

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav biologie a lékařské genetiky

Linda Neužilová

**Možnosti hodnocení a relevance výsledků
analýzy FISH u chromozomových aberací
v mozaikách**

Bakalářská práce

Praha 2012

Autor práce: **Linda Neužilová**

Vedoucí práce: **RNDr. Eduard Kočárek, Ph.D.**

Oponent práce: **MUDr. Aleš Panczak, CSc.**

Datum obhajoby: **23. 5. 2012**

Bibliografický záznam

NEUŽILOVÁ, Linda. *Možnosti hodnocení a relevance výsledků analýzy FISH u chromozomových aberací v mozaikách*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav lékařské biologie a genetiky, 2012. 72 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Eduard Kočárek, Ph. D.

Anotace

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou mozaicismu a jeho stanovením. Mozaicismus je definován jako přítomnost dvou nebo více buněčných linií s odlišným karyotypem v těle pacienta. Pro výsledný fenotyp je důležitý především celkový poměr, v jakém jsou jednotlivé buněčné linie zastoupeny. Často ho nacházíme u Turnerova a Klinefelterova syndromu. Turnerův syndrom je způsoben ztrátou části nebo celého chromozomu X u žen a patří mezi nejčastější chromozomální konstituce nalézané u spontánních potratů. Odhaduje se, že ale asi jen polovina žen s Turnerovým syndromem má karyotyp 45,X, ostatní jsou mozaiky či mají jiné abnormality chromozomu X.

Hlavním cílem praktické části této bakalářské práce bylo vyhodnotit možnosti stanovení mozaicismu pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a posoudit možné faktory ovlivňující správnost vyšetření. Posuzovali jsme individuální variabilitu mezi jednotlivými hodnotiteli a také rozdíl při použití dvou různě značných sond. Práce tak potvrdila, že metoda FISH zpřesňuje výsledky klasického cytogenetického vyšetření a je vzhledem k možnosti analýzy vysokého počtu buněk vhodná k analýze mozaicismu.

Klíčová slova

Mozaicismus, marker chromozomy, Turnerův syndrom, Klinefelterův syndrom, placentární mozaicismus, fluorescenční *in situ* hybridizace, FISH

Annotation

This bachelor thesis deals with mosaicism and its detection. Mosaicism is defined as the presence of two or more cell lines with different karyotype in the patient's body. An aspect of particular importance for the resulting phenotype is the overall ratio in which the individual cell lines are represented. It is often found in Turner and Klinefelter syndrome. Turner syndrome is caused by the loss of a part of, or the whole of the X chromosome in females and it belongs among the most common chromosomal constitutions, found in spontaneous abortions. However, it is estimated that only about half of the women with Turner syndrome have karyotype 45,X; the others are mosaics or have other abnormalities of the chromosome X.

The main aim of the practical part of this thesis was to evaluate the possibilities of detecting mosaicism using fluorescence in situ hybridization (FISH) and to consider the possible factors affecting the accuracy of the examination. The objectives of the assessment were the individual variability between the evaluators and also the differences caused by using two differently labelled probes. As a result, the thesis confirms that the FISH method enhances the accuracy of the results of conventional cytogenetic examination and it is suitable for analysis of mosaicism thanks to the possibility of analyzing a large number of cells.

Keywords

Mosaicism, marker chromosomes, Turner's syndrome, Klinefelter's syndrome, confined placental mosaicism, fluorescence in situ hybridization, FISH

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením Eduarda Kočárka, uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 23. 4. 2012

Linda Neužilová

Poděkování

Zde bych chtěla poděkovat mému školiteli RNDr. Eduardu Kočárkovi za odborné vedení mé práce, ochotu, cenné rady, velkou trpělivost a především za to, že mě přijal pod svá křídla a ve svém nabitém rozvrhu si na mě udělal vždy čas.

Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Pavlu Tesnerovi za pomoc, nesmírně vstřícné chování a poskytnutí doplňujících informací o pacientech.

Velké díky patří i Bc. Anně Cinkajzlové za její ochotu při naší spolupráci, cenné rady a podporu ve vypjatých chvílích.

Děkuji také mému příteli Honzovi, že to se mnou vydržel až do poslední chvíle, protože vím, že to se mnou nebylo lehké. A děkuji také mé mamince a jejímu příteli za pomoc a velkou podporu nejenom při psaní této práce, ale během celého studia.

OBSAH

ÚVOD.....	9
1 TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 CHROMOZOMOVÉ ABERACE.....	10
1.1.1 Numerické aberace	10
1.1.2 Strukturní aberace	12
1.1.3 Marker chromozomy	12
1.2 MOZAICISMUS.....	13
1.2.1 Vznik mozaikových karyotypů.....	14
1.2.2 Výskyt mozaikových karyotypů	15
1.2.2.1 Turnerův syndrom	15
1.2.2.2 Klinefelterův syndrom	18
1.2.2.3 Downův syndrom	19
1.2.2.4 Pallister-Killianův syndrom	20
1.3 METODICKÉ MOŽNOSTI DETEKCE MOZAICISMU.....	21
1.3.1 Prenatální diagnostika.....	21
1.3.1.1 Odběr choriových klků	21
1.3.1.2 Amniocentéza	21
1.3.1.3 Kordocentéza.....	22
1.3.1.4 Falešné výsledky u prenatálního vyšetření	22
1.3.1.5 Neinvazivní prenatální diagnostika	23
1.3.2 Postnatální diagnostika.....	24
1.3.2.1 Konvenční cytogenetické metody	24
1.3.2.2 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH)	26
1.4 PRAVIDLA ZÁPISU VÝSLEDKŮ	29
2 CÍLE A HYPOTÉZY	31
3 MATERIÁL A METODIKA	32
3.1 SOUBOR PACIENTŮ	32
3.2 PŘÍSTROJE A POMŮCKY	33
3.3 REAGENCIE	33
3.4 ROZTOKY	34
3.5 PREANALYTICKÁ FÁZE	34
3.6 ZPRACOVÁNÍ LYMFOCYTŮ PERIFERNÍ KRVE.....	34
3.7 VYŠETŘENÍ FISH	35
3.7.1 Specifikace použitých sond.....	35
3.7.2 Pracovní postup.....	36
4 VÝSLEDKY	39
5 DISKUZE	59
ZÁVĚR	66
REFERENČNÍ SEZNAM.....	68

SEZNAM ZKRATEK

CCD	zařízení s vázanými náboji (elektronická součástka používaná pro snímání obrazové informace)	<i>(charge-coupled device)</i>
CPM	mozaicismus omezený na placentu	<i>(confined placental mosaicism)</i>
CVS	odběr choriových klků	<i>(chorionic villus sampling)</i>
CY3	cyaninové barvivo 3	<i>(cyanine dye-3)</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol	<i>(4',6-diamidino-2-phenylindol)</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina	<i>(deoxyribonucleic acid)</i>
FACS	fluorescenčně aktivovaná separace buněk	<i>(fluorescence-activated cell sorting)</i>
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	<i>(fluorescence in situ hybridization)</i>
FITC	fluorescein isothiokyanát	<i>(fluorescein isothiocyanate)</i>
FNM	Fakultní nemocnice Motol	
ICSI	intracytoplazmatická injekce spermií	<i>(intracytoplasmic sperm injection)</i>
IQ	inteligenční kvocient	<i>(intelligence quotient)</i>
ISCN	mezinárodní systém lidské cytogenetické nomenklatury	<i>(international system for human cytogenetic nomenclature)</i>
MACS	magneticky aktivovaná separace buněk	<i>(magnetic-activated cell separation)</i>
MCC	kontaminace mateřskými buňkami	<i>(maternal cell contamination)</i>
MESA	mikrochirurgická epididymální aspirace spermií	<i>(microsurgical epididymal sperm aspiration)</i>
PAR	pseudoautozomální region	<i>(pseudoautosomal region)</i>
PI	propidium jodid	<i>(propidium iodide)</i>
PKS	Pallister-Killianův syndrom	<i>(Pallister-Killian syndrome)</i>
PUBS	odběr fetální krve	<i>(percutaneous umbilical blood sampling)</i>
SHOX	gen zodpovědný za růstovou retardaci	<i>(short stature homeobox)</i>
SMCs	malé nadpočetné marker chromozomy	<i>(small supernumerary marker chromosomes)</i>
SSC	solný roztok citrátu sodného	<i>(saline sodium citrate)</i>
TESE	testikulární extrakce spermatické tkáně	<i>(testicular sperm extraction)</i>
TS	Turnerův syndrom	<i>(Turner syndrome)</i>
ÚBLG	Ústav biologie a lékařské genetiky	
VNTR	variabilní počet tandemových repetitivních sekvencí	<i>(variable number of tandem repeats)</i>
WCPS	celochromozomové sondy	<i>(whole chromosome probes)</i>
XIST	specifický transkript inaktivující X	<i>(X-inactive specific transcript)</i>

ÚVOD

Základní metodou klinické genetiky je vyšetření karyotypu s cílem odhalení strukturních či numerických chromozomových aberací. Některé z nich nemusejí mít na svého nositele žádný vliv, jiné však mohou způsobovat vážné vrozené vady či smrt ještě nenarozeného plodu. Jejich přesná a včasná identifikace tedy může pomoci zabránit narození postiženého dítěte (u prenatalních vyšetření), anebo přispět ke zmírnění závažnosti onemocnění u pacienta (např. včasným zavedením vhodné symptomatické léčby), popř. poskytnout cennou informaci pro další členy rodiny, kteří jsou v riziku.

Tato práce se zabývá především numerickými aberacemi chromozomů, z nichž postnatálně nejčastěji nalézáme aneuploidie chromozomů 13, 18, 21, X a Y. Nejběžnější aberací autozomů je Downův syndrom a mezi nejběžnější aberace gonozomů patří Turnerův a Klinefelterův syndrom. U gonozomových aberací bývá častý mozaikový karyotyp, tedy přítomnost dvou nebo více buněčných linií s odlišným karyotypem v těle pacienta pocházejícího z jedné zygoty. Obecně bývá prognóza u těchto pacientů lepší než u těch, kteří mají aberaci přítomnou ve všech buňkách. U některých syndromů je dokonce tento stav prenatalně letální a pouze mozaikový karyotyp umožňuje přežití plodu. Je možné, že i v případě monozomie X u Turnerova syndromu mají všechny pacientky s tímto syndromem ve svém těle přítomnou další skrytou buněčnou linii se dvěma chromozomy X.

Určení podílu jednotlivých buněčných klonů v těle pacienta je tedy jedním z důležitých faktorů pro odhad výsledného fenotypu. Konvenční cytogenetické vyšetření analyzuje pouze omezený počet buněk a pro přesnou diagnózu je nejvhodnější jeho kombinace s fluorescenční in situ hybridizací (FISH), která umožňuje vyšetření i nedělicích se interfázních buněk a zvyšuje tak šance na upřesnění kvantitativních poměrů buněčných linií v mozaice, eventuálně též na zachycení minoritního buněčného klonu.

Úkolem praktické části této práce je vyhodnotit možnosti stanovení mozaicismu pomocí metody FISH, posoudit relevanci výsledků za použití dvou různě značených sond od různých výrobců a možnosti zpřesnění nálezu při aplikaci dvou sond hybridizujících s různými lokusy téhož chromozomu. Dílčím úkolem je též posouzení individuální variability při odečítání výsledků různými hodnotiteli v laboratoři. V závěru práce upozorňuji na možné problémy při hodnocení, které mohou způsobit diskrepanci ve výsledcích cytogenetických a molekulárně cytogenetických vyšetření.

1 Teoretická část

1.1 Chromozomové aberace

Chromozomové aberace jsou mutace, které zasahují velký počet genů. Řadí se mezi ně početní abnormality neboli numerické aberace a také poruchy struktury chromozomů neboli strukturní aberace. Nemusí jít vždy jen o poruchy autozomů či gonozomů, mohou být zasaženy i oba typy současně.

Většina těchto aberací je neslučitelná se životem a plod je potracen již v prvním trimestru těhotenství, některé se naopak ani neprojeví. Až 50 % spontánních potratů v prvním trimestru je spojováno s chromozomálními abnormalitami. Přesto je však velké množství abnormalit chromozomů, které mají postnatálně velký klinický význam. (Milunsky & Milunsky, 2010)

1.1.1 Numerické aberace

Numerické aberace jsou změny počtu chromozomů. V normální lidské diploidní buňce se nachází celkem 46 chromozomů. Chromozomový nálezn u zdravé ženy je tedy 46, XX, u muže 46, XY.

Chromozomovou sadu, která se liší počtem chromozomů od normální sady, nazýváme obecně heteroploidní. Pojem euploidní pak vyjadřuje přesný násobek haploidního počtu chromozomů. Pokud počet chromozomů není celým násobkem haploidní sady, pak jde o karyotyp aneuploidní. (Nussbaum et al., 2004)

Pojem polyploidie vyjadřuje znásobení celé chromozomové sady, nikoli jen jednoho chromozomu. Z patologických nálezů přichází u člověka v úvahu triploidie (3n) a tetraploidie (4n), které se však postnatálně téměř nevyskytují (ve výjimečných případech v mozaice).

Triploidie vzniká nejčastěji následkem oplození vajíčka dvěma spermii (tzv. dispermie) či fúzí již oplodněného oocytu s druhým pólóvým tělískem a vzácně též poruchou prvního nebo druhého meiotického dělení, kdy může vzniknout diploidní spermie nebo vajíčko. Tetraploidie naproti tomu vzniká následkem poruchy v závěru rýhovacího dělení zygoty. (Nussbaum et al., 2004)

Postnatálně se nejčastěji setkáváme s numerickými aberacemi u chromozomů 13, 18, 21, X a Y. (Nussbaum et al., 2004)

1.1.1.1 Aneuploidie

Velmi významnou numerickou aberací je aneuploidie. Jde o případ, kdy v chromozomové sadě přebývá nebo naopak chybí jeden či více chromozomů. Většinou jde o případy monozomie (chybění jednoho chromozomu) a trizomie (přítomnost nadpočetného chromozomu).

Monozomie celého chromozomu je téměř vždy prenatalně letální kromě monozomie chromozomu X u Turnerova syndromu (viz níže). Nejčastějším typem trizomie je Downův syndrom (viz níže).

Mezi novorozenci je incidence autozomálních aneuploidií okolo 0,3 %, jsou však příčinou až 35 % spontánních potratů a 4 % mrtvě narozených dětí. (Hassold et al., 1996).

	Spermie	Oocyty	Embrya před implantací	Spontánní potraty	Mrtvě narozené děti	Novorozenci
Incidence aneuploidie	1 – 2 %	~ 20 %	~ 20 %	35 %	4 %	0,3 %
Nejčastější aneuploidie	různé	různé	různé	45,X; +16; +21; +22	+13; +18; +21	+13; +18; +21; XXX;XXY;XYY

Tabulka 1. Incidence aneuploidie (Hassold & Hunt, 2001)

Hlavním predispozičním faktorem se v mnoha studiích ukázal věk matky. Souvislost mezi trizomií 21 a věkem matky byla prokázána již před více jak 70 lety. Incidence trizomie se s věkem matky dramaticky zvyšuje a kolem čtyřicátého roku života se trizomie vyskytuje dokonce až u 35 % všech klinicky rozpoznatelných těhotenství. (Hassold & Hunt, 2001)

Nejčastějším mechanismem vzniku aneuploidie je meiotická nondisjunkce. Dochází při ní k chybě při rozchodu chromozomů při prvním nebo druhém meiotickém dělení. Výsledkem chyby v prvním meiotickém dělení je buď nulizomická gameta anebo dizomická gameta s párem chromozomů, z nichž jeden je paternálního a druhý maternálního původu. Chybou ve druhém meiotickém dělení pak vzniká gameta s oběma kopiemi chromozomu, které jsou buď pouze paternálního či jen maternálního původu, anebo též gameta nulizomická. (Nussbaum et al., 2004)

K nondisjunkci může také dojít až po fertilizaci. V tomto případě jde o nondisjunkci mitotickou a jejím důsledkem je mozaicismus (viz níže).

1.1.2 Strukturní aberace

Strukturní aberace zahrnují různé strukturní přestavby chromozomů, které však bývají celkově méně časté než aberace numerické. Vznikají následkem chromozomových zlomů anebo nerovnoměrným crossing-overem při meióze. Mohou být buď balancované, pokud je zachováno původní množství genetického materiálu (stejně jako v normální diploidní buňce), či naopak nebalancované, kdy určitý podíl genetického materiálu chybí nebo je v nadbytku. (Nussbaum et al., 2004)

Mezi strukturní aberace patří například delece neboli ztráta části chromozomu, jejímž výsledkem může být haploinsuficience určitých genů. Chromozomy, kterým chybí jedno raménko a druhé je duplikováno, se nazývají izochromozomy. Další strukturní aberací jsou kruhové chromozomy (*ring chromosomes*), které vznikají ztrátou koncových částí a následným spojením volných konců chromozomu. (Nussbaum et al., 2004; Kočárek et al., 2010)

Delece krátkých ramének chromozomu X bývají častým nálezem u Turnerova syndromu, stejně jako izochromozom X nebo kruhový chromozom X. Izochromozom 12p se vyskytuje u Pallister-Killianova syndromu.

Mezi strukturní aberace patří ještě mnoho jiných přestaveb, uvádím zde jen ty, které se přímo týkají této bakalářské práce.

1.1.3 Marker chromozomy

Marker chromozomy (*small supernumerary marker chromosomes*, SMCs) nebo také jen markery, jsou morfologicky heterogenní skupina strukturně abnormálních chromozomů, která zahrnuje různé typy invertovaných duplikovaných chromozomů, chromozomů typu „*minute*“ a kruhových chromozomů. Mohou se vyskytovat jako nadpočetné chromozomy v kombinaci s normálními chromozomy, v některých případech však mohou být doprovázeny jinými numerickými či strukturními aberacemi. Incidence v lidské populaci se udává mezi 0,028 a 0,150 %, mezi novorozenci přibližně 0,05 %. (Liehr et al., 2004; Liehr & Weise, 2007)

SMCs jsou velmi malé, proto nemohou být jednoznačně identifikovány konvenčními pruhovacími metodami. Většinou jsou stejně velké či menší než chromozom 20 ve stejné mitóze. Nejvhodnější metodou na detekci marker chromozomů je v současnosti metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s různými sondami, nejčastěji centromerickými nebo malovacími. (Liehr et al., 2004)

Fenotypy, které jsou spjaty s marker chromozomy, jsou velmi různorodé, ve více jak 70 % nemají SMCs žádný fenotypový efekt. Záleží na jejich původu a charakteristice, např. na tom, kolik obsahují euchromatinu, z jakého chromozomu pocházejí a zda se nacházejí v mozaické formě či nikoliv. Často pocházejí z pohlavních chromozomů nebo akrocentrů a až v 50 % případů jde o derivované chromozomy 15. (Starke et al., 2003; Liehr et al., 2004)

Některé nálezy marker chromozomů korelují s klinickým nálezem specifických syndromů, jako je Pallister-Killianův syndrom – i(12p) a Cat eye syndrom – i(22p~q). (Liehr et al., 2004)

1.2 Mozaicismus

Mozaicismus je obecně definován jako přítomnost dvou nebo více buněčných linií s odlišným karyotypem, resp. genotypem v těle pacienta pocházejícího z jedné zygoty. (Seemanová, 2002) Výsledný fenotyp je ovlivněn mnoha faktory. Záleží na tom, v jakém stádiu vývoje k mozaicismu došlo, o jaký typ abnormality či mutace se jedná, které tkáně jsou postiženy, v jaké míře obsahují abnormální buňky a především v jakém celkovém poměru jsou jednotlivé buněčné linie zastoupeny. (Nussbaum et al., 2004)

Mozaiky většinou obsahují linii buněk s normální genetickou výbavou, která se vyskytuje společně s linií s abnormální výbavou, což má význam pro klinickou prognózu. Obecně je prognóza lepší u jedinců s mozaikou, než u plných mutací. (Seemanová, 2002)

Zvláštní typ mozaicismu se fyziologicky vyskytuje u žen důsledkem náhodné lyonizace chromozomu X. Všechny ženy jsou tedy mozaikami buněk, z nichž některé mají lyonizovaný paternální a jiné zas maternální chromozom X. Vzhledem k tomu, že poměr buněk s lyonizovaným X od matky a buněk s lyonizovaným X od otce nemusí být zcela vyrovnaný, je tento jev zodpovědný i za různé, často velmi variabilní projevy některých X-vázaných recesivních chorob. (Kočárek et al., 2010)

Mozaiky chromozomových aberací nacházíme postnatálně často u gonozomů. U Turnerova syndromu jsou mozaiky prokazatelné až u 75 % pacientek, u Klinefelterova syndromu u 17,5 % pacientů. Méně často se pak objevují autozomové mozaiky, např. mezi pacienty s Downovým syndromem je výskyt jen asi 2 %. (Seemanová, 2002)

U některých syndromů je plná mutace, tj. přítomnost aberace ve všech buňkách, prenatálně letální, ale pokud se vyskytují ve formě mozaiky, jedinci přežívají, příkladem je Pallister-Killianův syndrom (viz níže). (Seemanová, 2002)

Zdrojem chybných výsledků při vyšetření choriových klků je tzv. placentární mozaicismus (*confined placental mosaicism*, CPM). Jde o případ, kdy se chromozomální mozaicismus vyskytuje pouze v placentě a ne v buňkách plodu, které mají zpravidla normální karyotyp. Při nálezů mozaicismu při CVS (*chorionic villus sampling*) je tedy indikována amniocentéza, která buď potvrdí diagnózu mozaicismu u plodu i placenty, či nikoliv. I přesto, že plod může mít karyotyp normální, může docházet k různým prenatálním i perinatálním komplikacím, jako je intrauterinní růstová retardace či dokonce úmrtí plodu. (Kalousek & Vekemans, 1996)

Dalším problémem při diagnóze je tzv. pseudomozaicismus, který vzniká při kultivaci buněk důsledkem proliferace buněk *in vitro*. Často nebývá snadné rozlišit ho od pravého mozaicismu. Pokud ve velkém souboru vyhodnocených buněk najdeme jedinou buňku či buněčnou kolonii s odlišným karyotypem, nelze to považovat za potvrzení mozaicismu u pacienta. (Nussbaum et al., 2004; Gersen & Keagle, 2005)

1.2.1 Vznik mozaikových karyotypů

Chromozomový mozaicismus je většinou výsledkem mitotické čili postzygotické nondisjunkce při vzniku prvních dvou blastomer či v pozdějších fázích vývoje embrya. Výsledkem bývají dvě nebo více buněčných linií s odlišným karyotypem. (Kalousek, 2000)

V klasickém případě mitotické nondisjunkce dochází ke vzniku trizomické a monozomické buňky. Zatímco monozomická buňka většinou zaniká (výjimkou jsou buňky s monozomií X), trizomická buňka se dále dělí a vznikne tak jedinec, který bude mít dvě buněčné linie (trizomickou a původní diploidní). (How does trisomy mosaic occur?, 2007)

Dalším mechanismem vzniku je proces zvaný *anaphase lag*. Může se stát, že jeden z chromozomů při mitóze není zahrnut do nové buňky a zůstane tak izolovaný v cytoplasmě, kde je degradován. V případech, kdy vznikne trizomická zygota, pak může tento proces umožnit její vývoj. Je pak označován jako *trisomic rescue* a vznikne tak buňka s normálním karyotypem. Výsledkem může být placentární mozaicismus, či naopak trizomický plod. Záleží, v jakém stupni vývoje došlo k tomuto procesu. Obecně platí, že čím dříve ve vývoji *trisomic rescue* proběhne, tím více buněk s normálním

karyotypem se bude v těle jedince nacházet. Předpokládá se, že embryo má kontrolní mechanismus, který omezuje dělení abnormálních buněk, a proto se mozaiky objevují častěji v choriu. (Kalousek, 2000; Kočárek et al., 2010)

1.2.2 Výskyt mozaikových karyotypů

1.2.2.1 Turnerův syndrom

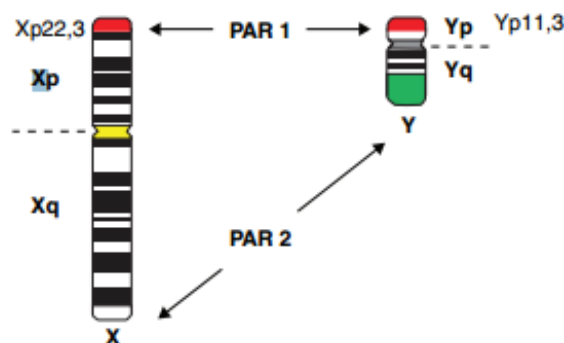
Turnerův syndrom (TS) je způsoben ztrátou části nebo celého chromozomu X u žen. Patří mezi nejčastější chromozomální konstituce nalézané u spontánních potratů. Je nalézán u 1 – 2 % všech těhotenství, ale spontánně potraceno bývá až 99 % z nich. Proto se spekuluje o tom, že všechny narozené dívky s TS mají určitý stupeň mozaicismu. (Gersen & Keagle, 2005)

Incidence se udává asi 1 na 2500 živě narozených dívek, podle některých odhadů může být i vyšší. Prevalence v populaci se odhaduje asi na 50 žen s TS na 100 tisíc obyvatel, ale je do velké míry ovlivněna prenatalní diagnostikou a následnými uměle přerušeny těhotenstvími. (Gersen & Keagle, 2005; Stochholm et al., 2006)

V 60 – 80 % případů má chromozom X maternální původ. Uvažovalo se o možném vlivu věku otce na tento jev, ale nebylo to prokázáno. Je ale možné, že paternální chromozom má vliv na spontánní potraty plodu s TS. Mnohé studie však prokázaly možný vliv genového imprintingu na výsledný fenotyp. Obecně mají pacientky s maternálním X-chromozomem větší poruchy sociálních a kognitivních funkcí oproti těm s paternálním. Ty měly naopak horší výsledky v testech vizuální paměti. Ale byl prokázán vliv i na jiné projevy fenotypu, například na nadváhu, poruchy ledvin, metabolismus lipidů aj. (Sagi et al., 2007)

Fenotyp pacientek s TS je velmi variabilní. Je ovlivněn řadou faktorů, například haploinsuficiencí pseudoautozomálních regionů (PAR), již zmíněným genovým imprintingem či selháním inaktivace a především konkrétním karyotypem. (Neumann et al., 2010)

Pseudoautozomální regiony na chromozomu X nepodléhají inaktivaci a proto je jejich přítomnost nutná pro normální fenotyp. Jedním z genů, který se nachází v oblasti PAR, konkrétně v distální části krátkého raménka chromozomu X, je gen SHOX (*short stature homeobox*). Jeho haploinsuficience způsobuje skeletální poruchy, především malou výšku (průměrně 142 – 147 cm) a kosterní abnormality (Madelungova deformita, zkrácení metakarpů a metatarsů atd.). (Oliveira & Alves, 2011)



Obrázek 1. Lokalizace genu SHOX (Oliveira & Alves, 2011)

Novorozenci s TS mívají nižší porodní váhu, edémy nohou a rukou a kožní duplikaturu v krční oblasti (tzv. *pterygium coli*). K typickým projevům v pozdějším věku patří především malá postava, dysgeneze gonád, nízká vlasová hranice, široký krk a výrazně oddálené bradavky. Pacientky s TS mívají kongenitální srdeční defekty (hlavně koarktaci aorty), anomálie ledvin, lymfedémy, poruchy sluchu a zraku a také se u nich často projevují autoimunitní choroby. Inteligence žen s TS je většinou průměrná nebo nadprůměrná, přesto jsou větší dispozice pro poruchy kognitivních a sociálních funkcí. Běžnou léčbou je suplementace růstovým hormonem a estrogeny. (Gersen & Keagle, 2005)

Varianty TS

Přibližně polovina pacientek má karyotyp 45,X, zbytek představují mozaiky a jiné abnormality chromozomu X.

Karyotyp	Incidence (%)
45,X	50
46,X,i(Xq)	17
45,X/46,XX	15
45,X/46,X,r(X)	7
45,X/46,XY	4

Tabulka 2. Incidence různých karyotypových variant mezi ženami s TS (Milunsky & Milunsky, 2010)

U TS je mozaicismus častější než u jiných chromozomálních poruch. Incidence mozaicismu 45,X je u novorozenců mnohem častější než u potratů, což podporuje teorii, že přítomnost druhé buněčné linie zvyšuje šanci plodu na přežití. Je známo více možných mozaikových karyotypů, např. 45,X/46,XY, 45,X/47,XXX, 45,X/46,XX/47,XXX, 45,X/46,Xi(Xq), 45,X/46,Xr(X) atd. (Milunsky & Milunsky, 2010)

Chromozomální mozaiky

MOZAICISMUS 45,X/46,XX

Tento karyotyp se vyskytuje přibližně u 15 % dívek s Turnerovým syndromem a zahrnuje různé fenotypy, které závisejí na poměrném zastoupení buněčných linií. Často bývá mozaika zachycena v prenatálním období a dítě má po narození naprosto normální fenotyp. Obecně mají tyto dívky lepší prognózu než dívky s karyotypem 45,X, mají větší pravděpodobnost nástupu spontánní *menarche* a otěhotnění a mívají také vyšší postavu. (Sybert & McCauley, 2004; Milunsky & Milunsky, 2010)

MOZAICISMUS 45,X/47,XXX

Přibližně u 2 % pacientek s TS nalzáme tento karyotyp, v populaci se udává prevalence mezi 0,03 % a 0,09 %. Mnoho z těchto pacientek mívá normální fenotyp, tzn. průměrnou výšku, normální dělohu a vaječníky a nebývají u nich nalzány ani kardiovaskulární, renální či jiné poruchy. (Akbas, 2009)

Existuje několik případů mozaicismu 45,X/46,XX/47,XXX, u kterých byl také popisován normální fenotyp. (Milunsky & Milunsky, 2010)

MOZAICISMUS 45,X/46,XY

V případě, kdy se vyskytuje chromozom Y nebo jeho části v mozaice s normální buněčnou linií, jde o smíšenou gonadální dysgenezi. Tento karyotyp zahrnuje poruchy sexuální diference, od převážně mužských fenotypů až po převážně ženské s obrazem Turnerova syndromu. Mužský fenotyp se objevuje u 90 % případů. (Milunsky & Milunsky, 2010)

Mozaiky se strukturálními abnormalitami

IZOCHROMOZOM X

Izochromozom X je nejčastější strukturální přestavba u Turnerova syndromu, vyskytuje se u 15 – 20 % pacientek a může se vyskytovat i v mozaice 45,X/46,X,i(Xq). Obvykle jde o izochromozom dlouhých ramének [i(Xq)]. Výskyt izochromozomu krátkých ramének je vzácný. Může také vzniknout izodicentrický chromozom, označovaný jako 46,X,idic(X), který má zpravidla dvě centromery, dvě dlouhá raménka a části krátkých ramének homologních, ale neidentických chromozomů. (Zapletalová et al., 2003; Milunsky & Milunsky, 2010)

KRUHOVÝ (RING) CHROMOZOM X

Kruhový chromozom vzniká ztrátou terminálních částí úseků chromozomu X a následným spojením jeho zbývajících částí. Obvykle bývá přítomen v mozaice 45,X/46,X,r(X) a jeho velikost může být různá, od *minute* chromozomu až po téměř celý chromozom X (závisí na rozsahu deletované oblasti). (Zapletalová et al., 2003)

U pacientek s kruhovým chromozomem X se častěji objevuje mentální retardace a další vážné fenotypové abnormality, především závažné kongenitální malformace. Některé pacientky mají podobný fenotyp jako vzácný syndrom Kabuki. Tento jev se přičítá úplné nebo částečné ztrátě inaktivace kruhového chromozomu, v důsledku ztráty X inaktivačního centra. V důsledku toho se neexprimuje gen XIST a exprimují se tak i geny z *ring* chromozomu, které by za normálních okolností byly inaktivní. Závažnost klinických projevů pak koreluje s velikostí kruhového chromozomu. U pacientek s extrémně malými kruhovými chromozomy je typická podobnost s Turnerovým syndromem a mentální retardace. (Zapletalová et al., 2003; Gersen & Keagle, 2005)

Marker chromozomy u pacientek s TS

V případě nálezu marker chromozomu u pacientek s TS je důležité určit jeho původ. U TS marker chromozomy pocházejí nejčastěji z chromozomu Y a bývají izodicentrické. Jejich přítomnost zvyšuje riziko rozvoje gonadoblastomu a nález je proto indikací ke gonadektomii. Určením původu se dá také částečně předpovědět fenotyp jedince, např. případná virilizace. (Liehr et al., 2007)

Druhou největší skupinou jsou markery derivované z chromozomu X a bývají to nejčastěji malé kruhové chromozomy. U karyotypu 45,X/46,X,der(X) je pak tedy nutné testovat, zda je chromozom X inaktivovaný, tzn., zda je přítomen XIST gen či nikoliv. (Liehr et al., 2007)

1.2.2.2 Klinefelterův syndrom

Tento syndrom byl poprvé popsán v roce 1942 americkým endokrinologem Harrym Fitchem Klinefelterem (1912 – 1990). Vyznačuje se přítomností nadbytečného chromozomu X v mužském karyotypu (47,XXY). Stejně jako Turnerův syndrom se vyskytuje až u 20 % pacientů ve více variantách a mozaikách. Je jednou z nejčastějších genetických příčin infertility, incidence je poměrně vysoká, asi 1/500 – 1/1000 na živě narozených mužů, takže jde o nejběžněji nalézanou gonozomální aberaci. Na druhou

stranu se ale odhaduje, že až 75 % všech případů není odhaleno. (Giltay & Maiburg, 2010)

Původ nadbytečného chromozomu X je nejčastěji výsledkem špatného rozchodu chromozomů v prvním meiotickém dělení. U 50 – 60 % případů jde o paternální původ chromozomu, ve 40 – 50 % o maternální. Příčinou může být vysoký věk matky a ukazuje se, že i vysoký věk otce, nicméně imprinting nemá na fenotyp žádný vliv. Menší procento případů může vzniknout také ve druhém meiotickém dělení či postzygoticky jako mozaika. (Milunsky & Milunsky, 2010; Wattendorf & Muenke, 2005)

Mezi pacienty s tímto syndromem je vysoká fenotypová variabilita a nepřítomnost signifikantního dysmorfismu u novorozenců, což je také důvodem, proč není tolik případů odhaleno. Typickými znaky v dospělosti jsou však poté vysoká a hubená postava, malá varlata, méně vyvinuté sekundární pohlavní znaky, hypogonadismus, infertilita (azoospermie nebo oligospermie), gynekomastie a také poruchy učení, nižší verbální schopnosti i IQ. (Wattendorf & Muenke, 2005)

Jak jsem se již zmínila, existuje několik variant Klinefelterova syndromu. Nejběžnější je varianta 48,XXYY, ale vyskytují se i jiné, například 48,XXXYY, 49,XXXXYY nebo 49,XXXYY. Platí, že čím více nadbytečných chromozomů X, tím závažnější fenotypový projev. (Nussbaum et al., 2004)

Mozaikový karyotyp se vyskytuje přibližně u 15 % pacientů (Seemanová, 2002 udává 17,5 %) a zpravidla vede k mírnějšímu fenotypu. (Wattendorf & Muenke, 2005) Nejběžnější je mozaika 46,XY/47,XXY, dále například: 46,XX/47,XXY, 46,XX/46,XY/47,XXY, 46,XY/48,XXXYY, 45,X/46,XY/47,XXY a 47,XXY/48,XXXYY. (Milunsky & Milunsky, 2010)

Vzhledem k tomu, jak je u těchto pacientů běžná oligospermie a azoospermie, dochází k jejich záchytu často na klinikách umělé reprodukce. Řešením pro tyto pacienty pak může být ISCI (*intracytoplasmic sperm injection*) a moderní techniky odběru spermií jako jsou TESE (*testicular sperm extraction*) a MESA (*microsurgical epididymal sperm aspiration*). (Šantavý & Šantavá, 2000)

1.2.2.3 Downův syndrom

Downův syndrom popsal v roce 1866 britský lékař John Langdon Down (1828 – 1896). V roce 1959 popsal francouzský genetik Jerome Lejeune trizomii 21, takže Downův syndrom se stal prvním lidským onemocněním, u něhož byla prokázána

asociace s chromozomovou aberací. (Mégarbané et al., 2009) Jde o nejčastější postnatálně zjištěnou chromozomální aberaci, incidence v populaci se udává 1 na 650 – 1000 novorozenců (častěji bývají postiženi muži) a představuje asi polovinu všech prenatalně odhalených abnormalit, z toho je výrazně vyšší incidence u plodů matek, které jsou starší 35 let. (Leon et al., 2010; Nussbaum et al., 2004)

Asi u 90 – 95 % všech případů Downova syndromu nalézáme volnou trizomii 21 (karyotyp 47,XX,+21 nebo 47,XY,+21) a 2 – 4 % připadají na Robertsonské translokace. Mozaické formy nejsou tak časté jako u ostatních syndromů, frekvence se obecně udává 2 – 4 %. (Papavassiliou et al., 2009) Fenotyp u mozaických forem může být mírnější. V mnoha studiích měli pacienti s nižším podílem trizomických buněk méně výrazné fenotypové projevy, často i vyšší IQ. Vysoká variabilita mezi těmito pacienty však neprokazuje žádnou korelaci mezi podílem trizomických buněk a závažností postižení, jak je tomu ostatně i u dalších syndromů. (Leon et al., 2010)

Fenotypové projevy u Downova syndromu byly již velmi dobře popsány a lze ho také snadno diagnostikovat hned po porodu díky nápadným dysmorfickým rysům a typické novorozenecké hypotonii. Charakteristické rysy jsou: epikanty, otevřená ústa, opičí rýha na dlani, rýha mezi prvním a druhým prstem na nohou, plochý nosní hřeben a nízko posazené ušní boltce. Dalšími typickými projevy syndromu jsou: mentální retardace, vrozené vady srdce (u 40 – 50 % pacientů) a atrézie dvanáctníku. Pacienti mívají zvýšené riziko vzniku některých onemocnění, například leukémie (desetkrát až dvacetkrát větší riziko). (Nussbaum et al., 2004)

1.2.2.4 Pallister-Killianův syndrom

Pallister-Killianův syndrom (PKS) je výsledkem přítomnosti nadbytečného izochromozomu krátkého raménka chromozomu 12. Bývá označován také jako tetrazomie 12p a vyskytuje se vždy v mozaice. Případy tohoto syndromu se objevují naštěstí jen velmi sporadicky. (Gersen & Keagle, 2005)

Nadbytečný izochromozom 12 bývá téměř u všech pacientů nalézán v kožních fibroblastech (příp. v amniocytech), naopak v lymfocytech se vyskytuje jen velmi vzácně. Ve většině případů je izochromozom původem maternální a byl jednoznačně prokázán vliv vyššího věku matky. (Gersen & Keagle, 2005)

Velká část pacientů s PKS umírá brzy po narození, další se většinou dožívají 10. až 15. roku života. Nejstarší pacient, který je popisován v literatuře, se dožil 45 let. U novorozenců bývají přítomné typické znaky, jako je silná hypotonie a prořídle vlasy

na temeni hlavy. Dysmorfické rysy obličeje se s věkem prohlubují, patří mezi ně nápadné čelo, velké malformované uši, hypertelorismus, široký kořen nosu nebo dlouhé filtrum a může být přítomen i rozštěp patra. Dospělí mívají krátký krk, špatně vyvinutou čelist, nadpočetné bradavky, různé abnormality urogenitálního traktu a těžkou mentální retardaci. (Schinzel, 1991)

1.3 Metodické možnosti detekce mozaicismu

1.3.1 Prenatální diagnostika

1.3.1.1 Odběr choriových klků (*chorionic villus sampling, CVS*)

Odběr choriových klků je nejčasnější invazivní metodou prenatální diagnostiky. Lze ho provádět již od 6. týdne těhotenství, ale vzhledem k vysokému riziku se provádí až mezi 10. a 12. týdnem těhotenství, typicky v 11. týdnu. Jeho nespornou výhodou je brzká diagnóza, ale na druhou stranu sebou nese i poměrně vysoké riziko potratu (u transcervikálního přístupu 2 – 4 %, u transabdominálního 0,5 – 1 %), které je závislé především na zručnosti operátora. (Milunsky & Milunsky, 2010; Kočárek, 2007)

Odběr se provádí nejčastěji transabdominálně (vzácně transcervikálně či transvaginálně) za kontroly ultrazvuku. Odebírají se tzv. terciární klky, které jsou tvořeny z mezenchymálního jádra a cytotrofoblastu. Vrstva cytotrofoblastu, která leží ještě pod vrstvou syncytiotrofoblastu, obsahuje mitoticky aktivní buňky, které není nutno kultivovat a proto je možné je vyšetřit rychle (do 24 – 72 hodin). Současně s touto přímou metodou se ale většinou provádí i dlouhodobá kultivace buněk z mezenchymálního jádra (tzv. nepřímá metoda), která je spolehlivější. V případě diskrepance mezi těmito dvěma vyšetřeními se provádí amniocentéza. (Milunsky & Milunsky, 2010; Nussbaum et al., 2004)

1.3.1.2 Amniocentéza

Amniocentéza neboli punkce plodové vody se provádí k účelům genetické diagnostiky již od sedmdesátých let a je považována za nejbezpečnější metodu invazivní prenatální diagnostiky, riziko potratu se uvádí méně než 0,5 %. (Gersen & Keagle, 2005) Odběr se provádí opět transabdominálně či vzácně transcervikálně za kontroly ultrazvuku nejčastěji mezi 15. a 16. týdnem těhotenství a je možné tak bezpečně odebrat 20 – 30 ml plodové vody. Provádí se i tzv. časná amniocentéza před

15. týdnem, při které je však možné odebrat menší množství tekutiny a také riziko potratu je vyšší. (Milunsky & Milunsky, 2010)

Buňky plodové vody, tzv. amniocyty je poté možné kultivovat. Tato metoda je také velmi spolehlivá, zdroje uvádí až 99 % přesnost při diagnóze, na čemž má velkou zásluhu i metoda FISH (*fluorescence in situ hybridization*). (Gersen & Keagle, 2005)

Plodová voda se kromě cytogenetické analýzy dá použít i k biochemickému vyšetření, především ke stanovení koncentrace α -fetoproteinu a acetylcholinesterázy, jejichž zvýšené hladiny mohou poukazovat například na defekty neurální trubice. (Milunsky & Milunsky, 2010)

1.3.1.3 Kordocentéza (*percutaneous umbilical blood sampling, PUBS*)

Kordocentéza neboli punkce pupečníku je metodou prováděnou zpravidla od 18. – 20. týdne těhotenství. Pro chromozomální vyšetření plodu se odebírá ideálně 1 – 2 ml fetální krve. Získané lymfocyty se lépe kultivují než amniocyty a výsledky vyšetření jsou proto známy zpravidla do 2 – 4 dnů, což je mnohem dříve než u předešlých metod. Indikací ke kordocentéze je tedy především potřeba rychlého výsledku, který pomůže objasnit nejasné nálezy při amniocentéze či CVS, především nález mozaicismu. Krev plodu se dá ale použít také ke stanovení krevní skupiny, při stanovení hladiny krevních plynů, při podezření na infekci nebo při diagnostice různých hematologických onemocnění plodu. Nevýhodou této metody je ale její poměrně vysoké riziko potratu, které se odhaduje na 0,8 – 1 %, některé zdroje uvádí dokonce i vyšší. (Gersen & Keagle, 2005; Kočárek et al., 2010)

1.3.1.4 Falešné výsledky u prenatalního vyšetření

U prenatalního chromozomového vyšetření se často setkáváme s falešně pozitivními či falešně negativními výsledky. Důvodem může být placentární mozaicismus (*confined placental mosaicism, CPM*) či kontaminace mateřskými buňkami (*maternal cell contamination, MCC*).

Jak jsem se již zmiňovala v kapitole 1.2 o mozaicismu, placentární mozaicismus je definovaný jako přítomnost zpravidla dvou chromozomově odlišných buněčných linií v buňkách placenty, ne však v buňkách plodu. Nejčastěji je možné ho nalézt v choriových klcích a až u 1 – 2 % vzorků je příčinou falešně pozitivního výsledku. Přítomnost trizomie v placentě může často signalizovat, že takto vzniklý mozaicismus je

výsledkem tzv. *trisomic rescue* a u plodu tak může ve vzácných případech jít i o uniparentální dizomii. (Gersen & Keagle, 2005; Milunsky & Milunsky, 2010)

I po vyloučení chromozomální aberace u plodu se u 16 – 21 % těhotenství s CPM objevuje široké spektrum různých prenatalních i perinatálních komplikací, které se mohou projevit intrauterinní růstovou retardací nebo dokonce i smrtí plodu. Na základě těchto poznatků se předpokládá, že některé konkrétní placentární mozaicismsy mohou být zodpovědné za špatnou funkci placenty. (Kalousek & Vekemans, 1996)

Kontaminace mateřskými buňkami se také vyskytuje nejčastěji u CVS a je výsledkem špatné separace choriových klků od mateřské deciduální tkáně. Objevuje se u 1 – 1,8 % případů a častěji u nepřímé metody kultivace. Lze tak vysvětlit některé nálezy mozaicismu s přítomností buněčných linií XX a XY. K rozlišení, zda se jedná o buňky mateřské či buňky plodu se pak používají metody založené na detekci polymorfismů VNTR (v případě, že je plod mužského pohlaví) nebo i interfázní FISH. (Milunsky & Milunsky, 2010)

Vzácně může dojít také k selhání kultivace a to obvykle ve vzorcích z amniocentézy, prováděné v pozdějším stádiu těhotenství. Zde bývá velké množství stárnoucích a neproliferujících buněk, které nemají pro vyšetření význam a naopak zpomalují růst těch životaschopných. (Gersen & Keagle, 2005)

1.3.1.5 Neinvazivní prenatalní diagnostika

I přes velký pokrok v prenatalní diagnostice, zůstávají invazivní metody stále velmi rizikové pro matku i plod a neinvazivní metody (tj. ultrazvuk a biochemický screening) málo specifické. Proto se v posledních letech uvažuje o nových možnostech neinvazivní prenatalní diagnostiky genetických i jiných poruch. V současnosti se pozornost obrací především na fetální buňky, které se vyskytují v periferní krvi matek.

Už v roce 1983 se zjistilo, že již v prvním trimestru těhotenství přecházejí do krve matek transplacentárně buňky trofoblastu. O jejich využití pro prenatalní diagnostiku se ale začalo mluvit až v 90. letech tohoto století v souvislosti s rozvojem metody FISH. Jejich výhodou je, že jsou poměrně velké a mnohjaderné a jsou rychle vychytávány a degradovány v plicích matky. Nevyskytují se ale u všech těhotenství a může se zde samozřejmě vyskytnout také izolovaný placentární mozaicismus. Proto nejsou pro diagnostiku příliš vhodné. (Hahn et al., 1998)

Ve druhém trimestru těhotenství jsou produkovány fetální leukocyty. Jejich velkou nevýhodou ale je, že v těle matek mohou přetrvávat mnoho let (obvykle 1 –

5 let). Diskutuje se také o jejich možném vlivu na rozvoj autoimunitních onemocnění u žen. Na druhou stranu se mohou přeměnit na kmenové buňky a účastnit se tak hojení. (Hahn et al., 1998)

Jako nejlepší varianta pro prenatální diagnostiku se nyní jeví fetální jaderné erytrocyty. Přecházejí již v prvním trimestru a v krevním oběhu matek přetrvávají obvykle nejdéle tři měsíce po porodu. V krevním oběhu dospělých lidí se nevyskytují a dají se proto dobře rozlišit. (Hromadníková & Daněk, 2000)

Koncentrace fetálních buněk v krevním oběhu matek není příliš vysoká. K jejich separaci se používají metody průtokové cytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) a separace v magnetickém poli (*magnetic-activated cell separation*, MACS) za pomoci různých protilátek proti specifickým antigenům, které se vyskytují na membránách těchto buněk. I přes to se v průměru podaří získat jen asi dvacet fetálních buněk z 20 ml mateřské krve. Tato analýza je také velice finančně i časově nákladná a buňky nelze kultivovat, což vylučuje analýzu na metafázních chromozomech. Proto je rutinní diagnostika fetálních buněk stále jen příslibem do budoucnosti. (Hahn et al., 1998; Hromadníková & Daněk, 2000)

1.3.2 Postnatální diagnostika

Již koncem 50. let po objevení postupu pro izolaci chromozomů se spolu s objevením prvních chromozomálních aberací stalo sestavení karyotypu základním nástrojem diagnostiky vrozených vývojových vad. Na začátku 60. let byla zavedena i kultivace lymfocytů z periferní krve a na přelomu 60. a 70. let techniky pruhování chromozomů. Tyto metody umožnily identifikaci jednotlivých chromozomů a pomohly tak odhalit mnoho syndromů spojených se specifickými chromozomovými abnormalitami. Velkým milníkem v cytogenetice pak bylo především zavedení metody FISH, s jejíž pomocí bylo odhaleno mnoho dalších chromozomálních aberací, které předtím nebyly při mikroskopickém vyšetření patrné. (Kočárek et al., 2010)

1.3.2.1 Konvenční cytogenetické metody

I přes nové a lepší metody, zůstává klasické cytogenetické vyšetření zlatým standardem genetické diagnostiky. Je prvním vyšetřením, které nám pomáhá odhalit případné změny v karyotypu, které mohou potvrdit diagnózu nebo případně indikovat další vyšetření. Je proto prováděno vždy při podezření na určitou chromozomální abnormalitu.

Samotnému vyšetření chromozomů předchází jejich příprava. V závislosti na typu vyšetření a typu vyšetřovaného materiálu se postup může lišit. Při běžném vyšetření se nejčastěji zjišťuje karyotyp lymfocytů z periferní krve. Periferní krev se kultivuje v růstovém médiu obsahujícím fytohemaglutinin a po 72 hodinách se kultivace zastaví mitotickým inhibitorem, nejčastěji kolcemidem. Tento vřetenkový jed narušuje polymeraci tubulinových jednotek, čímž zabraňuje sesterským chromatidám, aby se od sebe oddělily. Docílíme tak toho, že se dělení buněk zastaví v metafázi. Buňky poté převedeme do hypotonického roztoku (zpravidla 0,075 M roztok KCl), který způsobí, že voda se díky osmóze přesune do vnitra buněk a ty tak zvětší svůj objem, což umožní rozestoupení chromozomů. Aby buňky zůstaly v tomto stavu, je nutná jejich fixace. Ta se provádí směsí methanolu a kyseliny octové. Posledním krokem je aplikace buněčné suspenze na podložní skla. Během odpaření fixačního roztoku buněčné membrány prasknou, chromozomy se uvolní a adherují na povrchu skla. Takto připravené preparáty se pak různými způsoby barví (viz níže). Přesný postup zpracování vzorků se ale v každé laboratoři poněkud liší. (Kočárek et al., 2010)

Nejpoužívanější rutinní barvicí metodou je tzv. G-pruhování, podle kterého byla vytvořena pařížská cytogenetická nomenklatura. Ta přiřazuje ke každému pruhu konkrétní číslo, což umožňuje poměrně přesný popis chromozomových změn a tedy i rychlou orientaci v chromozomovém nálezu. Při této metodě jsou chromozomy nejprve vystavené účinkům trypsinu, který degraduje proteinovou složku chromatinu. Pak jsou chromozomy obarveny Giemsovým roztokem. Na chromozomu jsou po obarvení patrné střídající se tmavé a světlé pruhy, tzv. G-pruhy. Světlé pruhy jsou diagnosticky důležitější, protože obsahují zpravidla větší podíl transkripčně aktivního chromatinu, tj. více genů. Hodnocení výsledků chromozomálního vyšetření se provádí mikroskopicky, v současnosti většinou v kombinaci s počítačovými metodami analýzy obrazu.

I přes nesporné výhody, má klasické cytogenetické vyšetření mnohá omezení. Celý proces trvá nejméně 4 až 10 dní a je možno určit chromozomové změny pouze v rozsahu šířky pruhů, tzn. maximálně 5 – 10 megabází, v závislosti na kvalitě preparace, barvení a také rozlišovací schopnosti světelného mikroskopu (Vermeesch et al., 2007). Vyšetřuje se minimálně pět mitóz, ale v případě podezření na mozaicismus je nutné vyšetřit mitóz nejméně 30. (Wolff et al., 2010) To však stále umožňuje vyloučit 10 % mozaicismus jen s 95 % jistotou. Při podezření na nízkofrekvenční mozaiku je

tedy vhodné provést vyšetření metodou FISH, kterou je možno analyzovat mnohem více buněk. (Wiktor & Van Dyke, 2003)

1.3.2.2 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Metoda fluorescenční *in situ* hybridizace byla zavedena v roce 1988 a od té doby se stala jednou z nejvyužívanějších metod v cytogenetických laboratořích. Je založena na principu hybridizace značené denaturované sondy k denaturované cílové DNA. Tu je možné provádět přímo v biologickém materiálu, především na metafázních chromozomech, interfázních jádrech nebo dokonce na celých buňkách, popř. i v tkáni (např. u histologických řezů).

Sondy pro FISH jsou fluorescenčně značené a jejich vizualizace se provádí pomocí fluorescenční mikroskopie, která umožňuje i detekci více než jedné sondy, každé značené jiným fluorochromem. V současné době je možné kombinací specifických filtrů a příslušného počítačového softwaru (při následném zpracování obrazu) detekovat 24 různých fluorochromů, což postačuje k vizualizaci, resp. odlišení každého chromozomového páru v lidském karyotypu. (Gersen & Keagle, 2005)

Jako sonda mohou být použity různé druhy DNA. Na základě toho rozlišujeme tři druhy sond:

Satelitní sondy

Hybridizují s repetitivními satelitními sekvencemi, např. s α -satelitními sekvencemi lokalizovanými na centromerách lidských chromozomů. Tyto sekvence vytvářejí stovky až tisíce opakujících se úseků, takže se při vazbě sondy vytvoří velmi silný signál. Tyto sekvence jsou charakteristické pro každý chromozom (výjimku tvoří chromozomy 13 a 21 a chromozomy 14 a 22), a dají se proto využít k detekci aneuploidii jak na metafázních chromozomech, tak na interfázních jádrech. Dalšími příklady satelitních sond jsou sondy pro β -satelitní sekvence (lokalizované na krátkých raménkách akrocentrických chromozomů) nebo sondy pro telomerické sekvence (TTAGGG). (Gersen & Keagle, 2005)

Lokus-specifické sondy

Jak jejich název napovídá, hybridizují jen s konkrétním úsekem na chromozomu, zpravidla tvořeným jedním nebo více geny, popř. jinými jedinečnými sekvencemi. Velikost těchto sond se pohybuje od 1 kilobáze do 1 megabáze, v závislosti na typu klonovacího vektoru a bývají často používány při diagnostice mikrodelecií (zejména

mikrodelečních syndromů) a amplifikací, některých subtelomerických přestaveb a také specifických kryptických translokací. (Gersen & Keagle, 2005)

Celochromozomové sondy (malovací sondy, *whole chromosome probes*, WCPs)

Těmito sondami lze označit celé chromozomy nebo jen jejich krátká či dlouhá raménka. Využívají se při identifikaci původu nadbytečného chromozomového materiálu nebo k vyšetření rozsáhlejších chromozomových přestaveb. Na rozdíl od dvou předchozích sond, je lze při rutinní diagnostice použít jen na metafázních chromozomech. (Gersen & Keagle, 2005)

Základní protokol FISH (liší se podle výrobce)

1. Příprava vzorku

V případě, že materiál obsahuje živé buňky schopné dělení, provádí se zpravidla kultivace, hypotonizace a fixace buněk a poté nakapání suspenze na podložní sklo. U tkání, resp. buněk, které z různých důvodů nejsou schopné kultivace (např. fixovaného histologického materiálu, spermií apod.), anebo by kultivace znamenala závažné prodlení (např. u materiálů z prenatalních odběrů určených pro rychlá vyšetření apod.), se jádra zbavují cytoplazmy pomocí proteolytických enzymů, popř. chemických činidel. V některých případech je nutná homogenizace tkáně. Tyto postupy detailně popisuje např. Czepulkowski (2001).

2. Aplikace sondy

Obvykle se sonda denaturuje společně se vzorkem, někdy ale i odděleně.

3. Denaturace

Probíhá při stanovené teplotě po přesně stanovenou dobu na ohřívací destičce (příp. na přístroji zvaném Hybrite). Pokud je nutné denaturovat sondu odděleně, umístí se podložní skla se vzorkem do horkého roztoku formamidu a sonda do ohřáté vodní lázně. Až poté je možné sondu použít.

4. Hybridizace

Postupuje se opět podle doporučení výrobce, zpravidla se vzorky umístí do termostatu, který je zahřátý na 37 °C, kde se ponechají 30 minut – 24 hodin, popř. i déle podle charakteru sondy.

5. Odstranění nespecifických signálů (tzv. *stringent washing*)

Nespecifické signály vznikají navázáním sondy do míst, ke kterým není plně komplementární. Lze je odstranit při zvýšené teplotě pomocí roztoku o nízké iontové síle, obvykle roztokem 0,4x – 0,5x SSC.

6. Nespecifické obarvení chromozomů a interfázních jader (*counterstaining*)

Nejčastěji používanými barvivy jsou DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) a PI (propidiumjodid).

7. Vyhodnocení hybridizačních signálů

Provádí se pomocí epifluorescenčního mikroskopu, na který je připojena CCD kamera. Obraz z kamery je převáděn do počítače, kde je možné ho zpracovávat pomocí programu (např. ISIS od firmy MetaSystems). (Kočárek et al., 2010)

1.4 Pravidla zápisu výsledků (dle ISCN 2009)

1.4.1 Pravidla pro zápis mozaikových karyotypů

1. Popis mozaiky uvozuje zkratka „*mos*“ (*mosaic*, na rozdíl od „*chi*“ značící chiméru)
2. K oddělení popisů buněčných linií se používá lomítko (/).
3. Počet vyhodnocených buněk jednotlivých klonů se zapisuje do hranaté závorky [].
4. Početnější klon se udává jako první.
5. Pokud je přítomna buněčná linie s normálním karyotypem, zapisuje se jako poslední bez ohledu na to, kolik buněk bylo identifikováno.

Příklady:

mos 45,X[7]/46,XX[13]

Nález Turnerova syndromu se dvěma buněčnými liniemi. Celkem vyšetřeno 20 buněk, u 7 z nich nalezen karyotyp 45,X a u 13 z nich normální karyotyp 46,XX.

mos 45,X[6]/47,XYY[3]/46,XY[11]

Mozaika se třemi buněčnými liniemi.

1.4.2 Pravidla pro zápis karyotypů pro metodu FISH

1. Pro zápis výsledků vyšetření provedených metodou FISH na metafázních chromozomech se používá zkratka „*ish*“.
2. Pro interfázni FISH se používá zkratka „*nuc ish*“.
3. V případě, že bylo nejprve provedeno i základní cytogenetické vyšetření, uvádí se jeho výsledek před výsledek metody FISH a odděluje se tečkou (.).
4. Za zkratkou „*ish*“ následuje zkratka chromozomové abnormality, číslo chromozomu, rozsah aberace a tzv. GDB označení sondy (velkými písmeny), to vše uzavřené do kulatých závorek. Pokud není známo GDB označení sondy, postačí název sondy.
5. V případě, že je použito více sond na jednom chromozomu, uvádí se po sobě od pter k qter.
6. Pokud je použito více sond na různé chromozomy, oddělují se středníkem.

Nejvýznamnější zkratky používané pro zápis molekulárně cytogenetických nálezů shrnuje tab. 3.

Příklad:

ish del(4)(p16.p16)(D4S96-)

Delece chromozomu 4 v rozsahu pruhu p16.p16 za použití sondy D4S96.

7. Při interfázní FISH se za zkratkou „*nuc ish*“ uvádí oblast, pro kterou je sonda navržena a poté se v kulatých závorkách uvádí lokus a kolikrát je přítomen.

Příklad:

nuc ish Xcen(DXZ1×2)

Zkratka Xcen označuje sondu hybridizující s centromerou chromozomu X, lokus byl přítomen ve dvou kopiích, což znamená přítomnost dvou chromozomů X (nelze ovšem vyloučit např. výskyt dicentrického chromozomu X, eventuálně jiné strukturální aberace tohoto chromozomu).

8. Pokud se při interfázní FISH použije více sond pro různé lokusy, uvádějí se po sobě, oddělené čárkou.

Příklad:

nuc ish 4cen(D4Z1×2),4p16.3(D4S96×1)

Sonda pro lokus D4Z1, který je lokalizovaný na centromere chromozomu 4 potvrzuje nálezu dvou chromozomů 4 a přítomnost jednoho lokusu D4S96, který je lokalizovaný v pruhu 4p16.3 naznačuje jeho delecii.

9. V případě nálezů mozaiky se počet buněk jednotlivých buněčných klonů uvádí před celkový počet odečtených buněk a aberantní klon se uvádí jako první.

Příklad:

nuc ish Xcen(DXZ1×1)[271/507]/Xcen(DXZ1×2)[236/507]

Mozaika se dvěma buněčnými liniemi. Celkem bylo hodnoceno 507 buněk. Sonda pro lokus DXZ1, který je lokalizovaný na centromere chromozomu X potvrzuje u 271 buněk nálezu jednoho chromozomu X, u 236 buněk nálezu dvou chromozomů X.

ish	<i>in situ</i> hybridizace na metafázních chromozomech
nuc ish	interfázní FISH
-	nepřítomnost signálu
+	přítomnost signálu
++	duplikace signálu
×	uvádí počet signálů
wcp	výsledek s malovacími sondami

Tabulka 3. Používané značky

2 Cíle a hypotézy

Cíle práce:

1. Vyhodnotit možnosti stanovení mozaicismu pomocí metody FISH.
2. Porovnat sondy od různých výrobců.
3. Posoudit, resp. srovnat relevanci výsledků při použití jedné sondy a při použití dvou sond specifických pro různé lokusy na témže chromozomu.
4. Ukázat na příkladech možné problémy při interpretaci výsledků.
5. Posoudit individuální variabilitu ve výsledcích hodnotitelů při analýze stejného vzorku.

Pracovní hypotézy:

Hypotéza 1: Vyšetření metodou FISH za použití centromerických sond umožní přesně identifikovat mozaiky a kvantifikovat buněčné poměry v těchto mozaikách

Hypotéza 2: Analýzy mozaicismu s centromerickou sondou jakéhokoliv výrobce by měly poskytnout u jednoho vzorku stejné výsledky

Hypotéza 3: Současné použití centromerické a lokus-specifické sondy by mělo zpřesnit vyšetření mozaiky a eliminovat případné falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky.

Hypotéza 4: Pokud jeden vzorek vyšetří dva nebo více hodnotitelů, neměl by mezi jejich výsledky existovat významný rozdíl.

3 Materiál a metodika

3.1 Soubor pacientů

Do laboratoře byly zaslány vzorky pěti pacientek z genetické poradny Ústavu biologie a lékařské genetiky FNM. Tabulka 4 uvádí základní informace o těchto pacientkách včetně výsledku jejich základního cytogenetického vyšetření, které bylo provedeno v cytogenetické laboratoři ÚBLG FNM.

Pacient	Pohlaví	Věk (v době vyšetření)	Diagnóza	Karyotyp (výsledek základního cytogenetického vyšetření)
1	žena	26 let	Turnerův syndrom	45,X
2	žena	14 let	Primárně vyšetřována pro malý vzrůst, cytogeneticky prokázána mozaiková forma Turnerova syndromu	45,X/46,XX (55%/45%)
3	žena	6 let	Primárně vyšetřována pro malý vzrůst, cytogeneticky prokázána mozaiková forma Turnerova syndromu	45,X/47,XXX (53%/47%)
4	žena	10 let	normální karyotyp (vzorek použit jako negativní kontrola)	46,XX
5	žena	16 let	virilizace (podezření na přítomnost chromozomu Y v mozaice)	46,XX

Tabulka 4. Soubor pacientek

K vyšetření jsme z cytogenetické laboratoře získali suspenzi fixovaných kultivovaných lymfocytů z periferní krve (stejně suspenze, která byla využita pro základní vyšetření karyotypu). Z materiálu od každé pacientky jsme pak zhotovili 2 preparáty. Na jeden preparát jsme aplikovali pouze centromerickou sondou pro chromozom X, na druhý preparát pak centromerickou sondu na X (od jiného výrobce) v kombinaci s lokus-specifickou sondou pro region KAL, který je lokalizovaný na krátkém raménku chromozomu X (mutace, resp. haploinsuficience tohoto regionu způsobuje Kallmannův syndrom).

3.2 Přístroje a pomůcky

Název	Typ	Výrobce
Fluorescenční mikroskop s příslušnými filtry a imerzním objektivem (specifikace filtrů viz kapitola 3.8.7)	BX 51	Olympus
Laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce)		Kavalierglass a.s.
Mikrocentrifuga	MicroCentaur MSE	Sanyo
Plastové mikrozkuřavky	Eppendorf	neuveđen, zakoupeno od firmy P-lab
Počítačový vyhodnocovací systém	ISIS	Metasystems
Podložní a krycí skla		Menzel Gläser
Rtuťová výbojka	Mercury Short ARC, 100W	Osram
Sada nastavitelných mikropipet		Biohit
Skleněné kyvety	Hellendahl, Coplin	neuveđen, zakoupeno od firmy Fischer Scientific
Stojan na mikrozkuřavky		Bel-Art
Termostat	micra 18	ISCO
Termostatická ploténka	SD160	Stuart Scientific
Třepačka (vortex)	SA8	Stuart Scientific
Vodní lázeň	NB20	Nüve

Tabulka 5. Přístroje a pomůcky

3.3 Reagencie

Název	Dodavatel
20x SSC (<i>saline sodium citrate</i>)	Lékárna FNM
DAPI Antifade	Cytocell, součást souborů značených sond (viz specifikace sond, kapitola 3.7.)
Destilovaná voda	Lékárna FNM
Dietyler	Penta Chrudim
Etanol 100 %	Lékárna FNM
Etanol 95 %	Lékárna FNM
Etanol 80 %	Lékárna FNM
Imerzní olej	Olympus
Metanol	Fluka
Tween 20 (Polysorbatum 20)	RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové
Vulkanizační roztok (<i>Rubber cement</i>)	Marabuwerte GmbH
Značené DNA sondy	Cytocell, Abbot–Vysis

Tabulka 6. Reagencie (specifikace použitých sond pro FISH je uvedena v kapitole 3.7)

3.4 Roztoky

- **Roztok 20x SSC:** (*saline sodium citrate*) – již připravený dodává lékárna FNM
 - 173,5 g chloridu sodného
 - 88,2 g dihydrátu citrátu sodného
 - 900 ml destilované vody
- **Roztok 2x SSC (pH 7,0):**
 - 10 ml 20x SSC
 - 90 ml destilované vody
 - 50 µl Tween 20
- **Roztok 0,4x SSC (pH 7,0):**
 - 2 ml 20x SSC
 - 98 ml destilované vody
 - 50 µl Tween 20
- **Alkoholová vzestupná řada na dehydrataci:**
 - Etanol 80 %
 - Etanol 95 %
 - Etanol 100 %
- **Fixační roztok:**
 - 1 objemový díl ledové kyseliny octové : 3 objemové díly metanolu
- **100 % metanol**

Pozn.: Roztoky 2x SSC a 0,4x SSC a fixační roztok se připravují vždy čerstvě.

3.5 Preanalytická fáze

Pro postnatální vyšetření se nejčastěji odebírá 3 ml periferní krve do zkumavky s lithium-heparinem (zkumavka Vacuette se zeleným víčkem). Odebraný materiál musí být řádně označen a doplněn o vyplněný průvodní list. Vzorek se buď ihned transportuje do laboratoře, nebo se uchovává při teplotě 4 – 8 °C (maximálně 72 hodin). Z části materiálu se po příjmu do laboratoře založí tkáňová kultura, část se uchovává pro případ selhání první kultivace.

3.6 Zpracování lymfocytů periferní krve

Odebraná periferní krev se pipetuje do kultivačních lahvíček s kultivačním médiem obsahujícím fytohemaglutinin a poté se zpravidla 72 hodin kultivuje. Přibližně

2 hodiny před koncem kultivace se přidá kolcemid, který zastaví dělení buněk. Po ukončení kultivace se materiál zcentrifuguje a po slítí supernatantu se směs hypotonizuje roztokem 0,075M KCl po dobu 25 minut v termostatu (37 °C). Poté se buňky opět zcentrifugují. Posledním krokem je fixace vzorku směsí ledové kyseliny octové a metanolu, která se zpravidla alespoň třikrát opakuje, dokud není supernatant čirý a bezbarvý. (Kočárek et al., 2010)

3.7 Vyšetření FISH

3.7.1 Specifikace použitých sond

1) Směs centromerických sond

Výrobce	Název	Lokus	Fluorochrom
Cytocell	Aquarius Satellite X centromere	Xp11.1-q11.1 (DXZ1)	Spectrum Green
Cytocell	Aquarius Satellite Y centromere	Yp11.1-q11.1 (DYZ3)	Texas Red

Tabulka 7. Specifikace sond

Tato sonda hybridizuje se specifickými α -satelitními sekvencemi lokalizovanými na centromerách chromozomů X a Y. Je schopná identifikovat početní změny pohlavních chromozomů v interfázních buňkách a na metafázních chromozomech z periferní krve.



Obrázek 2. Lokus DXZ1 (FISH Probe Catalogue, Cytocell, 2012/2013)



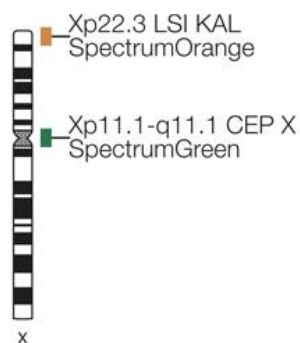
Obrázek 3. Lokus DYZ3 (FISH Probe Catalogue, Cytocell, 2012/2013)

2) Kombinace centromerické sondy a lokus-specifické sondy

Výrobce	Název	Lokus	Fluorochrom
Abott	Vysis LSI KAL	Xp22.3	Spectrum Orange
Abott	Vysis CEP X	Xp11.1-q11.1 α -Satellite DNA	Spectrum Green

Tabulka 8. Specifikace sond

Sonda LSI KAL identifikuje submikroskopické delece genu KAL, který je lokalizován na krátkém raménku chromozomu X. Sonda CEP X hybridizuje (stejně jako sonda Aquarius Satellite X centromere) s α -satelitními sekvencemi lokalizovanými na centromere chromozomu X.



Obrázek 4. Lokus Xp22.3 a Xp11.1-q11.1 (FISH Product Catalog, Vysis, 2011)

3.7.2 Pracovní postup (dle standardního operačního protokolu)

3.7.2.1 Příprava preparátu

1. Nejprve ponoříme podložní sklo na 2 minuty do 100 % metanolu a osušíme. Poté na něj pomocí automatické pipety kápneme 10 μ l buněčné suspenze a necháme tekutinu odpařit.
2. Pod mikroskopem s fázovým kontrastem zkontrolujeme hustotu buněčné suspenze. V zorném poli (při použití objektivu se zvětšením 10x) bychom měli vidět alespoň 5 metafází a asi 20 buněčných jader. V případě, že jsou buňky příliš nahloučené a překrývají se, suspenzi naředíme fixačním roztokem. Pokud je hustota mitóz příliš malá, suspenzi zcentrifugujeme (10 minut při 1000 otáčkách), odstraníme supernatant a naředíme čerstvým fixačním roztokem. V případě, že je přítomno málo mitóz, můžeme na již zaschlou suspenzi přikápnout další kapku.
3. Pokud je vzorek příliš znečištěn cytoplazmou, kápneme na jiné sklo znovu 10 μ l suspenze a na ještě nezaschlou buněčnou suspenzi kápneme kapku fixačního roztoku.
4. Místo s nejlépe rozprostřenými mitózami označíme diamantovým perem na spodní straně sklíčka.

Před samotnou hybridizací je nutné uchovávat preparáty v lednici (2 – 8 °C) v kazetách určených pro mikroskopická skla. V případě nutnosti delšího uskladnění se preparáty mohou skladovat v mrazicím boxu (-20 °C) po dobu až dvou let.

5. Preparáty dvakrát promyjeme v roztoku 2x SSC (20 – 25 °C) po dobu 2 minut a necháme okapat.
6. Následně preparáty dehydratujeme vzestupnou alkoholovou řadou, tzn. v ledovém 80 %, 90 % a 100 % etanolu, vždy po dobu 1 minuty a poté vysušíme při 37 °C na ohřívací ploténce.

3.7.2.2 Aplikace sondy

U sond od firmy Abbott je nutné si nejprve připravit hybridizační směs (v mém případě jsem na ni potřebovala 1 díl sondy, 7 dílů hybridizačního roztoku a 2 díly destilované vody). SONDY od firmy Cytocell jsou přímo připravené k použití.

Na každý vzorek poté aplikujeme 5 µl hybridizační směsi a překryjeme krycím sklíčkem o velikosti 18x18 mm (směs se musí rozprostřít po celé ploše pod sklíčkem a bez vzduchových bublin). Krycí sklíčko ještě poté orámujeme vulkanizačním roztokem a necháme zaschnout na ohřívací ploténce (37 °C).

3.7.2.3 Denaturace

Vzorek se sondou necháme denaturovat tak, že je umístíme na 5 minut na ohřívací plotýnku zahřátou na 75 °C. Za těchto podmínek probíhá společná denaturace cílové DNA i sondy.

3.7.2.4 Hybridizace

Preparát uložíme do vlhké hybridizační komůrky (v jejímž nitru je buničina navlhčená destilovanou vodou) a vložíme do termostatu (37 °C).

Centromerické sondy, které jsem použila, hybridizují nejméně 30 minut. Druhá sonda, lokus-specifická, hybridizuje minimálně 12 hodin, možné je však i prodloužení hybridizace na 2 – 3 dny. Nechala jsem proto preparát v termostatu 2 dny. *Doba hybridizace preparátu by neměla přesáhnout 4 dny, pak hrozí, že by preparát vyschl.*

3.7.2.5 Odmývání nespecifických signálů (*stringent washing*)

Nejdříve je nutné opatrně pomocí pinzety odstranit zaschlý vulkanizační roztok a krycí sklíčka. Podložní skla poté ponoříme do roztoku 0,4x SSC umístěného ve vodní

lázni zahřáté na 72 °C. Ihned po uplynutí 2 minut skla ponoříme na 30 vteřin do roztoku 2x SSC o pokojové teplotě a po vynětí necháme okapat.

3.7.2.6 Vizualizace jader a chromozomů (*counterstaining*)

Ještě na nezaschlá skla aplikujeme 10 µl roztoku DAPI-Antifade, který poté překryjeme krycími skly o velikosti 22x22 mm. Dbáme přitom na to, aby se roztok rozprostřel po celé ploše pod sklíčkem a bez vzduchových bublin. Skla ještě ponecháme 10 minut v temnu a poté můžeme hodnotit.

3.7.2.7 Mikroskopické hodnocení

Analýza hybridizačních signálů se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu, který je vybavený specifickými optickými filtry. Tyto filtry musejí odpovídat použitým fluorochromům.

Specifikace použitých filtrů:

DAPI: U-MWU2

FITC: U-NMF-101 SPEC GRN

CY3: U-NMF-102 SPEC ORNG

TexasRed (CY3,5): U-NSP103V1 CY3,5

Postup:

1. Zapneme UV lampu a počkáme přibližně 5 minut.
2. Zapneme počítač a spustíme program ISIS.
3. Umístíme preparát pod mikroskop a pomocí malého zvětšení a filtru pro DAPI vyhledáme jádra, resp. chromozomy a orientačně zhodnotíme kvalitu preparátu.
4. Poté na preparát kápneme přiměřené množství imerzního oleje a za pomoci imerzního objektivu se zvětšením 100x prohlížíme preparát.
5. Postupně měníme jednotlivé filtry a hodnotíme fluorescenční signály (při analýze mozaik hodnotíme nejméně 500 buněk).
6. Obraz vhodné mitózy či interfázního jádra nasnímáme pomocí CCD kamery do počítače a poté ho pomocí programu ISIS zpracujeme.

4 Výsledky

Následující tabulky (Tabulka 9 – 20) shrnují výsledky vyšetření vzorků od jednotlivých pacientek. U mozaikových karyotypů se do výsledku vyšetření započítávají pouze hodnotitelné buňky (pro stanovení hodnotitelnosti, resp. nehodnotitelnosti buněk jsme použili upravených kritérií, která uvádí Beatty et al., 2002 – tato kritéria používá většina laboratoří). Pro účely této práce uvádím i procenta nehodnotitelných buněk odvozených z celkového počtu odečtených buněk. Počet signálů vyjadřuji číslem v kombinaci se zavedenými symboly uváděnými pro specifikaci sond: tak např. „DXZ1×1“ znamená, že jde o buňky, na nichž jsem pozorovala jeden signál pro centromeru X; naopak zápis „DXZ1×2,KAL×1“ označuje buňky se dvěma signály na centromerách X a pouze jeden pozorovatelný signál na regionu KAL.

U pacientky č. 2 neposkytla první hybridizační analýza zcela přesvědčivé výsledky. Pro nezřetelné signály a s tím související vysoký podíl nehodnotitelných buněk jsem hybridizaci zopakovala. V následujícím textu uvádím výsledky obou analýz pro srovnání.

Pacientka č. 1

Karyotyp: 45,X

- 1) Použitá sonda: **Centromerická sonda X** (signály sondy na Y nenalezeny)
Výsledek: **45,X. nuc ish Xcen(DXZ1×1)**

Odovídá nálezu: 45,X (ve 100 % buněk)

	Počet buněk	Procentuální vyjádření
DXZ1×1	536	93,22 %
Celkový počet hodnotitelných buněk	536	93,22 %
Nehodnotitelné buňky	39	6,78 %
Celkový počet pozorovaných buněk	575	100 %

Tabulka 9. Výsledky – pacientka č. 1, centromerická sonda

- 2) Použitá sonda: **Kombinace centromerické sondy a lokus-specifické sondy**
Výsledek:
**45,X. nuc ish Xp22.3(KAL×1), Xp11.1-q11.1(DXZ1×1)[505/513]/
Xp22.3(KAL×2), Xp11.1-q11.1(DXZ1×2)[4/513]**

Odovídá poměru buněčných linií: 45,X(98,4%)/46,XX(0,8%)

	Počet buněk	Procentuální vyjádření
DXZ1×1,KAL×1	505	92,32 %
DXZ1×2,KAL×1	4	0,73 %
DXZ1×2,KAL×2	2	0,37 %
DXZ1×1,KAL×2	2	0,37 %
Celkový počet a podíl hodnotitelných buněk	513	93,78 %
Nehodnotitelné buňky	34	6,22 %
Celkový počet pozorovaných buněk	547	100 %

Tabulka 10. Výsledky – pacientka č. 1, centromerická a lokus-specifická sonda

Pacientka č. 2

Karyotyp: 45,X/46,XX

První hybridizace

- 1) Použitá sonda: **Centromerická sonda X** (signály sondy na Y nenalezeny)

Výsledek:

mos 45,X/46,XX. nuc ish Xcen(DXZ1×1)[271/507]/Xcen(DXZ1×2)[236/507]

Odpovídá poměru buněčných linií: 45,X(53,5%)/46,XX(46,6%)

Výsledek cytogenetického vyšetření provedeného v cytogenetické laboratoři

ÚBLG FNM: 45,X(55%)/46,XX(45%)

	Počet buněk	Procentuální vyjádření
DXZ1×1	271	36,77 %
DXZ1×2	236	32,02 %
Celkový počet a podíl hodnotitelných buněk	507	68,79 %
Nehodnotitelné buňky	230	31,21 %
Celkový počet pozorovaných buněk	737	100 %

Tabulka 11. Výsledky – pacientka č. 2, centromerická sonda I

- 2) Použitá sonda: **Kombinace centromerické sondy a lokus-specifické sondy**

Výsledek:

mos 45,X/46,XX. nuc ish Xp22.3(KALx1), Xp11.1-q11.1(DXZ1×1)[299/555]/Xp22.3(KALx2), Xp11.1-q11.1(DXZ1×2)[256/555]

Odpovídá poměru buněčných linií: 45,X(53,9%)/46,XX(46,1%)

Výsledek cytogenetického vyšetření provedeného v cytogenetické laboratoři

ÚBLG FNM: 45,X(55%)/46,XX(45%)

	Počet buněk	Procentuální vyjádření
DXZ1×1,KAL×1	299	33,45 %
DXZ1×2,KAL×2	256	28,64 %
Celkový počet a podíl hodnotitelných buněk	555	62,08 %
Nehodnotitelné buňky	338	37,81 %
Celkový počet pozorovaných buněk	894	100 %

Tabulka 12. Výsledky – pacientka č. 2, centromerická a lokus-specifická sonda I

Pacientka č. 2 – druhá hybridizace

- 1) Použitá sonda: **Centromerická sonda X** (signály sondy na Y nenalezeny)

Výsledek:

mos 45,X/46,XX . nuc ish Xcen(DXZ1×1)[322/601]/Xcen(DXZ1×2)[279/601]

Odpovídá poměru buněčných linií: 45,X(53,6%)/46,XX(46,4%)

Výsledek cytogenetického vyšetření provedeného v cytogenetické laboratoři

ÚBLG FNM: 45,X(55%)/46,XX(45%)

	Počet buněk	Procentuální vyjádření
DXZ1×1	322	45,35 %
DXZ1×2	279	39,30 %
Celkový počet a podíl hodnotitelných buněk	601	84,65 %
Nehodnotitelné buňky	109	15,35 %
Celkový počet pozorovaných buněk	710	100 %

Tabulka 13. Výsledky – pacientka č. 2, centromerická sonda II

- 2) Použitá sonda: **Kombinace centromerické sondy a lokus-specifické sondy**

Výsledek:

mos 45,X/46,XX . nuc ish Xp22.3(KAL×1), Xp11.1-q11.1(DXZ1×1)[211/351]/ Xp22.3(KAL×2), Xp11.1-q11.1(DXZ1×2)[140/351]

Odpovídá poměru buněčných linií: 45,X(60,1%)/46,XX(39,9%)

Výsledek cytogenetického vyšetření provedeného v cytogenetické laboratoři

ÚBLG FNM: 45,X(55%)/46,XX(45%)

	Počet buněk	Procentuální vyjádření
DXZ1×1,KAL×1	211	32,07 %
DXZ1×2,KAL×2	140	21,28 %
Celkový počet a podíl hodnotitelných buněk	351	53,34 %
Nehodnotitelné buňky	307	46,66 %
Celkový počet pozorovaných buněk	658	100,00 %

Tabulka 14. Výsledky – pacientka č. 2, centromerická a lokus-specifická sonda II

Pacientka č. 3

Karyotyp 45,X/47,XXX

- 1) Použitá sonda: **Centromerická sonda X** (signály sondy na Y nenalezeny)

Výsledek:

**mos 45,X/47,XXX . nuc ish Xcen(DXZ1×1)[335/556] /
Xcen(DXZ1×3)[216/556]/Xcen(DXZ1×2)[5/556]**

Odpovídá poměru buněčných linií:

45,X(60,3%)/47,XXX(38,9%)/46,XX(0,9%)

Výsledek cytogenetického vyšetření provedeného v cytogenetické laboratoři

ÚBLG FNM: 45,X(53%)/47,XXX(47%)

	Počet buněk	Procentuální vyjádření
DXZ1×1	335	52,76 %
DXZ1×2	5	0,79 %
DXZ1×3	216	34,02 %
Celkový počet a podíl hodnotitelných buněk	556	87,56 %
Nehodnotitelné buňky	75	11,81 %
Celkový počet pozorovaných buněk	635	100 %

Tabulka 15. Výsledky – pacientka č. 3, centromerická sonda

- 2) Použitá sonda: **Kombinace centromerické sondy a lokus-specifické sondy**

Výsledek:

**mos 45,X/47,XXX . nuc ish Xp22.3(KAL×1), Xp11.1-q11.1(DXZ1×1)[325/565]/ Xp22.3(KAL×3), Xp11.1-q11.1(DXZ1×3)
[235/565]/Xp22.3(KAL×2), Xp11.1-q11.1(DXZ1×2)[1/565]**

Odpovídá poměru buněčných linií:

45,X(57,5%)/47,XXX(42,3%)/46,XX(0,2%)

Výsledek cytogenetického vyšetření provedeného v cytogenetické laboratoři

ÚBLG FNM: 45,X(53%)/47,XXX(47%)

	Počet buněk	Procentuální vyjádření
DXZ1×1,KAL×1	325	57,02 %
DXZ1×2,KAL×2	1	0,18 %
DXZ1×3,KAL×3	235	41,23 %
DXZ1×2,KAL×3	4	0,70 %
Celkový počet a podíl hodnotitelných buněk	565	99,12 %
Nehodnotitelné buňky	13	2,2 %
Celkový počet pozorovaných buněk	570	100 %

Tabulka 16. Výsledky – pacientka č. 3, centromerická a lokus-specifická sonda

Pacientka č. 4 (negativní kontrola)

Karyotyp: 46,XX

- 1) Použitá sonda: **Centromerická sonda** (signály sondy na Y nenalezeny)

Výsledek:

46,XX . nuc ish Xcen(DXZ1×2)

Odovídá nálezu: 46,XX (ve 100 % buněk)

	Počet buněk	Procentuální vyjádření
DXZ1×2	502	75,83 %
Celkový počet a podíl hodnotitelných buněk	502	75,83 %
Nehodnotitelné buňky	160	24,17 %
Celkový počet pozorovaných buněk	662	100 %

Tabulka 17. Výsledky – pacientka č. 4, centromerická sonda

- 2) Použitá sonda: **Kombinace centromerické sondy a lokus-specifické sondy**

Výsledek:

46,XX . nuc ish Xp22.3(KAL×2), Xp11.1-q11.1(DXZ1×2)

Odovídá nálezu: 46,XX (ve 100 % buněk)

	Počet buněk	Procentuální vyjádření
DXZ1×2,KAL×2	473	83,87 %
Celkový počet hodnotitelných buněk	473	83,87 %
Nehodnotitelné buňky	91	16,13 %
Celkový počet pozorovaných buněk	564	100 %

Tabulka 18. Výsledky – pacientka č. 4, centromerická a lokus-specifická sonda

Pacientka č. 5

Karyotyp: 46,XX

- 1) Použitá sonda: **Centromerická sonda X** (signály sondy na Y nenalezeny)

Výsledek:

46,XX. nuc ish Xcen(DXZ1×2)

Suspektní mozaika obsahující buňky s chromozomem Y nebyla prokázána.

Odpovídá nálezu: 46,XX (ve 100 % buněk).

	Počet buněk	Procentuální vyjádření
DXZ1×2	234	50,21 %
Celkový počet a podíl hodnotitelných buněk	234	50,21 %
Nehodnotitelné buňky	232	49,79 %
Celkový počet pozorovaných buněk	466	100 %

Tabulka 19. Výsledky – pacientka č. 5, centromerická sonda

- 2) Použitá sonda: **Kombinace centromerické sondy a lokus-specifické sondy**

Výsledek:

46,XX. nuc ish Xp22.3(KAL×2), Xp11.1-q11.1(DXZ1×2)

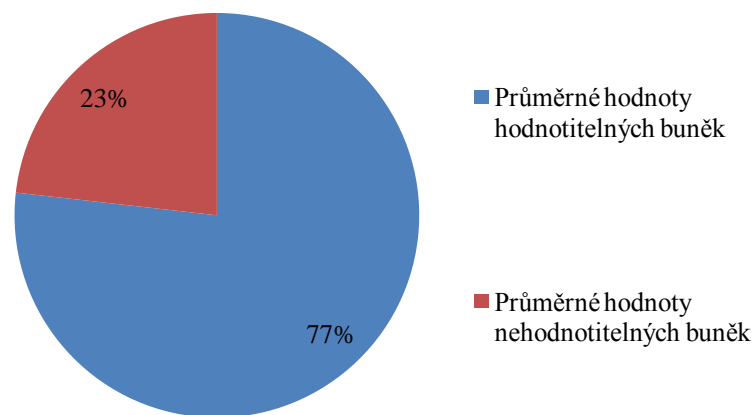
Odpovídá nálezu: 46,XX (ve 100 % buněk).

	Počet buněk	Procentuální vyjádření
DXZ1×2,KAL×2	284	50,81 %
Celkový počet a podíl hodnotitelných buněk	284	50,81 %
Nehodnotitelné buňky	275	49,19 %
Celkový počet pozorovaných buněk	559	100 %

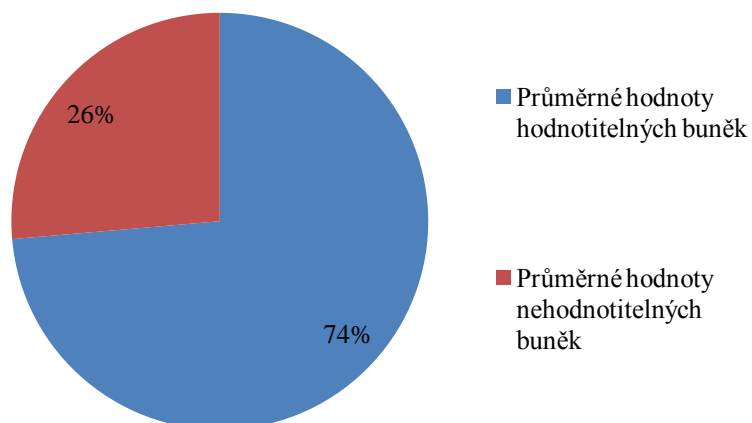
Tabulka 20. Výsledky – pacientka č. 5, centromerická a lokus-specifická sonda

4.1 Porovnání výsledků hybridizace s využitím samostatné centromerické sondy a kombinace centromerické a lokus-specifické sondy

Následující grafy srovnávají výsledky vyšetření s využitím dvou centromerických sond na lokus DXZ1 (centromera chromozomu X). Konkrétně jde o centromerickou sondu od firmy Cytocell (graf 1) a centromerickou sondu od firmy Abbott (kombinovanou se sondou na lokus KAL od téže firmy) – viz graf 2. Grafy srovnávají průměrné hodnoty získané vyšetřením všech vzorků.



Graf 1. Podíly hodnotitelných a nehodnotitelných buněk – centromerická sonda od firmy Cytocell



Graf 2. Podíly hodnotitelných a nehodnotitelných buněk – kombinace X-centromerické sondy a lokus-specifické sondy KAL od firmy Abbott

4.2 Srovnání kvality hybridizačních signálů

Číslo pacientky	Hodnocení vzorku
1	hybridizační signály všech sond silné a velmi dobře hodnotitelné
2 první hybridizace	výsledky hybridizace téměř nehodnotitelné z důvodů slabých hybridizačních signálů, signál lokus-specifické sondy ve většině případů úplně chyběl, mnoho nehodnotitelných buněk
2 druhá hybridizace	časté difúzní signály, hybridizační signály centromerické sondy od fy. Cytocell slabší, hybridizační signály centromerické sondy od fy. Abbott dobře zřetelné, ale lokus-specifická sonda vykazovala signály podstatně méně kvalitní
3	hybridizační signály všech sond silné a velmi dobře hodnotitelné
4	buňky hodně nahloučené, hybridizační signály často velmi slabé nebo nepřítomné, vysoký počet nespecifických signálů mimo jádra (sonda patrně zachycena na pozůstatcích cytoplazmy)
5	velmi málo buněk s velkým množstvím cytoplazmy, buňky se často překrývaly, hybridizační signály všech sond slabé

Tabulka 21. Hodnocení kvality hybridizačních signálů

4.3 Porovnání mých výsledků s výsledky druhého hodnotitele

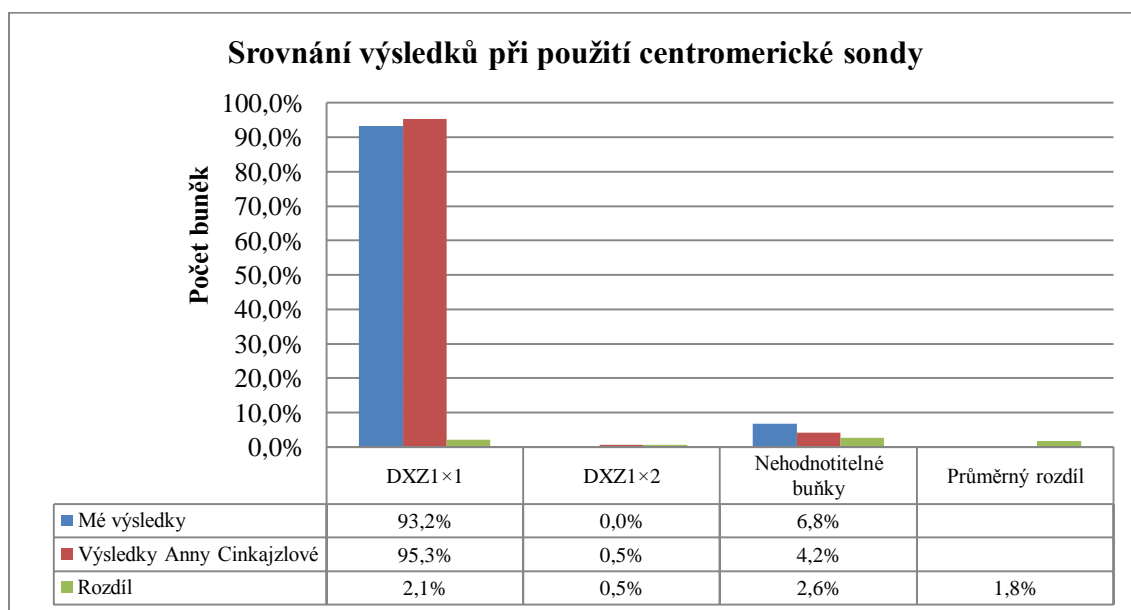
Pro posouzení možných rozdílů ve výsledcích zapříčiněných pouze osobou hodnotitele byly některé vzorky současně vyhodnoceny také zdravotní laborantkou Bc. Annou Cinkajzlovou. Rozdíly mezi mými výsledky a výsledky Anny Cinkajzlové uvádějí následující tabulky. U každého vzorku byl oběma hodnotitelkami prohlédnut zhruba shodný počet buněk, aby se předešlo možným diskrepancím způsobeným odlišným počtem vyhodnocených buněk.

Pro přehled a snadné srovnání uvádím v tabulkách pravděpodobné karyotypy odvozené od celkového počtu hodnotitelných buněk. V grafech jsou uvedena procenta odvozená od celkového počtu buněk (tzn. buněk jak hodnotitelných, tak nehodnotitelných).

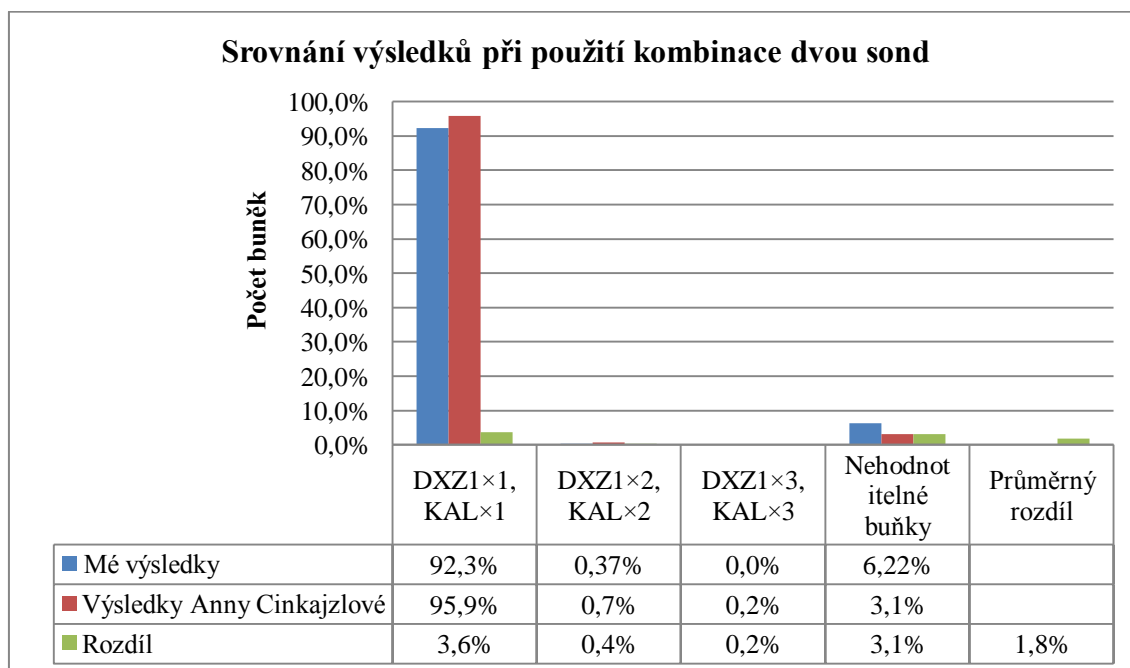
Pacientka č. 1

	Mé výsledky	Výsledky Anny Cinkajzlové
Centromerická sonda	45,X(100%)	45,X(99,4)/46,XX(0,6%)
Centromerická a lokus-specifická sonda	45,X(98,4%)/46,XX(0,8%)	45,X(99%)/46,XX(0,77%)/47,XXX(0,19%)

Tabulka 22. Srovnání výsledků, pacientka č. 1



Graf 3. Srovnání výsledků při použití centromerické sondy, pacientka č. 1

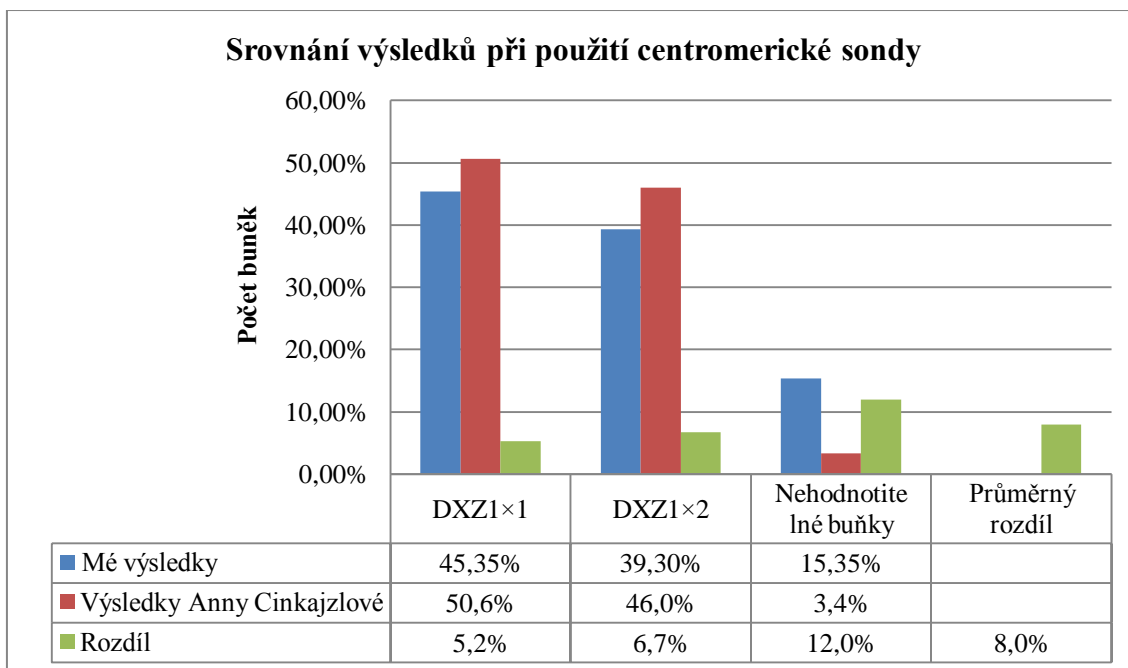


Graf 4. Srovnání výsledků při použití centromerické a lokus-specifické sondy, pacientka č. 1

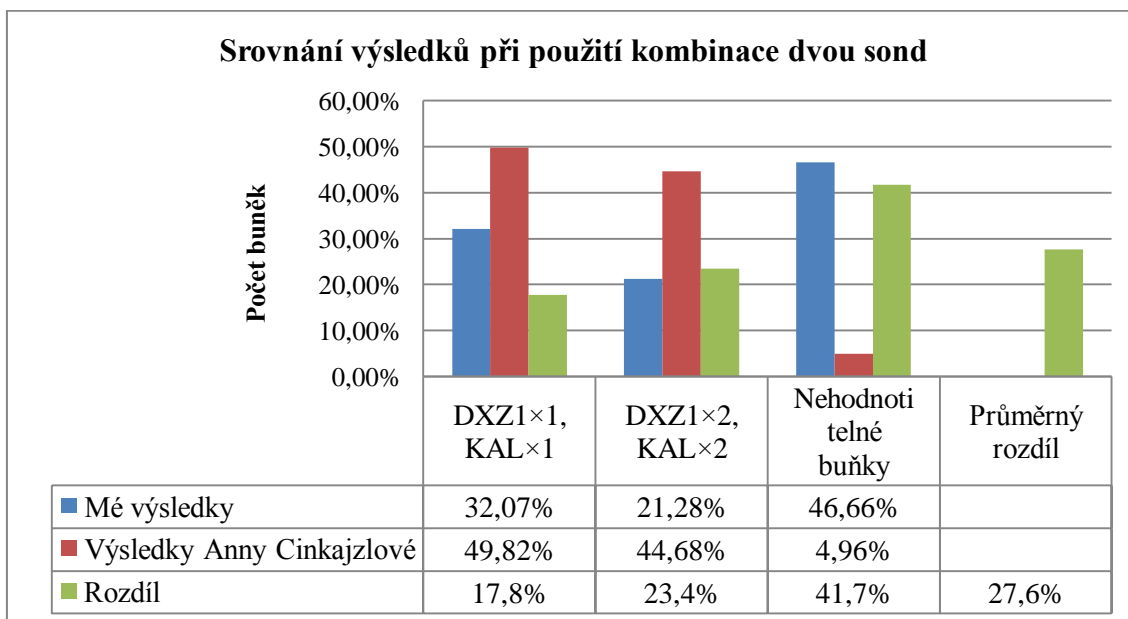
Pacientka č. 2 (výsledky vyšetření buněk ze druhé kultivace)

	Mé výsledky	Výsledky Anny Cinkajzlové
Centromerická sonda	45,X(53,6%)/46,XX(46,4%)	45,X(52,4%)/46,XX(47,6%)
Centromerická a lokus-specifická sonda	45,X(60,1%)/46,XX(39,9%)	45,X(52,5%)/46,XX(47,1%)

Tabulka 23. Srovnání výsledků, pacientka č. 2



Graf 5. Srovnání výsledků při použití centromerické sondy, pacientka č. 2

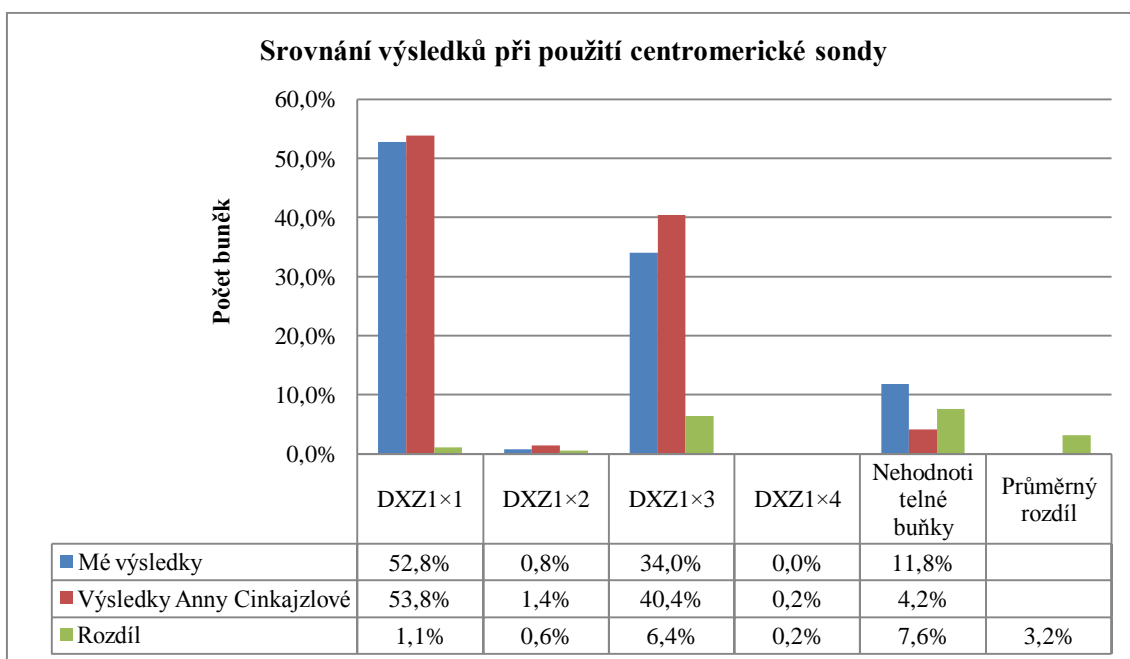


Graf 6. Srovnání výsledků při použití centromerické a lokus-specifické sondy, pacientka č. 2

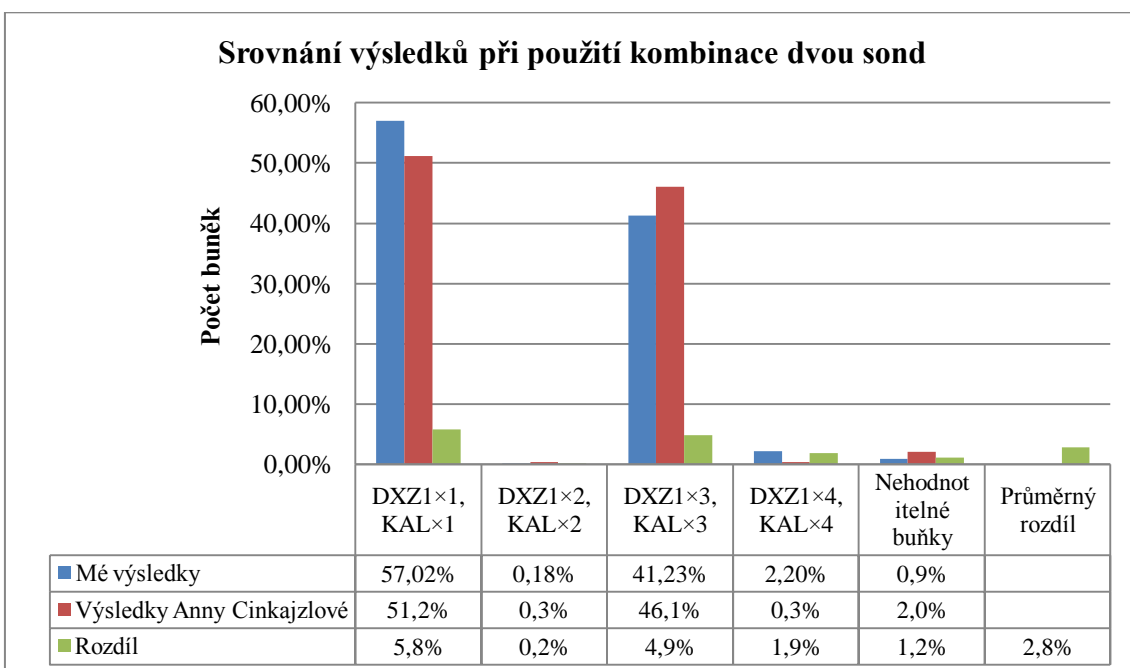
Pacientka č. 3

	Mé výsledky	Výsledky Anny Cinkajzlové
Centromerická sonda	45,X(60,3%)/47,XXX(38,9%) /46,XX(0,9%)	45,X(56,2%)/47,XXX(42,2%) /46,XX(1,5%)/48,XXX(0,2%)
Centromerická a lokus-specifická sonda	45,X(57,5%)/47,XXX(42,3%) /46,XX(0,2%)	45,X(52,3%)/47,XXX(47%) /46,XX(0,3%)/48,XXX(0,3%)

Tabulka 24. Srovnání výsledků, pacientka č. 3



Graf 7. Srovnání výsledků při použití centromerické sondy, pacientka č. 3

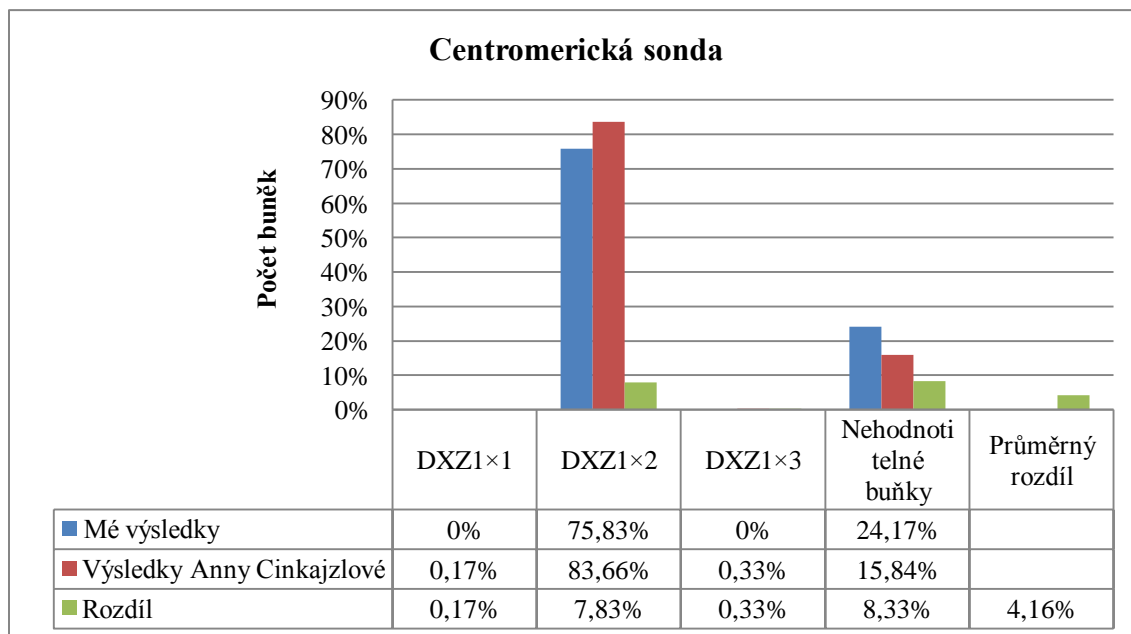


Graf 8. Srovnání výsledků při použití centromerické a lokus-specifické sondy, pacientka č. 3

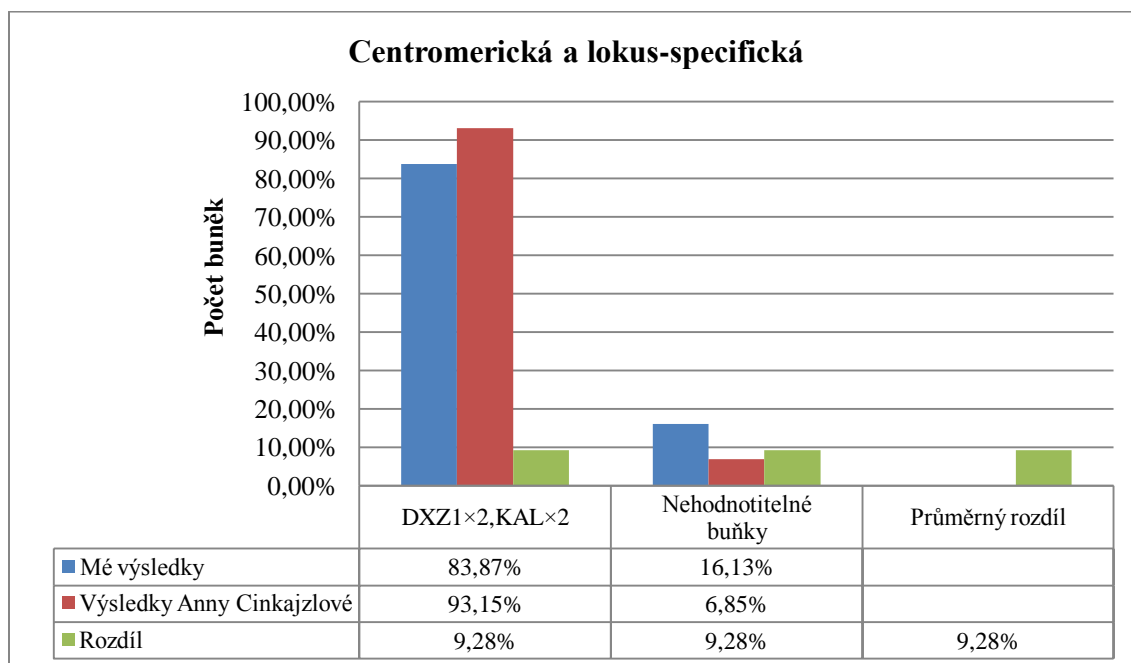
Pacientka č. 4

	Mé výsledky	Výsledky Anny Cinkajzlové
Centromerická sonda	46,XX(100%)	46,XX(99,4%)/47,XXX(0,4%) /45,X(0,2%)
Centromerická a lokus-specifická sonda	46,XX(100%)	46,XX(100%)

Tabulka 25. Srovnání výsledků, pacientka č. 4



Graf 9. Srovnání výsledků při použití centromerické sondy, pacientka č. 4

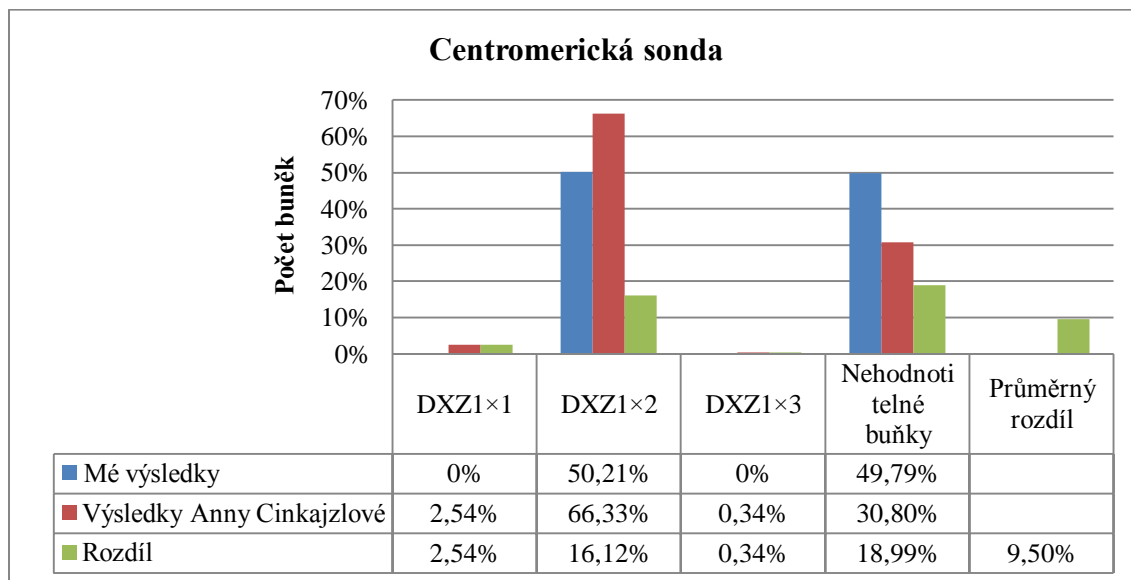


Graf 10. Srovnání výsledků při použití centromerické a lokus-specifické sondy, pacientka č. 4

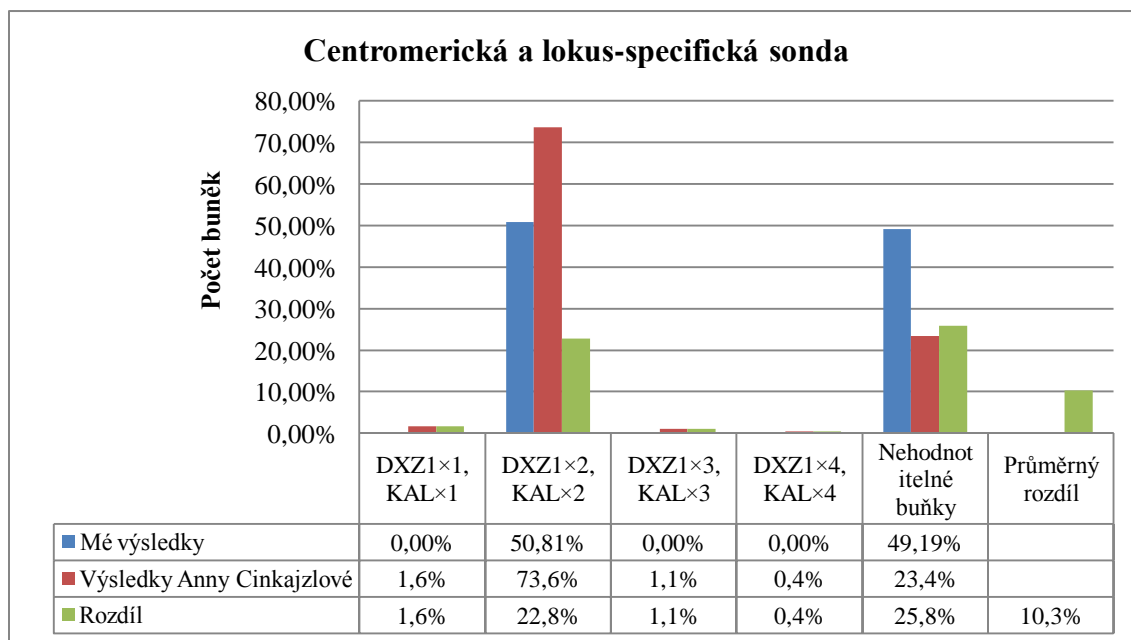
Pacientka č. 5

	Mé výsledky	Výsledky Anny Cinkajzlové
Centromerická sonda	46,XX(100%)	46,XX(95,8%)/45,X(3,7%)/47,XXX(0,49%)
Centromerická a lokus-specifická sonda	46,XX(100%)	46,XX(78,6%)/45,X(1,7%)/47,XXX(1,1%)/48,XXXX(0,4%)

Tabulka 25. Srovnání výsledků, pacientka č. 5



Graf 11. Srovnání výsledků při použití centromerické sondy, pacientka č. 4

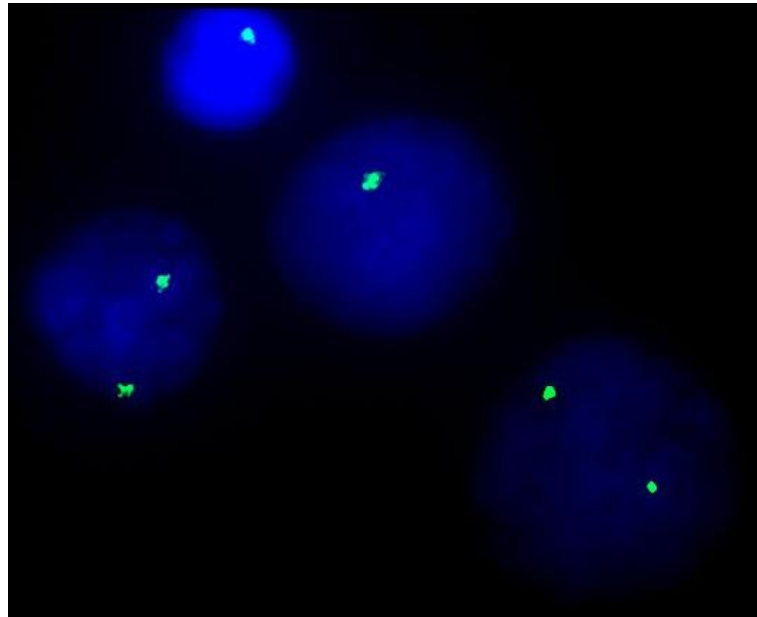


Graf 12. Srovnání výsledků při použití centromerické a lokus-specifické sondy, pacientka č. 4

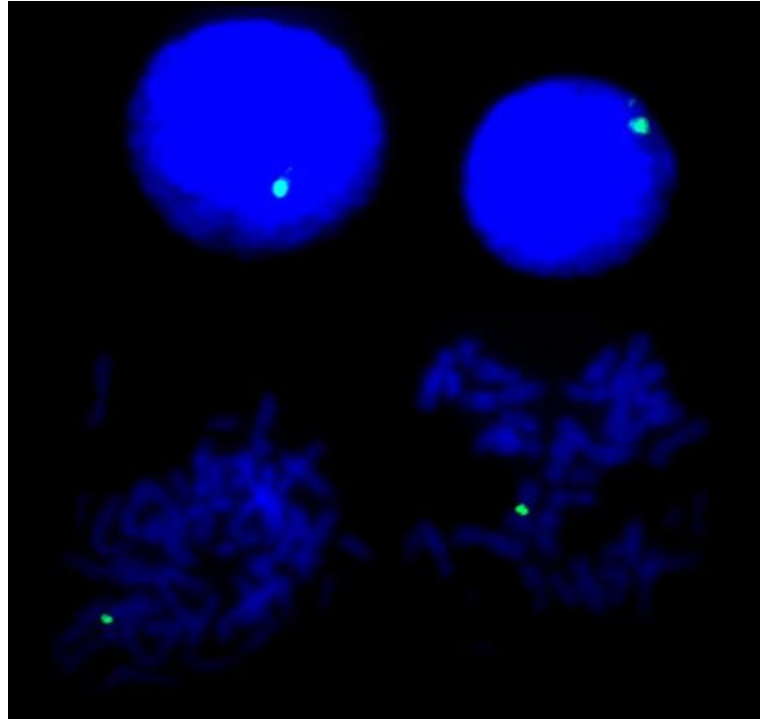
4.4 Ukázky výsledků metody FISH

Obrázky 5 – 14, které jsem vybrala ze své databáze, dokumentují výsledky vyšetření metodou FISH. Nejprve jsou zařazeny ty snímky (Obrázek 5 – 8), které ukazují dobře hodnotitelný nález se zřetelnými hybridizačními signály.

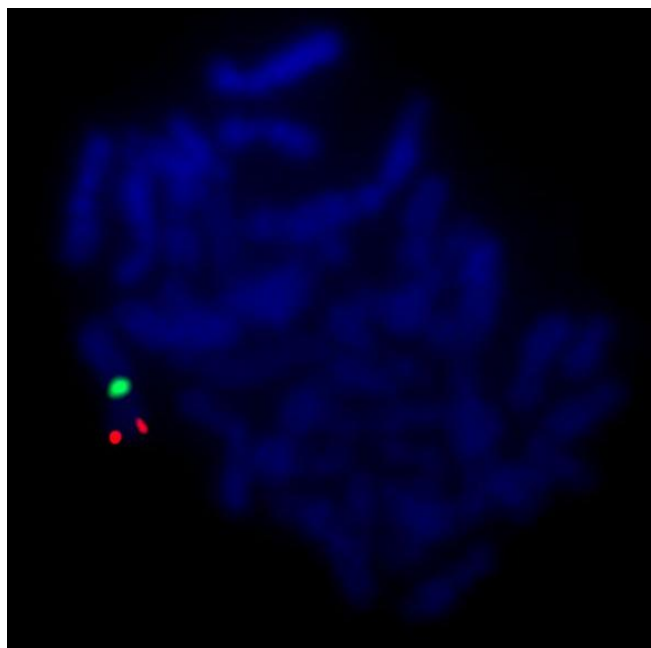
Poté jsem zařadila také několik snímků (Obrázek 8 – 14), které se snaží ukázat některé nálezy, které mohou způsobit potíže při interpretaci. V těchto případech by měly být buňky automaticky vyřazeny jako nehodnotitelné.



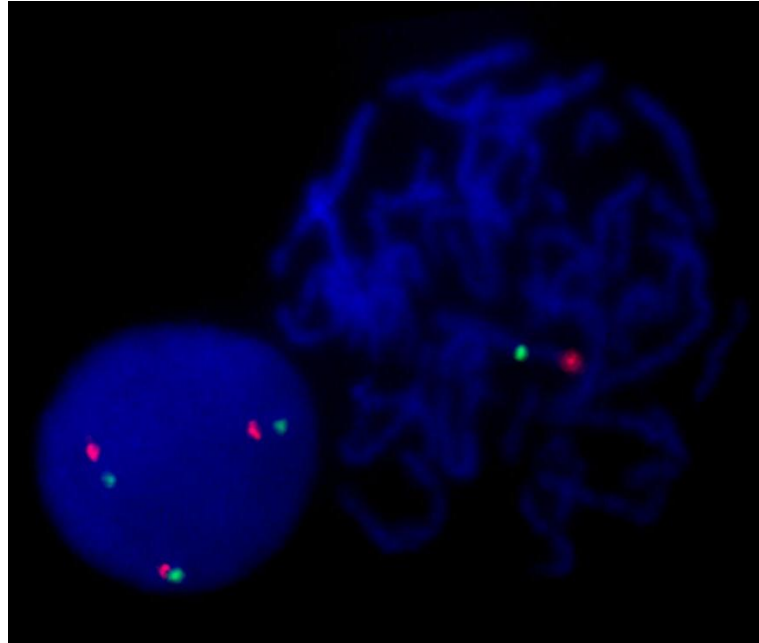
Obrázek 5. Pacientka č. 2: buňky s monozomií X a normální diploidní buňky. Sonda Aquarius X centromere Spectrum Green, zřetelné hybridizační signály



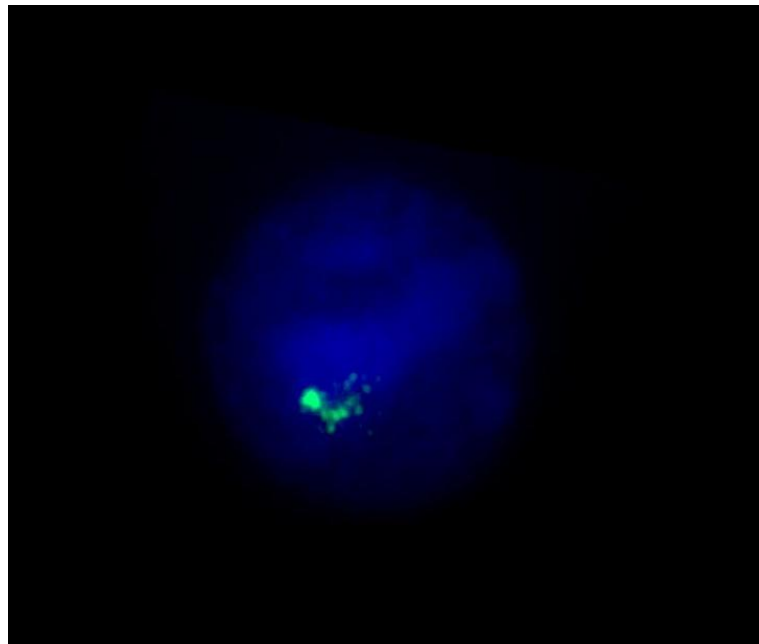
Obrázek 6. Pacientka č. 1: monozomická interfázní jádra a dobře rozprostřené mitózy. Sonda Aquarius X centromere Spectrum Green, zřetelné hybridizační signály



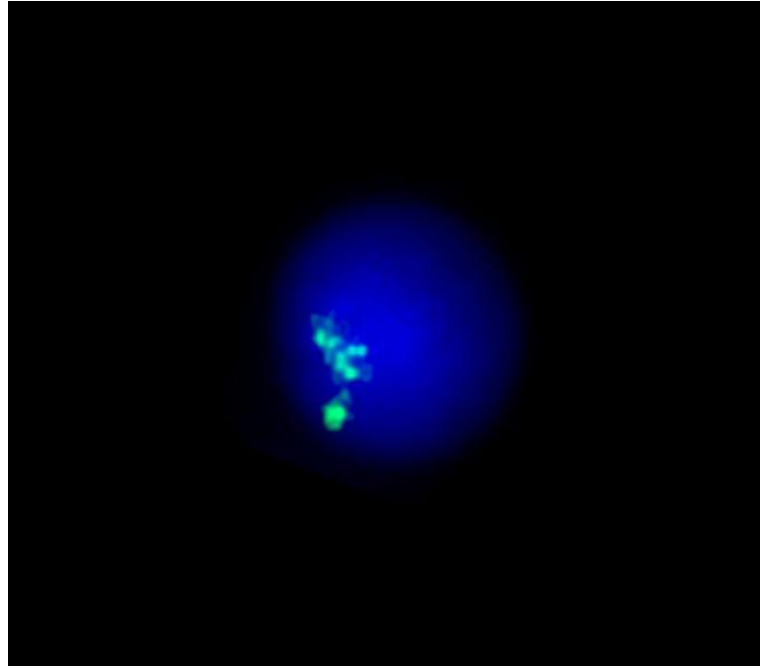
Obrázek 7. Pacientka č. 1: snímek mitózy s monozomií X s dobře hodnotitelnými hybridizačními signály. Sondy LSI KAL Spectrum Orange a CEP X Spectrum Green



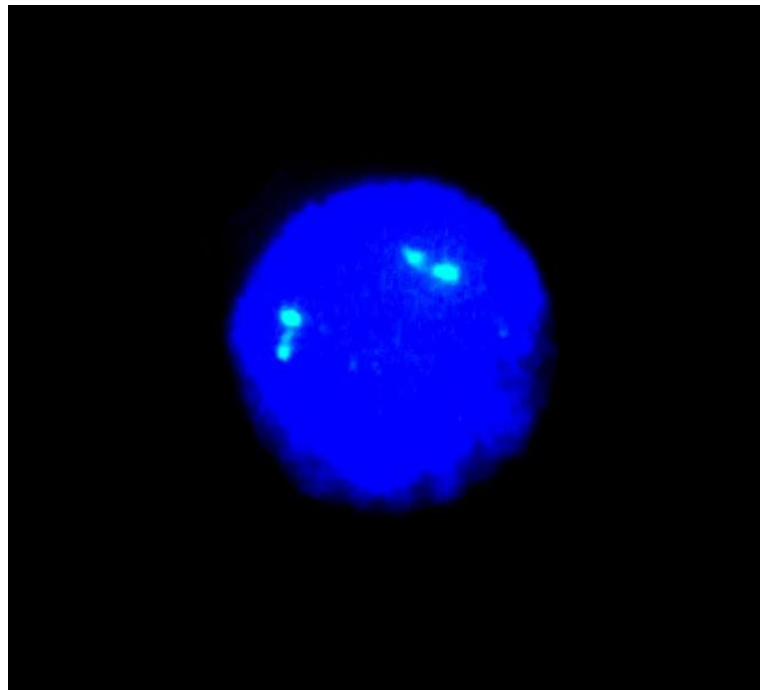
Obrázek 8. Pacientka č. 3: snímek interfázního jádra s trizomií X a mitózy obsahující prometafázní chromozomy. Sondy LSI KAL Spectrum Orange a CEP X Spectrum Green; u jádra i mitózy jsou hybridizační signály velmi jasné a tedy i dobře hodnotitelné



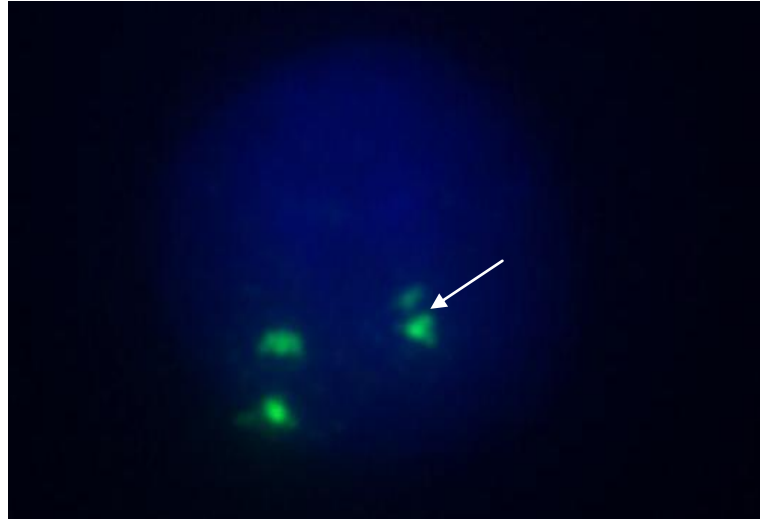
Obrázek 9. Difúzní hybridizační signál může být důsledkem rozpadu sondy či jejím nespecifickým navázáním na pozůstatky cytoplazmy. Tento jev pozorujeme často u starších vzorků. Jádra s difúzními signály nehodnotíme, protože si nemůžeme být jisti, zda se jedná o jeden či více signálů. Na snímku nehodnotitelné jádro s difúzním hybridizačním signálem (nelze jasně rozlišit, zda jde o jeden nebo dva signály). Sonda Aquarius X centromere Spectrum Green



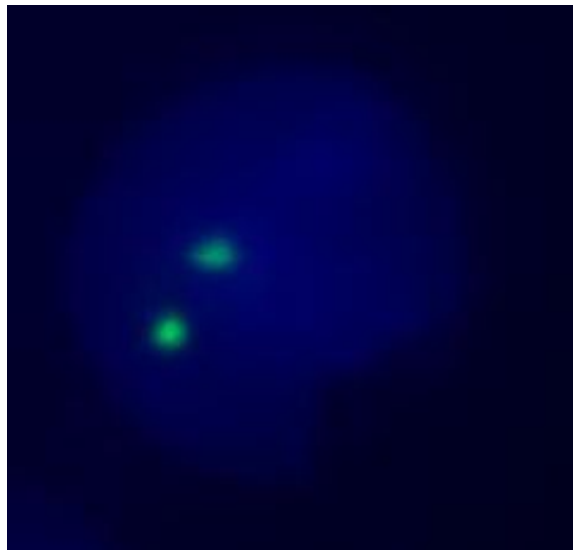
Obrázek 10. Nehodnotitelné interfázní jádro s výrazně difúzním hybridizačním signálem (nelze přesně stanovit počet signálů – dva nebo tři, možná více?). Sonda Aquarius X centromere Spectrum Green



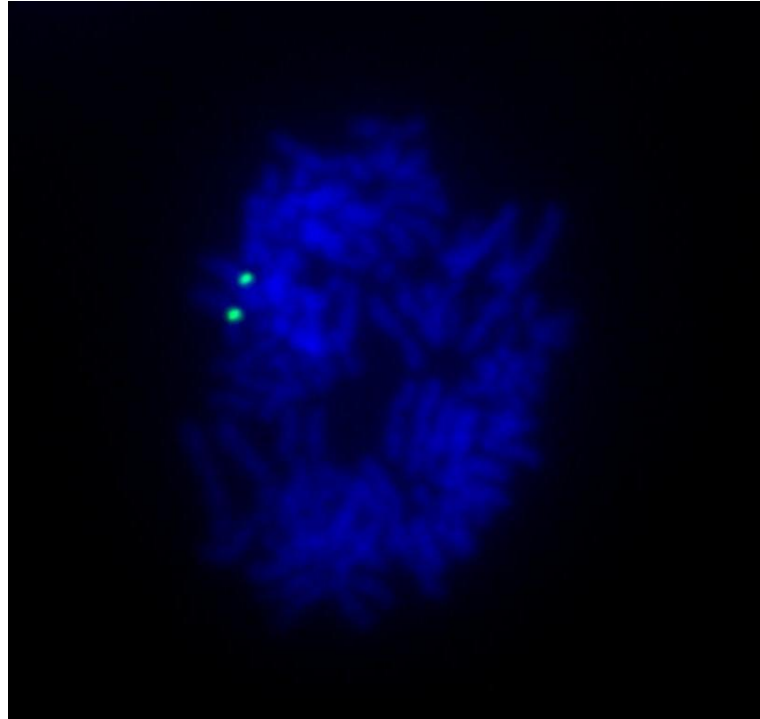
Obrázek 11. Hybridizační signály propojené můstky na interfázním jádře (opět nelze jednoznačně a s jistotou stanovit počet signálů). Sonda Aquarius X centromere Spectrum Green



Obrázek 12. Interfázní jádro se dvěma fluoreskujícími body v těsné blízkosti – označeny šipkou (nelze s jistotou rozhodnout, zda jde o hybridizační signály na dvou různých lokusech, anebo zda menší fluoreskující bod není pouhým artefaktem). Sonda Aquarius X centromere Spectrum Green



Obrázek 13. Nekompletní, poškozené jádro (část jádra zřejmě ztracena mechanickým poškozením). Jádra, která nejsou kompletní, nehodnotíme, protože nemusí obsahovat všechny chromozomy. Sonda Aquarius X centromere Spectrum Green



Obrázek 14. Chromozomy v anafázi. Jedním z problémů při interpretaci může být i hodnocení signálů v anafázi. Je důležité si uvědomit, že v anafázi již dochází k rozdělení centromer a rozchodu sesterských chromatid. Dva signály znamenají tedy ve skutečnosti přítomnost jen jednoho chromozomu. I když lze shluk anafázních chromozomů zpravidla s vysokou jistotou odlišit od metafázní, resp. prometafázní figury, nepovažujeme tyto buňky za hodnotitelné. Sonda Aquarius X centromere Spectrum Green

5 Diskuze

5.1 Hypotéza 1

Vyšetření metodou FISH za použití centromerických sond umožní přesně identifikovat mozaiky.

Konvenční cytogenetické vyšetření (karyotypizace) je schopné levně a efektivně identifikovat většinu chromozomových aberací, ale selhává v některých případech, jako je detekce nízkofrekvenčních mozaik či marker chromozomů. Ačkoliv předložená bakalářská práce vychází z vyšetření malého počtu vzorků, je i z těchto omezených dat zřejmé, že metodou FISH lze vyšetřit velké množství i nedělicích se interfázních buněk a zvýšit tak šance na upřesnění kvantitativních poměrů buněčných linií v mozaice, eventuálně též na zachycení minoritního buněčného klonu.

Díky dobré komerční dostupnosti různých sond specifických pro různé chromozomy, resp. pro jednotlivé lokusy na nich, je metoda FISH jednou z nejčastěji aplikovaných vyšetřovacích metod v klinicko-genetických laboratořích. Kromě mozaik lze s nimi např. identifikovat kryptické aberace chromozomů, objasnit původ marker chromozomů, anebo dovyšetřit složitější chromozomové přestavby. Při klasickém protokolu FISH ovšem používáme současně jednu až dvě sondy (maximálně 3 – 4), tzn., že analyzujeme jen velmi malou část genomu. Svoje omezení má i chromozomová CGH i multiplexní metody, jako např. M-FISH s malovacími sondami, centromerická M-FISH atd. To je také důvodem, proč metoda FISH nemůže nikdy spolehlivě nahradit konvenční cytogenetické vyšetření a proč v mnoha případech docházíme k relevantnímu výsledku pouze tehdy, pokud kombinujeme výsledky FISH a nálezem konvenční cytogenetické analýzy. (Stumm, 1999)

Vyšetření mozaicismu provází mnoho komplikací. Jedním z problémů je, že zastoupení buněčných klonů nemusí být ve všech tkáních stejné a výsledek vyšetření lymfocytů z periferní krve tak nemusí odpovídat skutečnému podílu buněčných klonů v organismu. Také je možné, že při kultivaci získá početnější klon proliferační výhodu a způsobí, že buněčné linie se namnoží v různých poměrech, či jedna úplně vymizí. Je tedy důležité si uvědomit, že nález jediného klonu (např. 45,X) nemusí nutně vylučovat přítomnost dalších buněčných linií. (Zemanová et al., 1999) Možný je také vznik tzv. pseudomozaicismu („kultivačního mozaicismu“), který vzniká při kultivaci buněk důsledkem non-disjunkce při proliferaci buněk *in vitro*, především v dlouhodobých

tkáňových kulturách. (Gersen & Keagle, 2005) V případě prenatalní diagnostiky je pak nutné myslet na mozaicismus omezený na placentu či kontaminaci mateřskými buňkami (podrobněji v kapitole 1.3.1.4).

Problémy s interpretací mohou také nastat, když se při rutinní cytogenetické diagnostice nalezne u jinak zdravé ženy linie buněk s karyotypem 45,X. Jedním z vysvětlení může být ztráta pohlavních chromozomů v důsledku věku. Již před více jak 40 lety se ukázalo, že se vzrůstajícím věkem dochází ke ztrátám pohlavních chromozomů a to častěji u žen než u mužů. Chromozom X se ztrácí spíše u žen a omezuje se na lymfocyty z periferní krve. U mužů se častěji ztrácí naopak chromozom Y v kostní dřeni. Pro ověření výsledku je proto užitečné provést i analýzu buněk z jiných tkání. (Russell et al., 2007)

Při stanovení nízkofrekvenčního mozaicismu hraje významnou roli hodnota zvaná *cut-off level*, kterou si určuje zpravidla sama laboratoř, anebo ji uvádí výrobce sondy. Obvykle se pohybuje od 1 do 5 %. Pokud je frekvence buněk předpokládaného minoritního klonu nižší než tato hodnota, nelze výskyt minoritního klonu s jistotou prokázat. Ale i v případě, že se procentuální zastoupení buněčných klonů pohybuje pod touto hodnotou, nelze nízkofrekvenční mozaicismus nikdy s jistotou vyloučit.

Na Ústavu biologie a lékařské genetiky jsem vyšetřovala celkem pět pacientek, u jedné z nich byl klasickým cytogenetickým vyšetřením nalezen klasický karyotyp 45,X ve všech hodnocených buňkách, u dalších dvou byly nalezeny, resp. potvrzeny mozaiky a u poslední vyloučena mozaika buněk obsahujících chromozom Y. Pro srovnání a ověření relevantnosti výsledků jsem vyšetřila i zdravou pacientku s normálním karyotypem – také zde se výsledek analýzy FISH shodoval s cytogenetickým nálezem. V následujícím textu blíže komentuji jednotlivé výsledky s ohledem na potvrzení stanovené hypotézy.

U pacientky č. 1 byl výsledek cytogenetického vyšetření 45,X ve 100 % buněk. Při použití centromerické sondy CEP X a lokus-specifické sondy LSI KAL se mi podařilo nalézt i další buněčnou linii se suspektním karyotypem 46,XX celkem ve 2 buňkách, tedy v 0,37 % z celkového počtu odečtených buněk. Do tohoto počtu bychom mohli zahrnout ještě další dvě buňky, které měly dva signály na lokusu KAL, ale pouze jeden signál na centromeře X. Mohlo by jít o buňky, kde došlo k překryvu dvou signálů na centromeře X, takže výsledný signál se jevil jako jediný, stejně tak však může být přítomnost 2 signálů na lokusu KAL artefaktem. Ačkoliv zjištěný nízký počet buněk se dvěma signály na X je výrazně pod hranicí i té nejnižší přípustné hodnoty

cut-off-level (1 %), je zarážející, že se u zmíněných dvou buněk shodly ve výsledku centromerická i lokus specifická sonda. I kdyby šlo o nízkofrekvenční mozaiku, zůstává otázkou, zda nejde o pseudomozaicismus při kultivaci. (viz Gersen & Keagle, 2005) K bližšímu objasnění nálezu by bylo vhodné provést analýzu buněk z jiné tkáně (zpravidla z fibroblastů kožní biopsie), která se však provádí jen výjimečně (Kočárek et al., 2010) a v tomto případě provedena nebyla.

Výsledek základního cytogenetického vyšetření u pacientky č. 2 byl 45,X(55%)/46,XX(45%) (z laboratoře jsem nezískala údaj o tom, kolik buněk bylo analyzováno). Mé výsledky z obou hybridizací s použitím obou typů, resp. kombinací sond byly téměř shodné a tento výsledek potvrdily.

Poslední pacientkou s prokazatelně mozaikovým karyotypem byla pacientka č. 3 s výsledkem ze základního cytogenetického vyšetření 45,X(53%)/47,XXX(47%) (ani v tomto případě se mi nepodařilo získat údaj o počtu vyšetřených buněk). Ačkoliv lze v tomto případě zjistit výraznější kvantitativní rozdíly mezi výsledkem analýzy FISH a cytogenetickým nálezem (maximálně 7 – 8 % buněk – možné důvody těchto rozdílů vysvětlují níže), nejsou tyto výsledky zásadně v rozporu. Mně se podařilo v nízkém procentu buněk nalézt ještě další suspektní buněčnou linii s možným karyotypem 46,XX, opět však nepřesahující 1 % z celkového počtu odečtených buněk.

Abych mohla spolehlivě ověřit citlivost a spolehlivost metody FISH, vyšetřovala jsem ještě pacientku č. 4 s normálním chromozomovým nálezem. U této pacientky jsem však nenašla jádra, resp. mitózy, které by měly jinou než normální konstituci hybridizačních signálů (tj. DXZ1×2, resp. KAL×2). Je pravděpodobné, že všechny buňky mají vskutku karyotyp 46,XX.

Zvláštním případem je pacientka č. 5, u níž se vzhledem k virilizaci genitálu předpokládala přítomnost mozaiky s buňkami obsahujícími chromozom Y. Mozaiková kombinace aneuploidií obou gonozomů bývá u podobných případů nalézána poměrně často. (Patsalis et al., 1998; de Oliveira et al., 2009) Ani základní cytogenetické vyšetření, ani naše analýza FISH však tento předpoklad nepotvrdily. Stejně tak nepotvrdily ani přítomnost mozaiky s rozdílným počtem chromozomů X, které bývají někdy s výše uvedeným fenotypem asociovány. Uvedený výsledek FISH ovšem nevyklučuje možnost přítomnosti pouze části chromozomu Y, který neobsahuje centromeru – časté jsou v tomto případě kryptické translokace X;Y. (např. Cheng et al., 2009). Proto byl vzorek hybridizován s lokus specifickou sondou pro lokus SRY (zodpovědným za virilizaci genitálu), avšak ani v tomto případě se nepodařilo

přítomnost segmentu z chromozomu Y prokázat. (Kočárek – ústní sdělení a nepublikovaný materiál, 2012). Pro další dovyšetření by bylo vhodné použít k analýze citlivější metodu PCR se zaměřením na některý lokus na chromozomu Y, popř. cytogeneticky analyzovat jiný materiál od pacientky (fibroblasty z kožní biopsie, eventuálně buňky z gonád, pokud by došlo k jejich chirurgické excizi pro riziko gonadoblastomu).

Ačkoli z vyšetření pouhých 5 vzorků nelze vyvozovat obecně platné závěry, je nález minoritních, základní karyotypizací neidentifikovaných buněčných linií ve dvou vzorcích přinejmenším impulzem pro úvahy o skutečné rozlišitelnosti metody FISH při diagnostice nízkofrekvenčních mozaik. Ačkoliv zastoupení těchto linií nepřesahuje 1 % (a proto nelze tento výsledek považovat za jednoznačný důkaz minoritního buněčného klonu), stojí za pozornost, že jsem v kontrolním vzorku (od pacientky 4) a také ve vzorcích od pacientek č. 1 a 5 nenalezla ani jedinou buňku s odlišným počtem signálů. Určitých rozdílů v mých výsledcích a výsledcích Bc. Anny Cinkajzlové se věnuji v jiné části diskuse.

Na základě těchto výsledků a srovnáním s dosavadními poznatky (např. Zemanová et al. 1999) lze uzavřít, že se nám hypotézu 1 podařilo potvrdit. Prokázali jsme, že metodou FISH za použití centromerických sond (resp. v kombinaci s lokus specifickými sondami) lze stanovit nebo upřesnit kvantitativní poměry buněčných linií v mozaice. Svědčí proto výrazná shoda kvantitativních buněčných poměrů zjištěných ve všech vzorcích. Ukazuje se také, že metoda FISH zřejmě může odhalit i minoritní buněčné klony, které nebyly klasickým cytogenetickým vyšetřením zachyceny. Na druhou stranu jsme také potvrdili určitá úskalí této metody. Ta spočívají zejména v nemožnosti komplexní analýzy karyotypu (týká se především klasické FISH s jednotlivými centromerickými nebo lokus specifickými sondami). Také údajná nenáročnost na kvalitu materiálu, která bývá uváděna jako jednoznačná výhoda metody FISH má svá omezení. U některých vzorků (zejména 2 a 5, zčásti i 4) se ani po opakovaných pokusech nepodařilo odstranit pozůstatky cytoplazmy, aby došlo k výraznému snížení podílu nehodnotitelných buněk. Také přítomnost těchto nehodnotitelných buněk může do jisté míry ovlivnit přesnost výsledku.

5.2 Hypotéza 2

Výsledky vyšetření mozaicismu s centromerickou sondou jakéhokoliv výrobce by měly poskytnout stejné výsledky.

Porovnání sond od různých výrobců ukazují grafy 1 a 2. Z výsledků není patrný žádný výrazný rozdíl mezi sondami od různých výrobců. Grafy ovšem neporovnávají dvě centromerické sondy jako takové, ale srovnávají výsledky aplikace jedné centromerické sondy a výsledky kombinace lokus-specifické a centromerické sondy od jiného výrobce. Proto se k těmto výsledkům vracím v části 5.3.

Celkově se zdálo, že centromerická sonda Aquarius X od firmy Cytocell poskytuje slabší signály než centromerická sonda na X od firmy Abbott (to se projevilo zejména u vzorku od pacientky 2, ale v menší míře i u jiných vzorků). To je jisté překvapení, neboť sonda od firmy Abbott, kterou jsme používali, je stará asi 5 let. Lze tedy usoudit, že sonda od firmy Abbott je poněkud robustnější než sonda od firmy Cytocell. Pro relevantní posouzení tohoto problému by však bylo potřeba provést analýzu většího počtu vzorků od různých osob, resp. buněčných kultur. Problémem zůstává také nedostatek informací o jednotlivých sondách, neboť výrobci ve svých materiálech neuvádějí detaily o charakteru sondy či složení hybridizačního roztoku.

Zdá se proto, že rozdíly mezi výsledky analýz jednotlivých vzorků je dána především kvalitou vyšetřovaného materiálu, kterou však lze ovlivnit jen částečně. Pro zlepšení kvality vzorků doporučují někteří autoři např. aplikaci proteolytických enzymů. (Beatty et al., 2002) Do budoucnosti stojí za úvahu vyzkoušet tyto techniky na více vzorcích o rozdílné kvalitě.

5.3 Hypotéza 3

Současné použití centromerické a lokus-specifické sondy by mělo zpřesnit vyšetření mozaiky.

Při vyšetření mozaikových aneuploidií chromozomu X metodou FISH se až dosud používala zpravidla jen centromerická sonda. (např. Zemanová et al., 2009; Wiktor a Van Dyke, 2004).

Otázkou ovšem zůstává, zda není použití jediné centromerické sondy zatíženo příliš velkou chybou. Její signály se mohou vzájemně překrývat a často mohou být (vzhledem k individuální variabilitě) velmi rozdílné intenzity. Nelze proto vyloučit vznik falešně pozitivních či falešně negativních výsledků. Příkladem je situace, kdy se

dva signály překrývají, takže vzniká dojem, že na interfázním jádře je přítomen jediný signál (na tento problém upozorňuji již v první části diskuze – 5.1). Ačkoliv lokus-specifická sonda vytváří zpravidla slabší signály než sonda centromerická (Beatty et al., 2002), intenzita jejích signálů je v zásadě konstantní. Může být užitečná jako kontrola v případech, kdy si nejsme úplně jisti, zda centromerická sonda na stejném chromozomu vykazuje správný hybridizační výsledek.

V případě pacientky č. 1 a pacientky č. 3, kde byla obecně kvalita preparátu velmi dobrá, vykazovala v mnoha případech lokus-specifická sonda lepší výsledky než sonda centromerická. U ostatních vzorků, kde kvalita preparátu byla naopak poměrně špatná, lokus-specifická sonda nebyla téměř vidět. Z toho lze vyvodit, že kvalita výsledků FISH souvisí stejně jako u centromerické sondy s kvalitou analyzovaného materiálu. Použití samotné lokus specifické sondy namísto sondy centromerické tedy nepředstavuje zásadní diagnostický přínos.

Grafy 1 a 2 (viz 4.1) srovnávají použití samotné X-centromerické sondy a kombinace X-centromerické sondy se sondou lokus-specifickou co do počtu hodnotitelných buněk. Ačkoliv se poměr hodnotitelných a nehodnotitelných buněk liší jen o 3 %, stojí za úvahu, zda tento rozdíl může mít nějakou příčinu a význam. Jednou z možných odpovědí je odlišný výrobce použitých sond. Vyšší podíl nehodnotitelných jader však může být také jistým příznivým parametrem hovořícím ve prospěch využití kombinace centromerické a lokus specifické sondy. Bylo-li při použití tohoto hybridizačního postupu vyřazeno více jader jako nehodnotitelných, znamená to, že v případě použití samostatné centromerické sondy tato problematická jádra „prošla“ jako hodnotitelná.

Specifickým problémem, s nímž jsem se při své práci nesešla, je hodnocení mozaik obsahujících strukturní aberace chromozomu X, popř. jiných chromozomů. V těchto případech může přítomnost či absence signálu lokus-specifické sondy prozradit, zda se v daném interfázním jádře nachází normální chromozom X, anebo deletovaný chromozom, který neobsahuje příslušný úsek, s nímž příslušná lokus-specifická sonda hybridizuje. Příkladem je nález malého derivovaného chromozomu X [47,Xder(X)] v mozaice s buňkami 47,XYY, kdy právě současná aplikace centromerické a lokus specifické sondy umožnila nejen identifikovat malý nadpočetný chromozom, ale také přesně určit poměr buněk v mozaice. (Kočárek et al. 2006a, 2006b) Je tedy nesporným faktem, že lokus-specifická sonda může eliminovat případné falešně pozitivní či falešně negativní výsledky

5.4 Hypotéza 4

Mezi jednotlivými hodnotiteli by se neměl vyskytovat významný rozdíl

Grafy 3 – 12 ukazují srovnání mých výsledků s výsledky zdravotní laborantky Bc. Anny Cinkajzlové. Z těchto grafů je patrné, že nejmenší rozdíly jsou u vzorků, které měly nejlepší kvalitu signálů (viz tabulka 21). U pacientky č. 1 byl průměrný rozdíl 1,8 % jak při použití centromerické sondy, tak při použití kombinace dvou různě značených sond. U pacientky č. 3 byl průměrný rozdíl za použití centromerické sondy 3,2 % a při použití kombinace dvou sond 2,8 %. Výsledky u dalších pacientek naznačují, že rozdíl se zvětšuje úměrně s kvalitou vzorku. Velké rozdíly jsem zaznamenala především v počtu nehodnotitelných buněk. Podle mého názoru to ukazuje, jak je posouzení hodnotitelnosti jádra subjektivní. Pokud se ale i přes tyto rozdíly odečte přibližně stejný počet buněk hodnotitelných, nemělo by to mít na výsledek vyšetření příliš velký vliv. Jsem také přesvědčena, že pokud bychom hodnotily rozdíly výsledků získaných zkušenými cytogenetiky, rozdíly by byly podstatně menší. Tuto hypotézu by však bylo potřeba ověřit vyšetřením většího počtu vzorků více hodnotiteli, což by poskytlo dostatečné podklady i pro statistické zhodnocení.

ZÁVĚR

Moje práce se zabývá molekulárně cytogenetickou diagnostikou chromozomových aberací se zvláštním zřetelem k nálezům mozaikovým. Teoretické základy této problematiky jsou probrány v úvodní části.

Hlavním cílem praktické části mé bakalářské práce bylo vyhodnotit možnosti stanovení chromozomových aberací v mozaikách pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a posoudit možné faktory ovlivňující správnost vyšetření. Pro práci jsme si vybrali 5 modelových vzorků s rozdílnými nálezy aneuploidií chromozomu X spjatých s Turnerovým syndromem (včetně negativní kontroly s normálním karyotypem). Posuzovali jsme individuální variabilitu mezi výsledky dvou hodnotitelů a také rozdíly ve výsledcích při použití samostatné centromerické sondy a kombinace centromerické a lokus specifické sondy, resp. při použití různě značených centromerických sond od různých výrobců.

Časový horizont práce neumožnil analýzu většího počtu vzorků, proto nashromážděné výsledky nelze statisticky hodnotit ani z nich vyvozovat obecnější poznatky. Přesto lze vyvodit alespoň dílčí závěry, které naznačují další cestu možného výzkumu.

Výsledky potvrzují, že metoda FISH je velmi specifická a senzitivní metoda, kterou je možné poměrně přesně identifikovat a kvantifikovat chromozomové aberace v mozaikách. Jde pravděpodobně o jedinou vhodnou metodu, kterou bude možné analyzovat nízkofrekvenční mozaiky, neboť ostatní cytogenetické či molekulárně cytogenetické metody v těchto případech selhávají (např. klasickým cytogenetickým vyšetřením lze většinou analyzovat maximálně 100 metafázních buněk, metoda array CGH zachytí minoritní klon, jen pokud jeho frekvence převyšuje 10 % buněk).

K analýze mozaik se jako nejvhodnější zdá použití centromerických sond, přičemž rozdílnou kvalitu hybridizačních výsledků ovlivněnou výrobcem sondy nelze na základě nashromážděných dat prokázat. Jistého zpřesnění výsledku lze zřejmě dosáhnout kombinací dvou různých sond hybridizujících se stejným chromozomem: nejčastěji kombinací centromerické a lokus-specifické sondy, která může být kontrolou, zejména pokud centromerická sonda nevykáže na daném jádře jasný výsledek. Tím se dá zabránit případným falešně pozitivním či falešně negativním výsledkům.

Otázkou zůstávají možné individuální rozdíly ve výsledcích různých hodnotitelů. Ty však podle mého názoru závisí, stejně tak jako v mnoha jiných

oblastech, na délce praxe v oboru. Zdá se také, že se snižující se kvalitou vzorku se mohou tyto individuální rozdíly zvětšovat. Ačkoli často nelze ani při důsledném dodržování standardního operačního postupu získat vzorek o optimální kvalitě, vyplývá z této skutečnosti zvýšený nárok na precizní práci zdravotních laborantů, kteří vzorek k hybridizaci připravují.

REFERENČNÍ SEZNAM

- ABBOTT MOLECULAR. *Abbott Molecular FISH Catalog 2011: For Africa, Europe, India, and Middle East*. Dostupný z WWW:
<https://www.abbottmolecular.com/static/cms_workspace/img/Support/download_catalog/pdfs/EMEAI__FISHcatalog2011b.pdf>
- AKBAS, E. et al. Turner syndrome and 45,X/47,XXX mosaicism. *Genetic Counseling* [online]. 2009, vol. 20, no. 2, s. 141-6 [cit. 2011-11-06]. ISSN 1015-8146. Dostupný z WWW:
<<http://search.proquest.com/docview/195852879/132E030B73E35E54FAF/2?accountid=15618#>>
- BEATTY B.; MAI S.; SQUIRE J.: *FISH – A Practical Approach*. 1. vyd. Oxford, Oxford University Press, 2002, 256 s., ISBN 0-19-963884-5
- CHENG De-Hua et al. Crypt Y chromosome fragment resulting from an X;Y translocation in a patient with premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*. [online]. 2009, vol. 92, no. 2, s. 828.e3–828.e6 [cit. 2012-04-18]. ISSN 0015-0282. Dostupný z WWW:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028208014659>>
- CYTOCELL. *Oncology and Constitutional FISH Probe Catalogue*. 2012/2013. Dostupný z WWW: <http://www.cytocell.co.uk/files/cytocell-2012-2013_catalogue.pdf>
- CZEPULKOWSKI, Barbara: *Analyzing chromosomes*. 1. vyd. Oxford: BIOS Scientific publishers Ltd., 2001, 206 s. ISBN 1-85996-188-6
- DE OLIVEIRA Rose Mary Rocco et al. Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. *São Paulo medical journal* [online]. 2009, vol. 127, no. 6, s. 373-8 [cit. 2012-04-18]. ISSN 1806-9460. Dostupný z WWW:
<<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-31802009000600010>>
- GERSEN, Steven L.; KEAGLE, Martha B.: *The principles of clinical cytogenetics*. 2nd ed. Totowa: Humana Press, 2005. 596 s. ISBN 1-58829-300-9.
- GILTAY, Jacques C.; MAIBURG, Merel C. Klinefelter syndrome: clinical and molecular aspects. *Expert Review of Molecular Diagnostics* [online]. 2010, vol. 10, no. 6, s. 765-776 [cit. 2012-03-01]. ISSN 1473-7159. Dostupný z WWW:
<<http://search.proquest.com/docview/751879944/fulltextPDF/13534BF3BA55A7AE6BC/1?accountid=15618>>
- HAHN, Sinuhe; SANT, Rosalie; HOLZGREVE, Wolfgang. Fetal cells in maternal blood: current and future perspectives. *Molecular Human Reproduction* [online]. 1998, vol. 4, no. 6, s. 515-521 [cit. 2011-03-01]. ISSN 14602407. Dostupný z WWW: <<http://www.molehr.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/molehr/4.6.515>>

- HASSOLD, Terry et al. Human aneuploidy: Incidence, origin, and etiology. *Environmental and Molecular Mutagenesis* [online]. 1996, vol. 3, no. 28, s. 167–175 [cit. 2011-11-06]. ISSN 0893-6692. Dostupný z WWW: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1996\)28:3%3C167::AID-EM2%3E3.0.CO;2-B/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1098-2280(1996)28:3%3C167::AID-EM2%3E3.0.CO;2-B/pdf)>
- HASSOLD, T.; HUNT, P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2001, vol. 2, no. 4, s. 280-91 [cit. 2011-11-06]. ISSN 1471-0056 Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283700>>
- How does trisomy mosaicism occur?* [online]. 2007 [cit. 2011-11-06]. CHROMOZOMAL MOSAICISM. Dostupný z WWW: <http://www.medgen.ubc.ca/robinsonlab/mosaic/intro/mos_how.htm>
- HROMADNÍKOVÁ, Ilona; DANĚK, Milan. Fetální buňky - zdroj neinvazivní prenatalní diagnostiky. *Postgraduální medicína* [online]. 2000, roč. 2, č. 4, s. 428-431 [cit. 2011-03-01]. ISSN 1212-4184. Dostupný z WWW: <<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/fetalni-bunky-zdroj-neinvazivni-prenatalni-diagnostiky-129944>>
- KALOUSEK, Dagmar. Pathogenesis of chromosomal mosaicism and its effect on early human development. *American Journal of Medical Genetics* [online]. 2000, vol. 91, no. 1, s. 39–45 [cit. 2011-11-06]. ISSN 0148-7299. Dostupný z WWW: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(20000306\)91:1%3C39::AID-AJMG7%3E3.0.CO;2-L/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1096-8628(20000306)91:1%3C39::AID-AJMG7%3E3.0.CO;2-L/full)>
- KALOUSEK, Dagmar; VEKEMANS, Michel. Confined placental mosaicism. *Journal of Medical Genetics* [online]. 1996, vol. 33, no. 7, s. 529-533 [cit. 2011-11-06]. ISSN 0022-2593. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1050657/pdf/jmedgene00261-0001.pdf>>
- KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.
- KOČÁREK, Eduard et al.: Přítomnost centromerických fragmentů a variabilita centromerických oblastí mohou zkreslit výsledek interfázní FISH (přednáška). 39. výroční konference cytogenetické sekce. České Budějovice, 14. – 15. září 2006, 2006a (abstrakt publikován na CD)
- KOČÁREK, Eduard et al. Submicroscopic DER(X) detected by FISH – Unusual finding in a Klinefelter Syndrome patient. *European journal of human genetics*. 2006, 2006b, roč. 14, č. 1, s. 180-181. ISSN 1018-4813.
- KOČÁREK, Eduard; PÁNEK, Martin; NOVOTNÁ, Drahuše. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky, vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2., upravené vyd. Praha: Karolinum, 2010. 134 s. ISBN 978-80-246-1880-7.

- LEON, Eyby; ZOU, Ying S.; MILUNSKY, Jeff M. Mosaic down syndrome in a patient with low-level mosaicism detected by microarray. *American Journal of Medical Genetics Part A* [online]. 2010, 152A, no. 12, s. 3154-3156 [cit. 2012-04-18]. ISSN 1552-4825. Dostupný z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.is.cuni.cz/doi/10.1002/ajmg.a.33739/pdf>>
- LIEHR, T. et al. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in patients with a 45,X/46,X,+mar karyotype - 17 new cases and a review of the literature. *Sexual Development* [online]. 2007, vol. 1, no. 6, 353–362 [cit. 2011-11-06]. ISSN 1661-5425 Dostupný z WWW: <<http://content.karger.com.ezproxy.is.cuni.cz/ProdukteDB/produkte.asp?Aktion=ShowFulltext&ArtikelNr=111767&Ausgabe=234190&ProduktNr=231547>>
- LIEHR, T.; CLAUSSEN, U.; STARKE, H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenetic & Genome Research* [online]. 2004, vol. 107, 1/2, s. 55-67 [cit. 2011-11-06]. ISSN 1661-5425. Dostupný z WWW: <<http://web.ebscohost.com/ehost/detail?sid=2e97948a-7dcb-4d23-94d9-523d0a3de956%40sessionmgr12&vid=1&hid=18&bdata=JnNpdGU9ZWhvc3QtbGl2ZQ%3d%3d#db=a9h&AN=14072385>>
- LIEHR, T.; WEISE, A. Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics.. *International Journal of molecular medicine* [online]. 2007, vol. 19, no. 5, s. 719-31 [cit. 2011-11-06]. ISSN 1107-3756. Dostupný z WWW: <<http://www.spandidos-publications.com/ijmm/19/5/719>>
- MÉGARBANÉ, André et al. The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: The past, present, and future of research and treatment of Down syndrome. *Genetics in Medicine* [online]. 2009, vol. 11, no. 9, s. 611-616 [cit. 2012-04-18]. ISSN 1098-3600. Dostupný z WWW: <<http://www.nature.com/gim/journal/v11/n9/full/gim200989a.html>>
- MILUNSKY, Aubrey; MILUNSKY, Jeff. *Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment* [online]. 6th ed. Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 978-1-4443-5821-6. Dostupný z WWW: <<http://books.google.com/books?id=yY-gIvbnRDUC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false.>>
- NEUMANN, David; HODÍK, Karel; ROZSÍVAL, Pavel. Turnerův syndrom. Variabilní klinický obraz haploinsuficience pseudoautosomálních genů a funkční disomie přirozeně inaktivovaných genů na X-chromosomu. *Postgraduální medicína* [online]. 2000, roč. 12, č. 4, s. 807-816 [cit. 2012-03-01]. ISSN: 1212-4184. Dostupný z WWW: <<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/turneruv-syndrom-454095>>
- NUSSBAUM, Robert; WILLARD, Huntington; MCINNES, Roderick. *Klinická genetika : Thompson & Thompson*. 1. vyd. Praha : Triton, 2004. 426 s. ISBN 80-7254-475-6.

- OLIVEIRA, C.; ALVES, C. The role of the SHOX gene in the pathophysiology of Turner syndrome. *Endocrinología y nutrición* [online]. 2011, vol. 58, no. 8, s. 433-42 [cit. 2011-11-06]. ISSN 1579-2021. Dostupný z WWW: <http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=90028498&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=412&ty=76&accion=L&origen=elsevier&web=www.elsevier.es&lan=en&fichero=12v58n08a90028498pdf001.pdf>
- PAPAVASSILIOU, Paulie et al. The phenotype of persons having mosaicism for trisomy 21/Down syndrome reflects the percentage of trisomic cells present in different tissues. *American Journal of Medical Genetics Part A* [online]. 2009, 149A, no. 4, s. 573-583 [cit. 2012-04-18]. ISSN 1552-4825. Dostupný z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.is.cuni.cz/doi/10.1002/ajmg.a.32729/pdf>>
- PATSALIS, Philippos C. et al. Detection and incidence of cryptic Y chromosome sequences in Turner syndrome patients. *Clinical Genetics* [online]. 1998, vol. 53, no. 4, s. 249-257 [cit. 2012-04-18]. ISSN 00099163. Dostupný z WWW: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0004.1998.tb02691.x>>
- SAGI, L. et al. Clinical significance of the parental origin of the X chromosome in turner syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* [online]. 2006, vol. 92, no. 3, s. 846-52 [cit. 2011-11-06]. ISSN 0021-972X. Dostupný z WWW: <<http://jcem.endojournals.org/content/92/3/846.long>>
- STUMM, M. et al. Molecular cytogenetic techniques for the diagnosis of chromosomal abnormalities in childhood disease. *European Journal of Pediatrics* [online]. 1999, vol. 158, no. 7, s. 531-536 [cit. 2012-04-18]. ISSN 0340-6199. DOI: 10.1007/s004310051140. Dostupný z WWW: <<http://search.proquest.com/docview/221932658/fulltextPDF/13641E5E97E144A9F1C/1?accountid=15618>>
- ŠANTAVÝ, Jiří; ŠANTAVÁ, Alena. Genetické příčiny: Fertilita a sterilita. *Postgraduální medicína* [online]. 2000, roč. 12, č. 4, 460-465 [cit. 2012-03-01]. ISSN: 1212-4184. Dostupný z WWW: <<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/geneticke-priciny-134342>>
- SCHINZEL, Albert. Tetrasomy 12p (Pallister-Killian syndrome). *Journal of medical genetics eJMG* [online]. 1991, vol. 28, no. 2, s. 122-5 [cit. 2012-03-19]. ISSN 1468-6244. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1016781/pdf/jmedgene00028-0052.pdf>>
- SHAFFER, Lisa G.; SLOVAK, Marilyn L.; CAMPBELL, Lynda J. *ISCN 2009: an international system for human cytogenetic nomenclature (2009)*. Unionville, CT: Karger, c2009, 138 s. ISBN 38-055-8985-9.

- STARKE, H. et al. Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype-phenotype correlation and classification. *Human genetics* [online]. 2003, vol. 114, no. 1, s. 51-67 [cit. 2011-11-06]. ISSN 0340-6717. Dostupný z WWW: <<http://search.proquest.com/docview/215528211/fulltextPDF/132BA1AB732181D8831/1?accountid=15618>>
- STOCHHOLM, K. et al. Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* [online]. 2006, vol. 91, no. 10, s. 3897-902 [cit. 2011-11-06]. ISSN 0021-972X. Dostupný z WWW: <<http://jcem.endojournals.org/content/91/10/3897.long>>
- SYBERT, Virginia P.; MCCAULEY, Elizabeth. Turner's syndrome. *The New England journal of medicine* [online]. 2004, vol. 351, no. 12, s. 1227-38 [cit. 2011-11-06]. ISSN 1533-4406. Dostupný z WWW: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra030360#t=citedby>>
- VERMEESCH, J. R., et al. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *European Journal of Human Genetics* [online]. 2007, vol. 15, no. 11, s. 1105–1114 [cit. 2012-03-20]. ISSN 1018-4813. Dostupný z WWW: <<http://www.eurogentest.org/web/files/public/unit1/J.%20Vermeesch.pdf>>
- WATTENDORF, D. J.; MUENKE, M. Klinefelter syndrome. *American Family Physician* [online]. 2005, vol. 72 [cit. 2012-03-01]. ISSN 0002-838X. Dostupný z WWW: <<http://search.proquest.com/docview/234262371/fulltextPDF/13534C3B42158EE3D17/1?accountid=15618>>
- WIKTOR, Anne; VAN DYKE, Daniel L. FISH analysis helps identify low-level mosaicism in Ullrich-Turner syndrome patients. *Genetics in medicine* [online]. 2004, vol. 6, no. 3, s. 132-5 [cit. 2012-03-20]. ISSN 1530-0366. Dostupný z WWW: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1097/01.GIM.0000127270.49902.56>>
- WOLFF, Dayna J.; VAN DYKE, Daniel L.; POWELL, Cynthia M. Laboratory guideline for Turner syndrome. *Genetics in medicine* [online]. 2010, vol. 12, no. 1, s. 52-5 [cit. 2012-03-20]. ISSN 1530-0366. Dostupný z WWW: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1097/GIM.0b013e3181c684b2>>
- ZAPLETALOVÁ, Jiřina et al. Turnerův syndrom. 1. vyd. Praha: Galén, 2003, 207 s. ISBN 80-7262-204-8.
- ZEMANOVÁ, Z. Detekce mozaicismu u žen s Turnerovým syndromem metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). *Časopis lékařů českých*. 1999, roč. 138, č. 13. ISSN 0008-7335.