

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra antropologie a genetiky člověka

STUDIUM ANEUPLOIDIÍ U LIDSKÝCH SPERMIÍ

Radek Veselý

Praha, 2006

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Jan Diblík

Garant: RNDr. Patrik Mottl, PhD

Obsah:

1. Úvod	3
2. Somatické a germinální buňky	3
3. Vývoj spermií	3
4. Meióza	5
5. Chromosomální aberace	8
5.1. Mechanismus vzniku aneuploidií	9
5.2. Frekvence aneuploidií	10
5.3. Paternální původ aneuploidií	11
5.4. Přehled nejčastějších aneuploidií u novorozenců	12
5.4.1. Přehled nejčastějších aneuploidií autosomů	12
5.4.1.1. Downův syndrom	12
5.4.1.2. Edwardsův syndrom	13
5.4.1.3. Patauův syndrom	13
5.4.2. Přehled nejčastějších aneuploidií gonosomů	14
5.4.2.1. Turnerův syndrom	14
5.4.2.2. Klinefelterův syndrom	15
5.4.2.3. XYY-syndrom	15
5.4.2.4. XXX-syndrom	16
6. Metody stanovení aneuploidií u lidských spermií	16
6.1. Fúze spermií s křeččími oocyty	16
6.2. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)	17
7. Frekvence aneuploidií jednotlivých chromosomů u lidských spermií	18
7.1. Pohlavní chromosomy a chromosom 21	20
8. Závěr	22
9. Seznam použité literatury	23

1. Úvod

Aneuploidie (trisomie nebo monosomie) je nejčastěji pozorovanou chromosomovou odchylkou u lidí, která se vyskytuje u nejméně 5 % rozpoznávaných těhotenství. Většina aneuploidních embryí zahyne již v děloze, čímž se aneuploidie stává hlavní příčinou spontánních potratů. I když jsou některé formy aneuploidie slučitelné se životem, bývá aneuploidie nejběžnější příčinou mentální retardace. V naprosté většině případů je vznik aneuploidie spojován s nondisjunkcí v průběhu meiotického dělení při tvorbě pohlavních buněk. U embryí je podíl aneuploidií způsobených poruchou meiotického dělení u otce rozdílný pro různé chromosomy. Stejně tak se u lidských spermií liší frekvence aneuploidií pro jednotlivé chromosomy. Některé chromosomy mají velice nízkou frekvenci disomie, zatímco chromosom 21 a pohlavní chromosomy vykazují větší tendenci k nondisjunkcím.

2. Somatické a germinální buňky

Buňky lidského těla můžeme rozdělit na buňky somatické (*soma* = tělo) a buňky zárodečné (germinální), z nichž vznikají gamety. Lidská somatická buňka obsahuje 23 párů chromosomů. 22 párů chromosomů je shodných u mužů i žen a nazývají se autosomy. Jsou číslovány v sestupné řadě od největšího (chromosom 1) k nejmenšímu (chromosomy 21 a 22). Jeden chromosom každého chromosomálního páru je zděděn od otce, druhý od matky. Zbývající chromosomální pár tvoří gonosomy, neboli pohlavní chromosomy. Ženy mají pár stejných pohlavních chromosomů, které se označují symbolem XX. U mužů jsou však pohlavní chromosomy odlišné. X chromosom je shodný s X chromosomem matky, je zděděn mužem od matky a je předáván jeho dcerám, druhým gonosomem je Y chromosom, který zdědil muž od otce a předává jej svým synům.

Zatímco somatické buňky mají diploidní (*diploos* = dvojitý) sadu chromosomů, neboli $2n$ sadu chromosomů, gamety mají haploidní (*haploos* = jednoduchý), neboli n sadu chromosomů (tj. 23 chromosomů) (Thompson & Thompson, 2004).

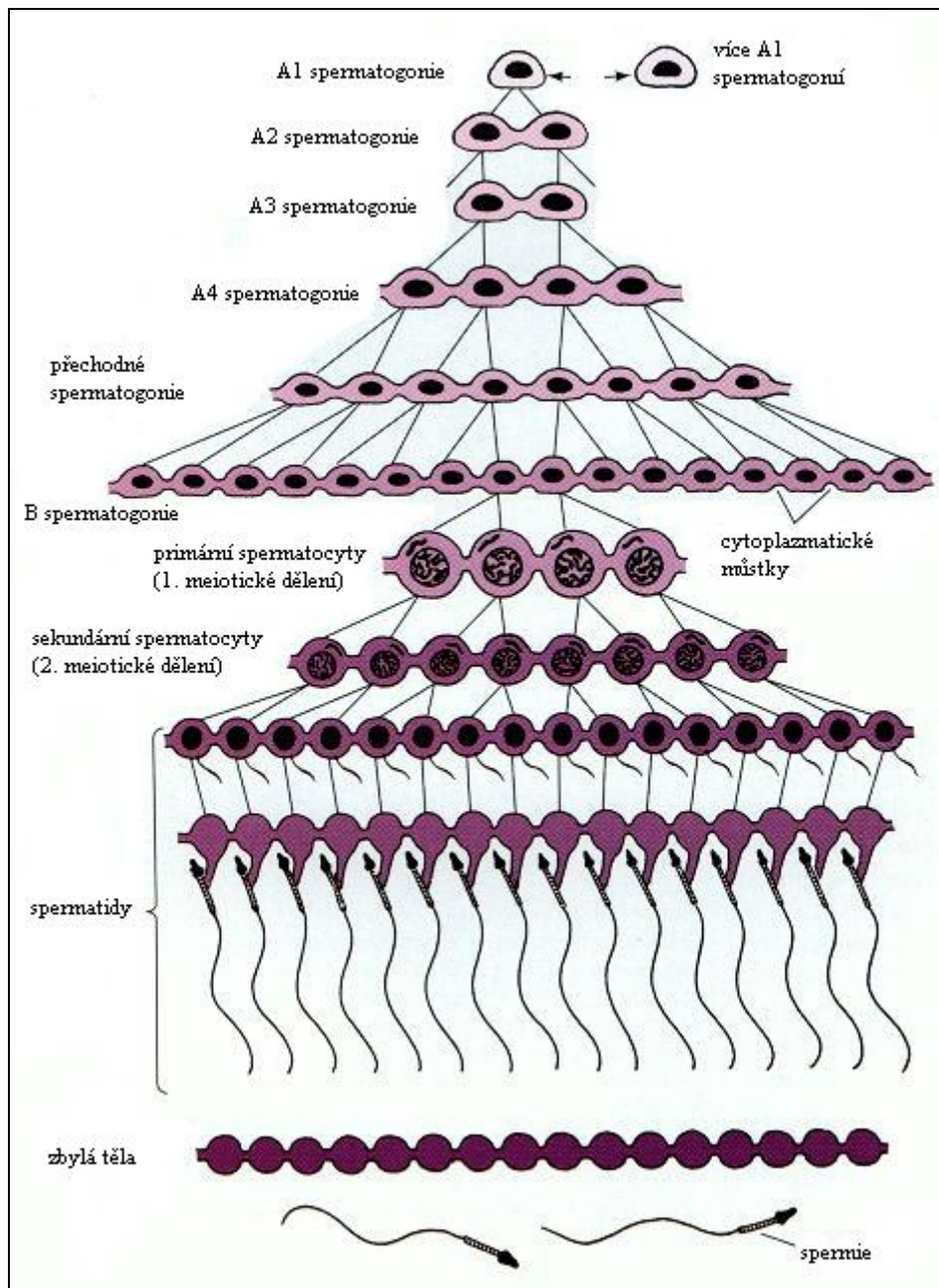
3. Vývoj spermií

Proces vývoje spermií lze rozdělit na dvě fáze: spermatogenezi (skládající se z fáze proliferace a meiózy) a spermiogenezi.

Spermatogeneze začíná u muže ve varlatech v semenotvorných kanálcích v období puberty. Na bázi semenotvorného epitelu testes je lokalizováno několik populací spermatogonií. Spermatogonie typu A představují populaci buněk, která za pomoci mitotického dělení zajišťuje po celý život řádné množství spermatogonií. Spermatogonie typu A dávají vzniknout spermatogoniím typu B, z nichž se systémem dělení stávají spermatocyty, které jsou připraveny opustit mitotický cyklus a vstoupit do meiózy. Spermatogonie vzniklé ze spermatogonií A jsou navzájem propojeny cytoplazmatickými můstky až do vzniku spermií. Produkce spermií je kontrolována počtem vzniklých spermatogonií typu B. Primárním spermatocytům trvá přibližně 24 dní, než první meiotické dělení dokončí. Po dokončení první fáze meiózy vznikají z primárních spermatocytů sekundární spermatocyty, které zůstávají spojeny plazmatickými můstky a mají zhruba poloviční velikost oproti primárním spermatocytům. Sekundární spermatocyty okamžitě vstupují do druhého meiotického dělení, které je oproti meióze I velice rychlé (trvá přibližně 8 hodin). Každý sekundární spermatocyt produkuje dvě nezralé haploidní gamety – spermatidy. Čtyři spermatidy vytvořené z jednoho primárního spermatocytu jsou stále navzájem propojené a obvykle jsou spojeny s dalšími přibližně sto spermatidami (Carlson, 2004). Nově vytvořené spermatidy jsou ještě o polovinu menší než sekundární spermatocyty. Spermatogenezi řídí Sertoliho buňky, které vystylají semenotvorné kanálky. Spermatidy se již dále nedělí, ale procházejí sérií změn, které je přemění z relativně běžně vypadajících buněk na vysoce specializované buňky - spermie. Proces transformace spermatid na spermie se nazývá spermiogeneze (viz obr. 1).

Po dokončení spermiogeneze (přibližně 64 dní od začátku spermatogeneze) je spermie plně diferencovaná a specializovaná buňka, která je dobře připravená k oplození vajíčka. Spermie se skládá z hlavičky (široké od 2 do 3 μm a dlouhé 4 až 5 μm) obsahující jádro a akrosom; ze střední části obsahující centrioly, proximální část bičíku a mitochondrie; a z ocásku (asi 50 μm dlouhého).

Každý den je v jednom varleti vyrobeno přibližně 100 miliónů spermií. V průběhu života je přítom muž schopen vyprodukovat mezi 10^{12} až 10^{13} spermií (Gilbert, 2003).



Obr. 1. Schéma vývoje spermií. Převzato a upraveno z Gilbert (2000).

4. Meióza

Meióza je redukční dělení, které nastává v průběhu zrání a diferenciace pohlavních buněk (spermatogeneze a oogeneze). Její význam je v zásadě trojí. (1) Redukce počtu chromosomů z diploidního ($2n$) na haploidní (n) počet, čímž je v každé generaci zachován stejný počet chromosomů. (2) Promíchání genetického materiálu náhodným rozdělením homologů. (3) V jejím průběhu se odehrává rekombinace genetického materiálu, což

zajišťuje, že gamety produkované meiotickým dělením nejsou ani v jednom případě vzájemně identické (Carlson, 2004).

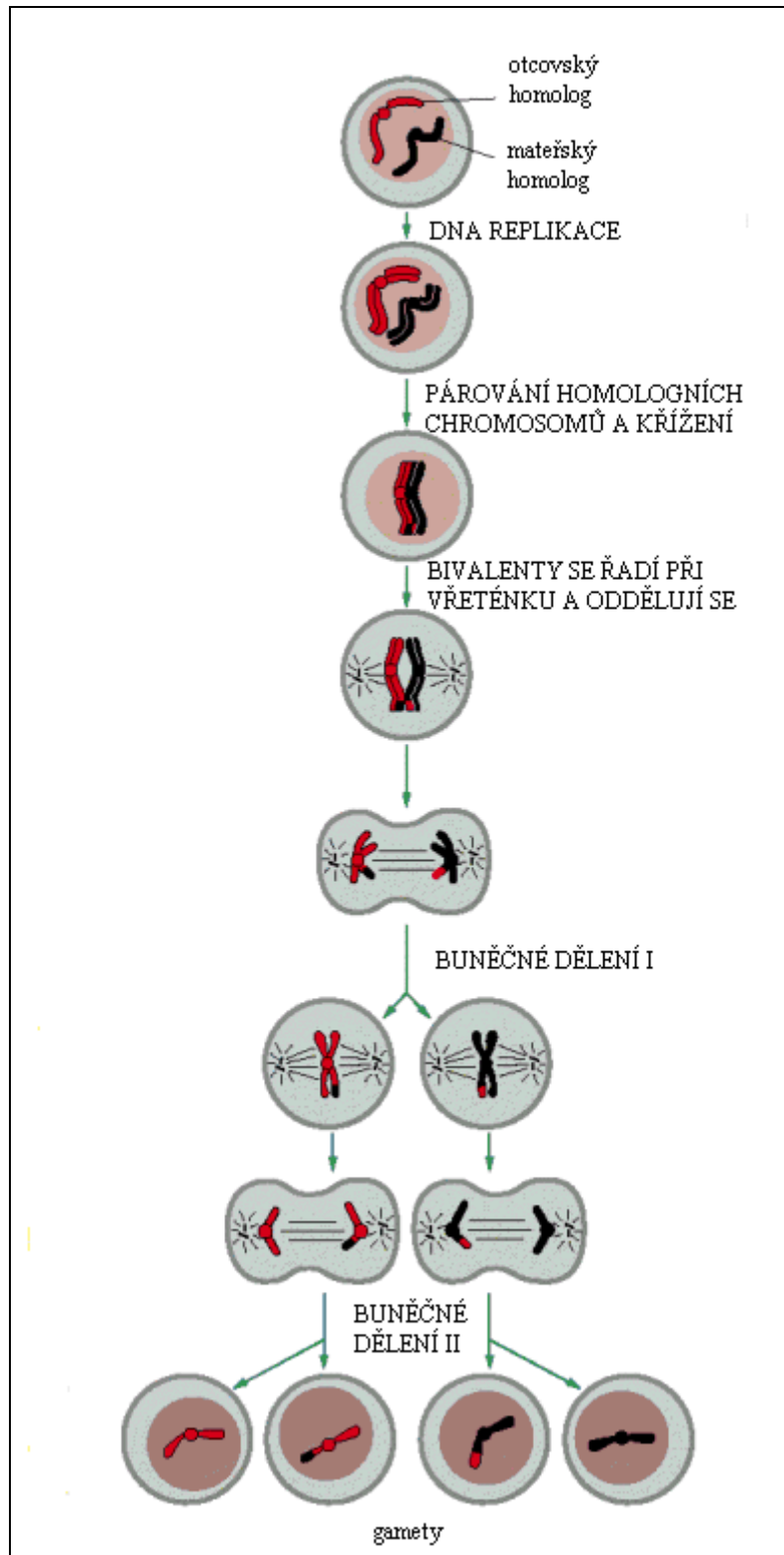
Meióza obsahuje dvě po sobě jdoucí dělení (první a druhé meiotické dělení), kterému předchází jen jedna replikace DNA (viz obr. 2). Profáze prvního meiotického dělení je komplikovaný proces a je značně odlišný od profáze druhého meiotického dělení. V zygotenním stadiu dochází k párování homologních chromosomů. Tyto synapse spolu drží pomocí synaptonemálního komplexu. V pachytenním stadiu je synapse dokončena a každý pár homologů se jeví jako bivalent. V této fázi dochází také ke crossing-overu (výměna homologních úseků DNA mezi nesesterskými chromatidami homologních chromosomů). Po rekombinaci synaptonemální komplex mizí a bivalenty se od sebe začínají oddalovat. Nakonec je každý bivalent spojen jen v místech zvaných chiasmata, která jsou považována za místa, kde proběhl crossing-over. Průměrný počet chiasmata v lidských spermatocytech je 50, tzn. několik v každém bivalentu (Thompson & Thompson, 2004) .

V metafázi I dochází k vymizení jaderného obalu, k vytvoření dělicího vřeténka a k seřazení spárovaných chromosomů v ekvatoriální rovině.

V anafázi I se oba homologní chromosomy každého bivalentu pohybují odděleně k protilehlým pólům buňky. Tento proces se nazývá disjunkce. Tím, že se rozchází celé chromosomy a nikoliv celé chromatidy, se počet chromosomů redukuje na polovinu a každý buněčný produkt prvního meiotického dělení má haploidní počet chromosomů. Bivalenty se rozdělují nezávisle na sobě a vytváří se náhodné kombinace. Pokud oba chromosomy putují na stejnou stranu buňky, pak dochází k poruše zvané nondisjunkce a vzniku aneuploidních spermií.

V průběhu poslední fáze prvního dělení (telofáze I) se obě haploidní sady chromosomů shluknou v opačných pólech buňky a ta se pak rozdělí.

Druhé meiotické dělení je podobné mitotickému kromě toho, že do meiózy II vstupují haploidní buňky. Konečným výsledkem jsou čtyři haploidní buňky, z nichž každá obsahuje 23 chromosomů.



Obr. 2. Schéma meiózy. Převzato a upraveno z Alberts *et al.* (2002).

5. Chromosomální aberace

Aberace chromosomů mohou být numerické nebo strukturní. Mohou postihnout jeden nebo více autosomů, pohlavní chromosomy nebo autosomy i gonosomy současně. Konkrétní odchylky chromosomů mohou být přítomny ve všech buňkách těla nebo jen v některých tkáních. Stav, kdy jsou chromosomové odhylky přítomny jen v některých buňkách, nazýváme mozaicismus.

Jako heteroploidní označujeme takovou sadu, která obsahuje jiný počet chromosomů než 46. Přesný násobek haploidního počtu chromosomů (n) nazýváme euploidní. U člověka byly popsány kromě diploidního počtu ($2n$), který je charakteristický pro normální somatické buňky, ještě triploidie ($3n$) a tetraploidie ($4n$). Zatímco tetraploidie byly zjištěny jen u plodů potracených v časně fázi těhotenství, triploidní novorozenci se ve výjimečných případech žít narodit mohou, ale doba přežití je velice krátká. Tyto polyploidie mohou vznikat několika mechanismy. K triploidii nejčastěji dochází oplozením vajíčka dvěma spermii (tzv. dispermií) nebo selháním jednoho meiotického dělení ve spermii (oocytu), čímž vzniká diploidní spermie (oocyt). Tetraploidní buňky obsahují vždy chromosomální sestavu $92,XXXX$ nebo $92,XXYY$. Proto se usuzuje, že tetraploidie vzniká následkem poruchy neumožňující dokončit první dělení rýhující se zygoty.

Jako aneuploidní označujeme takový defektní počet chromosomů, který není celým násobkem n . Aneuploidie můžeme rozdělit na trisomie a monosomie. Trisomie je stav, kdy se jeden z chromosomů vyskytuje třikrát (počet chromosomů je tedy $2n + 1$). Při monosomii se jeden z chromosomů vyskytuje pouze v jedné kopii (počet chromosomů je tedy $2n - 1$). Může ovšem docházet i k tzv. dvojnásobné trisomii, kdy se v nadbytečné kopii vyskytují chromosomy dva a jejich počet je tedy $2n + 1 + 1$.

U spermii (a gamet obecně) se můžeme setkat i s pojmem disomie a nulisomie. Pojmem nulisomie označujeme spermii, které chybí jeden z chromosomů a má tedy počet chromosomů $n-1$. Jako disomickou spermii nazýváme tu, které naopak jeden chromosom přebývá ($n+1$) (Downie *et al.*, 1997a).

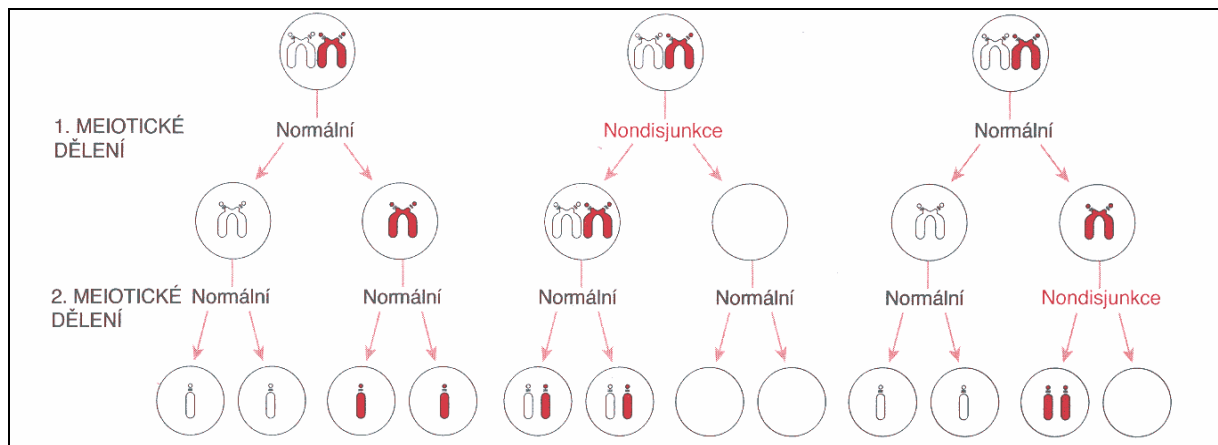
Strukturní přestavby chromosomů vznikají jako následek chromosomových zlomů a jejich reparace. Tyto změny ve struktuře chromosomů mohou být buď stabilní (delece, duplikace, inverze, inzerce, translokace a izochromosom) a nebo nestabilní (dicentrické, acentrické a kruhové chromosomy). Jako stabilní označujeme ty přestavby, které jsou schopné v nezměněné formě absolvovat buněčné dělení. Naproti tomu nestabilní formy nejsou

schopné překonat normální buněčné dělení. Nestabilita je způsobena ztrátou nebo nefunkčností centromer u takto přestavěných chromosomů.

5.1. Mechanismus vzniku aneuploidii

Vznik aneuploidii u lidských spermií je způsoben nondisjunkcí v průběhu buněčného dělení. Při tomto procesu dochází k neoddělení páru chromosomů nebo sesterských chromatid od sebe. K nondisjunkcím může docházet v průběhu prvního meiotického dělení, druhého meiotického dělení nebo v průběhu mitózy. Pokud nondisjunkce nastane v průběhu prvního meiotického dělení, tak výsledkem budou dva druhy gamet a žádná nebude normální. Buď bude gameta obsahovat chromosom jak maternálního, tak paternálního původu, nebo v gametě onen chromosom nebude přítomen vůbec. Pokud se ovšem nondisjunkce uskuteční až v průběhu druhého meiotického dělení, tak abnormální gamety budou obsahovat buď dvě kopie postiženého chromosomu (obě však od jediného rodiče), a tedy dvojnásobné množství, nebo v nich onen chromosom nebude opět přítomen (při označování původu chromosomu nepočítáme s vlivem crossing-overu) (viz obr. 3). Je možná i kombinace obou výše zmíněných poruch dohromady - nondisjunkce jak při prvním, tak současně i při druhém meiotickém dělení. Takovéto anomálie jsou ovšem velice vzácné (s výjimkou aberací pohlavních chromosomů). Další možností je vícenásobná aneuploidie, kdy nondisjunkce postihne více chromosomů najednou.

K nondisjunkci může ovšem dojít i při mitotickém dělení po vytvoření zygoty. Pokud k chybě dojde v časném postzygotickém mitotickém dělení, vznikají dvě linie buněk. Tato situace se nazývá mozaicismus. Daný jedinec má potom v těle přítomny různé buňky o dvou nebo více různých chromosomálních konstitucích.



Obr. 3. Odlišné důsledky nondisjunkce v prvním (uprostřed) a druhém meiotickém dělení (vpravo) ve srovnání s normálním rozchodem chromosomů (vlevo). Převzato z Thompson & Thompson (2004).

5.2. Frekvence aneuploidií

Meióza je u eukaryotních organismů velice konservovaný proces. Například u kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) je frekvence aneuploidie v meióze pouze 1 případ na 10 000 (Sears *et al.*, 1992). U savců je obecně výskyt numerických aberací o něco vyšší. Například u myši je frekvence meiotických chyb mezi 1-2 % (Bond & Chandley, 1983 podle Buwe *et al.*, 2005). Naproti tomu lidé se musí vyrovnat s mnohem většími hodnotami frekvence aneuploidie. U lidských oplozených oocytů je četnost aneuploidií odhadována na 10-30% (Hassold & Hunt, 2001). U neoplozených oocytů se počítá s frekvencí chromosomálních abnormalit kolem 22% (Pellestor *et al.*, 2002). U lidských spermiích je hodnota všech chromosomálně abnormálních spermií (včetně strukturálních vad) nejméně 6,7 % (Vidal *et al.*, 2001).

Aneuploidie je proto překvapivě častá aberace, která se vyskytuje u 0,3 % živě narozených jedinců, u 4 % mrtvorozených dětí (myšlena smrt plodu mezi 20. týdnem těhotenství a porodem) a u 35 % potracených plodů (spontánní potrat zárodku mezi 6-8. týdnem až 20. týdnem) (Hassold *et al.*, 1996). Většina aneuploidií je letálních a zárodky je nesoucí jsou spontánně potraceny v časně fázi embryonálního vývoje. Nejčastější příčinou spontánního potratu plodu je monosomie X chromosomu (45,X), která je příčinou 10 % spontánních potratů a trisomie autosomu 16 (21,5%), které spolu s trisomií 21 a 22 představují 50 % všech aneuploidií přítomných u potracených plodů (Eiben *et al.*, 1990; Hassold & Hunt, 2001).

Některé chromosomové abnormality ovšem mohou být slučitelné se životem. Jedná se například o trisomie chromosomů 13, 18, 21 a aneuploidie pohlavních chromosomů. Jedinci s těmito chromosomálními aberacemi mohou mít mentální a fyzické poruchy, mohou být neplodní, časté jsou též problémy v chování a narušený sexuální vývoj (Martin, 2005).

5.3. Paternální původ aneuploidií

Podíl paternálního původu chromosomálních anomálií se odhaduje na 0-30 % u autosomálních trisomií a na 50-100 % u trisomií pohlavních chromosomů (Hassold & Hunt, 2001). Jak je vidět, podíl aneuploidií způsobených poruchou meiotického dělení u otce je rozdílný pro různé chromosomy.

U autosomálních trisomií jsou to spíše poruchy v maternální meióze (a zpravidla meióza I), které způsobují aneuploidie plodu. Tak například u Downova syndromu (trisomie 21) je otcovský původ odhadován jen u přibližně 5 % případů (Antonarakis, 1991; Sherman *et al.*, 1991; Zaragoza *et al.*, 1994). U dalších autosomálních trisomií nalézáných u spontánně potracených plodů a novorozenců je procento případů způsobených poruchou v paternální meióze také nízké a pohybuje se mezi 5-10 % (Hassold & Hunt, 2001). Jako výjimka působí trisomie 2, kde přibližně 28 % případů má paternální původ (Hassold *et al.*, 1996; Zaragoza *et al.*, 1998). Naproti tomu u trisomie chromosomu 16 je paternální původ velice vzácný, pokud je vůbec nějaký (Hassold *et al.*, 1995). Na rozdíl od ostatních trisomií je hlavní příčinou trisomie 7 mitotická nondisjunkce (v 57 % případů) (Zaragoza *et al.*, 1998).

V porovnání k autosomálním aneuploidiím je paternální původ u většiny aneuploidií pohlavních chromosomů častější, ovšem i zde je rozpětí široké. Otcovský příspěvek k těmto aberacím kolísá od 6 % u XXX-syndromu (47,XXX), přes 50 % u Klinefelterova syndromu (47,XXY), až po 100 % u XYY-syndromu (47,XYY). U 80 % případů s monosomií chromosomu X chybí paternální chromosom X (Hassold *et al.*, 1988; Mathur *et al.*, 1991). Odhaduje se, že více jak 50 % všech aneuploidií pohlavních chromosomů vzniká nondisjunkcí v mužské meióze (Wyrobek *et al.*, 2000 podle Buwe *et al.*, 2005).

5.4. Přehled nejčastějších aneuploidií u novorozenců

Trisomie chromosomů 13, 18 a 21 a aneuploidie chromosomů X a Y jsou zodpovědné za 95 % chromosomálně podmíněných vývojových vad novorozenců (Hassold & Jacobs, 1984).

5.4.1. Přehled nejčastějších aneuploidií autosomů

5.4.1.1. Downův syndrom (47,XX,+21 nebo 47,XY,+21)

Tento syndrom byl poprvé klinicky popsán v roce 1866 Johnem Langdonem Downem a právě po něm nese své jméno. Až v roce 1959 však bylo zjištěno, že molekulární podstatou tohoto syndromu je trisomie 21. Mezi charakteristické projevy Downova syndromu patří mentální retardace, hypotonie a abnormality na obličeji, rukách a nohách, které zahrnují mongoloidní vzhled obličeje, zešíkvení očních štěrbin, ploché záhlaví, makroglosii, malé ušní boltce a krátké široké prsty. Častý je u těchto pacientů také výskyt vrozených vývojových vad srdce, šedý zákal, artrézie střeva, zvýšené riziko vzniku leukémie či větší náchylnost k infekcím dýchacích cest.

I když patří Downův syndrom mezi trisomie, které mohou být slučitelné se životem, 80 % zárodků s trisomií 21 je spontánně potraceno (Hook *et al.*, 1995) a jen zhruba 88 % dětí se dožívá 1 roku života. Průměrný věk pacientů s Downovým syndromem je sice zkrácen, ale více jak 50 % se jich dožívá 50 let (Baird & Sadovnick, 1989). Uvádí se, že incidence této choroby je přibližně 1 případ na 700 živě narozených dětí (Hassold & Jacobs, 1984), čímž se tento syndrom stává nejčastější příčinou mentální retardace (Sherman *et al.*, 2005).

Více než 95 % případů je způsobenou volnou trisomií chromosomu 21, která vzniká následkem nondisjunkce páru chromosomu 21 při vzniku gamet. Ze zbývajících 5 % je za 1 % případů odpovědná nondisjunkce během mitotického dělení v somatických buňkách vedoucí k mozaicismu a zbytek je způsoben translokacemi zahrnujícími chromosom 21 (Sherman *et al.*, 2005).

Přes 90 % případů má původ v přítomnosti nadbytečného mateřského chromosomu, většinou zapříčiněnou nondisjunkcí v první fázi meiotického dělení (Hassold *et al.*, 1996). Zbývajících necelých 5-10 % je způsobeno poruchou meiózy u otce, zde však většinou ve druhém meioickém dělení.

5.4.1.2. Edwardsův syndrom (47,XX,+18 nebo 47,XY,+18)

Edwardsův syndrom popsal jako první John Edwards v roce 1960. S incidencí 1 případ na 7500 živě narozených je druhou nejčastější trisomií. Přibližně 4/5 přeživších postižených jedinců je ženského pohlaví. To je způsobeno pravděpodobně tím, že zárodky mužského pohlaví mají menší šanci na přežití. Celkově je asi 95 % embryí s trisomií 18 spontánně potraceno (Buwe *et al.*, 2005). Doba přežití delší než několik měsíců je vzácností, více jak 90 % jedinců s diagnózou Edwardsova syndromu umírá do 1 roku života.

Mezi charakteristické projevy Edwardsova syndromu patří mentální retardace, neprospívání, hypertonie a četné malformace.

Stejně jako u trisomie 21 je fenotyp tohoto syndromu důsledkem volné trisomie. V 95 % případů pochází nadbytečný chromosom od matky, zatímco pouze u 5 % spontánně potracených embryí a novorozenců má chromosom 18 paternální původ (Jacobs & Hassold, 1995). U asi 10 % případů jsou zastoupeny mozaiky a translokační formy. V drtivé většině případů je chromosom mateřský, ale na rozdíl od ostatních aneuploidii je způsoben nondisjunkcí v průběhu druhého meiotického dělení (Hassold & Hunt, 2001).

5.4.1.3. Patauův syndrom (47,XX,+13 nebo 47,XY,+13)

Patauův syndrom diagnostikoval jako první Klaus Patau v roce 1960. Jedná se o třetí nejčastější trisomii. Přibližně 98 % postižených dětí umírá před narozením (Jacobs *et al.*, 1987). 82 % pacientů umírá do prvního měsíce života (Best, 2002). Třetina těchto dětí se rodí předčasně.

U pacientů se vyskytuje růstová a těžká mentální retardace, kterou doprovázejí mnohé malformace centrálního nervového systému, oběhového a urogenitálního systému (Duarte *et al.*, 2004). Patrné jsou mnohočetné malformace na obličeji a končetinách.

Většina případů Patauova syndromu je způsobena volnou trisomií chromosomu 13. Přibližně jedna třetina případů je způsobena translokací nebo mozaikou. Nadbytečný chromosom zpravidla pochází od matky a nejčastěji je způsoben nondisjunkcí v průběhu prvního meiotického dělení.

5.4.2. Přehled nejčastějších aneuploidií gonosomů

Mezi nejčastější aneuploidie pohlavních chromosomů řadíme Turnerův syndrom (45,X), Klinefelterův syndrom (47,XXY), XYY-syndrom (47,XYY) a XXX-syndrom (47,XXX). Tyto aberace jsou méně závažné než aneuploidie autosomů a projevují se převážně anomáliemi pohlavních orgánů a poruchami reprodukce a mnoho jedinců zůstává až do období puberty neidentifikováno.

5.4.2.1. Turnerův syndrom

Fenotypové projevy této gonosomální aberace byly poprvé popsány roku 1938 Henry Turnerem, ale karyotyp určil až Ford roku 1959.

Monosomie chromosomu X, neboli Turnerův syndrom, je gonosomální aberace s incidencí přibližně 1 případ na 3 000 živě narozených dívek a jedná se o jedinou monosomii, která byla nalezena u živého novorozence (Buwe *et al.*, 2005). Přestože je tato chromosomální aberace slučitelná se životem, dochází ke spontánnímu potratu u 99 % embryí s karyotypem 45,X (Jacobs & Hassold, 1995). Na rozdíl od ostatních aneuploidií gonosomů, lze pacientky s Turnerovým syndromem identifikovat na základě výrazných fenotypových znaků již po narození (kožní duplikatura na krku, lymfedémy na rukách a nohách) nebo před pubertou (malá postava, kožní duplikatura na krku, široký hrudník, nízká vlasová hranice na šíji, hypogenitalismus). Výskyt mentální retardace není u pacientek s Turnerovým syndromem zvýšen, ovšem může u nich docházet k poruchám sociálního chování.

Chromosomovou konstituci 45,X má 50 % pacientek (Mathur *et al.*, 1991). U asi 80% případů je X chromosom mateřského původu (Hassold *et al.*, 1988), což znamená, že k nondisjunkci v meióze dochází převážně u otce.

Druhá polovina pacientek má však jiný karyotyp. Nejčastější je mozaika 45,X/46,XX. Linie buňek s normálním karyotypem 46,XX zmírňují fenotypové projevy Turnerova syndromu – čím vyšší je jejich procentuální zastoupení, tím jsou fenotypové projevy syndromu mírnější. Mozaikové formy mohou být i jiných kombinací, např. 45,X/47,XXX; 45,X/46,XX/47,XXX. Vzácně se vyskytují i mozaiky s klonem buněk XY, což vede opět ke zmírnění projevů Turnerova syndromu, ale zároveň je možné pozorovat různý stupeň maskulinizace. Časté jsou rovněž strukturní aberace (delece, výskyt kruhového chromosomu a izochromosomů).

5.4.2.2. Klinefelterův syndrom

Klinefelterův syndrom je jedna z nejčastějších chromosomálních aberací u mužů a její incidence je 1 případ na 1000 živě narozených chlapců. Příčinou je obvykle kombinace chromosomů 47,XXY. Potraceno je přibližně 45 % embryí s karyotypem 47,XXY (Jacobs & Hassold, 1995).

Tento syndrom poprvé popsal Harry Klinefelter roku 1942. Pacienti s Klinefelterovým syndromem bývají vysocí a hubení s poměrně dlouhýma nohama. Až do puberty se zdají fenotypicky normální, pak se ale začínají objevovat znaky hypogonadismu. Jedinci jsou eunuchoidní a převážně neplodní v důsledku hypoplázie varlat. Fenotypové projevy choroby velice kolísají, proto u některých mužů postižených Klinefelterovým syndromem byla diagnóza stanovena až v průběhu léčby neplodnosti. Mnoho pacientů má problémy s psychosociální přizpůsobivostí.

Zhruba polovina případů je způsobena poruchou mateřské meiózy (ze dvou třetin meóza I), druhá polovina případů má příčinu v nondisjunkci v průběhu prvního meiotického dělení u otce (Lorda-Sanchez *et al.*, 1992). I u Klinefelterova syndromu se vyskytuje velká řada mozaikových forem se značně variabilními fenotypy (mozaikové formy tvoří asi 20% všech případů Klinefelterova syndromu). Nejčastější mozaikou u Klinefelterova syndromu je 46,XY/47,XXY (Foresta *et al.*, 1998). Stejně tak existuje u Klinefelterova syndromu několik variant, které mají jiný karyotyp než 47,XXY. Z cytogenetického hlediska jde o polysómie chromosomů X a Y. Mezi nejčastější patří karyotypy 48,XXXXY, 48,XXYY a 49,XXXXXY. Je pravidlem, že se stoupajícím počtem X chromosomů dochází k prohloubení mentální retardace, zhoršení pohlavního vývoje a prohloubení dysmorfických znaků.

5.4.2.3. XYY-syndrom (47,XYY)

XYY-syndrom (v některých publikacích nazývaný též jako Supermale syndrom) má incidenci odhadovanou na 1 případ na 1000 živě narozených chlapců. Riziko spontánního potratu plodu je oproti Turnerovu a Klinefelterovu syndromu minimální (blíží se k 0 %), čímž se tato aberace stává jedinou chromosomální numerickou odchylkou nezvyšující riziko potratu (Jacobs & Hassold, 1995). Tito muži se obvykle výrazněji neliší od jedinců s normálním karyotypem 46,XY. V porovnání s normálními muži jsou jedinci s XYY-syndromem vyšší a ve větší míře se u nich projevují obtíže při výchově a vzdělávání, u některých se projevuje mírné snížení hodnoty IQ.

Zajímavé je, že většina potomků těchto mužů má normální karyotyp a podíl spermií s konstitucí 24,YY a 24,XY u mužů s karyotypem 47,XYY nepřekračuje 1 %. Tyto výsledky naznačují, že v průběhu meiózy dochází ke ztrátě nadbytečného Y chromosomu. Zdá se, že extra Y chromosom aktivně eliminován z XYY buněk, nebo je náhodně ztracen z primitivních zárodečných buněk či spermatogonií a následnou selektivní proiferací XY buněčné linie odstraněn, není známo (Shi & Martin, 2000a).

Cytogenetickým podkladem je gonosomální trisomie (47,XYY), ke které dochází v důsledku nondisjunkce při druhém meiotickém dělení u muže, kdy vzniká spermie s konstitucí YY. Kromě klasického typu byly zjištěny i různé mozaikové formy.

5.4.2.4. XXX-syndrom (47,XXX)

Ženy postižené trisomií chromosomu X (v některé literatuře nazýváno jako Superfemale syndrom) mají obvykle normální fenotyp (až na poněkud vyšší postavu) a mírně snížené IQ. Frekvence výskytu tohoto syndromu je přibližně 1 na 1000 narozených děvčat, i když vzhledem k nevýrazným fenotypovým projevům zůstává mnoho případů nediodagnostikováno, nebo je porucha prvně odhalena až při léčbě neplodnosti. Většina pacientek ale zůstává fertálních, dokonce ani nebyl prokázán zvýšený výskyt chromosomálních vad u potomstva (Mau-Holzmann, 2005).

Potráceno je přibližně 30 % embryí s chromosomální konstitucí 47,XXX (Jacobs & Hassold, 1995) a naprostá většina případů je způsobena nondisjunkcí v první maternální meióze.

6. Metody stanovení aneuploidií u lidských spermiích

6.1. Fúze spermiích s křeččími oocyty

První přímé studie zaměřené přímo na aneuploidie u lidských spermiích byly provedeny až po roce 1978, kdy byla zavedena technika fúze spermiích s křeččími oocyty (Rudak *et al.*, 1978 podle Templado *et al.*, 2005). Chromosomy v jádru spermie jsou totiž kondenzovány, takže jádro má zmenšený objem a hmotnost. Nejsou tak dostupné pro standardní cytogenetické vyšetření. Aby je bylo možné vyšetřit standardními pruhovacími metodami, je nutné spermii fúzovat s oocytom, což vede k dekonenzaci jejího jádra, které se následně dá

nafixovat ve stadiu metafáze mitózy. Pro toto vyšetření se používají právě křeččí oocyty. V praxi se ale toto velice náročné vyšetření již příliš neprovádí. Tato metoda má totiž podstatné nevýhody: spermie musí být schopná oplodnit křeččí oocyt, technika provedení je velice obtížná a časově náročná a možný počet analyzovaných spermií je nízký (v lepších případech v řádu stovek gamet). Pouze 12 laboratoří na světě mělo úspěch s touto metodou (Martin, 2005).

6.2. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Základem této metody je denaturace studované DNA. Vzniklá jednořetězcová cílová DNA poté hybridizuje se značenou (obdobně denaturovanou) jednořetězcovou DNA sondou (Liehr & Claussen, 2002). Metoda umožňuje detekci jak jednotlivých chromosomů, tak i specifických sekvencí (např. subtelomerických sekvencí).

DNA sondy pro FISH mohou být značeny přímo fluorochromem a nebo nepřímo pomocí biotinu či degoxigeninu (Liehr & Claussen, 2002).

Rozlišuje se mnoho sond používaných pro FISH, pro numerické aberace ve spermiích se ale nejčastěji používají sondy založené na α -satelitní DNA. Tyto sondy odpovídají α -satelitním sekvencím, které se nacházejí ve všech lidských chromosomech. α -satelitní DNA je přítomna v centromerách lidských chromosomů v tisících tandemově se opakujících kopiích základní jednotky o délce 171 bp. Každá lidská centromera obsahuje jeden hlavní alfa satelitní úsek DNA. Jeho velikost se pohybuje přibližně od 250 kb na chromosomu Y až po 5000 kb na chromosomu 11 (Lee *et al.*, 1997). Proto jsou výsledkem hybridizace s centromerickými sondami obvykle velké silné signály.

Použití centromerických sond je však limitováno tím, že některé chromosomy mají satelitní DNA sekvenci velice podobnou (13 a 21; 14 a 22). Např. chromosomy 13 a 21 vykazují 99,7 % sekvenční homologii v oblasti centromery (Charlieu *et al.*, 1992).

V praxi je často užitečné analyzovat při jedné reakci co nejvíce chromosomů. Pro každý studovaný chromosom tedy sonda musí být značená jiným fluorochromem. V praxi jsou dostupné sady s maximálně 5 různě značenými sondami. Takovouto metodu pak nazýváme multicolor-FISH.

FISH nám oproti předchozí metodě (fúze spermií s křeččími oocyty) poskytuje mnohem rychlejší a jednodušší alternativu pro studium aneuploidii u lidských spermií

(Shi & Martin, 2000b) a jsme s ní schopni sledovat i daleko větší vzorek spermií (v řádu tisíců) (Templado *et al.*, 2005).

7. Frekvence aneuploidií jednotlivých chromosomů u lidských spermií

Většina výzkumů zabývajících se odhadem frekvence aneuploidií u jednotlivých chromosomů v lidských spermiích byla provedena metodou FISH. Jelikož se před objevem této metody pro studium aneuploidií používala metoda fúze spermií s křeččími oocyty, existuje také poměrně dost studií, kde byla použita i tato technika.

Bohužel ani jeden z těchto technických přístupů není schopen podat přesnou informaci o výskytu nulisomií u spermií. Zvýšený počet nulisomií oproti disomiím byl pozorován u většiny studií a může být způsoben ztrátou chromosomu při fúzi spermií s křeččími oocyty (Templado *et al.*, 1988), poruchou hybridizace (Downie *et al.*, 1997a; Guttenbach *et al.*, 1997) nebo překryvem signálů při FISH (Iourov *et al.*, 2005). Předpokládá se, že hlavní mechanismus vedoucí k aneuploidii u spermií je nondisjunkce, zahrnující ve stejném poměru (1:1) jak ztrátu, tak získání chromosomu navíc (Marquez *et al.*, 1996). Pokud vezmeme tento fakt v úvahu, tak k odhadu frekvence aneuploidie u lidských spermií můžeme použít hodnotu frekvence disomie vynásobenou dvěma (Templado *et al.*, 2005).

Většina FISH studií na dekonzenzovaných jádrech lidských spermií zabývajících se frekvencí numerických aberací (disomií) byla provedena na normálních zdravých mužích (Downie *et al.*, 1997a; Guttenbach *et al.*, 1997; Shi & Martin, 2000b). Přesto se hodnoty frekvencí disomií u jednotlivých studií značně liší. Příčinou je mezidárcovská heterogenita a rozdílná metodologie užívaná v každé laboratoři (hlavně typ DNA sondy, hodnotící kriteria a počet analyzovaných spermií).

V review (Shi & Martin, 2000b) je průměrná frekvence aneuploidií ve spermiích normálních mužů analyzovaných metodou FISH (dvojbarevná a tříbarevná FISH) odhadována na 0,15 % pro každý z autosomů a 0,26 % pro pohlavní chromosomy. Chromosomy 14, 21, 22 a pohlavní chromosomy vykazují signifikantně vyšší frekvenci disomie.

V dalším review (Templado *et al.*, 2005) byla spočítána celková frekvence disomie u lidských spermií u normálních mužů ze tří velkých studií (Brandriff & Gordon, 1990 podle Templado *et al.*, 2005; Martin & Rademaker, 1990; Templado *et al.*, 1996) prováděných fúzí

spermií s křeččími oocyty a došlo se k číslu pohybujícímu se mezi 0,7 % a 1,7 %. Pro jednotlivé chromosomy byla zjištěna zvýšená frekvence disomie u chromosomu 1 (Brandriff & Gordon, 1990), chromosomu 9 (Martin & Rademaker, 1990), chromosomu 21 (Templado *et al.*, 1996) a u pohlavních chromosomů (Martin & Rademaker, 1990; Templado *et al.*, 1996). Pokud se tato data dají dohromady, pak nejvyšší procento disomie má chromosom 1 (0,09 %), 21 (0,09 %) a pohlavní chromosomy (0,11 %). Průměrná disomická frekvence je 0,03 % pro každý z autosomů (rozpětí od 0,006 % do 0,9 %), 0,11 % pro pohlavní chromosomy a odhadovaná incidence aneuploidie (2x disomie) je 1,8 %.

Dále je v review (Templado *et al.*, 2005) odhadována celková frekvence disomie u spermií na základě 29 studií publikovaných mezi lety 1995 a 2004. Mezi tyto práce byly zahrnuty jen ty, které byly prováděny metodou multicolor-FISH a byla při nich používána podobná metodologie a podobná hodnotící kritéria: minimálně 10 000 spočítaných spermií na jedince; dva signály (signály stejné barvy) vzdálené alespoň průměr signálu; takový počet signálů, kdy je možné odlišit mezi disomickou a diploidní spermií (tedy dvojbarevná FISH pro autosomy a třibarevná FISH pro pohlavní chromosomy). V těchto studiích bylo souhrně hodnoceno 18 ze 24 chromosomů a průměrná frekvence disomií je pro většinu chromosomů podobná (pohybuje se v rozmezí od 0,03 % po 0,12 %). Výjimku tvoří chromosomy 3, 21, 22 a pohlavní chromosomy, které vykazují vyšší frekvenci.

Disomie chromosomu 3 byla publikována pouze v jediné studii (Downie *et al.*, 1997b). Sami autoři navrhují jako vysvětlení tak vysoké disomické frekvence tohoto chromosomu (0,20 %) velké rozdíly mezi dárci.

Chromosom 22 byl studován dvěma týmy a každý z nich došel k úplně rozdílnému výsledku, pravděpodobně v důsledku použití rozdílné sondy. První tým (Martin & Rademaker, 1999) našel signifikantně zvýšenou frekvenci disomie 22 (1,21 %) v porovnání s ostatními autosomy při použití centromerické α -satelitní sondy specifické pro chromosom 22, zatímco druhý tým (Soares *et al.*, 2001) pozoroval podobnou disomickou frekvenci pro tento chromosom (0,06 %) a ostatní autosomy při použití lokusově specifické sondy pro chromosom 22. Budoucí FISH studie na chromosomech 3 a 22 by proto měly mít za cíl stanovit přesnější hodnotu frekvence disomií u těchto chromosomů.

Vyloučíme-li dva výše uvedené chromosomy (3 a 22), pak průměrná disomická frekvence je 0,09 % pro autosomy a 0,26 % pro pohlavní chromosomy. Celková hodnota frekvence disomie u autosomů je 2,2 % a odhadovaná frekvence aneuploidie (2x disomie) je 4,5 %.

Dosažená hodnota je více jak dvakrát větší než hodnota aneuploidie vypočtená ze studií používajících fúzi spermií s křeččími oocyty (1,8 %). Je to pravděpodobně proto, že u FISH studií bylo počítáno s mnohem větším vzorkem spermií a proto mohlo být nalezeno více abnormálních spermií (Templado *et al.*, 2005). Dalším důvodem by mohlo být to, že některé abnormální spermie nejsou schopné s křeččími oocyty fúzovat. Metoda FISH ale není na schopnostech spermií závislá a umožňuje proto vyšetřit i tyto spermie neschopné fertilizace.

7.1. Pohlavní chromosomy a chromosom 21

Proč ale dochází ke zvýšení frekvence disomie u chromosomu 21 a pohlavních chromosomů? Jedním z důvodů může být fakt, že tyto chromosomy mají obvykle pouze jeden crossing-over: chromosom 21 proto, že je nejmenším autosomem, a chromosomy X a Y proto, že rekombinační oblast je omezena pouze na pseudoautosomální region (Martin, 2005). Proto není překvapivé, že právě tyto chromosomy jsou náchylné k nondisjunkci, protože jestli dojde k selhání rekombinace a toto jediné chiasma není přítomné, pak není žádný další mechanismus, který by zajistil řádné oddělení homologních chromosomů k protějším pólům (review Koehler *et al.*, 1996). U *Drosophily* a kvasinek je už delší dobu známo, že chromosomy bez rekombinace mají větší riziko, že budou postiženy nondisjunkcí (Koehler *et al.*, 1996). Navíc přibližně 50 % jedinců s Klinefelterovým syndromem (47,XXY) je postiženo důsledkem paternální nondisjunkce a předpokládá se, že je to způsobeno redukcí rekombinace mezi X a Y chromosomem (Hassold & Hunt, 2001; Lorda-Sanchez *et al.*, 1992; Shi *et al.*, 2001). Stejně tak se u pacientů s monosomií X předpokládá, že důvodem tak vysokého podílu paternálně podmíněných případů (80 % jich je způsobeno poruchou paternálního meiotického dělení), je redukce rekombinace mezi X a Y chromosomem, která vede k větší náchylnosti k nondisjunkci a tvorbě nuliosomických spermií (Jacobs *et al.*, 1997).

Stejně tak se ale u těchto chromosomů může uplatňovat tzv. sekundární rekombinační efekt, který souvisí s místem rekombinace. Pokud je totiž u nich chiasma přítomno, pak je umístěno distálně. A předpokládá se, že čím distálněji je místo crossing-overu, tím je chromosom náchylnější k nondisjunkci (Hassold & Hunt, 2001). Na druhou stranu se ovšem ukazuje, že místo rekombinace moc blízko u centromery také zvyšuje riziko chromosomální nondisjunkce (Lamb *et al.*, 2005). Jediné distální chiasma totiž není schopné držet homology u sebe s takovou pevností, čímž jim umožňuje téměř nezávislý pohyb a nezajistí správnou segregaci. Ale naopak pokud je místo crossing-overu moc blízko u centromery, jsou

chromosomy k sobě poutány příliš pevně a k oddělení vůbec nemusí dojít (Lamb *et al.*, 2005). Zdá se ale, že změna v pozici crossing-overu se u těchto chromosomů při aneuploidii neuplatňuje, proto se u těchto chromosomů můžeme setkat pouze s formou distálního rekombinačního efektu (Hassold & Hunt, 2001).

8. Závěr

Aneuploidie jsou důležité z klinického hlediska. V současnosti se předpokládá, že 50 % všech embryí, která přežijí do doby, kdy jsou klinicky rozpoznatelná, a která jsou následně spontánně potracena před 24. až 28. týdnem těhotenství, má abnormální chromosomovou konstituci. Většina chromosomálních anomálií u spontánně potracených plodů patří mezi početní odchylky chromosomů. Monosomie chromosomu X je příčinou přibližně 20 % aberací a trisomie autosomů a pohlavních chromosomů jsou zodpovědné za nejméně polovinu chromosomových anomálií. Proto se monosomie a trisomie řadí mezi jedny z hlavních příčin úmrtnosti našeho druhu.

Většina aneuploidií je způsobena poruchou meiotického dělení u žen, ale ani otcovský příspěvek k chromosomálním aberacím není zanedbatelný. Navíc spermie představují v porovnání s oocyty výhodnější studijní materiál vzhledem ke své snadné dostupnosti a velkému počtu. Pomocí FISH můžeme vyšetřit velký počet spermií najednou a zjistit, které chromosomy mají vyšší sklon k segregačním chybám, a pokusit se v budoucnu podrobněji objasnit, které mechanismy jsou za to odpovědné

V současné době se zdá, že hlavním důvodem pro zvýšenou četnost disomie chromosomu 21 a početních odchylek pohlavních chromosomů je snížená frekvence rekombinace. U ostatních chromosomů se může z větší části podílet i změna pozice rekombinace.

9. Seznam použité literatury

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P** (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition. Garland Science, New York, publikace na internetu.
- Antonarakis SE** (1991) Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of dna polymorphisms. Down syndrome collaborative group. *N Engl J Med* 324: 872-876.
- Baird PA, Sadovnick AD** (1989) Life tables for down syndrome. *Hum Genet* 82: 291-292.
- Best, RG** (2002) Patau syndrome. On-line článek: www.emedicine.com/PED/topic1745.htm. Vstup 25.7.2006
- Bond D, Chandley A** (1983) Aneuploidy. Oxford University Press : 86-91.
- Brandriff B, Gordon L** (1990) Human sperm cytogenetics and the one-cell zygote, in allen jw, bridges ba, lyon mf, moses mj, russell rb (eds): *biology of mammalian germ cell mutagenesis*. Banbury Report 34: 183-194.
- Buwe A, Guttenbach M, Schmid M** (2005) Effect of paternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet.Genome Res* 111: 213-228.
- Carlson BM** (2004) *Human Embryology and Developmental Biology*, 3rd Edition. Mosby, Philadelphia, 527 s.
- Charlieu JP, Murgue B, Laurent AM, Marcais B, Bellis M et al.** (1992) Discrimination between alpha-satellite dna sequences from chromosomes 21 and 13 by using polymerase chain reaction. *Genomics* 14: 515-516.
- Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD** (1997a) Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 3: 585-598.
- Downie SE, Flaherty SP, Swann NJ, Matthews CD** (1997b) Estimation of aneuploidy for chromosomes 3, 7, 16, x and y in spermatozoa from 10 normospermic men using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 3: 815-819.
- Duarte AC, Menezes AIC, Devens ES, Roth JM, Garcias GL et al.** (2004) Patau syndrome with a long survival. a case report. *Genet Mol Res* 3: 288-292.
- Eiben B, Bartels I, Bahr-Porsch S, Borgmann S, Gatz G et al.** (1990) Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet* 47: 656-663.
- Foresta C, Galeazzi C, Bettella A, Stella M, Scandellari C** (1998) High incidence of sperm sex chromosomes aneuploidies in two patients with klinefelter's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 203-205.
- Gilbert SF** (2000) *Developmental Biology*, 6th Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, publikace na internetu.

- Gilbert SF** (2003) *Developmental Biology*, 7th Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 838 s.
- Guttenbach M, Engel W, Schmid M** (1997) Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations. a review. *Hum Genet* 100: 1-21.
- Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M et al.** (1996) Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. *Environ Mol Mutagen* 28: 167-175.
- Hassold T, Benham F, Leppert M** (1988) Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. *Am J Hum Genet* 42: 534-541.
- Hassold T, Hunt P** (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2: 280-291.
- Hassold T, Merrill M, Adkins K, Freeman S, Sherman S** (1995) Recombination and maternal age-dependent nondisjunction: molecular studies of trisomy 16. *Am J Hum Genet* 57: 867-874.
- Hassold TJ, Jacobs PA** (1984) Trisomy in man. *Annu Rev Genet* 18: 69-97.
- Hook EB, Mutton DE, Ide R, Alberman E, Bobrow M** (1995) The natural history of down syndrome conceptuses diagnosed prenatally that are not electively terminated. *Am J Hum Genet* 57: 875-881.
- Iourov IY, Soloviev IV, Vorsanova SG, Monakhov VV, Yurov YB** (2005) An approach for quantitative assessment of fluorescence in situ hybridization (fish) signals for applied human molecular cytogenetics. *J Histochem Cytochem* 53: 401-408.
- Jacobs P, Dalton P, James R, Mosse K, Power M et al.** (1997) Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. *Ann Hum Genet* 61: 471-483.
- Jacobs PA, Hassold TJ** (1995) The origin of numerical chromosome abnormalities. *Adv Genet* 33: 101-133.
- Jacobs PA, Hassold TJ, Henry A, Pettay D, Takaesu N** (1987) Trisomy 13 ascertained in a survey of spontaneous abortions. *J Med Genet* 24: 721-724.
- Koehler KE, Hawley RS, Sherman S, Hassold T** (1996) Recombination and nondisjunction in humans and flies. *Hum Mol Genet* 5 Spec No: 1495-1504.
- Lamb NE, Sherman SL, Hassold TJ** (2005) Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. *Cytogenet Genome Res* 111: 250-255.
- Lee C, Wevrick R, Fisher RB, Ferguson-Smith MA, Lin CC** (1997) Human centromeric dnas. *Hum Genet* 100: 291-304.
- Liehr T, Claussen U** (2002) Current developments in human molecular cytogenetic techniques. *Curr Mol Med* 2: 283-297.
- Lorda-Sanchez I, Binkert F, Maechler M, Robinson WP, Schinzel AA** (1992) Reduced recombination and paternal age effect in klinefelter syndrome. *Hum Genet* 89: 524-530.

- Marquez C, Egozcue J, Martorell MR, Moreno V, Templado C** (1996) Colcemid increases the frequency of chromosome abnormalities in human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 72: 164-170.
- Martin R, Rademaker A** (1990) The frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements. *Cytogenet Cell Genet* 53: 103-107.
- Martin RH** (2005) Mechanisms of nondisjunction in human spermatogenesis. *Cytogenet Genome Res* 111: 245-249.
- Martin RH, Rademaker AW** (1999) Nondisjunction in human sperm: comparison of frequencies in acrocentric chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 86: 43-45.
- Mathur A, Stekol L, Schatz D, MacLaren NK, Scott ML et al.** (1991) The parental origin of the single x chromosome in turner syndrome: lack of correlation with parental age or clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 48: 682-686.
- Mau-Holzmann UA** (2005) Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res* 111: 317-336.
- Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J** (2002) Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Hum Reprod* 17: 2134-2145.
- Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi R** (1978) Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 274: 911-913.
- Sears DD, Hegemann JH, Hieter P** (1992) Meiotic recombination and segregation of human-derived artificial chromosomes in *saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5296-5300.
- Sherman SL, Freeman SB, Allen EG, Lamb NE** (2005) Risk factors for nondisjunction of trisomy 21. *Cytogenet Genome Res* 111: 273-280.
- Sherman SL, Takaesu N, Freeman SB, Grantham M, Phillips C et al.** (1991) Trisomy 21: association between reduced recombination and nondisjunction. *Am J Hum Genet* 49: 608-620.
- Shi Q, Spriggs E, Field LL, Ko E, Barclay L, Martin RH** (2001) Single sperm typing demonstrates that reduced recombination is associated with the production of aneuploid 24,XY human sperm. *Am J Med Genet* 99: 34-38.
- Shi Q, Martin RH** (2000a) Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of meiotic chromosome segregation in a 47,xyy male and a review of the literature. *Am J Med Genet* 93: 40-46.
- Shi Q, Martin RH** (2000b) Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. *Cytogenet Cell Genet* 90: 219-226.

- Soares SR, Templado C, Blanco J, Egozcue J, Vidal F** (2001) Numerical chromosome abnormalities in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 of paternal origin: generalised tendency to meiotic non-disjunction. *Hum Genet* 108: 134-139.
- Templado C, Benet J, Genesca A, Navarro J, Caballin MR, Miro R, Egozcue J** (1988) Human sperm chromosomes. *Hum Reprod* 3: 133-138.
- Templado C, Bosch M, Benet J** (2005) Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 111: 199-205.
- Templado C, Marquez C, Munne S, Colls P, Martorell MR et al.** (1996) An analysis of human sperm chromosome aneuploidy. *Cytogenet Cell Genet* 74: 194-200.
- Thompson JS, Thompson MW** (2004) *Klinická genetika*. Triton, Praha, 426 s.
- Vidal F, Blanco J, Egozcue J** (2001) Chromosomal abnormalities in sperm. *Mol Cell Endocrinol* 183 Suppl 1: S51-4.
- Wyrobek A, Marchetti F, Slotter E, Bishop J** (2000) Chromosomally defective sperm and their developmental consequences, in Anderson D, Karakaya AE, Sram RJ (eds): *Human Monitoring after Environmental and Occupational Exposure to Chemical and Physical Agents*. IOS Press, Amsterdam 313: 134-150.
- Zaragoza MV, Jacobs PA, James RS, Rogan P, Sherman S, Hassold T** (1994) Nondisjunction of human acrocentric chromosomes: studies of 432 trisomic fetuses and liveborns. *Hum Genet* 94: 411-417.
- Zaragoza MV, Millie E, Redline RW, Hassold TJ** (1998) Studies of non-disjunction in trisomies 2, 7, 15, and 22: does the parental origin of trisomy influence placental morphology?. *J Med Genet* 35: 924-931.