

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní program: Zdravotnická bioanalýtika

Studijní obor: Zdravotní laborant



Denisa Kovačičová

**Původ, migrace a vývoj zárodečných buněk v embryonálním a fetálním období
vývoje člověka**

Origin, migration and differentiation of germ cells in the embryonic and fetal period
of human development

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Hradec Králové, 2018

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala mému školiteli, doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za odborné vedení této práce, cenné rady, trpělivost a ochotu při jejím zpracování.

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, 24. 8. 2018

ABSTRAKT

Cílem této práce je zpracovat přehled odborné literatury a databází týkajících se embryonálního a fetálního vývoje mužských gonád.

Popisuje také genetickou determinaci pohlaví. Jedna z kapitol se věnuje vybraným metodám (metodě zpracování polosilných řezů a metodě FISH), které se používají při vyšetření chorob vyskytujících se v návaznosti na chybu v ontogenezi.

V poslední kapitole jsou vybrána dvě onemocnění: Klinefelterův syndrom, jako nejčastější numerická gonozomální aberace u mužů, a perzistence Müllerových vývodů, jako porucha při vývoji gonády u mužů s normálním karyotypem.

V závěru práce je diskutována komplexnost této problematiky.

Klíčová slova: zárodečné buňky, spermatogeneze, pohlavní determinace, Klinefelterův syndrom, perzistence Müllerových vývodů

ABSTRACT

The aim of the thesis is to make a review of academic literature and databases related to topics of embryonal and fetal development, morphology and physiology of male gonads.

This work describes also the genetic determination of sex development. One chapter is dedicated to describing two methods (histological method and FISH), which are used to diagnosing diseases related to mistakes in ontogenesis.

The last chapter deals with two diseases: the Klinefelter syndrome as the most frequent numeric gonosomal aberration of men, and persistent Müllerian duct syndrome as a defect of development of men with normal karyotype.

Finally, the complexity of topics of this thesis is discussed.

Key words: germ cells, spermatogenesis, sex determination, Klinefelter syndrome, persistent Müllerian duct syndrome

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

zkratka	anglicky	česky
AMH	anti-Müllerian hormone	anti-Mülleriánský hormon
BMP8B	bone morphogenetic protein 8b	kostní morfogenický protein
BTB	blood-testis barrier	hematotestikulární bariéra
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
FISH	fluorescent in-situ hybridization	fluorescenční hybridizace <i>in situ</i>
FN		fakultní nemocnice
FTN		fakultní Thomayerova nemocnice
GA		glutaraldehyd
KS		Klinefelterův syndrom
PAR	pseudoautosomal region	pseudoautozomální region
PCDH11XY	protocadherin 11 X/Y	
PZM	post-zygotic mitotic (phase)	postzygotická mitóza
SHOX	short stature homeobox	
SOP		standardní operační postupy
SRY	sex-determining region Y	oblast určující pohlaví
SYBL1	synaptobrevin-like 1	
TDF	testis-determining factor	faktor určující vznik varlat
TGFB	transforming growth factor-beta	transformující růstový faktor beta
PMDS	persistent Mullerian duct syndrome	perzistence Müllеровých vývodů

OBSAH

1. CÍL PRÁCE	1
2. ÚVOD	2
3. VÝVOJ, MORFOLOGIE a FYZIOLOGIE GONÁDY	3
3.1 Vývoj indiferentní gonády	3
3.2 Embryonální varle.....	4
3.3 Fetální varle	4
3.4 Prepubertální varle	5
3.5 Puberta	5
3.6 Dospělé varle	5
3.7 Spermatogeneze	5
3.8 Sertoliho buňky.....	8
3.9 Leydigovy buňky	10
4. GENETICKÁ DETERMINACE POHLAVÍ	12
4.1 Chromozom X.....	13
4.2 Chromozom Y.....	13
4.3 Pseudoautozomální region	14
4.4 SRY.....	14
5. METODY ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ	15
5.1 Metoda polosilných řezů.....	15
5.1.1 Příprava fixačních roztoků.....	15
5.1.2 Fixace, odvodnění, prosycení pryskyřicí, polymerace	17
5.1.3 Krájení polosilných řezů.....	18
5.1.4 Barvení a montování polosilných řezů	19

5.2 Fluorescenční hybridizace <i>in situ</i> (FISH)	20
5.2.1 Centromerické sondy	20
5.2.2 Lokus-specifické sondy	20
5.2.3 Celochromozomové (malovací) sondy	20
5.2.4. Princip metody.....	20
6. CHOROBY VÁZANÉ NA POHLAVÍ.....	22
6.1 Perzistence Mülleroých vývodů.....	22
6.1.1 Etiologie	22
6.1.2 Klinický projev – fenotyp.....	22
6.2 Klinefelterův syndrom	24
6.2.1 Karyotyp.....	24
6.2.2 Klinický projev – fenotyp.....	25
6.2.3 Genotyp	26
6.2.4 Snímky histologických preparátů.....	267
7. DISKUZE.....	32
8. ZÁVĚR.....	33
9. SEZNAM OBRÁZKŮ	34
10. SEZNAM TABULEK.....	35
11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	36

1. CÍL PRÁCE

Cílem této přehledové práce je popsat vývoj, morfologii a fyziologii mužské gonády především v embryonálním a fetálním období. Dále má práce za cíl věnovat se genetické determinaci pohlaví, popsat vybrané mikroskopické a histologické metody zobrazení pohlavních buněk a chromozomů, a v poslední části přiblížit některé vývojové vady s pohlavím spojené.

2. ÚVOD

Vývoj gonády, potažmo celého embrya, zahrnuje komplexní soubor kaskád a dějů, jejichž správný průběh je zásadní pro vývoj zdravého jedince.

Tato práce přibližuje období prvních osmi až deseti týdnů intrauterinního života se zaměřením právě na vývoj gonád. V této problematice se uplatňují faktory genetické, kterým se věnuje kapitola o determinaci pohlaví, faktory vnější, které mohou těhotenství ovlivňovat jak pozitivně, tak negativně, a dále hraje roli sled na sebe navazujících kroků ontogeneze, jejichž správný průběh a návaznost jsou důležité pro normální vývoj plodu.

Další část práce popisuje dvě vybrané metody diagnostiky. Méně invazivním typem, proveditelným už v období těhotenství, je vyšetření metodou fluorescenční hybridizace *in situ*. Indikací k takovému vyšetření mohou být nejasný nálezný na ultrazvuku, rizikové hodnoty screeningu v prvním trimestru těhotenství nebo společně s vyšším věkem matky vyšší riziko výskytu vývojových vad. V těchto případech se přistupuje právě k metodám molekulární cytogenetiky, aby se případná vrozená vývojová vada mohla vyloučit. Druhou metodou popisovanou v této práci je způsob zpracování preparátu metodou polosilných řezů. Tato technika nám dovoluje sledovat histologické změny přímo v gonádách a objasnit příčinu například infertility nebo snížené či žádné produkce pohlavních hormonů.

Poslední kapitola se zabývá etiologií dvou onemocnění. Jedním z nich je perzistence Müllerových vývodů. Tato choroba je následkem vady v ontogenezi zapříčiněné nedostatečnou nebo úplně chybějící sekrecí anti-Mülleriánského hormonu Sertoliho buňkami nebo chybou v jeho receptorech v tkáni. Druhou popisovanou diagnózou je Klinefelterův syndrom jako příklad vývojové vady spojené s pohlavím, která je způsobena chybou v genotypu.

3. VÝVOJ, MORFOLOGIE A FYZIOLOGIE GONÁDY

3.1 Vývoj indiferentní gonády

Za embryonální období, které lze též nazvat jako období organogeneze, považujeme období mezi 3. a 8. týdnem intrauterinního vývoje. V tomto období se ze tří zárodečných listů – ektodermu, mezodermu a entodermu vytváří většina orgánů a specializovaných tkání embrya.

Pohlavní systém se společně se močovým systémem vyvíjí z intermediálního mezodermu (mezenchymu), a v raných fázích vývoje mají tyto systémy společnou vývodnou cestu.

Dalším zdrojem buněk pro vývoj gonády je coelomový epitel (mezotel), který u embrya nalézáme podél zadní stěny břišní. Na tuto strukturu mezenchym navazuje.

Třetím typem buněk podílejících se na tvorbě pohlavních žláz jsou primordiální zárodečné buňky, nebo též buňky prvopohlavní. Ty se v začátku vývoje nenachází přímo v mezodermu, ale migrují sem ze stěny žloutkového váčku (Sadler, 2011; Jirásek, 1977).

Ve 3. týdnu vývoje se z proliferujících buněk coelomového epitelu a kondenzací buněk mezenchymu uložených blízko urogenitální lišty tvoří lišta genitální. Lištu urogenitální od této chvíle nazýváme lištou mezonefrickou.

Ve 4. týdnu začínají primordiální buňky migrovat ze stěny žloutkového váčku. Améboidním pohybem migrují podél dorsálního mezenteria zadního střeva ke genitální liště.

V období mezi 5. a 6. týdnem začne povrchový epitel genitální lišty proliferovat, proniká tak do mezenchymu a vznikají útvary zvané medulární provazce.

6. týden pak tyto provazce obsahují primordiální buňky a mluvíme o stadiu indiferentní gonády. Po toto stadium vývoje se vývoj mužských a ženských pohlavních žláz neliší.

Od 7. týdne dochází k pohlavní diferenciaci gonád, které jsou tvořeny kůrou a dření. Kůra indiferentní gonády se mění ve vaječníky a dřev zániká, naopak při diferenciaci v mužskou pohlavní žlázu zanikne kůra a z dřevě vzniká varle (Sadler, 2011; Moore et al., 2013).

3.2 Embryonální varle

Přeměna indiferentní gonády ve varle je geneticky determinována přítomností chromozomu Y, přesněji regionem na jeho krátkém raménku, známém jako *sex-determining region Y* – gen *SRY*, jiným názvem gen pro TDF (*testis-determining faktor*), blíže popsáného v kapitole 4.4.

Pod vlivem tohoto faktoru začnou medulární provazce proliferovat a dají za vznik semenotvorným kanálkům (*tubuli seminiferi*) a síti kanálků na zadní straně varlete (*rete testis*). Medulární provazce od povrchového epitelu odděluje vrstva vláknitého bělavého vaziva *tunica albuginea* (terminologie: Vokurka, Hugo, 2015).

Vzniklé semenotvorné kanálky jsou tvořeny třemi typy buněk. Nalezneme zde primordiální buňky, dále spermatogonie, což jsou kulaté prvopohlavní buňky, a Sertoliho buňky, diferencované z povrchového coelomového epitelu, plnící zde funkci podpůrnou. Prostor mezi kanálky není tvořen intersticiálními buňkami, nýbrž proliferujícím vazivem. Typický znakem pro embryonální varle je právě proliferace tohoto vaziva.

3.3 Fetální varle

Krátce po vzniku medulárních provazců se v intersticiu varlat diferencují z buněk podobným fibroblastům Leydigovy buňky. V embryonálním období varlete zůstávají nečinné, od 8. týdne pak začínají tvořit testosteron a androstendion. Postupně se jejich počet zvyšuje a mezi 12. – 14. týdnem intrauterinního vývoje zcela vyplňují prostor mezi semenotvornými kanálky. Jejich počet se začíná snižovat až v druhé polovině čtvrtého měsíce těhotenství. Sertoliho buňky se během fetálního období nijak nediferencují.

Semenotvorné kanálky se v tomto období vývoje prodlouží, více stočí a zvětší svou tloušťku, v posledním trimestru těhotenství pak dochází k jejich luminizaci. Sertoliho buňky se změň v jejich výstelku a dojde k zániku spermatogonií. Varle v tomto období sestupuje.

3.4 Prepubertální varle

Po narození dojde k úplnému vymizení Leydigových buněk a varle se nachází v prepubertální neboli klidové fázi.

3.5 Puberta

V pubertě dochází vlivem působení hormonů osy hypotalamus – hypofýza – gonáda opět k diferenciaci Leydigových buněk a ke zmnožení spermatogonií, z nichž u některých dojde k přeměně ve spermatocyty. Dozrává také spermiogenní epitel.

3.6 Dospělé varle

Dospělé varle se od klidového prepubertálního liší přítomností všech čtyř vývojových stadií pohlavních buněk – spermatogonií, spermatocytů I. a II. řádu, prespermatid a spermatozoí (Sadler, 2011; Jirásek, 1977).

3.7 Spermatogeneze

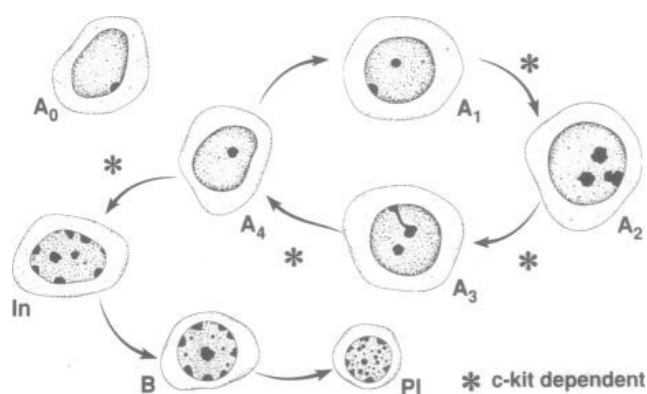
Spermatogeneze probíhá v semenotvorných kanálcích varlete. Tento proces můžeme rozdělit do tří fází. V první fázi, kterou nazýváme proliferativní či mitotickou, spermatogonie projdou několika mitotickými děleními. Vzniklé spermatocyty v druhé fázi prochází dvěma meiotickými děleními a dávají tak za vznik haploidním spermatidám. Třetí fáze vzniku spermatozoí se nazývá spermiogeneze (Chocu et al., 2012).

Jak již bylo řečeno, primordiální buňky domigrují do genitální lišty okolo 6. týdne intrauterinního života a inkorporují se do medulárních provazců, které vyžívají v semenotvorné kanálky. Spermatogeneze je zahájena v okamžiku, kdy

Leydigovy buňky v intersticiu varlete produkují testosteron a spermatogonia začnou produkovat protein BMP8B (*bone morphogenetic protein 8b*), který patří do *transforming growth factor-beta* (TGFB) rodiny proteinů, které ovlivňují diferenciaci a proliferaci mnoha buněk (Gilbert, 2000; OMIM, web 1). Sertoliho buňky plní v průběhu spermatogeneze podpůrnou funkci.

U bazální membrány semenotvorného kanálku můžeme nalézt hned tři typy spermatogonií. Typ A, nejméně diferencovaná buňka bez zřetelného chromatinu v jádře, dále intermediální spermatogonia s malým množstvím heterochromatinu, a spermatogonia typu B s nejhustším heterochromatinem, které jsou nejvíce diferencovaným stadiem těchto buněk (Phillips et al., 2010).

Spermatogonia typu A podléhají mitóze a dávají tak za vznik dalším buňkám tohoto typu. Buď v tomto stadiu zůstávají a dále se dělí, nebo diferencují v intermediální spermatogonie, ze kterých vznikají spermatogonie typu B, znázorněno na Obrázku 1.

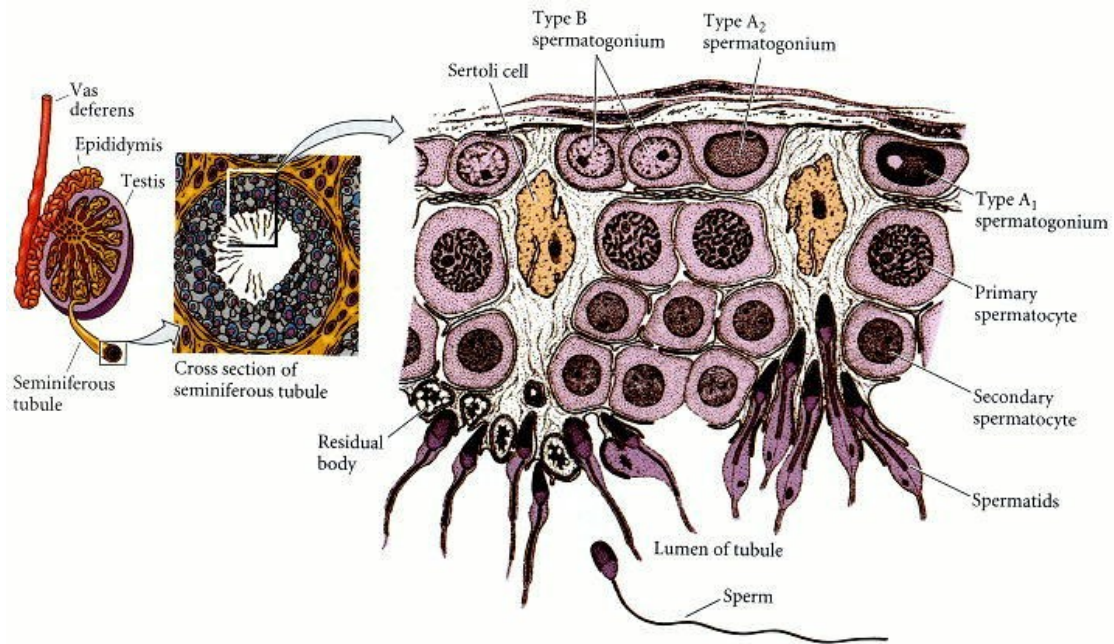


Obrázek 1

Dělení a diferenciaci spermatogonií (převzato z Dym, 1994; dostupné z [online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/pmc/articles/PMC45216/bin/pnas01146-0014-a.jpg>, poslední přístup 20.8.2018]).

Spermatogonie typu B pak migrují přes hematotestikulární bariéru Sertoliho buněk, kde se ještě jednou mitoticky dělí. Z tohoto dělení vychází jako primární spermatocyty, které

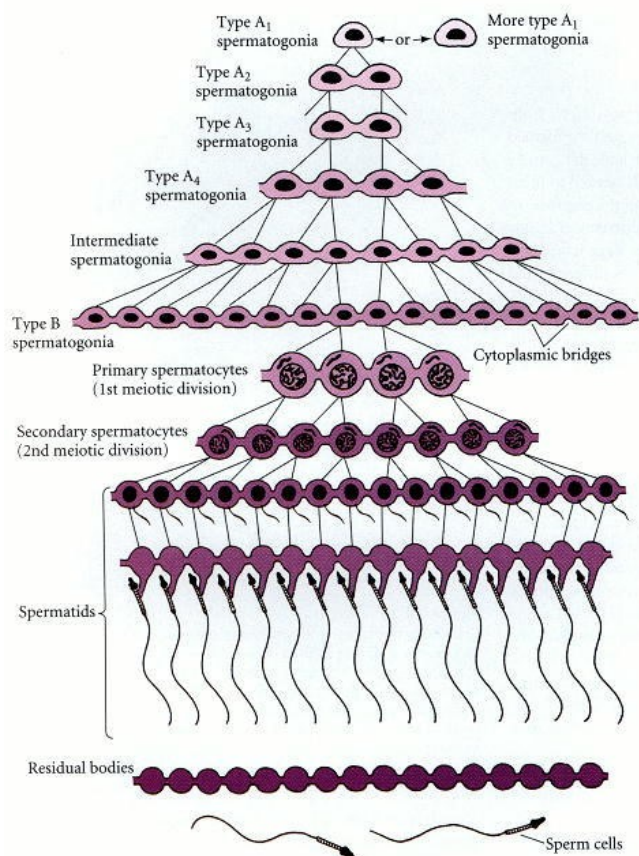
podléhají prvnímu meiotickému dělení. Vznikají tak sekundární spermatocyty. Po celou dobu dělení jsou buňky spojené plazmatickými můstky, a tak je vývoj celé této řady synchronizovaný. Sekundární spermatocyty se poté ještě jednou meioticky rozdělí za vzniku spermatid. V průběhu mitotických i meiotických dělení se celé syncytium pohybuje od bazální membrány semenotvorného kanálku k jeho lumen, viz Obrázek 2.



Obrázek 2

Řez semenotvorným kanálkem, znázorněny Sertoliho buňky (žlutě) a migrace diferencujících buněk stěnou semenotvorného kanálku (převzato z Gilbert, 2000; dostupné z [online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10095/bin/ch19f17.jpg>, poslední přístup 10.8.2018]).

Posledním krokem v diferenciaci mužských pohlavních buněk je spermiogeneze. V tomto kroku dojde u budoucích spermii ke kondenzaci jádra, vytvoření bičíku a vypuzení většiny cytoplazmy a organel. Spermie je poté uvolněna do semenotvorného kanálku. Celý proces diferenciacie trvá přibližně 72 dní (Gilbert, 2000; Kittnar et al., 2011).



Obrázek 3

Vývojová stadia mužských pohlavních buněk znázorněná v syncytiích (převzato z Gilbert, 2000; dostupné z [online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/books/NBK10095/bin/ch19f18.jpg>, poslední přístup 10.8.2018]).

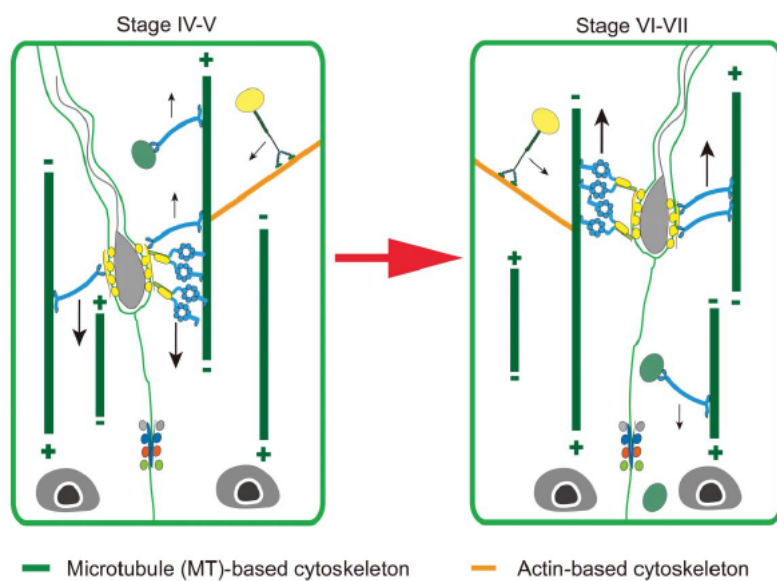
3.8 Sertoliho buňky

Sertoliho buňky diferencují z coelomového epitelu již v embryonálním stadiu varlete. Od této chvíle plní svou podpůrnou a výživnou funkci pro primordiální buňky, které do této oblasti migrují (Jirásek, 1977).

Svou další úlohu plní od 8. týdne intrauterinního života, kdy začnou produkovat AMH (*anti-Müllerian hormone*), tedy anti-Mülleriánský hormon. Působením tohoto hormonu dojde k involuci Müllerových vývodů, zároveň zde mají vliv i mužské pohlavní hormony, které indukují vývoj vývodů Wolffových (Rajpert-De Meyts et al., 1999).

Pravděpodobně nejdůležitější funkcí Sertoliho buněk je však utváření takzvané *blood-testis barriere* (BTB) neboli hematotestikulární bariéry, kterou tvoří spolu s bazální laminou.

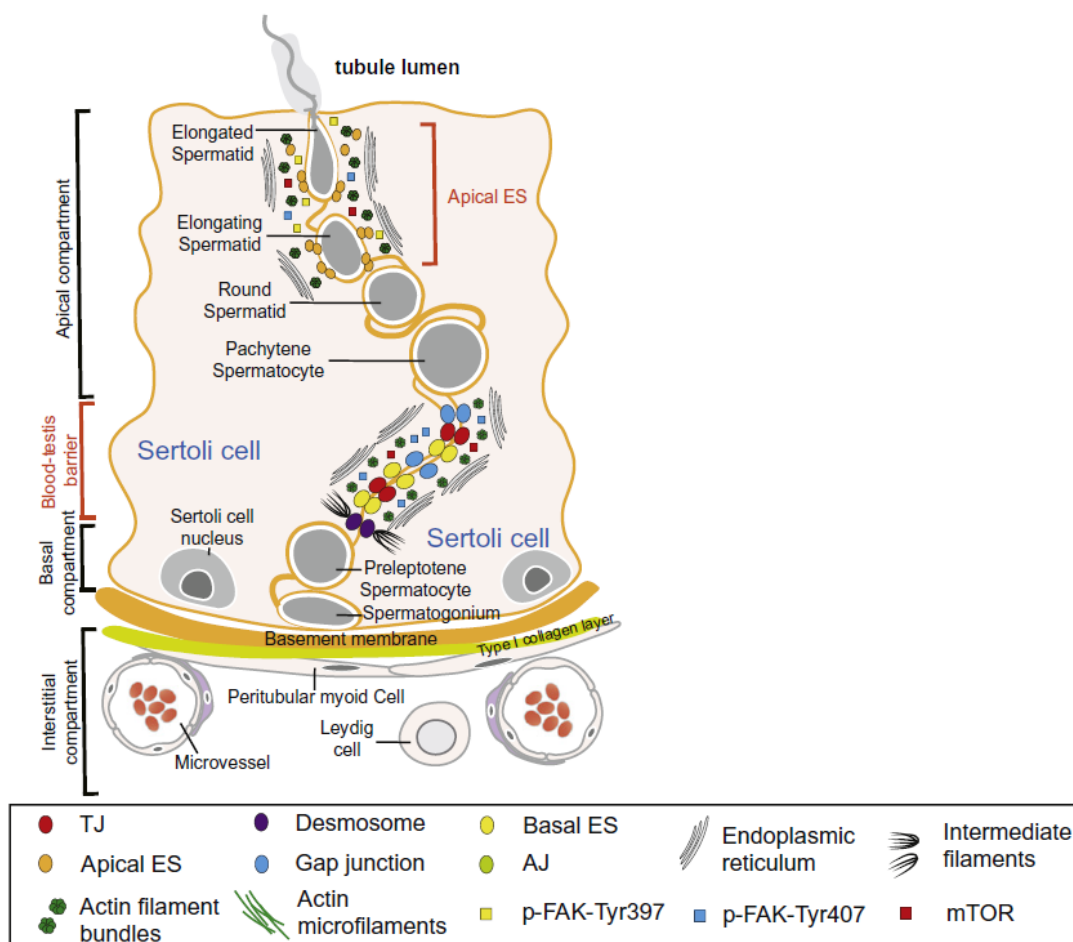
Sertoliho buňky jsou v této bariéře spojeny těsnými spoji (*tight junctions*). Tato bariéra je důležitá jako ochrana proti toxinům či cizorodým látkám z krve a z druhé strany brání průniku vyvíjejících se spermií do krevního oběhu, kde by antigeny na jejich povrchu vyvolaly autoimunitní reakci (Kittnar et al, 2011). Dříve se mělo za to, že spermatogonia se podél Sertoliho buněk a skrze hematotestikulární bariéru pohybují jen pomocí adheze buňky na buňku, ale nové studie ukázaly, že jsou v tomto procesu zapojeny i součásti cytoskeletu Sertoliho buněk, konkrétně aktinová mikrofilamenta (F-aktin) a mikrotubuly (Wen et al., 2016).



Obrázek 4

Znázornění navázání vyvíjejících se pohlavních buněk na cytoskelet Sertoliho buněk. Na obrázku vlevo transport spermatogonií směrem k hematotestikulární bariéře, vpravo transport buněk diferencovanějších směrem k lumen semenotvorného kanálku. Zeleně jsou znázorněny mikrotubuly, oranžově aktinová filamenta (převzato z Wen et al., 2016).

Tyto studie ukazují, že bariéry tvořené těsnými spoji nejsou rigidními strukturami, nýbrž procházejí dynamickými změnami, jako je rozvolnění, opětovné spojení či stabilizace. Díky této dynamice mohou spermatogonia typu B v rané fázi meiózy (proleptotene), po které se stávají primárními spermatocyty, projít hematotestikulární bariérou Sertoliho buněk, jak je znázorněno na Obrázku 5 (Wen et al., 2017).



Obrázek 5

Znázornění migrace spermatocytů skrze hematotestikulární bariéru a podél Sertoliho buněk k lumen semenotvorného kanálku (převzato z Wen et al., 2017).

3.9 Leydigovy buňky

Leydigovy buňky se ve varleti nachází v intersticiálním prostoru semenotvorných kanálků. Objevují se zde již krátce po začátku sexuální diferenciaci a jejich základem je několik embryonálních tkání jako coelomový epitel, mezenchym genitální lišty a migrující mezonefrické buňky (Svechnikov et al., 2010).

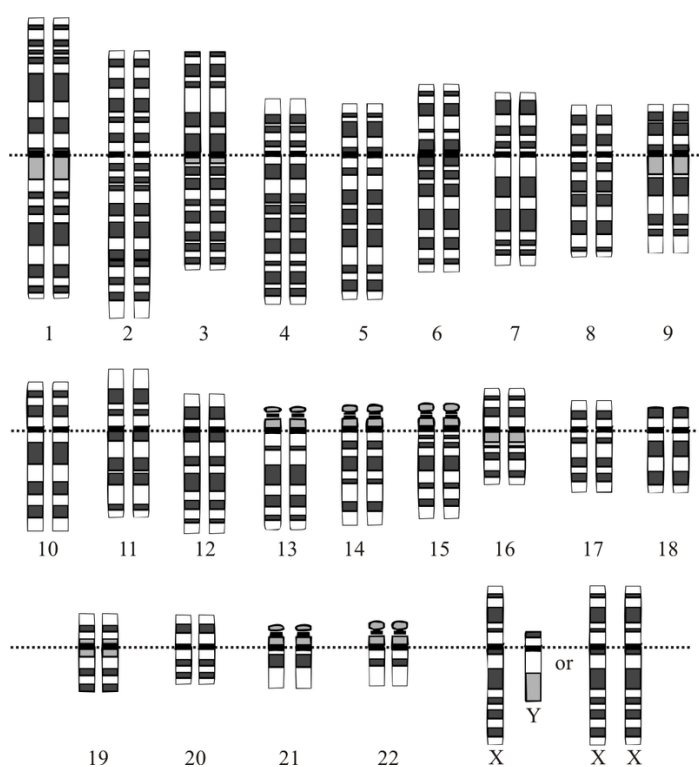
Vývoj Leydigových buněk můžeme rozdělit do tří stádií. Stadium diferenciaci, maturace a involuce. Diferenční fáze probíhá v embryonálním a fetálním varleti mezi 7. a 14. týdnem intrauterinního života. Právě v tomto období probíhá pohlavní diferenciaci indiferentních gonád a působením AMH a mužských pohlavních hormonů, které Leydigovy buňky produkují, dojde k diferenciaci v mužskou gonádu. Poté maturují

přibližně do 18. týdne a stadium involuce trvá od tohoto týdne až po konec těhotenství. Maximálního počtu dosahují mezi 14. a 16. týdnem fetálního vývoje.

Vývojová stadia Leydigových buněk můžeme také rozdělit podle hladin testosteronu v krvi, který vylučují. A to na fetální stadium, kdy jsou aktivní a testosteron produkují, dále na neaktivní období začínající mezi 2. – 3. měsícem po porodu, a trvající až do začátku puberty. V pubertě jsou Leydigovy buňky aktivovány luteinizačním hormonem a začínají opět produkovat testosteron, který je nezbytný pro vývoj sekundárních pohlavních znaků a spermatogenezi (Jirásek, 1977; Svechnikov et al., 2010).

4. GENETICKÁ DETERMINACE POHLAVÍ

Karyotyp člověka se skládá z 23 párů chromozomů, z toho 22 párů tvoří autozomy a o pohlaví jedince rozhoduje jeden pár gonozomů – X a Y. Pokud u jedince nalezneme jak chromozom X, tak Y, jedná se o muže. Pokud disponuje dvěma chromozomy X, jedná se o ženu (Šípek, web 2a). Pohlaví plodu je tedy určeno již při oplození, kdy jeden X chromozom vždy pochází od matky a záleží na tom, jestli spermie nese chromozom X nebo Y (Trojan, 2003). V dělicích se buňkách je během interfáze vyrovnávána genetická nerovnost mezi gonozomy. Aktivní zůstává pouze jeden chromozom X a všechny ostatní (v normálním případě jeden) podléhají inaktivaci. Tento proces nazýváme lyonizace (Jirásek, 2008).



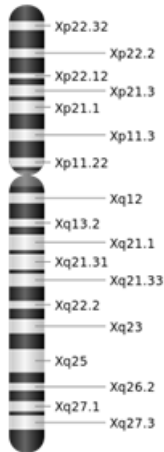
Obrázek 6

Schéma lidského karyotypu (převzato a upraveno z: [online:

https://www.wikiskripta.eu/w/Lidsk%C3%BD_karyotyp#/media/File:Karyotype.png, poslední přístup 14. 8. 2018]).

4.1 Chromozom X

Chromozom X se svou stavbou řadí do skupiny C, je tedy středně velkým submetacentrickým chromozomem (Šípek, web 2a). V současnosti víme o 2186 genech, které se na něm nacházejí (NCBI Genome Data Viewer, web 3).

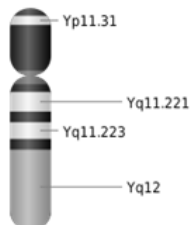


Obrázek 7

Schéma lidského chromozomu X (převzato a upraveno z: [online: https://cs.wikipedia.org/wiki/Chromozom_X#/media/File:Chromosome_X.svg, poslední přístup 11.8.2018]).

4.2 Chromozom Y

Jedná se o malý akrocentrický chromozom, čímž spadá do G skupiny chromozomů, na rozdíl od ostatních chromozomů této skupiny však nenese na svém krátkém raménku satelitní stopku (Šípek, web 2a). Nachází se na něm 580 genů (NCBI Genome Data Viewer, web 4).



Obrázek 8

Schéma lidského chromozomu Y (převzato a upraveno z: [online: https://cs.wikipedia.org/wiki/Chromozom_Y#/media/File:Chromosome_Y.svg, poslední přístup 13.8.2018]).

4.3 Pseudoautozomální region

Oba pohlavní chromozomy pocházejí z jednoho homologního předka (páru chromozomů) (Charlesworth, 1991). Zkracováním a degenerací chromozomu Y se však homologní oblast omezila na dva pseudoautozomální regiony – PAR1 a PAR2, které se chovají jako autozomy a rekombinují během meiózy. Tyto regiony můžeme nalézt na koncích krátkého (PAR1) a dlouhého (PAR2) raménka těchto chromozomů (Mangs, Morris, 2007). V současné době víme o minimálně 29 genech nacházejících se v této oblasti (Ross et al., 2005).

4.4 SRY

V těsné blízkosti pseudoautozomální oblasti se na krátkém raménku chromozomu Y, konkrétně v oblasti Yp11.2 (OMIM, web 5), nachází *sex-determining region Y* – gen *SRY* (MENDELU, web 6). Jedná se o 35 kb dlouhý úsek (Sinclair et al., 1990). Podle klasického paradigmatu pohlavního vývoje, z velké části založeného na výzkumech Alfreda Josta, je přítomnost a exprese tohoto genu důležitá pro spuštění kaskády dějů, jejíž výsledkem je vývoj indiferentní gonády v gonádu mužskou (primární pohlavní determinace). Testosteron, který je následně produkován Leydigovými buňkami v této gonádě, zajistí sekundární pohlavní diferenciaci (Blecher, Erickson, 2007). Můžeme tedy tvrdit, že chromozom Y určuje mužské pohlaví vzhledem k tomu, že u jedinců s Klinefelterovým syndromem (47, XXY) se vyvíjí mužský fenotyp, zatímco při karyotypu (45, X), který má za následek Turnerův syndrom, dojde k diferenciaci v ženský fenotyp (Šípek, web 2b).

5. METODY ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ

V této kapitole byly vybrány dva odlišné způsoby zpracování vzorků pro diagnostiku některých chorob souvisejících s pohlavními orgány či chromozomy. Jako metoda zobrazování vzorků měkkých tkání je vybrána metoda polosilných řezů.

Ve spojitosti s genetickou determinací pohlaví a chorobami s ní spojenými je pak popsána metoda FISH (*fluorescent in situ hybridization*).

5.1 Metoda polosilných řezů

Zpracování tkáně pro metodu polosilných řezů probíhá ve třech dnech. Prvním krokem zpracování je fixace.

5.1.1 Příprava fixačních roztoků

5.1.1.1 Millonigův pufr:

	složka	m nebo V	složka	V	pH
A	Na ₂ H ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	22,6 g	povařená destilovaná voda, pH= 6,47	1000 ml	
B	NaOH	12,6 g	povařená destilovaná voda	500 ml	
C	glukóza	5,4 g	redestilovaná voda, pH= 6,05	100 ml	
D	roztok A	415 ml	roztok B	85 ml	7,2 - 7,3
E	roztok C	10 ml	roztok D	90 ml	7,2 - 7,3

Tabulka 1

Poměr složek pro přípravu Millonigova pufru.

Jako uchovávací pufr používáme roztok D a skladujeme jej v lednici. Roztok E je vždy potřeba připravit čerstvý.

5.1.1.2 3% roztok glutaraldehydu v pufru (1:1):

Zásobní roztoky:

	složka	n	V	složka	V	teplota
X	Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	0,20 mol/l	7,16 ml	redestilovaná voda	100 ml	5 °C
Y	KH ₂ PO ₄	0,20 mol/l	2,72 ml	redestilovaná voda	100 ml	5 °C
Z	8% roztok glutaraldehydu		10 ml	redestilovaná voda	3,7 ml	

Tabulka 2

Poměr složek pro přípravu zásobních roztoků pro přípravu roztoku 3% GA v pufru.

Roztoky X a Y použijeme k přípravě tlumivého roztoku, roztok z je 6% vodný roztok glutaraldehydu (n= 0,59 mol/l).

Tlumivý roztok:

složka	V	složka	V
zásobní roztok X	80 ml	zásobní roztok Y	20 ml

Tabulka 3

Poměr složek pro přípravu tlumivého roztoku pro přípravu 3% GA v pufru.

Hodnotu pH změříme a upravíme na 6,7 – 7,1. Ke zvýšení hodnoty pH přikapáváme roztok X, naopak ke snížení roztok Y.

Fixační roztok:

složka	V	složka	V
Millonigův pufr (roztok D), pH 6,9 - 7,1	13,7 ml	6% roztok GA (roztok Z)	13,7 ml

Tabulka 4

Poměr složek pro přípravu fixačního roztoku 3% GA v pufru.

U vzniklého fixačního roztoku lze opět upravit pH, avšak je nutné ho připravit vždy čerstvý.

Vlastnosti: 3 % glutaraldehydu, n= 299 mmol/l, osmolalita 590 Osm/kg.

5.1.1.3 2% roztok kyseliny osmičelé v pufru:

složka	V
Millonigův pufr	1,5 ml
redestilovaná voda	1 ml
4% roztok kyseliny osmičelé	2,5 ml

Tabulka 5

Poměr složek pro přípravu 2% roztoku kyseliny osmičelé v pufru.

Smícháním těchto složek získáme 5 ml roztoku, který skladujeme v lednici při 5 °C.

5.1.2 Fixace, odvodnění, prosycení pryskyřicí, polymerace

První den odebraný biologický materiál vložíme do fixačního roztoku 3% glutaraldehydu ve fosfátovém pufru a necháme ho fixovat přes noc v lednici.

Druhý den vzorek 4x po 15 minutách propláchneme puftrem. Následuje druhá fixace, a to v roztoku 2% kyseliny osmičelé ve fosfátovém pufru, necháme fixovat 2-3 hodiny v lednici. Po uplynutí doby fixace vzorek znovu 4x po 15 minutách propláchneme puftrem. Po tomto kroku jej můžeme buď uchovat pro pozdější zpracování, či pokračovat jeho odvodněním vzestupnou alkoholovou řadou následovně:

	roztok	teplota roztoku	čas	teplota skladování
1.	25% ethanol	vychlazený	15 minut	lednice
2.	50% ethanol	vychlazený	15 minut	lednice
3.	75% ethanol s 1 % uranylacetátu	vychlazený	15 minut	lednice
4.	96% ethanol s 1 % uranylacetátu	laboratorní teplota	15 minut	laboratorní teplota
5.	100% ethanol s 1 % uranylacetátu	laboratorní teplota	15 minut	laboratorní teplota
6.	100% ethanol	laboratorní teplota	15 minut	laboratorní teplota
7.	100% ethanol	laboratorní teplota	15 minut	laboratorní teplota

Tabulka 6

Vzestupná alkoholová řada pro odvodnění vzorku.

Po odvodnění vzorek prosycujeme epoxidovou pryskyřicí tímto postupem:

	složky směsi		poměr složek	čas
1.	100% aceton	epoxidová pryskyřice	2:1	1 hodina na míchačce
2.	100% aceton	epoxidová pryskyřice	1:2	1 hodina na míchačce
3.	koncentrovaná epoxidová pryskyřice (Epon + Durkupan)			do druhého dne, vlhkost do 40 %

Tabulka 7

Postup prosycování vzorku epoxidovou pryskyřicí.

Třetí den zalejeme vzorek do formičky s epoxidovou pryskyřicí a necháme jej 72 hodin polymerovat při 60 °C, po tomto procesu je zcela tvrdý a připravený ke krájení.

5.1.3 Krájení polosilných řezů

Nejprve zpolymerovaný bloček uchytíme do hlavice a odmaštěnou žiletkou zkrajujeme pod úhlem 45° přebytečnou vrstvu polymeru. Cílem tohoto kroku je získat menší řeznou čtvercovou plochu se vzorkem po celé její ploše.

Takto připravený bloček upevníme do ultramikrotomu LKB a zkrajujeme skleněným nožem do roviny, nejprve na sucho.

Poté skleněný nůž vyměníme za nůž s vaničkou, do které si připravíme roztok redestilované vody s příměsí 96% alkoholu v poměru 2 ml alkoholu na 50 ml redestilované vody tak, aby hladina dosahovala k hraně nože.

Vzorek krájíme na řezy o tloušťce přibližně 1 μm.

Následně řezy spojené v řetízky z hladiny sbíráme na podložní sklo a obarvíme.

5.1.4 Barvení a montování polosilných řezů

Podložní sklo odmastíme acetonem, a do kapky redestilované vody vložíme preparační jehlou polosilné řezy a nad kahanem necháme vodu odpařit.

Poté je zakápneme 1% roztokem toluidinové modři a při teplotě 70 – 90 °C a necháme působit 10 – 30 sekund.

Následně barvu slijeme, zbytky spláchneme redestilovanou vodou a zkontrolujeme intenzitu zbarvení.

Montujeme do Entalánu zakápnutím a přiklopením odmaštěného krycího sklíčka (SOP ÚPMD Praha – Podolí).

K histologické analýze byly použity příčné řezy tkání prepubertálních a časně dospělých pacientů s Klinefelterovým syndromem. Preparáty byly pozorovány světelným mikroskopem OLYMPUS AX-70 s digitální kamerou ProgRes CT3. Jako zobrazovací program byl použit NIS – ELEMENTS AR 4.00.11. Snímky preparátů zpracovaných touto metodou jsou použity v kapitole 6.2 popisující Klinefelterův syndrom a pochází z archivu doc. RNDr. Vladimíra Semeckého, CSc.

5.2 Fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH)

Fluorescenční hybridizace *in situ* je metoda, která nám dovoluje detekovat konkrétní úsek genomu a zviditelnit ho pro sledování ve fluorescenčním mikroskopu. Jedná se o jednu ze základních metod molekulární cytogenetiky (FN Brno, web 7).

Princip metody spočívá v navázání fluorescenčně značených sond (komplementární úseky k hledané sekvenci o délce 200–300 kb) k denaturované DNA. Sondy lze značit buď radioaktivně, nebo neradioaktivně. Z bezpečnostních důvodů se v současné době využívá spíše neradioaktivního značení, a to pomocí fluorochromů. Podle toho, kam se daná sonda váže, rozlišujeme tři typy těchto sond (Michalová et al., 1999).

5.2.1 Centromerické sondy

Tyto sondy hybridizují s repetitivními sekvencemi v oblasti centromer. V rámci diagnostiky se používají k odhalení numerických chromozomových aberací.

5.2.2 Lokus-specifické sondy

Jde o přesné určení konkrétních genů či sekvencí na chromozomech. Používáme je k odhalení strukturních aberací, jako jsou mikrolece, mikroduplikace, translokace, inzerce a podobně.

5.2.3 Celochromozomové (malovací) sondy

Těmito sondami lze označit celý chromozom nebo jeho část. Umožňují analýzu složitých přestaveb a strukturních chromozomových aberací (Michalová et al., 1996, 1999).

5.2.4. Princip metody

Postup vyšetření lze shrnout obecně do pěti kroků. Konkrétní postupy jsou součástí kitů dodávaných přímo k tomuto vyšetření a mohou se mezi sebou mírně lišit. V principu se ale jedná o tyto kroky:

1. denaturace sondy a cílové DNA (jako původní biologický materiál lze použít buď suspenze interfázních jader nebo chromozomy z buněk metafázních)
2. navázání (hybridizace) sondy k cílové DNA
3. odstranění nespecifického signálu
4. barvení DAPI
5. vyhodnocení ve fluorescenčním mikroskopu, snímání do počítače a zpracování obrazu ve speciálních programech (SOP FTN Praha)

6. CHOROBY VÁZANÉ NA POHLAVÍ

6.1 Perzistence Müllerových vývodů

Perzistence Müllerových vývodů je vzácnou formou mužského pseudohermafroditismu (Shamim, 2007). Toto onemocnění bylo poprvé popsáno přibližně před 80 lety a do dnešní doby bylo zaznamenáno asi 200 případů. Pod názvem *hernia utri inguinale* najdeme první kompletní studii z roku 1939 (Saleem et al., 2016).

6.1.1 Etiologie

Etiologicky lze toto onemocnění rozdělit na dva typy: AMH – pozitivní PMDS (*persistent Müllerian duct syndrome*), kdy dochází k normální syntéze Anti-Mülleriánského hormonu, ale defekt se nachází v jeho receptorech, a AMH – negativní PMDS, kdy tento hormon produkován není (Imbeaud et al., 1995).

Anti-Mülleriánský hormon je při normálním vývoji mužské gonády zodpovědný za involuci Müllerových vývodů, které se při diferenciaci v ženskou gonádu mění v ženské pohlavní orgány, a tudíž chyba v sekreci nebo receptoru tohoto hormonu způsobuje vývoj ženských vnitřních pohlavních orgánů u muže (Rajpert-De Meyts et al., 1999).

6.1.2 Klinický projev – fenotyp

Perzistence Müllerových vývodů je charakterizována výskytem ženských vnitřních pohlavních orgánů u muže s normálním fenotypem i karyotypem (46, XY). Často pacientům chybí jedno nebo obě varlata. Současně se asi v 80 % případů vyskytuje tříselná kýla. Právě při operacích kýly často dochází k náhodné diagnostice tohoto onemocnění, na které před operací nic neukazovalo, jelikož vnější pohlavní orgány se dosud vyvíjely normálně. u většiny případů sledujeme také infertilitu (Saleem et al., 2016; Yuksel et al., 2006).

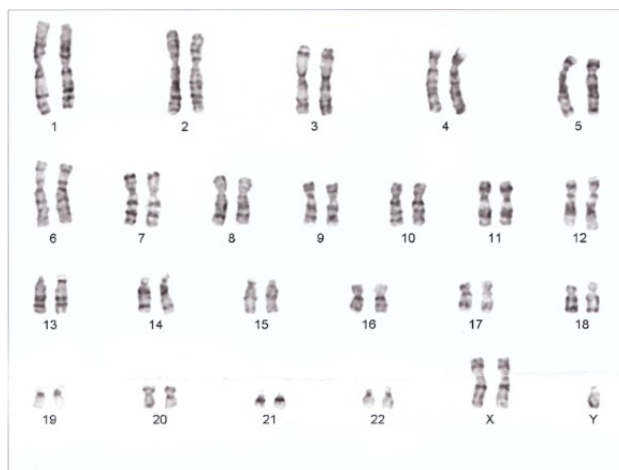
Anatomicky rozlišujeme tři typy tohoto syndromu podle uložení varlat a struktur utvořených z Müllerova vývodu. Prvním, nejčastějším typem je takzvaná mužská forma, kterou nalézáme u 80–90 % pacientů. Nejméně jedno varle je v tomto případě uloženo ve vaku tříselné kýly, děloha a vejcovody jsou zde uloženy také, nebo se do vaku dají lehce vtlačit (spolu s druhým varletem). Naopak nejméně častým typem je ženská forma, kdy jsou varlata uložena v pozici vaječníků, připojena k vejcovodu a děloha v normální pozici. Tuto situaci můžeme pozorovat asi u 10–20 % pacientů. Třetím typem jsou případy, kdy jsou obě varlata uložena na jedné straně tříselného kanálu, případně šourku. Mluvíme pak o takzvané transversální testikulární ektopii (Saleem et al., 2016).

6.2 Klinefelterův syndrom

Objevení tohoto syndromu bylo víceméně náhodné. Ve 40. letech minulého století požádal mladý doktor Harry Fitch Klinefelter doktora Fullera Albrighta, jednoho z nejuznávanějších endokrinologů té doby, o konzultaci diagnózy svého pacienta. Společně identifikovali stejné příznaky u dalších osmi pacientů a v roce 1942 vydali první publikaci popisující tento syndrom, který byl podle doktora Klinefeltera též pojmenován. S prevalencí 150 na 100 000 novorozenců je Klinefelterův syndrom nejčastější mužskou chromozomální aberací. S tímto počtem výskytů už tedy nelze mluvit o ojedinělém výskytu, za který považujeme 50 a méně na 100 000 novorozenců (Chang et al., 2015).

6.2.1 Karyotyp

Karyotyp tohoto onemocnění je definován jako 47, XXY (Obrázek 9). Jedná se tedy o chromozomovou numerickou aberaci, kdy má jedinec o jeden chromozom X více. Toto je nejběžnější forma, možné jsou však i další, např. 48, XXXY či 49, XXXXY, u kterých je manifestace syndromu ještě výraznější (Thompson et al., 2004).



Obrázek 9

Karyotyp 47, XXY (převzato z [online:

https://www.wikiskripta.eu/w/Klinefelter%C5%AFv_syndrom#/media/File:Human_chromosomes_XXY01.png, poslední přístup 8.8.2018]).

6.2.2 Klinický projev – fenotyp

Klinefelterův syndrom nepovažujeme za přesnou či konkrétní diagnózu v jejích projevech, spíše jde o soubor charakteristických znaků, které se u pacientů vyskytují s menší nebo větší četností. Mezi nejčastější projevy vyskytující se u drtivé většiny diagnostikovaných však patří menší varlata, na pohmat tuhá, hypergonadotropní hypogonadismus, gynekomastie, neplodnost a poruchy učení. Další symptomy s jejich četnostmi jsou vyjmenovány v Tabulce 8 (Groth et al., 2013).

Často u této choroby pozorujeme mozaicismus, což znamená, že v těle jedince jsou přítomny dvě nebo více buněčných linií s různým karyotypem (jeden normální, druhý aberantní). Pacienti s touto formou onemocnění pak nemusí být infertilní, pokud je v gonádách přítomna normální linie buněk (Thompson et al., 2004).

symptom	četnost
neplodnost	91–99 %
malá varlata	více než 95 %
zvýšená hladina gonadotropinu	více než 95 %
azoospermie (dospělí)	více než 95 %
poruchy učení (děti)	více než 75 %
snížená hladina testosteronu	63–85 %
menší míra ochlupení obličeje	60–80 %
menší míra pubického ochlupení	30–60 %
gynekomastie	38–75 %
abdominální obezita (dospělí)	okolo 50 %

Tabulka 8

Četnost nejčastějších projevů Klinefelterova syndromu (vybrány symptomy s četností nad 50 %, převzato a upraveno z Groth et al., 2013)

Diagnostika tohoto syndromu bývá povětšinou náhodná, vzhledem k tomu, že klinické projevy často nejsou příliš výrazné. Záchyt může nastat při doplňkových vyšetřeních karyotypu v těhotenství, nebo je toto vyšetření indikováno muži z páru, kterému se dlouhodobě nedaří počít potomka (Semecký, 1987).

6.2.3 Genotyp

Nadbytečný X chromozom může pocházet od obou rodičů, a to se stejným relativním výskytem 50 % jak od otce, tak od matky.

Při maternální dědičnosti dochází k chybě při meióze I i II a v necelých 16 % případů během postzygotické mitózy (PZM – *post-zygotic mitotic*), zatímco u paternální dědičnosti nastává chyba při dělení pouze v meióze I (Thomas, Hassold, 2003).

	maternální dědičnost	paternální dědičnost
meióza I – achiasmata	22,80 %	67,10 %
meióza I – chiasmata	25,70 %	32,90 %
meióza II	28,60 %	0
postzygotická mitóza (PZM)	15,70 %	0
ostatní chyby v meióze	7,10 %	0

Tabulka 9

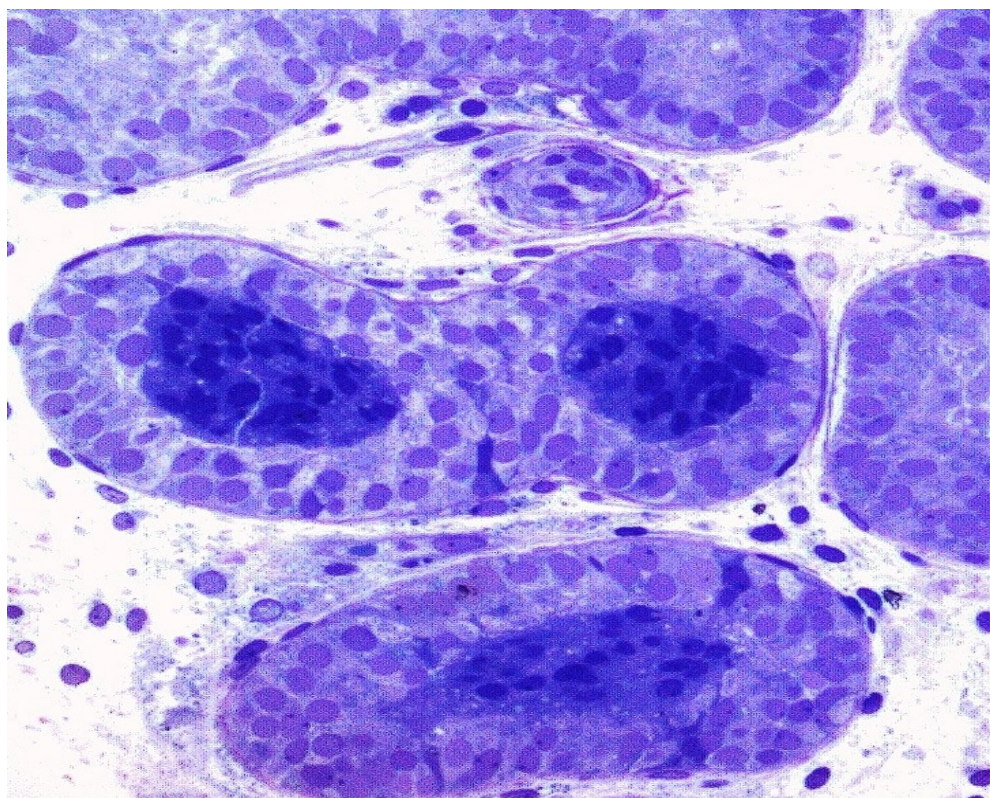
Tabulka s relativním zastoupením původu mutací vedoucích ke genotypu 47, XXY (převzato a upraveno z Thomas, Hassold, 2003).

Stejně jako je tomu u žen, i u mužů s touto diagnózou podléhá jeden z chromozomů X umlčování. Avšak asi 15 % genů, které jsou umístěné na nadbytečném X chromozomu, umlčení nepodlehne, a vzniklá zvýšená genová dávka má na svědomí genetické pozadí této nemoci. Tyto geny nalézáme po celém chromozomu X, nejvíc jich ale zůstává neumlčeno v pseudoautozomálním regionu chromozomů X a Y – PAR. Uvažuje se, že

konkrétně trojitě kopie genů *SHOX*, *PCDH11XY* a *SYBL1* by právě v Leydigových buňkách mohly způsobovat jejich nefunkčnost, tudíž nedostatek testosteronu u pacientů s Klinefelterovým syndromem (Nieschlag et al., 2014; Ross et al., 2006).

6.2.4 Snímky histologických preparátů

6.2.4.1 Prepubertální varle

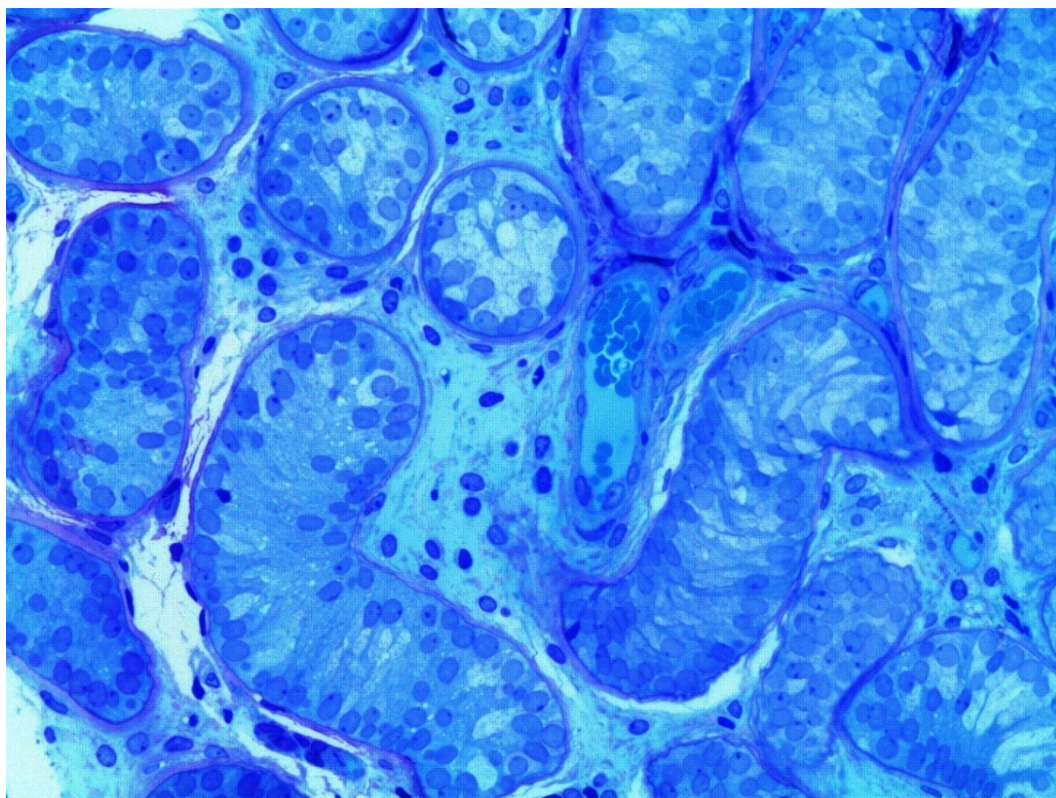


Obrázek 10

Biopsie prepubertálního varlete (pacient ve věku ~ 7 let), zvětšeno 100x.

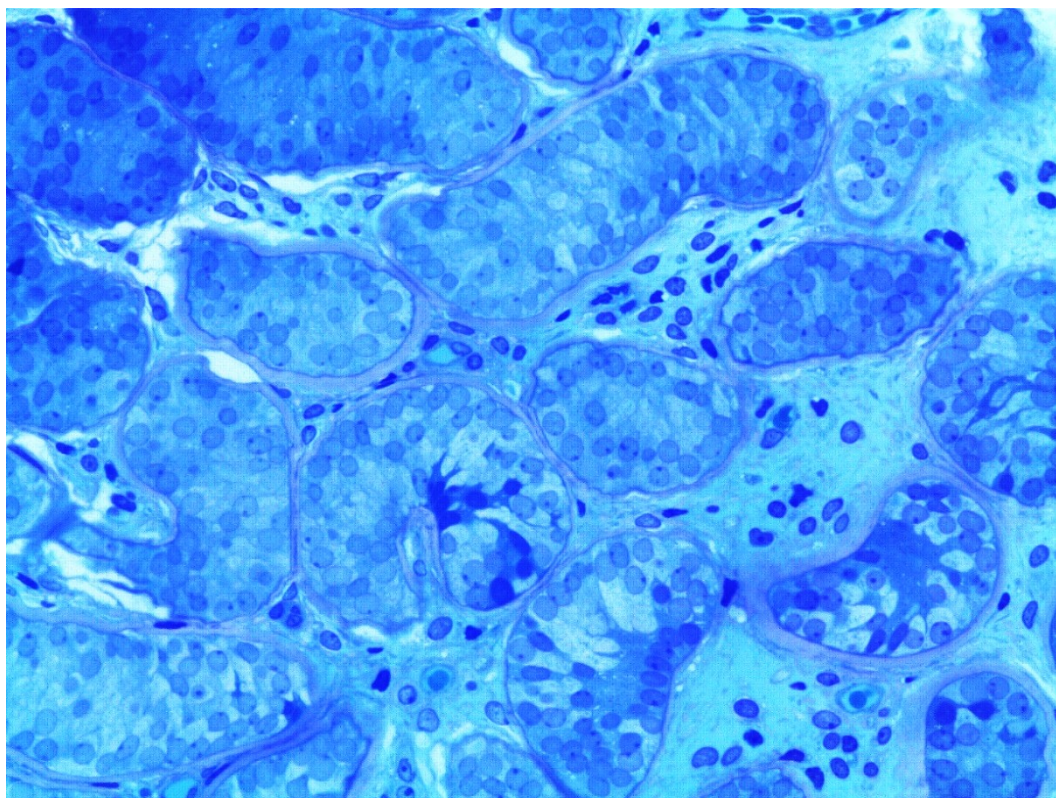
Na snímku můžeme vidět neprůchozí semenotvorné kanálky vystlané výběžky Sertoliho buněk.

Zřetelná je ztlustění bazální lamina. Intersticiium je tvořeno hladkým vazivem s přítomností fibroblastů a makrofágů, bez Leydigových buněk.



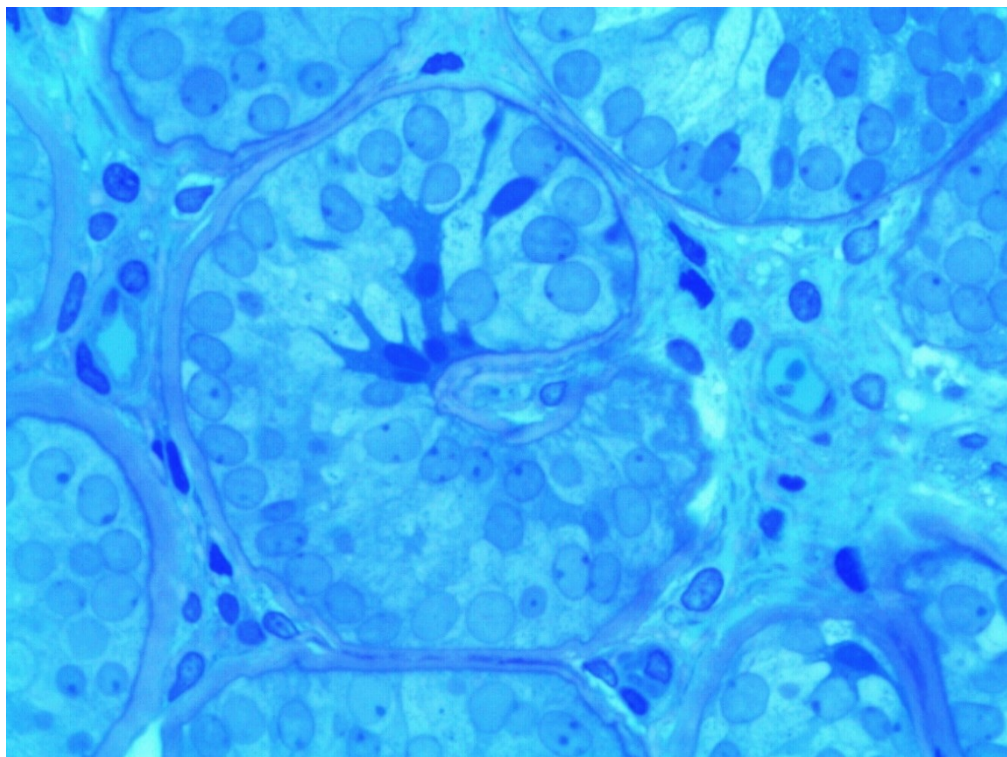
Obrázek 11

Biopsie prepubertálního varlete (pacient ve věku ~ 7 let), zvětšeno 200x.



Obrázek 12

Biopsie prepubertálního varlete (pacient ve věku ~ 7 let), zvětšeno 200x.

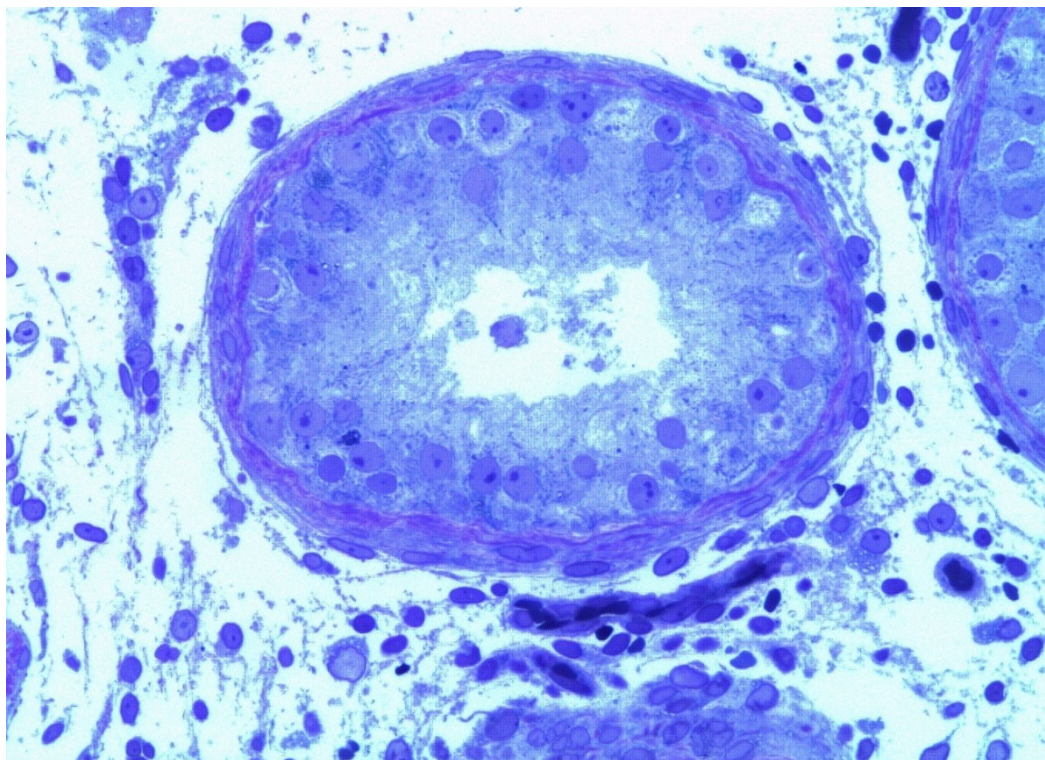


Obrázek 13

Biopsie prepubertálního varlete (pacient ve věku ~ 7 let), zvětšeno 400x.

Na tomto snímku lze zřetelně rozeznat dvě populace Sertoliho buněk. Předpokládáme, že světlá populace jsou normálně se vyvíjející Sertoliho buňky, kdežto tmavá populace pravděpodobně podléhá degeneraci. Lze zřetelně pozorovat úplné uzavření semenotvorných kanálků, intersticiální prostor s řídkým vazivem, bez Leydigových buněk.

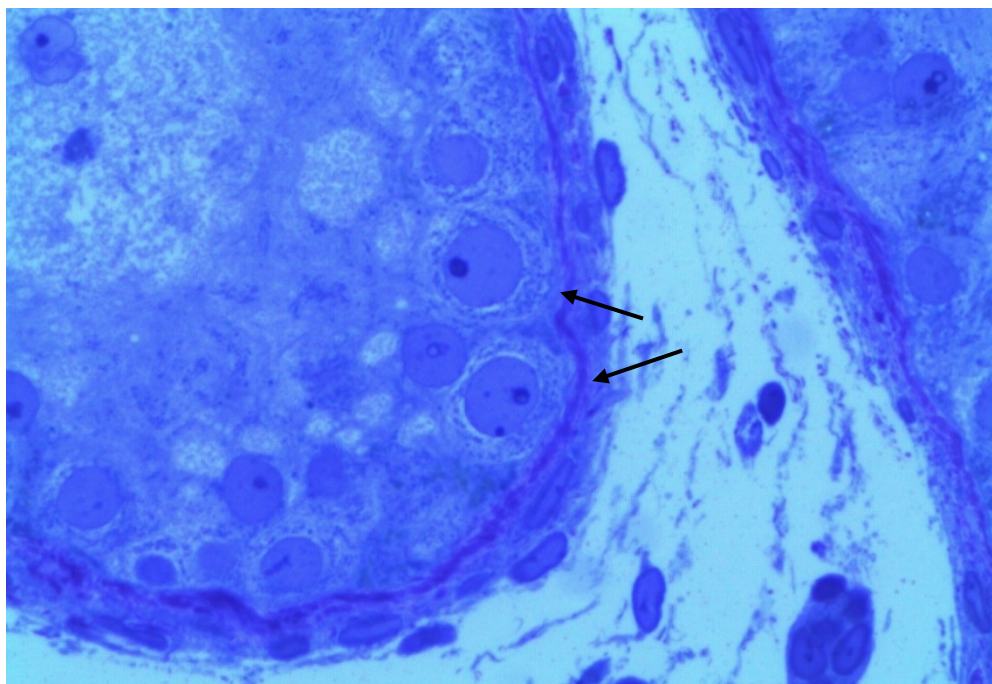
6.2.4.2 Pubertální varle



Obrázek 14

Biopsie pubertálního varlete (pacient ve věku ~ 14 let), zvětšeno 200x.

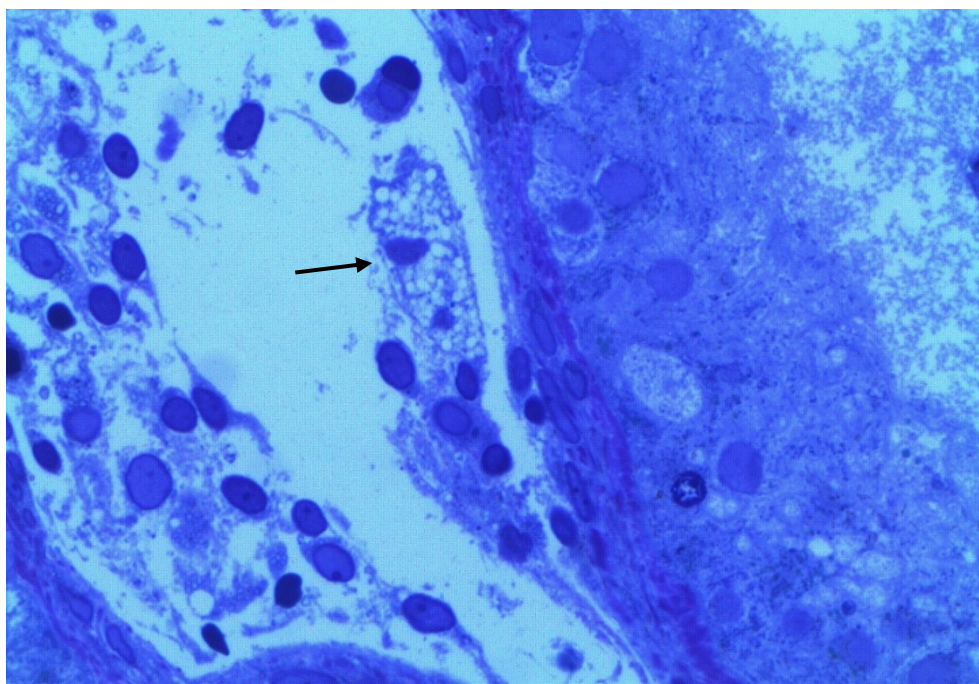
Průřez semenotvorným kanálkem. Lze pozorovat ztlustělou bazální laminu, při jejím okraji pozorujeme populaci Sertoliho buněk a zřídka buňky zárodečné. V řídkém vazivu intersticia jsou viditelné pouze zbytky populace Leydigových buněk.



Obrázek 15

Biopsie pubertálního varlete (pacient ve věku ~ 14 let), zvětšeno 400x.

Detail okraje semenotvorného kanálku. Při bazální lamině můžeme pozorovat stadia premeiotické diferenciace zárodečných buněk, které však nepokračují dále ve vývoji.



Obrázek 16

Biopsie pubertálního varlete (pacient ve věku ~ 14 let), zvětšeno 400x.

Detail rozpadající se Leydigovy buňky v intersticiálním prostoru. V semenotvorném kanálku vidíme malou populaci spermatogonií, která se však dále nevyvíjí. Nejsou vytvořeny ani spoje mezi Sertoliho buňkami, a tudíž hematotestikulární bariéra.

7. DISKUZE

Cílem této práce bylo popsat vývoj mužských gonád především v embryonálním a fetálním období tohoto vývoje. Zvláštní kapitoly vývoje jsou věnovány Sertoliho a Leydigovým buňkám, které se v gonádách nacházejí a plní důležité úlohy při jejich diferenciaci v dospělou gonádu a poté zajišťují podmínky pro spermatogenezi.

Prostudováním této problematiky lze tvrdit, že vývoj gonády, potažmo pohlaví je velmi komplexní proces, na kterém se podílí mnoho faktorů a byť jen malá chyba v jakémkoli kroku z tohoto procesu může mít fatální následky pro budoucí vývoj jedince.

Ve své minulé bakalářské práci obhajované v loňském roce na Přírodovědecké fakultě UK jsem se věnovala tématu vrozených vývojových vad a některým typům jejich etiologie (teratogen, chyba v kaskádě, mikrodelece a mikroduplikace). Proto jsme se v této práci rozhodli téma pojmout nejen jako přehled vývoje, ale zmínit i některé vady, které mohou v tomto vývoji nastat včetně metod, kterými se dají diagnostikovat.

Vyspělejší technika, nové pozorovací a vyšetřovací metody i pokrok vědy jako takové nám dovoluje bližší prostudování konkrétních kaskád a principů, které se v procesu embryonálního a fetálního vývoje uplatňují. Díky tomu můžeme chyby v ontogenezi lépe popsat, pochopit, diagnostikovat a pokud je to možné, tak i léčit.

Co se týče léčby, je nutné mít na paměti, že zdraví pacienta také není jednostrannou záležitostí, ale že zdraví fyzické jde ruku v ruce se zdravím psychickým. Například při diagnóze infertility, kterou u daného pacienta nelze nijak léčit je velmi důležité, aby se pacientovi dostalo také pomoci v rámci seznámení se s jinými možnostmi rodičovství. Speciálně u žen je nutno psychické podpory kvůli pocitům méněcennosti z důvodu nemožnosti stát se matkou.

8. ZÁVĚR

V této práci byl popsán vývoj mužských gonád přibližně od třetího týdne intrauterinního života až po dospělé varle, samostatná kapitola se pak věnuje spermatogenezi, Sertolihovým a Leydigovým buňkám.

Determinace pohlaví je zpracována i z genetického hlediska, popsány jsou pohlavní chromozomy, jejich pseudoautozomální oblast a pohlaví určující region na chromozomu Y.

V přehledu jsou diskutovány dva typy vývojových vad, které mohou nastat v průběhu ontogeneze. Klinefelterův syndrom jako zástupce chromozomální aberace a perzistence Müllerových vývodů zastupující chybu v sekreci/receptoru anti-Mülleriánského hormonu. V souvislosti s těmito chorobami jsou popsány dvě metody vyšetření a diagnostiky chorob spojených s pohlavím. Metoda fluorescenční hybridizace in situ a metoda polosilných řezů.

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

1	Dělení a diferenciacie spermatogonií	str. 6
2	Řez semenotvorným kanálkem	str. 7
3	Vývojová stadia mužských pohlavních buněk znázorněná v syncytiích	str. 8
4	Znázornění navázání vyvíjejících se pohlavních buněk na cytoskelet Sertoliho buněk	str. 9
5	Znázornění migrace spermatocytů skrze hematotestikulární bariéru	str. 10
6	Schéma lidského karyotypu	str. 12
7	Schéma lidského chromozomu X	str. 13
8	Schéma lidského chromozomu Y	str. 13
9	Karyotyp 47, XXY	str. 24
10	Biopsie prepubertálního varlete (pacient ve věku ~ 7 let), zvětšeno 100x	str. 27
11	Biopsie prepubertálního varlete (pacient ve věku ~ 7 let), zvětšeno 200x	str. 28
12	Biopsie prepubertálního varlete (pacient ve věku ~ 7 let), zvětšeno 200x	str. 28
13	Biopsie prepubertálního varlete (pacient ve věku ~ 7 let), zvětšeno 400x	str. 29
14	Biopsie pubertálního varlete (pacient ve věku ~ 14 let), zvětšeno 200x	str. 30
15	Biopsie pubertálního varlete (pacient ve věku ~ 14 let), zvětšeno 400x	str. 31
16	Biopsie pubertálního varlete (pacient ve věku ~ 14 let), zvětšeno 400x	str. 31

10. SEZNAM TABULEK

1	Poměr složek pro přípravu Millionigova pufru	str. 15
2	Poměr složek pro přípravu zásobních roztoků pro přípravu roztoku 3% GA v pufru	str. 16
3	Poměr složek pro přípravu tlumivého roztoku pro přípravu 3% GA v pufru	str. 16
4	Poměr složek pro přípravu fixačního roztoku 3% GA v pufru	str. 16
5	Poměr složek pro přípravu 2% roztoku kyseliny osmičelé v pufru	str. 17
6	Vzestupná alkoholová řada pro odvodnění vzorku	str. 17
7	Postup proscování vzorku epoxidovou pryskyřicí	str. 18
8	Četnosti nejčastějších projevů Klinefelterova syndromu	str. 25
9	Tabulka s relativním zastoupením původu mutací vedoucích ke genotypu 47, XXY	str. 26

11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- web 1: databáze OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man*, dostupné z [online: <https://www.omim.org/entry/190180>, poslední přístup 6.8.2018]
- web 2a: Šípek, A. jr.: Genetika – Biologie; Váš zdroj informací o genetice a biologii, 2010–2014, dostupné z [online: <http://www.genetika-biologie.cz/karyotyp-cloveka>, poslední přístup 20.8.2018]
- web 2b: Šípek, A. jr.: Genetika – Biologie; Váš zdroj informací o genetice a biologii, 2010–2014, dostupné z [online: <http://www.genetika-biologie.cz/urceni-pohlavi-cloveka>, poslední přístup 20. 8. 2018]
- web 3: NCBI *Genome Data Viewer* dostupné z [online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?cfg=NCID_1_20211273_130.14.18.128_9146_1534880567_320334559, poslední přístup 21. 8. 2018]
- web 4: NCBI *Genome Data Viewer* [online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?cfg=NCID_1_19052471_130.14.22.10_9146_1534880596_1897907596, poslední přístup 21. 8. 2018]
- web 5: databáze OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man*, dostupné z [online: <https://www.omim.org/entry/48000>, poslední přístup 18.8.2018]
- web 6: Mendelova univerzita v Brně: Virtuální svět genetiky 1, Genetika pohlaví – genetická determinace pohlaví, 2006, dostupné z [online: http://user.mendelu.cz/urban/vsg1/mendel/pdf/15_genetika_pohlavi.pdf, poslední přístup 21. 8. 2018]
- web 7: FN Brno, Integrované laboratoře molekulární cytogenetiky, dostupné z [online: <http://www.sci.muni.cz/cytogenlab/index.php?pg=metody--fish>, poslední přístup 20.8.2018]

obrázek 1: dostupné z [online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/pmc/articles/PMC45216/bin/pnas01146-0014-a.jpg>, poslední přístup 20.8.2018]

obrázek 2: dostupné z [online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10095/bin/ch19f17.jpg>, poslední přístup 10.8.2018]

obrázek 3: dostupné z [online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/books/NBK10095/bin/ch19f18.jpg>, poslední přístup 10.8.2018]

obrázek 6: dostupné z: [online: https://www.wikiskripta.eu/w/Lidsk%C3%BD_karyotyp#/media/File:Karyotype.png, poslední přístup 14. 8. 2018]

obrázek 7: dostupné z: [online: https://cs.wikipedia.org/wiki/Chromozom_X#/media/File:Chromosome_X.svg, poslední přístup 11.8.2018]

obrázek 8: dostupné z: [online: https://cs.wikipedia.org/wiki/Chromozom_Y#/media/File:Chromosome_Y.svg, poslední přístup 13.8.2018]

obrázek 9: dostupné z [online: https://www.wikiskripta.eu/w/Klinefelter%C5%AFv_syndrom#/media/File:Human_chromosomesXXY01.png, poslední přístup 8.8.2018]

- Blecher, S. R., Erickson, R. P. (2007). Genetics of sexual development: a new paradigm. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 143A (24), 3054–3068.
doi:10.1002/ajmg.a.32037
- Chang, S., Skakkebaek, A., Gravholt, C. H. (2015). Klinefelter syndrome and medical treatment: Hypogonadism and beyond. *Hormones*, 14(4), 531–548.
<https://doi.org/10.14310/horm.2002.1622>
- Charlesworth, B. (1991). Evolution of Sex Chromosomes. *Science*, 251, 1030–1033.
<https://doi.org/10.1126/science.1998119>
- Chocu, S., Calvel, P., Rolland, A. D., Pineau, C. (2012). Spermatogenesis in mammals: Proteomic insights. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58(4), 179–190.
<https://doi.org/10.3109/19396368.2012.691943>
- Dym, M. (1994). Spermatogonial stem cells of the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), 11287–9.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11287>
- Groth, K. A., Skakkebaek, A., Høst, C., Gravholt, C. H., Bojesen, A. (2013). Klinefelter syndrome - a clinical update. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(1), 20–30. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2382>
- Imbeaud, S., Rey, R., Berta, P., Chaussain, J. L., Wit, J. M., Lustig, R. H., ...Josso, N. (1995). Testicular degeneration in three patients with the persistent mullerian duct syndrome. *Eur J Pediatr*, 154(3), 187–190.
- Jirásek J. E.: *Endokrinologie fetoplacentární jednotky*, Praha, Avicentrum, 1. vydání, 1977, 200 s., s. 73–85
- Jirásek, J, *The Global library of women's medicine*, Normal Sex Differentiation (ISSN: 1756-2228), 2008; DOI 10.3843/GLOWM.10346
- Kittnar, O. et al.: *Lékařská fyziologie*, Praha, Grada, 1. vydání, 2011, 800 s., ISBN 978-80-247-3068-4

- Mangs, H. A., Morris, B. (2007). The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. *Current Genomics*, 8(2), 129–136. <https://doi.org/10.2174/138920207780368141>
- Michalová, K.: *Úvod do lidské cytogenetiky*, Brno, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1. vydání, 1999, 172 s., ISBN 80-701-3281-7
- Michalová, K.: *Fluorescence microscopy and fluorescent probes*, London, Plenum Press, 1. vydání, 1996, 306 s., ISBN 1520-0353
- Moore, K.L., Persaud, T. V. N., Mark, G.: *The developing human: clinically oriented embryology*, Saunders, 2013, 560 s., ISBN 9781437720020
- Nieschlag, E., Werler, S., Wistuba, J., Zitzmann, M. (2014). New approaches to the Klinefelter syndrome. *Annales d'Endocrinologie*, 75(2), 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2014.03.007>
- Phillips, B. T., Gassei, K., Orwig, K. E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1546), 1663–1678. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0026>
- Rajpert-De Meyts, E., Jørgensen, N., Graem, N., Müller, J., Cate, R. L., Skakkebaek, N. E. (1999). Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 84(10), 3836–44. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.10.6047>
- Ross, M. T., Grafham, D.V, Coffey, A. J., Scherer, S., McLay, K., Muzny, D., ...Bentley, D. R. (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*, 434(March), 325–337. <https://doi.org/nature03440> [pii]\r10.1038/nature03440
- Ross, N. L. J., Wadekar, R., Lopes, A., Dagnall, A., Close, J., DeLisi, L. E., Crow, T. J. (2006). Methylation of two Homo sapiens-specific X-Y homologous genes in

- Klinefelter's syndrome (XXY). *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 141(5), 544–548. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30339>
- Sadler, T. W.: *Langmanova lékařská embryologie*, Praha, Grada, 1. vydání, 2011, 432 s., ISBN 978-80-247-2640-3
- Saleem, M., Ather, U., Mirza, B., Iqbal, S., Sheikh, A., Shaukat, M., ...Rehan, T. (2016). Persistent mullerian duct syndrome: a 24-year experience. *Journal of Pediatric Surgery*, 51(10), 1721–1724. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.06.005>
- Shamim, M. (2007). Persistent Mullerian duct syndrome with transverse testicular ectopia presenting in an irreducible recurrent inguinal hernia. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 57(8), 421–423.
- Semecký, V.: *Ontogeneze mužských pohlavních buněk ve vztahu k ostatním strukturám gonád* (elektromikroskopická studie), disertační práce, 1987
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., ...Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346(6281), 240–244. <https://doi.org/10.1038/346240a0>
- SOP Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze – Podolí, Laboratoř poruch rané ontogeneze
SOP Fakultní Thomayerovy nemocnice v Praze, Oddělení lékařské genetiky
- Svechnikov, K., Landreh, L., Weisser, J., Izzo, G., Colón, E., Svechnikov, I., Söder, O. (2010). Origin, development and regulation of human leydig cells. *Hormone Research in Paediatrics*, 73(2), 93–101. <https://doi.org/10.1159/000277141>
- Thomas, N. S., Hassold, T. J. (2003). Aberrant recombination and the origin of Klinefelter syndrome. *Human Reproduction Update*, 9(4), 309–317. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg028>
- Thompson, J. S., Thompson, M. W., Nussbaum, R. L., McInnes, R. R. Willard, H. F.: *Klinická genetika*, Praha, Triton, 6. vydání, 2004, 426 s., ISBN 80-7254-475-6

- Trojan, S. et al.: *Lékařská fyziologie*, Praha, Grada, 4. přepracované a doplněné vydání, 2003, 771 s., ISBN 80-247-0512-5
- Vokurka, M., Hugo, J.: *Velký lékařský slovník*, Praha, Maxdorf, 10. aktualizované vydání, 2015, ISBN 978-80-7345-456-2
- Wen, Q., Tang, E. I., Xiao, X., Gao, Y., Chu, D. S., Mruk, D. D., ...Cheng, C. Y. (2016). Transport of germ cells across the seminiferous epithelium during spermatogenesis—the involvement of both actin- and microtubule-based cytoskeletons. *Tissue Barriers*, 4(4). <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1265042>
- Wen, Q., Tang, E. I., Gao, Y., Jesus, T. T., Chu, D. S., Lee, W. M., ...Cheng, C. Y. (2017). Signaling pathways regulating blood–tissue barriers — Lesson from the testis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1860(1), 141–153. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.020>
- Yuksel, B., Saygun, O., Hengirmen, S. (2006). Persistent müllerian duct syndrome associated with irreducible inguinal hernia, bilateral cryptorchidism and testicular neoplasia: a case report. *Acta Chirurgica Belgica*, 106(1), 119–120. <https://doi.org/10.1080/00015458.2006.11679852>