

**Univerzita Karlova v Praze  
2. lékařská fakulta**

**Ústav biologie a lékařské genetiky**

**Disertační práce**

**Studium aneuploidie v gametách a  
embryích**

**MUDr. Jan Diblík**

**Školitel: Doc. MUDr. Milan Macek, CSc.**

**Oborová rada: molekulární a buněčná biologie, genetik a  
virologie**

**Praha, 2006**

## Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli Doc. MUDr. Milanovi Mackovi za podporu a laskavou pomoc během celého mého postgraduálního studia. Děkuji také všem současným i bývalým spolupracovníkům z Centra reprodukční genetiky, bez nichž by tato práce nemohla vzniknout, především MUDr. Šárce Vilímové, Mgr. Petře Paulasové, MUDr. Silvii Doubravské, MUDr. Marině Zámečnickové, MUDr. Pavlíně Potužnickové, Mgr. Renátě Vincenciové, Mgr. Jarmile Zajícové, Janě Lagnerové, Kateřině Spejchalové a Janě Ichové i z dalších oddělení Ústavu biologie a lékařské genetiky, především Prof. MUDr. Petrovi Goetzovi CSc., Prof. MUDr. Milanovi Mackovi DrSc., RNDr. Eduardovi Kočárkovi, PhD., RNDr. Drahuši Novotné, RNDr. Danovi Chudobovi, MUDr. Alici Krebsové PhD., MUDr. Monice Koudové, Ing. Ivetě Horké a RNDr. Miladě Matějčkové. Vděčný jsem i všem odborníkům z ostatních pracovišť, kteří nám pomáhali na našem pracovišti zavést nové metody, mezi něž patří především Prof. Jurij Jurov z Moskvy, Dr. Frank Pellestor z Montpellier, Dr. Thomas Liehr z Jeny, Dr. Cristina Magli a Dr. Andor Crippa z Bologni, Dr. Markus Montag z Bonnu, Prof. MVDr. Jiří Rubeš, CSc. z Brna, Prof. Michael Speicher z Mnichova a RNDr. Roman Krejčí CSc. z Prahy.

Práce byla podpořena granty VZ FNM 00000064203, VZ UK 2.LF 111300003, Copernicus 2 ICA 2 CT 2000 100012, IGA MZ ČR NR/7962-3 a LN00A079

## Obsah

1. <i>Souhrn</i>	5
2. <i>Summary</i>	7
3. <i>Úvod</i>	9
3.1. <i>Vymezení tématu práce</i>	9
3.2. <i>Přehled molekulárně cytogenetických metod</i>	9
3.3. <i>Chromosomální vady u mužů a žen se sníženou plodností</i>	17
3.4. <i>Funkční topografie buněčného jádra</i>	20
4. <i>Chromosomální vady ve spermích</i>	22
4.1. <i>Úvod</i>	22
4.2. <i>Cíle</i>	25
4.3. <i>Materiál a metody</i>	25
4.4. <i>Výsledky</i>	28
4.5. <i>Diskuse</i>	32
4.6. <i>Závěry</i>	33
5. <i>Chromosomální vady v oocytech</i>	34
5.1. <i>Úvod</i>	34
5.2. <i>Cíle</i>	36
5.3. <i>Materiál a metody</i>	36
5.4. <i>Výsledky</i>	38
5.5. <i>Diskuse</i>	40
5.6. <i>Závěry</i>	41
6. <i>Chromosomální vady v embryích</i>	42
6.1. <i>Úvod</i>	42
6.2. <i>Cíle</i>	45
6.3. <i>Materiál a metody</i>	45
6.4. <i>Výsledky</i>	49
6.5. <i>Diskuse</i>	63
6.6. <i>Závěry</i>	65
7. <i>Databáze klinických a výzkumných údajů</i>	67
7.1. <i>Cíle</i>	67
7.2. <i>Materiál a metody</i>	67
7.3. <i>Výsledky</i>	67
7.4. <i>Diskuse</i>	72
7.5. <i>Závěry</i>	72

8.	<i>Seznam použité literatury</i>	73
9.	<i>Příloha 1 - Seznam publikací</i>	79
10.	<i>Příloha 2 - publikace</i>	83

# 1. Souhrn

## Úvod

Doktorská disertační práce se zabývá vypracováním a zavedením zdokonalených molekulárně cytogenetických vyšetření pro reprodukční genetiku. Zahrnuje metody klinické přímo užívané ke zlepšení diagnostiky a terapie pacientů z neplodných párů i metody experimentální, které pokud se jejich přínos prokáže, mohou být základem nových diagnostických postupů. Práce se soustřeďuje na studium aneuploidií, neboť představují závažnou komplikaci lidské reprodukce a jsou zásadním problémem léčby metodami asistované reprodukce.

## Cíle

Z klinického hlediska bylo hlavním cílem práce bylo zavedení vyšetření chromosomů spermií, polárních tělísek a blastomer pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH) pro prefertilizační a preimplantační diagnostiku aneuploidií

Hlavním výzkumným cílem bylo provedení studie lokalizace chromosomů v jádrech blastomer odebraných pro preimplantační vyšetření po mimotělním oplození. Záměrem bylo zjistit, zda pro polohu chromosomů z hlediska umístění ve středu nebo na periferii jádra platí u blastomer podobná pravidla jako u jiných buněčných typů v pozdějších stádiích vývoje a zda je poloha chromosomů ovlivněna aneuploidií. Dále jsme si dali za cíl pátrat pro periferní lokalizaci chromosomu X v buňkách s více kopiemi chromosomu X. Ta by mohla být projevem inaktivace chromosomu X, která dle nejnovějších výzkumů na myších embryích může začínat již v preimplantační fázi vývoje.

## Metody

Pro vyšetření spermií, polárních tělísek a blastomer byla použita FISH s DNA sondami na chromosomy 1, 13, 16, 18, 21, 22, X a Y. Bylo též otestováno použití PNA sond (peptide nucleic acids) na chromosomy 1, 4, 9, 16, 18, X a Y a metody 3-rozměrné počítačové analýzy mikroskopického obrazu pomocí počítače pro hodnocení výsledků FISH (3D-FISH). Pro hodnocení lokalizace chromosomů v jádrech blastomer byla vypracována metodika měření polohy jejich signálů pomocí počítačové obrazové analýzy a metoda porovnání nalezeného rozložení signálů s matematickým modelem náhodného rozložení.

## Výsledky

Úspěšně jsme do klinické praxe zavedli vyšetření aneuploidie spermií, polárních tělísek a blastomer a ukázali jsme, že FISH s PNA sondami a 3D-FISH jsou metody, které mohou umožnit vyšetřit více chromosomů a tuto diagnostiku zpřesnit.

V normálních blastomerách se lokalizace chromosomů 13, 16, 18, 21, 22, X a Y z hlediska umístění od středu k periferii neliší od náhodného rozmístění. Podobně se v aneuploidních blastomerách od náhodného rozmístění neliší poloha chromosomů 13, 16, 21, 22, X a Y. Ovšem u chromosomu 18 jsme v aneuploidních blastomerách našli významný posun k periferii jádra. V blastomerách s více chromosomy X jsme nenašli posun tohoto chromosomu k periferii

## Závěry

Výsledky dosažené vyšetřením aneuploidie spermií, polárních tělísek a blastomer odpovídají výsledkům ve světové literatuře.

## Souhrn

Výsledky studie lokalizace chromosomů v jádrech blastomer ukazují rozdíl v jaderné topologii mezi chromosomálně normálními a aneuploidní blastomerami. Tento rozdíl může být jedním z prvních projevů genomové nerovnováhy v aneuploidních embryích. Může ale také ukazovat na souvislost mezi narušením mechanismů řídících polohu chromosomů a vadami mitotického aparátu při poruchách časného embryonálního vývoje doprovázených postmeiotickým vznikem aneuploidii. V praxi se tyto výsledky mohou stát základem nových metod pro selekci nejvhodnějších embryí pro přenos do dělohy.

## 2. Summary

### Introduction

The thesis deals with improvement and clinical application of molecular cytogenetic methods for reproductive genetics. These methods include both clinical investigations used for improvement of diagnostic and therapeutic care for infertile couples and experimental methods that can become the basis of new diagnostic tools. The thesis concentrates on the study of aneuploidies, because they constitute a major complication of human reproduction especially by means of assisted reproductive technologies.

### Aims

The main practical aim was the introduction of fluorescence in situ hybridization (FISH) for evaluation of chromosomes in sperm, polar bodies and blastomeres for prefertilisation and preimplantation diagnosis of aneuploidies.

The main scientific objective was the study of chromosome localization in nuclei of blastomeres, that are removed from human embryos for preimplantation diagnosis. The aim of this study was to find, whether the localization of chromosomes in relation to the nuclear center and periphery is ruled by the same rules as in other cell types in later stages of development and whether the localization is influenced by aneuploidy. Next aim was to search for peripheral localization of chromosome X in embryos with more than one copies of the chromosome X. This could be a manifestation of X inactivation, that according to recent studies in mouse embryos, can be initiated already in the preimplantation phase.

### Methods

We have used DNA probes for chromosomes 1, 13, 16, 18, 21, 22, X and Y for FISH analysis of sperm, polar bodies and blastomeres. We have also tested PNA probes (peptide nucleic acids) for chromosomes 1, 4, 9, 16, 18, X and Y and 3-dimensional digital image analysis of microscopic image. We have developed a method of measurement of chromosome signals localization using digital image analysis and a method of evaluation of the localization by comparison with a mathematical model of random distribution.

### Results

We have introduced clinical investigation of aneuploidy in sperm, polar bodies and blastomeres. We have shown that FISH with PNA probes and 3D-FISH are methods that can allow an increase in the number of analyzed chromosomes and in precision of the analysis.

Localization of chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X and Y in chromosomally normal blastomeres does not differ from the model of random distribution. The distribution of chromosomes 13, 16, 21, 22, X and Y in aneuploid blastomeres is also not significantly different from the random distribution, but chromosome 18 is significantly shifted to the periphery. We have not found peripheral shift of chromosome X in blastomeres with more copies of chromosome X.

### Conclusions

The results of aneuploidy detection in sperm, polar bodies and blastomeres are in agreement with results of published studies.

We have found a difference in nuclear topology in aneuploid blastomeres compared to chromosomally normal blastomeres. This difference can be one of the first signs of genome

## Summary

imbalance in aneuploid embryos. But it can also show a relationship between defects of the mechanisms of chromosome positioning in the nucleus and failures of mitotic apparatus in embryos with early developmental disorders that are accompanied by aneuploidies of post-meiotic origin. These results can provide new tools for optimal selection of embryos for transfer into uterus.



## 3. Úvod

### 3.1. Vymezení tématu práce

Doktorská disertační práce se zabývá vypracováním a zavedením zdokonalených molekulárně cytogenetických vyšetření pro reprodukční genetiku. Tyto metody zahrnují metody klinické přímo užívané ke zlepšení diagnostiky a terapie pacientů z neplodných párů i metody experimentální, které pokud se jejich přínos prokáže, mohou být základem nových diagnostických metod. Hlavním výsledkem práce je zavedení preimplantačního vyšetření aneuploidií a studie lokalizace chromosomů v jádrech lidských preimplantačních embryí.

### 3.2. Přehled molekulárně cytogenetických metod

#### 3.2.1. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Základem molekulárně cytogenetických metod je denaturace a hybridizace studované cílové DNA se sondou (Liehr et al., 2002) – viz Obrázek 1.

##### 3.2.1.1. Sondy pro FISH

Při standardní FISH je sondou fluorescenčně značená DNA. Pro použití v reprodukční medicíně se užívají sondy centromerické a lokusově specifické.

Centromerické sondy odpovídají repetitivním sekvencím ( $\alpha$ -satelit,  $\beta$ -satelit, satelit III) (Liehr et al., 2002), které jsou specifické pro centromery jednotlivých chromosomů. Nejčastěji se používají sondy založené na  $\alpha$ -satelitní DNA. V centromerách je přítomná v tisících tandemově se opakujících kopií základní jednotky o délce 171 bp, které tvoří bloky o velikosti 250 kb až 5 Mb (Lee et al., 1997). Výsledkem hybridizace s centromerickými sondami jsou tedy obvykle velké silné signály. Pro jednotlivé chromosomy byly popsány specifické odchylky v sekvenci základního monomeru nebo repetice vyššího řádu, čímž je umožněno tyto sekvence používat jakožto sondy pro rozlišení jednotlivých chromosomů při FISH. Mezi některými chromosomy (13 a 21, 14 a 22) ale tyto rozdíly jsou tak malé, že centromery nelze pomocí FISH s těmito sondami rozlišit.

Lokusově specifické sondy sestávají ze značené DNA odpovídající krátkému úseku (1 kb – 2 Mb) (Liehr et al., 2002) daného chromosomu. Jejich signály bývají menší a méně intenzivní, podle velikosti detekované oblasti. Používají se pro detekci těch chromosomů, které nelze detekovat pomocí centromerických sond nebo pro detekci přestaveb daných úseků. Speciálním typem lokusově specifických sond jsou sondy pro subtelomerické úseky jednotlivých chromosomových ramének. Vzhledem k tomu, že jsou komerčně dostupné pro všechny chromosomy, dají se používat pro detekci translokací i na interfázních jádrech.

Jelikož po replikaci DNA se detekované sekvence DNA mohou od sebe v interfázním jádře oddálit, může být výsledkem místo jednoho signálu dvojice signálů. V případě centromerických signálů by takovýto dvojitý signál neměl být zcela rozdělený, v případě lokusově specifických sond mohou být signály i zcela oddělené - viz ukázka (Obrázek 2).

Pro preimplantační diagnostiku, kdy vyšetřovaným materiálem je jedna jediná buňka je důležité při jedné reakci analyzovat co nejvíce chromosomů. Pro každý studovaný chromosom nebo lokus tedy sonda musí být značená jiným fluorochromem. V praxi jsou dostupné sady s maximálně 5 různě značenými sondami. Aby bylo dosaženo většího počtu vyšetřených chromosomů, je nutno sondy odmýt a FISH reakci opakovat s další sadou sond.

## Úvod

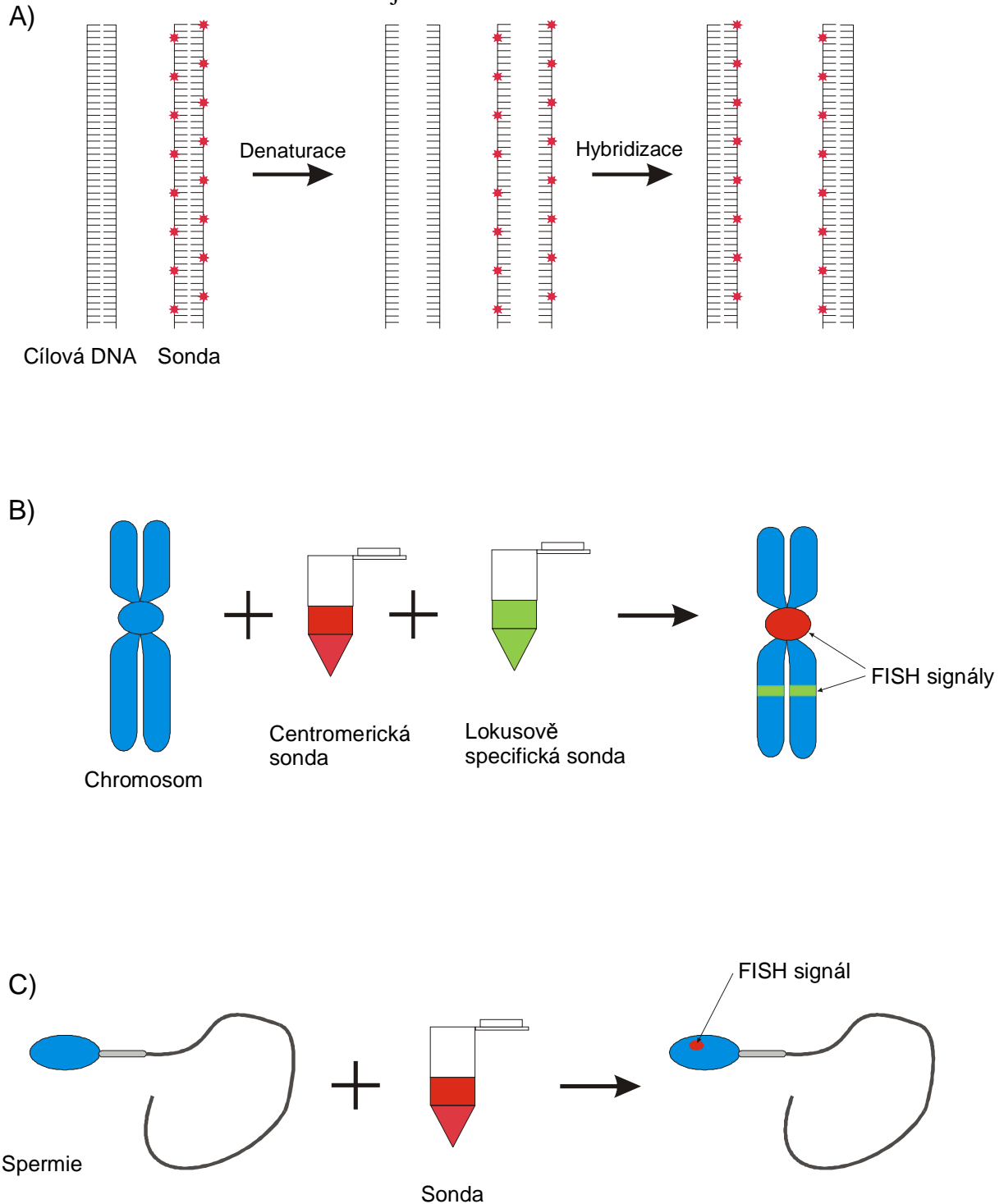
Při tom ovšem dochází k postupné ztrátě kvality cílové DNA a počet kol FISH je omezen na 2-3.

### Obrázek 1. Schéma fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

A. Denaturace DNA a hybridizace cílové DNA se sondou

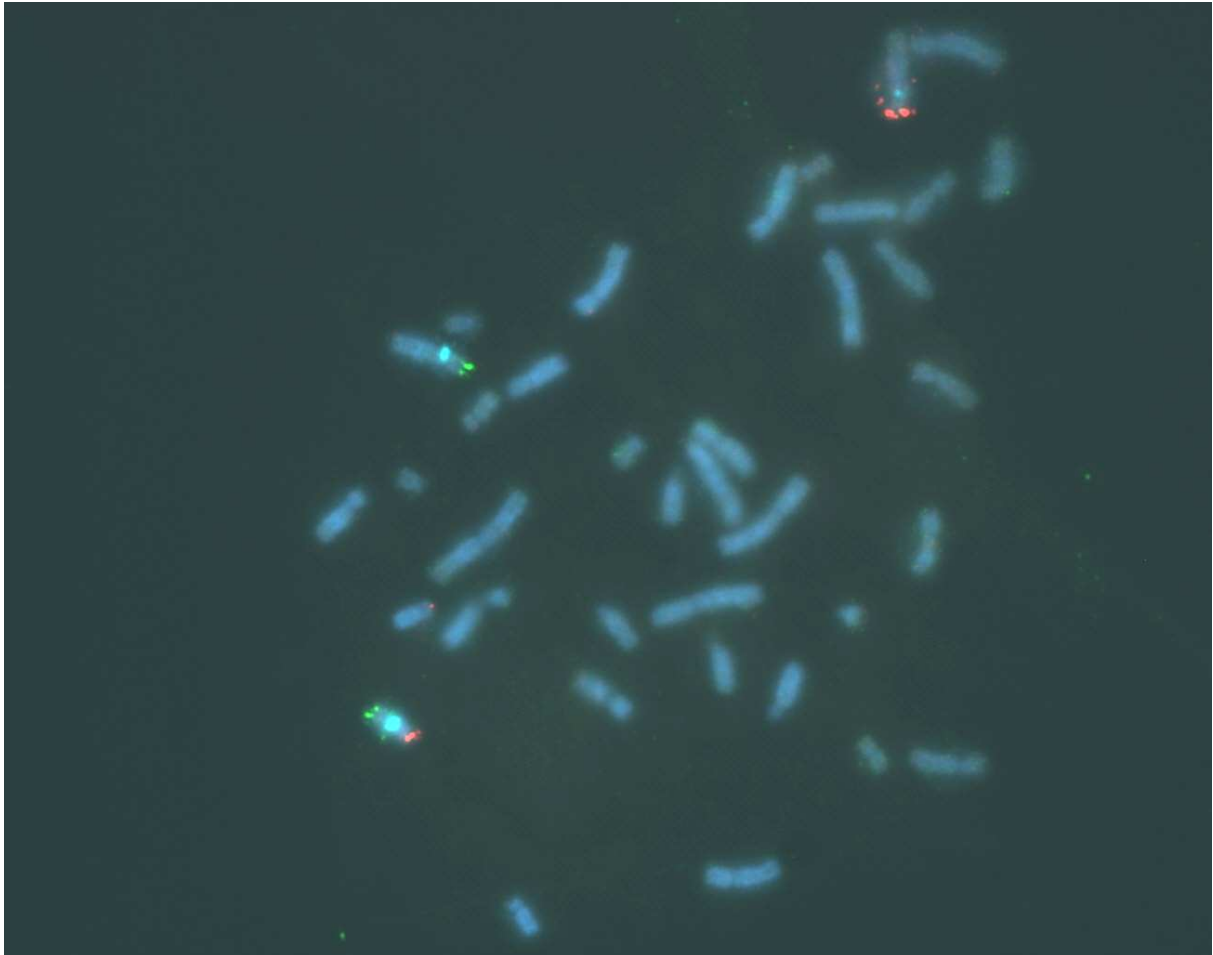
B. FISH na metafázických chromosomech

C. FISH na interfázních jádrech



**Obrázek 2. Fluorescenční in situ hybridizace na metafázických chromosomech kultivovaných lymfocytů.**

Použity byly sondy na centromeru chromosomu 16 (aqua), subtelomerickou oblast 16p (zelená) a subtelomerickou oblast 16q (červená). DNA byla obarvena DAPI (modrá). Pacientka s translokací t(1;16)(p11;q11) vyšetřovaná v rámci přípravy před eventuální preimplantační diagnostikou.

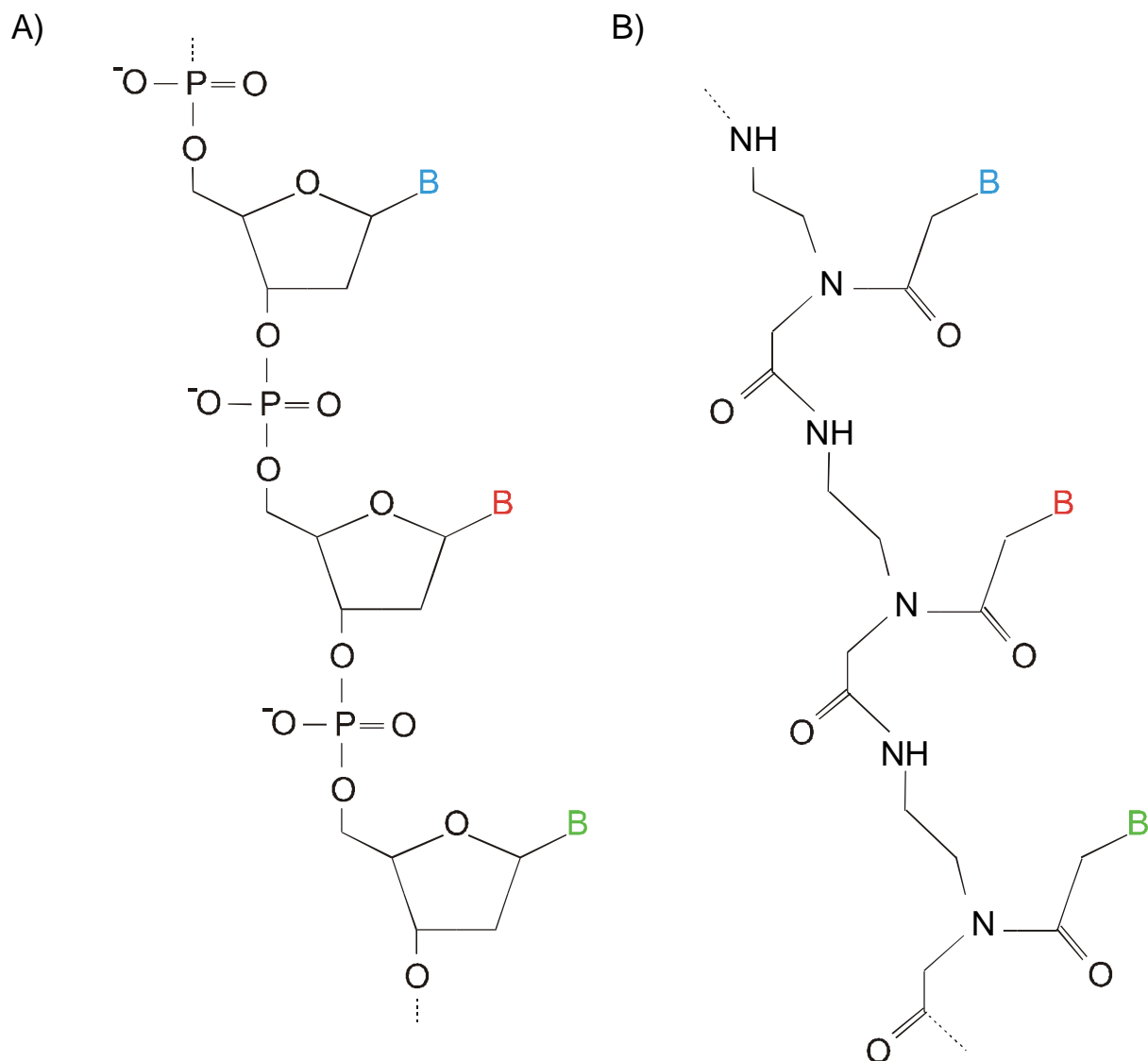


### 3.2.1.2. PNA-FISH

Peptide Nucleic Acids (PNA) jsou syntetické oligomery, analogy DNA, ve kterých je fosfodiesterová páteř nahrazena repetitivními jednotkami N (2-aminoethyl) glycinu, na které jsou purinové a pyrimidinové báze navázány metylkarbonylovou vazbou (viz Obrázek 3).

**Obrázek 3. Srovnání řetězců DNA a PNA**

- A. A) DNA  
B. B) PNA



Vysvětlivky:

B - báze

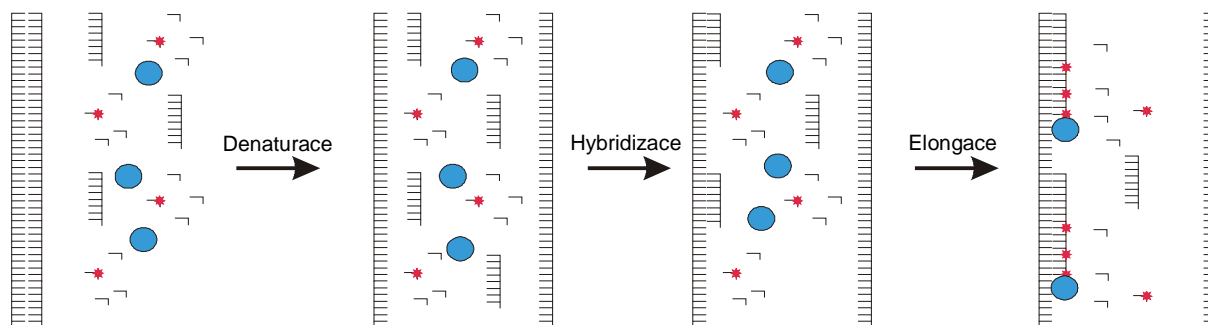
Pro FISH se používají PNA sondy tvořené krátkými oligonukleotidy (15–25 bp). Tím je dána jejich použitelnost pouze pro repetitivní sekvence (centromerické  $\alpha$ -satelitní sekvence, telomerické sekvence), kde díky počtu opakování sekvence, na níž se sonda váže, vzniká velký fluorescenční signál. Mezi vlastnosti PNA sond patří neutrální páteř řetězce a tím daná stabilita v širokém rozmezí pH a teplot, vysoká vazebná specifita a vysoká stabilita komplexu

PNA-DNA, krátká doba hybridizace a rezistence vůči nukleázám a proteázám (Nielsen et al., 1991). Z praktického hlediska to znamená, že pro odmyváání nespecificky navázných sond po hybridizaci stačí méně stringentní roztoky a nižší teplota. Při by mělo dojít k menší poškození cílové DNA. To znamená, že by na jednom preparátu mohlo být provedeno více kol hybridizace než při standardní FISH. Problémem je, že krátké oligonukleotidové sondy nejsou, vzhledem k podobnosti sekvencí mezi centromerami některých chromosomů, schopné rozlišit všechny chromosomy (viz 3.2.1.1). Pro použití v preimplantační diagnostice je tedy ve většině případů nutná kombinace s lokusově specifickými DNA sondami.






### 3.2.1.3. PRINS

Primed in situ labeling (PRINS) je metoda detekce chromosomů založená na hybridizaci cílové DNA s primery následované elongací s inkorporováním značených nukleotidů (Koch et al., 1995). Jako sondy se tedy používají krátké neznačené oligonukleotidy specifické pro repetitivní oblasti centromer chromosomů. Ke značení dochází až během elongace. Vzhledem k tomu, že k reakci dochází najednou na mnoha místech v rámci centromerické repetitivní sekvence, výsledkem je velký intenzivní fluorescenční signál. Limitem PRINS je ovšem opět použitelnost pouze pro ty chromosomy, které lze jednoznačně odlišit krátkými oligonukleotidy. Výhodou je snadná dostupnost a nízká cena primerů.

Obrázek 4. Schéma PRINS



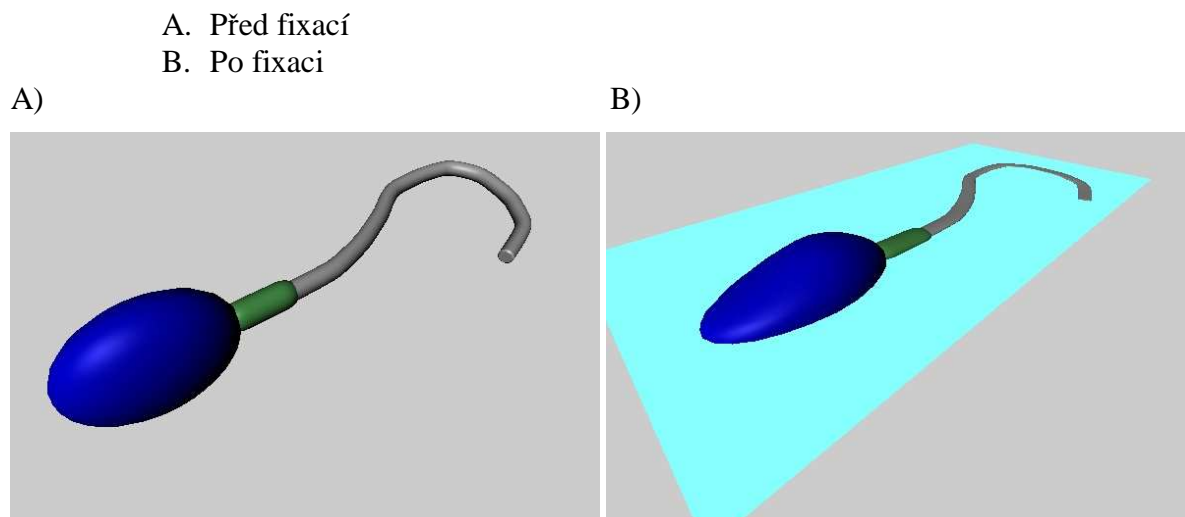
Vysvětlivky:

-  - cílová DNA
-  - oligonukleotidový primer
-  - DNA polymeráza
-  - fluorescenčně značený nukleotid (dUTP)
-  - neznačené nukleotidy (dATP, dCTP, dGTP)

### 3.2.1.4. 3D-FISH

Řada problémů diagnostiky pomocí FISH na interfázních jádrech, obzvláště v situacích, kdy je důležitý výsledek pro každou buňku jednotlivě, je dána tím, že pro mikroskopickou analýzu je zapotřebí dvojrozměrný preparát. Výsledkem fixace buněk na sklíčko je jejich částečné zploštění a roztažení. Přitom si ovšem jádra buněk určitou výšku ponechávají (viz Obrázek 5).

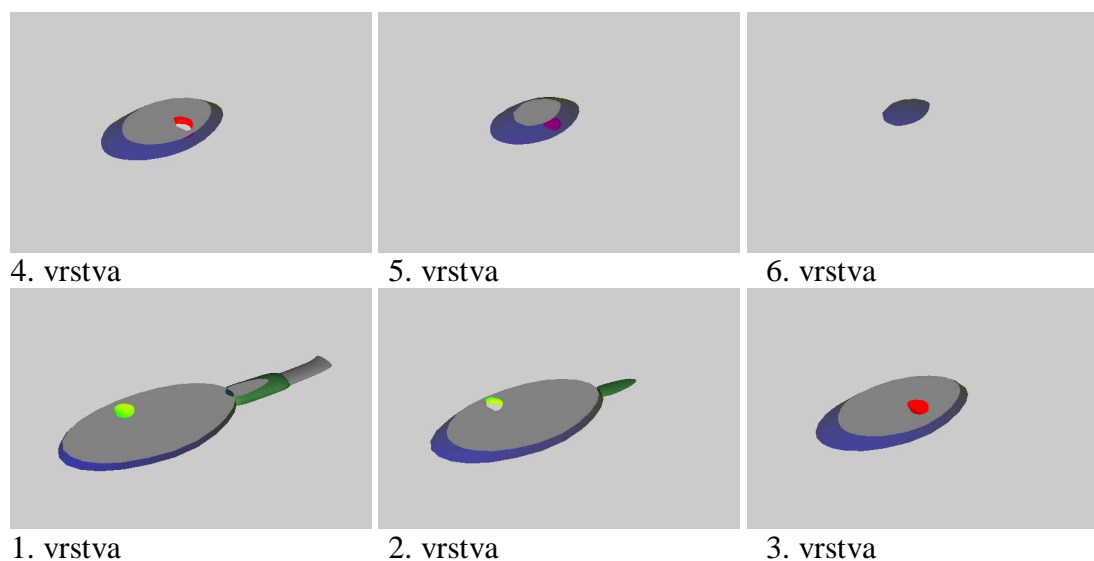
**Obrázek 5. Schéma zploštění spermie při fixaci na sklíčko**



Při hodnocení jsou pak problémem jak překryv signálů, tak výskyt signálů v různých rovinách ostrosti. Aby nebyl žádný ze signálů přehlédnut, je nutné pečlivé prohlížení s přeastřováním. Možným řešením těchto problémů je 3-rozměrná mikroskopická analýza preparátů po FISH s pomocí počítače (3D-FISH).

Základem 3D mikroskopie je pořízení série obrazů (optických řezů, „z-stack“) v různých rovinách ostrosti. K tomu je nutný přesný motorizovaný pohyb stolku v ose z. Nejlepších výsledků je dosahováno s pomocí konfokální mikroskopie, ale při menších požadavcích na rozlišení v ose z lze použít i standardní mikroskop a případně dekonvoluci (Maierhofer et al., 2003). Pro přesné intervaly mezi jednotlivými snímky je nutné používat mikroskop s motorizovaným a počítačem řízeným pohybem stolku v ose z.

**Obrázek 6. Schéma snímání preparátu po vrstvách odpovídajících sérii rovin ostrosti**



Série optických řezů je možné prohlížet pomocí počítače a provádět s nimi řadu dalších operací:

- Simulace proostřování pomocí animace jednotlivých snímků, čímž je napodobeno prohlížení v mikroskopu
- Projekce – 3 rozměrná zobrazení umožňující pohled z různých úhlů na jednotlivé objekty pro analýzu vzájemných prostorových vztahů
- Sestavení obrazu s rozšířenou hloubkou ostrosti (Extended focus), který obsahuje pouze ostré objekty z jednotlivých vrstev
- Dekonvoluce – odstranění neostrých částí obrazu z jednotlivých vrstev pro lepší analýzu ve třech rozměrech. Dekonvoluce je založena na matematické analýze série obrazů pořízených v různých rovinách ostrosti s cílem odstranit světlo pocházející z objektů mimo rovinu ostrosti (McNally et al., 1999). Pro dekonvoluci existuje řada algoritmů. z nichž některé jsou vysoce náročné na výpočetní výkon. Díky pokroku ve výkonu počítačů je v současné době tyto výpočty možné provádět na standardním osobním počítači.

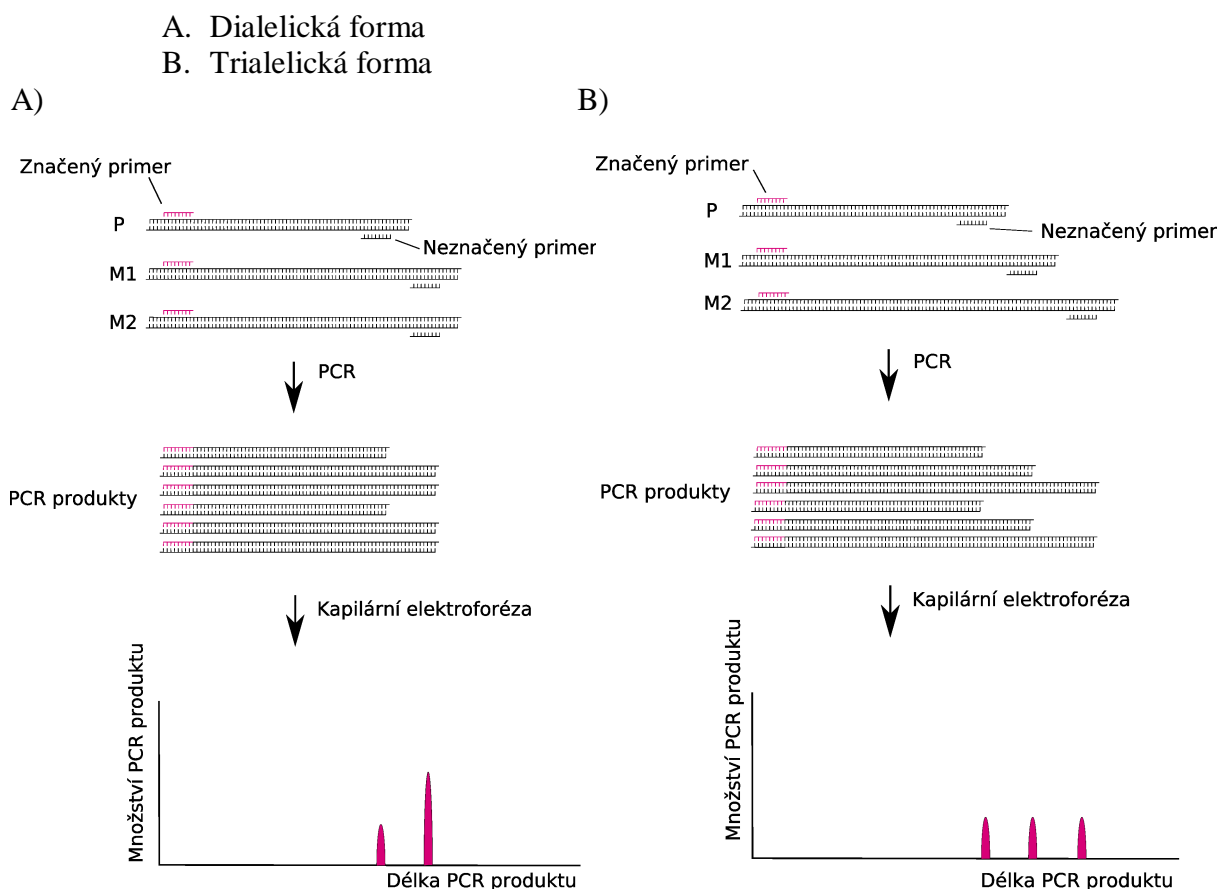
### 3.2.2. Kvantitativní fluorescenční PCR

Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězové reakce (QF-PCR) je molekulárně cytogenetická metoda umožňující detekci aneuploidií na základě amplifikace specifických alel mikrosatelitových polymorfismů (STR – short tandem repeats) v DNA (Pertl et al., 1994). Jednotlivé alely těchto polymorfních markerů se liší délkou PCR produktu. Základem tohoto polymorfismu je přítomnost variabilního počtu základních 2-4-nukleotidových repetitivních úseků. PCR je prováděna s fluorescenčně značenými primery, takže s pomocí kapilární elektroforézy s detektorem fluorescence je možné přesně stanovit délku PCR produktů a relativně kvantifikovat množství PCR produktu od každé alely.

Pro praktické použití je nutné vybrat STR markery s vysokou mírou heterozygoty ve sledované populaci, aby byla co největší šance, že se ve studovaném vzorku ve studovaných lokusech budou nacházet různé alely a markery tedy budou informativní. Proto se také vždy vyšetřuje více lokusů, aby alespoň některé byly informativní.

Zjištění aneuploidie je založeno na detekci nadpočetných alel nebo na relativní kvantifikaci produktu PCR. Nález 3 alel daného STR markeru nebo 2 alel, množství jejichž produktu je v poměru 2:1, ukazuje, že daný marker se ve studovaném vzorku vyskytuje 3-krát. Pokud je tento nález potvrzen i na dalších lokusech na daném chromosomu, svědčí to pro trisomii. Obdobný nález na všech chromosomech ukazuje na triploidii. Nález pouze jedné alely může svědčit pro monosomii nebo uniparentální isodisomii. Výsledek je vždy nutné potvrdit vyšetřením většího počtu markerů na daném chromosomu.

**Obrázek 7. Schéma detekce trisomie pomocí kvantitativní fluorescenční PCR (QF-PCR)**



**Vysvětlivky:**

Značený primer – fluorescenčně značený PCR primer

Neznačený primer – standardní PCR primer

P – paternálně zděděný chromosom

M1, M2 – maternálně zděděné chromosomy

PCR produkty – produkty PCR reakce

Kapilární elektroforéza – elektroferetogram z analyzátoru s kapilární elektroforézou a detekcí fluorescenčních PCR produktů

QF-PCR se v praxi používá k rychlé prenatální diagnostice nejčastějších aneuploidií (trisomie 13, 18, 21 a gonosomů) v případech kdy je výsledek nutný dříve, než jej může dát standardní chromosomální vyšetření. Pro QF-PCR lze použít nativní materiál bez kultivace a stačí ho velmi malé množství.

Je-li k dispozici DNA rodičů, lze v pomoci QF-PCR zjistit, od kterého z rodičů byla nadpočetná kopie chromosomu v případě trisomie získána. Nález tri-alelické formy přitom ukazuje, že aneuploidie vznikla již před meiózou nebo non-disjunkcí v prvním meiotickém dělení jednoho z rodičů. Dialelická forma může být způsobena předčasnou separací chromatid již v prvním meiotickém dělení, non-disjunkcí v druhém meiotickém dělení nebo post-meiotickou non-disjunkcí v embryu (viz 5.1.3 a 6.1.3).

Výsledky dosažené metodou QF-PCR byly zveřejněny v publikacích 2.1, 3.1, 4.1, 4.2, 6.2, 6.4, 6.7, 7.3, 7.5 a 7.6 - viz Příloha 2.



### 3.3. Chromosomální vady u mužů a žen se sníženou plodností

Konstitutivní chromosomální vady jsou jednou z genetických příčin neplodnosti mužů i žen. Jejich důsledkem může být také riziko chromosomálních vad u potomků počatých metodami asistované reprodukce. Tvoří tedy důležitou část indikací vyšetření spermií a preimplantačního vyšetření embryí.

#### 3.3.1. Výskyt chromosomálních vad

Výskyt konstitučních chromosomálních vad u partnerů z párů se sníženou fertilitou je nutné porovnávat s výskytem chromosomálních vad u novorozenců (0,6%), neboť přesný výskyt chromosomálních vad v dospělé populaci není známý.

**Muži s azoospermii** (nepřítomnost spermií v ejakulátu) – chromosomální vady jsou nalézány v 15%, častěji u neobstrukční azoospermie. Jde především o vady pohlavních chromosomů

**Muži s oligozoospermii** (snížená koncentrace spermií v ejakulátu) – 5%, častější jsou vady autosomů, především translokace.

**Infertilní ženy** – 4-5%, zvýšený je především výskyt translokací autosomů. Výskyt je vyšší u žen, u nichž opakovaně došlo k selhání IVF nebo k opakovaným spontánním potratům.

#### 3.3.2. Jednotlivé vady

##### 3.3.2.1. Klinefelterův syndrom (47,XXY a mozaiky 47,XXY/46,XY)

Nachází se asi u 0,2% novorozenců mužského pohlaví. Při azoospermii je to nejčastěji nalézáná vada (10% pacientů, tvoří 2/3 všech chromosomálních vad u azoospermiků), u mužů s oligozoospermii je méně častá (5%) (Mau-Holzmann, 2005).

U nemozaikové formy je obvykle možné spermie získat pouze mikrochirurgickým odběrem z varlete, u mozaikových forem se spermie v různých koncentracích nacházejí v ejakulátu. Z dosavadních výsledků ICSI s takto získanými spermii nevyplývá zvýšené riziko vad pohlavních chromosomů u potomků (Bielanska et al., 2000). Vyšetřením takto získaných spermií byl také zjištěn pouze mírně zvýšený výskyt spermií aneuploidních pro pohlavní chromozomy. Možným výkladem těchto nálezů je, že spermatogonie nesoucí sadu pohlavních chromosomů XXY časně odumírají (Mroz et al., 1999) a spermie z nich nevznikají. Spermatogeneze může probíhat pouze pokud dojde ke vzniku linie s normální sadou XY. Příčinou mírného zvýšení výskytu aneuploidie u vzniklých spermií (jak pro pohlavní chromozomy, tak autosomy) by potom byl spíše vliv celkově narušeného prostředí v semenotvorných kanálcích (Hall et al., 2006). Některé studie ovšem ukazují, že i spermatocyty s karyotypem 47,XXY mohou meiózu dokončit (Foresta et al., 1999). Tomu také odpovídá v některých studiích nacházený vyšší výskyt disomií XX a XY oproti disomii YY a vyšší výskyt normálních spermií s chromosomem X než normálních s Y (Ferlin et al., 2005)

##### 3.3.2.2. Syndrom 47,XYY a mozaiky 47,XYY/46,XY

Závažnost postižení tvorby spermií je různá, část postižených mužů má plodnost normální. Výskyt aneuploidie spermií mají pouze mírně zvýšený (1-2% spermií s disomiemi XY a YY), a zvýšení rizika gonosomálních vad u potomstva nebylo v praxi dosud prokázáno (Shi et al., 2000). Důvodem může být, podobně jako u Klinefelterova syndromu, ztráta nadpočetného chromozomu Y v některých spermatogoniích, přičemž tyto spermatogonie mohou mít selekční výhodu oproti abnormálním a mohou repopulovat značnou část semenotvorných kanálků. Účastnit se též může zástava v metafázi prvního meiotického dělení u těch

spermatocytů, u nichž zůstal nadpočetný chromosom nespárovaný. Tyto spermatocyty jsou eliminovány apoptózou (Eaker et al., 2001).

### **3.3.2.3. Mozaiky 46,XY/46,XX**

Tyto mozaiky jsou sice mezi neplodnými muži nalézány, ale závažnost postižení je různá a většinou jde o mozaiky s převažujícím zastoupením normální linie. Význam této vady je tedy obtížné stanovit (Mau-Holzmann, 2005).

### **3.3.2.4. Muži 46,XX**

Příčinou mužského fenotypu při karyotypu 46,XX může být translokace části chromosomu Y obsahující gen SRY na jiný chromosom (nejčastěji X) nebo mutace některého z dalších genů podílejících se na determinaci pohlaví. Pacientům chybí ostatní geny důležité pro tvorbu spermií, které se nacházejí na chromosomu Y, takže důsledkem je kompletní azoospermie bez šance na nalezení spermií ve varlatech (Mau-Holzmann, 2005).

### **3.3.2.5. Strukturní vady chromosomu Y**

Na Yq je několik lokusů, zvaných AZF (AZF – azoospermia factor), v nichž jsou geny důležité pro spermatogenezi. Jejich ztráta způsobuje azoospermii nebo závažnou oligozoospermii (Vogt, 1998). Častější než mikroskopicky viditelné přestavby nebo delece jsou mikrodelece, které je možné diagnostikovat pouze molekulárně genetickými metodami (Simoni et al., 1999). Vyskytují se u 10% mužů s azoospermii nebo těžkou oligozoospermii. Pokud jsou získány spermie a použity při ICSI, všichni případní mužští potomci tuto vadu zdědí. Navíc u mužů s těmito delecemi může častěji docházet ke kompletní ztrátě chromosomu Y ve spermiích (Siffroi et al., 2000) i ke zvýšení výskytu disomie XY ve spermiích (Ferlin et al., 2005).

### **3.3.2.6. Syndrom 47,XXX**

Tato chromosomální vada bez klinických projevů není u neplodných žen nacházena ve zvýšené frekvenci ani nebyl prokázán zvýšený výskyt chromosomálních vad u potomstva (Mau-Holzmann, 2005).

### **3.3.2.7. Turnerův syndrom**

Při klasické formě s karyotypem 45,X mají pacientky nefunkční vaječníky a jedinou terapií je použití oocytů od dárkyně. U forem se strukturálními aberacemi, z nichž nejčastější je izochromosom i(X)q, je postižení různě závažné (Mau-Holzmann, 2005).

### **3.3.2.8. Mozaiky gonosomálních aneuploidii (45,X/46,XX nebo 45,X/47,XXX/46,XX)**

Závažnost postižení je u těchto vad různá a závisí na procentuálním zastoupení jednotlivých linií v různých tkáních. Samotná přítomnost minoritní linie 45,X (do 10%) se nemusí fenotypově projevit. Tyto buňky jsou nalézány i u zdravých plodných žen, ale častěji u žen z neplodných párů. Ztráta jednoho z pohlavních chromosomů v některé buněčné linii je také běžným projevem stárnutí a to jak žen tak i mužů (Guttenbach et al., 1995).

### **3.3.2.9. Translokace mezi X a autosome**

U mužů většinou způsobuje neplodnost, u žen může být bez klinického projevu. V ženských buňkách je obvykle inaktivován normální chromosom X (Mau-Holzmann, 2005).

### **3.3.2.10. Translokace mezi Y a autosome**

Pokud je translokován heterochromatin dlouhého raménka Y na krátká raménka některého z akrocentrických chromosomů, nejsou žádné klinické důsledky. V ostatních případech dochází k narušení párování X a Y v meióze a tím k závažnému postižení spermatogeneze (Mau-Holzmann, 2005).

### 3.3.2.11. Robertsonské translokace

Výskyt robertsonských translokací u novorozenců je 0,1%, nejčastější jsou t(13;14) a t(14;21). U mužů s azoospermií se nacházejí v 0,2%, ale u mužů s oligozoospermií v 1,5% (Mau-Holzmann, 2005). U neplodných žen je výskyt stejný jako u novorozenců.

Závažnost postižení spermatogeneze u mužských nosičů translokace je různá a jeho mechanismus není zcela známý, podobně jako u reciprokových translokací, viz 3.3.2.12.

### 3.3.2.12. Reciproké translokace mezi autosomy

Výskyt v populaci je odhadován na 0,25%, u mužů s azoospermií je 0,5%, u mužů s oligozoospermií 0,7% a u infertilních žen 1%. (Mau-Holzmann, 2005)

U mužů nosičství translokace může způsobovat zástavu spermatogeneze, ale závažnost může být různá i u příbuzných nosičů téže translokace. U žen se nacházejí po opakovaných spontánních potratech a opakovaných selháních IVF. Průběh oogeneze nenarušují, projevují se až vznikem nebalancovaného karyotypu v embryích. Podstatou tohoto rozdílu mezi pohlavími mohou být dvě zásadní odlišnosti v průběhu meiózy (Oliver-Bonet et al., 2005):

- Při spermatogenezi dochází k párování chromozomů X a Y v sex body (SB), zatímco při oogenezi se normálně párují dva chromosomy X. SB je tvořeno z hlediska genové exprese inaktivním heterochromatinem z nespárovaných částí obou pohlavních chromosomů. Pro vznik SB je zřejmě zásadní právě přítomnost těchto asynaptických úseků chromosomů. V kvadrivalentech tvořených párujícími se translokovanými chromosomy v okolí míst zlomů také párování selhává. Tyto asynaptické oblasti mohou interagovat s proteiny SB, což může mít za následek represi transkripce. Pokud se v zasažené oblasti nachází geny potřebné pro správný průběh meiózy, může dojít k zástavě meiózy a apoptóze.
- Při spermatogenezi na rozdíl od oogeneze fungují dva kontrolní body – v pachytene a v metafázi prvního meiotického dělení. Oba dva jsou zodpovědné za to, že pokud meióza neprobíhá správně, je zastavena a pokud se problémy nevyřeší, spermatocyt odumírá apoptózou. Pachytenní kontrolní bod detekuje abnormality v rekombinaci a synapsi. Kontrolní bod ve metafázi, zvaný též vřeténkový, blokuje nástup anafáze, pokud není správně vytvořené dělicí vřeténko nebo pokud jím nejsou všechny chromosomy správně zachyceny. Reciproká translokace představuje překážku jak pro synapsi, tak pro správnou orientaci chromosomů v metafázi, značná část spermatocytů tedy meiózu nedokončí.

### 3.3.2.13. Komplexní chromosomální aberace

Jde o vzácné strukturální aberace zahrnující alespoň 3 chromosomy. Jsou nacházeny po narození postiženého dítěte nebo u neplodných mužů a žen s opakovanými spontánními potraty. Etiopatogeneze je podobná jako u reciprokových translokací.

### 3.3.2.14. Inverze

Výskyt v populaci je odhadován na 0,05%, u infertilních mužů i žen se nachází v asi 0,3%. U mužů mohou způsobovat zástavu spermatogeneze. Riziko nebalancovaného karyotypu u potomků je obvykle nízké, ale riziko spontánních potratů může být zvýšené (Mau-Holzmann, 2005)

### 3.3.2.15. Marker chromosomy

Nachází se u asi 0,04% novorozenců. U mužů z neplodných párů se nacházejí v asi 0,3%, u žen nebyl zvýšený výskyt nalezen (Mau-Holzmann, 2005).

## 3.4. Funkční topografie buněčného jádra

### 3.4.1. Chromosomová teritoria

Chromosomy v interfázním jádru zaujímají ohraničené oblasti zvané chromosomová teritoria (CT) (Cremer et al., 2001b). Poloha jednotlivých CT v jádře závisí na velikosti chromosomu a množství genů. Menší chromosomy jsou preferenčně lokalizovány ve středu jádra, zatímco větší chromosomy jsou spíše na periferii (Sun et al., 2000). Zároveň platí, že chromosomy s vyšší genovou denzitou (například chromosom 19) jsou lokalizovány ve středu, zatímco chromosomy s relativně menším počtem genů (například chromosomy 18 a X) jsou preferenčně na okraji jádra (Boyle et al., 2001, Kreth et al., 2004). Toto uspořádání je evolučně konzervované, nachází se jak u člověka, tak u ptáků (Habermann et al., 2001). V nádorových buňkách je korelace mezi genovou denzitou a radiálním uspořádáním také částečně zachována, ale méně výrazně (Cremer et al., 2003), což naznačuje spojitost mezi lokalizací chromosomů a nádorovým bujením.

Topologie CT je ovlivňuje buněčný typ, stadium vývoje i funkční stav buňky. Důležitou roli hraje tvar buňky (Cremer et al., 2001a). V kulových jádrech lymfocytů jsou chromosomy uspořádány podle obsahu genů, takže chromosom 18 je na periferii. V plochých elipsoidních jádrech amniocytů a fibroblastů převažuje uspořádání podle velikosti chromosomů. Ovšem v těchto plochých jádrech jsou i chromosomy umístěny ve středu jádra současně v kontaktu s jaderným obalem.

Lokalizace chromosomových teritorií se dynamicky mění během buněčného cyklu. V klidných nedělících se buňkách jsou centromery na periferii. V buňkách proliferujících je na začátku G1 fáze značná část centromer ve středu a na periferii se přesouvají až v pozdějších fázích (Solovei et al., 2004). V proliferujících lidských fibroblastech je chromosom 18 nacházen periferně, ale přesouvá se do centra, když se přestanou dělit (Bridger et al., 2000).

Na význam periferní zóny buněčného jádra ukazuje řada studií. Periferní lokalizace chromatinu u *Saccharomyces cerevisiae* vede k represí transkripce (Andrulis et al., 1998). V řadě různých lidských buněčných typů jsou netranskribované sekvence DNA nacházeny přednostně na periferii jádra nebo u jadérek, zatímco geny se nalézají spíše na površích chromosomových teritorií přivrácených do vnitřku jádra (Scheuermann et al., 2004).

Sekvence Alu, které jsou v genomu rozmístěny podobně jako house-keeping geny, jsou soustředěny ve vnitřku jádra (Bolzer et al., 2005).

### 3.4.2. Inaktivace chromosomu X

Důležitým příkladem funkčního významu lokalizace chromosomů je inaktivace X v samičích buňkách u placentárních savců. Jeden ze dvou chromosomů X je transkripčně inaktivní a tvoří pozdně se replikující a kondenzovaný sex chromatin. Inaktivní chromosom X se od aktivního liší i metylací DNA, acetylací a metylací histonů (Chow et al., 2003) a navíc i lokalizací a tvarem. Inaktivní X je typicky na periferii jádra (Dyer et al., 1989). Inaktivace postihuje i nadpočetné chromosomy X u jedinců s aneuploidiemi pohlavních chromosomů jako jsou Klinefelterův syndrom nebo syndrom 46,XXX. Důsledkem je tak i v těchto případech přítomnost pouze jednoho plně aktivního chromosomu X. Nejspíš je to také důvodem, proč, ve srovnání s autosomálními trisomiemi, nezpůsobují trisomie pohlavních chromosomů tak závažné postižení (Iitsuka et al., 2001).

Stabilní inaktivace jednoho X chromosomů doprovázená vznikem sex chromatinu nastává v jednotlivých buňkách náhodně. Jedním z prvních projevů je transkripce genu XIST a

hromadění jeho RNA na tom chromosomu, který bude následně inaktivován (Clemson et al., 1996). U myši se tak děje v jednotlivých tkáních embrya v různou dobu, vždy ovšem až po implantaci embrya v děloze (Tan et al., 1993). U králíků je sex chromatin přítomný již v buňkách 5-denních blastocyst (Kinsey, 1967, Zybina, 1965). Několik studií v poslední době ovšem ukázalo, že v myších embryích k inaktivaci dochází již v preimplantační fázi, ale tato inaktivace je pouze dočasná a před nástupem stabilní inaktivace je zrušena (Ferguson-Smith, 2004). Tato inaktivace začíná již v 2-buněčném embryu (Huynh et al., 2003) a vždy postihuje paternálně zděděný chromosom X (Okamoto et al., 2004). Na rozdíl od tkání embrya, kde je následně reaktivován a dochází k náhodné inaktivaci, v extramebryonálních tkáních myši zůstává inaktivní právě paternální X (Takagi et al., 1975).

V lidských preimplantačních embryích není sex chromatin přítomný, ale z funkčního hlediska není stav inaktivace X známý. Stoupající exprese XIST genu byla v lidských embryích nalezena již v období mezi zygotou a 8-buněčným embryem a to jak u embryí mužského i ženského pohlaví tak z paternálního i maternálního chromosomu X (Daniels et al., 1997). Tyto nálezy jsou v protikladu k výsledkům z myších embryí, u nichž je tato exprese nalézána pouze v embryích ženského pohlaví a pouze na paternálním chromosomu X. Preferenční inaktivace paternálního chromosomu v extramebryonálních tkáních nebyla u člověka jednoznačně prokázána, dosavadní studie dospěly k různým výsledkům (Goto et al., 1997, Zeng et al., 2003).

### **3.4.3. Studium jaderné topografie**

Pro studium jaderné topografie jsou ideální metody založené na fixaci, která zachovává původní 3-rozměrnou strukturu jádra (Kozubek et al., 2000). Tyto metody nejsou použitelné při klinické preimplantační diagnostice, při níž je nutné minimalizovat riziko ztráty odebrané buňky nebo diagnostické chyby. Nicméně bylo prokázáno, že i po standardní cytogenetické fixaci, která vede ke zploštění a roztažení jádra, zůstává relativní organizace jádra nezměněná (Croft et al., 1999)

### **3.4.4. Jaderná topografie v buňkách lidských embryí.**

První zveřejněná studie lokalizace chromosomů 13, 16, 18, 21, 22, X and Y v buňkách lidských preimplantačních embryí (McKenzie et al., 2004) našla, že všechny tyto chromosomy jsou v aneuploidních jádrech umístěny periferně a že chromosomy 13, 18, 21 a a 22 jsou na periférii, je-li jádro pro tyto chromosomy monosomické nebo trisomické. Dle autorů by vysvětlením mohlo být, že se jedná o důsledek apoptotických procesů v abnormálních embryích.

## 4. Chromosomální vady ve spermích

### 4.1. Úvod

#### 4.1.1. Spermatogeneze

Vývoj spermií lze rozdělit do tří fází:

##### 4.1.1.1. Proliferativní fáze

Spermatogonie prochází řadou buněčných dělení během nichž se postupně diferencují do spermatocytů.

##### 4.1.1.2. Meióza

Diploidní primární spermatocyty vstupují do prvního buněčného dělení, kterým vznikají sekundární spermatocyty nesoucí každý chromosom v jedné kopii tvořené dvěma chromatidami. Druhým meiotickým dělením z nich vznikají haploidní spermatidy mající od každého chromosomu jednu chromatidu.

##### 4.1.1.3. Spermioogeneze

Během zrání spermatid ve spermie dochází v jádře k nahrazení většiny histonů přechodnými proteiny a následně protaminy a tím k celkové kondenzaci jádra (Sassone-Corsi, 2002). Při tom ustává transkripční aktivita a zároveň i schopnost reparace DNA (Olsen et al., 2005).

Spermatida má centrosom tvořený dvěma centriolami a centrosomálními proteiny. Během zrání se centrosom rozpadá (Manandhar et al., 2005). Z distální centrioly vyrůstají mikrotubuly vznikající axonemy bičíku a centriola tak částečně degeneruje. Proximální centriola zůstává intaktní a je těsně u jádra. Centrosomální proteiny se ztrácí s cytoplasmou prostřednictvím reziduálních tělísek.

#### 4.1.2. Vyšetření chromosomů ve spermích

Chromosomy v jádru spermie jsou 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 oocytem, což vede k dekondenzaci jejího jádra, které se následně dá nafixovat ve stadiu metafáze mitózy. Pro toto vyšetření se používají křeččí oocyty (Rudak et al., 1978). V praxi se toto velice náročné vyšetření již příliš neprovádí. Pro stanovení počtu kopií několika chromosomů (nebo lokusů) lze totiž použít i fluorescenční in situ hybridizaci (FISH), případně PRINS (Pellestor et al., 1996) na chemicky částečně dekondenzovaných jádrech spermií (Wyrobek et al., 1990). Při tomto vyšetření se na jádře každé hodnocené spermie sleduje počet fluorescenčních signálů – normální je nález jednoho signálu pro každý vyšetřovaný chromosom. Nevýhodou FISH je, že neumožňuje najednou stanovit kompletní karyotyp spermie. V praxi lze najednou vyšetřit maximálně 3-5 chromosomů. V žádném případě také není možné vyšetřenou spermii přímo použít pro oplození. Vždy jde o stanovení výskytu chromosomálních vad ve vyšetřovaném vzorku, konkrétně frekvencí aneuploidií určitých chromosomů. Strukturální vady lze touto metodou analyzovat jen obtížně a se značnými omezeními.

Vzhledem k riziku ztráty chromosomu při fúzi s křeččími oocyty a riziku selhání hybridizace při FISH se v obou typech studií většinou nehodnotí výskyt nulisomií, ale pouze výskyt disomií. Celkový výskyt aneuploidie je pro jednotlivé chromosomy je pak odhadován jakožto dvojnásobek výskytu disomie. Výskyt diploidie lze stanovit pouze pomocí FISH, protože v křeččím oocytu se nedá odlišit od oplození dvěma spermii najednou.

Výsledky získané oběma přístupy se liší. Metodou FISH je nacházen větší výskyt aneuploidií (viz 4.1.3). Důvodem by mohlo být to, že některé abnormální spermie nejsou schopné s křeččími oocyty fúzovat. Metoda FISH není na schopnostech spermií závislá a umožňuje tedy vyšetřit i tyto spermie neschopné fertilizace. Z toho lze odvodit, že situaci při přirozeném oplození nebo oplození metodou IVF spíše odpovídá riziko na úrovni výsledků studií s křeččími oocyty. Při oplození metodou ICSI se teoretické riziko může blížit výsledkům studií s FISH. Ani při ICSI ale není úspěšnost fertilizace 100%. Některé abnormální spermie nejsou ani touto metodou schopné oocyt oplodnit. Tím by riziko aneuploide v embryu mohlo být opět o něco nižší.

### 4.1.3. Výskyt chromosomálních vad ve spermích zdravých mužů

#### 4.1.3.1. Numerické vady

Ve studiích pomocí fúze spermií s křeččími oocyty byla nalezena průměrná frekvence disomie autosomů 0,03% a průměrná frekvence disomie pohlavních chromosomů 0,11%. Ve studiích metodou FISH byla zjištěna průměrná frekvence disomie autosomů 0,09% a průměrná frekvence disomie pohlavních chromosomů 0,26%. Diploidie se nachází průměrně v 0,19% spermií (Templado et al., 2005).

I mezi zdravými muži je značný rozptyl v těchto hodnotách, přičemž u některých jinak zdravých mužů je frekvence některých aneuploidií zvýšená dlouhodobě a je nacházena i při opakovaných vyšetřeních (Rubeš et al., 2005).

#### 4.1.3.2. Strukturální vady

Pomocí fúze spermií s křeččími oocyty byla zjištěna průměrná frekvence strukturálních aberací ve spermích 6,6%, přičemž nalezeny byly všechny typy aberací (Templado et al., 2005). Místa zlomů odpovídají přestavbám, které jsou nalézány při prenatalních vyšetřeních. *De novo* vzniklé aberace jsou obecně častěji paternálního původu. Všechny tyto údaje ukazují, že při spermatogenezi je značné riziko vzniku strukturálních vad. Příčinou může být vysoký počet buněčných dělení, jímž linie mužských pohlavních buněk procházejí a to, že v dozrávajících spermích nejsou aktivní mechanismy reparace DNA (Estop et al., 1995). K opravě defektů v DNA spermií dochází až po oplození prostřednictvím reparačních mechanismů původem z oocyty. Při opravě zlomů v DNA může dojít k chybným napojením fragmentů a tím ke vzniku chromosomových přestaveb.

### 4.1.4. Výskyt aneuploidie ve spermích mužů s poruchami fertility

U mužů z různými formami snížení plodnosti bylo zjištěno 2-10ti násobné zvýšení výskytu aneuploidie ve spermích (Tempest et al., 2004). Nejvyšší vyšší výskyt aneuploidií je ve spermích získaných odběrem z tkáně varlat (Gianaroli et al., 2005).

Příčinami tohoto zvýšení mohou být:

- zvýšený výskyt konstitučních chromosomálních vad u neplodných mužů (viz 3.3)
- neplodnost přímo způsobená narušením meiózy. Ve spermatocytech (narozdíl od oocytů) jsou funkční kontrolní mechanismy, takže pokud meióza neprobíhá správně, mohou být eliminovány apoptózou (Odorisio et al., 1998). Do spermií dozrají jen ty spermatidy, které buďto správně prošly kontrolními body během obou dělení meiózy (viz 3.3.2.12), nebo u nichž kontrolní mechanismy selhaly. To je také jedním z důvodů, proč je výskyt aneuploidií ve spermích řádově nižší než v oocytech. U mužů se strukturálními aberacemi, které představují překážku párování v meióze, probíhá značná selekce spermií. Mají proto nižší výskyt spermií s nebalancovaným karyotypem, než by odpovídalo náhodné segregaci. Důsledkem ovšem zároveň bývá výrazné snížení celkového počtu

dozrávajících spermií a tedy oligozoospermie až azoospermie (viz 3.3.2.12). Podobně mutace v některých genech pro proteiny účastníci se meiózy způsobují především zástavu spermatogeneze a infertilitu a pouze mírné zvýšení výskytu aneuploidních spermií v ejakulátu (Hunt et al., 2002).

- narušení prostředí v semenotvorných kanálcích varlat při neplodnosti z jiných příčin (např. endokrinologických, infekcích, vlivech zevního prostředí)

Zvýšený výskyt aneuploidií je také nalézán u embryí počatých metodou ICSI. Tato metoda je užívána především u mužů se závažným postižením spermatogeneze. V nejtěžších případech, kdy v ejakulátu nejsou žádné spermie, se někdy dají spermie získat z chirurgicky odebrané tkáně varlat. V těchto případech je riziko aneuploidie nejvyšší. Mezi možné důvody aneuploidie v embryích po ICSI ale kromě přítomnosti aneuploidie ve spermii nebo oocytu, patří i zvýšené riziko chyb v prvních buněčných děleních (viz 6.1.3.2).

### **4.1.5. Výskyt nebalancovaných karyotypů ve spermiích nosičů translokací**

#### **4.1.5.1. Robertsonské translokace**

Vyšetřením spermií pomocí FISH byl zjištěn výskyt nebalancovaného karyotypu u t(13;14) mezi 9-23%, průměrně 14,2% a u t(14,21) mezi 7-18%, průměrně 10,4% (Roux et al., 2005).

#### **4.1.5.2. Reciproké translokace**

Výskyt jednotlivých variant segregace ve spermiích se u nosičů různých reciprokých translokací značně liší. Normální a balancované karyotypy tvoří 18,6-80,7%, průměrně 40% (ve studiích využívajících FISH) a 44% (ve studiích založených na fúzi s křeččími oocyty) (Benet et al., 2005). Výskyt nebalancovaných karyotypů je tedy vyšší než u Robertsonských translokací, podobně jako postižení spermatogeneze.

### **4.1.6. Vliv věku**

Na rozdíl od věku matky, nebyl u otců zjištěn žádný vliv jejich věku na výskyt aneuploidií u potomků ani u potracených plodů. Oproti aneuploidiím, které jsou většinou maternálního původu, většina strukturálních vad je původu paternálního. Ani u těch ale nebyl vliv věku otce prokázán.

Studie založené na fúzi s křeččími oocyty nenašly jasné zvýšení frekvenci aneuploidií ve spermiích při vyšším věku (některé dokonce našly snížení frekvence), ani statisticky významné zvýšení frekvence strukturálních vad.

Většina studií s použitím FISH také nenalezla zvýšení frekvence aneuploidií ve spermiích starších mužů. Několik studií našlo zvýšení frekvence aneuploidií některých chromosomů (především disomii YY) u mužů vyššího věku, ale nelze vyloučit, že příčinou těchto nálezů je častější výskyt chromosomových zlomů ve vyšším věku (Buwe et al., 2005). Studie sledující skupinu mužů v pravidelných intervalech během 5 let (Rubeš et al., 2005) ovšem u této skupiny prokázala zvýšení celkového výskytu disomií chromosomů 8, 18 a 21, aneuploidií pohlavních chromosomů i diploidií. Oproti tomu velká studie (Wyrobek et al., 2006) provedená na 97 mužích ve věku 22-80 let zvýšení výskytu aneuploidií ve vyšším věku nepotvrdila.



## 4.2. Cíle

Cílem práce bylo zavedení a zdokonalení metody FISH pro stanovení frekvence aneuploidních spermií v ejakulátu mužů s poruchami včetně vývoje a testování metod 3-rozměrné mikroskopické analýzy chromosomů spermií.

## 4.3. Materiál a metody

Pro molekulárně cytogenetické vyšetření spermií byla využita metoda fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Celé vyšetření sestává z následujících kroků:

### 4.3.1. Odběr ejakulátu

Odběr ejakulátu pro molekulárně cytogenetické se řídí stejnými pravidly jako odběr pro standardní vyšetření spermioqramu (WHO, 1999). Provádí se po 3-5-denní sexuální abstinenci do sterilní nádoby.

### 4.3.2. Zpracování ejakulátu

Ejakulát se nechává 20-30minut při pokojové teplotě zkapalnět. Následně je pomocí Maklerovy komůrky vyhodnocena koncentrace a pohyblivost spermií, abychom získali informace o základních parametrech ejakulátu. Vzorek je následně přenesen do zkumavky, promíchán s PBS a zcentrifugován po 10 minut při 10 000 ot. (140 g) Po odsátí supernatantu se 2× zopakuje proplach PBS a centrifugace. Vzorek je tedy propláchnut celkem 3-krát. Tím dojde k odstranění semenné plazmy, jejíž některé součásti by mohly, obzvláště u ejakulátů s vyšší viskozitou, narušit hybridizaci a mikroskopické hodnocení. Dalším krokem je fixace pomocí roztoku methanolu a kyseliny octové (v poměru 3:1). Fixativum se nejprve přidává po kapkách, postupně se doplní do celé zkumavky. Po centrifugaci se odsaje supernatant a zkumavka doplní čerstvým fixativem. Proplach se opět provede celkem 3-krát. Po odsátí většiny supernatantu se pelet spermií rozmíchá v 0,5-2 ml čerstvého fixativa a může se uchovávat v mrazáku při -20°C.

### 4.3.3. Příprava sklíček

Pomocí automatického pipetěru se 10-30μl suspenze spermií ve fixativu kápne na namražené sklíčko a nechá se zaschnout na plotýnce při 37°C. Hustota spermií se kontroluje pod mikroskopem s fázovým kontrastem. Pokud je hustota nedostatečná, přikápnou se na sklíčko další kapky suspenze a nechají se zaschnout.

Sklíčka se spermiemi se jednou opláchnou v 2×SSC a následně se dokondenzují roztokem 1mmol DTT v TRIS pufru (pH 8). Cílem tohoto kroku je narušení disulfidových vazeb mezi molekulami protaminu v jádře spermie a tím její dekonze a umožnění průniku DNA sond při FISH. Po dekonze se sklíčka 2-krát oplachují v 2×SSC a provede se post-fixace pomocí 4% paraformaldehydu v PBS. Tím je zajištěno, že při dalších krocích nedochází k dalšímu rozpadu spermií a zachovávají si, s výjimkou zvětšené hlavičky, původní tvar. Tím je umožněno jednoznačné odlišení spermií od ostatních buněčných elementů dle tvaru hlavičky a přítomnosti bičíku. Po post-fixaci se sklíčka 2× oplachují 2×SSC a dehydratují alkoholovou řadou (70, 80 a 100% alkohol).

### 4.3.4. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Podle typu použité sondy je tuto nutno dle instrukcí výrobce naředit hybridizačním roztokem, nebo je dodávána již v koncentraci pro použití. V tabulce (Tabulka 1) je seznam sond otestovaných a používaných pro stanovení chromozomů ve spermiích. Množství sondy odpovídající oblasti se spermiemi na sklíčku a vybranému rozměru krycího sklíčka je

## Chromosomální vady ve spermích

naneseno na krycí sklíčko a na to se sklopí podložní sklíčko. Tímto postupem je minimalizováno nebezpečí bublin pod krycím sklíčkem. Aby nedošlo k vysychání sondy nebo jejímu naředění kondenzující vodou ve vlhké hybridizační komůrce, je nutno krycí sklíčko oblépit lepidlem nebo zakrýt parafilmem.

Denaturace a hybridizace je prováděna v přístroji Vysis Hybrite (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Pro většinu sond je používána denaturace 5 min při 75°C a hybridizace 4-20 hodin (přes noc) při 37°C.

Odmytí nenavázaných molekul sondy je prováděno v roztoku dle instrukcí dodavatele. Je používán vysoce stringentní roztok bez formamidu, obvykle 0,3×SSC nebo 0,4×SSC s přídavkem detergentu (0,3% NP-40 nebo 0,3% Tween 20) po dobu 1-4 minut. Následuje oplach 2×SSC jenž slouží pouze k ochlazení sklíčka a zamezení přílišnému odmytí sondy. Na sklíčko je aplikován montovací roztok Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) chránící fluorochromy před vysvícením obsahující navíc DAPI, které nespecificky barví veškerou DNA modře.

**Tabulka 1. Seznam sond používaných pro vyšetření aneuploidie spermií**

Chromosom	Band	Lokus	Značení	Výrobce
1	1cen	D1Z1	FluorX	Jurov
1	1cen	D1Z2	Biotin	Jurov
7	7cen	D7Z1	Rhodamine	Qbiogene
8	8cen	D8Z1	Fluorescein	Qbiogene
13	13q14.3	D13S319 – D13S262	FITC	Oncor
13	13q14	RB	SpectrumGreen	Vysis
14	14qter	STS-X58399, SHGC-36156, STS-AA034492	SpectrumOrange	Vysis
15	15cen	D15Z1	SpectrumOrange	Vysis
16	16cen	D16Z3	SpectrumAqua	Vysis
17	17cen	D17Z1	SpectrumGreen	Vysis
18	18cen	D18Z1	Cy3	Jurov
18	18cen	D18Z1	SpectrumAqua	Vysis
21	21q22.2	D21S270 – D21S339	TexasRed	Oncor
21	21q22.13-q22.2	D21S259, D21S341, D21S342	SpectrumOrange	Vysis
22	22q11.2	BCR	SpectrumGreen	Vysis
X	Xcen	DXZ1	FITC	Qbiogene
X	Xcen	DXZ1	SpectrumGreen	Vysis
X	Xcen	DXZ1	FITC	Cytocell
X	Xcen	DXZ1	FluorX	Jurov
X	Xcen	DXZ1	Biotin	Jurov
Y	Ycen	DYZ3	Rhodamine	Qbiogene
Y	Ycen	DYZ3	SpectrumOrange	Vysis
Y	Ycen	DYZ3	TexasRed	Cytocell
Y	Ycen	DYZ3	Cy3	Jurov
Y	Ycen	DYZ3	Biotin	Jurov

Výrobci:

Cytocell - Cytocell Technologies Ltd., Cambridge, UK

Jurov - Prof. Jurij B. Jurov, Národní centrum mentálního zdraví, Ruská akademie lékařských věd, Moskva, Rusko

Oncor - MP Biomedicals, Morgan Irvine, CA, USA

Qbiogene - MP Biomedicals, Morgan Irvine, CA, USA

Vysis - Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA

### 4.3.5. Fluorescenční mikroskopie

Pro prohlížení výsledných preparátů je používán fluorescenční mikroskop Zeiss Axioplan 2 imaging mot (Carl Zeiss Jena, SRN) s příslušnými fluorescenčními filtry. Pro nalezení spermií a rychlé vyhodnocení signálů je používán 4-pásmový filtr Blue/Aqua/Green/Orange, který umožňuje současné nalezení spermií i hodnocení signálů ve 3 barvách. Pokud je nalezena suspektně abnormální spermie, je nutné jednotlivé signály prohlédnout v 1-pásmových filtrech (Yellow, Red, Green, Aqua, Blue), aby výsledek nebyl ovlivněn překryvem jednotlivých signálů.

### 4.3.6. Pravidla hodnocení spermií

Normálně by každá spermie měla být monosomická pro všechny vyšetřované chromosomy, a tedy mít jeden signál pro každý vyšetřovaný chromosom. Abnormálním je nález nulismie (chybění signálu pro daný chromosom) nebo disomie (přítomnost dvou signálů pro daný chromosom). Vzhledem k tomu, že nález nulismie může být též artefaktem způsobeným selháním hybridizace, vychází hodnocení výskytu aneuploidie spermií pouze z nalezené frekvence disomií.

**Nehodnotí** se spermie:

- bez bičíku – může jít o jinou buňku (epitelie, leukocyt, spermatogonie, spermatocyt, spermatida)
- ve shlucích, s hlavičkami přes sebe – pokud nelze jasně rozeznat okraje hlaviček
- se dvěma hlavičkami nebo dvěma bičíky – může se jednat o více spermií na sobě
- s příliš malou hlavičkou, nenabarvená DAPI – neobsahuje jádro, mohla se poškodit během FISH
- s velkou hlavičkou s nejasnými konturami – příliš dekonzenzovaná
- pokud se v zorném poli nachází více než 1 spermie bez signálů – špatně hybridizovaná oblast, okraj
- s difúzními neohraničenými signály

Aby bylo spermie hodnocena jako **disomická pro určitý chromosom**, musí mít bičík

- tvar a velikost vylučující, že jde o dvě hlavičky přes sebe (proostrít, zhodnotit kontury)
- oba signály přibližně stejně velkou plochu a intenzitu
- signály vzdálené alespoň průměr signálu

Aby bylo spermie hodnocena jako **diploidní**, musí být disomická pro všechny vyšetřované chromozomy resp. pár XY

### 4.3.7. Dokumentace

Pro dokumentaci každé nalezené a hodnocené spermie je používán program Anomaly Counter (PsSoft, Brno, ČR). Tento program komunikuje s řídicí jednotkou motorizovaného stolku, takže zaznamenává pro každou nalezenou spermii její přesné souřadnice. U normálních spermií se zaznamenává, zda nese chromozom X nebo Y (pokud byly sondy na X a Y použity). U abnormálních spermií se zaznamenává typ anomálie, zda je tato anomálie jednoznačná nebo suspektní, zda má jádro normálně se barvící DAPI, zda má jednu hlavičku

a jeden bičík. Pro další hodnocení se berou jen spermie s jednoznačnými anomáliemi, s jádrem normálně se barvícím DAPI, s jednou hlavičkou a jedním bičkem (viz 4.3.6).

K archivaci výsledků a sestavení výsledkové zprávy používáme databázovou aplikaci AR4 (viz 7).

#### **4.3.8. Obrazová dokumentace a počítačová analýza obrazu**

Pro obrazovou dokumentaci jsou používána kamera AxioCam MRm (Zeiss) a software Axiovision (Zeiss) nebo ISIS (Metasystems, Altussheim, Německo). Oba tyto programy umožňují nasnímat v příslušných fluorescenčních filtrech černobíle obrazy, které zachycují intenzitu signálů v odpovídajících vlnových délkách. Každému černobílému obrazu je následně přiřazena barva (která může odpovídat emisní vlnové délce) a je z nich složen výsledný obraz. Důležité je, že i nadále je možné pracovat s každým z těchto barevných kanálů nezávisle a tím ozřejmit vztahy dotýkajících se nebo překrývajících se signálů odpovídajících různě značeným sondám. Navíc, vzhledem k tomu, že nespecifická fluorescence pozadí je nejlépe viditelná filtrem Aqua, je možné nasnímáním v tomto kanálu získat i obraz bičíku a případných reziduí cytoplazmy spermií.

#### **4.3.9. Analýza ve 3 rozměrech (3D)**

Použití mikroskopu s motorizovaným jemným posunem v ose Z umožňuje nasnímat obraz v přesně definovaných rovinách ostrosti. V softwaru Axiovision je pak možné nejenom takto vzniklými vrstvami procházet, ale i je prohlížet v bočních projekcích a jako 3-rozměrné modely. Značnou část neostrého obrazu od objektů mimo rovinu ostrosti lze odstranit zvýšením prahu intenzity. Pokud toto nestačí, lze užít speciální matematické postupy dekonvoluce pro odstranění neostrých částí obrazu. Tímto postupem lze v řadě případů zpřesnit hodnocení dotýkajících a překrývajících se signálů.

### **4.4. Výsledky**

Výsledky vyšetření chromosomů 1, 7, 8, 18, X a Y jsou shrnuty v tabulkách (Tabulka 2, Tabulka 3, Tabulka 4). Ukázky hodnocených spermií jsou na obrázku (Obrázek 8).

Při vyšetření chromosomů 1 a 18 byl zjištěn výskyt disomie 1 průměrně v 0,16% spermií, median 0,11%, maximum 0,59, výskyt disomie 18 průměrně v 0,22%, median 0,13%, maximum 1,57% a výskyt diploidie průměrně v 0,19%, median 0,10%, maximum 0,80%.

Ve skupině mužů s oligozoospermii (koncentrace spermií pod 20 mil./ml) byla disomie 1 v 0,15%, median 0,10, maximum 0,58, disomie 18 průměrně 0,25%, median 0,17, maximum 0,50, diploidie průměrně 0,17%, median 0,14, maximum 0,59.

Ve skupině mužů s normální koncentrací spermií (od 20 mil./ml) byla nalezena disomie 1 v 0,18%, median 0,12, maximum 0,59, disomie 18 průměrně v 0,19%, median 0,10%, maximum 1,57 a diploidie průměrně v 0,20%, median 0,07%, maximum 0,80.

Chromosomy 7 a 8 byly vyšetřovány pouze ve skupině mužů s normální koncentrací. Disomie 7 byla nalezena průměrně v 0,05%, median 0,04%, maximum 0,08, disomie 8 průměrně v 0,07%, median 0,07, maximum 0,22 a diploidie průměrně v 0,05%, median 0,04, maximum 0,23.

Vyšetřením chromosomů pouze chromosomů X a Y nelze odlišit disomii gonosomů od diploidie, výsledky jsou proto uvedeny podle jednotlivých abnormálních nálezů. Kombinace XX byla nalezena průměrně v 0,12% spermií, median 0,07, maximum 0,43, kombinace XY průměrně v 0,39, median 0,27, maximum 1,11%, kombinace YY průměrně v 0,10%, median 0,10%, maximum 0,25.

## Chromosomální vady ve spermích

Ve skupině mužů s oligozoospermii byla kombinace XX průměrně v 0,10% spermích, medián 0,10, maximum 0,20, kombinace XY průměrně v 0,27, medián 0,21, maximum 0,49%, kombinace YY průměrně v 0,07%, medián 0,09%, maximum 0,10.

Ve skupině mužů s normální koncentrací byla kombinace XX nalezena průměrně v 0,13%, median 0,05, maximum 0,43, kombinace XY průměrně v 0,47%, median 0,34%, maximum 1,11% a kombinace YY průměrně v 0,12%, median 0,10%, maximum 0,25%.

**Tabulka 2. Výsledky vyšetření chromosomů 1 a 18 ve spermích**

Kód	Konc. spermii [mil./ml]	Nález								Celkem
		1, 18		1, 1, 18		1, 18, 18		1, 1, 18, 18		
		Počet	%	Počet	%	Počet	%	Počet	%	
F592	1,2	2013	98,63%	3	0,15%	2	0,10%	1	0,05%	2041
F332	1,8	1989	97,93%	3	0,15%	7	0,34%	16	0,79%	2031
F418+515	2	5991	99,25%	7	0,12%	7	0,12%	7	0,12%	6036
F635	3,6	2767	98,72%	2	0,07%	0	0,00%	5	0,18%	2803
F560	4	1592	95,96%	1	0,06%	26	1,57%	3	0,18%	1659
F556+559	4,4	4946	98,08%	4	0,08%	7	0,14%	6	0,12%	5043
F367	5,5	1067	99,16%	3	0,28%	0	0,00%	0	0,00%	1076
F366	6	1015	98,64%	3	0,29%	5	0,49%	0	0,00%	1029
F636	6	1154	97,38%	7	0,59%	2	0,17%	8	0,68%	1185
F581	7	1494	99,34%	2	0,13%	2	0,13%	1	0,07%	1504
F582	7,5	5001	99,64%	2	0,04%	3	0,06%	1	0,02%	5019
F531+532	8	5007	98,41%	1	0,02%	10	0,20%	2	0,04%	5088
F307	10,4	1002	97,19%	6	0,58%	1	0,10%	6	0,58%	1031
F664	11,1	2956	98,40%	8	0,27%	5	0,17%	24	0,80%	3004
F513	13	4999	99,58%	3	0,06%	3	0,06%	2	0,04%	5020
F549	13	5004	99,58%	3	0,06%	1	0,02%	1	0,02%	5025
F379	13,7	1140	97,94%	4	0,34%	0	0,00%	0	0,00%	1164
F331+363	14	3016	98,98%	1	0,03%	0	0,00%	1	0,03%	3047
F574+F570	14	5039	98,46%	3	0,06%	1	0,02%	5	0,10%	5118
F514+517	30	8842	98,90%	18	0,20%	11	0,12%	29	0,32%	8940
F731	34,3	1321	94,76%	5	0,36%	2	0,14%	0	0,00%	1394
F326	35	2008	98,72%	4	0,20%	1	0,05%	1	0,05%	2034
F548	41	1080	99,63%	0	0,00%	1	0,09%	0	0,00%	1084
F311	43	1018	98,36%	0	0,00%	1	0,10%	3	0,29%	1035
F314	52	1021	98,74%	2	0,19%	3	0,29%	1	0,10%	1034
F329	52	1982	98,95%	2	0,10%	10	0,50%	1	0,05%	2003
F324	53	1000	99,40%	1	0,10%	2	0,20%	0	0,00%	1006
F364+535	56,3	4580	99,26%	5	0,11%	6	0,13%	8	0,17%	4614
F323	65	1001	97,75%	2	0,20%	1	0,10%	6	0,59%	1024
F330	71,5	2000	98,72%	3	0,15%	2	0,10%	1	0,05%	2026
F321	72	998	97,37%	0	0,00%	5	0,49%	2	0,20%	1025
F327	91	1002	98,72%	0	0,00%	3	0,30%	2	0,20%	1015
F320	93	1018	99,32%	1	0,10%	4	0,39%	0	0,00%	1025
F306	126	1000	96,34%	1	0,10%	5	0,48%	3	0,29%	1038
F316	180	1000	97,47%	6	0,58%	5	0,49%	4	0,39%	1026

Chromosomální vady ve spermích

**Tabulka 3. Výsledky vyšetření chromosomů 7 a 8 ve spermích**

Kód	Konc. spermii [mil./ml]	Nález								Celkem
		7, 8		7, 7, 8		7, 8, 8		7, 7, 8, 8		
		Počet	%	Počet	%	Počet	%	Počet	%	
J001	30	5800	99,81%	1	0,02%	2	0,03%	2	0,03%	5811
J002	78	10029	99,79%	3	0,03%	7	0,07%	4	0,04%	10050
J004	91	10000	99,79%	4	0,04%	5	0,05%	3	0,03%	10021
J005	56	10163	99,79%	4	0,04%	6	0,06%	1	0,01%	10184
J006	52	10011	99,81%	4	0,04%	5	0,05%	2	0,02%	10030
J007	28	9998	99,80%	3	0,03%	5	0,05%	3	0,03%	10018
J008	37	10004	99,60%	5	0,05%	13	0,13%	2	0,02%	10044
J009	98	9987	99,40%	7	0,07%	22	0,22%	5	0,05%	10047
J010	203	9953	99,31%	7	0,07%	18	0,18%	23	0,23%	10022
J011	59,5	10051	99,71%	6	0,06%	7	0,07%	7	0,07%	10080
J012	41,5	10018	99,70%	5	0,05%	8	0,08%	5	0,05%	10048
J013	75	10005	99,65%	8	0,08%	11	0,11%	4	0,04%	10040

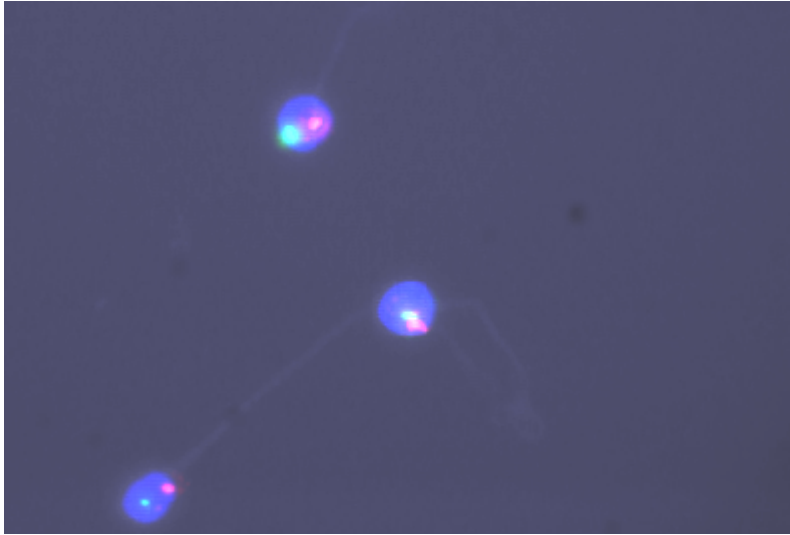
**Tabulka 4. Výsledky vyšetření chromosomů X a Y ve spermích**

Kód	Konc. spermii [mil./ml]	Nález										Součet
		X		Y		X, X		X, Y		Y, Y		
		Počet	%	Počet	%	Počet	%	Počet	%	Počet	%	
F551	0,8	995	49,75%	998	49,90%	1	0,05%	4	0,20%	2	0,10%	2000
F419	2	518	51,08%	488	48,13%	2	0,20%	5	0,49%	1	0,10%	1014
F484	13	718	51,69%	666	47,95%	2	0,14%	2	0,14%	1	0,07%	1389
F552	13	1770	50,40%	1732	49,32%	1	0,03%	8	0,23%	1	0,03%	3512
F482	30	806	49,97%	792	49,10%	7	0,43%	4	0,25%	4	0,25%	1613
F670	34,3	2111	53,11%	1806	45,43%	10	0,25%	44	1,11%	4	0,10%	3975
F547	41	482	48,06%	519	51,74%	0	0,00%	2	0,20%	0	0,00%	1003
F483	56,3	492	48,19%	521	51,03%	0	0,00%	6	0,59%	2	0,20%	1021
F302	61	492	48,47%	519	51,13%	0	0,00%	3	0,30%	1	0,10%	1015
F301	65	510	49,18%	521	50,24%	1	0,10%	4	0,39%	1	0,10%	1037

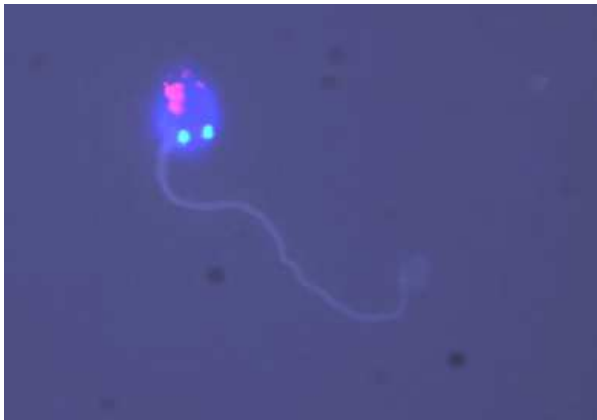
**Obrázek 8. FISH na spermích. Použity sondy na chromosomy 1 (zelená) a 18 (červená), jádro obarveno DAPI (modrá)**

- A. A) Normální nález
- B. B) Disomie 1
- C. C) Disomie 18
- D. D) Diploidie

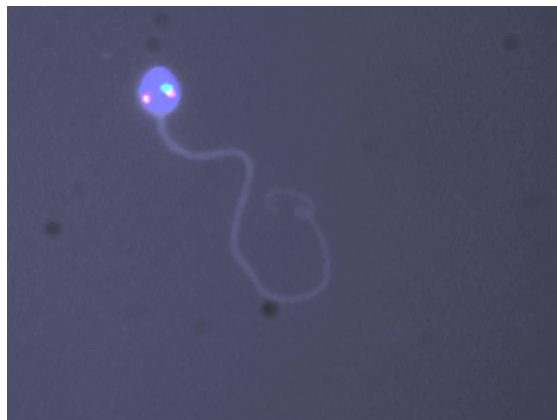
A)



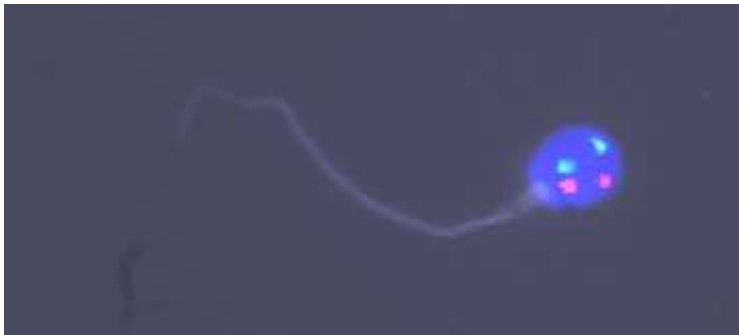
B)



C)

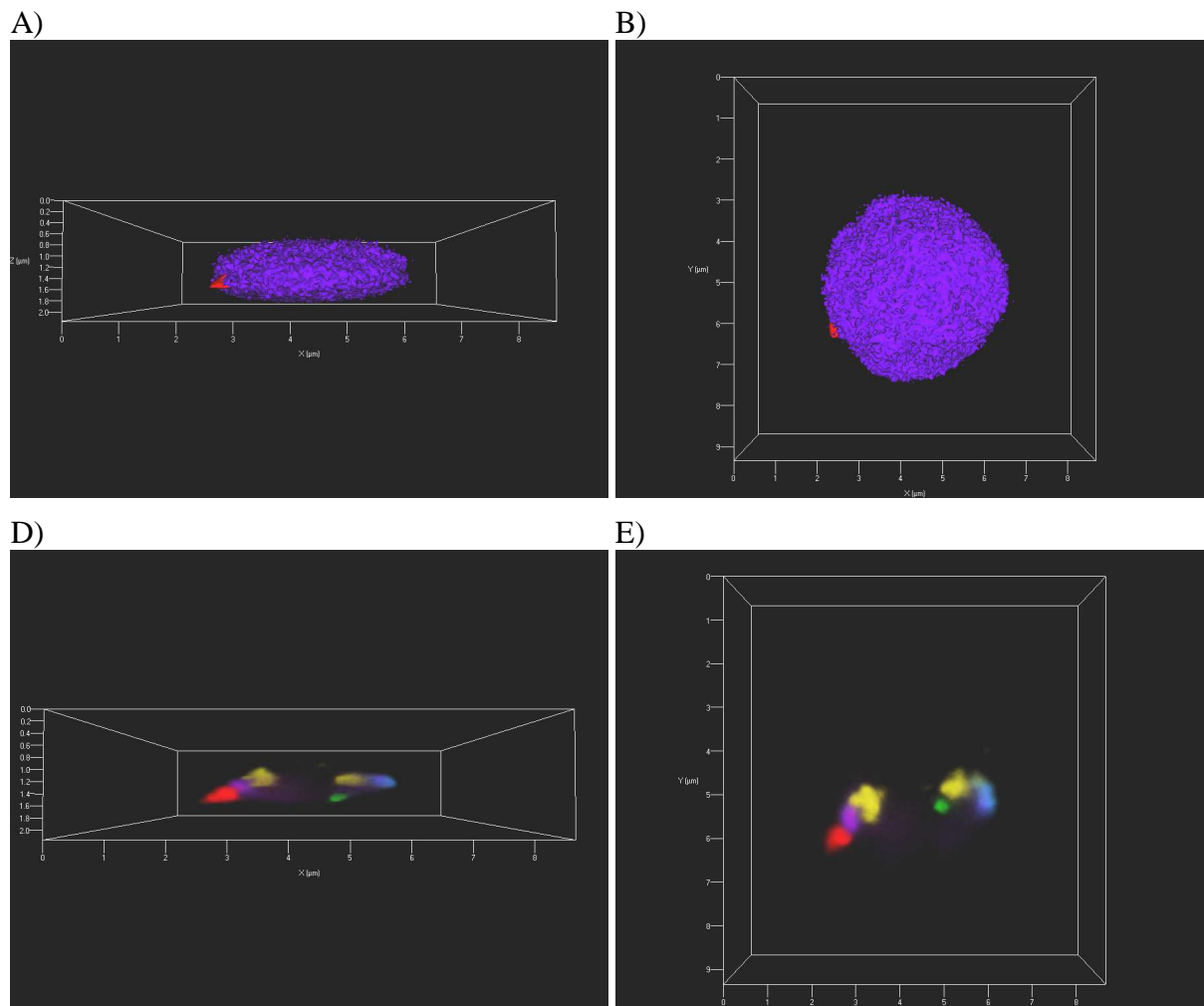


D)



**Obrázek 9.3D-FIAH na spermích. Použity sondy chromosomy 13 (červená), 16 (aqua), 18 (fialová), 21 (zelená) a 22 (žlutá), jádro obarveno DAPI (modrá). Abnormální nález - disomie 22.**

- A. Povrchová projekce, pohled ze strany
- B. Povrchová projekce, pohled shora
- C. Průhledná projekce, pohled ze strany
- D. Průhledná projekce, pohled shora



## 4.5. Diskuse

Námi modifikovaný postup fixace a dekondezace spermíí je založen na fixaci spermíí metanolem s kyselinou octovou. Spermie je pak možné uchovávat v suspenzi ve fixačním roztoku. Po nakapání na sklíčko je nutné provést dekondezaci dithiothreitem (Martini et al., 1995). Problémem této dekondezace je, že při ní dochází k narušení struktury jádra spermie. Při následné denaturaci a hybridizaci tak někdy dochází k dalšímu rozpadu jádra a signály FISH mohou být difúzní a obtížně hodnotitelné. Zavedením post-fixace paraformaldehydem po dekondezaci jsme dosáhli toho, že jádra spermíí jsou ideálně dekondezovaná, takže sondy mohou pronikat k DNA, ale nedochází k dalšímu rozpadu a degradaci signálů. Tím je dosaženo maximální úspěšnosti hybridizace a spolehlivosti vyšetření.



Analýza pomocí 3D-FISH umožňuje rozlišit signály které se dotýkají nebo překrývají. Tím může pomoci obzvláště v případech vzorků s extrémně nízkou koncentrací spermií, kdy je nutné vyšetřit analyzovat každou nalezenou spermii a kdy je zároveň potřeba použít sondy na co nejvíce chromosomů najednou. Tato metoda ale samozřejmě nemůže být standardem pro studie sledující výskyt aneuploidií u zdravým mužů nebo mužů s jen mírným postižením spermatogeneze, u nichž je pro spolehlivé stanovení frekvence aneuploidií nutné vyšetřit alespoň 10 000 spermií.

Dosažené výsledky odpovídají údajům ve světové literatuře, ale zatím neumožňují další hodnocení a stanovení referenčních hodnot pro studovanou populaci.

### **4.6. Závěry**

Molekulárně cytogenetické vyšetření spermií je jednou z metod, které podávají doplňující informace o ejakulátu mužů s poruchami plodnosti. Umožňuje odhadovat riziko chromosomálních vad po oplození přirozenou cestou nebo metodami asistované reprodukce.

Výsledky vyšetření aneuploidie spermií byly zveřejněny v publikacích 3.1, 6.3, 6.5, 7.4, 8.1, 9.2, 9.3, 10.1 a 10.4 - viz Příloha 2.

## 5. Chromosomální vady v oocytech

### 5.1. Úvod

#### 5.1.1. Oogeneze

Primární oocyty vstupují do profáze prvního meiotického dělení již ve 13. týdnu prenatálního období (Gondos et al., 1986). Postupně prochází jeho jednotlivými stadii až do fáze diplotene, ze které přechází do fáze dictyotene. V ní se chromosomy dekondenzují, čímž je umožněna genová exprese. Oocyt v tomto stavu setrvává až desítky let do okamžiku těsně před ovulací, kdy dokončuje první meiotické dělení a vypuzuje první polární tělísko. Společně s prvním polárním tělískem se v perivitelinním prostoru obvykle nachází i zbytky buněčných fragmentů (interbodies) (Sathananthan et al., 2006).

V sekundárním oocytu zbývá 23 chromosomů tvořených dvěma chromatidami. Oocyt okamžitě vstupuje do druhého meiotického dělení a v metafázi čeká na oplození spermií. Po oplození je dokončeno druhé meiotické dělení a odděluje se druhé polární tělísko. Chromosomy, které zůstávají v oocytu se dekondenzují a tvoří samčí prvojádro zygoty.

V savčích oocytech se během dlouhé fáze diktyotene rozpadají centrosomy (Manandhar et al., 2005). Centrosomální proteiny zůstávají rozpuštěné v cytoplasmě. Meiotická dělení tedy probíhají bez účasti centrosomů. Jako nukleační centra mikrotubulů dělicího vřeténka místo nich slouží přímo kondenzované chromosomy. Mikrotubuly se následně organizují do vřeténka, které postrádá astrální mikrotubuly.

#### 5.1.2. Vyšetření chromosomů v oocytech

Narozdíl od spermií není prakticky možné k analýze získat oocyty zdravých plodných žen, neboť dozrávají po jednom v každém cyklu. Základem metod AR je ovariální hyperstimulace, jejímž cílem je současné dozrávání a následný odběr více oocytů najednou. Obvykle je získáno od 0 do 20 oocytů. Je třeba mít na paměti, že tyto oocyty mají za sebou dozrávání během nefyziologické ovariální hyperstimulace, která může průběh meiózy a vznik chromosomálních vad ovlivňovat. Situace v přirozeně dozrávajících oocytech a u zdravých žen se může lišit.

Před oplozením lze od oocytu mikromanipulací odebrat první polární tělísko a jeho analýzou nepřímou vyšetřit oocyt (Verlinsky et al., 1995). Chybění některého chromosomu v prvním polárním tělísku znamená, že nejspíš přebývá v sekundárním oocytu a naopak. Podobně lze také po oplození odebrat druhé polární tělísko a z výsledku jeho analýzy usuzovat na průběh druhého meiotického dělení. Vyšetření obou polárních tělísek tedy poskytuje nepřímou informaci o chromosomech, které zůstaly v oocytu.

U některých oocytů oplození selhává a zůstávají ve stadiu metafáze druhého meiotického dělení. Ty lze analyzovat i s jejich prvním polárním tělískem (Pellestor et al., 1988). Vzhledem k vzácnosti oocytů je většina studií založena právě na analýze těchto zbylých oocytů nebo na analýze odebraných polárních tělísek.

Chromosomy neoplozeného oocytu sice jsou v metafázi, dají se tedy jednotlivě analyzovat, ale jejich kvalita neumožňuje jednoznačnou identifikaci pruhováním. Obě polární tělíška rychle odumírají, takže ani u nich nelze použít standardní cytogenetické metody. Pro klinické účely se tedy používá FISH a začínají se objevovat i studie založené na komparativní genomové hybridizaci (CGH) (Fragouli et al., 2006).

### 5.1.3. Mechanismy vzniku aneuploidie v oocytech

#### 5.1.3.1. Germinální mosaicismus

Vzácně může příčinou aneuploidie v oocytech chyba během některého z buněčných dělení během vývoje zárodečné (germinální) linie. V takovém případě mohou ovária obsahovat linii aneuploidních primárních oocytů (Mahmood et al., 2000).

#### 5.1.3.2. Non-disjunkce chromosomů

Tradičně bývá vznik aneuploidií vysvětlován tzv. non-disjunkcí, tedy neoddělením chromosomů v anafázi. V prvním dělení meiózy k tomu dochází častěji, pokud mezi chromosomy daného páru vůbec nedošlo k rekombinaci, nebo pokud k rekombinaci došlo pouze jednou a to poblíž telomer (Sherman et al., 2005). Nerekombinované chromosomy se rozcházejí náhodně, a snadno se může stát, že oba zůstanou v oocytu nebo naopak v polárním tělísku. Osamocená rekombinace poblíž telomer zřejmě také chromosomy nedrží dostatečně pevně.

#### 5.1.3.3. Předčasná separace chromatid

Pokud v jednom z chromosomů z páru, který se rozchází v anafázi prvního meiotického dělení, nejsou chromatidy pevně spojené prostřednictvím centromery, může se tento chromosom rozdělit již v prvním dělení (Angell, 1997). Důsledkem je, že v sekundárním oocytu zůstanou buďto tři nebo jedna chromatida místo dvou. Volná chromatida potom ve druhém dělení buďto zůstane v oocytu nebo skončí ve druhém polárním tělísku.

K předčasnému oddělení chromatid může dojít i v metafázi druhého dělení, v níž oocyt čeká na oplození. Volné chromatidy se následně opět rozcházejí náhodně.

#### 5.1.3.4. Opoždění v anafázi

Pokud v metafázi druhého meiotického dělení některý chromosom není napojen na dělicí vřeténko, nebo se v anafázi opoždí, zůstává v původní poloze odpovídající metafázi a není následně zavzat do obnovujícího se jádra. Dojde tedy k jeho kompletní ztrátě (Cupisti et al., 2003).

### 5.1.4. Výskyt chromosomálních vad v oocytech

Odhady výskytu chromosomálních vad v oocytech se významně liší podle toho zda vycházejí z analýzy polárních tělísek nebo z analýzy neoplozených oocytů. Mezi příčinami těchto rozdílů mohou být jak technické problémy, které zatěžují obě metody, tak rozdíly ve studovaných populacích, protože preimplantační vyšetření polárních tělísek je prováděno právě u žen s vysokým rizikem aneuploidie.

Mezi neoplozenými oocyty bývá nacházeno kolem 20% s chromosomálními vadami (Pellestor et al., 2002). Z vyšetření polárních tělísek vyplývá aneuploidie ve více než 60% oocytů (Kuliev et al., 2005). V obou polárních tělíscích je nacházen podobný výskyt aneuploidie (kolem 50%). U části oocytů jsou nacházeny chyby v obou meiotických děleních, které se projeví abnormalitou obou polárních tělísek. Někdy též dochází ke korekci aneuploidie vzniklé v prvním dělení následnou opačnou chybou ve druhém dělení.

Oba typy studií nacházejí v prvním meiotickém dělení výraznou převahu chromatidových vad (vzniklých předčasnou separací chromatid) nad celochromosomovými (vznikajícími nondisjunkcí).

Vyšetřením polárních tělísek nosiček robertsonských translokací bylo nalezeno u t(13;14) 33% nebalancovaných, 51% normálních a 16% balancovaných a u t(14,21) 42%, nebalancovaných, 37% normálních a 21% balancovaných (Munne et al., 2000).

V průběhu meiózy v oocytech se, na rozdíl od spermatogeneze, tolik neuplatňují buněčné kontrolní mechanismy. Poruchy v párování chromosomů (způsobené například jejich strukturálními vadami, mutacemi v genech pro proteiny podílející se na meióze nebo působením vnějších vlivů) tedy nemusí vést k zástavě vývoje a apoptóze. Tím je nejspíš dán vyšší výskyt aneuploidií v oocytech ve srovnání se spermii.

### 5.1.5. Vliv věku

Všeobecně známý vliv věku matky na výskyt aneuploidií u potomků je dán zvýšeným výskytem aneuploidií v oocytech žen vyššího věku. Z analýz neoplozených oocytů vyplývá, že do 30. roku je aneuploidních oocytů asi 5-10%, načež následuje prudký vzestup, takže, v 35 letech, je jich kolem 15%, ve 40 letech 30% a v 45 letech více než 50% (Pellestor et al., 2005a).

Příčina závislosti výskytu aneuploidie na věku ženy není známá, ale pravděpodobně se podílí více faktorů. Nejrozšířenější výklad je založen na teorii dvou zásahů (Lamb et al., 1996). Prvním je vznik náchylné meiotické konfigurace, dané počtem a polohou rekombinací, během profáze prvního meiotického dělení, která probíhá již prenatálně. Druhým zásahem je chybné rozdělení chromosomů v dozrávajícím oocytu, na němž se může podílet degradace proteinů nezbytných pro správný průběh meiózy i různé inzulty nasbírané během celé doby, kdy byl oocyt v klidu.

Roli může hrát i s časem klesající počet folikulů v ováriích. Jednotlivé folikuly odumírají apoptózou a tento proces začíná již během prenatálního období (De Pol et al., 1997). Z celkem asi 1 000 000 folikulů vzniklých během prenatálního vývoje, jich v 25 letech zbývá kolem 100 000 a v 45 letech již jen 1 000 (Gougeon, 1998). Počet antrálních folikulů, z nichž se během cyklu selektuje jeden, který dozraje, tak klesá z 20 mezi 20-30. rokem na 10 mezi 30-40. rokem a 2-3 po 40. roce (Gougeon, 1998). Tyto ve vyšším věku dozrávající oocyty mohou být méně kvalitní a zároveň je jich méně k selekci.

## 5.2. Cíle

Cílem práce bylo zavést metodu FISH pro vyšetření oocytů analýzou polárních tělísek a přímé vyšetření oocytů, u nichž selhala in vitro fertilizace

## 5.3. Materiál a metody

### 5.3.1. Materiál

Pro vyšetření chromosomů oocytů lze použít pouze neoplozené oocyty v metafázi 2. meiotického dělení nebo 1. a 2. polární tělíska (viz 5.1.2). Jedná se tedy o oocyty u nichž oplození selhalo a které není možné v rámci metod asistované reprodukce použít.

### 5.3.2. Fixace neoplozených oocytů

Pro fixaci neoplozených oocytů jsme testovali dvě metody: klasickou metodu fixace se schnutím na vzduchu (Tarkowski, 1996) a metodu postupné fixace (Kamiguchi et al., 1993, Pellestor et al., 2005b). Postup dle Tarkowského je stejný jako při fixování blastomer (viz 6.3.2.1). Při postupné fixaci je oocyt nejprve na 15 minut přenesen do hypotonického roztoku citrátu sodného (0,9% roztok), následně do fixace I (metanol s kyselinou octovou a vodou v poměru 5:1:4) na 5 minut. Poté je oocyt přenesen na podložní sklíčko a kápne se na něj fixace II (metanol s kyselinou octovou v poměru 3:1). Sklíčko se ihned umístí do kádinky s fixací II na 10 minut a poté do kádinky s fixací III (metanol s kyselinou octovou a vodou v poměru 3:3:1) na 1 minutu. Následně se nechá zaschnout.

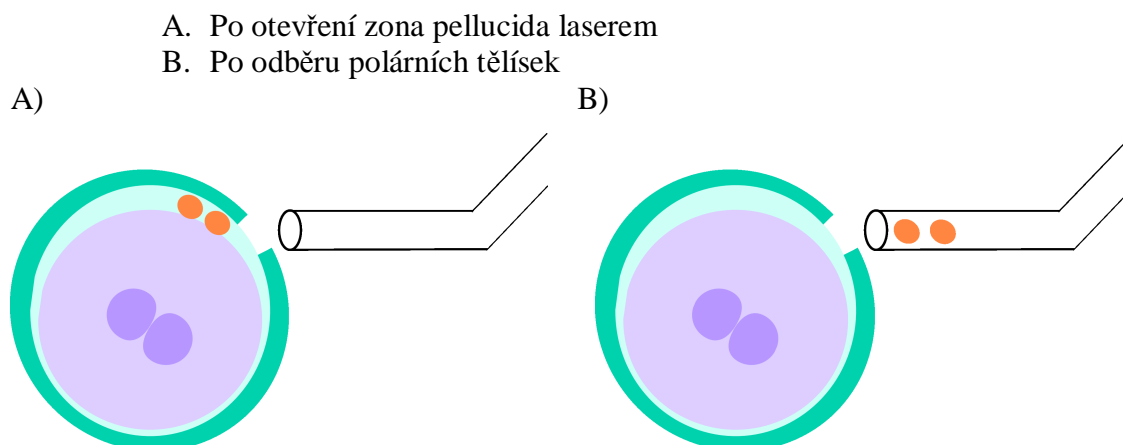
### 5.3.3. Biopsie polárních tělísek

V našich podmínkách je ideální provádět biopsii obou polárních tělísek najednou 20-24 hodin po inseminaci oocytů metodou IVF nebo ICSI, tedy ve stadiu zygoty. Biopsie je prováděna na invertovaném mikroskopu Nikon TE300 (Nikon, Tokyo, Japonsko) s mikromanipulačním zařízením Narshige (Narshige, Japonsko) a mikroinjektory Eppendorf Celltram (Eppendorf, Hamburg, Německo) v kapce media pod minerálním olejem na plastové misce. Zygota je uchycena pomocí holdingové mikropipety a nastavena tak, aby obě polární tělíska byla v rovině ostroži v poloze odpovídající 1 nebo 5 na ciferníku (viz Obrázek 10).

Otvor v zona pellucida je vytvořen pomocí infračerveného laseru Octax (MTG). Polární tělíska jsou aspirována pomocí bioptické mikropipety Eppendorf Custom Tip (Eppendorf).

Miska se zygotou je na mikroskopickém stolku nahrazena sklíčkem Superforst Plus (Menzel Glaser, Německo) s 0,2 µl destilované vody. Do ní jsou polární tělíska přenesena přímo bioptickou mikropipetou. V kapce vody dojde při zasychání k rozpadu membrán polárních tělísek a k jejich přischnutí ke sklíčku. Vzhledem k tomu, že mají jen zcela minimální objem cytoplasmy, mohou se takto nechat zaschnout a fixace se provádí až dodatečně kápnutím 2-krát 10 µl fixativa (methanol + kyselina octová v poměru 3:1). Sklíčka se dehydratují oplachem v methanolu.

#### Obrázek 10. Schéma biopsie polárních tělísek



### 5.3.4. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Pro vyšetření polárních tělísek je užívána sada sond Vysis Multivision PB (Abbott) obsahující sondy na chromosomy 13 (Spectrum Red), 16 (Spectrum Aqua), 18 (Spectrum Blue), 21 (Spectrum Green) a 22 (Spectrum Yellow). Denaturace probíhá 5 minut při 75°C a hybridizace 4 hodiny při 37°C. Oplach provádíme roztokem 0,5×SSC s 0,3% NP-40 při 72°C po dobu 3 minut. Jako montovací medium používáme Vectashield bez DAPI, protože modrá barva by bránila hodnocení signálů značených Spectrum Blue.

### 5.3.5. Fluorescenční mikroskopie

Při mikroskopické analýze je hlavním problémem nalezení chromatinu polárních tělísek, který je často fragmentovaný, neboť se jedná o degenerující nevitální buňky. Dále je potřeba rozlišit první polární tělísko od druhého. K tomu slouží rozdíl ve velikosti (první polární tělísko má větší jádro, obsahuje dvojnásobek chromatinu) a počtu signálů (první polární tělísko obsahuje v normálním případě pro každý chromosom dvě chromatidy, druhé jen jednu)..

### **5.3.6. Hodnocení polárních tělísek**

Hodnocení fluorescenčních signálů na polárních těliscích je zatíženo velkou nespolehlivostí danou tím, že se jedná o chromatin ve stadiu degenerace. Je nutné pro každé tělísko správně přiřadit všechny případné fragmenty.

V 1. polárním tělísku má normálně každý chromosom dvě chromatidy. Tyto dvě chromatidy ovšem mohou být jak těsně u sebe nebo značně vzdálené, případně každá v jiném fragmentu. Pozorovat bychom tedy měli buďto jeden velký dvojité signál nebo dva nezávislé signály a to jak pro sondy centromerické tak pro sondy lokus specifické. Odchylka od tohoto nálezu (přítomnost 0, 1, 3 nebo 4 signálů) znamená abnormalitu.

Ve 2. polárním tělísku je normální nález jednoho signál pro každý chromosom.

Pro celkové hodnocení je důležité kombinovat výsledky z obou tělísek. V některých případech může dojít ve druhém meiotickém dělení ke korekci chyby vzniklé v prvním meiotickém dělení (viz 5.1.4). Výsledná zygota potom pro daný chromosom nenes chromosomální vadu ze strany oocytu. Ale vzhledem k tomu, že se jedná o zygotu, v níž přinejmenším k jedné chybě v meióze došlo, je lépe pro transfer vybrat jiné normální embryo, je-li k dispozici.

### **5.3.7. Dokumentace a obrazová analýza**

K dokumentaci a obrazové analýze používáme software Axiovision (viz 4.3.8). K archivaci výsledků a sestavení výsledkové zprávy používáme databázovou aplikaci AR4 (viz 7).

## **5.4. Výsledky**

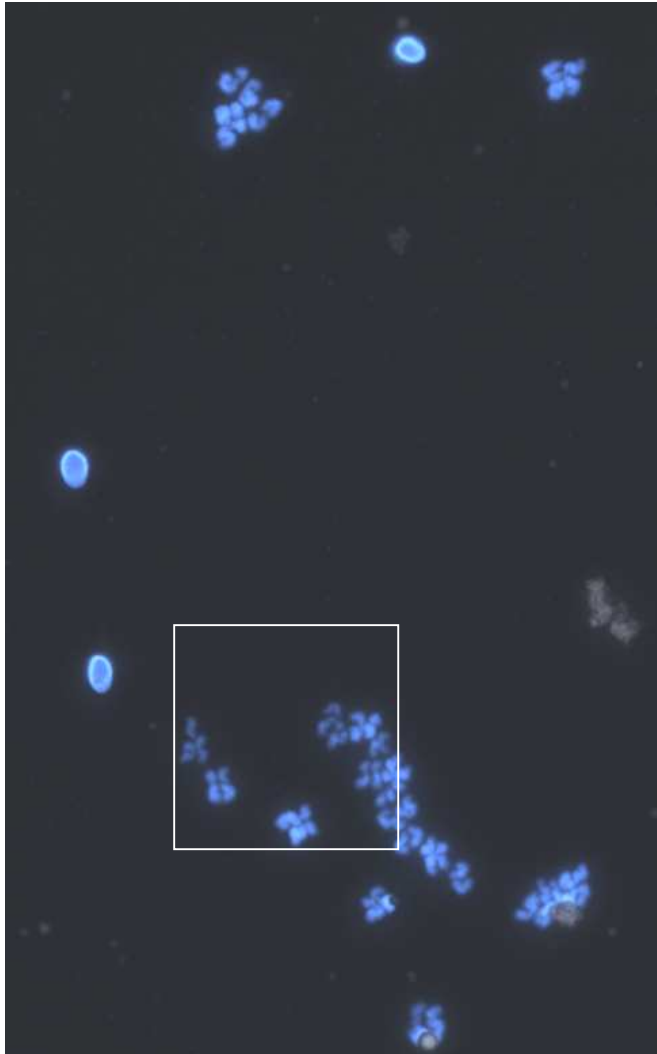
### **5.4.1. Vyšetření neoplozených oocytů**

Ukázka vyšetření neoplozeného oocytu v metafázi druhého meiotického dělení je na obrázku (Obrázek 11). Dokládá mechanismus vzniku aneuploidie předčasnou separací chromatid chromosomu 22, které by v této fázi měly být spojené v oblasti centromer. Dojde-li k jejich předčasnému oddělení, rozchází se do dceřiných buněk náhodně. Důsledkem může být aneuploidie ve vzniklé zygote.

**Obrázek 11. Chromosomy neoplozeného oocyty s**

- A. Chromosomy oocyty v MII fázi, čtverec ukazuje polohu detailu na obr. B a C
- B. Detail chromosomů, obarvené DAPI (modrá)
- C. FISH na chromosomy 16 (aqua), 21 (zelená) a 22 (žlutá)

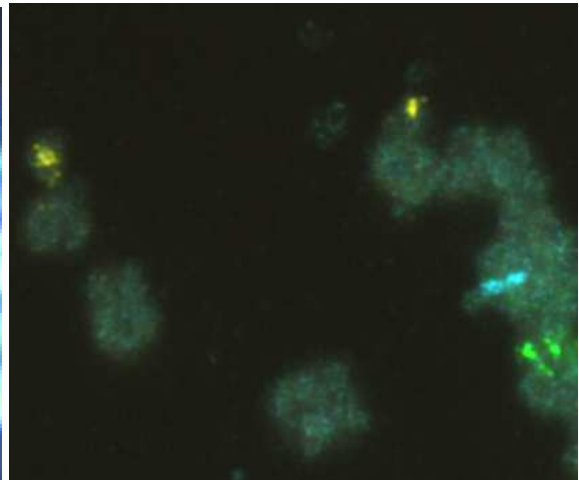
A)



B)



C)



### 5.4.2. Vyšetření polárních tělísek pro screening aneuploidií

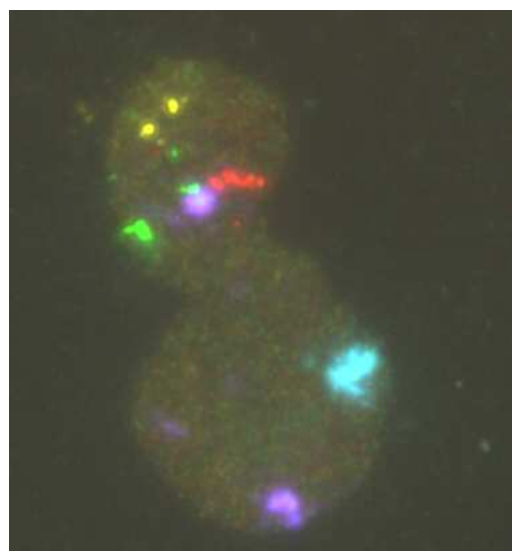
Vyšetření polárních tělísek bylo provedeno v 5 cyklech IVF s intracytoplasmatickou injekcí spermie (ICSI). Indikace zahrnovaly vyšší věk, opakované potraty a selhání IVF a mozaicismus 45,X/46,XX. Biopsie byla provedena v 1 cyklu před oplozením metodou ICSI, ve 4 cyklech druhý den po oplození. Vyšetřeno bylo 46 oocytů/zygot. Bylo analyzováno 42 PB1 a 27 PB2.

Výsledky jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 5). Normální nález byl u 16 ze 41 úspěšně vyšetřených PB1 (39%) a 19 z 27 úspěšně vyšetřených PB2 (70%). Celkově byl normální nález u 14 z 43 (33%) úspěšně vyšetřených oocytů/zygot. Transfer byl proveden ve 3 cyklech z 5 (60%), v jednom cyklu nebyla žádná embrya vhodná k transferu po PGS, v jednom cyklu pro kvalitu embryí. K těhotenství nedošlo u žádného z cyklů.

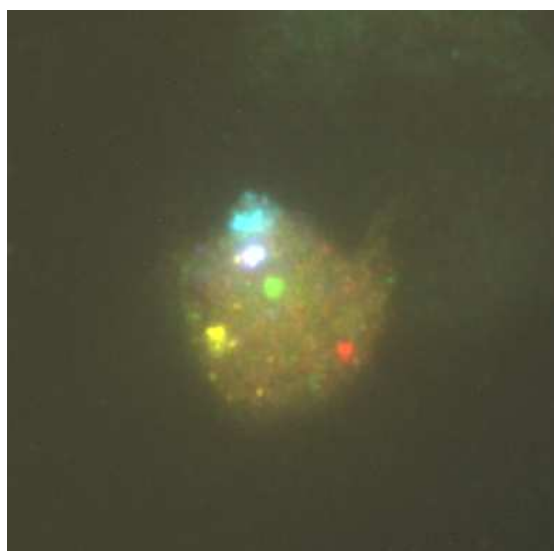
**Obrázek 12. Ukázka vyšetřených polárních tělísek, FISH na chromosomy (chromosomy 13 (červená), 16 (aqua), 18 (modrá), 21 (zelená) a 22 (žlutá)).**

- A. 1. polární tělísko, normální nález – pro každý chromosom buďto dvojitý signál nebo dva oddělené signály
- B. 2. polární tělísko, normální nález – pro každý chromosom jeden signál

A)



B)



**Tabulka 5. Výsledky vyšetření polárních tělísek**

	Odebráno	Vyšetřeno		Normálních	
<b>PB1</b>	42	41	97,6%	16	39,0%
<b>PB2</b>	27	27	100,0%	19	70,4%
<b>Dohromady zygoty</b>	46	43	93,5%	14	32,6%

Vyšetření polárních tělísek bylo navíc provedeno v 1 cyklu IVF po kompletním selhání fertilizace metodou ICSI, jakožto pokus o osvětlení příčin tohoto selhání.

## 5.5. Diskuse

Naše výsledky potvrzují, že vyšetření oocytů, u nichž selhalo oplození, může poskytnout důležité informace o poruchách meiózy. Většina aneuploidií má původ ze strany matky a



vzniká tedy právě během meiózy oocyty. Toto meiotické dělení začíná již v prenatální fázi vývoje ženy, ale dokončuje se až po úspěšném oplození oocyty spermií. Vyšetřením 1. polárního tělíska získáme informaci pouze o výsledku 1. meiotického dělení. Pro kompletní zhodnocení průběhu meiózy je tedy třeba analyzovat i 2. polární tělísko, které se odděluje až po oplození. Z technických důvodů je ideální provést odběr obou tělísek najednou po kontrole výsledku oplození pozorováním prvojader. Metoda odběru s pomocí laserového otevření zona pellucida (Montag et al., 1998) se nám osvědčila jakožto rychlá a relativně jednoduchá, obzvláště v kombinaci s přenesením polárních tělísek na podložní sklíčko přímo bioptickou mikropipetou. Tím je minimalizováno riziko jejich ztráty. Při mikroskopickém hodnocení je nutno rozlišit 1. a 2. polární tělísko. 1. polární tělísko je větší a pro každý chromosom by mělo mít dva signály nebo jeden dvojitý odpovídající dvěma chromatidám. V tomto tělísku, obdobně jako v oocyty v této fázi, se neobnovuje interfázní jádro. Jednotlivé chromosomy si tedy zůstávají ve formě metafázických chromosomů. Rychle ale nastává jejich degenerace, takže obvykle nacházíme spíše nepravidelné struktury různě fragmentovaného chromatinu. V druhém polárním tělísku sice nastává částečná obnova interfázního jádra, ale opět se jedná o nekompletní degenerující buňku, takže ani jeho chromatin nebývá ideálně zachová. Tím je dána hlavní technická nevýhoda vyšetření polárních tělísek. Při špatné kvalitě vyšetřovaného materiálu hrozí selhání hybridizace, rozštěpení i překryvy signálů.

### 5.6. Závěry

Ověřili jsme, že biopsie polárních tělísek po laserovém otevření ZP je vhodná metoda. Odběr 20 hodin po oplození umožňuje získat obě polární tělíska najednou. Získané výsledky umožňují zdokonalit výběr embryí vhodných k transferům vyřazením embryí s jasně prokázanou aneuploidí oocyty. Biopsie PB je v indikovaných případech důležitou součástí asistované reprodukce.

Výsledky vyšetření aneuploidie oocytů a polárních tělísek byly zveřejněny v publikacích 3.1, 9.1 a 10.1 - viz Příloha 2.

## 6. Chromosomální vady v embryích

### 6.1. Úvod

#### 6.1.1. Fertilizace a první buněčný cyklus

Teprve po fertilizaci haploidní spermií dochází k dokončení meiózy oocyty a vyloučení druhého polárního tělíška. Vzniká tak haploidní maternální prvojádro. Obdobně z kondenzovaného jádra spermie vzniká paternální prvojádro. To se během G1 fáze dekondukuje a protaminy jsou nahrazeny histony původem z oocyty. Replikace DNA v zygotě probíhá v obou prvojádrech zvlášť. Ke splynutí obou genomů dochází až po první mitóze.

Spermie do zygoty kromě chromosomů vnáší i proximální centriolu, která se stává základem centrosomu zygoty (Manandhar et al., 2005). Centrosomální proteiny pochází z cytoplasmy oocyty. Duplikace vzniklého centrosomu umožňuje vznik mitotického dělicího vřeténka zygoty a první buněčné dělení.

#### 6.1.2. Vyšetření chromosomů v embryích

Pro preimplantační genetickou diagnostiku lze buňky embrya odebrat buďto 3. den po oplození (Handyside et al., 1990) nebo 5. den (Dokras et al., 1990). Třetí den je správně se vyvíjející embryo tvořeno 8 blastomery, dříve by odběr jedné ze 4 nebo 2 buněk představoval příliš velkou ztrátu pro embryo. Čtvrtý den se embryo mění v morulu, jejíž buňky velice těsně přiléhají k sobě pomocí mezibuněčných spojů a odběr není možný. Pátý den vzniká blastocysta, která má uvnitř dutinu (blastocel) a buňky dvou typů: zevní vrstva (trofoblast) a k ní v jedné části naléhající vnitřní buněčná masa (embryoblast). V této fázi lze odebrat několik buněk trofoblastu bez poškození embryoblastu. Jelikož embryo je nutné nejpozději 6.-7. den přenést do dělohy, je z hlediska času potřebného pro diagnostiku výhodnější používat odběr blastomer 3. den. Pouze embrya s abnormálním nálezem nebo celkově narušeným vývojem lze analyzovat celá, pokud s tím rodiče souhlasí.

Ve všech případech se obvykle jedná o buňky v interfázi, takže se k analýze používá FISH. Tuto metodu v případě analýzy jednotlivých interfázních jader provází řada technických problémů jako ne zcela 100% spolehlivost a omezený počet najednou vyšetřitelných chromosomů. Do budoucna by mohlo být výhodnější ji nahradit metodami založenými na CGH.

Existují i postupy pro kompletní karyotypizaci blastomer v metafázi mitotického dělení založené na řízeném urychlení kondenzace chromosomů pomocí kyseliny okadaické (Hlinka et al., 2001) nebo fúzi se zvířecím oocytem (Willadsen et al., 1999), ale v praxi se pro technickou náročnost a nižší spolehlivost příliš nepoužívají.

Při vyšetření numerických aberací se nacházejí jak jednoduché vady (izolované trisomie či monosomie), tak komplexní aneuploidie zahrnující více chromosomů a vady počtu chromosomových sad (haploidie, triploidie, tetraploidie). Častý je též výskyt mozaicismu (Munne et al., 1993). Pro jeho detekci je ale nutné odebrat aspoň 2 buňky, což již pro embryo znamená značnou ztrátu.

#### 6.1.3. Mechanismy vzniku chromosomálních vad v embryích

Chromosomální vady v embryích mohou pocházet z oocyty či spermie a nebo mohou vzniknout až při oplození a dělení buněk embrya.

### 6.1.3.1. Poruchy fertilizace

Při abnormálním průběhu fertilizace může dojít k vadám počtu chromosomových sad.

Haploidie vzniká, pokud se oocyt aktivuje partenogeneticky bez oplození spermií.

Triploidie vzniká:

- oplozením oocyty dvěma spermiemi, zygota pak má celkem tři prvojádra, z toho dvě paternální
- fertilizací diploidní spermií nebo diploidního oocyty
- selháním vyloučení druhého polárního tělíška, zygota pak může mít tři prvojádra, z toho dvě maternální

Další vývoj zygot vzniklých oplozením dvěma (nebo i více) spermiemi se zásadně odlišuje od ostatních typů polyploidie (Golubovsky, 2003). Každá ze spermií totiž do oocyty vnesla svoji proximální centriolu, jejíž duplikací vzniká centrosom. Při současné přítomnosti více centrosomů v zygotě vzniká abnormální mitotické vřetenko, které má 3 či více pólů (místo normálních dvou). Výsledkem dělení pak mohou být tři blastomery místo dvou a/nebo chaotický rozchod chromosomů, takže každá dceřinná buňka má jiný počet chromosomů. Může dojít i ke vzniku normální diploidní buněčné linie nebo abnormální diploidní linie, tvořené pouze paternálními či pouze maternálními chromosomy.

Prvojádra jsou v zygotách viditelná v období 16-20 hodin po IVF. Pro další kultivaci se vybírají pouze embrya se dvěma prvojádry, aby nedošlo k transferu abnormálního embrya.

### 6.1.3.2. Poruchy mitotických dělení

Lidská embrya jsou velice náchylná k chybám v mitotických děleních. Důsledkem je, že při PGD je velice často nacházen mozaicismus. Výskyt mozaicismu během jednotlivých fází preimplantačního vývoje stoupá a ve stadiu 5-8 buněk dosahuje 50% (Bielanska et al., 2002).

Mozaicismus se vyskytuje v různých formách, podle toho, zda embryo bylo původně normální nebo abnormální a ve kterém z buněčných dělení k chybě došlo. Vyskytují se kombinace dvou typů buněk (euploidní/aneuploidní nebo dva typy aneuploidie), tři a více typů, až po tzv. chaotická embrya v nichž může každá buňka mít jiný nálezný (Delhanty et al., 1997).

Pro první buněčné dělení rýhujícího se embrya je důležitý centrosom vzniklý z proximální centrioly spermie a centrosomálních proteinů původem z cytoplasmy oocyty (Manandhar et al., 2005). Je možné, že za část chyb v prvních mitózách je zodpovědný právě tento centrosom (Silber et al., 2003) a tudíž že se na nich podílejí i abnormality spermií a ooplasmy.

Pokud některá mitóza vůbec neproběhne nebo není završena cytokinezí, zůstávají v buňce 4 sady chromosomů a je nalézána tetraploidie.

Na riziko *de novo* vznikajících strukturálních vad ukazují výsledky prvních studií pomocí CGH (Wilton, 2005), které u téměř 10% embryí našly parciální aneuploidie včetně reciprokových ztrát a získů chromosomových fragmentů v jednotlivých blastomerech.

### 6.1.4. Výskyt chromosomálních vad v embryích

Podíl abnormálních embryí činí v různých studiích 30-65%, přičemž mozaicismus je nalézán v 15-45%. Mezi nalezenými abnormalitami převládají komplexní aneuploidie postihující více než jeden chromosom (kolem 55%) nad aneuploidie jednoho chromosomu (kolem 40%) a vadami chromosomových sad (do 10%).

Téměř všechna data pocházejí z analýzy embryí vzniklých mimotělním oplozením v rámci léčby neplodnosti. Vyšetřují se pouze embrya se dvěma prvojádry po oplození, která třetí den

mají aspoň 6 buněk. Výsledky se mohou lišit podle indikace vyšetření i podle použitých metod. V normální populaci při přirozeném oplození může být výskyt nižší.

### 6.1.5. Důsledky chromosomálních vad v embryích

Další vývoj embrya s chromosomální vadou záleží na tom o jakou vadu se jedná. Všechny autosomální monosomie a většina trisomií znamenají tak vážné postižení, že embryo buďto není vůbec schopné implantace, nebo je časně potraceno (Munne et al., 2004). Takový časný spontánní potrat může proběhnout zcela nepozorovaně v rámci menstruačního cyklu nebo jako opožděná intenzivnější menstruace.

V potracených plodech z pozdějších stadií jsou nejčastěji nalézány trisomie 16, 21 a 22. Porodu se častěji dožívají jen plody postižené trisomiemi chromosomů 13, 18 a 21 nebo numerickými vadami pohlavních chromosomů. Značná část plodů s těmito vadami je ale také spontánně potracena.

Následky nebalancovaných strukturálních vad jsou podobně závislé na tom, jako část genomu postihují a zda se v ní nacházejí geny citlivé na genovou dávku. V případě balancovaných přestaveb záleží na tom, zda zlom naruší důležitý a citlivý gen.

Mozaicismus, obzvláště ve formě chaotických embryí s komplexními aneuploidii, většinou způsobuje selhání implantace nebo časný potrat. Někdy ale může dojít k tomu, že mozaicismus z embrya kompletně vymizí nebo zůstane pouze v placentě (confined placental mosaicism - CPM) (Kalousek et al., 1983). Příčinou může být nižší životaschopnost aneuploidní linie a působení selekce uvnitř vyvíjejícího se embrya (Los et al., 2004). Podobně působí vnější selekce, takže z embryí přežijí spíše ta, u nichž došlo k eliminaci aneuploidní linie nebo k jejímu omezení na placentu. Přítomnost aneuploidní linie v placentě ale nemusí být zcela bez následků. Může způsobit placentární dysfunkci a intrauterinní růstovou retardaci plodu (Kalousek et al., 1991). Studie sledující 36 dětí s diagnostikovaným CPM ovšem tuto asociaci nepotvrdila a našla pouze snížení postnatálního růstu (Amor et al., 2006).

### 6.1.6. Klinické aspekty preimplantačních vyšetření

Z hlediska indikace je možné preimplantační vyšetření chromosomů rozdělit na preimplantační genetickou diagnostiku (PGD) a preimplantační genetický screening (PGS) (Thornhill et al., 2005).

PGD se provádí u párů z nichž aspoň jeden partner je postižen určitou chromosomální vadou (translokace, mozaicismus, vady gonosomů ad. – viz 3.3.2) a cílem je tedy vyloučení embryí s konkrétními vadami, které v této situaci mohou vzniknout. Patří sem i detekce pohlaví u embryí nosiček X-vázaných onemocnění (hemofilie A, Duchenneova muskulární dystrofie ad.). Používá se FISH se sondami vybranými podle toho, jaká je indikace vyšetření. Například pro strukturální vady se používají sondy odpovídající oblastem, které se mohou dostat do nebalancovaného stavu.

PGS se provádí u párů se zvýšeným rizikem vzniku aneuploidie. Patří sem páry s opakovanými spontánními potraty, opakovanými neúspěchy IVF a ženy vyššího věku (>37 let). Vyšetřují se chromosomy, které jsou nejčastěji aneuploidii postiženy a u kterých to může mít závažné následky (obvykle 13, 16, 18, 21, 22, X a Y), takže je možné používat standardizované sady sond. Ideální by ovšem bylo vyšetřovat všechny chromosomy, což umožňují pouze metody založené na CGH. Překážkami jejich rozšíření jsou vysoká cena a delší doba potřebná pro vyšetření.

Kategorie PGD a PGS se v praxi mohou překrývat, protože u embryí nosičů strukturálních vad nebo X-vázaných chorob se někdy vyšetřují i ostatní chromosomy, aby byl výběr embryí pro přenos do dělohy optimální.

Zásadním problémem PGS je mosaicismus (viz 6.1.4, 6.1.5). Výsledek vyšetření jedné nebo dvou blastomer vůbec nemusí odpovídat situaci v ostatních buňkách a i ta se během dalšího vývoje může podstatně měnit. Řada pracovišť, která provádí PGD pro konkrétní chromosomální vady, tedy ze zásady PGS neprovádí (Ogilvie et al., 2005).

## 6.2. Cíle

Cílem práce bylo zavést metodu FISH pro vyšetření chromosomů preimplantačních embryí po mimotělním oplození za účelem zlepšení výběru embryí pro transfer do dělohy a pro selekci embryí nepostížených dědičnou chorobou vázanou na pohlaví.

Cílem studie lokalizace chromosomů v jádrech preimplantačních embryí bylo zjistit, zda se poloha vyšetřovaných chromosomů v normálních blastomerech liší od polohy v buňkách s chromosomální abnormalitou. Dalším cílem bylo zjistit, zda se liší poloha chromosomu X v buňkách s jedním chromosomem X od polohy v buňkách s více chromosomy X což by mohlo být způsobeno inaktivací chromosomu X v buňkách více kopiemi chromosomu X již v takto raném stadiu vývoje.

Cílem bylo též testovat metody 3D-FISH na buňkách z preimplantačních embryí pro další studium jaderné topologie pomocí těchto přesnějších metod.

## 6.3. Materiál a metody

Vyšetření embryí prostřednictvím biopsie blastomer bylo provedeno ve 38 cyklech IVF.

### 6.3.1. Biopsie

Klinické preimplantační vyšetření chromosomů se provádí na blastomerech odebíraných z embrya 3.den, kdy je embryo tvořeno ideálně 8 buňkami nebo na buňkách trofoblastu odebíraných 5. den z blastocysty. Embrya s abnormálním nálezem z vyšetření blastomer kompletně analyzujeme 5. den (až po tom, co jsou zdravá embrya transferována do dělohy nebo kryoprezervována), abychom ověřili správnost výsledku.

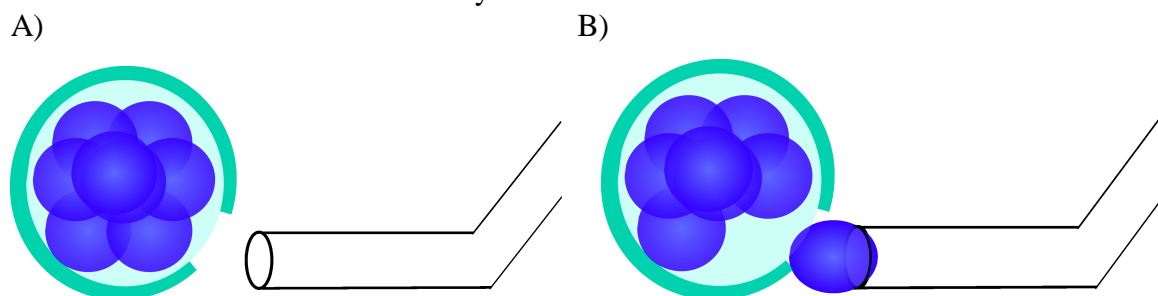
Odběr se provádí v kapce media pod minerálním olejem v mikromanipulační misce na invertovaném mikroskopu Eclipse TE 300 (Nikon) s mikromanipulačním zařízením Integra s infračerveným laserem Saturn (Research Instruments, UK) a mikropipetami Cook (Cook, Austrálie).

#### 6.3.1.1. Biopsie blastomer

K biopsii jsou vhodná jen u embrya, která dosáhla počtu alespoň 5 blastomer. Odebrat lze 1-2 blastomery. Pro odběr je nutné vybrat blastomeru, která je dobře zvenku přístupná a která má viditelné jádro. Otvor v zona pellucida vytváříme pomocí laseru poblíž blastomery, která se bude odebírat (viz Obrázek 13). Při tom by nemělo dojít k poškození membrány této blastomery, protože jinak hrozí její roztržení při biopsii nebo nedostatečné nabobtnání buňky a rozpuštění cytoplasmy při fixaci. Následně je blastomera částečně aspirována bioptickou pipetou, vytáhnutá z embrya a zanechána v mediu poblíž embrya. Embryo se vrátí do kultivační misky a blastomera zůstává v mikromanipulační misce.

**Obrázek 13. Schéma biopsie blastomery**

- A. Po otevření zona pellucida laserem  
 B. Po odběru blastomery



**6.3.1.2. Biopsie trofoblastu**

Je-li biopsie trofoblastu prováděna po předchozí biopsii polárních tělísek nebo blastomery, je nutné použít otvor v zona pellucida vytvořený při těchto předchozích odběrech. Jinak se otvor umístí tak, aby byl co nejdále od vnitřní buněčné masy blastocysty. Biopstickou mikropipete se aspiruje tkáň trofoblastu a vytáhne se otvorem v zona pellucida ven z blastocysty. Pro oddělení pevně spojených buněk lze opět použít laser. Při tom dojde ke kolapsu dutiny blastocysty, ale již po několika hodinách se obnoví mezibuněčné spoje i dutina.

**6.3.2. Příprava sklíček pro FISH**

Pro fixaci odebraných buněk na sklíčko a přípravu pro FISH lze použít dvou postupů. Pro jednotlivé blastomery používáme obvykle metodu fixace pomocí methanolu a kyseliny octové (Tarkowski, 1996), pro buňky trofoblastu a reanalýzu celých embryí metodu rozpuštění pomocí HCl a Tweenu (Coonen et al., 1994).

**6.3.2.1. Fixace methanolem s kyselinou octovou**

Odebraná blastomera je pod stereomikroskopem SMZ 1500 (Nikon) přenesena do čisté misky se 3 kapkami hypotonického roztoku (1% citrát sodný s 0,6% BSA) a postupně v těchto tří kapkách opláchnuta. S minimálním množstvím citrátu se následně přenesa na podložní sklíčko. Těsně před kompletním zaschnutím citrátu se na ní kápne fixativum (methanol + kyselina octová v poměru 3:1). Tím dojde k narušení membrány a odplavení cytoplasmy. Přítomnost jádra blastomery je možné ihned zkontrolovat na mikroskopu Eclipse 600 (Nikon) s fázovým kontrastem. Pomocí motorizovaného stolku propojeného s počítačem jsou přitom do softwaru Anomaly Counter (viz 4.3.7) uloženy přesné souřadnice jádra na sklíčku.

**6.3.2.2. Rozpuštění blastomery pomocí HCl a Tweenu**

Izolovaná blastomera, shluk buněk trofoektodermu nebo celé embryo při reanalýze jsou pod stereomikroskopem přeneseny do kapky PBS na podložním sklíčku Superfrost Plus (Menzel). Po oplachu v této kapce jsou přeneseny do kapky rozpouštěcího roztoku (0,01N HCl, 0,1% Tween 20). V této kapce nastává rozpad membrány a rozpuštění cytoplasmy. Při tom se z buněk uvolňují jádra, která lze přímo sledovat. Po zaschnutí lze polohu jader ověřit pomocí fázového kontrastu, ale vzhledem k zaschlým krystalům jsou hůře viditelná než po fixaci methanolem a kyselinou octovou. Dalším krokem je digesce zbylých proteinů pomocí roztoku pepsinu a fixace 1% paraformaldehydem.

### **6.3.3. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)**

Sklička se dehydratují alkoholovou řadou (70, 80 a 100% alkohol) a nechají se uschnout. Pro klinické preimplantační vyšetření používáme dvou kol FISH a hodnocení signálů. V jednom kole používáme sadu sond Vysis Multivision PB (viz 5.3.4) a ve druhém sondy pro chromosomy X a Y doplněné případně pro kontrolu další sondou na autosom. Při preimplantačním screeningu aneuploidií napřed používáme sadu Multivision PB a ve druhém kole X+Y, při stanovení pohlaví embryí napřed používáme sadu X+Y a ve druhém kole Multivision PB. Denaturace probíhá po 5 minut při 75°C, hybridizace v případě Multivision PB 30 minut při 42°C a 90 minut při 37°C nebo přes noc, v případě sady X+Y 30 minut při 42°C nebo přes noc. Odmývání se provádí roztokem 0,5×SSC s 0,3% NP-40 při 72°C. Po první hybridizaci se domývá 3:30 min, po druhé pouze 30 s.

Pro montování sklíček se v případě sady Multivision používá pouze Vectashield, pro sadu XY Vectashield s DAPI.

### **6.3.4. PNA-FISH**

Pro testování PNA sond byly použity sondy na centromery chromosomů 1, 4, 9, 16, 18, X a Y (Applied Biosystems, USA) Sondy na chromosomy 4, 9 a X byly značené fluoresceinem (zelená), sondy na chromosomy 16, 18 a Y rhodaminem (červená) a sonda na chromosom 1 diethylaminocoumarinem. Denaturace byla prováděna po dobu 3 minut při 75°C, hybridizace 60 minut při 37°C. Poté byla sklička opláchnuta 2 minuty v PBS s 0,1% Tweenem 20 při 58°C a následně 1 minutu v 2×SSC s 0,1% Tweenem při pokojové teplotě. Pro montování byl použit Vectashield s DAPI.

### **6.3.5. Fluorescenční mikroskopie**

Pro nalezení jader využíváme uložené souřadnice. Aby souřadnice uložené na mikroskopu Eclipse 600 odpovídaly souřadnicím na mikroskopu AxioPlan, je nutné vždy před použitím oba motorizované stolky zkalibrovat pomocí kalibračního přepočítávacího sklíčka. Souřadnice uložené programem Anomaly Counter lze vyexportovat do souboru a importovat do programu Axiovision. Tím je umožněno automatické procházení pozic nafixovaných jader.

Vzhledem k tomu, že spektra fluorochromů použitých v sadě Multivision PB se částečně překrývají, je nutné při hodnocení každý signál prohlédnout v jednopásmových i vícepásmových fluorescenčních filtrech.

### **6.3.6. Dokumentace**

K dokumentaci a obrazové analýze používáme kameru AxioCam MRm a software Axiovision (viz 4.3.8). K archivaci výsledků a sestavení výsledkové zprávy používáme databázovou aplikaci AR4 (viz 7)

### **6.3.7. Analýza lokalizace chromosomů**

#### **6.3.7.1. Materiál**

Pro studii lokalizace chromosomů v jádrech preimplantačních embryí byly použity blastomery podebrané pro preimplantační genetické vyšetření metodou FISH ve 32 cyklech mimotělního oplození (IVF) u 28 párů, přičemž u 4 párů bylo toto vyšetření provedeno dvakrát. Z 204 blastomer, které byly vyšetřeny, byly pro další analýzu vybrány takové, které měly jasné fluorescenční signály, neměly více jader, neměly jádra fragmentovaná ani poškozená. Pro tuto studii tak bylo vybráno pouze 96 blastomer z 22 cyklů IVF 20 párů.

Následující data přísluší k cyklům u nichž byla analyzována alespoň jedna blastomera. Medián věku žen v době odběru oocytů byl 31,5, rozmezí 22-40 let. Indikace zahrnovaly věk (6/22 cyklů), opakované selhání IVF (6/22), opakované potraty (3/22), předchozí těhotenství s anuploidním plodem, imunologické faktory neplodnosti (10/22), karyotyp s mozaikou 45,X/46,XX (1/22), předcházející onkologická terapie (3/22) a výběr pohlaví u přenašečky hemofilie A (1/22). Oligozoospermie partnera byla nalezena v 4/22 cyklů, v jednom cyklu byla koncentrace spermií nižší než 1 mil./ml.

### 6.3.7.2. Biopsie, FISH a fluoresenční mikroskopie

Viz 6.3.1-6.3.6.

### 6.3.7.3. Obrazová analýza

Obrazová data byla z programu Axiovision vyexportována jako bitmapové soubory. Ty byly analyzované programem ImageJ (National Institute of Health, USA, dostupná na internetu na <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Okraje jader byly označeny pomocí nástroje "Freehand tool" podle oblasti označené pomocí DAPI. Označená oblast byla převedena na černobílou masku a uložena jako nový bitmapový soubor. Pomocí funkce „Centroid“, která počítá těžiště geometrického útvaru jakožto aritmetický průměr souřadnic všech bodů v osách x a y byl určen střed masky. Souřadnice středů signálů a periferních okrajů signálů byly určeny manuálně pomocí nástroje "Crosshair". Souřadnice jádra a signálů společně s černobílou maskou byly importovány do programu, který jsme vyvinuli pomocí vývojového prostředí Delphi 6 (Borland, Scotts Valley, California, USA). V tomto programu byly provedeny výpočty relativních vzdáleností signálů od středu a okraje jádra. Výsledky byly uloženy v databázi Firebird SQL (IBPhoenix, Massachusetts, USA).

Pro každý FISH signál byly spočítány tyto vzdálenosti:

R - poloměr jádra. Pro každý signál byl spočítán zvlášť, aby se eliminovaly nepřesnosti vyplývající z nepravidelých tvarů některých jader

Rc - vzdálenost středu signálu od středu jádra

Re - vzdálenost periferního okraje signálu od středu jádra

Rs - poloměr signálu. Stanoven jakožto vzdálenost mezi středem signálu a periferním okrajem signálu

RDc - relativní vzdálenost středu signálu od středu jádra:  $RDc = Rc/R$

RDe - relativní vzdálenost periferního okraje signálu od středu jádra:  $RDe = Re/R$

CRD - korigovaná relativní vzdálenost signálu:  $CRD = RDc \times R / (R-Rs)$ . Tato hodnota ukazuje relativní polohu signálu vzhledem ke středu jádra i k okraji jádra bez na velikost signálu, přičemž je eliminován vliv velikosti signálu

Vzdálenosti RDc, RDe a CRD dosahují hodnot mezi 0 a 1, přičemž 0 odpovídá umístění signálu ve středu jádra a 1 odpovídá umístění na okraji jádra.

### 6.3.7.4. Statistická analýza

Analyzované signály byly rozděleny do kategorií podle chromosomů a podle celkového výsledku dané blastomery (normální / abnormální). Blastomery se dvěma signály pro každý z vyšetřovaných autosomů a dvěma signály pro X nebo jedním pro X a jedním pro Y byly označeny jako normální, ostatní abnormální.

Spočítané hodnoty RDc, RDe a CRD byly rozděleny do 9 intervalů odpovídajících 9 soustředným prstencům na kruhovém jádře a ne centrální ( $\leq 0,75$ ) a periferní ( $> 0,75$ ) intervaly.

Rozložení signálů v daných intervalech bylo porovnáno mezi jednotlivými kategoriemi testem nezávislosti v kontingenčních tabulkách. K hodnocení rozdílů mezi nalezenými rozloženími



signálů a rozložením očekávaným při náhodném rozmístění signálů byl použit chí-kvadrát test dobré shody. Očekávané náhodné rozložení signálů bylo získáno z matematického modelu, založeného na předpokladu, že signály jsou náhodně rozmístěné uvnitř kulového jádra a že plochý tvar jádra po fixaci odpovídá projekci původně trojrozměrného jádra do dvojrozměrné plochy. Očekávaný podíl signálů v jednotlivých soustředných kruzích je pak spočítán jakožto podíl objemu koule, který se promítá na tento prstavec. Označíme-li horní hranici intervalu odpovídajícího prstenci jako  $\rho_1$  a dolní hranici jako  $\rho_2$ , pak podíl na objemu  $V$  byl spočítán pomocí následujících rovnic:

$$V=f(\rho_1)-f(\rho_2), \text{ kde}$$

$$f(\rho)=(3/2)(\rho^2-\rho^2v/2+v^3/6), \text{ kde}$$

$$v=1-(1-\rho^2)^{1/2}.$$

## 6.4. Výsledky

### 6.4.1. Preimplantační screening aneuploidií a detekce pohlaví

Vyšetření embryí prostřednictvím biopsie blastomer a fluorescenční in situ hybridizace (FISH) bylo provedeno ve 38 cyklech IVF. Výsledky jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 6) a v grafu (Obrázek 15).

Pro preimplantační screening aneuploidií bylo vyšetřeno celkem 213 blastomer ze 185 embryí. U 91,5% vyšetřovaných blastomer byl získán výsledek. Z toho v 41% procentu byl výsledek normální a v 59% abnormální.

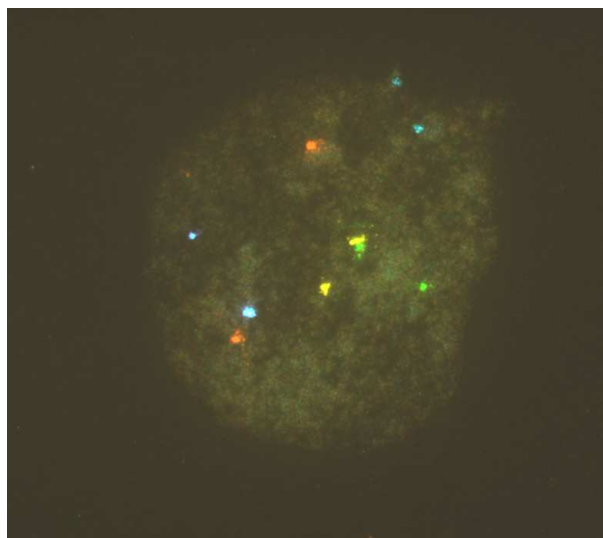
Výsledky vyšetření jednotlivých chromosomů v blastomerech jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 7) a v grafu (Obrázek 16, Obrázek 17).

#### Obrázek 14. Ukázka vyšetřené blastomery

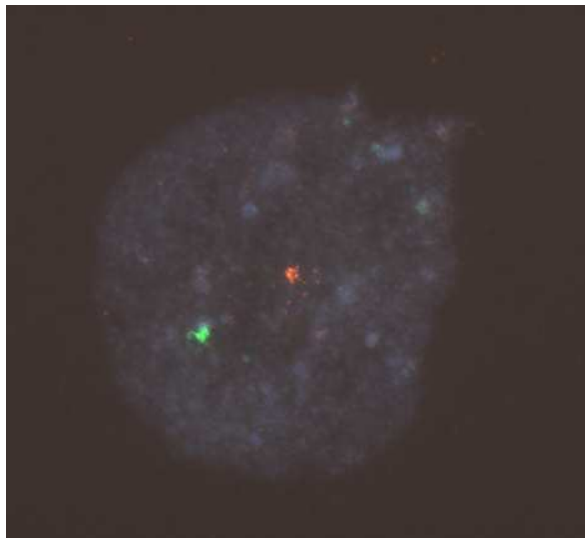
A. FISH se sondami na chromosomy 13 (červená), 16 (aqua), 18 (modrá), 21 (zelená) a 22 (žlutá). Normální nález

B. FISH se sondami na chromosomy X (zelená) and Y (červená). Normální nález, mužské pohlaví

A)



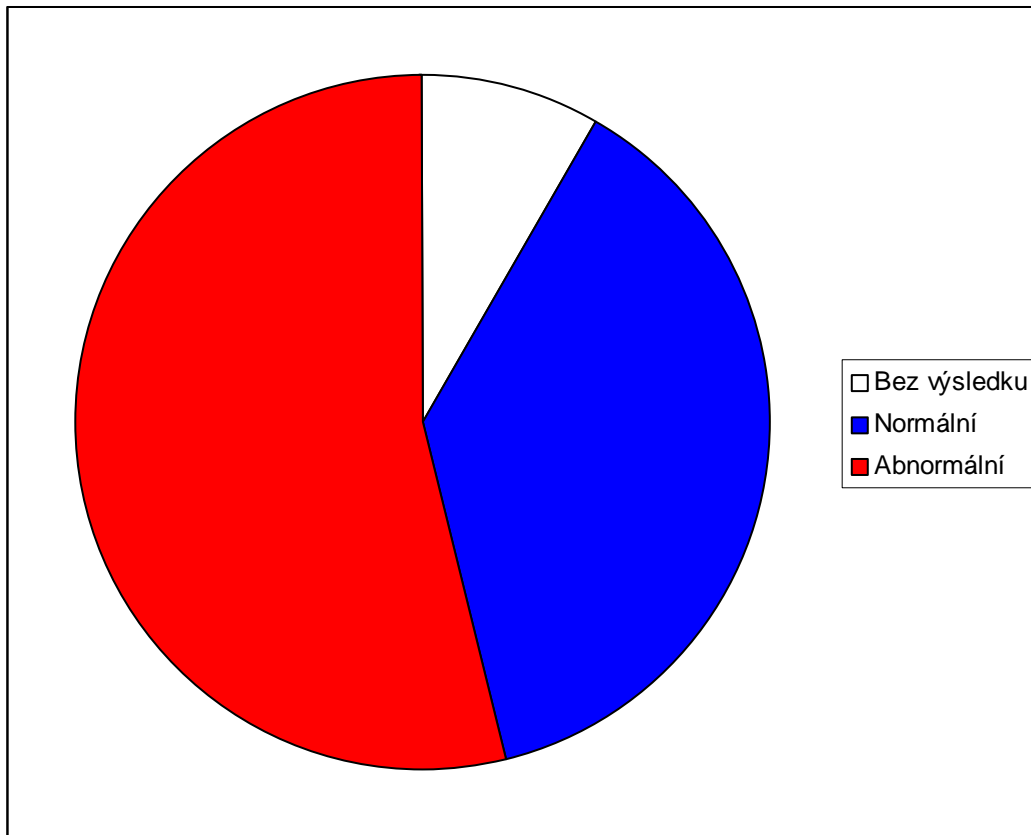
B)



**Tabulka 6. Výsledky vyšetření blastomer**

	Počet	Procento
<b>Celkem vyšetřeno</b>	213	
<b>Bez výsledku</b>	18	8,5%
<b>S výsledkem</b>	195	91,5%
<b>Normální</b>	80	41,0%
<b>Abnormální</b>	115	59,0%
<b>Trisomie</b>	28	24,3%
<b>Monosomie</b>	20	17,4%
<b>Dvojitá trisomie</b>	8	7,0%
<b>Dvojitá monosomie</b>	8	7,0%
<b>Trisomie + monosomie</b>	7	6,1%
<b>Polyploidie</b>	4	3,5%
<b>Haploidie</b>	1	0,9%
<b>Komplexní aneuploidie</b>	39	33,9%

**Obrázek 15. Grafické znázornění podílu blastomer s normálním a abnormálním nálezem a blastomer bez výsledku**

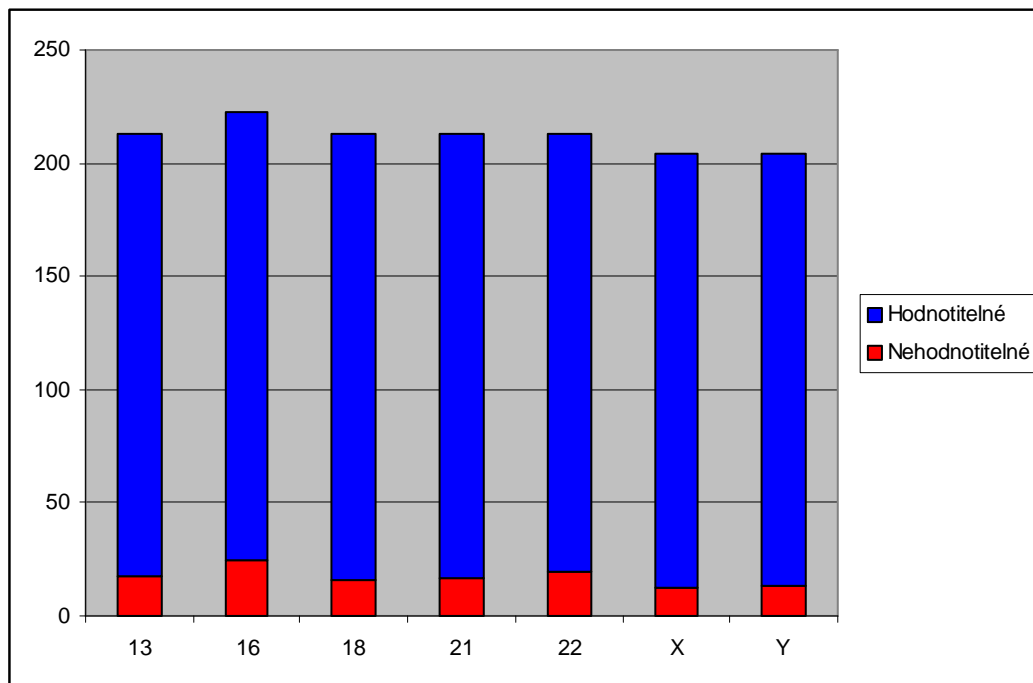


## Chromosomální vady v embryích

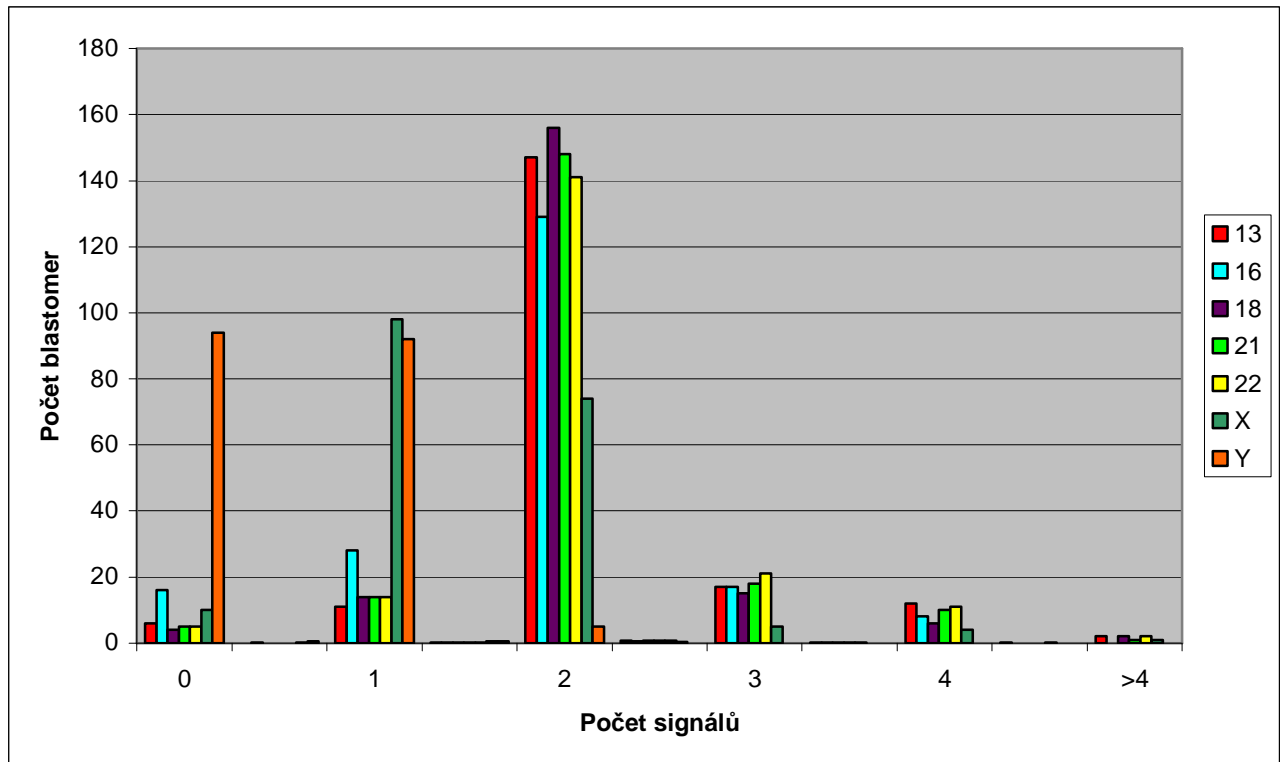
**Tabulka 7. Výsledky vyšetření jednotlivých chromosomů v blastomerách**

Chromosom	Výsledek (počet blastomer)														Celkem
	0		1		2		3		4		>4		Nehodnotitelné		
13	6	2,8%	11	5,2%	147	69,0%	17	8,0%	12	5,6%	2	0,9%	18	8,5%	213
16	16	7,2%	28	12,6%	129	57,8%	17	7,6%	8	3,6%	0	0,0%	25	11,2%	223
18	4	1,9%	14	6,6%	156	73,2%	15	7,0%	6	2,8%	2	0,9%	16	7,5%	213
21	5	2,3%	14	6,6%	148	69,5%	18	8,5%	10	4,7%	1	0,5%	17	8,0%	213
22	5	2,3%	14	6,6%	141	66,2%	21	9,9%	11	5,2%	2	0,9%	19	8,9%	213
<b>Celkem</b>	36	3,3%	81	7,5%	721	67,1%	88	8,2%	47	4,4%	7	0,7%	95	8,8%	1075
X	10	4,9%	98	48,0%	74	36,3%	5	2,5%	4	2,0%	1	0,5%	12	5,9%	204
Y	94	46,1%	92	45,1%	5	2,5%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	13	6,4%	204
<b>Celkem</b>	104	25,5%	190	46,6%	79	19,4%	5	1,2%	4	1,0%	1	0,2%	25	6,1%	408

**Obrázek 16. Grafické srovnání podílu blastomer nehodnotitelných pro jednotlivé chromosomy**



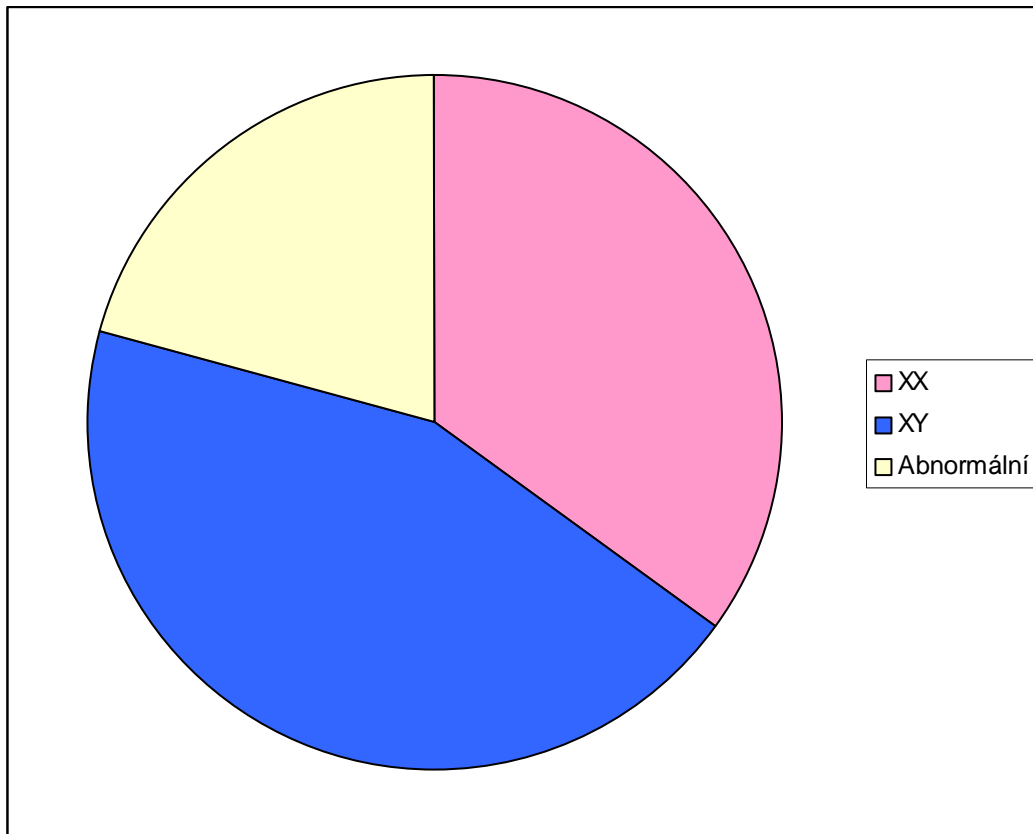
Obrázek 17. Graf výsledků vyšetření počtů jednotlivých chromosomů v blastomerách



**Tabulka 8. Souhrnné výsledky vyšetření pohlavních chromosomů v blastomerách**

	Výsledek (počet blastomer)						
	Normální				Abnormální	Celkem	
	XY		XX				
<b>Počet</b>	84	44,0%	67	35,1%	40	20,9%	191
<b>Celkem</b>	151						

**Obrázek 18. Graf souhrnných výsledků vyšetření pohlavních chromosomů v blastomerách**



## 6.4.2. Studium lokalizace chromosomů v jádrech preimplantačních embryí

### 6.4.2.1. Výsledky screeninu aneuploidií ve studovaných blastomerech

Pro analýzu lokalizace chromosomů byly vybrány jen blastomery bez fragmentace jádra a FISH signálů (viz 6.3.7.1). Výsledky PGS u těchto blastomer jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 9). Z 96 blastomer bylo 49(51%) normálních a 47 (49%) abnormálních.

**Tabulka 9. Výsledky preimplantačního genetického screeningu aneuploidií (PGS) v blastomerech v nichž byla provedena analýza polohy chromosomů**

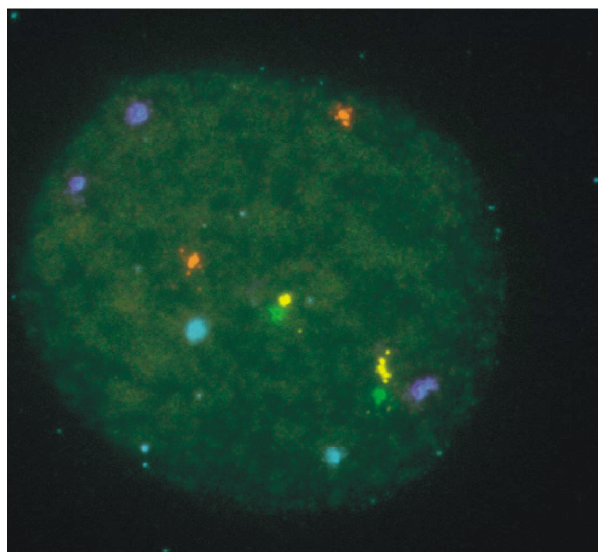
Výsledek	Počet	%
Normální	49	51,0%
Trisomie	15	15,6%
Dvojitá trisomie	3	3,1%
Monosomie	10	10,4%
Dvojitá monosomie	5	5,2%
Trisomie + monosomie	3	3,1%
Komplexní aneuploidie	10	10,4%
Polyploidie	1	1,0%
<b>Celkem</b>	<b>96</b>	

### Obrázek 19. Příklad analyzované blastomery

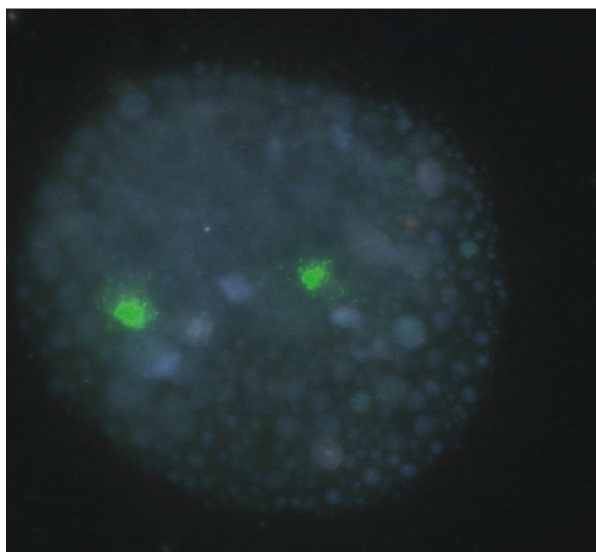
A. FISH se sondami na chromosomy 13 (červená), 16 (aqua), 18 (modrá), 21 (zelená) a 22 (žlutá). Nález trisomie 18 s periferní lokalizací signálů pro chromosom 18 (hodnoty CRD: 0.82, 0.86, 0.84).

B. B)FISH se sondami na chromosomy X (zelená) and Y (červená). Oba signály chromosomů X jsou v relativně centrální lokalizaci (hodnoty CRD: 0.26, 0.57).

A)



B)



**6.4.2.2. Přímé srovnání polohy chromosomů v normálních a abnormálních blastomerách**

Výsledky srovnání jsou shrnuty v tabulkách (Tabulka 10, Tabulka 11).

**Tabulka 10. Přímé srovnání polohy středů signálů**

	Porovnání výskytu ve vnitřní a vnější oblasti			Porovnání výskytu v 9 soustředných prstencích		
	$\chi^2$	Počet stupňů volnosti	P	$\chi^2$	Počet stupňů volnosti	P
Porovnání poloh středů signálů všech chromosomů v normálních a v abnormálních buňkách	0,08	1	0,7825	7,94	8	0,4393
Porovnání poloh středů signálů chromosomu 13 v normálních a v abnormálních buňkách	0,21	1	0,6435	10,06	8	0,2611
Porovnání poloh středů signálů chromosomu 16 v normálních a v abnormálních buňkách	0,45	1	0,5035	9,46	8	0,3052
Porovnání poloh středů signálů chromosomu 18 v normálních a v abnormálních buňkách	7,24	1	0,0071	9,45	8	0,3054
Porovnání poloh středů signálů chromosomu 21 v normálních a v abnormálních buňkách	0,06	1	0,8050	5,05	8	0,7526
Porovnání poloh středů signálů chromosomu 22 v normálních a v abnormálních buňkách	0,13	1	0,7152	16,10	8	0,0410
Porovnání poloh středů signálů chromosomu X v normálních a v abnormálních buňkách	3,06	1	0,0804	9,02	8	0,3406
Porovnání poloh středů signálů chromosomu Y v normálních a v abnormálních buňkách	0,94	1	0,3335	10,85	8	0,2101
Porovnání poloh středů signálů chromosomu X v buňkách s jedním chromosomem X a v buňkách s více než jedním chromosomem X	0,44	1	0,5074	4,11	8	0,8474

P – statistická významnost rozdílu

**Tabulka 11. Přímé srovnání polohy periferních okrajů signálů**

	Porovnání výskytu ve vnitřní a vnější oblasti			Porovnání výskytu v 9 soustředných prstencích		
	$\chi^2$	Počet stupňů volnosti	P	$\chi^2$	Počet stupňů volnosti	P
Porovnání poloh periferních okrajů signálů všech chromosomů v normálních a v abnormálních buňkách	0,26	1	0,6098	11,79	8	0,1607
Porovnání poloh periferních okrajů signálů chromosomu 13 v normálních a v abnormálních buňkách	0,19	1	0,6593	9,96	8	0,2679
Porovnání poloh periferních okrajů signálů chromosomu 16 v normálních a v abnormálních buňkách	1,05	1	0,3058	8,99	8	0,3434
Porovnání poloh periferních okrajů signálů chromosomu 18 v normálních a v abnormálních buňkách	5,32	1	0,0211	19,63	8	0,0118
Porovnání poloh periferních okrajů signálů chromosomu 21 v normálních a v abnormálních buňkách	0,00	1	0,9613	3,85	8	0,8704
Porovnání poloh periferních okrajů signálů chromosomu 22 v normálních a v abnormálních buňkách	0,44	1	0,5064	3,89	8	0,8668
Porovnání poloh periferních okrajů signálů chromosomu X v normálních a v abnormálních buňkách	0,77	1	0,3792	9,25	8	0,3219
Porovnání poloh periferních okrajů signálů chromosomu Y v normálních a v abnormálních buňkách	0,79	1	0,3737	4,06	8	0,8518
Porovnání poloh periferních okrajů signálů chromosomu X v buňkách s jedním chromosomem X a v buňkách s více než jedním chromosomem X	0,06	1	0,7993	2,56	8	0,9590

Porovnání rozložení hodnot relativní vzdálenosti středu signálu od středu jádra (RDc) ve vnitřní ( $RDc < 0,75$ ) a vnější ( $RDc \geq 0,75$ ) oblasti neukázalo statisticky významný rozdíl mezi lokalizací signálů v normálních a aneuploidních buňkách, pokud jsou signály všech chromosomů sloučeny dohromady ( $P=0,78$ ). Ovšem pokud jsou signály pro jednotlivé chromosomy hodnoceny zvlášť, je rozdíl v lokalizaci chromosomu 18 v normálních a v abnormálních blastomerách statisticky významný ( $P=0,0071$ ). Toto platí pouze pro chromosom 18 a nikoliv pro ostatní chromosomy. Rozdíl v lokalizaci chromosomu X v blastomerách s jednou kopií chromosomu X a blastomerách s více kopiemi chromosomu X také není významný ( $P=0,8$ ).

Ani porovnání rozložení hodnot relativní vzdálenosti středu signálu od středu jádra (RDc) v 9 koncentrických prstencích neodhalilo významný rozdíl mezi normálními a abnormálními



## Chromosomální vady v embryích

blastomerami, jsou-li všechny chromosomy sloučeny dohromady ( $P=0,44$ ). Rozdíl v rozložení středů signálů chromosomu 18 v 9 koncentrických kruzích také nedosahuje statistické významnosti ( $P=0,31$ ), ovšem rozdíl v rozložení středů signálů chromosomu 22 je významný ( $P=0,041$ ). Nebyl nalezen významný rozdíl v rozložení středů signálů chromosomu X v 9 koncentrických kruzích mezi buňkami s jedním X a s více X chromosomy ( $P=0,85$ )

Porovnání výskytu hodnot relativní vzdálenosti periferního okraje signálu od středu jádra (RDe) ve vnitřní ( $RDe < 0,75$ ) a vnější oblasti ( $RDe \geq 0,75$ ) při hodnocení všech chromosomů najednou neukázalo rozdíl mezi normálními a abnormálními blastomerami ( $P=0,61$ ). Ovšem pokud je chromosom 18 hodnocen zvlášť, je nalezen významný rozdíl ( $P=0,021$ ). To platí pouze pro tento chromosom. Mezi buňkami s jedním a více chromosomy X opět nebyl nalezen rozdíl ( $P=0,8$ ).

Při srovnání rozložení signálů v 9 koncentrických prstencích opět nebyl nalezen rozdíl v poloze periferního okraje signálu, jsou-li chromosomy hodnoceny dohromady ( $P=0,16$ ), pouze je-li zvlášť hodnocen chromosom 18 ( $P=0,012$ ). U chromosomu X nebyl opět v buňkách s více X chromosomy nalezen rozdíl oproti buňkám s jedním X ( $P=0,96$ ).

V každém z těchto srovnání bylo provedeno 9 testů statistické významnosti. Tomu by ovšem dle Bonferoniho principu měla být přizpůsobena hladina statistické významnosti na  $P < 0,0006$  ( $0,05/9$ ). Po této korekci ani jedna z nalezených statistických významností nedosahuje stanovené hladiny. Ovšem nález rozdílu v lokalizaci chromosomu 18 v 3 ze 4 provedených testů ukazuje na tendenci k různé lokalizaci těchto signálů a že se chromosom 18 od ostatních studovaných chromosomů liší (viz též porovnání s modelem náhodného rozložení - 6.4.2.3)

### **6.4.2.3. Porovnání s teoretickým modelem náhodného rozložení**

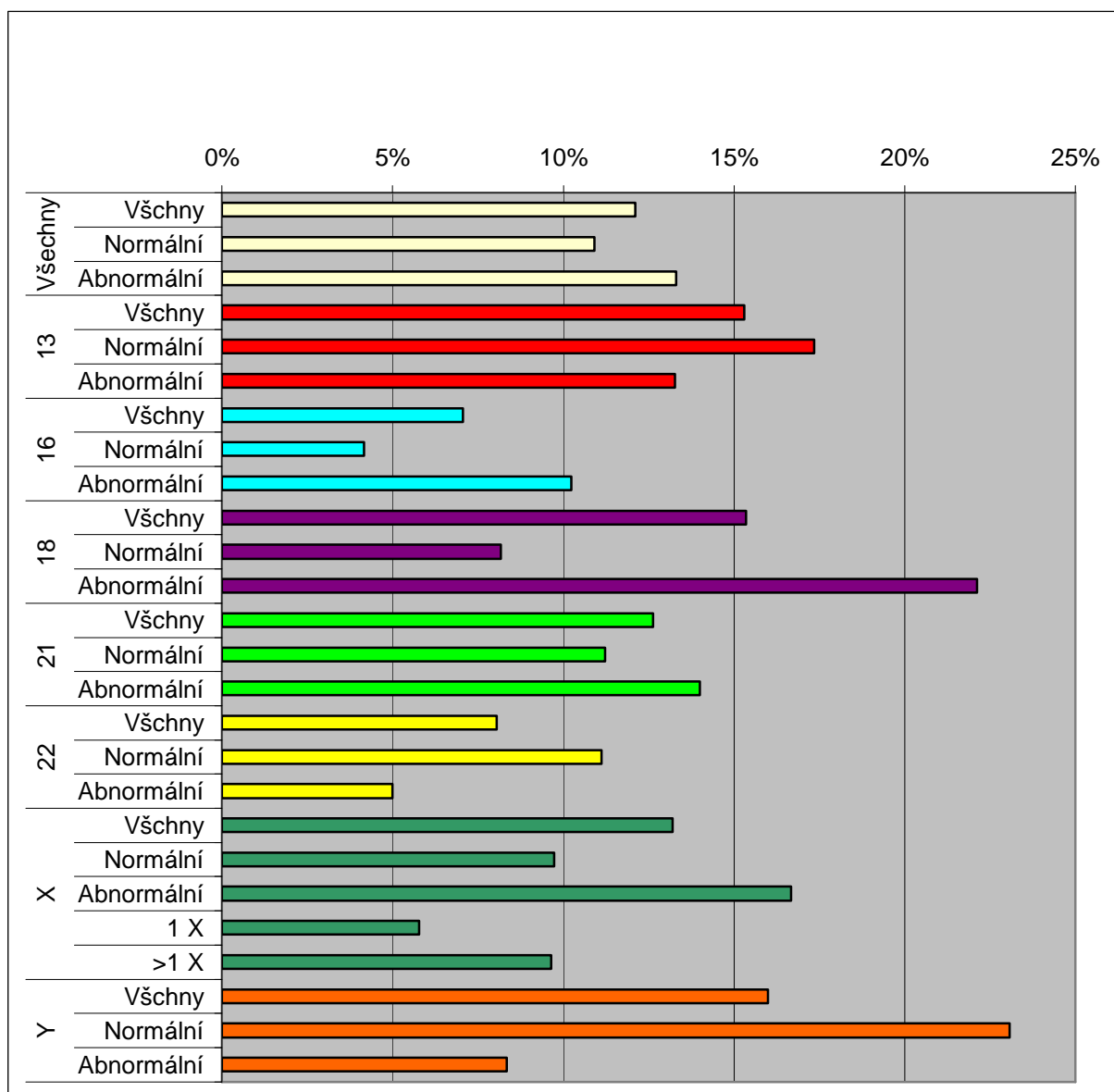
Bylo provedeno 26 statistických testů, jejichž výsledky jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 12) a grafu (Obrázek 20. Hladina statistické významnosti dle Bonferoniho principu je  $P < 0,002$ .

Chromosomální vady v embryích

**Tabulka 12. Porovnání korigované relativní vzdálenosti signálů (CRD) s modelem náhodného rozložení**

Chromosom	Blastomery	Počet	Medián	%>0,9	P
Model				<b>8,3%</b>	
Všechny chromosomy	Všechny	1173	0,632	<b>12,1%</b>	<b>0,0000</b>
	Normální	587	0,638	<b>10,9%</b>	0,0076
	Abnormální	586	0,625	<b>13,3%</b>	0,0022
13	Všechny	196	0,639	<b>15,3%</b>	0,0096
	Normální	98	0,677	<b>17,3%</b>	0,0027
	Abnormální	98	0,607	<b>13,3%</b>	0,7633
16	Všechny	184	0,581	<b>7,1%</b>	0,9646
	Normální	96	0,577	<b>4,2%</b>	0,5330
	Abnormální	88	0,589	<b>10,2%</b>	0,8707
18	Všechny	202	0,688	<b>15,3%</b>	<b>0,0000</b>
	Normální	98	0,651	<b>8,2%</b>	0,0716
	Abnormální	104	0,772	<b>22,1%</b>	<b>0,0000</b>
21	Všechny	198	0,644	<b>12,6%</b>	0,4978
	Normální	98	0,617	<b>11,2%</b>	0,8361
	Abnormální	100	0,664	<b>14,0%</b>	0,5826
22	Všechny	199	0,617	<b>8,0%</b>	0,8788
	Normální	99	0,621	<b>11,1%</b>	0,1050
	Abnormální	100	0,615	<b>5,0%</b>	0,5555
X	Všechny	144	0,603	<b>13,2%</b>	0,1203
	Normální	72	0,655	<b>9,7%</b>	0,0220
	Abnormální	72	0,579	<b>16,7%</b>	0,1387
	1 X	52	0,540	<b>5,8%</b>	0,3286
	>1 X	83	0,614	<b>9,6%</b>	0,2812
Y	Všechny	50	0,725	<b>16,0%</b>	0,0945
	Normální	26	0,737	<b>23,1%</b>	0,1387
	Abnormální	24	0,692	<b>8,3%</b>	0,4719

**Obrázek 20. Grafické znázornění procenta signálů v extrémní periférii jádra (CRD>0,9)**



Vysvětlivky (Tabulka 12 a Obrázek 20):

Chromosom – studovaný chromosom

Jádra – výsledek podle vyšetření chromosomů 13, 16, 18, 21, 22, X a Y

Počet – počet signálů v dané skupině

Medián - medián korigované relativní vzdálenosti signálů (CRD)

%>0,9 – procento signálů v extrémní periférii jádra (CRD>0.9)

P – statistická významnost rozdílu v rozložení ve srovnání s modelem náhodného rozložení

Model – procento signálů v extrémní periférii jádra dle modelu náhodného rozložení signálů v kulovém jádře

Všechny – signály z normálních a abnormálních blastomer dohromady

Normální – signály z normálních blastomer

Abnormální - signály z abnormálních blastomer

1 X - chromosom X v blastomerách s jedním chromosome X (normálních i abnormálních)

>1 X - chromosom X v blastomerách s více než jedním chromosomem X (normálních i abnormálních)

## Chromosomální vady v embryích

Rozložení hodnot korigované relativní vzdálenosti signálu (CRD) pro všechny chromosomy se signifikantně liší od matematického modelu náhodného rozložení signálů v kulovém jádře ( $P=0,00002$ ). Z toho vyplývá, že signály nejsou v jádře rozmístěny náhodně. Větší procento signálů (12,1%) než by odpovídalo modelu (8,3%) se nachází ve vnějším prstenci ( $CRD>0,9$ ) plochy jádra.

Porovnání rozložení signálů jednotlivých chromosomů s modelem ukazuje, že pouze chromosom 18 je rozmístěn významně odlišně ( $P=0,00005$ ), přičemž ve vnějším prstenci je nacházeno dokonce 15,3% signálů. Odlišnosti v rozložení ostatních signálů nedosahují hladiny významnosti.

Jsou-li signály rozděleny podle chromosomů a podle toho, zda jsou z chromosomálně normální nebo abnormální blastomery, pak pouze signály chromosomu 18 v abnormálních blastomerách mají významně nenáhodné rozložení ( $P=0,00005$ ), přičemž jich 22,1% procenta je v nejperifernějším prstenci. Nejvyšší podíl periferních signálů byl nalezen pro chromosom Y v normálních blastomerách (23,1%), ale vzhledem k nízkému počtu těchto signálů nebyla dosažena hladina statistické významnosti ( $P=0,14$ ).

Lokalizace signálů chromosomu X nebyla významně odlišná od modelu náhodného rozložení jak v blastomerách s jedním X, tak v blastomerách s více chromosomy X.

### 6.4.3. PNA-FISH

Fluorescenční in situ hybridizace s PNA sondami byla provedena na 23 blastomerách z 10 embryí. Výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 13). Příklady vyšetřených blastomer jsou uvedeny v obrázku (Obrázek 21)

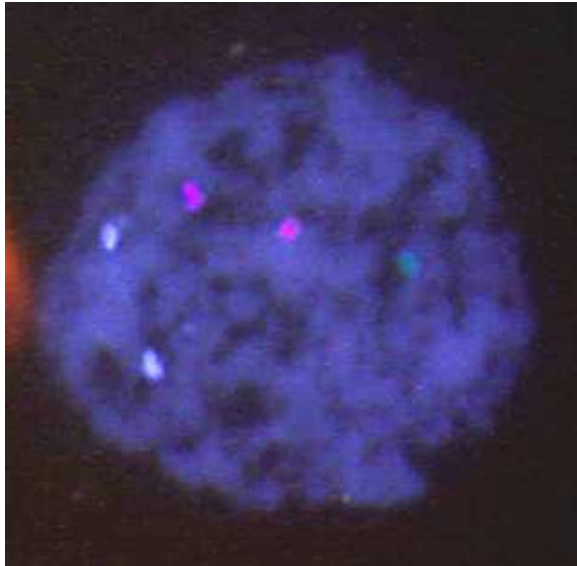
**Tabulka 13. Výsledky PNA-FISH na blastomerách**

Embryo	Věk ženy	Počet analyzovaných blastomer	Vyšetřené chromosomy							Výsledky	Komentář
			1	4	9	16	18	X	Y		
E1	28	2			?	?				Abnormální [9,9,9,16,16]	Trisomie 9
E2	31	3	?		?	?				Abnormální [1,1,X,Y][1,1,X][1,1,Y]	Mosaika XY/X0/Y0
E3	39	2	?	?		?				Abnormální [1,1,4,4,16,16,16]	Trisomie 16
E4	26	2	?					?	?	Normální [1,1,X,Y]	
E5	31	1	?					?	?	Abnormální [1,1,18,18,18]	Trisomie 18 a nulisomie X
E6	34	3	?					?	?	Abnormální [1,1,9,9,16,16][1,1,9,9,9,16,16][1,1,9,16,16]	Mosaika normální / trisomie 9 / monosomie 9
E7	30	2	?		?		?			Normální [1,1,9,9,18,18]	
E8	32	3	?		?	?				Abnormální [1,1,9,9,16]	Monosomie 16
E9	31	2	?		?		?			Abnormální [1,9,9,18,18][1,1,1,9,9,18,18]	Chaotická mosaika monosomie 1 / trisomie 1 / trisomie 18
E10	27	3	?			?		?		Normální [1,1,16,16,X,X]	

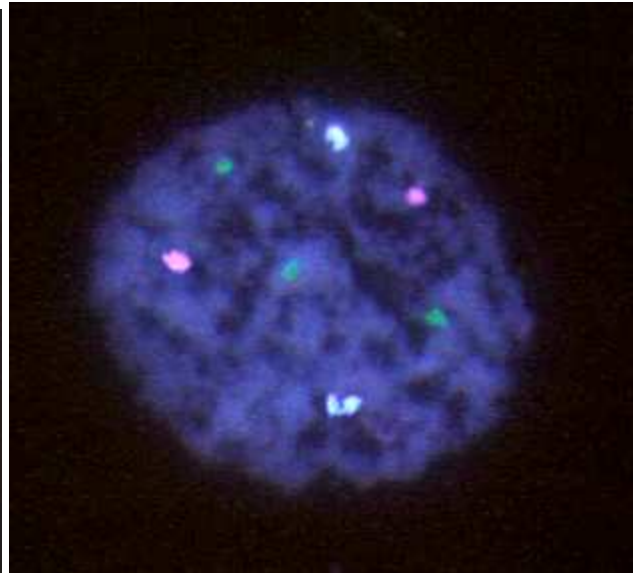
**Obrázek 21. Příklady blastomer vyšetřených PNA-FISH. Použity byly sondy na chromosomy 1 (modrá), 9 (zelená) a 16 (červená). Obě blastomery pochází z jednoho embrya.**

- A. A) Nález monosomie 9
- B. B) Nález trisomie 9

A)



B)



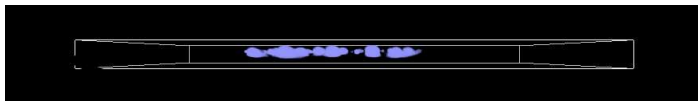
#### 6.4.4. 3D-FISH

Příklady výsledků dosažených metodami 3D-FISH na buňkách preimplantačních embryí jsou na obrázcích (Obrázek 22, Obrázek 23).

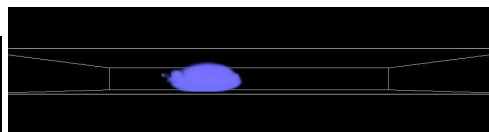
**Obrázek 22. Postranní pohled na jádra blastomer obarvená DAPI**

- A. Výrazně zploštělé a dilatované jádro
- B. Pouze částečně zploštělé jádro

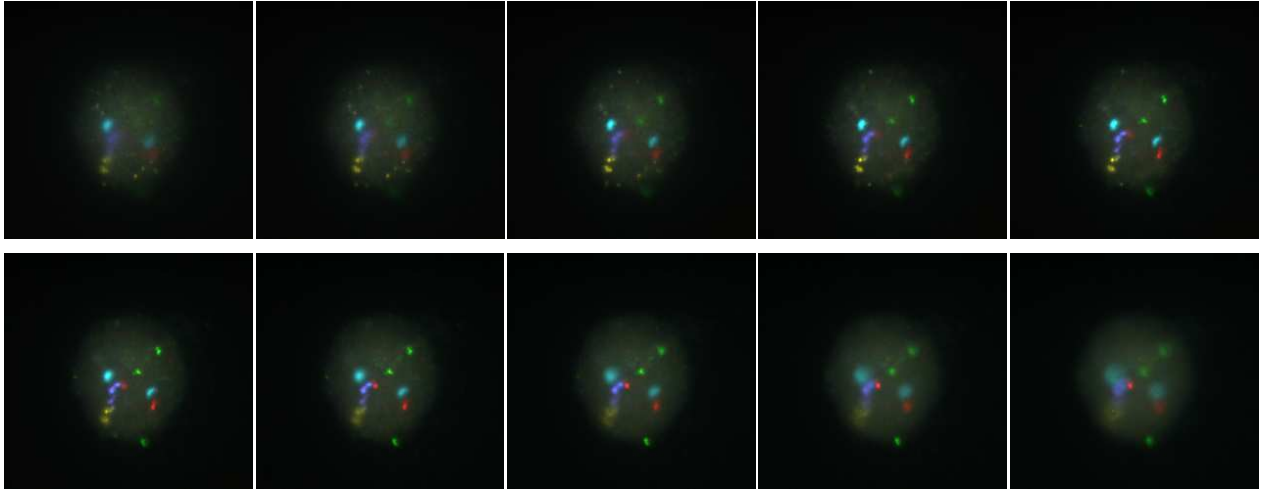
A)



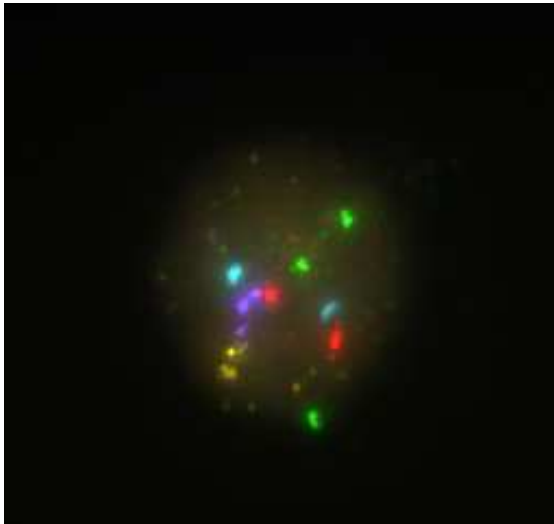
B)



**Obrázek 23. Série optických řezů (Z-stack) blastomerou po FISH se sondami na chromosomy 13, 16, 18, 21 a 22**



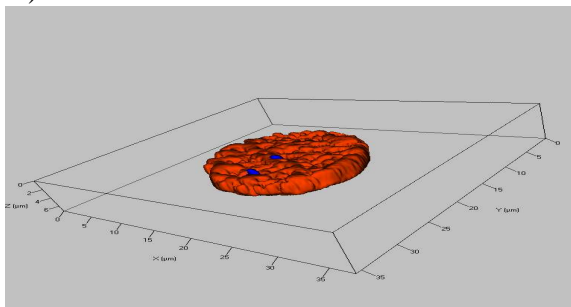
**Obrázek 24. Obraz s rozšířenou hloubkou ostrosti vygenerovaný ze série optických řezů na předchozím obrázku (Obrázek 23)**



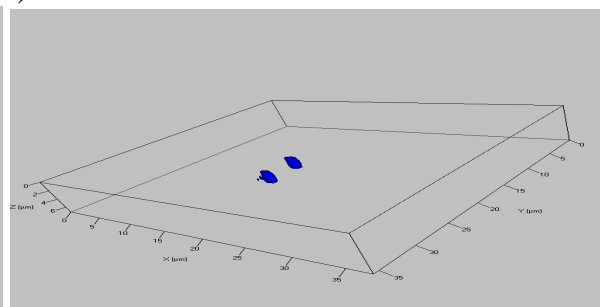
**Obrázek 25. Povrchová 3D projekce jádra blastomery, FISH se sondami na chromosom 18 (modré), DNA obarvena propidium jodidem (červená)**

- A. Zobrazeny oba barevné kanály
- B. Zobrazen pouze modrý kanál ukazující polohu a tvar FISH signálů

A)



B)



## 6.5. Diskuse

### 6.5.1. Preimplantační screening aneuploidií

Naše výsledky ukazují, že u rizikových párů je vysoký výskyt aneuploidií v preimplantačních embryích. Z vyšetřených blastomer bylo 59% abnormálních. Mezi abnormálními nálezy převažují kombinované abnormality se současnou přítomností dvou či více vad (dvojitá trisomie, dvojitá monosomie, kombinace trisomie a monosomie, komplexní aneuploidie, vady počtu chromosomových sad) v jedné blastomeře (58,3%) nad vadami jednoduchými (trisomie nebo monosomie jednoho chromosomu) (41,7%).

Vysoký výskyt aneuploidií v preimplantačních embryích je na jedné straně argumentem pro zavedení screeningu aneuploidií jakožto standardní součásti postupů asistované reprodukce za účelem selekce nejvhodnějších embryí pro přenos do dělohy. Zároveň je ale známo, že značná část aneuploidií se v embryích vyskytuje v mozaikové formě. Z toho vyplývá, že nález v odebrané blastomeře nemusí odpovídat situaci ve zbytku embrya. Jak ale ukazují i naše výsledky, většina blastomer s aneuploidií nese i aneuploidii dalšího chromosomu. Přitom jsme vyšetřovali pouze chromosomy 13, 16, 18, 21, 22, X a Y. Pokud se do praxe zavedou metody založené na CGH, bude možné detekovat všechny aneuploidie. Dosavadní výsledky ukazují, že tím klesá počet embryí s normálním nálezem. Zároveň stoupá počet embryí s abnormalitou více než jednoho chromosomu. I potom ale zbývají embrya bez chromosomálních vad (Wells et al., 2000).

### 6.5.2. Studium polohy chromosomů v jádrech preimplantačních embryí

Výsledky ukazují, že signály fluorescenční in situ hybridizace (FISH) nejsou v jádrech blastomer z lidských embryí rozmístěny náhodně. Toto rozmístění se u jednotlivých chromosomů liší. Chromosom 18 se výrazně liší od ostatních studovaných chromosomů. Jeho lokalizace se výrazně mění v chromosomálně abnormálních blastomerách, kde je posunut k periférii. U ostatních chromosomů jsme takovýto rozdíl nenašli.

Náš hlavní závěr, že lokalizace chromosomů je v abnormálních embryích změněna, jev souhlase se závěry studie McKenzie et al. (McKenzie et al., 2004). Že jsme tento rozdíl nenašli u všech chromosomů, může být způsobeno tím, že jsme použili jinou metodu určení polohy chromosomů založenou na přesném měření souřadnic středů a periferních okrajů signálů. Použili jsme také jak přímá porovnání naměřených hodnot, tak srovnání s teoretickým modelem náhodného rozmístění signálů. Oběma těmito přístupy jsme dospěli ke stejnému zjištění, že poloha signálů se mezi normálními a abnormálními blastomerami liší pouze v případě chromosomu 18. Rozdíly nalezené u ostatních chromosomů by statistické významnosti mohly dosáhnout, pokud by se potvrdily na větším počtu měření. Ovšem zdaleka se u všech chromosomů nejednalo o posun k periférii. V případě chromosomů 13 a Y jsme totiž našli větší podíl periferních signálů v normálních blastomerách než v abnormálních, což je v přímém rozporu se studií McKenzie et al.

Nalezené rozdíly mezi studovanými chromosomy mohou souviset s tím, že pro jednotlivé chromosomy byly použity různé typy sond. Pro studium topologie chromosomů jsou nejvhodnější celochromosomové malovací sondy, které označují polohu celého chromosomu. Tyto sondy ale nejsou vhodné pro klinické použití v preimplantační diagnostice, neboť výsledkem hybridizace jsou velké signály u kterých častěji nastávají překryvy a rozštěpení. Místo nich jsme použili komerčně dostupnou sadu tvořenou centromerickými sondami na chromosomy 16, 18, X a Y a sondami specifickými pro lokusy na dlouhých raménkách chromosomů 13, 21 a 22 (viz 3.2.1.1 a 6.3.3).

Dalším omezením studie je, že blastomery jsme rozdělily na normální abnormální podle pouze výsledků FISH se sondami na chromosomy 13, 16, 18, 21, 22, X a Y. Některé z blastomer ve skupině normálních při tom mohou nést abnormalitu některého z ostatních nevyšetřených chromosomů, což může celkové hodnocení ovlivnit a oslabit jeho závěry.

Posun chromosomu 18 do periferie může být přímým fyziologickým projevem změn v genové dávce, které spouští mechanismy tlumení transkripce v oblastech dotýkajících se periferie jádra. Vzhledem k tomu, že jde o období může se také jednat o projev narušení mechanismů zodpovědných za funkční lokalizaci chromosomů v důsledku nerovnováhy genové dávky. Další možností je, že jde o iniciální fázi fragmentace a buněčné smrti. K tomu je nutno připomenout, že u 53 % (108/204) vyšetřených blastomer nebylo vůbec možné lokalizaci chromosomů posoudit z důvodu fragmentace jádra nebo jeho extrémní nepravidelnosti. Součástí dalších studií by mohlo být také hodnocení přítomnosti signálů jednotlivých chromosomů v těchto fragmentech nebo výběžcích.

Dalším možným vysvětlením nálezů je, že aneuploidie je sekundárním důsledkem změněné lokalizace chromosomů v embryích s poruchou vývoje. Chromosomy v určité lokalizaci, např. na periférii, mohou být náchylnější k non-disjunkci nebo opoždění v anafázi z důvodu nesprávného přichycení mikrotubulů ke kinetochoru.

Vady mitotického aparátu mohou být zároveň zodpovědné za změny v lokalizaci chromosomů, protože lokalizace chromosomů je přinejmenším částečně závislá na jejich pozici po dokončení předchozí mitózy. Centrosom zygoty vzniká z centrioly, kterou do oocyty vnáší spermie (Palermo et al., 1994). V embryích počatých spermiemi mužů s nejzávažnějšími poruchami fertility u nichž se používá extrakce spermií z varlete (TESE) je zvýšený výskyt aneuploidií (Silber et al., 2003). Tyto aneuploidie mohou být přímým důsledkem aneuploidií ve spermiích, ale také mohou být následkem poruch mitotického dělicího vřeténka zygoty, které je organizováno právě centrosomem původem z centrioly spermie. Defekty centrosomu mohou být jednou z důležitých příčin post-meiotického vzniku aneuploidií a mosaicismu, jenž je často v preimplantačních embryích nalézán (Silber et al., 2003).

Inaktivní chromosom X v myších preimplantačních embryích samičího pohlaví nenabývá podoby heterochromatinového Barrova tělíška, která je typická pro inaktivní X v pozdějších fázích (Huynh et al., 2003). Z toho vyplývá, že tato přechodná inaktivace chromosomu X není ekvivalentem pozdější stabilní inaktivace. Periferní lokalizace inaktivovaného X může být typickým projevem pouze stabilní inaktivace a nikoliv této přechodné inaktivace.

Pokud bude souvislost mezi aneuploidií a časnou periferní lokalizací chromosomů potvrzena dalšími studiemi, mohla by tento poznatek významně přispět k lepšímu pochopení patogeneze časných poruch vývoje a interakcí mezi chromosomy při těchto dějích. Mohl by vést i k novým metodám pro zlepšení výběru nejvhodnějších embryí k transferu do dělohy. V dalších studiích je třeba analyzovat větší počet blastomer rozříděných podle typu aneuploidie, indikace preimplantační diagnostiky, věku rodičů, metod a médií použitých při fertilizaci a kultivaci i podle toho, jaký byl výsledek implantace embrya. Pro přesnější hodnocení polohy chromosomů by bylo optimální použít metody 3D-FISH, které ale zatím nejsou pro klinické použití v rámci preimplantační diagnostiky vhodné.

### 6.5.3. PNA-FISH

Ověřili jsme, že fluorescenční in situ hybridizace s PNA sondami je metodou, kterou lze použít pro preimplantační vyšetření chromosomů v embryích. Jelikož PNA sondy nevyžadují tak vysokou teplotu denaturace jako DNA sondy, skýtají naději, že by je bylo možno použít k více cyklům vyšetření na jednom preparátu. S DNA sondami je možné na jednom



preparátui vyšetření provést maximálně 2-3-krát, potom již kvalita materiálu klesá. Jednou z příčin může být právě opakované působení vysoké denaturační teploty. Závažným nedostatkem PNA sond ovšem je, že neumožňují rozlišit chromosomy 13 a 21, které jsou pro preimplantační diagnostiku zásadně důležité. Proto by pro praktické použití bylo nutné PNA sondy kombinovat s klasickými lokusově specifickými DNA sondami a to buďto v jedné reakci, nebo sekvenčně. Druhým praktickým problémem je komerční nedostupnost ověřených PNA sond připravených k použití, což je pro rychlou a spolehlivou preimplantační diagnostiku také velice důležité.

### 6.5.4. 3D-FISH

V preimplantační diagnostice, při níž jsou k dispozici pouze jedna nebo dvě buňky, 3D-FISH umožňuje

Přesnou dokumentaci preparátu bližší skutečnosti než jeden snímek v určité rovině ostrosti

Přesnější následnou analýzu digitálního obrazu

Uchování fluorescence. Preparát není nutné dlouhou dobu osvětlovat UV světlem během prohlížení, při čemž dochází ke slábnutí fluorescence.

3D-FISH je také možné využít pro výuku a externí kontrolu kvality laboratoří, protože umožňuje simulovat mikroskopickou analýzu preparátu po fluorescenční in situ hybridizaci lépe než standardní 2-rozměrné obrazy.

3D-FISH má i své nevýhody a není standardní metodou, protože:

- snímání preparátu kamerou do počítače ve více vrstvách trvá déle než v jedné rovině ostrosti. Při tom hrozí slábnutí fluorescence nejcitlivějších fluorochromů. Ale jakmile jsou snímky jednou nasnímány, další osvětlování preparátu UV světlem již není nutné, takže ve výsledku by měla fluorescence být zachována více.
- prodloužení celého diagnostického postupu je v preimplantační diagnostice nevýhodné, protože je velice časově limitována.
- pro dosažení nejlepších výsledků je nutný motorizovaný mikroskop řízený počítačem (pohyb stolku v ose z, výměna fluorescenčních filtrů, ovládání závěrky UV světla) a speciální software.

## 6.6. Závěry

Výsledky vyšetření embryí byly zveřejněny v publikacích 1.1, 1.2, 1.3, 3.1, 5.1, 6.1, 6.5, 7.1, 7.2 a 10.3 - viz Příloha 2.

### 6.6.1. Preimplantační screening aneuploidíí

Úspěšně jsme zavedli do klinické praxe na našem pracovišti preimplantační screening aneuploidíí a detekci pohlaví. Dosažené výsledky vyšetření embryí pomocí biopsie blastomer a vyšetření fluorescenční in situ hybridizací odpovídají výsledkům ve světové literatuře a potvrzují vysoký výskyt aneuploidíí v lidských preimplantačních embryích.

### 6.6.2. PNA-FISH

Ověřili jsme, že fluorescenční in situ hybridizace s PNA sondami je jednou z možných variant vyšetření aneuploidie ve blastomerách.

### **6.6.3. Studium polohy chromosomů v jádrech preimplantačních embryí**

Chromosomálně normální a abnormální blastomery se liší lokalizací signálů chromosomu 18. V abnormálních blastomerách je posunut k periférii. Lokalizace chromosomů 13, 16, 21, 22, X a Y se významně neliší od modelu náhodného rozložení a to jak v normálních tak v abnormálních blastomerách.

Nebyl nalezen rozdíl v lokalizaci signálů chromosomu X v blastomerách s jedním a s více chromosomy X. Z toho vyplývá, že v 3-4 dny starých lidských embryích s více než jedním chromosomem X nebyla nalezena inaktivace chromosomu X doprovázená jeho periferní lokalizací.

## 7. Databáze klinických a výzkumných údajů

### 7.1. Cíle

Cílem bylo vypracování a průběžné zdokonalování počítačové databáze výzkumných a klinických údajů pro zlepšení elektronické dokumentace v rámci Centra reprodukční genetiky a pro sběr dat pro výzkumné projekty.

### 7.2. Materiál a metody

#### 7.2.1. Verze 1

První verze počítačová databáze výzkumných a klinických údajů Centra reprodukční genetiky byla vytvořena v softwaru Access (součást Microsoft Office 97).

#### 7.2.2. Verze 2

Pro druhou verzi byla vytvořena samostatná klientská aplikace pomocí softwaru Delphi 6 professional (Borland, Scotts Valley, CA, USA) přistupující k databázi Access pomocí Borland Database Engine (BDE) propojení.

#### 7.2.3. Verze 3

Pro třetí verzi byla data přenesena na databázový server Interbase 6 (Borland), klientská aplikace byla upravena použitím nativních komponent InterbaseExpress (IBX - Borland) pro Interbase 6.

#### 7.2.4. Verze 4

Poslední verze využívá databázový server Firebird SQL 1.0 (IBPhoenix, Manchester, MA, USA) umístěný na samostatném serverovém počítači a klientskou aplikaci vytvořenou pomocí Delphi 6 Professional. Pro připojení k databázovému serveru jsou použity komponenty IBX. Pro tiskové sestavy jsou použity komponenty Fastreport 3 (Fast Reports, Inc., Rusko).

### 7.3. Výsledky

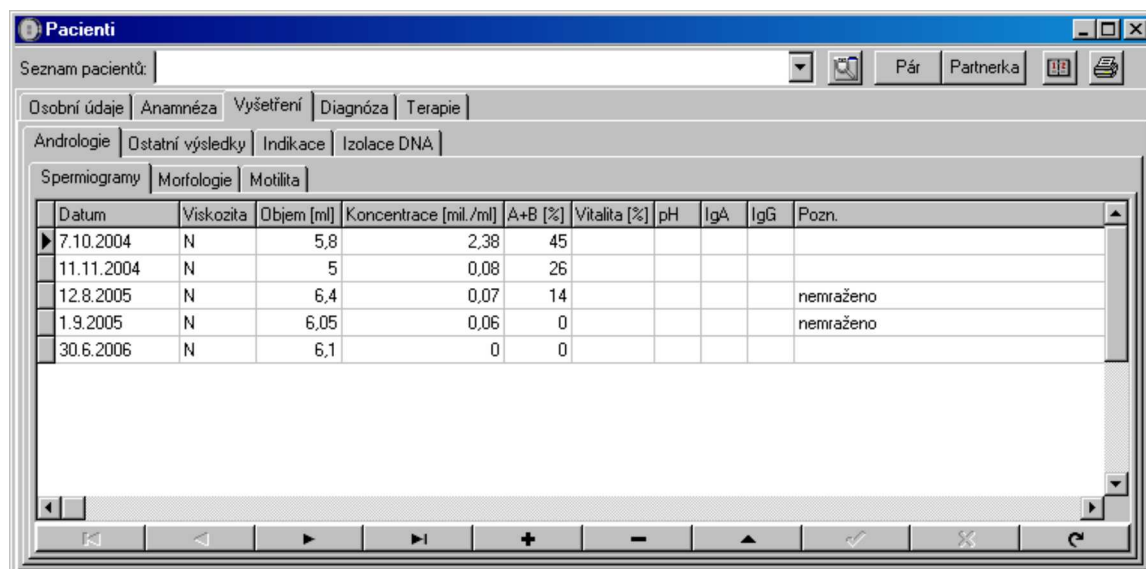
Databáze je využívána pracovníky Centra reprodukční genetiky a reprodukční medicíny Ústavu biologie a lékařské genetiky a Gynekologicko-porodnické kliniky Fakultní nemocnice v Motole. Tvoří ji 75 vzájemně propojených tabulek. Ke dni 10.6.2006 obsahuje záznamy o 5175 pacientech, z toho 3125 mužích a 2050 ženách. Záznamů o vyšetření spermogramu je 3892, záznamů o cyklech terapie metodami asistované reprodukce (mimotělní oplodnění nebo intrauterinní inseminace) je 4738. V dalších tabulkách jsou údaje o ostatních vyšetřeních prováděných na našem pracovišti i jinde, záznamy o výsledcích terapie, záznamy o plánovaných vyšetřeních a zákrocích ale i záznamy o používaných chemikáliích a vybavení. V databázi jsou také předpřipravené dotazy sloužící k pravidelnému získávání údajů o výsledcích práce Centra reprodukční genetiky a medicíny

Pro přístup k databázi slouží klientská aplikace. Ukázky uživatelského rozhraní jsou na obrázcích (Obrázek 26, Obrázek 27, Obrázek 28, Obrázek 29, Obrázek 30). Aplikace slouží také k tisku výsledkových sestav.

Obrázek 26. Startovací formulář



Obrázek 27. Formulář s údaji o pacientech, stránka s výsledky spermogramů



**Obrázek 28. Formulář s údaji o pacientech, stránka se záznamy o cyklech asistované reprodukce**

**Pacienti**

Seznam pacientů: [ ] Pár Partner [ ] [ ]

Osobní údaje Anamnéza Vyšetření Diagnóza Terapie

Cykly Kryosklad - embryo

Č.	Poř. IVF cel.	Hrazeno ZP	Úhrada	Zaplaceno	Typ cyklu	Typ stimulace	Datum OPU	Datum trans./IUI	Stav cyklu
1		A			IUI			31.8.2005	Bez gravidity
2		A			IUI			10.10.2005	Bez gravidity
3		A			IUI			1.12.2005	Bez gravidity
4	2	A	2500		IVF/ICSI		27.4.2006	1.5.2006	Gravidita

Stimulace OPU Fertilizace Embrya PGD Kultivace + Transfer Mražení Gravidita Porod Poznámky

Čas čištění: 14:00:00 Počet oocytů: 6 Počet oplozovaných ooc.: 6  
 Čas kontroly fertilizace: 8:00:00 Počet ZPN: 4 Počet IVF: Počet ICSI:  
 Medium cleavage: SICM Medium prod. k.: SIBM  
 Počet zmražených: 0 Slánek: Rozmražených: Stadium: Přijatých od dárců:  
 Datum transferu: 01.05.2006 Počet transf.: 2 Asist. hatching:  
 Embryolog: MUDr.Zámečnicková Gynekolog: MUDr.Hrehorčák  
 Průběh transferu: UZ Katetr: Luteální podpora:

**Obrázek 29. Formulář se záznamy o vyšetření spermií metodou FISH**

FISH

Seznam vzorků:  Seznam skel: **F783**

Vzorek:

Pacient:

Indikující l.:  Diagnóza:  NacístDg

Materiál: ejakulát

Místo odb.: FN Motol, ÚBLG, Centrum reprodukční genetiky Datum odběru: 17.08.2005

Označení:  Vygenerovat

Sklicka Souhrnná zpráva

Kód skla	Datum skla	Datum FISH	Závěr	Poznámky
F783	3.10.2005	3.10.2005		
F784	3.10.2005	3.10.2005		
F785	3.10.2005	3.10.2005		
F810	22.11.2005	22.11.2005		
F816	8.12.2005	8.12.2005		

Sondy Signály Anomaly Counter Počítadlo

Chromozom	Band	Lokus	Fluorochrom
X	Xcen	DXZ1	SpectrumGreen
Y	Ycen	DYZ3	SpectrumOrange
18	18cen	D18Z1	SpectrumAqua

Obrázek 30. Formulář se záznamy o preimplantačních vyšetřeních embryí

PGD

Cykly s PGD: [ ]

Sklička

Kód sklička [ ]

Sondy

Sonda

Multivision PB

Xcen+Ycen

Embrya

Číslo	Výsledek PGD	Doporučení	Poznámky
1	Bez výsledku		(Memo)
2	Abnormální	Není vhodné k transferu.	(Memo)
3	Normální - mužské pohlaví	Není vhodné k transferu.	(Memo)

Bunky

PB1 PB2 Blastomera Jina Reanaliza Odstranit

Typ	Označení	13	16	18	21	22	X	Y	Nález	Kategorie	Poznámky
Blastomera	2	2	3	2	2	2	2	0	Abnormální	Trisomie	Nelze vyloučit trisomii 22.

Obrázky

Embryo Embryo Blastomera

Blastomera Blastomera Blastomera

Vložit Nahrat

## 7.4. Diskuse

Počítačové uložení a zpracování klinických a výzkumných údajů je v dnešní době zcela nezbytné. Do budoucna bude nutné vyřešit, zda je možné nadále používat tento databázový systém nebo přejít na komerční řešení se zaručenou údržbou a vývojem dle našich přání a potřeb. Bude také důležité aby databáze byla propojena s nemocničním informačním systémem, což znamená značná technická omezení. Podobně bude nutné vyřešit export dat pro připravovaný celostátní registr asistované reprodukce.

Postupným vývojem databázového systému bylo dosaženo oddělení databázového serveru do klientské aplikace. Databázový server zajišťuje mnohem lépe současné požadavky více uživatelů, než jednoduchá souborová databáze používaná v prvních verzích. Nevýhodou tohoto řešení je, že vyžaduje použití specializovaných softwarových nástrojů. Pro sestavování databázových dotazů je nutná znalost jazyka SQL (Structured Query Language), ovšem použitím předdefinovaných dotazů s parametry lze potřebné dotazy pro získávání dat z databáze připravit tak, že je mohou používat všichni uživatelé dle svých potřeb bez znalosti SQL.

## 7.5. Závěry

Vytvořený databázový systém splňuje požadavky všech pracovníků Centra reprodukční medicíny a genetiky a nebylo by bez něj možné plnit jednotlivé úkoly této disertační práce.



## 8. Seznam použité literatury

1. Amor DJ, Neo WT, Waters E, Heussler H, Pertile M, Halliday J: Health and developmental outcome of children following prenatal diagnosis of confined placental mosaicism. *Prenat Diagn* 2006, 26(5):443-448.
2. Andrusis ED, Neiman AM, Zappulla DC, Sternglanz R: Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature* 1998, 394(6693):592-595.
3. Angell R: First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes. *Am.J.Hum.Genet.* 1997, 61(1):23-32.
4. Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J: Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet.Genome Res.* 2005, 111(3-4):281-290.
5. Bielanska M, Tan SL, Ao A: Fluorescence in-situ hybridization of sex chromosomes in spermatozoa and spare preimplantation embryos of a Klinefelter 46,XY/47,XXY male. *Hum Reprod* 2000, 15(2):440-444.
6. Bielanska M, Tan SL, Ao A: Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod* 2002, 17(2):413-419.
7. Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, Fauth C, Muller S, Eils R, Cremer C, Speicher MR *et al*: Three-Dimensional Maps of All Chromosomes in Human Male Fibroblast Nuclei and Prometaphase Rosettes. *PLoS.Biol.* 2005, 3(5):e157.
8. Boyle S, Gilchrist S, Bridger JM, Mahy NL, Ellis JA, Bickmore WA: The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum.Mol.Genet.* 2001, 10(3):211-219.
9. Bridger JM, Boyle S, Kill IR, Bickmore WA: Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Curr.Biol.* 2000, 10(3):149-152.
10. Buwe A, Guttenbach M, Schmid M: Effect of paternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet.Genome Res.* 2005, 111(3-4):213-228.
11. Clemson CM, McNeil JA, Willard HF, Lawrence JB: XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J.Cell Biol.* 1996, 132(3):259-275.
12. Coonen E, Dumoulin JC, Ramaekers FC, Hopman AH: Optimal preparation of preimplantation embryo interphase nuclei for analysis by fluorescence in-situ hybridization. *Hum.Reprod.* 1994, 9(3):533-537.
13. Cremer M, Kupper K, Wagler B, Wizelman L, von Hase J, Weiland Y, Kreja L, Diebold J, Speicher MR, Cremer T: Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J.Cell Biol.* 2003, 162(5):809-820.
14. Cremer M, von Hase J, Volm T, Brero A, Kreth G, Walter J, Fischer C, Solovei I, Cremer C, Cremer T: Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome.Res.* 2001a, 9(7):541-567.
15. Cremer T, Cremer C: Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat.Rev.Genet.* 2001b, 2(4):292-301.
16. Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA: Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J.Cell Biol.* 1999, 145(6):1119-1131.

## Seznam použité literatury

17. Cupisti S, Conn CM, Fragouli E, Whalley K, Mills JA, Faed MJ, Delhanty JD: Sequential FISH analysis of oocytes and polar bodies reveals aneuploidy mechanisms. *Prenat Diagn* 2003, 23(8):663-668.
18. Daniels R, Zuccotti M, Kinis T, Serhal P, Monk M: XIST expression in human oocytes and preimplantation embryos. *Am.J.Hum.Genet.* 1997, 61(1):33-39.
19. De Pol A, Vaccina F, Forabosco A, Cavazzuti E, Marzona L: Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. *Hum Reprod* 1997, 12(10):2235-2241.
20. Delhanty JD, Harper JC, Ao A, Handyside AH, Winston RM: Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet* 1997, 99(6):755-760.
21. Dokras A, Sargent IL, Ross C, Gardner RL, Barlow DH: Trophectoderm biopsy in human blastocysts. *Hum Reprod* 1990, 5(7):821-825.
22. Dyer KA, Canfield TK, Gartler SM: Molecular cytological differentiation of active from inactive X domains in interphase: implications for X chromosome inactivation. *Cytogenet.Cell Genet.* 1989, 50(2-3):116-120.
23. Eaker S, Pyle A, Cobb J, Handel MA: Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J.Cell Sci.* 2001, 114(Pt 16):2953-2965.
24. Estop AM, Marquez C, Munne S, Navarro J, Ciepły K, Van Kirk V, Martorell MR, Benet J, Templado C: An analysis of human sperm chromosome breakpoints. *Am J Hum Genet* 1995, 56(2):452-460.
25. Ferguson-Smith AC: X inactivation: pre- or post-fertilisation turn-off? *Curr.Biol.* 2004, 14(8):R323-R325.
26. Ferlin A, Garolla A, Foresta C: Chromosome abnormalities in sperm of individuals with constitutional sex chromosomal abnormalities. *Cytogenet Genome Res* 2005, 111(3-4):310-316.
27. Foresta C, Galeazzi C, Bettella A, Marin P, Rossato M, Garolla A, Ferlin A: Analysis of meiosis in intratesticular germ cells from subjects affected by classic Klinefelter's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84(10):3807-3810.
28. Fragouli E, Wells D, Whalley KM, Mills JA, Faed MJ, Delhanty JD: Increased susceptibility to maternal aneuploidy demonstrated by comparative genomic hybridization analysis of human MII oocytes and first polar bodies. *Cytogenet Genome Res* 2006, 114(1):30-38.
29. Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, Menchini Fabris GF, Voliani S, Ferraretti AP: Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum Reprod* 2005, 20(8):2140-2152.
30. Golubovsky MD: Postzygotic diploidization of triploids as a source of unusual cases of mosaicism, chimerism and twinning. *Hum.Reprod.* 2003, 18(2):236-242.
31. Gondos B, Westergaard L, Byskov AG: Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. *Am J Obstet Gynecol* 1986, 155(1):189-195.
32. Goto T, Wright E, Monk M: Paternal X-chromosome inactivation in human trophoblastic cells. *Mol.Hum.Reprod.* 1997, 3(1):77-80.
33. Gougeon A: Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles. *Maturitas* 1998, 30(2):137-142.
34. Guttenbach M, Koschorz B, Bernthaler U, Grimm T, Schmid M: Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei. *Am J Hum Genet* 1995, 57(5):1143-1150.

## Seznam použité literatury

35. Habermann FA, Cremer M, Walter J, Kreth G, von Hase J, Bauer K, Wienberg J, Cremer C, Cremer T, Solovei I: Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells. *Chromosome.Res.* 2001, 9(7):569-584.
36. Hall H, Hunt P, Hassold T: Meiosis and sex chromosome aneuploidy: how meiotic errors cause aneuploidy; how aneuploidy causes meiotic errors. *Curr Opin Genet Dev* 2006, 16(3):323-329.
37. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM: Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990, 344(6268):768-770.
38. Hlinka D, Dudas M, Herman M, Kalina I: Experimental attempts to extend the current preimplantation genetic diagnosis with individual karyotypization of human blastomeres. *Reprod Nutr Dev* 2001, 41(1):91-106.
39. Hunt PA, Hassold TJ: Sex matters in meiosis. *Science* 2002, 296(5576):2181-2183.
40. Huynh KD, Lee JT: Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature* 2003, 426(6968):857-862.
41. Chow JC, Brown CJ: Forming facultative heterochromatin: silencing of an X chromosome in mammalian females. *Cell Mol.Life Sci.* 2003, 60(12):2586-2603.
42. Iitsuka Y, Bock A, Nguyen DD, Samango-Sprouse CA, Simpson JL, Bischoff FZ: Evidence of skewed X-chromosome inactivation in 47,XXY and 48,XXYY Klinefelter patients. *American Journal of Medical Genetics* 2001, 98(1):25-31.
43. Kalousek DK, Dill FJ: Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions. *Science* 1983, 221(4611):665-667.
44. Kalousek DK, Howard-Peebles PN, Olson SB, Barrett IJ, Dorfmann A, Black SH, Schulman JD, Wilson RD: Confirmation of CVS mosaicism in term placentae and high frequency of intrauterine growth retardation association with confined placental mosaicism. *Prenat Diagn* 1991, 11(10):743-750.
45. Kamiguchi Y, Rosenbusch B, Sterzik K, Mikamo K: Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air drying method. *Hum Genet* 1993, 90(5):533-541.
46. Kinsey JD: X-chromosome replication in early rabbit embryos. *Genetics* 1967, 55(2):337-343.
47. Koch J, Hindkjaer J, Kolvraa S, Bolund L: Construction of a panel of chromosome-specific oligonucleotide probes (PRINS-primers) useful for the identification of individual human chromosomes in situ. *Cytogenet.Cell Genet.* 1995, 71(2):142-147.
48. Kozubek S, Lukasova E, Amrichova J, Kozubek M, Liskova A, Slotova J: Influence of cell fixation on chromatin topography. *Anal.Biochem.* 2000, 282(1):29-38.
49. Kreth G, Finsterle J, von Hase J, Cremer M, Cremer C: Radial arrangement of chromosome territories in human cell nuclei: a computer model approach based on gene density indicates a probabilistic global positioning code. *Biophys.J.* 2004, 86(5):2803-2812.
50. Kuliev A, Cieslak J, Verlinsky Y: Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human oocytes. *Cytogenet.Genome Res.* 2005, 111(3-4):193-198.
51. Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, Gu Y, Shen J, Saker D, May KM *et al*: Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet* 1996, 14(4):400-405.
52. Lee C, Wevrick R, Fisher RB, Ferguson-Smith MA, Lin CC: Human centromeric DNAs. *Hum.Genet.* 1997, 100(3-4):291-304.
53. Liehr T, Claussen U: Current developments in human molecular cytogenetic techniques. *Curr.Mol.Med.* 2002, 2(3):283-297.

## Seznam použité literatury

54. Los FJ, Van Opstal D, van den Berg C: The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model. *Hum Reprod Update* 2004, 10(1):79-94.
55. Mahmood R, Brierley CH, Faed MJ, Mills JA, Delhanty JD: Mechanisms of maternal aneuploidy: FISH analysis of oocytes and polar bodies in patients undergoing assisted conception. *Hum.Genet.* 2000, 106(6):620-626.
56. Maierhofer C, Gangnus R, Diebold J, Speicher MR: Multicolor deconvolution microscopy of thick biological specimens. *Am J Pathol* 2003, 162(2):373-379.
57. Manandhar G, Schatten H, Sutovsky P: Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biol.Reprod.* 2005, 72(1):2-13.
58. Martini E, Speel EJ, Geraedts JP, Ramaekers FC, Hopman AH: Application of different in-situ hybridization detection methods for human sperm analysis. *Hum Reprod* 1995, 10(4):855-861.
59. Mau-Holzmann UA: Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet.Genome Res.* 2005, 111(3-4):317-336.
60. McKenzie LJ, Carson SA, Marcelli S, Rooney E, Cisneros P, Torskey S, Buster J, Simpson JL, Bischoff FZ: Nuclear chromosomal localization in human preimplantation embryos: correlation with aneuploidy and embryo morphology. *Human Reproduction* 2004, 19(10):2231-2237.
61. McNally JG, Karpova T, Cooper J, Conchello JA: Three-dimensional imaging by deconvolution microscopy. *Methods* 1999, 19(3):373-385.
62. Montag M, van der Ven K, Delacretaz G, Rink K, van der Ven H: Laser-assisted microdissection of the zona pellucida facilitates polar body biopsy. *Fertil Steril* 1998, 69(3):539-542.
63. Mroz K, Hassold TJ, Hunt PA: Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors. *Hum Reprod* 1999, 14(5):1151-1156.
64. Munne S, Bahce M, Sandalinas M, Escudero T, Marquez C, Velilla E, Colls P, Oter M, Alikani M, Cohen J: Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. *Reprod Biomed Online* 2004, 8(1):81-90.
65. Munne S, Escudero T, Sandalinas M, Sable D, Cohen J: Gamete segregation in female carriers of Robertsonian translocations. *Cytogenet Cell Genet* 2000, 90(3-4):303-308.
66. Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J: Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993, 8(12):2185-2191.
67. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O: Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 1991, 254(5037):1497-1500.
68. Odorisio T, Rodriguez TA, Evans EP, Clarke AR, Burgoyne PS: The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nat Genet* 1998, 18(3):257-261.
69. Ogilvie CM, Braude PR, Scriven PN: Preimplantation genetic diagnosis--an overview. *J Histochem Cytochem* 2005, 53(3):255-260.
70. Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E: Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 2004, 303(5658):644-649.
71. Oliver-Bonet M, Ko E, Martin RH: Male infertility in reciprocal translocation carriers: the sex body affair. *Cytogenet.Genome Res.* 2005, 111(3-4):343-346.
72. Olsen AK, Lindeman B, Wiger R, Duale N, Brunborg G: How do male germ cells handle DNA damage? *Toxicol Appl Pharmacol* 2005, 207(2 Suppl):521-531.

## Seznam použité literatury

73. Palermo G, Munne S, Cohen J: The human zygote inherits its mitotic potential from the male gamete. *Human Reproduction* 1994, 9(7):1220-1225.
74. Pellestor F, Anahory T, Hamamah S: Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogenet.Genome Res.* 2005a, 111(3-4):206-212.
75. Pellestor F, Anahory T, Hamamah S: The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. *Hum Reprod Update* 2005b, 11(1):15-32.
76. Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J: 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.* 2002, 17(8):2134-2145.
77. Pellestor F, Quennesson I, Coignet L, Girardet A, Andreo B, Charlier JP: Direct detection of disomy in human sperm by the PRINS technique. *Hum.Genet* 1996, 97(1):21-25.
78. Pellestor F, Sele B: Assessment of aneuploidy in the human female by using cytogenetics of IVF failures. *Am J Hum Genet* 1988, 42(2):274-283.
79. Pertl B, Yau SC, Sherlock J, Davies AF, Mathew CG, Adinolfi M: Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome. *Lancet* 1994, 343(8907):1197-1198.
80. Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann F, Clavequin MC, Bresson JL: Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenet.Genome Res.* 2005, 111(3-4):291-296.
81. Rubeš J, Vozdová M, Oráčová E, Perreault SD: Individual variation in the frequency of sperm aneuploidy in humans. *Cytogenet.Genome Res.* 2005, 111(3-4):229-236.
82. Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi R: Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 1978, 274(5674):911-913.
83. Sassone-Corsi P: Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 2002, 296(5576):2176-2178.
84. Sathananthan AH, Selvaraj K, Girijashankar ML, Ganesh V, Selvaraj P, Trounson AO: From oogonia to mature oocytes: Inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microsc Res Tech* 2006, 69(6):396-407.
85. Sherman SL, Freeman SB, Allen EG, Lamb NE: Risk factors for nondisjunction of trisomy 21. *Cytogenet.Genome Res.* 2005, 111(3-4):273-280.
86. Shi Q, Martin RH: 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* 2000, 93(1):40-46.
87. Scheuermann MO, Tajbakhsh J, Kurz A, Saracoglu K, Eils R, Lichter P: Topology of genes and nontranscribed sequences in human interphase nuclei. *Experimental Cell Research* 2004, 301(2):266-279.
88. Siffroi JP, Le Bourhis C, Krausz C, Barboux S, Quintana-Murci L, Kanafani S, Rouba H, Bujan L, Bourrouillou G, Seifer I *et al*: Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. *Hum.Reprod.* 2000, 15(12):2559-2562.
89. Silber S, Escudero T, Lenahan K, Abdelhadi I, Kilani Z, Munne S: Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction. *Fertil.Steril.* 2003, 79(1):30-38.
90. Simoni M, Bakker E, Eurlings MC, Matthijs G, Moro E, Muller CR, Vogt PH: Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions 2. *Int.J.Androl* 1999, 22(5):292-299.

## Seznam použité literatury

91. Solovei I, Schermelleh L, Doring K, Engelhardt A, Stein S, Cremer C, Cremer T: Differences in centromere positioning of cycling and postmitotic human cell types. *Chromosoma* 2004, 112(8):410-423.
92. Sun HB, Shen J, Yokota H: Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys.J.* 2000, 79(1):184-190.
93. Takagi N, Sasaki M: Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature* 1975, 256(5519):640-642.
94. Tan SS, Williams EA, Tam PP: X-chromosome inactivation occurs at different times in different tissues of the post-implantation mouse embryo. *Nat.Genet.* 1993, 3(2):170-174.
95. Tarkowski AK: An air drying method for chromosome preparations form mouse eggs. *Cytogenetics* 1996, 5:394-400.
96. Tempest HG, Griffin DK: The relationship between male infertility and increased levels of sperm disomy. *Cytogenet Genome Res* 2004, 107(1-2):83-94.
97. Templado C, Bosch M, Benet J: Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet.Genome Res.* 2005, 111(3-4):199-205.
98. Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, Moutou C, Robinson MD, Schmutzler AG, Scriven PN *et al*: ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum.Reprod.* 2005, 20(1):35-48.
99. Verlinsky Y, Cieslak J, Freidine M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J *et al*: Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1995, 10(7):1923-1927.
100. Vogt PH: Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod* 1998, 4(8):739-744.
101. Wells D, Delhanty JD: Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 2000, 6(11):1055-1062.
102. WHO: WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction: Cambridge University Press 1999.
103. Willadsen S, Levron J, Munne S, Schimmel T, Marquez C, Scott R, Cohen J: Rapid visualization of metaphase chromosomes in single human blastomeres after fusion with in-vitro matured bovine eggs. *Hum Reprod* 1999, 14(2):470-475.
104. Wilton L: Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Hum Reprod Update* 2005, 11(1):33-41.
105. Wyrobek AJ, Alhorn T, Balhorn R, Stanker L, Pinkel D: Fluorescence in situ hybridization to Y chromosomes in decondensed human sperm nuclei. *Mol Reprod Dev* 1990, 27(3):200-208.
106. Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, Glaser RL, Pearson FS, Evenson D: Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(25):9601-9606.
107. Zeng SM, Yankowitz J: X-inactivation patterns in human embryonic and extra-embryonic tissues. *Placenta* 2003, 24(2-3):270-275.
108. Zybina EV: Sex chromatin in giant cells of trophoblast and in cells of early rabbit embryos. *Fed.Proc.Transl.Suppl* 1965, 24(5):868-872.

## 9. Příloha 1 - Seznam publikací

### 1. PUBLIKACE V ČASOPISECH S DEFINOVANÝM IMPACT FAKTOREM

- 1.1. Diblík J., Macek Sr. M., Magli C., Krejčí R., Gianaroli L.: Chromosome topology in euploid and aneuploid blastomeres from human embryos. Odesláno do Prenatal Diagnosis (John Wiley & Sons, Ltd.). Výsledek recenzního řízení by měl být znám do 31.8.2006.
- 1.2. Diblík J, Macek M Sr, Magli MC, Krejci R, Gianaroli L. Topology of chromosomes 18 and X in human blastomeres from 3- to 4-day-old embryos. J Histochem Cytochem. 2005 Mar;53(3):273-6.
- 1.3. Paulasova P, Andreo B, Diblík J, Macek M, Pellestor F. The peptide nucleic acids as probes for chromosomal analysis: application to human oocytes, polar bodies and preimplantation embryos. Mol Hum Reprod. 2004 Jun;10(6):467-72.

### 2. PUBLIKACE V OSTATNÍCH MEZINÁRODNÍCH ČASOPISECH

- 2.1. Macek M. Sr., Krebsová A., Broučková M., Matějčková M., Machatková M., Diblík J., Sperling K., Vorsanova, S. Kutsev S., Zerova S., Arbuzova S., Chudoba D. and Novotná D.: Quantitative fluorescent PCR (QFPCR) in the prenatal and postnatal diagnosis of the most frequent aneuploidies. Balkan Journal of Medical Genetics 2004, 6(3&4) Supplement, p. 87

### 3. PUBLIKACE V DOMÁCÍCH ČASOPISECH

- 3.1. Macek M, Vilimova S, Potuznikova P, Yurov Y, Vorsanova S, Diblík J, Krebsova A, Machatkova M, Koudova M, Alanova R, Matejckova M, Hladikova E, Brouckova M, Huttelova R, Vincenciova R, Paulasova P, Brandjeska M, Uhrova E, Kratenova A, Smetanova I, Novotna D, Chudoba D, Kulovany E, Krutilkova V, Hromadnikova I, Mardesic T, Macek M Jr.: Využití lékařské genetiky v reprodukční medicíně Cas Lek Cesk. 2002;141(1):28-34.

### 4. PUBLIKACE V MONOGRAFÍCH

- 4.1. Macek M. Sr., Krebsová A., Horká I., Diblík J., Matějčková M., Broučková M., Chudoba D., Hromadníková I., Novotná D., Havlovičová M., Kulovaný E.: Quantitative fluorescent PCR (QFPCR) in the examination of microquantity of fetal cells. Fetal Cells, Fetal DNA in Maternal Blood and Early Fetal Diagnosis. Present state and Perspectives. Monography – Bianchi W. D., Cuckle H. and Macek M. (eds). Carolinum, Charles University Press (2002), p. 304
- 4.2. Horká, A. Krebsová, E. Kulovaný, D. Smetanová, D. Chudoba, P. Potužníková, D. Černá, J. Diblík, M. Švarcová, E. Švagrová, E. Zemánková, M. Macek Jr., M. Macek Srov.: PAPP-A, Free  $\beta$ HCG, Ultrasound and Quantitative Fluorescent PCR in the Early Prenatal detection of Chromosome Aneuploidies. The First Congress on Controversies in Obstetrics Gynecology & Infertility, Prague, Czech Republic, October 28-31, 1999, Proceedings, Vol2- Free Papers, Medimond S.r.l. - Monduzzi Editore (1999), p. 124

## 5. PUBLIKACE VE SBORNÍCÍCH

- 5.1. Diblík J., Macek M. Sr., Magli C., Crippa A., Krejčí R., Gianaroli L.: FISH signal topology in euploid and aneuploid blastomeres. Prague Post Genome technology Workshop, 6-7.6.2005 – proceedings. Vydala odborná společnost pro rozpoznávání České společnosti pro kybernetiku a informatiku, s. 28

## 6. ABSTRAKTA V ČASOPISECH S DEFINOVANÝM IMPACT FAKTOREM

- 6.1. Diblík J., Macek M. sr, Magli C, Krejčí R, Gianaroli L.: Localization of chromosomes 13, 18, 21, 22, X and Y in nuclei of human preimplantation embryos. *Eur J Hum Genet*, vol 13, Suppl 1, May 2005, p. 162, P0386
- 6.2. Macek M. sr, Hájek P, Cuckle H, Houbová B, Simandlová M, Havlovicová M, Vlk R, Špálová I, Diblík J, Vilímová Š, Potužníková P: PAPP-A and proMBP proteins in contingent prenatal biochemical screening and detection of different types of coronary artery diseases. *Eur J Hum Genet*, vol 13, Suppl 1, May 2005, p. 183, P0482
- 6.3. Diblík J., Macek M., Yurov Y., Vorsanová S.: Aneuploidy and morphological changes in sperm cells. *Fetal Diagnosis and Therapy* 2001, 16:437-464, Abstracts of 12th Fetal Cell Workshop, Prague, May 12-13, 2001
- 6.4. Macek M. Sr, Krebsová A., Horká I., Matějčková M., Broučková M., Diblík J., Hromadníková I., Chudoba D., Novotná D., Havlovicová M., Kulovaný E.: Quantitative Fluorescent PCR QFPCR in the Examination of Microquantity of Fetal Cells. *Fetal Diagnosis and therapy* 2001, 16:437-464, Abstracts of 12th Fetal Cell Workshop, Prague, May 12-13, 2001
- 6.5. Y.B.Yurov, M. Macek, S.G.Vorsanova, J. Diblík, P.Potužníková, R. Hüttelová, E.Uhrová, M. Brandejská, J. Lagnerová, D. Černá, T. Mardešič, A. Krebsová, I. Horká, M. Macek Jr. Aneuploidy detection in sperm, blastomeres and early embryos by a simplified FISH method *Cytogenet. Cell. Genet.* 85:5-181 (1999), P232, 2nd European Cytogenetics Conference, July 3-6,1999, Vienna, Austria
- 6.6. D.Novotna, E.Kocarek, A.Puchmajerova, J.Diblik, D.Chudoba, P.Goetz Coincidence of X-chromosome monosomy and partial trisomy of the chromosome 1q (a case study) *Cytogenet. Cell. Genet.* 85:5 (1999), P666, 2nd European Cytogenetics Conference, July 3-6,1999, Vienna, Austria
- 6.7. Krebsová A., Horká I., Jobert S., Haas O.A., Chudoba D., Koudová M., Diblík J., Macek M. jr., Sperling K., Macek M.: Quantitative fluorescent PCR in the prenatal and postnatal detection of aneuploidies, loss of heterozygosity, interstitial deletions and of their parental origin. *American Journal of Human Genetics*, 1999, 65:4, 921

## 7. ABSTRAKTA V OSTATNÍCH MEZINÁRODNÍCH ČASOPISECH

- 7.1. Diblík J, Macek M Sr, Magli C, Crippa A, Krejčí R, Gianaroli L.: FISH signals topology in euploid and aneuploid blastomeres. *Reproductive Biomedicine Online* (2005), vol 10, Suppl.2, p. 28, O-86 Abstracts of 6th International Symposium on Preimplantation genetic Diagnosis
- 7.2. Paulasova P., Andréo B., Diblik J., Macek M., Pellestor F.,The Peptide Nucleic Acids (PNAs) probes for chromosomal analysis of human oocytes, polar bodies and preimplantation embryos. Abstrakt z XIV. Workshop on Fetal Cells and Fetal DNA Recent Progress in Molecular Genetic and Cytogenetic Investigations for Early Prenatal and Postnatal Diagnosis. University of Jena, Germany. 17. - 18. April 2004. *Medizinische Genetik* 2004.
- 7.3. Machatková M., Krebsová A., Broučková M., Matějčková M., Diblík J., Vorsanova S., Kutsev S., Zerova S., Arbuzova S., Sperling K., Macek Sr. M. Quantitative fluorescent PCR (QFPCR) in the study of the parental and meiotic origin of trisomy



- 21 in different European regions. Abstrakt z XIV. Workshop on Fetal Cells and Fetal DNA Recent Progress in Molecular Genetic and Cytogenetic Investigations for Early Prenatal and Postnatal Diagnosis. University of Jena, Germany. 17. - 18. April 2004. Medizinische Genetik 2004.
- 7.4. Macek M. Sr., Yurov Y., Diblík J., Vorsanová S., Paulasová P., Vincenciová R., Vilímová Š., Potužníková P.: Simplified method for molecular cytogenetic examination of human sperm cells. Reproductive BioMedicine Online, vol.4, Suppl.2, 2002, Abstracts of 4th International Symposium on Preimplantation genetic Diagnosis, P-19, p.48
- 7.5. Krebsová A., Broučková M., Horká I., Matějčková M., Diblík J., Chudoba D., Novotná D., Kulovaný E., Macek Jr. M., Macek M.: Quantitative fluorescent PCR in rapid prenatal and postnatal detection of the most frequent aneuploidies and their parental and meiotic origin. Annales de Génétique, International Journal of Human and Medical Genetics, vol. 44, suppl. 1, July 2001, ISSN 0003-3995, p.150, 3-352
- 7.6. Macek M., O.A.Haas, M. Broučková, M. Matějčková, A. Krebsová, I. Horká, J. Diblík, D. Chudoba, R. Kodet, M. Tichý, Z. Matějovský, K. Pýcha, M. Candrová, Š. Vilímová, V. Krutílková, M. Macek Jr.: Quantitative fluorescent PCR analysis of aneuploidy in cultivated and uncultivated solid tumors, ALL and disorders of trophoblast. Annales de Génétique, International Journal of Human and Medical Genetics, vol. 44, suppl. 1, July 2001, ISSN 0003-3995, p.87, 2-282

## 8. ABSTRAKTA V MEZINÁRODNÍCH SBORNÍCÍCH

- 8.1. Diblík J., Paulasová P., Macek M.: Three dimensional analysis of Fluorescence in situ Hybridization in sperm, EAA International Symposium- Genetics of Male Infertility: from research to clinic – Book of Abstracts, 2.- 4. 10. 2003, Florence, Italy

## 9. ABSTRAKTA V DOMÁCÍCH ČASOPISECH

- 9.1. Diblík J., Montag M., Magli C., Macek M. Sr., Vilímová Š.: Preimplantační screening aneuploidí vyšetřením 1. a 2. polárních tělísek. Prakt. Gynekologie 2005, 9(6) – abstrakta k 15. sympoziu asistované reprodukce SAR ČGPS, 24.11. 2005, Brno
- 9.2. Diblík J., Jurov J., Paulasová P., Potužníková P., Vilímová Š., Macek M. Sr.: Studium vztahu mezi parametry morfologie a frekvencí aneuploidie spermií. Asistovaná reprodukce 12. 2002, č. 12, s. 48 (12. Symposium asistované reprodukce Brno 19-20.11.2002)
- 9.3. Paulasová P., Pellestor F., Diblík J., Macek M. Sr.: Využití PRINS k rychlé diagnostice aneuploidí ve spermiích. Asistovaná reprodukce 12. 2002, č. 12, s. 45 (12. Symposium asistované reprodukce Brno 19-20.11.2002)
- 9.4. Diblík J., Vilímová Š., Potužníková P., Paulasová P., Macek M. Sr. : Vyšetření morfologie spermií pomocí počítačové analýzy. Mezinárodní symposium asistované reprodukce., Senohraby 2002, 18. – 19.10.2002 (Reprodukční medicína 1/02)

## 10. ABSTRAKTA V DOMÁCÍCH SBORNÍCÍCH

- 10.1. J. Diblík, P. Paulasová, M. Montag, C. Magli, F. Pellestor, M. Macek Sr., Š. Vilímová: Molecular cytogenetic examination of gametes. 1. mezinárodní andrologický kongres v České republice - sborník abstrakt, 23-25.2.2006, Štířín, ČR
- 10.2. S. Doubravská, J. Diblík, J. Ichová, Š. Vilímová, M. Macek Sr.: Comparison of standard spermogram evaluation with computer—aided sperm analysis. 1. mezinárodní andrologický kongres v České republice - sborník abstrakt, 23-25.2.2006, Štířín, ČR

## Příloha 1 - Seznam publikací

- 10.3. Diblík J., Macek M. Sr., Magli C., Krejčí R., Gianaroli L.: Topologie chromosomů 18 a X v blastomerách z 3-4 dny starých lidských embryí. Mezinárodní symposium asistované reprodukce, 22.10. - 23.10.2004, Senohraby – sborník abstrakt, s. 12
- 10.4. Diblík J., Vincenciová R., Paulasová P., Potužníková P., Vilímová Š., Macek M. Sr.: Studium vztahu mezi parametry morfologie a frekvencí aneuploidie spermií. 11. Symposium asistované reprodukce Brno 13-14.11.2001 – Sborník abstrakt

## **10. Příloha 2 - publikace**