



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Vyšetření gonozomálních mozaiek metodou FISH

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/ ZDRAVOTNÍ
LABORANT

Autor: Jana Šutková

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Vyšetření gonozomálních mozaiek metodou FISH*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 29.4.2022

.....

Jana Šutková

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Tomášovi Nixovi, Ph.D., za poskytnutí cenných informací, odborné konzultace, ale také za jeho vstřícnost a čas, který mi poskytl během psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity za umožnění zhotovení praktické části ve školní laboratoři. Poděkování patří také všem dobrovolníkům, kteří byli ochotni poskytnout vzorky pro tuto bakalářskou práci. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině za trpělivost a podporu po celou dobu mého studia.

Vyšetření gonozomálních mozaiek metodou FISH

Abstrakt

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala vyšetřením gonozomálních mozaiek. Mozaicismus můžeme popsat jako stav, při kterém se v jednom organismu nachází dvě a více odlišných buněčných linií pocházející z jedné zygoty. U žen se nejčastěji vyskytuje mozaiková forma zvaná Turnerův syndrom a Syndrom XXX neboli superžena. V mužské populaci je nejčastěji detekován Klineferterův syndrom a syndrom XYY (supermuž). Mozaicismus lze vyšetřit fluorescenční *in situ* hybridizací.

V teoretické části své bakalářské práce jsem se zaměřila na vrozený chromozomální mozaicismus, zejména na jeho varianty jako je Klineferterův syndrom, Turnerův syndrom, Syndrom XXX a Syndrom XYY. Dále jsem se v této části zabývala fluorescenční *in situ* hybridizací. Popsala jsem fluorescenci jako takovou a následně její aplikaci v klinické praxi, kde je využíváno několik typů fluorescenční *in situ* hybridizace.

V praktické části jsem se věnovala vyšetření počtu gonozomálních chromozomů metodou fluorescenční *in situ* hybridizace. Tuto část jsem vypracovala v laboratoři Zdravotně sociální fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Vyšetřovala jsem 40 zanonymizovaných vzorků od 20 probandů. U každého proběhl odběr kapilární krve a bukalního stěru. Po hybridizaci vzorků s centromerickou sondou pro chromozomy X a Y byla provedena mikroskopie.

V poslední části této bakalářské práce jsem se věnovala zpracování výsledků získaných fluorescenčním mikroskopováním. U žen tedy bylo detekováno celkem 6 případů mozaicismu (procento mozaických buněk bylo nad přípustnou hranici). U mužů byly celkem 2 případy zvýšeného počtu mozaických buněk.

Klíčová slova

Mozaicismus, gonozomy, monozomie, trizomie, fluorescenční *in situ* hybridizace, mikroskopování

Název bakalářské práce v anglickém jazyce

Abstract

In my bachelor thesis I dealt with the analysis of gonosomal mosaics. Mosaicism can be described as a condition in which two or more distinct cell lines originating from a single zygote are found in one organism. In women, the most common mosaic forms are Turner syndrome and triple X syndrome or superfemale. In the male population, Klinefelter syndrome and XYY syndrome (supermale) are most commonly detected. Mosaicism can be investigated by fluorescence in situ hybridization.

In the theoretical part of my bachelor's thesis I focused on congenital chromosomal mosaicism, especially on its variants such as Klinefelter syndrome, Turner syndrome, triple X and XYY syndrome. Furthermore, in this part I dealt with fluorescence in situ hybridization. I described fluorescence per se and then its application in clinical practice, where several types of fluorescence in situ hybridization are used.

In the practical part I examined the number of gonosomal chromosomes using fluorescence in situ hybridization. I prepared this part in the laboratory of the Faculty of Health and Social Sciences of the University of South Bohemia in České Budějovice. I examined 40 anonymized samples from 20 probands. Capillary blood samples and buccal swabs were taken from each of them. After hybridization of samples with centromeric probe for X and Y chromosomes microscopy was performed.

In the last part of this bachelor thesis I dealt with the processing of the results obtained by fluorescence microscopy. Thus, a total of 6 cases of mosaicism were detected in women (the percentage of mosaic cells was above the admissible limit). In males there were a total of 2 cases of increased percentage of mosaic cells.

Key words

Mosaicism, gonosomy, monosomy, trisomy, fluorescence in situ hybridization, microscopy

Obsah

Úvod	8
1 Genetika.....	9
1.1 Cytogenetika	10
1.2 Buněčný cyklus	10
2 Karyotyp.....	11
3 Chromozomy	12
3.1 Gonozomy	13
4 Chromozomální aberace	14
5 Mozaicismus.....	15
5.1 Turnerův syndrom	16
5.2 Klinefelterův syndrom	16
5.3 Syndrom XYY (supermuž)	17
5.4 Syndrom XXX (superžena).....	17
6 Fluorescenční mikroskopie	18
6.1 Fluorescence.....	18
6.2 Fluorescenční mikroskopie	19
6.3 Fluorescenční barviva	19
6.4 Hybridizace in situ	20
7 Fluorescenční in situ hybridizace	21
7.1 Sondy FISH	22
7.2 Využití metody FISH	23
7.3 Modifikace FISH.....	23
7.3.1 Mnohobarevná FISH (M-FISH)	24
7.3.2 Mnohobarevné pruhování (M-BAND)	25
7.3.3 Komparativní genomová hybridizace (CGH)	25
7.3.4 FISH na vlákně DNA (fiber – FISH)	25
7.3.5 Spektrální karyotypizace (SKY)	26
8 Cíl práce a výzkumné otázky.....	27
8.1 Cíl práce	27
8.2 Výzkumné otázky.....	27
9 Metodika.....	28
9.1 Odběr vzorku.....	28
9.2 Příprava vzorku	29
9.3 Fluorescenční mikroskopování	31
10 Výsledky	34

11	Diskuse.....	45
12	Závěr.....	47
13	Seznam použitých zdrojů.....	48
14	Seznam obrázků, grafů a tabulek	52
15	Seznam použitých zkratek	53

Úvod

Gonozomální mozaicismus, který je popsán jako přítomnost dvou či více buněčných linií v organismu, není v dnešní době tak probírané téma. Nicméně syndromy spojené s touto chromozomální aberací můžou mít vážné dopady na lidský organismus. Gonozomální mozaicismus může postihovat ženy i muže (Kočárek, 2008).

U žen hovoříme o Turnerově syndromu, který se převážně projevuje malou výškou, srdečními vadami a neplodností. Karyotyp těchto žen je ve většině případů 45, X (Lebl a Zapletalová, 2012). Ve druhém případě mluvíme o syndromu, který se projevuje vysokým vzrůstem, malformací prstů a poruchou vaječníků. Tento syndrom nazýváme superžena s karyotypem 47, XXX (Wigby et al., 2016).

Muži jsou zatíženi Klinefelterovým syndromem, pro který je charakteristická vysoká postava, zvětšené mléčné žlázy a neplodnost. Tento karyotyp má o jedno X víc, které je zděděno od jednoho z rodičů, tedy 47, XXY (Bonomi et al., 2017). Stejně jako u žen, tak i u mužů můžeme mluvit o supermuži, který má karyotyp 47, XYY. Tito jedinci často trpí poruchou autistického spektra, jsou vysoké postavy a vyznačují se velikým obvodem hlavy (Bryant et al., 2012).

Počty pohlavních chromozomů jsme schopni vyšetřit fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH). Principem metody je hybridizace s fluorescenční sondou, která se specificky váže na daný úsek DNA. V konečné fázi dochází k detekci signálů pomocí fluorescenčního mikroskopu. Právě detekce počtu gonozomů nám pomůže k upřesnění diagnózy. FISH je v některých případech nahrazena modernějšími metodami molekulární biologie, ale stále má své místo v určování mozaicismu (Kočárek, 2007).

.

1 Genetika

Genetika je vědní obor, který se zabývá dědičností a proměnlivostí živých organismů. Vysvětluje a popisuje jakými pravidly je řízen přenos dědičných znaků z rodičovské generace na potomky. Dědičnost řadíme mezi základní vlastnosti všech živých organismů. Genetika je definována jako schopnost organismů plodit potomstvo, které má stejné či podobné znaky. V každém jedinci je zabudována dědičná neboli genetická informace (Kočárek, 2008).

J.G. Mendel (1865) svými hybridizačními pokusy popsal základní principy o elementech, které jsou zodpovědné za prvotní vytvoření znaků oboru genetiky. Roku 1909 W. Johanssn nazval jednotku dědičnosti genem. T.H. Morgan (1911) zjistil pomocí cytogenetických studií polohu jednotlivých genů, která je na určitých místech neboli lokusech chromozomů. V roce 1953 J.D.Watson a F.H.C. Crick objasnili molekulární strukturu DNA. Z toho vyplynulo, že gen je část molekuly DNA, která kóduje jeden enzym (Nečas, 2000).

„Gen je jednotkou dědičnosti. Jde o sekvenci DNA, která nese informaci o primární struktuře molekuly bílkoviny či ribonukleové kyseliny (RNA)“ (Brdička a Didden, 2014-2018). Geny se skládají z nukleových kyselin. Základní stavební jednotky nukleových kyselin se nazývají nukleotidy, jež jsou tvořeny ze tří částí, a to z molekuly cukru, molekuly fosfátu a dusíkaté báze. Nukleové kyseliny dělíme do dvou typů, první je RNA neboli ribonukleová kyselina, kde cukernou složkou je ribóza, druhý typ je DNA (deoxyribonukleová kyselina), kde mezi cukernou složku řadíme deoxyribózu (Snustad et al., 2009). Další složkou nukleotidů jsou již zmíněné dusíkaté báze. Jsou to heterocyklické sloučeniny, které dále na základě purinu a pyrimidinu dělíme na dvě skupiny. Purinové báze jsou adenin (A) a guanin (G), mezi pyrimidinové báze v DNA řadíme cytosin (C) a thymin (T). V RNA je obsažen uracil (U) namísto thyminu (T) (Kočárek, 2008).

1.1 Cytogenetika

Cytogenetika je obor zabývající se strukturou, funkcí a změnami eukaryotických chromozomů. Dále se věnuje buněčnému dělení a dalším genetickým procesům, které s nimi úzce souvisí. Aplikovaný obor klinická cytogenetika se zabývá chromozomálními abnormalitami (Kočárek, 2008).

1.2 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je sled dějů, které se odehrávají v buňce při jejím růstu a dělení. Nejdelší období buněčného cyklu je interfáze, kdy buňka roste, replikuje své chromozomy a připravuje se na buněčné dělení. Po ukončení interfáze přejde buňka do mitózy a následně vytvoří dvě dceřiné buňky (Šmarda, 2003).

Buněčný cyklus má dvě stádia. První stádium je interfáze, která je dále dělena na G1 fázi, S fázi a G2 fázi. Během G1 fáze buňka roste, vytváří zásobu nukleotidů a je zahájena syntéza proteinů a enzymů, které jsou potřebné pro replikaci jaderného DNA. Délka G1 fáze je variabilní. V S fázi probíhá replikace jaderné DNA. Replikace znamená, že molekula DNA se kopíruje a vznikají dvě identické molekuly DNA se stejnou genetickou informací. G2 fáze vede k rozdělení buňky, kdy se zmnoží a aktivují proteiny, které zahájí kondenzaci chromozomů, dále vedou k tvorbě mitotického aparátu a destrukci jaderného obalu. G2 fáze končí zahájením mitózy (Otová a Mihalová, 2012).

V M fázi neboli mitotické fázi dochází k dělení jádra a buňky. Tato fáze nastává po interfázi a je to poslední stádium buněčného cyklu. M fáze je tvořena ze dvou úzce spojených procesů, a to jaderným dělením (karyokineze) a dělením cytoplazmy (cytokineze). Poté nastává vlastní mitóza, kdy chromozomy duplikované v S fázi jsou ohraničeny, sesterské chromatidy odděleny a přemístěny k protilehlým pólům buňky. Dceřiné buňky získají dvě kompletní sady chromozomů a totožnou výbavu cytoplazmatických organel (Otová a Mihalová, 2012).

Zatímco se buňky neustále dělí, některé přecházejí do tzv. klidové fáze. Po opuštění G1 fáze tyto buňky dále vstupují do klidového stavu zvaného G0. Buňka v této fázi vykonává svou funkci, ale nepřipravuje se na další dělení. G0 je pro některé buňky trvalý stav, pokud však dostanou správný signál mohou znovu zahájit buněčné dělení (Brdička, 2001).

2 Karyotyp

Každý biologický druh má charakteristický karyotyp. Lidský karyotyp je utvořen ze 46 chromozomů, které jsou přítomny jako 23 párů. Každý člověk má 22 párů autozomů, jež jsou očíslované (1-22) a jeden pár pohlavních chromozomů neboli gonozomů, které se označují X a Y (Otová a Mihalová, 2012). V somatické buňce se chromozomy nacházejí vždy v páru. Z tohoto důvodu je počet chromozomů v této buňce dvojnásobný neboli diploidní. Chromozomy tvořící pár označujeme jako homologické. Oba tyto chromozomy podmiňují díky své genetické informaci tvorbu stejných znaků. Pohlaví jedince udává kombinace gonozomů. Karyotyp ženy obsahuje dva pohlavní chromozomy X, zatímco muži mají jeden chromozom X a jeden Y. Chromozomy X a Y se výrazně liší svým utvářením a obsahem genetické informace, a proto je označujeme jako heterochromozomy (Kočárek, 2008).

Vizuální vzhled chromozomu při barvení a zkoumání pod mikroskopem, označuje termín cytogenetická mapa. Hlavní důležitý faktor jsou vizuálně odlišné světlé a tmavé pásy. Tyto pásy udávají jedinečný vzhled a vlastnosti každého chromozomu. Této metody se využívá při zjišťování chromozomálních změn karyotypu (Marks, 2021).

3 Chromozomy

První zmínka o chromozomech pochází již z 19. století, kdy byly popsány jako drobné barvitelné útvary nacházející se v rostlinných a živočišných buňkách. Chromozomy se nacházejí v jádře buňky (Kaprás et al., 1996).

Chromozomy jsou souborem vláknitých nukleoproteinových útvarů, které tvoří jadernou hmotu neboli chromatin (Kočárek, 2008). Každý chromozom je tedy složen ze dvou složek, a to z vlákna deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a ze specifických proteinů zejména histonů. Základní stavební jednotkou je nukleohistonové vlákno neboli nukleohistonový komplex, který je tvořen z právě již zmiňované DNA a histonů (Kočárek, 2008). Histony mohou vytvářet iontové vazby s negativně nabitými fosfátovými skupinami v DNA, a to díky pozitivně nabitému náboji (Pritchard a Korf, 2007).

V průběhu jaderného dělení se nukleohistonové vlákno zásadně mění. Chromozom ve fázi před započítím mitózy má tvar připomínající velmi dlouhou, tenkou nit a je velmi protažený, proto není možná optická mikroskopie. V počáteční fázi se nukleohistonové vlákno zkrátí na téměř jednu setinu své původní délky, a to díky ohýbání, stáčení do spirály a skládání se. V této fázi jsou při mikroskopickém pozorování výraznější, neboť jejich šířka se mnohokrát zvětší. Tento děj se označuje jako kondenzace (spiralizace) chromozomu. Za použití jaderných barviv lze dobře obarvit tyto kondenzované chromozomy tak, že se jsou rozlišitelné a díky tomu se dají snadno spočítat (Kočárek, 2008).

Telomery jsou jasně vymezené konce, které zajišťují připojení chromozomu k dělicímu vřeténku a jejich rozdělení do dceřiných buněk. Toto probíhá při jaderném dělení (Kočárek, 2008).

Funkce telomer je velmi rozmanitá a důležitá. První funkce je zabezpečit úplnou replikaci terminálních chromozomálních úseků, dále zabránit abnormálním fúzím konců chromozomů. Poté se při meióze účastní párování chromozomů a během interfáze napomáhají ke stabilizaci vnitřní struktury buněčného jádra tak, že připojují chromozomy k jaderné membráně. Na telomeru jsou navázány specifické telomerické proteiny (Pritchard a Korf, 2007).

Podle různých technik se rozlišují následující hlavní typy pruhování chromozomů:

- Q pruhování tuto techniku zavedl Caspersen v roce 1970. Je to nejstarší technika používající fluorescenční barviva, např. chinakrinu. Výhodou je možnost barvení Y chromozomu v interfázi, nevýhodou je nestálost preparátů.
- G pruhování je v současné době nejvíce používaná metoda. Buňky DNA denaturují a renaturují teplem, solnými roztoky a trypsinem. Barví se pomocí Giemsovo barvivem (proto G pruhy). Metoda G pruhů je totožná Q pruhům, ale je stálejší.
- R pruhování se provádí denaturací v horkých alkáliích a následným barvením Giemsovo barvivem. Vzhledem ke G pruhování je rozložení pruhů přesně opačné. Při této metodě jsou vyobrazeny úseky DNA obsahující vyšší obsah bází guaninu (G) a cytosinu (C).
- C pruhování je technikou velmi podobnou G pruhování, ale při této metodě je intenzita denaturace vyšší. Barvená část je pouze heterochromatin v oblasti centromer

(Nečas, 2000)

3.1 Gonozomy

Pohlavní chromozomy neboli gonozomy mají zásadní úlohu v určování pohlaví jedince. Ženský karyotyp má dva pohlavní chromozomy X, zatímco mužský obsahuje dva odlišné gonozomy, a to X a Y. Velikost chromozomu X je středně velká, kdy p raménka jsou výrazně menší než q raménka (submetacentrický). Chromozom Y je svou velikostí značně menší než chromozom X. Geneticky shodné oblasti gonozomů se nazývají pseudoautozomální oblast, tzv. PAR. Právě v této oblasti během profáze prvního meiotického dělení dochází k párování mezi chromozomy X a Y. Může zde nastat i crossing-over (Kočárek, 2008).

4 Chromozomální aberace

Některé vrozené vývojové vady na chromozomální úrovni nazýváme chromozomální aberace, ty jsou podmíněny změnami počtu nebo struktury chromozomů. Chromozomální aberace se dělí do dvou skupin, a to numerické a strukturální aberace. Numerické aberace představují změny v počtu přítomných chromozomů, z nichž k nejběžnějším patří tzv. aneuploidie. Takto můžeme nazvat monozomii, kdy je přítomen pouze jeden chromozom z páru, nebo naopak trizomii, kdy jeden chromozom přebývá (Tarantino, 2022).

5 Mozaicismus

Mozaicismus můžeme popsat jako stav, kdy má člověk ve svém těle dvě nebo více geneticky odlišných sad buněk. Poměr abnormálních buněk a zdravých buněk může být různý. Pokud ale počet abnormálních buněk převyšuje počet zdravých, vede to k onemocnění. Toto onemocnění může být od buněčné úrovně až k postižení tkání např. kůže, mozku, nebo jiných orgánů (Gajecka, 2016).

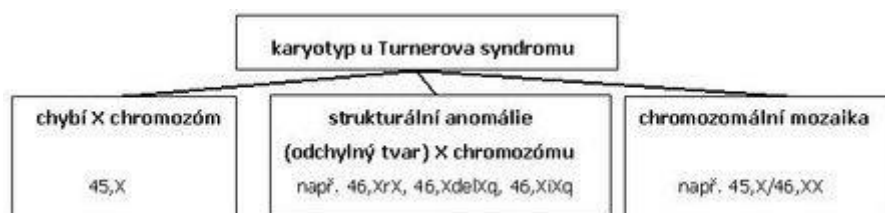
Mozaicismus můžeme rozdělit do dvou skupin, a to na zárodečný mozaicismus a somatický mozaicismus. Jak je zřejmé z názvů, somatická mozaika označuje přítomnost geneticky odlišných skupin buněk v somatických tkáních a zárodečná mozaika postihuje zárodečné linie. V důsledku mozaicismu, který nastane během vývoje se mozaikou mohou stát jak somatické, tak i zárodečné linie. Jedinec by v tomto případě mohl přenést mozaikový genotyp na své potomstvo. Naopak spouštěče mozaicismu, které se objeví v průběhu života můžou ovlivnit buď somatické buňky, nebo buňky zárodeční. V případě somatického mozaicismu je hlavním faktorem pro fenotypový účinek rozsah populace mozaikových buněk, potomstvu by však nehrozilo žádné předání mozaikového genotypu. Na druhou stranu, zárodečný mozaicismus neovlivňuje jedince, ale ohrožuje další generaci (Chial, 2008).

Odlišné buněčné linie musí však pocházet z jedné a té samé zygoty, protože při jejich původu ze dvou zygot, nebo od dvou odlišných jedinců (dvojčat) jde o tzv. chiméry (Sršeň a Sršňová, 2005).

Mozaiky vznikají po oplození vajíčka spermií a následném vytvoření zygoty. Při mitotickém dělení blastomer, buňky tvoří přesnou kopii vlastní DNA, která je poté rozdělena do dceřiných buněk. V tomto kroku může dojít k chybě, jako je například nerovnoměrné rozložení DNA, nebo vznik špatné kopie DNA. Tato abnormální buňka může v některých případech zemřít, nicméně pokud přežije vznikne mozaika. Vysoká úroveň mozaicismu je pravděpodobná, pokud chyba nastane v raném stádiu vývoje. Pokud chyba vznikne později, procento zastoupení mozaicismu buněk bude menší (Snustad a Simmons, Relichová, 2009). Změny počtu a struktury chromozomů v buněčné populaci vedou k určitým syndromům. Slučitelné se životem jsou pouze tři formy autozomální trizomie, a to trizomie 21 – Downův syndrom, trizomie 13 (Patauův syndrom) a trizomie 18 (Edwardsův syndrom) (Chial, 2008).

5.1 Turnerův syndrom

Turnerův syndrom je spojen hned se třemi chromozomálními změnami. První případ je, kdy vzniká karyotyp se 45 chromozomy. To je způsobeno ztrátou jednoho chromozomu při splynutí vajíčka a spermie, nebo pokud vajíčko a spermie přinese jen jeden chromozom. Karyotyp tohoto člověka bude 45, X, protože zde chybí jeden chromozom X. V dalším případě dochází ke strukturální anomálii, to znamená, že dívka sice má 46 chromozomů, ale jeden pohlavní chromozom není úplný. Posledním typem spojeným s Turnerovým syndromem je chromozomální mozaicismus. V tomto případě se jedná o směs dvou a více různých sestav chromozomů. V bodě, kdy spermie splynula s vajíčkem byla sestava chromozomů správná, nicméně v průběhu dalšího buněčného dělení se jeden chromozom X, nebo jeho část ztratila. Část buněk tedy má karyotyp 46, XX a další část karyotyp 45, X (Lebl a Zapletalová, 2012).



Obrázek 1: Odlišné karyotypy u pacientek s Turnerovým syndromem

Zdroj: Lebl a Zapletalová, 2012

Fenotypové projevy toho syndromu zahrnují malou výšku, neobvyklý tvar uší a krku, široký hrudník. Až 50 % pacientek s Turnerovým syndromem má vrozené srdeční vady, které mohou zapříčinit předčasnou smrt. Určité riziko zde tvoří i vrozený lymfedém, malformace ledvin, osteoporóza, obezita nebo diabetes. Pacientky trpí nedoslýchavostí a strabismem. Inteligence je normální, ale mohou se objevit problémy s neverbálními, sociálními dovednostmi. Porušený vývoj ovarií se může vyskytovat převážně u pacientek s karyotypem 45, X. Pacientky se strukturálními aberacemi a mozaikou mají postižení ovarií jen malé, nebo zcela nevyskytující se. (Pinsker, 2012).

5.2 Klinefelterův syndrom

Klinefelterův syndrom je nejčastěji se vyskytující chromozomální aberací u mužů. Muži s tímto syndromem mají o jedno X navíc, které zdědí od jednoho z rodičů (Groth et al., 2013). Definice karyotypu klasické formy Klinefelterova syndromu je 47, XXY a vyplývá z aneuploidie pohlavních chromozomů. Tento typ syndromu se vyskytuje v 80–90 %

případů. 10- 20 % tvoří aneuploidie vyššího stupně (např. 48, XXXY nebo 48XXYY), strukturně abnormální X chromozom, nebo mozaiky (např. 47, XXY/46,XY). Fenotyp pacientů s tímto syndromem je velmi variabilní, to způsobuje, že u určitého procenta mužů není celý život tento syndrom diagnostikován (Bonomi et al., 2017).

Mezi hlavní fenotypové znaky u pacientů s tímto syndromem patří vysoká postava, gynekomastie neboli zvětšení mléčných žláz v pozdní pubertě, široké boky a malá varlata. Ve většině případů jsou pacienti neplodní, trpí azoospermii (nepřítomnost spermií v ejakulátu) a mají sníženou hladinu testosteronu. Jsou náchylnější k obezitě, trombóze a kardiovaskulárním onemocněním. Klinefelterův syndrom má také vliv na verbální komunikaci (Kanakakis a Nieschlag, 2018).

5.3 Syndrom XYY (supermuž)

Syndrom XYY je chromozomální aberace charakterizována dalším chromozomem. Tento syndrom se vyskytuje jen u mužského karyotypu. Fenotypové projevy jsou vysoká postava, zvětšený obvod hlavy, dále porucha řeči a motorických schopností. Je zde veliký předpoklad ke zvýšenému riziku poruch autistického spektra (Bryant et al., 2012).

5.4 Syndrom XXX (superžena)

Toto genetické postižení se vyznačuje trizomií chromozomu X (47, XXX), postihuje ženský karyotyp a může mít různé stupně fenotypového projevu. Novorozenci nemají typický vzhled. Diagnostika tedy probíhá prenatálním testováním, nebo postnatálním diagnostickým hodnocením. Pro tento syndrom je typický vysoký vzrůst, klinodaktylie (malformace prstů, při které střední článek má klínový tvar a koncový článek je vybočen ke straně) a poruchy vaječníků. Mentální stav pacientek s tímto syndromem je srovnatelný se zdravým jedincem, nicméně může se zde objevit porucha řeči a motorických schopností (Wigby et al., 2016).

6 Fluorescenční mikroskopie

6.1 Fluorescence

Využití fluorescence v biologických vědách za posledních 20 let výrazně stoupl. Hlavně v biochemických a biofyzikálních oborech je na fluorescenční spektroskopie pohlíženo jako na důležitý výzkumný nástroj. Fluorescence se v dnešní době používá v lékařské diagnostice, průtokové cytometrii, forenzní a genetické analýze, sekvenování DNA a v dalších metodách klinické praxe. Fluorescence je dále aplikována při buněčném a molekulárním zobrazování (Lakowicz, 2006).

Při přechodu z metastabilního stavu do základního, vzniká elektromagnetické záření, které je označováno jako luminiscence. Pokud metastabilní stav trvá krátký časový úsek, nazýváme ho fluorescence, trvá-li však delší dobu mluvíme o fosforescenci. V plynné fázi jsou emisní spektra atomů čárová, a to v důsledku uvolnění pouze určitých kvant energie. U molekul nastává situace složitější. Energetické hladiny elektronů se vyznačují pásovým charakterem, a tomu odpovídají i pásová emisní spektra (Hrazdira a Mornstein, 2001).

Mezi hlavní výhody fluorescence patří vynikající citlivost, dobrá specifita a velký lineární rozsah. Fluoremetrické metody mohou detekovat velmi nízké koncentrace látek. To je způsobeno tím, že je emitované záření měřeno přímo a je tedy možná kontrola intenzity excitační zářivé energie (Guilbault, 2020).

Fluorescence byla poprvé pozorována u minerálu fluoridu neboli kazivce (CaF_2), podle kterého je tedy tento jev pojmenován. U anorganických sloučenin je tento typ fotoluminiscenčního záření pozorován jen výjimečně, a to např. u solí vzácných zemin. U organických sloučenin je fluorescence pozorována častěji, zejména u sloučenin obsahující aromatické cykly. Každá látka má charakteristické dva typy spekter, a to excitační a emisní spektrum. Principem excitačního spektra je zachycení relativní účinnosti různých vlnových délek excitujícího záření. Intenzita fluorescence je tedy závislá na vlnové délce excitujícího záření, kdy měření probíhá při konstantní vlnové délce excitačního záření. Rezonanční fluorescence nastává v okamžiku, kdy molekula vyzáří všechnu absorbovanou energii. Fluorescence má v tomto případě stejnou vlnovou délku jako absorbované záření. Toto můžeme detekovat převážně u nejjednodušších

dvouatomových molekul v plynné fázi. V případě složitějších molekul dochází také k nezářivým deaktivacím, které jsou spojeny s vnitřní, nebo vnější konverzí. Tento proces se děje většinou v kapalných roztocích. Vibrační deaktivace je nejběžnějším typem vnitřní konverze, během tohoto děje přechází molekula do nejnižší vibrační hladiny daného elektronového stavu. V důsledku srážek excitovaných molekul a molekul roztoku je vyvolaná vnější konverze, při které dochází k předání energie mezi molekulami. Pokud dojde k silnému ochlazení roztoku, vnější konverze bude omezena v účinnost zářivé deexcitace. Nezářivá deexcitace nastává, pokud má emitované záření větší vlnovou délku, než je vlnová délka excitačního záření. Tento princip je využíván ve fluorescenční mikroskopii (Kočárek et al., 2010).

6.2 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskop se od běžného světelného mikroskopu odlišuje osvětlením. Světelným zdrojem pro tento typ mikroskopování může být laser, rtuťová výbojka, nebo xenonová oblouková lampa. Další rozdíl je v tom, že fluorescenční mikroskop obsahuje excitační a emisní filtry. Excitaci vzorku, resp. jeho specifické barvivo propouští pouze excitační filtr. Před vstupem do detektoru musí světlo emitované vzorem nejprve projít emisním filtrem. Emisní filtr je propustný pouze pro světlo se specifickou vlnovou délkou, jako je světlo vyzařované vzorkem (Ockenga, 2021).

Tento typ mikroskopování se v cytogenetice používá při fluorescenčním barvení chromozomů, nebo fluorescenční *in situ* hybridizaci (Kočárek et al., 2010).

6.3 Fluorescenční barviva

Fluorescenční barviva jsou chemické sloučeniny. Tyto sloučeniny jsou schopny reagovat s nukleofilními skupinami (NH_2 , OH , SH) díky své reaktivní skupině. Jsou rozdělena do dvou skupin, a to na vnitřní, a vnější. Přítomností vnitřních fluofořů je podmíněná vnitřní fluorescence. Mezi tyto fluofory patří protein redukované formy NADH a NADPH, vitamin A, hemoglobin, chlorofyl, cytochromy, peroxidáza či myoglobin. Fluorescenční záření proteinů se pohybuje v UV oblasti spektra a jejich hlavními fluofory jsou aromatické aminokyseliny (tryptofan, fenylalanin, tyrosin). Absorpční i emisní pás těchto fluofořů leží mezi 240 a 300 nm. Viditelná oblast spektra (modrá, žlutá či červená) je typická pro ostatní uvedené látky. Vnější fluofory jsou mnohem častěji využívány než

vnitřní. Po přidání do vzorku se vytvoří určité vazby a podle nich jsou fluofory děleny na fluorescenční značky a fluorescenční sondy. Fluorescenční značky jsou nejčastěji využívány k fluorescenčnímu značení proteinů. K těmto proteinům se vážou kovalentní vazbou (Kočárek et al., 2010).

6.4 Hybridizace in situ

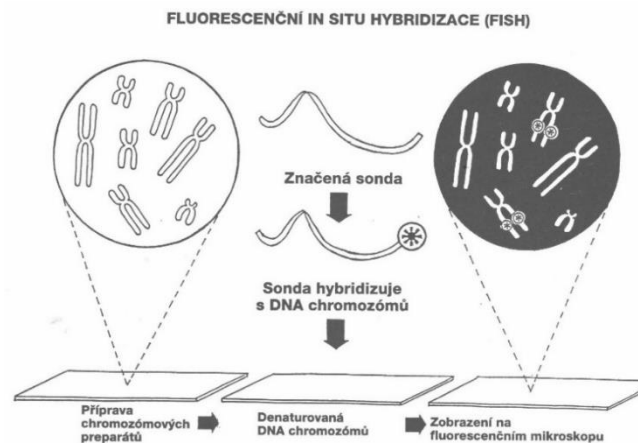
Hybridizace *in situ* je velmi důležitá metoda při stanovení specifických sekvencí nukleových kyselin v cytologických preparátech chromozomů, buněk a tkání, a také napomáhá určit jejich prostorovou lokalizaci, a to s vysokou přesností. Tato metoda je prospěšná pro detekci např. metastázních genů, nebo pro zjištění specifických molekul RNA, které se nacházejí uvnitř tkání (Šmarda, 2005).

7 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Fluorescenční *in situ* hybridizace neboli FISH je technika, která se používá k mnohým vyšetřením. Umožňuje specificky lokalizovat sekvence nukleových kyselin a přítomných aberací na molekulární úrovni. Metoda FISH je aplikována na různých preparátech např. buňky RNA, nebo DNA získaná z mitotických buněk za pomoci metafázových chromozomových preparátů. FISH napomáhá při studiu např. replikace DNA, zpracování RNA, genové exprese a odhalování chromozomálních aberací (Tsuchiya, 2011).

FISH spadá do skupiny hybridizačních metod. Principem této metody je hybridizace s uměle vyrobenou sondou (komplementární úsek nukleové kyseliny), označenou pro další a finální krok, který se nazývá detekce. Tímto postupem můžeme prokázat přítomnost DNA neboli deoxyribonukleové kyseliny, nebo RNA (ribonukleové kyseliny). Název metody se skládá ze dvou částí. *In situ* označuje hybridizaci, která probíhá přímo v místě, kde se nachází hledaná struktura sondy, označené fluorescenčními barvivy představující fluorescenční přívlastek (Kočárek, 2007).

K cílenému oddělení vláken DNA a zániku vodíkových můstků dochází při zahřívání dvoušroubovice vysokou teplotou okolo 100 °C. Může nastat jen částečná denaturace, a to pokud není DNA vystavena tak vysoké teplotě nebo jsou přítomny labilizující činidla (alkalie, formamid). Za odpovídající teploty, vlhkosti a molaritě mohou jednotlivá vlákna vytvořit zpětně dvoušroubovici DNA, to nastává jen v případě, pokud se vlákna setkají se svými komplementárními partnery. Průkaz pomocí fluorescenční enzymatickou reakce můžeme aplikovat v případě přítomnosti komplementárního vlákna DNA označeného radioaktivní látkou, nebo neradioaktivně (biotin, digoxigenin). Princip metody je znázorněn na obr. č. 2 (Michalová, 1999).



Obrázek 2: Princip metody fluorescenční in situ hybridizace

Zdroj: Michalová, 1999

7.1 Sondy FISH

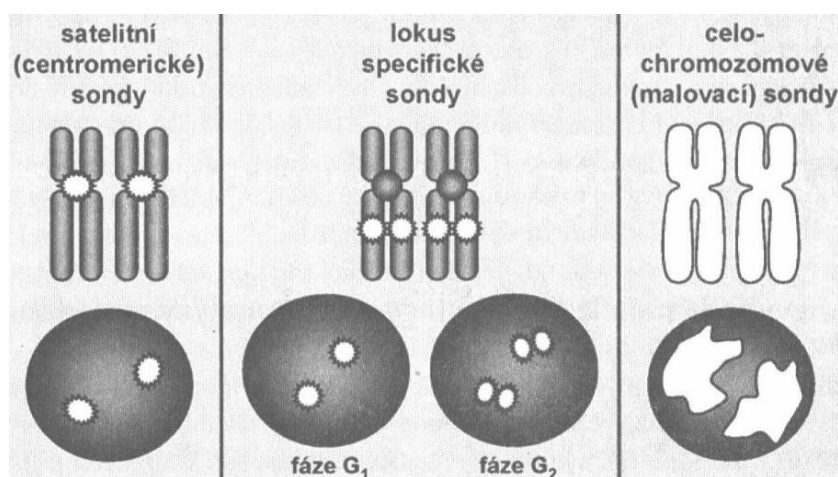
Pro metodu hybridizace byly z počátku sondy označovány radioaktivně a jejich detekce probíhala autoradiograficky. Nicméně v dnešní době jsou sondy značeny chemicky, detekce těchto sond je prováděna fluorescenčně označenou protilátkou, nebo se aplikují fluorescenčně barvené nukleotidy, které přímo značí danou sondu (Šmarda, 2005).

Sondy pro fluorescenční *in situ* hybridizaci dělíme do tří skupin podle lokalizace cílových míst a nazýváme je satelitní, lokus specifický a malovací. Satelitní sondy se vážou na satelitní sekvence DNA, které jsou lokalizovány v oblasti centromer a telomer a aplikují se při vyšetření aneuploidii, nebo k určení chromozomů neznámého původu. Lokus specifické sondy se připojují na jedinečné sekvence DNA. Jejich úkolem je zjistit polohu jednotlivých genů či specifických úseků DNA. Malovací sondy se používají pro označení celého chromozomu, nebo dlouhých případně krátkých ramének. To je zapříčiněno jejich složením, které obsahuje určité množství chromozomových sekvencí. Díky malovacím sondám mohou být odhaleny strukturní i početní odchylky. Metody, které využívají již zmíněné malovací sondy, se nazývají mnohobarevná fluorescence, nebo M-FISH a mnohobarevné pruhování neboli M-BAND (Březinová et al., 2017).

Základem fluorescenční *in situ* hybridizace je použití označené jednořetězové hybridizační sondy. Tuto sondu představuje krátký úsek DNA. Po denaturaci je sonda schopna vázat se k finální sekvenci DNA buněk, které se nacházejí na mikroskopickém skle. To je možné díky komplementaritě bází. Dělení těchto sond je závislé na místě

hybridizace, podle toho je rozdělujeme na satelitní (centromerické) sondy, lokus specifické sondy a celochromozomové (malovací) sondy (Pradhan, 2022).

Na obrázku č 3. je vyobrazené obarvené místo na chromozomu



Obrázek 3: Typy sond využívané k molekulárně cytogenetickému vyšetření

Zdroj: Kočárek, 2007

7.2 Využití metody FISH

V této kapitole jsou popsány některé příklady využití metody FISH. První příklad je při potřebě rychlé prenatalní a preimplantační diagnostice, kdy se stanovuje chromozomové konstituce interfázních buněk. Tohoto postupu se využívá i při chromozomovém vyšetření nádorů. V některých případech diagnostiky mozaiek nestačí cytogenetická analýza, proto je využívána metoda FISH, která dokáže identifikovat aneuploidní buňky i v případě nízké frekvenci. Cytogenetická analýza nestačí, protože neposkytuje analýzu velkého počtu buněk. Fluorescenční *in situ* hybridizace dále umožňuje zjištění původu derivovaných chromozomů a těžko určitelných translokací. Další význam spočívá v diagnostice mikrolečních syndromů, kdy se vyšetřují chromozomové aberace. Při nádorovém onemocněním se touto metodou sleduje úspěšnost léčby (Kočárek, 2007).

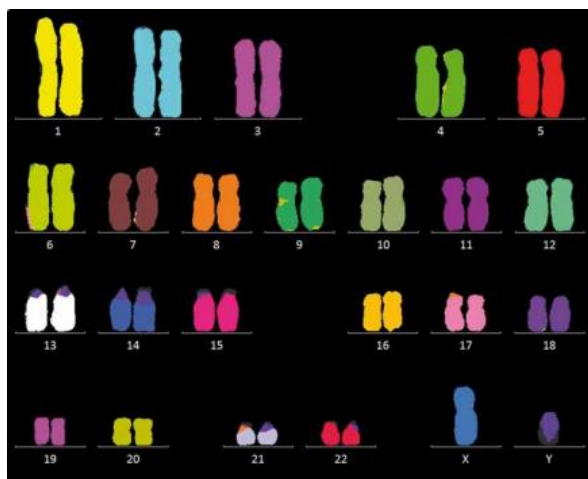
7.3 Modifikace FISH

Klasická metoda FISH je založenou na specifických sondách, to znamená velmi omezenou specificitu. Sondy proto hybridizují jen na určitý úsek chromozomu, a tím pádem lze určit, nebo vyvrátit pouze konkrétní aberaci, postihující jeden chromozom. V některých případech dvojici, nebo trojici chromozomů. Hybridizace *in situ* se proto v 90. letech minulého století dál rozvinula na další molekulárně cytogenetické metody, které

poskytují komplexnější identifikaci všech chromozomů a jejich případných aberací. Princip těchto metod je založen na analýze místa a identifikace chromozomálních změn, a to bez zacílení na konkrétní lokus, nebo chromozom. Mezi tyto nejvýznamnější metody patří mnohobarevná FISH neboli M-FISH (Multicolor FISH), spektrální karyotypizace neboli SKY (spectral karyotyping) a komparativní genomová hybridizace neboli CGH (comparative genomic hybridization) (Kočárek, 2007).

7.3.1 Mnohobarevná FISH (M-FISH)

Při mnohobarevné FISH metodě se jedná o hybridizaci s konkrétními chromozomy. Směs DNA sond se skládá z velkého počtu fluorescenčně označených částí jednotlivého chromozomu. Pro detekci se využívá set úzkopásmových filtrů. Po proběhnutí hybridizace je označen celý chromozom, a tím pádem fluoreskuje. Ke chromozomům jsou podle intenzity signálů, které jsou počítačově analyzovány, přiřazeny klasifikační barvy. Touto metodou lze popsat celý karyotyp, ale jen v případě, pokud se chromozom-specifické sondy označí více jak jedním fluoroforem. Normální buňka je jednobarevná, zatímco nádorová buňka je složena z více barev, tím jde snadno odhalit chromozomální aberace. Tato metoda je velmi přínosná v klinické i nádorové cytogenetice. Jednou z nevýhod je nutnost kultivace buněk a neschopnost zjistit intrachromozomové aberace (Petrovová a Svoboda, 2019).

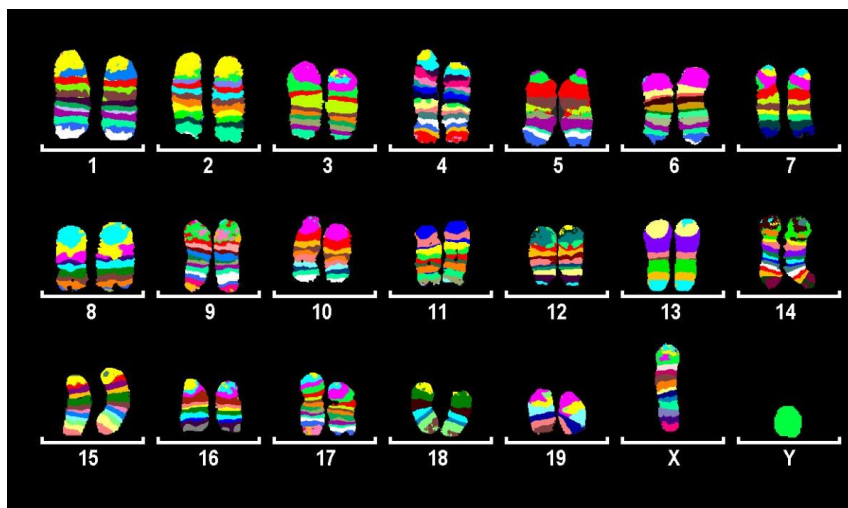


Obrázek 4: Mužský karyotyp zobrazený metodou M-FISH

Zdroj: Petrovová, 2019

7.3.2 Mnohobarevné pruhování (M-BAND)

Mnohobarevné pruhování neboli M-BAND je principem velmi podobné M-FISH. Rozdíl nastává v barvení chromozomu, kdy při této metodě identifikujeme pomocí různě značených sond pouze jednotlivé fragmenty jednoho vybraného chromozomu, nikoliv celý chromozom. Celý chromozom je tedy vyobrazený odlišně značenými sondami, které představují různé barevné pruhy (Kočárek, 2007).



Obrázek 5: Mužský karyotyp zobrazený metodou M-BAND

Zdroj: Kosyakova et al., 2013

7.3.3 Komparativní genomová hybridizace (CGH)

Komparativní genomová hybridizace je aplikovaná při odhalování rozdílného množství genetického materiálu mezi různými genomy. K této hybridizaci není potřeba přítomnost dělících se buněk, vyšetřovaným materiálem je izolovaná DNA. Princip CGH spočívá v současné hybridizaci vyšetřované a kontrolní DNA. Poměr mezi těmito DNA je 1:1. Výsledná změna poměru signálů je důsledek zmnožení, nebo ztráty DNA. Nejčastěji se tato metoda používá při vyšetření nádorových buněk (Otová a Mihalová, 2012).

7.3.4 FISH na vlákně DNA (fiber – FISH)

Princip této metody je na rozhraní mezi molekulárně cytogenetickými, a molekulárně biologickými metodami. Při této metodě se hybridizuje přímo na vlákně DNA, tím je docílená zvýšená citlivost vyšetření. Materiálem pro hybridizaci je přímo izolovaná DNA, nikoliv nativní chromozom, nebo interfazní jádra jako při klasické hybridizaci *in situ*. Díky přímé detekci genomových úseků na vlákně DNA si však zachovává vlastnosti klasické FISH (Kočárek, 2007).

7.3.5 *Spektrální karyotypizace (SKY)*

Spektrální karyotypizace je obdoba multicolor FISH. Rozdíl je ve snímání signálu. U M-FISH je signál detekován postupně u jednotlivých fluorochromů, nicméně při metodě SKY je možné identifikovat celý chromozom a analyzovat ho pomocí interferonu. Při mikroskopování se proto nemusí měnit jednotlivé filtry. Barevný signál je určen kombinací malovacích sond. Za pomoci počítače jsou pak signály vyhodnoceny a poskytnuty obrazy barevně odlišených chromozomů (Imataka a Arisaka, 2012).

8 Cíl práce a výzkumné otázky

8.1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo:

- Zavedení a optimalizace metody FISH v laboratoři ZSF.
- Vyšetření gonozomálních mozaiek z různých vzorků.

8.2 Výzkumné otázky

- Jaké je zastoupení gonozomálních mozaiek u mladistvých (15-25 let)?
- Jaký je rozdíl ve výskytu gonozomálních mozaiek ve vzorcích z krve a bukalních stěrů?

9 Metodika

Praktická část bakalářské práce byla provedena v laboratoři Zdravotně sociální fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, pod vedením Ing. Tomáše Nixe Ph.D. Vzorky pro tuto bakalářskou práci byly odebrány od 20 osob. Odebíraný materiál byl bukalní stěr (sliny) a kapilární krev.

9.1 Odběr vzorku

Pracovní pomůcky

- Termostat (firma Biotech – POP30-U)
- Jehla (firma: Haemolance, NORMAL FLOW)
- Výtěrový tampon
- Podložní skla SuperFrost (firma Thermo Scientific)
- Buničina
- Náplast
- Rukavice

Před vykonáním praktické části byly odebrány vzorky od vybraných jedinců. Vzorky byly následně anonymizovány. Před samotným odběrem byli všichni probandi obeznámeni o pravidlech správného odběru. Od jedné osoby proběhl vždy odběr dvou vzorků, a to bukalních stěrů a kapilární krve. Odběr bukalních stěrů byl vykonán pomocí výtěrového tamponu. Proband by neměl před odběrem minimálně hodinu pít ani jíst. Výtěr byl prováděn po dobu 3 minut z vnitřní strany tváře a z povrchu dásní. Během výtěru byl tampon otáčen pro docílení zachycení co nejvíce požadovaného vzorku. Poté byl vzorek nanesen na podložní sklo. Odběr kapilární krve probíhal za pomoci odběrové jehly. Před samotným vpichem byla provedena dezinfekce oblasti odběru, tzn. boční strana bříška 3. nebo 4. prstu. Po vpichu byla první kapka setřena malým kusem buničiny, poté se prst umístil nad podložní sklo, tak aby na sklo dopadla kapka krve. Při odběru by se neměla krev pod tlakem vytlačovat, protože by mohlo dojít ke kontaminaci krve tkáňovým mokem. Následně byla kapka krve na podložní sklo rozetřena po celé jeho ploše, pomocí jiného podložního skla. Oblast vpichu byla vydezinfikována a otřena buničinou, případně byla nalepena náplast. Podložní skla se vzorky byla řádně popsána,

aby nedošlo k záměně vzorků. Vzorky byly vloženy do termostatu, který byl nastaven na 37 °C. Po zaschnutí vzorku byla sklíčka vyndána z termostatu.

9.2 Příprava vzorku

Pomůcky

- Termostat (firma: biotech – OP30-U)
- Kyvety
- Odměrné válce
- Mikropipety
- Buničina
- Vlhká komůrka – nádoba s víkem, houba, ubrousek
- Krycí skla (firma: Menzel Gläser)
- Pinzeta
- Fixogum (firma:Marabu)
- Vortex mixer (firma: Labnet International, Inc.)
- Centrifuga (firma: Labnet International, Inc.)
- Ochranné brýle
- Rukavice
- Plášť

Reagencie

- Methanol
- Ethanol – 96 %,80 %,70%
- Pepsin
- 2xSSC, 0,5xSSC
- Fluorescenční sonda (firma: Leica biosystems)
- Hybridizační pufr
- Tween 20
- Fluorescenční barvivo DAPI (firma: Leica biosystems)

Vzorky se před samotným mikroskopováním musí určitými kroky upravit tak, aby byl vzorek přizpůsoben k vyšetření.

Termostaty byly nastaveny na teploty 37 °C a 80 °C. Sklíčka se zaschlými vzorky byla vyndána a vložena na 5 minut do methanolu, díky kterému byl vzorek zafixován. Sklíčka byla vyndána z methanolu a po řádném uschnutí vložena do 96 % ethanolu a dehydratována po dobu 5 minut. Mezitím byl připraven roztok pepsinu – čistá lahev byla řádně popsána. Do 250 ml odměrného válce bylo napipetováno 215 µl 37 % HCl, tento pracovní krok probíhal v digestoři s ochrannými pomůckami (brýle, rukavice, plášť). Válec byl doplněn destilovanou vodou po rysku. Do kyvety bylo nalito pomocí odměrného válce 100 ml HCl. Do roztoku HCl bylo pomocí pipety přidáno 10 µl 100 % pepsinu. Zásobní roztok pepsinu se uchovává v lednici. Do připraveného roztoku pepsinu byla vložena sklíčka, v tomto kroku došlo k rozrušení bílkovinných struktur. Po 5 minutách byla sklíčka přendána do kyvety s roztokem 2xSSC na stejně dlouhý čas, jako v předchozích krocích. Roztok SSC napomohl odmyt nežádoucí struktury ve vzorku. Poté byl proveden pomocí stříčky oplach destilovanou vodou. Sklíčka se nechala uschnout na buničině. Poté byly vzorky vloženy do ethanolové řady – 70% ethanol, 80% ethanol a 96% ethanol po dobu 2 minut v tomto kroku došlo k postupné dehydrataci. Sondy byly vytemperovány v termostatu, který byl nastaven na 37 °C. Na připravené krycí sklo bylo napipetováno 10 µl sondy. Podložní sklo bylo přiklopeno na krycí sklo. Pomocí buničiny bylo na skla zatlačeno, aby sonda byla pokryta pod celým krycím sklem. Okolo celého krycího skla bylo nanášeno Fixogum. Tento krok byl proveden proto, aby se vzorek se sondami neodpařil poté, co byl vložen do termostatu na 80 °C po dobu 5 minut. Mezitím byla připravena vlhká komůrka – do uzavíratelné krabičky byly vloženy mokré ubrousky a mokrá houba. Sklíčka byla vložena do vlhké komůrky a umístěna do termostatu, který byl nastaven na 37 °C. Komůrka byla nechána v termostatu přes noc. Vlhká komůrka se vzorky byla vyndána z termostatu. Druhý den je nutné odmyt nenavázané sondy, a to roztokem 1 % Tweenu a 0,5x SSC. Tween byl vytemperován v termostatu na 37°C. Do 100 ml kyvety bylo napipetováno 1 ml Tween, 25ml 2xSSC a pomocí odměrného válce přidáno 75ml destilované vody. Kyveta s roztokem byla dána do termostatu, který byl nastaven na 72°C. Sklíčka byla vyndána z vlhké komůrky a za pomoci pinzety bylo opatrně strhnuto zaschlé Fixogum a krycí sklo. Podložní skla se vzorky byla vložena do odmyvacího roztoku 1 % Tween, 0,5x SCC. Kyveta se vzorky byla umístěna do termostatu po dobu 5 minut. Teplota v termostatu byla 72°C. Kyveta byla vyndána z termostatu. Podložní skla byla omyta za pomoci stříčky destilovanou vodou. Po řádném uschnutí byly vzorky vloženy do ethanolové řady (70% ethanol, 85% ethanol, 96% ethanol) po dobu 1 minuty. Podložní skla byla přesunuta na buničinu, kde řádně

oschla. Fluorescenční barvivo DAPI bylo zvortexováno na přístroji Vortex a dále stočeno na centrifuze. Připravené krycí sklo bylo za pomoci pipety naneseo 5 μ l barviva DAPI. Podložní sklo se vzorkem bylo přiloženo na krycí sklo. Skla byla vložena na tmavé místo na 10 minut.

9.3 Fluorescenční mikroskopování

Pracovní pomůcky

- Mikroskop (firma: Nikon eclipse 50i)
- Imerzní olej

Poté bylo zahájeno mikroskopování. Nejprve byl vzorek mikroskopován na nejmenší zvětšení (20x), dále při zaostření signálu byl nanesen imerzní olej a zvětšení bylo přidáno (40x a 100x). Přes červené a zelené světlo byly sledovány signály na centromerách.

Sondy



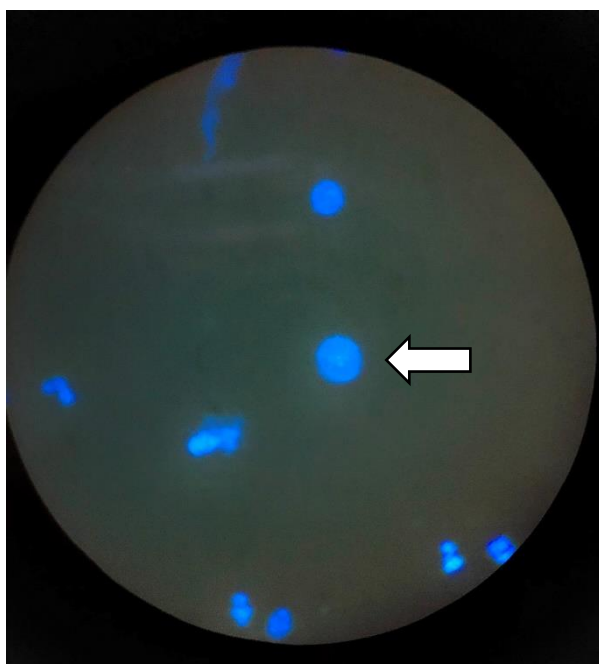
Obrázek 6: Sondy XY

Zdroj: (Leicabiosystems, 2015)

Satelitní sondy XY jsou tvořeny značenou repetitivní DNA, která se nachází v chromatinu chromozomu X a Y, hybridizují v centromerických oblastech. Změna počtu chromozomů se projevuje změnou počtu fluorescenčních signálů. Zdravá XX buňka ženy má dva zelené signály, mužská buňka XY má jeden červený a jeden zelený signál.

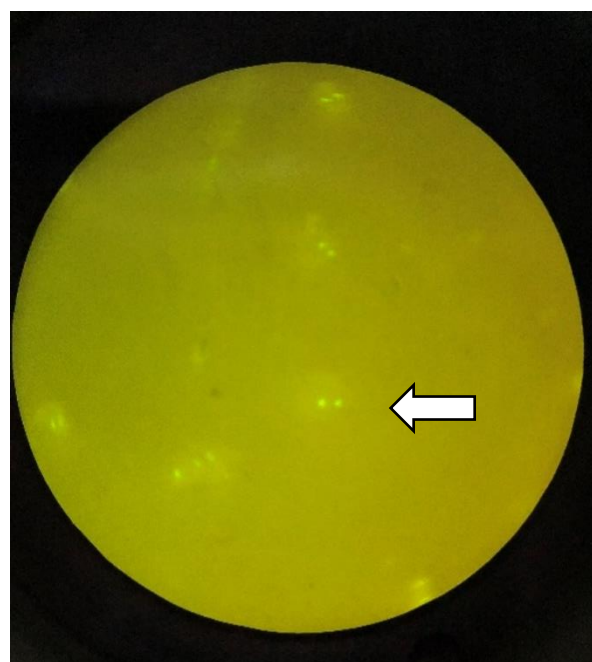
Většina fluorescenčních mikroskopů umožňuje propojení mikroskopu, kamery (fotoaparátu) a počítače, díky tomuto vznikají fotky. Nedílnou součástí provedení fotografií je program, který umožňuje fotky propojit a dát jim finální vzhled. Tento program v době výkonu mé praktické části nebyl aktualizován, důsledek jeho zastaralé verze byla neschopnost tyto fotky pořídit. Pro demonstraci mé praktické části byly pořízeny amatérské fotky vlastním zařízením.

Na prvních dvou obrázcích je buňka s ženským karyotypem, proto jsou zde sledovány dva zelené signály.



Obrázek 7: Buňka XX, UV světlo, DAPI

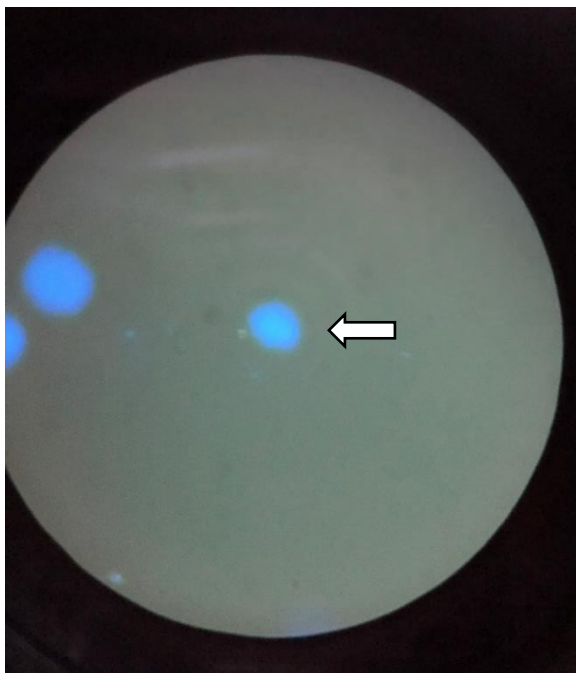
Zdroj: vlastní



Obrázek 8: Buňka XX, zelený filtr

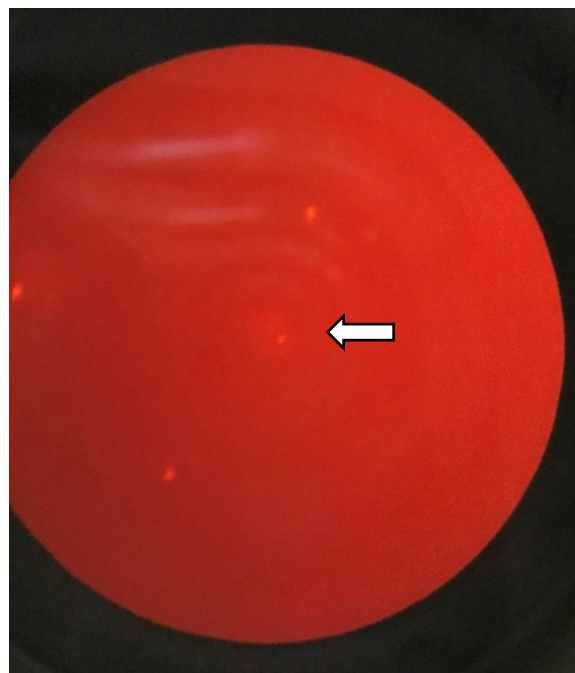
Zdroj: vlastní

Na těchto třech obrázcích je vidět mužská buňka (46,XY), zde svítí jeden červený signál a jeden zelený.



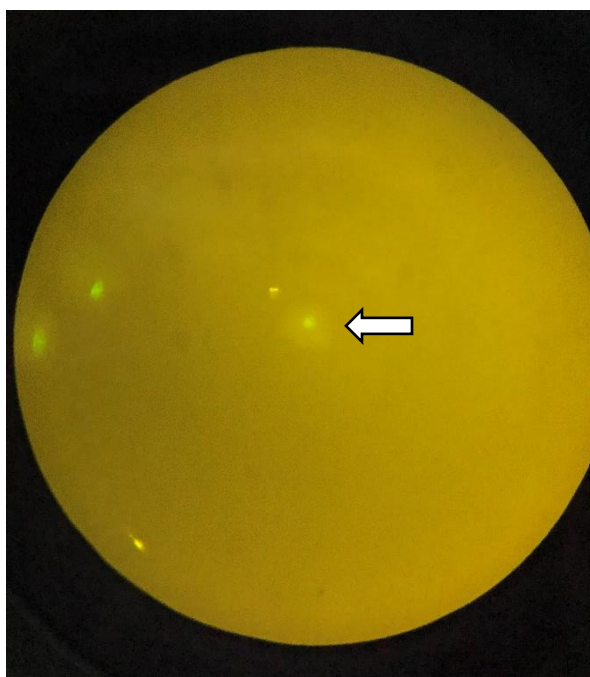
Obrázek 9: Buňka XY, UV světlo, DAPI

Zdroj: vlastní



Obrázek 10: Buňka XY, červený filtr

Zdroj: vlastní



Obrázek 11 Buňka XY, zelený filtr

Zdroj: vlastní

10 Výsledky

Do následujících dvaceti tabulek byly zaznamenány výsledky fluorescenčního mikroskopování. Vzorky byly odebrány třinácti ženám a sedmi mužům ve věku od 15 – 25ti let. Hodnoty hranic mozaicismu byly získány ústním sdělením vedoucího této bakalářské práce.

Incidence spojená s mozaicismem u Turnerova syndromu je 2,81 na 10 000 živě narozených. U syndrom 47, XXX (superžena) to je 0,45 na 10 000 živě narozených; Klinefelterův syndrom představuje 1,20 na 10 000 živě narozených a syndrom 47, XYY (supermuž) 0,16 na 10 000 živě narozených (Gregor et al., 2009).

Tabulka 1: Proband č.1 - žena 18 let

Vzorek	Buňky XX	Buňky X0	Buňky XXX	Ostatní
Krev	49	1 (2 %)	0	0
Bukální stěr	30	0	0	0

Zdroj: vlastní

Jak udávají procenta mozaicismu, tento vzorek je v pořádku a nevyskytuje se zde mozaicismus. U vzorku krve je mozaicismus 2 procenta, to je však přípustná hodnota. Tato buňka mohla být špatně rozpoznána, nebo jen výjimka.

Tabulka 2: Proband č.2 - žena 22 let

Vzorek	Buňky XX	Buňky X0	Buňky XXX	Ostatní
Krev	50	0	0	0
Bukální stěr	30	0	0	0

Zdroj: vlastní

Zde je nulový výsledek mozaicismu, a to znamená, že u probanda neshledáváme žádné buňky s abnormálním počtem gonozomálních chromozomů.

Tabulka 3: Proband č.3 - muž 19 let

Vzorek	Buňky XY	Buňky X0, Y0	Buňky XXY, XYY...	Ostatní
Krev	50	0	0	0
Bukální stěr	29	1 (3,3 %)	0	0

Zdroj: vlastní

Tento vzorek je od muže, proto se vyšetřovaly chromozomy XY, a to tak, že X vytvářelo zelený signál a Y červený. Všechny nalezené buňky v krevním vzorku měly přesný počet signálů. V bukálním stěru se nacházela jedna buňka, kde byl detekován jen jeden signál.

Tabulka 4: Proband č.4 – žena 21 let

Vzorek	Buňky XX	Buňky X0	Buňky XXX	Ostatní
Krev	50	0	0	0
Bukální stěr	28	0	2 (6,7 %)	0

Zdroj: vlastní

Ve vzorku z bukálního stěru byly nalezeny 2 buňky, které neodpovídaly zdravé buňce po stránce gonozomálních chromozomů. Zde svítily 3 zelené signály, ačkoliv procento mozaicismu udává již hodnotu nad hranicí, a to 6,7 %. Mohlo se jednat o artefakt, protože v krvi nebyla nalezena žádná buňka s gonozomálním mozaicismem. Pro prokázání mozaicismu by se musela provést další šetření a počet vyšetřených buněk by musel být vyšší.

Tabulka 5: Proband č.5 – žena 16 let

Vzorek	Buňky XX	Buňky X0	Buňky XXX	Ostatní
Krev	49	1 (2 %)	0	0
Bukální stěr	29	1 (3,3 %)	0	0

Zdroj: vlastní

Ve vzorku krve u probanda č.5 se vyšetřilo 50 buněk z toho 1 měla monozomii chromozomu X. Procento mozaicismu však je v přípustných hodnotách. Ve vzorku bukálního stěru se prokázala také 1 monozomická buňka. Procento udává nad přípustnou hodnotou, nicméně pro potvrzení by bylo vhodné udělat další podrobnější vyšetření.

Tabulka 6: Proband č.6 – muž 19 let

Vzorek	Buňky XY	Buňky X0, Y0	Buňky XXY, XYY...	Ostatní
Krev	49	0	1 (2 %)	0
Bukální stěr	30	0	0	0

Zdroj: vlastní

Vzorek krve u probanda č.6 vykazoval 1 buňku s trizomií – zde svítil jeden zelený a dva červené signály. Všechny buňky ve vzorku bukálního stěru prokazovaly jeden zelený a jeden červený signál.

Tabulka 7: Proband č.7 – žena 25 let

Vzorek	Buňky XX	Buňky X0	Buňky XXX	Ostatní
Krev	48 + 50	2 (4 %) + 0 (0 %) = 2%	0	0
Bukální stěr	30	0	0	0

Zdroj: vlastní

U vzorku krve se vyšetřilo 50 buněk, z toho 2 vykazovaly mozaicismus. Procento tedy udává hodnotu 4. To znamená nad horní mez přípustné hodnoty. Ve vzorku byly viděny velmi slabé signály, proto se provedla opětovná hybridizace. Druhé mikroskopování nepotvrdilo žádné buňky s neobvyklým počtem signálů. Znamená to tedy, že při prvním mikroskopování mohly být viděny slabé signály a mohlo dojít k nepřesnému určení monozomie u gonozomálních chromozomů.

Tabulka 8: Proband č.8 – žena 21 let

Vzorek	Buňky XX	Buňky X0	Buňky XXX	Ostatní
Krev	47	0	3 (6,0 %)	0
Bukální stěr	30	0	0	0

Zdroj: vlastní

U tohoto vzorku byly zjištěny 3 buňky se třemi zelenými signály. Procento udává nad horní přípustnou mez. V tomto případě se jednalo o buňky s gonozomální trizomií. Jedinec však nevykazuje žádnou poruchu, která by byla spojena s gonozomálními chromozomy.

Tabulka 9: Proband č.9 – žena 22 let

Vzorek	Buňky XX	Buňky X0	Buňky XXX	Ostatní
Krev	50	0	0	0
Bukální stěr	28	0	0	2 (6,7 %)

Zdroj: vlastní

Ve vzorku krve nebyly nalezeny žádné buňky, které by neměly 2 zelené signály. Ve vzorku bukálního stěru však byly zpozorovány 2 buňky se 4 zelenými signály. V tomto případě není možné odlišit tetraploidní buňky od 2 navzájem překrývajících se buněk. Tato skutečnost by musela být ověřena jinou sondou. V případě tetraploidní buňky by se zde nacházely opět 4 signály, ovšem ve druhém případě by byly viděny pouze 2 signály.

Tabulka 10: Proband č.10 – muž 26 let

Vzorek	Buňky XY	Buňky X0, Y0	Buňky XXY, XYY...	Ostatní
Krev	50	0	0	0
Bukální stěr	15	0	0	0

Zdroj: vlastní

Vzorek bukálního stěru bylo velmi obtížné vyšetřit, protože se zde nacházelo velmi malé množství buněk, proto byla analýza provedena jen u 15 z nich. Ve vzorku krve bylo vyšetřeno 50 buněk. Nebyla zde nalezena ani jedna buňka s nezdravým karyotypem, tzn. všechny buňky vykazovaly jeden zelený a jeden červený signál.

Tabulka 11: Proband č.11 – žena 24 let

Vzorek	Buňky XX	Buňky X0	Buňky XXX	Ostatní
Krev	48	1 (2 %)	1 (2,0 %)	0
Bukální stěr	30	0	0	0

Zdroj: vlastní

U probanda č. 11 buňky ze vzorku bukálního stěru vykazovaly 2 zelené signály. Ve vzorku krve byly zjištěny 2 buňky, které neměly odpovídající zelené signály. Nacházela se zde buňka s 1 zeleným signálem a buňka se 3 zelenými signály. Nicméně procento mozaicismu nepřekročilo přípustnou hranici.

Tabulka 12: Proband č.12 – žena 23 let

Vzorek	Buňky XX	Buňky X0	Buňky XXX	Ostatní
Krev	50	0	0	0
Bukální stěr	29	1 (3,3 %)	0	0

Zdroj: vlastní

Ve vzorku krve nebyly nalezeny žádné buňky s neobvyklým počtem gonozomálních chromozomů. Ve vzorku bukálního stěru byla nalezena buňka s jedním zeleným signálem, to znamená, že se zde nacházel jen jeden pohlavní chromozom. Nicméně u příslušného počtu vyšetřených buněk nemůžeme s jistotou říct, že se jedná o karyotyp mozaiky, pokud by se toto tvrzení mělo potvrdit, musela by se udělat další vyšetření.

Tabulka 13: Proband č.13 – muž 19 let

Vzorek	Buňky XY	Buňky X0, Y0	Buňky XXY, XYY...	Ostatní
Krev	50	0	0	0
Bukální stěr	30	0	0	0

Zdroj: vlastní

Každá buňka v tomto vzorku měla dva světelné signály, to znamená, že počet gonozomálních chromozomů odpovídá po stránce mozaicismu zdravému jedinci.

Tabulka 14: Proband č.14 – žena 20 let

Vzorek	Buňky XX	Buňky X0	Buňky XXX	Ostatní
Krev	30	0	0	0
Bukální stěr	30	0	0	0

Zdroj: vlastní

Vyšetření tohoto vzorku bylo obtížné, protože obraz nebyl jasný. Nacházela se zde „mlhavá clona“. Mikroskopování proto nebylo snadné, tudíž se vyšetřil u obou vzorků stejný počet buněk, a to 30. Při hybridizaci tohoto vzorku byl použit roztok pepsinu z předešlého dne, díky jehož slabě kyselému prostředí mohla vzniknout kontaminace mikroorganismy. Pro přesnější výsledek by se měl znova provést odběr vzorků, opětovné zhotovení a mikroskopování. Nicméně ve vzorku nebyly nalezeny žádné buňky s mozaicismem.

Tabulka 15: Proband č.15 – žena 17 let

Vzorek	Buňky XX	Buňky X0	Buňky XXX	Ostatní
Krev	50	0	0	0
Bukální stěr	30	0	0	0

Zdroj: vlastní

Vzorky č. 15 byly zcela v pořádku. Mikroskopování vzorku krve ukázalo 50 buněk se 2 zelenými signály. Vzorek bukálního stěru také vykazoval 30 buněk se správnými signály. Proband číslo 15 tedy nevykazuje mozaicismus.

Tabulka 16: Proband č.16 - žena 19 let

Vzorek	Buňky XX	Buňky X0	Buňky XXX	Ostatní
Krev	49	0	1 (2 %)	0
Bukální stěr	30	0	0	0

Zdroj: vlastní

Vzorek krve u probanda č. 16 prokázal 1 mozaickou buňku, a to trizomii gonozomálních chromozomů. Nicméně jak již bylo zmíněno, procento mozaicismu je stále v toleranci.

Tabulka 17: Proband č.17 – muž 25 let

Vzorek	Buňky XY	Buňky X0, Y0	Buňky XXY, XYY...	Ostatní
Krev	45	2 (4 %)	3 (6 %)	0
Bukální stěr	30	0	0	0

Zdroj: vlastní

Vzorek krve vykazoval 2 buňky s jedním zeleným signálem a žádným červeným. Procento monozomie je 4 %. Ve stejném vzorku byly 3 buňky s více než 2 signály. Procento trizomie je 6 %. Obě tyto hodnoty jsou nad krajní mez. U tohoto vzorku by tedy mělo proběhnout další a podrobnější vyšetření a na základě toho mozaicismus potvrdit, nebo vyvrátit. Vzorek bukálního stěru neprokázal žádnou mozaickou buňku. U tohoto probanda je vysoká pravděpodobnost nízkofrekvenční gonozomální mozaiky.

Tabulka 18: Proband č.18 – muž 17 let

Vzorek	Buňky XX	Buňky X0, Y0	Buňky XXY, XYY...	Ostatní
Krev	50	0	0	0
Bukální stěr	30	0	0	0

Zdroj: vlastní

Vzorek krve ani bukálního stěru neprokázal žádnou buňku s mozaikou.

Tabulka 19: Proband č.19 – žena 23 let

Vzorek	Buňky XX	Buňky X0	Buňky XXX	Ostatní
Krev	20	0	0	0
Bukální stěr	30	0	0	0

Zdroj: vlastní

Vzorek krve u probanda č.19 bylo těžké vyšetřit. Buňky nevykazovaly žádné signály a nacházela se zde nejasná „clona“, proto byla znova provedena hybridizace. Mikroskopování po hybridizaci prokázalo 20 buněk se 2 zelenými signály. Ve vzorku bukálního stěru byly viděny všechny buňky s dvěma zelenými signály.

Tabulka 20: Proband č.20 – muž 20 let

Vzorek	Buňky XY	Buňky X0, Y0	Buňky XXY, XYY...	Ostatní
Krev	0	0	0	0
Bukální stěr	30	0	0	0

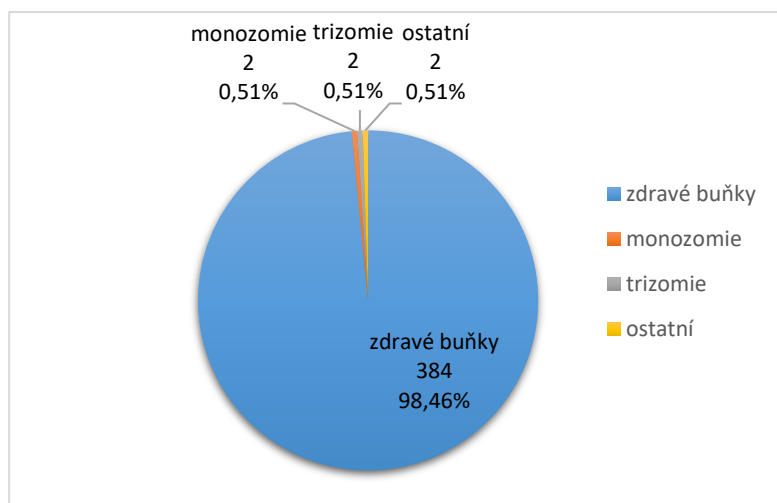
Zdroj: vlastní

Ve vzorku krve se nacházely buňky obarvené DAPI, nicméně nebyl detekován žádný světelný signál. Proto byl tento vzorek vyřazen z výzkumu. Všechny buňky bukálního stěru měly jeden zelený a jeden červený signál.

Celkově bylo pomocí fluorescenčního mikroskopování detekováno 1512 buněk bez gonozomálního mozaicismu, to je tedy 98,50% z celkového počtu vyšetřených buněk. Mozaické buňky byly zjištěny ve 23 případech, to znamená 1,50% z celkového počtu buněk. Ve vzorcích bukálních stěrů bylo celkem zjištěno 933 buněk (98,31%) bez prokázání mozaiek a 16 buněk (1,69%) s detekcí gonozomálního mozaicismu. Vzorky bukálních stěrů vykazovaly 578 buněk bez gonozomálního mozaicismu, to je tedy 98,80% a 7 mozaických buněk (1,20%)

V následujících grafech jsou znázorněny a shrnuty výsledky fluorescenčního mikroskopování.

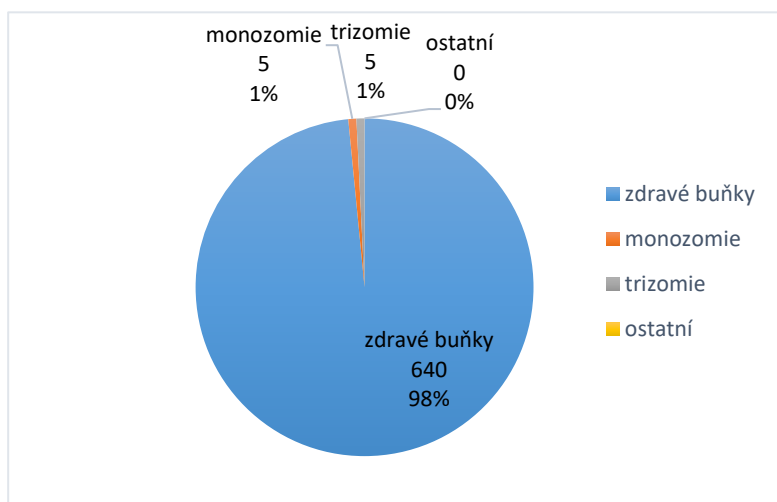
V prvním grafu můžeme vidět výsledek a celkové porovnání počtu buněk bez gonozomoálního mozaicismu, dále buňky monozomické, trizomické a ostatní, které byly vyšetřeny ze vzorků bukalních stěrů u žen.



Graf 1: Poměr zastoupení buněčných linií u žen v bukalních stěrech (X0,XX,XXX)

Zdroj: vlastní

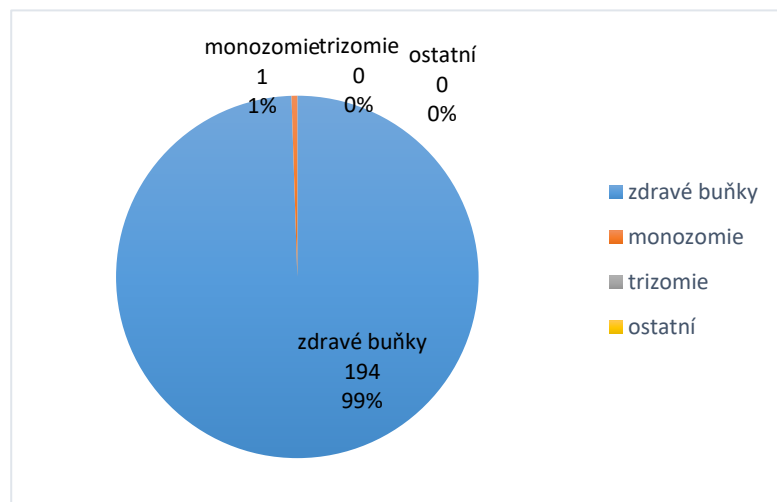
Na tomto grafu jsou uvedeny výsledky mikroskopování vzorků krve u žen. Výsledky udávají 98% buněk se správným počtem gonozomálních chromozomů, 1% monozomických buněk a 1% buněk s trizomií.



Graf 2: Poměr zastoupení buněčných linií u žen v krevních vzorcích (X0,XX,XXX)

Zdroj: vlastní

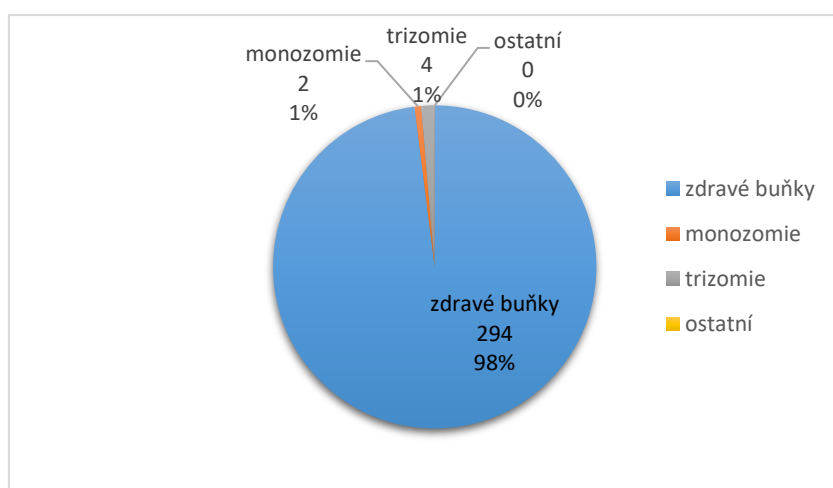
Další graf znázorňuje výsledky fluorescenčního mikroskopování bukalních stěrů u mužských probandů. Toto mikroskopování potvrdilo 99% buněk bez gonozomálního mozaicismu, to znamená, že vzorky měly jeden červený a jeden zelený signál. Nicméně se zde vyskytovala i 1 monozomická buňka, to znamená, že tato buňka měla jen jeden signál.



Graf 3: Poměr zastoupení buněčných linií u mužů v bukalních stěrech (X0, XY,XXY...)

Zdroj: vlastní

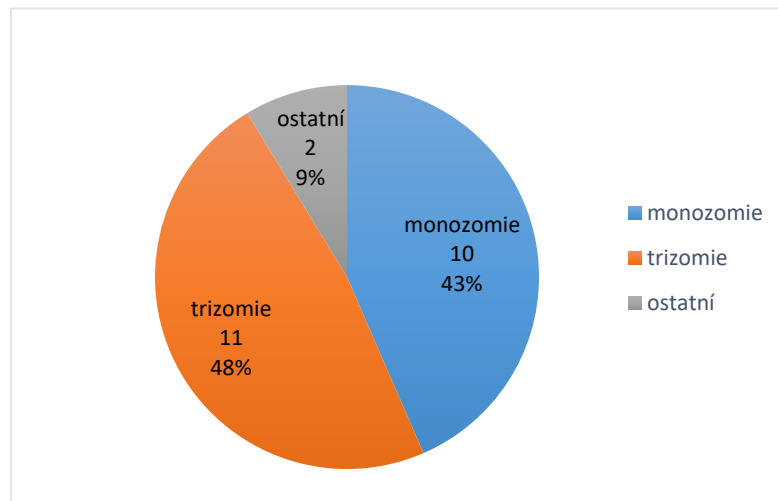
Čtvrtý graf vypovídá o výsledcích analýzy krevních vzorků, které byly odebírány mužům. Zde se vyskytovala monozomie ve 2 buňkách, to znamená 1% z celkového počtu buněk, dále trizomie ve 4 buňkách (1%) a 294 buněk bez výskytu gonozomálního mozaicismu.



Graf 4: Poměr zastoupení buněčných linií u mužů v krevních vzorcích (X0, XY,XXY...)

Zdroj: vlastní

Poslední graf znázorňuje typ, a k tomu přesný počet mozaicismu, který byl zjištěn u vyšetřovaných buněk. Bylo detekováno 23 monozomických buněk, z nichž bylo 43% monozomických, což je 10 buněk a dále 48% trizomických, čili 11 buněk a 9% ostatní (2 buňky).



Graf 5: Typy mozaicismu

Zdroj: vlastní

11 Diskuse

Tato bakalářská práce byla zaměřena na vyšetření gonozomálních mozaiek metodou FISH. Fluorescenční *in situ* hybridizace má své výhody i nevýhody.

Autoři Okada a kol. (2001) v článku popisují tuto metodu jako nejvíce vhodnou k detekci nízkofrekvenčních mozaiek (10 %). Tento typ mozaicismu byl v mé práci předpokládán, proto si myslím, že fluorescenční *in situ* hybridizace byla zvolena správně. Nicméně FISH umožňuje vyšetření jen několika chromozomů, a to je jeden z důvodů, proč je v dnešní době nahrazována modernějšími metodami, jako je například metoda microarray. Tato metoda testuje všech 24 chromozomů najednou. (Fiorentino et al., 2014) Jak doporučuje autorka Gajacka (2016), k vyšetření mozaicismu by mělo být aplikováno více metod, to znamená celkově komplexnější přístup. Proto si myslím že metoda FISH má v klinické praxi stále své místo.

Při fluorescenční *in situ* hybridizaci se nejčastěji využívají vzorky krve. Pro tuto bakalářskou práci jsem si tedy zvolila vzorky krve a dále vzorky bukálních stěrů. Bukální stěr není tolik používám, ale jak autoři Sdano a kol. (2014) v článku uvádějí, tento druh vzorku se v dnešní době začíná využívat více. Důvodem může být jednoduchý a neinvazivní odběr materiálu.

Při provádění praktické části mé bakalářské práce jsem provedla mikroskopování 40 vzorků. Ve vzorcích bukálních stěrů bylo vyšetřeno 30 buněk a v krevních vzorcích buněk 50. U žen bylo detekováno celkem 6 případů mozaicismu (procento mozaických buněk bylo nad přípustnou hranici). U mužů byly celkem 2 případy zvýšeného procenta mozaických buněk. U 4 vzorků však nastaly komplikace.

První komplikace nastala ve vzorku bukálního stěru u probanda č.10. Zde proběhla analýza jen 15 buněk, důvodem byla jejich malá koncentrace. Chyba mohla nastat už při odběru vzorku, kdy nemusela být dodržena doporučená doba odběru (3 minuty). Proband si z organizačních a časových důvodů odebíral vzorek sám. Dále by se před odběrem nemělo jíst, pít a kouřit. Při zpětném tázání probanda, zda dodržel tyto zásady, se přiznal že zhruba 10 minut před odběrem jedl. Tato skutečnost mohla znemožnit přesné vyšetření vzorku, tzn. vyšetření 30 buněk.

Výraznější komplikace nastaly i při analýze krevních vzorků. Tento fakt se nepředpokládal, protože v těchto vzorcích je vyšší koncentrace buněk. Avšak na druhou stranu je zde větší možnost nesprávného odběru kapilární krve. Dle Laboratorní příručky – Nemocnice České Budějovice (2019), může dojít při násilném vytlačování kapky krve z prstu ke kontaminaci tkáňovým mokem. Problém může nastat i v nesprávném rozetření kapky krve na podložní sklíčko.

U dvou vzorků kapilární krve nastala komplikace v podobě přítomnosti nejasné „clony“. Tento problém mohla zapříčinit nedostatečná hybridizace. Při hybridizaci byl z finančních důvodů použit roztok pepsinu z předešlého dne, nicméně v bezpečnostním listu tohoto roztoku je uvedeno, že pH je velmi slabě kyselé. Toto prostředí může vést ke kontaminaci mikroorganismy. Proto si myslím, že příčina mohla nastat právě v nepoužití čerstvého roztoku pepsinu. Vzorek krve probanda č.20 nevykazoval žádné světelné signály, proto jsem provedla opětovnou hybridizaci a ani poté nebyly detekovány žádné signály, proto byl vzorek z výzkumu odebrán.

Mozaicismus může být spojován s Turnerovým syndromem, jak tvrdí autoři Trovó de Marqui a kol. (2012). Dívky trpící tímto syndromem mají karyotyp 45, X/46, XX/47, XXX nebo 45, X/47,XXX, při kterém nejvýznamnější fenotypový projev je malý vzrůst. Proto souhlasím s autorovými názory, že pacientky s opožděným vývojem by měly podstoupit vyšetření mozaicismu.

V případě detekce mozaických buněk u mužů a následném diagnostikování Klinefelterova syndromu bych doporučila již zmíněné ověření mozaicismu další metodou. Dále bych se zaměřila na druh vyšetřovaného biologického materiálu, jak autoři Lanfranco a kol. (2004) v článku uvádějí, mozaické buňky nemusí být v těchto případech přítomny v krvi, a proto doporučují vyšetření vzorků spermií.

Když se zaměřím na porovnání vzorků krve a bukalních stěrů z výsledků praktické části této bakalářské práce můžu říct, že v krevních vzorcích se nacházela vyšší koncentrace buněk, proto mikroskopování probíhalo rychleji a efektivněji. Tato skutečnost byla předpokládána, nicméně počet detekovaných mozaických buněk byl přibližně stejný v obou typech vzorků. A to platí i přes fakt, že v bukalních stěrech bylo vyšetřeno méně buněk.

12 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem přiblížila problematiku gonozomálního mozaicismu a osvojila si metodu fluorescenční *in situ* hybridizace. V teoretické části jsem popsala od základu genetiku, cytogenetiku, buněčný cyklus, karyotyp a chromozomální aberace. Tyto okruhy jsem zahrnula do této práce pro lepší pochopení a orientaci v daném tématu. Dále jsem popsala mozaicismus jako takový a následně jeho možné formy, jako jsou – Turnerův syndrom, Klinefelterův syndrom, syndrom XYY a syndrom XXX. Tyto nemoci jsou nejčastěji spojovány právě s již zmiňovaným gonozomálním mozaicismem. Ve druhé polovině teoretické části jsem se zaměřila na fluorescenci a fluorescenční mikroskopování. Nejčastější metoda založená na fluorescenci je fluorescenční *in situ* hybridizace.

V praktické části této bakalářské práce jsem si osvojila metodu fluorescenční *in situ* hybridizaci. Hybridizováno bylo 40 vzorků od 20 probandů. Každému probandovi byla odebrána krev a bukální stěr. Hybridizace a následné mikroskopování bylo úspěšně provedeno u 39 vzorků. Na základě mikroskopování bylo zjištěno 8 probandů, kteří neměli žádné mozaické buňky. U žen bylo ve vzorcích bukálních stěrů nalezeno celkem 6 mozaických buněk – 2 monozomické, 2 trisomické a 2 ostatní. Krevní vzorky vykazovaly 10 buněk s mozaicismem, z toho 5 s jedním signálem (monozomie) a 5 se třemi signály (trisomie). U žen tedy bylo detekováno celkem 6 případů mozaicismu (procento mozaických buněk bylo nad přípustnou hranici) a u mužů v bukálních stěrech byla nalezena jen 1 buňka s monozomií. Ve vzorcích krve byly zjištěny 2 monozomické a 4 trisomické buňky. U mužů byly celkem 2 případy zvýšeného procenta mozaických buněk.

Hlavním přínosem této bakalářské práce bylo osvojení si práce v laboratoři, seznámení se s literaturou spojenou s problematikou gonozomálního mozaicismu a fluorescenční *in situ* hybridizace.

13 Seznam použitých zdrojů

1. BONOMI, M. et al., 2017. Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism. *Journal of Endocrinological Investigation* [online]. 40(2), 123-134 [cit. 2022-02-07]. DOI: 10.1007/s40618-016-0541-6. ISSN 1720-8386. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s40618-016-0541-6>
2. BRDIČKA, R., 2001. *Lidský genom na rozhraní tisíciletí*. 1. vyd. Praha: Grada. Malá monografie (Grada). ISBN 80-247-0118-9.
3. BRDIČKA, R., DIDDEN, W., 2014-2018. *Genetika v klinické praxi*. První vydání. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-106-3.
4. BRYANT, D. et al., 2012. Sex chromosomes and the brain: a study of neuroanatomy in XYY syndrome. *Developmental Medicine & Child Neurology* [online]. 54(12), 1149-1156 [cit. 2022-02-07]. DOI: 10.1111/j.1469-8749.2012.04418.x. ISSN 00121622. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8749.2012.04418.x>
5. BŘEZINOVÁ, J., ŠÁROVÁ, I., RANSDORFOVÁ, Š., ZEMANOVÁ, Z., MICHALOVÁ, K., 2017. Využití molekulárně cytogenetických technik při analýze chromozomových aberací u hematologických malignit. *Transfusiology* [online]. 23, 48-53 [cit. 2022-02-07]. ISSN 12135763.
6. FIORENTINO, F. et al., 2014. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Human Reproduction* [online]. 29(12), 2802-2813 [cit. 2022-04-21]. DOI: 10.1093/humrep/deu277. ISSN 1460-2350. Dostupné z: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/deu277>
7. GAJECKA, M., 2016. Unrevealed mosaicism in the next-generation sequencing era. *Molecular Genetics and Genomics* [online]. 291(2), 513-530 [cit. 2022-04-21]. DOI: 10.1007/s00438-015-1130-7. ISSN 1617-4615. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00438-015-1130-7>
8. GROTH, K., SKAKKEBÆK, A., HØST, C., GRAVHOLT, C., BOJESSEN, A., 2013. Klinefelter Syndrome—A Clinical Update. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 98(1), 20-30 [cit. 2022-02-07]. DOI: 10.1210/jc.2012-2382. ISSN 0021-972X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2012-2382>
9. GUILBAULT, G., 2020. *Practical fluorescence*. CRC Press. ISBN 1000147657.
10. HRAZDIRA, I., MORNSTEIN, V., 2001. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. 1. vyd. Brno: Neptun. ISBN 80-902896-1-4.
11. CHIAL, H., 2008. *Somatic Mosaicism and Chromosomal Disorders*. [online]. Scitable. [cit. 2022-03-07]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/somatic-mosaicism-and-chromosomal-disorders-867/>
12. IMATAKA, G., ARISAKA, O., 2012. Chromosome Analysis Using Spectral Karyotyping (SKY). *Cell Biochemistry and Biophysics* [online]. 62(1), 13-17 [cit. 2022-02-07]. DOI: 10.1007/s12013-011-9285-2. ISSN 1085-9195. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12013-011-9285-2>

13. KANAKIS, G., NIESCHLAG, E., 2018. Klinefelter syndrome: more than hypogonadism. *Metabolism* [online]. 86, 135-144 [cit. 2022-02-07]. DOI: 10.1016/j.metabol.2017.09.017. ISSN 00260495. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049518300283>
14. KAPRAS, J., OTOVÁ, B., KOHOUTOVÁ, M., 1996. *Kapitoly z lékařské biologie a genetiky*. 1. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 80-7184-322-9.
15. KOČÁREK, E., 2007. *Molekulární biologie v medicíně*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. ISBN 978-80-7013-450-4.
16. KOČÁREK, E., 2008. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vyd. Praha: Scientia. Biologie pro gymnázia. ISBN 978-80-86960-36-4.
17. KOČÁREK, E., PÁNEK, M., NOVOTNÁ, D., 2010. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky : vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 9788024618807.
18. KOSYAKOVA, N. et al., 2013. Generation of multicolor banding probes for chromosomes of different species. *Molecular Cytogenetics* [online]. 6(1) [cit. 2022-02-08]. DOI: 10.1186/1755-8166-6-6. ISSN 1755-8166. Dostupné z: <http://molecularcytogenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-8166-6-6>
19. LAKOWICZ, J., 2006. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer. ISBN 978-0-387-31278-1.
20. LANFRANCO, F., KAMISCHKE, A., ZITZMANN, M., NIESCHLAG, E., 2004. Klinefelter's syndrome. *The Lancet* [online]. 364(9430), 273-283 [cit. 2022-04-22]. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16678-6. ISSN 01406736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673604166786>
21. LEBL, J., ZAPLETALOVÁ, J., 2012. *Turnerův syndrom*. [online]. Fakultní nemocnice v Motole. [cit. 2022-03-07]. Dostupné z: <https://www.fnmotol.cz/kliniky-a-oddeleni/cast-pro-deti/pediatrica-klinika-uk-2-lf-a-fn-motol/pro-pacienty/informace-pro-pacienty/turneruv-syndrom/>
22. LEICABIOSYSTEMS, 2015. *Kreatech FISH probes* [online]. [cit. 15-04-2022]. Dostupné z: https://shop.leicabiosystems.com/pid-KBI-20030?_gl=1*ko7guq*_ga*MjczODUzMzE3LjE2NDg1NzMwMDg.*_ga_10W45KVS7Z*MTY1MDc5Nzg2Mi41LjEuMTY1MDc5Nzg3MC41Mg..
23. MARKS, J., 2021. *Medical Definition of Cytogenetic map*. [online]. MedicineNet. [cit. 2022-03-07]. Dostupné z: https://www.medicinenet.com/cytogenetic_map/definition.htm
24. MICHALOVÁ, K., 1999. *Úvod do lidské cytogenetiky*. Vyd. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-281-7.
25. NEČAS, O., 2000. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. přeprac. vyd., V nakl. H & H 1. vyd. Jinočany: H & H. ISBN 80-86022-46-3.
26. OCKENGA, W., 2021. *Fluorescenční mikroskopie*. [online]. Baria. [cit. 2022-03-07]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/blog/fluorescencni-mikroskopie/>

27. OKADA, H. et al., 2001. Fluorescence In Situ Hybridization Analysis of Sex-Chromosome Mosaicism in Azoospermic Men. *Journal of Andrology* [online]. 22(6), 970-972 [cit. 2022-04-22]. DOI: 10.1002/j.1939-4640.2001.tb03437.x. ISSN 01963635. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.2001.tb03437.x>
28. OTOVÁ, B., MIHALOVÁ, R., 2012. *Základy biologie a genetiky člověka*. 1. vyd. V Praze: Karolinum. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-246-2109-8.
29. PETROVOVÁ, M., SVOBODA, M., 2019. Methods of Classical and Molecular Cytogenetics Suitable for Biodosimetry of Persons with Professional Exposure to Carcinogens. *Klinická Onkologie* [online]. 32(4) [cit. 2022-02-07]. DOI: 10.14735/amko2019270. ISSN 0862495X. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/english-summary/klinicka-onkologie-journal/2019-08-15-4-en/metody-klasicke-a-molekularni-cytogenetiky-vhodne-pro-biodozimetrii-osob-s-profe-1/>
30. PINSKER, J., 2012. Turner Syndrome: Updating the Paradigm of Clinical Care. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 97(6), 994-1003 [cit. 2022-02-07]. DOI: 10.1210/jc.2012-1245. ISSN 0021-972X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jcem/article/97/6/E994/2536941>
31. PRADHAN, A., 2022. Fluorescence in situ hybridization (FISH). *Salem Press Encyclopedia of Health* [online]. [cit. 2022-03-10].
32. PRITCHARD, D., KORF, B., 2007. *Základy lékařské genetiky*. 1. české vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-449-2.
33. SDANO, M. et al., 2014. Clinical Utility of Chromosomal Microarray Analysis of DNA from Buccal Cells: Detection of Mosaicism in Three Patients. *Journal of Genetic Counseling* [online]. 23(6), 922-927 [cit. 2022-04-22]. DOI: 10.1007/s10897-014-9751-2. ISSN 1059-7700. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s10897-014-9751-2>
34. SNUSTAD, D., SIMMONS, M., RELICHOVÁ, J., ed., 2009. *Genetika*. Vyd. 1. Přeložil Anna MATALOVÁ. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2.
35. SRŠEŇ, Š., SRŠŇOVÁ, K., 2005. *Základy klinické genetiky a jej molekulárna podstata*. 4., preprac. a rozšíř. vyd. Martin: Vydavateľstvo Osveta. ISBN 80-8063-185-9.
36. ŠMARDA, J., 2003. *Genetika pro gymnázia*. 1. vyd. Praha: Fortuna. ISBN 80-7168-851-7.
37. ŠMARDA, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.
38. TARANTINO, C., 2022. *Chromosomal Aberrations*. [online]. Osmosis. [cit. 2022-03-07]. Dostupné z: <https://www.osmosis.org/answers/chromosomal-aberrations>
39. TROVÓ DE MARQUI, A., DA SILVA GRECCO, R., DA CUNHA PALHARES, H., DE FÁTIMA BORGES, M., BALARIN, M., 2012. 45,X/46,XX/47,XXX mosaicism. *Pediatrics International* [online]. 54(3), 437-438 [cit. 2022-04-22]. DOI: 10.1111/j.1442-200X.2012.03626.x. ISSN 13288067. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1442-200X.2012.03626.x>
40. TSUCHIYA, K., 2011. Fluorescence In Situ Hybridization. *Clinics in Laboratory Medicine* [online]. 31(4), 525-542 [cit. 2022-02-07]. DOI: 10.1016/j.cll.2011.08.011. ISSN

02722712. Dostupné z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272271211000771>

41. WIGBY, K. et al., 2016. Expanding the phenotype of Triple X syndrome: A comparison of prenatal versus postnatal diagnosis. *American Journal of Medical Genetics Part A* [online]. 170(11), 2870-2881 [cit. 2022-02-07]. DOI: 10.1002/ajmg.a.37688. ISSN 15524825. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajmg.a.37688>

14 Seznam obrázků, grafů a tabulek

Obrázek 1:Odlišné karyotypy u pacientek s Turnerovým syndromem.....	16
Obrázek 2:Princip metody fluorescenční in situ hybridizace.....	22
Obrázek 3:Typy sond využívané k molekulárně cytogenetickému vyšetření.....	23
Obrázek 4:Mužský karyotyp zobrazený metodou M-FISH	24
Obrázek 5:Mužský karyotyp zobrazený metodou M-BAND	25
Obrázek 6:Sondy XY	31
Obrázek 7:Buňka XX, UV světlo, DAPI	32
Obrázek 8:Buňka XX, zelený filtr	32
Obrázek 9:Buňka XY, UV světlo, DAPI	33
Obrázek 10:Buňka XY, červený filtr	33
Obrázek 11 Buňka XY, zelený filtr.....	33
Graf 1: Poměr zastoupení buněčných linií u žen v buklálních stěrech (X0,XX,XXX).....	42
Graf 2: Poměr zastoupení buněčných linií u žen v krevních vzorcích (X0,XX,XXX)	42
Graf 3: Poměr zastoupení buněčných linií u mužů v buklálních stěrech (X0,XY,XXY...)	43
Graf 4: Poměr zastoupení buněčných linií u mužů v krevních vzorcích (X0,XY,XXY...).....	43
Graf 5: Typy mozaicismu.....	44
Tabulka 1: Proband č.1 - žena 18 let.....	34
Tabulka 2: Proband č.2 - žena 22 let.....	34
Tabulka 3: Proband č.3 - muž 19 let	35
Tabulka 4: Proband č.4 – žena 21 let	35
Tabulka 5: Proband č.5 – žena 16 let	35
Tabulka 6: Proband č.6 – muž 19 let.....	36
Tabulka 7: Proband č.7 – žena 25 let	36
Tabulka 8: Proband č.8 – žena 21 let	37
Tabulka 9: Proband č.9 – žena 22 let	37
Tabulka 10: Proband č.10 – muž 26 let.....	37
Tabulka 11: Proband č.11 – žena 24 let	38
Tabulka 12: Proband č.12 – žena 23 let	38
Tabulka 13: Proband č.13 – muž 19 let.....	39
Tabulka 14: Proband č.14 – žena 20 let	39
Tabulka 15: Proband č.15 – žena 17 let	39
Tabulka 16: Proband č.16 - žena 19 let.....	40
Tabulka 17: Proband č.17 – muž 25 let.....	40
Tabulka 18: Proband č.18 – muž 17 let.....	40
Tabulka 19: Proband č.19 – žena 23 let	41
Tabulka 20: Proband č.20 – muž 20 let.....	41

15 Seznam použitých zkratk

A – Adenin

C – Cytosin

CaF₂ – kazivec

CGH – Komparativní genomová hybridizace

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

FISH – Fluorescenční *in situ* hybridizace

G – Guanin

M-BAND – Mnohobarevné pruhování

M-FISH – Mnohobarevná fluorescence

NADH – Nikotinamidadenindinukleotid

NADPH – Nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NH₂ – Amidy

OH – Hydroxidy

PAR – Pseudoautozomální oblast

RNA – Ribonukleová kyselina

SKY – Spektrální karyotypizace

T – Thymin

U – Uracil

UV – Ultrafialové

SSC – saline sodium citrate

TWEEN – Polyoxyethylensorbitanmonolaurát