

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Jana Limbergová**

**Molekulárně genetické přístupy užívané pro preimplantační genetickou analýzu lidských embryí v asistované reprodukci**

**Molecular genetic approaches used for preimplantation genetic analysis of human embryos in assisted reproduction**

*Bakalářská práce*

Vedoucí práce:  
RNDr. Ondřej Machoň, Ph.D.

Praha, 2022

**Charles University**  
**Faculty of Science**

Děkuji svému školiteli RNDr. Ondřeji Machoňovi, Ph.D. a jeho týmu z Ústavu experimentální medicíny za odborné konzultace, trpělivost a ochotu. Díky také patří doktoru MUDr. Janu Diblíkovi, Ph.D. za jeho drahý čas a konzultace.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama z uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Praha 2022

Jana Limbergová

.....

## Abstrakt

Preimplantační genetické testování je jednou z hlavních klinických procedur, které probíhají v centrech asistované reprodukce na celém světě. Vyhledávají ho páry z mnoha různých důvodů. Příčiny problémů párů se mohou týkat dědičných chorob, které budoucí rodiče nechtějí přenést na potomky, či mohou zahrnovat riziko přenosu chromozomálních přestaveb. Dále se může jednat o neplodnost způsobenou zvýšeným rizikem aneuploidie embryí, která koreluje s vyšším věkem pacientky a dalšími faktory, které tato bakalářská práce diskutuje. Tato bakalářská práce se dále soustřeďuje na přístupy cytogenetických vyšetření pro reprodukční genetiku a diskutuje moderní klinické molekulární metody užívané ke zlepšení diagnostiky a terapie neplodných párů. To jsou například microarray metody, kvantitativní real-time PCR či sekvenování nové generace a způsoby celogenomové amplifikace. Dále práce zmiňuje metody, od kterých se postupně opouští, např. fluorescenční *in situ* hybridizaci a porovnává jejich výhody a nevýhody.

**Klíčová slova:** preimplantační genetické testování, aneuploidie, strukturální přestavby, monogenní choroby, biopsie, fluorescenční *in situ* hybridizace, microarray metody, komparativní genomová hybridizace, kvantitativní PCR, sekvenování nové generace, karyomapping

## Abstract

Preimplantation genetic testing is one of the main clinical procedures that take place in assisted reproduction centres around the world. It is sought after by couples for many different reasons. The causes of problems may relate to hereditary diseases that potential parents do not wish to pass on to their offspring, or may include the risk of transmission of chromosomal alterations. In addition, infertility may be caused by an increased risk of embryo aneuploidy, which correlates with mother's increased age and other factors that this bachelor thesis discusses. The bachelor thesis also focuses on up-to-date approaches to cytogenetic examinations for reproductive genetics and discusses recent clinical molecular methods that are used to improve the diagnosis and therapy of infertile couples. These are, for example, microarray methods, quantitative real-time PCR or next-generation sequencing and methods of whole-genome amplification. This work also summarizes methods that are gradually being abandoned, e.g. fluorescent *in situ* hybridization, and compares their advantages and disadvantages.

**Key words:** preimplantation genetic testing, aneuploidy, structural rearrangements, monogenic diseases, biopsy, fluorescent *in situ* hybridization, microarray methods, comparative genomic hybridization, quantitative PCR, new generation sequencing, karyomapping

## Seznam zkratek

aCGH	Array komparativní genomová hybridizace
AI	Artificiální inseminace
ART	Assisted reproductive technology
BF	Blastocoelová tekutina
CGH	Komparativní genomová hybridizace
DOP-PCR	PCR s degenerovanými oligonukleotidy
ESHRE	Evropská společnost pro lidskou reprodukci a embryologii
ET	Embryotransfer
FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
HLA	Hlavní histokompatibilní komplex
ICM	Inner cell mass
ICSI	Intracytoplazmatická injekce spermie
IUI	Intrauterinní inseminace
IVF	<i>In vitro</i> fertilizace
LBR	Live birth rate
MALBAC	Multiple annealing and looping-based amplification cycles
MCB	Vícebarevná FISH, multicolour banding
MDA	Mnohočetná amplifikace s vytěšňováním řetězce
NGS	Sekvenování nové generace
PBS	Fosfátový roztok s 0,15 M NaCl
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PGT	Preimplantační genetické testování
PGT-A	Preimplantační genetické testování na aneuploidie

PGT-M	Preimplantační genetické testování na monogenní choroby
PGT-SR	Preimplantační genetické testování na strukturální přestavby/aberrace
qPCR	Kvantitativní PCR
RIF	Opakované selhání implantace
SCM	Použité pěstovací médium
SET	Single-embryo transfer
SKY	Spektrální karyotypování
SNP	Single-nucleotide polymorphism
SSC	Fyziologický roztok citrátu sodného
WGS	Whole-genome sequencing
WHO	World health organization

# Obsah

Historie léčby neplodnosti.....	1
Artifiální inseminace .....	2
Koncept kryokonzervace .....	2
Revoluce <i>in vitro</i> fertilizace (IVF).....	2
Metody současné asistované reprodukce.....	3
Intrauterinní inseminace (IUI) .....	3
<i>In vitro</i> fertilizace.....	3
Intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI) .....	3
Embryotransfer (ET) .....	4
Kryokonzervace gamet a embryí.....	4
Preimplantační genetické testování.....	4
Získávání materiálu pro genetické testování.....	6
Polární tělíška .....	6
Blastomery.....	6
Trofoektoderm .....	7
Neinvazivní techniky.....	8
Klinické využití preimplantačního genetického vyšetření .....	9
Aneuploidie .....	9
Monogenní choroby .....	11
Chromosomové aberace a přestavby.....	12
Chromosomální mozaicismus.....	15
Metody preimplantační molekulárně genetické analýzy .....	16
Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) .....	16
Celogenomová amplifikace DNA pro genetickou analýzu.....	19
Komparativní genomová hybridizace (CGH) .....	20
Microarray metody.....	21
Kvantitativní real-time PCR (qPCR).....	25
Karyomapping .....	26
Sekvenování nové generace (NGS).....	29
Závěr .....	31
Zdroje .....	32

## Historie léčby neplodnosti

Rodičovství je instinktivně řízená fyziologická potřeba<sup>1</sup>, která hraje velkou roli v procesu nesmrtnosti<sup>2</sup>. O neplodnosti a její případné léčbě lidé uvažovali již od pradávna. První zmínky o umělém oplodnění, jakožto o procesu injikování semene do reprodukčního traktu ženy, bychom mohli najít již ve Védské literatuře. Typická praktika pro léčbu neplodnosti v této době bylo podávání různorodých magických směsí či ‚lektvarů‘ připravovaných tehdejšími mudrci. Samozřejmě, v této době si podobnou pomoc nemohl dovolit každý. Lektvary mudrců byly podávány především bezdětným královnám, aby otěhotněly a tím udržely pokrevní linii na trůnu<sup>3</sup>.

V pozdějším období křesťané neplodnost prezentovali především jako chybu ženy. Obzvláště pro ženy na dálném východě znamenala neplodnost značné problémy. Plodnost byla naprosto zásadní pro společenský status tehdejší ženy a bezdětná žena byla odsuzována nejen svým manželem, ale i rodinou a společností<sup>4</sup>. Jakási lidská hodnota byla ženě v této době přisuzována zejména na základě její čistoty, sexuální i duchovní, a následně po svatbě její neschopnosti se rozmnožovat<sup>5</sup>. Neplodnost, nebo například i neschopnost porodit mužského potomka, byla jedním z hlavních důvodů pro polygamií a rozvody<sup>6</sup>. Manželská smlouva byla považována za kompletní až s narozením prvního dítěte<sup>7</sup>. Utrpení žen kvůli neschopnosti mít dítě pokračovalo i ve středověku.

V přechodu k modernímu náhledu na neplodnost bylo naprosto klíčové období Renesance, ruku v ruce se svým medicínským a vědeckým pokrokem. Pokud však chceme hovořit o praktikování moderní medicíny, musíme se vrátit již do Starověkého Řecka a období zhruba sedmého století před Kristem. Ačkoliv před medicínským pokrokem Řekové věřili spíše v metody založené na náboženství, magii a pověře, tak společně se začátkem medicínské vědy se řečtí lékaři začali přiklánět k faktické medicíně<sup>8</sup>. Další změny přišly s proslulým doktorem Hippokratem, podle jehož se dnes skládá tzv. Hippokratova přísaha, kterou se lékař zavazuje k plnění základních etických principů. Hippokrates posunul celý systém o pomyslný krůček dál a dal mu nové základy postavené na racionálním myšlení<sup>9</sup>. Neplodnost byla následně uznána problémem, který vyžaduje diagnózu a léčbu. Hippokrates za svůj život zformuloval mnoho možností léčby pro neplodné páry. Na rozdíl od moderní medicíny, která svou léčbu zakládá na farmaceutických a chirurgických procedurách, jeho byla založena na změnách životního stylu<sup>2</sup>.

Další vývoj různých technik léčby přišel společně s vědeckým pohledem na důvody neplodnosti. Největší pokrok v pochopení reprodukční fyziologie nastal s objevem spermií v roce 1677. Antonie van Leeuwenhoek jako první uviděl spermie pod mikroskopem a určil jejich zásadní důležitost ve formování embrya<sup>10</sup>. Tím začal proces objevování interakce gamet a možných způsobů léčby a následného řešení infertility<sup>11</sup>.



Významnost spermií pro reprodukci demonstroval italský fyziolog Lazzaro Spallanzani. Ukázal, že spermie mají jádro a cytoplazmu<sup>8</sup>. Poprvé bylo potvrzeno, že embryo se vyvíjí díky fyzickému kontaktu vajíčka se spermií<sup>12</sup>. Spallanzanimu se díky jeho objevu povedlo úspěšně inseminovat psi<sup>13</sup>. Také ukázal, že spermie mohou být zchlazením inaktivována a následně reaktivována, což byl zásadní objev pro budoucí uchovávání spermií a tedy i pro umělé oplodnění<sup>14</sup>. Další velmi významný přínos pro embryologii byl objev Carla Ernsta von Baera, který v roce 1827 objevil savčí vajíčko<sup>8</sup>.

## Artificiální inseminace

První snahy o zavedení artificiální inseminace (AI) jako normální procedury byly začaty v Rusku Ivanovem<sup>15</sup>. Dále se technika rychle rozšířila i do západních zemí. Nicméně, i když byla procedura již značně rozvinutá pro použití na zvířatech, zabralo řadu let, než se začala používat i na lidech. První zdokumentované AI provedl skotský chirurg John Hunter v sedmdesátých letech 18. století<sup>16</sup>. Pravý začátek technologie asistované reprodukce (ART) však nastal až o něco později, a to s prací Guttmachera, který poprvé zdokumentoval a zmapoval použití AI na člověku<sup>17</sup>. Inseminace dárcovských spermií nabyla popularity okolo roku 1909<sup>18</sup>.

## Koncept kryokonzervace

Neustálý vývoj v oboru artificiální inseminace poskytl hnací sílu pro vylepšení metod sběru a uchovávání semene. Snahy o zmrazování spermatu začaly od poloviny devatenáctého století, první pokusy provedl Mantegazza v roce 1866, který jako první hovořil o budoucí potřebě lidských bank mraženého spermatu<sup>19</sup>. Mantegazzeho vize se však naplnila až o 150 let později, a to během války v Zálivu (1990), kdy si vojáci nasazení v bitvách chtěli nechat zamrazit své sperma před odchodem do boje<sup>20</sup>.

Polgeho podstatná práce s glycerolem položila základy pro kryokonzervaci lidského spermatu<sup>21</sup>. V roce 1953 Sherman zamrazil lidské sperma s glycerolem procesem pomalého zchlazování a se suchým ledem jako chladičem. Dále ukázal, že rozmražené sperma si zachovalo fertilizační potenciál a indukovalo normální vývoj vajíčka. To vše vedlo k prvnímu úspěšnému těhotenství ze zmraženého spermatu<sup>16</sup>.

## Revoluce *in vitro* fertilizace (IVF)

První pokusy o *in vitro* fertilizaci sahají do roku 1890, kdy se prof. Walteru Heapemu povedla první transplantace králičího embrya na univerzitě v Cambridge<sup>22</sup>. Koncept reprodukce se stal koncem devatenáctého století pochopitelným a byl popsán jako fúze jader samčí spermie a samičího vajíčka<sup>23</sup>. O cca 80 let později se narodilo první „dítě ze zkumavky“. Louisa Joy Brown se narodila 25. července 1978 díky zásluhám Roberta G. Edwardse a Patricka Steptoa<sup>24</sup>.

## Metody současné asistované reprodukce

Pojem metody asistované reprodukce zaštituje všechny ART procedury, při kterých se manipuluje s lidskými spermii, vajíčky a embryi s cílem zajistit těhotenství<sup>25</sup>. Snaží se najít způsoby léčby neplodnosti, kterou WHO definuje jako „neschopnost mladého heterosexuálního páru dosáhnout otěhotnění při dostatečném počtu pokusů“<sup>26</sup>. Následující výčet velmi stručně popisuje jejich princip.

### Intrauterinní inseminace (IUI)

Jedná se o nejjednodušší metodu asistované reprodukce a patří do první linie léčby poruch neplodnosti. Pro pacientku je to bezpečná, levná a neinvazivní technika. Metoda je založena na vpravování spermií v živném roztoku inseminačním katetrem přes děložní hrdlo do děložní dutiny v době ovulace ženy. Výjimečně se před procedurou samotnou používá stimulace FSH (folikulostimulační hormon) hormonem, protože zvyšuje míru otěhotnění, ale zároveň zvyšuje riziko ovariálního hyperstimulačního syndromu a vícečetné gravidity. Indikací k IUI může být lehká porucha mužské plodnosti, anovulace nebo poruchy neplodnosti založené na imunologické neshodě<sup>26</sup>.

### *In vitro* fertilizace

*In vitro* fertilizace je procedura, při níž dochází k fertilizaci mimo dělohu pacientky. Cílem je dosáhnout vzniku životaschopné zygoty s intaktním genomem bez použití mikromanipulace. Tato metoda vyžaduje velmi kvalitní spermie<sup>27</sup>. Ejakulát musí obsahovat progresivně pohyblivé spermie s normální morfologií. Takovéto oplození vyžaduje fertilizační médium se suspenzí očištěných spermií, které se přidá ke skupině několika oocytů<sup>26</sup>. Od oplození *in vivo* se liší díky tomu, že není potřeba, aby spermie absolvovaly cestu přes cervikální hlen a děložní dutinu do ampuly vejcovodu<sup>27</sup>.

### Intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI)

Tato metoda využívá injekci jediné spermie do cytoplazmy vajíčka a vyžaduje mikromanipulační techniky<sup>25</sup>. Vyžaduje také manuální zručnost embryologa, přesnost a soustředění, protože se jedná o čistě mechanické vpravení jedné spermie do ooplazmy. Dále musí výkon probíhat co nejrychleji, aby nebyla vajíčka vystavena prostředí mimo kultivační systém po dlouhou dobu. Od přirozeného oplodnění se liší tím, že se spermie nemusí sama navazovat na zonu pellucidu ani později na oolemu, aby byla internalizována do oocytu, proto je také častá indikace pro tuto metodu neschopnost spermií proniknout do oocytu. Také se používá více než klasické *in vitro* oplození bez manipulace, protože má vyšší výtěžnost a zabraňuje polyspermii<sup>26</sup>.

## Embryotransfer (ET)

Jedná se proceduru, při které je jedno nebo více připravených a vyselektovaných embryí zavedeno přímo do dělohy nebo do vejcovodu. Představuje finální krok cyklu IVF. Vyžaduje úzkou spolupráci embryologa a lékaře, který dostává připravená embrya v katetru na operační sál<sup>26</sup>. Výběr nejlepšího embrya je klíčové pro úspěšnost embryotransferu, hlavně když je zaveden postup single-embryo transfer (SET). Embrya jsou hodnocena zkušenými embryology podle základních charakteristik, jako je pravidelnost nebo rychlost dělení, míra fragmentace cytoplazmy, přítomnost jader v jednotlivých buňkách atd. V rýhujícím se embryu je hodnocen počet buněk, jejich symetrie a přítomnost buněčných fragmentů. Blastocysty jsou hodnoceny na základě expanze a vzhledu vnitřní buněčné masy (ICM) a trofoektodermu<sup>28</sup>. V současné době se začaly aplikovat i neinvazivní metody pozorování morfologického vývoje embryí. Řadí se zde například morfokinetická technologie time-lapse<sup>29</sup>. Dále bylo navrženo provádět proteomické<sup>30</sup> a metabolické<sup>31</sup> studie pro zjištění kvality embrya. Po zavedení do dělohy pacientky již dále probíhá vývoj embrya *in vivo*. Pátý až šestý den po oplození vajíčka dochází ke spontánnímu hatchingu – praská zona pellucida – a embryo přichází do přímého kontaktu s děložní sliznicí a může dojít k implantaci embrya díky komunikaci trofoektodermu a endometria prostřednictvím adhezivní molekuly glykokalyxu<sup>26</sup>. V asistované reprodukci se provádí transfery i více embryí najednou, což je postup, který sice má přinášet lepší klinické výsledky, ale zároveň je spojován se zvyšujícím se rizikem vícečetného těhotenství<sup>32</sup>.

## Kryokonzervace gamet a embryí

Obecně kryokonzervací označujeme mrazení a uchovávání biologického materiálu při velmi nízkých teplotách. Jde o rutinní metodu přímo navazující na techniky asistované reprodukce. Zárodečné buňky a embrya jsou uchovávány v kapalném dusíku o teplotě -196°C. Díky takto nízké teplotě jsou pozastaveny všechny fyziologické buněčné aktivity. Takové buňky, i když mražené, zachovávají svůj reprodukční potenciál i po velmi dlouhé době skladování. V současné praxi se využívají dva různé způsoby mražení lidských reprodukčních buněk – pomalé mrazení a vitrifikace. Pomalé mrazení je praktika historicky starší a je založena na pomalém zchlazování vzorku až do -150°C. Vitrifikace je oproti tomu ultrarychlý způsob kryokonzervace, kdy jsou vzorky rychle zmrazeny ve velmi malém objemu mrazicího média na speciálních nosičích a rovnou ponořeny do tekutého dusíku. Další výhodou je, že metoda vitrifikace nevyžaduje žádné přístrojové vybavení laboratoře, narozdíl od pomalého mražení, které vyžaduje mrazicí přístroj. Díky převažujícím výhodám metody vitrifikace se proces rychlého mrazení využívá v současné době častěji<sup>26</sup>.

## Preimplantační genetické testování

Preimplantační genetické testování je samostatnou metodou asistované reprodukce, která pomáhá pacientům k početí zdravého potomka. Definujeme jej jako sérii genetických vyšetření oocytů, zygot a embryí, které mají za cíl najít chromozomové vady nebo genové

mutace, které by po implantaci daného embrya mohly vést ke vzniku genové vady nebo zániku těhotenství<sup>27</sup>. Předpokladem pro provedení preimplantačního genetického testování je oplození a pěstování embrya *in vitro*. Materiál se získává biopsií a dále je podroben metodám molekulární genetiky. Testy se provádí na různých buňkách z různých stádií vývoje – k analýze lze použít polární tělíška, blastomery či trofoektoderm<sup>25</sup>. Různým typům bioptovaného materiálu se bude práce zabývat v samostatné kapitole.

Konstitutivní chromosomální vady jsou velmi důležitou součástí indikací k preimplantačnímu vyšetření embryí. Podíl genetických příčin na vzniku neplodnosti se obtížně stanovuje, jelikož dědičnost má svůj podíl i na onemocněních jako je syndrom polycystických ovarií, obezita, endometrióza, poruchy spermiogeneze a různé defekty imunity<sup>26</sup>. Je odhadováno, že u zhruba 10 % ženské neplodnosti a 15 % mužské neplodnosti se na jejím vzniku podílejí genetické abnormality zahrnující chromozomální aberace a mutace jednotlivých genů<sup>26</sup>. Z toho vyplývá nutnost testovat na tyto molekulární anomálie s cílem snížení přenosu různých genetických vad na budoucí potomky a zlepšení klinických výsledků jako je implantace embrya, klinické těhotenství a podíl živých zdravých porodů (LBR). Jak už bylo zmíněno výše, preimplantační testování se provádí na biologickém materiálu získaného z embrya, tudíž jasnou podmínkou pro takové testování je úspěšné oplození oocyty *in vitro* a následná maturace embrya *in vitro*. To, jak moc chromosomální abnormality ovlivňují lidskou reprodukci, je pozoruhodné. Dokonce i na vrcholu ženské plodnosti není výskyt chromozomálních abnormalit zanedbatelný – jedná se o cca 20 % všech oocytů<sup>33</sup>. Můžeme porovnat s myšími embryi, kde chromozomálně abnormální je pouze 1 % embryí<sup>34</sup>. To vše naznačuje, že do jisté míry je chybovost během segregace chromozomů v gametogenezi výhodná pro náš druh. Embryonální chromosomální abnormality by tedy neměly být brány jako aberace, nicméně jako integrální a naprogramované komponenty v přírodním procesu lidské reprodukce<sup>35</sup>.

Pro preimplantační genetické testování se dříve užívaly dva termíny: preimplantační genetická diagnostika (PGD) a preimplantační genetický screening (PGS). PGD zahrnovala testování polárních tělíšek, blastomer nebo trofoektodermu pro detekci specifických genetických alternací<sup>25</sup> s cílem nalezení embrya s normálním karyotypem. Diagnostika PGD se zaměřovala na konkrétní genetické abnormality. Dnes se tomuto přístupu říká PGT-M – preimplantační genetické testování na monogenní genetické choroby. PGS zahrnovala analýzu těch stejných buněk pro detekci aneuploidií a strukturálních přestaveb<sup>25</sup>. PGS nahradily termíny PGT-A (z anglického názvu ‚preimplantation genetic testing for aneuploidy‘) a PGT-SR (z anglického názvu ‚preimplantation genetic testing for structural rearrangements‘), které jsou prováděné buď samostatně nebo současně. Celkově se tedy v současné době používá termín preimplantační genetické testování<sup>36</sup>. Moje bakalářská práce se bude dále soustředit na indikace a metody molekulární genetiky používané právě pro různé typy PGT.

## Získávání materiálu pro genetické testování

Před samotnou genetickou analýzou je potřeba získat biologický materiál. Tento proces je nazýván biopsie. Jedná se o odběr jedné či více buněk z vyvíjejícího se embrya v rámci IVF a ICSI cyklů pacientek. Následující výčet popisuje různé přístupy získávání bioptovaného materiálu.

### Polární tělíska

Polární tělíska jsou vedlejší produkty meiotického dělení oocyty. Nemají žádnou reprodukční funkci, a proto mohou být jednoduše odebrána bez jakéhokoliv zásahu do embryonálního vývoje. Biopsie polárních tělísek může být prováděna jedнокrokově nebo dvoukrokově. Buď se odeberou obě tělíska ve stejném čase a to 16 hodin po inseminaci. Anebo je odebráno první polární tělísko ještě před intracytoplazmatickou injekcí spermie a druhé zase 16 hodin po inseminaci<sup>28</sup>. Zdá se, že zkombinováním obou biopsií se vylepšuje počet správných detekcí chromozomálních abnormalit<sup>37</sup>. Limitace této techniky spočívá ve faktu, že polární tělíska reflektují pouze maternální genetickou informaci, zatímco parentální abnormality či chyby embryonálního mitotického dělení jsou zanedbány<sup>38</sup>. Nicméně randomizovaná studie pro zjištění efektivnosti PGT-A prováděného na polárních tělískách, kterou zaštitila Evropská společnost pro lidskou reprodukci a embryologii (ESHRE), neukázala žádný signifikantní rozdíl v LBR mezi ženami s vysokým maternálním věkem s PGT-A a bez PGT-A<sup>39</sup>. Hlavní výhodou použití polárních tělísek nadále zůstává to, že tento způsob biopsie poskytuje klinickým pracovníkům dostatek času na provedení genetického testování bez nutnosti kryokonzervace<sup>38</sup>, a tudíž je nadále taky jedinou možností v zemích, kde platí přísná legislativní pravidla ohledně genetického testování a manipulace s embryi<sup>28</sup>.

### Blastomery

Blastomery se odebírají v momentě, kdy embryo tvoří šest až osm buněk. Tento stav nastává zhruba 72 hodin po inseminaci. Prvním krokem bývá otevření zóny pellucidy (glykoproteinový obal vajíčka všech savců). Otevření zóny se může provádět použitím kyselého tyrodova roztoku, mechanickým propíchnutím anebo propálením laserem (laser-assisted hatching). Nejvíce používaná metoda ve světě je použití laseru k otevření zóny a použití média bez vápníku a hořčíku k oslabení buněčných spojů<sup>40</sup>.

Důležitou otázkou také je, kolik blastomer je možno odebrat. Obvykle se odebírá buď jedna, nebo dvě. Pokud embryolog odebere pouze jednu, výsledky genetických testů mohou být zavádějící nebo přímo nekorektní. Odebírání dvou blastomer zase škodí embryu, protože se jedná o skoro 30% buněčnou ztrátu<sup>41</sup>. Ačkoliv je sběr blastomer z časně se štěpících embryí kompatibilní s embryotransferem čerstvého embrya bez mražení<sup>42</sup>, technika se ukázala jako škodící embryonální vitalitě a tak se muselo načasování pro provádění biopsií pozměnit<sup>43</sup> a

přesměrovat biopsii k jinému materiálu. Trofoektoderm se ukázal jako nadějná tkáň, a proto se mu věnuje další podkapitola této práce.

## Trofoektoderm

Blastocystu tvoří dva buněčné typy – ICM (tvoří budoucí fetální tkáň) a trofoektoderm (tvoří budoucí placentu). Poprvé byla izolace trofoektodermu popsána v roce 1990 Dokrasem s kolegy<sup>44</sup>. Přechod k fázi blastocysty byl umožněn zejména dvěma pokroky. A to vývojem média, které v mnohem větší míře napodobuje fyziologické podmínky a tak byl umožněn konsistentní růst embrya<sup>45,46</sup>. A také vylepšením metody kryokonzervace známé jako vitrifikace, která zajišťuje mnohem vyšší míru přežití blastocyst<sup>47</sup>. Je tedy standardem ponechat embryo dorůst do pátého, šestého či až sedmého dne, podrobit ho biopsii trofoektodermu a blastocystu vitrifikovat do doby, než jsou výsledky PGT k dispozici a pacientkám se může naplánovat transfer.

Hlavních výhod spojovaných s trofoektodermní biopsií je pět. (1) Trofoektoderm se odebírá z fáze blastocysty, kdy se již aktivoval embryonální genom, tudíž je analýza přesnější<sup>37</sup>. (2) Trofoektoderm se nijak nepodílí na tvorbě fetální tkáně, protože tvoří pouze extra-embryonální tkáň. (3) Odebrání pěti až osmi buněk je zdaleka dostačující počet pro analýzu a pro blastocystu je to pouhá 10% ztráta všech buněk. V porovnání se ztrátou masy buněk při biopsii blastomer je tedy o dost méně invazivní<sup>48</sup>. (4) Analýza vícero buněk umožňuje detekovat mozaicismus v rámci biopsie<sup>35</sup>. (5) Pravděpodobnost falešných výsledků se snižuje díky úbytku výskytu mozaicismu ve fázi blastocysty<sup>32</sup> v porovnání s mozaicismem ve fázi blastomer<sup>49</sup>. Embrya vitrifikovaná v této fázi vykazují vyšší míru přežití v porovnání s vitrifikací blastomer, což umožňuje odložení transferu a adoptování (SET) strategie s cílem snížit vícečetné těhotenství<sup>50</sup>.

Při biopsii z trofoektodermu se uplatňují tři hlavní postupy. První spočívá v otevírání zóny pellucidy ve fázi blastomer laserovým vrtáním a poté v čekání na vytvoření expandované nebo herniované blastocysty v pátém dni vývoje<sup>51</sup>. Proděravění zóny se provádí ve fázi časného embrya s cílem zabránit kolapsu. Nicméně tento přístup má limitace spočívající v dvounásobné manipulaci s embryem mimo inkubátor. Také se může stát, že se pár buněk uvolní ze zóny pellucidy do média<sup>28</sup>. Druhý přístup zahrnuje jen jednu manipulaci s embryem, protože se vše provádí najednou včetně laserem asistovaného hatchingu. Výhoda tohoto přístupu spočívá ve faktu, že zóna pellucida může být otevřena v místě vzdáleném od ICM, což snižuje riziko jejího zapojení do biopsie. Třetí a poslední přístup kombinuje první dva. S otevřením zóny se čeká až do fáze, kdy je blastocysta expandovaná a na odběr se počká až do herniace trofoektodermu<sup>28</sup>. Výběr vhodného postupu ovlivňuje klinické výsledky<sup>52</sup>. Nicméně stálá manipulace s embryem je velmi diskutovaným tématem a objevují se i neinvazivní techniky, které by měly zamezit zbytečným zásahům do embrya. Těmto technikám se věnuje další část práce.

Další kontroverze ohledně trofoektodermní biopsie je, zdali by se měly analyzovat šesti- a sedmidenní embrya. Ačkoliv pětidenní embrya mají vyšší míru euploidie, vztah vůči embryonálnímu vývoji je stále nejasný. Na druhou stranu, sedmidenní embrya mohou také být dobré kvality a morfologie, i vyústit v živý porod. Z toho vyplývá, že pěstování embryí o jeden den déle zvyšuje počet použitelných embryí na jeden cyklus a dává větší šanci pacientům, kteří mají jen pár embryí anebo embrya špatné kvality<sup>28</sup>.

## Neinvazivní techniky

Biopsie embrya je, v jakémkoliv stádiu vývoje, velice invazivní proces, tudíž metoda, která by nevyžadovala fyzickou izolaci buněk z embrya by byla velkou revolucí. S postupně se snižující cenou sekvenování, se nejdražším komponentem PGT-A stala biopsie, která vyžaduje hi-tech laser a kvalitně vyškoleného embryologa pro provedení mikrochirurgického zákroku<sup>35</sup>.

První koncept minimálně invazivního postupu pro biopsii se objevil s objevem DNA v blastocoelové tekutině (BF) a použitím pěstovacím médiu (SCM)<sup>53</sup>. BF je izolována procesem zvaným blastocentéza<sup>54</sup> a provádí se zavedení velmi tenké jehly skrz zónu pellucidu a mezi buněčnými spoji trofoektodermu do blastocoelové kavity, kde je tekutina (1 mikrolitr) odebrána a blastocysta zůstává kolapsovaná<sup>55</sup>. To, zda je PGT-A z BF spolehlivým ukazatelem embryonální ploidie se snažilo ukázat mnoho studií. Například studie provedena v roce 2015 Toblerem analyzovala BF z 96 embryí. Embryonální DNA byla podrobena genetické analýze (úspěšnost celogenomové amplifikace byla pouhých 63 % případů). Výsledky se shodovaly s opravdovými karyotypy ICM jen v pouhých 48,3 % analyzovaných embryích, a tudíž autoři nedoporučují použití této neinvazivní metody jako alternativy v PGT-A<sup>56</sup>. Právě míra neúspěšnosti amplifikace po blastocentéze je o dost vyšší než po tradiční trofoektodermní biopsii<sup>57</sup>. Do budoucna bude důležité prokázat, zda ztráta tekutiny neovlivňuje buněčnou komunikaci a zda je tato DNA opravdu reprezentativní embryonální DNA<sup>28</sup>.

Další alternativní PGT strategií je analýza použitého pěstovacího média. Tato metoda se dá označovat za úplně neinvazivní, protože se odebírá pouze cell-free DNA z média, která do něj byla vypuštěna po apoptóze, nekróze či aktivním vylitím z makrováček. Tato DNA může mít více původů – maternální, paternální, embryonální nebo extra-DNA. Technika nevyžaduje zkušeného embryologa ani žádné speciální přístroje, a tudíž embryo zůstává nedotčeno. Nicméně výsledky ovlivňuje pár faktorů: zda je to kultura čerstvého či mraženého embrya, zda byla použita média jednokroková nebo vícekroková, zda se v kultuře pěstuje jedno nebo více embryí a také objem média hraje roli<sup>58,59</sup>. Výsledky studie provedené v roce 2018 naznačují, že existuje optimální načasování pro odběr média pro vyšší výtěžek DNA a spolehlivější analýzu. Byly porovnány výsledky z médií odebraných z třídenních a pětidenních embryí. Autoři označili pětidenní médium jako výhodnější díky vyšší míře amplifikace a vyšším výtěžku DNA pro spolehlivé provedení PGT-A<sup>59</sup>. V posledních letech bylo zveřejněno mnoho studií, které přinášejí poměrně úspěšné výsledky minimálně invazivních a neinvazivních technik.

Ačkoliv se zdají velmi slibné, jsou stále ještě ve fázi ranného vývoje a bude potřeba více studií a standardizovaných protokolů pro klinické využití<sup>28</sup>.

## Klinické využití preimplantačního genetického vyšetření

Existuje mnoho indikací k provedení PGT. Mohou pocházet ze strany muže, ženy, mohou postihovat celý pár, ale je důležité také posoudit rodinnou anamnézu. Indikace ze strany muže může pocházet například z patologického spermiogramu. U mužů s azoospermií, která se definuje nepřítomností spermií v ejakulátu, jsou chromosomální vady nalézány u 15 % mužů a jedná se zejména o vady pohlavních chromosomů. U mužů se sníženou koncentrací spermií v ejakulátu (pod 10 milionů/ml), které se říká oligozoospermie, je výskyt chromosomálních vad 5% a častěji nacházíme vady autozomů<sup>60</sup>. Ještě vyšší výskyt chromosomálních vad mají muži s těžkou oligozoospermií (<5 milionů/ml) spojenou s patologickými hodnotami FSH (folikulostimulační hormon), LH (luteinizační hormon), testosteronu a nízkým objemem varlat (a to cca 19 %)<sup>26</sup>. Muži s abnormálními karyotypy a s delecemi Y chromozomu častěji produkují spermatozoa s aneuploidiemi. I faktory jako endokrinní či imunologické onemocnění, životní styl, varikokéla (rozšíření žilní pleteně jdoucí od varlete), kryptorchismus (nepřítomnost varlete ve skrótu), léčba chemoterapií, a věk mohou negativně ovlivnit meiotické dělení v rámci spermatogeneze<sup>61</sup>. Existují ale i studie, které naznačují, že ‚male factor‘ by neměl být považován za kritický parametr pro určování euploidie embryí. Zmínit můžeme např. Mazzilliho studii založenou na pozorování 1 219 ICSI cyklů s trofoektodermní biopsií, kde se nenašel signifikantní rozdíl v podílu euploidních embryí na blastocystu mezi muži s normozoospermií a muži s neobstruktivní azoospermií<sup>62</sup>. Je možné, že oocyt má potenciál zabránit dalšímu vývoji aneuploidních embryí před aktivací embryonálního genomu<sup>63</sup>. Jako další vysvětlení se nabízí možnost, že aneuploidie vzniklé na základě chyby ve spermiu mají za následek časně přerušeno embryonálního vývoje<sup>64</sup>. Infertilní ženy mají zvýšený především výskyt translokací autozomů a to 4 až 5 %. Tento výskyt stoupá, došlo-li opakovaně ke spontánní ztrátě těhotenství nebo k opakovanému selhání IVF<sup>60</sup> (diskutováno dále).

## Aneuploidie

Diploidní buňky obsahují 46 chromosomů, takový stav je známý jako euploidie. Aneuploidie je pozměněný stav, kdy se počet chromosomů odchyluje od normálního počtu 23 párů. Je to nejvyskytovanější genetická abnormalita u lidí, která je hlavním důsledkem chyb v segregaci při meióze. Typickými příklady je trisomie nebo monosomie, vyplývající ze 47 nebo 45 chromosomů. Aneuploidie může postihnout vícero chromosomů, někdy je to označováno jako komplexní aneuploidie. Může také nastat nuliosomie nebo polysomie, kde je přítomna žádná nebo vícero kopií jednotlivých chromosomů<sup>35</sup>. Největší část meiotických chyb pochází z maternální meiózy (90 %-99 %). Aneuploidie ze strany otce je daleko méně pravděpodobná<sup>65</sup>. Právě vyšší riziko aneuploidii se považuje za indikaci ke genetickému vyšetření embryí. Mezi indikace pro preimplantační genetické testování na aneuploidie se řadí mnohé další faktory, které jsou diskutovány dále.



Jednou z dalších indikací je opakovaná ztráta těhotenství. Definuje se jako dva a více konsektivních potratů do 20. týdnu těhotenství a je jím postiženo cca 5 % všech párů podstupujících léčbu v IVF centrech. Důvody mohou různé až neznáme. Jako příčiny se uvádí genetické, anatomické, endokrinologické a imunologické abnormality<sup>66</sup>. V 50 % případů má prvotrimestrální těhotenská ztráta za příčinu právě chromosomální vadu<sup>26</sup>. Potraty s nevysvětlitelnou příčinou přinášejí párům velký stres, a to ztěžuje celý proces léčby. Bianco ve své retrospektivní studii pozoroval výsledky karyotypování téměř 47 tisíců žen a poznamenal, že výskyt aneuploidie u žen, u kterých nebyl žádný záznam o předešlém potratu, byl 1,3 %. Naopak u žen s jedním prodělaným potratem byl výskyt 1,6 %, se dvěma 1,8 % a se třemi dokonce 2,1 %<sup>67</sup>. Z toho vyplývá, že genetický preimplantační screening na aneuploidie by měl být doporučován párům s nevysvětlitelnými opakovanými potraty, aby se vybralo euploidní embryo. Tuto domněnku podpořila studie, kde bylo ukázáno snížení počtu potratů díky genetickému testování u párů s touto indikací<sup>68</sup>. Výskyt aneuploidií je zvýšen u žen do 35 let s idiopatickou ztrátou těhotenství, které podstoupily PGT na blastocystách, zatímco u žen nad 35 let se stejnou indikací a léčbou už navýšení není zdaleka tak signifikantní. Mladé pacientky tedy nehledě na to, že jim bylo transferováno euploidní embryo, mají vyšší počet potratů, což ukazuje, že u této skupiny pacientů může existovat i jiná příčina opakovaných ztrát těhotenství než jen ta genetická<sup>69</sup>.

Také opakované selhání implantace (RIF) se uvádí jako jedna z indikací pro genetické testování a je definováno jako nepřítomnost těhotenského vakuu na ultrazvuku v 5. nebo vyšším týdnu těhotenství po třech embryo transferech s vysoce kvalitními embryi anebo po transferu deseti a více embryí ve více cyklech.<sup>40</sup> Vysvětlení pro tuto skutečnost může být závislé na maternálních i na embryonálních faktorech<sup>28</sup>. U pacientů, kteří mají historii s RIF, je zvýšený výskyt chromosomálních abnormalit<sup>70</sup> a s každým dalším nepovedeným IVF cyklem stoupá<sup>71</sup>. A proto se u těchto pacientů začaly aplikovat přístupy jako kultivování blastocyst nebo asistovaný hatching a zdá se, že tímto se implantační schopnost embryí zvyšuje<sup>72</sup>. Nicméně studie založené na pozorování efektivity genetického testování za použití metody fluorescentní *in situ* hybridizace pro zvýšení LBR neukazují statisticky signifikantní rozdíl mezi RIF pacienty, kteří podstoupili PGT-A a mezi těmi, kteří ho nepodstoupili<sup>73</sup>. Z toho je možné usoudit, že příčina infertility v těchto případech je multifaktoriální a chromosomální abnormality s ní nemají moc společného. Naopak u studií, které ke svému genetickému testování používají mikročipovou verzi metody komparativní genomové hybridizace, se klinické výsledky přiklání k názoru, že to jsou právě aneuploidie, které jsou významnou příčinou pro opakované selhání implantace<sup>74</sup>.

Jako další velký faktor se považuje vyšší věk matky, protože v oocytech a embryích se hromadí chromosomální abnormality. Dále se také s věkem snižuje ovariální rezerva<sup>75</sup>. Ženy ve vyšším věku produkují vyšší počet embryí s chromosomálními aberacemi – počet aneuploidních oocytů po 30. roku věku je 10-25 % a po 40. roku věku roste až přes 50 %<sup>26</sup>. Zajímavé je, že velká část aneuploidních embryí vykazuje dobrou morfologii a některé studie poukazují na to,

že právě blastocysty dobré kvality mohou vyústit v aneuploidní embryo v 44,9 % případů<sup>76,77</sup>. Veliký rozdíl je u paternálního faktoru, kde výskyt aneuploidie nekoreluje s věkem otce<sup>78</sup>.

Preimplantační genetické testování na aneuploidie je tedy diagnostický nástroj pro chromosomální abnormality, které se vyskytly u jedince spontánně<sup>35</sup>. Společnost lékařské genetiky a genomiky tedy doporučuje genetické vyšetření embryí PGT-A infertilním pacientkám ve věku od 35 let, pacientkám s opakovanými těhotenskými ztrátami v prvním trimestru<sup>79</sup>, s opakovaným selháním implantace, s nálezem chromosomální vady v předchozí graviditě a taky po proběhlé onkologické léčbě jednoho nebo obou partnerů.

## Monogenní choroby

Preimplantační genetické testování na monogenní genetické choroby má za cíl zamezit rizika přenosu známé monogenně dědičné choroby v rodině. Téměř u 6000 genetických chorob je dnes znám jejich molekulární podklad, tím i jejich způsob dědičnosti. V rámci genetického poradenství s párem by měly být prodiskutovány všechny metody možné prevence přenosu daného onemocnění na potomky<sup>26</sup>. Konvenční metoda pro rozpoznání monogenních chorob zahrnuje biopsii embryí, provedení PCR, detekování mutace a následná diagnóza. Dnes se provádí převážně metodou karyomappingu, které se práce bude věnovat v samostatné kapitole.

V rodinné nebo v osobní anamnéze u jednoho nebo obou partnerů se může vyskytnout genetické onemocnění; dědičnost onemocnění může být buď autosomálně recesivní, autosomálně dominantní, mitochondriální nebo X-vázaná. Dále lékař hledá výskyt nádorů, které splňují kritéria pro vyšetření syndromů s hereditární nádorovou predispozicí jako například Liův-Fraumeniho syndrom, Lynchův syndrom nebo hereditární syndrom karcinomu prsu a ovarií. Výskyt vývojových a smyslových vad nebo mentální retardace v anamnéze také bude naznačovat nutnost preimplantačního testování<sup>26</sup>. Nutnost preimplantačního genetického testování na monogenní genetické choroby může být u velmi běžných chorob i u těch vzácnějších. Nejčastějšími indikacemi jsou v současné době cystická fibróza a dědičné hemoglobinopatie z autozomálně recesivních chorob, myotonická dystrofie typu I, neurofibromatóza, Huntingtova choroba a dědičné rakovinné syndromy z autozomálně dominantních chorob. V rámci X-vázaných chorob se PGT-M zaměřuje na Duchennovu muskulární dystrofii, hemofilii a syndrom křehkého X<sup>80</sup>.

Existují také monogenní genetické choroby s pozdním nástupem. Jedná se o například Huntingtovu chorobu a spinocerebelární ataxii<sup>26</sup>. Pro páry s takovouto historií v rodinách, které si zároveň nepřejí znát svůj vlastní genetický nálezn, je možné provést nepřímé genetické preimplantační testování (exclusion testing), které zahrnuje transfer embrya nesoucí haplotyp nezasazeného prarodiče<sup>81</sup>. To je proto, že embrya s haplotypem zasazeného prarodiče mají 50% šanci zdědit chorobu. V současné době, ale bohužel nejde přesně vymezit choroby s pozdním nástupem ve srovnání s těmi s časným<sup>26</sup>. Jedná se o kontroverzní téma vzhledem k tomu, že cca polovina párů podstupuje IVF/PGT léčbu zbytečně a vystavuje se tak vedlejším

účinkům a rizikům pro ženu a embryo. Proto je toto vylučovací testování v některých zemích zakázáno<sup>82</sup>.

Dnes se pod pojmem PGT-M skrývá také HLA typizace (vyšetření hlavního histokompatibilního komplexu) buď bez nebo se současným testováním na monogenní choroby<sup>36</sup>. HLA typizace je tedy jednou ze speciálních indikací, které vznesly debaty o etice procedur. Jedná se o nový přístup pro léčbu staršího sourozence zasaženým ať už získanou (akutní leukémie) nebo dědičnou chorobu (Fanconiho anémie, talasémie, Wiscottův-Aldrichův syndrom ad.). Je totiž nutné pro tyto potomky nalézt vhodného dárce kostní dřeně či zárodečných buněk z pupečnickové krve<sup>83</sup>, jelikož najít HLA-kompatibilního dárce je velmi složité i v řadách rodinných příslušníků. Je to tedy velice atraktivní a praktický způsob léčby zárodečnými buňkami. Poprvé byla metoda použita pro Fanconiho anémii<sup>84</sup>. Po porodu byla odebrána pupečnicková krev, která po transplantaci zárodečných buněk zajistila úplné vyléčení staršího potomka. Dříve byla typizace prováděna pro zajištění nepostiženého embrya, které zároveň poskytovalo kompatibilního dárce, tudíž současně probíhala s PGT-M. Nicméně preimplantační HLA typizace jako samostatná metoda byla taktéž již provedena<sup>85</sup>. Jsou zde ale zcela zásadní limitace metody HLA typizace. Například velkou nevýhodu mají páry s vysokým maternálním věkem právě kvůli nízkému počtu získaných embryí a pravděpodobnost, že se najde nezasažené HLA-kompatibilní embryo, u nich rapidně klesá<sup>83</sup>. Jedny z možných postupů, které by měli tento problém vyřešit je podrobení pacientky více stimulačním cyklům pro získání dostatečného množství vajíček anebo získání darovaných vajíček od mladší sestry pacientky<sup>86</sup>. Také je nutné zmínit, že je vhodné provést současné testování na aneuploidii, které by mělo zlepšovat výsledky PGT/HLA typizace<sup>87</sup>. Z hlediska spousty limitací a vzhledem ke kontroverznosti metody je páru silně doporučováno genetické poradenství. Do budoucna bude zvažován prospekt metody CRISPR, která by umožňovala genový editing zasažených HLA-kompatibilních embryí pro starší pacienty<sup>88</sup>.

### Chromosomové aberace a přestavby

Strukturální chromosomové aberace a přestavby jsou abnormality, které mění přirozené pořadí chromozomálních segmentů. Pokud počet kopií zůstane zachován, označujeme tyto přestavby jako balancované. Nosiči těchto abnormalit jsou typicky bez klinického projevu, ale tito lidé mají většinou sníženou plodnost, zvýšenou pravděpodobnost ztráty těhotenství a také výraznou šanci narození potomka s fyzickým či mentálním postižením. Meiotické procesy mohou totiž vytvořit nebalancované abnormality v potomcích těchto nosičů. Tyto problémy jsou způsobené abnormální segregací chromozomů v meióze a to vede k produkci gamet s chybějícími či naopak přebývajícími oblastmi genomu<sup>89</sup>. Preimplantační genetické testování na strukturální přestavby (PGT-SR) je tedy cílené na známé chromosomální abnormality přítomné v genomu rodičů. Použití PGT-SR k detekci strukturálních chromozomových abnormalit vede ke snížení rizika narození potomka s postižením a také snižuje počet ztrát těhotenství<sup>90</sup>.

Do chromosomových aberací řadíme zejména translokace, inserce, inverze a jednotlivé chromozomální vady, jejichž výčet a klinický význam je vypsán níže.

### **47,XXY – Klinefelterův syndrom**

Klinefelterův syndrom se vyskytuje u 1 : 600 mužů a je také nejčastější příčinou azoospermie. U mužů s oligozoospermií je to méně častá příčina<sup>91</sup>. V ejakulátu se živé spermie nachází jen u 8 % mužů s nemozaikovou formou a v takovém případě se spermie odebírají pomocí mikrochirurgické techniky z varlat nebo nadvarlat, nicméně i tak nalezení použitelné spermie není zajištěno. Jedná se o úspěšnost cca 30 %<sup>26</sup>. Mozaiková forma 47,XXY/46,XY má prevalenci u 10-20 %<sup>26</sup> a spermie dosavadně nevykazují zvýšené riziko vad pohlavních chromozomů u dětí po cyklech prováděných s ICSI metodou<sup>92</sup>. Riziko pro potomky takto postiženého muže je mírně zvýšeno a možným vysvětlením je, že i když mohou spermatocyty s karyotypem 47,XXY meiózu dokončit<sup>93</sup>, tak nadpočetný chromosom X ve spermatogoniích je většinou eliminován během spermatogeneze<sup>26</sup> nebo spermatogonie časně odumírá<sup>94</sup>. Je tedy i tak silně doporučování podstoupení preimplantační a prenatální diagnostiky.

### **Syndrom 47,XXY**

Takovýto karyotyp se vyskytuje u 1 : 1000 mužů a velká část postižených mužů má plodnost normální<sup>60</sup>. Zvýšená rizika gonosomálních vad u potomků nebyla zjištěna a výskyt aneuploidii je pouze mírně zvýšený<sup>95</sup>. Nicméně muži s těžkou oligospermií mohou mít výskyt aneuploidii zvýšený až na 38 % důsledkem různých abnormalit meiotického párování a tyto hodnoty už mohou představovat riziko pro potomky<sup>26</sup>.

### **Muži 46,XX**

Karyotypový nález 46,XX u mužů je velmi vzácný (1 : 20 000). Pacienti mívají translokovan SRY (sex-determining region Y) gen, většinou na chromozom X anebo na autozom (normálně se nachází na chromozomu Y)<sup>26</sup>. Chybí i další geny potřebné pro tvorbu spermií a z toho vyplývá kompletní azoospermie. Tito muži své vlastní genetické potomky mít nemohou<sup>91</sup> a jediná šance je využití dárcovských spermií.

### **Strukturální přestavby chromozomu Y**

Strukturální vady na chromozomu Y jsou spojovány s delecemi na lokusech zvaných AZF (azoospermia factor) a způsobují závažnou oligospermií nebo azoospermii<sup>96</sup>. V těchto případech je určitě vhodná preimplantační a prenatální diagnostika, protože každý mužský potomek ze spermie s tímto karyotypem tuto vadu zdědí. Také se jedná převážně o mikrolece, které je možné zachytit pouze molekulárně genetickými metodami<sup>97</sup>.

## **45,X – Turnerův syndrom**

Turnerův syndrom se vyskytuje u 1 : 5000 narozených děvčat<sup>26</sup> a takové pacientky mají nefunkční vaječníky. Možným a zároveň jediným řešením je použití oocytů od dárkyně<sup>91</sup>.

## **47,XXX – triple X syndrom**

V 95 % procentech případů triple X syndromu je nadpočetný X chromosom maternálního původu. Pacientky mohou trpět předčasným ovariálním selháním. Vzhledem k vyššímu riziku aneuploidie pohlavních chromosomů se silně doporučuje preimplantační a prenatální diagnostika<sup>26</sup>.

## **Translokace mezi Y a autozomem**

Klinické důsledky přichází v podobě závažného postižení spermatogeneze u mužů, protože dochází k narušení párování X a Y v meióze. V případech, kdy je translokován heterochromatin dlouhého raménka Y na krátké raménko některého z akrocentrických chromosomů, se důsledky klinicky neprojeví<sup>91</sup>.

## **Translokace mezi X a autozomem**

U žen bývá tato translokace bez projevu vzhledem k tomu, že v ženských buňkách bývá inaktivován normální chromosom X. Zatímco u mužů většinou translokace způsobuje neplodnost<sup>91</sup>.

## **Robertsonské translokace**

Tyto translokace vznikají při spojení dvou akrocentrických chromosomů (13, 14, 15, 21 a 22) v místě centromery. Vyskytují se u 1,1 % pacientů s opakovanými ztrátami těhotenství a u 3 % infertilních mužů. Riziko takových nosičů je v oplození, kdy mohou vznikat monosomická a trisomická embrya. Nejčastější translokací (75 % všech Robertsonských translokací) je přestavba zahrnující chromosomy 13 a 14 a zde je vyšší riziko pro trisomii 13 – Patauův syndrom<sup>26</sup>.

## **Reciproké translokace**

Reciproké translokace vznikají výměnou segmentů mezi dvěma nehomologními chromozomy. Pacienti mohou být bez fenotypového projevu, pokud místa zlomu neporušují funkci žádného genu či pokud nebyl žádný genetický materiál získán ani ztracen. Jinak mají pacienti mimo jiné zvýšené riziko neplodnosti, opakovaných potratů a narození potomka s vývojovými abnormalitami<sup>26</sup>. U mužů s azoospermií je výskyt 0,5%, s oligozoospermií je 0,7% a u infertilních žen cca 1 %<sup>91</sup>. Průběh oogeneze není těmito reciprokými translokacemi narušován (projeví se až se vznikem nebalancované konstituce) na rozdíl od spermatogeneze, kdy může

způsobovat až její úplnou zástavu. Výskyt nebalancovaných chromosomálních konstitucí je ve spermích je obecně nižší než ve vajíčkách díky přísnějším kontrolním bodům v meióze<sup>98</sup>.

### **Komplexní strukturální přestavby**

Tyto přestavby vznikají na základě více než dvou chromosomálních zlomů. Nosičství těchto aberací je spojováno s rizikem spontánních abortů a také se zvýšeným rizikem potomka s vývojovými vadami<sup>26</sup>.

### **Inverze**

Inverze vznikají jako znovu napojení ulomené části chromosomu v opačné orientaci. Dále se také rozdělují 2 typy inverzí: paracentrické a pericentrické<sup>26</sup>. Paracentrické neobsahují centrozom chromozomu, zatímco pericentrické ano. U neplodných žen i mužů se nachází ve stejné míře a to v 0,3 %. Může být dále zvýšené riziko spontánních abortů<sup>91</sup>.

### **Marker chromosomy**

Jsou to strukturálně abnormální fragmenty chromosomů a jsou jednoduše určeny cytogenetickými metodami. Přenáší se většinou maternálně, ale 70 % případů je *de novo*. Třetina nosičů marker chromosomů mají klinické projevy jako neplodnost, azoospermie nebo oligospermie<sup>26</sup>.

### **Chromosomální mozaicismus**

Definicí mozaicismu je přítomnost dvou nebo více buněk s odlišnými chromosomálními konstitucemi, která vzniká během mitotických dějů v post-zygotním vývoji<sup>35</sup>. Buněčná regulace, mechanismy oprav a body kontroly buněčného cyklu jsou potlačeny během prvních dní post-zygotického vývoje<sup>99</sup>, a proto se časná embrya vyznačují podobností s rakovinou, kde také probíhá deregulovaný buněčný cyklus a je zde vysoký výskyt aneuploidie<sup>100</sup>.

Embryonální mozaicismu byl poprvé pospán v roce 1993, kdy Delhanty s kolegy pozoroval metodou fluorescenční *in situ* hybridizace na rýhujících se embryích různé počty chromosomů mezi buňkami ze stejného zárodku<sup>101</sup>. Později bylo to stejné potvrzeno Esvikem a Verlinským na blastocystách<sup>102</sup>. Moderní metody preimplantační genetické analýzy jsou v současné době schopny rozeznat mix euploidních a aneuploidních buněk s vysokou přesností, ale stále jsou zde výrazné variace různých výsledků mozaických embryí ve fázi blastocysty mezi klinikami – nejnovější odhady se pohybují mezi 4 až 22 %<sup>103–105</sup>. Mozaicismus tedy stále představuje klinické dilema, protože může vést ke diagnostickým chybám. Po provedení PGT-A se mohou embrya jevit jako euploidní, ale zároveň mohou mít pár aneuploidních buněk. Toto může dále ovlivňovat jejich implantační potenciál<sup>106</sup>. Medicinální důsledky mozaicismu jsou stále předmětem zkoumání. Z nedávných studií se usuzuje, že mozaická preimplantační embrya mohou vyústit ve zdravé potomky, ale stále je jejich počet nižší než s plně euploidními embryi<sup>107</sup>. Tudíž pravý klinický význam

mozaicismu u novorozenců zůstává nezachytitelný. Na jedné straně byl mozaicismus spojen s různými nemocemi jako např. psychiatrické poruchy, autoimunitní choroby a kongenitální malformace<sup>108</sup>, ale na straně druhé, mozaicismus byl také zdokumentován i ve tkáních zdravých lidí<sup>109</sup>.

## Metody preimplantační molekulárně genetické analýzy

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

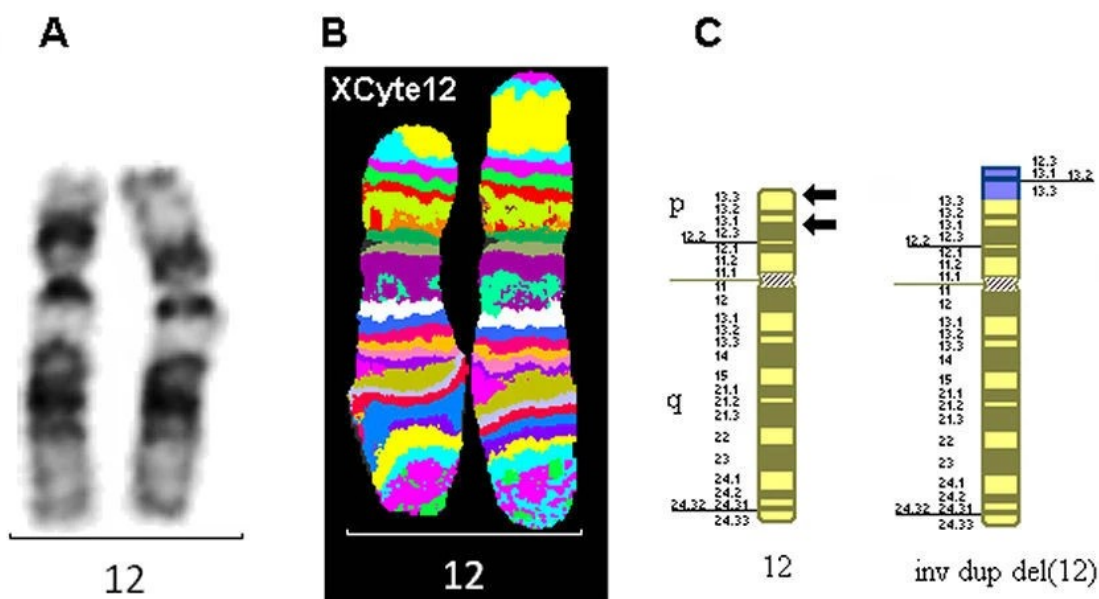
Vývoji metody fluorescenční *in situ* hybridizace předcházelo mnoho významných objevů v oblasti cytogenetiky. Pravděpodobně nejvíce přelomový byl objev počtu chromozomů a metod jejich zviditelnění. První pozorování lidských chromozomů pomocí hypotonického roztoku a speciálních barviv proběhlo již v roce 1956<sup>110</sup>. Dalším důležitým milníkem byl vývoj metody pruhování chromozomů (často používané je G-banding za použití barviva Giemsa) v roce 1970 a následné zavedení nomenklatury<sup>111</sup>. S rozvojem systému značení molekul radioaktivními sondami (byly nespecifické a výsledky měly velmi nízké rozlišení) přišla nová vědecká éra molekulární cytogenetiky. V roce 1992 se použila poprvé metoda FISH s využitím Y- a X-sond pro zabránění přenosu X-vázaných chorob na potomky<sup>112</sup>. Samotné zrození metody FISH pro přímé zjištění embryonální aneuploidie nastalo v roce 1993, od kdy se tato metoda používala na chromozomech se známými syndromy – 13 (Patauův), 18 (Edwardsův) a 21 (Downův)<sup>113,114</sup>. Většina autozomálních trisomií totiž nedovoluje přežití jedince, právě pouze trisomie chromozomů 13, 18 a 21 dovolují narození potomka (pouze u trisomie 21 se pacienti dožívají dospělosti). Dále se také obvykle sledovali chromozomy pohlavní a autozomy 16 a 22, u kterých jsou abnormality často pozorovány při opakovaných spontánních potratech<sup>115</sup>. Dnes je metoda určena k identifikaci chromozomálních poruch, a to buď změn v počtu chromozomů a tím vzniku aneuploidie anebo strukturních změn chromozomů, které již byly diskutovány výše.

Princip metody zahrnuje hybridizaci chromosomově specifických DNA sond značených různými barvivy na jádra nebo chromosomy fixované na mikroskopické sklíčko. Sondy jsou krátké úseky DNA komplementární k analyzovanému chromozomu, na který se váže právě fluorescenční barvivo. Po dokončené hybridizaci je možné pozorovat barevné signály pomocí fluorescenčního mikroskopu. V praxi se stanovuje buď počet signálů pro numerické aberace anebo poloha těchto signálů pro detekci strukturních přestaveb<sup>115</sup>. Značení sond probíhá buď přímo nebo nepřímě. Přímé značení využívá nejčastěji fluorescenční barvivo (fluorochrom) a umožňuje pozorovat barvený signál ihned po dokončení hybridizace. U nepřímého značení je sonda značena haptenem (látka s antigenními vlastnostmi) a následná detekce probíhá imunologicky pomocí protilátek<sup>116</sup>. Před samotnou hybridizací musí být vzorek ošetřen pepsinem po dobu 20 min při 37 °C za účelem omytí nežádoucích proteinů. Dále se provádí oplach v PBS pufru (fosfátový roztok s 0,15 M NaCl), ten následuje fixace v 1 % roztoku formaldehydu a dehydratace vzorku etanolovou řadou. Po takovémto procesu jsou jádra připravena na denaturaci a hybridizaci. K vzorku je tedy po denaturaci při 72 °C přidáno dostatečné množství sond a to při 37 °C po dobu 40-60 minut a sklíčko je zapečetěno. Odmytí

přebytečných sond probíhá za pomoci 60% roztoku formamidu a SSC (fyziologický roztok citrátu sodného). Tyto preparáty jsou poté uchovávány ve tmě a ošetřeny speciální látkou proti vysychání (antifade) společně s barvivem DAPI pro kontrast pozadí<sup>117</sup>. Takto připravené vzorky je možné podrobit obrazové analýze pomocí fluorescenčního mikroskopu.

FISH je dostatečně rychlý diagnostický molekulárně genetický nástroj a funguje stejně dobře jak na metafázních, tak na interfázních jádrech<sup>118</sup>, kdy tradiční cytogenetické metody jsou závislé na přítomnosti pouze metafázních chromozomů. FISH se dala tedy použít pro zkoumání více chromozomálních regionů najednou za použití vícero sond, např. jednu centromerickou a dvě sub-telomerické. Dnes existují také různé modifikace postupů FISH metody, které by ji měly vylepšovat a rozšiřovat její využití. Můžeme zmínit například spektrální karyotypování (SKY), které vyvinul Schröck s kolegy, jež je založeno na současné hybridizaci všech 24 chromozomů najednou se sondami s různými fluorochromy a jejich kombinacemi. SKY je o dost efektivnější v identifikaci nepatrných translokací a komplexnějších aberací než klasické provedení metody FISH<sup>119</sup>. Tato metoda dokáže odhalit i marker chromosomy<sup>120</sup>. Laboratorní protokol pro spektrální karyotypování se velmi podobá klasické FISH akorát k samotné hybridizaci dochází se směsí 24 barevných sond po dobu dvou dnů. Vyhodnocení probíhá pomocí speciálního spektrálního vyobrazení („spectral imaging“) a každý chromozom je rozpoznán svou vlastní barvou<sup>121</sup>. Na stranu druhou ale metoda SKY není schopna identifikovat pericentrické a paracentrické inverze a také přesně určit body zlomů<sup>122</sup>. Pro tyto účely se vyvinula další modifikace FISH a tou je metoda MCB („multicolor banding“) neboli M-FISH – vícebarevná fluorescenční *in situ* hybridizace. MCB je vysoce spolehlivá a reprodukovatelná metoda FISH. Může být použita pro detekci komplexních balancovaných i nebalancovaných chromosomových přestaveb a marker chromozomů, které by jinými metodami, ať už standardní FISH či pokročilými mikročipovými metodami (jejichž výhody a limity budou diskutovány později), nebyly zachyceny. Pro vyhodnocení se používá speciální počítačový software, který konvertuje fluorescenční profily podél délky chromozomů na pseudobarvené pruhy a ty mohou být dále porovnány se standardním G-pruhováním<sup>123</sup>. Pro lepší vizuální představení a popis metody MCB je níže připojen obrázek (Obrázek 1). V tomto případě byl zkoumán karyotyp jedince, který byl laboratoři dodán s doporučením týkajícího se vývojového a mentálního opoždění u jedince. Předběžně určený karyotyp byl 46,XX,12p+. Byla provedena analýza FISH s lokus-specifickou sondou a MCB se setem sond pro chromozom 12 (XCyte12). Vyhodnocení MCB se ukázalo být informativní pro pořadí pruhů a indikovalo invertovanou duplikaci na terminálním regionu krátkého ramena abnormálního chromozomu. Tudíž výsledný karyotyp lze zapsat jako 46,XX,inv dup del(12)(qter→p13.3::p13.3→p12.3:)<sup>120</sup>.





**Obrázek 1:** Chromozom 12s (A) chromozom s G-pruhováním, (B) chromozom s vícebarveným pruhováním, (C) ideogram s částečným G-pruhováním. Šipky označují body zlomů<sup>123</sup>.

PGT-A pomocí FISH bylo velmi populární v devadesátých letech až do brzkých let druhého tisíciletí, kdy byla zveřejněna Mastenbroekova kontroverze<sup>124</sup>, která tvrdila, že dle jejich výsledků, PGT-A prováděný metodou FISH snižoval LBR u žen s vyšším mateřským věkem. Od té doby byla PGT-A středem velkých debat mezi odborníky. FISH se tedy stala zastaralou metodou a byla postupně nahrazována modernějšími molekulárními technikami<sup>125</sup>. Je důležité dále vést diskuzi ohledně nutnosti PGT-A v IVF cyklech, zejména protože byly zveřejněny studie, které poukazují na narození normálních euploidních potomků po embryotransferu do děloh matek, které dle PGT-A měly všechna embrya aneuploidní<sup>126</sup>. Tomu všemu následovalo formální vyjádření profesionálních asociací jako například Americká společnost pro reprodukční medicínu, Americká vysoká škola porodnictví a gynekologie a ESHRE, které odrazovaly od použití PGT-A<sup>127</sup>.

Znovuzrození preimplantačního genetického testování jako součásti asistované reprodukce nastalo s postupným nahrazováním FISH metodami umožňujícími celogenomovou analýzu. Práce se jim bude věnovat v následujících kapitolách. Jakkoliv je totiž metoda FISH efektivní, má své vlastní limity. Jednou z nich je omezený počet zkoumaných chromozomů (jedna skupina objevila možnost sledování až 12 chromozomů najednou<sup>128</sup>, ale jedná se stále jen o polovinu všech chromozomů). Je tedy používána hlavně na chromozomy spojované s genetickými syndromy slčitelnými se životem. Další limitací je sledování pouze očekávaných aberací, kdy sondy jsou zaměřeny pouze na konkrétní lokusy či chromozomy<sup>129</sup> a také časté zanedbání chromozomálního mozaicismu.

## Celogenomová amplifikace DNA pro genetickou analýzu

Hlavní komplikací pro celochromozomální analýzu byl převážně nízký výtěžek DNA – lidská diploidní buňka totiž obsahuje cca 6,6 pg DNA, což je moc málo (i při biopsii 5 až 10 buněk z embrya) na to, aby se daly použít konvenční molekulární přístupy. Klíčovým krokem bylo tedy vynalezení metody amplifikace celogenomové DNA. Autor každoročního review pro Genomics and Human Genetics z roku 2015 Huang s kolegy rozlišuje tři různé přístupy, které se liší svou chemií. Jedná se o modifikaci klasické polymerázové řetězové reakce – PCR s degenerovanými oligonukleotidy (DOP-PCR), mnohočetná amplifikace s vytěsňováním řetězce (MDA) a amplifikační cykly s vícečetným annealingem a loopingem z anglického názvu ‚multiple annealing and looping-based amplification cycles‘ (MALBAC)<sup>130</sup>.

### Technika PCR

PCR neboli polymerázová řetězová reakce hraje v biologii velkou roli již posledních 30 let. Jejím základním principem je opakované střídání cyklů denaturace dvouřetězcové DNA a renaturace osamocených řetězců se specifickými oligonukleotidy – ty jsou ve směsi v nadbytku. Díky termostabilní DNA polymeráze se tak syntetizují nové řetězce DNA. Proces rozdělujeme na 3 fáze: (1) denaturace probíhající při teplotě 95 °C, kdy se vodíkové můstky DNA řetězce rozpadají, (2) nasednutí primerů neboli tzv. annealing probíhající v teplotách mezi 50 a 60 °C, (3) syntetická fáze probíhající při teplotách v rozmezí 65–75 °C, kdy daná DNA polymeráza nasedá na 3' konce a začíná syntézu nového řetězce komplementárního k původní DNA (templátu).

V laboratořích molekulární cytogenetiky se pro celogenomovou amplifikaci používají převážně modifikace klasické PCR metody. Jednou z nich je PCR s využitím degenerovaných oligonukleotidy (DOP-PCR). Principem DOP-PCR je použití degenerovaných primerů obsahujících náhodnou šesti bázeovou sekvenci na 3' konci a fixovanou sekvenci na 5' konci DNA<sup>130</sup>. Prvních pár kol připojování primerů a elongace řetězců probíhá za nižších teplot, aby se vytvořilo hodně bodů vazby primerů. Následně se teplota pro hybridizaci a elongaci zvýší, aby se primery mohly vázat specifitěji právě na již označené fragmenty z minulých kol PCR. Výsledkem jsou náhodně amplifikované rozdílně dlouhé fragmenty DNA. Data ukazují, že DOP-PCR je možné použít k amplifikaci jakékoliv sekvence v lidském genomu s excelentními výsledky pro další využití DNA ke genotypování<sup>131</sup>. Problémem DOP-PCR bývá nízké pokrytí genomu právě kvůli exponenciální amplifikaci, díky které se i malé odchylky exponenciálně zvětšují a vytváří se tak regiony s velmi nízkou a nebo naopak velmi vysokou amplifikací<sup>130</sup>.

### Technika MDA

Metoda mnohočetné amplifikace s vytěsňováním řetězce byla vyvinuta v roce 2001 Laskenem s kolegy<sup>132</sup> a využívá náhodné hexamery jako primery a bakteriofágovou vysoce procesní  $\phi$ 29 DNA polymerázu<sup>133</sup>, která má silnou aktivitu vytěsňování vláken. Polymeráza  $\phi$ 29 dokáže syntetizovat řetězce již při 30 °C, tudíž tato metoda nevyžaduje vysokých teplot<sup>134</sup>.

V izotermních podmínkách MDA prodlužuje náhodné primery a produkuje rozvětvené struktury, které jsou dále prodlužovány dalšími primery, až vytvoří více rozvětvenou strukturu. MDA nabízí mnohem větší pokrytí genomu než DOP-PCR, ale stejně jako DOP-PCR je to proces využívající exponenciální amplifikaci, která způsobuje nerovnováhu v míře amplifikace po délce genomu. Nicméně nutno dodat, že MDA snižuje tuto nerovnováhu až o 4 řády<sup>135</sup>. Další limitací je také nemožná reprodukovatelnost na jiných buňkách<sup>130</sup>.

### **Technika MALBAC**

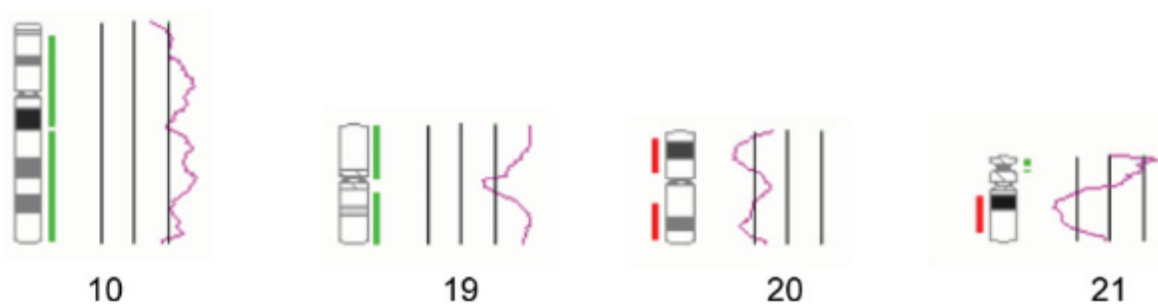
Poprvé byla tato metoda pro použití k celogenomové analýze popsána v roce 2012 Zongem s kolegy. Jedná se víceméně o kombinace dvou výše zmiňovaných metod. Její unikátní vlastností ale je, že provádí tzv. quasi-lineární amplifikaci, což má za následek snižování vlivu exponenciální amplifikace. Tímto je zvýšena přesnost metody a snížena míra falešné positivity. Je to dané tím, že MALBAC nevytváří kopie kopií, ale soustředí se na kopírování pouze originální genomové DNA. Primery navrhované speciálně pro tuto metodu mají 27 společných bází na 5' konci a 8 náhodných bází na 3' konci. DNA polymeráza používána v této metodě je termostabilní a disponuje vytěšňovací aktivitou. Primery hybridizují při teplotách v rozmezí 15–20 °C. Následně je teplota zvýšena na 65–75 °C a tvoří se semiamplikony. Ty jsou poté odstraněny z templátu při teplotě 95 °C a jsou z nich produkovány celé amplikony s komplementárními konci. Při snížení teploty na 58 °C začnou tvořit tzv. hairpin formace, a to zabrání jejich další amplifikaci. Tento cyklus je opakován 8x až 12x. Takto připravené amplikony jsou dále podrobeny exponenciální amplifikaci pomocí PCR, a tímto se vygeneruje dostatečné množství DNA pro potřebné genetické analýzy. Na rozdíl od výše zmiňovaných metod je MALBAC reprodukovatelná<sup>130</sup>. Data ukazují, že ze všech 3 metod, MALBAC vykazuje největší míru uniformity, specifity a reprodukovatelnosti<sup>135</sup>.

### **Komparativní genomová hybridizace (CGH)**

Komparativní genomová hybridizace je molekulárně cytogenetická metoda, která vyšetřuje chromozomové aberace pomocí principů kvantitativní dvoubarevné FISH. Porovnává intenzity dvou rozdílně fluorescenčně značených DNA sond, a to DNA pacienta a zároveň DNA zdravého jedince (referenční vzorek). Umožňuje tak detekci kvantitativních změn v genomu (amplifikace a delece). Metoda CGH byla původně vyvinuta pro evaluaci nabytí či ztrát chromozomů v tumorech a v roce 1996 byla poprvé použita na blastomerách pro současné vyšetření všech chromozomů<sup>136</sup>. CGH je aplikovatelná na buňky v jakémkoliv stádiu buněčného cyklu a nevyžaduje fixaci a nátěr na sklíčko. Nicméně před její použitím je nutné získat alespoň 1 mikrogram DNA pomocí celogenomové amplifikace. Metoda využívá kompetitivní hybridizace dvou sond, většinou značených zeleně (vyšetřovaná DNA) a červeně (referenční vzorek DNA), na metafázní chromozomy na mikroskopickém sklíčku. Sondy tak přisedají na komplementární sekvence, tudíž každý chromozom je obalen několika tisíci DNA fragmenty. Při vyhodnocování metody za pomoci počítačové analýzy se porovnává podíl zelených a červených signálů podél chromozomů a vytvoří se CGH křivka (Obrázek 2). Přebytek zelené značí nabytí genetického

materiálu (např. trisomie) a naopak přebytek červeného signálu indikuje chromozomální ztrátu<sup>136</sup>.

V porovnání s metodou FISH, která dokáže detekovat chromosomální aberace pouze na dopředu vybraných místech genomu, CGH umožňuje celogenomové screening k detekci aberantních míst bez předešlé znalosti jejich lokace. Metoda CGH má nicméně i své limitace. Jednou z nich je malá rozlišovací schopnost a to 5-10 Mb. Dále je to neschopnost identifikace přestaveb bez kvantitativních změn tzn. balancované změny jako například reciproké či Robertsonské translokace či inverze. Nízkou rozlišovací schopnost řeší modifikace CGH, která se označuje HR-CGH z anglického názvu high-resolution CGH. Tato metoda zvyšuje rozlišovací schopnost CGH až na 3-5 Mb<sup>137</sup>. Další modifikací CGH metody je její mikročipová dokonalejší verze, které se bude práce věnovat v další části.



**Obrázek 2:** Ukázka klinického screeningu lidské blastocysty pomocí CGH. Jsou zde vyobrazeny poměrové profily chromozomů 10, 19, 20 a 21 ukazující nadbytečné kopie u chromozomů 10 a 19 a ztrátu kopie u chromozomů 20 a 21. Předpokládaný karyotyp tohoto embrya je: 46,XX,+10,+19,-20,-21<sup>136</sup>.

## Microarray metody

Technika microarray se začala objevovat okolo roku 2005, kdy vícero laboratoří začalo uplatňovat metodu, která by byla schopna testovat všech 23 párů na aneuploidii a zároveň na chromozomální strukturální aberace<sup>136</sup>. Pro genetické analýzy jsou současně dostupné dva typy microarrays. Single-nucleotide polymorphism a array komparativní genomová hybridizace. Pro obojí musí být testované buňky (nejčastěji trofoektoderm) zlyzované a amplifikované. Těmito dvěma přístupům se práce bude věnovat v následujících podkapitolách.

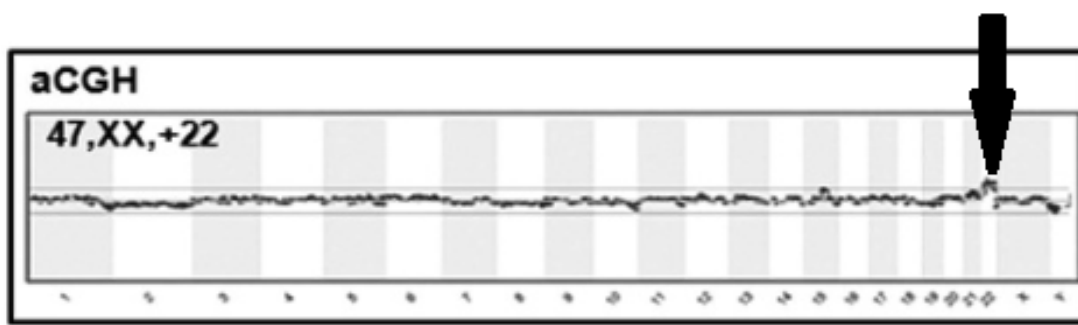
### Array komparativní genomová hybridizace (aCGH)

Hlavním rozdílem mezi CGH a její array verzí je, že namísto s metafázními chromosomy se fluorescenčně značená vyšetřovaná DNA a referenční DNA hybridizují s mnoha specifickými naklonovanými sekvencemi DNA. Genom je tudíž rozdělen na malé fragmenty a zároveň uspořádán do tzv. mřížky, kterou označujeme právě jako array, microarray nebo biočip. Využití biočipů jako podkladu pro hybridizaci se rozlišovací schopnost metody zlepšuje, a to pod 100 kb. Biočipy užívané pro tuto metodu mohou být různé. Můžeme zmínit např. BAC čipy založené

na umělých bakteriálních chromozomech o délce 150 až 200 kb a nebo oligonukleotidové čipy syntetizované *in situ* přímo na pevném povrchu mřížky/sklíčka (délky se pohybují mezi 25 a 85 nukleotidy)<sup>136</sup>.

Samotný princip metody aCGH zahrnuje počátečně celogenomovou amplifikaci jak kontrolní, tak vyšetřované DNA. Takto amplifikované vzorky jsou následně označeny fluorochromy Cy3 a Cy5, resp. zelenou a červenou fluorescenční sondou. Vzorky se sondami jsou poté smíchány a přidány na mřížku, kde jsou ponechány k hybridizaci po dobu 3 hodin. Následně je nutné sondy vymýt a k tomu slouží roztok SSC, který se nechá působit cca 10 minut při pokojové teplotě. Omyté mikročipy jsou vysušeny v centrifuze po dobu 3 minut. Poté jsou vzorky připravené na počítačovou analýzu a vyhotovení hybridizačního profilu. Embrya jsou takto klasifikována do 3 různých označení: (1) ‚normální či balancované‘, pokud výsledný profil neukáže žádné nabytí ani ztrátu v autozomech, (2) ‚nebalancované‘, pokud se ukáže částečné nebo kompletní nabytí či ztráta ve sledovaných chromozomech, které se účastní ve strukturálních přestavbách a (3) ‚aneuploidní‘, pokud je zachyceno nabytí či ztráta jakéhokoliv jiného chromozomu<sup>90</sup>.

Technika aCGH tedy umožňuje detekci variací v počtu kopií na základě porovnání bioptovaného genetického materiálu s referenčním vzorkem<sup>28</sup> (tj. normální karyotyp zdravého jedince 46,XY a 46,XX). Po amplifikaci DNA je vzorek označen fluorescenční sondou a hybridizován s DNA biočipovou mřížkou. Laserový skener poté získává data o každém bodě destičky a speciální počítačový software dokáže následně detekovat, zda se jedná o ztrátu nebo nabytí chromozomu<sup>138</sup>(Obrázek 3).



**Obrázek 3:** aCGH profil indikující trizomii chromozomu 22<sup>139</sup>. (Upraveno)

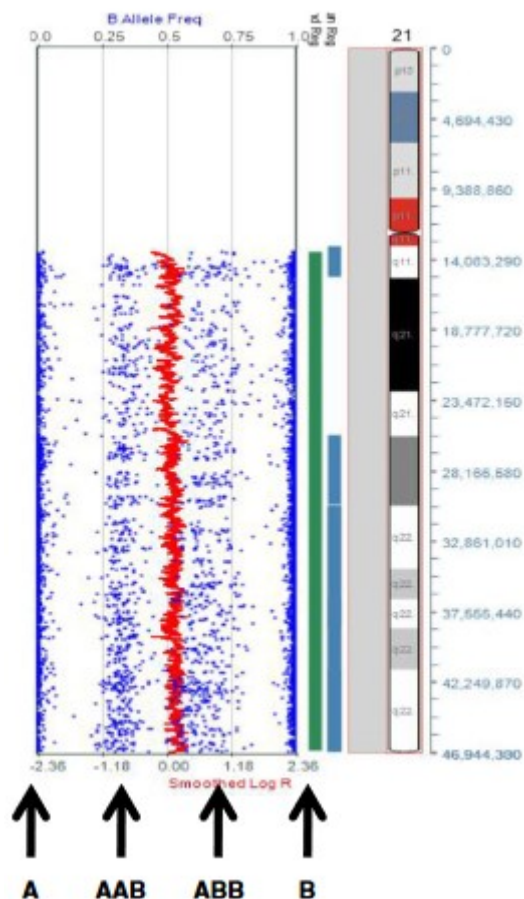
Komerčně používaná metoda aCGH pro preimplantační genetickou analýzu dokáže rozeznat pouze celochromozomální aneuploidie a není validovaná k rozeznávání balancovaných strukturálních aberací, které nedoprovází kvantitativní změna genetického materiálu, jako jsou translokace a inverze<sup>127</sup>. Nedokáže rovněž detekovat změnu sekvence ve formě bodových mutací. Na tyto případy je výhodnější využít metody FISH či celogenomového sekvenování, ideálně kombinace obou. Dále má také limitovanou schopnost rozeznat mozaicismus v trofoektodermálních buňkách<sup>127</sup>. Nevýhodou také zůstává, že nelze identifikovat abnormální

ploidii embrya a rozeznat meiotické a mitotické chyby ústící v aneuploidii či uniparentální dizomii (přítomnost dvou homologních chromozomů pocházejících od jednoho rodiče)<sup>140</sup>. Některé studie dokonce vykazují míru chybovosti aCGH až 30 %<sup>139</sup>.

Na stranu druhou je metoda zcela jistě revoluční díky pokrokovému řešení pro páry, kde jeden nebo oba partneři jsou nosiči Robertsonských či reciprokých translokací. Takovýto screening dokáže spojit vyšetření na známé translokace i detekci kompletní sady chromozomů pro odhalení možné aneuploidie při vyšším věku matky<sup>141</sup>. Metoda aCGH umožňuje celkovou analýzu do méně než 48 hodin, a tak nevyžaduje kryokonzervaci embryí, pokud jsou použity třídní embrya. Analýza se dá urychlit na zhruba 10 hodin, což by umožnilo testování i pozdějších stádií embryí bez nutnosti kryokonzervace, ale je nutné provést vícero studií na přesnost takto urychlené aCGH<sup>136</sup>. Klinický výzkum by se měl do budoucna soustředit na určení negativních prediktivních hodnot a klinickou přesnost metody aCGH, pro kterou tyto informace nejsou známy, zejména protože falešná pozitivita při screeningu na aneuploidii může mít velký vliv na pacientky ve vyšším věku či na pacientky s monogenními chorobami<sup>139</sup>.

### **Single-nucleotide polymorphism array (array SNP)**

Jednotlivé nukleotidové polymorfismy jsou páry jednotlivých nukleotidů (A, T, C, G) v genomové DNA, které jsou velmi variabilní mezi druhy. V kontextu preimplantační genetické analýzy se SNPs (vyslovováno *snips*) validují v non-exonových kódovacích regionech a obvykle je evaluováno až 300 000 SNPs roztroušených podél genomu najednou<sup>140,142</sup>. Metoda SNP pojímá microarray metodu trochu odlišně v porovnání s aCGH, která současně hybridizuje rozdílně značené DNA fragmenty na ten stejný biočip. Při využití SNP se vyšetřovaná DNA hybridizuje ne zároveň, ale paralelně s referenčním vzorkem. Tím, že jsou oba vzorky hybridizovány separátně, mohou být také oba značeny stejným fluorochromem. Následují dva způsoby, kterými je vyhodnocován počet kopií: (1) Detekované alely na každém SNP lokusu jsou porovnány s těmi od rodičů, díky čemuž se jsou odhaleny ty alely, které embryo zdědilo (např. trizomie chromozomu je indikována zděděním 3 zřetelných haplotypů a monozomie homozygotitou všech lokusů na postiženém chromozomu). (2) Jsou porovnány fluorescenční intenzity vyšetřovaného vzorky a referenčního vzorku. Pokud sonda daného chromozomu vykazuje jasnější signál pro vyšetřovanou DNA než pro referenční vzorek, tak se odhaduje nabytí chromozomálního materiálu (trizomie) a naopak snížená fluorescence naznačuje chromosomální ztrátu<sup>136</sup>. Příklad detekované trizomie pomocí SNP array je ukázán na Obrázku 4.



**Obrázek 4:** Ukázka SNP array profilu indikující trizomii chromozomu 21. Můžeme si všimnout dvou heterozygotních pruhů (AAB a ABB), což je asociováno s nálezem trizomie<sup>127</sup>.

Výhodou SNP array metody je její vysoké rozlišení a to až 5 kb. Informace o genotypu umožňuje identifikaci rodičovského původu jakékoliv abnormality díky srovnání genotypu referenčního vzorku s těmi od rodičů. Nevýhodou nicméně zůstává finanční a časová náročnost<sup>140</sup>. SNP array analýza trvá okolo 30 až 40 hodin a poskytuje genotyp. Výhodou je naopak, že SNP array metoda dokáže rozeznat uniparentální dizomii a mozaicismus (pokud bylo odebráno dostatečné množství trofoektodermních buněk), ale kvůli poskytování genotypu je limitovaná v identifikaci triploidie<sup>127</sup>. Další nevýhoda se týká již procesu celogenomové amplifikace. Kvůli nutnosti generování obrovského množství DNA pro microarray analýzu se často objevují chyby v podobě preferenční amplifikace a ADO z anglického názvu „allele drop out“<sup>136</sup>, kdy jedna alela zůstane nedostatečně amplifikována (toto může způsobit falešně pozitivní výsledky analýz, protože alelický poměr již nereprezentuje ten původní)<sup>143</sup>.

Metoda jednotlivých nukleotidových polymorfismů se dá současně použít k identifikaci single-gene poruch. Je to obrovská výhoda oproti FISH, která současný screening na aneuploidii a monogenní choroby nedokáže. Nelze to nicméně provést pouhou SNP array metodou, ale je

zde nutné určení zdědění mutace provést nepřímo tzv. linkage analýzou. To zahrnuje genotypování SNPs lokalizovaných v blízkosti bodu mutace způsobující danou poruchu<sup>136</sup>.

Která z microarray metod se bude do budoucna používat je stále nejasné. Klinicky používaná metoda musí spojovat přesnost, rychlost a také finanční náročnost na laboratoře a pacienty. Zatím se klinická sféra stále přiklání k použití klasické CGH metody pro komplexní screening na aneuploidie<sup>136</sup>.

### Kvantitativní real-time PCR (qPCR)

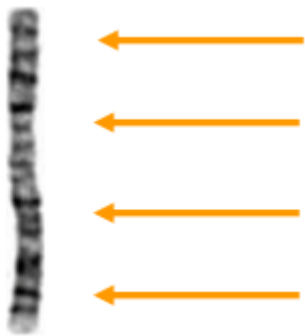
Kvantitativná PCR je jedna z dalších metod k identifikaci celochromozomální aneuploidie na základě detekce počtu kopií a také pro detekci monogenních chorob. Původně byla qPCR vyvinuta a používána jako základ studií genové exprese, kde bylo třeba kvantifikovat množství transkriptu daného genu. Má ale také potenciál evaluovat množství DNA v daném vzorku<sup>144</sup>. Byla vyvinuta jako rychlejší a levnější alternativa komplexního chromosomálního screeningu oproti aCGH a SNP metodám a preklinické studie na její přesnost udávají úspěšnost v určení správného karyotypu na 98-99 %.<sup>139</sup>.

Základním principem kvantitativní real-time PCR je sledování kvantity amplifikovaných fragmentů během jednotlivých cyklů. Toto pozorování je možné díky změnám intenzity fluorescenčního záření, kdy fluorescenční záření je přímo úměrné množství produktu. Fluorescenční schopnosti produktům dodávají fluorescenční barviva, která jsou do směsi přidávány a nijak neovlivňují průběh reakce<sup>145</sup>. Pro qPCR se může využít ‚SYBR assay‘ analýzy, která fluorescenčně značí dvouvláknové produkty polymerázové řetězové reakce, ale o mnoho častěji se pro preimplantační genetickou analýzu používá sada primerů a sond s názvem TaqMan Master Mix<sup>144</sup>. TaqMan PCR využívá nukleotidové sondy, které jsou komplementární k vnitřní sekvenci cílové DNA. Tato sonda má dvě fluorescenční části, kdy emisní spektrum jednoho překrývá excitační spektrum druhého. To má za následek tzv. ‚kalení‘ prvního fluoroforu o sekundu. Pokud je sledovaný produkt vytvořen, sonda je degradována prostřednictvím 5'-nukleázové aktivity Taq polymerázy. Degradace následně umožní oddělení dvou fluoroforů, což snižuje kalení a zvyšuje intenzitu vyzařovaného světla. Vzhledem k tomu, že tento přístup zahrnuje fluorescenční měření, která lze provést bez otevření PCR trubice, riziko kontaminace je výrazně sníženo<sup>146</sup>. Pro zjištění počtu kopií využívá qPCR 3 až 4 lokus-specifické amplikony podél každého chromozomu, které porovnává s referenčním genem ze stejného chromozomu<sup>28</sup>. Následné vyhodnocování probíhá stanovením tzv.  $C_t$  hodnoty.  $C_t$  hodnota je tzv. treshold, kdy množství fluorescence, které je přímo úměrné množství produktu, je možné detekovat. Pro každý chromozom ve vyšetřovaném vzorku je tato hodnota vypočítána a následně normalizována na  $C_t$  hodnoty chromozomů ze zdravých jedinců. Jejich odchylky jsou následně indikátory možných celochromozomálních aneuploidii<sup>144</sup>. Ukázku výsledku metody qPCR můžeme vidět na obrázku 5 a 6 níže.

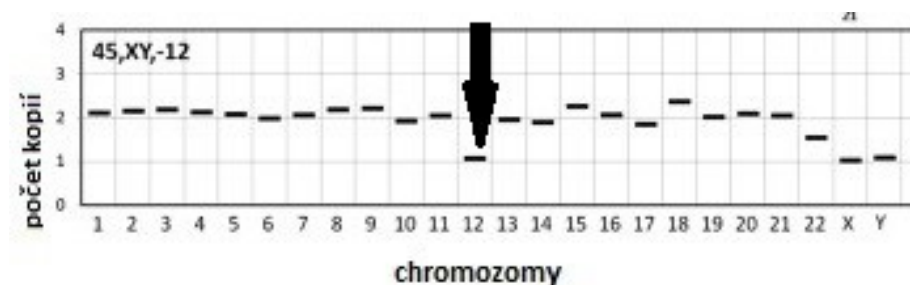
Metoda qPCR je sice velice rychlá (4-12 hodin), což umožňuje dokončení analýzy ve stejný den jako získání bioptovaného materiálu, ale zároveň velice vytěžující, co se týče nároků na



pracovníky. qPCR se nicméně jeví jako zcela robustní metoda pro aneuploidní screening díky nezávislosti na buněčném typu určenému k testování (vykazuje shodné výsledky záchytu aneuploidie jak u embryí, tak u lymfocytů či fibroblastů). Metoda qPCR by mohla být aplikována i pro identifikaci segmentálních aneuploidií spojených se zděděním nebalancovaných translokací a to jednoduchým přidáním specifických sond cílených na obě strany bodu zlomu na postiženém chromozomu<sup>144</sup>. Vzhledem k náročnosti se silně doporučuje použití automatizace. Metoda qPCR má tedy schopnost identifikovat triploidie, ale vzhledem k tomu, že neposkytuje genotyp, nerozezná uniparentální dizomii ani strukturální aberace<sup>144,147</sup>.



**Obrázek 5:** Toto schéma ukazuje reprezentaci regionů daného chromozomu zkoumaných qPCR. Povšimneme si nízkého počtu regionů, které tato metoda dokáže hodnotit<sup>127</sup>.

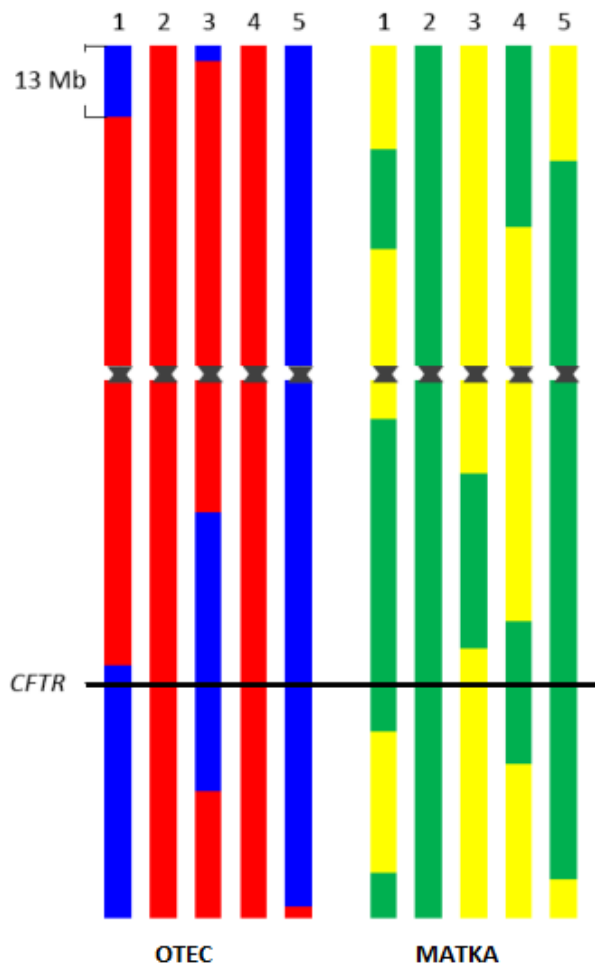


**Obrázek 6:** Příklad 24-chromozomální analýzy počtu kopií pomocí qPCR indikující monozomii chromozomu 12<sup>144</sup>. (Upraveno)

## Karyomapping

Karyomapping je jedna z nejnovějších metod (do praxe zavedena v roce 2010) preimplantační genetické analýzy lidských embryí pro stanovení přítomnosti monogenních chorob (ukázka na Obrázku 7), kterou je daný pár zatěžován, v embryích. Dnes je možné metodu využít pro identifikaci tedy jak monogenních chorob, tak strukturálních chromozomálních přestaveb, aneuploidií a také pro diagnostiku polyploidie a zjištění rodičovského původu jednotlivých mutací<sup>148</sup>. Využívá obecně známé polymorfní markery podél celého genomu k nalezení genu způsobující poruchu. Metoda je revoluční primárně z hlediska drastického snížení času pro přípravu testování tohoto typu. Dříve bylo nutné vytvořit pro každý jednotlivý případ, pro

každou rodinu, specifický set testů, což mohlo trvat až několik měsíců. Karyomapping je jeden test, který je aplikovatelný na každý případ a snižuje tím preklinickou přípravu na 2-4 týdny. Principem je vygenerování tzv. DNA ‚fingerprintu‘ objevující se okolo chybného genu v dané rodině. Pro karyomapping je nutné odebrat DNA jak páru, tak rodinného příslušníka, u kterého je jeho genetický status znám. DNA páru a DNA rodinného příslušníka se poté porovnávají a tím se tzv. DNA fingerprint získá. Dále se získá DNA vzorek z embryí a u nich se také vygeneruje stejný fingerprint okolo zasaženého genu. Následně se provádí porovnání a vyhodnocení, zda se u embryí vyvine stejná choroba<sup>149</sup>.



**Obrázek 7:** Ukázka diagnostiky v případě cystické fibrózy (mutace v transmembránovém receptoru CFTR na dlouhém ramenu chromozomu 7 způsobující toto autozomálně recesivní onemocnění; potomci mají 25% šanci, že budou také postiženi touto poruchou). Oba rodiče jsou nosiči. Na základě zkoumaného referenčního vzorku bylo zjištěno, že stejný haplotyp jako postižený rodinný příslušník má i chromozom označený modrou barvou (paternální původ) i chromozom značený žlutou barvou (maternální původ). Obrázek ukazuje profil 5 vzorků: (1) přenašeč, který mutantní alelu zdědil po otci, (2) zdravý jedinec, (3) postižený jedinec, (4) zdravý jedinec a (5) je přenašeč, který zdědil alelu po otci<sup>149</sup>. (Upraveno)

Karyomapping využívá SNP čipů a Mendelových principů dědičnosti pro zjištění haplotypů. Je tak možné identifikovat informativní lokusy pro každý ze čtyř rodičovských haplotypů napříč každým chromozomem a zmapovat dědičnost těchto haplotypů a pozici případných křížení v probandu. Výsledná ‚karyomapa‘ identifikuje rodičovský a prarodičovský původ každého chromozomu a chromozomálního segmentu. Toto je jedinečné při každého jedince. Karyomapping tedy umožňuje jak analýzu dědičnosti založenou na genomové vazbě, tak detekci chromozomové nerovnováhy, kde jsou přítomny buď oba haplotypy od jednoho rodiče (trizomie), nebo ani jeden (monozomie/delece)<sup>149</sup>.

K vytvoření ‚karyomapy‘ se tedy využívají data ze SNP genotypování. Rodičovský SNP genotyp je zkoumán k identifikaci všech informativních lokusů SNP, ve kterých jeden rodič byl homozygotní (AA nebo BB) a druhý heterozygotní (Bb). Dále je identifikována alela přítomná pouze na jednom ze čtyř rodičovských chromozomů. Poté je každý SNP lokus (s výjimkou Y chromozomu) v embryu zařazen vzhledem k referenční hodnotě na základě přítomnosti či nepřítomnosti této alely v obou vzorcích. Na konec je dědičnost nepostižených a postižených genů určena na základě porovnání rodičovských haplotypů v oblastech zájmu, včetně lokusu genu, s referencí<sup>148</sup>.

Samotnému karyomappingu musí předcházet celogenomová amplifikace pro získání dostatečného množství DNA. K tomu účelu se využívá technika MDA. Užitím MDA je možné karyomappingem omezit analýzu pouze na informativní SNP lokusy a vyhnout se tak chybám způsobenými ADO. Tímto se obnoví původní model rodičovského haplotypu<sup>149</sup>. Karyomapping dokáže určit tzv. ‚key SNPs‘, což jsou heterozygotní SNPs, které umožňují vyhnout se riziku spojeného s ADO<sup>150</sup>. Key SNPs jsou definovány jako vzorky genotypů na informativních lokusech, které nemohly být ovlivněny ADO<sup>150</sup>. Následuje hybridizace na SNP čipech s 12 pozicemi, a to až 300 000 SNP markerů (HumanCytoSNP-12 bead array; Illumina). Každý SNP marker se opakuje 19x. Takto získaná data se odesílají do speciálního karyomappingového softwaru (BlueFuse Multi, Version 4.0; Illumina)<sup>148</sup>.

Jako výhody karyomappingu můžeme uvést následujících pět: (1) Vysoké rozlišení metody díky hustému zastoupení SNP v genomu, tudíž dokáže identifikovat i drobné přestavby (klasická cytogenetika a pruhovací metody to nedokáží), (2) rychlé výsledky vyšetření (24 až 48 hodin), což umožňuje transfer čerstvého embrya bez mražení, (3) není potřeba vytvářet specifický set sond pro zkoumané aberace jako je tomu u FISH, protože se zkoumá celý genom, tudíž je spolehlivější a cenově dostupnější, (4) umožňuje určit rodičovský původ aberací (na rozdíl od aCGH) a také (5) dokáže odlišit embrya zdravá od embryí postiženými balancovanými translokacemi díky detekci haplotypů blízkých míst bodu zlomu (metoda aCGH takovou schopnost nemá)<sup>148</sup>.

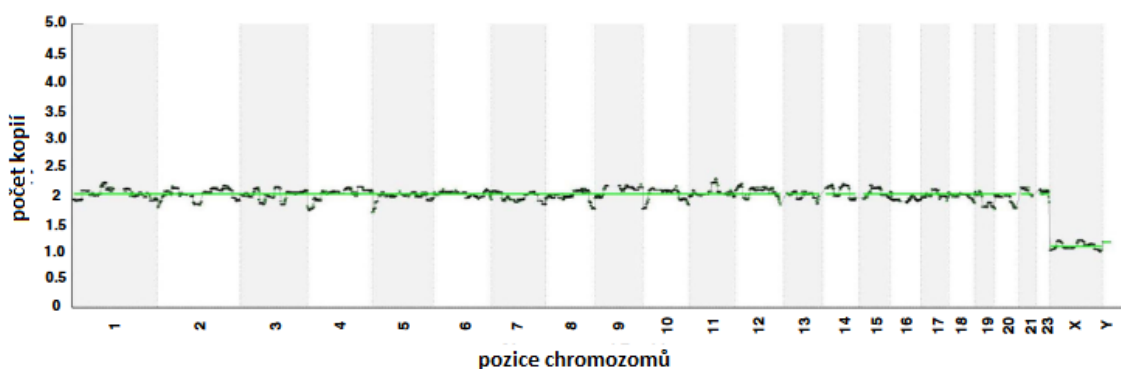
Nevýhodou zůstává nemožnost detekce mutací vzniklých *de novo*. Také potřeba referenčního vzorku od příslušníka rodiny může být limitujícím faktorem, protože nemusí být vždy dostupný<sup>148</sup>.

## Sekvenování nové generace (NGS)

Sekvenování nové generace (NGS z anglického názvu ‚New generation sequencing‘) je nejnovější přístup pro preimplantační genetického screeningu na aneuploidie a strukturální aberace. Nutno říci, že se nejedná o jednu specifickou metodu, ale NGS je spíše termín zastřešující vícero použití. Oproti metodám diskutovaným výše je to metoda na základě přímé DNA diagnostiky. Obdobně jako u karyomappingu můžeme zmínit schopnost analýzy všech chromozomů najednou.

První krok NGS protokolu je stejný jako u aCGH a to amplifikace pomocí WGA<sup>28</sup>. Po genomové amplifikaci je provedena procedura zvaná ‚bar-coding‘, při které je každému vzorku přidělena specifická sekvence<sup>151</sup> – cca 50 ng každého vzorku DNA je enzymaticky natráveno na milióny fragmentů a každý fragment je zfúzován s adaptérem a čárovým kódem<sup>127</sup>. Takto připravená DNA je tedy navázána na komplementární adaptérové oligonukleotidy na povrchu tzv. ‚flow cell‘<sup>151</sup> (označení pro pevnou destičku, kde sekvenace probíhá). Poté probíhá čtení sekvencí pomocí syntézy dvouvláknových řetězců s fluorescenčně značenými nukleotidy (sekvenace pomocí syntézy, z anglického názvu ‚sequencing by synthesis‘). Ty jsou dále excitovány světlem a data importována do softwaru. To vše vytvoří robustní knihovnu krátkých fragmentů až do cca 100 bází<sup>152</sup>, která je schopna produkovat reprezentativní a nezkreslené znázornění nukleových kyselin. Současně jsou dvě nejužívanější platformy: (1) MiSeq od Illumina a (2) Personal Genome Machine (PGM) od Thermo-Fisher Scientific<sup>151</sup>.

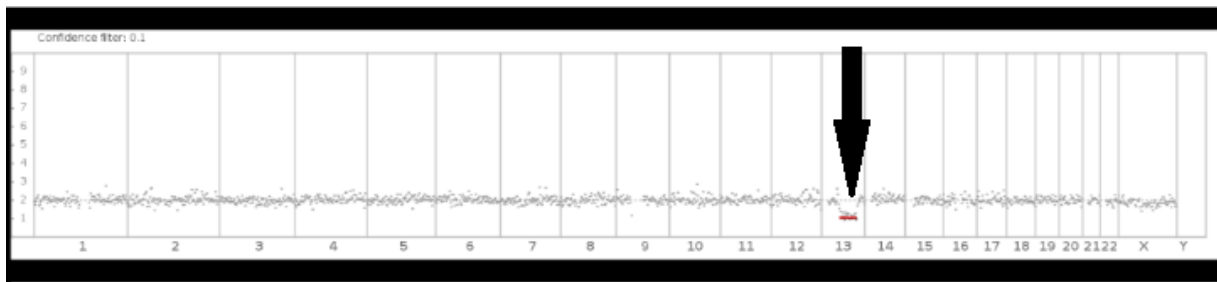
MiSeq využívá právě sekvenování pomocí syntézy, které bylo popsáno výše. Dokáže identifikovat pouze celochromozomální aneuploidie a neměla by se používat k detekci strukturálních přestaveb či abnormalit. Nicméně dokáže odhalit i změny v počtu kopií mitochondriálního genomu a monogenní mutace<sup>127</sup>.



**Obrázek 8:** Ukázka normálního karyotypu 46,XY zkoumaného pomocí NGS na platformě MiSeq<sup>127</sup>. (Upraveno)

Platforma PGM využívá k sekvenaci detekci iontů, které jsou uvolňovány při syntéze DNA polymerázou (při každém připojení nukleotidového trifosfátu je uvolněn jeden vodíkový ion, což způsobí malou změnu v pH a ta je snímána sensory). PGM dokáže analyzovat

celochromozomální aneuploidie, velké delece či duplikace a klinicky signifikantní delece a duplikace až do rozlišení 800 kb až 1 Mb. Dále dokáže identifikovat mozaicismus a zároveň určit mitochondriálního počet kopií<sup>127</sup>.



**Obrázek 9:** Ukázka karyotypu zkoumaného NGS pomocí platformy PGM. Jedná se karyotyp 46,XX s delecí na krátkém raménku chromozomu 13<sup>127</sup>. (Upraveno)

Takovýto proces umožňuje zkombinovat analýzy z 24 až 96 biopsií a zároveň optimalizuje náklady na jedno sekvenované embryo. Každá sekvence je poté porovnána s referenčním lidským genomem a speciálně naprogramovaný software (například Bluefuse Multi) využije data k nalezení variací v počtech kopiích a velkých delecích či duplikací<sup>151</sup>. Metoda vyžaduje také optimalizovanou DNA amplifikaci, aby se snížilo riziko artefaktů. Artefakty mohou být také identifikovány a odstraněny pomocí bioinformatického softwaru<sup>153</sup>. Nezávisle na použité platformě, analýza pomocí NGS trvá cca 13 až 16 hodin<sup>127</sup>.

Výhodou oproti microarray metodám je fakt, že se analyzuje každý jednotlivý nukleotid, který byl amplifikovaný WGA metodou, zatímco microarray metody sledují pouze dané lokusy definované fyzickou lokací sond<sup>152</sup>. Oproti aCGH se také liší tím, že nevyžaduje ko-hybridizaci s kontrolním vzorkem<sup>151</sup>. Dále také sekvenování umožňuje detekci *de novo* mutací po celém genomu (na rozdíl od například SNP array metody, která dokáže nalézat jen omezené množství SNPs známých v populaci)<sup>152</sup>. Další výhodou je, jak už bylo zmíněno, možnost testování vícero vzorků s různými indikacemi na jednom sekvenovacím čipu. Metoda je také poměrně přesná pro detekci segmentálních změn malých velikostí (až 14 Mb), tudíž je metoda schopná odhalit nejen celochromozomální aneuploidie, ale i částečné. Z toho vyplývá výhoda pro pacienty, kteří jsou nosiči balancovaných translokací, kteří metodu NGS podstupují pro detekci nebalancovaných derivací. Nicméně jsou potřeba hlubší validační studie pro tento přístup. Kromě toho je také metoda NGS schopná současné evaluace na monogenní choroby, translokace a abnormality mitochondriálního genomu<sup>151</sup>.

Mezi nevýhody se řadí nepříliš vysoká hloubka čtení, což má za následek nedostatečnou detekci alel pro identifikaci poměrů alel a tím rozpoznání haploidii a některých polyploidii, Také nedokáže metoda odhalit balancované chromozomální přestavby, jako jsou translokace či inverze<sup>151</sup>.

Díky dostupnosti mnoha molekulárních technik a přístupů se otevřela debata ohledně jejich senzitivity a spolehlivosti pro PGT. V současné době se kliničtí pracovníci nejvíce přiklání k NGS

založené na WGA díky jejímu širokému záběru pokrytí celého genomu, i když hloubka sekvenování není tak vysoká<sup>28</sup>. To vše je i tak výhodné pro detekci počtu kopií chromozomů. Pro příklad, Friedenthal et. al. vykazali vyšší míru implantace a zdravých těhotenství u žen podstupující PGT metodou NGS v porovnání s aCGH. Autoři tímto došli k závěru, že NGS zlepšuje klinické výsledky vzhledem k aCGH a metoda by mohla být účinnější při identifikaci mozaických embryí a těch s částečnou aneuploidii či triploidii<sup>154</sup>. Kliničtí pracovníci by měli také zvážit pravděpodobnost chyb. Míra chybovosti byla v kohortě embryí s NGS nalezena v 0,7 % a s použitím aCGH v 1,3 %<sup>155</sup>.

## Závěr

Molekulární a genetické přístupy v asistované reprodukci prošly velkými změnami za posledních pár desítek let. Snahou do budoucna je zcela jistě vývoj robustní, ale zároveň nízko nákladové analýzy pro všechny typy testování na aneuploidie, strukturní přestavby chromozomů a monogenní choroby (PGT-A, PGT-SR a PGT-M). Úkol do budoucnosti spočívá ve snižování nákladů na sekvenování a dostupnosti ‚whole genome sequencing‘ (WGS) pro každé jednotlivé embryo<sup>35</sup>. Otázkou ale nadále zůstává, zda široké uplatnění WGS je vůbec žádoucí. Na jedné straně by WGS mohla poskytovat jednotnou metodu pro testování na monogenní choroby. Nicméně zřetelnou nevýhodou by mohly být nečekané nálezy s vážnými zdravotními důsledky a také etická kontroverznost.

Jdou zde proti sobě dva opačné směry vylepšování celého procesu – jednoduchost a komplexnost. Na jedné straně je snaha o zjednodušení tím, že jsou zapojovány metody neinvazivní, které by podstatně ulehčily sběr genetického materiálu a učinilo by to tuto metodu dostupnější pro více center po světě. Na stranu druhou, je poptávka po větší komplexitě dat díky tomu, že došlo k enormnímu navýšení dat kombinováním více genetických analýz a eventuálně sekvenováním celých genomů embryí. Až čas ukáže, kterým směrem technologie půjde a zda-li více verzí PGT bude moct paralelně koexistovat<sup>35</sup>.

## Zdroje

1. Hrdy SB. *Mother Nature: Maternal Instincts and How They Shape the Human Species.*; 2000.
2. Sharma RS, Saxena R, Singh R. Infertility & assisted reproduction: A historical & modern scientific. *Assist Reprod*. Published online 2018:5.
3. Kalra B, Baruah MP, Kalra S. The Mahabharata and reproductive endocrinology. *Indian J Endocrinol Metab*. 2016;20(3):404-407. doi:10.4103/2230-8210.180004
4. Marsman HJ. *Women in Ugarit and Israel: Their Social and Religious Position in the Context of the Ancient Near East*. Brill; 2003.
5. Dake CL. *Infertility: A Survival Guide for Couples and Those Who Love Them*. New Hope Publishers; 2002.
6. Abasili AI. Hannah's ordeal of childlessness: Interpreting 1 Samuel 1 through the prism of a childless African woman in a polygynous family. *Old Testam Essays*. 2015;28(3):581-605. doi:10.17159/2312-3621/2015/v28n3a3
7. Durand JM. *La Femme Dans Le Proche-Orient Antique: Compte Rendu de La XXXIle Rencontre Assyriologique Internationale (Paris, 7-10 Juillet 1986)*. (Rencontre assyriologique internationale, ed.). Recherche sur les civilisations; 1987.
8. Johnston DR. The History of Human Infertility. *Fertil Steril*. 1963;14(3):261-272. doi:10.1016/S0015-0282(16)34860-9
9. Tsiompanou E, Marketos SG. Hippocrates: timeless still. *J R Soc Med*. 2013;106(7):288-292. doi:10.1177/0141076813492945
10. Leeuwenhoek AV. Observationes D. Anthonii Lewenhoeck, de natis'e semine genitali animalculis. *Philos Trans R Soc Lond*. 1679;12(142):1040-1046. doi:10.1098/rstl.1677.0068
11. Puerta Suárez J, du Plessis SS, Cardona Maya WD. Spermatozoa: A Historical Perspective. *Int J Fertil Steril*. 2018;12(3):182-190. doi:10.22074/ijfs.2018.5316
12. Spallanzani L. *Dissertations Relative to the Natural History of Animals and Vegetables*. J. Murray; 1784.
13. Bozzini G, Seveso M, Bono P, De Francesco O, Mandressi A, Taverna G. Lazzaro Spallanzani (1729-1799): the first successful artificial insemination experiments. *J Urol*. Published online 2016.
14. Foote RH. The history of artificial insemination: Selected notes and notables1. *J Anim Sci*. 2002;80(E-suppl\_2):1-10. doi:10.2527/animalsci2002.80E-Suppl\_21a
15. Ivanoff EI. On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. *J Agric Sci*. 1922;12(3):244-256. doi:10.1017/S002185960000530X
16. Ombelet W, Van Robays J. Artificial insemination history: hurdles and milestones. *Facts Views Vis ObGyn*. 2015;7(2):137-143.
17. Guttmacher AF. The Role of Artificial Insemination in the Treatment of Human Sterility. *Bull N Y Acad Med*. 1943;19(8):573-591.

18. Gregoire AT, Mayer RC. The Impregnators. *Fertil Steril*. 1965;16(1):130-134. doi:10.1016/S0015-0282(16)35476-0
19. Walters EM, Benson JD, Woods EJ, Critser JK. The history of sperm cryopreservation. In: Pacey AA, Tomlinson MJ, eds. *Sperm Banking*. Cambridge University Press; 2009:1-17. doi:10.1017/CBO9781139193771.002
20. Chelo E. Assisted reproduction: historical background. *Glob Bioeth*. 2001;14(2-3):69-74. doi:10.1080/11287462.2001.10800798
21. Polge C, Smith A, Parkes A. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures | Nature. *Nature*. 1949;(164).
22. Biggers JD. Walter Heape, FRS: a pioneer in reproductive biology. Centenary of his embryo transfer experiments. *Reproduction*. 1991;93(1):173-186. doi:10.1530/jrf.0.0930173
23. Gašsinovich AE, Glushakova TI. [Discovery of the nature of the process of fertilization and of the role of nuclear structures in this process (on the centenary of the discovery)]. *Tsitologija*. 1976;18(6):655-667.
24. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet Lond Engl*. 1978;2(8085):366. doi:10.1016/s0140-6736(78)92957-4
25. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009†. *Hum Reprod*. 2009;24(11):2683-2687. doi:10.1093/humrep/dep343
26. Řezáčová J. *Reprodukční medicína: současné možnosti v asistované reprodukci*. Mladá fronta; 2018.
27. Trávník P. *Klinická embryologie*. Mladá fronta; 2018.
28. Greco E, Litwicka K, Minasi MG, Cursio E, Greco PF, Barillari P. Preimplantation Genetic Testing: Where We Are Today. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4381. doi:10.3390/ijms21124381
29. Desai N, Ploskonka S, Goodman LR, Austin C, Goldberg J, Falcone T. Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2014;12:54. doi:10.1186/1477-7827-12-54
30. Katz-Jaffe MG, McReynolds S. Embryology in the era of proteomics. *Fertil Steril*. 2013;99(4):1073-1077. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.12.038
31. Uyar A, Seli E. Metabolomic assessment of embryo viability. *Semin Reprod Med*. 2014;32(2):141-152. doi:10.1055/s-0033-1363556
32. Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft WB, Wells D. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2008;23(11):2596-2608. doi:10.1093/humrep/den287



33. Gruhn JR, Zielinska AP, Shukla V, et al. Chromosome errors in human eggs shape natural fertility over reproductive life span. *Science*. Published online September 27, 2019. doi:10.1126/science.aav7321
34. Hook EB. Aneuploidy. Bond DJ, Chandley AC, (Oxford Monographs on Medical Genetics No. 11). Oxford and New York: Oxford University Press, 1983. *Am J Med Genet*. 1985;22(2):431-432. doi:10.1002/ajmg.1320220233
35. Viotti M. Preimplantation Genetic Testing for Chromosomal Abnormalities: Aneuploidy, Mosaicism, and Structural Rearrangements. *Genes*. 2020;11(6):E602. doi:10.3390/genes11060602
36. ESHRE PGT-M Working Group, Carvalho F, Moutou C, et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders. *Hum Reprod Open*. 2020;2020(3):hoaa018. doi:10.1093/hropen/hoaa018
37. Schmutzler AG. Theory and practice of preimplantation genetic screening (PGS). *Eur J Med Genet*. 2019;62(8):103670. doi:10.1016/j.ejmg.2019.103670
38. Delhanty JDA. Is the polar body approach best for pre-implantation genetic screening? *Placenta*. 2011;32 Suppl 3:S268-270. doi:10.1016/j.placenta.2011.06.028
39. Verpoest W, Staessen C, Bossuyt PM, et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy by microarray analysis of polar bodies in advanced maternal age: a randomized clinical trial. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2018;33(9):1767-1776. doi:10.1093/humrep/dey262
40. Harton G, Braude P, Lashwood A, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2011;26(1):14-24. doi:10.1093/humrep/deq229
41. Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, et al. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum Reprod*. 2013;28(2):509-518. doi:10.1093/humrep/des394
42. Scott KL, Hong KH, Scott RT. Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing. *Fertil Steril*. 2013;100(3):608-614. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.07.004
43. Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril*. 2013;100(3):624-630. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.039
44. Dokras A, Sargent IL, Ross C, Gardner RL, Barlow DH. Trophoctoderm biopsy in human blastocysts. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1990;5(7):821-825. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a137191
45. Quinn P. Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *J Assist Reprod Genet*. 1995;12(2):97-105. doi:10.1007/BF02211377
46. Marek D, Langley M, Gardner DK, Confer N, Doody KM, Doody KJ. Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril*. 1999;72(6):1035-1040. doi:10.1016/s0015-0282(99)00409-4

47. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*. 2007;67(1):73-80. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.09.014
48. De Vos A, Staessen C, De Rycke M, et al. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2009;24(12):2988-2996. doi:10.1093/humrep/dep251
49. 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. doi:10.1093/molehr/6.11.1055
50. Zeng M, Su S, Li L. Comparison of pregnancy outcomes after vitrification at the cleavage and blastocyst stage: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(1):127-134. doi:10.1007/s10815-017-1040-1
51. McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA, Jansen RPS. Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil Steril*. 2005;84(6):1628-1636. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.05.063
52. Rubino P, Tapia L, Ruiz de Assin Alonso R, et al. Trophoctoderm biopsy protocols can affect clinical outcomes: time to focus on the blastocyst biopsy technique. *Fertil Steril*. 2020;113(5):981-989. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.12.034
53. Palini S, Galluzzi L, De Stefani S, et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reprod Biomed Online*. 2013;26(6):603-610. doi:10.1016/j.rbmo.2013.02.012
54. Gianaroli L, Magli MC, Pomante A, et al. Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study. *Fertil Steril*. 2014;102(6):1692-1699.e6. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.08.021
55. Magli MC, Pomante A, Cafueri G, et al. Preimplantation genetic testing: polar bodies, blastomeres, trophoctoderm cells, or blastocoele fluid? *Fertil Steril*. 2016;105(3):676-683.e5. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.11.018
56. Tobler KJ, Zhao Y, Ross R, et al. Blastocoele fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis. *Fertil Steril*. 2015;104(2):418-425. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.04.028
57. Handyside AH. Noninvasive preimplantation genetic testing: dream or reality? *Fertil Steril*. 2016;106(6):1324-1325. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.08.046
58. Hammond ER, McGillivray BC, Wicker SM, et al. Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic contamination identified. *Fertil Steril*. 2017;107(1):220-228.e5. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.10.015
59. Ho JR, Arrach N, Rhodes-Long K, et al. Pushing the limits of detection: investigation of cell-free DNA for aneuploidy screening in embryos. *Fertil Steril*. 2018;110(3):467-475.e2. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.03.036
60. Diblík MudJ. Studium aneuploidie v gametách a embryích. Published online 2006:83.

61. Colaco S, Sakkas D. Paternal factors contributing to embryo quality. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(11):1953-1968. doi:10.1007/s10815-018-1304-4
62. Mazzilli R, Cimadomo D, Vaiarelli A, et al. Effect of the male factor on the clinical outcome of intracytoplasmic sperm injection combined with preimplantation aneuploidy testing: observational longitudinal cohort study of 1,219 consecutive cycles. *Fertil Steril.* 2017;108(6):961-972.e3. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.08.033
63. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-daHuman embryo mosaicism: did we drop the ball on chromosomal testing?maged spermatozoa. *J Exp Zool.* 1999;284(6):696-704. doi:10.1002/(sici)1097-010x(19991101)284:6<696::aid-jez11>3.0.co;2-e
64. Loutradi KE, Tarlatzis BC, Goulis DG, et al. The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet.* 2006;23(2):69-74. doi:10.1007/s10815-006-9022-8
65. Kubicek D, Hornak M, Horak J, et al. Incidence and origin of meiotic whole and segmental chromosomal aneuploidies detected by karyomapping. *Reprod Biomed Online.* 2019;38(3):330-339. doi:10.1016/j.rbmo.2018.11.023
66. Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2006;21(9):2216-2222. doi:10.1093/humrep/del150
67. Bianco K, Caughey AB, Shaffer BL, Davis R, Norton ME. History of miscarriage and increased incidence of fetal aneuploidy in subsequent pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2006;107(5):1098-1102. doi:10.1097/01.AOG.0000215560.86673.22
68. Rubio C. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples | Human Reproduction | Oxford Academic. Published 2003. Accessed December 17, 2021. <https://academic.oup.com/humrep/article/18/1/182/880337>
69. Liu XY, Fan Q, Wang J, et al. Higher chromosomal abnormality rate in blastocysts from young patients with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2020;113(4):853-864. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.11.016
70. Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, et al. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reprod Biomed Online.* 2003;6(2):232-237. doi:10.1016/s1472-6483(10)61715-4
71. Rubio C, Pehlivan T, Rodrigo L, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview. *Am J Reprod Immunol N Y N 1989.* 2005;53(4):159-165. doi:10.1111/j.1600-0897.2005.00260.x
72. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trombetta C, Boudjema E. The role of preimplantation diagnosis for aneuploidies. *Reprod Biomed Online.* 2002;4:31-36. doi:10.1016/S1472-6483(12)60113-8
73. Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, et al. Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. *Fertil Steril.* 2013;99(5):1400-1407. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.11.041

74. Greco E, Bono S, Ruberti A, et al. Comparative Genomic Hybridization Selection of Blastocysts for Repeated Implantation Failure Treatment: A Pilot Study. *BioMed Res Int*. 2014;2014:e457913. doi:10.1155/2014/457913
75. Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril*. 2014;101(3):656-663.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.11.004
76. Rabinowitz M, Ryan A, Gemelos G, et al. Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres. *Fertil Steril*. 2012;97(2):395-401. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.11.034
77. Yang Z, Liu J, Collins GS, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet*. 2012;5(1):24. doi:10.1186/1755-8166-5-24
78. Carrasquillo RJ, Kohn TP, Cinnioglu C, et al. Advanced paternal age does not affect embryo aneuploidy following blastocyst biopsy in egg donor cycles. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(10):2039-2045. doi:10.1007/s10815-019-01549-z
79. Hassold T, Chen N, Funkhouser J, et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet*. 1980;44(2):151-178. doi:10.1111/j.1469-1809.1980.tb00955.x
80. De Rycke M, Berckmoes V. Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disorders. *Genes*. 2020;11(8):871. doi:10.3390/genes11080871
81. Van Rij MC, De Rademaeker M, Moutou C, et al. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) for Huntington's disease: the experience of three European centres. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2012;20(4):368-375. doi:10.1038/ejhg.2011.202
82. Shenfield F, Pennings G, Devroey P, et al. Taskforce 5: preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2003;18(3):649-651. doi:10.1093/humrep/deg110
83. Kuliev A, Rechitsky S. Preimplantation genetic testing: current challenges and future prospects. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17(12):1071-1088. doi:10.1080/14737159.2017.1394186
84. Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Strom C, Kuliev A. Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. *JAMA*. 2001;285(24):3130-3133. doi:10.1001/jama.285.24.3130
85. Verlinsky Y, Rechitsky S, Sharapova T, Morris R, Taranissi M, Kuliev A. Preimplantation HLA testing. *JAMA*. 2004;291(17):2079-2085. doi:10.1001/jama.291.17.2079
86. Tur-Kaspa I, Jeelani R. Clinical guidelines for IVF with PGD for HLA matching. *Reprod Biomed Online*. 2015;30(2):115-119. doi:10.1016/j.rbmo.2014.10.007
87. Rechitsky S, Kuliev A, Sharapova T, et al. Preimplantation HLA typing with aneuploidy testing. *Reprod Biomed Online*. 2006;12(1):89-100. doi:10.1016/s1472-6483(10)60986-8
88. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. 2017;548(7668):413-419. doi:10.1038/nature23305

89. Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Wells D. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2011;26(6):1560-1574. doi:10.1093/humrep/der068
90. Colls P, Escudero T, Fischer J, et al. Validation of array comparative genome hybridization for diagnosis of translocations in preimplantation human embryos. *Reprod Biomed Online*. 2012;24(6):621-629. doi:10.1016/j.rbmo.2012.02.006
91. Mau-Holzmann UA. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res*. 2005;111(3-4):317-336. doi:10.1159/000086906
92. 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 Oxf Engl*. 2000;15(2):440-444. doi:10.1093/humrep/15.2.440
93. Foresta C, Galeazzi C, Bettella A, et al. Analysis of meiosis in intratesticular germ cells from subjects affected by classic Klinefelter's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(10):3807-3810. doi:10.1210/jcem.84.10.6029
94. 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 Oxf Engl*. 1999;14(5):1151-1156. doi:10.1093/humrep/14.5.1151
95. Shi Q, Martin RH. Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of meiotic chromosome segregation in a 47,XXY male and a review of the literature. *Am J Med Genet*. 2000;93(1):40-46. doi:10.1002/1096-8628(20000703)93:1<40::aid-ajmg7>3.0.co;2-k
96. Vogt PH. Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod*. 1998;4(8):739-744. doi:10.1093/molehr/4.8.739
97. Simoni, Bakker, Eurlings, et al. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. *Int J Androl*. 1999;22(5):292-299. doi:10.1046/j.1365-2605.1999.00193.x
98. 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. doi:10.1159/000086908
99. Li X, Hao Y, Elshewy N, Zhu X, Zhang Z, Zhou P. The mechanisms and clinical application of mosaicism in preimplantation embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37(3):497-508. doi:10.1007/s10815-019-01656-x
100. Sheltzer A. The aneuploidy paradox: costs and benefits of an incorrect karyotype. *Trends Genet TIG*. 2011;27(11). doi:10.1016/j.tig.2011.07.003
101. Delhanty JD, Griffin DK, Handyside AH, et al. Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridisation, (FISH). *Hum Mol Genet*. 1993;2(8):1183-1185. doi:10.1093/hmg/2.8.1183
102. Evsikov S, Verlinsky Y. Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1998;13(11):3151-3155. doi:10.1093/humrep/13.11.3151

103. Munné S, Spinella F, Grifo J, et al. Clinical outcomes after the transfer of blastocysts characterized as mosaic by high resolution Next Generation Sequencing- further insights. *Eur J Med Genet.* 2020;63(2):103741. doi:10.1016/j.ejmg.2019.103741
104. Munné S, Wells D. Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil Steril.* 2017;107(5):1085-1091. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.03.024
105. Popovic M, Dheedene A, Christodoulou C, et al. Chromosomal mosaicism in human blastocysts: the ultimate challenge of preimplantation genetic testing? *Hum Reprod Oxf Engl.* 2018;33(7):1342-1354. doi:10.1093/humrep/dey106
106. Esfandiari N, Bunnell ME, Casper RF. Human embryo mosaicism: did we drop the ball on chromosomal testing? *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(11):1439-1444. doi:10.1007/s10815-016-0797-y
107. Victor AR, Tyndall JC, Brake AJ, et al. One hundred mosaic embryos transferred prospectively in a single clinic: exploring when and why they result in healthy pregnancies. *Fertil Steril.* 2019;111(2):280-293. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.10.019
108. Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB. Chromosomal mosaicism goes global. *Mol Cytogenet.* 2008;1:26. doi:10.1186/1755-8166-1-26
109. Acuna-Hidalgo R, Veltman JA, Hoischen A. New insights into the generation and role of de novo mutations in health and disease. *Genome Biol.* 2016;17(1):241. doi:10.1186/s13059-016-1110-1
110. THE CHROMOSOME NUMBER OF MAN - TJIO - 1956 - Hereditas - Wiley Online Library. Accessed April 2, 2022. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.1956.tb03010.x>
111. Pearson PL. Historical development of analysing large-scale changes in the human genome. *Cytogenet Genome Res.* 2006;115(3-4):198-204. doi:10.1159/000095915
112. Griffin DK, Wilton LJ, Handyside AH, Atkinson GH, Winston RM, Delhanty JD. Diagnosis of sex in preimplantation embryos by fluorescent in situ hybridisation. *BMJ.* 1993;306(6889):1382. doi:10.1136/bmj.306.6889.1382
113. Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Fertilization and early embryology: Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod.* 1993;8(12):2185-2191. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a138001
114. Schrurs BM, Winston RM, Handyside AH. Preimplantation diagnosis of aneuploidy using fluorescent in-situ hybridization: evaluation using a chromosome 18-specific probe. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1993;8(2):296-301. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a138040
115. Vidal F, Giménez C, Rubio C, et al. FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J Assist Reprod Genet.* 1998;15(5):310-313. doi:10.1023/a:1022552713015
116. Eduard Kočárek 1967-. Klinická cytogenetika I. : úvod do klinické cytogenetiky, vyšetřovací metody v klinické cytogenetice.

117. Chen CK, Shen GY, Horng SG, et al. The relationship of pronuclear stage morphology and chromosome status at cleavage stage. *J Assist Reprod Genet.* 2003;20(10):413-420. doi:10.1023/a:1026232625659
118. Munné S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod Biomed Online.* 2006;12(2):234-253. doi:10.1016/S1472-6483(10)60866-8
119. Schröck E, Veldman T, Padilla-Nash H, et al. Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum Genet.* 1997;101(3):255-262. doi:10.1007/s004390050626
120. Bayani J, Squire JA. Advances in the detection of chromosomal aberrations using spectral karyotyping. *Clin Genet.* 2001;59(2):65-73. doi:10.1034/j.1399-0004.2001.590201.x
121. Zitzelsberger H, Lehmann L, Hieber L, et al. Cytogenetic changes in radiation-induced tumors of the thyroid. *Cancer Res.* 1999;59(1):135-140.
122. Chudoba I, Plesch A, Lörch T, Lemke J, Claussen U, Senger G. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* 1999;84(3-4):156-160. doi:10.1159/000015245
123. Bint SM, Davies AF, Ogilvie CM. Multicolor banding remains an important adjunct to array CGH and conventional karyotyping. *Mol Cytogenet.* 2013;6(1):55. doi:10.1186/1755-8166-6-55
124. Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med.* 2007;357(1):9-17. doi:10.1056/NEJMoa067744
125. Chen HF, Chen SU, Ma GC, et al. Preimplantation genetic diagnosis and screening: Current status and future challenges. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi.* 2018;117(2):94-100. doi:10.1016/j.jfma.2017.08.006
126. Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts. *N Engl J Med.* 2015;373(21):2089-2090. doi:10.1056/NEJMc1500421
127. Brezina PR, Anchan R, Kearns WG. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(7):823-832. doi:10.1007/s10815-016-0740-2
128. Munné S, Fragouli E, Colls P, Katz-Jaffe M, Schoolcraft W, Wells D. Improved detection of aneuploid blastocysts using a new 12-chromosome FISH test. *Reprod Biomed Online.* 2010;20(1):92-97. doi:10.1016/j.rbmo.2009.10.015
129. Keskinetepe L, Sher G, Keskinetepe M. Reproductive oocyte/embryo genetic analysis: comparison between fluorescence in-situ hybridization and comparative genomic hybridization. *Reprod Biomed Online.* 2007;15(3):303-309. doi:10.1016/s1472-6483(10)60343-4
130. Huang L, Ma F, Chapman A, Lu S, Xie XS. Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2015;16:79-102. doi:10.1146/annurev-genom-090413-025352

131. Cheung VG, Nelson SF. Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(25):14676-14679. doi:10.1073/pnas.93.25.14676
132. Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, Lasken RS. Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification. *Genome Res*. 2001;11(6):1095-1099. doi:10.1101/gr.180501
133. Blanco L, Bernad A, Lázaro JM, Martín G, Garmendia C, Salas M. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem*. 1989;264(15):8935-8940.
134. Ren Z, Zeng H tao, Xu Y wen, et al. Preimplantation genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy by multiple displacement amplification. *Fertil Steril*. 2009;91(2):359-364. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.11.044
135. Chen M, Song P, Zou D, et al. Comparison of multiple displacement amplification (MDA) and multiple annealing and looping-based amplification cycles (MALBAC) in single-cell sequencing. *PLoS One*. 2014;9(12):e114520. doi:10.1371/journal.pone.0114520
136. Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod*. 2008;14(12):703-710. doi:10.1093/molehr/gan062
137. Kirchoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet*. 2001;38(11):740-744. doi:10.1136/jmg.38.11.740
138. Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, et al. New tools for embryo selection: comprehensive chromosome screening by array comparative genomic hybridization. *BioMed Res Int*. 2014;2014:517125. doi:10.1155/2014/517125
139. Capalbo A, Treff NR, Cimadomo D, et al. Comparison of array comparative genomic hybridization and quantitative real-time PCR-based aneuploidy screening of blastocyst biopsies. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2015;23(7):901-906. doi:10.1038/ejhg.2014.222
140. Handyside AH. PGD and aneuploidy screening for 24 chromosomes by genome-wide SNP analysis: seeing the wood and the trees. *Reprod Biomed Online*. 2011;23(6):686-691. doi:10.1016/j.rbmo.2011.09.012
141. Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2011;26(7):1925-1935. doi:10.1093/humrep/der082
142. Treff NR, Levy B, Su J, Northrop LE, Tao X, Scott RT. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening is significantly more consistent than FISH. *Mol Hum Reprod*. 2010;16(8):583-589. doi:10.1093/molehr/gaq039
143. Tubbs RR, Stoler MH, eds. Foundations in Diagnostic Pathology. In: *Cell and Tissue Based Molecular Pathology*. Churchill Livingstone; 2009:ii. doi:10.1016/B978-044306901-7.50037-7
144. Treff NR, Tao X, Ferry KM, Su J, Taylor D, Scott RT. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst



- comprehensive chromosomal aneuploidy screening. *Fertil Steril*. 2012;97(4):819-824. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.01.115
145. Bustin S. *A-Z of Quantitative PCR*. Vol 2004.
  146. Hoy MA, ed. *Insect Molecular Genetics*. In: *Insect Molecular Genetics (Third Edition)*. 3rd ed. Academic Press; 2013:i-iii. doi:10.1016/B978-0-12-415874-0.00015-9
  147. Treff NR, Scott RT. Four-hour quantitative real-time polymerase chain reaction-based comprehensive chromosome screening and accumulating evidence of accuracy, safety, predictive value, and clinical efficacy. *Fertil Steril*. 2013;99(4):1049-1053. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.11.007
  148. Natesan SA, Bladon AJ, Coskun S, et al. Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2014;16(11):838-845. doi:10.1038/gim.2014.45
  149. Handyside AH, Harton GL, Mariani B, et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet*. 2010;47(10):651-658. doi:10.1136/jmg.2009.069971
  150. Gould RL, Griffin DK. Karyomapping and how is it improving preimplantation genetics? *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17(6):611-621. doi:10.1080/14737159.2017.1325736
  151. Fiorentino F, Biricik A, Bono S, et al. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertil Steril*. 2014;101(5):1375-1382.e2. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.01.051
  152. Van der Aa N, Zamani Esteki M, Vermeesch JR, Voet T. Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. *Genome Med*. 2013;5(8):71. doi:10.1186/gm475
  153. Zheng H, Jin H, Liu L, Liu J, Wang WH. Application of next-generation sequencing for 24-chromosome aneuploidy screening of human preimplantation embryos. *Mol Cytogenet*. 2015;8:38. doi:10.1186/s13039-015-0143-6
  154. Friedenthal J, Maxwell SM, Munné S, et al. Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles. *Fertil Steril*. 2018;109(4):627-632. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.12.017
  155. Friedenthal J, Maxwell SM, Tiegs AW, et al. Clinical error rates of next generation sequencing and array comparative genomic hybridization with single thawed euploid embryo transfer. *Eur J Med Genet*. 2020;63(5):103852. doi:10.1016/j.ejmg.2020.103852