

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

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



Jana Limbergová

Vývoj molekulárně genetických přístupů při asistované reprodukci

Development of new molecular genetic approaches in assisted reproductive technology

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 příchodu páru 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. Práce se tedy soustřeďuje na nové přístupy u cytogenetických vyšetřeních pro reprodukční genetiku. Dále diskutuje klinické metody používané ke zlepšení diagnostiky a terapie neplodných párů, a také metody experimentální, které by mohly do budoucna být základem nových diagnostických postupů. To jsou například metody single nukleotidových polymorfismů, array čipové metody či sekvenování nové generace a celogenomové amplifikace. Ohlíží se po metodách, od kterých se postupně odpouští, jako například fluorescentní *in situ* hybridizace a porovnává jejich výhody a nevýhody.

Klíčová slova: preimplantační genetické testování, aneuploidie, strukturální přestavby, monogenní choroby, biopsie

Abstract

Preimplantation genetic testing is one of the major clinical procedures that takes place in centres of assisted reproduction all around the world. It is sought out by couples for many reasons discussed in this paper. The causes of couples' arrival to the centres might vary from inherited diseases that future parents do not wish to transfer to their offspring to the risk of transfer of chromosomal structural rearrangements. What's more, infertility might be caused by the greater risk of aneuploidy in embryos which correlates with higher maternal age and other factors. This paper also focuses on new approaches in cytogenetic examinations for reproductive medicine. Furthermore, it discusses clinical methods used to improve diagnosis and treatment of infertile couples and experimental methods that could become the base of new diagnostic tools. These are for example single nucleotide polymorphism methods, array-based methods, new generation sequencing and whole genome amplifications. It also looks back at methods that became old-fashioned, just like for example fluorescent *in situ* hybridisation, and states its pros and cons.

Key words: preimplantation genetic testing, aneuploidy, structural rearrangements, monogenic diseases, biopsy

Obsah

Historie léčby neplodnosti.....	1
Artifiální inseminace	2
Koncept kryokonzervace	2
Revoluce <i>in vitro</i> fertilizace	2
Metody současné asistované reprodukce.....	3
Intrauterinní inseminace	3
<i>In vitro</i> fertilizace	3
Embryotransfer	3
Intracytoplazmatická injekce spermie.....	4
Kryokonzervace gamet a embryí.....	4
Preimplantační genetické testování.....	4
Další metody.....	5
Preimplantační genetické vyšetření	5
Biopsie pro PGT	6
Polární tělíska	6
Blastomery.....	6
Trofoektoderm	7
Neinvazivní techniky.....	8
Indikace ke genetickému vyšetření chromozomů.....	9
Jednotlivé chromozomální vady při infertilitě.....	11
Indikace při monogenních genetických chorobách.....	13
Chromosomální mozaicismus.....	14
Cytogenetické a molekulární metody	15
PGT na aneuploidie a strukturální přestavby	15
PGT na monogenní genetické choroby	18
PGT na polygenní choroby	19
Závěr	20
Zdroje	21

Historie léčby neplodnosti

Rodičovství je instinktivně řízená fyziologická potřeba¹, která hraje velkou roli v procesu nesmrtnosti². 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 byli různorodé magické směsi či ‚lektvary‘ připravované 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 trůnu³.

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 společností⁴. Jakási lidská hodnota byla ženě v této době přisuzována zejména na základě její čistoty, sexuální i duchovní, a následně po svatbě její neschopnosti se rozmnožovat⁵. Neplodnost, nebo například i neschopnost porodit mužského potomka, byla jedním z hlavních důvodů pro polygamii a rozvody⁶. Manželská smlouva byla považována za kompletní až s narozením prvního dítěte⁷. 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 se společně se začátkem medicínské vědy řečtí lékaři začali přiklánět k faktické medicíně⁸. 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 myšlení⁹. 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 stylu².

Další vývoj různých technik léčby přišel společně s vědeckým pohledem na důvody neplodnosti. Největší pokrok v pochopení reprodukční fyziologie nastal s objevem spermatozoa. V roce 1677. Antonie van Leeuwenhoek jako první uviděl spermatozoa pod mikroskopem a určil jejich zásadní důležitost ve formování embrya¹⁰. Tím začal proces objevování interakce gamet a možných způsobů léčby a následného řešení infertility¹¹.

Významnost spermatozoa pro reprodukci demonstroval italský fyziolog Lazzaro Spallanzani. Ukázal, že spermatozoa mají jádro a cytoplazmu⁸. Poprvé bylo potvrzeno, že embryo se vyvíjí díky fyzickému kontaktu vajíčka se spermii¹². Spallanzanimu se díky jeho objevu povedlo úspěšně inseminovat psi¹³. Také ukázal, že spermatozoa mohou být zchlazením inaktivována a následně reaktivována, což byl zásadní objev pro budoucí uchování spermii a tedy i pro umělé oplodnění¹⁴. Další velmi významný přínos pro embryologii byl objev Carla Ernsta von Baera, který v roce 1827 objevil savčí vajíčko⁸.

Artificiální inseminace

První snahy o zavedení artificiální inseminace (AI) jako normální procedury začaly v Rusku s Ivanovem¹⁵. 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. století¹⁶. Pravý začátek technologie asistované reprodukce (assisted reproductive technology, ART) však nastal až o něco později, a to s publikací Guttmachera, který poprvé zdokumentoval a zmapoval použití AI na člověku¹⁷. Inseminace dárcovských spermii nabyla popularity okolo roku 1909¹⁸.

Koncept kryokonzervace

Neustálý vývoj v oboru artificiální inseminace poskytl hnací sílu pro vylepšení metod sběru a uchování 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 spermatu¹⁹. 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 boje²⁰.

Polgeho podstatná práce s glycerolem položila základy pro kryokonzervaci lidského spermatu²¹. 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 spermatu¹⁶.

Revoluce *in vitro* fertilizace

První pokusy o *in vitro* fertilizaci sahají do roku 1890, kdy se prof. Walteru Heapemu povedla první transplantace králíčího embrya na univerzitě v Cambridge²². Koncept reprodukce se stal koncem devatenáctého století pochopitelným a byl popsán jako fúze jader samčí spermie a samičího vajíčka²³. 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 Steptoa²⁴.

Metody současné asistované reprodukce

Pojem metody asistované reprodukce zaštituje všechny procedury, při kterých se manipuluje s lidskými spermii, vajíčky a embryi s cílem zajistit těhotenství²⁵. Snaží se najít způsoby léčby neplodnosti, kterou WHO definuje jako „neschopnost mladého heterosexuálního páru dosáhnout otěhotnění při dostatečném počtu pokusů“²⁶. 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 neshodě²⁶.

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 a epigenomem, a to bez použití mikromanipulace. Tato metoda vyžaduje velmi kvalitní spermie²⁷. Ejakulát musí obsahovat progresivně pohyblivé spermie s normální morfologií. Takovéto oplození vyžaduje fertilizační médium a suspenzi očištěných spermií v něm, které se přidají ke skupině několika oocytů²⁶. Od oplození *in vivo* se liší díky tomu, že není potřeba, aby spermie absolvovaly cestu přes cervikální hlen a děložní dutinu do ampuly vejcovodu²⁷.

Embryotransfer (ET)

Procedura, při které je jedno nebo více připravených a vyselektovaných embryí zavedeno přímo do dělohy nebo do vejcovodu ženy. Představuje finální krok IVF cyklu. Vyžaduje úzkou spolupráci embryologa a lékaře, který dostává připravená embrya v katetru na sál²⁶. Výběr nejlepšího embrya je klíčové pro úspěšnost embryotransferu, především 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 (inner cell mass, ICM) a trofoektodermu²⁸. V současné době se začaly aplikovat i neinvazivní metody pozorování morfologického vývoje embryí. Řadí se zde například morfokinetická technologie time-lapse²⁹. Dále bylo navrženo provádět proteomické³⁰ a metabolické³¹ 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. Následně může dojít k implantaci embrya, a to díky komunikaci trofoektodermu a endometria prostřednictvím adhezivní molekuly glykokalyxu²⁶. 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 těhotenství³².

Intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI)

Tato metoda využívá injekci jednoho spermatozoonu do cytoplazmy vajíčka a vyžaduje mikromanipulační techniky²⁵. Díky tomu je třeba manuální zručnost embryologa, přesnost a soustředění, jelikož 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 příliš dlouhou dobu. Od přirozeného oplodnění se tato technika liší tím, že se spermie nemusí sama navazovat na zonu pellucidu ani později na oolemu, aby byla internalizována do oocyty. Proto je také častou indikací pro tuto metodu neschopnost spermií proniknout do oocyty. Také se používá více než klasické *in vitro* oplození bez manipulace, protože má vyšší výtěžnost a zabraňuje polyspermii²⁶.

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. Takovéto 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 mrazícího 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 mrazící přístroj. Díky převažujícím výhodám metody vitrifikace se proces rychlého mrazení využívá v současné době nejčastěji²⁶.

Preimplantační genetické testování

Preimplantační genetické testování definujeme jako sérii genetických vyšetření oocytů zygot a embryí, které mají za cíl najít chromozomové vady nebo genové mutace. Tyto mutace by po implantaci daného embrya mohly vést ke vzniku genové vady nebo zániku těhotenství²⁷. Testy se provádí na různých buňkách z různých stádií vývoje – k analýze lze použít polární tělíska, blastomery či trofoektoderm²⁵. Předpokladem pro provedení preimplantačního

genetického testování je oplození a pěstování embrya *in vitro*. Materiál se získává biopsií a dále je podroben metodám molekulární genetiky.

Další metody

V asistované reprodukci se provádí například i metoda GIFT (gamete intrafallopian transfer), čímž se označuje přenos pohlavních buněk do vejcovodu. Žena v tomto procesu taktéž podstupuje ovariální hormonální stimulaci jako při IVF cyklech, jsou jí odebrány vajíčka a následně jsou se spermii zavedena zpět do vejcovodu, kde může dojít k oplození přírodní cestou. Metoda ZIFT (zygote intrafallopian transfer) zahrnuje stejné kroky, ale místo pohlavních buněk je přenášen do vejcovodu již zárodek. Mezi metody asistované reprodukce je řazeno i náhradní mateřství a dárcovství oocytů a embryí²⁵. O těchto metodách se ale tato práce dále zmiňovat nebude.

Preimplantační genetické vyšetření

Konstitutivní chromosomální vady jsou velmi důležitou součástí indikací vyšetření spermií a preimplantačního 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 imunity²⁶. Je odhadováno, že u cca 10 % ženské neplodnosti a 15 % mužské neplodnosti se na jejím vzniku podílejí genetické abnormality zahrnující chromosomální aberace a mutace jednotlivých genů²⁶. 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 (live birth rate, LBR). Jak už bylo zmíněno výše, preimplantační testování se provádí na biologickém materiálu odebraného z embrya, tudíž jasnou podmínkou pro takové testování je úspěšné oplození oocytu *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 chromosomálních abnormalit zanedbatelný – jedná se o cca 20 % všech oocytů³³. Ento jev můžeme porovnat s myšími embryi, kde chromosomálně abnormální je pouhé 1 % embryí³⁴. 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, ale jako integrální a naprogramované komponenty v přírodním procesu lidské reprodukce³⁵.

Preimplantační genetické testování se dříve rozdělovalo na dva termíny. Preimplantační genetická diagnostika (PGD) a preimplantační genetický screening (PGS). PGD zahrnovala testování polárních tělísek, blastomer nebo trofoektodermu pro detekci specifických genetických alternací²⁵. Dnes se tomuto přístupu říká PGT-M – preimplantační genetické testování na monogenní genetické choroby. PGS zahrnovala analýzu těch stejných buněk pro detekci aneuploidí a strukturálních přestaveb²⁵. PGS nahradily termíny PGT-A

(preimplantation genetic testing for aneuploidy) a PGT-SR (preimplantation genetic testing for structural rearrangements), které jsou prováděné buď samostatně nebo současně. Celkově se tedy v současné době používá termín preimplantační genetické testování³⁶. Práce bude dále rozebírat indikace a metody právě PGT-A, M i SR.

Biopsie pro PGT

Biopsie je technika umělého oplodnění, kdy je odebíráno jedna či více buněk pro potřeby genetické analýzy. Provádí se různě a následující výčet popíše různé techniky biopsií.

Polární tělíška

Polární tělíška jsou vedlejší produkty meiotického dělení oocyty. Nemají žádnou reprodukční funkci, a proto mohou být jednoduše odebrána bez jakéhokoliv zásahu do embryonálního vývoje. Biopsie polárních tělíšek může být prováděna jedнокrokově nebo dvoukrokově. Buďto jsou odebrána obě tělíška ve stejném čase a to 16 hodin po inseminaci anebo je odebráno první polární tělíško ještě před intracytoplazmatickou injekcí spermie (ICSI). Druhé je opět v tomto případě odebráno 16 hodin po inseminaci²⁸. Zdá se, že zkombinováním obou biopsií se zvyšuje počet správných detekcí chromozomálních abnormalit³⁷. Limitace této techniky spočívá ve faktu, že polární tělíška reflektují pouze maternální genetickou informaci a parentální abnormality či chyby mitotického dělení jsou zanedbány³⁸. Nicméně randomizovaná studie pro zjištění efektivnosti PGT-A prováděného na polárních tělíškách, 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-A³⁹. Hlavní výhodou použití polárních tělíšek nadále zůstává to, že tento způsob biopsie poskytuje klinickým pracovníkům dostatek času na provedení genetického testování bez nutnosti kryokonzervace³⁸ a tím pádem je nadále taky jedinou možností v zemích, kde platí přísná legislativní pravidla ohledně genetického testování a manipulace s embryi²⁸.

Blastomery

Blastomery se odebírají v momentě, kdy je embryo tvořeno šesti až osmi buňkami. Tento stav nastává zhruba 72 hodin po inseminaci. Prvním krokem bývá otevření zóny pellucidy. Otevření zóny se může provádět použitím tyrodové kyseliny, mechanickým propíchnutím anebo propálením laserem (laser-assisted hatching). Nejvíce používaná metoda ve světě je použití laseru k otevření zóny a využití média bez vápníku a hořčíku k oslabení buněčných spojů⁴⁰. Otázkou je také, kolik blastomer je možno odebrat. Obvykle se odebírá buď jedna nebo dvě. Pokud embryolog odebere pouze jednu, výsledky genetických testů mohou být zavádějící či dokonce nekorektní. Odebírání dvou blastomer zase škodí embryu, protože se jedná o skoro 30% buněčnou ztrátu⁴¹. Ačkoliv je sběr blastomer z časně se štěpících embryí kompatibilní s embryotransferem čerstvého embrya bez mražení⁴², technika se ukázala jako škodící embryonální vitalitě. Proto se muselo načasování pro provádění biopsií pozměnit⁴³.

Trofoektoderm

Blastocystu tvoří dva buněčné typy – ICM (bude tvořit budoucí fetální tkáň) a trofoektoderm (tvoří budoucí placentu). Poprvé byla izolace trofoektodermu popsána v roce 1990 Dokrasem s kolegy⁴⁴. Přechod k fázi blastocysty byl umožněn zejména dvěma pokroky. A to vývojem média, které v mnohem větší míře napodobuje fyziologické podmínky, díky čemuž byl umožněn konsistentní růst embrya^{45,46}. A také vylepšením metody kryokonzervace, známé jako vitrifikace, která zajišťuje mnohem vyšší míru přežití blastocyst⁴⁷. Je tedy standardem ponechat embryo dorůst do pátého, šestého či až sedmého dne, následně jej podrobit biopsii trofoektodermu a blastocystu vitrifikovat do doby, než jsou výsledky PGT-A k dispozici. Pacientkám se následně může naplánovat transfer.

Hlavních výhod spojovaných s trofoektodermní biopsií spatřujeme pět. (1) Trofoektoderm se odebírá z fáze blastocysty, kdy již embryo aktivovalo embryonální genom, tudíž je analýza přesnější³⁷. (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 to je zhruba pouhá 10% ztráta všech buněk, což v porovnání se ztrátou hmoty buněk při biopsii blastomer je o dost méně invazivní⁴⁸. (4) Analýza vícero buněk umožňuje detekovat mozaicismu v rámci biopsie³⁵. (5) Pravděpodobnost falešných výsledků se snižuje díky úbytku výskytu mozaicismu ve fázi blastocysty³² v porovnání s mozaicismem ve fázi blastomer⁴⁹. Embrya vitrifikovaná v této fázi vykazují vyšší míru přežití v porovnání s vitrifikací blastomer, což umožňuje odložení transferu a adoptování single-embryo transfer (SET) strategie s cílem snížit vícečetné těhotenství⁵⁰.

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 vývoje⁵¹. Proděravění zóny se provádí ve fázi časného embrya s cílem snížit šanci kolapsu. Nicméně tento přístup má limitace spočívající ve dvojnásobné manipulaci s embryem mimo inkubátor. Také je zde riziko, že se pár buněk může vytrádit ze zóny pellucidy do média²⁸. 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 čeká až do herniace trofoektodermu²⁸. Výběr vhodného postupu ovlivňuje klinické výsledky⁵².

Další kontroverze ohledně trofoektodermní biopsie je ta, 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, přičemž stále dokáží vyústit v živý plod. Z toho vyplývá, že pěstování embryí o jeden den déle nejen zvyšuje počet použitelných embryí na jeden cyklus,

ale také dává větší šanci pacientům, kteří mají jen pár embryí, případně embrya špatné kvality²⁸.

Neinvazivní techniky

Biopsie embrya, ať už v jakémkoliv stádiu vývoje, je 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 zákroku³⁵.

První koncept minimálně invazivního postupu pro biopsii, se objevil společně s objevem DNA v blastocoelové tekutině (blastocoel fluid, BF) a použitím pěstovacím médiu (spent culture medium, SCM)⁵³. BF je izolována procesem zvaným blastocentéza⁵⁴ a provádí se zavedením velmi tenké jehly skrz zónu pellucidu a mezi buněčnými spoji trofoektodermu do blastocoelové kavity, kde je tekutina (1 mikrolitr) odebrána a blastocysta zůstává kolapsovaná⁵⁵. To, zdali 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 izolována, podrobena celogenomové amplifikaci (WGA) a v 63 % případů byla provedena microarray-komparativní genomová hybridizace (aCGH). Výsledky se shodovaly s opravdovými karyotypy ICM jen v pouhých 48,3 % analyzovaných embryích. Z tohoto důvodu autoři nedoporučují použití této neinvazivní metody jakožto alternativy v PGT-A⁵⁶. Právě míra neúspěšnosti amplifikace po blastocentéze je o dost vyšší, než po tradiční trofoektodermní biopsii⁵⁷. Do budoucna bude důležité prokázat, zda ztráta tekutiny neovlivňuje buněčnou komunikaci a zda je tato DNA opravdu reprezentativní embryonální DNA²⁸.

Další alternativní PGT-A 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, a to maternální, paternální, embryonální nebo extra-DNA. Technika nevyžaduje zkušeného embryologa, ani žádné speciální přístroje. Tudíž embryo zůstává nedotčeno. Nicméně existuje pár vlivných faktorů: zdali je to kultura čerstvého či mraženého embrya, zda byla použita média jedнокroková nebo vícečroková, zda se v kultuře pěstuje jedno nebo více embryí a také objem média hraje roli^{58,59}. Výsledky studie provedené v roce 2018 naznačují, že existuje optimální načasování pro odběr média pro vyšší výtěžek DNA a spolehlivější analýzu. Porovnávali výsledky z médií odebraných z tří denních a pěti denních embryí. Autoři označili pětidenní médium jako výhodnější, díky vyšší míře amplifikace a vyšším výtěžku DNA pro spolehlivé provedení PGT-A⁵⁹. 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 raného vývoje a bude nejspíše potřeba ještě více studií a standardizovaných protokolů pro klinické využití²⁸.

Indikace ke genetickému vyšetření chromozomů

Diploidní buňky obsahují 46 chromozomů, takový stav je známý jako euploidie. Aneuploidie je pozměněný stav, kdy se počet chromozomů odchyluje od normálního počtu 23 párů. Je to nejvyskytovanější genetická abnormalita u lidí a je také je hlavním důsledkem chyb v segregaci při meióze. Typickými příklady je pak trisomie nebo monosomie, vyplývající z 47 nebo 45 chromozomů. Aneuploidie může postihnout vícero chromozomů, někdy je tento stav označován jako komplexní aneuploidie, případně nastane nulisomie nebo polysomie, kde není přítomna žádná nebo vícero kopií jednotlivých chromozomů³⁵. Největší část meiotických chyb pochází z maternální meiózy (90 %-99 %). Aneuploidie ze strany otce je daleko méně pravděpodobná⁶⁰.

Indikací je spousta a mohou pocházet ze strany muže, ženy, popřípadě mohou postihovat celý pár. Důležité také je posoudit rodinnou anamnézu. Indikace ze strany muže může pocházet například z patologického spermogramu. 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 miliónů/ml), které se říká oligozoospermie, je výskyt chromosomálních vad 5%. U těch pak častěji nacházíme vady autozomů⁶¹. Ještě vyšší výskyt chromosomálních vad mají muži s těžkou oligozoospermií (<5 milionů/ml) spojenou s patologickými hodnotami FSH, LH (luteinizační hormon), testosteronu a nízkým objemem varlat (a to cca 19 %)²⁶. Muži s abnormálními karyotypy a s delecemi Y chromozomu častěji produkují spermatozoa s aneuploidie. I faktory jako endokrinní či imunologické onemocnění, životní styl, varikokéla, kryptorchismus, léčba chemoterapií, a věk mohou negativně ovlivnit meiotické dělení v rámci spermatogeneze⁶². Jsou zde ale i studie, které naznačují, že „male factor“ by neměl být považován za kritický parametr pro určování euploidie embryí, jako např. Mazzilliho studie založena na pozorování 1 219 ICSI cyklů s trofoektodermní biopsií za použití real-time PCR, kde se nenašel signifikantní rozdíl v podílu euploidních embryí na blastocystu mezi muži s normozoospermií a muži s neobstruktivní azoospermií⁶³. Je možné, že oocyt má potenciál zabránit dalšímu vývoji aneuploidních embryí před aktivací embryonálního genomu⁶⁴. Jako další vysvětlení se nabízí možnost, že aneuploidie vzniklé na základě chybě ve spermii mají za následek časně přerušení embryonálního vývoje⁶⁵. Infertilní ženy mají zvýšen především výskyt translokací autozomů, a to ve 4 až 5 %. Tento výskyt stoupá, došlo-li opakovaně ke spontánní ztrátě těhotenství, nebo k opakovanému selhání IVF⁶¹.

Opakovanou ztrátou těhotenství se míní dva a více konsekutivních potratů do 20. týdnu těhotenství. Tímto úkazem je postiženo cca 5 % všech párů podstupujících léčbu v IVF centrech. Důvody mohou být různé, až neznáme. Jako příčiny se uvádí genetické, anatomické, endokrinologické a imunologické abnormality⁶⁶. V 50 % případů má prvotrimestrální těhotenská ztráta za příčinu právě chromosomální vadu²⁶. Právě 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 potratem byl výskyt 1,6 %, se dvěma 1,8 % a se třemi dokonce 2,1 %⁶⁷. Z toho vyplývá, že genetické preimplantační testování by mělo být doporučováno párům s nevysvětlenými opakovanými potraty, aby bylo vybráno euploidní embryo. Tato domněnka byla podpořena studií, kde bylo prokázáno snížení počtu potratů, díky genetickému testování u párů s touto indikací⁶⁸. 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 významné. Mladé pacientky tedy nehledě na to, že jim bylo transferováno euploidní embryo, mají vyšší počet potratů. To ukazuje, že u této skupiny pacientů může existovat i jiná příčina opakovaných ztrát těhotenství, než jen ta genetická⁶⁹.

Také opakované selhání implantace (repeated implantation failure, RIF), se uvádí jako jedna z indikací pro genetické testování a je definováno jako nepřítomnost těhotenského vajíčka na ultrazvuku v pátém, nebo vyšším týdnu těhotenství po třech embryo transferech s vysoce kvalitními embryo, případně po transferu deseti a více embryí ve více cyklech⁴⁰. Vysvětlení pro tuto skutečnost může být závislé na maternálních i na embryonálních faktorech²⁸. U pacientů, kteří mají historii s RIF, je zvýšený výskyt chromozomálních abnormalit⁷⁰ a s každým dalším nepovedeným IVF cyklem stoupá⁷¹. A proto se u těchto pacientů začaly aplikovat přístupy jako kultivování blastocyst nebo asistovaný hatching. Zdá se, že tímto se implantační schopnost embryí zvyšuje⁷². Nicméně studie založené na studování efektivity genetického testování za použití metody fluorescentní *in situ* hybridizace pro zvýšení počtu živých porodů neukazují statisticky významný rozdíl mezi RIF pacienty, kteří podstoupili PGT a mezi těmi, kteří ho nepodstoupili⁷³. Z toho je možné usoudit, že příčina infertility v těchto případech je multifaktoriální a chromozomální abnormality s ní nemají moc společného. Naopak u studií, které ke svému genetickému testování používají metodu aCGH, se klinické výsledky přiklání k názoru, že to jsou právě aneuploidie, které jsou významnou příčinou pro opakované selhání implantace⁷⁴.

Jako další velký faktor a také indikátor ke genetickému vyšetření se považuje vyšší věk matky, protože v oocytech a embryích se hromadí chromosomální abnormality. Dále se také s věkem matky snižuje ovariální rezerva⁷⁵. Ženy ve vyšším věku produkují vyšší počet embryí s chromosomálními aberacemi – počet aneuploidních oocytů ve věku po 30. roku věku je 10-25 % a po 40. roku věku roste až přes 50 %²⁶. Zajímavé je, že velká část aneuploidních embryí vykazuje dobrou morfolonii a některé studie poukazují na to, že právě blastocysty dobré kvality mohou vyústit v aneuploidní embryo v 44,9 % případů^{76,77}. Velký rozdíl je u paternálního faktoru, kde výskyt aneuploidie nekoreluje s věkem otce⁷⁸.

Společnost lékařské genetiky a genomiky tedy doporučuje genetické vyšetření embryí preimplantačním genetickým testováním na aneuploidie (PGT-A) infertilním pacientkám ve věku od 35 let, pacientkám s opakovanými těhotenskými ztrátami v prvním trimestru⁷⁹, s opakovaným selháním implantace, s nálezem chromosomální vady v předchozí graviditě a

taky po proběhlé onkologické léčbě jednoho nebo obou partnerů. Toto opatření je to podloženo mnoha důvody, které již zde byly zmíněny.

Jednotlivé chromozomální vady při infertilitě

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 příčina⁸⁰. 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 přesto nalezení použitelné spermie není zajištěno. Jedná se o úspěšnost cca 30 %²⁶. Mozaiková forma 47,XXY/46,XY má prevalenci u 10-20 %²⁶ a spermie dosavadně nevykazují zvýšené riziko vad pohlavních chromozomů u dětí po cyklech prováděných s ICSI metodou⁸¹. Riziko pro potomky takto postiženého muže je mírně zvýšeno a možným vysvětlením je, že i spermatocyty s karyotypem 47,XXY mohou meiózu dokončit⁸². Následně je pak nadpočetný chromosom X ve spermatogoniích většinou eliminován během spermatogeneze²⁶ nebo spermatogonie časně odumírá⁸³. Je tedy i tak silně doporučováno podstoupení preimplantační a prenatalní diagnostiky.

Syndrom 47,XXY

Takovýto karyotyp se vyskytuje u 1 : 1000 mužů a velká část postižených mužů má plodnost normální⁶¹. Zvýšená rizika gonosomálních vad u potomků nebyla zjištěna a výskyt aneuploidí je pouze mírně zvýšen⁸⁴. Nicméně muži s těžkou oligospermií mohou mít výskyt aneuploidí zvýšen až na 38 % důsledkem různých abnormalit meiotického párování. Tyto hodnoty už mohou představovat riziko pro potomky²⁶.

Muži 46,XX

Karyotypový nález 46,XX u mužů je velmi vzácný (1 : 20 000). Pacienti mívají translokován SRY gen (normálně se nachází na chromozomu Y), většinou na chromozom X a nebo na autozom²⁶. Chybí i další geny potřebné pro tvorbu spermií, a z toho vyplývá kompletní azoospermie. Tito muži své vlastní genetické potomky mít nemohou⁸⁰ 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). Ty způsobují závažnou oligospermií nebo azoospermii⁸⁵. V těchto případech je určitě vhodná preimplantační a prenatalní 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 metodami⁸⁶.

45,X – Turnerův syndrom

Turnerův syndrom se vyskytuje u 1 : 5000 narozených děvčat²⁶ a takové pacientky mají nefunkční vaječníky. Možným a zároveň jediným řešením je použití oocytů od dárkyně⁸⁰.

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 diagnostika²⁶.

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 neprojeví⁸⁰.

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 neplodnost⁸⁰.

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. Zde je pak vyšší riziko pro trisomii 13 – Patauův syndrom²⁶.

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 abnormalitami²⁶. U mužů s azoospermií je výskyt 0,5%, s oligozoospermií je 0,7% a u infertilních žen cca 1 %⁸⁰. 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 obecně nižší než ve vajíčkách, díky přísnějším kontrolním bodům v meióze⁸⁷.

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 vadami²⁶.

Inverze

Inverze vznikají jako znovu napojení ulomené části chromosomu v opačné orientaci. Dále se také rozdělují 2 typy inverzí: paracentrické a pericentrické²⁶. U neplodných žen i mužů se nachází ve stejné míře, a to v 0,3 %. Může být dále zvýšené riziko spontánních abortů⁸⁰.

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 oligospermie²⁶.

Indikace při monogenních genetických chorobách

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, Jsou to 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 testování²⁶. Nutnost preimplantačního genetického testování na monogenní genetické choroby (PGT-M) může být u velmi běžných chorob i u těch vzácnějších. Nejčastějšími indikacemi jsou v současné době cystická fibróza a dědičné hemoglobinopatie z autozomálních recesivních chorob, myotonická dystrofie typu I, neurofibromatóza, Huntingtova choroba a dědičné rakovinné syndromy z autozomálně dominantních chorob. V rámci X-linked chorob se PGT-M zaměřuje na Duchennovu muskulární dystrofii, hemofilii a syndrom křehkého X⁸⁸.

Existují také monogenní genetické choroby s pozdním nástupem. Jedná se o například Huntingtovu chorobu a spinocerebelární ataxii²⁶. Pro páry s takovouto historií v rodinách, které si zároveň nepřejí znát svůj vlastní genetický nálezn, je možné provést nepřímé genetické preimplantační testování, které zahrnuje transfer embrya nesoucí haplotyp nezasazeného prarodiče⁸⁹. To je proto, že embrya s haplotypem zasaženého prarodiče mají 50% šanci zdědit

chorobu. V současné době, ale bohužel nejde přesně vymezit choroby s pozdním nástupem ve srovnání s těmi s časným²⁶. 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 zakázáno⁹⁰.

HLA typizace je jednou z dalších 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 (Fanconio anémie, talasémie, Wiscottův-Aldrichův syndrom ad.). Je totiž nutné pro tyto potomky nalézt vhodného dárce kostní dřeně či zárodečných buněk z pupečnickové krve⁹¹, 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 Fanconio anémii⁹². Po porodu byla odebrána pupečnicková krev, která po transplantaci zárodečných buněk zajistila úplné vyléčení staršího potomka. Dříve byla typizace prováděna pro zajištění nepostíženého embrya, které zároveň poskytovalo kompatibilního dárce, tudíž současně probíhala s PGT-M. Nicméně preimplantační HLA typizace jako samostatná metoda, byla taktéž již provedena⁹³. Jsou zde ale zcela zásadní limitace metody HLA typizace. Například velkou nevýhodu mají páry s vysokým maternálním věkem, právě kvůli nízkému počtu získaných embrya, Také pravděpodobnost, že se najde nezasažené HLA-kompatibilní embryo, u nich rapidně klesá⁹¹. Jedny z možných postupů, které by měly tento problém vyřešit, je podrobení pacientky více stimulačním cyklům pro získání dostatečného množství vajíček, a nebo získat darovaná vajíčka od mladší sestry pacientky⁹⁴. Také je nutné zmínit, že je potřeba provést současné testování na aneuploidii, které by mělo zlepšovat výsledky PGT/HLA typizace⁹⁵. 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 shodných embryí pro starší pacienty⁹⁶.

Chromosomální mozaicismus

Definicí mozaicismu je přítomnost dvou nebo více buněk s odlišnými chromozomálními konstitucemi, která vzniká během mitotických dějů v post-zygotním vývoji³⁵. Buněčná regulace, mechanismy oprav a body kontroly buněčného cyklu jsou potlačeny během prvních dní post-zygotického vývoje⁹⁷, a proto se časná embrya vyznačují podobností s rakovinou, kde také probíhá deregulovaný buněčný cyklus a je zde vysoký výskyt aneuploidie⁹⁸.

Embryonální mozaicismu byl poprvé pospán v roce 1993, kdy Delhanty s kolegy pozoroval metodou FISH na rýhujících se embryí různé počty chromozomů mezi buňkami ze stejného zárodku⁹⁹. Později bylo to stejné potvrzeno Esvikovem a Verlinskym na blastocystách¹⁰⁰. Moderní PGT-A metody 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 % a 22 %^{101–103}. 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 potenciál¹⁰⁴. 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 embryi¹⁰⁵. Tudíž pravý klinický význam mozaicismus u novorozenců zůstává nezachytitelný. Na jedné straně byl mozaicismus spojen s různými nemocemi, jako např. psychiatrické poruchy, autoimunitní choroby a kongenitální malformace¹⁰⁶, ale na straně druhé, mozaicismus byl také zdokumentován i ve tkáních zdravých lidí¹⁰⁷.

Cytogenetické a molekulární metody

PGT na aneuploidie a strukturální přestavby

Jednoduše řečeno, preimplantační genetické testování na aneuploidii má za cíl identifikovat euploidní embrya vhodná k intrauterinnímu transferu, a tak tedy zvýšit úspěšnost implantace. Data z PGT-A cyklů provedených v nedávné době se liší markantně oproti datům nashromážděných před cca 10 lety. Rozdíly nastaly díky dramatickým vylepšení aplikací PGT-A a díky možnosti testovat blastocysty¹⁰⁸.

První profilování chromozomů lidských embryí bylo provedeno v roce 1990 metodou amplifikování Y-specifických repetitiv pomocí PCR¹⁰⁹. V roce 1992 se použila poprvé metoda fluorescenční in situ hybridizace (FISH) s použitím Y- a X-sondami pro zabránění přenosu X-linked nemocí na potomky¹¹⁰. Zrození metody FISH pro přímé zjištění embryonální aneuploidie nastalo v roce 1993, kdy se tato metoda používala na chromozomech se známými syndromy (13, 18 a 21)^{111,112}. Metoda zahrnuje hybridizaci chromosomově specifických DNA sond, značených různými barvami, na jádra nebo chromosomy fixované na mikroskopickém sklíčku. Je rychlá a funguje stejně dobře jak na metafyzických, tak na interfázních jádrech¹¹³. Tradiční cytogenetické metody jsou závislé na přítomnosti právě metafyzických chromozomů. FISH se dala tedy použít pro zkoumání více chromozomálních regionů najednou za použití vícero sond, např. jednu centromerickou a dvě sub-telomerické a používala se na pacientech, kteří byli nosiči balancovaných translokací s cílem zjistit, zda jejich embrya zdělila translokaci nebalancovaně³⁵. Během následujících dvou dekád se PGT-A metodou FISH na časných embryích stala součástí IVF cyklů. Nicméně metoda zůstala stále limitována počtem chromozomů, které byla schopna zkoumat. Objevila se sice skupina, která navrhla možnost testování až 12 chromozomů najednou¹¹⁴, ale to stále nechávalo polovinu chromozomů nediodagnostikovanou.

PGT-A bylo velmi populární v devadesátých letech až do brzkých let druhého tisíciletí, kdy byla zveřejněna Mastenbroekova kontroverze¹¹⁵. Ta vrdila, že dle jejich výsledků, PGT-A prováděné metodou FISH snižuje 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 technikami¹¹⁶, které budou zmíněny dále. 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 aneuploidní¹¹⁷. Tomu všemu následovalo formální vyjádření profesionálních asociací jako například American Society for Reproductive medicine, American College of Obstetrics and Gynaecology a European society for human reproduction and embryology (ESHRE), které odrazovaly od použití PGT-A¹¹⁸.

Znovuzrození PGT-A nastalo s publikací vědců Scotta a Treffa z USA, kteří provedli sérii velmi dobře propracovaných studií na použití kvantitativní PCR pro komprehensivní chromosomální screening, kdy validovali její výsledky od roku 2010, včetně porovnání kvantitativní PCR s metodou SNP array^{43,119}. Další vývoj technik pro genotypování a možnost vitrifikovat embrya pro větší flexibilitu genetických laboratoří pomohlo vrátit PGT-A zpátky do klinické praxe reprodukční medicíny. Dnes jsou molekulární metody pro PGT-A již schopné rozeznat více než jen celo-chromozomální abnormality (např. monosomie/trisomie), ale také je možná identifikace mozaicismu či sub-chromozomálních abnormalit. Také pouhé škatulkování do kategorií normální a abnormální embryo je již zastaralé a bylo potřeba přiřadit embryím nové kategorie jako např. euploidní, aneuploidní, mozaikové anebo segmentálně abnormální³⁵.

Všechny tyto limitace metody FISH daly prostor vynalézání nových metod schopných otestovat všech 24 chromozomů, které jsou často označovány jako PGT-A 2.0. Hlavní komplikací pro celochromozomální analýzu byl nízký výtěžek DNA – lidská diploidní buňka totiž obsahuje cca 6,6 pg DNA a to je moc málo (i při biopsii 5 až 10 buněk z embrya) na to, aby se daly použít konvenční molekulární přístupy. Klíčovým krokem bylo vynalezení metody amplifikace DNA. Takovýto proces se nazývá whole genome amplification (WGA) a generuje dostatečné množství DNA pro analýzu 24 chromozomů³⁵. Další možnou strategií je cílená amplifikace. Ta se zaměřuje na strategické regiony, které jsou rozprostřeny po celém genomu a produkty jsou dále kvantifikovány metodou kvantitativní PCR (qPCR) nebo sekvenováním^{120,121}. Tato strategie může zvýšit sekvenační hloubku oproti WGA v cílových regionech, ale to vše na úkor širšího pokrytí celého genomu³⁵.

Jakmile je DNA amplifikována, je možné ji nechat podstoupit více možným metodám downstream analýz. Mezi ty se řadí komparativní genomová hybridizace (CGH)⁴⁹, microarray-CGH¹²², single nucleotide polymorphism array (SNP arrays)¹²³ nebo sekvenování nové generace (NGS)¹²⁴. Jejich cíl je víceméně stejný – identifikovat regiony genomu, které jsou málo nebo příliš přítomné a tím odhalit aneuploidii. Technika microarray se začala objevovat okolo roku 2005. Víceero laboratoří začalo vynalézat metodu, která by byla schopna testovat všech 23 párů na aneuploidii a zároveň na chromozomální strukturální aberaci¹²⁵. Pro genetické analýzy jsou současně dostupné dva typy microarrays. Single-nucleotide polymorphism a komparativní genomová hybridizace. Pro obojí musí být testované buňky (nejčastěji trofoektoderm) zlyzované a amplifikované.

Single nucleotide polymorphism jsou páry jednotlivých nukleotidů (A, T, C, G) v genomové DNA, které jsou velmi variabilní mezi druhy. V kontextu PGT-A se SNPs (vyslovováno *snips*) validují v non-exonových kódovacích regionech a obvykle je evaluováno až 300 000 SNPs roztroušených podél genomu najednou^{123,126}. SNP array analýza trvá okolo 30 až 40 hodin a poskytuje genotyp pro každý analyzovaný vzorek. Ten je následně porovnán s lidským referenčním genomem. Také dokáže rozeznat uniparentální dysomii a mozaicismus (pokud bylo odebráno dostatečné množství trofoektodermních buněk), ale kvůli poskytování genotypu je limitovaná v identifikaci triploidie¹¹⁸.

Technika aCGH umožňuje detekci variací v počtu kopií na základě porovnání bioptovaného genetického materiálu s referenčním vzorkem²⁸ – normálním karyotypem 46,XY a 46,XX. Po amplifikaci je vzorek označen s fluorescenční sondou a hybridizován s DNA microarray. Laserový skener poté získává data o každém bodě destičky a detekuje, zda se jedná o ztrátu nebo nabytí chromozomu¹²⁷. Oproti technice SNP array je sice aCGH schopna dokončit analýzu v kratším čase, a to za cca 12-15 hodin, ale nedokáže rozeznat uniparentální dysomii. Komerčně používaná metoda aCGH pro PGT-A dokáže rozeznat pouze celochromozomální aneuploidie a není validovaná k rozeznávání strukturálních aberací. Dále má také limitovanou schopnost rozeznat mozaicismus v trofoektodermálních buňkách¹¹⁸. Některé studie tudíž vykazují míru chybovosti aCGH až 30 %¹²⁸.

Kvantitativná PCR (qPCR) nebo ‚real-time PCR‘ (RT-PCR) je jedna z dalších metod k identifikaci celochromozomální aneuploidie na základě detekce počtu kopií. Pro zjištění počtu kopií využívá 3 až 4 lokus-specifické amplikony podél každého chromozomu, které porovnává s referenčním genem ze stejného chromozomu²⁸. Je to metoda velice rychlá (4-12 hodin), ale zároveň velice vytěžující, co se týče nároků na pracovníky. Vzhledem k náročnosti se silně doporučuje použití automatizace. Dále má schopnost identifikovat triploidie, ale vzhledem k tomu, že neposkytuje genotyp, nerozezná uniparentální dysomii ani strukturální aberace^{120,129}.

Sekvenování nové generace (NGS) je nejnovější přístup pro preimplantační genetické testování. První krok NGS protokolu je stejný jako u aCGH a to amplifikace pomocí WGA²⁸. Po genomové amplifikaci je provedena procedura zvaná ‚bar-coding‘, při které je každému vzorku přidělena specifická sekvence¹²⁴ – cca 50 ng každého vzorku DNA je enzymaticky natráveno na milióny fragmentů a každý fragment je zřuzován s adaptérem a čárovým kódem. To vše vytvoří robustní knihovnu, která je schopna produkovat reprezentativní a nezkreslené znázornění nukleových kyselin¹¹⁸. 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 využije data k nalezení variací v počtech kopií a velkých delecí či duplikací¹²⁴. Metoda vyžaduje také optimalizovanou DNA amplifikaci, aby se snížilo riziko artefaktů. Artefakty mohou být také identifikovány a odstraněny pomocí bioinformatického softwaru¹³⁰. Nezávisle na použité platformě, analýza pomocí NGS trvá cca 13 až 16 hodin¹¹⁸.

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 vysoká²⁸. To vše je i přesto výhodné pro detekci počtu kopií chromozomů. Pro příklad, Friedenthal et. al. vykazovali 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 aneuploidií či triploidií¹³¹. 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 %¹³². Úkol do budoucna by také měl být snižování nákladů na sekvenování a dostupnosti ‚deep whole genome sequencing‘ (WGS) pro každé jednotlivé embryo³⁵.

PGT je tedy také důležité pro nosiče chromosomálních strukturálních přestaveb, takové analýze se říká PGT-SR. Kvůli faktu, že nosiči balancovaných translokací mají nízkou šanci na nepostiženého potomka, PGT-SR má velkou výhodu nad tradiční prenatalní diagnostikou. Co se týče molekulárních přístupů, tak ačkoliv je metoda FISH dnes již velmi zastaralá, stále hraje roli ve specifických případech PGT-SR. Například pokud se jedná o velmi vzdálené zlomy - takové, na které konvenční PCR metoda nevystačí¹¹⁴. PGT-SR je prováděno i metodou aCGH, která je považována za víc spolehlivější než FISH. Výhodou je také současná detekce počtu kopií¹³³. Ve většině případů je ale používáno NGS⁹¹. Nejnovější metodou je speciálně designovaná technologie NGS zvaná ‚mate pair sequencing‘ (MPS) zahrnující sekvenování s vysokou mírou hloubky, které vede k definování přesných zlomů potřebných pro vývoj specifických primerů. Ty poté umožní rozlišení normálního embrya od toho, které zdědilo translokaci¹³⁴. Aplikace vylepšených technik PGT-SR signifikantně zlepšuje výsledky vzhledem k míře těhotenství. Míra spontánních abortů se také snížila a to až čtyřikrát⁹¹.

PGT na monogenní genetické 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 potomky²⁶. Dnes se pod pojmem PGT-M skrývá také HLA typizace buď bez nebo se současným testováním na monogenní choroby³⁶.

Po prvních zprávách z devadesátých let o genetických analýzách detekujících repetitivní Y-sekvence pro determinaci pohlaví v rodinách postiženými X-linked chorobami¹⁰⁹ se začala používat metoda simplex PCR s jedinou buňkou. Limitací tohoto přístupu je fakt, že vývoj a validace jednobuněčné simplex PCR je velice náročná pro laboratoř a to znamená dlouhou čekací dobu pro páry⁸⁸. Dalším nedostatkem je možnost nesprávné diagnózy kvůli erorům v amplifikaci. Těm se říká ‚preferenční amplifikace‘ nebo také ‚allele-specific amplification‘⁹¹.

Metoda byla tedy postupně nahrazena multiplex PCR testováním. To zahrnuje ko-amplifikaci markerů úzce spojených krátkých tandemových repetitiv (STR) s anebo bez patogenních variant amplikonu. Nejvíce uplatňovaným postupem pro detekci monogenních chorob se tehdy stala biopsie jedné buňky z třídeního embrya následovaná multiplexním PCR¹³⁵. WGA následována klasickou PCR reakcí velkého množství STR markerů lemuujících regiony, které nás zajímají, je jednodušší a vyžaduje kratší dobu pro validaci¹³⁶.

V posledních deseti letech byl tento přístup dále nahrazen biopsií ve fázi blastocysty a celogenomovými technologiemi (SNP array nebo NGS). Použití metody SNP array snižuje pracovní a technickou náročnost a také čekací dobu pro páry, protože nevyžaduje žádnou preklinickou přípravu. SNP je metoda velice silná při použití v případech, kde je přítomna dvojitá indikace (dvě monogenní choroby nebo jedna monogenní choroba a HLA typizace). Její nedostatek spočívá ve vysokých nákladech na zařízení a spotřební zboží, které stojí v cestě jejímu rozšíření do klinické praxe⁸⁸. Existuje více dostupných algoritmů pro karyomapping v rámci PGT-M. Například Handyside s kolegy vytvořil výpočetní fázování založené na rodině pro rekonstrukci SNP haplotypů, které lemují patogenní variantu/y^{137,138}. Algoritmus je aplikovatelný jak na SNP array, tak na protokol s NGS. Komerčně dostupné algoritmy karyomappingu fungují společně se základními Mendelovými zákony a vyžadují fázování s blízkým příbuzným pacientům. Dnes již také technologie umožňují současné testování na monogenní choroby i na aneuploidie⁸⁸.

S přibývajícími páry, kteří přicházejí do klinik bez genetické rodinné historie, jednou z překážek PGT-M se také stalo testování na *de novo* mutace. Proces analýzy pak zahrnuje verifikace mutace, evaluace polymorfních markerů, testování spermií nebo analýza polárních tělísek s cílem stanovit normální a mutantní haplotyp bez kterého nemůže být vůbec PGT-M pro *de novo* mutace provedeno⁹¹. Ačkoliv se zdá metoda velmi náročná, její výhoda spočívá v dostupnosti genetických analýz bez ohledu na dostupnosti rodinných dat.

PGT na polygenní choroby

Současná strategie pro vybrání správného embrya pro transfer je evaluace na základě jeho ploidie, mikroskopické charakterizace a vývojové morfologie. V poslední době se objevila nová metoda, která umožnila charakterizovat rizika polygenních chorob u preimplantačních embryí zvaná PGT-P¹³⁹. Polygenní choroby jsou ovlivňovány genetickými variantami ve vícero genech a stojí za velkou částí předčasných úmrtí u lidí^{140,141}. Dále se objevuje více poznatků a důkazů, že právě jednotlivci, kteří vyhledávají léčbu neplodnosti jsou vystaveni vyššímu riziku těchto chorob¹⁴². Risk polygenních chorob může být dnes zcela přesně detekován v DNA pro časté choroby jako rakovina, srdeční vady a diabetes^{143,144}.

Skórování rizika pro polygenní choroby je ale stále kontroverzní téma. Většinou se provádí a hodnotí v kontextu celých populací nepříbuzných lidí¹³⁹ a to s sebou přináší nevýhody. Zejména to, že polygenní choroby primárně ovlivňují faktory z prostředí, ve kterém člověk žije a také jaký je jeho životní styl. Tudíž to, co může platit pro populaci lidí nad šedesát let se nemusí vůbec nijak reflektovat na embrya. Nicméně je ale možné provádět toto testování pro

rodiny, kde jeden ze sourozenců trpí právě polygenní chorobou a rodiče si přejí dalšího potomka, který by jí nebyl postižen¹³⁹. Další poznatkem proti komerčnímu klinickému používání PGT-P by mohl být už tak nízký počet embryí, ze kterých je možno vybírat. Toto skórování by tedy ještě počet vhodných embryí snížilo. Další studie jsou tedy třeba pro ověření efektivnosti PGT-P.

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 (PGT-A, PGT-M a PGT-SR). Zde proti sobě stojí dva opačné směry vylepšování celého procesu – jednoduchost a komplexnost. Na jedné straně je vidíme snahu o zjednodušení tím, že jsou postupně zapojovány metody neinvazivní, které mají za cíl podstatně ulehčit sběr genetického materiálu a učinit tuto metodu dostupnější pro více center po světě. Na stranu druhou, pozorujeme poptávku po větší komplexitě dat díky tomu, že nastalo zvýšení v rozlišení genomu kombinováním vícero genetických analýz a eventuálně sekvenováním celých genomů embryí. Až čas ukáže, kterým směrem technologie půjde a zda-li více verzí PGT-A bude moct paralelně koexistovat³⁵.

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 | EndNote Click. Published 2020. Accessed December 28, 2021. https://click.endnote.com/viewer?doi=10.3390%2Fgenes11060602&token=WzlyNzQ3NTMsljEwLjMzOTAvZ2VuZXMxMTA2MDYwMiJd.UpuSalAizWW_XfCDbg8KkS6wdPs
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 trophectoderm 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. Trophectoderm 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, trophectoderm 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. 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
61. Diblík MudJ. Studium aneuploidie v gametách a embryích. Published online 2006:83.
62. 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
63. 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
64. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged 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
65. 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
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. Mau-Holzmann UA. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res*. 2005;111(3-4):317-336. doi:10.1159/000086906
81. 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
82. 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
83. 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
84. 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
85. 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
86. 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

87. 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
88. De Rycke M, Berckmoes V. Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disorders. *Genes.* 2020;11(8):871. doi:10.3390/genes11080871
89. 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
90. 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
91. 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
92. 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
93. 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
94. 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
95. 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
96. 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
97. 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
98. 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
99. 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
100. 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
101. 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

102. 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
103. 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
104. Casper NE and MEB and RF. Human embryo mosaicism: did we drop the ball on chromosomal testing? | EndNote Click. Published 2016. Accessed December 28, 2021. https://click.endnote.com/viewer?doi=10.1007%2Fs10815-016-0797-y&token=WzlyNzQ3NTMsIjEwLjEwMDcvczEwODE1LTAxNi0wNzk3LXkiXQ.0TNNOHsk1aSL-_ogzaCEd7YpNi0
105. 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
106. Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB. Chromosomal mosaicism goes global. *Mol Cytogenet*. 2008;1:26. doi:10.1186/1755-8166-1-26
107. 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
108. Dahdouh EM, Balayla J, Audibert F, et al. Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening. *J Obstet Gynaecol Can JOGC J Obstet Gynecol Can JOGC*. 2015;37(5):451-463. doi:10.1016/s1701-2163(15)30261-9
109. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*. 1990;344(6268):768-770. doi:10.1038/344768a0
110. 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
111. 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
112. 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
113. 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
114. 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

115. 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
116. 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
117. 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
118. 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
119. Forman EJ, Upham KM, Cheng M, et al. Comprehensive chromosome screening alters traditional morphology-based embryo selection: a prospective study of 100 consecutive cycles of planned fresh euploid blastocyst transfer. *Fertil Steril*. 2013;100(3):718-724. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.043
120. 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
121. Zimmerman RS, Tao X, Marin D, et al. Preclinical validation of a targeted next generation sequencing-based comprehensive chromosome screening methodology in human blastocysts. *Mol Hum Reprod*. 2018;24(1):37-45. doi:10.1093/molehr/gax060
122. Hellani A, Abu-Amero K, Azouri J, El-Akoum S. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(6):841-847. doi:10.1016/s1472-6483(10)60413-0
123. 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
124. 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
125. 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
126. 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
127. 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

128. 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
129. 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
130. 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
131. 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
132. 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
133. ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group, Coonen E, Rubio C, et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations†. *Hum Reprod Open*. 2020;2020(3):hoaa017. doi:10.1093/hropen/hoaa017
134. Wang L, Cram DS, Shen J, et al. Validation of copy number variation sequencing for detecting chromosome imbalances in human preimplantation embryos. *Biol Reprod*. 2014;91(2):37. doi:10.1095/biolreprod.114.120576
135. Laurie AD, Hill AM, Harraway JR, et al. Preimplantation genetic diagnosis for hemophilia A using indirect linkage analysis and direct genotyping approaches. *J Thromb Haemost JTH*. 2010;8(4):783-789. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03768.x
136. Renwick P, Trussler J, Lashwood A, Braude P, Ogilvie CM. Preimplantation genetic haplotyping: 127 diagnostic cycles demonstrating a robust, efficient alternative to direct mutation testing on single cells. *Reprod Biomed Online*. 2010;20(4):470-476. doi:10.1016/j.rbmo.2010.01.006
137. 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
138. 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
139. Treff NR, Eccles J, Marin D, et al. Preimplantation Genetic Testing for Polygenic Disease Relative Risk Reduction: Evaluation of Genomic Index Performance in 11,883 Adult Sibling Pairs. *Genes*. 2020;11(6):648. doi:10.3390/genes11060648
140. Forouzanfar MH, Afshin A, Alexander LT, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or

- clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*. 2016;388(10053):1659-1724. doi:10.1016/S0140-6736(16)31679-8
141. World Health Organization. *Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2014*. World Health Organization; 2014. Accessed January 6, 2022. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/148114>
 142. Cedars MI, Taymans SE, DePaolo LV, Warner L, Moss SB, Eisenberg ML. The sixth vital sign: what reproduction tells us about overall health. Proceedings from a NICHD/CDC workshop. *Hum Reprod Open*. 2017;2017(2):hox008. doi:10.1093/hropen/hox008
 143. Khera AV, Chaffin M, Aragam KG, et al. Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. *Nat Genet*. 2018;50(9):1219-1224. doi:10.1038/s41588-018-0183-z
 144. Torkamani A, Wineinger NE, Topol EJ. The personal and clinical utility of polygenic risk scores. *Nat Rev Genet*. 2018;19(9):581-590. doi:10.1038/s41576-018-0018-x