

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

PREIMPLANTAČNÍ DIAGNOSTIKA PŘI IVF

TEREZA SLAVÍKOVÁ

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. PETRA FIKROVÁ, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024

Poděkování

Chtěla bych touto cestou poděkovat PharmDr. Petře Fikrové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné připomínky, které mi během celé práce věnovala.

Dále bych chtěla poděkovat Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc za poskytnutí kazuistiky a jmenovitě Mgr. Petru Vrtělovi, Ph.D., za cenné rady a pomoc při vypracování práce.

Taktéž nemalé díky patří mé rodině, která mi byla obrovskou oporou v průběhu celého studia.

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

V Hradci Králové, 13. 5. 2024

Tereza Slavíková

1. OBSAH

1.	OBSAH	4
2.	ABSTRAKT	6
3.	ABSTRACT	7
4.	CÍL PRÁCE	8
5.	ÚVOD	9
5.1	SPERMIE.....	9
5.2	OOCYT.....	10
5.3	FYZIOLOGIE OPLOZENÍ.....	12
5.4	INDIKACE K IN VITRO FERTILIZACI.....	14
6.	FERTILIZACE <i>IN VITRO</i>	16
6.1	HISTORIE.....	16
6.2	IVF JAKO JEDEN Z DRUHŮ METOD ASISTOVANÉ REPRODUKCE.....	17
6.3	STRATEGIE VYŠETŘENÍ PŘI IVF.....	19
7.	PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA (PGD)	22
7.1	DIAGNOSTICKÉ METODY POUŽÍVANÉ V PGD.....	22
7.2	PGT-M (PGT MONOGENNÍCH CHOROB).....	24
7.2.1	Vývoj metod používaných pro PGT-M.....	25
7.2.2	Proces provedení PGT-M.....	26
7.3	PGT-A (PGT ANEUPLOIDIÍ).....	26
7.3.1	Vývoj metody PGT-A.....	28
7.3.2	Kontroverze PGT-A.....	29
7.4	PGT-SR (PGT CHROMOSOMÁLNÍCH ABERACÍ).....	29
8.	KAZUISTIKA	32

8.1	GENETICKÉ VYŠETŘENÍ ŽADATELŮ	32
8.1.1	Rodokmeny žadatelů.....	32
8.1.2	Hypokalemická periodická paralýza.....	34
8.1.3	Výsledky genetického testování žadatelů	35
8.2	PROVEDENÍ PGT-M	36
8.3	VÝSLEDEK CYKLU IVF	37
9.	AKTUÁLNÍ TRENDY V PGD.....	39
9.1	SEKVENOVÁNÍ TŘETÍ GENERACE (TGS).....	39
10.	ZÁVĚR.....	40
11.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	41
12.	SEZNAM TABULEK.....	42
13.	POUŽITÉ ZKRATKY	43
14.	POUŽITÁ LITERATURA.....	45

2. ABSTRAKT

Fertilizace *in vitro* je jedním z několika typů asistované reprodukce a v některých případech bývá doplněna o cílenou preimplantační genetickou diagnostiku.

Díky této metodě jsou selektována postižená embrya, ať už se jedná o embrya nesoucí monogenní onemocnění, nebo embrya s numerickými či strukturálními chromosomálními přestavbami. Každé z těchto embryí je analyzováno jinou metodou – monogenní choroby zkoumá PGT-M, aneuploidie PGT-A a strukturální chromosomové aberace PGT-SR. PGT vzniklo zejména ke snížení počtu uměle ukončených těhotenství, pro které se ženy mnohdy rozhodnou po sdělení nepříznivé diagnózy prenatální diagnostiky, a ke snížení samovolných potratů a mrtvě narozených dětí. Jeho princip totiž spočívá v selekci vadných embryí a zavedení pouze zdravých embryí do dělohy matky.

Na počátku každé preimplantační diagnostiky stojí nejčastěji biopsie několika málo buněk trofoktodermu daného embrya a jejich následná analýza. Analytické metody napříč PGT-M, PGT-A a PGT-SR se mnohdy doplňují, jinak řečeno, při použití jedné metody lze výsledky současně interpretovat pro potřeby PGT-M, PGT-A a PGT-SR.

Mezi nejpoužívanější analytické metody v PGT patří FISH (fluorescent *in situ* hybridization), celogenomová amplifikace (WGA), DNA mikročipy (DNA microarrays), SNP microarrays, sekvenování nové generace (NGS), haplotypizace a karyomapping.

Strategie genetického testování při IVF je demonstrována na vyšetření manželů Neznámých, kteří přicházejí ke genetickému vyšetření pro hypokalemickou periodickou paralýzu (autosomálně dominantně dědičné onemocnění) pana Neznámého. Metoda PGT-M byla vzhledem k této diagnóze doporučena před samotným zahájením procesu IVF. Kazuistika se zabývá přesným stanovením genotypu postiženého a následného provedení PGT využitím metody karyomappingu. Následně je zhodnocen genetický stav embryí a stanovení dalšího postupu v procesu IVF. Ačkoliv byla embrya, postižená zkoumanou chorobou, selektována, byla zbylá dvě zatížena numerickou chromosomální abnormalitou a ve výsledku nebyla doporučena pro transfer. V kazuistice je tedy i demonstrováno riziko odhalení jiných genetických změn, než byla původně stanovována a jež vylučují transfer. Jinými slovy, PGD nemusí zaručovat úspěšný cyklus IVF.

3. ABSTRACT

In vitro fertilization is one of several types of assisted reproduction and in some cases it is complemented by targeted preimplantation genetic diagnosis.

Through this method, affected embryos are selected, whether they are embryos with non-monogenic disease or embryos with numerical or structural chromosomal rearrangements. Each of these embryos is analysed by a different method - monogenic diseases are examined by PGT-M, aneuploidies by PGT-A and structural chromosomal aberrations by PGT-SR. PGT was developed primarily to reduce the number of artificially terminated pregnancies, which women often opt for after being told of an unfavorable prenatal diagnosis, and to reduce spontaneous abortions and stillbirths. Its principle is to select defective embryos and introduce only healthy embryos into the mother's womb.

At the beginning of each preimplantation diagnosis, a biopsy of a few trophoctoderm cells of the embryo in question and their subsequent analysis are usually the starting point. The analytical methods across PGT-M, PGT-A and PGT-SR are often complementary, in other words, using one method the results can be interpreted simultaneously for PGT-M, PGT-A and PGT-SR. The most commonly used analytical methods in PGT include FISH (fluorescent in situ hybridization), whole genome amplification (WGA), DNA microarrays, SNP microarrays, next generation sequencing (NGS), haplotyping and karyomapping.

The genetic testing strategy in IVF is demonstrated by the examination of Mr. and Mrs. Doe who present for genetic testing for Mr. Doe's hypokalemic periodic paralysis (an autosomal dominantly inherited disease). Due to this diagnosis, the PGT-M method was recommended before the actual IVF process was initiated. Kazuistics deals with the accurate genotyping of the affected person and the subsequent PGT using the karyomapping method. Subsequently, the genetic status of the embryos is evaluated and the next course of action in the IVF process is determined. Although the embryos affected by the disease under study were selected, the remaining two embryos were burdened with numerical chromosomal abnormalities and as a result were not recommended for transfer. Thus, the case report also demonstrates the risk of detecting genetic changes other than those initially determined, which preclude transfer. In other words, PGD may not guarantee a successful IVF cycle.

4. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je na základě literárních poznatků představit téma preimplantační diagnostiky a demonstrovat jeho využití na příkladu kazuistiky páru s hypokalemickou periodickou paralýzou.

5. ÚVOD

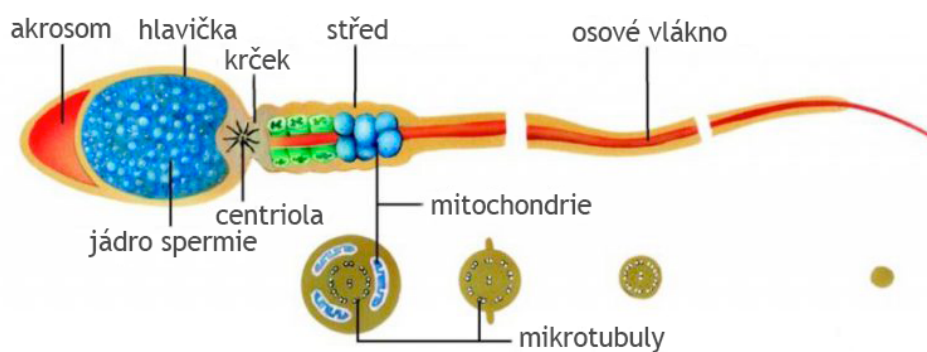
Na samotném začátku vzniku nového jedince stojí dvě pohlavní buňky, mužská spermie a ženský oocyt. Po jejich spojení vzniká tzv. *zygota*, což je diploidní buňka, která následně podléhá procesu rýhování.

5.1 Spermie

Na mužské pohlavní buňce, spermii, je možno rozlišit tři její části – hlavičku, krček a bičík.

Hlavička je kryta akrozomem, jenž obsahuje proteolytické enzymy a hyaluronidázu, které jsou potřebné pro průnik spermie do vajíčka při oplození. [1] Uvnitř hlavičky se nachází jádro s haploidní sadou chromosomů a dvojicí centriol, kdy distální centriola slouží jako bazální tělísko bičíku. Krček je tvořen axonemou bičíku a pochvou se spirálovitě uspořádanými mitochondriemi. Bičík se dělí na střední, hlavní a koncový úsek. [2] Stavba je z několika úhlů pohledu znázorněna na obrázku 1. [2]

Pohyb spermie je zajišťován zejména kývavým pohybem hlavičky oproti bičíku, z menší části je pak doplňován šroubovitým pohybem bičíku. [2] Pohyblivost spermie je až do ejakulace inhibována inhibičními proteiny. Vliv na pohyb má i pH, ve kterém se spermie nachází – alkalické a neutrální pH mírně zvyšuje pohyb, zatímco lehce kyselé prostředí pochvy jej zpomaluje. [1]



Obrázek 1 - Stavba spermie [3]

5.2 Oocyt

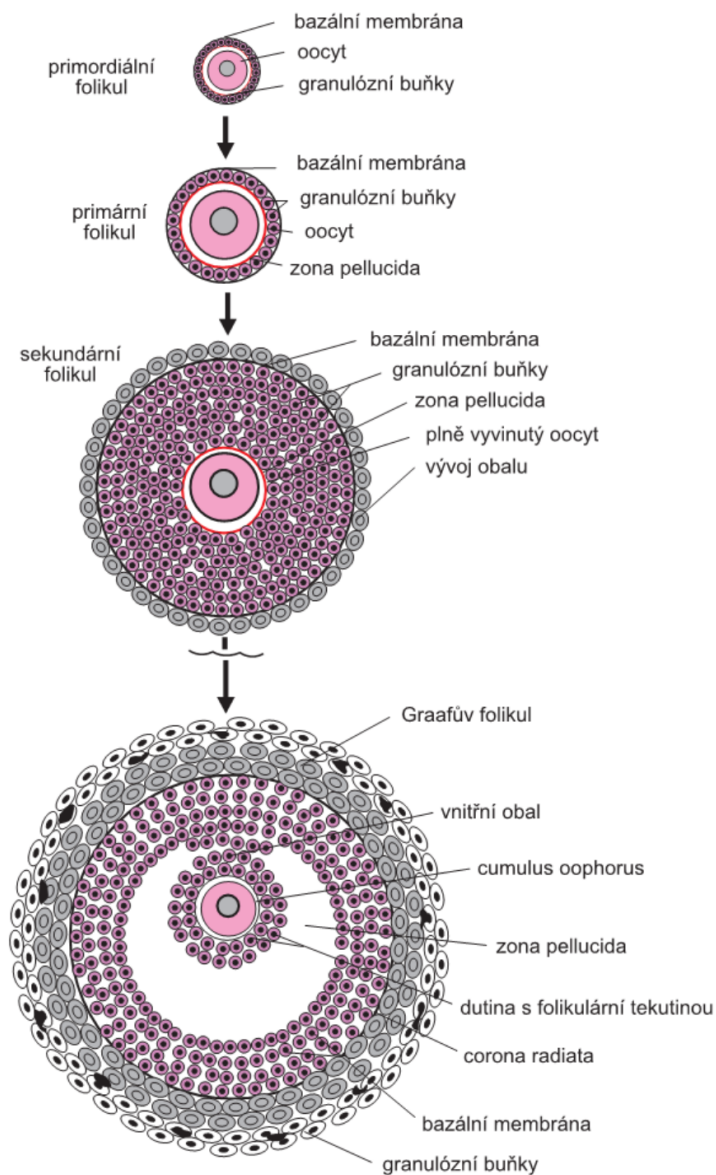
Ženská pohlavní buňka, vajíčko (lat. *oocyt*), má oproti spermii daleko složitější stavbu, proto je potřebné stavbu oocyty popsat včetně jeho vývoje.

První vývojové stádium, primordiální folikul, vzniká již v intrauterinní části vývoje ženy a v tomto stádiu zůstává až do puberty. Jeho stavba, jak je znázorněno na obrázku 2, je tvořena primárním oocytem, na nějž těsně přiléhá bazální membrána, na kterou nasedá jediná vrstva granulóznic buněk. [1, 2]

V pubertě dochází k paralelnímu zrání primárních folikulů, což znamená, že ve vaječniku současně nalezneme různá vývojová stadia folikulů. Prvním krokem dalšího vyžívání je zvětšení buněk jedné folikulární vrstvy do kubického tvaru a následné dělení těchto buněk tak, aby kolem vajíčka vznikl vícevrstevný obal, jenž je kryt vazivovou vrstvou (*theca folliculi*). [2]

V dalším stádiu dochází k vytvoření dutiny (*antrum folliculi*) s excentricky uloženým oocytem a vyplněnou tekutinou (*liquor folliculi*). [2]

Nejzralejší stádium, znázorněno taktéž na obrázku 2, se označuje jako Graafův folikul neboli *folliculus ovaricus vesiculosus*. V tomto stádiu tvoří folikulární buňky 4–5 vrstev, které se označují jako *membrana granulosa*. *Membrana granulosa* je dále kryta dvěma vrstvami – *theca folliculi interna* a *theca folliculi externa*. Vajíčko je uloženo v *membrana granulosa*, kde vytváří hrbolek zvaný *cumulus oophorus*. [2]



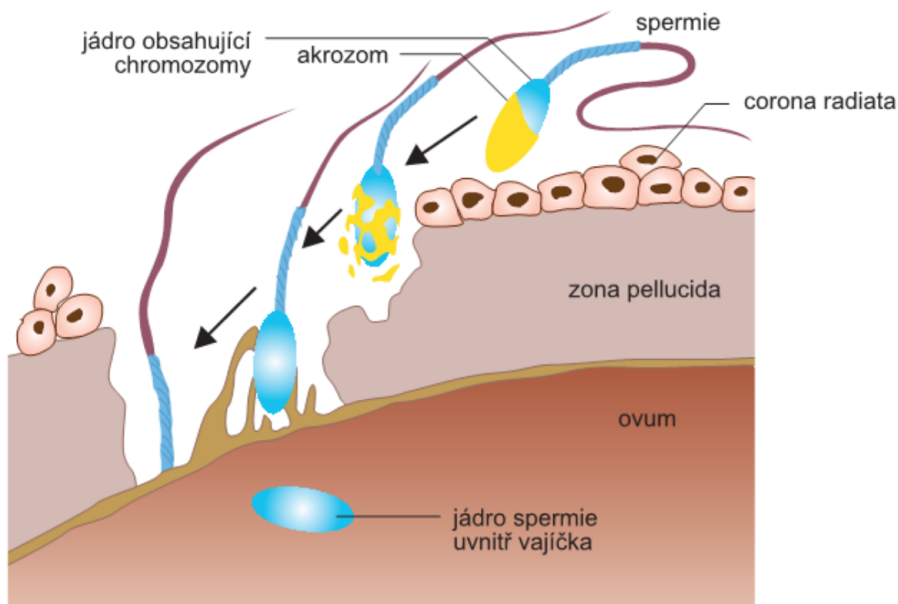
Obrázek 2 - Vývoj oocyty [1]

Aby se vajíčko uvolnilo z ovaria, musí Graafův folikul prasknout. Dojde tak k vylíčení *liquor folliculi* a oocyty k břišnímu ústí vejcovodu, kde je zachyceno pomocí *fimbriae tubae uterinae* a následně putuje vejcovodem až do dělohy. Celý tento děj je znám pod jednoduchým pojmem – ovulace. *Membrana granulosa* se po prasknutí folikulu sraší a vytvoří se tzv. *corpus luteum* (žluté tělísko), které se v závislosti na oplození mění na *corpus luteum menstruationis* nebo *corpus luteum graviditatis*. Konečným stádiem zániku žlutého tělíska je vytvoření jizvy neboli *corpus albicans*. [4]

5.3 Fyziologie oplození

Samotnému oplození oocyty předchází pohlavní styk mezi mužem a ženou, při němž jsou do pochvy ženy ejakulovány mužské pohlavní buňky. K oplození vajíčka dochází zpravidla až ve vejcovodu (přesněji v *ampulla tubae uterinae*). Do vejcovodu se uvolňuje sekundární oocyt z Graafova folikulu, který je kryt vrstvou sacharidů a proteinů (*zona pellucida*) a granulózních buněk (*corona radiata*). [1]

U spermie je důležitá jednak její pohyblivost, zejména proto, aby se dostala až právě do zmiňovaného vejcovodu, jednak kapacitace a reakce akrozomu. Pokud spermie nemá dostatečnou pohyblivost nebo nese jiný defekt, je eliminována periovulačním cervikálním hlenem – ten tedy pomáhá zajišťovat, aby se k vajíčku dostaly pouze „kvalitní“ spermie. Kapacitace je soubor dějů, které předchází vlastnímu splnutí pohlavních buněk. Během něj dochází ke zvýšení pohyblivosti spermií, zvyšuje se permeabilita akrozomální plazmatické membrány pro vápenaté ionty a uvolní se stabilizující glykoprotein. Aby pohlavní buňky splynuly, musí být spermie schopna rozpoznat oocyt od ostatních buněk. K tomu jí slouží specifické glykoproteinové receptory *corona radiata*. Akrozomální reakce poté zajistí rozrušení těsných spojů mezi buňkami tvořícími *corona radiata*. K tomu je spermie vybavena proteolytickými enzymy, které taktéž umožní spermii průchod přes *zona pellucida* až k plazmatické membráně oocyty. Celý tento proces je znázorněn na obrázku 3. [1, 5]

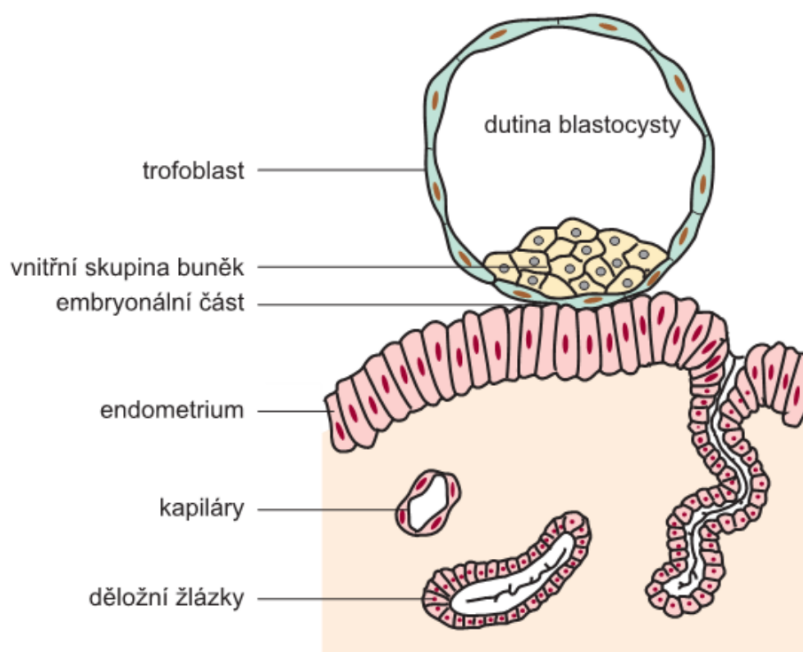


Obrázek 3 - Proces oplození oocyty [1]

V momentě, kdy dojde k fúzi akrozomu s oocytární membránou, z vajíčka se začne do extracelulárního prostoru uvolňovat obsah granul, jenž zamezuje dalšímu průniku spermií do oocyty. [1]

V tomto okamžiku dochází k samotnému oplodnění vajíčka. Mikrokilky oolemy (cytoplazmatická membrána oocyty) obklopí hlavičku spermie, která se nyní dostává dovnitř oocyty. Později se do nitra vajíčka dostává i bičík. Následně dojde ke zvýšení intracelulární koncentrace iontů kalcia, které jsou důležité pro dokončení druhého meiotického dělení vajíčka, které bylo zastaveno v průběhu metafáze ještě při svém vývoji. [1]

V posledním stádiu oplození dochází ke vzniku mužského a ženského prvojádra, což jsou jádra původních pohlavních buněk, a následně k jejich splynutí do jednoho jádra buňky. V tomto momentě již nazýváme tento útvar zygotou, která následně prochází procesem rýhování – stádium moruly a blastocysty. Buňky blastocysty se již diferencují na buňky budoucího embrya (embryoblast) a buňky budoucí placenty (trofoblast). Ve stádiu blastocysty navíc dochází k nidaci do stěny dělohy, a to právě stranou embryoblastu (viz obrázek 4). [1]



Obrázek 4 - Nidace vajíčka do děložní sliznice [1]

5.4 Indikace k *in vitro* fertilizaci

In vitro fertilizace je indikována z několika různých důvodů, prvním z nich je genetická zátěž rodičů. Touto problematikou se zabývá především genetické poradenství, čemuž se věnuje jedna z dalších kapitol, a vyšetření před provedením IVF. Druhou indikací k použití IVF je sterilita, která může mít několik příčin. Ačkoliv není hlavní tematikou této práce, je na místě ji zkrátce představit.

Sterilita je definována podle WHO jako onemocnění ženského nebo mužského reprodukčního systému, přičemž se danému páru nedaří dosáhnout těhotenství ani po více než 12 měsících, kdy pár provozuje pohlavní styk nejméně jednou za tři dny (bez použití jakýchkoliv antikoncepčních metod). [6] Sterilitu páru lze také rozdělit na primární a sekundární s tím rozdílem, že u primární sterility se ženě nikdy nepodařilo otěhotnět, kdežto u sekundární se ženě dříve s jiným partnerem otěhotnět podařilo. [7]

Mužská neplodnost je často způsobena anomáliemi ve tvaru spermií nebo jejich sníženou pohyblivostí. Taktéž ke sterilitě mužů přispívá nízké množství spermií ve spermatu nebo problémy s jeho výronem (např. obstrukce reprodukčního traktu). [7]

Prvním z několika aspektů ženské neplodnosti je neprůchodnost vejcovodů. Ta může být způsobena neléčenými pohlavními nemocemi, komplikacemi po nebezpečném potratu, poporodní sepsí nebo operací v oblasti břicha nebo pánve. Dalším důvodem můžou být různé poruchy dělohy a vaječnicků, ať už se jedná o endometriózu, myom nebo polycystické vaječnický. Poslední skupinou příčin ženské neplodnosti je dysfunkce endokrinního systému, což způsobí nerovnováhu v hladinách reprodukčních hormonů. Schopnost otěhotnět může být také komplikovanější ve vyšším věku pacientky. [7]

Další indikací k *in vitro* fertilizaci může být podstoupení chemoterapie, která může mít vliv na ovariální tkáň a dojde tak ke snížení zásoby folikulů. Tento stav může logicky vést ke snížení plodnosti nebo k úplné neplodnosti. Existuje několik metod, jenž dovolují neplodnost v takovém případě řešit. Prvním z nich je kryokonzervace oocytů. Ta probíhá pomocí odebrání zralých oocytů po předchozí ovariální stimulaci. Dalším z nich je *in vitro* maturace, což je metoda, při které jsou odebrána nezralá vajíčka. Ta pak maturují mimo lidské tělo ve zralé oocyty. Poslední metodou je kryokonzervace ovariální tkáně. Nicméně všechny tyto metody jsou značně omezeny aktuálním stavem pacientky, věkem nebo typem nádorového onemocnění. Cytostatická léčba nebo chemoterapie se může týkat i mužů.

V tomto případě je kryokonzervace o něco méně složitá, je totiž jednoduše kryokonzervováno sperma (uchovávání při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) a poté použito v momentě, kdy se pacient s partnerkou rozhodnou pro oplodnění touto cestou. [4, 8]

6. FERTILIZACE *IN VITRO*

Fertilizace *in vitro* je jedním z několika typů asistované reprodukce a v některých případech bývá doplněna o preimplantační genetickou diagnostiku. Její vývoj nebyl zejména kvůli její kontroverzi nejjednodušší. I v dnešní době se IVF potýká s mnohými etickými otázkami. Mezi nejrozšířenější etické otázky patří status embrya – neboli zda je embryo biologický materiál, nebo již plod, případně dítě. Další etickou otázkou může být právě pohled na preimplantační diagnostiku.

6.1 Historie

Historie IVF sahá až do 30. let 20. století, kdy doktor Gregory Pincus experimentálně potvrdil, že se po oplodnění králíčích vajíček *in vitro* narodila živá mláďata. V roce 1944 doktor John Rock a jeho kolegyně Miriam Menkinová publikovali výsledky experimentování s oplozenými i neoplozenými lidskými vajíčky z extrahovaných lidských ovarií při operaci, z nich se tři *in vitro* rozštěpila. O pár let později byla nezávisle na sobě dvěma vědci objevena kapacitace spermie. To je děj, kterým musí spermie projít, aby byla schopna akrozomální reakce a následné fúze s oocytem. [9]

Tento poslední objev vedl k přehodnocení dosavadních tvrzení a bylo stanoveno pět kritérií pro oplodnění vajíčka *in vitro*. Doktor Min Chueh Chang tak v roce 1959 prokázal úspěšnost IVF, kdy odebral králíčí samici neoplozená vajíčka, *in vitro* je oplodnil kapacitními spermii, inkuboval a vzniklá embrya byla přenesena do jiné králíčí samice, která poté porodila životaschopné potomky. [9]

V následujících několika letech se začalo schylovat k události, kterou dnes již popisujeme jako největší úspěch vývoje IVF. Předtím se ovšem gynekolog Patrick Steptoe a zejména fyziolog Robert G. Edwards museli potýkat s několika důležitými faktory, jako bylo financování výzkumu nebo zisk ovariální tkáně. Během toho ovšem Edwards dokázal mimo jiné, že pro metodu IVF není nutné použít spermie odebrané z reprodukčního systému ženy (tedy spermie ejakulované při souloži), ale povedlo se oplodnit vajíčka vlastními spermii Edwardse. [10]

Den 12. listopadu 1977 sice není označován jako nejprůlomovější, ale tento den bylo Lesley Brown implantováno do dělohy osmibuněčné embryo, což už konečně přímo vedlo ke stěžejnímu datu 25. července 1978, kdy se narodila Louise Brown, tedy první člověk

narozený pomocí IVF. Na tomto významném procesu se nejvíce podíleli, jak již bylo řečeno, gynekolog Dr. Patrick Steptoe a vědec Sir Robert Edwards, jemuž za tento úspěch byla v roce 2010 udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu. [10, 11]

6.2 IVF jako jeden z druhů metod asistované reprodukce

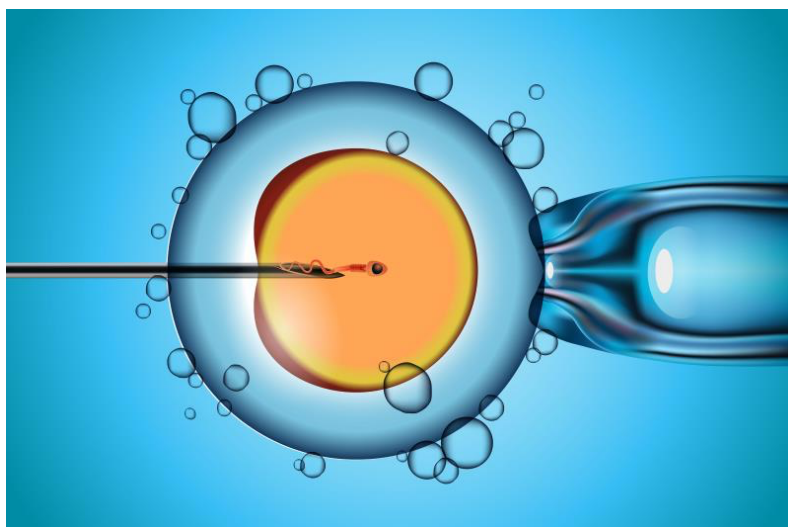
Metoda IVF je jedním z druhů asistované reprodukce. Jeho princip ovšem na rozdíl od ostatních druhů spočívá v oplodnění oocyty mimo dělohu matky. Tato metoda bývá často doplněna o preimplantační genetické testování.

Typy asistované reprodukce se liší podle situace, v níž se pár nachází. Tuto situaci je potřeba vyhodnotit ještě před samotným začátkem celého procesu, jelikož se dané postupy různí.

Prvním z těchto postupů je intravaginální, intracervikální nebo intrauterinní inseminace. Tato metoda se používá při vaginismu nebo poruchách erekce či ejakulace a spočívá ve vpravení kryokonzervovaného spermatu do reprodukčního traktu ženy. Nedochozí tedy k vyjmutí oocytů ven z těla ženy, pouze je usnadněna cesta spermiím k vajíčku. Proces inseminace musí být správně načasován dle ovulace ženy, která může být detekována nebo indukována pomocí hormonální substituce. Zdroje se ovšem nemohou shodnout, zda je příhodnější provést inseminaci v době ovulace, 24 hodin nebo 48 hodin po ovulaci. Tak či onak je tedy okolo doby odběru zavedeno sperma pomocí měkkého katétru do dělohy ženy (v případě intrauterinní inseminace). Co se spermatu týče, dochází i k jeho úpravě. Sperma není na rozdíl od oocytů stimulováno hormony, ale musí podstoupit tzv. proces čištění. To znamená, že z odebraného sperma musí být odstraněny všechny nežádoucí buňky, jako například leukocyty, epitelální buňky močového traktu nebo buňky prostaty, protože všechny tyto buňky mohou snižovat schopnost spermií oplodnit vajíčko. Dále musí být odstraněny mrtvé spermie a faktory dekapitace obsažené v semenné plasmě (tyto faktory zabraňují plné kapacitaci spermií). U darovaného spermatu navíc dochází k procesu kryokonzervace, protože darované sperma musí být půl roku v karanténě, dokud není proveden kontrolní test infekce HIV dárce. Pokud je výsledek vyšetření v pořádku, může být sperma rozmrazeno a použito k inseminaci. Ačkoliv je inseminace méně invazivní a levnější, doporučuje britský Národní institut pro zdraví a péči (NICE) používat fertilizaci *in vitro* jako primární léčbu neplodnosti nejasného původu. Oproti tomu nové směrnice z roku 2023,

vydané Evropskou společností pro lidskou reprodukci a embryologii (ESHRE), doporučují intrauterinní inseminaci jako primární léčbu. [6, 12, 13]

Fertilizace *in vitro* je naopak metoda, při níž musí být oocyty vyjmuty z ovarií. Ty se poté ve zkumavce (odtud *in vitro*) buďto smísí se spermii, nebo je spermie přímo vpíchnuta do oocytu (intracytoplasmatická injekce spermie (ICSI)). Metoda ICSI se ze začátku využívala zejména u spermií se sníženým potenciálem. Došlo tak k obejití kapacitace a akrozomové reakce. Detail metody ICSI je znázorněn na obrázku 5. Pomocí mikrojehly je nasáta jedna vybraná spermie. Mikrojehlou je poté propíchnuta *corona radiata*, *zona pellucida* a cytoplasmatická membrána oocytu (tzv. oolema). Následně je spermie vypuzena do cytoplasmy oocytu, kde navazují procesy jako při fyziologickém oplodnění – tedy splynutí jader a započetí procesu rýhování. V dnešní době se ICSI využívá v drtivé většině cyklů IVF (v USA více než 90 % cyklů). Vzniklá embrya jsou následně 2–6 dní kultivována a posléze je jedno či několik embryí vpraveno do dělohy. Před zavedením do dělohy jsou selektována ta embrya, která neodpovídají fyziologii morfologickým vzhledem nebo jsou vyřazena pro genetickou patologii. Transfer probíhá pomocí tenkého katétru skrz děložní hrdlo do děložní dutiny. Tento výkon není nijak bolestivý a trvá několik málo minut. Indikací pro použití této metody může být patologický spermioqram, neprůchodnost vejcovodů, endometrióza nebo nutnost vzniklá embrya geneticky vyšetřit před jejich implantací. [4, 6, 14]



Obrázek 5 - Schéma ICSI [15]

Kryokonzervace se dá provést jak u embryí, spermií, oocytů, nebo také u ovariální či testikulární tkáně. Provádí se zchlazením kapalným dusíkem na $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ za použití kryoprotektiv a dodržení přesných laboratorních postupů. Takto zmražený biologický materiál má relativně neomezenou životnost. Důvodem použití této metody může být například nutnost odebrání spermií či oocytů před zahájením léčby, která by pohlavní buňky poškodila (např. léčba cytostatiky). [6]

Kryoembryotransfer přímo navazuje na metodu kryokonzervace, jelikož spočívá v rozmražení dříve zmraženého embrya a jeho implantaci do dělohy. Důležité je ovšem také načasování transferu. Endometrium dělohy totiž musí být připraveno na implantaci embrya, čehož jde docílit podáváním gestagenů tolik dnů, kolik dní je staré embryo. Samozřejmě je možno provést transfer při plně nativním cyklu nebo při jinak zajištěných cyklech. [6]

K dárcovskému programu musíme přistoupit v případě, kdy není vůbec možné použít gamety jednoho nebo obou partnerů, ať už z důvodu jejich absence, nebo dysfunkce. [6]

V některých případech je nutné využít tzv. náhradní matku. K této metodě se přistupuje zejména pokud žena žádnou dělohu nemá nebo je nemocná způsobem, který by jí neumožnil otěhotnět (např. kardiomyopatie). V České republice je tato metoda sice možná, ale není legislativně ošetřena. [6]

Preimplantační genetické testování (PGT) doplňuje samotnou fertilizaci *in vitro*, jen s tím rozdílem, že embryo je testováno na přítomnost či nepřítomnost určité genetické mutace nebo jsou testovány chromosomální abnormality.

6.3 Strategie vyšetření při IVF

Před každým cyklem IVF je potřeba základního genetického vyšetření ženy a vyšetření spermioqramu muže. U muže i ženy je jako první zhodnocena anamnéza, ve které se posuzuje počet narozených dětí každého z partnerů (i v předchozích vztazích), prodělané operace, užívání návykových látek, případné obtíže při pohlavním styku a další parametry. Zpravidla se jako první provádí vyšetření spermioqramu, zejména kvůli jednoduchosti odběru vzorku a menšímu dopadu na psychický stav pacienta, než jsou mnohá gynekologická vyšetření ženy. Spermioqram je stanoven z ejakulátu získaného zpravidla masturbací. U ejakulátu jsou nejprve zhodnoceny fyzikální vlastnosti (vzhled, objem, pH atd.), a následně je stanoven počet spermií a zhodnocena jejich morfologie / fyziologie. Na základě těchto znaků jsou

spermie rozřazeny do tří skupin: progresivně pohyblivé spermie (lineární pohyb nebo pohyb ve velkém kruhu), neprogresivně pohyblivé spermie (všechny ostatní druhy pohybu spermií) a nepohyblivé spermie. Dle referenčních hodnot WHO z roku 2010 by měl být podíl progresivně a neprogresivně pohyblivých spermií ku počtu všech spermií větší nebo roven 40 % a podíl živých spermií ku počtu všech spermií ≥ 58 %. Vyšetření muže je taktéž provázeno fyzikálním vyšetřením, kdy je zhodnoceno, zda muž netrpí například rakovinou varlat, malformací penisu nebo odchylkami velikosti a tvaru varlat. Klasické gynekologické vyšetření ženy není nijak zvlášť odlišné od preventivní prohlídky. Zhodnotí se tedy případné malformace genitálu, jsou odebrány cytologické vzorky z děložního hrdla (vyloučení rakoviny děložního hrdla nebo prekancerózního stavu). Dále je toto vyšetření doplněno vyšetřením pomocí ultrazvuku. Intravaginální ultrazvukovou sondou je lékař schopen zhodnotit stav folikulů v ovariích, stav dělohy a vejcovodů. Pokud není příčina nalezena, může být provedeno ještě například hormonální či imunologické vyšetření, tuto problematiku ale není nutné pro tuto práci více představovat. [4, 16]

Součástí IVF může být i genetické poradenství poskytované rodičům často ještě před zahájením samotného procesu IVF (prekoncepční poradenství). Během tohoto poradenství tak nadcházející rodiče dostávají informace o onemocnění, kterým již sami jsou postiženi nebo mohou být ohroženi, případně pokud jsou postiženi jejich potomci. Následně jsou případně předány informace o možném přenosu, léčbě a průběhu daného onemocnění. [17]

Genetické poradenství začíná prekoncepčním pohovorem, při kterém je s oběma rodiči probírána jak osobní, tak rodinná anamnéza a další faktory, které by mohly ovlivnit budoucí těhotenství / potomky. Během tohoto pohovoru bývají položeny otázky, zda se již v minulosti narodilo páru postižené dítě, zda žena opakovaně potratila či porodila mrtvé dítě, zda se v rodině nevyskytuje nějaké postižení, nebo zda nejsou partneři v příbuzenském vztahu. Tyto otázky jsou klíčové a dle povahy jejich odpovědí je případně přistoupeno ke genetickému testování nebo screeningu. [17]

Genetická diagnostika se uplatňuje zejména pro odhalení autosomálně recesivně přenosných chorob, jako je například cystická fibróza, srpkovitá anémie nebo talasemie. Rodiče jsou totiž velmi často přenašeči neboli heterozygoti a o svém přenašečství zpravidla vůbec netuší. Nicméně pokud oba rodiče jsou přenašeči, mají 25% pravděpodobnost, že se

jejich dítě narodí postižené. Mohou ale využít právě preimplantační genetické diagnostiky, aby přenosu postižení zabránili. [17]

Pokud z prekoncepčního pohovoru vyplynulo, že jeden nebo oba rodiče jsou přenašeči nebo postižení určitou genetickou chorobou a existuje určitá pravděpodobnost přenosu postižené alely na dítě, přistoupí se ke genetickému testování.

7. PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA (PGD)

Preimplantační genetické testování (PGT) se skládá z několika souborů vyšetření. Prvním z nich je preimplantační genetická diagnostika (PGD), která se skládá z vyšetření monogenních chorob nebo chromosomálních aberací. Dalším souborem je preimplantační genetický screening (PGS), jenž se snaží co nejlépe selektovat embrya s patologickým počtem chromosomů (aneuploidii). Označení preimplantačního genetického testování aneuploidii jako screening je ovšem sporné, některé zdroje jej již považují za diagnostickou metodu, jiné se stále drží názvu PGS kvůli jeho kontroverzi, jak bude popsáno níže. V současné době je ale více využíván termín PGT jako synonymum pro PGD a PGS z literatury již téměř vymizelo.

PGT se v dnešní době dělí na tři základní typy: PGT monogenních chorob (PGT-M), PGT aneuploidii (PGT-A) a PGT chromosomových aberací (PGT-SR).

Na počátku PGT stojí biopsie jedné či několika buněk embrya vytvořeného *in vitro*. Dále jsou tyto buňky testovány jednou nebo několika metodami a případně selektovány. [18] Do dělohy matky jsou poté tedy implantována pouze embrya, která nejsou postižena daným onemocněním nebo aneuploidii. PGT se tak i přes svou náročnost stalo mnohdy nedílnou součástí procesu IVF, zejména proto, že se jedná o neinvazivní metodu, a navíc díky němu došlo k výraznému snížení terapeutických ukončení gravidit. [18]

7.1 Diagnostické metody používané v PGD

Použití diagnostických metod se napříč druhy PGT liší, ale některé jsou shodné, případně se vzájemně doplňují.

FISH (fluorescent *in situ* hybridization) je metoda používaná zejména pro genetický screening aneuploidii a diagnostiku chromosomových aberací, hlavně translokací. Principem FISH metody je specifické navázání fluorescenčně značených DNA sond na komplementární úsek chromosomu – centromery nebo specifické chromosomové lokusy. Ve fluorescenčním mikroskopu poté pozorujeme signály, které jsou přímo úměrné počtu chromosomů nebo počtu vyšetřovaných chromosomových úseků. [19]

PCR nebo její modifikace se využívají zejména při metodě PGT-M. Principem PCR metody je pomocí specifických primerů namnožení konkrétního úseku DNA, který se

následně analyzuje pomocí elektroforetické separace. Modifikacemi PCR vznikly například multiplex-PCR nebo real-time PCR. [19]

Celogenomová amplifikace (whole genome amplification (WGA)) se vyvinula, protože PCR nelze použít ve všech případech kvůli nedostatku množství DNA ve vzorku. WGA je totiž schopna namnožit až stovky kopií DNA, které jsou následně využity pro analýzu. WGA je naprosto nezbytnou metodou pro následovné použití mikročipových metod a sekvenování nové generace a stejně jako PCR je využívána hlavně při diagnostice monogenních chorob. [19]

DNA mikročipy (DNA microarray) se dělí na dvě základní kategorie – aCGH (array comparative genomic hybridization) a SNP microarray (single nucleotide polymorphism microarray). Principem aCGH je fluorescenční značení DNA, následná aplikace na mikročip, který obsahuje cílené sondy a následná detekce intenzity fluorescenčního signálu. aCGH je často používaná metoda pro diagnostiku chromosomálních aberací typu delece / duplikace a pro screening aneuploidií. Tato metoda není schopná detekovat polyploidie. SNP microarray se sice řadí mezi DNA mikročipy, ale její princip se řadí spíše mezi celogenomové sekvenování. [19]

SNP microarray spočívá v principu Watson-Crickova párování bází. Mikročip je vybaven až stovkami tisíc nukleotidových sond, které se specificky vážou na zkoumanou DNA. Signál, jenž je posléze měřen, je přímo úměrný množství cílové DNA. Tuto metodu lze použít jak pro PGT-M, tak pro PGT-A, jelikož získáme jak informace o genotypu, tak informace o počtu kopií chromosomů. NGS naopak využívá fragmentaci DNA, přípravu knihovny templátů (k tomu slouží PCR nebo hybridizační záchyt) a následuje analýza dat. Výstupem je nejčastěji sekvence cílové DNA. I tato metoda je vhodná jak pro provedení PGT-M, tak pro PGT-A. [18–21]

Haplotypizace je metoda určující skupinu alel na jednom chromosomu, která se dědí současně (tzv. haplotyp). Haplotyp, který mají společný příbuzní jedinci trpící daným onemocněním, se označuje jako vysoce rizikový haplotyp, zatímco opačným příkladem, tedy haplotyp bez přítomnosti patogenní varianty, je nízkorizikový haplotyp. Během předklinické diagnostiky se ve vzorcích obou rodičů a rodinného příslušníka, který taktéž trpí zkoumanou chorobou, genotypují genetické markery v blízkosti defektního genu. V klinickém testování pak zkoumáme informativní genetické markery, taktéž v okolí zkoumaného genu, což nám

poskytne informace o maternálním či paternálním původu haplotypu. V tomto bodě se analýza může vydat dvěma různými směry – přímá analýza a nepřímá analýza. Při přímé analýze se hodnotí přítomnost nebo nepřítomnost patogenní varianty a její souvislost s informativními genetickými markery. Nepřímá analýza je založena pouze na haplotypizaci. Podmínkou ale pro tento typ analýzy je, aby byl rizikový haplotyp stanoven již během předklinického vyšetření. [22]

Karyomapping je založen na principu SNP mikročipů, kterými se genotypizuje 300 000 SNP po celém genomu, a na Mendelovské analýze. Dále je princip stejný jako u haplotypizace. Jsou odebrány tři vzorky DNA – DNA matky i otce a vzorek DNA příbuzného, který je postižený. Při klinickém vyšetření jsme pak schopni diagnostikovat původ haplotypů. Karyomapping je taktéž schopen identifikovat aneuploidie nebo strukturální chromosomální přestavby. Pokud se genotypický otisk ve zkoumané oblasti shoduje s otiskem u referenčního vzorku, můžeme prohlásit, že dané embryo zdědí patogenní variantu. Pokud se naopak neshoduje, nezdedí ji. Tato metoda je navíc schopna detekovat monogenní choroby i aneuploidie. [22–25]

7.2 PGT-M (PGT monogenních chorob)

PGT-M dovoluje odhalit téměř veškeré dědičné monogenní choroby, u kterých je přesně znám jejich lokus. Tyto lokusy mohou být jednak jaderné, jednak mitochondriální (děděny pouze po matce). Jaderné lokusy pak mohou být gonosomální, autosomální a dominantně či recesivně vázané. [18]

Mezi nejčastější indikace vyžadující PGT-M patří z autosomálně recesivně dědičných chorob cystická fibróza a hereditární hemoglobinopatie, z autosomálně dominantně děděných chorob poté Huntingtonova choroba, myotonická dystrofie typu 1 a neurofibromatóza. U X-vázaných chorob je PGT-M prováděno zejména u hemofilie nebo Duchennovy svalové dystrofie. U gonosomálně děděných chorob se ovšem pohybujeme na hranici etiky. Většina zemí totiž neumožňuje výběr embrya na základě pohlaví a uvádí se, že by to ani nebylo eticky správné. U těchto chorob jsou tedy situace, kdy se dají embrya rozlišit na postižená a zdravá (případně ženy přenašečky) a etika tak není porušena, ale jsou ovšem i situace, kdy lze implantovat například pouze mužská embrya. [18]

7.2.1 Vývoj metod používaných pro PGT-M

V roce 1990 byla publikována první zpráva o dítěti narozeném po použití PGT-M. Vědci pod vedením prof. Handyside tehdy popsali použití PCR amplifikace, která byla využita k rozlišení embryí nesoucích mužské a ženské chromosomy. Indikací k tomuto vyšetření bylo onemocnění vázané na X-chromosom. Nejčastěji tak bývají postiženi hemizygotní muži, zatímco heterozygotní ženy jsou přenašečky. PCR amplifikace tak detekovala specifické Y-sekvence a embrya mužského pohlaví (neboli postižená embrya) byla eliminována a nebyla použita pro následnou implantaci do dělohy matky. [18]

Při prvním použití PGT-M byla použita simplexní PCR, ta byla později nahrazena multiplexní PCR. Při provedení multiplexní PCR lze narozdíl od simplexní amplifikovat vícero sekvencí najednou. [18, 26]

Jednobuněčná biopsie, provedená třetí den po oplození vajíčka, s následnou multiplexní PCR se stala zlatým standardem. Až v posledních několika letech jí pomalu začala konkurovat biopsie provedená až ve stádiu blastocytu (přesněji biopsie 5–8 trofoblastu) s následným použitím genomových technologií. Celogenomové metody tak umožňují spojení PGT-M i PGT-A, jelikož poskytují informace o genotypizaci i počtu kopií chromosomů. [18, 22]

Dalším důvodem, proč se upustilo od původní PCR metody, je možnost tzv. vypadnutí alely (allele dropout (ADO)), což je jev, který nastává během analýzy, zpravidla při malém vzorku DNA. Tento problém byl vyřešen s příchodem metody WGA, ať už se jedná o amplifikaci s vícenásobným posunem (MDA), amplifikační cykly založené na vícenásobném žíhání a smyčkování (MALBAC) nebo PCR s degenerovanými oligonukleotidy (DOP-PCR). V Evropě a USA se nejvíce používá metoda MDA. Hlavním posunem, který metoda WGA přinesla, byla možnost analýzy z jediné bioptované buňky. [22, 27]

Nyní je hlavní metodou pro provedení PGT-M WGA s následnou NGS nebo SNP, která je schopná kombinovat PGT-M a zároveň PGT-A, jelikož získá i informace o chromosomální aneuploidii. [22, 27]

7.2.2 Proces provedení PGT-M

Před samotným přistoupením k PGT-M je nutno provést genetickou konzultaci s oběma nastávajícími rodiči. Ta se skládá ze sestavení osobní i rodinné anamnézy, odběru vzorku krve a následného genetického vyšetření. Vyšetření je často doplněno o screeningové vyšetření nosičství několika základních hereditárních onemocnění (např. cystická fibróza, hereditární hemoglobinopatie nebo spinomuskulární atrofie). [18]

Při nálezu nějaké indikace ze strany alespoň jednoho nastávajícího rodiče se mohou rozhodnout pro dárcovský program pohlavních buněk, nebo jim je nabídnuta možnost PGT-M. Pokud se pro ni rozhodnou, zahájí se proces IVF s PGT-M a PGT-A diagnostikou. Ten začíná tedy samotným procesem IVF, kdy jsou odebrány oocyty a oplodněny *in vitro* pomocí metody ICSI. Následně se nechávají kultivovat a poté jsou bioptovány buňky trofoktodermy. Pomocí diagnostické metody, která je stanovena na základě konkrétní situace, jsou selektována embrya nesoucí patologickou variantu genu. Následně jsou embrya testována na přítomnost aneuploidii. Ostatně přesně tento proces je detailněji demonstrován na příkladu kazuistiky níže. [28]

7.3 PGT-A (PGT aneuploidii)

Mužská i ženská pohlavní buňka prochází při svém vývoji dvěma procesy meiózy. Meióza je jeden z typů dělení buněk, při kterém dochází k redukci počtu chromosomů. Výsledkem je tedy haploidní gameta s 23 chromosomy, oproti somatické buňce, která je diploidní a má tudíž 23 párů chromosomů (celkem tedy 46 chromosomů). [1] Nicméně pokud dojde při meiotickém dělení v procesu gametogeneze k chybě, dojde ke vzniku aneuploidii, jinak řečeno k abnormalitám v počtu chromosomů (numerické aberace chromosomů) – ty dělíme na dva základní typy: při jednom dojde ke ztrátě chromosomu (monosomie), při druhém naopak chromosom nebo více chromosomů přebývá (nejčastěji trisomie). Nejznámější příklad je Downův syndrom, kde dochází k trisomii 21. chromosomu.

Je také známo, že i věk matky hraje výraznou roli v četnosti výskytu aneuploidii (u všech chromosomů rovnoměrně), přičemž prevalence se zvyšuje z 30 % u žen ve věku 30 let na téměř 90 % u žen ve věku > 44 let (tyto podíly značí poměr aneuploidních embryí maternálního původu ku všem aneuploidním embryím). Nicméně tento problém může postihnout jakoukoliv ženu bez ohledu na její věk nebo rasu. Dalším faktorem vzniku

aneuploidií je typ gamety – riziko vzniku chromosomálních abnormalit je daleko vyšší v oocytech než ve spermích. [29, 30]

K chromosomálním abnormalitám může ovšem také dojít během mitotického dělení. Pokud při prvním dělení po oplození dojde k chybě, vznikne tzv. mozaicismus neboli směs buněk s rozdílnou chromosomální ploidií. Mitóza vede ke klonální proliferaci, jinými slovy se buňka mitózou dělí na dvě buňky dceřiné. Pokud se tedy v prvním mitotickém dělení stane chyba, vzniknou dva sousedící shluky buněk, které jsou aneuploidní, jelikož jedna dceřiná větev buněk získá chromosom nebo více navíc, zatímco druhá větev dceřiných buněk o toto množství chromosomů přišla. Mozaicistní embrya mají sice nižší míru implantace, ale vedou ke zdravým plodům. Tvoří tedy skupinu druhé priority, hned po fyziologických embryích, vhodných embryí pro transfer. [30, 31]

Aneuploidie chromosomů se při metodě IVF vyskytují velmi často a ve většině případů vedou k potratu nebo k celkovému neúspěchu IVF. Naopak u živě narozených dětí není výskyt tak vysoký a podíl postižených dětí činí cca 1:150. [29]

Nicméně na potratovost má vliv i typ aneuploidie, jelikož všechny monosomie a trisomie autosomů (vyjma trisomií na chromosomech 13, 18 a 21) jsou embryonálně smrtelné, oproti tomu monosomie nebo trisomie gonosomů nejsou embryonálně smrtelné. Důležité je, aby zůstal zachován gonosom X, u embryí s jediným gonosomem Y dochází totiž taktéž k úhynu. [31]

Díky použití PGT-A také odpadá dřívější praxe implantace několika embryí při jednom transferu, což mnohdy vedlo k vícečetným těhotenstvím, a tím pádem také ke klinickým problémům s tímto spojených. Dříve se totiž embrya hodnotila velmi často dle morfologického vzhledu, což ovšem neodhalilo skutečnost, že velké množství časných embryí obsahuje chromosomální abnormalitu. [31]

Proces vyšetření PGT-A spočívá v biopsii trofektodermu s jeho následnou analýzou. Ta zahrnuje v první řadě DNA amplifikaci, na kterou navazuje samotná DNA analýza. Z geneticky-molekulárních analytických metod se používají zejména SNP array, modifikace PCR, aCGH nebo NGS. Díky tomuto procesu jsme schopni embrya rozřadit do čtyř skupin: euploidní, aneuploidní, mozaiková a segmentálně abnormální. [31]

7.3.1 Vývoj metody PGT-A

Abychom se ovšem dostali až k této pokročilé diagnostice, museli jsme ujít velký kus cesty. Vývoj PGT-A začínal společně s PGT-M, tedy v roce 1990, kdy profesor Handyside a jeho kolegové analyzovali vzorek z časného embrya (3 dny po oplození) pro X-vázanou genetickou mutaci. K této analýze bylo použito PCR. Tato metoda byla o dva roky nahrazena metodou FISH, která ale opět zkoumala přítomnost X-vázaného onemocnění. Až o rok později byla tato metoda použita k diagnostice aneuploidií – tedy tedy dochází k vymezení vývoje PGT-A a PGT-SR. Nicméně tato technologie je omezena počtem chromosomů, které je schopna analyzovat v jednom cyklu měření. Toto omezení dovoluje diagnostikovat maximálně polovinu zkoumaných chromosomů, což vedlo k upuštění od této metody. [31]

Další metodou se stala diagnostika polárních tělísek. Polární tělíška nám sice poskytnou informace výhradně o aneuploidiích vzniklých meiotickými chybami u žen, nicméně právě tyto chyby jsou nejčastější příčinou aneuploidií embryí. Detekce spočívá ve vzájemné aneuploidii – polární tělíško obsahuje monosomii, oproti tomu přidružený oocyt trisomii. Úskalí této metody ale spočívá v otcovských meiotických chybách, nevzájemné aneuploidii nebo mitotické chyby vzniklé zygoty. Proto je tato metoda zatížena vysokou mírou nepřesnosti, přesto je však v některých zemích nadále využívána. [31]

Následující metoda se zaměřila na přechod k odběru biopsie ve stádiu blastocytu, tudíž odběru buněk trofektodermu, a na diagnostiku všech chromosomů. K tomu bylo ovšem potřeba namnožit množství DNA ve vzorku, což umožnila amplifikace celého genomu (WGA), díky které získáme dostatečné množství DNA pro analýzu všech 24 chromosomů. Označení 24 chromosomů může být dosti matoucí a zavádějící, nicméně v tomto případě se páry homologních autosomů počítají jako jeden chromosom (tedy 22 chromosomů), a k tomu jsou přičteny dva gonosomy, které se počítají zvlášť (tedy 2 chromosomy), čímž se dostaneme na oněch 24 chromosomů. Po amplifikaci DNA je možné provést analýzu jako například SNP array, NGS nebo aCGH. [31]

V současné době se nejvíce používá zmiňovaná WGA v kombinaci s NGS, zejména díky jeho vysoké šířce pokrytí genomu. [31]

7.3.2 Kontroverze PGT-A

Taktéž je důležité zmínit, že PGT-A je doposud zahaleno jistým závojem kontroverze. Nedošlo totiž ke zlepšení úspěšnosti IVF, ba naopak u žen mladších 35 let snižuje šanci na těhotenství. Vždy byla vina svalována na technologické nedostatky, což vyvrátila metoda NGS. Co ovšem opravdu ovlivňuje výsledek PGT-A, je samotná biopsie. Počet buněk odebraných právě při biopsii totiž není dostatečný pro jasnou předpověď chromosomální výbavy celého embrya. Dalším aspektem je jednak schopnost embrya v některých případech samoopravy aneuploidií, jednak neschopnost metody rozlišit, zda jsou aneuploidie mitotického, nebo meiotického původu. [32]

7.4 PGT-SR (PGT chromosomálních aberací)

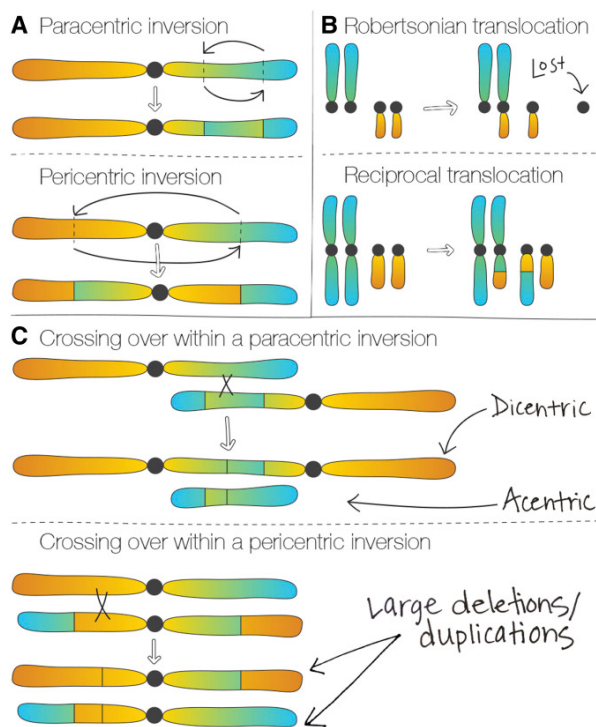
Při strukturních chromosomových aberacích zůstává počet chromosomů fyziologický – na rozdíl od aneuploidií výše, změny ale postihují samotnou strukturu částí chromosomů. K chromosomovým přestavbám může dojít *de novo* při tvorbě gamet, mohou být zděděny po jednom z rodičů, anebo mohou vzniknout až v průběhu života. [33]

Strukturní chromosomové aberace jsou dvojího typu. Prvním z nich jsou balancované aberace, při nichž zůstává zachováno množství DNA, která by za fyziologického stavu tvořila daný chromosom. Při druhém typu dochází k množstevním změnám částí chromosomů, ať už se jedná o delecii segmentů chromosomu, nebo její duplikaci (bude se tedy jednat o tzv. částečnou monosomii nebo částečnou trisomii). Tyto aberace se proto označují jako nebalancované. [33]

Mezi balancované aberace řadíme několik podtypů. Při inverzi dojde k otočení úseku chromosomu mezi dvěma zlomy, přičemž daný úsek může obsahovat centromeru (pericentrická inverze), nebo nemusí (paracentrická inverze), tento jev je popsán na obrázku 6 ve schématu A. Na schématu C v obrázku 6 je pak znázorněn následný crossing-over při meióze, pokud předtím došlo k paracentrické inverzi. Výsledkem tohoto děje je vznik acentrické (neobsahuje ani jednu centromeru) a dicentrické (obsahuje dvě centromery) chromatidy, což má za následek, že ani jedna z těchto chromatid poté nesegreguje správně. Dalším jevem může být vznik chromatid se správným počtem centromer, ale ty jsou naopak zatíženy velkou měrou delecí, což má za následek ve většině případů smrt organismu. Translokace je výsledkem děje, při němž dojde ke zlomům a následné výměně segmentů

nehomologních chromosomů. Prvním typem translokace je robertsonská translokace, při které dochází k přesunu celého raménka chromosomu na jiné. Druhým typem je reciproká translokace, při níž dochází k výměně velkých částí dvou ramének. Oba tyto mechanismy jsou znázorněny na obrázku 6 – schéma B. Tyto translokace většinou neovlivní fenotyp daného jedince, kdežto jeho gamety jsou zpravidla postiženy, což vede k opakovaným potratům nebo neplodnosti. [33, 34]

K nebalancovaným aberacím řadíme delecii, duplikaci nebo tzv. izochromosomy. Delece spočívá ve ztrátě části ramene chromosomu a vzniká nejčastěji v důsledku chyby při crossing-overu. Duplikace je v podstatě opačný děj oproti delecii, jelikož dojde ke zdvojení nebo multiplikaci úseku chromosomu. Isochromosom má obě ramena krátká nebo dlouhá – je tedy zrcadlově shodný (fyziologický chromosom má jedno raménko kratší a jedno delší). [33]



Obrázek 6 - Schématický přehled strukturálních chromosomových aberací [34]

A – Parecentrická inverze (paracentric inversion), pericentrická inverze (pericentric inversion); B – robertsonská translokace (Robertsonian translocation), ztracená centromera (lost), reciproká translokace (reciprocal translocation); C – crossing-over s paracentrickou inverzí (crossing over within a paracentric inversion), dicentrická (dicentric), acentrická (acentric), crossing-over s pericentrickou inverzí (crossing over within a pericentric inversion), velká delece / duplikace (large deletions / duplications)

Fenotyp nositele balancovaných chromosomálních aberací (zejména tedy translokací a inverzí) je normální, ale na druhé straně se potýká se zvýšenou incidencí potratů nebo pravděpodobnosti vzniku vývojové vady u svého potomka. Nejčastější chromosomální aberací je translokace. Lidé s translokací při gametogenezi tvoří defektní gamety, které právě mají na svědomí zvýšenou potratovost. K tomu dochází při segregaci chromosomů do gamet, kdy se mohou segregovat buďto vyváženě (pak zpravidla nedojde k projevu ve fenotypu, pokud zlomy nejsou v místě klíčových genů), nebo nevyváženě (v tomto případě dochází k oněm potratům, případně projevu ve fenotypu). Uvádí se, že riziko defektních gamet je $\geq 50\%$, a právě proto je pro tyto páry, ve kterých je alespoň jeden z nich nositelem strukturní chromosomové aberace, určena PGT-SR. [35–37]

Dalším efektem, který ovlivňuje chromosomální výbavu gamet jedinců s chromosomální aberací, je interchromosomální efekt (ICE). Tento efekt se projevuje tím, že translokace na jednom páru ovlivňuje segregaci jiných párů. Příkladem může být, jak uvádí zdroj, žena s translokací mezi chromosomy 2 a 22, u jejíž dcery vznikl Turnerův syndrom (ztráta jednoho gonosomu) a navíc zdědila i matčinu translokaci. Translokace autosomů tedy může ovlivnit segregaci gonosomů. Souhrnně řečeno, strukturální přestavby mohou vést ke vzniku aneuploidií. Kromě ICE, u kterého se vědci nejsou schopni shodnout, zda opravdu a v jaké míře ovlivňuje vznik aneuploidie, jsou další faktory (věk matky, místo zlomu, kvalita embrya) stále sporné. [34, 38]

Dříve se ve velké míře používala metoda FISH. U té ale bylo potřeba připravit několik sond, jež odpovídaly strukturálním chromosomálním abnormalitám. Později došlo k rozvoji metod jako aCGH nebo NGS, které sice, jak už bylo vysvětleno dříve, pro svoje samotné provedení vyžadují celogenomovou amplifikaci (WGA), ale oproti tomu díky nim došlo ke zlepšení klinických výsledků PGT-SR. Hlavním důvodem je, že zejména NGS je schopna diagnostikovat všechny chromosomy. [36]

8. KAZUISTIKA

Paní „Neznámá“ a pan „Neznámý“ přišli na genetickou konzultaci ještě před zahájením cyklu IVF. Důvodem návštěvy genetické ordinace bylo onemocnění hypokalemickou periodickou paralýzou pana Neznámého. Toto onemocnění se v jeho rodině vyskytuje opakovaně.

8.1 Genetické vyšetření žadatelů

Na začátku genetického vyšetření proběhl prekoncepční pohovor s manželi Neznámými, ze kterého vyplynuly prvotní základní informace:

Paní Neznámá:

- Osobní anamnéza: zdravá, bez medikace, žádné alergie, žádné operace, kuřačka (5 cigaret / den), alkohol příležitostně.
- Gynekologická anamnéza: menstruace od 15 let, cyklus nepravidelný, 1 spontánní potrat, porody žádné.
- Fenotyp: normální, bez vývojové vady či genetické stigmatizace.

Pan Neznámý:

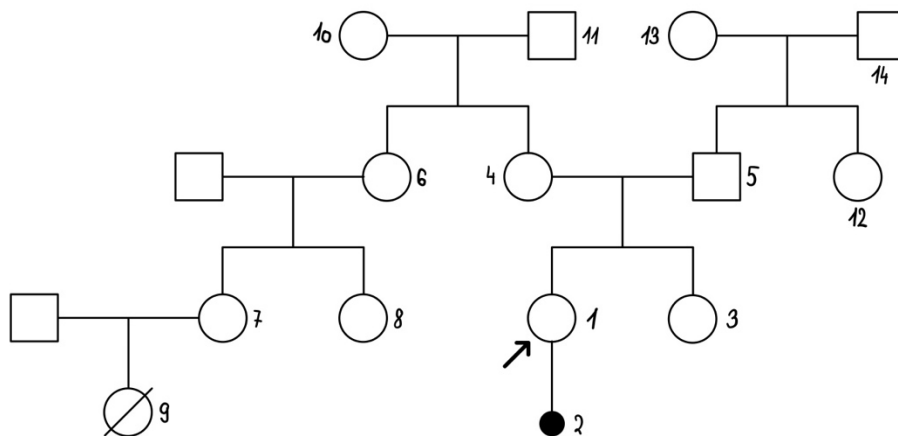
- Osobní anamnéza: hypokalemická obrna, v dětství zápal mozkových blan, medikace: Verospiron a Kalium chloratum, bez alergií, bez operací, kuřák (10 cigaret / den), alkohol příležitostně.
- Vyšetření spermiogramu v normě.
- Fenotyp: normální, bez vývojové vady či genetické stigmatizace.

Na základě těchto informací byla osobní anamnéza doplněna o rodinnou anamnézu a bylo přistoupeno k odběru vzorků DNA k vyšetření hypokalemické periodické paralýzy a screeningu dalších hereditárních chorob.

8.1.1 Rodokmeny žadatelů

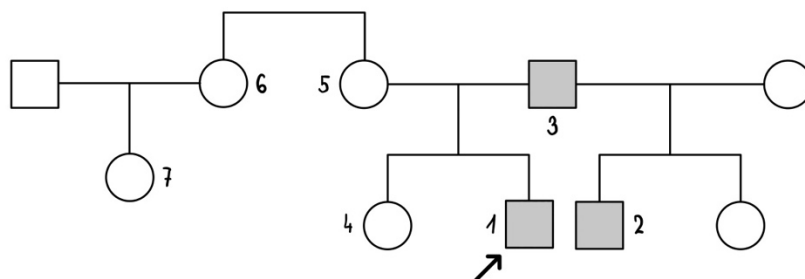
Rodinná anamnéza spočívá v sestavení rodokmenů, ze kterých mnohdy vyplývá, jak se onemocnění projevuje v průběhu několika generací, nebo může odhalit další aspekty vhodné k vyšetření. V našem případě je důležitý zejména rodokmen pana Neznámého

(obrázek 8), vzhledem k jeho diagnóze. Provéřit se ovšem musí i rodokmen paní Neznámé (obrázek 7).



Obrázek 7 - Genealogický rodokmen paní Neznámé

- 1 – proband – paní Neznámá
- 2 – potrat žadatelky
- 3 – sestra žadatelky – sledována kardiologem pro arytmií, bezdětná
- 4 – matka žadatelky – po hysterektomii pro myom
- 5 – otec žadatelky – po chronické hepatitidě, hypertenze, po operaci rektálního píštěle
- 6 – sestra matky žadatelky – sledována na gastroenterologii pro polypy konečníku
- 7, 8 – dcery sestry matky žadatelky (sestřenice žadatelky)
- 9 – dcera jedné ze sestřenic žadatelky zemřela první den po porodu
- 10 – maternální babička žadatelky – po hysterektomii
- 11 – maternální dědeček žadatelky – diabetes mellitus
- 12 – sestra otce žadatelky – deprese
- 13 – paternální babička žadatelky – po cévní mozkové příhodě
- 14 – paternální dědeček žadatelky – porucha sluchu, po cévní mozkové příhodě



Obrázek 8 - Genealogický rodokmen pana Neznámého

- 1 – proband – pan Neznámý
- 2 – nevlastní bratr žadatele – hypokalemická obrna
- 3 – otec žadatele – hypokalemická obrna
- 4 – sestra žadatele – zdravá
- 5 – matka žadatele – zdravá
- 6 – sestra matky žadatele – dětská mozková obrna
- 7 – dcera sestry matky žadatele (sestřenice žadatele) – zdravá

8.1.2 Hypokalemická periodická paralýza

Hypokalemická periodická paralýza (HypoPP) je jedním z typů nervosvalových poruch, které jsou způsobené mutací v genu pro sodíkové, vápníkové a draslíkové kanály kosterního svalstva. HypoPP se vyznačuje autosomálně dominantní dědičností, první projevy nemoci přicházejí zpravidla do třicátého roku života a je typická opakujícími se záchvaty svalové slabosti, při nichž je nízká koncentrace draslíku v krvi. Diagnóza je pak stanovena pomocí specifického klinického obrazu a doplněna o genetické testování daného jedince. K mutaci dochází nejčastěji v genu *CACNA1S* pro vápníkový kanál nebo v genu *SCN4A* pro sodíkový kanál. Genetické testování odhalí patogenní mutaci v heterozygotním stavu u 60–70 % pacientů trpících středně těžkými až těžkými klinickými projevy. [39]

HypoPP se projevuje lokalizovanými nebo celotělovými paralýzami kosterního svalstva, které se periodicky opakují v denních, týdenních nebo až měsíčních rozestupech a jsou doprovázeny sníženou koncentrací draslíku v séru (méně než 3,5 mmol/l). Záchvaty se spouští buďto spontánně, nebo v odpovědi na spouštěč, kterým může být například jídlo

bohaté na sacharidy, odpočinek po náročném cvičení nebo alkohol. Pacienti s HypoPP trpí navíc preanestetickými nebo postanestetickými komplikacemi. [39]

8.1.3 Výsledky genetického testování žadatelů

Odebraný vzorek DNA byl vyšetřen pomocí cytogenetiky a na molekulárně-genetické úrovni.

Karyotyp paní Neznámé je dle výsledku cytogenetického vyšetření normální ženský – 46, XX. Karyotyp pana Neznámého je fyziologický mužský – 46, XY. Cytogenetické vyšetření tedy neprokázalo žádné strukturální či numerické aberace.

U pana Neznámého se pomocí molekulárně-genetických metod zkoumalo 34 mutací v genu *CFTR* (při jeho poškození vzniká cystická fibróza). Výsledek je fyziologický – nebyla nalezena žádná mutace pro toto onemocnění.

U paní Neznámé byly na molekulární úrovni testovány trombofilní mutace. Konkrétně se jednalo o diagnostiku genu *F5* G1691A (mutace tohoto genu je známa jako Leidenská mutace faktoru V koagulační kaskády) a genu *F2* G20210 G>A (mutace protrombinu neboli faktoru II koagulační kaskády), kdy nebyla ani jedna z mutací prokázána.

Závěrem těchto vyšetření je, že karyotyp obou partnerů je v pořádku a nebyly prokázány žádné z výše uvedených poškozujících mutací. Nicméně bylo doporučeno molekulárně-genetické vyšetření genu *SCN4A* pana Neznámého.

Byl tedy odebrán další vzorek DNA pana Neznámého k analýze. Pomocí sekvenování nové generace nebyla prokázána žádná patologická mutace v genu *SCN4A*, proto bylo doporučeno doplnit vyšetření o analýzu genu *CACNAIS*. Tato analýza byla provedena pomocí amplifikace a klasické sekvenační analýzy a odhalila přítomnost patogenní varianty, konkrétně varianty c.3716G>A p.(Arg1239His) genu *CACNAIS* v heterozygotním stavu. Patogenní sekvence v tomto případě znamená, že na pozici 3716 kódující DNA (c), která je dále přepisována do mRNA, došlo k náhradě guaninu (G) za adenin (A), čímž došlo k projevu i při translaci. V proteinu je tedy na pozici 1239 arginin (Arg) nahrazen histidinem (His).

Vzhledem k heterozygotní variantě genu pro HypoPP je možné uvažovat o PGD, jelikož polovina spermií pana Neznámého nebude mít ve své genetické výbavě tuto

patogenní variantu. Pokud by manželé Neznámí nechtěli podstoupit při početí potomka metodu PGD, je možné ještě využít cesty dárcovských spermií.

Manželé Neznámí se nakonec rozhodli pro podstoupení IVF právě s metodou PGD.

8.2 Provedení PGT-M

Hypokalemická periodická paralýza je monogenní onemocnění se známým lokusem, je možno jej u embrya diagnostikovat pomocí PGT-M. K této diagnostice byla vybrána dvě embrya vzniklá z vajíček paní Neznámé a spermií pana Neznámého. Z každého embrya byl odebrán bioptický vzorek z trofektodermu.

Pro diagnostiku tohoto onemocnění byla použita metoda karyomappingu. Aby bylo možné správně identifikovat haplotyp v embryích, bylo zapotřebí několik vzorků uvedených v tabulce níže.

Vzorky DNA	Rodinná vazba k embryu	Genotyp
DNA partnerky	Matka	/
DNA partnera	Otec	c.[3716G>A]:[3716G=]
DNA reference	Paternální dědeček	c.[3716G>A]:[3716G=]

Tabulka 1 - Přehled vzorků DNA potřebných pro karyomapping

Jak bylo v teoretické části této práce vysvětleno, je zapotřebí tří vzorků DNA. DNA vzorek paternálního dědečka sloužil jako DNA reference. Genotyp „c.[3716G>A]:[3716G=]“ znamená, ostatně podobně jako bylo uvedeno výše, že se jedná o mutaci v heterozygotním stavu. Na pozici 3716 je buďto fyziologicky přítomen guanin (G), nebo je guanin nahrazen adeninem (A).

Číslo embrya	Výsledky PGT-M (<i>CACNAIS</i>)	Chromosomové abnormality
1	Přímá detekce: nevyšetřována	Pohlavní chromosomy: XY
	Paternální haplotyp: ve vazbě s normální variantou	Aneuploidie: +9 (mat), -21 (mat), -22 (mat)
2	Přímá detekce: nevyšetřována	Pohlavní chromosomy: XY
	Paternální haplotyp: ve vazbě s normální variantou	Aneuploidie: +9 (mat)

Tabulka 2 - Výsledky PGT-M a PGT-A embryí

Během PGT byla zkoumána dvě embrya. Embryo č. 1 nese pohlavní chromosomy XY, PGT-M prokázalo nepatogenní variantu genu (dítě bude zdravé), ale embryo je aneuploidní. Označení „+9 (mat)“ znamená, že se jedná o jeden chromosom 9 navíc, a že aneuploidie je maternálního původu. Oproti tomu označení „-21 (mat)“ a „-22 (mat)“ značí monosomii těchto chromosomů, rovněž maternálního původu. Souhrnně se tedy jedná o trisomii chromosomu 9 a monosomii chromosomů 21 a 22.

Embryo č. 2 je taktéž vybaveno gonosomy XY a nese aneuploidii. V tomto případě se jedná pouze o trisomii chromosomu 9, opět maternálního původu.

Zdroj uvádí, že trisomie chromosomu 9 je letální a většina plodů zmírá prenatálně nebo velmi časně po narození. Při monosomii chromosomu 21 není situace nijak výrazně jiná – většina jedinců umírá během prvních několika měsíců života. A při monosomii chromosomu 22, která je daleko méně popisována, je prognóza taktéž podobná. [40, 41]

Z těchto důvodů nebylo tedy ani jedno embryo doporučeno k transferu.

8.3 Výsledek cyklu IVF

Výsledek tohoto cyklu IVF je negativní, jelikož ani jedno embryo nebylo doporučeno k transferu. Metoda PGT-M sice vyloučila embrya nesoucí patogenní variantu pro gen *CACNAIS*, což bylo i hlavním cílem tohoto cyklu IVF, ale nepřinesla tzv. šťastný konec.

Z rodokmenu (obrázek č. 5) a z osobní anamnézy paní Neznámé vyplývá, že paní Neznámá již jeden potrat prodělala. Dalším faktem je původ aneuploidií u obou zkoumaných embryí, který taktéž odkazuje na maternální původ. Mohlo by tedy do budoucna být

předmětem zkoumání, zda paní Neznámá, i přes svůj fyziologický karyotyp, netvoří aneuploidní oocyty.

9. AKTUÁLNÍ TRENDY V PGD

Ačkoliv je preimplantační genetická diagnostika relativně nové odvětví, musela projít obrovským vývojem, aby překonala prvotní skeptické názory.

Popsané metody se neustále vyvíjejí neuvěřitelnou rychlostí a v poslední době se uplatňují nové metody, jako je například sekvenování třetí generace (TGS). Tento postup umožňuje rozšířit PGD nejen na známé a frekvenční mutace, ale také na úplné sekvenování celých genů, což dovoluje zachycení i raritně popsaných genetických změn i v neznámých genech. [42]

9.1 Sekvenování třetí generace (TGS)

Velká část pozornosti je v současné době věnována NGS, zejména sekvenování třetí generace (TGS) neboli sekvenování dlouhého čtení (long-read sequencing – LRS). Metoda krátkého čtení je schopna generovat zhruba 100–300 bp (párů bází). Výhodou LRS je schopnost generovat sekvence > 10 kb přímo z původní DNA. Jednotka „kb“ znamená kilobázi, hovoříme tedy o 10 000 bázích. Další výhodou LRS je rychlost. Výzkumníci ze Stanfordovy univerzity nedávno představili LRS celého genomu s využitím nanopórů, která je schopná genom sekvenovat za zhruba 8 hodin. [21, 42, 43]

Přestože NGS umožnila obrovský posun v odhalování patogenních genů, potýká se s několika omezeními, jako jsou například strukturální varianty, extrémní obsah guaninu a cytosinu v určité části DNA nebo opakující se prvky. Pro představu se jedná zhruba o 151 Mbp (151 milionů bp) neznámé sekvence. Tato informace se zdá být poněkud matoucí, jelikož je všeobecně známo, že celý lidský genom byl již přečten. [43–45]

Lidský referenční genom, hg38, je vysoce fragmentovaný a obsahuje 349 mezer. To znamená, že mezi známými oblastmi jsou mezery, které mají buď neznámé složení, nebo je tato oblast zatížena vysokou pravděpodobností chyby pro standardní techniky. Sekvenování třetí generace umožňuje, jak už bylo řečeno, číst delší úseky DNA, a tím pádem ke snížení počtu mezer mezi známými fragmenty. [43]

LRS se nyní používá jednak k odhalování onemocnění s neznámou genetickou příčinou, jednak ke zdokonalování popisu krátkých tandemových repetitiv (STR). STR mutace jsou velmi často zodpovědné za neurologická onemocnění. Dalšími zkoumanými chorobami jsou například onemocnění ovlivňující barevné vidění nebo nádorová onemocnění. [42]

10. ZÁVĚR

V této práci byla představena problematika fertilizace *in vitro* a preimplantační genetická diagnostika.

Práce v teoretickém úvodu shrnuje anatomii a fyziologii pohlavních buněk a proces jejich splynutí, který je nezbytný ke správnému pochopení principu IVF včetně možných komplikací, kdy metoda IVF řeší mnohé reprodukční překážky pacientů. V posledních letech byla navíc tato metoda doplněna preimplantační genetickou diagnostikou embryí, která se skládá ze tří základních diagnostických postupů – PGT-A, PGT-M a PGT-SR. V dnešní době je každé embryo diagnostikováno metodou PGT-A pro vyloučení přítomnosti aneuploidii. Další dvě metody (PGT-M a PGT-SR) jsou prováděny jen v indikovaných případech. Indikace často vyplývají z vyšetření patologií předcházejících celému cyklu IVF (tzv. prekoncepční IVF) nebo z prekoncepčního pohovoru, jinak nazývaného genetické poradenství. V samostatné kapitole byla věnována pozornost diagnostickým metodám používaným pro PGT. Byly vysvětleny jejich principy, využití, ale i jejich limity.

Na příkladu kazuistiky byl demonstrován příklad použití metod PGT-M a PGT-A, kdy PGT-M byla indikována ze strany žadatele, který měl klinické projevy hypokalemické periodické paralýzy. HypoPP je autosomálně dominantně dědičné onemocnění. U žadatele se toto onemocnění vyskytuje v rodině opakovaně, a proto bylo přistoupeno k použití PGT-M. I když PGT-M vyřešila problém možného přenosu PGT-M, metoda PGT-A vyloučila zdravá embrya pro jejich aneuploidii. Metoda PGT může být tedy velmi nápomocná, nicméně nezaručuje úspěšnost cyklu IVF.

Aktuální trendy v PGD se věnují v současné době sekvenování třetí generace (sekvenování dlouhého čtení). Jeho největší výhodou je zejména přesnost, rychlost, schopnost objevit dosud nepopsané geneticky podmíněné choroby a hlavně schopnost překlenout překážky, se kterými se potýkají dosavadní metody.

11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Stavba spermie [3]	9
Obrázek 2 - Vývoj oocyty [1]	11
Obrázek 3 - Proces oplození oocyty [1].....	12
Obrázek 4 - Nidace vajíčka do děložní sliznice [1]	13
Obrázek 5 - Schéma ICSI [15].....	18
Obrázek 6 - Schématický přehled strukturálních chromosomových aberací [34].....	30
Obrázek 7 - Genealogický rodokmen paní Neznámé	33
Obrázek 8 - Genealogický rodokmen pana Neznámého	34

12. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Přehled vzorků DNA potřebných pro karyomapping	36
Tabulka 2 - Výsledky PGT-M a PGT-A embryí.....	37

13. POUŽITÉ ZKRATKY

aCGH	komparativní genomická hybridizace na mikročipech (array comparative genomic hybridization)
ADO	výpadek alel (allele dropout)
DOP-PCR	polymerázová řetězová reakce s degenerovanými oligonukleotidovými primery (degenerate oligonucleotide polymerase chain reaction)
ESHRE	Evropská společnost pro lidskou reprodukci a embryologii (European Society of Human Reproduction and Embryology)
FISH	fluorescent <i>in situ</i> hybridization
HypoPP	hypokalemická periodická paralýza
ICE	intrachromosomální efekt (interchromosomal effect)
ICSI	intracytoplasmatická injekce spermií (intracytoplasmic sperm injection)
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
LRS	sekvenování dlouhého čtení (long-read sequencing)
MALBAC	amplifikační cykly založené na vícenásobném žihání a smyčkování (multiple annealing and looping based amplification cycles)
MDA	amplifikace s vícenásobným posunem (multiple displacement amplification)
NGS	sekvenování nové generace (new generation sequencing)
NICE	Národní institut pro zdraví a péči o kvalitu (National Institute for Health and Care Excellence)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PGD	preimplantační genetická diagnostika
PGS	preimplantační genetický screening
PGT	preimplantační genetické testování
PGT-A	preimplantační genetické testování aneuploidií
PGT-M	preimplantační genetické testování monogenních chorob
PGT-SR	preimplantační genetické testování strukturálních aberací
SMRT	sekvenování jednotlivých molekul v reálném čase (single molecule real time sequencing)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
STR	krátké tandemové repetice (short tandem repeat)

TGS	sekvenování třetí generace (third generation sequencing)
WGA	celogenomová amplifikace (whole genome amplification)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Healthcare Organization)

14. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
- [2] LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.
- [3] PROFERTIL. *Faktory ovlivňující zdraví spermie* [online]. [vid. 2024-04-30]. Dostupné z: <https://profertil.cz/sperm-health/kvalita-spermii/>
- [4] ROZTOČIL, Aleš a Pavel BARTOŠ. *Moderní gynekologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-2832-2.
- [5] TRÁVNÍK, Pavel. *Klinická fyziologie lidské reprodukce*. Praha: Grada Publishing, 2022. ISBN 978-80-271-1275-3.
- [6] ŘEŽÁBEK, Karel, Martina MOOSOVÁ a Simona JIRSOVÁ. Asistovaná reprodukce - principy, postupy a jejich efektivita. *Časopis lékařů českých*. 2023, **162**(5). ISSN 1805-4420.
- [7] WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Infertility* [online]. [vid. 2024-03-12]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>
- [8] SELLAMI, Ines, Isabelle BEAU a Charlotte SONIGO. Chemotherapy and female fertility. *Annales d'Endocrinologie* [online]. 2023, **84**(3), 382–387. ISSN 00034266. Dostupné z: doi:10.1016/j.ando.2023.03.013
- [9] JOHNSON, Martin Hume. A short history of in vitro fertilization (IVF). *International Journal of Developmental Biology* [online]. 2019, **63**(3–5), 83–92. ISSN 02146282. Dostupné z: doi:10.1387/ijdb.180364mj
- [10] FISHEL, Simon. First in vitro fertilization baby—this is how it happened. *Fertility and Sterility* [online]. 2018, **110**(1), 5–11. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2018.03.008
- [11] YUZPE, Abraham Albert. A Brief Overview of the History of In Vitro Fertilization in Canada. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* [online]. 2019, **41**, S334–S336. ISSN 17012163. Dostupné z: doi:10.1016/j.jogc.2019.08.020
- [12] LEMMENS, L., S. KOS, C. BEIJER, D.D.M. BRAAT, W.L.D.M. NELEN a A.M.M. WETZELS. Techniques used for IUI: is it time for a change? *Human Reproduction*

- [online]. 2017, **32**(9), 1835–1845. ISSN 0268-1161. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/dex223
- [13] MAN, Jessica Ka-Yan, Anne Elizabeth PARKER, Sophie BROUGHTON, Hamza IKHLAQ a Mausumi DAS. Should IUI replace IVF as first-line treatment for unexplained infertility? A literature review. *BMC Women's Health* [online]. 2023, **23**(1), 557. ISSN 1472-6874. Dostupné z: doi:10.1186/s12905-023-02717-1
- [14] CHMEL, Roman a Miloš ČEKAL. Metody asistované reprodukce – aktuální stav a perspektivy. *Česká gynekologie*. 2020, **85**(4), 244–253.
- [15] DELA CRUZ, Jairia. Oocyte microinjection device allows more efficient intracytoplasmic sperm injection. *MIMS* [online]. 19. květen 2022 [vid. 2024-04-27]. Dostupné z: <https://www.mims.com/specialty/topic/oocyte-microinjection-device-allows-more-efficient-intracytoplasmic-sperm-injection>
- [16] NOVÁK, Jan, Viktor VIK a Zuzana KRÁTKÁ. Diagnostika neplodnosti mužů v 21. století – tradiční pojetí, či moderní přístup? *Časopis lékařů českých*. 2021, **160**(1). ISSN 1805-4420.
- [17] IOANNIDES, Adonis S. Preconception and prenatal genetic counselling. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* [online]. 2017, **42**, 2–10. ISSN 15216934. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpobgyn.2017.04.003
- [18] DE RYCKE, Martine a Veerle BERCKMOES. Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disorders. *Genes* [online]. 2020, **11**(8), 871. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes11080871
- [19] MARDEŠIĆ, Tonko. *Diagnostika a léčba poruch plodnosti*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4458-2.
- [20] LAFRAMBOISE, Thomas. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Research* [online]. 2009, **37**(13), 4181–4193. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkp552
- [21] HU, Taishan, Nilesh CHITNIS, Dimitri MONOS a Anh DINH. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology* [online]. 2021, **82**(11), 801–811. ISSN 01988859. Dostupné z: doi:10.1016/j.humimm.2021.02.012

- [22] PARIKH, FiruzaR, ArundhatiS ATHALYE, DhananjayaK KULKARNI, RupeshR SANAP, SureshB DHUMAL, DhanashreeJ WARANG, DattatrayJ NAIK a ProchiF MADON. Evolution and utility of preimplantation genetic testing for monogenic disorders in assisted reproduction - A narrative review. *Journal of Human Reproductive Sciences* [online]. 2021, **14**(4), 329. ISSN 0974-1208. Dostupné z: doi:10.4103/jhrs.jhrs_148_21
- [23] HANDYSIDE, Alan H., G. L. HARTON, B. MARIANI, A. R. THORNHILL, N. AFFARA, M.-A. SHAW a D. K. GRIFFIN. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *Journal of Medical Genetics* [online]. 2010, **47**(10), 651–658. ISSN 0022-2593. Dostupné z: doi:10.1136/jmg.2009.069971
- [24] ŠIMEČKOVÁ, Veronika, Marek VACA a Štěpán MACHAČ. Současné možnosti preimplantačního genetického screeningu a preimplantační genetické diagnostiky. *Česká gynekologie*. 2016, **81**(6), 431–436.
- [25] GIMÉNEZ, Carles, Jonás SARASA, César ARJONA, Ester VILAMAJÓ, Olga MARTÍNEZ-PASARELL, Kenny WHEELER, Gemma VALLS, Elena GARCIA-GUIXÉ a Dagan WELLS. Karyomapping allows preimplantation genetic diagnosis of a de-novo deletion undetectable using conventional PGD technology. *Reproductive BioMedicine Online* [online]. 2015, **31**(6), 770–775. ISSN 14726483. Dostupné z: doi:10.1016/j.rbmo.2015.08.017
- [26] MARKOULATOS, Panayotis, Nikolaos SIAFAKAS a Maurice MONCANY. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. 2002, **16**(1), 47–51. ISSN 0887-8013. Dostupné z: doi:10.1002/jcla.2058
- [27] LIU, Yujun, Yixin REN, Hao FENG, Yuqian WANG, Liying YAN, Jie QIAO a Ping LIU. Development of preimplantation genetic testing for monogenic diseases in China. *Human Fertility* [online]. 2023, **26**(4), 879–886. ISSN 1464-7273. Dostupné z: doi:10.1080/14647273.2023.2284153
- [28] BUTLER, Rachel, Gary NAKHUDA, Colleen GUIMOND, Chen JING, Nora LEE, Jason HITKARI, Niamh TALLON, Beth TAYLOR a Albert YUZPE. Analysis of

- PGT-M and PGT-SR outcomes at a Canadian fertility clinic. *Prenatal Diagnosis* [online]. 2019, **39**(10), 866–870. ISSN 0197-3851. Dostupné z: doi:10.1002/pd.5496
- [29] KIMELMAN, Dana a Mary Ellen PAVONE. Non-invasive prenatal testing in the context of IVF and PGT-A. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* [online]. 2021, **70**, 51–62. ISSN 15216934. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpobgyn.2020.07.004
- [30] CASPER, Robert. PGT-A: Houston, we have a problem. *Journal of assisted reproduction and genetics* [online]. 2023, **40**(10), 2325–2332. ISSN 1573-7330. Dostupné z: doi:10.1007/s10815-023-02913-w
- [31] VIOTTI, Manuel. Preimplantation Genetic Testing for Chromosomal Abnormalities: Aneuploidy, Mosaicism, and Structural Rearrangements. *Genes* [online]. 2020, **11**(6), 602. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes11060602
- [32] PATRIZIO, Pasquale a Norbert GLEICHER. A New Test for Preimplantation Genetic Testing of Aneuploidy (PGT-A) and Structural Chromosomal Imbalances (PGT-SR) Is Non-inferior to Current Platforms but Still Not Clinically Useful. *Clinical Chemistry* [online]. 2023, **69**(8), 791–792. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1093/clinchem/hvad087
- [33] OTOVÁ, Berta, Romana MIHALOVÁ a Klára BOBKOVÁ. *Základy biologie a genetiky člověka*. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2020. ISBN 978-80-246-4565-0.
- [34] MILLER, Danny E. The Interchromosomal Effect: Different Meanings for Different Organisms. *Genetics* [online]. 2020, **216**(3), 621–631. ISSN 1943-2631. Dostupné z: doi:10.1534/genetics.120.303656
- [35] YUAN, Ping, Lingyan ZHENG, Songbang OU, Haijing ZHAO, Ruiqi LI, HongJiao LUO, Xin TAN, Qingxue ZHANG a Wenjun WANG. Evaluation of chromosomal abnormalities from preimplantation genetic testing to the reproductive outcomes: a comparison between three different structural rearrangements based on next-generation sequencing. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* [online]. 2021, **38**(3), 709–718. ISSN 1058-0468. Dostupné z: doi:10.1007/s10815-020-02053-5
- [36] BOYNUKALIN, Fazilet Kubra, Meral GULTOMRUK, Niyazi Emre TURGUT, Carmen RUBIO, Lorena RODRIGO, Zalihe YARKINER, Selen ECEMIS, Guvenc

- KARLIKAYA, Necati FINDIKLI a Mustafa BAHCECI. The impact of patient, embryo, and translocation characteristics on the ploidy status of young couples undergoing preimplantation genetic testing for structural rearrangements (PGT-SR) by next generation sequencing (NGS). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* [online]. 2021, **38**(2), 387–396. ISSN 1058-0468. Dostupné z: doi:10.1007/s10815-020-02054-4
- [37] NAKANO, Tatsuya, Michiko AMMAE, Manabu SATOH, Satoshi MIZUNO, Yoshiharu NAKAOKA a Yoshiharu MORIMOTO. Analysis of clinical outcomes and meiotic segregation modes following preimplantation genetic testing for structural rearrangements using aCGH/NGS in couples with balanced chromosome rearrangement. *Reproductive Medicine and Biology* [online]. 2022, **21**(1). ISSN 1445-5781. Dostupné z: doi:10.1002/rmb2.12476
- [38] FAN, Junmei, Xueluo ZHANG, Yanhua CHEN, Junkun ZHANG, Lei ZHANG, Xingyu BI, Jinbao WANG, Xiang HUANG, Meiqin YAN a Xueqing WU. Exploration of the interchromosomal effects in preimplantation genetic testing for structural rearrangements based on next-generation sequencing. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* [online]. 2022, **10**(9). ISSN 2324-9269. Dostupné z: doi:10.1002/mgg3.2017
- [39] STATLAND, Jeffrey M., Bertrand FONTAINE, Michael G. HANNA, Nicholas E. JOHNSON, John T. KISSEL, Valeria A. SANSONE, Perry B. SHIEH, Rabi N. TAWIL, Jaya TRIVEDI, Stephen C. CANNON a Robert C. GRIGGS. Review of the Diagnosis and Treatment of Periodic Paralysis. *Muscle & Nerve* [online]. 2018, **57**(4), 522–530. ISSN 0148-639X. Dostupné z: doi:10.1002/mus.26009
- [40] KANNAN, Thirumulu Ponnuraj, S. HEMLATHA, R. ANKATHIL a B. A. ZILFALIL. Clinical manifestations in trisomy 9. *The Indian Journal of Pediatrics* [online]. 2009, **76**(7), 745–746. ISSN 0019-5456. Dostupné z: doi:10.1007/s12098-009-0158-2
- [41] WISNIEWSKI, K., M. DAMBSKA, E. C. JENKINS, S. SKLOWER a W. T. BROWN. Monosomy 21 syndrome: Further delineation including clinical, neuropathological, cytogenetic and biochemical studies. *Clinical Genetics* [online]. 1983, **23**(2), 102–110. ISSN 0009-9163. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-0004.1983.tb01856.x

- [42] OEHLER, Josephine B., Helen WRIGHT, Zornitza STARK, Andrew J. MALLETT a Ulf SCHMITZ. The application of long-read sequencing in clinical settings. *Human Genomics* [online]. 2023, **17**(1), 73. ISSN 1479-7364. Dostupné z: doi:10.1186/s40246-023-00522-3
- [43] WARBURTON, Peter E. a Robert P. SEBRA. Long-Read DNA Sequencing: Recent Advances and Remaining Challenges. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* [online]. 2023, **24**(1), 109–132. ISSN 1527-8204. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-genom-101722-103045
- [44] XIAO, Tiantian a Wenhao ZHOU. The third generation sequencing: the advanced approach to genetic diseases. *Translational Pediatrics* [online]. 2020, **9**(2), 163–173. ISSN 22244336. Dostupné z: doi:10.21037/tp.2020.03.06
- [45] OWUSU, Rafaela a Marco SAVARESE. Long-read sequencing improves diagnostic rate in neuromuscular disorders. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology* [online]. 2023, **42**(4), 123–128. ISSN 2532-1900. Dostupné z: doi:10.36185/2532-1900-394