



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

---

Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Preimplantační vyšetření chromozomových abnormalit v raných  
lidských embryích**

**Preimplantation analysis of chromosomal abnormalities in early  
human embryos**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.  
Konzultant práce: RNDr. Marcela Kosařová, Ph.D.

**Tereza Vitnerová**

---

**Kladno 2018**

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Akademický rok: 2017/2018

## Z a d á n í   b a k a l á ř s k é   p r á c e

Student: **Tereza Vitnerová**  
Obor: Zdravotní laborant  
Téma: **Preimplantační vyšetření chromozomových abnormalit v raných lidských embryích**  
Téma anglicky: Preimplantation Analysis of Chromosomal Abnormalities in Early Human Embryos

### Z á s a d y   p r o   v y p r a c o v á n í :

Předmětem bakalářské práce bude analýza výskytu chromozomových abnormalit v lidských preimplantačních embryích. Poruchou plodnosti trpí v současnosti asi 15 % párů, a metody asistované reprodukce jsou často jedinou možností, jak těmto párům pomoci mít zdravé dítě. Reprodukční genetika je dnes již nezbytná součást reprodukční medicíny. Metody reprodukční genetiky se uplatňují nejen při odhalování případných genetických příčin neplodnosti páru, ale i při preimplantačním genetickém testování embryí vzniklých in vitro. Chromozomové abnormality vyskytující se v raných embryích jsou totiž jednou z nejčastějších příčin neúspěchů mimotělního oplodnění.

Práce v teoretické části shrne základní metody používané při vyšetření numerických a strukturních chromozomových abnormalit. Zaměří se na nejnovější metody používané pro preimplantační testování včetně indikací pro tato vyšetření. V praktické části se studentka obeznámí s metodami preimplantačního testování embryí včetně interpretace nálezů. Porovná výskyt abnormalit v embryích u různých věkových a indikačních kategorií žen. Vyhodnotí přínos preimplantačního testování embryí.

### Seznam odborné literatury:

- [1] Kuliev, Anver, Svetlana Rechitsky, Oleg Verlinsky, Atlas of Preimplantation Genetic Diagnosis, Third Edition, 2014, ISBN 1466598409
- [2] Mardešič Tonko a kolektiv, Diagnostika a léčba poruch plodnosti, Grada Publishing, ed. 1., 2013, ISBN 9788024744582
- [3] Munné, Santiago, Jacques Cohen, Advanced maternal age patients benefit from preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy, ed. Fertility and Sterility, ročník 107, číslo 5, 2017, 1122-1129, ISSN 0015-0282

Zadání platné do: 13.09.2019  
Vedoucí: RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.  
Konzultant: RNDr. Marcela Kosařová, Ph.D.

vedoucí katedry / pracoviště

děkan

V Kladně dne 25.10.2017

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Preimplantační vyšetření chromozomových abnormalit v raných lidských embryích vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 16.05.2018

.....  
Tereza Vitnerová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala paní RNDr. Taťáně Jarošíkové, CSc. za odborné vedení a cenné rady během vypracovávání mé bakalářské práce.

Velké poděkování taktéž patří RNDr. Marcele Kosařové, Ph.D. za vstřícnost, ochotu a velké množství rad a informací z oblasti preimplantační genetiky. Poděkovat bych též chtěla celému kolektivu laboratoře molekulární genetiky Sanatoria PRONATAL.

Poděkování náleží i mé rodině za trpělivost, ochotu a podporu během celého mého studia.

## **Abstrakt**

Nejčastější příčinou reprodukčních neúspěchů především u starších žen je výskyt chromozomových abnormalit v raných lidských embryích. Hlavním cílem preimplantačního testování embryí je proto zabránit přenosu aneuploidního embrya, a tím snížit riziko neúspěšnosti otěhotnění.

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou asistované reprodukce a jejími metodami, které se v dnešní době využívají. Zabývá se genetickými příčinami neplodnosti, které trápí řadu párů. Pro správný výběr a použití metody je proto třeba znát přesnou příčinu neplodnosti, kterou určí klinický genetik na základě laboratorních genetických vyšetření. Práce je zaměřena na metody, které se pro účely preimplantačního testování embryí využívají.

V práci jsou uvedeny metody preimplantačního testování embryí, kterými v dnešní době jsou především aCGH (komparativní genomová hybridizace na čipu) a NGS (sekvenování nové generace). Je zde podán ucelený přehled o všech cyklech PGT-A (preimplantační genetické testování aneuploidii) za období od roku 2012 do roku 2017. Dále je zde zahrnuto srovnání chromozomových abnormalit v embryích u pacientek v různých věkových kategoriích a s různými indikacemi k PGT-A a nakonec je vyhodnocena úspěšnost otěhotnění žen v těchto indikačních skupinách a porovnán výskyt euploidních a aneuploidních embryí a mozaiek u metod aCGH a NGS.

## **Klíčová slova**

aCGH; aneuploidie; IVF; NGS; PGT-A; PGT-M; PGT-SR

## **Abstract**

The most frequent reason of fertility problems mainly among older women is presence of chromosomal abnormalities in early human embryos. Therefore is the main task of preimplantation testing of embryos to prevent from the transfer of aneuploides embryos resulting in decreasing the risk of unachieving the pregnancy.

This Bachelor's thesis deals with problems of assisted reproduction and its methods that are being used nowadays. It deals with genetic causes of infertility which a lot of couples suffer from. For the correct choice and usage of the method is necessary to know the exact reason of the infertility diagnosed by clinic geneticist on the base of laboratory genetical examinations. This thesis focuses on methods that are used for purposes of preimplantation testing of embryos.

In this thesis, there are listed the methods of preimplantation testing of embryos which are nowadays mainly aCGH (Array Comparative Genomic Hybridization) and NGS (Next Generation Sequencing). The comprehensive overview of all the cycles PGT-A (Preimplantation Genetic Testing of Aneuploidy) for the period from year 2012 to year 2017 is presented. Furthermore the comparison of chromosome abnormalities in embryos among women patients in various age categories and various indications on PGT-A is included and finally the achievement of pregnancy among women in these indicational groups is evaluated and occurrence of euploides and aneuploides embryos and mosaic within method aCGH and NGS is compared.

## **Keywords**

aCGH; aneuploidy; IVF; NGS; PGT-A; PGT-M; PGT-SR

## Obsah

1	Úvod.....	10
2	Současný stav.....	12
2.1	Asistovaná reprodukce a její metody .....	12
2.1.1	AI, IUI – Arteficiální inseminace, Intrauterinní inseminace .....	13
2.1.2	IVF – In vitro fertilizace.....	13
2.1.3	ICSI – Intracytoplazmatická injekce spermie.....	13
2.1.4	Kultivace embryí .....	14
2.1.5	Kryokonzervace a kryoembryotransfer .....	14
2.1.6	Dárcovství gamet a embryí.....	15
2.2	Genetické příčiny neplodnosti.....	15
2.2.1	Chromozomové abnormality numerické .....	16
	Aneuploidie.....	16
	Polyploidie.....	18
2.2.2	Chromozomové abnormality strukturní .....	18
	Delece .....	19
	Duplikace.....	19
	Translokace.....	19
	Inverze.....	21
2.2.3	Mutace v <i>CFTR</i> genu .....	21
2.2.4	Mikrodelece na chromozomu Y .....	21
2.2.5	Trombofilní mutace.....	22
2.3	Preimplantační testování embryí .....	23
2.3.1	PGT-A – Preimplantační genetické testování aneuploidií.....	23

2.3.2	PGT-M - Preimplantační genetické testování monogenních chorob	24
2.3.3	PGT-SR - Preimplantační genetické testování strukturních aberací	25
2.3.4	Vyšetřovaný materiál	25
2.3.5	FISH – Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	27
2.3.6	WGA - Celogenomová amplifikace	28
2.3.7	aCGH – Komparativní genomová hybridizace na čipu	29
2.3.8	NGS – Sekvenování nové generace	30
2.3.9	PCR – Polymerázová řetězová reakce	31
2.3.10	Karyomapping	32
3	Cíl práce	33
4	Metodika	34
4.1	Celogenomová amplifikace soupravou SurePlex	34
4.2	aCGH – Komparativní genomová hybridizace na čipu	35
4.2.1	Značení DNA	36
4.2.2	Hybridizace	37
4.2.3	Odmytí nenavázané DNA	37
4.2.4	Skenování čipů	38
4.2.5	Analýza dat	39
4.3	NGS – Sekvenování nové generace	39
4.3.1	Kvantifikace dsDNA a ředění DNA	39
4.3.2	Tagmentace (označení a fragmentace SurePlex amplikonů)	40
4.3.3	PCR amplifikace (indexace)	41
4.3.4	Čištění PCR produktů	41
4.3.5	Normalizace knihovny	42



4.3.6	Smíchání knihoven a nanesení vzorku na MiSeq .....	44
4.3.7	Nanesení vzorku do sekvenátoru .....	44
4.3.8	Analýza dat .....	44
4.4	Statistické zpracování dat.....	45
5	Výsledky .....	46
5.1	Vyhodnocení výsledků laboratoře od roku 2012 .....	46
5.2	Zastoupení indikačních skupin u pacientek podstupujících PGT-A .....	48
5.3	Zastoupení euploidních a aneuploidních embryí v jednotlivých indikačních skupinách.....	51
5.4	Úspěšnost otěhotnění v jednotlivých indikačních skupinách.....	55
5.5	Zastoupení euploidních a aneuploidních embryí u aCGH a NGS.....	56
6	Diskuze .....	57
7	Závěr .....	61
8	Seznam použitých zkratk.....	62
9	seznam použité literatury .....	65
10	Seznam použitých obrázků .....	69
11	Seznam použitých tabulek.....	71

# 1 ÚVOD

Tato bakalářská práce s názvem Preimplantační vyšetření chromozomových abnormalit v raných lidských embryích pojednává o problematice asistované reprodukce a reprodukční genetiky, o nejčastějších příčinách neúspěchů při léčbě neplodnosti, a o metodách a možnostech, kterými lze zvýšit úspěšnost asistované reprodukce. Reprodukční medicína a reprodukční genetika jsou dva velmi úzce spolupracující obory, které mají jeden společný cíl: dopomoci párům k tomu, aby měli zdravé dítě.

V současné době přibývá stále více a více párů, které trpí neplodností. Neplodnost je celosvětově rozšířený problém, který se týká zhruba 15 % párů ve vyspělých zemích a má řadu příčin. Za jednu z příčin neplodnosti je považováno odkládání rodičovství do pozdějšího věku ženy, nezdravý životní styl a stres, který pak následně souvisí se sníženým počtem spermií a jejich kvalitou u mužů, a s psychickou nepohodou u žen. Nedílnou součástí vyšetření páru v centru asistované reprodukce by měla být rovněž genetická konzultace, při které klinický genetik na základě rodinné anamnézy a výsledku spermioqramu indikuje přinejmenším vyšetření karyotypu obou partnerů, protože častou příčinou jejich problémů s otěhotněním mohou být strukturní chromozomové aberace (translokace, inverze), případně numerické aberace v mozaice. Numerické aberace nacházené u infertilních párů se nejčastěji týkají pohlavních chromozomů X a Y. Trendem dnešní doby je odkládání těhotenství do pozdějšího věku, což je ovšem spojeno s narůstajícím počtem aneuploidních vajíček u žen nad 35 let. Aneuploidie jsou nejčastější příčinou reprodukčních neúspěchů u starších žen. Preimplantační genetické testování aneuploidii (PGT-A) je vyšetření embryí v raných fázích jejich vývoje (3. nebo 5. den po oplodnění). Cílem PGT-A je výběr euploidních embryí, které se doporučí k přenosu do dělohy. Tím, že se přenášejí pouze euploidní embrya, výrazně stoupne úspěšnost otěhotnění. V dnešní době IVF centra nabízejí klientům

co nejkvalitnější služby v souladu s nejnovějšími vědeckými poznatky, a tím umožňují většině párů mít zdravé dítě.

## 2 SOUČASNÝ STAV

### 2.1 Asistovaná reprodukce a její metody

Asistovaná reprodukce je samostatný medicínský obor, jehož cílem je oplodnění vajíček ženy *in vitro* (mimo lidské tělo). Pracuje se zde se spermii, oocyty a embryi. Metody asistované reprodukce se vždy týkají obou partnerů z páru, tedy muže i ženy. Neplodnost rozdělujeme na mužskou a ženskou, ale mnohdy může jít o problém obou stran současně. Vyšetření prováděná lékařem mohou ve značném množství případů určit pravděpodobnou příčinu neplodnosti [1].

Léčba pomocí asistované reprodukce se provádí ve zdravotnických centrech, podléhajícím dodržování zákona 296/2008 Sb., který pojednává o lidských tkáních a buňkách. Informace o průběhu cyklů jsou zasílány z těchto center do Národního registru asistované reprodukce (NRAR), který spadá pod Národní registr reprodukčního zdraví České republiky [1].

Léčebným cyklem rozumíme proces od začátku menstruačního cyklu ženy až po cyklus další. Je to proces, kdy se využívá metod asistované reprodukce za účelem otěhotnění ženy. Záměrem je stimulace ovarií vedoucí k dozrání většího počtu oocytů, poté následuje jejich odběr a oplození *in vitro*. Po oplození se vzniklá embrya kultivují ve speciálním médiu, a po vyhodnocení jejich kvality se provede přenos nej kvalitnějšího embrya nebo embryí do dělohy ženy. Počet přenášených embryí závisí na konkrétní situaci; preferuje se přenos jednoho nej kvalitnějšího embrya, nedoporučuje se přenos více než dvou embryí. Dlouhodobým cílem je snížení počtu mnohočetných těhotenství, které jsou vždy spojeny se zvýšeným rizikem komplikací. Patientky jsou proto motivovány k transferu jednoho embrya (tzv. elektivnímu single embryotransferu) [1;2].

### **2.1.1 AI, IUI – Arteficiální inseminace, Intrauterinní inseminace**

Při arteficiální inseminaci (AI) dochází k vpravení spermií do pohlavního ústrojí ženy, pro zvýšení účinku někdy přímo do děložní dutiny, což nazýváme intrauterinní inseminací (IUI). AI nebo IUI je indikováno například při mírně zhoršené kvalitě spermiogramu, impotenci nebo vaginismu [1].

### **2.1.2 IVF – In vitro fertilizace**

K nejzákladnějším metodám, které asistovaná reprodukce využívá, patří *In vitro* fertilizace (IVF). Pacientka podstupující IVF cyklus musí podstoupit hormonální stimulaci, aby dozrál co největší počet vajíček. Ke stimulaci se používá několik různých typů hormonů. Optimální typ hormonální stimulace určuje gynekolog. Počet folikulů, ve kterých se vajíčka nacházejí, je v průběhu hormonální stimulace sledován ultrazvukovým vyšetřením. Téměř zralé folikuly jsou odebrány ženě v částečné narkóze z vaječníků těsně před jejich puknutím. Vajíčka jsou následně oplodněna těmi nejkvalitnějšími spermiemi *in vitro* [3;4].

Při IVF jsou zralá vajíčka kultivována v přítomnosti spermií, a jedna z nich měla optimálně vajíčko oplodnit. Zvláště při zhoršené kvalitě spermiogramu však může být úspěšnost IVF velmi nízká, a proto se v centrech asistované reprodukce dává přednost oplodnění metodou ICSI [3].

### **2.1.3 ICSI – Intracytoplazmatická injekce spermie**

Intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI) je metoda, která se využívá při zhoršených parametrech spermiogramu, při špatné kvalitě oocytů, při neúspěšné předchozí IVF léčbě, nebo pokud jsou spermatické buňky získány mikrochirurgickými metodami TESE (Testicular Sperm Extraction) nebo MESA (Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration). ICSI je mikromanipulační metoda, kdy se pomocí kapiláry přepraví znehybněná spermie do cytoplazmy již zralého oocytu. Při ICSI tudíž nedochází ke spontánní fertilizaci oocytu, ale vpravením

spermie do vajíčka se překonají nejrůznější bariéry, které snižují pravděpodobnost průchodu spermie do oocyty. Vylepšení metody ICSI je metoda PICSI, kde jsou pomocí vazby spermií na hyaluronan vyselektovány spermie v nejlepší kondici, a ty jsou následně použity pro oplodnění vajíčka [2].

#### **2.1.4 Kultivace embryí**

Oplodněná vajíčka jsou kultivována v médiu pro IVF, které svým složením imituje prostředí v těle matky. V pravidelných intervalech je vývoj embryí kontrolován embryologem, který je pak následně v závislosti na jejich parametrech roztrídí. Pouze kvalitně se vyvíjející embrya (ve stádiu blastocysty) jsou doporučena k transferu do dělohy. Všechna ostatní embrya lze zamrazit a použít v dalším cyklu [3;4].

#### **2.1.5 Kryokonzervace a kryoembryotransfer**

Mražení embryí (kryokonzervaci) lze provádět dvěma způsoby, a to buď pomalým mražením (embrya 3. den po oplodnění) nebo vitrifikací (embrya ve stádiu blastocysty). Kryokonzervace se používá tehdy, je-li počet embryí vyšší, než je možné přenést v daném cyklu do dělohy matky. Kryoembryotransfer (KET) je proces po rozmrazení, kdy se vybere to nejkvalitnější embryo a přeneso se do dělohy ženy. Úspěšnost otěhotnění ze zamražených embryí je srovnatelná s embryi čerstvými, pouze proces zmrazování je spojený s určitým rizikem. Mezi vlivy, které mohou gamety i embrya poškodit, patří například nepřiměřená rychlost zmrazování (ponoření do tekutého dusíku) a následného rozmrazování, ale i způsob, jakým celý proces probíhá. Důležitý je také správný výběr média a látek, které zabraňují tvorbě ledových krystalů uvnitř buněk [3;5].

Vitrifikace je poměrně nová metoda kryokonzervace vajíček a embryí, kdy se prudkým ochlazením (ponořením do tekutého dusíku) z buněk a vitrifikačního média vytvoří hmota o sklovité konzistenci a buňky se nepotrhnají. Při pomalém

zmrazení bylo nutné opatrně, pomalu a řízeně snižovat teplotu, aby se zamezilo vzniku ledových krystalů, které by poškodily buňky. Při vitrifikaci se ledové krystaly nevytvářejí. Po rozmrazení jsou buňky ve výborné kondici a procento přeživších vajíček a embryí je mnohonásobně lepší než při použití postupů pomalého mražení. Metoda vitrifikace se používá jak ke kryokonzervaci těch embryí, která se nepoužijí pro čerstvý transfer, tak v případech, kdy potřebujeme odložit přenos embrya do dělohy [6].

### **2.1.6 Dárcovství gamet a embryí**

Přestože si každý pár přeje mít své geneticky vlastní dítě, někdy to z různých důvodů nejde. Pro mnoho párů je dárcovství spermií a vajíček jediná možnost k dosažení těhotenství. Důvodem je například situace, kdy se nepodaří získat žádné kvalitní embryo (často u žen ve vyšším věku, protože se stoupajícím věkem výrazně narůstá množství chromozomálních aberací v oocytech). Mezi další důvody pro zařazení páru do dárcovského programu je porušená funkce ovarií, azoospermie u partnera nebo velmi nízká kvalita spermií, případně specifické chromozomové aberace u jednoho z partnerů [1;5].

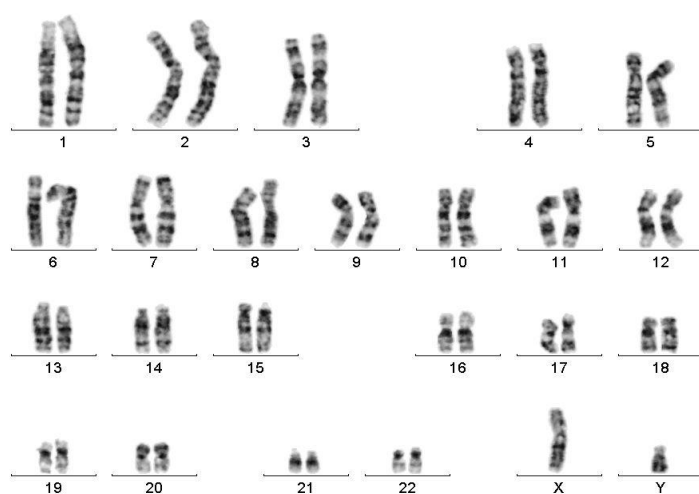
Darování oocytů či spermií musí probíhat vždy v naprosté anonymitě. Věk dárců je 18–40 let a dárcyň 18–35 let. Dárci musí být řádně vyšetřeni, aby se zajistila maximální kvalita odebíraných gamet [1].

## **2.2 Genetické příčiny neplodnosti**

Neplodnost může mít řadu příčin. Jednou z nich mohou být abnormality genetické. Neplodné páry, u kterých se vyloučí gynekologická a andrologická příčina neplodnosti, by měly absolvovat genetickou konzultaci s klinickým genetikem, který indikuje případné laboratorní genetické vyšetření. Základním genetickým vyšetřením je karyotyp – viz Obrázek 1. Pokud nalezneme v karyotypu nějaké změny, ať už to jsou početní změny, či změny strukturní, jedná se

o chromozomové abnormality. Tyto změny obecně dělíme na změny numerické a změny strukturní [2;7].

Výskyt chromozomových abnormalit je spojován se vznikem klinických syndromů, jako je např. Downův syndrom. Tento důsledek byl pozorován už několik let po tom, co v roce 1956 byl stanoven přesný počet chromozomů v buňce člověka. V populaci je výskyt chromozomových abnormalit ve výši 0,6 %, ale díky metodám, kterými lze objevit i některé další malé změny, se zvyšuje výskyt na 1 % [2;8].



Obrázek 1 - Normální mužský karyotyp (z archivu Genetické laboratoře Sanatoria PRONATAL)

## 2.2.1 Chromozomové abnormality numerické

### Aneuploidie

O aneuploidiih hovoříme v případě, kdy se jedná o takové numerické změny, které jsou v rámci celých homologních chromozomů. Chromozom tedy může buď chybět, v tom případě se jedná o monozomii, nebo naopak přebývat, potom se jedná o trizomii. V případě, že chybí celý chromozomový pár, nazýváme tuto změnu nulizomii [7;9].



Aneuploidie může vzniknout dvěma způsoby. Prvním způsobem je ztráta jednoho z homologních chromozomů, tzv. „opoždění při anafázi“ (anafáze lag), kdy se jeden z homologních chromozomů nepřipojí k dělicímu vřeténku, nebo v případě připojení putuje k pólu buňky příliš pomalu. K této ztrátě může dojít při mitóze i při meióze. Výsledná sestava chromozomů potom není kompletní. Dalším způsobem vzniku aneuploidie je nondisjunkce, která opět může být mitotická či meiotická. Při nondisjunkci dochází k nesprávnému rozestupu chromozomů, a tak v jedné buňce je chromozom navíc a v další naopak chybí. Počet aneuploidních vajíček narůstá hlavně s věkem, proto nejvíce aneuploidii se nalézá především ve vajíčkách žen nad 35 let věku [9].

Je prokázáno, že většina těchto abnormalit pochází z meiózy u ženy, kdy v průběhu prvního meiotického dělení dojde ke vzniku chromozomové nondisjunkce, a to tedy vede i k chybám v průběhu druhého meiotického dělení. V dnešní době především díky preimplantační genetické diagnostice aneuploidii lze zjistit výsledek prvního a druhého meiotického dělení, a tím zabránit přenosu aneuploidních embryí [10].

Výskyt chromozomových abnormalit je spojován se vznikem klinických syndromů, jako je např. Downův syndrom. Tato spojitost byla pozorována už několik let po tom, co v roce 1956 byl stanoven přesný počet chromozomů v buňce člověka. K nejznámější a nejčastěji se vyskytující aneuploidii patří bezesporu Downův syndrom, trizomie chromozomu 21. Celkový počet chromozomů u člověka s Downovým syndromem je 47, karyotyp 47,XX,+21 nebo 47,XY,+21. Tato trizomie je nejčastěji způsobena chybným rozestupem chromozomů při meióze. U starších žen nad 35 let začíná významně stoupat procento aneuploidních vajíček s abnormálním počtem chromozomu 21. Věk ženy je nejdůležitějším faktorem pro vznik tohoto syndromu v klasické formě. U Downova syndromu, který vznikl translokací, není spojitost s věkem prokázána. Mezi další přežívající autozomální trizomie patří například trizomie chromozomu 13 a nazývá se Patauův syndrom, karyotyp

47,XX,+13 nebo 47,XY,+13. Dále je to i trizomie chromozomu 18, neboli Edwardsův syndrom, karyotyp 47,XX,+ 18 nebo 47,XY,+18 [2;11].

Aneuploidie se mohou vyskytovat i u pohlavních chromozomů. Trizomie chromozomu X (47, XXX) postihuje pouze ženy (syndrom superfemale). Vzhledem k tomu, že v tomto případě zůstane aktivováno pouze jedno X a obě další X jsou inaktivována, mají tyto ženy obvykle normální fenotypový projev. Mezi další aneuploidie pohlavních chromozomů patří Klinefelterův syndrom (47,XXY). Postižení jsou muži, kteří mají typické fenotypové projevy – mívají některé typicky ženské sekundární pohlavní znaky a jsou většinou neplodní. Muži s tzv. syndromem supermuže mají karyotyp 47, XYY a tento syndromem bývá spojován především s vyšším vzrůstem [11].

K jediné monozomii, která je slučitelná se životem, patří Turnerův syndrom. Jedná se o monozomii pohlavního chromozomu X (45,X). Naprostá většina plodů s karyotypem 45,X se potrací v průběhu těhotenství, malé procento dívek s Turnerovým syndromem se narodí. Postižené jsou ženy s typickým fenotypem, kterým se nevyvíjí sekundární pohlavní znaky a jsou malého vzrůstu [7].

## **Polyploidie**

Polyploidie rozumíme zmnožení celých chromozomových sad. Tyto numerické chromozomové změny se u člověka nevyskytují, ale výjimečně u některých vyšších živočichů je lze nalézt. Naopak u rostlin se vyskytují poměrně hojně a na tom je založeno jejich šlechtění [9].

### **2.2.2 Chromozomové abnormality strukturní**

Strukturní abnormality chromozomů vznikají většinou po odlomení části chromozomu, nebo po špatně proběhlé rekombinaci. K těmto strukturním abnormalitám dochází, pokud se k sobě připojí špatné úseky chromozomů. Pokud na buňky působí některé vnější vlivy (záření nebo různé chemické látky), může dojít

k narušení struktury DNA a následně k těmto zlomům. Obecně jsou k tomu náchylnější buňky, které jsou ve fázi dělení než ty, které se právě nedělí. Buňky, které jsou v interfázi, mají totiž aktivní reparační enzymy, které dokáží vzniklou chybu opravit, ale ne vždy se to podaří. Všechny strukturální abnormality mohou být buď v rámci jednoho chromozomu, nebo v rámci dvou odlišných chromozomů, a tak se části chromozomů dostávají na jiná místa, než kde byly původně. Tyto změny bývají často příčinou vzniku nádorů nebo jiných závažných onemocnění [7;11].

### **Delece**

Pokud dojde ke ztrátě některé části chromozomu, nazýváme tuto strukturální změnu delecí. Může dojít ke ztrátě konečné části chromozomu, potom hovoříme o terminální delecí, nebo ke ztrátě části uprostřed chromozomu, potom se jedná o intersticiální delecí. Jestliže se ztratí některá část chromozomu, ztratí se společně s touto částí i geny v ní obsažené. Typickým příkladem syndromu, který je způsobený delecí chromozomu, je syndrom Cri du chat, který je projevem terminální delece na krátkém raménku chromozomu 5 (karyotyp 46,XX (XY),del (5p)). Tito jedinci mohou být obojího pohlaví, jsou mentálně postižení a mají mikrocefalii. Typickým pro ně je charakteristický pláč, který je velmi podobný kočičímu mňoukání [7;9].

### **Duplikace**

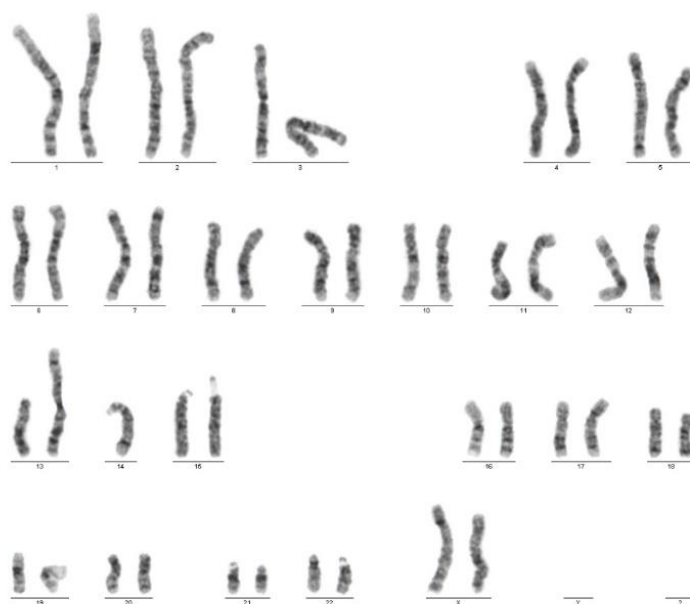
Duplikací rozumíme zdvojení některého úseku chromozomu. V některých případech může dojít až k multiplikaci, tedy ke zmnožení úseku vícekrát. Duplikace může vzniknout nerovnoměrným crossing-overem [9].

### **Translokace**

Části chromozomů se mohou zlomit a přemístit na jiný úsek jiného chromozomu. Pokud k této výměně dojde v rámci nehomologních chromozomů a zároveň

nedojde ke ztrátě genetických informací, pak se jedná o změny tzv. balancované, které se u přenašečů fenotypově neprojeví, avšak mohou být příčinou reprodukčních problémů [7;11].

Translokace dělíme na reciproké a Robertsonské. U recipročných translokací dochází k výměně chromozomálních úseků mezi libovolnými dvěma nebo více chromozomy. U Robertsonských translokací dochází ke zlomu v centromere dvou akrocentrických chromozomů 13, 14, 15, 21 nebo 22, dojde ke spojení akrocentrických chromozomů v jeden derivovaný metacentrický chromozom a ke ztrátě jejich krátkých ramének. Jedinec má tedy ve výsledku pouze 45 chromozomů, ale genetická informace je zachována. Přenašeči balancované translokace mezi dvěma chromozomy 21 mají 100% riziko, že jejich potomci budou trpět tzv. translokační formou Downova syndromu, které je ale poměrně vzácná. Vyskytuje se pouze asi u 5 % pacientů s Downovým syndromem [7;11].



Obrázek 2 - Karyotyp přenašečky Robertsonské translokace - 45,XX,t(13;14)(q1.0;q1.0) (z archivu Genetické laboratoře Sanatoria PRONATAL)

## **Inverze**

Při odštěpení části chromozomu, která se přetočí o 180° a následně se opět připojí na ono místo, ovšem již v obráceném směru, hovoříme o inverzi. Inverze vznikají pouze uvnitř chromozomu a nejčastěji chybným průběhem crossing-overu. Rozlišujeme inverzi pericentrickou a paracentrickou. Pericentrickou inverzí rozumíme inverzi, jejíž součástí je i centromera. Chromozom tedy poté v důsledku inverze změní tvar a polohu centromery. Paracentrická inverze naopak neobsahuje centromeru, tudíž nedochází ke změně tvaru chromozomu [9].

### **2.2.3 Mutace v *CFTR* genu**

*CFTR* gen (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) se nachází na 7. chromozomu, konkrétně v lokusu 7q31.2, a bylo u něj popsáno přes 2000 mutací. Mutace v *CFTR* genu jsou příčinou cystické fibrózy. Postižení touto nemocí trpí především onemocněním dýchacích cest, častými infekcemi a mají zvýšenou produkci chloridů v potu [2].

Většina mužů, kteří mají mutace v *CFTR* genu, trpí vrozenou bilaterální agenezí chámovodů (CBAVD). Jedná se v tomto případě pouze o mutace mírnější závažnosti, nebo kombinace závažné mutace s mutací mírnějšího charakteru. To má za následek azoospermii muže, kterou ale lze řešit pomocí některých metod asistované reprodukce, protože spermatogeneze je zachována nebo mírně snižena. Je ovšem nutné vyšetření na mutace v *CFTR* genu u partnerky [2].

### **2.2.4 Mikrodelece na chromozomu Y**

Přesto, že se na chromozomu Y nachází poměrně málo genů, jsou to důležité geny, které jsou zodpovědné za determinaci mužského pohlaví a za správný průběh spermiogeneze. Pro vývoj spermií jsou nejdůležitější geny, které se nacházejí na dlouhém raménku v oblasti zvané azoospermický faktor (AZF). Tyto oblasti jsou celkem tři a rozdělují se na AZFa, AZFb a AZFc. Pokud se v některé z těchto oblastí

nachází delece, projeví se to poruchou spermiogeneze. Delece v AZF oblastech jsou submikroskopické, tedy je nelze zachytit mikroskopickým pozorováním, proto se nazývají mikrodelece. Mikrodelece lze ovšem diagnostikovat metodami molekulární genetiky, především se využívá metoda multiplexové PCR se speciálním panelem primerů, které jsou konkrétní pro AZF oblasti [12].

U pacientů se mikrodelece mohou projevit různými způsoby v závislosti na pozici a rozsahu mikrodelece – obecně platí, že čím blíže k centromere se mikrodelece nachází, tím závažnější je postižení procesů spermiogeneze. K nejčastějším projevům patří azoospermie (úplná absence tvorby spermií) a oligozoospermie (snížené množství spermií v ejakulátu). U oligospermických mužů lze spermie chirurgicky odebrat a vpravit je do vajíčka pomocí metody ICSI. Vzhledem k 100% pravděpodobnosti přenosu mikrodelece na syna, lze v indikovaných případech po konzultaci páru s klinickým genetikem indikovat preimplantační genetické vyšetření a pro přenos do dělohy vybrat pouze embrya ženského pohlaví [2].

### **2.2.5 Trombofilní mutace**

Trombofilní mutace jsou příčinou vzniku tromboembolické nemoci (TEN), komplikací v graviditě a v šestinedělí a opakovaných potratů. Vyšetření vybraných trombofilních mutací se provádí u žen, které prodělaly těhotenské ztráty, mají výskyt mutací v rodině, nebo se u nich objevily komplikace během těhotenství. V léčbě neplodného páru je u žen před hormonální stimulací indikováno vyšetření Leidenské mutace G1691A v genu pro faktor V protrombinové kaskády a mutace G20210A v genu pro faktor II (protrombin). Trombofilní mutace se vyšetřují pomocí PCR, restriční analýzy a real-time PCR [12].

## 2.3 Preimplantační testování embryí

Preimplantačním vyšetřením se rozumí vyšetření embryí získaných metodami asistované reprodukce před tím, než se přenesou do dělohy matky. Mikromanipulačními technikami je z embryí odebráno několik buněk (blastomery, buňky trofektodermu) a molekulárně genetickými metodami je odebraný materiál vyšetřen. Pro přenos do dělohy jsou poté vybrána jen „zdravá“ embrya [2].

Dle důvodu, kvůli kterému se vyšetření embryí provádí, hovoříme o preimplantačním genetickém testování aneuploidií (PGT-A), preimplantačním genetickém testování monogenních chorob (PGT-M) a preimplantačním genetickém testování strukturních aberací (PGT-SR) [13].

### 2.3.1 PGT-A – Preimplantační genetické testování aneuploidií

Velmi obvyklou příčinou reprodukčních neúspěchů a spontánních potratů je nesprávný počet chromozomů u embryí (aneuploidie). Riziko aneuploidií roste se zvyšujícím se věkem ženy, což je pravděpodobně příčinou neplodnosti po 35. roce věku ženy. Většina těhotenství z aneuploidních embryí končí spontánním abortem v prvním trimestru gravidity. Preimplantační genetické testování aneuploidií (dříve PGS – preimplantační genetický screening) se provádí u řady indikací. Kromě vyššího věku matky - nad 35 let v době porodu jsou to dále opakovaná selhání implantace (RIF) a opakované časně aborty. Taktéž je vyšetření indikováno při nález chromozomových abnormalit v předchozím těhotenství, nebo u již narozeného dítěte. Dále je to nález gonozomálních mozaiek, především u žen [12].

Problémem při testování aneuploidií je výskyt mozaiek euploidních a aneuploidních buněk v preimplantačních embryích. Nelze zcela určit, zda výskyt aneuploidie pouze v některých buňkách znamená aneuploidní celé embryo. Vzorke trofektodermu obsahují více buněk, z nichž některé mohou mít odlišný karyotyp; význam a klinický dopad tohoto mozaicismu není dosud zcela jednoznačný.

Embrya s mozaikou do 20 % jsou hodnocena jako euploidní, embrya s mozaikou 20–80 % lze podmíněně doporučit k transferu. Embrya s mozaikou nad 80 % jsou považována za aneuploidní [14].

Od začátku 90. let 20. století se preimplantační vyšetření aneuploidií provádělo metodou FISH. Počet vyšetřovaných chromozomů byl ale omezen technickými limity metody. Maximální počet vyšetřovaných chromozomů byl většinou 8: chromozomy 13, 18, 21, X, Y, 15, 16 a 22. Abnormální počet chromozomů X, Y, 13, 18 a 21 je příčinou geneticky podmíněných syndromů u narozených dětí. Abnormální počet chromozomů 15, 16 a 22 se s vysokou četností vyskytuje u potracených plodů a starších párů. Vyšetření těchto vybraných chromozomů snižuje pravděpodobnost potratu a selhání implantace a jejich vyšetřením lze vyloučit až 80 % chromozomových abnormalit u preimplantačních embryí. V dnešní době je metoda FISH považována za nedostatečnou metodu a většina center ve vyspělých zemích vyšetřuje embrya pomocí metod, kterými lze zjistit aneuploidie všech 24 chromozomů (aCGH, NGS, karyomapping). Hlavním přínosem PGT-A, především u párů s horší prognózou úspěchu IVF cyklu, je zvýšení pravděpodobnosti otěhotnění a zároveň i snížení rizika potratů. Tím, že se transferuje pouze jedno vyšetřené euploidní embryo se rovněž může výrazně zkrátit doba léčby a snížit počet vícečetných těhotenství [12;15;16].

### **2.3.2 PGT-M - Preimplantační genetické testování monogenních chorob**

Preimplantační genetická diagnostika vzácných monogenních onemocnění se provádí u párů, kde se v rodině vyskytuje některé onemocnění, které je způsobeno mutací v jednom genu. Tato onemocnění bývají často přenášena z rodičů na potomky po řadu generací. V případě chorob, které se dědí autozomálně dominantně, se o genetické zátěži v rodině většinou ví. V případě chorob děděných autozomálně recesivně nebo u chorob s gonozomální dědičností se o svém přenašečství mutace rodiče často dozvědí až v případě, kdy se jim narodí postižené



dítě. V současné době je známo více než 5 000 monogenních chorob. Páry s genetickou zátěží monogenní choroby nemusí být neplodné, ale pro to, aby mohla být embryo vyšetřena, musí pár podstoupit IVF cyklus. Vzniklá embryo jsou vyšetřena na přítomnost mutace a pouze embryo, která nenesou sledovanou genetickou zátěž, jsou doporučena pro přenos do dělohy. Před PGT-M je nutné, aby pár absolvoval genetickou konzultaci s klinickým genetikem, který jim vysvětlí veškeré podrobnosti o použité metodě i možných variantách výsledku [15].

Pro PGT-M se používají metody s přímým stanovením mutace, nebo metody nepřímé genetické diagnostiky, které jsou založené na určení haplotypu. Vždy je potřeba otestovat zdravé i postižené členy rodiny a získat tak jejich haplotypy. Při PGT-M je doporučeno provést u embryí rovněž vyšetření aneuploidií [2].

### **2.3.3 PGT-SR - Preimplantační genetické testování strukturních aberací**

Pacienti, kteří jsou nosiči některých strukturních chromozomových aberací (balancovaných translokací nebo inverzí), mohou tvořit gamety s nebalancovaným genetickým materiálem a výsledně mohou vznikat nebalancovaná embryo. Páry, kde jeden nebo oba partneři jsou přenašeči balancované translokace, mají mnohonásobně vyšší riziko opakovaných potratů. Cílem PGT-SR je výběr embryo s balancovaným genotypem. Dříve používaná metoda FISH je v současnosti nahrazena metodami array CGH, NGS nebo karyomappingem, které jsou schopny současně vyšetřit i aneuploidie všech chromozomů [12].

### **2.3.4 Vyšetřovaný materiál**

Jako materiál sloužící k vyšetření vývoje embryo lze použít pólová tělíska, blastomery z třídenního embryo, nebo buňky trofektodermu z embryo pětidenního [2].

Vyšetření pólových tělísek je šetrnější metoda, která se provádí především v zemích, kde není možné invazivně zasahovat do vývoje embryo. U nás se ale

v dnešní době příliš tato metoda nevyužívá, jelikož vyšetření pólových tělísek vypovídá pouze o aneuploidiích, které pochází ze strany matky, tudíž nezískáme kompletní informaci o embryu. Další možností je odebrání buněk z třídenního embrya (viz Obrázek 3). Buňky se v této fázi nazývají blastomery a v embryu se jich nachází šest až osm. Pokud se odebere jedna nebo dvě blastomery, embryo se nepoškodí a lze vyšetřit jeho vývoj. Vyšetřením jedné nebo dvou blastomer ovšem taktéž nezískáme kompletní informaci o vývoji celého embrya, protože každá buňka se může vyvíjet odlišně. V dnešní době se preimplantační testování provádí především u embryí pětidenních ve stadiu blastocysty a odebíraným materiálem je trofektoderm (viz Obrázek 4). Odběr trofektodermu tolik nezasahuje do vývoje embrya a zároveň fakt, že embryo do stádia blastocysty dorostlo, poukazuje na jeho správný vývoj [2;16].



Obrázek 3 - Biopsie blastomery z třídenního embrya [17]



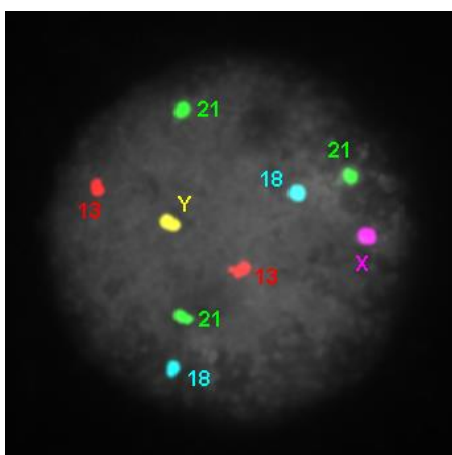
Obrázek 4 - Biopsie buněk trofektodermu z blastocysty (z archivu Genetické laboratoře Sanatoria PRONATAL)

### 2.3.5 FISH – Fluorescenční *in situ* hybridizace

Fluorescenční *in situ* hybridizace je molekulárně cytogenetická metoda, založená na hybridizaci fluorescenčně značených sond ke komplementárním specifickým oblastem na chromozomech. SONDY JSOU JEDNOŘETĚZCOVÉ ÚSEKY DNA O DÉLCE 300-600 bp a VÁŽOU SE NA VYBRANÉ SEKVENCE DNA VE VYŠETŘOVANÉM VZORKU. Nejčastěji se používají fluorescenční sondy, které jsou značené například biotinem nebo digoxigeninem, a po navázání detekovány avidinem s konkrétní fluorescenční látkou. Chromozomy se ještě následně obarvují barvivem, např. 4,6-diamidino-2-fenylindolem (DAPI). Výsledek se poté vyhodnotí ve fluorescenčním mikroskopu [12;18].

FISH metoda se nejčastěji využívá pro detekci chromozomových abnormalit v jádrech v interfázi nebo metafázi. Používá se několik typů DNA sond a ty se rozdělují dle oblastí, na které je hybridizace zaměřena. Centromerické sondy jsou zaměřené na sekvence v oblasti centromery a detekují se jimi aneuploidie. Lokusově specifické sondy hybridizují s konkrétními úseky DNA a jsou využívány při odhalování strukturních chromozomových abnormalit, např. translokací, delecí či inverzí. Celochromozomové sondy jsou zaměřené na úseky DNA po celé délce chromozomů a využívají se při detekci translokací [12].

Od začátku 80. let 20. století se metoda FISH používala pro detekci aneuploidií vybraných chromozomů u preimplantačních embryí. Nejčastěji se vyšetřoval počet chromozomů 13, 18, 21, X, Y, 15, 16 a 22, jejichž aneuploidie bývají spojeny s konkrétními syndromy u narozených dětí, nebo se vyskytují u potracených plodů. Obecně je dnes při preimplantačním vyšetření embryí metoda FISH nahrazována novějšími metodami (arrayCGH, NGS); přesto stále má své uplatnění např. v onkocytogenetice a při ověřování cytogenetických nálezů [16;18].



Obrázek 5 - Blastomera vyšetřená metodou FISH - trizomie chromozomu 21 (z archivu Genetické laboratoře Sanatoria PRONATAL)

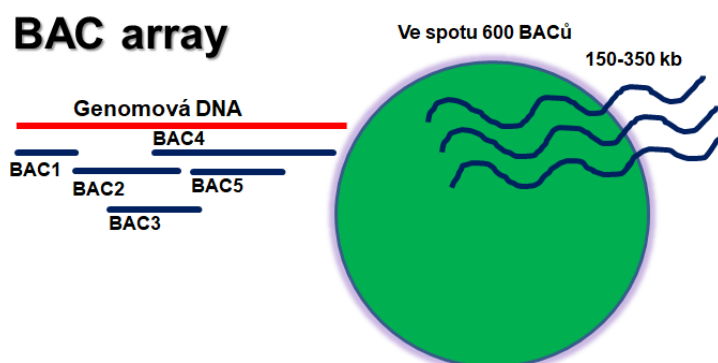
### 2.3.6 WGA - Celogenomová amplifikace

Lidská diploidní buňka obsahuje přibližně 7 pg DNA. Pokud chceme vyšetřovat pouze několik málo buněk odebraných z embrya, je zapotřebí DNA z jednotlivých buněk nejprve naamplifikovat, abychom získali dostatečné množství DNA pro molekulárně genetickou analýzu. Používají se k tomu postupy celogenomové amplifikace (WGA). Při WGA se rovnoměrně zkopíruje celý genom. Existuje několik typů WGA založených na různých principech a lze je rozdělit na metody, které využívají PCR a na metody využívající izotermickou amplifikaci. Výběr metody závisí na typu molekulárně genetické analýzy. Produkty WGA nejsou nikdy dokonalou kopií templátu a toto zkreslení může být způsobené například účinností použitých primerů, obsahem CG bazí, strukturou a přístupností DNA. V některých oblastech je amplifikace obtížnější, například v oblasti telomer a centromer. Chyby

při celogenomové amplifikaci se poté mohou projevit při analýze v podobě výpadku alely (ADO, allelic drop-out), což znamená, že jedna ze dvou alel se neamplifikuje, zatímco druhá ano. Dalším problémem může být tzv. preferenční amplifikace, kdy jedna ze dvou alel se amplifikuje s menší účinností než druhá [19].

### 2.3.7 aCGH – Komparativní genomová hybridizace na čipu

Array-CGH (aCGH) je metoda založená na technologii DNA čipů. Princip spočívá v hybridizaci molekul DNA na sondy, které jsou vázány na pevný nosič. Jako sondy se používají oligonukleotidy, cDNA nebo BAC (bacterial artificial chromosome) klony, kdy je lidská DNA zakomponována v bakteriální DNA. Sondy jsou na nosič „natištěny“ v tzv. spotech ve spoustě kopií a ty mají přesně určená místa na nosiči. Vyhodnocení hybridizace se provádí ve speciálních skenerech [20].



Obrázek 6 - Princip arrayCGH s BAC sondami (z archivu Genetické laboratoře Sanatoria PRONATAL)

Metoda aCGH se využívá v preimplantační, prenatalní i postnatální diagnostice např. k detekci submikroskopických nálezů nebo k ověření a upřesnění cytogenetických nálezů. V posledních letech mohou být čipové technologie nahrazovány metodou NGS [12;20].

### 2.3.8 NGS – Sekvenování nové generace

NGS patří mezi nejnovější molekulárně genetické metody. Správnější pojmenování je „masivní paralelní sekvenování“ (MPS), protože tyto techniky jsou schopny současně paralelně sekvenovat obrovské množství molekul DNA. Rozšířené jsou především technologie sekvenování druhé generace, ale je snaha o zavedení technologií generace třetí. Při sekvenování druhé generace je zapotřebí molekuly DNA nejprve pomocí metody PCR naamplifikovat, ale při sekvenování třetí generace stačí již pouze jedna molekula DNA. Pomocí těchto technik je možné určit sekvenci vybraných oblastí v genomu, nebo získat informaci o exomu, případně lze získat sekvenci celého genomu [20].

Princip NGS spočívá ve dvou krocích. Prvním krokem je příprava DNA knihovny, která se dále používá pro sekvenaci. Knihovnou se rozumí směs fragmentů DNA o přibližně stejné délce, každá molekula je opatřena na koncích přidanými sekvencemi, které mají specifickou funkci v procesu sekvenace. V jediné zkumavce můžeme mít směs vzorků např. od různých pacientů, které jsou od sebe odlišeny specifickými indexy. Dalším krokem je vlastní čtení sekvence v sekvenátoru, které se provádí sekvenováním syntézou, nebo pomocí ligace. Velmi důležitou částí práce se získanými daty je bioinformatická analýza dat. Vyhodnocovací software přesně vyhodnotí pořadí bazí v jednotlivých fragmentech a přiřadí je podle indexů k jednotlivým pacientům. V praxi se využívá několik typů technologií od různých firem, které jsou založeny na odlišných principech (Illumina, Roche, Heliscope) [18;21;22].

Metoda NGS našla uplatnění i při testování preimplantačního embrya a umožňuje s vysokým rozlišením získat informace o počtu všech chromozomů obsažených v lidské buňce. Je vhodná i pro vyšetření embryí u párů, kde jeden z rodičů je přenašeč balancované translokace nebo inverze; záleží však na velikosti translokovaných úseků a citlivosti použité diagnostické soupravy [2].

### 2.3.9 PCR – Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce je amplifikační metoda, která slouží k namnožení templátové DNA *in vitro*. Je to univerzální metoda s velmi širokým využitím jak ve výzkumu, tak v laboratořích klinické genetiky. V molekulární genetice se využívá především pro vyloučení monogenních chorob[2;11].

Základní princip PCR spočívá ve třech krocích. Nejprve je nutná denaturace dvouřetězcové DNA, která probíhá při 92-95°C. Dále musí proběhnout hybridizace již jednořetězcové DNA za přítomnosti oligonukleotidových primerů, ty jsou v reakční směsi v nadbytku. Hybridizace probíhá při teplotě 50-60°C. Posledním krokem je prodlužování řetězce (elongace) pomocí DNA-polymerázy při 70-72°C. Všechny kroky se opětovaně opakují a DNA přibývá exponenciálně [11].

Reakční směs musí obsahovat několik důležitých složek, aby PCR probíhala optimálně. Templátové DNA stačí poměrně malé množství, ale velmi důležitá je její čistota. Další složkou jsou specifické oligonukleotidové primery (18-24 nukleotidů), vždy dva pro každý templát, forward a reverse primer, z nichž každý nasedá na jiný konec. Důležité je, aby primery byly specifické pro konkrétní místa na templátové DNA a zároveň neobsahovaly komplementární sekvence. Také by měly mít podobnou teplotu tání (alespoň 50°C). Reakční směs obsahuje dále reakční pufr, deoxynukleotidy,  $Mg^{2+}$  ionty (kofaktor polymerázy), termostabilní DNA-polymerázu. Tyto termostabilní DNA-polymerázy jsou izolovány z bakterií *Thermus aquaticus* (*Taq*), které žijí v horkých pramenech, nemají schopnost exonukleázové aktivity ve směru 3' - 5', a tím je syntéza rychlejší. Ideální teplota pro nejefektivnější činnost *Taq* DNA-polymerázy je 72°C [18;23].

PCR probíhá v termocykleru s nastavitelnou teplotou v rozmezí 4-100°C, který umožňuje rychlou přeměnu teploty mezi jednotlivými kroky (denaturace, hybridizace, elongace) s přesností na desetiny °C [18].

Výsledkem PCR reakce jsou kopie původního templátu - úseky DNA o přesně stanovené velikosti, které se nazývají amplikony. K detekci amplikonů se používá gelová elektroforéza nebo kapilární elektroforéza. Existuje mnoho modifikací metody PCR - fluorescenční PCR, nested PCR, multiplex PCR apod. Často používaná je také real-time PCR, která umožňuje sledovat přírůstek vznikajících molekul DNA přímo v reálném čase. Je to velmi citlivá metoda využívající speciální sondy, které jsou detekovány laserem v real-time PCR cyklu [23].

### **2.3.10 Karyomapping**

Karyomapping je poměrně nová metoda založená na čipové technologii a využívající SNP (single nucleotid polymorphism). Uplatnění našla především v preimplantačním genetickém testování. Umožňuje s vysokým rozlišením identifikovat a analyzovat všechny chromozomy u embrya a určit jejich rodičovský původ. Výsledkem je karyomapa, která je jedinečná pro každého jedince. Kromě určení haplotypu segregujícího například s mutací umožňuje karyomapping současně detekci aneuploidií v jediném vzorku. Proto lze karyomapping úspěšně používat při preimplantační diagnostice monogenních chorob (PGT-M) současně s vyšetřením aneuploidií v preimplantačních embryích. K detekci SNP se používá skener s velmi vysokým rozlišením [19].



### 3 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce s názvem Preimplantační vyšetření chromozomových abnormalit v raných lidských embryích je seznámit se s metodami preimplantačního testování embryí, které se v dnešní době využívají – tedy komparativní genomová hybridizace na čipu (aCGH) a sekvenování nové generace (NGS) a vyhodnotit jejich přínos.

Dalším cílem práce je přehledně zpracovat informace o cyklech preimplantačního genetického testování aneuploidií (PGT-A) od roku 2012 do roku 2017. Porovnat citlivost těchto dvou používaných metod a jejich schopnost rozlišení strukturních abnormalit a numerických aberací v mozaice.

Porovnat nálezy u embryí pacientek ve věkových kategoriích do 34 let, 35–39 let a nad 40 let a s různými indikacemi k preimplantačnímu testování aneuploidií, a nakonec vyhodnotit úspěšnost otěhotnění v těchto kategoriích po PGT-A.

## 4 METODIKA

### 4.1 Celogenomová amplifikace soupravou SurePlex

Celogenomová amplifikace umožňuje namnožit původní množství DNA do množství potřebného k molekulárně genetické analýze. Produkt lze poté použít k hybridizaci na čípech nebo k NGS.

Buňky embryí k vyšetření jsou z embryologické laboratoře dodávány ve 2,5 µl sterilního PBS při -20°C. Po transportu do laboratoře se nechávají zkumavky s buňkami temperovat ve vychlazeném PCR stojánku na teplotu 0-7°C po dobu 15 minut a poté jsou stočeny 3 minuty při 200g.

Podle aktuálního návodu SurePlex Summary Protocol [24] jsme připravili reagentie na jednotlivé kroky amplifikace.

1. Připravili jsme **Extraction cocktail master mix**, do každé zkumavky jsme přidali 5 µl podle návodu a následovně inkubovali v cykleru (program SurePlex Lyze – Tabulka 1).

*Tabulka 1 - Program SurePlex Lyze*

1 cyklus	75°C	10 min
1 cyklus	95°C	4 min
1 cyklus	RT	∞

2. Připravili jsme **Pre-amp cocktail** a do každé zkumavky jsme ho přidali 5 µl, následovně inkubovali v cykleru (program SurePlex Pre-amp – Tabulka 2). Produkty jsme uchovávali při teplotě 0-7°C.

Tabulka 2- Program SurePlec Pre-amp

1 cyklus	95°C	2 min
12 cyklů	95°C	4 min
	15°C	50 s
	25°C	40 s
	35°C	30 s
	65°C	40 s
	75°C	40 s
1 cyklus	4°C	∞

3. Připravili jsme **Amplification cocktail** a přidali jsme ho 60 µl do každé zkumavky, amplifikace probíhala v cyklu (program SurePlex Amp – Tabulka 3).

Tabulka 3 - Program SurePlex Amp

1 cyklus	95°C	2 min
14 cyklů	95°C	15 s
	65°C	1 min
	75°C	1 min

Amplifikované produkty jsme uchovávali v chlazeném stojánku (0-7°C) nebo v ledničce, pokud následovalo ihned značení produktů. Pokud jsme DNA ihned neznačili, produkty jsme uchovávali v mrazničce při -18 až -25°C.

## 4.2 aCGH – Komparativní genomová hybridizace na čipu

Metodou aCGH lze vyšetřit aneuploidie všech 46 chromozomů, a tím výrazně zpřesnit výsledek vyšetření oproti metodě FISH, kterou lze vyšetřit pouze omezený počet chromozomů.

Nejprve jsme provedli celogenomovou amplifikaci vzorku. (viz 4.1)

#### 4.2.1 Značení DNA

Program pro plánování experimentu je součástí dodaného software. Excelový soubor umožňuje podle zadaných dat pacientů a vzorků vytvořit přesný rozpis, který je nutno dodržet, aby se zaručila přesnost vyšetření. Program sám generuje typ značení každého vzorku (Cy3 nebo Cy5), kombinaci dvou opačně značených vzorků a umístění kombinovaných vzorků na oblast array.

1. Přidání **Primer Solution** – do každé zkumavky jsme přidali 5  $\mu$ l Primer solution a 8  $\mu$ l vzorku nebo kontrol (2x male, 2x female) podle schématu v Planneru, reagentie jsme smíchali a denaturovali v cyklu při 94°C po dobu 5 minut (program PGD/24SURDEN), následně se nechali vzorky zchladit v chladničce.
2. Příprava **Labelling mixu** - podle počtu vzorků jsme přidali 12  $\mu$ l Cy3 labelling master mixu k polovině vzorků a 12  $\mu$ l Cy5 labelling master mixu k druhé polovině vzorků, reagentie jsme promíchali, centrifugovali a nechali značit v cyklu při 37°C po dobu 2 – 4 hodin (program PGD/24SURLAB), následně jsme zkumavky přemístili do chladicího stojánku.
3. **Kombinace značených vzorků** – vzorky jsme centrifugovali, smíchali (25  $\mu$ l vzorek značený Cy3 + 25  $\mu$ l vzorek značený Cy5) a ke každému již smíchanému vzorku jsme přidali 25  $\mu$ l Human COT DNA.
4. Otevřené zkumavky jsme vložili do vakuové centrifugy a centrifugovali po dobu asi 60 minut, dokud nebyl objem vzorků zredukovaný asi na 3  $\mu$ l (průběžně jsme kontrolovali).

5. Skleněné víko centrifugy jsme přikryli, aby byly vzorky ve tmě.

#### 4.2.2 Hybridizace

1. Předehřáli jsme DS hybridizační pufr v bločku suchého tepla na  $75\pm 1^\circ\text{C}$  (cca 10 minut).
2. Pelety vzorků (cca 3  $\mu\text{l}$ ) jsme rozsuspendovali ve 21  $\mu\text{l}$  teplého DS pufru ( $75\pm 1^\circ\text{C}$ ) a denaturovali 10 min při  $75\pm 1^\circ\text{C}$ . Během denaturace jsme vzorky promíchali na vortexu.
3. Na podložní sklíčka jsme nanесли 18  $\mu\text{l}$  vzorku a následně přiložili na příslušnou oblast (array).
4. Sklíčka jsme vložili do hybridizační kazety, kam jsme předem do jamek napipetovali 2 x 15  $\mu\text{l}$  2xSSC/50% formamidu.
5. Kazety jsme uzavřeli a vložili do inkubátoru na 3-16 hodin při  $47\pm 1^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.3 Odmytí nenavázané DNA

1. Příprava roztoků k odmytí DNA:
  - Zásobní roztok 20x SSC jsme připravili ze 175 g NaCl + 88,2 g  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 900  $\mu\text{l}$  dest.  $\text{H}_2\text{O}$  a bylo upraveno pH na 7 – objem jsme doplnili do 1l (ostatní roztoky jsme připravili ze zásobního roztoku).
  - 2xSSC/0,05% Tweenem 20 jsme přenesli do Coplinovy kyvety a nechali minimálně 30 minut temperovat na laboratorní teplotu.

- 2xSSC/0,05%Tween 20, 1xSSC a 0,1xSSC jsme přenesli do odmyvacích nádobek od firmy Arrayit a nechali minimálně 30 minut temperovat na laboratorní teplotu.
  - 0,1xSSC jsme přenesli do Hybexu a roztok jsme temperovali na  $60\pm 1^{\circ}\text{C}$ .
2. Skla jsme vyjmuli z hybridizačních kazet a v Coplinově kyvetě s 2xSSC/0,05% Tween 20 jsme nechali odmočit krycí sklíčka na několik minut.
  3. Naskládali jsme skla do držáčku, vložili do nádoby od Arrayit s míchadlem a 2xSSC/0,05% Tween 20 a odmyvali 10 minut.
  4. Přemístili jsme skla v držáčku do druhé odmyvací nádoby od Arrayit s míchadlem a 1xSSC a odmyvali 10 minut.
  5. Přemístili jsme držáček se skly do Hybexu s 0,1xSSC a odmyvali při  $60\pm 1^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 minut.
  6. Naposledy jsme odmyvali v nádobce od Arrayit s 0,1xSSC s míchadlem a odmyvali jsme po dobu 1 minuty.
  7. Skla jsme sušili v centrifuze po dobu 15 sekund a do skenování uchovávali ve tmě.

#### **4.2.4 Skenování čipů**

1. Odmytá skla jsme vložili do skeneru a skenovali podle návodu k přístroji.
2. Zapnuli jsme program Mapix.

3. Naskenované obrázky se dále exportovaly do programu BlueFuse Multi a v něm se analyzovaly. Obrázky jsme uložili do složky pacienta.

#### 4.2.5 Analýza dat

Program BlueFuse Multi analyzuje data získaná skenováním nahybridizovaných skel. Výsledkem je soubor údajů určujících kvalitu značení a hybridizace a další parametry potřebné k závěru vyšetření. Podle návodu pro hodnocení výsledků firmy Illumina (materiály volně ke stažení na stránkách [www.illumina.com](http://www.illumina.com)) lze rozlišit gonozomální numerické aberace, mozaiky apod. u konkrétních vzorků. Soupravou 24sureV3 lze ve vyšetřovaném vzorku trofektodermu zachytit mozaiku aneuploidie o rozsahu větším než 50 %. Souprava 24sureV3 není validována pro PGT-SR, tedy pro detekci segmentálních abnormalit. Není vhodný pro detekci reciprokových translokací, ale Robertsonské translokace, kde se jedná o translokaci celých dlouhých ramének akrocentrických chromozomů, touto soupravou detekovat lze.

### 4.3 NGS – Sekvenování nové generace

Metodou NGS, kterou využívá souprava VeriSeq (Illumina) lze vyšetřit aneuploidie všech 46 chromozomů.

Nejprve jsme provedli celogenomovou amplifikaci vzorku. (viz 4.1)

#### 4.3.1 Kvantifikace dsDNA a ředění DNA

1. Reagencie (Qubit buffer, S1 a S2 standardy a Qubit reagent) jsme nechali vytemperovat na pokojovou teplotu.
2. PCR destičku jsme vložili do chladicího stojánu a naředili naamplifikované produkty (5ul produktu + 45ul vody).

3. Na každý vzorek (a 2 standardy S1 a S2) jsme připravili working solution (199  $\mu$ l Qubit buffer + 1  $\mu$ l Qubit reagent).
4. Do 0,5 ml zkumavek jsme přidali 198 $\mu$ l working solutionu a přidali 2  $\mu$ l DNA, do 2 zkumavek pro standardy jsme přidali 190 $\mu$ l working solutionu a přidali 10  $\mu$ l S1 a S2, zvortexujeme.
5. Vzorky jsme uchovávali 2 minuty ve tmě při pokojové teplotě a následně změřili ve fluorometru (Qubitu).
6. Změřené koncentrace jsme zadali do Worklistu (ten vypočítá další ředění na koncentraci 0,2 ng/ $\mu$ l).
7. Do čisté PCR destičky jsme napipetovali vypočítané množství DNA a vody a uchovávali destičku na ledu.
8. Destičku jsme přikryli, zcentrifugovali a ihned jsme přešli k enzymatické fragmentaci (tagmentaci) DNA, (krok nelze přerušit - pokud nelze pokračovat v tagmentaci, DNA se neředí).

#### **4.3.2 Tagmentace (označení a fragmentace SurePlex ampliconů)**

1. Novou PCR destičku jsme označili VTA (VeriSeq Tagment Amplicon Plate).
2. Do každé jamky jsme přidali 10  $\mu$ l TD pufru, 5  $\mu$ l ATM tagmentačního mixu a 5  $\mu$ l DNA (o koncentraci 0,2 ng/ $\mu$ l).
3. Směs jsme promíchali pipetou, zalepili a centrifugovali 1 minutu při 1500 rpm.



4. Destičku jsme vložili do cykleru s vyhříváním víkem a nechali vzorky tagmentovat 5 minut při 55°C (program Tagment).
5. Vychladili jsme destičku na 10°C a ihned pokračovali k neutralizaci – přidali jsme 5 µl NT pufru do každé jamky a promíchali.
6. Zalepili jsme destičku, zcentrifugovali a inkubovali 5 minut při pokojové teplotě, ihned jsme pokračovali k PCR amplifikaci.

#### **4.3.3 PCR amplifikace (indexace)**

1. Ke vzorkům na destičce jsme přidali 5 µl 2 primerů.
2. Přidali jsme 15 µl PCR master mixu (NPM), promíchali, zalepili a zcentrifugovali.
3. Vložili jsme zalepenou destičku do PCR cykleru a spustili (program Indexace).

#### **4.3.4 Čištění PCR produktů**

1. AMPure XP roztok s kuličkami jsme nechali temperovat 15 minut při pokojové teplotě a zvortexovali ho, abychom rozptýlili kuličky.
2. VTA destičku jsme zcentrifugovali a ke každému vzorku jsme přidali 45 µl AMPure XP a pořádně promíchali.
3. Destičku jsme přemístili na magnetický stojánek.

4. Opatrně jsme odstranili supernatant (v případě, že se nám podařilo nabrat se supernatantem i nějaké kuličky, vrátili jsme obsah zpět a počkali jsme další 2min, postup jsme zopakovali).
5. Přidali jsme 200  $\mu$ l 80% ethanolu, inkubovali 30 sekund a poté opatrně odstranili supernatant. Tento krok jsme ještě jednou zopakovali.
6. Destičku jsme nechali 15 minut vyschnout a následně jsme přidali 50  $\mu$ l RSB pufru (resuspend buffer), vyjmuli jsme destičku z magnetického stojánek, promíchali a zcentrifugovali.
7. VTA destičku jsme přemístili na magnetický stojánek a nechali 2 minuty stát.
8. Připravili jsme si novou PCR destičku a do ní jsme přenesli 45  $\mu$ l supernatantu z VTA destičky.

#### **4.3.5 Normalizace knihovny**

1. Normalizační mikrokuličky (LNB1) a normalizační vymývací roztok (LNW1) jsme nechali temperovat při pokojové teplotě.
2. Normalizační mikrokuličky jsme museli důkladně zvortexovat, aby se kuličky rozsuspendovaly.
3. Smíchali jsme 1,1 ml normalizačního aditiva (LNA1) s 200  $\mu$ l LNB1 a promíchali.
4. Připravili jsme si novou destičku a nazvali jí LNP (Library normalization plate), přidali jsme do ní směs LNA1 s LNB1 po 45  $\mu$ l.

5. Přidali jsme 20  $\mu$ l přečištěné DNA z PCR destičky, zalepili jsme jí a nechali homogenizovat 30 minut při 1800 rpm, centrifugovali jsme jen krátce.
6. LNP destičku jsme přemístili na magnetický stojánek na 2 minuty, odebrali jsme supernatant a odstranili jsme formamid.
7. Destičku jsme sundali z magnetického stojánku a promyli jsme jí 45  $\mu$ l normalizačního vymývacího roztoku LNW1.
8. Destičku jsme zalepíme PCR fólií, 5 minut homogenizovali při 1800 rpm a následně centrifugovali.
9. Přemístili jsme destičku na magnetický stojánek na 2 minuty.
10. Sundali jsme destičku ze stojánku, oapkovali jsme promytí roztokem LNW1 a odsáli jsme supernatant.
11. Přidali jsme 30  $\mu$ l 0,1N NaOH, promíchali, destičku zalepili a homogenizovali 5 minut při 1800 rpm.
12. Opět jsme přemístili destičku na magnetický stojánek na 2 minuty.
13. Připravili jsme si novou PCR destičku a přidali do ní 25  $\mu$ l LNS1 pufru a 25  $\mu$ l supernatantu z LNP destičky.
14. PCR destičku jsme přikryli a centrifugovali 1 minutu při 280 g.

#### 4.3.6 Smíchání knihoven a nanesení vzorku na MiSeq

1. Smíchali jsme ve zkumavce 5  $\mu\text{l}$  od každého vzorku, směs jsme zhomogenizovali a zcentrifugovali.
2. 15  $\mu\text{l}$  vzniklé směsi (Library pool) jsme přenesli ze zkumavky do čisté PCR zkumavky.
3. Přidali jsme 85  $\mu\text{l}$  pufru HT1 ke vzniklé směsi (celkem 100  $\mu\text{l}$ ) a směs opatrně zvortexovali a zcentrifugovali.
4. Ihned jsme přemístili směs do cykleru (program Denatur).
5. Z cykleru jsme přenesli 100  $\mu\text{l}$  směsi do zkumavky k 600  $\mu\text{l}$  studeného HT1, směs jsme nechali v chladu do nanesení do kazety.
6. Do kazety jsme nanесли 600  $\mu\text{l}$  vzorku a kazetu vložili do přístroje MiSeq.

#### 4.3.7 Nanesení vzorku do sekvenátoru

Postupovali jsme přesně podle instrukcí na displeji přístroje. Sekvenační proces je plně automatizovaný.

Výsledkem sekvenování je rozsáhlý soubor dat a údajů o kvalitě proběhlé reakce. Pokud reakce splňuje kvalitativní parametry, lze výsledky použít pro analýzu.

#### 4.3.8 Analýza dat

Program BlueFuse Multi analyzuje data získaná sekvenováním DNA v MiSequ. Výsledkem je soubor údajů potřebných k formulaci závěru vyšetření. Podle návodu pro hodnocení výsledků firmy Illumina (materiály volně ke stažení na stránkách

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)) lze soupravou VeriSeq detekovat numerické aberace i mozaiky aneuploidií a rovněž strukturní (segmentální) abnormality v minimálním rozsahu alespoň 2Mb. [25]

#### **4.4 Statistické zpracování dat**

Získaná data jsme zpracovali pomocí programu Microsoft Excel. Informace o jednotlivých cyklech jsme uspořádali do tabulky, kde jsme u každého cyklu uvedli datum biopsie materiálu, identifikační číslo ženy, rodné číslo ženy, věk ženy v době odběru oocytů, typ vzorku, celkový počet embryí, počet euploidních embryí, počet podmíněně doporučitelných embryí, počet aneuploidních embryí, uskutečnění embryotransferu, počet gravidit, počet abortů, indikace k PGT-A a metodu vyšetření. Z těchto dat jsme vycházeli pro vyhodnocení výsledků za pomoci dostupných funkcí a pro vytvoření grafů.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Vyhodnocení výsledků laboratoře od roku 2012

Tabulka 4 - Přehled informací o PGT-A cyklech

Počet cyklů PGT-A (bez translokací a monogenních chorob)	637	arrayCGH	546
		NGS	91
Počet embryí	2981	Vyšetřovaný materiál: blastomera	1850
		Vyšetřovaný materiál: buňky trofektodermu	1131
Metoda aCGH	2595 embryí (546 cyklů)	Vyšetřovaný materiál: blastomera	1850 (343 cyklů)
		Vyšetřovaný materiál: buňky trofektodermu	745 (203 cyklů)
Metoda NGS	381 embryí (91 cyklů)	Vyšetřovaný materiál: buňky trofektodermu	381 embryí (91 cyklů)
Počet provedených embryotransferů	360		
Počet cyklů bez embryotranferu	277		
Počet těhotenství	176	Úspěšnost otěhotnění/embryotransfer	48,8 %
		Úspěšnost otěhotnění/ cyklus	27,6 %
		Počet abortů	30 (17 %)

Preimplantační genetické testování aneuploidií bylo provedeno u 637 pacientek (cyklů) podstupujících IVF cyklus. Průměrný věk pacientek je 38,41 let. Celkem bylo vyšetřeno 2981 embryí. U 1850 embryí byla bioptována a vyšetřena blastomera, u 1131

embryí byly odebrány a vyšetřeny buňky trofektodermu. K PGT-A byla zpočátku využívána metoda aCGH, která byla postupně nahrazena metodou NGS.

Metodou aCGH bylo vyšetřeno 2595 embryí (546 cyklů), u 1850 embryí (343 cyklů) byla vyšetřena blastomera a u 745 embryí (203 cyklů) byl vyšetřován trofektoderm. U 26 % vzorků bylo vyšetření blastomery neinformativní a vyšetření embrya bylo opakováno na buňkách trfektodermu.

Metodou NGS byly vyšetřeny buňky trofektodermu z 381 embryí (91 cyklů).

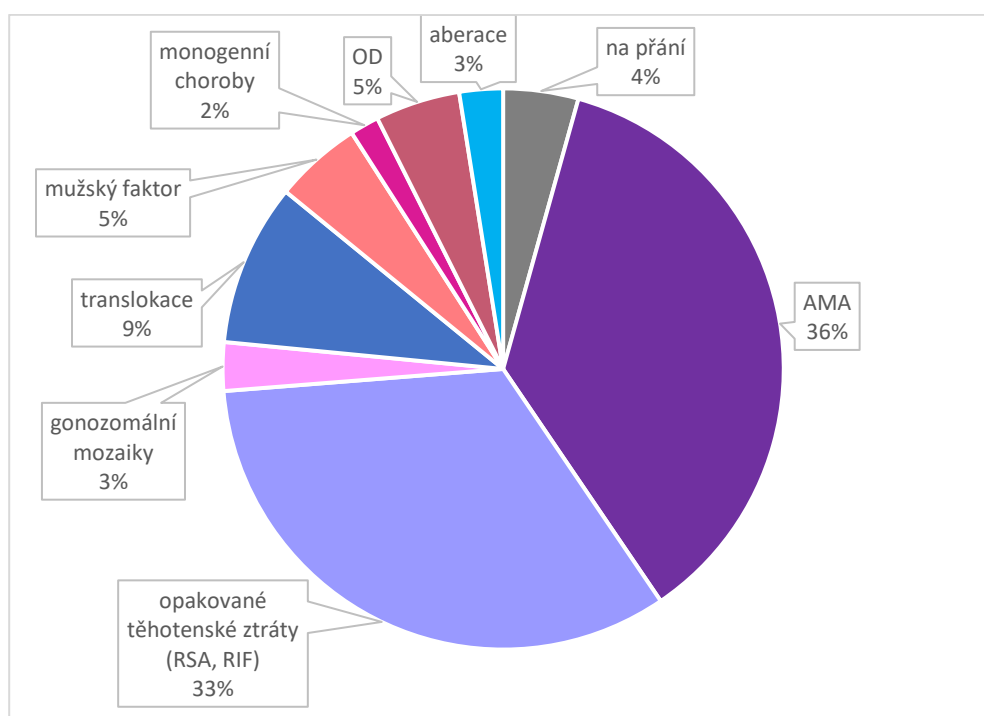
Euploidních embryí bylo 32 % z celkového počtu vyšetřovaných embryí a aneuploidních embryí bylo 68 %.

Transfer embrya byl proveden u 360 pacientek (56 % z 637 cyklů) a 176 pacientek (48 %) po transferu vyšetřeného a doporučeného embrya otěhotnělo. U 30 pacientek (17 % z celkového počtu těhotných) došlo k potratu.

Do výpočtu úspěšnosti PGT-A nebyly započítávány cykly, které se primárně vyšetřovaly z důvodu monogenní choroby a přenašečství translokace.

Popsaná data jsou uvedena v Tabulce 4.

## 5.2 Zastoupení indikačních skupin u pacientek podstupujících PGT-A



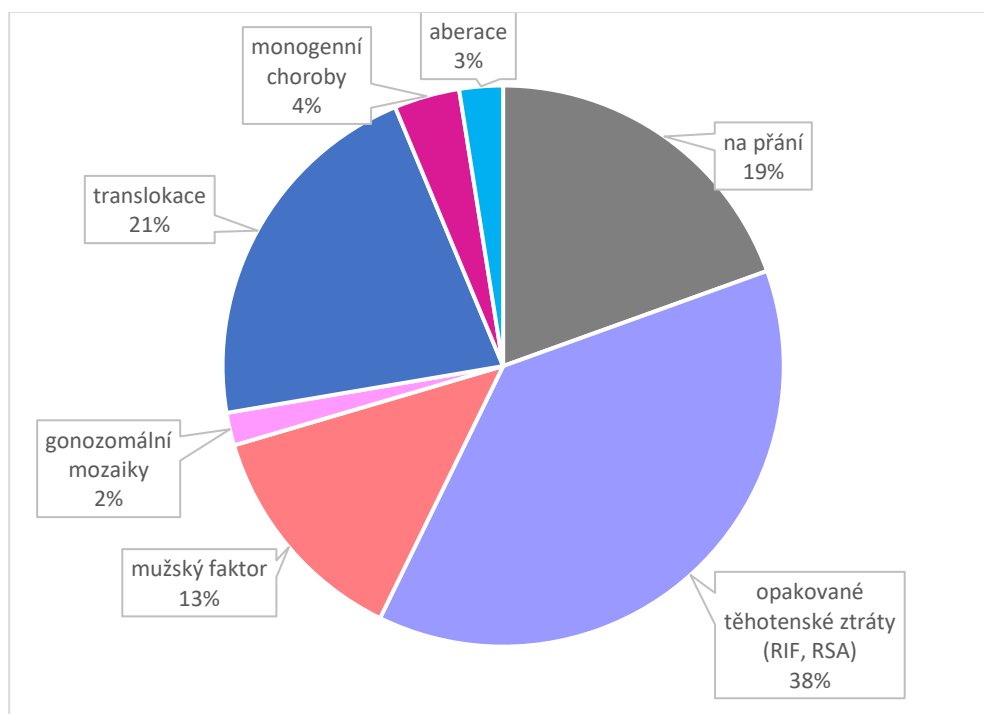
Obrázek 7 - Graf zastoupení jednotlivých indikací u celkové souboru pacientek podstupující PGT-A

Zastoupení jednotlivých indikací v celém souboru pacientek je uvedeno v Obrázku 7. Nejčastější indikací (259 ze 716 pacientek) k PGT-A bylo stáří pacientek nad 35 let (AMA) a to v zastoupení 36 %. Následně to jsou opakované těhotenské ztráty (selhání implantace - RIF a opakované spontánní potraty - RSA) ve 33 %. Mužský faktor (spermie získané metodami MESA/TESE, mikrolece v AZF oblastech na chromozomu Y, gonozomální abnormality nalezené u muže) byl důvodem k indikaci v 5 % PGT-A cyklů. Na přání pacientky (4 %) se PGT-A provádělo u mladších pacientek, které nespĺňovaly indikační kritéria (RIF, RSA, AMA) a přesto si přály provedení PGT-A (většinou cizinky samoplátkyňě). 5 % z celkového počtu PGT-A cyklů jsou pacientky, které podstupují léčbu s darovanými oocyty. Vyšetření aneuploidií všech chromozomů je důležité i v cyklech, kde je primární vyšetření genu způsobujícího monogenní chorobu (2 %) nebo v cyklech, kde jeden z partnerů je přenašečem balancované translokace (9 %). Výskyt gonozomální mozaiky



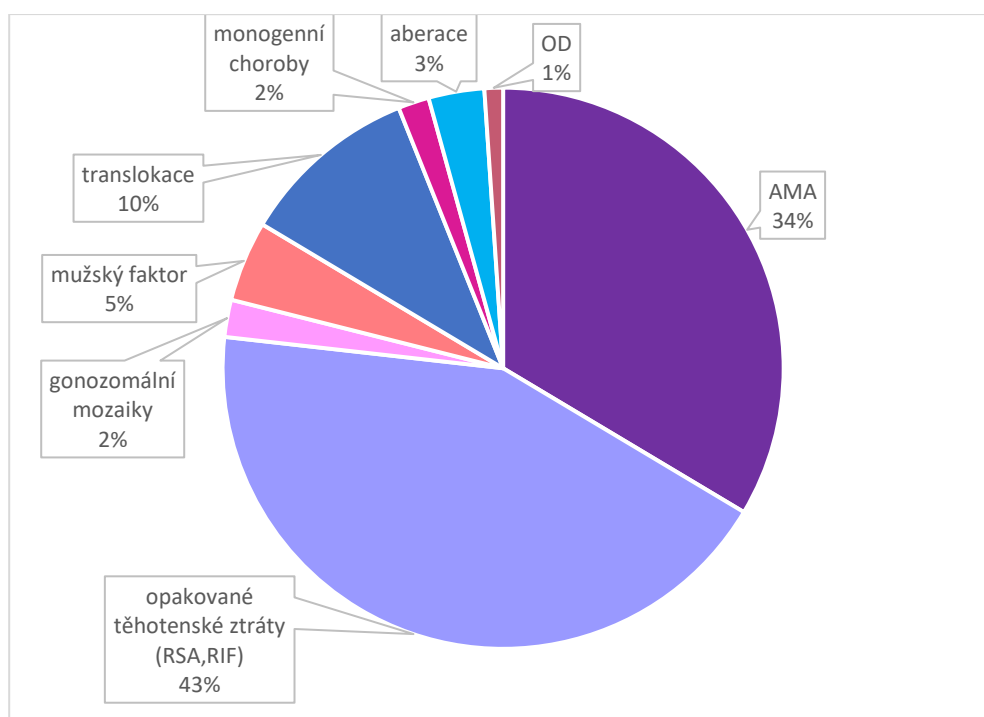
u partnerky je v zastoupení 3 %, dítě nebo plod z předchozí gravidity s chromozomální aberací bylo indikací ve 3 %.

Poměr indikací k PGT-A se liší v různých věkových skupinách pacientek, proto jsme soubor pacientek rozdělili do 3 věkových skupin – do 34 let, 35–39 let, nad 40 let.



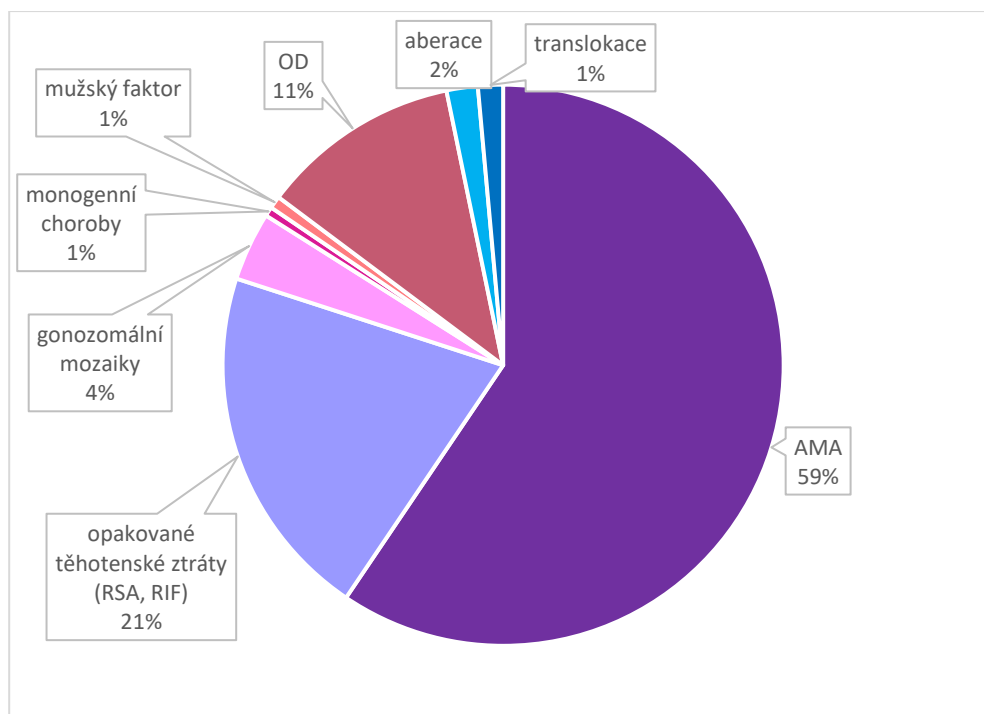
Obrázek 8 - Graf zastoupení jednotlivých indikací u pacientek do 34 let

Zastoupení jednotlivých indikací u pacientek do 34 let je uvedeno v Obrázku 8. U pacientek do 34 let věku byly nejčastější indikací opakované těhotenské ztráty (RSA, RIF) v 38 %. Přenašečství translokace u jednoho z partnerů bylo indikací u 21 % cyklů. V 19 % bylo indikací přání pacientky podstoupit preimplantační vyšetření embrya bez indikace. Z důvodu mužského faktoru se provádělo PGT-A u 13 % cyklů. Monogenní choroby jsou zastoupeny ve 4 %, ve 3 % chromozomální aberace diagnostikované u plodu nebo dítěte v předchozí graviditě. Z důvodu vyskytu gonozomální mozaiky u partnerky bylo PGT-A indikováno u 2 % pacientek.



Obrázek 9 – Graf zastoupení jednotlivých indikací u pacientek ve věku 35-39 let

Zastoupení jednotlivých indikací u pacientek ve věku 35-39 let je uvedeno v Obrázku 9. V této věkové kategorii jsou nejčastější indikací opakované těhotenské ztráty (tedy RSA a RIF) – 43 %. Začíná být poměrně hojně zastoupena indikace AMA, jelikož právě od 35 let věku je pokročilý věk ženy indikací k PGT-A. Tato indikace se v této věkové kategorii vyskytovala ve 34 %. Již v menším zastoupení se PGT-A provádělo i v cyklech, kdy se u partnerů vyskytovala translokace (10 %), kdy zde hrál roli mužský faktor (5 %) a v cyklech, kdy se vyšetřoval gen na monogenní onemocnění (2 %). Chromozomální aberace plodu nebo dítěte z předchozí gravidity jsou zastoupeny ve 3 %, gonozomální mozaiky u partnerky ve 2 %, případy, kdy jsou ženě darované oocyty v 1 %.

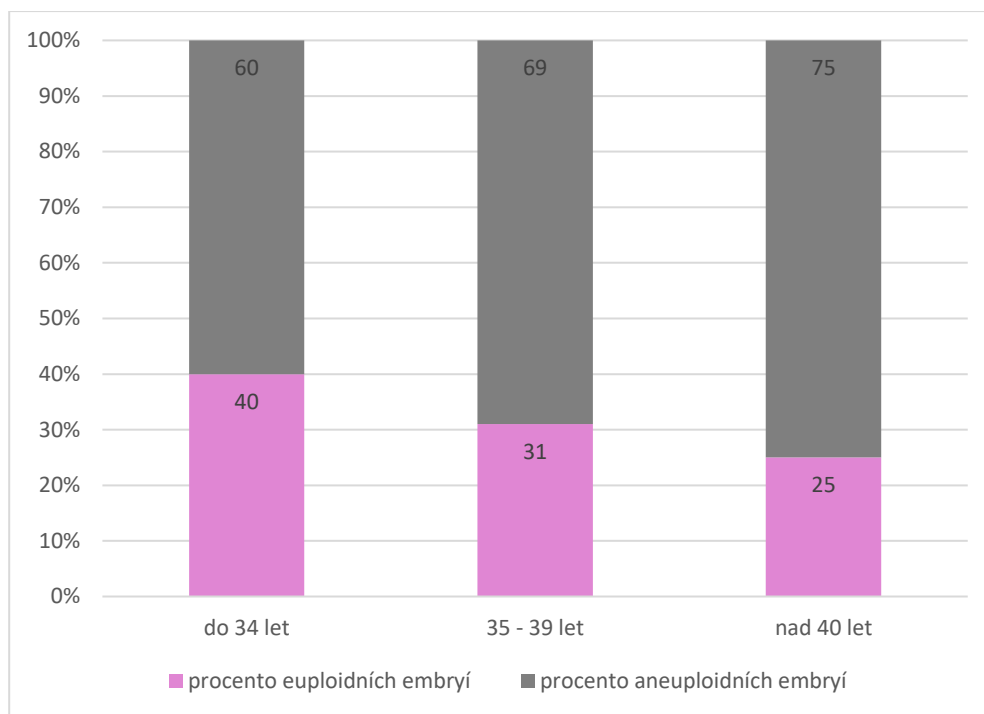


Obrázek 10 - Graf zastoupení jednotlivých indikací u pacientek ve věku nad 40 let

Zastoupení jednotlivých indikací u pacientek ve věku nad 40 let je uvedeno v Obrázku 10. U kategorie žen ve věku nad 40 let zcela převažuje (a to v 59 %) jako indikace pokročilý věk ženy (AMA). Ostatní indikace jsou zastoupeny v poměrně menší míře. Opakované těhotenské ztráty se zde jako indikace vyskytují ve 21 % případů, léčba s darovanými oocyty v 11 %. Ostatní indikace se vyskytovaly v nízké míře. Aberace z předchozích gravidit – 2 %, gonozomální mozaiky u ženy – 4 %, translokace, monogenní choroby i mužský faktor – 1 %.

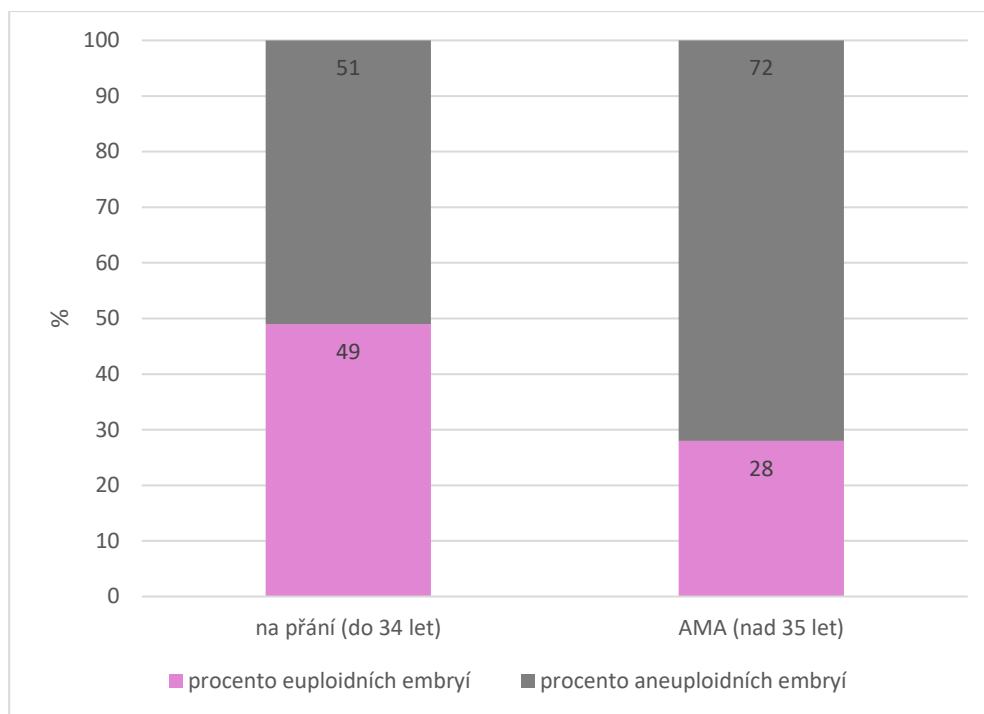
### 5.3 Zastoupení euploidních a aneuploidních embryí v jednotlivých indikačních skupinách

Porovnání výskytu euploidních a aneuploidních embryí v jednotlivých indikačních skupinách se provádělo u pacientek, které nepodstupovaly PGT-M a PGT-SR.



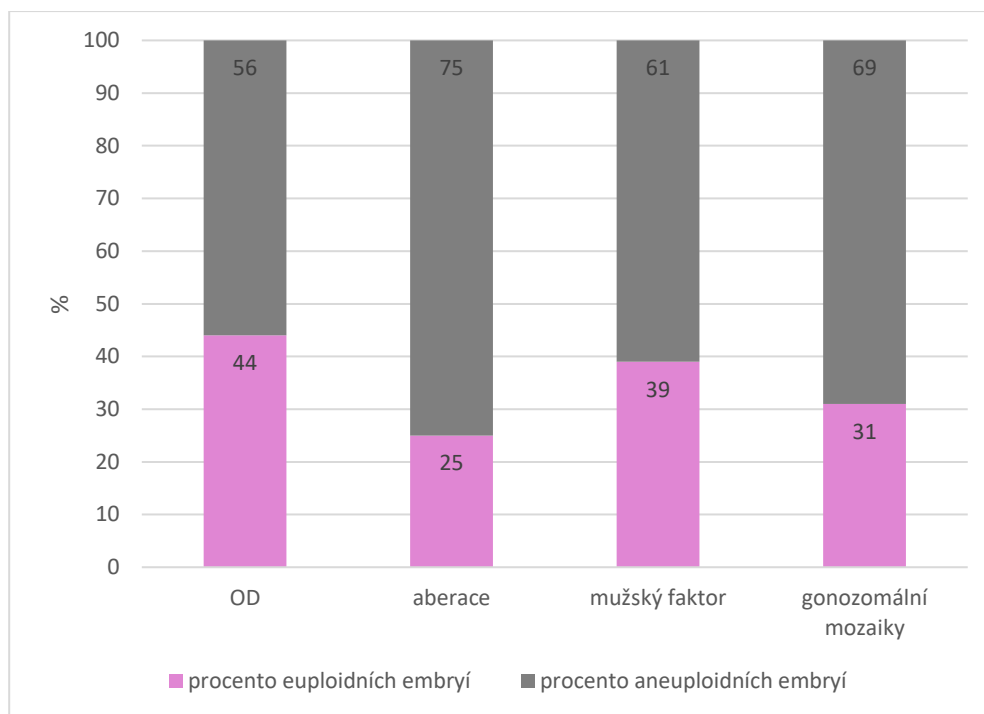
Obrázek 11 - Graf procentuálního zastoupení embryí u indikační skupiny opakovaných těhotenských ztrát

Procentuální zastoupení embryí u indikační skupiny opakovaných těhotenských ztrát je uvedeno v Obrázku 11. V jednotlivých věkových skupinách je poměr mezi euploidními a aneuploidními embryi u pacientek, které jako indikaci k PGT-A měly opakované těhotenské ztráty, znatelný. Celkový nárůst aneuploidních embryí je 15 %. U žen do 34 let věku převládají v 60 % aneuploidní embrya nad embryi euploidními – ve 40 %. Ve skupině 35–39 let začíná procento aneuploidních embryí stoupat a nárůst aneuploidních embryí je o 9 % - tedy 69 % aneuploidních embryí, 31 % euploidních embryí. V poslední věkové skupině – nad 40 let je již pouze 25 % euploidních embryí z celkového počtu embryí, 75 % embryí je tedy aneuploidních.



Obrázek 12 - Graf procentuálního zastoupení embryí u indikačních skupin na přání a AMA

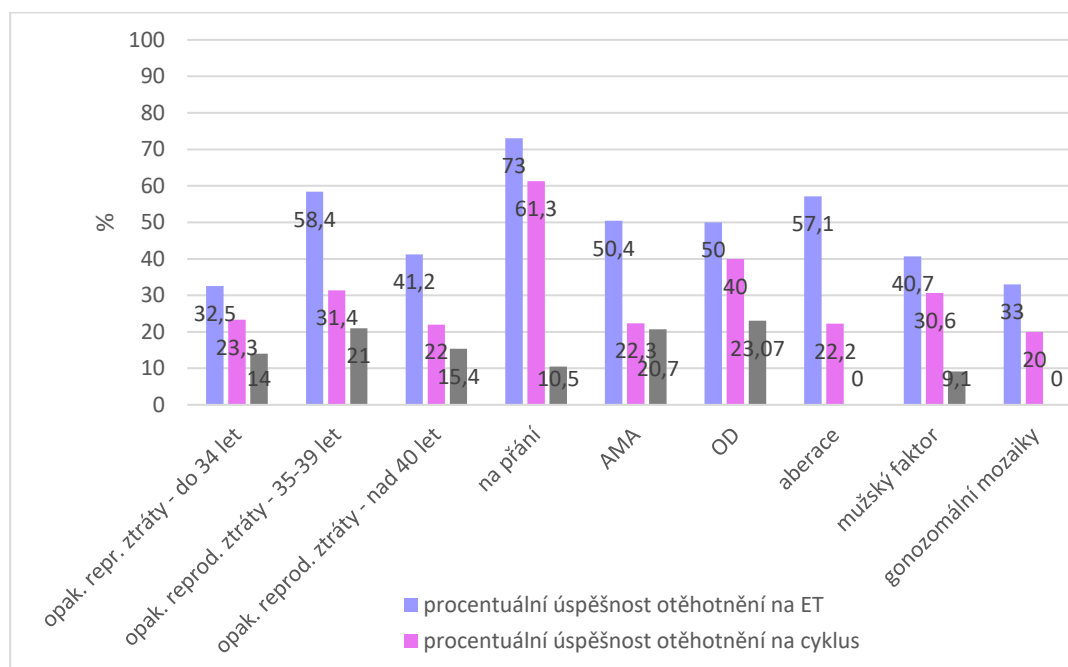
Procentuální zastoupení embryí u indikační skupiny na přání a AMA je uvedeno v Obrázku 12. Indikační skupina „na přání“ (tedy pacientky, které nemají žádnou historii reprodukčních neúspěchů, nesplňují věkovou hranici k indikaci PGT-A, ale přesto si přejí vyšetření PGT-A – věkový průměr 30,6 let) má poměrně vyrovnaný poměr euploidních a aneuploidních embryí. Aneuploidní embrya jsou zastoupena v 51 %, euploidní embrya ve 49 %. Nárůst aneuploidních embryí je ovšem značný v indikační skupině AMA (tedy pacientky nad 35 let věku bez historie reprodukčních neúspěchů – věkový průměr 40,9 let). Zde jsou aneuploidní embrya zastoupena v 72 % a euploidní v 28 %.



Obrázek 13 - Graf procentuálního zastoupení embryí u ostatních indikačních skupin

Procentuální zastoupení embryí u ostatních indikačních skupin je uvedeno v Obrázku 13. Poměrně vyrovnané zastoupení euploidních embryí (44 %) a aneuploidních embryí (56 %) je u pacientek, kterým byly darovány oocyty - nejčastěji to jsou právě pacientky nad 40 let věku. V případech, kdy je indikace k PGT-A z důvodu mužského faktoru se aneuploidní embrya vyskytují v 61 %, euploidní embrya ve 39 %. Výskyt aneuploidních embryí je vyšší u pacientek s výskytem chromozomálních aberací u plodu nebo dítěte v předchozích graviditách (aneuploidních embryí 75 %, euploidních embryí 25 %) a s nálezem gonozomálních mozaik (aneuploidních embryí 69 %, euploidních embryí 31 %).

## 5.4 Úspěšnost otěhotnění v jednotlivých indikačních skupinách

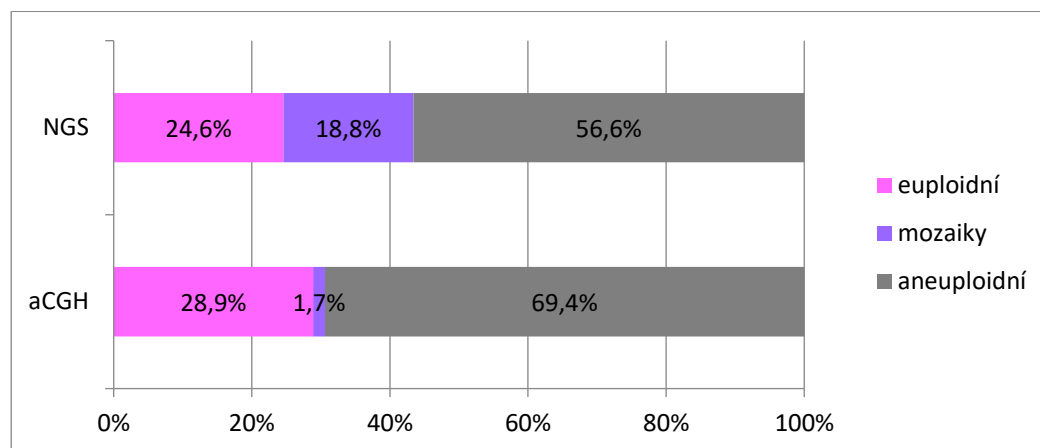


Obrázek 14 - Graf procentuální úspěšnosti otěhotnění a procentuálního zastoupení abortů

Procentuální úspěšnost otěhotnění a procentuální zastoupení abortů je uvedeno v Obrázku 14. Nejvyšší procentuální úspěšnost otěhotnění (73 % na embryotransfer; 61,3 % na cyklus) je u indikační skupiny pacientek „na přání“. Jedná se o mladé pacientky bez historie reprodukčních ztrát. K abortům u těchto pacientek došlo v 10 % případů z celkového počtu těhotenství. Procentuální úspěšnost otěhotnění ve výši 58,4 % na embryotransfer (31,4 % na cyklus) se vyskytuje u indikace opakovaných reprodukčních ztrát u žen ve věku 35–39 let. Četnost abortů je ovšem v této indikační skupině 21 %. Třetí nejvyšší úspěšnost otěhotnění na embryotransfer se vyskytuje u indikace chromozomálních aberací z předchozích gravidit, a to ve výši 57,1 % (22,2 % na cyklus) a to dokonce s nulovým výskytem abortů. Úspěšnost na embryotransfer je u indikace AMA 50,4 % (ovšem 22,3 % na cyklus). Taktéž výskyt abortů je zde poměrně vysoký – 20,7 %. U pacientek, které podstupovaly léčbu s darovanými oocyty je úspěšnost otěhotnění na embryotransfer 50 % (40 % na cyklus). Ovšem je zde nejvyšší procento abortů

ze všech indikačních skupin (23,07 %). Procentuální úspěšnost otěhotnění u dalších indikačních skupin je uvedena v Obrázku 14.

## 5.5 Zastoupení euploidních a aneuploidních embryí u aCGH a NGS



Obrázek 15 - Graf zastoupení euploidních a aneuploidních embryí a mozaiek u metod aCGH a NGS

Zastoupení euploidních a aneuploidních embryí a mozaiek u metod aCGH a NGS je uvedeno v Obrázku 15. Při používání metody aCGH bylo v celkovém počtu vyšetřovaných embryí detekováno 28,9 % euploidních embryí a 69,4 % embryí aneuploidních. Mozaiky byly detekovány u 1,7 % embryí z celkového počtu. Metodou NGS bylo v celkovém počtu vyšetřovaných embryí detekováno 24,6 % euploidních embryí a 56,6 % embryí, a 18,8 % embryí s mozaikou aneuploidie jednoho nebo více chromozomů.



## 6 DISKUZE

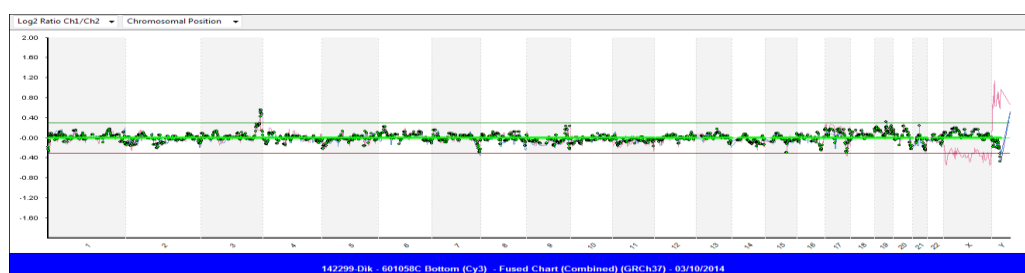
Určili jsme zastoupení všech indikací v kompletním souboru pacientek, které podstoupily PGT-A cyklus. Do výpočtu poměru jednotlivých indikací byly zařazeny i pacientky s primární indikací pro PGT-SR a PGT-M, u kterých se rovněž provádělo vyšetření PGT-A u embryí. Do jiného statistického zpracování nebyly tyto dvě indikační skupiny zařazeny z důvodu jejich specifických vlastností. Z kompletního souboru pacientek vyplývá, že nejčastější indikací k PGT-A je indikace AMA (36 %) a za ní následuje indikace opakovaných těhotenských ztrát (33 %). Lze tedy konstatovat, že právě tyto dvě skupiny indikací tvoří většinu pacientek Sanatoria PRONATAL. Ovšem zastoupení jednotlivých indikací se liší s věkem pacientek, proto jsme pacientky rozdělili do 3 věkových kategorií – do 34 let, 35-39 let a nad 40 let. Ve skupině do 34 let a ve skupině 35-39 let převládá v zastoupení všech indikací indikace opakovaných těhotenských ztrát – ve skupině do 34 let ve 38 % a ve skupině 35-39 let dokonce ve 43 %. Indikace AMA je ve skupině 35-39 let zastoupena u pacientek ve 34 %, ale ve věkové skupině nad 40 let již tvoří 59 %. PGT-A umožňuje výběr a přenos pouze euploidního embrya, a tím dosáhnout podobné úspěšnosti otěhotnění i u starších žen bez ohledu na věk a také snížit počet vícečetných těhotenství.

V našem souboru jsme detekovali z celkového počtu embryí z PGT-A cyklů 32 % euploidních a 68 % aneuploidních embryí. Výskyt euploidních a aneuploidních embryí se však liší v jednotlivých indikačních skupinách. Velkou skupinu pacientek IVF center tvoří ženy s historií reprodukčních ztrát (opakované potraty, opakovaná selhání implantace po přenosu embrya). Ve skupině žen s opakovanými selháními implantací a opakovanými aborty do 34 let byl výskyt euploidních embryí 40 %. Skupina žen 35–39 let měla euploidní embrya zastoupena ve 31 % a skupina žen nad 40 let ve 25 %. U žen, které měly jako indikaci k PGT-A vyšetření pouze AMA, jsou euploidní embrya zastoupena ve 28 %. Je zde vidět zřetelný pokles euploidních

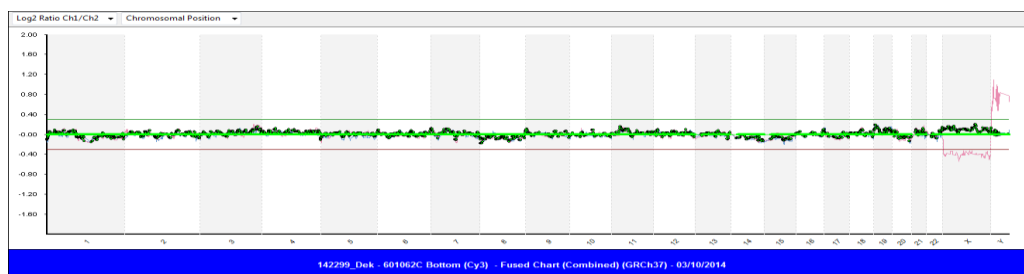
embryí a zároveň nárůst aneuploidních embryí se stoupajícím věkem žen, jak uvádí například [26].

Procentuální úspěšnost otěhotnění u pacientek se taktéž liší podle indikačních skupin. U každé indikace byla spočítána procentuální úspěšnost otěhotnění na cyklus a procentuální úspěšnost otěhotnění na embryotransfer. Úspěšnost otěhotnění na cyklus odpovídá situaci, kdy by přenášená embrya nebyla vyšetřena - všechna vyšetřovaná embrya byly kvalitní blastocysty, které byly z embryologického hlediska vhodné k transferu. V PGT-A cyklech, kdy embrya vyšetřena jsou, je pro nás rozhodující ukazatel úspěšnosti „otěhotnění na embryotransfer“. Porovnáním hodnoty úspěšnosti otěhotnění na cyklus s hodnotou úspěšnosti otěhotnění na embryotransfer dojdeme k závěru, že PGT-A zvyšuje úspěšnost otěhotnění v některých skupinách až dvojnásobně.

Od roku 2012 se pomocí metody aCGH, kdy se začala v Genetické laboratoři Sanatoria PRONATAL používat, vyšetřilo 2595 embryí u 546 pacientek. Vyšetření blastomery se provedlo u 1850 embryí, ale u 26 % vzorků bylo vyšetření blastomery neinformativní a po dohodě s embryology byla provedena rebiopsie buněk trofektodermu a jejich vyšetření k upřesnění výsledků. Poměrně častá nutnost opakování vyšetření vedla k rozhodnutí používat pro vyšetření embryí výhradně buňky trofektodermu (Obrázek 19, 20). Biopsie a vyšetření buněk trofektodermu bylo provedeno u 745 embryí.



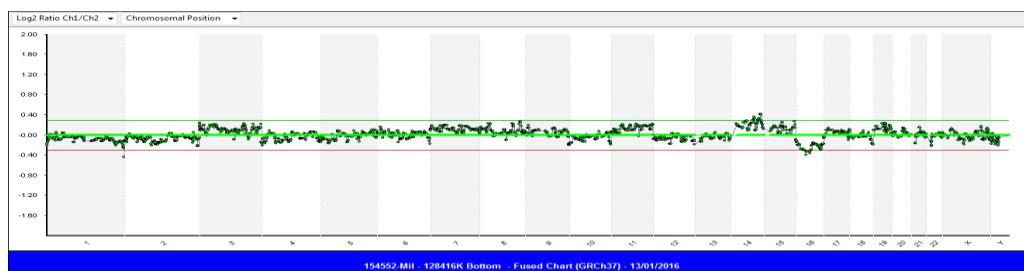
Obrázek 16 - Blastomera 3 denního embrya A vyšetřená metodou aCGH



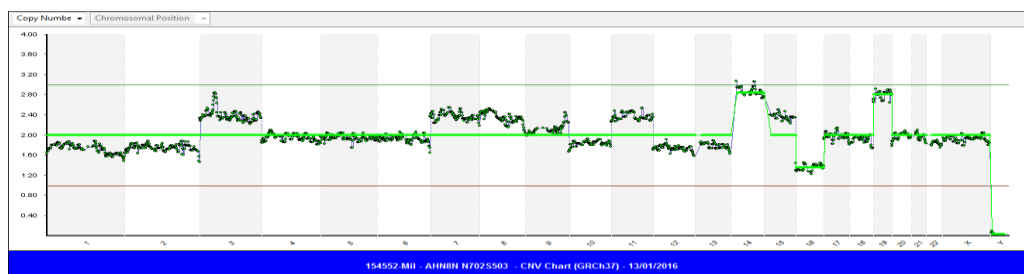
Obrázek 17 - Buňky trofektodermu 5 denního embrya A vyšetřené metodou aCGH

Na Obrázku 16 a Obrázku 17 je viditelný rozdíl výsledku vyšetření blastomery z 3 denního embrya a vyšetření buněk trofektodermu odebraných ze stejného 5 denního embrya metodou aCGH. Ve výsledku vyšetření blastomery byly viditelné suspektní segmentální abnormality a výsledek proto nebyl plně informativní. Vzhledem k tomu, že se jednalo o kvalitní a dobře se vyvíjející embryo, byla 5. den provedena rebiopsie buněk trofektodermu a jejich vyšetření metodou aCGH. Na základě normálního výsledku bylo embryo doporučeno k transferu. Je zřejmé, že vyšetření několika buněk trofektodermu odebraných z embrya výrazně zvyšuje kvalitu výsledku. Metoda aCGH byla vhodná pro detekci Robertsonských translokací, protože je schopna detekovat aneuploidie celých chromozomů, menší strukturní abnormality jsou pod detekčním limitem metody. [27]

S nástupem metody NGS v roce 2016 se výsledky vyšetřování buněk embryí zcela zpřesnily, jelikož tato metoda je schopna rozlišit i strukturní abnormality a numerické aberace v mozaice. Celkem bylo vyšetřeno 381 embryí u 91 pacientek. Vzhledem k tomu, že se z embrya odebere 5-10 buněk, výskyt neinformativních výsledků je výjimečný.



Obrázek 18 - Buňky trofektodermu 5 denního embrya B vyšetřené metodou aCGH



Obrázek 19 - Buňky trofektodermu 5 denního embrya B vyšetřené metodou NGS

Rozdílný výstup vyšetření stejného embrya metodou aCGH a NGS je znázorněn na Obrázku 18 a 19. Metoda aCGH není schopna detekovat mozaiku nižší než 50 % na rozdíl od metody NGS, která je schopna detekovat méně než 20% mozaiku. Mozaiky do 20 % jsou však považovány za normální výsledek. [14]

Embrya s mozaikou jsou komplexní problém, se kterým se potýkají všechny laboratoře provádějící PGT-A metodou NGS, a proto společnost PGDIS vydala doporučení týkající se jejich hodnocení a rozhodování o jejich doporučení k embryotransferu. Záleží na typu a míře mozaiky, např. embrya s mozaikou trizomie chromozomu 13, 18, 21 a 8, jejichž trizomie jsou slučitelné se životem, by se rozhodně pro transfer doporučovat neměla. Segmentální abnormality v mozaice by se měly hodnotit zvlášť obezřetně. Vysvětlení nálezů by mělo být provedeno pacientům v rámci genetické konzultace před případným transferem embrya. [28]

## 7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo seznámit se s metodami, které se využívají k detekci chromozomových abnormalit u preimplantačních embryí. V Genetické laboratoři Sanatoria PRONATAL jsem se zúčastnila provádění i vyhodnocení obou metod (aCGH, NGS), které se zde pro vyšetření buněk embryí využívají.

Obě metody výrazně snižují riziko přenosu aneuploidního embrya v IVF cyklu. Zavedením metody NGS se zpřesnilo vyšetření až na úroveň strukturních abnormalit a mozaiek, které metoda aCGH není schopna zachytit. Zpracováním informací o všech cyklech, které proběhly od roku 2012 až do roku 2017 lze potvrdit skutečnost, že vliv věku ženy na výskyt chromozomových abnormalit v raných embryích uváděný v literatuře je značný.

Přínos preimplantačního testování aneuploidií u embryí je zřejmý ve všech indikačních skupinách, především u starších pacientek a pacientek s opakovanými reprodukčními ztrátami. Díky přenosu euploidního embrya do dělohy se šance pacientek na otěhotnění výrazně zvyšuje.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

aCGH	Komparativní genomová hybridizace na čipu (array comparative genomic hybridization)
ADO	Výpadek alely (allelic drop-out)
AI	Arteficiální inseminace
AMA	Pokročilý věk matky (advanced maternal age)
AZF	Azoospermický faktor
BAC	Lidská DNA zakomponována v bakteriální DNA (bacterial artificial chromosomes)
CBAVD	Vrozená bilaterální ageneze chámovodů (congenital bilateral absence of the vas deferens)
CFTR	Membránový protein regulující přenos chloridů (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
DAPI	Fluorescenční barvivo, které se váže na oblasti DNA bohaté na báze AT (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ET	Embryotransfer
FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
ICSI	Intracytoplazmatická injekce spermie
IUI	Intrauterinní inseminace
IVF	Mimotělní oplodnění ( <i>in vitro</i> fertilizace)
KET	Kryoembryotransfer
LNA1	Normalizační aditivum

LNB1	Normalizační mikrokuličky
LNP	Normalizační deska (library normalization plate)
LNW1	Normalizační vymývací roztok
MESA	Mikrochirurgická aspirace spermií z nadvarlete (microsurgical epididymal sperm aspiration)
MPS	Masivní paralelní sekvenování
NaOH	Hydroxid sodný
NGS	Sekvenování nové generace (next-generation sequencing)
NRAR	Národní registr asistované reprodukce
NT pufr	Neutralizační tagmentační pufr (neutralize tagment buffer)
OD	Darovaná vajíčka (oocyte donor)
PBS	Fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PGT-A	Preimplantační genetické testování aneuploidií
PGT-M	Preimplantační genetické testování monogenních chorob
PGT-SR	Preimplantační genetické testování strukturních aberací
PICSI	Přirozený výběr zralé spermie pro ICSI (physiological intracytoplasmic sperm injection)
real-time PCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RIF	Opakované selhání implantace po IVF (repeated implantation failure)
RSA	Opakované potrácení po spontánním otěhotnění (repeated spontaneous abortions)

RSB	Standardní retikulocytový pufr (reticulocyte standard buffer)
SNP	Jednobodový polymorfismus (single nucleotid polymorphism)
SSC	Solný roztok citrátu sodného (saline sodium citrate)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEN	Tromboembolická nemoc
TESE	Extrakce spermií z tkáně varlete (testicular sperm extraction)
VTA	Tagmentační deska pro VeriSeq (VeriSeq tagment amplicon plate)
WGA	Celogenomová amplifikace (whole genome amplification)



## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŘEŽÁBEK, Karel. *Asistovaná reprodukce. 2.*, aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Maxdorf, 2014. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 978-80-7345-396-1.
- [2] MARDEŠIĆ, Tonko. *Diagnostika a léčba poruch plodnosti. 1.* vyd. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4458-2.
- [3] ŘEŽÁBEK, Karel. *Léčba neplodnosti. 4.*, aktualiz. vyd. Praha: Grada, 2008. Pro rodiče. ISBN 978-80-247-2103-3.
- [4] DOHERTY, C. a Melanie CLARK. *Léčba neplodnosti: podrobný rádce pro neplodné páry. Vyd. 1.* Brno: Computer Press, 2006. ISBN 80-251-0771-X.
- [5] OSTRÓ, Alexander, Ladislav PILKA a František LEŠNÍK. *Reprodukční medicína - současnost a perspektivy. 1.* vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2009. ISBN 978-80-7182-278-3.
- [6] RIENZI, Laura. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Human Reproduction Update. 2017, 23(2)*, 139-155.
- [7] OTOVÁ, Berta, Romana MIHALOVÁ a Jiří VYMLÁTIL. *I. - Základy biologie a genetiky. 3.* vyd. Praha: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1709-1.
- [8] MAŘÍKOVÁ, Taťána a Eva SEEMANOVÁ. *Klinická genetika: praktická aplikace. 1.* vyd. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-802-4623-184.

- [9] ŘEHOUT, Václav, Jindřich ČÍTEK a Lenka SÁKOVÁ. *Genetika I: (úvod do studia genetiky)*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 2000. ISBN 80-704-0405-1.
- [10] VERLINSKY, Yury. a Anver. KULIEV. *Practical preimplantation genetic diagnosis*. 1st edition. London: Springer, 2005. ISBN 978-1-85233-920-3.
- [11] SNUSTAD, D. a Michael SIMMONS, Jiřina RELICHOVÁ, ed. *Genetika*. Vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-4852-2.
- [12] SLABÝ, Ondřej. *Molekulární medicína*. 1. vydání. Praha: Galén, 2015. ISBN 978-80-7492-121-6.
- [13] LARMAN, Mark. Don't glance over the glossary - you might miss a new acronym. In: *Vitrolife* [online]. -: -, 2018 [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://blog.vitrolife.com>
- [14] PGDIS POSITION STATEMENT ON CHROMOSOME MOSAICISM AND PREIMPLANTATION ANEUPLOIDY TESTING AT THE BLASTOCYST STAGE. *Preimplantation genetic diagnosis international society* [online]. Illinois, 2016 [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: [http://www.pgdis.org/docs/newsletter\\_071816.html](http://www.pgdis.org/docs/newsletter_071816.html)
- [15] *Repromeda: Klinika reprodukční medicíny a preimplantační genetické diagnostiky* [online]. Brno: -, - [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <https://www.repromeda.cz/>

- [16] KULIEV, Anver, Svetlana RECHITSKY a Oleg VERLINSKY. *Atlas of preimplantation genetic diagnosis*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2014. ISBN 14-665-9840-9.
- [17] Obr.: Biopsie blastomery (3. den. In: *IVF Zlín* [online]. <http://www.ivf-zlin.cz>, b.r. [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <http://www.ivf-zlin.cz/25906n-dynamicky-laser-pro-asistovanou-reprodukcii-octax-navilase>
- [18] BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.
- [19] *Molekulární genetika na úrovni jedné buňky a její význam při studiu vrozených a získaných genetických odchylek lidského genomu*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- [20] ŠÁNA, Jiří a Ondřej SLABÝ. *Úvod do molekulární medicíny: cvičení (biomarkerové studie)*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8538-1.
- [21] *Sekvenování lidského genomu - technologie nové generace aneb budeme rutinně sekvenovat lidské genomy?*. Praha: Časopis lékařů českých, 2009, **148**(7). ISSN 1803-6597.
- [22] KREJČÍ, Adam, Petr MÜLLER a Bořivoj VOJTĚŠEK. Bioinformatics and Next-generation Sequencing. *Klinická onkologie* [online]. 2015, **28**(2), 291-296 [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.14735/amko20152S91. ISSN 0862495X. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/4764/>

- [23] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [24] *SurePlex Summary Protocol* [online]. San Diego, California: Illumina, 2014 [cit. 2018-04-25]. Dostupné z:  
<http://emea.support.illumina.com/?langsel=/cz/>
- [25] ZHENG ET AL., Haiyan. Application of next-generation sequencing for 24-chromosome aneuploidy screening of human preimplantation embryos. *Molecular Cytogenetics*. 2015, **8**(1), -. DOI: 10.1186/s13039-015-0143-6. ISSN 1755-8166. Dostupné také z:  
<http://www.molecularcytogenetics.org/content/8/1/38>
- [26] MUNNÉ, Santiago a Jacques COHEN. Advanced maternal age patients benefit from preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertility and Sterility*. 2017, **107**(5), 1122-1129.
- [27] FIORENTINO ET AL., F. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Human Reproduction*. 2011, **26**(7), 1925–1935.
- [28] MURTINGER, Maximilian. Scoring of mosaic embryos after preimplantation genetic testing: a rollercoaster ride between fear, hope and embryo wastage. *Reproductive BioMedicine Online*. 2018.

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Normální mužský karyotyp (z archivu Genetické laboratoře Sanatoria PRONATAL).....	16
Obrázek 2 - Karyotyp přenašečky Robertsonské translokace - 45,XX,t(13;14)(q1.0;q1.0) (z archivu Genetické laboratoře Sanatoria PRONATAL) ..	20
Obrázek 3 - Biopsie blastomery z třídenního embrya [17] .....	26
Obrázek 4 - Biopsie buněk trofektodermu z blastocysty (z archivu Genetické laboratoře Sanatoria PRONATAL).....	27
Obrázek 5 - Blastomera vyšetřená metodou FISH - trizomie chromozomu 21 (z archivu Genetické laboratoře Sanatoria PRONATAL) .....	28
Obrázek 6 - Princip arrayCGH s BAC sondami (z archivu Genetické laboratoře Sanatoria PRONATAL).....	29
Obrázek 7 - Graf zastoupení jednotlivých indikací u celkové souboru pacientek podstupující PGT-A .....	48
Obrázek 8 - Graf zastoupení jednotlivých indikací u pacientek do 34 let .....	49
Obrázek 9 – Graf zastoupení jednotlivých indikací u pacientek ve věku 35-39 let .....	50
Obrázek 10 - Graf zastoupení jednotlivých indikací u pacientek ve věku nad 40 let.....	51
Obrázek 11 - Graf procentuálního zastoupení embryí u indikační skupiny opakovaných těhotenských ztrát .....	52
Obrázek 12 - Graf procentuálního zastoupení embryí u indikačních skupin na přání a AMA.....	53
Obrázek 13 - Graf procentuálního zastoupení embryí u ostatních indikačních skupin.....	54
Obrázek 14 - Graf procentuální úspěšnosti otěhotnění a procentuálního zastoupení abortů.....	55

Obrázek 15 - Graf zastoupení euploidních a aneuploidních embryí a mozaiek u metod aCGH a NGS.....	56
Obrázek 16 - Blastomera 3 denního embrya A vyšetřená metodou aCGH .....	58
Obrázek 17 - Buňky trofektodermu 5 denního embrya A vyšetřené metodou aCGH.....	59
Obrázek 18 - Buňky trofektodermu 5 denního embrya B vyšetřené metodou aCGH.....	59
Obrázek 19 - Buňky trofektodermu 5 denního embrya B vyšetřené metodou NGS.....	60

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 - Program SurePlex Lyze.....	34
Tabulka 2- Program SurePlec Pre-amp .....	35
Tabulka 3 - Program SurePlex Amp .....	35
Tabulka 4 - Přehled informací o PGT-A cyklech .....	46

