

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Tereza Burdová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004)

Tereza Burdová

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004/0–2019)

**PREIMPLANTAČNÍ VYŠETŘENÍ CHROMOSOMOVÝCH
ANEUPLOIDIÍ METODOU SEKVENOVÁNÍ NOVÉ
GENERACE**

INCIDENCE A VÝZNAM MOZAIKOVÝCH NÁLEZŮ

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Martina Hrubá, Ph.D.

Plzeň 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 31. 3. 2024.

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Burdová Tereza

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Preimplantační vyšetření chromosomových aneuploidií metodou sekvenování nové generace: Incidence a význam mozaikových nálezů

Vedoucí práce: RNDr. Martina Hrubá Ph.D.

Počet stran – číslované: 57

Počet stran – nečíslované: 23

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 44

Klíčová slova: Preimplantační genetické testování, PGT-A, embryonální mozaicismus, NGS, aneuploidie

Souhrn:

Bakalářská práce se zaměřuje na preimplantační genetické vyšetření aneuploidií (PGT-A), které může být součástí cyklu IVF, pokud se páru nedaří otěhotnět ani po opakovaných IVF cyklech. Během vyšetření PGT-A genetická laboratoř narazí i na embrya, která nejsou klasifikována jako euploidní – normální (vhodná k embryotransferu (ET)). Mohou narazit na aneuploidní embrya, která nejsou vhodná k transferu, ale i na tzv. mozaiková embrya, u kterých je více buněčných linií (např. euploid – aneuploidní linie) pocházející z jedné zygoty. Mozaiky jsou novým fenoménem provázející vyšetření PGT-A a jsou spojeny se zahájením užívání metody sekvenování nové generace (NGS).

Výzkumný soubor tvořilo 2 775 embryí vyšetřených metodou NGS, kitem VeriSeq na platformě MiSeq (Illumina) za roky 2016-2022 pocházejících z různých IVF klinik a vyšetřovaných v Laboratoři reprodukční genetiky Genetika Plzeň s.r.o. Následně proběhlo vyhodnocení těchto dat.

Úspěšně vyšetřených embryí bylo 90,2 % (2 503/2 775). Z tohoto počtu bylo 33,4 % (836/2 503) embryí euploidních, 45,1 % (1 128/2 503) aneuploidních a 21,5 % (539/2 503) s euploid-aneuploidní mozaikou.

Mozaiková embrya se dále dělí dle vhodnosti k embryotransferu na vysoce rizikové mozaiky (242/539, 44,9 %), u kterých došlo k aberacím na chromozomech 13, 14, 15, 18, 21, X, Y, a proto nejsou dle interních pravidel Genetika Plzeň vhodná k embryotransferu, a na nízko riziková mozaiková embrya (297/539, 55,1 %), u kterých výše zmíněné aberace nenalzáme a jsou tedy po zvážení rizik a doporučení od mezinárodních odborných společností vhodná k transferu.

Po analýze byla k transferu doporučena všechna euploidní embrya (33,4 %, 836/2 503) a dále byla k transferu podmíněčně doporučena nízko riziková mozaiková embrya, která tvořila 297/2 503 (11, 9 %) ze všech úspěšně vyšetřených embryí. Po sloučení euploidních embryí a nízko rizikových mozaik z celého sledovaného souboru se významně zvyšuje počet embryí (podmínečně) vhodných k embryotransferu z 33,4 % (836/2 503) na 45,3 % (1 133/2 503).

Mozaiková embrya mají dle odborných společností šanci na implantaci i a na narození zdravého dítěte, a proto by se měla začít více transferovat i v našich podmínkách.

Abstract

Surname and name: Burdová Tereza

Department: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Title of thesis: Preimplantation genetic testing for aneuploidy using next generation sequencing: Incidence and significance of mosaic findings

Consultant: RNDr. Martina Hrubá Ph.D.

Number of pages – numbered: 57

Number of pages – unnumbered: 23

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 44

Keywords: Preimplantation genetic testing, PGT-A, embryonal mosaicism, NGS, aneuploidy

Summary:

The bachelor's thesis focuses on pre-implantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A), which can be part of an IVF cycle if the couple is unable to conceive even after repeated IVF cycles. During the PGT-A examination, the genetic laboratory also encounters embryos that are not classified as euploid-normal (suitable for embryo transfer (ET)). They may come across aneuploid embryos, which are not suitable for transfer, but also so-called mosaic embryos, in which there are several cell lines (e.g. euploid - aneuploid line) originating from one zygote. Mosaics are a new phenomenon accompanying the examination of PGT-A and are associated with the start of the use of the next generation sequencing (NGS) method.

The research set consisted of 2,775 embryos examined by the NGS method, the VeriSeq kit on the MiSeq platform (Illumina) for the years 2016-2022 originating from various IVF clinics and examined at the Laboratory of Reproductive Genetics Genetika Plzeň s.r.o. This data was subsequently evaluated.

Successfully examined embryos were 90.2% (2,503/2,775). Of this number, 33.4% (836/2,503) of embryos were euploid, 45.1% (1,128/2,503) were aneuploid, and 21.5% (539/2,503) were euploid-aneuploid mosaics.

Mosaic embryos are further divided according to suitability for embryotransfer into high-risk mosaics (242/539, 44.9%) in which aberrations occurred on chromosomes 13, 14, 15, 18, 21, X, Y and therefore they are not suitable for embryotransfer according to the internal rules in Genetika Plzeň, and for low-risk mosaic embryos (297/539, 55.1%), in which we do not find the above-mentioned aberrations and are therefore suitable for transfer after considering the risks and recommendations from international professional societies.

After analysis, all euploid embryos (33.4%, 836/2,503) were recommended for transfer, and low-risk mosaic embryos, which constituted 297/2,503 (11.9%) of all successfully screened embryos, were conditionally recommended for transfer. After combining euploid embryos and low-risk mosaics from the entire monitored group, the number of embryos (conditionally) suitable for embryotransfer increases significantly from 33.4% (836/2,503) to 45.3% (1,133/2,503).

According to professional societies, mosaic embryos have a chance of implantation and the birth of a healthy child, and therefore more should be transferred in our conditions.

Předmluva

Téma bakalářské práce jsem zvolila hlavně proto, že mě genetika a její zákony vždycky fascinovaly. Chtěla jsem se dozvědět víc, tak jsem využila tématu preimplantačního genetického testování a výběru vhodných embryí k transferu se zaměřením na embryonální mozaicismus. Cílem práce je zjistit procentuální zastoupení mozaikových embryí v souboru embryí vyšetřených v letech 2016-2022 metodou PGT-A.

Poděkování

Děkuji RNDr. Martině Hrubé Ph. D. za odborné vedení práce, poskytování cenných rad, materiálních podkladů, a hlavně za trpělivost. Dále děkuji MUDr. Lošanovi za možnost zpracovávat Bakalářskou práci v Laboratoři reprodukční genetiky Genetika Plzeň.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	13
SEZNAM OBRÁZKŮ	14
SEZNAM TABULEK	15
SEZNAM ZKRATEK	16
ÚVOD.....	18
TEORETICKÁ ČÁST	19
1 ZÁKLADY CYTOGENETIKY	19
1.1 DNA a RNA.....	19
1.2 Chromozom	20
1.2.1 Stavba chromozomu	20
1.2.2 Karyotyp.....	21
1.3 Chromozomové aberace	21
1.3.1 Numerické aberace	22
1.3.2 Strukturní aberace.....	23
1.3.3 Uniparentální dizomie	26
2 MEIÓZA A MITÓZA	28
2.1 Meióza	28
2.1.1 Meiotické dělení I.....	29
2.1.2 Meiotické dělení II	30
2.1.3 Poruchy meiózy	30
2.2 Mitóza	31
2.2.1 Fáze mitózy	32
2.2.2 Poruchy mitózy.....	33
3 ASISTOVANÁ REPRODUKCE	34
3.1 Postup při IVF léčbě	34
4 EMBRYONÁLNÍ MOZAICISMUS	37
4.1 Preimplantační vývoj a mozaicismus	37
4.2 Implantace a postimplantační vývoj mozaik	37
4.3 Rizika u mozaik	39
4.4 Klinická doporučení k transferům/nálezům mozaikových embryí.....	40
5 PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÉ TESTOVÁNÍ.....	42
5.1 Odběr materiálu	42
5.2 Druhy preimplantačních testů.....	43
5.2.1 Preimplantační genetické testování aneuploidí	43
5.2.2 Preimplantační genetické testování strukturních chromozomových aberací	44

5.2.3	Preimplantační genetické testování monogenních onemocnění.....	44
6	VYŠETŘOVACÍ METODY POUŽÍVANÉ PRO PGT.....	45
6.1	Sekvenování nové generace.....	45
6.1.1	Princip metody	45
6.1.2	Využití v preimplantačním testování	46
6.2	Array komparativní genomová hybridizace	46
6.2.1	Princip metody	46
6.2.2	Využití v preimplantačním testování	47
6.3	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace.....	47
6.3.1	Princip metody	47
6.3.2	Využití v preimplantačním testování	48
6.4	Polymerázová řetězová reakce.....	49
6.4.1	Princip metody	49
6.4.2	Využití v preimplantačním testování	50
6.5	Array detekující jednonukleotidové polymorfismy	50
6.5.1	Princip metody	50
6.5.2	Využití v preimplantačním testování	50
	PRAKTICKÁ ČÁST	51
7	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	51
7.1	Hlavní cíl.....	51
7.2	Dílčí cíle.....	51
8	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	52
9	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	53
10	METODIKA PRÁCE	54
10.1	Druh a odběr vzorku	54
10.2	Příprava odběrového pufru	54
10.3	Zvláštní opatření při manipulaci se vzorky.....	55
10.4	Celogenomová amplifikace	55
10.5	Sekvenování nové generace.....	59
10.6	Hodnocení vzorků a interpretace nálezů PGT-A.....	63
11	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	66
11.1	Úspěšně vyšetřená embrya.....	66
11.2	Zastoupení mozaikových embryí.....	67
11.3	Rozdělení mozaik dle vhodnosti k embryotransferu	68
11.4	Zhodnocení úspěšnosti embryotransferu u mozaik	68
11.5	Kazuistika I.....	68
11.6	Kazuistika II.....	70

DISKUZE.....	71
ZÁVĚR.....	74
SEZNAM LITERATURY.....	75

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Úspěšně vyšetřená embrya.....	66
Graf 2 – Zastoupení mozaikových embryí.....	67
Graf 3 – Rozdělení mozaik dle vhodnosti k embryotransferu.....	68

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Stavba chromozomu.....	20
Obrázek 2 - Karyotyp zdravá žena, 46,XX.....	21
Obrázek 3 - Karyotyp zdravý muž, 46,XY.....	21
Obrázek 4 - Meiotická nondisjunkce.....	31
Obrázek 5 - Chyby mitózy.....	33
Obrázek 6 - Myší chimérické modely.....	38
Obrázek 7 – Kontrola úspěšnosti WGA.....	58
Obrázek 8 - Příklad analýzy embrya metodou NGS.....	64
Obrázek 9 - Vhodné embryo k transferu.....	64
Obrázek 10 - Ztráta 9q v mozaice.....	69
Obrázek 11 - Ztráta terminální části 13q v mozaice.....	70

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Hodnocení kvality celého sekvenačního runu.....	62
Tabulka 2 – Hodnocení kvality sekvenace jednotlivých vzorků.....	63

SEZNAM ZKRATEK

aCGH.....	array komparativní genomová hybridizace (z angl. Array Comparative Genome Hybridization)
aSNP.....	array detekující jednonukleotidové polymorfismy (z angl. Array Single-Nucleotide Polymorphism)
CNV.....	analýza počtu kopií (z angl. Copy Number Variant)
BAC.....	bakteriální artifiální chromozomy (z angl. Bacterial Artificial Chromosome)
DNA.....	deoxyribonukleová kyselina
ET.....	embryotransfer
EtOH.....	ethanol
FISH.....	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FSH.....	folikulostimulační hormon
ICSI.....	intracytoplazmatická injekce spermie
IVF.....	<i>in vitro</i> fertilizace
NGS.....	sekvenování nové generace (z angl. New Generation Sequencing)
PB.....	pólové tělísko (z angl. Polar Body)
PBS.....	fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffered Saline)
PCR.....	polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)
PGD/PGT.....	preimplantační genetická diagnostika/preimplantační genetické testování
PGT-A.....	preimplantační genetické testování aneuploidií

PGT-SR preimplantační genetické testování strukturních chromozomových přestaveb

PGT-M..... preimplantační genetické testování monogenních onemocnění

RNA..... ribonukleová kyselina

rRNA ribozomální ribonukleová kyselina

SNP..... jednonukleotidové polymorfismy (z angl. Single-Nucleotide Polymorphism)

STR markery krátké tandemové repetice (z angl. Short Tandem Repeat)

TE trofoektoderm

TE pufr..... Tris/EDTA pufr

WGA..... celogenomová amplifikace (z angl. Whole Genome Amplification)

ÚVOD

S neplodností nebo s problémovým početím se v dnešní době potýká stále více párů. Když se poté rozhodnou navštívit centrum asistované reprodukce je možné, že za neschopností otěhotnět stojí abnormální karyotyp embryí.

Přesně na tento problém se zaměřuje preimplantační genetické testování aneuploidii (PGT-A).

V této bakalářské práci s názvem „Preimplantační vyšetření chromozomových aneuploidii metodou sekvenování nové generace“ se nechci věnovat pouze principu tohoto vyšetření, ale i stále méně vzácnému mozaicismu embryí, tedy výskytu více buněčných linií, kdy jedna linie může obsahovat normální karyotyp a druhá v sobě může ukrývat například trizomii chromozomu 21 (Downův syndrom).

Důkladné poznání a prozkoumání tohoto jevu dává párům větší šanci pro narození zdravého dítěte a pro vytvoření úplné rodiny.

TEORETICKÁ ČÁST

1 ZÁKLADY CYTOGENETIKY

1.1 DNA a RNA

DNA (deoxyribonukleová kyselina) je polymerní makromolekula nukleové kyseliny, nositelka genetické informace všech organismů s výjimkou některých nebuněčných organismů. U eukaryotických organismů je DNA hlavní složkou chromatinu a je uložena zejména uvnitř buněčného jádra, zatímco u prokaryot se DNA nachází volně v cytoplazmě.

Molekula DNA se skládá ze tří základních jednotek: z cukru deoxyribózy, dusíkatých bází a fosfátových skupin. Báze jsou dvojího druhu, a to puriny (adenin (A), guanin (G)) a pyrimidiny (thymin (T), cytosin (C)). Nejčastěji je vidět makromolekula DNA v nativním stavu, tedy ve tvaru pravotočivé dvoušroubovice. Protilehlé báze jsou spojeny vodíkovými můstky na principu komplementarity bází (A-T, G-C). Nukleotidy polymerizují do dlouhých polynukleotidových řetězců ve směru „5' -> 3'“.

Struktura DNA dovoluje přesný přenos genetické informace. Nukleotidová sekvence DNA určuje pořadí aminokyselin, které se řadí do proteinu během proteosyntézy.

Znalost sekvence nukleotidů u jednoho vlákna dovoluje stanovit sekvenci druhého vlákna na základě komplementarity bází.

Ribonukleová kyselina (RNA) je nukleová kyselina tvořená vláknem ribonukleotidů, které obsahují cukr ribózu, fosfátovou skupinu a nukleové báze adenin, guanin, cytosin a uracil. Je zodpovědná zejména za přenos informace z úrovně DNA kyselin do proteinů. V mnoha ohledech je podobná DNA, od které se liší jednak přítomností ribózy, kterou má ve své cukr-fosfátové kostře namísto deoxyribózy, a také tím, že využívá nukleovou bázi uracil namísto thyminu. Molekula RNA je také na rozdíl od DNA obvykle jednovláknová.

RNA má i řadu jiných funkcí, např. je nositelkou genetické informace u některých virů nebo nebuněčných organismů (Nussbaum, 2004).

1.2 Chromozom

Chromozom je barvitelný útvar skládající se z DNA a proteinů (histonů, kolem kterých je obmotané vlákno DNA). Chromozomy se nacházejí v jádře buněk. Tuto jadernou hmotu označujeme jako chromatin. Každý chromozom nese lineárně za sebou uspořádané geny, které se nachází v přesně definovaném místě výskytu konkrétního genu (lokusu) (Nussbaum, 2004).

1.2.1 Stavba chromozomu

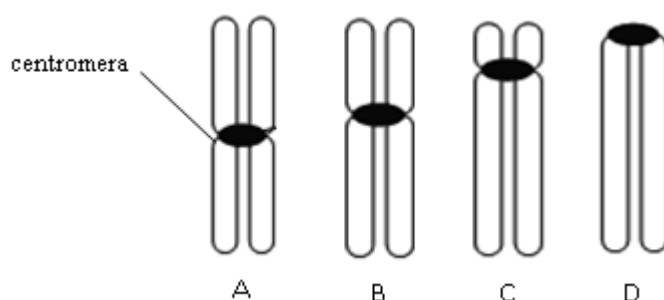
Eukaryotický chromozom je většinou rozdělen centromerou na krátké (p) a dlouhé (q) raménko. Centromera má význam při jaderném dělení. Konce ramének se nazývají telomery. Vlákna DNA tvořící chromozom se nazývají chromatida. Chromozom může být složen z jedné nebo ze dvou chromatid. Dvouchromatidový chromozom se vytvoří zdvojením jednochromatidového chromozomu před začátkem jaderného dělení procesem zvaným replikace. Obě chromatidy nesou obvykle zcela identickou genetickou informaci a jsou spolu spojeny prostřednictvím proteinového komplexu pouze v oblasti centromery.

Obrázek 1 níže znázorňuje, jak postavení centromery rozděluje jednotlivé chromozomy do určitých skupin, protože raménka chromozomů bývají, až na výjimky, nestejně dlouhá.

Na chromozomu A vidíme centromeru zhruba uprostřed chromatid a nazýváme ho metacentrický. U submetacentrických chromozomů (B) pozorujeme jedno delší raménko. Akrocentrický chromozom (C) se vyznačuje výrazně delším q-raménkem, protože p-raménko je redukováno pouze na malý úsek nad centromerou. Telocentrické chromozomy (D) obsahují pouze q-raménka, zatímco p-raménka zcela chybí (Kočárek, 2007).

Obrázek 1 - Stavba chromozomu

Zdroj: <https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-cytogenetika&lang=cz>

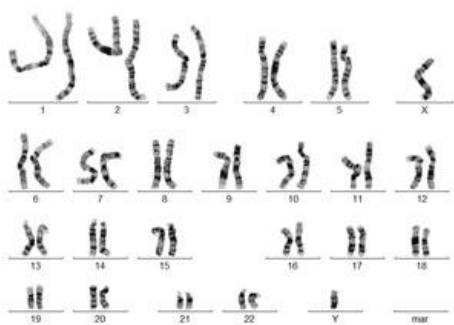


1.2.2 Karyotyp

Karyotyp je soubor všech chromozomů v buněčném jádře. Normální somatická buňka člověka má 46 chromozomů, z toho je 22 párů autozomů a jeden pár gonozomů (pohlavních chromozomů), viz obrázky 2 a 3. V každém páru je vždy jeden chromozom maternálního (od matky) a druhý paternálního (od otce) původu. Autozomy jsou v karyogramu číslovány podle velikosti od největšího (chromozom 1) po nejmenší (chromozom 22). Gonozomy se značí X a Y. Zápis normálního karyotypu ženy je 46,XX a muže 46,XY (Nussbaum, 2004).

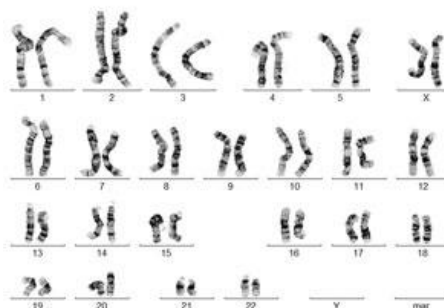
Obrázek 3 - Karyotyp zdravý muž,
46,XY

Zdroj: <https://www.genetika-plzen.cz/vysetreni/cytogeneticka-laborator>



Obrázek 2 - Karyotyp zdravá žena,
46,XX

Zdroj: <https://www.genetika-plzen.cz/vysetreni/cytogeneticka-laborator>



1.3 Chromozomové aberace

Chromozomové aberace jsou mutace na chromozomové úrovni. Rozdělují se na strukturní (např. různé delece či inverze chromozomů), nebo numerické. K numerickým aberacím se řadí buď aneuploidie, kdy se početní odchylka týká pouze některého chromozomu (trizomie, monozomie), nebo polyploidie, kdy je znásobena celá chromozomová výbava (triploidie, tetraploidie). Polyploidie patří mezi tzv. euploidní stavy, které jsou vždy celým násobkem základní chromosomové sady n . Mezi euploidní stavy tedy patří i diploidní stav (46 chromozomů, normální somatická buňka) a haploidie (23 chromozomů, normální gameta) (Kočárek, 2007).

1.3.1 Numerické aberace

Jako numerickou aberaci označujeme jakoukoliv odchylku od normálního počtu chromozomů (46,XX; 46,XY).

1.3.1.1 Polyploidie

Polyploidie je abnormální zmnožení celé chromozomální sady. Základní normální chromozomální sadou je 23 chromozomů (n), vyskytující se v gametách (haploidie). Normální somatická buňka se 46 chromozomy je diploidní ($2n$). Nejčastější polyploidii je triploidie s 69 chromozomy, tedy trojnásobek haploidní sady ($3n$), a tetraploidie s 92 chromozomy – čtyřnásobek haploidní sady ($4n$).

Triploidie i tetraploidie jsou letální; výjimečně se sice může narodit jedinec s triploidii, ale umírá záhy po porodu. Triploidie je nejčastěji způsobena poruchou fertilizace, tzv. dispermií (oplození vajíčka dvěma spermii naráz), tetraploidie poruchou mitózy (Snustad, 2017).

1.3.1.2 Aneuploidie

Aneuploidie jsou takové změny počtu chromozomů, kdy jsou zmnoženy nebo chybí pouze určité chromozomy, nikoli celé chromozomové sady. Nejčastěji se setkáváme s trizomiemi a monozomiemi.

Trizomie je chromozomová abnormalita, při níž je určitý chromozom v buňce přítomen v počtu tří (místo normálního počtu dvou). Konkrétními příklady mohou být Downův syndrom (trizomie chromozomu 21), Patauův syndrom (trizomie chromozomu 13) a Edwardsův syndrom (trizomie chromozomu 18).

Monozomie se vyznačuje přítomností pouze jednoho chromozomu místo normálního počtu dvou. Příkladem je Turnerův syndrom (monozomie chromozomu X). Jedinci s touto vadou jsou ženského pohlaví, ve většině případů sterilní s malou postavou a srdeční vadou (Kočárek, 2007).

Výše uvedené početní změny jsou viabilní (trizomie chromozomů 21, 13, 18 a monozomie chromozomu X), ostatní početní změny chromozomů obvykle viabilní nejsou (Nussbaum, 2004)

1.3.1.3 Mozaiky

Chromozomový mozaicismus je přítomnost dvou (nebo více) buněčných linií s různým karyotypem. Mozaiky s numerickou změnou vznikají při vývinu embrya nondisjunkcí nebo ztrátou chromozomu při mitotickém dělení blastomer, viz také kapitola 4. Embryonální mozaicismus.

Chromozomová mozaika (v postnatálním stavu) postihuje relativně často gonozomy (Turnerův syndrom), méně často autozomy (trizomie 21, 13, 18). Je známa též trizomie 8, která se u živě narozených dětí vyskytuje pouze v mozaice. U embryí se může vyskytovat mozaika jakéhokoliv chromozomu, viz kapitola 4 Embryonální mozaicismus, a poměr buněčných linií pak závisí na tom, ve kterém dělení k nondisjunkci nebo ztrátě chromozomu došlo a na tom, jak jsou abnormální buňky viabilní.

Dále se mohou vyskytovat i mozaiky se strukturními chromozomovými změnami, tedy s linií, kde došlo k inzerci, inverzi či translokaci, viz kapitola 1.3.2, ale jedná se o výjimečné stavy (Kočárek, 2007).

1.3.2 Strukturní aberace

Pro vznik strukturních aberací musí nejprve dojít ke zlomům, které jsou poté chybně znovuspojeny na jiném místě stejného nebo jiného chromozomu za vzniku chromozomové aberace (Nussbaum, 2004).

K chromozomovým zlomům může docházet kdykoli během buněčného cyklu (včetně mitózy i meiózy), a to buď spontánně (bez jakéhokoliv vnějšího zásahu), anebo důsledkem působení faktorů zevního prostředí, které zlomy způsobují (např. ionizační záření, chemické látky nebo některé virové infekce) (Nussbaum, 2004).

Strukturní aberace se rozlišují primárně na dva druhy a to: balancované a nebalancované. U balancovaných aberací nedochází ke ztrátě či zmnožení genetického materiálu a na první pohled ani nelze poznat jedince s touto vadou. Fenotypově téměř vždy vypadá normálně. Zato u nebalancovaných aberací dochází ke ztrátě nebo nadbytku genetického materiálu, což je obvykle spojeno s abnormálním fenotypem (Nussbaum, 2004).

1.3.2.1 Balancované strukturní aberace

U balancovaných aberací nedochází ke ztrátě nebo nadbytku genetického materiálu. Hlavním důvodem, proč je identifikace balancované přestavby důležitá, je riziko pro potomstvo, protože může docházet k tvorbě nebalancovaných gamet.

Jako balancované strukturní aberace rozeznáváme:

- Inverze
- Inzerce
- Translokace (viz kap. 1.3.2.3 Translokace)

Při vzniku inverze dochází ke dvěma zlomům na jednom chromozomu, k přetočení segmentu mezi zlomy a následnému spojení s distálními segmenty. Rozlišujeme dva typy inverze: pericentrickou inverzi, kdy invertovaný úsek chromozomu centromeru obsahuje, a paracentrickou inverzi, kdy invertovaný úsek centromeru neobsahuje.

Inzerce vzniká jako následek minimálně 3 chromozomových zlomů, kdy dojde k začlenění určité části chromozomu do jiného chromozomu. Vložený úsek může být na novém místě v normální nebo obrácené poloze (Nussbaum, 2004).

1.3.2.2 *Nebalancované strukturní aberace*

U nebalancovaných strukturních aberací dochází ke změnám, které vedou ke zisku či ztrátě genetické informace. Níže několik příkladů.

Duplikace – zdvojení úseku chromozomu. Může být způsobeno mimo jiné nerovnoměrným crossing-overem, jehož následkem dojde na jednom chromozomu k duplikaci sledovaného úseku, zatímco na druhém je tentýž úsek deletován (odstraněn).

Delece – chybí část chromozomu. Odstraněn může být terminální konec raménka (terminální delece) nebo střední část některého z ramének chromozomu (intersticiální delece). Delece vznikají jako následek zlomu (terminální delece), dvou zlomů (intersticiální delece) nebo nerovnoměrného crossing-overu.

Dicentrický chromozom – tento chromozom vzniká jako důsledek zlomů dvou chromozomů a fúze (spojení) chromozomů zlomenými konci, takhle vzniklý abnormální chromozom má dvě centromery. Pokud se vyskytuje jako vrozená chromozomální aberace, je jedna z centromer inaktivní, pak se chromozom chová jako monocentrický a může přežívat opakovaná buněčná dělení.

Izochromozom – je takový chromozom, který je tvořen pouze krátkými nebo dlouhými rameny spojenými v centromere. Vzniká chybným (příčným) štěpením centromery (namísto podélného) v druhém meiotickém dělení nebo v mitóze. Nejčastějším případem izochromozomu u živě narozených dětí je izochromozom pro q ramena chromozomu X.

Ring chromozom – pokud dojde u chromozomu k delecí konců obou ramének, může se chromozom stočit, zlomené konce se spojí a vznikne kruhový chromozom. Tato nebalancovaná aberace je spojena se ztrátou distálních částí obou ramen. Jedním z nejčastějších nálezů této aberace je ring chromozom X, který může být přítomný u mozaikové formy Turnerova syndromu.

Marker chromozom – je malý, nadpočetný chromozom, jehož původ nelze standardními cytogenetickými technikami určit. Jeho původ je různý (reciprokový produkt Robertsonské fúze, tvořený oblastmi krátkých ramen akrocentrů, nebo izochromozom krátkých ramen nebo pericentromerická oblast nějakého chromozomu atd.). Dle toho, zda obsahuje, či neobsahuje euchromatin (obohacen o geny, tvořen pouze nukleosomy navinutými do formy solenoidu, dále spiralizace nepokračuje. Euchromatin je rozvolněný, špatně se barví a hojně se transkribuje), může, ale nemusí být spojen s klinickými projevy. Relativně častý je výskyt marker chromozomu v mozaice (Snustad, 2017).

Nebalancované translokace – viz kapitola 1.3.2.3 Translokace.

1.3.2.3 Translokace

Translokace je strukturální přestavba, u které dochází k vzájemné výměně částí mezi dvěma (nebo více) chromozomy. Nejčastěji se setkáváme s balancovanými translokacemi, nebalancované translokace se v klinické genetice vyskytují až v gametách v důsledku špatné meiotické segregace. Rozlišujeme dva typy translokací: Robertsonské a reciproké (Snustad, 2017).

Robertsonská translokace

Robertsonská translokace vzniká zlomem dvou akrocentrických chromozomů v oblasti centromery a následným spojením dlouhých ramen – přestavbu označujeme jako centrickou fúzi. Jedinec s takovouto translokací má o jeden chromozom méně (45), neboť z odštěpených krátkých ramen (obvykle) nevzniká chromozom a tato sekvence je ztracena. Původní množství genetické informace tak není úplně zachováno, ale nosič této transloka-

ce nemá žádné klinické projevy (krátká ramena nesou geny jen pro rRNA, které se vyskytují i na ostatních akrocentrických chromozomech) (Snustad, 2017).

Reciproká translokace

Reciproké translokace jsou vzájemné výměny segmentů mezi dvěma nebo více nehomologními chromozomy se zlomy mimo centromerickou oblast. Počet chromozomů zůstává stejný. Např.: nejčastější translokace v klinické genetice je $t(11;22)(q23;q11)$ (Kurahashi, 2010).

1.3.3 Uniparentální dizomie

Uniparentální dizomie (UPD) je definována jako přítomnost dvou homologních chromozomů (nebo jejich částí), které pocházejí od jednoho rodiče. Uniparentální dizomie byla popsána např. u části pacientů s Prader – Williho syndromem (UPD mateřská – oba chromozomy 15 pocházejí od matky) a s Angelmanovým syndromem (UPD otcovská – oba chromozomy 15 od otce). Dále UPD chromozomu 14, která vede k mentálnímu postižení jedince (Nussbaum, 2004).

Mechanismů, kterými UPD může vzniknout, je několik. Patrně nejčastějším je ztráta jednoho chromozomu z trizomické zygoty (korekce pomocí Anaphase lag), kdy se ztratí ten chromozom, který je z hlediska rodičovského původu zastoupen jednou. Důkazem tohoto mechanismu je nález mozaiky trizomie 15 při prenatálním vyšetření buněk choriových klků. Opakované vyšetření buněk plodu (amniových buněk) prokázalo normální karyotyp, u dítěte pak byl zjištěn Prader – Williho syndrom s mateřskou UPD. Dalším důkazem existence tohoto mechanismu je popsáný neobvyklý přenos hemofilie z otce na syna, kdy muselo dojít ke vzniku zygoty s XXY chromozomy a pak ke ztrátě mateřského chromozomu X, nebo přenos homologní translokace 22/22 z rodiče na dítě v balancované podobě, kdy se z trizomické zygoty ztratil volný 22. chromozom. Důkazem ztráty chromozomu z trizomické zygoty je i vyšší věk rodičů u dětí s UPD. Dalším možným mechanismem je gametická komplementace (splynutí dizomické a nulizomické gamety – obě vzniklé nondisjunkcí), duplikace chromozomu monozomické zygoty nebo postfertilizační chyba, kdy dojde k postzygotické nondisjunkci a následné duplikaci chromozomu nebo k mitotické rekombinaci (Nussbaum, 2004).

Uniparentální dizomie je jedním z průkazů existence imprintovaných genů – genů, které mají aktivní jen jednu alelu, a to alelu určitého rodičovského původu. Kdyby neexistovaly imprintované geny, velmi pravděpodobně by UPD byla bez klinických projevů a zřejmě mnohé UPD chromozomů, na kterých nejsou imprintované geny, zůstávají nepoznány (Nussbaum, 2004).

Klinické projevy UPD těch chromozomů, které nesou imprintované geny, jsou spojeny s chyběním funkce aktivních alel (Prader – Williho a Angelmanův syndrom), eventuelně s nadbytkem funkce aktivních alel (Beckwithův – Wiedemannův syndrom) při UPD. Existence UPD prokazuje, že pro normální vývoj je potřeba komplementárního působení obou rodičovských sad chromozomů. Za situace, kdy tato podmínka není splněna, dochází k poruchám vývoje i při numericky a strukturně zcela normálním karyotypu, neboť je narušen důležitý mechanismus regulace genové exprese, kterým je imprinting genů (Nussbaum, 2004).

2 MEIÓZA A MITÓZA

MeiÓza a mitÓza jsou označeny pro dvě možnosti dělení se buněk v lidském těle. Při meiÓze vznikají pohlavní buňky a při mitÓze buňky somatické. Při obou typech dělení mohou vznikat chromozomové aberace (Snustad, 2017).

2.1 MeiÓza

MeiÓza je proces redukčního dělení buňky, který probíhá ve dvou po sobě následujících děleních a jehož výsledkem jsou buňky s haploidním (n) počtem chromozomů. Meiotickým dělením vznikají pohlavní buňky (gamety). Význam meiÓzy spočívá v rozdělení chromozomů z daného homologního páru, kdy jsou do pohlavních buněk náhodně vybrány chromozomy maternálního nebo paternálního původu, čímž vzniká genetická variabilita, která je dále posílena rekombinací mezi maternálními a paternálními homology.

Během meiÓzy může dojít ke vzniku gamet s abnormální chromozomovou výbavou (Snustad, 2017).

MeiÓza (gametogeneze) u žen a u mužů probíhá rozlišným způsobem. U mužů dochází k tzv. spermatogenezi a u žen k oogenezi.

Spermatogeneze probíhá v točitých kanálcích testes a z každé diploidní prekurzorové buňky vznikají čtyři rovnocenné spermie. Každý muž je schopen vyprodukovat až stovky milionů spermií denně.

Oogeneze začíná již v embryu, kde se určité buňky diferencují v oogonia. Oogonium brzy vchází do meiÓzy, která se však zastaví v profázi I (primární oocyty). Primární oocyty jsou kryty obalem z buněk zvaným folikul a zůstávají v klidu až do puberty.

Na začátku puberty začne pracovat hormon FSH – folikulostimulační hormon, který periodicky stimuluje jeden z folikulů, aby rostl a dokončil meiÓzu I a začal meiÓzu II. MeiÓza II se ale zastaví v anafázi a z primárního oocyty se stane sekundární. K dokončení ženské meiÓzy dochází až po oplodnění. Na konci každého dělení vzniká polární tělíčko (PB) (Řežábek, 2004).

Oogeneze se liší od spermatogeneze v několika důležitých bodech:

1. Při oogenezi dochází k nerovnoměrné cytokinesi, při které je většina cytoplazmy monopolizovaná jen jednou z dceřiných buněk,
2. zatímco spermie vznikají neustále, dívka má již při svém narození konečný počet oocytů,
3. spermatogeneze je kontinuální, zatímco jedna oogeneze je roztažena v čase na mnoho let a jsou zde dlouhé klidové pauzy,
4. zatímco muži produkují spermie neustále, žena uvolní jen jeden oocyt (nebo vzácněji několik) během jednoho cyklu,
5. hormonální kontrola cyklu u ženy je neobyčejně komplexní (Kočárek, 2006).

2.1.1 Meiotické dělení I

Během prvního meiotického dělení dochází k redukci počtu chromozomů na polovinu, z rodičovské diploidní ($2n$) buňky vznikají dvě dceřiné haploidní (n) buňky. Toto redukční dělení pohlavních buněk je tak zcela odlišné od dělení somatických buněk (mitózy), na rozdíl od druhého meiotického dělení (viz níže).

První fází meiotického dělení I je profáze I, která je oproti profázi v druhém meiotickém dělení mnohem komplikovanější a dělí se na 5 stadií:

- Leptotene, kdy dochází ke spiralizaci vláken DNA a diferenciaci chromozómů.
- Zygotene, kde se vytváří tzv. synaptonemální komplex, který zipovým způsobem spojuje oba homology. Příslušné lokusy se párují vždy vedle sebe. Na konci jsou spárovány všechny homology – bivalenty. Proces tvorby synapse je komplikovanější v případě chromozomových strukturních aberací, kdy jsou při párování homologních oblastí vytvářeny struktury odlišných tvarů (v přítomnosti inverze způsobuje synapse vznik inverzní smyčky, u reciproké translokace vzniká tetraivalent a u Robertsonovy translokace trivalent).
- V pachytene dochází, v místě překřížení, ke zlomu a znovu spojení nesesterských chromatid (chiazmata), a ke crossing-overu, který vede k rekombinaci částí homologů.
- Diplotene, ve kterém dochází k rozrušení synaptonemálních komplexů.

- Diakinéza je přechod do metafáze I. Probíhá zde silná kondenzace chromatid, jejich dělení a uvolnění jejich koncových částí od jaderného obalu. Sesterské chromatidy jsou spojeny v oddálených centromerách obou původních homologních chromozomů. Jaderný obal se rozpadá.

Po dokončení profáze I nastupuje metafáze I, kdy dochází k napojení vláken dělicího vřeténka na centromery chromozomů. Chromozomy se před tím seskupily v ekvatoriální rovině.

Anafáze I je proces, při kterém se dvouchromatidové chromozomy rozcházejí k opačným pólům buňky – jsou přitahovány pomocí dělicího vřeténka.

Poslední fází prvního meiotického dělení nazýváme telofáze I (chromozomy v jádře buňky se despiralizují, vzniká jaderná membrána a jadérko – dělicí vřeténko mizí – buňka se zaškrcuje a dělí se na dvě dceřiné buňky (cytokineze)) (Snustad, 2017).

2.1.2 Meiotické dělení II

Druhé dělení nastupuje po krátké interfázi, při které nedochází k replikaci DNA, pouze k dekonenzaci chromatinu a syntéze RNA a histonů. Následné dělení je průběhem velmi podobné mitóze, viz kapitola 2.2 (Snustad, 2017).

2.1.3 Poruchy meiózy

Poruchy meiózy vedoucí k chromozomově abnormální gametě mají dopad na celý organismus z této gamety počatý. Takto postižené zygoty obvykle ztrácejí viabilitu v časném embryonálním nebo fetálním vývoji, který vede ke spontánnímu potratu. Některé chyby v meióze mohou být nicméně slučitelné se životem, tzv. viabilní trizomie, popř. některé nebalancované translokace, viz kapitola 1. Chromozomové aberace. Tyto poruchy se projeví těžkým postižením – vrozenými vývojovými vadami a/nebo různým stupněm mentálního postižení (Snustad, 2017).

2.1.3.1 Poruchy synapse

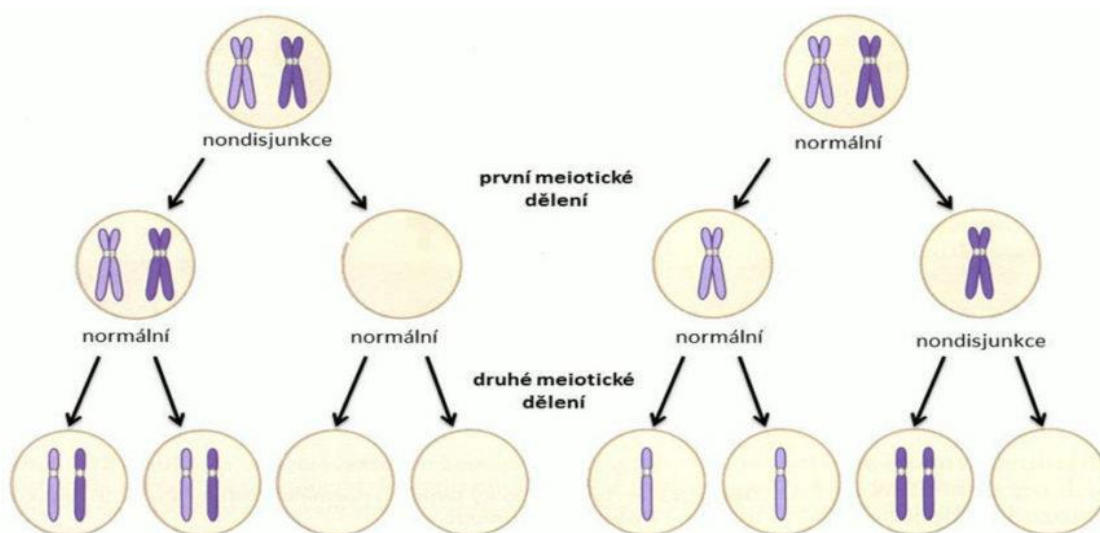
Poruchy párování homologních chromozomů v profázi I (synapse) stojí za vznikem mikrodelečních/mikroduplikačních syndromů, např. syndrom Cri du Chat (delece krátkého raménka 5. chromozomu) nebo Prader-Williho syndrom (delece 15q11-13 na paternálním chromozomu), mikrodelece téže oblasti na maternálním chromozomu způsobuje Angelmanův syndrom (Snustad, 2017).

2.1.3.2 Poruchy dělicího vřeténka

Porucha funkce dělicího vřeténka, která může být způsobena poruchou kinetochoru, vede k nondisjunkci (nesprávnému rozestupu chromozomů do dceřiných buněk), ale také k „anaphase lag“ (zdržení nenapojeného chromozomu/chromatidy v ekvatoriální rovině, vedoucí k chybění chromozomu v jedné z dceřiných buněk) a jiným početním změnám. Při poruše funkce kinetochoru nedochází ke standardnímu oddělení homologických chromozomů (anafáze I) nebo sesterských chromatid (anafáze II). U nosičů balancovaných strukturních aberací může také dojít k chybné segregaci chromozomů do buněk. Tato chyba vede ke vzniku nebalancovaných gamet u potomků. Na obrázku 4 níže je vidět chybný rozestup chromozomů do dceřiných buněk, vlevo je nondisjunkce v meióze I a vpravo v meióze II (Snustad, 2017).

Obrázek 4 – Meiotická nondisjunkce

Zdroj: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/zaklady-genetiky/pohlavni-rozmnozovani-cloveka.pdf>



2.2 Mitóza

Za mitózu označujeme buněčné dělení, při kterém z jedné mateřské diploidní buňky vznikají dvě dceřiné buňky s identickou genetickou výbavou. Tímto způsobem se dělí somatické buňky. Mitóza je poslední fází buněčného cyklu následující za G_2 fází. Zajišťuje růst, diferenciaci buněk a jejich obnovu (Snustad, 2017).

2.2.1 Fáze mitózy

Profáze:

Během této fáze dochází ke spiralizaci vláken DNA a diferenciaci chromozomů, u kterých jsou patrné dvě chromatidy. V závěru této fáze se rozpadá jaderná membrána (přesněji řečeno, včlení se do membránového systému endoplazmatického retikula) a chromozomy se rozptylují v cytoplazmě buňky (Kočárek, 2007).

Centrozom se rozdělí a takto rozdělené centrozomy se začnou vzdalovat a vytvářet dělicí vřeténko (Kočárek, 2007).

Prometafáze:

Pokračuje kondenzace chromozomů a dochází k jejich rozptýlení v celé buňce. Mikrotubuly aktivně vyhledávají chromozomy, ke kterým se připojují prostřednictvím kinetochorů. Kinetochory se nachází párově v oblasti centromery každého chromozomu a připojení k nim musí být bipolární, tzn. mikrotubuly z obou pólů se musí připojit současně (Kočárek, 2007).

Metafáze:

Chromozomy se seskupují v ekvatoriální rovině buňky a vzniká tak charakteristická metafázová destička (chromozomy jsou tvořeny dvěma chromatidami a spojeny centromerou). Tato fáze je nejvhodnější pro pozorování chromozomů a cytogenetická vyšetření (Kočárek, 2007).

Dělicí vřeténko je již plně vyvinuto (Kočárek, 2007).

Anafáze:

Chromozomy jsou v oblasti centromer napojeny na vlákna vycházející z opačných pólů dělicího vřeténka. Centromera se rozpadá na dvě části a chromozomy se rozpadají na dvě chromatidy, které jsou přitahovány k opačným pólům buňky (Kočárek, 2007).

Telofáze:

Chromatidy jsou nahloučeny u buněčných pólů a despiralizují se, vytváří se kolem nich jaderná membrána. Na konci telofáze dochází k zaškrcení buňky a vzniku dvou dceřiných buněk, z nichž každá má jedno nové jádro. Následně buňka vstupuje do G₁ fáze, případně (jde-li o již terminálně diferencovanou, dále se nedělící buňku) může vstoupit do G₀ fáze.

V takovém případě jejich buněčný cyklus končí – buňka plní svoji funkční úlohu (Kočárek, 2007).

2.2.2 Poruchy mitózy

Za postzygotický vznik mozaikového embrya může mitotická chyba (např. nondisjunkce) během stádia rýhování, příčinou přetrvávající aberantní linie (nestability chromozomů) je oslabení kontroly buněčného cyklu – v tomto stádiu je řízen pouze mRNA a proteiny ooplasmy (Nussbaum, 2004).

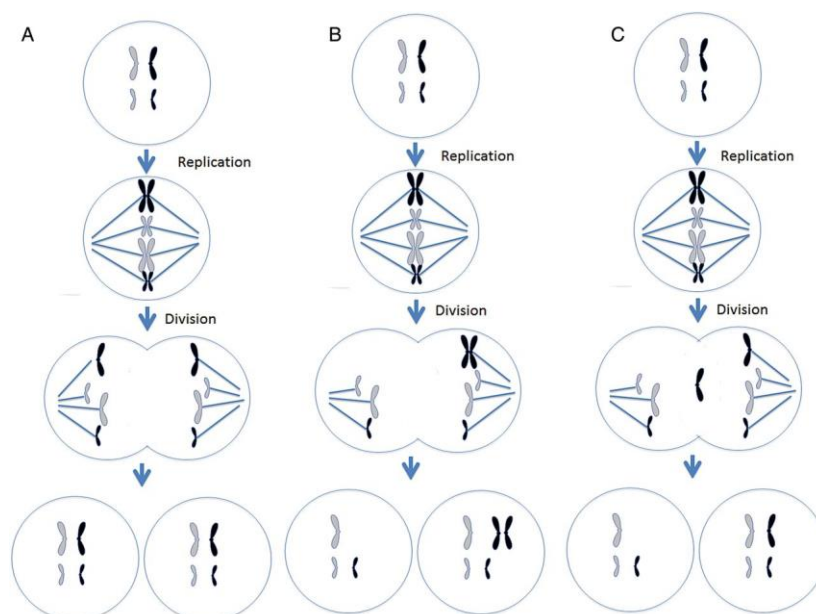
K nondisjunkci během mitózy může vést chyba dělicí vřeténka nebo anaphase lag. Při chybě dělicího vřeténka nedojde ke standardnímu rozestupu chromozomů do dceřiných buněk, ale v jedné buňce bude chromozom chybět a v druhé zase přebývat. Důsledkem je mozaika nebo zánik buňky.

Během anaphase lag se zpomalí nebo úplně zastaví přirozené migrování chromozomů během anafáze, což má za následek vyloučení takových chromozomů z jedné z dceřiných buněk (Nussbaum, 2004).

Obrázek 5 ukazuje správný rozchod chromozomů (A), mitotickou nondisjunkci (B) a mitotický anaphase lag (C).

Obrázek 5 - Chyby mitózy

Zdroj: TAYLOR, Tyl H., 2014



3 ASISTOVANÁ REPRODUKCE

Asistovaná reprodukce je jednou z metod léčby neplodnosti.

Příčinou neplodnosti mohou být problémy na straně ženy i muže a není výjimkou ani kombinace faktorů na obou stranách nebo neplodnost bez zjevné příčiny. Nejdříve je potřeba rozlišit primární a sekundární neplodnost.

Primární neplodnost znamená, že daná žena není schopna otěhotnět do jednoho roku při pravidelném pohlavním styku bez antikoncepčních přípravků nebo není schopna donosit dítě (Doherty, 2006).

Sekundární neplodnost znamená, že v minulosti už k těhotenství a porodu úspěšně došlo, ale další těhotenství se nedaří. Místo termínu neplodnost se lze setkat i s termíny sterilita nebo infertilita. Tato označení znamenají totéž, avšak někdy se používá termín sterilita pro neschopnost páru otěhotnět a infertilita při problémech se schopností donosit plod, nebo při opakovaných potratech (Doherty, 2006).

V České republice za rok 2020 navštívilo lékařské zařízení věnující se léčbě neplodnosti 9 981 párů (ÚZIS ČR, 2020).

Díky metodám asistované reprodukce se daří zajistit vlastní děti párům, kterým se to nepodařilo přirozenou cestou. Manipuluje se při nich vždy se zárodečnými buňkami, v případě IVF s embryi a obvykle se k nim přistupuje po selhání medikamentózní či chirurgické léčby (Doherty, 2006).

Nejčastěji užívanou léčbou neplodnosti pomocí technik asistované reprodukce je *in vitro* fertilizace (IVF), což doslovně znamená oplodnění ve skle, zkumavce. V určitých případech je léčba IVF spojena s provedením preimplantačního genetického testování (PGT, viz kapitola 5) (Doherty, 2006).

3.1 Postup při IVF léčbě

Podáním hormonů jsou stimulovány ženiny vaječníky, takže v nich dozraje více oocytů najednou. Ty jsou pak z vaječnicků biopsií odebrány a později oplodněny mimo tělo ženy. Při odběru oocytů je žena v celkové anestezii. Odběr trvá cca 15–20 minut a provádí se ambulantně. Po zákroku žena dvě hodiny odpočívá na lůžku, a pokud je vše v pořádku, může odejít domů (Doherty, 2006; Řežábek, 2004).

Spermie jsou získávány masturbací nebo metodami MESA či TESE – odebrání přímo z varlat (TESE) či nadvarlat (MESA). Tento zákrok provádí urolog (Doherty, 2006; Řežábek, 2004).

Oplození (fertilizaci) odebraných oocytů je možno provést dvěma způsoby. První z nich (méně častý) je takový, že smísíme oocyt se spermii pouze v Petriho misce a moment oplození je ponechán „přírodě“. Jedna ze spermií se naváže na povrch vajíčka (zona pellucida) a během tzv. akrozomální reakce se postupně propracuje k membráně vajíčka a prostoupí jí, čímž vlastně dochází k oplození. Druhý způsob (mnohem užívanější) zahrnuje intracytoplazmickou injekci spermie přímo do cytoplasmy vajíčka (ICSI); tento způsob fertilizace je povinný v případě následně prováděného preimplantačního genetického testování. Z dvou pohlavních buněk, které obsahovaly každá poloviční (haploidní) genetickou informaci, vzniká diploidní zygota (Doherty, 2006; Řežábek, 2004).

Kultivace oplozených vajíček (zygot) probíhá po dobu 5-6 dnů v laboratoři v inkubátorech/kultivátorech (teplota 37 °C, správná koncentrace O₂ a CO₂), kde jsou pod neustálým dohledem a jejich vývoj je zapisován a hodnocen embryologem.

Následujícím stádiem vývoje je rýhování, které obvykle zahrnuje asi 3 nebo 4 replikační cykly (buněčná dělení). V prvním cyklu vzniká dvoubuněčné embryo, při druhém čtyřbuněčné, po třetím dělení se morula (připomíná tvarem i velikostí plod moruše, odtud vznikl název morula) skládá z osmi buněk zvaných blastomery a po čtvrtém obsahuje šestnáct buněk. Asi 3. den po oplození je rýhování dokončeno (Řežábek, 2004).

V průběhu dalšího vývoje se zona pellucida (stále přítomná na povrchu moruly) stává mnohem propustnější. Tím se do vnitřní buněčné masy moruly dostane velké množství tekutiny a vznikají mezibuněčné prostory vyplněné vodou, ze kterých se nakonec zformuje tzv. blastocoel. Tímto okamžikem (v 5.-6. den vývoje) se morula mění v blastocystu. V blastocystě jsou přítomné dvě skupiny buněk: vnější masa – trofoektoderm, ze kterého vzniká později placenta, a tzv. vnitřní buněčná masa, ze které vzniká plod (Řežábek, 2004).

Následně jsou vybrána vhodná embrya k transferu do dělohy matky. V tuto dobu nastává těžký úkol pro embryologa, musí vybrat nejvhodnější embryo. Samotné hodnocení je složité, ale pokud bylo provedeno preimplantační genetické testování aneuploidii, embryo

první volby je euploidní embryo a za ním jsou embrya, která byla hodnocena podle morfologických znaků a označena za vhodná k transferu (Řežábek, 2004).

Embryotransfer, tedy přenesení embrya do dělohy ženy, je posledním krokem umělého oplodnění. Embryo se přenáší tenkou kanylou přes děložní hrdlo do dělohy ženy. Zákrok je podobný jako u odběru oocytů, tedy krátký, a u většiny žen se jedná o nebolestivý ambulantní výkon (Řežábek, 2004).

Po přenesení do dělohy se blastocysta vyživuje jejím sekretem, až dojde k jejímu přichycení k epitelu endometria a k postupnému uhnízdění (nidaci neboli implantaci) (Řežábek, 2004).

4 EMBRYONÁLNÍ MOZAICISMUS

Mozaicismus je u lidských embryí vzniklých procesem IVF častý jev (Vanneste, 2009). Jako mozaiku označujeme embryo s více než jednou buněčnou linií s jinou chromozomovou (genetickou) výbavou, která ovšem pochází ze stejné zygoty.

4.1 Preimplantační vývoj a mozaicismus

Pokud se embryo vyvíjí s několika buněčnými liniemi, lze rozlišit tři druhy mozaicismu, a to mozaiku (embryo) s euploidní a aneuploidní linií, mozaiku bez euploidní linie (bez normálního počtu chromozomů) (tzv. aneuploid-aneuploidní mozaika). Třetím druhem mozaiky je embryo s mixoploidii (mozaika různých počtů haploidních chromozomových sad) (Queremel, 2023).

Příčinou vzniku embryonálních mozaik je nejčastěji mitotická chyba (nondisjunkce či anaphase lag, viz kapitola 2.2.2). Přírozená chromozomová nestabilita během procesu rýhování moruly je způsobena „oslabením“ kontroly buněčného cyklu před aktivací embryonálního genomu, který je řízen pouze mRNA a proteiny ooplasmu (Queremel, 2023). V den 3 od oplození lze zachytit mozaicismus až u 90 % embryí (Vanneste, 2009). Zajímavostí je, že u embryí dochází k postupnému vyhojení mozaik a v den 5 od oplození nalézáme pouze 30 % mozaicismus (Munné, 2016).

4.2 Implantace a postimplantační vývoj mozaik

Postimplantační vývoj lidských mozaikových embryí nemůže být přímo experimentálně studován, nicméně z velmi nízké incidence mozaikových nálezů v prenatalních a postnatalních vyšetřeních (Greco, 2015) lze usuzovat, že abnormální linie dále postupně mizí.

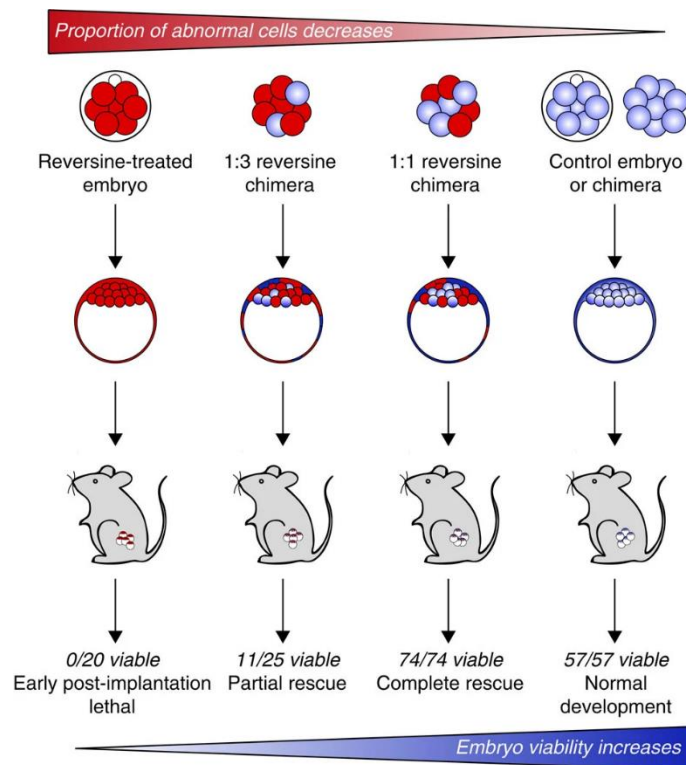
Pro ověření šance na implantaci embrya s mozaikou byl udělán pokus na myších chimérických modelech, kde byla studována implantace embryí s různým zastoupením mozaik a následně se sledoval jejich postimplantační vývoj, viz obrázek 6 (Bolton, 2016).

Pro pokus byla uměle vytvořena „mozaiková“ myší embrya (ve skutečnosti chiméry „normálních“ embryí a embryí po působení reversinu (inhibitor kontrolního bodu sestavení dělicího vřeténka), a to v poměru 1:1 a 1:3). Během implantace embryí „1:1“ byla zjištěna stejná (100%) úspěšnost implantace jako u normálních embryí (bez jakékoli abnormální linie); to už ale neplatilo u chimér v poměru 1:3, kde došlo k pouze částečně úspěšné implantaci.

Postimplantační vývoj byl plně úspěšný pouze u embryí s $\leq 50\%$ zastoupením abnormálního klonu. Zastoupení abnormální linie dále významně klesalo, avšak přetrvávalo (s rovnoměrným rozložením) (Bolton, 2016).

Obrázek 6 - Myší chimérické modely

Zdroj: Bolton, 2016



Studie Fragouli et al. (2017) se zabývala NGS re-analýzou archivovaných vzorků embryí, které byly dříve užívanou vyšetřovací technikou označeny za euploidní a transferovány. U části z nich (44) byla re-analýzou nalezena euploid-aneuploidní mozaika. Úspěšnost vývoje těchto embryí byla porovnána se skupinou embryí, potvrzených NGS jako euploidní (51). U mozaikových embryí bylo nižší procento implantace než u euploidních embryí (30,1 % vs 55,8 %). Potrat byl u 55,6 % mozaik oproti 17,2 % u euploidních embryí, pokračující těhotenství bylo u 15,4 % mozaik vs 46,2 % u euploidních embryí. Tyto výsledky ukázaly, že mozaiková embrya mají šanci na úspěšnou implantaci a narození dítěte, ale tato šance je nižší než u euploidních embryí. Bohužel zde nebyl ani v jednom případě prenatalně či postnatálně vyšetřen karyotyp plodu/novorozence.

4.3 Rizika u mozaik

Výše uvedené studie dávají šanci k transferům mozaikových embryí, nicméně je nutno respektovat rizika s tím spojená.

Těmito riziky jsou neúspěšná implantace embrya, potrat nebo narození dítěte s genetickou vadou. Stále se jedná o mozaiku několika buněčných linií, u které je nižší šance na implantaci a následné těhotenství než u plně euploidního embrya a ani podrobné prenatalní vyšetření plně nevyločí přítomnost dané chromozomové abnormality ve tkáni plodu/dítěte, tedy zde je stále (nízké) reziduální riziko, že by narozené dítě mohlo být postižené (tj. s vrozenými vývojovými vadami, mentální retardací apod.).

Rizika vyplývají z vyšetření jenom malého množství buněk (5-8 buněk) trofoektodermu (budoucí placenty) a nevíme přesné rozložení buněk linií, jestli se jedná o pravidelné nebo nepravidelné rozložení, nález v odebraném vzorku tedy nemusí být informativní pro celé embryo.

Embryotransfer mozaikového embrya s sebou nese výše zmíněná rizika, která by měla být prokonzultována s pacientkou/párem a klinickým genetikem. Po konzultaci by pár měl podepsat informovaný, písemný souhlas s transferem mozaikového embrya, který zahrnuje detailní vysvětlení daného jevu a rizika s ním spojená.

Pár dostává podepsáním informovaného souhlasu doporučení o provedení invazivního prenatalního vyšetření z plodové vody (aminocentéza), která umožňuje vyšetření karyotypu plodu a nejlépe vyloučí přítomnost mozaiky.

Pro ověření vymizení abnormální linie by byla velice vhodná i postnatální analýza karyotypu narozeného dítěte. Postnatální analýzu však bohužel vždy není možno provést pro obtížnou dosažitelnost pacientů po ukončení IVF léčby a porodu zdravého dítěte.

4.4 Klinická doporučení k transferům/nálezům mozaikových embryí

Transfery mozaik se stávají běžným standardem a je možné je transferovat při zohlednění rizik a při respektování doporučení od odborných společností.

Podle Position statement (PGDIS, 2016) by pacienti měli být informováni o možných mozaikových nálezech při PGT a potencionálních rizicích. Dále by měli být informováni o riziku misdiagnózy plynoucí z vyšetření malého počtu buněk.

Reportování mozaik je možné, pokud je biotrováno více než 5 buněk trofoektodermu, je omezeno užití laseru při biopsii, je užitá validovaná platforma sekvenování nové generace (NGS) a pokud jsou reportovány euploid-aneuploidní mozaiky v rozmezí 20-80 %.

Vždy by pro transfer měla mít přednost euploidní embrya.

Tento Position statement vytvořil i návrh prioritizace mozaikových embryí pro transfer a to takto: vždy upřednostnit mozaiku monozomie před trizomií (s výjimkou monozomie 45, X), pokud se jedná o mozaiku trizomie, vzít do úvahy zastoupení abnormální linie, nejnižší prioritu mají mozaiky s trizomií chromozomů 13, 18 a 21 (tzv. viabilní trizomie) a chromozomů 14, 15 (pro riziko uniparentální dizomie) (PGDIS, 2016).

CoGEN Statement 2016 přišel s několika doplněními: netransferovat „komplexní“ mozaiky, v případě těhotenství požadovat provedení prenatalní diagnostiky z buněk plodové vody a, pokud je to možné, po narození dítěte doplnění i postnatální diagnostiky. Dále, pár musí podepsat informovaný, písemný souhlas s transferem. Vzhledem k možné skryté přítomnosti trizomické linie je třeba považovat za rizikové i mozaiky monozomií (zejména u chromozomů 13, 14, 15, 18, 21) (CoGEN, 2016).

Podle PGDIS Position statement z roku 2019 je incidence mozaikových embryí vyšetřovaných metodou NGS vysoce variabilní a pohybuje se mezi 2 % - 40 %. Pokud by se měla transferovat mozaika, tak pouze nízko riziková. Embrya s potencionální UPD by měla mít rovněž nízkou preferenci (Cram, 2019).

Position statement PGDIS z roku 2021 doplňuje, že stále přetrvává nejistota spojená s transferem mozaikových embryí a důsledkem toho je, že spousta IVF klinik se tomuto transferu vyhýbá.

Chromozomové mozaiky, které jsou nižší než 20 % lze reportovat jako euploidní, změny nad 80 % zase jako aneuploidní. Některé laboratoře mají jinak stanovené hodnoty (30 %/70 %), což vede k nepřesným reportům nálezů.

Laboratoře by neměly mozaiková embrya klasifikovat jako plně aneuploidní, ale měli by jim dát šanci k transferu.

IVF kliniky by měli bioptovat 5–10 buněk a měly by dbát na zásady správného odběru a minimalizovat poškození genetického materiálu.

Dále se doporučuje prenatální diagnostika u všech těhotenství, která vznikla po IVF cyklu a u všech těhotenství, kde bylo indikováno vyšetření PGT-A (Leigh, 2022).

5 PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÉ TESTOVÁNÍ

Preimplantační genetické testování (PGT) je v některých indikovaných případech součástí IVF léčby. Cílem tohoto vyšetření je nalézt vhodné embryo bez genetických vad a onemocnění ještě před samotným transferem do dělohy ženy. V odborné literatuře se můžeme setkat i se staršími názvem, a to preimplantační genetická diagnostika (PGD) nebo preimplantační genetický screening (PGS).

5.1 Odběr materiálu

Pomocí biopsie lze pro PGT odebrat tři druhy materiálu. Jedná se o odběr pólových tělísek, blastomer nebo trofoektodermu (TE). Každý typ odebraného materiálu má své výhody a nevýhody, které budou popsány níže.

První typ materiálu pro preimplantační testování jsou pólová tělíska (PB), jejichž biopsie probíhá ve dnech 0 (PB1) a 1 (PB2) po oplození. PB obsahují jen malé množství genetického materiálu pro vyšetření, je to tím, že PB1 má jen 23 dvou chromatidových chromozomů a PB2 pouze 23 jedno chromatidových chromozomů. Malé množství vstupního materiálu znamená zvýšené riziko selhání následné analýzy. Dále je tu riziko poškození dělicího vřeténka a odběr musí být naplánovaný společně s intracytoplazmatickou injekcí spermií (ICSI). Z pólových tělísek lze získat a vyšetřit pouze maternální jaderný genom, což omezuje možnosti preimplantačního testování. Karyomapping, který představuje „zlatý standard“ pro preimplantační genetické testování monogenních onemocnění, pro nepřítomnost paternálního genomu nelze provést vůbec. Z toho vyplývá, že pólová tělíska jsou nejméně vhodný materiál a jejich odběr se již skoro neprovádí (Brdička, 2020).

Biopsie blastomery se provádí 3. den od oplození, kdy se embryo nachází ve stavu rýhování. Bezpečnost odběru je vysoká. Odebírá se pouze jedna buňka (výjimečně dvě b.), ze které se zjistí choroby spojené s maternálním i paternálním genomem. Biopsie blastomery má několik nevýhod: odebírá se pouze jedna diploidní buňka (výjimečně dvě), je zde tedy větší množství materiálu pro analýzu než u PB, ale stále výrazně menší než u trofoektodermu (TE, viz dále) a vyšetření je tedy stále poměrně obtížné (nicméně výsledky preimplantačního genetického testování strukturních chromozomových aberací (PGT-SR) a preimplantační genetické testování monogenních onemocnění (PGT-M) jsou plně validní). Další nevýhodou je nemožnost provést spolehlivé PGT-A, protože z jedné (ani ze 2

buněk) není možné zachytit mozaiku (zdánlivě euploidní nebo aneuploidní nález může znamenat mozaikové embryo).

Všechny tyto nevýhody ale ztrácí odběr trofoektodermu. Biopsie je sice náročnější na provedení, ale stále bezpečná pro embryo. Odběr se provádí 5. až 6. den po oplození, kdy lze bioptovat více buněk (cca 5-8), čímž se získá více materiálu vhodného pro náročnější analýzu. Trofoektoderm je nejvhodnější genetický materiál i pro PGT-A, které je zde již dobře proveditelné, protože je k dispozici několik buněk pro vyšetření a nejmenší výskyt mozaik; výsledek je proto nejrelevantnější – jak pro meiotické, tak pro mitotické změny (Brdička, 2020).

5.2 Druhy preimplantačních testů

Preimplantační genetické testování (PGT) můžeme rozdělit do tří specializací. Pro nalezení sporadických aneuploidií v embryu slouží preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A). K nalezení familiárních monogenních onemocnění se využívá preimplantační genetické testování monogenních onemocnění (PGT-M) a nebalancované familiární strukturní chromozomové aberace odhalí preimplantační genetické testování strukturních chromozomových aberací (PGT-SR).

5.2.1 Preimplantační genetické testování aneuploidií

Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A) se zabývá vyšetřením a následným záchytem *de novo* vzniklých embryonálních aneuploidií, nejedná se tedy o chromozomální přestavby, které by byly geneticky děděny po rodičích. Skoro za polovinu spontánních potratů můžou vzniklé aneuploidie, tudíž patří mezi nejčastější důvod potratu (Harris, 2020).

Indikací k vyšetření PGT-A je několik. Patří sem např. vyšší věk ženy (třicet pět a více let), opakované potraty, neúspěšné embryotransfery během předchozích cyklů IVF, potrat nebo porod dítěte s vývojovou vadou, abnormální spermogram partnera nebo onkologické onemocnění a léčba chemoterapií nebo ozařováním (SLG ČLS JEP, 2014).

Pro vyšetření PGT-A se ukázala jako nejvhodnější analýza pomocí NGS, které se zdá být nejvhodnější, protože metoda má dobrý záchyt mozaik a vyšetřovány jsou všechny chromozomy. Dále lze využít i array komparativní genomovou hybridizaci (aCGH), array detekující jednonukleotidové polymorfismy (aSNP) a fluorescenční *in situ* hybridizaci

(FISH), které už však nejsou tak specifické a/nebo citlivé, viz také kapitola 6. Vyšetřovací metody používané pro PGT (Harris, 2020).

5.2.2 Preimplantační genetické testování strukturních chromozomových aberací

Vyšetření preimplantační genetické testování strukturních chromozomových aberací (PGT-SR) je vhodné pro páry, kdy jeden z budoucích rodičů je nositelem balancované chromozomové přestavby.

V karyotypu nositele balancované chromozomové aberace je tedy možné narazit např. na translokaci bez ztráty genetického materiálu, ale s velkým rizikem pro potomstvo v důsledku rizika chybné segregace, která vede ke vzniku nebalancovaných forem translokace v gametách během meiotického dělení, viz kapitola 2.

Pro detekci těchto nebalancovaných forem se nyní nejvíce užívá NGS, další metodou mohou být aCGH a aSNP. Pro menší přestavby je někdy nutno použít metodu FISH. S PGT-SR se zároveň provádí i PGT-A pro vyloučení aneuploidií *de novo* (Harris, 2020).

5.2.3 Preimplantační genetické testování monogenních onemocnění

Mezi monogenní onemocnění řadíme ta, která jsou geneticky přenášena z rodiče na potomka s klasickým monogenním vzorem dědičnosti. Jedná se konkrétně o autozomálně dominantní, autozomálně recesivní nebo o X-vázaná onemocnění. Rodina o riziku před provedením PGT-M vždy ví, a v některých případech dokonce podstupují IVF léčbu i zcela plodné páry právě pro možnost provedení PGT-M.

Rodina s takovou genetickou zátěží se uchyluje k vyšetření PGT-M, aby zajistila transfer embrya, které tuto mutaci nenese a je tudíž zdravé.

Vyšetřovací metodou první volby („zlatým standardem“) pro PGT-M je v současnosti aSNP, resp. metoda Karyomapping. Nově může být vyšetření provedeno i sekvenováním nové generace (NGS). Dříve bylo běžně prováděno pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce), eventuálně metodou FISH (pouze selekce pohlaví u X-vázaných onemocnění), viz kapitola 6. Vyšetřovací metody používané pro PGT (Harris, 2020).

Společně s PGT-M se obvykle provádí i PGT-A abychom vyloučili možné *de novo* vzniklé chromozomové změny (Harris, 2020).

6 VYŠETŘOVACÍ METODY POUŽÍVANÉ PRO PGT

6.1 Sekvenování nové generace

Sekvenování nové generace (Next generation sequencing – NGS) předcházelo Sangerovo sekvenování, které bylo vyvinuto v roce 1977 Frederickem Sangerem. Brzy bylo Sangerovo sekvenování nedostačující, a proto muselo vzniknout masivně paralelní sekvenování neboli sekvenování nové generace (Zhong, 2021).

6.1.1 Princip metody

Existují různé platformy NGS, níže je popis aktuálně nejrozšířenější platformy Illumina.

Vyšetření NGS je složeno ze čtyř kroků: příprava knihovny, amplifikace na flow-cell, samotné sekvenování a následná analýza.

Prvním krokem je příprava knihovny. Tento krok zahajujeme fragmentací DNA, poté musí dojít k ligaci adaptérů ve směru 5' -> 3'. Může být provedena i tzv. indexace, která slouží k odlišení vzorků od různých pacientů. Vzorky jsou amplifikovány a přečištěny. Při jiném typu NGS, než celogenomovém je dále prováděn tzv. enrichment (nabohacení určitých oblastí genomu pro vyšetření panelu genů, atd.).

Druhým krokem je amplifikace na flow-cell, která probíhá uvnitř analyzátoru. Fragmenty DNA, připravené v předchozím kroku, jsou přichyceny na povrch flow-cell. Pomocí bridge PCR jsou všechny fragmenty vyšetřované DNA přichycené na flow-cell mnohonásobně zmnoženy, což je zásadní pro optickou detekci popsanou níže.

Po amplifikaci přichází na řadu samotné sekvenování. Ke každému fragmentu je syntetizováno komplementární vlákno, které je zakončeno chemicky upraveným nukleotidem. Každý nukleotid vyzařuje jinou fluorescenční barvu, která je snímána a tím je určeno pořadí bází v sekvenci (tzv. sekvenace syntézou). Zjištěná sekvence odpovídá původnímu vláknu vyšetřované DNA.

Posledním krokem NGS je analýza. Detekovaná DNA se porovná s lidským genomem a přiřadí se k odpovídajícímu regionu genomu. Dle typu experimentu je provedena následná SW analýza, která může nacházet sekvenční změny v určitém genu, panelu genů nebo celém genomu. Zároveň může být provedena i tzv. analýza počtu kopií (CNV, z angl.

Copy Number Variant), tedy detekce ztrát či duplikací genetického materiálu, tj. nebalancovaných chromozomových aberací (Illumina, 2017b).

6.1.2 Využití v preimplantačním testování

Aktuálně patří sekvenování nové generace mezi nejvíce využívané metody v preimplantačním testování, a to pro PGT-A a PGT-SR. Abychom mohli vyšetřit nebalancované chromozomové aberace, např. aneuploidie nebo strukturní přestavby, pomocí NGS, je zapotřebí nejprve provést celogenomovou amplifikaci (WGA) a poté použít tzv. low-pass (technika, kdy není každá báze celého genomu několikrát sekvenována) CNV NGS (Ye, 2021). Tato metoda je schopna analyzovat všech 23 párů chromozomů zároveň. NGS dokáže sekvenovat mnoho vzorků PGT současně, na platformě VeriSeq od firmy Illumina lze např. sekvenovat 24 vzorků, v průběhu jednoho vyšetření. Díky těmto vlastnostem je NGS ekonomicky výhodné (finančně efektivní). NGS oproti dřívějším metodám dává možnost detekovat mozaiková embrya.

Při kombinaci low-pass celogenomové CNV analýzy s podrobnějším namnožením určitého genu/ů je možno NGS (v budoucnu) použít pro PGT-M kombinované s PGT-A a případně i s PGT-SR (Brdička, 2016).

6.2 Array komparativní genomová hybridizace

Komparativní genomová hybridizace na čipu neboli arrayCGH (aCGH) slouží k vyšetření nebalancovaných chromozomových celogenomových změn (Procházka, 2018).

6.2.1 Princip metody

K vyšetření pomocí aCGH je potřeba dvou vzorků, vyšetřované DNA a referenční DNA s normálním nálezem, které jsou společně hybridizovány na array, kde jsou uchyceny úseky genomové DNA („sondy“). První (vyšetřovaný) vzorek je označen pomocí jednoho fluorochromu a druhý (referenční) vzorek je označen fluorochromem rozdílné barvy. Nejčastěji se používají fluorochromy červené a zelené barvy.

Oba barevně označené vzorky se smíchají ve stejném poměru a celá směs se hybridizuje na čip. Hybridizace probíhá na základě komplementarity k sondám, které se nacházejí na povrchu čipu. Intenzitu fluorescence obou fluorochromů detekujeme pomocí laserového skeneru a data analyzujeme pomocí speciálního softwaru.

Podle poměru intenzity jednotlivých fluorochromů je detekována ztráta či zisk genetického materiálu, jedná se tedy o CNV analýzu. U aCGH rozlišujeme dva druhy čipů dle použitých DNA sond a jejich využití – BAC čipy a oligonukleotidové čipy. V dnešní době se od BAC arrayí nicméně již ustupuje a jsou používána hlavně oligo aCGH (Brdička, 2016).

„BAC čipy jsou založené na umělých bakteriálních chromozomech o délce cca 80-200 kb. Využití BAC čipů o rozlišení 50-100 kb poskytuje dostatečně intenzivní signály pro detekci chromozomových aneuploidií, chromozomálních přestaveb nebo geneticky nebalancovaných embryí od rodičů s balancovanou translokací, a je tedy vhodná pro screening embryí“ (Brdička, str. 37, 2016).

„Na rozdíl od BAC čipů mají oligonukleotidové čipy kratší sekvence sond. Velikost oligonukleotidových sond se pohybuje v rozmezí od 25 do 85 nukleotidů. Tento typ je velice přesný a má vysoké rozlišení, dokáže zjistit nebalancované změny, které jsou v řádech desítek kilobází. Balancované změny a bodové změny v sekvenci DNA však detekovat nelze“ (Brdička, str. 37, 2016).

6.2.2 Využití v preimplantačním testování

Pro PGT není možno použít čipy s vysokou rozlišovací schopností, neboť vstupním materiálem je embryonální DNA, kterou je před zahájením nutno amplifikovat, což může přinést jisté odchylky. Proto by zde mohly být s výhodou použity BAC čipy.

6.3 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Jedná se o molekulárně-cytogenetickou metodu, která využívá přesně zvolené fluorescenční sondy k rozeznávání počtu kopií v předem vytipovaných lokusech v karyotypu (Snustad, 2017).

6.3.1 Princip metody

Základem pro vyšetření FISH je příprava vzorku, tedy fixace vzorku (cytogenetické suspenze z různých tkání, nativní tkáně, otiskové preparáty atd.) na mikroskopické sklo. Na fixovaném materiálu je provedena „*in situ*“ hybridizace.

Sondy, oligonukleotidy komplementární ke zvolenému vyšetřovanému úseku – centromery, telomery, geny, které jsou fluorescenčně označeny, se přidávají hned na začátku k dehydratovanému vzorku.

Denaturace vzorku a sondy probíhá na ohřívací destičce při teplotě 70-80°C. Stěžejním roztokem je formamid, který významně pomáhá snížit teplotu potřebnou k denuraci. Bez formamidu bychom museli dosáhnout teploty 90-95°C. Čas denaturace je různý, liší se druhem sondy, ale neměl by překročit limit 5 minut. Kdyby byla vyšetřovaná DNA vystavena vyšší teplotě delší dobu, mohlo by dojít k rozpadu jejích vnitřních struktur. Někdy se denaturace sondy a vzorku provádí zvlášť (Kočárek, 2007).

Po denuraci následuje hybridizace, kdy dochází k navázání sondy na DNA vyšetřovaného vzorku. Tento proces může trvat od půl hodiny až po celý den, záleží na konkrétním typu sondy. Celý proces hybridizace probíhá v termostatu při teplotě 37 °C (Kočárek, 2007).

Nespecifické signály (pokud se sonda navázala na úsek DNA, který není zcela komplementární) je potřeba opatrně odstranit za použití horkého pufovaného solného roztoku.

Předposledním krokem je podbarvení interfázních jader pomocí barviva DAPI.

Následuje už pouze vyhodnocení preparátu pod fluorescenčním mikroskopem (Kočárek, 2007).

6.3.2 Využití v preimplantačním testování

Pro PGT je vzorek připraven z nedělicích se buněk embrya, které jsou fixovány na podložní sklo a jsou dehydratovány pomocí vzestupné řady alkoholů.

V preimplantačním testování dříve FISH hrála velkou roli při PGT-A a PGT-SR. Metoda dokáže detekovat nebalancované přestavby způsobené chybnou meiotickou segregací u všech typů reciprokových i robertsonských translokací (PGT-SR). U PGT-A bylo vyšetření prováděno obvykle pro chromozomy 13, 18, 21, X a Y, někdy rovněž i pro chromozomy 15 a 16. V úplných počátcích PGT byla FISH využívána pro selekci pohlaví u X-vázaných monogenních onemocnění.

Nyní je FISH používána pouze pro detekci nebalancovaných forem strukturních familiárních přestaveb, které jsou malého rozsahu a nejdou vyšetřit pomocí NGS (Hrubá, 2021).

6.4 Polymerázová řetězová reakce

V roce 1983 dospěl K. Mullis k objevu polymerázové řetězové reakce, zkráceně PCR. Jednalo se o revoluční objev, který slouží k amplifikaci vybraného úseku DNA *in vitro*. K amplifikaci určitého úseku je potřeba znát sekvence nukleotidů, které chceme vyšetřit a sekvence, které tomuto úseku předcházejí (Šmarda, 2005).

6.4.1 Princip metody

Základním principem PCR je opakovaná řízená denaturace dvouřetězcové DNA a následná renaturace osamocených řetězců se specifickými oligonukleotidy, které jsou v reakční směsi v nadbytku. Tyto oligonukleotidy slouží jako primery pro syntézu nového řetězce DNA. Amplifikace DNA probíhá v opakujících se cyklech, které mají tři kroky.

Prvním krokem je denaturace. Zahřátím DNA na teplotu kolem 95 °C se rozpadnou vodíkové můstky mezi vlákna DNA, čímž se dvouvláknová DNA rozdělí na jednovláknovou DNA (Šmarda, 2005).

Druhým krokem je tzv. annealing (hybridizace primerů na komplementární cílové úseky vyšetřované DNA). Probíhá nejčastěji při teplotách kolem 50–60 °C. Molekuly jednořetězcové DNA po ochlazení opět renaturují. Pokud jsou ve směsi v nadbytku specifické oligonukleotidy, budou hybridizovat se svou komplementární sekvencí rychleji než dlouhé jednořetězcové molekuly, jejichž koncentrace je mnohem nižší. Teplota, při níž hybridizace probíhá, je pro výsledek PCR kritická a musí být vhodně nastavena pro použitý pár primerů. Při příliš nízké teplotě mohou primery nasedat i na sekvence, které jsou komplementární jen z části, a vytvoří se tak nespecifický produkt. Při příliš vysoké teplotě zase budou primery málo hybridizovat a produktu se nevytvoří dostatečné množství (Šmarda, 2005).

Posledním krokem je elongace. Syntéza nových řetězců probíhá při teplotě 65–75°C. Oligonukleotidy, které dosedly na jednořetězcovou DNA (templát) v předchozím kroku, slouží v tomto kroku jako primery pro DNA-polymerázu. Od jejich 3' konce začíná syntéza nového řetězce komplementárního s templátem (Šmarda, 2005).

Po prvním cyklu PCR se počet řetězců DNA ve směsi zdvojnásobí. V dalším cyklu mohou jako templát pro polymerázu sloužit i nově vytvořené řetězce, takže se nasyntetizuje dvojnásobné množství produktu. Při opakujících se cyklech bude množství vytvořených řetězců přibývat exponenciálně (Šmarda, 2005).

6.4.2 Využití v preimplantačním testování

Využití PCR je možné i v preimplantačním genetickém testování při vyšetřování monogenních onemocnění (PGT-M). Analýza je vždy založena na nepřímé diagnostice, tedy využití detekce několika polymorfismů ve vazbě s kauzální mutací. V tomto případě jsou vyšetřovány tzv. krátké tandemové repetice (STR markery). PCR se takto využívala pouze na počátku preimplantačního testování.

Aktuálně se PCR využívá pro celogenomovou amplifikaci (před NGS, aCGH, aSNP) a zároveň se opakovaně uplatňuje při přípravě NGS knihovny a sekvenace (Harris, 2020).

6.5 Array detekující jednonukleotidové polymorfismy

SNP array je molekulárně cytogenetická metoda, která umožňuje zjistit kromě celochromosomových aneuploidií, rozsáhlých delecí či duplikací a nebalancovaných submikroskopických aberací (desítky až stovky kilobází) také oblasti homozygotity (neboli oblasti ztráty heterozygotity) (RepromedaLab, 2020).

6.5.1 Princip metody

Základním principem metody aSNP je amplifikace, fragmentace a precipitace DNA vzorku, která hybridizuje k jednořetězcovým oligonukleotidovým sondám DNA ukotveným na partikulích rozestých v komůrkách čipu. K detekci jednonukleotidových polymorfismů vzorku dochází mechanismem jednobazové extenze využívající DNA vzorku jako templát a inkorporující fluorescenčně značené nukleotidy. Intenzity signálů obou fluorochromů se odečítají pomocí skeneru a vyhodnocují se softwarem k tomu určeným. Porovnání s referencí probíhá *in silico* (RepromedaLab, 2020).

6.5.2 Využití v preimplantačním testování

Na principu aSNP je založen Karyomapping, metoda umožňující na základě detekce jednonukleotidových polymorfismů provést haplotypovou analýzu, která je podkladem pro nepřímou diagnostiku monogenních onemocnění (RepromedaLab, 2020).

Karyomapping je označován za „zlatý standard“ preimplantačního genetického testování monogenních onemocnění.

PRAKTICKÁ ČÁST

7 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

7.1 Hlavní cíl

Zhodnotit zastoupení mozaikových embryí v souboru dat PGT-A (2016–2022).

7.2 Dílčí cíle

1. Zhodnotit zastoupení úspěšně vyšetřených embryí.
2. Zhodnotit podíl embryí s vysoce rizikovou mozaikou.
3. Zhodnocení výsledků u embryotransferu mozaikových embryí.
4. Prezentace kazuistik – transferů mozaikových embryí.

8 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

1. Jaké bylo zastoupení mozaikových embryí při vyšetření PGT-A v letech 2016-2022?
2. Kolik bylo celkově úspěšně vyšetřených embryí?
3. Jaký byl podíl embryí s vysoce rizikovou mozaikou?
4. Jaká byla úspěšnost embryotransferů u mozaikových embryí?
5. Jaké byly výsledky u kazuistik?

9 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

K ověření všech cílů této bakalářské práce byla využita data vyšetření PGT v Laboratoři reprodukční genetiky Genetika Plzeň s.r.o. (resp. v Genetické laboratoři IVF Zentren Prof. Zech – Pilsen) za roky 2016-2022.

Bylo vyšetřeno 493 pacientek/párů. Věk pacientky v době vyšetření byl v průměru 38,9 let (medián věku 39,5 let). Mezi hlavní indikace k vyšetření PGT-A byl vyšší věk matky, opakované potraty nebo opakované neúspěšné implantace embrya. Všechna vyšetření byla provedena vždy s informovaným souhlasem, který obsahuje souhlas i s anonymním použitím výsledků v medicínském výzkumu.

Celkově bylo vyšetřeno 2 775 embryí. K analýze byly použity buňky trofoektodermu, které byly odebrány v 5.-6. den embryonálního vývoje v různých IVF centrech (Rakousko, Itálie, Česká republika). Převážně se jednalo o IVF centra Next-Clinics v Evropské unii, event. o další žadatele mimo tuto síť.

10 METODIKA PRÁCE

Metodika (včetně podmínek odběru vzorků) vychází z laboratorní příručky PGT (Hrubá, 2021), standardních operačních postupů (SOP) vyšetřovacích a pracovních postupů, které jsou používány v Genetika PLZEŇ s.r.o. (interní neveřejná dokumentace) a navazují na postupy doporučené výrobcem používaných reagensů – Illuminou (Illumina, 2021, 2020, 2017a, 2017b, 2018 a 2014).

10.1 Druh a odběr vzorku

Před samotným odběrem vzorku pro vyšetření PGT podstupuje pacientka IVF léčbu – ovariální stimulaci, odběr oocytů, in-vitro oplodnění a event. kultivaci embryí (viz kap. 3.1). Biopsie polárních tělísek nebo embryí se provádí v IVF centrech. Genetická laboratoř přijímá pro PGT-A tyto vzorky: 1. a 2. polární tělísko, bioptované 0. a 1. den vývoje embrya, blastomery či více blastomer, které je potřeba bioptovat 3. den vývoje embrya a trofoektoderm, odebíraný 5.-6. den vývoje embrya a odebírá se přibližně 5-8 buněk.

10.2 Příprava odběrového pufru

Po odběru je bioptát vložen do připraveného odběrového pufru, dodávaného genetikou laboratoří. Odběrový pufr se připravuje z fosfátového pufru PBS a je uchováván v lednici při teplotě 2-8 °C. Před expedicí pufrů do IVF center Genetická laboratoř vždy kontroluje čistotu pufrů provedením celogenomové amplifikace (WGA, viz také níže).

10.3 Zvláštní opatření při manipulaci se vzorky

Každý úkon potřebný k vyšetření vzorku je prováděn v odlišných prostorách, a to z důvodu, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku cizorodou DNA a ke kontaminaci přístrojového vybavení. Pokud by se tak stalo, výsledek vyšetření by mohl být zkreslený, nebo by mohlo celé vyšetření selhat. Abychom předešli této situaci a vyšetřovaná DNA se nekontaminovala, je nutné dodržovat několik následujících pravidel:

- Používat jednorázové ochranné pomůcky – tj. ochranný plášť, rukavice, ústenka, čepice,
- Je vhodné používat rukavice, které neobsahují pudr; při podezření na znečištění je nutné rukavice okamžitě vyměnit,
- Provádět celé vyšetření v laminárním boxu, který je sterilizován UV germicidní lampou (30 min před i po použití),
- Používat dekontaminovaný spotřební materiál a sterilní média, ideálně jednorázové,
- Hlídat, aby nepřišla špička pipety do kontaktu s ničím, co není součástí kroku, který následuje (špička se může dotknout pouze užívané reagentie a vnitřní strany mikrozkušavky), při podezření styku špičky s něčím jiným raději vyměnit stávající špičku za novou,
- Centrifugovat mikrozkušavky vždy poté, co je dovnitř přidána reagentie,
- Nechávat mikrozkušavky otevřené co nejkratší dobu.

10.4 Celogenomová amplifikace

Celogenomová amplifikace (WGA) slouží k namnožení DNA celého genomu. Postup je prováděn dle interních dokumentů Genetika Plzeň, vycházejících z manuálů výrobce (Illumina, 2020).

Počáteční množství materiálu je velice malé (v případě TE 5-8 buněk, u ostatních materiálů méně) v pouhých 2,5 μ l, proto může snadno dojít ke kontaminaci či selhání celé amplifikace. Tomu předcházíme dodržováním protikontaminačních opatření (viz výše) a důsledným přesným postupem práce dle laboratorního protokolu. Při provádění WGA jsou pracovníci povinni dodržovat pravidla, která jsou stanovena pro uskutečnění vyšetření

(enzymy ponecháme v mrazáku a vyndáváme vždy až těsně před jejich použitím, ostatní rozmrazené reagenty (tj. kromě enzymů) a vzorky uchováváme před bezprostředním použitím buď v lednici anebo v namrazeném kryostojánku, během vlastní práce v laminárním boxu (míchání mixů, pipetování ke vzorkům) jsou reagenty (včetně enzymů) i vzorky uloženy v namrazených kryostojáncích (tzv. práce „na ledu“), zásobní enzymy se zásadně nevortexují, promíchají se invertováním nebo poklepáním na zkumavku, ostatní reagenty se jemně vortexují, vzorky se promíchávají poklepáním na zkumavku, invertováním (při větším objemu), event. velmi jemným vortexem, veškeré reagenty a vzorky je nutno stočit, vždy pipetujeme na stěnu mikrozkušavky).

Nedílnou součástí každého běhu WGA jsou povinné tři kontroly:

- P1 – vyředěná genomická DNA, kontrola správnosti provedení amplifikace pracovníkem genetické laboratoře; tzv. pozitivní kontrola (očekáváme vždy získání amplifikačního produktu);
- C – vzorek z poslední promývací kapky náhodně vybraného vzorku, vzorek dodaný embryologem, kontrola čistoty práce v IVF laboratoři (očekáváme „DNA-free“ výsledek),
- N – čistý alikvot odběrového pufru (ze zásob genetické laboratoře), kontrola čistoty reagentů a pufrů použitých při WGA, kontrola čistoty práce v genetické laboratoři; tzv. negativní kontrola (očekáváme „DNA-free“ výsledek).

Postup pro WGA je následovný. Zapneme termocykler a necháme ho přehřát. Vyndáme si kit SurePlex a všechny komponenty, mimo enzymů, a necháme je roztát. Vzorky s kontrolami si stočíme v minicentrifuze po dobu 3 minut při 200 rcf. Stočené vzorky vrátíme do kryostojánku a ke každému vzorku přidáme 2,5 µl extrakčního pufru. Do namrazeného kryostojánku si připravíme čistou mikrozkušavku, dále si vyndáme pufr pro extrakční enzym a z mrazáku vyjmeme extrakční enzym. Dle předpisu v amplifikačním protokolu namícháme extrakční mix. Do každé mikrozkušavky napipetujeme 5 µl extrakčního mixu. Vzorky jemně promícháme, stočíme a ihned vložíme do termocykleru. Spustíme extrakční program.

Do namrazeného kryostojánku si dáme čistou mikrozkušavku, zvertexujeme a stočíme rozmrazený SurePlex pre-AMP pufr, z mrazáku vyjmeme pre-AMP enzym, promícháme a stočíme a připravíme, dle předpisu v protokolu, pre-amplifikační mix. Ihned po skončení extrakčního programu vyjmeme mikrozkušavky a vložíme je do namrazeného kryostojánku (stočíme). Do všech mikrozkušavek přidáme 5 μ l pre-AMP mixu. Vzorky promícháme, stočíme a ihned vložíme do termocykleru. Spustíme pre-AMP program.

Nyní si dle předpisu v protokolu nachystáme AMP-mix. Do čisté mikrozkušavky smícháme rozmrazený amplifikační pufr a Nuclease-free water. Z mrazáku vyjmeme amplifikační enzym, promícháme, stočíme a přidáme do AMP-mixu. Namíchaný AMP-mix promícháme a krátce stočíme. Ihned po skončení pre-AMP programu vyjmeme zkušavky se vzorky z termocykleru, stočíme a vložíme do kryostojánku. Do všech zkušavek napipetujeme 60 μ l AMP mixu. Vzorky promícháme, vložíme do termocykleru a spustíme AMP program.

K ověření správné celogenomové amplifikace se provádí gelová elektroforéza za použití 1,5 % agarózového gelu. Do jednotlivých jamek gelu pipetujeme 7 μ l naamplifikovaných vzorků obarvených „loading dye“. Na gel nanese i kontrolní vzorky. Opět je nutné dbát na čistotu používaných špiček (na každý vzorek použijeme novou čistou špičku). Po ukončení separačního programu vyhodnocujeme pomocí UV transluminátoru a PC. Výsledky zaznamenáváme do protokolu a zároveň pořizujeme fotografii elektroforetických výsledků. Na gelu nejprve zkontrolujeme pozitivní a negativní kontrolu (v případě negativní kontroly a kontroly „C“ bychom neměli vidět žádný naamplifikovaný produkt, u pozitivní kontroly naopak vždy standardní množství produktu tvořící „smear“). Dále vyhodnotíme úspěšnost amplifikace pro jednotlivé embryonální vzorky (optimálně mají stejný výsledek jako pozitivní kontrola). Nenaamplifikované vzorky jsou likvidovány a naamplifikované vzorky jsou uchovávány v mrazáku při teplotě $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nižší a dále použity pro vyšetření pomocí NGS.

Obrázek 7 - Kontrola úspěšnosti WGA

Zdroj: Genetika Plzeň

Fotografie a popis gelu		
Popis vzorku	Výsledek amplifikace („FAILED“)	Komentář k výsledku
12/1	bez amplifikace („FAILED“)	vzorek (ID: 12), embryo č.: #1 - vzorek nebude dále zpracováván
12/2	✓	vzorek (ID: 12), embryo č.: #2 - možná slabší amplifikace, ale vzorek je vhodný k dalšímu vyšetření (aCGH, NGS, PCR); poznámku o slabším zisku uvedeme do kolonky „Poznámka/Komentář“
15/3	✓	vzorek (ID: 15), embryo č.: #3 - vzorek je vhodný k dalšímu vyšetření (aCGH, NGS, PCR)
16/5	✓	vzorek (ID: 16), embryo č.: #5 - vzorek je vhodný k dalšímu vyšetření (aCGH, NGS, PCR)
P1	✓	pozitivní kontrola 1 (správný = pozitivní výsledek)
N	✓	negativní kontrola (správný = negativní výsledek)
C12-1	✓	negativní kontrola z poslední promývací kapky vzorku embrya č. #1 ke vzorkům s ID: 12 (správný = negativní výsledek)
C15-3	✓	negativní kontrola z poslední promývací kapky vzorku embrya č. #3 ke vzorkům s ID: 15 (správný = negativní výsledek)
C16-5	✓	negativní kontrola z poslední promývací kapky vzorku embrya č. #5 ke vzorkům s ID: 16 (správný = negativní výsledek)

10.5 Sekvenování nové generace

Příprava knihovny pro NGS je prováděna dle interních dokumentů Genetika Plzeň, vycházejících z manuálů výrobce (Illumina, 2021).

V průběhu celého postupu extrémně dbáme opět na čistotu a u důležitých kroků jako je ředění vzorků a kvantifikace, tagmentace DNA, indexace a amplifikace tagmentované DNA provádíme kontrolu druhou osobou, aby nedošlo k záměně vzorků. Vzorky nenecháváme nikdy otevřené. Otevíráme je pouze na nezbytně dlouhou dobu (přidání reagentie nebo manipulace).

Vyšetření pomocí NGS je vhodné rozdělit do tří dnů. V průběhu prvního dne je dobré si připravit veškeré reagentie, embryonální zmnožený materiál, který je potřeba zředit 1:10 a kvantifikovat. Materiál o objemu 5 μ l se ředí 45 μ l Nuclease-free water. Naředěný vzorek je vhodné promíchat, aby se dostal do zkumavky celý objem a ve špičce nic nezůstalo. Důkladně ho zvortexujeme, poté stočíme, aby nebyl vyšetřovaný materiál na víčku a nedošlo k jeho případné ztrátě. U vzorků je potřeba dále změřit koncentraci. Pro změření koncentrace je potřeba smíchat 90 μ l TE pufru a 10 μ l naředěného vzorku. Směs zvortexujeme a stočíme, následně přidáme 100 μ l Dye, opět zvortexujeme, stočíme a necháme inkubovat ve tmě po dobu 5 minut. Koncentraci vzorků měříme na fluorimetru s přednastaveným objemem 10 μ l. Naměřené koncentrace zapíšeme. Ty vzorky, které mají naměřenou hodnotu <1 ng/ μ l, nejsou vhodné k přípravě knihovny. Po zředění vyšetřovacího materiálu ho uchováváme uzavřený v lednici do přípravy knihovny. Ještě týž den si připravíme i pracovní protokol, který bude potřeba pro pozdější sekvenování.

Druhý den ráno připravíme přístroj MiSeq k sekvenování tím, že ho promyjeme naředěným roztokem Tweenu 20. Na řadu přichází další ředění vzorku na koncentraci 0,2 ng/ μ l.

Množství Nuclease-free water, které máme napipetovat do nově popsané 0,2 mikrozukavky, vypočítáme z koncentrací změřených v předchozím dnu. K napipetované Nuclease-free water přidáme určené množství zvortexovaného a stočeného vzorku, nejčastěji 4 μ l. Zředěné vzorky dáme vortexovat a stočíme. Před zahájením tagmentace spustíme termocykler, aby se zahřál. Do nových popsaných mikrozukavek napipetujeme 10 μ l Tagment DNA Bufferu, uzavřeme a stočíme. Mikrozukavky dáme do kryostojánku a napipetujeme 5 μ l Amplicon Tagment Mixu, krátce vortexujeme a stočíme. K 15 μ l

napipetovaných reagensí přidáme 5 μ l naředěného vzorku. Mikrozkumavky uzavřeme, dáme vortexovat a poté stočíme. Stočené vzorky přendáme do termocykleru a provedeme tagmentaci, která spočívá ve fragmentaci DNA.

Po vyndání z termocykleru mikrozkumavky krátce stočíme a přidáme do každé 5 μ l Neutralize Tagment Bufferu, abychom přerušili tagmentaci. Zvortexujeme, stočíme a necháme inkubovat po dobu 10-15 minut při pokojové teplotě. Před samotnou amplifikací tagmentované DNA je důležité nezapomenout označit jednotlivé vzorky pomocí indexů. Indexace vzorků slouží k rozpoznání vzorků v případě, že bude najednou sekvenováno více různých pacientů (embryí). Díky tomu můžeme provést vyšetření mnoha pacientů (embryí) v jednom runu. Do mikrozkumavek se vzorky přidáme unikátní kombinace indexů, které máme předpřipravené v protokolu. Každý index se přidává do vzorku po 5 μ l. Při pipetování indexů je potřeba zvýšené soustředěnosti. Po indexaci krátce stočíme, mikrozkumavky přendáme na kryostojánek a přidáme 13 μ l Nextera PCR Master Mixu. Zvortexujeme a stočíme. Nyní přichází na řadu amplifikace tagmentované DNA v termocykleru.

Po amplifikaci vzorky stočíme. Můžeme se rozhodnout a amplifikované vzorky dále nepoužít a pokračovat ve vyšetření později. V tomto případě mikrozkumavky řádně uzavřeme a uložíme do mrazáku s teplotou < -15 °C nejdéle po dobu jednoho týdne. Pokud pokračujeme ve vyšetření, připravíme si 80 % roztok ethanolu (EtOH), který se namíchá z 20 ml 100 % ethanolu + 5 ml ultra-čisté H₂O. Do popsané deep-well destičky napipetujeme 45 μ l řádně promíchaných magnetických kuliček značky Agencourt AMPure® XP. K magnetickým kuličkám napipetujeme 45 μ l vzorku. Pipetou obsah jamek destičky promícháme. Deep-well destičku uzavřeme, zvortexujeme, stočíme a inkubujeme při pokojové teplotě 5 minut, poté opět krátce stočíme a destičku položíme na magnetický stojánek, kde ji necháme přibližně 2 minuty, dokud magnetické kuličky nevytvoří peletku. Když je supernatant čirý, odpipetujeme ho. DNA produkt zůstal na magnetických kuličkách a přichází na řadu promývání. Ke každému vzorku přidáme 200 μ l 80 % EtOH multikanálovou pipetou tak, aby se peletka neporušila. Po napipetování inkubujeme 30 sekund, poté supernatant odpipetujeme a nesmíme se při tom dotknout peletky. Celý proces promývání provedeme ještě jednou. Při promývání je důležité dodržovat časy inkubací a pipetované objemy reagensí. Po odpipetování supernatantu musíme peletky osušit. Osušené peletky poznáme tak, že jsou mírně popraskané. Nesmí však být přesušené. Sundáme je z magnetického stojánku a do jamek napipetujeme 50 μ l Resuspension Bufferu, který slouží k uvolnění PCR produktů z magnetických kuliček. Promícháme pipetou. Zvortexujeme je a sto-

číme. Opět je položíme na magnetický stojánek a čekáme, dokud se supernatant nevyčistí. Agregace kuliček nám umožní opatrně odpipetovat do čistých popsaných mikrozkušavek 45 μl supernatantu. Použité jamky v destičce příslušně označíme, aby nedošlo k jejich opakovanému použití. Mikrozkušavky stočíme a provedeme měření koncentrace. Ke změření koncentrace je zapotřebí smíchat v další mikrozkušavce 97 μl Tris/EDTA pufru (TE pufru) a 3 μl vzorku. Promícháme pipetou, zvortexujeme a stočíme. Dále přidáme 100 μl Dye zvortexujeme, stočíme a necháme inkubovat 5 minut ve tmě při pokojové teplotě. Takto připravíme kontrolní mikrozkušavky pro všechny vyšetřované vzorky. Měříme na fluorimetru při přednastaveném objemu 3 μl . Koncentrace jednotlivých vzorků nesmí být $<1,5$ $\text{ng}/\mu\text{l}$. Můžeme pokračovat ve vyšetřování nebo jamky uzavřeme a uložíme deep-well destičku stejným způsobem jako v předchozím kroku. Zbývá pouze manuálně normalizovat knihovny, poolovat a sekvenovat.

Do protokolu zaznamenáme naměřené koncentrace jednotlivých vzorků a zjistíme průměrnou koncentraci vzorků. Normalizace spočívá ve stočení a smíchání vzorků, čímž vznikne POOL 0, který je potřeba zvortexovat, stočit a dále ověřit jeho koncentraci. Do nové popsané mikrozkušavky napipetujeme 10 μl POOLu 0, 90 μl TE pufru a 100 μl Dye. Zvortexujeme, stočíme a měříme na fluorimetru. Koncentrace POOLu 0 by měla být podobná jako průměrná hodnota koncentrací, která nám vyšla v protokolu. Výslednou koncentraci zapíšeme do protokolu. Nyní musíme POOL 0 zředit na koncentraci 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Objem Nuclease-free water, kterou ředíme, vypočítáme křížovým pravidlem. Po zředění zvortexujeme a stočíme. Připravíme si roztok 0,2N NaOH namícháním 245 μl Nuclease-free water a 5 μl 10 N NaOH. Hydroxid sodný slouží k denaturaci PCR produktů. Roztok zvortexujeme, stočíme a napipetujeme 5 μl do nových a popsaných mikrozkušavek. Do mikrozkušavek s roztokem NaOH připipetujeme ještě 5 μl naředěného POOLu 0. Zvortexujeme, stočíme a inkubujeme při pokojové teplotě 5 minut. Připravíme si kryostojánek, do kterého umístíme 2 čisté zkumavky určené pro POOL 1 a POOL 2. Do zkumavky POOL 1 přijde 990 μl z lednice vyndaného Hybridization Bufferu a 10 μl POOLu 0. Nyní nesmíme denaturovaný mix vortexovat, proto ho pouze několikrát jemně otočíme a poté stočíme. POOL 1 ponecháme na ledu, dokud ho nepoužijeme. Do zkumavky POOL 2 napipetujeme množství Hybridization Bufferu a POOLu 1 dle požadované koncentrace POOLu 2. Koncentraci POOLu 2 určuje vedoucí reprodukční genetiky.

Už zbývá pouze připravit cartridge a FlowCell. Do cartridge, konkrétněji do jamky „Load sample“, napipetujeme špičkou s filtrem 600 μl POOLu 2. Nesmíme se přitom do-

tknout něčeho jiného a vzorek napipetovat doprostřed jamky. FlowCell vyndáme z lednice a z roztoku, ve kterém je uchována, řádně očistíme a osušíme speciálními ubrousky. Na FlowCell před vložením do MiSequ nesmí být žádná nečistota. Přístroj MiSeq musí být před zahájením sekvenace řádně promyt, dále musí být před sekvenací vložen do MiSequ nový inkorporační pufr. Sekvenování spustíme pomocí předem připraveného protokolu v PC („SampleSheet“, Illumina, 2018).

Poslední den slouží k SW zpracování výsledků. Po dokončení sekvenace na přístroji MiSeq jsou zkontrolovány výsledky pro celý sekvenační run, viz Tabulka 1.

Tabulka 1 – Hodnocení kvality celého sekvenačního runu

Parametr	Optimální hodnota	Akceptovatelná hodnota
Hustota clusterů [K/mm ²]	1200-1400	1100-1600
% clusterů prošlých filtrem („passing filter (PF) clusters“)	85	75
Celkový počet clusterů/čtení	30 000 000	25 000 000
Celkový počet clusterů/čtení prošlých filtrem (PF)	25 000 000	19 000 000
% čtení dosahujících Q30 (hodnota Q skóre ukazuje jistotu, že daná báze byla umístěna na správnou pozici; Q30 znamená, že ve výsledku je 0,1 % chybných bází)	95	90
% identifikovaných (rozpoznávaných) čtení z clusterů/čtení prošlých filtrem	95	85
% identifikovaných čtení připadajících na individuální vzorek	5	2,5-8

Sekvenační data jsou poté importována do interpretačního SW BlueFuse, kde je prováděno vlastní hodnocení výsledků (Illumina, 2018). Pro každý vzorek je zhodnocena úspěšnost sekvenace, viz Tabulka 2.

Tabulka 2 -Hodnocení kvality sekvenace jednotlivých vzorků

Parametr	Optimální hodnota	Akceptovatelná hodnota
Počet celkových identifikovaných čtení / vzorek	1 000 000	700 000
Počet čtení po filtrování / vzorek	500 000	250 000
Průměrné Q skóre / vzorek	> 35	> 30
Průměrné skóre správného přiřazení („alignment score“) / vzorek	> 35	> 30
Skóre rozptylu sousedících bodů profilu („sample noisy score“, DLR)	0,2	0,4
Důvěryhodnost sekvenačních dat pro jednotlivé chromosomy („confidence“)	1,0	0,7

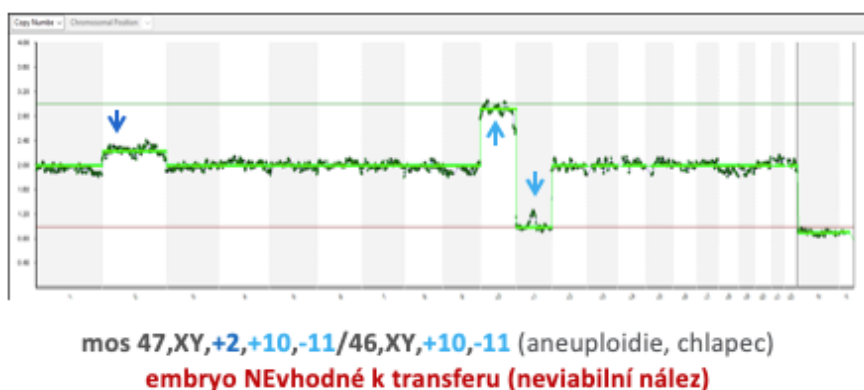
10.6 Hodnocení vzorků a interpretace nálezů PGT-A

Při interpretaci nálezů, viz Obrázky 8 a 9, je vycházeno z doporučení výrobce kitu „A Technical Guide to Aneuploidy calling with VeriSeq PGS (Illumina, 2014)“. Na základě provedené validace metody jsou v Laboratoři reprodukční genetiky Genetika Plzeň stanoveny pro vyšetření PGT-A tyto referenční hodnoty:

- rozlišení pro nemozaikové segmentální změny ~10Mbp,
- hranice pro určení mozaiky celochromozomové početní aberace ~20%, resp. ~80%,
- hranice pro určení mozaiky segmentálních změn ~40%, resp. ~80%.

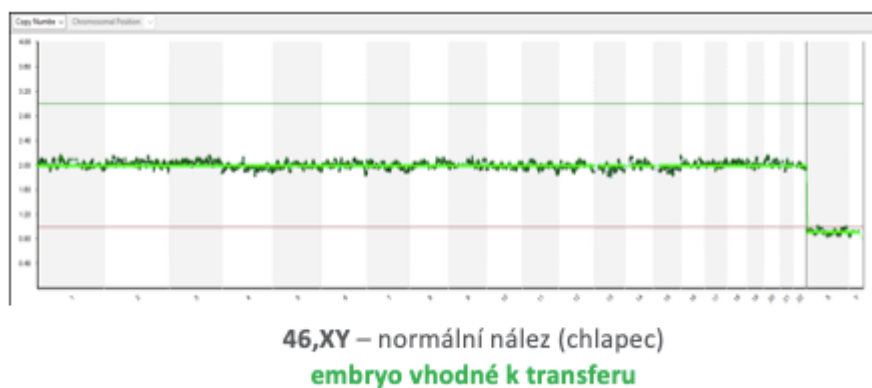
Obrázek 8 - Příklad analýzy embrya metodou NGS

Zdroj: Genetika Plzeň



Obrázek 9 - Vhodné embryo k transferu

Zdroj: Genetika Plzeň



Mozaikami jsou zde míněna embrya, kde nález odpovídá současné přítomnosti euploidní (normální) a aneuploidní buněčné linie. Tyto mozaiky jsou v Laboratoři reprodukční genetiky Genetika Plzeň dále děleny na vysoce rizikové a nízko rizikové.

Vysoce rizikové mozaiky (high-risk mosaic) jsou embrya, u kterých byly v mozaice nalezeny jakékoli početní změny chromozomů 13, 14, 15, 18, 21, X a Y, ať už samostatně nebo s dalšími aberacemi v mozaice, nebo u nich byla detekována tzv. komplexní mozaika (více než 4 jakékoli mozaikové změny). Popsané aberace by mohly způsobit závažné abnormality fenotypu plodu/dítěte nebo selhání implantace či potrat s vyšším rizikem, proto nejsou doporučeny k embryotransferu (ET).

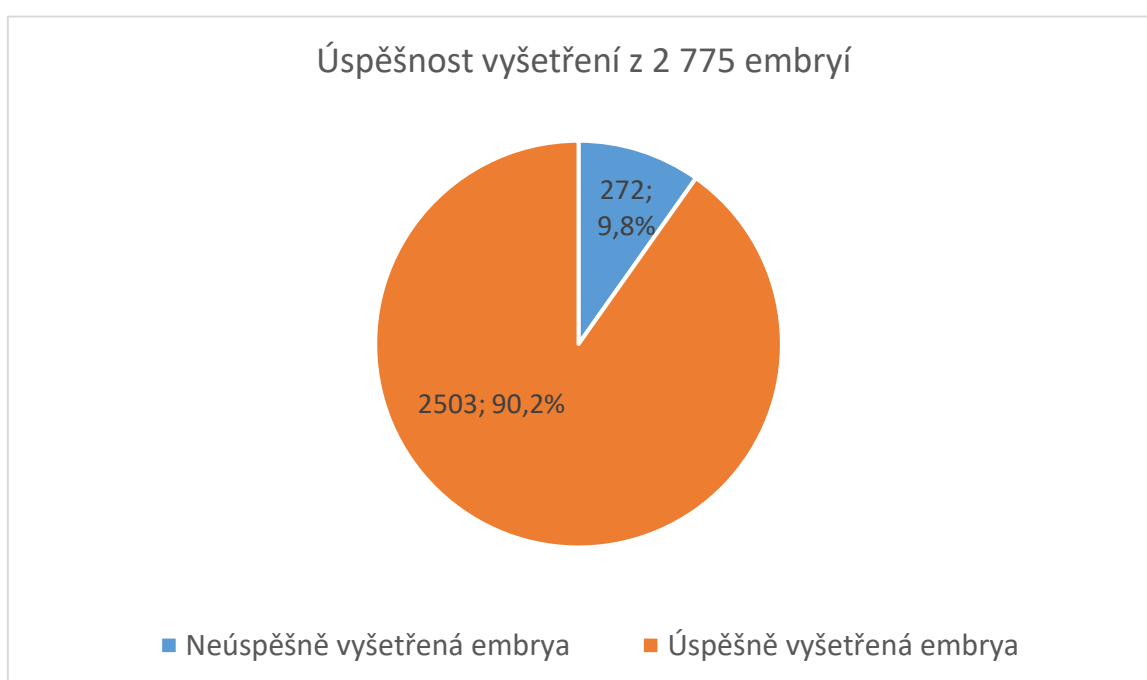
Nízko rizikové mozaiky (low-risk mosaic) jsou taková mozaiková embrya, u kterých po informovaném písemném souhlasu páru může dojít k embryotransferu a je zde šance na úspěšnou implantaci embrya a následné těhotenství. Jedná se o embrya, která neodpovídají vysoce rizikovým mozaikám. Nacházíme u nich maximálně 4 změny v mozaice s euploidní linií (segmentální či celochromozomové s výjimkou chromozomů uvedených v odstavci výše).

11 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

11.1 Úspěšně vyšetřená embrya

Metodou NGS na platformě VeriSeq bylo celkově vyšetřeno 2 775 embryí. Z toho bylo 272 (9,8 %) embryí bez výsledku. Příčinou mohlo být nedostatečné množství materiálu nebo jeho špatná kvalita. Úspěšně bylo vyšetřeno 2 503 embryí (90,2 %), viz Graf 1.

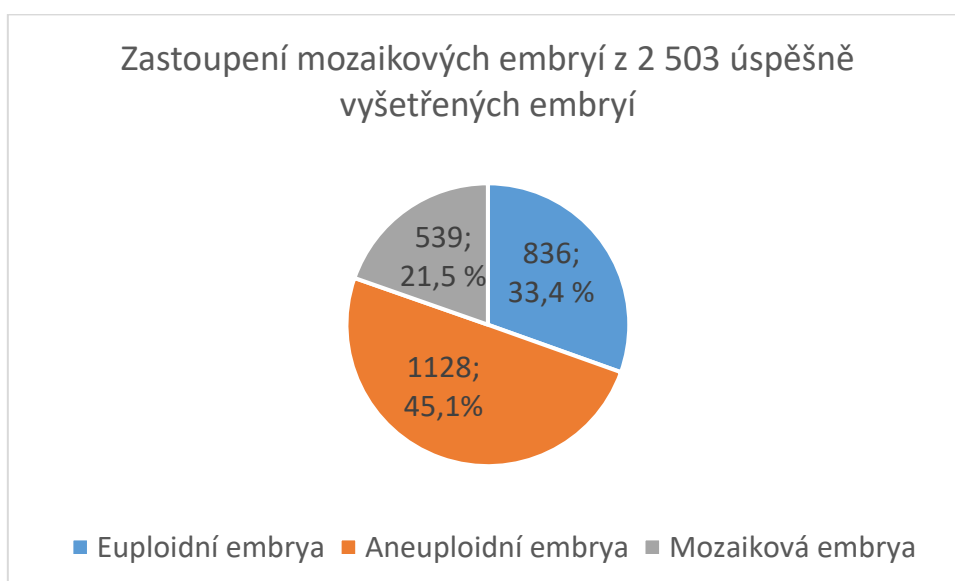
Graf 8 - Úspěšně vyšetřená embrya



11.2 Zastoupení mozaikových embryí

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo zjistit, jaké bylo celkové zastoupení mozaikových embryí vyšetřených metodou PGT-A během let 2016-2022. Z počtu 2 503 úspěšně vyšetřených embryí bylo 836 (33,4 %) embryí hodnoceno jako euploidních a tedy plně vhodných k ET. 1128 (45,1 %) embryí bylo hodnoceno jako abnormální (aneuploidní) a embryotransfer byl nedoporučen vzhledem k riziku potratu nebo narození postiženého dítěte. Mozaikových embryí bylo 539 (21,5 %). Tyto mozaikové nálezy byly dále děleny na vysoce a níže rizikové mozaiky, viz kapitola 11.3.

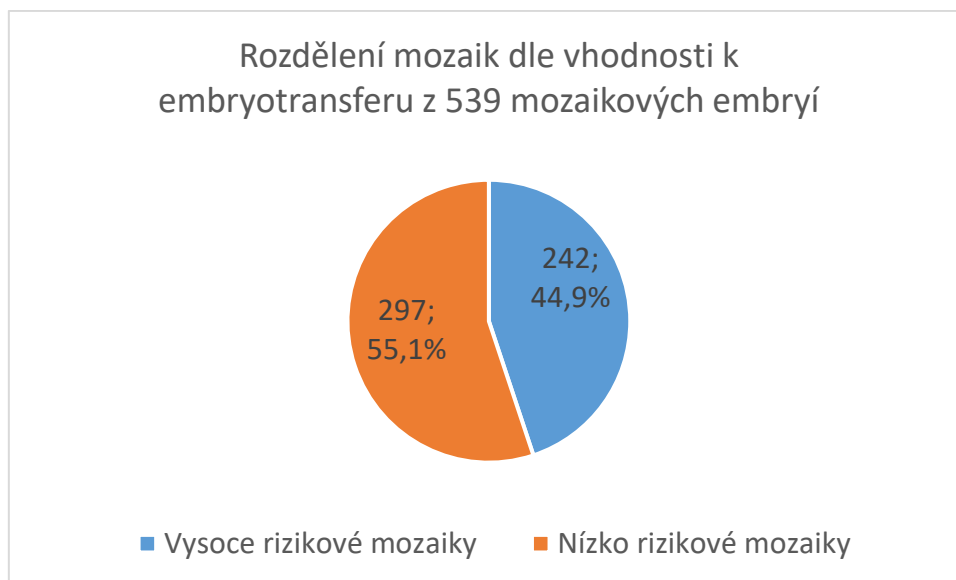
Graf 2 – Zastoupení mozaikových embryí



11.3 Rozdělení mozaik dle vhodnosti k embryotransferu

Z celkového počtu mozaikových embryí (539) bylo 242 (44,9 %) vysoce rizikových mozaik (s aberací na chromozomech 13, 18, 21, X, Y, 14 a 15 v mozaice) nevhodných k embryotransferu a 297 (55,1 %) nízko rizikových mozaik podmíněčně vhodných k embryotransferu, viz Graf 3.

Graf 3 – Rozdělení mozaik dle vhodnosti k embryotransferu



11.4 Zhodnocení úspěšnosti embryotransferu u mozaik

Předchozí analýzou bylo zjištěno 297 nízko rizikových embryonálních mozaik podmíněčně vhodných k embryotransferu. Z nich bylo dosud transferováno pouze 6 (2 %) mozaikových embryí. U 3 (50 %) případů byl následně pozitivní těhotenský test a srdeční akce plodu. Z těchto tří úspěšně implantovaných embryí v jednom případě došlo k následnému potratu plodu a ve dvou zbývajících případech se v roce 2018 narodily dvě zdravé děti.

11.5 Kazuistika I

Pacientka R. E. nejdříve v roce 2007 spontánně otěhotněla, ale brzy následoval první potrat. Z důvodu sekundární sterility se rozhodla podstoupit IVF cyklus.

V roce 2013 a 2015 podstoupila pacientka dva IVF cykly bez PGT-A, které nebyly úspěšné. Další cykly následovaly v letech 2016-2017 už s vyšetřením PGT-A (k indikacím přibyl vyšší maternální věk (39 let) a opakované selhání implantace).

První cyklus s PGT-A byl v roce 2016 a byly odebrány 4 blastocysty (vzniklé z 8 zygot), ale k samotnému embryotransferu nedošlo, důvodem bylo, že žádné embryo nebylo plně euploidní, byla zde pouze 3 aneuploidní embrya a 1 embryo s vysoce rizikovou mozaikou. Doporučeno bylo podstoupení dalšího cyklu léčby.

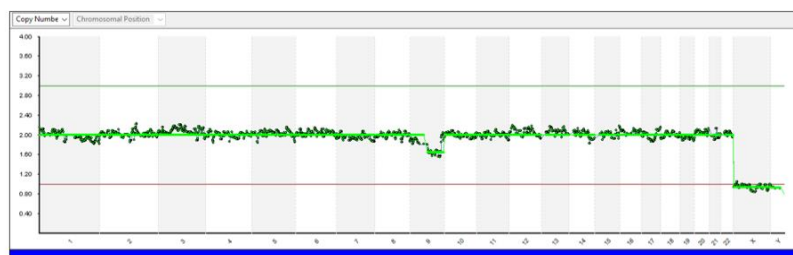
V roce 2017 bylo v dalším cyklu s PGT-A bioptováno 11 blastocyst (vzniklých ze 17 zygot) a u 8 z nich bylo požadováno vyšetření PGT-A. Výsledek PGT-A byl následující: 1 vzorek byl bez výsledku a 7 úspěšně vyšetřených vzorků, bohužel žádné embryo nebylo plně euploidní. Ze 7 úspěšně vyšetřených embryí bylo 5 embryí aneuploidních a 2 nízkou rizikové mozaiky podmíněčně vhodné k ET. Pacientka se rozhodla podstoupit transfer mozaikového embrya a podepsala informovaný souhlas. Následně byl proveden embryotransfer jednoho embrya mužského pohlaví s aberací na chromozomu 9 (ztráta 9q v mozaice), viz Obrázek 10.

Implantace embrya byla úspěšná. Byl zaznamenán pozitivní těhotenský test a též byla přítomna pozitivní srdeční akce plodu. Bohužel těhotenství skončilo v 10. těhotenském týdnu potratem.

Zajímavé je, že v tomto případě bylo v zahraniční laboratoři provedeno vyšetření tkáně abortu, resp. placenty, a nález byl sice normální, ale s ženským chromozomovým komplementem (46,XX v 10ti hodnocených mitózách). Neshodu s výsledkem PGT-A lze vysvětlit několika způsoby: buď se jednalo o kontaminaci vzorku placenty buňkami matky (které se preferenčně dělily a proto byly vyšetřeny při analýze karyotypu), nebo o (jiné) spontánní těhotenství. Vyloučit nelze ani záměnu vzorku. Forenzní vyšetření, které by diskrepanci vysvětlilo, bohužel nebylo provedeno.

Pacientka se rozhodla další IVF cyklus již nepodstoupit a v roce 2018 bylo ukončeno skladování všech embryí.

Obrázek 9 – Ztráta 9q v mozaice



11.6 Kazuistika II

Pacientka L.P. přichází do IVF kliniky s problémem, kdy 5x spontánně otěhotněla a také 5x spontánně potratila.

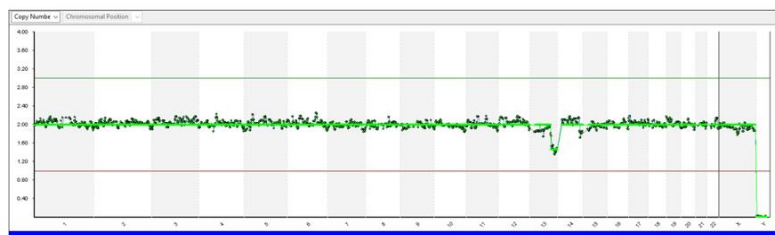
Celkem podstoupila 2 IVF cykly v roce 2020 s vyšetřením PGT-A s celkovým ziskem 3 blastocyst. Z prvního cyklu s PGT-A byly získány 2 blastocysty (z původních 18 úspěšně oplodněných oocytů/zygot) a po vyšetření PGT-A byl výsledek 1 nízko riziková mozaika podmíněčně vhodná pro ET a 1 aneuploidní embryo nevhodné k ET.

Jelikož v prvním cyklu s PGT-A nebylo žádné plně euploidní embryo, byl proveden druhý cyklus IVF s PGT-A, kde byl zisk 1 blastocysty (vzniklé z 8 zygot) a po vyšetření PGT-A byl výsledek 1 euploidní embryo vhodné k embryotransferu. Implantace embrya byla úspěšná a v roce 2021 se narodilo zdravé dítě (46,XX).

Pacientka se v roce 2023 vrací pro ET mozaiky (byl podepsán informovaný souhlas) z prvního cyklu, kde embryo mělo aberaci na chromozomu 13 (ztráta terminální části 13q v mozaice), viz Obrázek 11. Implantace embrya byla ale bohužel neúspěšná a nebyl pozitivní ani těhotenský test.

V porovnání s pacientkou R. E. z Kazuistiky I je u této pacientky (L. P.) zřejmé, že u ní docházelo k poruše vývoje embryí, a proto už nebyl další IVF cyklus doporučován.

Obrázek 11 - Ztráta terminální části 13q v mozaice



DISKUZE

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo zjistit zastoupení mozaikových embryí při vyšetření PGT-A v letech 2016-2022. Z analyzovaných dat bylo zjištěno, že zastoupení euploid – aneuploidních mozaik bylo 539/2503 (21,5 %).

Studie Capalbo et al. (2021) došla ale k mnohem vyššímu procentu zastoupených mozaik (46 % vs 21,5 %). Důvodem je započtení nejen euploid – aneuploidních mozaik, ale i aneuploid – aneuploidních mozaik. V souboru dat z Genetiky Plzeň byly naopak reportovány pouze euploid – aneuploidní mozaiky. Kdyby se porovnávaly pouze euploid – aneuploidní mozaiky, tak Capalbo et al. (2021) dospěl k 18,7 % a data z Genetiky Plzeň k 21,5 %, což je plně srovnatelné.

Další cíl se zabýval počtem úspěšně vyšetřených embryí. Ze statistiky jsem dospěla k číslu 2503/2775 (90,2 %). U zbylých 272 (9,8 %) vzorků výsledek vyšetření nebylo možno získat; velmi pravděpodobně z důvodu nedostatku materiálu nebo kvůli jeho snížené kvalitě. Každé vyšetření nese nějaké procento neúspěšnosti; 9,8 % je sice relativně vysoká míra neúspěšně vyšetřených embryí, ale u preimplantačních vyšetření to lze očekávat, protože se analyzuje jen velice málo genetického materiálu.

Třetí cíl se zabýval podílem vysoce rizikových mozaik z celého sledovaného souboru. Z celkového počtu mozaikových embryí bylo 242/539 (44,9 %) vysoce rizikových mozaik (aberrace na chromozomech 13, 18, 21, X, Y, 14, 15 v mozaice, hrozí riziko narození postiženého dítěte) nevhodných k embryotransferu. Tento výsledek nelze porovnat se studiiemi a výsledky ve světě, protože záleží na individuálním přístupu mezi genetickou laboratoří a IVF klinikou. Genetika Plzeň volí bezpečnější cestu a doporučuje pouze embrya bez viabilních trizomií/monozomií, čímž se snaží minimalizovat riziko narození postiženého dítěte.

V souboru dat Genetiky Plzeň za roky 2016-2022 bylo provedeno pouze 6 embryotransferů (2 % z 297 nízko rizikových mozaik) mozaikových embryí, z čehož u 3 (50 %) byl pozitivní těhotenský test a srdeční akce plodu a ve dvou případech (33,3 %) se narodily zdravé děti.

Studie Spinella et al. (2017) dospěla k výsledku, že v porovnání s plně euploidními embryi mají mozaiková embrya výrazně nižší procento úspěšné implantace (30,8 % u mo-

zaik vs 46,6 % u euploidních embryí). Je potřeba si ale uvědomit, že 30,8 % je vysoká šance na implantaci u embryí, která by mohla být hodnocena jako abnormální a dřív by nebyla transferována vůbec.

Podle studie z roku 2018 (Viotti, 2018) byl u 52 embryí (59,1 %) z celkového počtu 88 mozaikových embryí pozitivní těhotenský test, úspěšná implantace u 33 (37,5 %) embryí a u 26 embryí (29,5 %) byla zaznamenána srdeční akce plodu. Z těchto 26 embryí dospělo 10 k porodu zdravých dětí (z celého souboru tedy 11,4 %). 16 embryí bylo potraceno.

Viottiho studie z roku 2021 (Viotti, 2021) dospěla k výsledkům, že z 1000 mozaikových embryí bylo 465 (46,5 %) úspěšně implantováno a v 370 (37 %) případech pokračovalo těhotenství dál. Na větším souboru dat byla tedy oproti studii stejného autora z roku 2017 pozorována vyšší viabilita mozaikových embryí.

U mozaikových embryí je oproti plně euploidním embryům dle literárních údajů úspěšnost implantace vždy snížena a zároveň je zvýšená míra abortů (Spinella, 2017; Viotti, 2018, 2021). Dle výše uvedených dat Genetika Plzeň bylo v prezentovaném souboru dosaženo 50 % (3/6) úspěchu implantace a 33 % (2/6) pravděpodobnosti narození dítěte, což se jeví jako velmi dobré výsledky, nicméně se jedná o velmi malý soubor dat, z něhož bohužel zatím nelze vyvozovat jednoznačné závěry a ani je relevantně porovnat s výše uvedenými literárními daty. K embryotransferu mozaikového embrya nejčastěji přistupují páry, u kterých nebylo ani po opakovaných IVF cyklech nalezeno plně euploidní embryo, které je primárně vhodné k transferu a u něhož je největší šance na úspěšnou implantaci s následným narozením zdravého dítěte. IVF cyklus je náročný na psychický i fyzický stav pacientky a někdy embryotransfer nízko rizikové mozaiky je posledním pokusem páru, aby se stali rodiči. Z celkových dat Genetiky Plzeň vyplývá, že nález nízko rizikové mozaiky podmínečně vhodné k embryotransferu není neobvyklý jev a vzhledem k literárním údajům a s přihlédnutím k doporučení odborných společností (PGDIS, CoGEN) je možno tato embrya transferovat. V Plzni se mozaiky transferují velice málo (viz výše uvedená data), soubor nelze tedy hodnotit statisticky, a proto je význam transferů mozaik ukázán v individuálních případech – kazuistikách.

U pacientky R. E. z Kazuistiky I bylo transferováno embryo s aberací na chromozomu 9 (ztráta 9q v mozaice) a implantace byla úspěšná, stejně tak byl pozitivní těhotenský test a i srdeční akce plodu. Bohužel těhotenství skončilo spontánním potratem v 10.

týdnu těhotenství. Obecně ale platí, že první trimestr těhotenství bývá rizikový, tedy vůbec na vině nemusel být mozaicismus embrya. V případě této pacientky i přes získání relativně vysokého počtu embryí ze dvou IVF cyklů nebylo žádné embryo plně euploidní. Pacientka odmítla absolvovat další cyklus, a proto bylo na její žádost přistoupeno po genetické konzultaci k transferu mozaiky. Vzhledem k situaci byl transfer mozaiky pro pacientku poslední šancí na dosažení těhotenství.

Tímto postupem byla dodržena příslušná doporučení odborných společností PGDIS a CoGEN k transferu mozaikového embrya, tedy mozaika byla transferována až když ani z opakovaného cyklu nebylo žádné embryo plně euploidní, embryotransfer proběhl po konzultaci s klinickým genetikem a po podepsání informovaného souhlasu a zároveň se nejednalo o mozaiku chromozomů 13, 18, 21, X, Y, 14 ani 15.

V Kazuistice II pacientka L. P. trpěla opakovanými spontánními potraty, a proto se rozhodla podstoupit IVF cyklus s PGT-A. V prvním IVF cyklu nebylo žádné plně euploidní embryo, pouze aneuploidní embryo a nízká riziková mozaika a jak doporučují odborné společnosti (PGDIS, 2019; PGDIS 2021) měl by být proveden další IVF cyklus s vyšetřením PGT-A, aby byla šance najít euploidní embryo. To se povedlo v druhém IVF cyklu a v roce 2021 se narodilo zdravé dítě z plně euploidního embrya. Pacientka se v roce 2023 vrací pro embryotransfer nízké rizikové mozaiky z prvního cyklu, implantace však byla bohužel neúspěšná. U této pacientky docházelo opakovaně k poruše vývoje embryí, další IVF cyklus proto nebyl doporučen. Také v tomto případě byla splněna doporučení od odborných společností uvedená výše; dokonce i přes velmi špatný vývoj embryí již v prvním cyklu nebylo ihned transferováno mozaikové embryo a byl doporučen a proveden druhý IVF cyklus.

Z celkového počtu úspěšně vyšetřených embryí v Laboratoři reprodukční genetiky Genetika Plzeň s.r.o. (2 503/2 775) bylo plně euploidních embryí 33,4 % (836/2 503) a nízké rizikových mozaik podmíněčně vhodných k ET bylo 297/2 503 (11,9 %). Po sloučení euploidních embryí a nízké rizikových mozaik se významně zvyšuje počet embryí (podmínečně) vhodných k ET z 836/2 503 (33,4 %) na 1 133/2 503 (45,3 %) o 11,9 %.

Dle literatury transfer mozaiky není spojen se zvýšeným rizikem přetrvávání těhotenství s postiženým dítětem či narozením postiženého dítěte (Viotti, 2023). Existují doporučení odborných společností, za jakých podmínek lze tato embrya transferovat, takže není důvod tato embrya nezačít transferovat ve větší míře i v našich podmínkách.

ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se zabývala preimplantačním genetickým testováním aneuploidií, s důrazem na embryonální mozaicismus.

Hlavním cílem bylo zjistit zastoupení mozaikových embryí při vyšetření PGT-A metodou NGS v letech 2016-2022. Z analyzovaných dat bylo zjištěno, že zastoupení euploid-aneuploidních mozaik mezi úspěšně vyšetřenými vzorky bylo 539/2503 (21,5 %). Úspěšně vyšetřených embryí bylo 2503/2775 (90,2 %). U zbylých 272 (9,8 %) vzorků se vyšetření nepovedlo velmi pravděpodobně z důvodu špatného odběru nebo kvůli snížené kvalitě embryonálního vzorku. Třetí cíl se zabýval zjištěním podílu vysoce/nízce rizikových mozaik. Z celkového počtu mozaikových embryí bylo 242/539 (44,9 %) vysoce rizikových mozaik (aberrace na chromozomech 13, 18, 21, X, Y, 14, 15 v mozaice) nevhodných k embryotransferu (dle interních pravidel Genetika Plzeň vycházejících z mezinárodních odborných doporučení) a nízko rizikových mozaik, podmíněčně vhodných k ET, bylo 297/539 (55,1 %). Díky možnosti transferů i nízko rizikových mozaik se počet embryí vhodných k ET zvýšil o 11,9 % (297/2503).

Pacientky, které během cyklu IVF s vyšetřením PGT-A z nějakého důvodu nemají žádné plně euploidní embryo vhodné k transferu a mají pouze mozaiková embrya, by měly zvážit možnost transferu nízko rizikové mozaiky. Studie ohledně implantace mozaikových embryí mluví ve prospěch takového embryotransferu a dnes už víme, že i z mozaiky se může narodit zdravé dítě.

SEZNAM LITERATURY

BRDIČKA, Radim a HERLE, Petr (ed.). *Genetika pro všeobecné praktické lékaře*. Ediční řada pro všeobecné praktické lékaře. Praha: Raabe, [2020]. ISBN 978-80-7496-447-3.

BOLTON, Helen, GRAHAM, Sarah J. L., VAN DER AA, Niels, KUMAR, Parveen, THEUNIS, Koen et al. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. Online. *Nature Communications*. 2016, roč. 7, č. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ncomms11165>. [cit. 2024-03-14].

CAPALBO, Antonio, POLI, Maurizio, RIENZI, Laura, GIRARDI, Laura, PATASINI, Cristina et al. Mosaic human preimplantation embryos and their developmental potential in a prospective, non-selection clinical trial. Online. *The American Journal of Human Genetics*. 2021, roč. 108, č. 12, s. 2238-2247. ISSN 00029297. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.11.002>. [cit. 2024-03-18].

COGEN Position Statement on Chromosomal Mosaicism Detected in Preimplantation Blastocyst Biopsies. Online. 2016. Dostupné z: <https://ivf-worldwide.com/cogen/general/cogen-statement>. [cit. 2024-03-23].

CRAM, D.S., LEIGH, D., HANDYSIDE, A., RECHITSKY, L., XU, K. et al. PGDIS Position Statement on the Transfer of Mosaic Embryos 2019. Online. *Reproductive Bio-Medicine Online*. 2019, roč. 39, s. e1-e4. ISSN 14726483. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.06.012>. [cit. 2024-03-23].

DOHERTY, C. Maud a CLARK, Melanie Morrissey. *Léčba neplodnosti: podrobný rádce pro neplodné páry*. Brno: Computer Press, 2006. ISBN 802510771x.

FRAGOULI, Elpida, ALFARAWATI, Samer, SPATH, Katharina, BABARIYA, Dhruvi, TAROZZI, Nicoletta et al. Analysis of implantation and ongoing pregnancy rates following the transfer of mosaic diploid–aneuploid blastocysts. Online. *Human Genetics*. 2017, roč. 136, č. 7, s. 805-819. ISSN 0340-6717. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1797-4>. [cit. 2024-03-23].

GENETIKA PLZEŇ S.R.O. *Cytogenetická laboratoř*. Online. Dostupné z: <https://www.genetika-plzen.cz/vysetreni/cytogeneticka-laborator>. [cit. 2024-03-22].

GRECO, Ermanno; MINASI, Maria Giulia a FIORENTINO, Francesco. Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts. Online. *New England Journal of Medicine*. 2015, roč. 373, č. 21, s. 2089-2090. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <https://doi.org/10.1056/NEJMc1500421>. [cit. 2024-03-29].

HARRIS, Benjamin S. et al. Preimplantation genetic testing: a review of current modalities. Online. *F&S Reviews*. 2021, roč. 2, č. 1, s. 43-56. ISSN 26665719. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.xfnr.2020.10.001>. [cit. 2024-03-14].

HRUBÁ, Martina. Laboratorní příručka PGT. Online. 2021. Dostupné z: <http://genetika-plzen.cz>. VD.GP 05 v001. [cit. 2024-03-14].

ILLUMINA. A Technical Guide to Aneuploidy Calling with VeriSeq PGS. *Support Illumina*. Online. 2014. Dostupné z: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/veriseq-pgs/veriseq-pgs-technical-guide-to-aneuploidy-calling-15059470-a.pdf [cit. 2024-03-14].

ILLUMINA. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology. Online. 2017a. Dostupné z: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf. Pub. No. 770-2012-008-B. [cit. 2024-03-14].

ILLUMINA. BlueFuse Workflow Manager for VeriSeq PGS. *Support Illumina*. Online. 2017b. Dostupné z: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/software_documentation/bluefuse-workflow-manager/bluefuse-workflow-manager-veriseq-pgs-user-guide-1000000028842-00.pdf [cit. 2024-03-14].

ILLUMINA. BlueFuse Multi v4.5 Software Guide. *Support Illumina*. Online. 2018. Dostupné z: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/software_documentation/bluefuse-multi-software/bluefuse-multi-software-guide-15053620-04.pdf [cit. 2024-03-14].

ILLUMINA. SurePlex Summary Protocol, Reference Guide. *Support Illumina*. Online. 2020. Dostupné z: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/veriseq-pgs/sureplex-protocol-reference-guide-15053626-02.pdf [cit. 2024-03-14].

ILLUMINA. VeriSeq PGS Library Prep, Reference Guide. *Support Illumina*. Online. 2021. Dostupné z: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/veriseq-pgs/veriseq-pgs-library-prep-reference-guide-15052877-05.pdf. Dokument 15052877v05. [cit. 2024-03-14].

KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007. ISBN 978-80-7013-450-4.

KURAHASHI, H, INAGAKI, H, OHYE, T, KOGO, H, TSUTSUMI, M et al. The constitutional t(11;22): implications for a novel mechanism responsible for gross chromosomal rearrangements. Online. *Clinical Genetics*. 2010, roč. 78, č. 4, s. 299-309. ISSN 0009-9163. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01445.x>. [cit. 2024-02-09].

LEIGH, D., CRAM, D.S., RECHITSKY, S., HANDYSIDE, A., WELLS, D. et al. PGDIS position statement on the transfer of mosaic embryos 2021. Online. *Reproductive BioMedicine Online*. 2022, roč. 45, č. 1, s. 19-25. ISSN 14726483. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2022.03.013>. [cit. 2024-03-18].

MUNNÉ, Santiago, GRIFO, James a WELLS, Dagan. Mosaicism: “survival of the fittest” versus “no embryo left behind.” Online. *Fertility and Sterility*. 2016, roč. 105, č. 5, s. 1146-1149. ISSN 00150282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.01.016>. [cit. 2024-02-04].

MUNNÉ, Santiago, SPINELLA, Francesca, GRIFO, Jamie, ZHANG, John; BELTRAN, Monica Parriego et al. Clinical outcomes after the transfer of blastocysts characterized as mosaic by high resolution Next Generation Sequencing- further insights. Online. *European Journal of Medical Genetics*. 2020, roč. 63, č. 2. ISSN 17697212. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2019.103741>. [cit. 2024-03-25].

NUSSBAUM, Robert L., MCINNES, Roderick R. a WILLARD, Huntington F. *Klinická genetika*. 6. vyd. Praha: Triton, c2004. ISBN 80-7254-475-6.

PROCHÁZKA, Martin, VODIČKA, Radek a VRTĚL, Radek. *Základy lékařské genetiky pro studenty všeobecného lékařství*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2018. ISBN 978-80-244-5368-2.

PGDIS POSITION STATEMENT ON CHROMOSOME MOSAICISM AND PRE-IMPLANTATION ANEUPLOIDY TESTING AT THE BLASTOCYST STAGE. Online. 2016, s. 1. Dostupné z: https://pgdis.org/docs/newsletter_071816.html. [cit. 2024-03-23].

QUEREMEL MILANI DA, CHAUHAN PR. Genetics, Mosaicism. [Updated 2023 May 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559193/>

REPROMEDALAB. PGT-M. Online. 2020. Dostupné z: <https://www.repromedalab.cz/pgt-m>. [cit. 2024-02-09].

ŘEŽÁBEK, Karel. *Léčba neplodnosti: příčiny neplodnosti : metody léčby : mimotělní oplodnění : zákony.* 3., aktualiz. vyd. Pro rodiče. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-1010-2.

SCRIVEN, Paul N., KIRBY, Toby L. a OGILVIE, Caroline Mackie. FISH for Pre-implantation Genetic Diagnosis. Online. *Journal of Visualized Experiments.* 2011, č. 48. ISSN 1940-087X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3791/2570>. [cit. 2024-03-14].

SNUSTAD, D. Peter a SIMMONS, Michael J., RELICHOVÁ, Jiřina (ed.). *Genetika.* Druhé, aktualizované vydání. Přeložil Jiří DOŠKAŘ, přeložil Jiří FAJKUS, přeložil Petr HOŘÍN, přeložil Aleš KNOLL, přeložil Petr KUGLÍK, přeložil Jan ŠMARDA, přeložil Jana ŠMARDOVÁ, přeložil Renata VESELSKÁ, přeložil Boris VYSKOT. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8613-5.

SPINELLA, Francesca, FIORENTINO, Francesco, BIRICIK, Anil, BONO, Sara, RUBERTI, Alessandra et al. Extent of chromosomal mosaicism influences the clinical outcome of in vitro fertilization treatments. Online. *Fertility and Sterility.* 2018, roč. 109, č. 1, s. 77-83. ISSN 00150282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.09.025>. [cit. 2024-03-14].

Společnost lékařské genetiky a genomiky České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně, z. s. (SLG ČLS JEP). Online. *Doporučení k preimplantačnímu genetickému laboratornímu vyšetření* 2014, s. 3. Dostupné z: <https://slg.cz/documents/12/doporučeny-postup-preimplantacni-vysetreni.pdf>. [cit. 2024-03-24].

ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.

TAYLOR, Tyl H., GITLIN, Susan A., PATRICK, Jennifer L., CRAIN, Jack L., WILSON, J. Michael et al. The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. Online. *Human Reproduction Update*. 2014, roč. 20, č. 4, s. 571-581. ISSN 1355-4786. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu016>. [cit. 2024-03-23].

UNIVERZITA PARDUBICE. *Pohlavní rozmnožování*. Online. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/zaklady-genetiky/pohlavni-rozmnozovani-cloveka.pdf>. [cit. 2024-03-22].

ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR (ÚZIS ČR). Online. *Asistovaná reprodukce v ČR 2020*. 2022, s. 20. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008420/asistoreprodukce2020.pdf>. [cit. 2024-03-23].

VACEK, Zdeněk. *Embryologie: učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1267-9.

VANNESTE, Evelyne, VOET, Thierry, LE CAIGNEC, Cédric, AMPE, Michèle, KONINGS, Peter et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. Online. *Nature Medicine*. 2009, roč. 15, č. 5, s. 577-583. ISSN 1078-8956. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nm.1924>. [cit. 2024-02-04].

VIOTTI, M., VICTOR, A., GRIFFIN, D., TYNDALL, J., BRAKE, A. et al. 88 mosaic embryo transfers in a single clinic: what we have learned. Online. *Fertility and Sterility*. 2018, roč. 110, č. 4. ISSN 00150282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.07.1203>. [cit. 2024-03-14].

VIOTTI, Manuel, VICTOR, Andrea R., BARNES, Frank L., ZOUVES, Christo G., BESSER, Andria G. et al. Using outcome data from one thousand mosaic embryo transfers to formulate an embryo ranking system for clinical use. Online. *Fertility and Sterility*. 2021, roč. 115, č. 5, s. 1212-1224. ISSN 00150282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.11.041>. [cit. 2024-03-14].

VIOTTI, Manuel; GRECO, Ermanno; GRIFO, James A.; MADJUNKOV, Mitko; LIBRACH, Clifford et al. Chromosomal, gestational, and neonatal outcomes of embryos

classified as a mosaic by preimplantation genetic testing for aneuploidy. Online. *Fertility and Sterility*. 2023, roč. 120, č. 5, s. 957-966. ISSN 00150282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.07.022>. [cit. 2024-03-31].

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO. *Cytogenetika*. Online. 2014. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/opvk2014/index.php?title=teorie-cytogenetika&lang=cz>. [cit. 2024-03-24].

YE, Yinghui, MA, Jieliang, CUI, Long, LU, Sijia a JIN, Fan. A Rapid NGS-Based Preimplantation Genetic Testing for Chromosomal Abnormalities in Day-3 Blastomere Biopsy Allows Embryo Transfer Within the Same Treatment Cycle. Online. *Frontiers in Genetics*. 2021, roč. 12. ISSN 1664-8021. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.636370>. [cit. 2024-03-14].

ZHONG, Yiming, XU, Feng; WU, Jinhua, SCHUBERT, Jeffrey a LI, Marilyn M. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. Online. *Annals of Laboratory Medicine*. 2021, roč. 41, č. 1, s. 25-43. ISSN 2234-3806. Dostupné z: <https://doi.org/10.3343/alm.2021.41.1.25>. [cit. 2024-03-14].