



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta zdravotně sociální
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

ArrayCGH a její využití v preimplantační diagnostice

Vypracovala: Monika Pittrová
Vedoucí práce: RNDr. Martina Hrubá, Ph.D.

České Budějovice 2015

Abstrakt

Preimplantační analýza umožňuje genetické vyšetření embryí vzniklých procesem in vitro fertilizace, a to před jejich transferem do dělohy. V rámci preimplantačního vyšetření lze provádět jak screening náhodných aneuploidií (PGS), tak cílenou diagnostiku chromosomových aberací či monogenních onemocnění (PGD), popř. jejich kombinaci (PGD/PGS). Preimplantační vyšetření jsou tedy vhodná nejen pro páry s obecnými reprodukčními problémy (např. vyšší maternální věk), ale také pro páry s genetickou zátěží v rodinné anamnéze.

Metoda aCGH umožňuje v jednom experimentu rychlou a přesnou analýzu nebalancovaných chromosomových aberací v celém embryonálním genomu, tedy spojení screeningu náhodných aneuploidií (PGS) se současnou detekcí případné nebalancované formy familiární aberace (PGS/PGD).

V genetické laboratoři IVF Zentren Prof. Zech jsme metodou aCGH vyšetřili za rok 2014 celkem 469 embryí od 98 klientek. Biopsie embryí byly prováděny ve stádiu blastocysty, kdy bylo šetrně odebráno několik buněk trofoektodermu. U všech embryonálních vzorků byla provedena celogenomová amplifikace (WGA) a pro vyšetření aCGH byla použita platforma 24sure BlueGnome.

Preimplantační screening (PGS) byl proveden celkem u 366 embryí a kombinované vyšetření (PGD/PGS) celkem u 103 embryí. Průměrný věk našich klientek v době vyšetření byl 40,5 roku. Z výsledků vyšetření vyplývá, že se zvyšujícím se maternálním věkem u embryí významně stoupá četnost sporadických aneuploidií. Provádění preimplantačního screeningu je tedy zejména vhodné u klientek s vyšším maternálním věkem. Také u klientek, které podstoupily kombinované vyšetření z důvodu genetické zátěže v rodině (PGD/PGS) a klientek, u kterých byly indikovány cykly s dárcovskými gametami, však screeningové vyšetření může zvýšit úspěšnost IVF cyklu a šanci na donošení zdravého dítěte.

Klíčová slova: aCGH, PGD, PGS, PGD/PGS, trofoektoderm, chromosom, aneuploidie

Abstract

Preimplantation genetic analysis allows testing embryos produced by in vitro fertilisation before their transfer into the uterus. Preimplantation genetic analysis can be performed as screening of random aneuploidies (PGS) or targeted diagnosis of familial chromosomal aberrations or monogenic diseases (PGD) or combination of both approaches (PGD/PGS). Preimplantation genetic testing is appropriate for wide spectre of patients undregoing human assisted reproduction treatment.

Array comparative genomic hybridization (aCGH) is sensitive and high throughput method for detection of chromosomal copy number changes on whole embryonal genome, therefore allows performing screening of random aneuploidies (PGS) in combination with diagnosis of unbalanced chromosomal familial aberrations (PGD/PGS).

The data for this study were obtained from Genetic Laboratory IVF Zentren Prof. Zech in Pilsen during 2014. The results of 469 examined embryonal samples resulting from 98 clients were analysed. All biopsies of trophoctoderm cells were performed on blastocyst stage. All embryonal samples underwent whole genome amplification (WGA) and were processed using 24sure microarrays (BlueGnome).

PGS was performed for 366 embryos in total and combined analysis including PGS and PGD was performed for 103 embryos. An average maternal age at the time of analysis was 40,5. This study demonstrates that there is significantly higher rate of aneuploidy in patients of higher maternal age. A suitability of PGS for older patients was confirmed. In other groups of patients containing IVF cycles with donated oocytes or patients carrying familial chromosomal aberrations a higher profit of fertility treatment was observed.

Keywords: aCGH, PGD, PGS, PGD/PGS, trophoctoderm, chromosome, aneuploidy

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 4. 5. 2015

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Děkuji tímto způsobem všem, kteří mě podporovali po celou dobu bakalářského studia a při psaní závěrečné bakalářské práce.

Především bych chtěla jmenovitě mnohokrát poděkovat mojí školitelce RNDr. Martině Hrubé, Ph.D., která je mojí dlouholetou kolegyní a zároveň skvělou kamarádkou. To ona je mým velkým vzorem i příkladem a zároveň zcela jistě velmi ovlivnila moji práci i kariéru.

Také bych chtěla poděkovat mým kolegům RNDr. Romaně Vlčkové, Ing. Marii Císařovské a MUDr. Liborovi Hradeckému, Ph.D.

Zároveň děkuji celému týmu IVF Zentren Prof. Zech – Pilsen s.r.o., a to především celé embryologické laboratoři, která mě v nelehkých chvílích držela nad vodou.

Samozřejmě nesmím opomenout celou mojí rodinu za podporu a trpělivost.

Obsah

1	Úvod	10
1.1	Preimplantační vyšetření	11
2	Teoretická část	12
2.1	Chromosomové aberace u člověka	12
2.1.1	Numerické chromosomové aberace	13
2.1.2	Polyploidie	13
2.1.3	Aneuploidie	13
2.1.4	Aneuploidie pohlavních buněk	14
2.1.5	Chromosomové mosaiky	14
2.1.6	Strukturní chromosomové aberace	15
2.1.7	Balancované a nebalancované chromosomové aberace	16
2.2	Monogenní choroby	17
2.2.1	Choroby podmíněné mutacemi na autosomech	18
2.2.2	Choroby podmíněné mutacemi na gonosomech	19
2.2.3	Polygenní choroby	20
2.3	Poruchy reprodukce	20
2.4	Oplození <i>in vitro</i> (<i>In Vitro</i> Fertilization – IVF)	21
2.4.1	Stimulace a punkce ovárií	21
2.4.2	Hyperstimulační syndrom (OHSS)	22
2.5	Raný embryonální vývoj	23
2.5.1	Blastogeneze	23
2.5.2	Rýhování	23
2.5.3	Blastomera	23
2.5.4	Vývoj blastocysty	24
2.6	Preimplantační genetické vyšetření	25
2.6.1	Účel	25
2.6.2	Historie	25
2.6.3	Druhy preimplantačního vyšetření a indikace k jejich provedení	26
2.6.4	Metody preimplantačního vyšetření	28
2.6.5	Rizika preimplantačního genetického vyšetření	31
3	Cíl práce a hypotézy	32
4	Materiály a metodika	33
4.1	Vyšetřovaný biologický materiál	33
4.1.1	Odběr vzorků (biopsie)	33

4.2 Zvláštní opatření během provádění vyšetření.....	37
4.3 Příprava pacienta k odběru	37
4.4 Pufr pro biopsii	37
4.5 Analytická fáze.....	38
4.5.1 Celogenomová amplifikace	38
4.5.1.1 Odběr kontrolních vzorků	38
4.5.1.2 Kontrola úspěšnosti amplifikace pomocí gelové elektroforézy	39
4.5.2 Metoda aCGH	39
4.5.2.1 Princip metody	40
4.5.2.2 Postup	40
4.6 Postanalytická fáze	42
4.6.1 Archivace vzorků po WGA	42
4.6.2 Archivace aCGH preparátů	42
4.6.3 Interní kontrola kvality (IKK)	42
4.6.4 Mezilaboratorní porovnání	42
4.6.5 Metrologická návaznost	43
5 Výsledky	44
5.1 Celkový soubor vyšetření aCGH za rok 2014	44
5.1.1 Celkový počet vyšetřených embryí na obou platformách	44
5.1.2 Počet vyšetření dle věku klientek a typu platformy	46
5.1.3 Výsledky vyšetření na obou platformách	47
5.1.4 Výsledky vyšetření PGD/PGS na platformě 24sure ^{TM+}	48
5.1.5 Výsledky vyšetření PGS na platformě 24sure ^{TMV3}	49
5.1.6 Výsledky vyšetření PGS u IVF cyklů s vlastními gametami	50
5.1.7 Výsledky vyšetření PGS u IVF cyklů s darovanými gametami	53
6 Diskuse.....	55
7 Závěr	57

Seznam použitých zkratek

aCGH array-Comparative Genome Hybridization (metoda, která umožňuje detekovat zisky a ztráty DNA v celém genomu analyzovaného vzorku porovnáním s referenční DNA)

BWR klasická serologická reakce používána ke screeningu syfilis (Bordetova-Wassermannova reakce)

CFTR mutace v tomto genu je zodpovědná za onemocnění cystickou fibrózou (z ang. Cystis Fibrosis Transmembrane Conductante Regulator)

CGH Comparative Genome Hybridization (komparativní genomová hybridizace)

DIC diseminovaná intravaskulární koagulopatie (z ang. Disseminated Intravascular Coagulopathy)

DNA kyselina deoxyribonukleová

FA/FH neúspěšná amplifikace (z ang. Fail Amplification), neúspěšná hybridizace (z ang. Fail Hybridization)

FISH hybridizace se sondou, která umožňuje pozorování ve fluorescenčním mikroskopu (z ang. Fluorescence *In Situ* Hybridization)

HBsAg povrchový antigen HBV (Hepatitis B) viru (z ang. Hepatitis B surface Antigen)

HCV virus způsobující virový zánět jater hepatitidu typu C (z ang. Hepatis C Virus)

HIV virus lidské imunodeficiency způsobující chorobu AIDS (z ang. Human Immunodeficiency Virus)

ICSI intracytoplasmatická injekce spermie (z ang. IntraCytoplasmic Sperm Injection)

IKK interní kontrola kvality

IMSI intracytoplasmická injekce morfologicky selektované spermie (Intracytoplasmic Morphologically selected Sperm Injection)

IVF oplodnění mimo organismus matky (z ang. In Vitro Fertilization)

MESA mikrochirurgická epidermální aspirace spermií (z ang. Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration)

OHSS ovariální hyperstimulační syndrom (Ovarian HyperStimulation Syndrome)

PB pólocyt (z ang. Polar Body)

PBS fosfátový pufr (z ang. Phosphate Buffered Saline)

PCR polymerázová řetězová reakce (z ang. Polymerase Chain Reaction)

PGD preimplantační genetická diagnostika (z ang. Preimplantation Genetic Diagnostic)

PGS preimplantační genetický screening (z ang. Preimplantation Genetic Screening)

RA rodinná anamnéza

RNA kyselina ribonukleová

TE trofoektoderm

TESA testikulární aspirace spermíí (z ang. Testicular Sperm Aspiration)

VEGF cévní endotelový růstový faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)

WGA metoda mnohonásobného zmnožení DNA celého genomu z malého vstupního množství bioplogického materiálu (z angl. Whole Genome Amplification)

1 Úvod

Početí potomka je od pradávna přirozeným vývojem vztahu dvou jedinců, tedy muže a ženy. Proto si většina lidí v produktivním věku nepřipouští, že právě oni by měli mít problém s plodností.

V dnešní uspěchané době, kdy se každý nejprve věnuje studiu, cestování a poté budování kariérního růstu, mnoho párů odkládá početí a narození dítěte na pozdější dobu a plodnost berou jako přirozenou a samozřejmou věc.

Skutečnost je ovšem jiná, a s neplodností se potýká každý šestý pár. Problém může být na straně ženy nebo muže, ale mnohdy je problém ale složitější a komplikovanější. V současnosti jsou moderní léčebné metody velmi úspěšné a většině neplodných párů se dřív nebo později počít dítě podaří.

Velmi důležitým faktorem pro plodnost je čas a samozřejmě nahrává těm párům, které se rozhodnou pro řešení problému neplodnosti včas.

Ženě od 35 let naděje na otěhotnění začne výrazně klesat a po 40. roce se dostává téměř k nule. Příčinou je přirozené stárnutí vajíček ženy. Také muži stárnou, i když tvorba spermií většinou pokračuje do pokročilého věku. Kvalita spermatogeneze klesá, na vině zhoršené kvality spermií jsou kumulující se toxické vlivy zevního prostředí. Nemůžeme opomenout další civilizační choroby, jako např. diabetes, hypertenze, deprese a životní styl.

Diagnóza neplodnosti se klasifikuje po jednom roce pravidelného nechráněného pohlavního styku bez početí dítěte, resp. dosažení těhotenství. Pokud tato situace nastane, většinou neplodné páry vyhledají odbornou pomoc. Nejprve žena navštíví svého gynekologa: po základním vyšetření a konzultaci, je většinou neplodnému páru doporučena léčba na specializovaném pracovišti reprodukční medicíny, v tzv. Centrech asistované reprodukce (Řežábek, 2014).

1.1 Preimplantační vyšetření

Vyšetření se označuje jako preimplantační genetická analýza (zkratka PGA – z angl. **p**reimplantation **g**enetic **a**nalysis).

Preimplantační genetická analýza (PGA) se rozděluje ještě na další specifické segmenty vyšetření. Preimplantační genetická diagnostika (zkratka PGD - z angl. **p**reimplantation **g**enetic **d**iagnosis), preimplantační genetický screening (zkratka PGS – z angl. **p**reimplantation **g**enetic **s**creening), preimplantační diagnostika současně spojená s preimplantačním screeningem (zkratka - PGD/PGS z angl. **p**reimplantation **g**enetic **d**iagnosis and **p**reimplantation **g**enetic **s**creening) (Harper *et al.*, 2011).

Preimplantační vyšetření hraje velkou roli v metodách asistované reprodukce, neboť více než 50% embryí vzniklých po in vitro fertilizaci bývá aneuploidních a zároveň s věkem nad 36 let stoupá až na 82% (Liu *et al.*, 2012).

Preimplantační diagnostika (PGD) se může a také se provádí u párů, které mají sice zachovanou plodnost, ale jsou nosiči mutace pro konkrétní monogenní onemocnění. V tomto případě mají tyto páry velkou šanci na porod zdravého dítěte bez daného monogenního onemocnění (Fragouli, 2007).

2 Teoretická část

2.1 Chromosomové aberace u člověka

Základní cytogenetické vyšetření karyotypu člověka se provádí pomocí chromosomové analýzy buněk kultivovaných in vitro. Vyšetřované buňky mohou být různého typu, většinou se analyzují periferní lymfocyty, ale mohou se vyšetřovat také kožní fibroblasty, buňky choriových klků, buňky plodové vody a nádorové buňky (kostní dřev). Analyzované buňky jsou v metafázi mitotického dělení. Jádro normální lidské somatické buňky obsahuje 23 dvojic, to znamená 46 chromosomů.

Autosomy jsou číslovány 1-22 a gonosomy (pohlavní buňky) jsou značeny velkými písmeny X a Y.

Žena tak má 22 párů autosomů a dva pohlavní chromosomy (gonosomy) X a muž má stejný počet autosomů (22 párů) jako žena, ale místo jednoho pohlavního chromosomu X má jeden chromosom Y (tedy X a Y).

Převážná většina lidské populace má normální počet i strukturu chromosomů, tedy mluvíme o normální chromosomové výbavě.

Když vznikne jakákoliv odchylka ve struktuře nebo počtu chromosomů, je označována jako chromosomová odchylka nebo aberace.

Skoro každý chromosom obsahuje téměř tisíce genů (mimo chromosomu Y), a proto ztráta jednoho chromosomu nebo naopak, nadpočetný chromosom vede k závažnému postižení jedince. Chromosomové aberace jsou zodpovědné za asi více než 100 různých syndromů a zároveň mohou být příčinou spontánních potratů plodu (Kočárek, 2007).

Chromosomové aberace se dělí dvou základních skupin:

- a) **numerické aberace** – změny počtu chromosomů,
- b) **strukturní aberace** – změny struktury chromosomů.

2.1.1 Numerické chromosomové aberace

Odchylka od normálního počtu chromosomů se nazývá numerická aberace. Rozdělují se podle toho, je-li změněn počet některých chromosomů, anebo je zmnožena celá chromosomová sada:

- a) **polyploidie** – znásobení celé chromosomové sady,
- b) **aneuploidie** – je přítomen jeden nebo více nadpočetných chromosomů, případně chybí jeden nebo více chromosomů.

2.1.2 Polyploidie

Mezi polyploidie, patří triploidie a tetraploidie. Triploidie nacházíme u 12-20% plodů, které jsou potraceny většinou v prvním trimestru gravidity.

2.1.3 Aneuploidie

Aneuploidie nastává tehdy, když počet chromosomů v buňce není nikdy celým násobkem haploidní sady. Příčinou jsou chyby při segregaci chromosomů (nondisjunkce) a to během meiózy nebo mitózy.

Nejčastější aneuploidie somatických buněk jsou:

a) **Trisomie – kdy je přítomen nadpočetný chromosom ($2n+1$)**

Příkladem trisomie jsou Downův syndrom (nadpočetný chromosom 21), Patauův syndrom (nadpočetný chromosom 13), Edwardsův syndrom (nadpočetný chromosom 18). Všechny tyto syndromy jsou spojeny s těžkým mentálním a tělesným postižením, včetně závažných kombinovaných vývojových vad. Trisomie chromosomu 16 je zpravidla letální v prenatálním období a nejčastěji se nachází u spontánně potracených plodů (Kočárek, 2007).

Časté jsou také aneuploidie s nadbytečným pohlavním chromosomem, kdy nedochází k tak výraznému vlivu na tělesný a mentální vývoj jedince.

Někdy dochází k mírnému postižení intelektu spojeným s částečnou či úplnou sterilitou. Příkladem jsou syndromy superfemale (ženy s nadbytečným pohlavním

chromosomem X - konstituce gonosomů XXX) i když u těchto žen je plodnost zachována.

Dále supermale (muži s nadbytečným chromosomem Y- konstituce gonosomů XYY) a Klinefelterův syndrom (sterilní muži se dvěma chromosomy X a jedním chromosomem Y- konstituce XXY).

b) Monosomie – chybění jednoho chromosomu (2n-1)

Příkladem je Turnerův syndrom (monosomie chromosomu X – postižené ženy jsou ve většině sterilní, častým klinickým znakem je anomálie skeletu i vzrůstu a dysgeneze ovárií (Snustad, 2009).

2.1.4 Aneuploidie pohlavních buněk

V pohlavních buňkách (gametách) nacházíme také aneuploidie. Jestliže dojde při oplození, ke spojení normální gamety s aneuploidní gametou, vznikne zygota a následně embryo s početní chromosomovou odchylkou, a to nejčastěji monosomií či trisomií.

K nejčastějším aneuploidiím v gametách se řadí:

- a) nulisomie – chybí jeden chromosom (n-1),**
- b) disomie – je přítomný nadbytečný chromosom (n+1).**

Aneuploidie gamet vznikají zpravidla nondisjunkcí, kdy dojde k chybnému rozdělení chromosomů při meiotickém dělení u rodičů.

K postzygotickým změnám, ale dochází zřejmě velmi často a ty vedou k raným potratům, jak ukazují výsledky preimplantačního screeningu.

2.1.5 Chromosomové mosaiky

Podstatou je přítomnost dvou nebo více buněčných linií s odlišným karyotypem v lidském těle jedince. Mosaicismus nalézáme často u gonosomových aberací.

Při cytogenetickém vyšetření tak nacházíme při analyzování většího počtu buněk, různé chromosomové nálezy. Tyto mosaiky vznikají obvykle při vývoji embrya nondisjunkcí. Typické mosaiky se vyskytují zpravidla u Turnerova syndromu.

U většiny žen s Turnerovým syndromem je analyzován karyotyp 45, X. Asi 30% případů těchto žen má mosaiku 45,X/46,XX ve všech tkáních. U některých žen s Turnerovým syndromem, jsou nalezeny strukturální odchylky i u druhého chromosomu X. Nejčastěji isochromosom dlouhých ramének chromosomu X, kruhový (ring) chromosom X a méně časté jsou delece dlouhých nebo krátkých ramének chromosomu X.

Některé další gonosomové aneuploidie se mohou vyskytovat také v mosaikách (XXX, XYY, XYY).

Výskyt autosomových aberací může být také v mosaikové formě. Vzácné jsou mosaikové formy Downova syndromu, kdy se při cytogenetickém hodnocení buněk v karyotypu nachází vedle trisomie chromosomu 21, také normální buněčná linie s normálním počtem chromosomů. (Michalová, 1999).

2.1.6 Strukturální chromosomové aberace

Strukturální chromosomovými aberacemi se označují změny struktury chromosomů, nazývané též strukturální přestavby.

Rozdělují se do několika skupin:

- a) **Delece** – ztráta části chromosomů, které se rozlišují na terminální (ztráty koncových oblastí chromosomů) a intersticiální (ztráty vnitřních částí chromosomů) delece. Nejčastěji intersticiální delece nacházíme u mikrodelečních syndromů (deleční formy Turnerova syndromu, syndrom Wolf-Hirschhorn, Cri du chat syndrom).
- b) **Duplikace nebo zdvojení části chromosomů**
- c) **Translokace** – vzájemná výměna nebo přesun genetického materiálu mezi dvěma či více chromosomy.

Tyto chromosomové změny se rozdělují:

- **reciproké translokace** – vzájemná výměna genetického materiálu mezi dvěma či více chromosomy,
 - **Robertsonské (centrické) translokace** – delece krátkých ramének a následná fúze centromerických oblastí u akrocentrických chromosomů (např. translokační forma Downova syndromu).
- d) Inverze** – přemístění nebo otočení určitého úseku o 180° v jednom chromosomu
- **paracentrické inverze** – invertovaný úsek leží mimo centromeru,
 - **pericentrické inverze** – invertovaný úsek obsahuje i centromeru.
- e) Kruhové chromosomy** – oddělení koncových částí chromosomů a následné spojení volných konců na základě působení reparačních mechanismů.
- f) Marker chromosomy** – fragmenty chromosomů, které jsou malé a nadpočetné, ale mají zachovanou centromeru, kdy převážná část dlouhých ramének popřípadě i krátkých ramének, je deletována.
- g) Fragilní místa** – přerušení kontinuity struktury chromatinu
- h) Isochromosomy** – abnormální rozdělení chromosomů při mitotickém nebo druhém meiotickém dělení. Dochází k oddělení krátkých a dlouhých ramének místo chromatid a tak do jedné dceřiné buňky přechází isochromosom tvořený pouze p-raménky a druhé buňky pak isochromosom, který je tvořený pouze q-raménky.

Ke vzniku strukturních aberací dochází různými mechanismy. Většina přestaveb je způsobena mutagenními faktory, které způsobují zlomy nebo přerušení kontinuity na úrovni DNA.

Vlivy, které porušují strukturu chromosomů, se označují jako klastogeny (alkalyční činidla, ionizační záření apod.) (Kapras *et al.*, 1996)

2.1.7 Balancované a nebalancované chromosomové aberace

Podle ztráty či zisku chromosomového materiálu se rozdělují strukturní chromosomové aberace do dvou základních skupin:

- a) Nebalancované neboli nevyvážené přestavby** – změny, kdy je přítomný nadpočetný genetický materiál, případně naopak, určitý úsek genetického materiálu

chybí. Označují se jako parciální mosomie (část chromosomu chybí - tím odpovídající úsek na nedeletovaném homologu je monosomický, může chybět i v důsledku nebalancované translokace), nebo parciální trisomie (část chromosomu je nadbytečná nebo přítomna jako nadpočetný chromosom).

Také nepřesný crossing – over chybného párování u repetice, způsobuje vznik nebalancovaných přestaveb a tím k závažnému poškození u potomků (Kočárek, 2006).

b) Balancované neboli vyvážené přestavby – všechny strukturní změny chromosomů, které nenesou ztrátu či zisk genetického materiálu. K nejčastějším patří inverze, reciproké translokace i některé robertsonské translokace, pokud v karyotypu není přítomen nadbytečný chromosom.

Jedinci, kteří nesou balancované chromosomové aberace, nebývají zpravidla postiženi, neboť celkové množství genetického materiálu je stejné jako u osob s normálním karyotypem. U těchto jedinců se abnormální (translokované nebo invertované) chromosomy budou párovat s nezměněnými homology, riziko je při chybném oddělení spárovaných chromosomů (Kočárek, 2006).

2.2 Monogenní choroby

Monogenní onemocnění jsou způsobena mutací v jediném genu. Mutantní alela, tj. alela nesoucí mutaci, vede většinou ke vzniku proteinu se sníženou funkčností na rozdíl od zdravé alely. Dědičnost monogenních chorob je řízena Mendelovými zákony, kdy rozsah postižení a klinické projevy závisí na funkci mutovaného genu. Monogenní choroby jsou podmíněné mutacemi genů na autosomech nebo gonosomech.

Většina mutací na gonosomech vzniká mutací na chromosomu X, na rozdíl od chromosomu Y, kde se nacházejí pouze geny odpovědné za plodnost a sexuální determinaci.

2.2.1 Choroby podmíněné mutacemi na autosomech

Příčinou geneticky podmíněných chorob dědičnosti je mutace genu na autozomech. Tyto onemocnění postihuje stejným dílem muže i ženy (1:1).

Podle typu přenosu dědičnosti se rozdělují:

a) Autosomálně dominantní choroby

K monogenním onemocněním se řadí autosomálně dominantní choroby, kdy příslušná mutace se dědí jako dominantní znak.

Postižení jedinci jsou většinou heterozygoti a k projevu choroby stačí přítomnost jediné mutantní alely, kterou jim většinou předává jeden postižený rodič. Riziko přenosu na potomka je tak 50%.

Pokud se postižené dítě narodí zdravým rodičům, hovoří se o nově vzniklé mutaci tzv. mutaci *de novo*, ke které došlo v gametách jednoho z rodičů.

K autosomálně dominantním chorobám se řadí např. achondroplasie (nápadně zkrácené končetiny i další poruchy kostí), familiární hypercholesterolémie, adultní forma polycystických ledvin (výskyt mnohočetných cyst v ledvinách).

Klinicky velmi závažným onemocněním je Huntingtonova choroba (chorea), které patří k velmi těžkým neurodegenerativním onemocněním (Nussbaum, 2004).

b) Autosomálně recesivní onemocnění

Velká skupina monogenních onemocnění se dědí jako recesivní znak. Postižený jedinec má v genotypu obě alely mutantní a, je buď homozygotem, nebo tzv. složeným heterozygotem. Většinou jeho rodiče jsou zdravými heterozygoty, kdy jejich nemutovaná alela odpovídá za tvorbu normálního proteinu zachovávajícího normální formy daného znaku.

Heterozygotní pár, který je označován jako přenašeči, mají 25% riziko narození postiženého dítěte s autosomálně recesivním onemocněním.

Mezi autosomově recesivní choroby patří vrozené metabolické vady, nejčastěji enzymopatie. K nejvýznamnějším enzymopatiím patří fenylketonurie patřící mezi hyperfenylalaninémie.

Dalším závažným autosomálně recesivním onemocněním je cystická fibróza neboli mukoviscidóza.

2.2.2 Choroby podmíněné mutacemi na gonosomech

a) Choroby podmíněné mutacemi na chromosomu X

Označují se jako podmíněné mutace genů na chromosomu X a jsou vázány na pohlaví. Rozlišuje se u nich dominantní i recesivní dědičnost, přitom většina onemocnění vázaná na pohlaví jsou dědičná recesivně.

Ženy jsou zdravé přenašečky (některé mohou být mírně postižené) příslušné alely, která se většinou neprojeví, protože je plně nahrazena dominantní alelou na druhém chromosomu X. Polovina potomků mužského pohlaví těchto žen- přenašeček bývá postižených a druhá polovina se narodí zcela zdravá.

Dcery těchto matek- přenašeček se narodí zdravé, ale s 50% pravděpodobností budou také přenašečky dané choroby (Vojtíšková, 1999).

K nejčastějším gonosomálně recesivním onemocněním patří syndrom fragilního X, daltonismus (barvoslepost) a hemofilie A.

U chorob, které jsou vázané na chromosom X, může být stupeň postižení ovlivněn inaktivací tohoto chromosomu. Možnost, která z těchto dvou chromosomů X, bude inaktivován, je zcela náhodný výběr. Žena je mosaikou dvou typů buněk, a to typ buněk s aktivním chromosomem X získaným od otce a druhým typem buněk s aktivním chromosomem X získaným od matky a může se projevit ve fenotypu této ženy. Náhodná inaktivace chromosomu X ovlivňuje fenotyp ženy X- vázaného onemocnění.

Pro některé choroby vyskytující se méně často, je charakteristická gonosomově dominantní dědičnost. Při tomto typu dědičnosti se příslušná alela projeví i u žen, protože stačí, aby byla přítomna pouze na jednom z chromosomů X. U těchto žen se vyskytuje onemocnění dvakrát častěji než u mužů. Typem gonosomově dominantního onemocnění je hypofosfatemie - vitamin D- resistantní rachitis (Kočárek, 2007).

b) Choroby podmíněné mutacemi na chromosomu Y

Chromosom Y je znám jako jeden z nejmenších chromosomů člověka, na kterém se nachází malý počet funkčních genů. Dědičnost vázaná na chromosom Y neboli holandrická dědičnost, kdy muž předává znak pouze svým synům. Některé geny jsou typické pro chromosom Y: gen SRY, genová skupina DAZ (z ang. deleted in azoospermia), oblast AZF (ang. azoospermia factor). Nepřítomnost těchto genů je zjišťována u mužů, kteří nemají v ejakulátu žádné spermie (azoospermie) nebo nízký počet spermií v ejakulátu (oligospermie). Molekulárně genetickými metodami se dají zjistit delece na celé oblasti AZF i mikrolece chromosomu Y. Pokud spermie nesou dědičnost mikrolece chromosomu Y, tak všichni potomci mužského pohlaví ponесou ve 100 % stejnou mutaci. Tito potomci se budou potýkat se stejným problémem jako jejich otec, který jim tuto mutaci předal. V tomto případě jsou páru nabídnuty metody IVF například anonymní dárce spermatu, nebo preimplantační diagnostika/ preimplantační screening, kdy jsou upřednostněny embrya ženského pohlaví.

2.2.3 Polygenní choroby

Polygenní onemocnění se vyznačují změnami většího počtu genů a při jejich vzniku hrají velkou úlohu také faktory vnějšího prostředí. Někdy se proto také označují jako multifaktoriální onemocnění (např. kardiovaskulární choroby, hereditární formy nádorů, diabetes) (Kočárek, 2007).

2.3 Poruchy reprodukce

Poruchy reprodukce se v české terminologii rozdělují na sterilitu (neplodnost) a infertilitu (neschopnost ženy donosit životaschopné dítě).

Avšak ve světové terminologii se všechny poruchy reprodukce se shrnují do společného termínu infertilita. Každý šestý pár se potýká s diagnózou neplodnosti, v 50% se uvádí příčina u ženy, ve 40 % u muže a v 10% není příčina neplodnosti objasněna. Ve 20 % procentech je příčina na straně ženy a zároveň i muže (Řežábek, 2014).

Neploďnost je uváděna jako diagnóza páru, ale je zároveň se může rozdělit na mužskou a ženskou neploďnost. U žen to bývají nejčastěji hormonální poruchy, porucha funkce dělohy, opakované záněty adnex, endometrióza, absolutní tubární faktor nebo imunologická sterilita.

Příčinou neploďnosti u mužů mohou být poruchy spermatogeneze, neprůchodnost (obstrukce chámovodů), vrozené vady testes, stavy po úrazu.

Zároveň nemůžeme opomenout vnější vlivy prostředí a rizikové faktory. Významnými faktory jsou také civilizační vlivy, jako je obezita, nezdravý životní styl, alkohol a kouření.

Poruchy reprodukce u žen i mužů mohou být podmíněny i geneticky, buď chromosomovými aberacemi, genovými mutacemi nebo mikrodelecí chromosomu Y. Tyto genetické poruchy se mohou projevit opakovanými aborty, případně narozením postiženého dítěte.

2.4 Oplození *in vitro* (*In Vitro* Fertilization – IVF)

Oplození *in vitro* (oplození mimo tělo ženy) je jednou z častých metod asistované reprodukce, které podstupují páry většinou s diagnózou infertility.

2.4.1 Stimulace a punkce ovárií

Po nezbytném celkovém vyšetření obou partnerů, je zahájena příprava ženy k odběru oocytů.

U těchto žen se indikuje hormonální stimulace ovárií, které jsou během stimulace ovárií monitorovány pomocí ultrazvuku. Po dosažení správné velikosti a zralosti oocytů, se oocyty získávají pomocí laparoskopie pod pečlivou kontrolou ultrazvuku. Při punkci ovárií jsou získávány preovulační oocyty spolu s folikulární tekutinou. Oocyty jsou aspirovány kanylou a přeneseny do skleněné komůrky s kultivačním médiem. Následně jsou oocyty očištěny a následuje přidání spermií a to buď partnera, nebo anonymního dárce spermií (Vacek, 2006). Pomocí metod IVF, ICSI, IMSI se provede oplodnění oocytů a embrya jsou umístěna v živném médiu. Všechny tyto

mikromanipulační metody se provádí pod speciálním mikroskopem, mikromanipulační technikou, kterou provádí embryolog - specialista.

Po 16-18 hodinách je provedena kontrola fertilizace pod mikroskopem. Pomocí rozvoje nových technik se mohou embrya kultivovat déle (tzv. prodloužená kultivace) a embrya jsou transferována do dělohy ženy 5. den (ojediněle 6. den) od provedení punkce oocytů. V dnešní době se provádí transfer embryí v převážné většině center asistované reprodukce ve fázi blastocysty.

2.4.2 Hyperstimulační syndrom (OHSS)

Jednou ze závažnějších komplikací po hormonální stimulaci ovárií, s cílem získat větší počet ovulovaných vajíček, je ovariální hyperstimulační syndrom (OHSS). Může se vyskytnout u 0,5-1% klientek (Vacek, 2006).

K dosažení většího počtu předovulačních folikulů se ovária stimulují gonadotropiny, ovulace se provokuje lidským gonadotropinem (hCG). V ováriích se vyvine větší počet předovulačních folikulů, ty se po ovulaci změní na žlutá tělíska cystického charakteru vyplněná tekutinou. S rozvojem luteálních cyst se uvolňují faktory zvyšující srážlivost krve a propustnost cévní stěny a to zejména cévní endotelový růstový faktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) a interleukiny z nichž nejvýznamnější je IL-6. Únik tekutiny z cévního řečiště má za následek hypovolémii a narušení systému hemokoagulace. Může dojít k mnoha patologickým stavům jako oligurie, hyperkoagulace, embolie, ascites, hydrothorax, DIC.

OHSS se obvykle rozvine za 2-3 dny po punkci oocytů, občas u některých žen až po nidaci blastocysty. V ojedinělých případech může nastat stav, který ohrožuje klientku na zdraví, ale obvykle se stav zvládne pomocí symptomatické léčby (Vacek, 2006)

Jedním z článků při léčbě neplodnosti na specializovaném pracovišti reprodukční medicíny, může být genetické vyšetření embrya před samotnou implantací embrya do dělohy ženy.

2.5 Raný embryonální vývoj

2.5.1 Blastogeneze

Blastogeneze je časové období od vzniku zygoty, v její rýhování v morulu, přeměnu moruly v blastocystu až po vznik a diferenciaci zárodečných listů. Jde o období, které začíná několik hodin po oplození a trvá až do konce 2. týdne po oplození.

2.5.2 Rýhování

Podstatou rýhování jsou po řadě jdoucí následující mitózy.

Na rozdíl od běžné mitózy buněk, dceřiné buňky (blastomery) v relativně krátké interfázi po replikaci chromosomů nenabývají velikosti mateřské buňky. Vstupují ihned do další mitózy a postupně se zmenšují. Zmenšování buněk je jedním z předpokladů pro jejich migrace v dalších vývojových procesech. Rýhování tak zabezpečuje obnovení velikosti buněk. Způsob a průběh rýhování se odvíjí od množství a rozložení zásobních látek (proteinů, lipidů a polysacharidů) v cytoplazmě vajíčka tzv. žloutek. Žloutek je obecně, jako překážka při ohraničování buněk v období rýhování. Rýhování závisí nejenom na množství žloutku, ale také na jeho rozložení v cytoplazmě.

Lidské vajíčko je oligolecitální, izolecitální a holoblastické. Rýhování probíhá totálně a ekválně. Žloutkové inkluze nejsou rozloženy stejnoměrně po celé cytoplazmě vajíčka a projevuje se to v začátcích rýhování, nestejnou velikostí některých blastomer.

2.5.3 Blastomera

Prvním rýhovacím dělením se oplodněné vajíčko (zygota) rozdělí na 2 téměř stejné blastomery, které jsou uloženy uvnitř zona pellucida. U pokusů in vitro je známo, že dvoubuněčného stádia je dosaženo za 24-30 hodin po oplození. Další dělení je asynchronní. Jedna z blastomer může být o něco větší a dělí se dříve, takže následuje přechodně trojbuněčné stádium a blastomery jsou větší a menší. Asi za 40-50 hodin po oplození je dosaženo čtyřbuněčného stádia. Určitý nepoměr rýhování a rozdíl mezi velikostí blastomer je podmíněn tím, že žloutek ani u lidského vajíčka, klasifikovaného

jako izolecitální, není v cytoplazmě rozložen zcela rovnoměrně, což se projeví v dalším průběhu rýhování. Větší blastomery se dělí o něco dříve.

Blastomery až do osmibuněčného stádia jsou odděleny od sebe hlubokými rýhami, čímž vyniká jejich kulovitý tvar. Uspořádání blastomer je přirovnáváno k plodu moruše, proto tím pádem název morula (lat. morus = moruše). V rané morule drží blastomery pomocí přilnavostí adhezivních molekul CAMs (Cell Adhesive Molecules). V tomto stádiu jdou blastomery experimentálně snadno oddělit. Z každé blastomery se může dál vyvinout celý jedinec a přirozeným fyziologickým oddělením může vzniknout jednovaječná multiparita. Rýhování probíhá během postupování zygoty vejcovodem, což pomáhá zajišťovat řasinkový pohyb epitelu vejcovodu i peristaltika hladkého svalstva vejcovodu. Po 60-70 hodinách po oplození je dosaženo stádia šestnácti blastomer.

2.5.4 Vývoj blastocysty

Mitotickým dělením od osmibuněčného stádia vznikají další blastomery, které se vsouvají dovnitř moruly. Mezi blastomerami se v povrchové vrstvě utvářejí těsné mezibuněčné kontakty (zonulae occludentes, tight junctions). Morula dosahuje kompaktnějšího vzhledu a oddělující se rýhy jsou méně zřetelné. Na povrchu moruly zůstává zachována zona pellucida. V tomto stádiu vývoje vstupuje pozdní morula do dělohy, to je asi třetí den po oplození.

Rozdíly mezi mezibuněčnými kontakty v jejich propustnosti se uplatňují v prvním stádiu diferenciaci. Zevní blastomery se přemění v buňky zevní obalové vrstvy- budoucí trofoblast. Blastomery uvnitř útvaru vytvoří vnitřní buněčnou masu – budoucí embryoblast. K procesu diferenciaci dochází krátce po vstupu moruly do dělohy a obě dvě tyto tkáně se liší funkcí, strukturou i genovou expresí.

Trofoblast je schopen syntetizovat hormon choriový gonadotropin (hCG), což je hormon stukturou i funkcí podobný hypofyzárnímu luteinizačnímu hormonu (LH). Vzhledem k časnému začátku tvorby se dá detekovat v moči u žen již v 9. týdnu gravidity. Zvýšeným příjmem tekutiny z okolí, která prostupuje zónou pelucidou a

hromadí se mezi buňkami vnitřní buněčné masy a obalovou vrstvou, vznikne uvnitř rozsáhlý prostor – dutina blastocysty (blastocel).

Buňky vnitřní buněčné masy se přeskupí jako embryoblast k jednomu pólu vzniklého vajíčku zvaného blastocysta. Na povrchu je ohraničena vrstvou plochých buněk obalu – trofoblast a zona pelucida odpadne. V děložní dutině zůstává volná blastocysta asi 2 dny a 6. -7. den následuje její implantace do děložní sliznice. Blastocysta je specifickým vývojovým stádiem u savců (Vacek, 2006).

2.6 Preimplantační genetické vyšetření

2.6.1 Účel

Preimplantační genetické vyšetření je soubor experimentálních metod, které umožňují vyšetřit genetickou výbavu embryí vzniklých mimotělním oplodněním (in vitro fertilizací – IVF) ještě před jejich zavedením (transferem) do dělohy matky.

Preimplantační vyšetření je jednou z dostupných metod asistované reprodukce. Podstatou preimplantačního vyšetření je selekce geneticky zdravých embryí spolu s morfologickými kritérii při výběru transferovaného embrya. Genetické vyšetření je prováděno po odběru (biopsii) jedné nebo více buněk v raných fázích vývoje embrya. Preimplantační genetická vyšetření spočívají v analýze počtu a struktury chromosomů, případně v cíleném vyšetření jednotlivých genů/sekvence DNA. Chromosomy jsou uloženy v buněčném jádře a jsou tvořené spiralizovanou molekulou deoxyribonukleové kyseliny (DNA), která nese unikátní genetickou informaci každého jedince. Odbioptovaný materiál z embryí je vyšetřován pomocí molekulárně genetických nebo cytogenetických metod.

2.6.2 Historie

Začátky preimplantační diagnostiky (PGD) se tradují na konci 80. let 20. století v Londýně.

Byla provedena analýza DNA z jedné buňky, pomocí PCR byla vyšetřována přítomnost chromosomu Y u páru s X – vázanou recesivní chorobou -adrenoleukodystrofií

(Handyside et al, 1990). Toto onemocnění je velmi závažné a spojené s mentální retardací.

Preimplantační genetický screening (PGS) pomocí metody FISH (Fluorescenční in situ hybridizace) byl uskutečněn v roce 1993. Pro vyšetření byla použita jedna buňka – blastomera, odbioptována ze 4 denního embrya. Bylo provedeno vyšetření aneuploidii chromosomů X, Y, 13,15,18,21 a 22 (Munné et al., 1993).

2.6.3 Druhy preimplantačního vyšetření a indikace k jejich provedení

V současnosti lze preimplantační vyšetření provést pouze na základě indikace klinického genetika, který pečlivě prodiskutuje danou problematiku s konkrétním párem a nedirektivně nabídne možné alternativy genetického vyšetření.

Na základě genetické konzultace lze indikovat dva druhy preimplantačního vyšetření:

a) Preimplantační genetický screening (PGS)

Preimplantační screening je komplexní vyšetření, kterým lze vyloučit odchylky v počtu chromosomů, popřípadě jejich částí. Tím je možno snížit riziko potratu či narození dítěte s genetickou abnormalitou. U některých párů právě zvýšené riziko vzniku embryí s abnormální chromosomovou výbavou výrazně snižuje šanci na otěhotnění a porod zdravého dítěte.

Preimplantačním screeningem je možné vyšetřit sporadické (náhodné) aneuploidie embryí. K transferu jsou doporučena embrya bez prokázaných aneusomií či rozsáhlých segmentálních nebalancovaných chromosomových aberací. Vyšetření je limitováno rozlišovací schopností cca 20 Mb.

Indikace k PGS jsou:

- vyšší věk ženy,
- opakované těhotenské ztráty,
- neúspěšné předchozí IVF cykly,
- porod nebo potrat plodu s vývojovou vadou/ a nebo chromosomovou abnormalitou,
- výrazně zhoršené parametry spermogramu,

- použití spermií po TESE (odebrání spermií přímo z varlete) nebo MESA (odebrání spermií přímo z nadvarlete) pro IVF,
- stav po léčbě onkologického onemocnění či ozařování u jednoho nebo obou partnerů.

b) Preimplantační genetická diagnostika (PGD)

Preimplantační diagnostika je cílená diagnostika familiárního monogenního genetického onemocnění nebo chromosomové abnormality. Tyto poruchy jsou přenášeny s určitou mírou rizika z generace na generaci a tím můžou vést k postižení jedinců v rodině. Zároveň projevem familiárního genetického onemocnění nebo chromosomové abnormality mohou být opakované těhotenské ztráty.

Indikace k PGD jsou:

- nosičství tzv. balancované chromosomové přestavby (obvykle translokace) u jednoho nebo obou partnerů,
- přítomnost početních změn pohlavních chromosomů (gonosomů), včetně mosaikové formy u jednoho nebo obou partnerů,
- nosičství, tudíž i riziko přenosu závažného genetického onemocnění, které je způsobeno poruchou jednoho genu (tzv. monogenní onemocnění). V případě vyšetření monogenního onemocnění, obvykle nemá vyšetřovaný pár poruchu infertility, ale k podstoupení vyšetření je přiměřeně výskyt postiženého člena v rodině (Fragouli, 2007; Uflacker *et al.*, 2014).

c) Kombinace PGS a PGD

Kombinace preimplantační diagnostiky souběžně a preimplantačního screeningu je vyšetření familiárního monogenního genetického onemocnění zároveň i s vyšetřením chromosomových familiárních aberací.

2.6.4 Metody preimplantačního vyšetření

a) Metoda fluorescenční hybridizace in situ (FISH)

Metoda FISH je jednou z průkopnic metod preimplantačního vyšetření, které je v současné době již obsoletní z hlediska screeningu chromosomových abnormalit.

Vyšetření metodou FISH se dříve používalo pro preimplantační genetický screening (PGS) vybraných chromosomů (obvykle 5 vybraných nejčastějších chromosomových odchylek). Metoda je velmi limitována technickou stránkou vyšetření, která diagnostiku dosti limituje (Munné, 2002). Může dojít k selhání hybridizace (chybí signál nebo je jen velmi málo patrný), překryvu jader, anebo neúmyslné odmytí některých jader (při chybné fixaci).

Je ovšem nenahraditelná a obvykle jediná možnost pro vyšetření preimplantační genetické diagnostiky (PGD) u nebalancovaných forem familiárních translokací malého rozsahu, kde není možno použít metodu aCGH. Více než 5% všech párů, které hledají pomoc v centrech asistované reprodukce, jsou nositelé balancovaných chromosomových abnormalit (Celep et al., 2006). Tito jedinci mají normální fenotyp, ale mají zvýšené riziko produkce gamet s nesprávným počtem chromosomů.

Vyšetřují se buněčná jádra fixovaná na podložní mikroskopické sklo. Principem této metody, je označení několika specifických chromosomových oblastí fluorescenčně značenou sondou komplementární k danému úseku DNA. Vyhodnocení se provádí pomocí fluorescenční mikroskopie. Metodou lze stanovit početní změny chromosomů, označených zvolenou fluorescenční sondou. Při provádění preimplantační diagnostiky (PGD) pro zjištění nebalancované formy familiární translokace se jedná o části chromosomů účastnící se této přestavby. Preimplantační diagnostikou (PGD) metodou FISH obvykle předchází chromosomové vyšetření rodičů pro ověření přesnosti navržené kombinace fluorescenčních sond (SET-UP). FISH nelze vyloučit jakékoliv další onemocnění či vývojové vady plodu, které nejsou způsobeny změnou počtu vyšetřovaných chromosomových oblastí.

b) Komparativní genomová hybridizace (aCGH)

Komparativní genomová hybridizace je metoda, která tvoří spojení klasické cytogenetiky a molekulární genetiky. Vychází z metody fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Byla vyvinuta pro sledování a odhalování genetických změn u solidních nádorů (Kallioniemi et al., 1992) a v současnosti se velmi využívá pro preimplantační diagnostiku i preimplantační screening (Fiegler et al 2007).

c) Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce PCR (z ang. Polymerase Chain Reaction) je jednou z nejběžnějších a nejvyužívanějších molekulárně biologickou metodou. Slouží ke zmnožení (amplifikaci) specifických úseků DNA a využívá procesů denaturace, hybridizace a syntézy (replikace) DNA.

Je ve velké míře využívána v diagnostice mnoha geneticky podmíněných chorob, které bývají často vyvolány mutacemi, které mění počet nukleotidů v příslušných genech.

Nejčastěji vyšetřované mutace jsou například mutace v genu CFTR - cystická fibróza (Handyside *et al.*, 1992).

Dále mutace na chromosomu X -syndrom fragilního X, Duchennova muskulární atrofie a velmi závažné neurodegenerativní onemocnění Huntingtonova chorea.

d) Karyomapping

Karyomapping je nová metoda, která je rychlejší alternativou pro PGD monogenních onemocnění prováděných metodou PCR. Karyomapping je jedna z nejmodernějších technologií genetického testování embrya. Pomocí metody karyomappingu se mohou provádět vyšetření pro různá monogenní onemocnění a zároveň je možno vyšetřit screening aneuploidii vyšetřovaného embrya. K transferu jsou doporučena embrya bez zátěže daného genetického monogenního onemocnění s normální chromosomovou výbavou (Thornhill *et al.*, 2015; Handyside *et al.*, 2009).

e) Sekvenování nové generace (NGS - Next Generation Sequencing)

Sekvenování nové generace NGS (z ang. Next Generation Sequencing) je metoda, která v porovnání s klasickými metodami sekvenování umožňuje především rychlou a cenově příznivou produkci velkého množství osekvenovaných vzorků najednou. Je využíváno principu paralelizace procesu sekvenování, kdy dochází k sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně. Výsledkem je obrovská produkce výstupních dat, které se musí utřídit a analyzovat. Existují řady různých technologií, které mají své přednosti i nevýhody. Využití této metody pro celogenomové sekvenování, je vlastně sekvenování neznámých genomů tzv. *de novo*, sekvenování jednotlivých chromosomů, plazmidů, mitochondrií, mutační analýzu a kvantifikaci jednotlivých alel.

2.6.5 Rizika preimplantačního genetického vyšetření

Úspěšnost preimplantačních genetických vyšetření je limitována:

- získáním dostatečného počtu kvalitních a vyvíjejících embryí z IVF cyklu,
- tím, že pokud je u všech embryí prokázán abnormální genetický nález, nebude žádné z těchto embryí doporučeno k transferu (přenosu do dělohy),
- tím, že i přes dodržení veškerých postupů laboratorní praxe a použití odpovídajícího technického vybavení během vyšetření, nemusí výsledek preimplantačního vyšetření poskytnout informaci o genetické výbavě embrya se stoprocentní jistotou (riziko nesprávné diagnostiky),
- tím, že embrya, která byla doporučena k transferu na základě preimplantační analýzy mohou skončit spontánním potratem, mimoděložním těhotenstvím nebo úmrtím plodu přibližně se stejným rizikem jako těhotenství vzniklá spontánním početím.

3 Cíl práce a hypotézy

- 1.** Osvětlit problematiku preimplantační analýzy a to především vyšetření – preimplantačního screeningu (PGS) a preimplantační diagnostiky současně s preimplantačním screeningem (PGD/PGS).
- 2.** Porovnat výsledky počtu euploidních embryí u žen, u kterých se vyšetřovaly embrya z vlastních gamet, počet euploidních embryí, kde byly použity dárcovské gamety (tj. od dárkyň do 32 let věku) a provedeno vyšetření preimplantační screening (PGS)
- 3.** Porovnat počty euploidních a aneuploidních embryí při vyšetření preimplantační diagnostika současně s preimplantačním screeningem (PGS/PGD).
- 4.** Hypotéza – se zvyšujícím se věkem stoupá výskyt sporadických aneuploidií, potvrdit/vyvrátit porovnání počtu normálních/abnormálních embryí při vyšetření preimplantačního screeningu (PGS) dle věku matek.

4 Materiály a metodika

Vyšetřovaný soubor obsahuje celkem 98 případů vyšetřovaných klientek za rok 2014. Analyzovali jsme 469 embryonálních vzorků trofoektodermu, většinou 4-10 buněk z pěti nebo šestidenního embrya. Věkový rozsah klientek byl 30 let až 49 let. Požadované vyšetření bylo provedeno na základě genetické indikace a to buď preimplantační screening (PGS) nebo preimplantační diagnostika spolu se screeningem početních a strukturních změn ostatních chromosomů (PGD/PGS).

Veškerá vyšetření byla provedena v Genetické laboratoři v Centru IVF Prof. Zecha v Plzni.

U některých klientek bylo indikováno využít darované gamety (oocyty a spermie).

V našem IVF centru platí přísná kritéria pro dárkyně vajíček tak pro dárce spermií. Darování gamet je přísně anonymní a je zcela bezplatné.

Požadavky na dárkyně dárce oocytů a dárce spermií:

- věk do 19-32 let,
- minimálně SŠ vzdělání bez maturity,
- výborný zdravotní stav (negativní serologické testy: BWR, HIV1/2, HbSAg, HCV),
- bez genetické zátěže v rodinné anamnéze (RA)
- normální karyotyp a nepřítomnost mutace v genu CFTR.

4.1 Vyšetřovaný biologický materiál

4.1.1 Odběr vzorků (biopsie)

Při biopsii jsou z vajíčka (oocytu) nebo vyvíjejícího se embrya odebírány nediferencované buňky, jejichž odběr neovlivní další vývoj embrya.

Bioptovaný biologický materiál:

a) Polární tělísko

Polární tělísko jsou produktem meiotického dělení a obsahují 23 mateřských chromosomů (1. polární tělísko) a 23 mateřských chromatid (2. polární tělísko). Při

vyšetření polárních tělísek je tedy testována pouze mateřská chromosomová výbava budoucího embrya, viz Obr. č. 1.

- u zralého vajíčka – 1. polární tělísko (den 0 zárodečného vývoje),
- oplozeného vajíčka – 2. polární tělísko (den 1 zárodečného vývoje).

Obrázek č. 1: Odběr polárního tělíska



(Autor: Pavla Nováková, IVF laboratoř IVF Zentren Prof. Zecha, Plzeň.)

b) Blastomera

Odběr se provádí 3. den vývoje embrya, kdy se šetrně odeberou 1-2 buňky (blastomery) z 6-10 buněčného embrya. Všechny buňky tohoto embrya jsou totipotentní, může z takové každé buňky vzniknout celý organismus a tímto odběrem není vyvíjející se embryo ohroženo (Harper *et al.*, 2010), viz Obr. č. 2.

Obrázek č. 2: Odběr blastomery



(Autor: Pavla Nováková, IVF laboratoř IVF Zentren Prof. Zecha, Plzeň.)

3) Trofoektoderm

Odběr se provádí 5. - 6. den vývoje embrya (blastocysty), kdy se šetrně odebere několik buněk trofoektodermu. Z trofoektodermu se později v průběhu těhotenství vyvíjí placenta, nejedná se tedy o zásah do tkání budoucího plodu. Tento typ odběru je mnohem produktivnější, neboť získáme větší počet buněk než u odběru jedné nebo dvou blastomer. Díky tomu je genetická diagnostika jednodušší a zároveň robustnější. Nevýhodou je zvýšená pravděpodobnost mosaicistních buněk (Chang *et al.*,2013), viz Obr. č. 3, 4, 5 a 6.

Obrázek č. 3: Před odběrem trofoektodermu, blastocysta 5. den vývoje



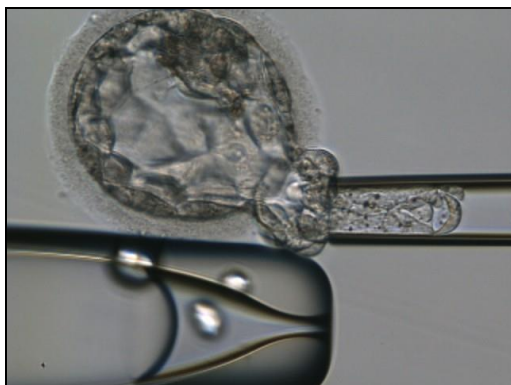
(Autor: Pavla Nováková, IVF laboratoř IVF Zentren Prof. Zecha, Plzeň.)

Obrázek č. 4: Odběr trofoektodermu



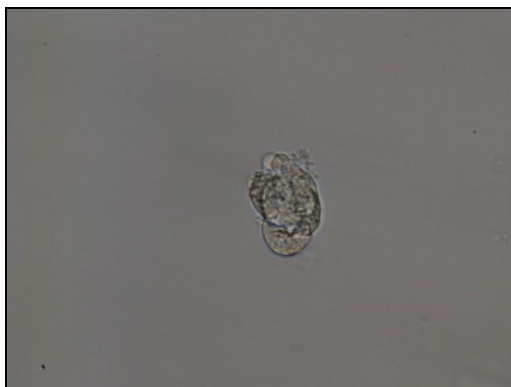
(Autor: Pavla Nováková, IVF laboratoř IVF Zentren Prof. Zecha, Plzeň.)

Obrázek č. 5: Provedení odběru trofoektodermu



(Autor: Pavla Nováková, IVF laboratoř IVF Zentren Prof. Zecha, Plzeň.)

Obrázek č. 6: Odebrané buňky trofoektodermu



(Autor: Pavla Nováková, IVF laboratoř IVF Zentren Prof. Zecha, Plzeň.)

Po provedení biopsie je embryo ihned uloženo zpět do inkubátoru. Vzorek odebraných buněk není samostatně životaschopný a je předán do genetické laboratoře k danému vyšetření.

Nejčastěji je používán embryonální materiál odebraný 5. den (výjimečně 6. den) z trofoektodermu embryonálního vývoje. Biopsie se provádí u embrya, které se již skládá z více jak 100 buněk, a proto je možno odebrat větší počet buněk (5-10), což významně zvyšuje přesnost genetického vyšetření.

4.2 Zvláštní opatření během provádění vyšetření

Jednotlivé fáze vyšetření se provádí v oddělených prostorách, proto aby nedošlo ke kontaminaci analyzovaných vzorků, používaných reagensů i přístrojového vybavení.

Manipulace se vzorky primárního odběru a provádění celogenomové amplifikace (WGA) se provádí za důsledného dodržování podmínek pro zamezení kontaminace vzorku cizorodou DNA.

Tato kontaminace by mohla způsobit selhání experimentu či nesprávný výsledek. Pro minimalizování kontaminace cizorodou DNA se dodržují nastavená pravidla:

- používání vhodných (jednorázových) ochranných pomůcek (laboratorní plášť, rukavice, čepice a ústenka),
- používání jednorázových sterilních rukavic bez pudru v průběhu celé analýzy a při podezření na znečištění ihned rukavice vyměnit,
- provádění celého postupu v čistém a dekontaminovaném laminárním boxu
- používání vhodného jednorázového dekontaminovaného spotřebního materiálu a sterilních médií,
- centrifugování mikrozkuvek vždy po přidání reagensů před jejich dalším otevřením,
- minimalizovat dobu, po kterou jsou mikrozkuvky otevřené.

4.3 Příprava pacienta k odběru

Embryonální vzorky primárního odběru jsou získávány biopsií embryí vykultivovaných v rámci IVF léčby v IVF centru, a proto jejich odběr nevyžaduje žádnou zvláštní přípravu klientky.

4.4 Pufr pro biopsii

Přípravu pufru 1x PBS (fosfátový pufr), do kterého se po biopsii embrya odbioptovaný embryonální vzorek odebírá, připravuje laboratorní pracovník genetické laboratoře.

Po provedení biopsie embrya, zpravidla z trofoektodermu, získáme jen několik buněk (5-10) pro další následné analýzy. Proto je velmi důležité tyto odebrané buňky

amplifikovat do požadovaného množství DNA pomocí celogenomové amplifikace (WGA).

4.5 Analytická fáze

4.5.1 Celogenomová amplifikace

Celogenomová amplifikace (WGA) byla prováděna pomocí komerčního kitu SurePlex™ DNA Amplification System. Celogenomovou amplifikaci provádíme v pre - PCR laboratoři a dodržujeme všechna doporučení přesně podle návodu výrobce (www.cambridgebluegnome.com).

Při celogenomové amplifikaci tak dochází ke zmnožení DNA odpovídající kvality z malého množství biologického materiálu, který vstupuje do reakce. V reakci startuje 5-10 odbioptovaných buněk trofoektodermu z pěti, případně šestidenního embrya. Jedna diploidní buňka obsahuje asi 6 pikogramů DNA. Pro účely celogenomové analýzy je zapotřebí DNA v koncentraci desítek nanogramů.

S malým množstvím vstupního materiálu je spojeno vysoké riziko kontaminace při manipulaci a odběru embryonálních vzorků. Současně může nastat i situace selhání amplifikace, preferenční amplifikace a alelický drop-out (Hughes *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005; Snabes *et al.*, 1994).

4.5.1.1 Odběr kontrolních vzorků

Pro vyšetření metodou aCGH a celogenomovou amplifikaci (WGA) je nutné odebrat ke každému embryonálnímu vzorku kontrolní vzorek z okolního prostředí v poslední promývací kapce. Požadováno je také poskytnutí čistého vzorku kultivačního média z aktuálně používaného balení. Odběrovou sadu vždy provází rezervní zkumavky s čistým transportním pufrem, alespoň jedna z nich je vždy ponechána neotevřená. Tyto vzorky slouží jako negativní kontrola v následných amplifikačních reakcích.

4.5.1.2 Kontrola úspěšnosti amplifikace pomocí gelové elektroforézy

Veškerá manipulace s naamplifikovanými vzorky probíhá v Post – PCR laboratoři.

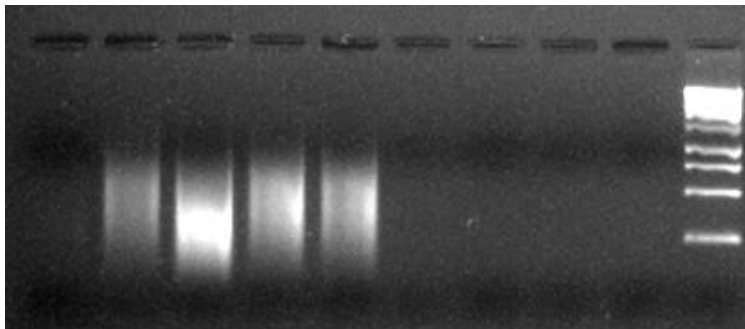
Po celogenomové amplifikaci (WGA) provádíme kontrolu úspěšnosti získání produktu naamplifikované embryonální DNA pomocí gelové elektroforézy, viz Obr. č. 7.

Obrázek č. 7: Příklad vyhodnocení úspěšnosti amplifikace

Vysvětlivky: **P1** - poz. kontrola; **N** - negat. kontrola; **C** - kontrola kultivač. média;

vzorek č. 12/1 - neúspěšná amplifikace embryonálního vzorku, **vzorek č. 12/2, 15/3,**

16/5 - úspěšná amplifikace embryonálního vzorku.



12/1 12/2 15/3 16/5 P1 N C12-1 C15-3 C16-5 Ladder

(Autor: Monika Pittrová (vlastní), IVF laboratoř IVF Zentren Prof. Zecha, Plzeň.)

Po odečtení a zhodnocení gelové elektroforézy můžeme přistoupit k provedení metody aCGH.

4.5.2 Metoda aCGH

Metoda aCGH je preimplantační genetická analýza biologického materiálu pocházejícího z embryí, které jsou produkty koncepce in vitro. Vyšetření se provádí na platformě 24sure BlueGnome (Illumina).

4.5.2.1 Princip metody

Metodou „single – cell“ a CGH je vyšetřován biologický materiál, který pochází z časných stádií embryí. Z embryonálních vzorků je extrahována DNA, následně je mnohonásobně zmnožena pomocí metody celogenomové amplifikace (WGA).

Úspěšně naamplifikované vzorky DNA a referenční genomová DNA jsou označeny rozdílnými fluorochromy. Poté jsou následně společně hybridizovány na sklo čipu (mikroarray čip). Po skenování s vysokým rozlišením se provádí vyhodnocení pomocí speciálního softwaru. Změny poměru intenzit obou fluorochromů detekují oblasti se ztrátou nebo ziskem celých chromosomů nebo jejich částí.

Metoda je limitována rozlišovací schopností použité čipové platformy.

Používané platformy (limit rozlišení):

- **BlueGnome 24sure™ V3** (rozlišovací schopnost cca 20Mb),
- **BlueGnome 24sure™+** (rozlišovací schopnost cca 10Mb).

4.5.2.2 Postup

Vyšetření arrayCGH je dvoudenní a provádí se převážně Post-PCR laboratoři. Pipetování se provádí v Post- PCR digestoři.

Fluorescenční barvy je nutné maximálně chránit před přímým světlem, a proto se veškerá manipulace s nimi provádí za tlumeného osvětlení.

Zároveň se identická manipulace provádí se zkumavkami s naředěnými značícími mastermixy, naznačenými vzorky a podložními skly (čipy) s nahybridizovanými vzorky, které chráníme před světlem – použitím aluminiové fólie.

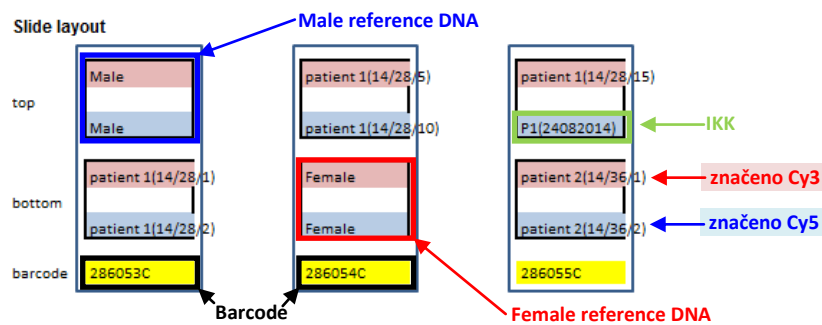
Vše provádíme podle doporučeného návodu výrobcem a dodržujeme přesně stanovené pokyny a doporučení (www.cambridgebluegnome.com).

Vyšetření je prováděno v několika krocích:

a) Fluorescenční značení vzorků

Před začátkem zahájení práce si připravíme Hybridizační protokol (24 sure) a příslušný BlueGnome planer (V3,V+). Značení se provádí dvěma odlišnými barevnými značeními (červená a modrá barva), (viz Obr. č. 8).

Obrázek č. 8: Příklad vyplněného BlueGnome planeru



b) Kombinace, zakoncentrování a hybridizace vzorků na mikroarray čipy

Po skončení značení se zkombinují barevně značené vzorky přesně podle vyplněného BlueGnome planeru. Po COT DNA se provede zakoncentrování vzorků a nanesení na mikroarray čipy a hybridizujeme obvykle do druhého dne.

c) Promytí čipů

Promývací roztoky připravíme vždy čerstvé a to maximálně 1 den předem.

Promývání čipů provádíme dle návodu a dodržujeme přesně stanovené čas v jednotlivých promývacích roztocích.

Po promytí čipů centrifugujeme mikroarray skla v centrifuze při 190 rcf/ 3 minuty.

Poté rychle vložíme skla do neprůhledné krabičky a dáme skenovat.

d) Skenování čipů

Před samotným skenováním čipů provedeme kontrolu laseru (obvykle se provádí před zahájením každého skenování, nejméně však 1x za 14 dnů).

e) Hodnocení čipů

Vyhodnocení čipů provádí odborný vysokoškolský laboratorní pracovník. Z vyšetření je vydán výsledkový list s interpretací výsledku pro žádajícího lékaře.

4.6 Postanalytická fáze

Řádně vyplněný a podepsaný hybridizační protokol je společně s planerem uchováván v papírové podobě v administrativní části genetické laboratoře. Výstup z hodnocení SW BlueFuse je uchováván pro každou pacientku zvlášť.

4.6.1 Archivace vzorků po WGA

Archivovány jsou pouze ty vzorky, které prošly úspěšnou amplifikací. Zkumavky jsou označeny samolepícím štítkem a uchovávány při teplotě nižší než -15°C nejméně po dobu 5 let.

4.6.2 Archivace aCGH preparátů

Preparáty jsou uchovávány v neprůhledných boxech při laboratorní teplotě po dobu 1 roku.

4.6.3 Interní kontrola kvality (IKK)

Ve shodě s pravidly jsou u preimplantačního vyšetření metodou aCGH prováděny postupy interní kontroly kvality dle platných směrnic.

4.6.4 Mezilaboratorní porovnání

Laboratoř se účastní pravidelně mezilaboratorního porovnání. Přednostně volí účast v mezinárodním externím hodnocení kvality CEQA/CEQAS (<http://www.ceqa-cyto.eu/cyton/Home>).

4.6.5 Metrologická návaznost

Metrologická návaznost je zajišťována a jsou dodržovány orientační a přesné hodnoty v pracovních postupech.

Hodnoty v pracovních postupech mohou být:

- **orientační:** je používáno orientační měřidlo, měřené hodnoty jsou uváděny pouze přibližně (například ~15 min.),
- **přesné:** je používáno na měření hodnot vyhovující kalibrované měřidlo nebo přístroj s integrovaným kalibrovaným měřidlem, které vyhovuje danému použití.

5 Výsledky

5.1 Celkový soubor vyšetření aCGH za rok 2014

Za rok 2014 jsme v naší genetické laboratoři vyšetřili celkem 98 případů – klientek. Tyto klientky absolvovaly v našem centru léčbu neplodnosti a zároveň využily také preimplantační analýzy. A to buď vyšetření preimplantačního screeningu (PGS), anebo vyšetření pro chromosomovou familiární aberaci spojenou se screeningem početních změn ostatních chromosomů (PGD/PGS) pomocí metody aCGH. Z toho vyšetření PGD/PGS na platformě 24sure^{TM+} absolvovalo 14 klientek a vyšetření PGS na platformě 24sureTM V3 84 klientek (viz Tab. č. 1).

Tabulka č. 1: Počet vyšetření za rok 2014 (klientky)

Počet vyšetření za rok 2014 (klientky)	
PGS/PGD (platforma 24sure ^{TM+})	14
PGS (platforma 24sure TM V3)	84
Celkem	98

5.1.1 Celkový počet vyšetřených embryí na obou platformách

Vyšetřili jsme celkem 469 embryí, vyšetřovaný materiál získaný pomocí biopsie trofoektodermu a to většinou 4-10 buněk z pěti nebo šestidenního embrya. Bylo provedeno vyšetření pomocí metody aCGH a to na platformách 24sure Bluegnome (čipy 24sureTM V3 a 24sure^{TM+}), viz Tab. č. 2 a Graf č. 1.

Metodou aCGH jsou vyšetřovány pouze ty vzorky, které prošly úspěšnou celogenomovou amplifikací s dostatečnou výtěžností produktu embryonální DNA (dle kontroly na elektroforéze).

Počet vyšetřených embryonálních vzorků za rok 2014 bylo 469. Z toho bylo analyzováno 366 embryí pomocí platformy 24sureTMV3 a 103 embryí bylo vyšetřeno pomocí platformy 24sure^{TM+}, viz tabulka č. 2.

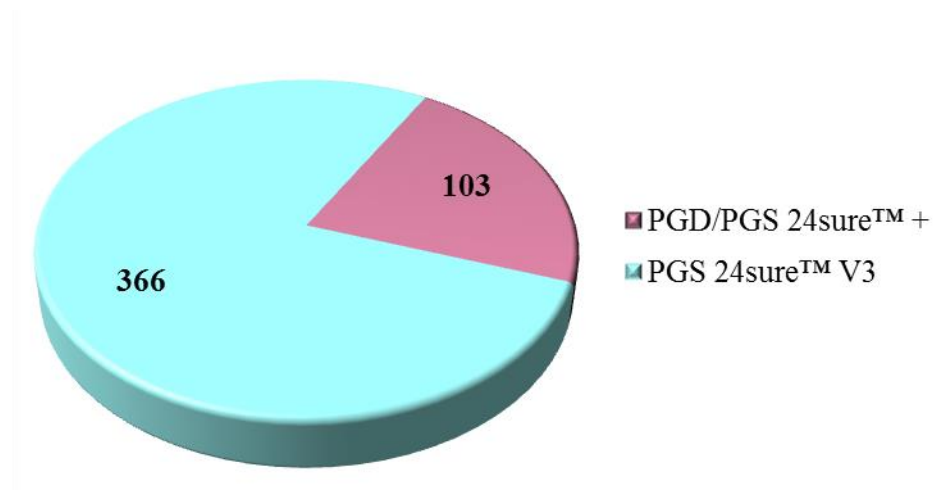
Tabulka č. 2: Počet vyšetřených embryí za rok 2014

(dle typu vyšetření a použité platformy)

Počty vyšetřených embryí za rok 2014		
Typ vyšetření	Platforma	Počet vyšetřených embryí
PGD/PGS	24sure™ +	103
PGS	24sure™ V3	366
Celkem vyšetřených embryí		469

Graf č. 1: Počet vyšetřených embryí za rok 2014

(podle typu vyšetření a platformy)



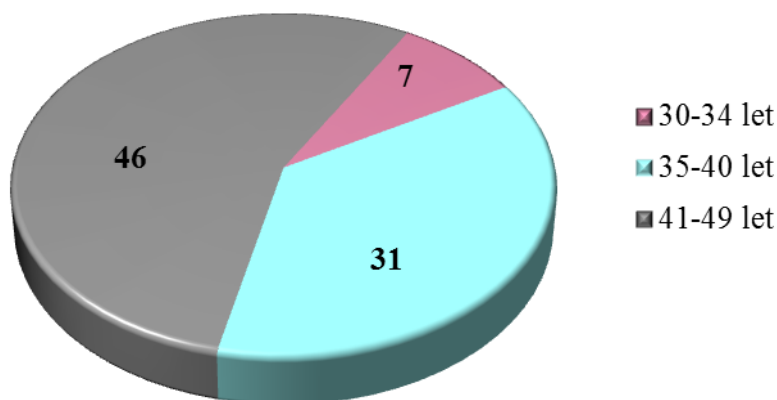
5.1.2 Počet vyšetření dle věku klientek a typu platformy

Celkový průměr věku klientek byl 40,5 roku. Věk vyšetřovaných klientek jsem rozdělila do věkové skupiny 30-34 let, kdy na platformě 24sure™ V3 bylo vyšetřeno 7 klientek a na platformě 24sure™ + byly vyšetřeny 4 klientky. Ve věkové skupině 34-40 let bylo na platformě 24sure™ V3 vyšetřeno 31 klientek a na platformě 24sure™ + bylo vyšetřeno 7 klientek. V poslední skupině v 41-49 let bylo vyšetřeno 46 klientek na platformě 24sure™ V3 a 3 klientky na platformě 24sure™ +. Celkově bylo vyšetřeno 98 klientek, viz Tab. č. 3.

Tabulka č. 3: Počet vyšetření podle věku klientek (vyšetření metodou aCGH 24sure Bluegnome na platformách 24sure™ V3 a 24sure™ +)

Počet vyšetření podle věku klientek			
Věk vyšetřovaných klientek	Počet vyšetření/ platforma 24sure™ V3	Počet vyšetření/ platforma 24sure™ +	Celkový počet vyšetření
30-34 let	7	4	11
35-40 let	31	7	38
41-49 let	46	3	49
Celkem	84	14	98

Graf č. 2: Počet vyšetření embryí podle věku klientek metodou aCGH na platformách 24sure™ V3 a 24sure™ +



5.1.3 Výsledky vyšetření na obou platformách

V genetické laboratoři se provedlo dohromady vyšetření 469 embryonálních vzorků, viz Tab. č. 4 a Graf č. 2.

Z toho bylo 167 embryí euploidních (36%), 241 embryí aneuploidních (57%), nebalancované translokace byly nalezeny u 11 embryí (2%), nebalancované translokace spolu s aneuploidii byly analyzovány u 17 embryí (4%) a u 33 embryí (7%) nebyla úspěšná celogenomová amplifikace (WGA) nebo neúspěšná hybridizace na mikročipech array CGH.

Tabulka č. 4: Celkový počet vyšetřených embryí metodou aCGH 24sure BlueGnome (platforma 24sureTMV3 a 24sureTM+) za rok 2014

Celkový počet vyšetřených embryí metodou aCGH		
Embrya	Počet	Podíl v procentech
Euploidní embrya	167	36%
Aneuploidní embrya	241	57%
Nebalancované translokace	11	2%
Nebalancované translokace + aneuploidní embrya	17	4%
FA/FH	33	7%
Celkový počet vyšetřených embryí	469	

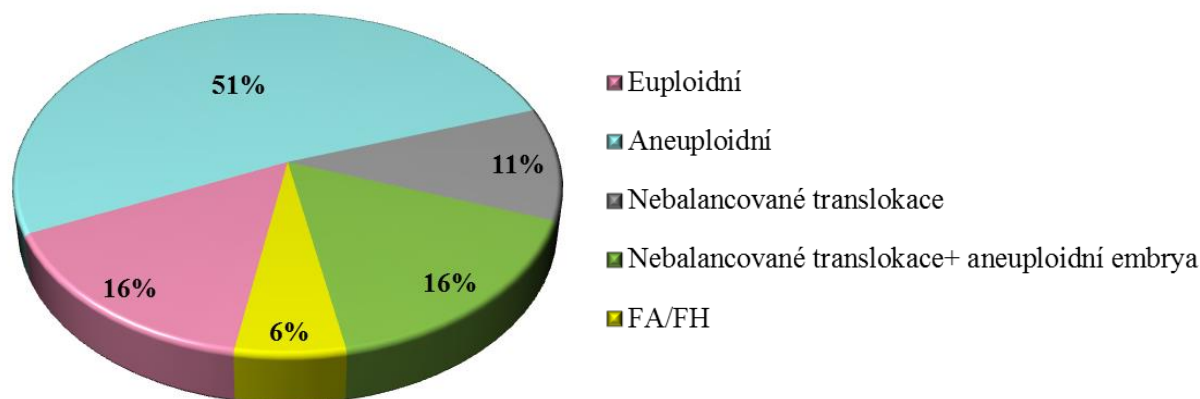
5.1.4 Výsledky vyšetření PGD/PGS na platformě 24sure™+

Metodou aCGH 24sure Bluegnome bylo provedeno vyšetření PGD/PGS na platformě 24sure™+ u 103 embryí. Z toho bylo nalezeno 16 euploidních embryí s balancovanými familiárními chromosomovými přestavbami (či normální sestavou - nelze rozlišit) (16%), 53 aneuploidních embryí (51%), nebalancované translokace u 11 embryí (11%), nebalancované translokace a aneuploidie u 17 embryí (16%) a u 6 embryí byla neúspěšná celogenomová amplifikace (WGA) nebo neúspěšná hybridizace (6%), viz Tab. č. 5 a Graf č. 3.

Tabulka č. 5: Celkový počet vyšetřených embryí PGD/PGS metodou aCGH Bluegnome platforma 24sure™+

Celkový počet vyšetřených embryí PGD/PGS metodou aCGH		
Embrya	Počet	Podíl v procentech
Euploidní	16	16%
Aneuploidní	53	51%
Nebalancované translokace	11	11%
Nebalancované translokace+ aneuploidní embrya	17	16%
FA/FH	6	6%
Celkový počet vyšetřených embryí	103	

Graf č. 3: Celkový počet vyšetřených embryí



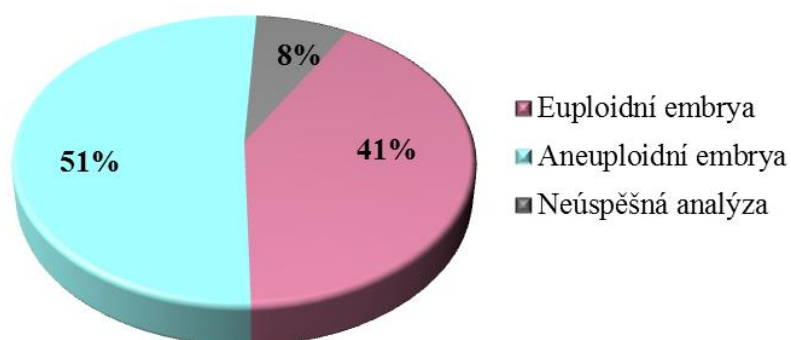
5.1.5 Výsledky vyšetření PGS na platformě 24sure™V3

Metodou aCGH 24sure Bluegnome bylo provedeno vyšetření PGS na platformě 24sure™V3 a byla provedena analýza u 366 embryí. Z toho bylo analyzováno 151 euploidních embryí (41%), aneuploidních embryí 188 (51%) a u 27 embryí byla neúspěšná celogenomová amplifikace nebo hybridizace (6%), viz Tab. č. 5 a Graf č. 4.

Tabulka č. 6: Celkový počet vyšetřených embryí PGS metodou aCGH BlueGnome platforma 24sure™ V3

Celkový počet vyšetřených embryí PGD/PGS metodou aCGH		
Embrya	Počet	Podíl v procentech
Euploidní embrya	151	41%
Aneuploidní embrya	188	51%
Neúspěšná analýza	27	8%
Celkový počet vyšetřených embryí	366	

Graf č. 4: Celkový počet vyšetřených embryí PGS metodou aCGH 24sure BlueGnome platforma 24sure™ V3 za rok 2014



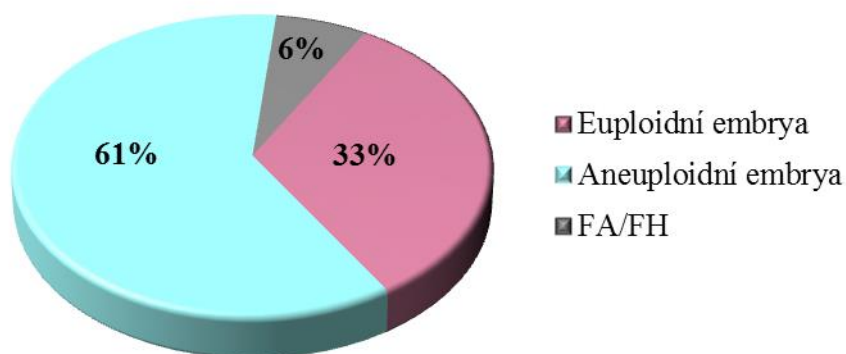
5.1.6 Výsledky vyšetření PGS u IVF cyklů s vlastními gametami

Metodou aCGH bylo vyšetřeno v rámci PGS 52 klientek, které měly vlastní gamety. Byla provedena analýza u 211 embryí. Průměrný věk klientek byl 39 let. Z toho bylo analyzováno 69 euploidních embryí (33%), 128 aneuploidních embryí (61%) a u 14 embryí (8%) byla neúspěšná celogenomová amplifikace nebo neúspěšná hybridizace, viz Tab. č. 7 a Graf. č. 5.

Tabulka č. 7: Vyšetření PGS metodou aCGH na platformě 24sure™ V3 (vlastní gamety)

Vyšetření PGS na platformě 24sure™ V3		
Embrya	Počet	Podíl v procentech
Euploidní embrya	69	33%
Aneuploidní embrya	128	61%
FA/FH	14	6%
Celkový počet vyšetřených embryí	211	

Graf č. 5: Celkový počet vyšetřených embryí PGS metodou aCGH 24sure BlueGnome platforma 24sure™ V3 (vlastní gamety) za rok 2014

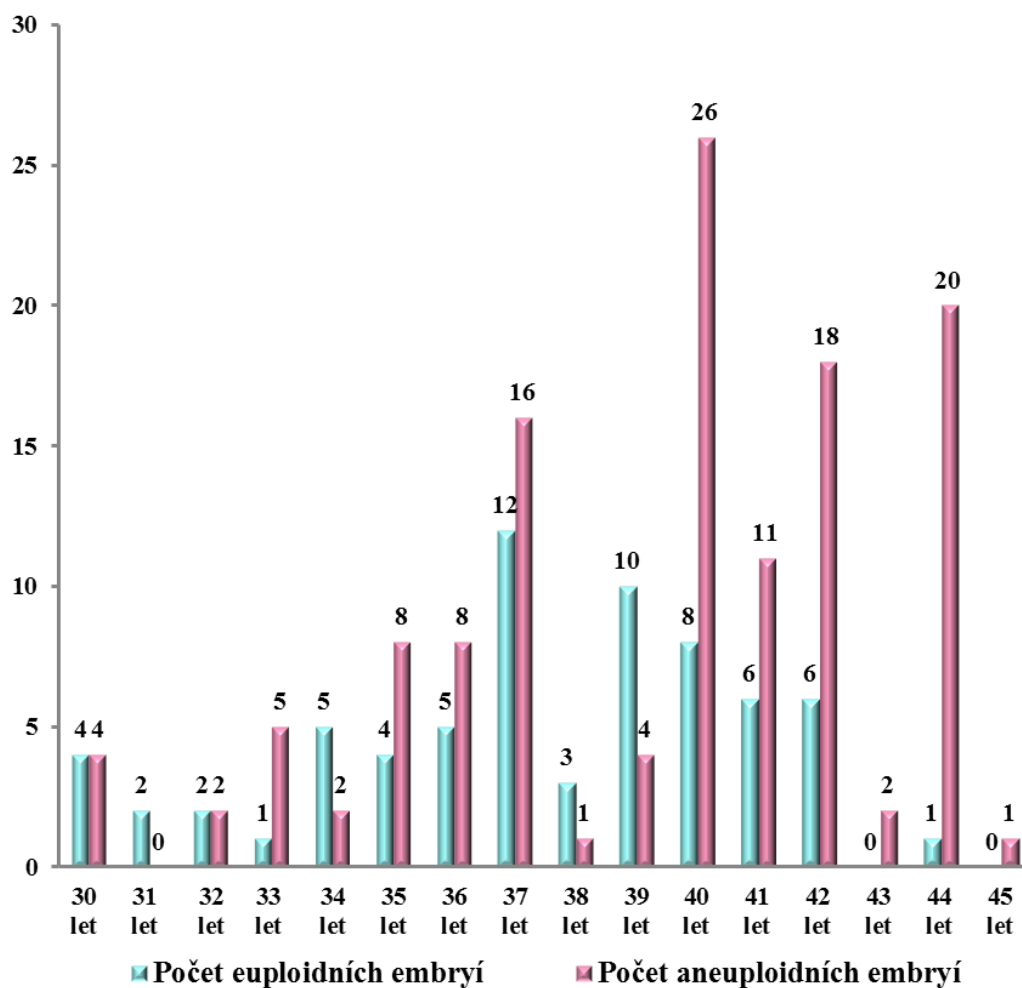


Rozdělení podle věku klientek u vyšetření preimplantačního screeningu (PGS) je uvedeno v Tab. č. 8 a Grafu č. 6.

Tabulka č. 8: Vyšetření PGS pomocí metody aCGH platforma 24sureTMV3 za rok 2014 (vlastní gamety)

Vyšetření PGS pomocí metody aCGH platforma 24sureTMV3 za rok 2014				
Věk klientky	Počet klientek	Počet euploidních embryí	Počet aneuploidních embryí	FA/FH
30 let	2	4	4	0
31 let	1	2	0	0
32 let	1	2	2	0
33 let	1	1	5	0
34 let	1	5	2	0
35 let	2	4	8	2
36 let	1	5	8	0
37 let	5	12	16	0
38 let	1	3	1	1
39 let	6	10	4	2
40 let	5	8	26	2
41 let	8	6	11	0
42 let	6	6	18	1
43 let	2	0	2	1
44 let	9	1	20	5
45 let	1	0	1	0
Celkem embryí	52	69	128	14

Graf č. 6: Vyšetření PGS pomocí metody aCGH platforma 24sure™V3 za rok 2014 (vlastní gamety) v závislosti na věku klientky



V grafu je uvedeno, jak stoupá počet sporadických aneuploidíí zároveň s věkem klientek.

5.1.7 Výsledky vyšetření PGS u IVF cyklů s darovanými gametami

Při vyšetření PGS bylo analyzováno celkem 155 embryí s dárcovskými gametami, z toho 133 dárcovských gamet- oocytů a 22 dárcovských gamet- spermii. Toto vyšetření bylo indikováno pro 21 klientek. Průměrný věk klientek byl 43,5 roku, ale věk dárkyň oocytů byl nižší < 32 let, viz Tab. č. 9 a Graf č. 6.

Tabulka č. 9: Vyšetření PGS pomocí metody aCGH na platformě 24sure™V3 za rok 2014 (dárcovské gamety, dárkyňe mladší <32 let)

Vyšetření PGS pomocí metody aCGH za rok 2014 (dárcovské gamety)				
Věk klientky	30-34 let	35-40 let	41-49 let	Všechny věkové kategorie
dárkyňe oocytů	9 embryí / 1 klientka	13 embryí/ 1 klientka	111 embryí/ 14 klientek	133/ 16 klientek
dárce spermii	6 embryí / 1 klientka	14 embryí/ 2 klientky	2 embrya/ 1 klientka	22/ 4 klientky
počet embryí s dárcovskými gametami	15	27	113	155
počet klientek/ dárcovské gamety	2	3	15	23

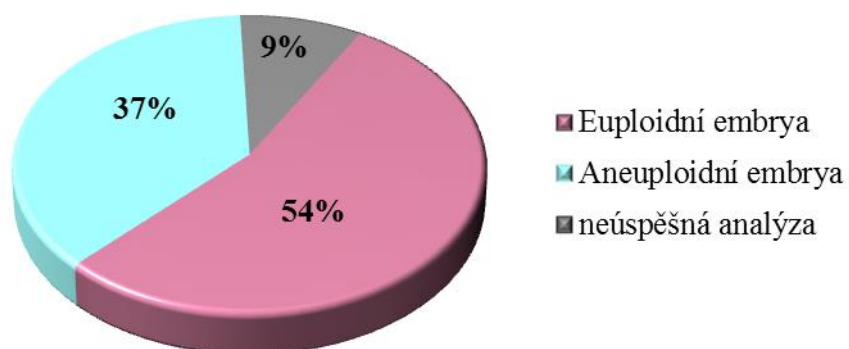
Pomocí metody aCGH na platformě 24sure™V3 bylo vyšetřeno celkem 133 embryí, euploidních embryí bylo 72 (54%), aneuploidních embryí 49 (37%) a u 12 (9%) embryí byla neúspěšná celogenomová amplifikace nebo hybridizace, viz Tab. č. 10 a Graf č. 7.

To dokazuje a potvrzuje hypotézu, že vyšší procento euploidních embryí je dáno tím, že biologický věk žen (dárkyňe oocytů) < než 32 let a tím výrazně klesají procenta sporadických aneuploidii.

Tabulka č. 10: Počet vyšetřených embryí u klientek s použitím dárcovských gamet (oocytů) za rok 2014

Počet vyšetřených embryí u klientek s použitím dárcovských gamet (oocytů) za rok 2014		
Embrya	Počet	Podíl v procentech
Euploidní embrya	72	54%
Aneuploidní embrya	49	37%
FA/FH	12	9%
Celkový počet vyšetřených embryí	133	

Graf č. 7: Počet vyšetřených embryí u klientek s použitím dárcovských gamet (oocytů) za rok 2014



6 Diskuse

Preimplantační genetická vyšetření pomocí metody arrayCGH jsou v dnešní době poměrně nové molekulárně – cytogenetické metody, které pomáhají detekovat genetické abnormality v genomu embrya před implantací do dělohy matky.

Preimplantační genetický screening (PGS) umožňuje detekci náhodných aneuploidí v genetické výbavě embrya.

Preimplantační diagnostika (PGD) familiárních chromosomových aberací se zaměřuje na detekci nebalancovaných chromosomových přestaveb, jako jsou nebalancované translokace a nebalancované rekombinantní produkty inverzí.

Preimplantační vyšetření pomocí metody aCGH je jedním z článků mozaiky léčby IVF. Důležitost preimplantačního vyšetření spočívá ve výběru takového embrya, které nenesé žádnou genetickou vadu. Tím se zároveň zvyšuje šance implantace do dělohy matky, dosažení úspěšného otěhotnění a následně porod zdravého dítěte.

Dříve byla hojně využívána metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) pro vyšetření preimplantačního screeningu (PGS). Tato metoda až na na výjimky nebalancovaných chromosomových abrací malého rozsahu, nahrazena metodou aCGH. V tom případě již není možné současné vyšetření celého genomu embrya, nýbrž jen cílené chromosomové odchylky.

Podle literatury je řečeno, že ve srovnání vyšetření preimplantačního screeningu (PGS) pomocí metody FISH a vyšetření preimplantačního screeningu (PGS) pomocí metody aCGH, jednoznačně vítězí metoda aCGH (Yury *et al*, 2012; Harton *et al*, 2013). Metoda aCGH, oproti analýze pomocí metody FISH jednoznačně vede, protože touto metodou lze analyzovat všech 24 chromosomů, na rozdíl od metody FISH, kde se provádí nejčastěji analýza 5-8 chromosomů.

Do výsledků v mé práci bylo zahrnuto celkem 469 analyzovaných embryí. Z tohoto souboru bylo 103 embryí vyšetřováno v rámci preimplantační diagnostiky současně preimplantačního screeningu (PGD/PGS) a 366 embryí v rámci vyšetření preimplantačního screeningu (PGS).

Z celkového počtu embryí v rámci vyšetření preimplantační diagnostiky současně preimplantačním screeningem (PGD/PGS) a preimplantačního screeningu (PGS) embryonálních vzorků bylo 36% embryí euploidních, 57% aneuploidních embryí, 2% nebalancovaných translokací a 4% nebalancovaných aberací a současně i aneuploidních embryí a u 7% embryí byla neúspěšná amplifikace/ hybridizace.

Vyšetřením preimplantačního screeningu (PGS) metodou aCGH na platformě 24sureTMV3 bylo vyšetřeno 366 embryí, z toho bylo 41% euploidních, 51% aneuploidních embryí a u 8% embryí byla neúspěšná amplifikace/ hybridizace.

Vyšetřením preimplantační diagnostiky a současně preimplantačního screeningu (PGD/PGS) metodou a CGH na platformě 24sureTM bylo vyšetřeno celkem 103 embryí. Z tohoto souboru bylo 16% euploidních embryí, 51% aneuploidních, 11% byla nosiči nebalancované translokace, 17% embryí neslo nebalancované chromosomální aberace současně s aneuploidiemi a u 6% embryí byla neúspěšná amplifikace/ hybridizace.

Vyšetřením preimplantačního screeningu (PGS) bylo vyšetřeno 211 embryí u klientek s vlastními gametami. Z tohoto souboru bylo 33% euploidních embryí, 61% aneuploidních embryí a u 6% embryí byla neúspěšná amplifikace/ hybridizace.

Vyšetřením v rámci preimplantačního screeningu (PGS) s použitím dárcovských gamet (oocytů) jsme analyzovali celkem 133 embryonálních vzorků. Z tohoto souboru bylo 54% embryí euploidních, 37% aneuploidních a u 9% embryí byla neúspěšná amplifikace/ hybridizace.

7 Závěr

Vyšetření preimplantačního screeningu (PGS) má velký význam převážně u žen s opakovanými potraty, neúspěšnými IVF cykly či riziky těhotenských ztrát. Vyšetřením preimplantačního screeningu (PGS) se zvyšuje jejich šance na otěhotnění a následný porod vytouženého zdravého dítěte.

Vyšetření preimplantační diagnostiky a současně preimplantačního screeningu (PGD/PGS) má určitě významnou a důležitou roli u párů s balancovanými chromosomovými abnormalitami. Tyto páry, mají velké riziko porodu plodu s nebalancovanou chromosomovou abnormalitou, bez ohledu na jejich věk.

Zároveň bych chtěla zdůraznit velkou a důležitou roli preimplantačního screeningu (PGS) u žen například s předčasným ovariálním selháním, s diagnózou polycystických ovárií nebo s genetickou vrozenou gonosomální abnormalitou. Tyto ženy mají velkou šanci na otěhotnění a porod zdravého dítěte, neboť darované gamety pochází od dárkyň, které jsou mladší 32 let.

V mojí práci jsem shrnula provedení a využití metody aCGH, kterému předcházelo provedení celogenomové amplifikace (WGA). Celogenomová amplifikace byla prováděna jen z malého množství biologického materiálu – trofoektodermu (asi 5-10 buněk) jsme použili SurePlex™ DNA Amplification System. Následně bylo provedeno značení fluorochromy Fluorescent Labeling System [dCTP] a vybraná platforma 24sure BlueGnome od firmy Illumina dle citlivosti rozlišovací schopnosti.

Na preimplantační screening jsme použili platformu 24sure™V3 s rozlišovací schopností 20Mb a na vyšetření preimplantační diagnostiky současně s preimplantačním screenigem (PGD/PGS) jsme použili platformu 24sure™ + s rozlišovací schopností 10Mb.

V mojí práci jsem potvrdila hypotézu, že u klientek se stoupajícím věkem stoupá počet sporadických aneuploidií a tím stoupá riziko narození postiženého dítěte nesoucí chromosomální odchylku.

Zároveň jsem potvrdila, že klientky, u nichž bylo indikováno použití dárcovských gamet, po vyšetření preimplantačním screeningem (PGS) mělo vyšší počet euploidních embryí, která mohla být doporučena k embryotransferu.

Není nic krásnějšího, než naplněná touha po mateřství a následná výchova alespoň z poloviny biologického potomka páru, který má problém s početím.

Použitá literatura

Použitá literatura

BREZINA, Paul R., et al. Preimplantation genetic testing. *The BMJ*, 2012, 345, e5908. ISSN 1756-1833

CELEP, F., et al. The frequency of chromosomal abnormalities in patients with reproductive failure. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2006, **127**(1), 106-109. ISSN 0301-2115

FIEGLER, Heike, et al. High resolution array-CGH analysis of single cells. *Nucleic acids research*, 2007, **35**(3), e15. ISSN1362-4962

FRAGOULI, E. Preimplantation genetic diagnosis: present and future. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2007, **24**(6), 201-207. ISSN 1058-0468

HANDYSIDE, A. H., et al. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 1992, **327**(13), 905-909. ISSN 0028-4793

HANDYSIDE, A. H., et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *Journal of medical genetics*, 2010, **47**(10), 651-658. ISSN 0022-2593

HANSON, C., et al. Re-analysis of 166 embryos not transferred after PGS with advanced reproductive maternal age as indication. *Human Reproduction*, 2009, **24**(11), 2960-2964. ISSN 0268-1161

HARPER, J. C., et al. ESHRE PGD Consortium data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008. *Human Reproduction*, 2010, **25**(11), 2685-2707. ISSN 0268-1161

HARPER, J. C.; SENGUPTA, S. B. Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011. *Human genetics*, 2012, **131**(2), 175-186. ISSN 0340-6717

HARTON, Gary L., et al. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *Fertility and sterility*, 2013, **100**(6), 1695-1703. ISSN 0015-0282

- HUGHES, S., ARNESON, N., DONE, S., SQUIRE, J. (2005) "The use of whole genome amplification in the study of human disease". *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **88**(1), 173–189. ISSN 0079-6107
- CHANG, L.-J., C.-C. HUANG, Y.-Y. TSAI, C.-C. HUNG, M.-Y. FANG, Y.-C. LIN, Y.-N. SU, S.-U. CHEN, Y.-S. YANG, PARRIEGO, M., VIDAL, F., VEIGA, A. Blastocyst biopsy and vitrification are effective for preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases. *Human Reproduction*. 2013, **28**(5), 1435-1444. ISSN 0268-1161
- JOHNSON, David S., et al. Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. *Molecular human reproduction*, 2010, **16**(12), 944-949. ISSN 1360-9947
- KALLIONIEMI, A., et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 1992, **258**(5083), 818-821. ISSN 0036-8075
- KAPRAS, J., OTOVÁ, B., KOHOUTOVÁ, M. Kapitoly z lékařské biologie a genetiky. 1. vydání Praha: Karolinum, 1996, 88 s. ISBN 80-7184-322-9.
- KOČÁREK, E. Molekulární biologie v medicíně. 1. vydání. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007, 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.
- KOČÁREK, E., PÁNEK, M., NOVOTNÁ, D. Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice. 1. vydání Praha: Karolinum, 2006, 120 s. ISBN 80-246-1069-8.
- LIU, J., et al. DNA microarray reveals that high proportions of human blastocysts from women of advanced maternal age are aneuploid and mosaic. *Biology of reproduction*, 2012, 87.6: 148. ISSN 0006-3363
- MICHALOVÁ, K. Úvod do lidské cytogenetiky. 1. vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1999, 172 s. ISBN 80-7013-281-7.
- MUNNÉ, S. Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *Reproductive biomedicine online*, 2002, **4**(2), 183-196. ISSN 1472-6483

MUNNÉ, S., et al. Fertilization and early embryology: Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Human Reproduction*, 1993, **8**(12), 2185-2191. ISSN: 0268-1161

NUSSBAUM, R. L., MCINNES, R. R., WILLARD, H. F., THOMPSON, J., THOMPSON, M., *Klinická genetika: Thompson*. 1. vydání, překlad: Petr Goetz. Praha: Triton, 2004, 426, lix s. ISBN 80-725-4475-6.

ŘEŽÁBEK, K. Asistovaná reprodukce: Farmakoterapie pro praxi. 2., aktualiz. a dopl. vydání Praha: Maxdorf, 2014, 137 s. ISBN 978-80-7345-396-1.

SNABES, Michael C., et al. Preimplantation single-cell analysis of multiple genetic loci by whole-genome amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, **91**(13), 6181-6185. ISSN 0027-8424

SNUSTAD, D., SIMMONS, M. J., *Genetika*. 1. české vydání Brno: Masarykova univerzita, 2009, 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

SUN, G., et al. Whole-genome amplification: relative efficiencies of the current methods. *Legal medicine*, 2005, **7**(5), 279-286. ISSN 1344-6223

THORNHILL, A. R., et al. Karyomapping—a comprehensive means of simultaneous monogenic and cytogenetic PGD: comparison with standard approaches in real time for Marfan syndrome. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2015, 1-10. ISSN 1058-0468

VELILLA, E; ESCUDERO, T; MUNNÉ, S. Blastomere fixation techniques and risk of misdiagnosis for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reproductive biomedicine online*, 2002, **4**(3), 210-217. ISSN 1472-6483

VOJTÍŠKOVÁ, M. *Klinická molekulární genetika*. 1. vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1999, 75 s. ISBN 80-7013-292-2.

www.cambridgebluegenome

YANG, Zhihong, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Molecular cytogenetics*, 2012, **5**(1), 1-8. ISSN 1755-8166