



**Analýza aneuploidií a studium meiózy u oocytů metodou
komparativní genomové hybridizace na DNA čipu**
Diplomová práce

Vedoucí práce:
prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Vypracoval:
Tomáš Kocur

Zadání

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci *Analýza aneuploidí a studium meiózy oocytů* metodou komparativní genomové hybridizace na DNA čipu vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat prof. RNDr. Aleši Knollovi, Ph.D., za vedení mé diplomové práce. Touto cestou bych chtěl také poděkovat Mgr. Jakubu Horákovi Ph.D., za podnětné konzultace v rámci jeho volného času a množství cenných rad a doporučení. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Evě Oráčové, Ph.D., za konzultace embryologických metod a v neposlední řadě patří poděkování i vedení Sanatoria Repromeda, zejména pak paní ředitelce MUDr. Kateřině Veselé, Ph.D., za možnost zpracování diplomové práce ve spolupráci s tímto pracovištěm.

Abstrakt

Analyza aneuploidií a studium meiózy u oocytů metodou komparativní genomové hybridizace na DNA čipu

Četnost aneuploidií zvyšující se s věkem je hlavní příčinou poruch fertility, nebo porodů postižených jedinců. Aneuploidie vznikají zejména v průběhu meiotického dělení. Analýzou všech chromozomů u souboru pólových tělísek odebraných po prvním a druhém meiotickém dělení metodou komparativní genomové hybridizace na čipu bylo zjištěno, že více než polovina oocytů studovaného souboru byla aneuploidních. Aneuploidie vzniklé v důsledku nondisjunkce během druhého meiotického dělení v souboru mírně převažovaly a naprostá většina chyb v prvním meiotickém dělení byla způsobena předčasnou separací chromatid. Ačkoliv aneuploidie byly detekovány u všech chromozomů, nejvíce chyb bylo zjištěno u malých akrocentrických chromozomů. Možné mechanismy vzniku aneuploidií jsou diskutovány s ohledem na poznatky získané s využitím živočišných biotechnologií u různých druhů savců. **Klíčová slova:** *poruchy meiotického dělení, nondisjunkce, pólové tělísko, chromozomové aberace, předčasná separace chromatid, aCGH*

Abstract

Aneuploidy analysis and study on oocyte meiosis using array comparative genomic hybridization

Aneuploidy frequency increases with advanced female age and results in infertility or live birth of affected individuals. Aneuploidies occur mainly during female meiosis. Polar bodies biosied from oocytes after first and second meiosis were analyzed using array comparative genomic hybridization testing for all chromosomes. More than a half of tested oocytes were aneuploid. Aneuploidies as a result of nondisjunction in meiosis II were slightly more frequent than meiosis I errors. Premature chromatide predivision was absolutely predominant among errors occurring during meiosis I. Despite the fact that aneuploidies were detected for each chromosome, most aneuploidies were detected for small acrocentric chromosomes. Possible mechanisms of aneuploidy formation are discussed in context of information obtained by the means of animal biotechnologies at different species of mammals. **Key words:** *meiotic errors, nondisjunction, polar body, chromosome aberations, premature chromatide predivision, aCGH*

Obsah

1	ÚVOD	8
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1	Meióza	10
2.1.1	Profáze I.....	10
2.1.2	Metafáze I.....	12
2.1.3	Anafáze I	12
2.1.4	Telofáze I.....	12
2.1.5	Druhé meiotické dělení.....	12
2.2	Meiotické poruchy oocytů vedoucí ke vzniku aneuploidí.....	13
2.2.1	Poruchy prvního meiotického dělení.....	13
2.2.2	Poruchy druhého meiotického dělení	14
2.2.3	Kompenzace chyb během meiotického dělení	15
2.3	Meiotické poruchy u savců.....	16
2.3.1	Meiotické poruchy v lidských IVF oocytech	16
2.3.2	Meiotické poruchy a jejich studium u savčích modelových organismů.....	17
2.4	Možnosti studia lidských oocytů	19
2.4.1	PGS a jeho postavení v rámci PGD.....	19
2.4.2	Pólová tělíska a jejich úloha v rámci PGS.....	21
2.4.3	Biopsie polocytů	21
3	CÍL PRÁCE	23
4	MATERIÁLY A METODIKA	24
4.1	Soubor pacientek	24
4.2	Zisk a zpracování lidských IVF oocytů	24
4.3	Metoda komparativní genomové hybridizace na DNA čipu pro studium aneuploidí u oocytů	26
4.3.1	Celogenomová amplifikace	26

4.3.2	Ověření amplifikace DNA vzorku – elektroforéza	28
4.3.3	Značení DNA.....	29
4.3.4	Hybridizace na DNA čip	30
4.3.5	Vymývání nenavázané DNA.....	30
4.3.6	Skenování fluorescence na DNA čipech	31
4.3.7	Zpracování dat pomocí software BlueFuse Multi a tvorba databáze	31
4.4	Statistická analýza dat	32
5	VÝSLEDKY.....	34
5.1	Výskyt aneuploidí u studovaných vzorků	35
5.2	Chyby v prvním meiotickém dělení	36
5.3	Chyby v druhém meiotickém dělení.....	39
5.4	Kompenzace chyb z prvního meiotického dělení ve druhém meiotickém dělení 40	
5.5	Meiotické poruchy a zastoupení jednotlivých chromozomů.....	42
6	DISKUZE.....	46
6.1	Četnost aneuploidí v oocytech.....	46
6.2	Podíl chyb v prvním a druhém meiotickém dělení a jejich kompenzace	47
6.3	Meiotické poruchy jednotlivých chromozomů.....	50
6.4	Srovnání meiotických poruch člověka s modelovými organismy.....	51
7	ZÁVĚR.....	55
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	57
9	SEZNAM TABULEK	64
10	SEZNAM OBRÁZKŮ	65

1 ÚVOD

Meiotické dělení je jedním z fascinujících biologických procesů podílejících se na obrovské rozmanitosti, které jsme v přírodě svědky dokonce i v rámci jednoho druhu. Meióza je základním kamenem pohlavního rozmnožování. Dochází při ní ke snížení počtu chromozomů na polovinu a navíc takovým způsobem, že dochází k náhodné kombinaci původních rodičovských genomů tak, že každá pohlavní buňka vzniklá meiózou je co do obsahu genetické informace unikátní. Noví jedinci vzniklí náhodnou kombinací gamet po meiotickém dělení, jsou natolik variabilní, že je položen nejen pevný základ pro jejich úspěšný individuální vývoj, ale zároveň vytvořeny i ty nejlepší předpoklady pro další evoluci biologického druhu. Ačkoliv významu a principům meiózy jakožto jednoho ze základních biologických procesů je dobře porozuměno, jedná se na molekulární úrovni o velice složitý proces, jehož fungování nám stále zůstává z velké části skryto. Rychlý vývoj moderních metod a technologií nicméně postupně umožňuje nahlédnout hlouběji a hlouběji do mechanismů, na kterých je meiotické dělení postaveno.

Předmětem intenzivního výzkumu a snahy o dokonalé pochopení jsou zejména mechanismy, které stojí za vznikem chyb v meiotickém dělení vedoucích ke vzniku chromozomových aneuploidií. Početní chromozomové aberace mají svůj původ především v chybách během prvního a druhého meiotického dělení. Tyto chromozomové poruchy daleko častěji vznikají v průběhu maternální meiózy – oogeneze, k čemuž jistě přispívá i fakt, že toto dělení může na rozdíl od spermatogeneze trvat i několik desítek let. Oocyt totiž zůstává v profázi prvního meiotického dělení prakticky od narození až do okamžiku ovulace. Meiotické dělení oocyty je dokončeno až poté, kdy do něj pronikne spermie. Vzhledem k tomu, že současné společenské trendy mají za následek posun věku, kdy ženy uvažují o těhotenství, je otázka studia meiotických poruch oocytů velmi aktuální.

Tak jako v mnoha jiných oborech, přineslo i v této oblasti studium některých zvířecích druhů množství cenných informací. Obrovskou výhodou studia meiózy u zvířat je jednak dostupnost studovaného materiálu ve velkém množství a absence etického faktoru přinejmenším relativně k etickým hlediskům, která musíme brát v úvahu u lidí. Zatímco u člověka budeme kupříkladu těžko studovat přímo metafázní oocyt a jeho

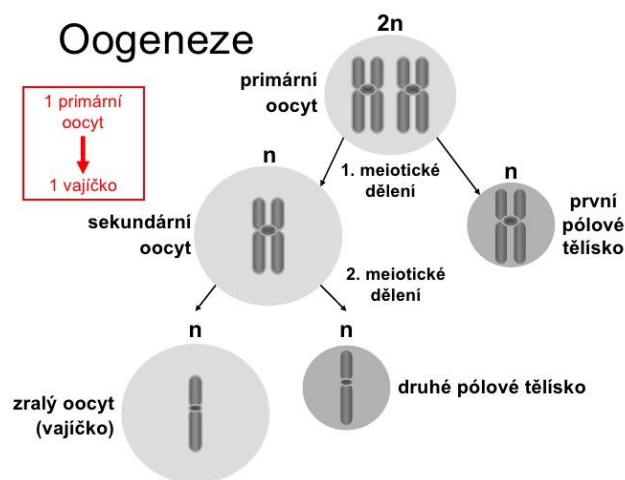
chromozomovou sestavu, u myši to možné je. Nabízí se tedy srovnání dostupných výsledků analýz modelových savčích organizmů s informacemi, které jsme schopni získat pro lidské oocyty analýzou obou jejich pólových tělísek, která je prováděna v průběhu preimplantačního genetického screeningu (PGS), jež se stal neodmyslitelnou součástí programu kvalitních center asistované reprodukce a umožňuje vyšetřit chromozomovou sestavu oocyty, nebo také embrya, ještě před jeho zavedením do dělohy matky.

V posledních třech dekádách bylo věnováno značné úsilí vývoji metod, jež by chromozomové poruchy oocytů a raných lidských embryí dokázala odhalit rychlým a robustním způsobem z minimálního množství vstupního materiálu (jedna buňka) a která by byla zároveň cenově dostupná a mohla být použitelná v rutinní praxi genetických laboratoří. V posledních pěti letech se masivním způsobem dokázala do PGS prosadit dnes nejpoužívanější metoda komparativní genomové hybridizace na DNA čipu (aCGH), která vznikla na začátku tohoto století. Touto metodou je možné získat informaci o aneuploidiiích všech 24 chromozomů lidských embryí do 12 hodin od odebrání vzorku a tato metoda byla také využita pro analýzu oocytů v této diplomové práci. Analýza oocytů je specifická v tom, že využívá dvou pólových tělísek (PB1 a PB2) vznikajících při dozrávání a vývoji oocyty. Genetické vyšetření těchto dvou produktů meiotického dělení nám dává zrcadlovou informaci o chromozomové sestavě studovaného oocyty, který prošel prvním i druhým meiotickým dělením a navíc umožňuje rozlišit aneuploidie vzniklé v prvním meiotickém dělení nondisjunkcí celých chromozomů od aneuploidii, jejichž příčinou je předčasné rozdělení sesterských chromatid. Analýza pólových tělísek metodou aCGH v rámci PGS je tak obrovsky cenným zdrojem informací o maternální meióze člověka a dává nám nahlédnout do mechanismů, jež vedou k jejím poruchám.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Meióza

Pohlavní rozmnožování organismů je možné jen díky zvláštnímu typu buněčného dělení, jehož výsledkem jsou buňky nebo produkty dělení, jejichž chromozomová výbava je zredukována na polovinu oproti běžným somatickým buňkám daného organismu. Tento proces se nazývá meióza, nebo též redukční dělení, meiotické dělení, zrací dělení či dříve používané heterotypické dělení. Meiotické dělení rozdělujeme podle toho, zda jeho produktem jsou samičí pohlavní buňky (oocyty) na oogenezi, anebo samčí pohlavní buňky (spermie) na spermatogenezi. Meiotické dělení probíhající v rámci oogeneze je velmi odlišné od toho, které probíhá v rámci spermatogeneze. Společné jsou jim v podstatě jen základní principy. Jelikož předmětem studia v této práci byly oocyty žen, v následující kapitole věnované meióze byl při charakterizaci meiózy kladen důraz na oogenezi tak, jak probíhá u člověka (obrázek 1).



Obrázek 1: Schéma meiotického dělení oocytu (internetový zdroj: www.slideshare.net)

2.1.1 Profáze I

Profáze prvního meiotického dělení je nejdelší částí meiózy a dochází v ní k párování homologických chromozomů a k rekombinaci chromozomů původem od otce a matky. Do profáze meiózy I vstupují diploidní primární oocyty, jež se diferenciovaly z oogonií v průběhu prenatálního vývoje ženy. Profáze prvního meiotického dělení se dá rozdělit na pět částí:

- Leptotene - V prvním stádiu profáze chromozomy začínají kondenzovat a rovněž začíná párování homologických chromozomů.
- Zygotene - Pokračuje párování homologických chromozomů, které jsou ve velmi těsném kontaktu, jež nazýváme synapse. Mezi párujícími se chromozomy dochází k vytvoření proteinové struktury zvané synaptonemální komplex. Současně pokračuje zkracování a kondenzace chromozomů.
- Pachytene - Dochází k dalšímu zesílení chromozomů, které jsou stále v pevné vazbě. Nyní jsou již jasně odlišitelné dva spárované homologické chromozomy, které se označují jako bivalenty a z pohledu chromatid tvoří tzv. tetrádu. Pro toto stádium profáze je typický crossing-over. Je to mechanismus, díky němuž dochází ke vzájemné výměně genetického materiálu mezi homologickými chromozomy. Principem crossing-overu jsou zlomy a překřížení chromatid v tetradě a jejich opětovné spojení, což umožňuje výměny částí chromatid a tedy i genových lokusů.
- Diplotene - V tomto stádiu profáze dochází k rozrušení struktury synaptonemálního komplexu a chromozomy se od sebe začínají oddělovat. Zůstávají spojené pouze v místech, kde došlo ke crossing-overu, tzv. chiazmatech. Proces prvního meiotického dělení je v porovnání s druhým meiotickým dělením složitější a trvá delší dobu. V případě lidských oocytů je pak časový faktor značně proměnlivý a závisí na věku, ve kterém žena otěhotní. Oocyty I. řádu, které původně vznikly mitotickým dělením v kůře vaječníků, zastavují své další dělení v tomto stádiu meiózy (zhruba do tří měsíců věku) a v tomto stádiu setrvávají až do hormonální iniciace pokračování dalšího dělení. K té dochází v pubertě vlivem změn hladiny estrogenů a progesteronu. Některé oocyty tak mohou zůstat ve fázi diplotene prvního meiotického dělení až 40 nebo v krajním případě i 50 let.
- Diakineze – Dochází k tvorbě dělicího vřeténka, rozpadání jaderné membrány a maximální kondenzaci chromozomů. Chromozomy stále drží pohromadě v místech chiazmat, avšak mikrotubuly dělicího vřeténka se připojují na kinetochory chromozomů a ty se začínají pohybovat směrem k ekvatoriální rovině.

2.1.2 Metafáze I

V průběhu metafáze prvního meiotického dělení dochází k orientaci spárovaných chromozomů směrem k opačným pólům dělicího vřeténka, tak aby mohlo dojít ke správnému rozchodu chromozomů. Dochází k zániku chiazmat jejich postupným posunem směrem k telomerám. Jaderný obal se úplně rozpadá. V případě oogeneze již v tomto stádiu vzniká oocyt II. řádu a jedna rudimentární buňka, první pólové tělísko. Tyto buňky zůstávají spojeny.

2.1.3 Anafáze I

V průběhu anafáze dochází k oddělení chromozomů tzv. disjunkci a následnému rozchodu chromozomů pomocí zkracování mikrotubulů dělicího vřeténka. Chromozomy se dostávají k pólům dělicího vřeténka.

2.1.4 Telofáze I

V závěru prvního meiotického dělení dochází k rozpadu dělicího vřeténka a vzniku dvou dceřiných buněk s vlastní plazmatickou membránou. Dochází k obnovení jaderného obalu a dekonduzaci chromozomů. Je velmi pravděpodobné, že v případě oogeneze je první pólové tělísko vyděleno ještě v průběhu telofáze I. Dělicí vřeténko zůstává patrné až dvě hodiny po tomto rozdělení, což je důležité pro bezpečnou biopsii v rámci PGS (Montag *et al.*, 2006). Výsledkem jsou dvě haploidní dceřiné buňky, každá s poloviční sadou chromozomů. Ty jsou stále tvořeny dvěma chromatidami, které ale díky procesu rekombinace nemusí být totožné. Náhodný rozchod chromozomů spolu s výměnou homologických úseků vytváří obrovský prostor pro genetickou variabilitu.

2.1.5 Druhé meiotické dělení

Druhá část meiózy, druhé meiotické dělení, je svým charakterem velmi podobné mitóze a sestává z profáze II, metafáze II, anafáze II a telofáze II. Profáze II je charakteristická opětovnou kondenzací chromozomů a vytvořením nového dělicího vřeténka. Následuje seřazení v ekvatoriální rovině v rámci metafáze II a oddělení centromer tak, aby se sesterské chromatidy mohly pohybovat směrem k opačným pólům buňky (anafáze II). V telofázi II se pak oddělené chromatidy, v tuto chvíli již chromozomy, shromažďují u pólu buňky, vytvoří se jaderné obaly a následně i dceřiné buňky. V případě oogeneze dochází u žen k druhému meiotickému dělení až ve chvíli ovulace, která vstup do druhého meiotického dělení iniciuje. Dokončeno je pak až po proniknutí spermie do oocytu II. řádu, po němž následuje vydělení druhého pólového tělíska z oplozeného oocytu.

Obě pólová tělíska jsou poté resorbována a zanikají. Následuje splynutí prvojader původem z oocytu a spermie (obrázek 2).



Obrázek 2: Oplozený oocyt s patrnými prvojádry. Mezi buněčnou stěnou a zona pellucida jsou viditelné první a druhé pólové tělísko (databáze Sanatoria Repromeda)

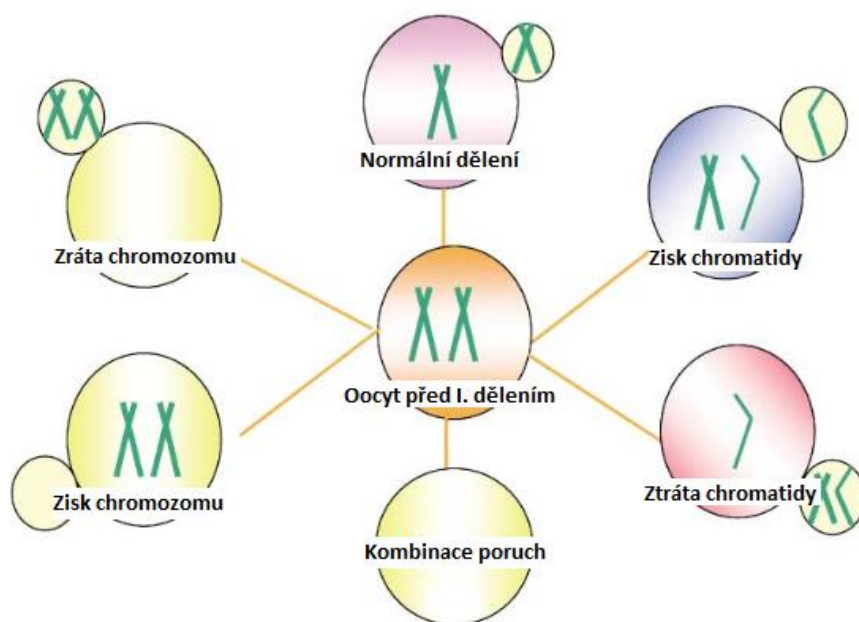
2.2 Meiotické poruchy oocytů vedoucí ke vzniku aneuploidií

Poruchy v meiotickém dělení jsou hlavní příčinou aneuploidií, se kterými se můžeme setkat u embryí a v některých případech pak i u narozených dětí. Životaschopnost embryí sice závisí na mnoha faktorech, ale mezi ty nejdůležitější z nich, jež mohou budoucí vývoj embrya negativně ovlivnit, patří chromozomové aneuploidie. Aneuploidie jsou jednou z hlavních příčin neúspěšného otěhotnění, potratů, vrozených vývojových vad a mentální retardace (Hassold a Hunt 2001; Hassold *et al.*, 2007). Bylo zjištěno, že až 30 % vyvíjejících se lidských embryí je aneuploidních, přičemž se zvyšujícím se věkem matky může být toto číslo až dvojnásobné (Kuliev *et al.*, 2005). Na tomto celkovém počtu se pak největší měrou podílí aneuploidie způsobené maternálními meiotickými poruchami prvního a druhého meiotického dělení (Hassold *et al.*, 2007).

2.2.1 Poruchy prvního meiotického dělení

První meiotické dělení oocytu může vyústit v chromozomové aneuploidie, jejichž mechanismem vzniku jsou buď nondisjunkce celých chromozomů tvořených dvěma chromatidami spojených centromerou, anebo náhodná segregace sesterských chromatid, u kterých došlo k jejich předčasnému rozdělení (Angell, 1991). Na obrázku č. 3 jsou názorně zobrazeny všechny možné varianty chromozomových poruch prvního meiotického dělení. Normální výsledek prvního dělení jsou haploidní sady vzniklé rozchodem

bivalentů tvořených dvěma sesterskými chromatidami spojenými centromerou a to jak v oocytu, tak i v příslušném pólovém tělísku. Poruchy charakteru nondisjunkce vedou buď ke kompletní ztrátě chromozomu v oocytu a zároveň k zisku daného chromozomu v příslušném pólovém tělísku, anebo k situaci opačné, kdy oocyt obsahuje jeden nadbytečný dvouchromatidový chromozom, který pak v příslušném pólovém tělísku kompletně chybí. V případě poruch způsobených předčasným rozdělením sesterských chromatid je v daném oocytu možné zachytit buď zisk, anebo ztrátu jedné chromatidy daného chromozomu, která pak v příslušném pólovém tělísku zrcadlově buď chybí, anebo přebývá. V praxi je také možné setkat se s oocyty, u kterých došlo k většímu množství chromozomových poruch v průběhu meiotického dělení, a takové tedy mohou nést kombinaci výše uvedených poruch (Handyside *et al.*, 2012).

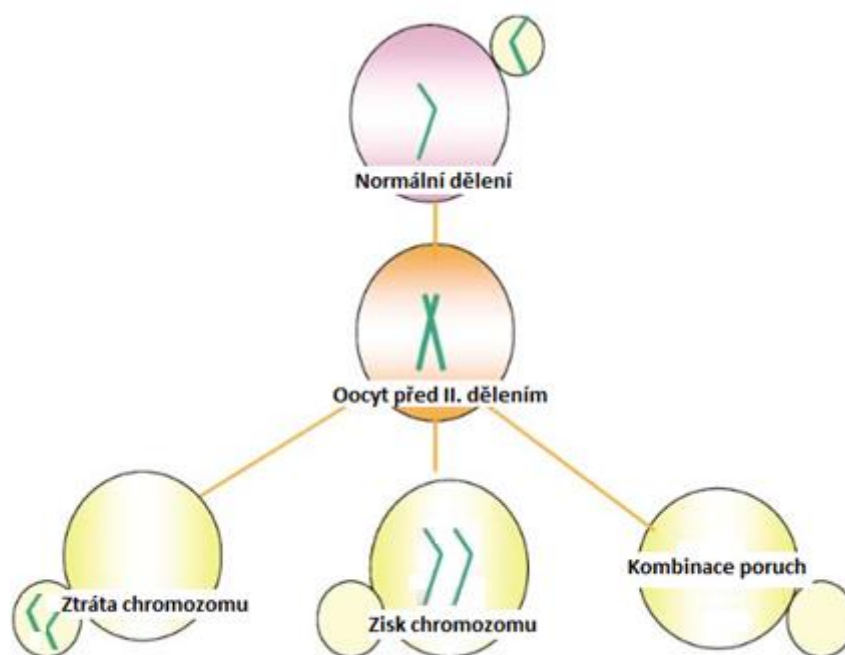


Obrázek 3: Schéma všech možných typů chromozomových aneuploidií způsobených poruchami prvního meiotického dělení. Zobrazena vždy chromozomová sestava oocytu pro jeden chromozom a současně odpovídající sestava chromozomu v příslušném prvním pólovém tělísku. (Upraveno podle Kuliev a Verlinsky, 2004)

2.2.2 Poruchy druhého meiotického dělení

Mechanismem vzniku chromozomových poruch druhého meiotického dělení vedoucím ke vzniku aneuploidií je nondisjunkce chromozomů v anafázi II. Do druhého meiotického dělení vstupují chromozomy, které jsou tvořeny dvěma sesterskými chromatidami.

Výsledkem nondisjunkce chromozomů po rozdělení centromery je buď zisk chromozomu v oocytu, anebo jeho ztráta s tím, že druhé pólóvé tělísko stejně jako v případě meiózy I obsahuje zrcadlový obraz chromozomové sestavy, a tedy buď obě chromatidy příslušného chromozomu, anebo žádný chromozom. Tyto situace jsou zobrazeny na obrázku č. 4.



Obrázek 4: Schéma všech možných typů chromozomových aneuploidií způsobených poruchami druhého meiotického dělení. Zobrazena je vždy chromozomová sestava oocyta pro jeden chromozom a současně odpovídající sestava chromozomu v příslušném pólóvním tělísku (Upraveno podle Kuliev a Verlinsky, 2004)

2.2.3 Kompenzace chyb během meiotických dělení

Jak ukázaly nedávné studie, aneuploidie z prvního meiotického dělení, jejíž příčinou byla předčasná separace sesterských chromatid, nemusí vždy vyústit v aneuploidní oocyt (Fragouli *et al.*, 2006). Tato chyba může být kompenzována díky principu náhodného rozchodu chromozomů během druhého meiotického dělení primárního oocyta, který je po prvním meiotickém dělení aneuploidní. Předčasné rozdělení sesterských chromatid v prvním meiotickém dělení může mít za následek zisk jedné nadbytečné chromatidy, anebo ztrátu jedné chromatidy v nově vzniklém primárním oocytu. Tento aneuploidní produkt meiózy I poté následně vstoupí do meiózy II, kde dochází k dalšímu

dělení, jehož výsledkem by měla být haploidní buňka, sekundární oocyt. V případě, že v primárním oocytu jsou přítomny 3 chromatidy, je 50% pravděpodobnost, že ona nadbytečná chromatida bude vyloučena v druhém pólovém tělísku a dojde tak k redukci chromozomové sestavy zpět do euploidního stavu. Možný je i reciproký scénář. Když má po prvním meiotickém dělení aneuploidní primární oocyt pouze jednu chromatidu pro daný chromozom, může s 50% pravděpodobností dojít k jeho rozdělení na druhé pólové tělísko bez příslušného chromozomu, a tím pádem je výsledný sekundární oocyt opět euploidní a nese odpovídající počet chromozomů. Teoreticky by tak 50 % chyb prvního meiotického dělení způsobených předčasným rozdělením chromatid nemělo hrát roli v budoucím zdárném vývoji oplozeného oocytu, potažmo vyvíjejícího se embrya, protože tyto chyby byly v polovině případů kompenzovány během druhého meiotického dělení. V praxi byla zaznamenána úspěšná kompenzace s četností 38 % u 125 chyb vzniklých v důsledku předčasné separace chromatid v meióze I (Handyside *et al.*, 2012).

2.3 Meiotické poruchy u savců

Meiotické poruchy vedoucí k aneuploidii jsou pozorovány nejen u člověka, ale také u ostatních savců. Poznatky získané o aneuploidii u různých živočišných druhů byly získány na hospodářských zvířatech nebo modelových organismech s využitím různých metod a postupů. Hospodářská zvířata jako je například prase či kráva se od modelových organismů jako je myš liší zejména tím, jak byla zvířata šlechtěna či jaké hybridní linie modelových organismů byly ve studii použity a tak, co se zdá být typické u myši, nemusí platit u prasete či skotu a naopak. V této kapitole bude stručně popsáno, co je typické pro konkrétní skupiny savců, u nichž jsou aneuploidie studovány a to včetně člověka, u kterého jsou zdrojem studia lidské IVF oocyty.

2.3.1 Meiotické poruchy v lidských IVF oocytech

Klasicky popisovaný mechanismus aneuploidii – nondisjunkce bivalentů v prvním meiotickém dělení respektive chromatid ve druhém meiotickém dělení byl dlouhou dobu považován za hlavní příčinu vzniku chromozomových aneuploidii v meióze (Gardner a Sutherland, 1989). Tento model příčiny vzniku aneuploidii byl také popsán s využitím molekulárně genetických analýz trizomií u plodů po spontánním oplození, které svědčily o tom, že většina trizomií má původ v maternální meióze. Heterozygotnost polymorfních markerů ve vazbě s centromerou pak byla brána jako známka toho, že hlavní

příčinou vzniku těchto poruch je nondisjunkce celých chromozomů v prvním meiotickém dělení (Nicolaidis a Petersen, 1998; Hassold *et al.*, 2007). Stanovení karyotypu oocytů v metafázi II u žen podstupujících IVF však ukázalo, že alespoň část aneuploidií nemá původ v chybném rozchodu celých chromozomů, ale pouze samostatných chromatid, což je pravděpodobně způsobeno předčasným rozdělením sesterských chromatid v rámci bivalentu a takto předčasně rozdělené chromatidy pak náhodně segregují (Angell, 1991). Model předčasného rozdělení sesterských chromatid také potvrdila studie zaměřená na detekci aneuploidií v oocytech využívající metodu FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) k analýze prvních a druhých pólových tělísek, jejíž výsledky ukazují, že většina poruch prvního meiotického dělení byla detekována jako jeden nebo tři fluorescenční signály místo normálně přítomných dvou signálů (Kuliev a Verlinsky, 2004). Novějším přístupem k vyšetření meiotických poruch je použití metod, které umožňují vyšetřit všechny chromozomy dělicího se oocytu u obou pólových tělísek. Rovněž tyto metody poukazují na významné zastoupení a dokonce převahu chyb způsobených předčasným rozdělením sesterských chromatid v meióze I. Handyside *et al.* (2012) s využitím metody aCGH došel k závěru, že u žen s vyšším věkem tvoří předčasná separace chromatid 97% chyb v meióze I. O něco větším dílem, než by odpovídalo polovině pak k aneuploidiím zjištěným u oocytů, přispívají chyby v meióze II.

2.3.2 Meiotické poruchy a jejich studium u savčích modelových organismů

Nejpoužívanějším modelem pro studium meiotických poruch je myš, která sama o sobě není ideálním organizmem pro studium faktorů, jež ovlivňují vznik aneuploidií. To je dáno poměrně krátkou délkou jejího života, což znesnadňuje sledování závislosti počtu meiotických poruch na věku samice. Myš je také nesmírně plodným organismem vyznačujícím se nízkým počtem meiotických aneuploidií (0,1 – 1 %), který navíc s věkem neroste tak výrazně jako u člověka (Koehler *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2008). V porovnání s člověkem má myš také velmi odlišný karyotyp sestávající z 20 krátkých akrocentrických chromozomů, které je od sebe velmi těžké rozeznat klasickými cytogenetickými metodami. Přes tyto problémy se Koehlerové *et al.*, (2006) podařilo vyšlechtit hybridní linii zkřížením *Mus musculus* a *Mus spretus*, u které došlo v F1 generaci ke zvýšení podílu aneuploidních oocytů u myši ve věku 4 týdnů na 10 % a u starších samic ve věku 8 – 9 týdnů dokonce až na více než dvojnásobek, což jsou hodnoty srovnatelné s člověkem. Zvýšení četnosti aneuploidií bylo dosaženo divergencí homologních

sekvencí obou druhů, která zajišťuje změnu počtu a pozic chiazmat. Meiózu myší je pak možné studovat nejen na chromozomové, ale i na expresní úrovni a díky tomu většina hypotéz a poznatků o původu aneuploidií byla získána právě s pomocí myšího modelu (Pan *et al.*, 2008). V současné době je intenzivně zkoumán vliv ztráty funkce proteínového komplexu tvořeného koheziny na předčasné rozdělení sesterských chromatid v meióze I (Nasmyth a Haering, 2009). Koheziny hrají důležitou úlohu při řazení bivalentů v metafázi I. Pokud není zajištěno, že sesterské chromatidy jsou pevně spojeny centromerou po celou dobu prvního dělení, neúčastní se volné chromatidy mimo bivalent kontrolovaného rozchodu chromozomů a rozcházejí se náhodně, což může vyústit v početní chromozomovou aberaci (Chiang *et al.*, 2010). Pozornost je rovněž věnována poruchám funkce SAC (spindle assembly checkpoint), což je kontrolní bod, jež je zodpovědný za vstup buňky do anafáze a jeho poruchy mohou vést k předčasnému rozchodu chromozomů ve chvíli, kdy tyto ještě nejsou plně seřazeny v ekvatoriální rovině na konci metafáze (Musacchio a Salmon, 2007). Selhání funkce SAC v závislosti na věku samice je sice popsáno u myší v prvním meiotickém dělení, ale s největší pravděpodobností je tento kontrolní bod nefunkční i v následujícím druhém meiotickém dělení (Kouznetsova *et al.*, 2007; LeMaire-Adkins *et al.*, 1997). Pozornost je věnována rovněž vlivu hormonální stimulace na množství aneuploidií a obecnému vztahu počtu aneuploidií k věku samice, což do budoucna může přinést cenné informace, na základě kterých pak bude možné zlepšení v léčbě lidské neplodnosti (Roberts *et al.*, 2005; Bean *et al.*, 2002).

Další savci, u nichž jsou meiotické aneuploidie studovány, jsou prase a skot. U prasete a skotu jsou rozvinuté biotechnologické postupy včetně umělého oplodnění, manipulace s embryi a jejich transfer. Tyto postupy našli dokonce komerční uplatnění (Velasquez 2008; Okere a Nelson, 2002). V rámci těchto postupů, ale také v chovech byly zaznamenány potraty a narození mláďat s aneuploidiemi (Schmutz *et al.*, 1996; King, 2008). Předpokládalo se tedy, že by u těchto živočichů mohly být v porovnání s hlodavci lépe vysledovatelné zákonitosti provázející výskyt aneuploidií u člověka. Přesto je prozatím o meiotických poruchách těchto savců dostupných poměrně málo informací. Analýza všech chromozomů v prasečích oocytech metodou CGH přinesla informaci o relativně malém zastoupení aneuploidií v samičích gametách (8,7 až 12,1 % v závislosti na věku a linii prasat), které se se zvyšujícím věkem nemění

(Horňák *et al.*, 2011). Kromě této celogenomové metody byly u prasat provedeny i studie využívající FISH (fluorescenční *in situ* hybridizaci) nebo klasické karyotypování. Výsledné počty aneuploidií se však vzájemně velmi liší podle použité techniky vyšetření, kultivace a linie prasat, a to od 3 % chromozomových poruch zachycených u chromozomů 1 a 10 metodou FISH až po 10,8 % hyperhaploidních oocytů (takových, u kterých bylo zjištěno více chromozomů než je běžná haploidní sada) detekovaných metodou klasického karyotypování (Vozdová *et al.*, 2001; Koenig a Stormshak, 1993). Obecně se má za to, že nízký počet aneuploidií a absence jejich zvyšující se četnosti v závislosti na věku může souviset s vysokou prošlechtěností prasat na jejich plodnost. V případě mléčného skotu bylo detekci aneuploidií metodou FISH pro chromozomy 5 a X zjištěno, že 2% *in vitro* maturovaných oocytů bylo aneuploidních. Dopočtem do kompletní haploidní sady chromozomů (30) mléčného skotu tedy bylo odhadnuto, že 30 % oocytů je aneuploidních a to za předpokladu, že se všechny chromozomy účastní meiotických poruch se stejnou četností (Nicodemo *et al.*, 2010); Lechniak a Switonski, (1998) pak opět u metafázních *in vitro* maturovaných oocytů klasickou metodou karyotypování zjistili přítomnost 7,1 % hyperhaploidních oocytů. Celogenomová analýza chromozomů, jaká byla použita pro oocyty prasat, v případě skotu chybí a dostupná data jsou bohužel v případě metody FISH zatížena poměrně velkou chybou způsobenou odhadem a extrapolací dat na všechny chromozomy a v případě klasického karyotypování pak různými artefakty a jistou nedokonalostí detekce aneuploidií u skotu prováděnou tímto způsobem.

2.4 Možnosti studia lidských oocytů

Základním zdrojem pro studium meiózy u žen jsou oocyty odebrané v rámci asistované reprodukce a to buď přímo ženám, které z různých důvodů nemohou spontánně otěhotnět, anebo dárkyním oocytů. V případě studia mechanismů, jež se podílí na poruchách meiotického dělení, je tedy možné kromě oocytů kompletně věnovaných výzkumu, využít zejména prvních a druhých pólových tělísek, které jsou z oocytů žen odebírány při PGS.

2.4.1 PGS a jeho postavení v rámci PGD

Preimplantační genetický screening je jednou z metod preimplantační genetické diagnostiky. Rozdíl mezi screeningem a diagnostikou je dán tím, že zatímco v případě diagnostiky je předem známo na jakou chromozomovou aberaci, nebo monogenní poruchu

je potřeba se u embryí zaměřit, screening slouží k vyloučení numerických chromozomových aberací vyskytujících se s určitou četností u každé ženy. Vzhledem k tomu, že podíl aneuploidních oocytů roste s věkem ženy (Hassold a Hunt, 2010), provádí se PGS zejména ženám přibližně od 30 let věku. Hlavním přínosem této metody je zvýšení úspěšnosti otěhotnění výběrem euploidního oocytu, nebo embrya a urychlení léčby neplodnosti. Sekundárním přínosem, který vyplývá z principu metody, je snížení množství potratů a eliminace počtu těhotenství s poroditelnými aneuploidii plodu, jakými jsou trizomie chromozomů 13, 18 a 21, nebo aneuploidie pohlavních chromozomů. Naproti tomu PGD je určeno pro vyloučení embryí s rodičovským haplotypem, jež se pojí s některým ze vzácných dědičných onemocnění, anebo slouží k detekci strukturních chromozomových abnormalit, jakými jsou translokace, inverze apod. Rozdíl je také v použitých metodách. Pro PGD dědičných onemocnění se v současné době používá karyomapping – Karyomapping (Handyside *et al.*, 2009a), což je v podstatě vazebná analýza s využitím čipové technologie umožňující detekci jednonukleotidových polymorfizmů napříč celým genomem. Je to tedy metoda univerzální, kterou lze využít pro jakýkoliv lidský gen. Pro PGD strukturních abnormalit i PGS se v současnosti nejčastěji používá metoda aCGH (Fiorentino *et al.*, 2011). Tato metoda představuje velmi robustní, spolehlivý a prakticky velmi dobře využitelný nástroj pro detekci početních chromozomových abnormalit všech lidských chromozomů. V případě PGD strukturních abnormalit jsou pak při zachování stejného postupu pouze použity jiné čipy, které poskytují vyšší rozlišení v telomerických oblastech, čímž se zvyšuje detekční schopnost u velmi malých strukturních chromozomových přestaveb. Obrovskou předností jak Karyomappingu, tak i metody aCGH v PGD strukturních abnormalit je vyšetření aneuploidii všech chromozomů člověka v rámci jednoho vyšetření (Handyside *et al.*, 2009b; Muné, 2012). Je tedy možné říci, že v současnosti již všechny moderní metody pro PGD mají v sobě automaticky zahrnuto i PGS. Cílem je dosáhnout vyšší úspěšnosti léčby v podobě vyšší četnosti těhotenství a v maximální možné míře eliminovat jak riziko spontánního potratu v důsledku aneuploidie plodu, tak i narození dítěte s numerickou chromozomovou aberací. V dnešní době v oblasti PGD ustoupila do pozadí biopsie blastomery raného embrya a byla nahrazena biopsií trofektodermu z blastocytu 5., nebo 6. den vývoje embrya (Schoolcraft *et al.*, 2010). PGD rovněž vstoupilo do doby, kdy sekvenování nové generace začíná postupně vytlačovat dosud používané čipové technologie (Fiorentino *et al.*, 2014). Biopsie obou pólůvých tělísek z oplozeného oocytu

léčené ženy se v dnešní době dostala na okraj a představuje pouze zlomek z celkového počtu prováděných PGS vyšetření. Ačkoliv na okraji, vyšetření tohoto materiálu má své pevné místo ve spektru prováděných preimplantačních vyšetření (Wells *et al.*, 2002). Je určeno zejména ženám nad 35 let, u kterých v rámci PGS chceme zjistit co nejvíce o tom, zda konkrétní žena ještě produkuje alespoň nějaké euploidní oocyty.

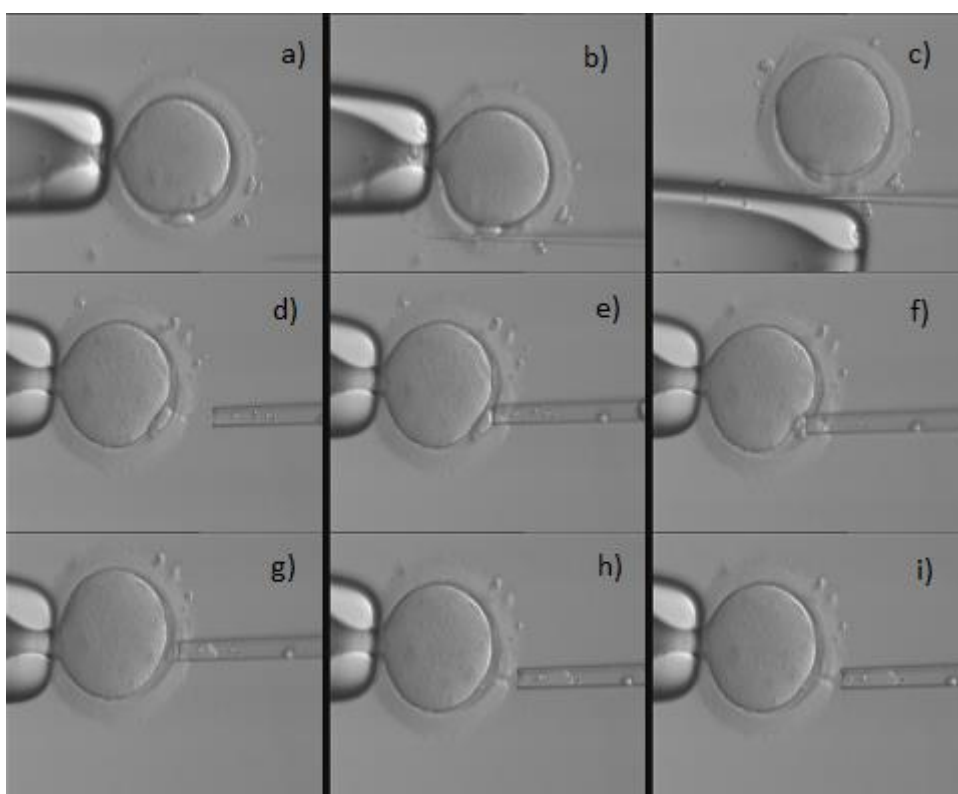
2.4.2 Pólová tělíska a jejich úloha v rámci PGS

Použití pólových tělísek má v rámci PGS velmi specifické postavení. Na rozdíl od ostatních stádií biopsie totiž vyšetřovaný materiál nepochází z vyvíjejícího se embrya, které se již dělí, ale z čerstvě oplozeného oocytu, který dokončil meiotické dělení. Díky tomu je možné získat informaci pouze o meiotických aneuploidních maternálního původu. Na druhou stranu je však biopsie pólových tělísek tou nejšetrnější variantou zisku materiálu pro PGS vzhledem k tomu, že se pólová tělíska neúčastní dalšího vývoje embrya, ale jsou pouze vedlejšími produkty meiotického dělení. Ačkoliv vyšetřením pólových tělísek nejsou získány informace o aneuploidních paternálního a mitotického původu, jsou naopak k dispozici těmito poruchami nezkreslené informace o chybách v oogenezi (Fragouli *et al.*, 2011). Možnost vybrat embryo s nejlepším implantačním potenciálem přitom zůstává zachována, protože meiotické aneuploidie jsou nejčastější příčinou aneuploidie u embrya u starších žen. Výhodou tohoto postupu je také to, že lze do jisté míry odhadnout, jaká je kvalita oocytů dané ženy a s ohledem na tuto perspektivu směřovat budoucí léčbu.

2.4.3 Biopsie polocytů

První a druhé pólové tělísko jsou produkty meiotického dělení oocytu a k tomu, aby bylo možné je získat ke genetickému vyšetření, musíme proniknout do perivitelinního prostoru daného oocytu otevřením *zony pellucida* viz obr. 5-b a 5-c. V současnosti jediné dva přípustné a spolehlivé způsoby jsou mechanická a laserová parciální disekce zony (Cieslak *et al.*, 1999; Montag *et al.*, 1998). Otvor nesmí být příliš velký, aby nedošlo ke ztrátě některé z blastomer rýhujícího se embrya, a naopak nesmí být ani příliš malý, aby nedošlo k uvěznění embrya v průběhu hatchingu ve stádiu blastocysty viz obr. č 5-d (Montag a Ven, 1999). Biopsie prvního a druhého pólového tělíska může být provedena postupně neboli sekvenčně anebo současně, simultánně. Simultánní biopsie vyžaduje pouze jednu operaci a tudíž je k oocytu šetrnější. Ideální je, pokud je tato metoda prováděna 8 až 14 hodin po fertilizaci. Pokud by se bioptovalo dříve, zůstává

riziko připojení zbytků vřeténka k druhému pólovému tělísku, pozdější biopsie naopak může být ohrožena dezintegrací a rozpadem polocyttů, což bylo ale problematické především při použití metody FISH (Montag *et al.*, 2006; Munné *et al.*, 1995). Současná biopsie obou polocyttů může v praxi rovněž znamenat problém v rozlišení prvního a druhého pólového tělíska. Postupná biopsie pak sice znamená dvě manipulace, nicméně odpadá problém s rozlišením polocyttů. Na obrázku č. 5 lze vidět jednotlivé kroky biopsie prvního pólového tělíska (otevření *zona pellucida*, nasátí polocyttu a jeho přenos).



Obrázek 5: Biopsie prvního pólového tělíska: a) holdingová pipeta, b), c) aspirace zony, d) biopsační pipeta, e) – i) postupné nasátí a přenos prvního pólového tělíska (databáze Sanatoria Repromeda)

3 CÍL PRÁCE

- Cílem práce je zjištění četnosti různých typů chromozomových chyb v prvním a druhém meiotickém dělení u oocytů, které vedou k jejich aneuploidiím
- Provedení analýzy, s jakou frekvencí se jednotlivé chromozomy podílí na meiotických poruchách
- Porovnání výsledků této práce s poznatky získanými na jiných souborech oocytů žen podstupujících léčbu neplodnosti
- Porovnání poznatků získaných analýzou oocytů prasat a myši s našimi výsledky

4 MATERIÁLY A METODIKA

Metodika této diplomové práce je rozdělena do čtyř podkapitol. V první je stručně charakterizován soubor pacientek, jejichž oocyty, respektive první a druhá pólová tělíska, byla použita k získání dat, u kterých bylo následně možné sledovat a vyhodnocovat poruchy meiózy. Druhá část je věnována zisku oocytů, jejich kultivaci, respektive kultivaci embryí a následně biopsii prvního a druhého polocytu. Třetí a zároveň nejobsáhlejší část metodiky práce se týká samotné metody genetické analýzy pólových tělísek metodou komparativní genomové hybridizace na DNA čipu. Poslední část je věnována vyhodnocení a statistické analýze dat o aneuploidiiích v rámci meiotického dělení.

Tuto diplomovou práci jsem vypracoval se souhlasem vedení Sanatoria Repromeda, ve spolupráci s pracovníky Sanatoria Repromeda. Vyšetření metodou komparativní genomové hybridizace na DNA čipu jsem prováděl vždy s dohledem některého z molekulárních genetiků Sanatoria Repromeda. Velkou část těchto vyšetření jsem buď sám aktivně dělal, nebo jsem byl pasivně přítomen. Embryologickou část laboratorní přípravy vzorků provedli vždy pracovníci embryologické laboratoře Sanatoria Repromeda.

4.1 Soubor pacientek

Materiálem pro studium meiotických poruch v této práci byly sady prvních a druhých pólových tělísek odbioptované z příslušných oocytů žen, které podstoupily léčbu neplodnosti s využitím metody PGS. Jednalo se o ženy, které tuto léčbu podstoupily v letech 2014 a 2015 v Sanatoriu Repromeda v Brně. Věk pacientek byl vzhledem ke smyslu použití této metody vyšší. Celkově se jednalo o 17 žen s průměrným věkem 39,3 let. Pro potřeby této diplomové práce byla jména pacientek zaslepena stejně jako protokolová označení jednotlivých cyklů. Cykly byly následně očíslovány číslicemi od 1 do 23 a v číslování nebylo nijak zohledněno to, zda se jedná o první nebo další cyklus stejné ženy.

4.2 Zisk a zpracování lidských IVF oocytů

Stejně jako v případě běžně prováděných cyklů s PGD/PGS a biopsií ve stádiu blastomery případně blastocysty, bylo nejprve třeba provést hormonální stimulaci, aby bylo možné najednou získat větší množství oocytů (tzv. kontrolovaná hyperstimulace).

Získané oocyty byly zpracovány a následně pomocí intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI), nebo preselektované intracytoplazmatické injekce spermie (PICSI) oplodněny. Z oplodněného oocyty pak byla postupně odbíoptována obě pólková tělíska vydělená v průběhu meiózy I a II, jež mohla následně sloužit jako vstupní materiál samotné genetické diagnostice.

Ke stimulaci pacientek byly použity běžné stimulační protokoly využívané v Sanatoriu Repromeda. Jednalo se o protokoly založené především na rekombinantních preparátech obsahujících folikulostimulační hormon. Cílem aplikace těchto hormonálních preparátů je kontrolovaná hyperstimulace pro následný odběr většího množství oocytů k oplodnění tak, aby bylo možné vybírat k transferu to nejvhodnější embryo. Samotný odběr byl proveden přes poševní stěnu tenkou jehlou v krátké celkové anestezii.

Získané oocyty byly opláchnuty přehřátým (37°C) médiem G-MOPST[™] (Vitrolife) a ekvilibrovaným médiem G-IVF Plus (Vitrolife) a uloženy do inkubátoru (Binder CB150), kde byly ponechány v ekvilibrovaném G-IVF Plus mediu při teplotě 37°C v 6% CO₂. Po dvou hodinách byly oocyty očištěny (denudace) od kumulárních buněk (ICSI Cumulase -ORIGIO), opláchnuty (G-MOPS a IVF medium) a poté přeneseny do jiné kapky ekvilibrovaného IVF media v kultivační misce, ve které byly ponechány až do doby oplozování. Oplodnění bylo prováděno technikou ICSI (intracytoplazmatická injekce spermie do oocyty) zpravidla 2 hodiny po denudaci. Oplodněné oocyty byly vráceny do inkubátoru a po dvou hodinách byla provedena biopsie prvního pólkového tělíska. Z důvodu snazšího odlišení prvního a druhého pólkového tělíska, které je stěžejní pro následnou genetickou diagnostiku, byla zvolena metoda sekvenčního biopování s postupnou biopsií prvního a až následně druhého pólkového tělíska. Biopsie byla prováděna na mikromanipulátoru Narishige mechanicky za pomoci hatchingové jehly a biopsační pipety o průměru 15 µm. Odbíoptované oocyty byly uloženy do kultivačního media jednotlivě do očíslovaných jamek a odebraná pólková buňka tělíska byla přenesena do 1 µl PBS (Phosphate buffered saline - fosfátový pufr s NaCl) v PCR zkumavkách. Následující den ráno (cca 19 hodin po ICSI) byla zhodnocena fertilizace a správně oplodněné oocyty (2 prvojádra) byly podrobeny odběru druhého pólkového tělíska. Odběr byl proveden opět na mikromanipulátoru za pomoci biopsační pipety a již vytvořeného otvoru v ZP (zona pellucida). Odebraná druhá pólková tělíska byla opět přenesena do 1 µl PBS v PCR zkumavkách.

Detaily a obrazová dokumentace samotné biopsie viz literární přehled.

4.3 Metoda komparativní genomové hybridizace na DNA čipu pro studium aneuploidí u oocytů

V této práci byla pro PGS na pólóvých těliscích použita platforma aCGH firmy Illumina (dříve BlueGnome) s čipy 24 sureV3. Jedná se o robustní nástroj pro rutinní diagnostiku chromozomových aneuploidí u člověka. Rozlišení čipů 24sureV3 je přibližně 10 Mb. Každý čip má dvě samostatná hybridizační pole s imobilizovanými BAC klony, na které je hybridizována různě fluorescenčně značená DNA dvou vzorků. Fluorescenční signály na každém BAC klonu jsou softwarově vyhodnoceny a reprezentují početní stav jednotlivých chromozomů, případně i jejich menších částí.

4.3.1 Celogenomová amplifikace

Vstupním materiálem pro PGD/S je obecně vždy minimální množství biologického materiálu (jedna nebo několik buněk), a proto je nutné pro další zpracování toto minimální množství DNA pomocí celogenomové amplifikace znásobit až na množství, které je dostatečné pro hybridizaci na DNA čipu. V případě této práce, týkající se meiotických poruch s využitím pólóvých tělísek, byl k celogenomové amplifikaci použit kit SurePlex DNA Amplification System (Illumina), díky kterému je možné amplifikací pólóvého tělíska získat 2-5 μg DNA, která rovnoměrně zastupuje celý genom, a je tedy vhodná pro kvantitativní detekci aneuploidí všech 23 chromozomů přítomných v pólóvém tělísku. Amplifikace DNA pólóvých tělísek je dvoufázová. V prvním kroku je s využitím náhodných primerů vytvořena knihovna, která je následně amplifikována pomocí univerzálních primerů nasedajících na komplementární sekvence vnesené na konce amplikonů během prvního kroku, kterým je příprava knihovny. Výsledkem je amplifikace vzorku DNA z pólóvého tělíska až 1 000 000krát, přičemž je zachován vzájemný poměr v zastoupení sekvencí z různých chromozomů tak, jak je tomu u vzorku před jeho amplifikací. Výhodou kitu SurePlex je rovněž časová úspora. Celogenomová amplifikace vzorku trvá cca 3 hodiny a byla prováděna v místnosti k tomu přímo určené. Všechny kroky, v rámci kterých byly připravovány reakční směsi, byly prováděny v laminárním boxu, který byl předem vysvícen UV lampou po dobu 30 minut. Z důvodu snížení rizika kontaminace bylo také nutné pracovat v rukavicích, roušce, sterilní pokrývce hlavy a jednorázovém chirurgickém plášti.

Prvním krokem amplifikačního protokolu je extrakce DNA. Do PCR zkumavky s 1 μ l PBS pufru obsahujícím odbioptované pólové tělísko, bylo napipetováno 9 μ l extrakční směsi připravené ze 4 μ l extrakčního pufru, 4,8 μ l extrakčního ředícího pufru a 0,2 μ l extrakčního enzymu. Směs byla vždy připravena předem v závislosti na počtu vzorků. V každé skupině amplifikovaných vzorků byl zařazen jeden vzorek jako negativní kontrola (1 μ l PBS bez pólového tělíška), aby bylo možné vyloučit případnou kontaminaci použitých reagensů. Zkumavky se vzorkem a extrakční směsí byly umístěny do termocyklieru Bioer určeného pouze pro amplifikaci vzorků pro PGD/S a byl spuštěn program viz tabulka č. 1.

Tabulka 1: Program určený k lýze biooptovaného materiálu a extrakci DNA z buňky

Počet cyklů	Teplota	čas
1	75°C	10 min
1	95°C	4 min
1	RT	udržovat

Po extrakci následovala preamplifikace. Ke každému vzorku bylo napipetováno 5 μ l preamplifikační směsi, která byla připravena smísením 4,8 μ l preamplifikačního pufru s 0,2 μ l preamplifikačního enzymu. PCR zkumavka byla poté opět vložena do stejného termocyklieru a byl spuštěn program viz tabulka č. 2.

Tabulka 2: Program určený k preamplifikace lyzovaného vzorku (příprava knihovny)

Počet cyklů	Teplota	Čas
1	95°C	2 min
12	95°C	15 s
	15°C	50 s
	25°C	40 s
	35°C	30 s
	65°C	40 s
	75°C	40 s
1	4°C	udržovat

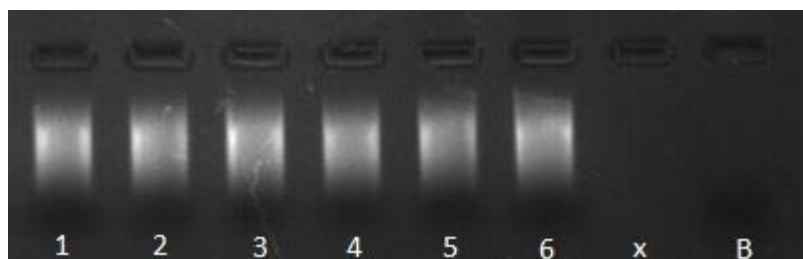
Posledním krokem celogenomové amplifikace je běžná PCR. K preamplifikovaným vzorkům bylo napipetováno 60 μ l amplifikační směsi tvořené 25 μ l amplifikačního pufru, 34,2 μ l vody (součást kitu) a 0,8 μ l amplifikačního enzymu. Poté byly zkumavky opět vloženy do termocyklieru a spuštěn program viz tabulka č. 3.

Tabulka 3: Program určený k poslední fázi amplifikace (PCR)

Počet cyklů	Teplota	čas
1	95°C	2 min
14	95°C	15 s
	65°C	1 min
	75°C	1 min

4.3.2 Ověření amplifikace DNA vzorku – elektroforéza

Po provedení celogenomové amplifikace je nutné ověřit, zda tato byla úspěšná a zda se podařilo získat dostatečné množství DNA pro značení a hybridizaci. K tomu slouží jedna z klasických metod molekulární biologie – agarózová gelová elektroforéza DNA. V průběhu amplifikace vzorků v termocykleru bylo připraveno elektroforetické zařízení a nachystána agaróza (AGAROSE I™, Amresco). Agaróza byla připravena rozmícháním 0,75 g agarózy v 50 ml pracovního TBE pufru (45 mmol/l tris, 45 mmol/l kyselina boritá a 1 mmol/l kyselina etylendiaminotetraoctová – EDTA) a zahřátím v mikrovlnné troubě po dobu nezbytnou k úplnému rozpuštění agarózy a zprůhlednění roztoku. Do připraveného roztoku bylo napipetováno 2,5 µl fluorescenční barvy GelRed™ určené k vizualizaci DNA, promícháno a roztok byl nalit do vaničky na přípravu agarózového gelu. Byl vložen hřebínek a gel cca 1 hodinu tuhnul. Poté byl hřebínek odstraněn, gel vložen do elektroforetické vany a převrstven pracovním pufrem TBE. Do jamek gelu byly napipetovány jednotlivé vzorky smíchané v poměru 5 : 1 s nanášecím pufrem (30% glycerol, 0,25% bromfenolová modř), přiklopeno víko a vana připojena ke zdroji napětí pro elektroforézu nastavenému na 130 V. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 5 V/cm a ukončena ve chvíli, kdy vzorky, respektive modrá barva v nanášecím pufrem doputovala do 2/3 délky gelu. To bylo cca po 20 až 25 minutách. Gel byl vyjmut z vany, vizualizován a zdokumentován v geldokumentačním systému UVIDOC HD5, viz vzorová fotografie gelu se vzorky, obr. č. 6. Amplifikované vzorky byly po ověření použity pro značení DNA a zbytek vzorků byl uchován při -20°C pro případné následné použití.



Obrázek 6: Fotografie agarózového gelu potvrzující úspěšnou amplifikaci tří prvních pólových tělísek (pozice označené 1, 2 a 3) a tří druhých pólových tělísek (pozice označené 4, 5 a 6), vyloučení kontaminace je po každé celogenomové amplifikaci potvrzeno vizualizací tzv. negativní kontroly (použité reagentie bez vyšetřovaného vzorku – pozice označená jako B, mezi pozicí negativní kontroly a vzorky byla vynechána jedna jamka (x))

4.3.3 Značení DNA

Vzorky amplifikované DNA byly značeny pomocí fluorescenčních značek Cy3 a Cy5, což umožnilo rozlišení vzorků, jež vzájemně soutěžily o navázání na imobilizované BAC klony naspotované na čipu, což je principem metody aCGH. Jednalo se o značení enzymem Klenow, čili šlo o prodlužování náhodných primerů a inkorporaci fluorescenčně značených nukleotidů dCTP. Ke značení DNA byl použit kit Fluorescent Labelling System [dCTP] (Illumina). Pro lepší organizaci laboratorní práce, výpočet objemu reagentií a generování značícího a hybridizačního schématu vzorků a referenční DNA, bylo použito makro v programu Excel poskytnuté výrobcem (V3 planner v3, Illumina). Z každého amplifikátu bylo napipetováno 8 μ l do PCR zkumavek označených dle laboratorního protokolu. To stejné bylo provedeno se vzorky referenčními. Do každé zkumavky pak bylo přidáno 5 μ l náhodných hexamerů. Výsledná směs byla denaturována v termocycleru Bioer určenému k postamplifikačním reakcím 5 minut při 99°C a následně byly zkumavky umístěny na led na 5 minut. V následujícím kroku byly připraveny dvě značící směsi Cy3 a Cy5 v poměrech 5:5:1:1 pro reakční pufr, směs nukleotidů dCTP, Cy3/Cy5 a enzym Klenow. Z těchto značících směsí bylo podle laboratorního plánu napipetováno po 12 μ l do příslušných zkumavek a ty inkubovány v termobloku Benchmark při 37 \pm 1°C 2 hodiny. Následovalo smíchání vzorků a jejich příprava na hybridizaci. Podle laboratorního plánu byly v 1,5ml zkumavce smíchány vždy jeden vzorek značený Cy3 s jedním vzorkem značených Cy5 a stejně tak i referenční vzorky (SureRef reference male DNA a SureRef reference female DNA – Illumina). Do každé

takto připravené směsi dvou vzorků bylo přidáno 25 μ l Human COT DNA (Illumina). Jednalo se o kompetitorovou DNA pro vyvážení repetitivních sekvencí. Zkumavky byly po promíchání vloženy do centrifugační vakuové odparky Thermo, ve které probíhalo odpařování po dobu cca 35 až 40 minut při teplotě 65 °C. Po odpaření zůstalo ve zkumavkách vždy asi 3 μ l směsi ve formě gelovitého peletu.

4.3.4 Hybridizace na DNA čip

Vzniklé pelety byly resuspendovány ve 22 μ l DS hybridizačního pufru, který byl předehřátý na 75 \pm 1°C a následně byla tato směs inkubována při 75 \pm 1°C po dobu 10 minut ve vyhřívané vodní lázni Major Science. Vzorky byly centrifugovány a pomalu zchlazeny až na teplotu laboratoře. Hybridizační směs byla následně nanášena ve formě kapky doprostřed krycího skla o rozměrech 22 \times 22 mm a opatrně přiklopena DNA čipem. Hybridizační směs se poté pomalu rozprostřela po celé ploše krycího skla, které v tu chvíli s mírným přesahem kopírovalo naspotovanou oblast čipu. Připravené čipy byly umístěny do předem zvlhčené (2 \times 15 μ l destilované vody) hybridizační komůrky Arrayit a hybridizovány přes noc při teplotě 47 \pm 1°C (výrobce doporučuje 3-16 hodin) v hybridizační pídce Illumina.

4.3.5 Vymývání nenavázané DNA

Ne všechna fluorescenčně značená DNA se v průběhu hybridizace naváže na čip, anebo může dojít k jejímu nespecifickému navázání. Během promývání je potřeba z čipu nejdříve odmyt nenavázanou DNA a v následném stringentním promývacím kroku rovněž nespecificky hybridizovanou DNA, aby pozadí a nespecificky hybridizovaná DNA nezkreslily intenzity specifických fluorescenčních signálů. Promývání bylo prováděno v několika fázích. Nejprve byly do Wheatonových kyvet připraveny promývací roztoky A, B a C viz tabulka č. 4. Jedna Wheatonova kyveta s roztokem C byla předehřáta na 60 \pm 1°C. DNA čip byl vložen nejprve do roztoku A, aby krycí sklo mohlo sklouznout z čipu. Pokud sklíčko nesklouzlo samovolně, bylo sejmuto z čipu opatrně pinzetou. Následně byl čip přemístěn do jiné kyvety s roztokem A a za stálého míchání na magnetické míchače promýván 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byl čip přesunut do kyvety s roztokem B a opět za stálého míchání vymýván po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byl čip přemístěn do kyvety s roztokem C předehřátým na 60 \pm 1°C a bez míchání inkubován 5 minut ve vodní lázni (stringentní promývací krok). Na závěr byl čip

přemístěn opět do kyvety s roztokem C a za stálého míchání na magnetické míchače po dobu 1 minuty temperován na laboratorní teplotu. Vymytý čip byl osušen důkladnou centrifugací po dobu 15 s využitím centrifugy Labnet s adaptérem na sklička. Suchý čip je pak připraven ke skenování a je nutné jej chránit před světlem v dodávaném originálním plastovém boxu, který alespoň částečně zamezí vysvěcování fluorescenčních značek.

Tabulka 4: Složení a koncentrace promývacích roztoků SSC (saline-sodium citrate)

Promývací roztok	Objem	Složení
A	1× 100 ml, 1× 250 ml	2× SSC/0,05% Tween20
B	1× 250 ml	1× SSC
C	2× 250 ml	0,1× SSC
Koncentrace		
20× SSC	20× koncentrovaný roztok standard sodium citrate (3 mol/l chorid sodný, 300 mmol/l citran sodný)	
2× SSC	2×koncentrovaný roztok standard sodium citrate (300 mmol/l chorid sodný, 30 mmol/l citran sodný)	
1× SSC	1×koncentrovaný roztok standard sodium citrate (150 mmol/l chorid sodný, 15 mmol/l citran sodný)	
0,1× SSC	0,1×koncentrovaný roztok standard sodium citrate (15 mmol/l chorid sodný, 1,5 mmol/l citran sodný)	

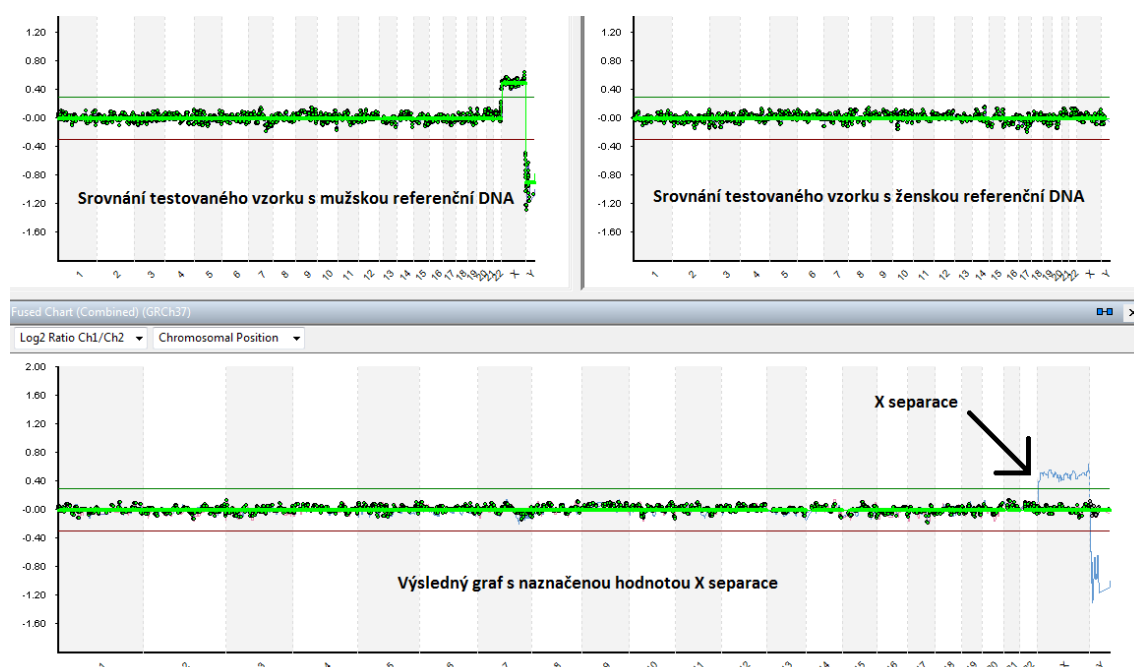
4.3.6 Skenování fluorescence na DNA čípech

Čipy byly po hybridizaci skenovány na skeneru ScanRI (PerkinElmer), aby byly získány hodnoty fluorescence pro jednotlivé spoty na čipu. K ovládání skeneru byl použit software ScanRI v1.0.0. (PerkinElmer) a čipy byly skenovány při rozlišení 10 µm. Získaná obrazová data byla uložena ve formátu TIF a použita pro vyhodnocení.

4.3.7 Zpracování dat pomocí software BlueFuse Multi a tvorba databáze

Zpracování fluorescenčních dat z naskenovaných čipů probíhalo automaticky pomocí software BlueFuse Multi v 3.1 – 4.0 (Illumina). Výsledkem softwarové analýzy je graf logaritmického poměru fluorescence ($\log_2\text{ratio}$). Získané hodnoty fluorescence jednotlivých vzorků jsou porovnávány s hodnotami získanými pro referenční DNA mužského pohlaví a s hodnotami získanými pro referenční DNA ženského pohlaví. Výsledkem jsou grafy s vynesnými hodnotami logaritmického poměru fluorescence pro všechny

chromozomy (BAC klony na čipu), a to zvlášť pro mužskou a zvlášť pro ženskou referenční DNA (obr. X). Pokud je počet kopií chromozomů u vzorku stejný jako u referenční, hodnota $\log_2\text{ratio}$ je nulová. Kladné hodnoty znamenají zisk chromozomu, záporné hodnoty ztrátu chromozomu. Pro hodnocení aneuploidii je důležité znát u každého vzorku hodnotu X separace, kterou je u pólóvých tělísek průměrná hodnota $\log_2\text{ratio}$ chromozomu X proti mužské referenční DNA. Zisky chromozomů odpovídají buď hodnotě X separace (poměr kopií 2:1), nebo 0,67 násobku hodnoty X separace (poměr kopií 3:2). Ztráty chromozomu mají buď zápornou hodnotu X separace (poměr kopií 1:2), anebo se v případě nulizomii pohybují výrazně pod hodnotou X separace (poměr kopií 0:2, hodnota pozadí). Při následném vyhodnocení aneuploidii bylo postupováno podle doporučení výrobce a s využitím získaných grafů a hodnot X separace.



Obrázek 7: Výsledek vyšetření metodou aCGH. Na obrázku je vidět euploidní nález po vyšetření PBI. Osa x označuje oblasti jednotlivých chromozomů. Osa y pak vyjadřuje hodnotu $\log_2\text{ratio}$. Pomocné čáry pro zisky a ztráty, tzv. „copy lines“ vyznačují typické hodnoty $\log_2\text{ratio}$ pro poměr fluorescence 3:2 (zeleně) a 1:2 (červeně). Na obrázku jsou vidět celkem tři grafy. 2 grafy srovnání testovaného vzorku s ženskou a mužskou referenční DNA, díky kterým je získána hodnota X separace. Ta je naznačena jako modrá křivka ve výsledném grafu

4.4 Statistická analýza dat

Všechna data, která byla získána v rámci této práce, byla zpracována do tabulky v programu Microsoft Excel. Pro každou ženu a všechny její oocyty zvlášť byl

zaznamenán věk pacientky, počet poruch v prvním a druhém dělení, celkový počet poruch a jejich reparace. Do tabulky byly následně zaneseny údaje o jednotlivých poruchách. Sledováno bylo, zda došlo k zisku nebo ztrátě jedné či dvou chromatid v rámci prvního meiotického dělení. Zda došlo k zisku nebo ztrátě v průběhu druhého meiotického dělení a na základě informací z obou meiotických dělení byly zaznamenány případné chromozomové kompenzace. Tato základní tabulka byla posléze využita pro tvorbu dílčích tabulek a grafů.

Pro finální vyhodnocení byly vytvořeny tabulky obsahující počty euploidních a aneuploidních vzorků, počty a poměry chyb meiózy I a meiózy II, počty kompenzačních událostí, a konečně i přehled všech chromozomových poruch napříč všemi chromozomy. Kde to bylo kvůli přehlednosti vyžadováno, byly vytvořeny v programu Microsoft Excel grafy. V případě rozložení aneuploidii mezi jednotlivými chromozomy byla použita lineární spojnice trendu, aby byla viditelná případná tendence vzniku poruch směrem k větším či k menším chromozomům. V případech, kdy bylo potřebné ověřit, zda pozorovaná četnost odpovídá četnosti očekávané, byla použita matematicko-statistická metoda testu dobré shody.

5 VÝSLEDKY

V letech 2014 a 2015 bylo v Sanatoriu Repromeda provedeno 23 cyklů PGS, při kterých bylo především kvůli vyššímu věku ženy (nad 35 let) zvoleno vyšetření pólových tělísek. Jednalo se celkem o 17 žen, jejichž průměrný věk byl 39,3 let. Ve třech případech podstoupila žena dva cykly PGS s biopsií pólových tělísek a v jednom případě bylo ženě odebráno postupně pět oocytů ve čtyřech po sobě jdoucích nativních cyklech, nebo cyklech s minimální hormonální stimulací. Počet vyšetřovaných oocytů byl celkem 54, což znamená průměr 3,2 oocytu na pacientku. Pomocí metody aCGH se podařilo vyšetřit 54 prvních pólových tělísek a 54 druhých pólových tělísek, čímž byla získána data o průchodu prvním a druhým meiotickým dělením pro 1242 párů homologických chromozomů. Základní parametry studovaného souboru žen jsou přehledně uvedeny v tabulce č. 5.

Tabulka 5 Základní parametry studovaného souboru žen

Počet žen	Průměrný věk ženy	Počet IVF cyklů	Získané oocyty	Průměrný počet získaných oocytů na ženu
17	39,3	23	54	3,2

Pro úspěšné vyšetření aneuploidií oocytu je třeba vyšetřit obě pólová tělíška. V prvním meiotickém dělení se vzájemně rozchází páry homologických chromozomů. Každý z chromozomů je v normálním případě složen ze dvou chromatid spojených centromerou. První pólové tělíško tedy obsahuje stejné množství DNA jako každá diploidní buňka před replikací a je z tohoto hlediska podobné blastomeře raného embrya. Druhé pólové tělíško je produktem druhého meiotického dělení, při kterém se po rozdělení centromer rozchází jednotlivé chromatidy a ve srovnání s prvním pólovým tělíškem obsahuje pouze poloviční množství DNA odpovídající haploidnímu genomu. Vyšetření druhého pólového tělíška by proto mělo být technicky ještě obtížnější než vyšetření prvního pólového tělíška, které je obdobou vyšetření jedné buňky. V našem souboru byla pólová tělíška bioptována jen z takových oocytů, které nejevily ani známky lýze, ani degradace. V rámci práce se podařilo vyšetřit obě pólová tělíška všech 54 vyšetřovaných oocytů, což představuje úspěšnost vyšetření 100% (Tabulka č. 6). Díky tomu bylo možné vyhodnotit chromozomové sestavy všech 54 sad pólových tělísek, což bylo

jedním z primárních cílů této práce. Stoprocentní úspěšnost celogenomové amplifikace jednobuněčného materiálu a následně také stoprocentně úspěšná aCGH ukazuje na precizní práci a velkou zkušenost bioptujících embryologů, je potvrzením robustnosti této vyšetřovací metody a svědčí o jejím dobrém zvládnutí na pracovišti.

Tabulka 6 Podíl úspěšně vyšetřených vzorků

Typ vzorku	Odebrané vzorky	Vyšetřené vzorky	Úspěšnost vyšetření (%)
PB1	54	54	100
PB2	54	54	100
<i>Oocyt (odvozeno)</i>	<i>54</i>	<i>54</i>	<i>100</i>

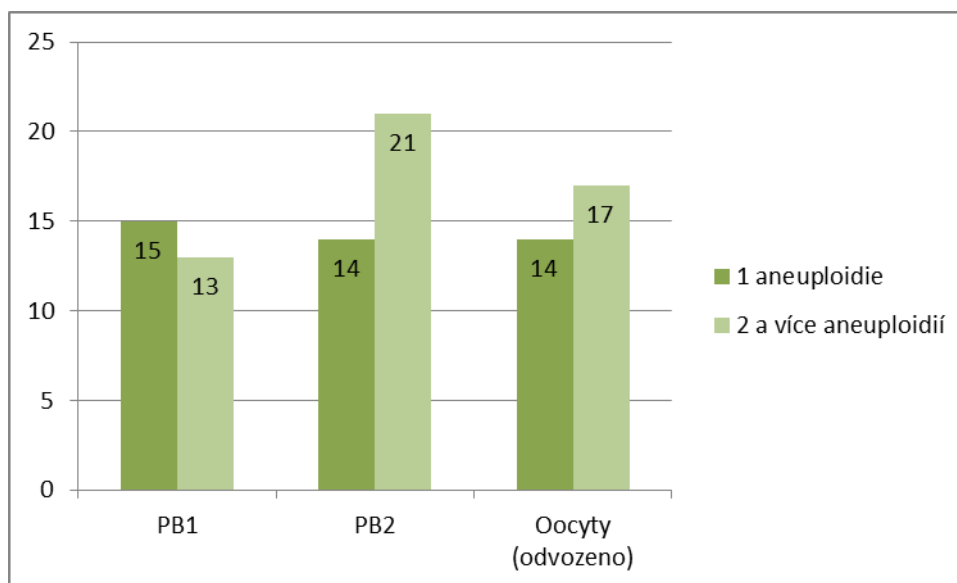
5.1 Výskyt aneuploidí u studovaných vzorků

Důvodem, proč byla pro vyšetřování chromozomových abnormalit zavedena metoda aCGH, je její schopnost spolehlivým a robustním způsobem detekovat aneuploidie všech chromozomů člověka a zjistit, zda se jedná o vzorek euploidní s normálním počtem chromozomů, anebo o vzorek aneuploidní obsahující jednu, nebo více odchylek od normálu v podobě numerických chromozomových aberací. V souboru vyšetřovaných sad pólových tělísek bylo zjištěno celkově 27 (50 %) aneuploidních prvních pólových tělísek a 36 (67%) aneuploidních druhých pólových tělísek viz tabulka č. 7. Mezi aneuploidními prvními pólovými tělísky byla nejčastěji zastoupena pólová tělíska s jednou aneuploidí, a to celkem ve 14 případech. U 13 prvních pólových tělísek pak byly přítomny 2 až 4 aneuploidie a mezi aneuploidními prvními pólovými tělísky je tak jen o jedno více těch, které obsahovaly jedinou chromozomovou aberaci. U druhých pólových tělísek byly naopak častější aneuploidie více chromozomů současně a v této skupině bylo zjištěno též více aberací v rámci jednoho vzorku. Z 36 aneuploidních druhých pólových tělísek obsahovalo 21 vzorků 2 až 6 chromozomových aberací. Jedna aneuploidie byla přítomna ve 14 vzorcích druhých pólových tělísek. Celkově bylo v našem souboru vyhodnoceno jako euploidní 23 oocytů (43%), a to včetně těch, u nichž ve druhém meiotickém dělení došlo ke kompenzaci chyby z prvního meiotického dělení. Tomuto jevu bude věnována samostatná kapitola. Ze studovaných oocytů bylo 31 (57% aneuploidních). Pokud jde o počet zaznamenaných aberací, převažovaly oocyty s více aneuploidii. V 17 případech bylo přítomno 2 až 6 aneuploidí, v 14 případech pak pouze jedna aneuploidie. Ve studovaném souboru byla detekována jediná

chromozomová aberace zasahující pouze část chromozomu, a proto nebyl důvod tento typ chromozomových aberací vyčlenit do samostatného podsouboru.

Tabulka 7 Počet euploidních a aneuploidních prvních a druhých pólých tělísek a odvozený počet euploidních a aneuploidních oocytů

Materiál	Euploidiní	Aneuploidní celkem
PB1	50 % (27/54)	50 % (27/54)
PB2	33 % (18/54)	67 % (36/54)
<i>Oocyty (odvozeno)</i>	<i>43 % (23/54)</i>	<i>57 % (31/54)</i>



Graf 1: Počet aneuploidních prvních a druhých pólých tělísek s jednou a s více aneuploidii a odvozený počet oocytů obsahující jednu, nebo více aneuploidii

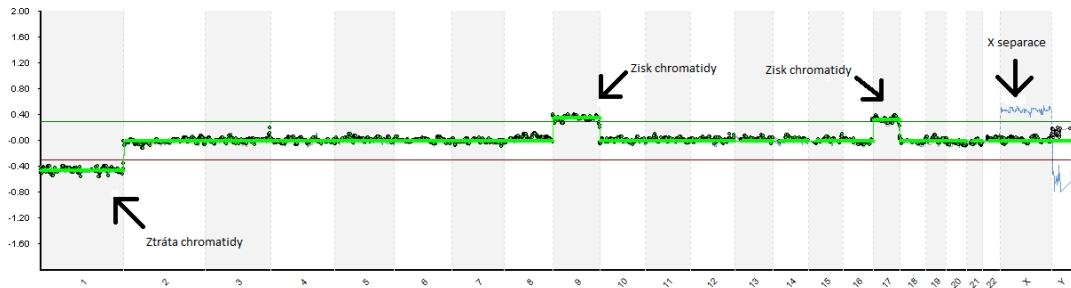
5.2 Chyby v prvním meiotickém dělení

Numerické chromozomové aberace vznikají v průběhu meiózy I dvěma různými způsoby. V prvním případě se jedná o nondisjunkci celých chromozomů, což je klasický model vzniku aneuploidii často popisovaný v učebnicích. Ve druhém případě jsou detekované chromozomové aberace důsledkem předčasného rozdělení sesterských chromatid v centromere jednoho ze spárovaných homologických chromozomů a tento typ chyby v prvním meiotickém dělení zcela převažuje.

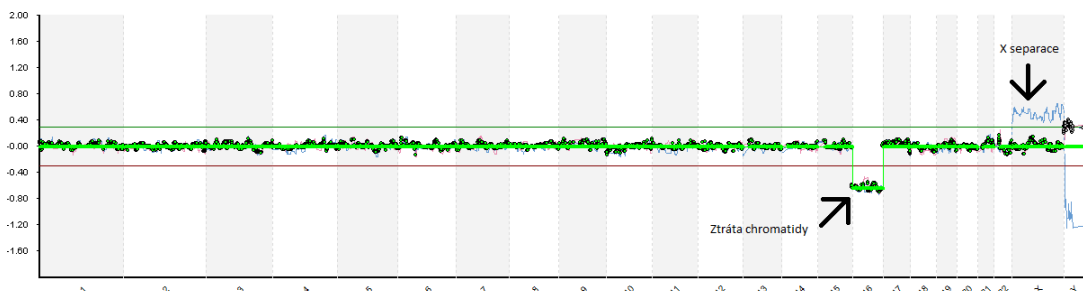
Při analýze aneuploidii oocytů pomocí pólých tělísek je klíčové správně od sebe rozlišit chyby v meióze I vzniklé nondisjunkcí od těch majících svůj původ v předčasné separaci chromatid. Špatné určení typu chyby může v některých případech přímo vést k

misdiagnóze chromozomového statutu vyšetřovaného oocyty, a proto představuje největší riziko při PGS analýzou pólůvých tělísek. Metoda aCGH využívá srovnání fluorescence značené DNA vzorku s fluorescencí kontrolní DNA s normálním počtem chromozomů. Je-li referenční DNA odvozena ze vzorku mužského pohlaví, pak můžeme u všech vzorků pólůvých tělísek očekávat zisk chromozomu X oproti mužské referenční DNA a u každého vzorku následně odečíst přesnou hodnotu poměru fluorescence vyjádřenou na ose Y jako poměr logaritmů ($\log_2\text{ratio}$). Tato hodnota označovaná jako X separace se může lišit mezi jednotlivými vzorky a různými experimenty. Pokud se hodnota $\log_2\text{ratio}$ pro určitý chromozom blíží kladné, nebo záporné hodnotě X separace, odpovídá to přítomnosti 4 chromatid, anebo v případě záporné hodnoty přítomnosti jedné chromatidy v prvním pólůvém tělísku. Odpovídá-li hodnota $\log_2\text{ratio}$ pro určitý chromozom 2/3 hodnoty X separace, v pólůvém tělísku se nachází 3 chromatidy tohoto chromozomu. Je-li zjištěná hodnota výrazně nižší než záporné vyjádření parametru X separace, pólůvé tělísko neobsahuje žádnou chromatidu daného chromozomu.

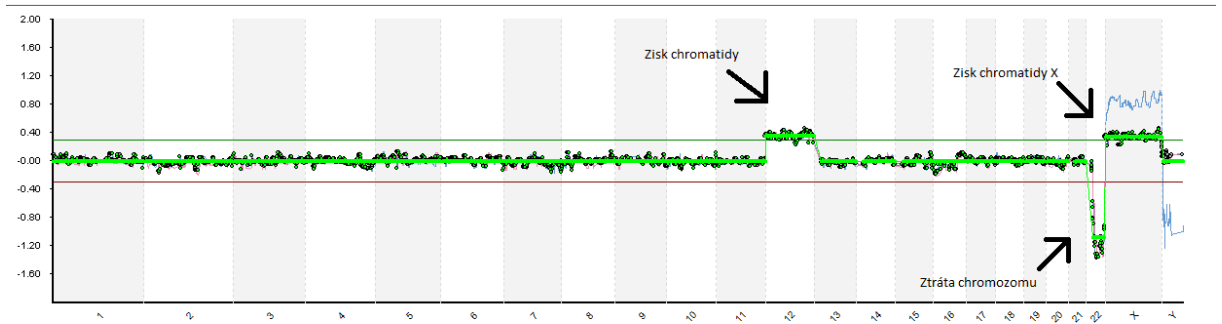
Přítomnost 0 chromatid, nebo 4 chromatid v prvním pólůvém tělísku je výsledkem nondisjunkce. Přítomnost 1, nebo 3 chromatid v prvním pólůvém tělísku je výsledkem předčasné separace chromatid. U 54 vyšetřených prvních pólůvých tělísek, byly zjištěny chyby v meióze I týkající se 46 chromozomů. V případě aneuploidií charakteru zisku genetického materiálu jsou zastoupeny pouze poruchy způsobené předčasnou separací chromatid, kdy jsou místo normálního počtu 2 chromatid přítomny chromatidy 3 (celkem 20 případů) viz obr. č. 8. Nebyla zaznamenána situace, kdy by v prvním pólůvém tělísku byly přítomny chromatidy 4, což by nasvědčovalo nondisjunkci chromozomového páru vedoucí k nulismii daného chromozomu v oocyty. Zbývajících 26 poruch 1. meiotického dělení představují ztráty genetického materiálu, a to buď jedné (obr. č. 9), anebo obou normálně přítomných chromatid (obr. č. 10). Ztráta jedné chromatidy byla zjištěna celkově ve 25 případech. Žádná chromatida, jak je typické pro nondisjunkci celých chromozomů, pak byla zaznamenána pouze jednou. Ze 46 chyb v prvním meiotickém dělení byla tedy zjištěna pouze jedna chyba způsobená nondisjunkcí homologického páru. Zbýlých 45 chyb bylo způsobeno předčasnou separací chromatid. Testem dobré shody bylo ověřeno, že předčasná separace chromatid vede ke ztrátě, či zisku chromatidy se stejnou četností.



Obrázek 8: Výsledný graf po provedení metody aCGH. Porucha prvního meiotického dělení – zisk chromatidy u chromozomu 9, 17 a ztráta chromatidy u chromozomu 1. Modrá křivka znázorňuje X separaci proti mužské referenční DNA



Obrázek 9: Výsledný graf po provedení metody aCGH. Porucha prvního meiotického dělení – ztráta chromatidy u chromozomu 16, modrá křivka znázorňuje X separaci proti mužské referenční DNA



Obrázek 10: Výsledný graf po provedení metody aCGH. Porucha prvního meiotického dělení – nondisjunkce celého chromozomového páru vedoucí k nulizomii chromozomu 22 v příslušném PB1. Kromě této aneuploidie je z grafu patrný i zisk jedné nadbytečné chromatidy u chromozomu 12 a chromozomu X.

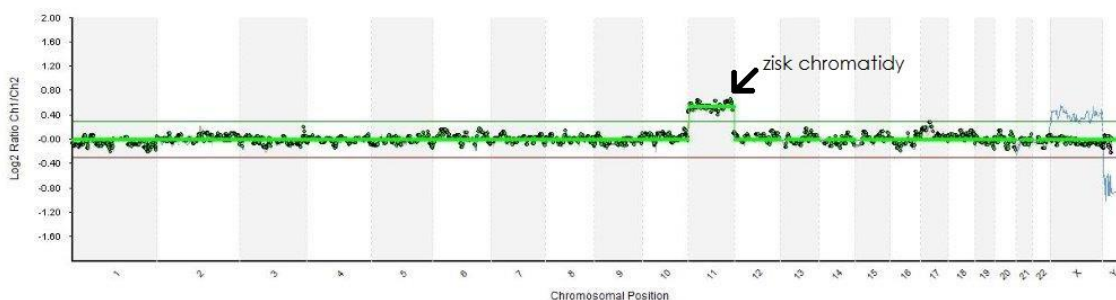
Tabulka 8 Zastoupení typů chromozomových aberací způsobených předčasným rozdělením sesterských chromatid u prvního meiotického dělení.

Typ aneuploidie			
3 chromatidy	1 chromatida	χ^2 test (P)	celkem
20	25	0,549	45

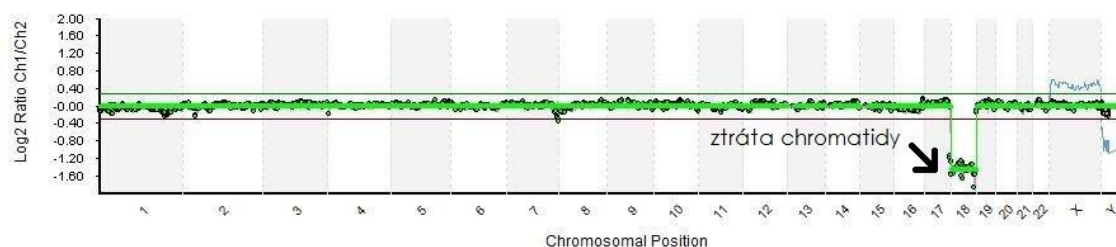
5.3 Chyby v druhém meiotickém dělení

V meióze II se po rozdělení centromery rozchází sesterské chromatidy a jedinou chybou, ke které může dojít, je nondisjunkce, kdy díky chybnému rozchodu skončí obě chromatidy buď v oocytu, anebo v pólovém tělísku. Druhé pólové tělísko tedy obsahuje haploidní jednochromatidovou sadu a výsledkem nondisjunkce je buď jedna chromatida navíc, anebo úplná absence chromatidy pro určitý chromozom. Přestože se fakticky jedná o zisk nebo ztrátu chromatidy, lze v této fázi meiózy již používat také označení chromozom. Metodou aCGH se nám chromatidové zisky projeví jako disomie s hodnotou \log_2 ratio odpovídající hodnotě X separace. Ztráty chromatidy se jeví jako nulisomie a hodnota \log_2 ratio odpovídá hodnotě pozadí a je výrazně nižší než je záporná hodnota X separace. Díky tomu je analýza druhého pólového tělíska oproti analýze prvního pólového tělíska mnohem snadnější a spolehlivější, ačkoliv druhé pólové tělísko obsahuje oproti prvnímu pouze polovinu množství DNA. U 54 vyšetřených druhých pólových tělísek bylo celkově detekováno 77 aneuploidií. Tyto aneuploidie jsou buď výsledkem nondisjunkce, a tedy chyby druhého meiotického dělení, anebo jsou přímým důsledkem předčasné separace chromatid v prvním meiotickém dělení. Takové aneuploidiní nálezy, které jsou důsledkem chyby v prvním meiotickém dělení, nejsou výsledkem nondisjunkce, a proto je není možné počítat a hodnotit jako chyby druhého meiotického dělení. Z tohoto důvodu jsou v tabulce č. 9. uvedeny pouze ty aneuploidie, které skutečně vznikly při meióze II jako důsledek nondisjunkce a zároveň jsou zde uvedeny tzv. chromozomové kompenzace. Jedná se o situace, kdy po vzniku aneuploidie při meióze I je následně reciproká aneuploidie detekována v PB2. Výsledkem je kompenzace původně vzniklé poruchy, a tím pádem „reparace“ dané aneuploidie. Ve skupině nondisjunkcí jsme u druhých pólových tělísek detekovali 25 zisků a 21 ztrát chromozomů. V případě kompenzací chyb šlo o 19 zisků a 13 ztrát chromozomů.

Testem dobré shody bylo ověřeno, že zisky a ztráty jsou v obou skupinách zastoupeny se stejnou četností.



Obrázek 11: Výsledný graf po provedení metody aCGH. Porucha druhého meiotického dělení – zisk nadbytečné chromatiidy u chromozomu 11



Obrázek 12: Výsledný graf po provedení metody aCGH. Porucha druhého meiotického dělení – Ztráta chromozomu 18

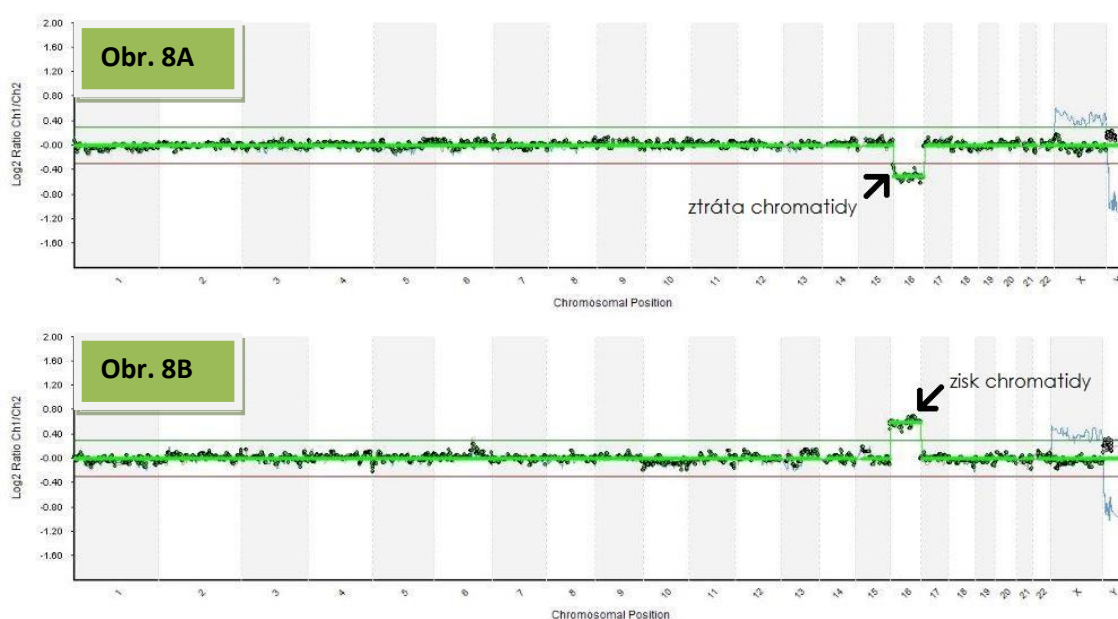
Tabulka 9: Zastoupení poruch druhého meiotického dělení. Náhodnost zastoupení zisků a ztrát ve druhém meiotickém dělení byla ověřena testem dobré shody.

	Typ aneuploidie			celkem
	2 chr.	0 chr.	χ^2 test (P)	
Aneup.(s uvážením reparačních mech.)	25	21	0,655	46
Kompenzace chyb	19	13	0,377	32

5.4 Kompenzace chyb z prvního meiotického dělení ve druhém meiotickém dělení

Chyby z prvního meiotického dělení, které jsou důsledkem předčasné separace chromatid, se mohou ve druhém meiotickém dělení kompenzovat. Předčasná separace chromatid v prvním meiotickém dělení vede k tomu, že v oocytu zůstane lichý počet chromatid určitého chromozomu, a sice buď 1 chromatida, anebo 3 chromatidy. Tento oocyt vstupuje do druhého meiotického dělení, při kterém může být porucha prvního meiotického dělení balancována vydělením druhého pólóvého tělíska s reciprokou aberací vzhledem k prvnímu, takže výsledný oocyt je po dokončení obou meiotických

dělení z pohledu tohoto chromozomu euploidní (obr. č. 13). Kompenzace předčasné separace chromatid z prvního meiotického dělení se dají rozdělit na dva typy. Prvním typem kompenzace této chyby ve druhém meiotickém dělení je situace, kdy v prvním pólovém tělísku detekované 3 chromatidy jsou kompenzovány absencí chromatidy tohoto chromozomu ve druhém pólovém tělísku. Druhý typ kompenzace je pak obrácená situace, kdy vydělení pouze jedné chromatidy v prvním pólovém tělísku je balancováno přítomností dvou chromatid ve druhém pólovém tělísku.



Obrázek 13: Příklad kompenzace chyby prvního meiotického dělení ve druhém meiotickém dělení (typ 2). (A) Výsledný graf po provedení metody aCGH u PB1 se ztrátou chromatidy u chromozomu 16. (B) Výsledný graf po provedení metody aCGH u PB2 se ziskem chromatidy u chromozomu 16

Ve studovaném souboru jsme vycházeli ze 45 chyb způsobených předčasnou separací chromatid v prvním meiotickém dělení, které mohly být ve druhém meiotickém dělení kompenzovány. Protože ve druhém meiotickém dělení se v takovém případě rozchází lichý počet chromatid do dvou buněk, je možné předpokládat, že ke kompenzaci dojde u poloviny chyb z prvního meiotického dělení. K našemu překvapení jsme kompenzaci zaznamenali ve 31 případech a test dobré shody potvrdil dvoutřetinový podíl kompenzovaných chyb jako statisticky významnou odchylku od očekávané četnosti ($P = 0,017$). Při podrobnější analýze kompenzačních událostí ve druhém meiotickém dělení bylo zjištěno, že první typ kompenzace byl ve studovaném souboru zachycen ve

13 případech z 20 možných a test dobré shody nepotvrdil statisticky významnou změnu proti očekávané četnosti kompenzace (50 %), ($P = 0,264$). Druhý typ kompenzace byl pak zaznamenán v 18 případech z 25 a test dobré shody vyšel na hranici statistické významnosti ($P = 0,046$), ale zjištěný dvoutřetinový podíl kompenzací byl analogický situaci zaznamenané v celém souboru. Získaná data tedy ukazují na to, že na zvýšené četnosti kompenzovaných chyb prvního meiotického dělení se podílí zejména kompenzace druhého typu, kdy dochází ve druhém meiotickém dělení k rozchodu 3 chromatid některého z chromozomů. Rozložení kompenzací napříč jednotlivými chromozomy kopíruje obecný trend počtu aneuploidíí jednotlivých chromozomů, kterému bude věnována následující kapitola.

Tabulka 10: Počty kompenzací chyb prvního a druhého typu u jednotlivých chromozomů. První typ kompenzace: 3 chromatidy detekované v PB1; 0 chromatid detekovaných v PB2; výsledná 1 chromatida v oocytu. Druhý typ kompenzace: 1 chromatida detekovaná v PB1; 2 chromatidy detekované v PB2; výsledná 1 chromatida v odpovídajícím oocytu.

Typ reparace	Chromozom																						Celkem	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		X
Typ 1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	2	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	2	13
Typ 2	1	2	0	2	0	1	0	1	0	1	0	0	2	0	1	3	0	1	1	0	2	0	0	18
Celkem	1	2	1	2	0	1	0	2	0	2	0	2	3	0	2	3	1	1	2	1	2	1	2	31

Tabulka 11: Ověření náhodnosti kompenzace chyby prvního meiotického dělení ve druhém meiotickém dělení

	Zik	Ztráta	Celkem
Aneuploidie v PB1	20	25	45
Reparace	13	18	31
χ^2 test (P)	0,264	0,046	0,017

Kompenzace chyb z prvního meiotického dělení druhým meiotickým dělením může mít za výsledek kompletně euploidní oocyt. Ve studovaném souboru 54 oocytů bylo vyhodnoceno jako euploidní 23 oocytů a z nich 4 euploidní oocyty byly výsledkem mechanismu kompenzace chyb.

5.5 Meiotické poruchy a zastoupení jednotlivých chromozomů

Dalším cílem této práce bylo zaměřit se na analýzu aneuploidíí z pohledu jednotlivých chromozomů a zjistit, zda jsou některé z nich zastoupeny u meiotických poruch častěji

než jiné. Metoda aCGH umožňuje u vzorku vyšetřit aneuploidie všech chromozomů člověka současně. U pólových tělísek je možné hodnotit aneuploidie 22 autozomů člověka. Z pohlavních chromozomů je možné hodnotit pouze chromozom X, protože chromozom Y se u zdravých žen nevyskytuje. Meiózy u žen se tedy účastní celkem 23 různých chromozomů, jejichž zastoupení v chybách prvního a druhého meiotického dělení bylo možné v souboru vyhodnotit. V tabulce č. 12. jsou uvedeny veškeré aneuploidie všech chromozomů vzniklé v prvním a druhém meiotickém dělení.

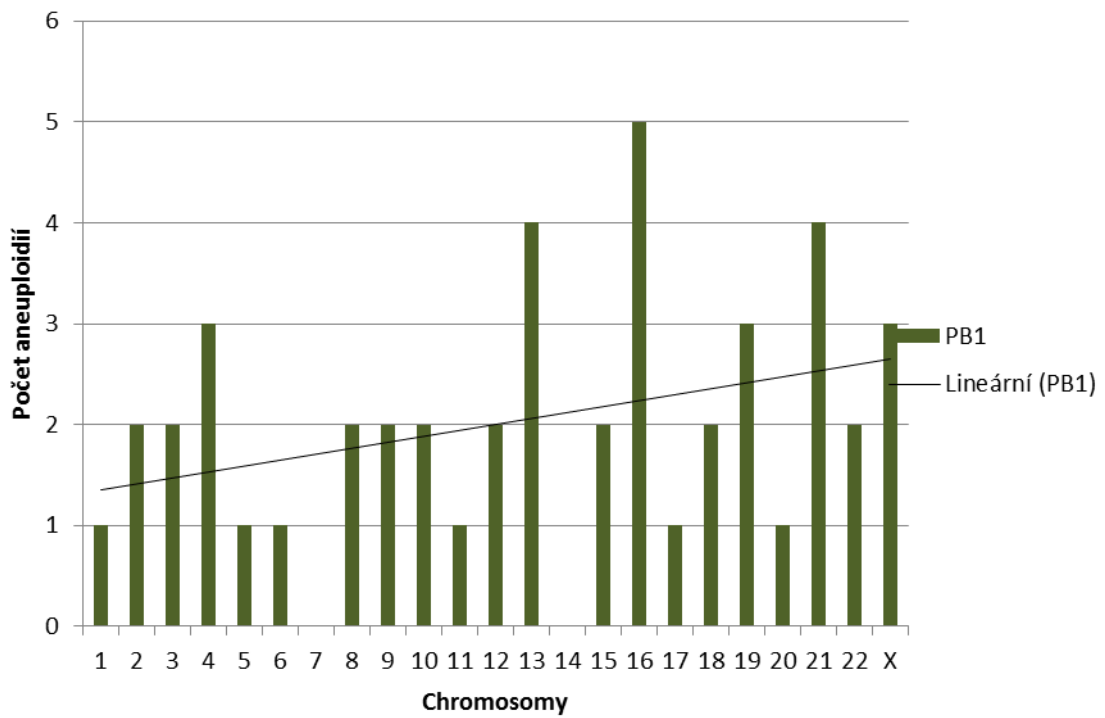
Tabulka 12 Celkový přehled jednotlivých poruch obou meiotických dělení zvlášť pro všechny chromozomy

Materiál	Typ aneuploidie	Chromozom																						Celkem	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		X
PB1	4 chromatidy	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3 chromatidy	0	0	2	0	0	0	0	1	2	1	1	2	2	0	1	0	1	0	2	1	1	1	2	20
	1 chromatida	1	2	0	3	1	1	0	1	0	1	0	0	2	0	1	5	0	2	1	0	3	0	1	25
	0 chromatid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	Celkem	1	2	2	3	1	1	0	2	2	2	1	2	4	0	2	5	1	2	3	1	4	2	3	46
PB2	2 chromatidy	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1	4	0	0	1	0	4	2	1	3	1	1	5	0	26
	0 chromatid	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	3	0	1	0	2	0	1	3	2	1	3	2	0	21
	Celkem	0	0	0	0	1	2	1	1	1	1	7	0	1	1	2	4	3	4	5	2	4	7	0	47

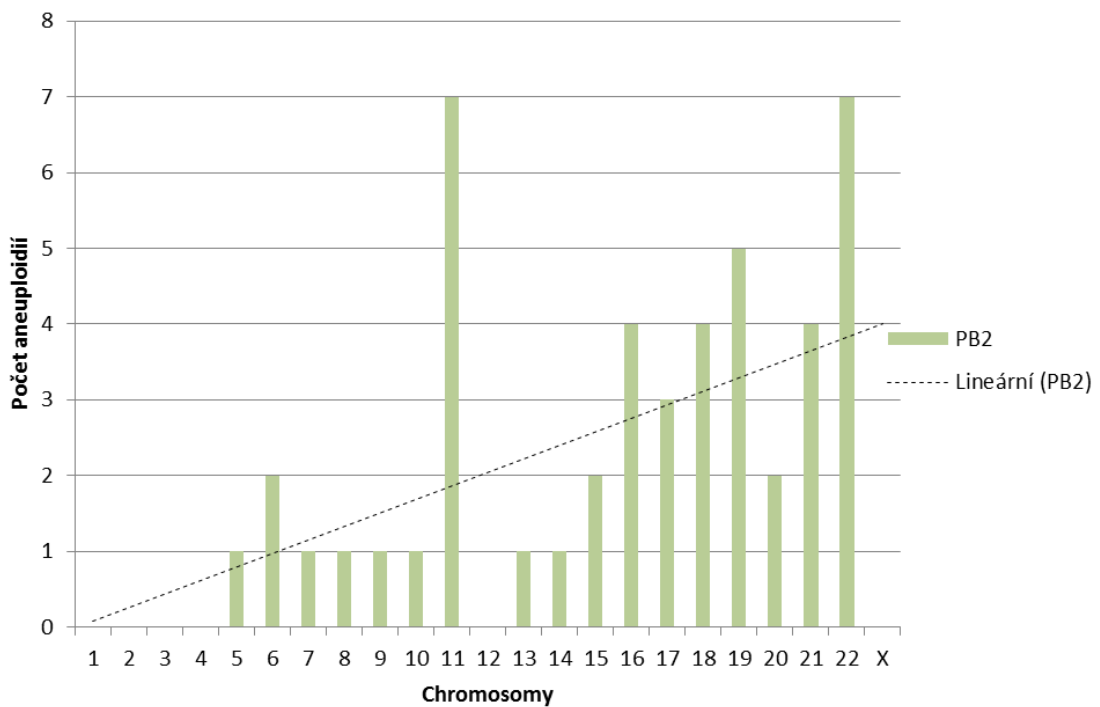
Chromozomové aneuploidie byly bez výjimky detekovány u všech 23 chromozomů. Mezi aneuploidii byly nejvíce zastoupeny chromozomy 16 a 22 (9x). U chromozomů 19 a 21 bylo zjištěno shodně 8 aneuploidií.

Po vynesení frekvence aneuploidií jednotlivých chromozomů do grafu byl zjištěn zajímavý rozdíl mezi prvním a druhým meiotickým dělením, pokud jde o podíl jednotlivých chromozomů na aneuploidiích, které jsou důsledkem chyb těchto dvou po sobě následujících meiotických dělení. Jak již bylo popsáno výše, většina chyb v prvním meiotickém dělení je způsobena předčasnou separací chromatid (45 ze 46 chyb v meióze I). K předčasné separaci chromatid v meióze I dochází u všech chromozomů s víceméně stejnou četností s výjimkou chromozomů 13, 16 a 21, u kterých bylo detekováno více chyb (4 až 5) viz graf č. 2. Absence chromozomů 7 a 14 mezi chybami v prvním meiotickém dělení jde zřejmě na vrub malému počtu vzorků v našem souboru. Naproti tomu mezi chybami v meióze II způsobenými nondisjunkcí byly výrazně častěji zastoupeny malé chromozomy (graf č. 3.). Určitou výjimku v tomto případě představovaly chromozomy 11 a 20, které byly zastoupeny častěji, respektive méně často než by odpovídalo jejich velikosti. Rozdíly v četnosti aneuploidií jednotlivých chromozomů mezi prvním a

druhým meiotickým dělením jsou dalším potvrzením toho, že mechanismy vedoucí k chybám v prvním a druhém meiotickém dělení jsou zcela jiné.



Graf 2: Přehled aneuploidií pro všechny chromozomy zjištěný u prvního meiotického dělení



Graf 3: Přehled aneuploidií pro všechny chromozomy zjištěný u druhého meiotického dělení

6 DISKUZE

Metodou aCGH se podařilo úspěšně vyšetřit všech 54 sad prvních a druhých pólých tělísek bioptovaných z oocytů žen podstupujících léčbu neplodnosti s využitím metody PGS. Vyšetřena byla vždy kompletní sada chromozomů, tedy 23 chromozomů prvního pólého tělíška a 23 chromozomů druhého pólého tělíška, které představují v dané fázi meiózy zrcadlový obraz chromozomové sestavy oocytu. Díky tomu bylo možné odvodit, jestli je daný oocyt aneuploidní, nebo euploidní, zda ke vzniku aneuploidie došlo v prvním, nebo druhém meiotickém dělení a jakým mechanismem. Bylo také možné vyhodnotit četnost kompenzace chyb vzniklých v prvním meiotickém dělení druhým meiotickým dělením a zjistit s jakou četností se na meiotických chybách podílejí jednotlivé chromozomy. Získaná data byla nakonec srovnána se znalostmi získanými studiem modelových organismů.

6.1 Četnost aneuploidii v oocytech

Úspěšnou analýzou a vyhodnocením 54 sad prvních a druhých pólých tělísek byla získána data o počtu chromozomů v 54 oocytech, které dokončily meiotické dělení. V našem souboru 17 žen, jejichž průměrný věk byl 39,3 let, jsme analýzou všech chromozomů metodou aCGH našli 57 % aneuploidních oocytů (31 z 54). S využitím klasických cytogenetických metod a z analýz četností výskytu aneuploidních plodů u těhotných žen je odhadováno, že v běžné populaci žen je více než 20% oocytů aneuploidních (Eichenlaub-Ritter, 1998). Procento aneuploidních oocytů roste s věkem a prudce se zvyšuje během poslední dekády předcházející menopauze ženy, a tedy po 35. roku života ženy (Hassold *et al.*, 2007). Analýzou 5 chromozomů (13, 16, 18, 21 a 22) metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) u obou pólých tělísek v rámci PGS na souboru 20 000 oocytů bylo zjištěno 40% aneuploidních oocytů u žen ve věku 39 let (Kuliev *et al.*, 2011) Zvážíme-li omezení metody FISH na 5 malých chromozomů oproti analýze všech chromozomů metodou aCGH a rostoucí podíl aneuploidii se zmenšující se velikostí chromozomu, je možné předpokládat, že četnost aneuploidii v našem souboru je obdobná. Pokud z našich dat získaných metodou aCGH vybereme pouze údaje o aneuploidii týkající se chromozomů 13, 16, 18, 21 a 22 je možné dovodit, že metodou FISH bychom teoreticky dospěli k četnosti 37% aneuploidních oocytů u našeho souboru žen (20 z 54).

Při srovnání se studií využívající stejnou metodu, a tedy aCGH, lze pak porovnat procentuální zastoupení aneuploidních oocytů přímo díky informací o meiotických poruchách všech chromozomů. Geraedts *et al.*, v roce 2011 publikoval výsledky studie konané ve dvou evropských centrech asistované reprodukce, kde se zaměřili na celkovou použitelnost metody aCGH pro rutinní vyšetřování polocytů v rámci PGS. Do této studie byly zařazeny oocyty žen s průměrným věkem $40 \pm 2,9$ let. Úspěšně bylo vyšetřeno 195 sad pólových tělísek, díky nimž mohl být predikován stav chromozomové výbavy odpovídajících oocytů. Ve 140 případech (72 %) byla nalezena alespoň jedna aneuploidie, zbylých 55 oocytů pak bylo euploidních (28 %), což je v porovnání s výsledky této diplomové práce výrazně vyšší číslo. Rozdíl může být způsoben o něco vyšším průměrným věkem pacientek ve srovnávané studii a zejména větším proporčním zastoupením pacientek s nižším věkem v našem souboru (30 až 44 let). I v našem malém souboru je možné pozorovat, že nárůst počtu aneuploidii s věkem je spíše exponenciálního než lineárního charakteru.

S rostoucím věkem ženy se nejen zvyšuje celkový počet aneuploidních oocytů, ale pravděpodobně se rovněž zvyšuje zastoupení oocytů s vyšším množstvím meiotických poruch. Ve zpracovaném souboru bylo z celkového počtu 31 aneuploidních oocytů 17 se dvěma a více aneuploidii (55%). Toto číslo se shoduje s dříve publikovanými výsledky 57 % oocytů se dvěma a více aneuploidii v souboru 51 oocytů skupiny pacientek ve věku 40 až 42 let (Handyside *et al.*, 2012). Tato studie rovněž poukazuje na velmi rychlý nárůst v počtu aneuploidii oocytů v závislosti na věku ženy, když k hodnotě 87 % oocytů s více aneuploidii u žen ve věku 43 – 45 let nabízí srovnání s 20 % ve skupině žen ve věku 33 – 36 let. Bod zlomu exponenciálního nárůstu v počtu aneuploidii u ženy leží zřejmě mezi 38 a 40 lety a je tedy možné, že v tomto intervalu se může četnost aneuploidii mezi studii nejvíce lišit v závislosti na přesném složení studovaného souboru žen. Pozorovaný počet aneuploidii v souboru našich oocytů a počet oocytů s více aneuploidii odpovídá tomu, co se dle publikovaných výsledků jiných autorů v souboru pacientek s průměrným věkem 39,3 dá očekávat.

6.2 Podíl chyb v prvním a druhém meiotickém dělení a jejich kompenzace

Chyby prvního meiotického dělení lze podle mechanismu jejich vzniku rozdělit na aneuploidie vzniklé nondisjunkcí celých chromozomů tvořených bivalenty a na aneuploidie

vzniklé z důvodu předčasného rozdělení sesterských chromatid. Ve studovaném souboru bylo detekováno celkem 46 poruch prvního meiotického dělení, přičemž nondisjunkce byla příčinou pouze jedné z nich. Zbývajících 45 aneuploidií vzniklých v prvním meiotickém dělení bylo detekováno jako ztráta, nebo zisk jedné nadbytečné chromatidy. Zjištění, že nondisjunkce celých chromozomů není převažujícím jevem vedoucím ke vzniku aneuploidií v prvním meiotickém dělení je v souladu s výsledky práce, ve které Handyside *et al.* (2012) uvádí, že z celkového počtu 125 meiotických poruch detekovaných v prvních pólových těliscích souboru 104 sad prvních a druhých pólových tělísek, pouze 4 odpovídaly chromozomové nondisjunkci. Stejní autoři rovněž pozorovali rozložení ve prospěch ztrát v meióze I (celkem 74 – 59 %) proti ziskům, kterých bylo pouze 51 (41 %). Odpovídající data souboru této diplomové práce jsou celkem 26 ztrát (57 %) proti 20 ziskům (43 %), což je v souladu s výše uvedeným a ukazuje na relativně vyrovnané zastoupení ztrát a zisků s mírnou tendencí k většímu počtu ztrát v prvním meiotickém dělení, která však není v našem souboru statisticky významná. Jak výskyt nondisjunkce, tak i poměr ztrát a zisků v prvním meiotickém dělení popsal rovněž Kulliev *et al.*, (2011), který ovšem použil pro detekci aneuploidií FISH na 5 chromozomech (13, 16, 18, 21 a 22). Poměr chromatidových a nondisjunkčních poruch v této práci byl 10:1 (ztráty chromatid v meióze I činily 67 % zisky pak 33 %). Určité rozdíly oproti souborům zpracovaných metodou aCGH můžeme připsat na vrub použití starší metody, ale informace získané analýzou našeho souboru jsou zcela ve shodě s trendy popsány jinými autory.

Jediná chyba, ke které může dojít během druhého meiotického dělení, je nondisjunkce chromatid, či chromozomů, jak chromatidy nazýváme po rozdělení centromer. Ve druhém meiotickém dělení tedy detekujeme ztráty a zisky chromozomů, které jsou následkem této chyby. Zisk chromozomů jsme našli ve 25 případech, zatímco ztrátu chromozomu bylo možné sledovat ve 21 případech, čili zde není statisticky významný rozdíl mezi zisky a ztrátami stejně jako uvádí Handyside *et al.* (2012). Rozložení zisků a ztrát v jejich souboru pólových tělísek bylo rovnoměrné 79 zisků a 79 ztrát a také Kulliev *et al.* (2011) popisuje poměr zisků a ztrát ve druhém meiotickém dělení rovněž jako vyrovnaný (39,2 % a 41,4 %, zbývajících 19,4 % bylo komplexně aneuploidních). Nondisjunkce chromozomů ve druhém meiotickém dělení probíhá v našem souboru i srovnávaných studiích náhodným způsobem.

Další otázkou, kterou si můžeme položit, je rozložení četnosti poruch mezi obě meiotická dělení. Vyrovnaný poměr 46 poruch jak v prvním tak v druhém meiotickém dělení v našem souboru se zásadním způsobem nelišil od souborů, které popsali jak Handyside *et al.* (2012), tak Geraedts *et al.* (2011). První zmíněná studie popisuje 125 (54 %) aneuploidií prvního meiotického dělení a 108 (46 %) aneuploidií druhého meiotického dělení, zatímco druhá studie popisuje 122 (46 %) respektive 142 (54%) aneuploidií ve sledovaném souboru. Výsledky získané metodou FISH pro pět vybraných chromozomů uvádí 5 921 (46 %) poruch prvního dělení a 6 938 (54 %) poruch druhého dělení (Kuliev *et al.*, 2011). Je tedy možné říci, že chyby v prvním a druhém meiotickém dělení jsou přibližně stejně četné.

Zajímavým fenoménem, který můžeme v dozrávajících oocytech sledovat, jsou kompenzace chromozomových poruch prvního meiotického dělení vzniklých náhodnou segregací předčasně rozdělených sesterských chromatid v následujícím druhém meiotickém dělení. Metoda aCGH tento jev umožňuje odhalit jako sled po sobě jdoucích recipročných aneuploidií v prvním a druhém pólovém tělísku, přičemž chromatidová porucha detekovaná v prvním pólovém tělísku je následně kompenzována zdánlivě se jevící chromozomovou poruchou opačného charakteru, detekovanou ve druhém pólovém tělísku. Ze 45 chromatidových poruch v prvním meiotickém dělení ve sledovaném souboru došlo celkově v 31 (69 %) případech ke kompenzaci, což představuje statisticky významnou odchylku od četnosti, kterou bychom očekávali pro náhodný průběh kompenzačních událostí. Na pozorované odchylce se podílely především případy, kdy ve druhém meiotickém dělení docházelo k segregaci tří chromatid. Dvě chromatidy pak byly ve druhém pólovém tělísku detekovány častěji než by odpovídalo náhodnému rozchodu chromozomů a tento rozdíl oproti očekávané četnosti byl na hranici statistické významnosti 5%. Handyside *et al.* (2012) zjistil četnost 58 % v kompenzaci ztráty ziskem v následujícím meiotickém dělení. Na druhou stranu autoři zaznamenali celkovou četnost chromozomových kompenzací pouze 38% a to u 125 chyb prvního meiotického dělení. Tato četnost je v ostrém kontrastu se 69 % chromozomových kompenzací u našeho souboru. Analýza většího souboru sad pólových tělísek by mohla vnést více světla jak do skutečné četnosti kompenzačních mechanismů, tak i do toho, zda by mohl existovat nějaký mechanismus, který zajišťuje, že nadbytečná chromatida po prvním meiotickém dělení bude s větší pravděpodobností segregovat do druhého pólového tělíska.

I přes vysokou četnost kompenzací chyb jsme v našem souboru zaznamenali pouze 4 oocyty, které byly v důsledku kompenzace chromozomových chyb vyhodnoceny jako euploidní. Stejně jako Handyside *et al.*, (2012) jsme tedy došli k závěru, že chyby ve druhém meiotickém dělení mají oproti chybám v prvním meiotickém dělení mnohem větší vliv na to, kolik oocytů bude ve výsledku vyhodnoceno jako euploidní či aneuploidní.

6.3 Meiotické poruchy jednotlivých chromozomů

Metodou aCGH je možné studovat poruchy všech 23 chromozomů vstupujících do meiotického dělení u oocyty. V našem souboru byla zachycena alespoň jedna aneuploidie pro každý chromozom. Obecně je možné říci, že četnost aneuploidií pro určitý chromozom roste s tím, jak klesá jeho velikost, což kromě naší studie potvrzují i data získaná jinými autory (Kuliev *et al.*, 2011; Handyside *et al.* 2012). Ačkoliv aneuploidie chromozomů 13 a 18 se z hlediska klinické závažnosti řadí hned za chromozom 21, analýzou 5 chromozomů (13, 16, 18, 21 a 22) bylo zjištěno, že aneuploidie těchto dvou chromozomů jsou nejméně četné (Kuliev *et al.* 2011). Naše studie provedená metodou aCGH tyto závěry potvrzuje stejně jako data, která touto metodou získali jiní autoři (Handyside *et al.* 2012).

Zajímavých rozdílů v četnosti aneuploidií pro jednotlivé chromozomy je možné si povšimnout, pokud se zaměříme zvláště na chyby v prvním a druhém meiotickém dělení. Předčasná separace chromatid v prvním meiotickém dělení postihuje všechny chromozomy s podobnou četností. Výjimku tvoří chromozomy 13, 16 a 21, u kterých došlo k předčasné separaci chromatid v našem souboru nejčastěji. Handyside *et al.* (2012) pozorovali největší četnost v předčasné separaci chromatid u chromozomů 15, 16, 19, 21 a 22. Srovnání se zjištěními jiných autorů je v této věci velmi obtížné, protože jak v našem, tak i v jejich případech se nám nalezené aneuploidie dělí mezi 23 chromozomů. Pozorované počty aneuploidií pro jednotlivé chromozomy jsou pak nízké (zpravidla do 10) a díky tomu dochází ke zkreslení skutečné situace chybou malých čísel.

Nondisjunkcí ve druhém meiotickém dělení jsou postiženy zejména malé chromozomy. Je možné říci, že čím menší chromozom, tím pravděpodobněji se u něj vyskytne aneuploidie mající svůj původ ve druhém meiotickém dělení (Kuliev *et al.* 2011; Handyside *et al.* 2012). Tomuto trendu se vymyká chromozom 11, u kterého jsme ve

druhém meiotickém dělení zjistili 7 aneuploidií stejně jako u nejmenšího chromozomu 22. Opačnou výjimkou byl chromozom 20, který je se svými 2 aneuploidie pod četností, která by odpovídala jeho velikosti. Tato pozorování svědčí o dosud blíže nepopsané zvláštnosti, kterou se tyto chromozomy vyznačují, protože také Handyside *et al.* (2012) zaznamenal 9 aneuploidií chromozomu 11 a 5 aneuploidií chromozomu 20 oproti 12 aneuploidiím detekovaných pro chromozom 22 v důsledku chyby ve druhém meiotickém dělení.

Jak již bylo diskutováno dříve, nondisjunkce ve druhém meiotickém dělení přispívá mnohem větší mírou k tomu, zda oocyt bude po dokončení meiotického dělení euploidní, anebo aneuploidní. Chybami ve druhém meiotickém dělení jsou mnohem častěji postiženy malé chromozomy ve srovnání s chromozomy většími. Dříve se mělo za to, že aneuploidie jsou způsobeny nondisjunkcí chromozomů v prvním meiotickém dělení, která je ovlivněna absencí crossing-overů, který byl pozorován u malých chromozomů. Studie pólových tělísek metodou FISH i aCGH odhalily, že nondisjunkce v prvním meiotickém dělení jsou vzácné a jejich četnost nedosahuje ani 10% (Kuliev *et al.*, 2011; Handyside *et al.* 2012; Gabriel *et al.*, 2011). Novější metodou karyomapování pomocí čipů využívajících jednonukleotidové polymorfismy bylo zjištěno, že v oocytech existuje mechanismus, který dokáže zajistit, že u každého chromozomu dojde alespoň k jednomu crossing-overu (Ottolini *et al.*, 2014). Na základě nejnovějších poznatků je možné dovodit, že s rostoucím věkem žen dochází k poruše molekulárních mechanismů, které zajišťují správnou funkci kontrolního bodu mezi metafází a anafází meiotického dělení (spindle assembly check-point). Díky poruše tohoto kontrolního bodu dochází k anafáznímu rozchodu chromozomů ještě před tím, než se všechny chromozomy shromáždí v ekvatoriální rovině na konci metafáze (Malmanche *et al.*, 2006). Výsledkem je nondisjunkce chromozomů, které zasahuje zejména chromozomy o malé velikosti

6.4 Srovnání meiotických poruch člověka s modelovými organismy

U savců jako je myš, prase nebo skot, u kterých byl studován výskyt chromozomových aneuploidií, bylo zjištěno, že četnost těchto poruch je v porovnání s člověkem podstatně nižší. Jak již bylo zmíněno, v běžné lidské populaci je až 20 % oocytů aneuploidních a toto číslo výrazně stoupá se zvyšujícím se věkem ženy (Eichenlaub-Ritter, 1998). Naproti tomu u savců, byť jednotlivé přístupy a metody pro studium aneuploidií

jsou značně nesourodé, bylo zjištěno velmi nízké procento aneuploidií ve srovnání s člověkem. U myši bylo zjištěno 1 % až 8 % aneuploidních oocytů, či embryí a stejně jako u člověka bylo zjištěno, že procento aneuploidií se s rostoucím věkem zvyšuje, ačkoliv ne tak dramaticky (Koehler *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2008). U prasat je množství zjištěných aneuploidií přece jen o něco vyšší (4,9 % až 12,1 %), ačkoliv člověku se zdaleka nepřibližuje. U tohoto druhu se ale zatím nepodařilo prokázat nárůst počtu aneuploidií s věkem (Sosnowski *et al.*, 2003; Horňák *et al.*, 2011). U skotu pak bylo pozorováno 7,1 až 30 % aneuploidních oocytů v závislosti na použité metodě. Ačkoliv 30% aneuploidií je nejbližší četnosti popisované u člověka, jedná se o odhad na základě analýzy dvou chromozomů metodou FISH u *in vitro* maturovaných bovinních oocytů (Lechniak a Switonski, 1998; Nicodemo *et al.*, 2010).

Organismem, jehož oocytární chromozomová sestava byla v nedávné době analyzována velmi podobným přístupem jako náš testovaný soubor, je prase. S využitím metody CGH – klasické komparativní genomové hybridizace na metafázních chromozomech, která je obdobou námi použité aCGH jen s tím rozdílem, že k hybridizaci dochází místo na čipu na metafázních chromozomech zdravého jedince, bylo analyzováno všech 20 chromozomů prasečího genomu přítomných v *in vitro* maturovaných oocytech (Horňák *et al.*, 2011). Jednalo se tak o vůbec první analýzu kompletní chromozomové sestavy u jiných než lidských oocytů metodou CGH, která je jasnou volbou, neboť čipová technologie je dostupná pouze pro člověka. Studovaným souborem bylo 33 oocytů získaných z miniprasat průměrného věku 15 měsíců, 46 oocytů miniprasat průměrného věku 96 měsíců a 59 oocytů kříženců Landras a Českého bílého ušlechtilého s průměrným věkem 69 měsíců. Četnost aneuploidií u jednotlivých skupin byla 12,1 %, 8,7 % a 10,2 %. Podobně Sosnowski *et al.*, 2003 zjistil konvenční metodou karyotypování u vzorku 1144 *in vitro* maturovaných oocytů relativně nízkou četnost aneuploidií u prasečích oocytů (4,9 %), což jsou v porovnání s našimi výsledky velmi malé hodnoty. Studie provedená Horňákem *et al.*, (2011) nárůst aneuploidií s rostoucím věkem prasnice nepotvrdila. U dvou testovaných věkově rozdílných skupin miniprasat nebyl pozorován rozdíl v četnosti aneuploidií a to i přes to, že skupina miniprasat s průměrným věkem 7,7 roku představuje poměrně dobré srovnání s námi testovanou skupinou žen, vzhledem k průměrnému dožití miniprasat 10 – 15 let (Vodička *et al.*, 2005). Možným vysvětlením těchto neshod ve výsledcích může být vysoká

prošlechtěnost hospodářských zvířat a tedy vyřazení jedinců s reprodukčními problémy. Do budoucna by mohlo být přínosné použít stejné schéma experimentu a tedy analýzu oocytů využitím metody CGH u jiného živočišného druhu dožívajícího se vyššího věku, případně u větší skupiny oocytů prasat jiného plemene.

Ohledně studia molekulárních mechanismů, které stojí za chybami meiotického dělení u samic savců, bylo nejvíce poznatků získáno u myši. Stejně jako u člověka, byl i u myši pozorován dramatický nárůst počtu aneuploidií s rostoucím věkem (Pan *et al.*, 2008). Je pravděpodobné, že klíčovou roli v častějším výskytu aneuploidií v prvním meiotickém dělení u jedinců s vyšším věkem hraje ztráta funkce kohezinů, která má za následek předčasné rozdělení sesterských chromatid. Tyto chromatidy, které už po této události nejsou součástí bivalentu, pak nejsou schopny srovnat se v ekvatoriální rovině v metafázi prvního meiotického dělení a segregují náhodně (Chiang *et al.*, 2010), což je v souladu s námi zjištěným rovnoměrným zastoupením zisků a ztrát a prakticky výhradně převažujícím zastoupením aneuploidií detekovaných jako ztráta, nebo zisk jedné chromatidy v prvním pólovém tělísku. V rámci této diplomové práce jsme pak stejně jako jiní autoři dospěli k závěru, že hlavním zdrojem aneuploidií u oocytů jsou nondisjunkce ve druhém meiotickém dělení, jejichž četnost se rovněž zvyšuje s věkem matky. Využití konfokální mikroskopie živých buněk umožnilo vizualizaci myších oocytů v průběhu prvního meiotického dělení (Šebestová *et al.*, 2012). Tento přístup umožnil pozorovat, že oocyty nejsou schopny reagovat na poruchy seřazení chromozomů v ekvatoriální rovině v metafázi prvního meiotického dělení prodloužením aktivity kontrolního bodu SAC, který je stěžejní pro zahájení anafáze. Bylo popsáno, že zahájení anafáze APC (anaphase promoting complex) je podmíněné určitým kritickým množstvím chromozomů seřazených v ekvatoriální rovině (Lane *et al.*, 2012; Nagaoka *et al.*, 2011), nicméně Šebestová *et al.*, (2012) pozorovala vstup do anafáze i v případě, kdy bylo v ekvatoriální rovině seřazeno méně než 50 % chromozomů, což naznačuje, že ono kritické množství pro vstup do anafáze je buď velmi malé, anebo je dokonce možné, že uspořádání chromozomů v ekvatoriální rovině není pro aktivaci APC vyžadováno. Předčasné zahájení anafáze, spolu s absencí mechanismu kontrolujícího správné uspořádání chromozomů, má pak za následek poruchu distribuce chromozomů do nově vznikajících dceřiných buněk, což vede ke vzniku aneuploidií v důsledku nondisjunkce. Tento mechanismus byl výše uvedenou studií zdokumentován pro první

meiotické dělení. Pro druhé meiotické dělení sice v tuto chvíli nejsou publikována odpovídající data, nicméně se lze domnívat, že s největší pravděpodobností bude i v následujícím druhém meiotickém dělení tento kontrolní bod v důsledku vyššího věku opět nefunkční. Zahájení anafáze druhého meiotického dělení před seřazením všech chromozomů v ekvatoriální rovině pak může být jednou z hlavních příčin nondisjunkce takto chybně uspořádaných chromozomů a příčinou pozorovaných chromozomových aneuploidii. V této situaci je rovněž možné si představit, že malé chromozomy budou nondisjunkcí zasaženy častěji a že individuální rozdíly v centromerách jednotlivých chromozomů mohou stát za tím, že se některé chromozomy (11 a 20) chovají jinak, než by odpovídalo pouze jejich velikosti. Je ovšem zapotřebí dalších studií na modelových organismech i na lidských oocytech, které by tyto domněnky potvrdily, nebo vyvrátily. Přes nepochybný přínos poznatků získaných díky studiu meiózy u myši by však bylo vhodné kvůli zásadním rozdílům v chromozomové výbavě (20 párů akrocentrických chromozomů podobné velikosti u myši) přenést studium aneuploidii na jiný vhodnější modelový organismus, např. na skot, případně prase, které se zdá být člověku v mnoha ohledech nejpodobnější.

Vezmeme-li v úvahu i u mladých žen popisovaný vysoký podíl aneuploidii a zamyslíme-li se nad srovnáním člověka s jinými zástupci třídy savců, dospějeme k závěru, že reprodukce člověka je v porovnání s jinými savci velmi neefektivní a to v důsledku meiotických chyb během oogeneze. Vzhledem k tomu, že rozmnožování člověka není vázáno na konkrétní roční období, můžeme si položit otázku, zda byl na člověka během evoluce vyvíjen potřebný tlak na efektivní reprodukci tak, jako je tento tlak nemilosrdným způsobem vyvíjen přírodou na ostatní savce, jejichž meióza byla do této doby studována. Nabízí se dokonce do jisté míry provokativní myšlenka, jestli určitá míra neefektivity v rozmnožování člověka není v celkových souvislostech důležitých pro přežití našeho druhu dokonce určitou výhodou. Ostatně populační exploze člověka, která tady je sice dlouho, ale jejíž exponenciální fáze jsme svědky právě v této době, je nejlepším důkazem toho, že člověk jako druh se s vysokým počtem aneuploidii v lidských oocytech dokázal bez problémů vyrovnat a svým způsobem úspěšně popřít tento neoddiskutovatelný selekční faktor.

7 ZÁVĚR

Rozvoj moderních biotechnologií přinesl možnost studia aneuploidii u savců jak v zárodečných buňkách, tak i v raných stádiích embryonálního vývoje a umožnil poodhalit příčiny a mechanismy jejich vzniku. Tato práce byla zaměřena na detekci a analýzu aneuploidii všech chromozomů u prvních a druhých pólových tělísek, odebraných v rámci metody preimplantačního genetického screeningu aneuploidii u žen podstupujících léčbu neplodnosti. Byly tak získány informace o aneuploidii maternálního meiotického původu, na základě kterých bylo možné analyzovat četnost a typ chyb odděleně pro první a druhé meiotické dělení a pro jednotlivé chromozomy a získat tak data o meiotickém dělení probíhajícím u ženy.

U studovaného souboru oocytů v této diplomové práci se podařilo potvrdit, že převážná část poruch v prvním meiotickém dělení je způsobena předčasným rozdělením sesterských chromatid a že tyto chyby mohou být v druhém meiotickém dělení kompenzovány. V našem případě byly kompenzovány přibližně dvě třetiny těchto poruch. Většina aneuploidii v oocytech ovšem byla způsobena nondisjunkcí chromozomů v druhém meiotickém dělení. Využití metody aCGH umožnilo vyšetřit aneuploidie všech 23 chromozomů obou pólových tělísek, díky čemuž bylo možné dospět k závěru, že u studovaného souboru oocytů byly až na výjimky chyby prvního meiotického dělení rovnoměrně zastoupeny u téměř všech chromozomů. Naopak v zastoupení chyb druhého meiotického dělení lze vysledovat trend nárůstu počtu aneuploidii se zmenšující se velikostí jednotlivých chromozomů.

Získané výsledky při srovnání s obdobnými studiemi jak lidských oocytů, tak i oocytů některých modelových organismů naznačují, že hlavní příčinou nárůstu aneuploidii je dlouhé setrvání oocytů v profázi I. Důsledkem toho může být narušena funkce kohezi-
nů, což zapříčiní předčasné rozdělení sesterských chromatid a následně jejich náhodný nekontrolovaný rozchod. Vysoký podíl aneuploidii v meióze II pak může být způsoben poruchou některého z kontrolních bodů, jež má za následek předčasné zahájení anafáze vedoucí k chybné distribuci chromozomů do dceřiných buněk. Tyto hypotézy je však nutné dále ověřit a rozvinout dalšími studiemi zabývajícími se meiotickými poruchami u lidí i jiných savců.

Do budoucna by měly být snahy výzkumu a vývoje v oblasti živočišných biotechnologií zaměřeny mimo jiné na studium podmínek kultivace savčích oocytů modelových

organismů *in vitro* a případné farmakologické ovlivnění meiózy tak, aby došlo ke snížení chybovosti meiotického dělení. Jak je totiž z našich výsledků patrné, maternální meióza je zejména u starších žen zdrojem obrovského množství poruch. Vzhledem k tomu, že druhé meiotické dělení probíhá v rámci IVF až po odběru a oplození oocytů v podmínkách kultivace *in vitro*, je farmakologická náprava meiotického dělení velmi lákavou a atraktivní výzvou pro výzkum v oblasti reprodukčních biotechnologií směrem ke zvýšení úspěšnosti léčby neplodnosti u starších žen.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ANGELL R. R. (1991) Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Human Genetics*, 86(4), s. 383-387. DOI: 10.1007/bf00201839

BEAN C. J., HASSOLD T. J., JUDIS L. A & HUNT P. (2002) Fertilization in vitro increases non-disjunction during early cleavage divisions in a mouse model system. *Human Reproduction*, 17(9), s. 2362-2367. DOI: 10.1093/humrep/17.9.2362

CIESLAK, J., V. IVAKHNENKO, G. WOLF, S. SHELEG a Y. VERLINSKY. (1999) Three-dimensional partial zona dissection for preimplantation genetic diagnosis and assisted hatching. *Fertility and Sterility*, 71(2), s. 308-313. DOI: 10.1016/s0015-0282(98)00452-x

EICHENLAUB-RITTER U. (1998) Genetics of oocyte ageing. *Maturitas*, 30 (2), s. 143-169. DOI: 10.1007/978-1-4684-1351-9_2

FIorentino F., Spizzichino L., BONO S., BIRICIK A., KOKKALI G., RIENZI L., UBALDI F. M., IAMMARRONE E., GORDON A. & PANTOS K. (2011) PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Human Reproductio*, 26(7), s. 1925-1935. DOI: 10.1093/humrep/der082

FIorentino F., BONO S., BIRICIK A., NUCCITELLI A., COTRONEO E., COTTONE G., KOKOCINSKI F., MICHEL C. E., MINASI M. G. & GRECO E. (2014) Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Human Reproduction*, 29(12), s. 2802-2813. DOI: 10.1093/humrep/deu277

FRAGOULI E., WELLS D., THORNHILL A., SERHAL P., FAED M. J. W., HARPER J. C. & DELHANTY J. D. A. (2006) Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Human Reproduction*, 21(9), s. 2319-2328. DOI: 10.1093/humrep/del157

FRAGOULI E., ALFARAWATI S., GOODALL N., SANCHEZ-GARCIA J. F., COLLS P. & D. WELLS. (2011) The cytogenetics of polar bodies: insights into female meiosis and the diagnosis of aneuploidy. *Molecular Human Reproduction*, 17(5), s. 286-295. DOI: 10.1093/molehr/gar024

- GABRIEL A. S., THORNHILL A. R., OTTOLINI C. S, GORDON A., BROWN A. P. C., TAYLOR J., BENNETT K., HANDYSIDE A. & GRIFFIN D. K.** (2011) Array comparative genomic hybridisation on first polar bodies suggests that non-disjunction is not the predominant mechanism leading to aneuploidy in humans. *Journal of Medical Genetics*, 48(7), s. 433-437. DOI: 10.1136/jmg.2010.088070
- GARDNER R. J. M. & SUTHERLAND G. R.** (1989) Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling. *Oxford Monographs in Medical Genetics*, 17, s. 255. ISBN 0 19 504932 2
- GERAEDTS J., MONTAG M., MAGLI C., REPPING S., HANDYSIDE A., STAESSEN C., HARPER J., SCHMUTZLER A., COLLINS J., GOOSSENS V., VEN H. van der, VESELA K. & GIANAROLI L.** (2011) Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results. *Human Reproduction*, 26(11), s. 3173-3180. DOI: 10.1093/humrep/der294
- HANDYSIDE A. H., HARTON G. L., MARIANI B., THORNHILL A. R., AFFARA N., SHAW M. A. & GRIFFIN D. K.** (2009) Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *Journal of Medical Genetics*, 47(10), s. 651-658. DOI: 10.1136/jmg.2009.069971
- HANDYSIDE A. H., ZECH N.H., B., MARIANI B. & HARTON G. L.** (2009) Genome wide karyomapping for preimplantation genetic diagnosis (PGD) detects inherited chromosomal aneuploidies. *Fertility and Sterility*, 92(3). DOI: 10.1007/springerreference_103042
- HANDYSIDE A. H., MONTAG M., MAGLI M. C., REPPING S., HARPER J., SCHMUTZLER A., VESELA K., GIANAROLI L., GERAEDTS J. & MASTENBROEK S.** (2012) Multiple meiotic errors caused by predivision of chromatids in women of advanced maternal age undergoing in vitro fertilisation. *European Journal of Human Genetics*, 20(7), s. 742-747. DOI: 10.1186/isrctn76355836
- HASSOLD T. & P. HUNT.** (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics*, 2(4), s. 280-291. DOI: 10.1038/35066065

- HASSOLD T., HALL H. & HUNT P.** (2007) The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human Molecular Genetics*, 16(2), s. 203-208. DOI: 10.1093/oxfordhb/9780199603329.013.0049
- HORNAK, M., JESETA M., MUSILOVA P., PAVLOK A., KUBELKA M., MOTLIK J., RUBES J. & ANGER M.** (2011) Frequency of Aneuploidy Related to Age in Porcine Oocytes. *PLoS ONE*, 6(4), s. 323-336. DOI: 10.1007/978-94-011-1510-0_25
- HUNT P. & HASSOLD T.** (2010) Female Meiosis: Coming Unglued with Age. *Current Biology*, 20(17), s. 699-702. DOI: 10.1016/j.cub.2010.08.011
- CHIANG T., DUNCAN F. E., SCHINDLER K., SCHULTZ R. M. & LAMPSON M. A.** (2010) Evidence that Weakened Centromere Cohesion Is a Leading Cause of Age-Related Aneuploidy in Oocytes. *Current Biology*, 20(17), s. 1522-1528. DOI: 10.1016/j.cub.2010.06.069
- KING W. A.** (2008) Chromosome variation in the embryos of domestic animals. *Cytogenetic and Genome Research*, 120(1-2), s. 81-90. DOI: 10.1159/000118743
- KOEHLER K. E., SCHRUMP S. E., CHERRY J. P., HASSOLD T. J. & HUNT P. A.** (2006) Near-human aneuploidy levels in female mice with homeologous chromosomes. *Current Biology*, 16(15), s. 230-239. DOI: 10.1007/978-94-010-9166-4_22
- KOENIG J. L. & STORMSHAK F.** (1993) Cytogenetic evaluation of ova from pubertal and third-estrous gilts. *Biology of Reproduction*, 49(6), s. 1158-1162. DOI: 10.1095/biolreprod49.6.1158
- KOUZNETSOVA A., LISTER L., NORDENSKJÖLD M., HERBERT M. & HÖÖG C.** (2007) Bi-orientation of achiasmatic chromosomes in meiosis I oocytes contributes to aneuploidy in mice. *Nature Genetics*, 39(8), s. 966-968. DOI: 10.1038/ng2065
- KULIEV A. & VERLINSKY Y.** (2004) Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis: lessons from preimplantation genetic diagnosis. *Human Reproduction Update*, 10(5), s. 401-407. DOI: 10.1007/1-84628-139-3
- KULIEV A., CIESLAK J. & a VERLINSKY Y.** (2005) Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human oocytes. *Cytogenetic and Genome Research*, 111(3-4), s. 193-198. DOI: 10.1159/000086889

- KULIEV A., ZLATOPOLSKY Z., KIRILLOVA I., SPIVAKOVA J. & JANZEN J. C.** (2011) Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. *Reproductive BioMedicine Online*, 22(1), s. 2-8. DOI: 10.1016/j.rbmo.2010.08.014
- LANE S. I. R., YUN Y. & JONES K. T.** (2012) Timing of anaphase-promoting complex activation in mouse oocytes is predicted by microtubule-kinetochore attachment but not by bivalent alignment or tension. *Development*, 139(11), s. 1947-1955. DOI: 10.1242/dev.077040
- LECHNIAK D. & ŚWITOŃSKI M.** (1998) Aneuploidy in bovine oocytes matured in vitro. *Chromosome Research*, 6(6), s. 504-506
- LEMAIRE-ADKINS R., XU N. & HUNT P. A.** (1997) Lack of Checkpoint Control at the Metaphase/Anaphase Transition: A Mechanism of Meiotic Nondisjunction in Mammalian Females. *The Journal of Cell Biology*, 139(7) s. 1611-1619. DOI: 10.14711/thesis-b786935
- MALMANCHE N., MAIA A. & SUNKEL C.** (2006) The spindle assembly checkpoint: Preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Letters*, 580(12), s. 2888-2895. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.03.081
- MONTAG M., VEN K., DELACRÉTAZ G., RINK K. & VEN H.** (1998) Laser-Assisted Microdissection of the Zona Pellucida Facilitates Polar Body Biopsy. *Fertility and Sterility*, 69(3), s. 539-542. DOI: 10.1016/S0015-0282(97)00538-4
- MONTAG M. & H. VEN.** (1999) Laser - Assisted Hatching in Assisted Reproduction. *Croatian Medical Journal*, 40(3), s. 398-403
- MONTAG M., SCHIMMING T. & VEN H.** (2006) Spindle imaging in human oocytes: the impact of the meiotic cell cycle. *Reproductive BioMedicine Online*, 12(4), s. 442-446. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)61996-7
- MONTAG M., KÖSTER M., STROWITZKI T. & TOTH B.** (2013) Polar body biopsy. *Fertility and Sterility*, 100(3), s. 603-607. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.05.053
- MUSACCHIO A. & SALMON E. D.** (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(5), s. 2793-2793. DOI: 10.1007/978-3-540-47648-1_5445

- MUNNE S., DAILEY T., SULTAN K. M., GRIFO J. & COHEN J.** (1995) The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Molecular Human Reproduction*, 1(2), s. 94-100. DOI: 10.1093/molehr/1.2.94
- MUNNE S.** (2012) Preimplantation Genetic Diagnosis for Aneuploidy and Translocations Using Array Comparative Genomic Hybridization. *Current Genomics*, 13(6), s. 463-470. DOI: 10.2174/138920212802510457
- NAGAOKA S. I., HODGES C. A., ALBERTINI D. F. & HUNT P. A.** (2011) Oocyte-Specific Differences in Cell-Cycle Control Create an Innate Susceptibility to Meiotic Errors. *Current Biology*, 21(8), s. 651-657. DOI: 10.1016/j.cub.2011.03.003
- NASMYTH, K. & HAERING C. H.** (2009) Cohesin: Its Roles and Mechanisms. *Annual Review of Genetics*, 43(1), s. 525-558. DOI: 10.1146/annurev-genet-102108-134233
- NICODEMO D., PAUCIULLO A., COSENZA G., PERETTI V., PERUCATTI A., Di MEO G. P., RAMUNNO L., IANNUZZI L., RUBES J. & Di BERARDINO D.** (2010) Frequency of aneuploidy in in vitro-matured MII oocytes and corresponding first polar bodies in two dairy cattle (*Bos taurus*) breeds as determined by dual-color fluorescent in situ hybridization. *Theriogenology*, 73(4), s. 523-529. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.10.007
- NICOLAIDIS P. & PETERSEN M. B.** (1998) Origin and mechanisms of non-disjunction In human autosomal trisomies. *Human Reproduction*, 13(2), s. 313-319. DOI: 10.1093/humrep/13.2.313
- OKERE C. & L. NELSON.** (2002) Novel Reproductive Techniques in Swine Production – A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 15(3), s. 445-452. DOI: 10.5713/ajas.2002.445
- OTTOLINI C., NEWNHAM, L., CAPALBO, A., NATESAN, S. A., JOSHI, H. A., GRIFFIN, D. K., HERBERT, A.D., RIENZI, L., UBALDI, F., HANDYSIDE, A. H., & HOFFMANN, E. R.** (2014) Combined genome-wide chrossover maps and chromosome segregation outcomes reveal crossover assurance and a novel segregation pattern in a single, adult human oocytes. In: 13th Annual Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS) Meeting Abstracts - April 29 – May 2 2014, *Chromosome research*, 14/Springer. DOI: 10.1007/s10577-014-9437-5

- PAN H., MA P., ZHU W. & SCHULTZ R. M.** (2008) Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs. *Developmental Biology*, 316(2), s. 397-407. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.01.048
- ROBERTS R., IATROPOULOU A., CIANTAR D., STAR J., BECKER D. L., FRANKS S. & HARDY K.** (2005) Follicle-Stimulating Hormone Affects Metaphase I Chromosome Alignment and Increases Aneuploidy in Mouse Oocytes Matured in Vitro. *Biology of Reproduction*, 72(1), s. 107-118. DOI: 10.1095/biolreprod.104.032003
- SEBESTOVA J., DANYLEVSKA A., DOBRUCKA L., KUBELKA M. & ANGER M.** (2012) Lack of response to unaligned chromosomes in mammalian female gametes. *Cell Cycle*, 11(16), s. 3011-3018. DOI: 10.4161/cc.21398
- SCHOOLCRAFT W. B., E. FRAGOULI, J. STEVENS, S. MUNNE, M. G. KATZ-JAFFE & D. WELLS.** (2010) Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertility and Sterility*, 94(5), s. 1700-1706. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.015
- SCHMUTZ S. M., J. S. MOKER, E. G. CLARK, J. P. ORR, P. WONG & K. SZEGO.** (1996) Chromosomal Aneuploidy Associated with Spontaneous Abortions and Neonatal Losses in Cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8(1), s. 91-98. DOI: 10.1016/b978-0-08-021517-4.50015-0
- SOSNOWSKI J., WAROCZYK M. & SWITONSKI M.** (2003) Chromosome abnormalities in secondary pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 60(3), s. 571-581. DOI: 10.1016/s0093-691x(03)00044-x
- VELAZQUEZ M. A.** (2008) Assisted Reproductive Technologies in Cattle: Applications in Livestock Production, Biomedical Research and Conservation Biology. *Annual Review of Biomedical Sciences*, 10(0). DOI: 10.5016/1806-8774.2008.v10p36
- VODIČKA P., SMETANA K., DVOŘÁNKOVÁ B., EMERICK T., XU Y. Z., OUŘEDNÍK J., OUŘEDNÍK V. & MOTLÍK J.** (2005) The Miniature Pig as an Animal Model in Biomedical Research. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1049(1), s. 161-171. DOI: 10.1196/annals.1334.015
- VOZDOVÁ M., MACHATKOVÁ M., KUBÍČKOVÁ S., ZUDOVÁ D., JOKEŠOVÁ E. & RUBES J.** (2001). Frequency of aneuploidy in pig oocytes matured *in vitro* and of the corresponding first polar bodies detected by fluorescent in

situ hybridization. *Theriogenology*, 56(5), s. 771-776. DOI: 10.1016/s0093-691x(01)00606-9

WELLS D., ESCUDERO T., LEVY B., HIRSCHHORN K., DELHANTY J. D. A. & MUNNÉ S. (2002) First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertility and Sterility*, 78(3), s. 543-549. DOI: 10.1016/s0015-0282(02)03271-5

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1:	Program určený k lýze biotovaného materiálu a extrakci DNA z buňky	27
Tabulka 2:	Program určený k preamplifikace lyzovaného vzorku (příprava knihovny)	27
Tabulka 3:	Program určený k poslední fázi amplifikace (PCR).....	28
Tabulka 4:	Složení a koncentrace promývacích roztoků SSC (saline-sodium citrate)	31
Tabulka 5	Základní parametry studovaného souboru žen	34
Tabulka 6	Podíl úspěšně vyšetřených vzorků.....	35
Tabulka 7	Počet euploidních a aneuploidních prvních a druhých pólových tělísek a odvozený počet euploidních a aneuploidních oocytů.....	36
Tabulka 8	Zastoupení typů chromozomových aberací způsobených předčasným rozdělením sesterských chromatid u prvního meiotického dělení.....	39
Tabulka 9:	Zastoupení poruch druhého meiotického dělení.....	40
Tabulka 10	Počty kompenzací chyb prvního a druhého typu u jednotlivých chromozomů.....	42
Tabulka 11	Ověření náhodnosti kompenzace chyby prvního meiotického dělení ve druhém meiotickém dělení	42
Tabulka 12	Celkový přehled jednotlivých poruch obou meiotických dělení zvláště pro všechny chromozomy	43

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1:	Schéma meiotického dělení oocytu	10
Obrázek 2:	Oplozený oocyt s patrnými prvojádry.	13
Obrázek 3:	Schéma všech možných typů chromozomových aneuploidií způsobených poruchami prvního meiotického dělení.	14
Obrázek 4:	Schéma všech možných typů chromozomových aneuploidií způsobených poruchami druhého meiotického dělení.	15
Obrázek 5:	Biopsie prvního pólového tělíska	22
Obrázek 6:	Fotografie agarózového gelu potvrzující úspěšnou amplifikaci.....	29
Obrázek 7:	Výsledek vyšetření metodou aCGH	32
Obrázek 8:	Výsledný graf po provedení metody aCGH. Porucha prvního meiotického dělení – získ chromatidy	38
Obrázek 9:	Výsledný graf po provedení metody aCGH. Porucha prvního meiotického dělení – ztráta chromatidy	38
Obrázek 10:	Výsledný graf po provedení metody aCGH. Porucha prvního meiotického dělení – nondisjunkce celého chromozomového páru.....	38
Obrázek 11:	Výsledný graf po provedení metody aCGH. Porucha druhého meiotického dělení – získ nadbytečné chromatidy.....	40
Obrázek 12:	Výsledný graf po provedení metody aCGH. Porucha druhého meiotického dělení – Ztráta chromozomu.....	40
Obrázek 13:	Příklad kompenzace chyby prvního meiotického dělení ve druhém meiotickém dělení.....	41