

**MASARYKOVA
UNIVERZITA**

PRINCIPY A TECHNIKY PREIMPLANTAČNÍHO GENETICKÉHO TESTOVÁNÍ

Adéla Voňková, Aleš Hampl, Zuzana Holubcová,
Michal Ješeta

Projekt: Masarykova univerzita 4.0
Reg. č.: CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_015/0002418



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

BRNO 2021

Autorský kolektiv: Bc. Adéla Voňková
doc. MVDr. Aleš Hampl, CSc.
PharmDr. Zuzana Holubcová, Ph.D.
doc. Ing. Michal Ješeta, Ph.D.

Nerecenzováno.

Obsah

Seznam pojmů a zkratk	5
1 Úvod	7
2 Historie preimplantačního genetického testování	9
3 Metody genetické analýzy	11
3.1 FISH – Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	11
3.1.1 Historie FISH	11
3.1.2 Typy FISH	11
3.1.3 Mechanismus FISH	12
3.2 PCR – polymerázová řetězcová reakce	13
3.2.1 Historie PCR	14
3.2.2 Princip PCR	14
3.3 WGA – celogenomová amplifikace	16
3.3.1 Metody WGA	16
3.4 aCGH – Komparativní genomová hybridizace na mikročipech	20
3.4.1 Princip aCGH	21
3.5 NGS – Sekvenování nové generace	22
3.5.1 Druhy NGS	23
3.6 Karyomapping	23
4 Technické aspekty provádění biopsie	25
4.1 Biopsie blastomer	25
4.1.1 Provedení biopsie blastomer	25
4.2 Biopsie polárního tělíska	26
4.2.1 Provedení biopsie polárního tělíska	27
4.3 Biopsie trofoektodermu z blastocysty	28
4.3.1 Provedení biopsie trofoektodermu z blastocysty	28
4.4 Alternativní metody biopsie	30
4.4.1 Blastocentéza	30
4.4.2 Detekce volné DNA z použitého kultivačního média	30

5	Typy preimplantačního genetického testování	32
5.1	Preimplantační genetické testování aneuploidí – PGT-A.....	32
5.1.1	Aneuploidie	32
5.1.2	Provedení PGT-A	33
5.2	Preimplantační genetické testování strukturních aberací – PGT-SR.....	34
5.2.1	Strukturní chromozomové aberace	34
5.2.2	Provedení PGT-SR.....	36
5.3	Preimplantační genetické testování monogenních chorob – PGT-M.....	37
5.3.1	Monogenní choroby	37
5.3.2	Provedení PGT-M	37
5.4	Shoda v HLA	38
6	Mozaicismus	39
6.1	Vznik a třídy mozaicismu.....	39
6.2	Výskyt mozaicismu a jeho dopad na embryo	40
6.3	Detekce mozaicismu	41
7	Indikace k provedení preimplantačního genetického testování	44
7.1	Indikace k PGT-A.....	44
7.2	Indikace k PGT-M	45
7.3	Indikace k PGT-SR.....	45
8	Závěr	46
	Použité literární zdroje	47
	Internetové zdroje	63

Seznam pojmů a zkratk

aCGH	– Komparativní genomová hybridizace na mikročipech (Array Comparative Genomic Hybridization)
BAC	– Bakteriální umělý chromozom (Bacterial Artificial Chromosome)
bp	– Páry bazí (Base Pairs)
CCS	– Komplexní screening chromozomů (Comprehensive Chromosome Screening)
CGH	– Komparativní genomová hybridizace (Comparative Genomic Hybridization)
CVS	– Odběr choriových klků (Chorionic Villus Sampling)
DOP-PCR	– PCR využívající degenerované oligonukleotidové primery (Degenerate Oligonucleotide Primed Polymerase Chain Reaction)
dsDNA	– Dvouvláknová DNA (Double-stranded DNA)
FISH	– Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (Fluorescent <i>in situ</i> hybridization)
HLA	– Lidský leukocytární antigen (Human Leukocyte Antigen)
ICM	– Vnitřní buněčná hmota – embryoblast (Inner Cell Mass)
IVF	– <i>in vitro</i> fertilizace (<i>in vitro</i> Fertilization)
kb	– Tisíc bazí
kbp	– Tisíc párů bazí
MDA	– Amplifikace násobným vytěsňováním řetězce (Multiple Displacement Amplification)
mtDNA	– Mitochondriální DNA
NGS	– Sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing)
PB	– Polární tělísko (Polar Body)
PCR	– Polymerázová řetězcová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PEP	– Preamplifikace prodlužováním primerů (Primer Extension Preamplification)
PGD	– Preimplantační genetická diagnostika (Preimplantation Genetic Diagnosis)

PGT	– Preimplantační genetické testování (Preimplantation Genetic Testing)
PGT-A	– Preimplantační genetické testování aneuploidií (Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies)
PGT-M	– Preimplantační genetické testování monogenních chorob (Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disorders)
PGT-SR	– Preimplantační genetické testování strukturních aberací (Preimplantation Genetic Testing for Structural Rearrangements)
SBS	– Sekvenování syntézou (Sequencing By Synthesis)
SCHA	– Strukturní chromozomové aberace
SCM	– Použité kultivační médium (Spent Culture Medium)
SNP	– Jednonukleotidový polymorfismus (Single Nucleotide Polymorphism)
ssDNA	– Jednovláknová DNA (Single-stranded DNA)
TE	– Trofoektoderm (Trophoectoderm)
UPD	– Uniparentální disomie (Uniparental Disomy)
WGA	– Celogenomová amplifikace (Whole Genome Amplification)
ZP	– <i>zona pellucida</i>

1 Úvod

Za posledních 50 let se míra lidské neplodnosti zvýšila o polovinu. Je odhadováno, že v dnešní době se 15-20 % lidí v České republice potýká s neplodností. Klinicky uznaná těhotenství až z 10-15 % končí potratem, přičemž asi polovina těhotenství je ukončena následky chromozomálních abnormalit, v drtivé většině aneuploidiemi. Je tedy zřejmé, že zájem o lékařskou pomoc v centrech asistované reprodukce je čím dál vyšší a díky tomu vědecký a technologický pokrok v rámci asistované reprodukce v posledních letech značně narůstá. Před více než 30 lety se poprvé objevilo a o pár let později bylo i aplikováno preimplantační genetické testování (Preimplantation Genetic Testing, PGT), které je dnes už široce využívané v centrech asistované reprodukce po celém světě, má velkou zásluhu v pomoci neplodným párům k úspěšnému těhotenství a pravděpodobně je budoucností asistované reprodukce.

Principem PGT je genetické vyšetření embryí prostřednictvím určitých metod, stanovení správné diagnózy a výběr embrya ideálního k přenosu do dělohy pacientky – k implantaci. Podle toho, co přesně je na embryu testováno, lze PGT rozdělit na preimplantační genetické testování aneuploidií (Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy, PGT-A), preimplantační genetické testování strukturních aberací (Preimplantation Genetic Testing for Structural Chromosomal Rearrangements, PGT-SR) a preimplantační genetické testování monogenních chorob (Preimplantation Genetic Testing of Monogenic Diseases, PGT-M).

PGT-A je nejběžněji využívaným typem PGT vzhledem ke skutečnosti, že právě výskyt aneuploidie (stav buňky, ve které existuje nadbytek či nedostatek chromozomů) v embryu, představuje nejčastější příčinu ukončení těhotenství. PGT-SR se zaměřuje na testování strukturních aberací týkajících se chyb pouze úseku konkrétního chromozomu, tj. translokací, delecí, duplikací aj. PGT-M se specializuje na detekci teoreticky všech (z více než 8000 různých) monogenně dědičných chorob vznikajících mutací v jednom z lidských genů. Tato bakalářská práce má za cíl shrnout problematiku všech typů preimplantačního genetického testování, včetně jeho historického vývoje, popisu současných technik i technik potenciálně využívaných v budoucnosti, které s PGT souvisí. Zaměří se také na genetické vady embryí a na indikace jednotlivých typů PGT.

Je nepochybné, že plné porozumění PGT vyžaduje znalosti z oblasti vývoje pohlavních buněk a embryí, které však jdou svým rozsahem za možnosti tohoto textu. Jako částečné řešení této otázky se v textu snažím důležité skutečnosti definovat či alespoň krátce vysvětlit.

2 Historie preimplantačního genetického testování

První diskuze o PGT byly vedeny již v roce 1986. Skupina odborníků projednávala možnosti provedení preimplantačního testování, které by zamezilo potratům způsobených genetickými vadami. Byli přesvědčení, že existují dvě skupiny potenciálních pacientů: první, s rizikem porodu dítěte se sporadickým genetickým onemocněním. Toto onemocnění je dědičné pouze pokud rodič získal chorobu genetickou mutací. Může mít za následek neurodegeneraci, kostní defekty, předčasné stárnutí i rakovinu (Fisher et al., 2009). Do druhé skupiny pak patří rodiče, kteří mají trvale vysoké riziko ke zplození dítěte s genetickým onemocněním (Imudia and Plosker, 2016). Odborníci vyvodili závěr, že *„preimplantační genetické testování nebude široce aplikované na všechny pacienty s IVF, ale pouze za účelem zjištění specifického onemocnění nebo onemocnění, pro která je konkrétní pár vysoce rizikový.“* (Wittingham and Penketh, 1987)

V roce 1990 byla poprvé zaznamenána aplikace preimplantačního genetického testování. Handyside *et al.* (1990) dosáhli úspěšného PGT u pěti párů. Pět žen s rizikem přenosu recesivně X-vázaných onemocnění podstoupilo hormonální stimulaci ovárií pomocí gonadotropinů, odběr oocytů a následně bylo provedeno oplodnění *in vitro*. Třetí den byla metodou polymerázové řetězcové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) amplifikována DNA specifická pro Y chromozom získána biopsií. Poté byla identifikována embrya ženského pohlaví a zavedena do děloh žen, přičemž dvě ženy otěhotněly s dvojvaječnými dvojčaty ženského pohlaví. Po deseti týdnech bylo ženské pohlaví plodů potvrzeno pomocí metody CVS (Chorionic Villus Sampling) – odběrem choriových klků.

V 90. letech se metoda PGT používala zejména za účelem omezení rození dětí s genetickými onemocněními u matek pokročilého věku, jelikož bylo několika výzkumy potvrzeno, že čím je věk ženy vyšší, tím se zvyšuje i prevalence abnormalit chromozomů v oocytech. Tím pádem je u těchto žen i vyšší pravděpodobnost produkce chromozomálně abnormálních embryí (Hassold and Hunt, 2009; Harper, 2017).

Roku 2000 se narodilo první dítě na světě po preimplantační genetické diagnostice Fanconiho anémie. Fanconiho anémie je velmi vzácné genetické onemocnění, které má za následek poruchu krvetvorby a riziko vzniku nádorů z krevních buněk. V organismu nemocného člověka dochází k mutaci specifických genů, které mají za úkol opravovat buněčnou DNA (Nepal et al., 2017). Proběhla selekce a přenos pouze nepostižených embryí, která

měla shodu v lidském leukocytárním antigenu (Human Leukocyte Antigen, HLA) se sourozencem, kterému bylo nutné transplantovat pupečnickovou krev. Po narození byla dítěti odebrána pupečnicková krev a kmenové buňky z krve transplantovány šestiletému sourozcovi s Fanconiho anémií. Tím pádem páry, kterým hrozí narození dítěte s tímto onemocněním a také jakémukoli onemocnění vyžadujícího dárce se shodou v HLA kmenových buněk, mohou podstoupit léčbu zamezující onemocnění dítěte (Wagner, 2000).

Při počátcích aplikací PGT se předpokládalo, že se výrazně zvýší procento porodnosti u žen pokročilého mateřského věku. Bohužel se však ukázalo, že PGT neprokazuje žádný progres spojený s vyšší porodností. Naopak se paradoxně porodnost u starších matek ještě snížila, což mělo za následek omezení užívání PGT na několik následujících let (Imudia and Plosker, 2016). Tento pokles nenastal proto, že by PGT nějakým způsobem nefungovalo, ale z toho důvodu, že po diagnostikování abnormalit v embryích nebyla tato embrya přenesena, tím pádem se snížila nejen potratovost, ale i celková porodnost.

V 10. letech 21. století se však užívání metody PGT výrazně zvýšilo. Začal se využívat tzv. komplexní screening chromozomů – tzn. všech 23 chromozomů namísto techniky fluorescenční *in situ* hybridizace (Fluorescent *in situ* Hybridization, FISH), prověřující pouze konkrétní sady chromozomů, která se používala doposud (Scott, Upham, Forman, Hong, et al., 2013; Imudia and Plosker, 2016).

3 Metody genetické analýzy

3.1 FISH – Fluorescenční *in situ* hybridizace

Metoda FISH patří mezi nejvýznamnější cytogenetické techniky. Spočívá v detekci dědičných i získaných chromozomálních abnormalit, jako např. chromozomální translokace, delece a amplifikace genů (Sugita and Hasegawa, 2017). Je to poměrně nákladná i časově náročná metoda, kterou by do budoucna chtělo co nejvíce přiblížit levnější a rychlejší podobě, čímž by se dosáhlo i vyšší dostupnosti v laboratořích (Vedarethinam et al., 2010).

3.1.1 Historie FISH

Roku 1980 byla provedena první aplikace fluorescenční detekce *in situ*, a to pomocí RNA sond, které byly značeny na 3' konci fluorofory komplementárními se specifickými sekvencemi DNA. V 80. letech byla detekce prováděna zejména pomocí biotinylovaných sond (biotinylace spočívá ve vazbě biotinu na protein, nukleovou kyselinu nebo jinou molekulu) a pomocí fluorescenčních streptavidinových konjugátů. Po asi deseti letech se značení sond DNA značně zlepšilo a umožnilo tak přímou detekci díky dostatku fluorescenčních molekul (Levsky and Singer, 2003; Vedarethinam et al., 2010; Cheng et al., 2017). Roku 1996 se podařilo Schrock *et al* (1996) pomocí pětibarevného schématu rozlišit všechny lidské chromozomy najednou.

Ve 21. století se FISH stále zdokonalovala, a to její specifitou, rozlišením a citlivostí. Dnes se FISH používá zejména v oblastech genomové medicíny a chirurgické patologie a stále je na velkém vzestupu (Cheng et al., 2017).

3.1.2 Typy FISH

Mezi dva nejběžnější typy chromozomálních technik se řadí FISH interfázová a FISH metafázová.

Interfázová FISH se zaměřuje na identifikaci numerických i strukturních abnormalit a je závislá na konkrétní sondě. Je tedy vhodná pouze k vizualizaci již známých translokací a specifických chromozomů. Pro její nedostatečnou shodu se interfázová FISH nepoužívá pro prenatální diagnostiku (Lee et al., 2001).

Metafázovou FISH lze naopak využít k detekci vzorků s neznámými translokacemi všech chromozomů pomocí vícebarevných sond. Používá se k identifikaci inzercí, delecí a jiných aberací specifické oblasti genomu. Její nevýhodou je extrémní obtížnost manipulace s chromozomy a jejich fixování (Liehr et al., 2006; Vedarethinam et al., 2010).

3.1.3 Mechanismus FISH

K provedení FISH je zapotřebí dvou základních složek: DNA sonda a cílová DNA sekvence. Typ sondy a sekvence se vybírá podle toho, jaký druh genetické abnormality je detekován.

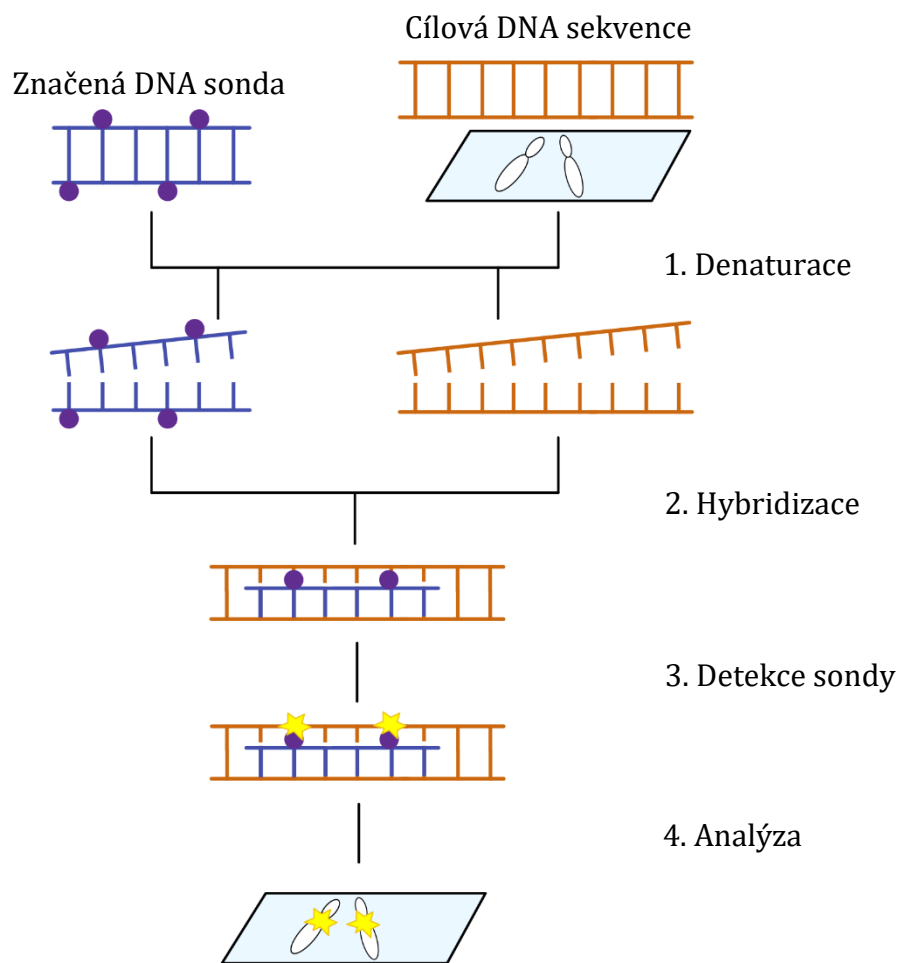
V prvním kroku je nutné si nachystat DNA sondu. Ta je získána tak, že se připraví krátké sekvence jednovláknové DNA (Single-stranded DNA, ssDNA) odpovídající části genu, který je zjišťován. SONDY jsou vždy značeny, a to různými způsoby – např. náhodným značením primeru, PCR nebo pomocí tzv. nick translation, což je technika radioaktivního značení dvouvláknové DNA (Double-stranded DNA, dsDNA) (Farrell, 2005).

SONDY se označují dvěma způsoby:

1. Přímé označování: ke značení se používají nukleotidy obsahující fluorofory.
2. Nepřímé označování: sondy jsou značeny modifikovanými nukleotidy obsahujícími hapteny, které jsou identifikovány značenou protilátkou. V tomto případě je možné haptenu konjugovat s enzymem, aby došlo k barevné reakci.

Dalším krokem je denaturace značené DNA sondy i cílové sekvence DNA za vysoké teploty (72-75 °C), čímž dojde k rozvolnění vláken sondy i sekvence. Poté je potřeba vzorek ochladit na 37 °C, tím se sonda naváže do cílové sekvence DNA a dojde k hybridizaci.

V dalším kroku je nutné odstranit přebytek sondy z cílové sekvence, ke které není komplementární. Poté se vzorek fluorescenčně barví a může se vyhodnocovat za pomoci fluorescenčního mikroskopu se specializovaným počítačovým programem (Savic and Bumbendorf, 2016; Ratan et al., 2017; Sugita and Hasegawa, 2017).



Obr. 1: Schématický postup metody FISH
(modifikováno dle Ratan et al., 2017)

3.2 PCR – polymerázová řetězcová reakce

PCR je metoda sloužící k molekulárnímu klonování DNA. Dochází k opakujícímu se cyklu replikace a amplifikace specifických segmentů DNA. Tyto segmenty pak umožňuje naklonovat až miliardkrát. PCR se využívá v mnoha laboratorních i klinických aplikacích, jako je klonování genů, diagnostika chorob i screening prenatálních genetických abnormalit. Jedná se o poměrně jednoduchou, časově nenáročnou a přesnou laboratorní techniku (Green and Sambrook, 2019; Ghannam and Varacallo, 2020).

3.2.1 Historie PCR

Poprvé metodu PCR představil Kary Banks Mullis (1990) v roce 1983. Aplikoval ji při identifikaci mutace srpkovitých buněk a po deseti letech za svůj objev dostal Nobelovu cenu.

V devadesátých letech byla PCR na velkém vzestupu – byla aplikována např. k detekci DNA ve forenzní stomatologii (Pötsch et al., 1992), k identifikaci parodontálního patogenu *Porphyromonas gingivalis* orálního plaku (Watanabe and Frommel, 1993).

V dnešní době už existuje mnoho různých druhů PCR aplikovaných v několika oblastech biologických a medicínských věd (Maheaswari et al., 2016).

3.2.2 Princip PCR

Princip PCR závisí na třech základních krocích: denaturace DNA, primární hybridizace a replikace (elongace) DNA.

Před samotným PCR je však ještě potřeba udělat následující kroky: tepelně, chemicky nebo enzymaticky extrahovat nukleovou kyselinu z určitého vzorku, cílová nukleová kyselina se poté přidá do reakční směsi s potřebnými komponenty k optimalizaci polymerázové aktivity, primery a enzymy a následně se umístí do termocykléru, díky němuž je DNA amplifikována (Maheaswari et al., 2016).

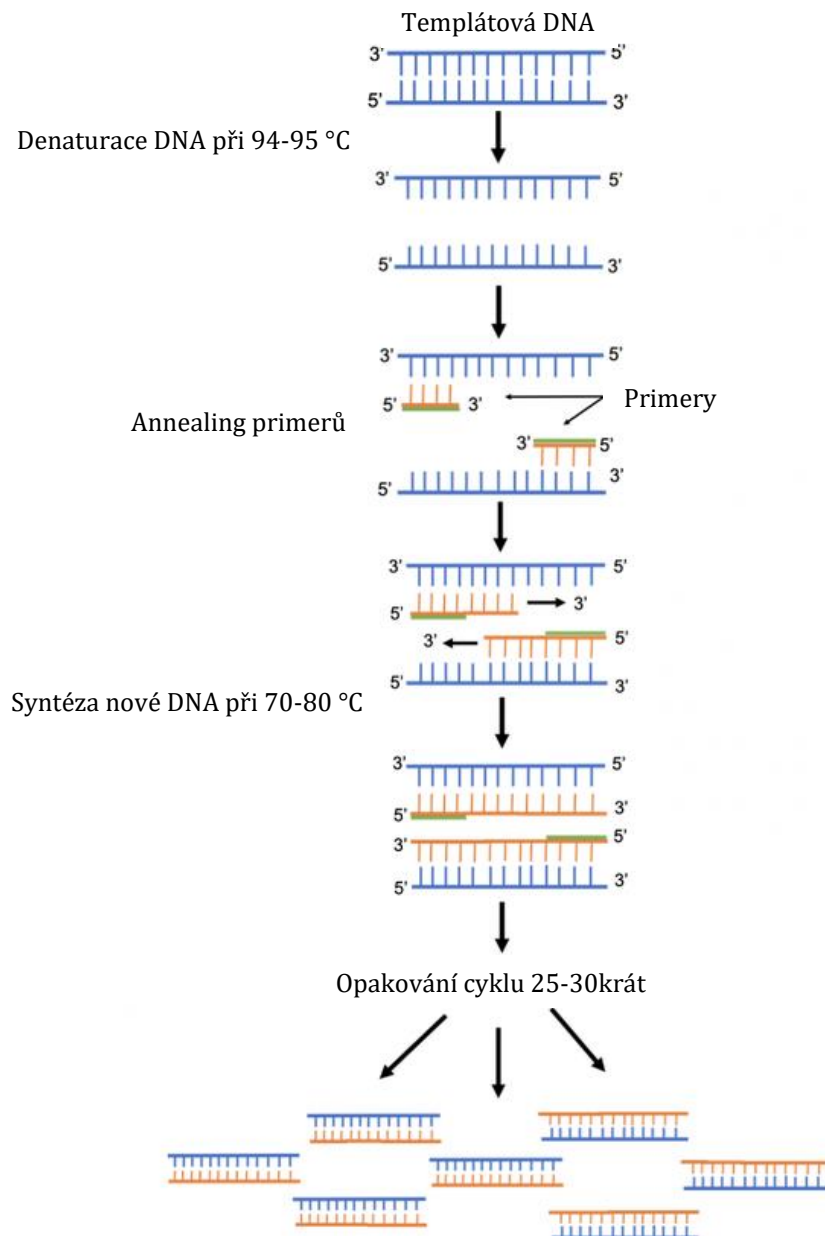
Poté navazují již zmíněné tři kroky (Mullis, 1990; Nghiem and Schatzberg, 2010; Maheaswari et al., 2016; Ghannam and Varacallo, 2020):

1. Denaturace DNA (tání) – vzorek je potřeba zahřát na $>90\text{ }^{\circ}\text{C}$ (obvykle $94/95\text{ }^{\circ}\text{C}$) dochází k narušení vodíkových vazeb držící vzájemně řetězec DNA (z jedné dsDNA se stanou dvě ssDNA)

2. Primární hybridizace (annealing) – snížení teploty na přibližně $50\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (přesná teplota se odvíjí od chemicko-fyzikálních vlastností primeru), dochází k žíhání (tj. prudkému ochlazení) komplementárních párů bazí. Pár primerů je smíchán s řetězcem DNA, 'forward primer' hybridizuje na specifické místo na konci prvního řetězce a 'reverse primer' hybridizuje na specifické místo opačného konce druhého řetězce. Primery, které jsou v přebytku se váží na 3' konec vlákna a zamezí opakované hybridizaci vlákna se sebou samým.

3. Replikace DNA (elongace, syntetická fáze) – při teplotě přibližně $70\text{--}80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (závisí na vlastnostech enzymu DNA polymerázy) dochází k prodlužování primerů a tím k syntéze

nových řetězců DNA ve směru od 3' ku 5' konci pomocí DNA polymerázy. Řetězce jsou identické s templátovým řetězcem DNA.



Obr. 2: Schéma principu metody PCR
(upraveno URL1)

3.3 WGA – celogenomová amplifikace

Metody FISH a PCR dříve patřily mezi hlavní techniky pro PGT, avšak u těchto metod existují jisté nedostatky v rámci bezchybné genetické diagnostiky. Proto byly vyvinuty další metody pro PGT, které dokáží zmnožit veškerou genetickou informaci v DNA – celý genom, celé buňky nebo exom – část genomu tvořená exony. Proto tuto metodu nazýváme celogenomová amplifikace (Whole Genome Amplification, WGA) (Borgström et al., 2017).

Kromě PGT se WGA aplikuje také ve forenzní vědě, k imortalizaci klinických vzorků, ke genotypizaci a k detekci genomu bioterorismu (Hawkins et al., 2002).

Velkou výhodou také je, že lze zkoumat i části určitého organismu s omezeným množstvím DNA (Zheng et al., 2011).

3.3.1 Metody WGA

Jednotlivé metody lze rozdělit na: WGA založené na PCR a WGA nezaložené na PCR. Nejvýznamnější z nich jsou vypsány níže.

1. Metody WGA založené na PCR:

I. **PCR využívající degenerované oligonukleotidové primery** (Degenerate Oligonucleotide Primed Polymerase Chain Reaction, DOP-PCR)

Tuto metodu poprvé popsal Telenius (1992) jako metodu pro mapování genomu. Jak již název napovídá, metoda využívá částečně degenerovaný primer, který se váže na několika místech celého genomu během mnoha cyklů žíhání za nízkých teplot. Následně se teplota žíhání zvýší, což umožní specifitější nasedání primerů pouze na ty fragmenty DNA, na kterých je specifická část sekvence primeru. Tak nastane exponenciální nárůst DNA. S vhodným templátem genomové DNA lze amplifikovat v podstatě jakékoli sekvence až 100krát (Peng et al., 2007). Genomová templátová DNA může mít 15 pg až 400 ng a množství produktů bude vždy větší než u metody PEP (viz níže), avšak „*pokud je genomová DNA snížena pod 640 pg, existuje větší pravděpodobnost, že daný lokus nebude v produktu DOP-PCR zastoupen.*“ (Cheung and Nelson, 1996).

V PGT se DOP-PCR využívá v posledních letech velmi často. Umožňuje celkovou analýzu všech 46 chromozomů v téměř každé buňce a detekuje chromozomové aberace

včetně aneuploidie (Voullaire et al., 1999), chromozomálního mozaicismu (viz kapitola 6) (Malmgren, 2002), translokací a delecí (Wells, 2000; Peng et al., 2007).

II. Preamplifikace prodlužováním primerů (Primer Extension Preamplification, PEP)

Tuto metodu poprvé aplikoval Zhang (1992) k amplifikaci DNA z jádra spermie pro analýzu specifických genů. Metodu provedli za pomoci *Taq* polymerázy a náhodných oligonukleotidových primerů o velikosti 15 bazí v celkem 50 cyklech. Templát je denaturován při 92 °C a následná hybridizace se provádí při 37 °C. Teplota se poté postupně zvyšuje až na výsledných 55 °C (1 °C za sekundu). Teplota 55 °C se pak udržuje ještě po dobu 4 minut, aby došlo k prodlužování primerů polymerázou. Prostřednictvím této metody Zhang et al. (1992) zjistili, že přibližně 78 % genomu jedné haploidní buňky lze až 30krát zmnožit po 50 cyklech. Zbylých 22 % genomu nelze množit, protože ne všechny sekvence DNA mohou být metodou PCR amplifikovány kvůli jejich sekvenční kompozici a jejich přirozené repetitivitě (Hughes et al., 2005; Peng et al., 2007).

Původní protokol k PEP zahrnoval postup, který trval 14 hodin. Aby se metoda dala jednodušeji používat v laboratořích, byl vyvinut protokol nový, který čas zkrátí na 5,5 hodiny, ale nijak neovlivnil účinnost metody (Sermon et al., 1996). Dále Dietmaier et al. (1999) protokol PEP upravili a vylepšili, což mělo za následek účinnější amplifikaci a název metody reformovali z PEP na I-PEP (Improved PEP – vylepšená PEP). I-PEP využívá pro lýzi buněk proteinázu K a při elongaci kromě *Taq* polymerázy i *Pwo* polymerázu.

PEP bohužel vykazuje ale také několik nevýhod. Asi nejzásadnějším problémem je, že vytváří s každým dalším cyklem amplifikace kratší a kratší produkty kvůli zcela degenerovaným krátkým primerům, které se vážou na vnitřní oblasti produktů z předešlých cyklů. Tím pádem se pak ani nejedná o exponenciální amplifikaci a výtěžek reakce je velmi malý (Kittler et al., 2002). Další nevýhodou je, že se může stát, že ne všechny sekvence DNA v buňce jsou amplifikovány nad prahovou hodnotu detekce (Peng et al., 2007). Důvodů může být hned několik: neúplná lýze buňky, při barvení buněk může dojít k úbytku částí genomu, degradace templátu a destrukce DNA či amplifikační zkreslení, které může vést ke ztrátě lokusů a chybné diagnóze embryí (Dean et al., 2002; Peng et al., 2007). Také je konstatováno, zda je možné, že by amplifikace mohla vnést do produktů PEP nežádané mutace (Peng et al., 2007). Na těchto problémech je stále potřeba pracovat, jelikož značně omezují širší využití v PGT (Zheng et al., 2011).

PEP je však stále široce užívanou metodou pro diagnostiku genetických chorob, která tak předchází narození nemocných dětí. V tabulce č. 1 jsou vypsány vybrané studie aplikací PEP v PGT (Kristjansson et al., 1994; Gibbons and Lanzendorf, 1995; Sekizawa et al., 1996; Ao et al., 1998; Watanabe et al., 1998; Chen et al., 2004; Jiao et al., 2004; Liu et al., 2004; Choe et al., 2005; Sánchez-García et al., 2005; Peng et al., 2007).

Tab. 1: Přehled studií PEP v PGT

Autoři	Rok vydání	Název choroby/genu	Výsledky
Kristjansson <i>et al.</i>	1994	Gen dystrofinu a geny ZFX/ZFY	93% přesnost diagnostiky
Gibbons <i>et al.</i>	1995	Tay-Sachsova choroba	Účinnost amplifikace Tay-Sachsovy choroby 51 %
Sekizawa <i>et al.</i>	1996	DSD	Ve 14 z 15 vzorků byly detekovány geny dystrofinu
Watanabe <i>et al.</i>	1998	Nedostatek OTC	Prenatální diagnostika nedostatku OTC
Ao <i>et al.</i>	1998	Familiární adenomatózní polypóza	Bylo přeneseno nepostižené embryo; k těhotenství nedošlo
Chen <i>et al.</i>	2004	SRY gen	Diagnostika genu SRY (přesnost 90,77 %)
Liu <i>et al.</i>	2004	DSD	Diagnostikováno 8 plodů s rizikem DSD
Jiao <i>et al.</i>	2004	Beta-talasémie	Narození dvou zdravých chlapců
Sanchez-Garcia <i>et al.</i>	2005	Cystická fibróza	Zjištění 31 nejčastějších mutací cystické fibrózy
Chloe <i>et al.</i>	2005	Geny hemofilie A a amelogeninu	52% amplifikace DNA; přesnost stanovení pohlaví plodu 65 %

DSD – Duchenova svalová dystrofie

OTC – Ornithintranskarbamyldáza

SRY – Sex Determining Region Y (pohlaví určující oblast chromozmu Y)

2. Metody WGA nezaložené na PCR:

I. **Amplifikace násobným vytěsňováním řetězce** (Multiple Displacement Amplification, MDA)

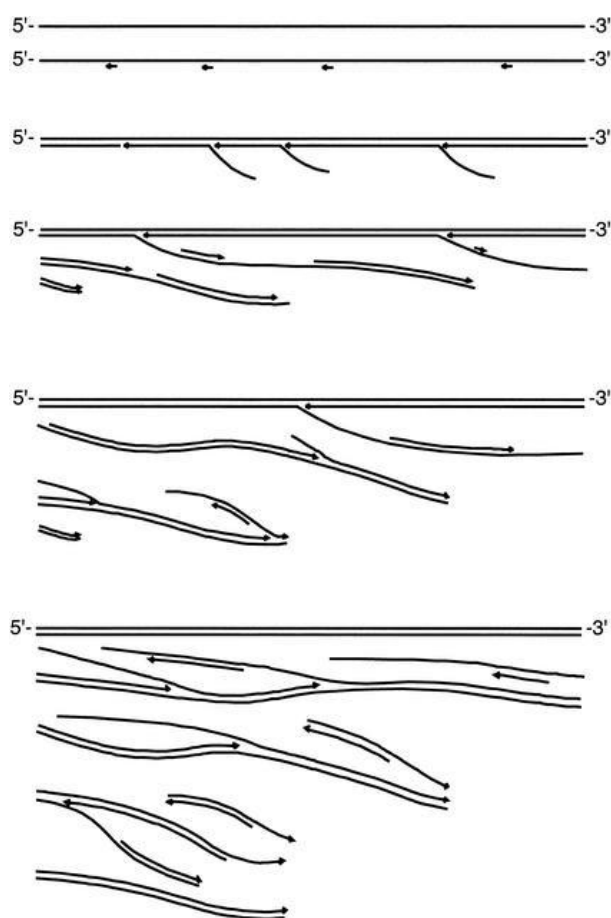
Metoda MDA (nebo také SDA – Strand Displacement Amplification) je jedna z nejvíce průlomových technik WGA a v dnešní době se jí věnuje mnoho pozornosti (Zheng et al., 2011). Poprvé metodu popsali v roce 2002 Dean *et al.* (2002) a byla určena k amplifikaci cirkulární DNA.

Principem MDA je náhodné nasedání hexamerů na jednovláknovou DNA, během prodlužování primerů polymerázou se řetězce DNA vytěsňují v protisměru, dochází k tzv. „hypervětvění“ a vytěsňovaná vlákna poté slouží jako nové templáty pro další reakce. Cílem je velké množství kopií cílové molekuly (z 1-10 kopií lidské genomové DNA lze získat až 20-30 μg DNA) (Hawkins et al., 2002; Lovmar and Syvänen, 2006). Z 5 ng výchozího materiálu je možné získat DNA v řádech μg , což je pro genomickou analýzu, kde je množství templátové DNA omezené, ideální (Hughes et al., 2005).

Pro katalýzu reakce se využívá buď $\phi 29$ DNA polymeráza, nebo *Bst* DNA polymeráza (Zheng et al., 2011). Spits (2006) udává, že $\phi 29$ DNA polymeráza je účinnější než *Bst* DNA polymeráza a reakce katalyzované touto polymerázou mají i nižší chybovost. Experimentálně byla určena chybovost $\phi 29$ DNA polymerázy na přibližně 3 chybné nukleotidy na 10^6 bazí (Nelson et al., 2002).

Produkty mají dostatečnou délku (>10 kb) (Dean et al., 2002), což je výhodné pro mnoho aplikací, jako např. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – polymorfismus délky restrikčních fragmentů) nebo sekvenování DNA (Zheng et al., 2011).

Produkty MDA se často podrobují další genomické analýze CGH nebo aCGH (viz kapitola 3.4) (Le Caignec et al., 2006).



Obr. 3: Schématické znázornění reakce MDA

(Lage et al., 2003)

3.4 aCGH – Komparativní genomová hybridizace na mikročipech

Molekulární cytogenetická metoda komparativní genomové hybridizace na mikročipech (Array Comparative Genomic Hybridization, aCGH) je založena na kvantitativní analýze a jejím cílem je srovnávání relativního množství testované DNA s množstvím kontrolní DNA zdravého jedince. DNA těchto dvou zdrojů je odlišně značena a hybridizována na mikročipech. Dokáže vyhodnotit chromozomální abnormality jako např. aneuploidie, nevyvážené translokace, delecce či duplikace, avšak nelze s její pomocí odlišit diploidii od haploidie nebo polyploidie (Munné, 2012; Jansen et al., 2015). Ploidie představuje počet homolog-

ních sad chromozomů v buňce. Při haploidním stavu existuje v buňce jedna sada chromozomů (lidské pohlavní buňky) a při diploidním dvě sady chromozomů (lidské somatické buňky). Polyploidie pak reprezentuje stav, ve kterém buňka obsahuje více než dvě sady homologních chromozomů. Triploidie představuje 3 sady chromozomů, tetraploidie 4 sady, hexaploidie 6 sad atd. Polyploidie je poměrně běžná u rostlin a objevuje se také u některých druhů zvířat, zejména pak u ryb či obojživelníků (Otto and Whitton, 2000).

Technika aCGH vznikla na základě vylepšení metody komparativní genomové hybridizace (Comparative Genomic Hybridization, CGH). Metoda CGH, která se využívá při identifikaci kvantitativních změn genomu, je založena na principu metody FISH. Jsou používány dva druhy DNA – testovaná DNA a výchozí (kontrolní) DNA, přičemž každá je značena dvěma odlišnými fluorochromy. Sondou je vždy DNA izolovaná z vyšetřované tkáně (De Paz et al., 2015).

3.4.1 Princip aCGH

Princip metody je založen na hybridizaci testované DNA v předem stanovených cílech (např. BAC, oligonukleotidové sondy, viz níže) a poté je nanášena na podložní sklíčko (Hillman et al., 2012). Testovaná DNA je opatřena amniocentézou (tj. odběr plodové vody), metodou CVS (tj. odběr choriové tkáně z trofoblastu embrya) nebo odběrem krve z plodu. Tato DNA je extrahována ze vzorku označeného fluorochromem, dále smíšena s výchozí DNA, která byla značena jiným fluorochromem, a nakonec jsou obě DNA hybridizovány na mikročipu na podložním sklíčku (Hillman et al., 2012).

Při aplikaci aCGH lze použít více druhů mikročipů (Hillman et al., 2012). Nejběžnější z nich jsou:

a) BAC aCGH – aCGH využívající mikročip založený na bakteriálním umělém chromozomu (Bacterial Artificial Chromosome, BAC). Mikročipy založené na BAC se často zaměřují na oblast genomu specifickou pro dané onemocnění nebo oblasti spojeny se syndromy mikrolece a duplikace.

b) Oligonukleotidová aCGH – aCGH využívající mikročip založený na oligonukleotidu. Používá se více než BAC aCGH z důvodů flexibilnějšího výběru sond.

c) SNP aCGH – aCGH využívající mikročip založený na jednonukleotidovém polymorfismu (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). Za pomoci tohoto druhu mikročipu lze detekovat dlouhé souvislé homozygotní úseky představující celochromozomovou uniparentální

disomii (Uniparental Disomy, UPD), což je stav, kdy potomek od jednoho rodiče získá dvě identické kopie jednoho chromozomu a žádný chromozom od druhého rodiče (Miller et al., 2010).

Metoda aCGH se v PGT upřednostňuje před metodou CGH pro její vyšší rozlišení, propustnost a rychlost detekce chromozomálních variací (Lu et al., 2016).

3.5 NGS – Sekvenování nové generace

Metoda sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing, NGS) je založena na sekvenování milionů fragmentů DNA probíhajícím současně, bez toho, aniž by byly sekvence dříve známy (Kamps et al., 2017). Tato technika poskytla obrovskou revoluci ve výzkumu genomiky. Lze díky ní sekvenovat celý lidský genom během pouhého jednoho dne (Behjati and Tarpey, 2013). Původně se využívala pouze pro výzkum celých genomů, avšak postupně bylo objeveno několik dalších přístupů ke studiu specifických oblastí genomu (Koboldt et al., 2013).

NGS je založeno na metodě Sangerovy dideoxysyntézy (Sanger and Coulson, 1989). Sangerova metoda, vyvinuta roku 1977, využívá dideoxynukleotidy ukončující řetězec, kterým chybí 3'-OH skupina. Není tedy vytvořena fosfodiesterová vazba DNA polymerázou, čímž se růst řetězce DNA ukončí. Do roku 2000, kdy metoda prošla pár úpravami a automatizací, byla považována za standardní techniku sekvenování. Sangerovo sekvenování se stále aplikuje tam, kde není potřeba vysoká propustnost a stále patří mezi základní metody mnoha laboratoří (Slatko et al., 2018).

Jak již bylo nastíněno, NGS spočívá v sekvenování milionů fragmentů DNA souběžně. Tyto fragmenty jsou získávány bioinformatickou analýzou, tedy mapováním jednotlivých čtení lidského genomu. Několikrát se sekvenuje každá ze tří miliard bazí, což má za následek poskytnutí přesných dat a bližšímu porozumění variace DNA. NGS se využívá k sekvenování jak celého genomu (celogenomové sekvenování), tak celého exomu – tedy 22 000 kódujících genů (exomové sekvenování), tak také i k sekvenování konkrétních oblastí genomu či jednotlivých genů (cílené sekvenování) (Behjati and Tarpey, 2013).

3.5.1 Druhy NGS

Metodu NGS lze rozdělit do dvou hlavních tříd (Kamps et al., 2017):

1. Sekvenování pomocí krátkého čtení

Tento druh sekvenování je popsán jako SBS (Sequencing By Synthesis, sekvenování syntézou), je levnější a jde o čtení <300 bp. Dodnes je častěji používaný než sekvenování pomocí dlouhého čtení (Kamps et al., 2017). Kamps (2017) také udává, že má tato metoda nižší chybovost, než sekvenování pomocí dlouhého čtení, avšak Slatko (2018) naopak při srovnání se Sangerovou metodou, která používá také dlouhé čtení, prohlašuje, že má SBS chybovost vyšší.

2. Sekvenování pomocí dlouhého čtení

Pomocí tohoto druhu sekvenování lze číst >2,5 kb až >10 kb, je nákladnější a není tak univerzální jako SBS. Má však i své výhody, a to že zlepšuje seřazení v bioinformatickém algoritmu. Je tedy vhodnější např. při detekci strukturních modifikací DNA a chromozomů, chromozomálních přesmyků nebo translokací (Kamps et al., 2017).

3.6 Karyomapování

Karyomapování je technika založená na screeningu embryí a sledování monogenických chorob před implantací. Tato metoda genetické analýzy byla tedy určena primárně pro PGT (Beyer et al., 2019). Metodu v roce 2010 poprvé popsali Handyside *et al.* (2010) a roku 2014 ji poprvé klinicky aplikovali Natesan *et al.* (2014), kterým se podařilo detekovat mutace u 213 z celkových 218 vzorků embryí z 44 cyklů preimplantační genetické diagnostiky (Pre-implantation Genetic Diagnosis, PGD), a to s 97,7% úspěšností.

Karyomapování zahrnuje hodnocení přibližně 300 000 SNP obou rodičů, dále tzv. reference (což může být postižené dítě daného páru nebo blízký příbuzný jakéhokoli z páru) a nakonec samotného embrya (Ben-Nagi et al., 2017; Beyer et al., 2019). Karyomapováním lze identifikovat chromozomální numerické aberace včetně trizomie meiotického původu a monozomie (Natesan et al., 2014), sledovat původ většiny forem aneuploidie a polohy rekombinací (Turner et al., 2019).

Principem této metody je analýza vazeb v celém genomu, ve kterých je rodičům a embryu genotypováno 300 000 SNP. Díky jedinečným „otiskům“ SNP jednotlivých chromozomálních oblastí lze sledovat dědičnost chromozomálních segmentů z jedné generace na

druhou. Poté jsou vzorky rodičů a referenční vzorek porovnávány a je detekována kombinace SNP alel spojených s chromozomem, který nese mutantní gen. Pak je tedy možné zabránit transferu embryí s tímto nežádoucím chromozomem (Giménez et al., 2015).

Velkou výhodou karyomappingu před ostatními metodami je, že je mnohem méně časově náročné (několik dní), jelikož není potřeba provést test specifický pro konkrétního pacienta (Giménez et al., 2015; Ben-Nagi et al., 2017).

Karyomapping je v dnešní době běžně používáno v andrologických laboratořích po celém světě, včetně České republiky, pro jeho dostupnost, spolehlivost, rychlost a úspěšnost. Umožňuje provést všechny typy PGT (PGT-M, PGT-SR a PGT-A) najednou (URL2).

Pozn: PGD je obdobný výraz pro PGT. V posledních pár letech se však upřednostňuje výraz PGT.

4 Technické aspekty provádění biopsie

Aby mohlo být provedeno PGT, je třeba získat určitou část embrya, která bude testování vystavena, a to tak, aby embryo nebylo nijak podstatně poškozeno a byla uchována jeho životaschopnost i reprodukční potenciál (Cimadomo et al., 2016).

Dnes se nejčastěji setkáváme se třemi způsoby biopsie embrya: biopsie blastomer, biopsie polárního tělíska a biopsie trofoektodermu.

4.1 Biopsie blastomer

Biopsie blastomer se provádí obvykle 3. den vývoje embrya ve fázi rýhování, a to s nejméně 6 blastomery. Zahrnuje porušení *zona pellucida* (ZP), rozrušení adheze buněk pro snadný odběr blastomer a samotný odběr jedné či dvou blastomer (Bar-El et al., 2016; Cimadomo et al., 2016). Odebrané blastomery jsou poté vystaveny analýze volné DNA, která odhaluje chorobné mutace a pomáhá identifikovat mateřské či otcovské zděděné alely (Bar-El et al., 2016). Po analýze a samotném PGT se pro přenos vybírají ta embrya, která byla diagnostikována bez mutací a mají nejvyšší implantační potenciál (Kalma et al., 2018).

4.1.1 Provedení biopsie blastomer

První krok biopsie – porušení ZP – se obvykle provádí třemi různými způsoby: chemicky, mechanicky nebo pomocí laseru.

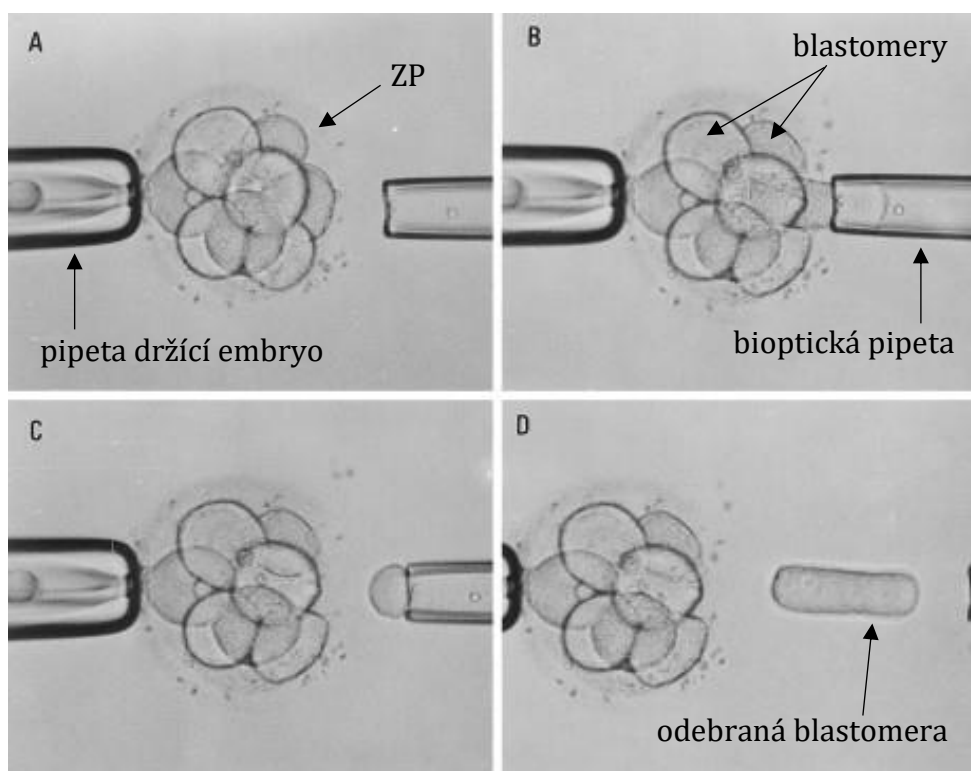
Chemické porušení ZP lze uskutečnit buď tzv. „Tyrodovým vrtáním“, a to pomocí kyselého Tyrodova roztoku, nebo použitím trávícího enzymu pronáza. Nevýhodou metody může často být škodlivý účinek chemické látky na embryo (Kim et al., 2012).

Mechanicky se porušení ZP provádí skleněnou mikroehlou. Tato metoda však vyžaduje vysokou úroveň zručnosti a nebývá proto upřednostňována (Kim et al., 2012).

Porušení ZP pomocí laseru je ze všech tří metod nejpresnější, nejméně časově náročné a není nárokována taková úroveň zručnosti jako u mechanické metody (De Vos and Van Steirteghem, 2001; Cimadomo et al., 2016). Dle sběru dat konsorcia ESHRE PGD XII z let 2009-2010 je v praxi tato metoda považována za nejčastěji používanou, a to až ze 75 % (Moutou et al., 2014), ačkoli je často omezující finanční náročnost (Han et al., 2003; Joris et al., 2003).

Už samotné porušení ZP má následky na další procesy vývoje embrya až po blastocystu. V několika studiích bylo prokázáno narušení vývoje blastocysty – vykazovaly zpožděný proces kompaktace, nesly ZP po delší dobu, než je tomu fyziologicky, výsledkem tedy byly menší blastocysty s tlustší ZP (Kirkegaard et al., 2012).

Dalším potenciálním problémem je mozaicismus – přítomnost různých karyotypů v buňkách embrya (Bielanska et al., 2002). Aby mohlo dojít k pravděpodobnější detekci mozaicismu, byl navržen odběr dvou blastomer, kterým však hrozí vyčerpání embryonální hmoty až o 25 %, což se odráží na klinických výsledcích (Cohen et al., 2007).



Obr. 4: Znázornění techniky biopsie blastomer

- A) V ZP je vytvořen otvor pro odběr blastomery B) Blastomera je nasávána bioptickou pipetou
C) Blastomera je vytažena ze ZP D) Blastomera je uvolněna z bioptické pipety
(upraveno dle Chen et al., 1998)

4.2 Biopsie polárního tělíska

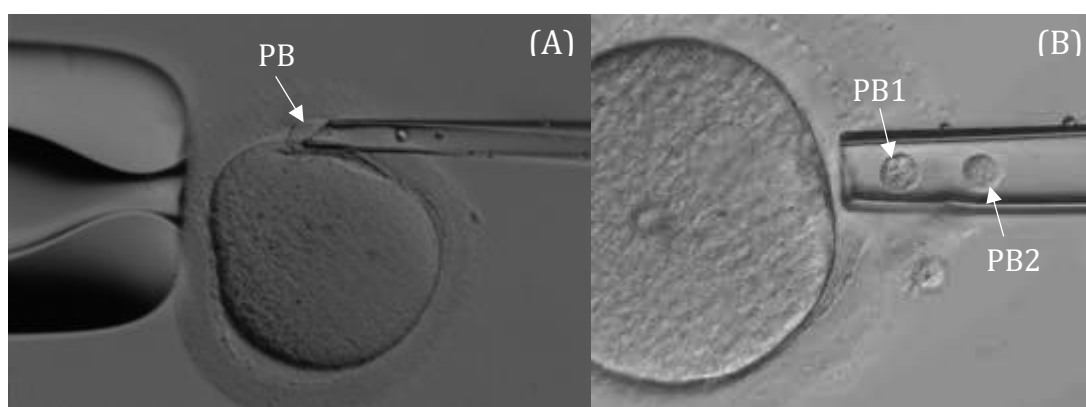
Biopsie polárního tělíska (Polar Body, PB) se dá považovat za nejméně invazivní druh biopsie proto, že získávaným materiálem je PB, které je pouze vedlejším produktem

meiózy oocyty a není dále potřebné pro oplodnění ani vývoj embrya (Montag et al., 2013). Aplikace tohoto druhu biopsie se však s časem snižuje zejména proto, že je publikováno čím dál více studií, které zdůrazňují technické, biologické a klinické nedostatky biopsie (Cimadomo et al., 2016). Nejzásadnějším problémem je, že nelze detekovat aneuploidie od otce (Capalbo et al., 2013), protože PB nese výhradně mateřskou genetickou informaci (Nicolaidis and Petersen, 1998). Každopádně v některých zemích, jako je např. Švýcarsko, Německo nebo Rakousko, je odběr PB jediným možným způsobem biopsie z důvodů právních omezení týkajících se etického přístupu (Schenk et al., 2018).

4.2.1 Provedení biopsie polárního tělíska

Provedení porušení ZP je shodné s postupem u biopsie blastomer (Cimadomo et al., 2016). Je možné odebrat pouze jedno, ale i obě PB obsažena v oocyty (PB1 a PB2). V případě odbírání obou PB lze provést biopsii současně nebo sekvenčně. Při současném odstranění se biopsie provádí mezi 6.-9. hodinou po inseminaci. Při sekvenčním odebrání je PB1 odstraněno již do 4 hodin po samotném odběru oocyty a PB2 po 6-9 nebo až 16-18 hodinách po inseminaci (Kokkali et al., 2020).

Bioptované oocyty lze vrátit do kultury nebo mohou být kryokonzervovány. V závislosti na zákonech ve státě, kde je biopsie prováděna, lze také realizovat rebiopsii, tedy provést biopsii podruhé na stejném oocyty (Kokkali et al., 2020).



Obr. 5: Znázornění techniky A) biopsie jednoho PB B) biopsie dvou PB
(A) upraveno dle Montag et al., 2009), (B) upraveno URL3)

4.3 Biopsie trofoektodermu z blastocysty

Biopsie TE je ze všech tří technik nejmladší. První zmínka o tomto typu biopsie se objevila v roce 2004 (de Boer et al., 2004) a roku 2005 se pomocí této metody narodilo první zdravé dítě (Kokkali et al., 2005). Biopsie TE se poté objevovala na klinikách čím dál častěji a v současné době dochází k postupnému nahrazování za biopsie blastomer a PB (Cimadomo et al., 2016).

Biopsie TE je neinvazivní vůči vnitřní buněčné hmotě embrya – embryoblastu (Inner Cell Mass, ICM), který je nezbytný pro jeho další vývoj. Cimadomo et al. (2016) udávají: *„Síla biopsie TE spočívá v její vyšší technické a biologické odolnosti. To znamená, jak nižší vliv procedurálních chyb, tak menší dopad mozaiky na molekulární analýzu.“* Nicméně Lu et al. (2020) ve své studii uvádí, že biopsie TE způsobila pokles hladiny hormonu chorionotropinu (b-hCG) produkovaného syncytiotrofoblastem placenty v těhotenství po 12 dnech po přenosu embrya. b-hCG je důležitý pro stimulaci růstu žlutého tělíska. Upozorňují tak na potenciální nepříznivé ovlivnění těhotenství způsobené biopsií TE.

4.3.1 Provedení biopsie trofoektodermu z blastocysty

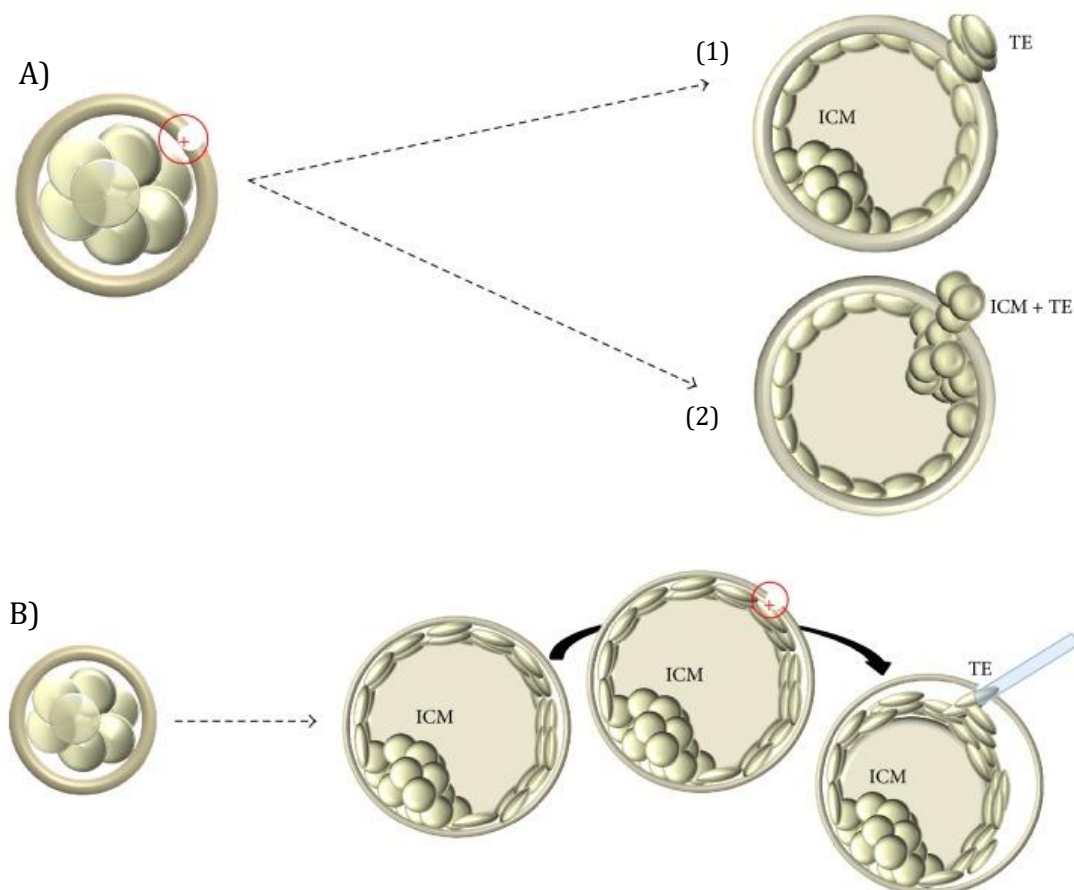
Z blastocysty se odebírá 5-10 buněk TE (obvykle 7-8) a to 5.-7. den po inseminaci, kdy je embryoblast zřetelně viditelný (Maggiulli et al., 2019; Kokkali et al., 2020). Odběr více buněk pro analýzu je výhodný zejména proto, že se tím zvyšuje pravděpodobnost pro odhalení mozaicismu (Griffin and Harton, 2020, p. 140).

Porušení ZP je nejčastěji prováděno pomocí laseru, a to třemi různými způsoby (Kokkali et al., 2020):

- Porušení ZP 3.-4. den po inseminaci a odebrání buněk TE 5.-7. den (ve fázi hatchující blastocysty). Při tomto postupu existuje riziko, že v místě porušení ZP se v budoucí blastocystě bude vyvíjet embryoblast. Lze to však vyřešit tak, že se blastocysta povytáhne ven, aby došlo ke zpřístupnění k buňkám TE, které jsou následně odebrány (Cimadomo et al., 2016).
- Porušení ZP v den vzniku blastocysty, poté navazuje kultivace, díky které se buňky TE od blastocysty oddělí a následně jsou odebrány. Tento způsob porušení ZP není příliš častý.

- Porušení ZP a odběr buněk TE probíhá současně (také 5.-7. den). Výhodou je, že místo porušení ZP si operátor může vybrat a tím existuje menší riziko narušení embryoblastu (Aoyama and Kato, 2020).

Pozn.: Pojem hatchující blastocysta (Hatching Blastocyst) vyjadřuje stav blastocysty uvolňované ze ZP. Protože je pojem "Hatching Blastocyst" široce užívaný, český překlad není zaveden a je ponecháván anglický termín.



Obr. 6: Schéma srovnání přístupů biopsie TE

- A) Porušení ZP ve fázi hatchující blastocysty a odběr buněk TE (1) z místa mimo embryoblast (2) v místě, kde se vyskytuje embryoblast B) Současné porušení ZP a odběr buněk TE (upraveno dle Cimadomo et al., 2016)

4.4 Alternativní metody biopsie

Protože u všech již zmíněných metod biopsie existují vždy nějaké nevýhody, dále jsou zkoumány další nové přístupy, jak biopsii embrya provádět, a to ideálně za těchto podmínek: biopsie by vůči embryu měla být co nejméně invazivní, čímž zabránila jakémukoli poškození embrya, technika by měla být časově, finančně a mechanicky přístupná.

Techniky by mohly potenciálně analyzovat i ta embrya, která byla předem pro analýzu vyřazena z důvodů nevyhovující morfologie, i když mohla být eventuálně vhodným materiálem. Tím pádem by existovalo více materiálu pro analýzu. Právě jeho nedostatek je totiž také často velmi omezující faktor pro PGT (Leaver and Wells, 2020; Cimadomo et al., 2016).

4.4.1 Blastocentéza

Tato technika je založena na odběru blastocelové tekutiny (obsažené v dutině blastocysty – blastocelu). Po porušení ZP se nasaje tekutina pomocí bioptické pipety, v dotčené blastocystě se blastocel opětovně vytvoří. DNA obsažená v tekutině je pak vystavena genetické analýze. Technika tedy není zcela neinvazivní, ale ztráta tekutiny by v budoucnu teoreticky neměla být pro embryo škodlivá (Leaver and Wells, 2020). Naopak např. u kryokonzervace je ztráta tekutiny v blastocystě žádoucí, protože tekutina může způsobovat tvorbu ledových krystalků a může buňky embrya během kryokonzervace fatálně poškodit (Mukaida et al., 2006). Je však nutné odběr tekutiny provádět na dostatečně expandovaných blastocystách, aby tekutiny pro analýzu byl dostatek (Palini et al., 2013).

U blastocentézy existuje riziko výskytu kontaminovaných vzorků blastocelové tekutiny neembryonální DNA (většinou mateřského původu), a tím tedy i riziko chybné analýzy. Tomu je možné předejít především ve fázi izolace a amplifikace DNA, ve které je nutné správně vzorek diagnostikovat a minimalizovat tím analýzu nesprávného materiálu (biologického odpadu) (Leaver and Wells, 2020).

4.4.2 Detekce volné DNA z použitého kultivačního média

V blastocelové tekutině se nachází tzv. volná DNA. K jejímu objevení v blastocelu došlo v roce 2013 (Palini et al., 2013), a v tentýž rok byla také detekována v použitém kul-

tivačním médiu (Spent Culture Medium, SCM) vyvíjejících se embryí v rámci *in vitro* fertilizace (*in vitro* Fertilisation, IVF) (Stigliani et al., 2013) – metody oplodnění oocyty v laboratorních podmínkách. Detekce volné DNA z SCM je potenciální neinvazivní metodou získání genetického materiálu pro PGT.

Brouillet et al. (2020) udávají, že výhodami tohoto přístupu je jednoduchá manipulace s embryi ve srovnání s blastocentézou, dále fakt, že SCM lze odebírat v jakékoli fázi vývoje embrya, a to i ve fázi rýhování s méně než 6 buňkami. Technika je proto vhodná i pro embrya, která by v případě invazivních technik biopsie byla vyřazena. Odběr volné DNA je velice slibnou alternativní metodou PGT do budoucna, avšak je ještě nutné zdokonalit detekci, amplifikaci DNA a její míru shody.

Je také důležité brát v potaz eventuální kontaminaci vzorku s volnou DNA prostřednictvím DNA z vnějšího prostředí – plastové pomůcky, média či znečištění důsledkem mechanické manipulace (Griffin and Harton, 2020, p. 144).

5 Typy preimplantačního genetického testování

5.1 Preimplantační genetické testování aneuploidií – PGT-A

PGT-A je typem preimplantačního genetického testování zaměřené na testování aneuploidií. Pomocí PGT-A je možné aneuploidii identifikovat, a tak předejít přenosu postiženého embrya a provést transfer euploidního embrya, tzn. takového, které má správný počet chromozomů – u člověka 23 párů (Homer, 2019).

5.1.1 Aneuploidie

Aneuploidie představuje jednu z nejčastějších příčin vývojových postižení člověka (MacLennan et al., 2015). Nejčastěji vzniká v oocytech v důsledku meiotických chyb (Homer, 2019). Patří mezi numerické chromozomové abnormality, při kterých dochází ke ztrátě či nadbytku jednoho chromozomu v buňce. V případě nadbytku chromozomu jde o tzv. trizomii a v případě ztráty chromozomu o tzv. monozomii. U aneuploidních embryí, u kterých dochází k autozomální monozomii, tedy ke ztrátě autozomu (somatického chromozomu), se vyvinou kritické abnormality, a tak většinou zaniknou dříve, než je těhotenství klinicky potvrzeno (MacLennan et al., 2015). Pokud už lze těhotenství klinicky pozorovat, k monozomii již nedochází, tedy monozomie není slučitelná s vývojem člověka (s výjimkou monozomie pohlavního chromozomu X). Aneuploidie (konkrétně tedy trizomie) je příčinou až jedné třetiny všech lidských potratů (Kojima and Cimini, 2019; MacLennan et al., 2015).

Pravděpodobnost výskytu aneuploidie se s věkem potenciálních matek zvyšuje. U žen, kterým se blíží konec jejich reprodukčního období, může výskyt aneuploidie překročit až 50 %. U žen v průměrném reprodukčním věku je pak pravděpodobnost výskytu aneuploidie 10 % (Nagaoka et al., 2012).

S aneuploidií se setkáváme mnohem častěji u oocytů než u spermií. U spermií je udáván výskyt aneuploidie v abnormálních embryích kolem 3-5 % (Sarrate et al., 2010; García-Mengual et al., 2019).

Mezi nejznámější lidské choroby zapříčiněné aneuploidií patří (Pritchard and Korf, 2007):

- Downův syndrom (trizomie 21. chromozomu)
- Patauův syndrom (trizomie 13. chromozomu)

- Turnerův syndrom (monozomie chromozomu X)
- Edwardsův syndrom (trizomie 18. chromozomu)
- Klinefelterův syndrom (nadbytečný chromozom X u muže)
- Syndrom 47,XXX (trizomie chromozomu X; syndrom tří X; „superfemale“ syndrom)
- Syndrom 47,XYY („supermale“ syndrom)

5.1.2 Provedení PGT-A

PGT-A je doporučována pacientům, kteří opakovaně prodělávají potraty, kterým se opakovaně nedaří úspěšně otěhotnět pomocí metody IVF, ženám v pokročilém věku, dále těm pacientům, u kterých se ve spermioqramu objevují patologické formy spermií nebo kteří prodělali chemoterapii (Brezina and Kutteh, 2015). V některých IVF centrech se PGT-A používá rutinně pro všechny pacienty (Chen et al., 2020).

Postup při PGT-A je takový, že se nejprve provede biopsie, a to buď dvou polárních tělísek, nebo 1-2 blastomer rýhujícího se embrya, nebo 5-10 buněk TE ve stádiu blastocysty. Nejčastěji se pro PGT-A využívá biopsie trofoektodermu a to přibližně v 90 % (Homer, 2019; Fragouli et al., 2017). Scott *et al.* (2013) a Treff s Zimmermanem (2017) udávají, že je blastocystová biopsie je nejlepší možnou technikou biopsie pro PGT-A, protože při ní nedochází k tak velkému úbytku buněčné hmoty, než u biopsie blastomery.

Dalším krokem je pak komplexní screening chromozomů (Comprehensive Chromosome Screening, CCS), a to nejčastěji pomocí metod aCGH, WGA a NGS (Goldman et al., 2018; Homer, 2019; Viotti, 2020).

5.2 Preimplantační genetické testování strukturních aberací – PGT-SR

5.2.1 Strukturní chromozomové aberace

Na rozdíl od aneuploidie, která se týká celých chromozomů, strukturní chromozomové aberace (SCHA) vznikají v rámci úseku pouze jednoho chromozomu. Jsou způsobeny chybami reparačních mechanismů vedoucích ke zlomům chromozomu.

Podle toho, zda po strukturní přestavbě došlo ke zjevné ztrátě či nadbytku genetického materiálu, můžeme SCHA rozdělit na balancované a nebalancované (Griffin and Harton, 2020, pp. 50-52).

1. Balancované strukturní chromozomové aberace

Genetický materiál je kvantitativně zachován, obvykle není nijak ovlivněn fenotyp. Může však dojít k přenesení aberace na potomka, u kterého se projeví nebalancovaná forma (Pritchard and Korf, 2007). U jedinců s balancovanou formou SCHA také existuje riziko neplodnosti, potratů a mentálních či tělesných postižení novorozenců (De Braekeleer and Dao, 1990). Tato rizika jsou ovlivněna kromě typu aberace také tím, který chromozom je zasažen, jeho bodem zlomu, rodinnou genetickou historií, věkem matky, stavem pohlavních buněk aj. (Shah et al., 2003).

Do balancovaných SCHA patří např. (Nussbaum et al., 2004; Pritchard and Korf, 2007):

- Inverze – tvoří dva zlomy na jednom chromozomu, segment mezi zlomy je převrácen a spojen s opačnými stranami zlomů; rozděluje inverzi paracentrickou (úsek mimo centromeru) a pericentrickou (úsek včetně centromery)
- Translokace – výměna chromozomových segmentů mezi dvěma nebo více nehomologními chromozomy
- Inzerce – vložení segmentu jednoho chromozomu do druhého

2. Nebalancované strukturní chromozomové aberace

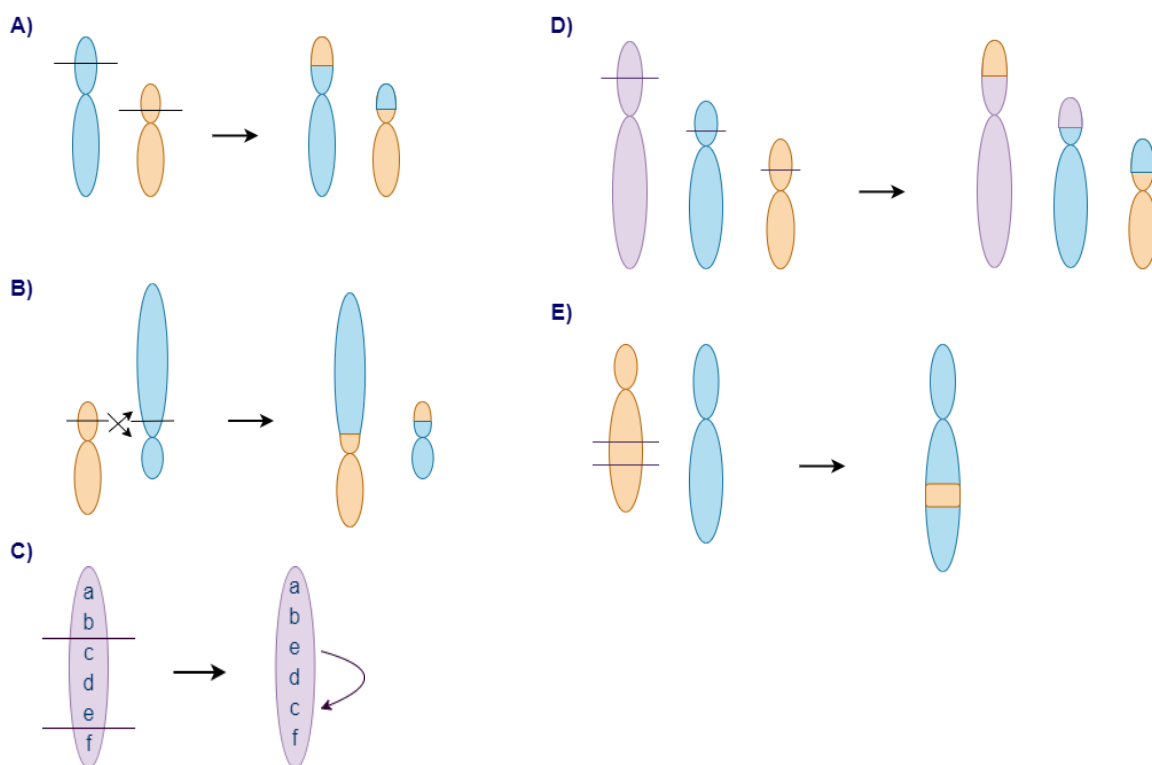
Proběhla ztráta či zisk genetického materiálu a dochází tak i k fenotypovým projevům. Do nebalancovaných SCHA patří např. (Pritchard and Korf, 2007):

- Delece – ztráta části chromozomu
- Duplikace – zdvojení části chromozomu

- Izochromozom – chromozom, který má jedno raménko chybějící („deletované“) a jedno duplikované následkem chybných mitotických dělení centromery chromozomu
- Dicentrický chromozom – zlom ve dvou chromozomech a následné spojení chromozomů v částech zlomů, což má za následek vznik chromozomu se dvěma centromerami

PGT-SR se setkává s reciprokými translokacemi, Robertsonskými translokacemi, inzerčními translokacemi, komplexními chromozomálními aberacemi, delecemi a inverzemi (Fesahat et al., 2020; Griffin and Harton, 2020, pp. 50-56; Coonen et al., 2020).

- Reciproká translokace: nejčastější typ translokace, dochází k výměně segmentů mezi dvěma nehomologními chromozomy.
- Robertsonská translokace: dochází při ní ke spojení dvou dlouhých ramen akrocentrických chromozomů svými konci a tím také ke ztrátě jejich krátkých ramen. Karyotyp postiženého člověka pak odpovídá 45 chromozomům (Griffin and Harton, 2020, p. 54). U člověka Robertsonská translokace nastává vždy u pěti párů chromozomů (13, 14, 15, 21 a 22) (Wiland et al., 2020) a to nejčastěji v kombinacích rob (13; 14) (cca 73-85 %) a rob (14; 21) (cca 10 %) (Therman et al., 1989).
- Inzerční translokace (IT): vzniká inzercí segmentu chromozomu do nehomologního chromozomu (interchromozomální IT) nebo do jiné části téhož chromozomu (intra-chromozomální IT) (Griffin and Harton, 2020, p. 56). Vyžadují vždy minimálně tři body zlomu v postiženém chromozomu (Luo et al., 2018).
- Komplexní chromozomální aberace: nastává v buď 1) v případě dvou na sobě nezávislých přeskupení segmentů v rámci jednoho chromozomu (dvojitá translokace), nebo 2) v případě výměny jednoho segmentu tří chromozomů mezi sebou (třicestná translokace) a nebo 3) v případě přeskupení více segmentů mezi více než třemi chromozomy (Griffin and Harton, 2020, p. 56; Eisfeldt et al., 2019; Scriven et al., 2014).



Obr. 7: Typy balancovaných strukturních chromozomových aberací

A) Reciproká translokace B) Robertsonská translokace C) Paracentrická inverze q ramen D) Komplexní chromozomální aberace třech chromozomů E) Interchromozomální inzerční translokace
(modifikováno dle Griffin and Harton, 2020, p. 51)

5.2.2 Provedení PGT-SR

PGT-SR se v klinické praxi využívá ke zvýšení úspěšnosti při IVF a snížení rizika potratu a vrozených vad. Doposud bylo pro PGT-SR využito několik metod genetických analýz spojených s různými strategiemi provádění biopsie a získávání klinických vzorků (Griffin and Harton, 2020, p. 57). V dnešní době k provádění PGT-SR převažují CGH, aCGH, Karyomapování, NGS a FISH (Chow et al., 2020; Griffin and Harton, 2020, p. 57-63).

5.3 Preimplantační genetické testování monogenních chorob – PGT-M

5.3.1 Monogenní choroby

Monogenní choroby nebo také monogenně dědičné choroby jsou onemocnění, která jsou zapříčiněná poškozením jednoho konkrétního genu, přičemž okolní prostředí je ovlivňuje minimálním způsobem. Původ choroby může být různý. Často je onemocnění způsobeno nedostatkem enzymu katalyzující konkrétní metabolickou dráhu, pak dochází k metabolickým chorobám. Jindy může jít o poruchu syntézy určité strukturní složky buňky (membránové kanálky, membránové receptory) nebo syntézy strukturního proteinu (Cerrato et al., 2020; Pritchard and Korf, 2007).

Podle typu dědičnosti monogenní choroby dělíme na:

- Autozomálně recesivní: fenyلكetonurie, galaktosemie, cystická fibróza, leprechaunismus, srpkovitá anémie, α/β -thalasemie, Friedreichova ataxie aj.
- Autozomálně dominantní: familiární hypercholesterolemie, Huntingtnova chorea, syn/poly/brachy/arachno -daktylie, Marfanův syndrom, neurofibromatóza, dědičné formy rakoviny prsu a vaječníků aj.
- X-vázané: hemofilie, daltonismus, svalová dystrofie, syndrom fragilního X chromozomu aj.
- Mitochondriální: jde o mimojadernou maternální dědičnost přenášenou mitochondriální DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA), patří sem poruchy oxidativní fosforylace negativně ovlivňující procesy buněčného dýchání (Craven et al., 2017).

5.3.2 Provedení PGT-M

V dnešní době se PGT-M nejčastěji setkává s cystickou fibrózou, svalovou dystrofií, neurofibromatózou, Huntingtnovou choreou, dědičnými rakovinami prsu a vaječníků, hemofilií a syndromem fragilního X chromozomu (Griffin and Harton, 2020, p. 78). V počátcích bylo PGT-M aplikováno zejména k eliminaci embryí s těžkými smrtelnými poruchami. Avšak dnes proto, že technologie se vylepšují a finanční náklady na ně se snižují, se PGT-M rozšířilo na aplikace pro mírnější a méně riziková onemocnění (Mounts and Besser, 2019).

Mezi nejčastější metody PGT-M patří PCR, WGA, aCGH, NGS, karyomapování a také jeho kombinace s PGT-A (Simón and Rubio, 2018, pp. 96-98; Griffin and Harton, 2020, pp. 79-85).

5.4 Shoda v HLA

Pro PGT je důležitá shoda v HLA, která se využívá při transplantacích kostní dřeně či krve. HLA, přítomné na většině lidských buněk, jedinec zdědí z 50 % po matce a z 50 % po otci. Je tedy 25% šance shody v HLA se sourozencem. V případě této shody bude pak úspěšnost transplantace pravděpodobnější.

Cílem shody v HLA je stanovení embrya, které má kompatibilní HLA se sourozencem a jejich transplantace z hematopoetických kmenových buněk z pupečnickové krve nebo z kostní dřeně dárce postiženému sourozcenci (Kakourou et al., 2017, 2018).

Shoda v HLA při PGT přichází v úvahu až po vyčerpání všech ostatních klinických možností (např. pokud nebyl nalezen vhodný dárce z příbuzných ani jiný nepříbuzný z registru dárců) (Griffin and Harton, 2020, p. 78). Výše zmíněná 25% úspěšnost v případě PGT-M není exaktní. Aby bylo získáno embryo jak zdravé, tak i shodné v HLA, podmínky jsou striktnější. U autozomálně recesivních chorob se úspěšnost pohybuje kolem 19 % a u autozomálně dominantních a X-vázaných chorob až kolem 13 %. Dalším limitujícím faktorem je samozřejmě i pokročilý věk matky, který pravděpodobnost úspěšnosti také rapidně snižuje (Simón and Rubio, 2018, pp. 95-96; Griffin and Harton, 2020, p. 78).

Mimo jiné také Kahraman et al. (2014) zdůrazňují, že kmenových buněk pupečnickové krve je často velký nedostatek a k tomu, aby bylo dítě schopno darovat kmenové buňky kostní dřeně, je nutný čas navíc pro získání dostatečné váhy dítěte. Tyto faktory komplikují a oddalují potenciální léčbu, což v případě akutních chorob není vyhovující. Proto je shoda v HLA u PGT vhodná zejména v nenaléhavých případech (Griffin and Harton, 2020, p. 78).

6 Mozaicismus

Mozaicismus je stav, kdy existují dvě a více genotypově odlišné buněčné linie, a to buď v celém organismu, embryu či konkrétní buněčné linii (Griffin and Harton, 2020, p. 111; Moog et al., 2020). V lidských preimplantačních embryích byl mozaicismus poprvé objeven v roce 1993 (Delhanty et al., 1993) pomocí metody FISH. Bylo zjištěno, že v některých buňkách embrya existoval odlišný počet chromozomů.

Příčinou mozaicismu jsou modifikace v sekvenci DNA nebo v počtu kopií DNA vedoucí ke změnám v genové expresi a/nebo změně funkce proteinu. Tyto změny jsou dědičné nebo mohou vzniknout během meiotického dělení zárodečných buněk embrya nebo po oplození během mitotického dělení (Spinner and Conlin, 2014; Popovic et al., 2020). Mozaicismus se obvykle objevuje u prenatálních vzorků (získaných amniocentézou nebo CVS) v méně než 2 %, avšak u hatchujících blastocyst se nalézá až u 73 % (van Echten-Arends et al., 2011). Nález mozaicismu ve fázi blastocysty je však mezi různými experimentálními studiemi procentuálně velmi proměnlivý, Marin et al (2017) udávají obvykle přítomnost mozaicismu u 3,3-83 %.

6.1 Vznik a třídy mozaicismu

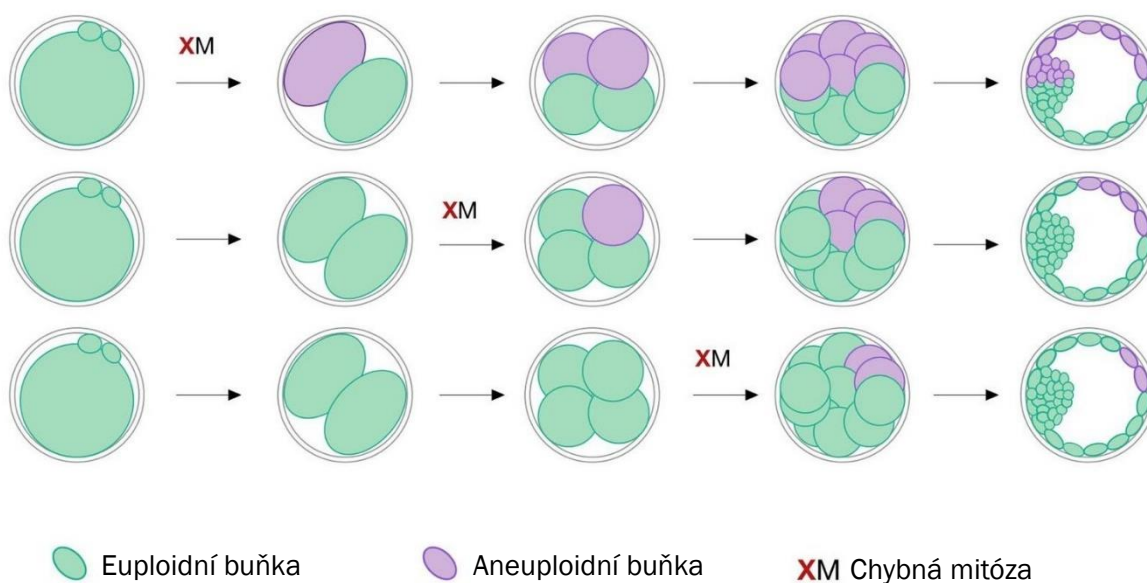
Mozaicismus embryí můžeme podle odlišných chromozomálních charakteristik rozdělit do čtyř tříd (McCoy, 2017; Griffin and Harton, 2020, p. 112):

1. Aneuploidní-aneuploidní typ: Vychází z aneuploidní zygoty, u které dochází k chybnému mitotickému dělení a nondisjunkci chromatid, což má za následek vznik buněčných linií nesoucích různé chromozomální abnormality. Všechny buněčné linie nesou tyto chromozomální vady – v embryu neexistují žádné euploidní ani diploidní buňky.
2. Euploidní-aneuploidní typ: Vychází buď z euploidní zygoty, která podstoupila mitotické dělení včetně nondisjunkce chromatid, což způsobilo vznik jedné či více vadných chromozomálních sad. Nebo se tento typ mozaicismu vytváří u chromozomálně abnormální zygoty – během mitózy, kterou se opraví původní aneuploidie, dochází k vyrovnávání chromozomových kopií a tvorbě euploidní buněčné linie. V tomto případě se může objevit také UPD.

3. Ploidový typ: Způsobuje přítomnost buněčných linií s různými úrovněmi ploidie v rámci jednoho embrya, a to sice diploidní a tetraploidní. Euploidní zygota neprojde správně cytokinetickým dělením, dojde k endoreplikaci, buňky se od sebe neoddělí a vytvoří se diploidní nebo tetraploidní stav.
4. Chaotický typ: Dochází k několikanásobným chybným mitotickým dělením a vzniká až několik různých abnormálních buněčných linií.

6.2 Výskyt mozaicismu a jeho dopad na embryo

Na základě toho, kdy dojde v průběhu vývoje embrya k chybné mitóze, lze předpokládat míru mozaicismu daného embrya. Čím dříve k chybné mitóze dojde, tím více buněk v embryu bude ovlivněno mozaicismem. Tím pádem také platí, že čím méně buněk, které podlehnou chybné mitóze, je v embryu přítomných, tím existuje větší pravděpodobnost postihnoutí mozaicismem jak embryoblast, tak trofoblast v blastocystě (viz obr. 8) (Capalbo et al., 2017).



Obr. 8: Zobrazení míry výskytu mozaicismu na základě času přítomnosti chybné mitózy
(modifikováno dle Griffin and Harton, 2020, p. 113)

Buňky blastocysty jsou pluripotentní, tedy dokážou se diferencovat na všechny buněčné linie (s výjimkou trofoblastu). V průběhu dělení embrya buňky vstupují do nevratného procesu diferenciaci (Nakai-Futatsugi and Niwa, 2015). Pokud se chybná mitóza projeví v okamžiku, kdy už určité buňky vstoupily do tohoto procesu diferenciaci v konkrétní buněčnou linii, pouze tato buněčná linie bude postihnuta mozaicismem.

Defekty mozaicismu jsou velmi rozmanité a závisí na typu mutace, počtu buněk s mutací a distribuci tkáně dané genetické změny (Spinner and Conlin, 2014). Z embrya obsahující mozaicismus se může vyvinout zcela zdravé dítě (pravděpodobně s malou mírou mozaicismu; chybná mitóza proběhla v pozdějších stádiích vývoje), stejně tak však mozaicismus může způsobit fatální následky na zdraví jedince (Marin et al., 2017). Mezi časté poruchy způsobené mozaicismem patří (Moog et al., 2020):

- Asymetrické poruchy růstu (např. v obličejové oblasti)
- Ohniskové malformace mozku
- Malformace cév
- Mozaikové RASopatie způsobující kardiovaskulární anomálie, nízký vzrůst, dysmorfismus či abnormality kůže, v některých případech může existovat i predispozice k rakovině (Zenker and Kutsche, 2016)















6.3 Detekce mozaicismu

Jak již bylo řečeno, poprvé byl mozaicismus detekován metodou FISH Delhantym et al. (1993). S rozvojem metod aCGH či NGS sledujících všech 46 chromozomů se dosáhlo vyšší diagnostické citlivosti, a tak přesnosti rozlišovat variace chromozomů (Vera-Rodriguez and Rubio, 2017; Griffin and Harton, 2020, p. 114).

Je zřejmé, že pro co nejpřesnější detekci mozaicismu je třeba získat co nejvyšší počet buněk pro analýzu. Biopsie TE, kdy je z blastocysty zpravidla odebíráno 5-10 buněk, je tedy v rámci nynějších možností nejideálnějším způsobem odběru vzorku pro detekci (Novik et al., 2014).

V blastocystě můžeme rozlišit 4 typy mozaicismu (viz obr. 9) (Esfandiari et al., 2016; Vera-Rodriguez and Rubio, 2017; Griffin and Harton, 2020, p. 114): 1) úplný mozaicismus se nachází u blastocysty, která obsahuje euploidní i aneuploidní buňky jak v embryoblastu – vnitřní buněčné hmotě, tak v trofoektodermu (k chybné mitóze došlo ve vývoji velmi brzy).

2) ICM mozaicismus a 3) TE mozaicismus nastává, pokud chybná mitóza proběhla u již diferencované buňky a její následné dělení způsobí výskyt mozaicismu pouze v určitých částech dané buněčné linie – ICM nebo TE. 4) ICM/TE mozaicismus typu I a typu II se vyskytuje v případě, že chybná mitóza postihla pluripotentní buňky diferencující se do určité buněčné linie. Celá tato linie bude pak mozaicismem zasáhnuta – buď ICM (typ I) nebo TE (typ II).

Typ mozaicismu	Možnosti vzorků z TE biopsie	Druh diagnózy
Úplný mozaicismus 	 Euploidní	Chybná diagnóza
	 Mozaický	Správná diagnóza
	 Aneuploidní	Chybná diagnóza
ICM mozaicismus 	 Euploidní	Chybná diagnóza (mozaicismus nelze detekovat)
TE mozaicismus 	 Euploidní	Chybná diagnóza
	 Mozaický	Správná diagnóza
	 Aneuploidní	Chybná diagnóza
ICM/TE mozaicismus typ I 	 Euploidní	Chybná diagnóza (mozaicismus nelze detekovat)
ICM/TE mozaicismus typ II 	 Aneuploidní	Chybná diagnóza (mozaicismus nelze detekovat)

Obr. 9: Znázornění typů mozaicismu, možností odebraných vzorků TE biopsií a druhu diagnózy daného vzorku
(upraveno dle Vera-Rodriguez and Rubio, 2017)

Obr. 9 znázorňuje, jaké možné diagnózy mohou u různých případů mozaicismu nastat. V případě diagnózy vzorků s typem mozaicismu ICM, ICM/TE typu I a ICM/TE typu II je vždy diagnóza nepravdivá, protože vzorek odebraný z TE nereprezentuje pravdivý stav blastocysty. V případě TE mozaicismu a úplného mozaicismu může být diagnóza různá. Pokud se ve vzorku nachází pouze euploidní buňky nebo pouze aneuploidní buňky, pak je diagnóza chybná, protože vzorek opět neodpovídá reálnému stavu blastocysty. Jedině v případě, že se podaří odebrat buňky euploidního i aneuploidního charakteru, je diagnóza pravdivá a mozaicismus se podařilo detekovat.

Je patrné, že v převážné většině je pravděpodobnější chybná diagnóza, což je bohužel překážka pro výběr bezvadných embryí pro PGT a následně pro jejich transfer. Navíc u těchto chybných diagnóz, kdy jsou v odebraném vzorku (z 5-10 buněk) přítomny pouze aneuploidní nebo s velkou převahou aneuploidní buňky, je embryo automaticky zavrhnuto k dalšímu testování s předpokladem, že aneuploidní buňky v blastocystě naprosto převažují, i když mohlo embryo reálně být složeno z většiny euploidních buněk a mohlo teoreticky podstoupit další testování. Naopak u zdánlivě ideálního embrya, kdy z blastocysty byl odebrán vzorek s pouze euploidními či převážně euploidními buňkami, ale reálně existuje v embryu převážně stav aneuploidní, je embryo vystaveno „zbytečně“ dalšímu testování, i když je naprosto nevyhovující pro budoucí transfer (Esfandiari et al., 2016; Marin et al., 2017; Griffin and Harton, 2020, p. 115).

7 Indikace k provedení preimplantačního genetického testování

Aby preimplantační genetické testování mohli pacienti podstoupit, je nutná existence specifických indikací. V jednotlivých státech se tyto indikace vzhledem ke zdejšímu legislativním nařízením podstatně liší.

Mezi hlavní indikace k PGT obecně nejčastěji patří pokročilý věk matky, opakovaná selhání implantací, opakované potraty a monogenní choroby. Dále sem může patřit také mužský faktor způsobující neplodnost, výskyt strukturních chromozomových aberací, výskyt embryí s chromozomální mozaikou, abnormální karyotyp pacienta, testování darovaných oocytů, transfer jednoho embrya, předchozí geneticky abnormální těhotenství, léčba radioterapií v minulosti a v některých státech i určení pohlaví dítěte. (Goossens et al., 2008; Harper et al., 2008; Kuliev and Rechitsky, 2017; Patrizio et al., 2019; Coonen et al., 2020; De Rycke and Berckmoes, 2020).

7.1 Indikace k PGT-A

Pokročilý věk matky je jedna z nejčastějších indikací k PGT. Za pokročilý je většinou považován věk nad 37-38 let (Harper et al., 2008). Nejnovější sběr dat z 59-60 mezinárodních center pro PGT konsorcia ESHRE z let 2013-2015 (Coonen et al., 2020) udává, že z indikací k PGT-A (z celkových 5020 cyklů PGT-A roku 2013, 6278 cyklů roku 2014 a 7155 cyklů roku 2015) pokročilý věk matky silně převažuje, a to až ze 44 % roku 2013, 47 % roku 2014 a z 51 % roku 2015. Lze tedy konstatovat, že tato indikace je stále častější i vzhledem k tomu, že v dnešní době mnohdy páry zakládají rodinu v pozdějším věku. Na druhé příčce je pokročilý věk matky v kombinaci s opakovanými potraty či s opakovaným selháním implantací (kolem 9-10 %), dále samotné opakované potraty (cca 6 %), opakované selhání implantace (cca 6 %), mužský faktor způsobující neplodnost (cca 6 %), předchozí geneticky abnormální těhotenství (kolem 2 %) a abnormální karyotyp pacienta (1-2 %) (Coonen et al., 2020).

7.2 Indikace k PGT-M

Co se týče indikací preimplantačního genetického testování monogenních chorob, testování je zpravidla nabízeno v případě teoreticky všech monogenních poruch, u kterých byly jasně identifikovány dané oblasti (lokusy) na chromozomu způsobující onemocnění, a to jak v případě jaderných lokusů (X-vázané, autozomálně dominantní či recesivní), tak mitochondriálních lokusů zděděných po matce (Richards et al., 2015). Mezi nejčastější indikace pro PGT-M patří choroby jako cystická fibróza, dědičné hemoglobinopatie (srpkovitá anémie, α/β -thalasemie), myotonická dystrofie typu I, neurofibromatóza, Huntingtnova choroba, onkologické syndromy (autozomálně dominantní dědičnost), Duchennova svalová dystrofie, hemofilie či syndrom fragilního X chromozomu (De Rycke and Berckmoes, 2020; Goossens et al., 2008). Co se týče např. shody v HLA, je považována spíše za ojedinělý faktor indikace k testování, protože se nejedná přímo o patologický stav (De Rycke and Berckmoes, 2020). Shoda v HLA se často kombinuje s určitou monogenní poruchou, nejčastěji s hemoglobinopatií či imunodeficiencí (Kakourou et al., 2018).

Sběr dat konsorcia ESHRE (Coonen et al., 2020) udává jako nejčastější indikace k PGT-M (z celkem 2026 cyklů PGT-M roku 2013, 2243 cyklů roku 2014 a 2661 cyklů roku 2015) autozomálně dominantní choroby (cca 50 %), dále autozomálně recesivní (cca 26 %), X-vázané (15 %), shodu v HLA (cca 13 %) a shodu v HLA v kombinaci s monogenní chorobou (cca 4 %).

7.3 Indikace k PGT-SR

Indikace k PGT zahrnující strukturní chromozomové aberace jsou ve srovnání s PGT-A a PGT-M nejméně časté. Sběr dat z konsorcia ESHRE (Coonen et al., 2020) zahrnoval 1039 cyklů PGT-SR roku 2013, 1189 cyklů roku 2014 a 1231 cyklů roku 2015. Z toho nejčastějšími indikacemi byly reciproké translokace (cca z 32 % přenašeči a cca z 29 % přenašečkami), dále Robertsonské translokace (z cca 16 % přenašeči a cca z 9 % přenašečkami), inverze (cca 6 %) a delece (cca 3 %).

8 Závěr

Jak je již řečeno v úvodu, reprodukční zdraví v lidské populaci podléhá, z dosud ne zcela jasných příčin, postupnému zhoršování, které se projevuje rostoucí mírou neplodnosti. Poslední třetina 20. století otevřela nové možnosti pro řešení tohoto vážného medicínského problému uvedením postupů *in vitro* fertilizace. Následujících pět dekad výzkumu a vývoje pak tyto postupy dovedly do stavu, kdy využívají kombinace sofistikovaných nástrojů buněčné a molekulární biologie s pokročilou instrumentací. Lze očekávat, že současné postupy preimplantačního genetického testování budou dále vyvíjeny a umožní, mimo jiné, preciznější a méně invazivní testování genetických a epigenetických parametrů embryí, včetně uvedení do kontextu s vývojovou kapacitou embrya a impaktu na celoživotní zdraví jedince.

Použité literární zdroje

Ao, A., D. Wells, A. H. Handyside, R. M. L. Winston, and J. D. A. Delhanty, 1998, Preimplantation Genetic Diagnosis of Inherited Cancer: Familial Adenomatous Polyposis Coli: *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 15, no. 3, p. 140–144, doi:10.1023/A:1023008921386.

Aoyama, N., and K. Kato, 2020, Trophoctoderm biopsy for preimplantation genetic test and technical tips: A review: *Reproductive Medicine and Biology*, v. 19, no. 3, p. 222–231, doi:10.1002/rmb2.12318.

Bar-El, L. et al., 2016, Blastomere biopsy for PGD delays embryo compaction and blastulation: a time-lapse microscopic analysis: *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 33, no. 11, p. 1449–1457, doi:10.1007/s10815-016-0813-2.

Behjati, S., and P. S. Tarpey, 2013, What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, v. 98, no. 6, p. 236–238, doi:10.1136/archdischild-2013-304340.

Ben-Nagi, J., D. Wells, K. Doye, K. Loutradi, H. Exeter, E. Drew, S. Alfarawati, R. Naja, and P. Serhal, 2017, Karyomapping: a single centre's experience from application of methodology to ongoing pregnancy and live-birth rates: *Reproductive BioMedicine Online*, v. 35, no. 3, p. 264–271, doi:10.1016/j.rbmo.2017.06.004.

Beyer, C. E., A. Lewis, E. Willats, and J. Mullen, 2019, Preimplantation genetic testing using Karyomapping for a paternally inherited reciprocal translocation: a case study: *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 36, no. 5, p. 951–963, doi:10.1007/s10815-019-01413-0.

Bielanska, M., S. L. Tan, and A. Ao, 2002, Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome: *Human Reproduction (Oxford, England)*, v. 17, no. 2, p. 413–419, doi:10.1093/humrep/17.2.413.

de Boer, K. A., J. W. Catt, R. P. S. Jansen, D. Leigh, and S. McArthur, 2004, Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF: *Fertility and Sterility*, v. 82, no. 2, p. 295–298, doi:10.1016/j.fertnstert.2003.11.064.

Borgström, E., M. Paterlini, J. E. Mold, J. Frisen, and J. Lundeberg, 2017, Comparison of whole genome amplification techniques for human single cell exome sequencing: *PLoS ONE*, v. 12, no. 2, doi:10.1371/journal.pone.0171566.

Brezina, P. R., and W. H. Kutteh, 2015, Clinical applications of preimplantation genetic testing: *BMJ (Clinical research ed.)*, v. 350, p. g7611, doi:10.1136/bmj.g7611.

Brouillet, S., G. Martinez, C. Coutton, and S. Hamamah, 2020, Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review: *Reproductive BioMedicine Online*, v. 40, no. 6, p. 779–796, doi:10.1016/j.rbmo.2020.02.002.

Capalbo, A. et al., 2017, Abnormally fertilized oocytes can result in healthy live births: improved genetic technologies for preimplantation genetic testing can be used to rescue viable embryos in in vitro fertilization cycles: *Fertility and Sterility*, v. 108, no. 6, p. 1007–1015.e3, doi:10.1016/j.fertnstert.2017.08.004.

Capalbo, A., S. Bono, L. Spizzichino, A. Biricik, M. Baldi, S. Colamaria, F. M. Ubaldi, L. Rienzi, and F. Fiorentino, 2013, Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development: *Human Reproduction (Oxford, England)*, v. 28, no. 2, p. 509–518, doi:10.1093/hum-rep/des394.

Cerrato, F. et al., 2020, DNA Methylation in the Diagnosis of Monogenic Diseases: *Genes*, v. 11, no. 4, doi:10.3390/genes11040355.

Chen, S.-U., K.-H. Chao, M.-Y. Wu, C.-D. Chen, H.-N. Ho, and Y.-S. Yang, 1998, The Simplified Two-Pipette Technique is More Efficient than the Conventional Three-Pipette Method for Blastomere Biopsy in Human Embryos 1: *Fertility and Sterility*, v. 69, no. 3, p. 569–575, doi:10.1016/S0015-0282(97)00535-9.

Chen, H.-F., M. Chen, and H.-N. Ho, 2020, An overview of the current and emerging platforms for preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) in in vitro fertilization programs: *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 59, no. 4, p. 489–495, doi:10.1016/j.tjog.2020.05.004.

Chen, H. P., T. R. Wang, J. P. Xu, X. Y. Xu, S. D. Dangol, and G. F. He, 2004, Fetal origin of single nucleated erythroblasts and free DNA in the peripheral blood of pregnant women: *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v. 85, no. 1, p. 1–5, doi:10.1016/j.ijgo.2003.09.015.

Cheng, L., S. Zhang, L. Wang, G. T. MacLennan, and D. D. Davidson, 2017, Fluorescence in situ hybridization in surgical pathology: principles and applications: *The Journal of Pathology: Clinical Research*, v. 3, no. 2, p. 73–99, doi:10.1002/cjp2.64.

- Cheung, V. G., and S. F. Nelson, 1996, Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, no. 25, p. 14676–14679, doi:10.1073/pnas.93.25.14676.
- Choe, J., D. Hwang, K.-C. Kim, and Y.-M. Choi, 2005, Fetal Gender Determination and BclI Polymorphism Using Nucleated Erythrocytes in Maternal Blood: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 53, no. 3, p. 323–327, doi:10.1369/jhc.4A6405.2005.
- Chow, J. F. C., H. H. Y. Cheng, E. Y. L. Lau, W. S. B. Yeung, and E. H. Y. Ng, 2020, Distinguishing between carrier and noncarrier embryos with the use of long-read sequencing in preimplantation genetic testing for reciprocal translocations: *Genomics*, v. 112, no. 1, p. 494–500, doi:10.1016/j.ygeno.2019.04.001.
- Cimadomo, D., A. Capalbo, F. M. Ubaldi, C. Scarica, A. Palagiano, R. Canipari, and L. Rienzi, 2016, The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis: *BioMed Research International*, v. 2016, doi:10.1155/2016/7193075.
- Cohen, J., D. Wells, and S. Munné, 2007, Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates: *Fertility and Sterility*, v. 87, no. 3, p. 496–503, doi:10.1016/j.fertnstert.2006.07.1516.
- Coonen, E., A. van Montfoort, F. Carvalho, G. Kokkali, C. Moutou, C. Rubio, M. De Rycke, and V. Goossens, 2020, ESHRE PGT Consortium data collection XVI–XVIII: cycles from 2013 to 2015†: *Human Reproduction Open*, v. 2020, no. 4, doi:10.1093/hropen/hoaa043.
- Craven, L., C. L. Alston, R. W. Taylor, and D. M. Turnbull, 2017, Recent Advances in Mitochondrial Disease: *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 18, no. 1, p. 257–275, doi:10.1146/annurev-genom-091416-035426.
- De Braekeleer, M., and T. N. Dao, 1990, Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses: *Human Reproduction (Oxford, England)*, v. 5, no. 5, p. 519–528, doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a137135.
- De Paz, J. F., R. Benito, J. Bajo, A. E. Rodríguez, and M. Abáigar, 2015, aCGH-MAS: Analysis of aCGH by means of Multiagent System: *BioMed Research International*, v. 2015, doi:10.1155/2015/194624.
- De Rycke, M., and V. Berckmoes, 2020, Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disorders: *Genes*, v. 11, no. 8, doi:10.3390/genes11080871.

De Vos, A., and A. Van Steirteghem, 2001, Aspects of biopsy procedures prior to pre-implantation genetic diagnosis: *Prenatal Diagnosis*, v. 21, no. 9, p. 767–780, doi:10.1002/pd.172.

Dean, F. B. et al., 2002, Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, no. 8, p. 5261–5266, doi:10.1073/pnas.082089499.

Delhanty, J. D., D. K. Griffin, A. H. Handyside, J. Harper, G. H. Atkinson, M. H. Pieters, and R. M. Winston, 1993, Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridisation, (FISH): *Human Molecular Genetics*, v. 2, no. 8, p. 1183–1185, doi:10.1093/hmg/2.8.1183.

Dietmaier, W., A. Hartmann, S. Wallinger, E. Heinmöller, T. Kerner, E. Endl, K.-W. Jauch, F. Hofstädter, and J. Rüschhoff, 1999, Multiple Mutation Analyses in Single Tumor Cells with Improved Whole Genome Amplification: *The American Journal of Pathology*, v. 154, no. 1, p. 83–95, doi:10.1016/S0002-9440(10)65254-6.

van Echten-Arends, J., S. Mastenbroek, B. Sikkema-Raddatz, J. C. Korevaar, M. J. Heine-man, F. van der Veen, and S. Repping, 2011, Chromosomal mosaicism in human pre-implantation embryos: a systematic review: *Human Reproduction Update*, v. 17, no. 5, p. 620–627, doi:10.1093/humupd/dmr014.

Eisfeldt, J., M. Pettersson, F. Vezzi, J. Wincent, M. Käller, J. Gruselius, D. Nilsson, E. Syk Lundberg, C. M. B. Carvalho, and A. Lindstrand, 2019, Comprehensive structural variation genome map of individuals carrying complex chromosomal rearrangements: *PLoS Genetics*, v. 15, no. 2, doi:10.1371/journal.pgen.1007858.

Esfandiari, N., M. E. Bunnell, and R. F. Casper, 2016, Human embryo mosaicism: did we drop the ball on chromosomal testing? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 33, no. 11, p. 1439–1444, doi:10.1007/s10815-016-0797-y.

Farrell, R. E., 2005, *Nucleic Acid Probe Technology*, in *RNA Methodologies*: Elsevier, p. 285–316, doi:10.1016/B978-012249696-7/50013-5.

Fesahat, F., F. Montazeri, and S. M. Hoseini, 2020, Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology: *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, v. 49, no. 5, p. 101723, doi:10.1016/j.jogoh.2020.101723.

Fisher, E. M. C., E. Lana-Elola, S. D. Watson, G. Vassiliou, and V. L. J. Tybulewicz, 2009, New approaches for modelling sporadic genetic disease in the mouse: *Disease Models & Mechanisms*, v. 2, no. 9–10, p. 446–453, doi:10.1242/dmm.001644.

- Fragouli, E., S. Alfarawati, K. Spath, D. Babariya, N. Tarozzi, A. Borini, and D. Wells, 2017, Analysis of implantation and ongoing pregnancy rates following the transfer of mosaic diploid–aneuploid blastocysts: *Human Genetics*, v. 136, no. 7, p. 805–819, doi:10.1007/s00439-017-1797-4.
- García-Mengual, E., J. C. Triviño, A. Sáez-Cuevas, J. Bataller, M. Ruíz-Jorro, and X. Vendrell, 2019, Male infertility: establishing sperm aneuploidy thresholds in the laboratory: *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 36, no. 3, p. 371–381, doi:10.1007/s10815-018-1385-0.
- Ghannam, M. G., and M. Varacallo, 2020, *Biochemistry, Polymerase Chain Reaction*, in *StatPearls: Treasure Island (FL)*, StatPearls Publishing.
- Gibbons, E., and E. Lanzendorf, 1995, Strategies to respond to polymerase chain reaction deoxyribonucleic acid amplification failure in a preimplantation genetic diagnosis program: *Am J Obstet Gynecol*, v. 172, no. 4, p. 9, doi:10.1016/0002-9378(95)91468-4
- Giménez, C., J. Sarasa, C. Arjona, E. Vilamajó, O. Martínez-Pasarell, K. Wheeler, G. Valls, E. Garcia-Guixé, and D. Wells, 2015, Karyomapping allows preimplantation genetic diagnosis of a de-novo deletion undetectable using conventional PGD technology: *Reproductive BioMedicine Online*, v. 31, no. 6, p. 770–775, doi:10.1016/j.rbmo.2015.08.017.
- Goldman, R. H., C. Racowsky, L. V. Farland, J. H. Fox, S. Munné, L. Ribustello, and E. S. Ginsburg, 2018, The cost of a euploid embryo identified from preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a counseling tool: *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 35, no. 9, p. 1641–1650, doi:10.1007/s10815-018-1275-5.
- Goossens, V., G. Harton, C. Moutou, P. N. Scriven, J. Traeger-Synodinos, K. Sermon, and J. C. Harper, 2008, ESHRE PGD Consortium data collection VIII: cycles from January to December 2005 with pregnancy follow-up to October 2006: *Human Reproduction*, v. 23, no. 12, p. 2629–2645, doi:10.1093/humrep/den238.
- Green, M. R., and J. Sambrook, 2019, *Polymerase Chain Reaction: Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2019, no. 6, p. pdb.top095109, doi:10.1101/pdb.top095109.
- Griffin, D. K., and G. L. Harton, 2020, *Preimplantation Genetic Testing, Recent Advances in Reproductive Medicine*: CRC Press, 175 p.
- Han, T. S., A. W. Sagoskin, J. R. Graham, M. J. Tucker, and J. Liebermann, 2003, Laser-assisted human embryo biopsy on the third day of development for preimplantation genetic diagnosis: two successful case reports: *Fertility and Sterility*, v. 80, no. 2, p. 453–455, doi:10.1016/s0015-0282(03)00598-3.

Handyside, A. H., G. L. Harton, B. Mariani, A. R. Thornhill, N. Affara, M.-A. Shaw, and D. K. Griffin, 2010, Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes: *Journal of Medical Genetics*, v. 47, no. 10, p. 651–658, doi:10.1136/jmg.2009.069971.

Handyside, A. H., E. H. Kontogianni, K. Hardy, and R. M. L. Winston, 1990, Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification: *Nature*, v. 344, no. 6268, p. 768–770, doi:10.1038/344768a0.

Harper, J. C., 2017, Preimplantation genetic screening: *Journal of Medical Screening*, doi:10.1177/0969141317691797.

Harper, J. et al., 2008, What next for preimplantation genetic screening? *Human Reproduction*, v. 23, no. 3, p. 478–480, doi:10.1093/humrep/dem424.

Hassold, T., and P. Hunt, 2009, Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew: *Current opinion in pediatrics*, v. 21, no. 6, p. 703–708, doi:10.1097/MOP.0b013e328332c6ab.

Hawkins, T. L., J. C. Detter, and P. M. Richardson, 2002, Whole genome amplification — applications and advances: *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, no. 1, p. 65–67, doi:10.1016/S0958-1669(02)00286-0.

Hillman, S. C., D. J. McMullan, D. Williams, E. R. Maher, and M. D. Kilby, 2012, Microarray comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis: a review: *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, v. 40, no. 4, p. 385–391, doi:10.1002/uog.11180.

Homer, H. A., 2019, Preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): The biology, the technology and the clinical outcomes: *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 59, no. 2, p. 317–324, doi:10.1111/ajo.12960.

Hughes, S., N. Arneson, S. Done, and J. Squire, 2005, The use of whole genome amplification in the study of human disease: *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 88, no. 1, p. 173–189, doi:10.1016/j.pbiomolbio.2004.01.007.

Imudia, A. N., and S. Plosker, 2016, The Past, Present, and Future of Preimplantation Genetic Testing: *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 36, no. 2, p. 385–399, doi:10.1016/j.cll.2016.01.012.

Jansen, F. a. R., Y. J. Blumenfeld, A. Fisher, J. M. Cobben, A. O. Odibo, A. Borrell, and M. C. Haak, 2015, Array comparative genomic hybridization and fetal congenital heart defects: a systematic review and meta-analysis: *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, v. 45, no. 1, p. 27–35, doi:10.1002/uog.14695.

- Jiao, Z.-X., G.-L. Zhuang, C.-Q. Zhou, Y.-M. Shu, J. Li, and X.-Y. Liang, 2004, Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of beta-thalassemia: Chinese Medical Journal, v. 117, no. 4, p. 483–487.
- Joris, H., A. De Vos, R. Janssens, P. Devroey, I. Liebaers, and A. Van Steirteghem, 2003, Comparison of the results of human embryo biopsy and outcome of PGD after zona drilling using acid Tyrode medium or a laser: Human Reproduction (Oxford, England), v. 18, no. 9, p. 1896–1902, doi:10.1093/humrep/deg355.
- Kahraman, S. et al., 2014, Successful haematopoietic stem cell transplantation in 44 children from healthy siblings conceived after preimplantation HLA matching: Reproductive BioMedicine Online, v. 29, no. 3, p. 340–351, doi:10.1016/j.rbmo.2014.05.010.
- Kakourou, G. et al., 2018, The clinical utility of PGD with HLA matching: a collaborative multi-centre ESHRE study: Human Reproduction (Oxford, England), v. 33, no. 3, p. 520–530, doi:10.1093/humrep/dex384.
- Kakourou, G., C. Vrettou, M. Moutafi, and J. Traeger-Synodinos, 2017, Pre-implantation HLA matching: The production of a Saviour Child: Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, v. 44, p. 76–89, doi:10.1016/j.bpobgyn.2017.05.008.
- Kalma, Y., L. Bar-El, S. Asaf-Tisser, M. Malcov, A. Reches, J. Hasson, H. Amir, F. Azem, and D. Ben-Yosef, 2018, Optimal timing for blastomere biopsy of 8-cell embryos for preimplantation genetic diagnosis: Human Reproduction, v. 33, no. 1, p. 32–38, doi:10.1093/humrep/dex343.
- Kamps, R., R. D. Brandão, B. J. van den Bosch, A. D. C. Paulussen, S. Xanthoulea, M. J. Blok, and A. Romano, 2017, Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification: International Journal of Molecular Sciences, v. 18, no. 2, doi:10.3390/ijms18020308.
- Kim, H. J., C. H. Kim, S. M. Lee, S. A. Choe, J. Y. Lee, B. C. Jee, D. Hwang, and K. C. Kim, 2012, Outcomes of preimplantation genetic diagnosis using either zona drilling with acidified Tyrode's solution or partial zona dissection: Clinical and Experimental Reproductive Medicine, v. 39, no. 3, p. 118–124, doi:10.5653/cerm.2012.39.3.118.
- Kirkegaard, K., J. J. Hindkjaer, and H. J. Ingerslev, 2012, Human embryonic development after blastomere removal: a time-lapse analysis: Human Reproduction (Oxford, England), v. 27, no. 1, p. 97–105, doi:10.1093/humrep/der382.
- Kittler, R., M. Stoneking, and M. Kayser, 2002, A Whole Genome Amplification Method to Generate Long Fragments from Low Quantities of Genomic DNA: Analytical Biochemistry, v. 300, no. 2, p. 237–244, doi:10.1006/abio.2001.5460.

- Koboldt, D. C., K. M. Steinberg, D. E. Larson, R. K. Wilson, and E. Mardis, 2013, The Next-Generation Sequencing Revolution and Its Impact on Genomics: *Cell*, v. 155, no. 1, p. 27–38, doi:10.1016/j.cell.2013.09.006.
- Kojima, S., and D. Cimini, 2019, Aneuploidy and gene expression: is there dosage compensation? *Epigenomics*, v. 11, no. 16, p. 1827–1837, doi:10.2217/epi-2019-0135.
- Kokkali, G. et al., 2020, ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT†: *Human Reproduction Open*, v. 2020, no. 3, doi:10.1093/hropen/hoaa020.
- Kokkali, G., C. Vrettou, J. Traeger-Synodinos, G. M. Jones, D. S. Cram, D. Stavrou, A. O. Trounson, E. Kanavakis, and K. Pantos, 2005, Birth of a healthy infant following trophoctoderm biopsy from blastocysts for PGD of beta-thalassaemia major: *Human Reproduction (Oxford, England)*, v. 20, no. 7, p. 1855–1859, doi:10.1093/hum-rep/deh893.
- Kristjansson, K., S. S. Chong, I. B. Van den Veyver, S. Subramanian, M. C. Snabes, and M. R. Hughes, 1994, Preimplantation single cell analyses of dystrophin gene deletions using whole genome amplification: *Nature Genetics*, v. 6, no. 1, p. 19–23, doi:10.1038/ng0194-19.
- Kuliev, A., and S. Rechitsky, 2017, Preimplantation genetic testing: current challenges and future prospects: *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 17, no. 12, p. 1071–1088, doi:10.1080/14737159.2017.1394186.
- Lage, J. M. et al., 2003, Whole Genome Analysis of Genetic Alterations in Small DNA Samples Using Hyperbranched Strand Displacement Amplification and Array-CGH: *Genome Research*, v. 13, no. 2, p. 294–307, doi:10.1101/gr.377203.
- Le Caignec, C. et al., 2006, Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH: *Nucleic Acids Research*, v. 34, no. 9, p. e68, doi:10.1093/nar/gkl336.
- Leaver, M., and D. Wells, 2020, Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): the next revolution in reproductive genetics? *Human Reproduction Update*, v. 26, no. 1, p. 16–42, doi:10.1093/humupd/dmz033.
- Lee, C., E. Lemyre, P. M. Miron, and C. C. Morton, 2001, Multicolor fluorescence in situ hybridization in clinical cytogenetic diagnostics: *Current Opinion in Pediatrics*, v. 13, no. 6, p. 550–555.
- Levsky, J. M., and R. H. Singer, 2003, Fluorescence in situ hybridization: past, present and future: *Journal of Cell Science*, v. 116, no. 14, p. 2833–2838, doi:10.1242/jcs.00633.

- Liehr, T. et al., 2006, Multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH) applied to FISH-banding: Cytogenetic and Genome Research, v. 114, no. 3–4, p. 240–244, doi:10.1159/000094207.
- Liu, L., C. Jin, Y. Wang, C. Lin, Q. Wang, and K. Sun, 2004, [Use of specific antibody to detect fetal erythroblasts in maternal circulation]: Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi = Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi = Chinese Journal of Medical Genetics, v. 21, no. 5, p. 494–497.
- Lovmar, L., and A.-C. Syvänen, 2006, Multiple displacement amplification to create a long-lasting source of DNA for genetic studies: Human Mutation, v. 27, no. 7, p. 603–614, doi:10.1002/humu.20341.
- Lu, L., B. Lv, K. Huang, Z. Xue, X. Zhu, and G. Fan, 2016, Recent advances in preimplantation genetic diagnosis and screening: Journal of Assisted Reproduction and Genetics, v. 33, no. 9, p. 1129–1134, doi:10.1007/s10815-016-0750-0.
- Lu, M., Y. Wen, Y. Liu, C. Ding, C. Zhou, and Y. Xu, 2020, Trophoctoderm biopsy reduces the level of serum β -human chorionic gonadotropin in early pregnancy: Fertility and Sterility, v. 114, no. 4, p. 801–808, doi:10.1016/j.fertnstert.2020.05.015.
- Luo, A., D. Cheng, S. Yuan, H. Li, J. Du, Y. Zhang, C. Yang, G. Lin, W. Zhang, and Y.-Q. Tan, 2018, Maternal interchromosomal insertional translocation leading to 1q43-q44 deletion and duplication in two siblings: Molecular Cytogenetics, v. 11, doi:10.1186/s13039-018-0371-7.
- MacLennan, M., J. H. Crichton, C. J. Playfoot, and I. R. Adams, 2015, Oocyte development, meiosis and aneuploidy: Seminars in Cell & Developmental Biology, v. 45, p. 68–76, doi:10.1016/j.semcd.2015.10.005.
- Maggiulli, R., A. Giancani, D. Cimadomo, F. M. Ubaldi, and L. Rienzi, 2019, Human Blastocyst Biopsy and Vitrification: Journal of Visualized Experiments, no. 149, p. 59625, doi:10.3791/59625.
- Maheaswari, R., J. T. Kshirsagar, and N. Lavanya, 2016, Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology: Journal of Indian Society of Periodontology, v. 20, no. 2, p. 128–135, doi:10.4103/0972-124X.176391.
- Malmgren, H., 2002, Single cell CGH analysis reveals a high degree of mosaicism in human embryos from patients with balanced structural chromosome aberrations: Molecular Human Reproduction, v. 8, no. 5, p. 502–510, doi:10.1093/molehr/8.5.502.

- Marin, D., R. T. Scott, and N. R. Treff, 2017, Preimplantation embryonic mosaicism: origin, consequences and the reliability of comprehensive chromosome screening: *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, v. 29, no. 3, p. 168–174, doi:10.1097/GCO.0000000000000358.
- McCoy, R. C., 2017, Mosaicism in Preimplantation Human Embryos: When Chromosomal Abnormalities Are the Norm: *Trends in Genetics*, v. 33, no. 7, p. 448–463, doi:10.1016/j.tig.2017.04.001.
- Miller, D. T. et al., 2010, Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies: *The American Journal of Human Genetics*, v. 86, no. 5, p. 749–764, doi:10.1016/j.ajhg.2010.04.006.
- Montag, M., M. Köster, T. Strowitzki, and B. Toth, 2013, Polar body biopsy: Fertility and Sterility, v. 100, no. 3, p. 603–607, doi:10.1016/j.fertnstert.2013.05.053.
- Montag, M., K. van der Ven, and H. van der Ven, 2009, Polar body biopsy, *in* J. Harper, ed., *Preimplantation Genetic Diagnosis*: Cambridge, Cambridge University Press, p. 166–174, doi:10.1017/CBO9780511581571.010.
- Moog, U., U. Felbor, C. Has, and B. Zirn, 2020, Disorders Caused by Genetic Mosaicism: *Deutsches Ärzteblatt International*, v. 117, no. 8, p. 119–125, doi:10.3238/arztebl.2020.0119.
- Mounts, E. L., and A. G. Besser, 2019, Chapter 6 - Genetic counseling for preimplantation genetic testing (PGT): Practical and ethical challenges, *in* E. S. Sills, and G. D. Palermo, eds., *Human Embryos and Preimplantation Genetic Technologies*: Academic Press, p. 43–52, doi:10.1016/B978-0-12-816468-6.00006-0.
- Moutou, C., V. Goossens, E. Coonen, M. De Rycke, G. Kokkali, P. Renwick, S. B. Sen-Gupta, K. Vesela, and J. Traeger-Synodinos, 2014, ESHRE PGD Consortium data collection XII: cycles from January to December 2009 with pregnancy follow-up to October 2010: *Human Reproduction (Oxford, England)*, v. 29, no. 5, p. 880–903, doi:10.1093/humrep/deu012.
- Mukaida, T., C. Oka, T. Goto, and K. Takahashi, 2006, Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts: *Human Reproduction*, v. 21, no. 12, p. 3246–3252, doi:10.1093/humrep/del285.
- Mullis, K. B., 1990, The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction: *Scientific American*, v. 262, no. 4, p. 56–65, doi:10.1038/scientificamerican0490-56.

- Munné, S., 2012, Preimplantation Genetic Diagnosis for Aneuploidy and Translocations Using Array Comparative Genomic Hybridization: *Current Genomics*, v. 13, no. 6, p. 463–470, doi:10.2174/138920212802510457.
- Nagaoka, S. I., T. J. Hassold, and P. A. Hunt, 2012, Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem: *Nature reviews. Genetics*, v. 13, no. 7, p. 493–504, doi:10.1038/nrg3245.
- Nakai-Futatsugi, Y., and H. Niwa, 2015, Epiblast and primitive endoderm differentiation: fragile specification ensures stable commitment: *Cell Stem Cell*, v. 16, no. 4, p. 346–347, doi:10.1016/j.stem.2015.03.005.
- Natesan, S. A. et al., 2014, Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro: *Genetics in Medicine*, v. 16, no. 11, p. 838–845, doi:10.1038/gim.2014.45.
- Nelson, J. R. et al., 2002, TempliPhi, phi29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing: *BioTechniques*, v. Suppl, p. 44–47.
- Nepal, M., R. Che, J. Zhang, C. Ma, and P. Fei, 2017, Fanconi Anemia Signaling and Cancer: *Trends in cancer*, v. 3, no. 12, p. 840–856, doi:10.1016/j.trecan.2017.10.005.
- Nghiem, P. P., and S. J. Schatzberg, 2010, Conventional and molecular diagnostic testing for the acute neurologic patient: *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 20, no. 1, p. 46–61, doi:10.1111/j.1476-4431.2009.00495.x.
- Nicolaidis, P., and M. B. Petersen, 1998, Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies: *Human Reproduction (Oxford, England)*, v. 13, no. 2, p. 313–319, doi:10.1093/humrep/13.2.313.
- Novik, V., E. B. Moulton, M. E. Sisson, S. L. Shrestha, K. D. Tran, H. J. Stern, B. D. Mariani, and W. S. Stanley, 2014, The accuracy of chromosomal microarray testing for identification of embryonic mosaicism in human blastocysts: *Molecular Cytogenetics*, v. 7, p. 18, doi:10.1186/1755-8166-7-18.
- Nussbaum, R. L., R. R. McInnes, H. F. Willard, J. Thompson, and M. W. Thompson, 2004, *Klinická genetika: Thompson & Thompson: 6. vyd: Praha, Triton, 426 p.*
- Otto, S. P., and J. Whitton, 2000, Polyploid incidence and evolution: *Annual Review of Genetics*, v. 34, p. 401–437, doi:10.1146/annurev.genet.34.1.401.
- Palini, S., L. Galluzzi, S. De Stefani, M. Bianchi, D. Wells, M. Magnani, and C. Bulletti, 2013, Genomic DNA in human blastocoele fluid: *Reproductive BioMedicine Online*, v. 26, no. 6, p. 603–610, doi:10.1016/j.rbmo.2013.02.012.

- Patrizio, P., G. Shoham, Z. Shoham, M. Leong, D. H. Barad, and N. Gleicher, 2019, Worldwide live births following the transfer of chromosomally “Abnormal” embryos after PGT/A: results of a worldwide web-based survey: *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 36, no. 8, p. 1599–1607, doi:10.1007/s10815-019-01510-0.
- Peng, W., H. Takabayashi, and K. Ikawa, 2007, Whole genome amplification from single cells in preimplantation genetic diagnosis and prenatal diagnosis: *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 131, no. 1, p. 13–20, doi:10.1016/j.ejogrb.2006.07.027.
- Popovic, M., L. Dhaenens, A. Boel, B. Menten, and B. Heindryckx, 2020, Chromosomal mosaicism in human blastocysts: the ultimate diagnostic dilemma: *Human Reproduction Update*, v. 26, no. 3, p. 313–334, doi:10.1093/humupd/dmz050.
- Pötsch, L., U. Meyer, S. Rothschild, P. M. Schneider, and Ch. Rittner, 1992, Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA: *International Journal of Legal Medicine*, v. 105, no. 3, p. 139–143, doi:10.1007/BF01625165.
- Pritchard, D. J., and B. R. Korf, 2007, *Základy lékařské genetiky*: Galén, 182 p.
- Ratan, Z. A., S. B. Zaman, V. Mehta, M. F. Haidere, N. J. Runa, and N. Akter, 2017, Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science: *Cureus*, doi:10.7759/cureus.1325.
- Richards, S. et al., 2015, Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology: *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, v. 17, no. 5, p. 405–424, doi:10.1038/gim.2015.30.
- Sánchez-García, J. F., J. Benet, C. Gutiérrez-Mateo, J. Luís Sécui, E. Monrós, and J. Navarro, 2005, Multiple mutation analysis of the cystic fibrosis gene in single cells: *MHR: Basic science of reproductive medicine*, v. 11, no. 6, p. 463–468, doi:10.1093/molehr/gah176.
- Sanger, F., and A. R. Coulson, 1989, A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase, *in* *Molecular Biology*: Elsevier, p. 595–604, doi:10.1016/B978-0-12-131200-8.50040-X.
- Sarrate, Z., F. Vidal, and J. Blanco, 2010, Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance: *Fertility and Sterility*, v. 93, no. 6, p. 1892–1902, doi:10.1016/j.fertnstert.2008.12.139.

- Savic, S., and L. Bubendorf, 2016, Common Fluorescence In Situ Hybridization Applications in Cytology: *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 140, no. 12, p. 1323–1330, doi:10.5858/arpa.2016-0202-RA.
- Schenk, M., A. Groselj-Strele, K. Eberhard, E. Feldmeier, D. Kastelic, S. Cerk, and G. Weiss, 2018, Impact of polar body biopsy on embryo morphokinetics—back to the roots in preimplantation genetic testing? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 35, no. 8, p. 1521–1528, doi:10.1007/s10815-018-1207-4.
- Schröck, E. et al., 1996, Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes: *Science*, v. 273, no. 5274, p. 494–497, doi:10.1126/science.273.5274.494.
- Scott, R. T., K. M. Upham, E. J. Forman, K. H. Hong, K. L. Scott, D. Taylor, X. Tao, and N. R. Treff, 2013, Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial: *Fertility and Sterility*, v. 100, no. 3, p. 697–703, doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.035.
- Scott, R. T., K. M. Upham, E. J. Forman, T. Zhao, and N. R. Treff, 2013, Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial: *Fertility and Sterility*, v. 100, no. 3, p. 624–630, doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.039.
- Scriven, P. N., S. M. Bint, A. F. Davies, and C. M. Ogilvie, 2014, Meiotic outcomes of three-way translocations ascertained in cleavage-stage embryos: refinement of reproductive risks and implications for PGD: *European Journal of Human Genetics*, v. 22, no. 6, p. 748–753, doi:10.1038/ejhg.2013.237.
- Sekizawa, A., T. Kimura, M. Sasaki, S. Nakamura, R. Kobayashi, and T. Sato, 1996, Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy using a single fetal nucleated erythrocyte in maternal blood: *Neurology*, v. 46, no. 5, p. 1350–1350, doi:10.1212/WNL.46.5.1350.
- Sermon, K., W. Lissens, H. Joris, A. V. Steirteghem, and I. Liebaers, 1996, Adaptation of the primer extension preamplification (PEP) reaction for preimplantation diagnosis: single blastomere analysis using short PEP protocols: *Molecular Human Reproduction*, v. 2, no. 3, p. 209–212, doi:10.1093/molehr/2.3.209.
- Shah, K., G. Sivapalan, N. Gibbons, H. Tempest, and D. K. Griffin, 2003, The genetic basis of infertility: *Reproduction (Cambridge, England)*, v. 126, no. 1, p. 13–25, doi:10.1530/rep.0.1260013.
- Simón, C., and C. Rubio (eds.), 2018, *Handbook Of New Genetic Diagnostic Technologies in Reproductive Medicine: Improving Patient Success Rates and Infant Health*: CRC Press, 179 p.

Slatko, B. E., A. F. Gardner, and F. M. Ausubel, 2018, Overview of Next Generation Sequencing Technologies: Current protocols in molecular biology, v. 122, no. 1, p. e59, doi:10.1002/cpmb.59.

Spinner, N. B., and L. K. Conlin, 2014, Mosaicism and clinical genetics: American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics, v. 166, no. 4, p. 397–405, doi:10.1002/ajmg.c.31421.

Spits, C., C. Le Caignec, M. De Rycke, L. Van Haute, A. Van Steirteghem, I. Liebaers, and K. Sermon, 2006, Optimization and evaluation of single-cell whole-genome multiple displacement amplification: Human Mutation, v. 27, no. 5, p. 496–503, doi:10.1002/humu.20324.

Stigliani, S., P. Anserini, P. L. Venturini, and P. Scaruffi, 2013, Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation: Human Reproduction, v. 28, no. 10, p. 2652–2660, doi:10.1093/hum-rep/det314.

Sugita, S., and T. Hasegawa, 2017, Practical use and utility of fluorescence in situ hybridization in the pathological diagnosis of soft tissue and bone tumors: Journal of Orthopaedic Science, v. 22, no. 4, p. 601–612, doi:10.1016/j.jos.2017.02.004.

Telenius, H., N. P. Carter, C. E. Bebb, M. Nordenskjöld, B. A. J. Ponder, and A. Tunnacliffe, 1992, Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer: Genomics, v. 13, no. 3, p. 718–725, doi:10.1016/0888-7543(92)90147-K.

Therman, E., B. Susman, and C. Denniston, 1989, The nonrandom participation of human acrocentric chromosomes in Robertsonian translocations: Annals of Human Genetics, v. 53, no. 1, p. 49–65, doi:10.1111/j.1469-1809.1989.tb01121.x.

Treff, N. R., and R. S. Zimmerman, 2017, Advances in Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disease and Aneuploidy: Annual Review of Genomics and Human Genetics, v. 18, no. 1, p. 189–200, doi:10.1146/annurev-genom-091416-035508.

Turner, K. J., G. Silvestri, D. H. Black, G. Dobson, C. Smith, A. H. Handyside, K. D. Sinclair, and D. K. Griffin, 2019, Karyomapping for simultaneous genomic evaluation and aneuploidy screening of preimplantation bovine embryos: The first live-born calves: Theriogenology, v. 125, p. 249–258, doi:10.1016/j.theriogenology.2018.11.014.

Vedarethinam, I., P. Shah, M. Dimaki, Z. Tumer, N. Tommerup, and W. E. Svendsen, 2010, Metaphase FISH on a Chip: Miniaturized Microfluidic Device for Fluorescence in situ Hybridization: Sensors (Basel, Switzerland), v. 10, no. 11, p. 9831–9846, doi:10.3390/s101109831.

- Vera-Rodriguez, M., and C. Rubio, 2017, Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos: *Fertility and Sterility*, v. 107, no. 5, p. 1107–1112, doi:10.1016/j.fertnstert.2017.03.019.
- Viotti, M., 2020, Preimplantation Genetic Testing for Chromosomal Abnormalities: Aneuploidy, Mosaicism, and Structural Rearrangements: *Genes*, v. 11, no. 6, doi:10.3390/genes11060602.
- Voullaire, L., L. Wilton, H. Slater, and R. Williamson, 1999, Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization: *Prenatal Diagnosis*, v. 19, no. 9, p. 846–851.
- Wagner, J. E., 2000, Designer babies - are they a reality yet? *Reproductive BioMedicine Online*, v. 1, no. 3, p. 77, doi:10.1016/S1472-6483(10)61943-8.
- Watanabe, K., and T. O. Frommel, 1993, Detection of *Porphyromonas gingivalis* in Oral Plaque Samples by Use of the Polymerase Chain Reaction: *Journal of Dental Research*, v. 72, no. 6, p. 1040–1044, doi:10.1177/00220345930720060801.
- Watanabe, A., A. Sekizawa, A. Taguchi, H. Saito, T. Yanaihara, M. Shimazu, and I. Matsuda, 1998, Prenatal diagnosis of ornithine transcarbamylase deficiency by using a single nucleated erythrocyte from maternal blood: *Human Genetics*, v. 102, no. 6, p. 611–615, doi:10.1007/s004390050750.
- Wells, D., 2000, Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization: *Molecular Human Reproduction*, v. 6, no. 11, p. 1055–1062, doi:10.1093/molehr/6.11.1055.
- Wiland, E., M. Olszewska, T. Woźniak, and M. Kurpisz, 2020, How much, if anything, do we know about sperm chromosomes of Robertsonian translocation carriers? *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 77, no. 23, p. 4765–4785, doi:10.1007/s00018-020-03560-5.
- Wittingham, D. G., and R. Penketh, 1987, Prenatal diagnosis in the human pre-implantation period: *Human Reproduction*, v. 2, no. 3, p. 267–270, doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a136530.
- Zenker, M., and K. Kutsche, 2016, RASopathien: medizinische genetik, v. 28, no. 1, p. 15–38, doi:10.1007/s11825-016-0080-8.
- Zhang, L., X. Cui, K. Schmitt, R. Hubert, W. Navidi, and N. Arnheim, 1992, Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis.: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, no. 13, p. 5847–5851, doi:10.1073/pnas.89.13.5847.

Zheng, Y., N. Wang, L. Li, and F. Jin, 2011, Whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis: Journal of Zhejiang University. Science. B, v. 12, no. 1, p. 1–11, doi:10.1631/jzus.B1000196.

Internetové zdroje

URL1: Addgene [cit. 18. 11. 2020].

<<https://www.addgene.org/protocols/pcr/>>

URL2: Repromeda [cit. 15. 12. 2020].

<<https://www.repromeda.cz/wp-content/uploads/pgd-karyomapping-tisk.pdf>>

URL3: Eppendorf [cit. 9. 4. 2021].

<https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/105357_Application-Note/Eppendorf_Cell-Technology_Application-Note_140_TransferMan-4m_Celltram-Air_vario_Pre-implantation-genetic-diagnosis-Polar-body-biopsy.pdf>



Toto dílo je šířeno pod licencí
CC BY-SA 4.0 Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International