



**MASARYKOVA UNIVERZITA**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

---



**Analýza aneuploidií u pacientů  
podstupujících preimplantační  
genetickou diagnostiku metodou  
karyomapping**

Diplomová práce

Tereza Agáta Veselá

## Bibliografický záznam

Autor: Ing. Bc. Tereza Agáta Veselá  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita  
Ústav experimentální biologie

Název práce: Analýza aneuploidií u pacientů podstupujících preimplantační genetickou diagnostiku metodou karyomapping

Studijní program: Experimentální biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetika

Vedoucí práce: Mgr. Jakub Horák, Dr. rer. nat

Akademický rok: 2016/17

Počet stran: 85

Klíčová slova: preimplantační genetická diagnostika, karyomapping, preimplantační genetický screening, asistovaná reprodukce, aneuploidie, crossing-over, monogenní onemocnění

## Bibliographic Entry

Author: Ing. Bc. Tereza Agáta Veselá

Faculty of Science, Masaryk University

Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Analysis of aneuploidy in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis by karyomapping

Degree programme: Experimental Biology

Field of Study: Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Mgr. Jakub Horák, Dr. rer. nat

Academic Year: 2016/17

Number of Pages: 85

Keywords: Preimplantation genetic diagnosis, karyomapping, preimplantation genetic screening, asissted reproduction, aneuploidies, crossing-over, single-gene disorders

## **Abstrakt**

Karyomapping je přelomová metoda, která umožňuje jak preimplantační genetickou diagnostiku monogenního onemocnění a výběr embrya bez konkrétní genetické zátěže, tak i screening aneuploidii. Tato práce se zabývá analýzou aneuploidních embryí u pacientek, které metodu karyomapping podstoupily na klinice asistované reprodukce REPROMEDA v Brně. Konkrétně jsme se zaměřili na věkový faktor, typ, původ aneuploidii a závislost počtu crossing-overů na míře aneuploidních embryí. Pro účely této diplomové práce jsme analyzovali výsledky vyšetření celkem 123 pacientek, které preimplantační genetickou diagnostiku podstoupily v období od června 2014 do září 2016.

## **Abstract**

Karyomapping is a breakthrough method that enables both preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease with selection of embryo without specific genetic burden as well as screening of aneuploidies. This thesis deals with analysis of aneuploidies in patients who have undergone karyomapping at the center for assisted reproduction REPROMEDA in Brno. Specifically, we focused on the age-related factors, type and origin of aneuploidies, and the dependence of the number of crossing-overs on the aneuploidy-rate of embryos. For the purpose of this thesis, we analyzed the results in a total of 123 patients who went through the preimplantation genetic examination in REPROMEDA in the period of June 2014 and September 2016.



Masarykova univerzita

Přírodovědecká fakulta



## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Student: **Bc. Tereza Agáta Veselá**  
Studijní program: **Experimentální biologie**  
Studijní obor: **Molekulární biologie a genetika**  
Studijní směr: **Molekulární biologie a genetika**

Ředitel Ústavu experimentální biologie PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s tématem:

### **Analýza aneuploidii u pacientů podstupujících preimplantační genetickou diagnostiku metodou Karyomapping**

Analysis of aneuploidies in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis by Karyomapping

#### *Oficiální zadání:*

Preimplantační genetická diagnostika (PGD) je založena na genetickém vyšetření embrya ještě před jeho uhnížděním v děloze matky a její provedení je vázáno na metody asistované reprodukce. Data získaná v rámci PGD Karyomappingem u pacientů Sanatoria Repromeda budou podrobně analyzována v souvislosti s anamnézou pacientů s cílem identifikovat klíčové faktory, které mají vliv na frekvenci výskytu aneuploidních embryí u lidí.

#### *Literatura:*

**Handyside A. H., Harton G. L., Mariani B., Thornhill A. R., Affara N., Shaw M., Griffin D. K.** 2010. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet.*

*Jazyk závěrečné práce:* český

*Vedoucí diplomové práce:*

*Podpis vedoucího práce:*

*Datum zadání diplomové práce:* 24. listopadu 2014

V Brně dne 24. listopadu 2014

Mgr. Jakub Horák, Dr. rer.nat

.....  
*Horák*

*Jan Šmarda*  
prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.  
ředitel Ústavu experimentální biologie

Zadání diplomové práce převzal dne: 24. listopadu 2014

*Tereza Veselá*  
Podpis studenta

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Jakubu Horákovi, Ph.D. za veškerý čas, odborné rady a pomoc při vedení této diplomové práce. Dále děkuji vedení společnosti REPROMEDA s.r.o. za ochotu, podporu a poskytnutí zázemí pro zpracování této práce.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 9. května 2017

TEREZA AGÁTA VESELÁ

Jméno Příjmení

# Obsah

<b>Obsah</b>	<b>7</b>
<b>Seznam zkratek</b>	<b>10</b>
<b>1. Úvod</b>	<b>11</b>
<b>2. Asistovaná reprodukce</b>	<b>12</b>
2.1 <i>Metody asistované reprodukce</i>	12
2.2 <i>Průběh IVF cyklu</i>	12
2.2.1 <i>Hormonální stimulace a odběr oocytů</i>	12
2.2.2 <i>Oplodnění mikromanipulačními metodami</i>	14
2.2.3 <i>Biopsie buněk</i>	14
<b>3. Preimplantační genetická vyšetření</b>	<b>17</b>
3.1 <i>Typy preimplantačních vyšetření</i>	17
3.2 <i>Preimplantační genetický screening (PGS)</i>	17
3.3 <i>Preimplantační genetická diagnostika (PGD)</i>	18
<b>4. Genetické změny analyzovatelné metodou karyomapping</b>	<b>21</b>
4.1 <i>Monogenní onemocnění s kauzální mutací</i>	21
4.2 <i>Chromozomové abnormality</i>	22
4.2.1 <i>Početní aberace</i>	22
4.2.2 <i>Strukturní abnormality</i>	25
4.3 <i>Genetická rekombinace</i>	26
<b>5. Cíle diplomové práce</b>	<b>27</b>
<b>6. Materiál a metodika</b>	<b>28</b>
6.1 <i>Soubor pacientek</i>	28
6.2 <i>Odběr a zpracování oocytů v rámci IVF s PGD</i>	28
6.3 <i>Biopsie embrya</i>	29
6.4 <i>Provedení vyšetření metodou karyomapping</i>	29
6.4.1 <i>Celogenomová amplifikace</i>	30
6.4.2 <i>Agarózová gelová elektroforéza</i>	31
6.4.3 <i>Celogenomová amplifikace 2</i>	32
6.4.4 <i>Fragmentace DNA</i>	33
6.4.5 <i>Precipitace DNA</i>	33
6.4.6 <i>Resuspendace DNA</i>	33
6.4.7 <i>Hybridizace na čipy</i>	34



6.4.8 Vymytí DNA čipů	34
6.4.9 Značení DNA čipů	34
6.4.10 Skenování DNA čipů	36
6.5 Vyhodnocení dat	36
6.5.1 Analýza jednonukleotidových polymorfismů	36
6.5.2 Analýza genotypu embrya	37
6.5.3 Analýza crossing-overů	38
6.5.4 Analýza aneuploidií	39
6.5.5 Analýza chyb v I. a II. meiotickém dělení	42
6.6 Analýza a statistické zhodnocení výsledků	43
<b>7. Výsledky</b>	<b>44</b>
7.1 Soubor pacientek podstupujících metodu karyomapping	44
7.2 Struktura souboru pacientek v závislosti na typu dědičnosti	44
7.3 Analýza chromozomových aberací detekovaných metodu karyomapping	46
7.3.1 Analýza počtu aneuploidií v závislosti na věku	46
7.3.2 Analýza aneuploidií podle jejich typu a původu	46
7.3.3 Analýza aneuploidií vzniklých chybou v meióze I a II u žen	50
7.4 Analýza crossing-overů	51
7.4.1 Srovnání počtu crossing-overů u pacientek v nejmladší věkové kategorii	52
7.4.2 Srovnání počtu crossing-overů u pacientek ve střední věkové kategorii	55
7.4.3 Srovnání počtu crossing-overů u pacientek v nejstarší věkové kategorii	58
7.4.4 Srovnání počtu crossing-overů navzájem mezi kategoriemi	61
<b>8. Diskuze</b>	<b>63</b>
8.1 Karyomapping je robustní metoda, která umožňuje spolehlivou analýzu aneuploidií	63
8.2 Biopsie trofektodermy je vhodnějším materiálem pro metodu karyomapping	64
8.3 Počet aneuploidních embryí se výrazně zvyšuje s rostoucím věkem ženy	64
8.4 Aneuploidie maternálního původu převažují nad paternálními aneuploidiemi	64
8.5 Růst počtu aneuploidií se zvyšujícím se věkem je způsoben zejména nárůstem chyb v prvním meiotickém dělení	65
8.6 Segmentální změny jsou zpravidla paternálního původu a nejsou závislé na věku	65
8.7 Monozomie jsou pozorovány častěji než trizomie	66
8.8 Pacientky s AR onemocněním podstupují metodu karyomapping později než ženy s AD onemocněním	66
8.9 Počet crossing-overů je vysoce variabilní hodnota, která může záviset na věku ženy, ale pravděpodobně nesouvisí s mírou aneuploidií	67
<b>9. Souhrn</b>	<b>69</b>

<b>10. Summary</b>	<b>71</b>
<b>11. Literatura</b>	<b>73</b>
<b>Internetové zdroje</b>	<b>79</b>
<b>12. Příloha</b>	<b>80</b>
<i>12.1 Seznam obrázků</i>	<i>80</i>
<i>12.2 Seznam grafů</i>	<i>81</i>
<i>12.3 Seznam tabulek</i>	<i>83</i>

## Seznam zkratek

aCGH	CGH na čipu
AD	Autozomálně dominantní
ADO	Alelový drop-out
AR	Autozomálně recesivní
CFTR	gen pro cystickou fibrózu
CGH	Komparativní genomová hybridizace (Comparative Genomic Hybridization)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouřetězcová DNA
ELFO	Elektroforéza
FISH	Fluorescenční In Situ Hybridizace
FSH	Folikulo-stimulační Hormon
hCGH	Lidský choriový gonadotropin
ICSI	Injekce spermie do vajíčka
IVF	In-vitro fertilizace
MACS	Magnetem aktivované třídění spermií
MDA	Multiple displacement amplification
MESA	Odsátí spermií z nadvarlete
M-FISH	Mnohobarevná FISH
NGS	Nová generace sekvenování
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PICSI	Injekce předvybrané spermie do vajíčka
PGD	Preimplantační genetická diagnostika
PGS	Preimplantační genetický screening
SNP	Jednořetězcové polymorfismy
STR	Krátké tandemové repetice
TESA	Odsátí spermií z varlete
TESE	Odběr tkáně z varlete
XD	Monogenní onemocnění vázané na chromozom X dominantně děděné
XR	Monogenní onemocnění vázané na chromozom X recesivně děděné

## 1. Úvod

Od prvního provedení preimplantační genetické diagnostiky uplynulo už 27 let. U zrodu této metody stál prof. Alan Handyside. Od té doby diagnostika monogenních chorob u embryí spolehala na metody založené na polymerázové řetězové reakci. Nevýhodou ovšem byla časová a finanční náročnost a neuniverzálnost spočívající v nutnosti provádět vyšetření pro každou chorobu zvlášť. Opět to byl prof. Alan Handyside, který stál o řadu let později u zrodu PGD metodou karyomapping. Tato přelomová metoda primárně umožňuje provedení diagnostiky monogenního onemocnění u embryí získaných metodami asistované reprodukce. Mimo to ale karyomapping umožňuje i analýzu strukturních a početních aberací u sledovaných embryí. Právě ty hrají důležitou roli v lidské reprodukci a jsou hlavní příčinou těhotenských ztrát, neúspěšných pokusů asistované reprodukce a stojí i za narozením dětí s vrozenou vývojovou vadou.

Rozvoj preimplantační genetické diagnostiky a screeningu je podnícen rozvojem metod molekulární genetiky i asistované reprodukce a je vázán na technologické změny a pokrok v těchto oborech. Zejména díky posledním moderním postupům, jako je rychlé mražení embryí, kvalitní a jednoduše aplikovatelná hormonální stimulace, nebo transfer rozmraženého embrya v následujícím cyklu, a také díky metodám jako je karyomapping a sekvenování nové generace umožňujících univerzálním způsobem analýzu na úrovni celého genomu může preimplantační genetická diagnostika fungovat v takové míře a kvalitě, jako funguje dnes.

Cílem této diplomové práce je analýza embryí u celkem 123 pacientek podstupujících PGD monogenních chorob metodou karyomapping na klinice asistované reprodukce REPRAMEDA v období od června 2014 do září 2016. Tyto pacientky jsme rozdělili do tří skupin dle věku a mezi těmito skupinami budeme provádět srovnání výsledků. Konkrétně se zaměříme na věkový faktor, typ a původ aneuploidií. Dále bude provedena analýza a srovnání počtu crossing-overů u vybraných pacientek se zaměřením na korelaci s podílem aneuploidních embryí, respektive věkem pacientek.

## 2. Asistovaná reprodukce

Asistovaná reprodukce neboli umělé oplodnění je označení lékařských postupů a metod, při kterých se manipuluje s pohlavními buňkami, tedy spermii a oocyty (Mrázek, 2003). Je to soubor metod, jehož cílem je zvýšení šance na početí a narození zdravého dítěte.

Obor asistované reprodukce byl založen v roce 1978, kdy se podařilo ve Velké Británii přivést na svět první dítě po použití těchto technik. V České republice se toto podařilo o 5 let později.

V počátcích byla asistovaná reprodukce spojená výhradně s léčbou neplodnosti. Kombinace metod asistované reprodukce s preimplantačně genetickým vyšetřením embryí rozšiřuje použití této metody rovněž na plodné páry s rizikem přenosu genetických vad a onemocnění na potomky.

### 2.1 Metody asistované reprodukce

Základní metodou asistované reprodukce je *in-vitro* fertilizace (IVF). Tento výraz pochází z původně užšího označení tzv. oplodnění na misce, misce, které se docилоvalo prostřednictvím společného umístění spermii a vajíček v Petriho misce. Metoda vyžadovala velice málo iniciativy a zásahů ze strany embryologa, vše se ponechalo náhodě a vyčkávalo se, kolik embryí takto vznikne. Dnes se tato metoda nazývá jako tzv. klasická nebo také konvenční kultivace a výraz IVF se spíše užívá pro označení souboru metod v rámci mimotělního oplodnění – nejčastěji jako IVF léčba nebo IVF cyklus.

### 2.2 Průběh IVF cyklu

IVF cyklus je celý cyklus léčby, který zahrnuje hormonální stimulaci ovarii, odběr oocytů, odběr spermii, oplodnění mikromanipulační metodou a následnou kultivaci embryí (Beckmann *et al.*, 2010). V moderních postupech reprodukční medicíny se doporučuje transferovat jen jedno získané embryo do dělohy ženy a ostatní embrya zamrazit a uchovávat pro případné budoucí použití.

#### 2.2.1 Hormonální stimulace a odběr oocytů

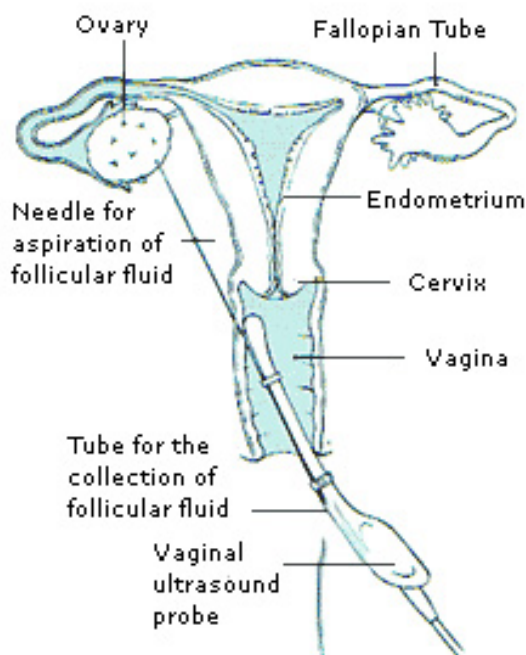
IVF cyklus začíná vždy hormonální stimulací ženy, jejímž cílem je dozrání většího množství oocytů ve vaječnicích. Někdy se ženy – především dárkyně vajíček – obávají, že jim hormonální stimulace a odběr oocytů sníží jejich primární zásobu. To však není pravda, jelikož při každé ovulaci má žena připravenou sadu vajíček (antrálních folikulů) – zpravidla 20-30, z nichž ale za normálních okolností uzraje jedno, maximálně dvě. Pokud není toto vajíčko oplozeno, zaniká mechanismem atrezie stejně tak jako ostatní rostoucí folikuly (Trávník a Čech, 2011). Stimulační

preparáty tedy nesnižují celkovou zásobu oocytů, ale pouze působí na kontrolní mechanismy, které v přirozeném cyklu brání těmto oocytům dozrát.

Růst antrálních ovariálních folikulů je podněcován FSH (folikuly stimulujícím hormonem) ze skupiny gonadotropinů (Trávník, 2015). Následně jsou aplikovány další léky podle typu protokolu. Rozlišujeme dlouhý stimulační protokol s agonisty GnRH analogy a krátký stimulační protokol s antagonisty GnRh. V dnešní době se častěji využívá stimulace krátkým protokolem z toho důvodu, že při něm lze prakticky eliminovat riziko hyperstimulačního syndromu (OHSS).

V průběhu stimulace je ultrazvukem prováděn pravidelný monitoring folikulogeneze. Při velikosti folikulů přibližně 18 mm je stanoven termín punkce folikulární tekutiny (OPU). Konečného dozrání folikulu i v něm obsaženého oocytu je dosaženo injekčním podáním lidského choriového gonadotropinu (hCG), který se podává 36-40 hodin před punkcí. Hormon hCG nahrazuje funkci druhého gonadotropinu – luteinizačního hormonu, který by dozrání vajíčka řídil standardně (Trávník, 2015).

Odběr oocytů se provádí v celkové anestezii, transvaginální cestou na obou vaječnicích. V průběhu zákroku dochází k odsátí folikulární tekutiny speciální jehlou. Celý proces je monitorován vaginální ultrazvukovou sondou. V odsáté folikulární tekutině embryolog vyhledá oocyty a následně je očistí od kumulárních buněk a umístí do inkubátoru, kde jsou udržovány stále podmínky – 37 °C a 5-6% CO<sub>2</sub> (Řežábek, 2004).



Obrázek 1 – Punkce folikulární tekutiny pomocí tenké jehly vaginální cestou (zdroj: [http://kapetanakis-center.gr/wp-content/uploads/2015/05/oocyte\\_retrieval.jpg](http://kapetanakis-center.gr/wp-content/uploads/2015/05/oocyte_retrieval.jpg))

## 2.2.2 Oplodnění mikromanipulačními metodami

Pokud je to možné, provede se v den punkce i odběr ejakulátu formou masturbace, případně se použijí spermie z rozmraženého vzorku. V případě, že v ejakulátu nejsou přítomny spermie, je možné se pokusit je předem získat pomocí mikrochirurgických metod – odsátí spermií z nadvarlete (MESA), odsátí spermií z varlete (TESA), odběr tkáně z varlete (TESE).

Po odstranění seminální plazmy, jejímž cílem je minimalizace rizika bakteriální infekce, a po eliminaci nepohyblivých spermií pomocí centrifugace, se přistupuje k fázi oplozování. V dnešní době se pro oplodnění vajíčka používají speciální mikromanipulační metody ICSI a PICSI. ICSI je zkratkou pro metodu intracytoplazmatické injekce spermie a jak tento název naznačuje, embryolog vybírá spermii, kterou pomocí mikromanipulátoru injektuje přímo do vajíčka. U metody PICSI jde o injekci tzv. „předvybrané“ spermie, selektované pomocí vazby na hyaluronan. Tuto vazbu vykazují pouze spermie, které by byly schopny *in-vivo* oplodnit vajíčko. V případě následného užití preimplantačně genetických metod je ICSI/PICSI vyžadováno z důvodu minimalizace rizika kontaminace vyšetřovaného vzorku DNA embrya prostřednictvím DNA spermií, které by zůstaly na povrchu vajíčka (Harper a SenGupta, 2012).

Novinkou v oblasti výběru spermií pro oplození je MACS neboli magnetem aktivované třídění buněk. Tato metoda umožňuje separaci apoptotických spermií, které se projevují expozicí fosfatidylserinu na povrchu membrány. Ejakulát se smíchá se směsí obsahující magnetické mikročástice Annexinu V, který vykazuje pozitivní vazbou s fosfatidylserinem. Vzorek se následně nechá protéct kolonou, kde se na okrajích magneticky zachytávají částice Annexinu V, a tedy i apoptické spermie. Spermie s intaktní DNA protékají dále a na konci kolony se shromažďují pro další použití libovolné oplozovací techniky v asistované reprodukci (Makker *et al.*, 2008). Například v práci Gila *et al.* (2013), kde bylo analyzováno 499 pacientek, se prokázalo, že metoda MACS signifikantně zvyšuje hodnoty ukazatele četnosti těhotenství. Sánchez-Martín *et al.* (2017) zase uvádí, že MACS s následným využitím metody ICSI dramaticky snižuje potratovost.

## 2.2.3 Biopsie buněk

Pro preimplantačně genetickou analýzu embrya je nutné z něj odebrat jednu až několik buněk. Dříve byla převažující metodou biopsie jedné blastomery ve stádiu raného embrya (3. den vývoje). V poslední době ale zcela převládla biopsie 5-10 buněk trofektodermu z embrya ve stádiu blastocysty (5. – 6. den). Tento materiál se jeví jako reprezentativnější z důvodu většího množství odebraných buněk a také z důvodu tzv. self-correcting mechanismu, který se vyskytuje v raných fázích embryonálního vývoje. U třídenního embrya se často vyskytují komplexní aneuploidie,

které ve zhruba ve 20 % případů během dalšího vývoje z embrya vymizí, což může v případě vyšetření blastomery vést k falešně pozitivnímu výsledku u vyšetřovaného embrya (Forman *et al.*, 2011, Ventruba *et al.*, 2013).

Kromě dvou popsaných způsobů je možné provést také preimplantační vyšetření u odebraných pólových tělísek. Nevýhodou ale je, že výsledek nereprezentuje celý genom embrya, ale pouze jeho maternální genetickou sadu. Tato metoda se však využívá v zemích, kde není možné použít jiný odběr buněk embrya z etických, nebo legislativních důvodů. Manipulace s pólocyty je v takové situaci možná z toho důvodu, že se jedná pouze o vedlejší produkt vznikající během vývoje oocyty, který se ale dál žádným způsobem nepodílí na dalším vývoji embrya (Thornhill a Handyside, 2008). V České republice se vyšetření pólových tělísek provádí minimálně, jelikož nemá žádnou výhodu oproti výše zmíněným způsobům biopsie embrya.

### 2.2.3.1 Biopsie blastomery

Ve stádiu raného embrya (3. den) má embryo zhruba osm buněk, kterým říkáme blastomery. Prvním krokem pro jejich odběr je narušení *zony pellucidy* mikromanipulátorem – tzv. asistovaný hatching. Díky tomu je následně možné pipetou odebrat buňku pro vyšetření. Výhodou biopsie blastomery je, že není nutné speciální laserové zařízení pro odebrání buněk. Další výhodou je, že časový rámec umožňuje transfer čerstvého embrya ještě 5. den jeho vývoje. (Lukaszuk *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2008, Ventruba *et al.*, 2013).



Obrázek 2 – Biopsie blastomery raného embrya (zdroj: <http://paveltravnik.blogspot.cz/2013/10/preimplantacni-geneticka-diagnostika.html>)



### 2.2.3.2 Biopsie blastocysty

Ve stádiu blastocysty (5. – 6. den) je embryo kompaktní a není již rozděleno na jednotlivé buňky. Má ale dvě odlišné buněčné struktury – trofektoderm, ze kterého později vznikne placenta a ICM (inner cell mass) neboli vnitřní buněčnou hmotu, ze které vzniknou zbývající tkáň embrya. Z trofektodermu se odebírá pomocí laseru skupina 5-10 buněk (Adler *et al.*, 2014). Výhodou tohoto postupu je větší množství získaných buněk, a tedy i genetického materiálu k analýze a možnost odhalení mozaicismu (Forman *et al.*, 2011). Při užití tohoto postupu je ale nutné embryo po odběru buněk (5. – 6. den) zamrazit - vitrifikovat - a transferovat je až v dalším cyklu, což je některými odborníky považováno za nevýhodu. Do fáze blastocysty však dozrají jen kvalitní embryo schopná implantace, což je jisté selekční kritérium. Vitřifikace je navíc oproti původním technikám mrazení velice šetrná metoda (Loutradi *et al.*, 2008).

Transfer rozmraženého (devitřifikovaného) embrya se provádí v následujícím cyklu. K nárůstu endometria se většinou využívá přirozené změny hladiny hormonů vlivem ovulačního cyklu. U starších žen, žen bez ovulace nebo s nízkou děložní sliznicí, se aplikuje HRT (hormon replacement therapy) neboli hormonální substituce, která pomůže připravit děložní sliznici do vhodného stádia pro implantaci embrya. Jelikož stimulační preparáty využívané pro dozrání většího množství vajíček mohou mít negativní vliv na nárůst děložní sliznice, osvědčil se v poslední době transfer až ob jeden menstruační cyklus, kde je delší prostor pro regeneraci organismu.



Obrázek 3 – Biopsie trofektodermu embrya ve fázi blastocysty (zdroj: [https://www.pgdnerland.nl/sites/pgd/files/styles/token-image-small/public/uploads/trofektoderm\\_biopsie\\_trophectoderm\\_biopsy.jpg?itok=T1abveph](https://www.pgdnerland.nl/sites/pgd/files/styles/token-image-small/public/uploads/trofektoderm_biopsie_trophectoderm_biopsy.jpg?itok=T1abveph))

### 3. Preimplantační genetická vyšetření

Preimplantačně genetická vyšetření mají za cíl vybrat tzv. geneticky zdravé embryo, tedy embryo bez konkrétní genetické zátěže. Vyšetření dělíme na preimplantační genetický screening a preimplantační genetickou diagnostiku. Preimplantační genetický screening, často také zkracován jako PGS, je plošný screening aneuploidií u embryí, a to na úrovni jednotlivých chromozomů. Preimplantační genetická diagnostika (PGD) je metoda, která se zaměřuje na detekci konkrétních mutací zděděných od rodičů, které způsobují vznik vzácného dědičného onemocnění. Kromě detekce monogenních onemocnění může PGD cílit také na detekci translokací či jiných strukturních chromosomálních aberací, jež způsobují časně těhotenské ztráty, případně narození dítěte s vrozenou vývojovou vadou.

#### 3.1 Typy preimplantačních vyšetření

Preimplantační genetická vyšetření prošla od roku 1990, kdy bylo toto vyšetření poprvé provedeno u lidského embrya (Handyside *et al.*, 1990), radikální proměnou. S tím, jak se vyvíjely metody, se také měnily termíny pro popis jednotlivých vyšetření prováděných u vzorků odebraných z embryí. Nejdříve se používal jednotný pojem preimplantační genetická diagnostika, následně se zavedlo označení screening pro necílenou analýzu aneuploidií. V dnešní době se názvosloví zase vrací tzv. ke kořenům. Zavedly se pojmy PGT-M, PGT-T a PGT-A, kde PGT znamená preimplantační genetické testování, M doplňuje monogenní choroby, T translokace a A aneuploidie. V brzké době tedy můžeme očekávat nahrazení zkratk PGD a PGS.

#### 3.2 Preimplantační genetický screening (PGS)

Již před více než 23 lety analyzoval s pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) tým Santiaga Munného aneuploidie chromozomů 13, 18, 21, X a Y (Munné *et al.*, 1993). Materiálem pro toto vyšetření byla jedna blastomera z třídenního raného embrya.

Výhoda metody FISH spočívá v tom, že nevyžaduje amplifikaci, naopak nevýhodou je omezený počet sond – tedy i omezený počet chromozomů, které mohou být analyzovány. Standardně začala být používána M-FISH (multicolor nebo také mnohobarevná FISH) s 5-9 sondami ve dvou sekvenčních hybridizacích (Liehr *et al.*, 2004). Nejčastěji byly analyzovány autozomy 13, 15, 16, 17, 18, 21 a 22 a gonozomy X a Y.

Tato metoda ale našla své kritiky. Nejdříve Staessen *et al.* (2004), později Mastenbroek *et al.* (2007) zpochybnili PGS s využitím FISH s tím, že tato metoda nemá požadovaný dopad na zvýšení úspěšnosti IVF cyklů. Kritici článků (Cohen a Grifo, 2007; Kuliev a Verlinsky, 2007; Munné et

al., 2007; Harper *et al.*, 2008, Handyside a Thornhill, 2007; Wilton, 2007) ale namítali, že za špatnou úspěšností metody PGS stojí zejména špatná embryologická práce<sup>1</sup> nikoliv selhání metody jako takové. Část odborníků a reprodukčních gynekologů ale s tímto článkem souhlasila (např. Collins, 2007) a díky tomu došlo v následujících letech k poklesu cyklů s využitím PGS, což se později nazvalo jako Mastenbroekův fenomén.

Odborná veřejnost následně přiznala, že testování pouze tří autozomů a dvou gonozomů z celého počtu chromozomů není pro preimplantačně genetickou analýzu embryí dostatečné. Docházelo tedy k rozvoji PGS a zavádění nových metod – zejména těch, které vyšetřují DNA embrya na úrovni celého genomu. Metody komparativní genomové hybridizace (CGH) a zejména potom komparativní genomové hybridizace na čipu (aCGH) vyžadují celogenomovou amplifikaci DNA. Díky těmto metodám je možné nejen analyzovat všech 24 chromozomů, ale také stanovovat početní změny na úrovni částí chromozomů neboli segmentální aneuploidie. Kromě pokrytí všech chromozomů mají tyto metody také vyšší rozlišení (Wells *et al.*, 2002; Harton *et al.*, 2013; Fragouli *et al.*, 2008; Le Caignec *et al.*, 2006; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2013; Voullaire *et al.*, 2000).

V případě použití PGS metodou aCGH v rámci cyklu umělého oplodnění, došlo ke zvýšení podílu implantovaných embryí a četnosti těhotenství (Yang *et al.*, 2012). Vzhledem k tomu, že se úspěšnost asistované reprodukce zvýšila, bylo doporučeno transferovat pouze jedno embryo. Transfer dvou embryí nezvyšuje šanci na otěhotnění, naopak pouze zvyšuje riziko vícečetného těhotenství (Schoolcraft *et al.*, 2010). Vícčrčata se rodí dříve a je u nich tím pádem větší riziko závažných komplikací, které mohou mít pro děti i trvalé zdravotní následky.

V současnosti je v rámci PGS na renomovaných pracovištích nejrozšířenější technika NGS – sekvenování nové generace. Hlavní benefit této metody spočívá v ještě vyšším rozlišení a lepším dynamickém rozsahu detekce odchylek v počtu kopií, díky čemuž je možné rozdělit embrya do tří skupin – euploidní, mozaicistní a aneuploidní. Další výhodou metod založených na NGS by měla být také nižší cena za vyšetření, protože je možné analyzovat velké množství vzorků současně.

### 3.3 Preimplantační genetická diagnostika (PGD)

Ještě před prvním PGS byla poprvé užita v roce 1990 metoda preimplantační genetické diagnostiky. Profesor Alan Handyside se svými spolupracovníky z londýnské Royal Postgraduate Medical School (Handyside *et al.*, 1990) stanovili pohlaví embryí u páru s dokonce dvěma

---

<sup>1</sup> Obě práce pocházely z pracoviště The Free University of Brussels. Podíl implantovaných embryí byl u kontrolní skupiny jen 11,5 %, u skupiny pacientek, které podstupovaly PGS, se navýšil na 17,1 %, což ale nebyl statisticky signifikantní nárůst.

závažnými X-vázanými chorobami – adrenoleukodystrofií a X-vázanou mentální retardací. Pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR) se amplifikovala specifická sekvence chromozomu Y. Byla rozlišena embrya ženského a mužského pohlaví a následně dvě embrya ženského pohlaví transferována. V roce 1992 již bylo provedeno preimplantačně genetické vyšetření pro monogenní onemocnění nevázané na pohlaví. Konkrétně se jednalo o cystickou fibrózu, a tedy o detekci mutace v genu CFTR. K tomu byla využita nested-PCR zacílená na zmnožení oblasti v okolí mutace. (Handyside *et al.*, 1992). Preimplantační genetická diagnostika založená na metodě PCR byla pak rozšířena i pro další choroby a používala se ještě poměrně nedávno. Rizikem ale byl tzv. alelový drop-out (ADO), při kterém dojde u heterozygotů k amplifikaci pouze jedné alely ze dvou, což může vést k falešně pozitivním či falešně negativním výsledkům analýzy. Později se pro PGD monogenních onemocnění používala metoda kvantitativní fluorescenční PCR (QF-PCR) založená na analýze dědičnosti krátkých tandemových repetitiv (STR – Short Tandem Repeat) ve vazbě s mutovaným genem. Jednalo se tedy o nepřímou genetickou diagnostiku, která v kombinaci s přímou detekcí mutace výrazně snižovala rizika spojená s ADO. Tímto postupem bylo možné provádět genotypizaci embryí s téměř stoprocentní spolehlivostí. Nevýhodou tohoto postupu byla nutnost provádění analýzy pro každé monogenní onemocnění zvlášť, což bylo časově i finančně náročné.

V roce 2009 přišel průkopník preimplantačně genetické diagnostiky Alan Handyside s novou metodou pro diagnostiku monogenních onemocnění – karyomapping (Handyside *et al.*, 2009). Karyomapping je metodou univerzální, protože umožňuje nepřímou DNA diagnostiku pro všechny lokusy lidského genomu, mimo to umožňuje i analýzu aneuploidií. Metoda je založena na přesném určení čtyř rodičovských haplotypů a zmapování crossing-overů v pohlavních buňkách, jejichž splynutím vzniklo embryo. Jedinečnost metody karyomapping spočívá ve spojení metod PGD a PGS. Mimo detekci monogenních onemocnění a vyřazení embryí s danou chorobou, karyomapping umožňuje také analýzu chromozomálních abnormalit – početních a strukturních změn.

Preimplantační genetická diagnostika se zaměřuje i na analýzu aneuploidií, které vznikají v důsledku přítomnosti balancované translokace či jiné strukturní aberace u jednoho z partnerů. Nejdříve byla pro tyto účely používána technika FISH, nakonec ale došlo k rozvoji metody a-CGH, která je pro tento účel univerzální, neboť umožňuje analýzu aneuploidií všech chromozomů v dostatečně velkém rozlišení (Wells *et al.*, 2002). Nevýhodou je nemožnost rozlišit, zda balancovaná embrya nesou normální chromozomy, anebo se jedná o přenašeče balancované strukturní aberace. Stejně tak jako při diagnostice aneuploidií se později začalo i při diagnostice translokací uplatňovat sekvenování nové generace (NGS), které je pro tento účel rovněž univerzálně použitelné (Fiorentino *et al.*, 2014). PGD translokací je možné provádět rovněž

pomocí karyomappingu, který je jedinou metodou umožňující dále rozlišit balancovaná embrya na zcela normální a na ta, která nesou oba derivované chromozomy a jedná se o přenašeče balancované translokace (Natesan *et al.*, 2014a). Pokud je nosičství balancované translokace spojeno s rizikem fenotypového projevu s neúplnou penetrancí je PGD metodou karyomapping u takové translokace nejlepší volbou.

## 4. Genetické změny analyzovatelné metodou karyomapping

Metodou karyomapping je možné zjistit celou řadu genetických změn. Primární aplikace této metody je genotypizace embryí u monogenních onemocnění, k čemuž je nutné znát kauzální mutaci. Karyomapping je univerzální metoda, která umožňuje PGD všech monogenních onemocnění s autozomální, gonozomální, recesivní i dominantní dědičností. Díky nepřímé DNA diagnostice je karyomapping vhodnou metodou pro diagnostiku Huntingtonovy choroby a umožňuje provedení PGD bez toho, aniž by osoba sama či pracovníci zacházející se vzorky, případně kliničtí genetici či reprodukční gynekologové znali genetický statut osoby, která je v riziku tohoto onemocnění a nechce se nechat vyšetřit. Toto platí i pro ostatní onemocnění s pozdním nástupem.

### 4.1 Monogenní onemocnění s kauzální mutací

Monogenní onemocnění jsou způsobena mutací jednoho genu, od toho je odvozen jejich anglický název *single-gene disorders*. Mutace v genech vznikají buďto *de novo*, anebo jsou předávány z generace na generaci v paternální či maternální linii (Stulp *et al.*, 2006). Incidence monogenních poruch je zhruba 5 postižených na 10 000 jedinců, což znamená, že je řadíme mezi vzácná onemocnění. Závažnost spočívá v tom, že existuje 8 000 – 10 000 různých poruch, takže souhrnný počet pacientů je nezanedbatelný. Přestože jsou jednotlivá onemocnění málo početná, ve svém souhrnu způsobují až 8 % morbidity a mortality v rámci Evropské unie (Gaillyová, 2013). Monogenní choroby se nejčastěji projeví ihned po narození, kde postihují 4 až 5 % novorozenců a kojenců. Existují ale i choroby, které se projeví v průběhu dětství či dospělosti – ty označujeme jako choroby s pozdním nástupem (Gaillyová, 2013). Podle lokalizace mutace dělíme tato onemocnění základním způsobem na autozomální a gonozomální. Dle způsobu dědičnosti potom na recesivní a dominantní. Poslední nejméně prozkoumanou skupinou jsou choroby s mitochondriální dědičností.

#### **Choroby s autozomálně dominantní dědičností**

Tyto choroby se projevují jak u homozygotů, tak u heterozygotů. Stačí přítomnost mutace v jedné alele. Pokud je jeden z rodičů heterozygot a druhý zdravý homozygot, riziko přenosu dané choroby na potomka je 50 %. Mezi tyto choroby patří například neurofibromatóza, myotonická dystrofie, polycystická choroba ledvin.

#### **Choroby s recesivní dědičností**

Většina monogenních chorob má recesivní dědičnost. Hlavním nebezpečím tohoto způsobu dědičnosti je fakt, že postižený jedinec se může narodit dvěma zdravým osobám, které jsou

přenašeči daného onemocnění. S 25% pravděpodobností se dvěma přenašečům narodí nemocný potomek, se stejnou pravděpodobností zdravý potomek, který onemocnění nebude přenášet dále. V 50 % případů se narodí zdravý přenašeč daného onemocnění. Pokud se reprodukce účastní zdravý jedinec a přenašeč, pak se v 50 % případů narodí opět přenašeč onemocnění. Mezi tyto choroby patří cystická fibróza, fenylketonurie nebo spinální muskulární atrofie. Nejčastějším onemocněním je cystická fibróza, kde je přenašečem každý 25. člověk.

### **Choroby vázané na pohlaví**

Choroby vázané na pohlaví jsou v drtivé většině případů způsobené mutací na chromozomu X. Opět je rozdělujeme na dominantní a recesivní, přičemž prakticky většina onemocnění je děděna recesivně. Nejčastějším X-vázaným onemocněním jsou hemofilie, Duchennova muskulární dystrofie a syndrom fragilního X, tyto jsou děděny recesivně. Mezi dominantní můžeme zmínit například vitamin D-rezistentní rachitis.

U recesivních onemocnění jsou postižení muži, a ženy, jelikož mají mutovanou jednu alelu, jsou přenašečky. Přenašečky mají buďto mírné nebo žádné fenotypové projevy. Polovina narozených dcer žen přenašeček jsou opět přenašečky, druhá polovina dcer je zdravá. 50 % synů je nemocných a 50 % synů je zdravých.

U dominantních onemocnění přenáší nemocný muž tuto nemoc na všechny své dcery, které jsou potom nemocné. Tyto dcery mají 50 % svých dětí nemocných.

## **4.2 Chromozomové abnormality**

Chromozomové abnormality jsou odchylky od normálního karyotypu a můžeme je rozlišit na početní (numerické) a strukturní. U početních je přítomen atypický počet jednotlivých chromozomů (aneuploidie) nebo celých sad (polyploidie). Strukturní se vyznačují změnou struktury, a to konkrétně zlomy, přeskupením, nebo ztrátou části chromozomu atd.

10-15 % všech klinických gravidit končí spontánním abortem. Přibližně 50 % těhotenských ztrát v prvním trimestru a 30 % ve druhém trimestru je způsobeno chromozomovými poruchami. Ve většině případů - 86 % se jedná o numerickou chromozomovou aberaci, 6 % případů tvoří strukturní chromozomové aberace a zbytek jsou aberace vyskytující se jen v mozaikách (8%) (Goddijn *et al.*, 2000).

### **4.2.1 Početní aberace**

Početní aberace jsou spojeny s nadbytečnou nebo nedostatečnou expresí několika stovek genů, což má výrazný dopad na fenotyp a zdraví jedince. Nejčastějším typem chromozomových aberací

jsou aneuploidie. Většina aneuploidních embryí se neimplantuje a ta, která se implantují, skončí v drtivé většině případů spontánním potratem v raném stádiu těhotenství. I přesto evidujeme zhruba 3-4 % aneuploidních klinických těhotenství (Nussbaum *et al.*, 2004 a Hassold a Hunt, 2001). Díky kontrolním mechanismům embrya a lidského organismu a kvalitní prenatální diagnostice se nakonec s aneuploidií autozomů či gonozomů narodí jen zhruba 0,3 % dětí (Hassold a Hunt, 2001). Slučitelné se životem jsou ve výjimečných případech pouze trizomie chromozomů 21, 18 a 13 a aneuploidie pohlavních chromozomů.

Trizomie je stav, kdy je v karyotypu jeden nadbytečný chromozom. Normální člověk má chromozomů 46, člověk s trizomií má chromozomů 47. Nejčastější poroditelnou a se životem slučitelnou početní změnou autozomů je trizomie chromozomu 21 neboli Downův syndrom. Děti s Patauovým či Edwardsovým syndromem mají prognózu obvykle velice špatnou a 50 % z nich nepřežije první dva měsíce svého života.



Obrázek 4 – Trizomie chromozomu 21 – Downův syndrom (zdroj [www.prenatalsafe.cz](http://www.prenatalsafe.cz))

Stav, kdy naopak jeden chromozom chybí, se nazývá monozomie. Pokud se tento stav týká autozomů, pak je u lidí letální. Slučitelná se životem je pouze monozomie gonozomu X – tzv. Turnerův syndrom. Dalšími početními aberacemi gonozomů jsou například Klinefelterův syndrom – XXY, trizomie X – XXX nebo Syndrom Jacobsové – XYY. Tyto syndromy často nemusí mít viditelné klinické projevy a odhaleny můžou být až při problémech s reprodukcí.





Obrázek 5 – Monozomie chromozomu X – Turnerův syndrom (zdroj: <http://www.wikiskripta.eu/images/thumb/1/1b/45%2CX.jpg/300px-45%2CX.jpg>)

Pravděpodobnost výskytu Downova syndromu u plodu se zvyšuje se zvyšujícím se věkem matky. Tento efekt byl pozorován už v roce 1993 (Penrose) a je spojen s tvorbou gamet u žen, respektive s vyšším podílem chyb v meiotickém dělení.

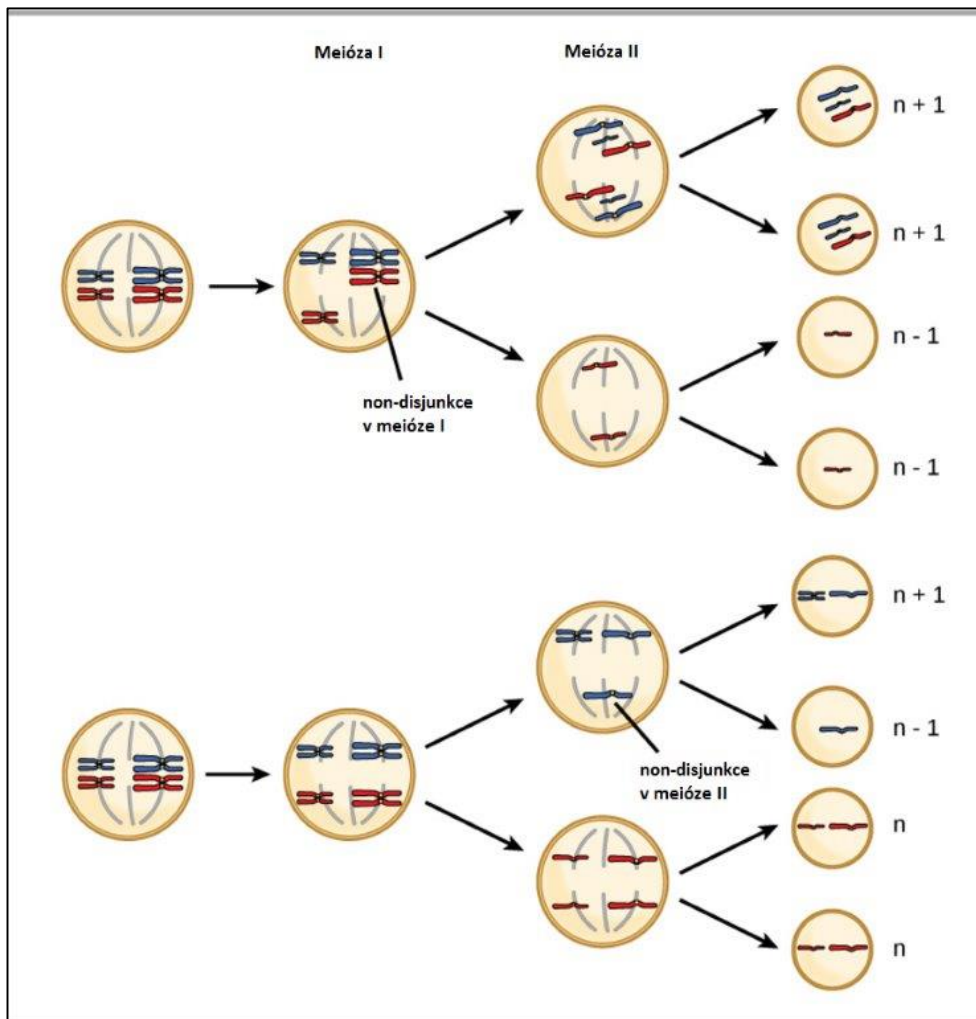
#### 4.2.1.1 Vznik chromozomových abnormalit

Donedávna se považovalo za hlavní příčinu vzniku chromozomových abnormalit chybné buněčné dělení v meióze, důsledkem non-disjunkce (nerozpojení) chromozomů jak v meióze I nebo v meióze II. Výsledkem mitotické non-disjunkce pak u embryí často vzniká mozaicismus (Gardner a Sutherland, 2004). V letech 2011 a 2012 se ale analýzou pólových buněk oocytů na čipech určených pro detekci jednonukleotidových polymorfismů (SNP čipy) prokázalo, že ještě častěji než non-disjunkcí vznikají aberace předčasnou segregací sesterských chromatid v meióze I (Treff *et al.*, 2009; Gabriel *et al.*, 2011; Handyside *et al.*, 2012). Tato varianta už byla publikována v roce 1991 (Angell), ale celých 20 let nebyla považována za tak zásadní.

Frekvence aneuploidii je mnohem častější u oocytů než u spermií, to potvrzuje klinická praxe i literatura. Například Azmanov *et al.*, (2007) uvádí, že přibližně ve 20-25 % případů našli u oocytů numerickou aberaci. U spermií je například dle Guttenbacha *et al.* (1997) frekvence aneuploidii odhadována na 3-4 %. To je způsobeno odlišností spermatogeneze a oogeneze.

Tvorba oocytů započne v prenatálním vývoji a zastaví se v meióze I, pokračování meiózy I a začátek meiózy II proběhne v postnatálním vývoji, zhruba každých 28 dní v průběhu ovulace, v případě, že je oocyt oplozen, dokončí se meióza II (Nussbaum a spol., 2004). Spermatogeneze

začíná u mužů až v období 10.-12. roku. Vznik nové spermie trvá 72-90 dní a je rozdělen na 5 fází – mitóza spermatogonií, první meióza, druhá meióza, spermiogeneze a finální transport nadvarletem.



Obrázek 6 - Schéma možných typů chromozomových aneuploidii způsobených poruchami prvního nebo druhého meiotického dělení. (upraveno dle <https://voer.edu.vn/c/errors-in-meiosis/a64457a4/753296a2>)

#### 4.2.2 Strukturní abnormality

Strukturní abnormality vznikají jako zlomy DNA s následným přeskupením či ztrátou zlomených částí chromozomů. Rozlišujeme je na balancované a nebalancované, podle fenotypového projevu, respektive podle množství DNA. Pokud dojde ke ztrátě či zisku množství DNA materiálu, pak je tato změna označována jako nebalancovaná a má v případě porozené těžší fenotypový dopad. Tato varianta je detekovatelná pomocí metody karyomapping. Naopak u balancované abnormality je množství DNA zachované. I když i tato varianta může mít v závislosti na pozici zlomů dopad na fenotypový projev jedince (poziční efekt), častějším problémem je vliv balancované změny na reprodukci daného jedince (Benner *et al.*, 2008).

Strukturní abnormality vznikají buď z neznámých příčin spontánně, nebo působením mutagenů (fyzikální, biologické, chemické). Mezi základní typy patří delece a mikrolece, duplikace a mikroduplikace, inverze, inverze a translokace – reciproké a robertsonské.

### 4.3 Genetická rekombinace

Meióza se skládá ze dvou po sobě jdoucích dělení označovaných jako meióza I a meióza II, přičemž každá meióza se ještě skládá z několika fází – profáze, prometáfáze, metafáze, anafáze, telofáze a cytokineze. Profáze I se dále dělí na stádia leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze. Standardně během profáze I dochází k párování chromozomů a tvorbě tzv. bivalentů. Každý bivalent je složen z jednoho chromozomu od matky a druhého od otce, celkem tedy ze čtyř chromatid. Následně dochází ke crossing-overu, což je mechanismus, při kterém dochází ke vzniku chiasmát, následně ke zlomům v dsDNA (double strand breaks – DSB) a reparaci pomocí reciproké výměny úseků nesesterských chromatid (Tsai a McKee, 2011). Pravděpodobnost jejich vzniku vzrůstá se zvyšující se vzdáleností od centromery (Phadnis *et al.*, 2011).

Prostřednictvím crossing-overů (chromozomové rekombinace) dochází ke zvyšování genetické variability. U většiny organismů jsou chromozomy bez crossing-overů jen velmi vzácné (Carlton *et al.*, 2006). Správná funkce genetické rekombinace v meióze je velice důležitá, její narušení vede s vyšší pravděpodobností ke vzniku meiotických non-disjunkcí, a to zejména v případě, kdy je crossing-over příliš blízko telomery nebo centromery (Hassold a Hunt, 2001). Dalo by se tedy předpokládat, že by měla být tvorba, počet a poloha crossing-overů kontrolovaná a regulovaná, nicméně několik teorií a studií tuto skutečnost popírá. Individuální rozdíly v počtu rekombinací jsou například dle Lynna *et al.* (2002) a Hassolda *et al.* (2009) kolem 15-25 % a jejich počet závisí i na pohlaví (Kong, *et al.*, 2010). Metodou karyomapping je možné pozice a počty crossing-overů sledovat, což je mimořádně důležité při určování statutu daného embrya ve sledované oblasti mutovaného genu a pro odhad spolehlivosti PGD u konkrétního embrya.

## 5. Cíle diplomové práce

- Podrobná analýza dat získaných od pacientů kliniky REPROMEDA, podstupujících preimplantační genetickou diagnostiku s využitím metody karyomapping.
- Teoretické a praktické zvládnutí metody karyomapping.
- Porovnání a statistické zhodnocení výskytu aneuploidních embryí u žen rozdělených do tří věkových skupin – do 30 let, od 31 do 35 let a od 36 let.
  - Zhodnocení výskytu aneuploidií v závislosti na věku
  - Rozdělení aneuploidií dle původu a typu
  - Analýza segmentálních versus celochromozomálních aneuploidií
  - Analýza chyb prvního a druhého meiotického dělení
- Výběr 6 vhodných pacientek pro analýzu crossing-overů a statistické zhodnocení výskytu crossing-overů
  - Analýza maternálních a paternálních crossing-overů
  - Srovnání počtu crossing-overů v závislosti na věku
  - Zhodnocení míry aneuploidních embryí v souvislosti s počtem crossing-overů

## 6. Materiál a metodika

### 6.1 Soubor pacientek

Pro vypracování této diplomové práce byla použita data z období od června 2014 do září 2016. V této době bylo získáno celkem 638 embryí od 123 pacientek. 582 vzorků pocházelo z biopsie trofektodermu, 56 z biopsie blastomer. Úspěšně se jich podařilo analyzovat 615.

V případě biopsie blastomer se odebírá z raného embrya den tři jedna až tři buňky. Následuje preimplantačně genetická analýza, která stanoví embrya vhodná k transferu. Tato embrya jsou kultivována do 5. dne vývoje, kdy jsou transferována do dělohy ženy.

Pro získání bioptátu trofektodermu se používají embrya stádia blastocysty, tedy 5. až 6. den kultivace. Zkušený embryolog odebere skupinu buněk pomocí mikromanipulátoru s laserem. Embrya jsou po biopsii vitrifikována, tedy zamražena nejšetrnější a nejmodernější metodou. Je provedeno preimplantačně genetické vyšetření, na které je podstatně více času, jelikož vhodné embryo je transferováno do dělohy ženy až v následujícím menstruačním cyklu. Ostatní vhodná embrya zůstávají zamražena pro případné budoucí použití. Důvodem, proč se netransferují embrya později než 5. nebo 6. den jejich vývoje je ten, že děložní sliznice ženy již není schopna připravit podmínky pro zahníždění.

### 6.2 Odběr a zpracování oocytů v rámci IVF s PGD

#### **Hormonální stimulace a odběr oocytů**

Každý IVF cyklus začíná hormonální stimulací ženy, jejímž cílem je získání většího množství oocytů. U pacientek podstupujících preimplantační genetickou diagnostiku je nutné brát v potaz, že část embryí bude vyřazena z důvodu přítomnosti mutovaného genu, další část z důvodu přítomnosti chromozomálních aberací. Zásadní roli v tomto hraje věkový faktor. U pacientek s vyšším věkem je nutné počítat s větším množstvím aberací a celkově nižším počtem získaných oocytů, respektive embryí, která dozrají do stádia blastocysty. Snahou tedy je zvolit optimální stimulační protokol a optimální množství jednotek hormonů, které bude aplikováno, a dosáhnout tak kvalitní odezvy, většího množství získaných oocytů a zároveň nepřivodit hyperstimulační syndrom.

Na klinice REPROMEDA se nejčastěji využívají rekombinantní stimulační preparáty, které se aplikují v krátkém protokolu. Tento postup zajišťuje nejlepší odezvu a minimalizaci rizika hyperstimulace. Některé páry ale volí i odlišné stimulační protokoly a preparáty, především z finančních důvodů. Odběr oocytů je potom proveden v krátkodobé anestezii tenkou kanylou zavedenou poševní cestou.

## Zpracování oocytů a oplodnění

Po odběru folikulární tekutiny dochází k vyhledávání oocytů pod mikroskopem, následně se vajíčka přenesou do fertilizačního média (Fert, ORIGIO). Během manipulace s oocyty (nebo embryi) mimo kultivační podmínky, která je delší, než jednu až dvě minuty se používá manipulační oplachové médium. Na klinice REPROMEDA se využívá manipulační médium Flushing medium ORIGIO, které obsahuje chemickou sloučeninu HEPES s pufrovacími vlastnostmi, které lépe udrží pH v roztoku. K minimalizaci kolísání teploty a pH během in vitro kultivace a při všech manipulacích s gametami a embryi se kapky s médiem ještě překrývají parafinovým nebo minerálním olejem (Ovoil, Vitrolife).

Po oplození vajíček metodami ICSI nebo PICSI se dávají vzniklá embrya do kultivačního média Sage 1-step od ORIGIO, ve kterém zůstávají až do doby kryokonzervace nebo transferu.

V průběhu kultivace jsou embrya umístěna ve stolním CO<sub>2</sub> inkubátor G185 od firmy K-SYSTEMS s redukovanou atmosférou kyslíku (redukce oproti vzdušným 21 % na 5 % O<sub>2</sub>), 6% CO<sub>2</sub> a 37°C, což jsou podmínky, které se blíží prostředí ve vejcovodech.

### 6.3 Biopsie embrya

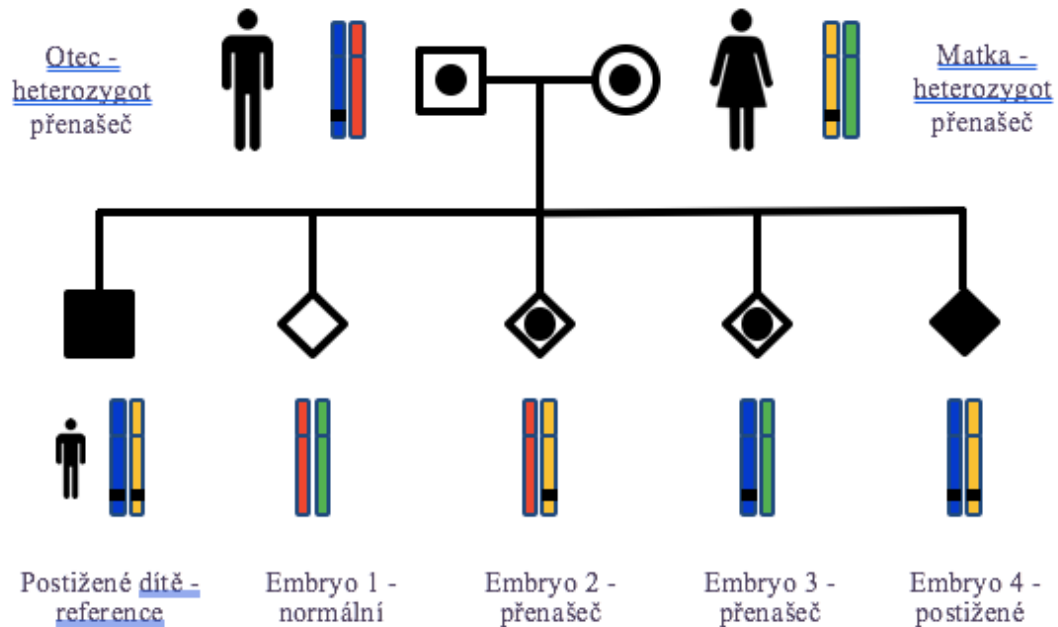
Pro potřeby metody karyomapping se provádí biopsie blastomer raného embrya nebo trofektodermu z blastocysty, přičemž preferována je druhá varianta. Zatímco pro biopsii raného embrya se využívá mechanického narušení *zóny pelucidy* a odebrání blastomery mikropipetou, pro biopsii blastocysty je nutné využít laserový drilling (Van de Velde *et al.*, 2000).

V případě provedení biopsie trofektodermu se blastocysty nechávají v médiu 1-step ORIGIO. Důvodem je, že tato manipulace je krátká a blastocystám přenos do média s HEPES nevyhovuje. Při biopsii blastomer den 3 se používá HEPES médium bez vápenatých a hořečnatých iontů (Medium with HEPES Ca and Mg free, ORIGIO), které rozvolní mezibuněčné spoje a usnadní provedení biopsie. Po biopsii je třeba embrya před návratem do kultivace opláchnout od zbytků biopsačního média v kapce kultivačního média.

### 6.4 Provedení vyšetření metodou karyomapping

V této kapitole bude popsána metodika analýzy karyomapping s využitím komerčních reagentů dle Standardního operačního postupu (SOP). SOP je soubor pracovních pokynů, které musí být splněny pro správné provedení metody, zároveň jsou základním nástrojem pro systém managementu kvality a pro akreditaci laboratoře dle normy ISO 15189, popisující požadavky na kvalitu a způsobilost klinických laboratoří.

Pro analýzu jsou nutné vzorky DNA obou partnerů a jedna tzv. referenční DNA. Tímto referenčním vzorkem často bývá dítě či rodič jednoho z partnerů se známým genetickým statutem. Osoba použitá jako reference tedy může být zdravá, nemocná nebo i přenašeč. Vždy záleží na způsobu dědičnosti. U autozomálně recesivních onemocnění bývá referencí většinou postižené dítě. U autozomálně dominantních to bývá zdravý nebo nemocný rodič postiženého partnera.



Obrázek 7 – Příklad autozomálně recesivní choroby řešené pomocí metody karyomappingu, zdroj: materiály kliniky REPROMEDA, upraveno autorkou

#### 6.4.1 Celogenomová amplifikace

Prvním krokem je celogenomová amplifikace vzorku – tedy získání dostatečného množství DNA sekvencí pro analýzu. Jelikož původní templát (jedna biopovaná blastomera třídeního embrya nebo 5-10 buněk blastocysty) obsahuje velice malé množství DNA je nutné využít metodu, která má vysokou výtěžnost. Pro celogenomovou amplifikaci při metodě karyomapping se užívá Multiple Displacement Amplification (MDA), která má jednoduchý protokol, zajišťuje pokrytí celého genomu a má vysoký výtěžek kolem 20-30  $\mu\text{g}$  DNA. Jelikož je Celogenomová amplifikace citlivá ke kontaminaci, je nutné dodržovat správnou laboratorní praxi.

Samotná MDA reakce spočívá v nasedání náhodných hexamerů na templátovou DNA. V přítomnosti polymerázy  $\phi 29$  dochází k elongaci hexamerů a k tvorbě nových řetězců. Oproti PCR amplifikačním metodám je velikost amplifikovaných fragmentů zhruba 10 kb.

1. Na začátku je nutné si připravit fosfátový pufr, pufovaný fyziologický roztok PBS, destilovanou vodu, DLB (lyophilizát), alikvotní množství jednomolárního DTT, alikvotní množství Stop Solution a REPLI-g SC reakční pufru.
2. Dalším krokem je vytvoření směsi DLB a D2. Pro vytvoření DLB směsi napipetujeme 500  $\mu$ l destilované vody do DLB lyofilizátu (po rozpuštění stabilní 6 měsíců při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Jako D2 směs označujeme 0,25  $\mu$ l jednomolárního DTT a 2,75  $\mu$ l DLB lyofilizátu (lyofilizováno 3 měsíce při  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
3. DTT a DLB (=D2) smícháme s pufrem PBS dle následující tabulky

D2+PBS					
Složka	Barva	1 reakce		počet reakcí	10
1M DTT		0,25	$\mu$ l	2,5	
DLB		2,75	$\mu$ l	27,5	
PBS		3	$\mu$ l	30	
		<b>6 <math>\mu</math>l</b>		<b>60</b>	

Tabulka 1 – Příprava D2, zdroj: SOP Preimplantační genetická diagnostika pomocí metody karyomapping, klinika REPRAMEDA

4. Ke vzorku biopsie přidáme 6  $\mu$ l směsi D2+PBS a inkubujeme 10 minut na  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
5. Ihned po inkubaci vložíme zkumavky na led a přidáme 3  $\mu$ l Stop Solution.
6. Namícháme Master Mix dle tabulky.

Master Mix					
Složka	Barva	1 reakce		počet reakcí (+5 %)	10
scH <sub>2</sub> O		9	$\mu$ l	94,5	
REPLI-g SC Reaction Buffer		29	$\mu$ l	304,5	
REPLI-g SC DNA polymerase		2	$\mu$ l	21	
		<b>40 <math>\mu</math>l</b>		<b>420</b>	

Tabulka 2 – Příprava Master Mixu, zdroj: SOP Preimplantační genetická diagnostika pomocí metody karyomapping, klinika REPRAMEDA

7. Ke vzorkům přidáme 40  $\mu$ l Master Mixu, jemně promícháme a inkubujeme 2 hodiny na  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 3 minuty na  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  při nastaveném programu MDA: MDA\_Amplif\* na termocykleru.
8. Kontrolu úspěšnosti amplifikace provedeme agarózovou elektroforézou

#### 6.4.2 Agarózová gelová elektroforéza

Agarózová gelová elektroforéza umožňuje kontrolu, detekci a identifikaci fragmentů DNA vzniklých za použití MDA. Její princip spočívá v separaci DNA fragmentů pomocí elektrického napětí, přičemž fragmenty migrují úměrně své velikosti. Jelikož má DNA záporný náboj, migruje v elektrickém poli směrem k anodě.

1. Připravíme si zásobní TBE pufr (koncentrace 5x) tak, že smícháme 54 g Tris báze, 27,5 g kyseliny borité a 3,8 g EDTA. Rozpusťme a doplníme do 1 l destilovanou vodou.



2. Připravíme si pracovní TBE pufr tak, že smícháme 100 ml zásobního TBE pufru a 900 ml destilované vody (koncentrace 0,5x).
3. Připravíme si 1 % agarózu. Rozpustíme 1 g agarózy ve 100 ml pracovního TBE pufru zahřátím v mikrovlnné troubě.
4. Sestavíme elektroforetické zařízení.
5. Do tekutého roztoku agarózy přidáme GelRed™ zamícháme a nalijeme do vaničky do výšky 0,5 cm. Vložíme hřebínek a necháme ztuhnout zhruba 1 hodinu.
6. Hřebínek odstraníme a přeneseme gel do elektroforetické vany a naplníme vnitřní obsah tanku pracovním TBE pufrem těsně nad okraj gelu.
7. Vzorky DNA smíchané s DNA nanášecím pufrem v poměru 5:1 nanese do jednotlivých jamek. Do jedné jamky nanese standard molekulové hmotnosti DNA.
8. Víko přiklopíme a zapojíme vanu do zdroje, nastavíme napětí 3 V/cm.
9. Po doputování modrého barviva obsaženého v nanášecím pufru cca do 2/3 délky gelu zdroj vypneme.
10. Vyjmeme gel a díky GelRed™ jej můžeme hodnotit pod UV transiluminátorem.

#### 6.4.3 Celogenomová amplifikace 2

Před prvním krokem je nutné rozpustit směsi MA1, MSM a MA2 a rozpustit a připravit 0,1N NaOH. Termoblok nastavíme na 37 °C. Nachystáme vzorky DNA a připravíme si schéma pipetování.

	Čip #:		Čip #:	
A				
B				
C				
D				
E				
F				
	1	2	3	4

*Tabulka 3 – Schéma pipetování, zdroj: SOP Preimplantační genetická diagnostika pomocí metody karyomapping, klinika REPROMEDA*

1. Do jamek destičky napipetujeme 40  $\mu$ l MA1.
2. Přidáme 8  $\mu$ l amplifikované DNA
3. Napipetujeme 8  $\mu$ l 0,1N NaOH.
4. Uzavřeme destičku gumovým víčkem a zvortexujeme na 1600 otáček jednu minutu a stočíme na 280x g.
5. Při pokojové teplotě inkubujeme 10 minut
6. Ke vzorkům přidáme 68  $\mu$ l MA2 a 76  $\mu$ l MSM.
7. Destičku opět po uzavření zvortexujeme a stočíme – viz výše. Následně inkubujeme na termobloku při 37 °C po dobu 2 hodin.

#### 6.4.4 Fragmentace DNA

V úvodu rozpustíme a promícháme FMS. Rozpustíme RA1 a termoblok zapneme na 37 °C na 30 minut.

1. Destičku stočíme na 280x g.
2. Ke vzorkům přidáme 50  $\mu$ l FMS. Destičku opět uzavřeme gumovým víčkem, vortexujeme opět na 1600 rpm 1 minutu a stočíme 280x g.
3. Znovu inkubujeme 30 minut na termobloku při 37 °C.

#### 6.4.5 Precipitace DNA

Před zahájením z ledničky vytáhneme PM1 a zapneme termoblok na 37 °C.

1. 100  $\mu$ l PM1 přidáme ke vzorkům, uzavřeme destičku gumovým víčkem a opět vortexujeme na 1600 rpm po dobu 1 minuty.
2. Na termobloku (37 °C) inkubujeme 5 minut a poté stočíme na 280 x g.
3. Destičku otevřeme a přidáme 310  $\mu$ l isopropanolu a uzavřeme novým gumovým víčkem.
4. Směs promícháme převrácením – 10 x.
5. Centrifugujeme na 3000x g při 4 °C po dobu 20 minut.
6. Supernatant slijeme a na buničité vatě poklepáváme destičkou zhruba 1 minutu.
7. Obrácenou destičku necháme vysychat na stojánku cca 15 minut.

#### 6.4.6 Resuspendace DNA

V rámci přípravy rozpustíme a protřepeme RA1 – pokud jsou přítomny krystaly pak zahřejeme. Termoblok nastavíme na 95 °C, hybridizační troubu na 48 °C a zapneme zatavovačku na hliníkovou fólii.

1. Ke vzorkům přidáme 17  $\mu$ l RA1.
2. Destičku zalepíme hliníkovou fólií (matnou stranou dolů) přimáčknutím zatavovačky na 5 sekund. Fólii domáčkujeme až jsou vidět obrysy jednotlivých jamek.
3. Destičku vložíme do hybridizační trouby a inkubujeme 15 minut.
4. Destičku resuspendujeme vortexováním při 1800 otáčkách po dobu 1 minuty. Následně destičku stočíme na 280x g.

#### 6.4.7 Hybridizace na čipy

Termoblok znovu zahřejeme na 95 °C a zapneme hybridizační troubu na 48 °C.

1. Z ledničky si vytáhneme PB2 a SNP DNA čipy (HumanCytoSNP-12 bead array od Illuminy).
2. Do XC4 koncentráту přidáme 330 ml EtOH a dobře protřepeme.
3. Destičku inkubujeme 20 minut na 95 °C.
4. Do hybridizační komůrky vložíme hybridizační podložky (gaskets) a napipetujeme 400  $\mu$ l PB2. Víčko komůrky uzavřeme.
5. Destičku necháme vychladnout na stole po dobu 5 minut a poté ji stočíme na 280x g.
6. DNA čipy vložíme do hybridizační podložky uvnitř komůrky a nanese dle schématu 15  $\mu$ l sondy.
7. Hybridizujeme 12-24 hodin při 48 °C.

#### 6.4.8 Vymytí DNA čipů

Vodní lázeň s pumpou nastavíme na 44 °C, teplotu kontrolujeme teploměrem.

1. Do dvou skleněných vymývacích kyvet nalijeme 200 ml PB1.
2. 150 ml PB1 nalijeme do fixační aparatury.
3. Rozpustíme směsi XC1, XC2, TEM, STM a ATM.
4. Připravít 95% Formamide / 1Mm EDTA.
5. Z DNA čipu odlepíme fólii a čip ponoříme do skleněného držáku v prvním roztoku PB1.
6. Se skleněným držákem jemně pohybujeme v kyvetě 1 minutu.
7. DNA čip ponoříme do druhého roztoku PB a opět jemně pohybujeme v kyvetě po dobu 1 minuty.
8. DNA čip přeneseme do fixační aparatury se 150 ml PB1 a pomocí spaceru, skleněného hranolku a kovových držáků smontujeme sestavu pro značení DNA čipů.

#### 6.4.9 Značení DNA čipů

Sestavu s DNA čipem vložíme do držáku aparatury vytemperovaného na 44 °C.

1. Do rezervoáru napipetujeme
  - a. 150  $\mu$ l RA1 a inkubujeme 30 sekund. Opakujeme 5x.
  - b. 450  $\mu$ l XC1 a inkubujeme 10 minut.
  - c. 450  $\mu$ l XC2 a inkubujeme 10 minut.
  - d. 200  $\mu$ l TEM a inkubujeme 15 minut.
  - e. 450  $\mu$ l 95% Formamid / 1mM EDTA a inkubujeme 1 minutu. Znovu zopakujeme a inkubujeme 5 minut.
2. Nastavíme vodní lázeň na teplotu uvedenou na STM tubě.
3. Do rezervoáru napipetujeme 450  $\mu$ l XC3 a inkubujeme 1 minutu a znovu zopakujeme.
4. Počkáme až je na digitálním teploměru správná teplota.
5. Do rezervoáru napipetujeme:
  - a. 250  $\mu$ l STM a inkubujeme 10 minut.
  - b. 450  $\mu$ l XC3 a inkubujeme 1 minutu. Opakujeme. Počkáme 5 minut.
  - c. 250  $\mu$ l ATM a inkubujeme 10 minut.
  - d. 450  $\mu$ l XC3 a inkubujeme 1 minutu. Opakujeme. Počkáme 5 minut.
  - e. 250  $\mu$ l STM a inkubujeme 10 minut.
  - f. 450  $\mu$ l XC3 a inkubujeme 1 minutu. Opakujeme. Počkáme 5 minut.
  - g. 250  $\mu$ l ATM a inkubujeme 10 minut.
  - h. 450  $\mu$ l XC3 a inkubujeme 1 minutu. Opakujeme. Počkáme 5 minut.
  - i. 250  $\mu$ l STM a inkubujeme 10 minut.
  - j. 450  $\mu$ l XC3 a inkubujeme 1 minutu. Opakujeme. Počkáme 5 minut.
6. Do plastové kyvety nalijeme 310 ml PB1.
7. Rozmontujeme sestavu s DNA čipem a vložíme ho do plastového držáku v plastové kyvetě s 310 ml PB1.
8. Jemně pohybuje plastovým držákem v kyvetě po dobu 20 sekund.
9. DNA čip necháme ponořený v PB1 po dobu 5 minut.
10. Protřepeme a nalijeme 310 ml XC4 do další plastové kyvety a vložíme do ní plastový držák s DNA čipy.
11. Jemně pohybuje s plastovým držákem v kyvetě po dobu 20 sekund.
12. DNA čipy necháme 5 minut ponořeny v XC4.
13. DNA čipy vytáhneme a položíme je na stojánek do vakuového desikátoru.
14. Vysušíme čipy při podtlaku  $\sim 0.9$  barů po dobu 55 minut.
15. DNA čipy naskenujeme do 3 dnů.

#### 6.4.10 Skenování DNA čipů

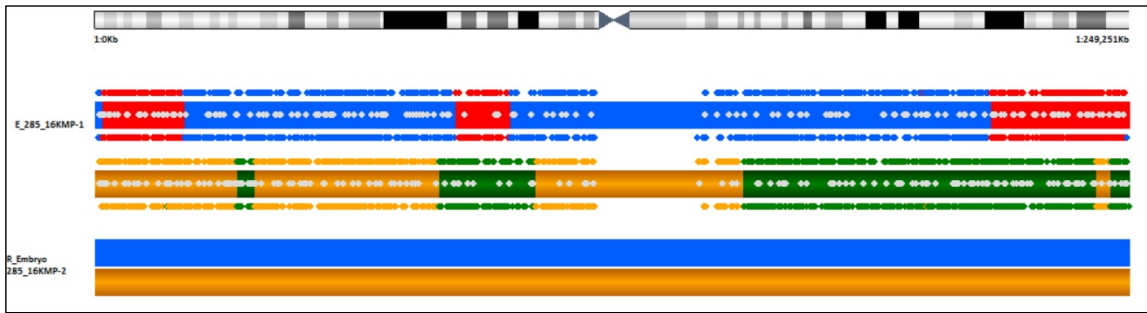
Spustíme program BeadScan pro skenování SNP DNA čipů. Stáhneme aktuální dmap files ke skenovaným čipům. Vložíme SNP DNA čip do výsuvného stolku iScan scanneru. Výsuvný stolec zasuneme a skenujeme čipy (rozlišení pixelů 0,54  $\mu\text{m}$ ). Skeny vyexportujeme v souboru gtc.

### 6.5 Vyhodnocení dat

V softwaru BlueFuse Multi (Illumina) vytvoříme nový případ pro dané PGD, zadáme údaje o rodičích, referenční DNA a vzorcích embryí. Připojíme gtc soubory rodičů, referenční DNA a vyšetřovaných vzorků k případu a pomocí softwaru v karyomapping modulu analyzujeme jednotlivé vzorky.

#### 6.5.1 Analýza jednonukleotidových polymorfismů

Karyomapping je založen na analýze dědičnosti jednonukleotidových polymorfismů (SNP – single nucleotide polymorphism), což jsou místa v genomu, kde došlo k jednobodové mutaci – výměně jednoho nukleotidu za jiný. V dnešní době je známo již 15 milionů SNP a jsou tedy zodpovědné za variabilitu mezi lidmi, ale i za velké množství monogenních onemocnění. Rozeznáváme homozygotní varianty AA, BB a heterozygotní variantu AB (Kumar *et al.*, 2013). Prvním krokem je srovnání SNP u rodičů a vybrání informativních SNP pro maternální a paternální alely. Informativní je každý SNP, který se u jednoho z rodičů nachází v heterozygotní sestavě AB a u druhého z rodičů v homozygotní sestavě AA, nebo BB. Pomocí referenčního vzorku je pak stanovena vazba alely A, nebo B s mutací, nebo se zdravou alelou. Informativní SNP pak v rámci karyomappingu dále rozdělujeme na key SNP, které jsou formou teček zobrazeny nad pruhem haplobloku a non-key SNP, zobrazené pod ním (Natesan *et al.*, 2014a). Key SNP jsou detekovány u vzorku v heterozygotní sestavě AB, a tudíž nemohou být ovlivněny ADO. Mají tedy vyšší vypovídající hodnotu pro určení haplotypu a následně genotypu embrya. Non-key SNP jsou informativní SNP detekované u vzorku v homozygotní sestavě, která může být rovněž důsledkem ADO a tato skutečnost musí být zvažena při určení spolehlivosti stanovení haplotypu v místě mutace a při určení pozice crossing-overu. Tečky, které jsou uprostřed haplobloku označují „no call“ a jde o místa, kde nebyl informativní SNP u vzorku detekován.



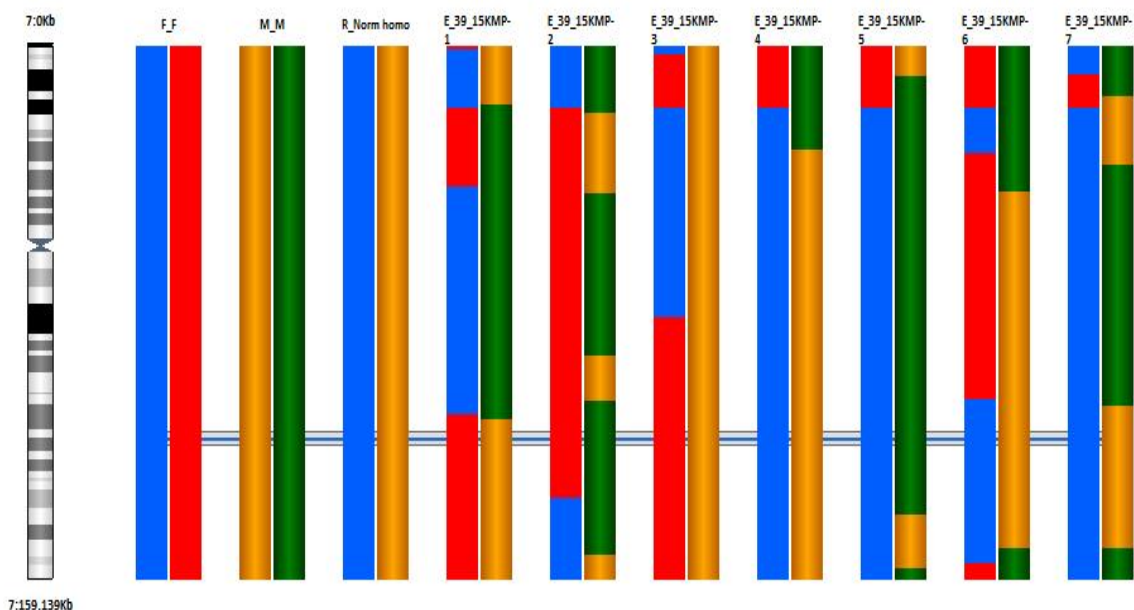
Obrázek 8 – Rozložení key a non-key SNP, zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou

Informativní rodič	Otec	Matka	Embryo	
Informativní SNP pro otce	AB	AA	AB = key	
			BB = key	
	AA = non-key	AB	BB	AB = key
				AA = key
BB = non-key	AA	AB	AB = key	
			BB = key	
Informativní SNP pro matku	AA	AB	AB = key	
			BB = key	
	AA = non-key	BB	AB	AB = key
				AA = key
BB = non-key	AA	BB	AB = key	
			BB = non-key	

Tabulka 4 - Key a non-key SNP, zdroj: Natesan et al., 2014a, upraveno autorkou

### 6.5.2 Analýza genotypu embrya

Nejdříve vyhodnotíme genotyp embrya na základě protokolu generovaného v softwaru pro daný případ. M je haplotyp maternální a F je haplotyp paternální, dále je zobrazena reference, kde máme zapsaný statut (homozygot zdravý/nemocný, heterozygot maternální/paternální). Software umožňuje odlišně zabarvit, a tedy i rozpoznat všechny čtyři rodičovské haplotypy a tím i jejich dědičnost.

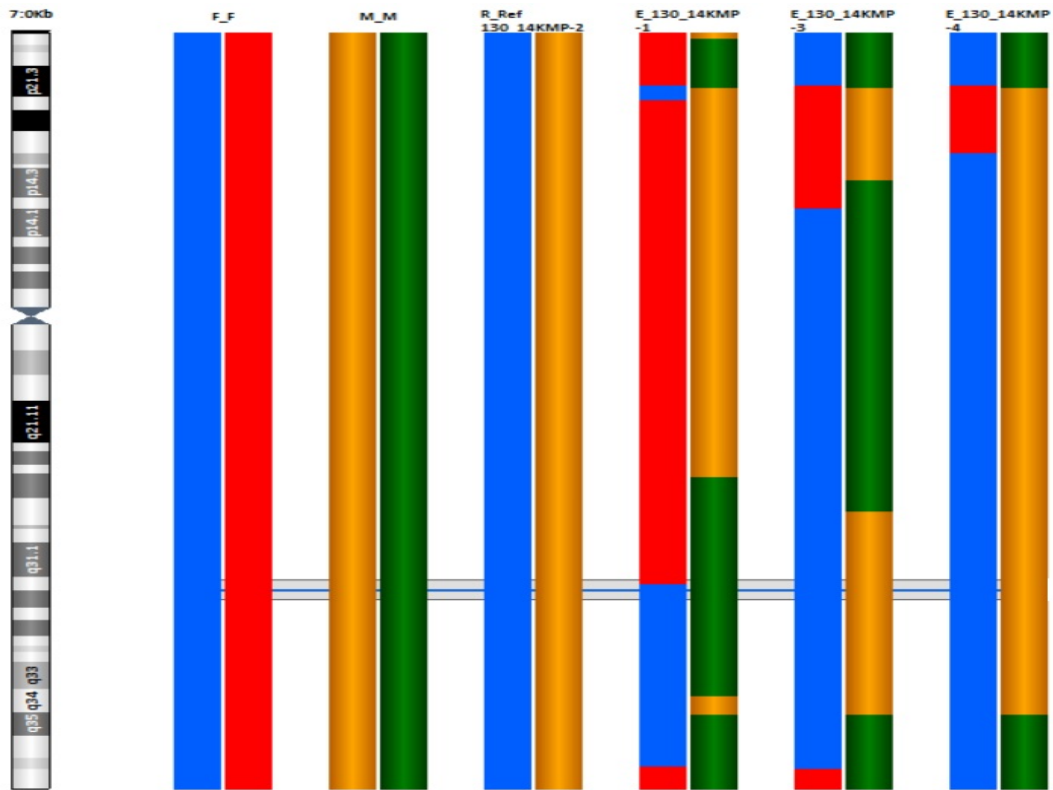


Obrázek 9 – Příklad výsledku karyomappingu pro autozomálně recesivní chorobu (cystická fibróza) – zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou

Na obrázku 9 vidíme haplotyp otce (modro-červený), matky (žluto-zelený) a zdravé reference (modro-žlutý). Víme tedy, že pokud má embryo ve sledovaném genu – vyznačeno proužkem, kombinaci modré a žluté, pak bude zdravý homozygot, pokud bude přítomna naopak kombinace zelené a červené, pak bude toto embryo nemocný homozygot. Kombinace modro-zelená a červeno-žlutá značí heterozygota – přenašeče onemocnění. Jako „zdraví homozygoté“ byla tedy označena embrya 4, 6 a 7. Embryo č. 2 byl nemocný homozygot, ostatní embrya byla detekována jako přenašeči.

### 6.5.3 Analýza crossing-overů

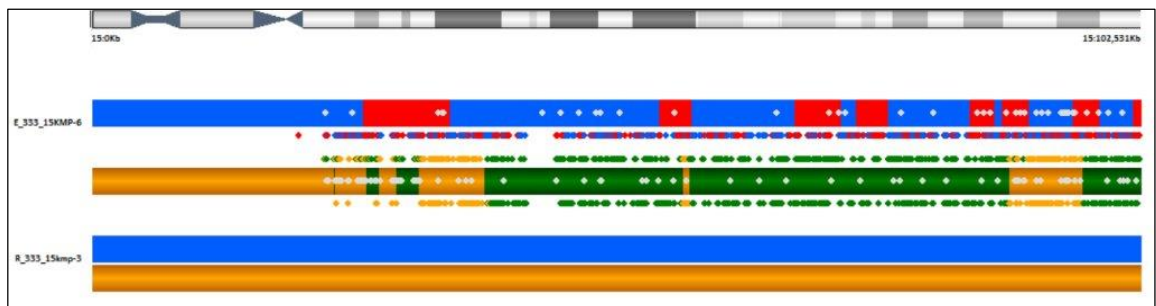
Při určování statutu vyšetřovaného embrya je rozhodující vymezení pozice nejbližších crossing-overů k definované oblasti s příslušným genem (Handyside *et al.*, 2010). Crossing-over je ale možné velice dobře analyzovat také u celého genomu embrya, jelikož jsou znázorněny změnami barev, a tedy je možné přesně zjistit jejich počet a určit jejich pozici na jednotlivých chromozomech. V některých případech proběhne crossing-over blízko sledované mutace. V tomto případě si sledovanou oblast zvětšíme a analyzujeme, zda daný crossing-over do oblasti mutace zasahuje či nikoliv. Navíc je možné v této oblasti sledovat key a non-key SNP a odhadnout spolehlivost detekce daného haplotypu v oblasti genu, či mutace.



Obrázek 10 – Analýza crossing-overů. Haplotyp otce znázorněný červeno-modře, haplotyp matky zeleno-žlutě, je možné dobře analyzovat crossing-overy. zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou

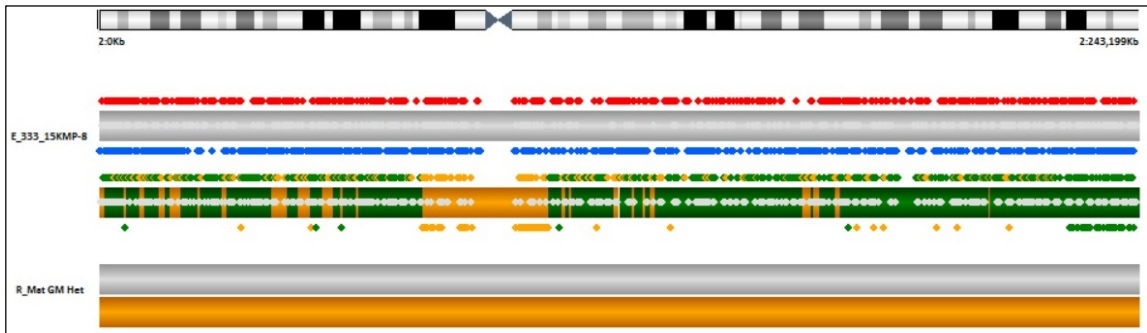
#### 6.5.4 Analýza aneuploidií

Detekce aneuploidií metodou karyomapping je možná dvěma různými způsoby. První způsob detekce je **kvalitativní** – dle distribuce key a non-key SNP. Pokud pro daný chromozom detekujeme pouze non-key SNP, jedná se o ztrátu heterozygotnosti, a tedy přítomnost pouze jediného chromozomu (monozomie). Pokud chybí key SNP pro paternální haplotypy, jedná se o monozomii paternálního původu, pokud chybí key SNP pro maternální haplotypy, jedná se o maternální původ. Naopak pokud pro paternální nebo maternální chromozom detekujeme pouze key SNP a non-key SNP chybí, jedná se o trizomii vzniklou v maternální nebo paternální meióze.



Obrázek 11 – Monozomie paternálního původu chromozomu 15, zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou

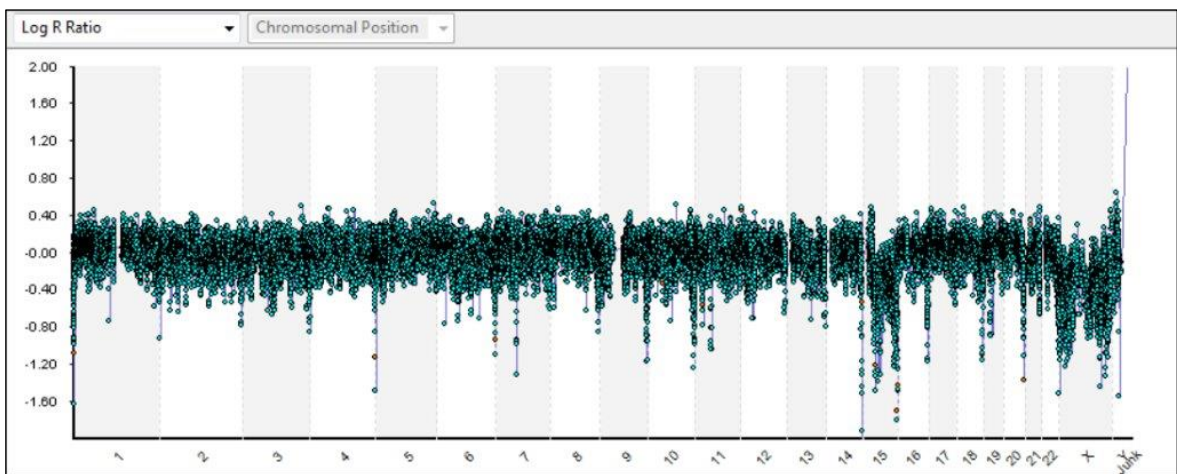




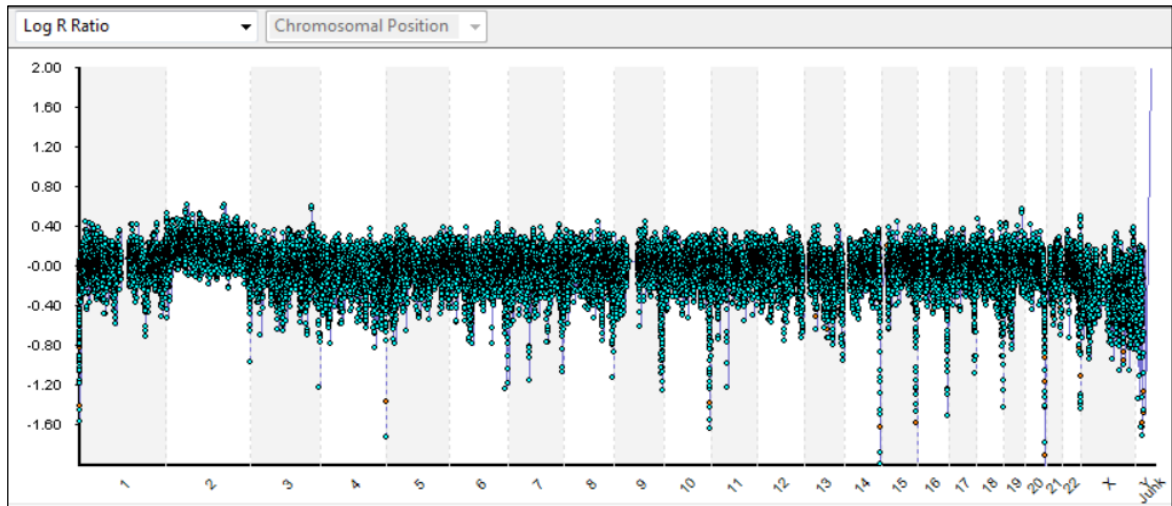
Obrázek 12 - Trizomie maternálního původu chromozomu 2, zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou

Druhý způsob detekce aneuploidii je založen na **kvantitativním** hodnocení fluorescenčních dat, získaných při skenování SNP čipů. Je možné vynést do grafu hodnoty fluorescence pro jednotlivé chromozomy a následně porovnat vzájemné odchylky těchto hodnot. K tomu slouží log-R chart – obrázek 13 a 14.

Pokles hodnot znamená monozomii a nárůst trizomií. Tímto způsobem je možné detekovat aneuploidie mitotického původu, což není možné předchozím kvalitativním způsobem. Vzhledem ke způsobu detekce jednotlivých SNP mají tato kvantitativní data nízký dynamický rozsah a detekce mitotických aneuploidii, zejména trizomií, není dostatečně spolehlivá.

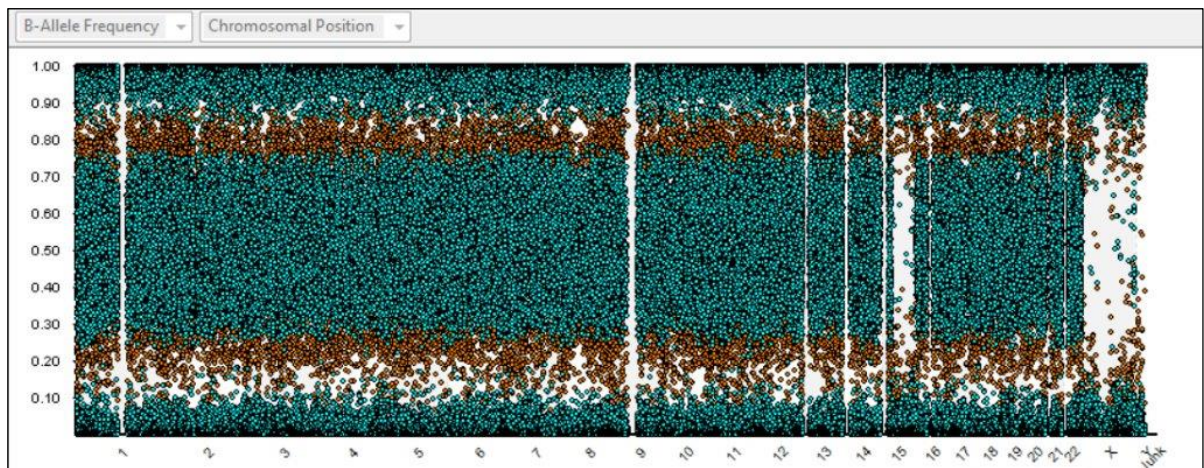


Obrázek 13 – Log-R chart: monozomie chromozomu 15, zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou

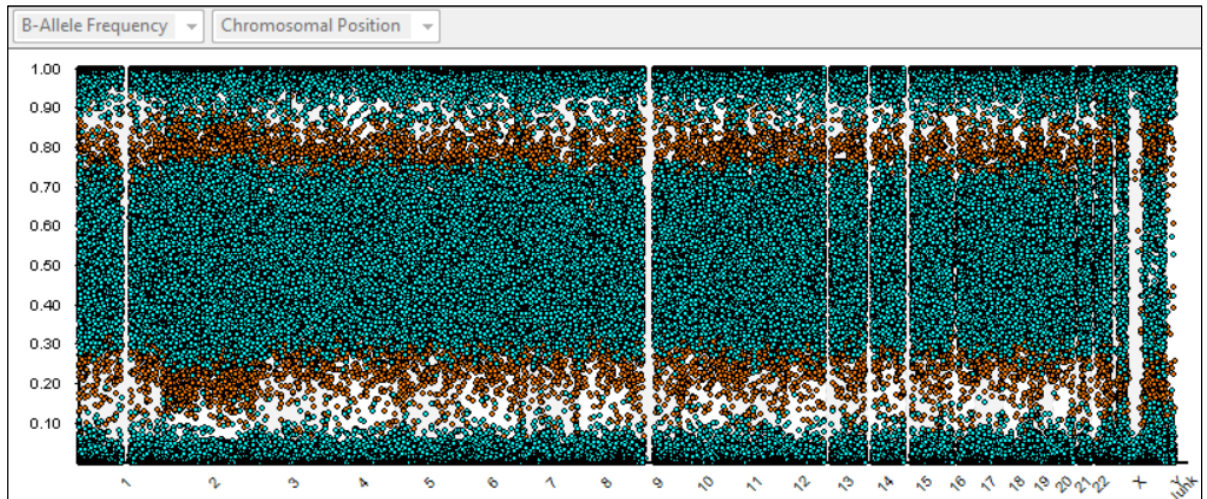


Obrázek 14 – Log-R chart: trizomie chromozomu 2 a chromozomu X, zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou

Další způsob kvantitativního hodnocení je založen na analýze poměru intenzity fluorescence pro alelu B ku intenzitě fluorescence pro alelu A, který je vyneseno do grafu pro každý SNP. Pro SNP v sestavě AA se tento poměr blíží nule, pro homozygotní SNP BB se naopak blíží 1. Pro heterozygotní SNP AB kolísá kolem 0,5. V případě monozomie se projeví jako ztráta heterozygotnosti, nedetekujeme populaci SNP u nichž poměr kolísá kolem hodnoty 0,5. V případě trizomie se nám populace heterozygotních SNP rozpadne na dvě, které kolísají kolem hodnot 0,33 (AAB) a 0,66 (ABB).



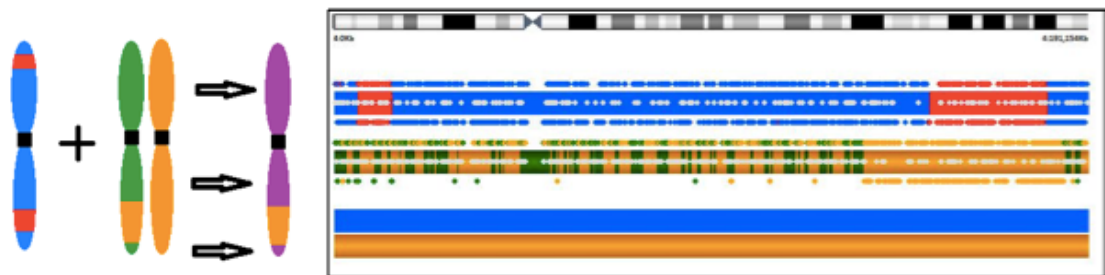
Obrázek 15 – B-allele frequency chart: monozomie chromozomu 15, zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou



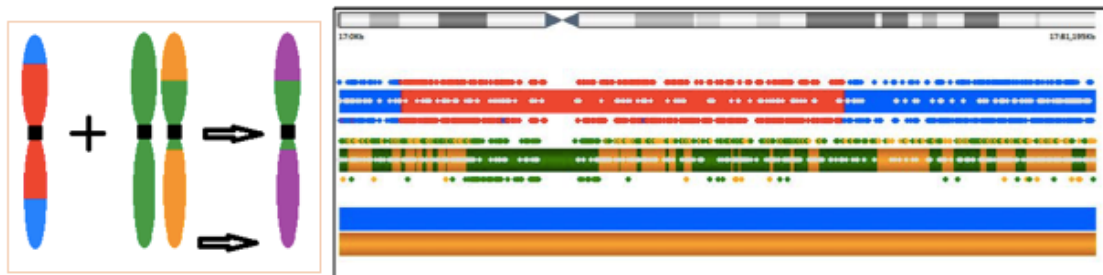
Obrázek 16 - B-allele frequency chart: trizomie chromozomu 2 a sestava pohlavních chromozomů XXY, zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou

### 6.5.5 Analýza chyb v I. a II. meiotickém dělení

U trizomií meiotického původu je možné určit, zda k chybě došlo v prvním nebo druhém meiotickém dělení. Pro rozlišení těchto chyb je klíčová oblast kolem centromery. Pokud na obou stranách centromery pozorujeme absenci non-key SNP, znamená to přítomnost dvou různých centromerických oblastí, kterou je možné vysvětlit pouze chybou během prvního meiotického dělení (non-disjunkce nebo předčasná separace sesterských chromatid). Je-li oblast na obou stranách centromery stejného původu, pozorujeme rovnoměrnou distribuci key a non-key SNP v této oblasti až do prvního crossing-overu. Znamená to, že nedošlo k rozchodu sesterských chromatid, jedná se tedy o non-disjunkci během druhého meiotického dělení.



Obrázek 17 – Chyba v I. meiotickém dělení, zdroj: materiály kliniky REPRODIMA



Obrázek 18 – Chyba ve II. meiotickém dělení, zdroj: materiály kliniky REPRODIMA

## 6.6 Analýza a statistické zhodnocení výsledků

Pro zaznamenání a statistické zhodnocení výsledků byl použit program Microsoft Excel. Každé embryo bylo zaneseno do tabulky a zařazeno dle jména, rodného čísla pacientky a jejího věku v den punkce. Dále se uvádí sledovaná monogenní choroba, respektive konkrétní mutovaný gen, způsob dědičnosti, číslo biopsie, typ biopsie (blastomera, trofektoderm), status embrya (normální, přenašeč, postižený), pohlaví embrya a případné nálezy chromozomálních abnormalit včetně jejich původu (maternální, paternální) a způsobu vzniku (1. nebo 2. meiotické dělení, zisk nebo ztráta genetického materiálu).

## 7. Výsledky

### 7.1 Soubor pacientek podstupujících metodu karyomapping

Pro zpracování a analýzu dat bylo nejprve nutné rozdělit pacientky podstupující metodu karyomapping do kategorií dle věku. Metodu karyomapping podstoupilo na klinice REPROMEDA v období od června 2014 do září 2016 celkem 123 pacientek ve věku od 20 do 46 let. Aby kategorie byly dostatečně početné a rovnoměrné, rozhodli jsme se pro rozdělení pacientek do tří skupin. První skupina zahrnovala ženy do 30 let a spadalo do ní 37 pacientek (30 %), druhá skupina obsahovala 49 pacientek (40 %) věku od 31 do 35 let. Poslední skupina pak zahrnovala 37 pacientek (30 %) ve věku od 36 let výše. Průměrná i mediánová hodnota věku pacientek byla v obou případech rovna 33,0.



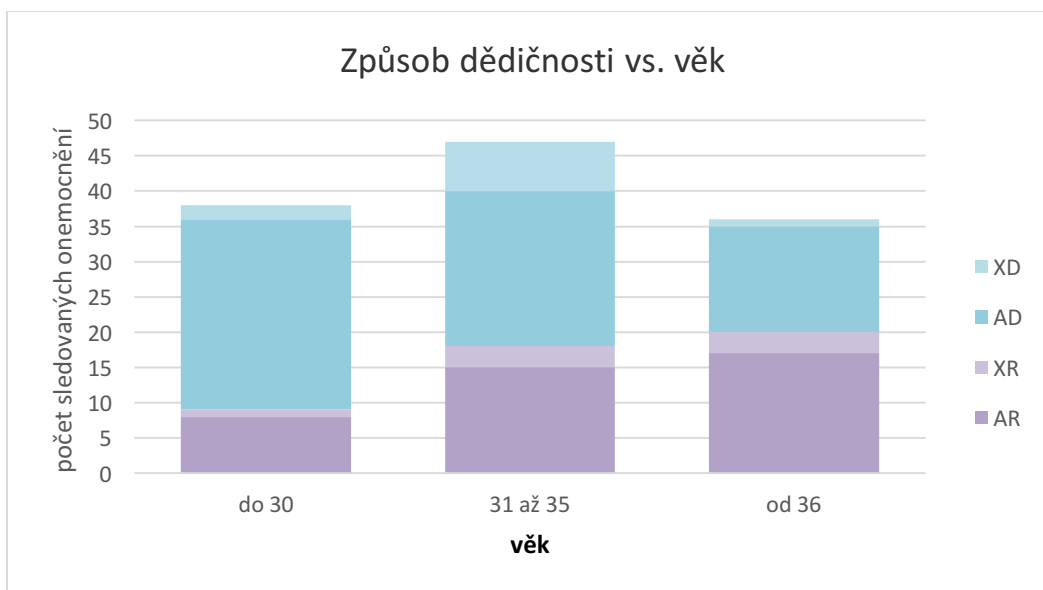
Graf 1 – Počet pacientek podstupujících metodu karyomapping – rozdělení do skupin dle věku, zdroj: autorka

Celkem bylo od pacientek získáno 638 embryí, vyšetřeno jich bylo 615 (96,4 %). Nemožnost vyšetření embryí byla způsobena degradací DNA nebo neúspěšnou celogenomovou amplifikací. U bioptátu blastomer se podařilo analyzovat 50 z 56 embryí (89,2 %) a u bioptátu trofektodermu 565 z 582 (97,1 %). Průměrně bylo na pacientku získáno 5,19 embryí.

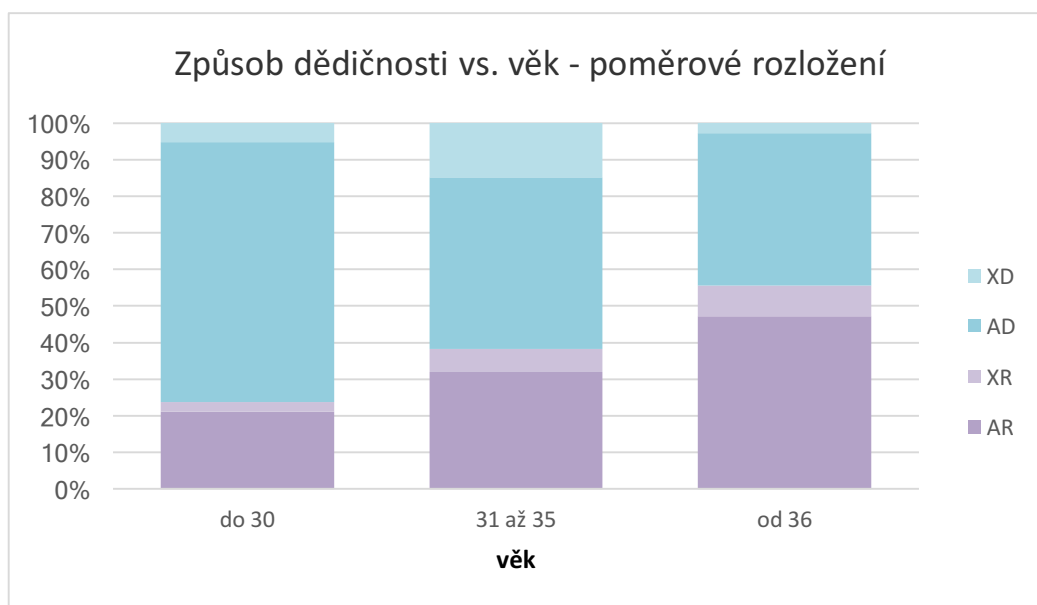
### 7.2 Struktura souboru pacientek v závislosti na typu dědičnosti

Položili jsme si otázku, zda distribuce monogenních chorob s různým typem dědičnosti zůstává napříč věkovými kategoriemi stejná, anebo se v závislosti na věku pacientek mění. Pozorovali jsme, že v nejmladší skupině žen převažují dominantní onemocnění (29 případů, 76 %), nad recesivními (9 případů, 24 %). V nejstarší skupině žen tomu bylo právě naopak. Ve 20 případech

se jednalo o recesivní onemocnění (55 %) v 16 případech šlo o dominantní onemocnění (45 %), PGD pro AR onemocnění bylo provedeno celkem ve 40 případech, pro AD onemocnění to bylo v 64 případech. V dalších případech se jednalo o onemocnění vázaná na pohlaví.



Graf 2 - Způsob dědičnosti vs. věk, zdroj: autorka

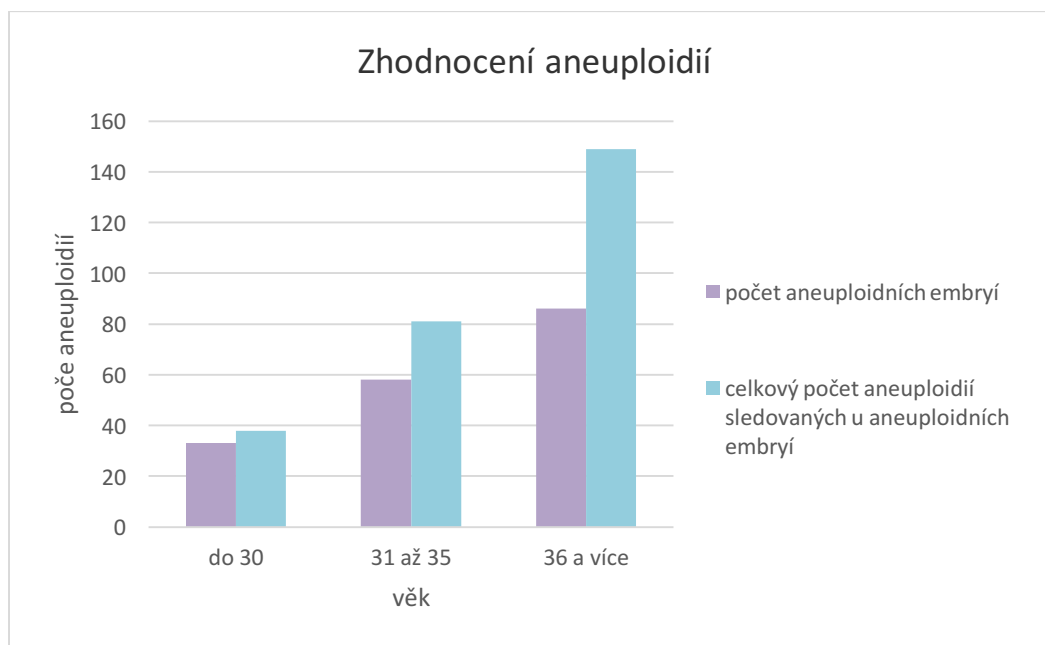


Graf 3 - Způsob dědičnosti vs. věk, poměrové rozložení, zdroj: autorka

## 7.3 Analýza chromozomových aberací detekovaných metodou karyomapping

### 7.3.1 Analýza počtu aneuploidií v závislosti na věku

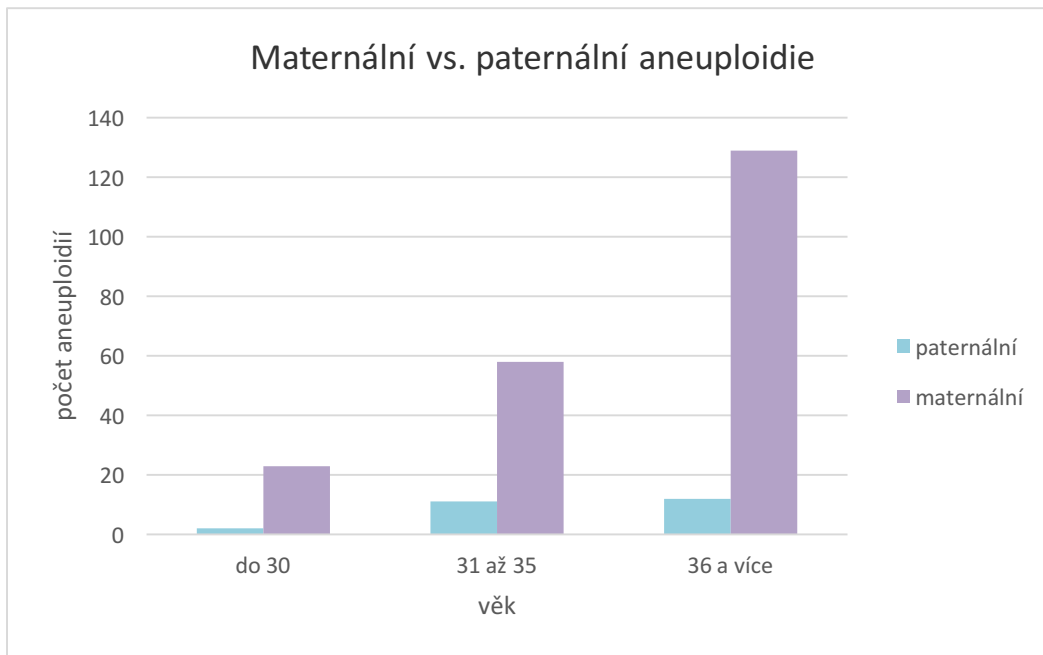
U tří skupin pacientek jsme hodnotili přítomnost aneuploidií u embryí. Počet aneuploidních embryí rostl napříč věkovými skupinami. Zvyšovalo se jak množství aneuploidních embryí, tak i počet aneuploidií na aneuploidní embryo. U nejmladší věkové skupiny bylo celkem 33 aneuploidních embryí, což činilo 15,5 % z celkového počtu získaných embryí u této skupiny a 1,15 aneuploidií na aneuploidní embryo. U prostřední věkové skupiny bylo 58 aneuploidií (24,9 %) a 1,45 aneuploidií na aneuploidní embryo. U nejstarší věkové skupiny bylo 86 aneuploidií (50 %) a 1,74 aneuploidií na jedno aneuploidní embryo.



Graf 4 - Způsob dědičnosti vs. věk, poměrové rozložení, zdroj: autorka

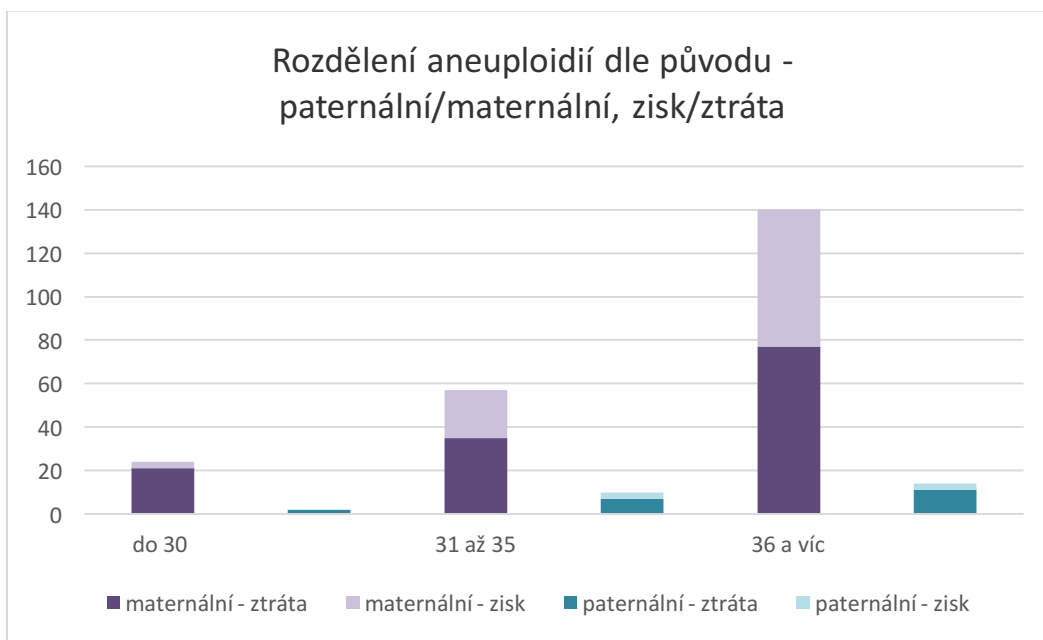
### 7.3.2 Analýza aneuploidií podle jejich typu a původu

Metodou karyomapping je možné rozlišit, zda jsou detekované aneuploidie maternálního nebo paternálního původu. Počet maternálních aneuploidií převažuje nad paternálními. Zatímco paternální aneuploidie se s rostoucím věkem zvyšují jen minimálně - 2, 11 a 12, maternálních aneuploidií se zvyšujícím se věkem dramaticky přibývá - 23, 58 a 129.



Graf 5 – Poměr maternálních vs. paternálních aneuploidií, zdroj: autorka

Aneuploidie detekované metodou karyomapping je možné rozdělit na zisky a ztráty chromozomů. Ztráty chromozomů převažují nad zisky zejména u nejmladší věkové kategorie a v případě aneuploidií paternálního původu. U maternálních aneuploidií byl celkově pozorován 88x zisk chromozomu a 133x ztráta. U paternálních jsme detekovali 6x zisk a 20x ztráta chromozomu.

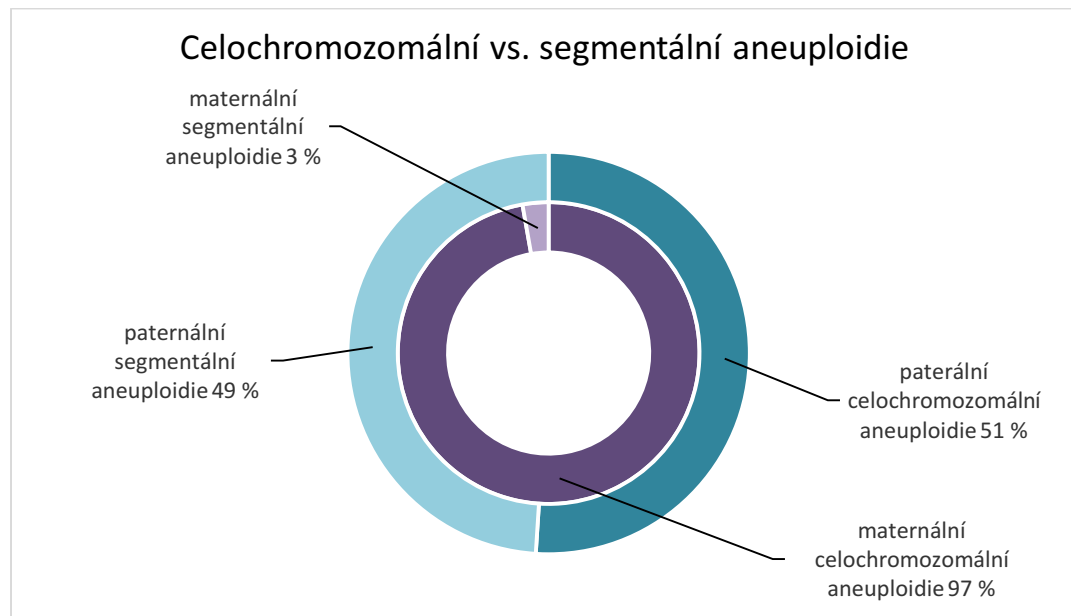


Graf 6 – Rozdělení aneuploidií dle původu, zdroj: autorka

Chromozomové aneuploidie mohou být záležitostí celých chromozomů, anebo pouze jejich částí. Zatímco maternální aneuploidie postihují zejména celé chromozomy, v případě paternálních

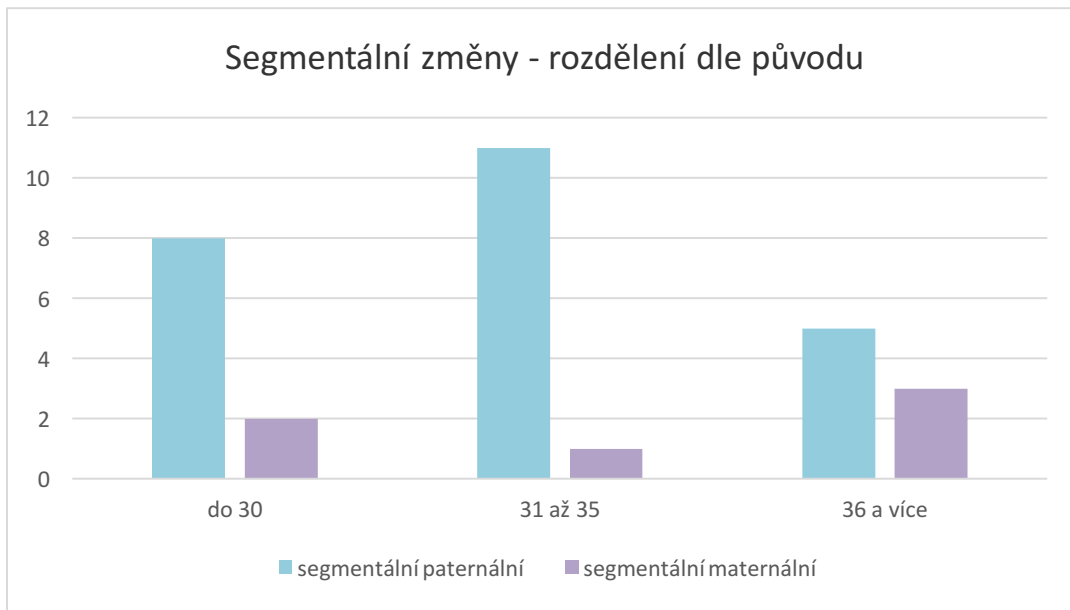


aneuploidií se nejčastěji jedná o změny zasahující pouze části chromozomu – tzv. segmentální aneuploidie. U aneuploidií maternálního původu připadalo celých 97 % na aberace postihující celý chromozom. Naopak u paternálních aneuploidií se vyskytovaly tyto aneuploidie téměř v rovnováze.



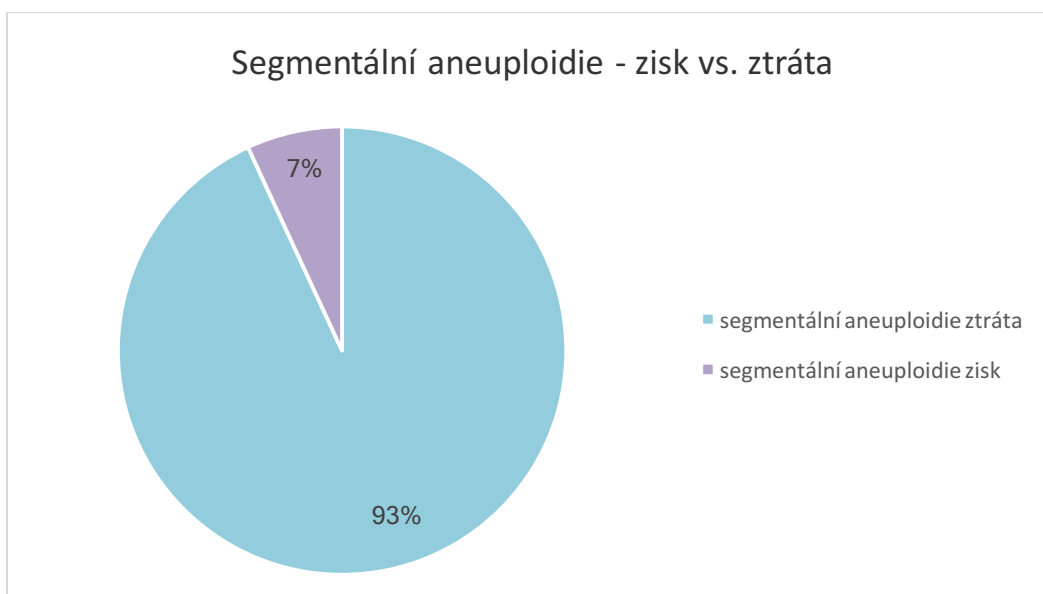
Graf 7 – Celochromozomální versus segmentální změny, zdroj: autorka

Počet paternálních segmentálních aneuploidií převažoval u všech věkových skupin nad těmi maternálními. U nejmladší skupiny patientek jsme sledovali 8 paternálních segmentálních změn a 2 maternální. V prostřední skupině byly přítomny paternální segmentální aneuploidie v počtu 11 a 1 aneuploidie postihující část chromozomu maternálního původu. U nejstarších žen bylo 5 paternálních aneuploidií a 3 maternální. Celkem tedy bylo 24 segmentálních aneuploidií paternálního původu a dalších 6 bylo maternálního původu.



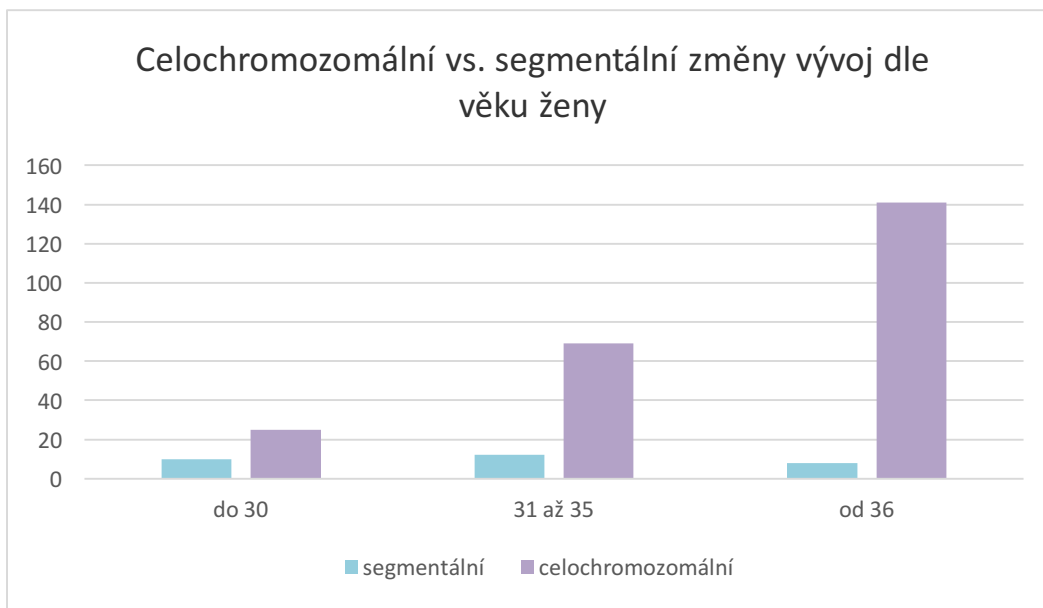
Graf 8 – Segmentální změny, rozdělení dle původu, zdroj: autorka

Sledovali jsme také, zda se v případě segmentálních aneuploidií jedná o částečný zisk nebo ztrátu chromozomu. V 93 % případů se jednalo o ztrátu části chromozomu – konkrétně 24x ztráta paternálního původu a 5x ztráta maternálního původu.



Graf 9 – Segmentální aneuploidie, zisk vs. ztráta, zdroj: autorka

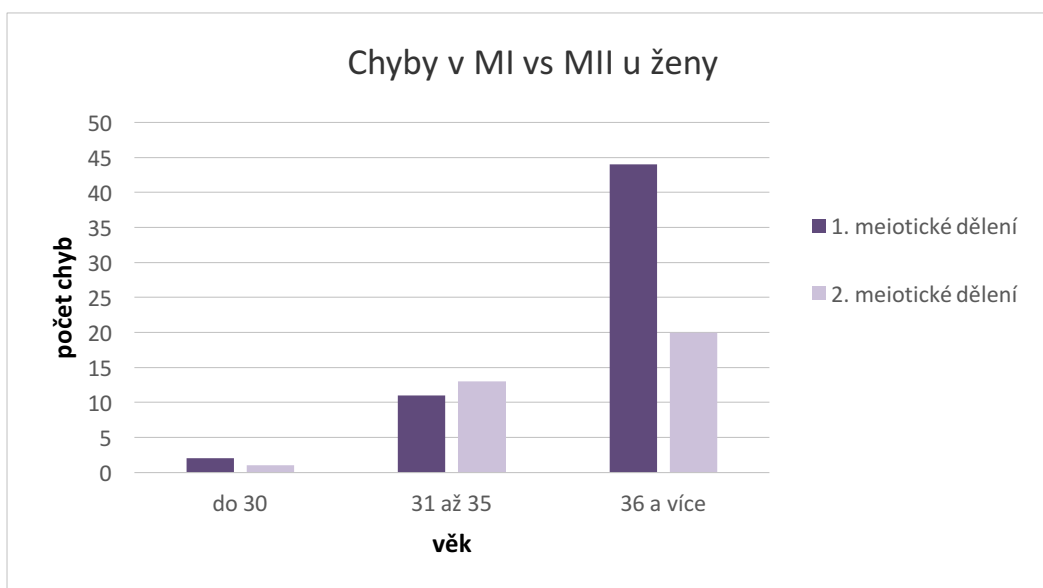
Z grafu číslo 8 je taktéž patrné, že zatímco aneuploidie celých chromozomů výrazně rostou s věkem ženy, podíl segmentálních aneuploidií zůstává nezávislý na věku pacientek, což platí jak pro segmentální změny s maternálním, tak i paternálním původem. Toto je znázorněno i na grafu č. 10, kde můžeme sledovat kumulativní četnosti celochromozomálních respektive segmentálních změn v závislosti na rostoucím věku pacientek.



Graf 10 - Celochromozomální versus segmentální změny – vývoj dle věku ženy, zdroj: autorka

### 7.3.3 Analýza aneuploidií vzniklých chybou v meióze I a II u žen

V případě zisků chromozomů je možné pomocí metody karyomapping rozlišit, zda mají tyto chyby svůj původ v prvním či druhém meiotickém dělení. Počet chyb v prvním a druhém meiotickém dělení jsme studovali v závislosti na věku pacientky. U prostřední věkové kategorie byl počet chyb mezi prvním a druhým meiotickým dělením podobný (11 a 13). U nejstarší věkové kategorie převažovaly chyby v prvním meiotickém dělení nad chybami, které měly svůj původ ve druhém meiotickém dělení (44 a 20).



Graf 11 – Chyby v prvním a druhém meiotickém dělení ženy, zdroj: autorka

## 7.4 Analýza crossing-overů

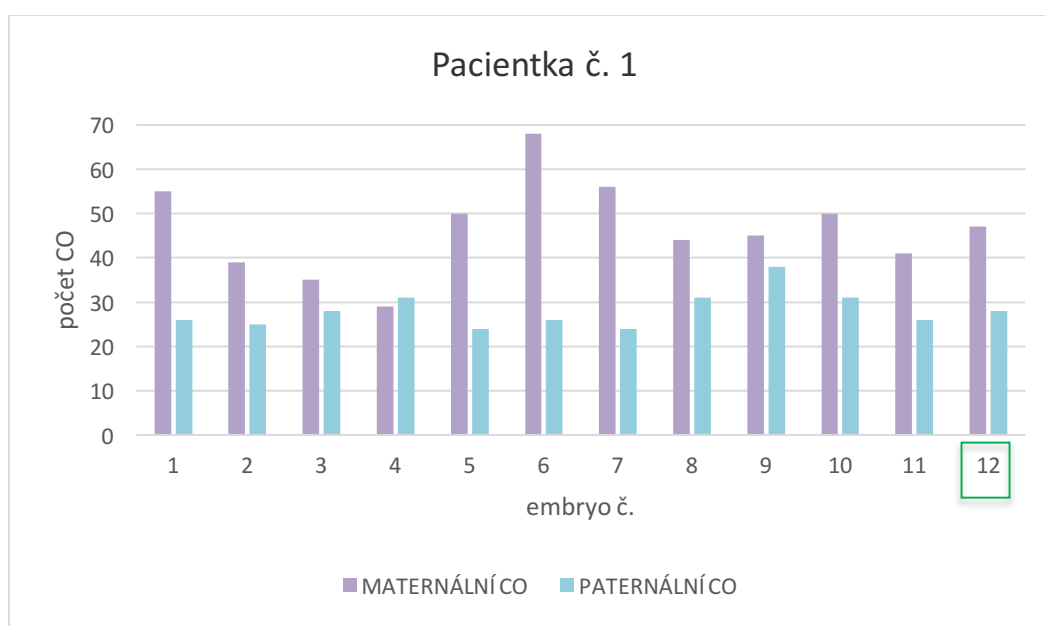
Abychom zjistili, zda výskyt aneuploidií může souviset s počtem crossing-overů, byly z každé věkové skupiny vybrány dvě pacientky, u jejichž embryí byl spočítán počet crossing-overů na maternálních a paternálních haplotypech. Pacientky v rámci jedné věkové skupiny byly vybírány tak, aby měly přibližně stejný počet embryí, ale rozdílný podíl aneuploidních embryí. Pro analýzu crossing-overů bylo vždy zvoleno jedno euploidní embryo s vysokou mírou SNP jako referenční. Počet crossing-overů v referenčním embryu byl dopočítán z počtu crossing-overů, které byly společné všem ostatním embryím. Následně bylo provedeno srovnání průměrného počtu crossing-overů včetně uvedení směrodatné odchylky vždy mezi oběma pacientkami z každé ze tří skupin. Toto srovnání se týkalo jak počtu paternálních, tak i maternálních crossing-overů. Cílem bylo určit, zda existuje mezi těmito počty jakýkoliv rozdíl, a to jak při srovnání aneuploidního a euploidního embrya, tak i při srovnání maternálního či paternálního původu crossing-overu.

## 7.4.1 Srovnání počtu crossing-overů u pacientek v nejmladší věkové kategorii

### Pacientka 1

- Huntingtonova chorea (HTT) – autozomálně dominantní onemocnění
- Věk pacientky: 30 let
- Pacientka heterozygot, partner homozygot normální
- 12 analyzovaných embryí – všechna euploidní
- Embryo č. 12 zvoleno jako referenční pro analýzu crossing-overů

U pacientky č. 1 z nejmladší věkové skupiny byla všechna embrya euploidní. Embryo číslo 12 bylo použito jako reference pro analýzu crossing-overů. Průměrně se vyskytlo 46 maternálních crossing-overů na embryo a 28 paternálních. Tento rozdíl je poměrně velký. Největší rozdíl jsme sledovali u embrya č. 6, kde byl zároveň největší počet maternálních crossing-overů (68). Největší počet paternálních crossing-overů bylo u embrya č. 9.

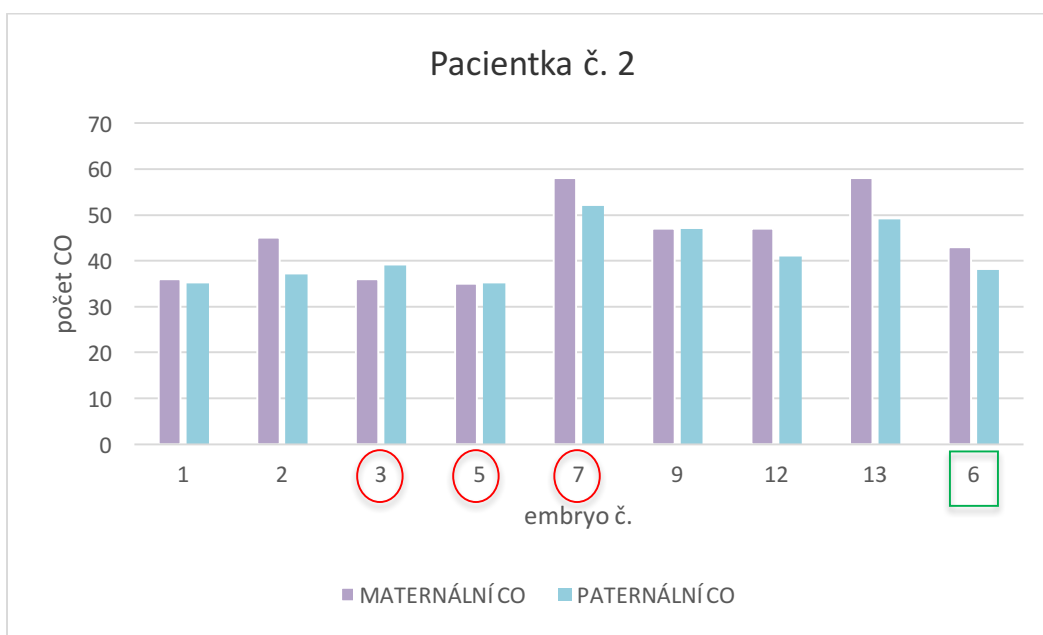


Graf 12 – Přehled počtu crossing-overů u jednotlivých embryí včetně rozdělení na paternální a maternální u pacientky č. 1; v zeleném rámečku je zobrazeno referenční embryo; zdroj: autorka

## Pacientka 2

- Myotonická dystrofie typu I (DMPK) – autozomálně recesivní onemocnění
- Věk pacientky: 29 let
- Pacientka heterozygot přenašeč, partner heterozygot přenašeč
- 9 analyzovaných embryí – 6 euploidních, 3 aneuploidní
- Embryo č. 6 zvoleno jako referenční pro analýzu crossing-overů

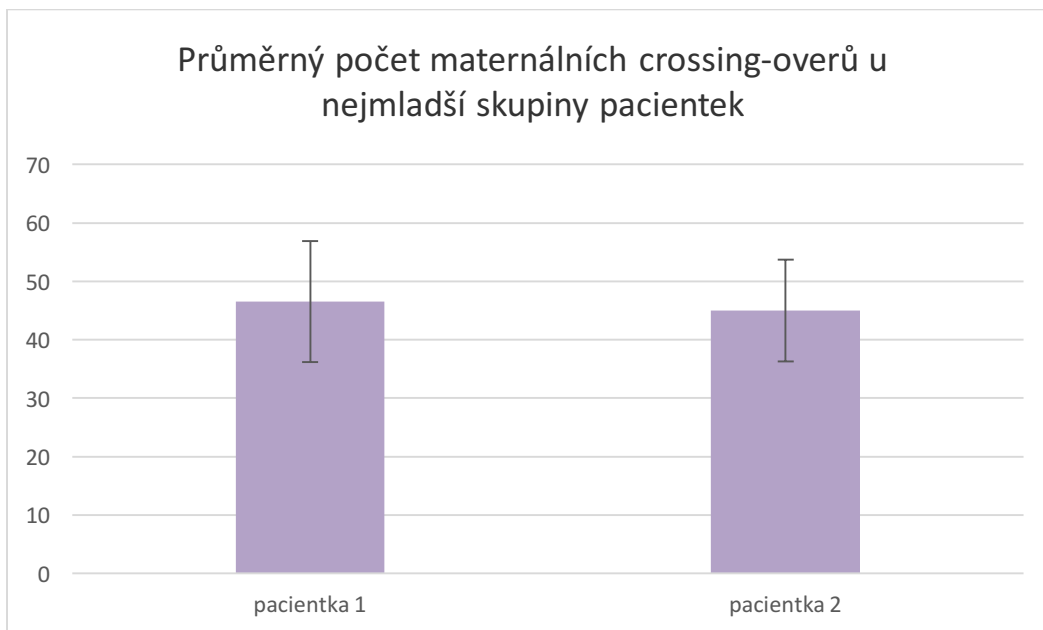
U pacientky č. 2 také z nejmladší věkové skupiny bylo k dispozici celkem 9 embryí. Euploidní embryo č. 6 jsme použili jako referenční. Embrya 3, 5 a 7 byla aneuploidní. Embryo č. 3 mělo monozomii chromozomů 16 a 22 maternálního původu. Embryo č. 5 mělo trizomii chromozomu 16 také maternálního původu. Embryo 7 měla terminální delecii paternálního chromozomu č. 2 v oblasti p22.1. Rozdíl mezi paternálními a maternálními crossing-overy byl minimální, pozorovali jsme jen velmi malé rozdíly. V mnoha případech se od sebe hodnoty nelišily a u embrya č. 3 byla dokonce hodnota paternálních crossing-overů vyšší než hodnota maternálních.



Graf 13 - Přehled počtu crossing-overů u jednotlivých embryí včetně rozdělení na paternální a maternální u pacientky č. 2; v zeleném rámečku je zobrazeno referenční embryo, v červeném kolečku jsou aneuploidní embrya; zdroj: autorka

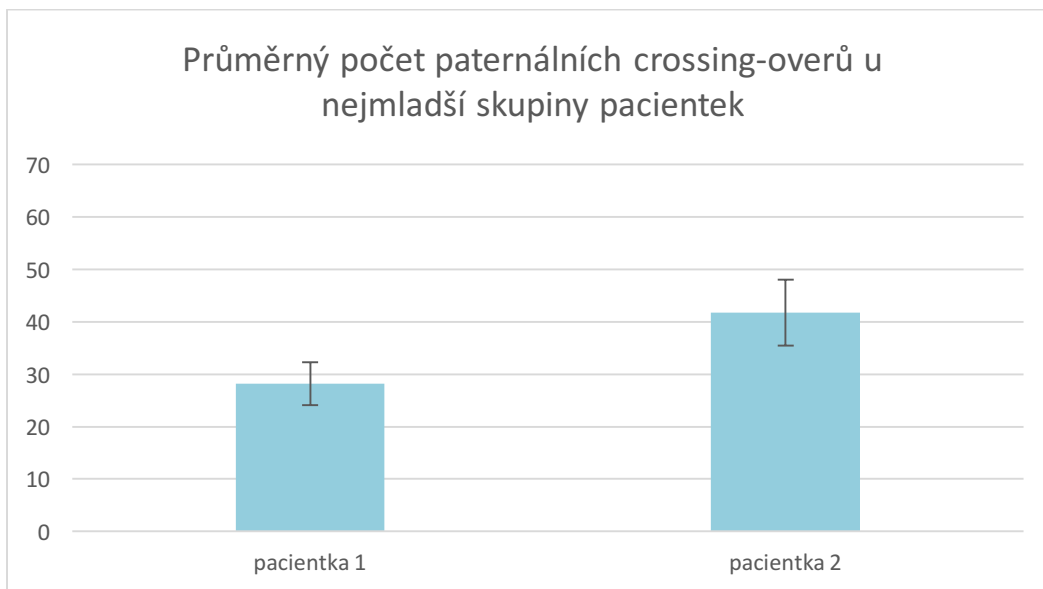
U první pacientky byl průměrný počet maternálních crossing-overů roven 46,6 u druhé pacientky 45,1, a to u všech embryí bez rozlišení – euploidní/aneuploidní. Pro zhodnocení statistické disperze byla vypočítána a naznačena v grafu i směrodatná odchylka, která u pacientky 1 byla rovna 10,3 a u druhé pacientky 8,7. Směrodatná odchylka byla v obou případech vysoká, což znamená, že se jednotlivé počty crossing-overů u dané pacientky mezi sebou poměrně lišily.

Zároveň se ale průměrný počet crossing-overů mezi jednou a druhou pacientkou v této skupině příliš nelišil.



Graf 14 – Průměrný počet maternálních crossing-overů u nejmladší skupiny pacientek včetně směrodatné odchylky, zdroj: autorka

U paternálních crossing-overů však nemůžeme tvrdit totéž. U pacientky 1 a 2 se od sebe průměrný počet lišil celkem o 13. Směrodatná odchylka byla v prvním případě rovna 4 a ve druhém 6,3.



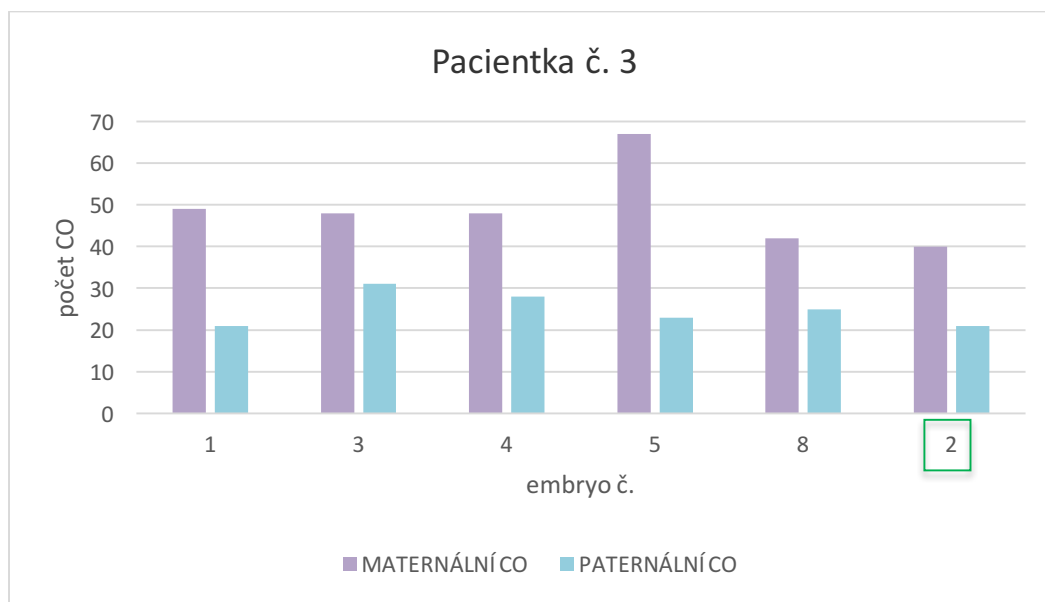
Graf 15 - Průměrný počet paternálních crossing-overů u nejmladší skupiny pacientek včetně směrodatné odchylky, zdroj: autorka

## 7.4.2 Srovnání počtu crossing-overů u pacientek ve střední věkové kategorii

### Pacientka 3

- Kongenitální nukleární katarakta (CRYBA1) – autozomálně dominantní onemocnění
- Věk pacientky: 35 let
- Pacientka heterozygot, partner homozygot zdravý
- 6 analyzovaných embryí – 6 euploidních
- Embryo č. 2 zvoleno jako referenční pro analýzu crossing-overů

Pacientka č. 3 ze skupiny žen 31-35 let měla 6 euploidních embryí, kde embryo č. 2 bylo využito jako reference. U embryí této pacientky byl pozorován největší průměrný počet maternálních crossing-overů (49). Naopak počet paternálních crossing-overů byl poměrně nízký (25), z čehož plyne, že rozdíl mezi nimi byl největší ze všech sledovaných případů.



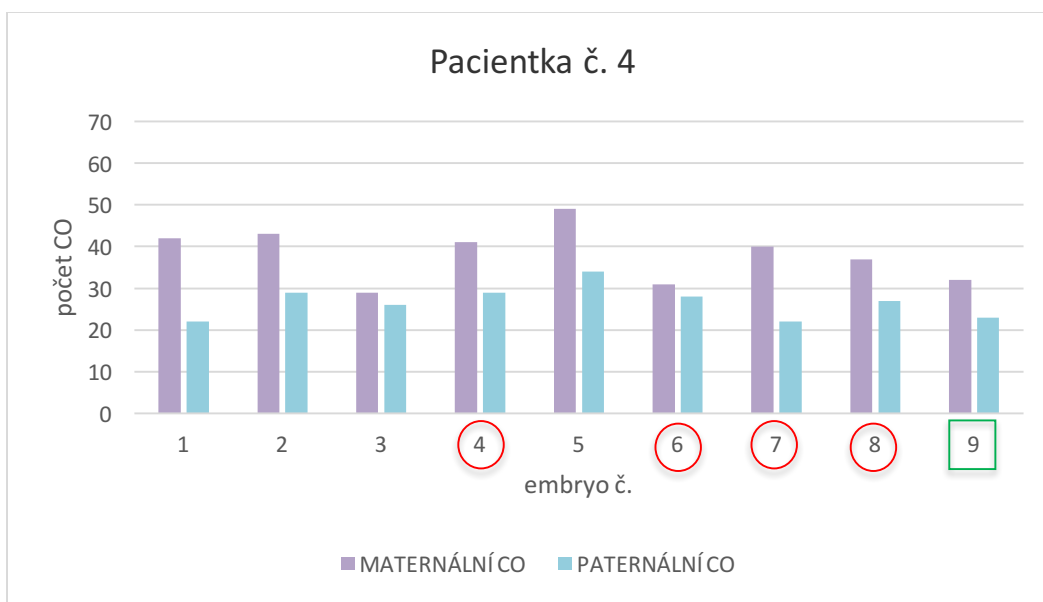
Graf 16 Přehled počtu crossing-overů u jednotlivých embryí včetně rozdělení na paternální a maternální u pacientky č. 3; v zeleném rámečku je zobrazeno referenční embryo; zdroj: autorka



#### Pacientka 4

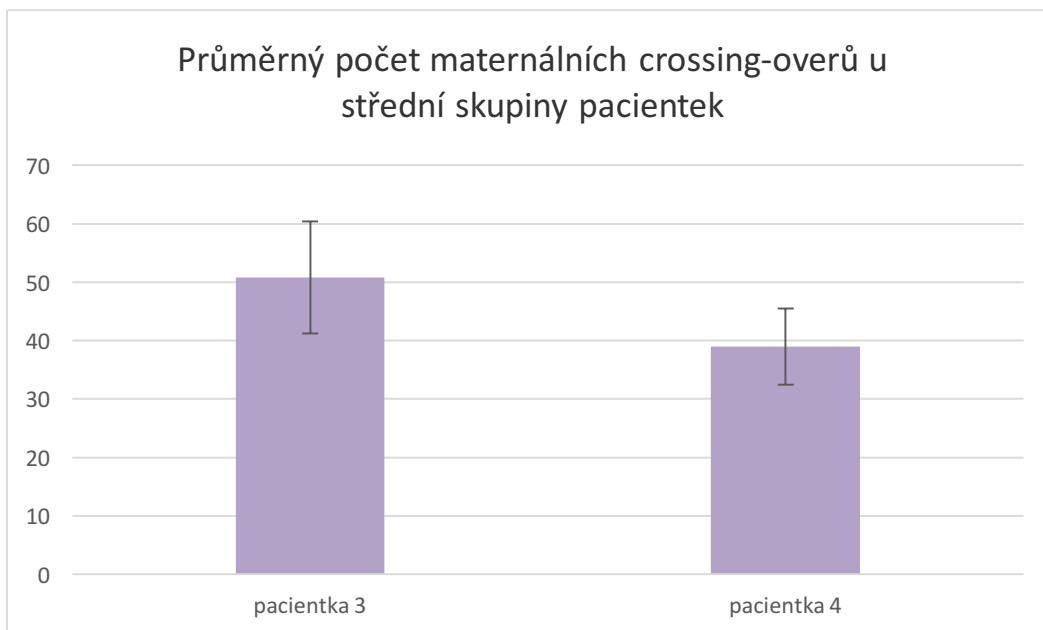
- Dispozice k nádoru prsu a vaječníku (BRCA 1) – autozomálně dominantní onemocnění
- Věk pacientky: 34 let
- Pacientka heterozygot, partner homozygot zdravý
- 9 analyzovaných embryí – 5 euploidní, 4 aneuploidní
- Embryo č. 9 zvoleno jako referenční pro analýzu crossing-overů

Pacientka č. 4 byla ze skupiny žen 31-35 let. Jako referenční bylo zvoleno embryo č. 9. Embrya 4, 6, 7 a 8 byla aneuploidní. Konkrétně embryo 4 mělo trizomii chromozomu 3 a 16 maternálního původu, embryo 6 mělo monozomii chromozomu 15 paternálního původu, embryo 7 monozomii 7. chromozomu taktéž paternálního původu a embryo číslo 8 mělo trizomii maternálního původu chromozomu 2 a nadbytečný chromozom X. Nejvíce paternálních i maternálních crossing-overů jsme sledovali u euploidního embrya č. 5.



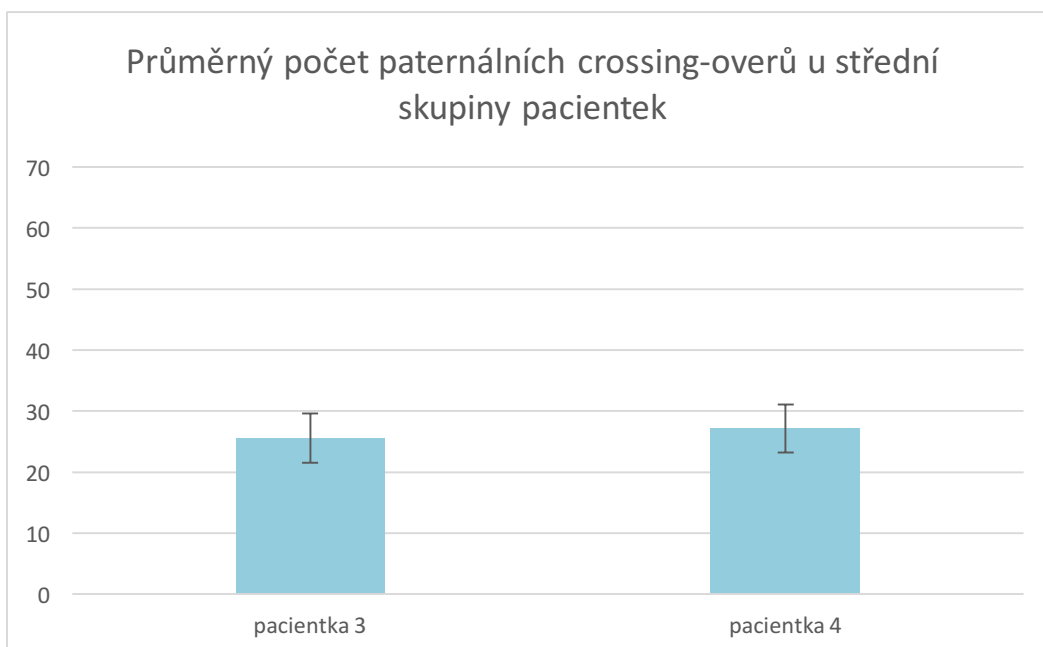
Graf 17 - Přehled počtu crossing-overů u jednotlivých embryí včetně rozdělení na paternální a maternální u pacientky č. 4; v zeleném rámečku je zobrazeno referenční embryo, v červeném kolečku jsou aneuploidní embrya; zdroj: autorka

Průměrný počet maternálních crossing-overů u pacientky č. 3 byl 49, u pacientky č. 4 byl 38,2, a to opět u všech aneuploidních i euploidních embryí. Zatímco směrodatná odchylka v prvním případě byla rovna 6,5 ve druhém případě se rovnala 9,5. U pacientky č. 4, která měla všechna embrya euploidní, byl tedy pozorován velký počet crossing-overů a velký rozptyl hodnot.



Graf 18 - Průměrný počet maternálních crossing-overů u střední skupiny pacientek včetně směrodatné odchylky, zdroj: autorka

Co se týče paternálních crossing-overů, nebyl zde patrný téměř žádný rozdíl. I přesto, že u pacientky č. 3 byla pozorována 4 aneuploidní embrya a u pacientky č. 4 žádné, v průměrném počtu paternálních crossing-overů (26,6 a 24,8) i v hodnotě směrodatné odchylky (3,9 a 4,0) se téměř nelišily.



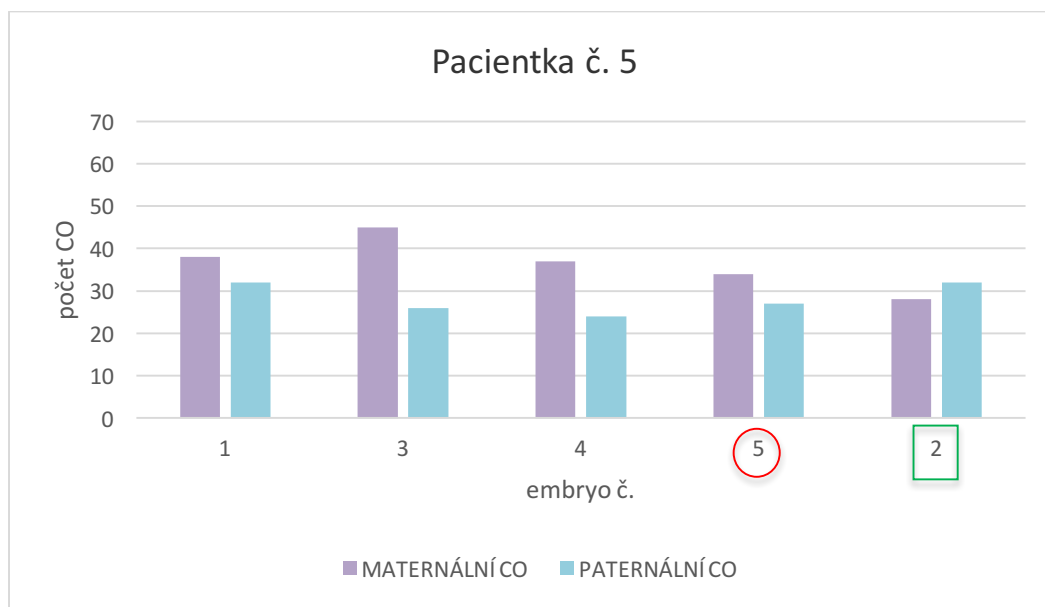
Graf 19 - Průměrný počet paternálních crossing-overů u střední skupiny pacientek včetně směrodatné odchylky, zdroj: autorka

### 7.4.3 Srovnání počtu crossing-overů u pacientek v nejstarší věkové kategorii

#### Pacientka 5

- Cystická fibróza (CFTR) – autozomálně recesivní onemocnění
- Věk pacientky: 37 let
- Pacientka heterozygot přenašeč, partner heterozygot přenašeč
- 5 analyzovaných embryí – 4 euploidní, 1 aneuploidní
- Embryo č. 2 zvoleno jako referenční pro analýzu crossing-overů

Sledovaná pacientka č. 5 byla ze skupiny nejstarších žen ve věku 36 let a více. Bylo analyzováno 5 embryí, z nichž embryo č. 2 bylo použito jako referenční a embryo č. 5 bylo aneuploidní s trizomií chromozomu 7 maternálního původu. Průměrný počet maternálních crossing-overů byl vůbec nejnižší ze všech pacientek.

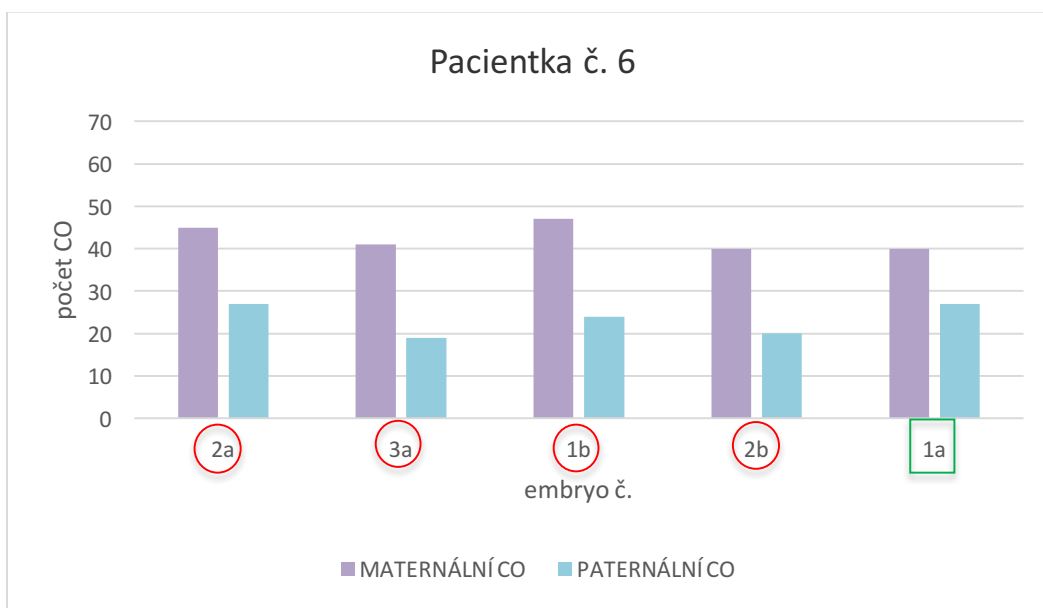


Graf 20 - Přehled počtu crossing-overů u jednotlivých embryí včetně rozdělení na paternální a maternální u pacientky č. 5; v zeleném rámečku je zobrazeno referenční embryo, v červeném kolečku je aneuploidní embryo; zdroj: autorka

## Pacientka 6

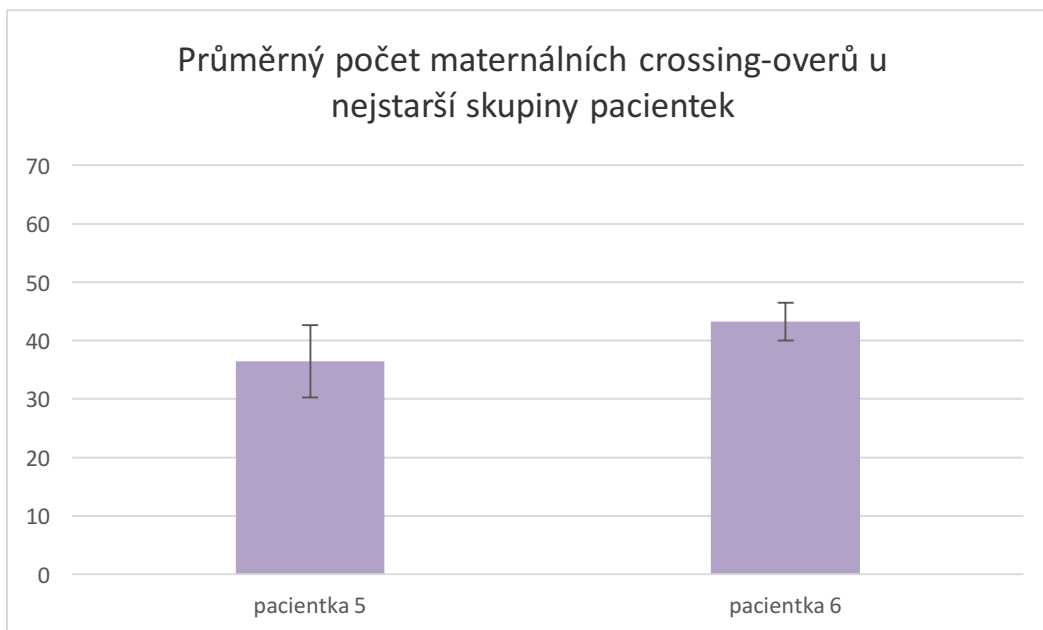
- Ceroidní lipofuscinóza (TPP1) – autozomálně recesivní onemocnění
- Věk pacientky: 42 let
- Pacientka heterozygot přenašeč, partner heterozygot přenašeč
- 5 analyzovaných embryí – 4 aneuploidní, 1 euploidní
- Embryo č. 1a zvoleno jako referenční pro analýzu crossing-overů

U poslední sledované pacientky č. 6 bylo získáno 5 embryí ve dvou střádacích cyklech. Jediné euploidní embryo číslo 1 z prvního cyklu bylo použito jako reference. Embryo č. 2 z prvního cyklu mělo monozomii chromozomu 15 maternálního původu. Embryo č. 3 z prvního cyklu mělo monozomii chromozomů 6 a 22 maternálního původu. Z dalšího cyklu se podařilo získat embryo číslo 1 s trizomií 15 (mat) a 20 (mat) a embryo číslo 2 s terminální delecí paternálního původu 7q31.1, dvěma trizomiemi maternálního původu chromozomů 9 a 16 a jednou monozomií maternálního původu chromozomu 16. Průměrný počet paternálních crossing-overů byl nejnižší ze sledovaných hodnot (23,4). Hodnota jediného euploidního embrya nijak nevybočovala, a to jak v počtu paternálních (27, průměrná 23,4), tak i maternálních (40, průměrná 42,6) crossing-overů.



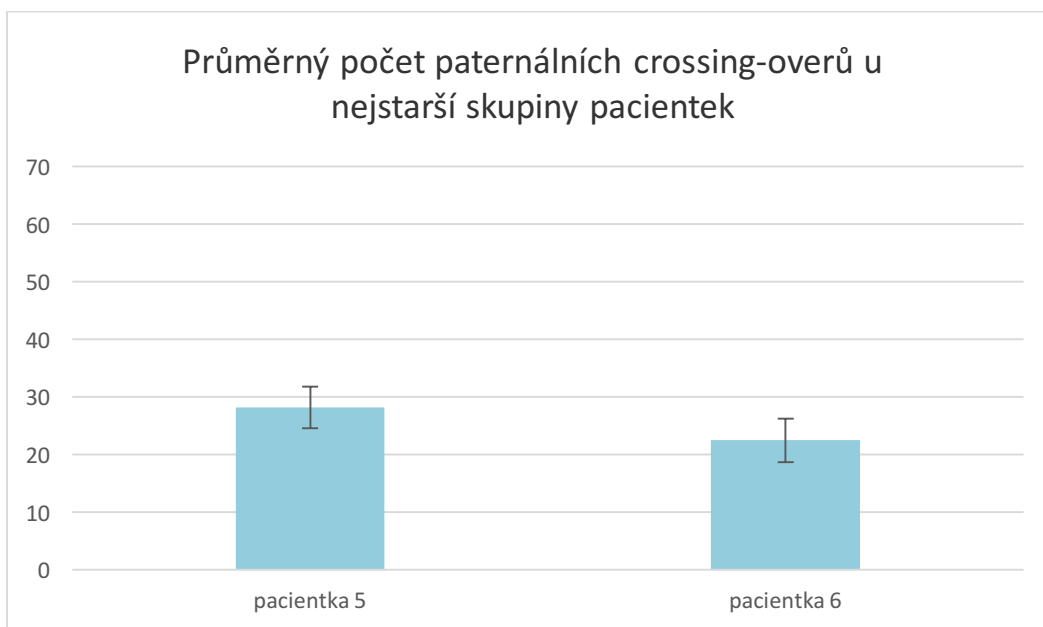
Graf 21 - Přehled počtu crossing-overů u jednotlivých embryí včetně rozdělení na paternální a maternální u pacientky č. 6; v zeleném rámečku je zobrazeno referenční embryo, v červeném kolečku jsou aneuploidní embrya; zdroj: autorka

Průměrný počet maternálních crossing-overů u aneuploidních a euploidních embryí pacientky č. 5 byl 36,4, u poslední sledované pacientky č. 6 byl 42,6. Směrodatná odchylka byla v prvním případě vyšší - 6,2. Ve druhém případě – u pacientky se všemi embryi aneuploidními – byla směrodatná odchylka poměrně nízká – jen 3,2.



Graf 22 - Průměrný počet maternálních crossing-overů u nejstarší skupiny pacientek včetně směrodatné odchylky, zdroj: autorka

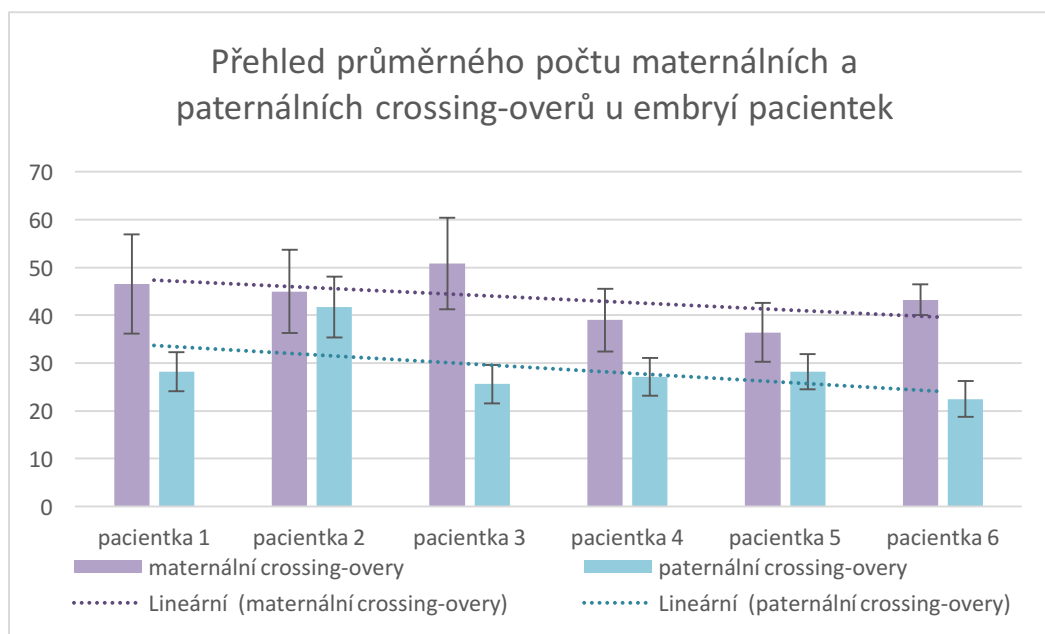
V poslední sledované skupině se hodnota paternálních crossing-overů u pacientky č. 5 rovnala 28,3 a u pacientky 6 potom 23,4. Směrodatná odchylka se v obou případech příliš nelišila – 3,3 a 3,8.



Graf 23 - Průměrný počet paternálních crossing-overů u nejstarší skupiny pacientek včetně směrodatné odchylky, zdroj: autorka

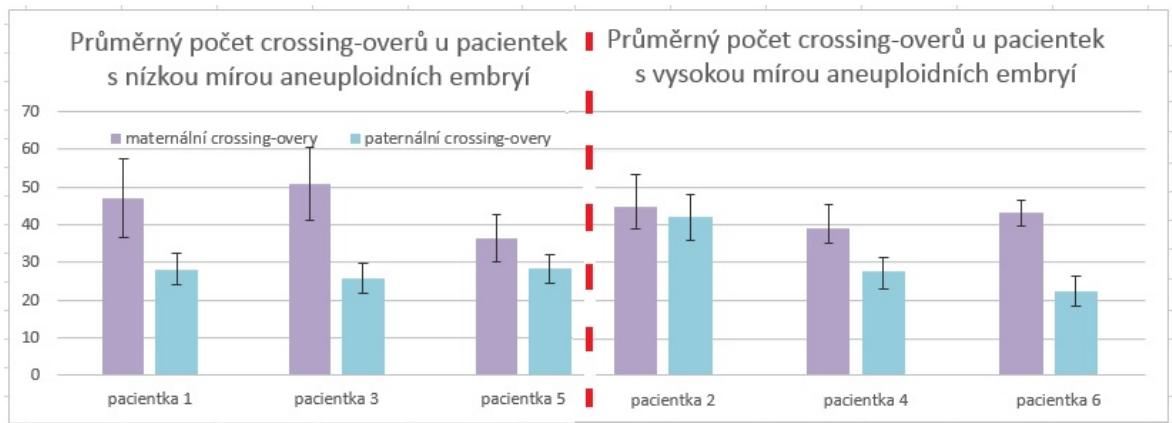
#### 7.4.4 Srovnání počtu crossing-overů navzájem mezi kategoriemi

Abychom zjistili, zda existuje závislost mezi věkem a počtem crossing-overů, provedli jsme srovnání průměrného počtu crossing-overů u všech pacientek. Počet crossing-overů se jeví jako značně variabilní. Průměrný počet maternálních kolísá od 36 do 51 a průměrný počet paternálních kolísá ještě více od 22 do 42. Při pohledu na trendy ale vidíme, že jsou v obou případech klesající se zvyšujícím se věkem.

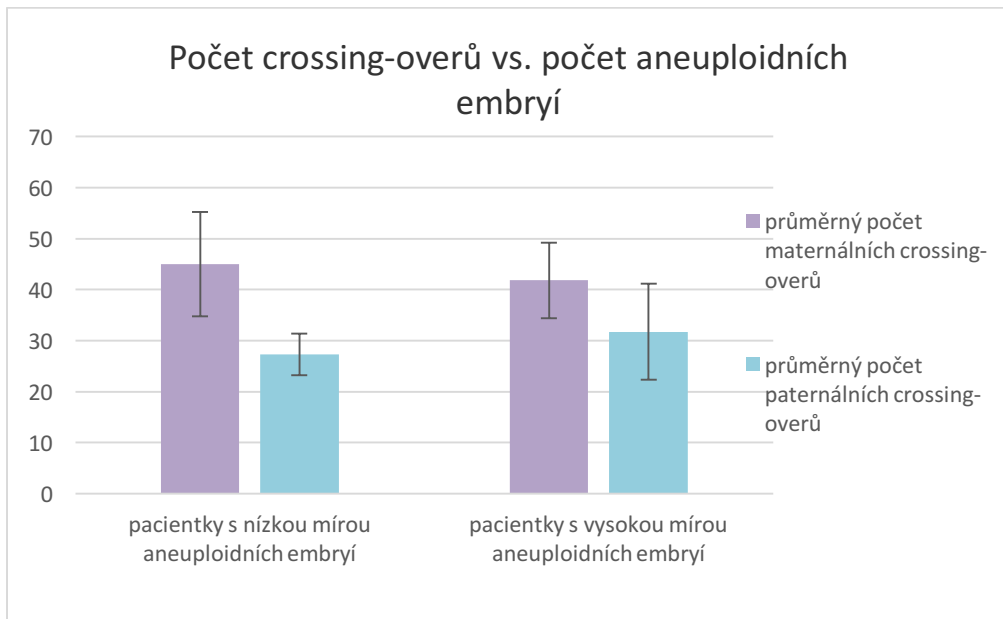


Graf 24 – Přehled průměrného počtu crossing-overů u sledovaných pacientek

Zaměřili jsme se také na to, zda spolu souvisí počet crossing-overů a tendence k většímu množství aneuploidních embryí. Srovnali jsme mezi sebou pacientky s nízkou a vysokou mírou aneuploidii. Na grafu 25 nesledujeme žádný dramatický rozdíl u paternálních ani u maternálních počtů crossing-overů. K lepšímu zhodnocení nám pomůže graf 26, který zobrazuje průměrný počet crossing-overů u všech pacientek s nízkou mírou aneuploidii vůči těm s vysokou mírou. V případě maternálních crossing-overů vidíme jejich nižší množství u pacientek s větším podílem aneuploidii. Zároveň vidíme u stejné skupiny i velkou variabilitu hodnot, směrodatná odchylka se rovnala 10,2. U paternálních crossing-overů jsme sice sledovali opačný trend – tedy nižší počet crossing-overů u pacientek s nižší mírou aneuploidních embryí, variabilita hodnot se ale u obou skupin podstatně lišila. Zatímco u pacientek s nízkou mírou aneuploidii byla variabilita u paternálních crossing-overů nízká a směrodatná odchylka se rovnala 4, u pacientek s vysokou mírou byla variabilita vysoká a směrodatná odchylka se rovnala 9,4. Vysvětlení najdeme při pohledu na graf 25, kde výrazně vybočuje počet paternálních crossing-overů u pacientky č. 2. Tyto hodnoty zvyšují jak variabilitu i celkovou hodnotu průměrného počtu crossing-overů u skupiny pacientek s vyšším podílem aneuploidních embryí.



Graf 25 – Průměrný počet crossing-overů, rozdělení pacientek dle míry aneuploidních embryí, zdroj: autorka



Graf 26 – Počet crossing-overů vs. počet aneuploidních embryí, zdroj: autorka

## 8. Diskuze

### 8.1 Karyomapping je robustní metoda, která umožňuje spolehlivou analýzu aneuploidií

Metoda karyomapping je přelomová v tom, že umožňuje PGD jakéhokoliv monogenního onemocnění, u kterého známe kauzální mutaci. V naprosté většině případů postačí k provedení karyomappingu, mít k dispozici referenční vzorek DNA dalšího člena rodiny kromě obou partnerů (Konstantinidis *et al.*, 2015). Touto referencí může být jejich potomek či rodič jednoho z nich. Tato reference umožní identifikaci haplotypů, spojených s mutací, způsobující dané onemocnění. Referencí může být jak zdravý, tak i nemocný homozygot, nebo přenašeč onemocnění. Jak uvádí Giménez *et al.* (2015), tato metoda stejně tak dobře umožňuje PGD monogenních onemocnění vzniklých *de novo*. V takovém případě je karyomapping doplněn o přímou detekci mutace u embryí, na základě které je mutace přiřazena na jeden ze segregujících haplotypů.

Dalším benefitem je možnost současného provedení detekce aneuploidií u vzorku odebraného z embrya. Jak uvedli Griffin *et al.* (2012), karyomapping lze užít pro stanovení jak rodičovského původu, tak i typu a mechanismu vzniku aneuploidií. Možnost detekce aneuploidií u vyšetřovaných embryí je pro pacienty mimořádně důležitá, jelikož šetří čas, peníze a dbá i na minimalizaci zdravotních rizik u pacientek. Předchozí PGD metody umožňovaly pouze výběr embrya bez konkrétní genetické zátěže, nicméně zejména u starší skupiny žen pozorujeme, že je detekce aneuploidií stěžejní. Transfer aneuploidního embrya totiž vede k selhání implantace, případně potratu nebo narození postiženého dítěte.

Karyomapping mimo výše zmíněné umožňuje detekci abnormálně oplozených embryí, a to haploidních, případně partenogenetických. Tato PGD metoda taktéž umí rozpoznat uniparentální disomie a triploidie včetně určení jejich původu. Stejně tak dobře si počíná i při odhalování segmentálních aneuploidií, které byly v této práci sledovány. Omezeně je také možné analyzovat mozaicismus u biopsií trofektodermy (Treff *et al.*, 2017). Metoda má ale i svá drobná omezení. Neumožňuje detekci tetraploidií a balancovaných strukturních změn. Taktéž touto metodou není možné u monozomií rozlišit mitotický, respektive meiotický původ – viz níže kapitola 8.6. V případě trizomií ale můžeme rozlišit i to, zda chyba vznikla v prvním nebo druhém meiotickém dělení.



## 8.2 Biopsie trofektodermu je vhodnějším materiálem pro metodu karyomapping

Ačkoliv je pro analýzu metodou karyomapping možné využít jak buňky trofektodermu, tak i blastomery, biopát pětidenního embrya poskytuje jednoznačně průkaznější výsledky. Mezi hlavní výhody analýzy buněk blastocysty patří vyšší podíl detekovatelných SNP a tím zvýšení přesnosti při analýze aneuploidií, respektive možnost detekce mozaicismu. Dle Kima *et al.*, (2008) je nespornou výhodou materiálu z blastocyst snížení pravděpodobnosti alelového drop-outu. V případě biopsií blastomer jsme u našeho souboru pacientek pozorovali nižší procento úspěšně analyzovaných embryí (89,2 % u blastomer a 97,1 % u trofektodermu), a to z důvodu degradace DNA nebo neúspěšné celogenomové amplifikace. Jedinou výhodou biopsie blastomer je v případě rychlého provedení analýzy možnost provedení ještě transferu čerstvého embrya. Tento postup však s rozvojem metody vitrifikace – rychlého mražení embryí nepřináší kromě časového hlediska žádnou další výhodu.

## 8.3 Počet aneuploidních embryí se výrazně zvyšuje s rostoucím věkem ženy

Naše předpoklady, že počet aneuploidních embryí poroste napříč věkovými skupinami, se potvrdily. Zvyšovalo se jak množství aneuploidních embryí, tak i počet aneuploidií na aneuploidní embryo. Tento závěr již publikovali Marquez *et al.* (2000), Ata *et al.* (2012), Harton *et al.* (2013), Fiorentino *et al.* (2014) a další. Například Handyside *et al.* (2012) zkoumali frekvence aneuploidií u různých věkových skupin žen a tyto výsledky jsou v souladu s naším pozorováním. Ve skupině žen od 33 do 36 let pozorovali asi 20 % všech embryí s vícečetnými aneuploidiemi, ve skupině od 37 do 39 let to bylo 33 % a ve skupině od 40 do 42 dokonce 57 %. V naší skupině žen do 30 let jsme pozorovali 18 % vícečetných aneuploidií ze všech sledovaných embryí. Ve skupině žen od 31 do 35 let to bylo 25 % a u nejstarší skupiny žen to bylo 50 %.

## 8.4 Aneuploidie maternálního původu převažují nad paternálními aneuploidiemi

Byl sledován poměr mezi maternálním a paternálním původem aneuploidií. Aneuploidie maternálního původu převažují a zároveň jejich počet dramaticky roste se zvyšujícím se věkem pacientky, jak bylo zmíněno výše. Naopak paternální aneuploidie se jeví jako méně závislé na věku. Například Magli *et al.* (2009) a Gianaroli *et al.* (2005) dávají paternální aneuploidie spíše do souvislosti se špatným spermioqramem.

Jak už bylo zmíněno, hlavním důvodem, proč převažují maternální aneuploidie nad těmi paternálními jsou odlišnosti v gametogenezi. Spermatogeneze probíhá v reprodukčním období

muže a trvá 72-90 dní. Naproti tomu oogeneze vajíček je zastavena v prenatalním období v profázi první meiózy a další dělení vajíčka probíhá až po jeho oplodnění. Čím delší prodleva v gametogenezi je, tím větší je pravděpodobnost vzniku chyb buněčného dělení vnějšími vlivy. V posledních letech se jeví jako klíčový i tzv. kohesinový komplex, který je pravděpodobně celý život odbouráván. Oslabení kohesinových vazeb potom vede k missegregaci sesterských chromatid (Tsutsumi *et al.*, 2014; Herbert *et al.*, 2015).

## 8.5 Růst počtu aneuploidií se zvyšujícím se věkem je způsoben zejména nárůstem chyb v prvním meiotickém dělení

Metodou karyomapping je u trizomií možné analyzovat, zda chyba vznikla v prvním nebo druhém meiotickém dělení. Rozhodující je oblast kolem centromery, kde pozorujeme rozložení key a non-key SNP. V případě, že v této oblasti sledujeme absenci non-key SNP, potom jde o chybu vzniklou v průběhu prvního meiotického dělení. Pokud je kolem centromery až do prvního crossing-overu rovnoměrná distribuce key a non-key SNP, jedná se o chybu meiózy II.

Chyby v prvním meiotickém dělení převažovaly nad chybami ve druhém meiotickém dělení. U chyb druhého meiotického dělení byl sledován skokový nárůst pouze mezi první a druhou skupinou žen. U prvního meiotického dělení byl pozorován skokový nárůst zejména mezi druhou a třetí skupinou žen. Převaha chyb v prvním meiotickém dělení již byla sledována dříve s využitím metody FISH (Nussbaum, 2004). Handyside *et al.* (2012) později využili i metodu a-CGH a došli ke stejným závěrům. Zároveň uvedli, že předčasná separace chromatid tvoří 97 % chyb v prvním meiotickém dělení a non-disjunkce je tedy pozorována jen minimálně. Mechanismem zodpovědným za tento fakt může být opět porušení kohesinových vazeb, jež jsou s rostoucím věkem ženy odbourávány – viz výše (Tsutsumi *et al.*, 2014; Herbert *et al.*, 2015).

## 8.6 Segmentální změny jsou zpravidla paternálního původu a nejsou závislé na věku

Zatímco celochromozomální aneuploidie byly ve většině případů maternálního původu, segmentální aneuploidie byly nejčastěji původu paternálního. Pozorovali jsme převahu segmentálních ztrát chromozomů nad jejich ziskem. Někteří autoři se domnívají, že ztráty částí chromozomů paternálního původu mohou být způsobeny nereparovanou fragmentovanou DNA ve spermích (například Shamsi *et al.*, 2011).

Ze všech sledovaných aneuploidií se segmentální změny vyskytovaly ve 12,4 % případů, což je o 3 % nižší výskyt, než uvádí Rabinowitz *et al.* (2012). Tento nižší nález může být způsoben tím, že zatímco v popisované studii se analýza prováděla na blastomerách, v naší práci byly blastomery

zastoupeny jen v minimálním počtu. V případě sledování segmentálních změn u blastocyst uvádí například Faulkner *et al.* (2016) incidenci 3-15 % u všech věkových skupin bez rozlišení. Naše další zjištění, že segmentální změny nejsou nikterak závislé na věku, a to jak v případě maternálního, tak i paternálního původu, opět potvrzují jak Faulkner tak i Rabinowitz.

## 8.7 Monozomie jsou pozorovány častěji než trizomie

Jak u maternálních, tak i u paternálních aneuploidií jsme sledovali převahu monozomií nad trizomiemi. U mladších pacientek téměř nebyly pozorovány zisky genetického materiálu. Větší počet nálezů monozomií pravděpodobně souvisí s tím, že metodou karyomapping u ztrát chromozomů není možné zjistit, zda k chybě došlo v průběhu meiotického dělení nebo postzygoticky v některé z mitóz raného embryonálního vývoje. Nejčastější mitotickou chybou je tzv. „anaphase lag“, kdy se jeden z chromozomů „opozdí“ při rozchodu chromozomů do dceřiné buňky, čímž dojde k jeho ztrátě (Cimini *et al.*, 2001, Pellestor *et al.*, 2002). Chyba v mitóze tedy ve většině případů vede právě ke ztrátě chromozomu.

U nejmladší skupiny pacientek jsme tedy pozorovali převahu monozomií, která byla z větší míry pravděpodobně tvořena chybou v mitóze. Přibližně stejný počet mitotických změn můžeme očekávat i v ostatních skupinách, kde se potom k němu přidávají s věkem přibývající meiotické chyby, čímž se zvyšuje podíl trizomií. Obdobné výsledky byly pozorovány například i v práci Daphnis *et al.* (2008).

## 8.8 Pacientky s AR onemocněním podstupují metodu karyomapping později než ženy s AD onemocněním

Byl analyzován vztah mezi způsobem dědičnosti daného onemocnění a věkem pacientek. Bylo vyzorováno, že pacientky s autozomálně recesivním (AR) onemocněním jsou více zastoupeny ve skupině starších žen. To je pochopitelné z toho důvodu, že páry o skutečnosti, že jsou přenašeči autozomálně recesivního onemocnění většinou neví a k tomuto zjištění dojde často až po narození nemocného dítěte. Péče o postižené dítě je zejména v prvních letech života velice náročná, případně jsou některé typy AR onemocnění smrtelné. Páry tedy uvažují o dalším potomkovi až po uplynutí delší doby, kdy se spoléhají na spontánní otěhotnění s využitím prenatalní diagnostiky, nebo se uchylují k metodám asistované reprodukce s využitím preimplantační genetické diagnostiky. Paralelu najdeme i u autozomálně dominantních (AD) onemocnění. Je zřejmé, že vzhledem k tomu, že osoby s AD onemocněním jsou samy postižené a o své nemoci vědí, PGD volí už na počátku své reprodukce před prvním plánovaným těhotenstvím. Řada autosomálně dominantních onemocnění má také nástup příznaků až v pozdějším věku a s tím se pojí i větší emocionální zátěž spojená s přerušением těhotenství, pokud by pár zvolil prenatalní diagnostiku.

## 8.9 Počet crossing-overů je vysoce variabilní hodnota, která může záviset na věku ženy, ale pravděpodobně nesouvisí s mírou aneuploidii

Trizomie se častěji týkají menších chromozomů, kde je tím pádem i nižší množství crossing-overů. Tento fakt vedl vědce k otázce, zda může existovat mezi počtem rekombinací a pravděpodobností ke vzniku početní změny chromozomu jakákoliv korelace. Například Lamb *et al.* (1996) uvádí že věkově vázaný nárůst trizomií u žen je spojen s redukcí meiotických rekombinací a vede k předčasnému rozdělení bivalentů a chromozomální non-disjunkci. Oliver *et al.* (2008) pozorovali závislost mezi počtem rekombinací a non-disjunkcí chromozomu 21, vedoucí k Downovu syndromu. Zároveň se zaměřili na polohu crossing-overu a jeho vlivu na sklon k častějším missegregacím. Ačkoliv výsledky nebyly statisticky významné, jistá korelace mezi rostoucím věkem a snižujícím se počtem crossing-overů byla nalezena. Oliver *et al.* (2012) později uvedli, že v případech, kdy proběhl jeden crossing-over v blízkosti telomery nebo pericentromericky, vedl výrazně častěji ke vzniku trizomie chromozomu 21. Jestliže je tedy poloha crossing-overu klíčová, dá se předpokládat, že u menších chromozomů bude větší pravděpodobnost vzniku crossing-overu v blízkosti telomery či centromery a tím častěji bude docházet k chybné segregaci těchto chromozomů. Tyto výsledky se shodují s již dříve publikovanými závěry Nussbauma *et al.* (2004) a Shermana *et al.* (2005).

Z výsledků této práce se jeví, že u mladších pacientek skutečně sledujeme vyšší počet crossing-overů nežli u starších. Sledovali jsme klesající trend jak u paternálních, tak i u maternálních crossing-overů. Můžeme tedy říct, že počet maternálních i paternálních crossing-overů s věkem klesá. Žádný rozdíl ale nebyl patrný při srovnání pacientek s nízkou mírou aneuploidních embryí vůči pacientkám s vysokou mírou. Ačkoliv byl u pacientek s vysokou mírou aneuploidii patrný mírný pokles počtu maternálních crossing-overů, a naopak mírný nárůst paternálních crossing-overů, musíme vzít v potaz variabilitu sledovaných hodnot. Variabilita mezi počty crossing-overů byla vysoká jak u jednotlivých embryí jedné pacientky, tak i u sledovaných pacientek navzájem. Dle našich závěrů se tedy jeví, že počet crossing-overů nesouvisí s mírou aneuploidii nebo se sklonem pro tvorbu většího množství aneuploidních embryí. Zároveň jsme pozorovali, převahu maternálních crossing-overů nad paternálními. Maternálních crossing-overů bylo v embryích v průměru 1x krát více než paternálních. Toto je pozorováno i jinými skupinami používajícími metodu karyomapping. Bohužel ale zatím nebyly publikovány žádné další studie, se kterými by bylo možné naše výsledky přímo srovnat.

K tomu, aby bylo možné zjistit, zda počet crossing-overů koreluje s počtem či sklonem k vyššímu poměru aneuploidii, by bylo nutné prozkoumat větší soubor pacientek. Z našeho vzorku analyzovaných embryí se zdá, že variabilita v počtu paternálních i maternálních crossing-overů je

vysoká. Soubor pacientek by bylo potřeba pečlivě rozčlenit podle dalších kritérií a dát do souvislosti s anamnézou páru – spermioqram, věk partnera, použitá hormonální stimulace, věk obou rodičů v době narození každého z partnerů atd. Velký přelom v pohledu na vznik a příčinu aneuploidii by nastal v případě prokázání námi pozorovaného trendu, že oocyty s větším počtem crossing-overů dokončují svůj vývoj v mladším věku ženy než oocyty s nižším počtem crossing-overů které přichází na řadu až na konci fertilního období ženy.

## 9. Souhrn

Cílem této práce bylo analyzovat embrya párů, které podstoupily preimplantační genetickou diagnostiku metodou karyomapping na klinice REPRONEDA v období od června 2014 do září 2016. Celkem jsme měli k dispozici 615 embryí (565 z biopsie trofektodermy, 50 z biopsie blastomer) od 123 pacientek a u nich jsme provedli analýzu aneuploidních embryí – počtu, původu, typu.

Pacientky byly rozděleny do tří skupin dle věku – do 30 let, od 31 do 35 let a od 36 let výše. První skupina zahrnovala 37 pacientek (30 %), druhá skupina 49 pacientek (40 %) a poslední skupina opět 37 pacientek (30 %). Průměrný i mediánový věk pacientek byl v obou případech roven 33,0.

Celkem byla provedena metoda karyomapping pro 64 autozomálně dominantních onemocnění a 40 autozomálně recesivních onemocnění, v ostatních případech šlo o monogenní onemocnění vázaná na pohlaví, případně kombinaci více chorob. Prvním diskutovaným závěrem byl fakt, že pacientky s AR onemocněním podstupují preimplantační genetickou diagnostiku metodou karyomapping později než ženy s AD onemocněním. Vysvětlení souvisí s tím, že páry, které jsou přenašeči autozomálně recesivního onemocnění o svém statutu většinou neví. Často k tomuto zjištění dojde až při dlouhodobějším problémem s početím potomka, opakovaných těhotenských ztrátách nebo až po narození nemocného dítěte. Páry s AR onemocněním tedy uvažují o dalším potomkovi až poté, co se postarají o prvního potomka.

Dále byly analyzovány aneuploidie v závislosti na věku pacientek. Počet aneuploidních embryí se s věkem zvyšoval, stejně tak se zvyšoval i počet aneuploidíí na aneuploidní embryo. Zatímco v nejmladší skupině pacientek jsme pozorovali 1,15 aneuploidie na aneuploidní embryo, u nejstarší skupiny žen to bylo 1,74.

Drtivá většina aneuploidíí měla maternální původ a byla způsobena chybou v prvním meiotickém dělení v důsledku předčasné separace chromatid. Paternální aneuploidie se naopak jevily jako poměrně nezávislé na věku. Zatímco maternální aneuploidie se v 97 % případů týkaly celých chromozomů, paternální aneuploidie se týkaly ve většině případů pouze jejich částí – tzv. segmentální aneuploidie. Výskyt segmentálních aneuploidíí byl nezávislý na jejich původu i na věku pacientek.

Častěji jsme pozorovali ztrátu chromozomů (monozomii) než zisk (trizomie). V případě maternálního původu – 88x zisk a 133x ztráta, u paternálního původu 6x zisk a 20x ztráta. Trizomie narůstají až se zvyšujícím se věkem pacientek. Metodou karyomapping není v případě monozomií možné zjistit, zda k chybě došlo v průběhu meiózy nebo mitózy. Jelikož nejčastější

chyba mitotického dělení tzv. „anaphase lag“ vede k monozomii, vyšší četnost monozomií bude pravděpodobně důsledkem příspěvku mitotických chyb.

V poslední části práce byl zkoumán počet crossing-overů v závislosti na různých faktorech. Zaměřili jsme se zejména na to, zda počet crossing-overů souvisí s výskytem aneuploidií, respektive koreluje s věkem pacientek. Z každé věkové skupiny jsme vybrali 2 pacientky s podobným počtem embryí, ale odlišným poměrem aneuploidií. Srovnáním pacientek se nám nepodařilo prokázat souvislost počtu crossing-overů s výskytem aneuploidií u embryí. Celkovým trendem byl vyšší počet crossing-overů původem v meióze u žen než u mužů. Dále jsme pozorovali klesající počet crossing-overů s rostoucím věkem, a to jak v případě jejich maternálního, tak i paternálního původu. Počet crossing-overů může sice záviset na věku ženy, nicméně pro průkazné závěry by bylo nutné analyzovat mnohem větší množství pacientek.

## 10. Summary

The aim of this thesis was to analyze the embryos of couples who underwent the preimplantation genetic diagnosis by karyomapping at the center of assisted reproduction REPRONEDA in the period of June 2014 till September 2016. In total, we analyzed 615 embryos (565 of the trophoctoderm biopsy and 50 of the blastomere biopsy) of 123 patients and we focused on aneuploidies – specifically on their number, origin and type.

Patients were divided into three groups by age - up to 30 years, from 31 to 35 years and from 36 years. The first group consisted of 37 patients (30 %), in the second group were 49 patients (40 %) and in the last group there were again 37 patients (30 %). The average and median age of the patients was 33.0 in both cases.

In total, the karyomapping method was performed for 64 autosomal dominant diseases and 40 autosomal recessive diseases, in other cases it was a X-linked monogenic disorder or a combination of multiple diseases. The first discussed conclusion was the fact that AR patients underwent preimplantation genetic diagnosis by karyomapping later than women with AD disease. The explanation is related to the fact that couples who are carriers of an autosomal recessive disease do not usually know about their heterozygous status. Often, this finding will only occur with a long-term problem with conception, repeated pregnancy losses, or the birth of an affected child. Couples with AR disease therefore consider another pregnancy only after they have taken care of their first affected offspring.

In addition, aneuploidy was analyzed depending on the age of the patients. The number of aneuploid embryos increased with age, as did the number of aneuploidy per aneuploid embryo. While in the youngest group of patients we observed 1,15 aneuploidy on the aneuploid embryo, the oldest group of women was 1,74.

The vast majority of aneuploidy had maternal origin and was caused by an error in the first meiotic division due to premature separation of sister chromatids. Paternal aneuploidy, on the contrary, appeared to be relatively independent of age. While maternal aneuploidies involved whole chromosomes in 97 % of cases, paternal aneuploidies related only to the parts of chromosomes – so-called segmental aneuploidies. The incidence of segmental aneuploidy was independent of their origin and age of the patients.

More often we observed losses of chromosomes (monosomies) than gains (trisomies). In the case of maternal origin – 88x gain and 133x loss, paternal origin 6x gain and 20x loss. Trisomies grow with increasing age of patients. By karyomapping, it is not possible to find out if the error occurred



during meiosis or mitosis. Since the most common mitotic error of "anaphase lag" leads to monosomy, the higher the frequency of monosomies is likely to be due to the contribution of mitotic errors.

In the last part of the thesis, the number of crossing-overs was examined depending on various factors. In particular, we focused on whether the number of crossing-overs was related to the occurrence of aneuploidies, or correlated with the age of our patients. From each age group, we selected 2 patients with a similar number of embryos, but with a different aneuploidy-ratio. By comparing patients, we have failed to demonstrate the dependence of the relationship of the number of crossing-overs and the aneuploidy-occurrence in embryos. The overall trend was the higher number of meiotic crossing-overs in women than in men. We also observed a decreasing number of crossing-overs with increasing age, both in maternal and paternal origin. The number of crossing-overs may depend on the age of the woman, however, for more conclusive results, it would be necessary to analyze a much larger number of patients.

## 11. Literatura

1. Adler, A., Lee, H.L., McCulloh, D.H., Ampelouio, E., Clarke-Williams, M., Wertz, B.H., Grifo, J., 2014. Blastocyst culture selects for euploid embryos: comparison of blastomere and trophoctoderm biopsies. *Reprod. Biomed. Online* 28, 485–491.
2. Ata, B., Kaplan, B., Danzer, H., Glassner, M., Opsahl, M., Tan, S. L., Munné, S. 2012. Array CGH analysis shows that aneuploidy is not related to the number of embryos generated. *Reproductive biomedicine online*, 24(6), 614-620.
3. Azmanov, D. N., Milachich, T. V., Zaharieva, B. M., Michailova, G. I., Dimitrova, V. G., Karagiozova, Z. H., Maznejkova, V. T., Chernev, T. A. and Toncheva, D. I. 2007. Profile of chromosomal aberrations in different gestational age spontaneous abortions detected by comparative genomic hybridization. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 131, 127-131.
4. Beckmann, C.R.B., Ling F.W., Barzansky B.M., Herbert W.N.P., Laube D.W., Smith R.P. 2010. *Obstetrics and Gynecology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
5. Benner, A., Pen, R., Kittai, A. and Kearns, W. G. (2008). PGD on 2,438 embryos from 261 cycles due to parental reciprocal translocations, robertsonian translocations or pericentric inversions. *Fertility and Sterility* 90, S310.
6. Carlton, P.M., Farruggio, A.P., Dernburg, A.F. 2006. A link between meiotic prophase progression and crossover control. *PLoS Genet* 2, e12.
7. Cimini, D., Howell, B., Maddox, P., Khodjakov, A., Degrassi, F., Salmon, E. D. 2001. Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *The Journal of cell biology*, 153(3), 517-528.
8. Cohen J., Grifo J.A. 2007 Multicentre trial of preimplantation genetic screening reported in the *New England Journal of Medicine*: an in-depth look at the findings. *Reproductive BioMedicine Online* 15, 365–366.
9. Collins, J.A. 2007. Preimplantation genetic screening in older mothers, *N Engl J Med*. vol. 35 (pg. 61-63)
10. Daphnis, D. D., Fragouli, E., Economou, K., Jerkovic, S., Craft, I. L., Delhanty, J. D. A., Harper, J. C. 2008. Analysis of the evolution of chromosome abnormalities in human embryos from Day 3 to 5 using CGH and FISH. *Molecular Human Reproduction* 14, 117-125.
11. Faulkner, N., Walters-Sen, L. C., Breton, B., Gore, A., Zhu, M., Robinson, K., Hallam, S. E. 2016. Segmental aneuploidy in preimplantation genetic screening stratified by age and clinical indication using targeted next-generation DNA sequencing. *Fertility and Sterility*, 106(3), e152.

12. Fiorentino, F., Biricik, A., Bono, S., Spizzichino, L., Cotroneo, E., Cottone, G., Kokocinski, F., Michel, C.E. 2014. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertil. Steril.* 101, 1375–1382.
13. Forman, E. J., Ferry, K. M., Gueye, N. A., Smith, R. D., Stevens, J., Scott, R. T. 2011. Trophectoderm biopsy for single-gene disorder preimplantation genetic diagnosis (PGD) is significantly more reliable than day 3 blastomere biopsy. *Fertility and Sterility*, 96(3), S222.
14. Fragouli, E., Alfarawati, S., Daphnis, D. D., Goodall, N. N., Mania, A., Griffiths, T., Gordon, A., Wells, D. 2011. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Human Reproduction*, 26(2), 480-490.
15. Fragouli, E., Lenzi, M., Ross, R., Katz-Jaffe, M., Schoolcraft, W. B., Wells, D. 2008. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Human Reproduction*, 23(11), 2596-2608.
16. Gabriel, A.S., Thornhill, A.R., Ottolini, C.S., Gordon, A., Brown, A.P.C., Taylor, J., Bennett, K., Handyside, A., Griffin, D.K. 2011. Array comparative genomic hybridisation on first polar bodies suggests that non-disjunction is not the predominant mechanism leading to aneuploidy in humans. *J. Med. Genet.* 48, 433–437.
17. Gaillyová, R. 2013. Vzácná onemocnění. *Universitas-revue Masarykovy univerzity*.
18. Gardner, R. J., Sutherland, G. R. 2004. *Chromosome abnormalities and genetic counseling*, 3rd ed. Oxford, Oxford University Press, 577s.
19. Gil, M., Sar-Shalom, V., Sivira, Y. M., Carreras, R., Checa, M. A. 2013. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(4), 479-485.
20. Giménez, C., Sarasa, J., Arjona, C., Vilamajó, E., Martínez-Pasarell, O., Wheeler, K., Wells, D. 2015. Karyomapping allows preimplantation genetic diagnosis of a de-novo deletion undetectable using conventional PGD technology. *Reproductive biomedicine online*, 31(6), 770-775.
21. Goddijn, M. and Leschot, N. J. 2000. Genetic aspects of miscarriage. *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology* 14, 855-865.
22. Griffin, D. K., Thornhill, A. R., Gordon, A., Handyside, A. H. 2012. Karyomapping as a means of universal diagnosis and providing insight into early human development. *Reproductive BioMedicine Online*, 24, S37.
23. Gutiérrez-Mateo, C., Colls, P., Sánchez-García, J., Escudero, T., Prates, R., Ketterson, K., Munné, S. 2011. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertility and sterility*, 95(3), 953-958.
24. Guttenbach, M., Engel, W. and Schmid, M. 1997. Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations. A review. *Human Genetics* 100, 1-21.

25. Handyside, A. H., Kontogianni, E. H., Hardy, K., Winston, R. M. L. 1990. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 344(6268), 768.
26. Handyside, A. H., Lesko, J. G., Tarín, J. J., Winston, R. M., Hughes, M. R. 1992. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 327(13), 905-909.
27. Handyside, A. H, Thornhill, A. R. 2007. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening, *N Engl J Med*, vol. 357 pg. 1770
28. Handyside, A.H., Harton, G.L., Mariani, B., Thornhil, A.R., Affara, N., Shaw, M.A., Griffin, D.K. 2009. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J. Med. Genet.* 47, 651–658.
29. Handyside, A. H., Montag, M., Magli, M. C., Repping, S., Harper, J., Schmutzler, A., Vesela, K., Gianaroli, L. Geraedts, J. 2012. Multiple meiotic errors caused by predivision of chromatids in women of advanced maternal age undergoing in vitro fertilisation. *European Journal of Human Genetics*, 20(7), 742-747.
30. Harper, J.C., SenGupta, S.B. 2012. Preimplantation genetic diagnosis: State of the art. *Hum Genet.* 131, p.175–186.
31. Harton, G. L., Munné, S., Surrey, M., Grifo, J., Kaplan, B., McCulloh, D. H., Griffin D.K., Wells, D. 2013. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *Fertility and sterility*, 2013, 100.6: 1695-1703.
32. Hassold, T. 1986. Chromosome abnormalities in human reproductive wastage. *Trends in Genetics*, 2, 105-110.
33. Hassold, T., Hansen, T., Hunt, P., VandeVoort, C. 2009. Cytological studies of recombination in rhesus males. *Cytogenet Genome Res* 124:132–8.
34. Hassold, T., Hunt, P. 2001. To ERR (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nature Rev Genet* 2:280-291.
35. Herbert, M., Kalleas, D., Cooney, D., Lamb, M., Lister, L. 2015. Meiosis and maternal aging: insights from aneuploid oocytes and trisomy births. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(4), a017970.
36. Kay, C., Jeyendran, R.S., Coulam, C.B. 2006. p53 tumor suppressor gene polymorphism is associated with recurrent implantation failure. *Reproductive BioMedicine Online* 13, 492–496.
37. Kim, M.J., Lim, C.K., Cho J.W., Jun J.H., Kim J.Y., Koong M.K., Song I.O., Kang I.S., Lee H.S. 2008. Developmental competence of fresh and frozen–thawed embryos after biopsy of two blastomeres in preimplantation genetic diagnosis. 2Speakers abstracts – PGDIS: 8th

- International Symposium on PGD. Reproductive BioMedicine Online, Vol.16, Suppl. 3, April.
38. Kong, A., Thorleifsson, G., Gudbjartsson, D.F., Masson, G., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Walters, G.B., Jonasdottir, A., Gylfason, A., Kristinsson, K.T., Gudjonsson, S.A., Frigge, M.L., Helgason, A., Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K. 2010. Fine-scale recombination rate differences between sexes, populations and individuals. *Nature* 467:1099–103.
  39. Konstantinidis, M., Prates, R., Goodall, N. N., Fischer, J., Tecson, V., Lemma, T., Munné, S. 2015. Live births following Karyomapping of human blastocysts: experience from clinical application of the method. *Reproductive biomedicine online*, 31(3), 394-403.
  40. Kuliev A, Verlinsky ET AL. 2007 Impact of preimplantation genetic diagnosis for chromosomal disorders on reproductive outcome. *Reproductive BioMedicine Online* 16, 9–10.
  41. Le Caignec, C., Spits, C., Sermon, K., De Rycke, M., Thienpont, B., Debrock, S., Staessen, C., Moreau, Y., Fryns, J. P., Van Steirteghem, A., Liebaers, I, Vermeesch, J. R. 2006. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res.* 34(9): e68. doi: 10.1093/nar/gkl336.
  42. Liang, L., Wang, C. T., Sun, X., Liu, L., Li, M., Witz, C., Williams, D., Griffith, J., Skorupski, J., Haddad, G., Gill, J., Wang, W. H. 2013. Identification of chromosomal errors in human preimplantation embryos with oligonucleotide DNA microarray. *PLoS One.* 8(4): e61838. doi: 10.1371/journal.pone.0061838.
  43. Liehr, T., Starke, H., Weise, A., Lehrer, H., Claussen, U. 2004. Multicolor FISH probe sets and their applications. *Histology and histopathology.*
  44. Loutradi, K.E., Kolibianakis, E.M., Venetis, C.A., Papanikolaou, E.G., Pados, G., Bontis, I., Tarlatzis, B.C., 2008. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril.* 90, 186–193.
  45. Łukaszuk, K., Pukszta, S., Wells, D., Cybulska, C., Liss, J., Płóciennik, Ł., ... & Zabielska, J. (2015). Routine use of next-generation sequencing for preimplantation genetic diagnosis of blastomeres obtained from embryos on day 3 in fresh in vitro fertilization cycles. *Fertility and sterility*, 103(4), 1031-1036.
  46. Lynn, A., Koehler, K.E., Judis, L., Chan, E.R., Cherry, J.P., Schwartz, S., Seftel, A., Hunt, P.A., Hassold, T.J. 2002. Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science* 296, 2222–2225.
  47. Magli, M. C., Gianaroli, L., Ferraretti, A. P., Gordts, S., Fredericks, V., & Crippa, A. 2009. Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos. *Reproductive biomedicine online*, 18(4), 536-542
  48. Makker, K., Agarwal, A., Sharma, R. K. 2008. Magnetic activated cell sorting (MACS): utility in assisted reproduction.

49. Marquez, C., Sandalinas, M., Bahce, M., Alikani, M., Munne, S., 2000. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod. Biomed. Online* 1, 17–26.
50. Mastenbroek, S., Twisk, M., van Echten-Arends, J., Sikkema-Raddatz, B., Korevaar, J. C., Verhoeve, H. R., Buys, C. H. 2007. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *New England Journal of Medicine*, 357(1), 9-17.
51. McCoy, R. C., Demko, Z. P., Ryan, A., Banjevic, M., Hill, M., Sigurjonsson, S., Petrov, D.A. 2015. Evidence of selection against complex mitotic-origin aneuploidy during preimplantation development. *PLoS Genet*, 11(10), e1005601.
52. Mrázek, M. 2003. *Umělé oplodnění 1*. 1. vydání. Praha: Triton. 62 s. ISBN 80-7254-413-6.
53. Munné, S., Lee, A., Rosenwaks, Z., Grifo, J., Cohen, J., 1993. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 8, 2185–2191.
54. Munné S, Cohen J, Simpson JL. 2007. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening, *N Engl J Med*, 2007, vol. a 357 (pg. 1769-1770)
55. Natesan, S.A., Handyside, A.H., Thornhill, A.R., Ottolini, C.S., Sage, K., Summers, M.C., Konstantinidis, M., Wells, D., Griffin, D.K., 2014b. Live birth after PGD with confirmation by a comprehensive approach (karyomapping) for simultaneous detection of monogenic and chromosomal disorders. *Reprod. Biomed. Online* 29, 600–605. doi:10.1016/j.rbmo.2014.07.007
56. Natesan, S.A., Bladon, A.J., Coskun, S., Qubbaj, W., Prates, R., Munne, S., Coonen, E., Dreesen, J.C.F.M., Stevens, S.J.C., Paulussen, A.D.C., Stock-Myer, S.E., Wilton, L.J., Jaroudi, S., Wells, D., Brown, A.P.C., Handyside, A.H. 2014a. Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro. *Genet. Med.* 16, 838–845.
57. Nussbaum, R.I., McIllnes, R.R., Willard, H.F. 2004. In: Thompson and Thompson, *Klinická genetika*. 6. vydání, Triton. ISBN 80-7254-475-6.
58. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., 2015. *Thompson & Thompson genetics in medicine*. Elsevier Health Sciences.
59. Oliver, T.R., Feingold, E., Yu, K., Cheung, V., Tinker, S., Yadav-Shah, M., Masse, N. Sherman, S.L., 2008. New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes. *PLoS Genet.* 4, e1000033.
60. Oliver, T.R., Tinker, S.W., Allen, E.G., Hollis, N., Locke, A.E., Bean, L.J.H., Chowdhury, R., Begum, F., Marazita, M., Cheung, V., Feingold, E., Sherman, S.L., 2012. Altered patterns of multiple recombinant events are associated with nondisjunction of chromosome 21. *Hum. Genet.* 131, 1039–1046.
61. Pellestor, F., Andreo, B., Arnal, F., Humeau, C., Demaille, J. 2002. Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation

- evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Human Reproduction* 17, 2134-2145. Penrose, L.S., 1933. The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. *J. Genet.* 27, 219–224.
62. Phadnis, N., Hyppa, R.W., Smith, G.R. 2011. New and old ways to control meiotic recombination *Trends Genet* 27(10): 411–421.
  63. Rabinowitz, M., Ryan, A., Gemelos, G., Hill, M., Baner, J., Cinnioglu, C., Demko, Z. 2012. Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres. *Fertility and sterility*, 97(2), 395-401.
  64. Řežábek, K. *Léčba neplodnosti 3., aktualizované vydání.* Praha: Grada, 2004. 120 s. ISBN 80-247-1010-2
  65. Sánchez-Martín, P., Dorado-Silva, M., Sánchez-Martín, F., Martínez, M. G., Johnston, S. D., & Gosálvez, J. 2017. Magnetic cell sorting of semen containing spermatozoa with high DNA fragmentation in ICSI cycles decreases miscarriage rate. *Reproductive BioMedicine Online*.
  66. Shamsi M. B., Imam S. N., Dada R. 2011. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Assist Reprod Genet* 28:1073–1085.
  67. Schoolcraft, W. B., Fragouli, E., Stevens, J., Munne, S., Katz-Jaffe, M. G., Wells, D. 2010. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertility and sterility*, 94(5), 1700-1706.
  68. Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial, *Hum Reprod* , 2004, vol. 19 (pg. 2849-2858)
  69. Stulp, R. P., Vos, Y. J., Mol, B., Karrenbeld, A., de Raad, M., van der Mijle, H. J., Sijmons, R. H. 2006. First report of a de novo germline mutation in the MLH1 gene. *World J. Gastroenterol*, 12, 809-811.
  70. Thornhill, A.R., Handyside, A.H., 2008. Human embryo biopsy procedures, in: *Textbook of Assisted Reproductive Technologies.* Informa Healthcare, pp. 191–206.
  71. Trávník P., Čech S. 2011. *Základy obecné a speciální embryologie pro klinické embryology*, Brno, YBUX
  72. Trávník, P. 2015. Moderní tendence ve stimulaci ovarií. *Prakt lékáren* 11.4:123-125.
  73. Treff, N., Tao, X., Su, J., Taylor, D., Miller, K., Scott, R. 2009. Four hour 24 chromosome aneuploidy screening using high throughput PCR SNP allele ratio analyses. *Fertility and Sterility*, 92(3), S49-S50.
  74. Treff, N. R., Franasiak, J. M. 2017. Detection of segmental aneuploidy and mosaicism in the human preimplantation embryo: technical considerations and limitations. *Fertility and Sterility*, 107(1), 27-31.

75. Tsai, J. H., McKee, B. D. 2011. Homologous pairing and the role of pairing centers in meiosis. *J Cell Sci*, 124(12), 1955-1963.
76. Tsutsumi, M., Fujiwara, R., Nishizawa, H., Ito, M., Kogo, H., Inagaki, H., Ohye, T., Kato, T., Fujii, T., Kurahashi, H. 2014. Age-Related Decrease of Meiotic Cohesins in Human Oocytes. *PLOS ONE* 9, e96710
77. Ventruba, P., Žáková, J., Trávník, P., Crha, I., Mrázek, M., Rumpík, D., ... & Veselá, K. (2013). Aktuální otázky asistované reprodukce v České republice. *Čes Gynek*, 78(4), 392-398.
78. Voullaire, L., Slater, H., Williamson, R., Wilton, L. 2000. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet*. 106(2): 210-217.
79. Wilton, L. 2002. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review, *Prenat Diagn*, vol. 19 (pg. 846-851)
80. Wells, D., Escudero, T., Levy, B., Hirschhorn, K., Delhanty, J. D. and Munne, S. 2002. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril*. 78(3): 543-549.
81. Yang, Z., Liu, J., Collins, G. S., Salem, S. A., Liu, X., Lyle, S. S., Peck, A. C., Sills, E. S. and Salem, R. D. 2012. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet*. 5(1): 24. doi: 10.1186/1755- 8166-5-24.

## Internetové zdroje

1. Oocyte retrieval (online) (cit 2017-03-20). Dostupné z: [http://kapetanakis-center.gr/wp-content/uploads/2015/05/oocyte\\_retrieval.jpg](http://kapetanakis-center.gr/wp-content/uploads/2015/05/oocyte_retrieval.jpg)
2. Biopsie blastomery (online) (cit 2017-03-20). Dostupné z: <http://paveltravnik.blogspot.cz/2013/10/preimplantacni-geneticka-diagnostika.html>
3. Biopsie blastocysty (online) (cit. 2017-03-30). Dostupné z: [https://www.pgdnederland.nl/sites/pgd/files/styles/token-image-small/public/uploads/trofectoderm\\_biopsie\\_trophectoderm\\_biopsy.jpg?itok=TIabveph](https://www.pgdnederland.nl/sites/pgd/files/styles/token-image-small/public/uploads/trofectoderm_biopsie_trophectoderm_biopsy.jpg?itok=TIabveph)
4. Downův syndrom (online) (cit 2017-04-01). Dostupné zdroj: <http://www.prenatalsafe.cz/>
5. Monozomie chromozomu X (online) (cit 2017-04-20). Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/images/thumb/1/1b/45%2CX.jpg/300px-45%2CX.jpg>
6. Errors in meiosis (online) (cit 2017-02-27). Dostupné z: <https://voer.edu.vn/c/errors-in-meiosis/a64457a4/753296a2>



## 12. Příloha

### 12.1 Seznam obrázků

Obrázek 1 – Punkce folikulární tekutiny pomocí tenké jehly vaginální cestou (zdroj: <a href="http://kapetanakis-center.gr/wp-content/uploads/2015/05/oocyte_retrieval.jpg">http://kapetanakis-center.gr/wp-content/uploads/2015/05/oocyte_retrieval.jpg</a> ) .....	13
Obrázek 2 – Biopsie blastomery raného embrya (zdroj: <a href="http://paveltravnik.blogspot.cz/2013/10/preimplantacni-geneticka-diagnostika.html">http://paveltravnik.blogspot.cz/2013/10/preimplantacni-geneticka-diagnostika.html</a> ) .....	15
Obrázek 3 – Biopsie trofektodermu embrya ve fázi blastocysty (zdroj: <a href="https://www.pgdnederland.nl/sites/pgd/files/styles/token-image-small/public/uploads/trofectoderm_biopsie_trophectoderm_biopsy.jpg?itok=TIabveph">https://www.pgdnederland.nl/sites/pgd/files/styles/token-image-small/public/uploads/trofectoderm_biopsie_trophectoderm_biopsy.jpg?itok=TIabveph</a> )...	16
Obrázek 4 – Trizomie chromozomu 21 – Downův syndrom (zdroj <a href="http://www.prenatalsafe.cz">www.prenatalsafe.cz</a> ) .....	23
Obrázek 5 – Monozomie chromozomu X – Turnerův syndrom (zdroj: <a href="http://www.wikiskripta.eu/images/thumb/1/1b/45%2CX.jpg/300px-45%2CX.jpg">http://www.wikiskripta.eu/images/thumb/1/1b/45%2CX.jpg/300px-45%2CX.jpg</a> ).....	24
Obrázek 6 - Schéma možných typů chromozomových aneuploidií způsobených poruchami prvního nebo druhého meiotického dělení. (upraveno dle <a href="https://voer.edu.vn/c/errors-in-meiosis/a64457a4/753296a2">https://voer.edu.vn/c/errors-in-meiosis/a64457a4/753296a2</a> ) .....	25
Obrázek 7 – Příklad autozomálně recesivní choroby řešené pomocí metody karyomappingu, zdroj: materiály kliniky REPROMEDA, upraveno autorkou .....	30
Obrázek 8 – Rozložení key a non-key SNP, zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou .....	37
Obrázek 9 – Příklad výsledku karyomappingu pro autozomálně recesivní chorobu (cystická fibróza) – zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou.....	38
Obrázek 10 – Analýza crossing-overů. Haplotyp otce znázorněný červeno-modře, haplotyp matky zeleno-žlutě, je možné dobře analyzovat crossing-overly. zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou .....	39
Obrázek 11 – Monozomie paternálního původu chromozomu 15, zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou .....	39
Obrázek 12 - Trizomie maternálního původu chromozomu 2, zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou .....	40

Obrázek 13 – Log-R chart: monozomie chromozomu 15, zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou .....	40
Obrázek 14 – Log-R chart: trizomie chromozomu 2 a chromozomu X, zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou .....	41
Obrázek 15 – B-allele frequency chart: monozomie chromozomu 15, zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou .....	41
Obrázek 16 - B-allele frequency chart: trizomie chromozomu 2 a sestava pohlavních chromozomů XXY,, zdroj: BlueFuse Multi, upraveno autorkou .....	42
Obrázek 17 – Chyba v I. meiotickém dělení, zdroj: materiály kliniky REPROMEDA .....	42
Obrázek 18 – Chyba ve II. meiotickém dělení, zdroj: materiály kliniky REPROMEDA .....	42

## 12.2 Seznam grafů

Graf 1 – Počet pacientek podstupujících metodu karyomapping – rozdělení do skupin dle věku, zdroj: autorka .....	44
Graf 2 - Způsob dědičnosti vs. věk, zdroj: autorka.....	45
Graf 3 - Způsob dědičnosti vs. věk, poměrové rozložení, zdroj: autorka .....	45
Graf 4 - Způsob dědičnosti vs. věk, poměrové rozložení, zdroj: autorka .....	46
Graf 5 – Poměr maternálních vs. paternálních aneuploidii, zdroj: autorka .....	47
Graf 6 – Rozdělení aneuploidii dle původu, zdroj: autorka.....	47
Graf 7 – Celochromozomální versus segmentální změny, zdroj: autorka .....	48
Graf 8 – Segmentální změny, rozdělení dle původu, zdroj: autorka .....	49
Graf 9 – Segmentální aneuploidie, zisk vs, ztráta, zdroj: autorka .....	49
Graf 10 - Celochromozomální versus segmentální změny – vývoj dle věku ženy, zdroj: autorka .....	50
Graf 11 – Chyby v prvním a druhém meiotickém dělení ženy, zdroj: autorka .....	50

Graf 12 – Přehled počtu crossing-overů u jednotlivých embryí včetně rozdělení na paternální a maternální u pacientky č. 1; v zeleném rámečku je zobrazeno referenční embryo; zdroj: autorka.....	52
Graf 13 - Přehled počtu crossing-overů u jednotlivých embryí včetně rozdělení na paternální a maternální u pacientky č. 2; v zeleném rámečku je zobrazeno referenční embryo, v červeném kolečku jsou aneuploidní embrya; zdroj: autorka.....	53
Graf 14 – Průměrný počet maternálních crossing-overů u nejmladší skupiny pacientek včetně směrodatné odchylky, zdroj: autorka.....	54
Graf 15 - Průměrný počet paternálních crossing-overů u nejmladší skupiny pacientek včetně směrodatné odchylky, zdroj: autorka.....	54
Graf 16 Přehled počtu crossing-overů u jednotlivých embryí včetně rozdělení na paternální a maternální u pacientky č. 3; v zeleném rámečku je zobrazeno referenční embryo; zdroj: autorka.....	55
Graf 17 - Přehled počtu crossing-overů u jednotlivých embryí včetně rozdělení na paternální a maternální u pacientky č. 4; v zeleném rámečku je zobrazeno referenční embryo, v červeném kolečku jsou aneuploidní embrya; zdroj: autorka.....	56
Graf 18 - Průměrný počet maternálních crossing-overů u střední skupiny pacientek včetně směrodatné odchylky, zdroj: autorka.....	57
Graf 19 - Průměrný počet paternálních crossing-overů u střední skupiny pacientek včetně směrodatné odchylky, zdroj: autorka.....	57
Graf 20 - Přehled počtu crossing-overů u jednotlivých embryí včetně rozdělení na paternální a maternální u pacientky č. 5; v zeleném rámečku je zobrazeno referenční embryo, v červeném kolečku je aneuploidní embryo; zdroj: autorka .....	58
Graf 21 - Přehled počtu crossing-overů u jednotlivých embryí včetně rozdělení na paternální a maternální u pacientky č. 6; v zeleném rámečku je zobrazeno referenční embryo, v červeném kolečku jsou aneuploidní embrya; zdroj: autorka.....	59
Graf 22 - Průměrný počet maternálních crossing-overů u nejstarší skupiny pacientek včetně směrodatné odchylky, zdroj: autorka.....	60
Graf 23 - Průměrný počet paternálních crossing-overů u nejstarší skupiny pacientek včetně směrodatné odchylky, zdroj: autorka.....	60

Graf 24 – Přehled průměrného počtu crossing-overů u sledovaných pacientek.....	61
Graf 25 – Průměrný počet crossing-overů, rozdělení pacientek dle míry aneuploidních embryí, zdroj: autorka .....	62
Graf 26 – Počet crossing-overů vs. počet aneuploidních embryí, zdroj: autorka .....	62

### 12.3 Seznam tabulek

Tabulka 1 – Příprava D2, zdroj: SOP Preimplantační genetická diagnostika pomocí metody karyomapping, klinika REPROMEDA.....	31
Tabulka 2 – Příprava Master Mixu, zdroj: SOP Preimplantační genetická diagnostika pomocí metody karyomapping, klinika REPROMEDA.....	31
Tabulka 3 – Schéma pipetování, zdroj: SOP Preimplantační genetická diagnostika pomocí metody karyomapping, klinika REPROMEDA.....	32
Tabulka 4 - Key a non-key SNP, zdroj: Natesan et al., 2014a, upraveno autorkou .....	37