

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

2022

**Ivana Ženíšková**

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004)

**Ivana Ženíšková**

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

**PREIMPLANTAČNÍ VYŠETŘENÍ NEBALANCOVANÝCH  
CHROMOZOMOVÝCH ABERACÍ METODOU NGS**

**Bakalářská práce**

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

PLZEŇ 2022

Na této straně se nachází v tištěné verzi zadání bakalářské práce.



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 31.3.2022.

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Ženíšková Ivana

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Preimplantační vyšetření nebalancovaných chromozomových aberací metodou NGS

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

Počet stran – číslované: 53

Počet stran – nečíslované: 23

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 29

Klíčová slova: Preimplantační genetické testování, PGT-SR, NGS, nebalancované aberace

### **Souhrn:**

Bakalářská práce se zabývá problematikou nebalancovaných chromozomových aberací u embryí, jejichž rodiče jsou nositeli reciprokových či robertsonských balancovaných translokací. Nositelé těchto translokací mají často problémy s reprodukcí, které jsou spjaty s nebalancovanými formami familiárních translokací u jejich potomků.

Výzkumný soubor tvořilo 383 úspěšně vyšetřených embryí pocházejících od nosičů translokací. Nebalancované aberace byly vyšetřovány z odebraných buněk trofoektodermu a detekovány pomocí speciálně upravené molekulární metody sekvenování nové generace (NGS) v rámci preimplantačního vyšetření strukturálních přestaveb (PGT-SR).

V práci jsem chtěla ověřit, že nosiči reciprokových balancovaných translokací mají vyšší podíl embryí s nebalancovanými formami translokace než nosiči robertsonských translokací. Podíl nebalancovaných forem familiárních translokací u embryí od nositelů

reciprokých translokací byl téměř dvakrát vyšší než u embryí od nositelů robertsonských translokací (53,6 % vs 28,4 %). Statisticky signifikantně vyšší podíl nebalancovaných embryí od nositelů reciprokých translokací byl potvrzen pomocí Fisherova exaktního testu ( $p < 0,00001$ ). Muži i ženy nesoucí jakýkoli z obou typů translokace mají téměř stejný podíl nebalancovaných embryí, na pohlaví nosiče translokace tudíž nezáleží. Při PGT-SR můžeme zachytit mnoho různých meiotických segregáčních vzorů, některé z nich byly v práci zdokumentovány. Kvůli aneuploidním změnám vzniklým *de novo* nemohlo být doporučeno k transferu 26,9 % úspěšně vyšetřených, v rámci PGT-SR balancovaných, embryí.

## **Abstract**

Surname and name: Ženíšková Ivana

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Preimplantation examination of unbalanced chromosomal aberrations using the NGS method

Consultant: RNDr. Martina Hrubá, Ph.D.

Number of pages – numbered: 53

Number of pages – unnumbered: 23

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 29

Keywords: Preimplantation genetic testing, PGT-SR, NGS, unbalanced aberrations

### Summary:

This bachelor's thesis addresses the issue of unbalanced chromosomal aberration of embryos, whose parents are carriers of balanced either reciprocal or Robertsonian translocations. Carriers of these translocations often experience reproduction problems, which are related to unbalanced forms of the familiar translocations in their offspring.

The research cohort consisted of 383 successfully examined embryos originating from carriers of the translocations. Unbalanced aberrations were examined from trophectoderm cells using a special modification of new generation sequencing (NGS) molecular method, in frame of preimplantation genetic testing for structural chromosomal rearrangements (PGT-SR).

The aim of my thesis was to verify the hypothesis that carriers of balanced reciprocal translocations have a higher proportion of embryos with unbalanced forms of the translocation than carriers of Robertsonian translocations. The percentage



of unbalanced forms of familiar translocations in embryos of carriers of reciprocal translocations was nearly double than in embryos of carriers of Robertsonian translocations (53.6 % vs 28.4 %). Statistical significance of the higher proportion of unbalanced embryos in carriers of reciprocal translocations was confirmed using Fisher's exact test ( $p < 0.00001$ ). Men and women carrying any of both translocation types have nearly the same proportion of unbalanced embryos, therefore the gender of carrier is not significant. Many different meiotic segregation patterns may be observed within PGT-SR, some of them were documented in the thesis. 26.9 % of successfully examined embryos with balanced results within PGT-SR could not be recommended for embryo transfer due to aneuploidies arisen *de novo*.

## **Předmluva**

Toto téma bakalářské práce jsem si vybrala z důvodu mého zájmu o genetiku. Chtěla jsem se dozvědět více o preimplantačním testování a vybrání vhodného embrya, které bude doporučeno k transferu do dělohy matky. Cílem práce je ověřit vyšší incidenci nebalancovaných forem familiárních translokací u embryí nositelů reciprokých translokací v porovnání s nositeli robertsonských translokací.

## **Poděkování**

Na tomto místě bych velmi chtěla poděkovat RNDr. Martině Hrubé Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, poskytování cenných rad, materiálních podkladů a hlavně za čas, který mi věnovala. Dále patří mé velké díky pracovníkům Genetika PLZEŇ s.r.o., konkrétně Ing. Anně Rykovské a Bc. Monice Pittrové též za jejich čas, který mi věnovaly v laboratoři reprodukční genetiky a přiblížení problematiky týkající se mé bakalářské práce.

# OBSAH

SEZNAM GRAFŮ .....	14
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	15
SEZNAM TABULEK .....	16
SEZNAM ZKRATEK .....	17
ÚVOD.....	19
TEORETICKÁ ČÁST .....	21
1 ZÁKLADNÍ POZNATKY Z CYTOGENETIKY .....	21
1.1 Eukaryota .....	21
1.2 Chromozom .....	21
1.2.1 Stavba chromozomu .....	21
1.2.2 Karyotyp .....	22
1.3 Numerické chromozomové aberace.....	23
1.3.1 Polyploidie.....	23
1.3.2 Aneuploidie .....	23
1.3.3 Mozaicismus.....	24
1.4 Strukturální chromozomové aberace .....	25
1.4.1 Nebalancované aberace .....	25
1.4.2 Balancované aberace .....	25
1.5 Translokace .....	26
1.5.1 Robertsonské translokace .....	26
1.5.2 Reciproké translokace.....	27
2 BUNĚČNÝ CYKLUS A MITÓZA.....	29
2.1 Interfáze .....	29
2.1.1 G <sub>1</sub> fáze .....	29
2.1.2 S fáze .....	29
2.1.3 G <sub>2</sub> fáze .....	29
2.2 M fáze .....	30
3 MEIOTICKÉ DĚLENÍ.....	31
3.1 Meiotické dělení I. ....	31
3.1.1 Profáze I.....	31
3.2 Meiotické dělení II.....	32
3.3 Spermatogeneze .....	32
3.4 Oogeneze .....	33
3.5 Meiotická nondisjunkce .....	34
4 RANÝ EMBRYONÁLNÍ VÝVOJ .....	35

5	PORUCHY REPRODUKCE.....	36
6	ASISTOVANÁ REPRODUKCE .....	37
6.1	<i>In vitro</i> Fertilizace.....	37
6.1.1	Princip metody.....	37
6.2	Intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI) .....	38
7	PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÉ TESTOVÁNÍ (PGT) .....	39
7.1	Historie preimplantačního testování .....	39
7.2	Odběrový materiál .....	40
7.3	Druhy preimplantačního testování.....	40
7.3.1	Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A).....	40
7.3.2	Preimplantační genetické testování monogenních onemocnění (PGT-M)....	41
7.3.3	Preimplantační genetické testování strukturních chromozomových aberací (PGT-SR).....	41
8	METODIKY VYŠETŘENÍ UŽÍVANÉ PRO PGT .....	43
8.1	Next generation sequencing (NGS) .....	43
8.1.1	Princip NGS.....	43
8.2	aCGH .....	44
8.2.1	Princip aCGH .....	44
8.3	Karyomapping .....	45
8.3.1	Princip aSNP .....	45
8.4	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) .....	45
8.4.1	Princip FISH.....	46
8.5	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	47
8.5.1	Princip PCR.....	47
	PRAKTICKÁ ČÁST .....	49
9	CÍL A ÚKOLY PRÁCE .....	49
9.1	Hlavní cíl.....	49
9.2	Dílčí cíle.....	49
10	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY .....	50
11	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU .....	51
12	METODIKA PRÁCE .....	52
12.1	Druh a odběr vzorku.....	52
12.2	Příprava a alikvotace odběrového pufru.....	52
12.3	Speciální opatření při manipulaci a zpracování vzorků .....	52
12.4	Celogenomová amplifikace.....	53
12.4.1	Kontroly pro WGA.....	53
12.4.2	Kontrola amplifikace pomocí elektroforézy.....	54

12.5	Sekvenování nové generace .....	54
13	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....	59
13.1	Úspěšně vyšetřená embrya .....	59
13.2	Porovnání podílu embryí s nebalancovanou translokací u nosičů robertsonských vs reciprokých translokací .....	59
13.3	Porovnání podílu nebalancovaných embryí dle pohlaví nosičů translokace.....	60
13.3.1	Nebalancovaná embrya dle pohlaví nosičů reciproké translokace .....	60
13.3.2	Nebalancovaná embrya dle pohlaví nosičů robertsonské translokace.....	61
13.4	Dokumentace chybných meiotických vzorů u embryí nosičů reciprokých translokací.....	62
13.5	Dokumentace chybných meiotických vzorů u embryí nositelů robertsonských translokací.....	65
13.6	Dokumentace výsledků PGT-A .....	67
	DISKUZE .....	69
	ZÁVĚR.....	71
14	SEZNAM LITERATURY .....	72
	SEZNAM PŘÍLOH .....	75
	PŘÍLOHY .....	76
	Příloha A – Segregační vzory u nosiče reciproké translokace .....	76

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Podíl vzorků pocházejících od nositelů reciprokých a robertsonských translokací .....	51
Graf 2 – Úspěšně vyšetřená embrya .....	59
Graf 3 – Podíl embryí s nebalancovanou formou translokace u nosičů reciprokých a robertsonských translokací .....	60
Graf 4 – Podíl nebalancovaných embryí dle pohlaví nosičů recipročné translokace.....	61
Graf 5 – Podíl nebalancovaných embryí dle pohlaví nosičů robertsonské translokace .....	62
Graf 6 – Výsledek PGT-A u embryí s balancovaným nálezem pro familiární translokaci.	67
Graf 7 – Zastoupení mozaikových a nemozaikových nálezů u embryí s de novo aneuploidií .....	68

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1- Stavba chromozomu .....	22
Obrázek 2 - Normální ženský karyotyp.....	23
Obrázek 3 - Normální mužský karyotyp .....	23
Obrázek 4 - Vznik nebalancovaných gamet.....	27
Obrázek 5 - Reciproká translokace.....	27
Obrázek 6 - Nejčastější segregace .....	28
Obrázek 7 - Buněčný cyklus.....	30
Obrázek 8 – Meiotické dělení.....	32
Obrázek 9 - A - Oogeneze, B - Spermatogeneze.....	33
Obrázek 10 - Meiotická nondisjunkce.....	34
Obrázek 11 – Výsledek NGS u balancovaného nálezu, embryo XX .....	63
Obrázek 12 – Výsledek NGS u nebalancované formy familiární translokace vzniklé 2:2 přilehlou segregací 1. typu.....	63
Obrázek 13 – Výsledek NGS u nebalancované formy familiární translokace vzniklé 2:2 přilehlou segregací 1. typu.....	64
Obrázek 14 – Výsledek NGS u nebalancované formy familiární translokace vzniklé 2:2 přilehlou segregací 2. typu.....	64
Obrázek 15 – Výsledek NGS u nebalancované formy familiární translokace vzniklé segregací 3:1 (terciální monozomie) .....	65
Obrázek 16 - Výsledek NGS nebalancované formy familiární translokace, vznik trizomie 13 v důsledku špatné meiózy u rodiče.....	66
Obrázek 17 –Výsledek NGS nebalancované formy familiární translokace, vznik trizomie 14 v důsledku špatné meiózy u rodiče.....	66
Obrázek 18 – Výsledek NGS nebalancované formy familiární translokace, vznik monozomie 14 v důsledku špatné meiózy u rodiče.....	67

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 – Tagmentace DNA v termocyklu.....	55
Tabulka 2 – Amplifikace tagmentované DNA v termocyklu.....	56
Tabulka 3 – Výsledná koncentrace POOLu 2 .....	58



## SEZNAM ZKRATEK

aCGH.....	array komparativní genomová hybridizace (z angl. array Comparative Genom Hybridization)
aSNP.....	array detekující jednonukleotidové polymorfismy (z angl. array Single-Nucleotid Polymorphism)
ATP.....	adenosin trifosfát (z angl. Adenosin TriPhosphate)
BAC.....	bakteriální umělé chromozomy (z angl. Bacterial Artificial Chromosome)
hCG.....	choriový gonadotropin (z angl. human Chorionic Gonadotropin)
DNA.....	deoxyribonukleová kyselina (z angl. DeoxyriboNucleic Acid)
FISH.....	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (z angl. Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridisation)
FSH.....	folikostimulační hormon (z angl. Follicle-Stimulating Hormone)
ICSI.....	intracytoplazmatická injekce spermie (z angl. IntraCytoplasmic Sperm Injection)
IUI.....	intrauterinní inseminace (z angl. IntraUterine Insemination)
IVF.....	<i>in vitro</i> fertilizace (z angl. <i>In Vitro</i> Fertilisation)
LH.....	luteinizační hormon (z angl. Luteinizing Hormon)
NGS.....	sekvenování nové generace (z angl. Next Generation Sequencing)
PBS.....	fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffered Saline)
PCR.....	polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)

PGD/PGT .....	preimplantační genetická diagnostika/preimplantační genetické testování (z angl. Preimplantation Genetic Diagnosis/ Preimplantation Genetic Testing)
PGT-A .....	preimplantační genetické testování aneuploidií (z angl. Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy)
PGT-M.....	preimplantační genetické testování monogenních onemocnění (z angl. Preimplantation Genetic Testing for Monogenic diseases)
PGT-SR .....	preimplantační genetické testování strukturních chromozomových přestaveb (z angl. Preimplantation Genetic Testing for Structure chromosomal Rearrangements)
RNA.....	ribonukleová kyselina (z angl. RiboNucleic Acid)
SNP.....	jednonukleotidové polymorfismy (z angl. Single-Nucleotide Polymorphism)
TE .....	trofoektoderm (z angl. TrophEctoderm)
WGA.....	celogenomová amplifikace (z angl. Whole Genome Amplification)

## ÚVOD

Většina lidí naší populace by si přála být ve svém životě alespoň jednonásobným rodičem. Bohužel toto přání nemusí být vždy a všem splněno. Nejen věk, ale i vrozené genotypové vady, o kterých mnohdy ani nevíme, nám mohou bránit stát se rodičem. Často se setkáváme s případy, kdy žena opakovaně potrací nebo si muž myslí, že je neplodný, protože se partnerce stále nedaří otěhotnět. V tomto případě je vhodné vyhledat lékařskou pomoc a zjistit, v čem spočívá problém, kvůli kterému se žena nemůže dostat do jiného stavu.

S případy neschopnosti otěhotnět jsou úzce spjaty balancované chromozomové translokace, ať už robertsonské nebo reciproké, které nese alespoň jeden z rodičů. Jestliže dojde ke špatnému rozchodu chromozomů zúčastněných v těchto translokacích v meiotickém dělení, v gametách vzniknou nebalancované formy familiární translokace a při oplodnění jsou poté přeneseny do embrya. Nebalancované formy familiárních translokací mohou způsobit samovolný potrat nebo postižení potomka. Při opakovaných potratech je proto vhodné provést vyšetření karyotypů obou rodičů pomocí cytogenetiky. Po případném odhalení balancované translokace u jednoho z partnerů může být provedena metoda *in vitro* fertilizace, neboli oplození ve zkumavce, a genetické vyšetření embryí před jejich zavedením do dělohy matky. Jedním z typů preimplantačního genetického testování (PGT) je právě vyšetření zaměřené na odhalení nebalancovaných forem familiárních translokací u embryí nosičů balancované translokace (PGT-SR). *In vitro* fertilizace je v dnešní době velice úspěšná. Provádí se v reprodukčních centrech.

Každé reprodukční centrum spolupracuje s genetickou laboratoří, jež je schopna odhalit vybrané genetické abnormality u embryí pomocí preimplantačního vyšetření. Tímto vyšetřením dochází ke snížení počtu narozených dětí s postižením a také díky tomu nedochází k tak častým potratům. PGT se začalo vyvíjet přibližně v 80. letech 20. století a od té doby jeho kvalita rapidně roste.

Tato bakalářská práce, nesoucí název „Preimplantační diagnostika nebalancovaných chromozomových aberací metodou NGS“, se zabývá genetickým vyšetřením embryí ve stádiu blastocysty upravenou metodou sekvenování nové generace (NGS). Metoda NGS je speciálně upravená tak, aby dokázala detekovat nebalancované chromozomové aberace,

jež se mohou vyskytnout ve vyšetřovaných embryonálních vzorcích, včetně nebalancovaných forem familiárních translokací. V této práci bych chtěla porovnat podíl nebalancovaných forem familiárních translokací u embryí nositelů balancovaných reciprokových a robertsonských translokací a ověřit vyšší incidenci nebalancovaných forem familiární translokace u embryí rodičů, kteří jsou nositeli balancovaných forem reciprokových translokací. Ráda bych také zjistila, zda pochází více embryí s nebalancovanou formou familiární translokace od muže s balancovanou translokací nebo od ženy s balancovanou translokací a kolik embryí nemohlo být doporučeno k embryotransferu kvůli nebalancovaným aberacím ať už vzniklým *de novo* nebo v důsledku nebalancované formy familiární translokace.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 ZÁKLADNÍ POZNATKY Z CYTOGENETIKY

### 1.1 Eukaryota

Eukaryota jsou buňky, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí od 5 mikrometrů do jednoho centimetru. Mohou být až 1000 krát větší než prokaryota. Tyto buňky se dělí na buňky živočišného a rostlinného typu. V této podkapitole budou probírány pouze buňky živočišného typu. Díky větší velikosti se do eukaryotní buňky vejde složitější systém organel. Stejně jako u prokaryotických buněk se nachází uvnitř jádro, které je však odlišné. Eukaryotické jádro obsahuje chromatin, jenž je ohraničený jadernou membránou. Chromozomy vyskytující se v chromatinu jsou důležitou součástí eukaryot. Dále můžeme v buňce nalézt Golgiho aparát, jenž hraje významnou roli v chemických procesech probíhajících uvnitř eukaryot, lysozomy odštěpující se z Golgiho aparátu a regulující trávicí enzymy nezbytné pro životaschopnost buňky, peroxizomy řídící metabolismus tuků a aminokyselin, mitochondrie vytvářející ATP. Ribozomy, které jsou též uvnitř buňky, jsou nezbytné pro výrobu bílkovin – proteosyntézu a jsou velice úzce spojeny s endoplazmatickým retikulem. Endoplazmatické retikulum dělíme na hladké a hrubé. Mezi další potřebné organely nacházející se v eukaryotických buňkách řadíme mikrofilamenta, intermediální filamenta a mikrotubuly. Tyto části buňky se podílejí na stavbě tzv. cytoskeletu neboli kostry. Všechny výše zmíněné organely se vyskytují stejně jako u prokaryot v cytoplazmě. Celá eukaryota mají na povrchu plazmatickou membránu. (Snustad, 2017)

### 1.2 Chromozom

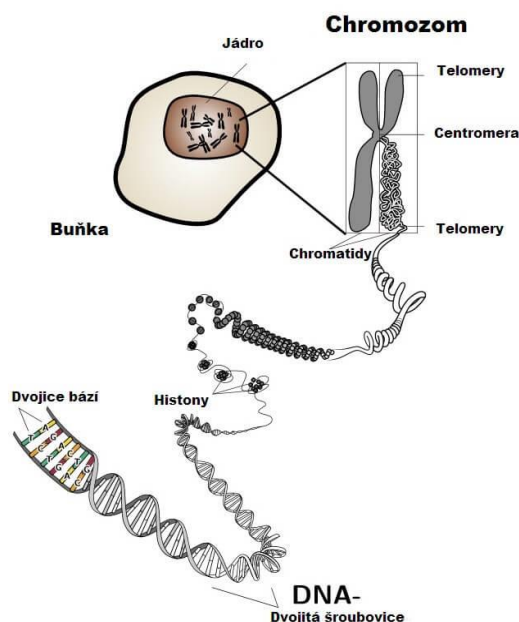
Chromozom byl objeven a pojmenován přibližně v druhé polovině 19. století cytologem W. Waldeyerem. Jak jsme se mohli dozvědět v předchozí kapitole, chromozomy jsou obsaženy v jádrech buněk. Jejich nejdůležitější úlohou, nejen v lidském organismu, je nosičství genetické informace a určování pohlaví jedinců. (Snustad, 2017)

#### 1.2.1 Stavba chromozomu

Nejdůležitější částí chromozomu je DNA, kterou popsal v roce 1953 James Watson a Francis Crick. Základní stavební jednotkou nukleových kyselin je nukleotid, který se skládá ze 3 složek – molekuly cukru, molekuly fosfátu a cyklické organické molekuly

obsahující dusík (tzv. dusíkaté báze). DNA nebo RNA vznikají spojením velkého počtu nukleotidů. Nukleotidy mohou obsahovat báze buď pyrimidinového nebo purinového původu. Mezi purinové báze patří adenin (A) a guanin (G), zatímco mezi pyrimidinové se řadí thymin (T), cytosin (C), v případě RNA uracil (U) střídající thymin. Komplementarita nukleotidů spočívá v párování adeninu s thyminem (uracilem) či guaninu s cytosinem. Vždy musí být spárována báze vycházející z purinu s bází, která má původ pyrimidinový. Výsledný produkt, DNA, má tvar dvoušroubovice. Tato DNA společně s proteiny, konkrétněji histony, tvoří jednu chromatidu (Snustad, 2017). Stavba chromozomu je zobrazena na Obrázku 1.

Na základě umístění centromery rozlišujeme chromozomy metacentrické, jež jsou charakteristické tím, že centromera je umístěna přibližně v polovině chromatid. Submetacentrické chromozomy se vyznačují výrazně kratším p raménkem než je dlouhé raménko. Akrocentrické chromozomy jsou takové, u nichž je krátké raménko tvořené pouze geny pro rRNA. Poslední v řadě jsou chromozomy telocentrické. Těmto chromozomům zcela chybí krátké raménko. (Kočárek, 2007)



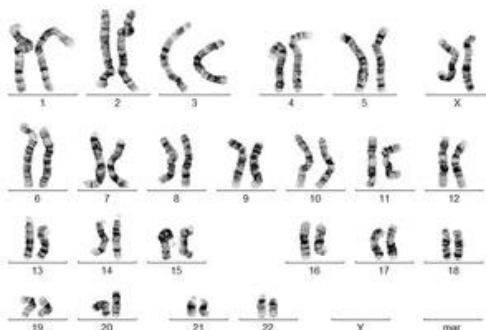
Obrázek 1- Stavba chromozomu

Zdroj: <https://trombofilik.cz/geny/>

## 1.2.2 Karyotyp

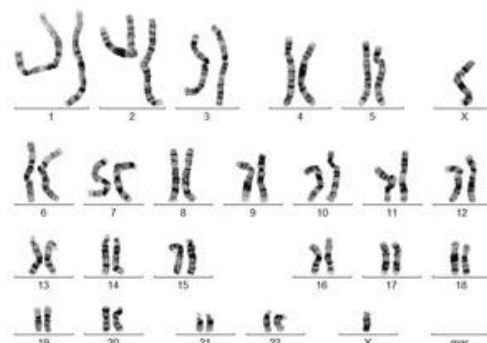
Lidský karyotyp je soubor všech chromozomů v buňce a se skládá z 23 párů chromozomů. Tyto chromozomy dělíme na autozomy (nepohlavní chromozomy) a gonozomy (pohlavní chromozomy). Autozomy se vyskytují v jádře v počtu 22 párů.

Zbýlý jeden pár chromozomů jsou gonozomy, na kterých závisí pohlaví jedince. Pokud je jedinec nositelem dvou totožných gonozomů XX, jde o jedince ženského pohlaví (Obrázek 2). Nese-li jedinec gonozomy XY, jedná se o muže (Obrázek 3). Karyotyp zdravého jedince zapisujeme 46,XX v případě ženy, 46,XY v případě muže. Chceme-li graficky znázornit celý karyotyp, zobrazíme ho pomocí karyogramu. (Kočárek, 2007)



Obrázek 2 - Normální ženský karyotyp

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



Obrázek 3 - Normální mužský karyotyp

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

### 1.3 Numerické chromozomové aberace

Jak už z názvu vyplývá, v případě numerických aberací mluvíme o početních změnách v lidském karyotypu. Představují zmnožení či úbytek chromozomů. Tyto změny rozdělujeme na aneuploidie a polyploidie.

#### 1.3.1 Polyploidie

Na rozdíl od aneuploidií se polyploidie vyznačují zmnožením celého genomu, tj. všech chromozomů v karyotypu, jinak též řečeno chromozomové sady. Nejčastěji se setkáváme s triploidii a tetraploidii. Tyto změny se u žijících jedinců nevyskytují, zatímco u spontánních abortů se objevuje polyploidie až ve 20 %. Stejně jako je tomu v případech aneuploidií, jsou polyploidie důsledkem špatných rozchodů chromozomů v průběhu mitózy či meiózy. (Kočárek, 2007)

#### 1.3.2 Aneuploidie

Pojem aneuploidie pojednává o početních změnách v karyotypu týkajících se zmnožení či úbytku jednoho nebo i více chromozomů. Na rozdíl od polyploidií se nejedná o zmnožení nebo úbytek celé chromozomové sady. S aneuploidiemi se setkáváme ve dvou verzích:

Při **monozomii** chybí jeden chromozom z chromozomového páru. Za nejčastější monozomii je považován Turnerův syndrom, kde dochází ke ztrátě jednoho gonozomu X. I přes ztrátu jednoho chromozomu X je jedinec ženského pohlaví, avšak syndrom je vždy spojen se sterilitou. Ženy jsou malého vzrůstu a mohou být postiženy srdeční vadou a dalšími vývojovými poruchami. Turnerův syndrom zapisujeme 45,X.

Pokud je chromozom zmnožen, a karyotyp obsahuje tři kopie daného chromozomu, mluvíme o **trizomii**. Nejčastější trizomií vyskytující se v lidské populaci je Downův syndrom. Downův syndrom je způsoben trizomií 21. chromozomu, jeho karyotyp je zapisován 47,XX,+21 nebo 47,XY,+21. Tento syndrom není letální, postižení jedinci se mohou dožít dospělého věku. Jsou nositeli typických fenotypových znaků, například tzv. mongoloidního postavení očních štěrbin, opičí rýhy na dlaních, širokého jazyka a jsou nízkého vzrůstu. Tito jedinci mají též často srdeční vady (Snustad, 2017). Mezi známé trizomie se řadí i Edwardsův syndrom (trizomie 18. chromozomu) a Patauův syndrom (trizomie 13. chromozomu). Novorozenci s oběma těmito syndromy mají krátkou dobu přežití, jedná se o týdny, výjimečně měsíce. Další trizomie týkající se nepohlavních chromozomů jsou letální, tedy smrtelné. Vyskytují se také trizomie gonozomů. Mezi známější řadíme Klinefelterův syndrom (47,XXY), který postihuje muže, již jsou nositeli dvou chromozomů X. Setkáváme se také se syndromem supermale (47,XYY) a superfemale (47,XXX). (Kočárek, 2007)

### 1.3.3 Mozaicismus

Dvě a více buněčných linií v lidském těle se označuje jako mozaicismus. Pokud se u jedince vyskytuje mozaicismus, znamená to, že se v organismu onoho jedince vyskytují dva nebo více odlišných karyotypů. Karyotypy v tomto těle jsou jeden fyziologický a ostatní patologické, nesoucí nějakou chromozomovou aberaci. Problémy, které mohou mozaiky způsobit, závisí na zastoupení patologické buněčné linie. Čím více je zastoupena normální linie, tím menší postižení jedince (Kočárek, 2007).

Přítomnost více buněčných linií je důsledkem chybného mitotického dělení, které je typické zejména pro období rýhování embrya. Mozaicismus často přetrvává i v blastocystách, což může ovlivnit výsledek vyšetření embryonálních aneuploidií, které je v současnosti standardně prováděno právě na buňkách odebraných z trofoektodermy blastocysty. Předpokládá se však, že mozaiky jsou v trofoektodermu a vnitřní buněčné mase rovnoměrně rozloženy, proto při odebrání 5-8 buněk trofoektodermy by neměl být výsledek



vyšetření aneuploidií případnou mozaikou významně zkreslen. (Mozaicismus embrya ve stádiu blastocysty a jeho vliv na vyšetření PGS (PGT-A), 2017)

## 1.4 Strukturální chromozomové aberace

Strukturální chromozomové aberace jsou změny struktury chromozomů v karyotypu. Podle toho, zda došlo ke změnám v počtu kopií chromozomových segmentů, rozlišujeme strukturální odchylky balancované a nebalancované.

### 1.4.1 Nebalancované aberace

Nebalancované odchylky jsou charakteristické tím, že v chromozomech chybí nebo naopak přebývá genetický materiál. Tyto odchylky mohou způsobit vážné problémy. Nevyvážené odchylky se rozdělují na:

**Delece**, už z názvu vyplývá, že je určitý genetický materiál deletován. Delece se dělí na terminální a intersticiální. Terminální delece je taková, kde chybí koncová část chromozomu, zatímco intersticiální se vyznačuje absencí segmentu, jež se nachází uprostřed chromozomového ramena.

**Duplikace** je opakem delece. V případě duplikace je materiál zmnožený.

U **ring chromozomu**, neboli chromozomu uspořádaného do kruhu, dochází ke zlomům v telomerických oblastech chromozomu, které se následně spojí. Koncové části obou ramének jsou deletovány.

**Marker chromozom** se při sestavování karyotypu objevuje jako nerozlišitelný chromozom, který nedokážeme přesněji určit. Často jde o materiál, který je duplikovaný.

**Izochromozom** má jedno raménko zcela deletované, přičemž druhé je zmnožené. Duplikované raménko je přichycené zrcadlově k centroměře.

Poslední zde uvedenou nebalancovanou aberací je **dicentrický chromozom**, který je specifický tím, že je nositel dvou centromer. Aby mohlo dojít k buněčnému dělení, měla by však být jedna centromera nefunkční, inaktivovaná, a mělo by se jednat o tzv. pseudodicentrický chromozom. Pseudodicentrický chromozom dokáže svá ramena přimět ke správnému rozchodu ve třetí fázi mitózy. (Nussbaum R. L., 2004)

### 1.4.2 Balancované aberace

Vyvážené aberace jsou takové, u kterých nechybí ani nepřebývá žádný genetický materiál. Může chybět na konkrétních místech, ale vždy se v karyotypu najde, byť na jiném

místě než tam, kde by měl být. Nositelé těchto aberací nemají většinou žádné fenotypové projevy. Mezi balancované přestavby patří:

**Inverze**, které jsou důsledkem otočení segmentů chromozomů o 180°. Dělíme je na paracentrické, kdy otočený úsek nedosahuje do centromery a na pericentrické, kde je obsažena centromera.

Další aberací je **inzerce**, kdy je část jednoho chromozomu odštěpena a poté se nachází na chromozomu jiném. Tento druh aberací se příliš nevyskytuje.

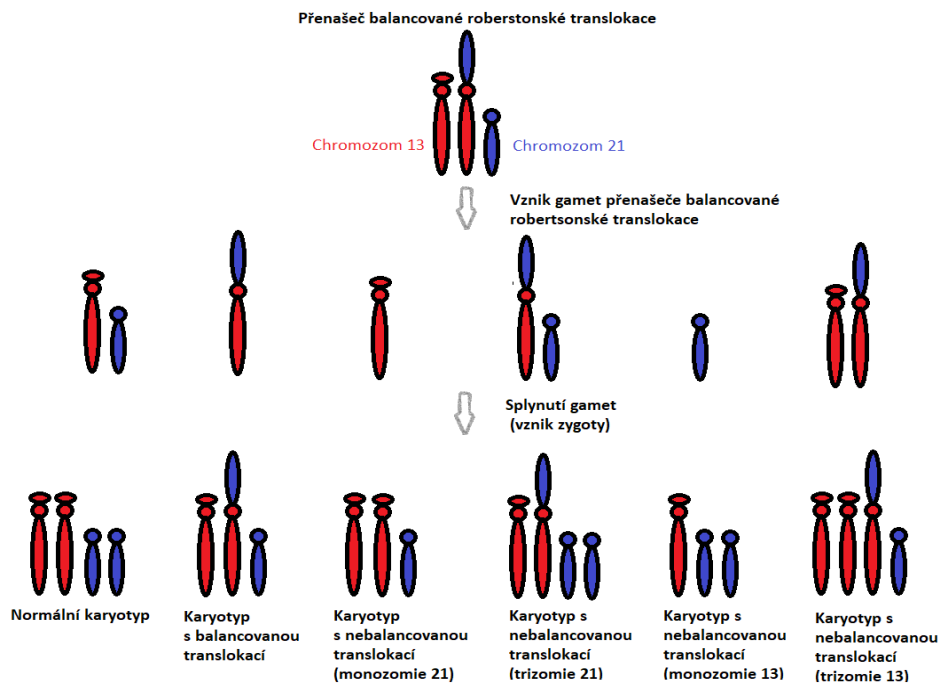
V poslední řadě se mezi balancované aberace řadí **translokace**, o kterých bude samostatná podkapitola. (Nussbaum R. L., 2004)

## 1.5 Translokace

Translokace znamenají přesun části (nebo celého) chromozomu na jiný chromozom. Tento děj se může týkat dvou nebo i více chromozomů. Dělíme je na robertsonské a reciproké. V případě výskytu balancovaných translokací u ženy, muže či obou v páru je vhodné provedení preimplantačního genetického testování strukturálních přestaveb a tím se vyhnout těhotenským ztrátám nebo narození postiženého potomka. (Hrubá, 2021)

### 1.5.1 Robertsonské translokace

Robertsonské translokace jsou způsobeny fúzí dvou akrocentrických chromozomů. Dochází ke zlomu v místě centromery a následnému spojení dlouhých ramének (Kočárek, 2007). Pokud je jedinec nositelem robertsonské translokace předpokládá se, že má o jeden chromozom méně. Přenašeč takovéto strukturální aberace je bezpříznakový, avšak následek balancované translokace může být velice nebezpečný pro jeho potomky. Chybný rozchod při meiotickém dělení, který je znázorněn na Obrázku 4, může způsobit chromozomové numerické abnormality, například trizomii 21. chromozomu, tedy výše zmíněný Downův syndrom. V případě nosičství robertsonské fúze může docházet i k častým spontánním potratům, nebo nemusí dojít ani k samotnému početí (při zástavě spermatogeneze). Při takovýchto problémech je vhodné nechat vyšetřit karyotyp a zjistit, zda jejich příčinou není nosičství translokace (Procházka, a další, 2018)

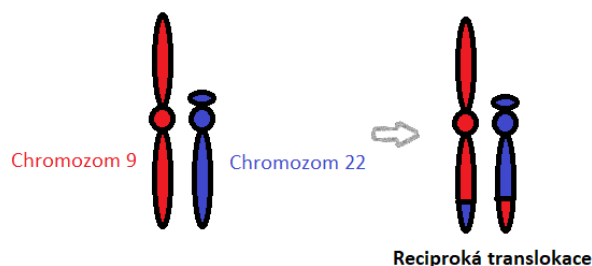


Obrázek 4 - Vznik nebalancovaných gamet

Zdroj: Vlastní

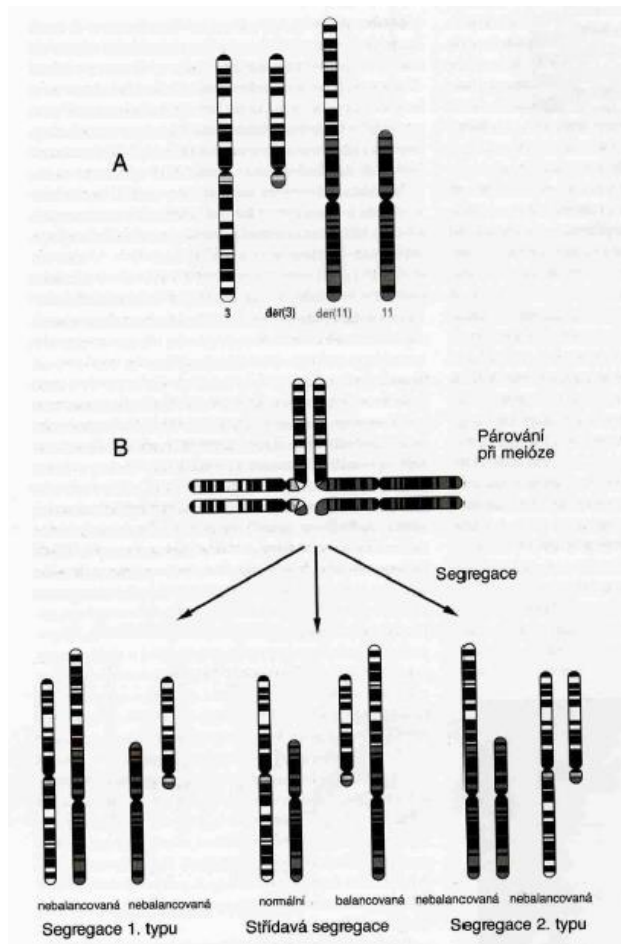
### 1.5.2 Recipročné translokace

Recipročné translokace vznikají důsledkem dvou či více zlomů na nehomologních chromozomech, které se poté mezi sebou vymění (Obrázek 5). Recipročné translokace mohou postihnout všechny chromozomy, jak autozomy, tak i gonozomy. (Procházka, a další, 2018). Na Obrázku 6 jsou zobrazeny nejčastější meiotické segregace, které se mohou při tvorbě gamet vyskytnout. „Bezpečné“ jsou střídavé segregace, které po splynutí gamet vedou buď k normálnímu karyotypu nebo k nosičství balancované translokace. Ostatní segregační vzory vedou k nebalancovaným gametám, ze kterých vznikají embrya s nebalancovanými formami familiární recipročné translokace. Nejčastěji se vyskytujícími chybnými segregačními vzory jsou přilehlé segregace 1. nebo 2. typu. Existuje mnoho dalších (chybných) segregačních vzorů, které jsou uvedeny v příloze A.



Obrázek 5 - Reciproká translokace

Zdroj: Vlastní



Obrázek 6 - Nejčastější segregace

Zdroj: Nussbaum R. L., 2004

## 2 BUNĚČNÝ CYKLUS A MITÓZA

Buněčný cyklus zajišťuje dělení mateřských buněk na buňky dceřiné v lidském těle. Hraje důležitou roli nejen v množení buněk, ale také v zachování genetické informace. Tento děj probíhá v lidském těle opakovaně a je složen ze čtyř fází (Obrázek 7).

### 2.1 Interfáze

V interfázi setrvává buňka většinu buněčného cyklu. Jedná se o neviditelný děj uvnitř buňky, může to tedy vypadat, že se v buňce nic neděje. Opak je pravdou. Mnoho mechanismů se podílí na třech jednotlivých na sebe navazujících fázích, kterými jsou  $G_1$  fáze, S fáze a  $G_2$  fáze, souhrnně se označující jako interfáze. (Kočárek, 2007)

#### 2.1.1 $G_1$ fáze

Po předchozím ukončeném jaderném dělení vzniká dceřiná buňka, která se účastní nového buněčného cyklu. První fáze buněčného cyklu se nazývá  $G_1$  fáze. Písmeno G je odvozeno z anglického slova gap, jež značí mezeru. V této fázi se buňka nachází nejdelší dobu buněčného cyklu.  $G_1$  fáze je určena pro opravování chyb v DNA, které vznikly v předchozím dělení, pomocí reparačních mechanismů. V této fázi se nachází jeden z nejdůležitějších kontrolních uzlů dohlížející na to, aby byla DNA správně opravena a buněčný cyklus probíhal dále bez chyb v genetické informaci. Pokud by došlo k selhání reparačních mechanismů a DNA nebyla řádně opravena, z původní buňky se může stát buňka nádorová (Kočárek, 2007). Může nastat i stav, kdy nelze rozsáhlé škody napravit, a proto dochází k apoptóze buňky, tzn. programované smrti buňky. (Nussbaum R. L., 2004)

#### 2.1.2 S fáze

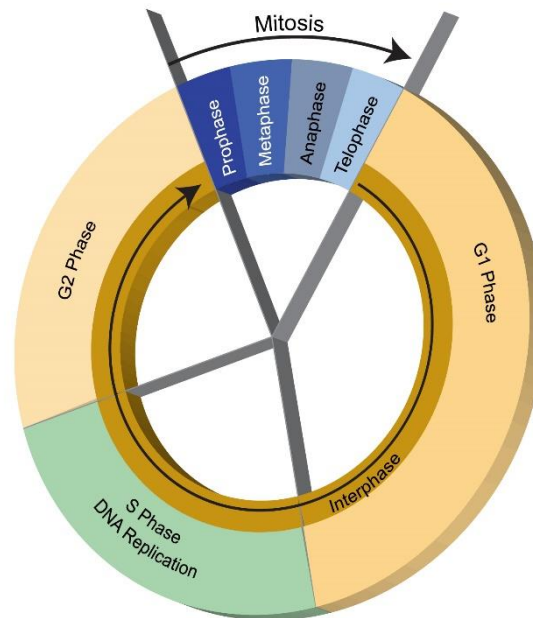
Po  $G_1$  fázi buňka přechází do S fáze, kdy se začíná syntetizovat nové vlákno podle opravené DNA (odtud S fáze). Původní dvoušroubovice DNA je rozpletena pomocí speciálních enzymů a k původním vláknům jsou vytvořena nová vlákna DNA díky komplementaritě nukleotidů (viz kapitola 1.2.1). Vzniká tak nová identická chromatida nesoucí jedno původní vlákno a jedno vlákno nově nasyntetizované. Výsledkem je chromozom obsahující dvě stejné chromatidy spojené centromerou. (Kočárek, 2007)

#### 2.1.3 $G_2$ fáze

Vznikem dvouchromatidového chromozomu interfáze nekončí. Buňka se dostává do  $G_2$  fáze, kde se připravuje na své dělení.  $G_2$  fáze obsahuje též reparační mechanismy a kontrolní uzel, podobně jako  $G_1$  fáze. (Kočárek, 2007)

## 2.2 M fáze

M fáze vychází z řeckého slova mitos značící vlákno, odtud mitóza. Je poslední fází buněčného cyklu a již nespadá do interfáze. Samotné jaderné dělení se dále diferencuje do čtyř fází – profáze, metafáze, anafáze a telofáze. Buňka stráví v mitóze nejkratší dobu. (Passarge, 2019)



Obrázek 7 - Buněčný cyklus

Zdroj: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cell-Cycle>

### 3 MEIOTICKÉ DĚLENÍ

Pojem redukční dělení, meióza, byl poprvé použit v roce 1884 Strasburgem. Meióza je stěžejní při rozmnožování eukaryot. Cílem meiózy je redukce chromozomů v pohlavních buňkách. Vychází z diploidních ( $4c$ ) zárodečných buněk, jejichž počet je snížen na polovinu, tedy na 23 chromozomů. Výsledkem meiózy jsou čtyři haploidní ( $c$ ) buňky. Schéma meiózy je vyobrazeno na Obrázku 8. Meióza je tvořena dvěma meiotickými děleními, ale dochází pouze k jedné replikaci DNA před prvním meiotickým dělením (Passarge, 2019). Meiotické dělení je u mužů a žen rozdílné. Meiotickým dělením v ženském těle je oogeneze, zatímco u mužů je to spermatogeneze (Obrázek 9).

#### 3.1 Meiotické dělení I.

První meiotické dělení je tzv. redukční. Profáze I je složitý proces, ve kterém dochází k výměně chromozomových úseků mezi homologními chromozomy. Po profázi následuje metafáze I, ve které jsou chromozomy seřazeny do ekvatoriální roviny, poté jsou homologní chromozomy přitahovány na opačné konce dělicího vřeténka, aby mohlo dojít k jejich rovnoměrnému rozdělení, což probíhá v anafázi I. Konečnou fází prvního meiotického dělení je telofáze I, kdy zaniká dělicí vřeténko a vznikají nové dceřiné buňky pomocí cytokineze. Dceřiné buňky obsahují zdvojené chromatidy, které jsou od sebe odděleny až v meióze II. (Snustad, 2012)

##### 3.1.1 Profáze I

Profáze I se rozděluje do 5 stádií.

První stádium profáze I je stádium **leptotene**. V leptotene jsou již chromatidy zdvojeny po předchozí replikaci. Nitkovité chromozomy od sebe však nelze rozlišit.

V následujícím stádiu **zygotene** dochází k synapsi, neboli párování homologních chromozomů pomocí synaptonemálního proteinového komplexu. Vznikají tzv. bivalenty.

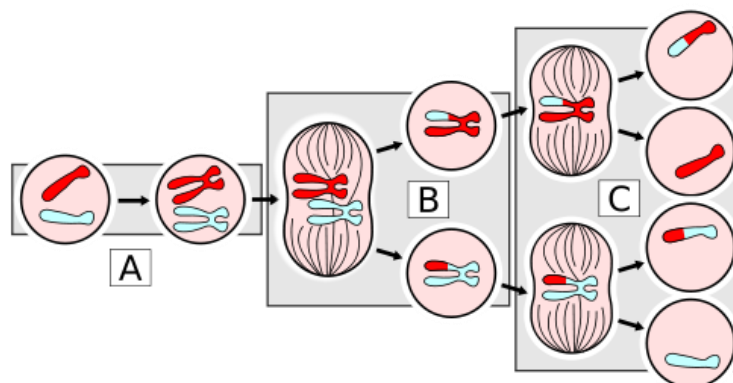
Bivalenty ve stádiu **pachytene** dále kondenzují a začínají být pozorovatelné jako tetrády, které se skládají ze čtyř sesterských chromatid. V tomto stádiu dochází k nejdůležitějšímu ději meiózy I, kterým je crossing-over. Při crossing-overu neboli procesu rekombinace se mění segmenty chromozomů mezi maternálním a paternálním chromozomem, a vzniká tak unikátní chromozom s jedinečnými vlohami.

V **diplotenním** stádiu se proteinový komplex začíná rozpadat a chromozomy jsou spojeny pouze chiasmaty, v místě, kde došlo ke crossing-overu.

V posledním stádiu, **diakineze**, dochází ke kondenzaci chromozomů. (Otová, a další, 2020)

### 3.2 Meiotické dělení II.

Druhé meiotické dělení, ekvační, není zdaleka tak složité a dlouhé. V tomto dělení probíhají obdobné procesy jako v mitóze. Před druhým meiotickým dělení již nedochází k replikaci DNA. V profázi II vznikají nová dělicí vřeténka, která pomáhají rozdělit chromozomy. V metafázi II jsou, stejně jako je tomu v prvním dělení, chromozomy seřazeny do ekvatoriální roviny. Při anafázi II dochází k rozdělení sesterských chromatid k opačným pólům dělicího vřeténka. V telofázi II vznikají nové dceřiné chromatinidy, které jsou haploidní. Vznik nových dceřiných buněk je označován jako cytokineze. (Snustad, 2012)



Obrázek 8 – Meiotické dělení

A – Replikace DNA (4c), B – Meióza I, C – Meióza II (c)

Zdroj: <http://www.genetika-biologie.cz/meioza>

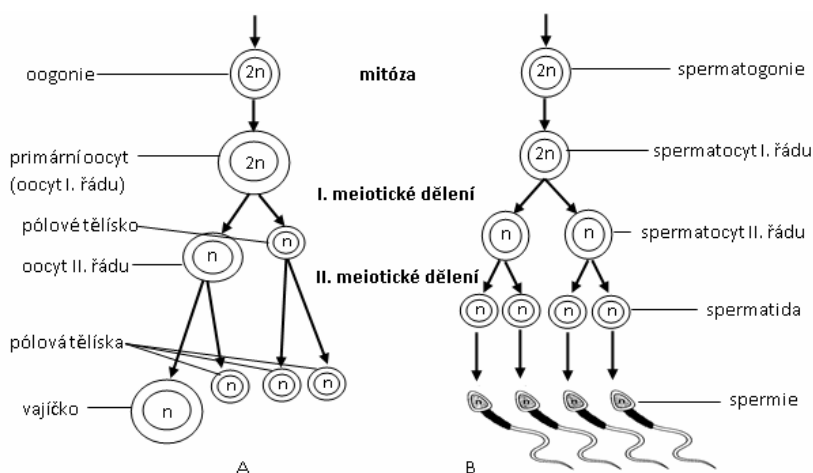
### 3.3 Spermatogeneze

Spermie začínají vznikat u mužského pohlaví v době dosažení pohlavní dospělosti. Primární spermatocyt, složený ze dvou sad dvouchromatidových chromozomů, se účastní meiózy I. V meióze I vznikají sekundární spermatocyty. Sekundární spermatocyty již obsahují pouze jednu sadu dvouchromatidových chromozomů. Ze sekundárních spermatocytů vznikají v meióze II haploidní spermatidy. Spermiogeneze zajišťuje přeměnu spermatid na funkční spermie. (Pritchard, a další, 2021)



### 3.4 Oogeneze

Vznik ženských pohlavních buněk začíná již před narozením. Ze zárodečných buněk vznikají primární oocyty. Primární oocyty ve stádiu diplotene, konkrétněji ve stádiu diktyotene (prodloužené klidové fázi), setrvávají až do doby, kdy dojde k pohlavní dospělosti. Když ženské tělo dosáhne pohlavní dospělosti, začíná proces ovulace. Teprve při ovulaci se oocyt dostává do další fáze meiotického dělení. Primární oocyt se dělí na sekundární oocyt a první pólóvé (polární) tělísko. Sekundární oocyt se dále meioticky dělí až do metafáze II, kde opět dochází k zástavě až do fertilizace. Pokud k oplodnění nedojde, oocyt odchází z ženského těla v době menstruace. Po oplodnění vzniká ovum a druhé pólóvé tělísko (Pritchard, a další, 2021). Vzniklá pólóvá tělíska mohou být bioptována a použita k vyšetření maternálního genomu v preimplantačním testování.

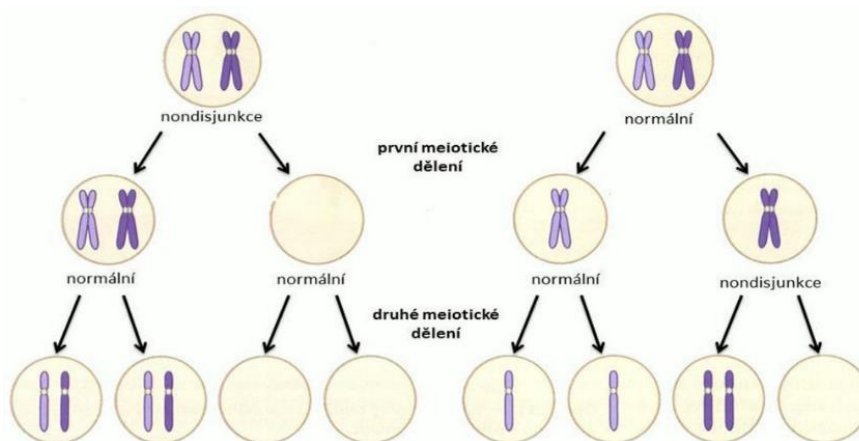


Obrázek 9 - A - Oogeneze, B - Spermatogeneze

Zdroj: [https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-rozmnozovani\\_a\\_vyvoj&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-rozmnozovani_a_vyvoj&lang=cz)

### 3.5 Meiotická nondisjunkce

Meiotická nondisjunkce může nastat jak v prvním meiotickém dělení, tak ve druhém (Obrázek 10). Při špatném rozchodu chromozomů v meióze I nedochází k jejich redukcí v gametách, proto může mít tento rozchod za následek nebalancované aberace v zygotě. V případě, že dojde k nondisjunkci v meióze II, riziko vzniku nebalancovaných gamet je nižší, ale stále zůstává 50% pravděpodobnost, že k oplození dojde špatnou gametou a tím opět vznikne zygota s nebalancovanou aberací. Meiotických nondisjunkcí přibývá s věkem, zejména u meiózy, jež probíhá v těle ženy. Ženské meiotické dělení je započato již v prenatálním období a ukončeno oplozením oocytu. V profázi meiózy I oocyt setrvává od prenatálního období do ovulace vajíčka. Čím déle zde vajíčko setrvává, tím více mohou být narušeny následné meiotické procesy a tím zvýšeno riziko nondisjunkce. (Snustad, 2012)



Obrázek 10 - Meiotická nondisjunkce

Zdroj: <https://kreacionismus.cz/meioticka-rekombinace-projekt-k-navozeni-genomicke-zmeny/>

## 4 RANÝ EMBRYONÁLNÍ VÝVOJ

Vznik embrya je složitý proces, který však není pouze sloučení mužské spermie a ženského vajíčka, ale obsahuje mnoho postupů a procesů, které se odehrávají v ženském těle.

Před samotným procesem oplodnění dochází ke styku vajíčka se spermií, kdy se spermie přichytí na zónu pellucidu. Zóna pellucida je glykoproteinovým obalem ženského oocytu. Spermie jsou nositeli speciálních enzymů, které dokáží umožnit průnik spermií skrz glykoproteinový obal. Po proniknutí do vajíčka dochází k rozpadu hlavičky spermie a následnému přechodu chromozomů do vajíčka (Khan, 2021). Oplodnění, neboli vznik zygoty nastává právě v tento okamžik. Prvním dělením zygoty vznikají dvě totožné blastomery. Poté se blastomery rychle mitoticky dělí po dobu přibližně jednoho dne a násobí tak počet buněk, ze kterých následně vzniká embryo. Buňky postupně vytváří kouli a jsou u sebe drženy pomocí adhezivních molekul. Když mitotické dělení dosáhne počtu 32 buněk, jedná se o morulu. Název morula je odvozen od plodu moruše, která je svým tvarem podobná. Proces probíhající doposud se může označovat též jako rýhování vajíčka. Morula je zhruba stejně velká jako počáteční zygota a to proto, že při rychlém dělení nestíhají jednotlivé buňky nabýt větší velikosti a zóna pellucida neumožňuje růst.

Po 4 dnech se začínají buňky rozdělovat a stávat se funkčně odlišné. Diferencují se do dvou vrstev na trofoektoderm a vnitřní buněčnou masu. Trofoektoderm (TE) neboli trofoblast představuje vnější obal. Vnitřní buněčná masa (embryoblast) je umístěná na jedné straně trofoektodermu, protože je utlačována tekutinou zvanou blastocoel. Vnější trofoektoderm se vyvíjí v placentu. K tomu, aby se mohla masa uvnitř zvětšovat, měnit svůj tvar, jenž byl původně uspořádaný do koule, je nutné, aby došlo k rozkládání zóny pellucidy. Až poté dochází k dalšímu dělení vnější buněčné masy. Můžeme se setkat též s termínem vznik embryoblastu. V tento okamžik již nemluvíme o morule, ale následujícím stádiu, stádiu blastocysty. Blastocysta je termín používající se pouze v případě savců. Buňky vnitřní buněčné masy jsou pluripotentní. (Khan, 2021)

## 5 PORUCHY REPRODUKCE

Poruchy reprodukce mohou být jak problémem na straně muže, tak na straně ženy. Pokud se vyskytne porucha reprodukce u ženy, jedná se zejména o neprůchodnost vejcovodů. Může být způsobena i špatnou funkčností dělohy, poruchou hormonů a imunologickými problémy. Imunologická sterilita nastává ve chvíli, kdy si tělo ženy vytváří protilátky proti spermiím partnera. U mužů se setkáváme s neprůchodností chámovodů, problémy s pohyblivostí spermií, či azoospermií. Azoospermie je stav, kdy se v ejakulátu nenachází spermie (Kočárek, 2007). Na spermatogenezi, vývoj a vznik spermií u muže, může mít vliv i balancovaná translokace (Trávník, 2019). Důležité je si uvědomit, že vliv na úspěšnost oplodnění mohou mít též psychické problémy a genetické vlohy u obou pohlaví. Opakované potrácení může být způsobeno i balancovanými translokacemi u rodičů. Nositelé těchto translokací mají riziko vzniku nebalancovaných forem familiární translokace u embryí, které často vedou ke spontánnímu potratu nebo k postižení dítěte.

Při řešení poruch reprodukce je podstatné rozlišovat pojmy sterilita a infertilita. Termín infertilita označuje stav, kdy dochází k těhotenským ztrátám. Oproti tomu sterilita je stav, kdy není možné oplodnění po dobu delší než dva roky probíhajícího nechráněného styku. (Kočárek, 2007)

Pokud se objeví u páru porucha reprodukce, poté je možné využít metody asistované reprodukce.

## 6 ASISTOVANÁ REPRODUKCE

### 6.1 *In vitro* Fertilizace

*In vitro* fertilizace je synonymem pro mimotělní oplodnění. Kdybychom chtěli doslovně přeložit název metody, získali bychom název oplození ve skle, přičemž sklem je myšlena zkumavka. Děti, které vznikly touto metodou, jsou někdy označovány jako „děti ze zkumavky“.

#### 6.1.1 Princip metody

Tato metoda se skládá ze sedmi kroků, které budou následně rozepsány.

Prvním krokem je **stimulace růstu folikulů**. Stimulace spočívá ve zvýšení hladiny folikostimulačního hormonu (FSH) pomocí léků, jež se začínají podávat první den cyklu. Výsledkem tohoto kroku je zvýšení počtu vajíček a jejich kvality, které budou později potřebné pro mimotělní oplodnění. (Řežábek, 2004)

Je nutné **sledovat účinnost FSH léků**. Lidé jsou odlišní, proto i každá žena potřebuje odlišnou dávku léků, aby se začaly folikuly zvětšovat. Zvětšování folikulů se pozoruje pomocí ultrazvuku, nebo můžeme měřit hladiny hormonů. K procesu dozrávání vajíček dochází v momentě, kdy má folikul průměr nejčastěji 18mm. (Řežábek, 2004)

Choriový gonadotropin (hCG) se používá pro zahájení **dozrávání vajíček**. Hormon hCG má stejný účinek na dozrávání jako LH, proto je nutné, aby se jeho podání uskutečnilo v přesný čas, který stanovil ošetřující lékař, a to z důvodu přesného načasování dozrání vajíček a jejich následnému odběru. (Řežábek, 2004)

**Odběr vajíček z folikulů** je možný po jejich dozrání. Je uskutečněn v případě, že folikul nabyde potřebné velikosti. Odběr se provádí pomocí jehly, nejčastěji v narkóze, a celý proces musí být neustále kontrolován ultrazvukem. Z folikulu se odebírá oocyt společně s tekutinou, která se nachází uvnitř. Po odběru se dostává vajíčko do laboratoře, kde je zkontrolováno. Po kontrole pod mikroskopem dochází k přesunutí vajíčka do průhledné misky s médiem, které je svým složením velice podobné přirozenému prostředí, krvi a tekutinám v těle matky. (Řežábek, 2004)

Po vyndání misky z termostatu následuje krok obnášející **přidání spermií k vajíčku**. Otec dítěte by měl dát k dispozici své spermie v den odběru vajíček. Pokud to situace

neumožňuje, mohou se použít jeho předem odebrané, zmražené spermie. K vajíčku do misky se přidává více než jedna spermie z důvodu větší šance na oplodnění. (Řežábek, 2004)

Následující den je provedena **kontrola oplodnění**, při které by měla být pozorována v zygotě přítomnost dvou prvojader. Při abnormálním počtu prvojader se sice může embryo dále vyvíjet, není však vhodné k transferu do dělohy. (Řežábek, 2004)

**Transfer do dělohy** se uskutečňuje nejdříve po třech (a obvykle po pěti) dnech kultivace. Probíhá pomocí katétru, uvnitř kterého je nasátá tekutina společně s embryem. Katétr je zaveden pochvou do dělohy, kde je embryo vypuštěno. Většinou se přenáší jedno, v některých případech dvě embrya. Ostatní embrya se kryokonzervují. (Řežábek, 2004)

## **6.2 Intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI)**

Tento typ oplození spočívá ve vybrání vhodné spermie a následného vložení do cytoplazmy vajíčka. Vložení se provádí pomocí velice tenké jehly, která slouží též k odběru spermie. Celý proces ICSI musí být prováděn velmi pečlivě a opatrně. Při průniku jehly do cytoplazmy a vložení spermie do oocytu se nesmí poškodit dělicí vřeténko, které je stěžejní pro správný rozchod chromozomů v průběhu meiotického dělení. Pokud dojde k narušení onoho vřeténka, musí se provést preimplantační vyšetření, které vyloučí chromozomové aberace. (Kočárek, 2007)

## 7 PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÉ TESTOVÁNÍ (PGT)

S preimplantačním genetickým testováním se můžeme setkat také v podobě zkratky PGD, která se používala dříve a vycházela z názvu Preimplantation Genetic Diagnosis. Jedná se o vyšetření embryí před transferem do dělohy matky. PGT (PGD) je používáno zejména u párů, kteří jsou nositeli chromozomových odchylek nebo jsou v riziku narození dítěte s monogenním onemocněním. Vyšetření brání přenosu mutovaných alel či aberací na potomky. Tato diagnostika dokáže odhalit zavčas chromozomové aberace či variace v období embrya či ještě dříve, a to ve stádiu vajíčka. (Kočárek, a další, 2006) Preimplantační genetická diagnostika se dá rozdělit do tří skupin, podle toho, co chceme z vyšetřovaného vzorku detekovat, na PGT-A, PGT-M a PGT-SR. (Benjamin S. Harris, 2020)

### 7.1 Historie preimplantačního testování

V roce 1937 John Rock předpověděl, že budou lidská *in vitro* fertilizace, detekce pohlaví a přenosy aberací využívány v reprodukční medicíně. Věda v budoucnosti, dle Rocka, dosáhne takové úrovně, že bude možné vyloučit aberace pomocí PGT. (Franasiak, a další, 2008)

V roce 1967 popsal Robert Edwards a Richard Gardener použití PGT při detekci pohlaví u králíčích blastocyst. Marilyn Monk pokračovala v použití PGT na zvířatech a roku 1987 prokázala Lesch-Nyanův syndrom na myších. Leeanda Wilton se stala průkopnicí biopsie blastomer v roce 1986, o rok později následovaly biopsie pólového tělíska Yurim Verlinskym a biopsie trofoektodermu Audrey Muggleton-Harrisovou. (Franasiak, a další, 2008)

První použití PGT se týkalo testování monogenních X-vázaných onemocnění. V roce 1989 Elana Kontogianni prokázala, že lze PCR vyšetřením vzorku blastomery detekovat chromozom Y. Zaměření na X-vázaná onemocnění, amplifikace a detekce sekvencí specifických pro Y chromozom umožnily určení embryí, která byla ženského pohlaví, a tudíž nebyla ohrožena přenosem onemocnění (Franasiak, a další, 2008). V roce 1991 byla ve spojení s PGT využita metoda FISH. Cystická fibróza se stala prvním autozomálně recesivním monogenním onemocněním stanoveným pomocí PGT. (Brdička, a další, 2015)

## 7.2 Odběrový materiál

K vyšetření pomocí PGT je možné odebrat tři typy biologického materiálu. Je možné provést biopsii pólových (polárních) tělísek, blastomer nebo trofoektodermu.

Nejvhodnějším materiálem k vyšetření je trofoektoderm, ze kterého lze odebrat nejvíce (několik) buněk. Trofoektoderm se odebírá 5.-6. den embryonálního vývoje, ve stádiu blastocysty. Z tohoto druhu odběrového materiálu se dá vyšetřit jak maternální, tak paternální genom. Trofoektoderm je též vhodným materiálem pro vyšetření mozaik. Avšak i přesto, že je možné biopsovat větší množství buněk, mohou být výsledky ovlivněny případným nerovnoměrným rozložením buněčných linií s různou chromozomovou výbavou.

Biopsie blastomery se provádí 3. den, kdy se embryo nachází ve stádiu rýhování. Biopsie spočívá v odběru pouze jedné buňky, ze které není vyšetření příliš přesné. Další nevýhodou je chromozomová nestabilita ve stádiu rýhování, kvůli které může být vyšetření zkresleno. Z těchto důvodů není odběr blastomery příliš využíván. Stejně jako u trofoektodermu lze z blastomery vyšetřit maternální i paternální genom.

Odběr pólových tělísek se provádí v den 0 a 1 po oplození. Při biopsii pólového tělíska lze vyšetřit pouze maternální genom. Pólová tělíska mají ještě méně genetického materiálu než blastomery, proto se biopsie pólových tělísek téměř neprovádí. (Brdička, a další, 2020)

## 7.3 Druhy preimplantačního testování

Preimplantační genetická diagnostika se rozděluje na subspecies podle toho, co chceme ve vyšetřovaném embryu nalézt. Dělí se na PGT-A, PGT-M a PGT-SR.

### 7.3.1 Preimplantační genetické testování aneuploidií (PGT-A)

Tento druh preimplantačního testování se zabývá vyšetřením aneuploidií, které vznikají *de novo*, nejsou tedy následkem chromozomových přestaveb, které nesou rodiče. Aneuploidie jsou zodpovědné přibližně za 50 %-70 % spontánních potratů, tudíž se řadí mezi nejčastější důvody potratů. (Benjamin S. Harris, 2020)

Indikace:

- opakované spontánní potraty
- matka je ve vyšším věku (35 let a více)
- opakovaně neúspěšný IVF cyklus



- po chemoterapiích.

Transfer mozaikových embryí do dělohy matky je možný pouze v případě, že není k dispozici embryo, které by neslo pouze euploidní buněčnou linii. Vznik mozaik je v průběhu vývoje plodu poměrně častým úkazem. Postihne celkem až 60 % embryí, kteří jsou nositeli alespoň jedné aneuploidní buňky v období moruly. Zhruba 2/3 embryí s mozaikou nesou více odlišných aneuploidních linií, zbylá 1/3 je mozaika abnormální a normální buněčné linie. Předpokládá se, že se mozaiky v embryu dokáží samy opravit a že tedy z embrya, pokud je zde mozaika s normální linií, se abnormální buněčné linie v průběhu postimplantačního vývoje vytratí. (Benjamin S. Harris, 2020)

Pro PGT-A se ukázalo jako nejvhodnější způsob vyšetření pomocí NGS, které se zdá být nejcitlivější a s největší specificitou. Dále lze využít i aCGH, aSNP a FISH, které už však nejsou tak specifické a citlivé. (Benjamin S. Harris, 2020)

### **7.3.2 Preimplantační genetické testování monogenních onemocnění (PGT-M)**

Cílem preimplantačního genetického testování monogenních onemocnění je zabránění jeho přenosu na potomka. Mezi monogenní onemocnění se řadí onemocnění, která jsou autozomálně dominantní, autozomálně recesivní a mohou být i X-vázané. Po vyšetření se transferují do dělohy pouze ta embrya, která nenesou dané monogenní onemocnění. (Benjamin S. Harris, 2020)

Vyšetřovací metodou první volby pro PGT-M je v současnosti aSNP, resp. metoda Karyomapping. Nově může být vyšetření provedeno i NGS. Dříve bylo běžně prováděno PCR, event.. FISH (zde pouze selekce pohlaví u X-vázaných onemocnění).

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

### **7.3.3 Preimplantační genetické testování strukturních chromozomových aberací (PGT-SR)**

Jde o vyšetření embryí u páru, kde nese alespoň jeden z rodičů balancovanou chromozomovou aberaci. V důsledku těchto přestaveb mohou v gametách vznikat chybným meiotickým rozchodem chromozomů nebalancované aberace. Pro detekci těchto nebalancovaných forem se nyní nejvíce užívá NGS, další metodou volby jsou aCGH a aSNP. Pro menší přestavby je někdy nutno použít FISH. Transferována jsou embrya, jež nejsou nositeli nebalancovaných aberací (Benjamin S. Harris, 2020).

S PGT-SR je v současnosti provedeno i PGT-A, abychom vyloučili i možné *de novo* vzniklé aneuploidie.

## 8 METODIKY VYŠETŘENÍ UŽÍVANÉ PRO PGT

### 8.1 Next generation sequencing (NGS)

Předchůdcem NGS je Sangerovo sekvenování, které bylo navrženo v roce 1977 Frederickem Sangerem. Věda se rozvíjela velice rychle, a proto došlo ke vzniku sekvenování další generace, resp. masivně paralelního sekvenování neboli sekvenování nové generace (NGS). (Zhong, a další, 2021)

Sekvenování nové generace patří v této době mezi nejvíce využívané molekulární metody v preimplantační diagnostice. Abychom mohli provádět vyšetření nebalancovaných chromozomových aberací jako je například vyšetření aneuploidií a strukturálních přestaveb, musí být NGS speciálně upraveno. Tato metoda je schopna analyzovat všech 23 párů chromozomů v buňce najednou. NGS dokáže sekvenovat až 96 vzorků v průběhu jednoho vyšetření. Díky této možnosti se výrazně snižují výdaje, které jsou potřebné k provedení vyšetření. Vyšetření celého genomu je pouze jednodenní záležitostí. (Brdička, a další, 2016)

#### 8.1.1 Princip NGS

Vyšetření pomocí NGS je složeno ze čtyř kroků, které obsahují přípravu knihovny, amplifikaci na flow-cell, sekvenování a analýzu.

**Příprava** tzv. **knihovny** je zahajovacím krokem celé metody. Tento krok je zahájen fragmentací DNA, poté je nutné, aby došlo k ligaci adaptérů ve směru 5'-3'. Může být provedena i tzv. indexace, která slouží k odlišení vzorků pocházejících od různých pacientů.

Metoda pokračuje **amplifikací na flow-cell**. Tento krok již probíhá v sekvenátoru. Fragmenty připravené z předchozího kroku jsou přichyceny na povrch flow-cell. Poté se všechny fragmenty vyšetřované DNA na flow-cell naamplifikují pomocí můstkové (z angl. bridge) PCR.

Po amplifikaci přichází na řadu **sekvenování**. Ke každému fragmentu je syntetizováno komplementární vlákno, které je zakončeno chemicky upraveným nukleotidem. Každý nukleotid vyzařuje fluorescenční barvu, která je snímána a tím je určeno pořadí bazí v sekvenci („sekvenace syntézou“).

Konečným krokem celé metody je **analýza**. Jednotlivé fluorescenční barvy mají svou vlnovou délku, jež je rozlišena systémem a následně vyhodnocena. Svou sekvenací odpovídá původnímu vláknu vyšetřované DNA. Analyzovaná DNA se nakonec porovnává s lidským

genomem a tím je detekován přebytečný nebo chybějící genetický materiál. Balancované chromozomové aberace nelze detekovat. (Illumina, 2017; Brdička, a další, 2015)

## 8.2 aCGH

Komparativní genomová hybridizace na čipu, neboli arrayCGH slouží k vyšetření nebalancovaných změn celého genomu. Pomocí arrayCGH dokážeme najít pouze nebalancované chromozomové aberace, stejně tak jako je tomu při vyšetření pomocí NGS. (Procházka, a další, 2018)

### 8.2.1 Princip aCGH

K vyšetření pomocí komparativní genomové hybridizace na čipu je potřeba dvou vzorků, vyšetřované DNA a referenční DNA, jež jsou společně hybridizovány na array, kde jsou uchyceny úseky genomové DNA („sondy“). První, vyšetřovaný, vzorek je označen pomocí jednoho fluorochromu, druhý, referenční, vzorek je označen odlišným fluorochromem (Kočárek, a další, 2006). Při metodě arrayCGH se nejčastěji používají fluorochromy červené a zelené barvy. V případě druhého vzorku, referenční DNA, jde o vzorek, který je kontrolní (je s normálním nálezem). Oba barevně označené vzorky jsou smíchány. Poměr směsi namíchaných DNA musí být stejný, aby mohl být výsledek správně odečten. Celá směs se hybridizuje na čip. Hybridizace na čip probíhá pomocí komplementarity k sondám, které se nacházejí na desce čipu (Procházka, a další, 2018). „Intenzita fluorescence je detekována laserovým skenerem. Data jsou následně analyzována pomocí speciálního softwaru.“ Dle poměru intenzity jednotlivých fluorochromů je detekován zisk či ztráta genetického materiálu. (Brdička, a další, 2016)

Rozlišujeme dva druhy čipů dle použitých DNA sond: BAC čipy a oligonukleotidové čipy.

#### BAC čipy

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

## **Oligonukleotidové čipy**

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

### **8.3 Karyomapping**

Karyomapping je nepřímá molekulárně-genetická metoda, stěžejní pro preimplantační vyšetření monogenních chorob (PGT-M). Karyomapping je metodou, založenou na technologii aSNP čipů (RepromedaLab, 2020). Array SNP je speciální typ čipového vyšetření, kterým je možno určit genotyp v místech jednonukleotidových polymorfismů (tzv. SNP). aSNP čipy obsahují až stovky tisíc unikátních SNP pozic rozmístěných po celém genomu.

#### **8.3.1 Princip aSNP**

K vyšetření pomocí karyomappingu je nutná analýza jednonukleotidových polymorfismů (SNP). Když jsou polymorfismy analyzovány, vzniká karyomapa, která zobrazuje veškeré informace o chromozomech, včetně crossing-overů přítomných ve vyšetřovaném embryu.

První krok spočívá v **analýze informativních SNP**, které pomohou určit haplotypy rodičů.

Detekované informativní SNP jsou **porovnány s genotypem** referenčního vzorku a dokáží identifikovat, který z chromozomů rodičů nese kauzální genovou variaci.

Následně jsou **porovnány jednotlivé haplotypy** s haplotypy možných potomků. (RepromedaLab, 2020)

### **8.4 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)**

Jedná se o molekulárně-cytogenetickou metodu. Metoda FISH pomocí fluorescenčních sond rozeznává cíleně počet kopií předem vytipovaných lokusů v karyotypu. Pokud se nachází v karyotypu změny mimo tyto analyzované oblasti, nebudou detekovány. (Hrubá, 2021)

V preimplantační diagnostice dříve FISH hrála velkou roli při vyšetřování sporadických aneuploidií i nebalancovaných translokací. Metoda dokáže detekovat nebalancované přestavby způsobené chybnou meiotickou segregací u reciprokých i robertsonských translokací, přičemž vždy musí být známa rodičovská translokace a předem sestavena a vyzkoušena speciální sada sond zaměřených na danou translokaci (Laboratoř lékařské genetiky Karlovy Vary, 2011). U PGT-A bylo vyšetření prováděno obvykle pro chromozomy 13, 18, 21, X a Y, někdy rovněž i pro chromozomy 15 a 16. V úplných počátcích PGT byla FISH využívána pro selekci pohlaví u X-vázaných monogenních onemocnění. (Scriven, a další, 2011)

Nyní je FISH používána pouze pro detekci nebalancovaných forem strukturních familiárních přestaveb, které jsou malého rozsahu a nejdou vyšetřit pomocí NGS (Genetika Plzeň, 2018).

#### 8.4.1 Princip FISH

Základním krokem pro FISH je **příprava vzorku**. Pro PGT je vzorek připraven z nedělicích se buněk embrya, které jsou fixovány na podložní sklo a dehydratovány pomocí vzestupné alkoholové řady.

**Sondy se přidávají** k dehydratovanému vzorku. Také se můžeme setkat s postupem, kdy se sonda přidává až po denaturaci vzorku.

**Denaturace vzorku a sondy** se děje na ohřívací destičce při teplotě 70-80°C. Stěžejním roztokem je formamid, který pomáhá snížit teplotu potřebnou k denaturaci. Kdyby nebyl formamid přítomný, museli bychom dosáhnout teploty na destičce 90-95°C. Čas denaturace je různý, liší se s druhem fluorescenční sondy, avšak by neměl překročit časový limit 5 minut. Kdyby byla cílová DNA vystavena vyšší teplotě delší dobu, mohlo by dojít k rozpadu jejích struktur. Někdy se denaturace sondy a vzorku provádí zvlášť.

Následuje **hybridizace**, kdy dochází k navázání sondy a vyšetřované DNA. Tento krok může trvat od 30 minut až po celý jeden den, záleží na typu sondy. Celý proces hybridizace probíhá v termostatu při 37°C.

Při hybridizaci se může stát, že se sonda naváže na úsek DNA, kde není zcela komplementární. Takovéto **nespecifické signály** musíme opatrně **odstranit**. Odstranění nespecifických signálů probíhá pomocí horkého pufovaného solného roztoku.

Předposledním krokem je **podbarvení interfázních jader** pomocí propidiumjodidu či 4',6-diamidin-2-fenyindolu.

Následuje **vyhodnocení preparátu** pod fluorescenčním mikroskopem. (Kočárek, a další, 2006)

## 8.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je objev Karyho Mullise v roce 1983. Metoda PCR slouží k amplifikaci, namnožení, vybraného úseku DNA *in vitro*. K tomu, abychom mohli daný úsek naamplifikovat, je potřeba znát sekvence nukleotidů, které chceme vyšetřovat a sekvence, jež tomuto úseku předcházejí. Existuje databáze sekvencí GenBank, ve které jsou nukleotidové sekvence zaznamenávány. (Snustad, 2012)

Využití PCR je možné i v preimplantační diagnostice při vyšetřování monogenních onemocnění, tedy při PGT-M (Benjamin S. Harris, 2020). Analýza je vždy založena na nepřímé diagnostice, tedy při využití detekce několika polymorfismů ve vazbě s kauzální mutací. PCR se takto využívala pouze na počátku vzniku preimplantační diagnostiky, nyní se PCR využívá v metodě NGS, kde se uplatňuje při přípravě knihovny a jako můstková PCR.

### 8.5.1 Princip PCR

Metoda PCR je založena na třech krocích, které se stále opakují, dokud nevznikne požadované množství namnoženého úseku.

Proces je zahájen **denaturací DNA**. Denurací dochází k rozpletení dvoušroubovice DNA při teplotě 92-95°C. Tento krok probíhá přibližně po dobu 15 vteřin.

Po denuraci následuje **annealing primerů**. Primery jsou zvoleny tak, aby byly komplementární k sekvenci DNA, kterou chceme vyšetřovat. Jsou párovány s denaturovanou DNA a poskytují volnou 3'-OH skupinu. Tato skupina je potřebná pro navázání následujících nukleotidů. Nukleotidy se navazují ve směru 5'-3'. Zahájení replikace nastává při teplotě 50-60°C. Primery se navazují asi 30-60 vteřin.

**Elongace** přichází po připojení primerů. V tomto kroku je nutné použití DNA-polymerázy, která je potřebná k replikaci požadovaného úseku DNA. Nové DNA vlákno se prodlužuje při 70-72°C po dobu 1-3minut.

Po provedeném prvním cyklu se proces stále opakuje. Opět dochází k denuraci, tentokrát již replikovaného DNA vlákna, annealingu a elongaci. Množení pomocí PCR exponenciálně narůstá. (Snustad, 2012)



# PRAKTICKÁ ČÁST

## 9 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

### 9.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem je ověřit vyšší incidenci nebalancovaných forem familiárních translokací u embryí rodičů s nerobertsonskou (reciprokou) translokací ve srovnání s translokacemi robertsonskými. Pro ověření budou využita data z vyšetření metodou NGS v rámci PTG-SR.

### 9.2 Dílčí cíle

1. Určení podílu úspěšně vyšetřených embryí.
2. Porovnání podílu embryí s nebalancovanými formami translokace dle pohlaví rodiče nesoucího translokaci.
3. Dokumentace rozdílných chybných meiotických segregáčních vzorů u embryí nosičů reciprokových translokací.
4. Dokumentace rozdílných chybných meiotických segregáčních vzorů u embryí nosičů robertsonských translokací.
5. Určení podílu embryí se sporadickými změnami (PGT-A), z toho podíl mozaikových nálezů.

## **10 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY**

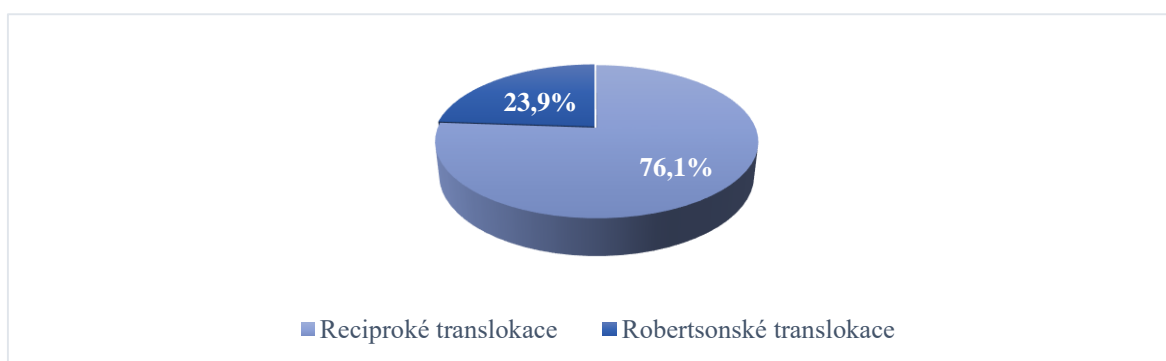
1. Vyskytuje se více embryí s nebalancovanou formou familiární translokace u rodičů s reciprokou nebo s robertsonskou translokací?
2. Jaký byl podíl úspěšně vyšetřených embryí?
3. Je nižší podíl nebalancovaných forem translokace u embryí v případě, že nositel translokace je muž?
4. Kolik embryí nebylo možné transferovat kvůli sporadickým změnám a mozaikám?

## 11 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

K ověření hlavního cíle této bakalářské práce byla využita výsledková data z vyšetření 410 vzorků embryí od budoucích matek ve věku 27-47 let. K analýze byly použity bioptáty 5-8 buněk trofoektodermu, které byly odebrány 5.-6. den embryonálního vývoje.

Vzorky embryí byly vyšetřeny v letech 2018-2021. Pocházejí i z několika IVF center, včetně zahraničních, které spolupracují s Laboratoří reprodukční genetiky Genetika PLZEŇ s.r.o. (dříve Genetická laboratoř IVF Zentren Prof. Zech – Pilsen).

Z celkového počtu 410 embryí pocházelo 312 (76,1 %) vzorků od rodičů, kteří jsou nositeli reciprokých translokací, zbylých 98 (23,9 %) embryí pocházelo od nositelů robertsonských translokací (Graf 1).



*Graf 1 – Podíl vzorků pocházejících od nositelů reciprokých a robertsonských translokací*

*Zdroj: Vlastní*

## 12 METODIKA PRÁCE

Metodika vychází z laboratorních příruček, standardních operačních postupů vyšetřovacích a pracovních postupů, které jsou užívány v Genetika PLZEŇ s.r.o. a navazují na postup doporučený Illuminou. (Illumina, 2021)

### 12.1 Druh a odběr vzorku

Před samotným odběrem materiálu k vyšetření nemusí být pacientka nijak zvláště připravena. Biopsie polárních tělísek nebo embryí se provádí v reprodukčních centrech. V preimplantačním genetickém testování mohou být použity čtyři druhy biologického materiálu. Biologický materiál pochází z časných vývojových stádií embrya. Může být prováděna biopsie:

- 1. polárního tělíska, které je potřeba bioptovat 0. den vývoje embrya
- 2. polárního tělíska, které je potřeba bioptovat 1. den vývoje embrya
- Blastomery či více blastomer, které je potřeba bioptovat 3. den vývoje embrya
- Trofoektodermu, který je potřeba bioptovat 5.-6. den vývoje embrya, odebírá se přibližně 5-8 buněk.

### 12.2 Příprava a alikvotace odběrového pufru

Po odběru musíme mít připravený pufr, do kterého vložíme odebraný bioptát potřebný k preimplantačnímu vyšetření. Odběrový pufr se připravuje z fosfátového pufru PBS před samotnou biopsií materiálu a je uchováván v lednici při teplotě 2-8°C. Zkumavky musí být popsány datem, kdy byl pufr připraven, jménem pracovníka, kým byl připraven, názvem a šarží roztoku a nesmíme zapomenout udat množství pufru. Nejčastěji se připravuje pufr do mikrozkušavek o objemu 0,2 ml. Poslední alikvot je doporučen pro provedení kontrolní WGA.

### 12.3 Speciální opatření při manipulaci a zpracování vzorků

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

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

## 12.4 Celogenomová amplifikace

Celogenomová amplifikace neboli whole genome amplification (WGA) slouží k namnožení DNA celého genomu. Počáteční množství materiálu je velice malé, 2,5 µl, proto může snadno dojít ke kontaminaci či selhání celé amplifikace. Je vhodné provést kontrolu pomocí elektroforézy, abychom ověřili, že amplifikace proběhla správně. Nenaamplifikované vzorky jsou likvidovány a naamplifikované vzorky jsou uchovány v mrazáku při teplotě < -15°C a dále použity pro vyšetření pomocí NGS.

Při provádění WGA jsou pracovníci povinni dodržovat pravidla, která jsou stanovena pro uskutečnění vyšetření. Amplifikace se provádí v laminárním boxu a po ukončení WGA je nutné box vysvítit UV lampou po dobu minimálně 30 minut a tím ho dekontaminovat. Též je potřeba vždy před i po vyšetření zabránit znečištění přístrojů a vybavení tím, že provedeme dekontaminaci.

### 12.4.1 Kontroly pro WGA

Kontroly pro celogenomovou amplifikaci jsou nedílnou součástí. Povinnou součástí WGA jsou tři kontroly:

- P1 – kontrola správnosti provedení amplifikace; pozitivní kontrola
- C – kontrola čistoty poslední promývací kapky náhodně vybraného vzorku; negativní kontrola z kapky promývacího/kultivačního média

- N – kontrola čistoty reagensů a pufrů použitých při WGA; negativní kontrola

#### 12.4.2 Kontrola amplifikace pomocí elektroforézy

Ověření správné celogenomové amplifikace se provádí pomocí gelové elektroforézy za použití agarózového gelu. Předem připravený roztok pufru, jež se lije do elektroforetické vany, by měl mít pokojovou teplotu. Do gelové formy pipetujeme 7  $\mu$ l předem stočených, obarvených a zkontrolovaných naamplifikovaných vzorků společně s kontrolami. Opět je nutné dbát na čistotu používaných špiček, na každý vzorek použijeme novou čistou špičku. Po ukončení separačního programu vyhodnocujeme pomocí UV transluminátoru a PC. Výsledky zaznamenáváme do protokolu a zároveň pořizujeme fotografii elektroforetických výsledků.

#### 12.5 Sekvenování nové generace

Po celogenomové amplifikaci přichází na řadu sekvenování nové generace. V průběhu celé NGS extrémně dbáme na čistotu a u důležitých kroků jako je ředění vzorků a kvantifikace, tagmentace DNA, indexace a amplifikace tagmentované DNA provádíme kontrolu druhou osobou, aby nedošlo k záměně vzorků. Vzorky nenecháváme nikdy otevřené. Otevíráme je pouze na nezbytně dlouhou dobu, pokud přidáváme reagentie nebo s nimi jinak manipulujeme.

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

Druhý den ráno připravíme přístroj MiSeq k sekvenování tím, že ho promyjeme Tweenem 20. Přichází na řadu další ředění vzorku na koncentraci 0,2 ng/ $\mu$ l. Množství

Nuclease-free water, které máme napipetovat do nové popsané 0,2 mikrozkušavky, vypočítáme z koncentrací změřených v předchozím dnu. K napipetované Nuclease-free water přidáme určené množství zvortexovaného a stočeného vzorku, nejčastěji 4  $\mu$ l. Zředěné vzorky dáme vortexovat a stočíme. Před zahájením tagmentace spustíme termocykler, aby se zahřál. Do nových popsaných mikrozkušavek napipetujeme 10  $\mu$ l Tagment DNA Bufferu, uzavřeme a stočíme. Mikrozkušavky dáme do kryostojánku a napipetujeme 5  $\mu$ l Amplicon Tagment Mixu, krátce vortexujeme a stočíme. K 15  $\mu$ l napipetovaných reagensů přidáme 5  $\mu$ l naředěného vzorku. Mikrozkušavky uzavřeme, dáme vortexovat a poté stočíme. Stočené vzorky přendáme do termocykleru a provedeme tagmentaci, která spočívá ve fragmentaci DNA. Průběh tagmentace DNA v termocykleru je uveden v Tabulce 1.

TEPLOTA	ČAS
55°C	5 minut
10°C	hold

*Tabulka 1 – Tagmentace DNA v termocykleru*

Po vyndání z termocykleru mikrozkušavky krátce stočíme a přidáme do každé 5  $\mu$ l Neutralize Tagment Bufferu, abychom přerušili tagmentaci. Zvortexujeme, stočíme a necháme inkubovat po dobu 10-15 minut při pokojové teplotě. Před samotnou amplifikací tagmentované DNA je důležité nezapomenout označit jednotlivé vzorky pomocí indexů. Indexace vzorků slouží k rozpoznání vzorků v případě, že bude najednou sekvenováno více různých pacientů (embryí). Díky tomu můžeme provést vyšetření mnoha pacientů (embryí) v jednom runu. Do mikrozkušavek se vzorky přidáme unikátní kombinace indexů, které máme předpřipravené v protokolu. Každý index se přidává do vzorku po 5  $\mu$ l. Při pipetování indexů je potřeba zvýšené soustředěnosti. Po indexaci krátce stočíme, mikrozkušavky přendáme na kryostojánek a přidáme 13  $\mu$ l Nextera PCR Master Mixu. Zvortexujeme a stočíme. Nyní přichází na řadu amplifikace tagmentované DNA v termocykleru, jejíž průběh je zobrazen v Tabulce 2.

POČET CYKLŮ	TEPLOTA	ČAS
/	72°C	3 minuty
/	95°C	30 sekund
12x	95°C	10 sekund
	55°C	30 sekund
	72°C	30 sekund
/	72°C	5 minut
/	4°C	hold

Tabulka 2 – Amplifikace tagmentované DNA v termocyklieru

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



označíme, aby nedošlo k jejich opakovanému použití. Mikrokumavky stočíme a provedeme měření koncentrace. Ke změření koncentrace je zapotřebí smíchat v další mikrokumavce 97  $\mu\text{l}$  TE pufru a 3  $\mu\text{l}$  vzorku. Promícháme pipetou, zvortexujeme a stočíme. Dále přidáme 100  $\mu\text{l}$  Dye zvortexujeme, stočíme a necháme inkubovat 5 minut ve tmě při pokojové teplotě. Takto připravíme kontrolní mikrokumavky pro všechny vyšetřované vzorky. Měříme na fluorimetru při přednastaveném objemu 3  $\mu\text{l}$ . Koncentrace jednotlivých vzorků nesmí být  $< 1,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ . Můžeme pokračovat ve vyšetřování nebo jamky uzavřeme a uložíme deep well destičku stejným způsobem jako v předchozím kroku. Zbývá pouze manuálně normalizovat knihovny, poolovat a sekvenovat. Do protokolu zaznamenáme naměřené koncentrace jednotlivých vzorků a zjistíme průměrnou koncentraci vzorků. Normalizace spočívá ve stočení a smíchání vzorků, čímž vznikne POOL 0, který je potřeba zvortexovat, stočit a dále ověřit jeho koncentraci. Do nové popsané mikrokumavky napipetujeme 10  $\mu\text{l}$  POOLu 0, 90  $\mu\text{l}$  TE pufru a 100  $\mu\text{l}$  Dye. Zvortexujeme, stočíme a měříme na fluorimetru. Koncentrace POOLu 0 by měla být podobná jako průměrná hodnota koncentrací, která nám vyšla v protokolu. Výslednou koncentraci zapíšeme do protokolu. Nyní musíme POOL 0 zředit na koncentraci 1  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Objem Nuclease-free water, kterou ředíme, vypočítáme křížovým pravidlem. Po zředění zvortexujeme a stočíme. Připravíme si roztok 0,2N NaOH namícháním 245  $\mu\text{l}$  Nuclease-free water a 5  $\mu\text{l}$  10 N NaOH. Hydroxid sodný slouží k denuraci PCR produktů. Roztok zvortexujeme, stočíme a napipetujeme 5  $\mu\text{l}$  do nových popsaných mikrokumavek. Do mikrokumavek s roztokem NaOH připipetujeme ještě 5  $\mu\text{l}$  naředěného POOLu 0. Zvortexujeme, stočíme a inkubujeme při pokojové teplotě 5 minut. Připravíme si kryostojánek, do kterého umístíme 2 čisté zkumavky určené pro POOL 1 a POOL 2. Do zkumavky POOL 1 přijde 990  $\mu\text{l}$  z lednice vyndaného Hybridization Bufferu a 10  $\mu\text{l}$  POOLu 0. Nyní nesmíme denaturovaný mix vortexovat, proto ho pouze několikrát jemně otočíme a poté stočíme. POOL 1 ponecháme na ledu, dokud ho nepoužijeme. Do zkumavky POOL 2 napipetujeme množství Hybridization Bufferu a POOLu 1 dle požadované koncentrace POOLu 2 viz Tabulka 3. Koncentraci POOLu 2 určuje vedoucí reprodukční genetiky.

POŽADOVANÁ KONCENTRACE POOLU 2	OBJEM HYBRIDIZATION BUFFERU	OBJEM POOLU 1
15 pM	150 µl	450 µl
14 pM	180 µl	420 µl
13 pM	210 µl	390 µl
12 pM	240 µl	360 µl
11pM	270 µl	330 µl
10 pM	300 µl	300 µl
9 pM	330 µl	270 µl

*Tabulka 3 – Výsledná koncentrace POOLu 2*

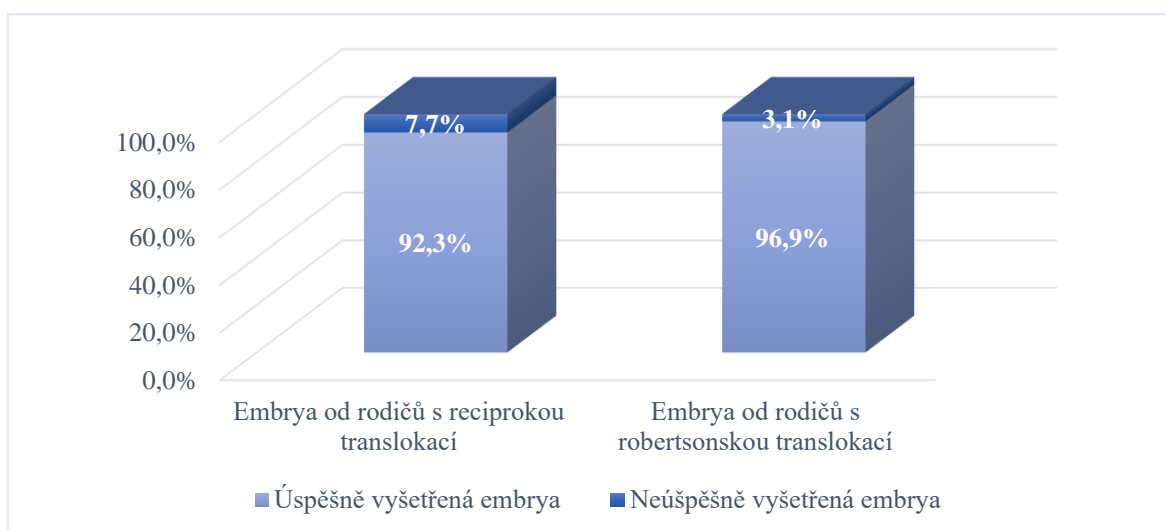
Zbývá pouze připravit cartridge a FlowCell. Do cartridge, konkrétněji do jamky „Load sample“, napipetujeme špičkou s filtrem 600 µl POOLu 2. Nesmíme se přitom dotknout ničeho jiného a vzorek napipetovat doprostřed jamky. FlowCell vyndáme z lednice a z roztoku, ve kterém je uchována, řádně očistíme a osušíme speciálními ubrousky. Na FlowCell před vložením do MiSequ nesmí být žádná nečistota. Přístroj MiSeq musí být před zahájením sekvenace řádně očištěn a zbaven nečistot, dále musí být před sekvenací vložen do MiSequ nový inkorporační pufr. Sekvenování spustíme pomocí předem připraveného protokolu v PC.

Poslední den slouží k vyhodnocení výsledků. Výsledky vzorků jsou zaznamenány v programu BlueFuse Multi v4.4 a vyhodnocovány pracovníky reprodukční genetiky v Genetika PLZEŇ s.r.o.

## 13 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

### 13.1 Úspěšně vyšetřená embrya

Metoda sekvenování nové generace byla použita pro vyšetření celkem 410 vzorků embryí. Úspěšně se povedlo analyzovat 93,4 % (383/410) embryonálních vzorků, u zbylých 6,6 % (27/410) embryonálních vzorků se nepovedlo vyhodnotit výsledek. Celkem bylo 312 embryí, která pocházela od rodičů s reciprokými translokacemi, z toho bylo úspěšně vyšetřeno 92,3 % (288/312) a neúspěšně 7,7 % (24/312). Od rodičů nositelů robertsonských translokací pocházelo celkem 98 embryí. Z počtu 98 embryí bylo úspěšně vyšetřeno 96,9 % (95/98) a neúspěšně 3,1 % (3/98) (Graf 2).



Graf 2 – Úspěšně vyšetřená embrya

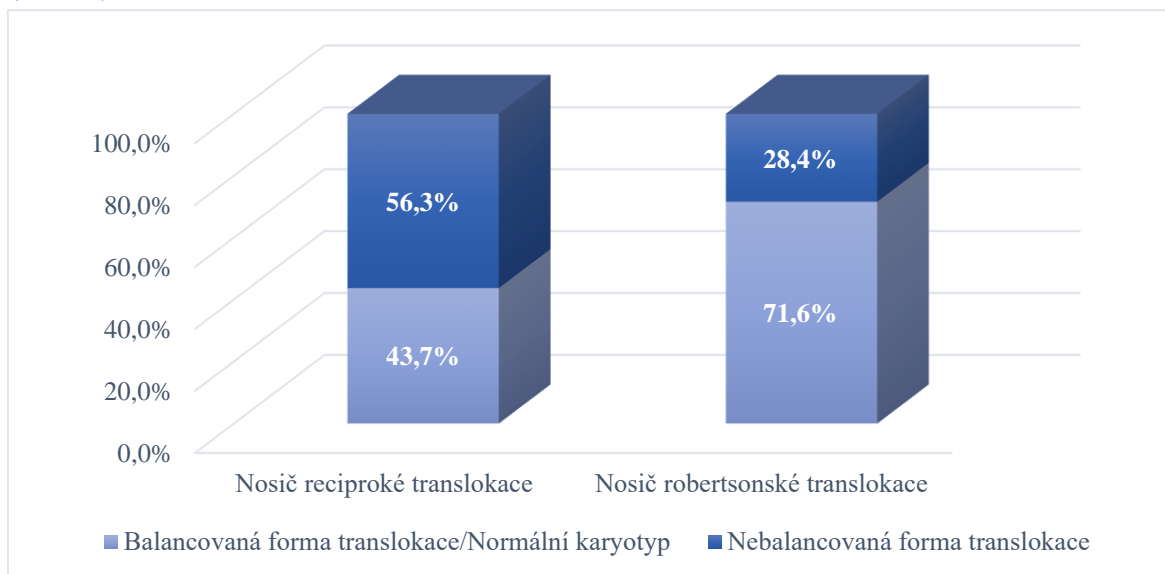
Zdroj: Vlastní

### 13.2 Porovnání podílu embryí s nebalancovanou translokací u nosičů robertsonských vs reciprokých translokací

Z úspěšně vyhodnocených 383 embryí bylo zjištěno, že 50,7 % (194/383) embryí je balancovaných, tj. má buď normální karyotyp nebo nese balancovanou translokaci stejnou jako rodič (toto zvolenou vyšetřovací metodikou nelze rozlišit), a 49,3 % (189/383) embryí nese nebalancovanou formu familiární translokace.

Z počtu 288 úspěšně vyšetřených embryí od rodičů, kteří jsou nositeli reciprokých translokací, bylo 43,7 % (126/288) s balancovaným karyotypem a 56,3 % (162/288) s nebalancovaným karyotypem.

Z celkových 95 úspěšně vyšetřených embryí pocházejících od nositelů robertsonských translokací byl nalezen balancovaný nález u 71,6 % (68/95) embryonálních vzorků. Zbýlých 28,4 % (27/95) embryí neslo nebalancovanou formu familiární translokace. (Graf 3).



Graf 3 – Podíl embryí s nebalancovanou formou translokace u nosičů reciprokých a robertsonských translokací

Zdroj: Vlastní

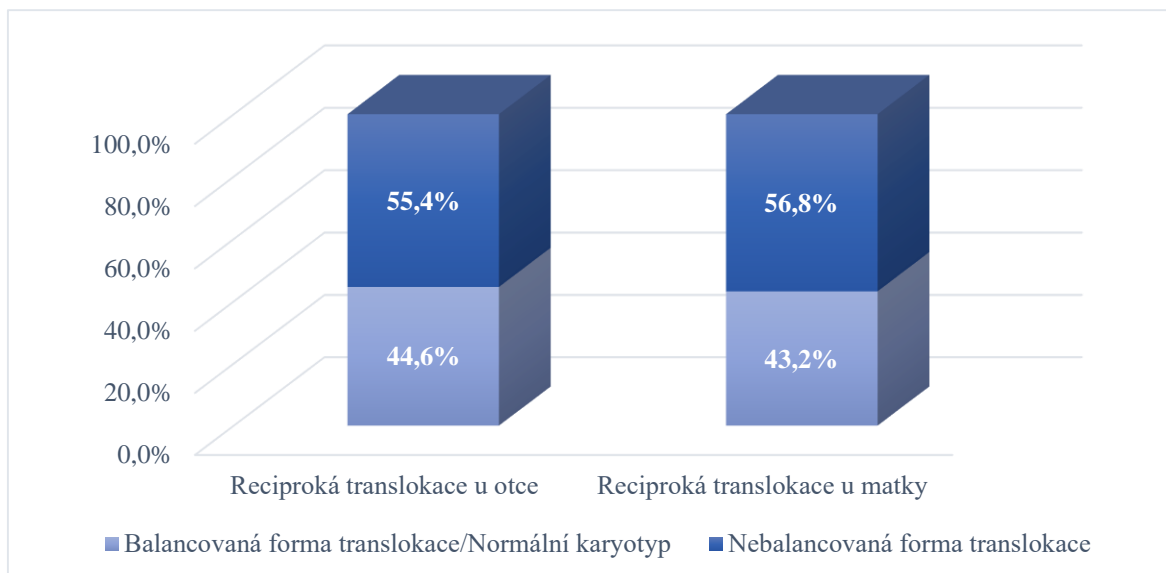
Fisherův exaktní test potvrdil statisticky signifikantně vyšší podíl nebalancovaných embryí u nosičů reciprokých translokací ve srovnání s nosiči robertsonských translokací ( $p < 0,00001$ ).

### 13.3 Porovnání podílu nebalancovaných embryí dle pohlaví nosičů translokace

#### 13.3.1 Nebalancovaná embrya dle pohlaví nosičů reciproké translokace

Celkem bylo úspěšně vyšetřeno 288 embryí od nositelů reciprokých translokací, z toho od otce s reciprokou translokací pocházelo 38,9 % (112/288) a od matky 61,1 % (176/288) embryí.

V případě otce – nosiče reciproké translokace bylo detekováno 44,6 % (50/112) balancovaných embryí a 55,4 % (62/112) nebalancovaných. U embryí, kde byla matka nositelkou reciproké translokace, se našlo 43,2 % (76/176) embryí s balancovanou formou translokace a 56,8 % (100/176) embryí s nebalancovanou formou familiární translokace. (Graf 4).



Graf 4 – Podíl nebalancovaných embryí dle pohlaví nosičů reciproké translokace

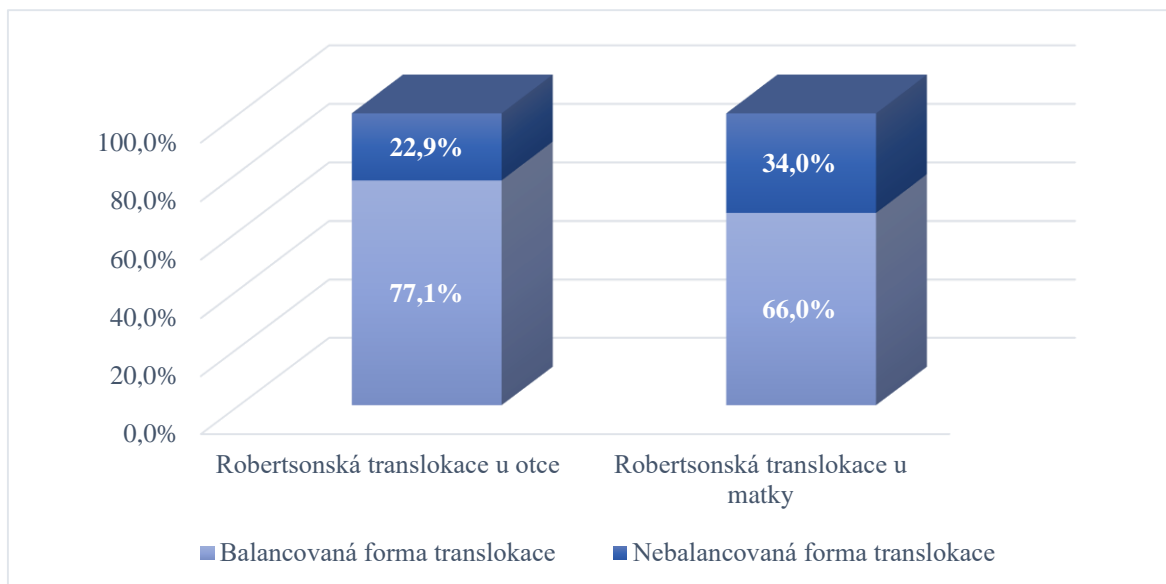
Zdroj: Vlastní

Bylo zjištěno, že nezávisí na pohlaví nosiče translokace. Z výsledků vyplývá, že je zastoupení nebalancovaných forem familiárních translokací téměř stejné jak u otce, nositele reciproké translokace, tak u matky, nositelky reciproké translokace.

### 13.3.2 Nebalancovaná embrya dle pohlaví nosičů robertsonské translokace

Z celkového počtu úspěšně vyšetřených 95 embryí, které pocházely od nositelů robertsonských translokací, bylo 50,5 % (48/95) embryí od párů, kde byl nosičem translokace otec a 49,5 % (47/95) od párů, kde byla nosičkou matka.

U otců bylo zjištěno 77,1 % (37/48) balancovaných a 22,9 % (11/48) nebalancovaných embryí. Obdobně u matek bylo 66,0 % (31/47) balancovaných a 34,0 % (16/47) nebalancovaných (Graf 5).



Graf 5 – Podíl nebalancovaných embryí dle pohlaví nosičů robertsonské translokace

Zdroj : Vlastní

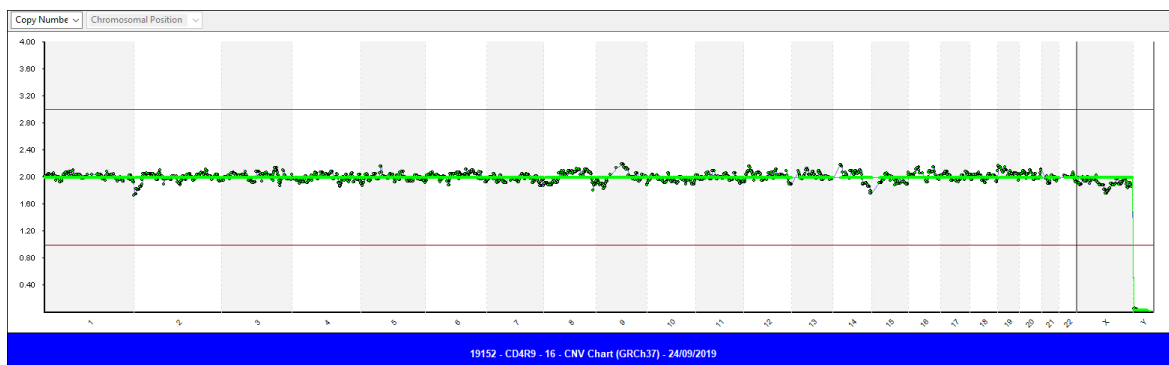
U robertsonské translokace je sice o 11,1 % vyšší zastoupení nebalancovaných embryí pokud je nosičkou robertsonské translokace matka, tento rozdíl však není statisticky signifikantní ( $p = 0,26$ ).

### 13.4 Dokumentace chybných meiotických vzorů u embryí nosičů reciprokých translokací

Pro znázornění příkladů rozdílných meiotických segregáčních vzorů byla vybrána pacientka, jež je nositelkou reciproké translokace vyskytující se na chromozomech 1 a 7, karyotyp 46,XX,t(1;7)(q32;q34). Od této pacientky bylo analyzováno 37 embryonálních vzorků, u kterých se objevily různé segregáční vzory. Do této práce bylo použito pouze 5 vzorků s odlišnými meiotickými segregáčními vzory.

**Příklad č. 1** – Balancovaný nález (balancovaná forma familiární translokace nebo normální karyotyp; 46,XX)

Tento obrázek (Obrázek 11) znázorňuje balancovaný nález. Z obrázku je zřejmé, že všechny chromozomy mají 2 kopie, včetně 2 kopií chromozomu X. Jedná se tedy o embryo, které bude holčička a je doporučené pro embryotransfer.

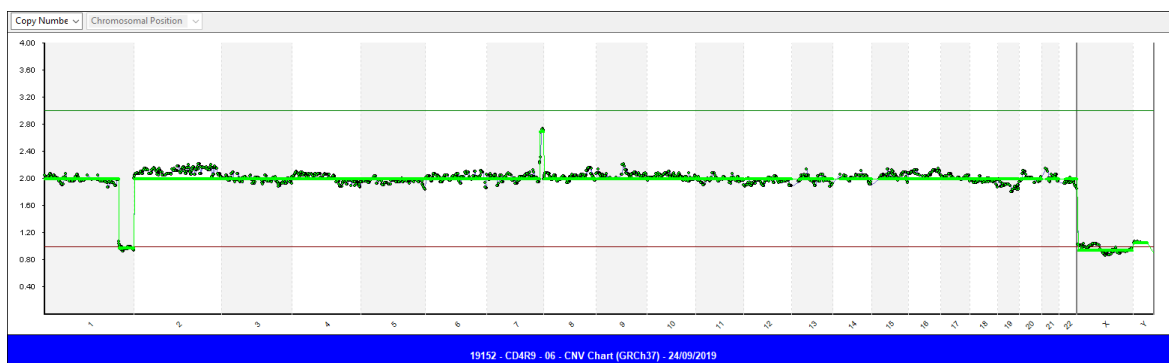


Obrázek 11 – Výsledek NGS u balancovaného nálezu, embryo XX

Zdroj: Archiv Genetika PLZEŇ s.r.o.

### Příklad č. 2 – Nebalancovaná forma familiární translokace; 2:2 přilehlá segregace 1. typu

Mezi nejčastější typy segregace vedoucí k nebalancovaným gametám u nosičů reciprokých translokací patří přilehlá segregace 1. typu, která je znázorněna na Obrázku 12. Zde byla nalezena nebalancovaná translokace  $t(1;7)$ , která odpovídá tomuto typu segregace při vzniku maternální gamety. Na chromozomu 1 má centrická část 2 kopie a terminální (translokovaná) pouze 1 kopii. Na chromozomu 7 je opět centrická část v počtu 2 kopií, ale terminální (translokovaná) část obsahuje kopie 3. Čísla kopií si najdeme v příloze A a určíme typ vzoru, kdy vyjde 2:2 přilehlá segregace 1. typu. Toto embryo je mužského pohlaví, jelikož se zde nachází 1 kopie chromozomu X a 1 kopie chromozomu Y. Bohužel nese nebalancovanou formu familiární translokace, a proto není vhodný k transferu.



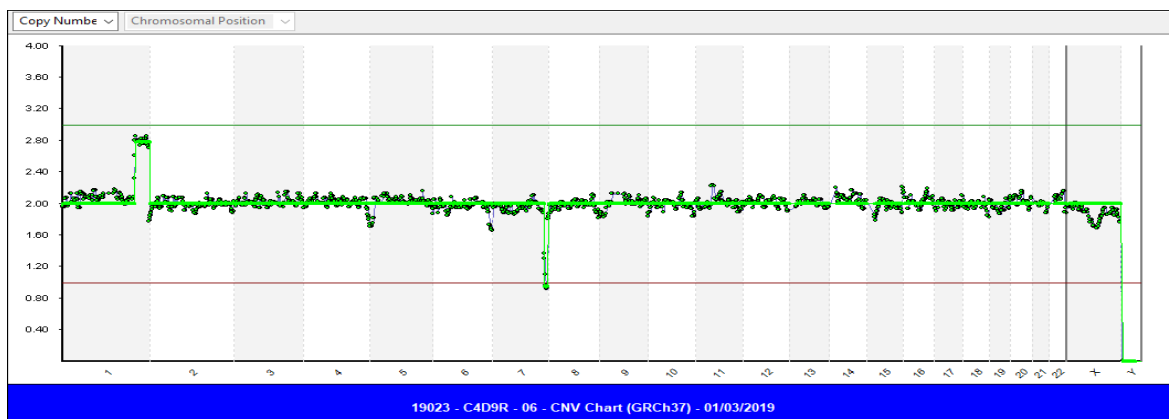
Obrázek 12 – Výsledek NGS u nebalancované formy familiární translokace vzniklé 2:2 přilehlou segregací 1. typu

Zdroj: Archiv Genetika PLZEŇ s.r.o.

### Příklad č. 3 – Nebalancovaná forma familiární translokace; 2:2 přilehlá segregace 1. typu

V příkladu č. 2 a na Obrázku 13 je uvedena přilehlá segregace 1. typu. Zde je uvedena opět přilehlá segregace 1. typu, ale s obrácenými čísly kopií v translokovaných chromozomech. Chromozom 1 obsahuje v centrické části 2 kopie, v terminální části jsou kopie 3. V tomto příkladu je opět stejná situace jako v předchozím příkladu. Na chromozomu

7 jsou v centrické části 2 kopie a v terminální části pouze 1 kopie. V příloze A dohledáme, že vzor náleží opět 2:2 přilehlé segregaci typu 1. Tento vzorek obsahuje 2 kopie chromozomu X, je to embryo ženského pohlaví, ale kvůli nebalancované translokaci nemůže být transferováno.

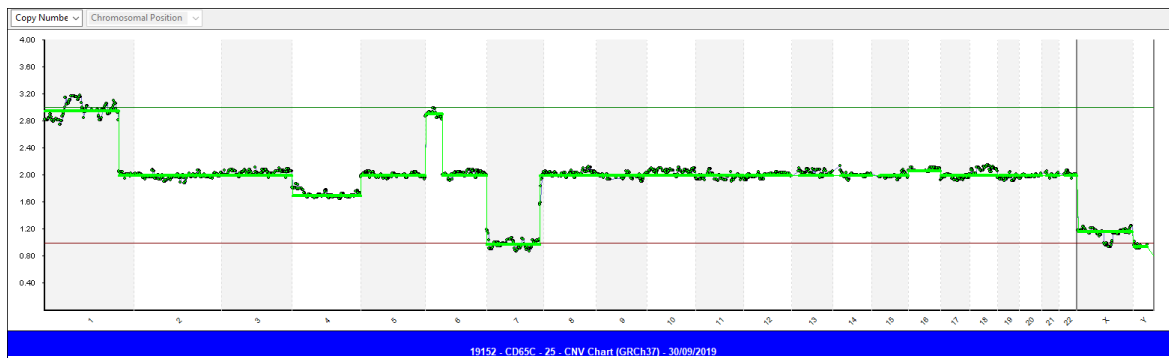


Obrázek 13 – Výsledek NGS u nebalancované formy familiární translokace vzniklé 2:2 přilehlou segregací 1. typu

Zdroj: Archiv Genetika PLZEŇ s.r.o.

#### Příklad č. 4 – Nebalancovaná forma familiární translokace; 2:2 přilehlá segregace 2. typu

Nebalancovaná translokace může nést i vzor, který odpovídá přilehlé segregaci 2. typu. Tato segregace je znázorněna na Obrázku 14, kde se bohužel vyskytují i jiné abnormality kromě translokace t(1;7). Chromozom 4 ve 30 % vyšetřených buněk chybí (mozaika monozomie 4), dále je na chromozomu 6 zmnožené téměř celé p raménko. Na chromozomu 1 je centrická část ve 3 kopiích, terminální část ve 2 kopiích. Chromozom 7 má v centrické části 1 kopii a u terminální části 2 kopie. Meiotický vzor je vyhodnocen jako přilehlá segregace 2. typu. Každý gonozom nese 1 kopii, proto je embryo chlapec. Embryo není možné transferovat kvůli nebalancované translokaci i dalším, nově vzniklým chromozomovým aberacím.



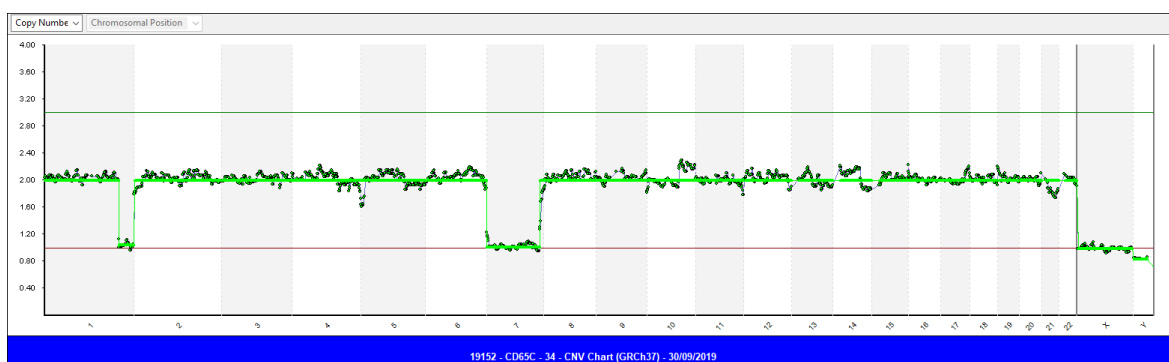
Obrázek 14 – Výsledek NGS u nebalancované formy familiární translokace vzniklé 2:2 přilehlou segregací 2. typu

Zdroj: Archiv Genetika PLZEŇ s.r.o.



### **Příklad č. 5** – Nebalancovaná forma familiární translokace; segregace 3:1 terciální monozomie

Poslední příklad meiotického vzoru je terciální monozomie vyobrazena na Obrázku 15. Na tomto vzorku má chromozom 1 v centrické části 2 kopie a v terminální části kopii pouze 1. Centrická část chromozomu 1 je přítomna pouze v 1 kopii, což je na obrázku dobře viditelné, terminální část ve 2 kopiích. Dle tabulky v příloze A dohledáme vzor 3:1 terciální monozomie. Vzorek obsahuje po 1 kopii gonozomů, tudíž je mužského pohlaví. Embryo nelze transferovat kvůli nebalancované translokaci.



Obrázek 15 – Výsledek NGS u nebalancované formy familiární translokace vzniklé segregací 3:1 (terciální monozomie)

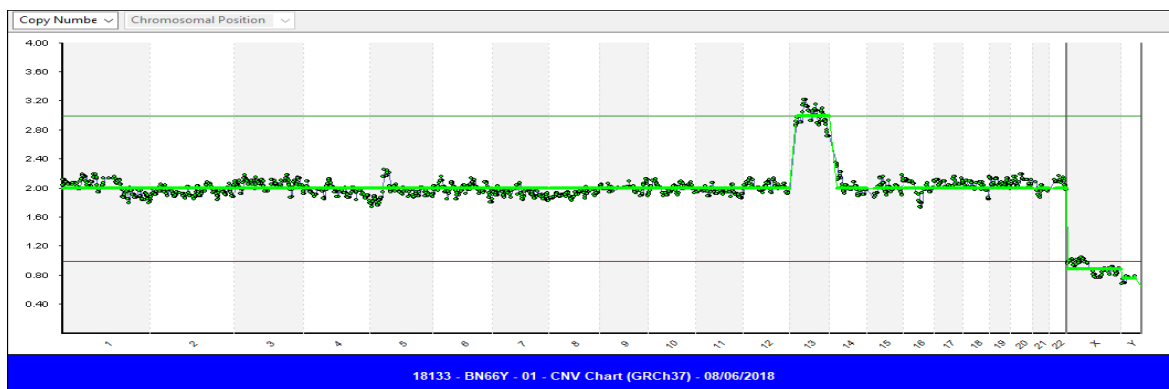
Zdroj: Archiv Genetika PLZEŇ s.r.o.

## **13.5 Dokumentace chybných meiotických vzorů u embryí nositelů robertsonských translokací**

Do dokumentace chybných meiotických vzorů byl vybrán pacient s robertsonskou translokací, která se objevuje na chromozomech 13 a 14, karyotyp 45,XY,t(13;14)(q10;q10). Nositel translokace je muž. Od pacienta se vyšetřilo celkem 10 embryonálních vzorků, ze kterých byly použity 3 s odlišnými meiotickými vzory. Chybné meiotické vzory u nositelů robertsonských translokací jsou uvedeny v kapitole 1.5.1 Robertsonské translokace.

### **Příklad č. 1** – Nebalancovaná forma familiární translokace, trizomie 13

V tomto případě, který ukazuje Obrázek 16, se vyskytla trizomie chromozomu 13. Pokud by se toto embryo transferovalo, bylo by postižené Patauovým syndromem, není tedy doporučeno k embryotransferu. Nese 1 kopii chromozomu X i chromozomu Y, proto je embryo chlapeček.

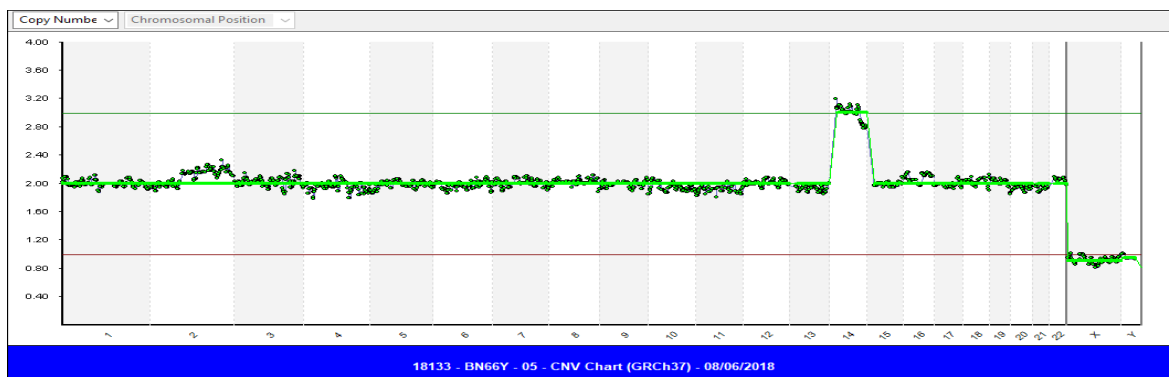


Obrázek 16 - Výsledek NGS nebalancované formy familiární translokace, vznik trizomie 13 v důsledku špatné meiózy u rodiče

Zdroj: Archiv Genetika PLZEŇ s.r.o.

### Příklad č. 2 – Nebalancovaná forma familiární translokace; trizomie 14

Příklad č. 2 zobrazuje 3 kopie chromozomu 14. Embryo není vhodné k transferu do dělohy, jelikož by pravděpodobně došlo k jeho neuchycení či potratu v průběhu těhotenství. Vzorek opět obsahuje 1 kopii chromozomu X a 1 kopii chromozomu Y, jedná se o mužské pohlaví.

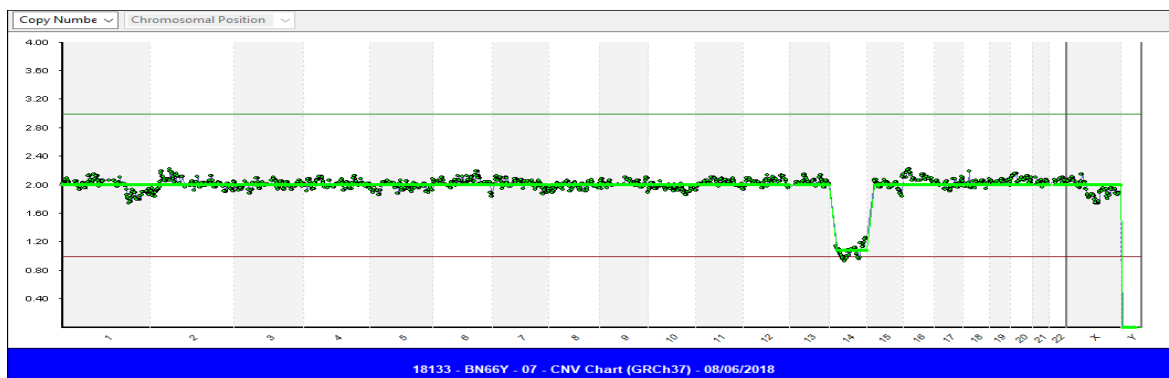


Obrázek 17 – Výsledek NGS nebalancované formy familiární translokace, vznik trizomie 14 v důsledku špatné meiózy u rodiče

Zdroj: Archiv Genetika PLZEŇ s.r.o.

### Příklad č. 3 – Nebalancovaná forma familiární translokace; monozomie 14

Obrázek 18 zobrazuje další odlišný případ chybného meiotického vzoru. V tomto embryu byla analyzována monozomie 14, je přítomna pouze 1 kopie chromozomu 14. Bohužel ani toto embryo není vhodné k implantaci. I tento vzorek nese po 1 kopii obou gonozomů, opět jde o chlapečka.

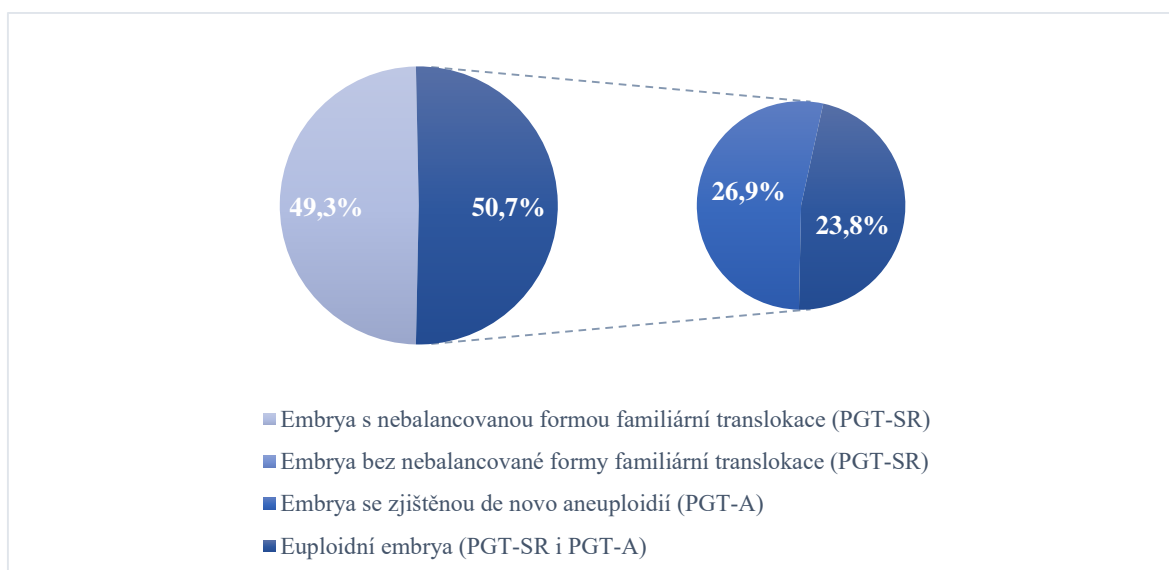


Obrázek 18 – Výsledek NGS nebalancované formy familiární translokace, vznik monozomie 14 v důsledku špatné meiózy u rodiče

Zdroj: Archiv Genetika PLZEŇ s.r.o.

### 13.6 Dokumentace výsledků PGT-A

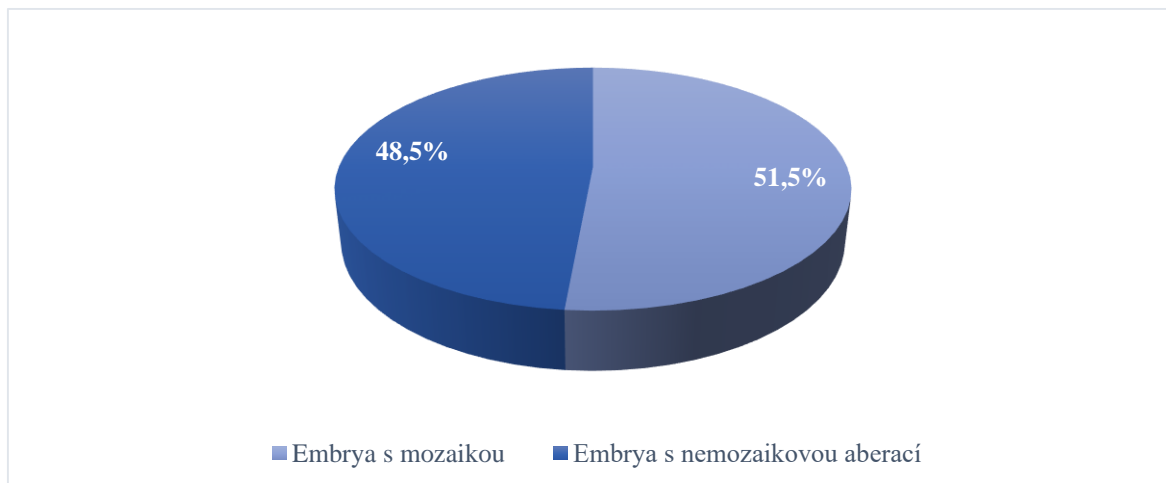
Z celkového počtu 383 úspěšně vyšetřených embryí bylo v rámci PGT-SR detekováno 49,3 % (189/383) nebalancovaných a 50,7 % (194/383) balancovaných embryí. Z pohledu PGT-SR by všechna embrya s balancovaným nálezem pro familiární translokaci mohla být transferována do dělohy matky, avšak v případě přítomnosti jakékoli aberace vzniklé *de novo* (detekované v rámci PGT-A) byla taková embrya z transferu také vyloučena. K této situaci došlo u 26,9 % (103/383) všech vyšetřených embryí. Jen zbývajících 23,8 % (91/383) embryí bylo doporučeno k embryotransferu (Graf 6).



Graf 6 – Výsledek PGT-A u embryí s balancovaným nálezem pro familiární translokaci

Zdroj: Vlastní

Ze 103 embryí, u nichž byla zjištěna *de novo* aneuploidie, se v 51,5 % (53/103) vzorcích jednalo o nemozaikové (strukturní či numerické) chromozomové aberace, ve zbylých 48,5 % (50/103) vzorcích byla zjištěna přítomnost více buněčných linií, tedy mozaik (Graf 7).



Graf 7 – Zastoupení mozaikových a nemozaikových nálezů u embryí s *de novo* aneuploidii

Zdroj: Vlastní

## DISKUZE

Hlavním cílem bakalářské práce je ověřit vyšší výskyt nebalancovaných embryí od rodičů s reciprokou translokací, což je i první výzkumná otázka. K ověření cíle byla použita data získaná metodou sekvenování nové generace (NGS) v rámci preimplantačního testování strukturálních přestaveb (PGT-SR). K tomu, aby mohly být zodpovězeny výzkumné otázky, bylo vyšetřeno 410 embryí pocházejících od nositelů recipročných a robertsonských translokací. Embrya pocházela od matek ve věku 27-47 let a vzorek k vyšetření byl odebírán 5.-6. den embryonálního vývoje.

Z analyzovaných výsledků bylo zjištěno, že výskyt nebalancovaných forem familiárních translokací je častější u embryí pocházejících od nosičů recipročných translokací. Rodiče s reciprokými translokacemi měli 56,3 % embryí s nebalancovanou formou translokace, to je téměř dvojnásobek hodnoty zjištěné u nebalancovaných embryí pocházejících od nositelů robertsonské translokace. U nositelů robertsonských translokací bylo detekováno 28,4 % nebalancovaných embryí. Rozdíl je jasně statisticky signifikantní (dle Fischerova exaktního testu).

Druhá výzkumná otázka se dotazovala, kolik embryí bylo úspěšně vyšetřeno. Úspěšně se povedlo vyšetřit 93,4 % vzorků embryí, zbylých 6,6 % vzorků se nepodařilo analyzovat. Obvykle se nepodaří vyhodnotit 5-10 % vzorků určených k vyšetření. Příčina, která způsobila nemožné vyhodnocení, může spočívat v nešetrně odebraném vzorku, kdy byla DNA při odběru narušena a proto nedošlo k dostatečné amplifikaci v průběhu metody.

I na výzkumnou otázku, zda mají muži, nositelé translokací nižší podíl na vzniku nebalancovaných forem u embryí, se podařilo získat odpověď. Z vyšetřených embryí bylo zjištěno, že procentuální zastoupení nebalancovaných forem familiárních translokací je téměř stejné u obou pohlaví v případě reciproké translokace. U nositelů robertsonských translokací byl podíl embryí s nebalancovanou translokací o 11,1 % vyšší u žen, nosiček translokace. Tento rozdíl však není statisticky signifikantní (při použití Fisherova exaktního testu). Proto můžeme říci, že pohlaví nositele translokace nemá na přenos žádný vliv.

Poslední výzkumná otázka se týkala embryí, která nemohla být transferována do dělohy matky kvůli sporadickým změnám, které byly nalezeny v rámci PGT-A. Takových embryí bylo 103, což je 26,9 % ze všech úspěšně vyšetřených embryí a 53,1 %

z embryí s balancovaným nálezem pro familiární translokaci. Sporadické změny jsou *de novo* vzniklé nemozaikové nebo mozaikové aberace. U 50 z těchto 103 embryí (tedy u 13,1 % z celkového počtu, resp. u 25,8 % z balancovaných embryí pro familiární translokaci) byly nalezeny *de novo* aberace pouze v mozaice s normální buněčnou linií. Takováto embrya by mohla být transferována do dělohy, jelikož se předpokládá, že se patologické buněčné linie v průběhu vývoje samy opraví (Benjamin S. Harris, 2020). O implantaci mozaikového embrya rozhoduje lékař, který však ve většině případů transfer takového embrya raději nedoporučuje.

## ZÁVĚR

V bakalářské práci jsem se zabírala preimplantační diagnostikou nebalancovaných chromozomových aberací, které jsou vyšetřeny pomocí metody NGS na přístroji MiSeq. Hlavní cíl spočíval v ověření vyššího výskytu nebalancovaných forem familiárních translokací u embryí pocházejících od rodičů s reciprokou balancovanou translokací ve srovnání s embryi od nositelů robertsonských balancovaných translokací. Tento cíl byl potvrzen. Z celkem 383 úspěšně vyšetřených embryí bylo detekováno téměř dvakrát více nebalancovaných forem familiárních translokací u embryí od nositelů reciprokých translokací oproti embryím od nositelů robertsonských translokací (53,6 % vs 28,4 %). Dále bylo zjištěno, že nezáleží na pohlaví nositele balancované translokace. Balancované translokace u mužů i u žen mají téměř stejný podíl na vzniku nebalancovaných forem familiárních translokací u potomků. Mezi vyšetřenými embryi se také vyskytla taková, která nesla balancovanou formu familiární translokace, ale objevila se u nich *de novo* sporadická nebalancovaná změna. Kvůli přítomnosti pouze sporadických změn nemohla být doporučena k transferu více než čtvrtina vyšetřených embryí.

Preimplantační diagnostika je vhodným nástrojem pro snížení rizika těhotenských ztrát či narození postiženého dítěte u nosičů chromozomových translokací. Kromě detekce nebalancovaných forem familiárních translokací, může být ale použita i pro detekci *de novo* vzniklých nebalancovaných aberací či pro odhalení familiárních monogenních onemocnění. Mnoho párů, které má rodinné genetické zatížení, tak má díky *in vitro* fertilizaci ve spojení s preimplantačním testováním možnost založit si rodinu a vyhnout se narození postiženého potomka.

## 14 SEZNAM LITERATURY

**Benjamin S. Harris, Katherine C. Bishop, Jeffrey A. Kuller, Sarah Alkilany, Thomas M. Price. 2020.** Preimplantation genetic testing: a review of current modalities. [Online] 2020. [Citace: 28. 11 2021.] <https://doi.org/10.1016/j.xfnr.2020.10.001>. ISSN 2666-5719.

**Brdička, Radim a Didden, William. 2015.** *Genetika v klinické praxi III*. Praha : Galen publishing, 2015. ISBN 9788074922268.

— . **2016.** *Genetika v klinické praxi IV*. Praha : Galen publishing, 2016. ISBN 9788074922770.

**Brdička, Radim a kolektiv autorů z Čech a Slovenska. 2020.** *Genetika pro všeobecné praktické lékaře*. [editor] Petr Herle. Praha : Nakladatelství Dr. Josef Raabe s.r.o., 2020. ISBN 978-80-7496-447-3.

**Eskew, M. Ashley a Jungheim, S. Emily., 2017.** A History of Developments to Improve in vitro Fertilization. [Online] 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6140213/>.

**Franasiak, Jason a Scott, Richard T. 2008.** History of PGD and PGS. *ivf-worldwide*. [Online] 2008. [ivf-worldwide.com](http://ivf-worldwide.com).

**Genetika Plzeň, . 2018.** FISH: Fluorescenční In Situ Hybridizace. [Online] Genetika Plzeň. Moderní pracoviště klinické genetiky, 2018. <https://www.genetika-plzen.cz/vysetreni/fish-fluorescenci-in-situ-hybridizace>.

— . **2018.** Karyomapping. [Online] Genetika Plzeň. Moderní pracoviště klinické genetiky, 2018. [Citace: 29. 11 2021.] <https://www.genetika-plzen.cz/vysetreni/karyomapping>. online.

**Hrubá, Ph.D., RNDr. Martina. 2021.** Laboratorní příručka PGT. [Online] 2021. <http://genetika-plzen.cz>. VD.GP 05.

**Illumina. 2017.** An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology. [Online] Illumina, 2017. [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina\\_sequencing\\_introduction.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf). Pub. No. 770-2012-008-B.



—, 2021. VeriSeq PGS Library Prep, Reference Guide. *Support Illumina*. [Online] 19. srpen 2021. [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/veriseq-pgs/veriseq-pgs-library-prep-reference-guide-15052877-05.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/veriseq-pgs/veriseq-pgs-library-prep-reference-guide-15052877-05.pdf). Dokument 15052877v05.

**Khan, Academy. 2021.** Egg meets sperm. [Online] Khan Academy, 2021. <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/cells/embryology/a/egg-meets-sperm>.

—, 2021. Human embryogenesis. [Online] Khan Academy, 2021. <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/cells/embryo-logy/a/human-embryogenesis>.

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

**Kočárek, Eduard, Pánek, Martin a Novotná, Drahuše. 2006.** *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky : vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. Praha : Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1069-8.

**Laboratoř lékařské genetiky Karlovy Vary, . 2011.** Vyšetření aneuploidií, mikrodeleci a strukturálních změn chromozomů metodou FISH. *genetikakv.cz*. [Online] 2011. <http://www.genetikakv.cz/fish.html>.

*Mozaicismus embrya ve stádiu blastocysty a jeho vliv na vyšetření PGS (PGT-A)*. **Hrubá Ph.D., RNDr. Martina. 2017.** místo neznámé : Genetická laboratoř IVF Zentren Prof. Zech - Pilsen, 2017.

**Nussbaum R. L., McInnes R. R., Willard H. F. 2004.** *Thompson & Thompson – Klinická genetiká*. Praha : Triton, 2004. ISBN 80-7254-475-6.

**Otová, Berta, Mihalová, Romana a Bobková, Klára. 2020.** *Základy biologie a genetiky člověka*. Praha : Univerzita Karlova, Nakladatelství Karolinum, 2020. IBSN 978-80-246-4565-0.

**Passarge, Eberhard. 2019.** *Barevný atlas genetiky*. [překl.] Kohoutová Milada. Praha : Grada Publishing, 2019. ISBN 978-80-247-3099-8.

**Pritchard, Dorian J. a Korf, Bruce R. 2021.** *Základy lékařské genetiky*. Praha : Galén, 2021. ISBN 978-80-7492-513-9.

**Procházka, Martin (editor) a Vodička Radek, Vrtěl Radek a kolektiv. 2018.** *Základy lékařské genetiky pro studenty všeobecného lékařství.* Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2018. ISBN 978-80-244-5368-2.

**RepromedaLab. 2020.** PGT-M. [Online] RepromedaLab, 2020. <https://www.repromedalab.cz/pgt-m>.

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

**Scriven, Paul N., Kirby, Toby L. a Ogilvie, Caroline Mackie. 2011.** FISH for Pre-implantation Genetic Diagnosis. [Online] 2011. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3197414/>.

**Snustad, Peter D. 2017.** *Genetika.* [překl.] Fajkus Jiří, Hořín Petr, Knoll Aleš, Kuglík Petr, Šmarda Jan, Šmardová Jana, Veselská Renata, Vyskot Boris Doškař Jiří. Brno : Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8613-5.

—. **2012.** *Principle of genetics.* místo neznámé : John Wiley & Sohn, 2012. ISBN 978-0-470-90359-9.

**Trávník, DrSc., prof. MUDr. Pavel. 2019.** Genetické vlivy a spermatogeneze. *Urologie pro praxi.* [Online] 2019. <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2019/03/08.pdf>.

**Zhong, Y, a další. 2021.** Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. [Online] Ann Lab Med, Leden 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7443516/>. PMC 7443516.

## **SEZNAM PŘÍLOH**

- Příloha A – Segregační vzory u nosiče reciproké translokace

# PŘÍLOHY

## Příloha A – Segregační vzory u nosiče reciproké translokace

Normal parent	Balanced carrier parent				Segregation mode	Segment copy number				
						centric A	terminal A	centric B	terminal B	
chrA	chrB	chrA	chrB		2:2 Alternate	2	2	2	2	
chrA	chrB	derA	derB		2:2 Alternate	2	2	2	2	
chrA	chrB	chrA	derB		2:2 Adjacent-1	2	3	2	1	
chrA	chrB	chrB	derA		2:2 Adjacent-1	2	1	2	3	
chrA	chrB	chrA	derA		2:2 Adjacent-2	3	2	1	2	
chrA	chrB	chrB	derB		2:2 Adjacent-2	1	2	3	2	
chrA	chrB	chrA	chrB	derA	3:1 Tertiary trisomy	3	2	2	3	
chrA	chrB	chrA	chrB	derB	3:1 Tertiary trisomy	2	3	3	2	
chrA	chrB	chrB	derA	derB	3:1 Interchange trisomy	2	2	3	3	
chrA	chrB	chrA	derA	derB	3:1 Interchange trisomy	3	3	2	2	
chrA	chrB	derB			3:1 Tertiary monosomy	1	2	2	1	
chrA	chrB	derA			3:1 Tertiary monosomy	2	1	1	2	
chrA	chrB	chrA			3:1 Interchange monosomy	2	2	1	1	
chrA	chrB	chrB			3:1 Interchange monosomy	1	1	2	2	
chrA	chrB	chrA	chrB	derA	derB	4:0 Double trisomy	3	3	3	3
chrA	chrB				4:0 Double monosomy	1	1	1	1	
chrA	chrB	chrA	chrA		2:2 Adjacent-2 cross-over in A	3	3	1	1	
chrA	chrB	derA	derA		2:2 Adjacent-2 cross-over in A	3	1	1	3	
chrA	chrB	chrB	chrB		2:2 Adjacent-2 cross-over in B	1	1	3	3	
chrA	chrB	derB	derB		2:2 Adjacent-2 cross-over in B	1	3	3	1	
chrA	chrB	chrA	chrA	chrB		3:1 Cross-over in A	3	3	2	2
chrA	chrB	chrA	chrA	derB		3:1 Cross-over in A	3	4	2	1
chrA	chrB	derA	derA	chrB		3:1 Cross-over in A	3	1	2	4
chrA	chrB	derA	derA	derB		3:1 Cross-over in A	3	2	2	3
chrA	chrB	chrA	chrB	chrB		3:1 Cross-over in B	2	2	3	3
chrA	chrB	chrB	chrB	derA		3:1 Cross-over in B	2	1	3	4
chrA	chrB	chrA	derB	derB		3:1 Cross-over in B	2	4	3	1
chrA	chrB	derA	derB	derB		3:1 Cross-over in B	2	3	3	2
chrA	chrB	chrA	chrA	derA		Anaphase II nondisjunction	4	3	1	2
chrA	chrB	chrA	derA	derA		Anaphase II nondisjunction	4	2	1	3
chrA	chrB	chrB	chrB	derB		Anaphase II nondisjunction	1	2	4	3
chrA	chrB	chrB	derB	derB		Anaphase II nondisjunction	1	3	4	2

(Zdroj: SOPV.GP 501, Genetika PLZEŇ s.r.o.)