

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Martina Bednářová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Genetická diagnostika při *in-vitro* fertilizaci (IVF)

Bakalářská práce

2022

Martina Bednářová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Martina Bednářová**
Osobní číslo: **C19212**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Genetická diagnostika při *in-vitro* fertilizaci (IVF)**
Téma práce anglicky: **Genetic Diagnostics Of *in-vitro* Fertilization (IVF)**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Rešerše na téma IVF a genetická diagnostika
 - a. Vyšetřované parametry
 - b. Současné metody vyšetření
 - c. Preimplantační diagnostika
 - d. Nové trendy v diagnostice

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**
Herbacos Recordati s.r.o.

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Genetická diagnostika při *in-vitro* fertilizaci (IVF) jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 21.6.2022

Martina Bednářová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé práce Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D. za velmi vstřícný přístup a cenné rady při zpracování bakalářské práce. Děkuji také Oddělení lékařské genetiky Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem za jejich užitečnou pomoc. V neposlední řadě své rodině, přátelům, a hlavně příteli za jejich podporu po celou dobu studia.

ANOTACE

Práce se zaměřuje na metody používané v rámci preimplantační genetické diagnostiky (PGD), které umožňují odhalit všechny dosud známé genetické abnormality ještě před narozením jedince. V první kapitole je popsána *in vitro* fertilizace, na kterou navazuje princip odběru biologického materiálu. Následující kapitoly obsahují výčet jednotlivých metod. Poslední kapitola se věnuje budoucnosti v oblasti metod pro PGD. Práce se soustřeďuje na principy metod, využití a v neposlední řadě na jejich pozitiva a negativa.

KLÍČOVÁ SLOVA

preimplantační genetická diagnostika, *in vitro* fertilizace, genetické abnormality, embryo, metody

TITLE

Genetic Diagnostics Of *in-vitro* Fertilization (IVF)

ANNOTATION

This abstract focuses on the methods used in the context of preimplantation genetic diagnosis (PGD), which can detect all known genetic abnormalities before the birth of an individual. In the first chapter is described *in vitro* fertilization, which is followed by the principle of biopsy of biological material. The following chapters contains a list of various methods. The last chapter deals with the future in the field of methods for PGD. The bachelor thesis mentions the principles of the methods, use and finally their pros and cons.

KEYWORDS

preimplantation genetic diagnosis, *in vitro* fertilization, genetic abnormalities, embryo, methods

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	10
SEZNAM TABULEK.....	10
ÚVOD.....	12
1. In vitro fertilizace (IVF)	14
1.1 Metody IVF.....	15
1.2 Provedení IVF	15
2. Preimplantační genetická analýza (PGA).....	17
2.1 Preimplantační genetická diagnostika (PGD)	17
2.2 Preimplantační genetický screening (PGS).....	18
2.3 Běžně vyšetřované parametry	19
2.3.1 Genetická analýza PGD.....	19
2.3.2 Biochemická analýza.....	21
3. Biologický materiál	22
3.1 Rýhování embrya	22
3.2 Biopsie embrya.....	22
4. Metody používané v rámci PGD a PGS.....	24
4.1 Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)	25
4.1.1 Vyhodnocení signálu hybridizace	26
4.2 Komparativní genomová hybridizace (CGH)	27
4.3 Mikročipové metody	29
4.3.1 Array komparativní genomová hybridizace (aCGH)	29
4.3.2 SNP čipy (jednonukleotidové polymorfismy).....	31
4.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	34
4.5 Karyomapping.....	36
4.6 NGS (Next Generation Sequencing).....	39
5. Nové trendy v diagnostice PGD.....	41

5.1 Metoda SMRT (single-molecule-real-time).....	43
5.2 Sekvenování Nanopore technologies	44
5.3 Helicos Genetic Analysis System	46
5.4 Multiple displacement amplification single cell (MDA)	47
6. ZÁVĚR	48
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	50

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Způsob zpracování vzorku pomocí metody FISH	27
Obrázek 2 Princip metody CGH prezentovaný na porovnání zdravé (červeně) a tumorové buňky (zeleně)	28
Obrázek 3 Princip metody aCGH.....	31
Obrázek 4 Výsledek vyšetření metodou SNP array – mikrodelece na chromozomu 7 (případ č. 9, tab. 4).	32
Obrázek 5 Dědičnost monogenních onemocnění.	38
Obrázek 6 Princip sekvenování třetí generace	42
Obrázek 7 Princip metody SMRT	43
Obrázek 8 Princip metody Nanopore	46

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Metody a běžně vyšetřované parametry v preimplantační genetické diagnostice..	20
Tabulka 2 Další metody a jejich použitelnost pro vyšetřované parametry v preimplantační genetické diagnostice	21
Tabulka 3 Metody využívané v PGD a jejich vyšetřované parametry	24
Tabulka 4 Srovnání diagnostických možností metod využívaných v prenatalní diagnostice..	33

SEZNAM ZKRATEK

aCGH	array komparativní genomová hybridizace (array comparative genomic hybridization)
ATR	asistovaná reprodukce
BAC	bacterial artificial chromosomes
bp	páry bází
cDNA	komplementární DNA
CGH	komparativní genomová hybridizace (comparative genomic hybridization)
CNV	copy number variation
COH	kontrolovaná (řízená) ovariální hyperstimulace
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
DOP-PCR	degenerate oligonucleotide-primed PCR
FISH	fluorescenční in situ hybridizace (fluorescence in situ hybridization)
FSH	folikulostimulační hormon
Gb	gigabáze
GnRH	gonadotropin-releasing hormone
hCG	lidský choriový gonádotropin
HSG	hysterosalpingografie
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICSI	intracytoplazmatická injekce spermie
IMSI	intracytoplazmatická morfologicky selektovaná injekce spermie
IMS-MDA	immunomagnetic separation – MDA
I-PEP-PCR	improved primer extension preamplification PCR
IVF	in vitro fertilizace (in vitro fertilization)

kb	kilobáze
LH	luteinizační hormon
MACS	magnetická separace spermií
Mb	megabáze
MDA	multiple displacement amplification
MESA	microsurgical epididymal sperm aspiration
NGS	sekvenování nové generace (new generation sequencing)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PGD	preimplantační genetická diagnostika (preimplantation genetic diagnosis)
PGS	preimplantační genetický screening (preimplatation genetic screening)
PGT-A	preimplantační genetické testování – analýza (preimplatation genetic testing – analysis)
qPCR	kvantitativní PCR (quantitative PCR)
SGS	single genome sequencing
SKY	spektrální karyotypování
SMRT	single-molecule-real-time
SMS	single-molecule sekvenování
SNP	single nucleotide polymorphism
STM	scanning tunneling microscope
TESE	testicular sperm extraction
TGS	sekvenování třetí generace (third generation sequencing)
UPD	uniparentální disomie
ZMW	zero-mode waveguide

ÚVOD

Preimplantační genetická diagnostika (PGD) je neustále se vyvíjející metoda, která umožňuje během umělého oplodnění (IVF) zjistit, zda zárodek není nositelem dědičné genetické choroby. Výhodou PGD je, že umožňuje zjistit jakoukoliv genetickou poruchu ještě před transferem a implantací embrya do dělohy matky, a tak se eliminuje riziko potratu nebo ukončení těhotenství. [1, 2]

K preimplantační genetické diagnostice se přistupuje v případě, kdy je u páru podstupujícího IVF, velmi vysoké riziko nějaké dědičné genetické poruchy. Tato diagnostika je prováděna u párů, kdy jeden z páru má dědičnou genetickou nemoc, je nositelem dědičné genetické nemoci, nebo u obou z páru se toto riziko nachází. V mnoha případech se také stává, že pár neví o žádné dědičné genetické poruše, nikdo v jejich rodině takovou poruchu nemá, ale i přesto se dlouhodobě léčí s neplodností, protože se jim nedaří počít potomka přirozenou cestou ani prostřednictvím IVF. [1, 2]

Dalším důvodem, kdy je metoda PGD párům doporučena, je například věk partnerky, který je vyšší než 35 let, tedy je zde zvýšená pravděpodobnost narození potomka s abnormálním počtem chromozomů. Nejčastěji jsou postiženy chromozomy číslo 13 (rozvinutí Patauova syndromu), chromozomy číslo 18 (Edwardsův syndrom) a v převážné většině hlavně chromozom číslo 21, který způsobuje Downův syndrom. V neposlední řadě je PGD doporučeno párům, u kterých se v rodině vyskytuje dědičná genetická porucha vázaná na pohlaví, nebo pokud jeden z partnerů podstupoval či podstupuje léčbu chemoterapií či radioterapií. [1, 2]

Při provádění této metody se používá metod typických pro IVF. Pro následnou diagnostiku se získává pólóvé tělísko nebo blastocysty. Nejčastěji se však odebírají blastomery (buňky vzniklé několika prvními mitotickými děleními zygoty). Poté následuje sled molekulárně-genetických vyšetření. Nebylo prokázáno, že by tato vyšetření měla negativní vliv na tyto buňky. [1, 2]

Preimplantační genetická diagnostika je důležitou součástí in vitro fertilizace, protože nám pomáhá výrazně snížit riziko spontánních potratů, odhalit chromozomální abnormality během probíhajícího těhotenství nebo také u nově narozených dětí s ještě nezjištěnou dědičnou genetickou poruchou. V posledních několika letech dochází k velkému rozvoji PGD. [1, 2]

Cílem této práce je popsat samotnou preimplantační diagnostiku, parametry, které se při ní vyšetřují. Dále se zaměřit na jednotlivé metody, které se v současnosti využívají, a v neposlední řadě prozkoumat nové trendy v diagnostice.

1. In vitro fertilizace (IVF)

In vitro fertilizace (IVF) nebo také umělé oplodnění, je proces, kdy je ženě odebrán oocyt nebo několik oocytů, pro proces oplodnění spermií mimo tělo ženy. Jedná se tedy o jednu z metod, se kterou se setkáváme v souvislosti s asistovanou reprodukcí.

S touto metodou se v dnešní době setkáváme stále častěji, protože přibývá párů, které nemohou počít potomka přirozenou cestou. Nejedná se ale pouze o problém s početím z důvodu nějaké genetické poruchy nebo jiné fyziologické poruchy, tuto metodu využívají například oboupohlavní páry, které jinak počít potomka nemohou, nebo také matky bez partnera (pokud je to v daném státě možné). Rozvoj a využívání IVF má tedy velké dopady na život mnoha lidí, protože by bez něho nemohli vytouženého potomka získat. [5]

Celý proces IVF je velmi náročný. Lékaři a kliničtí embryologové musí precizně ovládat techniky spojené s IVF, od odběru oocytů, přes jejich oplodnění až po transfer a implantaci do dělohy matky. Pár, který se pro IVF rozhodne, podstupuje velmi složitou cestu po emoční, ale hlavně fyzické stránce.

Nejprve musí oba z páru podstoupit řadu vyšetření, která by měla odhalit, proč se páru nedaří otěhotnět přirozenou cestou. Tato vyšetření většinou zahrnují odběry krve (převážně hormonů), ultrazvukové vyšetření, imunologické vyšetření, analýzu spermatu, hodnocení reprodukčního systému ženy pomocí hysterosalpingografie (HSG) a také testy na zjištění ovulace. [5]

Důležité je, že v daném chronologickém věku ženy existují velké rozdíly v citlivosti a plodnosti vaječníků, proto se ještě před podstoupením IVF provádí dodatečné testování ovariální rezervy. Snížená ovariální rezerva se projevuje sníženou odpovědí vaječníků na léky, které stimulují ovulaci, to umožňuje odebrat menší počet oocytů. Získáme tak méně embryí, čímž klesne i relativní počet těhotenství. Mnoho žen s nevysvětlitelnou neplodností má při testování sníženou ovariální rezervu. Snížená ovariální rezerva je většinou diagnostikována na základě zvýšené hladiny folikulostimulačního hormonu (FSH) v séru 3. den menstruačního cyklu nebo na základě transvaginálního ultrasonografického nálezu nízkého objemu vaječníků nebo na základě malého množství antrálních folikulů. Tyto výsledky se poté využívají k výběru ovariálního stimulačního protokolu. [6]

1.1 Metody IVF

U in vitro fertilizace vzniká riziko mnohočetného těhotenství. Embrya se implantují sice nezávisle na sobě, aby byla šance na otěhotnění vyšší, ale i přes výpočty je riziko vícečetného těhotenství poměrně vysoké. Snahou je do ženy implantovat co nejméně nejkvalitnějších embryí, aby došlo ke snížení tohoto rizika. V současné době je odbornou společností doporučováno transferovat nejvýše dvě embrya. [7]

V rámci IVF se využívají další metody, které jsou součástí asistované reprodukce:

- ICSI – intracytoplazmatická injekce spermie se používá, aby se zabránilo polyspermii a oplodnění velkého množství oocytů, vybere se tedy pouze jedna spermie, která je implantována do oocytu [4]
- MACS – magnetická separace spermií, používá se k oddělení apoptických spermií od zbytku, cílem je získat kvalitnější vzorek spermatu pomocí odstranění spermií, které nejsou životaschopné [9]
- IMSI – intracytoplazmatická morfologicky selektovaná injekce spermie se využívá k morfologické selekci spermií pod velkým mikroskopickým zvětšením, měla by pomoci párům, u kterých došlo opakovaně k selhání implantace spermie [10]
- TESE/MESA – metody, které se využívají k chirurgickému získání spermií z nadvarlat mužů s azoospermii (nepřítomnost spermií v ejakulátu, trpí tím asi 1 % mužů) [11, 12]

Pomocí těchto metod je snaha vyhovět všem párům, které nemohou počít potomka přirozenou cestou. A jsou tak nadějí i pro páry, které trpí například azoospermii, oligospermii (snížený počet spermií) nebo astenoospermii (snížená pohyblivost spermií). [13]

1.2 Provedení IVF

Samotný proces in vitro fertilizace se skládá z několika kroků, které je nutné provést u každé ženy, jež IVF podstupuje. V první řadě se jedná o hormonální stimulaci vaječnicků (COH). K tomu se nejčastěji využívá antagonisty GnRH (gonadotropin-releasing hormone). GnRH je zodpovědný za uvolňování gonadotropních hormonů, jako jsou FSH a LH. Jelikož se ale využívá antagonisty, snažíme se potlačit sekreci těchto hormonů, aby se zabránilo předčasné ovulaci. Následně se ženě podávají gonadotropiny, které stimulují vaječniky, a je tak možné později odebrat více folikulů. Ke zjištění vývoje folikulů se nejčastěji využívá ultrazvuk a stanovuje se také hormonální profil. Jakmile je proces zrání dokončen, je ženě aplikován

injekčně hormon hCG na podporu ovulace. Za 34-36 hodin jsou ženě odebrány folikuly. [14, 81]

Odebrání oocytů se provádí pod intravenózní anestézií. Folikuly jsou odsáty pod transvaginální ultrasonografií. Následně jsou vajíčka umístěna do speciálního média a kultivována v inkubátoru. Dalším krokem je již inseminace, kdy je do misky k vajíčkům přeneseno 50 000 až 100 000 pohyblivých spermií, které byly předtím vyšetřeny pomocí spermioqramu. Tato technika se používá, pouze pokud jsou parametry spermií normální. V jiném případě se využívá techniky ICSI, kdy pod mikroskopem embryolog odebere jednu spermii pomocí skleněné mikrojuhly a implantuje ji do cytoplazmy vajíčka. Tato metoda zvyšuje šanci oplodnit vajíčko v případech, kdy má partner málo spermií nebo jsou málo pohyblivé. Setkáváme se i s případy, kdy se ve spermatu nenachází žádné spermie, a v tomto případě jsou získány chirurgickým zákrokem. [14, 81]

Zda bylo oplodnění úspěšné, lze zhodnotit po 16-18 hodinách po inseminaci nebo ICSI, kdy se oplozená vajíčka nazývají zygota. Jsou kultivovány ve speciálních médiích, která podporují jejich růst. Pokud se embrya dobře vyvíjejí, je možné je kultivovat do stádia blastocysty pomocí speciálního média. Embrya ve stádiu blastocyst se dají implantovat již 5. den po oplození. V tomto stádiu se implantují nejlépe, a proto jich nemusíme transferovat do dělohy velké množství, tím se snižuje riziko vícečetného těhotenství. [14]

Předtím, než jsou embrya přenesena do dělohy, se musí vybrat ta nejkvalitnější. Embrya se transferují do dělohy 3. den po odebrání oocytů nebo, 5. den, kdy jsou již ve stádiu blastocysty. [14]

Posledním krokem IVF je transfer embrya. Jedná se o zákrok, který není složitý a provádí se bez anestezie. Embrya jsou pomocí katetru zavedena a umístěna do dělohy. Celý proces je kontrolován ultrazvukem. [14]

2. Preimplantační genetická analýza (PGA)

Preimplantační genetická analýza (PGT-A) nebo také preimplantační genetické testování je založeno na získání vzorku pomocí biopsie z vyvíjejícího se oocyty nebo z embrya. Tento genetický materiál získáváme prostřednictvím cyklu umělého oplodnění neboli IVF. [3]

Pod preimplantační genetickou analýzu spadá preimplantační genetická diagnostika (PGD), které se podrobněji budu věnovat v celé bakalářské práci, a také preimplantační genetický screening (PGS).

Obě tyto techniky se využívají při umělém oplodnění (IVF) v rámci asistované reprodukce (ATR), a snaží se tak zvýšit možnost otěhotnění u párů, které mají problém s početím. Obě techniky se zaměřují na genetické vyšetření pohlavních buněk obou pohlaví, snaží se snížit vznik aneuploidii u těchto buněk a tím snížit riziko potratu ze strany muže i ženy.

2.1 Preimplantační genetická diagnostika (PGD)

Preimplantační genetická diagnostika (PGD) je založená na testování oocytů nebo embryí v preimplantační fázi z důvodu možného výskytu genetických chromozomálních abnormalit. Tato diagnostická metoda se využívá pouze v rámci in vitro fertilizace (IVF).

K zavedení této metody došlo před více než dvaceti lety prostřednictvím skupin vědců Yuryho Verlinskeho a Alana Handysida. Od této doby se metoda neustále rozvíjí a stále více se s ní dnes setkáváme v rámci IVF. PGD pomohlo už při více než 50 000 cyklech IVF, a umožnilo tak narození více jak 10 000 dětí po celém světě. [1]

PGD se nabízí především párům, které jsou nebo mohou být zatíženy nějakou dědičnou genetickou poruchou. Má za úkol zabránit přenosu tohoto dědičného genetického onemocnění na jejich potomky, které by u nich mohlo vyvolat závažné zdravotní problémy nebo by mohlo dojít ke spontánnímu potratu během těhotenství. [1, 2]

Hlavní indikací pro PGD jsou mendelovské poruchy, které jsou často život ohrožující, autozomálně dominantní nebo recesivní onemocnění, X-vázané recesivní choroby a aberace počtu chromozomálních kopií. Všechny tyto chromozomální poruchy ve většině případů mohou vést k opakovaným potratům nebo k těžce postiženým potomkům [1, 2]

Embrya se získávají in vitro fertilizací pomocí intracytoplazmatické injekce spermií (ICSI) a biopsie se provádí 3. den menstruačního cyklu. V případě nutnosti se místo embryí dají odebrat i blastocysty. Genetická analýza se provádí na jedné nebo dvou blastomerách za

využití metody fluorescenční in situ hybridizace (FISH) pro cytogenetickou diagnostiku nebo pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) pro molekulární diagnostiku. Můžeme také odebrat pólové buňky, které se dají využít ke studiu genetického profilu matky. Do dělohy můžeme transferovat a implantovat pouze nepoškozená embrya, proto je jejich molekulárně-genetické vyšetření nezbytné. [4]

V posledních letech se v souvislosti s PGD objevují nové metody, například komparativní genomová hybridizace (CGH) anebo mikročipy. [1]

V rámci IVF se setkáváme i s další, podobnou diagnostickou metodou, s preimplantačním genetickým screeningem (PGS). Na rozdíl od PGD se zde nezaměřujeme na konkrétní chromozomální abnormality, ale teprve zjišťujeme důvod, proč se páru nedaří zplodit potomka přirozenou cestou. PGS je proto doporučováno párům, kdy je věk matky vyšší než 35 let, pár má za sebou již několik neúspěšných cyklů IVF, všechna přechází těhotenství skončila potratem nebo také při těžších poruchách spermatogeneze. Tento preimplantační diagnostický screening nám umožňuje vyšetřit všechna embrya, nebo pouze část z nich. [15]

Celosvětově se setkáváme s různými názory na IVF a PGD. V některých evropských zemích je PGD zakázáno nebo jej páry podstupují bez doporučení lékařů. [15]

2.2 Preimplantační genetický screening (PGS)

Součástí preimplantační genetické analýzy je také preimplantační genetický screening (PGS), který opět významně snižuje riziko potratů nebo narození dětí s genetickou poruchou.

Při PGS se také odebírají 1-2 blastomery a následně se provádí jejich analýza pomocí metody FISH (fluorescenční in situ hybridizace) ke zjištění výskytu abnormálního počtu chromozomů nebo různých strukturních aberací, tzv. translokací. Metoda FISH má velkou konkurenci v další hybridizační technice, microarray, ale tato metoda má své limity a nemůže FISH nahradit především proto, že nedokáže detekovat balancované změny na chromozomech, jako jsou translokace, vyvážené inserce a inverze. [46]

Dále se využívá i hybridizační metody microarray (mikročipová komparativní genomová hybridizace), která umožňuje vyšetření prakticky celého genomu technikou komparativní CGH, kde se provádí nejčastěji tzv. copynumber variation analýza, pro vyšetření abnormálního profilu exprimovaných genů (zvýšená nebo snížená exprese daných genů), případně lze využít metodu microarray pro přímou detekci sekvenčních abnormalit, zde se ale uplatňují spíše metody sekvenční (v dnešní době lze využít vysokokapacitní sekvenování nové

generace – NGS). V neposlední řadě se využívá také jedné z nejznámější molekulárně-cytogenetické metody FISH (fluorescence in situ hybridization) v diagnostice monogenních chorob. [15, 45]

PGS se používá zejména při opakovaných neúspěších v rámci asistované reprodukce, protože dochází ke zvyšování počtu aneuploidií u žen v pokročilém reprodukčním věku (věk nad 35 let) a v jejich důsledku dochází i k častějším potratům, tyto aneuploidie také nalzáme již při vyšetření blastomer a většinou jsou neslučitelné se životem. [15, 16]

Technika PGS se soustřeďuje na to, aby se vybrala lepší embrya, resp. zdravá embrya. Díky tomu by se snížil počet neúspěšných transferů embryí do dělohy matky, protože by nedocházelo k tak častým potratům. [16]

2.3 Běžně vyšetřované parametry

2.3.1 Genetická analýza PGD

Molekulárně-genetické metody jsou v současnosti schopné odhalit veškeré doposud známé genetické abnormality, avšak rutinní genetické laboratoře se zaměřují na vyšetření těch nejčastěji se vyskytujících.

Vyšetření karyotypu je základním vyšetřením v rámci PGD. Diagnostika se zaměřuje hlavně na vyšetření aneuploidií chromozomů 13, 18, 21, X a Y, ale sledují se i další. Také se často setkáváme s translokacemi zejména mezi 13. a 14. chromozomem, které jsou vyšetřovány metodou FISH (fluorescenční in situ hybridizace). Pro celogenomové a velmi přesné vyšetření se využívá mikročipových metod, hlavně array CGH, která dokáže odhalit i aberace, které metodou FISH nejsou viditelné. [60, 76, 77, 78]

Genetická analýza umožňuje odhalit i řadu monogenních chorob. Mezi nejznámější patří cystická fibróza, u které se vyšetřují mutace v CFTR genu. Do této skupiny se řadí také dědičné predispozice k nádorovým onemocněním, jako jsou BRCA1 a BRCA2 geny. [76, 78]

Tabulka 1 Metody a běžně vyšetřované parametry v preimplantační genetické diagnostice [60, 76, 77, 78, 83]

Vyšetřované parametry	Použité metody
Vyšetření aneuploidií chromozomů 13, 15, 16, 18, 21, 22, X, Y	FISH, aCGH
Mutace v CFTR genu	ICP – MS
Vyšetření chromozomových aberací (translokací) metodou FISH (zejména mezi chromozomy 13. a 14.)	FISH
Vyšetření chromozomových aberací na celogenomové úrovni metodou microarray za účelem analýzy CNVs	aCGH
Vyšetření monogenních chorob – spinální muskulární atrofie, fenylketonurie, Marfanův syndrom, Huntingtonova chorea, syndrom fragilního X, svalová dystrofie, BRCA1 a BRCA2 geny apod.	FISH, aCGH, NGS, Karyomapping

Tabulka 2 Další metody a jejich použitelnost pro vyšetřované parametry v preimplantační genetické diagnostice [84]

	Laboratorní metody a jejich použitelnost			
Vyšetřované parametry	aCGH	SNP array	qPCR	NGS
PGS 24 chromozomů	Ano	Ano	Ano	Ano
Uniparentální dizomie	Ne	Ano	Ano	Ne
Detekce balancovaných familiárních přestaveb	Ne	Ano	Ne	Ne
Haploidie a polyploidie	Limitované	Ano	Ano	Limitované
Segmentální aneuploidie	Ano	Ano	Ne	Ano

2.3.2 Biochemická analýza

V posledních několika letech se vědci zaměřují také na neinvazivní testování embryí v rámci PGD. Genetická analýza nám umožňuje morfologické hodnocení embrya, avšak biochemické testy nám jsou schopny podat ještě další podrobnější informace o jeho kvalitě. [79]

Blastocysty jsou kultivovány několik hodin v médiu, které jim dodává potřebné živiny. Embryo následně sekretuje do tohoto media své metabolity. Na konci kultivace je odebráno malé množství zbytkového kultivačního media tzv. BCM (blastocyst spent culture medium), které je podrobena analýze. [79, 80]

Biochemická analýza se soustřeďuje na detekci biomarkerů, proteomiku (strukturu proteinů, funkci proteinů, enzymy), genomiku (kódující a nekódující geny), metabolomiku (lipidy, aminokyseliny, karbohydráty, nukleotidy) a také na transkriptomiku (mRNA). Všechny tyto testy jsme schopni provést z BCM. Získané výsledky, také označované jako preimplantační metabolický profil, nám podávají informace o budoucím zdravotním stavu jedince v závislosti na vlivu epigenetiky embrya. [79, 80]

3. Biologický materiál

3.1 Rýhování embrya

Rýhování vajíčka je proces, kdy se zygota postupně přeměňuje ve fetus tak, že podstoupí několik po sobě následujících mitotických dělení.

Zygota vstupuje do prvního rýhovacího dělení zhruba po 30 minutách po oplození a dělí se na dvě stejně velké buňky, které se nazývají blastomery. Každá blastomera se začne po určité době dělit, a postupně tak vzniká 4, 8 a 16 blastomer. Buňky se neustále zmenšují a při počtu 12-16 blastomer se buňka označuje jako morula pro svou podobnost s plodem moruše. U tohoto stádia se dají poprvé rozlišit buňky na zevní buňky, uložené na povrchu embrya, a buňky vnitřní, jež jsou těmi zevními obklopeny. Následně vzniká při dalším vývoji z vnitřních buněk embryoblast, který již dává vznik embryu. Zevní buňky jsou zde také důležité, protože se z nich vyvíjí trofoblast, ze kterého se vyvíjejí plodové obaly. Morula se utváří 3. až 4. den po oplození a následně putuje do dělohy, kde se dalším dělením buněk mění ve váček zvaný blastula (blastocysta), která je důležitá právě pro proces IVF. Procesem gastrulace se blastocysta mění v gastrulu, která už je dvojvrstevná. Tyto vrstvy jsou známy pod pojmy ektoderm, vnější zárodečný list, a entoderm, vnitřní zárodečný list. Nakonec se vyvíjí i třetí zárodečný list mezoderm. [17]

3.2 Biopsie embrya

Pro preimplantační genetickou diagnostiku se využívají tři druhy biopsií. Můžeme provést biopsii:

- polárního tělíska
- biopsii ve fázi dělení buňky
- biopsii blastocysty

Nejprve se musí oslabit vnější vrstva oocytu nebo embrya, nejčastěji pomocí laseru. Poté následuje mechanická extrakce buňky. [3]

Vývoj oocytů zahrnuje několik po sobě následujících meiotických dělení, která vedou ke vzniku dvou sad haploidní mateřské DNA z původní mateřské buňky. Tyto sady se nazývají pólová tělíska. Testování pólových tělísek se provádí před oplodněním oocytu. Přestože je tento typ biopsie řadou vědců odsuzován, protože se pomocí ní dá testovat pouze genetická výbava

matky, má velké využití v zemích, kde jsou značná omezení ohledně biopsie embrya (Německo, Itálie atd.). [3]

Po oplodnění se embryo dělí a zhruba 3. den je tvořeno 6–8 buňkami, jedna tato buňka se odstraní a využívá se pro biopsii, tzv. biopsie ve fázi dělení buňky. V současnosti se jedná o nejpoužívanější druh biopsie. [3]

Biopsie ve stádiu blastocysty se provádí 5. den po oplození, kdy se odebírají buňky z trofoektodermu. Podle současných studií se jedná o biopsii, která poskytuje nejlepší výsledky, a je velmi pravděpodobné, že v budoucnosti bude nejpoužívanější metodou, a nahradí tak biopsii prováděnou ve fázi dělení buňky. [3]

Embrya získaná pomocí biopsie jsou následně kultivována in vitro a buňka získaná biopsií je analyzována nejčastěji pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) nebo pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH), kdy se zaměřujeme na alely, které mohou být zodpovědné za nějaké genetické onemocnění. [1]

4. Metody používané v rámci PGD a PGS

V současnosti se pro preimplantační genetickou diagnostiku a preimplantační genetický screening využívají molekulárně-genetické metody, které jsou schopny odhalit veškerá dosud známá genetická onemocnění.

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je jednou z nejznámějších metod využívajících se v PGD a slouží k amplifikaci DNA. Běžně se také setkáváme s fluorescenční in situ hybridizací (FISH), která je schopna identifikovat a lokalizovat chromozomální aberace.

V posledních několika letech se dostává do popředí také komparativní genomová hybridizace (CGH) anebo také mikročipové metody array komparativní genomová hybridizace (aCGH) nebo SNP array. Karyomapping je další metodou využívající mikročipy a využívá se především k odhalení monogenních chorob.

Sekvenování nové generace (NGS) představuje budoucnost pro preimplantační genetickou diagnostiku. Metody NGS se vyznačují schopností analyzovat celý lidský genom s vysokou přesností a nízkou chybovostí za velmi krátký čas. Postupně se tak setkáváme s těmito technologiemi stále častěji, a nalzáme je tak i v klasických rutinních cytogenetických laboratořích.

Tabulka 3 Metody využívané v PGD a jejich vyšetřované parametry

Metody	Sledované parametry
FISH	chromozomální aberace (identifikace a lokalizace)
PCR	přítomnost specifické sekvence (spec. genu)
CGH	copy number variation (CNV)
aCGH	copy number variation (CNV)
SNP array	polymorfismy s jednobodovou mutací
Karyomapping	informativní lokus pro každý ze čtyř rodičovských haplotypů napříč každým chromozomem
NGS	jednotlivé sekvence DNA

4.1 Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Pomocí této molekulárně genetické metody jsme schopni lokalizovat a identifikovat specifické úseky DNA nebo také jejich absenci na chromozomech. Dají se pomocí ní odhalit různé nádorové mutace, vývojové poruchy nebo syndromy. [18, 19]

Principem FISH je použití jednovláknové DNA fluorescenčně značené sondy (DNA nesoucí na sobě barvivo), která se hybridizuje (váže) na DNA přítomnou ve vzorku. Celý proces probíhá při teplotě 72-75 °C, kdy dochází k denaturaci (rozvolnění) vláken DNA sondy, ale i vzorku. Po ochlazení na cca 37 °C se sonda specificky naváže do místa, které vyšetřujeme – hybridizace. Sonda se váže na DNA s komplementární sekvencí. Díky tomu, že je sonda fluorescenčně značená, získáváme na konci barevný signál. [18, 19]

Pro svou velkou citlivost se pro FISH nejvíce používají sondy, které jsou značeny biotinem (neboli vitamin H) nebo digoxigeninem. Sondy jsou po hybridizaci detekovány komplexem avidinu s příslušným fluoroforem (fluorescein, Texas Red, rhodamin atd.). Celý chromozom se při pozorování prosvěcuje jeho obarvením pomocí barviva DAPI nebo propidiumjodidem. V závislosti na použitém barvivu jsou poté chromozomy obarveny modře nebo červeně. [50]

Podle místa na chromozomu, které vyšetřujeme, resp. do kterého se váže sonda, jsme schopni rozlišit čtyři typy DNA sond:

- **Centromerické sondy** jsou schopny se vázat na střední část chromozomu, která se nazývá centromera a využívá se zejména pro diagnostiku početních chromozomálních změn, detekci chromozomů neznámého původu.
- **Lokus specifické sondy**, u kterých dochází k vazbě na konkrétní místo genu, tzv. lokus, a slouží například k vyšetření mikroleceí (chybění malých částí chromozomů).
- **Subtelomerické sondy** se váží na telomery neboli koncové části chromozomů.
- **Sondy celochromozomové** (tzv. celomalovací sondy), které hybridizují s mnohačetnými chromozomovými sekvencemi a dojde tak k nabarvení celého chromozomu. Tato sonda slouží k analýze translokací, k detekci původu marker chromozomů (malých nadpočetných chromozomů, u kterých neznáme původ) nebo k vyšetření chromozomálních přestaveb. [20]

V rámci PGD vyšetření se vyšetřují především chromozomy 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X a Y. Právě tyto chromozomy jsou ve většině případů zodpovědné za vznik genetických

poruch již v prenatálním vývoji plodu. Trizomie chromozomu číslo 13 způsobuje vznik Patauova syndromu, aneuploidie chromozomu 15 – Marfanův syndrom nebo také Tay-Sachsovu chorobu, trizomie chromozomu 16 je neslučitelná se životem plodu, duplikace chromozomu 17 – Charcot-Marie-Tooth syndrom. Nejčastěji se však setkáváme s abnormalitami chromozomu 18, resp. s jeho trizomií, která je zodpovědná za vznik Edwardsova syndromu, dále s trizomií chromozomu 21 – Downův syndrom, s trizomií 22 chromozomu – ta způsobuje náchylnost k různým chorobám (leukémie, autismus), monozomie chromozomu X – Turnerův syndrom, XXY – Klinefelterův syndrom a jiné. [20, 21]

Nevýhodou této metody je její časová náročnost a pracnost, protože se sondy připravují přímo na míru, i když existují komerčně dostupné sondy nebo kity, které zjednodušují celou rutinní analýzu. V preimplantační genetické diagnostice můžeme například využít komerčně vyráběné chromozomové CABRTM sondy. [47]

V současnosti se v klinické praxi můžeme setkat nejčastěji s metodou SKY (spektrální karyotypování) a mnohobarevnou FISH (buď jako mFISH nebo mBAND), kde je každá ze sond opatřena kombinací fluoroforů umožňující získat pro každý lokus, který studujeme, specifická emisní spektra. U SKY se detekce fluorescence provádí pro všechny sondy současně pomocí tzv. interferometru. Na konci tak získáváme obraz chromozomů, kde je každý obarven specifickou barvou. Mezi dalšími významnými metodami používanými v PGD jsou metody komparativní genomové hybridizace, např. CGH a aCGH, které budou zmíněny na následujících několika stránkách. [50]

I přes široké využití metody FISH dochází postupně k jejímu nahrazování jinými metodami umožňujícími celogenomovou analýzu, např. metoda komparativní genomové hybridizace (CGH), jež z FISH vychází, nebo také array CGH, která se vyznačuje svou vysokou citlivostí, a tedy schopností detekovat i jednonukleotidové polymorfismy (SNP). [22, 52]

4.1.1 Vyhodnocení signálu hybridizace

Po skončení hybridizace získáváme její výsledek, a to pomocí počítačové analýzy s pomocí fluorescenční mikroskopie. Vyhodnotí se poměry intenzit fluorescence obou vzorků DNA a pro každý chromozom je zhotoven CGH profil ve formě křivky. Pokud převažuje červená fluorescence (křivka posunuta blíže k červené fluorescenci) došlo ke ztrátě DNA sekvencí. Naopak převažuje-li zelená fluorescence, došlo k zisku DNA sekvencí. Posledním

případem je, že vzorek neobsahuje žádné změny a všechny chromozomy jsou jednotně zbarveny. [24, 49]



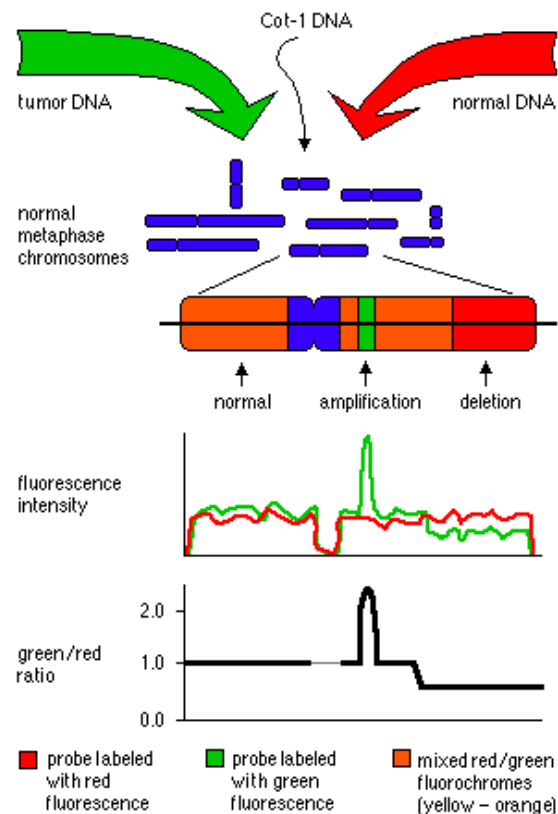
Obrázek 1 Způsob zpracování vzorku pomocí metody FISH. [48]

4.2 Komparativní genomová hybridizace (CGH)

Komparativní genomová hybridizace (CGH) je molekulárně cytogenetická metoda, která umožňuje detekci změn počtu chromozomálních kopií, tzv. copy number variation (CNV), a to bez toho, aniž bychom buňky museli kultivovat, to můžeme bezesporu považovat za její velkou výhodu. Umožňuje nám získat přehled o chromozomálních ztrátách nebo jejich zisku (delece, duplikace, amplifikace DNA atd.) v analyzovaném genomu vzorku. Tato technika nám umožňuje analyzovat celý genom v rámci jednoho vyšetření. Nejčastěji se s CHG setkáváme v onkologii, kdy se snažíme zjistit vznik a vývoj jednotlivých nádorových onemocnění. [23, 24]

Principem této metody je komparativní nebo také poměrná hybridizace dvou odlišně značených genomových DNA, jež mají normální metafázové chromozomy. K analýze se využívá genomové DNA vzorku a referenční DNA, jež jsou značené odlišnými fluorochromy (nejčastěji červeným a zeleným). Metoda provádí porovnání mezi těmito dvěma vzorky, avšak dá se porovnávat i vzorků více. Referenční vzorek může být přítomen také v tzv. knihovně přístroje, a není tak nutné pro každou analýzu vytvářet nový. Oba vzorky DNA jsou použity jako sondy. DNA, jež byla odebrána z embrya, se značí fluorochromem Spectrum Green-dUTP a kontrolní DNA fluorochromem Spectrum Red-dUTP. Tyto sondy jsou poté hybridizovány společně s metafázními chromozomy. Metoda tedy vychází z metody FISH, která byla popsána výše. Po skončení hybridizace se musí změřit intenzity obou fluorescence podél každého chromozomu. Poměr intenzit červené a zelené fluorescence nám poté určuje

relativní poměr počtu kopií ve vyšetřovaném genomu. Již bylo zmíněno, že jedna z genomových DNA je vždy normální, označená také jako referenční, tedy poměr přímo mapuje změny počtu kopií v testovaném genomu. Neměří se zde změna počtu chromozomů, ale tzv. copy number variation (CNV), tedy změna míry exprese genu. [24, 49]



Obrázek 2 Princip metody CGH prezentovaný na porovnání zdravé (červeně) a tumorové buňky (zeleně). [53]

Stejně jako většina metod i CGH má omezené rozlišovací schopnosti, kdy dovoluje určit nebalancované změny na chromozomech, které se pohybují od 3 megabází (Mb) pro ztrátu genetického materiálu a 7-10 Mb naopak pro určení přítomnosti nadbytečného genetického materiálu. Jsme schopni zvýšit citlivost této metody, čehož se využívá pro analýzu celého nádorového genomu, a metoda se pak označuje jako array komparativní genomová hybridizace (array CGH, aCGH). [24]

CGH microarray (DNA čip) se využívá nejčastěji ve smyslu komparativní genomová hybridizace, která provádí porovnání – komparaci – mezi dvěma nebo i více vzorky (nejčastěji referenčním, který ale může být přítomen „v knihovně“ přístroje). Neměří se změna počtu

chromozómů, ale tzv. copy number variation, což je změna míry exprese nějakého genu. Proto se měří mRNA.

DNA čipy lze využít samozřejmě i pro detekci sekvenčních změn (SNP, In/Dely). Pro všechny tyto aplikace jsou dostupné komerční čipy. Případně je možnost si nechat udělat i čip vlastní.

4.3 Mikročipové metody

4.3.1 Array komparativní genomová hybridizace (aCGH)

Metoda array komparativní genomová hybridizace (mikročip, array CGH, aCGH, DNA čip) vychází z předchozí CGH metody. V metodě CGH byl nahrazen cíl hybridizace – metafázové chromozomy za microarray neboli čip. V podstatě se jedná o sklíčko, na kterém jsou nanášeny malé segmenty DNA určené k hybridizaci. Tato změna umožnila zvýšit citlivost metody CGH z 10 Mb na 75-130 kilobází (kb). Oproti metodě CGH nám její vylepšená verze aCGH poskytuje větší rozlišení a s tím související přesnější výsledky. Array CGH se využívá pro detekci CNV, tzv. copy number variation. CNV je část DNA o velikosti 1 kb (kilobáze) nebo větší, která se nachází ve variabilním počtu kopií u jednoho jedince, a může tak způsobovat strukturní změny v jeho genomu. Tyto změny vedou ke vzniku mutací – delecí, inzercí nebo duplikací a tím dochází k rozvoji některých genetických onemocnění. [24, 54]

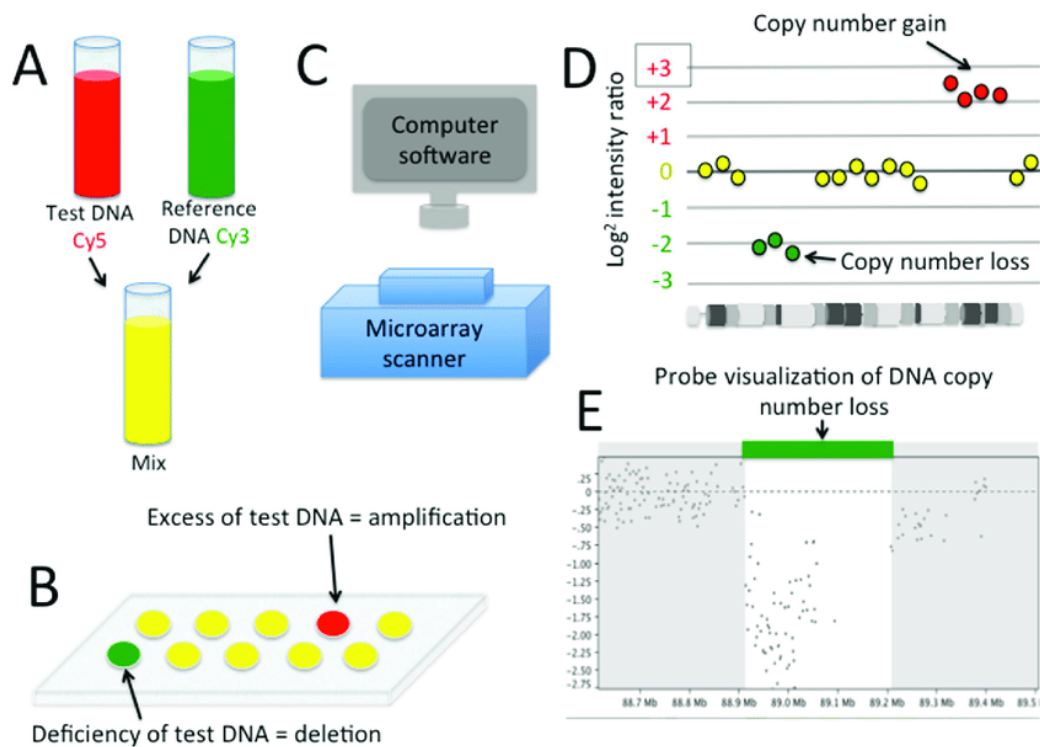
Nejvíce používaný čip v array CGH může být připraven z mapovaných BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) a dalších genomových klonů nebo také z fragmentů umístěných na hybridizačním skle komplementární DNA genů (cDNA) či z oligonukleotidů. Jednotlivé čipy se liší např. v rozlišovacích schopnostech nebo v množství potřebné DNA. [24]

Opět je základním principem hybridizace. Oba vzorky normální i genomové DNA jsou pomocí metody PCR označeny rozdílnými fluorochromy (nejčastěji červeným a zeleným). Takto značené vzorky DNA hybridizují s čipem, který obsahuje fragmenty genomové DNA vybraných genů. Po skončení hybridizace získáváme její výsledek, k tomu se používá speciální přístroj, který umožňuje měření intenzity fluorescence hybridizované normální a genomové DNA. Zjišťuje se rozdíl v poměru intenzity červené a zelené fluorescence, který určuje nebalancované změny v analyzovaném genomu. Signál normální i genomové DNA by měl být totožný (hodnoty by se měly držet okolo 0), pokud se u pacienta nenachází žádné abnormality. V případě patologického vzorku hodnoty vychýlí od 0. Pro vyhodnocení výsledků se používají speciální zabudované programy nebo jiné softwarové nástroje. [24]

Zavedení aCGH pro klinické využití pomohlo zvýšit počet diagnostikovaných abnormalit v rámci preimplantační genetické diagnostiky. V současnosti se array CGH považuje za první genetickou metodu používanou pro prenatalní diagnostiku mentálních postižení nebo neurovývojových poruch. I přestože se jedná o velice moderní metodu, nedají se pomocí ní detekovat balancované strukturní aberace – inverze. Metoda také neumožňuje detekovat nové sekvenční variace, protože k provedení testu nemáme o těchto variacích žádné podrobnější informace. Array CGH nedokáže také detekovat nízkofrekvenční chromozomální mozaiku (<10 % - 20 %). Avšak nespornou výhodou této metody je, že k analýze není potřeba buňky kultivovat. To celou analýzu zkracuje, ale také je možné odhalit mozaiku, která by v kultivovaných buňkách nemusela být viditelná z důvodu růstu běžné buněčné linie. [45, 52]

Metoda aCGH se v současné době dá také využívat pro detekci genetických onemocnění, která se začala projevovat až v dospělosti jedince (např. mutace BRCA nebo Charcot-Marie-Tooth onemocnění). Detekce onemocnění v pozdějším věku pacienta představuje i velké riziko výskytu tohoto onemocnění u jeho dětí. Je nutné pacienta informovat o této skutečnosti a nechat podrobit molekulárně-genetickému vyšetření i jeho potomky, případně provést tato vyšetření i později u budoucího plodu pacienta. [45]

Přestože se jedná o metodu poměrně drahou, na rozdíl například od karyotypizace, je považována za nejefektivnější metodu používanou v rámci preimplantační genetické diagnostiky, která umožňuje odhalovat anomálie plodu viditelné již ultrazvukem. Metoda aCGH je již také indikována u všech gravidních žen s pozitivním screeningem. Diskutuje se také o tom, že v budoucnosti bude karyotypizace nahrazena právě aCGH. [45]



Obrázek 3 Princip metody aCGH. **A** – Vzorke testované a referenční DNA jsou označeny odlišnými fluorochromy a následně smíchány v poměru 1:1. **B** – Směs testované a referenční DNA se aplikuje na čip, kde dochází k hybridizaci. **C** – Detekce intenzity signálu pomocí speciálních softwarových nástrojů. **D** – CGH profil, závislost intenzity fluorescence jednotlivých sond, kde se zjišťuje poměr intenzity červené a zelené fluorescence. **E** – Příklad sondy, kde došlo k úbytku počtu kopií v testovaném vzorku. [51]

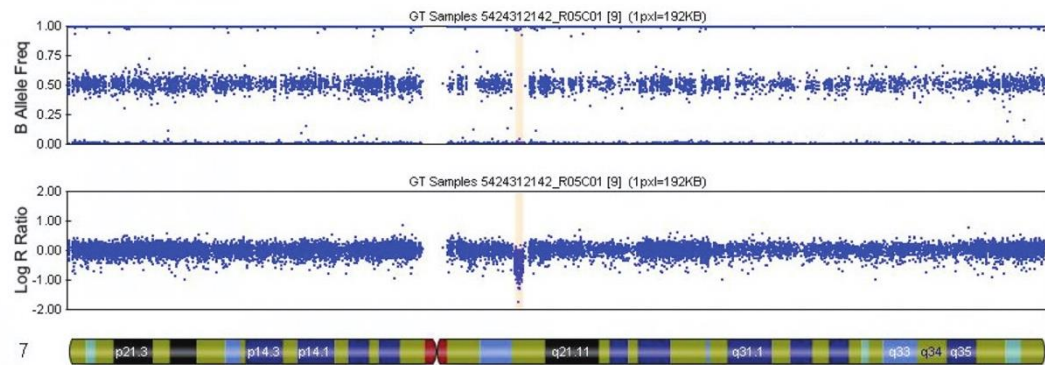
4.3.2 SNP čipy (jednonukleotidové polymorfismy)

Metody SNP array nebo také SNP čipy (single nucleotide polymorphism) se využívá k diagnostice polymorfismů s jednobodovou mutací. Pomáhá nám v karyotypu odhalit nedetekovatelné submikroskopické změny, jako jsou mikrolece a mikroduplikace, které mohou mít úzkou souvislost s patologickým ultrazvukovým nálezem. [26]

Stejně jako array CGH (komparativní genomové hybridizace) se dá SNP array použít pro screening celého genomu, kdy detekuje nebalancované chromozomální abnormality. Uvádí se, že SNP array má až 1000krát vyšší rozlišovací schopnosti než klasický karyotyp. Základním vyšetřovacím principem SNP array je využití statisticky vybraných konkrétních SNP polymorfismů mezi dvěma alelami, které se vyskytují v genomu každého jedince. Jinými slovy SNP jsou také místa v genomu charakterizována substitucí jednoho nukleotidu za nukleotid jiný, například nukleotid A může být nahrazen nukleotidem T, C nebo G. Pokud tato variace přesáhne 1 % v populaci, je považována za SNP. V opačném případě, tedy nepřekročí-li 1 %

v populaci, je tato variace považována pouze za ojedinělou mutaci. Většina lidských monogenních onemocnění má původ právě v SNP. V diploidních buňkách můžeme rozeznat až tři možné genotypy pro konkrétní SNP, a to homozygotní (AA, BB) nebo heterozygotní (AB).

U heterozygotního jedince se tedy na každém chromozomu (člověk je diploidní) vyskytuje jiná alela (A nebo B). [25, 26]



Obrázek 4 Výsledek vyšetření metodou SNP array – mikrolece na chromozomu 7 (případ č. 9, tab. 4). Mikrolece 7q11.23 (okrový blok) o velikosti 1.4 Mb u plodu se závažnou srdeční vadou a vývojovou asymetrií. Mikrolece překrývá oblast pro Williamsův-Beurenův syndrom. [26]

Negativem této metody je určitá časová náročnost. Standardní doba vyšetření byla přibližně 7 dnů. U fetálních buněk, které je třeba kultivovat, se doba vyšetření prodloužila o 15–20 dnů. Vyšetření SNP se také neprovádí každý den z kapacitních a ekonomických důvodů. Dalším a také hlavním úskalím při použití této metody v prenatalní diagnostice je omezená možnost korelovat nalezenou mikrolececi nebo mikroduplikaci s fenotypem. SNP array byla dříve používána jen pro postnatální diagnostiku, k jejímu rozšíření na prenatalní diagnostiku došlo až později. V rámci postnatální diagnostiky se metoda využívá k vyšetření psychomotorické retardace nebo stigmatizace. I v dnešní době je tato metoda první volbou pro postnatální diagnostiku a v prenatalní diagnostice slouží spíše jako doplňková a doporučuje se výsledky získané SNP ještě ověřit pomocí jiné metody, například FISH nebo aCGH. [26]

Naopak SNP array je velkým přínosem pro prenatalní diagnostiku při upřesňování rozsahu či závažnosti aberací vzniklých de novo. Velmi využívána je v případech, kdy je v karyotypu plodu nalezen de novo marker chromozom, tzv. nadpočetný. Jsme schopni rozlišit marker chromozom podle toho, zda obsahuje kódující DNA úsek, nebo naopak

heterochromatinový nekódující materiál, který nezpůsobuje klinické příznaky u plodu. SNP nám tak umožňuje jednoduše selektovat embrya, která nezdědila postižený chromozom. [26, 82]

Tabulka 4 Srovnání diagnostických možností metod využívaných v prenatalní diagnostice [26]

Metoda	ANO	NE
Karyotyp	aneuploidie, polyploidie	mikrodelece
	balancované přestavby (>5 Mb)	mikroduplikace
	nebalancované přestavby (>5 Mb)	intrachromozomální amplifikace
	mozaiky	uniparentální disomie (UPD)
FISH	aneuploidie, polyploidie	uniparentální disomie (UPD)
	cíleně balancované přestavby	
	cíleně nebalancované přestavby	
	mozaiky	
	cíleně některé mikrodelece	
	intrachromozomální amplifikace	
SNP array	aneuploidie	balancované přestavby
	mikrodelece	malé chromozomální mozaiky
	mikroduplikace	polyploidie
	mozaiky (>10 %)	
	intrachromozomální amplifikace	
	uniparentální dizomie (UPD)	

Metoda SNP nám pomáhá objasnit příčinu závažných ultrazvukových nálezů a také nám pomáhá určit osud gravidity, pokud ostatní vyšetření vykazují normální výsledky. [26]

4.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Jednou z nejpoužívanějších a nejnámějších molekulárních metod, která se v rámci PGD, ale i obecně jakékoliv genetické diagnostiky používá, je polymerázová řetězová reakce (PCR). Metoda byla vyvinuta již v 80. letech minulého století a od té doby došlo k jejímu velkému rozvoji a samozřejmě i k modernizaci. [27]

Polymerázová řetězová reakce využívá schopnosti DNA polymerázy syntetizovat nové vlákno DNA, které bude komplementární k (nabízenému) přítomnému templátovému vláknu. DNA polymeráza je schopna přidávat nukleotidy pouze na 3' konec (3'-OH skupinu) vznikajícího řetězce a ten se prodlužuje jen ve směru 5' - 3'. K syntéze je nezbytně potřebný tzv. primer, krátký oligonukleotid, který je díky komplementaritě přisedlý k templátovému řetězci a jehož správným návrhem omezujeme výslednou amplifikovanou sekvenci. Následně je DNA polymeráza již schopna přiřadit první nukleotid (dNTP) dle principu komplementarity. Takto je možno vymezit specifickou oblast templátové DNA, kterou chceme amplifikovat (namnožit). Výsledkem bude několikrát namnožená tato specifická sekvence DNA, kdy získáme až miliardy kopií (tzv. amplikonů). [27, 28]

Reakční směs obsahuje templátovou DNA, která byla izolována ze vzorku. Dále synteticky připravené primery, každý komplementární k jednomu řetězci DNA. Směs nukleotidů dNTP, tzv. deoxyribonukleosidtrifosfáty. Poslední složkou je DNA polymeráza, enzym, který katalyzuje syntézu DNA. [28, 29]

Samotný průběh PCR trvá několik minut a začíná napipetováním reakční směsi do malé PCR zkumavky, která se poté vloží do termocycleru, ve kterém probíhají teplotní cykly. Každý cyklus má tři fáze – denaturace, nasednutí primerů (tzv. annealing) a prodlužování řetězce DNA. Tyto kroky se liší teplotou, při které probíhají. Cyklus se typicky opakuje 25 - 40x za sebou a do reakce se zařazuje ještě počáteční denaturace a také závěrečná polymerační reakce. [29]

Počáteční denaturace DNA neboli separace řetězců DNA může probíhat např. při 94 °C po dobu 2-5 minut. Prvním opakujícím se krokem je již zmíněná denaturace, kdy dochází k rozvolnění řetězců DNA vlivem vysoké teploty (94-95 °C) po dobu 20-45 sekund. Druhý krok se označuje jako annealing. Při něm dochází k nasedání primerů na vlákno DNA podle

principu komplementarity dusíkatých bází, tento krok probíhá už při nižší teplotě, zhruba při 50-60 °C, po dobu 30-90 sekund. Posledním krokem je extension, polymerační reakce, kdy se syntetizuje komplementární řetězec DNA. DNA polymeráza nasedne na primery, a připojuje tak volné nukleotidy (dNTP) k vlákně DNA, opět podle principu komplementarity dusíkatých bází. Tato reakce probíhá při 72 °C po dobu 45-90 sekund. Závěrečná polymerační reakce je posledním krokem celé metody, dochází k dosyntetizování řetězců opět při teplotě 72 °C po dobu přibližně 5 minut. [29]

Výsledný amplifikovaný úsek DNA lze dále analyzovat. Pro stanovení velikosti produktu můžeme použít gelovou elektroforézu, ke stanovení sekvence DNA použijeme sekvenování nebo se dá použít i metoda FISH. [29]

Existuje několik variant metody PCR, zejména DOP-PCR (Degenerate oligonucleotide-primed PCR) neboli PCR s degenerovanými oligonukleotidovými primery. U DOP-PCR se ze začátku primery připojují při nižší teplotě než u běžné PCR metody, ale další nasedají již při vyšší teplotě. Touto metodou se dají amplifikovat rozdílně dlouhé fragmenty DNA, bohužel problémem této metody je, že nemůže být pokryt celý genom a má také omezenou účinnost amplifikace, což není pro další analýzu produktu příliš příznivé.

Za vylepšenou modifikaci metody PCR se dá považovat I-PEP-PCR (Improved Primer Extension Pre-amplification PCR). Pro tuto modifikaci se používá koktejl DNA polymeráz (včetně tzv. proofreading polymerázy, která poskytuje opravnou 3'-5' exonukleázovou aktivitu, k chybně začleněným nukleotidům, které zpomalují postup Taq DNA polymerázy). Výsledkem je mnohem účinnější amplifikace se zvýšenou přesností. [30, 31]

Nespornou výhodou metody PCR je, že vyžaduje minimální množství DNA. Teoreticky stačí pouze 1 molekula (v praxi samozřejmě více), ze které jsme schopni získat 2^n kopií DNA, kde n je počet cyklů. Tedy při 30 cyklech jsme schopni získat více než 10^9 kopií. Další výhodou bude jistě i menší časová i finanční náročnost oproti jiným metodám. [29]

Průběh reakce lze sledovat i on-line, kdy se metoda nazývá real-time PCR nebo také qPCR (kvantitativní PCR), kdy vznikající produkt je monitorován po každém cyklu. Metoda umožňuje nejen kvantifikaci templátové DNA, ale také tzv. genotypizaci – např. detekci SNP nebo in/del mutací, kdy v jedné reakci lze detekovat i více cílových sekvencí najednou (tzv. multiplexní PCR).

4.5 Karyomapping

Karyomapping je cytogenetická metoda, která využívá SNP čipů (Single Nucleotid Polymorfism), které v této práci byly již zmíněny, Mendelovské dědičnosti SNP genotypů rodičů a potomka či jiného blízkého rodinného příslušníka, kdy je schopna identifikovat informativní lokus pro každý ze čtyř rodičovských haplotypů napříč každým chromozomem a následně zmapovat dědičnost těchto haplotypů a jejich pozici všech crossing-overů u testovaného jedince. Metoda tedy umožňuje nepřímou diagnostiku z jedné buňky pomocí vazebné analýzy na všech chromozomech současně. Výsledkem je tzv. karyomapa, která se oproti karyotypu vyznačuje tím, že je schopna určit původ každého úseku chromozomu, který je unikátní pro každého jedince a je definovaný nezávislou segregací rodičovských chromozomů. [32, 33]

První, kdo tuto metodu využil, byl v roce 2009 profesor Alan H. Handyside, jeden z nejvýznamnějších průkopníků PGD. Pomocí této metody se zaměřil hlavně na diagnostiku monogenních onemocnění, na mutaci alel transmembránového receptoru pro cystickou fibrózu (CFTR). Cystická fibróza je autozomálně recesivní, velice závažné a život ohrožující onemocnění dýchacích cest, a tudíž použití karyomappingu pro diagnostiku tohoto onemocnění je považováno za jeden z největších objevů v rámci preimplantační genetické diagnostiky. Karyomapping se stal velmi využívanou metodou, protože pro diagnostiku potřebujeme menší počet embryí oproti jiným metodám a také se pomocí ní podařilo zvýšit efektivitu IVF z původních 50 %, které odpovídají původním metodám, na cca 69 % ET (embryotransfer). [32, 33]

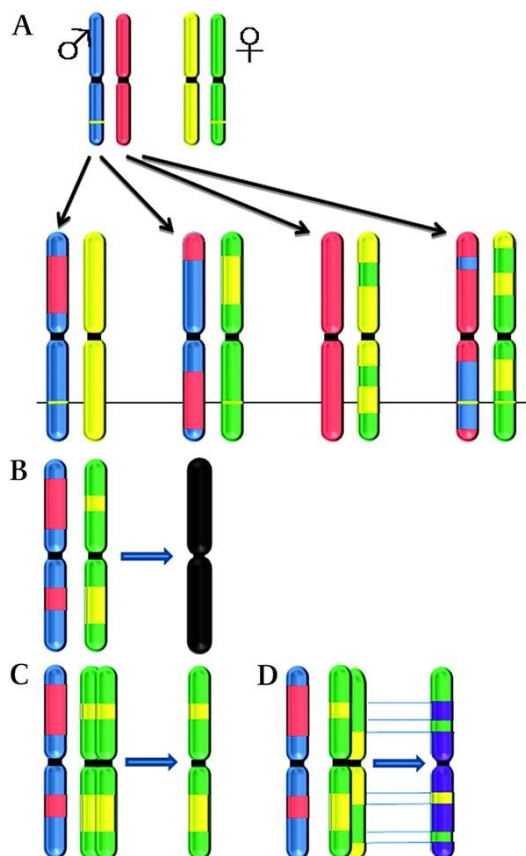
Pro analýzu pomocí karyomappingu je potřebný předchozí odběr trofektodermu, celogenomová amplifikace metodou MDA (Multiple Displacement Amplification) a následná hybridizace na SNP čípech obsahující 12 pozic, a to až 300 000 SNP markerů, kde se každý SNP čip nachází až 19x (pomocí SNP bead array nebo také HumanCytoSNP-12; Illumina, San Diego, CA). Data získaná z čipů jsou poté importována do speciálního softwaru pro karyomapping (BlueFuse Multi, Version 4.0; Illumina), ve kterém získáme výslednou „karyomapu“. Důležité je zde použití referenčního vzorku od rodinného příslušníka. Využívá se DNA obou rodičů nebo DNA od postiženého člena rodiny. [32, 33, 34]

Pro posouzení kvality vzorku se používá tzv. hodnota call rate, která se rovná počtu SNP, které jsou příjemcem AA, AB nebo BB genotypu, děleno celkovým počtem SNP na čipu. S vzorky s genomickou DNA bývá obvykle call rate >98 %. S produkty MDA z jednotlivých

blastomer a z více buněk trofoektodermu bývá call rate výrazně nižší, a to okolo 75-95 %. Vzorke, které mají call rate <60 % indikují poruchu amplifikace a z dalších analýz se vyřazují. Někdy se můžeme setkat i s termínem miss call, který nás informuje o kontaminaci vzorku cizí DNA. [35, 36]

Analýza pomocí karyomappingu podle Handysida et al. probíhá v následujících pěti krocích:

1. Genotypové kombinace pro každý lokus SNP rodičů se analyzují, aby mohl být identifikován informativní lokus.
 2. Jako vzor se zvolí genotyp potomka se známou vrozenou chorobou a následně se tím definují přesné pozice všech crossing-overů na 4 haplotypech obou rodičů.
 3. Genotypy všech sourozeneckých embryí se porovnají s genotypem vzoru v informativních heterozygotních lokusech.
 4. Ve sloupcích dojde k zobrazení kódované karyomapy každé otcovské i mateřské kopie chromozomového páru.
 5. Posledním krokem je porovnání pozic crossing-overů na všech chromozomových párech a následně jsou upraveny podle crossing-overů vzoru.
- [33]



Obrázek 5 Dědičnost monogenních onemocnění.

A – Horní řada zobrazuje dva páry rodičovských chromozomů; dolní řada – karyomapa čtyř potomků, na které je vyobrazena dědičnost monogenního defektu.

B – Monozomie je detekována absencí obou haplotypů z jednoho rodiče.

C – Trizomie, jež způsobená duplikací jednoho chromozomu nebo mitotickou poruchou disjunkce je samotným karyomappingem neodhalitelná.

D – Trizomie ze dvou rozdílných produktů meiózy. [33]

Karyomapping je univerzální metodou pro diagnostiku genetických chorob, a může tak teoreticky detekovat veškeré známé dědičné mutace. V minulosti se podařilo díky této metodě již detekovat řadu převážně monogenních chorob. S prvním využitím této metody přišel profesor Handyside et al. k detekci mutace pro cystickou fibrózu. Mezi další významné příklady můžeme zařadit výzkum Dr. Natesana et al., kteří se zaměřili na detekci mutace pro Praderův-Wiliho, Angelmanův a Smithův-Lemliův-Opitzův syndrom. Vědci se zabývali dále i neméně důležitými chorobami jako je Huntingtonova chorea, beta-talasemie, Duchennova muskulární dystrofie, myotonická dystrofie typu 1, Gaucherova choroba a také zohlednili Peutzův-Jeghersův syndrom nebo také Crieglerův-Najjarův syndrom. A v neposlední řadě se věnovali i detekci genetických predispozic rakoviny, konkrétně BRCA1 a BRCA2. Také uveřejnili článek, který navazuje na tuto práci a věnuje se detekci Marfanova syndromu pomocí karyomappingu. [34, 37]

V současné době je karyomapping jednou z nejpoužívanějších metod v rámci preimplantační genetické diagnostiky. Nejen, že pro diagnostiku potřebujeme méně embryí než pro některé jiné metody, ale jedná se hlavně o vysoce spolehlivou metodu, pomocí níž se dá

detekovat řada genetických onemocnění. S postupem času přibývá množství onemocnění, na jejichž detekci karyomapping můžeme využít.

4.6 NGS (Next Generation Sequencing)

Sekvenování nové generace (NGS) je považováno za revoluční metodu v oblasti výzkumu genomu. Na rozdíl od jiných metod používaných v rámci preimplantačního genetického testování umožňuje NGS přímou DNA diagnostiku. Jednou z velkých výhod NGS je, že je stejně jako karyomapping schopna analyzovat všechny chromozomy najednou. Pomocí NGS lze sekvenovat lidský genom ve velmi krátké době. V průběhu jednoho dne lze provést analýzu většiny důležitých oblastí genomu (téměř celou kódující oblast), což u předchozí metody sekvenování tzv. Sangerovy sekvenační technologie, nebylo možné. Nicméně analýza vzniklých dat je časově velmi náročná, což metodu samozřejmě prodlužuje. I přesto je možné získat data v řádech dnů, což je nesrovnatelné s klasickým Sangerovým sekvenováním. [32, 38, 39]

NGS se začala komerčně využívat v roce 2005 a její původní název byl „massive-parallel sequencing“, protože umožňovala sekvenování více řetězců DNA současně oproti Sangerově sekvenování. Přestože je NGS v dnešní době velmi využívanou metodou, tak i Sangerovo sekvenování má zde nezastupitelnou úlohu, protože Sangerovo sekvenování je považováno za tzv. zlatý standard, kvůli své přesnosti. Obě metody se využívají pro genetickou analýzu genomu, avšak Sangerovo sekvenování je považováno za nejlepší metodu pro analýzu malého počtu vzorků a konkrétní sekvence nebo malého množství sekvencí, neboť jedna analýza trvá několik hodin, nicméně moderní sekvenátory dokážou analyzovat stovky sekvencí naráz. Dále se pomocí Sangerova sekvenování ověřují výsledky NGS. [40]

Existuje několik platform NGS, které se odlišují nejen použitím jiného typu sekvenátoru, ale i využitím různých technik ke zjištění pořadí nukleotidů. Jejich společným znakem je masivní paralelní sekvenování miliónů malých fragmentů DNA. Spojování těchto jednotlivých malých fragmentů je umožněno mapováním lidského genomu pomocí bioinformatické analýzy. Každá ze tří miliard bází v lidském genomu je sekvenována vícekrát a díky tomu je umožněno dosáhnout velmi přesných výsledků a přehlednějšího hledání nečekaných variací v DNA. NGS lze použít k sekvenování celých genomů různých organismů nebo pouze některých částí. [32, 39]

NGS a karyomapping mohou detekovat monogenní i chromozomové onemocnění současně. Karyomapping je však metodou nepřímou oproti NGS. Zatímco NGS je schopno

detekovat mitochondriální a de novo mutace, karyomapping se soustřeďuje na odhalování balancovaných translokací a zjišťování původu vyšetřené mutace. [32, 41, 42]

Podle některých dostupných studií, které srovnávají výsledky metod aCGH a NGS, jsou výsledky získané metodou NGS shodné s těmi získanými vyšetřením metodou aCGH. Dále studie ukazují, že NGS je vhodnou metodou pro rutinní preimplantační genetické testování, protože výsledky jsou velmi přesné a analýza velmi rychlá (v závislosti na rozsahu analyzovaných sekvencí). [32, 43]

Metoda NGS má řadu výhod, které již byly zmíněny výše, avšak nacházíme jich mnohem více. Na rozdíl od metod microarray u NGS není primárně vyžadována znalost genomu nebo jeho znaků (avšak pro celkové vyšetření pacienta tyto znaky znát musíme, abychom mohli správně určit genetické abnormality, jinak bychom lokalizovali pouze mutace, o kterých nemáme další potřebné informace k jejich detekci). Metodou NGS lze tedy provádět i sekvenování *de novo*. Pro analýzu microarray je znalost referenční sekvence nutná.

NGS umožňuje rozlišit jednonukleotidové polymorfismy, různé varianty alel nebo alternativně spojené transkripty. Setkáváme se také s dynamičtějším rozsahem signálu a vyšší reprodukovatelností. V neposlední řadě metody NGS dokážou pracovat i s malým množstvím vstupního materiálu, a to je u PGD celkem zásadní, protože jsme většinou nuceni pracovat pouze s 1-2 buňkami a vyšetření není možné zopakovat. Naopak pro metody zmíněné výše, je malé množství vstupního materiálu velkým úskalím. [44]

Naopak hlavní nevýhodou NGS jsou počáteční pořizovací náklady. V klinickém prostředí je nutné zavést potřebnou přístrojovou techniku a také mít dostatečně kvalifikovaný personál, který tuto techniku bude obsluhovat. U metod NGS je důležité dostatečně dobře spravovat uložště s analyzovanými daty, protože často se v laboratořích nachází jejich obrovská množství, která musí být uchována pro pozdější interpretaci. Oproti Sangerově sekvenování jsou náklady na sekvenování jediné sekvence NGS zanedbatelné (nicméně cena za celý tzv. run je poměrně vysoká). Nejmodernější platforma NGS je schopna vygenerovat přibližně 150 milionů čtení za přibližně £1000 (pro lepší představu tato částka představuje, podle aktuálního kurzu k datu 3.5.2022, v přepočtu 29 300 Kč), zatímco 1 čtení Sangerovou metodou stojí £1. Aby byly zachovány tyto nízké provozní náklady na NGS, je nutné zpracovávat velké množství vzorků najednou, a to může prodloužit dobu analýzy. Nicméně i přes tato negativa jsou metody NGS v současnosti hojně využívány, protože zlepšují dosavadní péči o zdraví pacientů. [39]

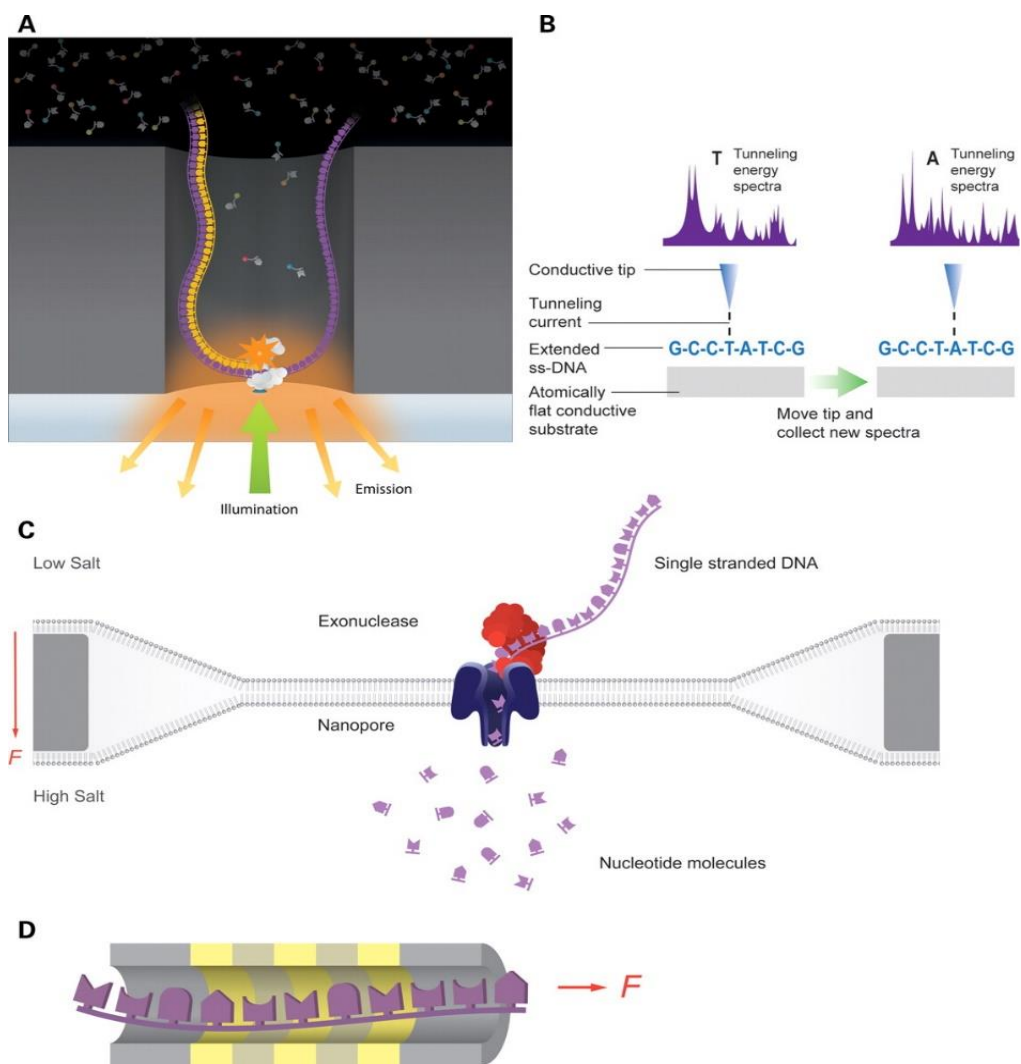
5. Nové trendy v diagnostice PGD

Současně nejpoužívanější metody v preimplantační genetické diagnostice jsou zejména ty založené na technologii mikročipů. Především array CGH nebo SNP array, které byly zmíněny v předchozích kapitolách. Novým trendem je však zavádění a velký rozvoj sekvenování nové generace (NGS) v rámci této diagnostiky. [60]

Pro monogenně dědičné choroby se využívá nepřímá genetická diagnostika, např. PCR, kde je však nutné vyšetření pacienta, ale i jeho rodičů nebo i blízkých příbuzných, pokud nějakým monogenním onemocněním trpí. Mimo PCR se také používá tzv. karyomappingu, který je vhodný i pro diagnostiku aneuploidií. V současnosti se pracuje na rozšíření využití NGS i pro monogenní dědičné choroby. [60]

Největšího rozvoje se v současné době dočkáváme u sekvenování nové generace (NGS). Metody spadající pod NGS se dostávají do popředí zejména díky svému širokému využití, menší časové náročnosti a jsou si také schopny vystačit s malým množstvím výchozího vzorku. Tyto technologie se označují jako tzv. single-molecule sekvenování nebo také sekvenování třetí generace (TGS) a řadí se sem například metoda SMRT, Nanopore technologies, Helicos sequencing nebo Multiple displacement amplification.

Single-molecule sekvenování (SMS) nevyužívá amplifikace DNA před vlastním sekvenováním. To nám umožňuje zkrátit dobu přípravy DNA, která je poměrně nákladná. Důležité je neopomenout, že chybovost se díky nevyužívání amplifikace značně snížila. Sekvenování třetí generace nám proto umožňuje přesnou a spolehlivou kvantifikaci DNA v reálném čase. [69, 75]



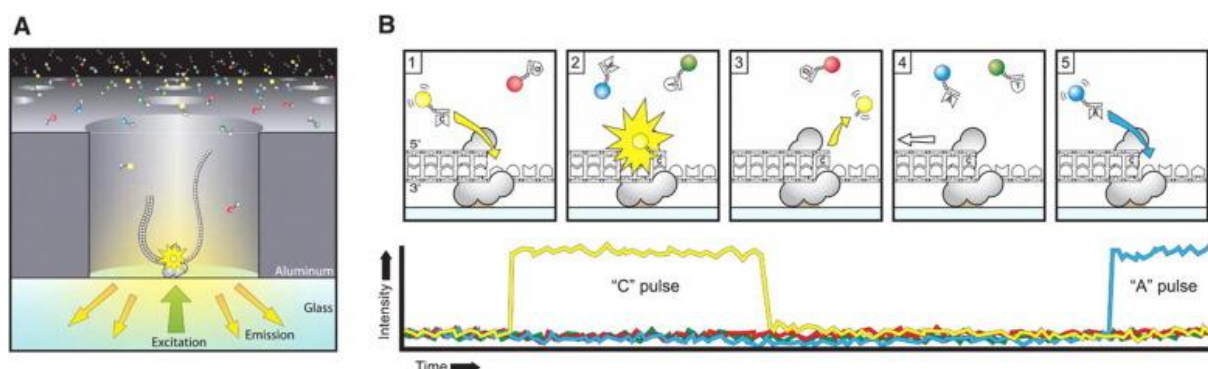
Obrázek 6 Princip sekvenování třetí generace. Sekvenování třetí generace využívá metody, které nevyžadují promývání vzorku během syntézy DNA. **A** – Technologie Pacific Biosciences se používá pro přímou syntézu DNA v reálném čase. DNA polymeráza se nachází na dně ZMW (zero mode waveguide) jamky. Dochází k navázání bází, u kterých se měří fluorescenční signál pomocí fluorescenčně značených fosfonukleotidů. **B** – Některé společnosti se pokoušejí sekvenovat DNA pomocí elektronové mikroskopie, která má podobný princip jako metoda Raveo zobrazená na obrázku. Molekula ssDNA je natažena a poté zkoumána pomocí STM (scanning tunneling microscope). **C** – Technologie Oxford Nanopore se používá pro měření translokací nukleotidů odštěpených z molekuly DNA. ssDNA prochází přes póry v membráně, její pohyb je zajištěn pomocí iontů o rozdílné koncentraci. Na konci získáváme jednotlivé nukleotidy. **D** – Společnost IBM vyvinula technologii DNA tranzistorů, které jsou schopny elektronicky detekovat jednotlivé báze v jedné molekule ssDNA. Molekula ssDNA prochází tenkou nanotrubičkou tvořenou ze zlatých a šedých pásů fungujících jako dobrý vodič. [55, 64]

5.1 Metoda SMRT (single-molecule-real-time)

Metoda SMRT byla vyvinuta firmou Pacific Biosciences a je považována za první metodu TGS (third-generation sequencing), která umožňuje sledovat replikaci molekuly DNA pomocí DNA polymerázy v reálném čase. Je založena na detekci aktivity polymerázy v reálném čase během procesu replikace DNA za využití čtyř odlišně fluorescenčně značených deoxynukleotidů. SMRT je vhodná pro dlouhé a opakující se sekvence. Udává se, že přesnost této metody je 99,999 %, proto se v současnosti také dostává nejvíce do popředí nejen v rámci PGD. [61, 62]

Pro sledování aktivity polymerázy se používá nanofotonická struktura, tzv. zero-mode waveguide (ZMW). ZMW je jamka s velmi malým objemem ($2 \cdot 10^{-22}$ l) o rozměrech 70x100 nm. Na dně této jamky je uchycena imobilizovaná DNA polymeráza. Tento malý objem umožňuje přesnou detekci i jediného fluoroforu. [62, 65]

Principem této metody je umístění DNA polymerázy společně s jednou molekulou templátu na dno ZMW pomocí biotin/streptavidin interakce. Dno ZMW je několik milisekund prosvěcováno paprsky, kdy dochází k excitaci fluoroforu a to nám umožňuje detekci jednotlivých nukleotidů (každý nukleotid je označen jinak barevným fluoroforem) při začlenění do vznikajícího vlákna DNA. Tyto nukleotidy obklopují DNA polymerázu, která se nachází na dně ZMW a následně difundují zpět a jamku opouštějí. Laserové paprsky pronikají pouze spodní částí ZMW (cca do 30 nm), proto nukleotidy nacházející se ve vrchní části jamky nejsou detekovány. Jestliže se DNA polymeráze podaří detekovat správný nukleotid, zařadí jej do rostoucího řetězce DNA. [55]



Obrázek 7 Princip metody SMRT. [63] **A** znázorňuje jamku ZMW s DNA polymerázou a templátem. Jednotlivé nukleotidy se vážou na DNA polymerázu. **Obrázek 7 B** poté znázorňuje označení jednotlivých nukleotidů jiným fluorescenčním barvivem (červeným, žlutým, zeleným a modrým). [63]

Metoda SMRT disponuje řadou potencionálních výhod, avšak stále se jedná o vyvíjející se metodu, u které se vyskytují nedostatky. U SMRT i u metody Helicos, která bude popsána níže, se setkáváme s chybami ve čtení lidského genomu. Chybovost často přesahuje i 5 % a obvykle se jedná o chybné čtení inzercí nebo delecí. Dalším omezením by také mohl být počet ZMW jamek, které bude možné detekovat najednou. Poslední verze této metody je schopna detekovat najednou maximálně 75 000 ZMW. [55]

Přestože u SMRT nacházíme několik nedostatků, představuje tato technologie budoucnost v oblasti TGS. Na rozdíl od SGS (single genome sequencing) získáváme metodou SMRT jinou formu sekvenčních dat, která slouží k získání podrobnějších informací o chemické i strukturní povaze jednotlivých nukleotidových sekvencí, a to se považuje za další nespornou výhodu SMRT. [55]

5.2 Sekvenování Nanopore technologies

Sekvenování Nanopore je další metodou považovanou za jednu z nejslibnějších technologií v oblasti sekvenování nové generace. Technologie byla uvedena na trh v roce 2014 jako levná a rychlá alternativa k Sangerově sekvenační metodě. Nanopórové sekvenování se považuje za jediné přenosné zařízení pro sekvenování DNA nebo RNA v reálném čase (okamžitý přístup k výsledkům). [57]

U této metody se setkáváme s velmi širokým využitím. Umožňuje nám celogenomové sekvenování a cílené sekvenování. Není zde nutná amplifikace DNA pomocí PCR (v závislosti na použitém kitu). Využívá se hlavně k detekci mutací DNA či RNA. [56]

Pomocí této technologie se také podařilo identifikovat nové druhy rostlin a živočichů v přírodě (pralese, divočině apod.). Podobně se dají identifikovat i patogeny v polních podmínkách, např. v Africe.

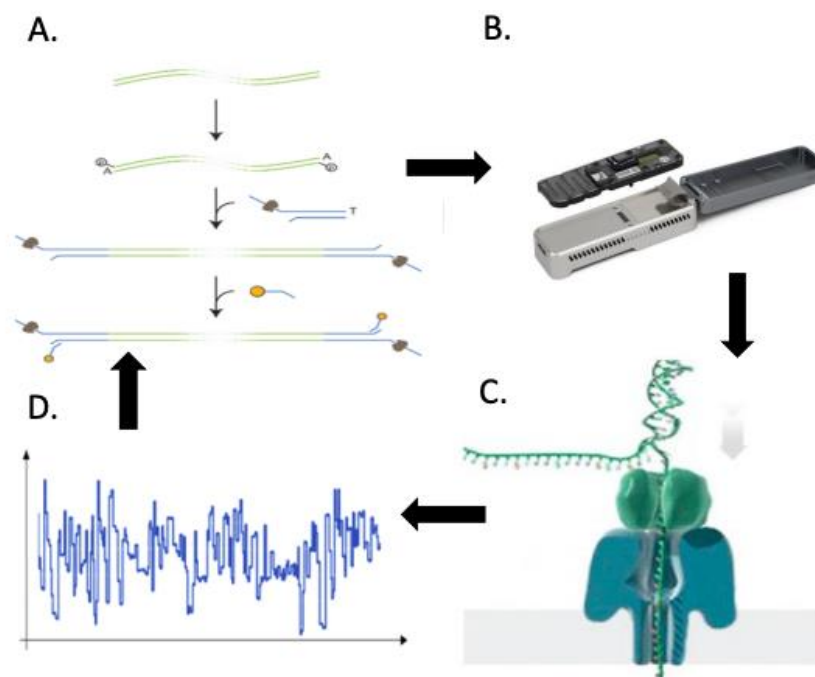
Měření je prováděno na průtokové cele (pole se senzory), která je vložena do příslušného zařízení před každou sekvenací. Každá průtoková cela může generovat až 30 Gb sekvenačních dat.

Princip metody je následovný:

1. Nejprve je nutné provést přípravu knihovny za pomoci různých sad. V tomto kroku dochází k měření koncentrace DNA, fragmentaci DNA (volitelná), k opravě konců (tupé konce) a ligaci adaptérů. Adaptéry interagují s proteiny na nanoporu (usnadňují přichycení na vlákna). Následně dochází k zavedení procesního enzymu na 5' konec jednoho vlákna.
2. Dalším krokem je nanášení vzorku na průtokovou celu.
3. Předposledním krokem je průchod pórem. Nanopór neboli umělý protein je zabudován do elektricky odolné membrány (vyrobené ze syntetického polymeru). Membrána je ponořena do iontového roztoku a napříč membránou je přivedeno napětí. Pomocí zjištění charakteristických změn proudu je možné identifikovat molekulu, která iontový proud přerušila, tedy jednotlivé báze.
4. Analýza dat – pro analýzu dat, jejich záznam a zpracování se využívá speciálního softwaru přístroje. [56]

Společnost Oxford Nanopore Technologies disponuje několika variantami zařízení určených k nanopórovému sekvenování. Mezi nejvíce používané zařízení patří MinION, které váží méně než půl kilogramu a jeho pořizovací cena se pohybuje od 1000\$ (pro lepší představu tato částka představuje, podle aktuálního kurzu k datu 18.5.2022, v přepočtu 23 450 Kč). Díky jeho velikosti a nízké pořizovací ceně je možné tento přístroj umístit do velkého množství laboratoří. Metoda je i poměrně ekologická, a ne příliš ekonomicky nákladná pro další použití, protože průtokové cely je možné opakovaně použít. [56, 58]

V neposlední řadě velkou výhodou nanopórového sekvenování je bezesporu jeho přenosnost. Zařízení bylo již využíváno například v horách, v džungli, v arktické oblasti nebo také na mezinárodní vesmírné stanici. [56]



Obrázek 8 Princip metody Nanopore. **A** – příprava knihovny, **B** – nanášení na průtokovou celu, **C** – průchod DNA nanopórem, **D** – analýza dat. [56]

5.3 Helicos Genetic Analysis System

Technologie Helicos Genetic Analysis System je považována za první dostupnou technologii třetí generace, která byla představena již v roce 2003. Je založena na principu sekvenace syntézou bez předchozí potřeby amplifikace pomocí PCR. Vynechání amplifikačního kroku umožňuje zrychlení celého procesu, nižší cenu a také nižší chybovost. [66, 67, 68]

Sekvenace pomocí Helicos metody je založena na zobrazování jednotlivých molekul DNA, které jsou přichycené na plochou destičku. K destičce je následně přidána DNA polymeráza a jeden ze čtyř fluorescenčně značených nukleotidů. Pomocí laserových paprsků jsme schopni detekovat fluorescenční značky a pomocí CCD kamery určit polohové souřadnice zachycených řetězců. Následuje promytí, které umožňuje odstranění fluorescenční značky. Celý cyklus se zopakuje ještě 3x, kdy jsou postupně využity všechny čtyři fluorescenčně značené nukleotidy. [69]

Metoda umožňuje analyzovat až jednu miliardu jednotlivých fragmentů DNA současně. Avšak doba sekvenování jednoho nukleotidu je celkem dlouhá (délka čtení max 32 nukleotidů). Přestože se díky odstranění amplifikačního kroku cena snížila, stále se jedná o jednu z nejnákladnějších metod, u kterých je vysoká pořizovací cena především u reagentů. Stejně jako

u metody SMRT zůstává chybovost stále poměrně vysoká (>5 %). Nejčastěji se setkáváme s chybami ve čtení inzercí a delecí, chybovost se objevuje ale i při sestavování celého genomu. [55]

5.4 Multiple displacement amplification single cell (MDA)

Multiple displacement amplification (MDA) se využívá pro sekvenaci velmi malých množství DNA. Umožňuje amplifikovat templáty >0,5 Mbp. Na rozdíl od metod, které využívají k amplifikaci PCR, je schopna generovat DNA s vyšší molekulovou hmotností, a vykazuje tak i lepší pokrytí genomu. V roce 2004 byly publikovány první studie, které popisovaly metodu MDA s využitím ϕ 29 DNA polymerázy. [70, 71]

Proces metody MDA je následovný:

1. Izolace jednotlivých buněk z krve nebo tkáně. Buňky jsou následně umístěny do PCR zkumavek pomocí inverzního mikroskopu a mikrokapilárního pipetovacího systému.
2. Následuje lýze a celogenomová amplifikace jednotlivých buněk, kdy náhodné hexamerní primery hybridizují s templátem DNA.
3. Phi29 DNA polymeráza (získaná z bakteriofága phi29) iniciuje amplifikaci. Dochází k syntéze více kopií z každé templátové DNA. Výsledkem jsou dlouhé rozvětvené sítě DNA. [70, 71, 72, 73]

Produkty reakce jsou velmi dlouhé, v rozmezí 12-100 kb, proto se dají využít pro sekvenování DNA, např. pomocí CGH. Celý proces trvá 3 hodiny a umožňuje detekovat 1-2 μ g DNA z jedné buňky. [8, 74]

Mezi velké výhody metody MDA se řadí velmi vysoká kvalita získaného materiálu, která umožňuje přesnější sekvenaci pomocí NGS, nízké množství vstupního materiálu. Vyznačuje se také minimální chybovostí. Přesto se v současnosti vyvíjejí a využívají metody, které jsou založené na MDA, ale jsou ještě mnohem přesnější, např. MIDAS (Microwell displacement amplification systém) nebo také IMS-MDA (Immunomagnetic separation – MDA), která se využívá spíše v mikrobiologii. [70, 72]

6. ZÁVĚR

Za posledních 20 let bylo vyvinuto množství nových metod, které nejenže zpřesnily genetickou diagnostiku v PGD, ale nabídly i nové možnosti.

V současné době se stále hojně využívají etablované metody, jako je real-time PCR, Sangerovo sekvenování, hybridizace FISH, případně vysokokapacitní microarray. Všechny tyto metody mají své výhody a hodí se pro detekci jiných parametrů. Pro většinu laboratoří je výběr metody závislý na přístrojovém vybavení a dalších možnostech.

Nicméně pomalu se prosazují nové vysokokapacitní metody, jako je NGS, kde se prosazují metody třetí generace do běžné diagnostiky. Tyto metody jsou natolik heterogenní, že je vždy nutné je mezi sebou správně rozlišovat, protože se metody mezi sebou velmi liší. Metody vybíráme na základě toho, jaké parametry chceme stanovit a jak se vzorky budeme dále nakládat. Některé mají vysokou citlivost (SMRT, MDA) nebo nepoužívají amplifikační metody (Nanopore), případně pracují s velmi malými reakčními celami (ZMW) atd.

Tyto metody vyžadují naprosto nový přístup, neboť generují obrovská množství dat, která je nutné vyhodnocovat specializovaným algoritmem, případně v bioinformatice specializovaným pracovníkem. Výhodou těchto metod je jejich velká kapacita (jsou schopny zpracovávat velké množství vzorků nebo umožňují celogenomové sekvenování).

Metody sekvenování nové generace jsou s vysokou pravděpodobností budoucností nejen PGD diagnostiky a teprve čas ukáže, které metody se prosadí nejvíce.

Preimplantační genetická diagnostika se tak stává nepostradatelnou součástí umělého oplodnění. Postupně přibývá stále více párů, které jsou nuceny podstoupit IVF z důvodu neplodnosti, a dá se předpokládat, že jejich množství se bude nadále zvyšovat.

Největší podíl na poruchách plodnosti má vnější prostředí (ovzduší, chemické látky přidávané do potravin nebo kosmetiky) a také životní styl dnešní populace (nezdravá strava, alkohol, návykové látky). Velkým a současně diskutovaným problémem je také hormonální antikoncepce (HA), která je předepisována dívkám již v raném věku a její dlouhodobé užívání zvyšuje neplodnost. I z tohoto důvodu se PGD v rámci IVF provádí, aby se minimalizovala rizika vzniku dědičných genetických poruch ale i poruch, které byly zapříčiněny právě vnějšími vlivy.

V České republice existuje poměrně mnoho pracovišť, kde se PGD provádí. Od klasických rutinních genetických laboratořích po specializovaná pracoviště, která se zaměřují

převážně na IVF a s ním spojenou PGD. Jedním z nejznámějších center lékařské genetiky a reprodukční medicíny je GENNET, které sídlí v Praze a nabízí širokou škálu vyšetření.

Metody používající se v PGD mají široké využití i v postnatální diagnostice, kde pomáhají odhalit genetické abnormality již u narozených dětí nebo u dospělých lidí. Proto metody popsané v této práci jsou velkým přínosem pro celou genetickou diagnostiku, kterou tak ještě posouvají na mnohem vyšší úroveň.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] VAN DER AA, Niels, Masoud Zamani ESTEKI, Joris R VERMEESCH a Thierry VOET. Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. *Genome Medicine* [online]. 2013, **5**(8) [cit. 2022-05-06]. ISSN 1756-994X. Dostupné z: doi:10.1186/gm475.
- [2] PARIKH, FiruzaRajesh, ArundhatiSitaram ATHALYE, NandkishorJagannath NAIK, DattatrayJayaram NAIK, RupeshRamesh SANAP a ProchiFali MADON. Preimplantation genetic testing: Its evolution, where are we today?. *Journal of Human Reproductive Sciences* [online]. 2018, **11**(4) [cit. 2022-05-06]. ISSN 0974-1208. Dostupné z: doi:10.4103/jhrs.JHRS_132_18.
- [3] BREZINA, P. R., D. S. BREZINA a W. G. KEARNS. Preimplantation genetic testing. *BMJ* [online]. 2012, **345**(sep18 2), e5908-e5908 [cit. 2022-05-06]. ISSN 1756-1833. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.e5908.
- [4] PALERMO, G D, C L O'NEILL, S CHOW, S CHEUNG, A PARRELLA, N PEREIRA a Z ROSENWAKS. Intracytoplasmic sperm injection: state of the art in humans. *Reproduction* [online]. 2017, **154**(6), F93-F110 [cit. 2022-05-06]. ISSN 1470-1626. Dostupné z: doi:10.1530/REP-17-0374.
- [6] JIRGE, PadmaRekha. Ovarian reserve tests. *Journal of Human Reproductive Sciences* [online]. 2011, **4**(3) [cit. 2022-05-06]. ISSN 0974-1208. Dostupné z: doi:10.4103/0974-1208.92283.
- [7] rov. ŘEŽÁBEK, K. *Asistovaná reprodukce*, s. 13-14.
- [8] SPITS, Claudia, Cédric LE CAIGNEC, Martine DE RYCKE, Lindsey VAN HAUTE, André VAN STEIRTEGHEM, Inge LIEBAERS a Karen SERMON. Whole-genome multiple displacement amplification from single cells. *Nature Protocols* [online]. 2006, **1**(4), 1965-1970 [cit. 2022-05-07]. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2006.326.
- [9] PACHECO, Alberto, Arancha BLANCO, Fernando BRONET, María CRUZ, Jaime GARCÍA-FERNÁNDEZ a Juan Antonio GARCÍA-VELASCO. Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS): A Useful Sperm-Selection Technique in Cases of High Levels of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Clinical Medicine* [online]. 2020, **9**(12) [cit. 2022-05-06]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm9123976.

- [10] TEIXEIRA, Danielle M, Andre H MIYAGUE, Mariana AP BARBOSA, Paula A NAVARRO, Nick RAINE-FENNING, Carolina O NASTRI a Wellington P MARTINS. Regular (ICSI) versus ultra-high magnification (IMSI) sperm selection for assisted reproduction. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. 2020, **2020**(2) [cit. 2022-05-06]. ISSN 14651858. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD010167.pub3.
- [11] ELIVELD, Jitske, Madelon VAN WELY, Andreas MEISSNER, Sjoerd REPPING, Fulco VAN DER VEEN a Ans M M VAN PELT. The risk of TESE-induced hypogonadism: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* [online]. 2018, **24**(4), 442-454 [cit. 2022-05-06]. ISSN 1355-4786. Dostupné z: doi:10.1093/humupd/dmy015.
- [12] CIOPPI, Francesca, Viktoria ROSTA a Csilla KRAUSZ. Genetics of Azoospermia. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(6) [cit. 2022-05-06]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22063264.
- [13] LU, Hui, Dongchuan XU, Ping WANG, Wenye SUN, Xinhuai XUE, Yuxin HU, Chunli XIE a Yanlin MA. RNA-sequencing and bioinformatics analysis of long noncoding RNAs and mRNAs in the asthenozoospermia. *Bioscience Reports* [online]. 2020, **40**(7) [cit. 2022-05-06]. ISSN 0144-8463. Dostupné z: doi:10.1042/BSR20194041.
- [14] *IVF Step-by-Step* [online]. [cit. 2022-02-28]. Dostupné z: <https://www.urmc.rochester.edu/ob-gyn/fertility-center/services/infertility/ivf/ivf-step-by-step.aspx>.
- [15] *Preimplantační genetická diagnostika (PGD) a screening (PGS)* [online]. [cit. 2022-02-28]. Dostupné z: <https://www.natalart.cz/index.php/cs/lecebne-metody/pgd-pgs>.
- [16] MASTENBROEK, S. a S. REPPING. Preimplantation genetic screening: back to the future. *Human Reproduction* [online]. 2014, **29**(9), 1846-1850 [cit. 2022-05-06]. ISSN 0268-1161. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/deu163.
- [17] KLIKA, ČIHÁK a Richard JELÍNEK. *Histologie & embryologie* [online]. 3. Lékařská fakulta, 2001.
- [18] *Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)* [online]. Olomouc: LF Upol [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: http://old.lf.upol.cz/fileadmin/user_upload/LF-kliniky/hippokrat/Pracoviste/UMTM/01_FISH.pdf.

- [19] RÉDEI, George P. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics*. 3rd Edition. vyd. [s.l.]: Springer, 2008. ISBN 978-1-4020-6753-2.
- [20] *Vyšetření aneuploidii, mikroleceí a strukturálních změn chromozomů metodou FISH* [online]. Karlovy Vary: Laboratoř lékařské genetiky [cit. 2022-03-01]. Dostupné z: <http://www.genetikav.cz/fish.html>.
- [21] TRÁVNÍK, Pavel. *Numerické anomálie pohlavních chromozomů* [online]. Brno [cit. 2022-03-01]. Dostupné z: https://www.travnik-brno.cz/genetika/cs/index.php?localpage=loc_heterochrom.php.
- [22] SCRIVEN, P.N. a P.M.M. BOSSUYT. Diagnostic accuracy: theoretical models for preimplantation genetic testing of a single nucleus using the fluorescence in situ hybridization technique. *Human Reproduction* [online]. 2010, **25**(10), 2622-2628 [cit. 2022-05-06]. ISSN 1460-2350. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/deq196.
- [23] WEISS, M. M., M. A. HERMSEN, G. A. MEIJER, N. C. VAN GRIEKEN, J. P. BAAK, E. J. KUIPERS a P. J. VAN DIEST. Comparative genomic hybridisation. *Molecular Pathology* [online]. 1999, **52**(5), 243-251 [cit. 2022-05-06]. ISSN 1366-8714. Dostupné z: doi:10.1136/mp.52.5.243.
- [24] *Časopis Klinická onkologie* [online]. Praha: Care Comm, 2006 [cit. 2022-03-14]. ISSN 1802-5307. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2006-12-30-supplement2/urcovani-nebalancovanych-genovych-zmen-metodou-array-komparativni-genomove-hybri/>.
- [25] KUMAR, Parveen, Masoud Zamani ESTEKI, Niels VAN DER AA, Thierry VOET, Karen SERMON a Stéphane VIVILLE. How to analyze a single blastomere?. SERMON, Karen a Stéphane VIVILLE, ed. *Textbook of Human Reproductive Genetics* [online]. Cambridge: Cambridge University Press, 2014, s. 15-32 [cit. 2022-05-06]. ISBN 9781139236027. Dostupné z: doi:10.1017/CBO9781139236027.003.
- [26] Aplikace metody SNP array v prenatalní diagnostice. *Česká gynekologie* [online]. Praha, 2011, (4) [cit. 2022-03-17]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2011-4-2/aplikace-metody-snp-array-v-prenatalni-diagnostice-36011>.
- [27] *Polymerase Chain Reaction (PCR)* [online]. National Library of Medicine [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>.

- [28] *DNA polymerázy* [online]. Lab Guide [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <https://labguide.cz/reagencie/enzymy/dna-polymerazy/>.
- [29] PCR (polymerázová řetězová reakce). *Molekulární biologie* [online]. Brno: VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz.
- [30] ARNESON, Nona, Simon HUGHES, Richard HOULSTON a Susan DONE. Whole-Genome Amplification by Improved Primer Extension Preamplification PCR (I-PEP-PCR). *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2010, **2008**(1) [cit. 2022-05-06]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot4921.
- [31] CHEUNG, Vivian G. a Stanley F. NELSON. Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1996, **93**(25), 14676-14679 [cit. 2022-05-06]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.93.25.14676.
- [32] ŠIMEČKOVÁ, V. Současné možnosti preimplantačního genetického screeningu a preimplantační genetické diagnostiky. *Česká gynekologie* [online]. 2016, (6) [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2016-6-7/soucasne-moznosti-preimplantacniho-genetickeho-screeningu-a-preimplantacni-geneticke-diagnostiky-59800>.
- [33] HANDYSIDE, A. H., G. L. HARTON, B. MARIANI, A. R. THORNHILL, N. AFFARA, M.-A. SHAW a D. K. GRIFFIN. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *Journal of Medical Genetics* [online]. 2010, **47**(10), 651-658 [cit. 2022-05-06]. ISSN 0022-2593. Dostupné z: doi:10.1136/jmg.2009.069971.
- [34] NATESAN, Senthilkumar A., Alex J. BLADON, Serdar COSKUN, et al. Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro. *Genetics in Medicine* [online]. 2014, **16**(11), 838-845 [cit. 2022-05-06]. ISSN 10983600. Dostupné z: doi:10.1038/gim.2014.45.
- [35] NATESAN, Senthilkumar A., Alex J. BLADON, Serdar COSKUN, et al. Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human

preimplantation embryos in vitro. *Genetics in Medicine* [online]. 2014, **16**(11), 838-845 [cit. 2022-05-07]. ISSN 10983600. Dostupné z: doi:10.1038/gim.2014.45.

[36] HUENTELMAN, Matthew J, David W CRAIG, Albert D SHIEH, Jason J CORNEVEAUX, Diane HU-LINCE, John V PEARSON a Dietrich A STEPHAN. SNiPer: Improved SNP genotype calling for Affymetrix 10K GeneChip microarray data. *BMC Genomics* [online]. 2005, **6**(1) [cit. 2022-05-07]. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-6-149.

[37] TIEGS, Ashley W., Brooke HODES-WERTZ, David H. MCCULLOH, Santiago MUNNÉ a James A. GRIFO. Discrepant diagnosis rate of array comparative genomic hybridization in thawed euploid blastocysts. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* [online]. 2016, **33**(7), 893-897 [cit. 2022-05-07]. ISSN 1058-0468. Dostupné z: doi:10.1007/s10815-016-0695-3.

[38] FIORENTINO, Francesco, Anil BIRICIK, Sara BONO, Letizia SPIZZICHINO, Ettore COTRONEO, Giuliano COTTONE, Felix KOKOCINSKI a Claude-Edouard MICHEL. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertility and Sterility* [online]. 2014, **101**(5), 1375-1382.e2 [cit. 2022-05-07]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2014.01.051.

[39] BEHJATI, Sam a Patrick S TARPEY. What is next generation sequencing?. *Archives of disease in childhood - Education & practice edition* [online]. 2013, **98**(6), 236-238 [cit. 2022-05-07]. ISSN 1743-0585. Dostupné z: doi:10.1136/archdischild-2013-304340.

[40] What is Next-Generation Sequencing (NGS)?. *ThermoFisher Scientific* [online]. [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/next-generation-sequencing-information/ngs-basics/what-is-next-generation-sequencing.html>.

[41] HANDYSIDE, Alan H. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies. *Fertility and Sterility* [online]. 2013, **100**(3), 595-602 [cit. 2022-05-07]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2013.07.1965.

[42] VAN DER AA, Niels, Masoud Zamani ESTEKI, Joris R VERMEESCH a Thierry VOET. Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. *Genome Medicine* [online]. 2013, **5**(8) [cit. 2022-05-07]. ISSN 1756-994X. Dostupné z: doi:10.1186/gm47.

- [43] LUKASZUK, Krzysztof, Grzegorz JAKIEL, Waldemar KUCZYNSKI, Sebastian PUKSZTA, Joanna LISS, Lukasz PLOCIENNIK, Aron LUKASZUK a Ewa PASTUSZEK. Next generation sequencing for preimplantation genetic testing of blastocysts aneuploidies in women of different ages. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* [online]. 2016, **23**(1), 163-166 [cit. 2022-05-07]. ISSN 1232-1966. Dostupné z: doi:10.5604/12321966.1196.
- [44] What is Next Generation DNA Sequencing?. *EMBL-EBI* [online]. [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/functional-genomics-ii-common-technologies-and-data-analysis-methods/next-generation-sequencing/>.
- [45] FREITAS, Marta, Joel PINTO, Carla RAMALHO a Sofia DÓRIA. Prenatal diagnosis: the clinical usefulness of array comparative genomic hybridization. *Porto Biomedical Journal* [online]. 2018, **3**(2) [cit. 2022-05-07]. ISSN 2444-8664. Dostupné z: doi:10.1016/j.pbj.0000000000000013.
- [46] EVANGELIDOU, Paola, Angelos ALEXANDROU, Maria MOUTAFI, et al. Implementation of High Resolution Whole Genome Array CGH in the Prenatal Clinical Setting: Advantages, Challenges, and Review of the Literature. *BioMed Research International* [online]. 2013, **2013**, 1-14 [cit. 2022-05-07]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2013/346762.
- [47] Probe. *Creative Bioarray* [online]. [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://www.creative-bioarray.com/products/probe-list-8.htm>.
- [48] Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Protocol. *Creative Bioarray* [online]. [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://www.creative-bioarray.com/protocol/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-Protocol.htm>.
- [49] WELLS, Dagan, Tomas ESCUDERO, Brynn LEVY, Kurt HIRSCHHORN, Joy D.A DELHANTY a Santiago MUNNÉ. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertility and Sterility* [online]. 2002, **78**(3), 543-549 [cit. 2022-05-07]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/S0015-0282(02)03271-5.
- [50] BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiku* [online]. Karolinum, 2016 [cit. 2022-05-07]. ISBN 9788024632469.

- [51] HAINS, David a Andrew SCHWADERER. Genetic Variations in Vesicoureteral Reflux Sequelae. *Pathogens* [online]. 2016, **5**(1) [cit. 2022-05-07]. ISSN 2076-0817. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens5010014.
- [52] MARTENS, Jan-Hening. What are the Pros and Cons of FISH, aCGH and NGS?. *Enzo* [online]. [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2018/september/what-are-the-pros-and-cons-of-fish-acgh-and-ngs>.
- [53] Comparative genomic hybridization (CGH). *Current Protocols in Human Genetics Online* [online]. 2003 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <http://www.geguchadze.com/PDF/protocols/CPonline/Doc/8322-8322.html>.
- [54] LOBO, Ingrid. Copy Number Variation and Genetic Disease. *Nature Education* [online]. 2008, **1**(1) [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/copy-number-variation-and-genetic-disease-911/>.
- [55] SCHADT, E. E., S. TURNER a A. KASARSKIS. A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics* [online]. 2010, **19**(R2), R227-R240 [cit. 2022-05-07]. ISSN 0964-6906. Dostupné z: doi:10.1093/hmg/ddq416.
- [56] PURKRTOVÁ, Sabina a Milada SUKOVÁ. *Nanopórové sekvenování MinION* [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: http://old-biomikro.vscht.cz/vyuka/mzp/C1_VSCHT_2019_066_Priloha_6.2_PREZENTACE_cesky.pdf.
- [57] RHEE, Minsoung a Mark A. BURNS. Nanopore sequencing technology: research trends and applications. *Trends in Biotechnology* [online]. 2006, **24**(12), 580-586 [cit. 2022-05-07]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2006.10.005.
- [58] MinION. *Oxford Nanopore Technologies* [online]. [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://nanoporetech.com/products/minion>.
- [60] *Doporučený postup č.4: Doporučení k preimplantačnímu genetickému laboratornímu vyšetření* [online]. Praha 2: Společnost lékařské genetiky, 2014 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://slg.cz/documents/12/doporučený-postup-preimplantacni-vysetreni.pdf>.

- [61] LOOMIS, Erick W., John S. EID, Paul PELUSO, et al. Sequencing the unsequenceable: Expanded CGG-repeat alleles of the fragile X gene. *Genome Research* [online]. 2013, **23**(1), 121-128 [cit. 2022-05-07]. ISSN 1088-9051. Dostupné z: doi:10.1101/gr.141705.112.
- [62] KORLACH, Jonas. Understanding Accuracy in SMRT® Sequencing. *Pacific Biosciences* [online]. 2013 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: https://www.pacb.com/wp-content/uploads/2015/09/Perspective_UnderstandingAccuracySMRTSequencing1.pdf.
- [63] RHOADS, Anthony a Kin Fai AU. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* [online]. 2015, **13**(5), 278-289 [cit. 2022-05-07]. ISSN 16720229. Dostupné z: doi:10.1016/j.gpb.2015.08.002.
- [64] CHURÝ, Lukáš a Zdeněk LEHOČKÝ. Tranzistor z nanotrubiček a z DNA. *Programujte* [online]. 2006 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <http://programujte.com/clanek/2006012804-tranzistor-z-nanotrubickek-a-z-dna/>.
- [65] EID, John, Adrian FEHR, Jeremy GRAY, et al. Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science* [online]. 2009, **323**(5910), 133-138 [cit. 2022-05-07]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1162986.
- [66] S, Vismaya. *Helicos Sequencing* [online]. [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/VismayaS1/helicos-sequencing>.
- [67] KOUBKOVÁ, L, B VOJTĚŠEK a R VYZULA. Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi: Next Generation Sequencing – Application in Clinical Practice. *Klinická onkologie* [online]. 2014 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/395/4484.pdf>.
- [68] BRASLAVSKY, Ido, Benedict HEBERT, Emil KARTALOV a Stephen R. QUAKE. Sequence information can be obtained from single DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2003, **100**(7), 3960-3964 [cit. 2022-05-07]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0230489100.
- [69] SCHADT, E. E., S. TURNER a A. KASARSKIS. A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics* [online]. 2010, **19**(R2), R227-R240 [cit. 2022-05-07]. ISSN 0964-6906. Dostupné z: doi:10.1093/hmg/ddq416.

- [70] MDA/IMS-MDA/MIDAS. *Illumina* [online]. 2022 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://emea.illumina.com/science/sequencing-method-explorer/kits-and-arrays/mda-ims-mda-midas.html>.
- [71] SPITS, Claudia, Cédric LE CAIGNEC, Martine DE RYCKE, Lindsey VAN HAUTE, André VAN STEIRTEGHEM, Inge LIEBAERS a Karen SERMON. Whole-genome multiple displacement amplification from single cells. *Nature Protocols* [online]. 2006, **1**(4), 1965-1970 [cit. 2022-05-07]. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2006.326.
- [72] Jak probíhá revoluční sekvenace genomů z jediné buňky. *BIOGEN* [online]. [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://biogen.cz/sekvenovani-z-jedne-bunky>.
- [73] Whole Genome Amplification & Multiple Displacement Amplification. *New England BioLabs, inc.* [online]. [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/isoothermal-amplification/whole-genome-amplification-and-multiple-displacement-amplification>.
- [74] LASKEN, Roger S. Single-cell genomic sequencing using Multiple Displacement Amplification. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2007, **10**(5), 510-516 [cit. 2022-05-07]. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2007.08.005.
- [75] XUAN, Jiekun, Ying YU, Tao QING, Lei GUO a Leming SHI. Next-generation sequencing in the clinic: Promises and challenges. *Cancer Letters* [online]. 2013, **340**(2), 284-295 [cit. 2022-05-07]. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2012.11.025.
- [76] http VALENTOVÁ, Zuzana. *Laboratorní příručka* [online]. GENNET, 2021 [cit. 2022-05-18]. Dostupné z: <https://www.gennet.cz/cs/file-link/laboratorni-prirucka.pdf>.
- [77] *Laboratorní příručka laboratoře oddělení lékařské genetiky UL* [online]. Ústí nad Labem: GENET [cit. 2022-05-18].
- [78] Preimplantační genetické testování (PGD). *Centrum asistované reprodukce* [online]. Brno: MUNI MED [cit. 2022-05-18]. Dostupné z: <http://www.ivfbrno.cz/preimplantacni-geneticke-testovani-pgd/t1035>.
- [79] ZMUIDINAITE, Raminta, Fady I. SHARARA a Ray K. ILES. Current Advancements in Noninvasive Profiling of the Embryo Culture Media Secretome. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(5) [cit. 2022-05-18]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22052513.

- [80] CHEN, Jingbo, Lei JIA, Tingting LI, et al. Diagnostic efficiency of blastocyst culture medium in noninvasive preimplantation genetic testing. *F&S Reports* [online]. 2021, **2**(1), 88-94 [cit. 2022-05-18]. ISSN 26663341. Dostupné z: doi:10.1016/j.xfre.2020.09.004.
- [81] Understanding the Steps of IVF. *City fertility* [online]. 2017 [cit. 2022-05-25]. Dostupné z: <https://www.cityfertility.com.au/understanding-the-steps-of-ivf/>.
- [82] HARPER, Joyce C. a Gary HARTON. The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertility and Sterility* [online]. 2010, **94**(4), 1173-1177 [cit. 2022-05-25]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2010.04.064.
- [83] MARVELLI, Antonella, Beatrice CAMPI, Gianfranco MERGNI, et al. Sweat chloride assay by inductively coupled plasma mass spectrometry: a confirmation test for cystic fibrosis diagnosis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2020, **412**(25), 6909-6916 [cit. 2022-05-25]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-020-02821-3.
- [84] KANE, Stefan C., Elissa WILLATS, Sammya BEZERRA MAIA E HOLANDA MOURA, Jonathan HYETT a Fabrício DA SILVA COSTA. Pre-Implantation Genetic Screening Techniques: Implications for Clinical Prenatal Diagnosis. *Fetal Diagnosis and Therapy* [online]. 2016, **40**(4), 241-254 [cit. 2022-05-25]. ISSN 1015-3837. Dostupné z: doi:10.1159/000449381.