



Postępy i perspektywy współczesnej diagnostyki preimplantacyjnej. Część 1. Aspekty kliniczne i embriologiczne

Recent Advances and Prospects of Preimplantation Genetic Testing. Part 1. Clinical and Embryological Aspects

Anna Sarosiak^{1,2}, Ilona Minota¹, Katarzyna Kozioł³, Monika Ołdak^{1,4}

¹Zakład Genetyki, Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu, Warszawa

²Studium Medycyny Molekularnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

³Przychodnia Lekarska Novum, Warszawa

⁴Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

¹Department of Genetics, Institute of Physiology and Pathology of Hearing, Warsaw

²Postgraduate School of Molecular Medicine, Medical University of Warsaw, Warsaw

³Novum Fertility Clinic, Warsaw

⁴Department of Histology and Embryology, Center for Biostructure Research, Medical
University of Warsaw, Warsaw

Streszczenie

Niepłodność stanowi istotny problem społeczny i medyczny, który dotyczy co piątej pary starającej się o potomstwo. Chociaż zapłodnienie pozaustrojowe (*in vitro fertilization*, IVF) jest jedną z najskuteczniejszych metod leczenia niepłodności, to nadal trwają intensywne badania nad jego optymalizacją na kilku płaszczyznach.

Czynniki genetyczne należą do najczęstszych przyczyn niepowodzeń ciąży. Dlatego w przypadku nawracających poronień, przy zaawansowanym wieku matki oraz dla par, które są szczególnie obciążone wysokim ryzykiem przeniesienia chorób uwarunkowanych genetycznie na swoje

potomstwo, rekomenduje się wzbogacenie IVF o badania preimplantacyjne (*preimplantation genetic testing*, PGT).

W PGT do badań wykorzystywane są najczęściej komórki zarodkowe (blastomery lub komórki trofoektodermy) pobrane w fazie przedimplantacyjnego rozwoju zarodka w warunkach *in vitro* i/lub ciątka kierunkowe pobrane z komórki jajowej przed zapłodnieniem lub po zapłodnieniu, sporadycznie także plemniki. Metoda ta obejmuje genetyczną analizę pozyskanego materiału, a głównym jej celem jest identyfikacja zarodków lub gamet, które są wolne od różnego rodzaju zmian genetycznych. Na sukces PGT składają się dwa główne elementy takie jak pozyskanie odpowiedniej jakości materiału biologicznego oraz wybór najbardziej adekwatnej i rzetelnej metody analizy genetycznej.

W niniejszej pracy omówiono aspekt kliniczny i embriologiczny PGT. Przedstawiono cele, założenia i wskazania do poszczególnych typów badań genetycznych wyróżnianych w PGT. Opisano wszystkie aktualnie dostępne metody pozyskiwania materiału biologicznego do tego typu badań. Scharakteryzowano wady i zalety biopsji poszczególnej frakcji komórkowej w różnych stadiach rozwojowych zarodka i opisano obecnie preferowane podejście przy wyborze materiału biologicznego do PGT oraz nowe kierunki rozwoju dla jego pozyskiwania i zmniejszenia ingerencji w strukturę zarodka.

Słowa kluczowe

diagnostyka preimplantacyjna, niepłodność, zapłodnienie pozaustrojowe, mozaicyzm zarodkowy

Abstract

Infertility is a major social and medical problem affecting one in five couples trying to conceive. Although in vitro fertilization (IVF) is one of the most effective methods in infertility treatment, it still requires further optimization at several levels.

Genetic factors are among the most common causes of pregnancy failure. In case of recurrent pregnancy loss, at the advanced maternal age and for couples at high risk of transmitting a genetic disease to their offspring, it is recommended to enrich IVF with preimplantation genetic testing (PGT).

PGT uses polar bodies collected from oocytes before or after fertilization, single sperms and/or embryo cells (blastomeres or trophoctoderm cells) col-

lected during the preimplantation phase of the embryo development under *in vitro* conditions. PGT involves genetic analysis of the collected material to identify embryos or gametes that are free from any pathogenic genetic changes. The success of PGT depends on obtaining the right quantity and quality of biological material from oocyte or embryo and selecting the most appropriate and reliable method of genetic analysis.

Here we discuss the embryological and clinical aspects of PGT. We describe aims and indications for particular subtypes of PGT. We present all currently available biopsy techniques and discuss advantages and disadvantages of biopsy of particular cell fractions at different stages of embryo development. We also analyze the influence of biopsy on embryo development and describe currently preferred approach for the selection of the biological material for PGT. We also show new direction of the development of the non-invasive methods reducing interference into the embryo structure.

Key words

preimplantation diagnosis, infertility, fertilization *in vitro*, mosaicism

Wykaz skrótów

aCGH – porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (*array comparative genomic hybridization*),

ADO – zjawisko wypadania alleli (*allele drop-out*),

ART – techniki wspomaganego rozrodu (*assisted reproductive technologies*),

FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (*fluorescent in situ hybridization*),

ICM – węzeł zarodkowy (*inner cell mass*),

IVF – zapłodnienie pozaustrojowe (*in vitro fertilization*),

NICS – nieinwazyjny screening chromosomów (*noninvasive chromosome screening*),

PA – preferencyjna amplifikacja (*preferential amplification*),

PBs – ciała kierunkowe (*polar bodies*),

PB1 – ciało kierunkowe I rzędu (*first polar body*),

PB2 – ciało kierunkowe II rzędu (*second polar body*),

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (*polymerase chain reaction*),

PGD – preimplantacyjna diagnostyka genetyczna (*preimplantation genetic diagnosis*),

PGS – preimplantacyjne genetyczne badania przesiewowe (*preimplantation genetic screening*),

PGT – preimplantacyjne badania genetyczne (*preimplantation genetic testing*),

PGT-A – preimplantacyjne badanie genetyczne dla aneuploidii (*preimplantation genetic testing for aneuploidies*),

PGT-M – preimplantacyjne badanie genetyczne dla chorób monogenowych (*preimplantation genetic testing for monogenic diseases*),

PGT-SR – preimplantacyjne badanie genetyczne dla rearanzacji strukturalnych (*preimplantation genetic testing for structural rearrangements*),

TE – trofoektoderma (*trophectoderm*),

WGA – reakcja amplifikacji całego genomu (*whole genome amplification*).

1. Wprowadzenie

Niepłodność definiowana jest jako niezdolność do osiągnięcia ciąży w czasie 1 roku regularnego współżycia w celach prokreacyjnych. Stanowi ona istotny problem ogólnospołeczny, demograficzny, a także jest niekiedy przyczyną rozpadu związków. Według Ministerstwa Zdrowia (Program – Leczenie Niepłodności Metodą Zapłodnienia Pozaustrojowego na lata 2013–2016) niepłodność dotyczy około 15% społeczeństwa polskiego w wieku prokreacyjnym, co stanowi około 1,5 mln par.

Klinicznie niepłodność jest wysoce heterogeniczną jednostką chorobową o złożonej etiologii, która obejmuje czynniki środowiskowe i genetyczne. Niepłodność dotyka w takim samym stopniu kobiety, jak i mężczyzn. Do głównych przyczyn niepłodności u kobiet należą m.in. zaburzenia owulacji, endometrioza, niedrożność lub upośledzona funkcja jajowodów, nieprawidłowości w budowie anatomicznej, czynniki psychogenne i jatrogenne, w tym terapia chorób nowotworowych, a także coraz późniejszy wiek, w którym kobiety decydują się na macierzyństwo. U mężczyzn za główną przyczynę niepłodności uznaje się słabą jakość nasienia, która może być skutkiem uszkodzenia jąder lub nasieniowodów spowodowanego różnymi czynnikami, np. przebytymi chorobami zakaźnymi. Zdarza się, że za pomocą rutynowych badań nie można ustalić przyczyny niepłodności i taką niepłodność określa się mianem nieokreślonej albo idiopatycznej.

Jeżeli możliwe postępowanie wyczekujące lub wdrożona terapia niepłodności nie przynoszą oczekiwanego skutku w postaci samoistnej ciąży, często jedynym sposobem na posiadanie własnego potomstwa jest skorzystanie z technik wspomaganego rozrodu (*assisted reproductive technologies*, ART). Do głównych metod ART zalicza się inseminację we-

wnątrzmaciczną, zapłodnienie *in vitro* (*in vitro fertilization*, IVF), jego odmianę – docytoplazmatyczną mikroiniekcję plemnika do komórki jajowej (*intracytoplasmic sperm injecton*, ICSI) i przeniesienie (*transfer*) zarodków do macicy.

Chociaż IVF jest jedną z najskuteczniejszych metod leczenia niepłodności, to nie jest metodą w 100% skuteczną, która zawsze prowadzi do ciąży i urodzenia zdrowego potomstwa. Różne źródła szacują, iż powodzenie procedury IVF w zależności od przyczyny niepłodności, a także wieku kobiety wynosi od 20% do 50%. Wskaźnik ciąż definiuje się jako łączną liczbę ciąż, w tym żywych urodzeń i poronień występujących w danej grupie kobiet (kobiet w wybranym wieku, dla określonego obszaru geograficznego) i w określonym przedziale czasu. W procedurze IVF wskaźnik ciąż na jedną pobraną komórkę jajową szacuje się na ok. 5% [1]. W związku z tym panuje ogólna zgoda co do tego, że wciąż istnieje potrzeba poprawy skuteczności metod obecnie stosowanych w ART.

2. Genetyczne przyczyny niepłodności

Szacuje się, że ponad 50% przypadków niepłodności ma podłoże genetyczne. Około 50% samoistnych poronień, które dotyczą 10–15% wszystkich ciąż, jest związanych z występowaniem nieprawidłowości genetycznych u zarodka [2]. Liczne badania oparte na metodach pozwalających na analizę całego genomu komórek rozrodczych oraz komórek pobranych z zarodków wskazują, że przeważającą większość tych nieprawidłowości stanowią aneuploidie (>96%). Aneuploidalne zarodki zazwyczaj nie implantują w macicy lub obumierają i ulegają poronieniu we wczesnym etapie ciąży. Analizując wyniki opublikowanych dotychczas badań, nie można jednoznacznie określić odsetka zarodków dotkniętych aneuploidami bądź innymi nieprawidłowościami chromosomowymi u człowieka. Ma na to wpływ wiele czynników, takich jak rodzaj zastosowanej metody detekcji zaburzeń genetycznych, różnice w stymulacji hormonalnej stosowanej w procedurze IVF, a co za tym idzie – różne liczby dojrzałych oocytów pobranych od pacjentek stanowiących badaną grupę czy też stadium rozwoju zarodka, z którego pobierany jest materiał do badań [3].

Do tej pory wielokrotnie potwierdzono występowanie istotnej korelacji między wzrostem liczby aneuploidalnych zarodków a wiekiem matki. W badaniach przeprowadzonych przez Demko i wsp., obejmujących analizę całego genomu komórek pobranych z dużej grupy 37 711 zarod-

ków, udział aneuploidalnych zarodków w przedziale wiekowym kobiet do 27 lat oszacowano na ok. 30–40%, w przedziale wiekowym 27–35 lat utrzymywał się on na równym poziomie ok. 40%, następnie gwałtownie rósł do poziomu 90% aneuploidalnych zarodków dla kobiet w wieku 45 lat [4].

Standardowym postępowaniem w procedurze IVF jest morfologiczna klasyfikacja zarodków i nadawanie pierwszeństwa do transferu zarodkom o prawidłowej strukturze i o prawidłowym przebiegu rozwoju. Co istotne, według badań C. Márqueza i wsp. przeprowadzonych w grupie 1255 zarodków stwierdzono, że aneuploidie występują często w zarodkach prawidłowo wyglądających pod względem morfologicznym. Natomiast zarodki obciążone poliploidią lub mozaikowością mogą częściej wykazywać cechy dysmorficzne, opóźniony rozwój lub obumierać we wczesnym etapie embriogenezy w stosunku do zarodków aneuploidalnych. Nie zauważono związku między wiekiem matki a poliploidalnością i mozaikowością zarodków [5,6]. Wynika z tego, że wiele zarodków podawanych do transferu na podstawie oceny morfologicznej to zarodki aneuploidalne. Aneuploidie są zatem uznawane za najczęstszą przyczynę niepowodzeń implantacji w procedurze IVF [7].

Kolejnym istotnym czynnikiem odpowiadającym za niepowodzenia ciąży u niepłodnych par są rearanżacje strukturalne chromosomów. Translokacje wzajemne zrównoważone oraz robertsonowskie u jednego z partnerów identyfikuje się u około 4–5% par z niepowodzeniami ciąży, inwersje zaś spotyka się u około 1% par. Nosicielstwo rearanżacji zrównoważonej spotyka się u par z poronieniami nawracającymi dziesięć razy częściej niż w populacji ogólnej [8]. Pacjenci ze strukturalnymi rearanżacjami chromosomów napotykają wiele problemów reprodukcyjnych, w tym niski odsetek ciąży, częste samoistne poronienia i zwiększone ryzyko posiadania potomstwa o niezrównoważonym, genetycznie nieprawidłowym genomie. Wynika to z wysokiej częstości występowania gamet o niezrównoważonym genomie u tych osób. Najczęstszą nieprawidłowością strukturalną chromosomów są translokacje wzajemne, obserwowane u około 0,16% populacji ogólnej. Szacuje się, że około 70% zarodków powstałych u par, w których jedno z rodziców jest obciążone wzajemną translokacją, jest nieprawidłowych [9].

W celu zwiększenia wskaźników implantacji zalecane jest, aby pacjenci z nieprawidłowościami w genomie uzupełniali IVF o badania pre-

implantacyjne (*preimplantation genetic testing*, PGT) do oceny materiału genetycznego komórek jajowych przed ich zapłodnieniem lub zarodków przed ich transferem do macicy.

3. Diagnostyka preimplantacyjna (PGT)

Podstawową strategią towarzyszącą procedurze IVF jest zastosowanie odpowiednich metod PGT do analizy materiału genetycznego zarodków i/lub komórek rozrodczych w celu zwiększenia szansy na posiadanie zdrowego dziecka u rodziców obciążonych chorobą genetyczną, a także metod PGT pozwalających na ograniczenie wpływu czynników genetycznych na implantację zarodka w przebiegu procedury IVF i tym samym skrócenie czasu do uzyskania prawidłowej ciąży.

PGT to najwcześniejsza metoda diagnostyczna dostępna w dziedzinie badań prenatalnych. Jej istnienie jest możliwe dzięki rozwojowi technik ART i wymaga współpracy doświadczonych specjalistów z zakresu embriologii oraz genetyki. PGT obejmuje analizę od wybranych fragmentów DNA do badania całego genomu, maksymalnie w rozdzielczości rzędu pojedynczej pary zasad w badanym materiale biologicznym otrzymywanym w procedurze biopsji embriologicznej. PGT zapobiega zagnieżdżeniu się uszkodzonego zarodka i w ten sposób pozwala na uniknięcie ryzyka dylematu terminacji ciąży, jeżeli okaże się, że w tradycyjnej diagnostyce prenatalnej płód jest obciążony chorobą genetycznie uwarunkowaną. Dlatego uważa się, że PGT jest cenną opcją diagnostyczną i terapeutyczną dla kobiet, które wcześniej przeżyły zakończenie ciąży po wykryciu uszkodzenia płodu w konwencjonalnej diagnostyce prenatalnej [10].

Obecnie ogólny termin PGT odnoszący się do technik diagnostyki preimplantacyjnej zastępuje stosowane dotychczas terminy PGD (*preimplantation genetic diagnosis*) oraz PGS (*preimplantation genetic screening*). PGT jest terminem podstawowym i dzieli się na trzy podkategorie badań genetycznych ze względu na ich ukierunkowanie na identyfikację różnych zmian genetycznych w materiale genetycznym zarodków i/lub gamet. Są to: (i) badania identyfikujące warianty genetyczne związane z występowaniem chorób monogenowych (*preimplantation genetic testing for monogenic diseases*, PGT-M), (ii) badania pod kątem występowania aberracji chromosomów (*preimplantation genetic testing for aneuploidies*, PGT-A) oraz (iii) badania pod kątem występowania rearanżacji strukturalnych (*preimplantation genetic testing for structural rearrangements* PGT-SR) [11].

W PGT każdy badany przypadek jest indywidualny i interpretacja wyników w kontekście klinicznym należy do lekarza specjalisty (genetyka klinicznego), pacjentom udziela się konsultacji genetycznej przed badaniem i po jego wykonaniu i decyzje o transferze zapadają w konsultacji z pacjentami. Wybór metody testowania genetycznego zależy od rodzaju badanej zmiany genetycznej i wybranego dla danego pacjenta postępowania diagnostycznego, a także od zaplecza i doświadczenia danej placówki. Aspekt badań genetycznych i preferowanej metodologii w badaniach poszczególnych zaburzeń genetycznych został szczegółowo opisany w drugiej części pracy pt. *Metody analizy genetycznej i aspekty etyczne*.

3.1. Diagnostyka chorób monogenowych (PGT-M)

Głównym celem PGT-M jest wybór tych zarodków, które są wolne od obciążeń genetycznych związanych z dziedzicznymi chorobami monogenowymi. Diagnostyka tego typu ma szczególne zastosowanie dla rodzin, w których u jednego z partnerów występuje choroba genetyczna bądź oboje partnerzy są nosicielami wariantów sprawczych dla choroby monogenowej i/lub dana choroba genetyczna występuje już u starszego potomstwa. Badania PGT-M można zastosować do detekcji dowolnych wariantów, które mogą być wykryte w standardowej diagnostyce genetycznej osób dorosłych. Mogą być to zmiany punktowe, ekspansje trójnukleotydowe, zmiany typu indel, dziedziczone lub powstające *de novo*, warunkujące występowanie chorób monogenowych autosomalnych dominujących, recesywnych, a także chorób sprzężonych z płcią i chorób mitochondrialnych [12]. Badanie PGT-M może być zastosowane do detekcji więcej niż jednego wariantu genetycznego i więcej niż jednej choroby w zarodkach w obrębie jednego cyklu diagnostycznego [13]. W niektórych przypadkach, m.in. gdy nie są dostępne wystarczające informacje o historii choroby w rodzinie pacjentów, dla par z różnymi wariantami w tym samym genie i w przypadku wystąpienia wariantu *de novo* od strony partnera, do analizy genetycznej mogą być wykorzystane pojedyncze plemniki pobrane od pacjenta. Przeprowadzenie analizy STR lub haplotypowania pojedynczych plemników pozwala na określenie allelu związanego z badaną zmianą genetyczną [14].

Najczęstszym wskazaniem do PGT-M jest mukowiscydoza, w dalszej kolejności różne schorzenia, takie jak genetyczne choroby narządów zmysłów (m.in. niedosłuch warunkowany występowaniem częstych wa-

riantów w genie *GJB2* i zespoły chorobowe, w których zaburzenia narządów zmysłów występują jako objawy główne lub towarzyszące, tj. zespół Wolframa), dystrofie mięśniowe i rdzeniowy zanik mięśni, anemia sierpowata, β -talasemia, choroba Huntingtona, choroba Charcota-Mariego-Tootha, achondroplazja i syndrom Marfana [15].

W polskim prawie procedura PGT jest dozwolona wyłącznie ze wskazań medycznych i nie dopuszcza się zastosowania PGT w celu wyboru cech fenotypowych dziecka z wyjątkiem sytuacji, gdy taka procedura pozwoliłaby na uniknięcie ciężkiej, nieuleczalnej choroby dziedzicznej (Dz.U. poz. 1087, art. 26. 1 ustawy z dnia 25 czerwca 2015 r. o leczeniu niepłodności). Jednak wyżej wspomniane wskazania medyczne i cechy fenotypowe nie zostały szczegółowo zdefiniowane.

PGT-M stosuje się także do identyfikacji zarodków, które mają specyficzne cechy, np. określony typ ludzkiego antygenu leukocytarnego (więcej informacji o tego typu diagnostyce w drugiej części pracy pt. *Metody analizy genetycznej i aspekty etyczne*).

3.2. Diagnostyka aberracji chromosomowych (PGT-A)

Metoda PGT-A była pierwszym rodzajem PGT zastosowanym klinicznie. Historia metody sięga lat 90. XX w., kiedy Handyside, Kontogianni i Winston przeprowadzili pierwsze pomyślne badania z wykorzystaniem metody PCR na ludzkich embrionach w 1989 roku, z pierwszymi narodzinami w 1990 roku. W tych pierwszych przypadkach PGT-A wykorzystano do oznaczania aneuploidii chromosomu X [16]. W Polsce ten rodzaj diagnostyki zastosowano po raz pierwszy w 2005 r. Pierwszym ośrodkiem, który wprowadził PGT-A do procedury IVF, była Klinika Leczenia Niepłodności INVICTA.

PGT-A służy identyfikacji aberracji liczbowych chromosomów w badanych zarodkach i/lub ciążkach kierunkowych w celu wyboru lub priorytetyzacji prawidłowych (wolnych od aberracji) zarodków do transferu. Kluczowym założeniem badania PGT-A jest ograniczenie odsetka poronień i poprawienie efektywności IVF poprzez zwiększenie współczynników implantacji zarodków i uzyskanych ciąż w danej jednostce czasu oraz zwiększenie szansy na posiadanie zdrowego (wolnego od aberracji chromosomowych) potomstwa.

Diagnostyka tego typu jest szczególnie zalecana kobietom, u których przyczyną niepłodności są poronienia o nieznannej etiologii (histo-

ria dwóch lub więcej poronień), będących w wieku powyżej 35 lat i/lub które mają dziecko lub nosiły płód z aberracjami chromosomowymi [17]. PGT-A jest także często zalecane parom, u których: wystąpiły przynajmniej dwa niepowodzenia w procedurze IVF (niepowodzenia implantacji), stwierdzono niepłodność idiopatyczną, występuje współczynnik męski niepłodności (niska ilość i/lub jakość nasienia). W niektórych klinikach PGT-A jest używane rutynowo w cyklach IVF z dawstwa komórek jajowych. PGT-A może być stosowane jako procedura towarzysząca PGT-M w celu identyfikacji zarodków jednocześnie nieobciążonych dziedziczną chorobą monogenową i o prawidłowej liczbie chromosomów.

Większość współczesnych metod do analizy całogenomowej wykorzystywanych standardowo w PGT-A ma także ograniczoną możliwość (rozdzielczość) do wykrywania dużych insercji i delecji w materiale genetycznym zarodka (>5Mb), powstających najczęściej *de novo* w gametogenezie lub podczas podziałów mitotycznych w dalszym etapie rozwoju zarodka.

3.3. Diagnostyka rearanżacji strukturalnych (PGT-SR)

PGT-SR służy do identyfikacji rearanżacji strukturalnych fragmentów chromosomów w badanych zarodkach w celu selekcji zarodków o prawidłowym (wolnym od rearanżacji) lub zrównoważonym genomie do transferu. Diagnostyka tego typu ma szczególne zastosowanie dla par, u których jeden z partnerów jest nosicielem translokacji wzajemnej, robertsonowskiej lub inwersji i/lub u których zidentyfikowano delecje i/lub duplikacje fragmentów chromosomów, które mają historię występowania rearanżacji strukturalnych chromosomów w rodzinie lub które mają już potomstwo z rearanżacjami chromosomowymi [9]. W przypadku występowania translokacji chromosomowej u mężczyzny do szacunkowej predykcji szansy na powodzenie procedury IVF może zostać wykorzystana metoda analizy pojedynczych plemników. W tego typu analizie ocenia się odsetek plemników o nieprawidłowym genomie i tym samym szansę na utworzenie prawidłowego zarodka [18].

Większość współczesnych metod wykorzystywanych standardowo w PGT-SR nie pozwala na odróżnienie genomu zrównoważonego od prawidłowego. Zastosowanie metod do analizy całogenomowej o bardzo wysokiej rozdzielczości i metody celowane, takie jak tradycyjna metoda fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (*fluorescent in situ hybridization*; FISH),

pozwalają jednak na przeprowadzenie takiej analizy w celu uzyskania zdrowego potomstwa nieobciążonego nosicielstwem rearanżacji rozpoznanej u rodzica/rodziców (więcej informacji o tego typu diagnostyce w drugiej części pracy pt. *Metody analizy genetycznej i aspekty etyczne*).

4. Materiał biologiczny w badaniach PGT

W zależności od typu prowadzonej diagnostyki, rodzaju badanej zmiany genetycznej oraz praktyki danego ośrodka PGT może być wykonywane z wykorzystaniem komórek powstałych w gametogenezie (ciałek kierunkowych, plemników) i/lub komórek pozyskanych z zarodka w różnych stadiach rozwoju embrionalnego (ryc. 1). W tym rozdziale zostaną przedstawione relatywne korzyści oraz wady płynące z wykorzystania każdej z poniższych metod.

4.1. Plemniki

Analiza genomu pojedynczych plemników jest nieinwazyjną metodą stosowaną w wybranych przypadkach do analizy materiału genetycznego męzczyzny w procedurze PGT-M do określania haplotypu związanego z daną zmianą genetyczną lub PGT-SR do określenia częstości występowania rearanżacji chromosomowych w gametach pacjentów z translokacjami [19]. W procedurze embriologicznej frakcja komórkowa nasienia jest izolowana ze świeżego ejakulatu poprzez wirowanie w gradiencie gęstości lub z wykorzystaniem innych metod frakcjonujących, a następnie płużkana w medium hodowlanym i porcjowana. Pojedyncze gamety męskie, plemniki, są oddzielane techniką mikromanipulacji i przenoszone do osobnych kropli medium hodowlanego i poddawane lizie komórkowej. DNA pojedynczych plemników jest poddawane amplifikacji w obrębie wybranych fragmentów w reakcji PCR lub całogenomowej amplifikacji w reakcji WGA, a następnie poddawane analizie genetycznej metodą dostosowaną do danego przypadku klinicznego i zgodnie z praktyką danego ośrodka.

4.2. Ciałka kierunkowe

Ciałka kierunkowe (*polar bodies*, PBs) służą do redukcji materiału genetycznego oocyty poprzez eliminację połowy diploidalnego zestawu chromosomów w podziale mejotycznym w komórce jajowej, pozostawiając ją haploidalną. Ciałko kierunkowe I rzędu (PB1) powstaje po pierwszym po-

dziale mejotycznym, natomiast ciałko kierunkowe II rzędu (PB2) po drugim podziale mejotycznym oogenezy, który zachodzi na skutek połączenia się komórki jajowej z plemnikiem. Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy PBs nie pełnią żadnej fizjologicznej funkcji w procesie rozwoju zarodka, ich biopsja jest całkowicie bezpieczna i nie wpływa na dalszy rozwój zarodka [20]. PBs są wykorzystywane w PGT od przeszło trzech dekad, jednak aktualnie istnieje stosunkowo niewiele laboratoriów PGT, w których testy genetyczne wykorzystujące PBs są nadal rutynowo stosowane. Ta procedura była powszechna w państwach (np. we Włoszech, w Szwajcarii i w Niemczech), w których regulacje prawne zabraniały genetycznego testowania komórek pochodzących z zarodka. W wielu z tych państw wskutek zmiany przepisów prawnych dopuszczono ostatecznie badanie komórek pochodzących z zarodków [21]. W związku z wieloma argumentami przeważającymi na korzyść badania materiału pochodzącego z zarodków odchodzi się od testowania PBs.

PBs zawierają wyłącznie matczyzny materiał genetyczny, zatem głównym ograniczeniem tej metody jest fakt, że nie uwzględnia ona badania materiału genetycznego przyszłego ojca oraz wyklucza wykrycie wszelkich zmian powstających w procesie rozwoju zarodka. PB1 może być pobierane przed zapłodnieniem komórki jajowej (ryc. 1A), a PB2 jest wyrzucane przez komórkę po jej zapłodnieniu (ryc. 1B). Procedura ich pobierania polega na mechanicznym lub laserowym nacięciu osłonki przejrzystej i pobraniu ciałka zlokalizowanego na zewnątrz dojrzałej komórki jajowej (ryc. 1A,B) [22].

W PGT-M, na podstawie badania PB1 i PB2 możliwe jest ustalenie genotypu oocyty (tzw. analiza pośrednia). Gdy w analizie PB1 pobranego od heterozygotycznego osobnika (kobiety, która jest nosicielką wariantu genetycznego) identyfikuje się genotyp homozygotyczny pod względem badanej zmiany, można wnioskować, że w oocycie znajduje się normalny allel. Taka dedukcja sprawia, że potencjalnie wytypowany nieobciążony genetycznie oocyt może zostać zapłodniony w procedurze IVF i zostać przekazany do transferu. Odwrotnie, genetycznie prawidłowe PB wskazuje genetycznie nieprawidłowy oocyt, zatem taki oocyt nie jest kwalifikowany do IVF.

W diagnostyce pojedynczego genu należy wziąć pod uwagę występowanie rekombinacji genetycznej w DNA komórki jajowej przed oddzieleniem PB1. Jeżeli w badaniu w PB1 zostanie zidentyfikowany genotyp

heterozygotyczny, wskazujący na zajście rekombinacji, niezbędna jest biopsja PB2 w celu ostatecznego ustalenia genotypu oocytu. Jest to konieczne ze względu na losową segregację chromatyd w drugim podziale mejotycznym, która w takiej sytuacji może doprowadzić do powstania zarówno obciążonej, jak i nieobciążonej genetycznie komórki jajowej. W praktyce prawie wszystkie ośrodki przeprowadzające PGT-M z użyciem PBs wykorzystują oba PBs do badania, gdyż często analiza tylko jednego PB nie daje wystarczająco wiarygodnej informacji do oceny genotypu oocytu. Jest to głównie związane z możliwym brakiem amplifikacji jednego z alleli wskutek zjawiska wypadania alleli (*allele drop-out*, ADO) oraz preferencyjnej amplifikacji alleli (*preferential amplification*, PA). W przypadku badania obu PBs utracona zostaje możliwość prekonceptyjnej diagnostyki oocytu, ponieważ aby uzyskać PB2 do badania, musi dojść do zapłodnienia komórki jajowej.

Błędy mejotyczne mogą prowadzić do powstania aneuploidalnych komórek jajowych, z których w znaczącej większości przypadków po zapłodnieniu powstaje zarodek aneuploidalny. Błędy mogą wystąpić podczas jednego z dwóch podziałów mejotycznych, w których powstają PBs, ale są częstsze podczas tworzenia PB1. Tworzenie PB1 wpływa na status ploidalności PB2, np. rozdział chromatyd przed anafazą w PB1 może indukować tworzenie aneuploidalnego PB2. Dlatego tworzenie PB1 jest szczególnie ważnym czynnikiem w tworzeniu prawidłowego zarodka [23].

Zjawisko nondysjunkcji obserwuje się zdecydowanie częściej podczas oogenezy niż spermatogenezy. Znaczna większość zarodkowych aneuploidii (około 80%) jest pochodzenia matczynego [24]. Ryzyko nondysjunkcji wzrasta wraz z wiekiem matki, powoli po ukończeniu 29. roku życia, następnie znacznie szybciej po 35. roku życia [25]. Identyfikacja w PB1 nieprawidłowej liczby chromosomów może oznaczać, że badany oocyt jest aneuploidalny i nie klasyfikuje się do zapłodnienia. Taki wynik należy jednak potwierdzić w analizie PB2, szczególnie ze względu na możliwość wystąpienia zjawiska korekcji błędu mejozy I poprzez wystąpienie odpowiadającego błędu korygującego w mejozie II, co może dotyczyć nawet 45% zarodków powstałych z oocytu z wykrytymi błędami mejotycznymi [26]. W wyniku tego zjawiska analiza PB1 może być obarczona wysokim odsetkiem odrzuconych oocytów, które mogłyby ulec autokorekcji i potencjalnie rozwinąć się w prawidłowy zarodek.

Unikalną zaletą biopsji PB1 jest to, że można ją przeprowadzić przed zapłodnieniem komórki jajowej. Jest to jedyna możliwość diagnozy na poziomie gamet, która w razie wykrycia nieprawidłowości nie zakłada eliminacji zarodków. W przypadku niektórych par sprzeciwiających się badaniu zarodków (np. ze względów ideologicznych) jest to jedyna dopuszczalna forma diagnostyki preimplantacyjnej. Niestety ilość pozyskanego materiału diagnostycznego w przypadku biopsji PB jest bardzo mała, a wyniki otrzymane z analizy pojedynczej komórki mogą być obciążone stosunkowo dużym błędem diagnostycznym wynikającym ze zjawiska ADO i PA.

4.3. Blastomery

Do niedawna biopsja blastomeru była najczęściej stosowaną procedurą w PGT [27]. Procedura pobrania odbywa się najczęściej w 3. dniu po zapłodnieniu, gdy całkowita liczba komórek w prawidłowym zarodku wynosi od 6 do 8. Przed wykonaniem biopsji zarodki zostają przeniesione do środowiska wolnego od jonów wapnia i magnezu, co ułatwia oddzielenie i pobranie komórek. Sama procedura jest bardzo podobna do biopsji PBs, polega na nacięciu osłonki przejrzystej za pomocą lasera, rozwarstwienia mechanicznego lub ekspozycji na kwaśny roztwór Tyrode'a. Komórki usuwa się przez wprowadzenie pipety i zassanie ich lub przez wytłoczenie, kładąc nacisk na zewnętrzną osłonkę zarodka (ryc. 1C) [28]. W taki sposób pobierane są jeden lub dwa blastomery. Transfer zarodka poddawanego analizie genetycznej wykonuje się w 5. dniu cyklu IVF, zapewnia to więc wystarczająco dużo czasu na przeprowadzenie niektórych badań genetycznych, wybranie i przeniesienie zdrowych zarodków, które rozwinęły się do stadium blastocysty [27]. W materiale z biopsji blastomeru lub trofoektodermy, w przeciwieństwie do analizy PBs, analizie podlega materiał genetyczny pochodzący od obojga rodziców.

Istnieje powszechna zgoda co do tego, że biopsja blastomeru/ów opóźnia kompakcję i blastulację zarodków, co prowadzi do zmniejszenia ich potencjału implantacyjnego [29, 30]. Inwazyjność biopsji jednego blastomeru w stosunku do biopsji dwóch blastomerów pozostaje natomiast kwestią sporną [31, 32]. Faktem jest natomiast, że nie zawsze biopsja jednej komórki dostarcza wystarczających informacji na temat materiału genetycznego zarodka. Badania przeprowadzone na grupie blastomerów uzyskanych z biopsji zarodków wykazały, że wydajność diagnostyczna

reakcji łańcuchowej polimerazy (*polimerase chain reaction*, PCR) wyniosła 88,6% dla analizy jednej komórki (grupa I) i 96,4% dla analizy dwóch pobranych komórek (grupa II). W przypadku PGT metodą FISH nie uzyskano istotnej statystycznie różnicy w skuteczności (odpowiednio 98,2 i 97,5% w grupie I i II) [33]. Ponadto analiza drugiej komórki pobranej z zarodka może być niezbędna do wyjaśnienia wątpliwego wyniku otrzymanego z biopsji jednej komórki.

Analiza więcej niż jednej komórki po biopsji daje szansę na wykrycie mozaicyzmu zarodkowego. Pełny zakres tego zjawiska ujawniono w badaniu, w którym wszystkie pojedyncze komórki pobrane z zarodków w 3. dniu rozwoju poddano kompleksowej analizie chromosomów [34]. Wykazano w nim, że niektóre trzydniowe zarodki składają się z mieszaniny normalnych komórek i komórek aneuploidalnych, podczas gdy niektóre zarodki mają tylko nieprawidłowe komórki i inne nieprawidłowości w każdej komórce; są to tzw. chaotyczne zarodki. Szacuje się, że odsetek mozaikowości zarodków w 3. dniu rozwoju, w której co najmniej jedna komórka ma inną ploidalność od reszty komórek w zarodku, wynosi od około 60% [35]. Koncepcja, że trzydniowe zarodki pokazują wysoki poziom mozaicyzmu, została zakwestionowana przez Capalbo i wsp., którzy postulowali, że mozaikowość blastomerów jest w dużej mierze spowodowana błędami technicznymi wykonanymi w aCGH, chociaż inni autorzy odrzucili to twierdzenie, powołując się na wysoki poziom walidacji i udowodnioną wiarygodność aCGH na poziomie badania pojedynczej komórki [36, 37].

Część zarodków w stadium bruzdkowania, zdiagnozowanych jako aneuploidalne, podlega zjawisku autokorekcji w stadium blastocysty, m.in. przez selektywną apoptozę lub alokację nieprawidłowych komórek do trofoektodermy [38, 28]. Jednakże ze względu na brak możliwości śledzenia mechanizmu tego zjawiska i oceny potencjału zarodka do autokorekcji, zarodki zidentyfikowane jako nieprawidłowe najczęściej nie są przekazywane do transferu [38]. Mimo że w PGT-A z użyciem blastomerów często skutecznie przewiduje się ploidalność płodu, ograniczenia takie jak mozaikowość i nieprzewidywalna autokorekta komplikują wystawianie prawidłowej diagnozy, nawet przy użyciu bardzo dokładnych technologii. Dlatego współcześnie niemożliwe jest całkowite wyeliminowanie ryzyka odrzucenia zarodka zdolnego do prawidłowego rozwoju, choć takie ryzyko jest niskie. Ostatecznie randomizowane badania

kliniczne potwierdziły, że pobranie blastomerów z zarodka w stadium bruzdkowania istotnie zmniejsza jego potencjał do implantacji, podczas gdy pobranie komórek trofoektodermy nie powoduje takiego efektu [30]. W świetle licznych korzyści wynikających z biopsji blastocysty w stosunku do biopsji trzydniowego zarodka obecnie zalecanym rozwiązaniem w biopsji zarodków jest pobieranie komórek trofoektodermy [39].

4.4. Komórki trofoektodermy

Ludzka blastocysta zawiera około 120–130 komórek rozmieszczonych pomiędzy węzłem zarodkowym (*inner cell mass*, ICM), z którego rozwija się płód, a otaczającymi komórkami trofoektodermy (*trophectoderm*, TE), z której rozwija się łożysko i błony płodowe. Od 2016 roku biopsja blastocysty jest rekomendowanym podejściem w technikach PGT. Diagnostyczne zastosowanie biopsji blastocysty zostało zaproponowane przez McArthura i zespół laboratorium IVF z Sydney (Australia) [40]. Biopsja na tym etapie jest technicznie łatwiejsza niż na etapie bruzdkowania oraz od pobierania PB. Polega na tzw. wspomaganym wylęganiu zarodka w 3. dniu rozwoju, czyli wykonaniu za pomocą lasera otworu o wymiarach 25–30 µm w osłonce przejrzystej, hodowli do dnia 5. w celu utworzenia się przepukliny z trofoektodermy i pobraniu przez rozciągnięcie i laserowe odcięcie od ok. 5 do 10 komórek. Usuwane są tylko komórki TE, nie naruszając ICM, dlatego ten rodzaj biopsji uważa się za bezpieczniejszy i mniej inwazyjny dla zarodka niż pobieranie pojedynczego blastomeru [41]. Otrzymuje się przy tym znacznie większą liczbę komórek do badań w porównaniu z poprzednimi metodami (ryc. 1D), co wpływa na lepszą reprezentatywność mozaikowatości zarodków i na mniejsze ryzyko wystąpienia ADO oraz PA w analizie genetycznej [28, 40]. Użycie komórek trofoektodermy jest też preferowanym materiałem diagnostycznym w badaniu preimplantacyjnym poziomu heteroplazmii [42].

Celem pracy zespołu Johnson i wsp. było zbadanie aneuploidii w ludzkich blastocystach i oceny różnicy pomiędzy genomem komórek TE a ICM [35]. Badanie przeprowadzono na grupie kobiet o średniej wieku 31 lat. Łącznie przebadano 51 blastocyst z wykorzystaniem metody aCGH do analizy całogenomowej. W około 80% blastocyst nie wykryto aberracji chromosomowych, u 14,2% stwierdzono obecność aneuploidii, a w pozostałych 5,8% wystąpiły strukturalne rearanżacje chromosomowe. To samo badanie powtórzono, analizując TE pochodzącą z biopsji

tych samych zarodków. Zgodny wynik otrzymano dla 96,1% porównywanego materiału, dla pozostałych 3,9% wystąpiła niezgodność między TE i ICM. W obu przypadkach różnica dotyczyła zarodków ze stwierdzoną rearanżacją chromosomową. Na podstawie tego badania wnioskowano, że genom komórek TE jest dobrym odzwierciedleniem genomu komórek ICM.

Dłuższa hodowla zarodka *in vitro* do 4–5 dnia ułatwia zidentyfikowanie nieprawidłowych morfologicznie i nierozwijających się zarodków. Około jednej trzeciej zarodków mających nieprawidłowości chromosomalne na etapie bruzdkowania nie udaje się rozwinąć do stadium blastocysty, w ten sposób poddaje się je naturalnej selekcji, ograniczając tym samym liczbę zarodków do badania w PGT z wykorzystaniem komórek trofoektodermy [43].

4.5. Płyn z blastocelu i medium hodowlane – techniki nieinwazyjne

Alternatywą dla ingerencji w strukturę zarodka mogą się okazać metody wykorzystujące odkrycie z 2013 roku, w którym Palini i wsp. wykazały obecność wolnego zarodkowego DNA w płynie jamy blastocelu [44]. Płyn ten można pozyskać podczas nakłuwania blastocysty (ang. *blastocentesis*) w rutynowym procesie witrifikacji – nowoczesnej praktyce stosowanej w kriokonserwacji zarodków przeznaczonych do IVF. Objętość otrzymanego płynu waha się w przedziale 0,3–0,5 nl i nie miał on do tej pory żadnego zastosowania.

Ustalenie obecności DNA w płynie z blastocelu rozpoczęto od amplifikacji pojedynczej kopii genu *GAPDH*. Do badania zastosowano technikę PCR w czasie rzeczywistym. Produkt amplifikacji uzyskano w 9 z 16 (56%) próbek płynu. Po optymalizacji metody wskaźnik wykrywalności w tym badaniu wyniósł 89,7% (26/29 próbek).

Na podstawie powyższych badań oszacowano, że średnia zawartość genomowego DNA w płynie blastocelu wynosi 9,9 pg. Pięć kolejnych próbek płynu poddano reakcji amplifikacji całogenomowej (*whole genome amplification*, WGA). Powodzenie amplifikacji odnotowano w 80% próbek. Dwie próbki przeznaczono do całogenomowego badania z wykorzystaniem metody aCGH, osiągając rozdzielczość do ok. 5 Mb. Otrzymane rezultaty pozwoliły na ustalenie płci, w obu badanych próbkach wykryto chromosom Y i było to zgodne z przeprowadzonym wcześniej testem PCR. Dodatkowo wykryto nieprawidłowości chromosomalne. Fakt, że

badanie aCGH dało wyniki przydatne do interpretacji, oznacza, że znaczna część DNA w blastocycie nie jest tak zdegradowana jak zakładano uprzednio [44]. Niestety wskaźnik interpretowalnych wyników przy użyciu tego materiału badawczego jest znacznie niższy w porównaniu z biopsją blastomeru lub TE, w których odsetek interpretowalnych wyników szacuje się na 98–99% [45].

Wykonywanie PGT bez biopsji zarodków niesie ze sobą korzyści w postaci uproszczenia procedury i zmniejszenia jej inwazyjności poprzez uniknięcie pobierania komórek zarodkowych, jednak metoda ta wymaga szeregu badań i testów przed wprowadzeniem do praktyki klinicznej. Obawy dotyczące badania są związane z pochodzeniem pobieranego w ten sposób DNA i wątpliwością, że nie reprezentuje ono całego genomu zarodka, ponieważ pożywki hodowlane stosowane w procedurze IVF mogą zawierać frakcje DNA obcego pochodzenia. Ponadto zasugerowano, że DNA znajdujące się w płynie blastocelu może być uwalniane z nieprawidłowych lub zdegenerowanych komórek, np. na skutek zjawiska autokorekcji zarodków, i dlatego nie może być tak reprezentatywne jak DNA wyizolowane z komórek nienaruszonych. Co za tym idzie – w takich testach istnieje zwiększone ryzyko otrzymania fałszywie dodatniego wyniku i odrzucenia zdrowego zarodka, jednak takie ryzyko w mniejszym bądź większym stopniu towarzyszy każdej z wcześniej przedstawionych metod. Co więcej, procedurę możemy nazwać nieinwazyjną, ale każda ingerencja w strukturę zarodka może doprowadzić do jego uszkodzenia, co może wpłynąć na żywotność blastocysty. Jeśli takie podejście okaże się lepszym rozwiązaniem niż dotychczas stosowane, potencjalne ryzyko związane z biopsją zarodków może zostać zmniejszone, a badania zespołu Palinię niewątpliwie przyczynią się do ogromnego postępu w technikach PGT [44].

Kolejną obiecującą, zupełnie nieinwazyjną metodą badania wszystkich chromosomów (noninvasive chromosome screening, NICS) jest analiza próbek zużytej pożywki hodowlanej pochodzącej z hodowli zarodków [46-48]. W dotychczasowych badaniach metoda ta spotykała się jednak z wieloma ograniczeniami i problemami, między innymi z występującym w pożywce zanieczyszczeniem DNA mitochondrialnym lub genomowym, pochodzącym z komórek ziarnistych, które w analizie medium może dawać wyniki fałszywie pozytywne [49]. Ograniczeniem tej metody jest także ilość i/lub fragmentacja dostępnego DNA, która pozwala na anali-

zę niewielkiego odsetka próbek, gdzie w jednym z badań analiza aCGH była możliwa jedynie dla 11% (6/55) wszystkich próbek [46]. Obecnie ocena statusu ploidalności zarodków przy użyciu tej metody znajduje się poniżej akceptowalnej normy w PGT (72,2% zgodności w stosunku do wyników z badania PB1 i PB2) i wymaga dalszej optymalizacji. Mimo to pierwsze kliniczne próby jej zastosowania w PGT zakończyły się sukcesem i urodzeniem zdrowych dzieci [48].

5. Podsumowanie

Wraz z rozwojem technologii wykorzystywanych w biologii molekularnej i badaniach genetycznych obserwuje się dynamiczny wzrost skuteczności i poszerzenie wachlarza możliwości PGT. Zastosowanie PGT umożliwiło posiadanie zdrowego potomstwa tysiącom par borykających się z problemem niepłodności i/lub obciążonych genetycznie. Wśród dzieci urodzonych po uprzednim przeprowadzeniu badania zarodka nie zaobserwowano dotąd wyższej częstości występowania wad wrodzonych w porównaniu z dziećmi urodzonymi po IVF, u których nie wykonywano PGT [50].

W celu dalszego doskonalenia PGT opracowywane są metody zastępcze w stosunku do inwazyjnej biopsji komórek jajowych i zarodków, która wymaga wyspecjalizowanych umiejętności, przeprowadzenia długoterminowych testów bezpieczeństwa dla każdego z wykonujących biopsje operatorów i zawsze jest obciążona czynnikiem ludzkim (błędem technicznym wynikającym z manualnej manipulacji z udziałem operatorów) [48]. Obecnie najbardziej preferowanym podejściem jest wykonywanie biopsji TE, natomiast odchodzi się od wykorzystania materiału biologicznego pochodzącego z biopsji blastomerów, który był rekomendowanym podejściem jeszcze kilka lat temu. Biopsja PB1 jest jedyną możliwością do przeprowadzenia PGT u par sprzeciwiających się z różnych względów badaniom materiału pochodzącego z zarodków, jednak jest obciążona stosunkowo dużym ryzykiem błędu i innymi wadami.

Przyszłością PGT może się okazać wykorzystanie do badań płynu z blastocelu i/lub pożywki hodowlanej zarodka, w której stwierdzono obecność zarodkowego DNA. Metody te są jednak na wczesnym etapie badań i wymagają jeszcze szeregu testów potwierdzających ich skuteczność, wiarygodność, dokładność i powtarzalność. Powszechnie popierana jest jak najmniejsza ingerencja w strukturę zarodka, która pozwoli na

maksymalne zmniejszenie ryzyka ewentualnych uszkodzeń wpływających na żywotność zarodków i ich potencjał implantacyjny.

Co istotne, na sukces reprodukcyjny w medycynie wspomaganego rozrodu wpływa nie tylko rozwijanie technologii stosowanych w PGT, lecz także zwiększanie efektywności wszystkich metod towarzyszących ART, także na etapie zapłodnienia *in vitro*, hodowli zarodków i ich krio-konserwacji. Istotnym ograniczeniem, z którym spotykają się pary decydujące się na PGT, jest brak lub mała liczba zarodków nieobarczonych wadami genetycznymi dostępnych do transferu. Dlatego bardzo istotne jest doskonalenie metod w PGT w celu ograniczenia liczby wyników fałszywie dodatnich, których otrzymanie może prowadzić do odrzucenia prawidłowych zarodków, które potencjalnie mogłyby zostać przekazane do transferu. Na tym polu szczególnie ważny jest rozwój i doskonalenie metod analizy genetycznej.

Publikacja powstała w związku z realizacją projektów Mazowieckiej Jednostki Wdrażania Projektów Unijnych nr RPMA.01.02.00-14-6087/16, RPMA.01.02.00-14-7395/16 i Polskiej Agencji Rozwoju Przedsiębiorczości nr POIR.02.03.02-14-0092/17.

Piśmiennictwo

1. Lemmen JG, Rodriguez NM, Andreasen LD, Loft A, Ziebe S. The total pregnancy potential per oocyte aspiration after assisted reproduction-in how many cycles are biologically competent oocytes available? *J Assist Reprod Genet* 2016; 33: 849-854.
2. Coelho FF, Marques FK, Goncalves MS, Almeida VC, Mateo EC, Ferreira AC. Detection of aneuploidies in spontaneous abortions by quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers: a retrospective study. *Genet Mol Res* 2016; 15.
3. Gutierrez-Mateo C, Wells D, Benet J et al. Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 2004; 19: 2118-2125.
4. Demko ZP, Simon AL, McCoy RC, Petrov DA, Rabinowitz M. Effects of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-chromosome single-nucleotide polymorphism-based preimplantation genetic screening. *Fertil Steril* 2016; 105: 1307-1313.
5. Marquez C, Sandalinas M, Bahce M, Alikani M, Munne S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online* 2000; 1: 17-26.
6. McCoy RC. Mosaicism in Preimplantation Human Embryos: When Chromosomal Abnormalities Are the Norm. *Trends Genet* 2017; 33: 448-463.
7. Kang HJ, Melnick AP, Stewart JD, Xu K, Rosenwaks Z. Preimplantation genetic screening: who benefits? *Fertil Steril* 2016; 106: 597-602.
8. Simpson JL. Causes of fetal wastage. *Clin Obstet Gynecol* 2007; 50: 10-30.
9. Escudero T. PGT for structural rearrangements (PGT-SR). *Reproductive BioMedicine Online* 2019; 38: e3-e4.

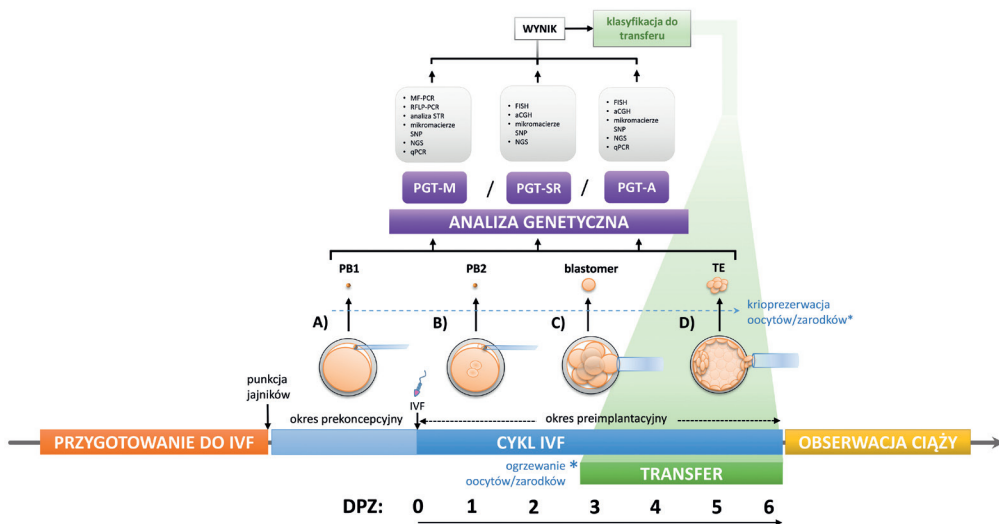
10. Traeger-Synodinos J. Pre-implantation genetic diagnosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2017; 39: 74-88.
11. Harper JC, Aittomaki K, Borry P et al. Recent developments in genetics and medically assisted reproduction: from research to clinical applications. *Eur J Hum Genet* 2018; 26: 12-33.
12. Ben, Nagi J, Serhal P, SenGupta S, Doye K, Wells D. Preimplantation genetic diagnosis: an overview and recent advances. *The Obstetrician & Gynaecologist* 2016; 18: 99-106.
13. Altarescu G, Brooks B, Margalioth E, Eldar Geva T, Levy-Lahad E, Renbaum P. Simultaneous preimplantation genetic diagnosis for Tay-Sachs and Gaucher disease. *Reprod Biomed Online* 2007; 15: 83-88.
14. Tur-Kaspa I, Rechitsky S, Ozen RS, Sharapova T, Laziuk K, Verlinsky Y. Sperm DNA genotyping for preimplantation genetic diagnosis (PGD). *Fertil Steril* 2004; 82: S254.
15. Verpoest W. Preimplantation genetic diagnosis: design or too much design. *Facts Views Vis Obgyn* 2009; 1: 208-222.
16. Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, Winston RM, Hughes MR. Birth of a normal girl after *in vitro* fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1992; 327: 905-909.
17. Won SY, Kim H, Lee WS, Kim JW, Shim SH. Pre-implantation genetic diagnosis and pre-implantation genetic screening: two years experience at a single center. *Obstet Gynecol Sci* 2018; 61: 95-101.
18. Patassini C, Garolla A, Bottacin A et al. Molecular karyotyping of human single sperm by array – comparative genomic hybridization. *PLoS One* 2013; 8: e60922.
19. Altarescu G, Brooks B, Kaplan Y et al. Single-sperm analysis for haplotype construction of de-novo paternal mutations: application to PGD for neurofibromatosis type 1. *Hum Reprod* 2006; 21: 2047-2051.

20. Wei Y, Zhang T, Wang YP, Schatten H, Sun QY. Polar bodies in assisted reproductive technology: current progress and future perspectives. *Biol Reprod* 2015; 92: 19.
21. Bayefsky MJ. Comparative preimplantation genetic diagnosis policy in Europe and the USA and its implications for reproductive tourism. *Reprod Biomed Soc Online* 2016; 3: 41-47.
22. Montag M, van der Ven K, Rosing B, van der Ven H. Polar body biopsy: a viable alternative to preimplantation genetic diagnosis and screening. *Reprod Biomed Online* 2009; 18 Suppl 1: 6-11.
23. Geraedts J, Collins J, Gianaroli L et al. What next for preimplantation genetic screening? A polar body approach! *Hum Reprod* 2010; 25: 575-577.
24. Kubicek D, Hornak M, Horak J et al. Incidence and origin of meiotic whole and segmental chromosomal aneuploidies detected by karyomapping. *Reprod Biomed Online* 2019; 38: 330-339.
25. Pellestor F, Anahory T, Hamamah S. The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 15-32.
26. Kuliev A, Zlatopolsky Z, Kirillova I, Spivakova J, Cieslak Janzen J. Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. *Reprod Biomed Online* 2011; 22: 2-8.
27. Adiga SK, Kalthur G, Kumar P, Girisha KM. Preimplantation diagnosis of genetic diseases. *J Postgrad Med* 2010; 56: 317-320.
28. Stern HJ. Preimplantation Genetic Diagnosis: Prenatal Testing for Embryos Finally Achieving Its Potential. *J Clin Med* 2014; 3: 280-309.
29. Bar-El L, Kalma Y, Malcov M et al. Blastomere biopsy for PGD delays embryo compaction and blastulation: a time-lapse microscopic analysis. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33: 1449-1457.

30. Scott RT, Jr., Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril* 2013; 100: 624-630.
31. Brodie D, Beyer CE, Osborne E, Kravetski V, Rasi S, Osianlis T. Pre-implantation genetic diagnosis for chromosome rearrangements – one blastomere biopsy versus two blastomere biopsy. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29: 821-827.
32. De Vos A, Staessen C, De Rycke M et al. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers. *Hum Reprod* 2009; 24: 2988-2996.
33. Goossens V, De Rycke M, De Vos A et al. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 2008; 23: 481-492.
34. Vanneste E, Voet T, Le Caignec C et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009; 15: 577-583.
35. Johnson DS, Cinnioglu C, Ross R et al. Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. *Mol Hum Reprod* 2010; 16: 944-949.
36. Capalbo A, Ubaldi FM, Rienzi L, Scott R, Treff N. Detecting mosaicism in trophectoderm biopsies: current challenges and future possibilities. *Hum Reprod* 2017; 32: 492-498.
37. Sermon KD, Spits C, Mertzaniidou A, Vermeesch JR, Fiorentino F. Detecting mosaicism in trophectoderm biopsies. *Hum Reprod* 2017; 32: 712-713.
38. Barbash-Hazan S, Frumkin T, Malcov M et al. Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. *Fertil Steril* 2009; 92: 890-896.

39. Coll L, Parriego M, Boada M et al. Transition from blastomere to trophoctoderm biopsy: comparing two preimplantation genetic testing for aneuploidies strategies. *Zygote* 2018; 26: 191-198.
40. McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA, Jansen RP. Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil Steril* 2005; 84: 1628-1636.
41. Kokkali G, Vrettou C, Traeger-Synodinos J et al. Birth of a healthy infant following trophoctoderm biopsy from blastocysts for PGD of beta-thalassaemia major. *Hum Reprod* 2005; 20: 1855-1859.
42. Smeets HJ, Sallevelt SC, Dreesen JC, de Die-Smulders CE, de Coo IF. Preventing the transmission of mitochondrial DNA disorders using prenatal or preimplantation genetic diagnosis. *Ann N Y Acad Sci* 2015; 1350: 29-36.
43. Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2010; 94: 1700-1706.
44. Palini S, Galluzzi L, De Stefani S et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reprod Biomed Online* 2013; 26: 603-610.
45. Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Hum Reprod* 2011; 26: 33-40.
46. Shamonki MI, Jin H, Haimowitz Z, Liu L. Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertil Steril* 2016; 106: 1312-1318.
47. Feichtinger M, Vaccari E, Carli L et al. Non-invasive preimplantation genetic screening using array comparative genomic hybridization on spent culture media: a proof-of-concept pilot study. *Reprod Biomed Online* 2017; 34: 583-589.

48. Xu J, Fang R, Chen L et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: 11907-11912.
49. Hammond ER, McGillivray BC, Wicker SM et al. Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic contamination identified. *Fertil Steril* 2017; 107: 220-228 e225.
50. Liebaers I, Desmyttere S, Verpoest W et al. Report on a consecutive series of 581 children born after blastomere biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 2010; 25: 275-282.



Rycina 1. Oś czasu przedstawiająca standardową procedurę cyklu zapłodnienia pozaustrojowego wzbogaconą o diagnostykę preimplantacyjną. Etap przygotowania do IVF obejmujący kontrolowaną hiperstymulację jajników w celu uzyskania wzrastania wielu pęcherzyków jajnikowych zakończony jest punkcją jajników, podczas której po nakłuciu dojrzałych pęcherzyków jajnikowych pobierane są komórki jajowe. Materiał biologiczny do badań jest pozyskiwany metodą biopsji na etapie prekoncepcyjnym z niezapłodnionej dojrzałej komórki jajowej (A) albo z zygoty lub zarodka na etapie preimplantacyjnym po zapłodnieniu (B, C, D). Materiał do badań mogą stanowić PB1 (A), PB2 (B), blastomery (C) lub komórki TE (D), które są następnie przeznaczone do analizy genetycznej. Po uzyskaniu wyniku komórki jajowe o prawidłowym genotypie są klasyfikowane do zapłodnienia, a prawidłowe zarodki do transferu do macicy. Po transferze pacjentka znajduje się pod opieką lekarza i dalszą obserwacją rozwoju ewentualnej ciąży.

We wczesnej ciąży proponuje się pacjentce nieinwazyjne lub inwazyjne (zależnie od wskazań medycznych) badania prenatalne.

aCGH – porównawcza hybrydyzacja całogenomowa do mikromacierzy,

DPZ – dzień po zapłodnieniu,

FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*,

IVF – zapłodnienie pozaustrojowe,

MF-PCR – fluorescencyjna reakcja multipleks PCR,

NGS – sekwencjonowanie następnej generacji,

PB1 – ciaśko kierunkowe I rzędu,

PB2 – ciałko kierunkowe II rzędu,
PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy,
PGT-A – preimplantacyjne badanie dla aneuploidii,
PGT-M – preimplantacyjne badanie dla chorób monogenowych,
PGT-SR – preimplantacyjne badanie dla rearanżacji strukturalnych,
RFLP – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych,
SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu,
STR – krótkie powtórzenia tandemowe,
TE – trofoektoderma,
qPCR – reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Adres do korespondencji / Address for correspondence

dr hab. med. Monika Ołdak
Zakład Genetyki, Światowe Centrum Słuchu, Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu
Kajetany 05-830, Nadarzyn, ul. Mokra 17
e-mail: m.oldak@ifps.org.pl

ORCID

Anna Sarosiak
Ilona Minota
Katarzyna Koziół
Monika Ołdak

<https://orcid.org/0000-0003-0806-9195>
<https://orcid.org/0000-0002-3106-5427>
<https://orcid.org/0000-0001-7003-3391>
<https://orcid.org/0000-0002-4216-9141>