



Postępy i perspektywy współczesnej diagnostyki preimplantacyjnej. Część 2. Metody analizy genetycznej i aspekty etyczne

Recent Advances and Prospects of Preimplantation Genetic Testing. Part 2. Methods for Genetic Analysis and Ethical 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 Embriology, Center for Biostructure Research, Medical
University of Warsaw, Warsaw

Streszczenie

Badania preimplantacyjne (PGT) umożliwiają analizę materiału genetycznego komórki jajowej przed zapłodnieniem i/lub zarodka przed transferem do macicy jako procedura towarzysząca zapłodnieniu pozaustrojowemu. Wdrożenie PGT jest możliwe dzięki rozwojowi technik wspomaganego rozrodu i wymaga współpracy doświadczonych specjalistów z zakresu embriologii oraz genetyki.

Aktualnie dostępny jest szeroki zakres zaawansowanych i precyzyjnych metod analizy genetycznej pozwalający na diagnostykę pod kątem chorób monogenowych (PGT-M), rearanżacji strukturalnych chromosomów (PGT-SR) oraz aneuploidii (PGT-A). Na przestrzeni ostatnich 30 lat

technologie stosowane w PGT ewoluowały od zastosowania fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ* dla kilku wybranych chromosomów, aż do rozwiązań pozwalających na szczegółową analizę całego genomu, takich jak sekwencjonowanie następnej generacji. Opracowanie wydajnych technik całogenomowego namnażania DNA pojedynczych komórek zrewolucjonizowało PGT i poszerzyło potencjalny zakres jego zastosowania, umożliwiając równoczesne badanie wielu zmian genetycznych w pojedynczej próbce.

Wzrost precyzyjności metod stosowanych w PGT doprowadził do identyfikacji zmian genetycznych takich jak mozaikowość zarodkowa, których znaczenie biologiczne i kliniczne nie jest dobrze znane, co wpłynęło na zaostrzenie dyskusji o skuteczności PGT. Stale poszerzający się zakres zastosowania PGT, obejmujący m.in. badanie zgodności tkankowej zarodka i wykrywanie zmian warunkujących choroby wieku dorosłego wzbudza kontrowersje etyczne i prawne wokół PGT.

W niniejszej pracy przedstawiono obszerny przegląd najważniejszych technik analizy genetycznej stosowanych współcześnie w PGT w świetle ich wad i zalet oraz skuteczności w procedurach, w których są stosowane. Przeanalizowano także aspekt etyczny i kontrowersje dotyczące zastosowania PGT i przedstawiono aktualne wyzwania oraz perspektywy nowo opracowywanych metod.

Słowa kluczowe

diagnostyka preimplantacyjna, badania genetyczne, techniki genetyczne, mozaicyzm

Abstract

Preimplantation genetic testing (PGT) enables analysis of genetic material from oocyte prior to fertilization or from embryo before its transfer to the uterus and it is performed concurrently with the in vitro fertilization cycle. Implementation of PGT is possible due to development of assisted reproduction technologies and requires cooperation of experienced specialists in the field of embryology and genetics.

Nowadays, a wide range of precise methods is available in PGT allowing the diagnosis of monogenic diseases (PGT-M), structural rearrangements of chromosomes (PGT-SR) and aneuploidies (PGT-A). Over the past 30 years technologies used in PGT have evolved from the use of fluorescent in situ hybridiza-

tion probes for several chromosomes, to advanced solutions for whole-genome analysis, including next generation sequencing. The development of efficient techniques for whole-genome amplification has revolutionized PGT and enabled simultaneous examination of different genetic defects in a single sample.

The enhanced precision of new methods used in PGT has facilitated the identification of embryonic mosaicism, which biological and clinical significance is poorly understood. New findings have sparked a discussion on the effectiveness of PGT. A constantly expanding range of PGT applications has aroused ethical and legal controversies over PGT.

In this paper we present an extensive overview of the techniques that are currently used in PGT. All methods are analyzed in terms of their advantages, disadvantages and effectiveness. Finally, the ethical aspects and controversies regarding the use of PGT are shown and current challenges and perspectives of newly developed methods are assessed.

Key words

preimplantation genetic diagnosis, genetic testing, genetic techniques, 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*),

ESHRE – Europejskie Towarzystwo Rozrodu Człowieka i Embriologii (*European Society of Human Reproduction and Embryology*),

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

HLA – ludzki antygen leukocytarny (*human leukocyte antigen*),

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

MGD – preimplantacyjne badania genetyczne dla chorób monogenowych (*preimplantation genetic diagnosis for monogenic diseases*),

NGS – sekwencjonowanie następnej generacji (*next generation sequencing*),

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-HLA – preimplantacyjne badanie zgodności tkankowej zarodka (*HLA-matching, HLA typing*),

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

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

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu (*single nucleotide polymorphism*),

STR – krótkie powtórzenia tandemowe (*short tandem repeats*),

TE – trofoektoderma (*trophectoderm*),

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

1. Wprowadzenie

Badania preimplantacyjne (*preimplantation genetic testing*, PGT) umożliwiają analizę materiału genetycznego komórki jajowej przed zapłodnieniem i/lub zarodka przed transferem do macicy jako procedura towarzysząca zapłodnieniu pozaustrojowemu (*in vitro fertilization*, IVF). Głównym celem badania jest identyfikacja zarodków, które są wolne od nieprawidłowości chromosomowych i obciążeń genetycznych związanych z chorobami dziedzicznymi. Badaniu mogą zostać poddane (i) ciałka kierunkowe pobrane z oocytu przed zapłodnieniem (ciałko kierunkowe I rzędu, PB1) i/lub po zapłodnieniu (ciałko kierunkowe II rzędu, PB2), (ii) blastomery pobrane z trzydniowego zarodka w stadium bruzdkowania, (iii) komórki trofoektodermy (TE) pobrane z zarodka w stadium blastocysty ok. 5. dnia rozwoju.

W 2017 roku w porozumieniu między Europejskim Towarzystwem Rozrodu Człowieka i Embriologii (European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE) i Amerykańskim Stowarzyszeniem Medycyny Rozrodu (American Society For Reproductive Medicine, ASRM) ujednolicono nomenklaturę stosowaną w dziedzinie badań preimplan-

tacyjnych i dotychczas stosowane terminy PGD (*preimplantation genetic diagnosis*) oraz PGS (*preimplantation genetic screening*) zastąpiono jednym terminem PGT [1]. PGT jest aktualnie terminem podstawowym i podlega podziałowi na trzy podkategorie:

- PGT-M (*preimplantation genetic testing for monogenic diseases*) – badania obejmujące analizę genetyczną zarodków i/lub gamet w celu wykluczenia występowania choroby monogenowej; uprzednio powszechnie określane w literaturze jako PGD lub MGD (*preimplantation genetic diagnosis for monogenic diseases*),
- PGT-A (*preimplantation genetic testing for aneuploidies*) – badania mające na celu wykrycie aberracji liczbowych chromosomów (*aneuploidii*) u zarodka i/lub gamet; odpowiednik wcześniej stosowanego terminu PGS,
- PGT-SR (*preimplantation genetic testing for structural rearrangements*) – badania mające na celu wykrycie rearanżacji strukturalnych chromosomów u zarodka i/lub gamet; uprzednio zawarte w definicji PGS.

2. Metody analizy genetycznej w PGT

2.1. Amplifikacja całego genomu (WGA)

Haploidalne komórki, takie jak plemniki i ciątka kierunkowe, dysponują bardzo małą ilością materiału genetycznego, dwa razy mniejszą niż komórki somatyczne organizmu (ok. 3 pg). Kompleksowa analiza całego genomu pojedynczej komórki wymaga jego wiernego powielenia i uzyskania odpowiedniej ilości DNA do przeprowadzenia reakcji. Opracowanie wydajnych metod do amplifikacji całego genomu (*whole genome amplification*, WGA) zrewolucjonizowało PGT, umożliwiając analizę całego genomu pojedynczej komórki i przeprowadzenie złożonych testów (najczęściej PGT-M, PGT-A lub PGT-SR jednocześnie) w materiale pochodzącym z pojedynczej biopsji. Do tej pory opracowano kilka rodzajów reakcji WGA opartych na różnych technologiach amplifikacji DNA, takich jak (i) MDA (*multiple displacement amplification*), (ii) modyfikacje techniki PCR (m.in. *linker-adapter PCR* [LA-PCR], *degenerate oligonucleotide primed PCR* [DOP-PCR]) oraz (iii) MALBAC (*multiple annealing and looping based amplification cycles*). Metody te oferują zróżnicowany stopień pokrycia genomowego DNA, długości otrzymywanych fragmentów, otrzymywanej

ilości DNA, czasu przygotowania i trwania reakcji oraz częstości występowania artefaktów amplifikacji [2]. Współcześnie większość dostępnych komercyjnie testów w PGT (w tym wszystkie służące do badania całego genomu) wymaga użycia produktu WGA jako matrycy w badaniu (tabela 1).

2.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Metody oparte na reakcji PCR były wykorzystywane przy pierwszych próbach przeprowadzenia diagnostyki preimplantacyjnej u człowieka na początku lat 90. XX wieku i dotyczyły diagnostyki chorób monogenowych. Metody oparte na reakcji PCR są współcześnie podstawowym narzędziem w diagnostyce preimplantacyjnej chorób monogenowych (tabela 1). Według raportu ESHRE z danych zebranych od 71 centrów badawczych w latach 2011–2012 reakcja PCR była najczęściej stosowaną metodą amplifikacji DNA w PGT-M (93% wykonanych testów) i od tego czasu sukcesywnie maleje na rzecz dynamicznego rozwoju wysokoprępowych technik analizy genomu [3].

Podstawową z odmian, stanowiącą przez długi czas złoty standard w PGT, jest fluorescencyjna reakcja multiplex PCR, która polega na jednoczesnej amplifikacji od kilku do kilkunastu wybranych fragmentów DNA. W reakcji wykorzystywane są wyznakowane fluorescencyjnie specyficzne startery, obejmujące sekwencje wysoce polimorficznych krótkich powtórzeń tandemowych (*short tandem repeats*, STR), sprzężonych z badaną zmianą genetyczną. Produkt DNA po namnożeniu wybranych fragmentów poddawany jest elektroforetycznemu rozdziałowi i oceniany pod względem długości wybranych fragmentów. Ostatecznie na podstawie analizy sprzężeń w rodzinie pacjentów określa się, czy w badanych zarodkach występuje wybrana zmiana genetyczna. W wyjątkowych przypadkach analiza STR daje też możliwość postawienia prawidłowej diagnozy, nawet gdy patogenna zmiana genetyczna nie jest znana [4].

Wykorzystanie sprzężonych markerów STR pozwala na wykrycie zjawiska wypadania alleli (*allele drop-out*, ADO), polegającego na braku amplifikacji danego allelu w reakcji PCR oraz efektu stochastycznego, objawiającego się preferencyjną amplifikacją (*preferential amplification*, PA) jednego z dwóch alleli. Oba zjawiska mogą imitować homozygotyczność heterozygotycznego *locus* i prowadzić do postawienia błędnej diagnozy [5].

Analiza długości STR u pacjentów i ich krewnych odbywa się w procesie opracowywania danego przypadku i przygotowania do PGT. Opracowanie i walidacja protokołu dla danego zestawu markerów STR zajmuje najczęściej od kilku tygodni do nawet kilku miesięcy. Jednak raz opracowany protokół może być zastosowany dla wielu rodzin bez względu na rodzaj rozpoznanej zmiany genetycznej (także dla mutacji mitochondrialnego DNA), co stanowi jedną z największych zalet metody opartej na analizie STR. Reakcja multiplex PCR może zostać przeprowadzona bezpośrednio na pojedynczej komórce (*single-cell PCR*, obecnie rzadko stosowana) lub z wykorzystaniem produktu WGA. Użycie produktu WGA podnosi ryzyko wystąpienia ADO dwukrotnie w stosunku do tradycyjnego PCR bez WGA, nawet w materiale biopsyjnym z trofoektodermi, zawierającym większą ilość materiału genetycznego. W związku z tym zalecane jest analizowanie możliwie największej liczby dostępnych markerów STR dla danego regionu (optymalnie ok. pięciu markerów) [6].

2.3. Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (aCGH)

Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (*array comparative genomic hybridization*; aCGH) stanowi zmodernizowaną wersję klasycznej metody CGH opracowanej w latach 90. XX wieku. W aCGH badane genomowe DNA pojedynczej komórki oraz prawidłowe ludzkie DNA referencyjne są znakowane dwoma różnymi barwnikami fluorescencyjnymi, następnie konkurują ze sobą w procesie hybrydyzacji do macierzy z komplementarnymi cząsteczkami jednoniciowego DNA (sondami). Każda z sond macierzy reprezentuje inny region genomu i jest umieszczona w określonym miejscu płytki macierzy. Różnice ilościowe pomiędzy genomem badanym i referencyjnym są widoczne w wyznaczonym miejscu płytki w postaci koloru emitowanego światła, które jest czytane przez detektor laserowy i analizowane komputerowo pod kątem nieprawidłowości w liczbie kopii badanego DNA.

Metoda aCGH jako jedna z pierwszych metod została użyta do kompleksowego badania całego genomu w PGT-A i nadal jest używana zarówno do diagnozowania aneuploidii w PBs, blastomerach, jak i komórkach TE w wielu klinikach IVF [7, 8]. Współcześnie wypierana jest przez zastosowanie bardziej zaawansowanych technologii takich jak mikromacierze polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (*single nucleotide poly-*

morphism array, SNP array) i sekwencjonowanie następnej generacji (*next generation sequencing*, NGS).

W badaniach PGT-A z wykorzystaniem materiału biopsyjnego z TE metoda aCGH wykazuje wysoką czułość (98,8%) i swoistość (99,6%) [9]. Możliwe jest także wykorzystanie metody aCGH do analizy genomu ciałek kierunkowych. W badaniu metodą aCGH przeprowadzonym na 226 zarodkach status ploidalności określony w badaniu PB1 i PB2 był w 94% zgodny z wynikami z badania zarodków [10].

Oprócz PGT-A metoda aCGH jest stosowana w całogenomowej identyfikacji rearanżacji chromosomowych (PGT-SR) w komórkach pobranych z zarodka na poziomie rozdzielczości średnio ok. 5–6 Mb (w walidacji na pojedynczych komórkach somatycznych od 1,8 Mb dla macierzy o wysokiej gęstości), nie pozwala jednak na odróżnienie prawidłowego genomu od genomu z translokacjami zrównoważonymi (tabela 1) [11]. Metoda aCGH nie pozwala także na wykrycie poliploidii zarodkowych, odpowiadających za od 2% do ponad 10% wczesnych poronień [12]. Wyjątkiem są aberracje chromosomów płciowych 69,XXY oraz 69,YYY, których wykrycie jest możliwe pod warunkiem zwrócenia szczególnej uwagi na proporcje chromosomów płci między badaną próbką a kontrolą (tabela 1) [13].

Niewątpliwą zaletą testów wykorzystujących technikę aCGH jest ich niższy koszt w stosunku do mikromacierzy SNP i krótki czas wykonania (<12 godz.), przy zapewnieniu interpretowalnych wyników dla ponad 97% badanych próbek, co umożliwia przeprowadzenie testu i transferu zarodków w jednym cyklu IVF, bez kriokonserwacji badanych zarodków [14]. Jednak w przeciwieństwie do technik opartych na całogenomowym genotypowaniu, np. mikromacierzach SNP, zmiany takie jak ekspansje trójnukleotydowe, małe delecje, duplikacje najczęściej znajdują się poniżej progu detekcji macierzy aCGH stosowanych w PGT. Większą czułość w wykrywaniu zmian sub-chromosomowych oraz mozaicyzmu zarodkowego oferują techniki wykorzystujące NGS.

2.4. Mikromacierze SNP

Technika mikromacierzy DNA (*DNA microarray*) o wysokiej gęstości pozwala na analizę od 200 tys. do ponad 900 tys. SNP w jednym eksperymencie. Metoda opiera się na genotypowaniu wielu bloków haplotypowych (sprzężonych ze sobą SNP) u rodziców i bliskich krewnych o znanym

statusie choroby genetycznej i identyfikuje rodzicielski haplotyp związany z patogenną zmianą genetyczną (tabela 1). Ostatecznie na podstawie analizy haplotypów w rodzinie pacjentów określa się, czy w badanych zarodkach występuje wybrana zmiana genetyczna.

W PGT-M jednym z najlepiej rozwiniętych i popularnych systemów identyfikacji rodzicielskich haplotypów opartych na mikromacierzach SNP jest metoda Karyomapping. Jej zaletą jest możliwość zastosowania w szerokim zakresie, bez konieczności opracowywania oddzielnego protokołu dla każdego nowego przypadku, tak jak w PGT-M z wykorzystaniem techniki PCR. Jednak we wszystkich metodach opartych na mikromacierzach SNP niezbędne jest przeprowadzenie testu także w rodzinie pacjentów, co nie zawsze jest możliwe. Z tego powodu zastosowanie takich metod jest wykluczone, jeśli nie ma dostępu do materiału od osób spokrewnionych, a także w wypadku większości zmian genetycznych występujących *de novo* oraz u blisko spokrewnionych ze sobą partnerów [15]. Podobny model mapowania genomu, tzw. Meiomapping, opracowano do analizy rekombinacji i segregacji chromosomów w oocytach i ciałkach kierunkowych. Meiomapping ma potencjał do zastosowania w PGT-M do oceny obecności wariantów genetycznych w oocytach, a w PGT-A do diagnozowania błędów mejotycznych i dziedziczenia wad strukturalnych chromosomów w linii matczynej, prowadzących do występowania aneuploidii w zarodkach powstałych z zapłodnienia aneuploidalnych komórek jajowych. Jednak metoda wymaga rozszerzenia o badanie materiału genetycznego rodziców i nie została dotychczas zwalidowana do użytku klinicznego [16].

Obok haplotypowania w badaniach typu PGT-M obserwuje się coraz większe wykorzystanie mikromacierzy SNP w diagnostyce rearanżacji chromosomowych (PGT-SR) i aneuploidii (PGT-A). W badaniu zarodków metody oparte na mikromacierzach SNP o wysokiej gęstości charakteryzują się wyższą rozdzielczością od metod aCGH, co wiąże się z możliwością wykrywania mikrodelekcji i duplikacji (<5 Mb) (tabela 1), które znajdują się poniżej progu detekcji dla większości metod opartych na aCGH stosowanych w PGT. Liczne metody wykorzystujące całogenomowe genotypowanie SNP w jednej komórce (m.in. Karyomapping, siCHILD, haplarithmisis) umożliwiają identyfikację zarodków o niezrównoważonym genomie z różnym typem translokacji (próg detekcji rzędu 5 Mb) [17]. Dzięki temu metody te cechują się znacznie większym współczynnikiem

uzyskanych cięż klinicznych w stosunku do metod dawniej stosowanych w identyfikacji translokacji niezrównoważonych takich jak fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH), odpowiednio 54% dla mikromacierzy SNP i 33–40% dla FISH [18].

Niektóre z mikromacierzy SNP pozwalają także na odróżnienie genu prawidłowego od zrównoważonego, czego nie umożliwiają metody aCGH i większość metod opartych na NGS. Tym samym mikromacierze SNP mogą w przyszłości umożliwić rodzicom będącym nosicielami translokacji posiadanie zdrowego dziecka bez translokacji zrównoważonej, które nie będzie obciążone tymi samymi problemami reprodukcyjnymi co jego rodzice. Jednak ze względu na wysoką częstość występowania rearanżacji w zarodkach pochodzących od rodziców obciążonych translokacjami (>80% wszystkich zarodków) takie pary najczęściej nie dysponują pulą zarodków umożliwiającą wybór pomiędzy zarodkami o zrównoważonym i niezrównoważonym genomie [19]. Współcześnie mikromacierze SNP są jedną z najdroższych metod w PGT-SR, a przygotowanie pojedynczego testu jest czasochłonne. Zajmuje ono od 30 do 40 godz., co uniemożliwia przeprowadzenie badania i transferu zarodków w jednym cyklu.

Mikromacierze SNP są wiarygodną metodą w diagnozowaniu aneuploidalności zarodków w PGT-A. Wskaźnik błędu w celnym diagnozowaniu aneuploidii jest dla tej metody bardzo niski (4%). W obszernym badaniu aneuploidii trzy- i pięciodniowych zarodków (odpowiednio 22 599 i 15 112 zarodków) z zastosowaniem technologii mikromacierzy SNP z powodzeniem udało się określić status ploidalności w przypadku 92% zarodków [20]. Mikromacierze SNP stosuje się także w celu identyfikacji aberracji chromosomowych, których wykrycie jest nieosiągalne w przypadku większości innych metod stosowanych w PGT. Do takich zmian należą m.in. jednorodzielskie disomie, triploidie o charakterze digynii i diandrii, triploidie chromosomów płciowych (69,XXX) oraz niektóre tetraploidie (tabela 1) [21].

Co istotne, wykorzystanie połączenia jakościowej i ilościowej analizy danych otrzymanych z mikromacierzy SNP pozwala na wykonanie kompleksowego badania, które może łączyć PGT-M, PGT-A, PGT-SR i badanie układu zgodności tkankowej zarodka (HLA-matching) w jednym teście [22].

2.5. Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)

Dynamiczny proces wdrażania technik opartych na wysokoprzepustowej metodzie NGS do diagnostyki genetycznej, który nastąpił w ostatnim dziesięcioleciu, szybko znalazł swoje odbicie w PGT. NGS charakteryzuje się wysoką czułością i rozdzielczością rzędu pojedynczej pary zasad i umożliwia równoległą analizę dowolnej liczby *loci* w materiale pochodzącym od różnych osób. Otwiera to liczne ścieżki do opracowania nowych rozwiązań i podniesienia jakości analizy genetycznej oferowanej w PGT.

W diagnostyce chorób monogenowych (PGT-M) NGS znajduje zastosowanie przede wszystkim jako narzędzie do odczytywania wybranych sekwencji genomu (sekwencjonowania celowanego) w celu identyfikacji wariantów genetycznych w materiale zarodkowym oraz do haplotypowania regionów otaczających zidentyfikowaną uprzednio zmianę genetyczną w materiale pobranym od badanej rodziny (tabela 1) [23]. W porównaniu z technologiami opartymi na mikromacierzach SNP, analizującymi warianty SNP rozprzestrzenione w całym genomie, NGS charakteryzuje się większą dokładnością w genotypowaniu badanego fragmentu DNA. Daje to także przewagę nad technikami wykorzystującymi markery STR, których dostępność dla części regionów genomu jest mocno ograniczona.

Wdrożenie technologii NGS przyniosło wiele korzyści dla PGT-A i otworzyło wachlarz możliwości ku rozwojowi nowych, szybkich, wysoce dokładnych, wiarygodnych i powtarzalnych metod. Większość testów NGS dedykowanych do rutynowego zastosowania w PGT-A, takich jak Veriseq (Illumina, San Diego, Kalifornia, Stany Zjednoczone) i PG-Seq (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) jest opartych na technologii NGS o niskiej głębokości sekwencjonowania (tzw. płytkie sekwencjonowanie, *shallow whole genome sequencing*) ukierunkowanego na wykrywanie wariantów liczby kopii (*copy number variation*, CNV). Takie testy pozwalają na detekcję niezrównoważonych rearanżacji fragmentów chromosomów większych od 5 Mb [24] i nie oferują możliwości odróżnienia genomu zrównoważonego od prawidłowego, identyfikacji inwersji, małych delecji i duplikacji (tabela 1).

Zmodyfikowane testy o wysokiej głębokości sekwencjonowania mogą jednak umożliwić przeprowadzenie badania o bardzo wysokiej rozdzielczości, wystarczającej do wyznaczenia dokładnych miejsc pęknięcia chromosomów w przypadku translokacji zrównoważonych. Do takich

metod należą m.in. całogenomowe sekwencjonowanie typu mate-pair, całogenomowe głębokie sekwencjonowanie CNV oraz metoda MicroSeq i MARSALA [25–28].

Zwiększona precyzja technologii NGS ujawniła częstość występowania zmian wykrywanych lub słabiej wykrywanych przez wcześniej stosowane metody, takich jak mozaikowatość genetyczna zarodków i zmiany sub-chromosomowe (m.in. aneuploidie odcinków chromosomów), których znaczenie biologiczne i kliniczne nadal często nie jest znane. Próg wykrywalności mozaikowatości zarodków zależy od czułości zastosowanej platformy NGS i wynosi ok. 20%, co oznacza, że zauważalne odchylenia od wartości referencyjnych (euploidalności) są obecne, gdy poziom komórek aneuploidalnych w próbce wynosi powyżej 20% (do maksymalnie 80%) [29]. Wspomniany próg wykrywalności dla metody aCGH wynosi ok. 50–70% [30].

Metody NGS i aCGH wykazują wysoki poziom zgodności w badaniu zarodków nieposiadających cech mozaikowatości. Poziom zgodności wynosił 99,5% (191/192 zarodków) w badaniach materiału z biopsji TE [24]. Jednak metoda aCGH posiada znacznie niższą czułość w wykrywaniu mozaicyzmu zarodka w materiale pochodzącym z biopsji TE w stosunku do NGS. Szacuje się, że około 80% zarodków określonych jako mozaikowate w NGS jest klasyfikowana w badaniu aCGH jako zarodki euploidalne, a pozostała część jako aneuploidalne [31]. W związku z tym przejście z aCGH na metodę NGS może skutkować mniejszą liczbą zarodków diagnozowanych jako prawidłowe i dopuszczanych do transferu po PGT-A.

Wśród części zarodków, które są rozpoznawane w badaniu aCGH jako euploidalne, możliwe jest wykrycie aberracji chromosomowych przy ponownym badaniu z użyciem metody NGS. Oznacza to, że pewien odsetek zarodków badanych metodą aCGH jest klasyfikowany do transferu mimo aneuploidalnej liczby chromosomów. Szacuje się, że ok. 50% poronień wynikających z braku wykrycia zmian aneuploidalnych przez metodę aCGH (wyniki fałszywie negatywne) można uniknąć, stosując metodę NGS [32].

NGS było na początku najbardziej kosztowną metodą w PGT, jednak wraz z wprowadzaniem dedykowanych do PGT rozwiązań i z rozpowszechnieniem NGS w zastosowaniach diagnostycznych dostępność tej technologii się zwiększyła, a jej cena sukcesywnie maleje. Wykorzystanie

NGS jest najbardziej opłacalne w ośrodkach z dostępem do dużej liczby pacjentów, gdyż dzięki specjalnemu indeksowaniu NGS pozwala na równoczesne badanie wielu próbek i obniżenie kosztów analizy.

Najnowsze metody oparte na technologii NGS umożliwiają przeprowadzenie PGT-M, PGT-A oraz haplotypowania w jednej reakcji. Pomimo dużego potencjału analiza wyników tej metody wymaga jednak szczególnej ostrożności, gdyż technologia NGS może wprowadzać artefakty sekwencjonowania i niewystarczająca głębokość sekwencjonowania może skutkować fałszywie dodatnią lub ujemną identyfikacją patogenicznej zmiany genetycznej i błędną diagnozą. Dodatkowo, tak jak w metodach opartych na technologii mikromacierzy, NGS wymaga namnożenia materiału wyjściowego w reakcji WGA, co może generować błędy w postaci ADO i PA w niektórych *loci* [28].

3. Dokładność i skuteczność PGT – kontrowersje i aspekty etyczne

PGT jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną, stanowiącą współcześnie istotną strategię w technikach wspomaganego rozrodu (*assisted reproductive technologies*, ART). Pomimo systematycznie rosnącego zainteresowania oraz tysięcy badań PGT realizowanych rocznie na całym świecie od początku lat 90. XX wieku metoda ta wciąż jest obiektem dyskusji metodologicznych, prawnych i etycznych.

3.1. Skuteczność PGT-A i mozaikowatość zarodkowa

Pierwsze metaanalizy i randomizowane badania kontrolne nad skutecznością procedury PGT-A wykazały, że PGT-A z zastosowaniem metody FISH (historycznej metody w PGT-A pozwalającej na zbadanie jedynie kilku wybranych par chromosomów) nie wpływa pozytywnie na sukces reprodukcyjny par, a nawet może się przyczynić do zmniejszenia szansy na uzyskanie ciąży [33]. Po wprowadzeniu do PGT-A metod pozwalających na kompleksowe badanie całego genomu obserwuje się zwiększony współczynnik implantacji i ciąży w danej jednostce czasu po zastosowaniu PGT-A [34]. Z uwagi na wzrastający z wiekiem matki odsetek aneuploidalnych zarodków wykazano także, że zastosowanie PGT-A jest szczególnie korzystne dla kobiet w zaawansowanym wieku rozrodczym (>35 lat) [35].

Sukces PGT-A w dużym stopniu zależy od kompetencji technicznych osób wykonujących biopsje zarodków, doświadczenia diagnostów gene-

tycznych, a także od jakości hodowli zarodków, co może wpłynąć na różnice we wskaźnikach implantacji po PGT-A w różnych ośrodkach IVF. Wyżej wymienione różnice są jednak najprawdopodobniej ściśle związane ze zjawiskiem mozaicyzmu zarodkowego, obserwowanego w przypadku ok. 60% zarodków w stadium bruzdkowania i ok. 20% zarodków w stadium blastocysty, z czego kolejne 10% stanowi mozaikę złożoną z dwóch lub wielu linii komórek aneuploidalnych [29]. Różnica w stopniu mozaikowości związana ze stadium rozwojowym zarodka jest najprawdopodobniej powodem, dla którego obserwuje się niższy sukces reprodukcyjny po PGT przeprowadzonym z wykorzystaniem materiału genetycznego blastomerów w stosunku do PGT w materiale trofoektodermy [36].

Mozaicyzm zarodkowy współcześnie stanowi największe wyzwanie w PGT-A i jednocześnie jest obiektem zagorzałych dyskusji toczących się pomiędzy zwolennikami i przeciwnikami tej metody. Argumenty strony przeciwnej PGT-A skupiają się wokół zdania, że materiał genetyczny pochodzący z kilku komórek pobranych z trofoektodermy nie reprezentuje faktycznego stanu mozaikowości zarodka, w związku z czym PGT-A nigdy nie może przewidzieć statusu aneuploidalności zarodka. Dzieje się tak, ponieważ zarodkowa linia komórkowa o odmiennym genotypie może występować w samym węźle zarodkowym bądź w innej od pobranej części TE. Jest to zgodne z doniesieniami o zdrowych urodzeniach po transferze zarodków, których status został określony jako mozaikowaty lub aneuploidalny w badaniu PGT-A. Jednak w badaniach porównujących zgodność wyników PGT-A w materiale z biopsji TE i wężła zarodkowego wykazano, że mozaicyzm diploidalno-aneuploidalny, który mógł zwiększać ryzyko złej diagnozy w przypadku badania samej TE, dotyczył tylko 4% badanych zarodków. Autorzy pracy podsumowali, że biopsja TE jest dobrą metodą do dokładnego diagnozowania mozaikowości całej blastocysty [30].

Po badaniu PGT-A pierwszeństwo do transferu otrzymują zarodki zdiagnozowane jako euploidalne. Całkowite wyłączenie zarodków mozaikowatych z puli transferowej budzi sprzeciw w grupie oponentów PGT-A, gdyż takie działanie może zmniejszyć potencjalny zasób zarodków dostępnych u par i tym samym obniżyć szansę na uzyskanie ciąży oraz narazić pacjentów na zbędne, dodatkowe koszty powtarzania procedury IVF. W badaniu sondażowym 102 klinik IVF dwie trzecie klinik popierających stosowanie PGT-A opowiedziało się za tym, że zarodki mo-

zaikowate powinny być przechowywane do potencjalnego transferu po uzyskaniu odpowiedniej porady genetycznej [37].

Warto jednak zwrócić uwagę na fakt, że w najnowszych badaniach, w których uczestniczyło sześć dużych klinik IVF, wykazano, że transfer zarodków mozaikowatych jest obarczony niższym współczynnikiem implantacji (53% w porównaniu z 71%, $p > 0,05$) i trwających ciąż (41% w porównaniu z 63%, $p < 0,006$) oraz wyższym współczynnikiem poronień (24% w porównaniu z 10%, $p = 0,002$) w stosunku do transferu zarodków określonych w PGT-A jako euploidalne [38]. W badaniu sondażowym 58,3% głosów z klinik przeciwnych PGT-A uważało, że problem mozaikowatości całkowicie podważa stosowność używania PGT-A, podczas gdy 66,4% głosów z klinik stosujących PGT-A było zdania, że problem mozaikowatości towarzyszył zawsze procedurom IVF i należy dalej stosować PGT-A przy odpowiednich zabezpieczeniach i poradnictwie [37]. Mimo wielu odmiennych podejść, zarówno przeciwnicy, jak i zwolennicy stosowania PGT-A podkreślają, że współczesna wiedza na temat mozaikowatości zarodków jest zbyt mała i istnieje znaczna potrzeba prowadzenia dalszych badań mających na celu odkrycie przyczyny i roli mozaikowatości zarodków w rozwoju embrionalnym człowieka.

Dotychczasowe badania wykazały, że PGT-A nie zwiększa kumulacyjnego wskaźnika ciąż osiągniętych w wyniku pojedynczej stymulacji hormonalnej owulacji do IVF, co oznacza, że badanie nie zwiększa ogólnej szansy na uzyskanie ciąży z puli zarodków uzyskanych w pojedynczym cyklu IVF. Jednak PGT-A może nieść ze sobą istotne korzyści, które przyczyniają się do zwiększenia ogólnego sukcesu i zadowolenia pacjentów z procedury IVF. Podstawową z nich jest obniżenie wskaźnika poronień oraz obniżenie ryzyka wystąpienia aberracji chromosomowych u dziecka. Ponadto badanie PGT-A skraca czas do uzyskania ciąży poprzez wybór prawidłowych zarodków do transferu, w porównaniu z sukcesywnym podawaniem zarodków w cyklu IVF bezpośrednio po stymulacji hormonalnej lub po kriokonserwacji, ale bez PGT-A. Tym samym PGT-A pozytywnie wpływa na wskaźnik ciąż w przeliczeniu na pojedynczy transfer zarodków (zwiększa efektywność transferu). Przekłada się to na obniżenie potencjalnej liczby transferów i stymulacji hormonalnych potrzebnych do uzyskania ciąży, zmniejszenie liczby zarodków przeznaczonych do kriokonserwacji, co wpływa na zmniejszenie kosztów zabiegu dla pacjenta i skrócenie terapii. PGT-A ogranicza także ryzyko ciąży mnogiej,

gdyż po przeprowadzeniu takiego badania podaje się zwykle pojedyncze zarodki [39].

3.2. PGT ze wskazań niemedyycznych

Jedną z największych kontrowersji etycznych dotyczących PGT odnosi się do zastosowania tego typu badań w celach niemedyycznych, takich jak wybór cech fenotypowych dziecka (tzw. *designer baby*). W Polsce, według regulacji prawnych w zakresie wspomaganiej prokreacji (Dz. U. Poz. 1087, Art. 26 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 25 czerwca 2015 r. o leczeniu niepłodności), niedopuszczalne jest stosowanie PGT w celu wyboru cech fenotypowych, w tym płci dziecka, z wyjątkiem sytuacji, gdy wybór taki pozwala uniknąć ciężkiej, nieuleczalnej choroby dziedzicznej. Selekcja płci jest zabroniona także m.in. w Wielkiej Brytanii, Australii, Kanadzie, Chinach, Indiach, jednak jest legalna w większości krajów na świecie, w tym w Stanach Zjednoczonych. Mimo to ASRM aktywnie zniechęca do czysto wybiórczego stosowania PGT w selekcji płci o charakterze społecznym. ESHRE przeciwstawia się PGT dla zastosowań niemedyycznych, lecz zaakceptowało selekcję płci w kontekście bilansowania rodziny.

Zastosowanie PGT w selekcji płci jest uznawane za procedurę nieetyczną ze względu na potencjalne zagrożenia, takie jak (i) zaburzenie stosunku płci w społeczeństwach, (ii) dyskryminację kobiet i (iii) odrzucanie zdrowych zarodków niepożądanego płci. Szczególnie niebezpieczny wydaje się brak monitorowania i regulacji prawnych w stosunku do selekcji płci w PGT. Wśród 192 cykli PGT przeprowadzonych w latach 2003–2004 w jednej z klinik w Libanie 96,3% służyło selekcji płci, z czego w przypadku 94,1% była to selekcja płci męskiej [40]. Jednocześnie badania w społeczeństwie amerykańskim pokazały, że nie ma odchyleń preferencji w stosunku do żadnej płci z wyjątkiem preferencji płci męskiej w niektórych grupach etnicznych pochodzenia chińskiego, indyjskiego i bliskowschodniego, które stanowią niewielki procent populacji Stanów Zjednoczonych [41]. Wyniki powyższych badań wskazują na istotny wpływ pochodzenia kulturowego i etnicznego rodziców na preferencję płci dziecka, a także dowodzą potrzeby wprowadzania państwowych regulacji prawnych w krajach dopuszczających selekcję płci w PGT.

3.3. Badania układu zgodności tkankowej zarodka (PGT-HLA)

PGT połączone z selekcją pod kątem zgodności tkankowej (HLA-matching, HLA typing) jest badaniem skierowanym do rodziców posiadających już chore potomstwo. Badanie polega na testowaniu genów kodujących ludzkie antygeny zgodności tkankowej, czyli ludzkie antygeny leukocytarne (*human leukocyte antigens*, HLA) w materiale pobranym z zarodka. Procedura ta doprowadza do urodzenia dziecka zgodnego tkankowo z chorym rodzeństwem, które mogłoby być dawcą krwiotwórczych komórek macierzystych lub krwi pępowinowej w celu leczenia rodzeństwa dotkniętego chorobą genetycznie uwarunkowaną.

PGT połączone z typowaniem HLA znacznie podnosi prawdopodobieństwo narodzin zdrowego dziecka u par obciążonych genetycznie, ale również zwiększa szansę na wyleczenie potomstwa cierpiącego na poważną chorobę. Przeszczep hematopoetycznych komórek macierzystych jest jedną z najlepszych form terapii w wielu nabytych i dziedzicznych zaburzeniach hematologicznych u dzieci, takich jak alfa- i beta- talasemia, ostra białaczka szpikowa i anemia sierpowata. Metoda wykazuje wysoką skuteczność leczniczą, jednak jedynie 30% pacjentów jest w stanie znaleźć odpowiedniego dawcę komórek macierzystych w swojej rodzinie. Prawdopodobieństwo znalezienia dawcy niespokrewnionego jest wyższe (ok. 70%), jednak obarczone większym ryzykiem powikłań, niższym wskaźnikiem przeżywalności i mniejszą skutecznością terapeutyczną [42].

Pomimo wysokiej wartości terapeutycznej, zastosowanie PGT w typowaniu zgodności tkankowej jest wysoce kontrowersyjne. Argumentem strony sprzeciwiającej się tej metodzie jest m.in. niedopuszczalność powoływania na świat dziecka w celu ratowania innego dziecka, gdyż może to być związane z uprzedmiotowionym podejściem rodziców do urodzonego w ten sposób potomstwa. Problemem, o którym się dyskutuje, jest także niemożność uzyskania świadomej zgody od pacjenta podawanego przeszczepowi. Przeciwnicy tego stanowiska opowiadają się jednak za tym, że nie ma powodów, dla których można by z góry stwierdzić, że rodzice korzystający z metody typowania HLA nie będą traktowali swojego dziecka jako pełnowartościowej istoty ludzkiej [43]. Metoda typowania HLA w PGT pozostaje nielegalna w większości państw na świecie, poza m.in. Stanami Zjednoczonymi, Wielką Brytanią, Hiszpanią, Belgią, Włochami i Francją. W Polsce w 2014 r. odnotowano pierwszą

próbę tego typu diagnostyki zakończoną sukcesem (urodzeniem zdrowego dziecka) [44].

3.4. PGT dla chorób wieku dorosłego

Od momentu wprowadzenia PGT-M dla dziedzicznych chorób wieku dziecięcego o ciężkim przebiegu zasięg zastosowania tej metody w stosunku do innych chorób systematycznie się powiększa. Drugą grupą chorób, dla których w niektórych państwach wykorzystanie PGT zostało uznane za uzasadnione, były choroby wieku dorosłego o ciężkim przebiegu. Do takich chorób należą m.in. choroby neurodegeneracyjne, takie jak płasawica Huntingtona i wczesnoobjawowa postać choroby Alzheimera. Od końca lat 90. XX wieku PGT-M stosuje się także w prewencji dziedziczenia genetycznej predyspozycji do nowotworów dziedzicznych, takich jak nowotwory jelita grubego, piersi, jajnika, rodzinna retinoblastoma, zespół Li-Fraumeni, neurofibromatozy i inne oraz dziedziczne choroby układu krążenia (np. rodzinna kardiomiopatia przerostowa i rozstrzeniowa, dystrofia mięśniowa Emery'ego–Dreifussa) [45, 46]. Ponieważ osoby dotknięte takimi chorobami pozostają zdrowe aż do ujawnienia się choroby, najczęściej w czwartej dekadzie życia, słuszność zastosowania PGT w takich przypadkach jest podawana w wątpliwość lub krytykowana.

Obecne rozważania obejmują ocenę prawdopodobieństwa rozwoju zaburzeń o danym podłożu genetycznym i potencjalnych możliwościach ich leczenia. W niektórych zespołach dziedzicznej predyspozycji do zachorowań na nowotwory wyniki oceny ryzyka są niejasne [47]. Komisja etyczna ASRM popiera tego typu diagnostykę zarodków, gdy badana choroba jest poważna i nie są dostępne dla niej żadne bezpieczne, skuteczne terapie. Jednak w wypadku chorób dominujących wieku dorosłego o ciężkim przebiegu decyzja o PGT-M jest najczęściej podejmowana przez pary, w których jedno z rodziców jest obciążone genetycznie i obarczone skróconym przewidywanym czasem życia. Posiadanie dziecka wolnego od choroby u takich par oznacza, że dziecko najprawdopodobniej przedwcześnie straci rodzica, będąc ciągle od niego zależnym. Stąd powstaje wątpliwość, czy udzielenie pomocy w przyszłości na świat dziecka w sytuacji, gdy jego rodzic może umrzeć przedwcześnie, jest działaniem odpowiedzialnym. Niektórzy lekarze i ośrodki mogą odmówić oferowania takich usług [48]. ASRM zdecydowanie zaleca, aby doświadczony ge-

netyk kliniczny odgrywał główną rolę w konsultowaniu pacjentów rozważających takie procedury.

3.5. PGT i edycja genomu zarodkowego

W zależności od regulacji legislacyjnych danego państwa zarodki zdiagnozowane w PGT jako nieprawidłowe są odrzucane lub długoterminowo kriokonserwowane, a pacjentka może się zdecydować na ponowną stymulację hormonalną i punkcję jajników w celu uzyskania puli komórek jajowych zdolnych do zapłodnienia. W niektórych państwach dopuszczalne jest prowadzenie badań na niedopuszczonych do transferu zarodkach, co w ostatnich latach przyczyniło się do pierwszych prób zastosowania metod inżynierii genetycznej na ludzkich zarodkach w Chinach, Stanach Zjednoczonych i Wielkiej Brytanii. Spośród opublikowanych dotychczas badań, w których edytowano ludzki genom zarodkowy, największe kontrowersje wzbudziły doświadczenia z użyciem technologii CRISPR/Cas9, która umożliwiła korektę heterozygotycznej delekcji o długości 4bp (g.9836_9839 del) w genie *MYBPC3* z wysoką wydajnością 72,4% (42/56 zarodków), przy zachowaniu wysokiej specyficzności (niskiej wykrytej liczbie błędów typu off-target) [49]. Wysoka dokładność, wydajność, szybkość oraz szeroka dostępność metody CRISPR/Cas9 powodują, że jej zastosowanie w praktyce medycznej w przyszłości wydaje się realne. Metoda CRISPR/Cas9 została także wykorzystana do modyfikacji genomu zarodka w celu badania funkcji genów w kontekście rozwoju embrionalnego człowieka [50].

Autorzy doświadczeń prowadzonych na ludzkich zarodkach wierzą w jej potencjalne wykorzystanie do eliminacji patogennych wariantów genetycznych w zarodkach obciążonych genetycznie, wyłączonych z puli transferowej. Taka praktyka miałaby zwiększyć liczbę dostępnych zarodków dla par, którym nie udało się uzyskać ciąży przez transfer zarodków prawidłowych. W ten sposób metody inżynierii genetycznej stanowiłyby technologię uzupełniającą w stosunku do PGT. W teorii takie podejście zwiększyłoby szansę na sukces reprodukcyjny u par obciążonych genetycznie, ograniczałoby narażanie pacjentek na wielokrotną stymulację hormonalną i skróciłoby czas do uzyskania ciąży. Jednak ingerencja w DNA zarodków jest związana z wieloma problemami etycznymi i regulacje prawne większości państw świata nie dopuszczają prowadzenia tego typu doświadczeń. Ponadto osiągnięcie zadowalającej pewności,

powtarzalności, a także precyzji, bezpieczeństwa i wiarygodności metody wymagałoby przeprowadzenia wielu badań i jest najprawdopodobniej odsunięte w czasie.

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. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil Steril* 2017; 108: 393-406.
2. Li N, Wang L, Wang H et al. The Performance of Whole Genome Amplification Methods and Next-Generation Sequencing for Pre-Implantation Genetic Diagnosis of Chromosomal Abnormalities. *J Genet Genomics* 2015; 42: 151-159.
3. De Rycke M, Goossens V, Kokkali G, Meijer-Hoogeveen M, Coonen E, Moutou C. ESHRE PGD Consortium data collection XIV-XV: cycles from January 2011 to December 2012 with pregnancy follow-up to October 2013. *Hum Reprod* 2017; 32: 1974-1994.
4. Apešos A, Abou-Sleiman PM, Harper JC, Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis of the fragile X syndrome by use of linked polymorphic markers. *Prenat Diagn* 2001; 21: 504-511.
5. Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J, Sermon KD, Harper JC. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod* 2009; 24: 1221-1228.
6. Rechitsky S, Pakhalchuk T, San Ramos G, Goodman A, Zlatopolsky Z, Kuliev A. First systematic experience of preimplantation genetic diagnosis for single-gene disorders, and/or preimplantation human leukocyte antigen typing, combined with 24-chromosome aneuploidy testing. *Fertil Steril* 2015; 103: 503-512.
7. Christopikou D, Tsorva E, Economou K et al. Polar body analysis by array comparative genomic hybridization accurately predicts aneuploidies of maternal meiotic origin in cleavage stage embryos of women of advanced maternal age. *Hum Reprod* 2013; 28: 1426-1434.
8. Mir P, Mateu E, Mercader A et al. Confirmation rates of array-CGH in day-3 embryo and blastocyst biopsies for preimplantation genetic screening. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33: 59-66.

9. Capalbo A, Treff NR, Cimadomo D et al. Comparison of array comparative genomic hybridization and quantitative real-time PCR-based aneuploidy screening of blastocyst biopsies. *Eur J Hum Genet* 2015; 23: 901-906.
10. Geraedts J, Montag M, Magli MC et al. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results. *Hum Reprod* 2011; 26: 3173-3180.
11. Zheng H, Jin H, Liu L, Liu J, Wang WH. Application of next-generation sequencing for 24-chromosome aneuploidy screening of human preimplantation embryos. *Mol Cytogenet* 2015; 8: 38.
12. Sundvall L, Lund H, Niemann I, Jensen UB, Bolund L, Sunde L. Tetraploidy in hydatidiform moles. *Hum Reprod* 2013; 28: 2010-2020.
13. Peng H-H, Van den Veyver IB. Clinical application of microarray-based comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis. *Expert Rev Obstet Gynecol* 2009; 4: 81-92.
14. Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sanchez-Garcia J et al. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril* 2011; 95: 953-958.
15. Natesan SA, Bladon AJ, Coskun S et al. Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro. *Genet Med* 2014; 16: 838-845.
16. Ottolini CS, Capalbo A, Newnham L et al. Generation of meiomaps of genome-wide recombination and chromosome segregation in human oocytes. *Nat Protoc* 2016; 11: 1229-1243.
17. van Uum CM, Stevens SJ, Dreesen JC et al. SNP array-based copy number and genotype analyses for preimplantation genetic diagnosis of human unbalanced translocations. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 938-944.

18. Li G, Jin H, Xin Z et al. Increased IVF pregnancy rates after microarray preimplantation genetic diagnosis due to parental translocations. *Syst Biol Reprod Med* 2014; 60: 119-124.
19. Munne S. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy and translocations using array comparative genomic hybridization. *Curr Genomics* 2012; 13: 463-470.
20. 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.
21. Keren B. The advantages of SNP arrays over CGH arrays. *Mol Cytogenet* 2014; 7: 131.
22. Konstantinidis M, Prates R, Goodall NN et al. Live births following Karyomapping of human blastocysts: experience from clinical application of the method. *Reprod Biomed Online* 2015; 31: 394-403.
23. Chen SC, Xu XL, Zhang JY et al. Identification of PKD2 mutations in human preimplantation embryos in vitro using a combination of targeted next-generation sequencing and targeted haplotyping. *Sci Rep* 2016; 6: 25488.
24. Fiorentino F, Bono S, Biricik A et al. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum Reprod* 2014; 29: 2802-2813.
25. Aristidou C, Koufaris C, Theodosiou A et al. Accurate Breakpoint Mapping in Apparently Balanced Translocation Families with Discordant Phenotypes Using Whole Genome Mate-Pair Sequencing. *PLoS One* 2017; 12: e0169935.
26. Fan J, Wang L, Wang H et al. The clinical utility of next-generation sequencing for identifying chromosome disease syndromes in human embryos. *Reprod Biomed Online* 2015; 31: 62-70.

27. Hu L, Cheng D, Gong F et al. Reciprocal Translocation Carrier Diagnosis in Preimplantation Human Embryos. *EBioMedicine* 2016; 14: 139-147.
28. Ren Y, Zhi X, Zhu X et al. Clinical applications of MARSALA for preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy. *J Genet Genomics* 2016; 43: 541-547.
29. Munne S, Wells D. Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil Steril* 2017; 107: 1085-1091.
30. Capalbo A, Wright G, Elliott T, Ubaldi FM, Rienzi L, Nagy ZP. FISH reanalysis of inner cell mass and trophectoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts shows high accuracy of diagnosis and no major diagnostic impact of mosaicism at the blastocyst stage. *Hum Reprod* 2013; 28: 2298-2307.
31. Maxwell SM, Colls P, Hodes-Wertz B et al. Why do euploid embryos miscarry? A case-control study comparing the rate of aneuploidy within presumed euploid embryos that resulted in miscarriage or live birth using next-generation sequencing. *Fertil Steril* 2016; 106: 1414-1419 e1415.
32. Grifo J, Colls P, Ribustello L, Escudero T, Liu E, Munne S. Why do array-CGH (ACGH) euploid embryos miscarry? Reanalysis by NGS reveals undetected abnormalities which would have prevented 56% of the miscarriages. *Fertil Steril* 2015; 104: e14.
33. Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update* 2011; 17: 454-466.
34. Dahdouh EM, Balayla J, Garcia-Velasco JA. Impact of blastocyst biopsy and comprehensive chromosome screening technology on preimplantation genetic screening: a systematic review of randomized controlled trials. *Reprod Biomed Online* 2015; 30: 281-289.

35. Vinals Gonzalez X, Oda R, Naja R et al. Euploid blastocysts implant irrespective of their morphology after NGS-(PGT-A) testing in advanced maternal age patients. *J Assist Reprod Genet* 2019.
36. Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C et al. Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia: a pilot study. *Hum Reprod* 2007; 22: 1443-1449.
37. Weissman A, Shoham G, Shoham Z, Fishel S, Leong M, Yaron Y. Chromosomal mosaicism detected during preimplantation genetic screening: results of a worldwide Web-based survey. *Fertil Steril* 2017; 107: 1092-1097.
38. Munne S, Blazek J, Large M et al. Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil Steril* 2017; 108: 62-71 e68.
39. Rosenwaks Z, Handyside AH, Fiorentino F et al. The pros and cons of preimplantation genetic testing for aneuploidy: clinical and laboratory perspectives. *Fertil Steril* 2018; 110: 353-361.
40. Farra C, Nassar A, Arawi T, Ashkar H, Monsef C, Awwad J. The utilization of pre-implantation genetic testing in the absence of governance: a real-time experience. *Clin Genet* 2014; 86: 177-180.
41. Colls P, Silver L, Olivera G et al. Preimplantation genetic diagnosis for gender selection in the USA. *Reprod Biomed Online* 2009; 19 Suppl 2: 16-22.
42. Altaf SY, Apperley JF, Olavarria E. Matched unrelated donor transplants-State of the art in the 21st century. *Semin Hematol* 2016; 53: 221-229.
43. Dryła O. Genetyczna diagnostyka preimplantacyjna w świetle stanowiska Komitetu Bioetyki przy Prezydium PAN. *Diametros* 2012; 34: 116-135.

44. Lukaszuk K, Kalwak K, Pukszta S et al. Preimplantation genetic diagnosis of human leukocyte antigen for X-linked immunoproliferative syndrome caused by SAP mutation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014; 182: 252-253.
45. Rechitsky S, Verlinsky O, Chistokhina A et al. Preimplantation genetic diagnosis for cancer predisposition. *Reprod Biomed Online* 2002; 5: 148-155.
46. Kuliev A, Pomerantseva E, Polling D, Verlinsky O, Rechitsky S. PGD for inherited cardiac diseases. *Reprod Biomed Online* 2012; 24: 443-453.
47. Friebel TM, Domchek SM, Rebbeck TR. Modifiers of cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106: dju091.
48. Towner D, Loewy RS. Ethics of preimplantation diagnosis for a woman destined to develop early-onset Alzheimer disease. *JAMA* 2002; 287: 1038-1040.
49. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 2017; 548: 413-419.
50. Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature* 2017; 550: 67-73.

Tabela 1.: Zakres diagnostyczny i porównanie wybranych metod diagnostycznych stosowanych w PGT w kontekście detekcji różnych zmian genetycznych. Kolorem fioletowym oznaczono metody wymagające wstępnej amplifikacji DNA w reakcji amplifikacji catogenomowej (WGA)

Typ analizy	Rodzaj zmiany genetycznej	Metody – detekcja				
		Multiplex-PCR + STR	FISH	aCGH	mikromacierze SNP	NGS
PGT-M	warianty germinalne	+	-	-	+ ¹	+
	warianty <i>de novo</i>	+	-	-	-	+ ²
	warianty mitochondrialne	+	-	-	-	+ ^{2,3}
PGT-SR	insercje/delecje	-	+ ⁴	+ (5-6Mb)	+ (2,5-5Mb)	+ (3,2-5Mb)
	zmiany niezrównoważone	-	+	+	+	+
	zmiany zrównoważone	-	+ ⁵	-	+ ⁵	+/- ⁶
PGT-A	aneuploidie	-	+ ⁴	+ ⁷	+ ⁷	+ ⁷
PGT-HLA	nd.	+	-	-	+	+
Określanie płci	nd.	+	+	+	+	+

Inne analizy	disomia jednorodzielska	-	-	-	+	-
	digynia/diandria	-	+	-	+	+/- ⁸
	tetraploidie	-	+	-	+	-

¹poprzez haplotypowanie,

²możliwe, ale nie stosuje się,

³detekcja liczby kopii mitochondrialnego DNA,

⁴rozwiązanie celowane, współcześnie rzadko stosowane,

⁵pozwała na odróżnienie genomu prawidłowego od zrównoważonego,

⁶zależy od platformy NGS,

⁷możliwe badanie całego genomu,

⁸wykrywa zmiany 69 XYY i 69 XXY,

nd. – nie dotyczy,

PGT-M – diagnostyka preimplantacyjna pod kątem występowania chorób monogenowych,
 PGT-A – diagnostyka preimplantacyjna pod kątem występowania aberracji chromosomowych,
 PGT-SR – diagnostyka preimplantacyjna pod kątem występowania rearanżacji strukturalnych,
 PGT-HLA – diagnostyka preimplantacyjna z typowaniem zgodności tkankowej

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

<https://orcid.org/0000-0003-0806-9195>

Ilona Minota

<https://orcid.org/0000-0002-3106-5427>

Katarzyna Kozioł

<https://orcid.org/0000-0001-7003-3391>

Monika Ołdak

<https://orcid.org/0000-0002-4216-9141>