

# Predimplantacijska genetička dijagnostika i njena primjena u IVF klinikama

---

**Anđelić, Matej**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:906095>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK**

**PREDIMPLANTACIJSKA GENETIČKA DIJAGNOSTIKA  
I NJENA PRIMJENA U IVF KLINIKAMA**

**PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS  
AND ITS USAGE IN IVF CLINICS**

**SEMINARSKI RAD**

Matej Anđelić

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vesna Benković

Zagreb, 2018.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OPLODNJA U UVJETIMA <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>3</b>
<b>3. METODE BIOPSIJE.....</b>	<b>4</b>
3.1. BIOPSIJA POLARNOG TJELEŠCA.....	4
3.2. BIOPSIJA BLASTOCISTE 3. DANA.....	6
3.3. BIOPSIJA TROFOEKTODERMA BLASTOCISTE.....	8
<b>4. CITOGENETIČKE TEHNIKE.....</b>	<b>10</b>
4.1. KOMPARATIVNA GENETIČKA HIBRIDIZACIJA NA MATRICI.....	10
4.2. FLUORESCENTNA HIBRIDIZACIJA IN SITU .....	11
4.3. KVANTITATIVNA LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE.....	11
<b>5. PRIMJENA PREDIMPLANTACIJSKE GENETIČKE DIJAGNOSTIKE.....</b>	<b>13</b>
5.1. POREMEĆAJI VEZANI UZ SPOL.....	13
5.2. MONOGENSKI POREMEĆAJI.....	14
5.3. KROMOSOMSKI POREMEĆAJI.....	15
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>21</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>21</b>

## 1. UVOD

Predimplantacijska genetička dijagnostika (engl. *Preimplantation genetic diagnosis* – PGD) predstavlja jednu od tehnika genomskih analiza molekule DNA embrija prije implantacije. PGD se pojavljuje otkada i razvijanje postupaka oplodnje u *in vitro* uvjetima (engl. *in vitro fertilization* – IVF), prvo se sastojala od proučavanja morfoloških karakteristika te se razvijala do danas kada se koriste specifične genetičke analize za provjeru genetskog stanja embrija. Prva uspješna primijenjena suvremena PGD-a za nasljedne bolesti objavljena je 1990. [1] te od tada predstavlja veliku prednost za pacijente koji su u rizičnoj skupini, ukoliko su npr. nosioci ili koji su u riziku za prijenos nasljednih genetskih bolesti (npr. hemofilija, cistična fibroza, fragile X, Duchenneova mišićna distrofija itd.). Zastupljenost postupaka je u konstantnom porastu te je izvještaj Europskog društva za humanu reprodukciju i embriologiju (engl. *European Society of Human Reproduction and Embryology*, ESHRE) udruženja objavilo da u periodu od 1997. do 2007. obavljeno više od 4 000 postupaka u Europi. Novije zastupljena tehnika amplifikacije (engl. *Whole Genome Amplification*) [2], omogućuje skupljanje mikrograma DNA molekule od jedne blastomere i primjenu *microarrays* analize cijelog genoma. Iz tog razloga prednost postupka PGD je što služi za detekciju kromosomskih anomalija, mutacija i aneuploidija. Dijagnostika se najčešće provodi na jednom od tri različita razvojna stadija: polarno tješće (engl. *polar body biopsy*), blastomere 6-8 staničnog embrija (treći dan, engl. *cleavage stage biopsy*), te biopsiji trofektodermskih stanica blastociste (peti ili šesti dan razvoja, engl. *blastocyst biopsy*). Slika 1. usporedno prikazuje biopsije u tri ranije navedena stadija. Tehnike kojima se uzorci prikupljeni biopsijom analiziraju su lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction* - PCR) ili fluorescentna hibridizacija *in situ* (engl. *fluorescence in situ hybridization* – FISH) te komparativna genomna hibridizacija na matrici (engl. *array comparative genomic hybridization array* – aCGH). PCR se primjenjuje za dijagnosticiranje specifičnih genskih bolesti te prednost PCR metode je veoma brza dijagnostika i mogućnost rada s prvotno malo genetičkog materijala, dok aCGH te FISH tehnika zastupljena za analizu broja kromosoma u pacijenata s kromosomskim anomalijama ili za spolnu selekciju embrija za bolesti koje se prenose na X kromosomu.[3] Nedostatak FISH metode je što se može analizirati 5 do 12 kromosoma, od 24 te također često dolazi do lažno pozitivnih, tj. lažno negativnih rezultata. Trenutno se PGD primjenjuje u mnogim zemljama širom svijeta primjerice Australiji, Indiji te u Brazilu, dok od europskih zemalja postupak PGD može se obaviti u državama zapadne Europe uključujući Njemačku, Slovačku i Češku. [4]

Pomno proučavanje djece rođene nakon provedbe PGD-a ne upućuje na povećanje kongenitalnih anomalija [5] te znanstvenici u SAD-u ukazuju na činjenicu ukoliko bi se uveo besplatan postupak dijagnostike za sve nosioce cistične fibroze da bi se uštedilo nekoliko milijardi dolara. [6,7]



Slika 1: Biopsija polarnog tijela (A),  
blastomere 6-staničnog embrija (B) i,  
trofektodermskih stanica blastociste (C) [Preuzeto od 8]

## 2. OPLODNJA U UVJETIMA *IN VITRO*

Oplodnja u uvjetima *in vitro* (engl. *in vitro fertilization- IVF*) prvi put izvedena je od strane Patricka Steptoe i Roberta Edwardsa kasnih 70-ih godina dvadesetog stoljeća kada su liječili neplodnost uzrokovanu oštećenim jajovodima. Početak oplodnje jajne stanice izvan ženskog reproduktivnog sustava započinje pokušajima bečkog embriologa Samuela Leopolda Schenka 1878. godine korištenjem zečeva i zamoraca kao modelnih organizama. Do velikih dostignuća došlo je početkom suradnje ranije navedenih znanstvenika, Steptoe i Edwardsa, kasnih šezdestih godina prošlog stoljeća kada je nakon oplodnje jajne stanice slijedilo brazdanje u petrijevoj zdjelici. Tek desetak godina kasnije, 1978. godine, uspjeli su izvesti prijenos oplođene jajne stanice u uvjetima *in vitro* u reproduktivni sustav žene. Stoga, datum bitan za reprodukciju biologiju je 25. srpanj 1978. kada je rođeno prvo dijete začeto umjetnom oplodnjom- Louise Brown. Od rođenja Louise Brown do danas, pomoću IVF-a, rodilo se preko 3 milijuna djece.

Procedura zahtjeva aspiraciju (punkciju) folikula, tj. invazivni postupak kod kojeg se iglom iz abdomena dobivaju jajne stanice nastale stimulacijom ovulacije. Ovulacija se stimulira najčešće hormonskom terapijom dva tjedna prije planirane procedure kako bi nastalo više funkcionalnih, zrelih jajnih stanica. Kao hormonska terapija najčešće se oralno uzima klomifen citrat. Ultrazvuk te analiza krvne slike služi za određivanje trenutka punkcije jajne stanice koja se izvodi neposredno prije nego što je jajna stanica sposobna za oplodnju. Nakon punkcije jajnih stanica, smještaju se u petrijevu zdjelicu sa spermijima. Ukoliko je problem muške neplodnosti, u vidu smanjene pokretljivosti spermija ili njihove koncentracije u ejakulatu, izvodi se efikasnija metoda- intracitoplazmatsko injektiranje spermija (engl. *intracytoplasmic sperm injection- ICSI*). U samom procesu ICSI, spermij se direktno injektira u jajnu stanicu te dolazi do oplodnje, iz tog razloga metoda ICSI pokazala je najviši postotak uspješnosti.[9]

### **3. METODE BIOPSIJE**

Zadnjih 20 godina biopsije su se izvodile na tri karakteristična stadija- polarno tjelešće, blastomeri i blastocisti koje će biti objašnjene kasnije u tekstu. O kojoj god metodi je riječ, prvi korak je svakako probijanje zone pellucide te uzimanje genetičkog materijala iz oocite ili embrija u predimplantacijskom stadiju. Prije ukonjanja jedne ili dvije stanice iz predimplantacijskog embrija prethodi korak probijanje zone pellucide koje se može izvesti na više načina te se kontinuirano radi na poboljšavanju navedenog koraka. Prvi i najstariji način je mehaničko probijanje mikropipetom, zatim slijede kemijsko probijanje otapanjem zone pellucide te pomoću lasera. Od same pojave dijagnostike PGD, velik broj znanstvenih radova se temelji na pitanju u kojem stadiju od ranije navedenih je najbolje, najsigurnije i s najmanje posljedica izvršiti biopsiju. Prije same biopsije uzorak se pomoću mikromanipulatora smjesti u sredini vidnog polja mikroskopa s povećanjem od 400X. Uzorak se imobilizira držeći ga s mikropipetom. Kada dođe do probijanja zone pellucide, polarno tjelešće ili blastomere se nježno uklone pomoću odgovarajuće mikropipete.[10]

#### **3.1. BIOPSIJA POLARNOG TIJELA**

Biopsija prvog polarnog tjelešća koje nastaje prije oplodnje također može biti procjena točnosti prve mejotske diobe. Također, greška se može dogoditi i u drugoj mejotskoj diobi koja se završava neposredno nakon oplodnje. Nedostatak ove vrste biopsije je što se ne može procijeniti je li se greška dogodila u mejotskim diobama muškaraca ili pogreška koja se dogodila nakon oplodnje jajne stanice, iz tog razloga biopsija blastomere na treći dan se više preferira. Biopsija polarnog tjelešća je korisna kada postoji rizik da žena prenese morganogensku bolest. Kao što je navedeno ranije u tekstu, da bi se izbjegla pogrešna dijagnoza bitno je da se oba polarna tjelešća analiziraju. Ukoliko je svrha određivanje aneuploidije obje biopsije se mogu izvoditi istovremeno, no ukoliko je u pitanju monogenska bolest biopsija se mora sekvencijalno odrađivati kako bi se utvrdio mutirani gen. U državama gdje je PGD zabranjeno provoditi na embrijima, jedina tehnika koja je dopuštena je biopsija prvog polarnog tjelešća što dovodi do problema jer se često na osnovu prvog polarnog tjelešća ne može sa sigurnosti tvrditi da će embrij biti zdrav, iz razloga što može doći do nepravilne segregacije tijekom druge mejotske diobe, bez obzira je li prva mejotska dioba bila ispravna ili neispravna. PB biopsija zahtjeva precizno vremensko planiranje te praćenje mejotskih dioba koje je neophodno za izvesti uspješnu biopsiju, iz tog razloga se PB biopsija najčešće izvodi nakon intracitoplazmatskog

mikroinjektiranje spermija u jajnu stanicu (engl. *intracytoplasmic sperm injection*, -ICSI). ICSI predstavlja najuspješniji oblik medicinski potpomognute oplodnje iz razloga što embriolog direktno kontrolira trenutak oplodnje. Tijekom perioda od sazrijevanja germinalne vezikule do metafaze II., prvo polarno tjelešće je formirano. U tom trenutku citoplazmatski mostić koji sadrži ostatke diobenog vretena je i dalje u kontaktu s genetičkim materijalom, povezivajući polarno tjelešće s olemom. Moguće je da se ostaci diobenog vretena uoče na polarizacijskom mikroskopu te je neophodno da se biopsija ne obavlja dok prvo polarno tjelešće više nije povezano sa olemom iz razloga što do tog stadija još nije dovoljno zrela. Oocita tolerira mehaničko probijanje zone pellucide najbolje tijekom 4 do 6 sati nakon izvođenja ICSI iz razloga što je olema do tada stabilizirana reakcijama korikalnih granula. Drugo polarno tjelešće se formira 2 do 4 sata nakon ICSI. Optimalno vrijeme za biopsiju drugog polarnog tjelešća je 8 do 16 sati nakon ICSI iz razloga što je PB II u kontaktu s olemom preko ostataka diobenog vretena do 6 sati nakon izvođenja ICSI tretmana, biopsija u tom periodu može uzrokovati gubitak jezgre, tj. enukleaciju oocite. Studije su pokazale da višestruka uspješnost molekule DNA sekundarnog polarnog tjelešća je lošija ukoliko je PB izolirana u periodu do 8 sati nakon tretmana ICSI. Tako da je moguće izvršiti sekvencijalno i simultanu biopsiju primarnog i sekundarnog polarnog tjelešća. Ukoliko se izvodi sekvencijalna biopsija prvog polarnog tjelešća, PB I morala bi se izolirati OD 4 do 12 sati i sekundarna 8 do 16 sati nakon ICSI. Optimalno vrijeme za biopsiju polarnih tjelešća za simultanu biopsiju je 8 do 12 sati nakon ICSI. Preporuča se biopsija oba polarnog tjelešća zbog potencijalnih aneuploidija u polarnim tjeleščima te rekombinacije homolognih kromosoma tijekom mejoze.[11,12] Procedura biopsije polarnih tjelešća počinje s probijanjem zone pellucide. Od ranije navedenih načina, probijanje preko kemijski agensa nije preporučljivo iz razloga što kiselkasta tiroidna otopina može utjecati na oocitu te imati štetne utjecaje na razvoj embrija. Iz tog razloga najčešće se koristi ili mehanički način probijanja ili laserski. Prednost laserskog otvaranje je što je brže i jednostavnije. Posebno je potrebno paziti na veličinu otvora, iz razloga što ukoliko je prevelik blastomere bi se mogle izgubiti tijekom embrijskog razvoja, no ukoliko je premala moglo bi utjecati na implantaciju embrija tijekom stadija blastociste.[12]





Slika 2: Biopsija polarnog tijela laserskim probijanjem zone pellucide.[Preuzeto sa: 13]

Prednosti ove metode su što biopsija nikako ne utječe na razvoj embrija (Slika 2.), metoda osigurava dovoljno vremena da se naprave genetička testiranja te je najbolja metoda biopsije ukoliko je majka nositeljica određene bolesti. Također, izbjegavaju se sve etičke dvojbe s obzirom na to da se ne radi direktno na embriju. Kao nedostatak najčešće dolazi do izražaja da metoda može samo detektirati majčinske mutacije te mejotičke greške. Često dolazi i do degradacije polarnog tjelešca s obzirom na činjenicu da su polarna tjelešca poprilično mala te kao nedostatak bi se još mogla navesti činjenica da zahtjevaju i sekvencijalnu biopsiju prvog i drugog polarnog tjelešca kako bi se moglo utvrditi u kojoj fazi, tj. u kojem ciklusu mejoze je došlo do eventualne nepravilnosti.

### 3.2. BIOPSIJA BLASTOMERE NA TREĆI DAN

Biopsija blastomere 3. dan od oplodnje je po izvještaju ESHRE iz 2013. dokumentirano da je 79,8% svih predimplantacijskih genetičkih dijagnostika upravo izvedeno u ovom stadiju.[14] Problematika koja se često vodi vezano uz ovu metodu je pitanje potrebe broja stanica. Ukoliko se uzme jedna blastomera, izvođenje metoda FISH ili PCR same stanice može biti poprilično zahtjevno. Iz razloga točnosti i preciznosti se preferiraju dvije blastomere, no također postoji i šansa da uklanjanje dvije blastomere je preinvazivno za embrij te da može oštetiti navedeni. Prednosti biopsije blastomere D3 je što su stanice embrija još uvijek nediferencirane te se mogu testirati moguće aberacije roditelja. Također izvođenjem tretmana 3. dan od oplodnje donosi veliku prednost jer nakon uzimanja stanice ostaje dovoljno vremena da iz IVF klinike bude preneseno i analizirano u PGD laboratorij te će dijagnostika biti gotova do 5. dana kada se embrij prenese u spolni sustav žene te ne postoji potreba za krioprezervaciju embrija. Kontroverzna polemika ove tehnike je što se proučavajući animalne modele dovelo u pitanje mogu li se i kod ljudi uspostaviti dvije stanične linije već u četverostaničnom embriju.[15]

Također postoje i indikacije da se u miša već nakon druge mitotske diobe počinju javljati tri različita tipa blastomera [16]. No kloniranje životinja i razdvajanje blastomera jasno pokazuje da su blastomere u ranim stadijima brazdanja totipotentne, tj. iz jedne pojedinačne stanice mogu se razviti svi stanični tipovi. U ljudi je pokazano da 4 pojedinačne stanice četverostaničnog embrija mogu tvoriti 4 blastocista te da iz svake pojedinačne blastociste nastaju dvije linije matičnih stanica.[17] Također preko 20 godina istraživanja ukazuje na to da je embrij koji se sastoji od 4 do 10 stanica sadrži nediferencirane stanice. Sukladno tome, biopsija jedne ili dvije stanice ne bi trebale imati utjecaj na razvojni potencijal. Također provedena su i istraživanja gdje su se proučavala djeca rođena nakon navede metode biopsije PGD-a te djeca ne pokazuju nikakve razlike u periodu do druge godine života što potvrđuje da je biopsija blastomera na 3. dan sigurna.[18]

Procedura biopsije počinje probijanjem zone pellucide. U zadnje vrijeme je sve više zastupljeno otvaranje metodom lasera, što više zbog preciznosti, no i jednostavnosti postupka. Postupak je prikazan na slici 3. No također treba uzeti u obzir da mehaničko i kemijsko probijanje zone je još zastupljeno, s ovom metodom se ustvari najviše razvijala kemijska metoda probijanja koja i danas često izbor embriologa, čisto zbog skupoće laserske opreme. Kemijska metoda probijanja kao što je bilo ranije u tekstu navedeno je uz pomoć tiroidne otopine. Također važno je pripaziti na dodani volumen otopine. Veći volumeni, od 40 do 50  $\mu\text{L}$  je najoptimalniji ukoliko postupak obavlja manje vješt embriolog. Razvijajući najučinkovitije metode biopsije u stadiju brazdanja bi se mogli istaknuti metoda istiskivanja koja za manu ima problematiku ukoliko je embrio već kompaktan ili primjerice da su membrane embrija krhke pa je potreban dodatan oprez. Kao taj dodatan oprez embriolozi često nastavak pipete za biopsiju otupe spaljivanjem. Vrijeme obavljanja biopsije ovisi o više faktora. Važno je da embrio ima što više stanica kako se uklanjanjem jedne stanice ne bi utjecalo na kompaktnost embrija, te je od važnosti da stanice s kojima se rade još nisu postigle diferencijacijsku aktivnost. Iz ranije navedenih razloga biopsija se najčešće izvodi 66 do 70 sati nakon ICSI tretmana kada embrio postigne stadij od 6 do 10 stanica, no treba uzeti u obzir da brzina brazdanja varira između pacijenata.[10,19]



Slika 3. Biopsija blastomere 3. dana od začeca.[Preuzeto sa: 20]

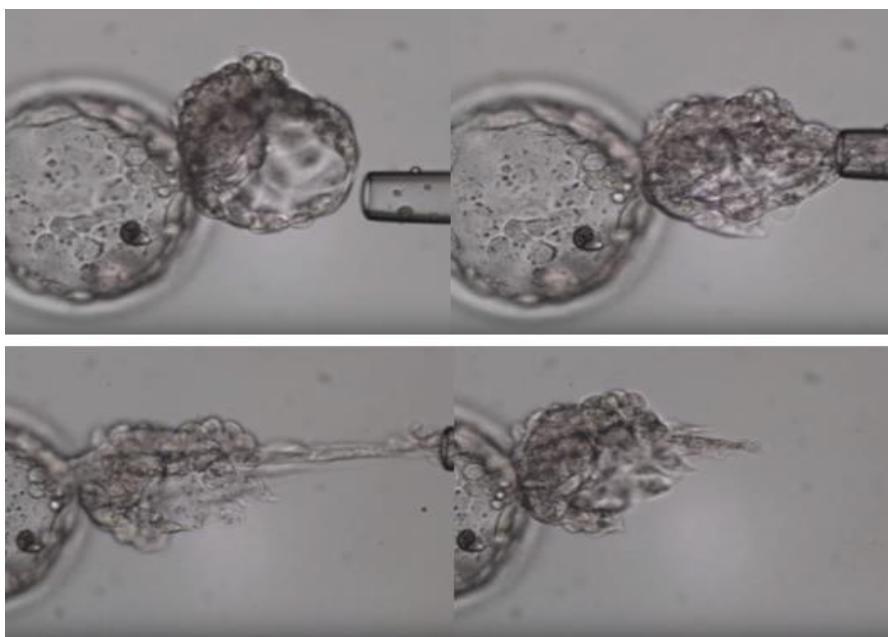
Prednosti ove metode što blastomerom možemo analizirati cijeli genom embrija, za razliku od polarnog tjelešca, te time se dobiva cijela genetička slika. Također, ne dolazi do potrebe krioprezervacije embrija s obzirom da postoji dovoljno vremena za dijagnostiku. Pojava koja predstavlja nedostatak ove metode je mozaicizam. S obzirom da mozaicizam definiramo kao postojanje dvije ili više stanične linije različitog genotipa koje su podrijetlom iz jedne zigote, oko 15-80% svih embrija manifestiraju mozaicizam na 3. dan te samim time može doći do pogrešne dijagnostike, tj. do krivog tumačenja genetičke analize te lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata.

### 3.3. BIOPSIJA TROFOEKTODERMSKIH STANICA BLASTOCISTE

Blastocista je najviši stupanj razvoja embrija koji je moguće postići u *in vitro* uvjetima i karakteriziran je nizom promjena. Od trenutka da se haploidni setovi majke i oca počinju „funkcionirati“ zajedno, tj. dolazi do aktivacije embrijskog genoma. Također dolazi do preciznih promjena koje pripremaju embrio za implantaciju.[21] Jedna od glavnih karakteristika embrijskog razvoja 5. i 6. dana su i brze mitotske diobe koje uzrokuju rast broja stanica sa 10 na više od 100 u svega dva dana. Samim time, dolazi do karakterističnih struktura, primjerice prvog diferencijacijskog događaja u razvoju, gdje dolazi do unutrašnje (embrioblast) i vanjske(trofoblasta) mase stanica te pojave šupljine-blastocel. Membrane stanice trofoblasta sadrže natrijevu pumpu koja omogućuje da natrijevi ioni ulaze u šupljinu i samim time, dolazi do ulaska vode te povećanja volumena blastocela. Također, osim što dolazi do eksponencijalnog rasta stanica, također dolazi i do programiranih staničnih smrti koje osiguravaju gubljenje abnormalnih stanica.[22] Na 4. dan dolazi i do morfološke promjene blastomera, blastomere koje se nalaze uz rub se produljuju, tj. poprimaju više sferičan oblik što je rezultat sinteze adhezijskih molekula, uključujući integrine, kadherin i selektin.[23]

Razvojem ove metode došlo je tek do napredovanja medija za kulturu embrija kako bi se embrij mogao razvijati do tako uznapredovalog stadija.[24] Također, odgoda transfera embrija s 5. na 6. dan očituje se u nižoj razini uspješne implantacije, što ukazuje da je idealno vrijeme za navedenu metodu biopsije 5. dan od oplodnje kada se očekuje da će se zdravi embrio razviti u *in vitro* uvjetima do stadija blastociste.[25] Embriji koji su dostigli razvoj u 6. danu do stadija blastociste isto tako pokazuju uspješni postotak biopsije. Znanstvenici su također probali utjecaj biopsije 7. dana, no za sada nema značajnih podataka o rezultatima uspješnosti iznesene trudnoće.[26]

Procedura biopsije se odvija u Hapes pufer mediju te prvi korak kao u ranije navedenim metodama biopsije je probijanje zone pellucide, prikazano na slici 4.. U zadnje vrijeme preferira laserska metoda, no stvar oko koje postoje varijacije je vrijeme probijanja. Određene grupe znanstvenika su probijale rupu na zoni pellucidi veličine oko 25  $\mu\text{m}$  na 3. ili 4. dan tako da stanice trofoblasta počnu navirati iz otvora predviđenog za biopsiju.[27] Isto tako su zaobilježeni i pokušaji probijanja zone pellucide 4 sata prije biopsije jednako tako dajući vremena za hernaciju stanica trofoblasta izvan zone pellucide. Pažnja se mora pridodati i tome da su stanice trofoblasta teže za razdvojiti od stanica blastomera.[28] Prednosti biopsije trofektodermskih stanica su što se može izbjeći pojava mozaicizma koje mogu utjecati na genetičku analizu te također što se metodom mogu detektirati poremećaji vezani uz spol, translokacije ili monogenske poremećaje. No treba uzeti u obzir da provođenjem ove vrste biopsije krioprezervacija obavezna, no ukoliko se genetički testovi mogu obaviti unutar 24 sata ne dolazi do krioprezervacije.



Slika 4: Biopsija stanica trofektoderma 5. dan od začeća.[Preuzeto sa: 29]

#### **4. CITOGENETIČKE TEHNIKE U PREDIMPLANTACIJSKOJ DIJAGNOSTICI**

Najraniji početci predimplantacijske genetičke dijagnostike uključivali su provjeru kariotipa kao i PCR u svrhu određivanja spola embrija te analizu polarnih tjelešaca za Mendelove bolesti.[10] Zatim otkrićem i poboljšavanjem tehnologije sredinom 1990-ih, u rutinu dijagnostike uključuje se FISH tehnika koja omogućuje predimplantacijsku dijagnostiku aneuploidija i kromosomskih translokacija. Nedugo nakon toga pokazali su se i prvi ograničavajući segmenti dijagnostike, primjerice preklapanje signala te pogreške u hibridizaciji što je potaknulo razvoj novih tehnika poput komparativne genomske hibridizacije na matrici (engl. *array comparative genomic hybridization array* – aCHG) i kvantitativne inačice lančane reakcije polimeraze (engl. *quantitative polymerase chain reaction* - qPCR), koja omogućuje proučavanje cijelog kromosomskog materijala. [30,31]

##### **4.1. KOMPARATIVNA GENOMSKA HIBRIDIZACIJA NA MATRICI**

Provedbom aCGH tehnike efikasno se može provjeriti cijeli genom te utvrditi ukoliko je došlo do pojave aneuploidije. CGH tehnika je prvenstveno bila razvijena kako bi se detektirao broj promjena prisutnih u tumorskoj masi. Funkcionira na principu da genom koji se želi ispitati označi jednom fluorescentnom bojom, a kontrolni genom drugom fluorescentnom bojom te se detektiraju signali. Ranije inačice ove metode su bile limitirane zbog rezolucije same slike signala. Razvojem aCGH, preko mikropločice, ova metoda uspoređuje željeni i kontrolni uzorak koji sadrže kratke fragmente DNA koje imaju ulogu probe. Duljine probe mogu biti kratki oligonukleotidi (od 28 do 85 parova baza) s ciljem prepoznavanja ciljane sekvencije, do genomske klonova veličina od 80 000 do 200 000 baznih parova.[32] Kao dio predimplantacijske genetičke dijagnostike, uzima se uzorak iz polarnog tješeca, blastomere trećeg dana ili trofektodermskih stanica blastociste te se označi DNA s fluorescentnom bojom, također se ponovi postupak s kontrolnom DNA. Nakon toga slijedi komplementacija denaturiranih jednolančanih lanaca čije rezultate proučavamo kao fluorescentne signale. Na osnovu intenziteta fluorescencije i hibridizacijskih signala na različitim lokacijama u genomu kontrolna DNA služi za identificiranje bilo kakvih varijanti genoma. Na taj način aCGH olakšava kliničku dijagnostiku submikroskopskih kromosomskih duplikacija, delecija te trisomije 1-22 i specifične poremećaje vezane uz spol. Duplikacije u DNA su prikazane na računalu kao šiljci/vrhovi koji prelaze preko praga, dok su delecije prikazane kao šiljci ili udubine ispod praga. [33]

## **4.2. FLUORESCENTNA IN SITU HIBRIDIZACIJA**

FISH predstavlja jednu od najviše korištenih i najbržih metoda u predimplantacijskoj genetičkoj dijagnostici. Olakšava dijagnostiku kromosomskih poremećaja poput sekvencijalnih duplikacija, delecija i preraspodjelu kromosoma koji su često propušteni mikroskopskom analizom. FISH tehnikom možemo locirati specifične DNA sekvence unutar kromosoma te je posebno pogodna za ženske embrije koje su u rizičnoj skupini za poremećaje vezane uz X kromosom. Procedura počinje skupljanjem uzorka iz embrija te zagrijavanjem molekule DNA kako bi se postigla denaturacija. Zatim se dodaju komplementarne probe koje su označene malim kemijskim agensima koje svijetle u prisutnosti specifične regije na kromosomu. Specifične probe se zatim hibridiziraju i dodaju komplementarnom DNA lancu te na razini fluorescirajućih oznaka dolazi do točnog detektiranja prisutnosti ili odsutnosti određene lokacije na specifičnom kromosomu, tj. kromosomu od interesa. Broj i relativna lokacija fluorescirajućih točaka se analizira i određuje dijagnoza. Ukoliko proba nije u potpunosti hibridizirana, ukoliko je na toj lokaciji došlo do duplikacije ili delecije molekule DNA, rezultat inicira na kromosomske i spolno-kromosomske poremećaje poput trisomije i aneuploidije. Drugačije probe su korištene za drugačije svrhe.[34]

## **4.3. LANČANA REKACIJA POLIMERAZE**

Lančana reakcija polimeraze (engl. Polymerase Chain Reaction – PCR) umnaža DNA od interesa. Razvoj tehnike javlja se 1980-ih godina te znanstvenik zaslužan za razvoj tehnike, Kay Mullis, 1993. godine primio je Nobelovu nagradu iz kemije.[35] PCR omogućuje embriolozima da prati i dijagnosticiraju bolest koristeći jako malo uzorka iz embrijske stanice. PCR se koristi za detekciju genetičkih poremećaja, koje kao dio PGD dijagnostike se koristi za detekciju poremećaja i na molekularnoj razini, poput monogenских bolesti uključujući Tay Sachs, Cystic fibrosis, Duchenne mišićna distrofija, beta talasemija, Huntingotonova bolest, spinalno-mišićna atrofija itd. Za razne genetičke i molekularne analize potrebna je određena količina uzorka, što je uzorka više, lakše je raditi, upravo u tome leži najveća prednost ove tehnike. Do danas je razvijeno više vrsta lančane reakcije polimeraze, no svaka se sastoji od tri osnovna koraka: denaturacija, sljepljivanje početnica te produljenje lanca na 3' kraju. S obzirom na prethodno spomenuto, procedura počinje uzimanjem uzorka iz polarnog tijela, blastomere na 3. dan ili trofektodermskih stanica blastociste te se DNA denaturira na 90°C te nastaju dva lanca koji služe kao kalup za cikluse koji slijede. Nakon toga se dodaju početnice, naručeni umjetni oligonukleotidi, koji se lijepe na specifične slijedove na temperaturi od 40 do 60°C. PCR reakcijom umnažat će se samo sekvencija od interesa određena PCR početnicom. Zatim će TAQ

polimeraza (polimeraza iz vrste bakterije *Thermus aquaticus*) produljiti lanace pri temperaturi od 72°C. Te se ciklus elongacije, tj. umnažanja može ponoviti 30-40 puta u istoj reakcijskoj smjesi.[36] Specifično kod qPCR je što predstavlja alternativnu metodu mogućnosti kopiranja 24 kromosoma. Ovoj metodi prethodi korak višestruke PCR reakcija (engl. multiplex PCR) u formatu 384-višestruke ploče, koja se koristi za umnažanje najmanje dvije sekvencije na svakom kraku kromosoma.[37]

## 5. PRIMJENA PREDIMPLANTACIJSKE GENETIČKE DIJAGNOSTIKE

Predimplantacijska genetička dijagnostika se koristi za dijagnostiku genoma embrija, točnije služi za detektiranje monogenih poremećaja, kromosomskih abnormalija i mitohondrijskih poremećaja. Također ima i primjenu u izboru spola u slučaju ako se zna da jedan od roditelja nosi gen za spolno vezane bolesti. U rizičnoj skupini ljudi ta bolest prenosi samo na jedan spol.[38] Bolesti često detektirane PGD-om su cistična fibroza, spinalna mišićna distrofija, beta talasemije. [39]

### 5.1. POREMEĆAJI VEZANI UZ SPOL

Poremećaji vezani uz X kromosom se prenose sa zdrave nositeljice majke na njezine sinove sa šansom od 50% te iz tog razloga postupak PGD je koristan jer omogućuje selekciju spola gdje se selektiraju muški potomci koji nose ispravan, tj. funkcionalan X kromosom. Primjeri recesivnih bolesti vezanih uz X kromosom su hemofilija, sindrom fragilnog X-kromosoma (Martin-Bellov sindrom) te Duchenne mišićna distrofija.

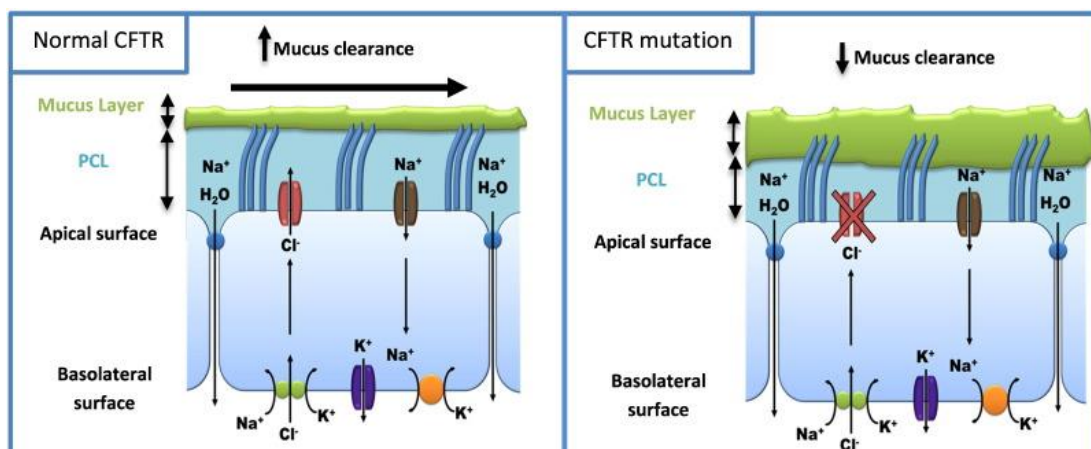
Sindrom fragilnog X kromosoma najčešći je uzrok naslijeđene mentalne retardacije te se javlja s učestalošću od 1:2 500-4 000 muškaraca, a u žena 1:6 000. Specifičnost ove bolesti je na dugom kraku kromosoma X (q27.3), točnije SINDROMFMR-1 gen koji kodira protein FMR-1 (engl. *fragile X mental retardation 1*) za koji se smatra da ima važnu ulogu u razvoju središnjeg živčanog sustava. Bolest nastaje kao posljedica dinamične mutacije u genu FMR-1, a očituje se elongacijom ponavljajućih tripleta slijeda CGG u polimorfnoj, nekodirajućoj regiji prvog eksona. U zdravih ljudi taj slijed tripleta ponavlja se od 6 do 50 puta, kod osoba koji nemaju izraženu kliničku sliku od 50 do 200 puta, dok se simptomi bolesti javljaju kod pacijenata koji imaju preko 200 ponavljajućih tripleta u genu FMR-1.[40] Za razliku od recesivnih bolesti ranije navedenih, dominantne bolesti vezane uz X kromosom koje se nasljeđuju od zahvaćene majke na 50 posto njezinih kćeri i sinova, no zahvaćeni sinovi dalje ne prenose na svoje sinove. Primjeri su Rettov sindrom, pseudohiperparatiroidizam, rahitis otporan na vitamin D i hipomelanoza ITO. Primjer abnormalnosti povezanih uz Y kromosom koje jako često dovode do neplodnosti muške populacije su AZF regije (engl. *azoospermia factor*) u kojima je došlo do mikroleucije u dugom kraku Y kromosoma, iako na spermatogenezu utječe i niz drugih gena raspršenih po čitavom genomu. U ovom slučaju, jedini način za izbjeći prijenos na potomstvo je selekcija ženskog spola.[41]



## 5.2. MONOGENSKI POREMEĆAJI

Monogenske bolesti mogu biti podijeljene u kategorije dominantnih i recesivnih. U kategoriju recesivnih poremećaja mogu se uključiti kongenitalni poremećaji poput cistične fibroze, Tay-Sachs i talasemije koje uključuje dva mutirana kromosoma od svakog zdravog roditelja, no prenosioca. Kada se poremećaji dijagnosticiraju na molekularnoj razini, mutacije se mogu analizirati u stanicama uklonjenim iz stadija blastociste. Primjeri autosomno dominantnih poremećaja su miotonična distrofija, Facioskapulohumeralna distrofija, retinoblastom, Von Hippel Lindau, MEN I i MEN II, Huntingtonova bolest, Osteogenesis imperfecta i ahondroplazija. Ukoliko pacijent ima „de novo mutaciju“, neophodno je sekvencirati cijeli gen kako bi se identificirala mutacija. Kada je mutacija dijagnosticirana, neispravna sekvencija može biti označena u stanicama koje se uklanjaju iz embrija. Suprotno ovoj situaciji, ukoliko je već nekoliko pojedinaca u obitelji zahvaćeno određenom mutacijom, PGD se može provoditi i preko polimorfnih markera povezanih uz dotičan gen.[42]

Jedna od najistraživnijih bolesti, a predstavnik ove skupine bila bi ranije navedena cistična fibroza. Razlog za njezinu atraktivnu poziciju među objektima istraživanja proizlazi i iz njene visoke zastupljenosti u svijetu. Istraživanja provedena od strane Fundacije cistične fibroze (engl. *Cystic Fibrosis Foundation*) ukazuju na to da na 3 tisuće rođene djece, jedno dijete boluje od cistične fibroze. Također, istraživanja ukazuju da u određenim rasama dolazi do drugačije distribucije bolesti te istraživanje u SAD-u je potvrdilo da bijelci koji imaju europsko podrijetlo su najčešći prenosioci bolesti. Uzrok cistične fibroze je mutacija u CFTR genu te je za sada otkriveno oko 1 700 različitih mutacija zbog kojih ne dolazi do prijenosa kloridnih iona (Slika 5.). Osnovno obilježje bolesti je stvaranje gustog, ljepljivog sekreta na svim mjestima gdje ima žlijezda s vanjskim izlučivanjem.[43]



Slika 5. Posljedica mutacija u CFTR genu je nemogućnost prijenosa kloridnih iona.[Preuzeto od 44]

### 5.3. KROMOSOMSKI POREMEĆAJI

Kromosomski poremećaji mogu biti posljedica recipročne translokacije, Robertsonove translokacije, inverzije, delecije i insercije.[45] Većina brojnih anomalija autosomnih kromosoma su letalne ili pojedinci jedva dostignu zrelu dob, osim Downovog sindroma. Žene koje boluju od Downovog sindroma su plodne te postoji pedeset posto šanse da se njezino stanje prenese i na potomke, dok su muškarci zahvaćeni Downovim sindromom neplodni. Downov sindrom je jedan od najčešće prisutnih trisomija (trisomija 21. kromosoma) te incidencija je prosječno 1 porod od 1 000 te je usko vezano uz godine majke (Slika 6). [46]

Maternal Age	Incidence of Down syndrome	Maternal Age	Incidence of Down syndrome	Maternal Age	Incidence of Down syndrome
20	1 in 2.000	30	1 in 900	40	1 in 100
21	1 in 1.700	31	1 in 800	41	1 in 80
22	1 in 1.500	32	1 in 720	42	1 in 70
23	1 in 1.400	33	1 in 600	43	1 in 50
24	1 in 1.300	34	1 in 450	44	1 in 40
25	1 in 1.200	35	1 in 350	45	1 in 30
26	1 in 1.100	36	1 in 300	46	1 in 25
27	1 in 1.050	37	1 in 250	47	1 in 20
28	1 in 1.000	38	1 in 200	48	1 in 15
29	1 in 950	39	1 in 150	49	1 in 10

Slika 6: Povezanost dobi roditelje s pojavom Downovog sindroma.[Preuzeto od 46]

U brojnim slučajevima gdje dolazi do abnormalnosti spolnih kromosoma, za razliku od anomalija autosomnih kromosoma, pojedinci dostižu odraslu dob, no veoma često imaju problema sa plodnosti. Žene koje imaju 47 kromosoma, (spolni kromosomi XXX) te muškarci sa 47 kromosoma (spolni kromosomi XXY) su najčešće plodni, no imaju 50% šanse da će imati potomke/kćeri s istim poremećajem. No muškarci s viškom spolnog kromosoma, slijeda XYY su plodni te ne postoji šansa za prijenos na potomstvo. Treba spomenuti da ukoliko XXY muškarci proizvode spermije u stvari imaju mozaične gonade, tj. samo XY spermatogonijske stanice ulaze u mejozu (Sciurano et al. 2009). PGD se pokazao uspješnom dijagnostičkom metodom za Robertsonovu translokaciju (RT). Djeca koja nose ovaj tip strukturne translokacije fenotipski izgledaju zdravo, no u kasnijim godinama se manifestira u problemu sa neplodnošću ili uzastopnim spontanim pobačajima.[47] Dvije glavne metode određivanja kromosomskih poremećaja su metode qPCR, FISH te aCGH.

## 6. LITERATURA

- [1] Handyside, A., Kontogianni, E., Hardy, K. and Winston, R. (1990). Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 344(6268), pp.768-770.
- [2] Handyside, A., Robinson, M., Simpson, R., Omar, M., Shaw, M., Grudzinkas, J. and Rutherford, A. (2004). Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 10(10), pp.767-772.
- [3] Harper, J. and Harton, G. (2010). The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertility and Sterility*, 94(4), pp.1173-1177.
- [4] Corveleyn, A., Morris, M., Dequeker, E., Sermon, K., Davies, J., Antiñolo, G., Schmutzler, A., Vanecek, J., Nagels, N., Zika, E., Palau, F. and Ibarreta, D. (2007). Provision and quality assurance of preimplantation genetic diagnosis in Europe. *European Journal of Human Genetics*, 16(3), pp.290-299.
- [5] Goossens, V., Harton, G., Moutou, C., Traeger-Synodinos, J., Van Rij, M. and Harper, J. (2009). ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Human Reproduction*, 24(8), pp.1786-1810.
- [6] Šimunić, V. (2012). Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga, pp.529.-531.
- [7] Tur-Kaspa, I., Aljadef, G., Rechitsky, S., Grotjan, H. and Verlinsky, Y. (2010). PGD for all cystic fibrosis carrier couples: novel strategy for preventive medicine and cost analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 21(2), pp.186-195.
- [8] [2] Greco, E., Biricik, A., Cotarelo, R., Iammarone, E., Rubino, P., Tesarik, J., Fiorentino, F. and Minasi, M. (2015). Successful implantation and live birth of a healthy boy after triple biopsy and double vitrification of oocyte-embryo-blastocyst. *SpringerPlus*, 4(1).
- [9] Zhu, Tian, "In Vitro Fertilization". *Embryo Project Encyclopedia* (2009-07-22). ISSN: 1940-5030
- [10] Harper, J. and SenGupta, S. (2011). Preimplantation genetic diagnosis: State of the ART 2011. *Human Genetics*, 131(2), pp.175-186.

- [11] Fragouli, E., Alfarawati, S., Goodall, N., Sanchez-Garcia, J., Colls, P. and Wells, D. (2011). The cytogenetics of polar bodies: insights into female meiosis and the diagnosis of aneuploidy. *Molecular Human Reproduction*, 17(5), pp.286-295.
- [12] Montag, M., Köster, M., Strowitzki, T. and Toth, B. (2013). Polar body biopsy. *Fertility and Sterility*, 100(3), pp.603-607.
- [13] RIUK, R. (2013, June 25) Polar Body Biopsy [Video file]. Retrieved from <https://www.youtube.com/watch?v=JTaQzszVr8o>
- [14] Traeger-Synodinos, J., Coonen, E., Goossens, V., De Mouzon, J., Shenfield, F., Ruiz, A., Goossens, V., Ferraretti, A., Mardesic, T., Pennings, G., Pennings, G., Shenfield, F., de Mouzon, J., Ruiz, A., Ferraretti, A., Mardesic, T. and Goossens, V. (2013). Session 09: ESHRE data reporting on PGD cycles and oocyte donation. *Human Reproduction*, 28(suppl 1), pp.i18-i19.
- [15] Edwards, R. (1997). Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Molecular Human Reproduction*, 3(10), pp.863-905.
- [16] Motosugi, N. (2005). Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned. *Genes & Development*, 19(9), pp.1081-1092.
- [17] Van de Velde, H., Cauffman, G., Tournaye, H., Devroey, P. and Liebaers, I. (2008). The four blastomeres of a 4-cell stage human embryo are able to develop individually into blastocysts with inner cell mass and trophoctoderm. *Human Reproduction*, 23(8), pp.1742-1747.
- [18] Liebaers, I., Desmyttere, S., Verpoest, W., De Rycke, M., Staessen, C., Sermon, K., Devroey, P., Haentjens, P. and Bonduelle, M. (2010). Report on a Consecutive Series of 581 Children Born After Blastomere Biopsy for Preimplantation Genetic Diagnosis. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 65(4), pp.240-241.
- [19] Stern, H. (2014). Preimplantation Genetic Diagnosis: Prenatal Testing for Embryos Finally Achieving Its Potential. *Journal of Clinical Medicine*, 3(1), pp.280-309.
- [20] Sukprasert, M. (2014, March 5) Day 3 Blastomere Biopsy 1 [Video file]. Retrieved from <https://www.youtube.com/watch?v=TbridWVwipl>

- [21] Vassena, R., Boue, S., Gonzalez-Roca, E., Aran, B., Auer, H., Veiga, A. and Belmonte, J. (2011). Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development*, 138(17), pp.3699-3709.
- [22] Hardy, K. (1997). Cell death in the mammalian blastocyst. *Molecular Human Reproduction*, 3(10), pp.919-925.
- [23] Bloor, D. (2002). Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. *Molecular Human Reproduction*, 8(3), pp.237-245.
- [24] Gardner, D. and Schoolcraft, W. (1999). A randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization: Reply. *Human Reproduction*, 14(6), pp.1663A-1663.
- [25] Richter, K., Harris, D., Daneshmand, S. and Shapiro, B. (2001). Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertility and Sterility*, 76(6), pp.1157-1167.
- [26] Wilcox, A., Baird, D. and Weinberg, C. (1999). Time of Implantation of the Conceptus and Loss of Pregnancy. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 54(11), p.705.
- [27] McArthur, S., Leigh, D., Marshall, J., de Boer, K. and Jansen, R. (2005). Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertility and Sterility*, 84(6), pp.1628-1636.
- [28] Kokkali, G., Traeger-Synodinos, J., Vrettou, C., Stavrou, D., Jones, G., Cram, D., Makrakis, E., Trounson, A., Kanavakis, E. and Pantos, K. (2007). Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of  $\beta$ -thalassaemia: a pilot study. *Human Reproduction*, 22(5), pp.1443-1449.
- [29] Coco, R. (2014, April 30) Trophectoderm biopsy in a Hatching blastocyst protruding ICM [Video file]. Retrieved from [https://www.youtube.com/watch?v=JI\\_TQ8d8tNM](https://www.youtube.com/watch?v=JI_TQ8d8tNM)
- [30] Treff, N., Su, J., Tao, X., Levy, B. and Scott Jr., R. (2010). Accurate single cell 24 chromosome aneuploidy screening using whole genome amplification and single nucleotide polymorphism microarrays. *Fertility and Sterility*, 94(6), pp.2017-2021.
- [31] Forman, E., Tao, X., Ferry, K., Taylor, D., Treff, N. and Scott, R. (2012). Single embryo transfer with comprehensive chromosome screening results in improved ongoing pregnancy rates and decreased miscarriage rates. *Human Reproduction*, 27(4), pp.1217-1222.

- [32] Breman, A., Pursley, A., Hixson, P., Bi, W., Ward, P., Bacino, C., Shaw, C., Lupski, J., Beaudet, A., Patel, A., Cheung, S. and Van den Veyver, I. (2012). Prenatal chromosomal microarray analysis in a diagnostic laboratory; experience with >1000 cases and review of the literature. *Prenatal Diagnosis*, 32(4), pp.351-361.
- [33] Theisen, A. (2008) Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH). *Nature Education* 1(1):45. Retrieved from [12]
- [34] Scriven, P., Kirby, T. and Ogilvie, C. (2011). FISH for Pre-implantation Genetic Diagnosis. *Journal of Visualized Experiments*, (48).
- [35] Ncbi.nlm.nih.gov. (2018). Polymerase Chain Reaction (PCR). [online] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/> [Accessed 27 May 2018].
- [36] Dreesen, J., Destouni, A., Kourlaba, G., Degn, B., Mette, W., Carvalho, F., Moutou, C., Sengupta, S., Dhanjal, S., Renwick, P., Davies, S., Kanavakis, E., Harton, G. and Traeger-Synodinos, J. (2013). Evaluation of PCR-based preimplantation genetic diagnosis applied to monogenic diseases: a collaborative ESHRE PGD consortium study. *European Journal of Human Genetics*, 22(8), pp.1012-1018.
- [37] Treff, N. and Scott, R. (2013). Four-hour quantitative real-time polymerase chain reaction–based comprehensive chromosome screening and accumulating evidence of accuracy, safety, predictive value, and clinical efficacy. *Fertility and Sterility*, 99(4), pp.1049-1053.
- [38] Cooper, A. and Jungheim, E. (2010). Preimplantation Genetic Testing: Indications and Controversies. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(3), pp.519-531.
- [39] Braude, P. and Flinter, F. (2007). Use and misuse of preimplantation genetic testing. *BMJ*, 335(7623), pp.752-754.
- [40] Bago, R., Hecimovic, S., Barisic, I. and Pavelic, J. (2004). Diagnostics of fragile X syndrome by the methods of molecular medicine. *Paediatrica Croatica*.
- [41] Vogt, P. (2005). AZF deletions and Y chromosomal haplogroups: history and update based on sequence. *Human Reproduction Update*, 11(4), pp.319-336.
- [42] Single gene disorders. (2008). *Genomic Medicine*, 2(3-4), pp.163-165.
- [43] Cff.org. (2018). *About Cystic Fibrosis*. [online] Available at: <https://www.cff.org/What-is-CF/About-Cystic-Fibrosis/> [Accessed 27 May 2018].

- [44] Kumar, S., Tana, A. and Shankar, A. (2014). Cystic fibrosis — What are the prospects for a cure?. *European Journal of Internal Medicine*, 25(9), pp.803-807.
- [45] Kőrösi, T., Török, O. and Vajta, G. (2014). Update on preimplantation genetic diagnosis and screening. *Orvosi Hetilap*, 155(35), pp.1375-1382.
- [46] NDSS. (2018). *What is Down Syndrome? / National Down Syndrome Society*. [online] Available at: <https://www.ndss.org/about-down-syndrome/down-syndrome/> [Accessed 27 May 2018].
- [47] Chang, E., Han, J., Kwak, I., Lee, W., Yoon, T. and Shim, S. (2011). Preimplantation genetic diagnosis for couples with a Robertsonian translocation: practical information for genetic counseling. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(1), pp.67-75.

## 7. SAŽETAK

Predimplantacijska genetička dijagnostika (engl. *preimplantation genetic diagnosis*- PGD), razvijena krajem prošlog stoljeća, postupak je analize jedne ili više stanica embrija prije implantacije u ženinu maternicu. Usko je vezana uz oplodnju jajne stanice u uvjetima *in vitro*, bilo klasičnom oplodnjom *in vitro* (engl. *in vitro fertilization*- IVF) ili intracitoplazmatskim injektiranjem spermija (engl. *intracytoplasmic sperm injection*- ICSI). Izvori uzoraka za biopsiju najčešće su polarno tjelešce, stanice blastociste trećeg dana te biopsija trofektoderma blastociste. Tehnike kojima se analizira uzorak su komparativna genetička hibridizacija na matrici (engl. *array comparative genomic hybridization array* – aCHG), fluorescentna hibridizacija *in situ* (engl. *fluorescent in situ hybridization*- FISH) te kvantitativna lančana reakcije polimeraze (engl. *quantitative polymerase chain reaction* – qPCR). Prednost dijagnostike PGD je otkrivanje širokog spektra poremećaja, rezultata monogenских poremećaja, no jednako tome i poremećaja na razini kromosoma bez utjecaja na razvojni potencijal embrija. Također, uz predimplantacijsku genetičku dijagnostiku, uvijek se postavlja pitanje bioetike. Glavna problematika koja se vodi kome se treba ponuditi pravo na PGD? Najčešće se nudi samo osobama ozbiljnog zdravstvenog stanja i osobama u rizičnoj skupini. Problem samim time što oba kriterija se mogu shvatiti subjektivno, tj. kada povući crtu da je osoba teško bolesna ili primjerice u rizičnoj skupini ljudi.

## 8. SUMMARY

Preimplantation genetic diagnosis involves the testing of a single or a few cells biopsied from oocytes or embryos generated *in vitro*. As only embryos unaffected for a given genetic condition are transferred to the uterus, prenatal diagnosis and the termination of a pregnancy are avoided. For the past two decades these biopsies have been performed at three stages, the polar body, blastomere on day three, and trophoctoderm of blastocyst. Depending on the type of genetic disorder, PGD utilises different methods of genetic testing. These include fluorescence *in situ* hybridisation (FISH), Polymerase chain reaction (PCR) and Array Comparative Genomic Hybridisation (aCGH). PGD is used to test the genetic makeup of embryos to detect single gene disorders and chromosomal abnormalities. One of the ethical problem is to whom these tests should be offered. Usually, they are limited to severe illnesses and to persons in specific 'high risk' groups. But both these criteria are pretty subjective, and cannot be strictly established.