Preimplantační genetická diagnostika

Preimplantační genetická diagnostika (PGD)

- **Selekce embryí pro in vitro fertilizaci (IVF)**
  pro páry s rizikem přenosu dědičné choroby na potomky
- **Reprezentuje alternativu prenatální diagnostiky**
  pro páry s rizikem transmitující genetické choroby
  bez nutnosti předčasného ukončení těhotenství,
  během kterého byla odhalena genetická zátěž embrya nebo fetu
- **Spojuje embryologickou a genetickou kontrolu embryí**

Děti ze zkumavky

25. 7. 1978	29. 10. 1984	4. 1. 1988	2001	V současné době
První dítě na světě počaté metodou in vitro se narodilo třicetileté Angličance Lesley Brownové. Šlo o holčičku jménem Louisa.	První dítě v České republice narozené po početí in vitro. Stalo se tak na gynekologicko-porodnické klinice FN v Brně, která je dodnes jedním z nejvýznamnějších center asistované reprodukce ve střední Evropě.	Porod prvních dvojčat ze zkumavky v ČR	První těhotenství po použití PGD v ČR	se rodí v ČR „ze zkumavky", tedy po metodách asistované reprodukce (AR), kolem 2 % dětí ze všech, což je téměř 2000 ročně. Ve světě počet takto narozených dětí již překročil milión.

PGD

kombinace technik

in vitro fertilizace a genetické diagnostiky

1. **Genetické vyšetření**
   u párů s rizikem přenosu dědičné choroby na potomky
   je přesně determinována genetická abnormalita
2. **IVF cyklus**
   - **odběr vajíček (oocytů) a jejich oplodnění metodou ICSI**
   - **kultivace embryí**
3. **Biopsie embrya**
   - **u optimálně se vyvíjejícího embrya je mikromanipulační technikou odebrán příslušný biologický materiál**
4. **Genetické vyšetření**
   - **vybrána embrya bez genetické zátěže**
     a s nejlepší morfologickou a vývojovou chararkteristikou
5. **Implantace embrya do dělohy**

PGD

1. Genetické vyšetření

u párů s rizikem přenosu dědičné choroby na potomky je přesně determinována genetická abnormalita

Indikace:

- **Vrozená chromozomální aberace u některého z rodičů**
- **Monogenně dědičné onemocnění u některého z členů rodiny**
- **V rodině se vyskytuje choroba vázaná na pohlaví**
- **Vyšší věk ženy**
- **Potrat nebo porod dítěte s vrozenou vývojovou vadou v rodině**
- **Opakované spontánní potraty nejasné etiologie**
- **Opakovaná zástava vývoje embryí při kultivaci in vitro**
- **Opakované aborty**

PGD

2.in vitro fertilizace

odběr vajíček (oocytů) a jejich oplodnění metodou ICSI

Intracytoplasmatická injekce spermií

Způsob oplodnění zavedením spermie přímo do vajíčka

- **Zvýšena úspěšnost při mimotělním oplodnění**
- **Zabráněno kontaminaci buňkami spermií při provedení PGD monogenně dědičných chorob**

PGD

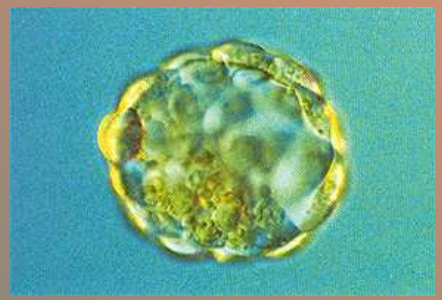
3.Biopsie

pro genetickou analýzu vhodné tři typy buněk

1. **Polární tělíska odebrané ze stádia oocyt/zygota**

2. **Buňky (blastomery) z embryí ve stádiu rýhování**

1. **Buňky trofoblastu z blastocyst**



PGD

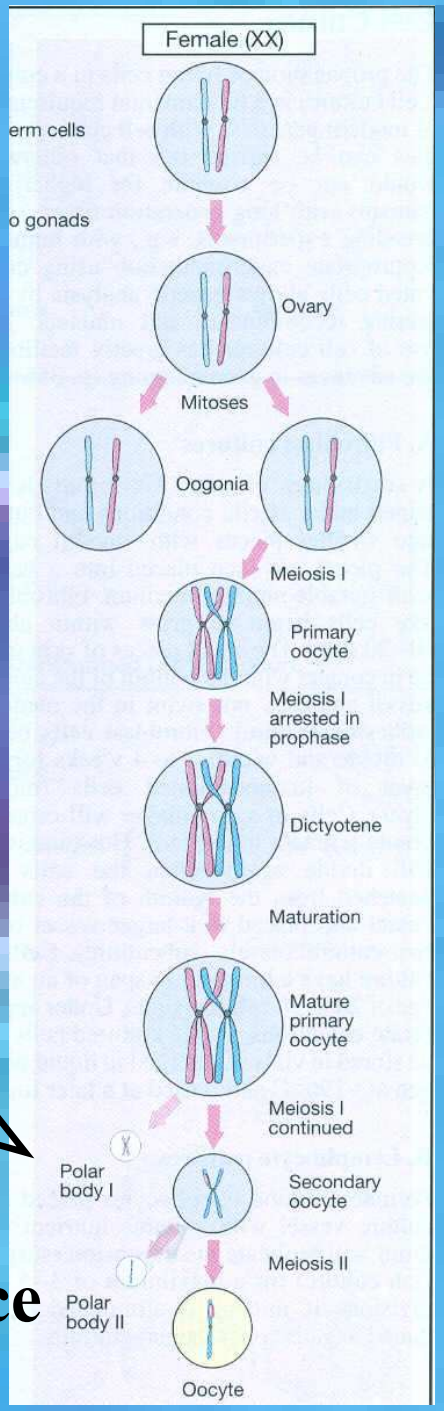
3.Biopsie

pro genetickou analýzu vhodné tři typy buněk

1. **Polární tělíska (PB)**
   odebraná ze stádia oocyt/zygota

1.polární tělísko

- **Přítomno v zralém oocytu**
- **Produkt 1. meiotického dělení**
- **Obsahuje soubor 23 bivalentních chromozomů**
- **Vyjmuto z oocytu po skončení meiotického dělění, po kterém za normálních okolností následuje ovulace**
- **Vyšetření se uskuteňuje před oplodněním vajíčka**



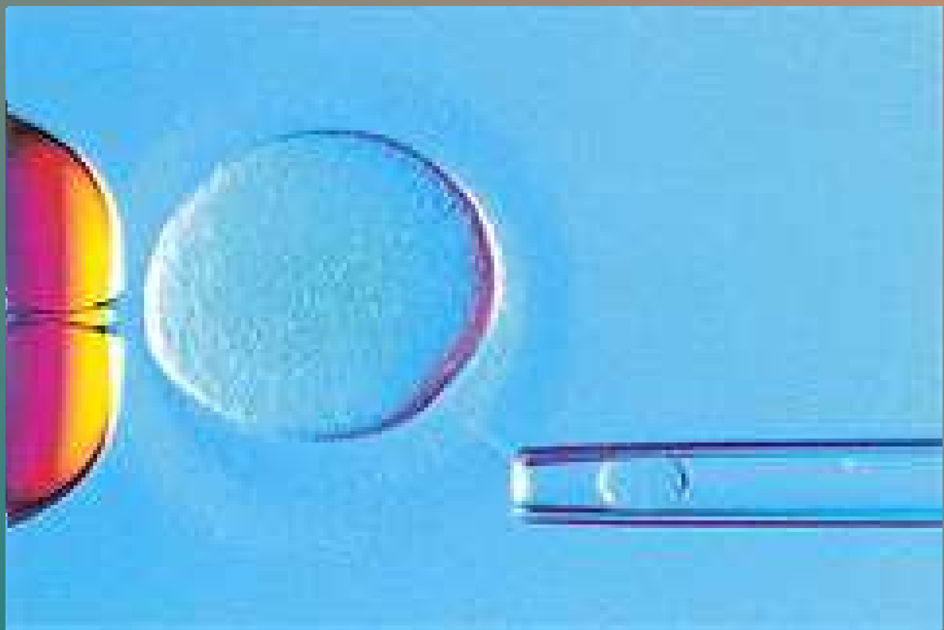
PGD

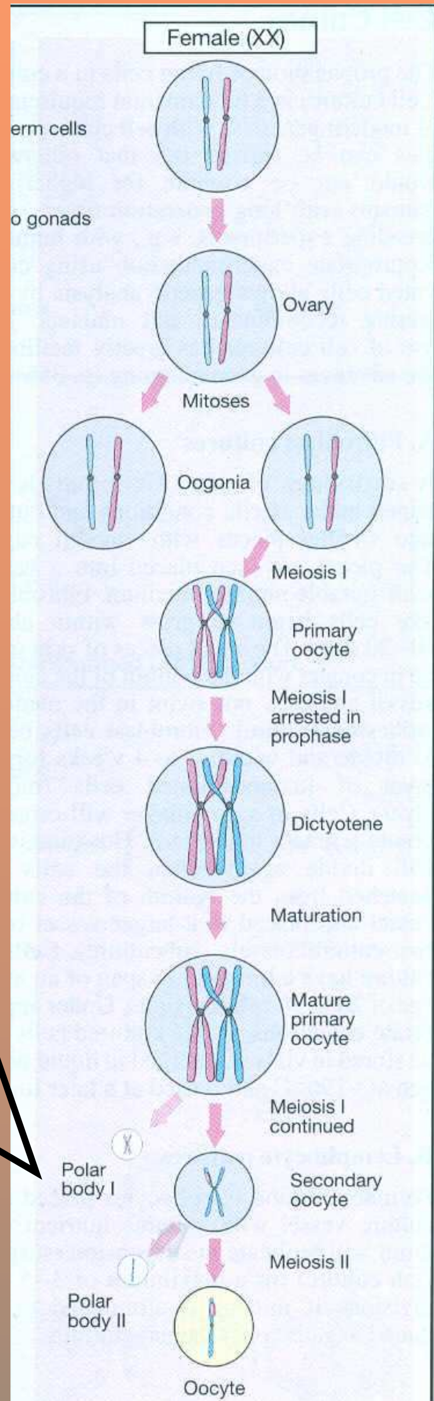
3.Biopsie

pro genetickou analýzu vhodné tři typy buněk

1. **Polární tělíska (PB) odebrané ze stádia oocyt/zygota**

Biopsie prvního polárního tělíska





1. Vytvoření otvoru v zona pellucida

2. Uchycení mikropipetou

2. Odsátí polárního tělíska mikropipetou

PGD

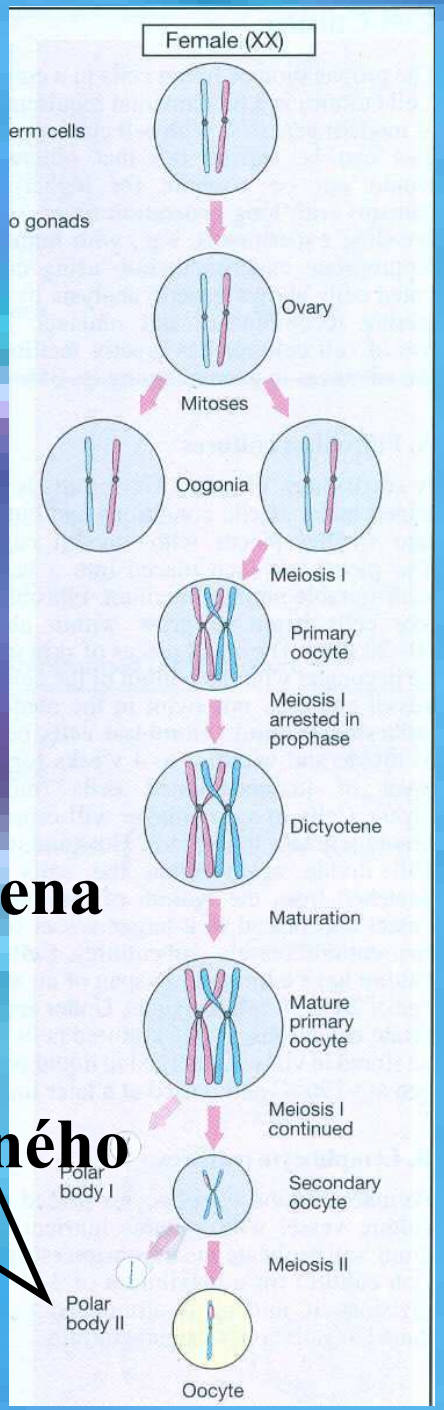
3.Biopsie

pro genetickou analýzu vhodné tři typy buněk

1. **Polární tělíska (PB) odebraná ze stádia oocyt/zygota**

Druhé polární tělísko

- **Po oplození vajíčka metodou ICSI je meioza dokončena**
- **Produkt 2. meiotického dělení**
- **Obsahuje soubor 23 mateřských chromatid**
- **Vyjmuto a testováno pro potvrzení výsledku dosaženého při vyšetření prvního polárního tělíska**
- **Vyšetření se uskutečňuje po oplodnění vajíčka**



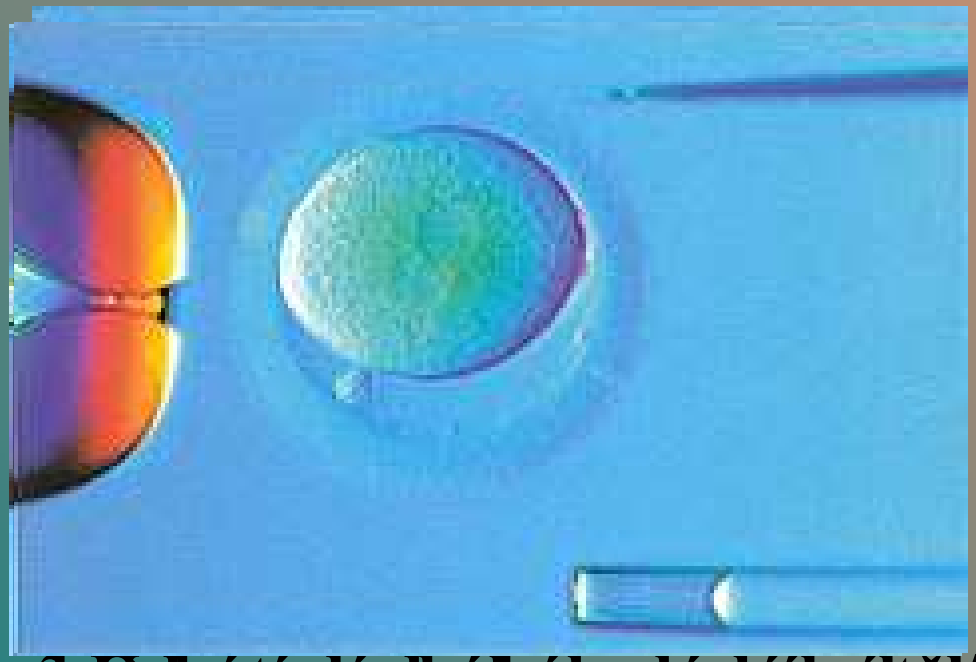
PGD

3.Biopsie

pro genetickou analýzu vhodné tři typy buněk

1. **Polární tělíska (PB)**
   odebraná ze stádia oocyt/zygota

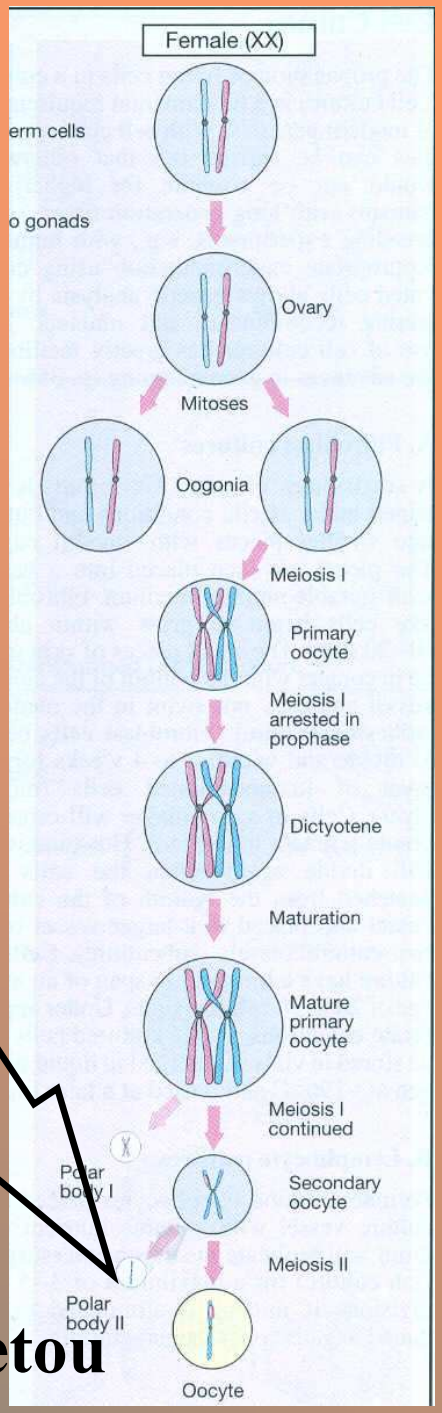
Biopsie druhého polárního tělíska



4.Odsátí druhého polárního tělíska mikropipetou

3.Otevření zony pelucidy

2.Vytvoření otvoru v zona pelucida



PGD

3.Biopsie

pro genetickou analýzu vhodné tři typy buněk

1. **Polární tělíska (PB)**
   odebraná ze stádia oocyt/zygota

- **možnosti PB analýzy**

detekce numerických chromozomálních abnormalit
monogenních chorob

- **komplikace PB analýzy**

možnost rekombinace
genotyp paternální alely zůstává neznámý

maternálního původu

původně preferováno z etických důvodů
(manipulace s oocyty , genetický materiál použitý k analýze není částí vyvíjejíciho se embrya)

PGD

3.Biopsie

pro genetickou analýzu vhodné tři typy buněk

2. Buňky (blastomery) z embryí ve stádiu rýhování

3.den po oplození

fertilizované embryo

složeno z 6-8 buněk (blastomer)

- každá buňka obsahuje stejnou genetickou výbavu
- buňky ještě nejsou specializovány

odebrány 1 – 2 blastomery → **provedeno genetické vyšetření**

PGD

3.Biopsie

pro genetickou analýzu vhodné tři typy buněk

2. Buňky (blastomery) z embryí ve stádiu rýhování

Biopsie blastomery z osmibuněčného embrya

1.Vytvoření otvoru v zona pelucida [illegible]

genetickému vyšetření

PGD

3.Biopsie

pro genetickou analýzu vhodné tři typy buněk

2. Buňky (blastomery) z embryí ve stádiu rýhování

- **možnosti analýzy blastomer**

  detekce numerických chromozomálních abnormalit

  monogenních chorob

- **komplikace analýzy blastomer**

  limitované množství genetického materiálu

  maternálního i paternálního původu

- **většina center PGD preferuje biopsii blastomer**

PGD

3.Biopsie

pro genetickou analýzu vhodné tři typy buněk

3. Buňky trofoblastu z blastocyst

5. –6. den po oplození → **blastocysta**

tvořená 50 –60 blastomerami

obal - trofoblast

odebráno 10 buněk ke genetickému vyšetření

PGD

3.Biopsie

pro genetickou analýzu vhodné tři typy buněk

3. **Buňky trofoblastu z blastocyst**

- **možnosti analýzy buněk trofoblastu**

  vyšetření většího počtu buněk

  menší technická náročnost biopsie

- **komplikace analýzy buněk trofoblastu**

  pouze asi 40-50% preimplantovaných embryí se vyvine do tohoto stádia in vitro

PGD

4. Genetické vyšetření embrya

Choroby vyšetřované metodami PGD

Chromozomové abnormality

Metoda FISH

- Numerické odchylky chromozomů
- Numerické odchylky gonozomů
- Strukturální anomálie chromozomů

Monogenní choroby

Metoda PCR

- Gonozomálně recesivní onemocnění
- Autozomálně recesivní onemocnění
- Autozomálně dominantní onemocnění

PGD

4. Genetické vyšetření embrya

Chromozomové abnormality

Metoda FISH (fluorescenční in situ hybridizace)

- **analýza chromozomů v interfázním jádře jednotlivých buněk embrya**

↳ **fixovány na podložní sklo**

Komplikace:

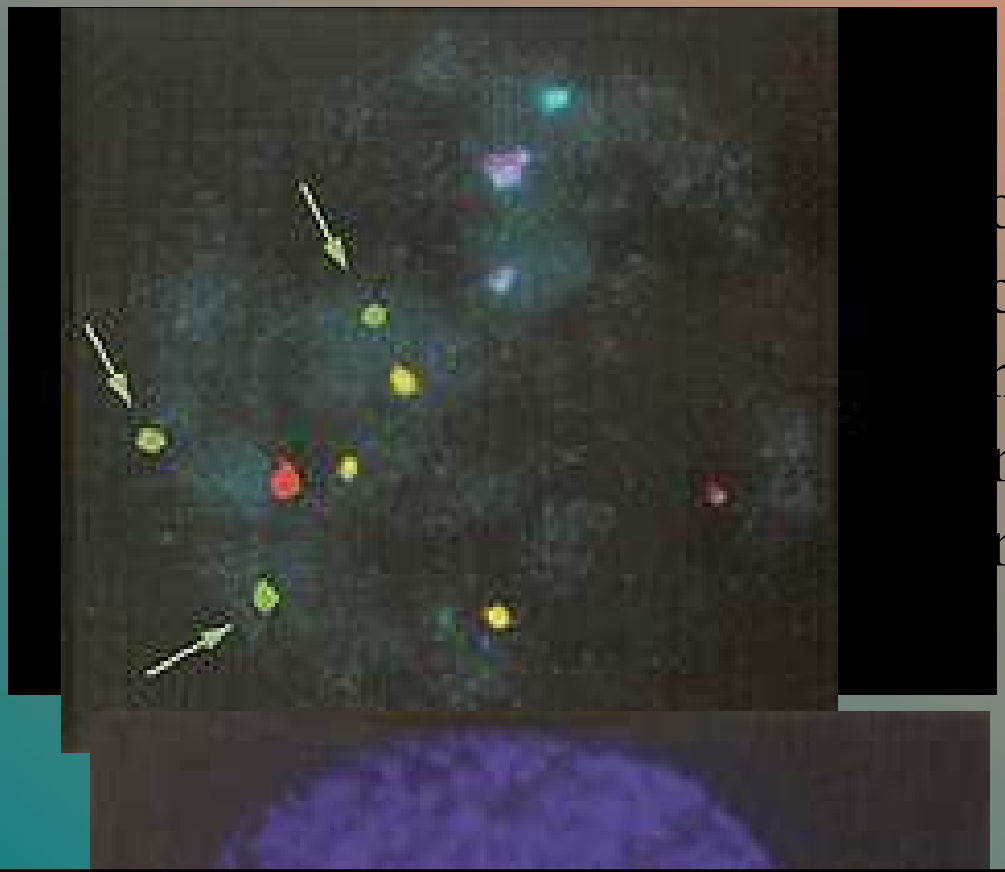
- **Limitovaný počet kvalitních embryí (oocytů) u žen v pokročilém věku**
- **Vyšetření jen určitého spektra odchylek na omezeném počtu chromozomů**
- **Chyby způsobené technickými problémy**
- **Chybná diagnóza způsobená mozaicismem**

PGD

4. Genetické vyšetření embrya

Chromozomové abnormality - metoda FISH

Numerické odchylky chromozomů
X, Y, 21, 18, 13, 14, 22, 16, 15 aj.



omie 21 (zelený signál),
omie 22 (žlutý signál),
nosomie 16 (modrý signál),
mální počet 13 (červený signál),
mální počet18 (fialový signál)

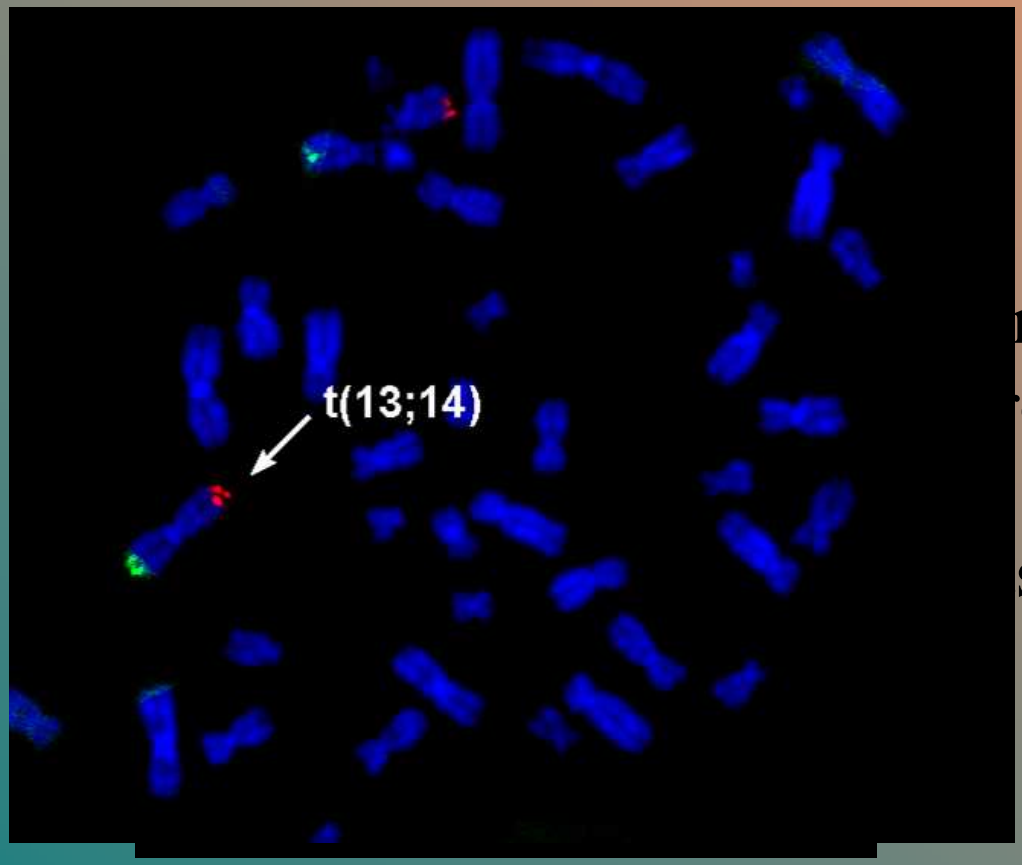
Normální počet chromozomů
13, 18, 21, X a Y

PGD

4. Genetické vyšetření embrya

Chromozomové abnormality – metoda FISH

Strukturální anomálie - translokace



romozom 13 (zelený signál)

romozom 14 (červený signál)

Robertsonova translokace t(13,14

Lymfocyty periferní krve

stomera

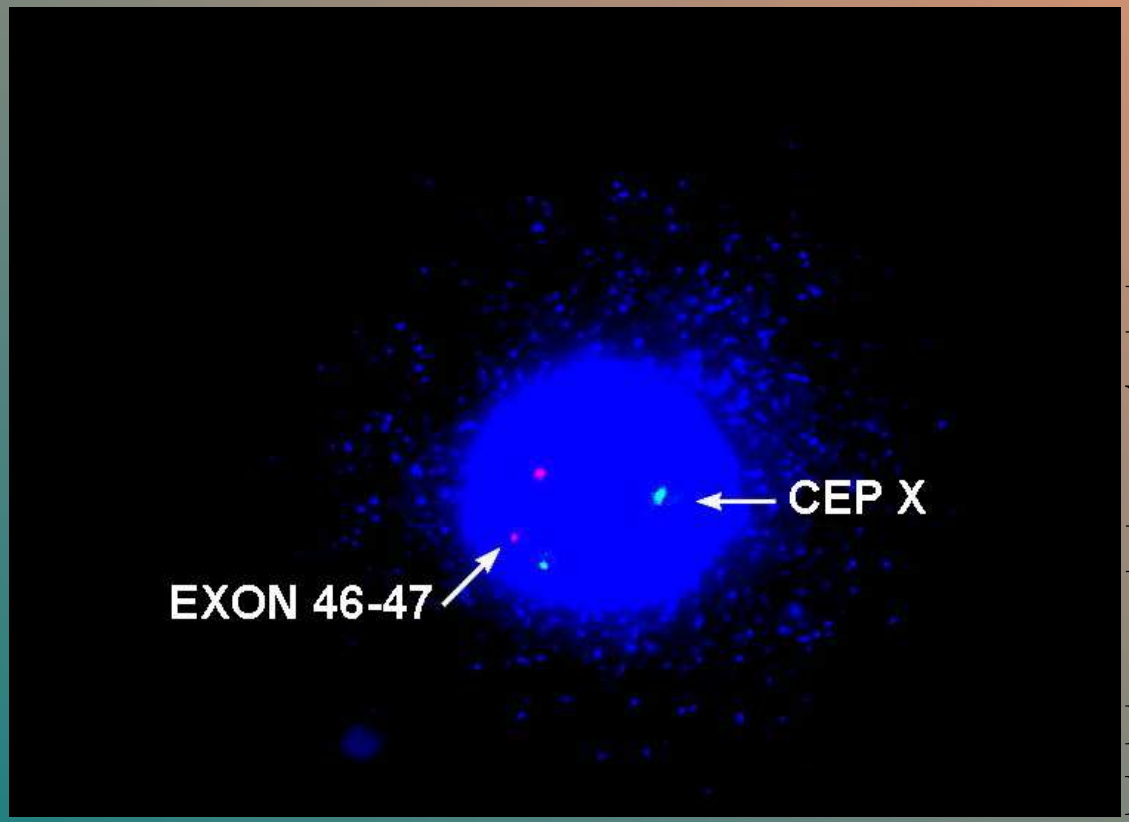
Kuglík, Slámová
Laboratoř molekulární cytogenetiky,
OLG, FN Brno

PGD

4. Genetické vyšetření embrya

Chromozomové abnormality – metoda FISH

Strukturální anomálie - delece



Normální ženský genotyp

Přenašečka delece exonu 46-47 v genu pro dystrofin na chr.X

bez delece exonu 46-47

blastomera

Lymfocyty periferní krve

Kuglík, Slámová
Laboratoř molekulární cytogenetiky, OLG, FN Brno

PGD

4. Genetické vyšetření embrya

Monogenní choroby - metoda PCR

oplach a transport blastomer v dest. vodě

Důležitý faktor úspěšné amplifikace DNA z jedné buňky

procedura buněčné lyze

- ***Proteinaza K***
- ***KOH***
- ***zamražení- rozmražení***

deproteinace - 94°C 20 min.

PCR – nested, semisted

PGD

4. Genetické vyšetření embrya

Monogenní choroby - metoda PCR

Komplikace :

- **možná kontaminace vzorku**
  - – cumulus buňky, obklopující oocyt/maternální původ kontaminace
  - – spermie, zapuštěná do zony pelucidy pro fertilizaci/paternální kontaminace
- **ADO (alelic drop out)**

amplifikace jedné alely pod úrovní detekovatelnosti

- –optimalizace PCR (výskyt ADO <10%)
- –příčina ADO: obecně neznámá, avšak je ovlivněna :
  - »metodou buněčné lyse před PCR
  - »PCR podmínkami
  - »sekvencí cílové DNA
  - »velikostí PCR produktu

PGD

4. Genetické vyšetření embrya

Monogenní choroby - metoda PCR

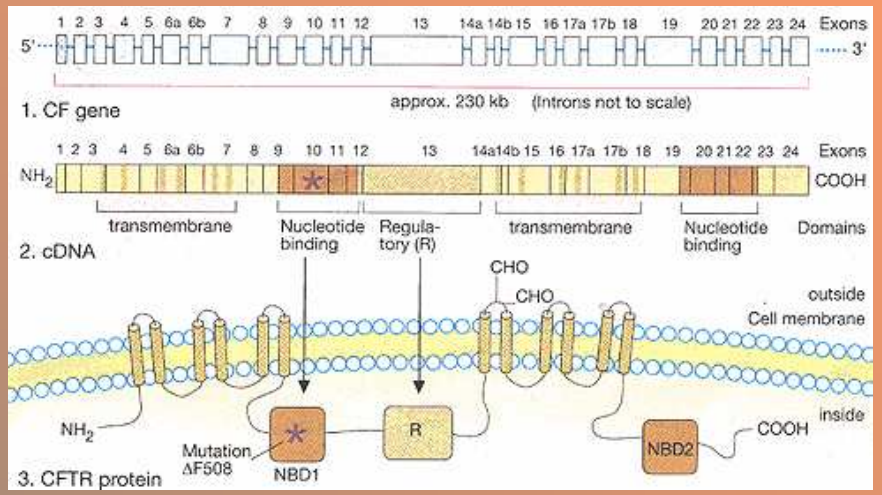
Minimalizace ADO

- protokol monitorující výskyt ADO:
  - ***multiplex PCR*** (koamplifikace mutace s polymorfními markery)
  - ***SSCP nebo DGGE analýzy*** (detekující obě alely současně, potvrdí genotyp)
  - ***fluorescenční PCR*** - redukuje výskyt ADO, detekce DNA fragmentu je až 1000x citlivější ve srovnání s konvenční PCR technikou

PGD – Cystická fibróza

CF představuje nejčastější žádost o PGD

incidence 1/2500 novorozenců
1/25 přenašečů



70% CF pacientů v evropské populaci nese mutaci F508del

- oba partneři nositelé F508del (49%)
- jeden partner F508del a druhý jinou mutaci (42%)

PGD zaměřena na eliminaci embryí nesoucích F508del

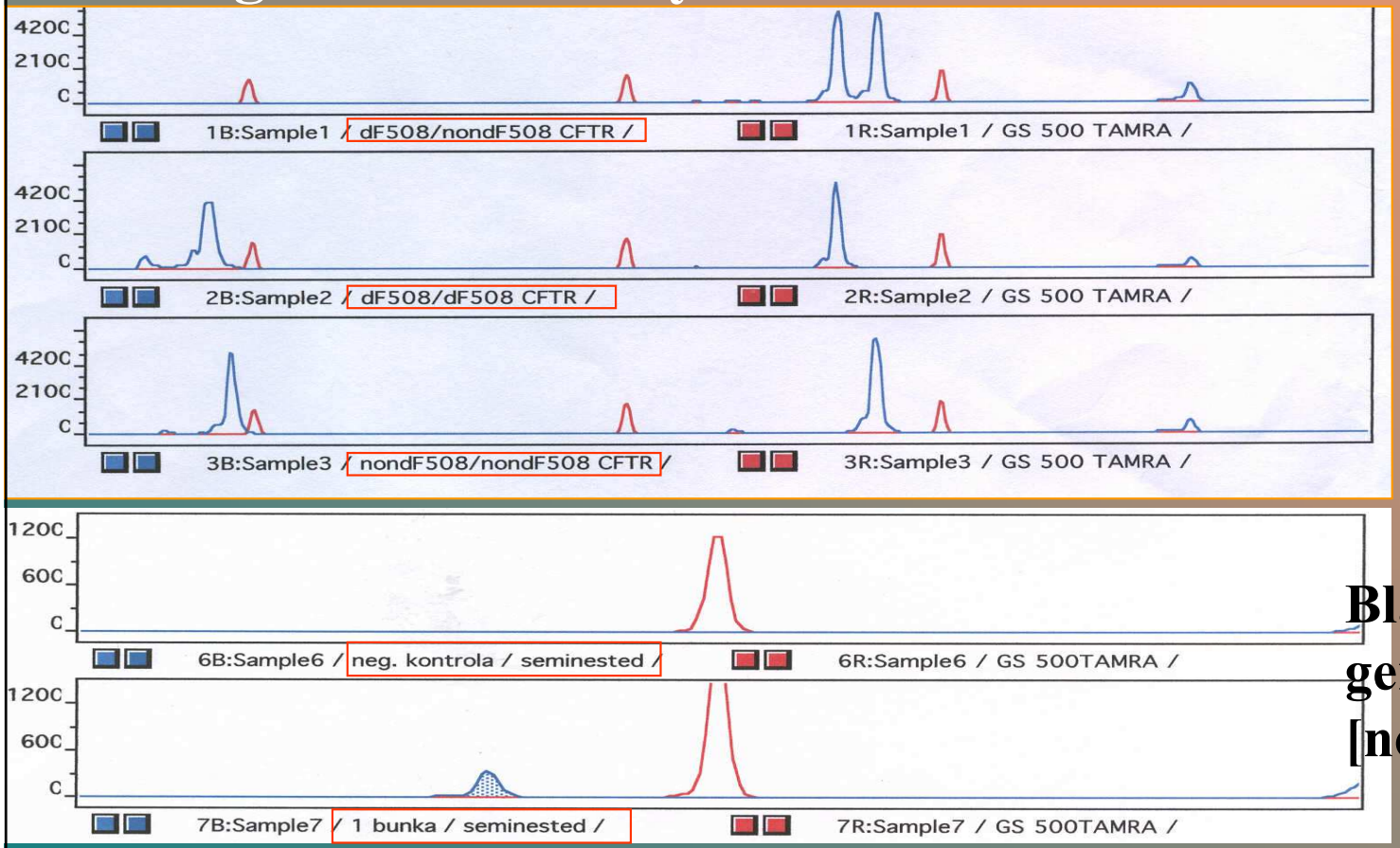
- oba partneři nesou jinou mutaci než F508del (9%)

Specifický test na detekci mutací nebo nepřímá DNA diagnostika

PGD – Cystická fibróza

Detekce mutace F508del v genu CFTR

Fragmentační analýza – ABI PRISM 310



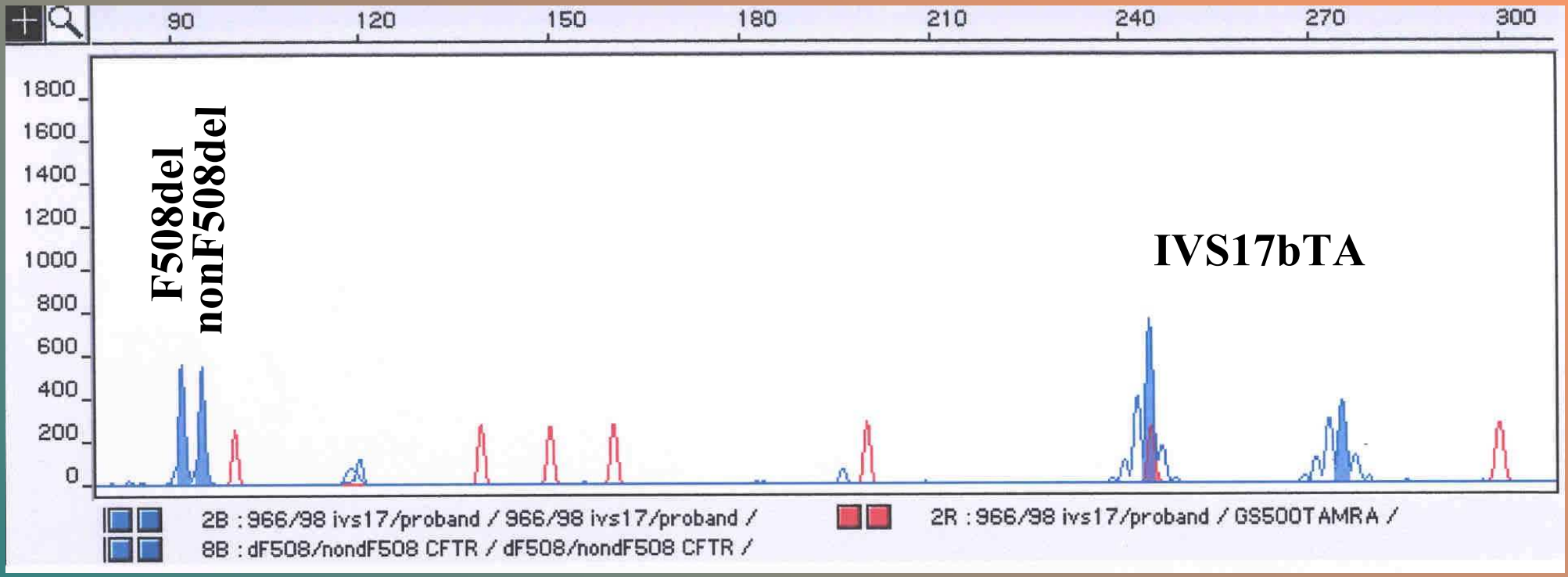
Lymfocyty z periferní krve

Blastomera genotyp: [nonF508del],[nonF508del]

PGD – Cystická fibróza

Detekce mutace F508del v genu CFTR

Fragmentační analýza – ABI PRISM 310



Multiplex PCR – koamplifikace mutace F508del s intragenním mikrosatelitem IVS17bTA

Genotyp blastomery: [F508del],[nonF508del]

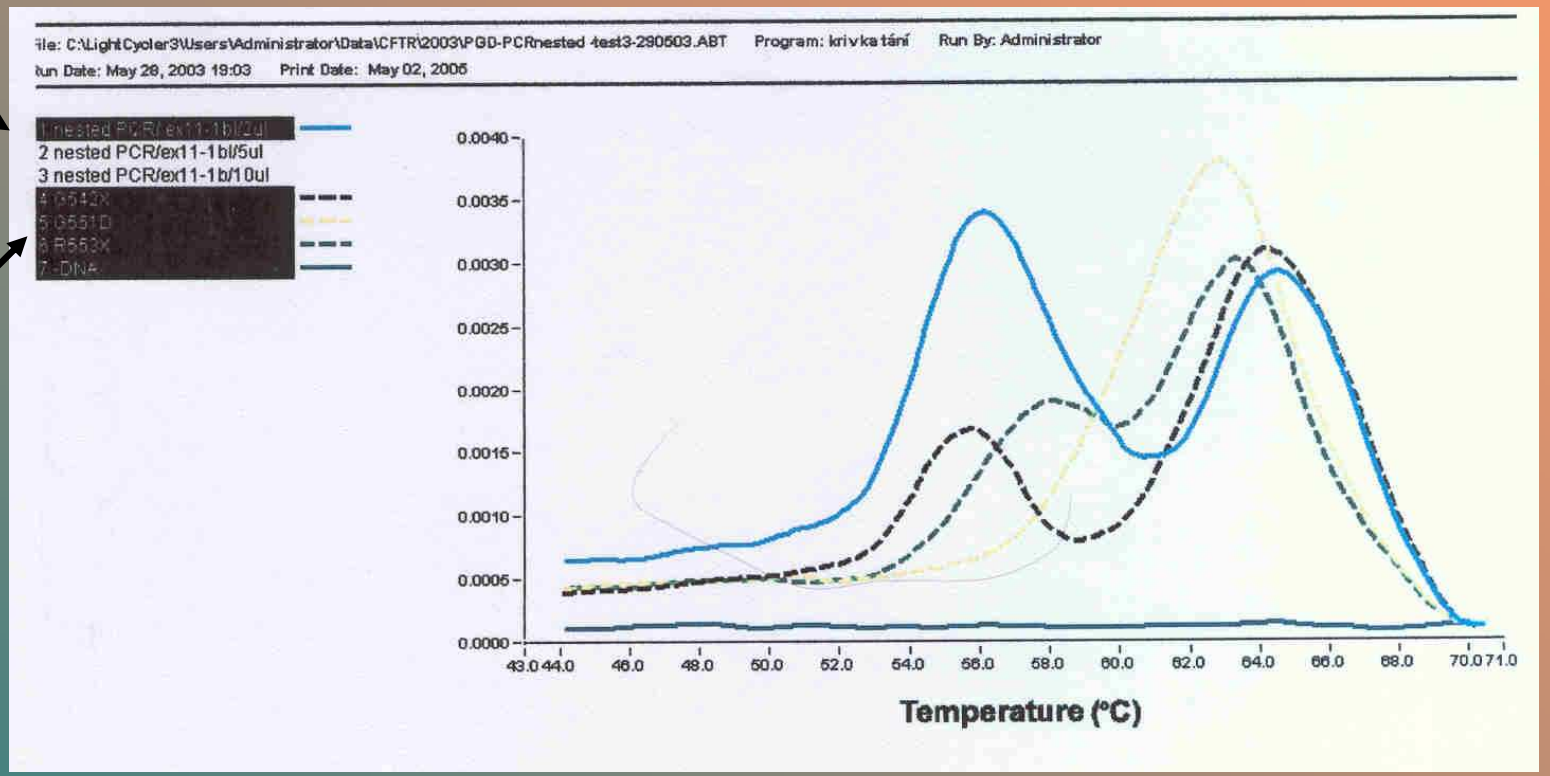
PGD – Cystická fibróza

Detekce mutace G542X,G551D a R553X v genu CFTR

Real-time PCR Light cycler Roche

Blastomera genotyp: [G542X],[non]

Lymfocyty z per. krve



Nevýhody PGD

- **Limitovaný počet buněk dostupných genetické analýze**
- **Možnost nesprávného výsledku (10% případů)**
- **Možné riziko narušení vývoje vyšetřovaného embrya**
- **Není vyloučená jiná genetická vada**
- **Doplnění PGD amniocentézou**

Etické problémy PGD

- **selekce podle pohlaví (sexing) -na přání všem**
  -pouze pro rovnováhu v rodině ?
  -pouze u X-vázaných chorob
- **embrya přenašečů chorob (AR, XR) jsou vhodná k implantaci ?**
- **provádět PGD u rodin se zátěží chorob s pozdním nástupem (HD) ?**
- **HLA typizace embryí pro transplantaci kmenových buněk ?**

Etické problémy PGD

Naše pracoviště provádí PGD
pouze jako prevenci závažných dědičných chorob

Jsme zásadně proti selekci embryí
ze sociálních a eugenických důvodů

Děkuji za pozornost