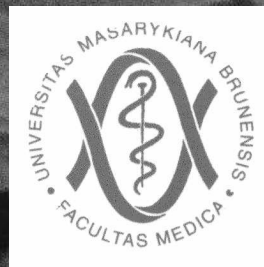


Preimplantační genetická diagnostika

Oddělení lékařské genetiky FN Brno
Gynekologicko - porodnická klinika
Masarykovy univerzity v Brně



Preimplantační genetická diagnostika (PGD)

- alternativa k prenatalní diagnostice
- alternativní prevence potratů indikovaných po amniocentéze
- preventivní a cílená diagnostika dané geneticky dědičné nemoci
- selekce embryí pro IVF u párů s rizikem transmitující genetické choroby

Umělé oplodnění- in vitro fertilizace (IVF)

nejrozšířenější metoda asistované reprodukce

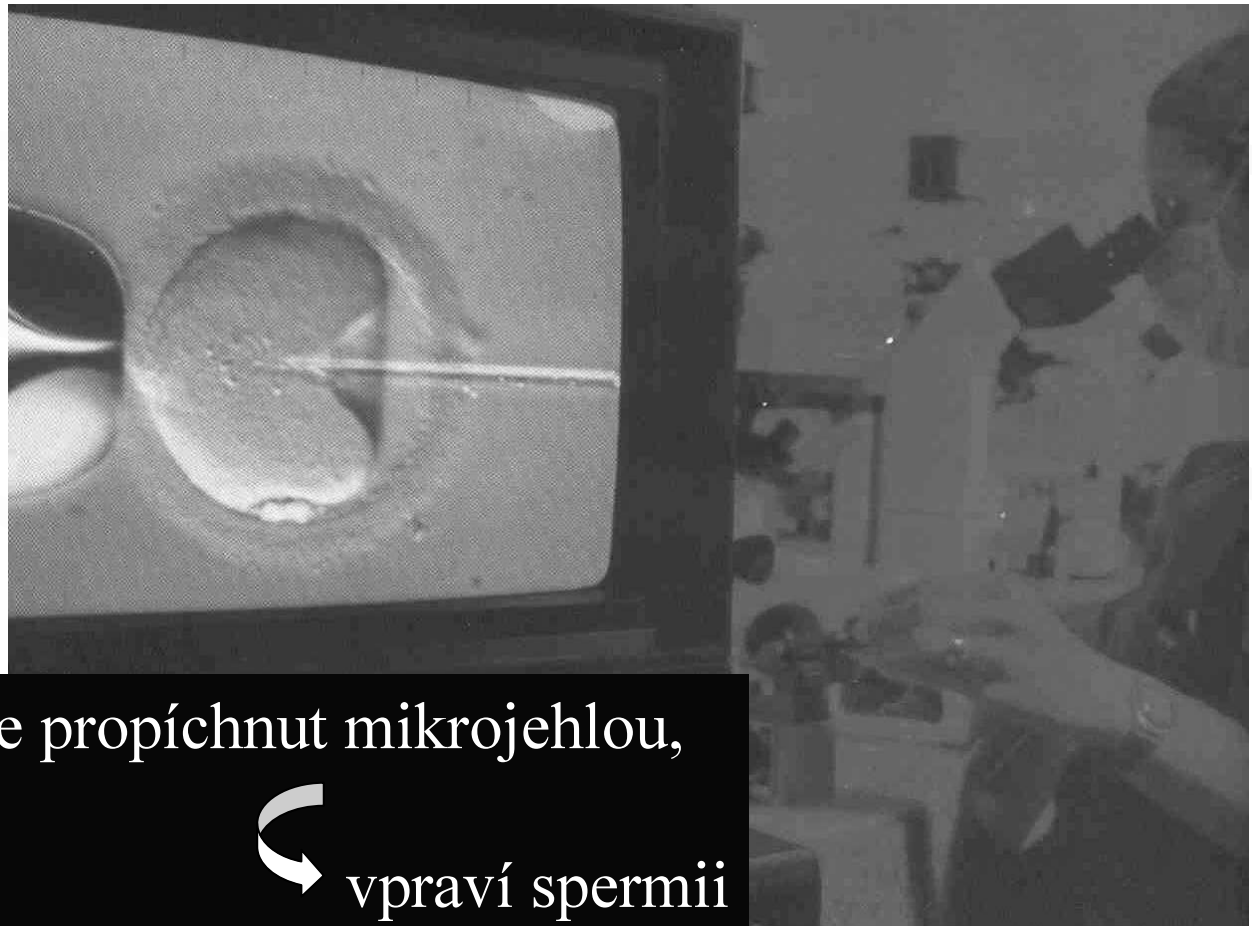
- z vaječníku se odebere několik vajíček
- oplodní se spermiemi partnera in vitro
- několik vybraných embryí se přenese do dělohy
- dochází k implantaci a těhotenství

K otěhotnění dochází v 25% případů na jeden cyklus léčby

Průměrný počet dětí narozených po IVF je 15% na každý cyklus léčby

Intracytoplasmická injekce testikulárních spermií (ICSI)

- do vajíčka je injekcí vpravena jedna připravená spermie



Oocyt je propíchnut mikrojehlou,



vpraví spermii

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.

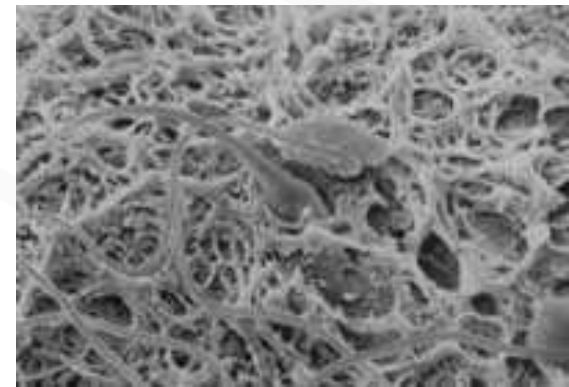


Co předchází provedení PGD ?

- Genetické poradenství před cyklem IVF
 - konzultace s párem včetně genetického vyšetření
- Poradenství s gynekologem a embryologem
- Informovaný souhlas pacientky

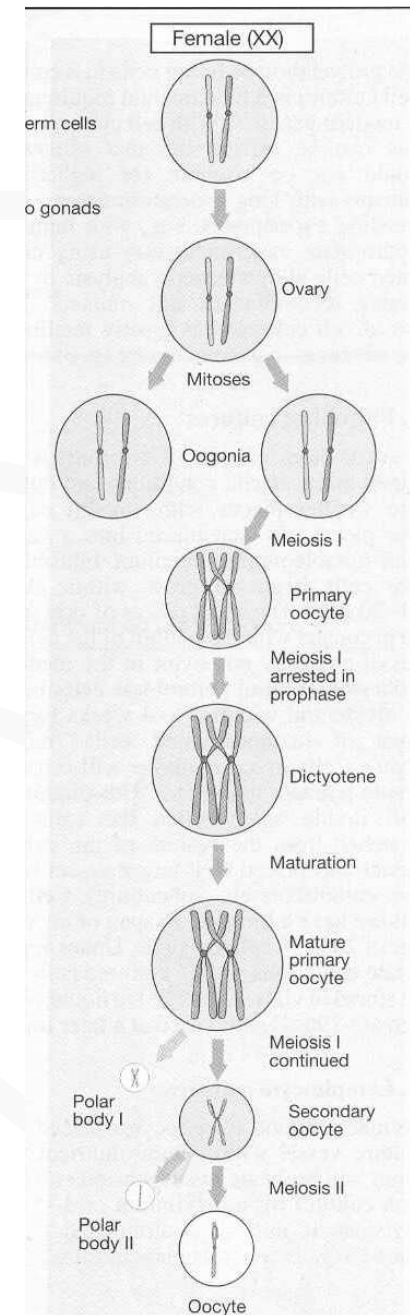
Genetická analýza

- oocyt/zygota (polární tělísko)
- blastomera (embryo)
- blastocysta



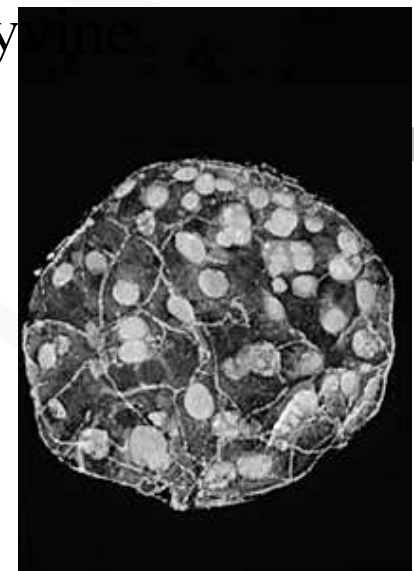
Biopsie polárního tělíska (PB biopsie)

- původně preferováno z etických důvodů (manipulace s oocyty, genetický materiál použitý k analýze není částí vyvíjejícího se embrya)
- komplikace: možnost rekombinace
genotyp paternální alely zůstává neznámý
- možnosti PB analýzy : detekce numerických chromozomálních abnormalit maternálního původu
 - “age related” aneuploidie
 - žena nositelka translokace
- většina center PGD toto vyšetření nepreferuje



Biopsie blastocyst

- blastocysta:
 - opouzdřená struktura obsahující přibližně 100 buněk
 - vyvíjí se 5-6 den po inseminaci
 - trofoektodermální buňky - odvozeny z placenty a jiných extra-embryonálních tkání
 - odběr 10 buněk nepostihuje časný vývoj embryí, ale neví se jaký efekt má na pozdější vývoj fetu
 - pouze asi 40-50% preimplantovaných embryí se vyvíjí do tohoto stádia in vitro
- výhoda:
 - menší technická náročnost biopsie
 - možnost více buněk k analýze



Biopsie blastomer

- 3.den → fertilizované embryo: 6-8 totipotentních buněk
- hlavní nevýhoda:
 - limitované množství materiálu, doporučována biopsie a analýza dvou blastomer z každého embrya
- většina center PGD preferuje biopsii blastomer

Princip biopsie blastomer

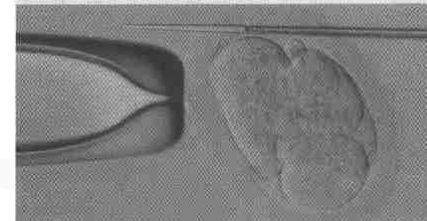
- Odběr blastomery z rýhujícího se embrya
- Testování blastomery metodami molekulární biologie
- Eliminace embryí se specifickou genetickou vadou

Technika provedení biopsie blastomer

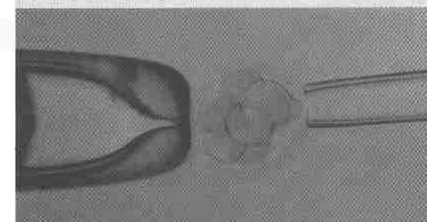
- Fertilizace metodou ICSI
- Biopsie po 72 hod. kultivace
- Narušení zona pellucida
- Odběr blastomer v EB mediu
- Fixace blastomery na podložní sklo
- Kultivace embryí po biopsii (48 hod.)
- Oplach a transport blastomer v dest. vodě pro PCR vyšetření

GENETICKÉ TESTOVÁNÍ EMBRYÍ

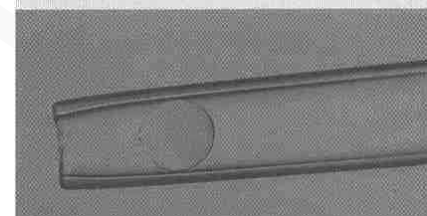
PGD je metoda umožňující genetickým vyšetřením jedné nebo dvou buněk odebraných z embrya určit jeho genotyp. Buňky pro genetické testování jsou odebírány z embrya nejčastěji ve stadiu 8 buněk. Embryo se tímto zákrokem nepoškodí, neboť každá buňka v tomto stadiu je schopna samostatného vývoje v celého jedince. Obrázky ukazují postup odebírání buňky pro testování:

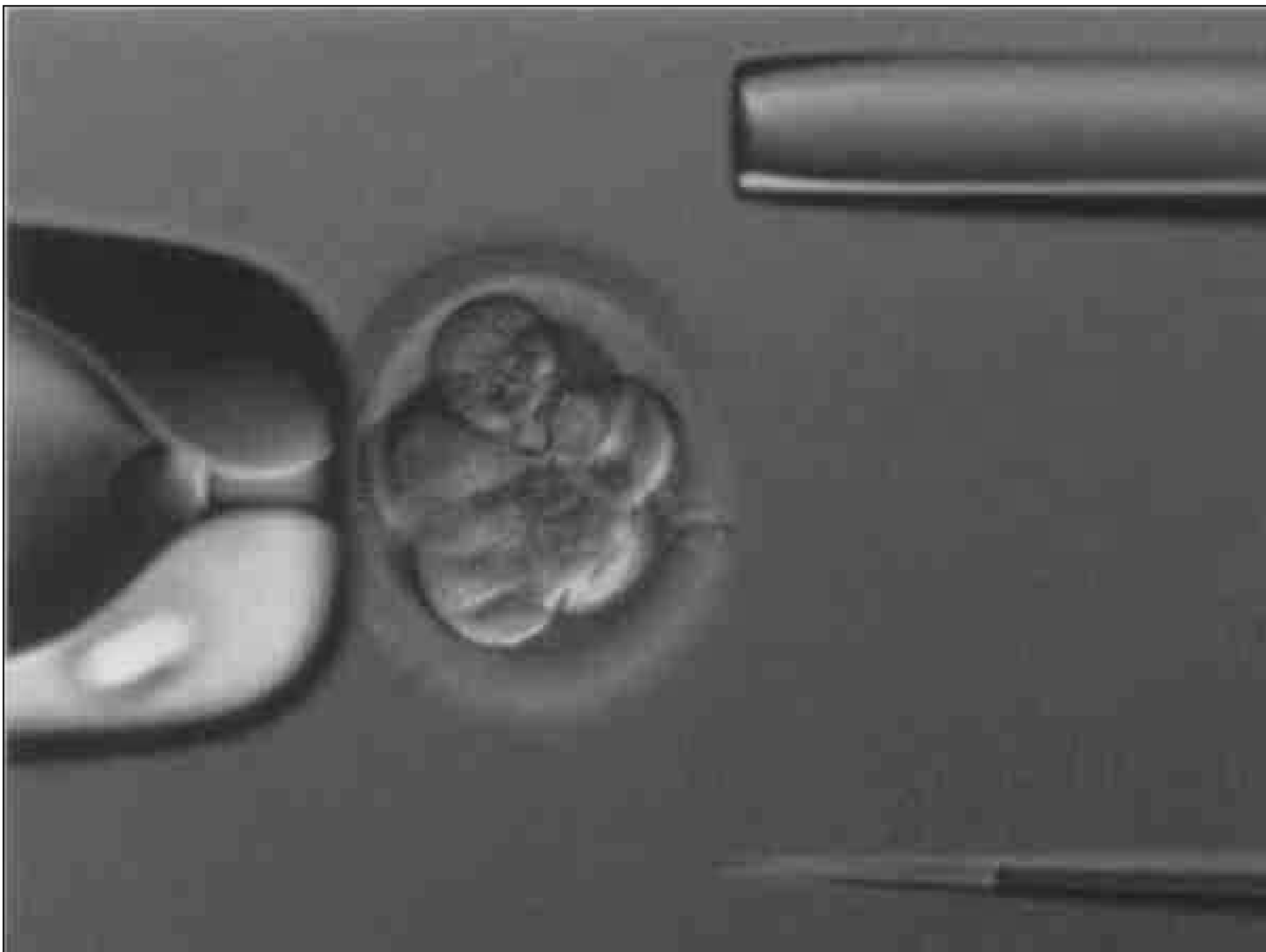


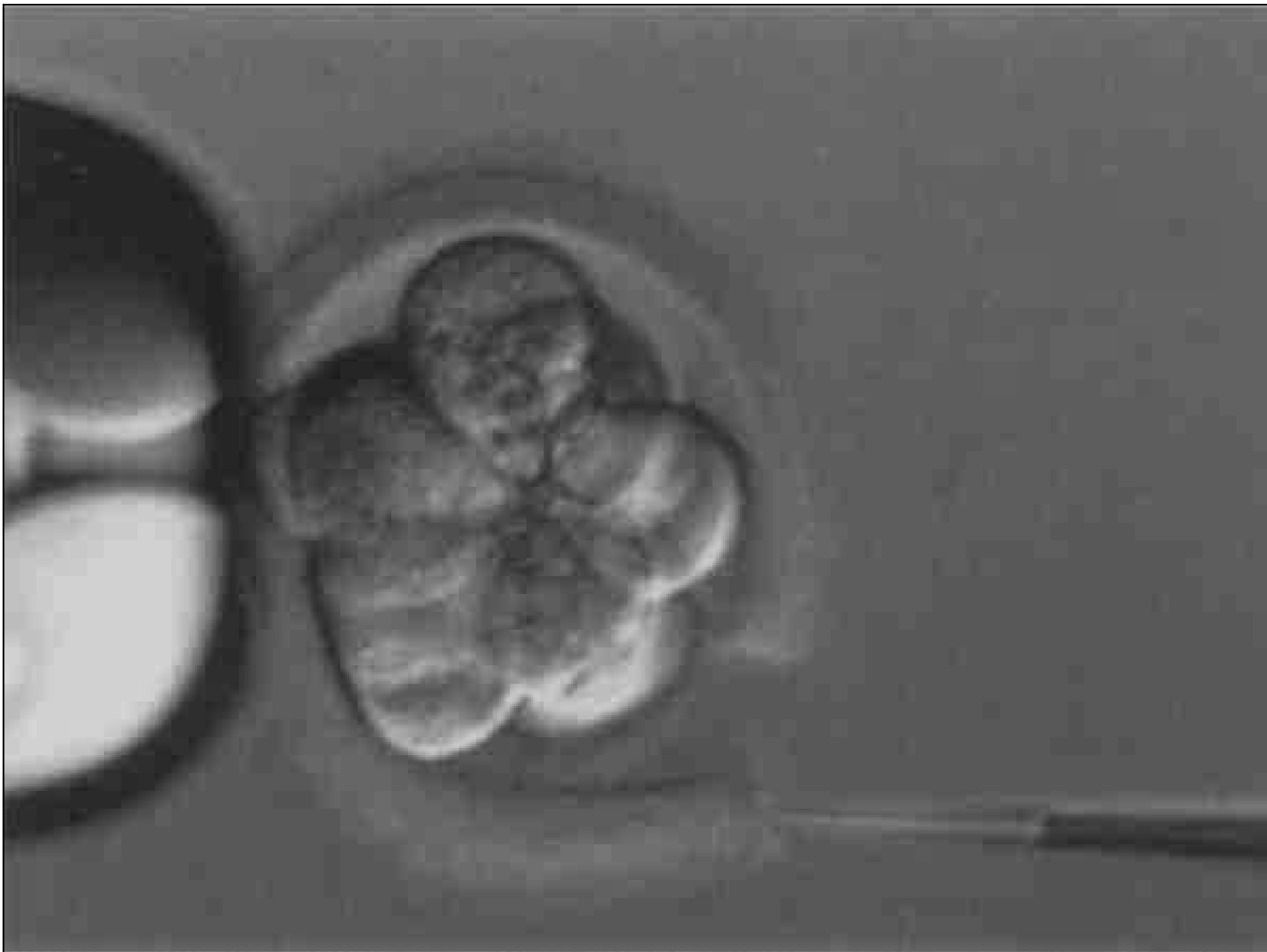
● Skleněná pipeta (vlevo) drží embrya. Vpravo je vidět skleněná mikrožehla, která předtím, než je zkoumaná buňka vytažena jinou pipetou, propíchně membránu embrya.

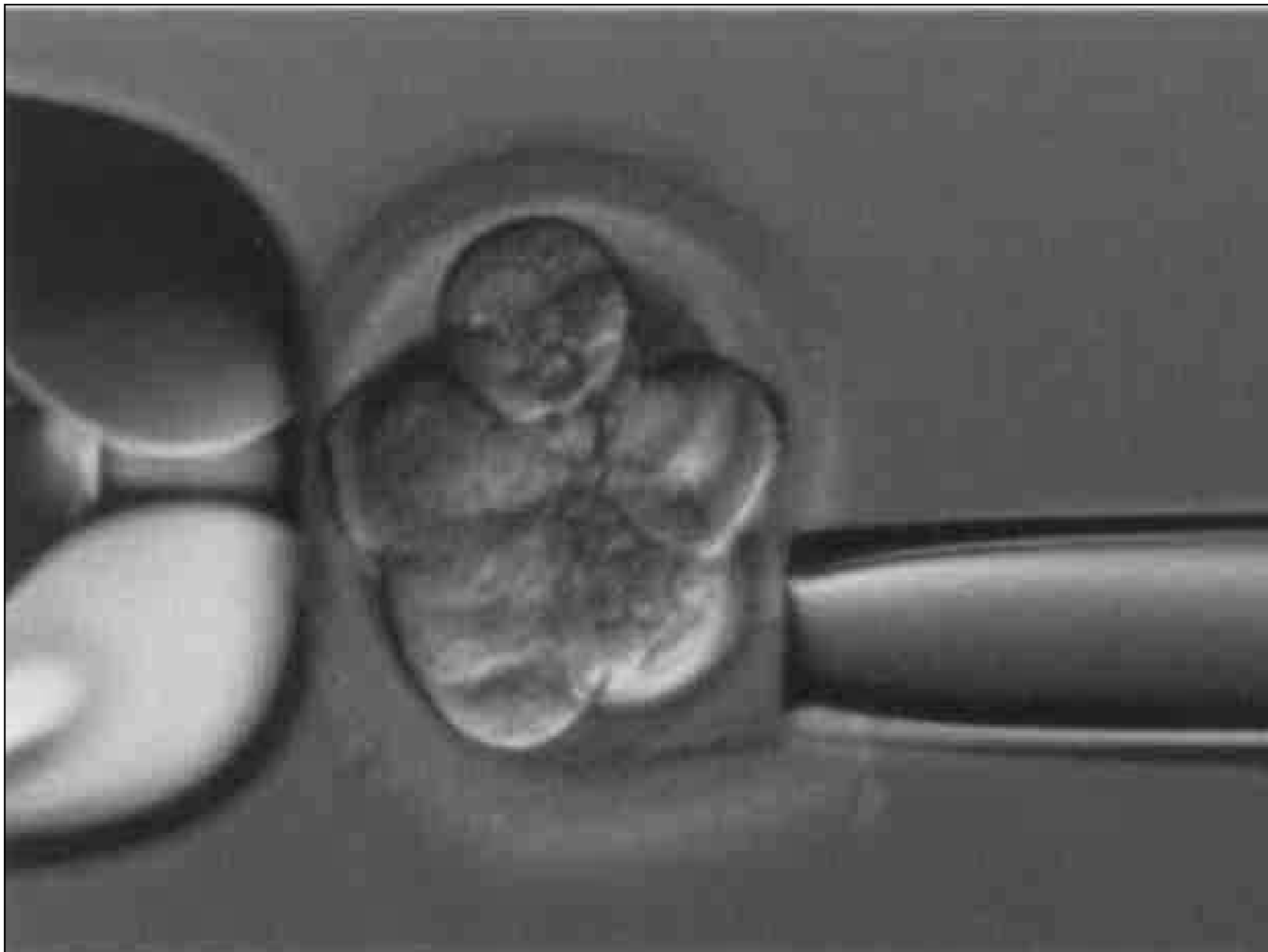


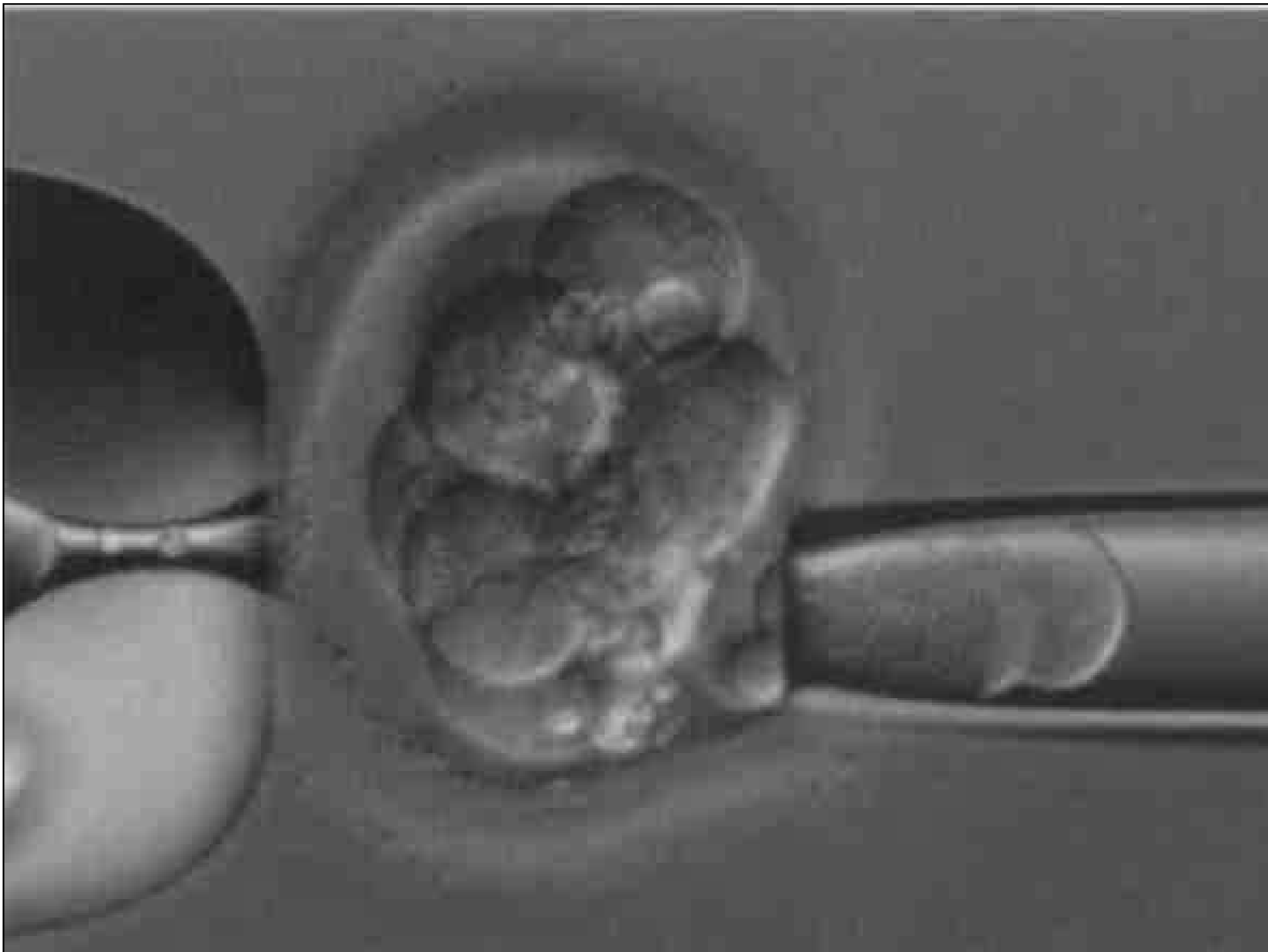
● Jedna pipeta stále drží embrya (vlevo), vpravo malá pipeta odebírá buňku z embrya. Předtím byla membrána narušena kyselinou.

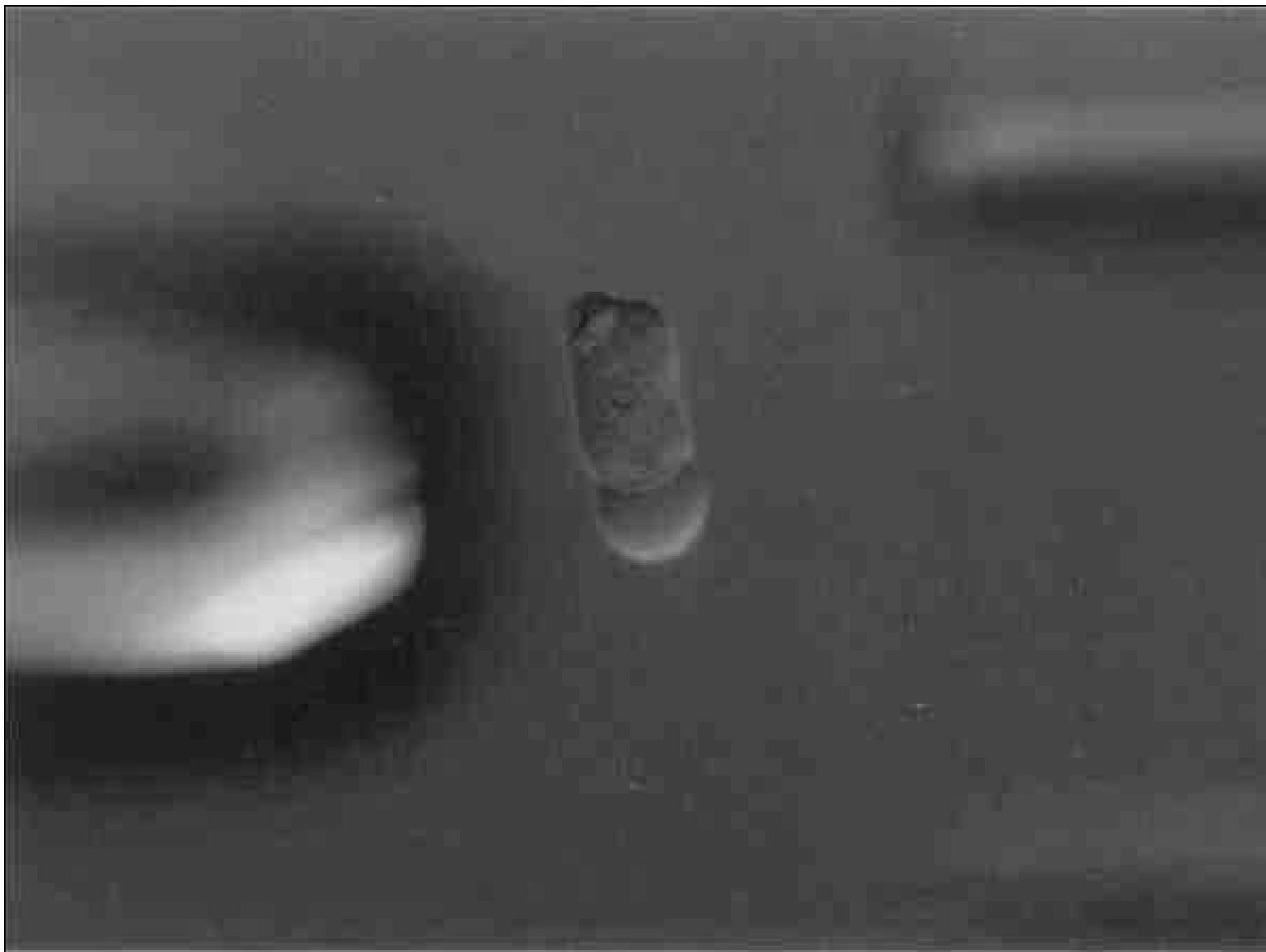


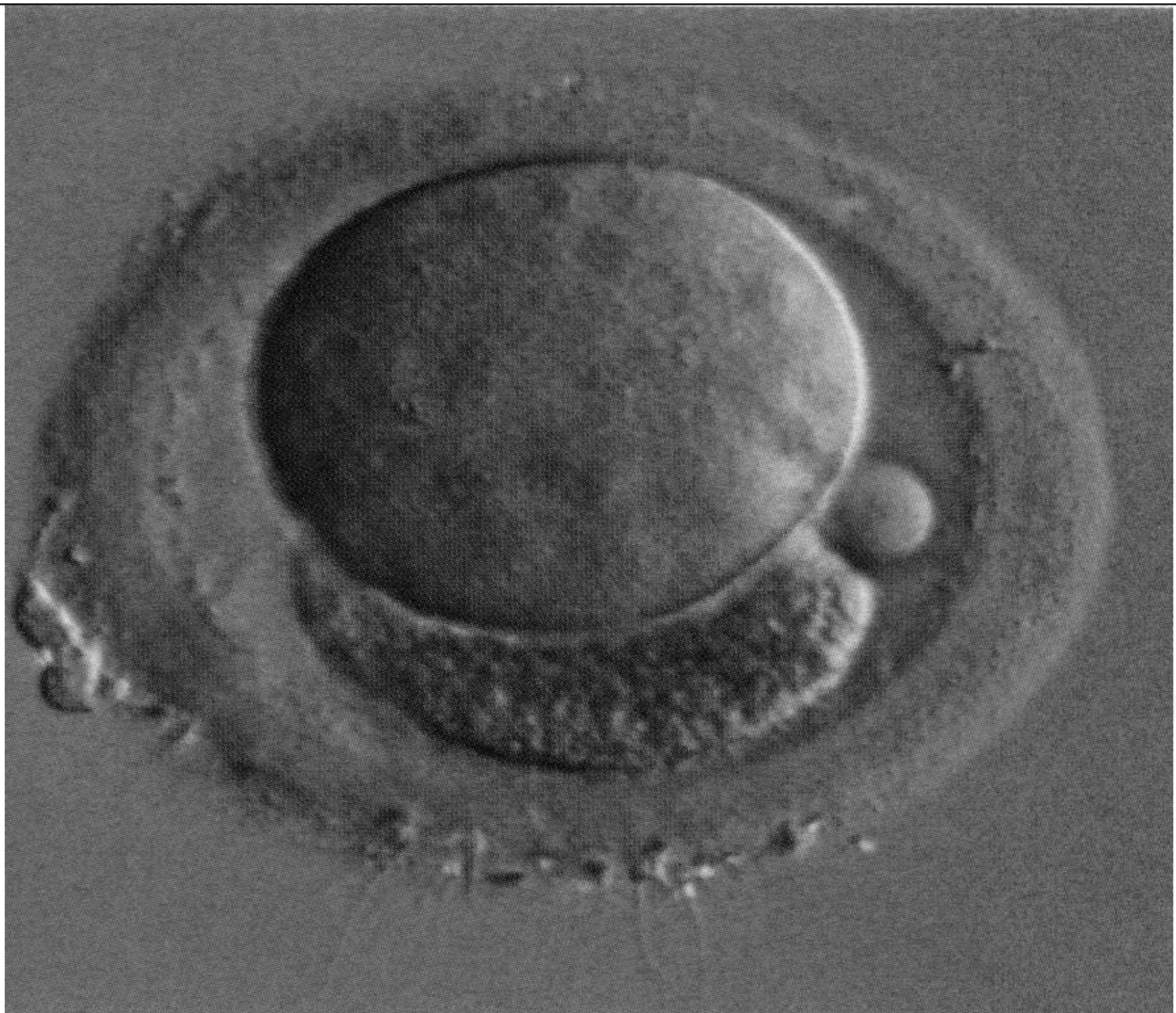












Diagnostika PGD

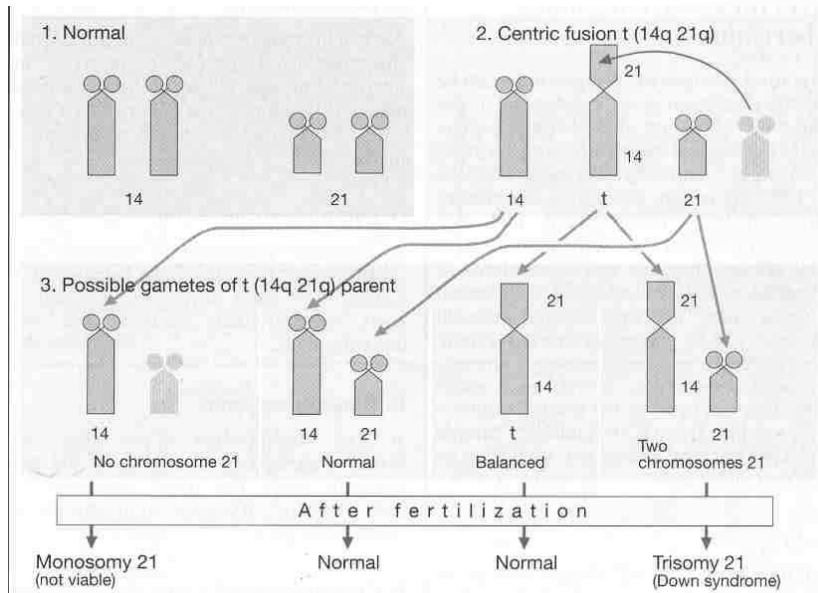
- chromozomální abnormality:
 - aneuploidie chromozomů X,Y, 13, 18, 21
 - chromozomální přestavby
 - určení pohlaví
 - FISH metoda
 - nevýhoda: častý výskyt chromosomálního mozaicismu
- monogenní choroby
 - pro jakoukoli genetickou chorobu u které je dostatečná sekvenční informace
 - PCR
 - fenomén: allelic drop out (ADO)

Table 1 Monogenic diseases for which PGD has been more commonly applied

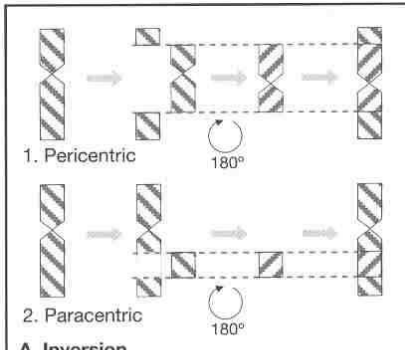
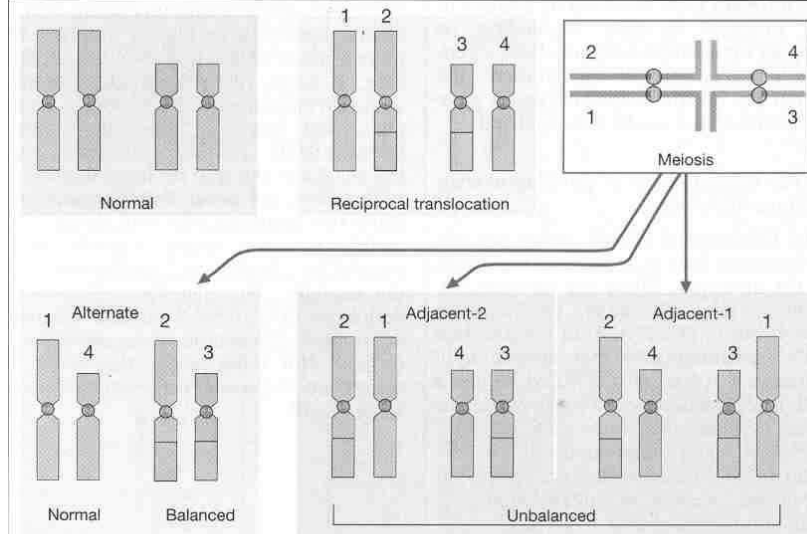
Autosomal recessive
Cystic fibrosis
β thalassaemia (β globin gene)
Sickle cell anaemia (β globin gene)
Spinal muscular atrophy (type I)
Tay-Sachs disease
Congenital adrenal hyperplasia
Autosomal dominant
Myotonic dystrophy
Huntington's disease
Charcot-Marie-Tooth disease IA
Marfan syndrome
Familial adenomatous polyposis coli
X linked
Duchenne/Becker muscular dystrophy
Haemophilia
Fragile X syndrome
Wiskott-Aldrich syndrome
Lesch-Nyhan syndrome

PGD chromozomálních abnormalit

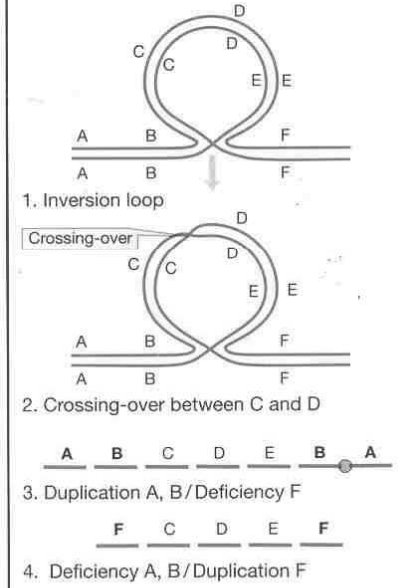
- chromozomy v interfázním jádře buňky
- první PGD : FISH na X-vázané choroby (stanovení pohlaví)
- většina chromozomálních abnormalit je maternálního původu
- častá aplikace biopsie pólového tělíska (PB)
- limitace:
 - starší ženy nebo ženy s opakovaným IVF: limitovaný počet kvalitních embryí/oocytů (aneuploidie!)
 - maximální počet chromozomů analyzovaných z jedné buňky je 7 - 9
 - chybné stanovení aneuploidie dosahuje až 15%, nejčastější příčinou chyb:
 - „background“ fluorescence, slabý signál, ztráta jádra při aplikaci blastomery na podložní sklíčko
- nyní zavádění CGH v PGD



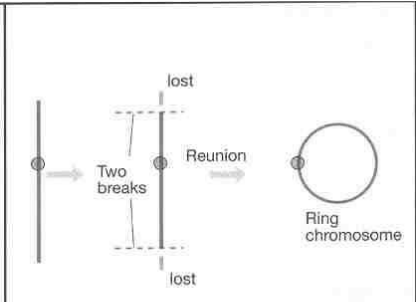
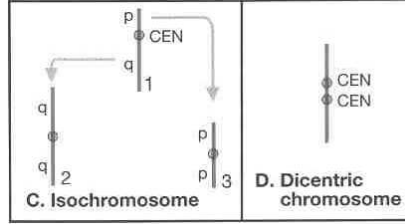
A. Centric fusion of acrocentric chromosomes



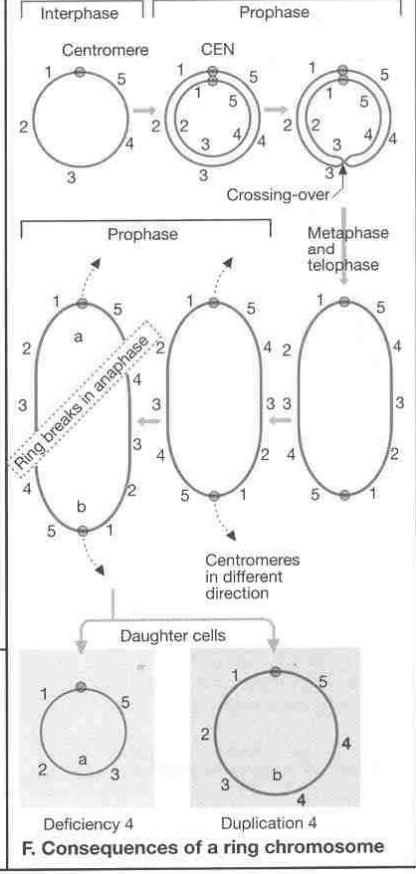
A. Inversion



B. Consequences of crossing-over in an inversion



E. Ring chromosome



Blastomera-zastavené embryo



270701/9

21

160701/6

21



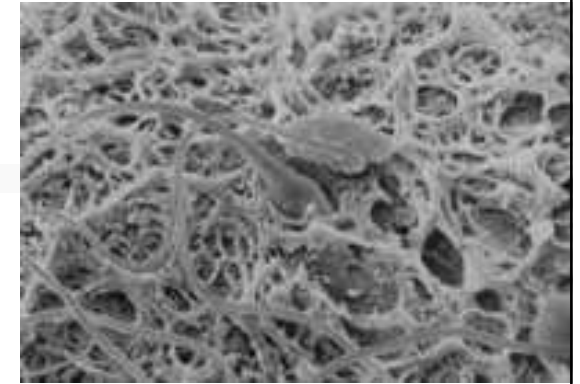
18

A glowing smiley face is centered in the upper half of the image. It consists of two small, bright white dots for eyes and a thick, curved white line for a mouth, all set against a dark, grainy background that resembles a night sky or a microscopic view. The smiley face has a soft, ethereal glow around it.

Smějící se blastomera

PGD monogenních chorob

- genotypování jedné buňky založeno na metodě 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

Minimalizace ADO

- protokol monitorující výskyt ADO:
 - multiplex PCR (dva a více lokusů vztažených ke genotypu)
 - 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

Nevýhody PGD

- Limitovaný počet buněk dostupných genetické analýze
- Možné riziko narušení vývoje vyšetřovaného embrya
- Není vyloučena jiná genetická vada
- Doplnění PGD amniocentézou

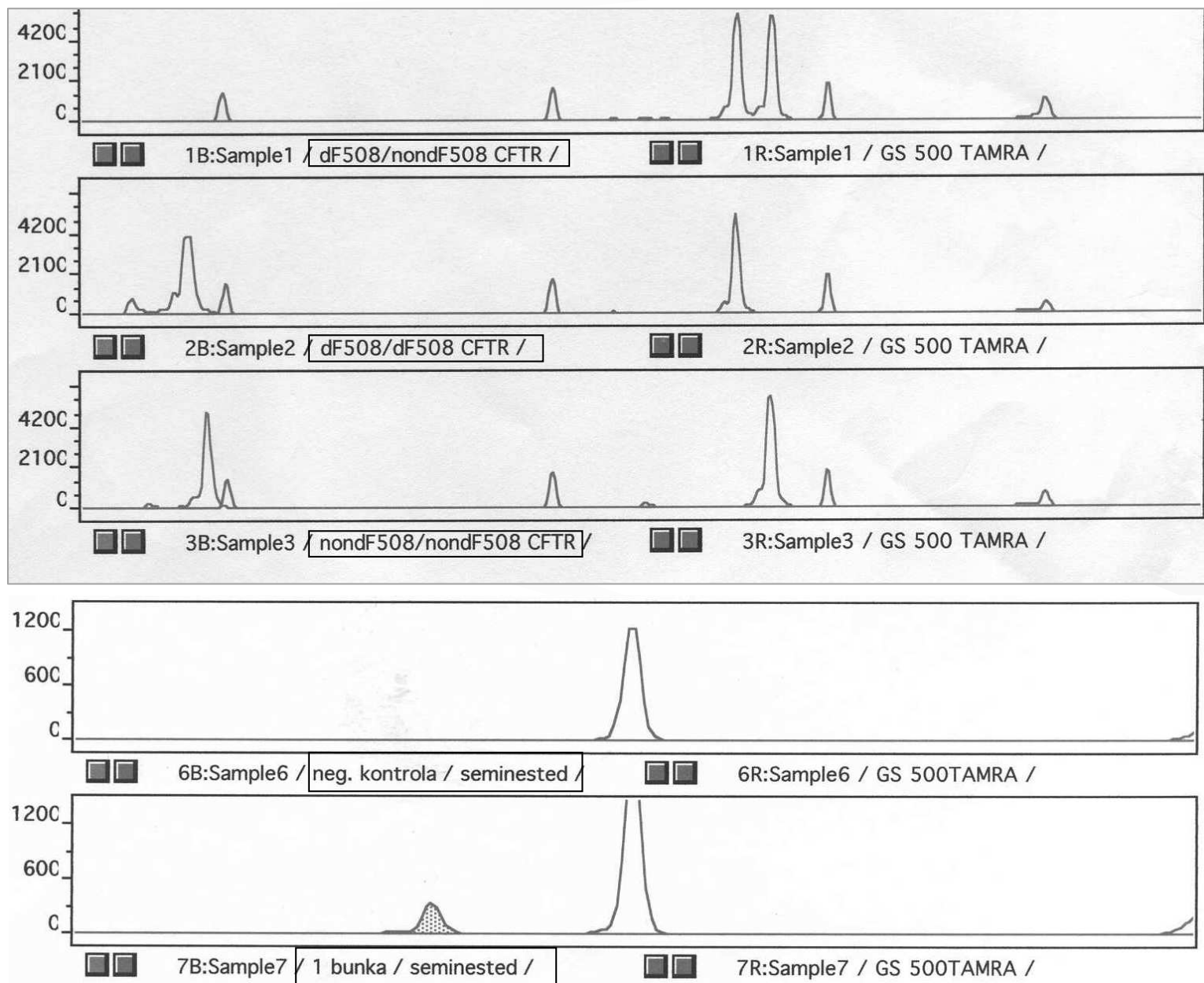
PGD u Cystické fibrózy

- **CF představuje nejčastější žádost o PGD**
 - incidence 1/2500 novorozenců
- minoritní forma CF je způsobena kongenitální bilaterální absencí vas deferens (CBAVD)
 - CBAVD nepostihuje spermatogenezi → IVF + intracytoplasmická injekce testikulárních spermií (ICSI)
 - jestliže partnerka je také nositelkou některé z mutací CFTR genu, pak ICSI procedura je následována PGD
- 70% mutací CFTR genu v Evropské populaci : $\Delta F508$
 - oba partneři nositelé $\Delta F508$ (49%)
 - jeden partner : $\Delta F508$ a druhý jiná mutace (42%) (PGD zaměřena na eliminaci embryí nesoucích $\Delta F508$)
 - oba partneři nesou jinou mutaci než $\Delta F508$ (9%) (specifický test na detekci mutací nebo nepřímá DNA diagnostika)

Identifikace alel

- nepřímá DNA diagnostika: užití polymorfních míst v genu (haplotyp)
 - jednoduchý a universální test pro všechny páry, jakmile je nalezena heterozygozyta polymorfního místa
 - interní kontrola kontaminace vzorku
 - dva a více polymorfních markerů snižuje riziko chybné interpretace (ADO)
 - vyhodnotí status ploidie testované blastomery

Fragmentační analýza dF508 z jedné buňky



Využití PGD

- preventivní a cílená diagnostika dané geneticky dědičné nemoci před IVF
- při léčbě transplantací kmenových buněk z pupečnickové krve (genetická typologie vhodných embryí)

JAKÁ ONEMOCNĚNÍ SE DAJÍ LÉČIT TRANSPLANTACÍ kostní dřeň nebo krvetvorných buněk z pupečnickové krve?

- hematologická nádorová onemocnění - například akutní i chronická leukémie

- nádory mozku - například neuroblastom a gliom
- nádory kostí u dětí - Ewingův sarkom

- karcinom prsu
- různé typy anémie (chudokrevnosti)
- těžké poruchy imunity |

- léčba lidského embrya metodami genové terapie

Etické problémy PGD

- sexing -na přání všem
 - pouze pro rovnováhu v rodině ?
 - pouze u X-vázaných chorob
- přenašeči chorob (AR, XR) jsou přijatelní ?
- provádět PGD u rodin se zátěží chorob s pozdním nástupem (HD) ?
- HLA typizace embryí pro transplantaci kmenových buněk ?