

Preimplantační genetická diagnostika

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



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

Co předchází provedení PGD ?

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

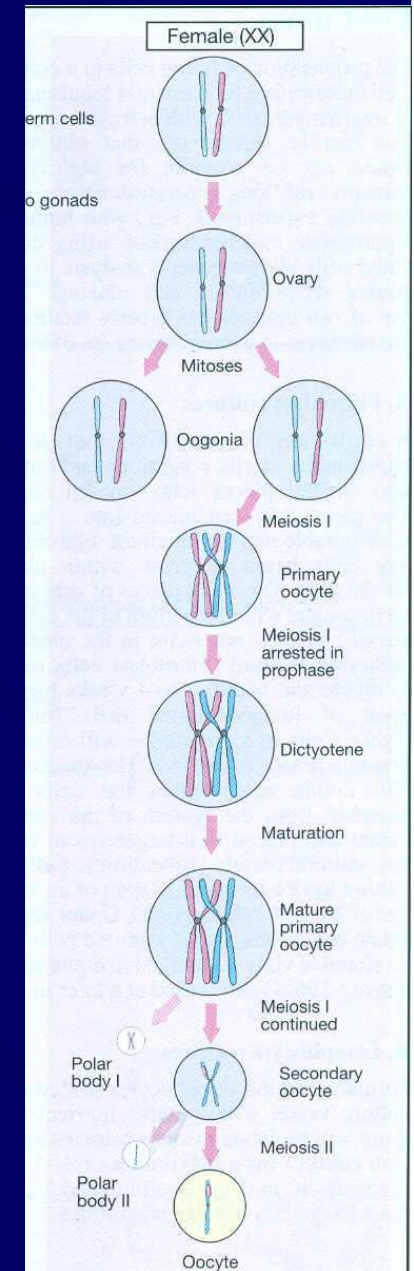
Genetická analýza

- 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 vyvine 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

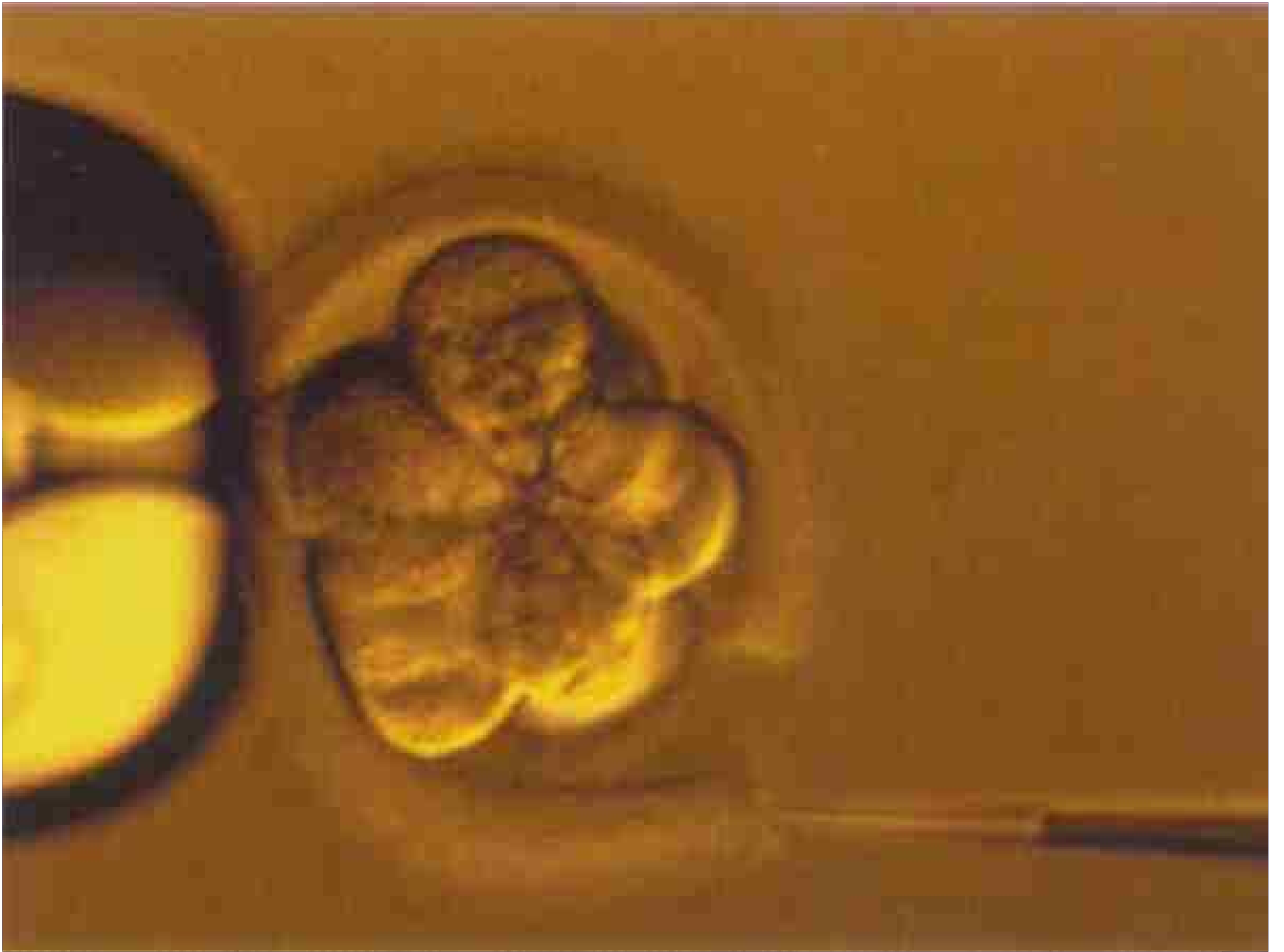
Princip biopsie blastomer

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

Technika provedení biopsie blastomer

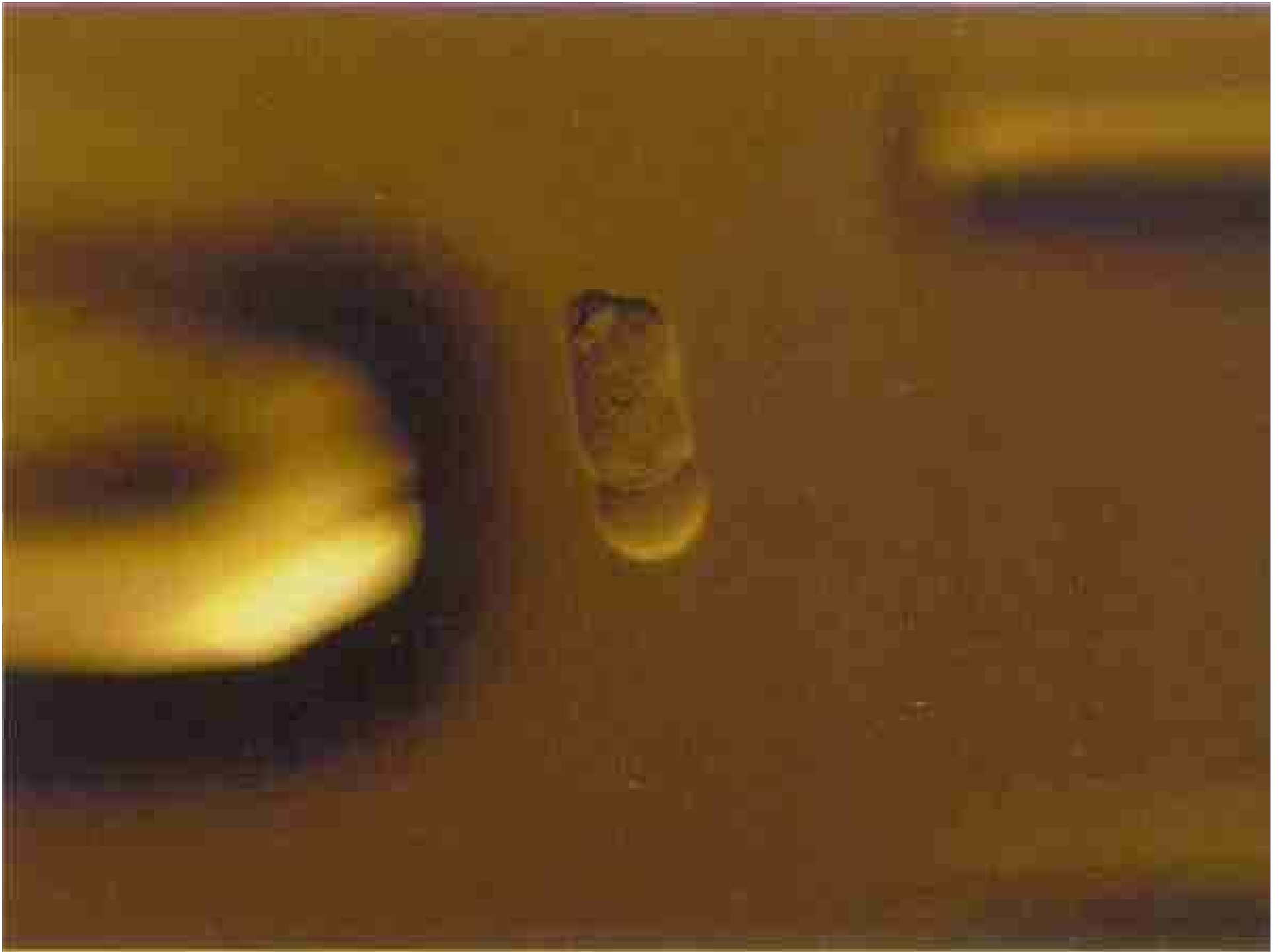
- Fertilizace metodou ICSI
- Biopsie po 72 hod. kultivace
- Narušení zona pellucida
- Odběr blastomer v EB mediu
- Fixace blastomery na podložní sklo
- Kultivace embryí po biopsii (48 hod.)
- Oplach a transport blastomer v dest. vodě pro PCR vyšetření

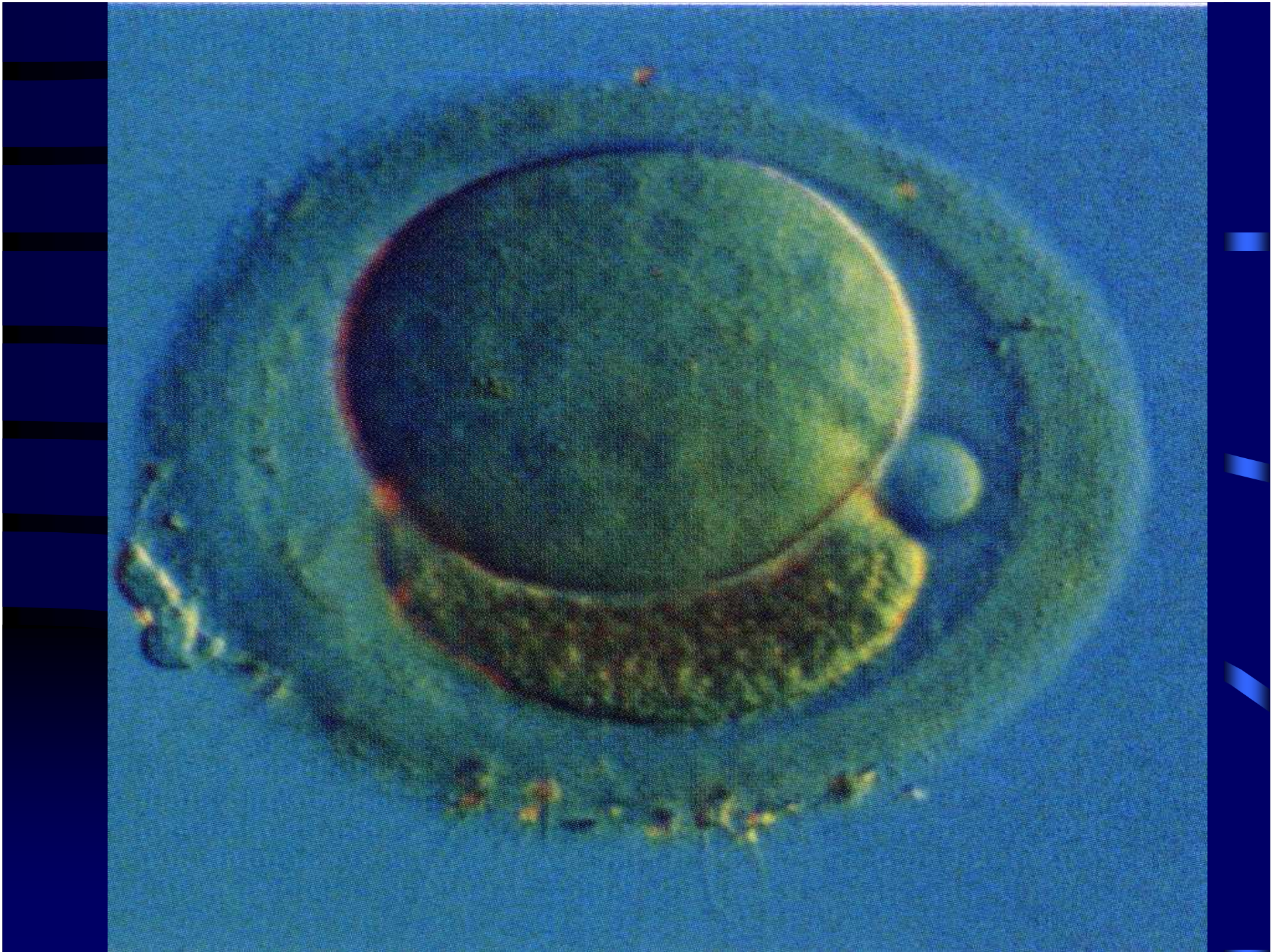












Diagnostika PGD

- chromozomální abnormality:
 - aneuploidie chromozomů X,Y, 13, 18, 21
 - 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)

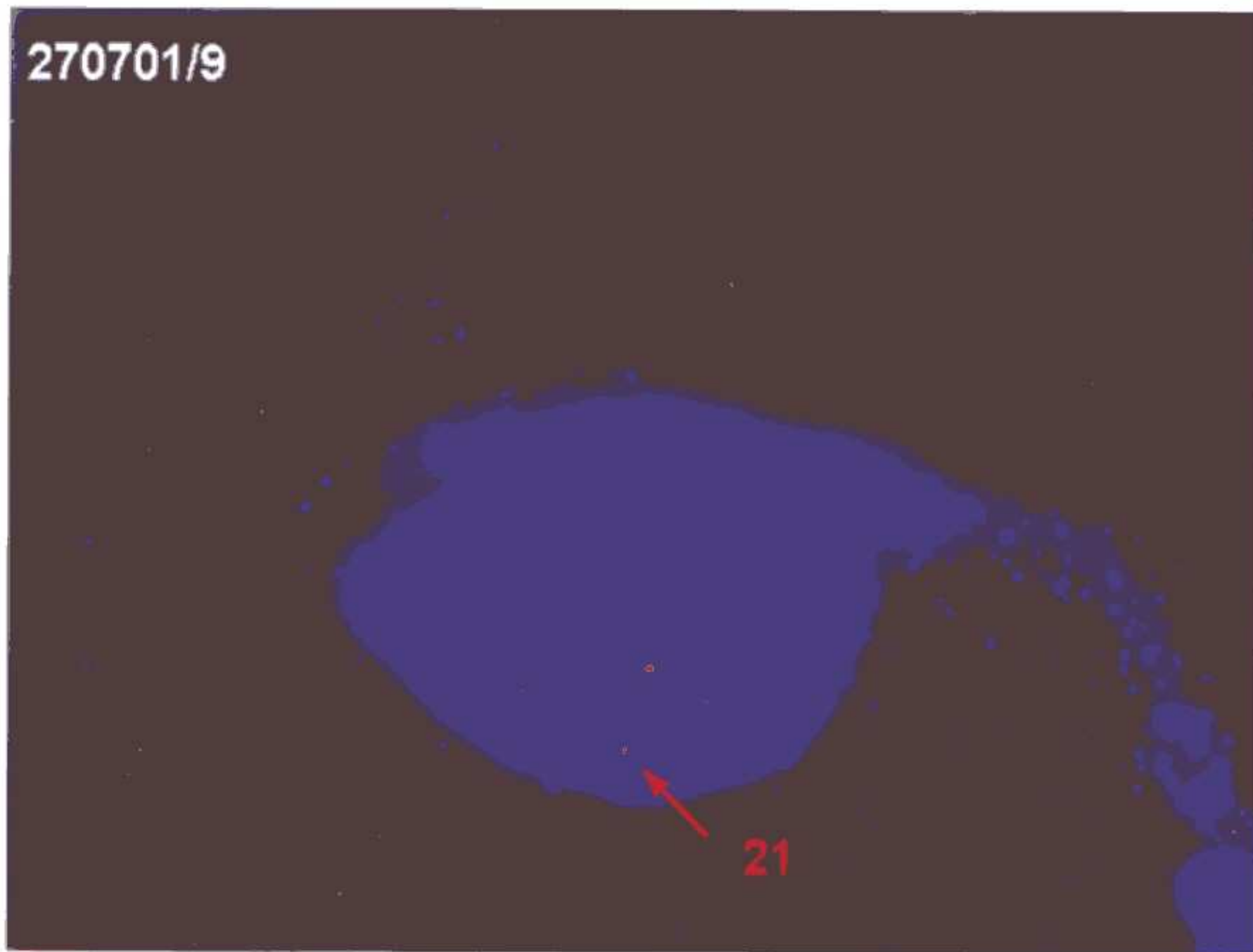
Table 1 Monogenic diseases for which PGD has been more commonly applied

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

270701/9



160701/6



Blastomera-zastavené embryó



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 vyloučená jiná genetická vada
- Doplnění PGD amniocentézou

PGD u Cystické fibrózy

- CF představuje nejčastější žádost o PGD
 - incidence 1/4000 novorozenců
- minoritní forma CF je způsobena kongenitální bilaterální absencí vas deferens (CBAVD)
 - CBAVD nepostihuje spermatogenezi testikulárních spermií (ICSI) IVF + intracytoplasmická injekce
 - jestliže partnerka je také nositelkou některé z mutací CFTR genu, pak ICSI procedura je následována PGD
- 70% mutací CFTR genu v Evropské populaci : F508del
 - oba partneři nositelé F508del (49%)
 - jeden partner :F508del a druhý jiná mutace (42%) (PGD zaměřena na eliminaci embryí nesoucích F508del)
 - oba partneři nesou jinou mutaci než F508del (9%) (specifický test na detekci mutací nebo nepřímá DNA dignostika)

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 F508del z jedné buňky

