

A fluorescence microscopy image showing two chromosomes. The chromosomes are stained with a greyish substance, likely DAPI. Several small, brightly colored spots (red, green, blue, yellow) are scattered across the chromosomes, representing fluorescent probes used for genetic diagnosis. The background is black.

Preimplantačná genetická diagnostika

Černáková I.

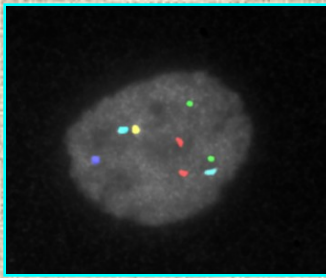
ISCARE, a.s., Bratislava

História PGD

- 1978** Narodenie 1. IVF dieťaťa
- 1990** Narodenie 1. dieťaťa po PGD
Určenie pohlavia preimplantačného embrya
- 1993** Určenie pohlavia FISH metódou a PGD aneuploidíí
- 1996** PGD chromozómových translokácií
- 1999** PGD ochorení s prejavom v neskoršom veku
a genetickou predispozíciou
- 2000** HLA typizácia preimplantačných embryí
- 2002** Prvých 1000 detí narodených po PGD

PGD algoritmus





Indikácie PGD

Genetická indikácia - PGD:

- ✦ Chromozómová patológia u jedného z partnerov
- ✦ X-viazaná monogénová choroba, pri ktorej nie je možná priama diagnostika mutácie

Vyšetrenie aneuploidie chromozómov - PGS:

- ✦ Vek ženy > 35 rokov
- ✦ Opakované spontánne aborty u párov s normálnym karyotypom
- ✦ Opakovane neúspešná implantácia embryí v IVF programe
- ✦ Ťažké formy mužskej sterility /ťažká OAT, azoospermia/
- ✦ Predchádzajúca gravidita s trizomickým plodom
- ✦ IVM oocytov
- ✦ Predchádzajúca chemo-/rádioterapia
- ✦ Darcovstvo oocytov

Metódy PGD

FISH - *Fluorescenčná in situ hybridizácia*

- *skríning aneuploidií chromozómov 13, 15, 16, 18, 21, 22, X, Y*
- *nosičstvo chromozómovej aberácie jedným z rodičov*
- *určenie pohlavia embrya pri X-viazaných monogénových chorobách, kde nie je možná priama diagnostika danej mutácie*

Vyšetrovaný materiál

1. pólové teliesko – v štádiu zavedenia metodiky

2. pólové teliesko - v štádiu zavedenia metodiky

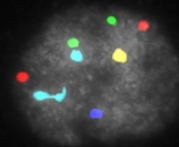
blastoméry 3-denného embrya – 4 IVF centrá

trofoektoderm 5-dňovej blastocysty – 1 centrum

Deň 3

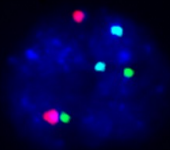


7cg₁A



13 18 21 X Y

Identická blastoméra vyšetrená na počet chromozómov 15, 16, 22



15

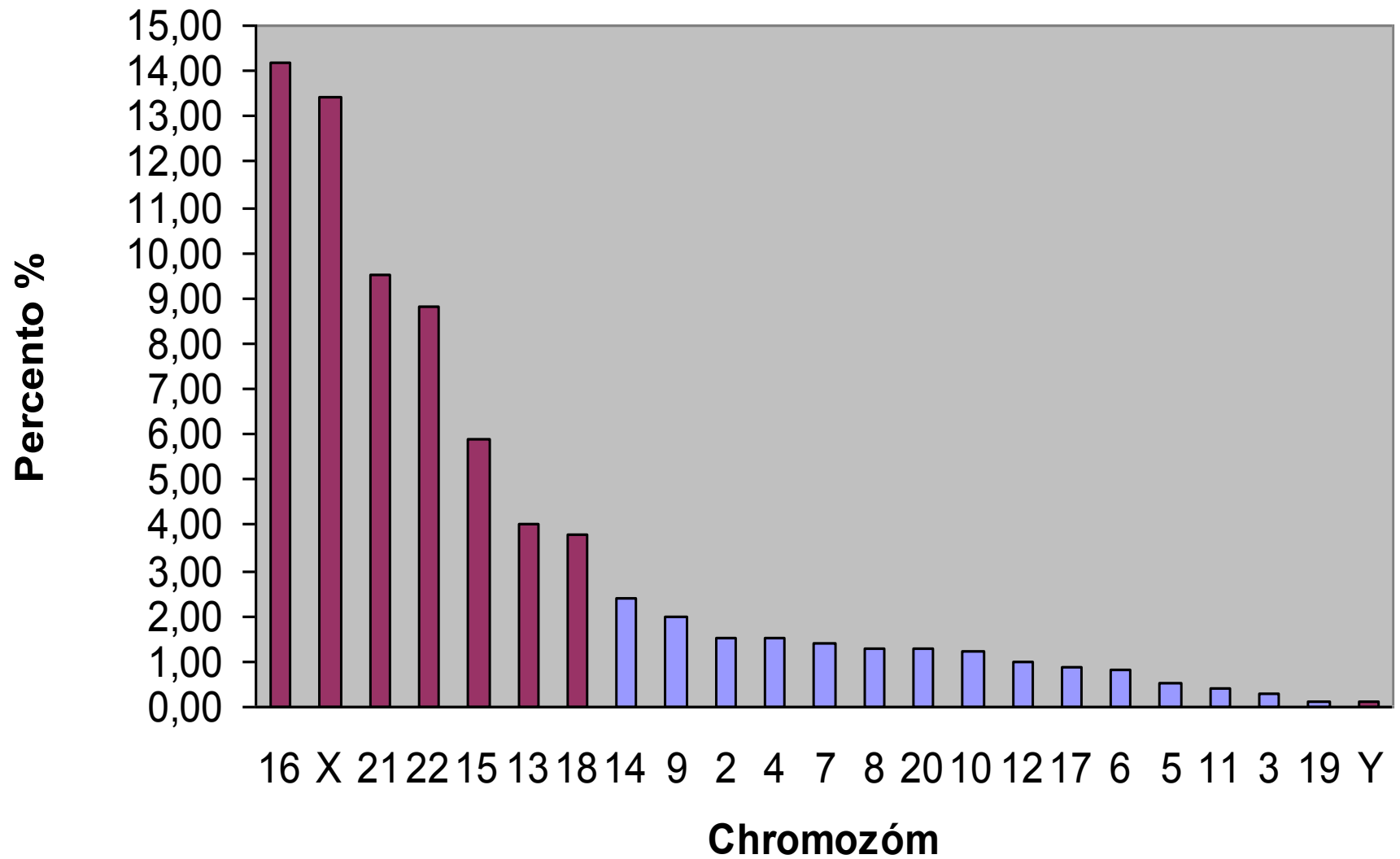
16

22

Deň 5



Výber vyšetřovaných chromozómů



Ktoré chromozómy vyšetrujeme?

Narodenie postihnutých detí:

13, 18, 21, X, Y

Spontánne potraty:

14, 15, 16, 22

Najčastejšie poruchy u starších párov:

1, 15, 17, 22

Odporúčanie PGD International Society:

13, 15, 16, 18, 21, 22, X, Y

detekcia 83% numerických chromozómových

anomálií detekovaných CGH

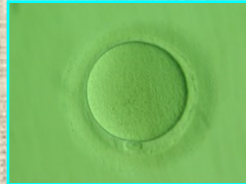
rozšírenie na 10 vyšetovaných chromozómov (údaje z CGH)

zavedenie 3. kroku hybridizácie v prípade 'no result rescue'

Schéma PGD vyšetrenia

0. deň

Odber oocytov



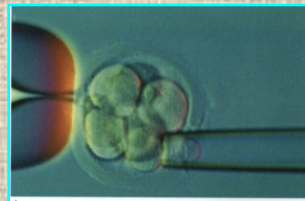
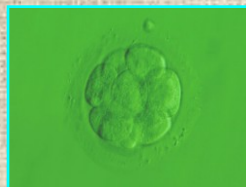
1. deň

Fertilizácia



3. deň

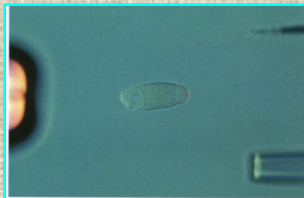
Biopsia blastoméru



≥ 6 blastomér: 1 bunka

3. + 4. deň

FISH



FISH vyšetrenie + správa

5. deň

Embryo transfer



ET, KET

Význam PiGD

- ☀ **Diagnostický** - dg chr. aberácií podľa indikácie
- ☀ **Liečebný** - ↑ efektívnosti liečby neplodnosti
- ☀ **Prognostický** - stanovenie prognózy pre ďalšiu liečbu metódami AR
- ☀ **Preventívny** - prevencia pôrodov detí s patologickým karyotypom
 - ↓ výskytu Sab u IVF párov
- ☀ **Finančný** - ďalšie vyšetrenia
 - voľba ďalších metód AR, adopcie
- ☀ **Psychologický** – odraz na psychike patientskeho páru

Spontánne potraty I.

Aneuploidie

Prirodzená koncepcia:

15 %

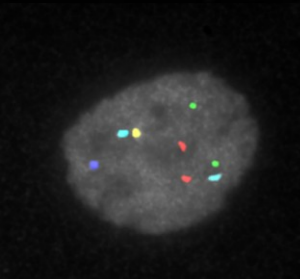
ART:

23 – 37 %

PiGD -AS:

9 – 12 %

2 – 4 x ↓ v porovnaní s IVF/ICSI



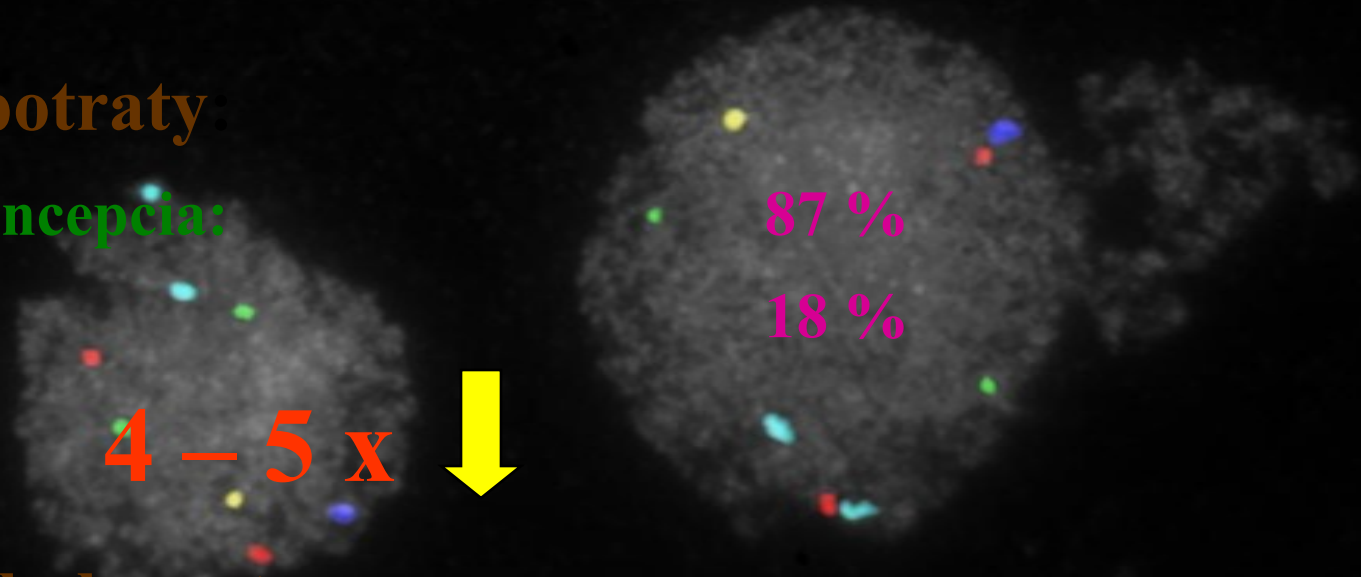
Spontánne potraty II.

Nosičstvo translokácie

Spontánne potraty

Prirodzená koncepcia:

PiGD:



4 – 5 x



Take-home-baby rate:

Prirodzená koncepcia:

PiGD:

11,5 %

81,4 %

7 x



Pôrody trizomických plodov

Prirodzená koncepcia:

2,6 % trizómia 13, 18 a 21 /choriové klky/

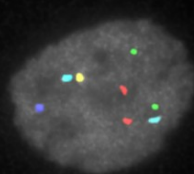
PiGD:

0,6 % nezávisle na hormonálnej stimulácii

4 x



Kryokonzervácia embryí

- 
- ✳ **IVF/ICSI** – kryokonzervácia cca **50 % embryí**
 - ✳ **PiGD** - kryokonzervácia len výnimočne – **5,5 % embryí**
 - len vo veľkom cykle
 - kryokonzervované embryá sú **normálne**
 - zníženie nákladov na kryokonzerváciu a priestoru na dlhodobé uchovávanie embryí

10 x ↓

Monozygotné dvojčatá

Prirodzená koncepcia:

0,35 – 0,4 % zo všetkých pôrodov

- rovnaká vo všetkých ľudských populáciách

/Ferák, 1986/

IVF/ICSI: **3 – 20 x vyššia !**

PiGD: **ako po prirodzenom počatí**



Stanovenie prognózy po PiGD cykle

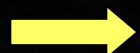
Negatívny výsledok v 1. PiGD cykle nasvedčuje na možné zlyhanie ďalších IVF-PiGD cyklov → predikcia úspechu v ďalšej IVF liečbe:

Euploidné embryá v 1. PiGD cykle – dobrá prognóza

dosiahnutie gravidity v ďalších IVF-PiGD cykloch

Žiadne euploidné embryá v 1. PiGD cykle – pravdepodobne

nedosiahnutia gravidity v ďalších IVF cykloch < 10%



→ ďalšie vyšetrovacie metódy spermia a ovocia

→ agresívnejšia hormonálna stimulácia

→ darcovstvo gamét, embryí

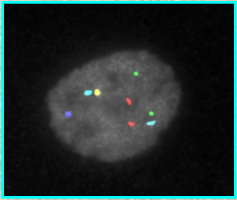
Porovnanie preimplantačnej a prenatálnej genetickej diagnostiky

Preimplantačná genetická dg

- Diagnostika embryí *in vitro*
→ potrebné metódy ART
- Prevencia pôrodu dieťaťa s genet. chorobou
- **Bez ukončenia gravidity**
- Limitovaná dostupnosť
- Cena: +++
- Štandardná súčasť asistovanej reprodukcie

Prenatálna genetická dg

- Diagnostika plodu *in vivo*
- Prevencia pôrodu dieťaťa s genet. chorobou
- **Predčasné ukončenie gravidity v prípade postihnutia plodu**
- Rutinná procedúra
- Cena: +



Ako ďalej, PGD?

Negatívny výsledok v 1. PGD cykle nasvedčuje na možné zlyhanie ďalších IVF-PiGD cyklov → predikcia úspechu v ďalšej IVF liečbe + ďalšie diagnosticko-vyšetrovacie metódy:

→ vyšetrenie spermií a pólóvých teliesok

→ CGH-PGD, microarray-PGD

→ zmena hormonálnej stimulácie – dg SNP v génoch pre FSH/LH receptory

→ vyšetrenie receptivity endometria (microarray)

→ proteomika gamét

Chromosomal CGH / Matrix-CGH

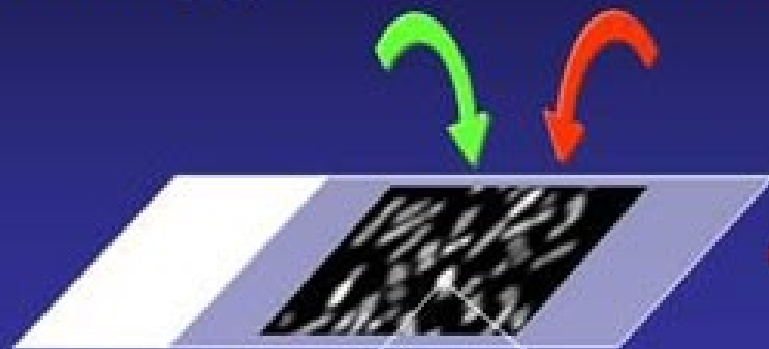
Test-DNA (e.g. Tumor)

Reference-DNA

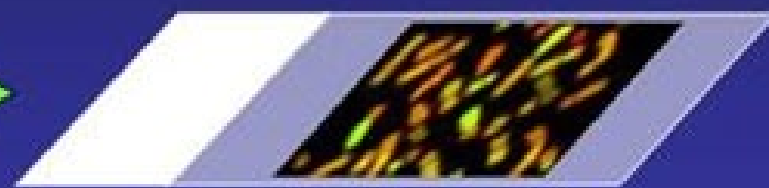
● = gain of genomic material

● = loss of genomic material

● = balanced status



Metaphase

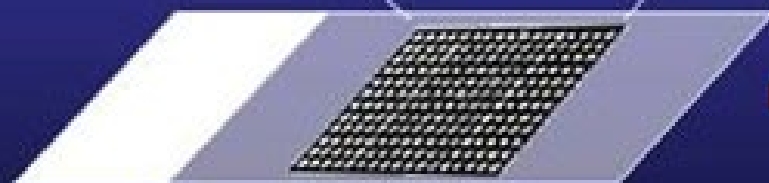
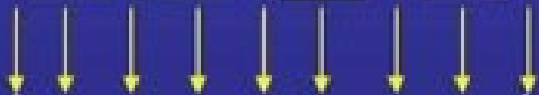


Chromosomal CGH

genomic DNA



DNA fragments



Matrix of spotted DNA fragments



Matrix-CGH

Zásadný význam PGD

**V súčasnosti jediná metóda
primárnej genetickej prevencie
narodenia postihnutého dieťaťa**