

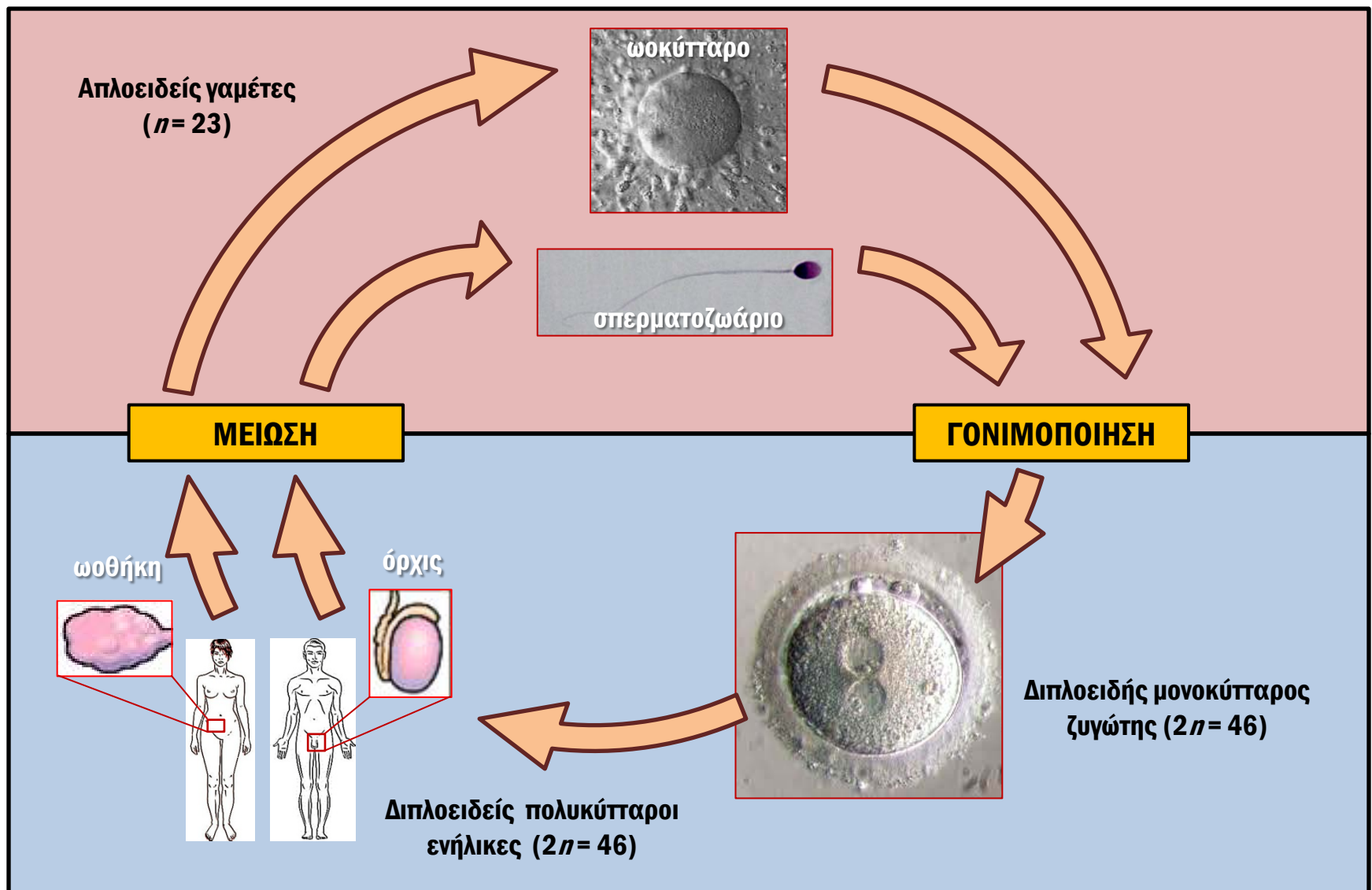


**Ελεύθερο Σεμινάριο για τη Βιοηθική και το Δίκαιο
Αθήνα, 31 Ιανουαρίου 2012**

**Προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD) και
προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος (PGS):
ειδικές εξετάσεις, ή εφαρμογές ρουτίνας;**

*Χάρης Ε. Καζλαρής, PhD
Βιοχημικός -Κλινικός Εμβρυολόγος
τ. Μέλος της Εθνικής Αρχής Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής*

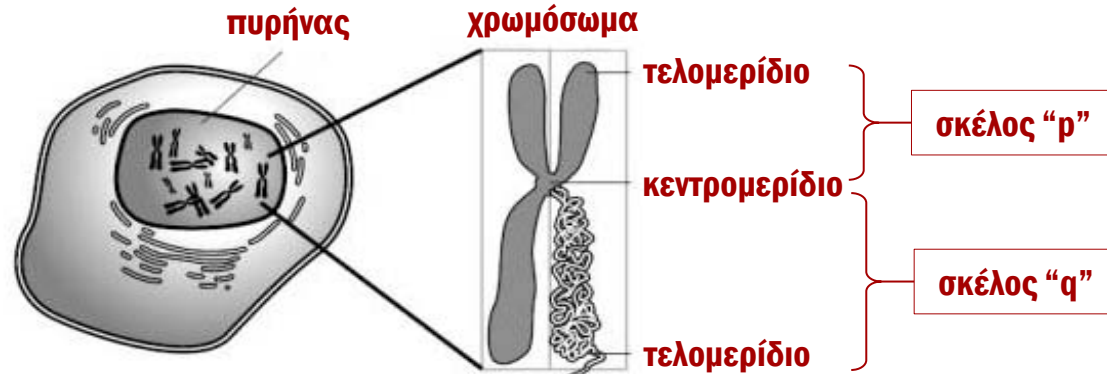
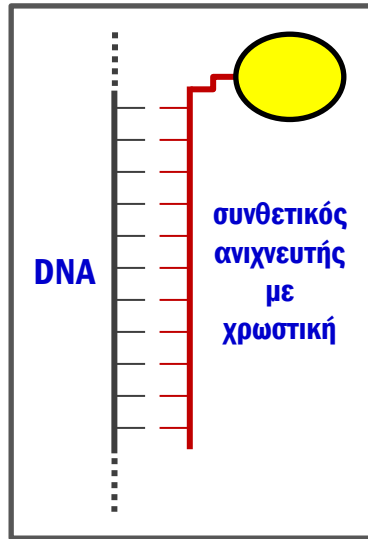
Βασικοί ορισμοί: ο κύκλος της ζωής



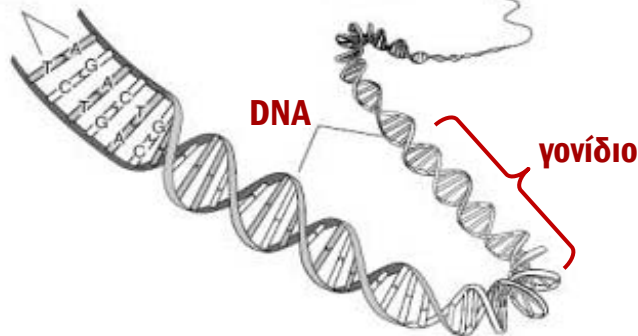
Χρωμοσώματα, γονίδια, FISH

(fluorescence *in situ* hybridisation)

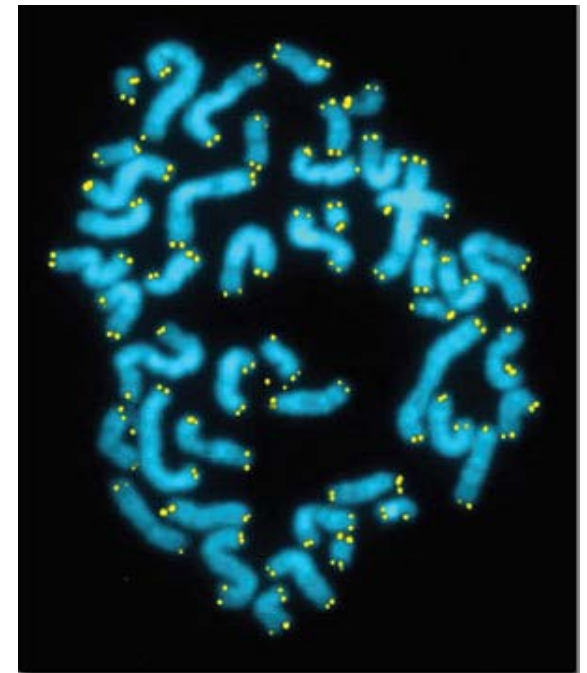
επιτόπιος υβριδισμός



ζεύγη βάσεων
στη διπλή έλικα

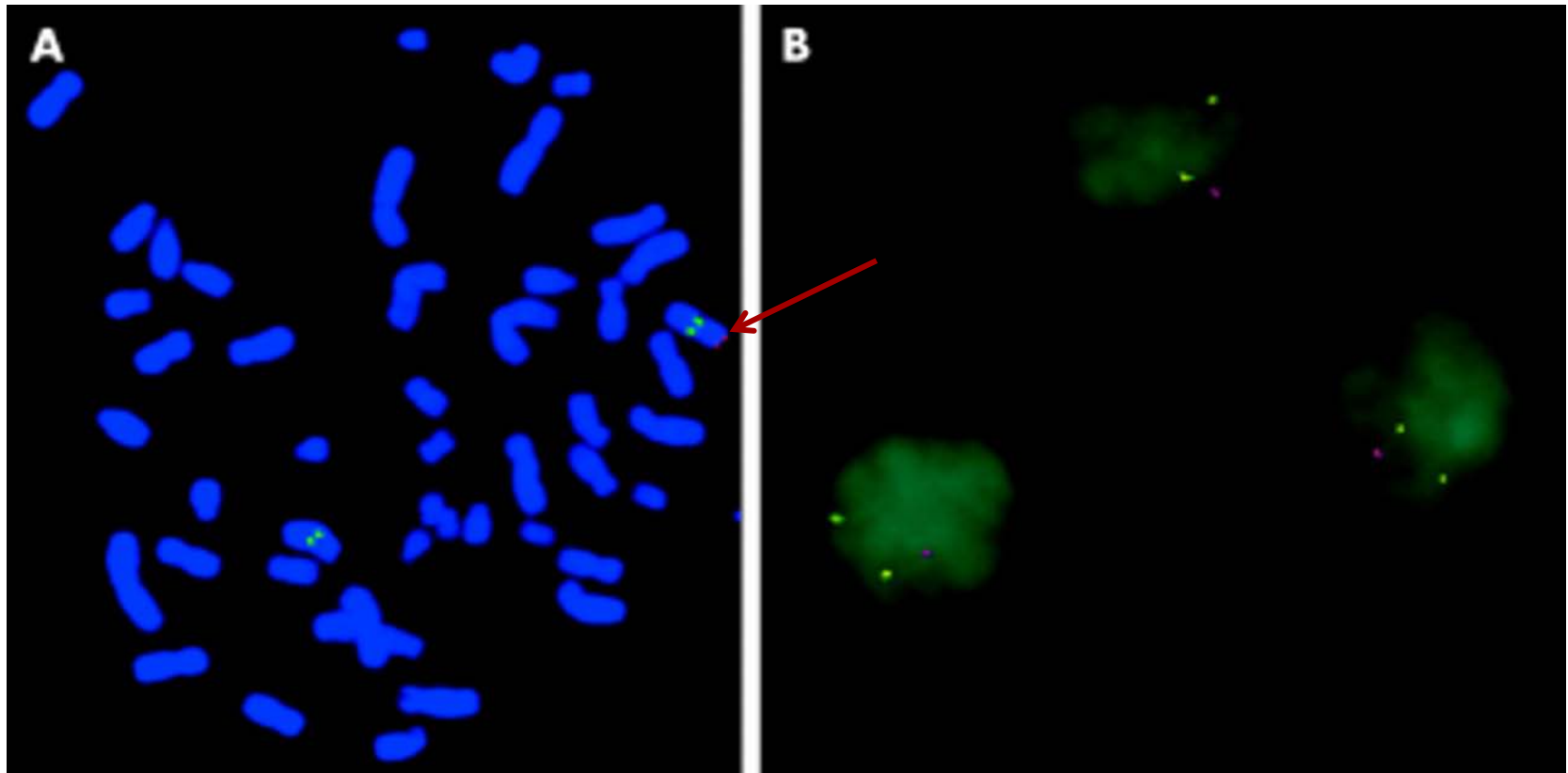


Χρωμοσώματα
ανθρώπινου
λεμφοκυττάρου
(FISH στα
τελομερίδια)



FISH (fluorescence *in situ* hybridisation)

Παράδειγμα: διάγνωση μεταλλάξεων του γονιδίου *SHOX* σε μικρόσωμους ασθενείς



(A) Dual colour FISH analysis in patient 2 showing the presence of one copy of the *SHOX* gene (red signals) on an X chromosome; YAC clone 922B5 (green signals) was used as a control probe to indicate both X chromosomes. (B) FISH analysis on peripheral blood nuclei from the same patient showing one red signal for *SHOX* and two control yellow signals for X chromosomes.

Stuppia L et al. *J Med Genet* 2003;40:e11-e11

Προεμφυτευτική διάγνωση (preimplantation genetic diagnosis, PGD) και προγεννητική διάγνωση (prenatal diagnosis, PND)

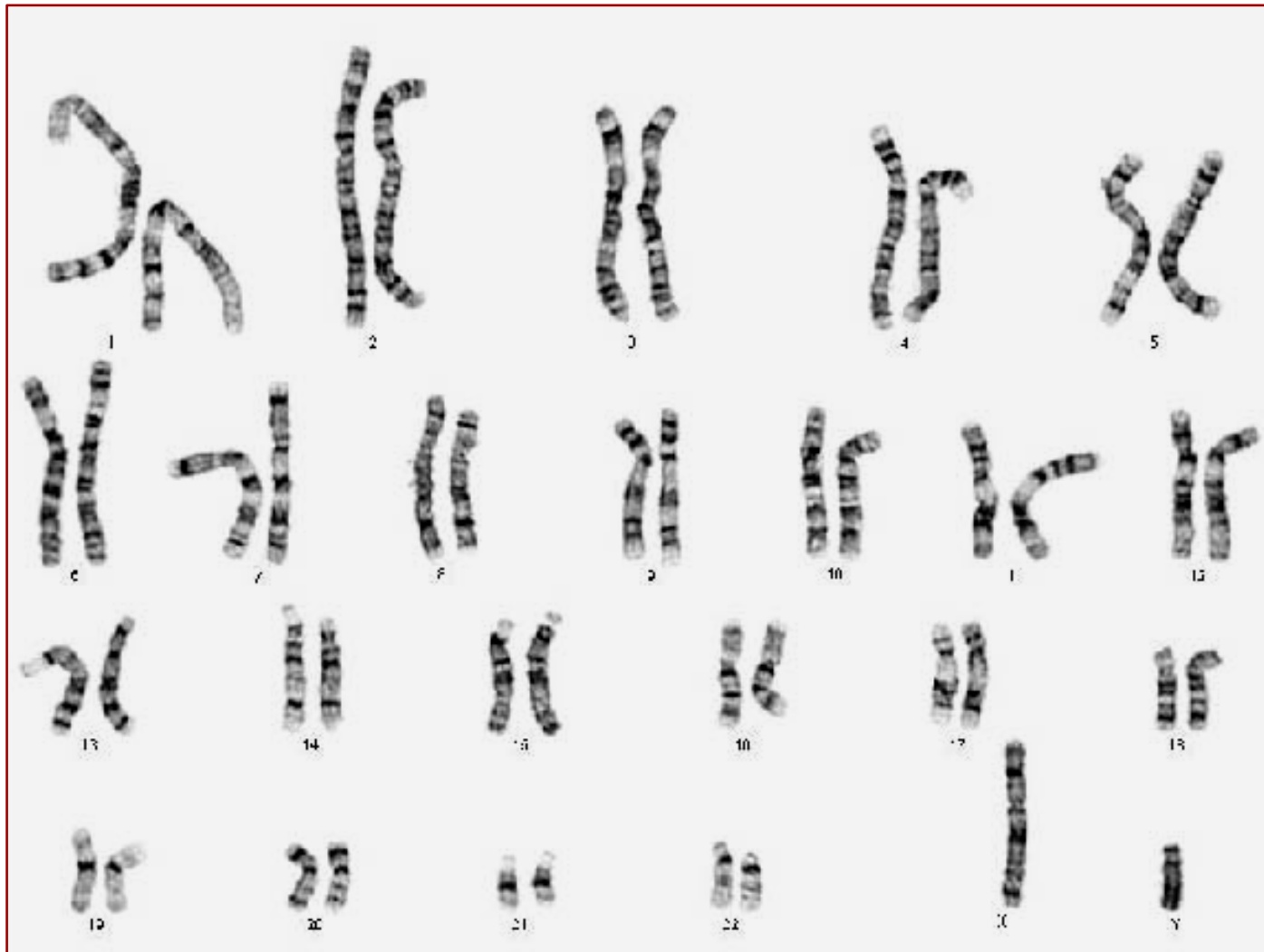
ΟΜΟΙΟΤΗΤΕΣ

- Ανίχνευση γενετικών χαρακτηριστικών των κυττάρων του εμβρύου: δομικές και αριθμητικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων, γνωστές μεταλλάξεις, φύλο
- Χωρίς τη συναίνεση του εξεταζόμενου, αλλά των γονέων του (!)
- Στόχος η απόρριψη εμβρύων που φέρουν γενετικές ανωμαλίες (= “φόνος”;))
- Παρεμβάλλεται εργαστηριακή φάση της διαδικασίας
- Ερμηνεία των αποτελεσμάτων από γενετιστή

ΔΙΑΦΟΡΕΣ

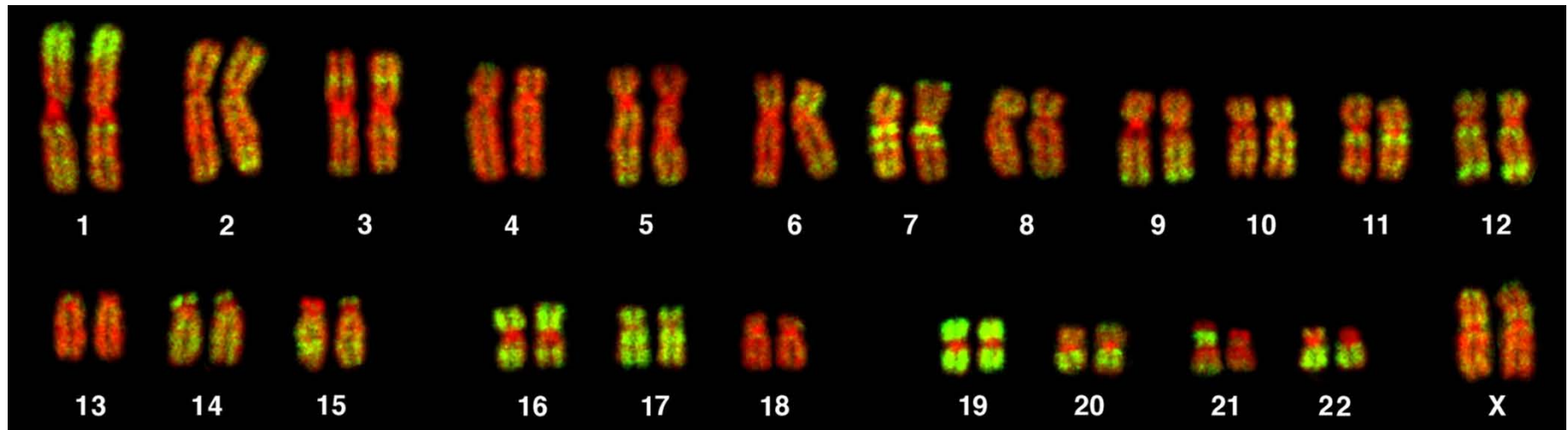
- Η PGD πραγματοποιείται πριν την εμφύτευση (3^η-5^η ημέρα από τη γονιμοποίηση), πολύ νωρίτερα από τον προγεννητικό έλεγχο (10^η εβδομάδα κύησης το νωρίτερο με CVS)
- Η PND οδηγεί σε τεχνητή διακοπή μιας εγκατεστημένης κύησης (ψυχικό τραύμα), η PGD είναι λιγότερο “επώδυνη” (αν και το ψυχικό κόστος μιας αποτυχημένης προσπάθειας IVF δεν είναι αμελητέο) – για κάποιους ο “φόνος” είναι ο ίδιος, απλώς είναι συγκαλυμμένος...
- Η πρώιμη ανίχνευση ανευπλοειδιών με PGS, ακόμη και στα ωάρια, επιτρέπει έως και την αποφυγή της IVF εάν κανένα ωάριο δεν είναι φυσιολογικό
- Μεγάλο οικονομικό κόστος για την PGD/PGS (υποχρεωτικά IVF, βιοψία, μοριακή ανάλυση)

Καρυότυπος



φυσιολογικός καρυότυπος άρρενος 46,XY

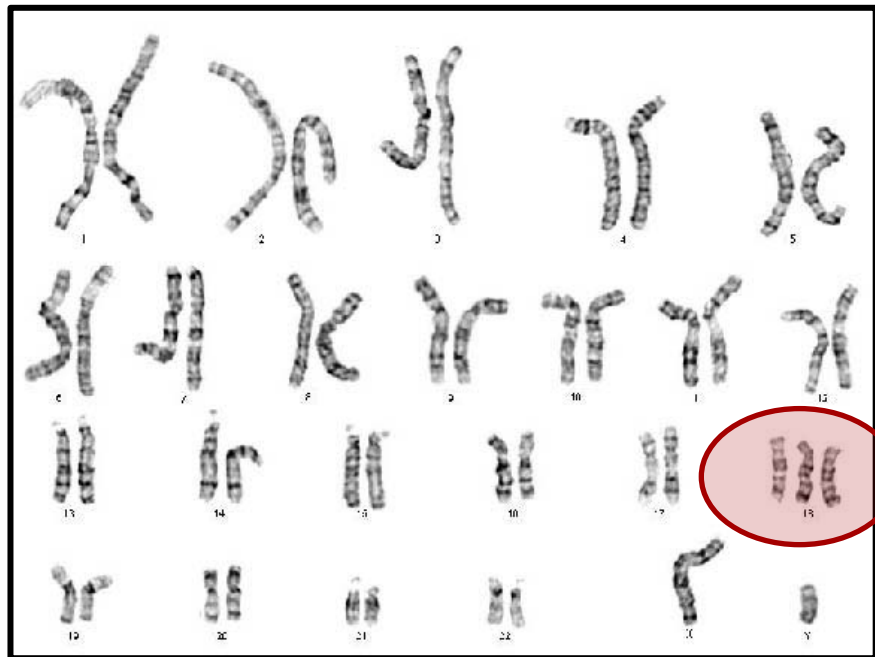
Καρυότυπος



φυσιολογικός καρυότυπος θήλεος 46,XX

χρωμοσώματα ανθρώπινου λεμφοκυττάρου σε FISH
αλληλουχίες Alu (πράσινο) + DNA (ερυθρό)

Χρωμοσωματικές ανωμαλίες

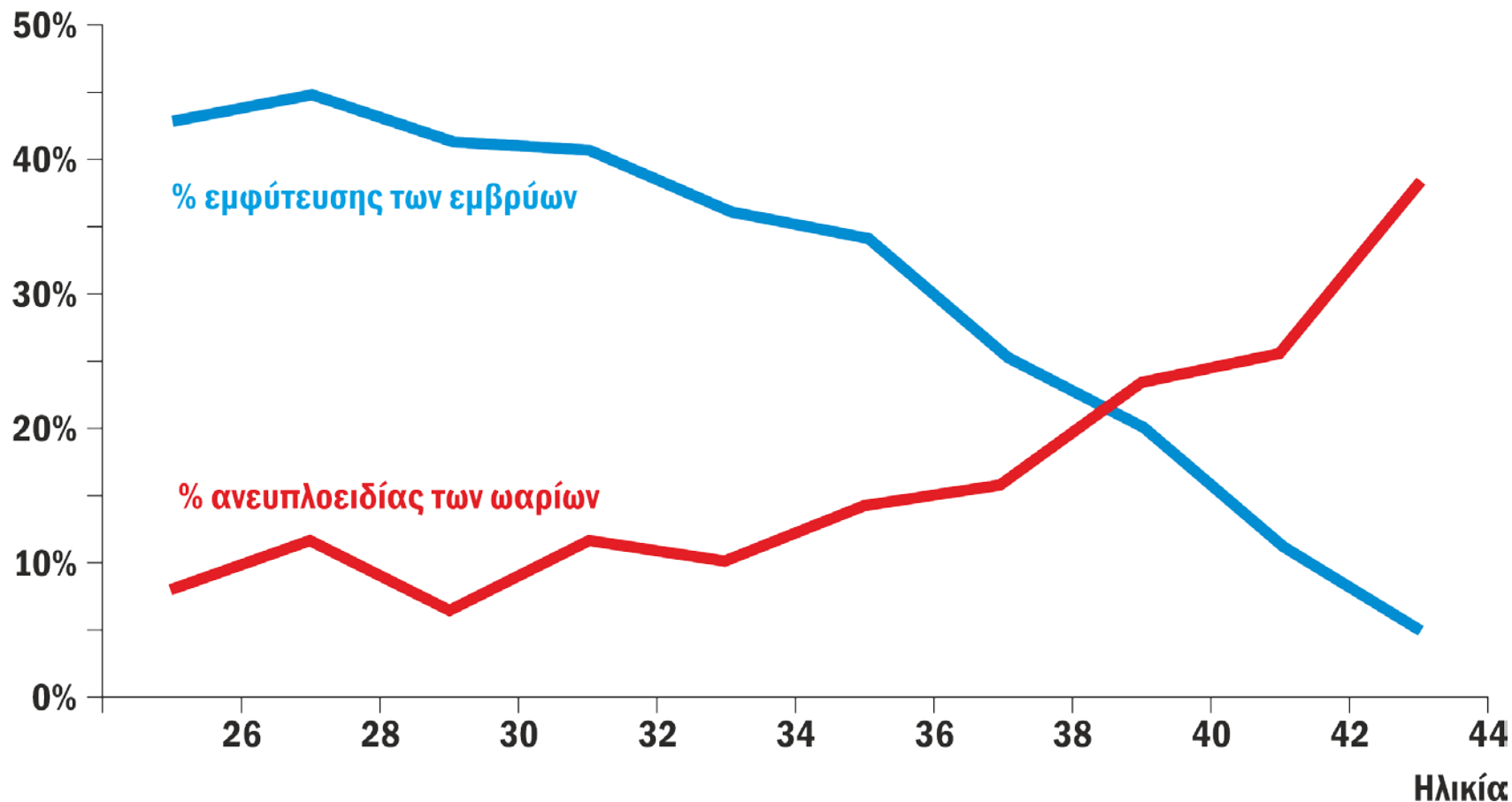


**παθολογικός καρυότυπος:
τρισωμία 18 (σύνδρομο Edward)**



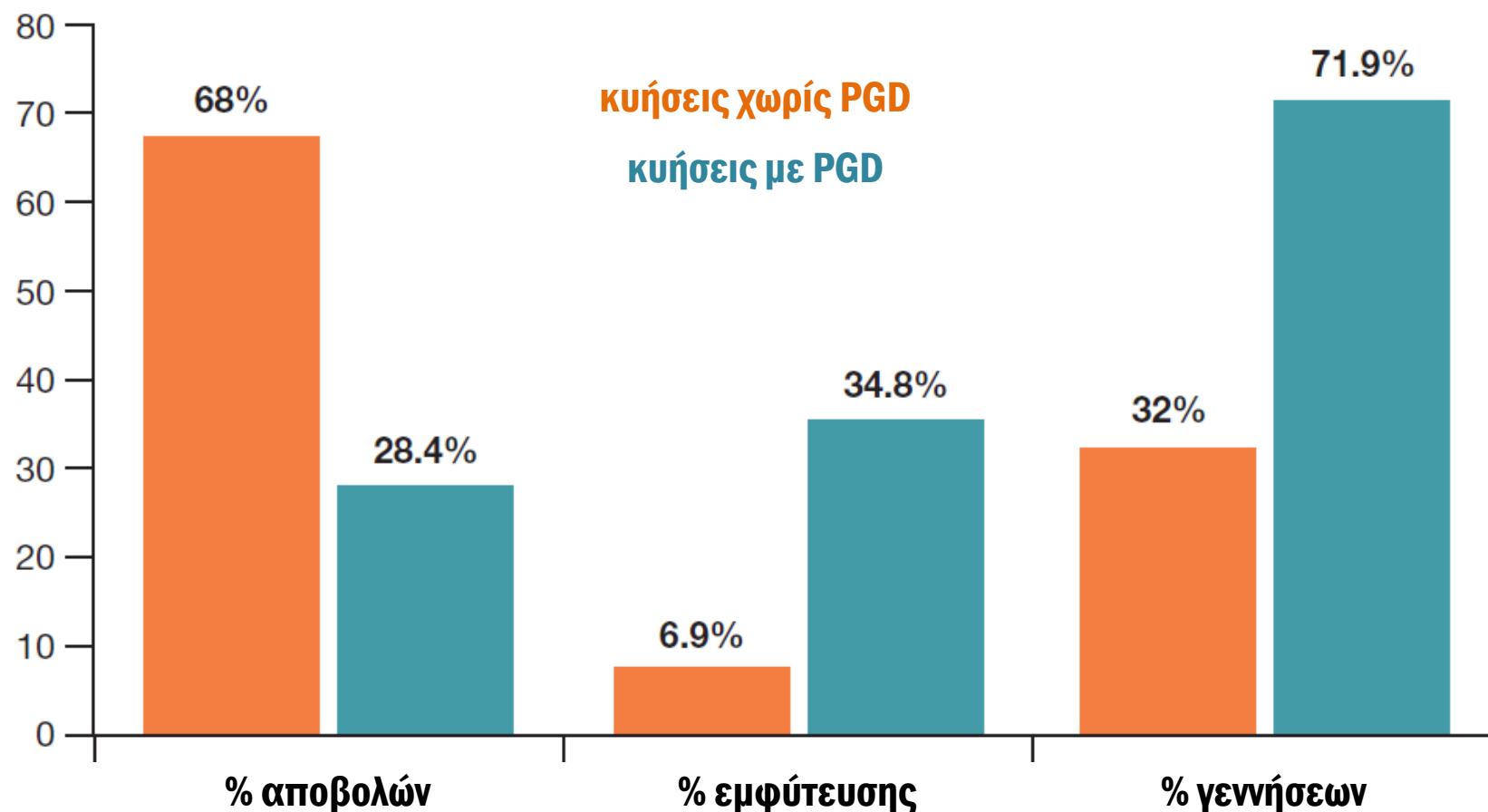
**παθολογικός καρυότυπος:
απώλεια 5p- (σύνδρομο “cri du chat”)**

Ανευπλοειδία και εμφύτευση των εμβρύων



(διάφορες βιβλιογραφικές πηγές)

Χρησιμότητα της PGD



Verlinsky Y, Tur-Kaspa I, Cieslak J, Bernal A, Morris R, Taranissi M, Kaplan B, Kuliev A.
Preimplantation testing for chromosomal disorders improves reproductive outcome of poor-prognosis patients.
Reprod Biomed Online 2005 Aug;11(2):219-25.

Ιστορία της PGD



Από αριστερά:
**Richard Gardner,
Bob Edwards,
Barry Bavister**

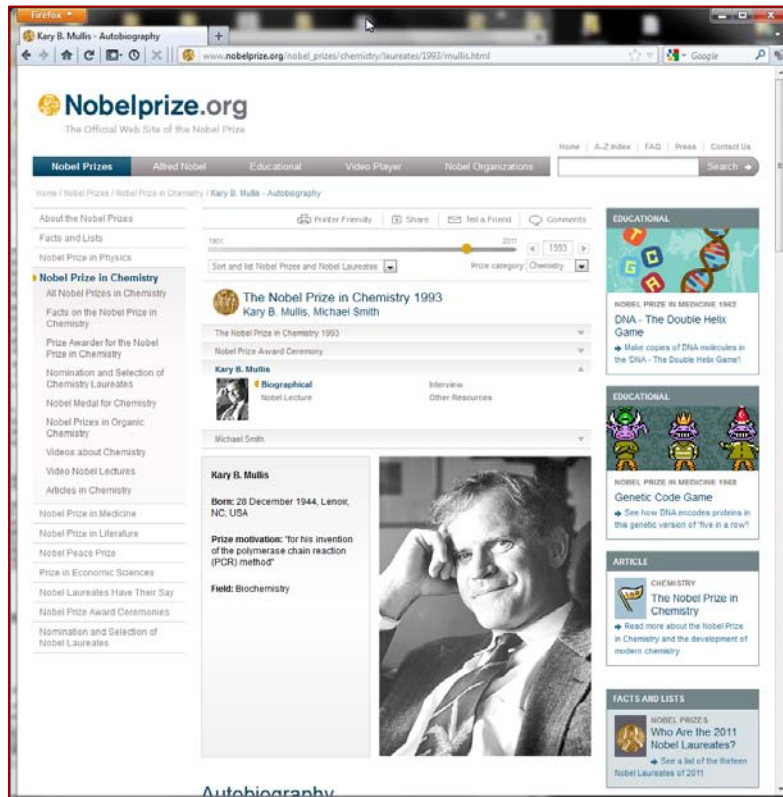
Cambridge, 1/3/1969

R. G. Edwards, B. D. Bavister & P. C. Steptoe.
Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro.
Nature 221:632-5, 1969 (15 Feb)

Edwards RG, Gardner RL.
Sexing of live rabbit blastocysts.
Nature 214(5088):576-7, 1967 (6 May).

Gardner RL, Edwards RG.
**Control of the sex ratio at full term in the
rabbit by transferring sexed blastocysts.**
Nature 218(5139):346-8, 1968 (27 Apr).

Ιστορία της PGD

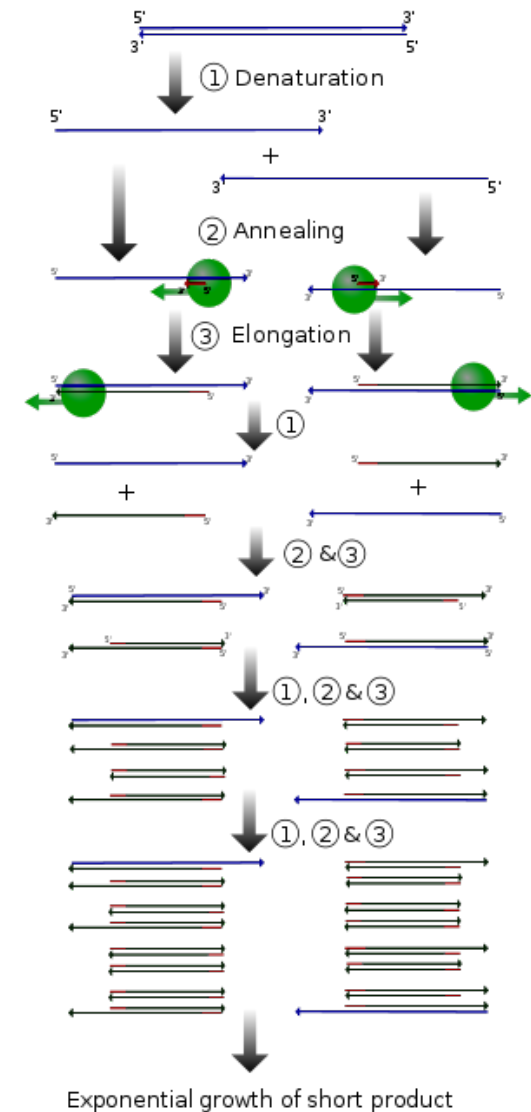


Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and
restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
***Science* 230(4732):1350-4,1985**

Kary Mullis

PCR
1985

Nobel Χημείας
1993



Ιστορία της PGD

Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification

A. H. Handyside, E. H. Kontogianni, K. Hardy
& R. M. L. Winston

Institute of Obstetrics and Gynaecology, Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, Du Cane Road, London W12 0NN, UK

OVER 200 recessive X chromosome-linked diseases, typically affecting only hemizygous males, have been identified. In many of these, prenatal diagnosis is possible by chorion villus sampling (CVS) or amniocentesis, followed by cytogenetic, biochemical or molecular analysis of the cells recovered from the conceptus. In others, the only alternative is to determine the sex of the fetus. If the fetus is affected by the defect or is male, abortion can be offered. Diagnosis of genetic defects in preimplantation embryos would allow those unaffected to be identified and transferred to the uterus¹. Here we report the first established pregnancies using this procedure, in two couples known to be at risk of transmitting adrenoleukodystrophy and X-linked mental retardation. Two female embryos were transferred after *in vitro* fertilization (IVF), biopsy of a single cell at the six- to eight-cell stage, and sexing by DNA amplification of a Y chromosome-specific repeat sequence. Both women are confirmed as carrying normal female twins.

Five couples at risk of transmitting recessive X-linked diseases, including X-linked mental retardation, adrenoleukodystrophy, Lesch-Nyhan syndrome and Duchenne muscular dystrophy (DMD) were counselled about the possibility of having preimplantation embryos sexed after IVF and those identified as females replaced in the uterus. All of the women had previous terminations of affected fetuses but most had had difficulties in conceiving; each couple expressed a preference for this approach even though, in most cases, a specific diagnosis capable of distinguishing normal males and carrier females would be possible later in pregnancy. Over 6 months, 10 treatment cycles using superovulation after pituitary suppression² were performed (Table 1). Three couples had two treatments, and the other two couples, one and three treatments, respectively. The couples abstained from sexual intercourse during treatment cycles.

The number of oocytes collected and normally fertilized, 11.2 and 6.3 per treatment cycle, were consistent and similar to those we have previously reported². A high proportion of normally

NATURE · VOL 344 · 19 APRIL 1990

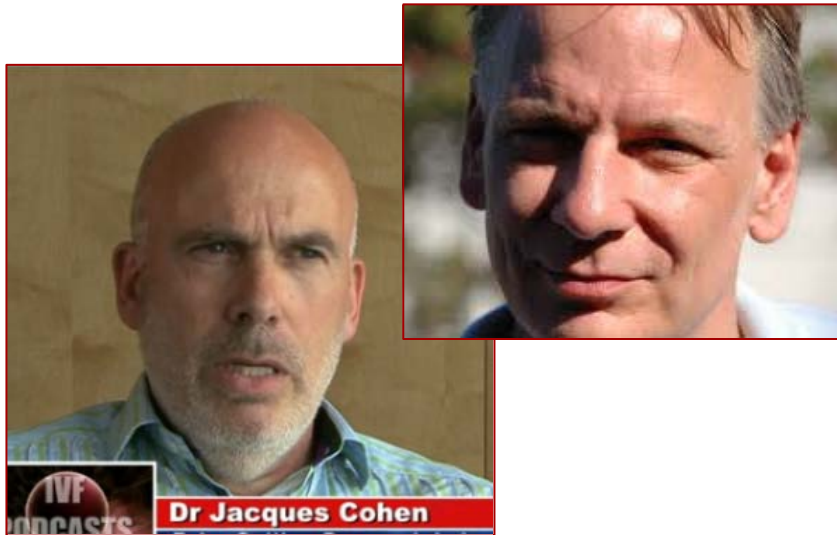


Alan Handyside
2011



Έλενα Κοντογιάννη
1990

Ιστορία της PGD



Santiago Munné & Jacques Cohen
FISH για ανευπλοειδίες, 1993

Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J.
Diagnosis of major chromosome aneuploidies in
human preimplantation embryos.
Hum Reprod 8(12):2185-91, 1993.



Yury Verlinsky [1943-2009]
PGD -PCR σε πολικά σωμάτια, 1990
PGD-HLA matching, 2001
PGD- p53 (late-onset), 2001

Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, Xu K, Schattman G, Masciangelo C, Ginberg N, Strom C, Rosenwaks Z, Kuliev A.
Preimplantation diagnosis for p53 tumour suppressor gene mutations.
Reprod Biomed Online 2(2):102-5, 2001.

Ιστορία της PGD



Dagan Wells

CGH σε μοναδιαία κύτταρα, 1999

Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JD.
Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation.
Nucleic Acids Res 27(4):1214-8, 1999.

Πρώτη γέννηση υγιούς τέκνου με CGH σε πολικά σωμάτια, 2002

Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JDA and Munné S.
First clinical application of comparative genomic hybridisation and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy.
Fertil Steril 78, 543-9, 2002.



Leeanda Wilton

Πρώτη γέννηση υγιούς τέκνου με PGS-CGH σε βλαστομερίδια, 2001

Wilton L, Williamson R, McBain J, Edgar D, Voullaire L
Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridisation.
New Engl J Med 345,1537-41, 2001.

Ιστορία της PGD

Πρώτη γέννηση υγιούς τέκνου με array-CGH σε πολικά σωμάτια, 2009

Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K, Ndukwe G, Kelada E, Thornton S, Jenner L, Cater E, Brown A, Garcia-Bernardo J.
Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy-the future of IVF?
Fertil Steril 2010 Feb;93(3):1006.e7-1006.e10. Epub 2009 Nov 25.

**Ο μικρός Oliver,
στην αγκαλιά του Simon Fishel**

**Μητέρα 41 ετών,
με 13 αποτυχημένες προσπάθειες IVF**

**8/12 πρώτα πολικά σωμάτια
έφεραν ανευπλοειδίες**



Βήμα 1

DNA
μάρτυρα

DNA
εμβρύου

Βήμα 2

Βήμα 3

Βήμα 4

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

ίσες ποσότητες
DNA

περίσσεια
DNA

έλλειμμα
DNA

Συγκριτικός γονιδωματικός υβριδισμός σε μικροσυστοιχίες (a-CGH)

Βήματα 1-3 Σήμανση του DNA με φθορίζουσες χρωστικές και εφαρμογή στη μικροσυστοιχία

Βήμα 4 Το DNA του ασθενούς και του μάρτυρα ανταγωνίζονται για τον υβριδισμό στη μικροσυστοιχία

Βήμα 5 Ο σαρωτής μετρά την ένταση των σημάτων φθορισμού από τη μικροσυστοιχία

Βήμα 6 Ένα ειδικό λογισμικό αναλύει τα αποτελέσματα και δημιουργεί μια γραφική παράσταση των σημάτων ανά χρωμόσωμα

Βήμα 5



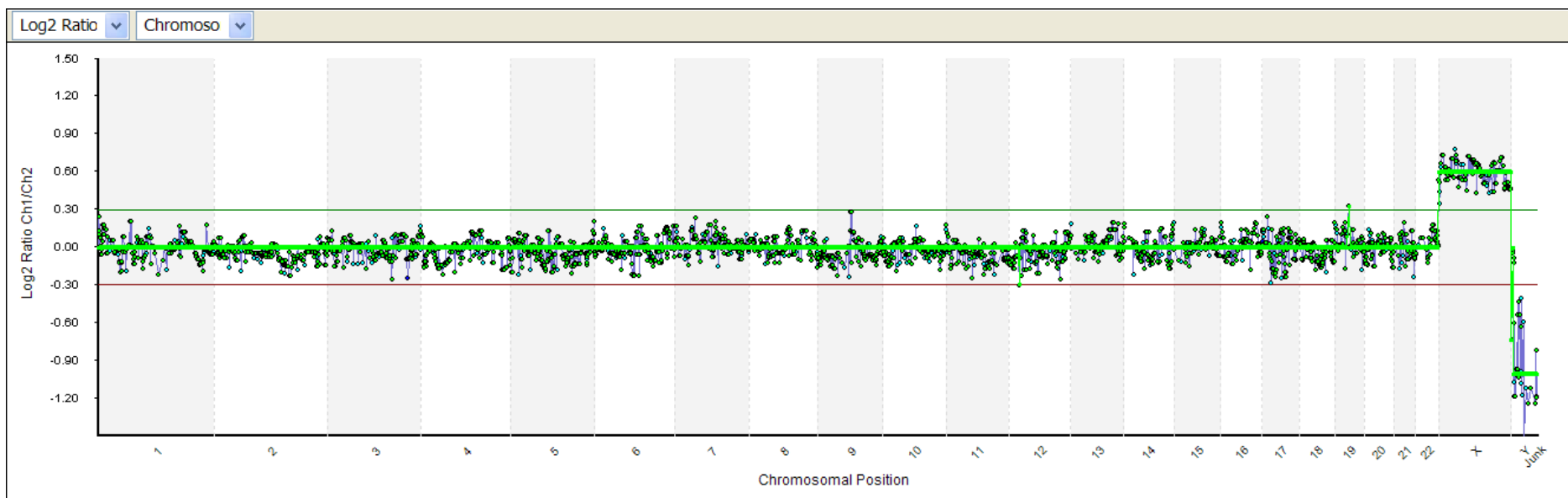
ΣΑΡΩΤΗΣ - ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΣ

Βήμα 6



γραφική παράσταση

Παραδείγματα αποτελεσμάτων a-CGH/PGS

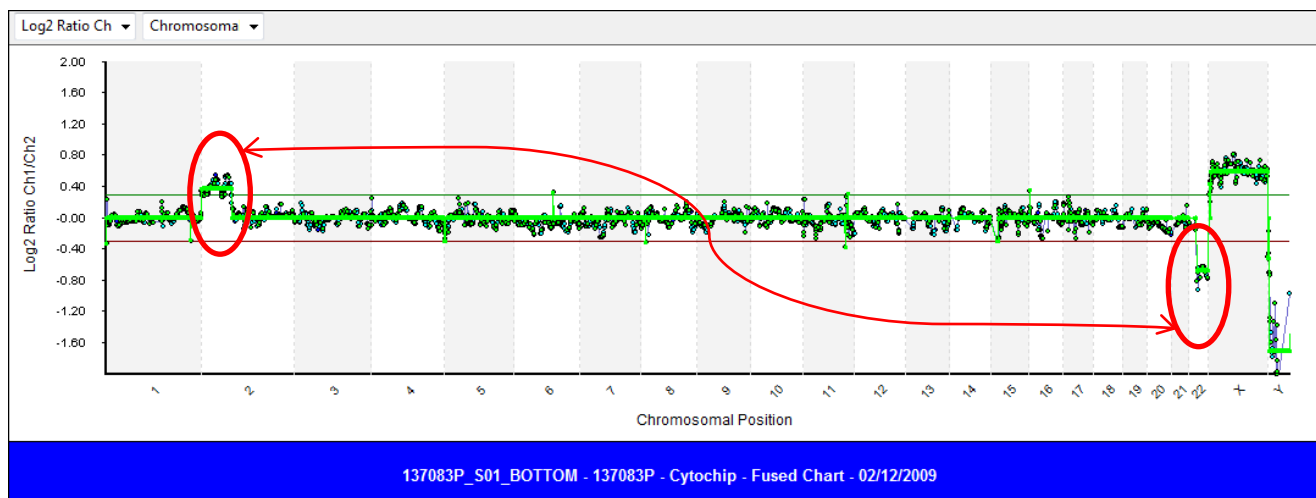


**Ανάλυση μεμονωμένου βλαστομεριδίου:
ευπλοειδία, θήλυ έμβρυο**

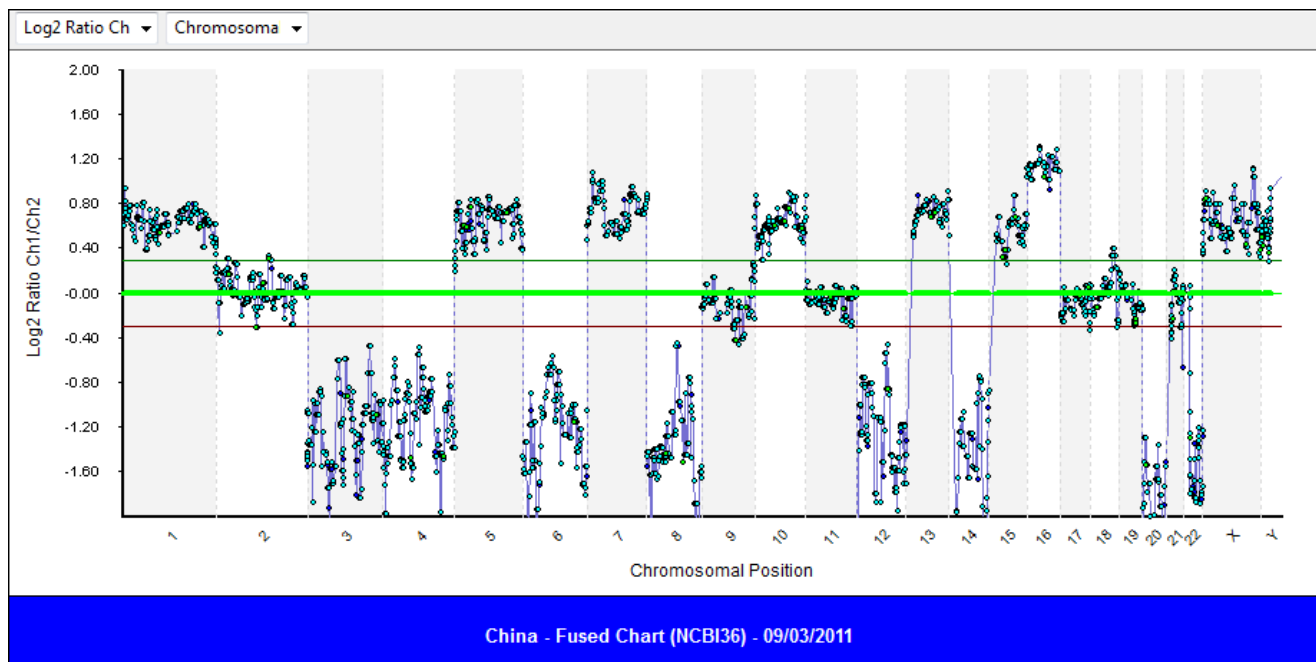
Πηγή: Alan Handyside/Δήμητρα Χριστόπικου, *ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΙΣ*

Παραδείγματα αποτελεσμάτων a-CGH/PGS

μετατόπιση
[Paternal t(2;22)]

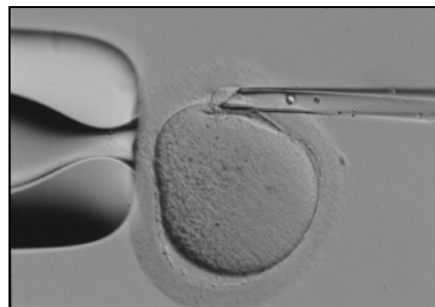


πολλαπλές ανωμαλίες,
χαοτικό έμβρυο



Πηγή: Alan Handyside
Δήμητρα Χριστόπικου,
ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΙΣ

Μέθοδοι βιοψίας



πολικά σωμάτια



βλαστομερίδια



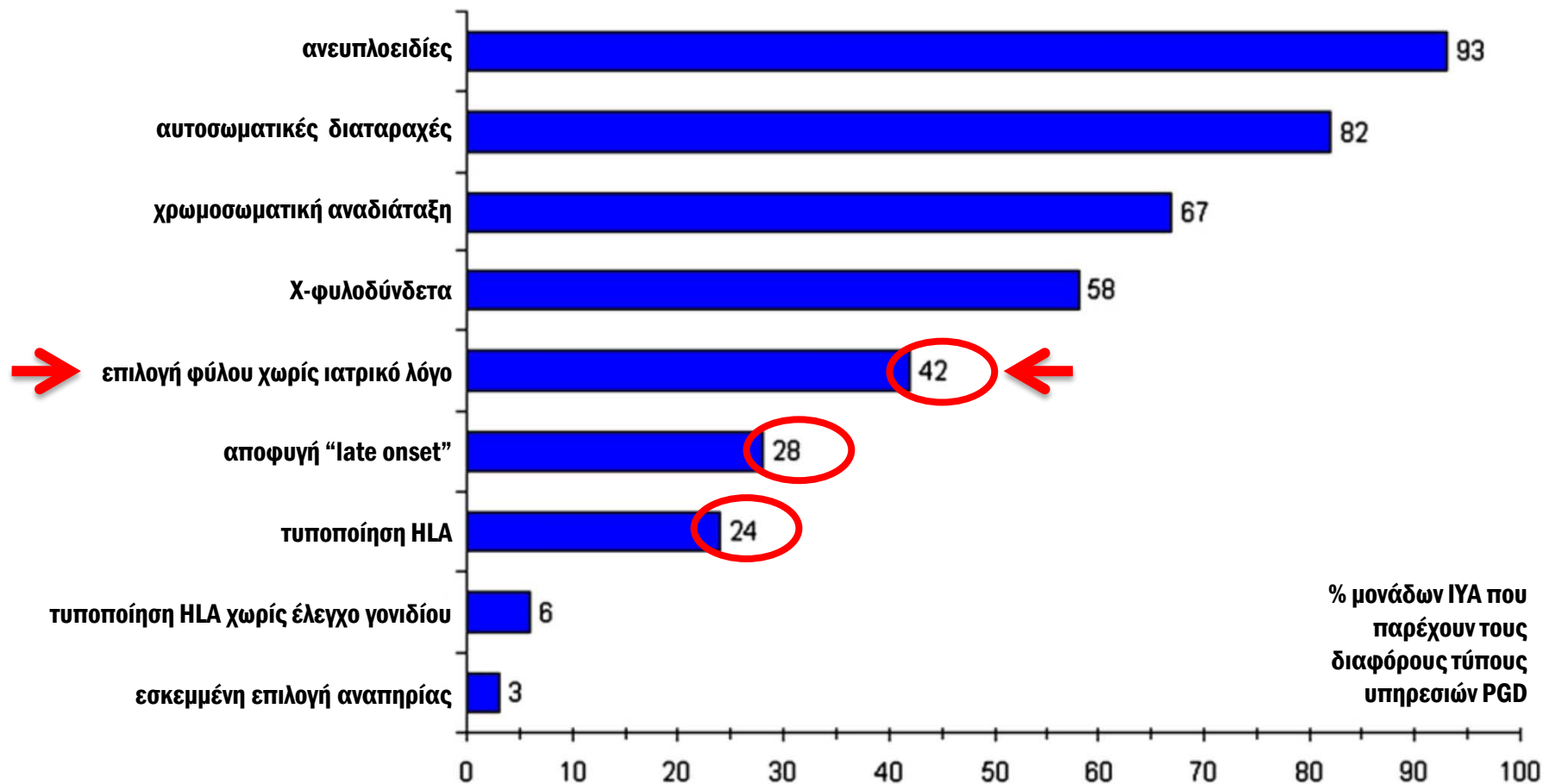
τροφοεξώδερμα

Ανάλυση
PCR, FISH, a-CGH

Πιθανά προβλήματα της PGD

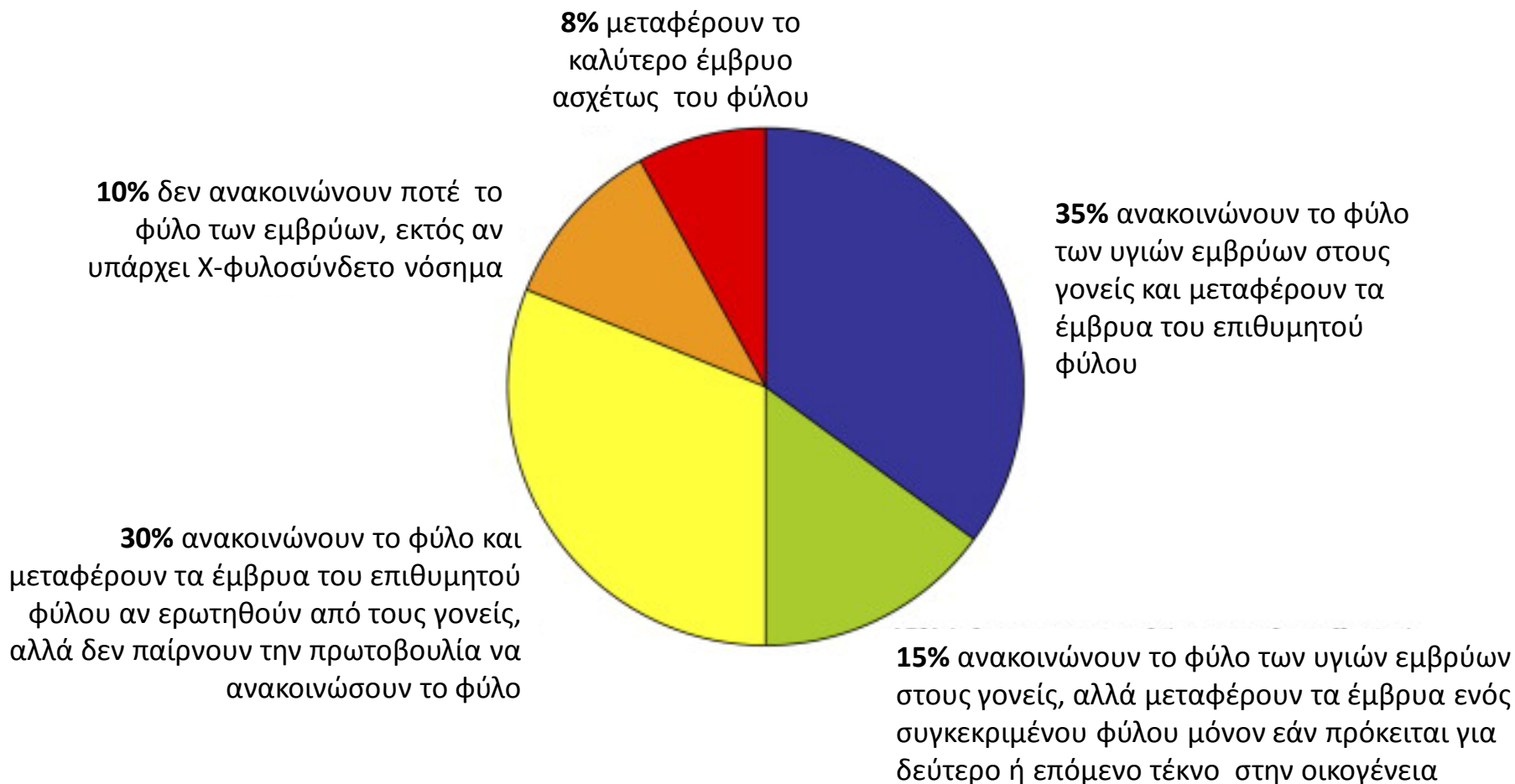
- **Αφαίρεση βιολογικού υλικού** από το έμβρυο
- **Τραυματισμός / καταστροφή του εμβρύου** κατά τη βιοψία (<0,5%)
- **Πιθανή μείωση του ποσοστού εμφύτευσης** ύστερα από τη βιοψία
- **Σφάλμα διάγνωσης** (ακρίβεια >95%)
 - ψευδώς αρνητική διάγνωση
 - ψευδώς θετική διάγνωση
 - ανάλυση χωρίς αποτέλεσμα
 - μωσαϊκισμός
- **Αυξημένο κόστος**
 - επιπρόσθετο κόστος στην προσπάθεια εξωσωματικής γονιμοποίησης
 - ανιχνευτές DNA
 - πλακίδια μικροσυστοιχιών
 - κόστος της βιοψίας
 - πολυπληθής θεραπευτική ομάδα (ιατροί, εμβρυολόγοι, γενετιστές, κ.λπ.)

Παράδειγμα της πρακτικής στις Η.Π.Α.



Τύπος PGD που παρέχεται από τις μονάδες IVF-PGD (n = 137)

Παράδειγμα της πρακτικής στις Η.Π.Α.



Πολιτική των μονάδων IVF-PGD σχετικά με το φύλο των εμβρύων (n = 132)