



Zdravé dítě ze zkumavky aneb možnosti preimplantačních genetických analýz na prahu nového milénia

Mgr. Jan Smetana, Ph.D

Ústav Experimentální Biologie, PŘF MU
Laboratoř molekulární cytogenetiky
OLG FN Brno



„Znáte se už dostatečně dlouho, začínáte uvažovat o dítěti a tak se rozhodnete, že se vezmete ... Budoucí matka zvědavě nakukuje do kočárků a zjišťuje, že v centru města mají krásné těhotenské šaty, přesně její styl, manželovi se určitě také budou líbit. Muž obhlíží tříkolky a odhaduje, kolik asi stojí dětská hokejová výzbroj.“



Plodnost (Fertilita)

- Pravděpodobnost otěhotnění při nechráněném styku u zdravého páru na jeden menstruační cyklus je cca 25%
- Průměrný věk provorodiček v ČR 26,3 roku
- Průměrná zdravá žena do 35 let s pravidelným nechráněným pohl. stykem má šanci otěhotnět cca 16%, tj. průměrně otěhotnění lze dosáhnout 1/6 ovulačních cyklů
- 50% žen (20-34 let) otěhotní do dvou měsíců, 80% do půl roku

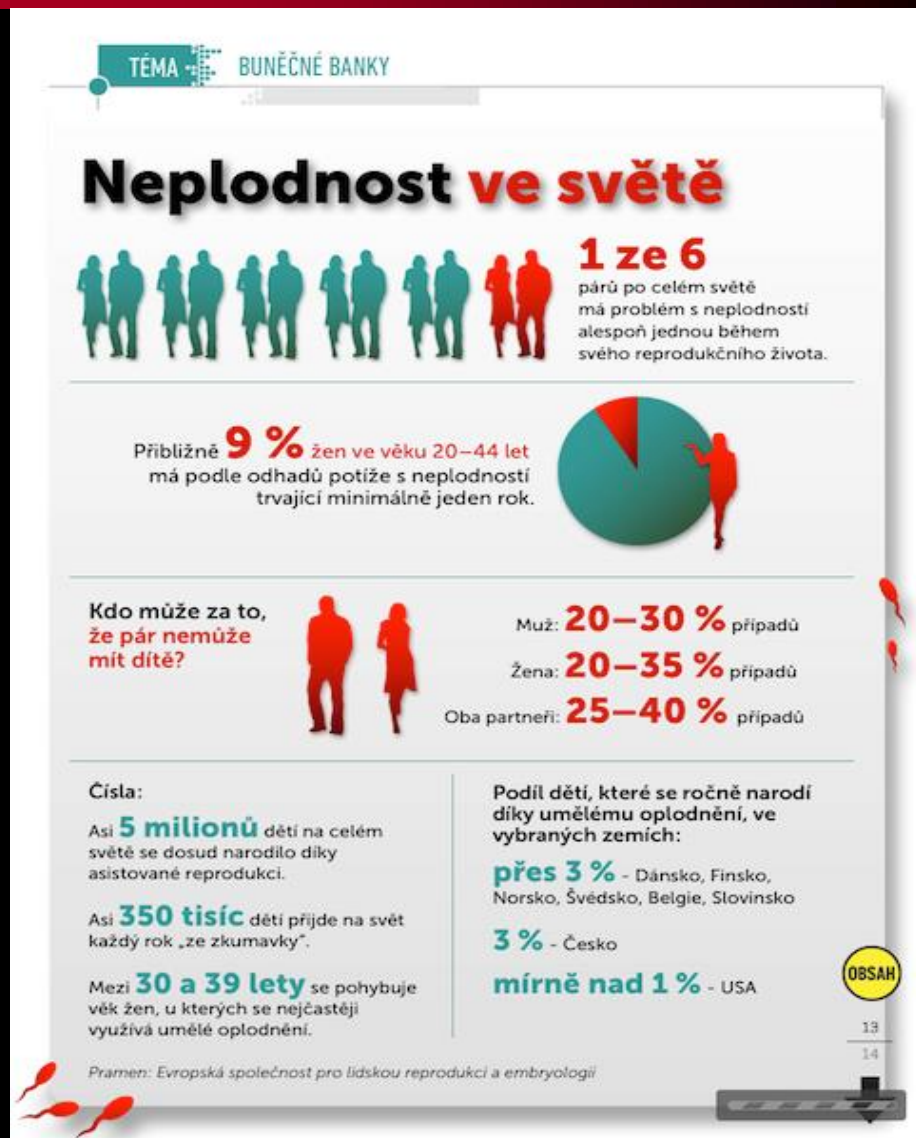
(Zdravotnická statistika MZCR, www.uzis.cz)

Neplodnost (Infertilita)

Neplodnost (Infertilita)

= neschopnost dosáhnout klinického těhotenství po 12 a více měsících nechráněného pravidelného pohlavního styku (WHO)

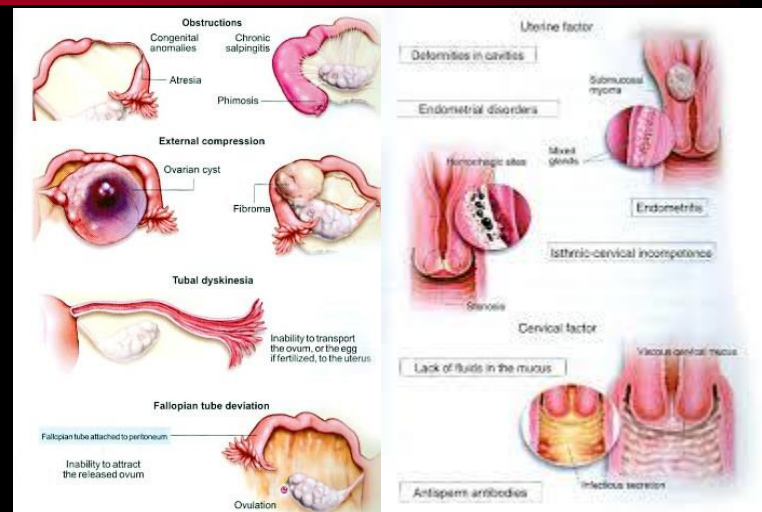
- V ČR ~ 20-25 % párů
- Léčba neplodnosti = reprodukční medicína



Příčiny neplodnosti

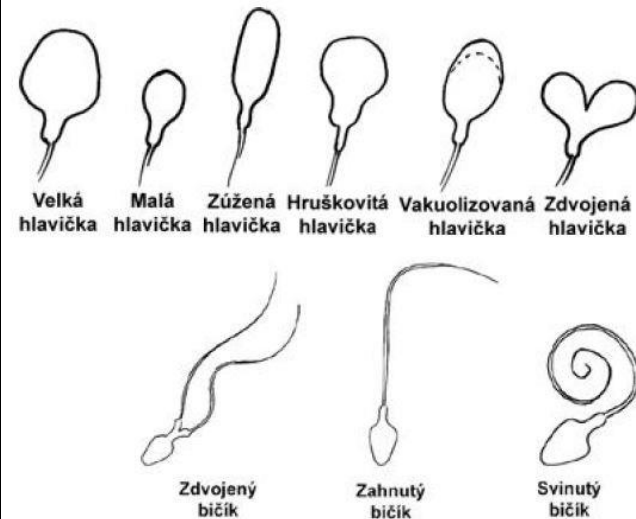
Ženské faktory

- *ovariální faktor* - vaječník nevytvoří nebo neuvolní kvalitní životaschopné vajíčko
- *tubární faktor* - poškození vejcovodů, chybění vejcovodů, neprůchodné vejcovody
- *endometrioza* - přítomnost děložní sliznice mimo dutinu děložní



Mužské faktory

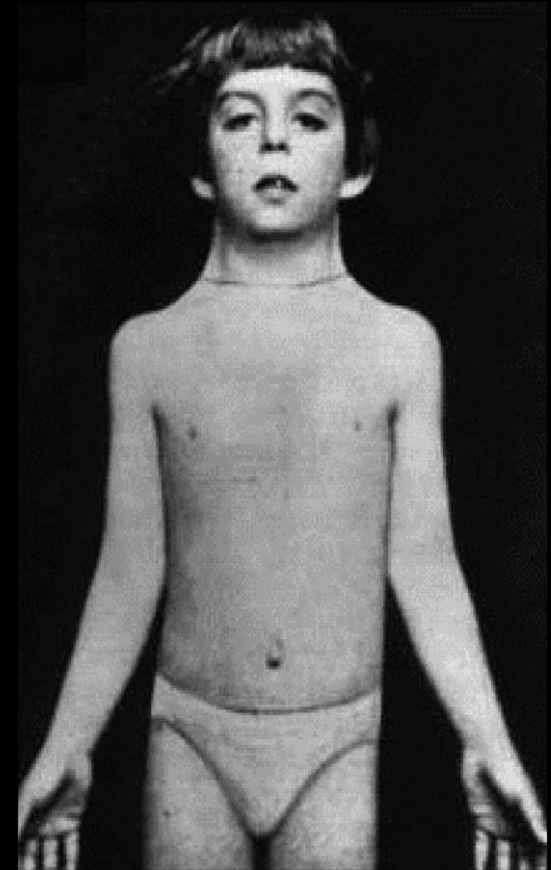
- *špatná funkce spermie* - neschopnost spermie proniknout a oplodnit vajíčko ženy
- Oligozoospermie ($15 \cdot 10^6$ v ejakulátu)
- Astenozoospermie (nedostatečná pohyblivost)
- Teratozoospermie (špatná morfologie)
- Azoospermie (nepřítomnost spermií v ejakulátu)



Obr. Příklady patologických morfologických nálezů (zdroj: ZDRAVÁ SPERMIE – prevence neplodnosti)

Genetické příčiny neplodnosti u žen

- 1) Chromozomvé aberace - strukturní i početní změny
Turnerův syndrom - 45, X
„Superženy“ - 47, XXX
Aneuploidie v gametách
- 2) Mutace - geny ovlivňující srážení krve
MTHFR (1p36.3)
Leidenská mutace (*F5* - 1q23),
G20210A v genu pro trombin



Genetické příčiny neplodnosti u mužů

Chromozomové aberace

- Klinefelterův syndrom - 47, XXY
- Muži - 47, XYY
- Strukturní abnormality chr. Y
delece v (Yp)(11.3) - *SRY* - porucha vývoje pohl. ústojí
delece Yq11 - *AZF* - azoosperma factor
= porucha vývoje spermií
- Translokace autozomů, Y/A, Robertsonské translokace
- centromerická fúze akrocentrických chromozomů (13-15, 21, 22)
- Aneuploidie v gametách (X,Y, 21, 13,18)



Genové mutace

Cystická fibróza - mutace DF508 v *CFTR1*, 97% mužů neplodných

Asistovaná reprodukce (ART)

- Asistovaná reprodukce je označení pro lékařské postupy a metody, při kterých dochází k manipulaci se zárodečnými buňkami nebo s embryi, včetně jejich uchovávání, a to za účelem léčby neplodnosti ženy nebo muže
- Komplexní proces je dnes většinou založen na technikách *in vitro* fertilizace
- Kromě párů s diagnózou využívají i páry s normální fertilitou, ale riziko přenosu genetické vady nebo patologických markerů
- Specializovaná centra - kliniky, sanatoria

Historie IVF

- 17st- **van Graaf** - Graafovy folikuly, **van Leeuwenhoek** - pozorování savčích spermií
- 19st - první vědecké práce o oplození *in vitro* **na zvířatech**
 - Schenk (1878), W. Heape – porod 6 králičích mláďat po vitro oplození (1890).
- 1944 – **Rock, Menkin** – oplození lidského oocytu *in vitro*
- 1951 – **Austin, Chang** - pro oplozovací schopnost spermie je nezbytný její předchozí pobyt v genitálním traktu samice (kapacitace spermií)

- **2. pol 20st – Cambridge University - R.G. Edwards**
 - popis zrání oocytů a oplození *in vitro*, možnost kultivace embryí
- 1971 – Steptoe, Purdy: Nature – možnost *in vitro* kultivace lidských embryí do stádia blasycysty
- 70. léta – vylepšení kultivačních médií, laparoskopických technik, kryokonzervace
- 1978 – Lancet – klinické aplikace oplození *in vitro* - L. Brownová
- 2010 - **R.G. Edwards** - Nobelova cena za embryologii



A. van Leeuwenhoek



R.G. Edwards



P.C. Steptoe

Historie IVF

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.



Prof. L. Pilka



MUDr. J. Tesarik

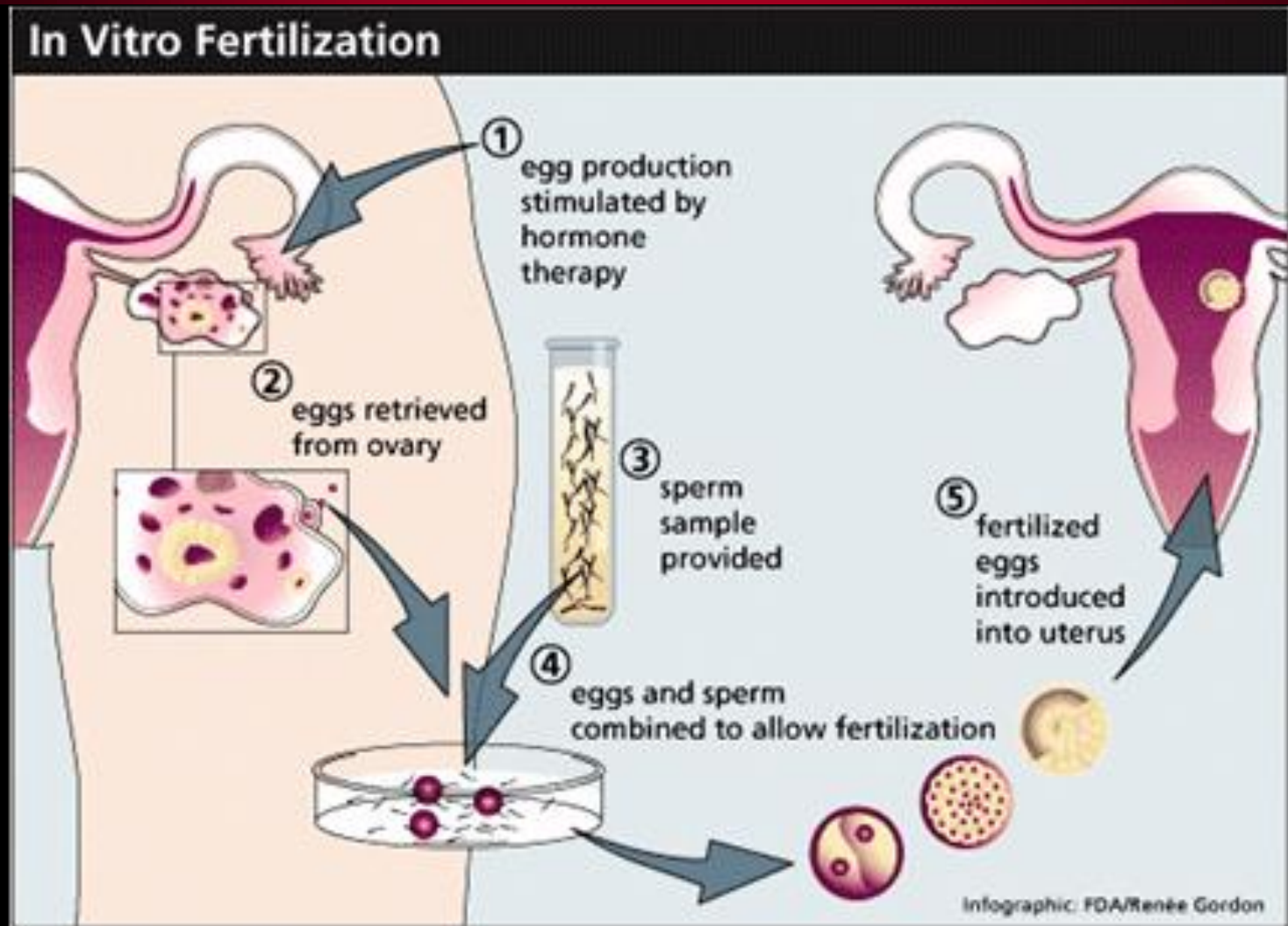


Prof. P. Trávník

IVF kliniky

- V ČR v současné době 41 registrovaných IVF center (6x Brno, 8x Praha)
- Specializovaná centra asistované reprodukce (gynekologie, porodnictví, reprodukční medicína, genetika, biochemie)
- Většinou soukromá centra x spolupráce s akademickým a zdravotnickým sektorem
- 2016 – **17998** IVF cyklů, **52%** hrazeno ZP
- Specializace na zahraniční klientela - „reprodukční turistiska“

Co obnáší IVF



Chirurgická aspirace spermií

Table 2 - Sperm retrieval techniques, acronyms and indications.

Technique	Acronym	Indications
Percutaneous epididymal sperm aspiration	PESA	Obstructive azoospermia
Microsurgical epididymal sperm aspiration	MESA	Obstructive azoospermia
Open epididymal fine-needle aspiration	ND	Obstructive azoospermia
Percutaneous testicular sperm aspiration; percutaneous testicular fine-needle aspiration	TESA; TEFNA	Obstructive azoospermia; Failed epididymal retrieval in OA cases; Epididymal agenesis in CAVD cases; Favorable testicular histopathology ¹ in NOA cases; Previous successful TESA/TEFNA attempt in NOA cases
Testicular sperm extraction (single or multiple biopsies)	TESE	Obstructive azoospermia; Failed epididymal retrieval in OA cases; Failed TESA/TEFNA in OA cases; Non-obstructive azoospermia
Single seminiferous tubule biopsy	ND	Obstructive azoospermia; Failed epididymal retrieval in OA cases; Failed TESA/TEFNA in OA cases; Non-obstructive azoospermia
Microsurgical testicular sperm extraction	Micro-TESE	Non-obstructive azoospermia

OA: obstructive azoospermia; NOA: non-obstructive azoospermia. CAVD: congenital absence of the vas deferens. ND: not defined.
¹Hypospermatogenesis.

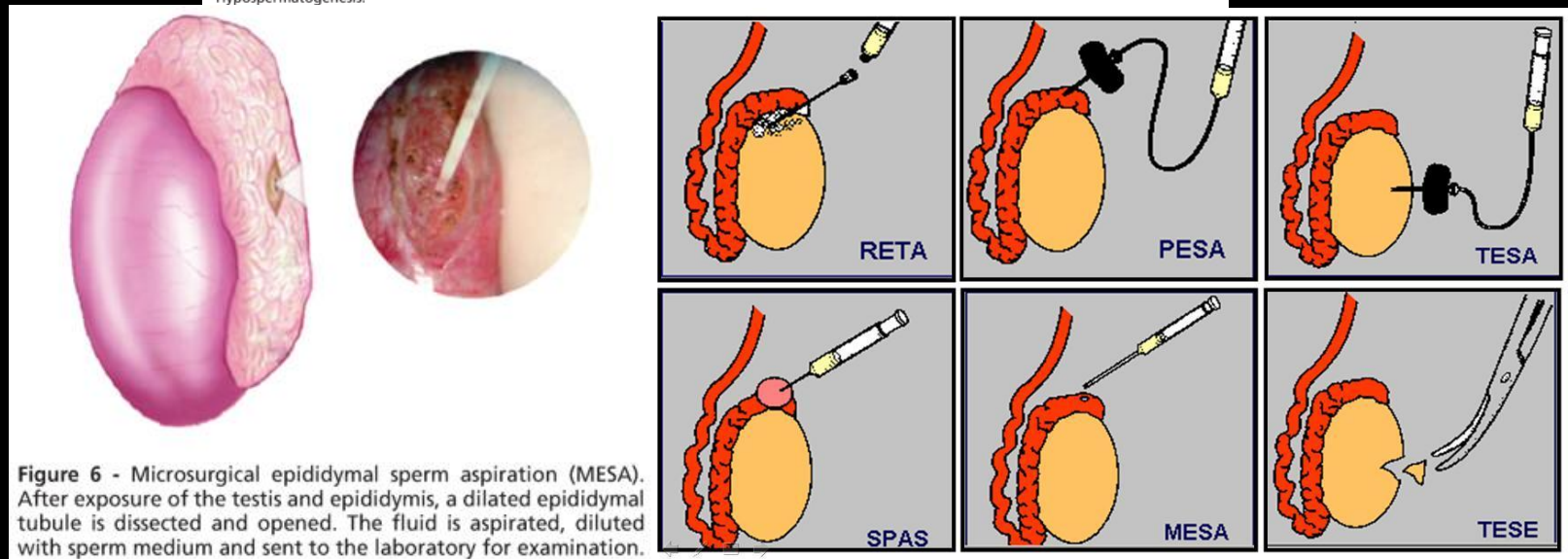
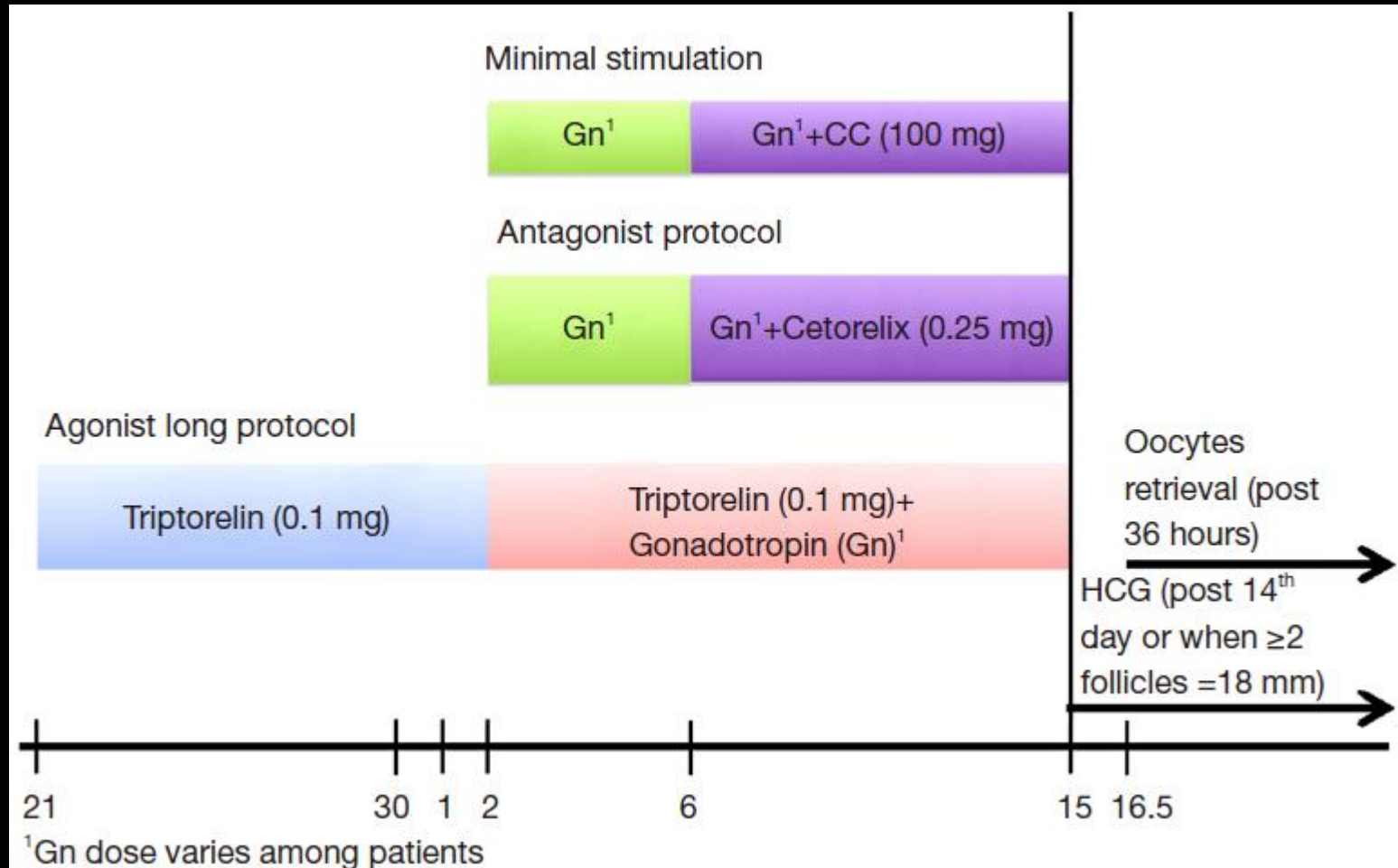


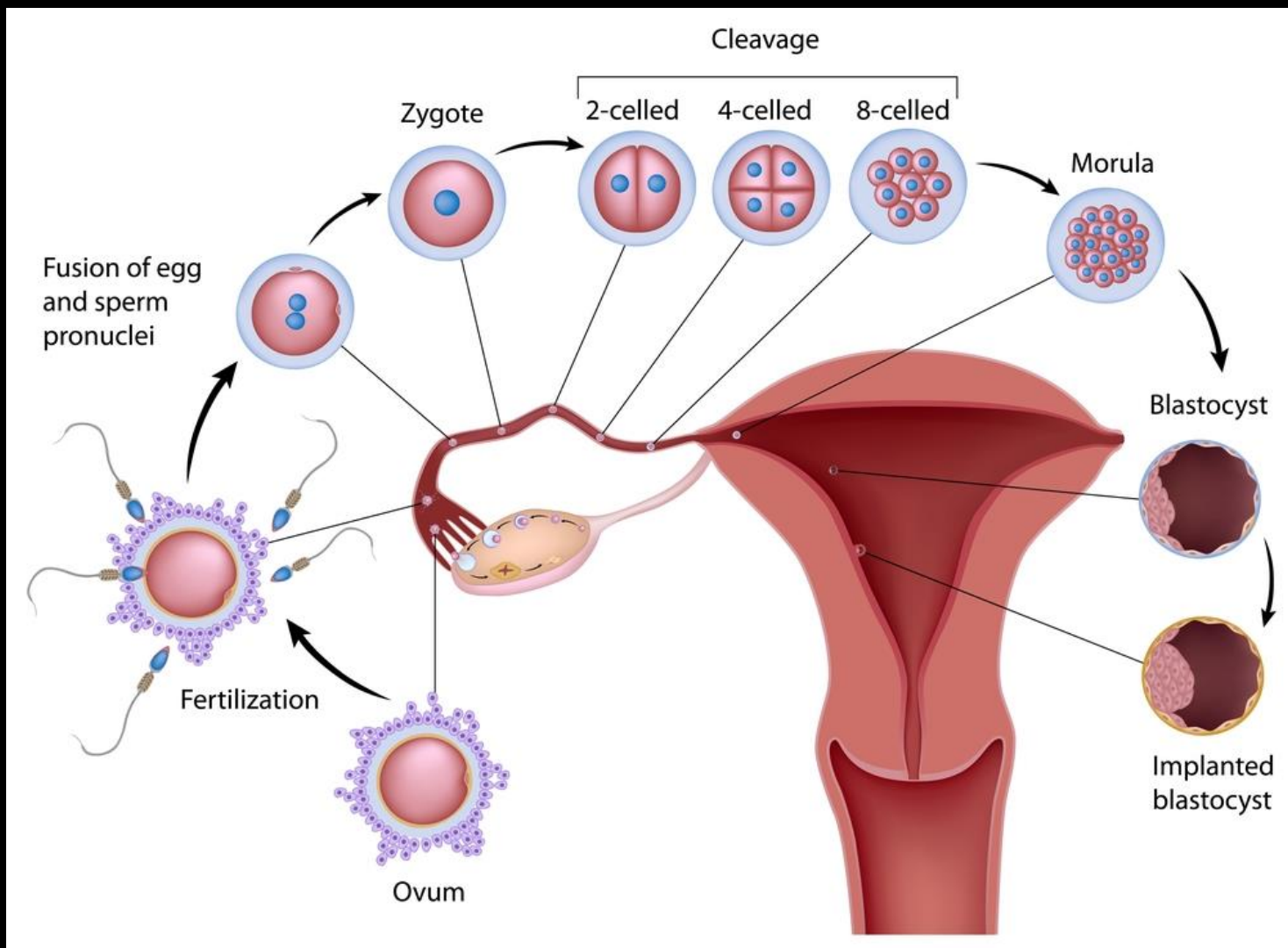
Figure 6 - Microsurgical epididymal sperm aspiration (MESA). After exposure of the testis and epididymis, a dilated epididymal tubule is dissected and opened. The fluid is aspirated, diluted with sperm medium and sent to the laboratory for examination.

Hormonální stimulace - zisk oocytů

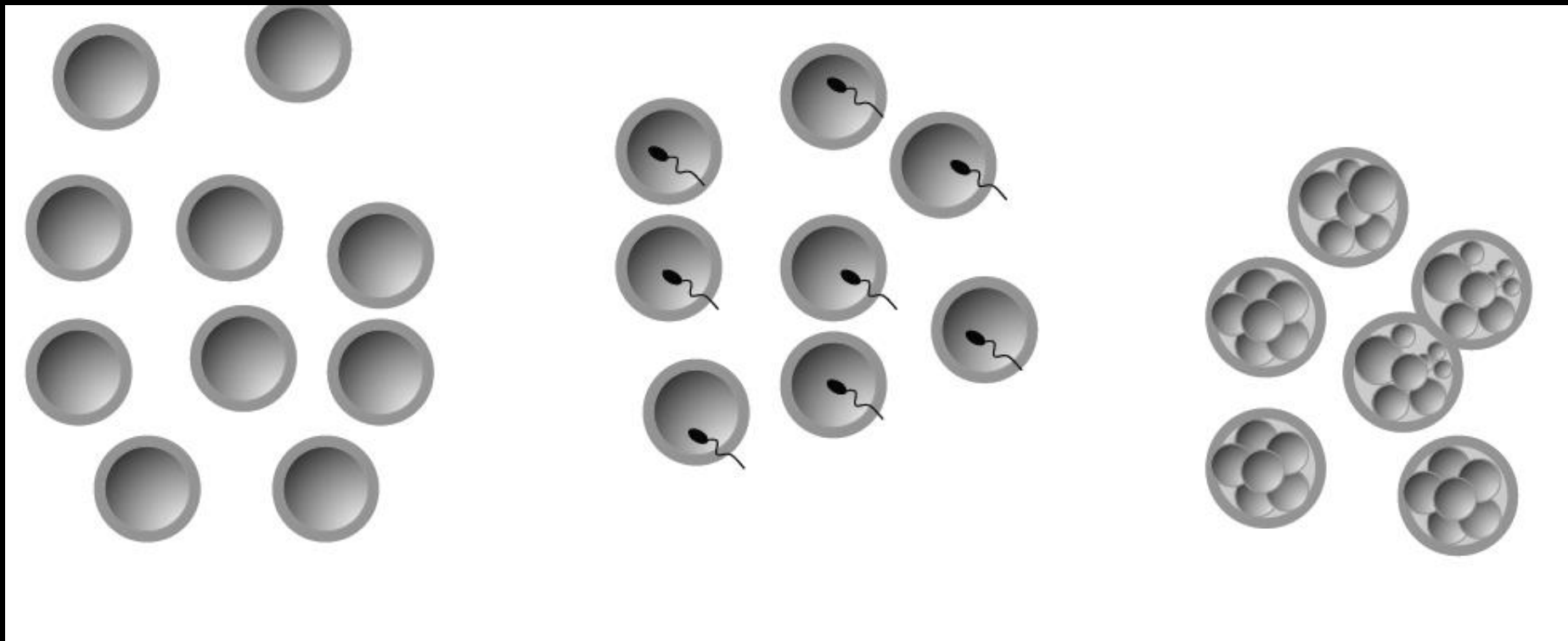


GnRH - gonadorelin, **hormon** uvolňující gonadotropin
CC - clomiphene citrate, syntetický estrogen, podpora ovulace

IVF cyklus




IVF cyklus



- při IVF cyklu získáme obvykle několik embryí...
 - ideální je provést transfer jednoho embrya
- ale kterého...a jak ho vybereme...??? ...**morfologie** ?

Genetické abnormality



IVEF News, Volume 11, No 2, 2000. IVEF News is a newsletter offered to you by N.V. Organon. For further information, please contact: N.V. Organon, PO Box 20, 5340 BH Oss, The Netherlands, www.fertility-net.com

I N S I D E

Page 2

- ESHRE: IVF monitoring program
- Cost-effectiveness of gonadotropins

Page 3

- New regimes in ovarian stimulation
- The potential for blastocyst transfer

Page 4

- Consumers take the stage at ESHRE: future directions described


Around 70 percent of embryos in older patients are chromosomally abnormal

Pre-implantation genetic diagnosis for aneuploidy is 'living up to its promise'


Pre-implantation genetic diagnosis, technology pioneered more than a decade ago by Handyside and colleagues at the Hammersmith Hospital in London, UK, is finally living up to initial expectations, thereby bringing new hope to couples formerly at high risk of having a baby affected by a genetic abnormality.

Dr Santiago Munné of Saint Barnabas Medical Center in New Jersey, USA, said that application of the technique has already dramatically reduced the number of miscarriages in older mothers and of babies born with an inherited chromosomal condition. In reviewing progress so far for

ESHRE, Dr Munné reported that pre-implantation genetic diagnosis (PGD) for aneuploidy (currently also known as pre-implantation genetic screening (PGS) in Europe) and for translocations is now available in most developed countries. He added, however, that large-scale PGD for these conditions is still confined to a total of only half a dozen centers in the Netherlands, the USA, Italy, Belgium and the UK. Work conducted by Dr Munné has already shown that the risk of aneuploidy rises up to 70-fold as



Dr Luca Gianaroli: 'Pregnancy rates three times higher in PGD cycles'



Dr Santiago Munné: 'Risk of aneuploidy increases 70-fold as women age'

over 38 years as many as 70 percent of embryos are aneuploid and 50 percent are monosomies or trisomies.

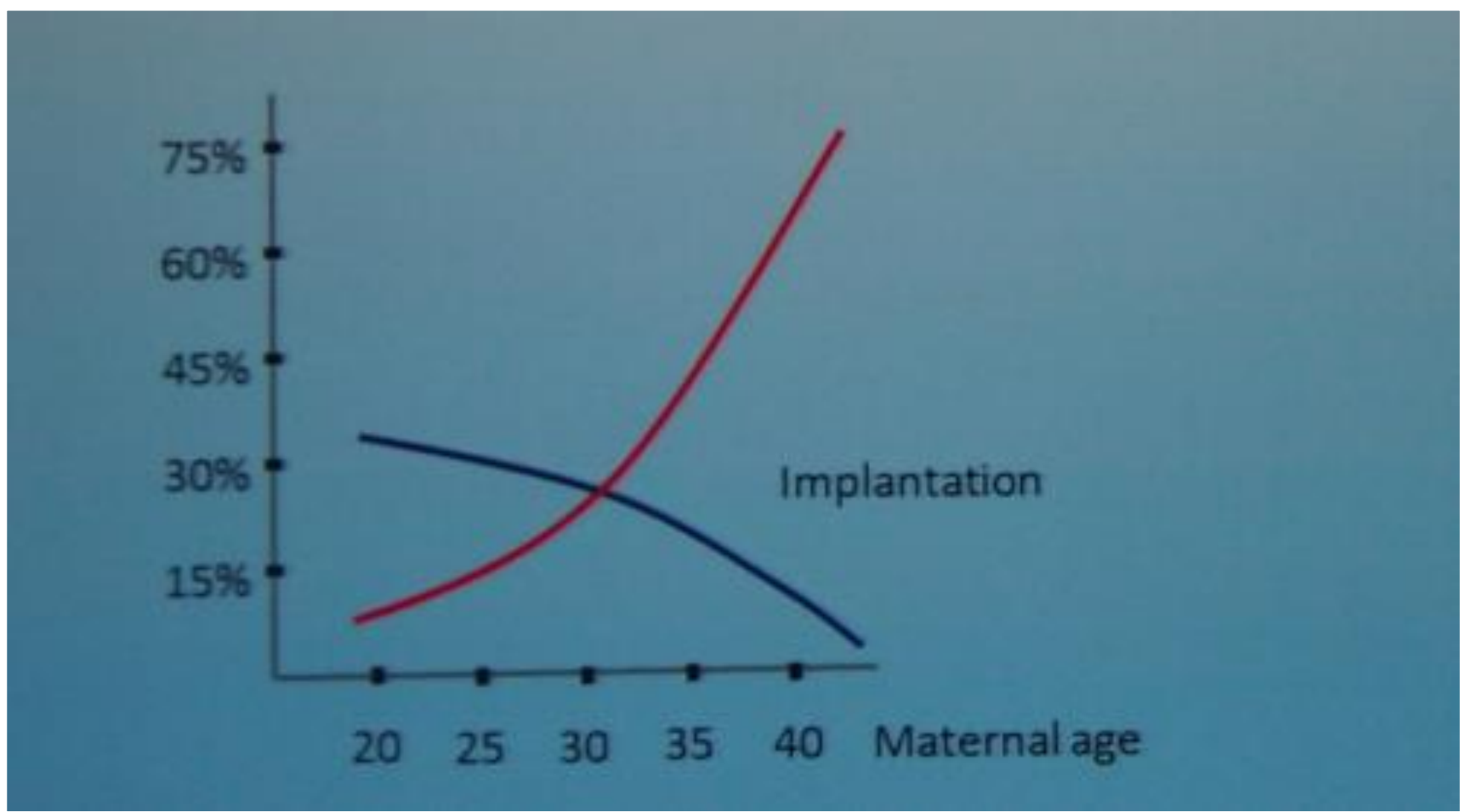
a valuable tool to overcome the necessity of transferring more than two embryos in poor prognosis patients, without negatively

User-friendliness steers developments at Organon

- velká část embryí bez ohledu na věk matky je aneuploidní (54 % ve věku pod 35 let, 82 % ve věku 40 let a více)

Důvod = poruchy meiózy

Závislost věku matky na úspěšnosti implantace embryí

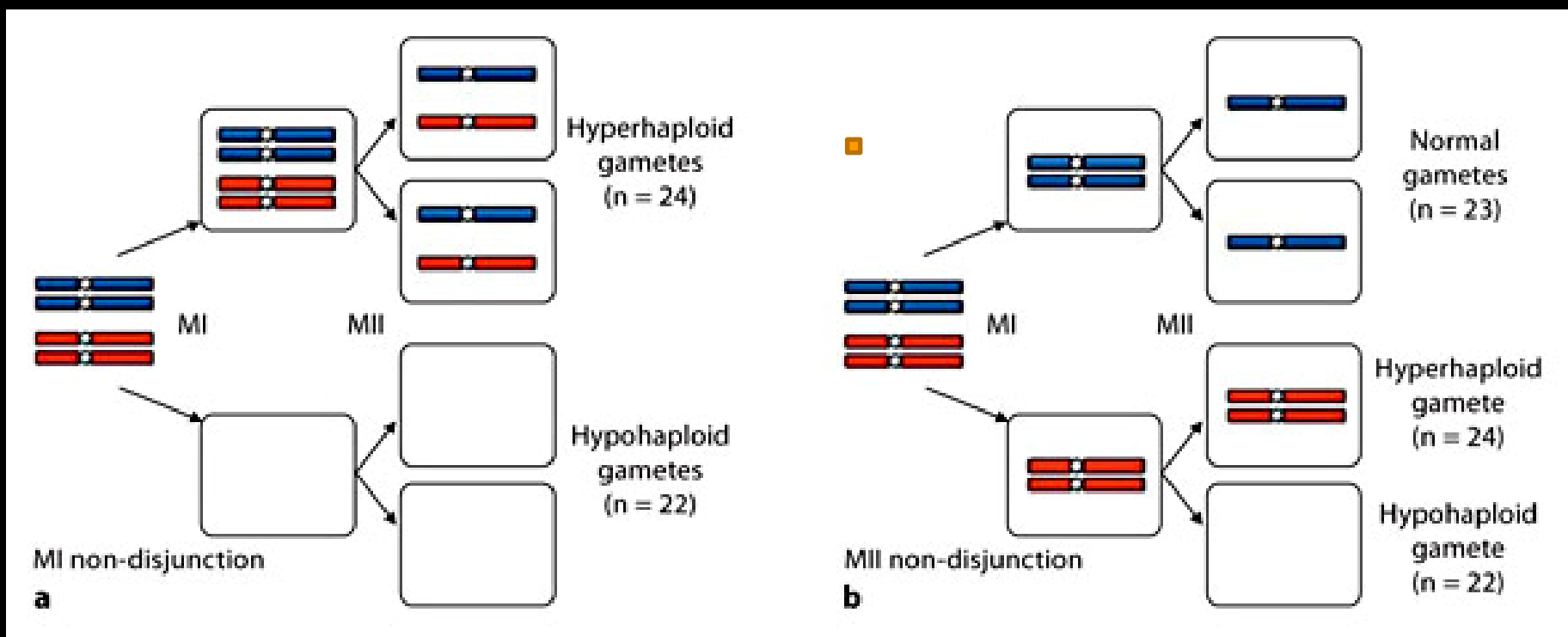


D. Wells, ESHG Paris, 2013

Chromozomové aberace u embryí

- Klasický model

~ 90 % aneuploidií vzniká v průběhu meiózy I u žen



Array comparative genomic hybridisation on first polar bodies suggests that non-disjunction is not the predominant mechanism leading to aneuploidy in humans.

Gabriel AS, Thornhill AR, Ottolini CS, Gordon A, Brown AP, Taylor J, Bennett K, Handyside A, Griffin DK.

School of Biosciences, University of Kent, Canterbury CT2 7NJ, UK.

Oocyte at metaphase I



Předčasné rozdělení sesterských chromatid v MI je více než desetkrát častější příčinou vzniku aneuploidie, než klasická nondisjunkce !



Oocyte at Anaphase I following non-disjunction (smaller chromosome)

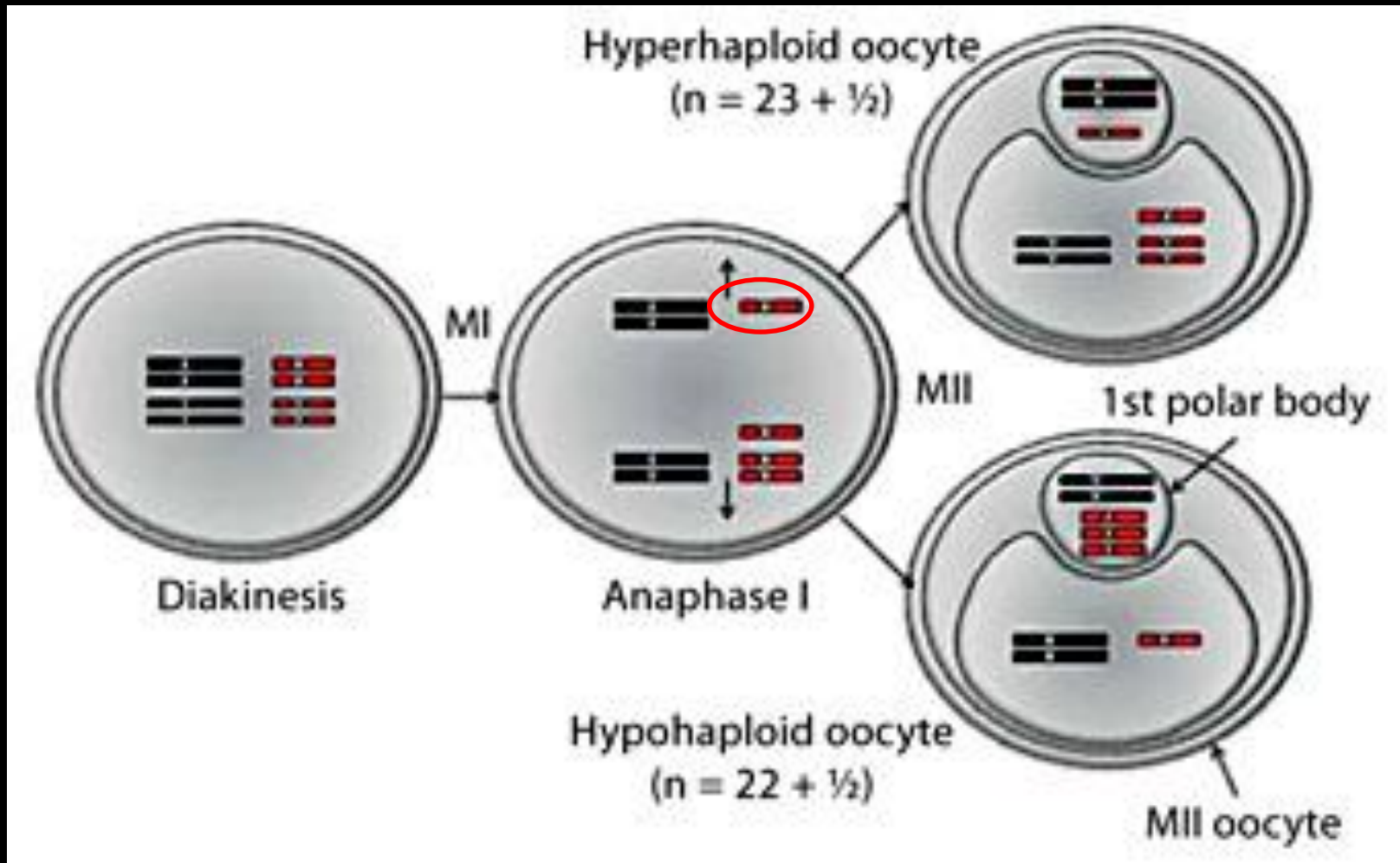


Oocyte at Anaphase I following precocious separation of sister chromatid (smaller chromosome)

Chromosome abnormalities in the human oocyte.

Fragouli E, Wells D, Delhanty JD.

Institute of Reproductive Sciences, Nuffield Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Oxford, Oxford, UK. elpida.fragouli@obs-gyn.ox.ac.uk



Genetické analýzy používané u IVF

1. PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA

- monogenní choroby
- volba pohlaví u X-vázaných chorob
- vrozené strukturní abnormality (Robertsonské translokace, balancované translokace)

1. PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÝ SCREENING

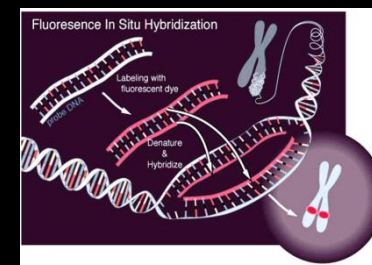
- detekce nejčastějších vrozených početních chromozomových aberací - aneuploidií

PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÁ ANALÝZA (PGA)

PGA - diagnostické metody

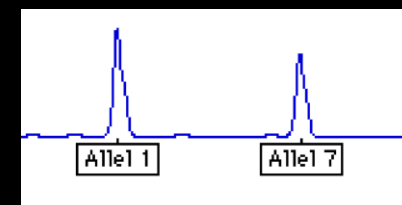
a) Molekulární cytogenetika (I-FISH)

- aneuploidie, translokace, mikrodeleční syndromy aj



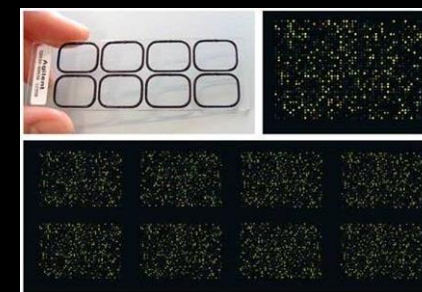
b) PCR - monogenní choroby

- specifické mutace - CF, thalasemie, srpkovitá anémie, hemofilie, DMD.....



c) Screeningové techniky - celogenomové pokrytí

- array-CGH (DNA čipy) - početní i strukturní CHA
- SNP čipy - KARYOMAPPING
- Exomové sekvenování - validační studie



Genetické analýzy používané u IVF

1. PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA

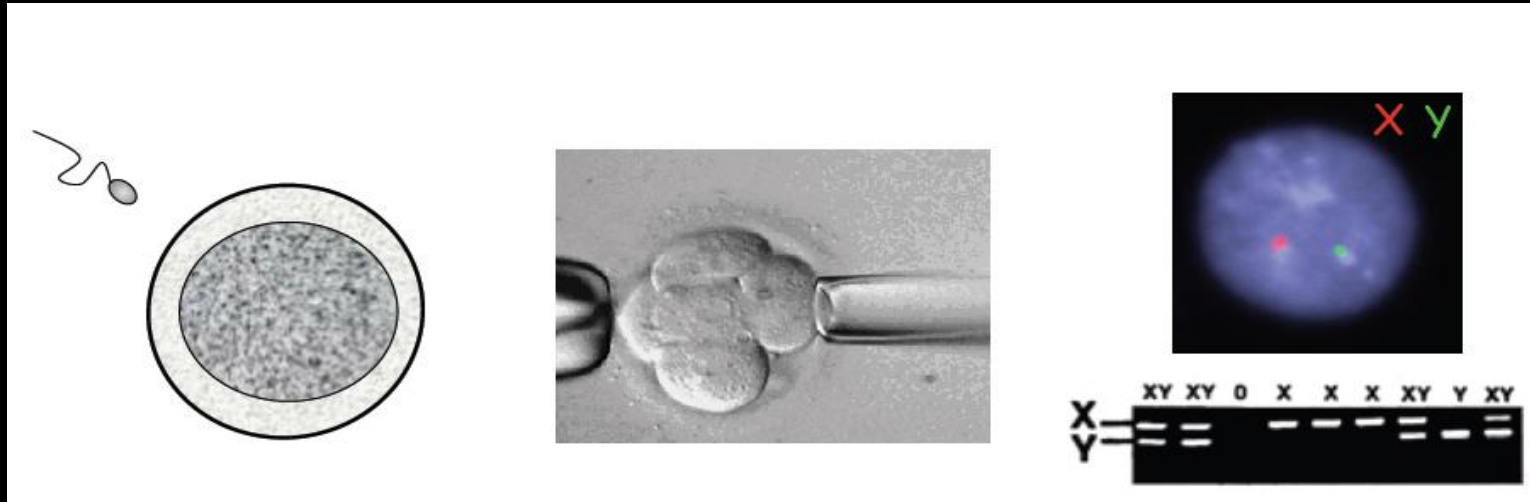
- monogenní choroby
- volba pohlaví u X-vázaných chorob
- vrozené strukturní abnormality (Robertsonské translokace, balancované translokace)

1. PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÝ SCREENING

- detekce nejčastějších vrozených početních chromozomových aberací - aneuploidií

PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÁ ANALÝZA (PGA)

PGA - vstupní biologický materiál



Oplození *in vitro*

Biopsie embrya

Genetický test



Polární tělísko



Blastomera (3. den)



Blastocysta (5-6. den)

Chromozomové abnormality u embryí

Početní chromozomové aberace (aneuploidie)

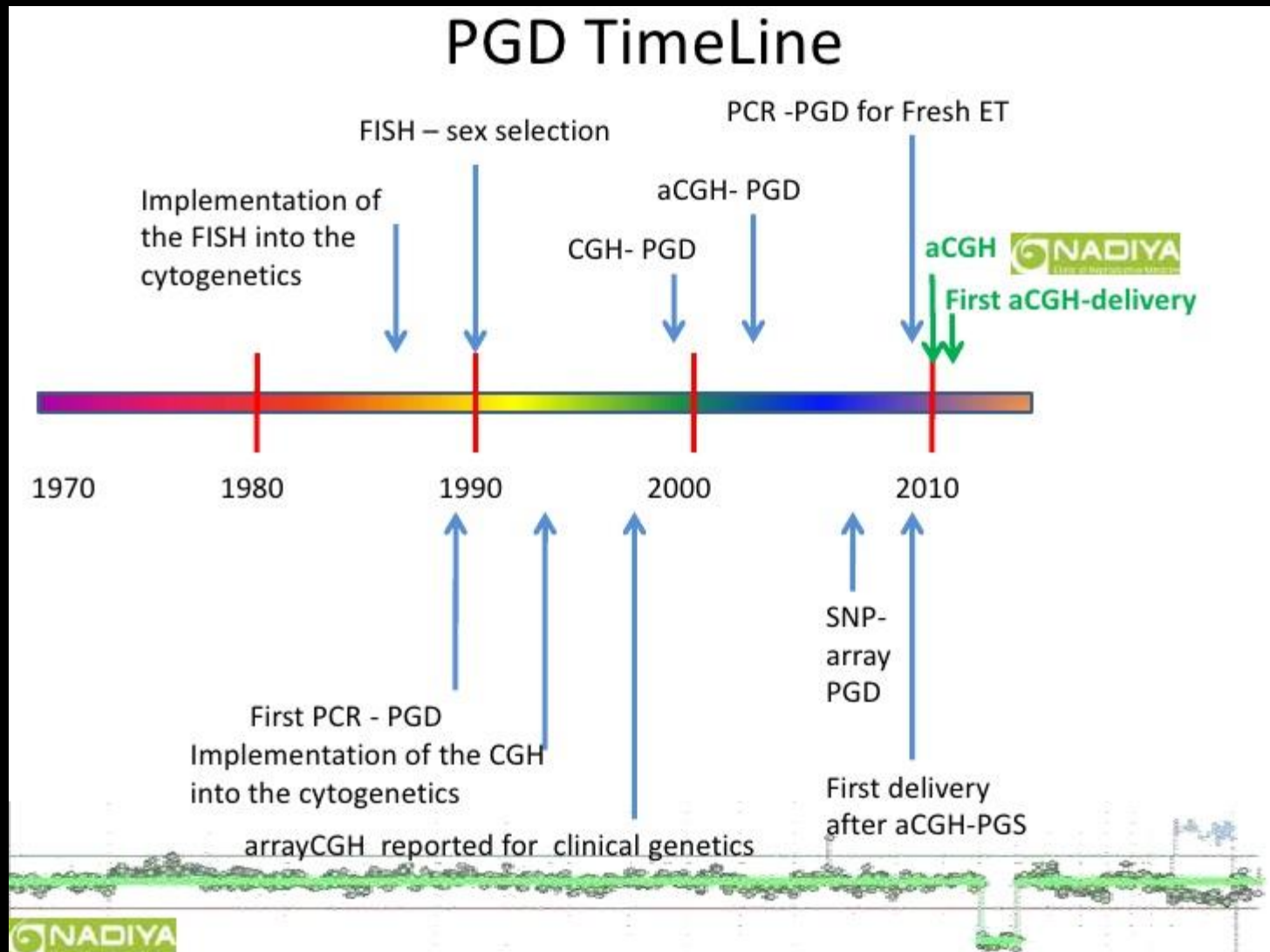
- jsou nejčastější genetickou změnou u lidských embryí
- aneuploidie se často vyskytují i u morfologicky normálně se vyvíjejících embryí (*A. Mertzaniidou, 2013*)
- snižují úspěšnost metod asistované reprodukce

Strukturní chromozomové aberace

- postzygotické mitotické poruchy jsou u embryí velmi časté
- až u 70 % embryí byla pomocí SNP čipů prokázána chromozomová nestabilita - duplikace, amplifikace, delece, UPD (*Vanneste et al., 2009*)

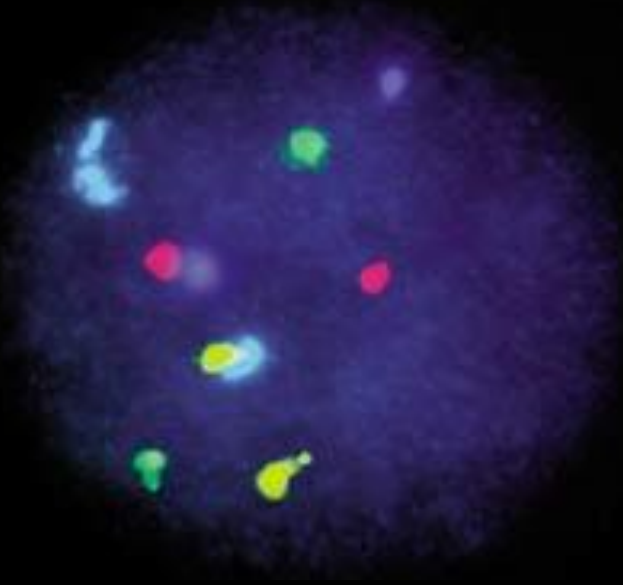
**SCREEINING POUHÝCH ANEUPLOIDIÍ U RANÝCH
EMBRYÍ NESTAČÍ!**

Preimplantační genetický screening/diagnostika



Preimplantační genetický screening/diagnostika pomocí techniky I-FISH

Screening - AneuVysion Vysis MultiVysion Probe Panel (13,18,21,X,Y,16,22)



SpectrumGreen 21

SpectrumRed 13

SpectrumBlue X

SpectrumGold Y

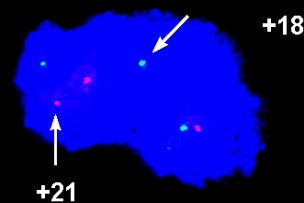
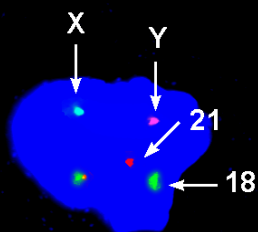
SpectrumAqua 18

Více chromozomů na jedné buňce - opakovaná FISH (FISH - zhodnocení, odmytí, nová FISH - zhodnocení)

Ukázka screeningu - detekce aneuploidií pro účely PGD

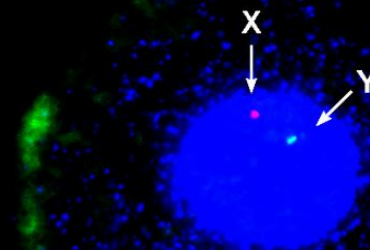
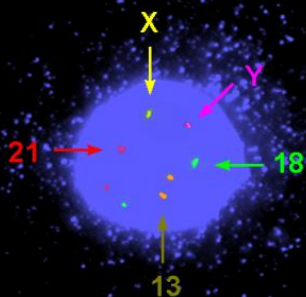
070601/2

Blastomera-zastavené embryo



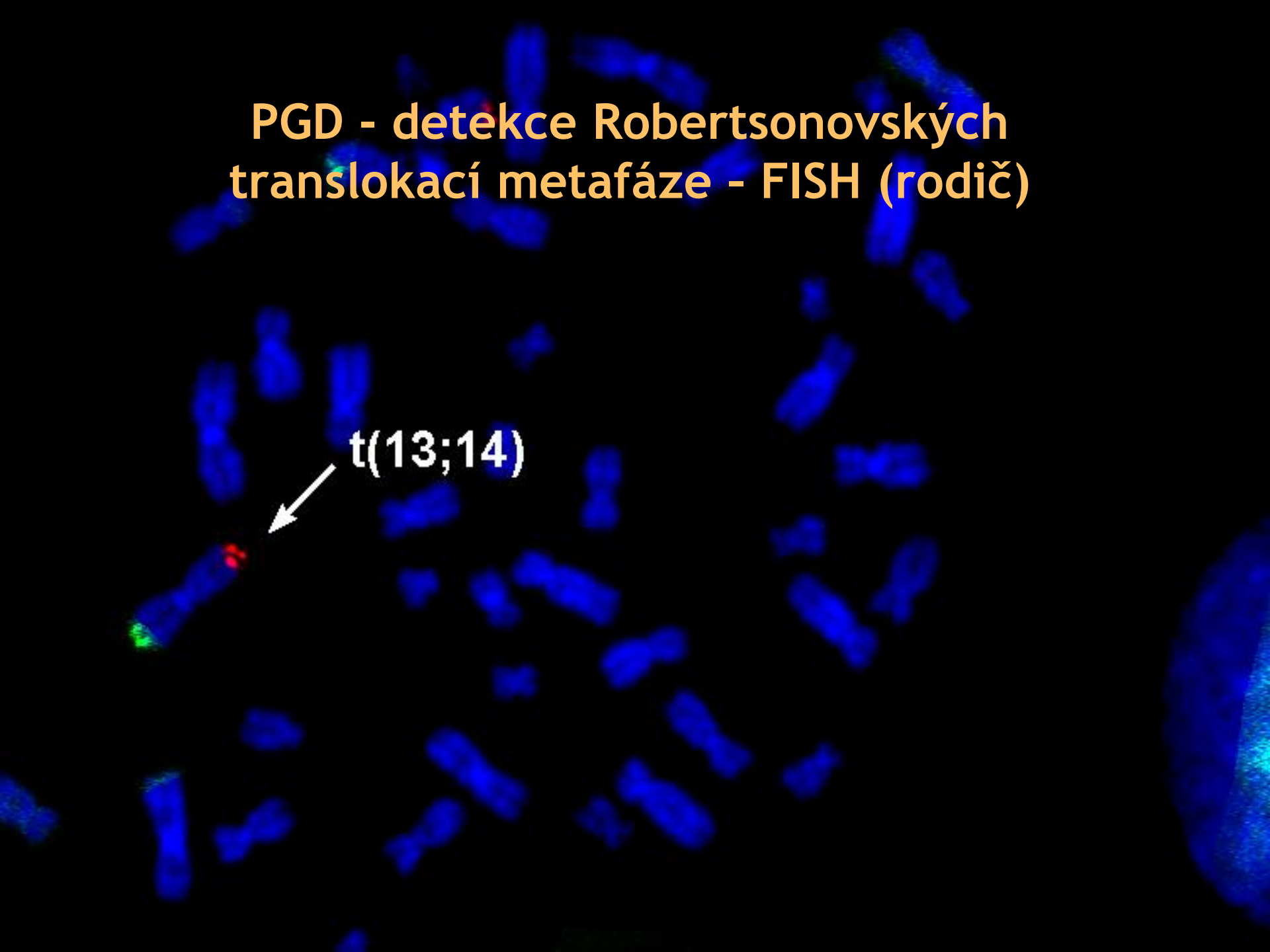
BLASTOMERA

300901/17
pozice 16



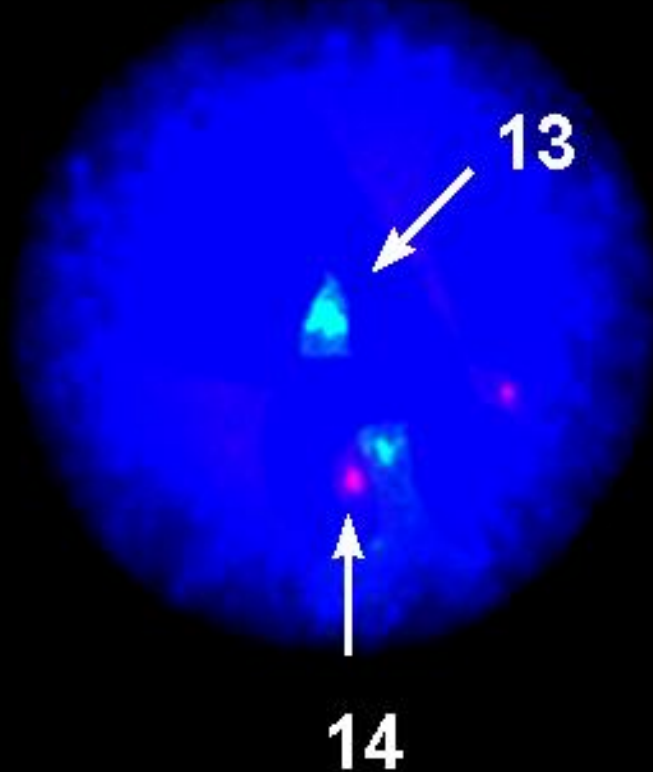
PGD - detekce Robertsonových
translokací metafáze - FISH (rodič)

t(13;14)



PGD - detekce Robertsonových translokací interfáze - nadbytečný nebo chybějící signál

(výběr blastomer s balancovanou translokací nebo normální
sestavou chromozomů)



Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs

S. Mastenbroek*, M. Twisk, F. van der Veen, and S. Repping

Center for Reproductive Medicine, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Meibergdreef 9, 1105 AZ, Amsterdam, The Netherlands

*Correspondence address. Tel: +31-20-5663090; E-mail: s.mastenbroek@amc.uva.nl

Submitted on December 31, 2009; resubmitted on January 10, 2011; accepted on January 31, 2011

BACKGROUND: Preimplantation genetic screening (PGS) has increasingly been used in the past decade. Here we present a systematic review and meta-analysis of RCTs on the effect of PGS on the probability of live birth after IVF.

METHODS: PubMed and trial registers were searched for RCTs on PGS. Trials were assessed following predetermined quality criteria. The primary outcome was live birth rate per woman, secondary outcomes were ongoing pregnancy rate, miscarriage rate, multiple pregnancy rate and pregnancy outcome.

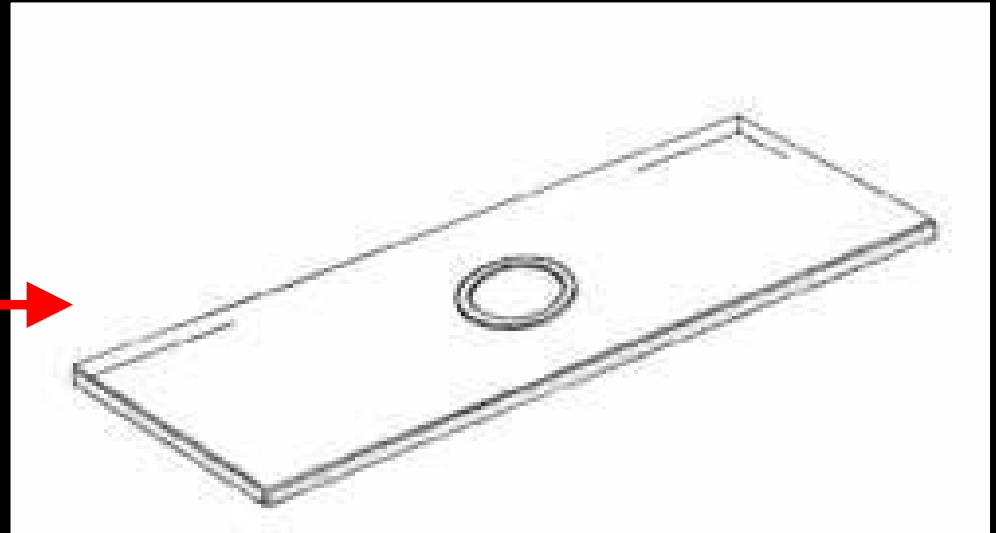
RESULTS: Nine RCTs comparing IVF with and without PGS were included in our meta-analysis. Fluorescence *in situ* hybridization was used in all trials and cleavage stage biopsy was used in all but one trial. PGS significantly lowered live birth rate after IVF for women of advanced maternal age (risk difference: -0.08 ; 95% confidence interval: -0.13 to -0.03). For a live birth rate of 26% after IVF without PGS, the rate would be between 13 and 23% using PGS. Trials where PGS was offered to women with a good prognosis and to women with repeated implantation failure suggested similar outcomes.

CONCLUSIONS: There is no evidence of a beneficial effect of PGS as currently applied on the live birth rate after IVF. On the contrary, for women of advanced maternal age PGS significantly lowers the live birth rate. Technical drawbacks and chromosomal mosaicism underlie this inefficacy of PGS. New approaches in the application of PGS should be evaluated carefully before their introduction into clinical practice.

PGS pomocí I-FISH nezlepšuje úspěšnost IVF....proč?

Problémy PGA I

- vyšetření 1 buňky - možnost diagnostického omylu ?



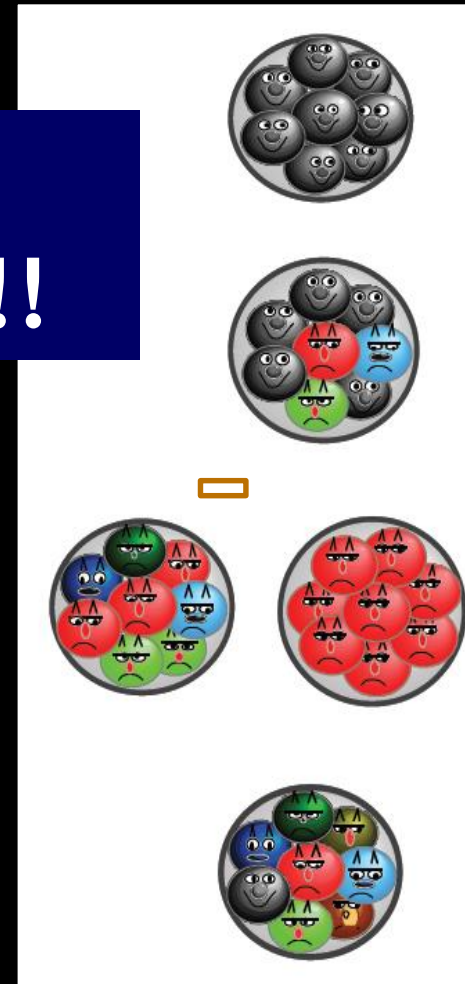
Problémy PGA II

EMBRYA:

- normální (všechny buňky diploidní)

**Jedna buňka nemusí
reprezentovat celé embryo !!!**

- mozaika (diploidní + aneuploidní buňky)
- abnormální (všechny buňky abnormální)
- chaotické (každá buňka obsahuje jiný počet chromozomů)



Problémy PGA III - strukturní CHA

nature medicine

Full text access provided to Masaryk University, Faculty of Science by Central Library

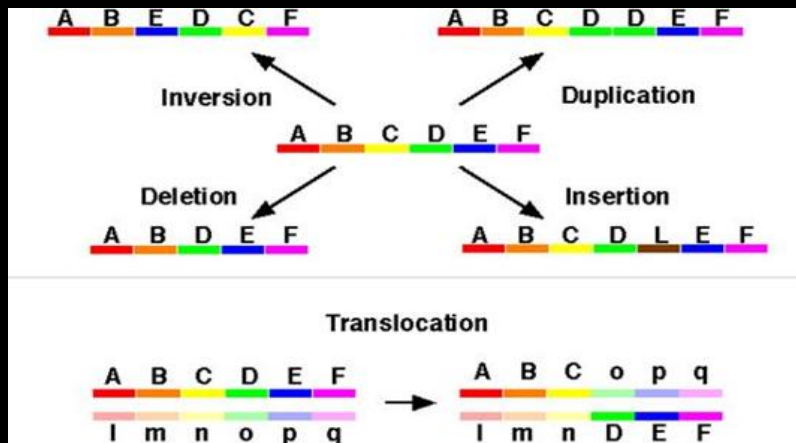
Journal home > Archive > Technical Report > Full Text

Technical Report

Nature Medicine 15, 577 - 583 (2009)
Published online: 26 April 2009 | doi:10.1038/nm.1924

Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos

Evelyne Vanneste^{1,2,3}, Thierry Voet^{1,2}, Cédric Le Caignec^{1,2,4}, Michèle Ampe⁵, Peter Konings⁶, Cindy Melotte¹, Sophie Debrock², Mustapha Amyere⁷, Miikka Vikkula², Frans Schuit⁸, Jean-Pierre Fryns¹, Geert Verbeke⁵, Thomas D'Hooghe², Yves Moreau⁵ & Joris R Vermeesch¹



Nestačí vyšetřit
aneuploidie !
Celogenomové
vyšetření !

- u embryí se vyskytují též strukturní aberace (delece, duplikace, UPD atd...) ...postygotické mitotické poruchy mitózy jsou četnější než meiotické...

Využití celogenomových screeningových technik v PGA

- Izolace 1 - několika buněk + celogenomová amplifikace
- Využití mikročipových technik array-CGH, SNP čipy
- Možnost vyšetřit celý genom - nutno v krátkém časovém intervalu (24 h) X zamražená embrya (vitrifikace)



Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)
ISSN 1673-1581 (Print); ISSN 1862-1783 (Online)
www.zju.edu.cn/jzus; www.springerlink.com
E-mail: jzus@zju.edu.cn



Review:

Whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis ^{*}

Ying-ming ZHENG, Ning WANG, Lei LI, Fan JIN^{1,2}

(Department of Reproductive Endocrinology, Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

^{*}E-mail: jinfan@zju.edu.cn

Received June 1, 2010; Revision accepted Sept. 29, 2010; Crosschecked Dec. 8, 2010



Human Reproduction, Vol.25, No.4 pp. 1066–1075, 2010

Advanced Access publication on January 24, 2010 doi:10.1093/humrep/dep452

human
reproduction

ORIGINAL ARTICLE *Reproductive genetics*

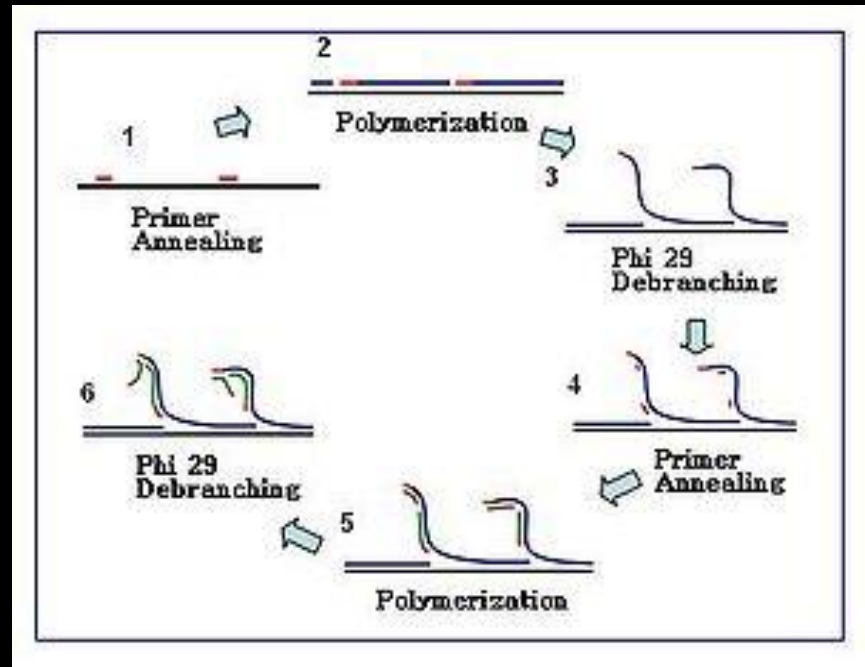
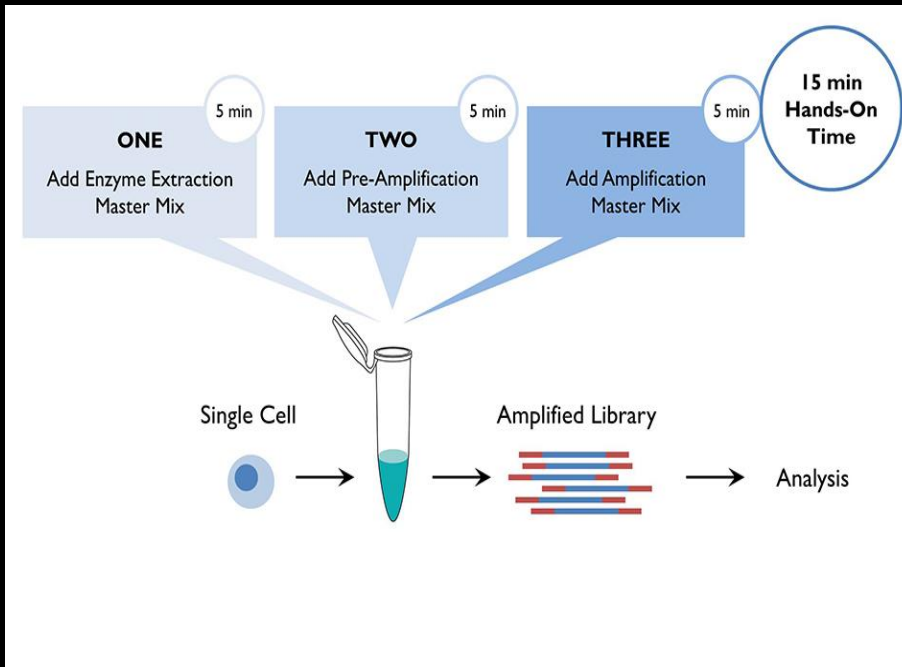
Preclinical validation of a microarray method for full molecular karyotyping of blastomeres in a 24-h protocol

D.S. Johnson^{1,8}, G. Gemelos¹, J. Baner^{1,2}, A. Ryan¹, C. Cinnioglu¹,
M. Banjevic¹, R. Ross³, M. Alper⁴, B. Barrett⁴, J. Frederick⁵,
D. Potter^{1,5}, B. Behr⁶, and M. Rabinowitz^{1,7}

¹Gene Security Network, Inc., 2686 Middlefield Road, Suite C, Redwood City, CA 94063, USA ²Genome Technology Center, Stanford University, 318 Campus Drive, Stanford, CA 94305, USA ³La Jolla IVF, 9850 Genesee Avenue No. 610, La Jolla, CA 92037, USA ⁴Boston IVF, 130 Second Avenue, Waltham, MA 02451, USA ⁵Huntington Reproductive Center, 23961 Calle de la Magdalena, Suite 503, Laguna Hills, CA 92653, USA ⁶Obstetrics and Gynecology, Stanford University Medical Center, 900 Welch Road, Palo Alto, CA 94304, USA ⁷School of Engineering, Aeronautics and Astronautics, Stanford University, Stanford, CA 94305, USA

⁸Correspondence address. E-mail: djohnson@gensecurity.net

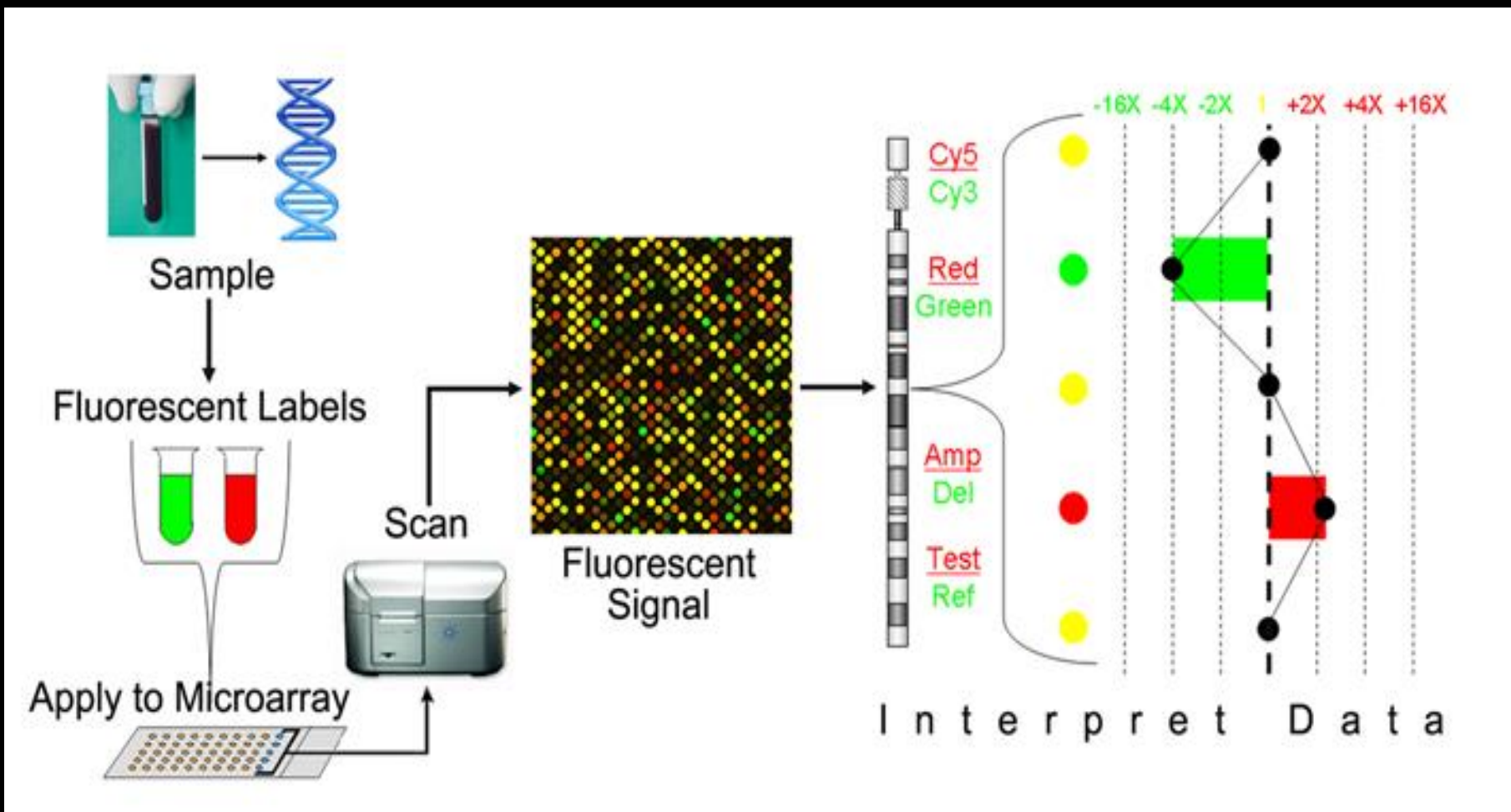
Amplifikace DNA - klíčový krok PGA



Genomové metody – potřeba μg DNA, = 10^6 buněk, aspirát trofoekrodermu
20 buněk = pg DNA, nutnost amplifikace DNA

Metodika screeningových technik u PGD

Array-cgh workflow



BAC array CGH-za 12 hodin

Aneuploidie i strukturní změny (delece, duplikace) v celém genomu Rozlišení ~ 5 Mbp

24sure™
First to deliver 24 chromosome aneuploidy screening in 12 hours

24sure™

24 chromosome PGS aneuploidy screening

Rapid results from single cells
24sure is widely used with cells from all stages of embryo development.

Polar bodies
Blastomeres
Trophectoderm

Sample preparation and amplification 3 1/2 hours
Labelling 3 hours

Reliable results in under 12 hours

24sure uses array technology to estimate the relative abundance of over 3000 genomic sequences at the chromosome level and is fully automated to ensure objective and reproducible results of the highest quality.

24sure is supplied as a complete solution of consumables, software and hardware backed by a range of specialist technical support and training services from BlueGene's global offices in America, Europe and Asia.

24sure uses simple protocols familiar to laboratories experienced in classical molecular techniques. Protocols have been optimised for routine application with minimal tube transfers, documented quality control stages and flexible stop points.

24sure requires minimal specialist hardware and is compatible with low cost, 10µm, laser scanners. Where high throughput operation is required optional hardware and protocol stages may be substituted to enable plate level operation.

The broadest range of applications from Europe's leading microarray supplier

24sure is part of a complete suite of microarray applications covering pre-implantation, constitutional and cancer cytogenetics. All BlueGene products share the same workflow and are supported by a common software platform for the analysis and storage of results.

Amplification
Labelling
Hybridization 3 1/2 hours
Confirmation
Postnatal
Prenatal
Cancer
PGS

Scanning and reporting 2 hours

24sure result

12 hours

BlueGene software
Single software platform

Oligo array-CGH pro PGD

Agilent Technologies

1. Agilent SurePrint Mikročipy

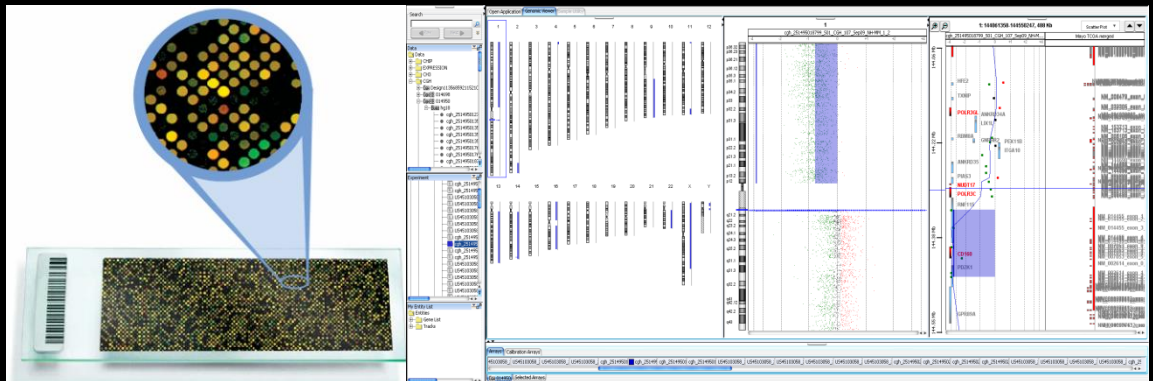
- 8x60k mikročipy
- Rozlišení až 1 Mbp, . 2 - 5 Mbp standard

2. High Resolution Scanner

- Rozlišení 10- 2 mm
- Až 48 microarrays / cyklus
- 15 min / 1 array (60k array)

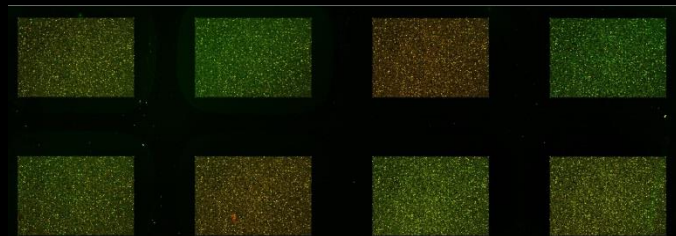
3. Agilent Genomic Workbench

- Kritéria pro analýzu
- Vizualizace dat
- Tvorba protokolů, správa dat



Preimplantační genetická analýza pomocí high-resolution array-CGH

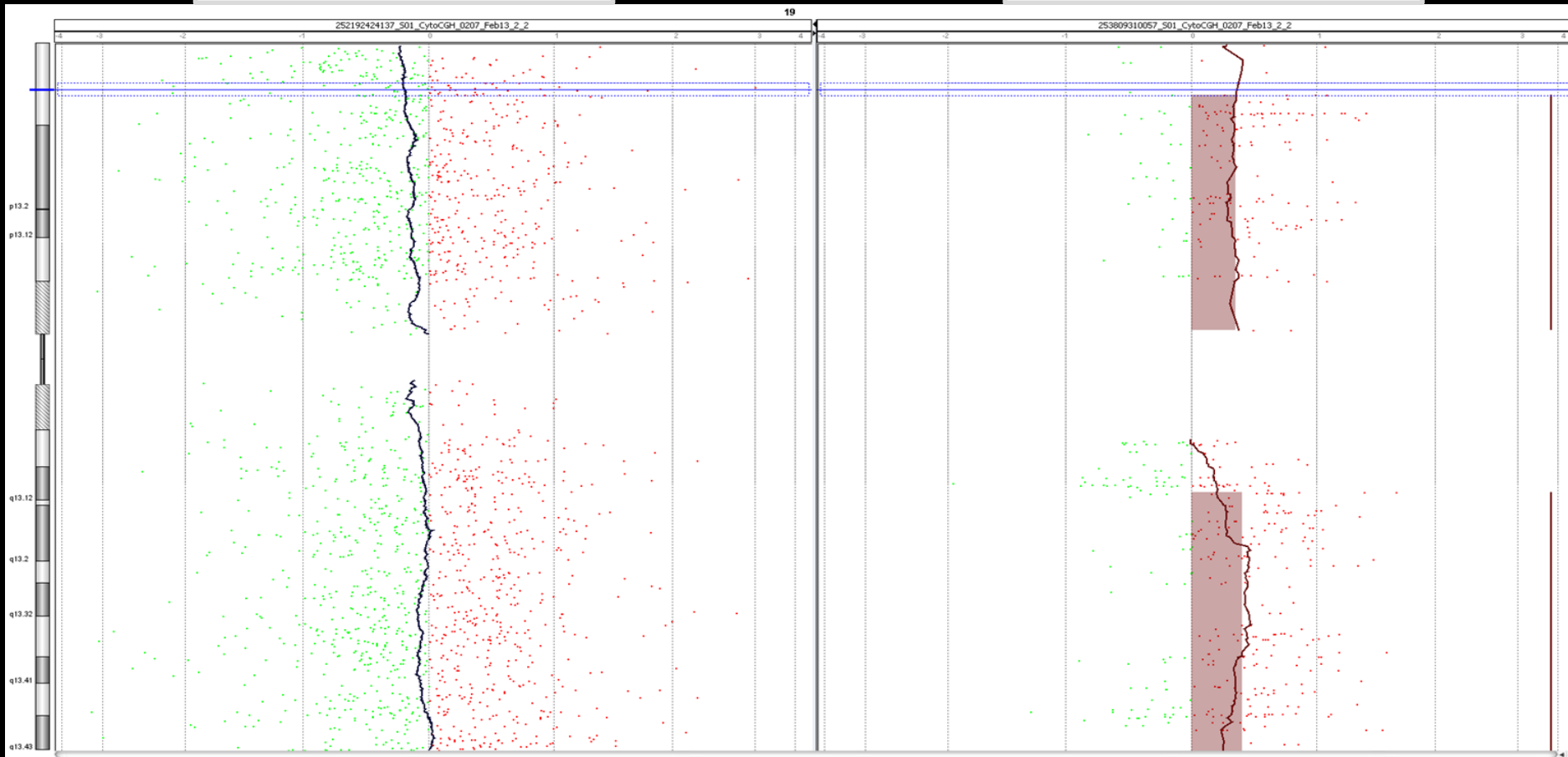
- **Materiál:** buňky z trofoektodermu 5-denních embryí
- **Amplifikační protokol:** PicoPLEX WGA Kit (Rubicon Genomics, USA)
- **Microarrays:** 8x15K - CytoSure™ Single Cell Aneuploidy Array, OGT UK
- 8x60K - Agilent SurePrint G3 Oligo CGH Microarray
- **Software:** CytoSure Interpret Software, Genomic Workbench
- **Kontrola:** hodnocení 4 zaškolení pracovníci



Porovnání profilu chromozomu 19 u na platformě Agilent a OGT

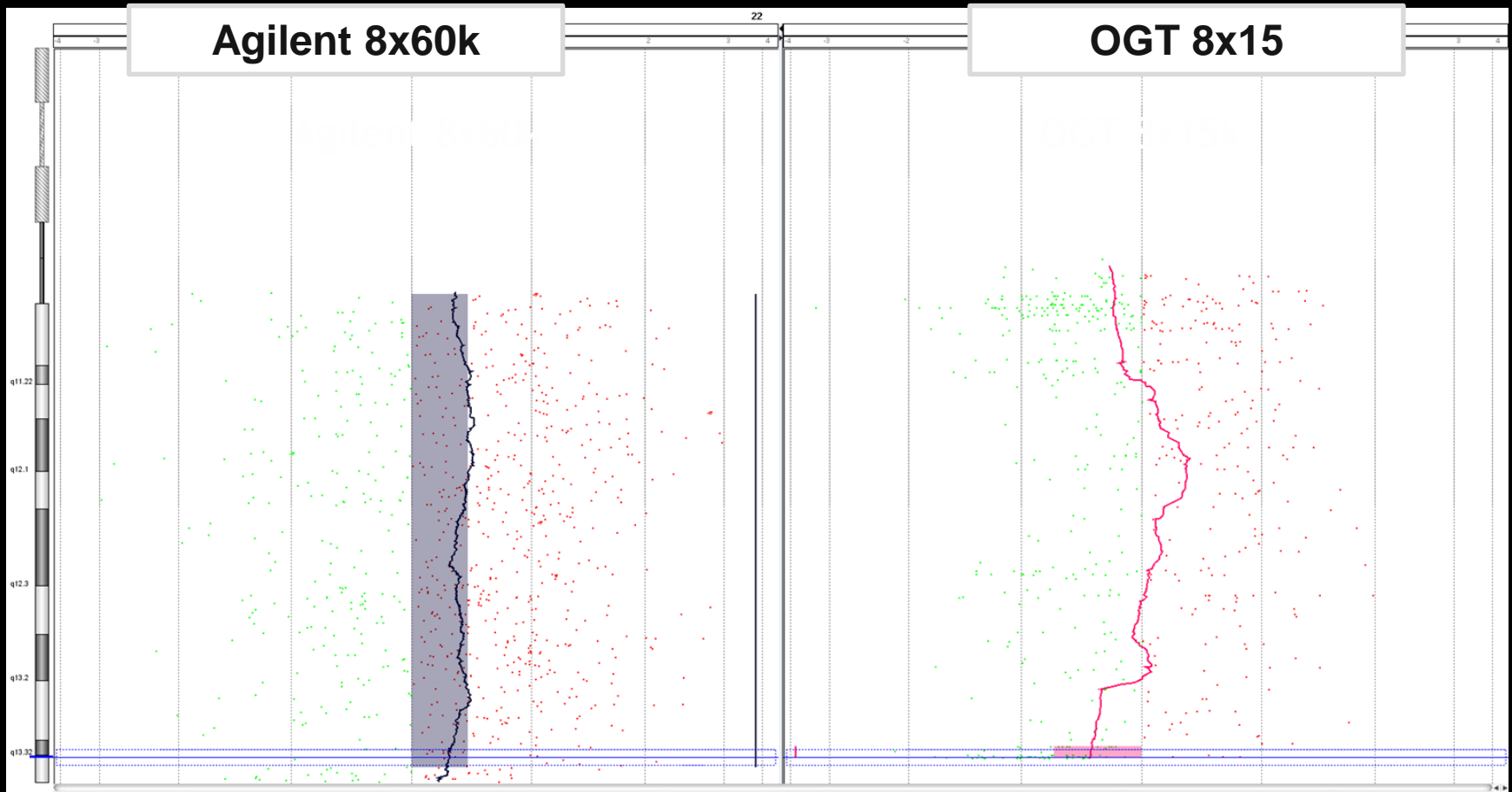
Agilent 8x60k

OGT 8x15



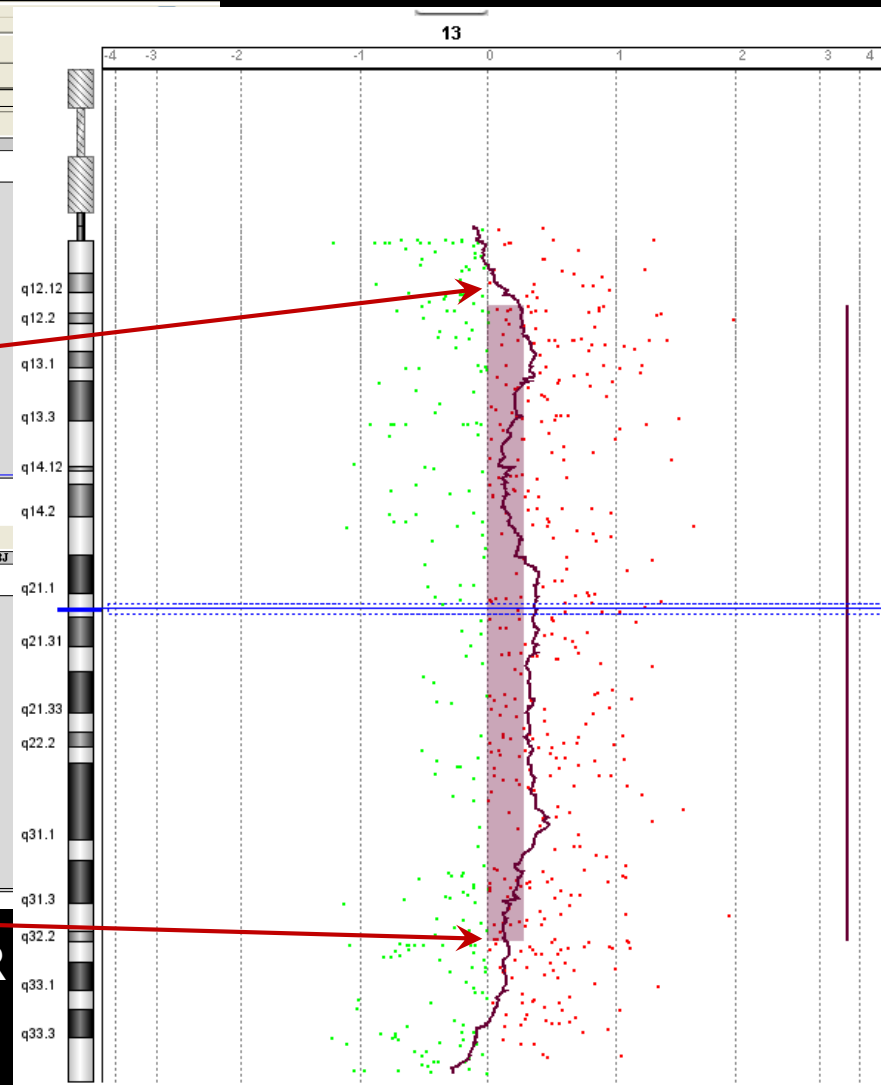
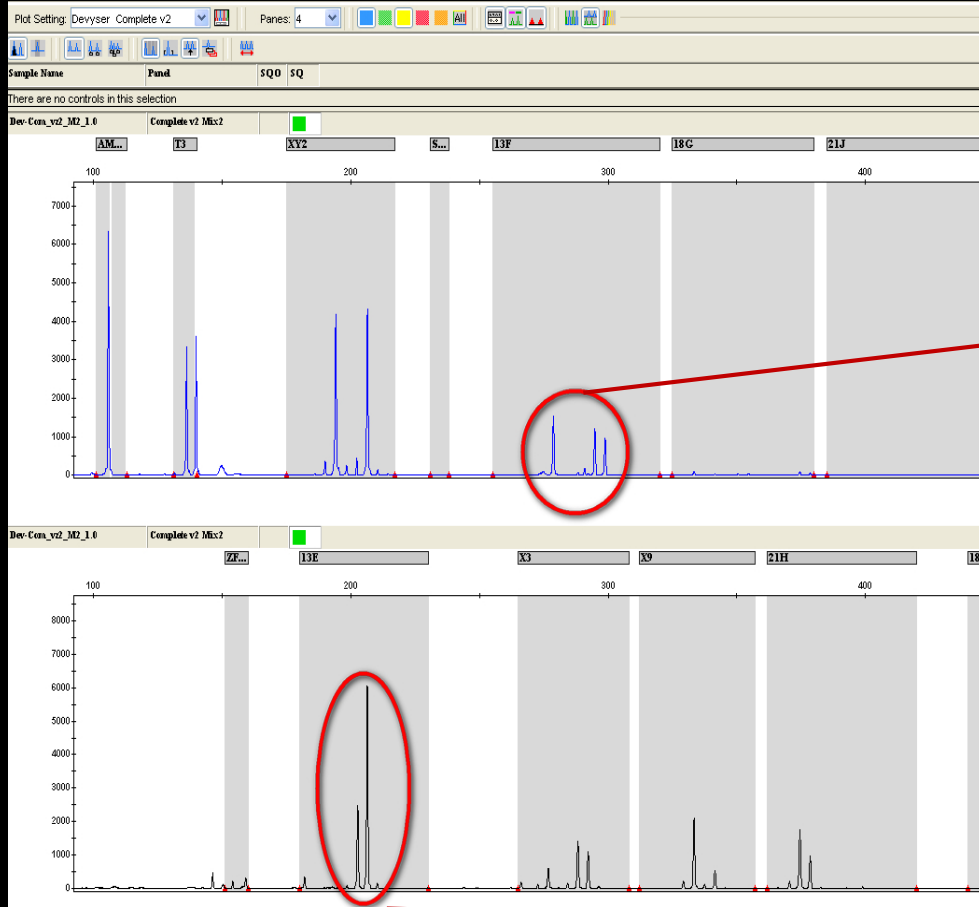
Vyšší falešná pozitivita 15k platformy, nejčastěji chr. 11, 16 a 19

Porovnání profilu chromozomu 22 na platformě Agilent a OGT



Vyšší hustota 60k microarrays dává robustnější výsledky v porovnání s 15k

Mozaicismus a verifikace výsledků u PGA



Embryo s mozaikou +13, potvrzeno QF PCR

Preimplantační genetická analýza pomocí high-resolution array-CGH

Thanks to WGA... Story of 400 Embryos

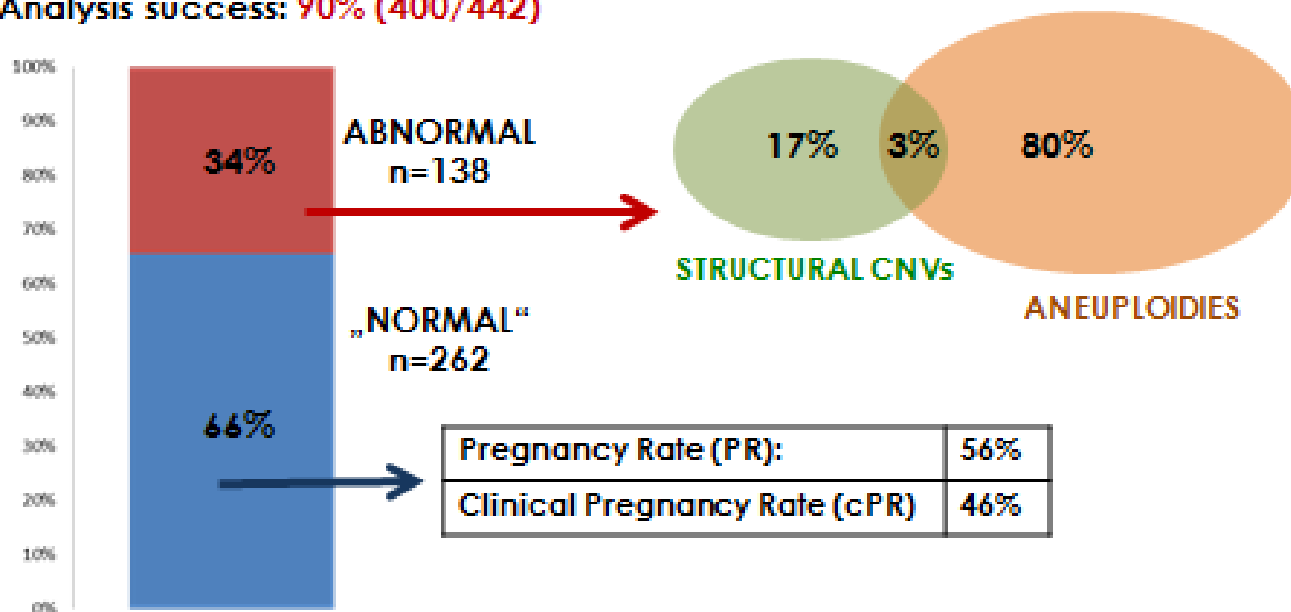
Preimplantation genetic analysis

REPROFIT

Oligonucleotide DNA microarrays platforms:

CytoSure Single Cell Aneuploidy Array	8x15K (OGT) (Resolution: 250kb)	n=222
SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit	8x60K (Agilent) (Resolution: 41kb)	n=178
		<hr/>
		n=400

Analysis success: 90% (400/442)



Mikulášová A. et al, SLG konference 2014, Praha

[Biol Reprod.](#) 2012 Dec 27;87(6):148. doi: 10.1095/biolreprod.112.103192. Print 2012 Jun.

DNA microarray reveals that high proportions of human blastocysts from women of advanced maternal age are aneuploid and mosaic.

[Liu J](#), [Wang W](#), [Sun X](#), [Liu L](#), [Jin H](#), [Li M](#), [Witz C](#), [Williams D](#), [Griffith J](#), [Skorupski J](#), [Haddad G](#), [Gill J](#).

Key Laboratory of Major Obstetrics Diseases of Guangdong Province, Guangzhou Medical College, Guangdong, China.

[Hum Reprod.](#) 2013 Jan;28(1):256-64. doi: 10.1093/humrep/des362. Epub 2012 Oct 9.

Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos.

[Mertzanidou A](#), [Wilton L](#), [Cheng J](#), [Spits C](#), [Vanneste E](#), [Moreau Y](#), [Vermeesch JR](#), [Sermon K](#).

Faculty of Medicine and Pharmacy, Research Group Reproduction & Genetics, Vrije Universiteit Brussel, 1090 Brussels, Belgium.

Human Reproduction, Vol.26, No.4 pp. 941-949, 2011

Advanced Access publication on February 2, 2011 doi:10.1093/humrep/der004

human
reproduction

CASE REPORT *Reproductive genetics*

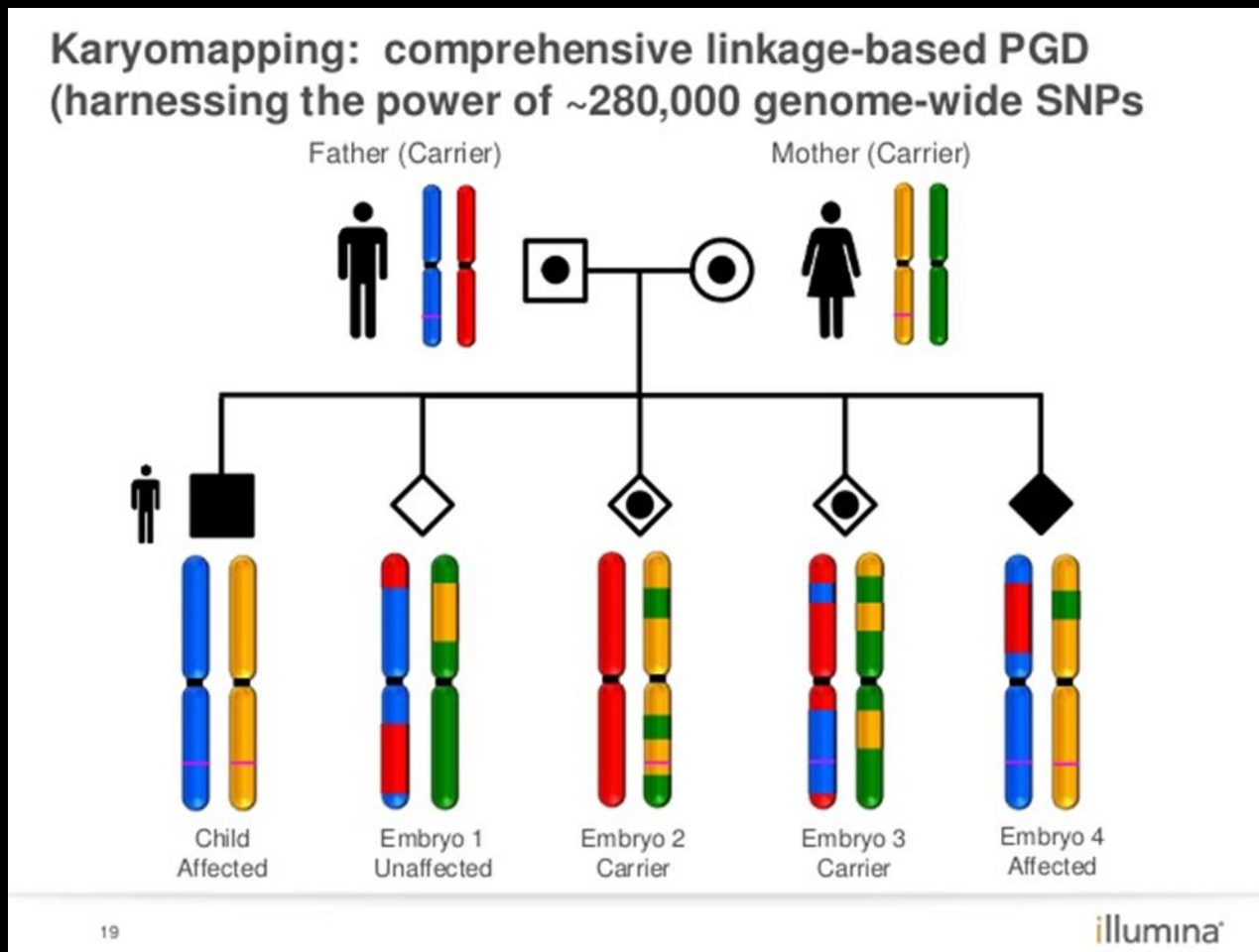
PGD for a complex chromosomal rearrangement by array comparative genomic hybridization

E. Vanneste^{1,2}, C. Melotte¹, T. Voet¹, C. Robberecht¹, S. Debrock², A. Pexsters³, C. Staessen⁴, C. Tomassetti², E. Legius¹, T. D'Hooghe², and J.R. Vermeesch^{1,*}

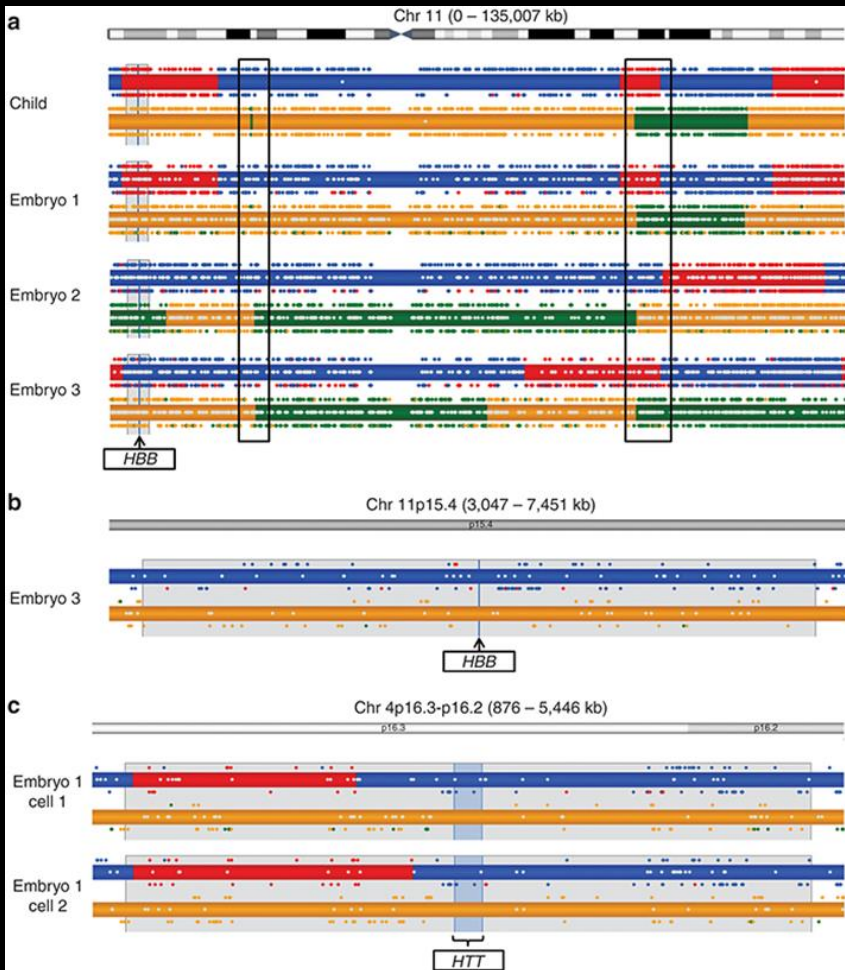


Karyomapping - SNP profilování

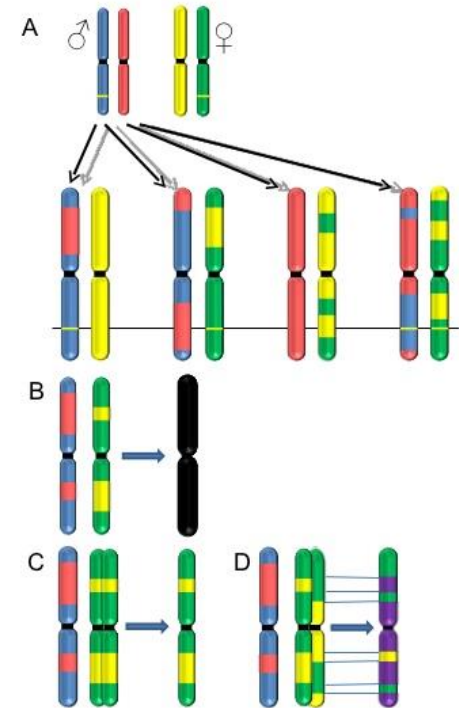
SNP profilování rodičů + embryí = komplexní pohled, monogenní choroby + detekce aneuploíí



Karyomapping - SNP profilování

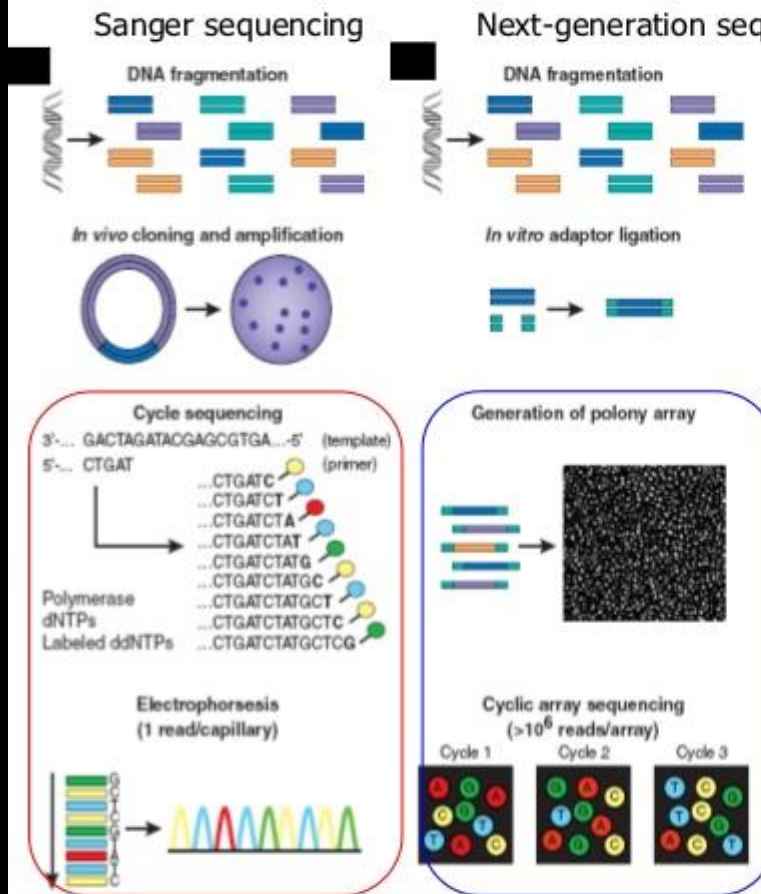


Karyomapping combines genome wide linkage based detection of single gene defects (A) with chromosomal aneuploidy including monosomy/deletions (B) and trisomies involving inheritance of two different meiotic chromosomes from one parent (D). Chromosome duplication is not detected (C).



Technologie masivního paralelního sekvenování

Next-generation DNA sequencing



Advantages:

- Construction of a sequencing library → clonal amplification to generate sequencing features
 - ✓ No in vivo cloning, transformation, colony picking...
- Array-based sequencing
 - ✓ Higher degree of parallelism than capillary-based sequencing

Technologie masivního paralelního sekvenování (NGS) v IVF

- NGS technologie se pomalu začínají prosazovat i v rámci PGS
- Zpracování většího množství vzorků v jednom experimentu v porovnávání s mikorčip. technikami
- V současné době používány na velkých IVF klinikách hlavně pro screening aneuploidií x možnosti komplexního pohledu (ploidie, strukturní změny, mutace)
- Nejčastěji forma uzavřených systémů - Illumina, Ion Torrent, nebo forma přípravy knihoven (např Agilent, Roche apod)

VeriSeq PGS (Illumina)

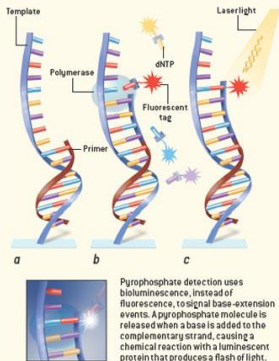


SEQUENCING BY SYNTHESIS

Most new sequencing techniques simulate aspects of natural DNA synthesis to identify the bases on a DNA strand of interest either by "base extension" or "ligation" (below). Both approaches depend on repeated cycles of chemical reactions, but the technologies lower sequencing costs and increase speed by miniaturizing equipment to reduce the amount of chemicals used in all steps and by reading millions of DNA fragments simultaneously (opposite page).

BASE EXTENSION

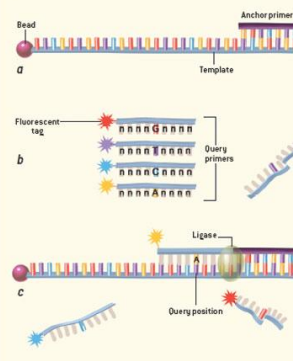
A single-stranded DNA fragment, known as the template, is anchored to a surface with the starting point of a complementary strand, called the primer, attached to one of its ends (a). When fluorescently tagged nucleotides (dNTPs) and polymerase are exposed to the template, a base complementary to the template will be added to the primer strand (b). Remaining polymerase and dNTPs are washed away, then laser light excites the fluorescent tag, revealing the identity of the newly incorporated nucleotide (c). Its fluorescent tag is then stripped away, and the process starts anew.



Pyrophosphate detection uses bioluminescence. Instead of fluorescence, a signal base-extension events. A pyrophosphate molecule is released when a base is added to the complementary strand, causing a chemical reaction with a luminescent protein that produces a flash of light.

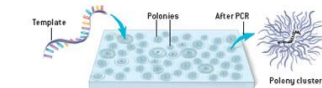
LIGATION

An "anchor primer" is attached to a single-stranded template to designate the beginning of an unknown sequence (a). Short, fluorescently labeled "query primers" are created with degenerate DNA, except for one nucleotide at the query position bearing one of the four base types (b). The enzyme ligase joins one of the query primers to the anchor primer, following base-pairing rules to match the base at the query position in the template strand (c). The anchor-query primer complex is then stripped away and the process repeated for a different position in the template.

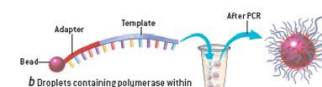


AMPLIFICATION

Because light signals are difficult to detect at the scale of a single DNA molecule, base-extension or ligation reactions are often performed on millions of copies of the same template strand simultaneously. Cell-free methods (a and b) for making these copies involve PCR on a miniaturized scale.



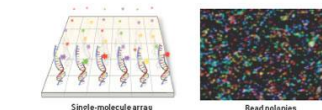
(a) Polonies—polymerase colonies—created directly on the surface of a slide or gel each contain a primer, which a template fragment can find and bind to. PCR within each polony produces a cluster containing millions of template copies.



(b) Beadplate containing polymerase within an oil emulsion can serve as tiny PCR chambers to produce bead polonies. When a template fragment attached to a bead is added to each droplet, PCR produces 10 million copies of the template, all attached to the bead.

MULTIPLEXING

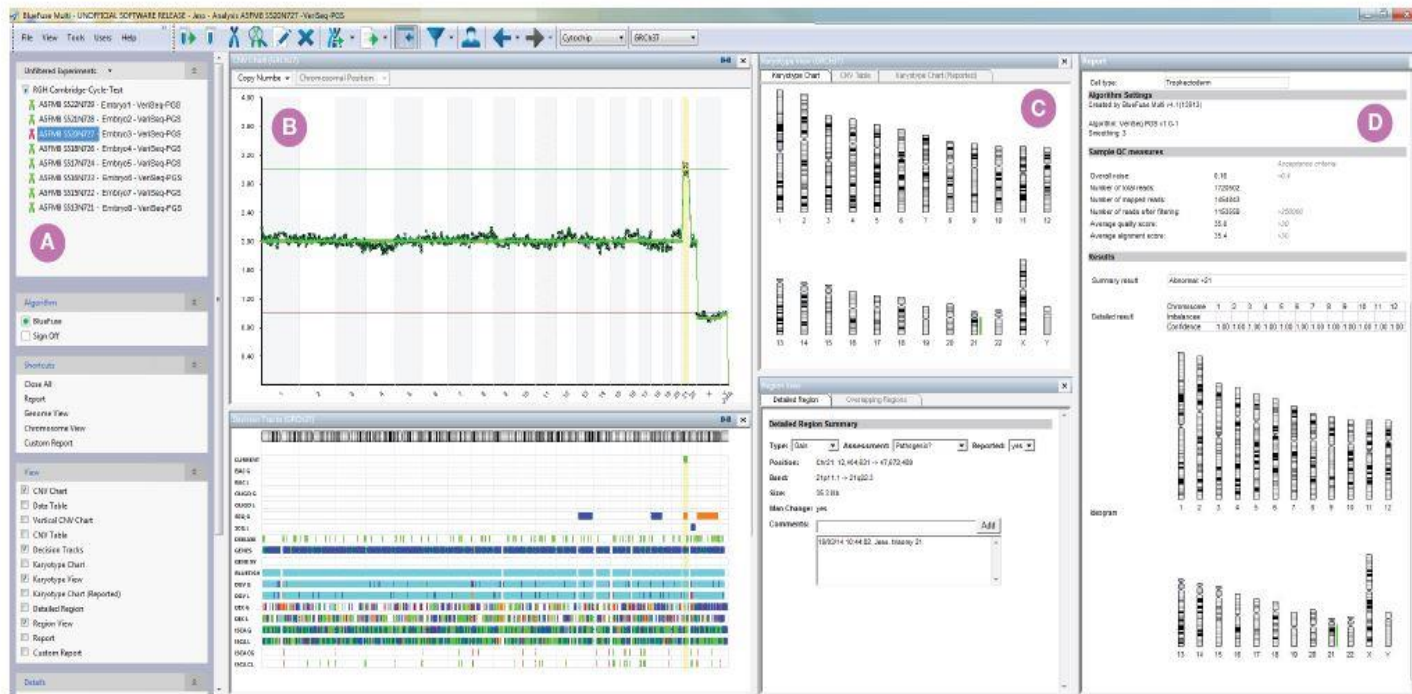
Sequencing thousands or millions of template fragments in parallel maximizes speed. A single-molecule base-extension system using fluorescence signal detection, for example, places hundreds of millions of different template fragments on a single array (below left). Another method immobilizes millions of bead polonies on a gel surface for simultaneous sequencing by ligation with fluorescence signals, shown in the image at right below, which represents 0.01 percent of the total slide area.



- Sekvence syntézou
- Detekce aneuploidii za 12 hod.
- Až 24 vzorků, rozlišení 16 Mbp

VeriSeq PGS (Illumina)

BlueFuse analytický SW

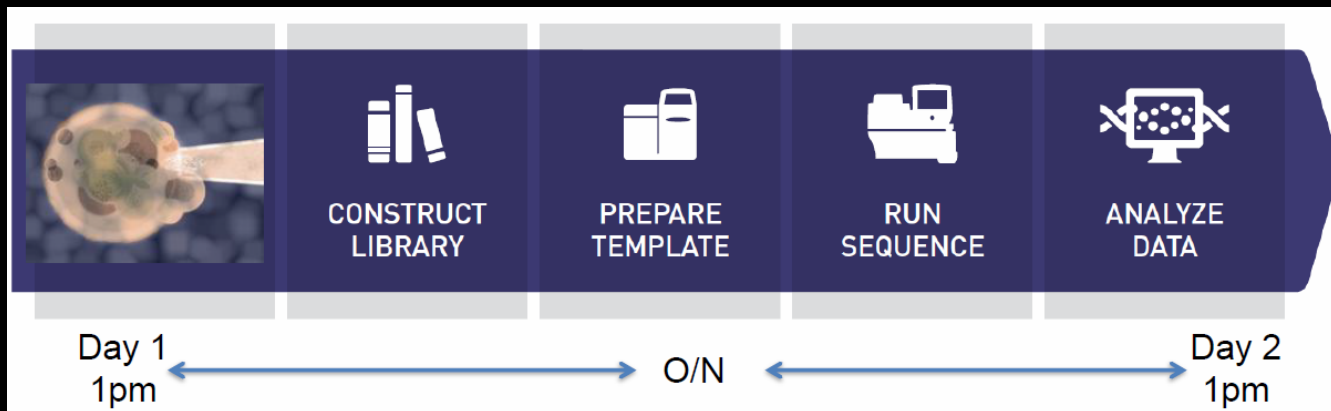
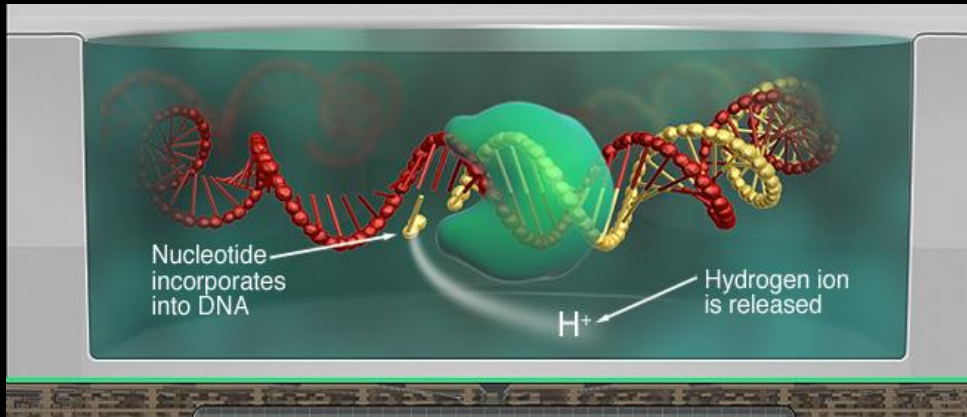


BlueFuse software provides a complete solution for analyzing, storing, and reporting VeriSeq results. A. Sample database shows experimental information. B. Profiles for the sample (top) and DecisionTrack information (bottom). C. Karyotype chart for whole-genome view (top) and region view with the opportunity to annotate (bottom). D. Reports per embryo or per cycle (embryo report shown).



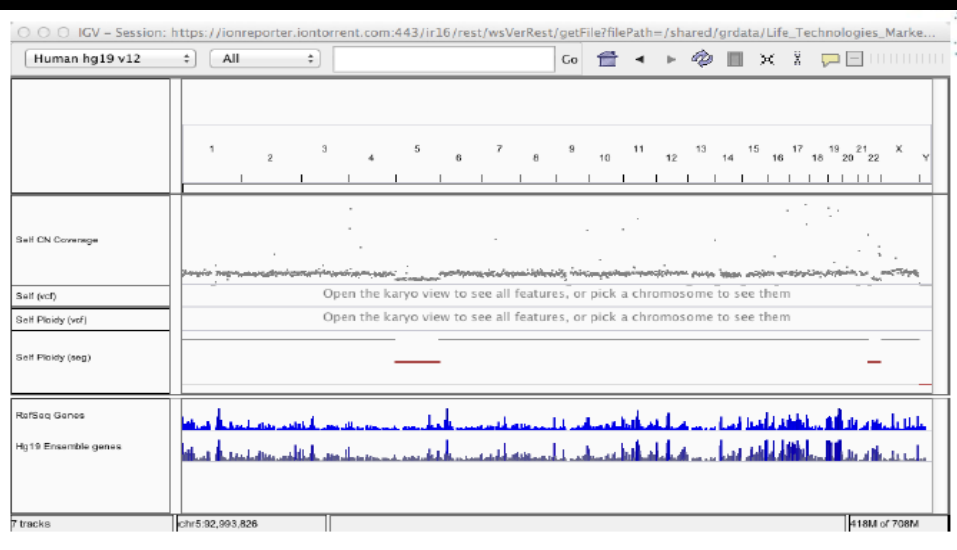
Ion Torrent Aneuploidy Analysis

(Life Tech Inc.)



Ion Torrent Aneuploidy Analysis

- Protokol do 24 hodin
- Rozlišení ~ 10 Mbp
- Cena 70\$ / embryo při 32 společné analýze 32 embryí



NGS u PGD

- Technologie budoucnosti
- Rutinnímu využití zatím brání cenové náklady a algoritmus v laboratořích (3 vs. 5 denní embrya, technologie vitrifikace apod.)
- Vývoj - detekce na exomové úrovni - „all in“
= CHA, mutace pro monogení choroby
- V současné době probíhají validační studie

NGS u PGD

Agilent OneSeq Target Enrichment

Detekce CNAs, LOH a mutací v rámci jednoho experimentu

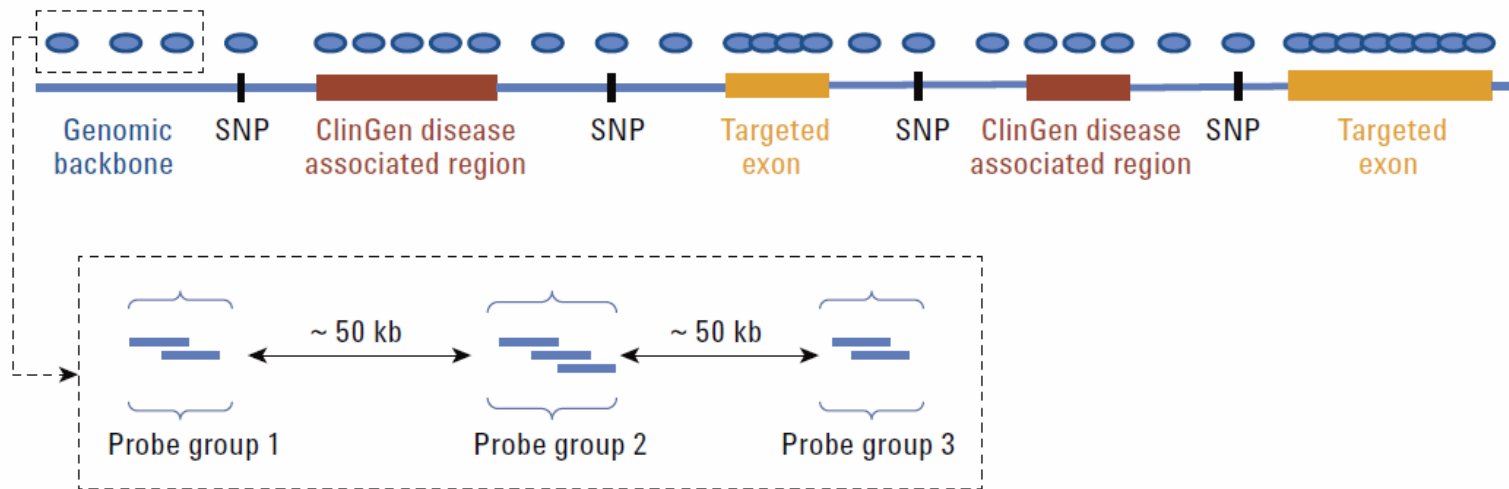


Figure 1. Bait design schema used for OneSeq target enrichment.

Knihovna: 60 Mbp / vzorek: 300 kbp rozlišení, LOH oblasti od 5 Mp, exomový panel klinicky významných mutací

NGS u PGD

Display Settings: Abstract

Send to:

Fertil Steril. 2013 Apr;99(5):1377-1384.e6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.018. Epub 2013 Jan 9.

Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease.

Treff NR¹, Fedick A, Tao X, Devkota B, Taylor D, Scott RT Jr.

Author information

Abstract

OBJECTIVE: To investigate the applicability of next-generation sequencing (NGS) to preimplantation genetic diagnosis (PGD); to evaluate semiconductor-based NGS for genetic analysis of human embryos.

DESIGN: Blinded.

SETTING: Academic center for reproductive medicine.

PATIENT(S): Six couples at risk of transmitting single-gene disorders to their offspring.

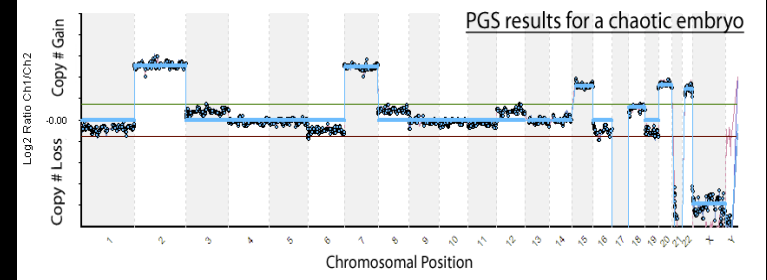
INTERVENTION(S): None.

MAIN OUTCOME MEASURE(S): Embryonic genotype consistency of NGS with two independent conventional methods of PGD.

RESULT(S): NGS provided 100% equivalent PGD diagnoses of compound point mutations and small deletions and insertions compared with both reference laboratory- and internally developed quantitative polymerase chain reaction (qPCR)-based analyses. Furthermore, NGS single-gene disorder screening could be performed in parallel with qPCR-based comprehensive chromosome screening.

CONCLUSION(S): NGS can provide blastocyst PGD results with a high level of consistency with established methodologies. This study and its design could serve as a model for further development of this important and emerging technology.

Copyright © 2013 American Society for Reproductive Medicine. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.



Display Settings: Abstract

Send to:

Fertil Steril. 2014 May;101(5):1375-82. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.01.051. Epub 2014 Mar 6.

Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos.

Florentino F¹, Biricik A², Bono S², Spizzichino L², Cotroneo E², Cottone G², Kokocinski E³, Michel CE³.

Author information

Abstract

OBJECTIVE: To validate a next-generation sequencing (NGS)-based method for 24-chromosome aneuploidy screening and to investigate its applicability to preimplantation genetic screening (PGS).

DESIGN: Retrospective blinded study.

SETTING: Reference laboratory.

PATIENT(S): Karyotypically defined chromosomally abnormal single cells and whole-genome amplification (WGA) products, previously analyzed by array comparative genomic hybridization (array-CGH), selected from 68 clinical PGS cycles with embryos biopsied at cleavage stage.

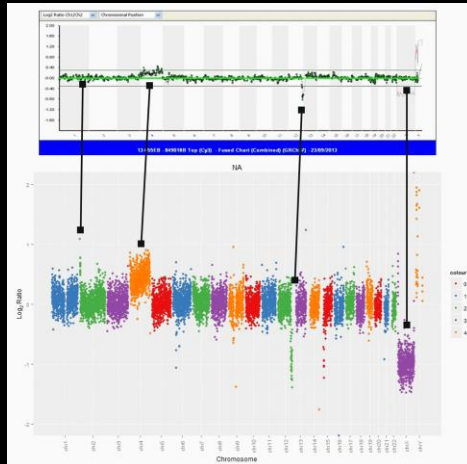
INTERVENTION(S): None.

MAIN OUTCOME MEASURE(S): Consistency of NGS-based diagnosis of aneuploidy compared with either conventional karyotyping of single cells or array-CGH diagnoses of single blastomeres.

RESULT(S): Eighteen single cells and 190 WGA products from single blastomeres, were blindly evaluated with the NGS-based protocol. In total, 4,992 chromosomes were assessed, 402 of which carried a copy number imbalance. NGS specificity for aneuploidy call (consistency of chromosome copy number assignment) was 99.98% (95% confidence interval [CI] 99.88%-100%) with a sensitivity of 100% (95% CI 99.08%-100%). NGS specificity for aneuploid embryo call (24-chromosome diagnosis consistency) was 100% (95% CI 94.59%-100%) with a sensitivity of 100% (95% CI 97.39%-100%).

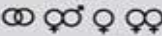

























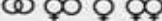


















































CONCLUSION(S): This is the first study reporting extensive preclinical validation and accuracy assessment of NGS-based comprehensive aneuploidy screening on single cells. Given the high level of consistency with an established methodology, such as array-CGH, NGS has demonstrated a robust high-throughput methodology ready for clinical application in reproductive medicine, with potential advantages of reduced costs and enhanced precision.








Copyright © 2014 American Society for Reproductive Medicine. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.



Legislative a IVF

Different countries, different rules

	PROSPECTIVE PARENTS 	NATIONAL HEALTH INSURANCE COVERAGE	SPERM DONATION for IVF*	OVUM DONATION for IVF	ICSI**	GENETIC TESTING***
National regulations by statute						
BELGIUM		full coverage				
GERMANY		partial coverage				
FRANCE		full coverage				
GREAT BRITAIN		partial coverage				
ISRAEL		full coverage				
ITALY		partial coverage				 ****
NETHERLANDS		partial coverage				
AUSTRIA		partial coverage				no info
RUSSIA		no coverage				
SPAIN		partial coverage				
SWEDEN		full coverage				
TURKEY		partial coverage				
National regulations by guidelines						
CHINA		no coverage			no info	no info
INDIA		no coverage				
JAPAN		no info available				
USA		no coverage				

 Marriage
  common-law relationship
  single women
  lesbians
  permitted and used
  not permitted
  permitted, but not used

Source: IFFS Survey 07, Fertility and Sterility
 *in-vitro-Fertilization
 **Intracytoplasmic sperm injection
 ***Preimplantation diagnostics
 **** limited use permitted since 2008

- <http://www.pharmaceutical-int.com/article/co2-incubator-for-in-vitro-fertilisation.html>

PGD a embryotransfer

PGD

- ČR: povolena Německo, Švýcarsko: nepovolena

Embryotransfer (ET):

- ČR: max 1 embryo, USA 2-5, některé země neomezeno,
- Vyšší počet embryí - nižší porodní váha, nezralost, zvýš. péče, sociální problémy

Kryokonzervace: ČR povolena

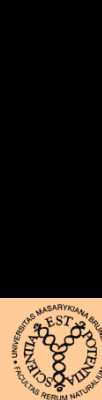
po IVF riziko SA 5%, vícečetné gravidity SA 50%

Fetoredukce: nad 3 plody v ČR povolena

Náhradní matka: v ČR nepovoleno zákonem, biolog. matka

Etické aspekty

- Pokrok technologií asistované reprodukce a prenatální a preimplantační diagnostiky vyžaduje úpravu etických a právních norem, které by bránily jejich zneužití a umožnily naopak jejich využití v prevenci
- Zabránění neodůvodněným genetickým manipulacím...volba pohlaví ?



Po PGD...

Po provedení PGD by měly být výsledky konzultovány s klinickým genetikem

+

Měla by být provedena kontrola pomocí prenatální genetické diagnostiky

Rozhodnutí vždy přísluší rodině.





Děkuji za pozornost