



FERTILITY VISION 2019

AKTUÁLNÍ KONTROVERZE A NOVÉ SMĚRY V PREIMPLANTAČNÍM GENETICKÉM TESTOVÁNÍ EMBRYÍ

Mgr. Jakub Horák, Ph.D.



REPROMEDA
BIOLOGY PARK

1. mezinárodní kongres asistované reprodukce a genetiky
3.-4. 5., Hradec Králové, Česká republika



PGD/PGS - JAK TO BYLO?

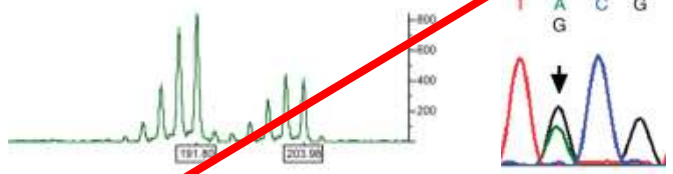
Preimplantační genetická diagnostika (PGD)

- cíleně zaměřené vyšetření k detekci předem známé mutace (monogenní choroby), nebo chromozomové aberace (translokace, inverze, atd.)

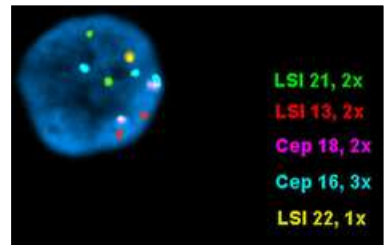
Preimplantační genetický screening (PGS)

- obecně zaměřené vyšetření k odhalení aneuploidií, které se velmi často vyskytují u lidských embryí a jsou nejčastější příčinou neúspěchu IVF

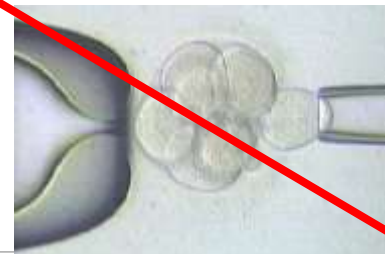
PCR



FISH



- Blastomera
- Výsledky do 48 hodin
- Čerstvý transfer





JAK TO JE? PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÉ TESTOVÁNÍ (PGT)

PGT-A = preimplantační genetické testování aneuploidií.

- Všechny chromozomy, segmentální aneuploidie, mozaicismus.

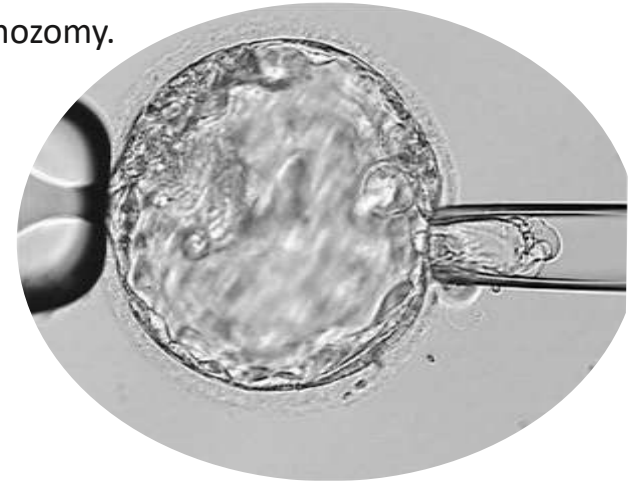
PGT-SR = preimplantační genetické testování strukturních aberací.

- Nositelé balancovaných chromozomových aberací – translokace, inverze, aj.

PGT-M = preimplantační genetické testování monogenních chorob.

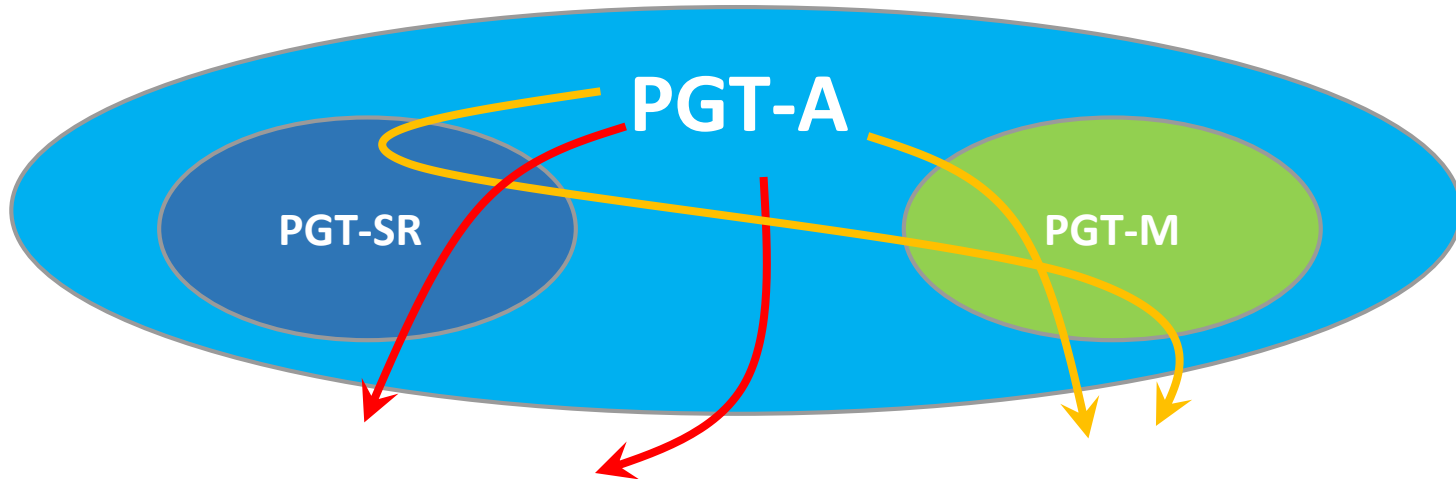
- Nositelé mutací – recesivních, dominantních, vázaných na pohlavní chromozomy.

- **Biopsie trofektodermu u blastocysty den 5/6.**
- **Vitrifikace embrya, genetické testování (do 1 měsíce).**
- **KET v některém z dalších cyklů.**





PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÉ TESTOVÁNÍ (PGT)



NGS – next generation sequencing
(MPS – massive parallel sequencing)



MiSeq (PG-Seq, VeriSeq)

SNP analýza - karyomapping



iScan (SNP array)



BIOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA VZORKU PRO PGT-A

Biopsie trofektodermu u blastocysty den 5/6



euploidní x aneuploidní gamety

*chyby v prvních mitózách
nestabilita genomu*

5-10 buněk

jedna buněčná linie

více buněčných linií

euploidní embryo

aneuploidní embryo

mozaicistní embryo

zdravé dítě

potrat

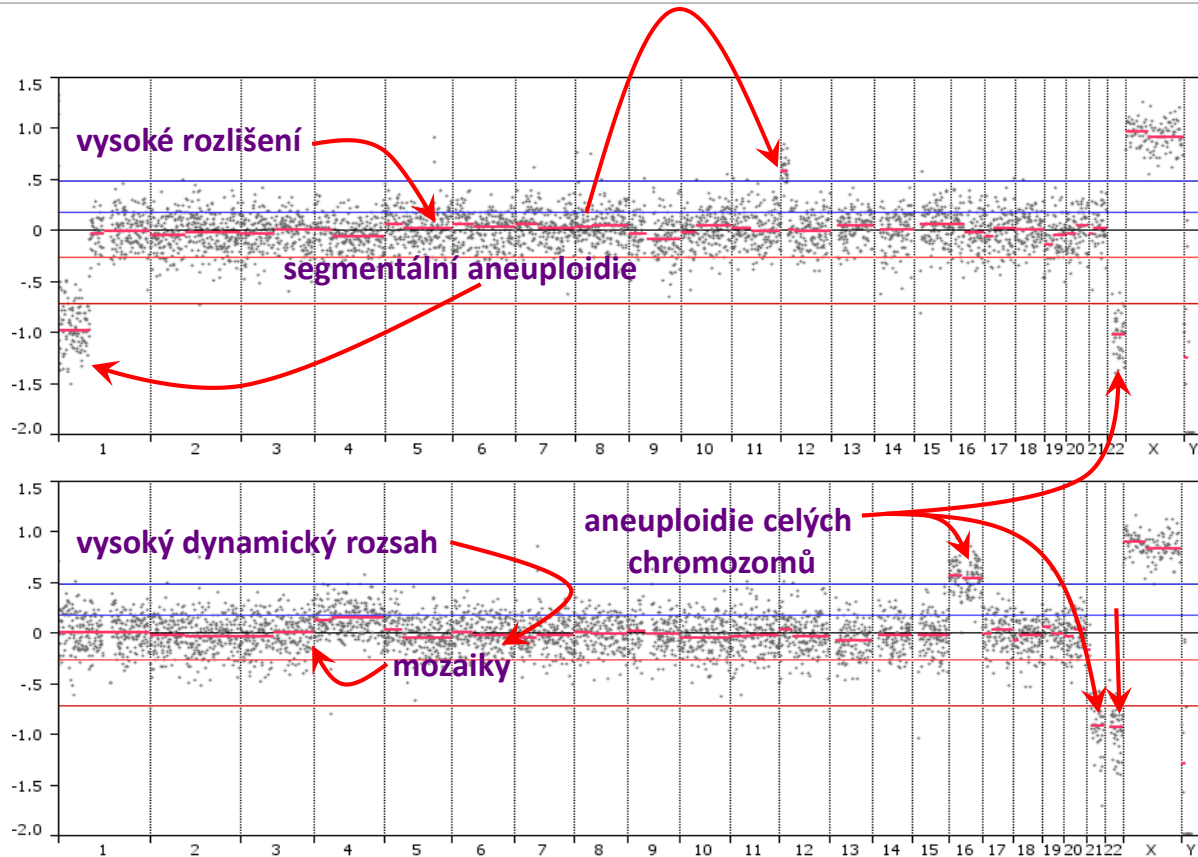
postižené dítě

zdravé dítě

potrat



PGT-A, SR METODOU NGS/MPS



Kategorie výsledků

Aneuploidní

celé chromozomy
segmentální

Mozaicistní

celé chromozomy
segmentální

Euploidní

nelze vyloučit
mozaiky (<50%)



CÍLE A ÚSKALÍ PGT-A

Preimplantační genetické testování aneuploidií

- Výběr euploidního embrya.

↑ implantace + ↓ potraty = ↑ úspěšnost IVF (na ET)

- **Nevylučovat perspektivní embrya z transferu** (chybová laboratorní metoda, nevhodná interpretace výsledků).

↓ falešná negativita

- Misdiagnóza.
- Právní důsledky.



↓ falešná pozitivita

- Vyřazení perspektivních embryí z transferu.
- Chybná kategorizace nálezu:
 - ✓ Mozaiky,
 - ✓ segmentální aneuploidie,



JAK NEPOCHOPENÍ NUTNOSTI MAXIMÁLNĚ SNÍŽIT FALEŠNOU POZITIVITU NIČÍ POVĚST PGT-A I DŮVĚRU V NĚJ



Annual 2019 Conference of the Foundation for Reproductive Medicine

TRANSLATIONAL REPRODUCTIVE BIOLOGY AND CLINICAL REPRODUCTIVE ENDOCRINOLOGY

"Think differently" and "Paradigm changes you will hear here first"

November 21-24, 2019 | New York, USA

Beyond the individualization of egg retrieval, the “Thinking differently in clinical practice II” session includes:

- Universal trend toward eSET is self-defeating for IVF
- PGS/PGT-A actually reduces live birth chances in most patients
- High false positive diagnoses with PGT-A and hundreds of chromosomally normal births



JAK SE VYHNOUT FALEŠNÉ POZITIVĚ PŘI PGT-A

- 1. Respektuj biologii lidských embryí** – naprostá většina aneuploidií má svůj původ v oocytu, některé aneuploidie jsou ovšem důsledkem chyb během několika prvních mitóz a nestability genomu během časného embryonálního vývoje.
- 2. Přesně popiš nálezy u vzorku** – zaveď různé kategorie výsledků, které ti umožní přesně popsat nálezy, aby je bylo možné správně komunikovat s lékařem či (selhání amplifikace, nehodnotitelný profil, nelze vyloučit mozaiky do 50%, euploidní, aneuploidní, mozaicistní, segmentální mozaika, segmentální aneuploidie).
- 3. Nepodléhej ani strachu z právních důsledků ani tlaku zákazníka a pečuj o důvěryhodnost metody** – mozaiky nejsou kostlivcem ve skříni ani strašákem, je potřeba vysvětlit zákazníkovi (lékaři i pacientovi), jak se k nim rozumně postavit a jak si klinicky počínat (školení, vysvětlování, budování důvěry).
- 4. Vyber si přesnou platformu pro PGT-A** – nauč se ji správně používat, neustále a opakovaně si ověřuj svá hodnotící kritéria pravidelným dovyšetřením zajímavých hraničních vzorků ve spolupráci s IVF klinikou a embryology.



REPRODUKOVATELNOST RŮZNÝCH KATEGORIÍ NÁLEZŮ U VZORKŮ TROFEKTODERMU A ZBYTKU EMBRYA

- PG-Seq™ (Perkin Elmer), vyhodnocení pomocí softwaru Nexus (BioDiscovery).
- Původní trofektodermu (**TE1**) vyšetřený VeriSeq (Illumina)™ → **PG-Seq**™ re-analýza.

Pacienti	65		
Vzorky	89		
Euploidní	18		
Aneuploidní	65	celé	42
		segmentální	23
Mozaicistní	5	celé	2
		segmentální	3

Nálezy	
Aneuploidie	62
Segmentální	33
Mozaiky	26
Segmentální mozaiky	7

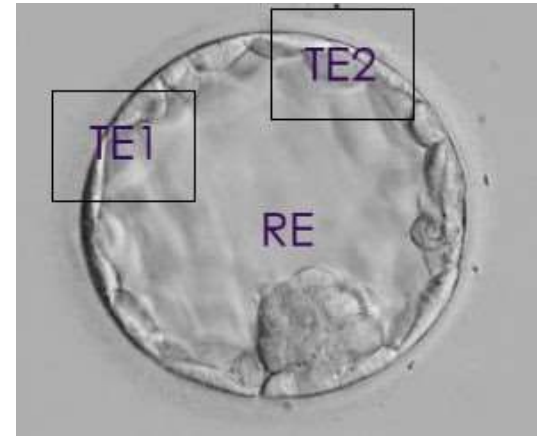
- Druhý vzorek trofektodermu (**TE2**) a zbytek embrya (**RE**) zahrnující ICM byly analyzovány platformou **PG-Seq**™.



VÝSLEDKY

Embryo category	TE1	TE2	RE
Total	89		
Euploid	18	30	30
Aneuploid	66	55	53
Mosaic	5	4	6

Errors overview	TE1	TE2	RE
Aneuploidies	62	65	63
Segmentals	33	16	19
Mosaics	26	9	20
Segmental mosaics	7	8	6

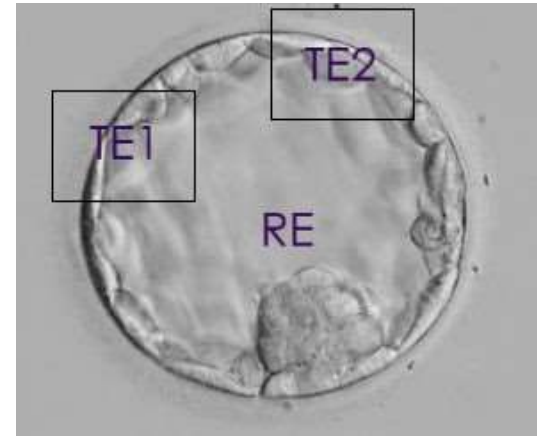




VÝSLEDKY

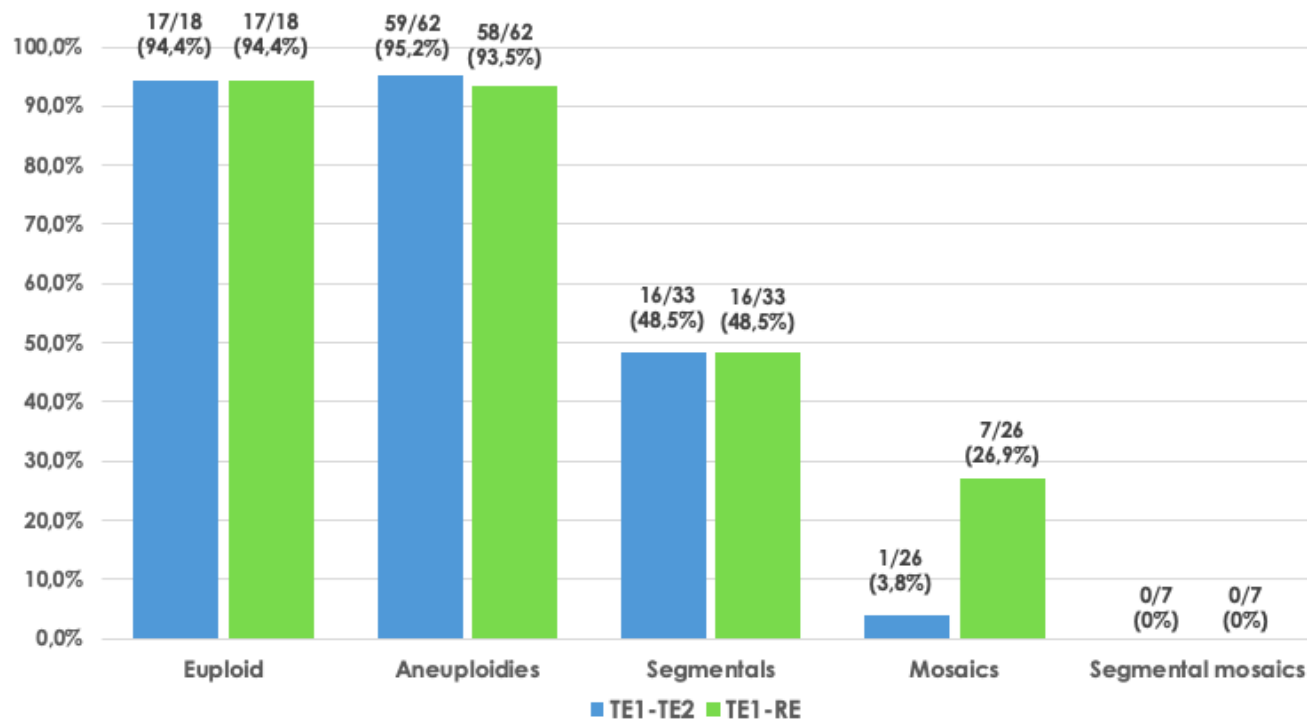
Embryo category	TE1	TE2	RE
Total	89		
Euploid	18	30	30
Aneuploid	66	55	53
Mosaic	5	4	6

Errors overview	TE1	TE2	RE
Aneuploidies	62	65	63
Segmentals	33	16	19
Mosaics	26	9	20
Segmental mosaics	7	8	6



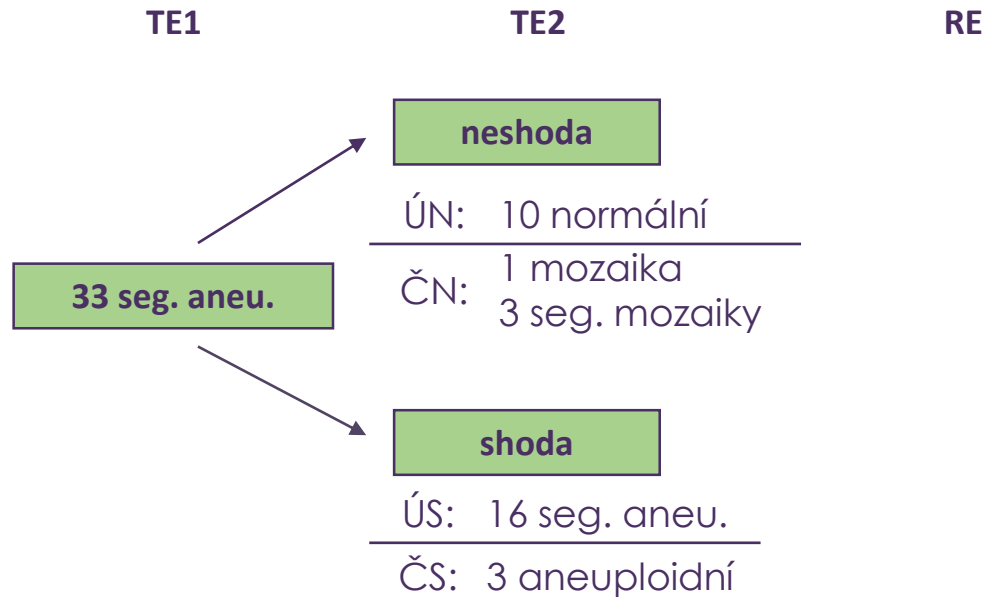


VÝSLEDKY – KONKORDANCE U RŮZNÝCH NÁLEZŮ



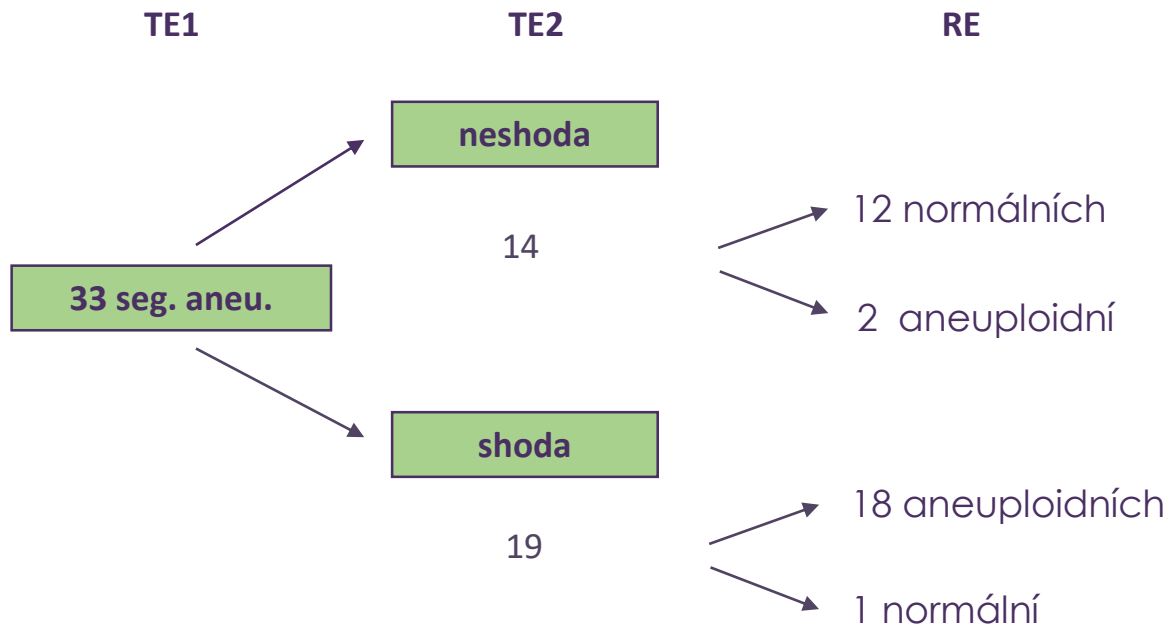


SEGMENTÁLNÍ ANEUPLOIDIE - REPRODUKOVATELNOST



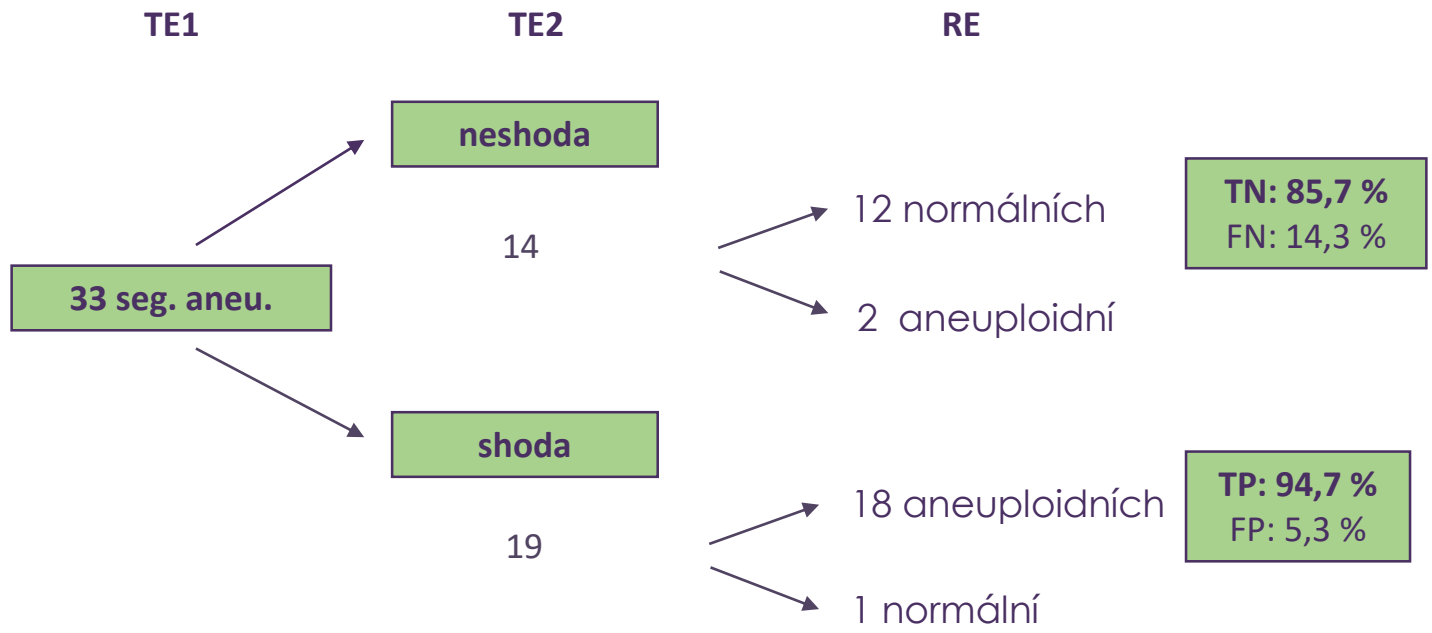


SEGMENTÁLNÍ ANEUPLOIDIE - REPRODUKOVATELNOST



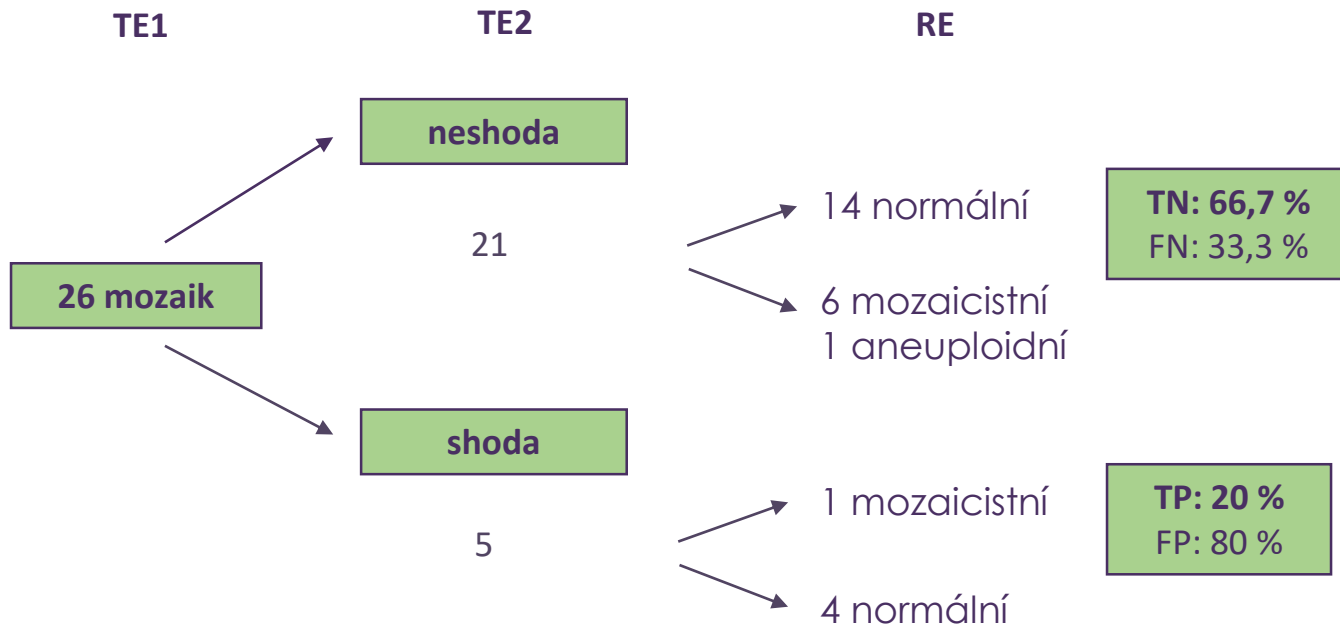


SEGMENTÁLNÍ ANEUPLOIDIE - REPRODUKOVATELNOST





CELOCHROMOZOMOVÉ MOZAIKY - REPRODUKOVATELNOST



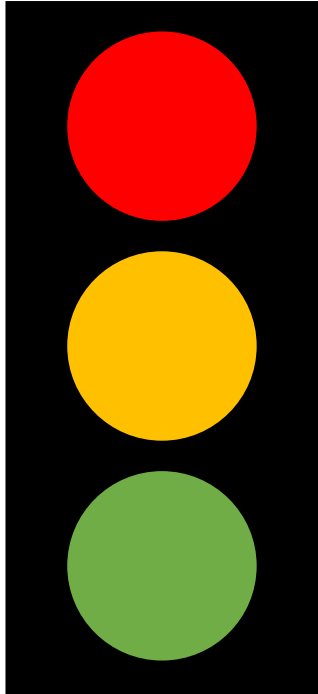
ZÁVĚRY



- PGT-A je vyšetřením, které má vysokou diagnostickou spolehlivost a prediktivní hodnotu (97%) pro euploidní embrya a aneuploidie celých chromozomů.
- Mozaiky celých chromozomů mají nízkou konkordanci mezi dvěma vzorky trofektodermu a mají tudíž nízkou reprodukovatelnost také vzhledem ke zbytku embrya.
- Polovina segmentálních aneuploidií jsou ve skutečnosti mozaiky a vyšetřením druhého vzorku trofektodermu je možné tato perspektivní embrya odlišit od neperspektivních s aneuploidií přítomnou v celém embryu se spolehlivostí 95%.
- Úspěšné a správné provedení PGT-A vyžaduje spolehlivou vyšetřovací platformu a zejména zvládnutí přesné kategorizace nálezů u vzorků trofektodermu s adekvátními klinickými postupy směrem k pacientovi.



KLINICKÁ DOPORUČENÍ PRO RŮZNÉ KATEGORIE NÁLEZŮ U EMBRYÍ



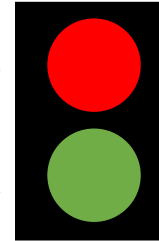
aneuploidní (aneuploidie **celých** chromozomů) → **vyřadit**

mozaicistní → transferovat / vyřadit

Doporučena konzultace
s klinickým genetikem

segmentální aneu → **rebiopsie embrya**

euploidní → transferovat



aneuploidní → **vyřadit**

euploidní → transferovat



**DĚKUJI VÁM
ZA POZORNOST**

