

PREIMPLANTAČNÍ DIAGNOSTIKA

RNDr. Renata Hüttelová, Ph.D.

Ústav pro péči o matku a dítě, Praha

Preimplantační diagnostika neboli PGD (preimplantation genetic diagnosis) byla vyvinuta jako alternativa prenatalní diagnostiky, aby se snížila možnost přenosu některých dědičných chorob na děti rodičů s genetickou zátěží. Podstatou metodiky je testování určitých genetických chyb na buňkách pocházejících z oocyty (vajíček) ženy nebo z velmi časných lidských embryí kultivovaných mimo tělo ženy v laboratorních podmínkách. Pouze „zdravá“ embrya jsou poté vrácena ženě do dělohy s reálnou nadějí na vznik těhotenství a narození zdravého dítěte.

Sama myšlenka testování velmi časných embryí není nová. Už v roce 1968 bylo úspěšně provedeno sexování (rozlišení pohlaví) králičích embryí ještě před jejich zavedením do dělohy samice. Nicméně začátky klinické aplikace PGD v humánní medicíně spadají až do konce 80. let minulého století a první dítě po PGD spatřilo světlo světa v roce 1992. Ačkoliv preimplantační testování je rutinně používáno v živočišné výrobě pro produkci zvířat určitého pohlaví, použití PGD u lidí podléhá různým regulím s cílem zabránit jejímu využití pro eugenickou selekci. Ve Velké Británii podléhá PGD (a stejně tak i všechny techniky uplatňované při mimotělním oplodnění) přísným pravidlům zakotveným v dokumentu z roku 1990 (The Human Fertilization and Embryology Act). Podle něho může být PGD uplatněna pouze v případech vážných genetických onemocnění a nikoliv z důvodů sociálních (tj. např. pro páry, které již mají děti stejného pohlaví a přáli by si potomka opačného pohlaví). Zatímco ve Francii má povolení provádět PGD jen několik málo center asistované reprodukce, v Argentině, Rakousku, Švýcarsku a Taiwanu není povolena vůbec. V Německu se možnost provádění PGD diskutuje v parlamentu, ale zatím je zakázána. Naopak v Itálii, kde byla PGD ještě donedávna možná, vstoupil v loňském roce v platnost nový zákon upravující podmínky pro práci s časnými lidskými embryi, který provedení PGD neumožňuje. Žádné legislativní normy neupravují použití PGD v USA. V České republice není žádný právní předpis upravující použití PGD. Většina laboratoří se ale řídí doporučeními upravujícími používání techniky PGD, které vydalo evropské konsorcium. Ještě před tím, než existovala možnost PGD, byly páry s genetickou zátěží odkázány na prenatalní diagnostiku během již probíhajícího těhotenství s vyhlídkou na jeho případné umělé přerušení, jestliže bylo prokázáno poškození plodu. Takové rozhodnutí pro pár není lehké a může vést i k psychickým problémům. U některých párů ukončení těhotenství nepřichází do úvahy z osobních či náboženských důvodů. Valná většina z nich pak nechce riskovat další těhotenství s podobným osudem. Některé páry mohou volit možnost použití darovaných pohlavních buněk (ať už spermií či vajíček) nebo adopci. Jiné páry volí raději život bez dětí, než riskovat narození nemocného dítěte. Pro tyto páry je dnes východiskem právě PGD.

Genetické chyby, u nichž je možno využít PGD, můžeme rozdělit do 3 skupin. První je kategorie genových mutací. Podmínkou je, že známe mutaci (chybu v zápise genu) způsobující chorobu a známe její umístění v rámci celého genetického zápisu a umíme ji najít. Zjednodušeně řečeno, existují sondy (značky), které hledanou mutaci dokáží najít mezi ostatními geny a přichytí se na ni. Druhou kategorií tvoří choroby vázané na pohlaví. Tady často ani neznáme genovou chybu, která nemoc způsobuje, ale výskyt onemocnění je striktně vázán na jedno pohlaví. Onemocnění je pak

eliminováno výběrem embrya druhého pohlaví. Do třetí, poslední, skupiny spadají choroby, způsobené chromosomálními translokacemi (výměna určitých částí mezi 2 nesesterskými chromosomy).

Jak už bylo výše řečeno, podmínkou PGD je odebrání ženských pohlavních buněk, jejich oplození a kultivace vzniklých embryí v laboratorních podmínkách. Buněčný materiál, na němž má být provedena genetická analýza, pak lze získat trojím způsobem.

Nejčastěji používaná technika je odběr (biopsie) 1 až 2 buněk z časného 8–12 buněčného embrya. Embryo je v této době (72 hodin po oplození) tvořeno samostatnými totipotentními buňkami (každá buňka má schopnost vytvořit jakýkoliv typ buněk lidského organismu, na rozdíl od pozdějších stadií, kdy je u každé buňky již určeno k čemu bude sloužit). Odebráním 1–2 buněk v tomto stádiu není narušen vývojový potenciál embrya a toto je schopno se nadále vyvíjet bez velkých obtíží. Biopsií u dvou- či čtyřbuněčných embryí bychom způsobili ztrátu velké části buněčné masy, čímž je narušen vývojový potenciál embryí a proto se neprovádí. Naopak u embryí majících více než 16 buněk je biopsie velice obtížná a může vést opět k poškození embrya, neboť buňky v této době jsou již navzájem propojeny a není snadné je od sebe oddělit. Proto se biopsie u těchto embryí rovněž neprovádí.

Embryo určené k biopsii je pod mikroskopem při velkém zvětšení zafixováno v určité pozici přísátím ke speciální skleněné mikropipetě. Glykoproteinový plášť obklopující embryo (zóna pellucida) je otevřen buď pomocí laserového paprsku nebo působením kyselého roztoku, případně je rozříznut tenkou skleněnou mikro Jehlou. Tímto otvorem je přímo k jedné z buněk zavedena bioptická mikropipeta, která jemným sáním buňku uvolní z embrya. Buňka je pak fixována na podložní sklo nebo je přenesena na dno mikroskopové misky. Záleží na tom, jaká metoda genetické analýzy má být použita. Poté je předána do genetické laboratoře ke zpracování.

Druhým typem získávání materiálu pro genetickou analýzu je biopsie pólové buňky. Pólová buňka je malá buňka vytěsněná z vajíčka během jeho zrání a obsahuje polovinu chromozómů stejně tak jako vajíčko. Tato drobná buňka může být odebrána podobným způsobem jako při odběru buňky embrya a lze ji použít pro genetické testy. Po oplození vzniká ještě jedna pólová buňka, v níž jsou obsaženy poloviny chromozómů, které zbyly ve vajíčku. Bez jejich „vyhození“ by nemohlo dojít k propojení genetické informace od matky a od otce. I tato druhá pólová buňka bývá odebrána a rovněž otestována. Výhodou tohoto postupu je, že testovaná buňka není buňkou vlastního embrya, ale bohužel ho nelze použít pro vyšetření řady onemocnění.

Hlavním problémem při testování pólové buňky nebo jedné buňky embrya je velmi malé a omezené množství DNA, kterou máme otestovat. Větší množství buněk bez poškozujícího vlivu na embryo může být odebráno z vývojového stadia embrya, které se označuje jako blastocysta. Blastocysta je preimplantační embryo tvořené až 300 buňkami a vzhledově připomíná balónek, neboť uvnitř je tekutinou vyplněná dutina. Buňky jsou rozdělené do dvou skupin. Z jedné (trophectoderm) později vzniknou zárodečné obaly a ze druhé (inner cell mass) vlastní plod. Při biopsiích se pak odebírají pouze buňky trophoctodermu. Tato technika se bude pravděpodobně více využívat v blízké budoucnosti, protože v současnosti jsou stále rezervy v kultivačních systémech a množství embryí, které dosáhne stadia blastocysty je limitované. Ale stále se hledají optimální kultivační média.

Požadavky na metody genetické analýzy jsou velmi striktní. Metoda musí být efektivní už na úrovni velmi malého množství DNA, jaké obsahuje 1 buňka, neboť více buněk není k dispozici. Zároveň musí být rychlá, protože výsledek musí být znám během 12–48 hodin po biopsii, aby bylo možné stále se vyvíjející embryo přenést v pravý čas zpátky do dělohy pacientky. Je to zcela odlišná

situace než v případě prenatalní diagnostiky, kdy se pracuje až se stovkami odebraných buněk a čas v rámci hodin zde nehraje žádnou roli. V současné době jsou k dispozici 2 metody genetické analýzy s jejich různými variacemi, splňující náročné požadavky PGD.

Jednou z nich je PCR (polymerase chain reaction). Vzhledem k malému množství DNA v jedné buňce, je nemožné přímo v buňce detekovat hledanou genovou mutaci. Díky PCR je odpovídající DNA sekvence nejprve mnohonásobně amplifikována (zkopírována) a teprve potom podrobena analýze. Tato metoda se používá pro detekce onemocnění způsobené genovými mutacemi nebo pro detekci pohlavních chromosomu u chorob vázaných na pohlaví.

Druhou metodou genetické analýzy je tzv. FISH technika (fluorescence in situ hybridization). Při této metodě jsou značeny hledané chromosomy (tedy ne jednotlivé geny) různobarevnými fluorescenčními barvami. Při prohlížení ve fluorescenčním mikroskopu (oproti standardnímu optickému mikroskopu je osazen speciálními filtry a speciálním zdrojem světla) je pak možné vidět barevné signály. Každý signál odpovídá jednomu chromosomu. Tato technika se uplatňuje při detekci chorob způsobených chybením či přebýváním některého chromosomu (chromosomální aneuploidie), při určování pohlavních chromosomu u chorob vázaných na pohlaví (v těchto případech je více využívána než PCR) a s malými obměnami při detekci chromosomálních translokací.

Technika PGD s následnou FISH analýzou je v dnešní době na celém světě používána nejen pro páry s genetickou zátěží, ale rovněž pro neplodné páry podstupující IVF. PGD pak slouží k odhalení běžných nebo s věkem ženy souvisejících chromosomálních aneuploidií, které mohou způsobit neúspěch léčby nebo potraty v časných fázích těhotenství, eventuálně narození nemocného dítěte. Mezi nejsledovanější chromosomy patří pohlavní chromosomy X a Y, jejich chybění či naopak přebývání způsobuje tzv. Turnerův syndrom či Klinefelterův syndrom, chromosom 21 (Downův syndrom), dále pak chromosomy 13, 16, 18, 22. U těchto analýz však většinou mluvíme o tzv. preimplantačním screeningu aneuploidií PGS (preimplantation genetic screening), aby byly zcela jasně odlišeny důvody, proč byla PGD použita.

Samotná biopsie je náročná technika a její provedení vyžaduje zkušeného embryologa. Ovšem i další fáze PGD mají svá úskalí a omezení. Mohou nastat technické problémy, např. odebraná buňka se nedostatečně přichytí povrchu podložního skla a během dalších procedur se ze skla smyje, použité sondy se nenaváží na vazebná místa genu či chromosomu, chromosomy leží přes sebe, takže barevné signály nejsou čitelné apod. Ale také v přírodě běžně se vyskytující „odchytky od pravidel“ ztěžují získání přesných informací. V některých případech totiž embryo může obsahovat pár buněk, jejichž genetická výbava je zmatená (tzv. mozaiky), ačkoliv ostatní buňky jsou naprosto v pořádku. A je možné, že právě tuhle buňku jste získali při biopsii.

Znamená to tedy, že PGD není neomylná a je nutné s tím počítat. Pár podstupující PGD by měl být ještě před zahájením léčby podrobně informován o podstatě této metody, o jejích možnostech a rovněž o možnosti chybné analýzy. Toto riziko je však minimalizováno. Přesto se v případě těhotenství po PGD doporučuje provést ještě prenatalní diagnostiku pro potvrzení výsledku PGD. Jestliže však existuje příliš vysoké riziko chybné analýzy (to je závislé především na typu stanovovaného onemocnění), PGD se neprovádí. Rovněž je celá řada nemocí, které se – zatím – nedají pomocí PGD u embryí vyšetřit. Přesto PGD bezesporu významně zvyšuje naděje párů na dosažení těhotenství završeného porodem zdravého dítěte. A to je to nejdůležitější, co můžeme pro léčené páry udělat.

Moderní babictví 6, 2005

Literatura u autora.

*Renata Hüttelová
Podolské nám. 157
147 00 Praha 4*