

Preimplantacijsko genetsko testiranje

Marinović, Dunja

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:350924>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine
Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Dunja Marinović

Preimplantacijsko genetsko testiranje

Diplomski rad



Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za humanu reprodukciju Klinike za ženske bolesti i porode, KBC Zagreb, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Lana Škrgatić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2023./2024.

Popis i objašnjenje kratica korištenih u radu:

PGT – engl. *preimplantation genetic testing*; preimplantacijsko genetsko testiranje

IVF – engl. *in vitro fertilization*; in vitro fertilizacija

MPO – medicinski pomognuta oplodnja

PGT-A – engl. *preimplantation genetic testing for aneuploidy*; preimplantacijsko genetsko testiranje aneuploidija

PGT-M – engl. *preimplantation genetic testing for monogenic disorders*; preimplantacijsko genetsko testiranje monogenских bolesti

PGT-SR – engl. *preimplantation genetic testing for structural rearrangements*; preimplantacijsko genetsko testiranje strukturnih kromosomskih anomalija

PCR – engl. *polymerase chain reaction*; lančana reakcija polimeraze

NGS – engl. *next generation sequencing*; sekvenciranje sljedeće generacije

PGD – engl. *preimplantation genetic diagnosis*; preimplantacijska genetska dijagnostika

HLA – engl. *human leukocyte antigen*; humani leukocitni antigen

FISH – engl. *fluorescence in situ hybridization*; fluorescentna in situ hibridizacija

CGH - engl. *comparative genomic hybridisation*; komparativne genomske hibridizacije

PGS - engl. *preimplantation genetic screening*; preimplantacijski genetski screening

aCGH - engl. *array comparative genomic hybridisation*; komparativna genomska hibridizacija

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

AI – engl. *artificial intelligence*; umjetna inteligencija

SADRŽAJ:

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD	1
2. PREIMPLANTACIJSKO GENETSKO TESTIRANJE (PGT)	2
2.1 Preimplantacijsko genetsko testiranje monogenских bolesti (PGT-M)	3
2.2. Preimplantacijsko genetsko testiranje aneuploidija (PGT-A)	4
2.3. Preimplantacijsko genetsko testiranje strukturnih kromosomskih anomalija (PGT-SR)	6
3. TEHNIKA IZVOĐENJA PGT-a	7
3.1. Tehnike biopsije	8
3.1.1. Biopsija polarnog tjelešca	8
3.1.2. Biopsija blastomera	8
3.1.3. Biopsija blastociste	9
3.2. Metode genske analize	9
3.2.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR)	10
3.2.2. Fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija (FISH)	10
3.2.3. Komparativna genomska hibridizacija (CGH)	10
3.2.4. Sekvenciranje sljedeće generacije (NGS)	11
4. INDIKACIJE ZA PGT	11
4.1. Indikacije za izvođenje PGT-M	12
4.2. Indikacije za izvođenje PGT-A	13
4.3. Indikacije za izvođenje PGT-SR	13
5. PREDNOSTI I OGRANIČENJA PGT-a	14
6. EKONOMSKI I DRUŠTVENI UTJECAJI PGT-a	15
7. BUDUĆI SMJEROVI ISTRAŽIVANJA I NAPREDAK PGT-a	17
8. ZAKLJUČAK	19
9. ZAHVALE	20
10. LITERATURA	21

SAŽETAK

Preimplantacijsko genetsko testiranje

Dunja Marinović

Preimplantacijsko genetsko testiranje (PGT) predstavlja revolucionaran pristup reproduktivnoj medicini, omogućujući pregled i dijagnostiku embrija prije implantacije u maternicu. Indikacije za PGT obuhvaćaju širok spektar genetskih stanja, od kromosomskih abnormalnosti do poremećaja pojedinačnih gena, pružajući budućim roditeljima priliku da donesu informirane odluke u vezi s budućim djetetom. Međutim, proces PGT-a nije bez izazova, jer uključuje složene postupke te nosi etičke i moralne dvojbe. Prednosti PGT-a očituju se u njegovoj sposobnosti sprječavanja prijenosa nasljednih bolesti i smanjenje vjerojatnosti pobačaja i potencijalnog neuspjeha IVF postupaka. Ipak, mogućnost postavljanja krive dijagnoze i visoki troškovi postupka naglašavaju potrebu za daljnjim istraživanjem i usavršavanjem. Pravni okviri i propisi koji se odnose na PGT variraju, ukazujući na potrebu za standardizacijom i većom dostupnosti. Dok neke zemlje imaju stroge propise koji reguliraju upotrebu PGT-a, druge vode liberalniju politiku, što dovodi u pitanje etički aspekt i autonomiju embrija. S ekonomskog aspekta, cijena postupka varira ovisno od centra u kojem se provodi, povećavajući cijenu IVF postupka čineći ga nedostupnim za neke parove. S obzirom na to da je PGT još uvijek relativno nova dijagnostička metoda, otvoren je put njegovom napretku koji bi trebao biti usmjeren na rješavanje trenutnih ograničenja PGT-a, uključujući razvoj preciznijih i manje invazivnih metoda testiranja. Taj napredak trebao bi dovesti do poboljšanja ishoda trudnoće te povećanje dostupnosti genetičkog testiranja. Etička pitanja ključna su za kompletno razmatranje PGT-a. Prvenstveno se odnose na pitanje dostojanstva embrija. Stoga, iako PGT nudi značajna dostignuća u reproduktivnoj medicini, njegova široka prihvaćenost zahtjeva pažljivo razmatranje etičkih, pravnih i društvenih aspekata. Svladavanjem tih izazova i poticanjem interdisciplinarnе suradnje, PGT ima revolucionaran potencijal u asistiranoj reprodukciji, čuvajući etičke standarde i dobrobit pacijenata.

Ključne riječi: PGT, genetske bolesti, IVF, MPO, etički aspekt

SUMMARY

Preimplantation genetic testing

Dunja Marinović

Preimplantation Genetic Testing (PGT) represents a revolutionary approach in reproductive medicine, enabling the examination and diagnosis of embryos before implantation into the uterus. Indications for PGT encompass a wide range of genetic conditions, from chromosomal abnormalities to single gene disorders, providing prospective parents with the opportunity to make informed decisions about their future child. However, the process of PGT is not without challenges, as it involves complex procedures and raises ethical and moral dilemmas. The advantages of PGT are evident in its ability to prevent the transmission of hereditary diseases and reduce the likelihood of miscarriages and potential IVF cycle failures. Nonetheless, the possibility of misdiagnosis and the high cost of the procedure underscore the need for further research and refinement. Legal frameworks and regulations related to PGT vary, highlighting the need for standardization and greater accessibility. While some countries have strict regulations governing the use of PGT, others adopt a more liberal policy, raising questions about the ethical aspect and autonomy of embryos. From an economic perspective, the cost of the procedure varies depending on the center where it is performed, making the IVF procedure more expensive and inaccessible for some couples. Since PGT is still a relatively new diagnostic method, there is room for its advancement, which should focus on addressing the current limitations of PGT, including the development of more precise and less invasive testing methods. This progress should lead to improved pregnancy outcomes and increased availability of genetic testing. Ethical issues are crucial for a comprehensive consideration of PGT, primarily concerning the question of the dignity of embryos. Therefore, while PGT offers significant achievements in reproductive medicine, its widespread acceptance requires careful consideration of ethical, legal, and social aspects. By overcoming these challenges and promoting interdisciplinary collaboration, PGT has revolutionary potential in assisted reproduction, while preserving ethical standards and patient welfare.

Keywords: PGT, genetic diseases, IVF, ART, ethical aspect

1. UVOD

Genetski ili urođeni defekti kompliciraju približno 3 % porođaja. Više od 600 poremećaja izazvano je nasljeđivanjem jednog mutiranog gena, a na 1 od 300 porođaja dolazi do rođenja djeteta koje nosi genetsku mutaciju. Kromosomske abnormalnosti obuhvaćaju aneuploidije, translokacije, delecije i duplikacije. Veće kromosomske abnormalnosti javljaju se u otprilike 1 na 140 živorođene djece (1, 2). Rizik od prenošenja genetskih poremećaja na potomstvo predstavlja ključnu prepreku za parove koji su nositelji teških genetskih bolesti. Preimplantacijsko genetsko testiranje - PGT – omogućuje testiranje embrija na nasljedni poremećaj prije njegovog transfera u maternicu majke (3). Tim postupkom znatno se povećavaju šanse za zdravu trudnoću i rođenje zdravog djeteta jer se u samom postupku odabiru embriji koji nisu nosioci testiranih mutacija ili kromosomskih abnormalnosti (4). Preimplantacijsko genetsko testiranje uključuje *in vitro* oplodnju (IVF), potom biopsiju blastociste za genetsko testiranje te transfer zdravih embrija u maternicu na temelju rezultata genetskog testiranja (5).

Postoje tri različite vrste PGT-a: PGT-A (preimplantacijsko genetsko testiranje aneuploidija), tehnika kojom se provjerava je li embrij euploidan ili aneuploidan, PGT-M (preimplantacijsko genetsko testiranje monogenetskih bolesti), testiranje koje se provodi kada se zna da su jedan ili oba roditelja nositelji genetske mutacije, a ne žele ju prenijeti na potomstvo te PGT-SR (preimplantacijsko genetsko testiranje strukturnih kromosomskih anomalija), što uključuje specifično ispitivanje strukturnih promjena kromosoma (6).

Budući da se samo nezahvaćeni embriji prenose u maternicu, PGT je jedina dostupna metoda za testiranje embrija na genetske poremećaje prije trudnoće čime se izbjegavaju invazivni postkonceptijski dijagnostički postupci: amniocenteza odnosno biopsija korionskih resica. Rezultati invazivnih postupaka povezani su s teškim odlukama partnera o nastavku trudnoće u slučaju dokazanih genetskih poremećaja. PGT je visoko precizna metoda, ali kao i svaki dijagnostički postupak ima svoja ograničenja. Za neke nalaze savjetuje se dodatna provjera u trudnoći (biopsija korionskih resica ili amniocenteza). Izuzetno je važno informirati buduće roditelje o prednostima i rizicima metode što zahtijeva interdisciplinarni pristup (6,7).

2. PREIMPLANTACIJSKO GENETSKO TESTIRANJE (PGT)

Preimplantacijsko genetsko testiranje revolucionarna je tehnika u polju reproduktivne medicine koja omogućuje pregled embrija u ranim fazama razvoja. Time se omogućuje odabir i prijenos zdravih embrija u maternicu, što smanjuje vjerojatnost nasljeđivanja ozbiljnih genetskih poremećaja, kao i začeca embrija s greškom u broju kromosoma pa stoga PGT poboljšava izgleda za uspješnu trudnoću. Omogućuje parovima da izbjegnu tešku odluku o prekidu trudnoće zbog medicinskih indikacija, odabirom embrija koji nisu zahvaćeni genetskim poremećajem za transfer u maternicu (4).

PGT tehnike široko su prihvaćene u današnjoj kliničkoj praksi te istovremeno predstavljaju značajno područje interesa, uključujući i komercijalni aspekt, u kontekstu znanstvenih i tehnoloških istraživanja, ostavljajući prostora za daljnji napredak. Tehnika je to koja zahtijeva multidisciplinarni pristup jer je usko povezana s tehnikama medicinski pomognute oplodnje (MPO) i genetske analize, olakšavajući istraživanje nasljednih monogenetskih bolesti, tj. mutacije jednoga gena (PGT-M), detekciju aneuploidije (PGT-A) i strukturnih kromosomskih abnormalnosti (PGT-SR) (4, 8). U svome početku, postupak je bio temeljen na lančanoj reakciji polimeraze (PCR), ali se implementacijom novih molekularno bioloških tehnika i značajnim tehnološkim napretkom proces razvoja PGT-a uvelike ubrzao, dosegnuvši razinu značajnog smanjenja vremena i troškova analize. Navedeni napredci na području genetskog testiranja povezani su s razvojem tehnike *next generation sequencing* (NGS) koja omogućuje sekvencioniranje odabranih genetskih panela ili većih dijelova genoma, a danas predstavlja zlatni standard u dijagnostici PGT-em (4). Napredak je vidljiv i u tehnikama biopsije kod kojih danas metodu izbora čini biopsija trofoektoderma blastociste, a budućnost je usmjerena na minimalno invazivne metode. Međutim, unatoč izvanrednim naprecima, implementacija PGT-a suočava se s nizom ograničenja i izazova koji zahtijevaju pažljivo razmatranje.

Kao što je ranije navedeno, PGT se koristi za detekciju monogenetskih bolesti, strukturnih kromosomskih abnormalnosti te za otkrivanje aneuploidija. Temeljno se koriste genetske pretrage koje bi trebale utvrditi normalnost embrija prije embriotransfera odnosno prije potencijalne implantacije. Stoga, PGT predstavlja alternativu invazivnoj prenatalnoj dijagnostici (8).

PGT se danas koristi u IVF centrima diljem svijeta. Najčešće se koristi radi utvrđivanja euploidnosti (normalnosti) embrija prije embriotransfera što je povezano sa značajnim poboljšanjem stope kliničkih trudnoća, smanjenjem stope komplikacija u trudnoći te u konačnici s povećanom stopom živorođene djece nakon postupka medicinski pomognute oplodnje. Najkritičnija točka cijelog procesa je implantacija embrija u zdravi endometriji maternice, o čemu ovisi i uspješnost same trudnoće. Odabir embrija za embriotransfer povezan je s ocjenom kvalitete što predstavlja veliki izazov, posebno ako se radi embriotransfer pojedinačnih embrija. Kvaliteta embrija ocjenjuje se na osnovi morfoloških kriterija, iako mikroskopski izgled embrija ne mora uvijek korelirati s njegovom vitalnošću. Te činjenice, kao i dokazi da je aneuploidija najvažniji razlog neuspjeha IVF-a te podatci da na 1 od 300 porođaja dođe do rođenja djeteta s naslijeđenim poremećajem, sve više ukazuju na dijagnostičku vrijednost PGT-a kao metode odabira zdravih embrija (2, 9).

2.1 Preimplantacijsko genetsko testiranje monogenских bolesti (PGT-M)

Preimplantacijska genetska dijagnostika (PGD) napretkom MPO tehnika i dijagnostike mijenja naziv u PGT-M (10). Cilj PGT-M testiranja je izbjegavanje prijenosa embrija s određenim monogenским bolestima u maternicu. Monogenские bolesti su genetski poremećaji koji su uzrokovani mutacijom u jednom genu, a mutaciju dijete nasljeđuje od roditelja. Postoji više od 6000 do sada detektiranih bolesti i stanja izazvanih naslijeđem mutiranog gena. Trudnoća sa zdravim plodom postiže se odabirom embrija koji nisu nositelji mutacije ili odabirom zdravih nositelja (za recesivno nasljedne bolesti). Generalno, PGT-M se može primjenjivati za sve nasljedne monogenские bolesti za koje su poznati odgovorni geni, za koje postoje barem jedan ili dva opisana slučaja te postoje dijagnostički protokoli za detekciju. Monogenские bolesti uključuju X-vezane recesivne ili dominantne bolesti, poremećaje trinukleotidnog ponavljanja te bolesti s kasnim početkom. PGT-M se može proširiti na HLA kompatibilnosti i sindrome hereditarnog karcinoma (mutacija BRCA-1 gena). Posebno je zahtjevna detekcija monogenских bolesti poput cistične fibroze, koju karakterizira više različitih mutacija, a i detekcija novih još uvijek raste. Dakle, roditelji bez kliničkih manifestacija nositelji su mutacije gena za cističnu fibrozu. Rutinski se testiraju samo one mutacije za cističnu fibrozu koje se u populaciji češće javljaju pa tako

roditelji s rijetkom mutacijom budu testirani negativno, ali i dalje mogu prenijeti bolest na svoje potomstvo. Da bi se izvelo kvalitetno testiranje potrebno je prikupiti uzorke genetskog materijala oba roditelja, a ponekad i ostalih članova obitelji (2, 4, 6). Nakon biopsije embrija, uzorci se analiziraju u laboratorijima specijaliziranim za PGT, u kojima se provodi neka od metoda detekcije gena kao što su PCR, FISH (fluorescentna *in situ* hibridizacija), CGH (komparativna genomska hibridizacija) ili NGS. Na taj se način detektira mutacija od interesa i postavlja dijagnoza. Međutim, uvijek postoji mogućnost da dođe do ispadanja alela (*allele dropout*), tj. mogućnost da se samo jedna od dvije kopije gena amplificira u slučaju uzorkovanja maloga broja stanica. Ako ispadanje alela zahvati mutirani gen, prava dijagnoza teško će se moći postaviti. Zbog toga se uvijek dodatno radi i analiza polimorfizama koji su u blizini lokusa mutacije od interesa. Polimorfizmi su varijacije DNA koje ne uzrokuju bolest, ali se uvijek nasljeđuju jer su smješteni blizu lokusa te mutacije na odgovarajućem kromosomu. Tijekom PGT testiranja, testira se više različitih polimorfizama, a oni nam govore je li embrij naslijedio kromosom s mutiranim genom ili ne. Također, polimorfizmi nam govore o kontaminaciji DNA majčinim i očevim materijalom jer kontaminirana DNA također utječe na točnost dijagnostike. Na osnovi toga se polimorfizmi smatraju otiskom prsta embrija te nam govore o valjanosti učinjene dijagnostike (2, 8).

Važno je naglasiti da PGT-M predstavlja alternativu prenatalnoj dijagnostici u slučajevima kada roditelji znaju da su nositelji mutacije te da postoji rizik prijenosa iste na njihovo potomstvo, dakle ne služi za detekciju sporadičnih mutacija u embriju (2).

2.2. Preimplantacijsko genetsko testiranje aneuploidija (PGT-A)

PGT-A najčešće je korištena tehnika PGT-a s ciljem analize normalnosti cijelog kromosoma odnosno numeričkih pogreški svih kromosoma. Tijekom tog postupka moguće je otkriti monosomije (embriju nedostaje cijeli kromosom), kao i trisomije (embrij ima cijeli kromosom viška), a ovom metodom otkrivaju se i veće delecije te duplikacije (embriju nedostaje ili ima viška samo dio kromosoma) (11). Cilj metode je poboljšati uspješnost MPO-a detekcijom aneuploidnih embrija. Od svojih početaka PGT-A bilježi značajan napredak. Početni naziv bio je preimplantacijski genetski screening (PGS), a od 2016. PGS nosi naziv PGT-A (12).

Rutinski se kvaliteta embrija za embriotransfer ocjenjuje na osnovu morfološkog izgleda, što je djelomično subjektivna metoda, ali poznata je činjenica da se samo na temelju morfoloških karakteristika embrija ne može detektirati euploidnost. Embriotransfer više embrija povećava uspješnost MPO-a, ali nosi rizike za višeploidne trudnoće koje su u pravilu rizičnije od jednoploidnih trudnoća. Preporuka je stručnih društava da se vraća jedan embrio (single embryo transfer – SET) s ciljem izbjegavanja višeploidnih trudnoća. Razvojem PGT-A poboljšane su metode selekcije euploidnih zametaka čime se potencijalno povećala uspješnost SET-a (2).

Iako se PGT-A koristi u brojnim MPO klinikama diljem svijeta kao dijagnostička metoda u postupcima MPO-a, postoje još brojne rasprave o njegovoj rutinskoj primjeni. Ono što izaziva nedoumice je činjenica da je PGT-A samo probirni, a ne i dijagnostički test (13). Karakteristika probirnih testova je da se testiraju još uvijek zdrave osobe kako bi se među njima izdvojili oni koji imaju veći rizik za razvoj bolesti koja se istražuje (14). Glavni problem u detekciji aneuploidnih embrija je mozaicizam. Mozaički embrio ima mješavinu normalnih i aneuploidnih stanica. Radi se o postfertilizacijskim pogreškama koje nastanu u daljnjim diobama zigote pa tako neke stanice imaju normalan, a neke poremećen broj kromosoma. Moguće je rođenje zdravog djeteta iz embrija s mozaicizmom jer embriji može proći samoisprava tijekom diferencijacije i proliferacije. Upravo su ovo rizici PGT-a jer biopsirana stanica za PGT-A dijagnostiku može rezultirati lažno pozitivnim rezultatom. Usavršene tehnike NGS-a detektiraju i stupanj mozaicizma. Unatoč tome lažno pozitivni rezultati izazivaju veliku zabrinutost i predmet su intenzivnih rasprava (2, 12, 13).

Danas je tehnika PGT-A značajno napredovala. U samim počecima glavna dijagnostička metoda bio je FISH, a biopsija se provodila u stadiju morule. Danas je FISH zamijenjen NGS-om koji testira svaki kromosom na različitim područjima, a biopsija se radi u stadiju blastociste, kada je manji rizik od oštećenja embrija, a manje je i mozaicizama. Iako rasprave o dobrobiti PGT-A u skraćivanju vremena do postizanja uspješne trudnoće kontinuirano traje, stručna društva su složna da treba i dalje raditi na usavršavanju dijagnostičke preciznosti metode PGT-A s obzirom na značaj ove metode u prenatalnoj dijagnostici, pogotovo u žena iznad 35. godine života (2, 12).

2.3. Preimplantacijsko genetsko testiranje strukturnih kromosomskih anomalija (PGT-SR)

Preimplantacijsko genetsko testiranje za strukturna kromosomska preuređenja ima za cilj identifikaciju kromosomskih poremećaja. Najčešće strukturne kromosomske anomalije uključuju inverzije, delecije i translokacije, koje mogu biti nasljedne ili se pojavljuju *de novo*. Prva tehnika korištena u PGT-SR, kao i u PGT-A, bila je FISH, no pokazala se neisplativim jer je omogućavala pregled samo malih dijelova kromosoma (<2 megabaze), dok današnje tehnike omogućuju pregled oba kromosoma u komplementarnom paru. Danas se za otkrivanje ovih kromosomskih abnormalnosti koristi NGS tehnika koja podrazumijeva simultano sekvenciranje malih dijelova DNK te usklađivanje pojedinačnih sekvenci s referentnim ljudskim genomom. NGS se može primijeniti za sekvenciranje kompletnog genoma ili se fokusira na određena ciljana područja (4, 6).

Neka genetska preuređenja mogu biti bez jasnih posljedica po zdravlje budućeg djeteta, dok druga mogu dovesti do ozbiljnih invaliditeta ili spontanih pobačaja. Poteškoće u predviđanju točnih kliničkih posljedica određenog genetskog preuređenja mogu otežati proces genetskog savjetovanja i donošenja reproduktivnih odluka (4). Roditelji nosioci strukturnih abnormalnosti zbog nebalansirane raspodjele kromosoma suočavaju se s ponavljanim spontanim pobačajima. Kada se kariotipiziranjem kod roditelja detektiraju strukturne abnormalnosti izrađuju se posebne sonde koje će detektirati ove promjene u embrijima (6). Važno je točno odrediti mjesto prekida kromosoma jer u suprotnom može doći do krivog tumačenja rezultata PGT-SR analize. U svrhu precizne analize genetskog materijala, koriste se sofisticirane genetske analitičke metode poput arrayCGH (aCGH) i NGS. Ove tehnike omogućuju precizno identificiranje zahvaćenih područja, prekida i prisutnosti mozaicizma. Uz to, suradnja s iskusnim genetičarima u interpretaciji rezultata ključna je za donošenje informiranih odluka (4).

Varijabilnost potencijalnih kromosomskih razmještaja ukazuje na složenost PGT-SR-a kao dijagnostičke metode. Kada se tome pridodaju tehnološka ograničenja u provođenju same analize, jasno je da je potrebna izrazita preciznost i strpljivost u tumačenju rezultata kako bi se parovi koji prolaze sam proces dobili što vjerodostojnije informacije. Iako su tehnike koje se koriste u PGT-SR danas značajno napredovale, točnost same dijagnostike ovisi prije svega o veličini i kompleksnosti strukturnih kromosomskih promjena (4).

3. TEHNIKA IZVOĐENJA PGT-a

Oplodnja je proces spajanja haploidne muške i ženske gamete u jedinstvenu diploidnu zigotu koja ima 23 para kromosoma, a u slučaju prirodne oplodnje događa se u ampuli jajovoda. Tijekom tjelesne oplodnje zigoti je potrebno oko 4 dana da dođe do maternice, a na svome putu prolazi kroz brojne mitotičke diobe povećavajući broj stanica (blastomera) raspodjelom citoplazme, ne mijenjajući veličinu početne zigote. Četvrtoga dana nakon oplodnje formira se morula. U tom stadiju embrij se sastoji od 16 do 32 stanice. Od stanica u središtu morule kasnije će se formirati embrij, dok će se od stanice s periferije kasnije formirati fetalni dio posteljice. Petoga dana od oplodnje u moruli se počinje formirati šupljina (blastocel) te morula postaje blastocista, a broj stanica poveća se na 50 do 150. Blastocista se sastoji od dva dijela, embrioblasta i trofoblasta. Embrioblast je unutarnja stanična masa od koje će se kasnije razvijati sve strukture embrija, a trofoblast okružuje šupljinu ispunjenu tekućinom (blastocel) te se implantira u endometrij maternice. Blastocista u maternici nije više okružena zonom pellucidom što joj omogućuje da se ugnijezdi u zadebljali endometrij maternice, najčešće u području fundusa (15).

Da bi se dobio uzorak za biopsiju u sklopu PGT obrade, pacijentice prolaze kroz IVF postupak u kojem su stadiji razvoja embrija identični prirodnome procesu, osim što se događaju u *in vitro* uvjetima. Uobičajeni IVF postupak ima nekoliko koraka: 1. stimulacija jajnika gonadotropinima, 2. aspiracija jajnih stanica, 3. *in vitro* oplodnja jajnih stanica, 4. razvoj embrija u *in vitro* uvjetima i 5. prijenos embrija u maternicu. Embriotransfer u svježem ciklusu odgađa se u slučaju PGT-a zbog vremenskog trajanja genetske dijagnostike. Embriji se 5. dana od aspiracije razvijaju do stadija blastociste. Upravo petoga dana uzima se bioptički uzorak blastociste kojega čini 3-5 stanica trofoektoderma. Kako sam postupak PGT-a traje određeno vrijeme, embriji se zamrzavaju do postavljanja dijagnoze. Dijagnostika može uključivati PCR-a, FISH-a, CGH ili NGS-a, ali NGS danas predstavlja najčešće korištenu tehniku. Nakon postavljanja dijagnoze, planira se prijenos zdravih, euploidnih embrija u maternicu u nekom budućem ciklusu (6).

3.1. Tehnike biopsije

Tri su tipa uzoraka koja se mogu uzeti za dijagnostiku, a to su: polarna tjelešca, blastomere iz stadija brazdanja i stanice trofoektoderma blastociste. Za prikupljanje uzoraka embrija mora se otvoriti zona pellucida, što se danas najčešće radi putem lasera, nakon čega se mikropipetom aspiriraju stanice koje će služiti kao uzorci za biopsiju (4).

3.1.1. Biopsija polarnog tjelešca

Zrela jajna stanica u metafazi II izbacuje jedno polarno tjelešce, dakle polarna tjelešca proizvodi su oogeneze, tj. formiranja ženskih spolnih stanica i pruža informacije samo o jajnoj stanici, odnosno majčinom kromosomskom statusu. Kromosomske abnormalnosti koje se javljaju nakon oplodnje, kada spermij oplodi jajnu stanicu, na ovaj način ne mogu biti otkrivene (6). Stoga je prikupljanje polarnih tjelešaca zastarjela i nepotpuna metoda koja se danas rijetko koristi i to uglavnom u državama koje imaju stroge zakone vezane za testiranje embrija (2).

3.1.2. Biopsija blastomera

Drugi pristup uključuje uzorkovanje blastomera u fazi brazdanja, 3. dana od oplodnje, kada se embrij sastoji od 6 do 10 stanica. Ova procedura tehnički je vrlo zahtjevna, a glavni cilj embriologa je odvojiti jednu blastomeru što preciznije da se ne ošteti preostali dio embrija. Kako bi popustile veze između blastomera, embrij se prvo ulaže u poseban medij na otprilike 20 minuta. Potrebno je napraviti otvor na zoni pellucidi što se može izvoditi s posebnom otopinom, laserom ili oštrom kiretom. Nakon otvaranja zone pellucide, blastomera se pažljivo aspirira pipetom. Ova metoda ima svoje prednosti i ograničenja. Prednost je što, ako nalazi dijagnostike budu gotovi u kratkom roku, moguć je svježiji embriotransfer u maternicu petog ili šestog dana. Nedostatak ove metode je premali uzorak kojeg čini tek jedna stanica, što ne pruža uvijek dovoljno informacija. Uzimanjem dodatnih stanica gubilo bi se više od 30% mase embrija što bi značajno narušilo njegovu vitalnost. Uz to prikupljena blastomera možda nije potpuno

reprezentativna za cijeli embrij jer on može biti sastavljeni od više populacija stanica, tj. može činiti mozaik (4, 6).

3.1.3. Biopsija blastociste

Prikupljanje bioptičkih uzoraka 5. dana od oplodnje pokazalo se kao najuspješniji način u procesu PGT-a. Blastocista se tada sastoji od puno većeg broja stanica (barem 100), što znači da ima i veću količinu DNA dostupne za analizu te je veća šansa otkrivanja genetskih nepravilnosti. Uz to, uzorak se uzima iz trofoektoderma, tkiva koje nije izravno povezano s formacijom samog ploda pa je i mogućnost oštećenja daljnjeg razvoja embrija svedena na minimum. Prvo se otvara zona pellucida, a potom se s pomoću fine biopsijske pipete uzimaju stanice (prosječno 5 stanica) trofoektoderma. Nakon toga obavlja se genetska analiza putem FISH-a, PCR analize, CGH-a ili NGS-a. Nedostatak ovog pristupa je u tome što stanice trofoektoderma ne čine reprezentativan uzorak samog embrija. Prednosti biopsije u stadiju blastociste su to što uzorkovanjem dobijemo više materijala nego iz prethodnih metoda, pa je i preciznost u postavljanja dijagnoze veća. Uz to, neke su studije pokazale da je uzorkovanje iz trofoektoderma povezano s većom stopom preživljavanja embrija, nego uzorkovanje u fazi brazdanja jer se stanice uzimaju iz vanjskog sloja (trofoektoderma), a ne unutrašnje mase stanica koja čini osnovu za razvoj ploda. To, kao i činjenica analize većeg dijela DNA omogućili su veću pouzdanost metode (2, 4, 6).

3.2. Metode genske analize

Sve do 2010. godine PGT se temeljio na biopsiji blastomera te na FISH-u. Uvidjevši prednosti NGS-a pred FISH-om, NGS postaje metoda izbora za analizu kromosoma. Naime, FISH može detektirati samo specifična područja kromosoma, dok NGS analizira sve kromosome i ukazuje na područja translokacije (16).

3.2.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Za genetsko testiranje tijekom provođenja PGT dijagnostike jedna od metoda koja se koristi je PCR. Ova metoda predstavlja brz i praktičan način genetske analize, ali zahtjeva dovoljnu količinu čiste DNA što se teško može dobiti samo iz jedne stanice poput polarnog tjelešca ili blastomere. PCR omogućuje dijagnostiku pojedinačnih genskih defekata. Cilj je ove tehnike kopirati određeni niz DNA mnogo puta čime se olakšava njegova analiza. Posebnu pažnju treba posvetiti čistoći uzorka, kako ne bi došlo do kontaminacije majčnim ili očevim genetskim materijalom. (6).

3.2.2. Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)

FISH se u sklopu prenatalne dijagnostike koristi češće od PCR-a, zbog svoje mogućnosti detekcije aneuploidija. Dakle, ovom metodom dokazuju se X-vezane bolesti i kromosomske abnormalnosti, a koristi se i kao probirna metoda za aneuploidije. Analizira se ograničen broj kromosoma, a to su X, Y, 1, 13, 16, 18 i 21. S obzirom na to da od 23 para kromosoma FISH analizira svega 7 do 9 u svakoj bioptiranoj stanici, jasno je da mnoge nepravilnosti embrija ne budu otkrivene, što može dovesti do lažno negativnih nalaza. Ova metoda podrazumijeva postojanje posebnih sonda koje se vežu za određene kromosome, a njihovim fluorescentnim bojanjem i detekcijom pod fluorescentnim mikroskopom, postavlja se dijagnoza. Tako obilježene sonde, tj. mali fragmenti DNA koji se podudaraju s traženim kromosomima, nanose se na bioptičke uzorke pri čemu se očekuje detekcija obojenih sonda (6).

3.2.3. Komparativna genomska hibridizacija (CGH)

U novije vrijeme CGH i NGS zamijenili su prethodno korištene starije metode poput FISH-a ili PCR-a u postupcima PGT-a. CGH ne samo da omogućuje prebrojavanje svih 23 kromosoma, već pruža i detaljan prikaz cijele dužine kromosoma, što može otkriti neuravnotežene dijelove kromosoma. Iako prilično detaljna, CGH je dugotrajna tehnika koja traje 72 sata, stoga zahtjeva

zamrzavanje embrija. Postupak CGH-a je takav da se jezgra embrija označi fluorescentnim bojom, a kontrolna stanica bude označena drugom bojom, najčešće crvenom ili zelenom. Kada se stanice povežu na kontrolnom metafaznom razmazu, prate se omjeri boja. Ako kromosomska analiza pokazuje višak crvene boje, jezgra embrija sadrži dodatni kromosom, a ako zelene boje ima više, tada je jezgra embrija lišena jednog od tih kromosoma (6).

3.2.4. Sekvenciranje sljedeće generacije (NGS)

Najnovija i danas najčešće korištena metoda genske analize u sklopu PGT-a je NGS. Omogućuje brzo i efikasno sekvenciranje cijelih genoma ili određenih područja kromosoma, što je razlog da postaje zlatni standard PGT-M, PGT-A i PGT-SR testiranja. Sekvenciranje uključuje sekvenciranje cijeloga genoma, egzona ili ciljanih gena. Kako bi se ukazalo na razliku u isplativosti, valja napomenuti da je sekvenciranje cijeloga genoma najskuplje, a ujedno daje i najmanje točne podatke. S druge strane, ciljano sekvenciranje gena ekonomičniji je postupak koji nudi veću točnost podataka. U ovoj metodi koristi se kapilarna elektroforeza. Emitirani signali pomažu u identifikaciji DNA fragmenata, a potom dolazi do njihovoga vezanja za originalni lanac (6).

4. INDIKACIJE ZA PGT

Indikacije za PGT mogu biti rijetke, ali i česte genetske bolesti. Provođenje PGT dijagnostike preporučuje se parovima kod kojih postoji rizik prijenosa nasljednih bolesti na potomstvo. Odabirom samo zdravih embrija za prijenos u maternicu nastoji se smanjiti mogućnost pobačaja i rođenja bolesnog djeteta. Kandidati za PGT dijagnostiku su parovi s autosomno dominantnim bolestima (rizik prijenosa bolesti na dijete iznosi 50 %), parovi s autosomno recesivnim bolestima (rizik prijenosa bolesti na dijete iznosi 25 %), parovi koji u obitelji imaju članove oboljele od X-vezanih bolesti (25 % rizik, tj. pola muških embrija bit će nositelji mutacije),

parovi s kromosomskom neravnotežom, oni s ponavljanim neuspjelim trudnoćama te oni s rizikom aneuploidije zbog dobi (6).

4.1. Indikacije za izvođenje PGT-M

Prve indikacije za PGT-M bila su prvenstveno vezane uz sprječavanje prijenosa teških, neizlječivih ili po život opasnih genetskih bolesti koje se klinički manifestiraju već u dječjoj dobi. Međutim, danas su se indikacije značajno proširile. Indikacije vezane uz genetska stanja s blagim ili umjerenim fenotipovima, većom kliničkom varijabilnošću ili smanjenom penetracijom predmet su većih ili manjih kontroverzi (17).

Primjeri težih i neizlječivih bolesti koje počinju u djetinjstvu uključuju: Tay-Sachsovu bolest, bolest srpastih stanica, spinalna mišićna atrofija, klasična cistična fibroza. Sindrom nasljednog karcinoma dojki i jajnika (*BRCA 1* i *BRCA 2*), Huntingtonova bolest i hereditarna kardiomiopatija primjeri su težih nasljednih bolesti koje se javljaju u odrasloj dobi (17).

Trenutačno PGT-M može detektirati više od 300 različitih mutacija, a najčešće indikacije su identifikacija cistične fibroze i nasljednih hemoglobinopatija u slučaju autosomno recesivnih poremećaja, te miotonička distrofija tipa 1, neurofibromatoza, Huntingtonova bolest i nasljedni sindromi raka ako govorimo o autosomno dominantnim poremećajima. PGT-M postavlja dijagnozu s točnošću višom od 99%. Za neke bolesti s kasnim početkom, poput Huntingtonove bolesti, moguće je u nekim državama zatražiti isključujuće testiranje u kojem roditelji ne saznaju jesu li oni nositelji gena za tu mutaciju, ali im se osigura prijenos u potpunosti zdravog embrija (2,8).

U nekim zemljama dozvoljen je PGT u svrhu odabira embrija s određenim HLA antigenima kao potencijalnog donora, što je tehnički vrlo zahtjevno, ali i etički dvojbeno jer instrumentalizira dijete koje je predviđeno da bude donor te u pitanje dovodi njegovu autonomiju i osobnu vrijednost.(8).

Prije postavljanja indikacije za PGT-M preporučuje se genetsko savjetovanje vezano uz prijenos bolesti te savjetovanje o reproduktivskim opcijama. Genetsko savjetovanje o rezultatima PGT-M izuzetno je važno pri donošenju odluka o prijenosu embrija u maternicu (17).

4.2. Indikacije za izvođenje PGT-A

Jedna od najčešćih indikacija za PGT-a jest dob žene. Studije pokazuju da u žena dobne skupine 35-39 godina zbog aneuploidnosti jajnih stanica, stopa aneuploidnih embrija iznosi 20 %, a u onih iznad 40. godine gotovo 40 %. PGT-A se preporučuje i parovima s dvije ili više trudnoća koje su završile spontanim pobačajem prije 20. tjedna gestacije. Kromosomske abnormalnosti zabilježene su u 50-80 % spontanih pobačaja. Također, preporuku za provođenje PGT-A imaju i parovi koji nisu uspjeli ostvariti trudnoću u 3 ili više IVF postupaka nakon transfera kvalitetne blastociste. Ipak, još uvijek nema studija koje pokazuju da je stopa implantacije u tih žena bolja uz primjenu PGT-a. Valja uzeti u obzir da neuspjehu implantacije dodatno pridonose imunološki i anatomske faktori. Ako je riječ o muškom faktoru neplodnosti (mali broj spermija, slaba pokretljivost ili loša morfologija), preporučuje se primjena PGT-A. Dokazano je da normalno plodni muškarci imaju 3-8 % kromosomski abnormalnih spermija, a u slučaju nekog od faktora muške neplodnosti, taj se broj povećava na 27-74 %. Parovi nekada izražavaju želju za provođenjem PGT-A samo u svrhu odabira spola djeteta, što može biti potaknuto kulturnim, socijalnim, etničkim ili drugim razlozima. Elektivna selekcija spola bez indikacije (nasljedne bolesti vezane uz spolni kromosom) kontroverzna je i etički upitna te je stoga u većini država koje provode PGT zabranjena (6).

4.3. Indikacije za izvođenje PGT-SR

Strukturalni poremećaji kromosoma dovode do neplodnosti, ponavljanih implantacijskih neuspjeha, habitualnih pobačaja i rađanja djece s kongenitalnim poremećajima unatoč činjenici da roditelji koji nose balansiranu kromosomsku varijantu imaju uredan fenotip. Upravo navedeno je indikacija za kariotipiziranje oba partnera. U slučajevima da se dokaže strukturalni poremećaj

u jednog od partnera indicirana je PGT-SR zbog visokog rizika za nebalansiranu translokaciju u gametama odnosno embrijima. Od svih oblika PGT-a, PGT-SR je povezan s najmanje kontroverzi. Vrlo je učinkovita metoda u detekciji nebalansiranih translokacija koje su povezane neuspjelim trudnoćama ili kongenitalnim bolestima, s jednim ograničavajućim čimbenikom, a to je mogućnost da ne postoji balansirani embrio za embriotransfer. Stoga je također izuzetno važan interdisciplinarni pristup koji uključuje konzultacije s kliničkim genetičarem (18).

5. PREDNOSTI I OGRANIČENJA PGT-a

Dijagnostički postupci koji se, kada su indicirani, provode prije embriotransfera u postupku MPO-a od velikog su značaja za cjelokupno društvo, a pogotovo za buduće roditelje. Razvoj preimplantacijske dijagnostike bio je veliki korak u izbjegavanju prijenosa genetskih poremećaja te čini važan doprinos personaliziranoj medicini.

PGT nudi brojne prednosti od čega odmah treba izdvojiti onu najvažniju, a to je da smanjuje rizik prijenosa genetskih mutacija na potomstvo. PGT-M dijagnostikom prije implantacije možemo detektirati embrije koji su nositelji genetske mutacije te oni neće biti kandidati za embriotransfer. Nadalje, PGT-A smanjuje stopu spontanih pobačaja izbjegavanjem prijenosa aneuploidnih zametaka što može doprinijeti većoj stopi kliničkih trudnoća i stopi živorođene djece nakon MPO postupaka. Pobornici PGT-A čvrsto zastupaju stav da PGT-A značajno skraćuje „vrijeme ostvarivanja“ uspješne trudnoće. Time se ujedno smanjuje i emocionalni stres kroz koji parovi prolaze tijekom liječenja neplodnosti očekujući pozitivan ishod (19).

Napretkom tehnologije, PGT kao metoda postaje sve preciznija i uspješnija u sigurnoj detekciji genetskih abnormalnosti. Ipak, kao i svaka druga dijagnostička pretraga ima svoje nedostatke. Najvažniji nedostatak je taj što je za cijeli postupak potreban biopsijski uzorak. To podrazumijeva biopsiju zametka pri kojoj može doći do oštećenja embrioblasta, tj. budućeg ploda. Postoje i realne mogućnosti biološke i metodološke pogreške te lažno pozitivni nalazi. Uz to, moramo biti svjesni ograničenosti pojedine metode (npr. PGT-A). PGT-A predstavlja probirni test, ali samo za najčešće aneuploidije. Ovom metodom neće se detektirati neke druge nasljedne bolesti. Kao

nedostatak treba napomenuti i to da PGT ne ulazi u osnovni komplet prenatalnih pretraga, a cijena samog postupka može varirati od centra do centra te mnogim parovima nije pristupačna. (6, 13, 19).

Temeljito razmatranje kliničkih, tehničkih, ali i etičkih ograničenja PGT-a presudno je za njegovo odgovorno korištenje te njegovu provedbu u skladu s najnovijim znanstvenim spoznajama. Posebno treba naglasiti da sva ograničenja u dijagnostici trebaju biti pažljivo prezentirana pacijentima tijekom genetskog savjetovanja, ali i transparentno iznesena tijekom procesa dobivanja informiranog pristanka. Za daljnji napredak tehnologija PGT-a potrebna je interdisciplinarna suradnja između znanstvenika, kliničara, genetičara i etičara (4).

6. EKONOMSKI I DRUŠTVENI UTJECAJI PGT-a

PGT značajno povećava troškove liječenja neplodnosti zbog korištenja složenih laboratorijskih i dijagnostičkih postupaka pa se tako ekonomski utjecaj ovog oblika prenatalne dijagnostike ne može zanemariti. Još se uvijek smatra relativno novom dijagnostičkom metodom, stoga u mnogim državama nije pokrivena zdravstvenim osiguranjem. Cijena postupka varira ovisno o klinici u kojoj se obavlja, kao i o broju embrija koji se testiraju, a troškovi mogu biti visoki zbog složenosti tehnike te potrebe za naprednom tehnologijom i stručnim osobljem.

Starenjem žene dolazi do porasta aneuploidije oocita, što posljedično dovodi do aneuploidije zametaka i povećane vjerojatnosti za neuspjele trudnoće i kromosomopatije. Studije su dokazale da žene iznad 35 godina imaju više koristi od PGT-A, nego mlađe žene. PGT-A - om se izbjegava embriotransfer nevjabilnih / abnormalnih zametaka što skraćuje vrijeme do postizanja uredne trudnoće odnosno čime se izbjegavaju opetovani IVF postupci (20). U jednom istraživanju uspoređivala se isplativost između IVF postupaka u kojima je rađeno PGT-A testiranje i onih u kojima nije rađeno PGT-A. Omjer isplativosti računao se prema dobi i broju dostupnih blastocista. MPO koji uključuje PGT-A postaje isplativiji s povećanjem dobi. Istraživanja su također pokazala da pacijentice iznad 38. godine imaju manje troškove PGT-A, a razlog tome je manji broj blastocista u ovoj dobnoj skupini. S druge strane, kada se gledala

potrošnja po pojedinom embriju, pacijentice iznad 38 godina u prosijeku su plaćale više nego mlađe pacijentice. Stoga, uzimajući u obzir troškove postupka, uspješnost trudnoće i rađanje živorođene djece, PGT, a posebice PGT-A, nudi značajne prednosti ženama iznad 38. godine (21). S obzirom na to da je optimalna isplativost važna komponenta u financiranju dijagnostičkih metoda u modernoj medicini, PGT-A može povećati isplativost kada se primjenjuje u određenoj dobnoj skupini, odnosno u specifičnim indikacijama. Također je važno naglasiti da unatoč povećanju proceduralne složenosti i troškova IVF-a povezanih s PGT-A, usvajanje NGS tehnike smanjilo je dijagnostičke troškove. Smanjenjem vjerojatnosti prijenosa embrija s kromosomskim abnormalnostima, PGT-A može potencijalno dovesti do većih stopa uspješnosti MPO-a, manjeg broja spontanih pobačaja te dugoročnog smanjenja broja ukupnih postupaka (22).

Pacijenti s genetskim bolestima češće su i dulje hospitalizirani, što rezultira većim zdravstvenim troškovima (23). Primjena PGT-a može smanjiti troškove zdravstvene skrbi sprječavajući rođenje djece s ozbiljnim genetskim poremećajima. Omogućavajući dijagnosticiranje i odabir embrija bez genetskih poremećaja, PGT pomaže obiteljima da izbjegnu dugoročne zdravstvene troškove. Tako obitelji ne samo da štite zdravlje budućih generacija, već i ublažavaju financijski teret koji bi mogao nastati zbog liječenja i brige za osobe s težim genetskim bolestima.

Parovi koji se odluče za PGT tijekom MPO postupka kao glavni motiv navode želju za što bržim postizanjem uspješne trudnoće kada uvide neuspjeh prirodnog začeća. Razlozi zbog kojih se parovi odlučuju na ovu vrstu dijagnostike mogu biti podijeljeni na psihičke, fizičke, etičke i praktične aspekte. Kao psihički razlog za odabir PGT-a najčešće se navodi izbjegavanje stresa tijekom procesa prirodnog začeća u slučaju rizika za genetske bolesti, psihološki napor povezan s postizanjem uspješne trudnoće, psihološki teret ponavljanih pobačaja te osjećaj kao da su već sve pokušali. Psihološki čimbenici koji idu protivno odabiru PGT-a jesu, strah od negativnih reakcija okoline i psihološki teret u slučaju genetske bolesti embrija. Kao glavni praktični razlog za odabir PGT-a ističe se brže postizanje uspješne trudnoće sa zdravim djetetom u parova koji već duže vrijeme pokušavaju prirodno začeti, dok se etička pitanja svode na mogućnost eugeničkog djelovanja i miješanje u prirodni proces (24). Uz to, etički aspekti PGT-a uvelike se razlikuju od države do države, tako je u nekim državama poput SAD-a popularizirano liberalno shvaćanje PGT-a pa se roditeljima ostavlja mogućnost odabira spola djeteta na osnovi rezultata pretrage,

dok neke europske države zabranjuju svaki oblik genetičkog ispitivanja embrija (8). Dakle, nema ustaljene pravne osnove koja će globalno vrijediti za PGT.

PGT je skup postupak koji mnogima nije dostupan, što otvara pitanje pravednosti i pristupačnosti. Parovi s nižim primanjima često ne mogu priuštiti ovu tehnologiju, što može biti izuzetno frustrirajuće i bolno za one koji žele povećati svoje šanse za zdravu trudnoću. Osim toga, razlike u zdravstvenim sustavima među zemljama znače i razliku u dostupnosti ove dijagnostičke pretrage. Iako PGT nudi značajne prednosti u sprječavanju genetskih poremećaja i smanjenju povezanih zdravstvenih troškova, rješavanje važnih društvenih i etičkih pitanja bit će ključno je za njegovu pravednu i odgovornu uporabu u društvu.

7. BUDUĆI SMJEROVI ISTRAŽIVANJA I NAPREDAK PGT-a

Od kako je prvi puta primijenjeno kao dodatna metoda dijagnostike u postupku MPO-a, preimplantacijsko genetsko testiranje sada je dostupno u većini razvijenih zemalja te je postalo neizbježan korak u testiranju kromosomskih abnormalnosti i genetskih mutacija embrija, istovremeno ostavljajući prostora za daljnji napredak u području MPO-a (16). Značajan potencijal za unapređenje ostavlja prostora za poboljšanje rezultata liječenja, povećanje pristupačnosti i smanjenje troškova provođenja PGT-a.

Istražuju se novi, manje invazivni pristupi i tehnike. Primjer je istraživanje u kojem su analizirali blastocelnu tekućinu kao izvor genetičkog materijala za PGT. Podudarnost nalaza PGT-a iz blastocelne tekućine s nalazom iz uzorka polarnog tjelešca, blastomera ili trofoektoderma bila je vrlo visoka (16). Uz to, neka su istraživanja potvrdila da je kod PGT-a provedenog s blastocelnom tekućinom učinkovitost NGS-a bila 84 %, što znači da je blastocelna tekućina korisna kao izvor DNA (25). S druge strane, dio autora nije potvrdio ove činjenice stoga su potrebna dodatna istraživanja u ovome području (26). Novija istraživanja pokušala su iskoristiti potrošeni medij kulture embrija kao uzorak za PGT dijagnostiku (27, 28, 29, 30, 31). Iako minimalno invazivan, ovaj postupak ponekad dovodi do kontaminacije majčinim stanicama. Prikupljanje potrošenog medija za kulturu embrija, kao i prikupljanje blastocelne tekućine bio bi značajan iskorak u smanjenju invazivnosti postupka PGT-a. Uspoređujući ove neinvazivne

metode sa zlatnim standardom, tj. biopsijom blastociste, zaključeno je da bi navedene neinvazivne metode u budućnosti bile sigurnija alternativa za probir embrija (16, 32).

Uvođenje umjetne inteligencije (AI) i strojnog učenja u analizu PGT-a predstavlja suvremen pristup s velikim potencijalom i izazovima. Nedavne studije su obrađivale primjenu AI u PGT-A, naročito u predviđanju aneuploidije u embrijima. Osnovni problem u primjeni umjetne inteligencije u sklopu PGT-a još uvijek predstavlja nejasno tumačenje rezultata. Razvoj AI i strojnog učenja u analizi PGT-a ima velik potencijal, ali zahtijeva kontinuirano istraživanje i pažljivu procjenu kako bi se osigurala sigurna integracija u tehnologije pomognute oplodnje (33). Tehnološki napredak omogućit će smanjenje troškova PGT-a, čineći ga dostupnijim široj populaciji.

Pristup personalizirane medicine unutar PGT-a fokusiran je na unapređenje u odabiru embrija prepoznavanjem genetskih abnormalnosti u embrijima nakon IVF-a. Važan aspekt personalizirane medicine u PGT-u je sprječavanje rođenja djece s terminalnim ili kroničnim bolestima te izbjegavanje obiteljskih genetskih bolesti (33). Implementacija PGT-a u personaliziranu medicinu zahtjeva suradnju različitih grana medicine uključujući ginekologe, embriologe i genetičare. Takav individualan pristup u obradi parova koji ulaze u postupak medicinski pomognute oplodnje omogućio bi brže i lakše postizanje zdrave trudnoće, što bi u konačnici smanjilo troškove povezane s ponovljenim ciklusima IVF-a i liječenjem genetskih bolesti.

Sveobuhvatan pristup koji uključuje genetsko savjetovanje, personaliziranje terapije temeljeno na individualnim genetskim profilima i PGT-u poboljšalo bi ishode liječenja i reproduktivno zdravlje te dovelo do smanjenja teških genetskih bolesti i povećanja uspješnosti trudnoća. Cilj je napredak u interdisciplinarnoj suradnji koji će omogućiti kvalitetu i cjelovitost samoga postupka. Ovo područje i dalje zahtjeva kontinuirano ulaganje u istraživanje, tehnologiju i etičko razmatranje kako bi ostvarilo svoj puni potencijal.

8. ZAKLJUČAK

Preimplantacijsko genetsko testiranje predstavlja ključnu inovaciju u reproduktivnoj medicini, s potencijalom unapređenja kvalitete života obiteljima s teškim nasljednim bolestima. Povećava uspješnost IVF postupka identifikacijom aneuploidnih embrija što smanjuje stope spontanih pobačaja. Razvoj tehnoloških metoda poput NGS-a omogućio je precizniju i efikasniju analizu genetskog materijala embrija. Budući roditelji koji znaju da su sami nositelji mutacije odlučuju se na PGT sa željom da njihovo buduće potomstvo bude zdravo.

PGT-M je danas metoda izbora u poznatih nosioca genetskih bolesti. Pretpostavlja se da su monogenske bolesti uzrok 20 % smrti novorođenčadi. Metoda je to visoke točnosti koja će osigurati zdravo potomstvo parovima koji su svjesni da su nositelji mutacije, odnosno da su u riziku prijenosa bolesti na iduće generacije. Parovi koji se odluče na PGT-M trebaju proći genetsko savjetovanje, a za postavljanje točne dijagnoze u cijeli proces trebaju biti uključeni stručnjaci iz područja genetike, embriologije i ginekologije (2).

Kromosomske abnormalnosti vrlo su česte u embrijima, a učestalost značajno raste s dobi majke. U dobi od 35 godina stopa aneuploidnih embrija iznosi otprilike 40 %, no nakon 35 godina ta se stopa povisuje za >0,5 % mjesečno. Uporabom PGT-A dijagnostike smanjena je stopa spontanih pobačaja, koji su većinom posljedica aneuploidije embrija. Gledajući te podatke, postaje jasna uloga PGT-A testiranja u probiru euploidnih zametaka, što može značajno skratiti vrijeme potrebno za ostvarivanje zdrave i uspješne trudnoće (2).

Zaključno, PGT je jedina dostupna metoda za testiranje embrija na genetske poremećaje prije trudnoće čime se izbjegavaju invazivni postkonceptijski dijagnostički postupci. Rezultati invazivnih postupaka povezani su s teškim odlukama partnera o nastavku trudnoće u slučaju dokazanih genetskih poremećaja. PGT je visoko precizna metoda, ali kao i svaki dijagnostički postupak ima svoja ograničenja. Izuzetno je važno informirati buduće roditelje o ograničenjima, prednostima i rizicima metode što zahtjeva interdisciplinarni pristup.

9. ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Lani Škrgatić na suradnji i stručnom vodstvu tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji i partneru koji su bili uz mene i podržali me tijekom svih šest godina studija.

10. LITERATURA

1. Giovannopoulou E, Tsakiridis I, Mamopoulos A, Kalogiannidis I, Papoulidis I, Athanasiadis A i sur. Invasive Prenatal Diagnostic Testing for Aneuploidies in Singleton Pregnancies: A Comparative Review of Major Guidelines. Medicina [Internet]. 2022 Oct 1;58(10):1472. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/1648-9144/58/10/1472/htm>
2. Wells D. Current status and role of PGT [video na internetu]. [pristupljeno 2024 Apr 10]. Dostupno na: <https://player.vimeo.com/video/597297670>
3. Girsh E, Malcov M. Preimplantation Genetic Testing (PGT). In: Girsh E, editor. A Textbook of Clinical Embryology. Cambridge: Cambridge University Press; 2021. p. 207–25.
4. Giuliano R, Maione A, Vallefucio A, Sorrentino U, Zuccarello D. Preimplantation Genetic Testing for Genetic Diseases: Limits and Review of Current Literature. Genes. 2023 Nov 17;14(11):2095. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38003038/>
5. Schattman GL, Xu K. Preimplantation genetic testing.[ažurirano 2024 Jan 19; pristupljeno 2024 Apr 18]. U: Wilkins-Haug L. UpToDate [Internet]. 2022 Dec. Dostupno na: https://www.uptodate.com/contents/preimplantation-genetic-testing?search=Preimplantation%20genetic%20testing%20Glenn%20L%20Schattman%2C%20MD%2C%20Kangpu%20Xu%2C%20PhD%2C%20HCLD%20&source=search_result&selectedTitle=1%7E150&usage_type=default&display_rank=1
6. Dayal MB. Preimplantation Genetic Diagnosis: Overview, Indications and Conditions, Process [Internet]. Medscape.com. 2019. Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/273415-overview>

7. Lipscomb DM. PGT and Prenatal Testing [Internet]. sharinghealthygenes.com. 2019 [pristupljeno 2024 Apr 22]. Dostupno na: <https://sharinghealthygenes.com/pgt-vs-prenatal-testing-steps-for-your-future-childs-health/>
8. De Rycke M, Berckmoes V. Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disorders. Genes. 2020 Jul 31;11(8):871. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32752000/>
9. Greco E, Litwicka K, Minasi MG, Cursio E, Greco PF, Barillari P. Preimplantation Genetic Testing: Where We Are Today. International Journal of Molecular Sciences. 2020 Jun 19;21(12):4381. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32575575/>
10. Pre-implantation genetic testing (PGT-M/SR) - Overview [Internet]. Guy's and St Thomas' NHS Foundation Trust. [pristupljeno 2024 May 3]. Dostupno na: <https://www.guysandstthomas.nhs.uk/our-services/pre-implantation-genetic-testing-pgt-msr>
11. Preimplantation Genetic Testing – FAQ | Fertility & Reproductive Medicine Center [Internet]. Fertility wustl.edu. [pristupljeno 2024 May 3]. Dostupno na: <https://fertility.wustl.edu/treatments-services/genetic-counseling/preimplantation-genetic-testing-faq/>
12. Gleicher N, Patrizio P, Brivanlou A. Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy – a Castle Built on Sand. Trends in Molecular Medicine. 2021 Aug;27(8):731–42. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33446425/>
13. Yang H, DeWan AT, Desai MM, Vermund SH. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: challenges in clinical practice. Human Genomics. 2022 Dec 20;16(1). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36536471/>

14. John Hopkins Medicine. Screening Tests for Common Diseases [Internet]. JOHNS HOPKINS MEDICINE. 2019. [pristupljeno 2024 May 10]. Dostupno na: <https://www.hopkinsmedicine.org/health/treatment-tests-and-therapies/screening-tests-for-common-diseases>
15. Khan YS, Ackerman KM. Embryology, Week 1 [Internet]. PubMed. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32119449/>
16. Takeuchi K. Pre-implantation genetic testing: Past, present, future. Reproductive Medicine and Biology. 2020 Oct 13;20(1). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33488281/>
17. Practice Committee and Genetic Counseling Professional Group of the American Society for Reproductive Medicine, ACOG. Indications and management of preimplantation genetic testing for monogenic conditions: a committee opinion. Fertil Steril. 2023 Jul;120(1):61-71. doi: 10.1016/j.fertnstert.2023.03.003.
18. Griffin DK, Ogur C. PGT-SR: A Comprehensive Overview and a Requiem for the Interchromosomal Effect. DNA. 2023; 3(1):41-64. <https://doi.org/10.3390/dna3010004>
19. Benefits of Embryo Genetic Testing | Prime Fertility Clinic [Internet]. primefertilitycenter. 2021. [pristupljeno 2024 May 22]. Dostupno na: <https://www.primefertilitycenter.com/en/benefits-of-embryo-genetic-testing/>
20. How much does PGT-A cost and is it worth it? [Internet]. fertilityspace.io. [pristupljeno 2024 May 22]. Dostupno na: <https://fertilityspace.io/blog/how-much-does-pgt-a-cost-and-is-it-worth-it>

21. Davis OS, Favetta LA, Deniz S, Mehrnoosh Faghih, Amin S, Karnis M i sur. Potential Costs and Benefits of Incorporating PGT-A Across Age Groups: A Canadian Clinic Perspective. JOGC/Journal of obstetrics and gynaecology Canada. 2024 May 1;46(5):102361–1. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38272217/>
22. Somigliana E, Busnelli A, Paffoni A, Vigano P, Riccaboni A, Rubio C i sur. Cost-effectiveness of preimplantation genetic testing for aneuploidies. Fertility and Sterility. 2019 Jun;111(6):1169–76. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30777289/>
23. Miller KE, Hoyt R, Rust S, Doerschuk R, Huang Y, Lin SM. The Financial Impact of Genetic Diseases in a Pediatric Accountable Care Organization. Frontiers in Public Health. 2020 Feb 28;8. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32181236/>
24. De Krom G, Severijns Y, Vlieg WL, Arens YHJM, Van Golde RJT, De Die-Smulders CEM i sur. Motives and considerations regarding PGT in couples carrying a structural chromosomal abnormality: a qualitative exploration. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2020 May 16;37(7):1719–27. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32418135/>
25. Zhang Y, Li N, Wang L, et al. Molecular analysis of DNA in blastocoelic fluid using next-generation sequencing. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(5):637-645.
26. Capalbo A, Romanelli V, Patassini C, et al. Diagnostic efficacy of blastocoel fluid and spent media as sources of DNA for preimplantation genetic testing in standard clinical conditions. *Fertil Steril*. 2018;110(5):870-879.
27. Shamonki MI, Jin H, Haimowitz Z, Liu L. Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertil Steril*. 2016;106(6):1312-1318. 10.1016/j.fertnstert.2016.07.1112

28. Xu J, Fang R, Chen L, et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(42):11907-11912.
29. Lane M, Zander-Fox DL, Hamilton H, et al. Ability to detect aneuploidy from cell free DNA collected from media is dependent on the stage of development of the embryo. *Fertil Steril*. 2017;108(3):e61.
30. Rubio C, Navarro-Sánchez L, Garcia-Pascual CM, et al. Multicenter prospective study of concordance between embryo cell-free DNA and trophectoderm biopsies from 1,301 human blastocysts. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;S0002-9378(20):30520–30522.
31. Ho JR, Arrach N, Rhodes-Long K, et al. Pushing the limits of detection: investigation of cell-free DNA for aneuploidy screening in embryos. *Fertil Steril*. 2018;110(3):467-474.
32. Shi W, Zhao Z, Xue X, Li Q, Yao Y, Wang D i sur. Ploidy Testing of Blastocoel Fluid for Screening May Be Technically Challenging and More Invasive Than That of Spent Cell Culture Media. *Frontiers in Physiology*. 2022 Feb 21;13. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35264976/>
33. Gudapati S, Chaudhari K, Shrivastava D, Yelne S. Advancements and Applications of Preimplantation Genetic Testing in In Vitro Fertilization: A Comprehensive Review. *Curēus*. 2024 Mar 31; Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38694414/>

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zadru, 27. Srpnja 1999. Svoje obrazovanje započela sam u OŠ Smiljevac u Zadru, koju sam pohađala od 2006. do 2014. godine. U tom periodu pohađala sam i Glazbenu školu Blagoje Bersa u kojoj sam postigla osnovno glazbeno obrazovanje. Daljnje obrazovanje nastavila sam u Gimnaziji Franje Petrića (MIOC) u Zadru, koju sam pohađala do mature 2018. godine. Iste godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci koji sam pohađala do 2021. godine. Daljnje medicinsko školovanje nastavila sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu koji završavam u akademskoj godini 2023./2024. Obavljala sam posao demonstratora na Zavodu za anatomiju i Zavodu za histologiju i embriologiju. Aktivni sam član Sekcije za ginekologiju i opstetriciju u sklopu koje sam sudjelovala u organizaciji Simpozija o sindromu policističnih jajnika i endometriozi te sam pomagala u radu udruge „Sve za nju“ za žene oboljele od endometrioze. Aktivno se služim engleskim jezikom.