

Leuven Institute for
Fertility and Embryology



Eicel en Embryo biopsie

S. Gordts, L. Gianaroli*, C. Maggii*, B. Vandamme, R. Campo

**S.I.S.M.E.R.. Via Mazzini 12, 40138 Bologna*

1. Indicaties

De technieken van eicel en embryo biopsie kunnen gebruikt worden voor de volgende groepen van patiënten:

1. Koppels die drager zijn van een genetische aandoening die aan hun nageslacht kunnen worden doorgegeven. Tabel 1 geeft een niet tentatief overzicht van de lijst van zulke aandoeningen die echter continu wordt bijgewerkt.
2. Patiënten met fertiliteitproblemen en met een ongunstige prognose. Hierbij gaat het voornamelijk om koppels waarvan de vrouw ouder is dan 38 jaar en/of een voorgeschiedenis van 3 of 4 gefaalde IVF – (ICSI) behandelingen.
3. Patiënten die drager zijn van een chromosomale translocatie. Een translocatie bestaat uit een abnormale positie van een korter of langer fragment van een bepaald chromosoom waarbij deze laatste zich vastzet op een ander chromosoom. Dit kan leiden tot de geboorte van kinderen met ernstige chromosomen afwijkingen. Meestal gaan deze translocaties echter gepaard met een probleem van onvruchtbaarheid of herhaald miskraam. Medisch gezien worden deze translocaties ingedeeld in Robertsoniaanse translocaties en reciproque translocaties. (Tabel 2)
4. Patiënten met een voorgeschiedenis van herhaald miskraam en waarbij geen andere mechanische oorzaken kunnen worden gevonden zoals bepaalde afwijkingen van de baarmoeder.

De technieken van eicel en embryo biopsie kunnen nog gebruikt worden bij andere aandoeningen doch hiervoor bestaan nog onvoldoende wetenschappelijke gegevens en is verder onderzoek nog noodzakelijk.

2. Historiek

In het midden van de jaren tachtig opperde voor de eerste maal Alan Trounson van Melbourne de mogelijkheid voor het verwijderen van een enkelvoudige cel uit een 8-cellig embryo voor verder genetisch onderzoek zonder schade toe te brengen aan het embryo. Deze mogelijkheden werden uitgetest op muizenembryo's.

In het begin van de jaren negentig beschreven Alan Handyside en Lord Robert Winston van het Hammersmith hospitaal in Londen het tot stand komen van de eerste zwangerschap na embryo biopsies voor genetische aandoeningen. In 1995 verfijnde Santiago Munné een techniek die toelaat een telling van het aantal chromosomen uit te voeren op één enkelvoudige cel. Door het gebruik van deze techniek bleek al gauw dat bepaalde categorieën van patiënten bestonden met een zeer hoge incidentie van genetisch abnormale embryo's waarbij er bij herhaling geen implantatie of zwangerschap optrad na embryo transfer.

Rond hetzelfde ogenblik onderzocht Yuri Verlinski in Chicago de mogelijkheden voor het onderzoek van het genetisch materiaal van het eerste poollichaampje, een bijproduct van de niet bevruchte eicel. Deze techniek is minder invasief dan de biopsie van het embryo, maar heeft het nadeel dat de onderzochte cel nog kleiner is en dat bij dit onderzoek mogelijke genetische afwijkingen geïnduceerd door de mannelijke zaadcel niet worden onderzocht.

Sinds 1997 komt het gebruik van deze technieken in een stroomversnelling met verschillende publicaties in internationale tijdschriften.

Op dit ogenblik bestaan twee internationale organisaties die zich specifiek met deze tak van de reproductieve geneeskunde bezig houden: de International Working Group on Preimplantation Genetic Diagnosis en het consortium van Preimplantation Genetic Diagnosis van de European Society of Human Reproduction. Beide groepen houden regelmatig vergaderingen voor besprekingen van de resultaten en updating van de nieuwste ontwikkelingen in dit domein.

3. Techniek voor het uitvoeren van biopsies

3.1. Eicel biopsie

Eicel biopsie wordt uitgevoerd door het verwijderen van het eerste en/of tweede poollichaampje. Het eerste poollichaampje, welke een set bevat van 46 chromosomen, wordt door de eicel uitgestoten voor de bevruchting om plaats te maken voor de 23 chromosomen van de zaadcel. Het tweede poollichaampje wordt door de eicel uitgestoten na de bevruchting. Na opening van de zona pellucida kan door gebruik van een zeer dunne glazen microneald het eerste en/of tweede poollichaampje worden verwijderd, waarna het kan worden voorbereid voor verder onderzoek.

3.2. Embryo biopsie

Embryo biopsie wordt uitgevoerd drie dagen na de inseminatie. Op dat ogenblik bevindt het embryo zich in een acht-cellig stadium. De techniek kan vergeleken worden met de voorgaande, maar dient met de grootste omzichtigheid te worden uitgevoerd om de naburige cellen niet te beschadigen. Indien de techniek op een correcte manier wordt uitgevoerd, zal geen schade worden toegebracht aan het embryo zoals mag blijken uit verschillende dierexperimentele en humane studies.

Na verwijdering zal de cel (blastomeer) voorbereid worden voor verder onderzoek.

Eicel biopsie

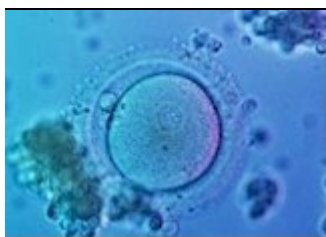


Fig. 1: Niet bevruchte eicel met aanwezigheid van eerste poollichaampje (op 10 uur). **Fig. 2:** Verwijderen van eerste poollichaampje van eerste poollichaampje (op 10 uur).



Fig. 3 en 4: Biopsie van het tweede poollichaampje wordt uitgevoerd op een bevruchte eicel zoals blijkt uit de aanwezigheid van de twee centrale kernen of pronuclei. Aan de linkerkant bemerkt men de holding pipet voor fixatie van de bevruchte eicel terwijl met de biopsiepipette (rechts) het tweede poollichaampje wordt verwijderd.

Embryo biopsie

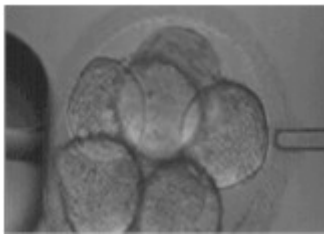


Fig. 5: Embryo biopsie wordt uitgevoerd door verwijdering van één enkele cel (blastomeer) uit een acht cel embryo. Het embryo wordt gefixeerd door de holding pipet (links). Deze foto toont het maken van een kleine opening in het membraan dat het embryo omgeeft; hiervoor wordt een speciale oplossing gebruikt die wordt aangebracht dicht bij de te verwijderen cel.

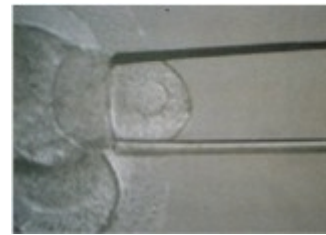


Fig. 6: Eens het membraan is geopend wordt een micropipet gebruikt met een iets grotere diameter. Deze wordt doorheen de opening tot bij de te verwijderen cel gebracht. Door middel van een lichte suctie wordt de cel vervolgens verwijderd.



Fig. 7: Deze foto toont de verwijderde cel (blastomeer) waarop de verdere onderzoeken zullen worden uitgevoerd.

4. Het verdere onderzoek

Eens de cel verwijderd kunnen de verdere onderzoeken gebeuren. Hiervoor worden hoofdzakelijk gebruik gemaakt van twee technieken: de FISH techniek (Fluorescent In Situ Hybridization) en de PCR techniek (Polymerase Chain Reaction).

4.1. FISH

Deze techniek wordt gebruikt voor identificatie van de chromosomen en detectie van numerieke afwijkingen. De techniek verloopt in verschillende stappen waarbij de

kleine hoeveelheid DNA van de celkern van de verwijderde cel in contact wordt gebracht met een grotere hoeveelheid DNA op een specifieke manier gekleurd door fluochromes waarvan de kleur gerelateerd is aan het te onderzoeken chromosoom. Eens dat de celkern op een adequate manier is voorbereid kan dan het verdere microscopisch onderzoek bij middel van een fluorescentie microscoop worden uitgevoerd. Hierbij kan het onderzoek van verschillende chromosomen worden uitgevoerd, die worden geïdentificeerd door hun specifieke kleur.

4.2. PCR

Deze techniek wordt gebruikt voor het onderzoek van kleine stukjes van chromosomen zoals enkelvoudige genen, stukjes van een enkelvoudig gen of specifieke gen sequenties. Hiervoor wordt een gesofisticeerd systeem gebruikt, waarvoor de uitvinder trouwens een Nobelprijs won, waarbij de kleine hoeveelheid DNA van de enkelvoudige cel wordt meerdere male worden geamplificeerd (vermenigvuldigd) zodat een grotere hoeveelheid DNA beschikbaar wordt voor onderzoek.

FISH

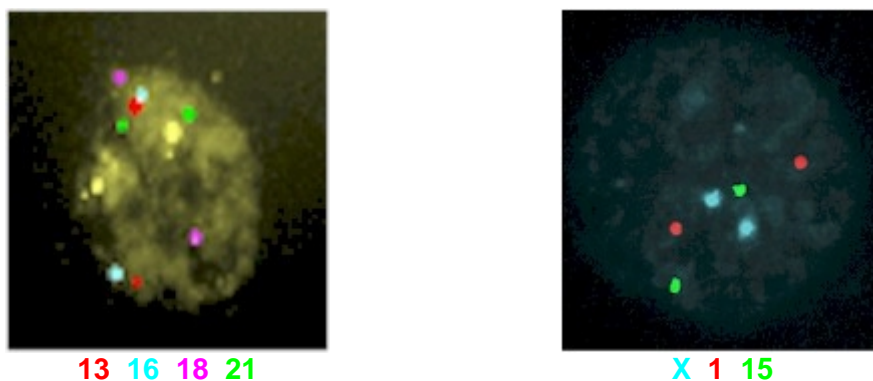


Fig. 8 en 9: Visualisatie van verschillende chromosomen zoals gezien door de fluorescentie microscoop: twee signalen van elk chromosoom worden gevisualiseerd: 13 (rood), 16 (blauw), 18 (paars), 21 (groen) en 22 (geel). Na het eerste onderzoek wordt dezelfde cel aan een tweede behandeling (hybridisatie) onderworpen waardoor twee signalen kunnen worden waargenomen van chromosoom X (blauw), 1 (rood) en 15 (groen).

PCR

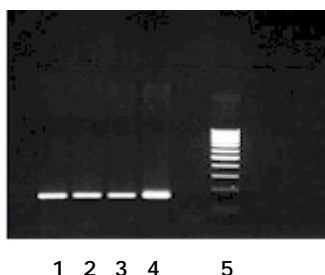


Fig. 10: Door gebruik te maken van de PCR techniek werd de gen sequentie voor cystische fibrose versterkt. De drie signalen links tonen de amplificatie. De vierde band is een controle waarbij de versterkte band wordt gezien bij correcte handeling. Deze band zal afwezig zijn in de vijfde band welke de negatieve controle is.

5. Accuraatheid van deze nieuwe technieken

Voor zover tot op heden gekend zijn deze technieken effectief bij 90-93 % van de patiënten. Mogelijks kan dit oplopen tot 100% indien zich nieuwe technologieën zouden ontwikkelen. Tot op heden kan deze techniek zeker niet beschouwd worden als een vervanging van de prenatale diagnose (vlokkentest of vruchtwaterpunctie) maar eerder als een aanvulling ervan. Inderdaad zal door het uitvoeren van deze techniek de kans dat er zich abnormale embryo's gaan inplanten in de baarmoeder gereduceerd worden met 90% of wordt de kans gereduceerd in geval van infertiliteit dat embryo's, die niet zullen inplanten, worden teruggeplaatst.

Belangrijk is echter te weten dat er enige discrepantie beschreven is tussen de resultaten van het pre-implantatie onderzoek en een latere prenataal onderzoek.* Gezien de zeer minimale discrepantie bewijst dit enerzijds de efficiëntie van deze techniek, maar anderzijds benadrukt het nogmaals eens de noodzakelijkheid van een bijkomende prenatale diagnose ter bevestiging van de laboresultaten.

Tabel 1. Overerfbare afwijkingen welke door genetisch onderzoek na eicel of embryo biopsie kunnen worden gediagnosticeerd.	
Achondroplasia	Central core disease
Agammaglobulinemia	Gaucer's disease
Sickle-cell anemia	Huntington's disease
Fanconi's anemia	Alport's disease
Spinal/bulbar muscular atrophy	Tay-Sachs' disease
Alpha ₁ -antitrypsin deficiency	MELAS
Long chain hydroxyacyl CoA dehydrogenase deficiency	X-linked myotubular myopathy
Ornithine transcarbamylase deficiency	Neurofibromatosis I and II
Deficiency of the mitochondrial trifunctional protein	Multiple endocrine neoplasia type II
Multiple epiphyseal dysplasia	Osteogenesis imperfecta I and IV
Myotonic dystrophy	Familial adenomatous polyposis coli
Becker's muscular dystrophy	Rhetinitis pigmentosa
Duchenne's muscular dystrophy	Rhesus (Rh D)
Haemofilia A and B	Tuberous sclerosis
Epidermolysis bullosa	Crouzon's syndrome
Exclusion HD	Di George's syndrome
FAP-Gardner	Hunter's syndrome MPS II
Phenylketonuria	Lesch-Nyhan's syndrome
Cistic fibrosis	Marfan's syndrome
X-linked hydrocephalus	Digital oro-facial-syndrome type 1
Incontinentia pigmenti	Stickler's syndrome
Hyperinsulinemic hypoglycemia PHH1	Fragile X syndrome
Early onset Alzheimer's disease	Wiskott-Aldrich syndrome
Charcot-Marie-Tooth's disease 1 and 2A	Thalassemia

* Referenties:

Hardy K. and Handyside A.H (1992) Biopsy of cleavage stage human embryos and diagnosis of single gene defects by DNA amplification. Arch. Patol. Lab. Med. 116, 388-392.

Harper K. and Handyside A.H. (1994) The current status of preimplantation diagnosis. Curr. Obstet. Gynecol. 4, 143-149.

Sermon K., Goossens V., Seneca S. et al. (1998) Preimplantation diagnosis of Huntington's disease (HD): clinical application and analysis of the HD expansions in affected embryos. Prenat Diagn 18, 1427-1436.

ESHRE PGD Consortium (2000) ESHRE Preimplantation genetic diagnosis (PGD) Consortium: data collection II (May 2000) Hum. Reprod. 15, 2673-2683.

Tabel 2. Translocaties: structurele veranderingen tussen 2 niet-homologe chromosomen. Types van translocaties reeds behandeld of nog onder onderzoek.	
Robertsonian translocaties: komen voor tussen chromosomen 13, 14, 15, 21, 22	Reciprocal translocaties: komen voor tussen alle andere chromosomen
13:14 13:21 14:21	1:3 1:11 1:22 2:8 3:12 4:15 4:20 11:22 12:13 14:17 14:20 16:17 18:20

6. Resultaten

Het centrum van Dr. Gianaroli (SISMER-Bologna) was een van de eerste centra om deze techniek op een systematische wijze toe te passen. Door de intense samenwerking tussen onze beide centra kunnen we dan ook beroep doen op hun expertise en de vermelde resultaten zijn de weerspiegeling van deze samenwerking.

Table 3. Resultaten bij patienten met vrouwelijke leeftijd \geq 38 years (September 1996 – December 2000).	
N° cyclussen	174
Totaal aantal embryos	1078
N° embryos onderzocht	920
N° normale embryos (%)	257 (28)
N° aneuploïede embryos (%)	655 (71)
N° embryos zonder resultaat (%)	8 (1)
N° transfers (%)	107 (61)
N° klinische zwangerschappen (%)	36 (34)
N° miskramen (%)	5 (14)
Implantatie rate (%)	20.0

Table 4. Resultaten bij patienten met \geq 3 IVF gefaalde IVF behandelingen (September 1996 – December 2000).	
N° cyclussen	105
Total aantal of embryos	675
N° embryos onderzocht	588
N° normale embryos (%)	214 (36)
N° aneuploïede embryos (%)	361 (61)
N° embryos zonder resultaat (%)	13 (2)
N° transfers (%)	76 (72)
N° klinische zwangerschappen (%)	24 (32)
N° miskramen (%)	1 (4)*
Implantatie rate (%)	22.4

*Extra uteriene zwangerschap

Table 5. Resultaten bij patiënten met afwijkend karyotype toe te schrijven aan mosaïsme van de sex chromosomen (September 1996 – december 2000).

N° cyclussen	38
Total aantal embryos	232
N° embryos onderzocht	192
N° normale embryos (%)	69 (36)
N° aneuploïede embryos (%)	118 (61)
N° embryos zonder resultaat (%)	5 (3)
N° transfers (%)	27 (71)
N° klinische zwangerschappen (%)	13 (48)
N° miskramen (%)	0
Implantatie rate (%)	36.2

Tabel 6. Resultaten bij patiënten drager van robertsonian of reciprocal translocaties (September 1996 – December 2000).

	Robertsonian translocaties	Reciprocal translocaties
N° cyclussen	22	15
Total aantal of embryos	125	86
N° embryos onderzocht	107	73
N° normale embryos (%)	26 (24)	19 (26)
N° aneuploïede embryos (%)	81 (76)	53 (73)
N° embryos zonder resultaat (%)	0	1 (1)
N° transfers (%)	13 (59)	9 (60)
N° klinische zwangerschappen (%)	8 (62)	2 (22)
N° abortions (%)	2 (25)*	1 (50)
Implantation rate (%)	43.5	10.5

*1 miskraam na vruchtwaterpunctie (normaal fetaal karyotype)

Tabel 7. Resultaten bij patiënten met herhaald miskraam (September 1996 – December 2000).

N° cyclussen	49
Total aantal of embryos	331
N° embryos onderzocht	276
N° normale embryos (%)	76 (27)
N° aneuploïede embryos (%)	198 (72)
N° embryos zonder resultaat (%)	2 (1)
N° transfers (%)	32 (65)
N° klinische zwangerschappen (%)	13 (41)
N° miskramen (%)	1 (8)
Implantatie rate (%)	25.8

Tabel 8. Resultaten bij patiënten drager van geïsoleerde gen defecten (September 1996 – July 2001).

N° cyclussen	15
Total aantal embryos	95
N° embryos onderzocht	87
N° normale embryos (%)	28 (32)
N° gezonde embryos-drager (%)	42 (48)
N° embryos aangetast voor de onderzochte afwijking (%)	14 (16)
N° embryos zonder resultaat (%)	3 (4)
N° transfers (%)	12 (80)
N° klinische zwangerschappen (%)	4 (33)*
N° miskramen (%)	0
Implantatie rate (%)	23.5

*Diagnose bevestigd door latere prenatale diagnose.

7. Instructies voor deelname

Na duidelijke bespreking op raadpleging zal voor de overgrote meerderheid van de patiënten de behandeling bestaan uit een normale cyclus van in vitro fertilisatie. Voor andere patiënten met specifieke genetische aandoeningen zullen bijkomende onderzoeken noodzakelijk zijn en is samenwerking met een centrum voor genetica en moleculaire biochemie noodzakelijk. Sommige van deze onderzoeken kunnen tot 2 maanden duren.

Eens alle voorafgaandelijke onderzoeken uitgevoerd zijn, kan de behandeling met in vitro fertilisatie worden opgestart.

Wegens de moeilijkheidsgraad van deze behandelingen zullen ze enkel op vooraf ingestelde periodes worden uitgevoerd.

Voor deelname dient een specifiek document te worden ondertekend waarbij toestemming wordt gegeven tot het uitvoeren van een eicel of embryo biopsie.

Toestemmingsformulier voor pre-implantatie genetische screening.

Embryo biopsie bestaat uit het verwijderen van een of meerdere cellen uit het embryo welke dan gebruikt worden voor verder genetisch onderzoek. Ook het verwijderen van het poollichaampje uit de eicel behoort tot de mogelijkheden.

Met de op dit ogenblik bestaande technologie kan niet met 100% zekerheid gesteld worden dat de teruggeplaatste embryo's helemaal geen genetische afwijkingen vertonen of normaal zijn.

We zijn er ons van bewust dat hoger beschreven techniek:

1. Voor het ogenblik gebruikt wordt om in een geselecteerde groep van patiënten de kansen op zwangerschap te verhogen (leeftijd van de vrouw >37 jaar, verschillende gefaalde IVF behandelingen, herhaald miskraam)
2. Kan leiden tot het niet uitvoeren van een transfer indien alle embryo's afwijkingen zouden vertonen. Onder geen beding zal een transfer van "niet normale" embryo's worden uitgevoerd.
3. Kan leiden tot het niet uitvoeren van een embryo transfer indien de embryo's zich niet verder ontwikkelen.
4. Niet volledig uitsluit dat de teruggeplaatste embryo's genetisch volledig normaal zijn
5. Misschien niet kan worden uitgevoerd op onze embryo's wegens een onvoldoende ontwikkeling van deze laatsten of door onvoorziene technische problemen tijdens de voorbereidingen voor het genetisch onderzoek.
6. Hoewel verschillende experimentele studies aantonen dat het nemen van een biopsie geen schade toebrengt aan het embryo, er hierover geen 100% zekerheid bestaat.
7. Niet 100% accuraat is waarbij het kan gebeuren dat een normaal embryo verkeerdelijk als abnormaal wordt beschouwd en vice versa (5%).
8. Niet gebruikt wordt voor sex selectie.

In het licht van de vorige opgenoemde punten is het noodzakelijk de zwangerschap nauwkeurig te laten opvolgen. Het is hierbij ten sterkste aangewezen een prenataal onderzoek te laten uitvoeren tussen de 10^e en de 16^e zwangerschapsweek. Deze tests laten een volledige chromosomenanalyses van de foetus toe.

Hierbij bevestigen we dat we dit formulier aandachtig hebben gelezen en dat we de nodige uitleg hebben gekregen over deze procedure zodat we deze duidelijk begrijpen.

Datum:

Naam echtgenote:

Handtekening

Naam echtgenoot:

Handtekening