

Preimplantációs genetikai diagnosztika sikeres alkalmazása 1-es típusú mukopoliszaccharidózisban



Varga Tünde¹, Mátyás Szabolcs², Kónya Márton¹, Kurcsics Judit¹, Rajczy Klára², Babenko Éva², Szabó Barbara², Krizsa Ferenc²

¹ Istenhegyi Géndiagnosztikai, Nőgyógyászati és Családtervezési Centrum, Budapest

² Kaáli Intézet, Budapest

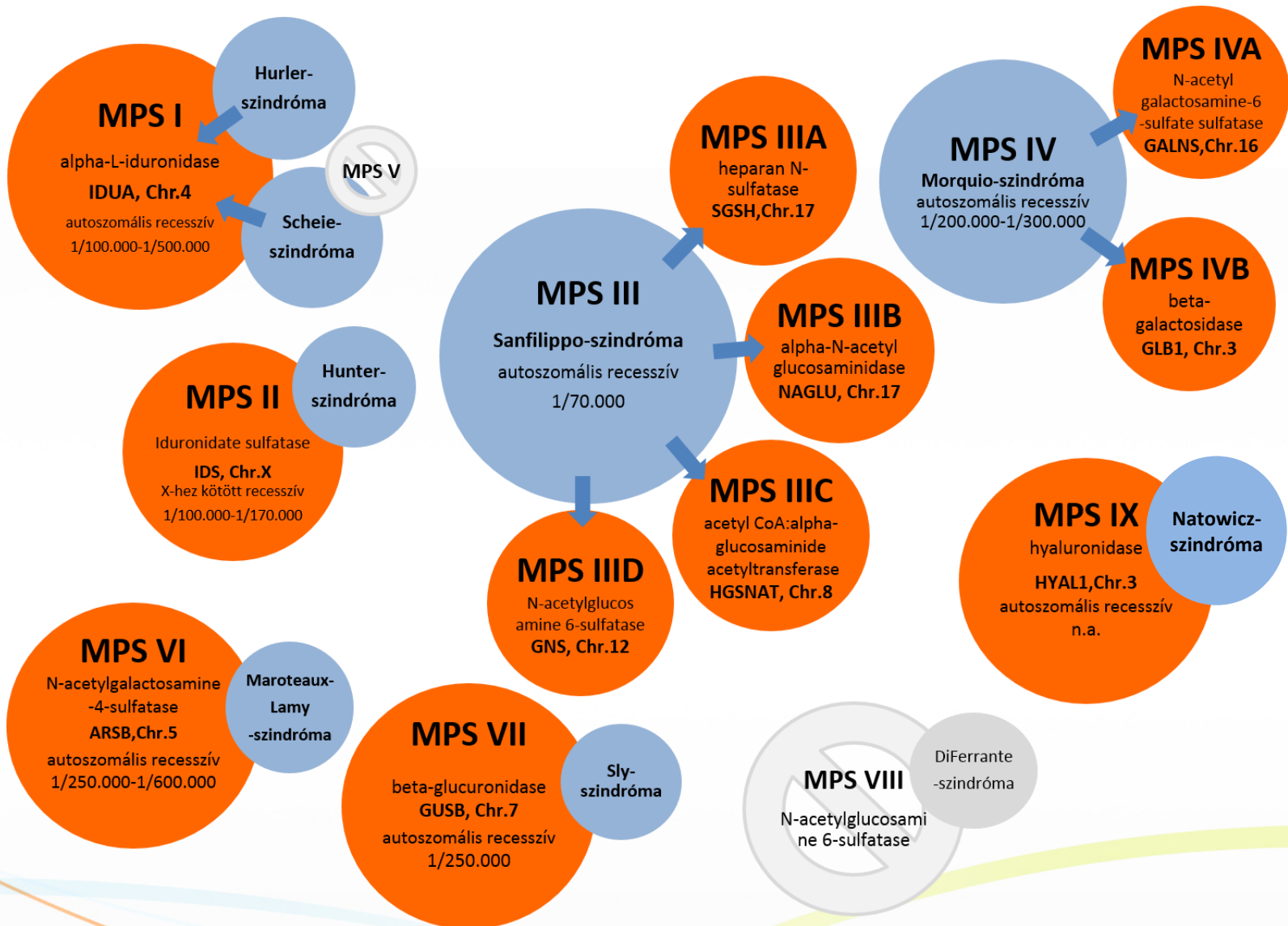
Vázlat

- ✓ MPS genetika
- ✓ monogénes betegségek PGD-jéről általánosságban
- ✓ esetbemutató – MPS I PGD

A mukopoliszaccharidózis típusai

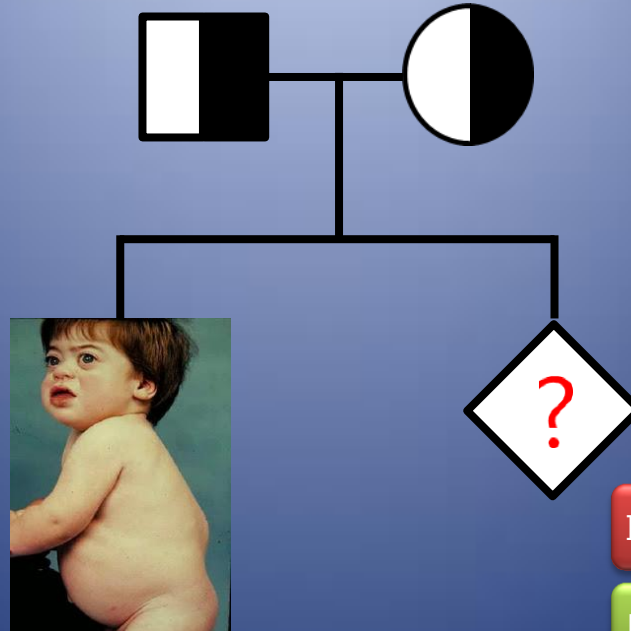
	MPS altípus	enzimdeficiencia	gén	öröklésmenet	incidencia
1.	MPS I (Hurler-, Scheie-, Hurler-Scheie-szindróma)	alpha-L-iduronidase	IDUA, Chr.4	autoszomális recesszív	1/100.000-1/500.000
2.	MPS II (Hunter-szindróma)	iduronate sulfatase	IDS, Chr.X	X-hez kötött recesszív	1/100.000-1/170.000
3.	MPS IIIA (Sanfilippo-szindróma)	heparan N-sulfatase	SGSH, Chr.17	autoszomális recesszív	1/70.000
4.	MPS IIIB (Sanfilippo-szindróma)	alpha-N-acetyl glucosaminidase	NAGLU, Chr.17	autoszomális recesszív	
5.	MPS IIIC (Sanfilippo-szindróma)	acetyl CoA:alpha -glucosaminide acetyl transferase	HGSNAT Chr.8	autoszomális recesszív	
6.	MPS IIID (Sanfilippo-szindróma)	N-acetylglucosamine 6-sulfatase	GNS, Chr.12	autoszomális recesszív	
7.	MPS IVA (Morquio-szindróma)	N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase	GALNS, Chr.16	autoszomális recesszív	1/200.000-1/300.000
8.	MPS IVB (Morquio-szindróma)	beta-galactosidase	GLB1, Chr.3	autoszomális recesszív	
9.	MPS VI (Maroteaux-Lamy-szindróma)	N-acetylgalactosamine-4-sulfatase	ARSB, Chr.5	autoszomális recesszív	1-250.000-1/600.000
10.	MPS VII (Sly-szindróma)	beta-glucuronidase	GUSB, Chr.7	autoszomális recesszív	1/250.000
11.	MPS IX (Natowicz-szindróma)	hyaluronidase	HYAL1, Chr.3	autoszomális recesszív	n.a.

A mukopoliszaccharidózis típusai



Autoszomális recesszív öröklődés

- kérdések, amikor felszínre kerül egy rejtetten öröklődő genetikai hiba



Mi ez a betegség?

Mi az oka?

Gyógyítható?

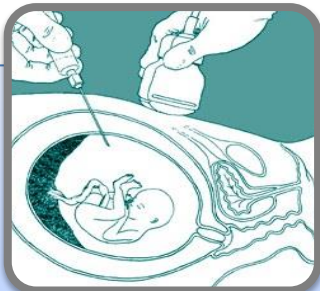
Mik a kilátások?

Ismétlődhet-e?

Mennyi az ismétlődés kockázata?

Van-e mód az ismétlődés megelőzésére?

Prenatális vizsgálatok típusai



Klasszikus prenatális vizsgálatok – CVS, AC

CVS - chorion boholy vizsgálat

11-15 terhességi héten

AC - magzatvíz vizsgálat

15. terhességi héttől

Rendellenességek kiszűrése a **terhesség alatt**.

Genetikai eredmény birtokában már létrejött terhesség sorsáról döntenek a szülők (továbbviselés vs. megszakítás).



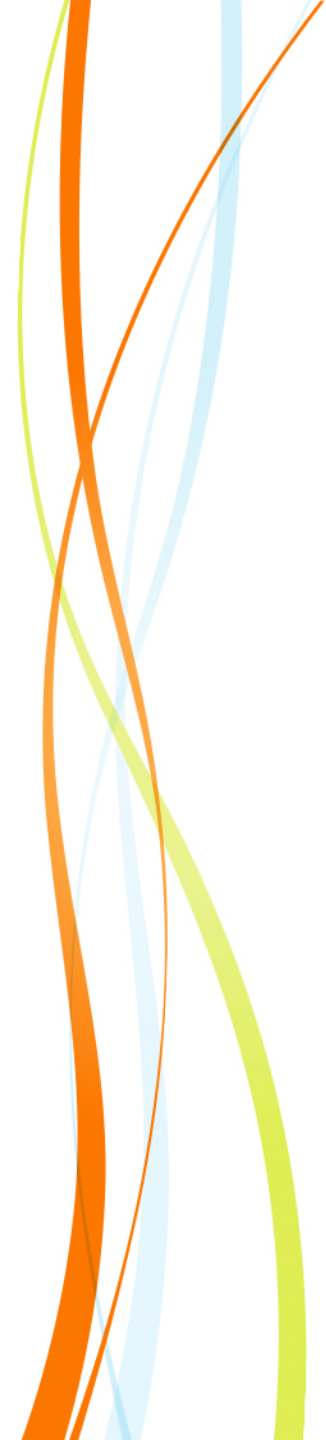
Preimplantációs genetikai diagnosztika - PGD

PGD - beágyazódás előtti **preembrió** (előébrény) genetikai vizsgálata.

A prenatális diagnosztika legkorábbi formája.

Rendellenességek célzott kiszűrése a **terhesség létrejötte előtt**.

Az eljárással csökkenthető a monogénis betegségeknek fennálló genetikai kockázat, ill. a művi abortuszok száma.



Preimplantációs genetikai diagnosztika

A PGD olyan pároknak is lehetőséget ad a reprodukcióra, akik számára a prenatális vizsgálatot követő esetleges terhesség-megszakítás nem elfogadható alternatíva a gyermekvállalásra.

PGD lépései – monogénes betegségek

Pre-teszt
konzultáció

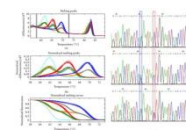
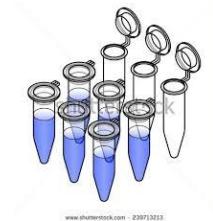
Módszer
beállítás

IVF kezelés

Embrió
biopszia

Genetikai
vizsgálat

Embrió
transzfer



PGD lépései

Pre-teszt konzultáció

- Genetikai leletek áttekintése
- Családi anamnézis



Alkalmazható-e PGD az esetre?

- Ha igen, az eljárás ismertetése
 - Előnyök-kockázatok
 - A kezelés lépései

Ha a pár a PGD mellett dönt, beleegyező nyilatkozat aláírása, vérvétel a beállítási procedúra kezdéséhez

PGD lépései – monogénes betegségek

Pre-teszt
konzultáció

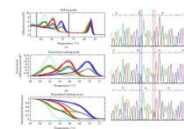
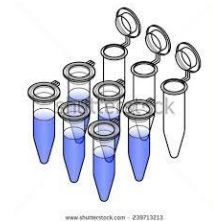
Módszer
beállítás

IVF kezelés

Embrió
biopszia

Genetikai
vizsgálat

Embrió
transzfer



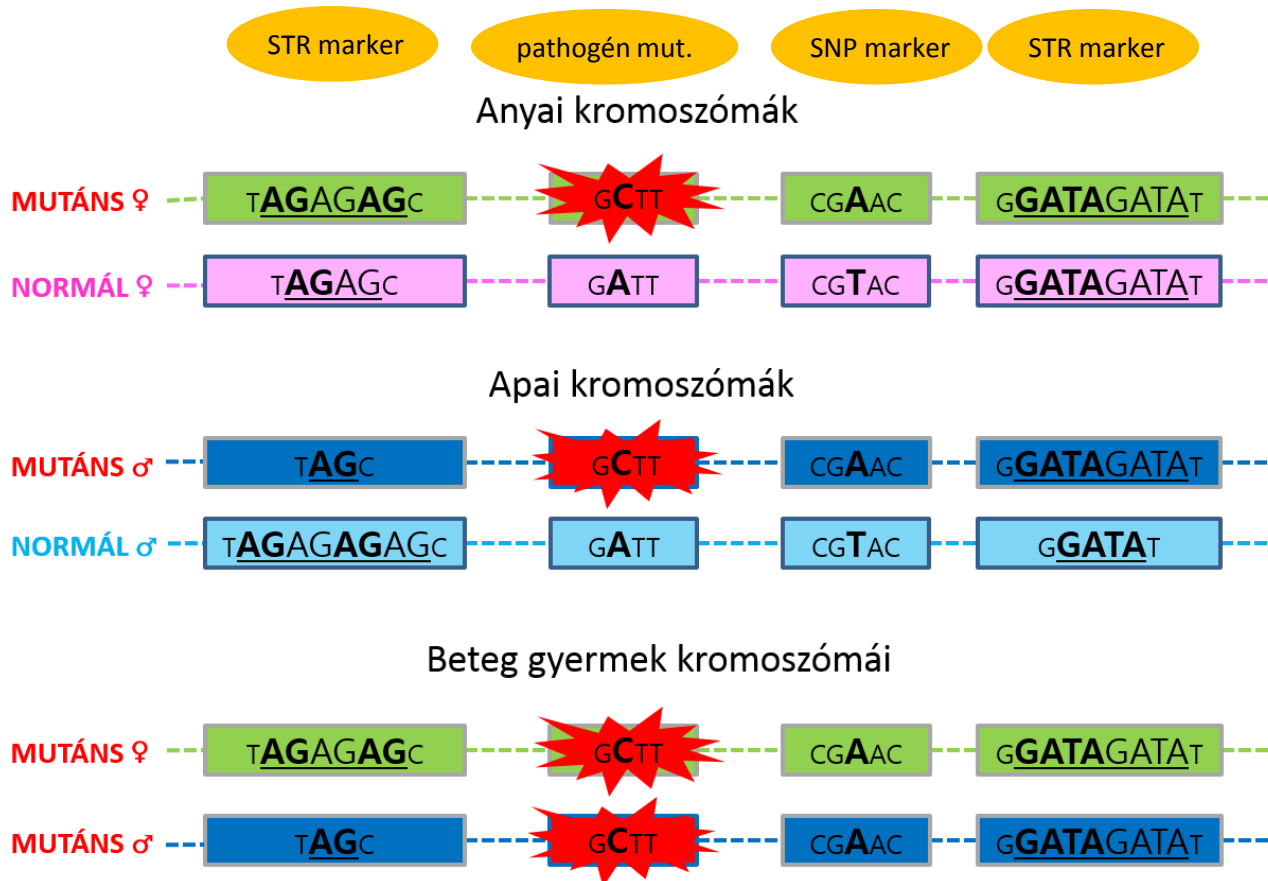
PGD lépései – módszerbeállítás/1

PGD módszerbeállítás monogénis betegségeknel

PCR alapú vizsgálat

kontamináció, allélkiesés kizárására: **haplotípus meghatározás** - növeli a vizsgálat biztonságát

- polimorf markerek vizsgálata (STR, SNP)
- a családra INFORMATÍV polimorf markerek kiválasztása (heterozigotáságot keresünk)



PGD lépései – módszerbeállítás/2

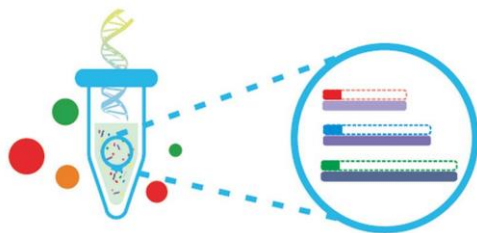
PGD módszerbeállítás monogénis betegségeknél

multiplex PCR reakció beállítása

informatív markerek + patogén mutáció együttes kimutatásra

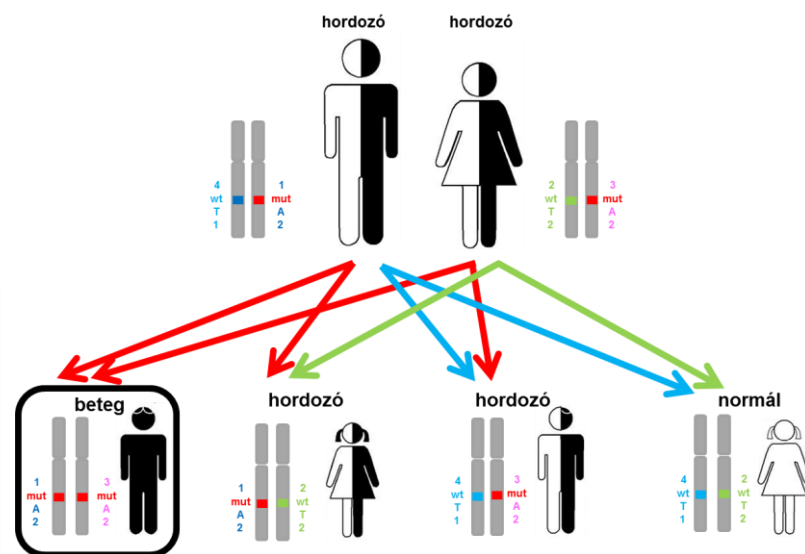
beállított módszer tesztelése kis DNS mennyiségen

4 nagyságrenddel a hagyományos genetikai vizsgálatokhoz használt DNS mennyiségből kell megbízható eredményt adni



PGD beállítás elkészültekor:

- Optimalizált multiplex reakció
 - több locus egyidejű vizsgálata 5-10 sejtben
- Ismert haplotípus:
 - direkt mutációkimutatás
 - indirekt mutációkövetés



PGD lépései – monogénes betegségek

Pre-teszt
konzultáció

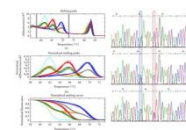
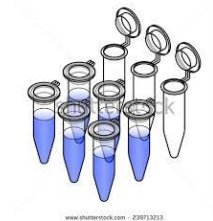
Módszer
beállítás

IVF kezelés

Embrió
biopszia

Genetikai
vizsgálat

Embrió
transzfer



PGD lépései – IVF

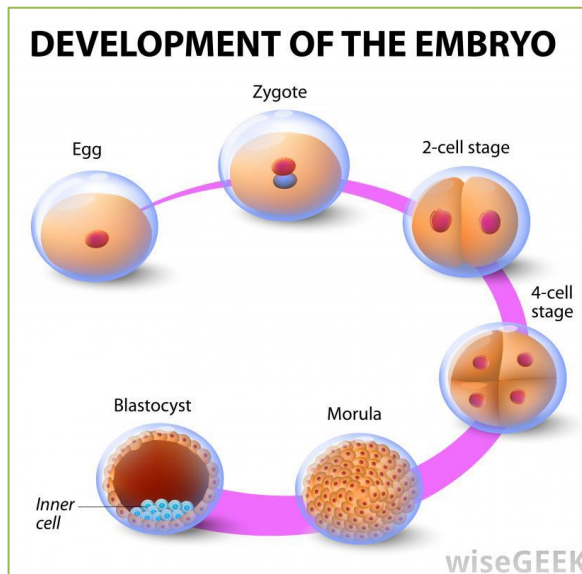
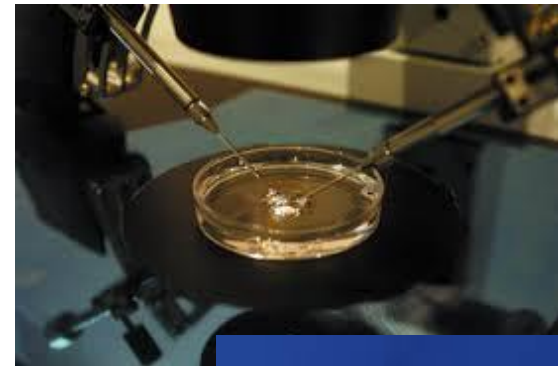
Mesterséges megtermékenyítés

- Petesejt
- Spermium



ICSI - intracitoplazmatikus
spermium injekció (kontamináció
kockázatának csökkentésére)

korai embrionális osztódások



PGD lépései – mintavétel

Embrió biopszia

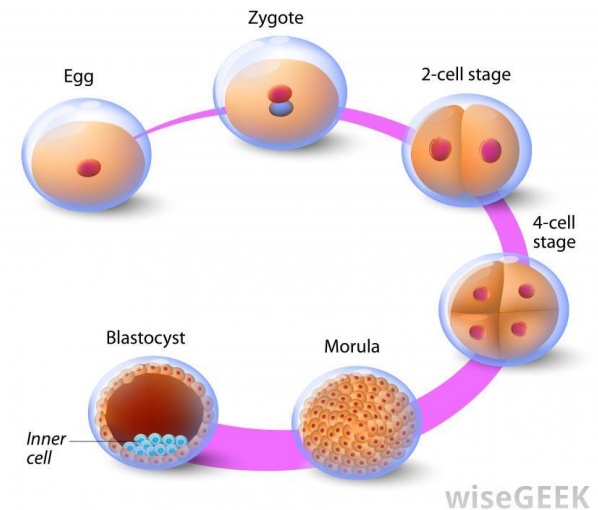
monogénes betegségeknel

- 5 napos embrióból **trophectoderma** mintavétel
- 2-10 sejtet távolítunk el genetikai analízis céljára
- embriók krioprezerválása vitrifikációval későbbi transzferhez



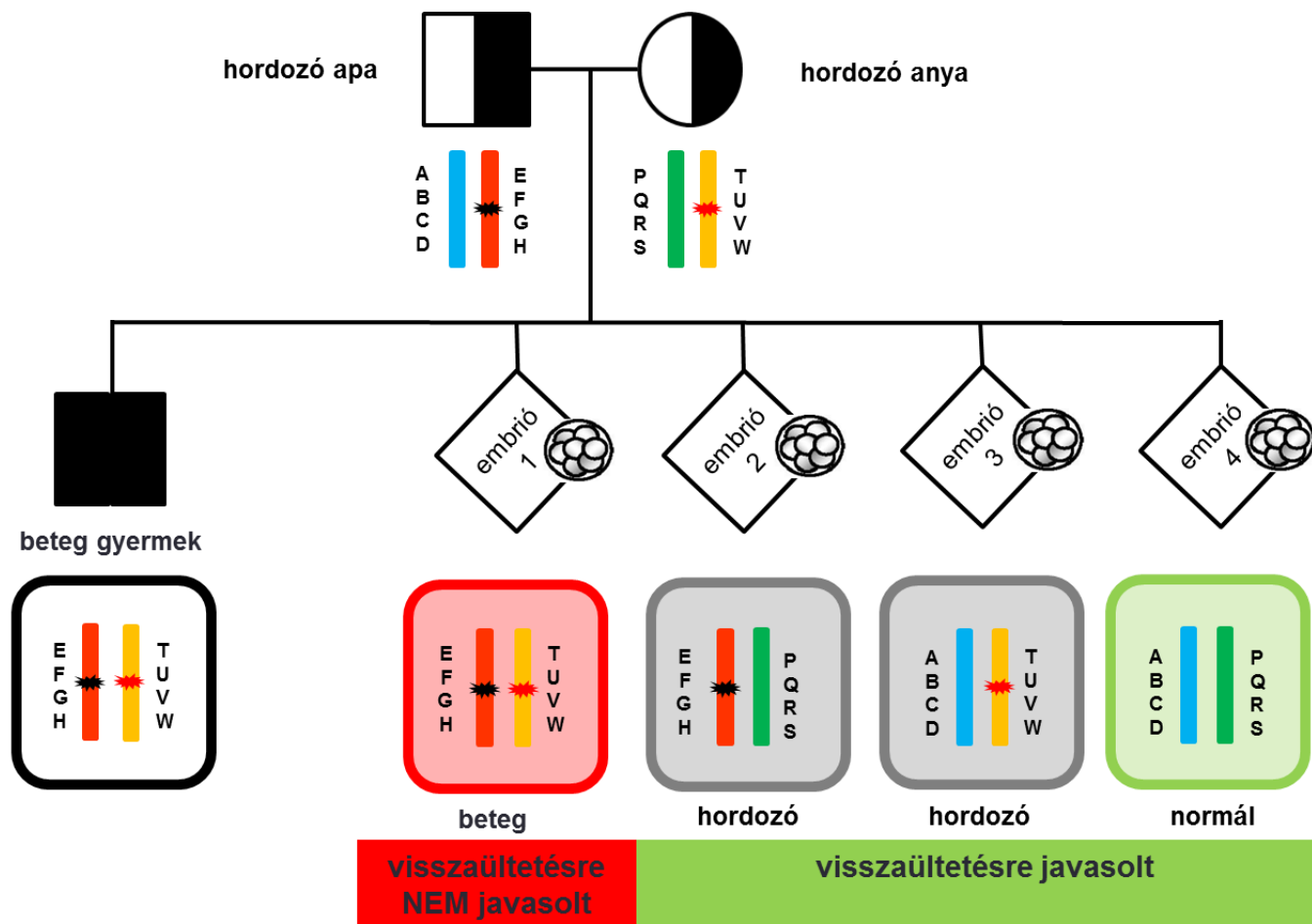
kiemelt sejteken
genetikai vizsgálat

DEVELOPMENT OF THE EMBRYO



PGD lépései – genetikai vizsgálat

- embriókból kiemelt sejteken PCR vizsgálat, haplotípus felállítása
- transzferre javasolt embriók kiválasztása genetikai eredmény alapján



PGD lépései – monogénes betegségek

Pre-teszt
konzultáció

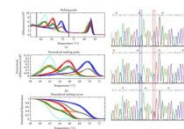
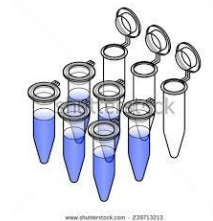
Módszer
beállítás

IVF kezelés

Embrió
biopszia

Genetikai
vizsgálat

Embrió
transzfer



PGD lépései - embriótranszfer

- Genetikai vizsgálat alapján visszaültetésre javasolt embriók beültetése későbbi, spontán ciklusban - fagyasztott embriótranszfer (FET)
- egy alkalommal 1 v. 2 embrió kerül beültetésre

Ha számfeletti visszaültethető embrió áll rendelkezésre, egymás után több transzfer is lehetséges egyetlen IVF ciklusból.

Sikeres terhesség esetén CVS és ellenőrző genetikai vizsgálat javasolt!

MPS I PGD esetismertetés

33 éves nő, 35 éves férfi (2013 tavasz)

első gyermekük 4 éves, MPS I súlyos formájával, már csontvelő transzplantáción túl

- korai diagnózis (első gyanújelek 6 hónapos korában):
 - enzimpótlás: 1 éves kor előtt indult
 - csontvelő-transzplantáció: 19 hónaposan
- kezelése sikeres

család genetikai vizsgálata Monzában

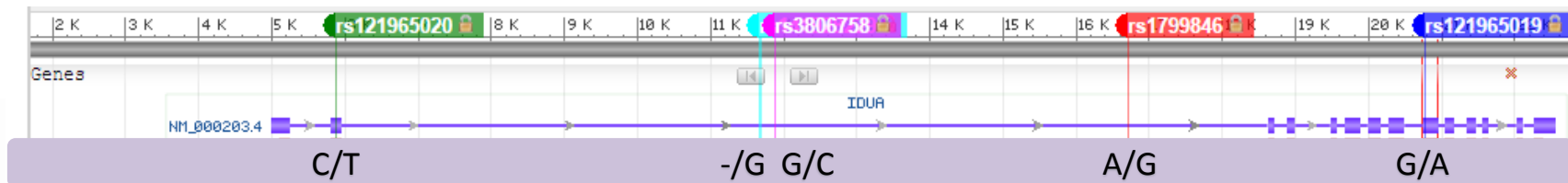
- IDUA (α -L-iduronidáz) mutációk:
 - gyermek: Q70X/W402X compound heterozigóta
 - apa: Q70X heterozigóta (2.exon)
 - anya: W402X heterozigóta (9.exon)

második, spontán terhességnél CVS-ből igazolt magzati MPS I (Q70X/W402X)

következő terhességet PGD -vel szeretnék vállalni

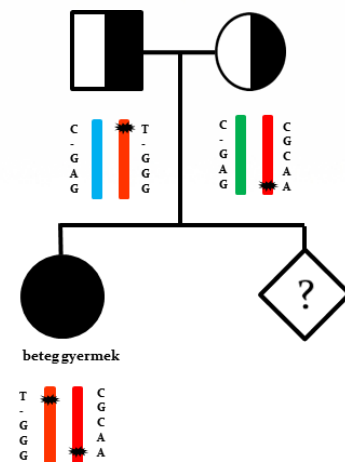
MPS I PGD esetismertetés – beállítás/2

haplotípus meghatározás



9 polimorf locus tesztelve, ebből 3 informatív

apai normál IDUA gén	C	-	G	A	G
apai mutáns IDUA gén	T	-	G	G	G
anyai normál IDUA gén	C	-	G	A	G
anyai mutáns IDUA gén	C	G	C	A	A



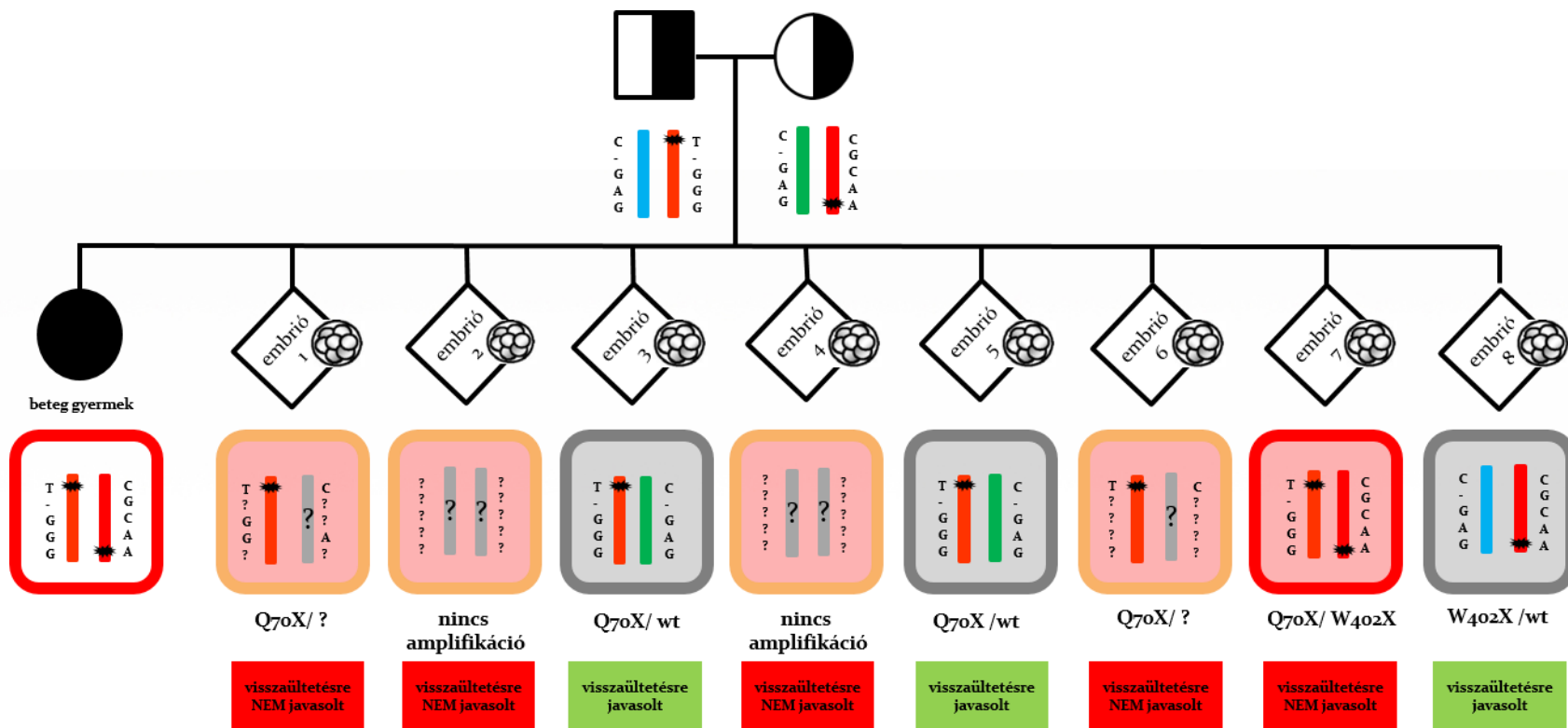
multiplex PCR reakció beállítása
5 informatív locusra (2 mutáció + 3 kapcsolt marker)



PGD beállítás elkészültekor:

- Optimalizált multiplex reakció
 - 5 locus egyidejű vizsgálata 5-10 sejten
- Ismert haplotípus:
 - direkt mutációkimutatás
 - indirekt mutációkövetés

MPS I PGD esetismertetés – 1. IVF ciklus



3 visszaültetésre javasolt embrió

- 2 Q70X hordozó
- 1 W402X hordozó

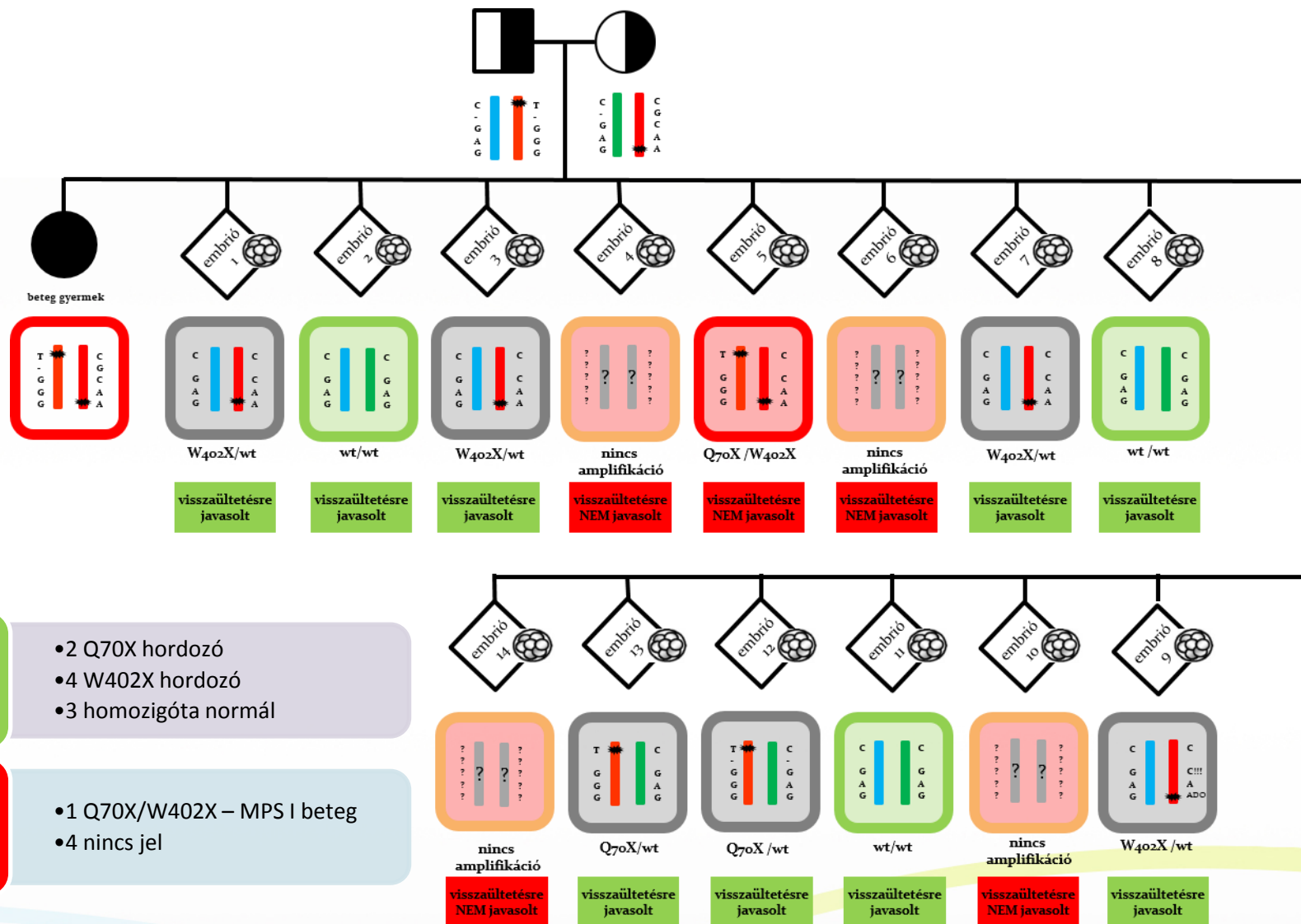
5 visszaültetésre nem javasolt

- 1 Q70X/W402X – MPS I beteg
- 2 nincs jel
- 2 bizonytalan: Q70X / ?

3 visszaültetésre javasolt embrióval
2 transzfer:

2 + 1 embrió beültetve
sikertelen -> ismételt stimuláció

MPS I PGD esetismertetés – 2. IVF ciklus



MPS I PGD esetismertetés - embriótranszfer

2. IVF ciklusból 9 visszaültethető embrió

1. embriótranszfer: 1 normál és 1 hordozó embrióval -> sikertelen

2. embriótranszfer: 2 normál embrióval -> **SIKERES**

- ultrahang: egyes terhesség
- 12. terhességi héten CVS ellenőrző genetikai vizsgálat MPS I-re + kariotipizálás
->**homozigóta normál IDUA genotípus; 46,XY normál ffi kariotípus**
- zavartalan terhesség
- 40. héten, császármetszéssel egészséges fiú gyermek született

rendelkezésre áll még további 5 visszaültethető embrió





Köszönöm a figyelmet!

Varga Tünde

Istenhegyi Géndiagnosztika

varga.tunde@gendiagnosztika.hu

+36-1-580-8652