

# Mikrocytogenetika

## Prenatální diagnostika VCA

Renata Gaillyová

LF MU

2009

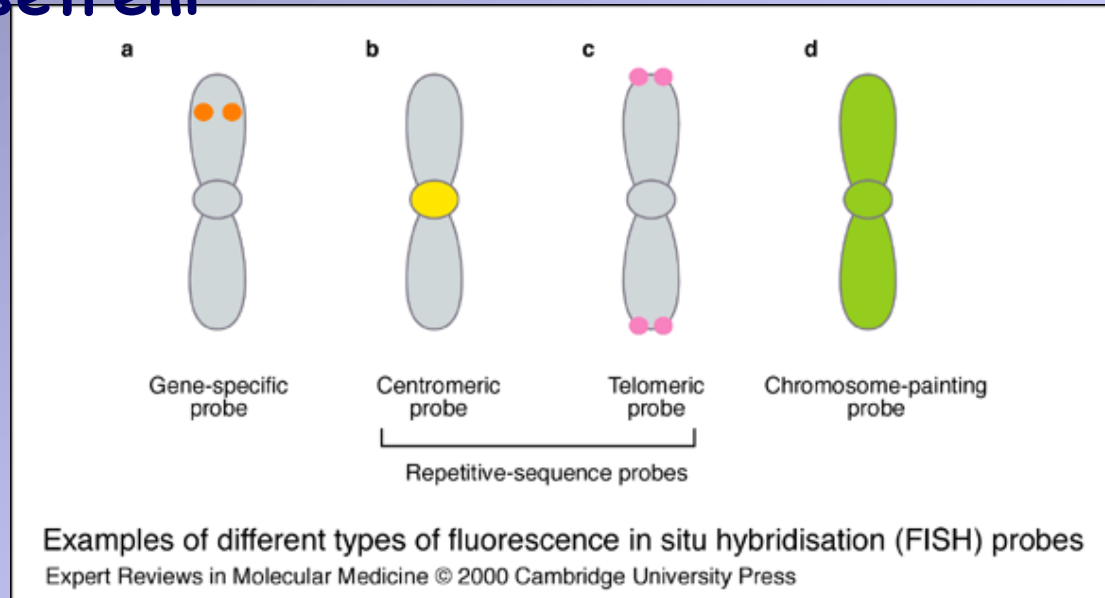
# Mikrocytogenetika

## Molekulární cytogenetika

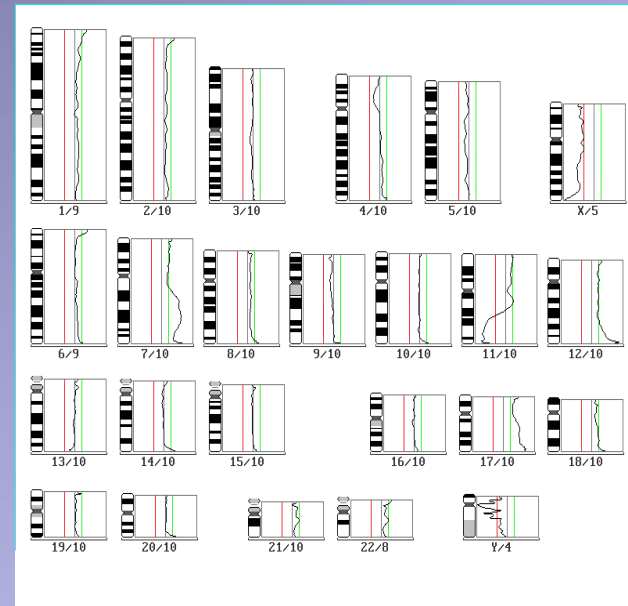
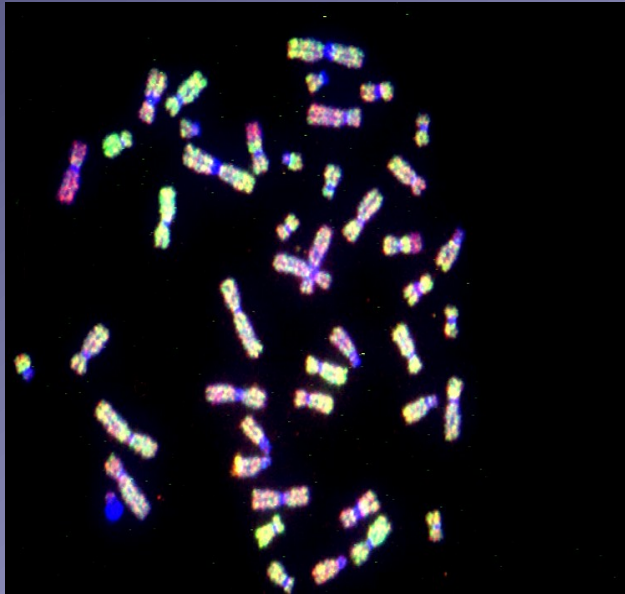
- FISH (fluorescenční in situ hybridizace), M-FISH, SKY (spektrální karyotypování), CGH (komparativní genomová hybridizace), MLPA
- submikroskopické změny (mikrodelece nebo mikroduplikace, marker chromosomy, složité přestavby, vyhledávání typických změn v onkologii...)
- rychlá diagnostika v časové tísní, v graviditě
- vyšetření v metafázi i interfázi

- spojení poznatků molekulární biologie a cytogenetiky
- doplňuje, zpřesňuje a urychluje cytogenetické vyšetření
- řeší nedostatky klasické cytogenetiky:
- nedostatečný počet mitóz
- špatná kvalita chromozomů
- nízká citlivost vyšetření

# FISH



# Komparativní genomová hybridizace



# MLPA

- **Multiplex ligation-dependent Probe Amplification**
- Multiplex gene dosage analysis made easy"  
Poprvé popsána: Schouten JP et al. (2002)  
Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification.  
Nucleic Acids Res. Jun 15;30(12):e57.
- Metoda využívaná na OLG od roku 2006
- Doplňuje a rozšiřuje spektrum metod využívaných v molekulární genetice a molekulární cytogenetice

# MLPA

- detekce aberantních DNA sekvencí - převážně delecí a duplikací celých exonů genů
- jednoduché provedení na základě PCR reakce
- minimum pouze 20 ng DNA
- lze analyzovat degradovanou DNA
- diskriminuje sekvence lišící se pouze v jednom nukleotidu
- determinuje metylační status promotrů
- detekce známých mutací a SNP

# MLPA

## spektrum vyšetření na OLG FN Brno

- Mikrodeleční syndromy
- Syndrom Di George  
(22q11,10p15,4q34,8p23,9q34,17p13)
- Přestavby subtelomerických oblastí

Klinické znaky pro selekci pacientů		Body
Růstové anomálie postnat.-mikro/makrocephalie	max 1 bod	
Růstové anomálie postnat.-malá/vysoká postava	max 1 bod	
Faciální dysmorfie	max 2 body	
Drobné atypie rukou a nohou	max 2 body	
Velké vrozené vývojové vady	max 2 body	
Dysproporcionální postava	max 2 body	
	<b>Celkem</b>	

# Syndrom Di George

- Velo - Kardio- Faciální syndrom
- CATCH 22
- Vrozené srdeční vady typické konotrunkální vady, faciální dysmorfie, hypoplasie - aplasie thymu event. příštítných tělísek, imunodefekty, hypoparathyreoidismus
- (22q11, 10p15, 4q34, 8p23, 9q34, 17p13)



# Williams - Beuren syndrom

- del 7q11.23
- Faciální dysmorfie - Elfin face - silné rty, odstávající větší uši, srdeční vady - stenosis aorty, plicnice, hypokalcemie, malá postava, PMR, hernie, hrubý hlas, kostní anomálie, přátelská povaha, dobrý sluch...

# Prader-Willi syndrom

- Hypotonie, hypotrofie, poruchy příjmu potravy v kojeneckém věku
- PMR, malá postava, obesita, hyperfagie, akromikrie, hypogonadismus později
- mikrodele delece 15q11-12 paternální

# Prader-Willi syndrom

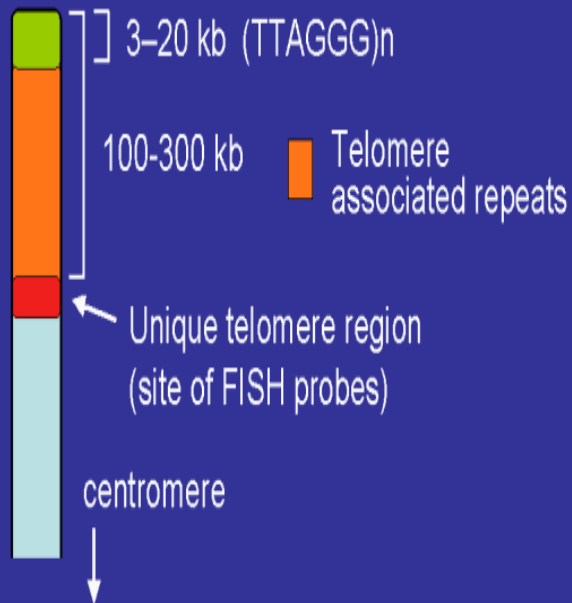
- Snížená aktivita plodu
- Neprospívání kojenců
- Hypotonie novorozenců
- Obesita
- Hyperfagie, neukojitelný hlad
- Hypogenitalismus, hypogonadismus
- PMR
- Malá postava
- Akromikrie
- Hypopigmentace
- Problémy s chováním

# Angelman syndrom

- těžká PMR,  
epilepsie, záchvaty  
smíchu, těžce  
opožděn vývoj řeči
- atypické chování
- stigmatizace
- mikrodelece  
15q11-12 mat

# Telomery

## The telomere



- fyzické konce chromozomů
- úplné konce tvořeny proteiny a tandemovými repetitivními DNA(TTAGGG) 3-20 Kb (společné pro všechny chromozomy)
- TAR - doprovodné repetitivní sekvence subteloerické oblasti 100-300 Kb
- jedinečné sekvence - sondy pro FISH, MLPA, HR-CGH

# Klinický význam přestaveb telomer

- aberace v této oblasti - příčina spontánních abortů, VVV a mentálních retardací
- **6-8 %** pacientů s dysmorfií a MR - mikrodelece subtelomerických oblastí chromozomů !!!

# Prenatální diagnostika VCA

- **Screeningové vyšetření (celoplošné)**
- biochemický screening I. trimestru,
- biochemický screening II. trimestru
- integrovaný a kombinovaný screening
- screening UZ
  
- **Vyšetření cílené (invazivní)**
- CVS
- AMC
- Kordocentéza
- Specializovaný UZ

# Biochemický screening

- Biochemický screening I. trimestru
- v 10.-12. týdnu těhotenství (t.g.)
- Biochemický screening II. trimestru
- 16-18. týdnu těhotenství
  
- Vyhledávání těhotenství se zvýšeným rizikem Downova syndromu, Edwardsova syndromu, rozštěpu neurální trubice nebo Smith-Lemli-Opitzova syndromu u plodu
  
- Vyšetření dobrovolné - doporučené všem těhotným, hodnotí specialista



# Screenin I. trimestr

- 10.-13.t.g. dle UZ
- PAPP-A, free beta hCG
- UZ - nuchální projasnění (NT v mm)
- UZ - přítomnost-osifikace nosní kůstky (NB+/-)
- Riziko M. Down (+21)
- Výpočet individuálního rizika pro těhotenství
- Hodnotí specialista

# BCH screening - II. trimestr

## Downův syndrom

AFP (snížení)	pod 0,5 MOM
HCG (zvýšení)	nad 2,0 MOM
uE3 (snížení)	pod 0,6 MOM

- Počítačové vyhodnocení- individuální riziko
- **Positivní: 1/250 a méně**
- **Hraniční: 1/250 - 1/350**
- **Kombinovaný, integrovaný screening**

# BCH screening II. trim. Syndrom Edwards

- AFP - snížen
- HCG - snížen
- uE3 - snížen
- Počítačové vyhodnocení - ind. riziko!!!
- UZ - hypotrofie, VVV, atypické držení prstů, atypický profil obličeje....

# Jiné chromosomové aberace

- zvýšená hodnota HCG
- patologie při UZ specializovaném vyšetření
- atypický screening
- Screening hodnotí vždy specialista
- Nespolehlivé a nespecifické

# Prenatální biochemický screening

- Hodnotí se počítačový výsledek
- **Individuální riziko**
- Zvýšené riziko = doporučení genetické konzultace a dalšího upřesňujícího vyšetření
- ultrazvuk
- odběr plodové vody

# UZ screening

- **10-13.t.g.** - délka těhotenství, počet plodů, srdeční akce, základní anatomie plodu
- projasnění na krčku plodu NT, přítomnost nosní kůstky NB+/- k hodnocení riziko Downova syndromu u plodu a další
- **20.t.g.** - poznatelné vrozené vývojové vady a nepřímé známky VCA, velikost plodu, množství plodové vody, srdeční akce
- **21.t.g.** - vrozené srdeční vady
- **Vyšetření by měl vždy provádět specialista**

# Prenatální kardiologie ve 21.t.g.

(detekce poznatelných srdečních vad)

- Vrozené srdeční vady jsou nejčastější vývojovou vadou u člověka, často spojené s dalším postižením
- Prenatální diagnostika srdečních vad vyžaduje specializovanou erudici a zkušenost
- Poznání srdeční vady u plodu umožňuje dle závažnosti modifikovat další postup (ukončení těhotenství, léčba plodu, sledování a porod na specializovaném pracovišti)

# Invazivní postupy

- CVS - odběr choriových klků - od 11.t.g.
- AMC - odběr plodové vody
- Časná AMC - 12-14.t.g.
- Klasická AMC 15-18.t.g.
- Pozdní AMC
- Kordocenteza - odběr fetální krve z pupečníku
- Placentocenteza



# Důvody k odběru plodové vody

- Positivní biochemický screening
- Patologický ultrazvukový nálezn u plodu
- Vyšší věk rodičů
- Nosičství balancované chromosomové aberace u rodičů
- Chromosomová aberace v rodině
- Monogenně dědičné nemocnění v rodině

# Preimplantační genetická diagnostika (PGD)

- Jedná se o časnou prenatální diagnostiku, která je vázaná na techniky umělého oplodnění.
- PGD je metoda umožňující genetickým vyšetřením jedné nebo dvou buněk (blastomer) odebraných z vyvíjejícího se embrya odhalit genetické abnormality budoucího plodu. K transferu do dělohy lze vybrat pouze embrya bez genetické zátěže.
- Před provedením PGD doporučujeme prekoncepční genetické vyšetření a stanovení karyotypu partnerů, DNA analýza rodičů při monogenně dědičném onemocnění.

# Preimplantační genetická diagnostika v.s. preimplantační genetický screening častých aneuploidií

- **PG Diagnostika** - vyšetření u párů s vysokým genetickým rizikem onemocnění u plodu
- Strukturní chrom. aberace
- Monogenně dědičná onemocnění
- **PG Screening** - screening nejčastějších aneuploidií, riziko je zvýšené vzhledem k věku nebo nepříznivé reprodukční anamnese

# Preimplantační genetický screening nejčastějších aneuploidií

## Nejčastěji vyšetřované chromosomy

- 13, 15, 16, 18, 21, 22, X, Y
- příčiny nejčastějších aneuploidií
- příčiny spontánních potratů

# Výhody PGD

- detekce genetických změn v nejranějším stádiu prenatálního vývoje
- zvýšení pravděpodobnosti úspěšného transferu a tím i úspěšné gravidit
- snížení rizika spontánního potratu výběrem embrya bez chromozomové aberace
- snížení potřeby ukončení gravidity z genetické indikace
- snížení psychické zátěže pro rodiče

# Nevýhody PGD

- nutnost IVF (i u plodných párů)
- časová tíseň
- finanční náročnost metody
- možno provádět pouze malé množství materiálu
- (dg. z 1 - 2 buněk)
- větší riziko diagnostického omylu prenatální diagnostiky
- neodhalení případného mozaicizmu !!
- **nutno doporučit vždy kontrolu klasickými metodami**
- etické hledisko

# Etické a právní aspekty prenatální diagnostiky

- vyšetření dobrovolné
- vždy dle přání rodiny
- dle platných zákonů
- genetické poradenství
- nedirektivní přístup
- snaha o maximální informovanost rodiny