

Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση για αιμοσφαιρινοπάθειες και άλλες Μονογονιδιακές Ασθένειες (PGT-M)

Δρ. Θεσσαλία Παπασάββα

Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (ΠΓΔ) είναι μέθοδος πρόληψης γενετικών ασθενειών, η οποία συνδυάζει την τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής με τη μοριακή γενετική διάγνωση. Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση για μονογονιδιακές ασθένειες (PGT-M) είναι μια εργαστηριακή διαδικασία που γίνεται πριν την μεταφορά των εμβρύων, προκειμένου να γίνει έλεγχος για παρουσία κληρονομικών γενετικών ασθενειών στο έμβρυο. Γίνεται σε συνδυασμό με εξωσωματική γονιμοποίηση και βασίζεται στην γενετική ανάλυση της βιοψίας του εμβρύου χρησιμοποιώντας μοριακές τεχνικές. Με αυτόν τον τρόπο εντοπίζονται τα υγιή έμβρυα και έτσι αποτρέπεται η εμφύτευση εμβρύων με κληρονομικά γενετικά νοσήματα μονογονιδιακής προέλευσης, όπως η β-θαλασσαιμία, κυστική ίνωση, νόσος του Huntington's και άλλα, μεταφέροντας στη μήτρα μόνο τα υγιή έμβρυα.

Η πρώτη πρωτοποριακή εφαρμογή της ΠΓΔ ανακοινώθηκε το 1990 σε δύο οικογένειες που είχαν ιστορικό φυλοσύνδετης ασθένειας, καθιερώνοντάς την ως μίαν εναλλακτική προσέγγιση της προγεννητικής διάγνωσης και προσφέρεται από διάφορα εξειδικευμένα κέντρα σε όλο τον κόσμο. Η πρώτη πετυχημένη εφαρμογή της ΠΓΔ για τη β-θαλασσαιμία ανακοινώθηκε το 1998 και έκτοτε έχει γίνει μία από τις πιο κοινές εφαρμογές σε μονογονιδιακές ασθένειες. Στην Κύπρο η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται στο Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου στο τμήμα Μοριακής Γενετικής Θαλασσαιμίας (ΜΓΘ) από το 2004.

Το PGT-M μπορεί να προσφερθεί σε:

- ζευγάρια φορείς μονογονιδιακού νοσήματος με γνωστή γενετική διαταραχή και σε αυτά περιλαμβάνονται τα αυτοσωμικά υπολειπόμενα, αυτοσωμικά επικρατή, φυλοσύνδετα και μιτοχονδριακά.
- ζευγάρια που επιθυμούν τυποποίηση ιστοσυμβατότητας (HLA) για γέννηση ενός ιστοσυμβατού μωρού που θα αποτελέσει δότη μυελού των οστών σε άλλο πάσχων ανοσολογικά συμβατό παιδί της οικογένειας. Η εξέταση αυτή μπορεί να γίνει με ή χωρίς ταυτόχρονο έλεγχο της μονογονιδιακής διαταραχής.

Το PGT-M εφαρμόζεται για όλες τις μονογονιδιακές διαταραχές για τις οποίες έχουν εντοπιστεί αδιαμφισβήτητα οι παθογενείς μεταλλαγές.

Στάδια βιοψίας εμβρύου

Η βιοψία του εμβρύου μπορεί να πραγματοποιηθεί σε τρία διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια ως ακολούθως.

- βιοψία πρώτου και δεύτερου πολικού σωματίου γίνεται την ημέρα της ωοληψίας. Τα πολικά σωματίδια δημιουργούνται αμέσως μετά τη γονιμοποίηση (polar body biopsy).
- βιοψία βλαστομεριδίου η οποία γίνεται την τρίτη μέρα μετά τη γονιμοποίηση, όταν το έμβρυο βρίσκεται στη φάση των 6-8 κυττάρων (Day 3 Single cell biopsy).
- βιοψία κυττάρων από βλαστοκύστη (blastocyst stage biopsy). Η βιοψία κυττάρων από βλαστοκύστη γίνεται την πέμπτη ή έκτη ημέρα μετά τη γονιμοποίηση και αφορά τη λήψη

κυττάρων από την εξωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης, η οποία στη συνέχεια θα εξελιχθεί στις χορειακές λάχνες του εμβρύου (Day 5 Trophoctoderm biopsy).

Η βιοψία βλαστοκύστης αποτελεί πλέον την συνηθέστερη διαδικασία αφού επιτρέπει τη βιοψία περισσότερων κυττάρων (~10 κύτταρα) για γενετική ανάλυση, περιορίζοντας τον κίνδυνο σφάλματος που υπάρχει κατά την ανάλυση της βλαστοκύστης όπου έχουμε ένα κύτταρο όπως πτώση αλληλίου (Allele Drop Out-ADO) και επιμόλυνση.

Λόγω των ηθικών διλημάτων και προβληματισμών που αναδεικνύονται καθώς και της πολυπλοκότητας της διαδικασίας, αρκετές διεθνείς εταιρείες όπως η PGD International Society (PGDIS), η Αμερικανική Εταιρεία για Αναπαραγωγική Ιατρική (ASRM) και η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και Εμβρυολογίας Κοινοπραξία (ESHRE) PGT έχουν συντάξει οδηγίες και συστάσεις για καλή πρακτική PGT. Συμπληρωματικά με τις οδηγίες αυτές, οι εθνικές αρχές, μέσω ειδικά καταρτισμένων σωμάτων, είναι υπεύθυνες για την αξιολόγηση και έγκριση των περιστατικών PGT. Η διαδικασία που ακολουθείται από το εργαστήριο ΜΓΘ είναι σύμφωνα με τις ευρωπαϊκές και κρατικές οδηγίες όπως αυτές παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Στάδια Προεμφυτευτικής Γενετικής Διάγνωσης σύμφωνα με το ESHRE

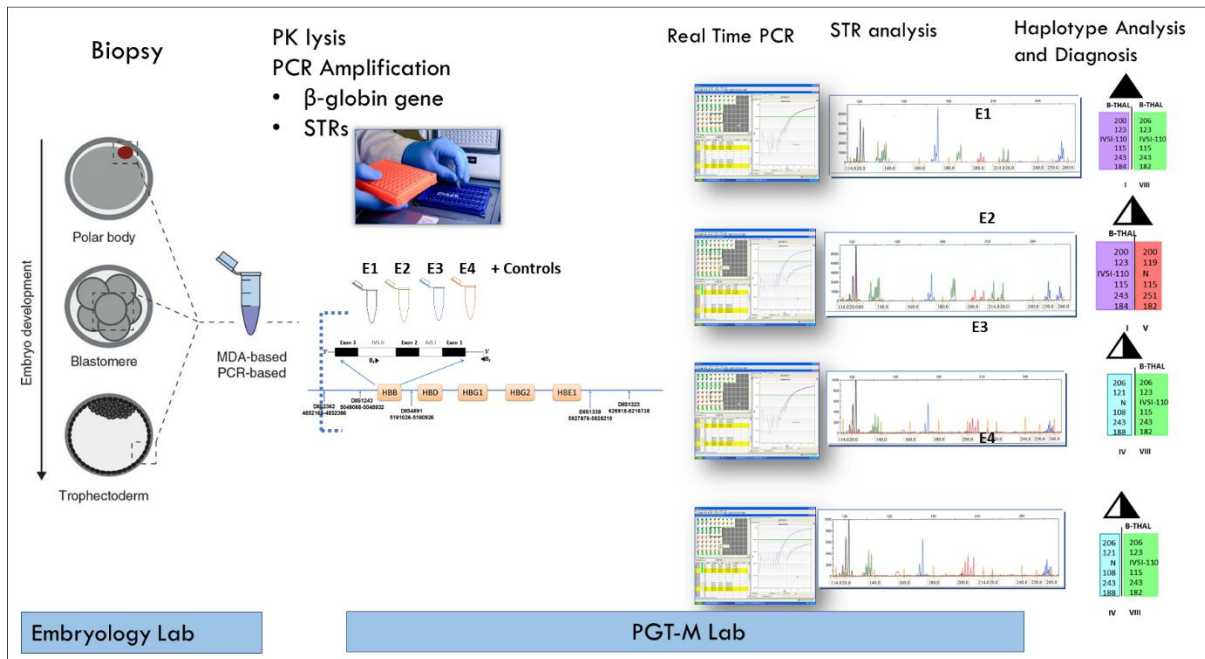
ESHRE-European Society of Human Reproduction and Embryology
Στάδια Προεμφυτευτικής Γενετικής Διάγνωσης
Γενετική Συμβουλευτική
Προκλινική Εργασία
Πρόκληση ωορρηξίας
Συλλογή ωαρίων
Γονιμοποίηση με ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection)
Βιοψία εμβρύου
Γενετική Διάγνωση
Εμφύτευση 1-2 κατάλληλων εμβρύων
Επιβεβαίωση εγκυμοσύνης
Προγεννητική διάγνωση (σύσταση)

Γενετική Ανάλυση

Το PGT-M είναι τεχνικά πολύπλοκο και έτσι απαιτείται το εργαστήριο να έχει εξειδικευμένη και κατάλληλα καταρτισμένη ομάδα καθώς και τεχνογνωσία και εξοπλισμό για γενετική ανάλυση σε μεμονωμένα ή λίγα κύτταρα.

Για κάθε περιστατικό, πριν το PGT-M, πραγματοποιείται οικογενειακή μελέτη για τον καθορισμό των παθογόνων μεταλλαγών που φέρει κάθε γονέας στο γονίδιο που εμπλέκεται στη νόσο (γονότυπος). Ταυτόχρονα γίνεται και ανάλυση απλοτύπων με πολυμορφικούς δείκτες (STRs) που είναι συνδεδεμένοι με το γονίδιο, για το καθορισμό των απλοτύπων που συνδέονται με το φυσιολογικό ή παθολογικό αλληλίο του γονιδίου. Κατά τη γενετική διάγνωση στις βιοψίες των εμβρύων, εφαρμόζεται πολύπλεκτη αντίδραση PCR σε κάθε κύτταρο (βιοψία), για το ταυτόχρονο καθορισμό γονότυπου και απλοτύπου. Σε περιπτώσεις όπου η ανίχνευση των μεταλλάξεων σε μονά κύτταρα δεν είναι δυνατή, ειδικά σε

περιπτώσεις μεταλλάξεων έλλειψης ή αναστροφής ή επεκτάσεις επαναληπτικών αλληλουχιών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο η ανάλυση απλοτύπου. Πολυμορφικοί δείκτες επίσης χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση τυχόν παρουσίας εξωγενούς γενετικού υλικού που θα αλλοιώσει το οποιοδήποτε αποτέλεσμα. Η πιο πάνω προσέγγιση διευκολύνει τη γενετική ανάλυση περιορίζοντας επίσης παράγοντες όπως τυχόν επιμόλυνση και πτώση αλληλίου (ADO).



Εικόνα 1. Διαδικασία PGT-M με παράδειγμα τη β-θαλασσαιμία

Η Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση εφαρμόζεται στο τμήμα Μοριακής Γενετικής Θαλασσαιμίας από το 2004, όπου διενεργούνται περίπου 40 περιστατικά για β-αιμοσφαιρινοπάθειες ετησίως, περιλαμβανομένης ταυτοποίησης συμβατών δοτών για αδέρφια που πάσχουν από θαλασσαιμία. Ταυτόχρονα, εξατομικευμένη PGT-M έχει αναπτυχθεί και πραγματοποιηθεί σε περισσότερα από 20 διαφορετικά μονογονιδιακά νοσήματα όπως Huntignton's, Νευροϊνωμάτωση (NF1), Μυϊκή Δυστροφία και άλλα