

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


Ημερίδα  
«Θαλασσαιμία: Η σημασία πρόληψης και ενημέρωσης στο σχολικό πλαίσιο»  
3 Μαρτίου 2023  
Παιδαγωγικό Ινστιτούτο Κύπρου  
Λευκωσία

Δρ. Θεσσαλία Παπασάββα  
Τμήμα Μοριακής Γενετικής Θαλασσαιμίας  
Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου


# Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση (PGT)

- PGT είναι μέθοδος πρόληψης γενετικών ασθενειών που συνδυάζει:
  - Τεχνολογία Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (IVF)
  - Μοριακή Γενετική Διάγνωση
- Εργαστηριακή διαδικασία που γίνεται πριν την μεταφορά των εμβρύων, προκειμένου να γίνει έλεγχος για παρουσία κληρονομικών γενετικών ασθενειών στο έμβρυο
- DNA από βιοψίες ωαρίων ή εμβρύων αναλύεται προκειμένου να προσδιοριστούν γενετικές ανωμαλίες και να εντοπιστούν έμβρυα που δεν φέρουν τη νόσο.
- Αποτρέπεται η μεταφορά και εμφύτευση εμβρύων με κληρονομικά γενετικά νοσήματα μονογονιδιακής προέλευσης, όπως η β-θαλασσαιμία, κυστική ίνωση, νόσος του Huntington's και άλλα.
- Το PGT δίνει στο ζευγάρι την ευκαιρία να αποκτήσει ένα υγιές παιδί χωρίς να υποβληθεί σε διακοπή της εγκυμοσύνης


# Ενδείξεις για PGT




Ζευγάρια κατά των αμβλώσεων για ηθικούς ή θρησκευτικούς λόγους



Ζευγάρια που βιώνουν επανειλημμένες εκτρώσεις/ προβλήματα υπογονιμότητας/ στειρότητας



Ζευγάρια με ιστορικό κληρονομικής νόσου

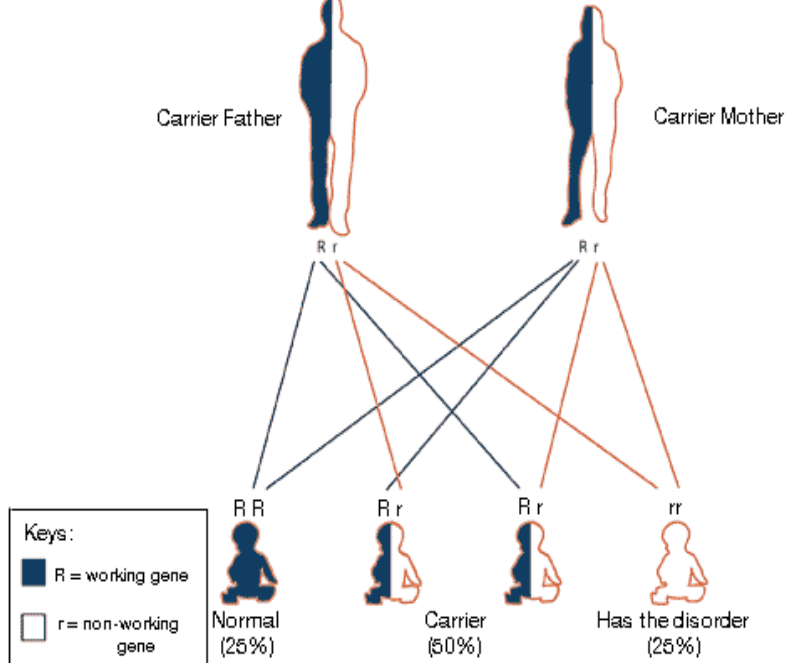


Προηγούμενες αποβολές μετά από προγεννητική διάγνωση

# Τρόποι κληρονομικότητας

## Autosomal Recessive Inheritance

Chances for each child when both parents are carriers

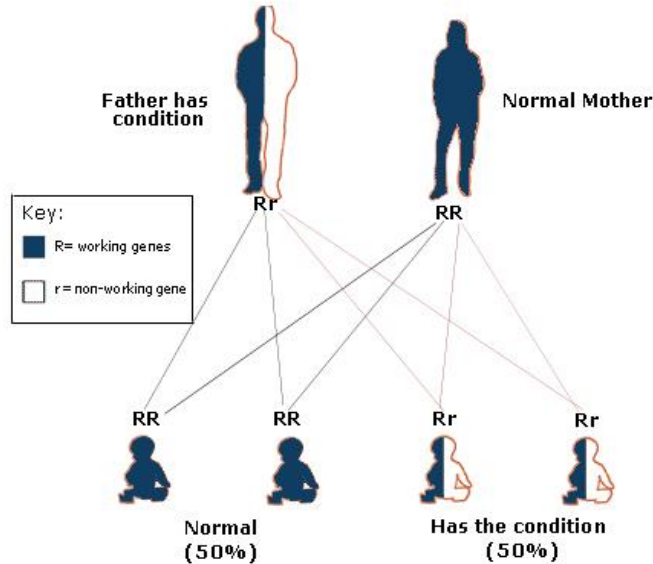


### Αυτοσωματικό υπολειπόμενο νόσημα:

π.χ. **β-θαλασσαιμία**, κυστική ίνωση κ.α.  
 25% πιθανότητα για κύηση με τη νόσο

## Autosomal Dominant Inheritance

Chances for each child when one parent has the condition and one parent is normal

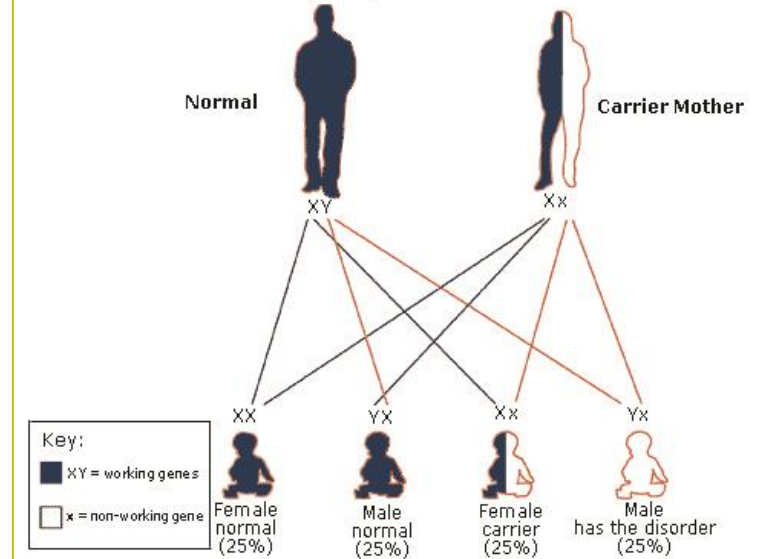


### Αυτοσωματικό επικρατές νόσημα:

π.χ. μυοτονική δυστροφία, νευροϊνωμάτωση κ.α.  
 50% πιθανότητα για κύηση με τη νόσο

## X-linked Recessive Inheritance

Chances for each child when mother is carrier



### X-φυλοσύνδετο νόσημα:

π.χ. μυϊκή δυστροφία Duchenne ή Becker, αιμορροφιλία A, κ.α.  
 50% πιθανότητα για κύηση άρρενος εμβρύου με τη νόσο

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

# PGT-M: Υποδομή

Τεχνογνωσία και εξειδίκευση προσωπικού

Ειδικοί χώροι με αποκλειστικό εξοπλισμό

Διασφαλισμένη σειρότητα εργαστηριακού χώρου

Διαδικασία Διαπίστευσης  
(ISO15189)

- Preimplantation Genetic Diagnosis accredited with ISO15189 by the Cyprus Accreditation body CY-CYSAB

Κατευθυντήριες γραμμές  
καλής πρακτικής

- Operates according to the ESHRE best practice guidelines for PGT (<https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/Guidelines/PGT>)

Εξωτερικός Έλεγχος  
Ποιότητας (EQA)

- Genomic Quality Assessment GenQA (<http://www.genqa.org>)

# Στάδια PGT

- Συμβουλευτική
- Μελέτη γονιδίου-Ανάπτυξη/προσαρμογή μεθόδου
- Πρόκληση ωορρηξίας
- Συλλογή ωαρίων
- Γονιμοποίηση με ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection)
- Βιοψία εμβρύου
- Γενετική Διάγνωση
- Εμφύτευση 1-2 κατάλληλων εμβρύων
- Επιβεβαίωση εγκυμοσύνης
- Προγεννητική διάγνωση (σύσταση ESHRE)



European Society of  
Human Reproduction and Embryology



Δίκτυο επιστημόνων υγείας

Κλινικοί Γενετιστές  
Γυναικολόγοι  
Εμβρυολόγοι  
Μοριακοί Γενετιστές

# Στάδια ανάπτυξης βιοψίας



## Βιοψία βλαστομεριδίου

- Ημέρα 3<sup>η</sup> (8 κύτταρα)
- Βιοψία ενός εμβρυϊκού κυττάρου (βλαστομερίδιο)
- Γενετική ανάλυση σε ένα κύτταρο
- Άμεση μεταφορά εμβρύου στη μήτρα transfer την 5<sup>η</sup> μέρα ανάπτυξης.
- Το αρχικό πρότυπο για πάνω από δύο δεκαετίες



## Βιοψία βλαστοκύστης-τροφωεξόδερμα

- Ημέρα 5<sup>η</sup> (100 κύτταρα)
- Βιοψία ~10 κυττάρων – τροφωεξόδερμα (trophectoderm)
- Κρυοσυντήρηση όλων των εμβρύων-Εμβρυομεταφορά σε αργότερο στάδιο
- Πιθανότητες επιτυχημένης εγκυμοσύνης: >40%
- **Μέθοδος επιλογής** ←

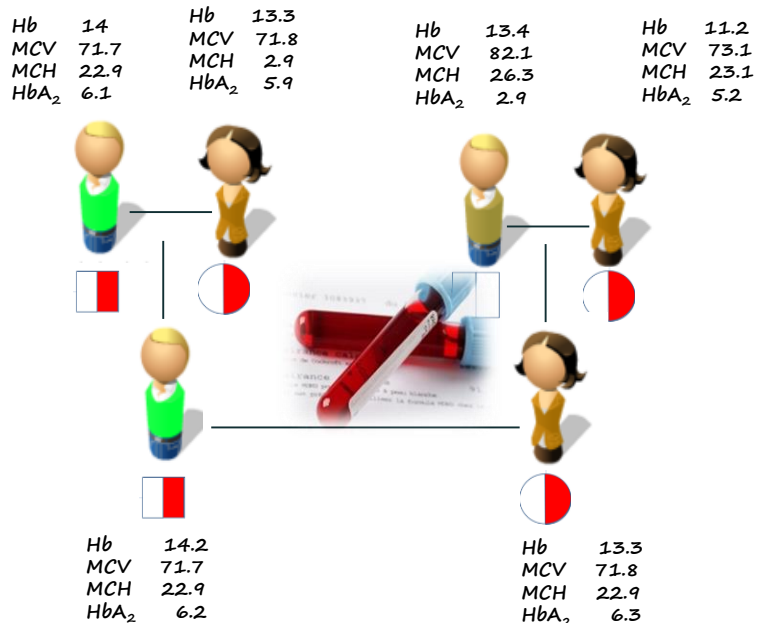
# Προϋποθέσεις

## Αιμοσφαιρινοπαθειες

- Αιματολογική / οικογενειακή μελέτη
- Παραπομπή από το Εργ. Πληθυσμιακού Ελέγχου/Κλ. Θαλασσαιμίας
- Εθνικό Πρόγραμμα Πρόληψης Θαλασσαιμίας

## Άλλες μονογονιδιακές παθήσεις

- Παραπομπή από κλινικό γενετιστή ή γυναικολόγο
- Επιβεβαιωμένη Γενετική Διάγνωση (Εμπλεκόμενο γονίδιο και παθογόνα μετάλλαξη)





# Σχεδιασμός εξατομικευμένου πρωτοκόλλου PGT για μονογονιδιακό νόσημα (Bespoke PGT-M)

## Μελέτη σκοπιμότητας (Feasibility study)

- ❑ Έλεγχος γονίδιου, παθογόνος μεταλλαγή
- ❑ διαθεσιμότητα πληροφοριακών δεικτών γύρω από το γονίδιο όπου θα επιτρέψει την σύνδεση απλοτύπων.

## Σχεδιασμός δοκιμής (Assay design)

- ❑ Σχεδιασμός και ανάπτυξη πρωτοκόλλου,
- ❑ Μοριακές τεχνικές, άμεσο εντοπισμό της μεταλλαγής, ανάλυση σύνδεσης (STR linkage analysis)
- ❑ PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR), PCR σε συνδυασμό με ένζυμα περιορισμού, αλληλούχιση του DNA όπως Sanger Sequencing και ανάλυση προέκτασης του εκκινητή όπως mini-sequencing,

## Επικύρωση του πρωτοκόλλου (Assay validation)

- ❑ Έλεγχος ευαισθησίας και ακρίβειας μεθόδου σε ένα μεγάλο αριθμών δειγμάτων ενός κυττάρου.

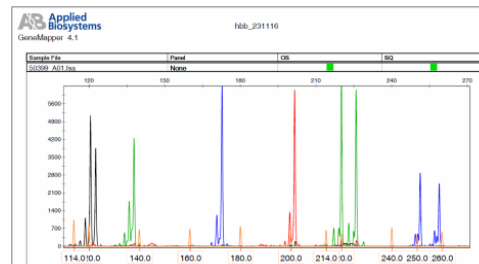
## Γενετική ανάλυση βιοψιών εμβρύου

- ❑ πραγματοποίηση του επικυρωμένου πρωτοκόλλου στις βιοψίες των εμβρύων του ζευγαριού.

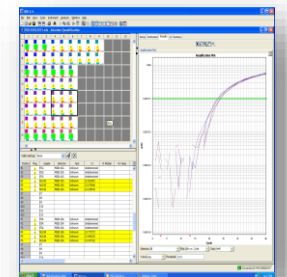
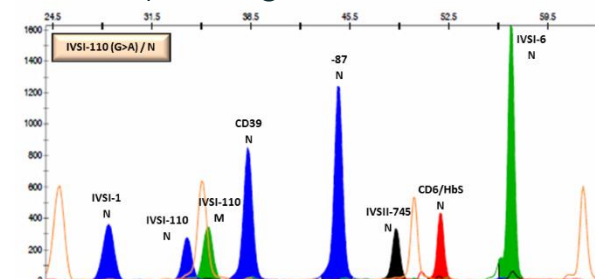
# Μοριακή Γενετική Διάγνωση Βιοψιών



- Πρώτο πολλαπλό PCR με εξωτερικούς εκκινητές για ενίσχυση των περιοχών που θα αναλυθούν
- Μοριακή Ανάλυση – **Συνδυασμός δυο διαγνωστικών προσεγγίσεων:**
  - ✓ Τεχνικές απευθείας ανίχνευσης μεταλλάξεων (RealTime-PCR, RED-PCR, Αλληλούχηση DNA, Fragment Analysis, κτλ)
  - ✓ Ανάλυση απλοτύπων με χρήση πολυμορφικών δεικτών (STR linkage analysis)
- Πλήρης συμφωνία αποτελεσμάτων των δυο μεθόδων και αποκλεισμός επιμόλυνσης των βιοψιών από εξωγενές DNA.
- **ΤΕΛΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ**

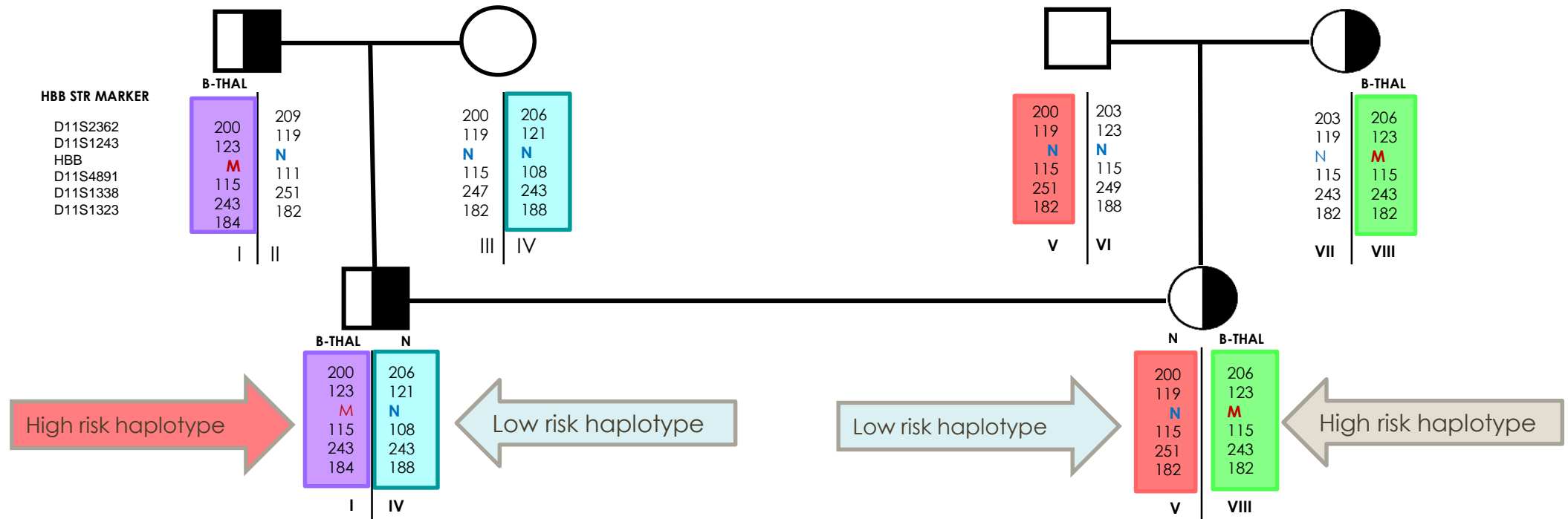


Minisequencing



# Οικογενειακή Μελέτη

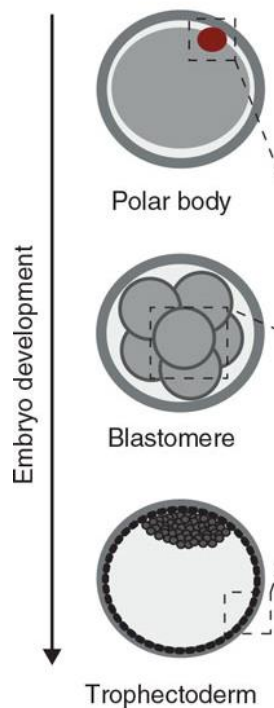
- Οι παθογόνες μεταλλάξεις εντοπίζονται
- Οικογενειακή μελέτη για καθορισμό των πληροφοριακών δεικτών SNPs/STRs
- Καθορισμός των χαμηλού και υψηλού ρίσκου απλοτύπων



\* Η ανάλυση οικογενειακής μελέτης για τον προσδιορισμό των απλοτύπων υψηλού κινδύνου δεν είναι δυνατή για de novo παθογόνες παραλλαγές

# Γενετική Ανάλυση-β Θαλασσαιμία

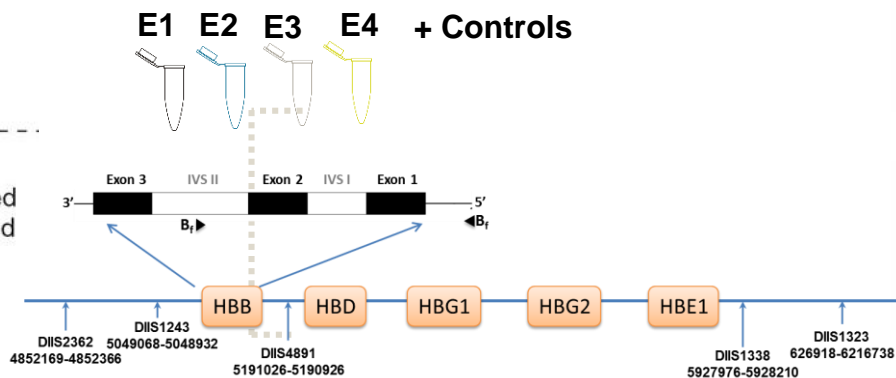
## Βιοψία



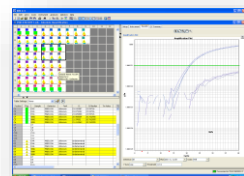
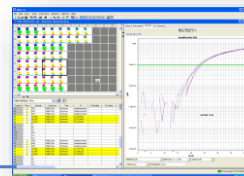
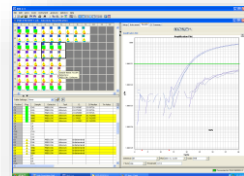
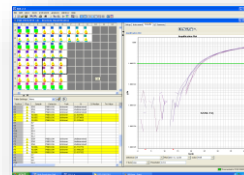
- PK λύση
- 1<sup>st</sup> PCR: Πολύπλεκτη-PCR για τον ταυτόχρονο καθορισμό γονοτύπου και απλοτύπου.
- ενίσχυση β-γονίδιου + 5 πολυμορφικά STR στη συστάδα β γονίδιου



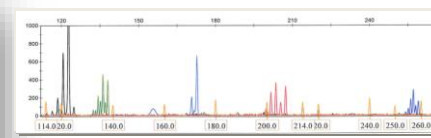
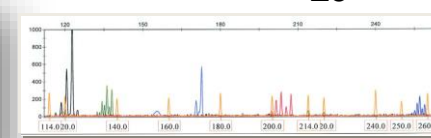
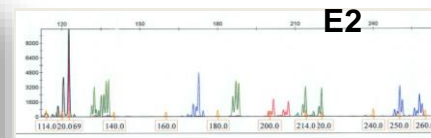
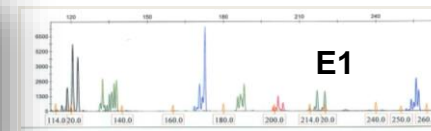
MDA-based PCR-based



## Real Time PCR



## Fragment analysis



## Διάγνωση

B-THAL	
200	206
123	123
IVSI-110	IVSI-110
115	115
243	243
184	182

I VIII

B-THAL	
200	200
123	119
IVSI-110	N
115	115
243	251
184	182

I V

B-THAL	
206	206
121	123
N	IVSI-110
108	115
243	243
188	182

IV VIII

B-THAL	
206	206
121	123
N	IVSI-110
108	115
243	243
188	182

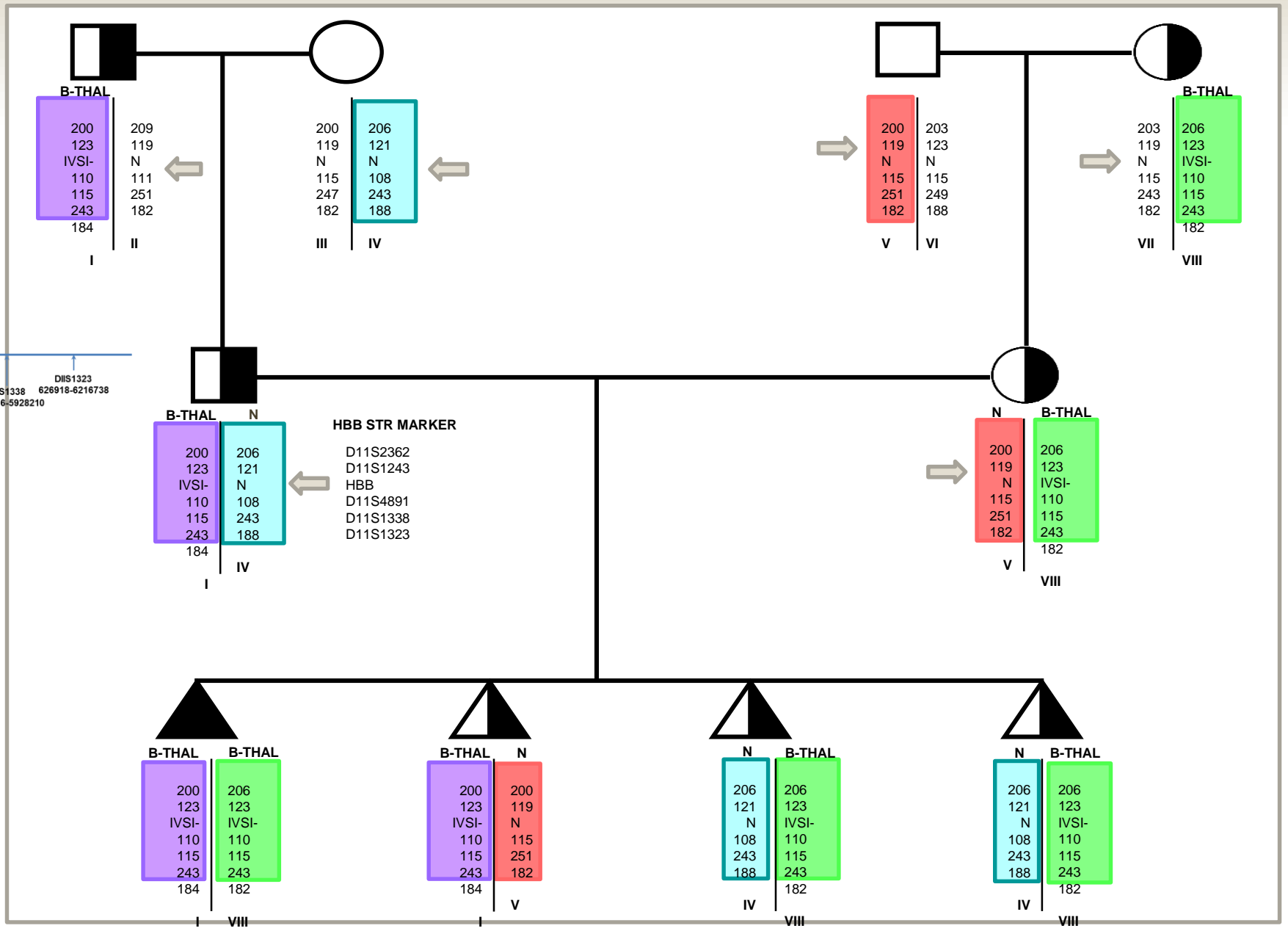
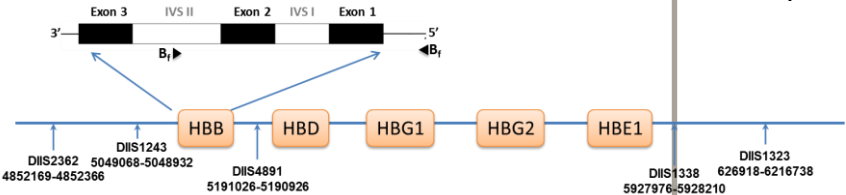
IV VIII

Εμβρυολογικό Εργαστήριο

INγκ-PGT Εργαστήριο

DNA Εργαστήριο

# PGT-για β-θαλασσαιμία



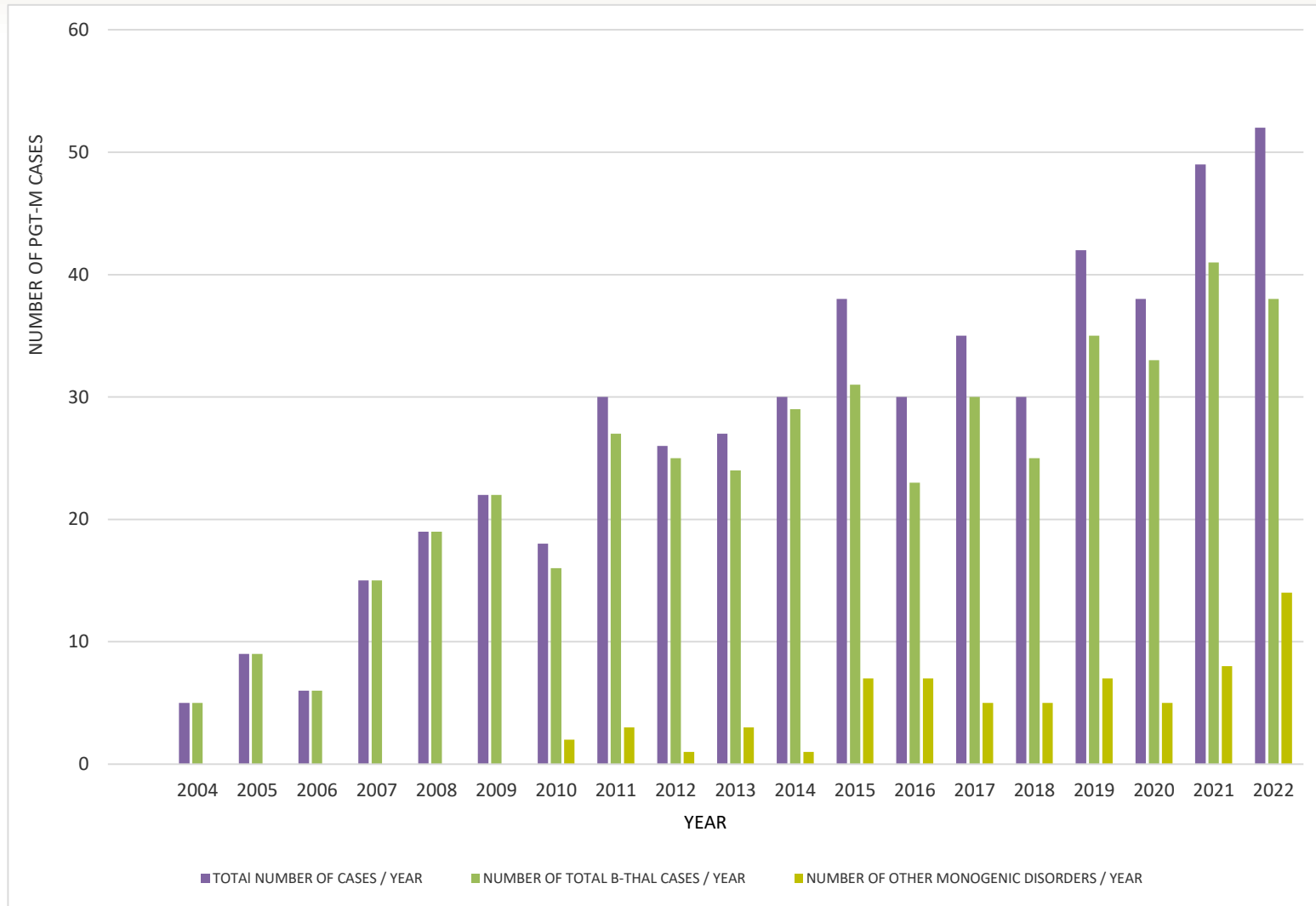


- Διασφαλίζει την μεταφορά στη μήτρα μόνο υγιών εμβρύων
- Αποφυγή διαδικασίας προγεννητικής διάγνωσης σε κύηση
- Υψηλή ακρίβεια διάγνωσης >99%



- Υπαρκτή πιθανότητα να μην βρεθεί υγιές έμβρυο
- Επίπονη διαδικασία
- Πιθανότητα απώλειας κύησης στις πρώτες μέρες
- Περίπου 40-45% συνολική πιθανότητα επιτυχούς εγκυμοσύνης
- Υψηλό κόστος

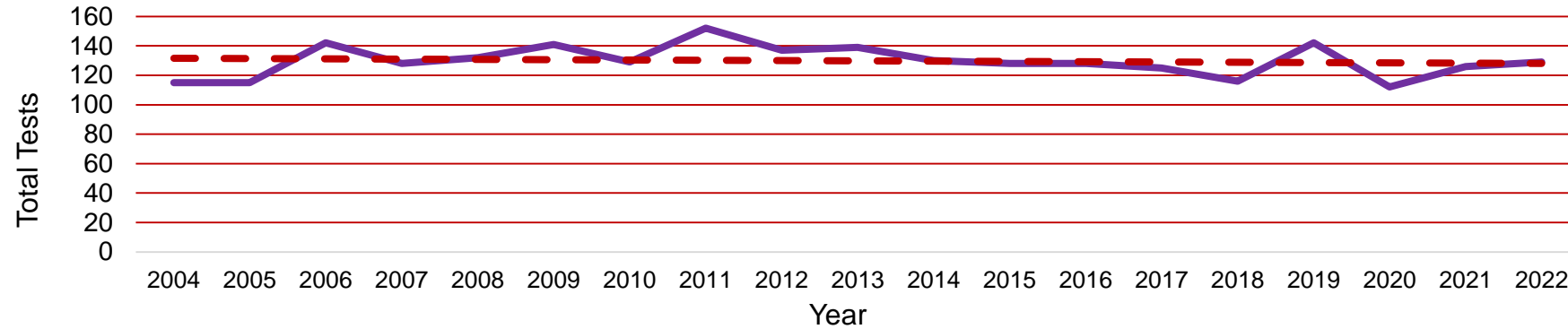
# 18 χρόνια PGT στο INΓΚ (2004-2022)



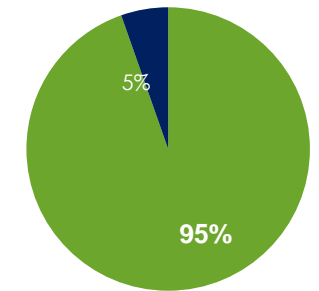
YEAR	TOTAL NUMBER OF CASES / YEAR	NUMBER OF B-THAL ONLY CASES / YEAR	NUMBER OF B-THAL+HLA CASES / YEAR	NUMBER OF TOTAL B-THAL CASES / YEAR
2004	5	5		5
2005	9	9		9
2006	6	6		6
2007	15	15		15
2008	19	19		19
2009	22	22		22
2010	18	16		16
2011	30	27		27
2012	26	25		25
2013	27	22	2	24
2014	30	28	1	29
2015	38	31		31
2016	30	22	1	23
2017	35	30		30
2018	30	23	2	25
2019	42	35		35
2020	38	32	1	33
2021	49	40	1	41
2022	52	38		38
<b>SUM</b>	<b>521</b>	<b>445</b>	<b>8</b>	<b>453</b>

# Πρόληψη β-θαλασσαιμίας στη Κύπρο

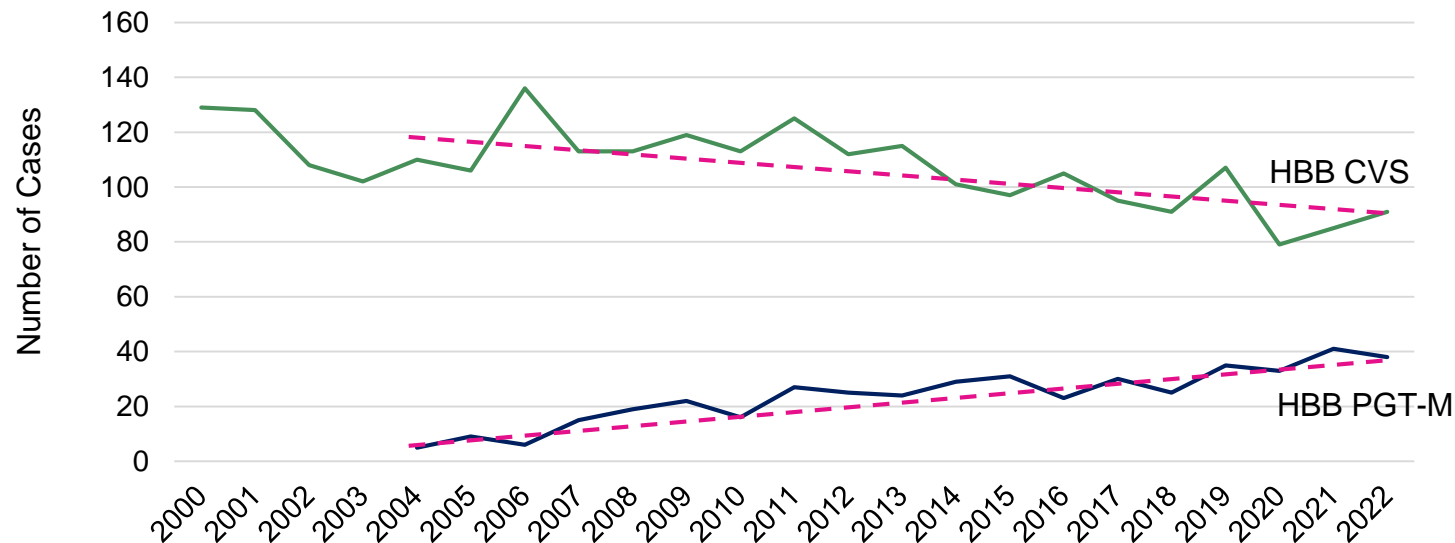
## 2004-2022 β-θαλασσαιμία συνολικά ετήσια τεστ πρόληψης PND+PGT



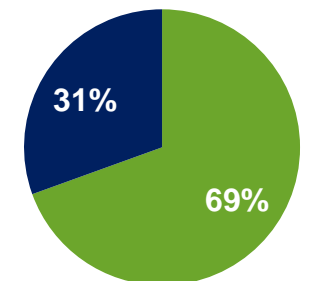
### PND vs PGT-M (2004 -2007)



## β-θαλασσαιμία PND vs PGT-M ανα έτος



### PND vs PGT-M (2019-2022)





# PGT στο ΙΝΓΚ

## 2004 – 2022

Άλλα επικυρωμένα τεστ (αναμένοντας IVF/βιοψίες)

Freidreich Ataxia (FA)

Emery-Dreifuss MD

Spherocytosis (SPTB)

PIZO1-Related Diseases

RYR1-Related Diseases

X linked Charcot Marie Tooth Disease type 1 (CMTX1)

Hereditary Breast Cancer type 2 (BRCA2)

**>445 PGT-M for  $\beta$ -thalassaemia**

**>76 PGT-M for any other monogenic disorder**

**Ανάπτυξη Universal PGT-M μεθόδου**



1	<b><math>\beta</math>-thalassaemia (including Sickle Cell disease) (HBB)</b>	<b>445</b>
2	$\beta$ -haemoglobinopathies combined with HLA matching (HBB+HLA)	8
3	$\alpha$ -thalassaemia (Hb Barts Hydrops foetalis) (HBA)	5
4	$\beta$ -haemoglobinopathy combined with Autosomal Dominant Nephropathy (HBB/NEPHRO)	1
5	Prion Disease (PRNP)	10
6	Huntington's Disease (HD)	7
7	Cystic Fibrosis (CFTR)	5
8	Hypochondroplasia (FGFR3)	4
9	PTEN/Cowden Syndrome (PTEN)	4
10	SDHB- Related Autosomal Dominant Paraganglioma (SDHB)	3
11	Duchenne/Becker Muscular Dystrophy (DMD)	3
12	Charcot-Marie-Tooth 1A (CMT1A)	2
13	Multiple Endocrine Neoplasia 2B (MEN2B)	2
14	Cerebral Cavernous Malformations (CCM1)	2
15	Incontinentia Pigmenti (IKBKG)	2
16	Spinal Muscular Atrophy 1 (SMA1)	2
17	Polycystic Kidney Disease (ADPKD)	2
18	Nemaline Myopathy (ACTA1)	2
19	WWOX-Related Diseases	2
20	Neurofibromatosis type 1 (NF1)	1
21	Tay-Sachs Disease (TSD)	1
22	Congenital Deafness (Connexin26)	1
23	Myotonic Dystrophy (DMPK)	1
24	Léri-Weill Dyschondrosteosis (SHOX)	1
25	Multiple Endocrine Neoplasia Type2A (MEN2A)	1
26	Hereditary Breast and Ovarian Cancer (BRCA1)	1
27	Ichthyosis Prematurity Syndrome (SLC27A4)	1
28	X-linked Severe Combined Immunodeficiency (SCID)	1
29	Duchenne Muscular Dystrophy with Spinal Muscular Atrophy with lower extremity predominance (DMD/DYNC1H1)	1
30	Familial Hypercholesterolaemia (LDLR)	1
	<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>521</b>

# Το μέλλον

Τρέχον Ερευνητικό Πρόγραμμα για την ανάπτυξη καθολικού τεστ (Universal) για ΠΕΓΔ.

Συνδυασμός τεχνολογιών:

MDA whole genome amplification

Αλληλούχηση επόμενης γενιάς NGS

Oxford Nanopore: Long Read-Amplicon



Στόχοι

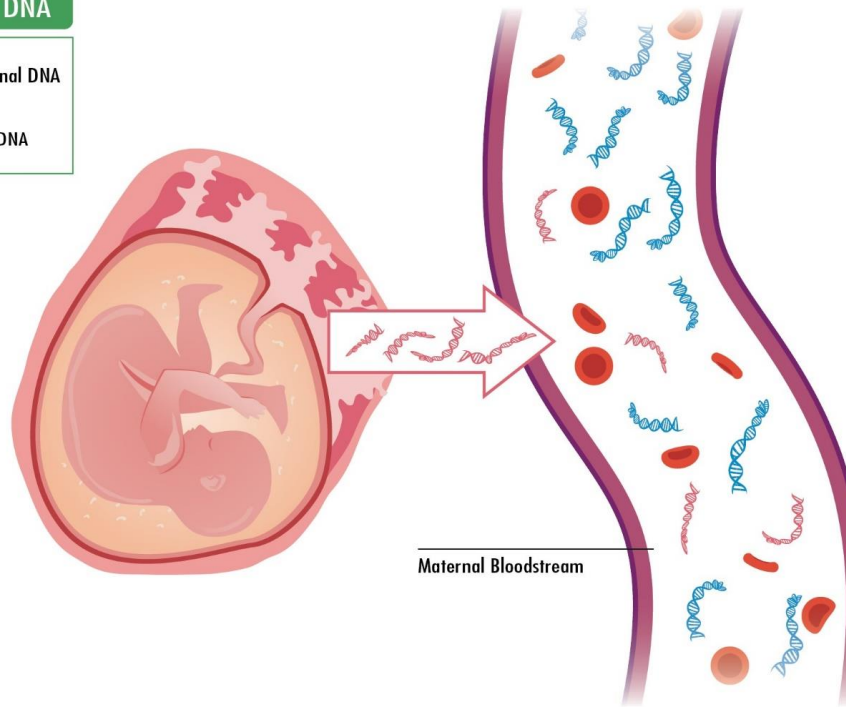
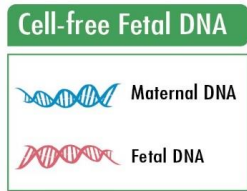
Άμεση ανίχνευση απλότυπου και γονότυπου χωρίς προηγούμενη μελέτη, σε πάνελ για >50 μονογονιδιακές παθήσεις (επεκτάσιμο σε >100)

Συνδυασμένο με ταυτόχρονη ανάλυση για ανίχνευση χρωμοσωματικών ανωμαλιών (μονοσωμίες, τρισωμίες, δομικές ανακατατάξεις κτλ.)

Ανίχνευση de-novo (εκ νέου) παθογόνων μεταλλάξεων

# Μη επεμβατική Προγεννητική Διάγνωση\_β-θαλασσαιμία

- Εξωκυτταρικό εμβρυϊκό DNA (cell free fetal DNA) το οποίο κυκλοφορεί στο μητρικό πλάσμα (Lo *et al.*, 1997)
- Δείγμα περιφερικού αίματος – **χωρίς ρίσκο**



- Χαμηλή ποσότητα (10% του μητρικού DNA) και αμφιλεγόμενη ποιότητα εμβρυϊκού DNA
- Το απομονωμένο DNA είναι κυρίως μητρικό
- Μητρικό και εμβρυϊκό DNA είναι παρόμοια
- Οι περισσότεροι γονείς έχουν την ίδια μετάλλαξη



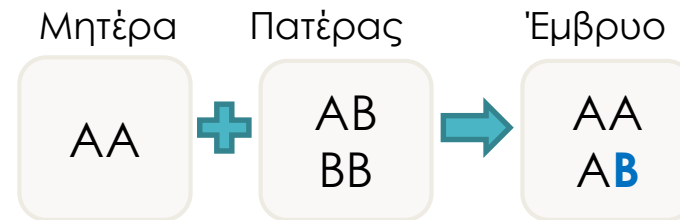
Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων ή διαφορών  
ου παρουσία υψηλής ποσότητας των  
αλληλουχιών

ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ

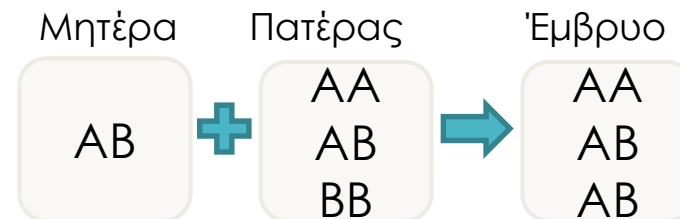
# Ανάπτυξη ολοκληρωμένης ΜΕΠΔ μεθόδου για τη β-θαλασσαιμία

## ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΣ ΔΥΟ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ

- [Αλληλούχηση Νέας Γενιάς \(NGS\)](#)
- Ανίχνευση των πατρικών κληρονομούμενων αλληλομόρφων που απουσιάζουν από μητρικό πλάσμα με την ανάλυση πολυμορφισμών που βρίσκονται στο σύμπλεγμα γονιδίων β-σφαιρίνης  
Εφαρμόζεται μόνο στο 50% των περιπτώσεων όπου το έμβρυο δεν κληρονομεί το παθολογικό πατρικό αλληλόμορφο



- [Ψηφιακή PCR-Droplet Digital PCR](#)
- Καθορισμός μητρικού και πατρικού αλληλομόρφου (παθολογικό ή φυσιολογικό)
  - Εξαιρετικά ευαίσθητη μεθοδολογία
- Εφαρμόζεται στο 100% των περιπτώσεων για την κάθε μετάλλαξη



# Ομάδα Γενετικής Ανάλυσης Αιμοσφαιρινοπαθειών, PGT, ΙΝΓΚ



## **Ευχαριστίες στους συνεργάτες μας:**

- Εργαστήριο Πληθυσμιακού Ελέγχου Θαλασσαιμίας
- Κλινικές Θαλασσαιμίας
- Κέντρα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (ιατρούς & εμβρυολόγους)

Σας ευχαριστώ!