

# Preimplantační genetická diagnostika (PGD) hereditárních nádorových syndromů

## Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) of Hereditary Cancer Syndromes

Raszyková L., Hořínová V., Texl P.

Laboratoř lékařské genetiky, Sanatorium Helios, Brno

### Souhrn

Pokroky v molekulárně biologických metodách umožňují analýzu genotypu z jedné či několika buněk, což přináší rozsáhlé využití v preimplantační genetické diagnostice (PGD) nejen chromozomálních aneuploidií, ale i monogenních nemocí, tudíž i hereditárních nádorových syndromů. PGD tak může být přínosná v těch případech, kdy je riziko přenosu patologické vlohy z rodiče na potomka z různých důvodů nežádoucí. Předkládáme tři případy rodin s PGD a dosavadní výsledky.

### Klíčová slova

preimplantační genetická diagnostika – monogenní onemocnění – hereditární nádorové syndromy – *in vitro* fertilizace

### Summary

Advances in molecular biology techniques made possible genotype analysis from one or several cells. This can be used in preimplantation genetic diagnosis (PGD) not only of chromosomal aneuploidy but also of single gene diseases as well as hereditary cancer syndromes. PGD can be a benefit for those cases when the risk of transfer of pathological alteration from parent to offspring is unwelcome. We submit three cases of PGD with the results.

### Key words

preimplantation genetic diagnosis – single gene disease – hereditary cancer syndromes – *in vitro* fertilization

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



**Mgr. Lenka Raszyková**  
Laboratoř lékařské genetiky  
Sanatorium Helios  
Štefánikova 12  
602 00 Brno  
e-mail:  
lraszykova@sanatoriumhelios.cz

Obdrženo/Submitted: 27. 4. 2012

Přijato/Accepted: 25. 6. 2012

## Úvod

Preimplantační genetická diagnostika (PGD) zahrnuje soubor molekulárně-biologických metod umožňujících popsat genetický stav embrya před jeho implantací v děloze, tzn. že do dělohy jsou transferována pouze „zdravá embrya“ (ta, u kterých nebyla prokázána sledovaná abnormalita). Cílem je tedy zabránit přenosu závažného genetického onemocnění do další generace. Mezi nejčastější indikace k provedení PGD patří chromozomové aberace (vyšetřované pomocí metod: fluorescenční *in situ* hybridizace FISH, metoda mikročipové komparativní hybridizace aCGH) nebo monogenně podmíněné choroby děděné dominantně, recesivně či vázané na pohlaví (vyšetřované pomocí metody polymerázové řetězové reakce – PCR). PGD je vázána na asistovanou reprodukci (IVF) [1].

V PGD monogenních onemocnění včetně hereditárních nádorových syndromů je využívána již zmíněná polymerázová řetězová reakce (PCR), konkrétně multiplex PCR, s následnou analýzou. Principiálně se v PGD PCR diagnostice uplatňují dva přístupy. Jednak tzv. vazebná analýza (nepřímá DNA diagnostika s použitím polymorfních mikrosatelitních markerů) a analýza vlastního místa genové alterace. Kombinace obou přístupů zvyšuje přesnost genotypizace [2,3].

V Sanatoriu Helios se PGD PCR provádí na embryích ve stadiu blastocysty, tj. po pětidenní a/nebo šestidenní kultivaci. Rutinní biopsii blastocyst provádí Sanatorium Helios jako jedno z mála IVF center v Evropě. Její hlavní výhoda spočívá jednak v tom, že na rozdíl od biopsie třídních embryí se bioptují a vyšetřují pouze embrya nejvyšší kvality, s největší pravděpodobností implantace (což ušetří nemalé finanční prostředky), jednak v získání většího počtu buněk, a tím vyšetřovaného materiálu, což významně ovlivňuje přesnost výsledku genotypizace (klesá pravděpodobnost selhání amplifikace a alelického drop-outu) [4].

Dodržení veškerých opatření minimalizujících (a de facto vylučujících) kontaminaci vzorku je samozřejmostí.

V naší PGD PCR laboratoři bylo řešeno sedm případů PGD z důvodu výskytu dě-

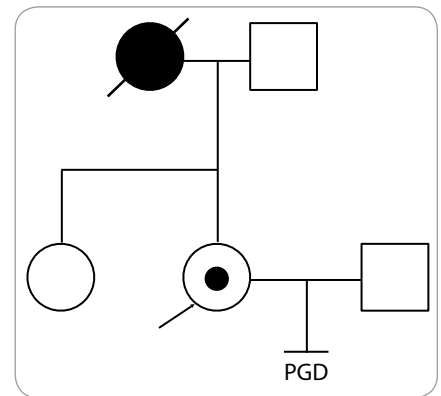
dičných nádorových onemocnění v rodině. Pět případů se týkalo nosičů různých mutací v *BRCA1* genu (hereditární karcinom prsu a ovarií), po jednom pak mutace v *MSH2* genu (hereditární nepolypózní karcinom tlustého střeva – Lynchův syndrom) a mutace v *CDH1* genu (hereditární difuzní karcinom žaludku). Vývoj testu v případě mutace v *CDH1* genu byl přerušen z důvodu neúplné diagnózy, všechny ostatní byly dokončeny. Žadatelky jsou v různých fázích celého procesu (vývoj testu, hormonální stimulace, odběr vajíček a kultivace embryí, transfer a/nebo kryoembryotransfer, potvrzení biochemické gravidity, klinická gravidita (Asp+)). Jedna žadatelka již porodila zdravou holčičku.

Všechny případy PGD PCR jsou konzultovány týmem odborníků (onkolog, klinický genetik, molekulární biolog, gynekolog, embryolog). V případech indikovaných klinickým genetikem je PGD PCR v Sanatoriu Helios hrazeno některými zdravotními pojišťovnami.

Ambulance lékařské genetiky v Sanatoriu Helios zajišťuje především komplexní genetickou péči pro páry s poruchou reprodukce. V souvislosti s léčbou poruch plodnosti zajišťuje genetické vyšetření pro páry, které mají problémy otěhotnět nebo trpí opakovanými samovolnými potraty. V indikovaných případech je nabízena preimplantační genetická diagnostika monogenních onemocnění a chromozomálních vad u embryí. Do této kategorie patří i páry, kde je jeden z partnerů nositelem mutace, která významně zvyšuje onkologické riziko a je prokázán hereditární nádorový syndrom.

## Kazuistiky

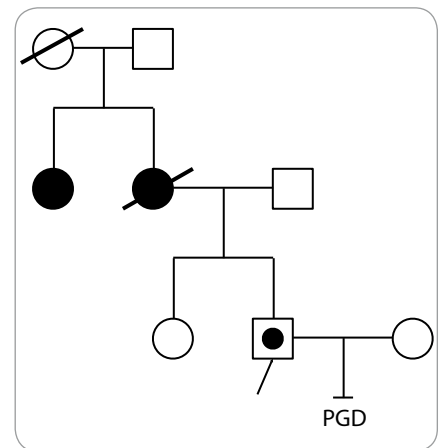
1. Do genetické poradny se dostavil pár, kde byla nositelkou mutace v genu *BRCA1* žena-probandka (obr. 1). Její matka zemřela na nádor prsu a vaječníku ve 45 letech. Protože na našem pracovišti vyšetřujeme nejen konkrétní mutaci, ale využíváme i vazebnou analýzu, byl zahájen tzv. work up, kdy jsme porovnávali polymorfní markery probandky, jejího partnera, její zdravé sestry a otce – viz rodokmen. Rodina byla pro použité markery informativní. Provedli jsme vy-



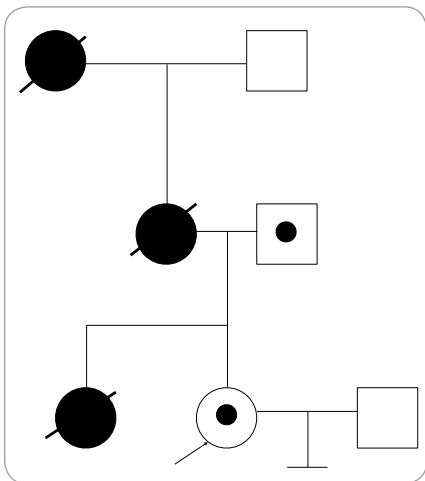
Obr. 1. Rodina s úspěšnou PGD, v listopadu 2011 se narodila zdravá dcera. Probandka je nosička mutace v *BRCA1* genu, její matka zemřela ve 45 letech na nádor prsu a ovaria. U sestry probandky byla přítomnost mutace vyloučena molekulárně-biologickou analýzou *BRCA1* genu.

šetření pětidenních embryí. Embryo s negativním nálezem bylo transferováno. 18. 11. 2011 porod zdravé dcery p.v. 3 950/52 cm.

2. Druhá kazuistika již byla komplikovanější. Jednalo se o Lynchův syndrom, kde probandem byl partner nesoucí mutaci v genu *MSH2* (obr. 2). Matka



Obr. 2. Proband s Lynchovým syndromem, mutací v genu *MSH2*. Matka zemřela v 47 letech na nádor žlučových cest a uteru. Teta probanda (sestra matky) nese stejnou mutaci jako proband, předpokládáme tudíž, že tuto nese i matka probanda. U sestry probanda byla přítomnost mutace vyloučena molekulárně-biologickou analýzou *MSH2* genu. První pokus IVF se nezdařil, embrya nemohla být vyšetřena, cyklus bude opakován.



Obr. 3. Rodina s předpokládanou dědičnou formou difuzního karcinomu žaludku. Probandka nese mutaci v *CDH1* genu. Sestra probandky zemřela ve 30 letech na nádor žaludku, matka ve 46 letech na nádor slinivky, matka matky v 63 letech na nádor žaludku. Ani u jedné ze zemřelých nebyla provedena analýza *CDH1* genu, DNA není dostupná. Předpokládali jsme, že probandka zdědila mutaci po matce. Ukázalo se však, že mutaci v *CDH1* genu nese „zdravý“ otec. Proces byl zastaven.

mu zemřela ve 47 letech na ca žlučového systému a ca uteru. Opět byl zahájen work up, kdy jsme porovnávali markery jeho, jeho tety, jeho partnerky a otce. Ukázalo se, že rodina není pro sledované markery plně in-

formativní. Proto jsme se snažili získat další materiál – od zdravé sestry probanda, která žije ve Švýcarsku. Po porovnání všech markerů vyplynulo, že u probanda došlo k rekombinaci mutace s přílehlým markerem. Byla zahájena hormonální stimulace, proběhl IVF cyklus. Kultivovaná embrya bohužel nedosáhla stadia biopsie – embrya nemohla být vyšetřena. Nyní je plánován druhý cyklus.

3. Nejzajímavější a nejkomplicovanější je třetí případ, kdy probandkou je partnerka-nositelka mutace v genu pro cadherin (*CDH1*) IVS15-6C>G – splicingová mutace v exonu 16, zapsaná do databáze mutací poprvé (obr. 3). Její sestra zemřela ve 30 letech na ca žaludku, její matka ve 46 letech na ca pankreatu, matka matky v 63 letech na ca žaludku. Předpokládali jsme, že probandka zdědila mutaci po matce. Zahájili jsme tedy work up a hodnotili markery a mutaci u probandky, jejího partnera a jejího zdravého otce. Genetický materiál od ostatních členů rodiny není přímého stanovení mutace jsme k našemu velkému překvapení zjistili, že nositelem výše uvedené mutace je otec probandky! Veškerá vysvětlení jsou spekulativní. Jedná se pouze o klinicky nezávažný po-

lymorfismus (otec je v 62 letech zdravý)? Nebo se jedná o mutaci a onemocnění se u otce dosud neprojevovalo a snad ani neprojevilo? Existuje vůbec a event. jaká (vzácná?) mutace ze strany matky (všichni zemřeli)? Byla sestra probandky složený heterozygot? Po konzultaci s kolegy ze Sydney IVF byl work up přerušen pro nedostatek informací. Z uvedeného případu vyplývá nutnost důsledné klinické interpretace kauzální mutace v laboratoři, kde genetické testování rodiny probíhá.

### Závěr

Pro mnoho párů s výskytem genetického onemocnění v rodině představuje PGD možnost mít dítě, které patologickou vlohu neponese. Přes veškerá úskalí a etická dilemata tak představuje unikátní alternativu prenatální diagnostiky.

### Literatura

1. Wells D, Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med* 2001; 7(1): 23–30.
2. Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F et al. ESHRE PGD consortium best practise guidelines for amplification-based PGD. *Hum Reprod* 2011; 26(1): 33–40.
3. Hüttelová R, Kleibl Z, Řezáčová J et al. Předpoklady pro preimplantační genetickou diagnostiku (PGD) u nosičů mutací v nádorových predispozičních genech. *Klin Onkol* 2009; 22 (Suppl): 69–74.
4. De Boer K, MacArthur S, Murray C et al. First live birth following blastocyst biopsy and PGD analysis. *Reprod Biomed Online* 2002; 4: 35.