

# **ГЕНЕТИЧНИ ПЛАТФОРМИ В РЕПРОДУКТИВНАТА МЕДИЦИНА – ГОТОВИ ЛИ СМЕ ЗА ГЕНОМНАТА РЕВОЛЮЦИЯ?**

Доц. д-р Иванка Димова  
Медицински Университет София

# РЕПРОДУКТИВНА МЕДИЦИНА



- **Репродуктивната медицина** е област от медицината, която се занимава с превенцията, диагнозата и лечението на репродуктивните проблеми; целта е подобряване и подържане на репродуктивното здраве, за да може да се осъществи раждане на здрави деца при всички желаещи двойки. Основава се на знанието от репродуктивната анатомия, физиология и ендокринология, в съчетание с молекулната биология, биохимия и патология.

# РЕПРОДУКТИВНА ГЕНЕТИКА



- **Репродуктивната генетика** е термин, който свързва репродуктивните и генетични технологии, като използва всички постижения на генетиката, с цел диагностика и избор на най-подходящо лечение при инфертилитет, както и превенция на раждането на дете с вродени аномалии и генетични болести.

# С разчитането на генома започна нова ера в биологията и медицината



# ВАЖНИ СЪБИТИЯ В КЛИНИЧНАТА (репродуктивна) ГЕНЕТИКА



**Walther Flemming** открива митозата и хромозомите, което се признава за едно от 100-те най-велики научни открития за всички времена и топ 10 на най-важните открития в биологията

1858



**Jérôme Lejeune** открива за първи път при деца с описания по-рано синдром на Даун, че броят на хромозомите е 47, с допълнителна 21-ва хромозома

1958

**Thomas Hunt Morgan** печели Нобелова награда по медицина и физиология за откриване ролята на хромозомите в наследствеността



1933

**Henry Turner** описва клинично синдрома на ниски жени с първична аменорея, а хромозомната аномалия е открита през 1960 г.



1938



1942

**Harry Klinefelter** описва за първи път мъже с гинекомастия, слаба вирилизация, малки тестиси и азооспермия. В края на 1950-те се установява, че тези мъже имат допълнителна X-хромозома

# ВАЖНИ СЪБИТИЯ В КЛИНИЧНАТА (репродуктивна) ГЕНЕТИКА



The Infertility Center of St. Louis

- След въвеждането на ICSI през 1992 настъпва революция във виждането за мъжкия инфертилитет. За първи път в статия през 1995 г. се коментира ролята на много гени от Y-хромозомата за сперматогенезата, като делеции на тези гени се откриват често при инфертилни мъже

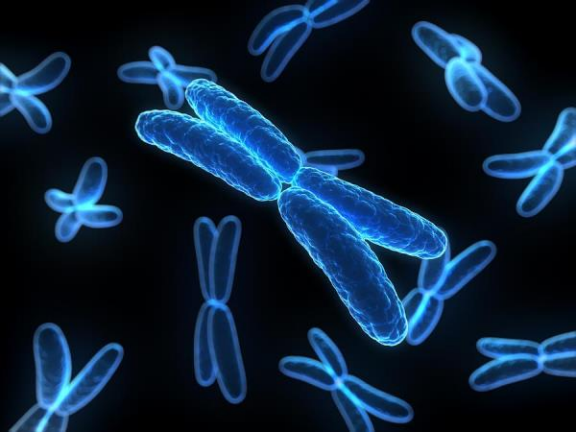
Reijo, R., Lee, T.Y., Salo, P. *et al.* (1995) Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. ***Nature Genet.***, 10, 383–393.

Pryor, J.L., Kent-First, M., Muallem, A. *et al.* (1997). Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. ***New Eng. J. Med.***, 336, 534–539.

# Основни въпроси в презентацията

1. Хромозомни мутации при инфертилитет
2. Генни мутации при инфертилитет
3. Генни панели при инфертилитет
4. Пренатална диагностика за установяване на генетични аномалии у плода
5. Развитие на феталната медицина, свързана със специализирана генетична диагностика





# Хромозомни мутации при инфертилитет

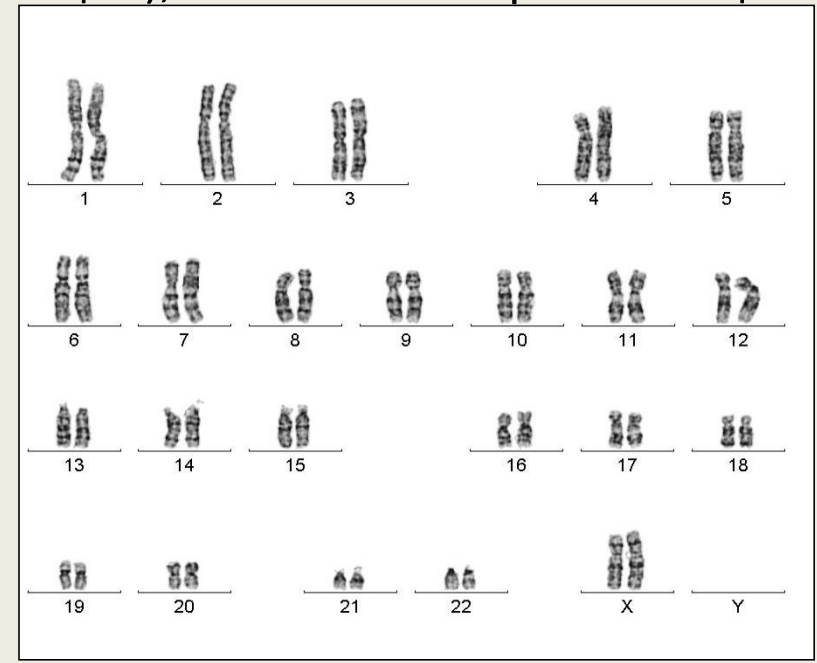
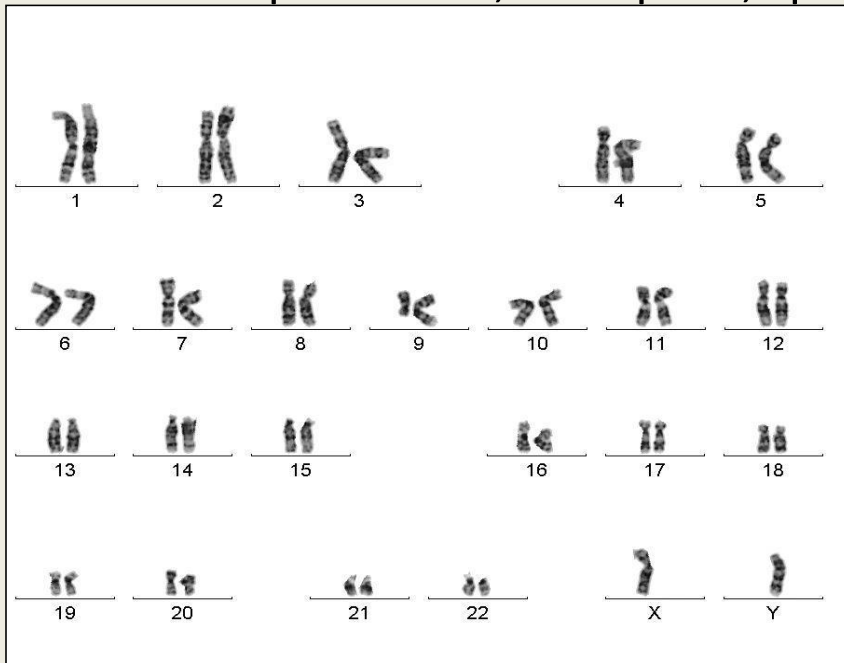
- Висока честота на хромозомни аномалии сред пациентите с репродуктивни проблеми (инфертилитет):
  - При **5-10%** от мъжете с репродуктивни проблеми се откриват хромозомни аномалии, този дял нараства на **20%** при мъжете с азооспермия
  - **Около 5%** от жените с репродуктивни проблеми носят хромозомни аномалии, при наличие на аменорея те се срещат в около **30%**
- Уточняването на хромозомната аномалия има отношение към вземането на решение при конкретния пациент – избор на репродуктивна техника, провеждане на предимплантационна диагностика или използване на донорски яйцеклетки или сперматозоиди



# Хромозомни мутации при инфертилитет



- Мъже:
  - свързани с половите хромозоми: 47,XXY (синдром на Клайнфелтър); 47,XYY и други YY-анеуплоидии; 46,XX- и 45,X-мъже; структурни аберации на Y хромозомата (делеции, рингове, изохромозома, инверсии, транслокации); Y-автозомни транслокации

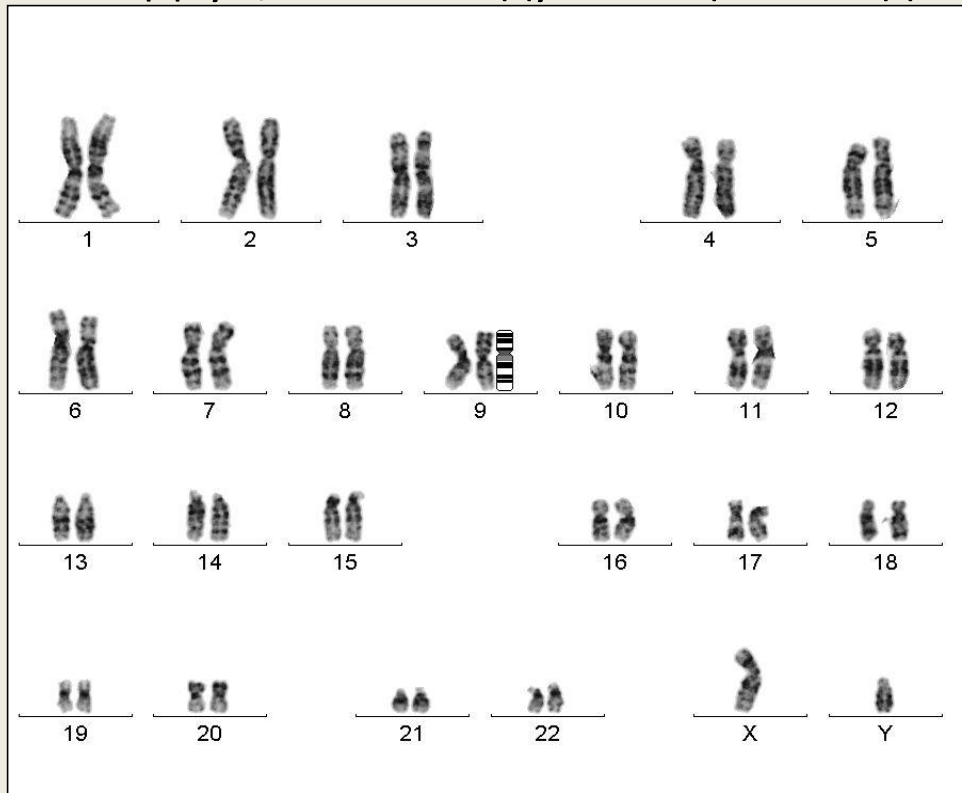


# Хромозомни мутации при инфертилитет



- Мъже:

— СВЪРЗАНИ С АВТОЗОМИТЕ: транслокации (Робертсонови, реципрочни); инверсии; маркерни хромозоми; клинични синдроми (синдром на Даун, частични дупликации или делеции)



46,XY,inv(9)(p11;q13)



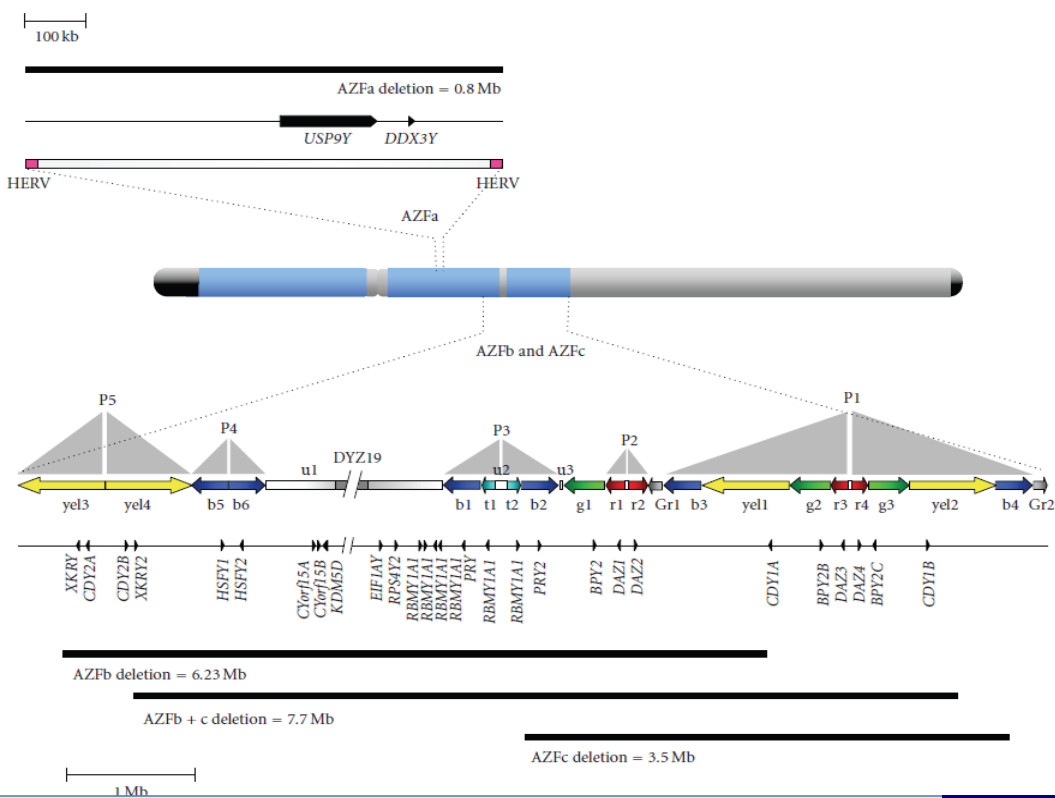
# Хромозомни мутации при инфертилитет

- Жени:
  - Свързани с половите хромозоми: Синдром на Търнър и гонадни дисгенезии с нисък ръст - 45,X; мозаицизъм 45,X/46,XX и 45,X/47,XXX; Xq изохромозома; del (Xq); del (Xp); r(X) и др.; Гонадни дисгенезии с Y-клетъчна линия: смесени дисгенезии (45,X/46XY); 46,XY гонадна дисгенезия (синдром на Swyer) истински хермафродитизъм с Y-клетъчна линия; X-автозомни транслокации; 47,XXX и мозаицизъм.
  - Свързани с автозомите: Транслокации (Робертсонови, реципрочни); инверсии; клинични синдроми (частични дупликации или делеции)



# Генни мутации при инфертилитет

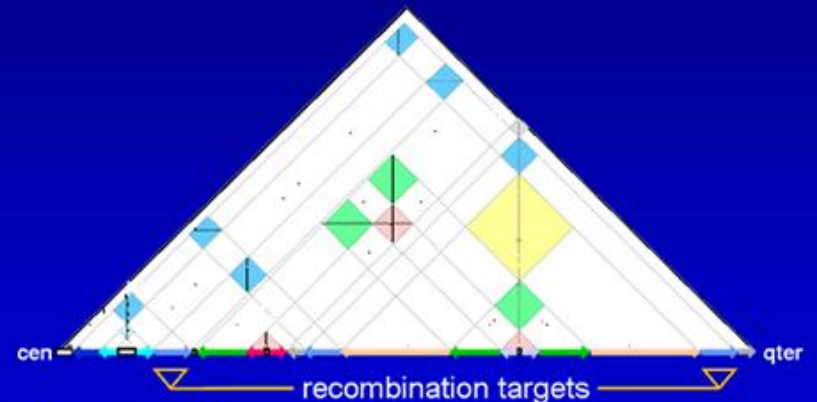
- **Висока честота на мутации в гени от половите хромозоми при пациенти с инфертилитет**
  - Микроделеции в У-хромозомата се откриват при **10-15%** от азооспермичните мъже и съответно при **5-10%** от мъжете с тежка олигозооспермия.
- Уточняването на вида на делецията подпомага поведението при асистирания репродукция – прилагане на ICSI, тестикуларна биопсия, донор на сперматозоиди.



**AZFa** -Sertoli cell-only syndrome (SCOS)  
**AZFb** – арест в мейоза I  
**AZFc** - хипосперматогенеза, прогресираща от олигоспермия към азооспермия

Микроделециите на AZFa и AZFb имат изключително лоша прогноза за получаване на сперматозоиди чрез TESE/биопсия, докато тези на AZFc (80% от всички) имат шансове за получаване на сперматозоиди за IVF/ICSI.

### 3.5-Mb AZFc Deletions Caused by Homologous Recombination Between 229-kb Direct Repeats



Adapted from Kuroda-Kawaguchi et al. The human Y chromosome's AZFc region features massive palindromes, uniform recurrent deletions, and testis gene families. *Nature Genetics* 29: 279-286, 2001.

# Някои важни аспекти на У-микроделециите

- Макар и много рядко, У-микроделеции се срещат и сред мъже, които са станали бащи без да си изследват спермограмата
- При пациенти с У-микроделеции се наблюдава намаляване на броя на сперматозоидите с времето
- Мъже с У-микроделеции ги предават на потомството си от мъжки пол (може и в потезък вариант)





# Генни мутации при инфертилитет

- Мутации в гени от X-хромозомата имат отношение към сперматогенезата:
  - **2-3%** от мъжете с азооспермия или тежка олигозооспермия имат мутации в **AR гена**: вариабилен фенотип от нормално изглеждащи женски индивиди до двойствени гениталии или инфертилни мъже в асоциация с други аномалии (крипторхизъм, хипоспадия, гинекомастия, слаба вирилизация)
  - болест на Кенеди (спинобулбарна мускулна атрофия ).
  - мутации в гена *KAL1* - Синдром на Калман, засяга 1 на 10 000 мъже и се характеризира с вроден, изолиран хипогонадотропен хипогонадизъм, асоцииран с аносмия; подходяща хормонална терапия може да възстанови фертилността при мъжете със синдрома на Калман.
  - Премутацията за синдрома на чупливата X-хромозома (отговорен за интелектуална недостатъчност при мъжете) при нормални жени асоциира с преждевременна яйчникова недостатъчност и слаб отговор при овариална стимулация в хода на ин витро процедура; уточняването е важно и с оглед предотвратяване раждането на дете със синдром на чупливата X.





# Генни мутации при инфертилитет

- **Мутации в гени от автозомите имат отношение към мъжкия и женския инфертилитет**
  - При 60-90% от мъжете с вродена двустранна агенезия на vas deferens (CBAVD - congenital bilateral absence of the vas deferens) се откриват мутации в CFTR гена (муковисцидозния ген) - при тези пациенти най-подходяща е ICSI техниката, като при наличие на мутация и в партньорката се препоръчва предимплантационна генетична диагноза, за да се предотврати предаването на болестта в потомството.
  - Мутации в *SRD5A2* (5-алфа-редуктаза-2 – 2p23) генът се проявяват с азооспермия или тежка олигозооспермия, асоциирана понякога с крипорхизъм и хипоспадия.

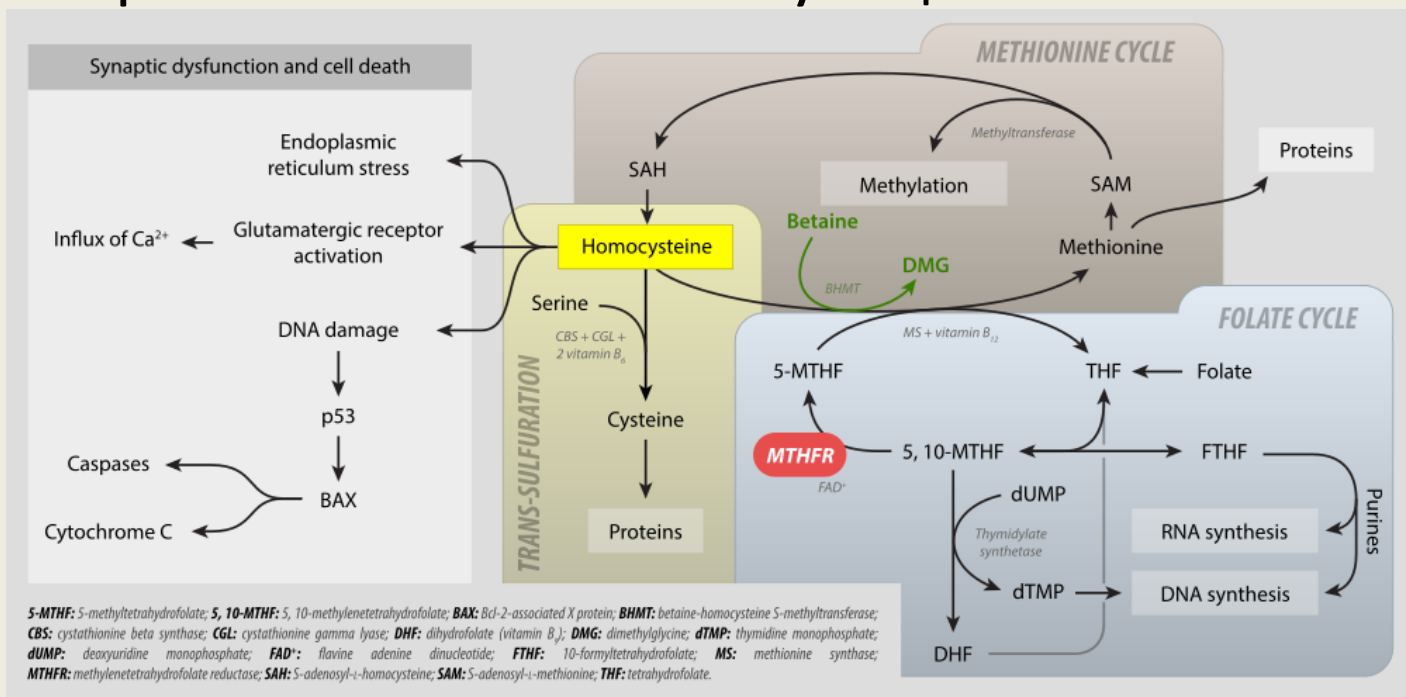


# Генни мутации при инфертилитет

- При моногенни болести като миотонична дистрофия; дефицит на 21- $\alpha$ -хидроксилаза и др. стероидогенни ензими; церебеларна атаксия; анемия на Фанкони;  $\beta$ -таласемия; хемохроматоза – стерилитетът може да бъде един от симптомите; при жени ефект имат и мутациите за галактоземия, мукополизахаридози и ароматазен дефицит

# Генни мутации при инфертилитет

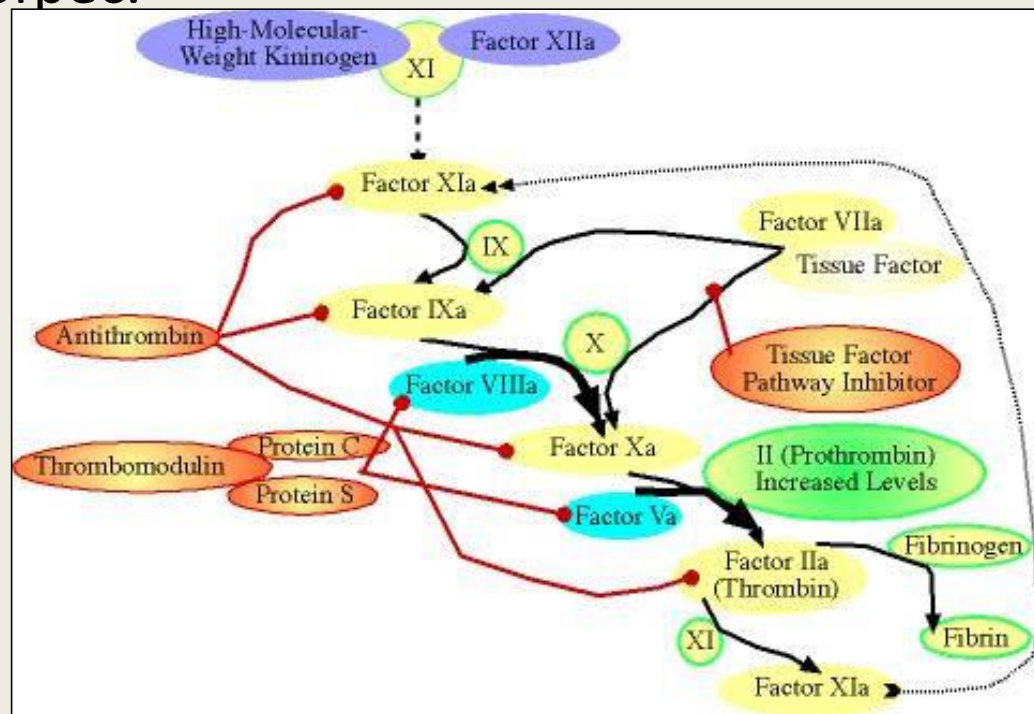
- Мутациите в ***MTHFR*** (метилен-тетрахидрофолат-редуктаза) са свързани с фолатния метаболизъм и хомоцистеиновата обмяна - повишен риск за сърдечно-съдови усложнения и раждане на дете с дефект на невралната тръба, както и атипичен отговор към яйчникова стимулация.



# Генни мутации при инфертилитет

## генетични предразположения

- Мутациите за **вродени тромбофилии** при жените носят увеличен риск за усложнения като прееклампсия, вътреутробно изоставане на растежа, абрупцио на плацентата, преждевременно раждане, хабитуални аборти и хроничен фетален дистрес.



Тромбофиличен статус	Относителен риск за венозни тромбози
Нормален	1
Употреба на орални контрацептиви	4
Factor V Leiden, хетерозигот	5 to 7
Factor V Leiden, хетерозигот + ор.контр	30 to 35
Factor V Leiden, хомозигот	80
Factor V Leiden, хомозигот + ор.контр	??? >100
Протромбин генна мутация, хетерозигот	3
Протромбин генна мутация, хомозигот	??? Възможен риск от артериална тромбоза
Протромбин генна мутация, хетерозигот + ор.контр	16
Protein C дефицит, хетерозигот	7
Protein C дефицит, хомозигот	Тежка тромбоза при раждането
Protein S дефицит, хетерозигот	6
Protein S deficiency, хомозигот	Тежка тромбоза при раждането
Antithrombin дефицит, хетерозигот	5
Antithrombin дефицит, хомозигот	Счита се за особено тежка при раждане
Hyperhomocysteinemia	2 to 4
Hyperhomocysteinemia комбинирана с Factor V Leiden, хетерозигот	20

# ??? Провеждане на антикоагулантна терапия при вродени тромбофилии

- Стриктна фамилна и персонална история за тромбози
- Преценка на рискови фактори
- Преценка на чернодробна функция
- Преценка на бъбречна функция
- Напреднала възраст и безитас
- Надеждни лабораторни тестове за преценка на лечението (анти-фактор Ха assay)

Лечението с антикоагуланти също носи риск (около 3% шанс за голяма хеморагия на година, от които 1/5 са фатални).





# Генни панели при инфертилитет

## Мъжки стерилитет / инфертилитет

GOPC, INSL3, RXFP2, FGFR1, PROKR2, CHD7, KAL1, FGF8, DPY19L2, CATSPER1, DDX3Y, CSNK2A2, AGFG1, CSNK2B, LHCGR, SPATA16, SYCP3, HSFY2, CFTR, SRD5A2, DAZ1, RBMY1A1, AR, PICK1, PRY, AURKC, USP9Y, SRY, MTHFR, NR5A1

## Крипторхизъм

RXFP2, INSL3

## Женски стерилитет / инфертилитет

FSHB, AR, DIAPH2, FIGLA, FMR1, FOXL2, POF1B, NOBOX, BMP15, LHCGR, NR5A1, PROKR2, KAL1, FGFR1, FGF8, CHD7, HARS, DHH, CBX2, FSHR

## Преждевременна овариална недостатъчност (POF)

DIAPH2, FIGLA, FMR1, FOXL2, POF1B, NOBOX, BMP15, LHCGR, NR5A1

## Гонадна дисгенезия

HARS, DHH, CBX2, SRY, AR, NR5A1

## Синдром на Калман

PROKR2, KAL1, FGFR1, FGF8, CHD7

## Хипогонадотропен хипогонадизъм

KISS1, TAC3, TACR3, NELF, KISS1R

## Вродена надбъбречна хиперплазия

CYP11B1, CYP17A1, CYP21A2, HSD3B2, STAR

## Отговор към стимулация с FSH

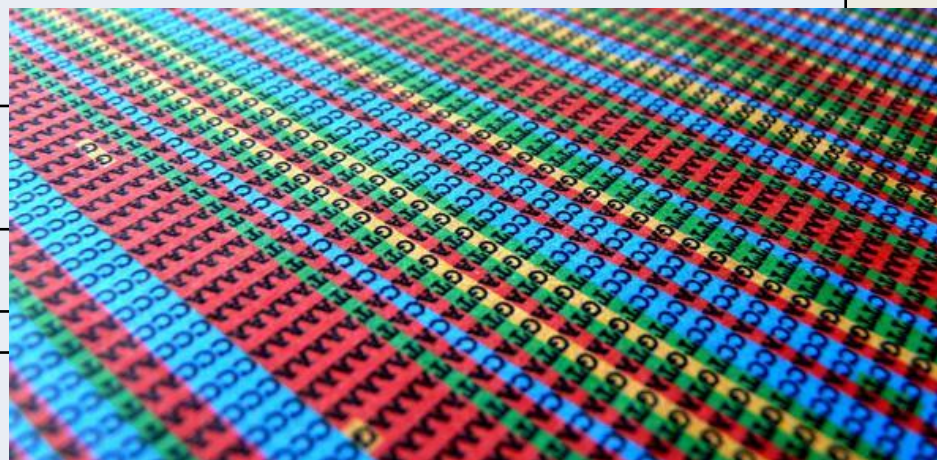
FSHB, FSHR

## Поликистоза на яйчниците (PCOS)

SRD5A, AR, SHBG, BMP15, FSHB

## Вродена тромбофилия

THBD, SERPINE1, SERPIND1, PROS1, PROC, MTHFR, ITGB3, ITGA2B, FGG, FGB, FGA, F8, F5, F2, F13A1, ANXA5





# Провеждане на инвазивна пренатална диагностика за установяване на генетични аномалии у плода

- Възраст на бременната над 35 години;
- Аномалии, открити в хода на бременността - суспектни резултати от биохимичния скрининг и феталната морфология, изоставане във вътреутробното развитие, несъвместима с живота аномалия;
- Родено дете с хромозомна аномалия;
- Фамилна история за хромозомни аномалии;
- Фамилна история за моногенна болест;
- Фамилна история за дефект на невралната тръба;
- Фамилна история на други вродени малформации;
- Други високо-рискови фактори - обременена акушерска анамнеза като хабитуални аборти или мъртвораждания, майчини заболявания като лошо контролиран захарен диабет или епилепсия, лекувана с валпроати.

# Пренатална диагностика на хромозомните болести

## Молекулни техники

Всеки метод с възможност да определя разлики в броя копия на един или повече локуси

- Флуоресцентна *In Situ* Хибридизация (FISH)
- Количествена флуоресцентна PCR
- Мултиплексна лигазно-зависима амплификация (MLPA)
- Пиросеквениране
- Хибридизация на множество амплифицирани проби (MAPN)
- **Сравнителна геномна хибридизация върху микрочипове (array CGH)**

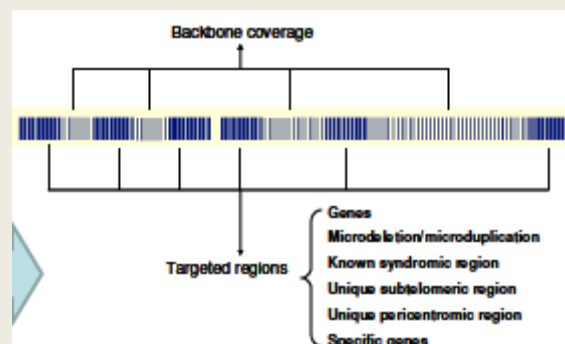
## Array CGH

### Предимства

- Анализът може да бъде цялостно-геномен или таргетен
- Детекция на суб-микроскопски делеции/дупликации, по-малки от 100 kb
- Едновременно анализ на  $10^3$ - $10^6$  локуси

# Технология на Array CGH

- BAC array
- Full tiling BAC array
- cDNA array
- Oligonucleotide array
- SNP array



Основни платформи

**Agilent**

**Affymetrix**

**NimbleGen**

Дизайни

Цялостно-геномни

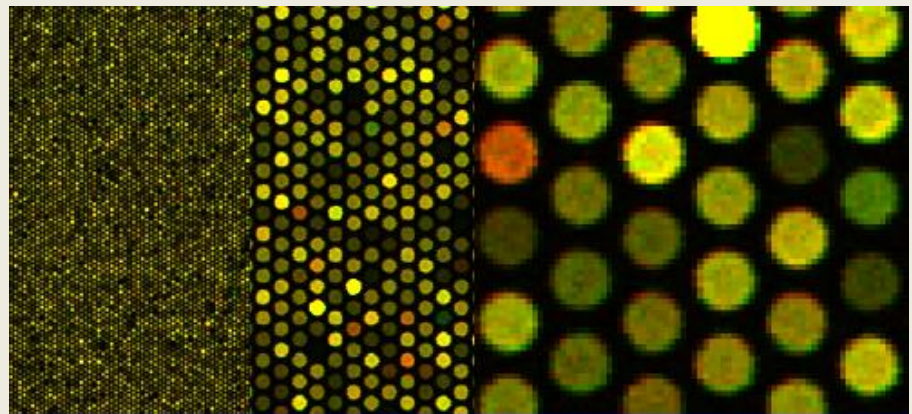
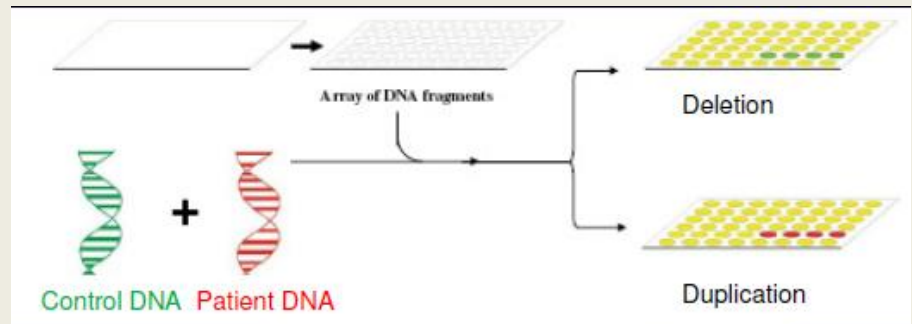
Таргетни:

- Екзони
- Болест-асоциирани региони
- CNV

Поръчков дизайн

# Array CGH

- Изолиране и белязване на геномна ДНК от **пациента** и референтна ДНК (**контрола**) с два флуорохрома (**Cy3** и **Cy5**)
- Ко-хибридизация на смесената ДНК към матричните ДНК фрагменти (проби) с известни геномни позиции
- Флуоресцентното съотношение при всяка проба показва отношението на броя копия между пациента и контролата



# Array CGH

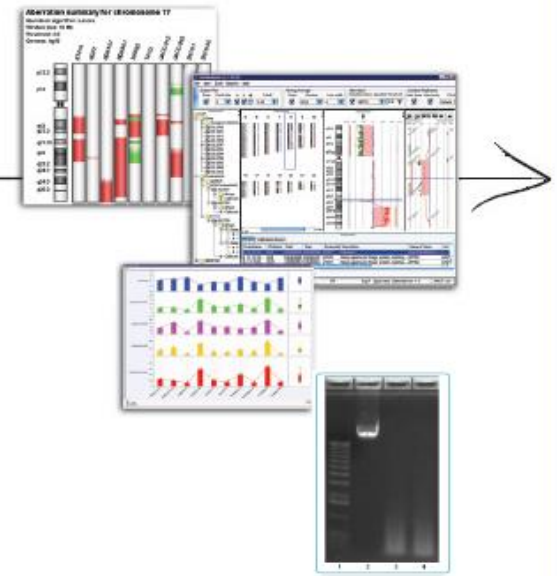
Quality Control  
Labelling Kits



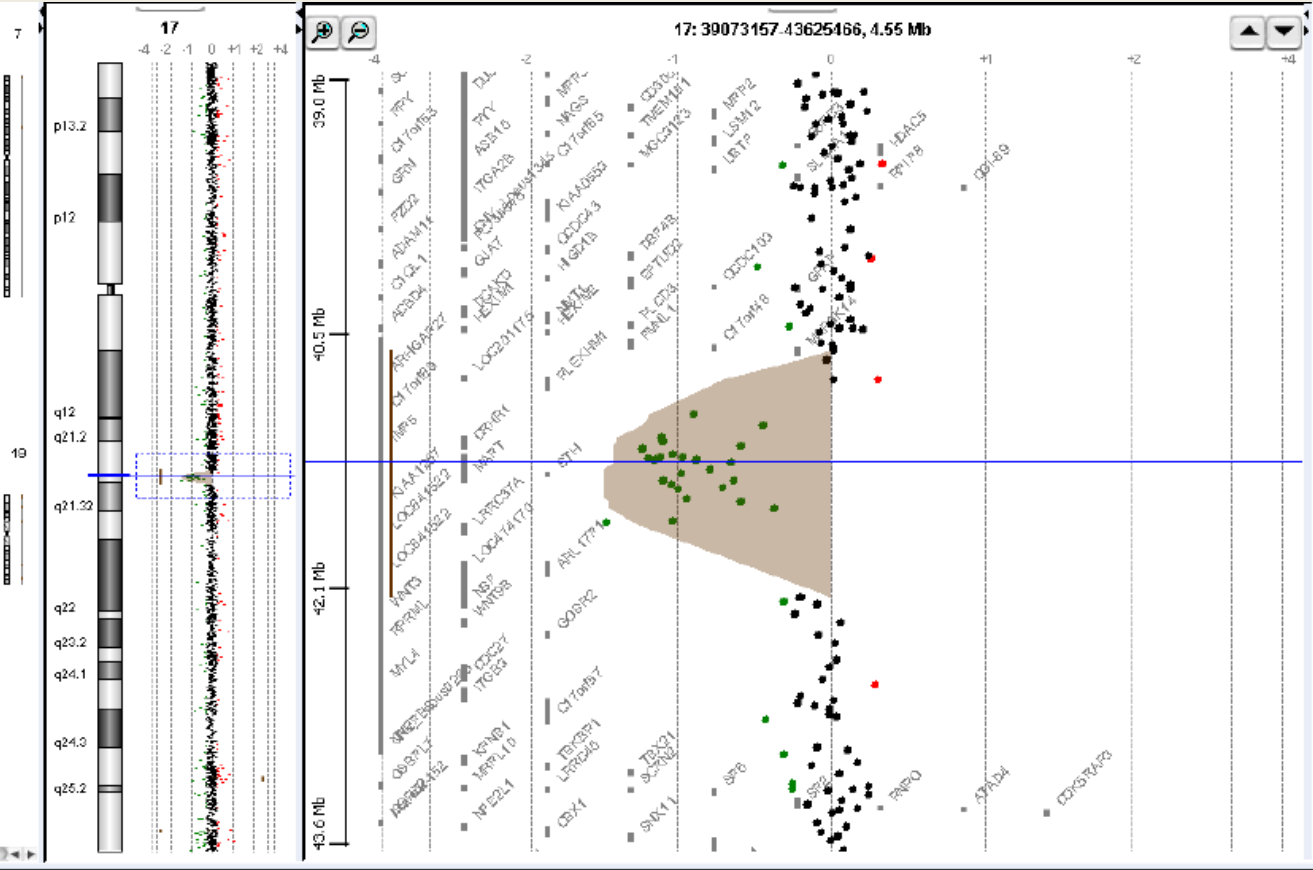
Hybridisation Array Processing  
Scanning



Analysis & Statistics  
Visualisation  
Pathway Integration



# Array CGH



## Del(17)(q21.31) de novo ~633 Kb

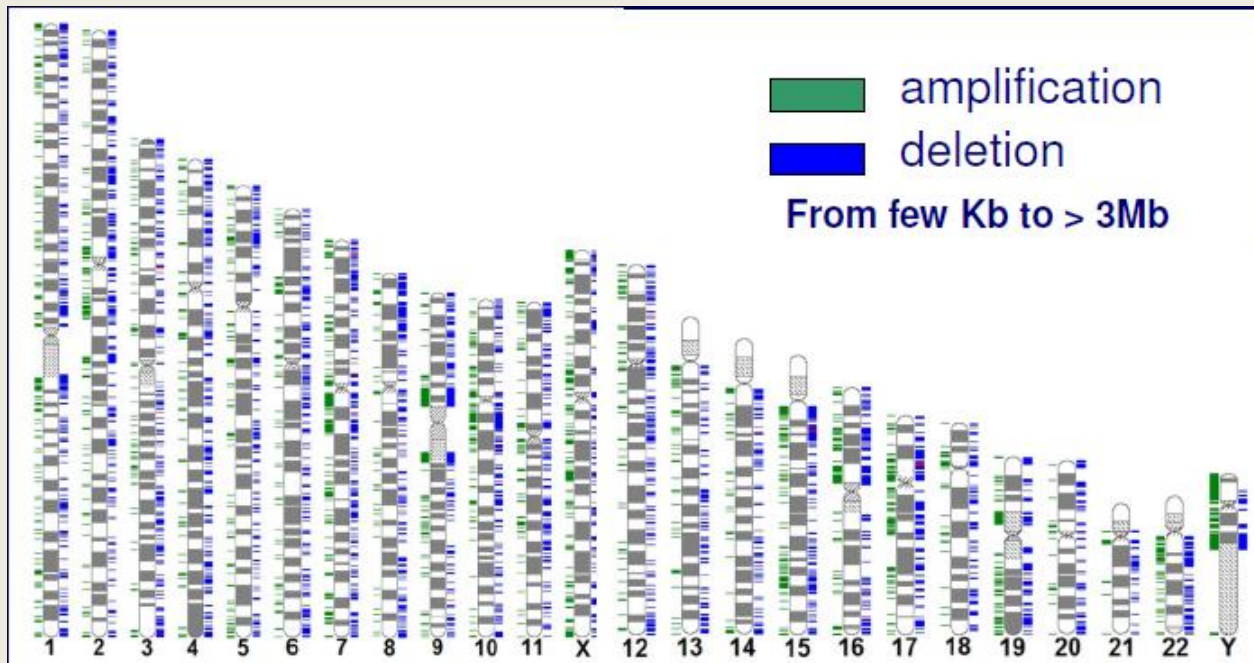


# Array CGH

## Copy Number Variations (CNV)

### Структурни вариации в броя копия на даден регион от генома

- 12% от човешкия геном са CNV (около 40% от тях включват известни гени)
- Отговарят за 7% от вариабилността на генома
- Над 29 000 CNV са описани в базата данни на геномните варианти



# Copy Number Variations: Класификация

- Патогенни дисбаланси
  - Известни микроделеционни/дупликационни райони
  - Големи дисбаланси (1-5 Мв), включващи голям брой важни гени
- Непатогенни дисбаланси (полиморфни)
  - Най-честите CNV
- Варианти с неясно клинично значение



(<http://decipher.sanger.ac.uk/>)

ISCA

International Standards for Cytogenetic Arrays

(<https://www.iscaconsortium.org/>)



# Проследяване на абнормни резултати от Array CGH

- **Родителски произход на дисбаланса**
  - За автозоми – микрочипов анализ родител vs родител (разнополов анализ) с фокус върху небалансирания регион
  - За половите хромозоми – еднополов микрочипов анализ, MLPA или FISH
- **Друга характеристика на дисбаланса**
  - MLPA (при налични праймери)
  - FISH (терминална делеция с терминална дупликация предполагат наличие на транслокация)

# Пренатална диагностика на хромозомните болести

## Предпоставки за използване на Array CGH

- 1-1.5% от новородените са засегнати от големи вродени аномалии
- Хромозомните дисбаланси са отговорни за 20-25% от случаите
- На всички бременни се провежда УЗИ в 11-14 и 18-20 г.с.
  - 3% имат риск за хромозомни болести
  - 1.5% за микроструктурни геномни аномалии
- Някои микроструктурни аномалии отговарят на добре дефинирани синдроми, напр. делеция 22q11
- Фетуси с множество микроструктурни аномалии са застрашени от абнормно нервно-психическо развитие

# Пренатална диагностика на хромозомните болести

## История на Array CGH проучванията

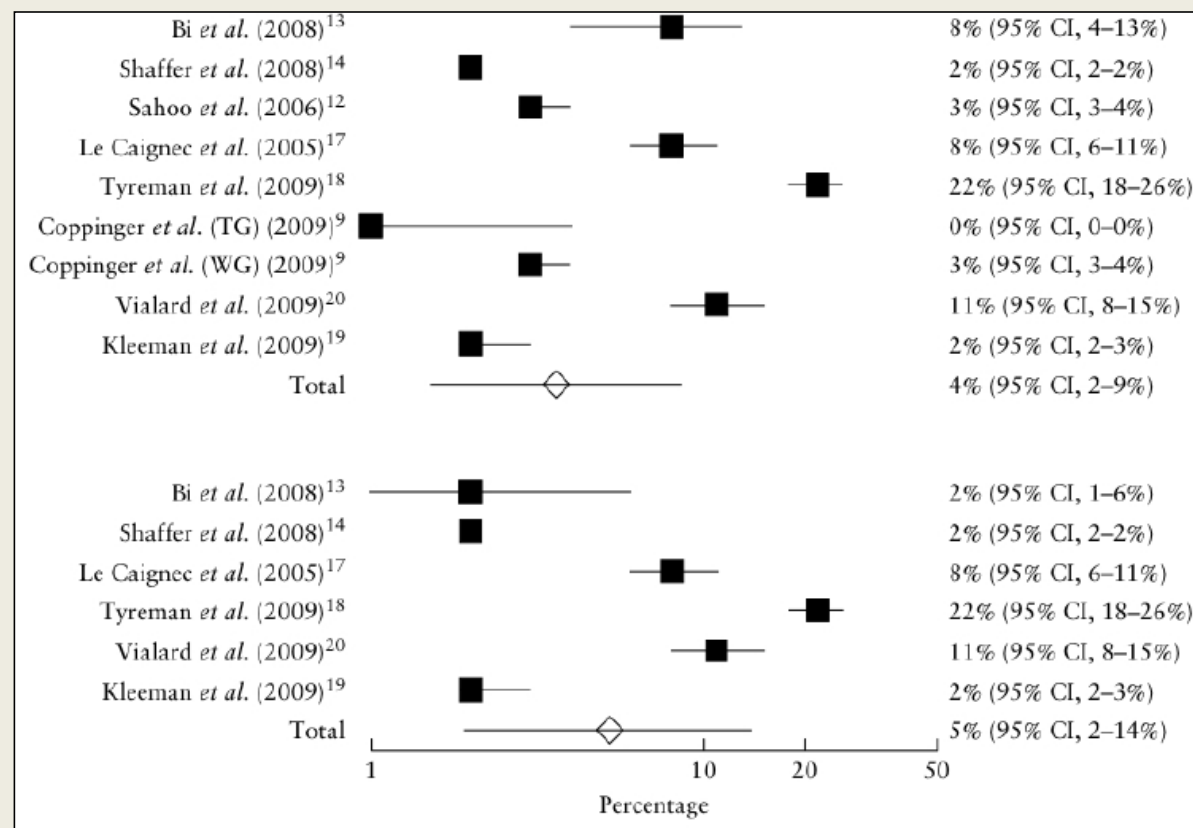
- Първите проучвания използват BAC arrays с геномна ДНК, изолирана от TOR (*Schaeffer et al, 2004*)
- Използване на фетална ДНК от некултивирани и култивирани амниоцити и хорионни въси за array CGH (*Lapaire et al, 2007*)
- Начални серии (BAC arrays при фетуси с нормален кариотип) намира патогенни CNVs в 1.3-2.7% (полиморфни CNVs в 8.8%) (*Schaeffer et al, 2008*)
- Първо проучване с таргетни олигонуклеотидни микрочипове идентифицира CNVs в 58/300 (19.3%) фетуси (5% са патогенни) (*van de Veyver et al, 2009*)
- Проучвания с олигомикрочипове при фетуси (39-106) с УЗ аномалии и нормален кариотип – намерени са CNVs в 8-33%, от тях 25-100% са обсъждани като патогенни

# Хромозомен дисбаланс открит с Array CGH и пропуснат от кариотипирането

## CNVs, които са патогенни или с неясно клинично значение

Всички клинични  
индикации

3.6 (1.5-8.5)%



УЗ аномалии

5.2 (1.9-13.9)%

# Хромозомен дисбаланс открит с Array CGH и пропуснат от кариотипирането

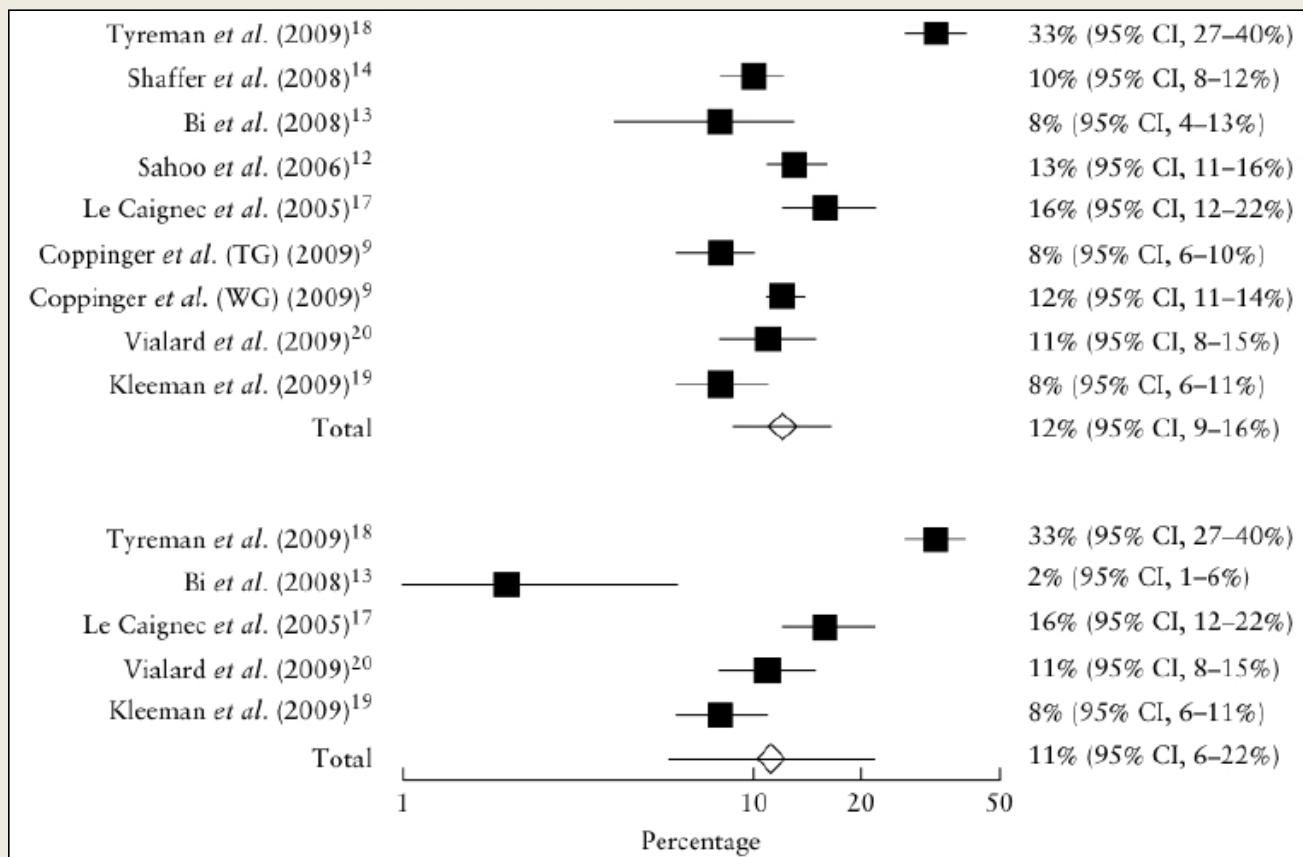
## Всички CNVs

Всички клинични  
индикации

12 (8.8-16.4)%

УЗ аномалии

11.2 (5.7-22.1)%





# Array CGH

## Предизвикателства пред пренаталната диагностика

- Да се разграничат нормалните CNV полиморфизми
  - Трудно се определя тяхната модифицираща роля
  - Съобщаването им може да увеличи напрежението в семейството и доведе до решение за TOP без сериозни индикации
- Детекция на известна микроделеция с вариабилен фенотип
- Не се установяват балансирани преустройства и нискостепенни мозайки
- Няма единно мнение за оптималните микрочипове
  - Цялостно-геномни или таргетни, както и оптималната резолюция
- Цена
  - Средна цена на aCGH 400 Euro (за кариотипиране 80 Euro)
  - За потвърждение MLPA 200 Euro, таргетен FISH 160 Euro

# Array CGH

## Въпроси

- Дали array CGH установява повече патогенни CNVs от кариотипирането?
- По-бърз ли е анализа при array CGH в сравнение с кариотипирането?
- Каква е цената на всеки допълнителен дисбаланс от array CGH спрямо кариотипирането?
- Кои фактори повлияват родителите и лекарите да изберат array CGH (и евентуално да заменят кариотипирането)?

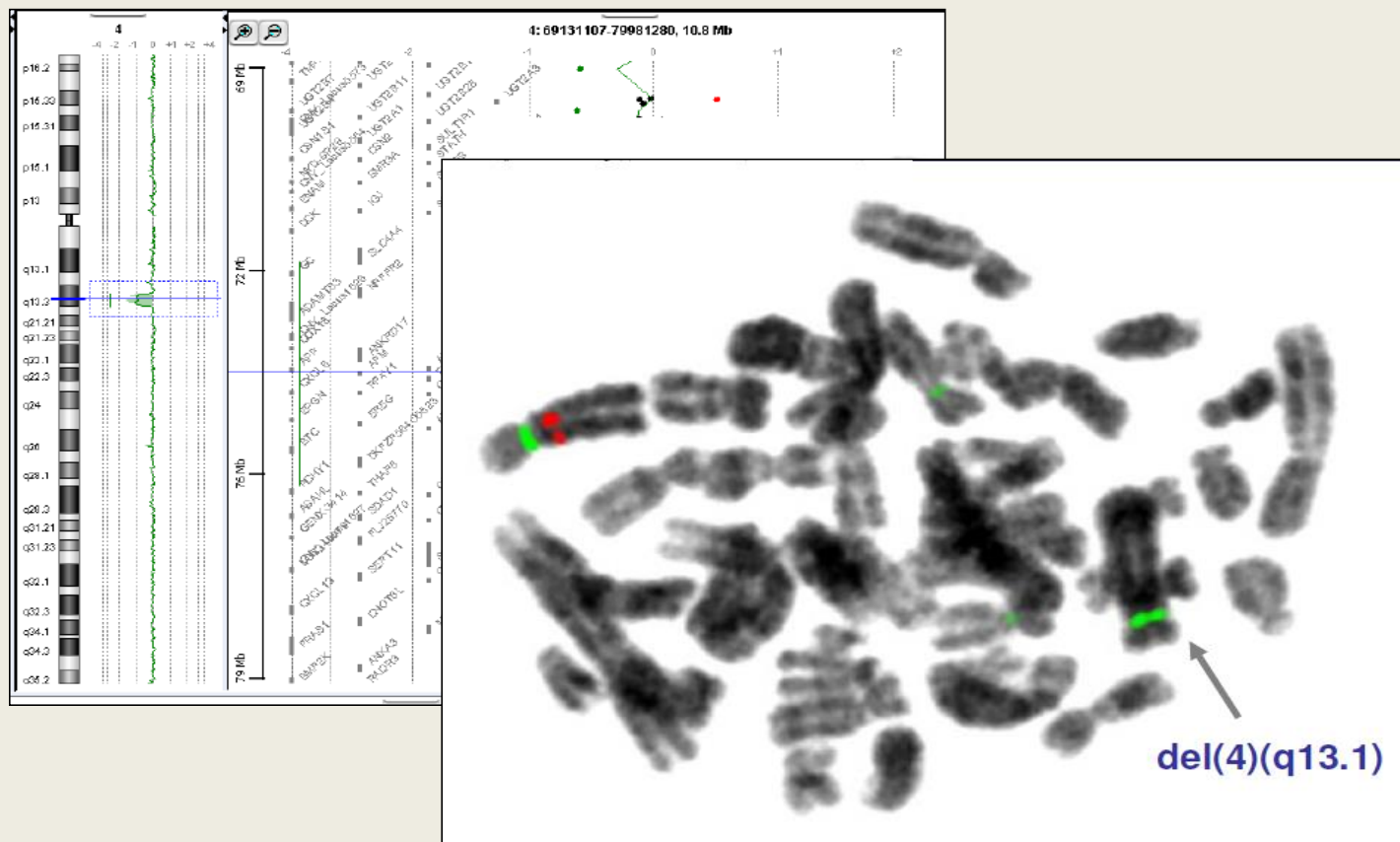
# Проучването EACH

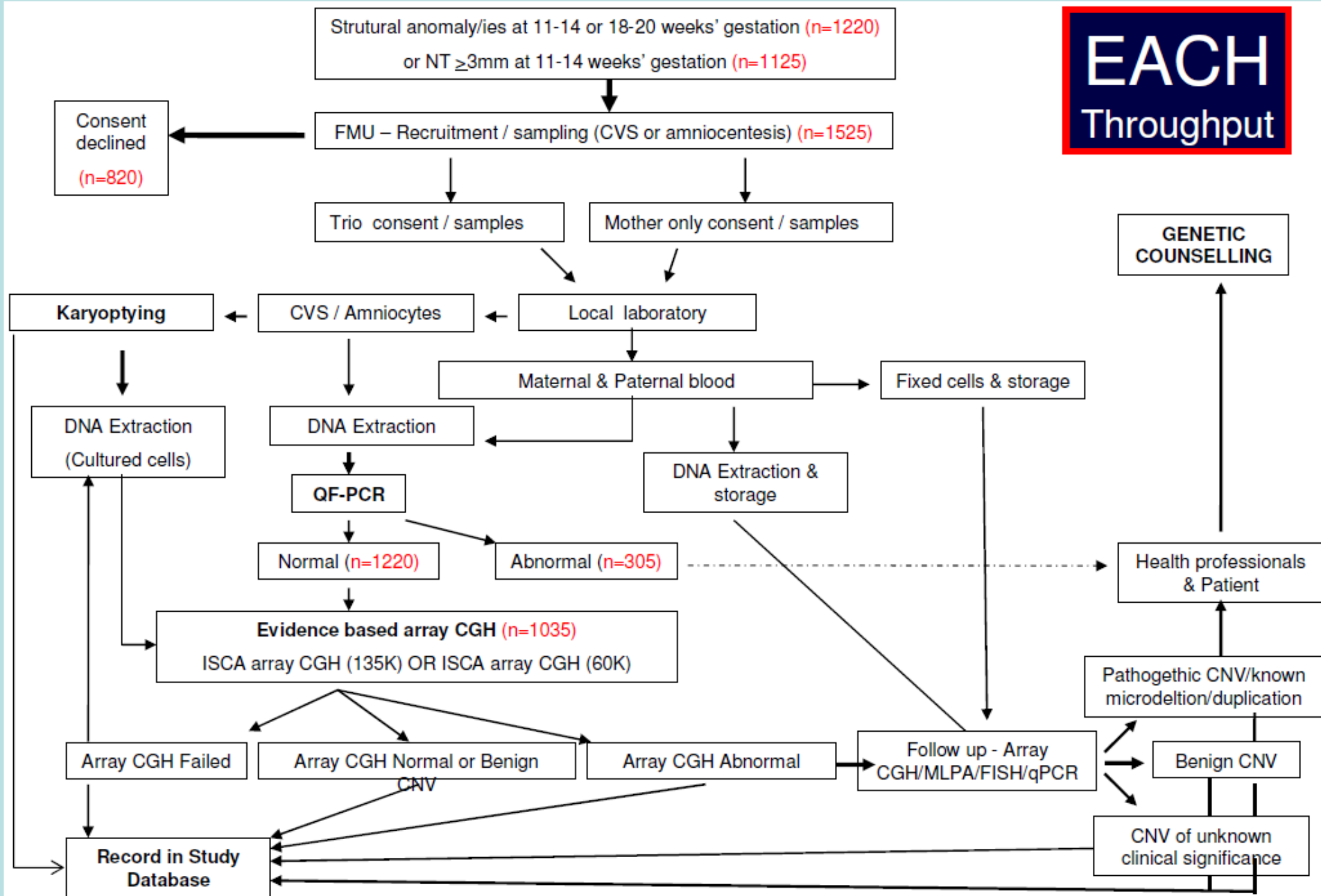
## Evaluation of Array comparative genomic Hybridization in prenatal diagnosis of fetal anomalies

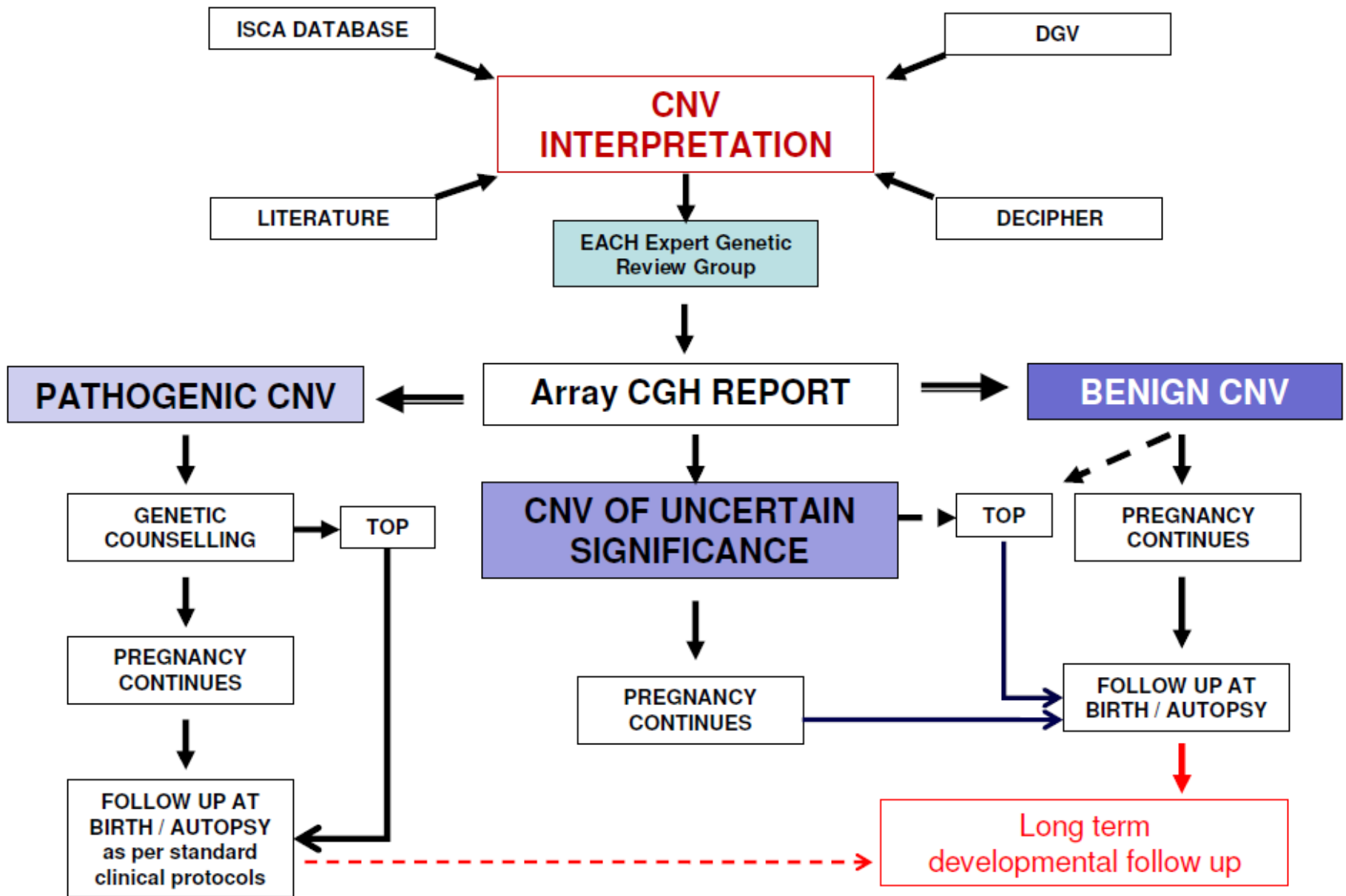
- Мултицентрово проучване, сравняващо и array CGH кариотипирането при фетуси с:
  - (а) Една или повече аномалии, идентифицирани при УЗИ
  - (б) Нухална транслоценция, по-голяма от 3 мм
- Брой изследвани: 500 във всяка група (>90% вероятност за откриване на патогенни CNVs при 5% ниво на значимост; презумция, че кариотипирането и array CGH установяват аномалии в 5% и 10% от фетусите, съответно)
- Забележки: 35% изключени от проучването
  - 20% поради детекция на хромозомни аномалии с QF-PCR
  - 15% поради недостатъчна ДНК
- Включва качествено суб-проучване за мнението на пациентите, лекарите и чиновниците за използването на array CGH в практиката

# Проучването ЕАСН

## Проследяване на абнормни резултати







# Резултати от цялостно-геномни проучвания с Array CGH при деца с аномалии на развитието и нормален кариотип

Author	N	N (%) with apparently pCNVs
de Vries et al. 2005	100	10 (10%)
Friedman et al. 2006	100	10 (10%)
Menton et al. 2006	140	19 (13.6%)
Fan et al. 2007	100	15 (15%)
Hoyer et al. 2007	104	10 (9.6%)



# Проследяване на абнормни резултати от Array CGH

Category	No	%
Abnormal	122	27.2%
Normal	327	72.8%
Total	449	100.0%

Потвърдени de novo	27 (22.1%)
Сегрегиращи дисбаланси*	10 (8.2%)
CNV**	37 (30.3%)
Абнормно развитие в прогрес	48 (39.3%)

- \* Същата аномалия се намира при родител с подобен фенотип или е известно да има варираща пенетрантност
- \*\* Същият дисбаланс се намира при фенотипно нормален родител

# Какви са изводите от първите Array CGH проучвания при деца с аномалии на развитието?

- **Повечето CNVs са непатогенни**
  - Най-големия източник на геномни вариации
  - Среден брой непатогенни bCNVs на човек=24-824
  - По-голям абсолютен брой нуклеотиди отколкото SNPs
- **Повечето bCNVs са наследствени**
  - Някои са общи полиморфизми в популацията
  - >95% имат популационна честота <2%
  - Да се открият тези за конкретната аномалия е сериозно предизвикателство

## Array CGH при фетални аномалии

### Заклучение

- Предлага цялостно-геномен скрининг за патогенни CNVs при фетални аномалии
- Интерпретацията на някои CNVs продължава да бъде предизвикателство (но данните се натрупват с времето)
- Възможностите на **масивното паралелно секвениране** (предмет на цял отделен симпозиум) могат да заместят array CGH

**БЛАГОДАРЯ ЗА ВНИМАНИЕТО!**