
Koraljka
HUSNJK

GENETIČKA
DIJAGNOSTIKA IZ
JEDNE STANICE:
STVARNOST ILI FIKCIJA?

Preimplantacijska genetska dijagnostika (PGD, od eng. *pre-implantation genetic diagnosis*) jedna je od metoda prenatalne dijagnostike. Za razliku od analize korionskih resica i amniocenteze, koje se provode u prvom, odnosno u drugom tromjesečju trudnoće, PGD se provodi prije implantacije embrija u maternicu, najčešće na razini zigote (oplođene jajne stanice), a nakon oplodnje *in vitro*, kako bi se odredio genetski status embrija čiji roditelji imaju poznatu genetsku bolest.

Analiza se najčešće radi na jednoj ili dvije stanice, blastomere, dobivene biopsijom iz osamstaničnog embrija. Pri genetskoj analizi nužno je voditi računa o tome radi li se o autosomno dominantnim, recesivnim ili o bolestima vezanim za kromosom X.

U slučaju autosomno recesivnih bolesti, kad su oba roditelja heterozigoti (Aa) za proučavani gen, vjerojatnost da embrio bude zdrav iznosi 75%.

Ako se radi o autosomno dominantnim bolestima, kada je jedan roditelj heterozigot (Aa) a drugi recesivni homozigot (aa) za proučavani gen, vjerojatnost da će embrio biti zdrav iznosi 50%.

Danas također postoji oko 300 nasljednih poremećaja vezanih za kromosom X, od kojih su samo neki molekularno karakterizirani. Ako je majka prenositelj spolno vezanog recesivnog gena (Xx), ženski embriji nisu bolesni, dok muški imaju vjerojatnost 50% da budu bolesni, ovisno o tome koji će od kromosoma X, "bolesni" ili "zdravi", dobiti od majke.

Analiza blastomera bitno povećava vjerojatnost odabira zdravog embrija, ali to nije 100% zbog moguće pogreške u analizi.

Nakon genetske analize embriji koji nose barem jedan (recesivne bolesti) ili oba (dominantne bolesti) zdrava gena implantiraju se u maternicu, dok je u slučaju spolno vezanih nasljednih poremećaja dovoljno odrediti spol embrija.

Preimplantacijska genetska dijagnostika danas je alternativa prenatalnoj dijagnostici i terapijskom pobačaju pacijenata s X-vezanim, monogenetskim bolestima te aneuploidijama. U klinici je prvi put primijenjena 1989. godine u slučaju bolesti vezane za kromosom X. (1)

Do 1996. godine rođeno je 40 zdrave djece iz 83 kliničke trudnoće, dok je do 1998. PGD primijenjen na više od 700 parova s rizikom rađanja djece s monogenetskim ili kromosomskim poremećajima; rođeno je više od 100 zdrave djece.

Međunarodna radna grupa za preimplantacijsku genetik (International Working Group on Preimplantation Genetics) osnovana je 1990. godine u Chicagu na Prvom međunarodnom simpoziju o preimplantacijskoj genetici (*The First International Symposium on Preimplantation Genetics*) i prati napredak u preimplantacijskoj genetici. (2)

Sam postupak počinje nakon dobivanja oocita metodom hormonski izazvane superovulacije te oplodnje konvencionalnom metodom umjetne oplodnje (IVF, od eng. *in vitro fertilization*) ili injektiranjem spermija u citoplazmu jajne stanice (ICSI, od eng. *intracytoplasmic sperm injection*). Do oplodnje dolazi nakon 16 do 18 sati. Oocyte s dva pronukleusa dalje se kultiviraju u uvjetima *in vitro* do stadija od šest do deset stanica (do tri dana nakon oplodnje). Nakon toga provodi se biopsija blastomera i njihova analiza. Tijekom analize embriji se i dalje čuvaju u kulturi i nakon pozitivnog ishoda analize implantiraju se u maternicu. U slučaju većeg broja zdravih embrija dio ih se može zamrznuti za kasniju upotrebu, dok se embriji koji nose oštećen gen uklanjaju ili koriste u istraživačke svrhe.

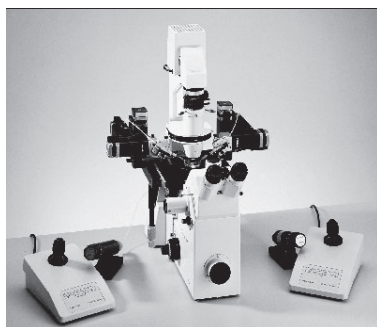
Za uzimanje 1-2 stanice iz embrija koristi se sustav za mikromanipulaciju. Sastoji se od invertnog mikroskopa, sustava za držanje embrija (zaobljene mikrokapilare koje se mogu vrlo fino pomicati u prostoru i kojima se može pridržavati embrij) te sustava za bušenje otvora u *zoni pellucidi* i vađenje pojedinih blastomera. *Zonu pellucidu* moguće je probušiti pomoću posebne, tzv. tirodne otopine, a zatim se kroz tu malu rupicu precizno izvadi 1 do 2 stanice a da se pritom ne ošteti ostatak embrija. Danas se za PGD većinom uzimaju blastomere iz stadija od 6 do 10 stanica. Tada su pojedinačne blastomere još uvijek totipotentne, tj. biopsija jedne ili dvije blastomere ne utječe na daljnji razvoj embrija. Glavni nedostatak biopsije u stadiju 6 do 10 stanica mali je broj stanica dostupan za analizu. Veći broj stanica dobio bi se dužim kultiviranjem embrija u uvjetima *in vitro*. No embrije je do takva stadija puno teže uzgajati u uvjetima *in vitro*.

Slika 1.

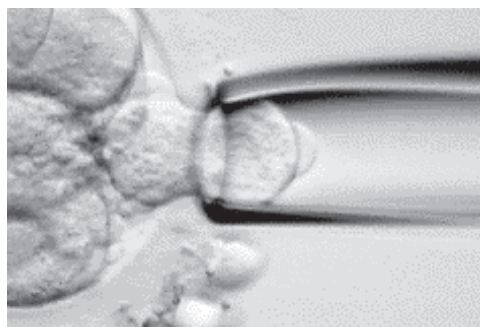
Sustav za mikromanipulaciju "Eppendorf" Zavoda za molekularnu medicinu Instituta "Ruđer Bošković" (a) i biopsija pojedinačnih blastomera iz osamstaničnog embrija korištenjem mikromanipulatora (b)

Koraljka Husnjak
**Genetička dijagnostika iz
jedne stanice: stvarnost ili
fikcija**

a)



b)



Molekularno-genetičke metode analize pojedinačnih stanica dobivenih biopsijom osamstaničnog embrija

Fluorescentna hibridizacija *in situ* (3) (FISH, od eng. *fluorescence in situ hybridization*) citogenetska je analiza kromosoma oocita i embrija korištenjem fluorescentno obilježenih sonde za pojedine kromosome. Koristi se za određivanje spola kod bolesti vezanih za kromosom X te pri određivanju aneuploidnosti (naročito starijih žena). Ograničenje metode jest da se pomoću nje ne mogu odrediti male promjene unutar gena (npr. točkaste mutacije, delecije i slično). Mogućnost detekcije pet kromosoma na jednoj interfaznoj jezgri omogućila je korištenje te metode u pretraživanju najčešćih trisomija (kromosomi 13, 18, 21, X i Y). Do 1996. godine opisano je oko 200 testiranja, od kojih je 33 rezultiralo trudnoćom, a 7 rođenjem zdrave djece.

Danas se FISH većinom koristi za određivanje spola pomoću sonde za oba spolna kromosoma.

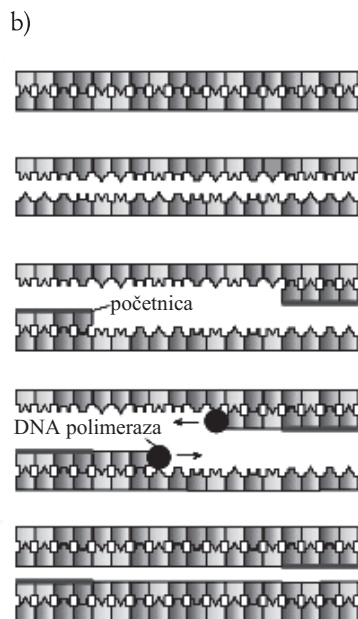
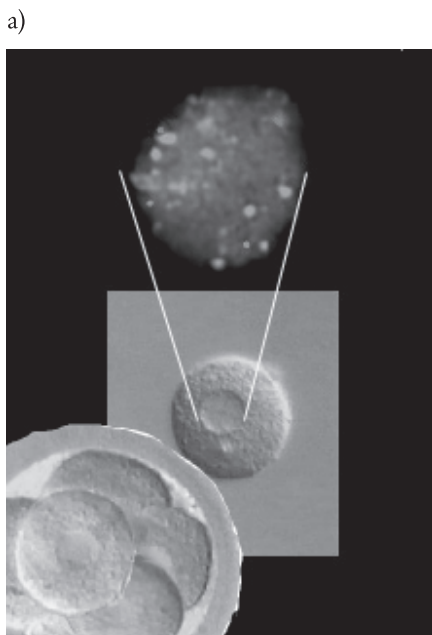
Lančana reakcija polimeraze (4) (PCR, od eng. *polymerase chain reaction*) jednostavna je metoda brzog umnožavanja odsječaka DNA u uvjetima *in vitro*. Tom metodom moguće je selektivno umnožiti željeni odsječak DNA koji inače ne bismo mogli analizirati zbog kompleksnosti samoga genoma stanice. U reakciji se koriste kratki odsječci jednolančane DNA (oligonukleotidi, početnice, eng. *primer*) komplementarni rubnim dijelovima slijeda DNA koji se želi umnožiti, četiri deoksiribonukleotida te termostabilna DNA-polimeraza (npr. enzim *Taq* polimeraza). U velikom broju ciklusa sintetizira se velik broj kopija željenog odsječaka DNA, koji se onda može dalje analizirati.

Danas se u molekularnoj medicini većinom koristi reakcija PCR na DNA izoliranoj iz većeg broja stanica (obično je DNA izolirana iz 150.000 stanica, odnosno 300.000 kopija gena).

Budući da jedna diploidna stanica sadrži samo dvije kopije određenoga gena, pri analizi samo jedne stanice ključna je točnost određivanja genotipa, odnosno učinkovitost umnožavanja odsječaka DNA u reakciji PCR. Naime, kod velikog broja stanica različita učinkovitost umnožavanja pojedinih molekula DNA ne utječe bitno na rezultat reakcije, dok je kod reakcije PCR na jednoj stanici nužno umnožiti obje molekule DNA do granice detekcije, što je bitno kod heterozigota za određeni gen.

Prilikom preimplantacijske genetske dijagnostike nužno je voditi računa o ograničenjima reakcije PCR na jednoj stanici te o mogućnostima zagađenja stranom DNA.

Slika 2.
Shematski prikaz metoda
fluorescentne hibridizacije *in situ* (a) i lančane reakcije
polimeraze (b)



Iz dana u dan sve je više bolesti za koje se radi ili je u pripremi preimplantacijska genetska dijagnostika, npr. cistična fibroza, Tay-Sachsova bolest, hemofilija A i B, retinitis pigmentosa, srpasta anemija, talasemija, Alportova bolest, deficijencija α -1-antitripsina, sindrom fragilnog X-kromosoma, Duchennova mišićna distrofija, Lesch-Nyhanov sindrom, miotonična distrofija, Marfanov sindrom, Huntingtonova bolest, bolesti vezane za kromosom X te mnoge druge.

Preimplantacijska genetska dijagnostika jest alternativa prekidu trudnoće nakon prenatalne dijagnostike za parove s povećanim rizikom dobivanja djece s genetskim poremećajima. Takav način dijagnostike genetskih bolesti smanjio bi psihološku traumu uzrokovanu prekidom trudnoće nakon analize korionskih resica ili nakon amniocenteze, a analiza polarnih tijela (koja se stvaraju za vrijeme mejoze), odnosno oocita prije oplodnje, mogla bi biti etički prihvatljivija nekim parovima jer isključuje manipulaciju embrijem.

Budući da je PGD kao metoda u samom začetku, nužno je svaku dijagnozu potvrditi prenatalno i nakon rođenja, a zbog same prirode postupka svakom paru potrebno je također omogućiti opsežno genetsko savjetovanje.

Mnogo su složenija etička pitanja odabira embrija kod bolesti koje se javljaju poslije u životu i koje nisu odmah opasne za život, no te se bolesti danas ne dijagnosticiraju preimplantacijski u klinici.

1. Handyside, A. H., Kontogianni, E. H., Hardy, K., Winston, R. M. L. (1990), Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification, *Nature*, 344:768-770.
2. Verlinsky, Y., Kuliev, A. (1991), *Preimplantation genetics*, New York, Plenum Press.
3. Griffin, D. K., Handyside, A. H., Harper, J. C., Wilton, L. J., Atkinson, G., Soussis, I., Wells, D., Kontogianni, E., Tarin, J., Geber, S. et al. (1994), Clinical experience with preimplantation diagnosis of sex by dual fluorescent in situ hybridization, *J. Assist. Reprod. Genet.*, 11: 132-143.
4. Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., Arnheim, N. (1985), Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230:1350-1354.

LITERATURA