

KORSZERŰ GENETIKAI VIZSGÁLÓMÓDSZEREK A VELESZÜLETETT RENDELLENESSÉGEK DIAGNOSZTIKÁJÁBAN

A VELESZÜLETETT RENDELLENESSÉGEK DIAGNOSZTIKÁJÁNAK KIINDULÓ PONTJA A HAGYOMÁNYOS SÁVTECHNIKÁVAL VÉGZETT CITOGENETIKAI VIZSGÁLAT. A HAGYOMÁNYOS KROMOSZÓMAANALÍZIS MOLEKULÁRIS CITOGENETIKAI (FISH, M-FISH) ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI (SOUTHERN-BLOT, PCR) MÓDSZEREKKEL KIEGÉSZÍTVE A VELESZÜLETETT RENDELLENESSÉGEK EGYRE NAGYOBB RÉSZÉBEN SEGÍT FELISMERNI, PONTOSÍTANI A BETEGSÉGEK GENETIKAI HÁTTÉRÉT. EZÁLTAL LEHETŐVÉ VÁLIK A MEGBETEGEDÉSEK KORAI, PONTOS DIAGNOSZTIZÁLÁSA, A GENOTÍPUS-FENOTÍPUS ÖSSZEFÜGGÉSEK MEGISMERÉSE ÉS A RENDELLENESSÉGEK ISMÉTLŐDÉSÉNEK MEGELŐZÉSE. A SZERZŐK A FISH ÉS AZ M-FISH-MÓDSZER ALKALMAZÁSÁNAK JELENTŐSÉGÉT MUTATJÁK BE EGY FEJLŐDÉSI RENDELLENESSÉGGEL SZÜLETETT GYERMEK ESETÉBEN KIMUTATOTT KROMOSZÓMAABERRÁCIÓ TISZTÁZÁSÁBAN.

UJFALUSI
ANIKÓ DR.,
BALOGH
ERZSÉBET DR.,
BESSENYEI
BEÁTA,
HALÁSZNÉ DR.
LUKÁCS VALÉ-
RIA DR.¹,
OLÁH ÉVA DR.

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTU-
DOMÁNYI CENTRUM,
GYERMEKKLINIKA, REGIO-
NÁLIS GENETIKAI LABORA-
TÓRIUM, DEBRECEN
¹BORSOD-ÁBAÚJ-
ZEMPLÉN MEGYEI KÓRHÁZ
ÉS EGYETEMI OKTATÓ
KÓRHÁZ, SZÜLÉSZETI ÉS
NŐGYÓGYÁSZATI OSZTÁLY,
MISKOLC

A veleszületett rendellenességek (fejlődési rendellenességek és genetikai betegségek) a magzati életben genetikai és/vagy külső környezeti tényezők hatására kialakuló morfológiai, biokémiai vagy funkcionális zavarok, amelyek születéskor vagy születés után, esetleg már prenatálisan felismerhetők. Egészségügyi, gazdasági, társadalmi jelentőségüket gyakoriságuk, a morbiditásban és mortalitásban játszott szerepük, valamint az magyarázza, hogy legtöbbször súlyos, nem vagy alig befolyásolható betegségekről van szó. A veleszületett rendellenességek előfordulási gyakorisága hazánkban 3-5%. A perinatális mortalitás 25%-át, a csecsemőhalálozás mintegy 40%-át veleszületett rendellenesség okozza, a rendellenességgel született csecsemők mortalitása tízszer nagyobb az általános csecsemőhalálozásnál. A rendellenes magzatot viselő anyák terhessége gyakran végződik vetéléssel, halvaszületéssel vagy koraszüléssel. Az esetek egy része súlyos, az élettel nem vagy alig összeegyeztethető, az életminőséget jelentős mértékben rontó stacioner állapot, ezek többsége ma sem gyógyítható, csupán a betegség progressziója lassítható vagy a szövődmények előzhető meg.

Ezért a veleszületett rendellenességek súlyos fizikai, lelki és anyagi terhet jelentenek a beteg, a család és a társadalom számára. A veleszületett rendellenességek esetében legfontosabb teendő a betegség minél előbbi diagnosztizálása és az újabb esetek előfordulásának megelőzése. A korai, pontos diagnózis több szempontból is jelentős: elkerülhetővé válnak a hosszú kórházi bentfekvések, a feleslegesen elvégzett vizsgálatok; lehetőség nyílik a betegség kimenetelének előrejelzésére, az érintett gyermek állapotának megfelelő ellátására (rehabilitáció, gyógytorna, speciális kezelés); elsősorban az öröklött anyagcsere-megbetegedések esetén a korai kezeléssel akár tünetmentesség, vagy jelentős állapotjavulás érhető el; az ismétlődés célzott prenatális vizsgálat révén csökkenthető. A legkörültekintőbb vizsgálatok ellenére a rendellenességgel született gyermekek 30-60%-ában nem jutunk etiológiai diagnózishoz (1). Különösen nehéz a diagnózis felállítása újszülöttkorban, mivel egyes veleszületett eltérések (pl. csípőficam, mentális retardáció stb.) tünetei csak a későbbi életkorban manifesztálódnak.

Veleszületett rendellenesség gyanúja esetén első lépés a minden részletre kiterjedő egyéni (prenatális, perinatális események) és családi anamnézis felvétele, spontán vetélés, halvaszületés vagy gyermektelenesség előfordulásának dokumentálása, rokonházasság, etnikai eredet tisztázása. Minden esetben szükséges három generációt magába foglaló családfa készítése. Ezt követi a részletes fizikális vizsgálat, különös figyelemmel a látható eltérésekre, a növekedés ütemének, az értelmi fejlődés alakulásának leírására, a testmérétek

megadására, aránytalanság esetén részletes antropometriai vizsgálatra. Az anamnézis, a családfa-elemzés és a fizikális vizsgálat alapján eldönthető, hogy szerzett (pl. teratogén ártalmak) vagy öröklött megbetegedésről van szó. A veleszületett rendellenességek megjelenésük szerint lehetnek izolált vagy multiplex eltérések (ismert tünetegyüttesel járó szindróma vagy eddig nem ismert többszörös fejlődési rendellenesség). *A klinikai diagnózis tisztázását vagy megerősítését szolgálják a különböző diagnosztikai eljárások:* az érzékszervek működésének vizsgálata; az egyes szervek funkcionális állapotának megítélése laboratóriumi és biokémiai módszerekkel; az anatómiai eltérések felismerése különböző képalkotó eljárásokkal (röntgen, ultrahang, CT, MRI). A végleges, etiológiai diagnózis felállításához speciális genetikai vizsgálómódszerek szükségesek (2, 3, 4, 5).

Genetikai vizsgálómódszerek

Citogenetika

A genetikai kivizsgálás kiindulópontja a hagyományos kromoszómaanalízis. Ezzel a módszerrel egy sejt teljes kromoszóma-állományáról kapunk képet egyetlen lépésben. A vizsgálat során az osztódó sejtek metafázisú kromoszómáit G-sávozás (Giemsa-festés) után méretük, a centromerek helyzete és a sávmintázat alapján csoportokba osztjuk (kariogram). A módszer egy sejt számbeli és szerkezeti kromoszómaaberrációinak felismerésére alkalmas, de segítségével csak a mikroszkóppal látható 10 Mb-nál nagyobb méretű eltérések mutathatók ki.

SZÁMBELI KROMOSZÓMAELTÉRÉSEK (KROMOSZÓMAVESZTÉS/-TÖBBLET)

A klinikai gyakorlatban észlelt autoszómákat érintő számbeli eltérések döntően triszómiák. Leggyakoribb a 21-es kromoszóma triszómiája (*Down-szindróma*), gyakoriságát tekintve ezt követi a 18-as triszómia (*Edwards-szindróma*), illetve a 13-as triszómia (*Patau-szindróma*). A nemi kromoszómák számbeli eltérései az életet nem veszélyeztetik, ezért születéskori incidenciájuk az előbbieknél nagyobb (2,5-3‰). *Leggyakoribb kórképek:* a

Turner-szindróma (45,X), *Klinefelter-szindróma* (47,XXY), *Tripla-X-szindróma* (47,XXX), *Dupla-Y-szindróma* (47,XXY).

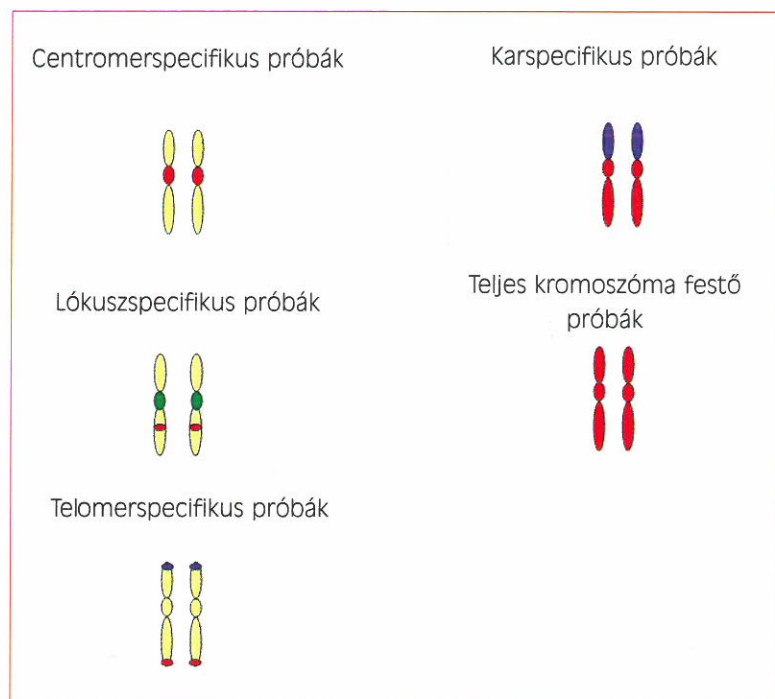
A számbeli eltérések mozaik formában is előfordulhatnak. Mozaikosság esetén eltérő kromoszómakészletű (normális és kóros) sejtek egyidejű jelenléte mutatható ki az egyedben. A tüneteket a normális és kóros sejtek aránya és szöveti előfordulása határozza meg (pl. 47,XY,+21/46,XY; 45,X/46,XX).

SZERKEZETI KROMOSZÓMAELTÉRÉSEK

A szerkezeti rendellenességek kromoszómatörések következményei. A veleszületett fejlődési rendellenességekben előforduló leggyakoribb szerkezeti eltérések: transzlokáció, deléció, izokromoszóma, inverzió, gyűrűkromoszóma. A tünetegyüttesek a töréspontok és ezáltal az érintett kromoszómarégiók különbözősége miatt igen változatosak.

A hagyományos citogenetikai vizsgálómódszer előnye, hogy nem kell előzetesen ismerni a genetikai eltéréseket, rámutat azokra a kromoszómákra vagy kromoszómarégiókra, amelyek eltéréseinek tisztázása további vizsgálatokat igényel, egy lépésben sikerül kimutatni a számbeli és szerkezeti abnormalitásokat. Hátránya viszont, hogy korlátozott felbontóképessége miatt a rejtett (szubmikroszkópikus) kromoszómaátrendeződések, a kisméretű deléciók és inszerciók nem ismerhetők fel. Ha a kromoszóma vizsgálat eredménye, a kimutatott genetikai eltérés összhangban van a fenotípus alapján feltételezett rendellenességgel, akkor eljutunk a végleges diagnózishoz, további genetikai vizsgálatok nem szükségesek. Normális kariotípus esetén, vagy ha a talált eltérés citogenetikailag nem egyértelmű, a klinikai kép alapján további molekuláris genetikai vizsgálatokat javasolt végezni az etiológia tisztázásához.

A dysmorfhiás, mentálisan retardált gyermekeknek mindössze 20-25%-ában mutatható ki kromoszómaaberráció klasszikus citogenetikával. Nem meglepő tehát, hogy a molekuláris genetikai vizsgálómódszerek rendkívül fontos eszközzé váltak a citogenetikával kimutatott genetikai eltérések megerősítésében és tisztázásában, valamint ezzel az eljárással nem kimutatható kromoszómaaberrációk felis-



1. ÁBRA:
FLUORESZCENS
IN SITU HIBRIDIZÁCIÓ
SORÁN
ALKALMAZOTT
PRÓBÁK

merésében és a genetikai eredetű betegségek diagnosztizálásában.

Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH)

A FISH-analízis során fluorokrómmal jelölt DNS próbát hibridizálunk a vizsgálni kívánt kromoszómarégióhoz (6). A szekvensspecifikus DNS-próbák segítségével konkrét számbeli és szerkezeti eltérések mutathatók ki. A módszer nemcsak metafázisú kromoszómákon, hanem interfázisú sejteken is alkalmazható. Nagyszámú sejt (200-400) vizsgálata révén különösen alkalmas a mozaikosság arányának pontos megítélésére. Hátránya, hogy csak az előzetesen ismert vagy a feltételezett specifikus eltérések szűrésére alkalmas. A kromoszómaaberrációk kimutatása különböző FISH-próbák segítségével történhet.

CENTROMERSPECIFIKUS PRÓBÁK

A centromerspecifikus próbák a kromoszómák centromerikus régiójához (alfaszatellita) kötődő DNS-szekvenciák (1. ábra). Normális, diploid sejtekben a két homológ kromoszómának megfelelően két hibridizációs szignált kapunk. Kevesebb vagy több jel az adott kromoszóma hiányát vagy többletét jelzi. Ezek a próbák elsősorban számbeli eltérések (leggyakoribb triszómiák: +13, +18, +21, +X, +Y;

monoszómiák: -X, -Y) kimutatására, megerősítésére, mozaikosság esetén az eltérő kromoszómakészletű sejtek arányának meghatározására alkalmasak. *Turner-szindrómában*, amikor a 45,X kariotípus az Y-kromoszóma elvesztésével jön létre, rendkívül fontos a maradék Y-kromoszóma kimutatása FISH-módszerrel.

LÓKUSZSPECIFIKUS PRÓBÁK

Ezek a próbák a kromoszóma egy specifikus DNS-szekvenciájához (kromoszóma lókuszt) kötődnek, mikrodeléciós szindrómák kimutatására alkalmasak (1. ábra). Ezek közül leggyakoribbak: Prader-Willi/Angelman (15q11-13); Di George, Velo-Cardio-Facial (22q11.2); Wolf-Hirschhorn (4p16.3); Williams (7q11.23) szindróma. A mikrodeléciós szindrómák kimutatására kétszínű próbakeveréket használunk. Egyik próba a kritikus deletált régiót jelöli (piros), a másik az ún. kontrollpróba (zöld), amely az érintett kromoszóma azonosítására alkalmas. Normális metafázison/interfázisú sejten két piros és két zöld szignál látható, míg mikrodeléció esetén a két kontroll szignál mellett csak egy régió specifikus szignál mutatható ki.

KARFESTŐ ÉS TELJES KROMOSZÓMA-FESTŐ PRÓBÁK

A karfestő próbák a kromoszómák rövid és hosszú karját eltérő színnel jelölik meg. Teljes kromoszómafestő próbákkal az egész kromoszóma azonos színűre festődik (1. ábra). A karfestő próbák kromoszómán belüli szerkezeti átrendeződések (inverzió, izokromoszóma) kimutatására, a teljes kromoszóma festők marker kromoszómák eredetének tisztázására alkalmasak.

TELOMERSPECIFIKUS PRÓBÁK

Az ismeretlen eredetű mentális retardációk egy részéért a subtelomerikus régió rejtett átrendeződései lehetnek a felelősek (7). Hagyományos citogenetikai vizsgálatokkal ezek az aberrációk nem, vagy csak részben ismerhetők fel, mivel a kromoszómák terminális részei többnyire G-sávzással világosan festődnek és az átrendeződések (deléciók, duplikációk) kisméretűek. Ezért a mentálisan enyhén retardált és/vagy dysmorphiás, normális kariotípus-

sú gyermekek szűrése a rejtett subtelomerikus kromoszómaátrendeződések kimutatására alkalmas subtelomerikus FISH-próba panellel történhet. A panel próbái az egyes kromoszómák hosszú és rövid karjának végeit eltérő színnel jelzik (1. ábra). A próbákat úgy tervezték, hogy a legtöbb rejtett telomerikus kromoszóma aberrációt, deléciót és kromozómatöbbletet képesek kimutatni anélkül, hogy más kromoszómákkal keresztkötést mutattának.

MULTICOLOR-FISH (M-FISH)

Az M-FISH-vizsgálat során mind a 24 kromoszóma egyidejű megjelenítése történik egy lépésben, különböző színekkel jelölve az egyes kromoszómákat (2. ábra). A módszer alkalmas komplex genetikai eltérések azonosítására, marker kromoszómák eredetének tisztázására és rejtett kromoszómaaberrációk kimutatására (8).

Southern-blot, polimeráz láncreakció (PCR)

A DNS- vagy RNS-alapú molekuláris biológiai módszerek, a Southern-blot módszer és a PCR különböző formái, valamint a szekvenálás a génszintű változások kimutatására szolgálnak (9). Segítségükkel az egy génpár által meghatározott kórképek („monogénes szindrómák”), a triplet-expanzió alapuló rendellenességek (pl. *Fragilis-X-szindróma*, Huntington-chorea) genetikai háttere tisztázható. A *Fragilis-X-szindróma* a leggyakoribb öröklött, mentális retardációval járó tünetegyüttes, a betegség hátterében az Xq27.3 régióra lokalizálódó FMR₁-gén csökkent vagy hiányzó aktivitása áll. A szindróma csak molekuláris genetikai módszerrel (Southern-blot, PCR) diagnosztizálható megbízhatóan (10). Ezt a vizsgálatot nemcsak a *Fragilis-X-szindróma* típusos tüneteit mutató esetekben, hanem minden ismeretlen eredetű mentális retardáció esetén ajánlott elvégezni. A klasszikus citogenetika mellett a korszerű genetikai vizsgálómódszerek alkalmazásával lehetőség nyílt a veleszületett rendellenességek kialakulásáért felelős genetikai eltérések pontos tisztázására (11). Az alábbi eset ismertetésével azt mutatjuk be, hogy a különböző genetikai vizsgálómódszerek egymást kiegészítve hogyan segítik a megbetegedés hátterében álló etiológia tisztázását.

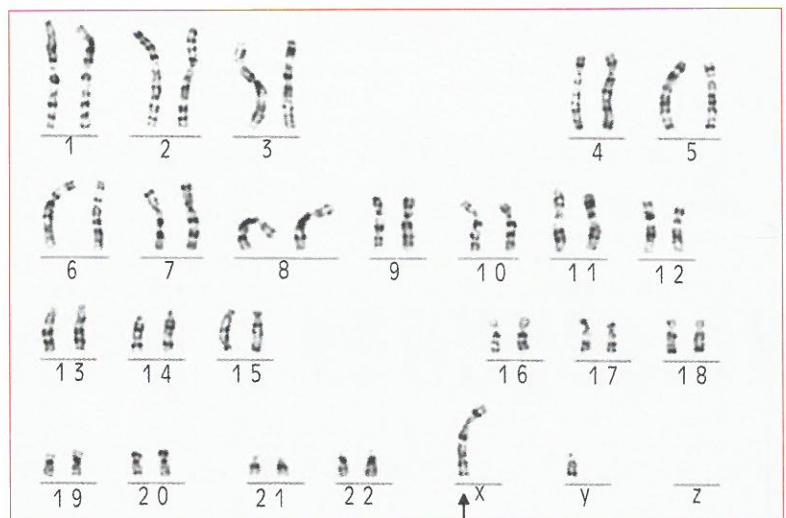


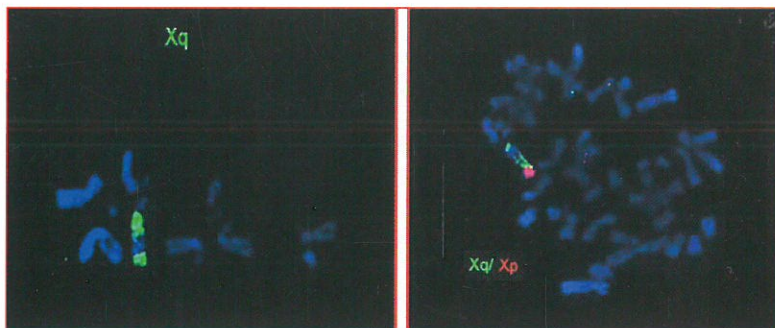
Esetismertetés

K. B. 2 és fél éves, szomatomentálisan enyhén retardált, dysmorph kisfiú, aki a 38. gesztációs héten, 3000 g-mal született fiatal, egészséges szülők első gyermekeként. Újszülöttkorban az enyhe dysmorph tünetek miatt kromoszóma-vizsgálat történt, amely extra nagy X-kromoszómát igazolt (46,add(Xq)Y) (3. ábra). A szülők citogenetikai vizsgálata során az apa kariotípusa normálisnak bizonyult (46,XY), az anyánál hasonló extra nagy X-kromoszóma volt kimutatható (46,Xadd(Xq)). Az anyai nagyszülők kariotípusa normális. Az X-kromoszóma hosszú karján található többlet eredetének tisztázása céljából FISH-vizsgálatot végeztünk X karfestő próbákkal (Xq, Xp) (4. ábra). A vizsgálat során kiderült, hogy

2. ÁBRA:
NORMÁL
KROMOSZÓMA-
KÉSZLETŰ META-
FÁZIS M-FISH-
MÓDSZERREL
(24XCYTE KIT,
SOFTWARE ISIS,
METASYSTEMS)

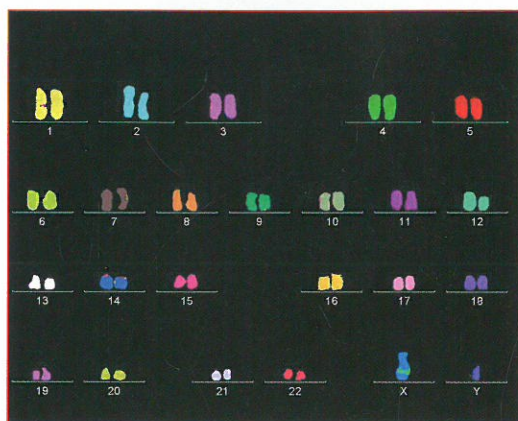
3. ÁBRA:
KARIOTÍPUS:
46, add(Xq)Y





**4. ÁBRA: A, Xq B, Xq (ZÖLD) ÉS Xp (PIROS)
KARSPECIFIKUS FISH-PRÓBÁK ALKALMAZÁSA METAFÁZISÚ
KROMOSZÓMÁKON**

**5. ÁBRA:
A 4-ES
KROMOSZÓMA
EGY RÉSZÉNEK
BEÉKELŐDÉSE AZ
X-KROMOSZÓMA
HOSSZÚ KARJÁBA
M-FISH-
ANALÍZISSEL**



az X-kromoszóma hosszú karjának egy része sem a rövid, sem a hosszú kart festő próbával nem jelölődik, tehát nem X eredetű. Ezek után elvégeztük a minta M-FISH-vizsgálatát a nem festődő kromoszómarégió eredetének pontosítására, amellyel sikerült kimutatni mind az érintett gyermekben, mind az anyában, hogy az X-kromoszómába beékelődött rész 4-es kromoszóma eredetű (5. ábra).

Klinikailag fontos, hogy az azonos kromoszómaeltérés ellenére az anya tü-

netmentes, míg a fiúgyermeknél klinikai tünetek észlelhetők. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy az anyában a kóros X-kromoszóma inaktiválódott (lioni-záció). Az anya hordozó volta miatt egy következő terhesség esetén prénatális genetikai vizsgálat szükséges a rendellenesség ismétlődésének megelőzésére.

Következtetések

A korszerű molekuláris genetikai módszerek bevezetése és elterjedése lehetővé tette a veleszületett rendellenességek korábbanál pontosabb post- és prénatális diagnosztizálását, a genotípus-fenotípus összefüggések, a genetikai heterogenitás megismerését.

A korszerű módszerek birtokában lehetőség van a korábban hagyományos kromoszómaanalízissel nem tisztázott esetek további vizsgálatára. Fontos minden veleszületett rendellenességre gyanús gyermek vizsgálati mintájának (kromoszómapreparálás során nyert sejtszuspenzió, DNS) tárolása további vizsgálatok elvégzése céljából (hazai vagy külföldi laboratóriumokkal együttműködve). A gyakorló gyermekorvos feladata és felelőssége, hogy felismerje, szenved-e a betege ismert vagy feltételezett genetikai betegségben. Ennek gyanúja esetén a beteget minél korábban küldje specialistához, hogy a diagnózis birtokában az esetek ismétlődése megakadályozható legyen.

A DE OEC Gyermekklinika Regionális Genetikai Laboratóriumában elvégezhető vizsgálatok: citogenetika, FISH, M-FISH, Southern-blot, PCR.

Irodalom

1. Evaluation of the newborn with single or multiple congenital anomalies: statement and purpose. <http://www.health.state.ny.us>
2. Papp Z. Klinikai genetika. Budapest: Golden Book Kiadó Kft.; 1995.
3. Oláh É. A klinikai genetika alapjai. Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt.; 1999.
4. Kiss P. Szindróma atlasz. Budapest: Golden Book Kiadó Kft.; 2000.
5. Balogh E, Oláh É. Genetikai betegségek. In: Oláh É, editor. Gyermekgyógyászati kézikönyv. Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt.; 2004. p. 701–720.
6. Li MM. Advanced molecular and cytogenetic technologies in birth defect diagnosis and prevention. Beijing Da Xue Xue Bao 2005; 37 (1): 14–19.
7. Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, et al. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. Nat Genet 1995; 9: 132–140.
8. Langer S, Kraus J, Jentsch I, et al. Multicolor chromosome painting in diagnostic and research applications. Chromosome Res 2004; 12: 15–23.
9. Kovalkovszky I. Génhibák kimutatása. Módszerek In: Kopper L, Marcsek Z, Kovalkovszky I. Molekuláris medicina. Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt.; 1997.
10. Sherman S, Pletcher BA, Driscoll DA. Fragile X syndrome: Diagnostic and carrier testing. Genet Med 2005; 7 (8): 584–587.
11. Salman M, Jhanwar SC, Ostrer H. Will the new cytogenetics replace the old cytogenetics? Clin Genet 2004; 66: 265–275.