

4. Genetické vyšetření (MUDr. Renata Gailyová)

4.1. Genetické poradenství

Klinická genetika má v současné době tři základní charakteristické rysy:

1. využívá zcela nedirektivních přístupů vůči pacientovi a jeho rodině
2. není v současné době oborem terapeutickým, ale především diagnostickým, preventivním
3. genetické poradenství je založeno na přesné klinické diagnóze

Klinická genetika se zabývá diagnózou dědičných chorob a stará se o jejich medicínské, sociální a psychologické aspekty. Stejně jako ve všech ostatních oblastech medicíny i v genetice je zásadní stanovit správnou diagnózu a poskytnout vhodnou péči, která musí zahrnovat pomoc postiženému jedinci a členům jeho rodiny tak, aby porozuměli povaze a důsledkům onemocnění a vyrovnali se s nimi. Je-li však choroba dědičná, přistupuje další rozměr: potřeba informovat ostatní členy rodiny o jejich riziku a možnostech, jak toto riziko mohou modifikovat. Jako je specifickým rysem genetické choroby její tendence vyskytovat se v rodině opakovaně, je specifickým rysem genetického poradenství nejen zaměřovat se na původního pacienta, ale také na členy jeho rodiny, a to současné i budoucí. Genetické poradenství, základní činnost v lékařské genetice, se zabývá nejen informováním pacienta a jeho rodiny, ale také poskytuje psychologickou podporu, aby pomohlo jednotlivým členům rodiny, přizpůsobit se vlivu a důsledkům dědičné choroby.

Zavedené standardní metody lékařské péče vyžadují, aby ti, kdo poskytují genetické služby, znali anamnézu, která zahrnuje rodinné a etnické informace, poradili pacientům, jaké je jejich genetické riziko a riziko členů jejich rodiny, nabídli diagnostické genetické vyšetření nebo prenatální diagnostiku, je-li indikována, a nastínili různé možnosti péče nebo léčby ke snížení rizika choroby. Obecně vzato pacientům neříkají, jak se mají rozhodnout s ohledem na různá vyšetření a možnosti péče, ale místo toho se jim snaží poskytnout maximální množství informací o tom, jak by se rozhodnout mohli a podporují je při realizaci jejich rozhodnutí. Tento přístup označujeme jako nedirektivní a je široce přijat do standardní praxe genetického poradenství. Je vhodné zdůraznit, že genetické poradenství není omezené na poskytování informací a výpočet rizika onemocnění, ale jde spíše o proces komunikace

4.2. Genetická onemocnění

Hlavní význam genetiky v klinické praxi je osvětlování úlohy genetické variability a mutací v etiologii rozsáhlého počtu onemocnění. Prakticky každé onemocnění je výsledkem kombinace působení genů a prostředí. Význam genetické komponenty může být menší nebo větší.

Rozlišujeme tři hlavní typy onemocnění, která jsou zcela nebo částečně podmíněna genetickými faktory:

1. Chromosomální poruchy
2. Monogenně podmíněná onemocnění
3. Multifaktoriálně dědičná onemocnění

4.2.1. Chromosomální poruchy

U chromosomálních poruch se jedná o nadbytek nebo nedostatek genů obsažených v celých chromosomech nebo jejich segmentech. Abnormality chromosomů mohou být buď numerické nebo strukturní a mohou zahrnovat jeden nebo více autosomů nebo pohlavních chromosomů. Nejčastějším klinickým problémem jsou aneuploidie, kdy je abnormální počet chromosomů způsoben absencí chromosomu nebo přítomností nadbytečného chromosomu. Například přítomnost nadbytečné kopie jednoho chromosomu 21 vyvolá charakteristické postižení – Downův syndrom. Jako skupina postihují chromosomové abnormality asi 7 z 1000 živě narozených jedinců. Výskyt chromosomových abnormalit u živě narozených dětí je tedy asi 0,7%. Zvýšený výskyt zjišťujeme u dětí mrtvorozených a umírajících v novorozeneckém období (okolo 10%). Dále je zvýšený výskyt chromosomových abnormalit u dětí s vývojovými vadami, mentální retardací, abnormalitami somatického a sexuálního vývoje. Chromosomové aberace podmiňují asi polovinu spontánních potratů v prvním trimestru.

4.2.2. Monogenně podmíněná onemocnění

Monogenní onemocnění jsou způsobena mutacemi jednotlivých genů. Mutace může být přítomna pouze na jednom chromosomu z páru nebo na obou chromosomech páru. Vzácněji je mutace přítomna v mitochondriálním namísto jaderném genomu. V každém případě se jedná o kritickou chybu v genetické informaci jednoho genu. Monogenní onemocnění vykazují v rodokmenech obvykle zřetelné a charakteristické rysy. Monogenní znaky nazýváme často mendelovskými, protože se v potomstvu při specifickém způsobu křížení objevují v průměru ve stálých poměrech popsaných J. G. Mendlem. Dosud známé monogenní fenotypy jsou uvedeny v klasické práci Victora Mc Kusica (Mendelian Inheritance in Man). Průběžně aktualizovaná online verze je dostupná na internetu - OMIM.

Většina monogenních defektů je vzácná, frekvence může dosahovat až 1:500, ale obvykle je mnohem nižší. Přestože jednotlivě jsou monogenně dědičná onemocnění vzácná, jako skupina jsou tato onemocnění zodpovědná za významnou část onemocnění a úmrtí. V populaci postihují v některém období života asi 2% jedinců. V populaci větší než milion živě narozených je incidence vážných monogenních onemocnění v dětském věku 0,36%, mezi hospitalizovanými dětmi je pravděpodobně 6-8% pacientů s monogenně dědičnými chorobami. Monogenně podmíněná onemocnění jsou primárně, nikoli však výlučně chorobami dětského věku. Méně než 10% z nich se manifestuje po pubertě a pouhé 1% se objeví po skončení reprodukčního věku.

4.2.3. Multifaktoriálně dědičná onemocnění

Multifaktoriální dědičnost podmiňuje řadu vývojových poruch, vyúsťujících v kongenitální malformace, a dále mnoho populačně častých chorob dospělého věku. U mnoha těchto onemocnění neexistuje jediná porucha genetické informace. Postižení je spíše následkem kombinace působení malých genových variant, které v součtu podmiňují predispozici k závažnému defektu, často za spoluúčasti environmentálních faktorů. Multifaktoriálně podmíněná postižení mají tendenci se v rodinách opakovat, ale v rodokmenech nevykazují typické charakteristiky monogenní dědičnosti. Odhady stanovující populační závažnost multifaktoriálních onemocnění udávají 5% u dětské populace a více než 60% v celé populaci.

4.3. Indikace ke genetickému vyšetření

K nejčastějším pacientům genetických poraden patří rodiny s dítětem s potenciálním nebo známým genetickým postižením, ale konzultující mohou být také dospělí s abnormalitou, reprodukčními problémy nebo s výskytem abnormality v rodinné anamneze.

Nejčastější indikace ke genetickému vyšetření v pediatrii:

1. izolované vývojové vady
2. mnohočetné kongenitální anomálie
3. psychomotorická a mentální retardace
4. poruchy somatického vývoje (malý vzrůst, vysoký vzrůst)
5. poruchy sexuálního vývoje (pubertas praecox, pubertas tarda)
6. stigmatizace – výskyt většinou mnohočetných odchylek od normy ve fenotypu
7. prematurita, neprospívání, poruchy příjmu potravy, poruchy chování
8. podezření na monogenně podmíněné onemocnění
9. neobjasněná porucha vědomí, křeče, nervosvalové postižené
10. rodinná anamnesa s dědičným postižením
11. vyšetření v návaznosti na provedenou prenatální diagnostiku
12. pozitivní test v novorozeneckém screeningu

Další indikace ke genetickému vyšetření – bez věkové vazby:

1. předchozí dítě s izolovanou nebo mnohočetnou vývojovou vadou
2. rodinná anamnesa s dědičným onemocněním
3. prenatální vyšetření při vyšším věku rodičů nebo z jiné indikace
4. konsanguinita
5. vystavení účinkům teratogenu
6. opakovaný samovolný potrat nebo sterilita
7. podezření na hereditární nádorové onemocnění

4.4. Klinicko-genetické vyšetření

Při genetickém vyšetření dítěte se vedle klasického komplexního pediatrického vyšetření zaměřujeme na některé specifické detaily:

1. antropometrické parametry – výška, hmotnost, obvod hlavy, růstová rychlost, proporcionalita
2. stigmatizace – drobné odchylky od normy, které izolovaně nacházíme ve fenotypu mnoha zdravých jedinců, které však mohou v kombinaci být významné pro správnou diagnosu onemocnění.

Hlava – tvar lebky, vlasová hranice, hypo- a hypotelorismus, plochý kořen nosu, hypoplastická střední část obličeje, srostlé či velmi sporné obočí, výrazné nebo chybějící řasy, antevrtované nostrily, atypický tvar nosu,

krátké, dlouhé nebo vyhlazené filtrum, úzké nebo výrazně plné rty, gotické patro, ortodontické anomálie, charakter sklovin, rozštěpy rtu, patra, uvuly, atypicky tvarované, nízko nasedající ušní boltce, fistuly, výrůstky kožní apod.

Krk – krátký, pterygia...

Hrudník – široký, úzký, štítovitý, uložení prsních bradavek...

Břicho – hypotonie, hernie, rozestup přímých svalů břišních...

Genitál – hypoplatický, dysgenetický, infantilní...

Končetiny – proporcionalita, abnormality (ectro-, poly-, syndaktylie), klinodaktilie pátého prstu, atypické dermatoglyfy – příčná dlaňová rýha, atypické držení prstů, protáhlé patičky...

Ortopedické a neurologické abnormality – hypotonie, atrofie, spasticita, vadné držení těla, vývojové vady, skoliosa, pes planovalgi, pes equinovarus, calcaneovalgus....

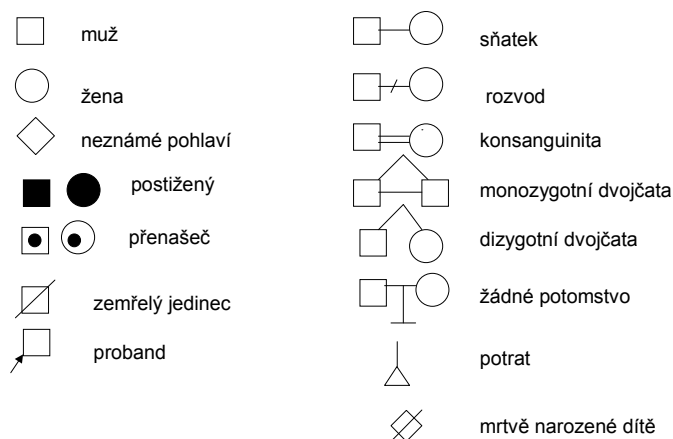
Kůže, vlasy, nehty – poruchy pigmentace, hemangiomy, atrofie, dystrofie nehtů, alopecie...

Pro komplexní zhodnocení vždy spolupracujeme s lékaři - specialisty, doplňujeme konziliární, zobrazovací a laboratorní vyšetření.

4.5. Genealogické vyšetření

Součástí každého genetického vyšetření je sestavení minimálně třígeneračního rodokmenu - genealogie. V pediatrii je nutno tuto část vyšetření doplnit s rodiči dětského pacienta. Genetické vyšetření je proto vždy nutno spojit s konzultací s rodiči.

Pro záznam genealogického vyšetření využíváme běžně užívaných symbolů. Neexistuje sice žádný jednotný systém zápisu rodokmenů, symboly uvedené na obrázku 1 odpovídají současným doporučením.



Obrázek 4.1: Symboly používané k zakreslení rodokmenů

4.6. Cytogenetické vyšetření

Cytogenetickým vyšetřením stanovujeme nejčastěji karyotyp za účelem vyhledávání vrozených chromosomových abnormalit. Karyotyp vyšetřujeme v těch případech, kdy máme podezření, že klinické potíže

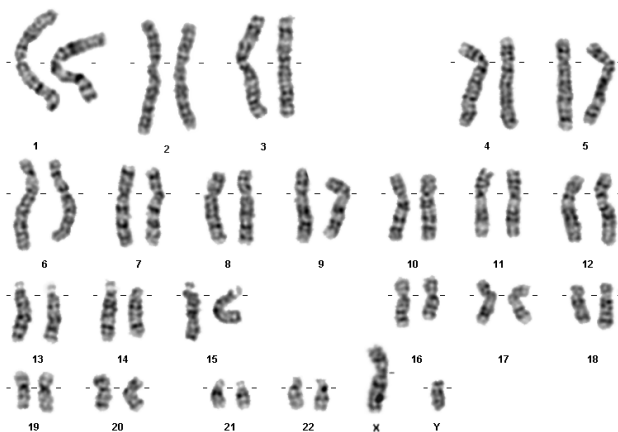
souvisí se změnou počtu nebo struktury chromosomů. Pokud diagnóza nebyla stanovena bez cytogenetického vyšetření, měla by být chromosomální analýza zajištěna těm pacientům, u kterých se vyskytla některá z uvedených potíží nebo jejich kombinace.

Indikace k postnatálnímu stanovení karyotypu v pediatrii:

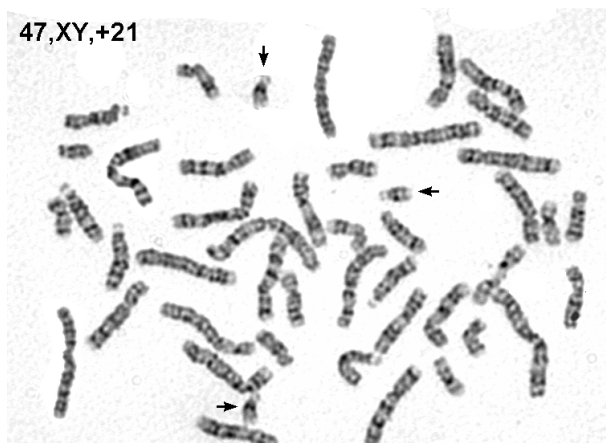
1. neprospívání
2. opožděný vývoj
3. dysmorfická facies, stigmatizace
4. vývojová vada
5. mnohočetné malformace
6. malá postava
7. indiferentní genitál
8. mentální retardace
9. narození mrtvého plodu, úmrtí novorozence
10. vrozená chromosomá aberace u rodiče

Další indikace k postnatálnímu cytogenetickému vyšetření – bez věkové vazby:

1. sterilita
2. opakované spontánní potraty
3. známá nebo suspektní chromosomální abnormalita v rodině
4. nádorové onemocnění (onkocytogenetické vyšetření má svá specifická kritéria, která nejsou součástí tohoto textu)



Obrázek 4.2 : Normální mužský karyotyp, G - pruhy



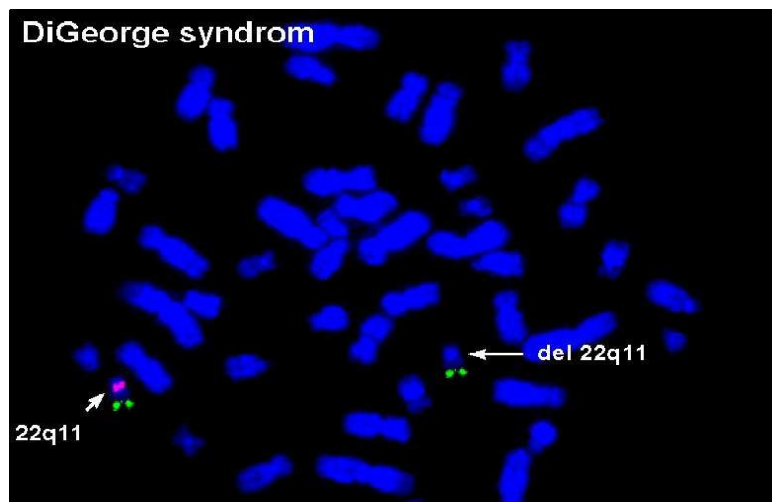
Obrázek 4.3: Karyotyp Downova syndromu – trisomie 21

Karyotyp vyšetřujeme většinou z lymfocytů periferní krve. Odběr krve provádíme sterilně do heparinu (2-3ml krve do 0,3 ml Heparinu).

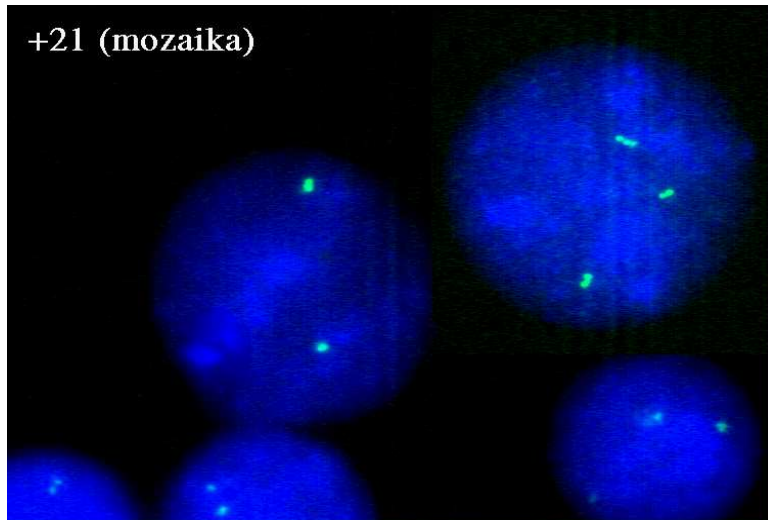
4.7. Molekulárně cytogenetické vyšetření

S rozvojem cytogenetických metodik se objevují metody využívající současně cytogenetické a molekulárně genetické postupy umožňující detailnější analýzu chromosomů a vyhledávání submikroskopických změn, které při klasickém cytogenetickém vyšetření ve světelném mikroskopu nejsme schopni odhalit. Mezi tyto metody patří například fluorescenční in situ hybridizace (FISH) v různých variantách, spektrální karyotypování (SKY) nebo komparativní genomová hybridizace (CHG). Tyto metody umožňují zjištění přítomnosti či absence určitých sekvencí DNA nebo studium počtu popřípadě uspořádání chromosomů nebo jejich částí. Tyto metody zvýšily významně rozsah a přesnost rutinní chromosomální analýzy.

Při metodě FISH se používají sondy specifické pro jednotlivé chromosomy, chromosomální oblasti nebo geny, aby bylo možno identifikovat příslušné chromosomální přestavby nebo rychle diagnostikovat abnormální počet chromosomů.



Obrázek 4.4: Metoda FISH, průkaz mikrolečního syndromu Di George, del 22q11 (metafáze)

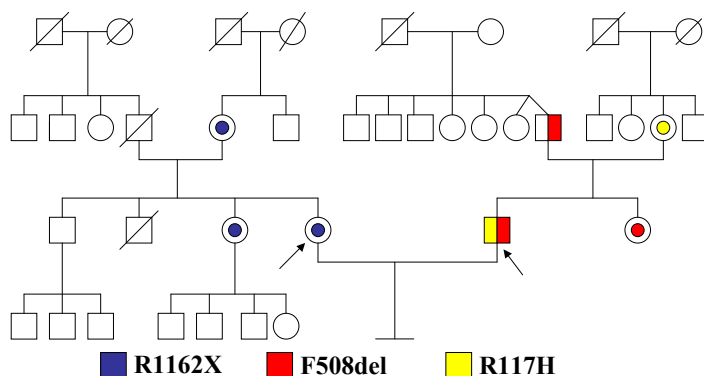


Obrázek 4.5: Metoda FISH, trisomie 21 v mozaice (interfáze)

Pro postnatální vyšetření metodou FISH nejčastěji využíváme suspenzi, připravenou pro cytogenetické vyšetření, pro vyšetření metodou CHG je nutno izolovat DNA pacienta.

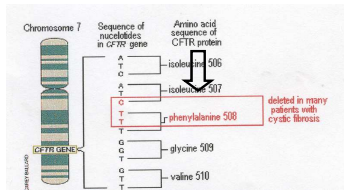
4.8. Vyšetřování monogenně podmíněných onemocnění - analýza DNA / RNA

Molekulárně genetická vyšetření jsou založena na vyhledávání známých nebo neznámých změn – mutací v sekvenci DNA/RNA jedince. Mutace mají různý charakter a rovněž přístupy k jejich detekci vyžadují individuálně volené metodiky specializovaného pracoviště. Vyšetření DNA / RNA je vždy cíleně zaměřené na určité onemocnění. Pro molekulárně genetické vyšetření využívají specializovaná pracoviště často speciální indikační protokoly zahrnující výsledky odborných a laboratorních vyšetření, která vedla k podezření na dané onemocnění - diagnózu. Molekulárně genetické vyšetření by mělo být prováděno vždy s informovaným souhlasem pacienta nebo jeho zákonného zástupce, cíleně, na základě vysokého podezření na určité onemocnění. Interpretace výsledku molekulárně genetického vyšetření by měla být prováděna klinickým genetikem a spojena s genetickým poradenstvím. Vyšetření se nejčastěji provádí z DNA / RNA izolované z lymfocytů periferní krve. Odběr se provádí sterilně do EDTA.



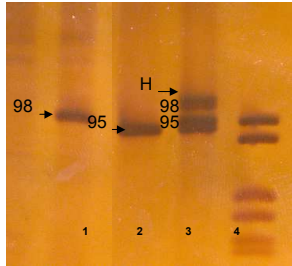
Obrázek 4.6: Rodokmen rodiny se záchytem 3 mutací v genu pro cystickou fibrosu

Obrázek 4.7: Detekce mutace F508del CFTR genu



Mutace F508del - delece tří nukleotidů CTT v CFTR exonu 10. Ztráta jedné aminokyseliny – fenylalaninu v pozici 508 v CFTR proteinu.

Polyacrylamidová gelová elektroforéza PCR produktů exonu 10



Bandy označené 95,98 jsou 95 a 98 párů bází dlouhé PCR produkty. Band značený H jsou heteroduplexy formované chybně spárovanými jednořetězci DNA (95/98 a 98/95).

1. non F508del / non F508del
2. F508del / F508del
3. F508del / non F508del
4. marker pBR322/Alu1

4.9. Terminologie

alela - alternativní varianta genetické informace v konkrétním lokusu

mutace – trvalá změna nukleotidové sekvence nebo uspořádání DNA

genotyp – sada alel, které tvoří genetickou výbavu jedince

fenotyp – pozorovatelná exprese genotypu

monogenní choroba – choroba determinovaná alelami v jednom lokusu

homozygot – jedinec s identickými alelami v jednom lokusu

heterozygot – jedinec s rozdílnými alelami v jednom lokusu (přenašeč)

složený heterozygot – genotyp, kde se vyskytují dvě různé mutantní alely

proband – osoba, kvůli které je rodina vyšetřovaná

DNA – deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

autosom – nepohlavní chromosom (1-22)

gonosom – pohlavní chromosom (X,Y)