

## BADANIE KARIOTYPU PŁODU METODAMI CYTOGENETYKI KLASYCZNEJ – DLACZEGO JUŻ NIE WYSTARCZA?

**Nowe standardy w inwazyjnej diagnostyce prenatalnej:**

# Mikromacierze aCGH

**BADANIE KARIOTYPU PŁODU METODAMI CYTOGENETYKI KLASYCZNEJ BYŁO PRZEZ LATA ŻŁOTYM STANDARDEM W INWAZYJNEJ DIAGNOSTYCE PRENATALNEJ.** Metoda ta ma jednak istotne ograniczenia. Badanie kariotypu metodami cytogenetyki klasycznej wymaga hodowli komórek, która trwa 7-14 dni, stąd oczekiwanie na wynik badania wynosi 10-20 dni (niekiedy dłużej), a w tych przypadkach, kiedy nie uzyskuje się wzrostu amniocytów, nie można wydać wyniku.

**P**owinno być jasne, że wynik badania zależy w znacznym stopniu od jakości próbki i metody badania cytogenetyka i o ile aberracje liczby chromosomów są łatwe do wykrycia, to przy mniejszym doświadczeniu cytogenetyka aberracje na granicy rozdzielczości mogą zostać przeoczone. Sama analiza cytogenetyczna również napotyka na trudności: aberracja chromosomowa może być widoczna, ale niemożliwa do dokładnego określenia, a niekiedy nie można jednoznacznie stwierdzić, czy jest to aberracja chromosomowa czy polimorfizm chromosomu (wariant normy).

Przed wszystkim jednak w świetle tego, co wiemy na temat podłoża genetycznego wad wrodzonych, badanie kariotypu metodami cytogenetyki klasycznej jest w tych przypadkach niewystarczające. Jest to metoda pozwalająca na wykrycie aberracji liczby chromosomów i dużych aberracji struktury chromosomów (powyżej 4 milionów par zasad, tj. powyżej 4Mpz), ale nie wy-

**Oprócz zmian typu CNVs, mikromacierze aCGH wykrywają wszystkie trisomie i wszystkie nie zrównoważone aberracje struktury chromosomów i dzięki temu są niezwykle pomocne w ustaleniu przyczyn poronień samoistnych**

### WADY ROZWOJOWE SĄ CZĘSTO SPOWODOWANE SUBMIKROSKOPOWYMI ZMIANAMI GENOMOWYMI

Zgodnie z aktualną wiedzą, genetyczne przyczyny wad wrodzonych obejmują:

- Klasyczne aberracje chromosomowe;
- Submikroskopowe zmiany chromosomów – mikrodelekcje i mikroduplikacje (choroby genomowe);
- Mutacje pojedynczych genów;
- Uwarunkowania genetyczno-środowiskowe (wiele polimorfizmów w licznych genach, udział czynników środowiskowych).

autor:  
Prof. dr hab. n. med.  
Anna  
Latos-Bieleńska



FOT. SXC

krywa ona submikroskopowych aberracji chromosomowych. Tymczasem to właśnie submikroskopowe zmiany genomowe są jedną z zasadniczych przyczyn wad rozwojowych [6, 11].

Choroby genomowe mają związek z wariantami liczby kopii (CNVs Copy Number Variations). Warianty liczby kopii to rodzaj zmienności w genomie człowieka (inny rodzaj zmienności w genomie człowieka to SNP – Single Nucleotide Polymorphism). CNVs – to segmenty DNA (około 1kpz-1Mpz długości), które wykazują zmienną liczbę kopii w porównywanych genomach (delekcje, duplikacje, wielokrotne duplikacje, złożone rearanżacje). Odkrycie CNVs zmieniło myślenie o genomie człowieka, pokazało, że od klasycznej organizacji genomu, w której geny są zawsze w dwóch kopiach (jedna od matki, druga od ojca), są odstępstwa – obecność CNVs powoduje, że geny mogą mieć również jedną, trzy lub więcej kopii. CNVs są powszechne, obejmują około 10 proc. ludzkiego genomu, zawierają geny, sekwencje regulatorowe i inne funkcjonalne elementy genomu. Większość CNVs ma neutralny charakter, ale odkrywanych jest coraz więcej CNVs o skutkach klinicznych. Przede wszystkim okazało się, że CNVs są przyczyną 10-20 proc. (i więcej) wad rozwojowych i w podobnym odsetku przyczyną autyzmu, opóźnienia rozwoju i niepełnosprawności intelektualnej [11].

W badaniach u 522 pacjentów z wadami rozwojowymi układu moczowego, prowadzonych w Division of Nephrology, Uniwersytet Columbia w Nowym Jorku we współpracy z Katedrą i Zakładem Genetyki Medycznej UM w Poznaniu oraz Centrum Genetyki Medycznej GENESIS w Poznaniu wykazano, że w 16,6 proc. przypadków wady rozwojowe układu moczowego są spowodowane zmianami typu CNVs, przy czym aż w 22,5 proc. przypadków, gdy oprócz wady nerek były także inne wady rozwojowe [7, 9].

sekwencji badanego DNA. Do przeprowadzenia badania nie trzeba hodowli komórkowej, wystarczy próbka DNA wyizolowanego w standardowy sposób. W badaniach prenatalnych jest to DNA wyizolowane z kosmówki, próbki płynu owodniowego lub z krwi płodu. Dla porównania potrzebny jest DNA kontrolny, tj. DNA osoby zdrowej, nie zawierający patogennych CNVs.

Zarówno DNA badany, jak i DNA kontrolny znakuje się fluorochromem, jednak w taki sposób, żeby różniły się one kolorem fluorescencji. Następnie obie wyznakowane próbki DNA się łączą i nanosi na mikromacierz, gdzie konkurują one o hybrydyzację do sond molekularnych mikromacierzy. Po ukończonej hybrydyzacji płytka mikromacierzowa jest płukana, a następnie świecenie poszczególnych fluorochromów w miejscach spotów jest mierzone za pomocą czytnika laserowego. Przewaga jednego lub drugiego fluorochromu wskazuje odpowiednio na delekcję lub duplikację ściśle określonego fragmentu chromosomu. Uzyskany obraz jest analizowany z zastosowaniem specjalnych programów, wynik zawiera listę genów, które uległy delekcji lub duplikacji, a przy określaniu skutków klinicznych wykrytych zmian typu CNVs korzysta się ze światowych baz danych zawierających informacje o dotychczas wykrytych CNVs i ich znaczeniu klinicznym [11].

W Centrum Genetyki Medycznej GENESIS w Poznaniu badanie metodą mikromacierzy aCGH wprowadzono w 2010 roku i do tej pory przeprowadzono blisko 1500 badań tą metodą, potwierdzając jego wielką przydatność dla praktyki klinicznej.

### **MIKROMACIERZE W DIAGNOSTYCE PRENATALNEJ**

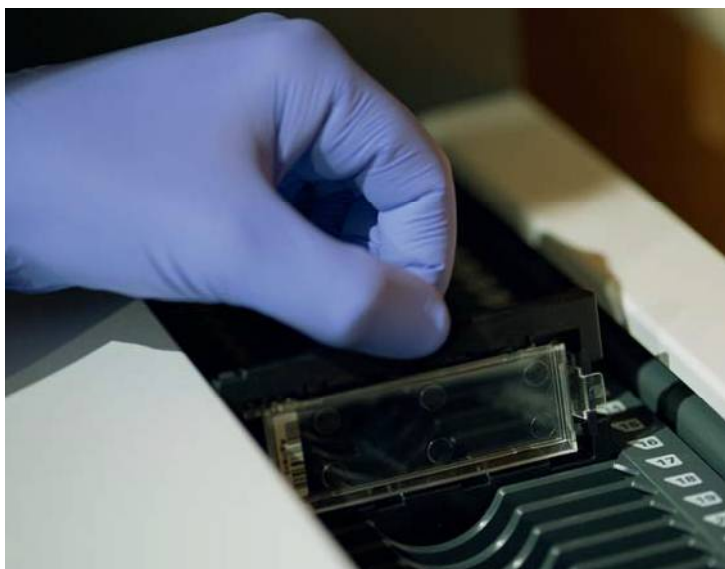
W 2013 roku opublikowano pracę, w której podsumowano 4 duże badania (łącznie 12

**Mikromacierz aCGH to szklana lub plastikowa płytka, zazwyczaj wielkości i kształtu szkiełka mikroskopowego, na której są naniesione w regularnych pozycjach pola (spots) mikroskopijnej wielkości**

### **MIKROMACIERZE aCGH - NA CZYM POLEGA BADANIE?**

Mikromacierz aCGH to szklana lub plastikowa płytka, zazwyczaj wielkości i kształtu szkiełka mikroskopowego, na której są naniesione w regularnych pozycjach pola (spots) mikroskopijnej wielkości. Pola te zawierają sondy molekularne, którymi są jednoniciowe cząsteczki DNA, mające zdolność specyficznego wiązania komplementarnych

362 przypadków) dotyczące wykorzystania mikromacierzy w diagnostyce prenatalnej w przypadkach, kiedy kariotyp płodu określony metodami cytogenetyki klasycznej był prawidłowy. Zmiany genomowe stwierdzono w 2,4 proc. przypadków (295/12 362) niezależnie od wskazań do diagnostyki prenatalnej, ale w 6,5 proc. przypadków (201/3090) z nieprawidłowymi wynikami badania USG, jednak tylko w 1,0 proc. przypadków



FOT. GENESIS

(50/5108), kiedy wskazaniem był wiek matki i w 1,1 proc. przypadków (44/4164), kiedy badanie prenatalne było wykonane z powodu lęku pacjentki, aberracji chromosomowej w rodzinie lub nieprawidłowych wyników przesiewowych badań biochemicznych [2].

W 2014 roku przedstawiono podsumowanie danych z 18 publikacji (2220 płodów). Zmiany genomowe występowały u 3,1 - 7,9 proc. płodów z pojedynczą wadą rozwojową w badaniu USG i prawidłowym kariotypem oznaczonym metodami cytogenetyki klasycznej [3].

Mikromacierze okazały się efektywne w diagnostyce prenatalnej w przypadku wady serca u płodu. Podsumowano prace z lat 2007-2014 (13 publikacji, 1131 płodów z wrodzoną wadą serca). Zmiany typu CNVs wykryto w 12 proc. przypadków, w których

kariotyp oznaczony metodami cytogenetyki klasycznej był prawidłowy i w 7 proc. przypadków, w których wykluczono aberrację liczby chromosomów i mikrodelecję 22q11 [5].

W przypadku diagnostyki prenatalnej po stwierdzeniu u płodu wady rozwojowej OUN, na 46 płodów z prawidłowym kariotypem w 10,9 proc. przypadków (5/46) wykryto CNVs patogene, a w 6,5 proc. przypadków (3/46) - wykryto CNVs prawdopodobnie patogene. CNVs występowały w 8,3 proc. przypadków, jeśli wada OUN była izolowana i w 13,6 proc. przypadków, jeśli płód miał także inne wady rozwojowe. Zwraca uwagę wysoki odsetek CNVs w przypadku zespołu Dandy-Walkera (2/6 przypadków, tj. 33,3 proc.) oraz holoprosencefalii (2/7 przypadków, tj. 28,6 proc.) [10].

CNVs są także wykrywane w przypadku nieprawidłowej

## ZALETY I OGRANICZENIA ZASTOSOWANIA MIKROMACIERZY ACGH W DIAGNOSTYCE PRENATALNEJ

Badania metodą mikromacierzy aCGH posiada liczne zalety i kilka ograniczeń.

Mikromacierz w diagnostyce prenatalnej – zalety:

- Nie wymaga hodowli komórek;
- Badanie można zrobić na każdym materiale biologicznym (kosmówka, płyn owodniowy, krew płodu);
- Badanie można zrobić na mniejszej ilości płynu owodniowego w porównaniu z badaniem metodą cytogenetyki klasycznej;
- Pozwala na szybkie uzyskanie wyniku, porównywalne z „szybkimi” testami (FISH, QF-PCR);
- Wykrywa wszystkie klasyczne niezrównoważone aberracje chromosomowe;
- Wykrywa wszystkie znane zespoły mikrodelecji i mikroduplikacji;
- Wykrywa wszystkie inne patologiczne zmiany genomowe typu CNV, także nie opisane do tej pory w piśmiennictwie.

Mikromacierz w diagnostyce prenatalnej – ograniczenia:

- Nie wykrywa zrównoważonych aberracji chromosomowych;
- Nie jest to poważnym ograniczeniem, ponieważ bardzo rzadko translokacja zrównoważona powoduje skutki fenotypowe (chorobę genetyczną);
- Może wykryć CNVs o nieznannej patogenności, co - zwłaszcza jeśli zmiana jest mała - powoduje trudności w określeniu skutków fenotypowych;
- W miarę prowadzenia badań pre- i postnatalnych metodą mikromacierzy i gromadzenia danych, ten problem będzie malał;
- Niekiedy nosicielem takiej samej zmiany, jak u płodu, jest zdrowy rodzic, co może powodować trudności interpretacyjne.





## PIŚMIENICTWO

1. AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS COMMITTEE ON GENETICS SOCIETY FOR MATERNAL-FETAL MEDICINE (COMMITTEE OPINION NO 581, DEC. 2014) [HTTP://WWW.ACOG.ORG/RESOURCES-AND-PUBLICATIONS/COMMITTEE-OPINIONS/COMMITTEE-ON-GENETICS/THE-USE-OF-CHROMOSOMAL-MICROARRAY-ANALYSIS-IN-PRENATAL-DIAGNOSIS](http://www.acog.org/resources-and-publications/committee-opinions/committee-on-genetics/the-use-of-chromosomal-microarray-analysis-in-prenatal-diagnosis)
2. CALLAWAY I WSP. PRENAT DIAGN. 2013;33(12):1119-23.
3. DE WIT I WSP. ULTRASOUND OBSTET GYNECOL 2014; 43: 139-146.
4. GRANDE ET AL. ULTRASOUND OBSTET. GYNECOL. 2015; 46(6):650-8
5. JANSEN I WSP. ULTRASOUND OBSTET. GYNECOL. 2015; 45: 27-35.
6. LU I WSP. PEDIATRICS. 2008; 122(6): 1310-1318.
7. MATERNA-KIRYLUK A. I WSP. PEDIATR. NEPHROL. 2014; 29: 257-267.
8. REDDY I WSP. NEJM 2012; 367(23):2185-93.
9. SANNA-CHERCHI I WSP. AM. J. HUM. GENET. 2012; 91: 987-997.
10. SUN I WSP. BIOMED.RES.INTERNATIONAL 2015, [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1155/2015/426379](http://dx.doi.org/10.1155/2015/426379)
11. TOBIAS E, CONNOR M, FERGUSON-SMITH M. GENETYKA MEDYCZNA. WYD. 3. RED. NAUK. TŁUMACZENIA ANNA LATOS-BIELEŃSKA. PZWL 2013.

przezierności karkowej (NT). Z publikacji, w której podsumowano 17 prac z lat 2009-2014, wynika, że CNVs wykryto w 5 proc. przypadków (po wykluczeniu aberracji chromosomowej), przy czym w 4 proc. przypadków, jeśli nieprawidłowa przezierność karkowa była jedyną patologią i w 7 proc. przypadków, jeśli były także inne nieprawidłowości płodu [4].

### INNE ZASTOSOWANIA MIKROMACIERZY aCGH W POŁOŻNICTWIE I GINEKOLOGII

Mikromacierze znajdują zastosowanie w badaniu genetycznych przyczyn poronień samoistnych i późnych obumarciach ciąży.

Wykazano dużo większą skuteczność badania metodą mikromacierzy u płodów martwo urodzonych w porównaniu z klasycznymi badaniami cytogenetycznymi. W badaniach, w których zbadano 532 płody, badania metodą cytogenetyki klasycznej wykazały zmiany u 5,8 proc. z nich, a po zastosowaniu mikromacierzy u 8,3 proc. Jeśli doszło do obumarcia płodu z wadami wrodzonymi, mikromacierz wykazała zmiany u 29,9 proc., podczas gdy metody cytogenetyki klasycznej u 19,4 proc. z nich [8].

Oprócz zmian typu CNVs, mikromacierze aCGH wykrywają wszystkie trisomie i wszystkie niezrównoważone aberracje struktury chromosomów i dzięki temu są niezwykle pomocne w ustaleniu przyczyn poronień samoistnych. Badanie genetyczne materiału z poronienia pomaga w ukierunkowaniu dalszej diagnostyki przyczyn poronień i ma ogromne znaczenie psychologiczne dla pary, która straciła ciążę. W Centrum Genetyki Medycznej GENESIS w Poznaniu przeprowadziliśmy badania metodą mikromacierzy u około 400 zarodków i płodów, stwierdzając nieprawidłowy kariotyp u 60

proc. z nich. Stwierdzenie aberracji chromosomowej u obumarłego/poronionego zarodka/płodu pokazuje przyczynę utraty ciąży, rokowanie co do utrzymania następnych ciąży, a niekiedy ujawnia ukrytą aberrację chromosomową u któregoś z partnerów. Badanie jest prowadzone na fragmentach kosmówki pobranych przy zabiegu oczyszczania jamy macicy po obumarciu ciąży lub wydalonych w przebiegu poronienia samostnego. Można użyć jałowego naczynia (np. plastikowego pojemniczka do badania moczu), a fragmenty materiału biologicznego zalać jałową solą fizjologiczną.

### REKOMENDACJE DOTYCZĄCE ZASTOSOWANIA MIKROMACIERZY aCGH

American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics Socie-

natalnej, rekomenduje się badanie metodą mikromacierzy;

■ Jeśli płód nie ma wad rozwojowych, a wykonuje się diagnostykę inwazyjną, można stosować alternatywnie cytogenetykę klasyczną lub mikromacierzy;

■ W przypadku późnego obumarcia płodu wskazane jest badanie płodu metodą mikromacierzy aCGH. Podobnie badanie metodą mikromacierzy aCGH materiału z poronienia jest niezwykle pomocne przy ustaleniu przyczyn wczesnych utrat ciąży.

Konieczna jest porada genetyczna przed i po badaniu metodą mikromacierzy, z omówieniem wszystkich możliwości i ograniczeń metody. Badanie metodą mikromacierzy może być przeprowadzone tylko za pisemną świadomą zgodą pacjentki, zawsze obowiązującą przy badaniach genetycznych genomu człowieka.

**Mikromacierze okazały się efektywne w diagnostyce prenatalnej w przypadku wady serca u płodu. Zmiany typu CNVs wykryto w 12 proc. przypadków, w których kariotyp oznaczony metodami cytogenetyki klasycznej był prawidłowy i w 7 proc. przypadków, w których wykluczono aberrację liczby chromosomów i mikrodelecję 22q11**

ty for Maternal-Fetal Medicine (Committee Opinion No 581, Dec. 2014) jednoznacznie rekomenduje stosowanie metody mikromacierzy w diagnostyce prenatalnej [1]. Wymienia trzy podstawowe przypadki:

■ W przypadku stwierdzenia u płodu jednej (lub więcej) dużej wady rozwojowej i podjęciu decyzji o inwazyjnej diagnostyce pre-

### PODSUMOWANIE

Badanie metodą mikromacierzy udowodniło swoją wielką przydatność zarówno w diagnostyce prenatalnej, jak również w badaniu genetycznych przyczyn niepowodzeń rozrodu. W wielu krajach mikromacierze są badaniem pierwszego rzutu u dzieci z wadami, z opóźnieniem rozwoju czy autyzmem i obecnie coraz więcej ośrodków wprowadza mikromacierze do diagnostyki genetycznej również w ginekologii i położnictwie. Badanie z zastosowaniem mikromacierzy nie zostało jeszcze uwzględnione w koszyku świadczeń refundowanych przez NFZ, jednak jest to nieuchronnie kwestią czasu, ponieważ góruje ono nad dotychczasowymi metodami badania chromosomów.



### PROF. DR HAB. N. MED. ANNA LATOS-BIELEŃSKA

Katedra i Zakład Genetyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu; Centrum Genetyki Medycznej GENESIS w Poznaniu [www.genesis.pl](http://www.genesis.pl)