

UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU
KATEDRA I ZAKŁAD GENETYKI MEDYCZNEJ

Choroby genetyczne zarodka i płodu jako przyczyny niepowodzeń ciąży

Rozprawa doktorska

mgr inż. biotech. **Monika Zakrzewska**

Promotor: Prof. dr hab. med. Anna Latos-Bieleńska

Poznań, 2013

Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego promotorskiego pt. „Choroby genetyczne zarodka i płodu jako przyczyny niepowodzeń ciąży”, numer projektu 4138/B/P01/2009/36.

INFORMACJE DOTYCZĄCE DOROBKU NAUKOWEGO

Prace poglądowe:

- **Zakrzewska M**, Latos-Bieleńska A: Przesunięta inaktywacja chromosomu X u kobiet z idiopatycznymi poronieniami nawracającymi. *Przegląd Ginekologiczno-Położniczy* 2006, 4(6): 227-232.

Prace oryginalne:

- Kwinecka-Dmitriew B, **Zakrzewska M**, Latos-Bieleńska A, Skrzypczak J: Częstość występowania aberracji chromosomowych w materiale z poronień. *Ginekol Pol* 2010, 81: 896-901.
- Skrzypczak J, Kwinecka-Dmitriew B, **Zakrzewska M**, Latos-Bieleńska A: Czy i jak często aberracje chromosomowe zarodków powtarzają się w kolejnej ciąży? *Ginekol Pol* 2010, 81: 681-686.
- Latos-Bieleńska A, Materna-Kiryłuk A, Mejnartowicz J, Badura M, Wiśniewska K, **Zakrzewska M** i in.: „Polski Rejestr Wrodzonych Wad Rozwojowych w identyfikacji rzadkich chorób”. *Standardy Medyczne* 2005, 2 (5): 1889-1893.

Monografie:

- **Zakrzewska M**: Diagnostyka genetyczna. W: Nieznane? Poznane. Zaburzenia rozwojowe u dzieci z rzadkimi zespołami genetycznymi i wadami wrodzonymi. Red: Buchnat M, Pawelczak K. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, 2011.
- Latos-Bieleńska A, Materna-Kiryłuk A, Badura-Stronka M, Wiśniewska K, Borszewska-Kornacka MK, Bręborowicz G, Czerwionka-Szaflarska M, Gadzinowski J, Gajewska E, Godula-Stuglik U, Helwich E, Krawczyński M, Limon J, Mejnartowicz JP, Rusin J, Sawulicka-Oleszczuk H, Szczapa J, Szwałkiewicz-Warowicka E, Walczak M, Wysocki J ... **Zakrzewska M** i wsp. Wrodzone Wady Rozwojowe w Polsce w Latach 2005-2006. Dane z Polskiego Rejestru Wrodzonych Wad Rozwojowych. Red.: Latos-Bieleńska A, Materna-Kiryłuk A. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu 2010, Poznań.
- **Zakrzewska M**: Strony internetowe w praktyce klinicznej. W monografii „Wrodzone Wady Rozwojowe w Polsce w Latach 2003-2004. Dane z Polskiego Rejestru Wrodzonych Wad Rozwojowych”. Red.: Latos-Bieleńska A, Materna-Kiryłuk A. Ośrodek Wydawnictw Naukowych 2008, Poznań.
- Latos-Bieleńska A, Materna-Kiryłuk A, Mejnartowicz JP, Balcar-Boroń A, Bręborowicz G, Czerwionka-Szaflarska M, Gadzinowski J, Gajewska E, Godula-Stuglik U, Krawczyński M, Limon J, Rusin J, Sawulicka-Oleszczuk H, Szczapa J,

Szwałkiewicz-Warowicka E, Świetliński J, Walczak M, ... **Zakrzewska M** i wsp. Wrodzone Wady Rozwojowe w Polsce w Latach 2000-2002. Dane z Polskiego Rejestru Wrodzonych Wad Rozwojowych. Red.: Latos-Bieleńska A, Materna-Kiryłuk A. Ośrodek Wydawnictw Naukowych 2006, Poznań.

- Latos-Bieleńska A, Materna-Kiryłuk A, Mejnartowicz JP, Balcar-Boroń A, Borszewska-Kornacka MK, Bręborowicz G, Czerwionka-Szaflarska M, Gadzinowski J, Gajewska E, Godula-Stuglik U, Krawczyński M, Limon J, Rusin J, Sawulicka-Oleszczuk H, Stańczyk J, Szczapa J, Szwałkiewicz-Warowicka E, Świetliński J, Walczak M, ... **Zakrzewska M** i wsp. Wrodzone wady rozwojowe w Polsce w latach 1998-1999. Dane z Polskiego Rejestru Wrodzonych Wad Rozwojowych. (Red. A. Latos-Bieleńska, A. Materna-Kiryłuk). Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań, 2002.

Komunikaty streszczenia zjazdowe:

- **Zakrzewska M**, Skrzypczak J, Latos-Bieleńska A: Diagnostyka genetyczna niepowodzeń ciąży – identyfikacja aberracji chromosomowych u zarodka/płodu z zastosowaniem metod molekularnych QF-PCR, MLPA, FISH. Konferencja „Badania molekularne w położnictwie i ginekologii – możliwy element strategii klinicznej”, Poznań 08.04.2011 – **wyróżnienie pracy**.
- **Zakrzewska M**: Genetyczne przyczyny niepowodzeń ciąży. II Konferencja Naukowo-Szkoleniowa – Miejsce Genetyki Klinicznej we Współczesnej Medycynie. Poznań, 29.05.2010.
- Latos-Bieleńska A, Materna-Kiryłuk A, Mejnartowicz JP, Badura-Stronka M, Wiśniewska K, Więckowska B, Wiśniewska M, **Zakrzewska M**, Glazar R, and PCRM Working Group: Congenital Malformations in Children live born during 1998-2002 in Poland – data from The Polish Registry of Congenital Malformations (PRCM). 1st Central and Eastern European Summit on Preconception Health and Prevention of Birth Defects. Budapeszt, Węgry, 27-30.08.2008.
- Latos-Bieleńska A, Zając M, Skołodźy J, **Zakrzewska M**, Mayer M: Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH) w diagnostyce cytogenetycznej u par z niepowodzeniami rozrodu. II Forum Zdrowia Kobiety – kobieta w obliczu walki z patologią i chorobą, Kalisz, 24-25.11.2006
- Latos-Bieleńska A, Kwinecka B, Skołodźy J, **Zakrzewska M**, Skrzypczak J: Aberracje chromosomowe u zarodka jako przyczyna obumarcia wczesnej ciąży. „Zygota w okresie przedimplantacyjnym” - Konferencja Naukowa Sekcji Endokrynologii i Menopauzy oraz Sekcji Genetyki Klinicznej Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego, Karpacz, 30.09-03.10.2004.

- Czaczyk K., Olejnik A., **Zakrzewska M.**: Wpływ zewnętrznej warstwy białkowej na adhezję bakterii do powierzchni szkła. XXXIII Sesja Naukowa Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN „Nauka o Żywności: Osiągnięcia i Perspektywy”. Lublin, 10-11. 09.2002.

WYKAZ SKRÓTÓW

- **ADHD** – **ang.** *Attention Deficit Hyperactivity Disorder* - zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi
- **APS** – **ang.** *antiphospholipid syndrome* - zespół antyfosfolipidowy
- **array CGH** – **ang.** *comparative genome hybridization* - genomowa hybrydyzacja porównawcza do mikromacierzy
- **BAC** – **ang.** *bacterial artificial chromosome* – sztuczny chromosom bakteryjny
- **BMI** – **ang.** *body mass index* – wskaźnik masy ciała
- **CCD** – **ang.** *Charge Coupled Device* – układ elementów światłoczułych służących detekcji światła
- **CGH** – genomowa hybrydyzacja porównawcza
- **CI, CII, CIII, CIV, CV** – ciąża pierwsza, druga, trzecia, czwarta, piąta
- **Cot-1 DNA** – DNA bogaty w sekwencje repetytywne
- **DAPCO** - 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
- **DAPI** - 4',6-diamidyno-2-fenylindol
- **ESHRE** – **ang.** *European Society of Human Reproduction* – Europejskie Towarzystwo Reprodukcyjności Człowieka
- **FISH** – **ang.** *fluorescence in situ hybridization* - fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*
- **LH** – hormon luteinizujący
- **MLPA** – **ang.** *multiplex ligation-dependent probe amplification* – kompleksowa amplifikacja sond zależna od ligacji
- **NOR** – **ang.** *nucleolus organizer region* - organizator jąderkotwórczy
- **PCOS** – **ang.** *polycystic ovary syndrome* – zespół policystycznych jajników
- **PCR** – **ang.** *polymerase chain reaction* - reakcja łańcuchowa polimerazy
- **PTSD** – **ang.** *posttraumatic stress disorder* – zaburzenie stresowe pourazowe
- **QF-PCR** – **ang.** *quantitative fluorescent PCR* - ilościowa fluorescencyjna PCR
- **RM** – **ang.** *recurrent miscarriages*- poronienia nawracające
- **t.c.** – tydzień ciąży
- **WHO** – **ang.** *World Health Organization* - Światowa Organizacja Zdrowia
- **βHCG** – podjednostka beta gonadotropiny kosmówkowej

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	8
1.1 Niepowodzenia ciąży – definicja i klasyfikacja	8
1.2 Historia badań genetycznych w niepowodzeniach ciąży	9
1.3 Etiologia niepowodzeń ciąży	14
1.3.1 Genetyczne przyczyny niepowodzeń ciąży.....	17
1.4 Diagnostyka genetyczna niepowodzeń ciąży.....	24
1.4.1 Wywiad rodzinny i analiza rodowodu	24
1.4.2 Badania cytogenetyczne.....	25
1.4.3 Badania molekularne.....	25
1.4.4 Poradnictwo genetyczne w niepowodzeniach ciąży	26
1.4.5 Aspekty psychologiczne utraty ciąży.....	27
1.5 Techniki genetyczne stosowane w diagnostyce niepowodzeń ciąży	28
1.5.1 Analiza kariotypu	28
1.5.2 Interfazowa fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> (FISH).....	29
1.5.3 Porównawcza hybrydyzacja genomowa (CGH)	30
1.5.4 Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy – array CGH.....	32
1.5.5 Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) oraz jej odmiany	33
2. CELE PRACY	38
3. PACJENCI, MATERIAŁY I METODY	39
3.1. Pacjenci	39
3.2. Materiał biologiczny	39
3.3. Odczynniki	40
3.4. Roztwory i podłoża	41
3.5. Metody	43
3.5.1. Uzyskiwanie chromosomów metafazowych do analizy kariotypu	43
3.5.2. FISH.....	44
3.5.3. Izolacja DNA	49
3.5.4. MLPA.....	51
3.5.5. QF-PCR.....	58
3.5.6. Array CGH.....	61
4. WYNIKI	63
4.1. Choroby genetyczne zarodka/płodu zidentyfikowane w materiale z poronień.....	63
4.1.1. Wyniki badania kariotypu par z niepowodzeniami ciąży	66
4.2. Wyniki badań materiału z poronienia metodą FISH.....	67

4.3.	Wyniki badań materiału z poronienia metodą QF-PCR.....	71
4.4.	Wyniki badań materiału z poronienia metodą MLPA	77
4.4.1.	MLPA P095	77
4.4.2.	MLPA P036 i P070	91
4.4.3.	Wyniki MLPA P245	101
4.5.	Wyniki badań materiału z poronienia u nosicieli translokacji wzajemnych zrównoważonych	103
4.5.1.	Nosicielka dodatkowego chromosomu markerowego	115
4.6.	Aberracje chromosomów płci u pacjentek i w materiale z poronienia	118
4.7.	Wyniki badań materiału z poronienia metodą array CGH	121
5.	DYSKUSJA.....	127
5.1.	Ocena zastosowanych badań molekularnych u par z niepowodzeniami ciąży	127
5.2.	Analiza aberracji chromosomowych zidentyfikowanych w badanym materiale z poronienia.....	130
5.3.	Aberracje strukturalne u par z niepowodzeniami ciąży i w materiale z poronienia..	133
5.4.	Aberracje chromosomów płci u par i w materiale z poronienia.....	135
5.5.	Analiza zastosowanych metod FISH, QF-PCR i MLPA P095	137
5.6.	Analiza regionów subtelomerowych i regionów związanych z zespołami mikrodelecji/mikroduplikacji.....	146
5.7.	Analiza badania materiału z poronienia przeprowadzona metodą array CGH	149
5.8.	Mozaikowość	154
5.9.	Podsumowanie	156
6.	WNIOSKI	159
7.	STRESZCZENIE	160
8.	SUMMARY	163
9.	SPIS TABEL I RYCIN	166
10.	PIŚMIENNICTWO.....	169

1. WSTĘP

Prokreacja człowieka jest procesem zarówno skomplikowanym, jak i w porównaniu do innych gatunków, mało efektywnym. Maksymalne prawdopodobieństwo zapłodnienia przy każdym cyklu owulacyjnym wynosi nie więcej niż 40%, a co najmniej jedna trzecia zapłodnionych oocytów nie będzie się dalej rozwijać i nie przyniesie parze upragnionego potomstwa (Wang i wsp., 2003; Kavalier, 2005). Wydaje się więc, że niepowodzenia ciąży to zjawisko dość częste, dotyczące wszystkich grup etnicznych, będące skutkiem samej natury prokreacji, która jest wynikiem wielu połączonych i wzajemnie oddziałujących ze sobą procesów. Niemniej dla lekarza niepowodzenia ciąży to także poważny problem diagnostyczny i leczniczy a dla kobiety, która doświadczyła niepowodzenia oraz dla jej partnera niejednokrotnie źródło ogromnego stresu i problemów psychologicznych.

1.1 Niepowodzenia ciąży – definicja i klasyfikacja

Trudno ustalić dokładną skalę problemu niepowodzeń ciąży, ze względu na to, że oficjalne statystyki dotyczące niepowodzeń ciąży opierają się głównie na danych pochodzących z jednostek służby zdrowia a nie biorą pod uwagę niezarejestrowanych niepowodzeń ciąży, do których dochodzi poza szpitalem. Najczęściej uważa się, że co najmniej 10-15%, a nawet 15-20% ciąż kończy się niepowodzeniem (Goddijn, Leschot, 2000; Farquharson i wsp., 2005). Jeśli wziąć pod uwagę utratę bardzo wczesnych ciąż, które nie są rozpoznawane klinicznie, odsetek ten może wynosić ponad 30% (Exalto i wsp., 2007). W większości przypadków do niepowodzenia ciąży dochodzi przed 12 tygodniem jej trwania, najczęściej jeszcze przed stwierdzeniem czynności serca płodu (Farquharson i wsp., 2005). Do utraty ciąży w drugim trymestrze, między 12 a 24 tygodniem dochodzi znacznie rzadziej, nie więcej niż 4% ciąż kończy się niepowodzeniem w tym okresie (Exalto i wsp., 2007).

Okolo 1-2% kobiet doświadcza poronień nawracających, czyli przynajmniej trzech kolejno po sobie występujących poronień, kiedy do zakończenia ciąży doszło przed 20 tygodniem (Farquharson i wsp., 2005, Exalto i wsp., 2007). W przypadku wielokrotnych niepowodzeń ciąży możemy mówić zarówno o nawracających poronieniach jak i nawracającej utracie ciąży. W tym drugim przypadku za nawracającą utratę ciąży uznajemy także niepowodzenia ciąży do 28. tygodnia (Skrzypczak, 2011).

Zwyczajowo, niepowodzenia ciąży dzieli się na poronienia samoistne i martwe porody. Według WHO poronieniem nazywamy utratę płodu o masie 500 g lub niższej (Goddijn, Leschot, 2000). Płód uzyskuje taką masę ciała około 20-22. tygodnia trwania ciąży, stąd kryterium czasowe zakłada, że poronieniem nazywamy utratę płodu poniżej 20. tygodnia (Skrzypczak, 2010). Utrata ciąży powyżej tego tygodnia określana jest jako poród martwy. Taki podział, uwzględniający możliwość przeżycia płodu poza łonem matki, nie odzwierciedla jednak natury samego niepowodzenia. Z punktu widzenia osiągnięć z dziedziny embriologii i biologii rozwoju, potrzebna jest nowa klasyfikacja uwzględniająca stopień rozwoju oraz etiologię niepowodzenia.

Zaproponowana przez ESHRE klasyfikacja dzieli niepowodzenia ciąży na trzy grupy: biochemiczną utratę ciąży, wczesną utratę ciąży, oraz późną utratę ciąży (Farquharson i wsp., 2005; Exalto i wsp., 2007). W pierwszym przypadku do utraty ciąży dochodzi poniżej 6. tygodnia jej trwania (Farquharson i wsp., 2005; Exalto i wsp., 2007). To bardzo wczesne niepowodzenie, które najczęściej nie jest rozpoznawane klinicznie, ciąża jest niewidoczna w obrazie ultrasonograficznym a jedynym dowodem na zapłodnienie jest obecność β -HCG. W tym okresie niepowodzenia wiążą się głównie z nieudanym procesem implantacji blastocysty (30%) lub obumarciem krótko po implantacji (30%) (Exalto i wsp., 2007). Między 6 a 12 tygodniem ciąży dochodzi do wczesnej utraty ciąży, przy czym w tym okresie ciąża jest już widoczna w obrazie ultrasonograficznym, a poziom β -HCG początkowo rośnie, a potem spada (Farquharson i wsp., 2005). Często brak też czynności serca płodu. Późna utrata ciąży to niepowodzenie, do którego dochodzi powyżej 12. tygodnia jej trwania, przy początkowym wzroście β -HCG, aktywności serca i widocznych strukturach płodu w obrazie ultrasonograficznym (Farquharson i wsp., 2005).

Zaproponowana klasyfikacja może przyczynić się do zmiany podejścia do diagnostyki i leczenia niepowodzeń rozrodu w odniesieniu do czasu niepowodzenia i najczęstszej potencjalnej przyczyny tego okresu.

1.2 Historia badań genetycznych w niepowodzeniach ciąży

Początki badań genetycznych w niepowodzeniach ciąży sięgają drugiej połowy dwudziestego wieku, tuż po fundamentalnych odkryciach z dziedziny genetyki, takich jak odkrycie struktury kwasu deoksyrybonukleinowego przez Jamesa Watsona i Francisca Cricka w roku 1953 oraz ustaleniu prawidłowej liczby chromosomów w jądrze

komórkowym człowieka w 1956 przez Joe Hin Tjio i Johana Alberta Levana (Lawce, Brown, 1997).

Rozwój badań genetycznych w niepowodzeniach ciąży ma ścisły związek z rozwojem dwóch dyscyplin naukowych - embriologii i genetyki. Odkrycia w dziedzinie embriologii umożliwiły wyodrębnienie struktur, które mimo iż nie są integralną częścią rozwijającego się zarodka/płodu, mają taki sam materiał genetyczny. Z drugiej strony rozwój genetyki, szczególnie w drugiej połowie dwudziestego wieku, doprowadził nie tylko do najistotniejszych odkryć, takich jak odkrycie struktury DNA, ale także zapoczątkował rozwój technik diagnostycznych, umożliwiających ocenę materiału genetycznego.

Szczególne znaczenie dla badań dotyczących genetycznych przyczyn niepowodzeń ciąży, miał rozwój cytogenetyki. Najwcześniejsze obserwacje chromosomów w materiale roślinnym i zwierzęcym pochodzą odpowiednio z badań Edwarda Strasburgera (1875) i Walthera Fleminga (1879-1889) (Lawce, Brown, 1997). Prawdziwym wyzwaniem naukowym było jednak nie odkrycie samych chromosomów, ale określenie ich prawidłowej liczby. W 1923 roku Theophilus Painter stwierdził, że prawidłowa liczba chromosomów u człowieka wynosi 48 (wg Lawce, Brown, 1997). Liczba ta była uznawana za prawdziwą przez trzy kolejne dekady, do 1956 roku, kiedy to dwóch naukowców – Indonezyjczyk Joe Hin Tjio i Szwed Johan Albert Levan odkryli, że prawidłowa liczba chromosomów w jądrze komórkowym człowieka wynosi 46 (wg Lawce, Brown, 1997).

Należy zaznaczyć, że odkrycie to nie byłoby możliwe bez udoskonalenia technik badawczych chromosomów. Takie odkrycia, jak: zastosowanie kolchicyny do zatrzymania podziałów komórkowych w stadium metafazy (1937), wynalezienie mikroskopu kontrastowo-fazowego (1941) oraz zastosowanie roztworu hipotonicznego w celu rozproszenia chromosomów metafazowych (1952), umożliwiły dokładną analizę chromosomów w jądrze komórkowym, a tym samym ustalenie ich prawidłowej liczby (Lawce, Brown, 1997).

Określenie prawidłowej liczby chromosomów u człowieka stało się odkryciem przełomowym i zapoczątkowało rozwój genetyki medycznej. Przede wszystkim umożliwiło identyfikację zmian najpierw w zakresie liczby chromosomów a w późniejszym czasie, wraz z rozwojem technik barwienia chromosomów i uzyskiwania wzorów prążkowych, także zmian strukturalnych chromosomów.

Prawdopodobnie pierwszy mikroskopowy obraz łożyska pochodzi z obserwacji Ernsta Heinricha Webera z 1832 roku (wg Pijnenborg, Vercruyssen, 2008). Weber zaobserwował nabłonkową wyściółkę, w późniejszym czasie prawidłowo rozpoznaną, jako warstwę komórek doczesnej podstawnej, oddzielającą kosmki płodowe od krwi matczynej. W 1889 roku holenderski embriolog Ambrosius Hubrecht wprowadził nazwę „trofoblast” dla określenia części epiblastu blastocysty, pochodzenia płodowego, która bierze udział we wczesnym odżywianiu zarodka, podkreślając jednocześnie znaczenie trofoblastu w pierwszych tygodniach ciąży (Pijnenborg, Vercruyssen, 2008).

W latach pięćdziesiątych dwudziestego wieku przyczyn niepowodzeń ciąży szukano przede wszystkim w nieprawidłowej budowie łożyska oraz nieprawidłowej morfologii zarodka/płodu. Również traumatyczne doświadczenia wpływające na stan emocjonalny kobiet w ciąży uważano za częstą przyczynę poronień. Sugerowano także pozytywny wpływ witaminy E w profilaktyce niepowodzeń ciąży (szczególnie nawracających) (Hertig, Sheldon, 1943; Shute, 1960). Poważnym problemem w tamtym czasie była też wysoka śmiertelność wśród kobiet doświadczających niepowodzeń ciąży – nawet 10-15% kobiet, które poroniły, umierało (Randall, Birtch, 1952).

Doświadczenia w identyfikowaniu zespołów aberracji chromosomowych, które odpowiadają za poważne konsekwencje kliniczne i niejednokrotnie są przyczyną zgonów okołoporodowych płodów i noworodków, spowodowały, że zaczęto wiązać zmiany w liczbie i strukturze chromosomów z niepowodzeniami ciąży, w tym z poronieniami samoistnymi i martwymi porodami.

Pierwsze prace wiążące niepowodzenia ciąży z występowaniem aberracji chromosomowych pojawiły się już na początku lat sześćdziesiątych dwudziestego wieku, a więc tuż po pierwszych istotnych odkryciach w dziedzinie cytogenetyki klinicznej, ale jeszcze przed narodzinami diagnostyki prenatalnej. Są to, między innymi, takie prace, jak: „A familial chromosome abnormalities associated with repeated abortion” (1962), „A genetical and cytological study of repeated spontaneous abortion” (1963), czy „Translocation in the 13-15 group as a cause of partial trisomy and spontaneous abortion in the same family” (1963) (Schmid, 1962; Rowley, Marshall, Ellis, 1963; Jacobsen, Dupont i Mikkelsen, 1963).

W następnych latach wraz z postępem w zakresie technik cytogenetycznych oraz prowadzeniem wieloletnich badań nad genetycznymi przyczynami niepowodzeń ciąży,

a w szczególności poronieniami samoistnymi okazało się, że aberracje chromosomowe stanowią istotną przyczynę występowania niepowodzeń (Carr, 1971).

Lata siedemdziesiąte to okres dynamicznego rozwoju technik prążkowania chromosomów. W 1970 Caspersson opisuje technikę prążkowania Q, w 1971 Sumner i wsp. opisują technikę prążkowania G, a Dutrillaux i Lejeune opisują metodę prążkową R (wg Lawce, Brown, 1997). W 1975 Goodpasture i Bloom wprowadzają metodę srebrzenia organizatorów jąderka NOR (wg Lawce, Brown, 1997). Techniki prążkowe zdecydowanie usprawniły diagnostykę cytogenetyczną, pozwalając na wnikliwą analizę chromosomów, szczególnie zmian strukturalnych. W niepowodzeniach ciąży nieprawidłowości strukturalne – zrównoważone translokacje i inwersje u rodziców, często stanowią przyczynę niepowodzeń. Nosicielstwo zrównoważonej aberracji strukturalnej identyfikuje się u około 4-5% par z niepowodzeniami ciąży (Simpson, 2007).

W 1969 Joseph G. Gall i Mary Lou Pardue po raz pierwszy opisali technikę hybrydyzacji (renaturacji) *in situ*, wykorzystując jako sondę zarówno fragmenty RNA, jak i DNA znakowane radioaktywnie (Gall, Pardue, 1969; Pardue, Gall, 1969). Wykorzystanie fragmentów DNA komplementarnych do określonej sekwencji chromosomu, które mają zdolność tworzenia stabilnych dupleksów w preparacie cytologicznym, uzyskanym w rutynowej hodowli, otworzyło nowy dział cytogenetyki, tak zwaną cytogenetykę molekularną, dając tym samym początek rozwojowi metod z pogranicza biologii molekularnej i cytogenetyki. Jednak dopiero lata osiemdziesiąte przyniosły dynamiczny rozwój tej nowej dziedziny cytogenetyki. W 1981 roku Pennina R. Langer i współpracownicy opisała po raz pierwszy sondy znakowane biotyną, a w 1982 roku ukazała się praca dotycząca wykorzystania sond znakowanych bezpośrednio znacznikiem fluorescencyjnym w hybrydyzacji do chromosomów metafazowych (Langer, Waldrop, Ward, 1981; Van Prooijen-Knegt i wsp., 1982). Wykorzystanie sond znakowanych fluorescencyjnie pozwoliło na opracowanie techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, w skrócie FISH. Technika FISH stała się pomostem łączącym sekwencje na poziomie molekularnym z jednoczesną możliwością ich identyfikacji w preparacie chromosomowym. Technika ta okazała się równie ważna ze względu na to, że umożliwiała badanie materiału genetycznego także w jądrach interfazowych bez konieczności uzyskiwania chromosomów metafazowych (FISH interfazowa). Nowa technika pozwoliła na uzyskanie wielu istotnych informacji dotyczących

chromosomów, których nie dałoby się uzyskać techniką cytogenetyki klasycznej. Różne rodzaje sond: malujące, czyli pokrywające cały chromosom, okołocentromerowe (alfa-satelitarne) oraz sondy specyficzne dla określonych sekwencji DNA, pozwoliły na identyfikację zmian różnego typu, od prostych zmian liczbowych typu trisomia, czy triploidia, po rearanżacje chromosomowe, jak na przykład translokacje złożone, chromosomy markerowe, mikrodelecje lub mikroduplikacje. Metoda ta znalazła zastosowanie nie tylko w diagnostyce, lecz także w badaniach naukowych, szczególnie w poszukiwaniach genów i przy tworzeniu map fizycznych chromosomów. W badaniach niepowodzeń ciąży technika FISH znalazła zastosowanie w latach dziewięćdziesiątych. Okazała się metodą szybką, często niewymagającą hodowli komórkowych a wykorzystującą jedynie jądra interfazowe.

W 1992 roku Anna i Ollie Kallioniemi wraz ze współpracownikami po raz pierwszy opisali technikę porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH), która także wykorzystuje zjawisko hybrydyzacji pomiędzy cząsteczkami DNA (Kallioniemi i wsp., 1992). Metoda polega na jednoczesnej hybrydyzacji wyznakowanego fluorescencyjnie DNA prawidłowego (referencyjnego) i DNA pacjenta do prawidłowych chromosomów metafazowych na szkiełku podstawowym. Pierwsze prace dotyczące badań kosmówki techniką genomowej hybrydyzacji porównawczej pojawiły się już w pierwszej połowie lat dziewięćdziesiątych, a więc tuż po jej pierwszym zastosowaniu (Bryndorf i wsp., 1995).

Intensywny rozwój technik molekularnych spowodował, że w następnym dziesięcioleciu metoda CGH została udoskonalona, co przede wszystkim zwiększyło jej rozdzielczość poprzez zastosowanie do hybrydyzacji klonów typu BAC, czyli tak zwanych sztucznych chromosomów bakteryjnych. Pierwsza praca dotycząca metody array CGH w niepowodzeniach ciąży ukazała się w 2004 roku i wykazała, że klasyczna metoda analizy chromosomów nie pozwala na identyfikację wszystkich zmian w materiale genetycznym (Schaeffer, 2004). Inne prace badawcze wykorzystujące tę technikę również udowodniły, że tą metodą można zidentyfikować więcej zmian, niż się spodziewano (Benkhalifa i wsp., 2005).

Z uwagi na wysoki udział aberracji liczbowych w etiologii niepowodzeń ciąży, już w latach dziewięćdziesiątych zaczęto wykorzystywać metody molekularne, oparte głównie na technice ilościowej PCR do identyfikacji najczęstszych zmian liczbowych chromosomów. W badaniach niepowodzeń ciąży wykorzystuje się takie metody

molekularne, jak na przykład: QF-PCR, Real Time PCR oraz MLPA. Ze względu na możliwość automatyzacji badań, a co za tym idzie jednoczesnej analizy wielu prób, znalazły one zastosowanie do szybkiej identyfikacji najczęstszych aberracji chromosomowych.

W ostatniej dekadzie dużo uwagi poświęcono mutacjom genowym oraz polimorfizmom genetycznym, które mogą mieć związek z występowaniem niepowodzeń ciąży. Geny cząstek sygnałowych (cytokin), czynników krzepnięcia, hormonów oraz geny kodujące białka związane z procesami odpowiedzi immunologicznej lub detoksyfikacji brano pod uwagę jako mogące mieć związek z utratą ciąży. Analizowano geny kodujące interleuliny: IL-1, IL-4, IL-6, IL-10 a także geny kodujące IFN-gamma, TNF, KIR, protrombinę, czynnik V Leiden, czynnik XII i XIII, białko C, MTHFR i inne (Suzumori, Sugiera-Ogasawara, 2010, Daher i wsp., 2012).

1.3 Etiologia niepowodzeń ciąży

Różnorodność czynników genetycznych, epigenetycznych i środowiskowych, które mogą wpływać na proces reprodukcji – od powstawania gamet aż do narodzin – sprawia trudności w diagnozowaniu przyczyn niepowodzeń ciąży. Pary, które doświadczają niepowodzeń, szczególnie tych nawracających, muszą być przygotowane na wieloetapowy proces diagnostyczny, który nie zawsze pozwoli na uzyskanie jednoznacznej odpowiedzi, co jest przyczyną problemów.

Do najczęściej wymienianych czynników mogących przyczyniać się do niepowodzeń ciąży należą: wady anatomiczne macicy, zaburzenia endokrynologiczne, choroby autoimmunologiczne, choroby metaboliczne, zakażenia, choroby genetyczne i zaburzenia wieloczynnikowe.

Wady anatomiczne macicy mogą zwiększać ryzyko utraty ciąży w pierwszym i drugim trymestrze, komplikować przebieg ciąży oraz przyczyniać się do przedwczesnego porodu. Najczęściej spotykanymi wadami są: macica dwurożna, macica podwójna oraz macica z przegrodą (Toth i wsp., 2010). Występowanie macicy z przegrodą zwiększa ryzyko niepowodzeń pierwszego trymestru ciąży, podczas, gdy macica siodełkowata zwiększa ryzyko niepowodzeń w drugim trymestrze oraz zwiększa ryzyko porodu przedwczesnego (Woelfer i wsp., 2001). Uważa się także, że macica dwurożna nie wiąże się z niepowodzeniami pierwszego trymestru ciąży (Quenby, 2002). Wśród par z poronieniami nawracającymi wady anatomiczne macicy u kobiety

identyfikowane są w 10-15% przypadków (Berghella, 2007). Mimo, iż nie ma istotnych statystycznie różnic pomiędzy częstością występowania wad macicy pomiędzy kobietami z poronieniami nawracającymi a grupą kontrolną, to u kobiet z poronieniami nawracającymi zaobserwowano znacznie mniejszą jamę macicy oraz jej większe zniekształcenie (Toth i wsp., 2010)

Wczesne badania epidemiologiczne sugerowały związek niepowodzeń ciąży z niedoczynnością tarczycy i cukrzycą wieku dorosłego. Obecnie uważa się, że nie zwiększają one ryzyka niepowodzeń ciąży, pod warunkiem, że pacjentki pozostają pod opieką lekarską, poziom glukozy u pacjentek z cukrzycą jest stale kontrolowany a niedoczynność tarczycy leczona (Jauniaux i wsp., 2006).

Natomiast otyłość kobiety zwiększa ryzyko niepowodzeń pierwszego trymestru (Lashen, Fear i Sturdee, 2004). Otyłość ma duży wpływ na prawidłowe funkcjonowanie organizmu kobiety, mogąc się przyczyniać zarówno do problemów z zajściem w ciążę jak i do jej utrzymania (Exalto i wsp., 2007).

Do zaburzeń hormonalnych, które mogą się wiązać się z niepowodzeniami ciąży, ale ich wpływ jest niejednoznaczny należą: zespół policystycznych jajników, nadmierne wydzielanie LH, hiperprolaktynemia, wysoki poziom androgenów oraz niewydolność lutealna ciała żółtego (Christiansen, 1996; Li i wsp., 2002; Jauniaux i wsp., 2006).

Kluczowym procesem dla pomyślnego rozwoju ciąży jest proces implantacji. Matczyna odpowiedź immunologiczna podczas implantacji blastocysty może odgrywać rolę we wczesnych niepowodzeniach ciąży. Agresywna odpowiedź immunologiczna przeciwko antygenom trofoblastu, związana z nieprawidłową ilością uwalnianych komórek odpowiedzi immunologicznej oraz cytokin, uważana jest za prawdopodobną przyczynę wczesnych niepowodzeń ciąży (Exalto i wsp., 2006; Toth i wsp., 2010). Stosowanie terapii immunologicznych, polegających na wstrzyknięciu leukocytów partnera lub infuzji immunoglobulin w celu przełamania bariery immunologicznej jest kontrowersyjne i jak dotąd nie odnotowano znaczących efektów takiego działania (Exalto i wsp., 2007; Toth i wsp., 2010).

Zespół antyfosfolipidowy (APS) to znana przyczyna niepowodzeń ciąży (Toth i wsp., 2010, Skrzypczak, 2011). Występowanie przeciwciał skierowanych przeciwko fosfolipidom, takim jak: kardiolipiny, fosfatydyloseryna, koagulant toczniowy oraz β 2-glikoproteidom związane jest z ryzykiem zakrzepicy zatorowej tętniczej i żyłnej (Lim,

2009). W przypadku pacjentów z APS do utraty ciąży dochodzi z powodu przyłączania się przeciwciał antyfosfolipidowych do komórek trofoblastycznych, a co za tym idzie do nieprawidłowego formowania się łożyska (Di Simone i wsp., 2007). Także powikłania zakrzepowo-zatorowe mogą utrudniać krążenie łożyskowe (Di Simone i wsp., 2007).

Wrodzona trombofilia matczyzna może także zwiększać ryzyko zatorowej zakrzepicy żyłnej. Trombofilia wrodzona występuje u 15% populacji kaukaskiej, a 5% to heterozygotyczni nosiciele mutacji w genie czynnika V Leiden (Fogerty, Connors, 2009). Oprócz czynnika V Leiden, także mutacje w genie protrombiny, wrodzone niedobory białka C i S oraz wrodzony niedobór antytrombiny III, polimorfizmy w genie MTHFR oraz inhibitora aktywatora plazminogenu typu I wiąże się z trombofilią wrodzoną (Bates, 2010). Dotychczas prowadzone badania nie potwierdzają zwiększonego ryzyka wczesnej utraty ciąży a częstość występowania zakrzepicy żyłnej w trakcie trwania ciąży jest niska (Fogerty, Connors, 2009).

Niepowodzenia ciąży może także zwiększać wysoki poziom homocysteiny (hiperhomocysteinemia) (Garcia-Enguidanos i wsp., 2002; Exalto i wsp., 2007). Także celiakia, choroba polegająca na nietolerancji glutenu pochodzącego z produktów spożywczych, może wpływać na niepowodzenia ciąży (Garcia-Enguidanos i wsp., 2002; Soni i Badawy, 2010).

Zakażenia bakteryjne, wirusowe oraz interakcje pasożytnicze mogą być również przyczyną powikłań ciążowych. Zakażenia bakteryjne pochwy mogą wiązać się z niepowodzeniami drugiego trymestru ciąży, ale nie znaleziono jednoznacznych powiązań między zakażeniami a poronieniami nawracającymi (Quenby, 2002; Exalto, 2007). Okazuje się, że występowanie niezdiagnozowanych zakażeń o bardzo łagodnym podklinicznym przebiegu może uwalniać mediatory reakcji zapalnych i mieć niszczący wpływ na rozwijający się zarodek/plód (Bansal i wsp., 2011)

Wiele uwagi poświęcono także czynnikom środowiskowym mogącym wpływać na występowanie niepowodzeń ciąży. Potwierdzony został wpływ promieniowania jonizującego, rozpuszczalników organicznych, rtęci i alkoholu na utratę ciąży (Gardella, Hill, 2000). Badany jest także wpływ kofeiny, narkotyków (szczególnie marihuany i kokainy), palenia papierosów oraz hipertermii na utratę ciąży (Garcia-Enguidanos i wsp., 2002).

1.3.1 Genetyczne przyczyny niepowodzeń ciąży

Czynniki genetyczne należą do najczęstszych przyczyn niepowodzeń ciąży. Największą grupę stanowią aberracje chromosomowe, które identyfikuje się w około 50% przypadków utraty ciąży w pierwszym trymestrze (Simpson, 2007). Poza aberracjami chromosomowymi przyczyną niepowodzenia mogą być także choroby jednogenowe zarodka/płodu, disomia jednorodzielska oraz szeroko dyskutowane w piśmiennictwie polimorfizmy i mutacje w genach, związane z różnymi procesami zachodzącymi w komórkach, takimi jak na przykład: immunosupresja, apoptoza, angiogeneza, czy przekazywanie sygnałów w komórce.

Czynniki genetyczne, które mogą prowadzić do niepowodzenia ciąży można podzielić na dwie grupy: te, które występują *de novo* u zarodka/płodu, powodując utratę ciąży oraz takie, które są wynikiem nieprawidłowości w materiale genetycznym rodzica.

Aberracje liczbowe i strukturalne chromosomów

Ocenia się, że od około 50% niepowodzeń pierwszego trymestru ciąży związanych jest z aberracjami chromosomowymi występującymi u rozwijającego się zarodka/płodu (Goddijn, Leschot, 2000; Simpson, 2007). Wśród nich największą grupę stanowią aberracje liczbowe chromosomów, głównie trisomie chromosomów autosomalnych, monosomia chromosomu X oraz poliploidie.

Trisomie chromosomów autosomalnych u zarodka/płodu stanowią co najmniej 50% aberracji liczbowych odpowiedzialnych za utratę ciąży (Goddijn, Leschot, 2000; Simpson, 2007). Zaobserwowano trisomię każdego chromosomu autosomalnego, ale nie wszystkie występują z jednakową częstością. Najczęstszą jest trisomia chromosomu 16, a następnie trisomia chromosomu 22 (Simpson, 2007). Do równie często występujących należą również trisomie chromosomów: 13, 15, 18, 21 (Simpson, 2007). Rzadko spotykane są trisomie chromosomów: 5, 11, 17 i 19 (Kalousek, Lau, 1992). Trisomia chromosomów 1 jest niezwykle rzadko spotykana, najczęściej diagnozowana na etapie przedembrionalnym (blastomerów), rzadko w klinicznie rozpoznawalnej ciąży (Banzai i wsp., 2004). Płody z trisomiami, których nigdy nie obserwuje się u dzieci żywo urodzonych, wznastają wolnej, często wykazując większe wewnątrzmaciczne opóźnienie wzrastania (Ljunger i wsp., 2011). Również wiek ciążowy, w którym dochodzi do obumarcia ciąży, jest często niższy.

W przypadku większości trisomii obserwuje się efekt *wieku matki*. Trisomie są spowodowane nondysjunkcją pierwszego lub drugiego (rzadziej) podziału mejotycznego, a także w przypadkach mozaiki – w trakcie podziału mitotycznego już po zapłodnieniu. Zjawisko nondysjunkcji obserwuje się zdecydowanie częściej podczas oogenezy niż spermatogenezy. Ryzyko nondysjunkcji wzrasta wraz z wiekiem matki, początkowo powoli po ukończeniu 29. roku życia, następnie znacznie szybciej po 35 roku życia (Pellestor, Anahory, Hamamah, 2005). Zaawansowany wiek matki nie jest jedyną przyczyną występowania nondysjunkcji, bowiem ryzyko to zwiększa się także wraz ze zmniejszającą się częstością rekombinacji pomiędzy chromosomami lub jej całkowitym brakiem. Sam mechanizm nondysjunkcji też wydaje się być różny dla różnych chromosomów. Dla przykładu trisomia chromosomu 16 zawsze związana jest z nondysjunkcją pierwszego podziału mejotycznego i z wiekiem matki (ESHRE, 2008). Trisomia 13 może być wynikiem nondysjunkcji w pierwszym lub drugim podziale mejotycznym, za to trisomia 18 jest spowodowana nondysjunkcją drugiego podziału mejotycznego (ESHRE, 2008). Trisomia 21 może być wynikiem nierozdzielczości mejotycznej zarówno pierwszego, jak i drugiego podziału (ESHRE, 2008). Zjawisko nondysjunkcji obserwuje się także w przypadku mejozy ojcowskiej, najczęściej dotyczy ona chromosomów z grupy akrocentryków oraz chromosomu 2. Dotyczy ona jednak nie więcej niż 10% przypadków trisomii wyżej wymienionych chromosomów (ESHRE, 2008).

Obserwuje się także występowanie podwójnych trisomii (0,7%), najczęściej chromosomów 21, 18, 16, 13, 8, 2 i 15 oraz chromosomu X (Simpson, 2007). Do utraty ciąży dochodzi najczęściej między 8 a 9 tygodniem jej trwania, a średnia wieku matki to najczęściej 39 lat (Diego-Alvarez i wsp., 2006).

Trisomie chromosomów płci – X i Y u zarodka/płodu są związane z dużo większą szansą na utrzymanie ciąży, niż w przypadku trisomii chromosomów autosomalnych, choć ich występowanie w przypadku niepowodzeń ciąży jest częstsze (10%) niż w przypadku dzieci żywo urodzonych (Simpson, 2007). W przypadku kariotypu 47,XXY u zarodka ocenia się, że szanse na urodzenie dziecka wynoszą 50% (Egozcue, 2000). Trisomia chromosomu X (47,XXX), podobnie jak dodatkowy chromosom Y w kariotypie płodu (47,XYY) wiążą się z wysokim odsetkiem (około 99%) ciąż zakończonych w terminie (Egozcue, 2000; Tartaglia i wsp., 2010).

Wynikiem nondysjunkcji jest powstawanie gamet nie tylko disomicznych, ale także nullisomicznych, co może prowadzić do występowania monosomii. Monosomie chromosomów autosomalnych rzadko są identyfikowane w badaniach materiału z poronienia, ze względu na to, że najczęściej do utraty ciąży dochodzi we wczesnym etapie rozwoju, w okresie okołoinplantacyjnym. Monosomie autosomalne są przyczyną bardzo wczesnej utraty ciąży, najczęściej nierozpoznanej klinicznie.

Zupełnie odmienny mechanizm dotyczy jednak monosomii chromosomu X, która jest jedną z najczęstszych chromosomowych przyczyn niepowodzeń ciąży (15-20%) (Simpson, 2007; Templado, Vidal, Estop, 2011). Monosomia X jest w 80% przypadków wynikiem błędów spermatogenezy, a więc ma charakter ojcowski, a zaawansowany wiek kobiety nie ma wpływu na występowanie monosomii X (Tobias, Connor, Ferguson-Smith, 2011). Brak chromosomu płci w gamecie męskiej jest wynikiem opóźnionego ruchu chromosomu Y w anafazie, a najnowsze obserwacje sugerują związek tego opóźnienia z pełną delecją regionu AZFc w długim ramieniu chromosomu Y (O'Flynn-O'Brien, Varghese, Agarwal 2010).

Obok zmian o charakterze aneuploidii, znaczący udział w niepowodzeniach ciąży mają także poliploidie u zarodka/płodu (10-20%) (Godijn, Leschot, 2000, Simpson 2007). Często spotykaną poliploidią jest triploidia, najczęściej 69,XXY lub 69,XXX, rzadziej 69,XYY (Simpson, 2007). Triploidia może być wynikiem dispermii lub dygynii (diploidalnej gamety żeńskiej). Dodatkowy haploidalny zestaw chromosomów, pochodzący od ojca, związany jest z nieproporcjonalnie dużym łożyskiem oraz zaśnadem groniastym kosmówki (Jauniaux, Burton; 2005). Jeśli natomiast dodatkowy zestaw chromosomów pochodzi od matki, obserwuje się wewnątrzmaciczne opóźnienie wzrastania oraz dysproporcje ciała (dużą głowę w stosunku do tułowia). Często triploidii towarzyszą wady cewy nerwowej oraz przepuklina sznura pępowinowego i wady kończyn (McFadden, Robinson, 2006).

Tetraploidia, czyli występowanie kariotypu 92,XXXX lub 92,XXYY, rzadko jest identyfikowana w badaniach niepowodzeń ciąży, ze względu na to, iż do utraty ciąży dochodzi najczęściej między drugim a trzecim tygodniem jej trwania. Jej występowanie jest związane najprawdopodobniej z błędami cytokinezy pierwszego podziału zygoty po zapłodnieniu (Tobias, Connor, Ferguson-Smith, 2011).

Mimo, iż aberracje liczbowe chromosomów u zarodka/płodu są najczęstszą przyczyną niepowodzeń, nie należy zapominać o aberracjach strukturalnych, które także

mogą mieć istotne znaczenie w niepowodzeniach ciąży. Aberracje strukturalne u zarodka/płodu są przyczyną około 2% niepowodzeń ciąży (Goddijn, Leschot, 2000; Simpson, 2007, ESHRE, 2008). Wśród aberracji strukturalnych wyróżniamy: delecje, duplikacje, translokacje i inwersje. Około 50% aberracji strukturalnych, przede wszystkim delecji i duplikacji powstaje *de novo* podczas gametogenezy (Simpson, 2007). Drugą część stanowią przypadki, w których aberracja zostaje odziedziczona od któregoś z rodziców, najczęściej w formie niezrównoważonej (Simpson, 2007).

Wspomniane wyżej nosicielstwo zrównoważonych aberracji struktury chromosomów stanowi znaną od dawna przyczynę poronień samoistnych. Translokacje wzajemne zrównoważone jak i robertsonowskie, u któregoś z partnerów, identyfikuje się u około 4-5% par z niepowodzeniami ciąży, podczas gdy inwersje spotyka się u około 1% par (Simpson, 2007). Nosicielstwo aberracji zrównoważonej spotyka się u par z poronieniami nawracającymi dziesięć razy częściej, niż w populacji osób z prawidłowym kariotypem (Goddijn, Leschot, 2000). W przypadku nosicieli możliwe są trzy scenariusze przekazywania materiału genetycznego, w wyniku czego możemy spodziewać się u potomstwa: prawidłowego kariotypu, kariotypu z aberracją chromosomową zrównoważoną albo kariotypu z aberracją niezrównoważoną. Ostatnia sytuacja jest konsekwencją niekorzystnej segregacji chromosomów oraz rekombinacji w trakcie gametogenezy. Częstość występowania niezrównoważonych gamet w przypadku nosicielstwa aberracji strukturalnej jest kwestią indywidualną i zależy w dużej mierze od tego, które chromosomy są zaangażowane w aberrację oraz w którym miejscu w chromosomie występują punkty pęknięcia (ESHRE, 2008). Ryzyko zidentyfikowania nosicielstwa aberracji strukturalnej zwiększają następujące czynniki: młody wiek matki przy drugim poronieniu, występowanie trzech lub więcej poronień samoistnych u pary, występowanie dwóch lub więcej poronień samoistnych u rodzeństwa oraz u rodziców któregoś z partnerów (Exalto i wsp., 2007).

Chociaż zrównoważone aberracje strukturalne mogą stanowić przyczynę niepowodzeń ciąży, to wydaje się, że mogą one być dziedziczone w formie zrównoważonej z pokolenia na pokolenia bez klinicznych konsekwencji, takich jak niepowodzenia ciąży (Jacobs i wsp., 1975, Morton i wsp., 1975). Stąd uważa się, że w niektórych rodzinach zidentyfikowanie zrównoważonej aberracji strukturalnej u któregoś z partnerów może być zupełnie przypadkowe i nie wiązać się z prawdziwą przyczyną niepowodzeń (ESHRE, 2008).

Choroby jednogenowe, mutacje i polimorfizmy genowe

Mimo, iż najczęstszymi nieprawidłowościami, które identyfikuje się w niepowodzeniach ciąży są aberracje chromosomowe, wydaje się, że choroby genetyczne uwarunkowane jednogenowo także mogą odgrywać rolę w niepowodzeniach ciąży. Ze względu na bardzo liczną grupę genów zaangażowanych w proces embriogenezy oraz fakt, że jest to bardzo skomplikowany proces, ich identyfikacja jest jednak trudna.

Choroby jednogenowe najczęściej powodują utratę późnych ciąż – w drugim i trzecim trymestrze oraz zgonów okołoporodowych. Jedną z takich chorób jest alfa-talasemia. U płodów z delecją wszystkich czterech genów alfa-globiny pojawia się patologiczna hemoglobina Barta, powodując wewnątrzmaciczną niedokrwistość, obrzęk płodu oraz utratę ciąży lub zgon okołoporodowy (Connor, Ferguson-Smith, 1999; Laurino i wsp., 2005). Dzieje się tak w przypadku, gdy oboje rodzice są nosicielami pełnej delecji obu genów alfa-globiny w jednym chromosomie. Także dystrofia miotoniczna u kobiet może zwiększać ryzyko niepowodzeń ciąży, aczkolwiek obserwuje się odmienną częstość niepowodzeń w przypadku dystrofii typu 1 i typu 2 (Rudnik-Schöneborn i wsp., 1998; Goddijn, Leschot, 2000; Laurino i wsp., 2005; Rudnik-Schöneborn i wsp., 2006). Z kolei choroby dziedziczące się w sposób sprzężony z X dominujący mogą być przyczyną utraty płodów męskich. Do chorób tych należą: wrodzone nietrzymanie barwnika, zespół Goltza, zespół Retta oraz zespół Aicardi. Inną grupę chorób, które mogą się przyczyniać do niepowodzeń ciąży, są letalne dysplazje kostne u płodu, takie jak dysplazja tanatoforyczna oraz wrodzona łamliwości kości typu II. Powodują one najczęściej zgony w trzecim trymestrze ciąży (Goddijn i Leschot, 2000).

Badania na modelach zwierzęcych pokazują, iż prawdopodobnie istnieje wiele takich genów, których mutacje mają letalne konsekwencje dla zarodka/płodu (Baek, 2004; Laissue i wsp., 2009). Przykładem może być praca badawcza Vatin i wsp. (2012), która wykorzystując model myszy, znalazła związek pomiędzy regionem QTL w chromosomie pary 1, w którym wytypowano 7 kandydujących genów a wysoką częstością występowania śmierci zarodkowej myszy.

Wiele uwagi poświęca się także badaniom w kierunku wyszukiwania polimorfizmów genetycznych, które mogą w istotny sposób zwiększać ryzyko niepowodzeń ciąży. Dotyczy to przede wszystkim par z poronieniami nawracającymi,

których kariotyp jest prawidłowy, tak samo jak kariotyp utraconego zarodka/płodu. Przykłady polimorfizmów genetycznych, które były analizowane na przestrzeni ostatnich 10 lat przedstawiono w Tabeli 1. Nie we wszystkich badaniach wykazano różnice istotne statystycznie, które mogłyby potwierdzić znaczenie pojedynczego polimorfizmu dla zwiększenia ryzyka niepowodzeń ciąży.

Tabela .1 Wybrane polimorfizmy genetyczne analizowane u pacjentów z niepowodzeniami ciąży (Suzumori, Sugiura-Ogasawara, 2010).

Geny/ produkty białkowe	Genotyp	P-wartość
<i>IL-1 beta</i>	+3953	NS
<i>IL-1 antagonist receptor</i>	VNTR	NS
<i>IL-4</i>	-590C>T	NS
<i>IL-6</i>	-634C>G	S
<i>IL6</i>	-174G>C	NS
<i>IL-10</i>	-1082A>G, -819C>T	NS
<i>IL10</i>	-592C>A	P<0.01
<i>IFN-gamma</i>	874A>T	P=0.01
<i>TNF</i>	TNF-alfa -308G>A, TNF-beta +252G>A	NS
<i>KIR</i>	KIR BB	P=0.0001
<i>VEGF</i>	-2578C>A, -1154G>A, - 634G>C, 936C>T	NS
<i>Protrombina</i>	20210G>A	NS
<i>Czynnik V Leiden</i>	1691G>A	NS
<i>Czynnik XII</i>	46C>T	NS
<i>Trombomodulina</i>	Promotor	NS
<i>EPCR</i>	Egzon 1-7	NS
<i>Apo E</i>	Apo E4	P=0.036
<i>MTHFR</i>	677C>T	NS
<i>Białko Z</i>	Intron F 79G>A	NS
<i>Aneksyna A5</i>	Promotor	S
<i>CBG5</i>	Cały gen	P=0.007
<i>CBG8</i>	Cały gen	P=0.042
<i>mtDNA</i>	mtDNA	NS
<i>GSTT1</i>	Cały gen	P<0.005
<i>CYP1A1</i>	Cały gen	NS
<i>CYP2D6</i>	Cały gen	NS
<i>GSTM1</i>	Cały gen	NS
<i>SYCP3</i>	657T>C, 643delA, cIVS7-16_19delACTT	P<0.0001 P<0.005

Inne czynniki genetyczne

Jednym z mechanizmów genetycznych, które mogą odgrywać rolę w niepowodzeniach ciąży, jest jednorodzicielska disomia u zarodka/płodu. Występowanie dwóch chromosomów jednej pary, pochodzących od tego samego rodzica najczęściej jest tłumaczone, jako swego rodzaju „ratunek” embrionu przed letalnymi skutkami

trisomii (Srebnik, Tomaszewska, 2009). Ze względu na piętnowanie genów, dla prawidłowego funkcjonowania organizmu ważne jest nie tylko to, iż mamy dwa chromosomy jednej pary, ale także to, czy pochodzą od jednego i drugiego rodzica. Przykładem wpływu piętnowania genomowego na rozwój człowieka mogą być zespoły: Angelmana i Pradera-Willego. W niepowodzeniach ciąży znane są przypadki występowania disomii jednorodzielskiej chromosomu pary 21 (Henderson i wsp., 1994; Simpson, 2007).

Innym analizowanym mechanizmem jest nielosowa, przesunięta inaktywacja chromosomu X u kobiet. Na podstawie doniesień dotyczących znaczenia nielosowej inaktywacji trudno ocenić jej związek z niepowodzeniami ciąży, ponieważ może być ona konsekwencją różnych zdarzeń. Nielosowa inaktywacja może oznaczać występowanie mutacji genowych w chromosomie X (Pegoraro i wsp., 1997; Lanasa i wsp., 1999). Może być wynikiem małej liczby komórek prekursorowych w trakcie inaktywacji, co z kolei wpływa na słabszy rozwój zarodka i może zakończyć się utratą ciąży (Robinson i wsp., 2001; Beever i wsp., 2003). Może mieć także związek z ograniczoną rezerwę oocytów w jajniku, co wiąże się ze zwiększonym ryzykiem trisomii (Robinson i wsp., 2001; Beever i wsp., 2003). Według innych autorów, nie istnieje żaden związek między odchylną inaktywacją, a niepowodzeniami ciąży (Sullivan i wsp., 2003, Warburton i wsp., 2009).

Niewielu badaczy zajmuje się rolą, jaką może odgrywać czynnik męski w niepowodzeniach ciąży. Badania dotyczące znaczenia polimorfizmów genetycznych w niepowodzeniach ciąży są prowadzone wśród kobiet z poronieniami nawracającymi, nie biorą natomiast pod uwagę potencjalnych markerów genetycznych u mężczyzny. Drugi aspekt to uszkodzenia DNA plemników, które są bardzo wrażliwe na czynniki zewnętrzne. Mogą one zwiększać ryzyko występowania pęknięć dwuniciowych w chromosomach oraz mikrodelecji (Rosenbusch, Sterzik, 1991; Allison, Schust, 2009). Także stres oksydacyjny ma wpływ na uszkodzenia DNA plemnika (Gil-Villa i wsp., 2009; Greco i wsp., 2005).

Mutacje w DNA mitochondrialnym mogą mieć również związek z niepowodzeniami ciąży. Prowadzone dotąd badania nie potwierdziły jednak ich wpływu na utratę ciąży (Kaare i wsp., 2009). Z drugiej jednak strony okazuje się, że zmniejszona liczba mitochondriów oraz uszkodzenia DNA mitochondrialnego mogą

być oznaką obniżonej jakości oocytów a tym samym wpływać na powodzenie procesu zapłodnienia (Wang i wsp., 2009).

Inny mechanizm związany z utratą ciąży kryje się prawdopodobnie w długości telomerów. Zaobserwowano, iż u pacjentek z poronieniami nawracającymi długość telomerów jest istotnie krótsza niż u pacjentek z grupy kontrolnej. Może to być oznaką szybko postępującego procesu starzenia się komórek, w tym oocytów, co z kolei może mieć wpływ na utrzymanie ciąży (Hanna i wsp., 2009).

1.4 Diagnostyka genetyczna niepowodzeń ciąży

Ze względu na wieloczynnikowy charakter niepowodzeń ciąży, diagnostyka przyczyn utraty ciąży może być długotrwała i wieloetapowa. Metody skriningowe powinny być odpowiednio dobrane, aby pomagać w identyfikacji przyczyn niepowodzeń, pozwolić na ocenę ryzyka wystąpienia kolejnego niepowodzenia oraz w określonych przypadkach pozwolić na zastosowanie skutecznej terapii.

Diagnostyka genetyczna niepowodzeń ciąży opiera się na identyfikacji genetycznych przyczyn niepowodzeń ciąży, identyfikacji rodzin podwyższonego ryzyka genetycznego oraz prognostycznej oceny sytuacji. Według rekomendacji Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego, wskazaniem do przeprowadzenia diagnostyki genetycznej u par z niepowodzeniami ciąży jest wystąpienie co najmniej dwóch poronień samoistnych u pary a także wystąpienie martwego porodu lub zgonu okołoporodowego dziecka (PTG, 2008).

1.4.1 Wywiad rodzinny i analiza rodowodu

W przypadku par z niepowodzeniami ciąży, w wywiadzie zwraca się szczególną uwagę na sytuacje, które mogą mieć związek z utratą ciąży. Zbiera się informacje dotyczące stanu zdrowia pacjentów, z uwzględnieniem wad anatomicznych macicy u kobiety, a także zaburzeń hormonalnych, BMI, chorób o charakterze autoimmunologicznym, chorób związanych z zaburzeniami krzepnięcia oraz chorób przebytych w trakcie ciąży (Laurino i wsp., 2005). Ważna jest również ocena dysmorfologiczna obojga pacjentów, informacje dotyczące ewentualnej niepełnosprawności intelektualnej, chorób genetycznych występujących w rodzinie, długotrwałego narażenia na działanie czynników teratogennych (na przykład alkoholu, narkotyków, nikotyny lub innych substancji chemicznych w środowisku) (Laurino i wsp., 2005, Latos-Bieleńska 2010). Istotną informacją są również przypadki

niepowodzeń ciąży, które miały miejsce u innych członków rodziny (szczególnie u rodziców i rodzeństwa, ale także u dalszych krewnych), w tym poronienia samoistne, martwe porody, zgony okołoporodowe, niepłodność (Laurino i wsp., 2005, Latos-Bieleńska, 2010).

Analiza rodowodu u par z niepowodzeniami ciąży może pomóc w ocenie sytuacji, ujawnić rodzinne występowanie niepowodzeń ciąży o charakterystycznym sposobie dziedziczenia lub wykazać bliskie pokrewieństwo między partnerami. Analiza rodowodu jest podstawowym elementem postępowania w genetyce klinicznej i nie można jej zastąpić jedynie wywiadem rodzinnym (Krawczyński i Latos-Bieleńska, 1998).

1.4.2 Badania cytogenetyczne

Analiza kariotypu obojga partnerów to podstawowy test genetyczny, który proponowany jest parom z niepowodzeniami ciąży. Analiza kariotypu przeprowadzana jest w celu wykluczenia lub identyfikacji nosicielstwa aberracji strukturalnej zrównoważonej (translokacji lub inwersji). Test tego typu jest standardową procedurą rekomendowaną przez ośrodki diagnostyczne na całym świecie (PTG 2004; Laurino i wsp., 2005; Jauniaux i wsp., 2006; Berghella, 2007).

Oprócz analizy kariotypu obojga partnerów, drugim, coraz częściej rekomendowanym badaniem cytogenetycznym jest badanie trofoblastu po utracie ciąży (Berghella, 2007). Ze względu na wysoki udział aberracji chromosomowych w niepowodzeniach ciąży pierwszego trymestru, badanie pozwala ustalić przyczynę niepowodzeń w około połowie przypadków. Jest to szczególnie ważne badanie wśród par z prawidłowym kariotypem, kiedy jedynie wgląd w materiał genetyczny zarodka/płodu pozwala stwierdzić, że przyczyną poronienia była aberracja chromosomowa, która wystąpiła u zarodka/płodu *de novo* jako błąd gametogenezy.

Dynamiczny rozwój technik diagnostycznych sprawił, iż obecnie możliwe jest stosowanie różnego typu technik w celu identyfikacji aberracji chromosomowych. Techniki te zostały omówione poniżej.

1.4.3 Badania molekularne

Badania molekularne w kierunku identyfikacji mutacji genowych nie należą do rutynowych badań przeprowadzonych w diagnostyce niepowodzeń ciąży. Mogą być zastosowane w przypadku podejrzenia, że przyczyną utraty ciąży była choroba

jednogenowa o znanym podłożu molekularnym, albo kiedy jedno z partnerów lub oboje są nosicielami genów, których odziedziczenie może doprowadzać do niepowodzeń ciąży. Najczęściej badania molekularne prowadzone są w przypadku podejrzenia, że przyczyny utraty ciąży mogą mieć związek z mutacjami w genach związanych z przebiegiem procesu krzepnięcia (na przykład czynnik V Leiden, protrombina, antytrombina III, białko C i S) (Bates, 2010). Badania molekularne prowadzone są także w kierunku ewentualnej identyfikacji polimorfizmów genetycznych, mających związek z niepowodzeniami ciąży. Najczęściej nie należą one jednak do standardowej diagnostyki, ale są elementem prac poznawczych.

Warto zaznaczyć, że techniki molekularne znalazły zastosowanie w identyfikacji aberracji chromosomowych, zarówno tych najczęstszych, jak i submikroskopowych, poszerzając jednocześnie możliwości diagnostyczne. Techniki te zostały omówione w dalszej części pracy.

1.4.4 Poradnictwo genetyczne w niepowodzeniach ciąży

Kompetentne poradnictwo genetyczne jest nieodłącznym elementem procesu diagnostycznego (Mazurczak, 2004). Udzielenie adekwatnej porady genetycznej jest uwarunkowane informacjami uzyskanymi w trakcie procesu diagnostycznego oraz ich właściwą interpretacją.

W przypadku nosicieli zrównoważonych aberracji strukturalnych ryzyko niepowodzeń rozrodu będzie podwyższone i uzależnione od typu aberracji, chromosomu, który uległ aberracji oraz jego punktów złamań. Dla oszacowania ryzyka genetycznego potrzebna jest dokładana analiza punktów złamań chromosomów oraz analiza rodowodowa danych empirycznych (Midro, Stengel-Rutkowski, Stene, 1992).

Nosicielstwo aberracji strukturalnej wiąże się nie tylko z podwyższonym ryzykiem niepowodzeń ciąży, ale także z ryzykiem urodzenia dziecka chorego. W przypadku translokacji robertsonowskich, w których zaangażowane są chromosomy pary 13 lub 21, istnieje podwyższone ryzyko urodzenia dziecka z zespołem Patau oraz z zespołem Downa (Simpson, 2007). Innym aspektem w przypadku nosicieli jest ocena, czy nosicielstwo aberracji strukturalnej może w istotny sposób zmniejszać szanse na urodzenie dziecka zdrowego. Prowadzone badania wśród par nosicieli nie dają jednoznacznej odpowiedzi (Stephenson i Sierra, 2006; Carp i wsp., 2004, Suzumori, Sugiura-Ogasawara, 2010).

W przypadku par z prawidłowym kariotypem, u których przyczyną niepowodzenia była aberracja chromosomowa zarodka/płodu, ocena ryzyka powinna uwzględniać rodzaj aberracji oraz wiek matki. Ryzyko trisomii autosomalnej u płodu jako przyczyny poronienia, jest niskie u kobiet w przedziale wiekowym 20-24, ale wzrasta do 35% u kobiet w wieku 40-44 lat (ESHRE, 2008). Aneuploidia u zarodka/płodu częściej identyfikowana jest w przypadku niepowodzeń sporadycznych, niż poronień nawracających. Szansę na urodzenie żywego dziecka ocenia się na około 68% (Simpson, 2007). Inaczej wygląda sytuacja, kiedy przyczyną kolejnych niepowodzeń ciąży jest ta sama aneuploidia chromosomowa. Należy rozważyć wówczas występowanie mozaikowości gonadalnej (Delhanty, 2011).

Pary z prawidłowym kariotypem i prawidłowym kariotypem poronionego samoistnie zarodka/płodu mają najprawdopodobniej mniejsze szanse na urodzenie żywego dziecka a także zwiększone ryzyko kolejnego niepowodzenia (Suzumori i Sugiura-Ogasawara, 2010). Prawidłowy kariotyp zarodka/płodu jest zatem istotnym czynnikiem ryzyka dla kolejnych niepowodzeń (Exhlato i wsp., 2007).

W przypadku, jeśli przyczyną niepowodzenia była choroba genetyczna o charakterze jednogenowym, ryzyko kolejnego niepowodzenia zależy od typu dziedziczenia choroby, nosicielstwa nieprawidłowych genów u partnerów, częstości występowania mutacji *de novo* oraz czasami również od płci zarodka/płodu (Latos-Bieleńska, 2010).

1.4.5 Aspekty psychologiczne utraty ciąży

Utrata ciąży nie jest jedynie zagadnieniem medycznym, ale także wiąże się niejednokrotnie z wieloma problemami natury psychologicznej. Reakcje emocjonalne związane z utratą ciąży są różne, począwszy od minimalnego poczucia niespełnienia, po silny wstrząs emocjonalny. Katz i Kuller wyróżnili sposób zachowania osób doświadczających pierwszego poronienia (opisując je jako traumę szokową), dla których utrata ciąży była przede wszystkim zaskoczeniem oraz par z wielokrotną utratą ciąży, dla których trauma ma charakter stałego obciążenia psychicznego i wpływa na podejście do kolejnych niepowodzeń (Katz, Kuller, 1994).

Do psychiatrycznych następstw utraty ciąży należą: depresja (22-55%), lęki i ataki paniki (22-41%), zaburzenia kompulsywne, zaburzenie stresowe pourazowe (PTSD) (Łuczak-Wawrzyniak i wsp., 2010). Okazuje się, że wielokrotna utrata ciąży wpływa również później na dzieci matek, które doświadczyły niepowodzeń. Częściej

wśród tych dzieci obserwuje się zachowania antyspołeczne, autyzm, schizofrenię, zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD) oraz zaburzenia lękowe i opóźnienia w sferze psychomotorycznej (Łuczak-Wawrzyniak i wsp., 2010; Laurino i wsp., 2005).

Poradnictwo genetyczne jest procesem diagnostyczno-prognostycznym, ale musi także brać pod uwagę problemy natury psychologicznej, z którymi borykają się pacjenci zgłaszający się do poradni genetycznej (Mazurczak, 2004). Prowadzenie rozmowy dotyczącej możliwości prokreacyjnych musi uwzględniać wiele delikatnych czynników natury psychologicznej (Mazurczak, 2004). Na odbiór przekazywanej treści mają wpływ nie tylko przykre wydarzenia związane z niepowodzeniami ciąży, ale niejednokrotnie sama osobowość partnerów. I tak, na przykład osoby z niską skłonnością do ryzyka mają tendencje do zniekształcania przekazywanych im informacji, w taki sposób, aby były dla nich akceptowalne (Łuczak-Wawrzyniak i wsp., 2010). Z kolei osoby z wysoką skłonnością do ryzyka najczęściej przyjmują treści zgodnie z rzeczywistością (Łuczak-Wawrzyniak i wsp., 2010).

Czasami, pomimo uzyskania medycznego wyjaśnienia przyczyny utraty ciąży, pacjentki mogą borykać się nadal z problemami natury emocjonalnej. Uzyskana pomoc, zarówno ze strony wspierającego partnera, jak i otoczenia oraz służb medycznych przypuszczalnie mogą zwiększać szanse na urodzenia zdrowego dziecka, a przynajmniej wpłynąć pozytywnie na przyszłe plany prokreacyjne (Laurino i wsp., 2005).

1.5 Techniki genetyczne stosowane w diagnostyce niepowodzeń ciąży

Współczesna diagnostyka genetyczna ma do dyspozycji wiele metod badawczych, które pozwalają na identyfikację chorób genetycznych. Są to metody oparte zarówno na technikach cytogenetyki klasycznej oraz molekularnej, jak również techniki molekularne oparte o metodę PCR.

1.5.1 Analiza kariotypu

Analiza obrazu prążkowego chromosomów metafazowych uzyskanych po hodowli komórek trofoblastu był to tradycyjnie złoty standard w badaniach prenatalnych, ale także w diagnostyce niepowodzeń ciąży (Bocian, 2007). Badanie polega na pośredniej lub bezpośredniej hodowli komórek trofoblastu, a następnie zahamowaniu podziałów w stadium metafazy, utrwaleniu oraz po naniesieniu na

szkiełko podstawowe wybarwieniu barwnikiem Giemzy (Barch, Knutsen, Spurbeck, 1997).

Niewątpliwie największą zaletą tego typu badania jest możliwość obserwacji wszystkich chromosomów jądra komórkowego, a więc analiza aberracji zarówno liczbowych, jak i strukturalnych. W badaniach prenatalnych skuteczność i wiarygodność tej metody sięga w przypadku biopsji trofoblastu 99,6% (Bocian, 2007). Niestety w przypadku badania tkanek uzyskanych z abrazyj lub wydalonych z organizmu matki po śmierci zarodka/płodów uzyskanie dzielących się komórek jest bardzo trudne (Srebniak, Tomaszewska, 2008). Wynika to najczęściej z faktu, iż czas, jaki mija od chwili obumarcia zarodka/płodów do momentu pobrania komórek do hodowli jest trudny do ustalenia, nierzadko może to być nawet kilka tygodni. Stąd w przypadku trofoblastu po poronieniu odsetek hodowli zakończonych niepowodzeniem wynosi nawet 40% (Lomax i wsp., 2000). Drugą, istotną przyczyną problemów z konwencjonalnymi badaniami cytogenetycznymi jest częsta kontaminacja pobranego materiału komórkami maczynymi, a co za tym idzie selektywny wzrost tych komórek podczas hodowli (Bell i wsp., 1999). Konsekwencją tego zjawiska mogą być fałszywie ujemne wyniki badania kariotypu (kariotypy prawidłowe żeńskie). Trzecia przyczyna to niska jakość preparatów uzyskanych po hodowli, co utrudnia lub wręcz uniemożliwia przeprowadzanie analizy chromosomów z zachowaniem kryteriów i zasad jakości (Bocian, 2007).

1.5.2 Interfazowa fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH)

Alternatywą dla klasycznych hodowli komórkowych jest szybka diagnostyka najczęściej występujących aberracji chromosomowych z wykorzystaniem techniki hybrydyzacji. Metoda FISH wykorzystuje znakowane fluorescencyjnie sondy molekularne, które hybrydują do komplementarnej sekwencji w chromosomie. Wizualizacja miejsca przyłączenia się sondy jest możliwa dzięki analizie preparatu pod mikroskopem fluorescencyjnym. Wyznakowana i przyłączona sonda jest widoczna jako jasny sygnał w chromosomie lub jądrze interfazowym.

Współczesna procedura wykonania tego typu hybrydyzacji jest stosunkowo prosta, szczególnie, jeśli korzysta się z gotowych, komercyjnych zestawów sond. Polega ona najczęściej na denaturacji preparatu i sondy lub częściowo na jednoczesnej denaturacji obu, a następnie na całkowitej hybrydyzacji. Ważnym elementem jest odplukanie niezwiązanej lub niespecyficznie związanej do preparatu sondy po

hybrydyzacji. Najistotniejszym etapem w tego typu badaniach jest natomiast właściwa analiza mikroskopowa preparatów. Jak każde badanie opierające się na analizie obrazów przez obserwatora, wymaga doświadczenia i poprawnego interpretowania uzyskanych wyników.

W badaniu materiału z poronienia stosuje się głównie sondy znakowane fluorescencyjnie, które hybrydują do centromerów chromosomów lub innych sekwencji, na przykład specyficznych lub telomerowych. Liczba sond stosowanych w tego typu badaniach jest różna i waha się najczęściej od pięciu do dziewięciu. Najczęściej stosowane są sondy dla chromosomów płci X i Y oraz chromosomów autosomalnych: 13, 15, 16, 21 i 22 (Jobanputra i wsp., 2002). Ponieważ sondy hybrydują do jąder interfazowych, a nie do chromosomów metafazowych, etap hodowli zostaje pominięty, a procedura zakłada jedynie uwolnienie i utwalenie jąder interfazowych, a następnie rozłożenie zawiesiny na szkiełku podstawowym (Bryndorf i wsp., 1996). Liczba kopii chromosomów ustalana jest w oparciu o analizę sygnałów hybrydyzacyjnych. Najczęściej stosowana jest mieszanina sond wyznakowanych różnymi fluorochromami, hybrydujących do jednego preparatu, co umożliwia równoczesną analizę sygnałów dla różnych chromosomów (Jobanputra i wsp., 2002).

Wykorzystanie jąder komórkowych w stadium interfazy jest niewątpliwą zaletą tej metody, należy jednak pamiętać o tym, że ze względu na ograniczone możliwości stosowania sond, badanie ukierunkowane jest na identyfikację najczęstszych aberracji liczby chromosomów: poliploidii (triploidii i tetraploidii) oraz wybranych aneuploidii. Z kolei pominięcie etapu hodowli komórkowych daje możliwość badań retrospektywnych z tkanek utweralonych.

W badaniach prenatalnych czułość tej metody szacowana jest na 83-100%, a specyficzność 99,8-100% (Shaffer, Bui, 2007).

1.5.3 Porównawcza hybrydyzacja genomowa (CGH)

Porównawcza hybrydyzacja genomowa, podobnie jak metoda FISH, oparta jest na jednoczesnej i kompetytywnej hybrydyzacji dwóch różnych próbek DNA (Kujawski, 2008). W metodzie CGH wyznakowany fluorescencyjnie DNA badany (pacjenta) oraz DNA prawidłowy (referencyjny) hybrydują do prawidłowych chromosomów metafazowych. Znakowanie DNA może się odbywać się w procesie *nick*-translacji - DNA badany znakowany jest bezpośrednio fluorochromem zielonym (na przykład fluoresceiną), natomiast referencyjny czerwonym (na przykład czerwieńią teksańską),

(Bryndorf i wsp., 1995). DNA znakowany może być również w sposób bezpośredni poprzez syntezę fragmentu DNA ze znakowanych nukleotydów podczas PCR, czy też metodą random priming. Tak wyznakowany oraz zmieszany w stosunku 1:1 DNA pacjenta i referencyjny hybrydują do prawidłowych chromosomów metafazowych. Hybrydyzacja przebiega w obecności Cot-1 DNA, komplementarnego do sekwencji powtórzonych w genomie, aby uniemożliwić niespecyficzne wiązanie sekwencji wysoko powtarzalnych (Redon, Fitzgerald, Carter, 2009).

Wynik hybrydyzacji analizowany jest przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w odpowiedni zestaw filtrów oraz kamerę CCD (Lasser-Ross i wsp., 1991). Dla każdej płytki metafazowej utrwalane są trzy obrazy, odpowiednio w kolorach czerwonym, zielonym i niebieskim (barwienie DAPI pozwala na identyfikację poszczególnych chromosomów) (Kujawski, 2008). Analiza w tej metodzie opiera się na ocenie intensywności profili fluorescencji (stosunku fluorescencji czerwonej do zielonej) na całej długości chromosomów przy użyciu odpowiedniego programu komputerowego. W celu uniknięcia błędnej interpretacji, najczęściej analizowanych jest kilka płytek metafazowych, a ostateczny wynik opiera się na uśrednionej wartości intensywności fluorescencji.

Metoda CGH umożliwia analizowanie całego genomu w jednym badaniu z rozdzielczością od 5-10 Mbp w metodzie standardowej do 2-3 Mbp w zmodyfikowanej wersji o wysokiej rozdzielczości (Schoumans i wsp., 2004). Początkowo największe zastosowanie znalazła w diagnostyce genetycznej nowotworów, identyfikując delecje i duplikacje w różnych regionach genomu, a później także w przypadku podejrzenia nie zrównoważonego kariotypu u pacjentów z nieprawidłowym fenotypem (Forozan i wsp., 1997). Metoda ta znalazła także zastosowanie w badaniach niepowodzeń ciąży, umożliwiając wykrywanie nie zrównoważonych zmian w genomie (Daniely i wsp., 1998; Bell i wsp., 2001).

Podobnie jak metoda FISH, porównawcza hybrydyzacja genomowa nie wymaga prowadzenia hodowli komórek, a DNA może zostać wyizolowany nawet z tkanek niedzielących się, czy preparatów utrwalonych. CGH pozwala na analizę całego genomu, ale umożliwia detekcję tylko wtedy, gdy zmiana ma charakter nie zrównoważony. Nie można natomiast odróżnić genomu diploidalnego od tri-, czy tetraploidalnego, nie wykrywa także zmian w okolicach centromerów i telomerów (Lomax i wsp., 2000; Dória i wsp., 2009).

1.5.4 Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy – array CGH

Nowoczesną odmianą metody CGH jest porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy. Metoda ta opiera się na podobnych zasadach jak klasyczna wersja CGH, z tą różnicą, że mieszanina wyznakowanego DNA badanego i referencyjnego hybryduje do odpowiednio przygotowanej płytki mikromacierzy, a nie do chromosomów metafazowych (Schaeffer i wsp.; 2004). Wynik badania otrzymywany jest przez pomiar intensywności fluorescencji obu fluorochromów, pochodzącej od konkretnych regionów DNA umiejscowionych na mikromacierzy (Redon, Carter, 2009). Pomiar dokonywany jest przez laserowy skaner, a wyniki przetwarzane przez specjalny program komputerowy. Ostateczna interpretacja odbywa się przez wprowadzenie wyników do bazy danych, co pozwala na określenie regionów, w których doszło do delecji/duplikacji wraz z oceną ich patogenności oraz lokalizacją genów/sekwencji znajdujących się w badanym regionie.

Mikromacierz to płytka z naniesionymi fragmentami sekwencji DNA. Wielkość fragmentów osadzonych na płytce może być różna: od klonów typu BAC, do sekwencji oligonukleotydowych i produktów PCR (Redon, Carter, 2009). Dzięki różnie skonstruowanym mikromacierzom, od pokrywających cały genom po specyficzne dla określonego regionu, metoda ta może być wykorzystywana zarówno jako metoda skriningowa do poszukiwania nowych zmian typu delecji/duplikacji w całym genomie, jak i zmian tylko w wybranych miejscach. Rozdzielczość tej metody zależy od technologii mikromacierzy oraz jej przeznaczenia i wynosi od ~100 pb do 1-5 Mpb (Coe i wsp., 2007). Coraz częściej stosowane są mikromacierze specyficzne, stosowane do identyfikacji zmian tylko w określonych genach, których zmiany charakteryzuje podobny fenotyp pacjenta. Mikromacierze typu „klinicznego” najczęściej stosowane są w przypadku podejrzenia submikroskopowych zmian niewidocznych w analizie kariotypu, często o charakterze polimorfizmu typu CNV (Stankiewicz, Beaudet, 2007).

Podobnie jak klasyczna wersja CGH, metoda ta nie pozwala na identyfikację zmian o charakterze zrównoważonym. Ze względu jednak na możliwość identyfikacji zmian mniejszych niż te, które można obserwować w standardowej analizie kariotypu, metoda ta znalazła zastosowanie także w identyfikacji submikroskopowych zmian, będących przyczyną niepowodzeń ciąży (Menten i wsp., 2009; Warren i wsp., 2009). Zmiany typu CNV identyfikowane w materiale z poronienia mogą mieć zarówno charakter „łagodny”, czyli polimorfizmu, pozostającego bez wpływu na fenotyp jak i

„patologiczny”, który niesie za sobą konsekwencje kliniczne (Rajcan-Separovic i wsp., 2010). Znalazienie zmian tego typu wymaga potwierdzającego badania obojga partnerów, w celu określenia, czy zmiana wystąpiła *de novo*, czy została odziedziczona (Rajcan-Separovic, i wsp., 2010). Ze względu na nadal wysokie koszty pojedynczej analizy, nie jest to metoda stosowana w badaniach rutynowych, lecz częściej, jako pogłębienie lub uzupełnienie podstawowej diagnostyki. Z kolei skuteczność i specyficzność tej metody pozwala sądzić, że w niedługim czasie będzie stopniowo wypierała inne metody diagnostyczne.

1.5.5 Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) oraz jej odmiany

Techniki molekularne oparte na metodzie PCR znalazły wszechstronne zastosowanie w diagnostyce chorób genetycznych: począwszy od identyfikacji mutacji na podstawie analizy produktu po reakcji, przez analizę ekspresji genów, po możliwość dokładnej analizy sekwencji (Słomski, Szalata, Wielgus, 2008). Modyfikacje metody PCR, a także łączenie jej z innymi technikami badawczymi, na przykład z hybrydyzacją, poszerzyło możliwości diagnostyczne, pozwalając niejednokrotnie na kompleksowe badanie wybranych regionów chromosomów. Również w diagnostyce prenatalnej oraz w badaniach nad genetycznymi przyczynami niepowodzeń ciąży techniki molekularne zyskują coraz większe zainteresowanie. Możliwość automatyzacji metod, uzyskania wyniku w bardzo krótkim czasie oraz ich mniejsza czaso- i pracochłonność w porównaniu do klasycznych technik cytogenetycznych sprawia, iż coraz częściej są rutynowo wykorzystywane w laboratoriach diagnostycznych.

Ilościowa fluorescencyjna PCR (QF-PCR)

Metoda QF-PCR polega na amplifikacji specyficznych tandemowych sekwencji mikrosatelitarnych typu STR, usytuowanych w genomie w sposób rozproszony (Adinolfi, Sherlock, Pertl, 1995). Sekwencje mikrosatelitarne wykazują wysoki stopień polimorfizmu genetycznego, najczęściej występując w układzie heterozygotycznym. Sekwencje te wykorzystywane są jako markery do identyfikacji liczby kopii danej sekwencji.

W QF-PCR startery wyznakowane są fluorochromem a reakcja ma najczęściej charakter złożony. W jednej reakcji wykorzystuje się kilka par starterów z różnymi znacznikami fluorescencyjnymi. Jest to odmiana metody PCR multipleks z kombinacją różnych par starterów. Wynik badania opiera się na analizie otrzymanych fragmentów,

które muszą zostać rozdzielone na drodze elektroforezy kapilarnej. Tego typu elektroforeza przeprowadzana jest na sekwenatorze kapilarnym, w którym przetworzony sygnał fluorescencyjny, pochodzących z analizowanych produktów PCR, pozwala na rozmieszczenie fragmentów zgodnie z ich wielkością. Otrzymany po przetworzeniu komputerowym piktoqram, dzięki kompatybilnym programom komputerowym pozwala na analizę produktów PCR. Dzięki temu możliwa jest ocena liczby alleli dla każdego markera, co odpowiada liczbie kopii danego chromosomu (Mann i wsp., 2004).

QF-PCR jest metodą stosowaną do tak zwanej „szybkiej diagnostyki” najczęstszych aberracji liczbowych (Mann i wsp., 2004). Pozwala zarówno na identyfikację niezrównoważonych aberracji typu aneuploidia i triploidia, ale także pozwala na wykrycie przypadków mozaikowości komórkowej, kontaminacji materiału komórkami maczynymi oraz odróżnienia izochromosomów od chromosomów powstałych w wyniku fuzji centrycznej. Czulość tej metody wynosi 83-100%, a specyficzność prawie 100% (Shaffer, Bui, 2007).

PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR)

W przeciwieństwie do konwencjonalnej techniki PCR, w której zasadnicze znaczenie ma jakość produktu, Real-Time PCR jest techniką oceniającą przyrost ilości produktu w tak zwanym czasie rzeczywistym. Dzięki takiej technice możliwe jest określenie ilości badanego DNA, czyli liczby kopii sekwencji, co pozwala na identyfikację różnego typu zmian, w tym o charakterze ploidii. W przeciwieństwie do innych technik bazujących na PCR, jest metodą bardzo czułą, specyficzną i powtarzalną (Dudarewicz i współ., 2005). PCR w czasie rzeczywistym jest wykorzystywana szczególnie w badaniach ekspresji genów, delecji/duplikacji genów w chorobach nowotworowych, badaniu metylacji, identyfikacji patogenów, a nawet skuteczności działania leków. Próby wykorzystania tej techniki podejmowano także w przypadku badań prenatalnych (Zimmermann i Dudarewicz, 2008).

Technika wymaga specjalnie skonstruowanego termocyklera, wyposażonego w urządzenie optyczne do wzbudzania fluorochromów oraz detektora pomiaru poziomu fluorescencji. W przeciwieństwie do tradycyjnej metody PCR, w tej metodzie monitorowana jest ilość amplifikowanego w każdym cyklu produktu, w taki sposób, żeby można było ocenić różnice ilościowe między próbka badaną a kontrolną (Traeger-

Synodinos, 2006). Monitorowanie ilości produktu można osiągnąć przy pomocy różnych systemów znakowania barwnikami fluorescencyjnymi lub interkalującymi, takimi jak na przykład bromek etydyny. W metodzie tej można również wykorzystywać różnego typu sondy, na przykład: TaqMan™, Molecular Beacons, Scorpions, czy HybProbes, co rozwiązuje problem detekcji niespecyficznego produktu amplifikacji (Lipiński, Zeyland, Słomski, 2008). Bez względu na zastosowaną metodę detekcji, po każdym cyklu reakcji zbierane są dane, które pozwalają na konstrukcję wykresu zależności wielkości sygnału od liczby cykli lub czasu (Lipiński, Zeyland, Słomski, 2008).

Metoda Real-Time PCR może być wykorzystywana w reakcjach typu multipleks, gdzie amplifikowanych może być do czterech różnych sekwencji (Dudarewicz i wsp., 2005, Zimmermann i Dudarewicz, 2008). Zaletą tej metody jest także niskie prawdopodobieństwo kontaminacji próby, ze względu na zamknięty system reakcji. Reakcja nie wymaga stosowania dodatkowych systemów oceny produktów po amplifikacji, wysokoplimorficznych sekwencji, a przebieg całej reakcji jest obserwowany na bieżąco.

Metoda Real-Time PCR była wykorzystana do detekcji najczęstszych aneuploidii w badaniach prenatalnych, szczególnie trisomii 21 (Zimmermann, Dudarewicz, 2008). Próby jej wykorzystywania podejmowano także przypadku diagnostyki preimplantacyjnej chorób o charakterze jednogenowym, w genotypowaniu mutacji typu insercji lub delecji oraz mutacji punktowych (Traeger-Synodinos, 2006).

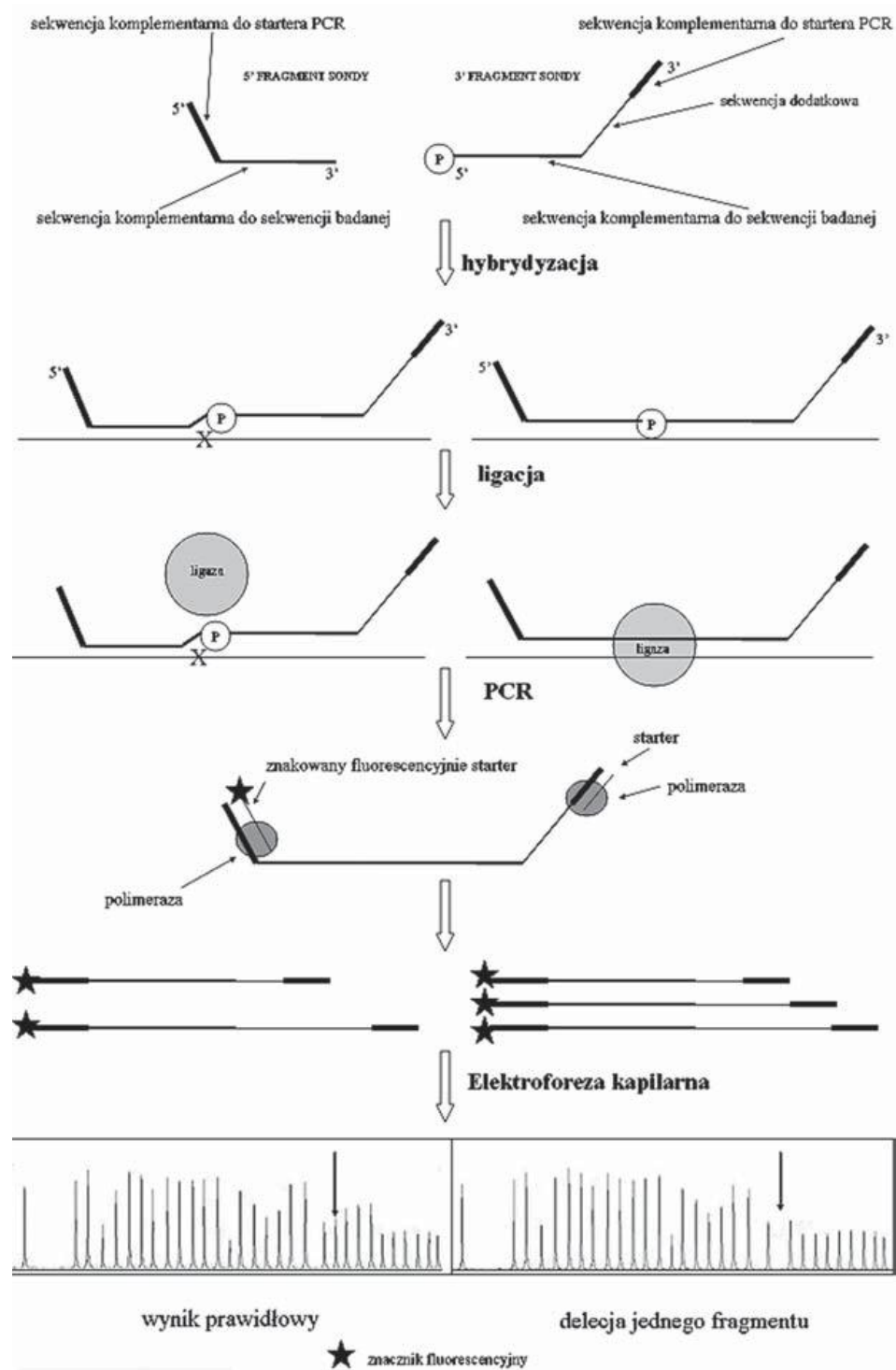
Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

MLPA – technika wprowadzona przez Schoutena w 2002 podobnie jak Real-Time PCR oraz QF-PCR należy do metod ilościowych, opierających się na detekcji liczby kopii określonej sekwencji DNA (Shouten i wsp., 2002). MLPA łączy metodę hybrydyzacji sekwencji DNA badanego z sondą molekularną oraz amplifikację starterów podczas reakcji PCR. Metoda obejmuje trzy etapy: denaturację sekwencji oraz sondy, co najmniej szesnastogodzinną hybrydyzację, ligację zhybrydyzowanych sond oraz PCR ze starterami znakowanymi fluorescencyjnie (Ryc. 1). Do każdej badanej sekwencji hybrydują dwie sondy o specyficznej budowie. Jedna sonda, z wolnym końcem 5', składa się z sekwencji hybrydującej do określonego fragmentu DNA oraz z sekwencji komplementarnej do startera PCR, druga, z wolnym końcem 3', posiada natomiast jeszcze sekwencję dodatkową, czyli tak zwaną wstawkę o różnej długości. Po

hybrydyzacji sondy ulegają ligacji, a wytworzony w ten sposób łańcuch DNA jest matrycą do reakcji PCR. Dzięki temu, że wszystkie sondy mają identyczne sekwencje na swoich końcach 5' i 3', reakcja PCR wymaga tylko jednej pary starterów, które jednocześnie ulegają amplifikacji. Podczas jednej analizy możemy równocześnie badać ponad czterdzieści różnych sekwencji. Wielkość produktów mieści się w przedziale pomiędzy około 130 a 480 nukleotydów (Shouten i wsp., 2002). Detekcja produktów oparta jest na pomiarze fluorescencji podczas rozdziału na sekwenatorze kapilarnym, pozwalając tym samym na ocenę ilościową produktów po amplifikacji. Ostateczna analiza wyniku odbywa się przy użyciu specjalnego oprogramowania, a następnie normalizacji uzyskanych wyników w programie typu Microsoft Excel.

Metoda MLPA znalazła szerokie zastosowanie w diagnostyce zmian typu delecja/duplikacja. Komercyjne zestawy do MLPA wykorzystywane są w diagnostyce prenatalnej i postnatalnej, w identyfikacji przyczyn niepełnosprawności intelektualnej oraz neurogenetyce, w diagnostyce aberracji chromosomowych, chorobach jednogenowych i wieloczynnikowych, chorobach nowotworowych, analizie metylacji, analizie mRNA, nawet farmakogenetyce. Istnieje możliwość także samodzielnego zaprojektowania sond dla badanej sekwencji.

W badaniach prenatalnych oraz w niepowodzeniach ciąży wykorzystuje się najczęściej komercyjne zestawy do identyfikacji najczęstszych aneuploidii: 13, 18, 21 oraz X, Y, a także zestaw do identyfikacji zmian w sekwencjach subtelomerowych (Diego-Alvarez i wsp., 2007, Kooper i wsp., 2009). Mimo wielu zalet, między innymi możliwości badania wielu próbek podczas jednego eksperymentu, niewielkiej ilości DNA (nawet 20 ng), dużej czułości i specyficzności (odpowiednio 100% i 98%), metoda wykrywa jedynie zmiany o charakterze niezrównoważonym, nie wykrywa natomiast poliploidii, mozaikowości oraz kontaminacji materiałem matczynym (Bocian, 2007).



Ryc. 1. Schemat reakcji MLPA (wg Łaczmńska i Łaczmński, 2009).

2. CELE PRACY

Cele pracy obejmowały:

- Ustalenie częstości występowania aberracji chromosomowych u zarodka/płodu, jako przyczyny utraty ciąży oraz identyfikację wybranych chorób genetycznych o charakterze jednogenowym.
- Ocenę skuteczności zastosowanych metod, takich jak: QF-PCR, MLPA, FISH oraz array CGH w celu identyfikacji aberracji chromosomowych (liczbowych, strukturalnych oraz submikroskopowych rearanżacji genomowych).
- Zaproponowanie strategii diagnostyki genetycznej w przypadku par z niepowodzeniami ciąży.

3. PACJENCI, MATERIAŁY I METODY

Badania prowadzono na fragmentach kosmówki świeżej lub utrwalonej, pobranej od kobiet po niepowodzeniach ciąży. Dodatkowo, od pacjentek i ich partnerów, pobrana została krew obwodowa w celu analizy kariotypu.

3.1. Pacjenci

Do badań zakwalifikowano kobiety z niepowodzeniami ciąży, u których możliwe było badanie kosmówki zabezpieczonej bezpośrednio po poronieniu lub w postaci utrwalonych w parafinie fragmentów kosmówki. Łącznie zebrano materiał od 138 kobiet, przy czym w 5 przypadkach kosmówka pochodziła z dwóch kolejnych poronień, co łącznie stanowiło 143 kosmówki. W przypadku 8 kosmówek materiał pochodził z kosmówki utrwalonej, w pozostałych 135 przypadkach była to kosmówka bezpośrednio pobrana po niepowodzeniu ciąży. Badaniami objęto pacjentów Poradni Genetycznej NZOZ Centrum Genetyki Medycznej Genesis w Poznaniu oraz Kliniki Rozrodczości UM w Poznaniu. Pacjentom przedstawiono wyniki badań genetycznych i udzielony im porady genetycznej (NZOZ CGM Genesis w Poznaniu).

3.2. Materiał biologiczny

W badaniach wykorzystywano głównie fragmenty cytotrofloblastycznej warstwy kosmówki kosmatej (włochatej), pobranej bezpośrednio po poronieniu samoistnym oraz utrwalone w postaci bloczków parafinowych fragmenty kosmówki.

Materiałem do badań molekularnych był DNA wyizolowany z fragmentów kosmówki. Do izolacji DNA potrzebne było, co najmniej 20 mg kosmówki w przypadku kosmówki świeżej oraz około 4-5 skrawków z bloczków parafinowych.

W badaniach cytogenetycznych metodą FISH wykorzystywano wyizolowane z kosmówki jądra interfazowe. W przypadku kosmówki świeżej do izolacji potrzebny był co najmniej 1cm³ kosmówki świeżej lub 4-5 skrawków z bloczków parafinowych.

Do analizy kariotypu partnerów wykorzystywano limfocyty krwi obwodowej. Krew żylną w ilości do 3-5 ml pobierano z żyły odłkociowej pacjentek i ich partnerów do jałowych probówek z antykoagulantem.

3.3. Odczynniki

Odczynniki stosowane w badaniach przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Odczynniki stosowane w badaniach.

Nazwa odczynnika	Nazwa firmy
Agaroza	Invitrogen™
Alkohol etylowy	POCH™
Bromek etydyny	Sigma™
Bydłęca surowica płodowa FBS	Biomed
Chlorek sodu	POCH/Sigma
Cytrynian sodu	Sigma™
DAPI	Roth™
DABCO	Roth™
Gliceryna	POCH
EDTA	Sigma™
Formaldehyd 35%	Sigma™
GeneRuler™ 100-1000 pz	Fermentas™
Giemsa	Merck™
Kanamycyna	Sigma™
KaryoMax	GIBCO™
Chlorek potasu	POCH
Ksylen	POCH
Kwas octowy	POCH
Lambda DNA/HindIII	Feremntas™
LF-7	Biomed
Metanol	POCH

Chlorek magnezu	Solis Biodyne
PBS	Sigma™
Pepsyna	Sigma™/ Kreatech Biotechnology
PHA-M	Biological Industries
Płyn Hanksa	Biomed
Płyn Parkera	Biomed
Proteinaza K	Sigma™
RNasa A	Fermentas™
RPMI 1640	Sigma™
SDS	Sigma™
Tiocyanian sodu	Kreatech Biotechnology
Tris	Sigma™
Trypsyna	Biomed
pUC Mix 19-1118 pz	Fermentas™
NP-40	Abott Molecular

3.4. Roztwory i podłoża

Roztwory i podłoża stosowane w badaniach przedstawiono w Tabeli 3. Wszystkie roztwory i podłoża przygotowano z użyciem wody destylowanej przy użyciu kolumny jonowymiennej firmy TKA oraz zestawu uzdatniającego wodę TKA MicroPure UF/UV.

Tabela 3. Roztwory i podłoża stosowane w badaniach

Nazwa	Skład
1% roztwór agarozy	0,5 g agarozy 50 ml 1x TAE
2% roztwór agarozy	3 g agarozy 150 ml 1x TAE
10% roztwór SDS	10 g SDS 100 ml H ₂ O _{dest}

1x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,3
1x TAE	40 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0
50x TAE	2 M Tris 5,71% kwas octowy 50 mM EDTA pH 8,0
20x SSC	300 mM cytrianu sodu 3 M NaCl pH 7,0
2x SSC	30 mM cytrynian sodu 300 mM NaCl pH 7,0
0,4x SSC	6 mM cytrynian sodu 60 mM NaCl pH 7,0
8% roztwór tiocyjanianu sodu	4 g tiocyjanianu sodu 50 ml H ₂ O _{dest}
80% roztwór kwasu octowy	8 ml kwasu octowego 2 ml H ₂ O _{dest}
Bromek etydyny	10 mg/ml
Bufor płuczący I	0,4xSSC 0,3% NP.-40 pH 7,0
Bufor płuczący II	2x SSC 0,1% NP.-40 pH 7,0
Bufor prehybrydacyjny FFS	39 ml 1x PBS 1 ml formaldehydu 37% 0,18 g MgCl ₂
Bufor SE	75 mM NaCl 25 mM EDTA pH 8,0
Bufor Sörensen	0,07 M KH ₂ PO ₄ 0,07 M Na ₂ HPO ₄ 1000 ml H ₂ O _{dest}
DAPI/DABCO	25 mg/ml DABCO 0,5 mg/ml DAPI 100 ml 50% glicerolu w 1xPBS pH 8,6
Kolcemid	1 ml kolcemidu 10µl/ml 4 ml H ₂ O _{dest}
Podłoże do hodowli limfocytów	80 ml podłoża RPMI 1640 20 ml FBS (inakt. przez 45 min w temp. 56°C) 1,2 ml roztwory kanamycyny 3 ml roztworu PHA-M
Roztwór kanamycyny	10 mg kanamycyny 10 ml płynu Hanksa

Roztwór pepsyny 0,025%	50 µl pepsyny 50 ml 0,2 M HCl
Roztwór pepsyny 0,015%	75 mg pepsyny 50 ml 0.01 M HCl
Utrwalacz	metanol 96% kwas octowy 99,5% w stosunku 3:1

3.5. Metody

3.5.1. Uzyskiwanie chromosomów metafazowych do analizy kariotypu

W analizie kariotypu wykorzystano standardowe procedury uzyskiwania chromosomów metafazowych z limfocytów krwi obwodowej (Rooney i Czepulkowski, 1986). Do założenia hodowli limfocytów wykorzystywano krew pełną, pobraną jałowo do próbek z heparyną litową. Zakładanie hodowli odbywało się w warunkach jałowych. Do jałowych próbek hodowlanych dodawano po 5 ml medium do hodowli o składzie: 8 ml podłoże RPMI 1640 (Sigma), 2 ml płodowa surowica bydlęca FBS (Biomed), 0,3 ml mitogen LF-7 (Biomed), 0,12 ml kanamycyna (Sigma). Następnie do każdej próbki dodawano 0,4 ml krwi. Dla każdego pacjenta zakładano dwie hodowle (I i II seria). Hodowle prowadzono w cieplarni, w stałej temperaturze 37°C przez 72 godziny. Godzinę przed zakończeniem hodowli dodawano do każdej próbki 100 µl kolcemidu KaryoMax (Gibco) o stężeniu 0,1 µg/ml hodowli. Po inkubacji próbki wirowano 10 minut przy prędkości 1300 rpm, usuwano supernatant, zostawiając 0,5 ml nad osadem. Następnie komórki zawieszano w 7 ml chlorku potasu o stężeniu 0,75 M (ogrzanego do temperatury 37°C) i inkubowano przez 20 – 30 minut w cieplarni (37°C). Komórki ponownie wirowano przez 10 minut przy prędkości 1300 rpm a po wirowaniu usuwano supernatant zostawiając około 0,5 ml nad osadem. Po etapie rozpraszania chromosomów metafazowych następował proces ich odbiałczania i utrwalania. Porcjami dodawano do próbek 6 ml utrwalacza (mieszanina metanol:kwas octowy w stosunku 3:1), schłodzonego do temperatury -20°C. Następnie inkubowano przez 10-15 minut w temperaturze +4°C. Po inkubacji wirowano (10 minut, 1300 rpm) i usuwano supernatant. Etap utrwalania, inkubacji i wirowania powtarzano jeszcze dwukrotnie, w tych samych warunkach. Po ostatnim wirowaniu usuwano supernatant, zostawiając około 300 µl nad osadem. Na zimne, odtłuszczone i mokre szkiełko podstawowe,

ustawione pod kątem 45°, наносzono około 30 µl hodowli. Gęstość preparatu sprawdzano pod mikroskopem kontrastowo-fazowym.

Preparaty suszono w temperaturze pokojowej. Po upływie około tygodnia preparaty chromosomowe poddawano procesowi prążkowania. Prążki GTG uzyskiwano przez nadtrawianie chromosomów przez około 40 sekund 0,25% roztworem trypsyny (Biomed). Po trawieniu preparaty umieszczano w kolejno w trzech roztworach płuczących. Pierwszy roztwór to bufor Sörensen (mieszaniny buforów fosforanowych w stosunku 1:1), drugi roztwór składał się z 40 ml płynu Hanksa (Biomed), 40 ml płynu Parkera (Biomed) i 4 ml surowicy bydlęcej FBS (Biomed), a trzeci z 80 ml płynu Parkera (Biomed). Strawione preparaty barwiono roztworem z barwnikiem Giemzy przez około 3 minuty. Czas barwienia preparatów podlegał każdorazowo kontroli. Po barwieniu preparaty płukano w wodzie destylowanej i suszono.

3.5.2. FISH

Izolacja jąder interfazowych z kosmówki pobranej bezpośrednio po poronieniu

Po poronieniu samoistnym pozyskany materiał biologiczny był umieszczany w jałowych plastikowych pojemnikach o pojemności 100 ml z płynem Hanksa. W ciągu 24 godzin od pobrania izolowano jądra interfazowe z kosmówki. W pierwszym etapie materiał przenoszono z pojemnika na jałową szalkę Petriego o średnicy 14 cm z płynem Hanksa. Następnie kosmówkę oczyszczano od śluzu szyjkowego, zlepow krwinek, naczyń krwionośnych i fragmentów doczesnej przy użyciu dwóch jałowych pęset. Odseparowaną z pozyskanego materiału kosmówkę przenoszono na kolejną jałową szalkę Petriego o średnicy 9 cm, płukano płynem Hanksa i oczyszczano z fragmentów innych tkanek. Proces powtarzano, aż do uzyskania wolnych kosmków. Kosmówkę oceniano pod inwertoskopem Olympus CK 40, pod powiększeniem 4, 10 i 20-krotnym. Część kosmówki umieszczano w próbówce o pojemności 2 ml i przeznaczano do izolacji DNA. W kolejnym etapie kosmówkę umieszczano na szalce Petriego o średnicy 6 cm i kroplami dodawano 4 ml hipotonicznego 1% roztworu cytrynianu sodu o temperaturze 37°C. Kosmówkę inkubowano przez 30 minut w inkubatorze Elkon, w temperaturze 37°C. Po inkubacji roztwór cytrynianu sodu usuwano przez odpipetowanie. Kosmówkę utrwalano przez dodanie 4 ml utrwalacza (mieszanina metanolu i kwasu octowego w stosunku 3:1). Proces utrwalania przeprowadzano trzykrotnie, przy czym pierwszą porcję dodawano powoli kroplami, kolejne były

dodawane szybciej. Kosmówkę z ostatnią porcją utrwalacza umieszczano w lodówce w temperaturze + 4°C na 10 minut. Po 10 minutach utrwalacz usuwano przez odpipetowanie, a kosmówkę podsuszano w temperaturze pokojowej. W celu uwolnienia jąder interfazowych do kosmówki kroplami dodawano 80% kwas octowy w ilości 1000-1500 µl. Proces uwalniania kosmków obserwowano pod mikroskopem odwróconym. Po 4-5 minutach od dodania kwasu zawiesinę z uwolnionymi jądrami przenoszono do probówki. Probówki z zawiesiną jąder interfazowych przechowywano w temperaturze - 20°C.

Przygotowanie preparatów z kosmówki pobranej bezpośrednio po poronieniu do fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* z sondami centromerowymi i specyficznymi

Zawiesinę z jądrami interfazowymi w objętości 200 µl przenoszono na szkiełko podstawowe umieszczone na płycie grzejnej Super-Nuova™ Barnstead Thermolyne o temperaturze 42°C. Dla każdej kosmówki przygotowywano cztery preparaty. Proces rozpraszania polegał na przesuwaniu kropli po szkiełku podstawowym przy użyciu pipety z sterylnym tipsem. Wysuszone szkiełka podstawowe umieszczano na 4 min w roztworze 2x SSC w temperaturze pokojowej. Następnie preparaty dehydratowano w roztworach etanolu o wzrastającym stężeniu: 70%, 85% i 96% przez okres 1 minuty w temperaturze pokojowej. Po dehydratacji preparaty suszono w temperaturze pokojowej.

Izolacja jąder interfazowych z kosmówki utrwalonej w postaci bloczków parafinowych

Z bloczków parafinowych wycinano 4-5 skrawków przy pomocy sterylnego skalpela jednorazowego. Skrawki umieszczano w probówce o pojemności 2 ml, po czym dodawano 1,5 ml ksylenu. Probówki wirowano przez 20 minut, przy prędkości 12 000 obrotów na minutę w wirówce MiniSpin® Eppendorf. Po odwirowaniu, ksylen odpipetowywano, a następnie dodawano kolejną porcję ksylenu i powtarzano wirowanie. Po odwirowaniu, ksylen odpipetowywano a skrawki rehydratowano w roztworach etanolu o malejącym stężeniu: 96%, 75%, 50%. Po dodaniu 1,5 ml etanolu każdą porcję wirowano przez 10 min przy prędkości 12 000 obrotów na minutę. Na koniec do skrawków dodawano wodę dejonizowaną do objętości 2 ml i wirowano przez 20 min przy prędkości 12 000 obrotów na minutę. Po usunięciu wody skrawki

podsuszano w temperaturze 37°C przez 15-20 minut na Termomikserze Comfort Eppendorf. W kolejnym etapie do próbki dodawano 0,025% roztwór pepsyny, a następnie trawiono w temperaturze 37°C w inkubatorze Elkon przez 20-60 minut. Co 10 minut próbkę ze skrawkami i roztworem pepsyny intensywnie wytrząsano przy użyciu Vortex BVX-10 Biomix i kontrolowano stopień trawienia. Po trawieniu preparat wirowano przez 10 minut przy prędkości 12 000 obrotów na minutę. Do zatrzymania procesu trawienia wykorzystywano roztwór 1x PBS. Do próbki dodawano dwukrotnie roztwór 1x PBS i wirowano przez 5 minut przy prędkości 12 000 obrotów na minutę. Uzyskany po ostatnim wirowaniu osad zawieszano w 1,5 ml roztworu 1x PBS. Zawiesinę przechowywano w temperaturze - 20°C.

Przygotowanie preparatów z kosmówki pochodzącej z utrwalonych bloczków parafinowych do fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* z sondami centromerowymi i specyficznymi

Zawiesinę w ilości 200 µl nanoszono na szkiełko podstawowe i suszono przez całą noc. Dla każdej próbki przygotowywano cztery preparaty. Wysuszone preparaty umieszczano na 10 minut w roztworze 2x SSC w temperaturze pokojowej. Następnie umieszczano w 8% roztworze tjoocyjanianu sodu ogrzanego do temperatury 80°C. Inkubacja prowadzona była w łaźni wodnej o temperaturze 80°C przez 30 minut. Po inkubacji preparaty umieszczano w roztworze 2x SSC na okres 5 minut. Kolejnym etapem była dehydratacja w roztworach etanolu o zwiększającym się stężeniu: 70%, 85%, 96% w temperaturze pokojowej przez okres 1 minuty. Po dehydratacji preparaty suszono w temperaturze pokojowej.

Przygotowanie preparatów do fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* z sondami subtelomerowymi

Zawiesinę z jądrami interfazowymi w ilości 200 µl przenoszono na szkiełko podstawowe, umieszczone na płycie grzejnej o temperaturze 42°C. Jałowym tipsem rozpraszano krople aż do całkowitego wysuszenia. Preparaty do hybrydyzacji przygotowywano według zmodyfikowanej procedury producenta (Vysis Abort Molecular), stosowanej w przypadku jednoczesnej denaturacji preparatu i sond. Preparat umieszczano w roztworze 2x SSC ogrzanego do temperatury 37°C. Inkubację prowadzono w cieplarni w temperaturze 37°C. Po 10 minutach preparaty osuszano z

nadmiaru płynu i przenoszono do roztworu prehybrydyzacyjnego FFS na 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie przenoszono preparat do roztworu 1x PBS i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 5 minut. Kolejnym etapem było trawienie w 0,015% roztworze pepsyny przez 30 min. Trawienie prowadzono w inkubatorze Elkon w temperaturze 37°C. Preparat płukano w roztworze 1x PBS przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Preparat suszono w temperaturze pokojowej, a następnie dehydratowano w roztworach etanolu o zwiększającym się stężeniu: 70%, 85%, 96% w temperaturze pokojowej przez okres 1 minuty. Preparat suszono na płycie grzejnej w temperaturze 45°C.

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* z sondami centromerowymi i specyficznymi

Do hybrydyzacji wykorzystano sondy komercyjne Poseidon™ FISH Probe Kreatech Diagnostic oraz Vysis Abort Molecular (Tabela 4). Denaturacja preparatu i sondy odbywała się jednocześnie, zgodnie z instrukcją podaną przez producenta sond (Kreatech Diagnostic). Na każdy preparat nakładano po 5 µl sondy, następnie nakładano szkiełko nakrywkowe o wymiarach 22x22 mm i zaklejano Fixogumą. Denaturację prowadzono na płycie grzejnej Super-Nuova™ Barnstead Thermolyne w temperaturze 75°C przez 5 minut. Sposób nakładania oraz rodzaje sond zostały przedstawione w tabeli 4. Preparaty hybrydyzowano przez całą noc w łaźni wodnej w temperaturze 37°C.

Tabela 4. Rodzaje sond stosowanych do fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*.

Nazwa	Chromosomy	Rodzaje sond	Fluorochrom
Preparat 1	X, Y, 18	Xcen (DXZ1) ¹ Ycen (DYZ3) ¹ 18 (D18Z1) ¹	Zielony (Platinm Bright 495) Czerwony (Platinum Bright 550) Niebieski (Platinum Bright 415)
Preparat 2	13, 21	13q14.2 (D13S1195-D13S810) ¹ 21q22.1 (RH 72110-RH 92717) ¹	Zielony (Platinm Bright 495) Czerwony (Platinum Bright 550)
Preparat 3	15, 16	15cen (D15Z) ¹ 16cen (D16Z2) ¹	Zielony (Platinm Bright 495) Czerwony (Platinum Bright 550)
Preparat 4	22	22q11.2/22q13 TUPLE1(HIRA)/ARSA) ²	Czerwony/Zielony (Spectrum Orange/Spectrum Green)

¹Poseidon™ FISH Probe Kreatech Diagnostics

²Vysis Abort Molecular

Po zakończeniu hybrydyzacji preparaty płukano dwukrotnie. Po usunięciu Fixogumy oraz szkiełka nakrywkowego preparaty płukano w buforze płuczącym I w temperaturze 72°C przez 2 minuty, a następnie przenoszono do buforu płuczającego II i

płukano dalej przez 1 minutę w temperaturze pokojowej. Na koniec preparaty dehydratowano w roztworach etanolu o zwiększającym się stężeniu: 70%, 85%, 96% w temperaturze pokojowej przez okres 1 minuty. Preparaty suszono w temperaturze pokojowej. Po wysuszeniu nakładano 15 µl DAPI i nakładano szkiełko nakrywkowe o wymiarach 20x40 mm.

Analiza preparatów po fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*

Preparaty analizowano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Axiophot Zeiss oraz programu komputerowego CytoVision 7.0. Dla każdego preparatu analizowano, co najmniej 100 jąder interfazowych, a w przypadku podejrzenia mozaicyzmu analizowano 200-300 jąder.

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* z sondami subtelomerowymi

W hybrydyzacji wykorzystano komercyjny zestaw sond subtelomerowych ToTelVysion™ Multi-color DNA Probe Mixture Vysis Abbott Molecular. Opis sond znajduje się w Tabeli 5. Denaturacja preparatu i sondy odbywała się jednocześnie, zgodnie z instrukcją podaną przez producenta (Vysis Abbott Molecular). Na każdy preparat nakładano po 3 µl sondy, następnie nakładano szkiełko nakrywkowe o wymiarach 12 mm i zaklejano Fixogumą. Denaturację prowadzono na płycie grzejnej Super-Nuova™ Barnstead Thermolyne w temperaturze 70°C przez 5 minut. Hybrydyzację preparatów prowadzono przez całą noc w łaźni wodnej w temperaturze 37°C w celu .

Tabela 5. Sondy subtelomerowe Vysis wykorzystane w metodzie FISH

Nazwa	Pozycja na chromosomie	Locus
Zestaw 1	1p, 1q, Xp/Xq ¹	<i>CEB108/T7, D1S3738, DXYS129</i>
Zestaw 2	2p, 2q, Xq/Yq ¹	<i>VIJ yRM2052, D2S447, Z43206</i>
Zestaw 3	3p, 3q, 22q ¹	<i>D3S4559, D3S4560, X58044</i>
Zestaw 4	4p, 4q, 21q ¹	<i>GS10K2/T7, D4S2930, VIJ yRM2029</i>
Zestaw 5	5p, 5q ²	<i>C84c11/T3, GS35o8/T7</i>
Zestaw 6	6p, 6q, 13q ¹	<i>6PTEL48, VIJ yRM2158, D13S327</i>
Zestaw 7	7p, 7q, 14q ¹	<i>G31341, STS2000H, sD14S1420</i>
Zestaw 8	8p, 8q, 17p ¹	<i>D8S504, VIJ yRM2053, 282M15/SP6</i>
Zestaw 9	9p, 9q, 17q ¹	<i>305J7-T7, D9S325, D17S928</i>
Zestaw 10	10p, 10q, 15q ¹	<i>Z96139, D10S2290, D15S936</i>
Zestaw 11	11p, 11q, 18p ¹	<i>U12896, D11S1037, D18S552</i>
Zestaw 12	12p, 12q, 18q ¹	<i>8M16/SP6, VIJ yRM2196, D18S1390</i>
Zestaw 13	16p, 16q ²	<i>STSG608831;STSSG608938, Z96319</i>
Zestaw 14	19p, 19q, 19p13 ¹	<i>I29F16/SP6, D19S238E</i>
Zestaw 15	20p, 20q ²	<i>D20S1157, 20QTEL14</i>

¹Sondy wyznakowane fluorochromem (kolejno): zielonym (SpectrumGreen), czerwonym (SpectrumOrange) i niebieskim (SpectrumAqua).

²Sondy wyznakowane fluorochromem (kolejno): zielonym (SpectrumGreen) i czerwonym (SpectrumOrange).

Po zakończeniu hybrydyzacji preparaty płukano dwukrotnie. Po usunięciu Fixogumy oraz szkiełka nakrywkowego preparaty płukano w buforze płuczącym I w temperaturze 73°C przez 2 minuty, a następnie przenoszono do buforu płuczającego II i płukano dalej przez 1 minutę w temperaturze pokojowej. Po wysuszeniu nakładano 15 µl DAPI i nakładano szkiełko nakrywkowe o wymiarach 20x40 mm.

3.5.3. Izolacja DNA

Izolacja genomowego DNA z kosmówki metodą detergentową

Do umieszczonej w próbówce kosmówki w ilości 100-200 mg dodawano roztwór 1x PBS do objętości 2 ml, a następnie wirowano przez 10 minut przy prędkości 6000 obrotów na minutę. Po odwirowaniu i zlaniu roztworu, do próbówki dodawano bufor SE do objętości 1 ml, proteinazę K (10 mg/ml) w ilości 30 µl oraz 400 µl 10% roztworu SDS. Probówkę inkubowano przez 1-2 godziny w temperaturze 56°C na termomikserze Comfort Eppendorf. Po inkubacji dodawano 200 µl 5M roztworu NaCl i wirowano przez 10 minut przy prędkości 12 000 obrotów na minutę. Etap powtarzano dwukrotnie. Po drugim wirowaniu supernatant przenoszono do próbówki o pojemności 15 ml i dodawano 6 ml 96% schłodzonego etanolu w celu wytrącenia DNA. Wytrącony DNA przenoszono do próbówki o pojemności 1,5 ml, dodawano 500 µl 75% etanolu, a następnie wirowano przez 5 minut przy prędkości 9600 obrotów na minutę. Po

wirowaniu, etanol usuwano, a DNA suszono na termomikserze przez około 30 minut w temperaturze 37°C. DNA rozpuszczano w 500 µl wody dejonizowanej.

Izolacja genomowego DNA z kosmówki z zestawem innuPrep DNA Mini Kit Analytik Jena

Zestaw innuPrep DNA Mini Kit ma zastosowanie do izolacji niewielkich fragmentów tkanek (do 40 mg) oraz tkanek utrwalonych, pochodzących z bloczków parafinowych. Zestaw wykorzystano do izolacji kosmówki pobranej bezpośrednio po poronieniu jak i utrwalonej. Izolacja DNA odbywała się zgodnie z instrukcją producenta zestawu innuPrep DNA Mini Kit (Analytik Jena).

Pomiar ilości i ocena jakości DNA

Ocenę jakościową wyizolowanego DNA dokonywano przez rozdział elektroforetyczny DNA w obecności standardu wielkości Lambda DNA/HindIII (Fermentas). Elektroforezę prowadzono w 1% żelu agarozowym w buforze 1x TAE, zawierającym 1 µg/ml bromku etydyny, przy napięciu 40V, przez 3 godziny. Rozdział elektroforetyczny oceniano w świetle UV za pomocą systemu do dokumentacji żeli Gel DocTM2000 (BioRad).

Pomiar stężenia genomowego DNA dokonywano przez pomiar spektrofotometryczny absorpcji światła UV, wodnego preparatu DNA przy długościach fal 260, 280 przy pomocy spektrofotometru Nanodrop 2000 Thermo Scientific.

Oczyszczanie DNA z użyciem fenolu, chloroformu i alkoholu izoamylowego

Jeżeli preparaty wykazywały wysoki stopień zanieczyszczenia białkami ($A_{260} / A_{280} \cdot 1, 8$), co wpływało na przebieg reakcji PCR, preparaty doczyszczano przy użyciu mieszaniny fenolu, chloroformu i alkoholu izoamylowego. Do próbki z wodnym roztworem DNA dodawano równą ilość mieszaniny fenolu, chloroformu i alkoholu izoamylowego (stosunek objętościowy 25:24:1). Próby wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 min przy prędkości obrotów 4000 na minutę. Po wirowaniu fazę wodną zbierano i przenoszono do nowej próbki, do której dodawano 3M roztwór octanu sodu w ilości 0,1 objętości oraz 2,5 objętości 96% etanolu. Po wymieszaniu składników przez 5 sekund przy użyciu próbki pozostawiano na suchym lodzie przez 15 minut. Po upływie czasu próby wirowano przez 30 minut w temperaturze 4°C przy

prędkości 12 000 obrotów na minutę. Po wirowaniu supernatant zlewano a osad suszono na termomikserze w temperaturze 37°C przez 15 min, a następnie rozpuszczano w wodzie dejonizowanej.

3.5.4. MLPA

W reakcji MLPA stosowano zestawy komercyjne firmy MRC-Holland: zestaw P095 do identyfikacji aneuploidii chromosomów pary 13, 18, 21, X i Y, zestaw P036 i P070 do identyfikacji zmian w regionach subtelomerowych wszystkich chromosomów oraz zestaw P245 do identyfikacji zespołów mikrodelecji/mikroduplicacji i P373 dla regionu krytycznego zespołu Wolfa-Hirschhorna.

Reakcję MLPA przeprowadzano zgodnie z instrukcją producenta MRC-Holland. W każdym doświadczeniu reakcję przeprowadzano na 8-16 próbach. Zestaw prób dla każdego doświadczenia stanowiły próby badane oraz cztery próby kontrolne. Próby kontrolne stanowiły: kontrola pozytywna (DNA ze znaną wcześniej aneuploidią) oraz kontrole negatywne (DNA prawidłowe od trzech zdrowych osób). Stężenie DNA prób w reakcji wynosiło 50-150 ng. Przebieg reakcji MLPA przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Etapy reakcji MLPA

Etapy reakcji	Temperatura	Czas
<i>Hybrydyzacja:</i> <ul style="list-style-type: none"> • Denaturacja DNA • Schłodzenie prób • Denaturacja sond • Hybrydyzacja 	1. 98°C 2. 25°C 3. 95°C 4. 60°C	5 minut 1 minut 1 minuta 16 godzin
<i>Ligacja:</i> <ul style="list-style-type: none"> • Schłodzenie prób • Ligacja • Inaktywacja ligazy • Schłodzenie prób 	5. 54°C 6. 54°C 7. 98°C 8. 4°C	~ 15 minut 5 minut ~
<i>Reakcja PCR:</i> <ul style="list-style-type: none"> • Dodawanie mieszaniny reakcyjnej • Denaturacja • Wiązanie starterów • Synteza • Synteza końcowa • Schłodzenie prób 	9. 60°C 10. 35 cykli: <ul style="list-style-type: none"> • 95°C • 60°C • 72°C 11. 72°C 12. 4°C	2-3 minuty 30 sekund 30 sekund 60 sekund 20 minut ~

Produkty po reakcji poddawano wstępnej ocenie poprzez rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym w buforze 1xTAE pod napięciem 180V przez 30 minut (2 μ l produktu mieszano przed nałożeniem na żel z 3 μ l buforu obciążającego). Żel agarozowy z bromkiem etydyny (1 μ g/ml) analizowano w świetle UV. Obraz utrwalano przy pomocy systemu do dokumentacji żeli (GelDocTM2000, Biorad).

Po wstępnej ocenie produkty poddawano rozdziałowi elektroforetycznemu na sekwenatorze kapilarnym Genetic Analyser ABI Prism 3130XL (Applied Biosystems) w laboratorium komercyjnym Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej UAM w Poznaniu. Elektroforezę prowadzono z standardem wielkości LIZ600.

Analizę reakcji przeprowadzano z użyciem programu PeakScanner Softver v.1.0 (Applied Biosystem). Uzyskane dane analizowano z wykorzystaniem programu Microsoft Excel. Normalizacja wyników uzyskanych po reakcji MLPA przebiegała zgodnie z zaleceniami producenta. Ocenę pomiaru intensywności fluorescencji produktów po reakcji dokonywano poprzez analizę powierzchni pików w procesie normalizacji wewnętrznej oraz normalizacji zewnętrznej między próbą badaną a próbkami kontrolnymi (referencyjnymi). Wewnętrzna normalizacja polegała na podziale powierzchni każdego pików przez sumę powierzchni wszystkich pików w jednej próbce. W następnym etapie normalizacja zewnętrzna polegała na podziale wartości uzyskanej dla każdego pików przez średnią wartość uzyskaną dla wszystkich prób kontrolnych.

W przypadku zestawu P095 wewnętrzna normalizacja prowadzona była dla każdego bloku sond (13, 18, 21, X, Y) oddzielnie i polegała na podziale wartości powierzchni każdego pików przez sumę wartości pików przyległych. Wartości dla produktów pochodzących z chromosomów X i Y były uzyskiwane przez podział wartości powierzchni pików przez sumę wartości powierzchni pików pochodzących od chromosomów autosomalnych. W przypadku zewnętrznej normalizacji, wynik uzyskiwano poprzez podział wartości każdego pików przez średnią wartość uzyskaną dla wszystkich prób w doświadczeniu. Ponieważ w przypadku tego zestawu oceniano także aneuploidie chromosomów X i Y, zawsze porównywano próby pochodzące z zarodków/płodów tej samej płci (żeńskie z żeńskimi, a męskie z męskimi).

Wartości pików prawidłowych mieściły się w granicach 0.7-1.3. Wartości niemieszczące się w tych granicach uznawano za nieprawidłowe. Wyniki uzyskane dla

pików, które osiągnęły wartość powyżej 1.3 uznawane były za duplikację regionie, natomiast poniżej 0.7 za delecję w danym regionie chromosomu.

Zestaw P095-A2 Aneuploidy

Zestaw P095-A2 służy do identyfikacji najczęstszych aneuploidii, które wykrywane są w okresie prenatalnym. Zestaw złożony jest z 36 sond hybrydujących do chromosomów pary 13, 18, 21, X i Y. Do każdego chromosomu hybryduje 8 różnych sond, z wyjątkiem chromosomu Y, do którego hybrydują tylko 4 sondy. Wielkość produktów po amplifikacji, geny, których regiony ulegają amplifikacji oraz *locus* dla hybrydującej sondy przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Zestaw MLPA P095. W Tabeli przedstawiono wielkość produktu, *locus* badanego genu oraz badany ekson.

Lp.	Wielkość produktu w nt	Gen	<i>Locus</i>
1	136	<i>SIM2</i>	21q22.13
2	142	<i>SMAD4</i>	18q21.2
3	148	<i>ABCC4</i>	13q32
4	154	<i>AR</i>	Xq12
5	160	<i>SRY</i>	Yp11.31
6	166	<i>NCAM2</i>	21q21.1
7	172	<i>PMAIP1</i>	18q21.32
8	178	<i>CCNA1</i>	13q12.3
9	184	<i>ACSL4</i>	Xq22.3
10	193	<i>SRY</i>	Yp11.31
11	202	<i>USP25</i>	21q21.1
12	211	<i>SSI8</i>	18q11.2
13	220	<i>RBI</i>	13q14.2
14	229	<i>ARX</i>	Xp21.3
15	238	<i>UTY</i>	Yq11.21
16	247	<i>STCH</i>	21q11.2
17	256	<i>NFATC1</i>	18q23
18	265	<i>DACH1</i>	13q21.32
19	274	<i>TM4SF2</i>	Xp11.4
20	283	<i>ZFY</i>	Yp11.31
21	292	<i>SOD1</i>	21q22.11
22	301	<i>TYMS</i>	18p11.32
23	310	<i>ARHGEF7</i>	13q34
24	319	<i>LICAM</i>	Xq28
25	337	<i>APP</i>	21q21.3
26	346	<i>SERPINB2</i>	18q21.33
27	355	<i>BRCA2</i>	13q13.1
28	364	<i>RPS6KA3</i>	Xp22.12
29	382	<i>TFF1</i>	21q22.3
30	391	<i>SSI8</i>	18q11.2

31	400	<i>DLEU1</i>	13q14.3
32	409	<i>AIFM1</i>	Xq25
33	427	<i>TIAMI</i>	21q22.11
34	436	<i>MC2R</i>	18p11.22
35	445	<i>ING1</i>	13q34
36	454	<i>DMD</i>	Xp21.2

Zestaw P036-E1Human Telomere-3 i P070-B1Human Telomere-5

Zestawy P036 i P070 służą do identyfikacji zmian w regionach subtelomerowych chromosomów. Zestawy zaprojektowane zostały w ten sposób, że zawierają po 46 sond subtelomerowych, po dwie sondy dla każdego chromosomu oraz dodatkową sondę dla regionu nietelomerowego chromosomu Y. Zestawy te są przeznaczone przede wszystkim do identyfikacji zmian, które mogą być przyczyną niepełnosprawności intelektualnej. Ze względu jednak na możliwość detekcji zmian niezrównoważonych o charakterze delecji lub duplikacji, dotyczących dystalnych odcinków ramion p i q wszystkich chromosomów, znalazły zastosowanie do identyfikacji aneuploidii chromosomowych oraz niezrównoważonych aberracji strukturalnych (translokacji, delecji/duplikacji). Duplikacja lub delecja obu sond na tym samym chromosomie może wskazywać na występowanie aneuploidii (odpowiednio monosomii lub trisomii). Geny, których regiony ulegają amplifikacji wraz z wielkością produktów oraz *locus* dla hybrydującej sondy przedstawiono dla obu zestawów w Tabelach 8 i 9.

Tabela 8. Zestaw MLPA P036. W Tabeli przedstawiono wielkość produktu, *locus* badanego genu oraz badany ekson.

Lp	Wielkość produktu w nt	Gen	Ekson	Locus
1	130	<i>TNFRSF4</i>	5	1p36.33
2	136	<i>ACPI</i>	1	2p25.3
3	142	<i>CHL1</i>	5	3p26.3
4	151	<i>PIGG</i>	7b	4p16.3
5	158	<i>PDCD6</i>	6	5p15.33
6	166	<i>IRF4</i>	2	6p25.3
7	172	<i>ADAP1</i>	4	7p22.3
8	179	<i>FBXO25</i>	9	8p23.3
9	186	<i>DMRT1</i>	2	9p24.3
10	193	<i>DIP2C</i>	4	10p15.3
11	202	<i>RIC8B</i>	3	11p15.5
12	208	<i>SLC6A12</i>	19	12p13.33
13	219	<i>PSPC1</i>	2	13q11
14	227	<i>CCNB1IP1</i>	4	14q11.2

15	235	<i>MKRN3</i>	1	15q11.2
16	242	<i>POLR3K</i>		16p13.3
17	250	<i>RPH3AL</i>	5	17p13.3
18	258	<i>USP14</i>	7	18p11.32
19	265	<i>CDC34</i>	5	19p13.3
20	274	<i>SOX12</i>	1	20p13
21	283	<i>RBM11</i>	1	21q11.2
22	289	<i>BID</i>	4	22q11.21
23	298	<i>SHOX</i>	4	Xp22.33PAR
24	307	<i>SH3BP5L</i>	5	1q44
25	313	<i>CAPN10</i>	3	2q37.3
26	322	<i>BDH1</i>	4	3q29
27	330	<i>TRIML2</i>	2	4q35.2
28	337	<i>GNB2L1</i>	6	5q35.3
29	346	<i>PSMB1</i>	5	6q27
30	355	<i>VIPR2</i>	3	7q36.3
31	361	<i>ZC3H3</i>	2	8q24.3
32	37	<i>EHMT1</i>	23	9q34.3
33	379	<i>PAOX</i>	3	10q26.3
34	386	<i>NCAPD3</i>	2	11q25
35	395	<i>ZNF10</i>	5	12q24.33
36	402	<i>F7</i>	6	13q34
37	411	<i>MTA1</i>	8	14q32.33
38	418	<i>ALDH1A3</i>	11	15q26.3
39	426	<i>GAS8</i>	6	16q24.3
40	434	<i>TBCD</i>	18	17q25.3
41	441	<i>C18orf22</i>	4	18q23
42	450	<i>CHMP2A</i>	6	19q13.43
43	458	<i>OPRL1</i>	3	20q13.33
44	466	<i>PRMT2</i>	4	21q22.3
45	475	<i>RABL2B</i>	9	22q13.33
46	483	<i>VAMP7</i>	4	Xq28PAR

Tabela 9. Zestaw MLPA P070. W Tabeli przedstawiono wielkość produktu, *locus* badanego genu oraz badany ekson.

Lp.	Wielkość produktu w nt	Gen	Ekson	<i>Locus</i>
1	132	<i>SH3BP5L</i>	3	1q44
2	139	<i>ATG4B</i>	7	2q37.3
3	145	<i>KIAA0226</i>	22a	3q29
4	152	<i>FRG1</i>	1	4q35.2
5	160	<i>GNB2L1</i>	2	5q35.3
6	166	<i>TBP</i>	2	6q27
7	172	<i>VIPR2</i>	2	7q36.3
8	179	<i>RECQL4</i>	17	8q24.3
9	186	<i>EHMT1</i>	10	9q34.3
10	193	<i>ECHS1</i>	8	10q26.3
11	202	<i>IGSF9B</i>	20	11q25
12	211	<i>ZNF10</i>	5	12q24.33
13	218	<i>CDC16</i>	8	13q34

14	226	<i>MTA1</i>	7	14q32.3
15	233	<i>TM2D3</i>	3	15q26.3
16	241	<i>GAS8</i>	11b	16q24.3
17	250	<i>SECTM1</i>	4	17q25.3
18	258	<i>CTDP1</i>	8	18q23
19	265	<i>CHMP2A</i>	3	19q13.43
20	274	<i>UCKL1</i>	6	20q13.33
21	281	<i>S100B</i>	2	21q22.3
22	290	<i>ARSA</i>	1d	22q13.33
23	298	<i>VAMP7</i>	8	Xq28
24	306	<i>TNFRSF18</i>	4b	1p36.33
25	315	<i>ACPI</i>	5	2p25.3
26	323	<i>CHL1</i>	3	3p26.3
27	329	<i>PIGG</i>	7	4p16.3
28	337	<i>CCDC127</i>	3	5p15.33
29	346	<i>IRF4</i>	3	6p25.3
30	355	<i>UNC84A</i>	3	7p22
31	362	<i>FBXO25</i>	8	8p23.3
32	370	<i>DOCK8</i>	23	9p24.3
33	379	<i>ZMYND11</i>	2a	10p15.3
34	387	<i>BET1L</i>	3b	11p15.5
35	393	<i>JARID1A</i>	23	12p13.33
36	402	<i>PSPC1</i>	1	13q11
37	409	<i>PARP2</i>	16	14q11.2
38	418	<i>NDN</i>	1	15q11.2
39	427	<i>DECR2</i>	9	16p13.3
40	436	<i>RPH3AL</i>	2	17p13.3
41	444	<i>THOC1</i>	21	18p11.32
42	450	<i>PPAP2C</i>	7	19p13.3
43	459	<i>ZCCHC3</i>	1	20p13
44	466	<i>HSPA13</i>	2	21q11.2
45	478	<i>IL17RA</i>	4	22q11.1
46	484	<i>SHOX</i>	5	Xp22.33

Zestaw P245-A2

Zestaw P245 został zaprojektowany do identyfikacji delecji lub duplikacji w regionach genów związanych ze znanymi zespołami mikrodelecyjnymi lub mikroduplikacyjnymi. Każdy zestaw zawiera 49 sond dla 20 różnych zespołów oraz sondę kontrolną (Xp21.2). Sondy są zaprojektowane do regionów krytycznych następujących zespołów: delecja 1p36 (sondy), mikrodelecja 2p16, mikrodelecja 3q29, mikrodelecja 9q22.3, delecja 15q24, mikrodelecja 17q21, delecja 22q13/zespół Phelan-McDermid, zespół Cri du Chat 5p15, zespół DiGeorga (region 22q11 oraz 10p15), zespół Langer-Giediona 8q24.12, zespół Millera-Diekera 17p13.3, mikrodelecja NF1 17q11.2, zespół Pradera-Willego/Angelmana 15q12, duplikacja w regionie genu

MECP2 (Xq28), zespół Rubinsteina-Taybiego 16p13.3, zespół Smith-Magenis 17p11.2, zespół Sorosa 5q35.3, zespół WAGR 11p13, zespół Williama 7q11.23, zespół Wolfa-Hirschhorna 4p16.3 (Tabela 10).

Tabela 10. Zestaw MLPA P245. W Tabeli przedstawiono wielkość produktu, *locus* badanego genu oraz badany ekson.

Lp.	Wielkość produktu w nt	Gen	Ekson	Locus
1	297	<i>DMD</i>	35	Xp21.2
2	184	<i>MECP2</i>	4	Xq28
3	148	<i>MECP2</i>	4	Xq28
4	202	<i>MECP2</i>	1	Xq28
5	130	<i>TNFRSF4</i>	5	1p36.33
6	178	<i>GNBI</i>	3	1p36.33
7	166	<i>GABRD</i>	2	1p36.33
8	267	<i>FANCL</i>	5	2p16.1
9	484	<i>REL</i>	11	2p16.1
10	355	<i>DLG1</i>	23	3q29
11	418	<i>DLG1</i>	3	3q29
12	232	<i>LETM1</i>	3	4p16.3
13	445	<i>WHSCI</i>	9	4p16.3
14	437	<i>TERT</i>	3	5p15.33
15	283	<i>CLPTMIL</i>	2	5p15.33
16	153	<i>NSD1</i>	17	5q35.3
17	454	<i>NSD1</i>	22	5q35.3
18	310	<i>ELN</i>	1	7q11.23
19	364	<i>ELN</i>	20	7q11.23
20	391	<i>LIMK1</i>	4	7q11.23
21	401	<i>TRPS1</i>	1	8q24.11
22	427	<i>EIF3H</i>	8	8q24.11
23	319	<i>TGFBR1</i>	7	9q22.33
24	409	<i>TGFBR1</i>	8	9q22.33
25	136	<i>GATA3</i>	1	10p15.1
26	349	Hs.538604	down	10p15.1
27	220	<i>PAX6</i>	5	11p13
28	214	<i>NDN</i>	1	15q11.2
29	246	<i>SNRPN</i>	3	15q11.2
30	292	<i>SNRPN</i>	8	15q11.2
31	160	<i>UBE3A</i>	7	15q11.2
32	190	<i>SEMA7A</i>	8	15q24.1
33	326	<i>CYP11A1</i>	2	15q24.1
34	172	<i>CREBBP</i>	1	16p13.3
35	142	<i>PAFAH1B7</i>	3	17p13.3
36	238	<i>PAFAH1B1</i>	7	17p13.3
37	466	<i>RAI1</i>	1	17p11.2
38	274	<i>LRRC48</i>	6	17p11.2
39	304	<i>LLGL1</i>	4	17p11.2
40	260	<i>NF1</i>	12	17q11.2
41	335	<i>NF1</i>	20	17q11.2

42	474	<i>CRHR1</i>	8	17q21.31
43	226	<i>MAPT</i>	11	17q21.31
44	341	<i>MAPT</i>	13	17q21.31
45	196	<i>CLDN5</i>	AB-region	22q11.21
46	208	<i>GP1BB</i>	AB-region	22q11.21
47	373	<i>SNAP29</i>	CD-region	22q11.21
48	254	<i>SHANK3</i>	17	22q13.33
49	382	<i>SHANK3</i>	22	22q13.33

Zestaw MLPA P373-A1

Zestaw P373-A1 służy do szczegółowej identyfikacji 5 zespołów mikrodelecji: 1p36 (13 sond), 3q29 (8 sond), zespołu Wolfa-Hirschhorna 4p (10 sond), zespołu Cri-du-chat 5p (9 sond) i zespołu Phelan-Mcdermid 22q13 (10 sond). Zestaw został zastosowany do potwierdzenia duplikacji w regionie 4p16.3, krytycznym dla zespołu Wolfa-Hirschhorna, która została zidentyfikowana metodą array CGH. Szczegółowy układ sond dla tego regionu przedstawiono w Tabeli 11.

Tabela 11. Fragment zestawu MLPA P373. W Tabeli przedstawiono geny analizowane w regionie krytycznym dla Wolfa-Hirschhorna 4p16.3.

Lp.	Wielkość produktu w nt	Gen	Locus
1	122	<i>SPON2</i>	4p16.3
2	154	<i>PIGG</i>	4p16.3
3	160	<i>FGFRL1</i>	4p16.3
4	202	<i>FGFR3</i>	4p16.3
5	208	<i>WHSC1</i>	4p16.3
6	234	<i>WHSC1</i>	4p16.3
7	274	<i>GAK</i>	4p16.3
8	418	<i>WHSC1</i>	4p16.3
9	453	<i>WHSC1</i>	4p16.3
10	463	<i>WHSC2</i>	4p16.3

3.5.5. QF-PCR

Reakcję QF-PCR przeprowadzano dla wybranych sekwencji STR chromosomów pary: 13, 15, 16, 18, 21, 22. Sekwencje starterowe zostały zaczerpnięte z piśmiennictwa (Diego-Alvarez i wsp, 2005) i przedstawione w Tabeli 12. Startery zostały wyznakowane odpowiednimi fluorochromami. Wybrano sekwencje starterowe o wysokim stopniu heterozygotyczności w populacji i o różnych powtórzeniach nukleotydowych typu STR..

Tabela 12. Markery STR stosowane w reakcji QF-PCR.

Marker	Znacznik	Sekwencja starterowa	Wielkość (pz)	Typ	Locus
<i>Mieszanina A</i>					
AMXY	6-FAM niebieski	F 5'- CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG- 3' R 5'- ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG- 3'	106(X)/ 112 (Y)	-	Xp22.1- 22.3/ Yp11.2
D18S535	PET czerwony	F 5'-TCATGTGACAAAAGCCACAC-3' R 5'- AGACAGAAATATAGATGAGAATGC A-3'	130-154	Tetra	18q12.3
D13S631	NED żółty	F 5'-GGCAACAAGAGCAAACTCT- 3' R 5'-TAGCCCTCACCATGATTGG-3'	195-215	Tetra	13q32.2
D21S1414	VIC zielony	F 5'- AAATTAGTGTCTGGCACCCAGTA-3' R 5'- CAATTCCCCAAGTGAATTGCCTTC- 3'	344-364	Tetra	21q21.1
<i>Mieszanina B</i>					
D16S539	PET Czerwony	F 5'-GATCCCAAGCTCTTCCTCTT-3' R 5'-ACGTTTGTGTGTGCATCTGT-3'	145-169	Tetra	16q24.1
D15S123	NED żółty	F 5'-AGCTGAACCCAATGGACT-3' R 5'-TTTCATGCCACCAACAAA-3'	188-206	Di	15q21.1
D22S280	VIC zielony	F 5'-GCTCCAGCCTATCAGGATG-3' R 5'- GATTCCAGATCACAAAAGTGGT-3'	216-228	Di	22q12.3
DXS1002	6-FAM	F 5'-CTGCTACCCTTTAGTTCTCTC-3' R 5'-TCCATGTTGCTGCGAA-3'	266-274	Di	Xq21.2

W reakcji PCR wykorzystano zestaw Qiagene Type-it® Microsatellite PCR dla metod typu multipleks, zawierający: 2x Type-it Multiplex PCR Master Mix

(polimeraza DNA HotStarTaq *Plus*, 6 mM MgCl₂, cztery dNTP), bufor Q-solution oraz wodę wolną od RNazy.

Stężenie genomowego DNA w reakcji wynosiło około 50-100 ng, zgodnie z zaleceniami producenta. Skład mieszaniny reakcyjnej został przedstawiony w Tabeli 13.

Tabela 13. Skład mieszaniny reakcyjnej w metodzie QF-PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Objętość (1 reakcja) w μ l
2x Type-it Multiplex PCR Master Mix	5
Startery A/B 0,2 μ M	1
Genomowe DNA ~ 50-100 ng	4
<i>Całkowita objętość reakcji</i>	10

Całkowita objętość reakcji wynosiła 10 μ l. W przypadku stosowania mniejszej objętości niż 25 μ l stosunek objętości 2x Type-it Multiplex PCR Master Mix do mieszaniny starterów i genomowego DNA powinien wynosić 1:1. Dla każdej próby przeprowadzano dwie reakcje Multiplex PCR z dwoma różnymi grupami starterów. W reakcji A użyto mieszaniny starterów dla chromosomów pary X i Y, 18, 13 i 21, natomiast w reakcji B znajdowała się mieszanina starterów dla chromosomów pary 16, 15, 22 i X. Obie reakcje przebiegały w takich samych warunkach. Warunki reakcji PCR przedstawione zostały w Tabeli 14.

Tabela 14. Warunki reakcji QF-PCR

Etap reakcji	Temperatura	Czas	Cykle
<i>Aktywacja polimerazy</i>	95°C	10 minut	1
<i>Denaturacja</i>	94°C	15 sekund	25
<i>Wiązanie starterów</i>	53°C	40 sekund	
<i>Synteza</i>	72°C	40 sekund	
<i>Synteza końcowa</i>	72°C	7 minut	1

Analiza produktów po reakcji

Produkty po QF-PCR były rozdzielane na sekwenatorze kapilarnym Genetic Analyser ABI Prism 3130XL (Applied Biosystems) w laboratorium komercyjnym Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej UAM w Poznaniu. Elektroforezę prowadzono z standardem wielkości LIZ600.

Ocena produktów odbywała się przy użyciu programu PeakScanner Software v.1.0. Analizowano wielkość pików, liczbę oraz stosunek wielkości pików

pochodzących od jednego markera STR. Obecność dwóch pików dla jednego markera zbliżonej wielkości oznaczała występowanie w danym *locus* dwóch heterozygotycznych alleli. Trzy piki o zbliżonych wielkościach w danym *locus* oznaczały występowanie trisomii (stosunek pików 1:1:1 – wzór trisomii trójalleliczny), podobnie, jeśli występowały dwa piki o różnych wielkościach (stosunek pików 2:1 – wzór trisomii dwualleliczny), których stosunek wysokości mieścił się w przedziale <0.65 lub >1.8 . W przypadku występowania triploidii, wszystkie piki przedstawiały wzór trisomiczny (dwu- lub trójalleliczny). Monosomię chromosomu X identyfikowano przy występowaniu pojedynczego pików dla markera AMXY oraz DXS1002. W innych przypadkach występowanie pojedynczego pików oznaczało obecność w określonym *locus* homozygotycznych alleli (dwóch lub trzech).

3.5.6. Array CGH

CGH do mikromacierzy przeprowadzono na platformie NibleGen CGH 12x135K firmy Roche. Wszystkie odczynniki stosowane w reakcji pochodziły z gotowego zestawu tego producenta. Badania mikromacierzowe zostały przeprowadzone w NZOZ Centrum Genetyki Medycznej Genesis w Poznaniu.

Znakowanie

Pierwszy etap obejmował znakowanie barwnikami fluorescencyjnymi Cy3 i Cy5 DNA pochodzącego z kosmówki oraz DNA referencyjnego (prawidłowego). W pierwszym przypadku badany DNA o stężeniu 1 μg łączono z 40 μl Cy3 i uzupełniano do 80 μl wodą. Tak samo postępowano z DNA referencyjnym, który łączono z Cy5. Próby denaturowano w termocyklerze w 98°C przez 10 minut. Po wyjęciu z termocyklera próby natychmiast wstawiano do lodowatego statywu na 2 minuty. Po dwóch minutach dodawano do prób 20 μl mieszaniny składającej się z dNTP, fragmentu Klenowa (3'->5' exo-) oraz wody wolnej od nukleaz, a następnie mieszano oba składniki przez pipetowanie. Poprzez krótkie wirowanie w mikrowirówce mieszanina opadała na dno próbki, a następnie inkubowano ją przez 2 godziny w 37°C w termocyklerze. Po inkubacji wyznakowany DNA wytrącano z roztworu. Przed wytrącaniem dodawano po 10 0,5M EDTA, aby zatrzymać reakcję, a następnie dodawano 11,5 μl 5M NaCl. W kolejnym etapie dodawano całą objętość mieszaniny do

wcześniej przygotowanych probówek z 2-propanolem (110 μ l). Próby wortexowano, a następnie inkubowano przez 10 minut w pokojowej temperaturze, unikając ekspozycji na światło. Następnie próby wirowano przez 10 minut przy prędkości 12 000 obrotów na minutę. Po wirowaniu na dnie probówki otrzymywano różowy lub niebieski osad (w zależności od barwnika), a supernatant ostrożnie usuwano. Osad przemywano w 500 μ l 80% lodowatego alkoholu etylowego, a potem po raz kolejny wirowano z taką samą prędkością, ale tylko przez 2 minuty. Supernatant usuwano, a osad suszono.

Hybrydyzacja

Wysuszony osad po znakowaniu uwadniano w 25 μ l wody, wortexowano i wirowano, aby zebrać mieszaninę na dnie probówki. Następnie mierzono stężenie każdej próby z użyciem spektrofotometru Nanodrop. Po tym etapie obie wyznakowane próby – badaną i referencyjną łączono w równych ilościach (20 μ g każda). Próby następnie suszono, a potem uwadniano i wirowano, aby osadzić mieszaninę na dnie probówki. Tak przygotowane DNA łączono z mieszaniną hybrydyzacyjną (2x bufor do hybrydyzacji, komponent hybrydyzacyjny A, Alignment Oligo) w ten sposób, aby ostateczna objętość wynosiła 12 μ l. Następnie mieszaninę wortexowano i inkubowano na termomikserze przez 5 minut w 95°C, wortexowano i umieszczano w systemie hybrydyzacyjnym w temperaturze 42°C. Przy użyciu specjalnej pipety hybrydyzacyjnej nanoszono mieszaninę na mikromacierz. Próby były hybrydyzowane przez całą noc w temperaturze 42°C.

Płukanie

Do płukania mikromacierzy stosowano trzy bufony płuczące: I, II, III. Po wyjęciu mikromacierzy z systemu hybrydyzacyjnego płukano ją kolejno w trzech buforach o temperaturze pokojowej, energicznie mieszając (bufor płuczący I – 2 minuty, bufor płuczący II – 1 minuta, bufor płuczący III – 15 sekund). Po płukaniu mikromacierz suszono.

Analiza

Wstępna analiza wyników odbywała się przy użyciu skanera systemu NibleGen. Następnie wyniki analizowano z zastosowaniem bazy danych Genoglyphix firmy Signature Genomics Laboratories LLC.

4. WYNIKI

4.1. Choroby genetyczne zarodka/płodu zidentyfikowane w materiale z poronień

Przeprowadzone badania różnymi metodami (FISH, QF-PCR, MLPA i array CGH) pozwoliły na zidentyfikowanie nieprawidłowości genetycznych w 67 kosmówkach ze 143 badanych, co stanowi 47% przypadków. Były to aberracje chromosomowe o charakterze liczbowym i strukturalnym oraz submikroskopowe rearanżacje genomowe typu delekcji/duplikacji. Najczęstszymi zmianami były aberracje liczbowe chromosomów. Spośród 67 nieprawidłowości 51% stanowiły trisomie chromosomów autosomalnych (30 trisomii pojedynczych chromosomów i 4 trisomie wielokrotne), 18% monosomia chromosomu X (12 przypadków), 15% triploidie (10 przypadków), 3% trisomie chromosomów płci (2 przypadki), 3% monosomie chromosomu X z trisomią chromosomu autosomalnego (2 przypadki), 1% mozaika XX/XY (1 przypadek) oraz 9% aberracje strukturalne chromosomów (6 przypadków, w tym 2 o charakterze submikroskopowym). Najczęstsza wśród trisomii była trisomia chromosomu pary 16 (9 przypadków), a następnie pary 22 (5 przypadków). Kolejne trisomie dotyczyły chromosomów pary 14, 18 i 21 (3 przypadki każdej trisomii) oraz pary 13 (2 przypadki). Najrzadsze trisomie (po 1 przypadku) dotyczyły chromosomów pary 5, 7, 8, 15 i 20. Trisomie wielokrotne dotyczyły chromosomów pary 13, 15, 16, 19 (dwukrotnie), 20, 21 i 22 (dwukrotnie). Wśród triploidii najczęstszą była triploidia z chromosomami płci XXY (6 przypadków), następnie XXX (3 przypadki), a najrzadsza XYY (1 przypadek).

Wszystkie uzyskane wyniki zostały przedstawione w Tabeli 15, z uwzględnieniem kolejności ciąży, tygodnia ciąży, wieku matki, kariotypu obojga rodziców oraz informacji na temat rodowodu partnerów.

Tabela 15. Wyniki badań materiału po poronieniu, uzyskanego od par z niepowodzeniami ciąży. W Tabeli przedstawiono również informacje dotyczące czasu trwania ciąży oraz kolejności ciąży, wieku matki w chwili utraty ciąży, kariotypu obojga partnerów oraz informacji uzyskanych na podstawie analizy rodowodu.

Lp	Aberracja chromosomowa	Kolejność ciąży	Tydzień ciąży	Wiek matki	Kariotypy pary ¹	Rodowód ²
Trisomie autosomalne						
1.	trisomia 5	CIII	8	28	P	O
2.	trisomia 7	CII	7	38	P	N
3.	trisomia 8	CII	8	25	P	O
4.	trisomia 13	CIV	11	30	P	N
5.	trisomia 13	CV	12	43	P	O
6.	trisomia 14	CII	14	33	P	N
7.	trisomia 14	CIII	8	30	P	O
8.	trisomia 14	CIV	10	36	P	N
9.	trisomia 15	CIII	10	35	P	N
10.	trisomia 16	CV	10	32	P	N
11.	trisomia 16	CII	9	34	N♀/P♂	O
12.	trisomia 16	CIV	12	34	P	O
13.	trisomia 16	CII	9	35	P	N
14.	trisomia 16	CIII	9	29	P	N
15.	trisomia 16	CII	10	29	P	N
16.	trisomia 16	CII	8	29	P	N
17.	trisomia 16	CIII	8	34	P	N
18.	trisomia 16	CII	8	31	P	N
18.	trisomia 18	CII	21	29	P	N
20.	trisomia 18	CI	12	39	P	O
21.	trisomia 18	CI	8	41	P	N
22.	trisomia 20	CIII	8	40	P	N
23.	trisomia 21	CII	10	28	P	O
24.	trisomia 21	CIII	10	33	P	O
25.	trisomia 21	CIII	34	28	P	O
26.	trisomia 22	CI	7	40	P	O
27.	trisomia 22	CII	18	33	P	N
28.	trisomia 22	CII	11	35	P	N
29.	trisomia 22	CIII	9	33	P	N
30.	trisomia 22	CI	11	36	P	N
Triploidia						
31.	triploidia XXX	CIII	12	34	P	O
32.	triploidia XXX	CV	9	34	P	N
33.	triploidia XXX	CI	11	31	P	N
34.	triploidia XXY	CII	13	33	P	N
35.	triploidia XXY	CII	20	29	P	O
36.	triploidia XXY	CII	12	32	P	N
37.	triploidia XXY	CII	9	31	P	N
38.	triploidia XXY	CII	10	30	P	N
39.	triploidia XXY	CIII	10	34	P	N
40.	triploidia XYY	CII	10	33	P	N
Wielokrotne trisomie						
41.	trisomia 21 i 22	CII	9	25	P	O
42.	trisomia 16 i 19	CII	27	21	-	-
43.	trisomia 19 i 22	CIV	7	41	P	O
44.	trisomia 13, 15 i 20	CI	7	48	P	N

Aberracje chromosomów płci						
<i>Monosomia X</i>						
45.	monosomia X	CII	14	32	P	N
46.	monosomia X	CIII	10	31	P	N
47.	monosomia X	CII	10	26	P	O
48.	monosomia X	CIII	8	27	P	O
49.	monosomia X	CIII	10	34	P	N
50.	monosomia X	CIII	10	30	P	N
51.	monosomia X	CIII	8	29	P	O
52.	monosomia X	CI	9	30	P	N
53.	monosomia X	CII	10	35	P	N
54.	monosomia X	CIV	8	29	P	N
55.	monosomia X	CIII	5	29	P	N
56.	monosomia X	CII	9	25	P	N
<i>Inne</i>						
57.	XYY	CII	13	29	N♀/P♂	N
58.	XXX	CII	8	30	N♀/P♂	N
Inne aberracje liczbowe						
59.	monosomia X z trisomią 18	CIII	10	34	P	N
60.	monosomia X z trisomią 16	CIII	9	31	P	N
61.	XX/XY	CIV	12	32	P	N
Aberracje strukturalne						
62.	del 6q dup 9q	CIII	11	33	P♀/N♂	O
63.	dup 18q	CIII	9	27	N♀/P♂	O
64.	del 6p22.3 i dup 6q23.3	CV	10	31	N♀/P♂	O
65.	marker 14/22	CIII	10	33	N♀/P♂	N
66.	dup 4p16.3 i del 5q14.3	CII	16	29	P♀/N♂	N
67.	del 6q i dup 2p	CIV	19	31	P♀/N♂	O

¹ P – kariotypy prawidłowe u obojga partnerów, N♀/P♂ - kobieta nosicielka i partner z kariotypem prawidłowym, P♀/N♂ - partnerka z kariotypem prawidłowym i mężczyzna nosiciel,

² N – rodowód nieobciążony (nie występowały niepowodzenia rozrodu w obu rodzinach), O – rodowód obciążony (w rodowodzie pary występowały niepowodzenia rozrodu)

Na podstawie analiz danych uzyskanych od pacjentów oceniono średni wiek kobiet w chwili poronienia, tydzień ciąży, w którym najczęściej dochodziło do poronienia oraz z której ciąży pochodziła badana kosmówka.

Średni wiek kobiet, które brały udział w badaniu wynosił 31,27+/-3,93. Najmłodsza kobieta miała w chwili poronienia 21 lat, najstarsza 48. Wśród pacjentek, w przypadku których przyczyną utraty ciąży była aberracja chromosomowa u zarodka/płodu średni wiek był nieznacznie wyższy i wynosił 32,13+/-4,57.

Najwięcej badanych kosmówek pochodziło z ciąży drugiej (43%), następnie z ciąży trzeciej (29%) oraz z ciąży pierwszej (15%). Kosmówki pochodzące z ciąży czwartej i piątej stanowiły odpowiednio 8% i 5% wszystkich badanych. Podobne wyniki uzyskano dla ciąż z aberracją chromosomową: 40% stanowiły kosmówki z ciąży drugiej, 33% z ciąży trzeciej, 10,5% z ciąży pierwszej i czwartej oraz 6% z ciąży piątej.

Czas trwania ciąży w przypadku poszczególnych par wynosił od 5 do 34 tygodni, przy czym najczęściej kosmówka pochodziła z ciąży zakończonej w 8 (15%), 9

(16%) i 10 (23%) tygodniu, co stanowiło 54% badanego materiału. Tylko jedna kosmówka pochodziła z ciąży zakończonej w 5 i jedna w 6 tygodniu ciąży. Kosmówki pochodzące z ciąży zakończonej po 13 tygodniu stanowiły łącznie 15%. W przypadku kosmówek z aberracją chromosomową średni czas trwania ciąży wynosił $10,95 \pm 4,61$ tygodni.

Wśród par, w przypadku których przyczyną utraty ciąży była aberracja chromosomowa analiza rodowodu wykazała, że u 67% par w rodzinie występowały niepowodzenia rozrodu. W przypadku 13% par znaleziono także nieprawidłowości w kariotypie któregoś z partnerów, także o charakterze submikroskopowym.

W badanym materiale nie zidentyfikowano zmian wskazujących na występowanie znanej choroby jednogenowej u zarodka/płodu.

4.1.1. Wyniki badania kariotypu par z niepowodzeniami ciąży

Wśród par z niepowodzeniami ciąży nieprawidłowości w kariotypie zidentyfikowano u 11 pacjentów. W 5 przypadkach były to nieprawidłowości chromosomów płci u pacjentek, w przypadku jednej pacjentki inwersja w chromosomie pary 9 bez znaczenia klinicznego, u 1 pacjentki dodatkowy chromosom markerowy oraz u 4 pacjentów nosicielstwo translokacji wzajemnej zrównoważonej. Wszystkie wyniki przedstawiono w Tabeli 16. W przypadku dwóch pacjentek z aberracjami chromosomów płci nieprawidłowości stwierdzono również w materiale z poronienia. U pacjentki z inwersją stwierdzono występowanie trisomii chromosomu pary 16 w kosmówce po poronieniu. U pacjentki z dodatkowym chromosomem markerowym jego obecność stwierdzono również w kosmówce. W przypadku pacjentów – nosicieli translokacji wzajemnych nieprawidłowości o charakterze delekcji i duplikacji stwierdzono w 3 przypadkach, w jednym przypadku wynik był prawidłowy.

Tabela 16. Wyniki badania kariotypu u par z niepowodzeniami ciąży.

Lp.	Aberracja chromosomowa	Wynik badania materiału z poronienia
1.	47,XXX[4]/45,X[1]/46,XX[95]	dodatkowy chromosom Y u płci męskiej
2.	47,XXX[1]/45,X[2]/46,XX[47]	dodatkowy chromosom X u płci żeńskiej
3.	45,X[5]/46,XX[50]	prawidłowy
4.	45,X[3]/46,XX[47]	prawidłowy
5.	45,X[4]/46,XX[46]	prawidłowy
6.	46,XX,inv(9)(p12q13)	trisomia 16
7.	47,XX,+mar.isch14/22cen(x5)	nuc isch14/22cen(x5)[36/100]
8.	46,XX,t(14;18)(q10;q10)	duplikacja 18q
9.	46,XY,t(6;9)(q26;q32)	delecja 6q i duplikacja 9q
10.	46,XX,t(9;10)(p21.2;q13)	prawidłowy
11.	46,XY,t(2;6)(p25.1;q25.1)	delecja 6q i duplikacja 2p

4.2. Wyniki badań materiału z poronienia metodą FISH

Badaniami metodą FISH objęto 122 kosmówki po poronieniu samoistnym, w tym 114 kosmówek pobranych bezpośrednio po poronieniu oraz 8 kosmówek utrwalonych, pochodzących z bloczków parafinowych. W 121 przypadkach uzyskano jądra interfazowe do hybrydyzacji (w przypadku kosmówki 121 nie udało się uzyskać jąder interfazowych). Technika FISH umożliwiła analizę wybranych aberracji chromosomowych w zakresie chromosomów pary 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y w 119 przypadkach. Hybrydyzacja nie powiodła się w przypadku dwóch kosmówek pochodzących z bloczków parafinowych (kosmówki nr 103 i 104), pomimo iż uzyskano preparat z jądrami interfazowymi. Ponadto w przypadku jednej kosmówki (nr 69) nie uzyskano sygnałów hybrydyzacyjnych dla chromosomów pary 13 i 16.

Techniką FISH zidentyfikowano aberracje chromosomowe w 48 kosmówkach, co stanowiło 40% wszystkich przypadków (Tabela 17). Najczęściej występującą aberracją chromosomową była trisomia, zidentyfikowano ją w 21 przypadkach (44% aberracji), następnie monosomia chromosomu X – 11 przypadków (23% aberracji) oraz triploidia 10 przypadków (21% aberracji). Pozostałe aberracje liczbowe (12% aberracji) to: monosomia chromosomu X z trisomią 16, monosomia chromosomu X z trisomią 18, dodatkowy chromosom Y (XYY), chromosom markerowy pochodzący z krótkich ramion chromosomów akrocentrycznych pary 14 lub 22 oraz w dwóch przypadkach kariotyp mozaikowy pod względem chromosomów płci XX/XY. W 7 przypadkach zidentyfikowano aberracje chromosomowe w postaci mozaikowej z prawidłową i nieprawidłową liczbą sygnałów hybrydyzacyjnych.

W przypadku 71 kosmówek badanych metodą FISH nie stwierdzono nieprawidłowości świadczących o występowaniu aberracji chromosomowych. W przypadku 43 kosmówek analiza jąder interfazowych stwierdziła występowanie płci żeńskiej, w pozostałych 28 płci męskiej.

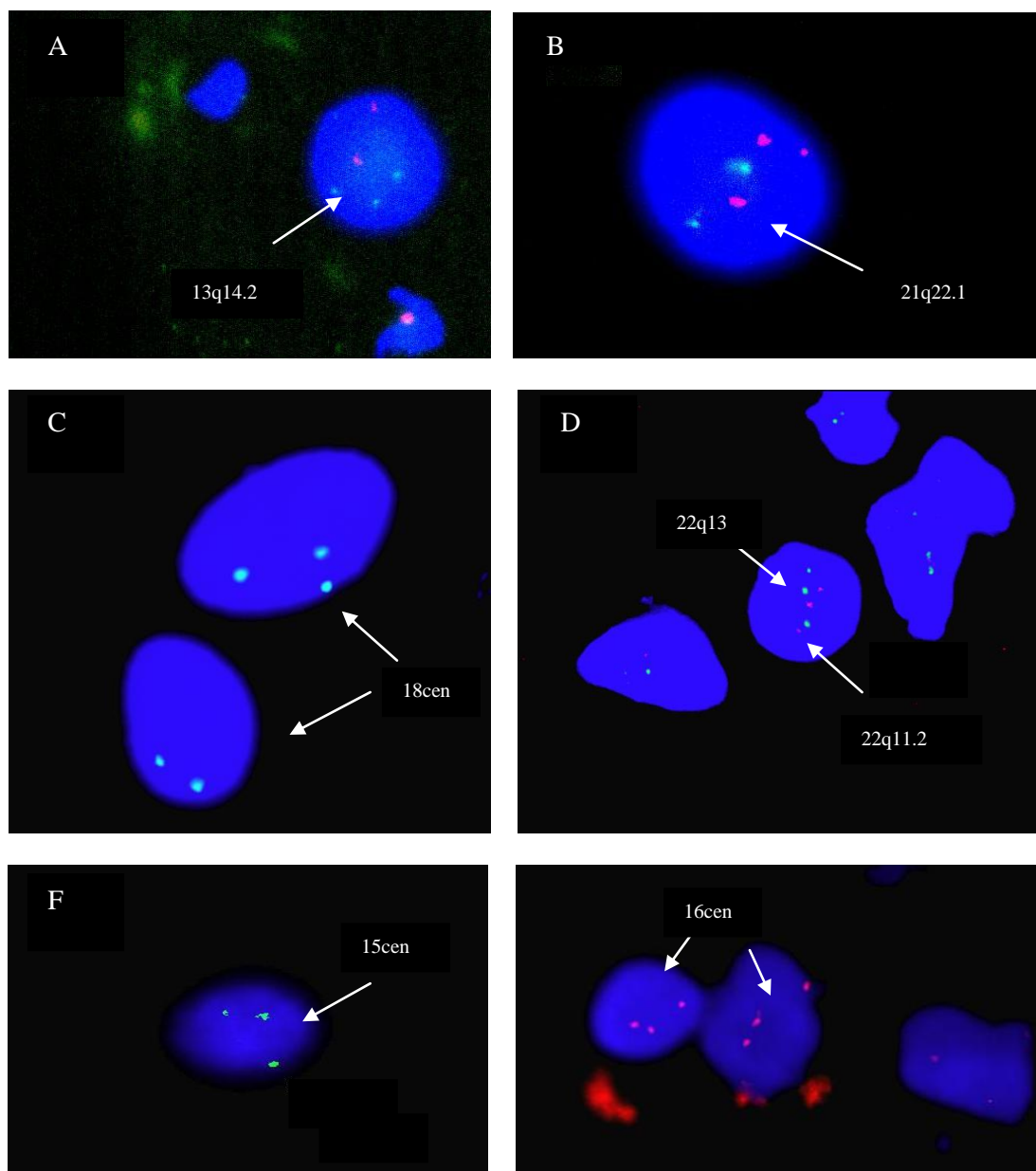
Przykładowe obrazy uzyskane w wyniku fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* przedstawiono na Rycinach 2 i 3.

Tabela 17. Wyniki badania aberracji chromosomowych metodą FISH z sondami dla chromosomów pary 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y. Kolorem szarym zaznaczono wyniki nieprawidłowe uzyskane dla poszczególnych sond.

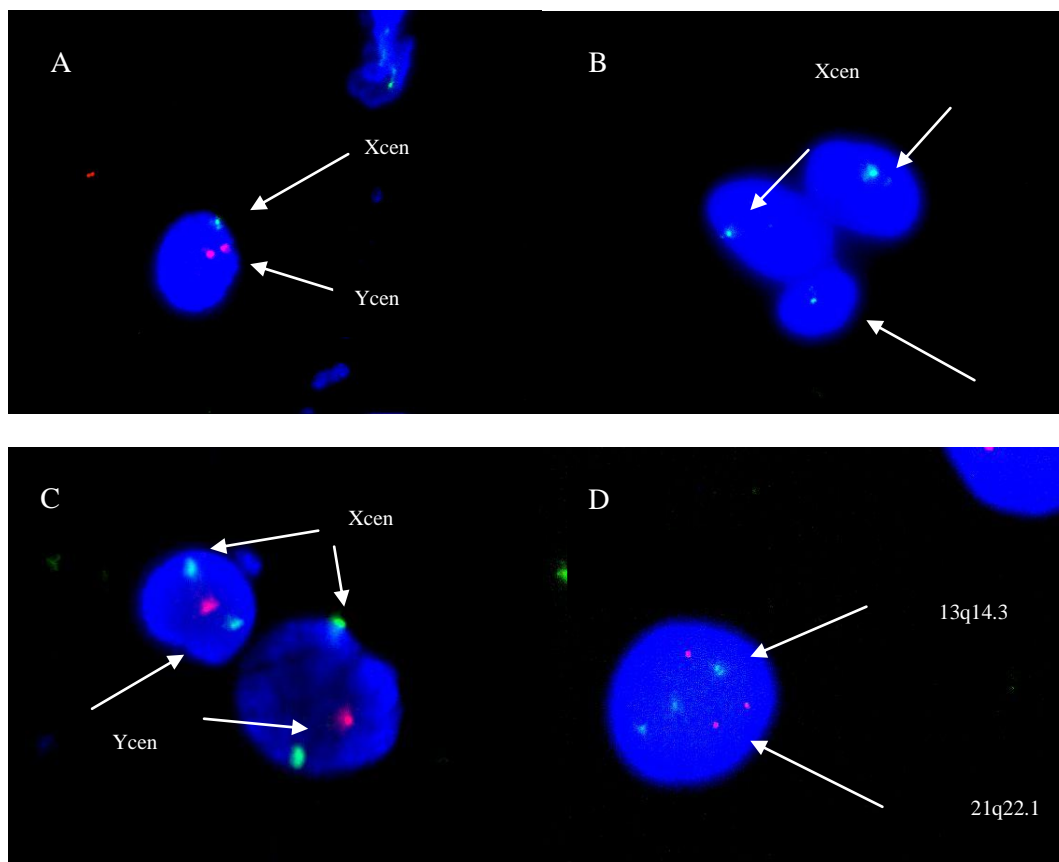
Numer	Sygnały hybrydyzacyjne								Aberracja/Płeć
	Chr.13	Chr.15	Chr.16	Chr.18	Chr.21	Chr.22	Chr. X	Chr.Y	
4	++	++	++	++	++	++	+ X	++ YY	XYY męska
8	++	++	++	++	++	++	+ X	-	monosomia X żeńska
10	++	++	++	++	+++ [84/100]	+++ [82/100]	++ XX	-	trisomia 21 i 22 żeńska
14	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++ XXX	-	triploidia XXX żeńska
15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++ XX	+ Y	triploidia XXY męska
18	++	++	++	++	++	++	+ X	-	monosomia X żeńska
20	++	++	++	++	++	+++	++ XX	-	trisomia 22 żeńska
21	++	++	++	+++	++	++	+ X	+ Y	trisomia 18 męska
22	++	++	++	++	++	+++ [22/200]	++ XX	-	trisomia 22 (11% jąder) żeńska
23	++	++	++	++	++	++	++/+ XX/X [83/17]	-/+ 0/Y [83/17]	XX[83%]/XY [17%] żeńska/męska
26	++	++	++	++	++	++	+ X	-	monosomia X żeńska
28	++	++	++	++	+++	++	+ X	+ Y	trisomia 21 męska
29	++	++	++	+++ [36/100]	++	++	+ X	+ Y	trisomia 18 (36% jąder) męska
30	++	++	++	++	++	++	+ X	-	monosomia X żeńska
31	+++	++	++	++	++	++	++ XX	-	trisomia 13 żeńska
35	++	++	++	++	++	++	+ X	-	monosomia X żeńska
42	++	++	++	++	++	++	+ X	+ Y	prawidłowy* męska
44	++	++	++	++	++	++	+ X	-	monosomia X żeńska
45	++	++	++	++	++	++	+ X	-	monosomia X żeńska
46	++	++	++	++	++	+++	++ XX	-	trisomia 22 żeńska
47	++	++	++	+++ [76/100]	++	++	+ X	-	monosomia X z trisomią 18 (76% jąder) męska
51	+++ [30/100]	+++ [27/100]	+++ [24/100]	+++ [52/100]	+++ [30/100]	+++ [26/100]	++ XX	+/- [52/100]	triploidia XXY męska

53	++	++	++	++	++	+++	+ X	+ Y	trisomia 22 <i>męska</i>
54	+++ [11/100]	+++ [21/100]	+++ [28/100]	+++ [24/100]	+++ [17/100]	+++ [29/100]	++ XX	+/- [29/100]	triploidia XXY <i>męska</i>
55	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++ XX	+ Y	triploidia XXY <i>męska</i>
59	++	++	++	+++	++	++	+ X	+ Y	trisomia 18 <i>męska</i>
71	++	++	+++	++	++	++	+ X	+ Y	trisomia 16 <i>męska</i>
72	++	+++	++	++	++	++	++ XX	-	trisomia 15 <i>żeńska</i>
73	++	++	+++	++	++	++	++ XX	-	trisomia 16 <i>żeńska</i>
74	++	++	++	+++	++	++	++ XX	-	trisomia 18 <i>żeńska</i>
76	++	++	++	++	+++	++	++ XX	-	trisomia 21 <i>żeńska</i>
78	++	++	+++	++	++	++	+ X	+ Y	trisomia 16 <i>męska</i>
80	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++ XXX	-	triploidia XXX <i>żeńska</i>
83	++	++	+++	++	++	++	+ X	+ Y	trisomia 16 <i>męska</i>
84	++	++	++	++	++	++	+ X	-	monosomia X <i>żeńska</i>
86	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++ XX	+ Y	triploidia XXY <i>męska</i>
88	++	++	+++	++	++	++	+ X	+ Y	trisomia 16 <i>męska</i>
92	++	++	+++	++	++	++	++ XX	-	trisomia 16 <i>żeńska</i>
93	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++ XX	+ Y	triploidia XXY <i>męska</i>
94	++	++	++	++	++	++	++/+ XX/X [84/16]	-/+ 0/Y [84/16]	XX[84]/ XY[16] <i>żeńska/męska</i>
96	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++ XXX	-	triploidia XXX <i>żeńska</i>
102	++	++	+++ [42/100]	++	++	++	+ X	+ Y	mozaikowa trisomia 16 (42%) <i>żeńska</i>
107	++	++	+++ [54/100]	++	++	++	+ X	+ Y	monosomia X z trisomią 16 (54% jąder) <i>żeńska</i>
110	++	++	++	++	++	+++	++ XX	-	trisomia 22 <i>żeńska</i>
115	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+ X	++ YY	triploidia XYY <i>męska</i>
116	++	++	++	++	++	++	+ X [11/100]	-	monosomia X (11% jąder) <i>żeńska</i>
119	++	++	++	++	++	++	+ X	-	monosomia X <i>żeńska</i>
120	++	++	++	++	++	++	+ X [14/100]	-	monosomia X (14% jąder) <i>żeńska</i>

* Wynik prawidłowy uzyskano w zakresie liczby chromosomów pary 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y. Ze względu na występowanie u matki chromosomu markerowego pochodzącego z krótkich ramion chromosomów akrocentrycznych pary 14 lub 22 przeprowadzono dodatkowe badanie metodą FISH z sondą do centromerów chromosomów 14 i 22, które charakteryzują się identyczną sekwencją okolic centromerowych. Analiza FISH wykazała występowanie dodatkowego, piątego sygnału hybrydacyjnego w 36% jąder interfazowych.



Ryc. 2. FISH z sondami centromerowymi i specyficznymi do jąder interfazowych trofoblastu. A. Hybrydyzacja z dwukolorową sondą specyficzną do chromosomów pary 13 (*locus* 13q14.4) i 21 (*locus* 21.q22.1). Dwa czerwone sygnały pochodzą od chromosomów pary 21, a trzy zielone od chromosomów pary 13. Świadczy to o występowaniu trisomii 13. B. Hybrydyzacja z tą samą sondą specyficzną. W tym przypadku trzy czerwone sygnały hybrydyzacyjne świadczą o występowaniu trisomii chromosomu 21. C. Hybrydyzacja z sondą centromerową do chromosomów pary 18 (*locus* D18Z1). Występowanie jąder interfazowych z trzema i dwoma sygnałami niebieskimi świadczy o występowaniu trisomii chromosomu 18 tylko w części komórek. D. Hybrydyzacja z sondą specyficzną do chromosomów pary 22. Sygnał czerwony to sonda hybrydująca do regionu krytycznego zespołu Di Georga (*locus* 22q11.2), zielony sygnał pochodzi od sondy kontrolnej hybrydującej do regionu telomerowego chromosomu 22 (*locus* 22q13). Trzy sygnały pochodzące od każdej sondy świadczą o trisomii 22. E. Hybrydyzacja z sondą centromerową do chromosomu pary 15 (*locus* D15Z4). Trzy zielone sygnały hybrydyzacyjne świadczą o trisomii 15. F. Hybrydyzacja z sondą centromerową do chromosomu pary 16 (*locus* D16Z2). Trzy czerwone sygnały hybrydyzacyjne świadczą o trisomii 16.



Ryc. 3. FISH z sondami centromerowymi i specyficznymi do jąder interfazowych trofoblastu. A. Hybrydyzacja z dwukolorową sondą centromerową do chromosomu pary X (*locus* DXZ1) i Y (*locus* DYZ3). Jeden zielony sygnał pochodzi od chromosomu X, dwa czerwone sygnały od chromosomu Y. Taki wynik świadczy o występowaniu dodatkowego chromosomu Y w kariotypie. B. Przykład monosomii chromosomu X. Hybrydyzacja z tą samą dwukolorową sondą centromerową pokazuje tylko jeden zielony sygnał pochodzący od chromosomu X. C i D. Przykład triploidii. Na rycinie C pokazano trzy sygnały hybrydyzacyjne pochodzące od chromosomów płci: dwa zielone od chromosomu X i jeden czerwony od chromosomu Y. Ryciną D pokazuje hybrydyzację z dwukolorową sondą specyficzną do chromosomów pary 13 i 21 (przedstawioną także na Rycinie A i B). Dla każdej sondy obserwowano trzy sygnały hybrydyzacyjne. Taki wynik świadczy o występowaniu triploidii z chromosomami płci XXY.

4.3. Wyniki badań materiału z poronienia metodą QF-PCR

Badania materiału z poronienia metodą QF-PCR w celu identyfikacji najczęstszych aberracji chromosomowych 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y przeprowadzono na 122 kosmówkach, które wcześniej zbadano metodą FISH. Oczyszczone preparaty DNA udało się uzyskać we wszystkich 122 przypadkach. Stężenie genomowego DNA dla poszczególnych prób wynosiło od 18 ng/μl do 1687 ng/μl, przy czym dla większości prób wynosiło ono 100-300 ng/μl. Spośród 122 badanych kosmówek w 4

przypadkach nie udało się uzyskać wyników (kosmówki nr: 101, 103, 104 i 115). Trzy próby DNA (101, 103 i 104) pochodziły z kosmówki utrwalonej w parafinie, jedna z kosmówki świeżej, ale o bardzo niskim stężeniu DNA (18 ng/ μ l).

Analiza markerów mikrosatelitarnych pozwoliła na identyfikację aberracji chromosomowych w 44 przypadkach (37%). Najczęściej występującą aberracją była trisomia – 20 przypadków (45,5% aberracji), monosomia chromosomu X – 11 przypadków (25% aberracji), triploidia – 9 przypadków (20,5% aberracji) oraz 4 przypadki (9% aberracji) innych nieprawidłowości: dodatkowy chromosom Y u płci męskiej, monosomia chromosomu X z trisomią 18, monosomia chromosomu X z trisomią 16 oraz kariotyp z 4 allelami, wskazujący na występowanie dwóch linii komórkowych XX i XY. Wyniki analizy nieprawidłowych markerów mikrosatelitarnych metodą QF-PCR przedstawia Tabela 18.

W pozostałych 74 przypadkach nie stwierdzono nieprawidłowego wzoru allelicznego, który wskazywałby na występowanie aberracji chromosomowej. W przypadku 29 kosmówek rozkład alleli wskazywał na płć męską, w pozostałych 45 na płć żeńską. W przypadku 5 kosmówek o kariotypie żeńskim wzór dla markera *DXS1002* był jednoalleliczny, wskazujący na występowanie monosomii chromosomu X. Jednakże ze względu na prawidłowe wyniki badań metodą FISH i MLPA P095 w tych przypadkach, uznano je za wyniki prawidłowe o kariotypie żeńskim z allelami homozygotycznymi.

Analizowano także stopień heterozygotyczności poszczególnych markerów mikrosatelitarnych chromosomów pary 13, 15, 16, 18, 21, 22 oraz jednego markera dla chromosomu X. Wyniki analizy zostały przedstawione w Tabeli 19.

Przykłady analizy markerów mikrosatelitarnych w programie Peak Scanner Software v.1.0 zostały przedstawione na Rycinach 4, 5 i 6.

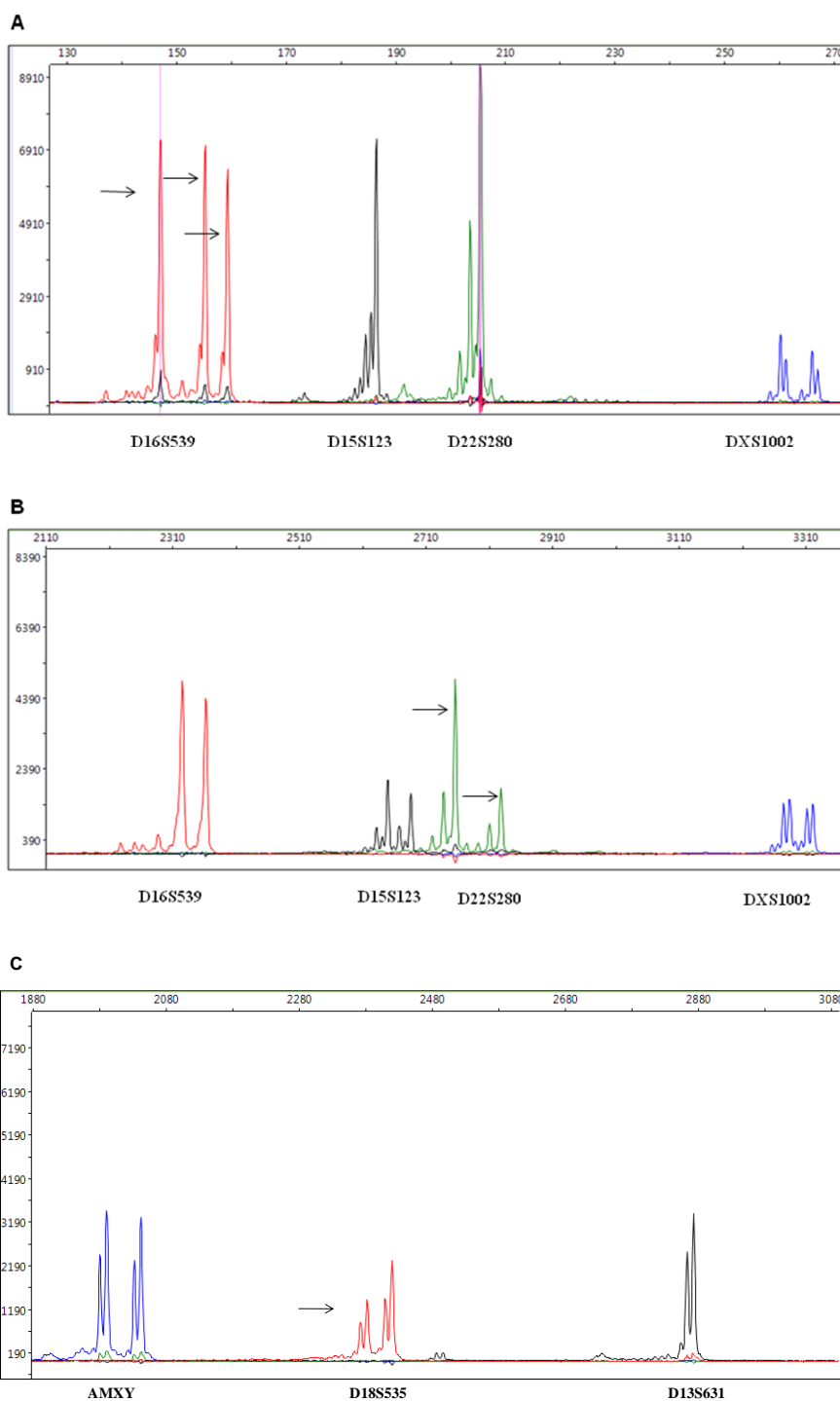
Tabela 18. Wyniki analizy aberracji liczbowych chromosomów pary 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y metodą QF-PCR. Kolorem szarym zaznaczono nieprawidłowe wartości uzyskane dla poszczególnych markerów.

Numer kosmówki	Markery - wzór alleliczny i stosunek wysokości pików								Aberracja/ Płeć
	D13S631	D15S123	D16S539	D18S535	D21S1414	D22S280	AMXY	DXS1002	
4	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:2 1,53/0,64	1	XYY męska
8	1:1	1	1:1	1:1	1:1	1:1	1	1	monosomia X żeńska
10	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1:1	2:1 0,44/2,26	1	1:1	trisomia 21 i 22 żeńska
14	1:1:1	1	1	2:1 0,40/2,47	1:1:1	1:1:1	1	2:1 0,63/1,58	triploidia XXX żeńska
15	1:1:1	2:1 0,41/2,39	2:1 0,44/2,25	1:1:1	1:1:1	1:1:1	2:1 0,34/2,54	1	triploidia XXY męska
18	1:1	1:1	1	1:1	1:1	1	1	1	monosomia X żeńska
20	1:1	1:1	1	1:1	1:1	1:1:1	1	1:1	trisomia 22 żeńska
21	1:1	1:1	1	2:1 0,46/2,14	1:1	1:1	1:1	1	trisomia 18 męska
23	2:1:1 0,58/1,70 0,41/2,38	2:1:1 0,80/1,23 0,51/1,94	2:1 0,34/2,86	2:1:1 0,47/2,09 0,45/2,20	2:1 0,32/3,04	2:1:1 0,53/1,88 0,42/2,32	2:1 0,48/2,08	2:1 0,35/2,78	XX/XY żeński/męski
26	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1	1	monosomia X żeńska
28	1:1	1	1:1	1:1	2:1 0,41/2,42	1:1	1:1	1	trisomia 21 męska
29	1:1	1	1	2:1 0,18/5,39	1:1	1:1	1:1	1	trisomia 18 męska
30	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1	1	monosomia X żeńska
31	2:1 0,58/1,7	1:1	1:1	1	1:1	1:1	1	1:1	trisomia 13 żeńska
35	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1	1	monosomia X żeńska
44	1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1	1	monosomia X żeńska
45	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1	1	monosomia X żeńska
46	1:1	1:1	1	1	1:1	1:1:1	1	1:1	trisomia 22 żeńska
47	1	1:1	1:1	1:1:1	1:1	1:1:1	1	1	monosomia X z trisomią 18 męska
51	2:1 0,49/2,02	1:1:1	2:1 0,45/2,19	2:1 0,37/2,64	2:1 0,56/1,78	2:1 0,43/2,32	2:1 0,48/2,04	1	triploidia XXY męska
53	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1:1	1:1	1	trisomia 22 męska
54	2:1 0,44/2,27	1:1:1	1:1:1	2:1 0,46/2,13	1:1:1	1:1:1	2:1 0,46/2,14	1:1	triploidia XXY męska
55	2:1 0,63/1,57	2:1 0,37/2,68	1:1:1	2:1 0,51/1,93	1:1:1	1:1:1	2:1 0,51/1,92	1:1	triploidia XXY męska
59	1	1:1	1:1	2:1 0,51/1,79	1:1:1	1:1	1:1	1	trisomia 18 męska
71	1:1	1:1	1:1:1	1	1	1:1	1:1	1	trisomia 16 męska
72	1:1	2:1 0,41/2,42	1:1	1	1:1	1:1	1	1:1	trisomia 15 żeńska

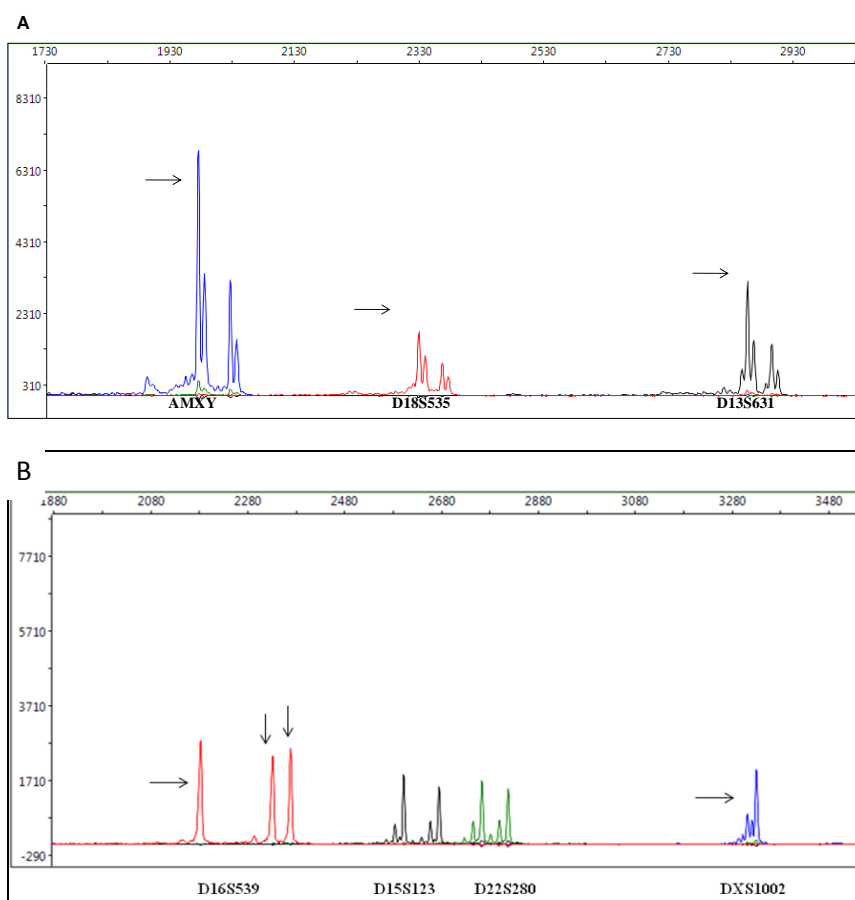
73	1:1	1	1:1:1	1:1	1	1	1	1:1	trisomia 16 żeńska
74	1:1	1:1	1:1	1:1:1	1:1	1:1	1	1:1	trisomia 18 żeńska
76	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1:1	1:1	1	1:1	trisomia 21 żeńska
78	1:1	1	2:1 0,58/1,76	1:1	1:1	1:1	1:1	1	trisomia 16 męska
80	1:1:1	1:1:1	1	1:1:1	2:1 0,43/2,32	2:1 0,46/2,07	1	1	triploidia XXX żeńska
83	1	1:1	1:1:1	1:1	1:1	1	1:1	1	trisomia 16 męska
84	1:1	1	1:1	1	1:1	1	1	1	monosomia X żeńska
86	2:1 0,44/2,26	1:1:1	1:1:1	2:1 0,57/1,74	1:1:1	2:1 0,38/2,57	2:1 0,48/2,07	1:1	triploidia XXY męska
88	1:1	1:1	2:1 0,58/1,70	1:1	1	1	1:1	1	trisomia 16 męska
92	1	1:1	2:1 0,29/3,37	1:1	1:1	1:1	1	1	trisomia 16 żeńska
93	2:1 0,45/2,18	2:1 0,57/1,72	1:1:1	2:1 0,51/1,94	1:1:1	1	2:1 0,48/2,05	1	triploidia XXY męska
96	2:1 0,45/2,22	1:1:1	2:1 0,48/2,07	1:1:1	2:1 0,64/1,55	2:1 0,64/1,55	1	1	triploidia XXX żeńska
102	1	1:1	1:1:1	1:1	1	1:1	1	1:1	trisomia 16 żeńska
107	1:1	1:1	1:1:1	1:1	1:1	1:1	1	1	monosomia X z trisomią 16 żeńska
110	1:1	1	1:1	1:1	1:1	1:1:1	1	1:1	trisomia 22 żeńska
116	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1	1	monosomia X żeńska
119	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1	1	monosomia X żeńska
120	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1	1	monosomia X żeńska

Tabela 19. Częstość występowania heterozygotycznych alleli w *locus*: D13S631, D15S123, D16S539, D18S535, D21S1414, D22S280 i DXS1002 ustalona na podstawie wyników badań kosmówek metodą QF-PCR.

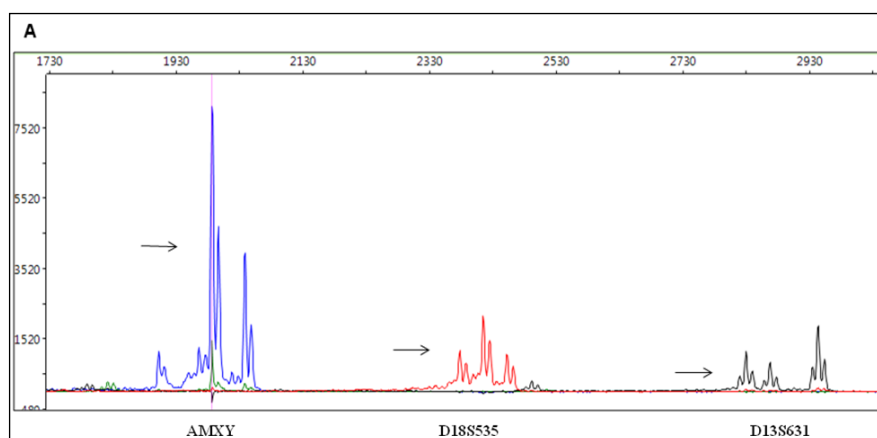
<i>Marker</i>	<i>Częstość heterozygotyczność</i>
<i>D13S631</i>	0,81
<i>D15S123</i>	0,81
<i>D16S539</i>	0,83
<i>D18S535</i>	0,84
<i>D21S1414</i>	0,82
<i>D22S280</i>	0,84
<i>DXS1002</i>	0,92

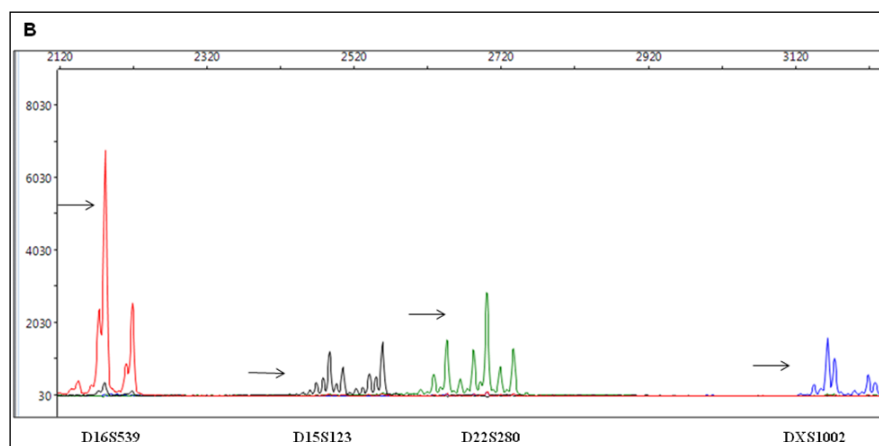


Ryc. 4. Fragment analizy QF-PCR z markerami STR (Peak Scanner Software v.1.0). Rycina A przedstawia trisomię chromosomu pary 16 u płci żeńskiej. Dla *locus* D15S123 i D22S280 wynik jest nieinformacyjny (homozygota – pojedynczy pik). Dla *locus* D16S539 wzór jest trójalleliczny (trzy allele 1:1:1), co świadczy o występowaniu trzech kopii chromosomu pary 16. W *locus* DXS1002 wzór jest dwualleliczny 1:1 (heterozygota – dwa piki). Rycina B przedstawia trisomię chromosomu pary 22 u płci żeńskiej. Wzór dwualleliczny 1:1 występuje dla *locus* D16S539, D15S123 i DXS1002. Dla *locus* D22S280 wzór jest dwualleliczny, gdzie stosunek wysokości pików wynosi 2:1. Taki wynik świadczy o trzech kopiach chromosomu pary 22. Rycina C przedstawia trisomię chromosomu pary 18 u płci męskiej. Dla *locus* D18S535 wzór jest dwualleliczny 2:1 co świadczy o trzech kopiach chromosomu pary 18. Wzór dwualleliczny 1:1 dla markera AMXY świadczy o występowaniu chromosomu X i Y (płeć męska). Dla *locus* D13S631 wynik jest nieinformacyjny (homozygota).



Ryc. 5. Fragment analizy QF-PCR z markerami STR (Peak Scanner Software v.1.0). Rycina A przedstawia triploidię XXY. Dla *locus* AMXY, D18S535 i D13S631 wzór jest dwualleliczny 2:1. Taki wynik świadczy o występowaniu trzech kopii chromosomów pary 13 i 18, dwóch kopii chromosomów X oraz jednej chromosomu Y. Rycina B przedstawia monosomię chromosomu X z trisomią chromosomu pary 16. W *locus* D16S539 wzór pików jest trójalleliczny 1:1:1, w *locus* DXS1002 występuje pojedynczy pik (jeden allel). W *locus* D15S123 i D22S280 wzór jest dwualleliczny 1:1 (heterozygota).





Ryc. 6. Fragment analizy QF-PCR z markerami STR (Peak Scanner Software v.1.0). Rycina A i B przedstawia wynik badania kosmówki nr 23. W badaniu FISH stwierdzono występowanie dwóch linii komórkowych z chromosomami płci XX i XY. Analiza markerów mikrosatelitarnych pokazuje, że w *locus* D13S631, D15S123, D18S535, D22S280 wzór jest trójalleliczny, przy czym stosunek wysokości pików wynosi 2:1:1. W *locus* D16S539 wzór jest dwualleliczny o stosunku 2:1. W *locus* AMXY wzór jest dwualleliczny 2:1, podobnie jak w DXS1002, co świadczy o występowaniu trzech kopii chromosomu X oraz jednej kopii chromosomu Y. Taki wynik sugeruje występowanie w jednym preparacie DNA pochodzącego od dwóch osób.

4.4. Wyniki badań materiału z poronienia metodą MLPA

4.4.1. MLPA P095

Wszystkie próby DNA wyizolowanego ze 122 kosmówek, które zostały zanalizowane metodą QF-PCR, wykorzystano do badań metodą MLPA z zestawem P095 do identyfikacji najczęstszych aneuploidii chromosomów pary 13, 18, 21, X i Y. W przypadku trzech kosmówek nie udało uzyskać się wyniku. Były to kosmówki nr: 77, 101 i 109. Preparaty DNA nr: 77 i 109 pochodziły z kosmówki świeżej, a preparat 101 ze skrawków kosmówki utrwalonej. W przypadku kosmówki nr 109 przyczyną mogło być niskie stężenie DNA, które wynosiło 25 ng/ μ l, a w pozostałych dwóch przypadkach mogło być to związane również z degradacją preparatu DNA (występowaniem tylko niskocząsteczkowego, zdegradowanego DNA genomowego). W pozostałych 119 przypadkach otrzymano wyniki, które zostały następnie przeanalizowano statystycznie.

Nieprawidłowy wynik, wskazujący na aberrację liczbową chromosomów uzyskano w przypadku 28 ze 119 kosmówek (24% kosmówek z aberracją chromosomową). W przypadku 12 kosmówek (43% aberracji) otrzymano wyniki wskazujące na występowanie monosomii chromosomu X, a w 8 kosmówkach (29,5% aberracji) na występowanie trisomii: w trzech przypadkach trisomii 21, w czterech trisomii 18, w jednym trisomii 13. W przypadku pozostałych 8 kosmówek (29,5%

aberracji) stwierdzono w jednym przypadku monosomię X z trisomią 18, w dwóch przypadkach dodatkowy chromosom Y u płci męskiej, w jednym przypadku dodatkowy chromosomu X u płci żeńskiej, w trzech dodatkowy chromosomu X u płci męskiej oraz w jednym przypadku dodatkowy chromosom X oraz delecje w chromosomie Y u płci męskiej. Wyniki zostały przedstawione w Tabeli 20.

Tabela 20. Wyniki MLPA P095. U góry przedstawiono zidentyfikowaną nieprawidłowość oraz *locus* dla każdej sondy pojedynczego chromosomu. Kolorem szarym zaznaczono prawidłowe wartości uzyskane dla poszczególnych sond w tym samym chromosomie.

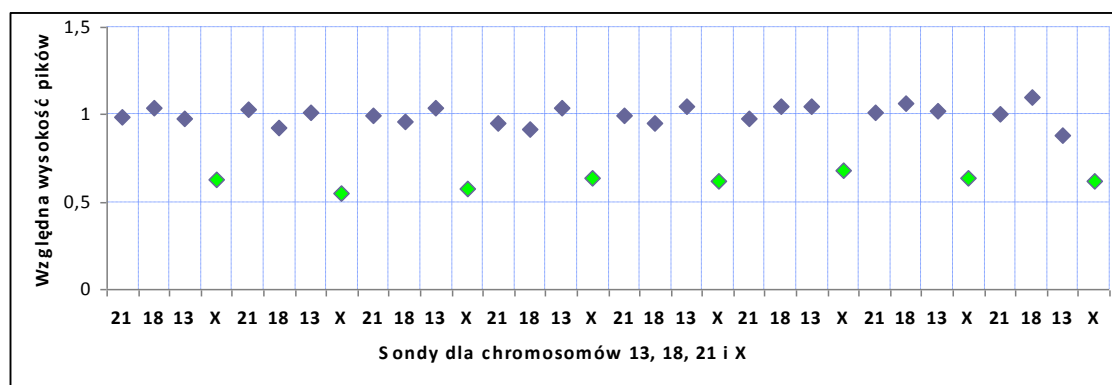
Nr kosm.	Aberracja chromosomowa								Sondy z del/dup
	<i>Monosomia X</i>								
	Xq12	Xq23.3	Xp21.3	Xp11.4	Xq28	Xp22.12	Xq25	Xp21.2	
8	del	del	del	del	del	del	del	del	8
18	del	del	del	del	del	del	del	del	8
26	del	del	del	nor	del	nor	del	del	6
30	del	del	del	del	del	del	del	nor	7
35	del	del	del	del	del	del	del	del	8
44	del	del	nor	del	del	del	del	del	7
45	del	del	del	del	del	del	del	del	8
84	nor	del	nor	del	del	del	del	del	6
107	del	del	del	del	del	del	del	del	8
116	del	del	del	del	del	nor	del	del	7
119	del	del	del	del	nor	del	nor	del	6
120	del	del	del	del	nor	del	nor	del	6
<i>Trisomia 13</i>									
	13q32	13q13.3	13q14.2	13q21.32	13q34	13q13.1	13q14.3	13q34	
31	dup	dup	dup	dup	dup	dup	dup	dup	8
<i>Trisomia 18</i>									
	18q21.2	18q21.32	18q11.2	18q23	18p11.32	18q21.33	18q11.2	18p11.21	
21	dup	nor	nor	dup	nor	dup	dup	dup	5
29	nor	dup	dup	nor	nor	dup	dup	dup	5
59	dup	dup	dup	dup	nor	dup	dup	dup	7
74	dup	dup	dup	dup	dup	dup	dup	dup	8
<i>Trisomia 21</i>									
	21q22.13	21q21.1	21q21.1	21q11.2	21q22.11	21q21.3	21q23.3	21q22.11	
10	dup	dup	dup	dup	dup	dup	dup	dup	8
28	dup	dup	dup	dup	dup	dup	dup	dup	8
76	dup	dup	dup	dup	dup	dup	dup	dup	8
<i>Dodatkowy chromosom Y u płci męskiej – XYY</i>									
	Yp11.31	Yp11.31	Yp11.31	Yp11.21	Yp11.31	Yp11.31	Yp11.31	Yp11.31	
4	dup	dup	dup	dup	dup	dup	dup	dup	4
115	dup	dup	dup	dup	dup	dup	dup	dup	4

<i>Dodatkowy chromosom X u płci męskiej – XXY</i>																	
	Xq12	Xq22.3	Xp21.3	Xp11.4	Xq28	Xp22.12	Xq25	Xp21.2									
15	dup	dup	dup	dup	nor	nor	nor	dup	5								
55	dup	dup	dup	dup	nor	nor	nor	dup	5								
86	dup	dup	dup	dup	nor	nor	nor	dup	5								
<i>Dodatkowy chromosom X u płci żeńskiej – XXX</i>																	
	Xq12	Xq22.3	Xp21.3	Xp11.4	Xq28	Xp22.12	Xq25	Xp21.2									
103	nor	dup	dup	dup	dup	nor	nor	nor	4								
<i>Monosomia X z trisomią 18*</i>																	
	18	X	18	X	18	X	18	X	18	X	18	X	18	X	18	X	18/X
47	nor	del	nor	del	dup	del	dup	del	dup	del	dup	del	nor	del	dup	del	5/8
<i>Mozaika XX/XY*</i>																	
	Xq	Yp	Xq	Yp	Xp	Yp	Xp	Yp	Xq	Xp	Xq	Xp	X/Y				
23	dup	del	dup	del	dup	del	dup	del	dup	dup	dup	dup	8/4				

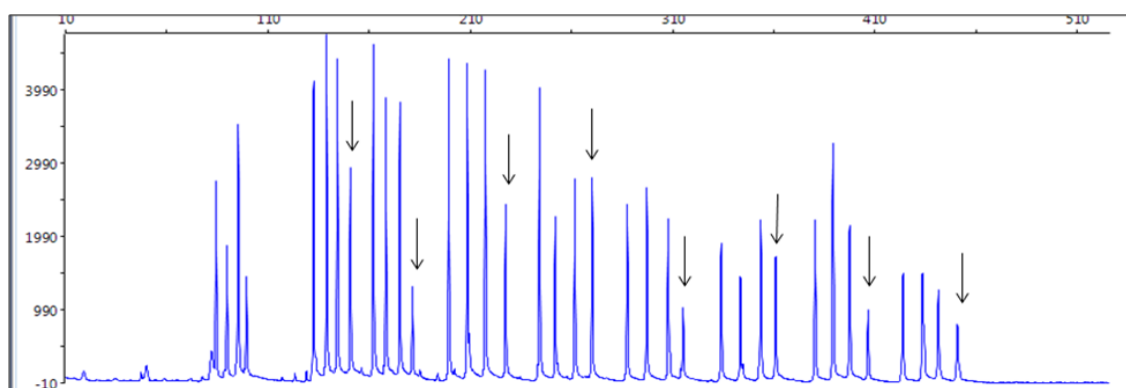
*Pozycja sond X, Y i 18 jest identyczna jak podana dla dodatkowego chromosomu X, Y oraz trisomii 18

Monosomia X

Monosomię chromosomu X zidentyfikowano w 12 przypadkach (kosmówki nr: 8, 18, 26, 30, 35, 44, 45, 84, 107, 116, 119, 120). Liczba sond dla chromosomu X, które wykazywały delecję wahała się w poszczególnych przypadkach od 6 do 8 (Tabela 20). Uzyskane w wyniku normalizacji średnie wartości względne fluorescencji sond dla chromosomu X wynosiły od 0,54 do 0,67. Uśrednione wyniki uzyskane dla wszystkich kosmówek z monosomią X przedstawione zostały na Rycinie 7. Przykładową analizę pików dla kosmówki z monosomią chromosomu X w programie Peak Scanner Software v.1.0 pokazuje Rycina 8.



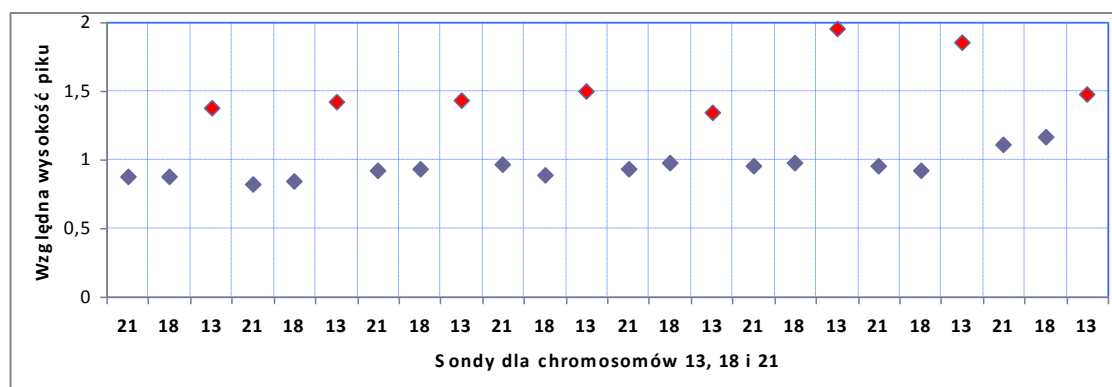
Ryc. 7. Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007). Wartości względne fluorescencji pików sond dla chromosomów pary 13, 18 i 21 mieszczą się w prawidłowym zakresie 0,7-1,3 (niebieski znacznik). Wartości dla chromosomu X wynoszą poniżej 0,7 (0,54-0,67), co wskazuje na delecję chromosomu X - monosomię X (zielony znacznik).



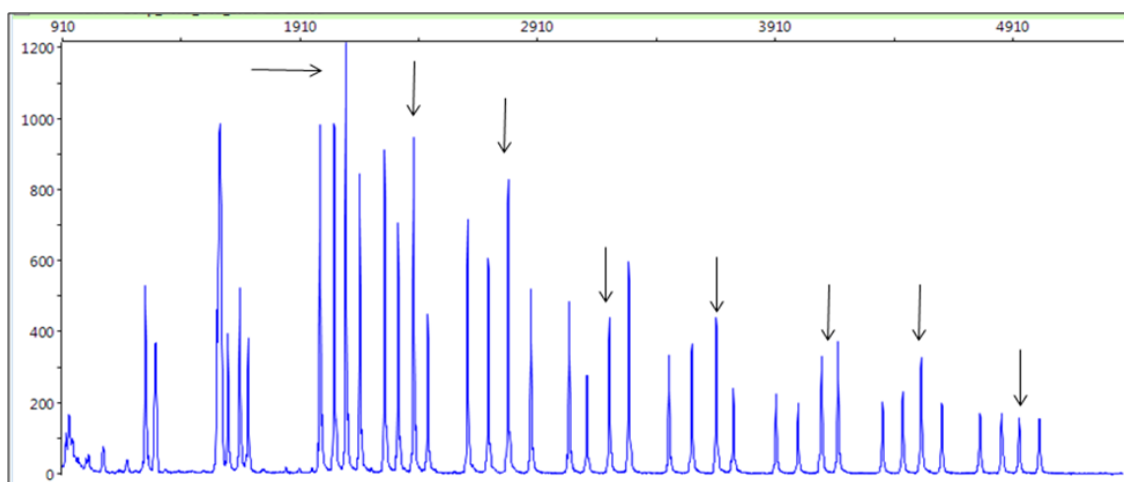
Ryc. 8. Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0). Wynik nieprawidłowy wskazujący na występowanie monosomii chromosomu X. Strzałkami zaznaczono nieprawidłowe produkty amplifikacji 8 różnych fragmentów chromosomu X. Zmniejszona wysokość wszystkich pików oznacza występowanie tylko jednej kopii chromosomu X w kariotypie żeńskim.

Trisomia 13

Trisomię chromosomu pary 13 zidentyfikowano w jednym przypadku (kosmówka nr 31). Wszystkie amplifikowane fragmenty DNA pochodzące z chromosomu pary 13 wykazywały duplikację, co oznacza występowanie dodatkowej kopii chromosomu pary 13. Wartości względne fluorescencji sond dla chromosomu 13 wynosiły od 1,37 do 1,95. Wartości dla wszystkich sond kosmówki 31 przedstawione zostały na Rycinie 9. Analiza pików dla tej kosmówki w programie Peak Scanner Software v.1.0 pokazuje Rycinę 10.



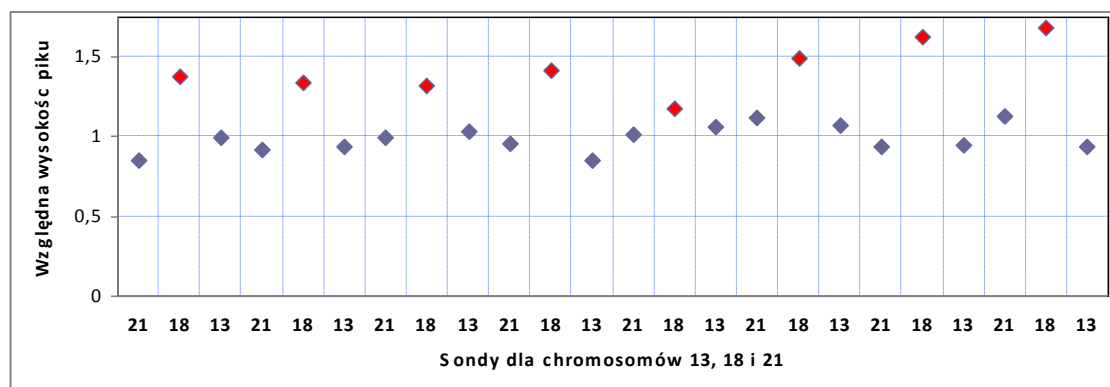
Ryc. 9. Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007). Wartości względne fluorescencji pików sond dla chromosomów pary 18 i 21 mieszczą się w prawidłowym zakresie 0,7-1,3 (niebieski znacznik). Wartości dla chromosomu pary 13 wynoszą powyżej 1,3 (1,37-1,95), co wskazuje na duplikację chromosomu pary 13 - trisomię 13 (czerwony znacznik).



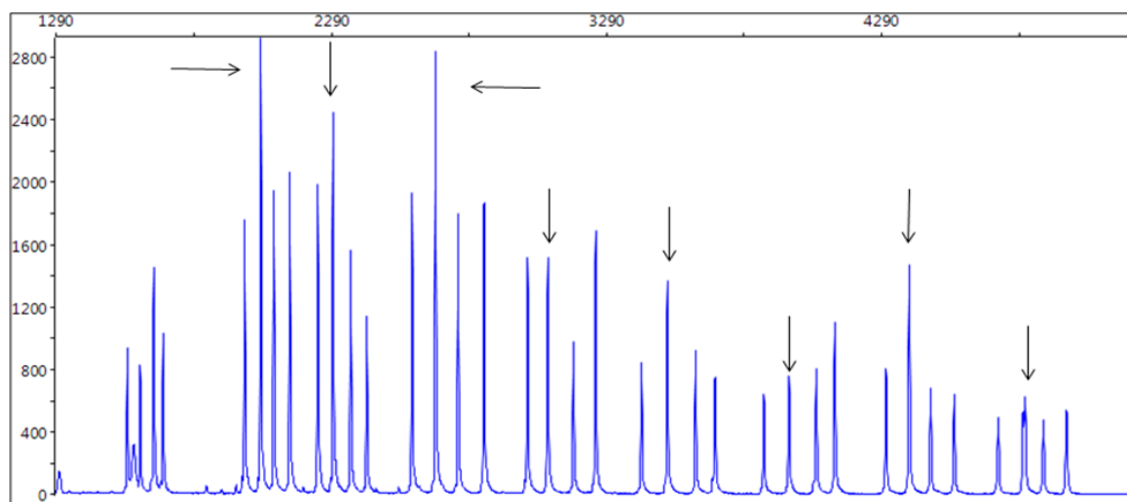
Ryc. 10 Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v1.0). Wynik nieprawidłowy wskazujący na występowanie trisomii chromosomu pary 13. Strzałkami zaznaczono nieprawidłowe produkty amplifikacji 8 różnych fragmentów chromosomu 13. Wzrost wysokości wszystkich pików oznacza duplikację, czyli występowanie dodatkowej kopii chromosomu pary 13.

Trisomia 18

Trisomię chromosomu pary 18 zidentyfikowano w 4 przypadkach (kosmówki nr: 21, 29, 59, 74). Liczba sond z duplikacją dla poszczególnych prób wynosiła od 5 do 8 (Tabela 20). Uzyskane w wyniku normalizacji średnie wartości względne fluorescencji wynosiły od 1,32 do 1,68. Średnie wartości uzyskane dla wszystkich kosmówek z trisomią 18 przedstawione zostały na Rycinie 11. Przykładową analizę pików dla kosmówki z trisomią chromosomu pary 18 w programie Peak Scanner Software v.1.0 pokazuje Rycina 12.



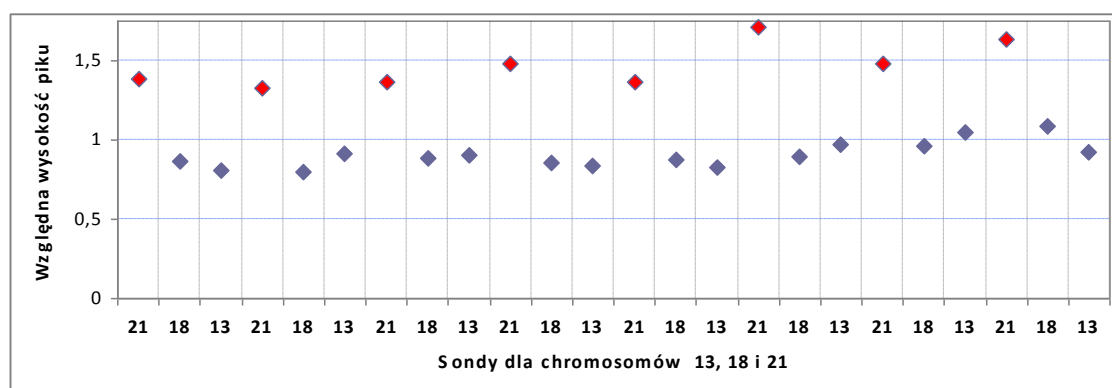
Ryc. 11 Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007). Wartości względne fluorescencji pików sond dla chromosomów pary 13 i 21 mieszczą się w prawidłowym zakresie 0,7-1,3 (niebieski znacznik). Wartości dla chromosomu pary 18 wynoszą powyżej 1,3 (1,32-1,68), co wskazuje na duplikację chromosomu pary 18 - trisomię 18 (czerwony znacznik).



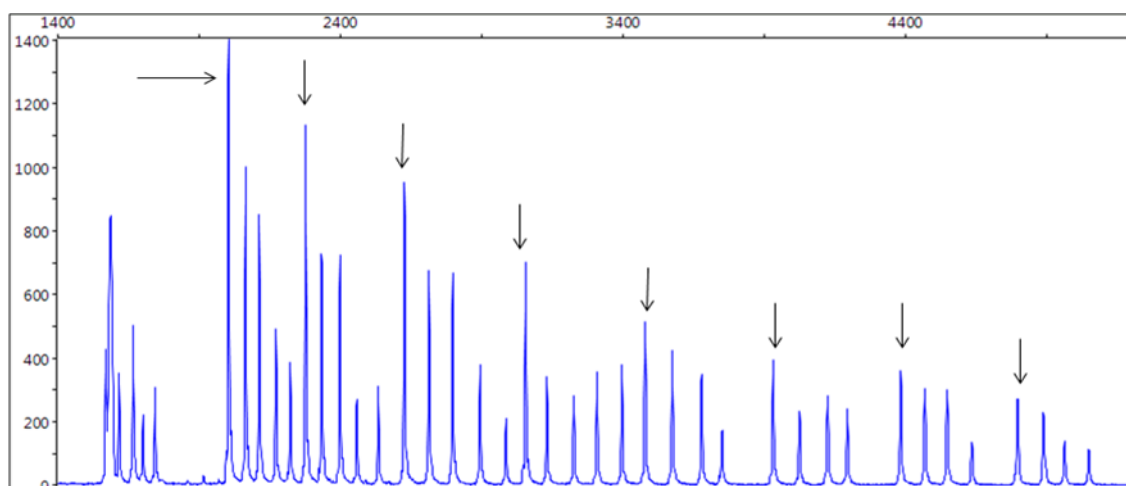
Ryc. 12 Fragment analiza MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0). Wynik nieprawidłowy wskazujący na występowanie trisomii chromosomu pary 18. Strzałkami zaznaczono nieprawidłowe produkty amplifikacji 8 różnych fragmentów chromosomu 18. Wzrost wysokości wszystkich pików oznacza duplikację, czyli występowanie dodatkowej kopii chromosomu pary 18.

Trisomia 21

Trisomię chromosomu pary 21 stwierdzono w 3 przypadkach (kosmówki nr: 10, 28, 76). W każdym przypadku obserwowano duplikację dla wszystkich 8 sond chromosomu pary 21 (Tabela 20). Uzyskane w wyniku normalizacji średnie wartości względne fluorescencji wynosiły od 1,33 do 1,7. Średnie wartości uzyskane dla wszystkich kosmówek z trisomią 21 przedstawione zostały na Rycinie 13. Przykładowa analiza pików dla kosmówki z trisomią chromosomu pary 21 w programie Peak Scanner Software v.1.0 pokazuje Rycina 14.



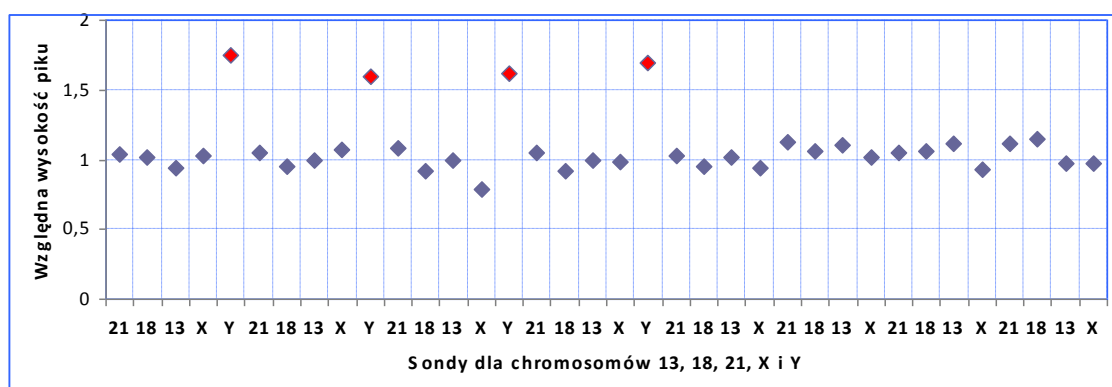
Ryc. 13 Fragment analiza wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007). Wartości względne fluorescencji pików sond dla chromosomów pary 13 i 18 mieszczą się w prawidłowym zakresie 0,7-1,3 (niebieski znacznik). Wartości dla chromosomu pary 21 wynoszą powyżej 1,3 (1,33-1,7), co wskazuje na duplikację chromosomu pary 21 - trisomię 21 (czerwony znacznik).



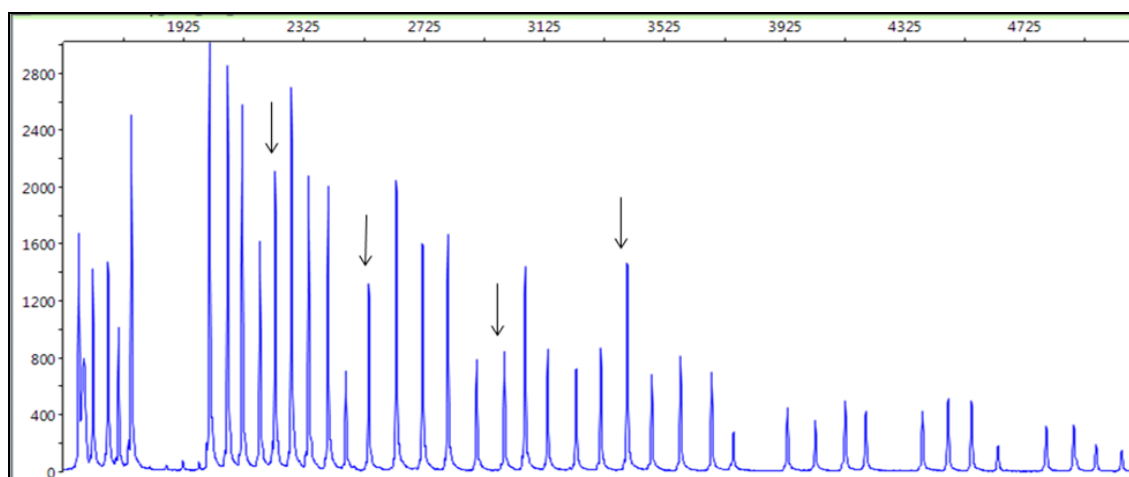
Ryc. 14 Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0). Wynik nieprawidłowy wskazujący na występowanie trisomii chromosomu pary 21. Strzałkami zaznaczono nieprawidłowe produkty amplifikacji 8 różnych fragmentów chromosomu 21. Wzrost wysokości wszystkich pików oznacza duplikację, czyli występowanie dodatkowej kopii chromosomu pary 21.

Dodatkowy chromosom Y w kariotypie męskim - XYY

W przypadku dwóch kosmówek analiza MLPA wykazała obecność dodatkowego chromosomu Y w kariotypie męskim (kosmówki nr 4 i 115). Występowanie dodatkowego chromosomu Y może oznaczać zarówno triploidię z chromosomami płci XYY, jak i dodatkowy chromosom Y w kariotypie męskim. W przypadku triploidii wartości dla wszystkich pozostałych sond dla chromosomów autosomalnych będą mieściły się w normie. Nieprawidłowe wartości można jedynie zaobserwować w przypadku zmiany ilości chromosomów płci, ale tylko w odniesieniu do kariotypu męskiego XXY (dodatkowa kopia chromosomu X) lub XYY (dodatkowa kopia chromosomu Y). W przypadku kosmówki nr 4 analiza FISH wykazała obecność dodatkowego chromosomu Y, przy prawidłowych wynikach dla pozostałych analizowanych chromosomów. Natomiast w przypadku próby nr 115 wyniki FISH wskazywały na triploidię z chromosomami płci XYY. W analizie metodą MLPA obie kosmówki wykazywały zbliżony rozkład wartości poszczególnych pików. W obu przypadkach obserwowano duplikację 4 sond chromosomu Y i prawidłowe wartości dla pozostałych chromosomów. Uzyskane w wyniku normalizacji średnie wartości względnej fluorescencji dla chromosomu Y wynosiły od 1,59 do 1,74. Średnie wartości uzyskane dla obu kosmówek przedstawione zostały na Rycinie 15. Analiza pików dla kosmówki nr 4 z dodatkowym chromosomem Y w kariotypie męskim w programie Peak Scanner Software v. 1.0 pokazuje Rycinę 16.



Ryc. 15 Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007). Wartości względne fluorescencji pików sond dla chromosomów pary 13, 18, 21 i X mieszczą się w prawidłowym zakresie 0,7-1,3 (niebieski znacznik). Wartości dla chromosomu Y wynoszą powyżej 1,3 (1,59-1,74) (czerwony znacznik), co wskazuje na duplikację chromosomu Y (kariotyp męski XYY).



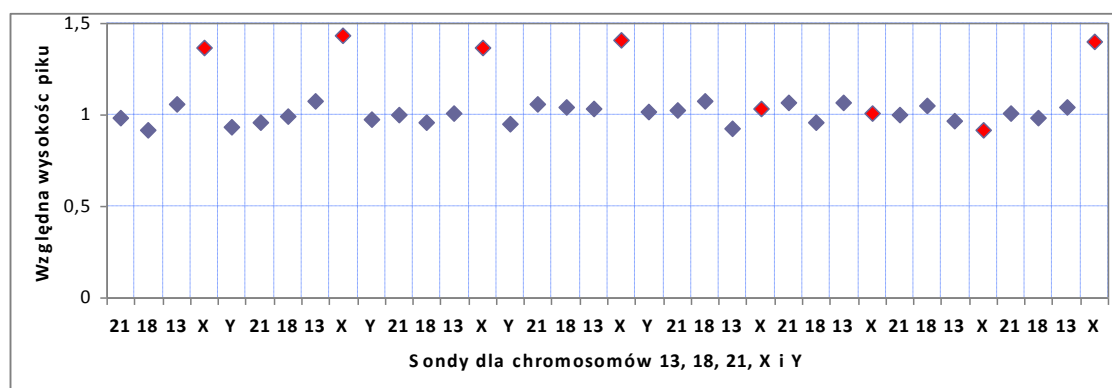
Ryc. 16 Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0). Wynik nieprawidłowy wskazujący na występowanie dodatkowego chromosomu Y w kariotypie męskim. Strzałkami zaznaczono nieprawidłowe produkty amplifikacji 4 różnych fragmentów chromosomu Y. Wzrost wysokości wszystkich pików oznacza duplikację, czyli występowanie dodatkowej kopii chromosomu Y.

Dodatkowy chromosom X w kariotypie męskim - XXY

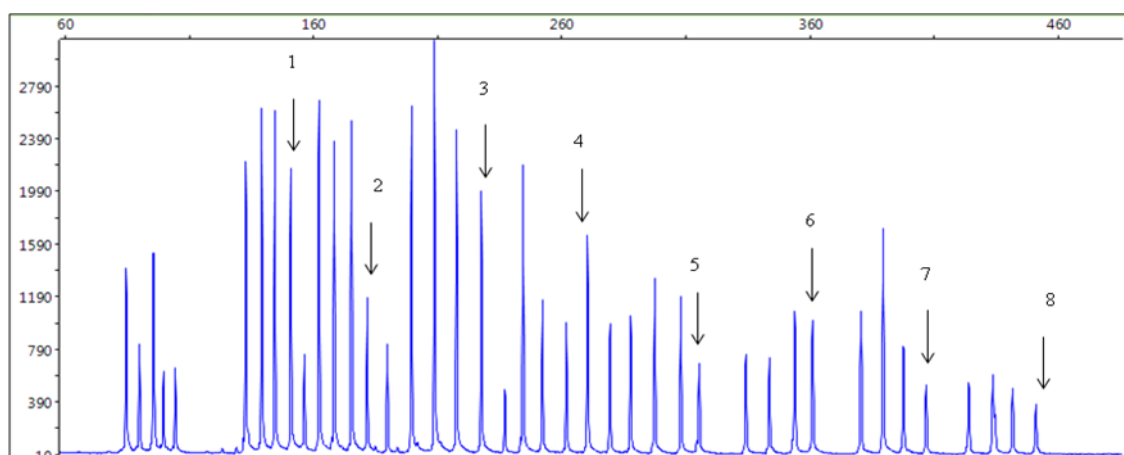
Dodatkowy chromosom X w kariotypie męskim stwierdzono w przypadku trzech kosmówek nr: 15, 55, 86. Podobnie jak w przypadku powyżej może to oznaczać zarówno triploidię z chromosomami płci XXY jak i dodatkowy chromosom X u płci męskiej. We wszystkich trzech przypadkach analiza metodą FISH potwierdziła występowanie triploidii z chromosomami płci XXY.

W każdym analizowanym przypadku duplikację obserwowano w przypadku 5 z 8 sond dla chromosomu X (Tabela 20). Wartości względne fluorescencji dla tych sond

były powyżej normy i znajdowały się w przedziale od 1,37 do 1,43. Natomiast wartości prawidłowe zaobserwowano dla pozostałych 3 sond chromosomu X, które wynosiły od 0,91 do 1,03 (we wszystkich trzech kosmówkach prawidłowe wartości uzyskano dla tych samych 3 sond). Średnie wartości uzyskane w przypadku analizy tych 3 kosmówek przedstawione zostały na Rycinie 17. Przykładowa analiza pików dla kosmówki z dodatkowym chromosomem X w kariotypie męskim w programie Peak Scanner Software v.1.0 pokazuje Rycina 18.



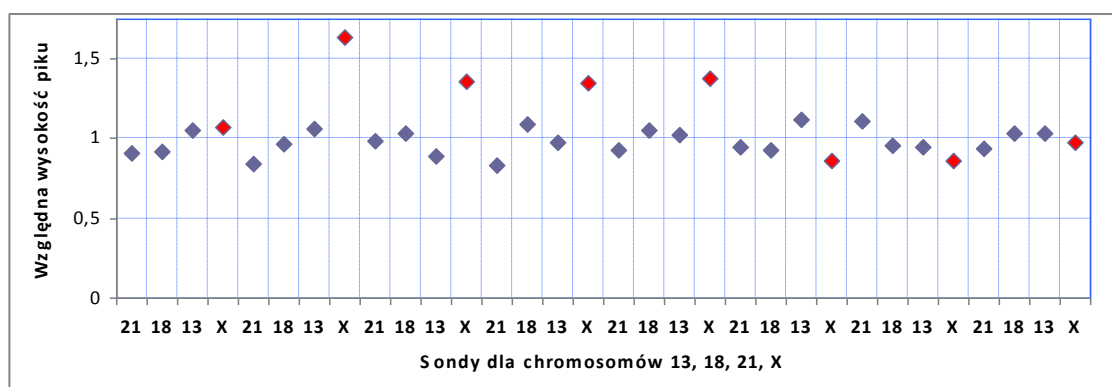
Ryc. 17 Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007). Wartości względnej fluorescencji pików sond dla chromosomów pary 13, 18, 21 i Y mieszczą się w prawidłowym zakresie 0,7-1,3 (znacznik niebieski). Wartości dla 5 sond (sondy 1, 2, 3, 4, 8) chromosomu X wynoszą powyżej 1,3 (1,37-1,43), co wskazuje na duplikację chromosomu X (znacznik czerwony). Pozostałe 3 sond znajdują się w prawidłowym zakresie (sondy 5, 6, 7 – znacznik czerwony). Taki wynik może oznaczać zarówno występowanie triploidii z chromosomami płci XXY, jak również dodatkowy chromosom X u płci męskiej (kariotyp męski XXY).



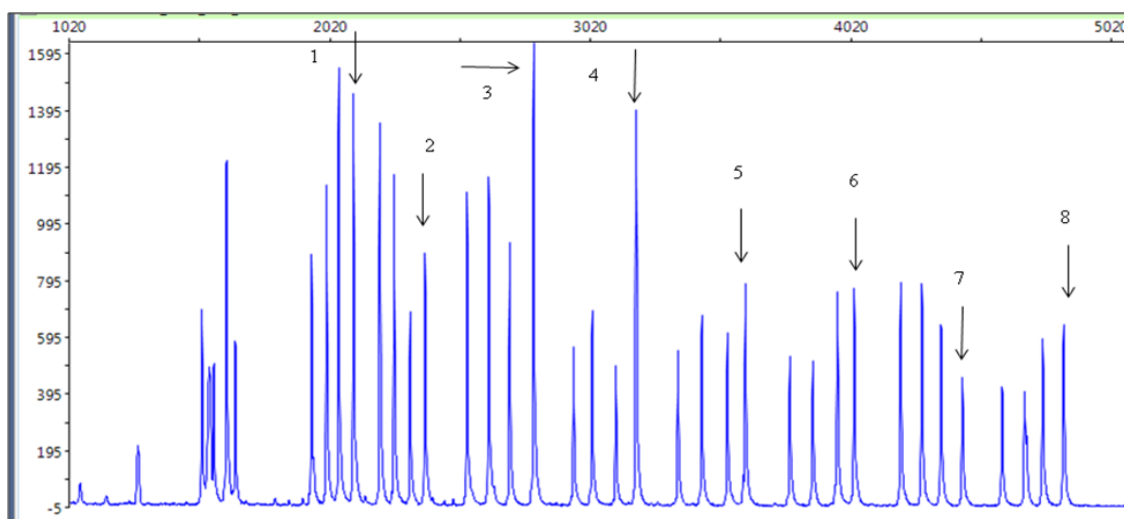
Ryc. 18 Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0). Wynik nieprawidłowy wskazujący na występowanie dodatkowego chromosomu X w kariotypie męskim. Strzałkami zaznaczono produkty amplifikacji 8 różnych fragmentów chromosomu X. W przypadku 3 fragmentów (5, 6, 7) wysokości pików postają w normie, w przypadku pozostałych 5 fragmentów (1, 2, 3, 4, 8) obserwuje się wzrost wysokości, co oznacza duplikację, czyli występowanie dodatkowej kopii chromosomu X.

Trisomia X - XXX

W przypadku jednej kosmówki stwierdzono występowanie dodatkowego chromosomu X u płci żeńskiej (kosmówka nr 103). W tym przypadku 4 z 8 sond dla chromosomu X wykazały wartości powyżej normy, od 1,37 do 1,63 (sondy 2, 3, 4, 5) (Tabela 20). W przypadku pozostałych sond wartości dla chromosomu X mieściły się w granicach normy – 0,86 – 1,07 (sondy 1, 6, 7, 8). Wartości uzyskane dla wszystkich sond kosmówki nr 103 przedstawione zostały na Rycinie 19. Analiza pików dla tej kosmówki w programie Peak Scanner Software v.1.0 pokazuje Rycina 20.



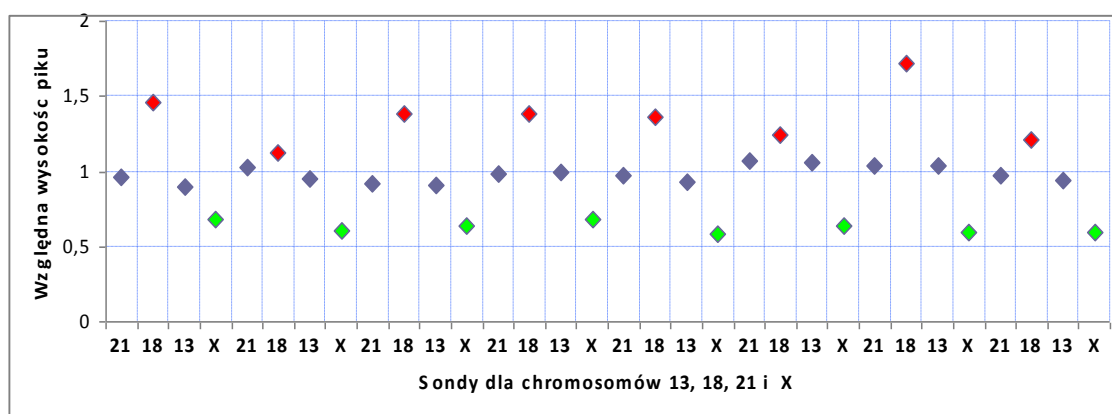
Ryc. 19 Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007). Wartości względnej fluorescencji pików sond dla chromosomów pary 13, 18 i 21 mieszczą się w prawidłowym zakresie 0,7-1,3 (znacznik niebieski). Wartości dla 4 sond chromosomu X (sondy 2, 3, 4, 5) wynoszą powyżej 1,3 (1,37-1,63), co wskazuje na duplikację chromosomu X (znacznik czerwony). Pozostałe 4 sondy (sondy 1, 6, 7, 8) znajdują się w prawidłowym zakresie (znacznik czerwony). Taki wynik może oznaczać występowanie dodatkowego chromosomu X w kariotypie żeńskim (trisomia X – XXX).



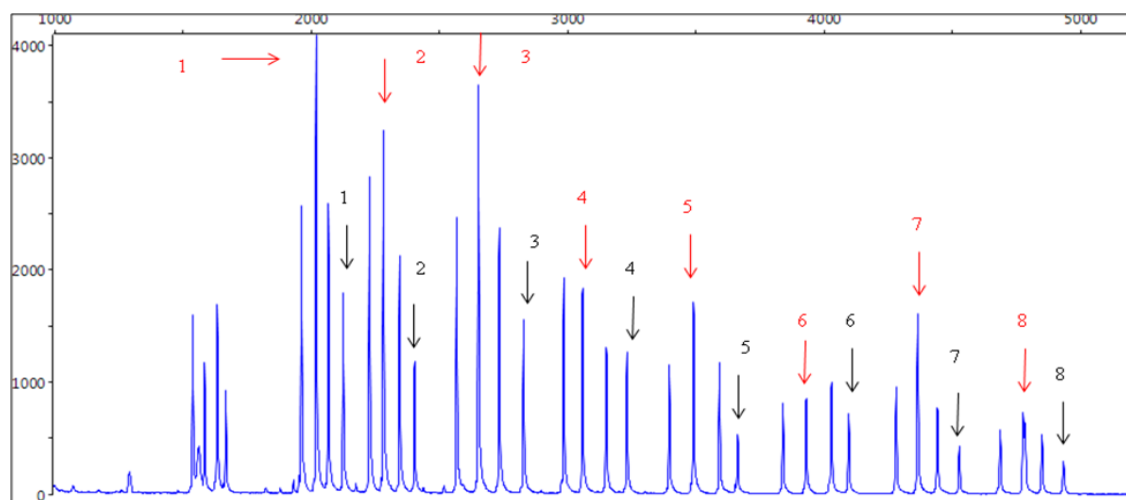
Ryc. 20 Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0). Wynik nieprawidłowy wskazujący na występowanie trisomii chromosomu X. Strzałkami zaznaczono produkty amplifikacji 8 różnych fragmentów chromosomu X. W przypadku 4 fragmentów (1, 6, 7, 8) wysokości pików postają w normie, w przypadku pozostałych 4 fragmentów (2, 3, 4, 5) obserwuje się wzrost wysokości, co oznacza duplikację, czyli występowanie dodatkowej kopii chromosomu X.

Monosomia X z trisomią 18

W jednym przypadku (kosmówka nr 47) stwierdzono występowanie monosomii chromosomu X z trisomią chromosomu pary 18. Delecję stwierdzono w przypadku wszystkich sond chromosomu X oraz 5 z 8 sond chromosomu pary 18 (sondy 1, 3, 4, 5, 7). Względne wartości fluorescencji dla sond chromosomu X wynosiły od 0,58 do 0,68, natomiast dla chromosomu 18 wartości nieprawidłowe mieściły się w granicach od 1,35 do 1,71 dla 5 sond, a dla 3 pozostałych wynosiły 1,12- 1,24. Wartości dla wszystkich sond kosmówki nr 47 przedstawione zostały na Rycinie 21. Analiza pików dla kosmówki 47 w programie Peak Scanner Software v.1.0 pokazuje Rycina 22.



Ryc. 21 Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007). Wartości względne fluorescencji pików sond dla chromosomów pary 13 i 21 mieszczą się w prawidłowym zakresie 0,7-1,3 (niebieski znacznik). Wartości dla 5 sond (1, 3, 4, 5, 7) chromosomu pary 18 wynoszą powyżej 1,3 (1,35-1,71), co wskazuje na duplikację chromosomu pary 18, czyli trisomię 18 (czerwony znacznik). Wartości dla pozostałych 3 sond (2, 6, 8) mieszczą się w granicach normy (czerwony znacznik). Dodatkowo wartości dla chromosomu X wynoszą poniżej 0,7 (0,54-0,67), co wskazuje na delecję chromosomu X - monosomię X (zielony znacznik).

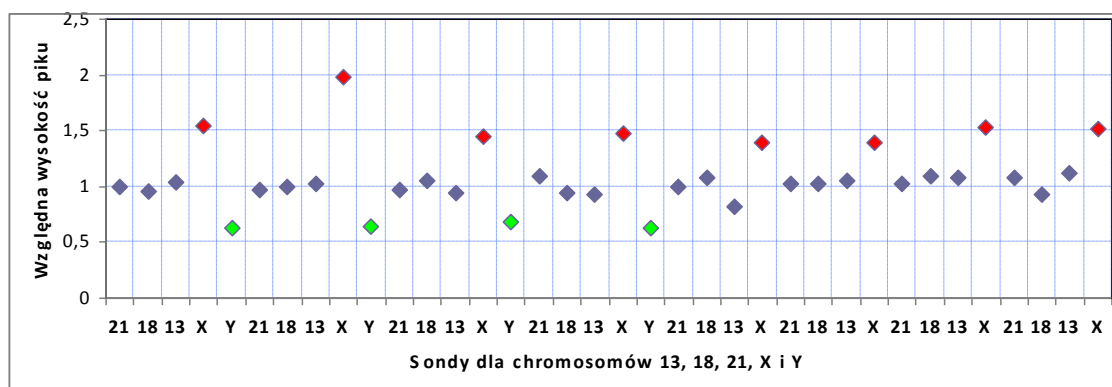


Ryc. 22 Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0). Wynik nieprawidłowy wskazujący na występowanie monosomii X z trisomią 18. Czarnymi strzałkami zaznaczono produkty amplifikacji 8 różnych fragmentów chromosomu X, a czerwonymi chromosomu pary 18. W przypadku chromosomu X zmniejszona wysokość wszystkich pików oznacza występowanie tylko jednej kopii tego chromosomu, przy braku chromosomu Y. W przypadku chromosomu pary 18 wysokości pików 2, 6 i 8 postają w normie, w przypadku pozostałych: 1, 3, 4, 5 i 7 obserwuje się wzrost wysokości, co oznacza duplikację, czyli występowanie dodatkowej kopii chromosomu pary 18.

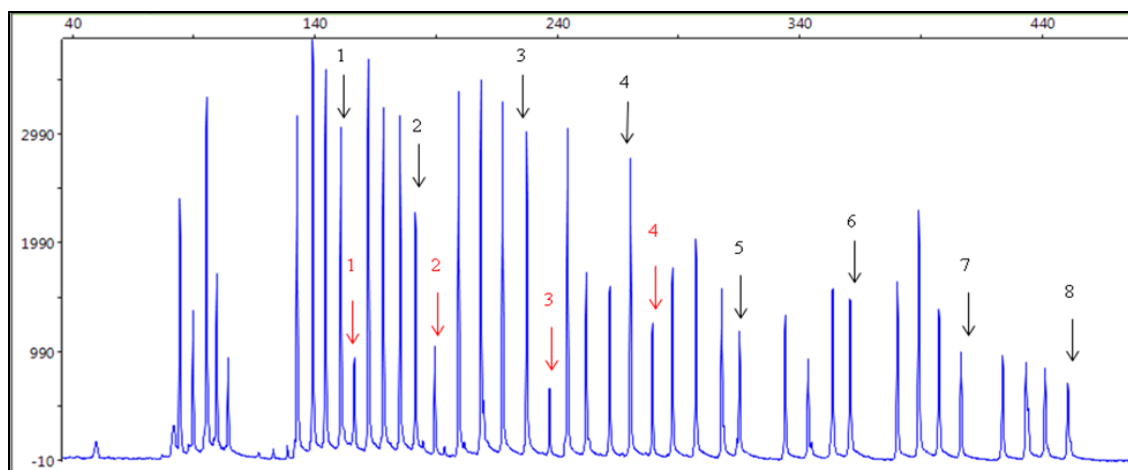
XX/XY

W przypadku kosmówki nr 23 analiza MLPA wykazała wzrost względnych wartości fluorescencji pików dla chromosomu X (powyżej 1,3) oraz zmniejszenie wartości fluorescencji pików dla chromosomu Y (poniżej 0,7). Wskazuje to na występowanie kariotypu żeńskiego i męskiego XX/XY. Przeprowadzona wcześniej analiza metodą FISH dla tej kosmówki stwierdziła równoczesne występowanie w jednym preparacie jąder interfazowych z dwoma chromosomami X jak z chromosomem X oraz Y, z przewagą jąder XX (83/17).

W przypadku sond dla chromosomu X względne wartości fluorescencji były nieprawidłowe w zakresie od 1,38 do 1,98. Wartości dla chromosomu Y były poniżej normy i wynosiły od 0,62 do 0,68. Wartości fluorescencji uzyskane dla wszystkich sond w badaniu kosmówki nr 23 przedstawione zostały na Rycinie 23. Analiza pików dla tej kosmówki w programie Peak Scanner Software v.1.0 pokazuje Ryciną 24.



Ryc. 23 Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007). Wartości względnej fluorescencji pików sond dla chromosomów pary 13, 18 i 21 mieszczą się w prawidłowym zakresie 0,7-1,3 (niebieski znacznik). Wartości dla sond chromosomu X wynoszą powyżej 1,3 (1,37-1,98), co wskazuje na duplikację chromosomu X (czerwony znacznik). Natomiast wartości dla sond chromosomu Y wynoszą poniżej 0,7 (0,62-0,68) (zielony znacznik). Taki wynik może oznaczać zarówno kontaminację komórek płodowych płci męskiej komórkami matki, jak również występowanie mozaikowości komórkowej XX/XY.

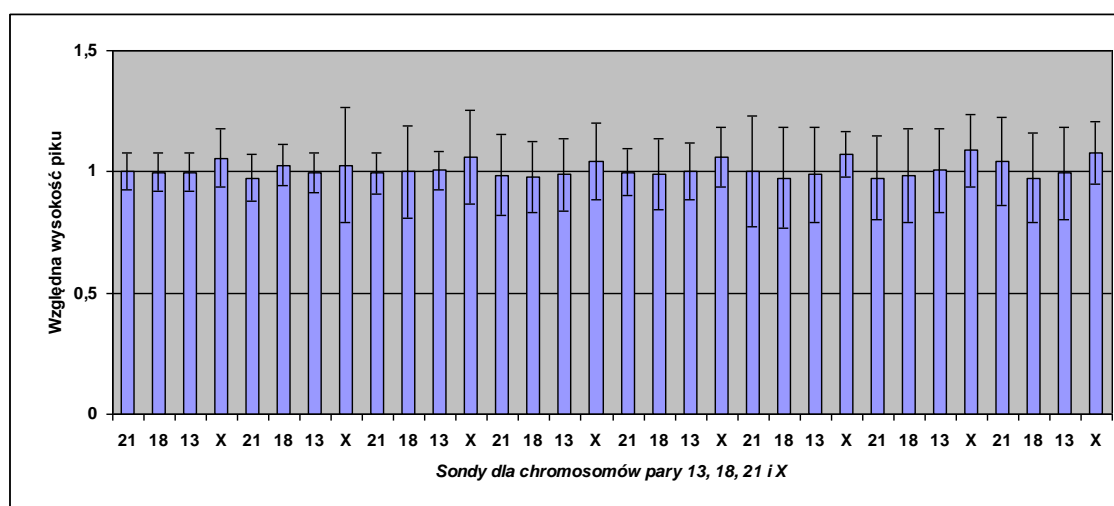


Ryc. 24 Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0). Wynik wskazujący na występowanie zarówno kariotypu XX jak i XY. Czarnymi strzałkami zaznaczono produkty amplifikacji 8 różnych fragmentów chromosomu X, a czerwonymi chromosomu Y. Wartości pików dla chromosomu X znajdują się powyżej granicy normy (1,3), co wskazuje na występowanie dodatkowej kopii chromosomu X w kariotypie męskim. Z kolei dla produktów amplifikacji chromosomu Y wartości te są niższe niż dolna granica normy. Taki układ może oznaczać kontaminację materiału biologicznego komórkami matczynymi lub kariotyp mozaikowy XX/XY.

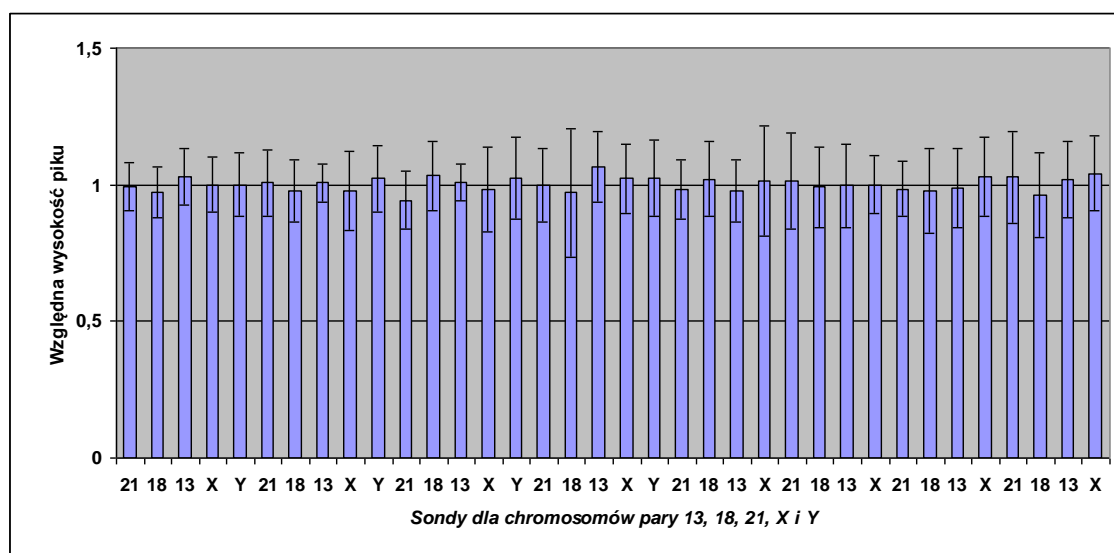
Wyniki prawidłowe

W przypadku 91 ze 119 przebadanych kosmówek nie stwierdzono zmian w liczbie chromosomów pary 13, 18, 21, X i Y. W 58 kosmówkach analiza MLPA stwierdziła występowanie płci żeńskiej, w pozostałych 33 przypadkach stwierdzono płęć męską. Uzyskane w wyniku normalizacji średnie wartości względnej fluorescencji

sond dla wyżej wymienionych chromosomów mieściły się w granicach normy i wynosiły od 0,97 do 1,08 dla kosmówek z kariotypem żeńskim oraz od 0,94 do 1,04 dla kosmówek z kariotypem męskim. Odchylenie standardowe dla wyników prawidłowych żeńskich wynosiło od 0,07 do 0,22, natomiast dla wyników prawidłowych męskich od 0,07 do 0,20. Uśrednione wartości fluorescencji oraz wartość odchylenia standardowego uzyskane dla poszczególnych sond przedstawiono na Rycinach 25 i 26.



Ryc. 25 Fragment analizy MLPA P095 (Microsoft Excel 2007). Wyniki prawidłowe 58 kosmówek (płeć żeńska). Na wykresie przedstawiono średnie wartości fluorescencji pików dla wszystkich sond w zestawie P095 oraz wartości odchylenia standardowego dla poszczególnych sond.



Ryc. 26 Fragment analizy MLPA P095 (Microsoft Excel 2007). Wyniki prawidłowe 33 kosmówek (płeć męska). Na wykresie przedstawiono średnie wartości fluorescencji pików dla wszystkich sond w zestawie P095 oraz wartości odchylenia standardowego dla poszczególnych sond.

4.4.2. MLPA P036 i P070

Analizę regionów subtelomerowych metodą MLPA dwoma zestawami P036 i P070 podjęto w przypadku 77 kosmówek. Do badania zakwalifikowano 74 kosmówki, w przypadku których nie zidentyfikowano nieprawidłowości chromosomowych metodami FISH, QF-PCR oraz MLPA z zestawem P095. Dodatkowo do badania włączono także 3 dodatkowe kosmówki nr: 21, 42, 94. W przypadku kosmówki nr 21 analizę regionów subtelomerowych wykonano, aby ocenić sposób dziedziczenia chromosomów w gametach, ze względu na nosicielstwo u matki translokacji wzajemnej zrównoważonej pomiędzy chromosomami pary 14 i 18 (wyniki badań metodą FISH, QF-PCR i MLPA P095 wskazywały na występowanie u płodu trisomii chromosomu pary 18).

W drugim przypadku (kosmówka nr 42) zidentyfikowano występowanie dodatkowego materiału genetycznego pochodzącego od matki, która jest nosicielką chromosomu markerowego utworzonego z krótkich ramion chromosomów akrocentrycznych pary 14 lub 22. Ze względu na to, iż w krótkich ramionach chromosomów akrocentrycznych nie występują sekwencje kodujące białka, podjęto analizę regionów subtelomerowych w celu wykluczenia innych, dodatkowych aberracji chromosomowych.

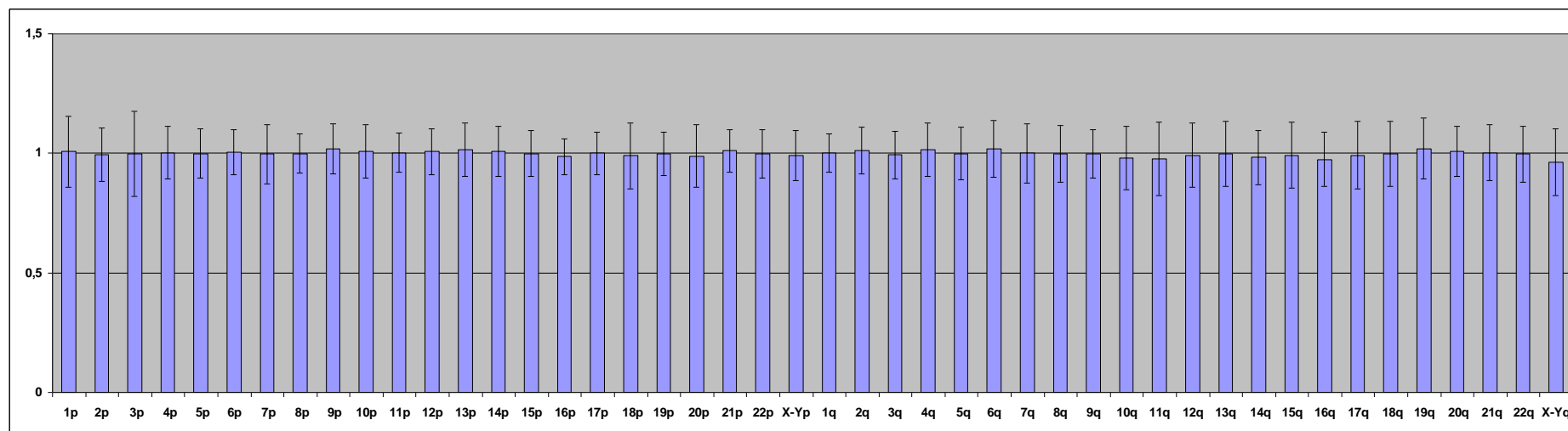
W trzecim przypadku, kosmówki nr 94, analiza FISH wykryła obecność w 84% jąder interfazowych chromosomów płci XX, a w 16% chromosomów X i Y. Badania molekularne metodą QF-PCR oraz MLPA P095 nie wykazały natomiast występowania chromosomu Y w badanym DNA. W obu przypadkach wyniki badań były prawidłowe i wskazywały na występowanie płci żeńskiej.

Spośród 77 kosmówek zakwalifikowanych do badań informacyjne wyniki udało się uzyskać w 62 przypadkach (81% badanych kosmówek). W przypadku pozostałych 15 kosmówek wyniki rozdziału elektroforezy kapilarnej były nieinformacyjne i nie pozwoliły na prawidłową analizę produktów amplifikacji.

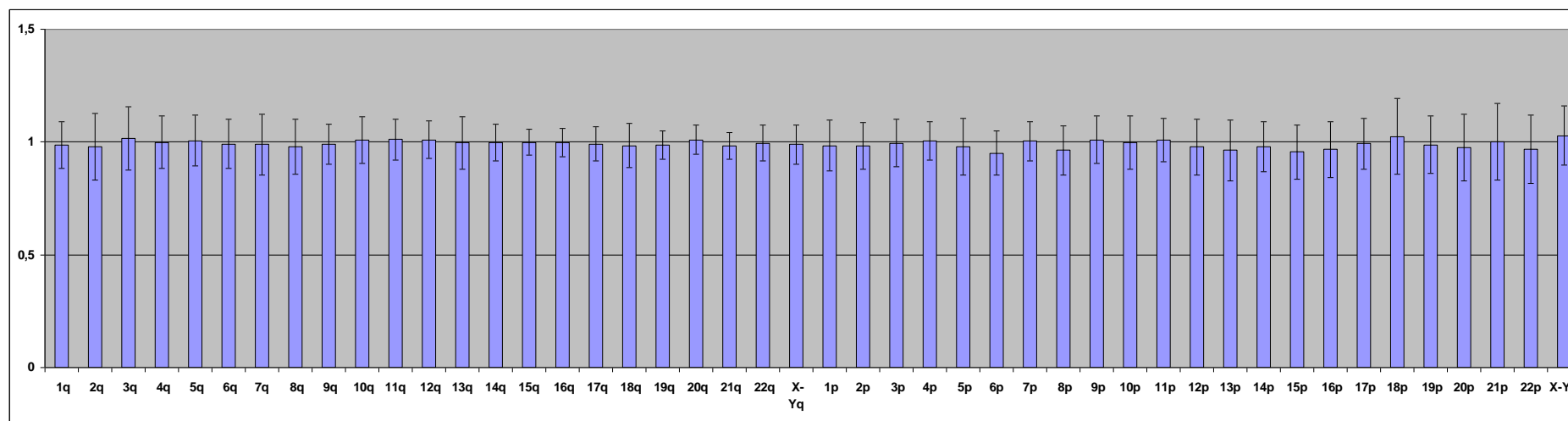
Badania regionów subtelomerowych z zestawami MLPA P036 i P070 pozwoliły na zidentyfikowanie nieprawidłowości w 7 kosmówkach. W 4 przypadkach wyniki badań wskazywały na obecność dodatkowej kopii chromosomu pary: 7 (kosmówka nr 91), 8 (kosmówka nr 57), 14 (kosmówka nr 56) i 20 (kosmówka nr 48), czyli występowanie trisomii chromosomów autosomalnych. W 2 kosmówkach stwierdzono występowanie delecji i duplikacji w regionach subtelomerowych: kosmówka nr 11 –

delecja w regionie 6q i duplikacja w regionie 9q oraz kosmówka nr 122 – delecja w regionie 6q i duplikacja w regionie 2p. W przypadku kosmówki nr 21 stwierdzono występowanie duplikacji w regionie 18q.

W pozostałych 55 kosmówkach nie stwierdzono nieprawidłowości świadczących o występowaniu trisomii lub innej aberracji strukturalnej o charakterze delecji lub duplikacji. Średnie wartości fluorescencji dla sond w zestawie P036 w przypadku prawidłowych kosmówek znajdowały się w granicach od 0,96 do 1,02, a wartości odchylenia standardowego w przedziale od 0,07 do 0,17. Dla zestawu P070 średnie wartości fluorescencji prawidłowych kosmówek wynosiły od 0,95 do 1,02, a wartości odchylenia standardowego od 0,05 do 0,17. Średnie wartości fluorescencji oraz wartości odchylenia standardowego dla każdej sondy w zestawie P036 i P070 przedstawiono na Rycinach 27 i 28.



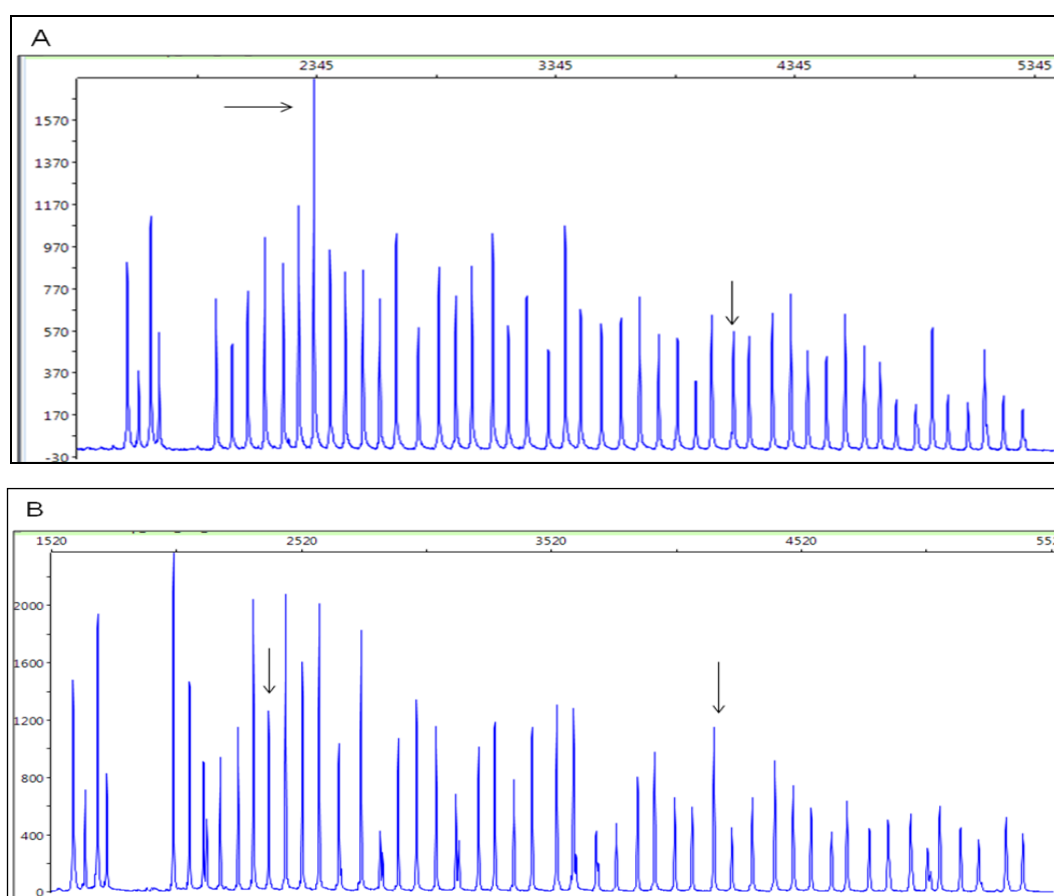
Ryc. 27 Fragment analizy MLPA P036 (Microsoft Excel 2007). Wyniki prawidłowe 55 kosmówek. Na wykresie przedstawiono średnie wartości fluorescencji pików dla wszystkich sond w zestawie P036 oraz wartości odchylenia standardowego dla poszczególnych sond. Średnie wartości są bliskie 1,0, natomiast wartość odchylenia standardowego dla poszczególnych sond wyniosła od 0,07 do 0,17.



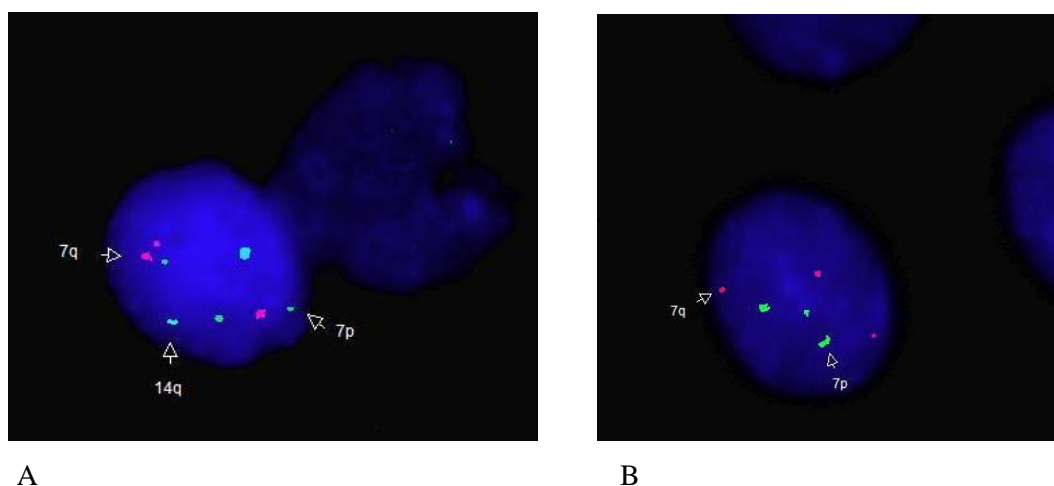
Ryc. 28 Fragment analizy MLPA P070 (Microsoft Excel 2007). Wyniki prawidłowe 55 kosmówek. Na wykresie przedstawiono średnie wartości fluorescencji pików dla wszystkich sond w zestawie P070 oraz wartości odchylenia standardowego dla poszczególnych sond. Średnie wartości są bliskie 1,0, natomiast wartość odchylenia standardowego dla poszczególnych sond wyniosła od 0,05 do 0,17.

Trisomia 7

Trisomię chromosomu pary 7 zidentyfikowano w przypadku kosmówki nr 91. Analiza MLPA z zestawem P036 i P070 wykazała występowanie duplikacji w regionach subtelerowych chromosomu pary 7 – 7p i 7q. Wartości pomiaru fluorescencji dla sond regionu 7p wynosiły dla zestawu P036 i P070 odpowiednio 1,52 i 1,35, a dla regionu 7q - 1,39 i 1,44. Analiza wyników w programie Peak Scanner Software v.1.0 przedstawia Rycina 29. Wyniki uzyskane metodą MLPA zostały potwierdzone metodą FISH z sondami subtelerowymi do ramion p i q chromosomu pary 7 oraz z sondą kontrolną do ramienia q chromosomu pary 14 (Ryc. 30).



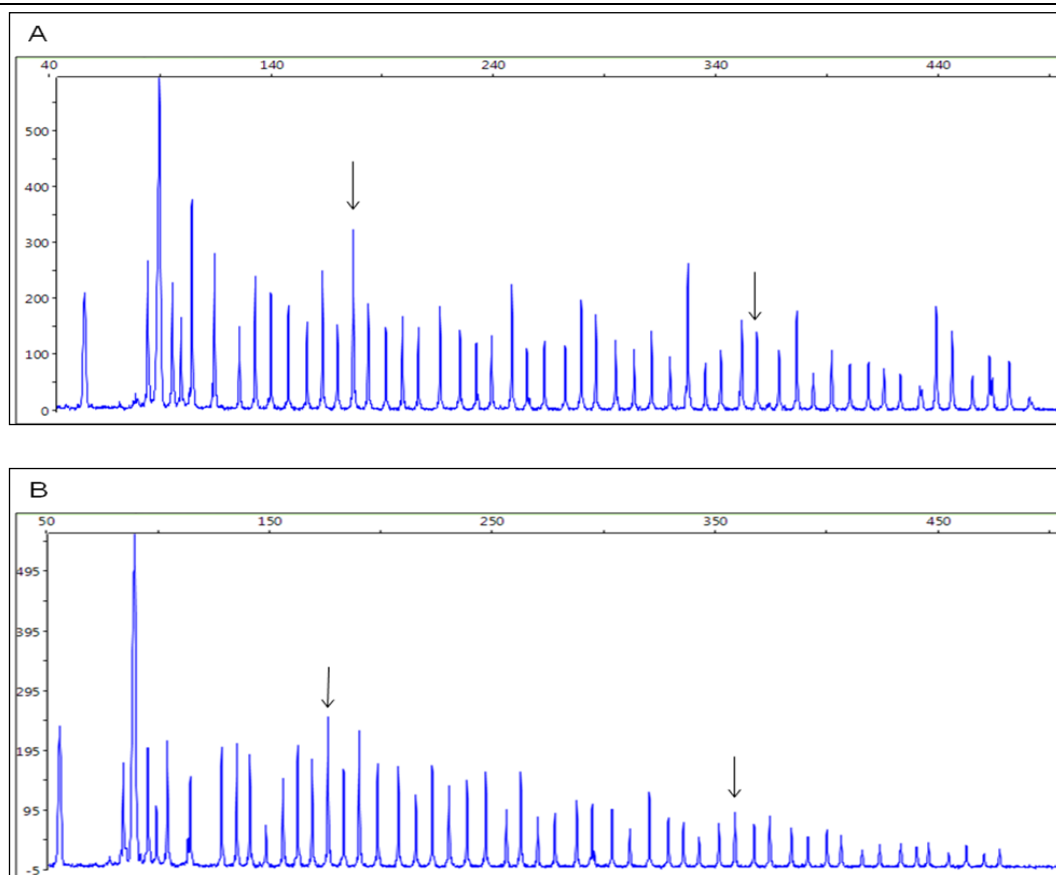
Ryc. 29 Fragment analizy MLPA z zestawem P036 i P070 (Peak Scanner Software v.1.0). Wynik nieprawidłowy wskazujący na występowanie dodatkowego chromosomu pary 7 (trisomia 7). Rycina A przedstawia rozdział pików w zestawie P036, rycina B w zestawie P070. Strzałkami oznaczono wzrost wysokości pików dla sondy 7p i 7q w obu zestawach. Duplikacja w obu regionach, w każdym zestawie oznacza trisomię chromosomu pary 7.



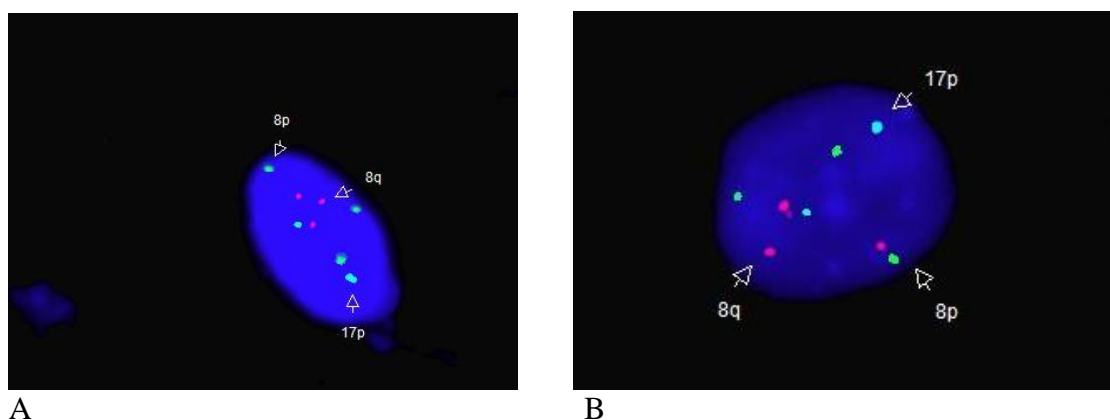
Ryc. 30 FISH do jąder interfazowych z sondami subtelerowymi do ramion p i q chromosomu pary 7. Strzałkami zaznaczono sygnały hybrydazyjne. Czerwone sygnały pochodzą od sondy hybrydującej do ramienia 7q (7QTEL20), zielone od sondy 7p (G31341), a niebieskie od sondy hybrydującej do ramienia q chromosomu pary 14 (D14S1420). Na Rycinie A przedstawiono jądro interfazowe z trzema sygnałami pochodzącymi od sondy 7p i 7q oraz dwoma od sondy 14q. Rycina B przedstawia tylko sondy hybrydujące do ramion p i q chromosomu pary 7.

Trisomia 8

Obecność dodatkowej kopii chromosomu pary 8 zaobserwowano w przypadku kosmówki nr 57. Analiza MLPA z zestawem P036 i P070 wykazała występowanie duplikacji w regionach subtelerowych chromosomu pary 8 – 8p i 8q. Wartości pomiaru fluorescencji dla sond regionu 8p wynosiły dla zestawu P036 i P070 odpowiednio 1,36 i 1,35, a dla regionu 8q - 1,41 i 1,35. Analizę wyników w programie Peak Scanner Software v.1.0 przedstawia Rycina 31. Wyniki uzyskane metodą MLPA zostały potwierdzone metodą FISH z sondami subtelerowymi do ramion p i q chromosomu pary 8 oraz z sondą kontrolną do ramienia p chromosomu pary 17 (Ryc. 32).



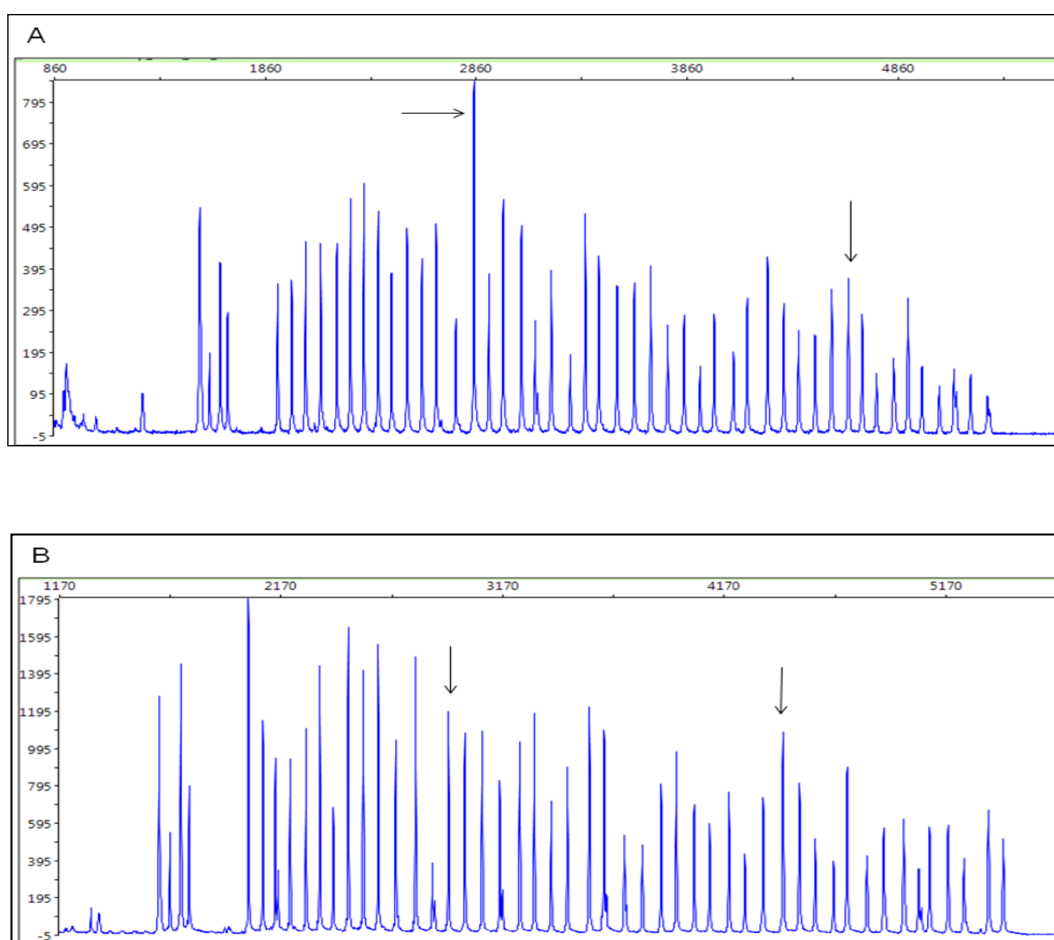
Ryc. 31 Fragment analizy MLPA z zestawem P036 i P070 (Peak Scanner Software v.1.0). Wynik nieprawidłowy wskazujący na występowanie dodatkowego chromosomu pary 8. Rycina A przedstawia rozdział pików w zestawie P036, Rycina B w zestawie P070. Strzałkami oznaczono wzrost wysokości pików dla sondy 8p i 8q w obu zestawach. Duplikacja w obu regionach, w każdym zestawie oznacza trisomię chromosomu pary 8.



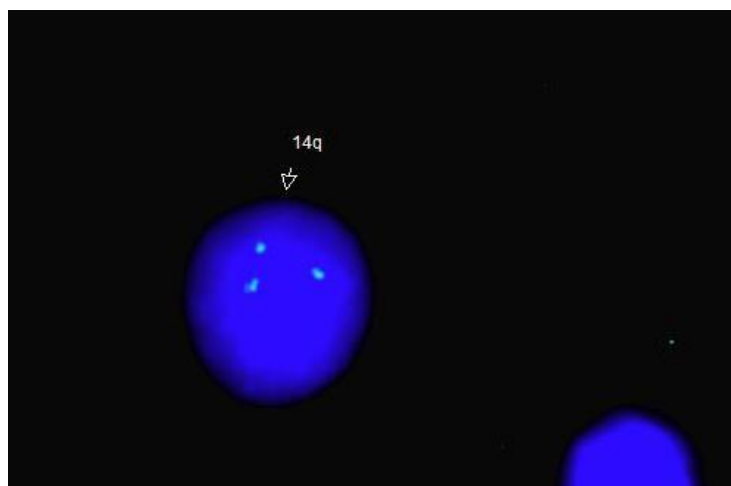
Ryc. 32 FISH do jąder interfazowych z sondami subtelerowymi do ramion p i q chromosomu pary 8. Strzałkami zaznaczono sygnały hybrydyzacyjne. Czerwone sygnały pochodzą od sondy hybrydującej do ramienia 8q (VIJ²yRM2053), zielone od sondy 8p (D8S504), a niebieskie od sondy hybrydującej do ramienia p chromosomu pary 17 (282M15/SP6). Na Rycinie A i B przedstawiono jądro interfazowe z trzema sygnałami pochodzącymi od sondy 8p i 8q oraz dwoma sygnałami od sondy 17p.

Trisomia 14

W przypadku kosmówki nr 56 zidentyfikowano trisomię chromosomu pary 14. Analiza MLPA z zestawem P036 i P070 wykazała występowanie duplikacji w regionach subtelerowych chromosomu pary 14 – 14”p” i 14q (sonda 14p hybryduje do sekwencji leżącej pod centromerem ramienia q, ze względu na to, iż chromosom pary 14 jest akrocentrykiem i nie posiada sekwencji kodujących w okolicach subteleru ramienia p). Wartości pomiaru fluorescencji dla sond regionu 14p wynosiły dla zestawu P036 i P070 odpowiednio 1,37 i 1,52, a dla regionu 14q - 1,45 i 1,38. Analizę wyników w programie Peak Scanner Software v.1.0 przedstawia Rycina 33. Wyniki uzyskane metodą MLPA zostały potwierdzone metodą FISH z sondami subtelerowymi do ramienia q chromosomu pary 14 (Ryc. 34).



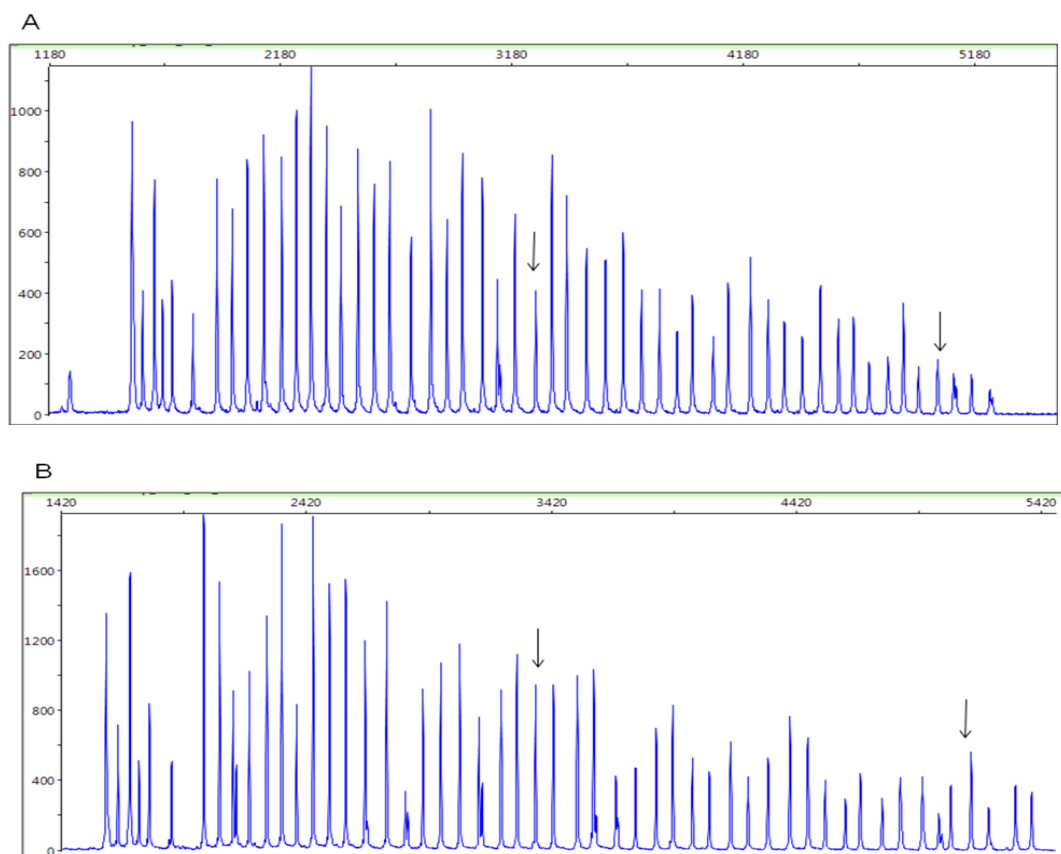
Ryc. 33 Fragment analizy MLPA z zestawem P036 i P070 (Peak Scanner Software v.1.0). Wynik nieprawidłowy wskazujący na występowanie dodatkowego chromosomu pary 14. Rycina A przedstawia rozdział pików w zestawie P036, Rycina B w zestawie P070. Strzałkami oznaczono wzrost wysokości pików dla sondy 14p i 14q w obu zestawach. Duplikacja w obu regionach, w każdym zestawie oznacza trisomię chromosomu pary 14.



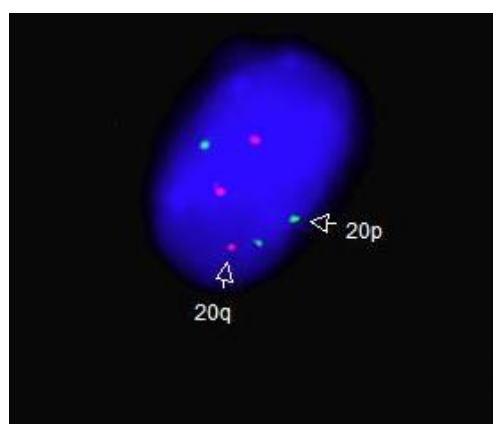
Ryc. 34 FISH do jąder interfazowych z sondami subtelerowymi do ramienia q chromosomu pary 14. Strzałkami zaznaczono sygnały hybrydazyjne. Niebieskie sygnały pochodzą od sondy hybrydującej do ramienia 14q (D14S1420). Na Rycinie przedstawiono jądro interfazowe z trzema sygnałami pochodzącymi od sondy 14q.

Trisomia 20

Obecność dodatkowej kopii chromosomu pary 20 zaobserwowano w przypadku kosmowki nr 48. Analiza MLPA z zestawem P036 i P070 wykazała występowanie duplikacji w regionach subtelerowych chromosomu pary 20 – 20p i 20q. Wartości pomiaru fluorescencji dla sond regionu 20p wynosiły dla zestawu P036 i P070 odpowiednio 1,41 i 1,74, a dla regionu 20q - 1,43 i 1,55. Analizę wyników w programie Peak Scanner Software v.1.0 przedstawia Rycina 35. Wyniki uzyskane metodą MLPA zostały potwierdzone metodą FISH z sondami subtelerowymi do ramion p i q chromosomu pary 20 (Ryc. 36).



Ryc. 35 Fragment analizy MLPA z zestawem P036 i P070 (Peak Scanner Software v.1.0). Wynik nieprawidłowy wskazujący na występowanie dodatkowego chromosomu pary 14. Rycina A przedstawia rozdział pików w zestawie P036, Rycina B w zestawie P070. Strzałkami oznaczono wzrost wysokości pików dla sondy 14p i 14q w obu zestawach. Duplikacja w obu regionach, w każdym zestawie oznacza trisomie chromosomu pary 14.

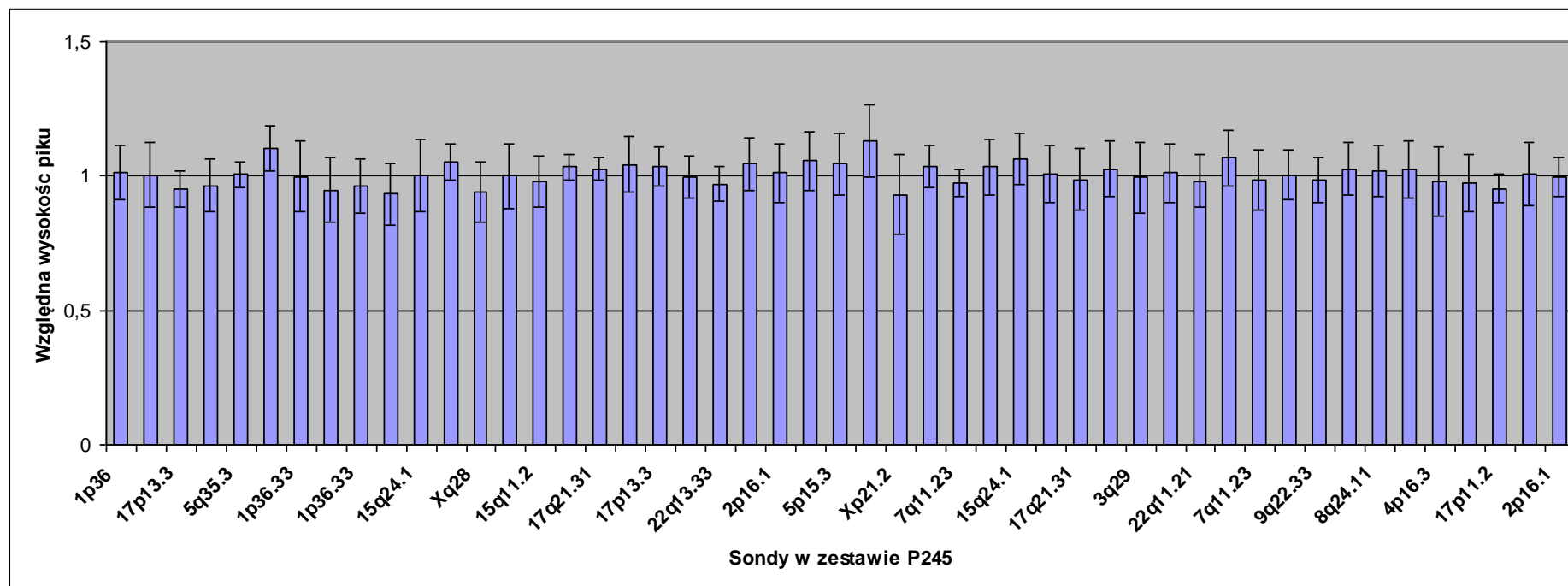


Ryc. 36 FISH do jąder interfazowych z sondami subtelerowymi do ramienia q chromosomu pary 20. Strzałkami zaznaczono sygnały hybrydazyjne. Czerwone sygnały pochodzą od sondy hybrydującej do ramienia 20q (20QTEL14), zielone od sondy 20p (D20S1157). Na Rycinie przedstawiono jądro interfazowe z trzema sygnałami pochodzącymi od sondy 20p i 20q.

4.4.3. Wyniki MLPA P245

Do identyfikacji mikrodelecji/mikroduplikacji wykorzystano zestaw MLPA P245. Do badania zakwalifikowano 10 kosmówek – wszystkie pochodziły z późnych poronień, powyżej 12 tygodnia ciąży, a wcześniej przeprowadzone badania innymi metodami nie wykazały aberracji chromosomowych. Badaniami objęto kosmówki nr: 13 (21 t.c.), 16 (23 t.c.), 19 (15 t.c.), 28 (17 t.c.), 34 (19 t.c.), 60 (22 t.c.), 62 (21 t.c.), 69 (19 t.c.), 82 (17 t.c.), 118 (16 t.c.). W przypadku kosmówek nr: 16, 60 i 118 u płodu występowały wrodzone wady rozwojowe (wady cewy nerwowej i wady kończyn).

W badaniu nie stwierdzono występowania zmian o charakterze mikrodelecji/mikroduplikacji w przypadku żadnej z 10 kosmówek. Uzyskane w wyniku normalizacji średnie wartości względne fluorescencji sond wynosiły od 0,92 do 1,13. Wartości odchylenia standardowego wynosiły od 0,04 do 0,13. Wyniki analizy MLPA P245 zostały przedstawione na Rycinie 37.



Ryc. 37 Fragment analizy MLPA P245 (Microsoft Excel 2007). Wyniki prawidłowe 10 badanych kosmówek. Na wykresie przedstawiono średnie wartości fluorescencji pików dla wszystkich sond w zestawie P245 oraz wartości odchylenia standardowego dla poszczególnych sond.

4.5. Wyniki badań materiału z poronienia u nosicieli translokacji wzajemnych zrównoważonych

Para BK i WK

Państwo *BK* i *WK* zgłosili się do Poradni Genetycznej w związku z utratą trzeciej ciąży, po której została zabezpieczona kosmówka do badań genetycznych. W badaniu kosmówki nie wykryto zmian w liczbie chromosomów pary 13, 15, 16, 18, 21 i 22, w związku z czym wykonano analizę sekwencji subtelomerowych metodą MLPA. U pary wykonano równocześnie badanie kariotypu.

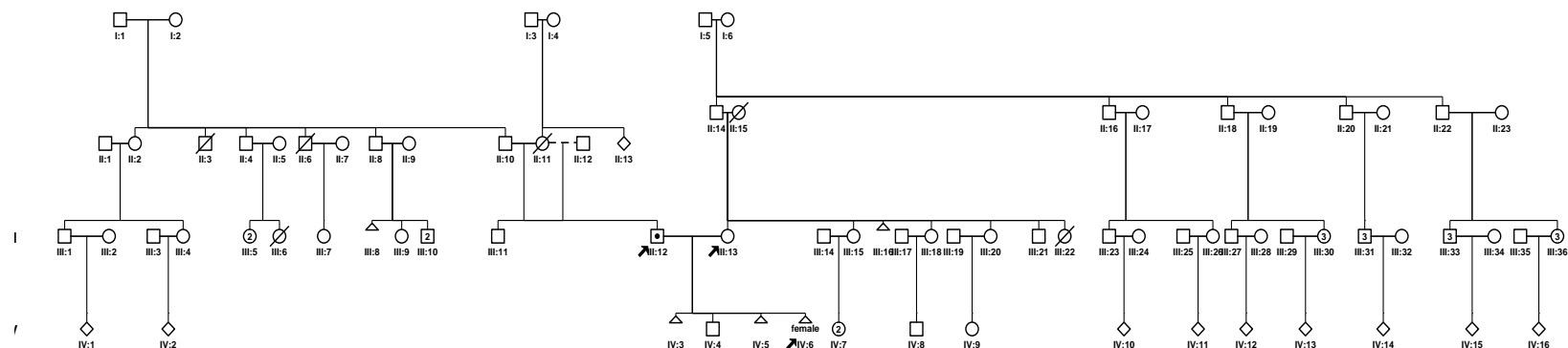
W chwili badania pacjentka miała 33 lata, a pacjent 40. Oboje byli zdrowi, bez chorób genetycznych i wad wrodzonych, nie byli także ze sobą spokrewnieni. Przeprowadzony wywiad lekarski nie wskazywał na szczególne narażenie obojga partnerów na czynniki mutagenne lub teratogenne w środowisku pracy, które mogłyby wiązać się z niepowodzeniami rozrodu. U pary wystąpiły dotychczas 4 ciąży: CI - poronienie samoistne w 5/6 t.c., CII - zdrowy syn (rozwój prawidłowy), CIII – obumarcie zarodka w 7 t.c., CIV – obumarcie płodu w 11 t.c. (kosmówka została zabezpieczona do badań genetycznych).

Analiza rodowodu partnerów wskazywała na występowanie niepowodzeń ciąży w obu rodzinach. U matki pacjentki nastąpiła utrata jednej wczesnej ciąży oraz zgon przedwcześnie urodzonej córki. U babci pacjenta ze strony ojca wystąpił zgon syna (zaraz po urodzeniu), u bratowej ojca pacjenta utrata jednej zdrowej ciąży, u drugiej bratowej zgon przedwcześnie urodzonej córki. Szczegółowa analiza rodowodu została przedstawiona na Rycinie 38.

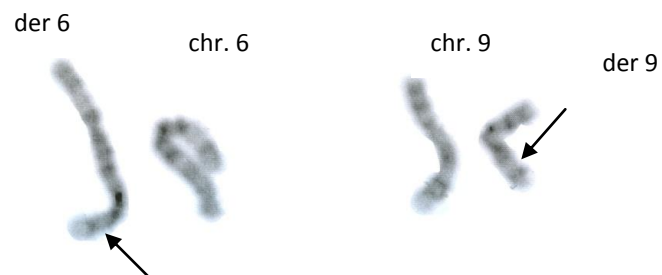
Wynik badania kariotypu pary wykazał u pacjenta występowanie zrównoważonej translokacji wzajemnej między chromosomami pary 6 i 9 – 46,XY,t(6;9)(q26;q32) (Ryc. 39). Kariotyp pacjentki był prawidłowy.

W badaniu MLPA z zestawem P036 i P070 do regionów subtelomerowych, które wykonano z DNA wyizolowanego z kosmówki po trzecim poronieniu (kosmówka nr 11), wykryto delecję w długim ramieniu chromosomu pary 6 (del 6q: sonda 01746-L01304, 346 nt; sonda 02694-L02844, 166 nt) oraz duplikację w długim ramieniu chromosomu pary 9 (dup 9q: sonda 08205-L08170, 372 nt; sonda 02792-L02846, 186 nt). Fragmenty analizy sekwencji subtelomerowych przedstawiono na Rycinie 40.

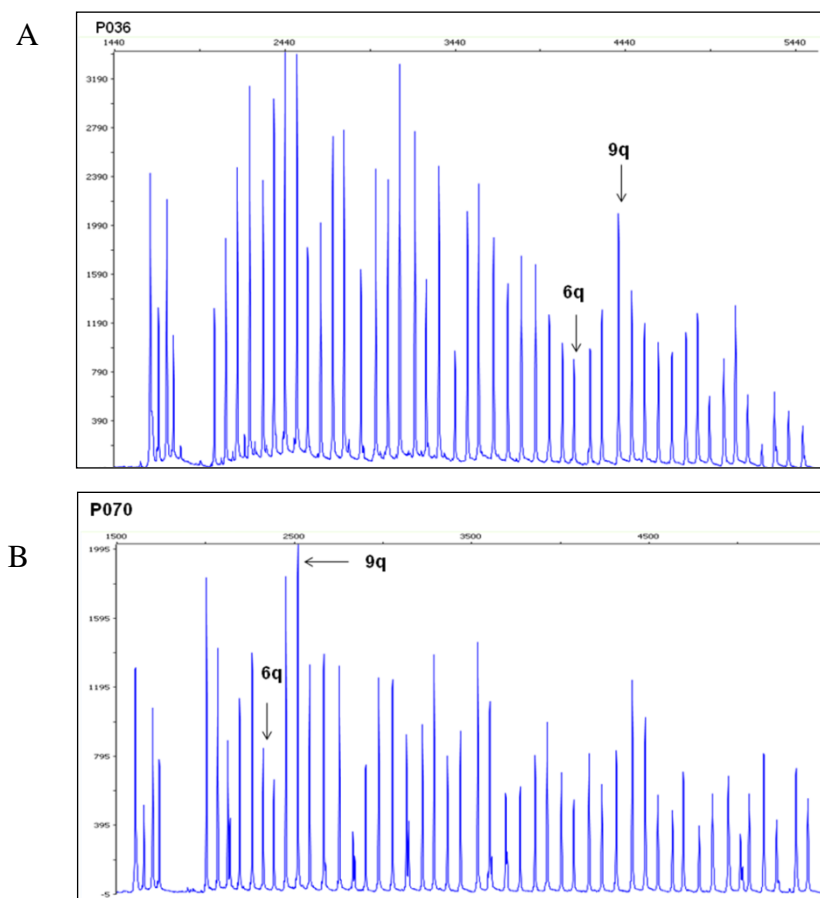
Wynik badania MLPA został potwierdzony metodą FISH do sekwencji subtelomerowych (Rycina 41).



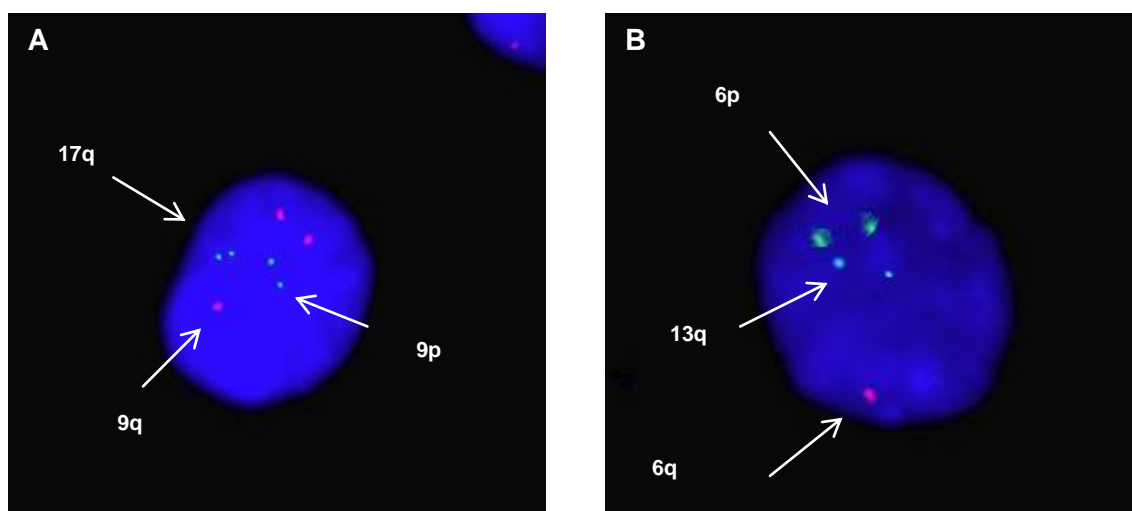
Ryc. 38 Rodowód pary BK i WK. Strzałkami zaznaczono pacjentów oraz trzecie poronienie samoistne (badana kosmówka).



Ryc. 39 Translokacja wzajemna u pacjenta WK. Rycina przedstawia prawidłowe chromosomy pary 6 i 9 oraz chromosomy po translokacji der(6) i der(9). Kariotyp pacjenta: 46,XY,t(6;9)(q26;q32).



Ryc. 40 Fragment analizy MLPA P036 i P070 (Peak Scanner Software v. 1.0). Wynik nieprawidłowy (kosmówka nr 11) wskazujący na występowanie delecji 6q i duplikacji 9q. Rycina A przedstawia rozdział pików w zestawie P036, Rycina B w zestawie P070. Strzałkami oznaczono wzrost wysokości pików dla sondy 9q i zmniejszenie wysokości dla sondy 6q w obu zestawach.



Ryc. 41 FISH z sondami subtelerowymi do jąder interfazowych. Czerwone i zielone sygnały hybrydazyjne pochodzą z regionu subtelerowego 9p i 9q (A) oraz 6p i 6q (B). Niebieskie sygnały pochodzą z regionu 17q (A) oraz 13q (B). Na Rycinie A strzałkami zaznaczono trzy czerwone sygnały sondy 9q (D9S325). Rycina B przedstawia pojedynczy czerwony sygnał od sondy 6q (6QTEL54). Taki wynik świadczy o delecji w regionie 6q i duplikacji w regionie 9q.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że przyczyną poronienia samoistnego z czwartej ciąży było występowanie niezrównoważonej translokacji pochodzenia ojcowskiego. Odziedziczenie tylko jednego chromosomu pochodnego od ojca spowodowało delecję w długim ramieniu chromosomu pary 6 oraz duplikację fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 9. Nie stwierdzono także żadnych innych aberracji, które mogłyby być przyczyną poronień. Uzyskane wyniki świadczą o tym, iż aberracja strukturalna, która występuje u pacjenta, prowadzić może do tworzenia gamet z jednym z chromosomów pochodnych powstałych po translokacji, co prowadzi do wczesnych poronień samoistnych. Ponieważ nie badano materiału pochodzącego z wcześniejszych poronień nie można jednoznacznie stwierdzić, iż w każdym przypadku wzór dziedziczenia chromosomów pochodnych był taki sam.

Para MK i DK

Pacjenci *MK* i *DK* to para, u której wystąpiły trzy niepowodzenia ciąży. Pacjentka czterokrotnie była w ciąży: CI – zdrowy syn, CII – poronienie samoistne w 9 t.c., CIII – obumarcie płodu w 8 t.c., CIV – obumarcie płodu w 19 t.c. Badania molekularne prowadzono na kosmówce z czwartej ciąży (kosmówka nr 122).

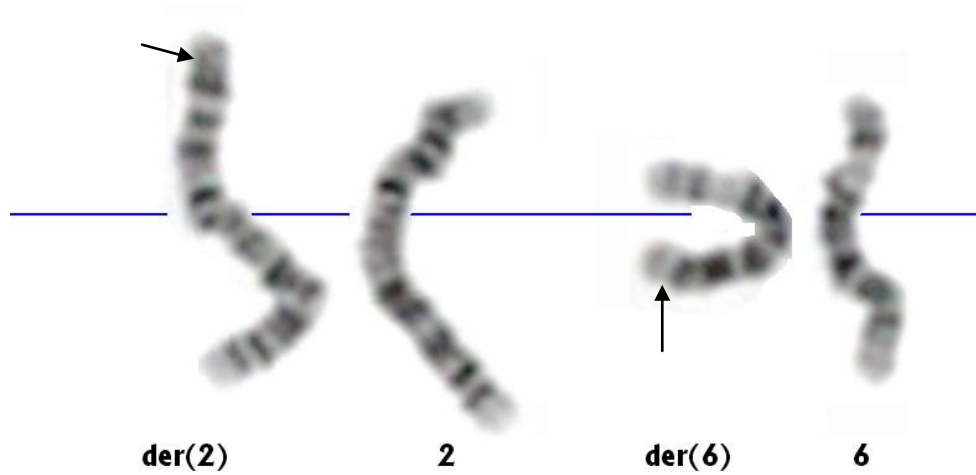
Pacjenci nie są ze sobą spokrewnieni, nie mają wad wrodzonych, nie byli narażeni na szkodliwe czynniki teratogenne lub mutagenne mogące mieć znaczenie w ustalaniu przyczyny niepowodzenia. Przeprowadzony wywiad ujawnił niepowodzenia

rozrodu w rodzinie pacjentów (Ryc. 43). U brata matki pacjenta wystąpił zgon córki kilka miesięcy po porodzie. Córka brata matki pacjentki bezskutecznie stara się o ciążę, a u jej siostry wystąpiło poronienie samoistne ciąży bliźniaczej.

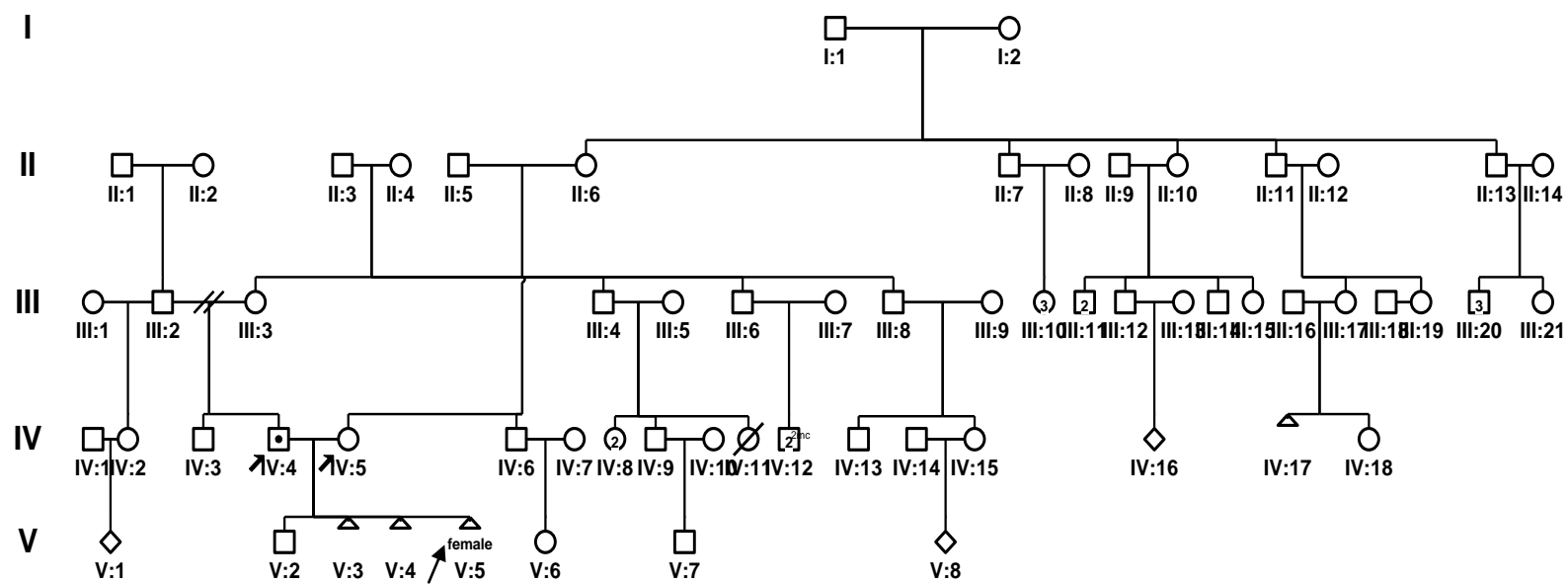
Analiza kariotypu obojga partnerów wykazała, że pacjent jest nosicielem translokacji wzajemnej zrównoważonej pomiędzy chromosomami pary 2 i 6 – 46,XY,t(2;6)(p25.1;q25.1) (Ryc. 42).

Wyniki przeprowadzonych badań, w kierunku najczęściej występujących aneuploidii 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y były prawidłowe. Analiza molekularna metodą MLPA z zestawem P036 i P070 dla regionów subtelomerowych wykazała występowanie delecji w długim ramieniu chromosomu pary 6 (delecja 6q: sonda 01746-L01304, 130 nt; sonda 02694-L02844, 166 nt) i duplikacji w krótkim ramieniu chromosomu pary 2 (dup 2p: sonda 02269-L01761, 130 nt; sonda 02709-L02856, 315 nt). Fragment analizy sekwencji subtelomerowych przedstawiono na Rycinie 44. Wynik badania MLPA został potwierdzony metodą FISH do sekwencji subtelomerowych (Rycina 45).

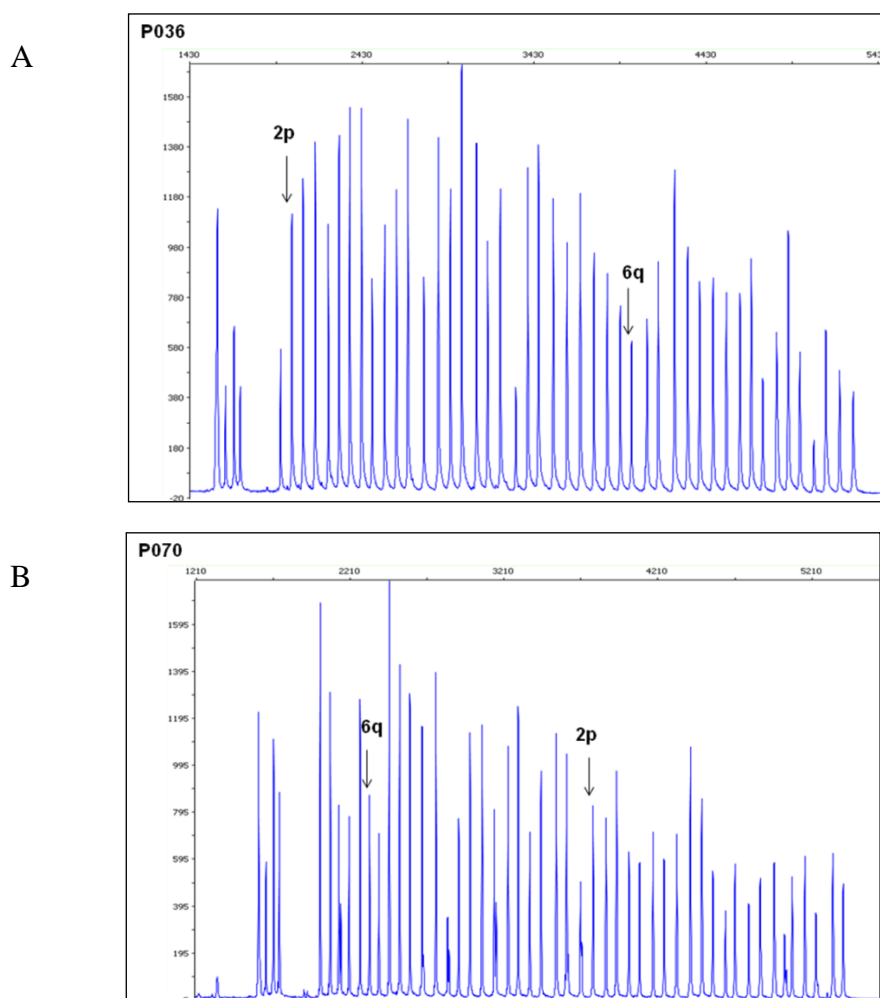
W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że przyczyną obumarcia płodu z CIV było występowanie niezrównoważonej translokacji pochodzenia ojcowskiego. Odziedziczenie tylko jednego chromosomu pochodnego od ojca spowodowało delecję w długim ramieniu chromosomu pary 6 oraz duplikację fragmentu krótkiego ramienia chromosomu pary 2. Nie stwierdzono także żadnych innych aberracji, które mogłyby być przyczyną poronienia.



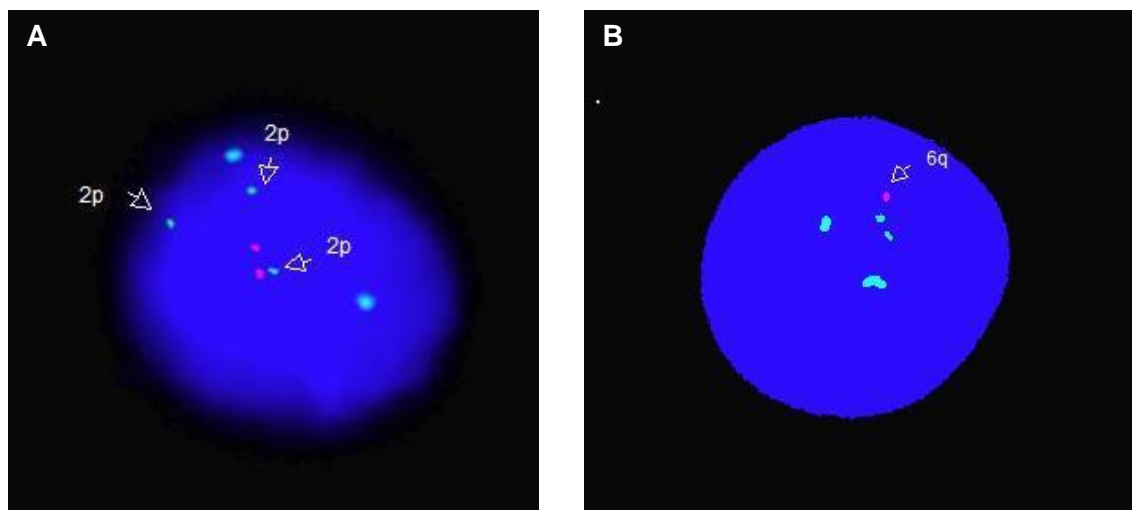
Ryc. 42 Translokacja wzajemna u pacjenta *DK*. Rycina przedstawia prawidłowe chromosomy pary 2 i 6 oraz chromosomy po translokacji *der(2)* i *der(6)*. Kariotyp pacjenta: 46,XY,t(2;6)(p25.1;q25.1).



Ryc. 43 Rodowód pacjentów *MK* i *DK*. Strzałkami zaznaczono pacjentów oraz badane poronienie.



Ryc. 44 Fragment analizy MLPA P036 i P070 (Peak Scanner Software v.1.0). Wynik nieprawidłowy (kosmówka nr 122) wskazujący na występowanie delecji 6q i duplikacji 2p. Rycina A przedstawia rozdział pików w zestawie P036, Rycina B w zestawie P070. Strzałkami oznaczono wzrost wysokości pików dla sondy 2p i zmniejszenie wysokości dla sondy 6q w obu zestawach.



Ryc. 45 FISH z sondami subtelerowymi do jąder interfazowych. Czerwone i zielone sygnały hybrydazyjne pochodzą z regionu subtelerowego 2p i 2q (A) oraz 6p i 6q (B). Niebieskie sygnały pochodzą z regionu Xq/Yq (A) oraz 13q (B). Na Rycinie A strzałkami zaznaczono trzy zielone sygnały sondy 2p (VIJ²yRM2052). Rycina B przedstawia pojedynczy czerwony sygnał od sondy 6q (6QTEL54). Taki wynik świadczy o delecji w regionie 6q i duplikacji w regionie 2p.

Para MB i MB

U pacjentów *MB* i *MB* wystąpiły trzy poronienia samoistne: CI – poronienie samoistne w 9 t.c., CII – obumarcie ciąży w 14 t.c., CIII – poronienie samoistne w 9 t.c. Para nie ma dzieci. W ciąży drugiej, w badaniu ultrasonograficznym stwierdzono nieprawidłową przezierność karkową. Do badań molekularnych wykorzystano kosmówkę z trzeciej ciąży (kosmówka nr 21).

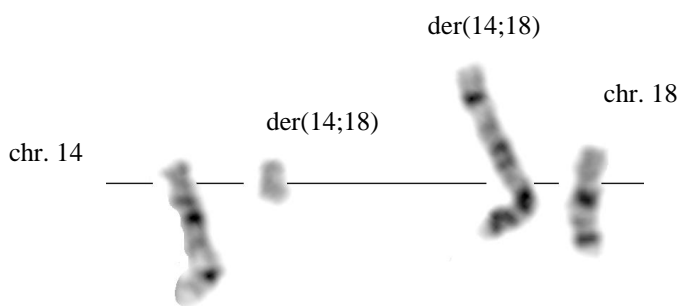
Pacjenci nie są spokrewnieni, nie mają wad wrodzonych. W rodowodzie obu rodzin nie występowały niepowodzenia ciąży, natomiast w rodzinie pacjenta jest trzech krewnych z niepełnosprawnością intelektualną i fizyczną.

Analiza kariotypu przeprowadzona u obojga partnerów pozwoliła na identyfikację u pacjentki translokacji wzajemnej zrównoważonej – 46,XX,t(14;18)(q10;q10). Do translokacji doszło w wyniku fuzji ramion krótkich chromosomów pary 14 i 18 oraz fuzji ramion długich tych samych chromosomów (Ryc. 46).

We wcześniejszych badaniach FISH kosmówki z ciąży drugiej, które przeprowadzono w NZOZ CGM Genesis w Poznaniu, stwierdzono występowanie trzech sygnałów hybrydazyjnych pochodzących od chromosomu pary 18. Nie pozwoliło to jednak na ustalenie, który z chromosomów po translokacji został odziedziczony. W przypadku kosmówki z ciąży trzeciej wykonano najpierw badanie

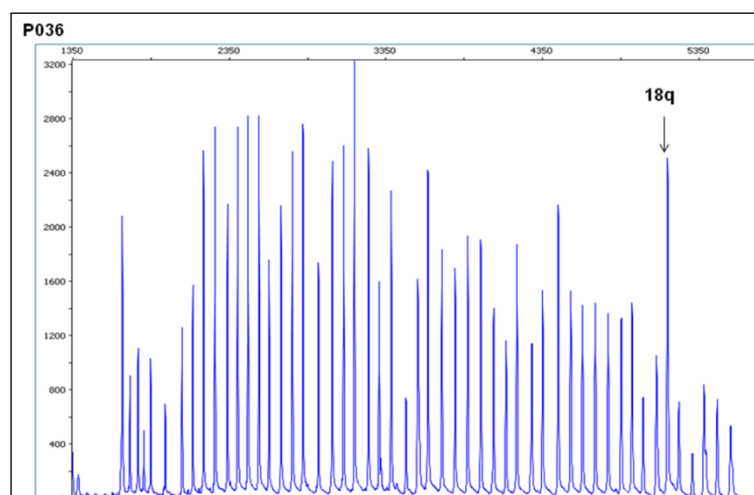
metodą FISH z chromosomami 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y, który wykazały występowanie trisomii 18 a następnie badania molekularne. Dzięki badaniom molekularnym ustalono, że przyczyną niepowodzenia ciąży była trisomia długiego ramienia chromosomu pary 18. W badaniu MLPA z zestawem P095 z sondami do ramienia krótkiego i długiego chromosomu pary 18, nieprawidłowe wartości uzyskano dla 5 z 8 sond. Cztery sondy hybrydowały do ramienia długiego (18q21.2, 18q23, 18q21.33, 18q11.2) oraz jedna do ramienia krótkiego (18p11.21). Wyniki badań z pozostałymi trzema sondami były prawidłowe (18q21.32, 18q11.2, 18p11.32). Nieprawidłowy wynik uzyskano także dla tej samej kosmówki w badaniu QF-PCR – wzór trójalleliczny 2:1 dla markera *DI8S535*(18q12.3) leżącego w długim ramieniu chromosomu pary 18. Także analiza MLPA z zestawem P036 i P070 wskazała na występowanie duplikacji w regionie 18q (sonda 01758-L01292, 441 nt; sonda 02704-L03607, 258 nt) (Ryc. 47) co potwierdziła analiza FISH z sondami subtelerowymi (Ryc. 48).

Przeprowadzone badania pokazują, że przyczyną poronienia były trisomia długiego ramienia chromosomu pary 18. Gameta matczyna zawierała tylko jeden chromosom po translokacji, złożony z dwóch ramion długich 14 i 18 oraz jeden prawidłowy chromosom pary 18. Gameta ojcowska była prawidłowa z jednym chromosomem każdej pary. Po zapłodnieniu w komórce znalazły się dwa prawidłowe chromosomy pary 18, jeden prawidłowy pary 14 i jeden złożony z długiego ramienia chromosomu 14 i 18. Wynikiem takiego rozkładu była trisomia długich ramion chromosomu 18. W związku z tym, że duplikacji uległa także sonda do ramienia krótkiego regionu 18p11.21 (względna wartość fluorescencji 1,56), który leży bezpośrednio nad centromerem można wnioskować, że punkt pęknięcia chromosomu pary 18 znajduje się w prążku p11.

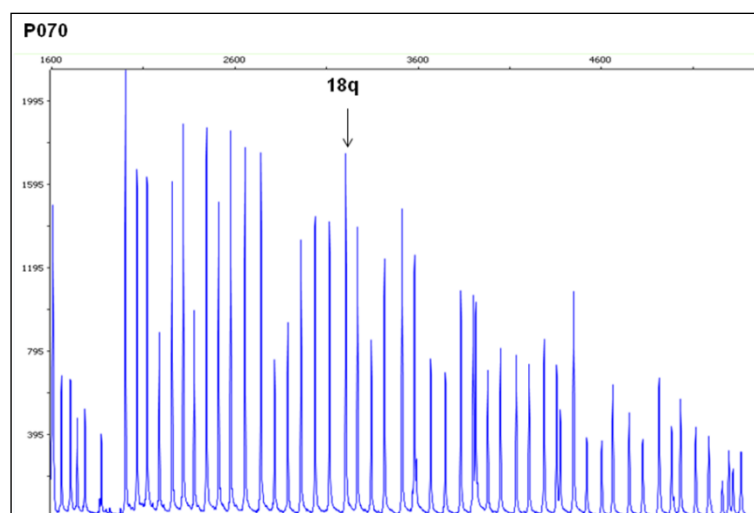


Ryc. 46 Translokacja wzajemna u pacjentki *MB*. Rycina przedstawia prawidłowe chromosomy pary 14 i 18 oraz chromosomy po translokacji *der(14;18)*.

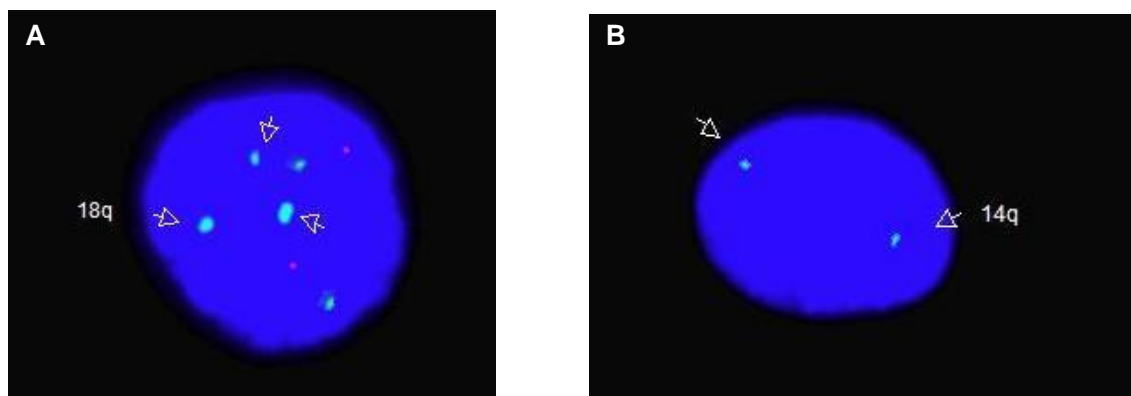
A



B



Ryc. 47 Fragment analizy MLPA P036 i P070 (Peak Scanner Software v.1.0). Wynik nieprawidłowy (kosmówka nr 21) wskazujący na występowanie duplikacji 18q. Rycina A przedstawia rozdział pików w zestawie P036, Rycina B w zestawie P070. Strzałkami oznaczono wzrost wysokości piku dla sondy 18q w obu zestawach.

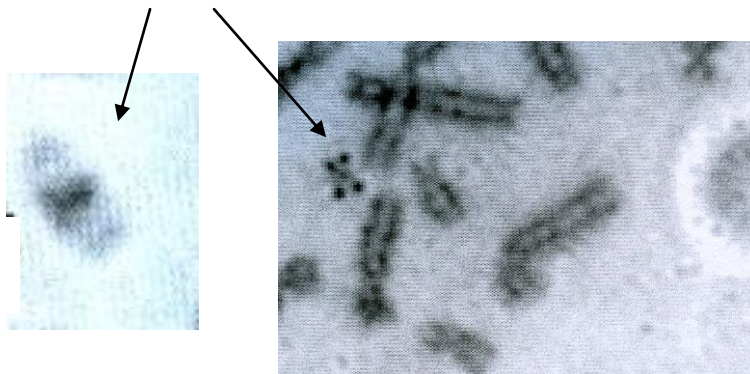


Ryc. 48 FISH z sondami subtelerowymi do jąder interfazowych. Rycina A przedstawia jądro interfazowe z trzema niebieskimi sygnałami z regionu 18q (duplikacja 18q). Dwa czerwone i dwa zielone sygnały pochodzą z regionu subtelerowego chromosomu pary 12 (wynik prawidłowy). Rycina B przedstawia jądro interfazowe z dwoma sygnałami niebieskimi pochodzącymi od sondy 14q (wynik prawidłowy).

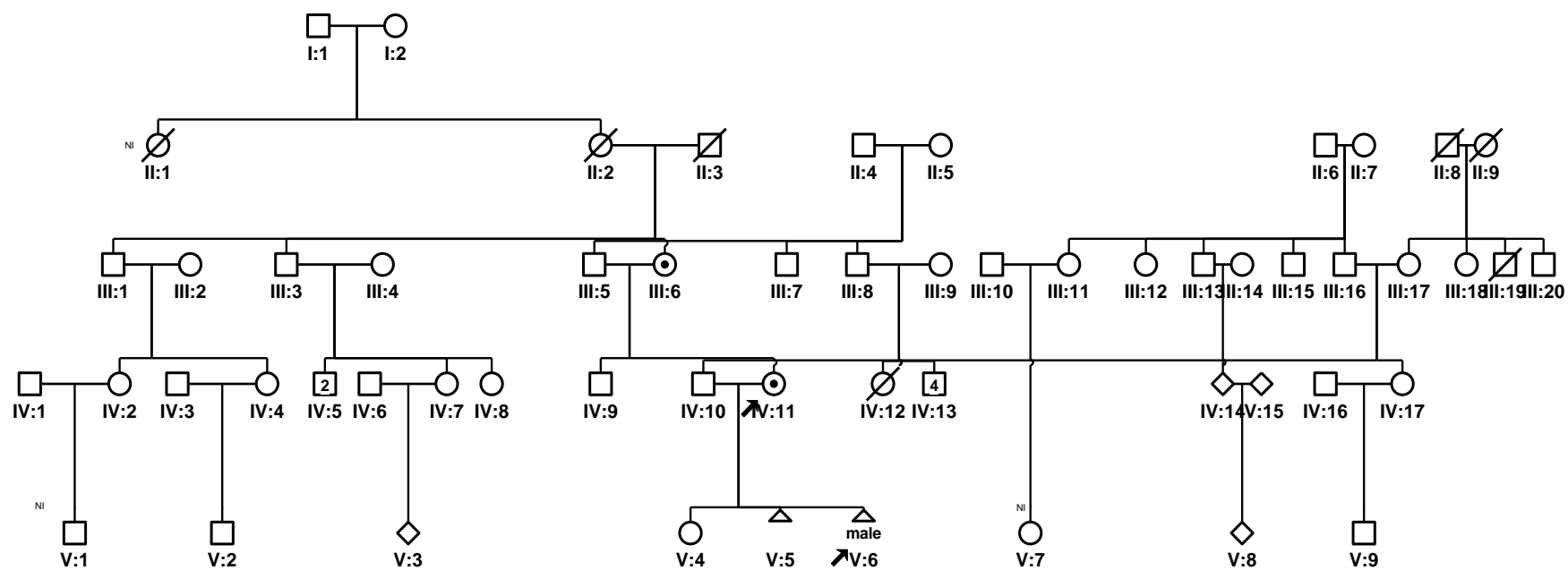
4.5.1. Nosicielka dodatkowego chromosomu markerowego

Pacjenci *BK* i *RK* to para z dwoma bardzo wczesnymi poronieniami samoistnymi (CII – poronienie samoistne w 5-6 t.c., CIII – poronienie samoistne w 5-6 t.c.). Para ma także zdrową córkę (CI). Kosmówka po drugim poronieniu (kosmówka nr 42) została zabezpieczona i poddana badaniom w kierunku występowania aberracji chromosomowych. Oboje partnerów poddano także badaniu kariotypu.

Analiza kariotypu pacjentki *BK* wykazała, że pacjentka jest nosicielką dodatkowego chromosomu markerowego, pochodzącego z chromosomu akrocentrycznego – 47,XX,+mar (Ryc. 49). Analiza metodą FISH wykluczyła pochodzenie chromosomu markerowego z pary 15, natomiast dodatkowe badanie FISH z sondą centromerową 14/22 wykazało występowanie 5 sygnałów hybrydyzacyjnych, świadczących o tym, że chromosom markerowy pochodzi z któregoś z wyżej wymienionych chromosomów (ish 14/22cen(x5)). Chromosom markerowy powstał w wyniku fuzji centrycznej dwóch ramion krótkich chromosomów akrocentrycznych pary 14 lub 22 i posiada centromer. Badania w kierunku obecności chromosomu markerowego przeprowadzono również u innych członków rodziny: matki, ojca i brata pacjentki. Chromosom markerowy zidentyfikowano u matki pacjentki, ale tylko w części komórek – 46,XX[31]/47,XX,+mar[19].ish mar14/22cen(x5)[8/30]. Rodowód pacjentów *BK* i *RK* przedstawia Rycina 50.

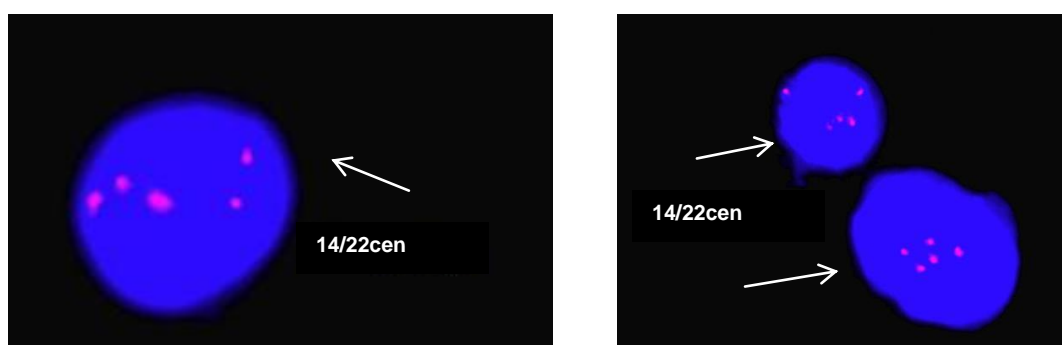


Ryc. 49 Chromosom markerowy zidentyfikowany podczas analizy kariotypu u pacjentki *BK* (strzałki). Rycina z lewej strony przedstawia chromosom markerowy widoczny w metafazie (prążki GTG). Na Rycinie po prawej stronie widać na obu końcach chromosomu satelity, uwidocznione dzięki metodzie barwienia AgNOR.



Ryc. 50 Rodowód pacjentów BK i RK. Strzałkami zaznaczono pacjentkę oraz badane poronienie

W badaniach nie stwierdzono występowania w kosmówce aberracji liczbowych chromosomów pary 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y. Wynik badania regionów subtelerowych metodą MLPA P036 i P070 był prawidłowy – nie stwierdzono żadnych zmian wskazujących na aberrację liczbową, bądź strukturalną. Dodatkowo wykonano FISH z tą samą sondą centromerową, jak u pacjentki, do centromerów chromosomów pary 14 i 22. Wynik okazał się nieprawidłowy – w 36% jąder interfazowych stwierdzono występowanie dodatkowego piątego sygnału hybrydacyjnego (Ryc. 51).



Ryc. 51 Analiza FISH z sondą centromerową do chromosomu pary 14 i 22. Strzałka wskazuje na występowanie pięciu sygnałów hybrydacyjnych, dwóch pochodzących od chromosomów pary 14, dwóch od chromosomów pary 22 oraz jednego dodatkowego sygnału pochodzącego od chromosomu pary 14 lub 22.

4.6. Aberracje chromosomów płci u pacjentek i w materiale z poronienia

W kariotypie 5 pacjentek zidentyfikowano aberracje liczbowe chromosomów płci. W przypadku dwóch z nich zidentyfikowano także aberracje chromosomów płci w materiale z poronienia (kosmówka nr 4 i 104). U pozostałych trzech wynik badań molekularnych materiału z poronienia był prawidłowy.

Ponadto u 3 kolejnych pacjentek z prawidłowym kariotypem, u których wykonano badania kosmówek z dwóch kolejnych poronień, zidentyfikowano aberracje chromosomów płci w materiale z poronienia.

Pacjentka AS - 47,XXX[4]/45,X[1]/46,XX[95]

W badaniu kariotypu pacjentki znaleziono linie komórkowe z nieprawidłową liczbą chromosomów płci: monosomię X w jednej płytce metafazowej oraz trisomię X w czterech płytkach metafazowych na 100 analizowanych komórek. Pacjentka utraciła dwie ciąży: CI – puste jajo płodowe, 8 t.c., CII – obumarcie ciąży w 12 t.c. Partner ma prawidłowy kariotyp. Para nie posiada potomstwa, oboje są zdrowi, a rodowód nie wskazuje na obciążenia rodzinne niepowodzeniami rozrodu.

Badana kosmówka nr 4 pochodziła z ciąży drugiej. Wyniki badań okazały się nieprawidłowe. W badaniu metodami FISH (100% jąder interfazowych), MLPA P095 (4 sondy) oraz QF-PCR (wzór trójalleliczny 2:1) stwierdzono występowanie dodatkowego chromosomu Y – XYY.

Pacjentka AG – 47,XXX[1]/45,X[2]/46,XX[47]

Badanie kariotypu pacjentki AG ujawniło niewielkie zmiany w liczbie chromosomów płci. W jednej mitozie na 50 stwierdzono trisomię X, a w dwóch monosomię X. Wykonane dodatkowo badanie FISH potwierdziło występowanie w niskim odsetku jąder interfazowych (2%) aberracji liczbowych chromosomów płci (monosomii X i trisomii X). Kariotyp partnera jest prawidłowy. W rodzinie nie występowały niepowodzenia rozrodu, pacjenci są zdrowi.

Pacjentka trzykrotnie utraciła ciążę: CI – poronienie samoistne w 8 t.c., CII – poronienie samoistne w 8 t.c., CIII – poronienie samoistne w 8 t.c. Badaniami została objęta kosmówka z ciąży pierwszej i drugiej. Kosmówki pochodziły z preparatów utrwalonych w postaci bloczków parafinowych (kosmówka nr 103 i 104). Wynik informacyjny udało się uzyskać jedynie metodą MLPA P095. Nie stwierdzono zmian w zakresie liczby chromosomów pary 13, 18, 21. W obu przypadkach kariotyp był żeński. W przypadku kosmówki nr 104 nieprawidłowe okazały się wartości dla 4 z 8 sond chromosomu X, co wskazuje na występowanie trisomii X. W przypadku kosmówki nr 103 wynik był prawidłowy.

Pacjentka DHK – 46,XX

U pacjentki DHK wystąpiły trzy niepowodzenia ciąży: CI – obumarcie płodu w 19 t.c., CII – obumarcie płodu w 10 t.c., CIII – obumarcie płodu w 10 t.c.. Badania wykonano na kosmówce z ciąży drugiej i trzeciej. Kosmówka z ciąży drugiej (10 t.c.)

pochodziła z bloczków parafinowych (kosmówka nr 116), z ciąży trzeciej była pobrana bezpośrednio po poronieniu (10 t.c.) (kosmówka nr 47).

W przypadku obu kosmówek stwierdzono występowanie monosomii chromosomu X, a w kosmówce z ciąży trzeciej dodatkowo trisomię 18. W materiale z ciąży drugiej stwierdzono monosomię X, przy czym wyniki różniły się dla każdej metody. W badaniu FISH monosomia dotyczyła tylko 11% jąder interfazowych, w badaniu MLPA P095 wartości 7 z 8 sond wskazywały na monosomię X, a w badaniu QF-PCR występował tylko jeden pik dla markera AMXY oraz DXS1002. W materiale z ciąży trzeciej stwierdzono występowanie nie tylko monosomii X, ale także trisomii chromosomu pary 18. I tak, w badaniu FISH monosomię stwierdzono we wszystkich jądrach, trisomię 18 w 76% jąder, w MLPA P095 wartości wszystkich sond wskazywały na monosomię X, a dla chromosomu pary 18 nieprawidłowe wartości występowały w przypadku 5 z 8 sond. Analiza QF-PCR wykazała występowanie monosomii chromosomu X z trisomią 18 (stosunek alleli 1:1:1).

Pacjentka SW - 46,XX

U pacjentki SW wystąpiły 4 wczesne utraty ciąży: CI – poronienie samoistne w 9 t.c., CII, poronienie samoistne w 5 t.c., CIII – poronienie samoistne w 5 t.c. i CIV – obumarcie płodu w 8 t.c. Zarówno pacjentka jak i jej partner mają prawidłowe kariotypy, nie są spokrewnieni, a w rodzinie nie występowały niepowodzenia rozrodu.

W badaniach wykorzystano kosmówkę pochodzącą z dwóch kolejnych ciąż – ciąży trzeciej (kosmówka nr 120) i czwartej (kosmówka nr 119). W pierwszym przypadku materiał pochodził z bloczków parafinowych, w drugim z kosmówki świeżej. W obu przypadkach analiza wykazała występowanie monosomii chromosomu X w kosmówce z dwóch kolejnych ciąż. W kosmówce nr 120 monosomię X stwierdzono w 14% jąder interfazowych, w badaniu MLPA P095 wartości 6 z 8 sond wskazywały na występowanie monosomii chromosomu X, a w badaniu QF-PCR stwierdzono tylko jeden allel AMXY oraz jeden DXS1002. W kosmówce nr 119 stwierdzono monosomię X we wszystkich trzech badaniach: FISH (100% jąder interfazowych), MLPA P095 (6 z 8 sond) i QF-PCR (1 allel AMXY i 1 DXS1002).

Pacjentka BP -46,XX

U pacjentki *BP* wystąpiły trzy niepowodzenia ciąży: CI – poronienie samoistne w 7 t.c., CII – obumarcie płodu w 10 t.c., CIII – obumarcie płodu w 11 t.c. Pacjentka i jej partner mają prawidłowy kariotyp, są osobami zdrowymi, niespokrewnionymi. W rodzinie obojga partnerów występowały niepowodzenia ciąży.

Badana kosmówka pochodziła z ciąży drugiej (kosmówka nr 26) oraz trzeciej (kosmówka nr 116). W pierwszym przypadku kosmówka została zabezpieczona bezpośrednio po poronieniu, w drugim pochodziła z bloczków parafinowych. Wyniki badań kosmówki nr 26 okazały się nieprawidłowe – zidentyfikowano monosomię chromosomu X wszystkimi trzema metodami (100% jąder interfazowych, 6 z 8 sond w MLPA P095 i jeden allel dla AMXY oraz DXS1002). W drugim przypadku, kosmówki nr 116 wynik był prawidłowy, a płeć żeńska. Dodatkowo wykonano badanie MLPA do regionów subtelomerowych, wynik był prawidłowy.

4.7. Wyniki badań materiału z poronienia metodą array CGH

Array CGH został wykorzystany do badania 24 kosmówek. Trzy kosmówki zostały zakwalifikowane do badania z grupy 122 wcześniej analizowanych kosmówek. W wyborze kosmówek kierowano się zebraniem wywiadem dotyczącym pary, prawidłowymi wynikami wcześniejszych badań oraz ilością oraz jakością preparatu DNA. W dwóch przypadkach DNA pochodziło od par z wczesnymi poronieniami nawracającymi (5 poronień w wywiadzie), w jednym od pary z dwoma poronieniami późnych ciąż. Dodatkowo do badania włączono 21 kosmówek, które nie były wcześniej badane innymi metodami, łącznie przebadano 24 kosmówki. Zmiany zidentyfikowano w 13 kosmówkach – w 11 przypadkach były to aberracje liczbowe chromosomów, a w pozostałych trzech dwie zmiany miały charakter submikroskopowych mikrodelecji i mikroduplikacji (Tabela 21).

Tabela 21 Nieprawidłowe wyniki uzyskane metodą array CGH.

Lp.	Aberracja chromosomowa	Dziedziczenie
1.	trisomia 5	<i>de novo</i>
2.	trisomia 13	<i>de novo</i>
3.	trisomia 14	<i>de novo</i>
4.	trisomia 14	<i>de novo</i>
5.	trisomia 16	<i>de novo</i>
6.	trisomia 16	<i>de novo</i>
7.	trisomia 21	<i>de novo</i>
8.	trisomia 19 i 22	<i>de novo</i>
9.	trisomia 16 i 19	<i>de novo</i>
10.	trisomia 13, 15 i 20	<i>de novo</i>
11.	monosomia X	<i>de novo</i>
12.	delecja 6p22.3 i duplikacja 6q23.3	obie zmiany odziedziczone od matki
13.	duplikacja 4p16.3 i delecja 5q14.3	duplikacja 4p16.3 <i>de novo</i> , delecja 5q14.3 odziedziczona od ojca

Pacjenci MR i RR

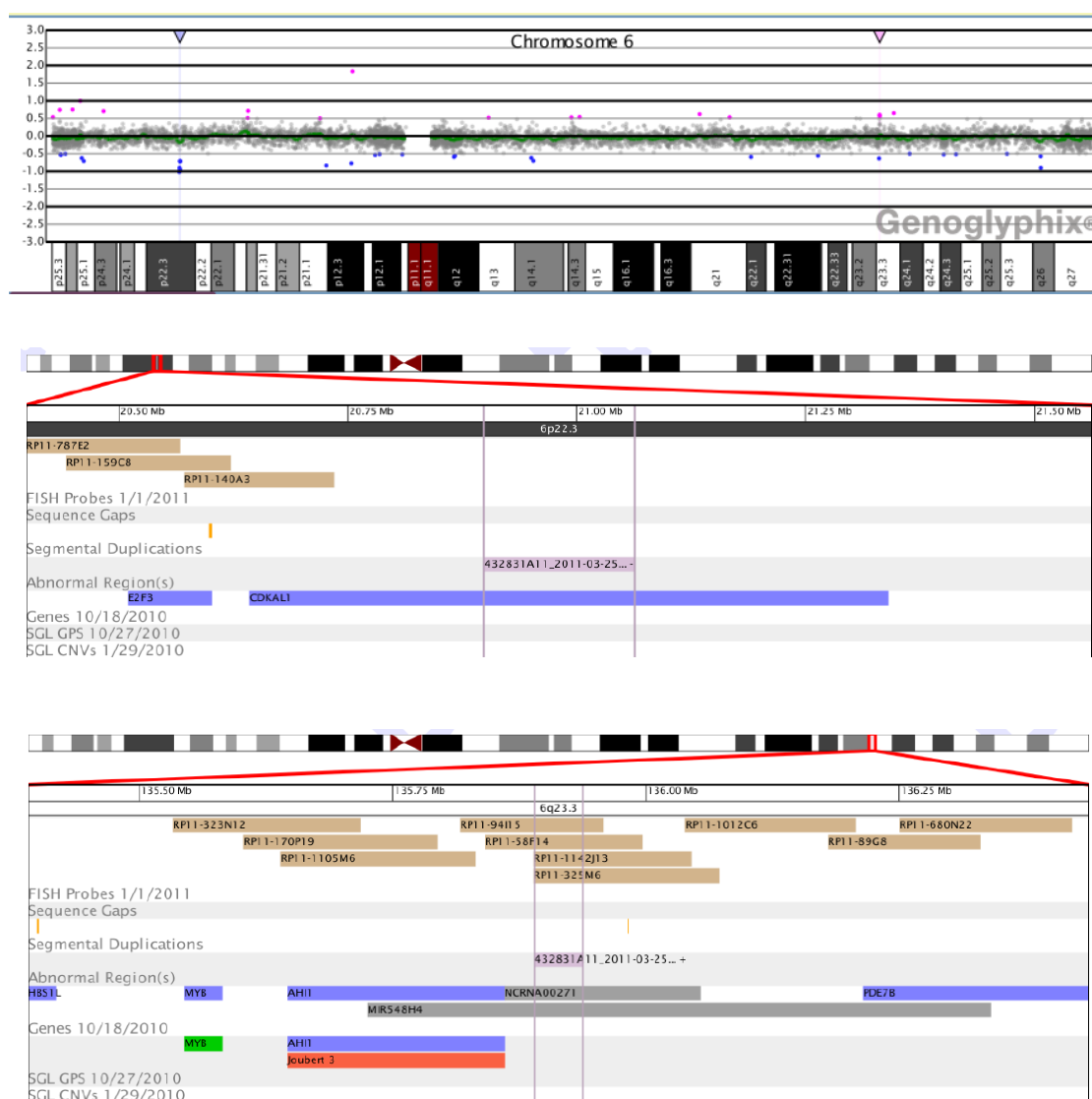
Para MR i RR zgłosiła się do poradni genetycznej w związku z niepowodzeniami ciąży. Pierwsza ciąża została uzyskana po dwóch latach starań i zakończyła się poronieniem samoistnym w 6 t.c. U pacjenta po przeprowadzonej analizie nasienia stwierdzono występowanie oligoastenoteratozoospermii. U pacjentki badania hormonalne ujawniły dysfunkcję sterydo- i folikulogenezy jajników. Para przeszła cztery próby zapłodnienia *in vitro*, zakończone niepowodzeniem. W przypadku czwartego zapłodnienia *in vitro* przeprowadzono także diagnostykę preimplantacyjną w kierunku występowania aberracji chromosomowych pary 13, 18, 21, X i Y. Para nie jest ze sobą spokrewniona, nie stwierdzono chorób genetycznych ani wad wrodzonych u żadnego z partnerów. W rodzinie pacjenta oprócz niepełnosprawności intelektualnej u kuzyna (syn przyrodniej siostry matki) nie występowały inne choroby genetyczne lub niepowodzenia rozrodu.

Badania zostały prowadzone na kosmówce pochodzącej z ciąży V (kosmówka nr 40). Ponieważ nie stwierdzono występowania aberracji liczbowych chromosomów, przeprowadzono analizę regionów subtelomerowych metodą MLPA, która również nie ujawniła nieprawidłowości w tym regionie. Badanie kariotypu obojga partnerów nie ujawniło występowania aberracji chromosomowych.

Następnym etapem badania była analiza mikromacierzowa array CGH. Stwierdzono występowanie submikroskopowych zmian w długim i krótkim ramieniu

chromosomu pary 6: delecję w regionie 6p22.3 o wielkości 164.59-219.07 kpz (delecji uległo 6 sond) oraz duplikację w regionie 6q23.3 o wielkości 47.93-62.02 kpz (duplikacji uległo 6 sond) (Ryc. 52). Żadna z tych zmian nie była wcześniej zidentyfikowana przez innych autorów. W regionie 6p22.3 znajduje się gen *CDKALI*. Natomiast w regionie 6q23.3. nie występują sekwencje kodujące.

Przeprowadzona analiza array CGH u obojga partnerów wykazała, że obie zmiany tej samej wielkości zostały odziedziczone od matki. U pary nie znalezione innych zmian w chromosomach.



Ryc. 52 Fragment analizy array CGH w programie Genoglyphix. Na Rycinie przedstawiono wyniki uzyskane dla chromosomu pary 6. Pierwsza rycina pokazuje region 6p22.3 w chromosomie pary 6, w którym doszło do delecji (niebieska strzałka) oraz region 6q23.3 (niebieska strzałka) z delecją. Ryciny poniżej pokazują dokładnie zaznaczone regiony z sondami, które uległy delecji w 6p22.3 i duplikacji w 6q23.3.

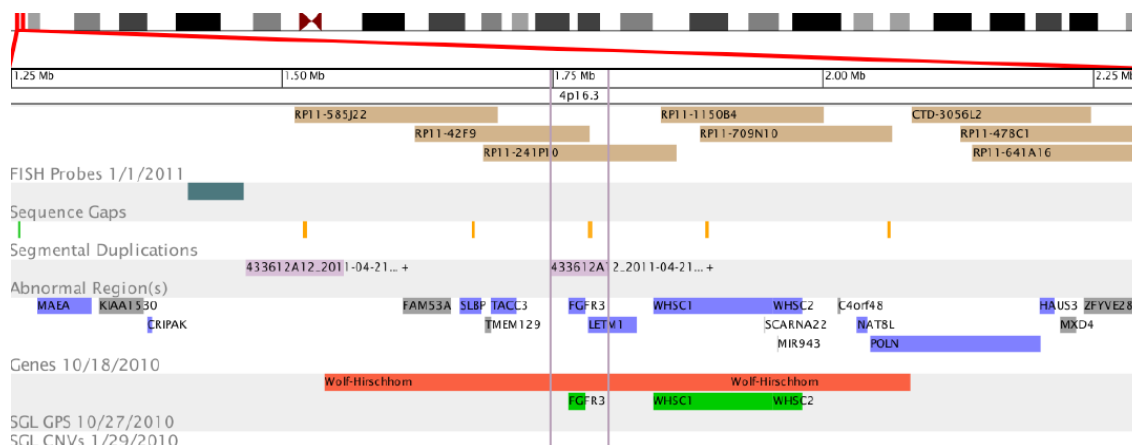
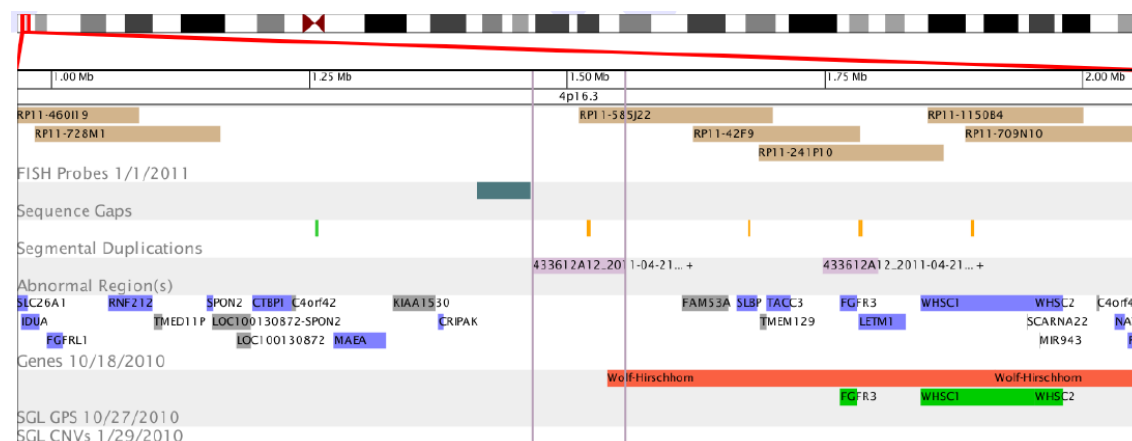
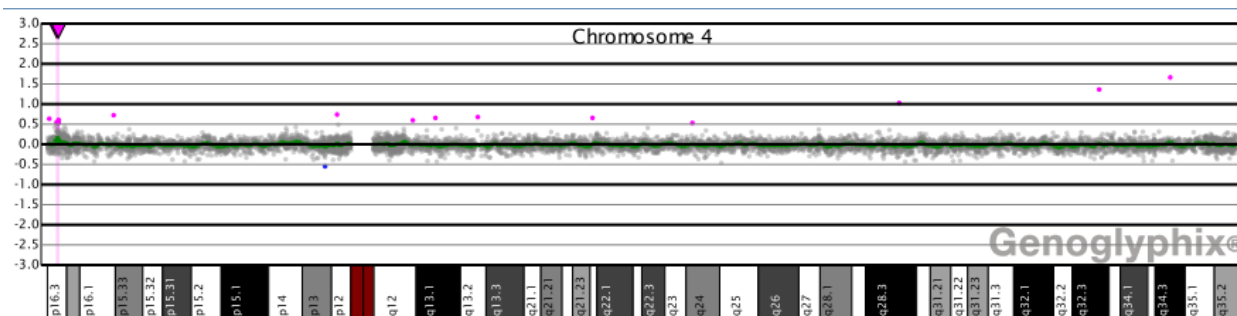
Pacjenci KP i JP

U pary *KP i JP* wystąpiły dotychczas dwa późne niepowodzenia ciąży: CI – zakończona w 20 t.c. obumarciem płodu (brak informacji o ewentualnych wadach płodu) oraz CII – uzyskana po trzech latach od czasu ciąży pierwszej, zakończona w 16 t.c. obumarciem płodu. U płodu z ciąży drugiej stwierdzono występowanie wad cewy nerwowej (przepuklina mózgowo-rdzeniowa). Pacjenci nie są ze sobą spokrewnieni, a w rodowodzie obu rodzin nie występowały niepowodzenia rozrodu. Przeprowadzone badanie kariotypu nie ujawniło nosicielstwa aberracji chromosomowych u obojga partnerów. Wiek pacjentki w chwili utraty pierwszej ciąży wynosił 26 lat, a w przypadku drugiej 29 lat.

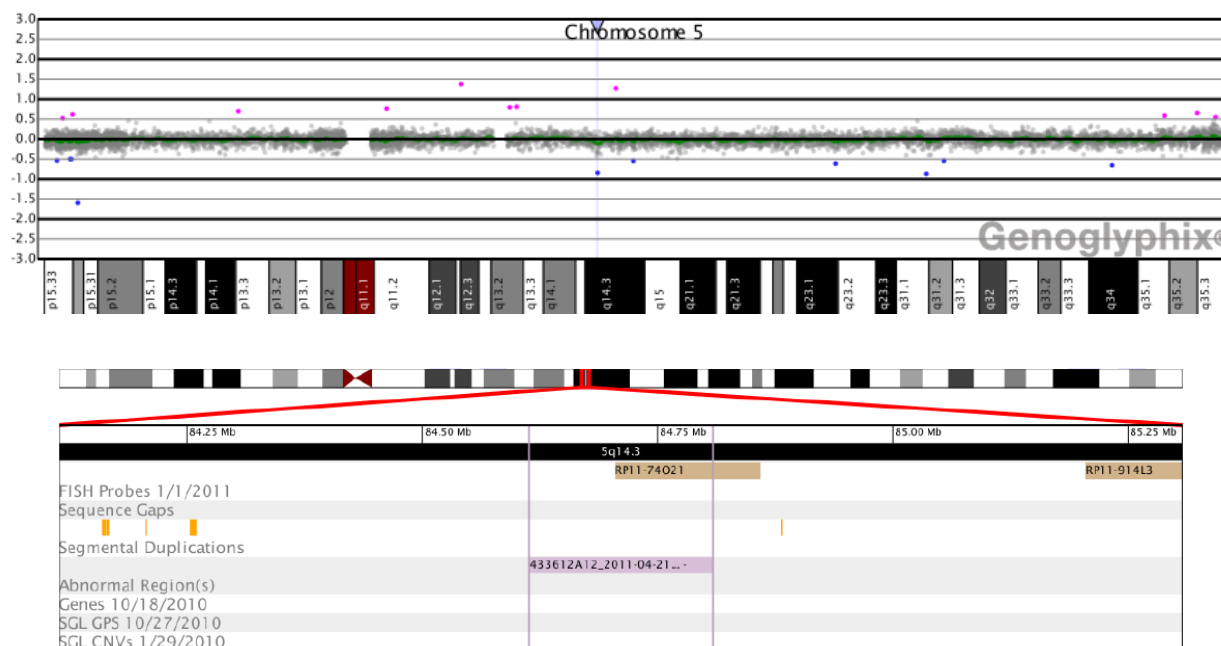
Badaniu została poddana kosmówka pochodzące z ciąży drugiej (kosmówka nr 118). W badaniu QF-PCR oraz FISH nie stwierdzono nieprawidłowości w zakresie badanych chromosomów, nie znaleziono również zmian w regionach subtelerowych badanych metodą MLPA. Wynik prawidłowy uzyskano także w badaniu identyfikacji zespołów mikrodelecji/mikroduplikacji również metodą MLPA. Przeprowadzona następnie analiza array CGH ujawniła występowanie dwóch submikroskopowych zmian o charakterze delecji i duplikacji (Rycina 53 i 54). Dwie duplikacje w prążku 4p16.3, obejmujące region zespołu Wolfa-Hirschhorna: pierwsza o wielkości 90.30-161.44 kpz, w przypadku której duplikacji uległo 7 oligonukleotydowych sond oraz druga o wielkości 53.67-100.27 kpz, w której także duplikację zidentyfikowano w przypadku 7 sond. Druga zmiana dotyczyła delecji w regionie 5q14.3 – delecji uległo 7 sond, a wielkość delecji wynosiła 194.96-253.90 kpz.

W regionie, który uległ duplikacji znajdują się dwa geny: *FGFR3* i *LETM1*. Jest to także region krytyczny dla zespołu Wolfa-Hirschhorna. W przypadku delecji w regionie 5q14.3 nie zidentyfikowano żadnych genów.

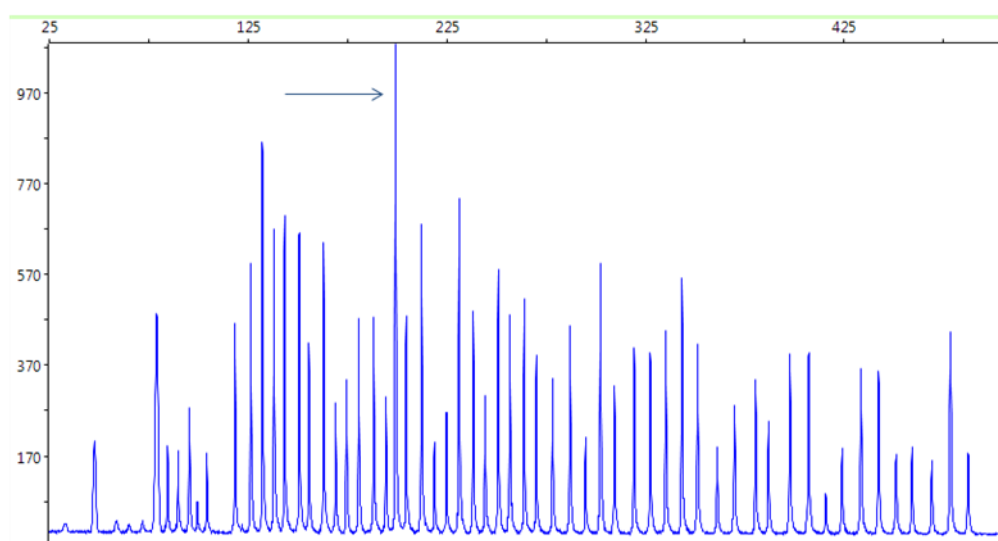
Dodatkowo wykonana analiza MLPA z zestawem P373, który zawiera 10 różnych sond dla regionu Wolfa-Hirschhorna potwierdziła duplikację w regionie genu *FGFR3* (Rycina 55). Średnia wartość fluorescencji pików dla tego regionu znajdowała się powyżej wartości granicznej 1,3 i wyniosła 1,52.



Ryc. 53 Fragment analizy array CGH w programie Genoglyphix. Na Rycinie przedstawiono wyniki uzyskane dla chromosomu pary 4. Pierwsza rycina pokazuje region 4p16.3 w chromosomie pary 4, w którym doszło do duplikacji (różowa strzałka). Kolejne Ryciny pokazują dokładnie zaznaczony region z sondami, które uległy duplikacji.



Ryc. 54 Fragment analizy array CGH w programie Genoglyphix. Na Rycinie przedstawiono wyniki uzyskane dla chromosomu pary 5. Pierwsza Rycina pokazuje region 5p14.3 w chromosomie pary 5, w którym doszło do delecji (niebieska strzałka). Druga Rycina pokazuje dokładnie zaznaczony region z sondami, które uległy delecji.



Ryc. 55 Fragment analizy MLPA z zestawem P373 (Peak Scanner Software v.1.0). Wynik nieprawidłowy (kosmówka nr 118) wskazujący na występowanie duplikacji w genie *FGFR3* (sonda 04182-L03904). Duplikację pików dla badanego regionu zaznaczono strzałką.

5. DYSKUSJA

5.1. Ocena zastosowanych badań molekularnych u par z niepowodzeniami ciąży

Czynniki genetyczne uważane są za jedną z głównych przyczyn występowania niepowodzeń ciąży, a aberracje chromosomowe u zarodka/płodu za przyczynę 50-80% poronień samoistnych w pierwszym trymestrze (Simpson, 2007).

W badanym materiale, uzyskanym po niepowodzeniach ciąży, nieprawidłowości chromosomowe zidentyfikowano w 47% przypadków (67 kosmówek ze 143 badanych). Uzyskane wyniki nie różnią się od wyników uzyskanych w innych pracach, w których stosowano badania w kierunku występowania aberracji chromosomowych u zarodka/płodu. Goddijn i Leschot przeanalizowali wyniki uzyskane w latach 1987-1998 przez 11 różnych zespołów badawczych (Goddijn i Leschot, 2000). Uzyskane przez nich zestawienie pokazuje, że wyniki nieprawidłowe uzyskane przez różne grupy mieściły się w granicach od 38% do 83%, ze średnią wynoszącą 49% (Goddijn i Leschot, 2000). Liczebność badanych grup wynosiła od 95 do 1607 przypadków (Goddijn i Leschot, 2000). Co ciekawe, w przypadku pracy, w której analizowano 1607 przypadków, wyniki nieprawidłowe stanowiły 45%, natomiast w pracy gdzie analizowano 95 przypadków odsetek ten wyniósł aż 83% (Goddijn i Leschot, 2000). Stephenson i współpracownicy uzyskali nieprawidłowe wyniki w 46% przypadków, Philipp i współpracownicy w 75%, a Ljunger i współpracownicy w 61% (Stephenson i wsp., 2002; Philipp i wsp., 2003; Ljunger i wsp., 2005). W pracy Stephenson wyniki nieprawidłowe uzyskano w 46% przypadków, przy badanych 225 kosmówkach (Stephenson i wsp., 2002). Podobny odsetek uzyskano w pracach Dejmek i wsp. – 46% wyników nieprawidłowych, w grupie 926 badanych kosmówek oraz Ford i wsp. – 45% nieprawidłowych wyników przy 1607 badanych (Dejmek, Vojtassák, Malová, 1992; Ford i wsp., 1996).

We wszystkich wspomnianych wyżej pracach stosowaną metodą badawczą było badanie kariotypu poprzedzone hodowlą komórek trofoblastu i barwieniem odczynnikiem Giemzy. Warto zauważyć, że w poszczególnych badaniach bardzo wysoki odsetek hodowli zakończył się niepowodzeniem. W badaniach, w których uzyskano zbliżone wyniki, niepowodzeniem zakończyło się od 39% do 47% przeprowadzonych hodowli (Stephenson i wsp., 2002; Dejmek, Vojtassák, Malová, wsp., 1992; Ford i wsp., 1996). Nie we wszystkich pracach zaznaczono, w ilu

przypadkach nie udało się uzyskać wyników, ale w wielu przypadkach dotyczyło to prawie 40-50% badań (Goddijn i Leschot, 2000).

W badaniach własnych zastosowanie różnych metod badań genetycznych pozwoliło na uzyskanie wyników w przypadku każdej badanej kosmówki. Pokazuje to, że klasyczne badanie kariotypu w przypadku materiału z poronienia nie jest metodą doskonałą, która pozwala na rutynową ocenę aberracji chromosomowych w ponad 90% badanych przypadków. Zdecydowanie mniejszy odsetek nieudanych badań odnotowały zespoły, które w przypadku ultrasonograficznie potwierdzonej śmierci zarodka/płodu zastosowały biopsję trofoblastu. Zastosowana biopsja trofoblastu pozwoliła na natychmiastowe uzyskanie fragmentów kosmówki, bez konieczności oczekiwania na samoistne wydalenie jaja płodowego oraz zmniejszyła ryzyko pobrania niewłaściwego lub mocno zdegradowanego materiału biologicznego. W pracy Strom i wsp. (1992) tylko w jednym przypadku nie udało się uzyskać wyniku, a odsetek wyników nieprawidłowych wynosił aż 83% (95 kosmówek kariotypowanych). Podobnie w pracy Philipp i wsp. wyniki udało się uzyskać w 95% przypadków (221 z 233 kosmówek), a nieprawidłowości sięgały 75% (Philipp i wsp., 2003). Biopsja kosmówki nie jest jednak metodą rutynowo wykonywaną w przypadku poronień samoistnych, wymaga również umiejętności pobierania materiału biologicznego.

Uzyskane wyniki mogą oznaczać, że wadą klasycznych metod cytogenetycznych w przypadku materiału z poronienia, nie jest jedynie ryzyko niepowodzenia hodowli i nieuzyskania podziałów metafazowych, ale także uzyskanie wyników fałszywie negatywnych. Jest to efekt kontaminacji komórkami maczynymi, a w przypadku występowania mozaikowości łożyskowej preferencyjnego wzrastania komórek prawidłowych. Bell i wsp. przeanalizowali wyniki badań uzyskane z trofoblastów po poronieniu samoistnym i w przypadku stwierdzonego kariotypu prawidłowego żeńskiego zastosowali PCR umożliwiającą identyfikację markerów chromosomu Y oraz metodę FISH z sondami alfa-satelitarnymi (Bell i wsp., 1999). Badanie pokazało, że w 29% przypadków poronień pierwszego trymestru i 5% poronień drugie trymestru zidentyfikowano chromosom Y w DNA wyizolowanym z badanych kosmówek (Bell i wsp., 1999).

W badaniach własnych różnice dotyczące płci odnotowano w dwóch przypadkach. W jednym przypadku (kosmówka nr 23) analiza metodą FISH, QF-PCR oraz MLPA stwierdziła występowanie dwóch linii komórkowych XX i XY, z przewagą

komórek XX. Dane uzyskane na podstawie wywiadu lekarskiego oraz wyników badań ginekologicznych nie sugerowały występowania ciąży bliźniaczej, a więc w tym przypadku przyczyną występowania dwóch linii komórkowych była najprawdopodobniej kontaminacja komórkami maczynymi. W drugim przypadku (kosmówka nr 94) linię komórkową z chromosomami XY zaobserwowano tylko w przypadku badania metodą FISH (w 16 komórkowych jądrach na 100), natomiast w przypadku badań molekularnych kariotyp był żeński i nie zaobserwowano występowania sekwencji dla chromosomu Y. Być może w tym przypadku w podczas badania metodą FISH wystąpiła niespecyficzna hybrydyzacja z sondą dla chromosomu Y.

W świetle analizowanych badań stosowanie metod cytogenetyki molekularnej i biologii molekularnej w przypadku badania materiału po poronieniu jest jak najbardziej zasadne. W aspekcie rozwoju technologicznego oraz możliwości stosowania metod o coraz wyższym stopniu rozdzielczości, klasyczne badania kariotypu w przypadku tej grupy pacjentów jest mało skuteczne.

Najnowsze badania przeprowadzone przez van den Berg i wsp. (2012) pokazują, że zastosowanie metod molekularnych, takich jak FISH, QF-PCR, MLPA, a przede wszystkim array CGH pozwala na dokładną analizę chromosomową, w tym na identyfikację także zmian submikroskopowych. Co ciekawe łączenie metod klasycznych i molekularnych w wyżej wymienionej pracy zwiększyło istotnie odsetek badań zakończonych powodzeniem, natomiast odsetek zidentyfikowanych aberracji chromosomowych w materiale z poronienia samoistnego wynosił – w przypadku poronień sporadycznych 45%, w przypadku poronień nawracających 39% (van den Berg i wsp., 2012).

Przyczyny jednogenowe, oprócz kilku znanych przypadków, nie są dobrze poznane, a identyfikacja choroby jednogenowej jako przyczyny poronienia samoistnego jest rzadka. Ważne, ale bardzo trudne byłoby rozpoznanie kliniczne choroby na podstawie fenotypu zarodka/płodu. Uważa się także, że choroby jednogenowe częściej są przyczyną wad wrodzonych u dzieci oraz zgonów okołoporodowych, niż poronień samoistnych, szczególnie wczesnych (Kalousek, Lau, 1992; Simpson, 2007,).

5.2. Analiza aberracji chromosomowych zidentyfikowanych w badanym materiale z poronienia

Najczęstszą stwierdzaną aberracją chromosomową w materiale z poronienia była trisomia chromosomów autosomalnych, która stanowiła 51% wszystkich nieprawidłowości. Najczęstszą zidentyfikowaną trisomią była trisomia chromosomu pary 16 (30% trisomi), następnie chromosomu pary 22 (17% trisomii). Pozostałe zidentyfikowane trisomie dotyczą chromosomów pary 14 (10% trisomii), 18 (10% trisomii) i 21 (10% trisomii), 13 (7% trisomii). Najrzadsze pojedyncze trisomie to trisomie chromosomów pary: 5, 7, 8, 15 i 20. Uzyskane wyniki nie odbiegają od wyników uzyskanych przez inne grupy badawcze. Ocenia się, że trisomie identyfikowane są najczęściej, stanowiąc około 50% aberracji chromosomowych wykrywanych w poronieniach samoistnych zarodka/płodu, z czego najczęstszą trisomią jest trisomia chromosomu pary 16, identyfikowana w około 30% przypadków trisomii (Goddijn i Leschot, 2000). W większości przeprowadzonych badań odsetek trisomii wahał się od 33% do 66%, najczęściej jednak było to około 50% (Goddijn i Leschot, 2000; Stephenson i wsp., 2002; Phillipp i wsp., 2003; Ljunger i wsp., 2005). Także Simpson (2007) ocenił, iż trisomie stanowią około 50% wszystkich zidentyfikowanych aberracji w materiale z poronienia samoistnego, z największym udziałem trisomii chromosomu pary 16. Jeśli chodzi o udział trisomii poszczególnych chromosomów, to na podstawie zebranych danych Simpson (2007) zaobserwował, iż najczęściej trisomii ulega sześć chromosomów, stanowiąc 70% wszystkich trisomii, a są to chromosomy następujących par (uszeregowane według zmniejszającej się częstości występowania): 16, 22, 21, 15, 18 i 13. Z pewnością trisomie chromosomów pary 16 i 22 należą do najczęściej występujących, co można wywnioskować na podstawie analizy innych prac. W pracy Ljunger i wsp. (2005) dwie najczęstsze trisomie to 16 i 22, następnie 2, 13, 14, 3, 20, 15 i 9. Z kolei w pracach Stephenson i wsp. (2002) oraz Phillipa i wsp. (2003) dwie najczęstsze to 15 i 16, kolejne to 21 i 22, 13 i 14 oraz 8 i 9. Z pewnością te sześć chromosomów, to znaczy 13, 15, 16, 18, 21 i 22 należy do tych, które trisomii ulegają najczęściej. Warto zwrócić na to uwagę przy projektowaniu panelu diagnostycznego w przypadku metod molekularnych, choćby FISH, czy QF-PCR, które zakładają badanie tylko ograniczonej liczby chromosomów w przypadku badania materiału z poronienia a także w przypadku planowania diagnostyki preimplantacyjnej, badającej najczęstsze aneuploidie.

Wśród 34 zidentyfikowanych trisomii w czterech przypadkach były to trisomie podwójne, a w jednym trzykrotna trisomia chromosomów, co stanowiło aż 6% wszystkich wykrytych aberracji. Wśród chromosomów, które zidentyfikowano w tych przypadkach były chromosomy pary 13, 15, 16, 19, 20, 21 i 22, a więc w większości należące do tej samej grupy chromosomów jak w przypadkach pojedynczych trisomii. Choć odsetek trisomii wielokrotnych w przypadku badań własnych był wyższy niż w badaniach innych autorów, to dotyczyły tej samej grupy chromosomów, co potwierdza, że najczęściej właśnie one ulegają nondysjunkcji. Simpson ocenił, iż występowanie podwójnych trisomii nie jest takie rzadkie jak należałoby się spodziewać, chociaż odsetek zidentyfikowanych trisomii w przeprowadzonych badaniach wyniósł 0,7% (Simpson, 2007). W większości prac podwójne trisomie identyfikowane są w 0,21 do 2,8% przypadków (Diego-Alvarez i wsp., 2006). Być może wiąże się to z faktem stosowania w przypadku większości badań standardowego badania kariotypu, co może być przyczyną niedoszacowania podwójnych trisomii. Diego-Alvarez i wsp. w badaniach zastosowali oprócz klasycznego kariotypu także metody molekularne, takie jak QF-PCR i MLPA, stąd być może wyższy odsetek rzędu 2,18% (Diego-Alvarez i wsp., 2006). Podobnie zastosowanie łączonych metod klasycznych i molekularnych w pracy Li i wsp. pozwoliło na zidentyfikowanie podwójnych trisomii w 2,4% przypadków (Li i wsp., 2005). W przypadku badań własnych, trzy z czterech wielokrotnych trisomii zostało zidentyfikowane metodą mikromacierzy – array CGH z wykorzystaniem niehodowanych komórek kosmówki, co może wskazywać na wyższą czułość i dokładność tej metody w identyfikowaniu aneuploidii chromosomowych.

Drugą najczęściej identyfikowaną aneuploidią była monosomia chromosomu X (18%). Jest ona, obok poliploidii, wskazywana, jako częsta przyczyna poronień samoistnych. W przypadku badań własnych zidentyfikowano tylko triploidię, która stanowiła 12% wszystkich aberracji, przy czym najczęściej był to kariotyp 69,XXX, następnie 69,XXY i jeden przypadek 69,XYY. Według Simpsona monosomia chromosomu X stanowi 15 do 20% wszystkich aberracji chromosomowych (Simpson, 2007). Goddijn i Leschot na podstawie analizy 11 prac badawczych stwierdzili, że średnio monosomia stanowi około 13% wszystkich przypadków, a jej udział w poszczególnych badaniach wahał się od 2% do 25% (Goddijn i Leschot, 2000). Poliploidie zwykle identyfikuje się częściej niż monosomię X - około 20% aberracji w materiale z poronienia samoistnego to poliploidie (Goddijn i Leschot, 2000). W

badaniach własnych nie zidentyfikowano tetraploidii w żadnym przypadku a podobne wyniki uzyskała grupa Philippa – poliploidie stanowiły 12% przypadków, monosomia X - 22% (Philipp i wsp, 2003).

Aberracje strukturalne chromosomów stanowiły w materiale własnym 9% zidentyfikowanych aberracji. Najczęściej aberracje struktury chromosomów stanowią około 5% wszystkich aberracji, przy czym według różnych autorów odsetek ten waha się w granicach od 1,5% do 9% (Godijn i Leschot, 2000; Stephenson i wsp., 2002; Philipp i wsp., 2003, Ljunger i wsp. , 2005). Warto jednak zaznaczyć, że w badanym materiale własnym dwie spośród sześciu zidentyfikowanych aberracji strukturalnych o charakterze rearanżacji genomowych zostały wykryte metodą mikromacierzy array CGH, o dużo wyższej rozdzielczości niż klasyczna analiza kariotypu, co może tłumaczyć wyższy odsetek zidentyfikowanych zmian.

Pozostałe zidentyfikowane aberracje chromosomowe to dwie monosomie z trisomią, aberracje chromosomów płci oraz jeden przypadek mozaikowości chromosomowej XX/XY. Występowanie jednocześnie monosomii i trisomii w badanym materiale jest rzadkie i częściej dotyczy dwóch chromosomów autosomalnych. W pracy Jobanputra i wsp. (2011) zidentyfikowali w jednym materiale występowanie równoczesnej monosomii chromosomu pary 15 i trisomii 21. Ljunger i wsp. (2005) przedstawili przypadek równoczesnej monosomii chromosomu pary 5 i trisomii 14 z dodatkowym chromosomem markerowym. Natomiast monosomię chromosomu X z trisomią chromosomu pary 21 w badanej grupie zidentyfikowała Stephenson i wsp. (2002).

W większości przypadków aneuploidie chromosomów płci takie jak 47,XXX i 47,XYY dają prawie 99% szansę na przeżycie płodu (Tartaglia i wsp., 2010; Egozcue i wsp., 2000). Według Simpsona jednak aneuploidie chromosomów płci spotykane są z nieco wyższą częstością (10%) w materiale z poronienia, niż u żywo urodzonych dzieci (Simpson, 2007). Niewykluczone, iż w przypadku poronień, w których identyfikuje się dodatkowe chromosomy płci, oprócz czynników chromosomowych na utratę ciąży mają wpływ także inne, pozagenetyczne czynniki.

5.3. Aberracje strukturalne u par z niepowodzeniami ciąży i w materiale z poronienia

U pięciu par analiza kariotypu pozwoliła zidentyfikować u jednego z partnerów nosicielstwo aberracji strukturalnej. W czterech przypadkach było to nosicielstwo translokacji wzajemnej zrównoważonej oraz w jednym przypadku chromosom markerowy. Analiza kosmówki po poronieniu pozwoliła na identyfikację w trzech przypadkach (kosmówki nr: 11, 21 i 122) aberracji strukturalnej o charakterze niezrównoważonym, odziedziczonej od jednego z rodziców oraz w jednym przypadku odziedziczenie chromosomu markerowego od matki. W jednym przypadku (kosmówka nr 33), w którym pacjentka jest nosicielką translokacji wzajemnej zrównoważonej, analiza molekularna nie zidentyfikowała niezrównoważenia genetycznego w badanej kosmówce.

Nosicielstwo translokacji wzajemnej zrównoważonej jak i robertsonowskiej wymieniane jest jako jedna z genetycznych przyczyn niepowodzeń rozrodu (niepłodność, niepowodzenia ciąży, potomstwo z wadami). W badaniach własnych u par występowały poronienia samoistne, nie było natomiast przypadku urodzenia chorego dziecka. U dwóch par oprócz poronień samoistnych, jedna z ciąż zakończyła się urodzeniem dziecka zdrowego (w obu przypadkach był to syn). Pozostałe dwie pary nie miały potomstwa, występowały jedynie poronienia samoistne.

Według Simpsona i wsp. (1989) oraz według badań Goddijn i wsp. (2004) znalezienie translokacji u pary z poronieniami nawracającymi wzrasta wraz z liczbą przebytych niepowodzeń ciąży. Badania pokazują także, że w przypadku par, których analiza kariotypu została przeprowadzona ze względu na występowanie poronień samoistnych, ryzyko urodzenia dziecka chorego jest niskie, szczególnie, jeśli para ma także zdrowe potomstwo (Simpson, 2007; Franssen i wsp., 2008). Wskazaniem do analizy kariotypu obojga partnerów są dwa poronienia samoistne, natomiast nie wiąże się to także z analizą kariotypu poronionego zarodka/płodu. Najczęściej zakłada się *a priori* w przypadku znalezienia zrównoważonej translokacji, że przyczyną było odziedziczenie przez potomka niezrównoważonej translokacji, kiedy do gamety trafia tylko jeden z chromosomów pochodnych. Jak pokazują jednak badania różnych grup w przypadku rodziców nosieli tylko około 30% poronionych zarodków/płodów dziedziczy translokację niezrównoważoną, kolejne 30% ma prawidłowy kariotyp a w przypadku pozostałych identyfikuje się aneuploidię chromosomu autosomalnego

(*interchromosomal effect*) (Carp i wsp., 2006; Stephenson i Sierra, 2006, Simpson, 2007).

W przypadku badań własnych u trzech par badania kosmówki po poronieniu potwierdziły odziedziczenie translokacji w postaci niezrównoważonej, ale ze względu na brak badań wcześniejszych niepowodzeń nie można jednoznacznie stwierdzić, że w pozostałych przypadkach przyczyna była identyczna. Tylko u nosicielki fuzji centrycznej 46,XX,t(14;18) wcześniej przeprowadzone badania metodą FISH pozwoliły na identyfikację trisomii chromosomu pary 18, co świadczy o powtarzającej się, niekorzystnej segregacji chromosomów w gametach. W przypadku nosicielki translokacji 46,XX,t(9;10) przeprowadzone badania dały wynik prawidłowy, jednak ze względu na to, iż metody molekularne wykrywają tylko zmiany niezrównoważone nie można stwierdzić, czy kariotyp płodu był prawidłowy, czy translokacja została odziedziczona w postaci zrównoważonej od matki. Co ciekawe, przeprowadzone przez innych autorów badania sugerują, że w niektórych rodzinach translokacja jest dziedziczona w postaci zrównoważonej, a występowanie niepowodzeń ciąży może mieć związek z innymi pozagenetycznymi czynnikami (Jacobs i wsp., 1970; Carp i wsp., 2006). Taką hipotezę potwierdzają wyniki przeprowadzonego badania materiału z poronienia, które u par z translokacjami jest tak samo zasadne, jak w przypadku par nie będących nosicielami. Jak pokazują doświadczenia własne, brak jednoznacznego potwierdzenia, iż przyczyną niepowodzeń ciąży było odziedziczenie aberracji w postaci niezrównoważonej nie jest satysfakcjonujące dla pacjenta i niejednokrotnie skłania go to przeprowadzania dalszych badań diagnostycznych. W przypadku badania materiału z poronienia mamy możliwość ocenić kariotyp zarodka/płodu przy każdym niepowodzeniu i na tej podstawie wykluczyć lub potwierdzić znaczący wpływ nosicielstwa aberracji strukturalnej

Szansę na posiadanie zdrowego potomstwa u par nosicieli w porównaniu do par z poronieniami idiopatycznymi są trudne w ocenie. Badania nie pozwalają jednoznacznie stwierdzić, iż w przypadku nosicieli szanse są istotnie statystycznie mniejsze, niż w przypadku par bez nosicielstwa (Simpson, 2007). Jednak jak podkreśla Carp w swojej pracy, analiza genetyczna nie powinna dotyczyć tylko pary, ze względu na ograniczone możliwości prognozowania przyszłych zdarzeń oraz adekwatnej porady genetycznej (Carp i wsp., 2006). Badania genetyczne zarodka/płodu mogą dostarczyć wielu cennych informacji, a co za tym idzie zmienić podejście w terapii danej pary.

Oprócz par z translokacjami wzajemnymi u jednej z pacjentek zidentyfikowano chromosom markerowy pochodzący z krótkich ramion chromosomów akrocentrycznych pary 14 lub 22. Niestety ze względu na charakter tego regionu (brak sekwencji kodujących białka) nie można jednoznacznie stwierdzić, która para chromosomów brała udział w translokacji. Chromosom markerowy został zidentyfikowany tylko w części jąder trofoblastu, a obecność chromosomu markerowego stwierdzono także u matki pacjentki (tylko w części komórek), u której nie występowały niepowodzenia rozrodu. Analiza molekularna metodą MLPA do sekwencji subtelomerowych nie ujawniła niezrównoważonego materiału genetycznego zarówno w obrębie chromosomów pary 14 i 22 jak i pozostałych. Sondy dla ramion p chromosomów pary 14 i 22 hybrydują do sekwencji najbliższych centromerowi w ramieniu q, co pozwala wykluczyć obecność euchromatyny w chromosomie markerowym. Manvelyan i wsp. przeanalizowali 111 przypadków występowania dodatkowego chromosomu markerowego u par z niepowodzeniami rozrodu (niepłodnością, niepowodzeniami ciąży) i stwierdzili, iż u tych par występują one trzykrotnie częściej (Manvelyan i wsp., 2008). Najczęściej pochodziły z chromosomów pary 14 i 22 i tylko w 30% przypadków zawierały euchromatynę (Manvelyan i wsp., 2008). W 4 przypadkach były to chromosomy pochodzące z krótkich ramion akrocentryków 14 lub 22 u mężczyzn (podobnie jak u pacjentki w badaniach własnych), przy czym u dwóch pacjentów występowały nieprawidłowości nasienia, u pozostałych problemy z płodnością i poronienia samoistne u partnerki (Manvelyan i wsp., 2008). Ponieważ trudno jednoznacznie ocenić wpływ tych chromosomów na problemy prokreacyjne, bardzo trudno jest także prognozować możliwe następstwa nosicielstwa takiego chromosomu. Być może występowanie tego chromosomu może wpływać na obniżenie zdolności reprodukcyjnej, chociażby poprzez zaburzenia w parowaniu chromosomów oraz tendencję to występowania disomii jednorodzicielskiej (Manvelyan i wsp., 2008). Możliwe jednak, że obecność chromosomu markerowego nie wpływa na niepowodzenia ciąży, a znaczenie mają jeszcze inne, pozagenetyczne czynniki.

5.4. Aberracje chromosomów płci u par i w materiale z poronienia

W badaniach własnych u 5 pacjentek zidentyfikowano aberracje liczbowe chromosomów płci, występujące w postaci mozaikowej. W trzech przypadkach w badaniach materiału z poronienia samoistnego, pochodzącego od tych pacjentek, nie

zidentyfikowano aberracji liczbowych, w dwóch pozostałych występowały aberracje chromosomów płci. W pierwszym przypadku dodatkowy chromosom Y w kariotypie męskim z pewnością nie był konsekwencją występowania aberracji chromosomów płci u matki, ponieważ został odziedziczony od ojca i ma związek z zaburzeniami spermatogenezy. W drugim przypadku, badano materiał z dwóch kolejnych poronień. Aberrację zidentyfikowano w jednym tylko przypadku i dotyczyła ona dodatkowego chromosomu X u płci żeńskiej w materiale z drugiej ciąży. Mimo, iż w kariotypie pacjentki znaleziono dodatkowy chromosom X tylko w niewielkim odsetku komórek nie można wykluczyć możliwości, że trisomia X w materiale z poronienia została odziedziczona od matki, co mogło być wynikiem występowania mozaikowości germinalnej oocytów.

Badania prowadzone przez innych badaczy wśród grupy pacjentek z aberracjami chromosomów płci w postaci mozaikowej pokazały wyższą częstość występowania poronień samoistnych u tych pacjentek niż w grupie kontrolnej (Homer i wsp., 2010). Może to być związane zarówno z występowaniem aneuploidalnych gamet, ale również zmniejszonej rezerwy oocytów (Homer i wsp., 2010). W przypadku kobiet z trisomią chromosomu X także były przypadki przekazywania dodatkowego chromosomu X potomstwu (Tartaglia i wsp., 2010). Ryzyko w tym przypadku jest szacowane na 1-5%, ale, co ciekawe, jest ono wyższe w przypadku kobiet z mozaikowymi postaciami trisomii X (Tartaglia i wsp., 2010).

Ponadto, w badaniach własnych zidentyfikowano u dwóch innych pacjentek z prawidłowym kariotypem występowanie monosomii X w dwóch kolejnych poronieniach samoistnych. Świadczy to o możliwości występowania nawracających aneuploidii nie tylko o charakterze trisomii, ale także monosomii X. Może to wynikać zarówno z występowania mozaikowości germinalnej u pacjentek, lecz również z zaburzeniami spermatogenezy u partnerów. Badania prowadzono w celu identyfikacji pochodzenia monosomii X pokazują, że w przypadku mężczyzn może dochodzić do zaburzeń spermatogenezy – nondysjunkcji w I podziale mejozy a więc także istnieje wyższe ryzyko występowania monosomii X w kolejnych ciążach (Martínez-Pasarell i wsp., 1999). Także u mężczyzn z mikrodelecjami w chromosomie Y obserwuje się wyższy odsetek występowania monosomii X u zarodków (Mateu i wsp., 2010). W badaniach własnych nie przeprowadzono jednak badań w kierunku mikrodelecji chromosomu Y u partnerów pacjentek.

5.5. Analiza zastosowanych metod FISH, QF-PCR i MLPA P095

W celu porównania uzyskanych wyników metodami FISH, QF-PCR i MLPA z zestawem P095 zestawiono analizowane dane w tabeli porównawczej (Tabela 22). Wszystkie trzy metody stosowano na jednej, tej samej grupie zebranych kosmówek po niepowodzeniu ciąży – łącznie 122 kosmówki. W przypadku metody FISH wynik udało się uzyskać w przypadku 119 kosmówek (98%), metody QF-PCR 118 kosmówek (97%), a MLPA P095 119 kosmówek (98%) (Tabela 22). W porównaniu do metody FISH czułość metod zarówno QF-PCR jak i MLPA P095 wynosiła 96%.

Najwięcej nieprawidłowości chromosomowych zidentyfikowano stosując metodę FISH, gdzie badano 8 chromosomów, wykrywając aberrację chromosomową w 39% badanych kosmówek (47 przypadków) (Tabela 22). Dodatkowo, zidentyfikowano również występowanie dodatkowego materiału genetycznego pochodzenia matczynego, stosując hybrydyzację z sondą centromerową 14/22. Metoda QF-PCR z zastosowaniem markerów satelitarnych dla 8 chromosomów pozwoliła na wykrycie aberracji chromosomowych w 37% badanych kosmówek (44 przypadki) (Tabela 22). W przypadku zastosowania zestawu MLPA P095 z sondami tylko dla 5 chromosomów aberracje chromosomowe zidentyfikowano tylko w 24% badań (28 przypadków) (Tabela 22).

Zarówno metoda QF-PCR jak i MLPA pozwoliła na identyfikację trisomii chromosomów autosomalnych w badanym zakresie chromosomów a wyniki były zgodne z wynikami uzyskanymi metodą FISH. Tylko w jednym przypadku kosmówki nr 9, metodą FISH wykryto w 11% jąder interfazowych trisomię chromosomu pary 22, a w badaniu QF-PCR wynik okazał się prawidłowy w zakresie tego chromosomu. Identyfikacja trisomii 22 w tak niewielkim odsetku jąder, która nie została potwierdzona w badaniu QF-PCR może świadczyć o nieprawidłowej interpretacji sygnałów hybrydyzacyjnych, które mogły być pozostałością nieodpłukanej sondy lub o hybrydyzacji krzyżowej z innym chromosomem. Obie metody pozwoliły także na identyfikację zmian w zakresie chromosomów płci: monosomii X, dodatkowego chromosomu Y, a w przypadku MLPA także trisomii X.

Metodą QF-PCR udało się zidentyfikować wszystkie, z wyjątkiem jednej, triploidie wykryte metodą FISH. W przypadku kosmówki nr 115, niskie stężenie genomowego DNA uniemożliwiło uzyskanie wyniku. W dwóch przypadkach (kosmówki nr 51 i 54) stwierdzono występowanie triploidii XXY, mimo iż wynik w

badaniu FISH nie był jednoznaczny (tylko w części jąder obserwowano trzy sygnały hybrydyzacyjne).

Metodą MLPA uzyskano informację o nieprawidłowościach w zakresie chromosomów płci, które mogą wskazywać na triploidię XXY, natomiast w przypadku triploidii XXX wyniki były prawidłowe.

Metoda FISH pozwoliła na zidentyfikowanie w dwóch przypadkach (kosmówki nr 23 i 94) jąder interfazowych z różnym zestawem chromosomów płci, zarówno XX jak i XY. QF-PCR w jednym przypadku (kosmówka nr 23) potwierdziła występowanie dwóch różnych linii komórkowych w zakresie chromosomów płci. W drugim przypadku (kosmówka nr 94) wynik był prawidłowy, a płeć żeńska. Taki sam wynik – płeć żeńską - uzyskano metodą MLPA.

Występowanie aberracji chromosomowych tylko w części jąder interfazowych w metodzie FISH nie przeszkodziła w identyfikacji tych aberracji metodami molekularnymi. Z wyjątkiem kosmówki nr 22, w pozostałych przypadkach mozaikowości w zakresie aberracji chromosomowych wykrytych metodą FISH, badania QF-PCR i MLPA wykazały występowanie aberracji chromosomowych, co świadczy o wysokiej czułości metod molekularnych.

Zestawienie najważniejszych cech ocenianych metod QF-PCR i MLPA przedstawiono w Tabeli 23.

Tabela 22 Porównanie wyników uzyskanych metodami FISH, QF-PCR i MLPA P095. Szarym kolorem wyróżniono te próby, których wyniki różniły się.

<i>Lp.</i>	<i>Numer kosmówki</i>	<i>Wynik FISH 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y</i>	<i>Wynik QF-PCR 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y</i>	<i>Wynik MLPA P095 13, 18, 21, X i Y</i>
1	4	XYY	XYY	XYY
2	8	monosomia X	monosomia X	monosomia X
3	10	trisomia 21 i 22	trisomia 21 i 22	trisomia 21
4	14	triploidia XXX	triploidia XXX	prawidłowy
5	15	triploidia XXY	triploidia XXY	XXY
6	18	monosomia X	monosomia X	monosomia X
7	20	trisomia 22	trisomia 22	prawidłowy
8	21 ¹	trisomia 18	trisomia 18	trisomia 18
9	22	trisomia 22 [mozaika 11/100]	prawidłowy	prawidłowy <i>nie badano chromosomu 22</i>
10	23	XX/XY [83/17]	XX/XY	XX/XY
11	26	monosomia X	monosomia X	monosomia X
12	28	trisomia 21	trisomia 21	trisomia 21

13	29	trisomia 18 [mozaika 36/100]	trisomia 18	trisomia 18
14	30	monosomia X	monosomia X	monosomia X
15	31	trisomia 13	trisomia 13	trisomia 13
16	35	monosomia X	monosomia X	monosomia X
17	44	monosomia X	monosomia X	monosomia X
18	45	monosomia X	monosomia X	monosomia X
19	46	trisomia 22	trisomia 22	prawidłowy <i>nie badano chromosomu 22</i>
20	47	monosomia X z trisomia 18	monosomia X z trisomia 18	monosomia X z trisomia 18
21	51	triploidia XXY [tylko w części jąder interfazowych]	triploidia XXY	prawidłowy
22	53	trisomia 22	trisomia 22	prawidłowy <i>nie badano chromosomu 22</i>
23	54	triploidia XXY [tylko w części jąder interfazowych]	triploidia XXY	prawidłowy
24	55	triploidia XXY	triploidia XXY	XXY
25	59	trisomia 18	trisomia 18	trisomia 18
26	71	trisomia 16	trisomia 16	prawidłowy <i>nie badano chromosomu 16</i>
27	72	trisomia 15	trisomia 15	prawidłowy <i>nie badano chromosomu 15</i>
28	73	trisomia 16	trisomia 16	prawidłowy <i>nie badano chromosomu 16</i>
29	74	trisomia 18	trisomia 18	trisomia 18
30	76	trisomia 21	trisomia 21	trisomia 21
31	78	trisomia 16	trisomia 16	prawidłowy <i>nie badano chromosomu 16</i>
32	80	triploidia XXX	triploidia XXX	prawidłowy
33	83	trisomia 16	trisomia 16	prawidłowy <i>nie badano chromosomu 16</i>
34	84	monosomia X	monosomia X	monosomia X
35	86	triploidia XXY	triploidia XXY	XXY
36	88	trisomia 16	trisomia 16	prawidłowy <i>nie badano chromosomu 16</i>
37	92	trisomia 16	trisomia 16	prawidłowy <i>nie badano chromosomu 16</i>
38	93	triploidia XXY	triploidia XXY	XXY
39	94	XX/XY [84/16]	XX	XX
40	96	triploidia XXX	triploidia XXX	prawidłowy
41	102	trisomia 16 [mozaika 42/100]	trisomia 16	prawidłowy <i>nie badano</i>

				<i>chromosomu 16</i>
42	103	-	-	XXX
43	107	monosomia X z trisomią 16	monosomia X z trisomią 16	monosomia X
44	110	trisomia 22	trisomia 22	prawidłowy
45	115	triploidia XYY	-	XYY
46	116	monosomia X [mozaika 11/100]	monosomia X	monosomia X
47	119	monosomia X	monosomia X	monosomia X
48	120	monosomia X [mozaika 14/100]	monosomia X	monosomia X
Podsumowanie:		47 nieprawidłowych wyników/ 119 badanych [39%]²	44 nieprawidłowych wyników/118 badanych [37%]	28 nieprawidłowych wyników/119 badanych [24%]³

¹ W przypadku kosmówki nr 21 trisomia dotyczy tylko długiego ramienia chromosomu pary 18 (trzy kopie długiego ramienia), ze względu na odziedziczenie od matki-nosicielki niezrównoważonej translokacji z chromosomem pochodnym, zbudowanym z dwóch długich ramion chromosomów pary 14 i 18. Potwierdzono tę zmianę w badaniu regionów subtelomerowych metodą MLPA i FISH.

² W badaniu metodą FISH uzyskano również dodatkowo nieprawidłowy wynik badania kosmówki 42 z sondą centromerową dla chromosomów pary 14/22, zastosowaną w celu identyfikacji dodatkowego materiału genetycznego pochodzenia matczynego.

³ W 11 przypadkach nie badano chromosomu pary 16 i 22.

Tabela 23 Porównanie skuteczności metody QF-PCR i MLPA P095.

Cecha	QF-PCR	MLPA P095
Skuteczność	97%	98%
Czułość	96%	96%
Identyfikacja trisomii chromosomów autosomalnych:	Tak w zakresie badanych chromosomów	Tak w zakresie badanych chromosomów
Identyfikacja aberracji chromosomów płci: Monosomii chromosomu X Trisomii XXX Trisomii XYY	Tak Nie wiadomo Tak	Tak Tak Tak
Identyfikacja triploidii: XXX XXY XYY	Tak Tak Nie wiadomo	Nie Tylko w zakresie dodatkowego chromosomu X Tylko w zakresie dodatkowego chromosomu Y
Identyfikacji aberracji chromosomowych w przypadku występowania mozaikowości: XX/XY Trisomie Monosomia X Triploidia (XXY)	Tak Tak Tak Tak	Tak Tak Tak Nie

Metoda FISH stosowana jest szeroko w diagnostyce prenatalnej do tak zwanej szybkiej diagnostyki najczęstszych aneuploidii od lat dziewięćdziesiątych XX wieku

(Klinger i wsp. 1992; Ward i wsp., 1993, Bryndorf i wsp., 1997; Eiben i wsp., 1998). Zastosowanie znalazła także w badaniu materiału z poronienia, choć w tym przypadku analizowana jest większa liczba chromosomów niż w przypadku diagnostyki prenatalnej. Badania Jobanputry pokazały, iż metoda FISH z zastosowaniem sond dla chromosomów pary 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y pozwoliła na identyfikację 83% aberracji chromosomowych wśród wszystkich wykrytych w badanym materiale, przy 100% skuteczności (Jobanputra i wsp., 2002). W badaniach własnych tą metodą uzyskano podobny wynik – 86% aberracji chromosomowych wśród wszystkich, które w badanym materiale znaleziono. Ponadto, jak zauważyła Jobanputra FISH pozwolił na identyfikację aberracji także w przypadku tych prób, których badanie kariotypu się nie powiodło (w 4 przypadkach na 5 wykryto aberrację chromosomową) (Jobanputra i wsp., 2002). W badaniach własnych skuteczność metody wyniosła 98%, co można tłumaczyć włączeniem do badania materiału z bloczków parafinowych, w przypadku których istnieje ryzyko, iż materiał został utrwalony w odczynnikach, które nie pozwalają na hybrydyzację, na przykład niebuforowana parafina. Podobne wyniki uzyskała Jobanputra i wsp. w późniejszych badaniach, w których zastosowano metodę FISH z tym samym zestawem chromosomów. Kosmówki były badane zarówno metodą cytogenetyki klasycznej jak i metodą FISH, co pozwoliło łącznie na identyfikację wszystkich aberracji chromosomowych w 65,5% przypadków (Jobanputra i wsp., 2011).

W badaniach własnych odsetek kosmówek, w których zidentyfikowano metodą FISH aberrację chromosomową wynosił 40%. Ocenę skuteczności tej metody z takim samym zestawem sond przeprowadzili też Shearer i wsp. analizując 5555 kosmówek (Shearer i wsp., 2011). Metodą FISH udało im się uzyskać informatywne wyniki we wszystkich przypadkach, przy czym badany panel chromosomów pozwolił na identyfikację 70% aberracji chromosomowych, a połączenie metody FISH i klasycznego kariotypu pozwoliło na identyfikację nieprawidłowości w 47% przypadków (Shearer i wsp., 2011). W badaniach własnych aberracje chromosomowe zostały zidentyfikowane w 40% przypadków tylko metodą FISH, a w połączeniu z metodami molekularnym w 47%, co daje porównywalne wyniki.

Wśród metod molekularnych, pozwalających na diagnostykę aberracji chromosomowych metoda QF-PCR coraz częściej zastępuje metodę FISH w przypadku badań prenatalnych, a obecnie także w przypadku analizy materiału z poronienia. W

badaniach własnych wyniki udało się uzyskać w 97% przypadków przebadanych kosmówek, a aberracje zidentyfikowano w 37% przypadków. Zastosowano tylko jeden marker dla każdego chromosomu z uwagi na porównawczą analizę metodą FISH. Według standardów *Association for Clinical Cytogenetics* przy przeprowadzaniu testów na aneuploidię metodą QF-PCR przynajmniej dwa markery powinny być informacyjne, ale akceptowalny jest także jeden informacyjny marker, gdy analiza zostaje potwierdzona inną metodą, na przykład FISH (ACC; 2007). Niejednoznaczne wyniki dla markerów nieprawidłowych o stosunku alleli 2:1, pomiędzy 1,4-1,8 oraz 0,68-0,8 uzyskano w przypadku kariotypu XYY oraz w dwóch przypadkach triploidii XXX, ale tylko dla jednego lub dwóch markerów (pozostałe wskazywały na triploidię). Ponadto pojawiły się wyniki, których wartość wynosiła powyżej 2,4 lub poniżej 0,45, co według standardów może świadczyć o występowaniu więcej niż 3 kopii chromosomów. Wyniki takie uzyskano w przypadku kosmówki nr 29 z trisomią 18 (0,18/5,39), w przypadku której badanie FISH wykazało trisomię 18 tylko w 36% jąder interfazowych (kariotyp mozaikowy). Podobnie w przypadku kosmówek nr 51 i 55 z triploidią XXY, gdzie jeden z alleli wykroczał poza zasięg normy, a w badaniu FISH triploidia została stwierdzona tylko w części komórek. Dodatkowo w przypadku triploidii XXY (kosmówka nr 86) także jeden z alleli wykazywał zasięg poza granicami normy (w badaniu FISH bez cech mozaiki) oraz trisomii 16 (kosmówka nr 92 - 0,29/3,37, w badaniu FISH – trisomia 16 w 100% jąder). W badaniu kosmówek z monosomią X tylko w części jąder interfazowych (11% i 14%) w analizie QF-PCR nie stwierdzono dodatkowego allelu wskazującego na kariotyp mozaikowy. Może być to związane zarówno z tym, iż monosomia mogła dotyczyć większej liczby komórek, niż wykazało badanie FISH, z drugiej strony badane allele mogły być homozygotyczne.

Zastosowanie QF-PCR na próbach DNA uzyskanych z płynu owodniowego lub kosmówki pokazały, iż jest to metoda o wysokiej czułości i specyficzności, pozwalająca zarówno na identyfikację aberracji chromosomowych, takich jak aneuploidia, triploidia, ale także w przypadku mozaikowości, disomii jednorodzicielskiej oraz kontaminacji materiałem matczynym. W 1997 roku Adinolfi i wsp. przedstawili w swojej pracy test na najczęstsze aneuploidie chromosomowe zidentyfikowane w badaniach prenatalnych oparty na metodzie ilościowej fluorescencyjnej PCR (Adinolfi, Pertl, Sherlock, 1997). W 1999 roku Cirigliano i wsp. przedstawili diagnostykę aneuploidii chromosomów X i Y przy użyciu metody QF-PCR stosując nowy marker dla chromosomu X – X22

(Cirigilano i wsp., 1999). W 2005 roku Mann i wsp. (2005) przedstawili badania przeprowadzone w ciągu trzech lat na 7720 próbach płynu owodniowego, których celem była ocena skuteczności metody QF-PCR w diagnostyce najczęstszych aneuploidii. Badania pokazały, iż skuteczność metody sięgała niemal 100%, a większość wyników (97%) można było uzyskać już w dniu pobrania próby do badania (Mann i wsp., 2005). Co więcej, nie było rozbieżności pomiędzy trisomiami wykrytymi w klasycznej analizie kariotypu, a w badaniach molekularnych, które pozwoliły także na identyfikację kariotypu mozaikowego oraz kontaminacji materiałem matczynym. Putzowa i wsp. przeprowadzili podwójny test – analizę kariotypu i analizę molekularną metodą QF-PCR na próbach uzyskanych z płynu owodniowego oraz kosmówki (Putzowa i wsp., 2008). W metodzie QF-PCR zastosowano dwa testy – jeden w kierunku trisomii 21 oraz chromosomów X/Y, drugi w kierunku aneuploidii 13, 18, 21 oraz chromosomów X i Y. Podobnie jak u innych autorów wyniki udało się uzyskać w ciągu 24 godzin, czułość testu oceniona została na 90%, specyficzność na 100%, dowodząc tym samym zasadność wprowadzenia tego testu w badaniach prenatalnych. W 2010 roku Hills i wsp. przedstawili badania prowadzone w ciągu dwóch lat na próbach prenatalnych (płyn owodniowy i kosmówka), gdzie stosowali jedynie metodę QF-PCR z markerami dla chromosomów pary 13, 18, 21, X i Y, jako samodzielny test nie potwierdzany (z pewnymi wyjątkami) analizą kariotypu (Hills i wsp., 2010). Wśród 9737 przebadanych prób, tylko w 25 przypadkach (0,3%) dodatkowo wykonana (prenatalnie lub postnatalnie) analiza kariotypu pokazała fałszywie negatywny wynik badania molekularnego, dowodząc skuteczności oraz zasadności jego stosowania jako samodzielnego testu diagnostycznego (Hills i wsp., 2010).

W 2005 roku Diego-Alvarez i wsp. (2005) przedstawili w swojej pracy wykorzystanie testu QF-PCR także w poronieniach samoistnych. Zastosowano rozszerzony panel markerów dla chromosomów pary 2, 7, 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y. Dla każdego z chromosomów stosowano po dwa markery, a w przypadku obu nieinformacyjnych, także markery dodatkowe. Wyniki udało się uzyskać w 94% przypadków, a odsetek wykrytych aberracji liczbowych wynosił 36% (Diego-Alvarez i wsp., 2005).

Zou i wsp. (2008) przedstawili badania porównawcze analizy materiału z poronienia metodą klasyczną (analiza kariotypu) a metodą molekularną (QF-PCR). Metodą QF-PCR analizowali dziewięć chromosomów: 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y,

stosując co najmniej dwa markery dla każdego chromosomu (dla niektórych także 3 markery) (Zou i wsp., 2008). Wyniki uzyskali w 98,3% przypadków, aberracje chromosomowe zidentyfikowali w 36,1% przypadków, a wyniki analizy kariotypu i analizy molekularnej były zgodne w 95% przypadków (Zou i wsp., 2008).

W pracach obu autorów jak i badaniach własnych markery wykazywały wysoki stopień heterozygotyczności (powyżej 0,8), co pozwala na uzyskiwanie informacyjnych wyników dla większości badanych prób.

Uzyskane w badaniach własnych wyniki pokazują wysoką czułość i specyficzność tej metody, nie tylko w identyfikowaniu kompletnych aneuploidii, ale także triploidii oraz kariotypów mozaikowych. Ze względu jednak na możliwość występowania wyników nieinformacyjnych lub niejednoznacznych, analiza taka przeprowadzana, jako samodzielny test powinna badać więcej niż jeden marker dla każdego chromosomu (optymalnie trzy do czterech markerów).

Obok FISH i QF-PCR także metoda MLPA może być stosowana do identyfikacji najczęstszych aneuploidii. Komercyjnie dostępny zestaw do identyfikacji aneuploidii w zakresie chromosomów pary 13, 18, 21, X i Y (MLPA P095) został skonstruowany głównie z myślą o diagnostyce prenatalnej, ale można go również zastosować w przypadku materiału z poronienia.

W badaniach własnych, dzięki zastosowaniu zestawu MLPA P095 udało się wykryć 50% aberracji chromosomowych wśród wszystkich, łącznie zidentyfikowanych różnymi metodami, przy czym należy zaznaczyć, że także ogólny odsetek zidentyfikowanych nieprawidłowości jest wyższy niż u innych autorów (Carvalho i wsp., 2010). We wszystkich przypadkach trisomii względne wartości fluorescencji wynosiły powyżej 1,3, a nieprawidłowości odnotowano w przypadku co najmniej w 5 z 8 sond. W przypadku kariotypu mozaikowego – trisomii 18 w 36% komórek (kosmówka nr 29), monosomii X w 11% komórek (kosmówka nr 116) i monosomii X w 14% komórek (kosmówka nr 120) – co najmniej 5 z 8 sond wykazywało nieprawidłowe wartości. Wyniki te są zbliżone do uzyskanych przez inne grupy, pokazując tym samym niezwykle czułość metody MLPA, która pozwala na identyfikację nieprawidłowości występującą nawet w części komórek. Podobnie w przypadku kariotypu mozaikowego XX/XY wartości dla chromosomu Y były poniżej granicy normy, w przeciwieństwie do wysokich wartości uzyskanych dla chromosomu X. W przypadku kariotypu 47,XYY wartości nie osiągnęły 1,8, jak przedstawiono to na

przykład w pracy van Opstal i wsp. podobnie w przypadku 47,XXX wartości także były niższe niż podawane przez tych autorów 2,5 (van Opstal i wsp., 2009).

Warto zwrócić uwagę także na to, iż zestaw ten, pomimo że przeznaczony do identyfikacji aneuploidii, pozwala także na badanie aberracji strukturalnych. W przypadku kosmówki nr 21 wystąpiła trisomia długiego ramienia chromosomu pary 18, co zostało potwierdzone w badaniu MLPA do subtelomerów. W przypadku zestawu MLPA P095 duplikacji uległy nie tylko sondy znajdujące się w długim ramieniu chromosomu pary 18, ale także jedna z dwóch, które występują w regionie okołocentromerowym ramienia p. Chromosom pary 18 uległ złamaniu powyżej centromeru w ramieniu p, a więc zawierał centromer 18, stąd duplikacja tego regionu w badaniu. Zgodnie z przeprowadzoną analizą u płodu występował jeden prawidłowy chromosom pary 18 odziedziczony od ojca oraz jeden od matki, jeden prawidłowy chromosom 14 odziedziczony od ojca oraz jeden chromosom matczyny złożony z długich ramion chromosomów 18 i 14.

Kooper i wsp. (2008) wykorzystali MLPA P095 do identyfikacji aneuploidii na 1000 prób płynu owodniowego, chcąc ocenić jego możliwości, jako samodzielnego testu prenatalnego. W swoich badaniach uzyskali 94,7% skuteczności, 100% czułości i specyficzności dla tego zestawu, który w większości przypadków (94%) pozwolił na uzyskanie wyników w przeciągu trzech dni roboczych (Kooper i wsp., 2008). Test taki powtórzyli także na 152 próbach pochodzących z biopsji kosmówki (Kooper i wsp., 2009). Wyniki pokazały wysoką czułość i specyficzność testu oraz całkowitą zgodność wyników pomiędzy klasyczną analizą kariotypu a badaniami molekularnymi w przypadku euploidii, oraz niemozaikowych aneuploidii (Kooper i wsp., 2009).

Van Opstal i wsp. (2009) przebadali 4000 próbek płynu owodniowego uzyskując podobne rezultaty – 100% czułość i specyficzność. Wyniki uzyskano dla wszystkich prób, przy czym niejednoznaczne wyniki stanowiły 1,7% przypadków (van Opstal i wsp., 2009). Fałszywie negatywne wyniki uzyskano dla prób z triploidią 69,XXX, aberracjami strukturalnymi, chromosomem markerowym, mozaikowymi aberracjami chromosomów płci. Pełną trisomię identyfikowano jeśli wartości wynosiły powyżej 1,3 przynajmniej dla 5 z 8 sond. W przypadku kariotypu mozaikowego wartości nieprawidłowe uzyskiwano dla 4 z 8 sond (trisomia 21 w 24% komórek), 6 z 8 sond (trisomia 18 w 26% komórek) i 7 z 8 sond (mozaika 47,XXY/46,XY w 22% komórek)

(van Opstal i wsp., 2009). W przypadku kariotypów 47,XYY wartości fluorescencji wynosiły 1,8, a dla 47,XXX nawet 2,5 (van Opstal i wsp., 2009).

Próby wykorzystania zestawu P095 podjęli także Carvalho i wsp. (2010), w tym przypadku jednak badaniami objęli 489 prób pochodzących z poronień samoistnych (92,3%) oraz martwych porodów. Rezultaty badań uzyskali w przeciągu 24 godzin, przy czym wszystkie analizowane próby dały jednoznaczny, informacyjny wynik (Carvalho i wsp., 2010). Aberracje chromosomowe zidentyfikowano w 7,8% przypadków, a fałszywie negatywne wyniki dotyczyły przypadków triploidii 69,XXY, podwójnej trisomii 7 i 13 oraz 20 i 21 (Carvalho i wsp., 2010). W przypadku kontaminacji materiałem matczynym tylko w badaniu MLPA zidentyfikowano chromosom Y (stosunek wartości chromosomu Y do X był relatywnie niższy), w badaniu cytogenetycznym wynik był prawidłowy żeński. Ogółem, w badanym materiale, metodą molekularną i klasyczną wykryto 29,9% nieprawidłowości chromosomowych (Carvalho i wsp., 2010).

5.6. Analiza regionów subtelomerowych i regionów związanych z zespołami mikrodelecji/mikroduplikacji

Analiza regionów subtelomerowych metodą MLPA pozwoliła na identyfikację dodatkowych trisomii chromosomowych oraz aberracji strukturalnych, nie zidentyfikowała jednak submikroskopowych rearanżacji w tych regionach. Znaczenie rearanżacji subtelomerowych w poronieniach samoistnych, szczególnie tych nawracających, jest dyskusyjne, aczkolwiek istnieją prace przedstawiające pary z poronieniami nawracającymi, które są nosicielami zmian w tych regionach (Brackley i wsp., 1999; Monfort i wsp., 2006). Wydaje się jednak, iż tego typu aberracje można zidentyfikować u par, w rodowodzie których występowały nie tylko poronienia samoistne, ale także urodzenia dzieci z wadami wrodzonymi, cechami dysmorfii oraz/lub z niepełnosprawnością intelektualną. Badania wśród pacjentów tylko z poronieniami nawracającymi w większości nie potwierdziły zmian w tych regionach (Benzacken i wsp., 2002; Fan, Zhang, 2003; Jalal i wsp., 2003). Ponadto, wdrożenie do diagnostyki metod mikromacierzowych, takich jak array CGH pozwala na ocenę zmian submikroskopowych nie tylko w regionach subtelomerowych, ale także w pozostałych regionach chromosomowych, co wydaje się w przypadku par z niepowodzeniami ciąży dużo lepszym rozwiązaniem, niż analiza samych subtelomerów.

Metoda MLPA pozwoliła natomiast na identyfikację dodatkowych trisomii chromosomów autosomalnych oraz aberracji strukturalnych. Wykorzystanie testu subtelomerowego MLPA w poronieniach samoistnych zaproponował Bruno (Bruno i wsp., 2006). W pierwszym teście przebadali 78 kosmówek metodą MLPA oraz wykonali analizę kariotypu, natomiast w drugim teście wykonali badanie MLPA z zestawem P069 i P036 na 100 kosmówkach, dodatkowo stosując FISH z sondą 13/21 do analizy triploidii. W pierwszym badaniu udało im się uzyskać wyniki w 95% przypadków, w drugim, dzięki większej ilości kosmówki przeznaczonej do izolacji DNA (5-10 μg zamiast 1-5 μg) wyniki uzyskali w 97% przypadków (Bruno i wsp., 2006). W badaniu zidentyfikowali wszystkie trisomie autosomalne, monosomię X oraz aberracje strukturalne. W przypadku 100 kosmówek badanych tylko metodą MLPA nieprawidłowości zidentyfikowano w 18 (Bruno i wsp., 2006). Test nie zidentyfikował jedynie triploidii, jednak w pozostałych przypadkach okazał się skuteczny i efektywny.

Diego-Alvarez i wsp. (2007) badali wykorzystanie testu subtelomerowego MLPA P036 i P070 do analizy materiału z poronienia. W tym celu przebadali 221 kosmówek, dodatkowo wykonując w 178 przypadkach także analizę cytogenetyczną (Diego-Alvarez i wsp., 2007). Wyniki uzyskano dla wszystkich prób. Zidentyfikowali trisomie autosomalne (duplikacje sond w ramieniu p i q chromosomu w obu zestawach), aberracje strukturalne (delecję i duplikację w ramionach p lub q chromosomów), ale także trzy submikroskopowe zmiany o charakterze delecji/duplikacji, które nie zostały zidentyfikowane w badaniu kariotypu. Test nie zidentyfikował triploidii, zrównoważonych translokacji oraz interstycjalnych delecji/duplikacji, co według autorów może zmniejszyć odsetek zidentyfikowanych zmian o około 7% (Diego-Alvarez i wsp., 2007). Pomimo tego, uznali test subtelomerowy za skuteczny a w połączeniu z metodą QF-PCR oraz badaniami cytogenetycznymi pozwalający uzyskać wiarygodne wyniki badań.

Donaghue zaproponowała połączenie dwóch testów molekularnych, które pozwoliłyby zastąpić klasyczną analizę kariotypu i wyeliminować ewentualne ograniczenia obu metod (Donaghue i wsp., 2010). Ocenili oni, iż w ciągu 10 lat przeprowadzania klasycznej analizy kariotypu w około 2,7% przypadków analiza cytogenetyczna nie pozwoliła na identyfikację subtelných zmian typu delecji/duplikacji (Donaghue i wsp., 2010). Stąd próba zastosowania połączonych badań molekularnych. Badania przeprowadzili na 500 próbach pochodzących z materiału z poronienia

(Donaghue i wsp., 2010). W pierwszym etapie zastosowali analizę QF-PCR dla chromosomów pary 13, 18, 21, X i Y, a gdy wynik był prawidłowy stosowali test subtelerowy MLPA P069. Jeśli wynik wskazywał na trisomię 14, 15 lub 16, potwierdzali to metodą QF-PCR, jeśli natomiast inne sondy wykazywały nieprawidłowe wartości przeprowadzali dodatkową analizę drugim testem MLPA P036. Takie same nieprawidłowości zidentyfikowane w obu testach traktowali, jako aberrację chromosomową, jeśli natomiast dotyczyły tylko jednego, uznawali za wynik prawidłowy. Skuteczność obu połączonych metod wynosiła 95%, przy czym 88% wyników uzyskiwano w okresie poniżej 28 dni (Donaghue i wsp., 2010). Nieprawidłowości wykryto w 23% przypadków, a odsetek ten był podobny, jaki uzyskiwano stosując jedynie metody cytogenetyki klasycznej (Donaghue i wsp., 2010).

Przedstawione powyżej badania pokazują kierunki współczesnej genetycznej diagnostyki niepowodzeń ciąży. W badaniach własnych zastosowano nieco odmienne podejście – rozszerzając pierwszy test o badanie chromosomów, których aneuploidie najczęściej są spotykane w materiale z poronienia (13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y), co wydaje się dużo lepszym podejściem i pozwala na wykrycie około 80% aberracji chromosomowych. W przypadku MLPA subtelerowego skuteczność w badaniach własnych wynosiła mniej, bo 81%, na co wpływ mogła mieć zarówno technika izolacji DNA jak i jakość materiału wyjściowego - kosmówki. Ponieważ MLPA jest metodą niezwykle czułą na wszelkiego typu zanieczyszczenia, zdecydowanie lepszym rozwiązaniem jest izolacja DNA z użyciem gotowych zestawów do izolacji, pozwalających uzyskać DNA o wyższej jakości i czystości. Ponadto, niejednokrotnie dostarczany materiał uległ już częściowej degradacji, stąd po izolacji, DNA genomowy był częściowo zdegradowany, z małą ilością wysokocząsteczkowego DNA, co przekładało się na uzyskiwane w badaniu rezultaty. W pozostałych przypadkach test MLPA z zestawem P036 i P070 pozwolił na identyfikację dodatkowych trisomii oraz aberracji strukturalnych chromosomów. Mimo iż niektórzy podkreślają większą skuteczność zestawu P070 (wcześniejszy test P069) niż P036 (Donaghue i wsp., 2010) to badania własne nie potwierdziły tej zależności. W obu testach uzyskiwano podobne rezultaty, a ze względu na to, iż jeden zestaw ma zaprojektowaną tylko jedną sondę dla każdego ramienia, stosowanie dwóch zestawów jednocześnie wydaje się bardziej zasadne, ponieważ zmniejsza ryzyko niejednoznacznych wyników.

Badania z zastosowaniem zestawu MLPA do identyfikacji zespołów mikrodelecji/mikroduplikacji nie potwierdziły występowania zmian w analizowanych regionach w badanej grupie kosmówek. Może to wynikać z tego, iż zestaw ten przeznaczony jest do diagnostyki zespołów identyfikowanych u dzieci z cechami dysmorfii, wadami, opóźnieniem rozwojowym. Trudno ocenić, czy są one także przyczyną niepowodzeń ciąży, ponieważ często są to zmiany submikroskopowe, które nie są identyfikowane w klasycznym badaniu kariotypu. Wstępne rozpoznanie określonego zespołu jest ustalane na podstawie analizy dysmorfologicznej, co w przypadku niepowodzeń ciąży jest niemożliwie. Jednakże, z drugiej strony, w przypadku jednej z kosmówek (kosmówka nr 118), która została zakwalifikowana do badania metodą array CGH zidentyfikowano submikroskopową duplikację w regionie 4p16.3, co pokazuje, że tego typu zmiany także mogą zostać rozpoznane w przypadku materiału z poronienia.

5.7. Analiza badania materiału z poronienia przeprowadzona metodą array CGH

Przeprowadzone badania własne dowiodły, że metoda porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy jest skuteczna w identyfikacji najczęstszych zmian genetycznych jak i submikroskopowych rearanżacji genomowych typu CNV. Spośród 24 przebadanych kosmówek w 54% znaleziono zmiany genetyczne, z czego 77% aberracji stanowiły aneuploidie chromosomowe (trisomie, wielokrotne trisomie, monosomia X), ale aż 13% stanowiły zmiany małe, nie zidentyfikowane innymi metodami. Z pewnością świadczy to o olbrzymim potencjale tej metody w identyfikowaniu przede wszystkim tych zmian, które dotychczas pozostawały poza zasięgiem dostępnych metod badawczych. Jest to także szansa w przypadku par z prawidłowym kariotypem zarówno partnerów jak i zarodka/płodu na zidentyfikowanie przyczyny poronień, szczególnie tych nawracających. Metoda ta pozwala także na znalezienie regionów, w których znajdują się ważne dla rozwoju embrionalnego geny, a których uszkodzenie może prowadzić do niepowodzeń ciąży.

Nowe technologie oparte na metodach mikromacierzowych, takiej jak array CGH, nazywane czasami „molekularnym kariotypem”, pozwalają na identyfikację nowych zmian w kariotypie o charakterze submikroskopowym, powodując tym samym identyfikację nowych zespołów mikrodelecji/mikroduplikacji. Dotychczas klasyczna

analiza chromosomowa była przeprowadzana w przypadku rozpoznania opóźnienia rozwojowego/niepełnosprawności intelektualnej o nieznaną etiologię lub zespołów wad wrodzonych, chorób ze spektrum autyzmu, stanowiąc „złoty standard” diagnostyczny przez ponad 35 lat. Okazało się jednak, że metody oparte na mikromacierzach pozwalają w dużo większym stopniu niż badanie klasyczne zidentyfikować zmiany w kariotypie, odpowiedzialne za występujące objawy. Stąd, w wielu ośrodkach diagnostyczno-badawczych wprowadzono jako pierwszy test badanie oparte o technikę mikromacierzy, z pominięciem badania kariotypu, a badanie to jest rekomendowane przez wielu badaczy, jako pierwszy samodzielny, w pełni skuteczny test diagnostyczny w wyżej wymienionych przypadkach (Miller i wsp., 2010). Być może także w przypadku par z niepowodzeniami ciąży (szczególnie nawracającymi) test ten zostanie na szeroką skalę wykorzystywany w badaniach kosmówki po poronieniu.

Już Philipp i wsp. (2003) w swoich badaniach poświęconych cytogenetycznej i embrioskopowej analizie zarodków/płodów po poronieniu samoistnym, zauważyli, iż zmiany morfologiczne w części przebadanych przypadków o prawidłowym kariotypie mogą mieć bardzo subtelny charakter, który wymagałby bardziej szczegółowej analizy genomowej niż analiza kariotypu.

W 2004 roku Shaeffer i wsp. (2003) wykorzystali metodę array CGH do identyfikacji zmian w materiale z poronienia. Wyniki badania porównali z tym otrzymanymi po klasycznej analizie kariotypu. W 41 przebadanych przypadkach w 38 wyniki kariotypu i array CGH były zgodne. Dodatkowo analiza wykryła 4 wcześniej nie zidentyfikowane zmiany, co stanowiło 9,8% przypadków i (Shaeffer i wsp., 2003). Metoda array CGH pozwoliła na identyfikację nie tylko trisomii i monosomii autosomalnych, aneuploidii chromosomów płci, ale także była pomocna w przypadku niejednoznacznego wyniku analizy kariotypu oraz zmian, które w takim badaniu nie są możliwe do zidentyfikowania (zmiany w regionach subtelomerowych, małe interstycjalne duplikacje).

Metoda array CGH została wykorzystana także, w przypadkach niepowodzenia hodowli trofoblastu i nieudanej analizy cytogenetycznej (Benkhalifa i wsp., 2005). Okazało się, że i w tym wypadku zidentyfikowano zmiany niemożliwe do zidentyfikowania w badaniach klasycznych.

Array CGH zastosowany z cytometrią przepływową pozwolił w badaniach Mentena na zidentyfikowanie 26 aberracji chromosomowych w 100 badanych

kosmówkach (Menten i wsp., 2009). Oprócz trisomii autosomalnych, monosomii X i triploidii, zidentyfikowano także niezrównoważoną translokację odziedziczoną od rodzica nosiciela oraz dwie delecje terminalne. Nie zidentyfikowano natomiast żadnego unikalnego CNV. Analiza zawiodła także w przypadku translokacji zrównoważonej odziedziczonej od rodzica nosiciela. Triploidię rozpoznawano na podstawie zmian w liczbie chromosomów płci.

W pracy Warren analiza array CGH powiodła się w 86% badanych kosmówek, przy czym 20% zmian stanowiły małe rearanżacje genomowe powstałe *de novo* (pięć duplikacji i jedna delecja) (Warren i wsp., 2009).

Pertile i wsp. (2012) analizowali metodą array CGH ponad 2000 przypadków niepowodzeń ciąży (poronień samoistnych, martwych porodów oraz zespołów wad wrodzonych u płodu). Wyniki udało im się uzyskać w 98% przypadków, przy czym najczęstszymi aberracjami chromosomowymi w badanym materiale były aneuploidie (Pertile i wsp., 2012). Oprócz aberracji liczbowych wykryto także zespoły mikrodelecji/mikroduplikacji, takie jak: zespół Williamsa (7q11.23), duplikację 7q11.23, zespół Angelmana (15q11.2q13), zespół DiGeorga (22q11.21) i zespół Sotosa (5q35.2q35.3). Ponadto w 4,1% przypadków zidentyfikowano CNV o nieznanym jak dotąd znaczeniu klinicznym (Pertile i wsp. 2012).

W badaniach własnych zmiany o charakterze CNV zidentyfikowano w dwóch kosmówkach, w obu przypadkach badaniami objęto także rodziców. W przypadku pary *MR* i *RR* zidentyfikowano dwie zmiany w chromosomie pary 6 – delecje w 6p22.3 oraz duplikacje w 6q23.3. Obie zmiany należą do unikalnych CNV o nieznanym jak dotąd znaczeniu klinicznym, a także obie zostały odziedziczone od matki w niezmienionej postaci. W regionie 6p22.3 znajduje się gen *CDKALI*, który uległ częściowej delecji. Funkcja genu *CDKALI* jest niejasna, ale prawdopodobnie białko, które koduje jest enzymem modyfikującym tRNA, która to modyfikacja zapobiega mylnemu łączeniu się tRNA z kodonem w mRNA (Wei i Tomizawa, 2011). Ekspresję tego genu zaobserwowano w wyspach trzustkowych, mięśniach szkieletowych i mózgu (Zeggini i wsp., 2007). Dotychczas zaobserwowano związek polimorfizmów typu SNP tego genu z insulinoniezależną cukrzycą typu 2 oraz chorobą wieńcową (Zeggini i wsp., 2007, Scott i wsp., 2007, Saade i wsp., 2011). Związek pomiędzy wariantami genu *CDKALI* znaleziono także w przypadku choroby Leśniowskiego-Crohna (Umeno i wsp., 2011). Badania prowadzone nad ekspresją genu *CDKALI* w wyspach trzustkowych na

transgenicznych myszach pokazały, że produkt genu kontroluje pierwszą fazę egocytozy insuliny (Ohara-Imaizumi i wsp., 2010).

Jak dotąd zidentyfikowano dwie mikrodelecje w regionie 6p22.3 obie związane z opóźnieniem rozwojowym/intelektualnym i cechami dysmorfii u dziecka oraz u dorosłej kobiety, ale ani w jednym, ani w drugim przypadku nie obejmowały regionu z genem *CDKALI* (Bremer i wsp., 2009; Ansermet i wsp., 2010).

Jak dotychczas nie znaleziono związku pomiędzy tym genem a niepowodzeniami ciąży, ani ewentualnym wpływem na funkcje jajników (u pacjentki stwierdzono zaburzenia sterydo- i folikulogenezy jajników). Jednakże ze względu na to, iż w przypadku kobiet z PCOS, a więc pacjentek z zaburzoną gospodarką hormonalną, znajduje się podobne genetyczne uwarunkowania jak w przypadku pacjentów z cukrzycą typu 2, Liu i wsp. poszukiwali zmian typu SNP między innymi właśnie w genie *CDKALI* (Liu i wsp., 2010). Niestety takich polimorfizmów wskazujących na znaczenie tego genu w przypadku PCOS nie znaleźli, co jednak do końca nie wyklucza jego wpływu na gospodarkę hormonalną jajników (Liu i wsp., 2010). Ponieważ nie przeprowadzono analizy molekularnej tego genu, jest możliwe także, że delecja u matki ujawniła recesywny charakter allelu ojcowskiego lub też wpłynęła na procesy epigenetyczne. Być może delecja u matki ma wpływ na funkcjonowanie organizmu, w taki sposób, iż pośrednio zwiększa także ryzyko niepowodzeń ciąży, wiążąc się jednocześnie z innymi pozagenetycznymi czynnikami.

W regionie 6q23.3., który także uległ duplikacji nie stwierdzono natomiast obecności żadnych genów; prawdopodobnie ta duplikacja należy to łagodnych CNV. Nie było też jak dotąd żadnych doniesień o mikroduplikacjach w tym regionie.

W przypadku drugiej pary *KP* i *JP* zidentyfikowano trzy zmiany o charakterze CNV. Dwie z nich dotyczyły duplikacji w regionie 4p16.3 i wystąpiły *de novo*, natomiast trzecia zmiana dotyczyła delecji w regionie 5q14.3 i została odziedziczona od ojca. Obie zmiany to unikalne CNV o nieznanym znaczeniu klinicznym. Region duplikacji 4p16.3 to region krytyczny dla zespołu Wolfa-Hirschhorna, ale zmiana wystąpiła poza genami *WHSC1* i *WHSC2* i dotyczyła genów *FGFR3* i *LETMI*. Gen *FGFR3* koduje receptor czynnika wzrostu fibroblastów 3, a mutacje w tym genie są przyczyną występowania, między innymi, dysplazji kostnych (achondroplazja, dysplazja tanatoforyczna, hypochondroplazja), nowotworów (rak szyjki macicy, rak pęcherza, rak jelita grubego), zespołów Crouzona i Muenkego. Gen *LETMI* koduje

białko przezłonowe 1 z motywem zamka leucynowego, występujące w mitochondriach (wewnętrznej błonie mitochondrialnej). Zarówno gen *FGFR3* jak i *LETMI* są genami wrażliwymi na dawkę. Niewiele jest doniesień dotyczących mikroduplikacji w tym regionie. Dotyczą one głównie identyfikacji zmian o charakterze duplikacji u dzieci z opóźnieniem rozwojowym, cechami dysmorfii i wadami wrodzonymi, a w większości obejmują przede wszystkim region krytyczny dla zespołu Wolfa-Hirschhrona – geny *WHSC 1* i *2* (Roselló i wsp., 2009; Hannes i wsp., 2010; Carmany i Bawle, 2011). Tylko jedna praca dotyczy mikroduplikacji obejmującej geny *FGFR3*, *LETMI* oraz *TACC3* (Cyr i wsp., 2011). Cyr i wsp. (2011) opisali chłopca z mikroduplikacją i cechami dysmorfii (między innymi: wielkogłowie, nieregularna pigmentacja tęczówki, nisko osadzone uszy, krótka szyja) oraz opóźnieniem rozwojowym, obejmującą tylko trzy wyżej wymienione geny.

Z pewnością mikroduplikacja tego regionu wpływa na nieprawidłowy rozwój płodowy. U badanych pacjentów wystąpiły dwie utraty późnych ciąż (20 t.c. i 16 t.c.), przy czym w drugiej ciąży u płodu wystąpiła przepuklina mózgowo-rdzeniowa, a być może także inne zmiany morfologiczne, które nie zostały odnotowane. Niestety brak jest informacji o ewentualnych wadach towarzyszących pierwszej ciąży. Dodatkowo, stwierdzono także występowanie, odziedziczonej od ojca, delecji w regionie 15q14.3. Region ten jest związany z występowaniem niepełnosprawności intelektualnej u pacjentów z towarzyszącą epilepsją, ruchami stereotypowymi i wadami mózgu, prawdopodobnie wynikającej z delecji genu *MEF2C* (gen regulatorowy zaangażowany w miogenezę) (Le Meur i wsp., 2010). W przypadku jednak tej pary region delecji nie obejmuje wyżej wymienionego genu. Ponieważ badanie zostało przeprowadzone na kosmówce z ciąży drugiej trudno ocenić, czy w pierwszej ciąży wystąpiły te same zmiany. Niemniej jednak nie można wykluczyć występowania mozaikowości gonadalnej u pacjentki, która łącznie z odziedziczoną od partnera mikrodelecją może wpływać na występowanie niepowodzeń ciąży i zwiększać ryzyko niepowodzeń w kolejnych ciążach.

Wśród par z niepowodzeniami ciąży są takie, które doświadczają poronienia raz, ale też takie, u których do poronień dochodzi wielokrotnie. Pytanie, jakie nasuwa się w tym przypadku, dotyczy tego, czy możliwe jest występowanie zmian typu CNV o charakterze patogennym w każdej kolejnej ciąży? Tym samym można się zastanawiać, czy w przypadku par z niepowodzeniami ciąży występowanie unikalnego CNV o

nieznanym znaczeniu klinicznym jest skutkiem odziedziczenia go od rodziców, czy też pojawia się on jako nowa zmiana? Jeśli wynik badania rodziców pokazuje, że jest to zmiana *de novo*, a u partnerów wystąpiło kilka poronień, to czy w każdym przypadku możemy spodziewać się znalezienia rearanżacji genomowej, czy też w takim przypadku czynniki genetyczne nakładają się z jeszcze innymi czynnikami pozagenetycznymi? Czy jednak należy się spodziewać, że częściej zmiany te będą odziedziczone od któregoś rodzica? W przypadku tego typu badań wykrycie rearanżacji genomowej zawsze powinno być potwierdzane badaniami pary, szczególnie, jeśli CNV nie był wcześniej zidentyfikowany, a więc jego charakter jest nieznanym, a także, jeśli w jego obszarze znajdują się geny.

Rajcan-Separovic i wsp. (2010) jako pierwsi przeprowadzili badania kosmówek oraz badania rodziców w celu identyfikacji rearanżacji genomowych u par z poronieniami nawracającymi wychodząc z założenia, iż w ich przypadku zmiany te powinny być przede wszystkim odziedziczone, ale także prowadzić do uszkodzenia ważnych w rozwoju embrionalnym genów. Badanie 27 poronień pochodzących od 22 par oraz badania 20 partnerów pozwoliło na zidentyfikowanie 11 unikalnych CNV odziedziczonych od rodziców, z czego 2 o potencjalnym patogennym charakterze, ze względu na występujące w tych regionach geny (Rajcan-Separovic i wsp., 2010). Dwa z nich *TIMP2* i *CTNNA3* są inhibitorami inwazji trofoblastu, ulegającymi ekspresji w łożysku, tylko z allelu matczynego, których uszkodzenie może wpływać na niepowodzenia ciąży (Rajcan-Separovic i wsp., 2010).

5.8. Mozaikowość

Występowanie w jednym organizmie linii komórkowych o różnym kariotypie, czyli tak zwana mozaikowość jest jednym z ciekawszych zjawisk cytogenetycznych. Mozaikowość może dotyczyć całego organizmu lub być ograniczona tylko do określonej tkanki. Jednym z typów mozaikowości jest tak zwana ograniczona mozaikowości łożyskowa (*confined placental mosaicism*). Zjawisko to znane jest od 1969 roku, kiedy to Ford opisał mozaikową aneuploidię łożyska myszy (Lebedev, 2011). Także późniejsze badania materiału prowadzone przez Warburton i wsp. (1978) oraz Kalousek i Dilla (1985) potwierdziły występowanie mozaikowości łożyskowej.

Mozaikowość łożyskowa dotyczy około 1-2% przypadków ciąż (Kalousek, Lau, 1992). Prowadzone przez innych autorów badania pokazały, że występowanie

aneuploidii lub nawet triploidii może być ograniczone na kilka sposobów. Różnice mogą dotyczyć trzech struktur – warstwy cytotrofoblastycznej kosmówki, mezodermy pozazarodkowej kosmówki oraz samych tkanek płodowych (Lebedev, 2011). Co ciekawe, kompletna lub mozaikowa trisomia warstwy cytotrofoblastu nie musi wiązać się jednocześnie z trisomią mezodermy lub tkanek płodowych oraz w odwrotnym kierunku prawidłowy kariotyp cytotrofoblastu i mezodermy może występować z trisomią zarodkową/płodową. Lebedev przedstawił, co najmniej siedem różnych podtypów mozaikowości łożyskowej, zgodnie z klasyfikacją podaną przez Vejerslev i Kalousek w 2000 roku (Lebedev, 2011).

Wbrew pozorom ograniczenie występowanie aneuploidii tylko i wyłącznie do tkanek pozazarodkowych (cytotrofoblastu i mezodermy) przy prawidłowym kariotypie płodowym nie oznacza jednocześnie, że pozostaje to bez wpływu na rozwój zarodka/płodu. Zgodnie z badaniami prowadzonymi przez Lestou i Kalousek szczególnie podtyp trzeci mozaikowości łożyskowej (trisomia kompletna lub mozaikowa w cytotrofoblastie i mezodermie przy prawidłowym kariotypie płodowym) wpływa na znaczące, wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrostu płodu i wysoką śmiertelność płodową (Lestou i Kalousek, 1998).

W badaniach własnych główną badaną tkanką była warstwa cytotrofoblastyczna kosmówki z/bez warstwy mezodermy pozazarodkowej. Nie prowadzono badań na tkankach płodowych. W siedmiu przypadkach zaobserwowano występowanie dwóch linii komórkowych – prawidłowych i nieprawidłowych w postaci mozaikowej. Trudno ocenić na ile mozaikowość dotyczyła wyłącznie tkanek pozaembrionalnych i czy wiązała się z prawidłowym/nieprawidłowym kariotypem płodowym, czy też z kontaminacją komórkami matczynymi. W dwóch przypadkach monosomii X (kosmówka nr 116 i nr 120) mozaikowość mogła być pozorna, ponieważ w obu przypadkach materiał pozyskano z fragmentów utrwalonych w parafinie, które często zawierają także komórki matczyne. Równoległe prowadzone badania w Katedrze i Zakładzie Genetyki Medycznej wspólnie z Kliniki Rozrodczości UM w Poznaniu na tkankach utrwalonych z poronień samoistnych pokazują, że nierzadko aneuploidii w postaci mozaikowej towarzyszą różnice w chromosomach płci, co świadczy o wysokiej kontaminacji takich utrwalonych fragmentów materiałem matczynym. W przypadku występowania różnic w chromosomach płci XX/XY w kosmówce nr 23 badania molekularne – MLPA i QF-PCR pokazały, iż mamy do czynienia z czterema allelami, a

przy braku informacji o ciąży bliźniaczej możemy założyć, iż było to związane z kontaminacją materiałem matczynym. W pozostałych przypadkach (kosmówki nr: 29, 42, 51, 54) występowanie nieprawidłowości w postaci mozaikowej w cytotrofoblaście nie wyklucza ich wpływu na wystąpienie poronienia samoistnego.

Z pewnością występowanie mozaikowości łożyskowej typu trzeciego można podejrzewać w przypadku kosmówki nr 131, badanej tylko metodą array CGH, w której zidentyfikowano podwójną trisomię chromosomu pary 16 i 19. Kosmówka pochodziła z ciąży drugiej, w której doszło do martwego porodu w 27 t.c, a płód charakteryzował się symetryczną hipotrofią (występowało także bezwodzie). Poprzednia ciąża tej pacjentki także zakończyła się urodzeniem martwego dziecka z hipotrofią płodową i małowodziem w 30 t.c. Zidentyfikowanie podwójnej trisomii w przypadku tak zaawansowanej ciąży, która występowałaby nie tylko w tkankach łożyskowych, ale i płodowych jest mało prawdopodobne, a obraz kliniczny płodu może wskazywać na typ trzeci mozaikowości, co tłumaczyłoby wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrostu oraz śmierć płodu. Ten podtyp wiąże się z wysokim ryzykiem występowania mozaikowości gonadalnej lub też błędnego systemu kontroli podziałów mitotycznych we wczesnych etapach rozwoju embrionalnego. Hipoteza ta wymagałaby jednak dalszych badań komórek płodowych oraz badań materiału z ciąży pierwszej. Niemniej jednak, w przypadku tej pacjentki możemy mówić o zwiększonym ryzyku wystąpienia niepowodzeń w przyszłości.

5.9. Podsumowanie

W aspekcie przeprowadzonych badań można uznać, że współczesne poradnictwo, opieka i diagnostyka dla par niepowodzeniami ciąży to proces wieloetapowy i skomplikowany. Z pewnością diagnostyka genetyczna, zarówno pary jak i zarodka/płodu stanowi bardzo ważny element tego procesu, szczególnie przy prognozowaniu przyszłych zdarzeń i ocenie ryzyka powtórzenia się niepowodzeniu lub urodzenia dziecka uszkodzonego. Z pewnością także, w świetle współczesnej wiedzy na temat wieloczynnikowego charakteru niepowodzeń ciąży proces ten będzie coraz bardziej zindywidualizowany dla danej pary, adekwatny do jej historii klinicznej. Z pewnością wśród par z niepowodzeniami można wyróżnić kilka podgrup, nie tylko w oparciu o okres, w którym dochodzi do niepowodzenia (tydzień ciąży), ale także przebieg ciąży, dotychczasowe wyniki badań pary, rodowód rodziny, okres starania się

o ciąży, trudności z uzyskaniem ciąży, stosowane metody wspomaganego rozrodu, historie poprzednich ciąż, także tych zakończonych urodzeniem zdrowego dziecka, stan zdrowia i kondycję fizyczną partnerów.

Czynniki genetyczne mają bardzo duży wpływ na przebieg ciąży, dlatego też badania genetyczne, nie tylko wśród par z niepowodzeniami ciąży, ale także badania zarodka/płodu powinny stać się podstawowym standardem diagnostycznym. Oprócz identyfikowania aberracji chromosomowych, nowe techniki molekularne pozwalają na identyfikację zupełnie nowych genów, których uszkodzenie może w istotny sposób wpływać na prawidłowy rozwój zarodkowy/płodowy. Klasyczne techniki cytogenetyczne nadal są niezawodną metodą identyfikacji nosicieli wśród par z niepowodzeniami, ale co raz częściej wymagają dodatkowych, bardzo szczegółowych badań molekularnych, które umożliwiają wykrycie bardzo małych zmian genomowych.

W przypadku badania materiału z poronienia techniki molekularne mają wyraźną przewagę nad badaniami cytogenetycznymi, pozwalając na izolację materiału z tkanek niedzielących się, utrwalonych, a także dają możliwość ponownej diagnostyki, jeśli istnieje podejrzenie wystąpienia dotychczas nieznannej zmiany genetycznej. Badania własne potwierdziły wysoką skuteczność i specyficzność badań takich jak: QF-PCR, MLPA oraz array CGH. Odpowiednie wykorzystanie tych metod pozwala na szybką i skuteczną diagnostykę w wielu przypadkach. Idealną sytuacją byłaby ścisła współpraca ginekologów, genetyków, patomorfologów i diagnostów laboratoryjnych, co umożliwiłoby pobranie właściwego materiału do badań, ocenę płodu pod kątem występowania zmian morfologicznych, dobrania odpowiedniego panelu badań w oparciu o profil kliniczny pary i na koniec skuteczną diagnostykę i adekwatną poradę genetyczną. Metody molekularne powinny zostać wdrożone w laboratoriach diagnostycznych, tak, aby umożliwić szybką i właściwą dla danej pary diagnostykę. Z drugiej strony powinno się umożliwić pacjentom możliwość pobierania i ewentualnego przechowywania materiału z poronienia lub jego utrwalenia w taki sposób, aby można było tego typu badania wykonać.

Prawdopodobne podejście do badań wśród par z niepowodzeniami ciąży będzie się zmieniać. Dotychczasowy podział niepowodzeń ze względu na etiologię, na przykład endokrynologiczną, genetyczną, czy immunologiczną może stracić rację bytu, ze względu na możliwość jednoczesnego występowania kilku czynników ryzyka u danej pary, które nie w dość, że wzajemnie się nie wykluczają, to wręcz mogą wynikać

jedne z drugich. Gleicher i wsp. (2011) postawili hipotezę o znaczącym wpływie chorób autoimmunologicznych u kobiet z poronieniami samoistnymi na występowanie aneuploidii płodowej. Podobnie badanie polimorfizmów genetycznych nie wyklucza istnienia innych zmian o charakterze aberracji chromosomowych, czy rearanżacji typu CNV. Na przykład Kim i wsp. (2011) znaleźli zależność między polimorfizmem genu *MTHFR* i występowaniem aneuploidii płodowych. Slim i wsp. (2011) odkryli powiązania pomiędzy występowaniem mutacji w genie *NLRP7* i triploidią płodową, spowodowaną dispermią. Bardzo prawdopodobne, że szybki rozwój i szerokie zastosowanie metod opartych na mikromacierzach, takich jak array CGH, ale też łączonych typu MLPA do mikromacierzy pozwolą na identyfikowanie wielu zmian genetycznych oraz polimorfizmów potencjalnie zwiększającym ryzyko poronienia u danej pary (Yan i wsp., 2011).

W chwili obecnej nie istnieją żadne zintegrowane testy przesiewowe w kierunku jednoczesnej identyfikacji mutacji genowych w kluczowych dla procesu rozwojowego genach. Z pewnością szybki postęp technologiczny oraz naukowy umożliwi poszerzenie badań o testy molekularne, identyfikujące zmiany w tych regionach, które przyczyniają się do występowania nosicielstwa u rodziców i niepowodzeń kolejnych ciąży, ale także wskazując geny, których warianty mogą zwiększać ryzyko niepowodzeń kolejnych ciąży.

Podsumowując, przyszłością dla par z niepowodzeniami ciąży i skutecznego poradnictwa genetycznego są zintegrowane testy pozwalające na analizę wielu aspektów genetycznych, mogących przyczyniać się do niepowodzeń ciąży, oparte o nowoczesne techniki molekularne. Dotychczasowe standardowe procedury nie pozwalają na znalezienie odpowiedzi dotyczącej etiologii niepowodzenia u wielu par, stąd powinno się rozważyć nowe podejście do tego zagadnienia. Natomiast badanie materiału z poronienia w kierunku aberracji chromosomowych powinno stać się standardem postępowania u par z niepowodzeniami ciąży i powinno być przeprowadzane jako pierwsze badanie u pary i to niezależnie od wykonania badania kariotypu partnerów, a w miarę poznawania molekularnego podłoża niepowodzeń ciąży, także indywidualnie dobrane badanie molekularne poronionego zarodka/płodu oraz partnerów.

6. WNIOSKI

1. W co najmniej 50% przypadków poronień samoistnych przyczyną poronień jest aberracja chromosomowa u zarodka/płodu, przy czym najczęstszymi aberracjami są trisomie chromosomów autosomalnych, w tym trisomia chromosomów pary 16 i 22.
2. Nosicielstwo aberracji chromosomowej u partnerów nie przesądza o tym, że to jedyna przyczyna poronień.
3. Metody molekularne, takie jak: FISH, QF-PCR, MLPA i array CGH pozwalają na efektywną i szybką diagnostykę genetycznych przyczyn niepowodzeń ciąży, a tym samym mogą stanowić samodzielny lub kompleksowy test diagnostyczny materiału z poronienia.
4. Metoda array CGH pozwala na zidentyfikowanie nie tylko najczęstszych aberracji chromosomowych, ale także nowych rearanżacji genomowych u par z niepowodzeniami ciąży, które mogą się wiązać z problemami rozrodczymi tych par.
5. Geny *FGFR3*, *LETMI* i *CDKALI* mogą być genami kandydującymi, których mutacje mają związek z niepowodzeniami ciąży.
6. Badanie genetyczne materiału z poronienia jest ważnym i niejednokrotnie rozstrzygającym badaniem diagnostycznym u par z niepowodzeniami ciąży i powinno stać się standardem w diagnostyce genetycznej u tej grupy pacjentów. Diagnostyka genetyczna w tej grupie pacjentów powinna być szeroka i różnorodna.

7. STRESZCZENIE

Celem prowadzonych badań było ustalenie rzeczywistej częstości występowania aberracji chromosomowych u zarodka/płodu, jako przyczyny utraty ciąży i identyfikacja wybranych chorób genetycznych samoistnie poronionego/obumarłego zarodka/płodu. Projekt zakładał zastosowanie metod biologii molekularnej, takich jak MLPA, QF-PCR i FISH oraz techniki opartej na mikromacierzach DNA – array CGH. Badania miały służyć opracowaniu skutecznej strategii diagnostyki genetycznej w przypadku par z niepowodzeniami ciąży.

Badania prowadzono na kosmówce pobranej od pacjentek z niepowodzeniami ciąży, u których możliwe było pobranie kosmówki bezpośrednio po poronieniu lub w postaci utrwalonych w parafinie preparatów. Łącznie zebrano materiał od 138 kobiet, przy czym w 5 przypadkach udało się uzyskać kosmówki z dwóch kolejnych poronień, co łącznie stanowiło 143 kosmówki. W przypadku 8 kosmówek materiał pochodził z kosmówki utrwalonej, w pozostałych 135 przypadkach była to kosmówka bezpośrednio pobrana po niepowodzeniu ciąży. W przypadku 122 kosmówek przeprowadzono badania porównawcze metodami FISH, MLPA i QF-PCR w celu identyfikacji aberracji chromosomowych. W przypadku 21 kosmówek badanie przeprowadzono tylko metodą array CGH, w celu identyfikacji zmian zarówno o charakterze liczbowym, strukturalnym, jak i submikroskopowych aberracji chromosomowych. Dodatkowo metodą array CGH przebadano trzy kosmówki wybrane z grupy przebadanych wcześniej 122 kosmówek.

Badania przeprowadzone różnymi metodami (FISH, QF-PCR, MLPA i array CGH) pozwoliły na zidentyfikowanie nieprawidłowości genetycznych w 67 kosmówkach ze 143 badanych, co stanowi 47% przypadków. Były to aberracje chromosomowe o charakterze liczbowym i strukturalnym oraz submikroskopowe rearanżacje genomowe typu delekcji/duplikacji. Najczęstszymi zmianami były aberracje liczbowe chromosomów. Spośród 67 nieprawidłowości 51% stanowiły trisomie chromosomów autosomalnych (30 trisomii pojedynczych chromosomów i 4 trisomie wielokrotne), 18% monosomia chromosomu X (12 przypadków), 15% triploidie (10 przypadków), 3% trisomie chromosomów płci (2 przypadki – XYY w kariotypie męskim i XXX w kariotypie żeńskim), 3% monosomie chromosomu X z trisomią

chromosomu autosomalnego (2 przypadki – monosomia X z trisomią 16 oraz monosomia X z trisomią 18), 1% mozaika XX/XY (1 przypadek) oraz 9% aberracje strukturalne chromosomów (6 przypadków, w tym 2 o charakterze submikroskopowym).

Zidentyfikowane aberracje strukturalne chromosomów to: duplikacja 18q (duplikacja całego długiego ramienia chromosomu pary 18), delecja 6q i duplikacja 9q, delecja 6q i duplikacja 2p oraz dodatkowy chromosom markerowy pochodzący z krótkich ramion chromosomów akrocentrycznych 14 lub 22 – mar 14/22. Wszystkie 4 nierównoważone aberracje strukturalne zostały odziedziczone od jednego z rodziców – nosicieli. Dodatkowo, dzięki badaniu array CGH udało się zidentyfikować w dwóch przypadkach rearanżacji genomowo o charakterze delecji i duplikacji. Odkryte zmiany nie były wcześniej scharakteryzowane. W pierwszym przypadku zidentyfikowano delecję w chromosomie pary 6 w regionie 6p22.3 oraz w tym samym chromosomie duplikację w regionie 6q23.3. W regionie objętym delecją znajduje się gen *CDKALI* o nieznannej funkcji, w regionie duplikacji nie ma genów kodujących białka. Analiza mikromacierzowa rodziców wykazała matczyne pochodzenie obu zmian – delecji i duplikacji. Zmiany zostały odziedziczone od matki w niezmienionej postaci. U ojca nie zidentyfikowano żadnych zmian o charakterze łagodnym lub patogennym. W drugim przypadku zidentyfikowano również dwie zmiany: pierwszą o charakterze duplikacji w regionie 4p16.3 oraz delecję w chromosomie pary 5 -5q14. W regionie delecji nie ma genów kodujących białka, natomiast w regionie duplikacji znajdują się dwa geny *FGFR3* oraz *LETMI*. Dodatkowo wykonane badania metodą MLPA potwierdziły duplikację w genie *FGFR3*. Przeprowadzona analiza u obojga partnerów ujawniła odziedziczenie delecji 5q14.3 od ojca w niezmienionej postaci. U matki nie znaleziono żadnych rearanżacji o charakterze patogennym lub łagodnym. Tym samym duplikacja 4p16.3 okazała się zmianą *de novo*.

W prowadzonych badaniach, na podstawie uzyskanych danych klinicznych, nie zidentyfikowano chorób o charakterze jednogenowym, które mogłyby być przyczyną niepowodzenia ciąży

Dla oceny skuteczności, specyficzności i czułości stosowanych metod porównano wyniki uzyskane metodami FISH, QF-PCR i MLPA P095 w przypadku przebadanych 122 kosmówek. W przypadku metody FISH wynik udało się uzyskać w przypadku 119 kosmówek (98%), metody QF-PCR 118 kosmówek (97%), a MLPA

P095 119 kosmówek (98%). W porównaniu do metody FISH czułość metod zarówno QF-PCR jak i MLPA P095 wynosiła 96%. Najwięcej nieprawidłowości chromosomowych zidentyfikowano stosując metodę FISH, dzięki której zidentyfikowano 40% nieprawidłowości (48 przypadków). Metoda QF-PCR pozwoliła na wykrycie nieprawidłowości w 37% badanych kosmówek (44 przypadki). W przypadku zastosowania zestawu MLPA P095 nieprawidłowe wyniki uzyskano tylko w 24% kosmówek (28 przypadków). W przypadku metody array CGH zastosowanej w przypadku 24 kosmówek nieprawidłowe wyniki uzyskano w 54% przypadków (13 kosmówek), były to aberracje zarówno o charakterze liczbowym jak i submikroskopowych delecji/duplikacji.

Przeprowadzone badania potwierdziły, iż aberracje chromosomowe są przyczyną co najmniej 50% poronień samoistnych u zarodka/płodu, przy czym największy udział mają zmiany liczbowe: monosomia chromosomu X, triploidia oraz trisomie chromosomów pary 16 i 22. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi uzyskanymi w badaniach innych populacji. Badania potwierdziły także skuteczność wszystkich stosowanych metod, które mogą stanowić podstawę algorytmu diagnostycznego w przypadku par z niepowodzeniami ciąży. Badania dowiodły również, że submikroskopowe rearanżacje genomowe mogą być związane z niepowodzeniami ciąży, zarówno wczesnych (przed 12 tygodniem), jak i późnych (po 12 tygodniu) oraz jak istotne są badania rodziców w kierunku dziedziczenia zmian genomowych u zarodka/płodu. Zastosowanie nowoczesnych metod diagnostycznych, takich jak array CGH pozwala na poszerzenie badań i uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat genetycznych przyczyn niepowodzeń ciąży.

8. SUMMARY

The aim of the study was to assess the actual frequency of chromosomal aberrations in the embryo/fetus as a cause of pregnancy loss and identification of selected genetic disorders of the spontaneously miscarried/dead embryo/fetus. The project was determined to use methods of molecular biology, such as MLPA, QF-PCR and FISH as well as DNA microarray-based technique – array CGH. The analyses were used to develop effective strategy of genetic diagnostics for couples with pregnancy failure.

The research carried out on chorionic villus sample and included females with pregnancy failure in whom it was possible to collect chorion preserved directly after miscarriage or in the form of paraffin-embedded placenta fragments. In total, material was collected from 138 females, and in 5 of them it was possible to obtain chorions from two subsequent miscarriages, which altogether resulted in 143 chorions. In the case of 8 chorions, material was derived from preserved chorions, and in other 135 cases chorion was collected directly after pregnancy failure. Comparative analyses were carried out for 122 chorions with the use of FISH, MLPA and QF-PCR methods to identify chromosomal aberrations. In the case of 21 chorions, the material was analyzed only with array CGH method in order to identify changes both in the number, structure and submicroscopic chromosomal aberrations. In addition, array CGH was used to examine three chorions selected from a group of previously analyzed 122 chorions.

Different methods were used (FISH, QF-PCR, MLPA and array CGH) to identify genetic abnormalities in 67 chorions out of 143 examined ones, which accounts for 47% of cases. They included chromosomal aberrations concerning the number, structure and deletion/duplication submicroscopic genomic rearrangements. The most frequent changes were numerical chromosomal aberrations. Among 67 abnormalities, 51% were trisomies of autosomal chromosomes (30 trisomies of single chromosomes and 4 multiple trisomies), 18% – monosomy X (12 cases), 15% – triploidies (10 cases), 3% – sex chromosome trisomies (2 cases – XYY male karyotype and XXX female karyotype), 3% – monosomies X with autosomal chromosome trisomy (2 cases – monosomy X with trisomy 16 and monosomy X with trisomy 18), 1% – XX/XY mosaic

(1 case) and 9% – structural chromosomal aberrations (6 cases, including 2 submicroscopic changes).

Identified structural chromosomal aberrations included: duplication 18q (duplication of the long arm of chromosome 18), deletion 6q and duplication 9q, deletion 6q and duplication 2p as well as additional marker chromosome deriving from short arms of acrocentric chromosomes 14 or 22 – mar 14/22. All the 4 imbalanced structural aberrations were inherited from one parent – the carrier. Additionally, owing to array CGH, it was possible to identify deletion and duplication genomic rearrangements in two cases. The discovered changes have not been previously described by other authors. In the first case deletion in chromosome 6 involving the 6p22.3 region was identified as well as duplication in the same chromosome in the 6q23.3 region. The deletion region includes *CDKALI* gene, whose function is unknown, the duplication region does not comprise protein-encoding genes. Microarray analysis of parents showed that the both changes – deletion and duplication, are of maternal origin. They were inherited from the mother in unaltered form. No benign or pathogenic changes were found in the father. In the second case, also two changes were identified: duplication in the 4p16.3 region and deletion in chromosome 5 -5q14. The deletion region does not include protein-encoding genes, while the duplication region comprises two genes: *FGFR3* and *LETM1*. What is more, analyses carried out with the use of MLPA method confirmed duplication in *FGFR3* gene. The analysis of the both partners revealed inheritance of deletion 5q14.3 from the father in unaltered form. No pathogenic or benign rearrangements were found in the mother. Thus duplication 4p16.3 turned out to be a *de novo* change.

No monogenic diseases which could have been the cause of pregnancy failure were identified in the research on the basis of the obtained clinical data.

In order to assess the effectiveness, specificity and sensitivity of the used methods, the results were compared, obtained with FISH, QF-PCR and MLPA P095 for examined 122 chorions. In the case of FISH method, results were obtained for 119 chorions (98%), QF-PCR method produced results for 118 chorions (97%), while MLPA P095 for 119 chorions (98%). When compared to FISH method, sensitivity of both QF-PCR and MLPA P095 amounted to 96%. The greatest number of chromosomal abnormalities was found with application of FISH, which identified 40% of abnormalities (48 cases). QF-PCR method enabled to detect abnormalities in 37% of

examined chorions (44 cases). In the case of using the MLPA P095 kit, abnormal results were noted only in 24% of chorions (28 cases). Array CGH method was used for 24 chorions and gave abnormal results in 54% of cases (13 chorions), i.e. both numerical aberrations and submicroscopic deletions/duplications.

The research confirmed that chromosomal aberrations account for at least 50% of causes of pregnancy failure, and numerical changes are predominant: monosomy X, triploidies and trisomies of chromosomes 16 and 22. The obtained results are in accordance with data from researches on other populations. The research confirmed also effectiveness of all the applied methods, which may be a basis of diagnostic algorithm in the case of couples experiencing pregnancy failure. It also proved that submicroscopic genomic rearrangements may be associated with failure of both early (before the 12th week) and late (after the 12th week) pregnancy and demonstrated significance of examination of parents for inheritance of genomic changes of the embryo/fetus. Employment of modern diagnostic methods, such as array CGH, enables to extend research on and broaden knowledge of genetic causes of pregnancy failure.

9. SPIS TABEL I RYCIŃ

Tabele

Tabela .1 Wybrane polimorfizmy genetyczne analizowane u pacjentów z niepowodzeniami ciąży (Suzumori, Sugiura-Ogasawara, 2010).	22
Tabela 2. Odczynniki stosowane w badaniach.....	40
Tabela 3. Roztwory i podłoża stosowane w badaniach	40
Tabela 4. Rodzaje sond stosowanych do fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ.	47
Tabela 5. Sondy subtelerowe Vysis wykorzystane w metodzie FISH	49
Tabela 6. Etapy reakcji MLPA	51
Tabela 7. Zestaw MLPA P095. W Tabeli przedstawiono wielkość produktu, <i>locus</i> badanego genu oraz badany ekson.	53
Tabela 8. Zestaw MLPA P036. W Tabeli przedstawiono wielkość produktu, <i>locus</i> badanego genu oraz badany ekson.	54
Tabela 9. Zestaw MLPA P070. W Tabeli przedstawiono wielkość produktu, <i>locus</i> badanego genu oraz badany ekson.	55
Tabela 10. Zestaw MLPA P245. W Tabeli przedstawiono wielkość produktu, <i>locus</i> badanego genu oraz badany ekson.....	57
Tabela 11. Fragment zestawu MLPA P373. W Tabeli przedstawiono geny analizowane w regionie krytycznym dla Wolfa-Hirschhorna 4p16.3.	58
Tabela 12. Markery STR stosowane w reakcji QF-PCR.....	59
Tabela 13. Skład mieszaniny reakcyjnej w metodzie QF-PCR.....	60
Tabela 14. Warunki reakcji QF-PCR.....	60
Tabela 15. Wyniki badań materiału po poronieniu, uzyskanego od par z niepowodzeniami ciąży. W Tabeli przedstawiono również informacje dotyczące czasu trwania ciąży oraz kolejności ciąży, wieku matki w chwili utraty ciąży, kariotypu obojga partnerów oraz informacji uzyskanych na podstawie analizy rodowodu.	64
Tabela 16. Wyniki badania kariotypu u par z niepowodzeniami ciąży.	67
Tabela 17. Wyniki badania aberracji chromosomowych metodą FISH z sondami dla chromosomów pary 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y. Kolorem szarym zaznaczono wyniki nieprawidłowe uzyskane dla poszczególnych sond.	68
Tabela 18. Wyniki analizy aberracji liczbowych chromosomów pary 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y metodą QF-PCR. Kolorem szarym zaznaczono nieprawidłowe wartości uzyskane dla poszczególnych markerów.	73
Tabela 19. Częstość występowania heterozygotycznych alleli w <i>locus</i> : D13S631, D15S123, D16S539, D18S535, D21S1414, D22S280 i DXS1002 ustalona na podstawie wyników badań kosmówek metodą QF-PCR.	74
Tabela 20. Wyniki MLPA P095. U góry przedstawiono zidentyfikowaną nieprawidłowość oraz <i>locus</i> dla każdej sondy pojedynczego chromosomu. Kolorem szarym zaznaczono prawidłowe wartości uzyskane dla poszczególnych sond w tym samym chromosomie.....	78
Tabela 21 Nieprawidłowe wyniki uzyskane metodą array CGH.	122
Tabela 22 Porównanie wyników uzyskanych metodami FISH, QF-PCR i MLPA P095. Szarym kolorem wyróżniono te próby, których wyniki różniły się.	138
Tabela 23 Porównanie skuteczności metody QF-PCR i MLPA P095.....	140

Ryciny

Ryc. 1. Schemat reakcji MLPA (wg Łaczmańska i Łaczmański, 2009).	37
Ryc. 2. FISH z sondami centromerowymi i specyficznymi do jąder interfazowych trofoblastu.	70
Ryc. 3. FISH z sondami centromerowymi i specyficznymi do jąder interfazowych trofoblastu.	71
Ryc. 4. Fragment analizy QF-PCR z markerami STR (Peak Scanner Software v.1.0).	75
Ryc. 5. Fragment analizy QF-PCR z markerami STR (Peak Scanner Software v.1.0).	76
Ryc. 6. Fragment analizy QF-PCR z markerami STR (Peak Scanner Software v.1.0).	77
Ryc. 7. Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007).	79
Ryc. 8. Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0).	80
Ryc. 9. Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007).	80
Ryc. 10. Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0).	81
Ryc. 11. Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007).	81
Ryc. 12. Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0).	82
Ryc. 13. Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007).	82
Ryc. 14. Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0).	83
Ryc. 15. Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007).	84
Ryc. 16. Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0).	84
Ryc. 17. Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007).	85
Ryc. 18. Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0).	85
Ryc. 19. Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007).	86
Ryc. 20. Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0).	86
Ryc. 21. Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007).	87
Ryc. 22. Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0).	88
Ryc. 23. Fragment analizy wyniku MLPA (Microsoft Office Excel 2007).	89
Ryc. 24. Fragment analizy MLPA z zestawem P095 (Peak Scanner Software v.1.0).	89
Ryc. 25. Fragment analizy MLPA P095 (Microsoft Excel 2007).	90
Ryc. 26. Fragment analizy MLPA P095 (Microsoft Excel 2007).	90
Ryc. 27. Fragment analizy MLPA P036 (Microsoft Excel 2007).	93
Ryc. 28. Fragment analizy MLPA P070 (Microsoft Excel 2007).	94
Ryc. 29. Fragment analizy MLPA z zestawem P036 i P070 (Peak Scanner Software v.1.0).	95
Ryc. 30. FISH do jąder interfazowych z sondami subtelomerowymi do ramion p i q chromosomu pary 7.	96
Ryc. 31. Fragment analizy MLPA z zestawem P036 i P070 (Peak Scanner Software v.1.0).	97
Ryc. 32. FISH do jąder interfazowych z sondami subtelomerowymi do ramion p i q chromosomu pary 8.	97
Ryc. 33. Fragment analizy MLPA z zestawem P036 i P070 (Peak Scanner Software v.1.0).	98
Ryc. 34. FISH do jąder interfazowych z sondami subtelomerowymi do ramienia q chromosomu pary 14.	99
Ryc. 35. Fragment analizy MLPA z zestawem P036 i P070 (Peak Scanner Software v.1.0).	100
Ryc. 36. FISH do jąder interfazowych z sondami subtelomerowymi do ramienia q chromosomu pary 20.	100
Ryc. 37. Fragment analizy MLPA P245 (Microsoft Excel 2007).	102
Ryc. 38. Rodowód pary <i>BK</i> i <i>WK</i> . Strzałkami zaznaczono pacjentów oraz trzecie poronienie samoistne (badana kosmówka).	105
Ryc. 39. Translokacja wzajemna u pacjenta <i>WK</i> .	105
Ryc. 40. Fragment analizy MLPA P036 i P070 (Peak Scanner Software v. 1.0).	106
Ryc. 41. FISH z sondami subtelomerowymi do jąder interfazowych.	107
Ryc. 42. Translokacja wzajemna u pacjenta <i>DK</i> .	109

Ryc. 43 Rodowód pacjentów <i>MK</i> i <i>DK</i>	110
Ryc. 44 Fragment analizy MLPA P036 i P070 (Peak Scanner Software v.1.0).....	111
Ryc. 45 FISH z sondami subtelomerowymi do jąder interfazowych.....	112
Ryc. 46 Translokacja wzajemna u pacjentki <i>MB</i>	113
Ryc. 47 Fragment analizy MLPA P036 i P070 (Peak Scanner Software v.1.0).....	114
Ryc. 48 FISH z sondami subtelomerowymi do jąder interfazowych.....	115
Ryc. 49 Chromosom markerowy zidentyfikowany podczas analizy kariotypu u pacjentki <i>BK</i> (strzałki).....	116
Ryc. 50 Rodowód pacjentów <i>BK</i> i <i>RK</i> . Strzałkami zaznaczono pacjentkę oraz badane poronienie.....	117
Ryc. 51 Analiza FISH z sondą centromerową do chromosomu pary 14 i 22.....	118
Ryc. 52 Fragment analizy array CGH w programie Genoglyphix.....	123
Ryc. 53 Fragment analizy array CGH w programie Genoglyphix.....	125
Ryc. 54 Fragment analizy array CGH w programie Genoglyphix.....	126
Ryc. 55 Fragment analizy MLPA z zestawem P373 (Peak Scanner Software v.1.0).....	126

10. PIŚMIENNICTWO

1. Acien P. Incidence of müllerian defects in fertile and infertile women. *Hum Reprod* 1997; 12(7): 1372–1376.
2. Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J. Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn.* 1997; 17(13): 1299-311.
3. Adinolfi M, Sherlock J, Pertl B. Rapid detection of selected aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Bioessays.* 1995; 17(7):661-4.
4. Allison JL, Schust DJ. Recurrent first trimester pregnancy loss: revised definitions and novel causes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009; 16(6):446-50.
5. Ansermet F, Lespinasse J, Gimelli S, Béna F, Paoloni-Giacobino A. Mild intellectual disability associated with a progeny of father-daughter incest: genetic and environmental considerations. *J Child Sex Abus.* 2011; 19(3): 337-44.
6. Association for Clinical Cytogenetics. QF-PCR for the diagnosis of aneuploidy best practice guidelines (2007) v2.01. *Professional Guidelines for Clinical Cytogenetics and Clinical Molecular Genetics*; 2007: 1-21.
7. Baek KH. Aberrant gene expression associated with recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod.* 2004 May;10(5):291-7.
8. Bansal AS, Bajardeen B, Shehata H, Thum MY. Recurrent miscarriage and autoimmunity. *Expert Rev Clin Immunol.* 2011; 7(1):37-44.
9. Banzai M, Sato S, Matsuda H, Kanasugi H. Trisomy 1 in a case of a missed abortion. *J Hum Genet.* 2004;49(7):396-7.
10. Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL (red.). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual.* Lippincott- Raven, Philadelphia – New York 1997: 1-688.
11. Bates SM. Consultative hematology: the pregnant patient pregnancy loss. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010; :166-72.
12. Beever CL, Stephenson MD, Peñaherrera MS, Jiang RH, Kalousek DK, Hayden M, Field L, Brown CJ, Robinson WP. Skewed X-chromosome inactivation is associated with trisomy in women ascertained on the basis of recurrent spontaneous abortion or chromosomally abnormal pregnancies. *Am J Hum Genet.* 2003; 72(2):399-407.
13. Bell KA, Van Deerlin PG, Feinberg RF, du Manoir S, Haddad BR. Diagnosis of aneuploidy in archival, paraffin-embedded pregnancy-loss tissues by comparative genomic hybridization. *Fertil Steril.* 2001; 75(2):374-9.
14. Bell KA, Van Deerlin PG, Haddad BR, Feinberg RF. Cytogenetic diagnosis of "normal 46,XX" karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading. *Fertil Steril.* 1999; 71(2): 334-41.
15. Benkhalifa M, Kasakyan S, Clement P, Baldi M, Tachdjian G, Demiroglu A, Gurgan T, Fiorentino F, Mohammed M, Qumsiyeh MB. Array comparative genomic hybridization

- profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro. *Prenat. Diagn.* 2005; 25(10):894-900.
16. Benzacken B, Carbillon L, Dupont C, Siffroi JP, Monier-Gavelle F, Bucourt M, Uzan M, Wolf JP. Lack of submicroscopic rearrangements involving telomeres in reproductive failures. *Hum Reprod.* 2002; 17(5): 1154-7.
 17. van den Berg MM, van Maarle MC, van Wely M, Goddijn M. Genetics of early miscarriage. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822(12): 1951-1959.
 18. Berghella M. Recurrent pregnancy loss. W: *Obstetric Evidence Base Guidelines* (red. Berghella V). Informa Healthcare, UK, 2007: 109-115.
 19. Bocian E. Przyszłość prenatalnych badań cytogenetycznych: szybki test na aneuploidię czy pełny kariotyp. *Ginekol Pol.* 2007; 78(11):881-7.
 20. Brackley KJ, Kilby MD, Morton J, Whittle MJ, Knight SJ, Flint J. A case of recurrent congenital fetal anomalies associated with a familial subtelomeric translocation. *Prenat Diagn.* 1999; 19(6): 570-4.
 21. Bremer A, Schoumans J, Nordenskjöld M, Anderlid BM, Giacobini M. An interstitial deletion of 7.1Mb in chromosome band 6p22.3 associated with developmental delay and dysmorphic features including heart defects, short neck, and eye abnormalities. *Eur J Med Genet.* 2009; 52(5): 358-62.
 22. Bruno DL, Burgess T, Ren H, Nouri S, Pertile MD, Francis DI, Norris F, Kenney BK, Schouten J, Andy Choo KH, Slater HR. High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy. *Am J Med Genet A.* 2006; 140(24): 2786-93.
 23. Bryndorf T, Christensen B, Vad M, Parner J, Brocks V, Philip J. Prenatal detection of chromosome aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: experience with 2000 uncultured amniotic fluid samples in a prospective preclinical trial. *Prenat Diagn.* 1997; 17(4): 333-41.
 24. Bryndorf T, Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Karhu R, Kallioniemi A, Christensen B, Lundsteen C, Philip J. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am. J. Hum. Genet.* 1995; 57(5):1211-20.
 25. Carmany EP, Bawle EV. Microduplication of 4p16.3 due to an unbalanced translocation resulting in a mild phenotype. *Am J Med Genet A.* 2011; 155A(4): 819-24.
 26. Carp H, Guetta E, Dorf H, Soriano D, Barkai G, Schiff E. Embryonic karyotype in recurrent miscarriage with parental karyotypic aberrations. *Fertil Steril.* 2006; 85(2): 446-50.
 27. Carr DH. Genetic basis of abortion. *Annu Rev Genet.* 1971;5:65-80.
 28. Carvalho B, Dória S, Ramalho C, Brandão O, Sousa M, Matias A, Barros A, Carvalho F. Aneuploidies detection in miscarriages and fetal deaths using multiplex ligation-dependent probe amplification: an alternative for speeding up results? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010; 153(2): 151-5.
 29. Christiansen OB. A fresh look at the causes and treatments of recurrent miscarriage, especially its immunological aspects. *Hum Reprod.* 1996; 2(4):271-93.

30. Cirigliano V, Sherlock J, Conway G, Quilter C, Rodeck C, Adinolfi M. Rapid detection of chromosomes X and Y aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Prenat Diagn.* 1999; 19(12): 1099-103.
31. Coe BP, Ylstra B, Carvalho B, Meijer GA, Macaulay C, Lam WL. Resolving the resolution of array CGH. *Genomics.* 2007; 89(5):647-53.
32. Connor M, Ferguson-Smith M. *Podstawy genetyki medycznej.* PZWL, Warszawa 1999: 1-279.
33. Cyr AB, Nimmakayalu M, Longmuir SQ, Patil SR, Keppler-Noreuil KM, Shchelochkov OA. A novel 4p16.3 microduplication distal to WHSC1 and WHSC2 characterized by oligonucleotide array with new phenotypic features. *Am J Med Genet A.* 2011; 155A(9): 2224-8.
34. Daher S, Mattar R, Gueuvoghlian-Silva BY, Torloni MR. Genetic polymorphisms and recurrent spontaneous abortions: an overview of current knowledge. *Am J Reprod Immunol.* 2012; 67(4):341-7.
35. Daniely M, Aviram-Goldring A, Barkai G, Goldman B. Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Hum Reprod.* 1998; 13(4):805-9.
36. Dejmek J, Vojtassák J, Malová J. Cytogenetic analysis of 1508 spontaneous abortions originating from south Slovakia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1992; 46(2-3): 129-36.
37. Delhanty JD. Inherited aneuploidy: germline mosaicism. *Cytogenet Genome Res.* 2011;133(2-4):136-40.
38. Diego-Alvarez D, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Gonzalez-Gonzalez C, Rodriguez de Alba M, Ayuso C, Ramos-Corrales C, Lorda-Sanchez I. Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages. *Hum Reprod.* 2005; 20(5): 1235-43.
39. Diego-Alvarez D, Ramos-Corrales C, Garcia-Hoyos M, Bustamante-Aragones A, Cantalapiedra D, Diaz-Recasens J, Vallespin-Garcia E, Ayuso C, Lorda-Sanchez I. Double trisomy in spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach. *Hum Reprod.* 2006; 21(4):958-66.
40. Diego-Alvarez D, Rodriguez de Alba M, Cardero-Merlo R, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C, Lorda-Sanchez I. MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. *Prenat Diagn.* 2007; 27(8):765-71.
41. Donaghue C, Mann K, Docherty Z, Mazzaschi R, Fear C, Ogilvie C. Combined QF-PCR and MLPA molecular analysis of miscarriage products: an efficient and robust alternative to karyotype analysis. *Prenat Diagn.* 2010; 30(2): 133-7.
42. Dória S, Carvalho F, Ramalho C, Lima V, Francisco T, Machado AP, Brandão O, Sousa M, Matias A, Barros A. An efficient protocol for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous miscarriages or foetal deaths. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009; 147(2):144-50.

43. Dudarewicz L, Holzgreve W, Jeziorowska A, Jakubowski L, Zimmermann B. Molecular methods for rapid detection of aneuploidy. *J Appl Genet.* 2005; 46(2):207-15.
44. Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update.* 2000; 6(1):93-105.
45. Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Epplen JT. A prospective comparative study on fluorescence in situ hybridization (FISH) of uncultured amniocytes and standard karyotype analysis. *Prenat Diagn.* 1998; 18(9): 901-6.
46. ESHRE Capri Workshop Group. Genetic aspects of female reproduction. *Hum Reprod Update.* 2008; 14(4):293-307.
47. Exalto N, Christiansen OB, Farquharson RG, Jauniaux E. Early pregnancy failure: a review. *Eur Clinics Obstet Gynaecol.* 2007; 2:171-179.
48. Fan YS, Zhang Y. Subtelomeric translocations are not a frequent cause of recurrent miscarriages. *Am J Med Genet.* 2002; 109(2): 154.
49. Farquharson RG, Jauniaux E, Exalto N; ESHRE Special Interest Group for Early Pregnancy (SIGEP). Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events. *Hum Reprod.* 2005; 20(11):3008-11.
50. Fogerty AE, Connors JM. Management of inherited thrombophilia in pregnancy. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009; 16(6):464-9.
51. Ford JH, Wilkin HZ, Thomas P, McCarthy C. A 13-year cytogenetic study of spontaneous abortion: clinical applications of testing. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1996; 36(3): 314-8.
52. Forozan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi OP. Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet.* 1997; 13(10):405-9.
53. Franssen MT, Korevaar JC, Tjoa WM, Leschot NJ, Bossuyt PM, Knegt AC, Suykerbuyk RF, Hochstenbach R, van der Veen F, Goddijn M. Inherited unbalanced structural chromosome abnormalities at prenatal chromosome analysis are rarely ascertained through recurrent miscarriage. *Prenat Diagn.* 2008; 28(5): 408-11.
54. Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1969; 63(2):378-83.
55. García-Enguádanos A, Calle ME, Valero J, Luna S, Domínguez-Rojas V. Risk factors in miscarriage: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002; 102(2):111-9.
56. Gardella JR, Hill JA. Environmental toxins associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med.* 2000;18(4):407-24.
57. Gil-Villa AM, Cardona-Maya W, Agarwal A, Sharma R, Cadavid A. Assessment of sperm factors possibly involved in early recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2010; 94(4):1465-72.
58. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Do chromosomally abnormal pregnancies really preclude autoimmune etiologies of spontaneous miscarriages? *Autoimmun Rev.* 2011; 10(6): 361-3.

59. Goddijn M, Joosten JH, Knecht AC, van derVeen F, Franssen MT, Bonse GJ, Leschot NJ. Clinical relevance of diagnosing structural chromosome abnormalities in couples with repeated miscarriage. *Hum Reprod.* 2004; 19(4): 1013-7.
60. Goddijn M, Leschot NJ. Genetic aspects of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2000; 14(5):855-65.
61. Greco E, Romano S, Iacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi MG, Ubaldi F, Rienzi L, Tesarik J. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod.* 2005; 20(9):2590-4.
62. Hanna CW, Bretherick KL, Gair JL, Fluker MR, Stephenson MD, Robinson WP. Telomere length and reproductive aging. *Hum Reprod.* 2009; 24(5):1206-11.
63. Hannes F, Drozniewska M, Vermeesch JR, Haus O. Duplication of the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region causes neurodevelopmental delay. *Eur J Med Genet.* 2010; 53(3): 136-40.
64. Henderson DJ, Sherman LS, Loughna SC, Bennett PR, Moore GE. Early embryonic failure associated with uniparental disomy for human chromosome 21. *Hum Mol Genet.* 1994; 3(8):1373-6.
65. Hertig AT, Sheldon WH. Minimal criteria required to prove prima facie case of traumatic abortion or miscarriages: an analysis of 1000 spontaneous abortion. *Ann Surg.* 1943; 117(4):596-606.
66. Hills A, Donaghue C, Waters J, Waters K, Sullivan C, Kulkarni A, Docherty Z, Mann K, Ogilvie CM. QF-PCR as a stand-alone test for prenatal samples: the first 2 years' experience in the London region. *Prenat Diagn.* 2010; 30(6): 509-17.
67. Homer L, Le Martelot MT, Morel F, Amice V, Kerlan V, Collet M, De Braekeleer M. 45,X/46,XX mosaicism below 30% of aneuploidy: clinical implications in adult women from a reproductive medicine unit. *Eur J Endocrinol.* 2010; 162(3): 617-23.
68. Jacobs PA, Aitken J, Frackiewicz A, Law P, Newton MS, Smith PG. The inheritance of translocations in man: data from families ascertained through a balanced heterozygote. *Ann Hum Genet.* 1970; 34(2): 119-36.
69. Jacobs PA, Frackiewicz A, Law P, Hilditch CJ, Morton NE. The effect of structural aberrations of the chromosomes on reproductive fitness in man. II. Results. *Clin Genet.* 1975 Sep;8(3):169-78.
70. Jacobsen P, Dupont A, Mikkelsen M. Translocation in the 13-15 group as a cause of partial trisomy and spontaneous abortion in the same family. *Lancet.* 1963; 2(7307):584-5
71. Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS, Pham Lorentz C, Ketterling RP, Babovic-Vuksanovic D, Meyer RG, Ensenuer R, Anderson MH Jr, Michels VV. Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. *Genet Med.* 2003; 5(1): 28-34.
72. Jauniaux E, Burton GJ. Pathophysiology of histological changes in early pregnancy loss. *Placenta.* 2005; 26(2-3):114-23.

73. Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2006; 21(9):2216-22.
74. Jobanputra V, Esteves C, Sobrino A, Brown S, Kline J, Warburton D. Using FISH to increase the yield and accuracy of karyotypes from spontaneous abortion specimens. *Prenat Diagn.* 2011; 31(8): 755-9.
75. Jobanputra V, Sobrino A, Kinney A, Kline J, Warburton D. Multiplex interphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions. *Hum Reprod.* 2002; 17(5):1166-70.
76. Kaare M, Götz A, Ulander VM, Ariansen S, Kaaja R, Suomalainen A, Aittomäki K. Do mitochondrial mutations cause recurrent miscarriage? *Mol Hum Reprod.* 2009; 15(5):295-300.
77. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992; 258(5083):818-21.
78. Kalousek DK, Dill FJ: Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions. *Science.* 1983; 221: 665–667.
79. Kalousek DK, Lau AE. Pathology of spontaneous abortion. W: *Developmental pathology of the embryo and fetus* (red. Dimmick JE, Kalosuek DK). JB Lippincott Company, Filadelfia, 1992.
80. Katz VL, Kuller JA. Recurrent miscarriage. *Am J Perinatol.* 1994; 11(6):386-97.
81. Kavalier F. Investigation of recurrent miscarriages. *BMJ.* 2005; 16;331(7509): 121-2.
82. Kim SY, Park SY, Choi JW, Kim do J, Lee SY, Lim JH, Han JY, Ryu HM, Kim MH. Association between MTHFR 1298A>C polymorphism and spontaneous abortion with fetal chromosomal aneuploidy. *Am J Reprod Immunol.* 2011; 66(4): 252-8.
83. Klinger K, Landes G, Shook D, Harvey R, Lopez L, Locke P, Lerner T, Osathanondh R, Leverone B, Houseal T, Pavelka K, Dackowski W. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Am J Hum Genet.* 1992; 51(1): 55-65.
84. Kooper AJ, Faas BH, Feuth T, Creemers JW, Zondervan HH, Boekkooi PF, Quartero RW, Rijnders RJ, van der Burgt I, van Kessel AG, Smits AP. Detection of chromosome aneuploidies in chorionic villus samples by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Mol Diagn.* 2009 Jan;11(1):17-24.
85. Kooper AJ, Faas BH, Kater-Baats E, Feuth T, Janssen JC, van der Burgt I, Lotgering FK, van Kessel AG, Smits AP. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) as a stand-alone test for rapid aneuploidy detection in amniotic fluid cells. *Prenat Diagn.* 2008; 28(11): 1004-10.
86. Krawczyński MR, Latos-Bieleńska A. Zasady analizy rodowodów. *Pediatr Prakt.* 1998; 6(3-4): 33-44.

87. Kujawski M. Analiza aberracji chromosomowych w chorobach nowotworowych metodą porównawczej hybrydyzacji genomów (CGH). W: Analiza DNA. Teoria i praktyka (red. Słomski R). Wyd. UP w Poznaniu, Poznań 2008: 564-567.
88. Laissue P, Burgio G, l'Hôte D, Renault G, Marchiol-Fournigault C, Fradelizi D, Fellous M, Serres C, Montagutelli X, Monget P, Vaiman D. Identification of Quantitative Trait Loci responsible for embryonic lethality in mice assessed by ultrasonography. *Int J Dev Biol.* 2009;53(4):623-9.
89. Lanasa MC, Hogge WA, Kubik C, Blancato J, Hoffman EP. Highly skewed X-chromosome inactivation is associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Am J Hum Genet.* 1999 Jul;65(1):252-4.
90. Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1981; 78(11):6633-7.
91. Lashen H, Fear K, Sturdee DW. Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: matched case-control study. *Hum Reprod.* 2004; 19(7):1644-6
92. Lasser-Ross N, Miyakawa H, Lev-Ram V, Young SR, Ross WN. High time resolution fluorescence imaging with a CCD camera. *J Neurosci Methods* 1991; 36(2-3): 253-261.
93. Latos-Bieleńska A. Genetyka rozrodczości. W: Ciąża wysokiego ryzyka (red. GH Bręborowicz). OWN PAN, Poznań 2010, Wyd 3: 67-96.
94. Laurino MY, Bennett RL, Saraiya DS, Baumeister L, Doyle DL, Leppig K, Pettersen B, Resta R, Shields L, Uhrich S, Varga EA, Raskind WH. Genetic evaluation and counseling of couples with recurrent miscarriage: recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns.* 2005 Jun;14(3):165-81.
95. Lawce HJ, Brown MG: Cytogenetics. An Overview. W: The AGT Cytogenetics Laboratory Manual (red. Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL). Lippincott- Raven, Philadelphia – New York 1997: 20-23.
96. Lebedev I. Mosaic aneuploidy in early fetal losses. *Cytogenet Genome Res.* 2011; 133(2-4): 169-83.
97. Lestou VS, Kalousek DK: Confined placental mosaicism and intrauterine fetal growth. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1998; 79: 223–226.
98. Li QY, Tsukishiro S, Nakagawa C, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K, Sonta S. Parental origin and cell stage of non-disjunction of double trisomy in spontaneous abortion. *Congenit Anom (Kyoto).* 2005; 45(1): 21-5.
99. Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E, Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update.* 2002;8(5):463-81.
100. Lim W. Antiphospholipid antibody syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:233-9.
101. Lipiński D, Zeyland J, Słomski R. PCR w czasie rzeczywistym. W: Analiza DNA. Teoria i praktyka (red. Słomski R). Wyd. UP w Poznaniu, Poznań 2008: 169-175.
102. Liu X, Li L, Chen ZJ, Lu Z, Shi Y, Zhao Y. Genetic variants of cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit associated protein 1-like 1 and transcription factor 7-like 2 are not

- associated with polycystic ovary syndrome in Chinese women. *Gynecol Endocrinol.* 2010; 26(2): 129-34.
103. Ljunger E, Cnattingius S, Lundin C, Annerén G. Chromosomal anomalies in first-trimester miscarriages. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005; 84(11):1103-7.
104. Ljunger E, Stavreus-Evers A, Cnattingius S, Ekblom A, Lundin C, Annerén G, Sundström-Poromaa I. Ultrasonographic findings in spontaneous miscarriage: relation to euploidy and aneuploidy. *Fertil Steril.* 2011; 95(1):221-4.
105. Lomax B, Tang S, Separovic E, Phillips D, Hillard E, Thomson T, Kalousek DK. Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions. *Am J Hum Genet.* 2000; 66(5):1516-21.
106. Łaczmńska I, Łaczmński L. Metoda MLPA oraz jej zastosowanie w diagnostyce chorób uwarunkowanych genetycznie. *Post Biol Kom* 2009; 36(4):555-563.
107. Łuczak-Wawrzyniak J, Czarnecka-Iwańczuk M, Bukowska A, Konofalska N. Wczesne i późne psychologiczne skutki utraty ciąży. *Ginekol Pol.* 2010; 81(5):374-7.
108. Mann K, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Ogilvie CM. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *Eur J Hum Genet.* 2004; 12(11):907-15.
109. Manvelyan M, Riegel M, Santos M, Fuster C, Pellestor F, Mazaurik ML, Schulze B, Polityko A, Tittelbach H, Reising-Ackermann G, Belitz B, Hehr U, Kelbova C, Volleth M, Gödde E, Anderson J, Küpferling P, Köhler S, Duba HC, Dufke A, Aktas D, Martin T, Schreyer I, Ewers E, Reich D, Mrasek K, Weise A, Liehr T. Thirty-two new cases with small supernumerary marker chromosomes detected in connection with fertility problems: detailed molecular cytogenetic characterization and review of the literature. *Int J Mol Med.* 2008; 21(6): 705-14.
110. Martínez-Pasarell O, Nogués C, Bosch M, Egozcue J, Templado C. Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet.* 1999; 104(4): 345-9.
111. Mateu E, Rodrigo L, Martínez MC, Peinado V, Milán M, Gil-Salom M, Martínez-Jabaloyas JM, Remohí J, Pellicer A, Rubio C. Aneuploidies in embryos and spermatozoa from patients with Y chromosome microdeletions. *Fertil Steril.* 2010; 94(7): 2874-7.
112. Mazurczak T. Poradnictwo genetyczne – czym jest i jakim być powinno? *Med. Sci Rev – Genetyka* 2004: 11-17.
113. McFadden DE, Robinson WP. Phenotype of triploid embryos. *J Med Genet.* 2006; 43(7):609-12.
114. Menten B, Swerts K, Delle Chiaie B, Janssens S, Buysse K, Philippé J, Speleman F. Array comparative genomic hybridization and flow cytometry analysis of spontaneous abortions and mores in utero samples. *BMC Med Genet.* 2009; 14:10:89.
115. Le Meur N, Holder-Espinasse M, Jaillard S, Goldenberg A, Joriot S, Amati-Bonneau P, Guichet A, Barth M, Charollais A, Journel H, Auvin S, Boucher C, Kerckaert JP, David V, Manouvrier-Hanu S, Saugier-veber P, Frébourg T, Dubourg C, Andrieux J, Bonneau D. MEF2C haploinsufficiency caused by either microdeletion of the 5q14.3 region or mutation

- is responsible for severe mental retardation with stereotypic movements, epilepsy and/or cerebral malformations. *J Med Genet.* 2010; 47(1): 22-9.
116. Midro AT, Stengel-Rutkowski S, Stene J. Experiences with risk estimates for carriers of chromosomal reciprocal translocations. *Clin Genet.* 1992; 41(3):113-22.
117. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010; 86(5): 749-64.
118. Monfort S, Martínez F, Roselló M, Badia L, Prieto F, Orellana C. A subtelomeric translocation apparently implied in multiple abortions. *J Assist Reprod Genet.* 2006; 23(2): 97-101.
119. Morton NE, Jacobs PA, Frackiewicz A, Law P, Hilditch CJ. The effect of structural aberrations of the chromosomes on reproductive fitness in man. I. Methodology. *Clin Genet.* 1975 Sep;8(3):159-68.
120. O'Flynn-O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril.* 2010; 93(1):1-12.
121. Ohara-Imaizumi M, Yoshida M, Aoyagi K, Saito T, Okamura T, Takenaka H, Akimoto Y, Nakamichi Y, Takanashi-Yanobu R, Nishiwaki C, Kawakami H, Kato N, Hisanaga S, Kakei M, Nagamatsu S. Deletion of CDKAL1 affects mitochondrial ATP generation and first-phase insulin exocytosis. *PLoS One.* 2010; 5(12): e15553.
122. van Opstal D, Boter M, de Jong D, van den Berg C, Brüggewirth HT, Wildschut HI, de Klein A, Galjaard RJ. Rapid aneuploidy detection with multiplex ligation-dependent probe amplification: a prospective study of 4000 amniotic fluid samples. *Eur J Hum Genet.* 2009; 17(1): 112-21.
123. Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1969; 64(2):600-4.
124. Pegoraro E, Whitaker J, Mowery-Rushton P, Surti U, Lanasa M, Hoffman EP. Familial skewed X inactivation: a molecular trait associated with high spontaneous-abortion rate maps to Xq28. *Am J Hum Genet.* 1997; 61(1):160-70.
125. Pellestor F, Anahory T, Hamamah S. The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. *Hum Reprod Update.* 2005; 11(1):15-32.
126. Pertile MD, Oertel R, Hills L, Boys A, Norris F, Burns I, Bruno DL, Slater HR. Whole genome microarray in clinical practice: Investigation of 2,024 miscarriage, stillbirth and fetal malformation referrals. *Eur J Hum Genet* 2012; 20 Suppl. 1: P05.34.
127. Philipp T, Philipp K, Reiner A, Beer F, Kalousek DK. Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. *Hum Reprod.* 2003 A; 18(8): 1724-32.

128. Pijnenborg R, Vercruyse L.: Shifting concepts of the fetal-maternal interface: a historical perspective. *Placenta*. 2008, 29, Suppl A:S20-5.
129. van Prooijen-Knegt AC, van Hoek JF, Bauman JG, van Duijn P, Wool IG, van der Ploeg M. In situ hybridization of DNA sequences in human metaphase chromosomes visualized by an indirect fluorescent immunocytochemical procedure. *Exp. Cell Res.* 1982; 141(2):397-407.
130. PTG. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego w zakresie wybranych patologii wczesnej ciąży oraz postępowania w ciąży po zapłodnieniu *in vitro*. *Gin po Dyp* 2008; II/01.
131. Putzova M, Soldatova I, Pecnova L, Dvorakova L, Jencikova N, Goetz P, Stejskal D. QF-PCR-based prenatal detection of common aneuploidies in the Czech population: five years of experience. *Eur J Med Genet.* 2008; 51(3): 209-18.
132. Quenby S. Miscarriage. *Curr Obstet Gynaecol.* 2002; 12: 170-174.
133. Rajcan-Separovic E, Diego-Alvarez D, Robinson WP, Tyson C, Qiao Y, Harvard C, Fawcett C, Kalousek D, Philipp T, Somerville MJ, Stephenson MD. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod.* 2010; 25(11):2913-22.
134. Rajcan-Separovic E, Qiao Y, Tyson C, Harvard C, Fawcett C, Kalousek D, Stephenson M, Philipp T. Genomic changes detected by array CGH in human embryos with developmental defects. *Mol Hum Reprod.* 2010; 16(2):125-34.
135. Randall CL, Birtch PK. Spontaneous abortion diagnosis and treatment. *Can Med Assoc J.* 1952; 66(2):132-7.
136. Redon R, Carter NP. Comparative genomic hybridization: microarray design and data interpretation. *Methods Mol Biol.* 2009; 529:37-49.
137. Redon R, Fitzgerald T, Carter NP. Comparative genomic hybridization: DNA labeling, hybridization and detection. *Methods Mol Biol.* 2009; 529:267-78.
138. Robinson WP, Beever C, Brown CJ, Stephenson MD. Skewed X inactivation and recurrent spontaneous abortion. *Semin Reprod Med.* 2001; 19(2):175-81.
139. Rooney DE, Czepulkowski DH. *Human cytogenetics: a practical approach.* IRL Press, Oxford, 1986.
140. Roselló M, Monfort S, Orellana C, Ferrer-Bolufer I, Quiroga R, Oltra S, Martínez F. Submicroscopic duplication of the Wolf-Hirschhorn critical region with a 4p terminal deletion. *Cytogenet Genome Res.* 2009; 125(2): 103-8.
141. Rosenbusch B, Sterzik K. Sperm chromosomes and habitual abortion. *Fertil Steril.* 1991; 56(2):370-2.
142. Rowley PT, Marshall R, Ellis JR. A genetical and cytological study of repeated spontaneous abortion. *Ann Hum Genet.* 1963; 27:87-100.
143. Rudnik-Schöneborn S, Nicholson GA, Morgan G, Röhrig D, Zerres K. Different patterns of obstetric complications in myotonic dystrophy in relation to the disease status of the fetus. *Am J Med Genet.* 1998; 80(4):314-21.

144. Rudnik-Schöneborn S, Schneider-Gold C, Raabe U, Kress W, Zerres K, Schoser BG. Outcome and effect of pregnancy in myotonic dystrophy type 2. *Neurology*. 2006; 66(4):579-80.
145. Saade S, Cazier JB, Ghassibe-Sabbagh M, Youhanna S, Badro DA, Kamatani Y, Hager J, Yeretziyan JS, El-Khazen G, Haber M, Salloum AK, Douaihy B, Othman R, Shasha N, Kabbani S, Bayeh HE, Chammas E, Farrall M, Gauguier D, Platt DE, Zalloua PA; the FGENTCARD consortium. Large Scale Association Analysis Identifies Three Susceptibility Loci for Coronary Artery Disease. *PLoS One*. 2011; 6(12): e29427.
146. Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K, Wong A, Ledbetter DH, Lese Martin C. Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *Am. J. Hum. Genet.* 2004; 74(6):1168-74.
147. Schmid W. A familial chromosome abnormality associated with repeated abortions. *Cytogenetics*. 1962;1:199-209.
148. Schoumans J, Nielsen K, Jeppesen I, Anderlid BM, Blennow E, Brøndum-Nielsen K, Nordenskjöld M. A comparison of different metaphase CGH methods for the detection of cryptic chromosome aberrations of defined size. *Eur J Hum Genet*. 2004; 12(6):447-54.
149. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(12):e57.
150. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding CJ, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science*. 2007; 316(5829): 1341-5.
151. Shaffer LG, Bui TH. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2007; 145C(1):87-98.
152. Shearer BM, Thorland EC, Carlson AW, Jalal SM, Ketterling RP. Reflex fluorescent in situ hybridization testing for unsuccessful product of conception cultures: a retrospective analysis of 5555 samples attempted by conventional cytogenetics and fluorescent in situ hybridization. *Genet Med*. 2011; 13(6): 545-52.
153. Shute EV. Should spontaneous abortion be prevented? Vitamin E in its management. *Can Med Assoc J*. 1960 Jan 9;82:72-6.
154. Di Simone N, Luigi MP, Marco D, Fiorella DN, Silvia D, Clara DM, Alessandro C. Pregnancies complicated with antiphospholipid syndrome: the pathogenic mechanism of antiphospholipid antibodies: a review of the literature. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1108:505-14.

- 155.Simpson JL, Meyers CM, Martin AO, Elias S, Ober C. Translocations are infrequent among couples having repeated spontaneous abortions but no other abnormal pregnancies. *Fertil Steril*. 1989; 51(5): 811-4.
- 156.Simpson JL. Genetics of spontaneous abortion. W: *Recurrent pregnancy loss. Causes, controversies and treatment* (red. HJA Carp). Informa Healthcare, London 2007: 23-34.
- 157.Skrzypczak J (red.). *Poronienia nawracające*. PZWL, Warszawa, 2011: 1-222.
- 158.Skrzypczak J. Poronienie. W: *Ciąża wysokiego ryzyka* (red. GH Bręborowicz). OWN PAN, Poznań 2010, Wyd 3: 97-119.
- 159.Slim R, Ao A, Surti U, Zhang L, Hoffner L, Arseneau J, Cheung A, Chebaro W, Wischmeijer A. Recurrent triploid and dispermic conceptions in patients with NLRP7 mutations. *Placenta*. 2011; 32(5): 409-12.
- 160.Słomski R, Szalata M, Wielgus K. Diagnostyka molekularna. W: *Analiza DNA. Teoria i praktyka* (red. Słomski R). Wyd. UP w Poznaniu, Poznań 2008: 17-23.
- 161.Soni S, Badawy SZ. Celiac disease and its effect on human reproduction: a review. *J Reprod Med*. 2010; 55(1-2):3-8.
- 162.Srebniak MI, Tomaszewska A. *Badania cytogenetyczne w praktyce klinicznej*. PZWL, Warszawa 2008, Wyd. 1: 1-216.
- 163.Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev*. 2007; 17(3):182-92.
- 164.Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod*. 2002; 17(2): 446-51.
- 165.Stephenson MD, Sierra S. Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement. *Hum Reprod*. 2006; 21(4): 1076-82.
- 166.Strom CM, Ginsberg N, Applebaum M, Bozorgi N, White M, Caffarelli M, Verlinsky Y. Analyses of 95 first-trimester spontaneous abortions by chorionic villus sampling and karyotype. *J Assist Reprod Genet*. 1992; 9(5): 458-61.
- 167.Sullivan AE, Lewis T, Stephenson M, Odem R, Schreiber J, Ober C, Branch DW. Pregnancy outcome in recurrent miscarriage patients with skewed X chromosome inactivation. *Obstet Gynecol*. 2003; 101(6):1236-42.
- 168.Suzumori N, Sugiura-Ogasawara M. Genetic factors as a cause of miscarriage. *Curr Med Chem*. 2010; 17(29):3431-7.
- 169.Tartaglia NR, Howell S, Sutherland A, Wilson R, Wilson L. A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet J Rare Dis*. 2010; 5:8.
- 170.Templado C, Vidal F, Estop A. Aneuploidy in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res*. 2011;133(2-4):91-9.
- 171.Tobias ES, Connor M, Ferguson-Smith M. *Essential Medical Genetics*. Wiley-Blackwell 2011, 6th Edition: 1-332.

172. Toth B, Jeschke U, Rogenhofer N, Scholz C, Würfel W, Thaler CJ, Makrigiannakis A. Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. *J Reprod Immunol.* 2010; 85(1):25-32.
173. Traeger-Synodinos J. Real-time PCR for prenatal and preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases. *Mol Aspects Med.* 2006; 27(2-3):176-91.
174. Umeno J, Asano K, Matsushita T, Matsumoto T, Kiyohara Y, Iida M, Nakamura Y, Kamatani N, Kubo M. Meta-analysis of published studies identified eight additional common susceptibility loci for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17(12): 2407-15.
175. Vatin M, Burgio G, Renault G, Laissue P, Firlej V, Mondon F, Montagutelli X, Vaiman D, Serres C, Ziyat A. Refined mapping of a quantitative trait locus on chromosome 1 responsible for mouse embryonic death. *PLoS One.* 2012;7(8): e43356 1-13.
176. Wang LY, Wang DH, Zou XY, Xu CM. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2009; 10(7):483-92.
177. Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French J. Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study. *Fertil Steril.* 2003; 79(3):577-84.
178. Warburton D, Kline J, Kinney A, Yu CY, Levin B, Brown S. Skewed X chromosome inactivation and trisomic spontaneous abortion: no association. *Am J Hum Genet.* 2009; 85(2):179-93.
179. Warburton D, Yu CY, Kline J, Stein Z. Mosaic autosomal trisomy in cultures from spontaneous abortions. *Am J Hum Genet.* 1978; 30: 609–617.
180. Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, McGuire NM, Dackowski WR, Weinstein M, Sandlin C, Warren R, Klinger KW. Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4,500 specimens. *Am J Hum Genet.* 1993; 52(5): 854-65.
181. Warren JE, Turok DK, Maxwell TM, Brothman AR, Silver RM. Array comparative genomic hybridization for genetic evaluation of fetal loss between 10 and 20 weeks of gestation. *Obstet Gynecol.* 2009; 114(5):1093-102.
182. Wei FY, Tomizawa K. Functional loss of Cdkal1, a novel tRNA modification enzyme, causes the development of type 2 diabetes. *Endocr J.* 2011; 58(10):819-25.
183. Woelfer B, Salim R, Banerjee S, Elson J, Regan L, Jurkovic D. Reproductive outcomes in women with congenital uterine anomalies detected by three-dimensional ultrasound screening. *Obstet Gynecol.* 2001; 98(6):1099-103.
184. Yan JB, Xu M, Xiong C, Zhou DW, Ren ZR, Huang Y, Mommersteeg M, van Beuningen R, Wang YT, Liao SX, Zeng F, Wu Y, Zeng YT. Rapid screening for chromosomal aneuploidies using array-MLPA. *BMC Med Genet.* 2011; 12: 68.

185. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM, Barrett JC, Shields B, Morris AP, Ellard S, Groves CJ, Harries LW, Marchini JL, Owen KR, Knight B, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Morris AD, Doney AS; Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), McCarthy MI, Hattersley AT. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science*. 2007; 316(5829): 1336-41.
186. Zimmermann BG, Dudarewicz L. Real-time quantitative PCR for the detection of fetal aneuploidies. *Methods Mol Biol*. 2008; 444:95-109.
187. Zou G, Zhang J, Li XW, He L, He G, Duan T. Quantitative fluorescent polymerase chain reaction to detect chromosomal anomalies in spontaneous abortion. *Int J Gynaecol Obstet*. 2008; 103(3): 237-40.