



UNIwersytet Medyczny
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Mariusz Nawrocki

Analiza zmienności genetycznej bliźniąt – polimorfizm sekwencji
mikrosatelitarnych, heteroplazmia mitochondrialnego DNA
i występowanie chimeryzmu komórek krwi

Rozprawa doktorska przygotowana
w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

w Instytucie Genetyki Człowieka
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

oraz w Laboratorium Genetyki Molekularnej w Poznaniu

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Ryszard Słomski

Poznań, 2013

*Panu Profesorowi Ryszardowi Słomskiemu
składam serdeczne podziękowania za opiekę naukową i pomoc
jakie uzyskałem w czasie pisania rozprawy*

4.	Wyniki	66
4.1.	Analiza jądrowego DNA	66
4.1.1.	Odcisk genetyczny	66
4.1.2.	Oznaczenie zygotyczności bliźniąt metodą hybrydyzacji z sondą molekularną MS31	68
4.1.3.	Oznaczenie zygotyczności bliźniąt metodą hybrydyzacji z sondą molekularną MS43A	68
4.1.4.	Analiza polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych <i>PLA2A1</i> , <i>CYARO</i> , <i>vWF</i> , <i>TPOX</i> i <i>TH01</i> u bliźniąt dwuzygotycznych i jednozygotycznych	71
4.1.5.	Przeprowadzenie analizy DNA bliźniąt z zastosowaniem zestawu <i>PowerPlex 16</i>	75
4.1.6.	Rozdział produktów reakcji PCR z zastosowaniem sekwenatora kapilarnego	76
4.2.	Amplifikacja regionu zmiennego mitochondrialnego DNA bliźniąt jednozygotycznych	105
4.2.1.	Amplifikacja fragmentu H2/L2 mitochondrialnego DNA bliźniąt jednozygotycznych	105
4.2.2.	Analiza polimorfizmu mitochondrialnego DNA bliźniąt jednozygotycznych metodą analizy heterodupleksów	106
4.3.	Genotypowanie bliźniąt	107
4.3.1.	Genotypowanie bliźniąt z zastosowaniem badań hybrydyzacyjnych	107
4.3.2.	Genotypowanie bliźniąt z zastosowaniem amplifikacji pojedynczych <i>loci</i>	109
4.3.3.	Genotypowanie bliźniąt z zastosowaniem reakcji multiplex PCR w oparciu o komercyjnie dostępny zestaw <i>PowerPlex 16</i>	114
4.3.4.	Porównanie wyników uzyskanych różnymi metodami	128
4.4.	Przypadki chimeryzmu u bliźniąt jednozygotycznych	130
5.	Dyskusja	144
5.1.	Znaczenie badań zygotyczności	145
5.2.	Polimorfizm DNA u bliźniąt	150
5.3.	Zygotyczność bliźniąt	153
5.4.	Chimeryzm krwi	156
6.	Wnioski	162
7.	Piśmiennictwo	164
8.	Streszczenie	171
9.	Summary	172
10.	Aneks	173
11.	Zgoda Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań	187

Ryc. 25	Zestawienie częstości występowania alleli <i>D8S1179</i> w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską	117
Ryc. 26	Zestawienie częstości występowania alleli <i>FGA</i> w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską	118
Ryc. 27	Zestawienie częstości występowania alleli <i>CSF1PO</i> w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską	119
Ryc. 28	Zestawienie częstości występowania alleli <i>vWA</i> w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską	119
Ryc. 29	Zestawienie częstości występowania alleli <i>TPOX</i> w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską	120
Ryc. 30	Zestawienie częstości występowania alleli <i>D5S818</i> w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską	120
Ryc. 31	Zestawienie częstości występowania alleli <i>D7S820</i> w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską	121
Ryc. 32	Zestawienie częstości występowania alleli <i>D16S539</i> w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską	122
Ryc. 33	Zestawienie częstości występowania alleli <i>Penta D</i> w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską	122
Ryc. 34	Zestawienie częstości występowania alleli <i>Penta E</i> w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską	123
Ryc. 35	Zestawienie częstości występowania alleli <i>D3S1358</i> w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską	124
Ryc. 36	Zestawienie częstości występowania alleli <i>D21S11</i> w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską	124
Ryc. 37	Zestawienie częstości występowania alleli <i>D18S51</i> w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską	125
Ryc. 38	Zestawienie częstości występowania alleli <i>TH01</i> w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską	126
Ryc. 39	Zestawienie częstości występowania alleli <i>TPOX</i> w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską	128
Ryc. 40	Zestawienie częstości występowania alleli <i>vWA</i> w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską	129
Ryc. 41	Zestawienie częstości występowania alleli <i>TH01</i> w badanej populacji bliźniąt uzyskanych z wykorzystaniem tradycyjnej reakcji PCR i PCR typu multipleks w porównaniu z populacją polską	129
Ryc. 42	Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźniąt z chimeryzmem krwi z zastosowaniem zestawu <i>PowerPlex 16</i>	131-143
Ryc. 43	Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźniąt z chimeryzmem krwi z zastosowaniem zestawu <i>PowerPlex 16</i>	173-179
Ryc. 44	Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźniąt z chimeryzmem krwi z zastosowaniem zestawu <i>PowerPlex 16</i>	180-186

Spis tabel

Tabela 1	Rodzaje ciąży bliźniaczej jednozygotycznej w zależności od terminu podziału zarodka i częstość ich powstawania	16
Tabela 2	Ryzyko wystąpienia chorób u bliźniąt w zależności od zygotywności	33
Tabela 3	Przypadki wykrycia trisomii 21 u jednego z bliźniąt	35
Tabela 4	Współczynnik płci u bliźniąt	36
Tabela 5	Zestawienie polimorficznych <i>loci</i> DNA wykorzystanych do określenia zygotywności bliźniąt	59
Tabela 6	Zestawienie polimorficznych <i>loci</i> typu STR wykorzystanych do określenia zygotywności bliźniąt	65
Tabela 7	Przykładowe zestawienie wyników analiz hybrydacyjnych z sondą molekularną dla 20 par bliźniąt	108
Tabela 8	Zestawienie częstości występowania alleli <i>PLA2A1</i> , <i>CYARO</i> , <i>vWF</i> , <i>TPOX</i> , <i>TH01</i> i <i>DIS80</i> u bliźniąt jednozygotycznych i dwuzzygotycznych	109
Tabela 9	Przykładowe zestawienie wyników analizy zygotywności bliźniąt z zastosowaniem reakcji amplifikacji wybranych pojedynczych <i>loci</i>	114
Tabela 10	Zestawienie częstości występowania alleli <i>vWA</i> , <i>D8S1179</i> , <i>TPOX</i> , <i>FGA</i> , <i>D3S1358</i> , <i>TH01</i> , <i>D21S11</i> , <i>D18S51</i> , <i>Penta E</i> , <i>D5S818</i> , <i>D13S317</i> , <i>D7S820</i> , <i>D16S539</i> , <i>CSF1PO</i> , <i>Penta D</i> u bliźniąt jednozygotycznych i dwuzzygotycznych	115-116
Tabela 11	Zestawienie przykładowych wyników analizy <i>PowerPlex 16</i> dla bliźniąt	127

1. WSTĘP

Badania wariantów sekwencji DNA odegrały ogromną rolę w genetyce człowieka, diagnostyce molekularnej chorób i w medycynie sądowej. Są również szeroko wykorzystywane w badaniach zmian informacji genetycznej w nowotworach. Rodzaje badanych wariantów DNA bardzo zmieniały się w ostatnich 25 latach. Obecnie można je sklasyfikować w pięć głównych klas: polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych - RFLP (ang. *restriction fragment length polymorphism*), polimorfizm tandemowych powtórzeń - VNTR (ang. *variable number of tandem repeats*), polimorfizm krótkich powtórzeń tandemowych zwanych również mikrosatelitami - STR (ang. *short tandem repeats or microsatellite*), polimorfizm pojedynczych nukleotydów - SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) i warianty liczby kopii - CNV (ang. *copy number variation*). W ostatnim czasie bardzo dużo uwagi poświęca się badaniom CNV. Szczególnej wagi nabierają badania CNV u bliźniąt, ponieważ zmiana CNV może prowadzić do zmian fenotypowych mimo jednozygotyczności.

W diagnostyce prenatalnej ciąż wielopłodowych bardzo ważne jest czy są to ciążę dwukosmówkowe czy jednokosmówkowe oraz jednoowodniowe, natomiast mniejsze znaczenie ma zygotyczność. Wynika to ze wzrostu ryzyka śmiertelności wraz z późniejszym podziałem płodów (8,9% dwukosmówkowe dwuowodniowe, 25% jednokosmówkowe dwuowodniowe, 50-60% jednokosmówkowe jednoowodniowe). Jednak informacja na temat zygotyczności może mieć znaczenie w przypadku wystąpienia konieczności leczenia noworodków. Genetyka molekularna wniosła do badań bliźniąt ułatwienie określenia zygotyczności oraz możliwość wydania wyniku nie budzącego wątpliwości. Badania porównawcze między bliźniętami jedno- i dwuzygotycznymi są stosowane w ocenie idiopatogenezy zespołów chorobowych u płodów i noworodków.

Innym ważnym aspektem badań DNA bliźniąt są badania mitochondrialnego DNA, który charakteryzuje się wysoką częstotliwością mutacji, 5-10 razy większą niż jądrowy DNA, która wynika z braku białek histonowych i niesprawnego mechanizmu naprawiającego uszkodzony DNA. Mutacjom podlega tylko część mitochondriów, stąd w komórce współistnieją mitochondria typu dzikiego i zmutowanego (heteroplazmia) i od ich proporcji zależy ujawnienie się mutacji w postaci chorób mitochondrialnych. Do niedawna panowało przekonanie, że mitochondria dziedziczą się wyłącznie w linii

żeńskiej, ponieważ jedynym dawcą genotypu mitochondrialnego jest w czasie zapłodnienia matka i tylko córki mogą przenieść mtDNA do następnego pokolenia. Dzięki ubikwitynie, którą jest oznakowany plemnik wnikający do komórki jajowej podczas zapłodnienia, mitochondria plemnika są rozpoznawane i niszczone. W ten sposób komórka broni się przed możliwością wystąpienia heteroplazmii. W sytuacji, w której jeden z haplotypów byłby obciążony mutacją, a jego replikacja przebiegałaby szybciej niż mtDNA prawidłowego, wówczas wadliwe mitochondria występowałyby w komórce w przeważającej liczbie, co obniżyłoby wydajność energetyczną komórki.

1.1. Bliźnięta w wierzeniach, w mitologii i Biblii

Narodziny bliźniąt wzbudzały zawsze wiele emocji. Najczęściej postrzegano je jako cud natury, a w poczęciu bliźniąt dopatrywano się udziału czynnika boskiego, magicznego. Bliźnięta zaciekawiały, lecz również budziły lęk i były podstawą przesądów. W niektórych społeczeństwach pierwotnych, wśród wielu plemion afrykańskich, Aborygenów i Eskimosów, narodziny bliźniąt uważano za zły omen. Strach przed karą bogów, którą zwiastowały, był tak duży, że dzieci te zabijano. Jednym z najgorszych przekleństw było powiedzenie: „Abyś została matką bliźniąt”. Wystarczyło skierować dwa palce prawej ręki w kierunku kobiety ciężarnej, by ją przekląć (Malinowski i Koszada, 2003). Negatywny stosunek do bliźniąt miał wiele przyczyn, związanych głównie z niewiedzą i tajemniczością, która je otaczała. Narodziny bliźniąt odbiegały od normy, przypominały świat zwierząt, w którym ciążę mnogie nie należą do rzadkości. Ponadto panowało przeświadczenie, że bliźnięta mają dwóch ojców, tym samym oskarżano matkę o zdradę. Natomiast u plemion Nomadów i Eskimosów zabijanie jednego z bliźniąt było podyktowane warunkami praktycznymi – starano się w ten sposób uchronić matkę przed koniecznością wykarmienia dwójki noworodków oraz wędrowania z nimi na duże odległości, często w ekstremalnych warunkach.

Zainteresowanie bliźniętami znalazło odzwierciedlenie w mitologii i Biblii. W wielu wierzeniach istniało przekonanie, że bliźnięta obdarzone są nadludzką mocą (ryc. 1). Najważniejsi bogowie starożytnego Egiptu, Ozyrys i Izyda, również byli bliźniętami. Zostali połączeni węzłem małżeńskim jeszcze w łonie matki. Na uwagę zasługują również czczone w mitologii staroindyjskiej bliźnięta Aswini, którym

przypisywano moc leczenia chorych, w tym niepłodnych kobiet. Natomiast w mitologii Celtów można znaleźć tylko pojedynczą wzmiankę o narodzinach bliźniąt. Bogini Macha, która była brzemienna, została zmuszona do wzięcia udziału w wyścigach w dniu święta Emain Macha. Wygrała wyścig, ale padła martwa na mecie, wydając na świat bliźnięta. Być może należy tą opowieść traktować jako przestrożę dla kobiet ciężarnych, dla których nadmierny wysiłek fizyczny może mieć tragiczne skutki.



A



B

Ryc. 1. Bliźnięta w mitologii i starożytności.

1A. Kastor i Polluks. 1B. Wilczyca Kapitołińska - Romulus i Remus. Źródło: www.wikipedia.org.pl

Opisy bliźniąt znajdują się również w Starym Testamencie. Przedstawione opisy są tak zaskakująco szczegółowe, że można na ich podstawie rozpoznać obecność ciąży bliźniaczych jednokosmówkowych jednoowodniowych wraz z towarzyszącymi im powikłaniami: zespołem przetoczenia krwi między płodami i wypadnięciem rączki drugiego z płodów przed część przodującą pierwszego (Malinowski i Koszada, 2003).

Obecnie ciąży bliźniacze nadal wzbudzają duże zainteresowanie wśród ginekologów położników oraz naukowców zajmujących się biologią rozrodu, genetyką kliniczną i genetyką molekularną, którzy mają nadzieję, że zrozumienie procesów prowadzących do rozwinięcia ciąży mnogiej doprowadzi do poznania wczesnych etapów rozwoju człowieka.

1.2. Słynne bliźnięta

Postacie biblijne

Jakub i Ezaw, synowie Izaaka i Rebeki, byli bliźniętami i walczyli ze sobą już w łonie matki, co Jahwe objaśnił jej słowami „Dwa narody są w twym łonie, dwa odrębne ludy wyjdą z twych wnętrzności; jeden będzie silniejszy od drugiego, starszy będzie

sługą młodszego” (Rdz 25,23). Biblia określa Jakuba jako człowieka spokojnego, a Ezawa - jako zręcznego myśliwego. Ezaw był faworyzowany przez ojca, a Jakub - przez matkę. Ezaw był pierworodnym, jednak lekceważył ten przywilej i odstąpił go bratu za potrawę z gotowanej soczewicy. Również ojcowskie błogosławieństwo Jakub uzyskuje podstępem od niedowidzącego ze starości Izaaka. Z powodu gniewu brata był zmuszony udać się do Charanu, do brata swojej matki Labana, którego obie córki - Rachele i Leę - poślubił (Ks. Rodzaju 25:20-26).

²⁰*Izaak miał czterdzieści lat, gdy wziął sobie za żonę Rebekę, córkę Betuela, Aramejczyka z Paddan-Aram, siostrę Labana Aramejczyka.*

²¹*Izaak modlił się do Pana za swą żonę, gdyż była ona nieplodna. Pan wysłuchał go, i Rebeka, żona Izaaka, stała się brzemienna.*

²²*A gdy walczyły z sobą dzieci w jej łonie, pomyślała: Jeśli tak bywa, to czemu mnie się to przytrafia? Poszła więc zapytać o to Pana,*

²³*a Pan jej powiedział: Dwa narody są w twym łonie, dwa odrębne ludy wyjdą z twych wnętrzości; jeden będzie silniejszy od drugiego, starszy będzie sługą młodszego.*

²⁴*Kiedy nadszedł czas porodu, okazało się, że w łonie jej były bliźnięta.*

²⁵*I wyszedł pierwszy syn czerwony, cały pokryty owłosieniem, jakby płaszczem; nazwano go więc Ezaw.*

²⁶*Zaraz potem ukazał się brat jego, trzymający Ezawa za piętę; dano mu przeto imię Jakub. - Izaak miał lat sześćdziesiąt, gdy mu się oni urodzili.*

Drugi opis porodu bliźnięt znajduje się również w Księdze Rodzaju i dotyczy Peresa i Zeracha, potomków Judy (Ks. Rodzaju 38:1-30).

²⁷*A gdy nadszedł czas jej porodu, okazało się, że będzie miała bliźnięta.*

²⁸*Kiedy zaczęła rodzić, [jedno z dzieci] wyciągnęło rączkę; położna, zawiązawszy na tej rączce czerwoną tasiemkę, rzekła: Ten urodzi się pierwszy.*

²⁹*Ale cofnęło ono rączkę i wyszedł z łona jego brat. Wtedy [położna] powiedziała: Dlaczego przedarłeś się przez to przejście? Dano mu więc imię Peres.*

³⁰*Gdy po nim urodził się jego brat, na którego rączce była czerwona tasiemka, nazwano go Zerach.*

Postacie mityczne

Kastor i Polluks, bliźniacy z mitologii greckiej, ubóstwieni herosi, Argonauci, uczestnicy łowów kalidońskich i amazonomachii, opiekunowie żeglarzy i żołnierzy. Uchodzili za synów boga Zeusa i Ledy, żony króla Sparty. Byli braćmi Heleny i Klitajmestry, a także Filonoe, Timandry i Febe. Jedna z wersji mitu podaje, że królowa Leda oddała się tej samej nocy Zeusowi, który uwiódł ją pod postacią łabędzia i swojemu mężowi, królowi Tyndareosowi. Stąd za ojca Polluksa i Heleny uważano Zeusa, natomiast Kastora i Klitajmestry – męża Ledy. Kastor i Polluks porwali obie córki króla Leukipposa, Fojbe i Hilajrę, narzeczone synów króla Afareusa – Idasa i Linkeusa. Braci łączyła szczerą braterską miłość. Po śmierci Kastora - Polluks w odróżnieniu od Kastora był nieśmiertelny - Zeus obydwu przemienił w gwiazdozbiór nieba północnego, aby na zawsze pozostali razem.

Starożytność

Romulus i Remus. Romulus według legend był założycielem Rzymu i jego pierwszym władcą. Prawdopodobnie żył w VIII wieku p.n.e. (772-716). Według Rzymian Romulus był synem boga Marsa. Jego matka - kapłanka bogini Westy wywodziła się z królewskiego rodu, od Eneasza. Jej ojciec został pozbawiony tronu i wraz z synem zamordowany przez brata. Remus, brat bliźniak Romulusa żył w latach 772-753. Według rzymskich historyków bracia byli wnukami króla miasta Alba Longa, Numitora. Brat Numitora Amulius dokonał zamachu stanu, króla wtrącił do więzienia, a jego córce Rei Sylwii kazał zostać westalką i żyć w celibacie. Rea Sylwia zaszła jednak w ciążę i urodziła bliźnięta, dwóch chłopców, nazwanych Romulusem i Remusem, którzy rzekomo byli dziećmi Marsa. Westalkom zakazane były stosunki płciowe, skazano ją na okrutną śmierć – zakopano żywcem. Amuliusz kazał dzieci utopić w rzece. Kat, który nie chciał zamordować niemowląt, wrzucił je do wody w koszyku. Ten popłynął z prądem i utknął na mieliźnie w jednej z zatoczek. Płacz dzieci usłyszała wilczyca, która zaczęła regularnie odwiedzać zatoczkę, by karmić dzieci własnym mlekiem. Wilczycę wyszedł pasterz królewski Faustulus, który znalazł koszyk z dziećmi i wraz z żoną Accą Laurentią zaopiekował się nimi. Z tego względu wilczyca jest nieoficjalnym symbolem Rzymu. Najbardziej znany wizerunek to tzw. Wilczyca Kapitolińska. Po osiągnięciu pełnoletności Romulus i Remus założyli gród w miejscu, w którym ongi wyrzuciły ich fale Tybru. Romulus został królem, a miasto swoje nazwał

Roma, panował dłuższy czas i miał zostać wzięty żywcem do nieba, by stać się bogiem Kwirynem (łac. Quirinus) (Augias, 2008).

Rodziny panujące

Mohammad Reza Pahlawi (ur. 26 października 1919 w Teheranie, zm. 27 lipca 1980 w Kairze) – ostatni szachinśach Iranu, z dynastii Pahlawi, nastawiony prozachodnio, inicjator głębokich reform społecznych i gospodarczych w Iranie. Jego siostra bliźniaczka Ashraf Pahlawi jest najstarszą, żyjącą przedstawicielką dynastii. W 1979 r. został odsunięty od władzy w wyniku rewolucji islamskiej i zmuszony do ucieczki z kraju przez islamskich fundamentalistów pod wodzą ajatollaha Chomeiniego na fali olbrzymiego niezadowolenia, spowodowanego uciskiem i biedą, a także nieznajdującym społecznego poparcia zbliżeniem Iranu z Zachodem i odejściem od korzeni świata islamu. W Iranie proklamowano wówczas republikę islamską. Mohammad Reza Pahlawi nie wrócił już do Iranu, zmarł na emigracji w Egipcie.

Aktorzy

Mary-Kate i Ashley Fuller Olsen (ur. 13 czerwca 1986 w Sherman Oaks) – amerykańskie aktorki; siostry-bliźniaczki, określane mianem „najbardziej znanych sióstr świata”. Zagrały główne i epizodyczne role w ponad pięćdziesięciu filmach, serialach i programach telewizyjnych. Kilkakrotnie uczestniczyły w galach MTV. Mary-Kate Olsen została nominowana do nagrody Emmy za rolę w serialu „Jak dwie krople wody”. Ich kariera rozpoczęła się w wieku trzech miesięcy, kiedy grały w reklamach. Następnie, w wieku dziewięciu miesięcy, pojawiły się na planie serialu „Pełna chata”, w którym grały na zmianę rolę Michelle Tanner, najmłodszej córki głównego bohatera, wdowca Danny’ego Tannera. Serial emitowała stacja ABC przez osiem lat. Pierwszym filmem bliźniaczek, który wszedł na ekrany kin, był „Czy to ty, czy to ja?”. W 2004 r. do dystrybucji wyszedł ich pierwszy od wielu lat film kinowy – młodzieżowa komedia „Nowy Jork, nowa miłość”.

W wieku dziewięciu lat słynne siostry założyły firmę Dualstar, która produkuje filmy i gadzety. Dzięki temu stały się najmłodszymi producentkami w historii kina.

Słynni biznesmeni

Jednozygotyczni bliźniacy Frederick oraz David Barclay należą do pierwszej 20

najbogatszych ludzi na Wyspach Brytyjskich. Należą do nich m.in. gazety *The Scotsman* oraz *Business*. Ponadto mają też sieć supermarketów *Littlewood Stores* oraz słynne hotele Ritz. Łączną wartość ich majątku szacuje się na ok. 4 mld funtów. Ekscentryczni miliarderzy - bliźnięta David i Frederick Barclay - wycofali swoją ofertę kupna brytyjskiego dziennika *Daily Telegraph*, ale to nie koniec walki, a skutek decyzji amerykańskiego sądu, który zakazał milionerowi Conradowi Blackowi sprzedaży większościowych udziałów w firmie *Hollinger*, do której należy tytuł. Bracia, unieważnili również swoje porozumienie dotyczące wykupu zadłużenia firmy *Hollinger*, wydającej również takie tytuły jak np. *The Spectator*, *Chicago Sun-Times* czy *Jerusalem Post*.

Politycy

Lech Aleksander Kaczyński i Jarosław Aleksander Kaczyński (ur. 18 czerwca 1949 w Warszawie na Żoliborzu). Ojciec, Rajmund Kaczyński, z zawodu inżynier, był żołnierzem Armii Krajowej i uczestnikiem powstania warszawskiego. Matka, Jadwiga z domu Jasiewicz, z wykształcenia była filologiem polskim (zawodowo związana z IBL PAN). Przy ich porodzie asystowała jako położna matka poety Tadeusza Gajcego. W 1962 r. bracia zagrali role Jacka (Lech Kaczyński) i Placka (Jarosław Kaczyński) w ekranizacji powieści Kornela Makuszyńskiego „O dwóch takich, co ukradli księżyc” w reżyserii Jana Batorego. Lech Kaczyński (zm. 10 kwietnia 2010 r. w Smoleńsku) był politykiem i prawnikiem, Prezydentem Rzeczypospolitej Polskiej w latach 2005-2010. Wcześniej pełnił urząd Prezesa Najwyższej Izby Kontroli w latach 1992-1995, ministra sprawiedliwości i prokuratora generalnego w rządzie Jerzego Buzka w latach 2000-2001, był prezydentem Warszawy w latach 2002-2005. Współzałożyciel partii Prawo i Sprawiedliwość i jej pierwszy prezes, senator I kadencji oraz poseł na Sejm I i IV kadencji. Był doktorem habilitowanym nauk prawnych, profesorem nadzwyczajnym UKSW i UG, specjalistą w zakresie prawa pracy. Zginął w katastrofie rządowego samolotu Tu-154.

Jarosław Aleksander Kaczyński – polityk, doktor nauk prawnych, twórca i prezes partii politycznych Porozumienie Centrum oraz Prawo i Sprawiedliwość, senator I kadencji, poseł na Sejm I, III, IV, V, VI i VII kadencji. Od lipca 2006 do listopada 2007 r. prezes Rady Ministrów. Kandydat na urząd Prezydenta RP w przedterminowych wyborach prezydenckich w 2010 r.

Przestępcy

Albert Ebenezer Fox (1857 - 20 maja 1937) i Ebenezer Albert Fox (1857 - 2 października 1926) byli niesławnymi kłusownikami, którzy żyli w Stevenage na przełomie XIX i XX wieku. Są również znani jako Twin Foxes. Urodzili się jako bliźnięta jednozygotyczne w 1857 r. w Symonds Green i uzyskali imiona na cześć kaplicy Ebenezera kościoła baptyjskiego na Albert Street. Ich matka, Charlotte Fox, zajmowała się wyplataniem ze słomy, a ojciec uprawiał 10 akrów ziemi. Pomimo szacownego wychowania, bliźniacy byli zainteresowani przestępstwem. Ponieważ na kłusowanie nigdy nie chodzili razem, stąd łatwiej było im uciekać i dostarczać wzajemnie alibi. Pomimo tego spędzili trochę czasu w więzieniu, gdzie zainteresował się nimi Sir Edward Henry, który badał bliźnięta, aby udowodnić, że każda osoba może być zidentyfikowana przez odciski palców. Ich zbrodnie były nagłaśniane w kraju i zagranicą. Obaj bliźniacy umarli w Chalkdell House, Hitchin. Ebenezer zmarł 2 października 1926 r., w wieku 68 lat, a Albert zmarł 20 maja 1937 r., w wieku 79 lat. W 1953 r. został otwarty *Twin Foxes Public House* w Stevenage. W 1998 r. w Stevenage powstało osiedle w Woolmer Green, nazwane *Twin Foxes* dla uczczenia Alberta i Ebenezera Fox. Popiersia obu mężczyzn umieszczono na szczycie filarów przy wejściu do osiedla.

Modelki

Gisele Caroline Bündchen (ur. 20 lipca 1980 w Horizontina w Rio Grande do Sul w Brazylii) to brazylijska modelka współpracująca z projektantami, fotografami i magazynami poświęconymi modzie. Gisele przyszła na świat w południowo-brazylijskiej Horizontinie. Jej rodzice, Valdir i Vânia, mają niemieckie korzenie. Gisele ma sześć siostr, w tym jedną bliźniaczkę Patrícję (młodsza od Gisele o pięć minut). Początkowo Gisele chciała zostać zawodową siatkarką w barwach brazylijskiej drużyny Sogipa. W czasach szkolnych znana była pod wieloma przydomkami określającymi jej wyjątkowo szczupłe kształty. Wedle znanej anegdoty na temat odkrycia przyszłej gwiazdy światowych wybiegów, 14-letnia Gisele została wypatrzona przez pracownika agencji mody podczas posiłku w miejscowym McDonaldsie. Została okrzyknięta najsławniejszą i najlepiej opłacaną modelką na świecie. Obecnie jest rzeczniczką ponad dwudziestu światowych marek, m.in.: w Stanach Zjednoczonych, Brazylii, Meksyku, Niemczech, Włoszech, Francji, Korei, Turcji i Szwajcarii. Współpracowała z takimi

markami, projektantami i fotografami jak: Balenciaga, Christian Dior, Dolce & Gabbana, Missoni, Versace, Céline, Givenchy, Bulgari, Lanvin, Guerlain, Ralph Lauren, Polo Jeans, Victoria's Secret, Earl Jeans, Mario Testino, Steven Meisel, Nick Knight, Steven Klein, Craig McDean, Michael Thompson, Mert & Marcus, Inez & Vinoodh, Alex Cayley, Solve Sundsbo, Regan Cameron, Phil Poynter, Corrine Day, Gilles Bensimon, Patrick Demachelier.

Sportowcy

Bliźniętami są piłkarze Marcin i Michał Żewłakow (ur. 22 kwietnia 1976 w Warszawie). Marcin Żewłakow – grający na pozycji napastnika, reprezentant Polski, zawodnik Korony Kielce. Karierę rozpoczynał w zespole Drukarza Warszawa. Następnie występował w Marymoncie Warszawa, Polonii Warszawa, Hutniku Warszawa, SK Beveren i Excelsiorze Mouscron. Na zasadzie wypożyczenia zasilił FCV Dender EH, a w 2008 r. przeniósł się do cypryjskiego APOEL-u Nikozja. Z cypryjskim zespołem wystąpił w Lidze Mistrzów. W 2010 r. przeniósł się do GKS Bełchatów, a następnie przeszedł do Korony Kielce. Brał udział w Mistrzostwach Świata 2002, gdzie strzelił bramkę zespołowi Stanów Zjednoczonych.

Brat bliźniak Michał – obrońca Legii Warszawa, były reprezentant Polski. Od czerwca 2011 r. zawodnik Legii Warszawa. W 2010 r., w meczu z Ekwadorem, po raz 101 wystąpił w drużynie narodowej. Tym samym pobił należący do Grzegorza Laty rekord występów w reprezentacji.

Muzycy

Amerykański piosenkarz i aktor Elvis Aaron Presley (ur. 8 stycznia 1935 w Tupelo, zm. 16 sierpnia 1977 w Memphis) miał brata bliźniaka. Często nazywany Królem *rock'n'rolla* lub po prostu, Królem. Elvis Presley był prekursorem *rock and rolla* i znaczącą postacią w kulturze masowej XX wieku. Sprzedał ponad miliard płyt na całym świecie – najwięcej w dziejach muzyki. Został określony przez magazyn *Billboard* najlepszym artystą lat pięćdziesiątych XX wieku. Po śmierci został pożegnany przez prezydenta USA Jimmy'ego Cartera słowami: „Jego muzyka, jego osobowość zmieniły oblicze amerykańskiej kultury. Elvis Presley był symbolem buntowniczego ducha naszego narodu”. W 1986 r. został wprowadzony do *Rock and*

Roll Hall of Fame. Trzydzieści pięć minut przed jego urodzeniem urodził się martwy jego brat bliźniak Jesse Garon Presley.

Lekarze

Stewart i Cyril Marcus byli bliźniakami, ginekologami, którzy praktykowali i mieszkali razem w Nowym Jorku. 19 lipca 1975 r., zostali znalezieni martwi w swoim mieszkaniu na Manhattanie 450 East 63rd Street z powodu uzależnienia od barbituranów. Mieszkanie braci Marcus oraz okoliczności ich śmierci są przedmiotem artykułu w kolekcji esejów Rona Rosenbauma, *The Secret Parts of Fortune*. Reżyser David Cronenberg przygotował w 1988 r. film *Dead Ringers* o ich upadku i śmierci.

W niniejszym rozdziale wymieniono tylko 12 par bliźniąt z różnych okresów historii, kultur i środowisk. W piśmiennictwie naukowym, literaturze i mediach można znaleźć setki słynnych bliźniąt, celem było wskazanie, że spotykani są na co dzień i często przebijają się do wąskiej grupy najbardziej rozpoznawanych osób na Świecie, reprezentując różne grupy społeczne i zawodowe.

1.3. Cięża wielopłodowa

Ciąża wielopłodowa, ciąża mnoga (*graviditas multiplex, multifetalis*) oznacza jednoczesny rozwój w jamie macicy dwóch lub więcej płodów. W zależności od liczby rozwijających się płodów wyróżnia się ciążę bliźniaczą (*graviditas gemellaris, bigeminalis*), trojaczą (*graviditas trigeminalis*), czworaczą (*graviditas quadrigeminalis*), pięcioraczą (*graviditas quintigeminalis*) itd., a urodzone z nich noworodki nazywane są: bliźniętami (*gemelli*), trojaczkami (*trigemi*), czworaczkami (*quadrigemi*), pięcioraczkami (*quintigemi*) (Malinowski i Bożiłow, 2003). Jest wynikiem implantacji kilku zarodków powstałych w wyniku jednoczesnej owulacji wielu pęcherzyków jajnikowych (ciąże mnogie różne zygotycznie) lub w wyniku podziału jednego zarodka na zarodki potomne (ciąże mnogie jednozygotyczne). W wyniku ciąży trojacznej lub z większą liczbą dzieci, można spodziewać pojawienia się dzieci jednozygotycznych, jak również dwuzygotycznych. Cięże mnogie polizygotyczne występują znacznie częściej podczas hormonalnego leczenia bezpłodności, najczęściej do zapłodnienia dochodzi w trakcie jednego stosunku

płciowego. W niektórych przypadkach może dojść do zapłodnienia na skutek kilku oddzielnych stosunków płciowych (tzw. nadpłodnienie – łac. *superfecundatio*), co umożliwia urodzenie z jednej ciąży dwóch lub większej liczby dzieci posiadających osobnych ojców. Innym, teoretycznym typem ciąży polizygotycznej jest dodatkowe zajście w ciążę podczas ciąży (łac. *superfetatio*) w następstwie kolejnej owulacji. Przyjmuje się jednak, że domniemane przypadki dodatkowego zapłodnienia wynikają z nierównomiernego wzrostu płodów pochodzących z zapłodnienia w tym samym okresie (Malinowski, 2011a).

Ciąże wielopłodowe pojawiają się samoistnie u człowieka z częstością 1,05% - 1,35%. Szczególnie często rodzą się bliźnięta - raz na 80 porodów, co oznacza, że jeden na 40 noworodków jest bliźniakiem. Przyjmuje się, że ciąży bliźniacze stanowią początkowo do 75% wszystkich ciąż, przy czym donoszone zostaje tylko 5%, pozostałe ciąży kończą się jako ciąży pojedyncze (Słomski i wsp., 2003b). Ciąże jednozygotyczne występują w populacji z częstością 0,3-0,4%. Częstość występowania spontanicznych ciąży różnozygotycznych uzależniona jest od szeregu czynników takich jak wiek matki i jej przynależność etniczna. Ciąża wielopłodowa jednozygotyczna charakteryzuje się stabilnością występowania. Występuje na całym świecie ze względnie stałą częstością, tak więc stosunek bliźniąt jednozygotycznych do dwuzygotycznych znacząco zmienia się w różnych częściach świata. Liczni autorzy dowodzą, że częstość spontanicznie występujących ciąż mnogich stanowi wiarygodny współczynnik płodności danej populacji. Częstość narodzin bliźniąt na 1000 żywych urodzeń wynosi 6 w Azji, 10-20 w Europie i USA oraz prawie 40 w Afryce. W Japonii jeden na 250 noworodków jest bliźniakiem, natomiast w Nigerii jeden na 11. Jednak w populacji Afroamerykanów tylko 26 na 1000 noworodków to bliźnięta, co tłumaczy się wpływem lokalizacji geograficznej oraz domieszką genów rodzimych populacji amerykańskich (Hall, 2003). Obecny poziom wiedzy medycznej pozwala na rozwiązanie wielu problemów związanych z rozwojem ciąż wielopłodowych, jednak etiologia ich powstawania w wielu punktach pozostaje nadal w sferze domysłów i stanowi jedno z bardziej interesujących zagadnień w etiologii rozrodu człowieka. Częstość występowania spontanicznych ciąż mnogich w ostatnich latach maleje.

Mimo że bliźnięta stanowią najczęstsze przypadki ciąż wielopłodowych, pojawiają się coraz częściej przypadki ciąż z wieloma płodami, co ma również związek ze wspomaganym rozrodem. Pierwszy znany przypadek narodzin ośmioraczków

pochodzi z 1998 r., kiedy to w nigeryjskiej rodzinie Chukwu w Teksasie urodziło się ośmioro dzieci, przy czym jedno zmarło w pierwszym tygodniu, a pięcioro dziewczynek i dwóch chłopców rozwija się prawidłowo. Najwięcej emocji wzbudziły jednak narodziny ośmioraczków Suleman w 2009 r. w Bellflower (Kalifornia), w wyniku sztucznego zapłodnienia nasieniem dawcy. Nadya Suleman jest matką jeszcze sześciorga dzieci, w tym jednej pary bliźniąt, wszystkie dzieci zostały także urodzone w wyniku sztucznego zapłodnienia nasieniem tego samego dawcy. Sprawa Suleman związana była z pojawieniem się kontrowersji dotyczących stosowania technik wspomaganego rozrodu u kobiety niezamężnej z wykorzystaniem nasienia dawcy, wieku kobiety, liczby wprowadzonych zarodków, hospitalizacji dzieci, jak również pokrywania kosztów takich zabiegów u osoby utrzymującej się z zasiłku (Rosenthal, 2010; Ory, 2010). W związku z nagłośnieniem sprawy lekarz przeprowadzający zabieg sztucznego zapłodnienia u pani Suleman Michael Kamrava został pozbawiony prawa wykonywania zawodu przez *Medical Board of California*, z dniem 1 lipca 2011 r.

1.3.1. Cięża bliźniacza dwuzygotyczna

Najczęściej występującą postacią ciąży wielopłodowej u człowieka jest ciąża bliźniacza dwuzygotyczna (*graviditas gemellaris dizygotici s. biovulares*), następstwo poliowulacji, czyli jednoczesnego uwolnienia co najmniej dwóch komórek jajowych z osobnych pęcherzyków Graafa. W wyniku zapłodnienia dwóch komórek jajowych przez dwa plemniki powstają dwa oddzielne, różne genetycznie zarodki. Rozwijające się płody, tej samej albo odmiennej płci, nazywane są bliźniakami dwuzygotycznymi lub dwujajowymi (*gemiini dizygotici s. biovulares*). Bliźnięta dwuzygotyczne posiadają 50% wspólnych cech genetycznych, podobieństwo genetyczne między nimi jest więc na takim samym poziomie jak między rodzeństwem posiadającym obu wspólnych rodziców. Bliźnięta dwuzygotyczne zawsze mają odrębną kosmówkę i owodnię. Występowanie ciąży bliźniaczej dwuzygotycznej można wykryć prenatalnie w badaniach ultrasonograficznych tylko wówczas, gdy bliźnięta różnią się płcią. W innym przypadku konieczne jest późniejsze wykonanie oznaczeń grup krwi, badań cytogenetycznych, typowania antygenów HLA czy analizy DNA (Malinowski i Koszada, 2003).

Ciąże bliźniacze dwuzygotyczne stanowią około 70% wszystkich ciąż bliźniaczych. Częstość narodzin bliźniąt dwuzygotycznych jest różna w różnych populacjach (Ananth i Chauhan, 2012). W ostatnim stuleciu w krajach rozwiniętych obserwowano powolny spadek liczby narodzin bliźniąt, który tłumaczono zmniejszającym się wiekiem matki i narastającą urbanizacją. Natomiast w latach 80-tych XX wieku częstość narodzin bliźniąt dwuzygotycznych gwałtownie wzrosła. Za przyczynę notowanego wzrostu uważa się częste leczenie niepłodności środkami hormonalnymi oraz wprowadzenie techniki zapłodnienia *in vitro*. W Wielkiej Brytanii częstość ciąż wielopłodowych wzrosła z 10,7 na 1000 w 1985 r., poprzez 14,4 na 1000 w 1997 r., do 16,3 na 1000 w 2009 r. Według badań szwedzkich za to zjawisko w 1/3 odpowiada rozwój technologii wspomagania rozrodu, w 1/3 indukcja owulacji i również w 1/3 wzrost odsetka kobiet powyżej 35 r. życia w okresie porodu. Podobnie rzecz się miała w Polsce, gdzie w latach powojennych do 1979 r. liczba porodów bliźniaczych na 1000 porodów ogółem malała od 12,15 w latach 1949-1954 do 8,1 w latach 1975-1979. Później liczba ta zaczęła rosnąć osiągając dwa zbliżone wielkością szczyty w całej populacji w latach 1986 i 1991. Trzeba podkreślić, że w Polsce nasilający się wpływ hormonalnego leczenia niepłodności i zapłodnień pozaustrojowych nie zaważył na częstości narodzin bliźniąt, lecz zaznaczył się w zwiększającej się systematycznie w coraz większym tempie liczbie urodzeń trojacznych i ponadtrojacznych (Słomski i wsp., 2003b; Sawicki i Sawicka, 2003).

Koniecznym warunkiem do wystąpienia ciąży bliźniaczej dwuzygotycznej jest polioowulacja, zjawisko rzadko spotykane u człowieka jednak często występujące u większości zwierząt, związane ze wzrostem stężenia hormonów gonadotropowych w surowicy krwi kobiety. Poziom hormonów zależy od wielu czynników m.in. od przynależności rasowej matki (rasa biała), wieku matki (powyżej 35 roku życia), jej wzrostu i masy ciała, przeszłości położniczej (wyższa liczba poprzednich ciąż) a nawet pory roku, w której ciąża została poczęta. Uważa się, że częstość poczęcia ciąż bliźniaczych dwuzygotycznych jest proporcjonalna do naświetlenia, ponieważ w północnej części Finlandii i w Japonii obserwuje się wzrost liczby poczęć bliźniąt w miesiącach letnich. Polioowulacja może również zostać wzbudzona poprzez podanie preparatów stosowanych w leczeniu niepłodności, takich jak gonadotropiny czy klomifen. Odsetek ciąż wielopłodowych po zastosowaniu gonadotropin wynosi od 17% do 40%, natomiast po zastosowaniu klomifenu od 8% do 10%. Obserwowane różnice

mogą wynikać z częstości strat płodów w ciążyach wielopłodowych powstałych w wyniku egzogennej stymulacji owulacji, która dla klomifenu sięga 64% a nie jest obserwowana w przypadku stosowania gonadotropin. Ciąże dwuzygotyczne częstsze są u kobiet zachodzących w ciążę krótko po odstawieniu doustnych środków antykoncepcyjnych, po okresie laktacji oraz po terapii wtórnego braku miesiączki w przebiegu jadłowstrętu psychicznego (*anorexia nervosa*) (Hall, 2003; Malinowski i Bożiłow, 2003).

Poza powyżej opisanym mechanizmem powstawania bliźniąt dwuzygotycznych rozważa się również możliwość istnienia innych mechanizmów prowadzących do rozwoju ciąży bliźniaczej dwuzygotycznej. Jednym z nich jest zapłodnienie przez dwa plemniki dwóch komórek jajowych, które rozwinęły się w tym samym oocyście i zostały jednocześnie uwolnione. Za prawdopodobieństwem tej teorii przemawiają liczne dwujajowe pęcherzyki Graafa znajduwane w aspiratach z jajników pobranych do zapłodnienia *in vitro*. Stanowi ona również, przynajmniej teoretycznie, wytłumaczenie dla zaskakujących i trudnych do interpretacji nieprawidłowości rozwojowych u płodów, takich jak: chimery obejmujące wszystkie komórki ciała oraz zrosnięte ze sobą bliźnięta różnej płci. Kolejną grupę teoretycznie możliwych wyjaśnień mechanizmu powstawania ciąży bliźniaczych stanowią ciążę bliźniacze jednojajowe dwuplemnikowe. Wśród nich wymienia się przypadki, w których pojedyncza komórka jajowa lub komórka jajowa i jej I lub II ciało kierunkowe ulegają zapłodnieniu dwoma plemnikami (ang. *polar body twinning*). Udokumentowano jednak tylko jeden przypadek tego typu etiologii ciąży bliźniaczej. Kolejnym mechanizmem jest zjawisko nadpłodnienia (ang. *superfecundation*), które polega na dodatkowym zapłodnieniu drugiej komórki jajowej, uwolnionej w tym samym cyklu płciowym. Do zapłodnienia dochodzi przez plemniki pochodzące z różnych stosunków płciowych, odbytych w krótkim odstępie czasu po sobie, z jednym lub różnymi partnerami (ang. *heteropaternal superfecundation*). Drugie zapłodnienie występuje zwykle w odstępie 3-4 dni, niektórzy autorzy wskazują na możliwość większego odstępu czasu, 1-2 tygodnie. Innym mechanizmem jest dodatkowe zapłodnienie (ang. *superfetation*), czyli poczęcie następnej ciąży, podczas gdy w macicy rozwija się już jedna zygota. Ten mechanizm może tłumaczyć występujące różnice w stopniu rozwoju i wielkości rozwijających się w jednej ciąży płodów, jednak wielu naukowców uważa, że jest on trudny do zaakceptowania. Teoretycznie przyjmuje się, że okres czasu między pierwszym a drugim zapłodnieniem

nie może przekraczać jednego miesiąca (Malinowski i Bożiłow, 2003;).W przypadku ciąży trojacznych lub o wyższej krotności, w których dochodzi do redukcji liczby płodów do dwóch (samoistnej lub powstałej w wyniku ingerencji zewnętrznej) powstanie ciąży bliźniaczej dwuzygotycznej ma charakter wtórny.

Poszukuje się również czynników genetycznych, związanych z wystąpieniem ciąży wielopłodowej. Nadal nie jest wyjaśnione czy skłonność do powstawania ciąży bliźniaczych dwuzygotycznych jest związana z czynnikiem matczynym, czy ojcowskim. Z jednej strony podkreśla się, że odsetek bliźniąt u matek trojaczek wzrasta 2-3-krotnie a występowanie ciąży bliźniaczych u kobiet, które urodziły już bliźnięta 2-krotnie. Stwierdzono również, że niedobór enzymu α -1 antytrypsyny w śluzie szyjkowym kobiety może powodować przyspieszony pasaż plemników, tym samym zwiększoną możliwość zapłodnienia komórek jajowych uwolnionych w procesie poliowulacji. Z drugiej strony nie można wykluczyć udziału czynnika ojcowskiego w występowaniu ciąży bliźniaczych dwuzygotycznych. Przypuszcza się, że przedłużona zdolność zapładniająca nasienia może odgrywać istotną rolę w etiologii opisywanego typu ciąży (Malinowski i Bożiłow, 2003; Badura i Latos-Bieleńska, 2003).

Ciąża bliźniacza dwuzygotyczna zaliczana jest do grupy wysokiego ryzyka. Rodzaje spotykanych tu powikłań są w zasadzie takie jak w ciążach z rozwijającym się pojedynczym płodem tyle, że występują one ze zwiększoną częstością. Najczęściej występujące nieprawidłowości dotyczą wad rozwojowych płodu, które wynikają z ucisku, spowodowanego rozwojem dwóch płodów w przestrzeni, która przystosowana jest do rozwoju jednego płodu. Ucisk prowadzi do spowolnienia przybierania przez rozwijające się płody na wadze ok. 30 tygodnia ciąży oraz wystąpienia wad wrodzonych takich jak: nieprawidłowa budowa głowy płodu, deformacja stóp i szpotawość kolan (Hall, 2003).

1.3.2. Ciąza bliźniacza jednozygotyczna

Rzadziej występującą postacią ciąży bliźniaczej jest ciąża bliźniacza jednozygotyczna, stanowiąca około 30% wszystkich ciąży bliźniaczych, a tylko 0,3% wszystkich porodów. Powstaje w wyniku zapłodnienia pojedynczej komórki jajowej przez jeden plemnik, po czym następuje podział zarodka na dwa, genetycznie

identyczne zarodki. Rozwijające się w takiej ciąży bliźnięta nazywane są jednozygotycznymi lub jednojajowymi (*gemi monozygotici s. monoovulares*), w piśmiennictwie anglo-amerykańskim określane są również mianem prawdziwych (ang. *true*) lub identycznych (ang. *identical*). Uważa się, że są naturalnie występującymi klonami. Cięża bliźniacze jednozygotyczne stanowią 1/3 naturalnie powstających cięża bliźniaczych, to oznacza, że jedno na 165 dzieci jest bliźniakiem jednozygotycznym (Hall, 2003; Malinowski i Bożyłow, 2003; Słomski i wsp., 2003b).

Badania prenatalne USG oraz badania poporodowe łożyska i błon płodowych pozwalają wnioskować na temat czasu, w którym nastąpił rozwój ciąży bliźniaczej jednozygotycznej. W prawidłowo przebiegającym procesie embriogenezy kosmówka zaczyna formować się około 3 dnia po zapłodnieniu. Jeżeli do podziału zarodka dochodzi przed upływem 4-tego dnia od zapłodnienia wówczas rozwijające się płody posiadają odrębne kosmówki i owodnie, rozwija się ciąża dwukosmówkowa dwuowodniowa. Przyjmuje się, że bliźnięta, które posiadają wspólną kosmówkę, ale odrębne owodnie powstały na skutek podziału zarodka po uformowaniu się kosmówki, między 4 a 7 dniem po zapłodnieniu. Ten rodzaj ciąży określono jako jednokosmówkową dwuowodniową. Pomiędzy 6 a 8 dniem rozwija się owodnia, dlatego podział zarodka, który dokonał się między 7 a 14 dniem po zapłodnieniu, prowadzi do rozwoju ciąży jednokosmówkowej jednoowodniowej, w której płody dzielą zarówno wspólną kosmówkę jak i owodnię (tabela 1) (Hall, 2003; Malinowski i Bożyłow, 2003).

Tabela 1. Rodzaje ciąży bliźniaczej jednozygotycznej w zależności od terminu podziału zarodka i częstość ich powstawania (Hall, 2003; Malinowski i Bożyłow, 2003).

Rodzaj ciąży bliźniaczej jednozygotycznej	Termin podziału zarodka	Częstość występowania wśród żywych urodzeń bliźniąt	
		jednozygotycznych	ogółem
dwukosmówkowa dwuowodniowa	≤ 4 dni po zapłodnieniu	25-30%	80%
jednokosmówkowa dwuowodniowa	4-7 dzień po zapłodnieniu	70-75%	25%
jednokosmówkowa jednoowodniowa	≥ 7 dnia po zapłodnieniu	1-2%	1%

Ciąża bliźniacza dwukosmówkowa dwuowodniowa stanowi 80% ciąż bliźniaczych ogółem i 25-30% ciąż jednozygotycznych. Jest najczęściej występującą formą ciąży bliźniaczej u człowieka. Płody mogą być tej samej lub odmiennej płci. Obecność dwóch kosmówek i dwóch owodni w 90% świadczy o ciąży dwuzygotycznej. Tylko 10% bliźniąt urodzonych z ciąży dwukosmówkowej dwuowodniowej jest jednozygotyczna. W przypadku ciąży jednozygotycznej podział pierwotnie pojedynczego zarodka na dwa dokonuje się do czwartego dnia po zapłodnieniu. Ciąże dwukosmówkowe dwuowodniowe charakteryzują się obecnością dwóch dysków łożyska połączonych ze sobą bądź rozdzielonych. Przegroda rozdzielająca płody zawsze składa się z czterech warstw (dwie kosmówki i dwie owodnie).

Ciąża bliźniacza jednokosmówkowa dwuowodniowa jest zawsze jednozygotyczna, więc płody są tej samej płci. Stanowi u rasy białej około 25% ogółu ciąż bliźniaczych i 70-75% wszystkich ciąż jednozygotycznych. Powstaje w wyniku podziału pierwotnie pojedynczego zarodka na dwa, dokonującego się między piątym a siódmym dniem od zapłodnienia. Posiada pojedynczy dysk łożyska a przegroda rozdzielająca płody zawsze składa się z dwóch warstw (dwie owodnie). W łożysku często występują połączenia naczyniowe między płodami.

Ciąża bliźniacza jednoowodniowa jest zawsze jednozygotyczna i jednokosmówkowa, płody są tej samej płci. Stanowi do 1% ogółu ciąż bliźniaczych i około 2% ciąż jednokosmówkowych. Powstaje w wyniku podziału pierwotnie pojedynczego zarodka na dwie struktury embrionalne, dokonującego się po siódmym dniu od zapłodnienia. Charakteryzuje się brakiem przegrody rozdzielającej płody. W tego rodzaju ciążach można spotkać płody niecałkowicie rozdzielone, asymetryczny rozdział bliźniąt oraz poskręcane sznury pępowinowe (Hall, 2003; Ropacka, 2003; Malinowski, 2003).

Próby przedstawienia mechanizmu odpowiedzialnego za podział zarodka podejmowano już w latach 60-tych ubiegłego wieku, jednak mimo licznych potwierdzeń niektórych teorii w praktyce położniczej, nadal przyjmuje się, że powstanie bliźniąt jednozygotycznych jest dziełem przypadku. Nie zaobserwowano wpływu wieku matki, rasy ani przeszłości położniczej kobiety na częstość występowania ciąż jednozygotycznych. Stwierdzono natomiast większą częstość występowania bliźniąt jednozygotycznych w grupie ciąż powstałych w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego i sztucznie indukowanej owulacji, zwłaszcza, gdy stosowano zabiegi mikromanipulacji w

obrębie *zona pellucida*. Ostatnie doniesienia wskazują również na niewielką dziedziczną skłonność do występowania bliźniąt jednozygotycznych w linii maczynie (Malinowski i Bożiłow, 2003; Badura i Latos-Bieleńska, 2003).

1.3.3. Powikłania w ciążach wielopłodowych

Ciąża wielopłodowa zaliczana jest do ciąży wysokiego ryzyka. Wiąże się to z możliwością wystąpienia wielu powikłań, które, mimo iż występują także w ciążach jedнопłodowych, w ciążach mnogich pojawiają się ze zwiększoną częstością (Oloyede i wsp., 2012). Niekiedy są one wyłącznie charakterystyczne dla ciąży wielopłodowej (Norwitz i wsp., 2005). Ciąże trojacze i czworacze charakteryzują się znacznie wyższym ryzykiem występowania komplikacji maczynnych i płodowych niż ciążę bliźniacze. Wydaje się, że obniżenie tego ryzyka może być związane z cechami antropometrycznymi matki czy zwyczajami żywieniowymi (Luke i Brown, 2008). Biorąc pod uwagę przyczyny tych powikłań, możemy je podzielić na maczynie i płodowe.

Do powikłań maczynnych zalicza się: a) niedokrwistość ciężarnych; b) nadciśnienie tętnicze indukowane ciążą (PIH – ang. *pregnancy induced hypertension*); c) niepowściągliwe wymioty; d) cholestazę ciężarnych; e) cukrzycę ciężarnych; f) przedwczesne pęknięcie błon płodowych; g) przedwczesne oddzielenie łożyska; h) łożysko przodu oraz i) niewydolność cieśniowo-szyjkową.

Najczęściej występującą niedokrwistością w ciąży nie tylko bliźniaczej jest niedokrwistość niedobarwliwa, związana z niedoborem żelaza jak również kwasu foliowego. Obecność ciąży wielopłodowej sprzyja obniżaniu wartości hemoglobiny $Hb < 10$ g/dl i hematokrytu $Ht < 30\%$ podczas I trymestru ciąży. Pod koniec II trymestru osiągają one najniższą wartość, a następnie stopniowo wzrastają podczas III trymestru (Ronin-Walknowska, 2003).

Ciąże bliźniacze, w których jest odpowiednio większa liczba płodów oraz większa łączna masa łożyska, wymagają większej podaży żelaza. Występowanie niedokrwistości niedoborowej w ciąży wielopłodowej sięga 21-36% i jest 2-3-krotnie wyższe niż w ciąży pojedynczej (Ronin-Walknowska, 2003). Malinowski (Malinowski, 1998) przedstawia to następująco: ciąża pojedyncza 3,0-4,1%, ciąża bliźniacza 6,7-11%, trojacza 13,3-23,1%, czworacza 49%. Newman i Luke (Newman i Luke, 2000; Ronin-

Walknowska, 2003) podają, iż wartości hemoglobiny i hematokrytu osiągają największy spadek w 20-24 tygodniu ciąży.

Nadciśnienie tętnicze indukowane ciążą (PIH – ang. *pregnancy induced hypertension*) rozpoznaje się wówczas, gdy wartości ciśnienia tętniczego przekraczają 140/90 mm Hg (Korszun, 2004). W przypadku ciąży wielopłodowej ryzyko wystąpienia nadciśnienia tętniczego wzrasta 3-5-krotnie, w porównaniu z ciążą pojedynczą (Korszun, 2004). W Stanach Zjednoczonych nadciśnienie tętnicze stanowi drugą co do częstości przyczynę zgonu matki i wynosi 15-20% (Dera i wsp., 2007). Często ujawnia się już we wczesnym okresie ciąży i może doprowadzić w krótkim czasie do wystąpienia stanu przedrzucawkowego (ciśnienie tętnicze RR>140/90 mm Hg, któremu towarzyszy znamieny białkomocz – utrata >300 mg białka na dobę), zaobserwowanego u około 11,4% pacjentek z ciąż bliźniaczych, a także do rzucawki (napady toniczno-kloniczne, śpiączka u ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym) lub zespołu HELLP (ang. *hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets*) (Leszczyńska-Gorzelałak i wsp., 2000). Leszczyńska-Gorzelałak i wsp. (2000) na podstawie własnych obserwacji wykazali, iż u wieloródek stan przedrzucawkowy występował rzadziej (32%) niż u nieródek (68%).

Nadciśnienie tętnicze indukowane ciążą w przebiegu ciąży wielopłodowej może doprowadzić do takich powikłań jak: wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu (IUGR – ang. *intrauterine growth restriction*), obumarcia płodu, wystąpienia zatoru płucnego i zawału. Wynikiem nasilenia się objawów nadciśnienia tętniczego indukowanego ciążą może być również przedwczesne oddzielenie się łożyska (większa liczba naczyń łożyska w ciąży wielopłodowej niż pojedynczej) (Bręborowicz i wsp., 2003). Według Malinowskiego (Malinowski, 1998) częstość występowania nadciśnienia tętniczego w ciąży przedstawia się następująco: ciąża pojedyncza 4,7-5,6%, ciąża bliźniacza 12,9-14,5%, trojaczka 28,6%, czworaczka 67%.

Niepowściągliwe wymioty występują częściej w przypadku ciąż wielopłodowych, stanowią około 10% w ciąży bliźniaczej i 46% w ciąży trojacznej. Niepowściągliwe wymioty przyczyniające się do znacznego stopnia odwodnienia, zaburzeń elektrolitowych, kwasicy, ketonurii i utraty masy ciała, stają się poważnym zagrożeniem dla zdrowia matki. Niewątpliwie przyczyna tego typu zaburzeń tkwi w większej łącznej masie tkanki łożyskowej i zwiększonej produkcji gonadotropiny

kosmówkowej (hCG – ang. *human chorionic gonadotropin*) (Bręborowicz i wsp., 2003).

Częstość występowania cholestazy ciężarnych sięga 4-9% ciąż bliźniaczych. Obserwuje się wzrost stężenia transaminaz u około 60% pacjentek a wzrost stężenia bilirubiny oraz kwasów żółciowych u około 25% kobiet ciężarnych (Bobrowska, 2003; Bręborowicz, 2006). Badania Gonzaleza i wsp. (1989) (Bręborowicz i wsp., 2003) donoszą o występowaniu cholestazy ciężarnych u 4,7% ciąż pojedynczych i 20,9% ciąż bliźniaczych. Jako przyczynę tego typu zaburzeń Gonzalez podaje znacznie wyższą produkcję estrogenów i progesteronu przez jednostkę płodowo-łożyskową w ciąży mnogiej. W przypadku wystąpienia cholestazy wewnątrzwątrobowej w ciąży bliźniaczej istnieje większe ryzyko porodu przedwczesnego, odsetka cięć cesarskich, a objawy pojawiają się wcześniej niż w ciążach pojedynczych (Bobrowska, 2003).

Cukrzyca ciężarnych typu 1 (G_1DM – ang. *gestational diabetes mellitus type 1*) występuje, gdy organizm kobiety ciężarnej nie jest w stanie wytwarzać odpowiedniej ilości insuliny bądź nie jest możliwe utrzymanie prawidłowego poziomu glikemii przy właściwym wytwarzaniu insuliny. Czynnikiem powodującym występowanie cukrzycy u kobiet ciężarnych jest zatem deficyt wytwarzania insuliny oraz insulinooporność. Wzrost stężenia estrogenów, progesteronu, kortyzolu, laktogenu łożyskowego i prolaktyny w ciąży sprzyja rozwojowi cukrzycy (Pieles i wsp., 2004).

Opinie, że ciąża bliźniacza zwiększa ryzyko wystąpienia cukrzycy są podzielone. Prowadzone badania (Bręborowicz i wsp., 2003) wykazały, że częstość występowania G_1DM w ciążach pojedynczych wynosi 5,6%, a w ciążach bliźniaczych 7,4%. Roach i wsp. (Roach i wsp., 1998; Pieles i wsp., 2004) stwierdzili natomiast, że częstość G_1DM w ciążach pojedynczych wynosi 9,1%, a w ciążach bliźniaczych 15,5%. Schwartz i wsp. (Schwartz i wsp., 1999) wykazali obecność G_1DM w 4,2% ciąż pojedynczych i 7,7% ciąż bliźniaczych. Wskazuje to, że częstość występowania cukrzycy w ciąży zależna jest od liczby płodów. Pieles i wsp. (2004) analizując własny materiał badawczy zauważyli, że częstość występowania cukrzycy w ciąży bliźniaczej wynosi 12,25%, natomiast w ciąży pojedynczej 8,08%. Odmienne poglądy prezentował Henderson i wsp. (Henderson i wsp., 1995), twierdząc na podstawie przeprowadzonych badań, że ciąża bliźniacza nie wpływa istotnie na ryzyko wystąpienia cukrzycy ciężarnych.

Przedwczesne pęknięcie błon płodowych występuje u około 5-8% ciąż wielopłodowych i jest najczęściej wynikiem zakażenia wewnątrzmacicznego, jak również nadmiernego rozciągnięcia mięśnia macicy w przypadku ciąż wielopłodowych (Bręborowicz, 2006). Częstość występowania w ciążach bliźniaczych jest trzykrotnie wyższa niż w ciążach pojedynczych. W ciążach trojacznych przedwczesne pęknięcie błon płodowych stanowi główną przyczynę śmierci noworodków i ich zachorowalności (Malinowski, 2011b).

Przedwczesne oddzielenie łożyska stanowi około 0,9-1,8% powikłań w ciąży bliźniaczej. Związane jest z większą częstością występowania w ciąży mnogiej stanu przedrzucawkowego (*preeclampsja*), wcześniactwa oraz wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu (IUGR) (Bręborowicz, 2006). Stan przedrzucawkowy i komplikacje związane są często z nadmierną masą ciała matki przed ciążą bliźniaczą (Lučovnik i wsp., 2012). Spellacy i wsp. (Spellacy i wsp., 1990) wykazali występowanie przedwczesnego oddzielenia łożyska u 0,8% ciąż pojedynczych i u 2,2% ciąż bliźniaczych, natomiast Saftlas i wsp. (Saftlas i wsp., 1991) dowiedli, iż zjawisko przedwczesnego oddzielania się łożyska występuje 2,8-krotnie częściej w przypadku ciąż bliźniaczych w porównaniu z ciążami pojedynczymi.

Częstość występowania łożyska przodującego sięga około 0,9-1,2% (Bręborowicz, 2006). Na podstawie wielu lat doświadczeń stwierdzono, iż ciąża wielopłodowa, w której rozmiar łożyska sprzyja umiejscowieniu się tkanki łożyskowej w okolicy ujścia wewnętrznego szyjki macicy, może przyczynić się do powstania łożyska przodującego (Bręborowicz i wsp., 2003). Nie tylko rozmiary łożyska są czynnikami determinującymi występowanie łożyska przodującego w ciąży wielopłodowej. Badania ultrasonograficzne wykazały, że łożysko we wczesnym okresie II trymestru znajduje się w okolicy ujścia wewnętrznego, natomiast w dalszych tygodniach II i III trymestru przemieszcza się w kierunku trzonu macicy.

Niewydolność cieśniowo-szyjkowa występuje 15 razy częściej w ciążach wielopłodowych niż pojedynczych. Spowodowane może to być wieloma czynnikami, wśród których najczęstsze to wzmożona aktywność skurczowa macicy, zespół czynników endokrynych, czynnik mechaniczny oraz czynnik infekcyjny (Malinowski, 1998).

Wśród powikłań płodowych wyróżnia się: a) poród przedwczesny; b) wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu (IUGR); c) wady rozwojowe i anomalie

chromosomalne; d) zaburzenia oddychania; e) zgon wewnątrzmaciczny jednego z płodów oraz f) kolizje pępowinowe.

Poród przedwczesny jest najczęstszym powikłaniem ciąży wielopłodowej, stanowi około 50-60% wszystkich powikłań (Bręborowicz, 2006). Jest wielokrotnie uwarunkowany przedwczesną czynnością skurczową, nadciśnieniem tętniczym indukowanym ciążą (PIH), przedwczesnym dojrzewaniem szyjki macicy, przedwczesnym pęknięciem pęcherza płodowego spowodowanym często zakażeniem wewnątrzmacicznym (Szymański i wsp., 2000).

Przeciętny czas trwania ciąż wielopłodowych jest różny, w ciąży pojedynczej wynosi 39 tygodni, ciąży dwojacznej – 35 tygodni, ciąży trojacznej – 32 tygodnie, ciąży czworacznej – 29 tygodni (Malinowski, 2008). Wykazano także, że czas trwania ciąży bliźniaczej zagrożonej porodem przedwczesnym jest krótszy u kobiet młodych oraz rodzących po raz pierwszy, jak również u bliźniąt jednokosmówkowych (Malinowski, 1998).

Wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu (IUGR - *intrauterine growth restriction*) stanowi około 46% powikłań ciąż bliźniaczych. W ciąży bliźniaczej do 32 tygodnia, a w ciąży trojacznej do 29 tygodnia przyrost masy ciała przebiega podobnie jak w ciąży jedнопłodowej. W miarę upływu czasu trwania ciąży wzrastanie płodów ulega spowolnieniu. Obserwuje się tym samym różnice w masach obu płodów: I° – gdy różnica w masach wynosi 15-25%, II° – powyżej 25% (charakterystyczny dla bliźniąt jednokosmówkowych spowodowany zespołem przetoczenia krwi między płodami) (Bręborowicz, 2006; Malinowski, 2008; Siddiqui i McEwan, 2008; Kot i wsp., 2009; Świątkowska-Freund i Preis, 2010a).

Wady rozwojowe i anomalie chromosomalne w ciążach bliźniaczych występują 2-krotnie, a w ciążach trojacznych nawet 4-krotnie częściej niż w ciążach jedнопłodowych (Malinowski, 1998; Bręborowicz, 2006). Wśród najczęściej występujących wad rozwojowych wyróżnia się: stopę końsko-szpotawą, wrodzone zwichnięcie stawu biodrowego, wady serca, przepuklinę mózgową, wady przepony czy nerki torbielowate (Malinowski, 2008). Wady te mogą pojawić się u jednego z bliźniąt bądź obu jednocześnie, a stopień nasilenia może być taki sam albo różny. Ponadto wykazano, iż wady te występują częściej u bliźniąt jednozygotycznych niż dwuzygotycznych. Pamiętać należy również, iż wykorzystywane do potwierdzenia wad rozwojowych badania przesiewowe w oparciu o oznaczenie stężenia alfa-fetoproteiny

AFP oraz testu potrójnego (AFP, E₃- estriol, podjednostka beta gonadotropiny kosmówkowej β -hCG), charakteryzują się w przypadku ciąż wielopłodowych znacznie mniejszą czułością. Dlatego też często o wiele większe znaczenie odgrywa inwazyjna diagnostyka prenatalna (biopsja kosmówki, amniocenteza). Anomalie chromosomalne występują jedynie w przypadku ciąż bliźniaczych jednokosmówkowych. Zalicza się do nich płody niecałkowicie rozdzielone czy płód w płodzie (Malinowski, 1998; Bręborowicz, 2006; Malinowski i wsp., 2006).

Zaburzenia oddychania stanowią ok. 10% powikłań ciąż bliźniaczych. W związku z tym, że średni czas trwania ciąży wielopłodowej jest krótszy niż ciąży jedнопłodowej, może prowadzić to do zaburzeń oddychania, wynikających z braku osiągnięcia odpowiedniej dojrzałości płuc płodów. Wykazano, że odpowiednia profilaktyka kortykosterydowa, gdy konieczne jest ukończenie ciąży przed terminem, zmniejsza ryzyko powikłań o typie zaburzeń oddychania. Płody osiągają odpowiednią dojrzałość płuc do 34 tygodnia ciąży, stąd ważne jest wdrożenie profilaktyki sterydowej w tym czasie, w przypadku gdy jest to konieczne (Bręborowicz, 2006; Oszukowski, 2010).

Zgon wewnątrzmaciczny jednego z płodów występuje częściej w I trymestrze ciąży i stanowi około 25-50% przypadków, rzadziej w II trymestrze 2,4-4,6% i III trymestrze ciąży 3,0-14%. Dokonując analizy każdego okresu ciąży bliźniaczej wyodrębniono w przypadku tego powikłania trzy postacie: I trymestr – zespół znikającego płodu (ang. *vanishing twin syndrome*), II trymestr – płód papierowaty (łac. *fetus papyraceus*), III trymestr – płód zmacerowany (Marciniak i wsp., 2000; Malinowski, 2008). Wykazano również zależność pomiędzy odsetkiem zgonów jednego z płodów a kosmówkowością, w przypadku ciąż dwukosmówkowych 4%, natomiast jednokosmówkowych 12% (Siddiqui i McEwan, 2008). Dlatego też ryzyko powikłań takich jak wielotorbielowate rozmiękanie mózgu, porażenie mózgowe, aseptyczna martwica jelit i nadnerczy w ciążach bliźniaczych jednokosmówkowych ze względu na obecność połączeń naczyniowych jest znacznie wyższe i wynosi 25-50% (Siddiqui i McEwan, 2008; Malinowski, 2008).

Kolizje pępowinowe występują znacznie częściej w ciążach wielopłodowych niż pojedynczych, a w szczególności w ciążach jednokosmówkowych jednoowodniowych (28-60%). Kolizje sznurów pępowinowych będące najczęstszym powikłaniem tego rodzaju ciąż prowadzą do obumarcia obu płodów (Grzesiak i wsp., 2005).

Należy również wspomnieć o zespole przetoczenia krwi między płodami (TTTS – ang. *twin-to-twin transfusion syndrome*), jako powikłaniu ciąży bliźniaczej jednokosmówkowej dwuowodniowej. Etiologia tego zespołu związana jest z obecnością, funkcjonowaniem oraz liczbą połączeń naczyniowych tzw. anastomoz. Spotyka się je w prawie wszystkich łożyskach ciąż jednokosmówkowych. Wyróżnia się 3 typy połączeń naczyniowych: żylnno-żylnne, tętniczo-żylnne i tętniczo-tętnicze. Zaburzenie równowagi między anastomozami tętniczo-żylnnymi prowadzi do zespołu TTTS (Czuba i wsp., 2007; Siddiqui i McEwan, 2008; Malinowski i Dyrduła, 2009). U 85-90% bliźniąt przepływ krwi jest uregulowany i nie przyczynia się do powstania patologii. U 10-15% płodów jednokosmówkowych przepływ jest niesymetryczny i prowadzi do upustu krwi u jednego bliźniaka z jednoczesnym przetoczeniem jej drugiemu z bliźniąt (Świątkowska-Freund i Preis, 2010a).

Zespół przetoczenia krwi między płodami charakteryzuje się znacznym wzrostem objętości płynu owodniowego u biorcy (maksymalna głębokość kieszonki płynu owodniowego MVP>8 cm) i spadkiem objętości u dawcy (MVP<2 cm). Pierwsze objawy obserwuje się między 18-26 tygodniem ciąży. U biorcy pojawia się hiperwoleミア, poliuria i wielowodzie z rozdętym pęcherzem moczowym, które może przyczynić się do wystąpienia obrzęku płuc oraz niewydolności prawokomorowej z niedomykalnością zastawki trójdzielnej. U dawcy obserwuje się małowodzie oraz tzw. płód unieruchomiony (ang. *stuck twin*). Skrajną postacią TTTS jest zespół odwróconego kierunku przepływu krwi – TRAP (ang. *twin reversed arterial perfusion syndrome*). Mamy wówczas do czynienia z płodem bezsercowym, występującym z częstością 1% (Malinowski i Dec, 1995; Marciniak i wsp., 2000; Bręborowicz i wsp., 2003; Bręborowicz, 2006; China i wsp., 2007; Siddiqui i McEwan, 2008; Świątkowska-Freund i Preis, 2010a). Nieleczony zespół TTTS rozpoznany między 16-26 tygodniem ciąży jest przyczyną około 80-100% zgonów okołoporodowych (Świątkowska-Freund i Preis, 2010b).

Ponieważ ciążę bliźniaczą jednokosmówkową wykazują się zwiększoną zachorowalnością i śmiertelnością, wskazane jest wczesne wykrywanie kosmówkowości przez badanie ultrasonograficzne między 11-13 tygodniem ciąży, umożliwiające wcześniejsze prawidłowe prowadzenie ciąży (Manso i wsp., 2011). Badania prowadzone w latach 1999-2008 w Portugalii dla 504 ciąż (356 dwukosmówkowych dwuowodniowych, 148 jednokosmówkowych dwuowodniowych)

wykazały wcześniejsze porody dla bliźniąt jednokosmówkowych (43,9% vs 31,5%, $p < 0,05$), zwiększoną częstość występowania małowodzia i wielowodzia (9,8% vs 3,3%, $p < 0,001$), nierównomierny wzrost płodów (26,8% vs 14,8%, $p < 0,001$) oraz zahamowanie wewnątrzmaciczne wzrostu płodu (7,4% vs 3,7%, $p < 0,05$). Obserwowano również w tej grupie występowanie wcześniejszych porodów, częściej przeprowadzano poród metodą cesarskiego cięcia. Noworodki charakteryzowały się niższą masą urodzeniową, częściej pojawiał się zespół zaburzeń oddychania noworodka (5,8% vs 2,8%, $p < 0,05$), krwawienie dokomorowe (2,1% vs 0,4%, $p < 0,05$) i występowały zgony (7,8% vs 1,8%, $p < 0,001$). Podobne wyniki uzyskano również w Kanadzie, gdzie w latach 2001-2007 badaniom poddano 93 pary bliźniąt jednokosmówkowych w porównaniu z kolejnymi 428 parami bliźniąt dwukosmówkowych (Shrim i wsp., 2010).

1.3.4. Poród w ciąży wielopłodowej

Ważnym elementem porodu w ciąży wielopłodowej jest zapewnienie jej właściwego przebiegu, co jest związane z dużo większym zagrożeniem dla płodów niż w ciąży pojedynczej. Zwraca się uwagę na odpowiednie przygotowanie ciężarnej do porodu, z uwzględnieniem właściwej oceny kosmówkowości i owodniowości, liczby płodów, ich położenia, ustalenia optymalnego terminu hospitalizacji, właściwego wyboru oddziału położniczego, jak również wcześniejszego zaplanowania sposobu rozwiązania (Malinowski, 1998; Bręborowicz, 2006).

Ponieważ optymalny termin porodu w ciąży bliźniaczej nie jest dokładnie określony, wykazano, iż ukończenie ciąży między 37 a 39 tygodniem, przy masie urodzeniowej płodów wynoszącej od 2500 do 3100 g zmniejsza odsetek umieralności okołoporodowej noworodków (Bręborowicz i wsp., 2003; Bręborowicz, 2006; Malinowski, 2008). W oparciu o dane amerykańskie wykazano, iż najniższy odsetek zgonów okołoporodowych ma miejsce między 36 a 37 tygodniem w ciąży bliźniaczej oraz między 40 a 41 tygodniem w ciąży pojedynczej (Dera i wsp., 2007). Dodd i wsp. uważają, że niepowikłaną ciążę bliźniaczą należy rozwiązać po 37 tygodniu, a planowe cięcie cesarskie wykonać między 37 a 38 tygodniem ciąży (Dodd i wsp., 2010). Obecnie przyjmuje się zakończenie prawidłowo przebiegającej ciąży bliźniaczej w 38 tygodniu dla dwukosmówkowych dwuowodniowych bliźniąt, między 34-36 tygodniem

dla jednokosmówkowych dwuowodniowych bliźniąt oraz między 32-34 tygodniem dla jednoowodniowych bliźniąt (Lee, 2012).

W ciążach bliźniaczych można wyróżnić następujące położenia bliźniąt względem siebie:

a/ główkowo – główkowe, z częstością	42,5%,
b/ główkowo – miednicowe, z częstością	26,0%,
c/ główkowo – poprzeczne, z częstością	12,4%,
d/ miednicowo – główkowe, z częstością	6,9%,
e/ miednicowo – miednicowe, z częstością	6,1%,
f/ miednicowo – poprzeczne, z częstością	4,7%,
g/ poprzeczno – główkowe, z częstością	0,6%,
h/ poprzeczno – poprzeczne, z częstością	0,6%,
i/ poprzeczno – miednicowe, z częstością	0,3%.

Znając położenia płodów w stosunku do siebie można wybrać właściwy sposób ukończenia ciąży (Malinowski, 1998; Bręborowicz i wsp., 2003; Bręborowicz, 2006). Przyjmuje się, że poród drogą naturalną powinien przebiegać przy główkowo – główkowym położeniu bliźniąt, a w przypadku gdy tylko jeden płód jest położony główkowo, wybór tej metody powinien być uzależniony od umiejętności i doświadczenia położnika. W przypadku niegłówkowego położenia płodu w ciąży bliźniaczej jednoowodniowej zaleca się wykonanie cięcia cesarskiego (Lee, 2012).

Poród w ciąży wielopłodowej stanowi o wiele większe zagrożenie dla płodów jak i matki, niż w przypadku ciąży pojedynczej. Pojawiają się często znacznie bardziej nasilone powikłania obejmujące:

- nieprawidłowe położenie jednego bądź obu płodów,
- rozbieżny wzrost wewnątrzmaciczny płodów,
- przedwczesne oddzielenie łożyska drugiego płodu,
- współobecność żywego płodu z drugim obumarłym wewnątrzmacicznie,
- współistnienie ciążowej choroby trofoblastycznej z żywym płodem,
- przedwczesne pęknięcie błon płodowych drugiego płodu, przy zachowanym pęcherzu płodowym u pierwszego płodu,
- obecność anastomoz pomiędzy bliźniakami w łożyskach jednokosmówkowych,
- zakleszczenie płodów,

- zapętlenia, zawężenia i okręcenia sznurów pępowinowych,
- rozwój płodów niecałkowicie rozdzielonych.

Czynniki te prowadzą do wzrostu zachorowalności i umieralności okołoporodowej bliźniąt. Uważa się, że niepowikłaną ciążę bliźniaczą należy hospitalizować od 37 tygodnia ciąży (Malinowski, 1998; Bręborowicz i wsp., 2003).

Dla zapewnienia prawidłowego przebiegu porodu w ciąży bliźniaczej niezbędna jest, oprócz obecności odpowiednio wykwalifikowanego personelu medycznego, aparatura umożliwiająca monitorowanie obu płodów jednocześnie, sala operacyjna, zestawy porodowe, zestawy do resuscytacji, zestawy płynów infuzyjnych i leków. Ze względu na zwiększone ryzyko utraty krwi w trakcie porodu w ciąży bliźniaczej w porównaniu z ciążą pojedynczą, ważne jest również zabezpieczenie odpowiedniej ilości krwi (Malinowski, 1998; Bręborowicz i wsp., 2003).

W ciąży bliźniaczej wyróżnia się trzy metody przeprowadzenia porodu:

- I. Poród siłami natury,
- II. Cięcie cesarskie,
- III. Poród drogą pochwową pierwszego bliźniaka i wydobycie drugiego płodu drogą cięcia cesarskiego (Malinowski, 1998; Malinowski, 2008).

W przypadku główkowego położenia obu płodów sposób ukończenia ciąży nie stwarza obecnie większych kłopotów. Problem pojawia się w przypadku niegłówkowego położenia bliźniąt. Malinowski (Malinowski, 1998) zaobserwował największy odsetek umieralności okołoporodowej wśród bliźniąt w położeniu niegłówkowym – 23,9%, a najniższy w położeniach główkowych obu płodów – 4,8%. Morales i wsp. (Morales i wsp., 1989) na podstawie obserwacji zauważyli, iż poród bliźniąt z niską masą ciała drogą cięcia cesarskiego pozwolił uzyskać lepszy stan urodzeniowy noworodków niż poród drogą pochwową. Przyjmuje się, że występuje możliwość ukończenia ciąży bliźniaczej drogami natury przy takich położeniach obu płodów jak: główkowo – miednicowe, miednicowo – główkowe i miednicowo – miednicowe. Świadomość występowania wielu powikłań zmusza jednak położników do odstąpienia od tej formy porodu. Należy pamiętać, że najczęstszą przyczyną zgonu okołoporodowego noworodków podczas porodu drogami natury w położeniach miednicowych, dotyczącą szczególnie porodów przedwczesnych, jest interwencja położnicza (Malinowski, 1998). Poród drogą pochwową w przypadku położenia miednicowego pierwszego bliźniaka jest niebezpieczny, obarczony dużym ryzykiem

zachorowalności i umieralności okołoporodowej i dlatego wykonanie cięcia cesarskiego sprzyja uzyskaniu lepszego stanu urodzeniowego płodu wraz z wyższą jego oceną w skali Apgar (Carlin i Alfirevic, 2006).

Wiele dyskusji ma miejsce w przypadku, gdy pierwszy płód znajduje się w położeniu główkowym, a drugi w położeniu miednicowym (Malinowski 1998; Bręborowicz i wsp., 2003; Bręborowicz, 2006). W takiej sytuacji poród drogą pochwową jest możliwy gdy: masa ciała drugiego bliźniaka nie przekracza 3500 g, różnica między masą obu płodów jest mniejsza niż 20%, poród prowadzi wykwalifikowany zespół medyczny oraz kiedy rodząca jest wieloródką (Bręborowicz i wsp., 2003). Podczas porodu pierwszego i drugiego bliźniaka konieczny jest stały nadzór kardiokograficzny, który zmniejsza ryzyko głębokiego niedotlenienia obu płodów (Bręborowicz, 2006).

Największa umieralność okołoporodowa dotyczy obrotu wewnętrznego, bo aż 21,2%, następnie ręcznego wydobycia płodu 13,2%, zabiegu kleszczowego 9,1%, a najniższa porodu samoistnego 7,5% (Malinowski, 1998; Bręborowicz i wsp., 2003). Dla porównania Malinowski zaobserwował największą śmiertelność rzędu 33,3% związaną z obrotem wewnętrznym płodu i jego ręcznym wydobyciem, a najniższą 5,6% na drodze cięcia cesarskiego (Malinowski, 1998). Położenia niegłówkowe płodów są obecnie wskazaniem do cięcia cesarskiego.

Istnieją sytuacje, kiedy poród w ciąży bliźniaczej drogą pochwową jest niemożliwy. Zalicza się do nich:

- poród przedwczesny przed 32 tygodniem lub noworodków z masą poniżej 1500 g (noworodki charakteryzują się niedojrzałością układu oddechowego, krążenia i nerwowego, co sprzyja zwiększonej umieralności),
- masa drugiego bliźniaka jest większa od pierwszego i przekracza ją o ponad 20%,
- ciąża bliźniacza jest jednoowodniowa,
- przebyte wcześniej cięcia cesarskie, również gdy położenia obu płodów są główkowe (Dera i wsp., 2007).

Przyjmuje się, że ciąża bliźniacza powinna zostać ukończona cięciem cesarskim, kiedy masa jednego z bliźniąt znacznie odbiega od drugiego.

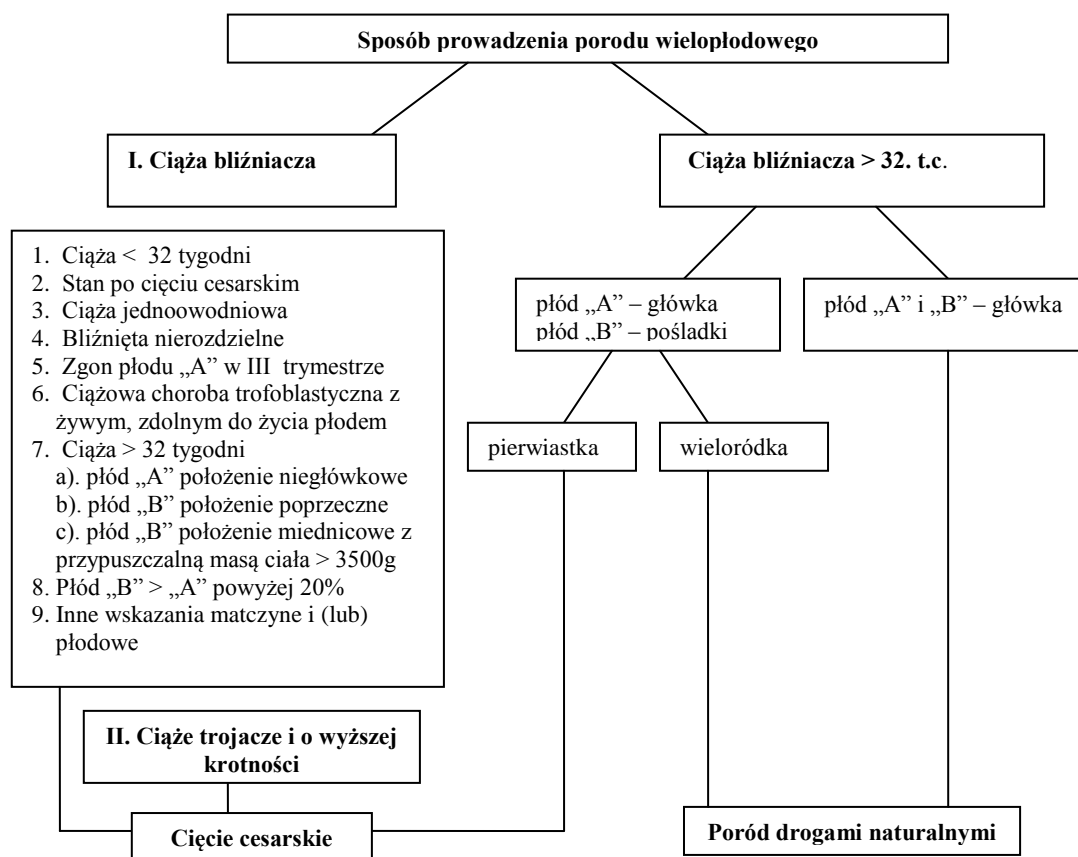
Wśród ciąż bliźniaczych na szczególną uwagę zasługują ciąże jednokosmówkowe jednoowodniowe. Ryzyko zgonu związane głównie z zapętlaniem

pepowin, ale również z płodami niecałkowicie rozdzielonymi, zakleszczeniem płodów, wielowodziem szacuje się na 60% (Malinowski, 1998; Bręborowicz i wsp., 2003; Siddiqui i McEwan, 2008). Malinowski (Malinowski, 1998; Malinowski i wsp., 2006) przyjął określony schemat postępowania w przypadku ciąży jednokosmówkowych jednoowodniowych, w którym uwzględnił hospitalizację ciężarnej począwszy od 26 tygodnia ciąży, kontrolę kardiokograficzną płodów, z cotygodniową oceną ultrasonograficzną, promocję dojrzewania płuc kortykosterydami i wykonanie elektywnego cięcia cesarskiego w 35 tygodniu ciąży.

Istnieją sytuacje, kiedy obumiera jeden z płodów. Jeżeli zgon wewnątrzmaciczny jednego z bliźniaków ma miejsce w pierwszym trymestrze ciąży, dochodzi do resorpcji tego płodu (ang. *vanishing twin syndrome*), natomiast gdy ma to miejsce w drugim trymestrze ciąży powstaje płód papierowaty (łac. *fetus papyraceus*), przy czym żadna z tych sytuacji nie stanowi przeciwwskazań do porodu drogami natury. Inaczej przedstawia się sytuacja, gdy obumiera płód przodujący w trzecim trymestrze ciąży, występuje wówczas potencjalne zagrożenie dla żywego drugiego bliźniaka, wynikające z przedłużającego się pierwszego i drugiego okresu porodu, większej urazowości okołoporodowej oraz możliwości zakleszczenia bliźniąt. Gdy natomiast płód przodujący jest żywy, a drugi obumiera wewnątrzmacicznie w trzecim trymestrze ciąży zagrożenie to jest znacznie mniejsze. Dlatego też w pierwszym przypadku wykonuje się cięcie cesarskie, w drugim możliwy jest poród drogą pochwową (Malinowski, 1998; Bręborowicz i wsp., 2003).

Innym ważnym problemem pojawiającym się podczas porodu w ciąży bliźniaczej jest odstęp czasowy między porodem pierwszego i drugiego bliźniaka. Początkowo uważano, że odstęp ten nie powinien przekraczać 30 minut, gdyż zmniejsza się przepływ maciczno-łożyskowy. Następnie za właściwy uznano odstęp czasowy od 10 do 20 minut, a przekroczenie tej granicy skutkowało zwiększeniem odsetka umieralności okołoporodowej drugiego bliźniaka. Zważywszy na fakt, iż dysponujemy w dzisiejszych czasach odpowiednim sprzętem umożliwiającym ciągle monitorowanie stanu płodów w jamie macicy, odstęp czasowy między porodem pierwszego i drugiego bliźniaka nie ma większego znaczenia praktycznego. Skrócenie lub wydłużenie tego odstępu powinno być podyktowane jedynie pojawiającym się w trakcie porodu zagrożeniem życia drugiego płodu lub stanem psychicznym i fizycznym matki (Malinowski, 1998; Dera i wsp., 2007).

Należy również wspomnieć o sytuacji, kiedy I bliźniak rodzi się drogą pochwową, natomiast przy drugim bliźniaku konieczne jest wykonanie cięcia cesarskiego (ryc. 2).



Ryc. 2. Schemat prowadzenia ciąży wielopłodowych (Malinowski, 1998; Bręborowicz i wsp., 2003).

Sullivan i wsp. (Sullivan i wsp., 1998) przedstawili 4 przypadki, obejmujące objawy zagrożenia życia płodu (35%), wypadnięcie pępowiny (35%), nieprawidłowe położenie drugiego bliźniaka (23%), przedwczesne oddzielenie łożyska (6%), w których położnik zmuszony został do wykonania cięcia cesarskiego przy drugim płodzie (Suchońska i wsp., 2004). Ginsberg i Levine (2005) w oparciu o badania 10365 żywo urodzonych par bliźniąt wskazali na częstość występowania metody cesarskiego cięcia dla porodu drugiego bliźniaka wynoszącą 10,1%, przy pochwowym porodzie pierwszego bliźniaka. Przypadki związane były z niegłówkowym położeniem drugiego płodu i uzyskaniem lepszego stanu urodzeniowego dla dzieci o masie poniżej 2000 g.

W ciążach wielopłodowych częściej niż w ciążach pojedynczych obserwowana jest zwiększona częstość występowania rozrostów i nowotworów trofoblastu. Przejawia

się to współistniejącym z płodem lub płodami ciężarnej choroby trofoblastycznej, która jest bezwzględny wskazaniem do ukończenia porodu cięciem cesarskim (Bręborowicz i wsp., 2003).

Rzadkim, ale niebezpiecznym powikłaniem przebiegu porodu w ciąży bliźniaczej są kolizje płodowe (zakleszczenia bliźniąt), występujące z częstością 1:500 (Bręborowicz i wsp., 2003). Stwarzają one ryzyko zatrzymania postępu porodu i stanowią poważne zagrożenie zarówno dla rodzącej jak i płodów. Według Nissena odsetek położzeń bliźniąt przedstawia się następująco (Nissen, 1958):

- położenie miednicowo – główkowe 52-63% - najczęstsza postać zakleszczenia, płody zahaczone są zuchwami (ang. *chin-to-chin*),
- położenie główkowo – główkowe 24-32%,
- położenie główkowo – poprzeczne 7-13%,
- położenie miednicowo – miednicowe ok. 3%.

Powstanie kolizji płodowych jest uwarunkowane takimi czynnikami jak:

- poród u pierwiastki,
- mała ilość wód płodowych,
- obszerna miednica matki,
- odgięciowe ułożenie główki pierwszego płodu,
- zgon wewnątrzmaciczny pierwszego lub obu płodów,
- ciąża jednokosmówkowa, zwłaszcza jednoowodniowa,
- masa pierwszego płodu mniejsza od drugiego o ponad 25%,
- małe doświadczenie lekarza lub nadmierny pośpiech w prowadzeniu porodu.

Odsetek zgonów okołoporodowych w kolizjach płodowych waha się od 43 do 72% w zależności od rodzaju kolizji i właściwego postępowania. Dlatego bardzo ważny jest wybór właściwej metody ukończenia porodu, biorąc pod uwagę groźne następstwa wynikające z zaklinowania płodów (Bręborowicz i wsp., 2003; Dera i wsp., 2007).

Poród w ciąży bliźniaczej to nie tylko I i II okres porodu, ale również III okres – łożyskowy, obarczony większym ryzykiem powikłań niż w ciąży pojedynczej. Związane jest to z pojawiającymi się o wiele częściej nieprawidłowościami w obrębie łożysk. Zalicza się do nich niskie usadowienie oraz zajęcie większej powierzchni ściany macicy, zwiększając utratę krwi w trakcie porodu oraz częstość zabiegów wewnątrzmacicznych (Malinowski, 1998; Bręborowicz i wsp., 2003).

Konieczność ręcznego wydobycia łożyska występuje u około 6% porodów bliźniaczych (Malinowski, 1998; Bręborowicz i wsp., 2003). Nadmierne krwawienie z dróg rodnych obserwowano u 40% kobiet, z czego u 24% utrata krwi wahała się od 500 do 1000 ml, u 10% od 1000 do 1500 ml, a u 6% przekraczała 1500 ml. Malinowski (Malinowski, 1998) na podstawie własnych badań pokazał, że ręczne wydobycie łożyska miało miejsce u 8,2% ciąż bliźniaczych po porodzie drogami natury i u 1,2% ciąż pojedynczych. Zwiększona utrata krwi podczas porodu bliźniaczego spowodowała konieczność przetoczenia krwi u 12,7% kobiet po porodzie drogą pochwową (ciąża pojedyncza u 2,2%) i u 11,4% po cięciu cesarskim (ciąża pojedyncza u 3,1%).

Badania przeprowadzone w latach 2005-2012 na 100 pacjentkach z indukowanym porodem w ciąży bliźniaczej w porównaniu ze 100 losowo wybranymi pacjentkami z indukowanym porodem w ciąży pojedynczej, nie wykazały różnic w przeprowadzonych porodach metodą cesarskiego cięcia. Prawdopodobieństwo zastosowania cesarskiego cięcia wynosiło 19% u bliźniąt w porównaniu z 21% w ciążach pojedynczych, nie wykazano też różnic w czasie między indukcją porodu a porodem metodą pochwową (Taylor i wsp., 2012).

Retrospektywne badania metody prawidłowo przebiegających porodów bliźniąt jednokosmówkowych między 35 a 37 tygodniem ciąży porównywano z grupą kontrolną 1934 dwukosmówkowych bliźniąt. Częstość stosowania metody cesarskiego cięcia w jednokosmówkowych jednoowodniowych ciążach bliźniaczych wynosiła 63,4% i nie różniła się od bliźniąt dwukosmówkowych (61%, $p=0,65$), co wskazuje na brak przeciwwskazań do porodu naturalnego w prawidłowo przebiegającej ciąży (Weisz i wsp., 2012).

1.4. Ryzyko wystąpienia dziedzicznych chorób jednogenowych

W stosunku do ciąż pojedynczych u bliźniąt wzrasta ryzyko wystąpienia dziedzicznych chorób jednogenowych. Dla chorób autosomalnie recesywnych wartość ryzyka dla bliźniąt należy pomnożyć przez $3/8$ ($1/4 \times 3/8$). Dla chorób autosomalnie dominujących ryzyko wystąpienia choroby wzrasta o $5/6$ ($1/2 \times 5/6$). Dla chorób związanych z chromosomem X, dla dwóch płodów męskich, gdy matka jest nosicielką, występuje ryzyko jak w przypadku chorób autosomalnie dominujących. Gdy płody mają różną płeć, to płód męski ma taką samą szansę na wystąpienie choroby jak przy

ciąży pojedynczej (Słomski i wsp., 2003a). Ryzyko wystąpienia chorób u bliźniąt w zależności od zygotywności przedstawia tabela 2.

Tabela 2. Ryzyko wystąpienia chorób u bliźniąt w zależności od zygotywności (Słomski i wsp., 2003a).

Choroba (liczba dotkniętych płodów)	Bliźnięta jednozygotyczne	Bliźnięta dwuzzygotyczne	Zygotywność nieznana
Anomalie chromosomowe			
Obydwa płody	F^*	F^2	$1/3 F^{**}$
Przynajmniej jeden płód	F	$2F^{**}$	$5/3 F^{**}$
Tylko jeden płód	-	$2F^{**}$	$4/3 F^{**}$
Dziedziczenie autosomalnie recesywne			
Obydwa płody	$1/4$	$1/16$	$1/8$
Przynajmniej jeden płód	$1/4$	$7/16$	$3/8$
Tylko jeden płód	-	$6/16$	$1/4$
Sprzężenie z chromosomem X^{***}			
Obydwa płody	$1/4$	$1/16$	$1/8$
Przynajmniej jeden płód	$1/4$	$7/16$	$3/8$
Tylko jeden płód	-	$6/16$	$1/4$
Dziedziczenie autosomalnie dominujące			
Obydwa płody	$1/2$	$1/4$	$1/3$
Przynajmniej jeden płód	$1/2$	$3/4$	$2/3$
Tylko jeden płód	-	$1/2$	$1/3$

* Ryzyko dla jednego nieprawidłowego kariotypu płodu związane z wiekiem matki; ** Ryzyko wystąpienia choroby; *** W obliczeniach przyjęto, że połowa potomstwa będzie płci męskiej, o 50% ryzyko wystąpienia choroby.

Ryzyko wystąpienia zespołu Downa w ciążach bliźniaczych teoretycznie powinno być dwukrotnie wyższe niż w ciążach pojedynczych (tabela 3). Jednakże występowanie tego zespołu jest tylko o 3% wyższe w ciążach bliźniaczych, stąd przyjmuje się, że ryzyko jest takie samo dla obydwu typów ciąży (Cuckle, 1998). Prawdopodobnie u podłoża tego zjawiska leży większa śmiertelność płodów w ciążach bliźniaczych w pierwszym trymestrze (Sebire i wsp., 1997). W ciążach bliźniaczych poziom alfa-fetoproteiny wzrasta ok. 2,5-krotnie, podobnie poziom estradiolu 1,7-krotnie, a gonadotropiny kosmówkowej 1,8-2 razy w stosunku do ciąży pojedynczych. Trudności przy analizie

wyników są związane z możliwością podwyższenia wartości ze względu na obecność dwóch płodów, czy uśrednienie wartości, które trudno przyporządkować określonemu dziecku. Występują również problemy z wykrywaniem zespołu Downa. Badania surowicy na aneuploidię u bliźniąt nie są wystarczająco czułe, prawdopodobnie dlatego, że zmienione markery biochemiczne u aneuploidalnego płodu maskowane są przez prawidłowe poziomy markerów u prawidłowego bliźniaka. Większe znaczenie mają badania ultrasonograficzne pogrubienia fałdu karkowego – NT (ang. *nuchal translucency*), które powinny być wzięte pod uwagę przy podejmowaniu decyzji o przerwaniu ciąży z trisomią płodu.

Berkowitz i wsp. (1997) przeprowadzili badania nad ciążami wielopłodowymi, w których w przypadku występowania anomalii przeprowadzono wybiórcze usunięcie płodu w 100 ciążach. W 40 przypadkach na 100 przyczyną terminacji było wystąpienie zespołu Downa, w 8 przypadkach rozszczepu kręgosłupa tylnego i wodogłowia, w 4 przypadkach trisomia chromosomu 18, wodogłowie i translokacja lub delecja chromosomu, w 3 przypadkach zespół Turnera, przepuklina pierścienia pępkowego i bezmózgowie, dwukrotnie mozaikowa trisomia chromosomu 21, beta talasemia, zespół Klinefeltera, ciężka postać skoliozy, bliźnięta niecałkowicie rozdzielone. Inne przypadki wystąpiły jednorazowo w całej badanej grupie (Berkowitz i wsp., 1997).

Objaw unieruchomionego płodu, nie poruszającego się wraz z ruchami matki, nie musi być związany z monozygotycznością i występowaniem zespołu odwróconego kierunku przepływu krwi. Może wystąpić także u bliźniąt dwukosmówkowo dwuwodniowych. Przypadek taki zaobserwowano, gdy w jednym z płodów wystąpiła triploidia 69, XXX przy prawidłowym drugim płodzie 46, XX (Wax i wsp., 1998).

Tabela 3. Przypadki wykrycia trisomii 21 u jednego z bliźniąt.

Badania wykonano dla bliźniąt dwukosmówkowo-dwuowodniowych. We wszystkich przypadkach usunięto płód wykazujący trisomię 21. Drugi płód był prawidłowy (Spencer i Nicolaides, 2003).

L.p.	Wiek matki (lata)	Ciąża (tydzień +dzień)	NT MoM 1	NT MoM 2	NT Ryzyko 1	NT Ryzyko 2	Wolna β -hCG MoM	PAPP-A MoM	Ryzyko biochem.	Ryzyko całkowite 1	Ryzyko całkowite 2	Bliźniak 1	Bliźniak 2
1	35	11 + 5	1,43	1,86	212	46	1,86	0,64	120	122	27	Pr	T21
2	39	12 + 2	1,03	2,58	503	3	0,80	0,46	118	758	4	Pr	T21
3	33	12 + 5	0,69	0,80	2988	2988	1,57	0,55	214	1776	1776	Pr	T21
4	35	12 + 1	1,06	1,98	1162	32	0,97	1,06	1593	2230	225	Pr	T21

NT – pogrubienie fałdu karkowego

T21 – trisomia chromosomu 21

Wolna β -hCG - poziom wolnej kosmówkowej gonadotropiny

PAPP-A - białko A związane z ciążą

MoM - wielokrotna mediana

1.5. Współczynnik płci u bliźniąt

Współczynnik płci określa liczbę noworodków płci męskiej w stosunku do wszystkich noworodków (współczynnik płci = noworodki płci męskiej / (noworodki płci męskiej + noworodki płci żeńskiej)). Współczynnik płci dla bliźniąt dwuzygotycznych wskazuje na niewielką nadwyżkę noworodków płci męskiej i jest zbliżony do proporcji obliczonej dla ciąży pojedynczych (tabela 4). Natomiast wśród bliźniąt jednozygotycznych, podobnie jak u trojaczków i czworaczków zaznacza się przewaga noworodków płci żeńskiej. Co znamienne, wartość współczynnika płci maleje od ciąży jednozygotycznych dwukosmówkowych poprzez ciążę jednokosmówkowe dwuowodniowe, jednokosmówkowe jednoowodniowe, aż do ciąż w których rozwijają się bliźnięta złączone. Niektórzy badacze sugerują, że wartość współczynnika płci może być związana z inaktywacją chromosomu X (tzw. imprintingiem genetycznym). U bliźniąt rozwijających się w ciąży jednokosmówkowej zaobserwowano bardzo duże podobieństwo dotyczące pochodzenia inaktywowanego chromosomu X, podczas gdy bliźnięta z ciąży dwukosmówkowej wyraźnie różnią się między sobą pod tym względem. Uważa się, że podział zarodka prowadzący do rozwoju ciąży dwukosmówkowej następuje na krótko przed inaktywacją chromosomu X, natomiast podział, w wyniku którego rozwija się ciąża jednokosmówkowa, dokonuje się pomiędzy 3 a 4 dniem po inaktywacji (Hall, 2003; Loat i wsp., 2004).

Tabela 4. Współczynnik płci u bliźniąt (Hall, 2003).

Rodzaj bliźniąt	Współczynnik płci
Dwuzygotyczne	0,514
Jednozygotyczne	0,484
Jednoowodniowe	0,231
Złączone	0,230

1.6. Genetyczne podłoże ciąż bliźniaczych

Na początku XX wieku zwrócono uwagę na fakt występowania w niektórych rodzinach zwiększonej częstotliwości ciąż bliźniaczych i rozpoczęto badania w celu identyfikacji czynnika etiologicznego rodzinnie występujących ciąż mnogich. Badacze

problemu zgadzają się, że w przypadku predyspozycji rodzinnej do ciąży dwuzygotycznych czynnik genetyczny ma decydujące znaczenie. W przypadku ciąży jednozygotycznych opinie są niekiedy sprzeczne, jednak przemawiają za istnieniem genetycznego czynnika etiologicznego.

Prowadzone obecnie poszukiwania czynnika etiologicznego koncentrują się z jednej strony na analizie rodowodów bliźniąt celem ustalenia sposobu dziedziczenia predyspozycji do wystąpienia ciąży mnogich, z drugiej strony na próbach identyfikacji genu odpowiedzialnego za występowanie tej skłonności. Wnikliwe i na szeroką skalę prowadzone analizy rodowodów bliźniąt wykonuje się w wielu krajach, na podstawie danych zgromadzonych w rejestrach bliźniąt. Rejestrami dysponuje szereg krajów europejskich: Szwecja, Finlandia, Norwegia, Dania, Belgia, Niemcy, Holandia, a także Chiny, Japonia, Australia i Stany Zjednoczone. Otrzymane wyniki nie są jednoznaczne a często nawet wzajemnie sprzeczne. Opisywano zarówno autosomalny dominujący jak i autosomalny recesywny wzór dziedziczenia predyspozycji. Podsumowując otrzymane wyniki i formułowane na ich podstawie hipotezy można stwierdzić, że predyspozycja do występowania ciąży dwuzygotycznych warunkowana jest jednogenuowo. Dziedziczenie genu jest dominujące z niepełną penetracją genu w linii matczynej, nie można jednak wykluczyć dziedziczenia w linii ojcowskiej. Predyspozycja do wystąpienia ciąży jednozygotycznych nie zaznacza się tak wyraźnie. W niektórych rodzinach stwierdzono dziedziczenie w sposób autosomalny dominujący, raczej w linii matczynej, jednak ten temat budzi nadal wiele kontrowersji. Wydaje się, że prawdopodobieństwo wystąpienia ciąży jednozygotycznej w rodzinie bliźniąt jednozygotycznych nie jest podwyższone w stosunku do obserwowanego w populacji. Istnieje grupa rodzin, w której występuje ogólna predyspozycja do występowania ciąży mnogich. Mechanizm tego zjawiska nie jest jeszcze poznany i wymaga przeprowadzenia dalszych badań (Badura i Latos-Bieleńska, 2003).

Jednocześnie trwają prace nad identyfikacją i analizą genów kandydatów, które potencjalnie mogą mieć znaczenie w skłonności do wystąpienia ciąży wielopłodowych. Na podstawie wyników badań endokrynologicznych matek bliźniąt stwierdzono, że występuje u niektórych z nich nieznaczne zaburzenie regulacji podwzgórze – przysadka – jajnik, które predysponuje do polioowulacji. Wychodząc z założenia, że mutacje genu receptora dla hormonu folikulotropowego (FSH) oraz genu inhibiny α mogą zmieniać

wpływ FSH na jajnik, w pierwszej kolejności do grupy genów kandydatów zakwalifikowano właśnie te geny.

Receptor dla FSH (FSHR) jest białkiem transbłonowym, zbudowanym z 678 reszt aminokwasowych. Gen kodujący FSHR zlokalizowany jest w chromosomie 2 (2p21-p16), zawiera 10 eksonów. Największy z nich, ekson 10, o wielkości 1234 par zasad (pz) koduje C-końcową część odcinka zewnątrzłonowego, fragment transbłonowy i wewnątrzłonowy. Al-Hendy wykonał analizę sekwencji 10 eksonu dla 26-cio letniej kobiety, która dwukrotnie urodziła bliźnięta dwuzygotyczne. Stwierdził obecność dwóch tranzycji A>G, które warunkowały substytucję dwóch aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym receptora (Thr307Ala; Asn680Ser). Zakładał, że homozygotyczność dla obu mutacji zwiększa powinowactwo receptora do FSH i predysponuje do poliowulacji (Al-Hendy i wsp., 2000). Jednak ta hipoteza spotkała się z krytyką świata nauki. Okazało się, że opisywane zmiany należą do powszechnych polimorfizmów, rozkładających się w populacji rasy białej z częstością mendlowską, a receptor o zmienionej sekwencji nie charakteryzuje się zmianą wrażliwości na FSH (Simoni i wsp., 1999; Gromoll i Simoni, 2001). Dalsze badania z udziałem 186 bliźniaczek, które same urodziły bliźnięta dwuzygotyczne, wykluczyły związek między polimorfizmami w genie kodującym FSHR a skłonnością do poliowulacji.

Kolejne badania metodą analizy sprzężeń wykluczyły udział mutacji genów zlokalizowanych w chromosomie 2 w etiologii predyspozycji do występowania ciąż dwuzygotycznych. Tym samym odrzucono wpływ mutacji w kolejnym genie kandydacie, genie kodującym inhibinę α (2q33-q36). Nadal uważa się, że zmiany na poziomie białka, które powodują zwrotną supresję wydzielania FSH, mogą potencjalnie wpływać na mechanizm poliowulacji (Badura i Latos-Bieleńska, 2003).

Na liście genów kandydujących był również gen *PPARG γ* oraz homologiczny do owczego genu płodności Booroola (*FecB*) fragment chromosomu 4 (4q22-23), jednak wyniki prowadzonych badań wykluczają ich udział w predyspozycji do wystąpienia ciąż mnogich u człowieka. Nie są potwierdzone również wiadomości na temat wpływu mutacji Gln79Arg w genie *PTPN11*, której obecność stwierdzono u członków rodziny z zespołem Noonan, w której dwie kobiety były matkami bliźniąt dwuzygotycznych (Schollen i wsp., 2003).

Pomimo że naukowcy dysponują danymi o dużej liczbie rodzin ze skłonnością do występowania ciąż bliźniaczych, nadal nie jest znany czynnik etiologiczny.

Prowadzone do tej pory badania pozwoliły jednak na wykluczenie udziału genów, które do tej pory uważano za kluczowe w rodzinnej predyspozycji do polioiwulacji. Badania związane z identyfikacją czynnika genetycznego, odpowiedzialnego za polioiwulację prowadzone są na szeroką skalę i cieszą się dużym zainteresowaniem wśród badaczy, głównie dlatego, że mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów regulujących płodność kobiet i pozwolić na rozwiązanie problemu idiopatycznej niepłodności.

1.7. Diagnostyka molekularna - analiza DNA

Diagnostyka molekularna należy do najbardziej dynamicznie rozwijających się działów biologii i medycyny. Pierwsze badania z tego zakresu zostały wykonane przez Kana i Dozy'ego oraz niezależnie przez Orkina i wsp. w 1978 r. Prace dotyczyły wykrywania mutacji (transwersji A>T) w 6 kodonie beta globiny, która warunkuje wystąpienie anemii sierpowatej. Kan i Dozy zastosowali analizę restrykcyjną DNA i hybrydyzację z sondą molekularną (fragmentem genu β globiny człowieka). Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) pozwoliła rozróżnić osoby chore od nosicieli choroby (heterozygot) i osób zdrowych (Kan i Dozy, 1978). Z kolei Orkin i wsp. do wykrycia tej samej mutacji zastosowali hybrydyzację z dwoma wariantami oligonukleotydowej sondy molekularnej, umożliwiającymi rozróżnienie alleli prawidłowych od zmutowanych (Orkin i wsp., 1978). W ten sposób badania DNA dołączyły do technik diagnostycznych, które do tej pory polegały głównie na reakcjach immunochemicznych antygenu z przeciwciałem.

Rozwój diagnostyki molekularnej stał się możliwy dzięki wprowadzeniu do badań naukowych sond molekularnych i enzymów restrykcyjnych oraz nowych technik badawczych takich jak klonowanie DNA, transfer Southerna, sekwencjonowanie, znakowanie i detekcja DNA, amplifikacja DNA w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) i synteza oligonukleotydów. Okres rozpowszechnienia badań DNA przypadł na lata 90-te ubiegłego stulecia. Diagnostyka molekularna obejmuje dwa zasadnicze działy - diagnostykę bezpośrednią i pośrednią. Diagnostyka bezpośrednia dotyczy wykrywania mutacji w DNA oraz wykrywania DNA patogenów, natomiast w diagnostyce pośredniej o występowaniu zmutowanych genów wnioskuje się na podstawie analizy sprzężeń. Współczesna diagnostyka molekularna przebiega z zastosowaniem dwóch metod –

analizy restrykcyjnej i hybrydyzacji z sondami molekularnymi oraz amplifikacji DNA metodą PCR. Ostateczny wynik diagnostyczny powstaje w wyniku oceny polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (RFLP), określenia długości badanego fragmentu DNA, wykrycia delecji, insercji, mutacji punktowych lub określenia sekwencji badanego fragmentu DNA (Słomski, 2008).

Najwcześniej wykonywano badania typu RFLP, przy czym nie określano defektu genu potencjalnie zawierającego mutację, lecz jego dziedziczenie. Ogromny postęp, który doprowadził do zwiększenia czułości i skrócenia czasu hybrydyzacji oraz wprowadzenie nieradioaktywnych metod znakowania sond sprawił, że pozostaje ona nadal bardzo atrakcyjnym narzędziem w diagnostyce molekularnej. W diagnostyce molekularnej stosowane są, w zależności od potrzeb, krótkie (20-150 pz) lub długie (powyżej 400 pz) sondy molekularne, komplementarne do unikatowej sekwencji badanego DNA lub RNA. Mogą to być syntetyczne oligomery, syntetyczne bądź naturalne geny lub ich fragmenty, cDNA, fragmenty chromosomów lub całe genomy bakteryjne (Słomski, 2008).

Po upowszechnieniu techniki PCR nastąpił przełom w diagnostyce molekularnej. Obecnie diagnostyka molekularna oparta o PCR rozwija się bardzo dynamicznie i stopniowo zastępuje badania hybrydyzacyjne. Najważniejszym zastosowaniem PCR w diagnostyce jest wykorzystanie tej techniki do uzyskania zwiększonej ilości DNA przed jego dalszą analizą. Po uzyskaniu fragmentu genu, w którym występuje polimorfizm, możliwe jest dalsze jego badanie za pomocą metody RFLP. Badanie sprowadza się do trawienia produktu enzymem restrykcyjnym specyficznym dla miejsca wykazującego polimorfizm. Pierwsze opracowanie tego typu badań dotyczyło diagnostyki molekularnej anemii sierpowatej (Saiki i wsp., 1985). Uzyskany wynik jest podobny do wyniku uzyskiwanego z zastosowaniem transferu Southerna i hybrydyzacji z sondą molekularną, przy czym technika PCR jest zdecydowanie mniej czasochłonna. W 1988 r. Williams i wsp. przeprowadzili pełną diagnostykę jednej z najczęstszych chorób genetycznych - mukowiscydozy w ciągu jednego dnia. Wykrycie ponad 400 mutacji genu *CFTR* warunkującego mukowiscydozę, byłoby niemożliwe bez zastosowania techniki PCR (Williams i wsp., 1988).

Różnice między diagnostyką klasyczną, a molekularną polegają przede wszystkim na zwiększeniu szybkości i czułości wykonywanych badań, dlatego

diagnostyka molekularna jest coraz częściej stosowana w różnych dziedzinach nauk biologicznych, medycynie, medycynie sądowej, medycynie weterynaryjnej i hodowli oraz w przemyśle korzystającym z osiągnięć biotechnologii. Metoda PCR jest obecnie szeroko stosowana do szybkiego wykrywania patogenów, szczególnie takich, których hodowla *in vitro* jest pracołłonna lub długotrwała (rzeżączka i chlamydia). Bezpośrednie wykrywanie wirusów HIV i HCV przyczynia się również do rozwoju badań nad poszukiwaniem nowych leków i monitorowaniem terapii, której koszt jest obecnie bardzo wysoki. Innym przykładem zainteresowań firm farmaceutycznych jest badanie mykobakterii. Występuje tutaj istotna przewaga badań molekularnych nad badaniami obejmującymi hodowlę, ponieważ w badaniach molekularnych uzyskuje się wynik w ciągu jednego dnia, podczas gdy badania klasyczne trwają często kilka tygodni. Badania DNA stały się nieodzownym elementem nie tylko diagnostyki dotyczącej człowieka, lecz są również włączane do programów hodowlanych (zarówno zwierząt jak i roślin) i znacznie zwiększają ich efektywność (Słomski, 2008).

Zasadniczą informacją istotną w diagnostyce prenatalnej ciąży wielopłodowych jest określenie czy są to ciążę dwukosmówkowe, czy jednokosmówkowe oraz jednoowodniowe, natomiast mniejsze znaczenie ma zygotyczność. Wynika to ze wzrostu ryzyka śmiertelności oraz wzrostu ryzyka wystąpienia wad wrodzonych i aberracji chromosomowych wraz z późniejszym podziałem płodów (8,9% dwukosmówkowe dwuowodniowe, 25% jednokosmówkowe dwuowodniowe, 50-60% jednokosmówkowe jednoowodniowe). Jednak informacja na temat zygotyczności jest bardzo wartościowa z punktu widzenia genetyki oraz może mieć znaczenie w przypadku wystąpienia konieczności leczenia noworodków. Po porodzie łożysko jest poddane badaniom celem sprawdzenia prawidłowości budowy oraz określenia kosmówkowości. W przypadku stwierdzenia obecności jednej kosmówki bliźnięta uznaje się za jednozygotyczne, chyba że wyniki innych badań udowodnią, że bliźnięta są dwuzygotyczne. Genetyka molekularna wniosła do badań bliźniąt ułatwienie określenia zygotyczności oraz możliwość wydania wyniku nie budzącego wątpliwości. Dodatkową zaletą badań DNA jest to, że można je wykonywać przez całe życie bliźniąt, począwszy od dnia ich narodzin (Hall, 2003).

Pierwsze doniesienia wskazujące na możliwość wykorzystania badań DNA do identyfikacji osób pochodzą z 1985 r. z pracowni Sir Aleca Jeffreys'a z Uniwersytetu Leicester w Wielkiej Brytanii, który wykazał, że w genomie człowieka występują proste

powtórzenia sekwencji DNA, charakterystyczne dla poszczególnych osobników w populacji. Metodę uwidocznienia powtórzeń sekwencji poprzez hybrydyzację z sondą molekularną określił jako *DNA fingerprinting*, analogicznie do odcisków palców, które również wykazują specyficzną indywidualność (Jeffreys i wsp., 1985b; Słomski i wsp., 2002). Poprawną polską wersją językową opisującą metodę *DNA fingerprinting* jest określenie „odcisk genetyczny”. Odkrycie Jeffreys’a poprzedziły tak ważne wydarzenia w biologii molekularnej jak wykrycie enzymów restrykcyjnych, opracowanie metod hybrydyzacji z sondami molekularnymi, sekwencjonowania DNA i syntezy oligonukleotydów, które umożliwiły praktyczne zastosowanie badań DNA. Stopniowo, ze względu na większą czułość, badania DNA zaczęły zastępować badania cech grupowych krwi i polimorfizmu białek surowicy oraz badania układów grupowych enzymów erytrocytarnych. Obiekt badań z czynnika białkowego przesunął się w kierunku bezpośrednich badań materiału dziedziczenia - DNA. Analiza DNA dla potrzeb określania pokrewieństwa bardzo szybko rozpowszechniła się i jest szeroko wykonywana na całym Świecie. W naszym kraju badania DNA dla potrzeb określania pokrewieństwa i zygotywności zostały zainicjowane w 1991 r. przez prof. Ryszarda Słomskiego z Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Obecnie badania z tego zakresu prowadzą również jednostki akademii medycznych i laboratoria kryminalistyczne (Słomski i wsp., 2002). Liczne przykłady diagnostyki molekularnej z zastosowaniem DNA są bardzo dobrze udokumentowane i mogą być praktycznie zastosowane do określenia zygotywności bliźniąt (Słomski i wsp., 1998a; Słomski i wsp., 1998b; Słomski i wsp., 1998c; Siemieniako i wsp., 2000; Słomski i wsp., 2002; Słomski, 2010).

1.7.1. Sekwencje satelitarne, minisatelitarne i mikrosatelitarne oraz ich zastosowanie w badaniach identyfikacyjnych

W badaniach DNA w celu określenia pokrewieństwa oceniany jest wyłącznie genotyp, zarówno dla sekwencji kodujących i niekodujących. Badaniem objęty jest szczególnie rodzaj DNA, tzw. sekwencje powtórzone, które cechują się olbrzymim polimorfizmem i najczęściej są niekodujące. Sekwencje powtórzone występujące w genomie człowieka można podzielić na dwie grupy: grupa I obejmuje duże powtórzenia, w których jednostki powtarzające się występują kolejno po sobie

(satelitarny DNA), natomiast grupa II obejmuje sekwencje tworzące małe bloki zgrupowane lub rozproszone w genomie (minisatelitarny i mikrosatelitarny DNA) (Vogt, 1990; Kwiatkowska i wsp., 1995; Kwiatkowska i Słomski, 1996). Poprzez analogię do sekwencji satelitarnych, termin „sekwencje minisatelitarne” został wprowadzony przez Jeffreys’a (Jeffreys i wsp., 1985a), po wykazaniu, że sekwencje minisatelitarne również należą do sekwencji występujących powszechnie w genomach różnych organizmów i są najbardziej polimorficznymi sekwencjami w genomie człowieka (Nakamura i wsp., 1987; Jeffreys i wsp., 1990). Stąd analiza sekwencji minisatelitarnych znalazła zastosowanie praktyczne i została wdrożona do określania pokrewieństwa.

Wkrótce po doniesieniach Jeffreys’a, Nakamura i wsp. (Nakamura i wsp., 1988) opisali dalsze sekwencje minisatelitarne i potwierdzili polimorfizm powtarzających się jednostek, jak również zaproponowali dla nich nazwę VNTR (ang. *variable number of tandem repeats*) - zmienna liczba tandemowych powtórzeń. Sekwencje minisatelitarne różnią się od sekwencji satelitarnych stopniem powtarzalności, długością jednostki powtarzającej, są bardziej rozproszone w genomie, chociaż wykazują tendencje do grupowania się w regionach telomerowych chromosomów (Royle i wsp., 1988). Prawdopodobnie w genomie człowieka występują tysiące takich *loci*, przy czym różnią się one jednostkami rdzeniowymi. Każdy element powtórzony złożony jest z 7 do 100 pz. Jako pierwsze opisane sekwencje minisatelitarne należy wymienić koniec 5’ genu insuliny (Smith i wsp., 1990), genu mieliny (Boylan i wsp., 1987), region JH ciężkiego łańcucha immunoglobuliny (Silva i wsp., 1987), koniec 3’ genu CH ras (Capon i wsp., 1983), gen α -globiny (Higgs i wsp., 1986), gen kolagenu typu II (Stoker i wsp., 1985) i gen apolipoproteiny B (Knott i wsp., 1986). Jednym z najbardziej polimorficznych *locus* jest *locus* D1S7, którego allele o wielkości 1-23 kpz wykrywane są sondą MS1, przy czym prawie 99% osobników w populacji to heterozygoty. Jednostka powtarzająca złożona jest z 9 pz i należy przypuszczać, że w populacji występuje ponad 2000 alleli, które można wykryć tą sondą (Vogt, 1990; Smith i wsp., 1990; Jeffreys i wsp., 1991). W wyniku badań hybrydyzacyjnych z sondami molekularnymi rozpoznającymi jednocześnie kilkanaście *loci* otrzymuje się dla każdego osobnika charakterystyczny obraz fragmentów DNA, tzw. „*fingerprint*” – odcisk genetyczny.

Funkcja biologiczna minisatelitarnego DNA nie została dotychczas wyjaśniona. Zaobserwowano jednak, że sekwencje te występują w regionach chromosomów

odpowiedzialnych za tworzenie homologicznych par i ewentualną rekombinację. Niektóre sekwencje powtórzone ulegają transkrypcji, lecz nie kodują one sekwencji aminokwasowej białka. Zakłada się, że minisatelitarny DNA może brać udział w procesach regulacji transkrypcji genów, określać trwałość transkryptu, a przede wszystkim w istotny sposób wpływać na strukturę poszczególnych chromosomów.

W DNA człowieka występują również powtórzenia mono-, di-, tri- i tetranukleotydowe. Litt i Luty (Litt i Luty, 1989) zaproponowali, aby te sekwencje, w odróżnieniu od sekwencji satelitarnych i minisatelitarnych, nazwać mikrosatelitami. W 1991 r. Edwards i wsp. (Edwards i wsp., 1991) wprowadzili dodatkowo określenie STR (ang. *short tandem repeats*) - krótkie powtórzenia tandemowe. Wszystkie przebadane dotychczas sekwencje mikrosatelitarne od mononukleotydów do tetranukleotydów charakteryzują się polimorfizmem. Najwcześniej do badań diagnostycznych włączono sekwencje powtórzone $(CA)_n$. Inne mikrosatelity jak $(A)_n$ i $(AAAT)_n$ również charakteryzują się polimorfizmem i te ostatnie częściej stosowane są w badaniach rutynowych. Obecnie przy określaniu pokrewieństwa najbardziej przydatne są sekwencje tri- i tetranukleotydowe, które w porównaniu z sekwencjami $(CA)_n$ wykazują dwie istotne zalety - łatwiejszy rozdział elektroforetyczny (brak konieczności rozdziału na dużych żelach sekwencyjnych) i łatwiejszą identyfikację poszczególnych alleli oraz mniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia artefaktów przy ich amplifikacji metodą PCR (Kwiatkowska i wsp., 1995; Kwiatkowska i Słomski, 1996; Słomski, 2008). Tri- i tetranukleotydowe powtórzenia występują co 300-500 tys. pz w chromosomie człowieka i są rozmieszczone równomiernie w całym genomie (około 10 000 *loci*) (Edwards i wsp., 1991). Ta grupa powtórzeń znalazła duże zastosowanie w praktyce, w diagnostyce molekularnej, a szczególnie w medycynie sądowej i stanowi bardzo ważne narzędzie w badaniach identyfikacyjnych i w dochodzeniu spornego ojcostwa. Analiza DNA oparta o reakcję amplifikacji sekwencji mikrosatelitarnych jest techniką znacznie czulszą w porównaniu z technikami klasycznymi stosowanymi w medycynie sądowej. Ponieważ wielkość tych alleli jest mała, zwykle nie przekracza 300 pz, mogą być one stosowane do badania niezabezpieczonego materiału biologicznego, zawierającego zdegradowany DNA, przechowywanego nawet przez wiele lat. Frakcjonowanie produktów PCR w żelach poliakryloamidowych umożliwia dokładne oznaczenie alleli u poszczególnych osobników i w ten sposób możliwe jest dokładne prześledzenie dziedziczenia cech genetycznych u poszczególnych osobników. Najbardziej przydatną

techniką do analizy sekwencji typu STR jest reakcja PCR typu multipleks, w której jednocześnie amplifikuje się kilka *loci*. Prawdopodobieństwo uzyskania identycznych wyników dla dwóch osobników maleje w miarę stosowania coraz większej liczby analizowanych *loci* STR. W diagnostyce medycznej markery STR stosuje się, gdy nie można w analizie bezpośredniej określić rodzaju miejsca mutacji w danej chorobie genetycznej. Analizuje się wówczas dwa lub więcej markerów sprzężonych z genem odpowiedzialnym za określoną jednostkę chorobową w celu wykluczenia możliwości rekombinacji, jak również celem zapobieżenia błędnemu odczytaniu wyniku, co może być spowodowane nowymi mutacjami w tych sekwencjach (Słomski i wsp., 2002; Słomski, 2008; Słomski, 2010).

1.7.2. Przygotowanie materiału biologicznego do badań molekularnych

Materiałem wyjściowym do izolacji DNA na potrzeby określania pokrewieństwa i zygotywności może być pełna krew obwodowa, komórki płynu owodniowego, kosmówka, hodowle fibroblastów, komórki nabłonka, cebulki włosowe, plamy krwi, nasienie, fragmenty tkanek pobranych metodą biopsji cienkoigłowej i szpik kostny. Jak w każdym teście biologicznym, jakość wyniku najbardziej zależy od jakości pobranego materiału. Szczególną uwagę należy zatem zwrócić na etap pobrania materiału, prawidłowego oznaczenia próbki, transportu, przechowywania oraz izolacji DNA przy pomocy technik gwarantujących wysoką wydajność izolacji, jak i wysoki stopień czystości DNA.

W badaniach dotyczących człowieka najlepszym materiałem wyjściowym przy ustalaniu zygotywności jest, i na pewno pozostanie jeszcze przez długie lata, krew. Do wykonania pełnych badań diagnostycznych wystarczy 1 ml krwi pobranej na EDTA (10 µl 10% EDTA na 1 ml krwi). Inne antykoagulanty mogą być również stosowane pod warunkiem, że nie będą interferowały w następnych etapach pracy z DNA. Izolacja DNA powinna być rozpoczęta zaraz po pobraniu materiału. Tkanki mogą być wprawdzie przechowywane w temperaturze 4°C przez kilka dni bez widocznej degradacji DNA, jednak wskazane jest, aby materiał, który nie zostanie wykorzystany do izolacji DNA w ciągu 48 godz. od pobrania zamrozić i przechowywać w temperaturze -20 do -80°C. Przy dłuższym przechowywaniu zarówno wydajność izolacji jak i jakość DNA obniża się. Materiał suchy (plamy krwi jak w teście

Guthrie'go) można przechowywać w kopertach, w temperaturze pokojowej, w suchym miejscu. W przypadku oparcia badania wyłącznie o reakcję PCR ilość materiału może być bardzo zredukowana nawet do ilości śladowych, wystarczy wtedy 50 μ l krwi. Głównym celem izolacji jest uzyskanie maksymalnej wydajności dla wysokocząsteczkowego DNA, przy jednoczesnym oczyszczeniu preparatu DNA z białek i inhibitorów enzymów stosowanych w następnych etapach pracy z DNA. Podczas izolacji DNA z krwi obwodowej w początkowym etapie lizie ulegają głównie komórki niezawierające jąder, które odrzucane są razem z surowicą. Leukocyty są zbierane, przemywane, a następnie lizowane. Obecnie metody izolacji DNA można podzielić na trzy grupy: a) izolacja DNA z zastosowaniem fenolu i chloroformu celem odbiałczenia preparatów; b) izolacja DNA przebiegająca poprzez wysolenie białek z lizatów komórek; c) izolacja DNA poprzez związanie z nośnikiem, odmycie zanieczyszczeń i uwolnienie DNA. Oczyszczony preparat DNA można przesyłać w temperaturze pokojowej i przechowywać przez kilka miesięcy w temperaturze 4°C. Nie jest zalecane częste zamrażanie i rozmrażanie preparatów DNA ze względu na możliwość jego degradacji.

Współczesna diagnostyka molekularna przebiega głównie z zastosowaniem analizy restrykcyjnej i amplifikacji DNA w reakcji PCR. Do analizy restrykcyjnej należy przeznaczyć 5-10 μ g DNA. Po hydrolizie enzymem restrykcyjnym prowadzi się elektroforezę w 0,9% żelu agarozowym o wymiarach 20x20 cm. Po elektroforezie wykonywana jest alkaliczna denaturacja i neutralizacja DNA, a następnie DNA jest przenoszony na filtr nitrocelulozowy. Z kolei filtr poddawany jest hybrydyzacji z sondą molekularną zawierającą znacznik, najczęściej promieniotwórczy izotop (32 P) lub ligand, który może być rozpoznany swoistym przeciwciałem i reakcją kolorymetryczną. W miejscach, w których nastąpiła hybrydyzacja sondy molekularnej z DNA, powstają charakterystyczne prążki. Badania hybrydyzacyjne stanowią nadal bardzo atrakcyjne narzędzie badawcze w diagnostyce molekularnej, co zawdzięczają dużej czułości, krótkiemu czasowi hybrydyzacji oraz wprowadzeniu nieradioaktywnych sposobów znakowania i detekcji sond molekularnych. Analiza hybrydyzacyjna jest szczególnie cenna dla weryfikacji wyników badań uzyskanych wyłącznie w oparciu o metodę PCR (Siemieniako i wsp., 2004). W rozprawie zaplanowano wykonywanie zarówno hybrydyzacji obejmującej jednoczesną analizę wielu *loci* (ang. *multi locus system*,

MLS) – z sondą (CAC)₅, jak i hybrydyzacji typu pojedynczego *locus* (ang. *single locus system*, SLS) – z sondami MS43A i MS31.

W ostatnich latach badania hybrydyzacyjne zostały uzupełnione i w dużej mierze zastąpione reakcją PCR. Technika PCR jest bez wątpienia jedną z najważniejszych technik biologii molekularnej, stąd zrozumiałe jest jej natychmiastowe zastosowanie w badaniach nad ustalaniem pokrewieństwa (Słomski i wsp., 1992; Słomski i Kwiatkowska, 1995). Metoda PCR umożliwia specyficzną amplifikację *in vitro* wybranych odcinków DNA, dzięki wykorzystaniu dwóch starterów komplementarnych do sekwencji docelowej. Czułość reakcji pozwala amplifikować DNA pojedynczych genów ponad 1 000 000 razy mimo obecności innych sekwencji. Typowa reakcja PCR obejmuje 30 powtarzających się cyklicznie denaturacji, wiązań starterów i syntez z zastosowaniem termostabilnej polimerazy. Mieszanina reakcyjna zawiera matrycę DNA, dwa startery komplementarne do matrycy i ograniczające długość syntetyzowanego łańcucha, dNTP będące substratami reakcji i dostarczające energii do jej przebiegu, termostabilną polimerazę, kationy Mg²⁺ oraz bufor. Produkty reakcji PCR można analizować metodą elektroforezy w żelach agarozowych lub poliakryloamidowych i wybarwiać bromkiem etydyny lub srebrem (Budowle i wsp., 1991). Najczulszą i zarazem najkosztowniejszą metodą detekcji jest znakowanie DNA barwnikami fluorescencyjnymi, których wykorzystanie nie stanowi zagrożenia dla zdrowia operatora, jednak wymagają zastosowania specjalistycznego sprzętu (automatycznych sekwenatorów DNA) (Słomski, 2008).

1.7.3. Wykorzystanie polimorfizmu DNA do określania zygocności bliźniąt

Badania DNA metodą hybrydyzacji można podzielić na dwie grupy. Pierwszą z nich stanowi analiza pojedynczego *locus* (ang. *single locus system*, SLS), natomiast druga grupa obejmuje jednoczesną analizę wielu *loci* (ang. *multi locus system*, MLS). Wymienione grupy badań można określić również jako analizę jednopunktową lub wielopunktową (Słomski i wsp., 1994). Wnioski określające pokrewieństwo lub zygocność bliźniąt formułowane są na podstawie porównania wielkości fragmentów DNA występujących u badanych osób. Dla jednoznacznego wnioskowania w oparciu o analizę jednopunktową, konieczne jest wykonanie badań dla 3-4 niezależnych *loci*.

Alternatywnym podejściem badawczym jest analiza *multi locus*, analiza wielopunktowa. Jednym z najlepiej udokumentowanych badań z tej grupy jest jednoczesne wykrywanie wielu fragmentów DNA przy użyciu sondy MZ 1.3 lub (CAC)₅ (Pena i wsp., 1992). Wysokiej informatywności sondy towarzyszy skomplikowana analiza wyniku, który odpowiada rozdzielonym elektroforetycznie fragmentom DNA i jest swoisty dla badanej osoby (z wyjątkiem bliźniąt jednozygotycznych, dla których układ prążków jest jednakowy). Na początku lat dziewięćdziesiątych XX wieku pojawiły się doniesienia wskazujące na brak modelu genetycznego dla oszacowania wyników uzyskanych analizą *multi locus*. W odpowiedzi na krytykę pojawiły się doniesienia wykazujące ogromną dokładność i wysoką informatywność analizy wielopunktowej.

W prowadzonych w Laboratorium Genetyki Molekularnej profesora Słomskiego badaniach, standardowa analiza obejmuje wykonanie zarówno analizy *multi locus*, jak i pojedynczego *locus*. W badaniach *multi locus* najczęściej stosowane są enzymy *HinfI* lub *HaeIII* i sonda (GTG)₅, natomiast w badaniach pojedynczego *locus* wykonywane są analizy hybrydyzacyjne dla sond molekularnych MS31 i MS43A oraz badania metodą PCR dla *DIS80*, *ApoB*, *D17S30*, *DXS52*, *PLA2A1(AAT)_n*, *TH01(AATG)_n*, *CYAR04(AAAT)_n*. Własne doświadczenia z ostatnich lat wskazują, że najlepsze wyniki dla określenia zygotywności uzyskuje się po wykonaniu jednej analizy *multi locus* i dwóch analiz pojedynczego *locus* metodą hybrydyzacji. Badania z zastosowaniem PCR w przypadku osób blisko spokrewnionych często okazują się nieinformatywne.

Diagnostyka bliźniąt w oparciu o badania DNA nie tylko daje rozstrzygającą odpowiedź na temat zygotywności bliźniąt, ale również poszerza naszą wiedzę na temat mechanizmów powstawania ciężych bliźniaczych. Badania DNA dają niezaprzeczalny dowód na istnienie zjawiska nadpłodnienia. Girela i wsp. (Girela i wsp., 1997) opisuje przypadek bliźniąt płci żeńskiej, które urodziły się w 35 tygodniu ciąży. Różnica wagi pomiędzy dziewczynkami wynosiła 350 gramów. Na podstawie wykonanych badań, obejmujących analizę sekwencji polimorficznych metodami PCR i RFLP, wykluczono ojcostwo męża matki bliźniąt w stosunku do drugiego noworodka, natomiast w stosunku do pierwszego potwierdzono jego ojcostwo z prawdopodobieństwem 99,9999998%. Badania potwierdziły pokrewieństwo matki w stosunku do obu dziewczynek (wykluczenie zamiany drugiego dziecka po porodzie). Po zapoznaniu się z wynikami badań, matka przyznała, że współżyła z mężem i innym mężczyzną, w

krótkim odstępie czasu, zanim stwierdziła, że jest w ciąży. Inny przypadek bliźniąt posiadających dwóch ojców opisano w 2003 r. W tym przypadku wykonano w pierwszej kolejności standardowe badania serologiczne, jednak dopiero wynik badania DNA wykluczył ojcostwo badanego mężczyzny w stosunku do jednego z bliźniąt, a potwierdził w stosunku do drugiego dziecka (Lebeau-Le Guiner i wsp., 2003).

W 2008 r. w Wielkiej Brytanii urodziły się po raz drugi w tej samej rodzinie bliźniaczki różniące się kolorem skóry. Badania DNA potwierdziły, że obydwie pary dziewczynek mają tego samego ojca.

2. CEL ROZPRAWY

Ciąże wielopłodowe pojawiają się samoistnie u człowieka z częstością 1,05-1,35%. Szczególnie często rodzą się bliźnięta - raz na 80 porodów, co oznacza, że jeden na 40 noworodków jest bliźniakiem. Przyjmuje się, że ciążę bliźniacze stanowią początkowo do 75% wszystkich ciąż, przy czym donoszone zostaje tylko 5%, pozostałe ciążę kończą się jako ciążę pojedyncze. Częstość występowania spontanicznych ciąż mnogich w ostatnich latach maleje. Obecny poziom wiedzy medycznej pozwala na rozwiązanie wielu problemów związanych z rozwojem ciąż wielopłodowych, jednak etiologia ich powstawania w wielu punktach pozostaje nadal w sferze domysłów i stanowi jedno z bardziej interesujących zagadnień w etiologii rozrodu człowieka. W rozprawie doktorskiej postawiono następujące cele:

1. Głównym celem badań będzie ocena zmienności genetycznej u 200 par bliźniąt jednozygotycznych i dwuzzygotycznych.
2. Celem dodatkowym będzie określenie zygotyczności bliźniąt i występowania chimeryzmu krwi.
3. Trzecim celem będzie zaproponowanie najskuteczniejszej metody oceny zygotyczności bliźniąt.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiały

3.1.1. Odczynniki i roztwory

10, 80, 96% alkohol etylowy

40% akryloamid

2% metylenobisakryloamid

20% akryloamid/metylenobisakryloamid (29:1)

20% akryloamid/metylenobisakryloamid (49:1)

99% N,N,N',N'-tetrametylo-etylenodiamina (TEMED)

10% nadsiarazan amonu (APS)

1% HNO₃

0,2% roztwór azotanu srebra (AgNO₃)

10% kwas octowy

80% izopropanol

Chloroform

Deoksynukleotydy (dNTP) (*Fermentas, Sigma*)

EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy

Marker wielkości 50-500 (*Amersham Biosciences*)

Marker wielkości *MegaBACE ET550-R Size Standard* (*GE Healthcare Life Sciences*)

Marker wielkości λ /*EcoRI+HindIII*

Mieszanina fenolu, chloroformu i alkoholu izoamylowego (25:24:1)

Węglan sodu (Na₂CO₃)

Roztwór bromku etydyny (5 mg/ml)

Roztwór obciążający do próbek *MegaBACE* (*GE Healthcare Life Sciences*)

Roztwór do denaturacji DNA:

- 1,5 M NaCl

- 0,5 M NaOH

Roztwór do neutralizacji (pH 7,2):

- 0,5 M Tris-HCl
- 1,5 M NaCl
- 0,001 M EDTA

Roztwór GTC do izolacji DNA (pH 7,4):

- 4 M izotiocyanian guanidyny
- 25 mM cytrynian sodu
- 0,5% sarkozyl
- 0,1 M 2-merkaptoetanol

Roztwór obciążający 6x SUC:

- 0,25% błękit bromofenolowy
- 0,25% ksylencjanol
- 40% (w/v) sacharoza w wodzie

Roztwór obciążający do SSCP:

- 99% formamid
- 1% bufor 6x SUC

Roztwór obciążający do rozdzielania na zestawie ALFExpress:

- 99,5% formamid
- 0,5% błękit dekstranu

Roztwór stop:

- 10 mM EDTA
- 15% fikol 400
- oranż G (niewielka ilość do uzyskania zabarwienia roztworu)

3.1.2. Bufory*Bufor TBE (10x stężony):*

- 890 mM Tris
- 890 mM H₃BO₃

-
- 20 mM EDTA (pH 7,4-7,8)

Bufor do lizy komórek:

- 155 mM NH₄CL
- 10 mM KHCO₃
- 0,1 mM NaEDTA (pH 7,4)

Bufor do hybrydyzacji DNA z sondą molekularną:

- 5x SSPE
- 0,1% SDS

Bufor 20x SSPE (pH 7,0):

- 210,4g NaCl
- 31,2 g NaH₂PO₄·2H₂O
- 7,4 g Na₂EDTA
- H₂O do 1000 ml

Bufor 20x SSC (pH 7,0):

- 175,3g NaCl
- 88,2 g cytrynian sodu
- H₂O do 1000 ml

Bufor do PCR – 10x Bufor (Finnzymes, Sigma)

3.1.3. Zestawy komercyjne

Zestaw *GenePrint PowerPlex 16* (Promega) umożliwiający jednoczesną amplifikację i detekcję polimorfizmu 16 loci (15 loci STR i amelogeniny).

Zestaw do sekwencjonowania *DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (MegaBACE™, GE Healthcare Life Sciences)* (MIX).

3.1.4. Enzymy

Polimeraza Taq 2 jedn./μl DyNAzyme III (*Finnzymes*)

Polimeraza Taq z *Thermus aquaticus* 5 jedn./ μ l (*Sigma*)

*Hinf*I (10 jedn./1 μ l) (*Fermentas*)

*Hind*III (10 jedn./1 μ l) (*Fermentas*)

3.1.5. Żele agarozowe i poliakryloamidowe

0,8% żel agarozowy (100 ml):

- 0,8 g agaroz (Sigma)
- 100 ml 1xTBE
- 5 μ l roztworu bromku etydyny (5 mg/ml)

1,5% żel agarozowy (100 ml):

- 1,5 g agaroz (Sigma)
- 100 ml 1xTBE
- 5 μ l roztworu bromku etydyny (5 mg/ml)

8% żel poliakryloamidowy do HD (70 ml):

- 28 ml 20% akryloamid/metylenobisakryloamid (29:1)
- 7 ml 10x TBE
- 35 ml H₂O
- 70 μ l TEMED
- 700 μ l 10% APS

8% żel poliakryloamidowy do SSCP (70 ml):

- 28 ml 20% akryloamid/metylenobisakryloamid (49:1)
- 4 ml glicerol
- 3,5 10x TBE
- 34,5 H₂O
- 70 μ l TEMED
- 700 μ l 10% APS

6% żel do rozdzielu na zestawie ALFExpress (40 ml):

- 6 ml 40% akryloamid
- 6 ml 2% bisakryloamid

- 16,8 g 7 M mocznik
- woda do objętości 40 ml
- 35 µl TEMED
- 140 µl APS

3.1.6. Aparatura

Aparat do elektroforezy poziomej (żel 12x12, 20x20, 38x21)

Kołyaska do inkubacji żeli PA Heido Polymax 2040

Sekwencator ALFExpress (*Amersham Biosciences*)

Sekwencator *MegaBACE* (*GE Healthcare Life Sciences*)

Suszarka do żeli PA Heto Dry GD-I

Spektrofotometr Ultrospec 2000 (*Amersham Biosciences*)

Spektrofotometr NanoDrop ND2000 (*ThermoScientific*)

Piec do hybrydyzacji

Termocykler Biometra Personal Cycler

Termoblok Termostat 5320 Eppendorf

Wirówka Sorvall RT7

Wirówka 5417R Eppendorf

Wirówka 5804R Eppendorf

Wstrząsarka IKA Labortechnik

Zasilacz Bio Rad Power Pac

Zestaw do dokumentacji wyników Vilber Lourmat

3.1.7. Materiał biologiczny

Materiał biologiczny stanowiła krew pępowinowa pobrana od 200 par bliźniąt urodzonych w Ginekologiczno-Położniczym Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Oddziale Położniczo-Ginekologicznym Wojewódzkiego Szpitala Zespólnego im. Ludwika Perzyny w Kaliszu oraz DNA bliźniąt przechowywane w Banku DNA Laboratorium Genetyki Molekularnej prof. dr hab. Ryszarda Słomskiego. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu - uchwała nr 764/09 z 08 października 2009 r.

3.2. Metody

3.2.1. Izolacja DNA

DNA izolowano z zastosowaniem izotiocyanianu guanidyny (GTC). W tym celu pobrano 5 ml krwi pępowinowej do probówek zawierających 50 µl 10% EDTA (stężenie końcowe 0,1%), dodawano 25 ml buforu do lizy, mieszano i inkubowano przez 30 min. w temperaturze 0°C. Lizat wirowano w wirówce Sorvall RT6000B, 2500 rpm przez 15 min. w temperaturze 4°C, odrzucano supernatant a osad zawieszano w 500 µl buforu do lizy i dokładnie mieszano. Dodawano 2 ml GTC, dokładnie mieszano, inkubowano przez 15 min. w temperaturze 0°C. Następnie dodawano 2,5 ml mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamyłowy (25:24:1) o pH 8,0, dokładnie mieszano, wirowano w wirówce Sorvall, 3000 rpm przez 15 min. w temperaturze 4°C i zbierano supernatant. Do supernatantu dodawano 2,5 ml chloroformu, dokładnie mieszano, wirowano w wirówce Sorvall, 3000 rpm przez 15 min. w temperaturze 4°C i zbierano supernatant. Do zebranego supernatantu dodawano 5 ml etanolu (-20°C) i po zwirowaniu zbierano osad. Osad przemywano 1 ml 80% etanolu, suszono w temperaturze 37°C i rozpuszczano DNA w 300 µl sterylnej wody.

3.2.2. Ocena ilościowa i jakościowa preparatów DNA

Stężenie DNA określano poprzez pomiar absorpcji światła UV. Do pomiaru spektrofotometrycznego preparaty rozcieńczano 100 razy sterylną wodą. Po kalibracji spektrofotometru odczytywano punktowo wartość absorpcji (A) przy 260, 280 i 320 nm. Stężenie dwuniciowego DNA (C) obliczano według wzoru:

$$C (\mu\text{g/ml}) = (A_{260} - A_{320}) \times 50 \times \text{rozcieńczenie}$$

Czystość DNA jest wyrażana stosunkiem wartości absorpcji A_{260} do A_{280} , który świadczy o zanieczyszczeniu preparatów kwasów nukleinowych białkami. Wartość współczynnika A_{260}/A_{280} między 1,8-2,0 oznacza, że preparaty są wystarczająco oczyszczone, natomiast wartość równa 1,5 oznacza, że preparat zawiera 50% białka.

Jakość DNA określano również po frakcjonowaniu preparatów DNA w 0,8% żelu agarozowym poprzez ocenę ich migracji. DNA wysokocząsteczkowy migruje w postaci zwartego prążka o wielkości ponad 50 kpz, bez widocznych smug.

3.2.3. Hybrydyzacja DNA z sondami molekularnymi

Przygotowanie sondy molekularnej

Sondy molekularne znakowano izotopem γ [^{32}P]ATP (5000 Ci/mM) stosując kinazę polinukleotydową faga T4 (PNK). Pobierano 1 μl oligonukleotydowej sondy (CAC)₅, MS31 lub MS43A o stężeniu 10 pmoli/ μl , 1 μl 10x stężonego buforu dla kinazy, 5 μl γ [^{32}P]ATP (50 μCi), 2 μl H₂O oraz 1 μl kinazy (10 jedn./ μl). Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10 μl . Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 1 godz. w temperaturze 37°C. Nieprzyłączone do sondy radioaktywne nukleotydy oddzielano od sondy na kolumnie wypełnionej żelą Sephadex G-50 Medium. W tym celu, po zakończeniu znakowania, mieszaninę reakcyjną nakładano na kolumnę i przemywano 10 porcjami po 120 μl H₂O. Zbierano frakcje 6-9 (około 500 μl). Poziom znakowania radioaktywnego mierzono licznikiem Geigera-Müllera. Oczyszczoną w ten sposób sondę stosowano do hybrydyzacji lub przechowywano w temperaturze -20°C.

Przygotowanie DNA do hybrydyzacji z sondą molekularną

Do analizy restrykcyjnej pobierano 20 μl DNA o stężeniu 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dodawano 3 μl enzymu restrykcyjnego *Hinf*I (10 jedn./ μl), 3 μl 10 razy buforu do hydrolizy i uzupełniano wodą do objętości końcowej 30 μl . Mieszaninę reakcyjną przygotowywano na lodzie. Hydrolizę prowadzono przez 5 godz. w temperaturze 37°C. Po zakończeniu inkubacji sprawdzano czy nastąpiła pełna hydroliza DNA poprzez elektroforezę w 1% żelu agarozowym. W tym celu pobierano 5 μl mieszaniny, dodawano do roztworu obciążającego i nakładano na 1% żel agarozowy. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 80 V/cm przez 1 godzinę.

Dla celów analitycznych hydrolizowany DNA rozdzielano w 0,9% żelu agarozowym z 0,1% hydroksyetylenocelulozą (HEC), o wymiarach 20x20 cm. Elektroforezę prowadzono w buforze 1x TBE przez 48 godz. pod napięciem 40 V (2 V/cm). Równoległe z próbkami DNA наносzono standard wielkości DNA faga λ hydrolizowany enzymem restrykcyjnym *Hind*III. Po elektroforezie żel umieszczano w naczyniu zawierającym 500 ml H₂O z 25 μl bromkiem etydyny (0,5 mg/ml), barwiono przez 10 min., a następnie fotografowano.

Hybrydyzacja

Po wybarwieniu i wykonaniu dokumentacji przygotowywano żel do hybrydyzacji z sondą molekularną. W tym celu umieszczano żel na wytrząsarce w płaskim naczyniu zawierającym 500 ml 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH na 1 godz. celem denaturacji. Żel przemywano wodą, następnie dodawano roztwór do neutralizacji (0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,2) i inkubowano przez 1-1,5 godz. Kolejny etap stanowiło suszenie żelu w temperaturze 45°C przez 1 godz.

Lekko wilgotny żel przenoszono do dużej probówki hybrydyzacyjnej i rozwijano na jej ściankach. Dodawano 25 ml buforu do hybrydyzacji (5x SSPE, 0,1% SDS). Całość umieszczano w piecu do hybrydyzacji i prowadzono prehybrydyzację przez 1-1,5 godz. w temperaturze 45°C. Następnie bufor zastępowano nowym, zawierającym wyznakowaną sondę molekularną. Hybrydyzację prowadzono w temperaturze 45°C przez 18-20 godz.

Następnie do naczynia wlewano zimny roztwór 5x SSC i silnie wstrząsano w celu uwolnienia żelu ze ścianek naczynia hybrydyzacyjnego. Żel przenoszono do płaskiego naczynia, dodawano roztwór 5x SSC i płukano łagodnie kołysząc przez 30 min. Następnie zlewano bufor, zastępowano go roztworem 2x SSC, 0,1% SDS i płukano 30 min.

Tak przygotowany żel odsączano na bibule, zamykano między dwiema warstwami folii na zgrzewarce i poddawano autoradiografii przez 24 godz. w temperaturze -80°C.

3.2.4. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Analiza powtórzeń tri- i tetra nukleotydów w DNA

W niniejszej rozprawie przeprowadzono analizę polimorfizmu powtórzeń mikrosatelitarnych dla następujących genów: fosfolipazy trzustkowej, cytochromu P450, peroksydazy z tarczycy, hydroksylazy tyrozynowej oraz czynnika von Willebrandta (tabela 5).

Tabela 5. Zestawienie polimorficznych *loci* DNA wykorzystanych do określenia zygocyzności bliźniąt (Słomski i wsp., 2008).

<i>Locus</i>	Chromosom	Sonda Gen	Motyw (pz)	Liczba alleli	Heterozygotyczność (%)	Metoda badań	Sekwencje starterów do PCR	Wielkość produktu (pz)
<i>Multi locus</i>		(CAC) ₅	15			H		
<i>DIS21</i>	7p22	MS31	21		97	H		3200-13300
<i>DI2S11</i>	12q24.3	MS43A	45		96	H		3300-14300
<i>PLA2A1</i>	12q23	fosfolipaza trzustkowa	3	8	72-82	PCR	GGTTGTAAGCTCCATGAGGTTAGA TTGAGCACTTACTATGTGCCAGGCT	118-139
<i>CYP19</i>	15q21.1	cytochrom P450	4	8	57-78	PCR	GGTAAGCAGGTACTTAGTTAGCTAC GTTACAGTGAGCCCAAGGTCGTGAG	173-201
<i>vWF</i>	12p13	czynnik von Willebrandta	4	8		PCR	GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG CCCTAGTGGATG ATAAGAATAATC	134-162
<i>TPOX</i>	2p23	peroksydaza tarczycy	4	10	75	PCR	ACTGGCACAGAACAGGCACITTAGG GGAGGAACTGGGAACCCACACAGGT	220-256
<i>TH01</i>	11p15.5	hydroksylaza tyrozynowa	4	8	79	PCR	GTGGGCTGAAAAGCTCCCGAATTAT ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG	179-203

H – hybrydyzacja z sondą molekularną

W analizie polimorfizmu powtórzenia mikrosatelitarnego (AAT)_n w genie fosfolipazy trzustkowej *PLA2A1(AAT)_n* wykorzystano startery:

PLA2A1F 5'-Cy5-GGTTGTAAGCTCCATGAGGTTAGA-3'

PLA2A1R 5'-TTGAGCACTTACTATGTGCCAGGCT-3'

Wielkość amplifikowanych fragmentów wynosiła od 118 do 139 pz. Zastosowano następujący skład mieszaniny reakcyjnej: 10,9 µl wody, 2 µl 10x buforu do PCR, po 0,3 µl 50 pmoli/µl starterów PLA2A1F-Cy5 i PLA2A1R (0,75 pmoli/µl starterów), 1,3 µl 5 mM dNTP (0,325 nmoli/µl), 0,2 µl polimerazy Taq o stężeniu 5 jedn./µl (0,05 jedn./µl) oraz 5 µl DNA o stężeniu 25 ng/µl (6,25 ng/µl). Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µl.

W analizie polimorfizmu powtórzenia mikrosatelitarnego (AAAT)_n w genie cytochromu P450 *CYAR0(AAAT)_n* wykorzystano następujące sekwencje starterów:

CYP19F 5'-Cy5-GGTAAGCAGGTAAGTACTTAGCTAC-3'

CYP19R 5'-GTTACAGTGAGCCAAGGTCGTGAG-3'

Wielkość amplifikowanych fragmentów wynosiła od 173 do 201 pz. Zastosowano następujący skład mieszaniny reakcyjnej: 10,9 µl wody, 2 µl 10x buforu do PCR, po 0,3 µl 50 pmoli/µl starterów CYP19F-Cy5 i CYP19-R, 1,3 µl 5 mM dNTP, 0,2 µl polimerazy Taq o stężeniu 5 jedn./µl oraz 5 µl DNA o stężeniu 25 ng/µl. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µl.

W analizie polimorfizmu powtórzenia mikrosatelitarnego (AATG)_n w genie peroksydazy z tarczycy *TPOX* wykorzystano następujące sekwencje starterów:

TPOX F 5'-Cy 5-ACTGGCACAGAACAGGCCTTAGG-3'

TPOX R 5'-GGAGGAACTGGGAACCACACAGGT-3'

Wielkość amplifikowanych fragmentów wynosiła od 220 do 256 pz. Zastosowano następujący skład mieszaniny reakcyjnej: 10,9 µl wody, 2 µl 10x buforu do PCR, po 0,3 µl 50 pmoli/µl starterów TPOX F-Cy5 i TPOX R, 1,3 µl 5 mM dNTP, 0,2 µl polimerazy Taq o stężeniu 5 jedn./µl oraz 5 µl DNA o stężeniu 25 ng/µl. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µl.

W analizie polimorfizmu powtórzenia mikrosatelitarnego (AATG)_n w genie hydroksylazy tyrozynowej *TH01* wykorzystano następujące sekwencje starterów:

TH01 F 5'-Cy5 GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3'

TH01 R 5'-ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG-3'

Wielkość amplifikowanych fragmentów wynosiła od 179 do 203 pz. Zastosowano następujący skład mieszaniny reakcyjnej: 10,9 µl wody, 2 µl 10x buforu do PCR, po 0,3

μl 50 pmoli/μl starterów TH01 F-Cy5 i TH01 R, 1,3 μl 5 mM dNTP, 0,2 μl polimerazy Taq o stężeniu 5 jedn./μl oraz 5 μl DNA o stężeniu 25 ng/μl. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 μl.

W analizie polimorfizmu powtórzenia mikrosatelitarnego (AGAT)_n w genie czynnika von Willebrandta *VWFA* wykorzystano następujące sekwencje starterów:

VWFA31 F 5'-Cy5-GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG-3'

VWFA31 R 5'-CCCTAGTGGATGATAAGAATAATC-3'

Wielkość amplifikowanych fragmentów wynosiła od 134 do 162 pz. Zastosowano następujący skład mieszaniny reakcyjnej: 10,9 μl wody, 2 μl 10x buforu do PCR, po 0,3 μl 50 pmoli/μl starterów VWFA31 F-Cy5 i VWFA31 R, 1,3 μl 5 mM dNTP, 0,2 μl polimerazy Taq o stężeniu 5 jedn./μl oraz 5 μl DNA o stężeniu 25 ng/μl. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 μl.

Reakcję PCR przeprowadzano w następujących warunkach: denaturacja wstępna w temperaturze 94°C przez 300 sekund, denaturacja w temperaturze 92°C przez 30 sekund, wiązanie starterów w temperaturze 58°C przez 45 sekund, synteza w temperaturze 72°C przez 120 sekund, synteza końcowa w temperaturze 72°C przez 300 sekund, produkt PCR przechowywano do wyłączenia termocyklera w temperaturze 4°C. Reakcja PCR prowadzona w termocyklerze Biometra obejmowała 26 cykli dla analizy polimorfizmów genów fosfolipazy trzustkowej, cytochromu P450, peroksydazy z tarczycy oraz hydroksylazy tyrozynowej, natomiast do analizy polimorfizmu powtórzenia mikrosatelitarnego (AGAT)_n w genie czynnika von Willebrandta stosowano 33 cykle.

Amplifikacja regionu D mitochondrialnego DNA człowieka

Materiał do analizy mtDNA człowieka stanowił całkowity DNA komórkowy, wyizolowany z leukocytów krwi pępowinowej. W analizie polimorfizmu mtDNA wykorzystano następujące sekwencje starterów:

H2 (H16401) 5'-TGATTTTCACGGAGGATGGTG-3'

L2 (L15997tRNA-Pro) 5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3'

Wielkość amplifikowanych fragmentów wynosiła 443 pz. Zastosowano następujący skład mieszaniny reakcyjnej: 10,9 μl wody, 2 μl 10x buforu do PCR, po 0,3 μl 10 pmoli/μl starterów H2 i L2 (0,15 pmoli/μl starterów), 1,3 μl 5 mM dNTP (0,325 nmoli/μl), 0,2 μl polimerazy Taq o stężeniu 5 jedn./μl (0,05 jedn./μl) oraz 5 μl DNA o

stężeniu 25 ng/μl (6,25 ng/μl). Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 μl.

Reakcję PCR przeprowadzano w następujących warunkach: denaturacja wstępna w temperaturze 94°C przez 300 sekund, denaturacja w temperaturze 92°C przez 45 sekund, wiązanie starterów w temperaturze 48°C przez 45 sekund, synteza w temperaturze 72°C przez 90 sekund, synteza końcowa w temperaturze 72°C przez 300 sekund, produkt PCR przechowywano do wyłączenia termocyklera w temperaturze 4°C. Reakcja PCR prowadzona w termocyklerze Biometra obejmowała 30 cykli.

3.2.5. Rozdział produktów reakcji PCR w żelu agarozowym

Fragmenty mtDNA, uzyskane w reakcji PCR ze starterami H2/L2, rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny przez około 30 minut przy napięciu 100 V w buforze TBE. Na żel nakładano 5 μl produktu zmieszanego z 5 μl roztworu stop. Na jedną ze ścieżek nakładano 2 μl markera wielkości. Ocenę rozdziału przeprowadzano na transiluminatorze UV.

3.2.6. Rozdział produktów reakcji PCR na zestawie ALFExpress

Produkty reakcji PCR dla genów: fosfolipazy trzustkowej (*HUMPLA2A1*), cytochromu P450 (*HUMCYP19*), czynnika von Willebrandta (*HUMvWF*), peroksydazy z tarczycy (*HUMTPOX*) i hydroksylazy tyrozynowej (*TH01*) frakcjonowano na zestawie ALFExpress. Rozdział w żelu poliakryloamidowym oraz komputerowa analiza otrzymanych wyników umożliwia dokładne oznaczenie alleli i określenie zygotywności bliźniąt. Do 1,5 μl produktu PCR dodawano 6 μl buforu obciążającego do rozdziału na zestawie ALFExpress. Bufor obciążający zawierał wzorce długości 113 i 268 pz. Mieszaninę denaturowano przez 5 minut w temperaturze 94°C, po czym gwałtownie schładzano na lodzie. Elektroforezę prowadzono w denaturującym, 6% żelu poliakryloamidowym o stosunku akryloamidu do metylenobisakryloamidu 29:1. Rozdział przeprowadzano w temperaturze 55°C w 0,6x stężonym buforze TBE. Na zestawie ALFExpress detekcja następuje przez wzbudzenie i pomiar fluorescencji znacznika Cy5, którym wyznakowany jest jeden ze starterów do reakcji PCR. Komputerową analizę wyników wykonywano za pomocą oprogramowania dołączonego do urządzenia.

3.2.7. Wykrywanie polimorfizmów metodą PCR-HD

Próbki do analizy metodą heterodupleksów przygotowano dodając do 2 μ l produktu PCR 4 μ l buforu do HD. Mieszaninę denaturowano przez 5 minut w temperaturze 95°C, a następnie inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 65°C. Na żel nakładano 8 μ l mieszaniny. Elektroforezę prowadzono w niedenaturującym, 8% żelu poliakryloamidowym o stosunku akryloamidu do metylenobisakryloamidu 29:1. Rozdział przeprowadzano w temperaturze pokojowej przy stałym napięciu 90 V. Rozdział prowadzono w buforze TBE przez 16 godzin. Po rozdziale fragmenty DNA uwidaczniano przez barwienie srebrem.

3.2.8. Barwienie DNA srebrem

Po zakończeniu elektroforezy żel umieszczano w naczyniu szklanym lub plastikowym, w 300 ml 10% etanolu i łagodnie kołysano przez 15 min. Następnie usuwano etanol, przepłukiwano żel wodą i dodawano 300 ml 1% kwasu azotowego. Inkubowano z łagodnym kołysaniem przez 10 minut, po czym usuwano kwas azotowy i przepłukiwano żel wodą. Barwienie przeprowadzano w 300 ml 0,2% azotanu srebra z dodatkiem 300 μ l formaldehydu, inkubując żel z łagodnym kołysaniem przez 30 min. Następnie usuwano azotan srebra, a żel kilkakrotnie dokładnie płukano w dużej objętości wody. Do wywoływania przygotowano 1000 ml 3% roztworu węglańu sodu z dodatkiem 500 μ l formaldehydu. Roztwór dodawano porcjami po ok. 100 ml. Roztwór wymieniało na świeży, gdy zaczynał ciemnieć. Reakcję przerywano przez płukanie żelu przez 10 min. w 10% kwasie octowym, a następnie 2 razy w wodzie. Wybarwiony żel przenoszono na wilgotną bibułę Whatman 3mm i przykrywano dobrze zwilżoną folią celofanową. Żel suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 80°C przez 45 minut. Roztwór węglańu sodu przygotowano na świeżo, formaldehyd dodawano do roztworów tuż przed użyciem.

3.3. Analiza zygotywności bliźnięt metodą multipleks PCR z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*

Do oceny zygotywności bliźnięt stosowano zestaw *PowerPlex 16* firmy Promega, który jest powszechnie wykorzystywany do genotypowania dla potrzeb

medyczo-sądowych. W pierwszym etapie, po dokładnym oznaczeniu, nakładano do probówek 2 µl roztworu DNA (0,5-1 ng). Zastosowano następujący skład mieszaniny reakcyjnej: 17,2 µl wody, 2,5 µl buforu do PCR *PowerPlex 16*, 2,5 µl starterów *PowerPlex 16*, 0,8 µl polimerazy DNA Gold o stężeniu 5 jedn./µl oraz 2 µl DNA o stężeniu 0,25-0,5 ng/µl. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 25 µl.

Reakcję multipleks PCR przeprowadzano w następujących warunkach: denaturacja wstępna w temperaturze 95°C przez 660 sekund, denaturacja w temperaturze 96°C przez 60 sekund, denaturacja w temperaturze 94°C przez 30 sekund, wiązanie starterów w temperaturze 60°C przez 30 sekund, synteza w temperaturze 70°C przez 45 sekund. Ta część reakcji obejmowała 10 cykli. Denaturacja w temperaturze 90°C przez 30 sekund, wiązanie starterów w temperaturze 60°C przez 30 sekund, synteza w temperaturze 70°C przez 45 sekund, liczba cykli 22, synteza końcowa w temperaturze 60°C przez 1800 sekund. Produkt PCR przechowywano do wyłączenia termocyklera w temperaturze 4°C. Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze MJ.

Ważną część stanowiło sprawdzenie wyniku reakcji multipleks PCR poprzez uwidocznienie rozdziału produktów reakcji PCR w żelu agarozowym. Dla wykonania rozdziału metodą elektroforezy kapilarnej przygotowywano 5 µl mieszaniny zawierającej 2 µl oczyszczonego produktu PCR, 2,75 µl roztworu obciążającego do próbek (*MegaBACETM Loading solution*) i 0,25 µl markera wielkości *MegaBACE ET550-R Size Standard*. Próbkę ogrzewano w temperaturze 95°C przez 3 minuty, następnie chłodzono na lodzie przez 3 minuty i przeprowadzano elektroforezę kapilarną z wykorzystaniem sekwenatora *MegaBACE*. Uzyskane wyniki analizowano z zastosowaniem oprogramowania *MegaBACE Fragment Profiler v2.2 (GE Healthcare Life Sciences)*.

Drabiny alleli umożliwiają genotypowanie poszczególnych próbek prowadząc do uzyskania profilu DNA. W systemie analizowane są następujące *loci*: *Penta E*, *D18S51*, *D21S11*, *TH01*, *D3S1358*, *FGA*, *TPOX*, *D8S1179*, *vWA*, amelogenina, *Penta D*, *CSF1PO*, *D16S539*, *D7S820*, *D13S317* oraz *D5S818* (tabela 6). Startery reakcji PCR dla *Penta E*, *D18S51*, *D21S11*, *TH01* i *D3S1358* są znakowane fluoresceiną (FL); startery dla *FGA*, *TPOX*, *D8S1179*, *vWA* i amelogeniny są znakowane karboksytetrametylorodaminą (TMR); startery dla *Penta D*, *CSF1PO*, *D16S539*, *D7S820*, *D13S317* i *D5S818* są znakowane 6-karboksy-4',5'-dichloro-2',7'-dimetoksyfluoresceiną (JOE). Wszystkie 16 *loci* podlegają jednoczesnej amplifikacji typu multipleks i powstałe produkty PCR są rozdzielane w pojedynczej kapilarze.

Tabela 6. Zestawienie polimorficznych loci typu STR wykorzystanych do określenia zygotywności bliźniąt (Słomski i wsp., 2008).

<i>Locus STR</i>	<i>Znacznik</i>	<i>Chromosom</i>	<i>Określenie locus</i>	<i>Powtórzenie 5'-3'</i>
<i>Penta E</i>	FL	15q	Nie dotyczy	AAAGA
<i>D18S51</i>	FL	18q21.3	UT574	AGAA
<i>D21S11</i>	FL	21q11–21q21	D21LOC	TCTA Złożone
<i>TH01</i>	FL	11p15.5	TH01 Hydroksylaza tyrozyny	AATG
<i>D3S1358</i>	FL	3p	Nie dotyczy	TCTA Złożone
<i>FGA</i>	TMR	4q28	FIBRA Łańcuch alfa fibrynogenu	TTTC Złożone
<i>TPOX</i>	TMR	2p24–2pter	TPOX Peroksydaza tarczycy	AATG
<i>D8S1179</i>	TMR	8q	Nie dotyczy	TCTA Złożone
<i>vWA</i>	TMR	12p12–pter	VWFA31 Czynnik von Willebrandta	TCTA Złożone
<i>Amelogenina</i>	TMR	Xp22.1-22.3 i Y	AMEL Amelogenina	Nie dotyczy
<i>Penta D</i>	JOE	21q	Nie dotyczy	AAAGA
<i>CSF1PO</i>	JOE	5q33.3–34	CSF1PO Receptor proto-onkogenu CSF-1	AGAT
<i>D16S539</i>	JOE	16q24–qter	Nie dotyczy	GATA
<i>D7S820</i>	JOE	7q11.21–22	Nie dotyczy	GATA
<i>D13S317</i>	JOE	13q22–q31	Nie dotyczy	TATC
<i>D5S818</i>	JOE	5q23.3–32	Nie dotyczy	AGAT

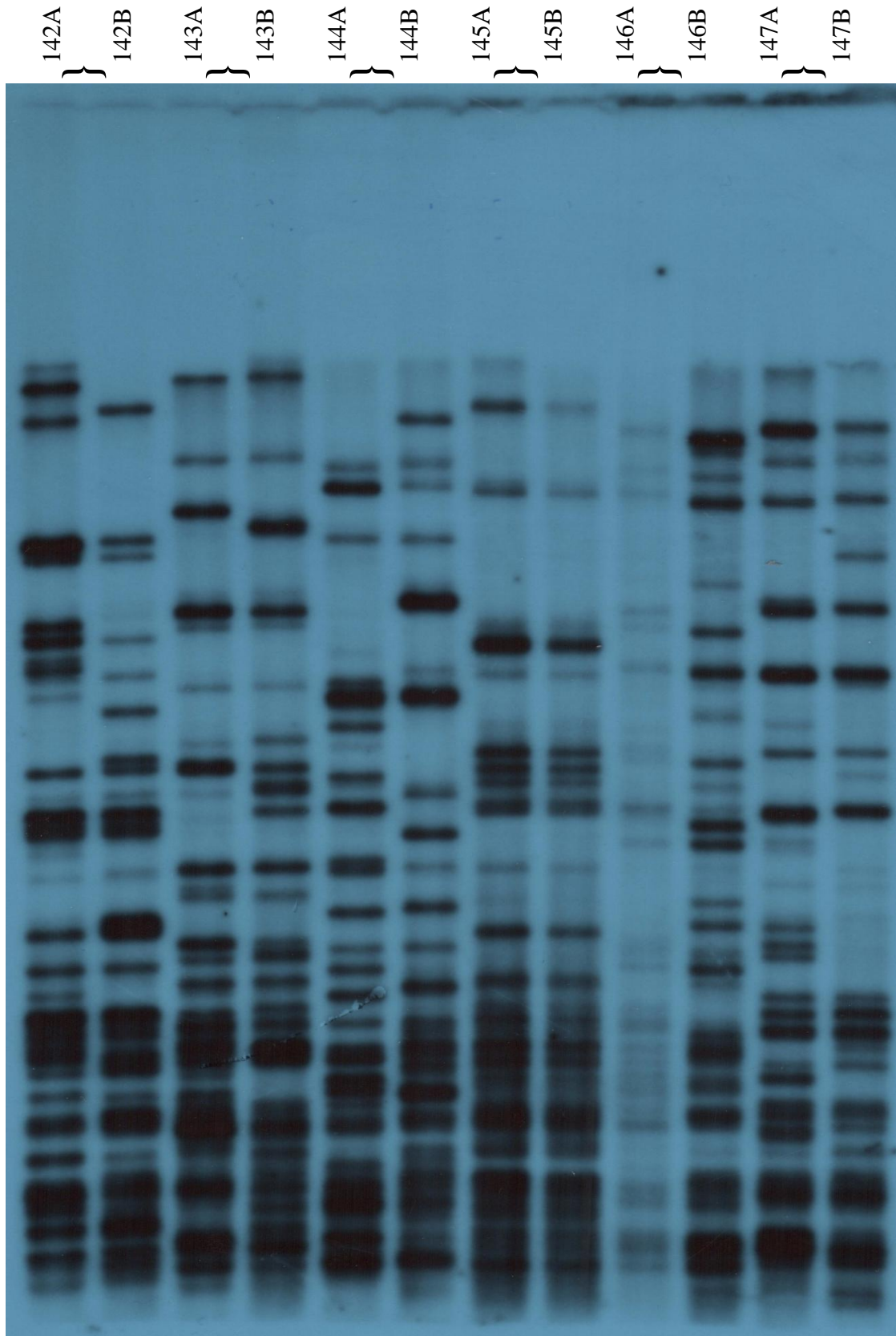
4. WYNIKI

4.1. Analiza jądrowego DNA

Po wyizolowaniu DNA z leukocytów krwi pępowinowej metodą z GTC wykonano dla wszystkich bliźniąt analizy polimorfizmu DNA zarówno poprzez hybrydyzację z sondą molekularną, jak i w oparciu o metodę PCR. Badania hybrydyzacyjne obejmowały analizę pojedynczego *locus*: D7S21 (7p22) i D12S11 (12q24.3) oraz jednoczesną analizę wielu *loci*, przy użyciu sondy (CAC)₅. Poprzez hybrydyzację z sondą (CAC)₅ otrzymano dla każdego z bliźniąt charakterystyczny wzór prążkowy, tzw. odcisk genetyczny. Przy pomocy metody PCR wykonano analizy polimorfizmu DNA w obrębie krótkich powtórzeń tandemowych (STR) dla następujących genów: fosfolipazy trzustkowej (*PLA2A1*, 12q23), cytochromu P450 (*CYAR0*, 15q21.1), czynnika von Willebrandta (*vWF*, 12p13), peroksydazy z tarczycy (*TPOX*, 2p23) i hydroksylazy tyrozynowej (*TH01*, 11p15.5). Łącznie przeprowadzono analizy *loci* zlokalizowanych na 5 różnych chromosomach.

4.1.1. Odcisk genetyczny

Określenie zygotywności metodą odcisku genetycznego (*DNA fingerprinting*) przeprowadzono dla każdej pary bliźniąt. Badanie wykonano z zastosowaniem hybrydyzacji z sondą molekularną (CAC)₅, znakowaną ³²P. W tym celu DNA hydrolizowano enzymem restrykcyjnym *Hinf*I, rozdzielano w 0,9% żelu agarozowym zawierającym 0,1% HEC, a następnie wykonywano hybrydyzację bezpośrednio z DNA unieruchomionym w żelu. Sondę znakowano na końcu 5' zgodnie z procedurą znakowania oligonukleotydów opisaną w rozdziale 3.2.3. Końcowy wynik uzyskiwano po odmyciu sondy i wykonaniu autoradiografii. Na ryc. 3. przedstawiono przykładowy wynik hybrydyzacji. Metoda *DNA fingerprinting* umożliwia jednoczesną analizę ponad 70 *loci*, pozwalając jednocześnie na określenie pokrewieństwa badanych osób, a w przypadku analizy bliźniąt na określenie ich zygotywności. Występowanie identycznego odcisku genetycznego wskazuje na jednozygotywność pary bliźniąt, które wykazują 100% wspólnych cech.



Ryc. 3. Określanie zygotywności bliźniąt metodą odcisku genetycznego.

Po hydrolizie DNA enzymem restrykcyjnym *Hinf*I i rozdzieleniu elektroforetycznym w 0,9% żelu agarozowym wykonano hybrydyzację z sondą molekularną $(CAC)_5$, a następnie autoradiografię. Pary bliźniąt jednozygotycznych – 145, dwuzygotycznych – 142, 143, 144, 146 i 147.

4.1.2. Oznaczenie zygotywności bliźniąt metodą hybrydyzacji z sondą molekularną MS31

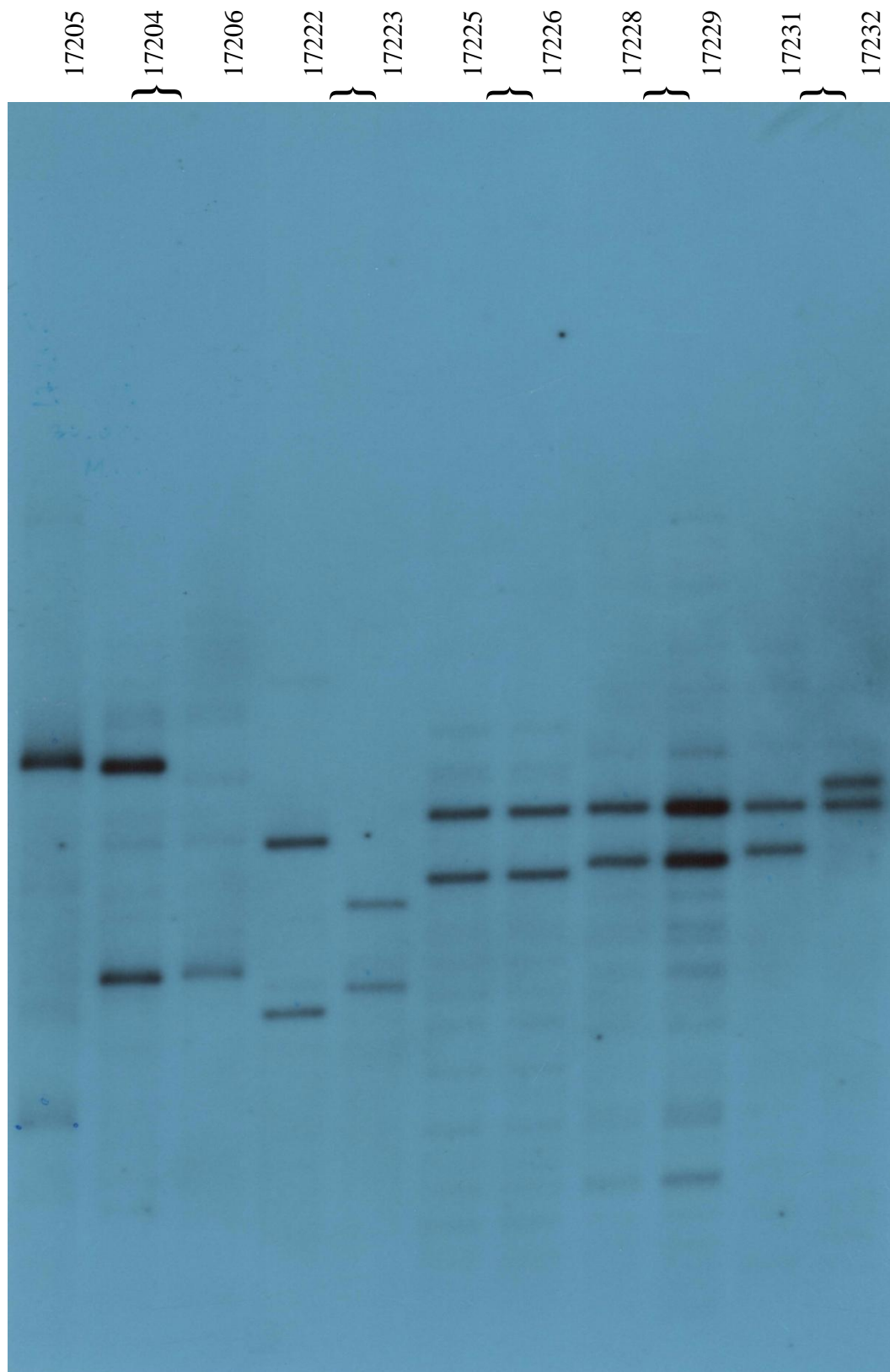
Metodę hybrydyzacji wykorzystano również do analizy polimorfizmu sekwencji minisatelitarnego DNA w pojedynczym *locus*. Obecność identycznych alleli u bliźniąt w danym *locus* nie może jednak jednoznacznie świadczyć o jednozygotywności badanych dzieci. Na podstawie analizy jednego *locus* nie można wykluczyć dwuzygotywności. Dopiero połączenie wyników analiz kilku *loci* umożliwia jednoznaczne wnioskowanie.

Do analizy wykorzystano ten sam żel, który został przygotowany do analizy metodą odcisku genetycznego. Zamiast sondy (CAC)₅, która rozpoznaje wiele *loci*, zastosowano znakowaną izotopem sondę molekularną MS31, komplementarną do *locus* D7S21, zlokalizowanego na chromosomie 7. Przykład analizy rozróżniającej zygotywność bliźniąt przedstawiono na ryc. 4.

4.1.3. Oznaczenie zygotywności bliźniąt metodą hybrydyzacji z sondą molekularną MS43A

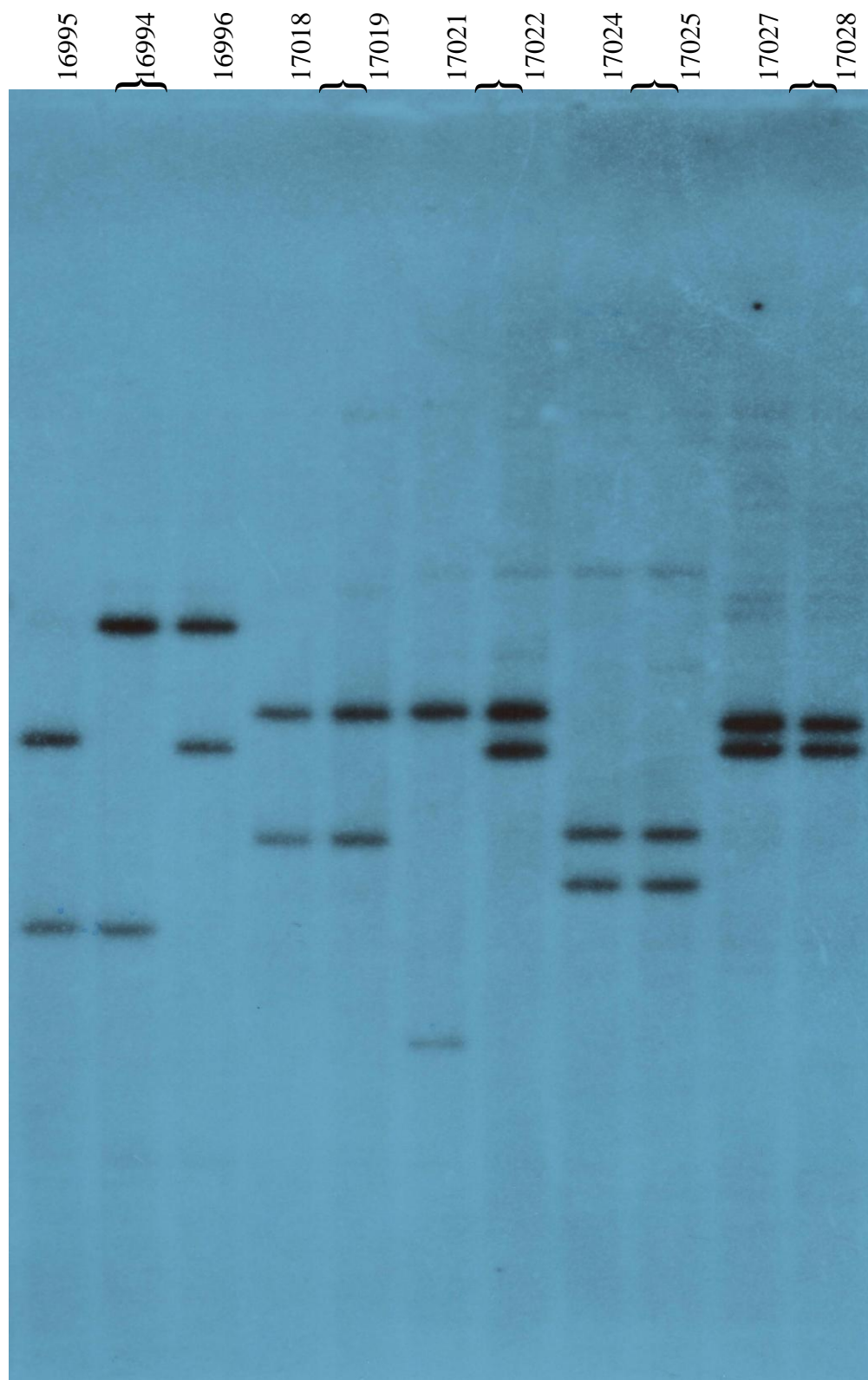
Metodę hybrydyzacji zastosowano do analizy *locus* D12S11 z zastosowaniem specyficznej sondy MS43A. Podobnie jak w przypadku hybrydyzacji z sondą MS31, występowanie identycznych alleli nie może świadczyć jednoznacznie o jednozygotywności badanych dzieci, ponieważ nie można na podstawie analizy jednego *locus* wykluczyć dwuzygotywności. Dopiero połączenie wyników analiz kilku genów umożliwia jednoznaczne wnioskowanie.

Do analizy wykorzystano ten sam żel, który został przygotowany do analizy metodą odcisku genetycznego. Zamiast sondy (CAC)₅, która rozpoznaje wiele *loci*, zastosowano znakowaną izotopem sondę molekularną MS43A, komplementarną do *locus* D12S11, zlokalizowanego na chromosomie 12. Przykład analizy rozróżniającej zygotywność bliźniąt przedstawiono na ryc. 5.



Ryc. 4. Określanie zygocności bliźniąt metodą hybrydyzacji z sondą molekularną MS31.

Po hydrolizie DNA enzymem restrykcyjnym *HinfI* i rozdziale elektroforetycznym w 0,9% żelu agarozowym wykonano hybrydyzację z sondą molekularną MS31, a następnie autoradiografię. Pary bliźniąt jednozygotycznych – 17225 i 17226, dwuzygotycznych – 17222 i 17223. 17228 i 17229, oraz 17231 i 17232. Pierwsze trzy tory przedstawiają rodzinę – matka 17205, dziecko 17204, ojciec 17206.

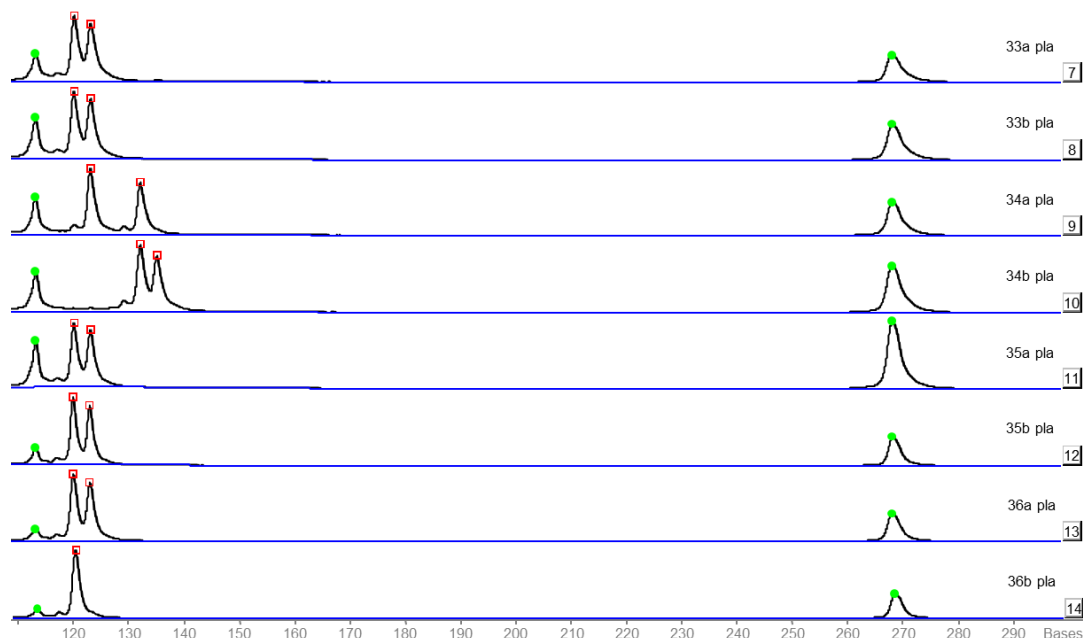


Ryc. 5. Określanie zygotywności bliźniąt metodą hybrydyzacji z sondą molekularną MS43A.

Po hydrolizie DNA enzymem restrykcyjnym *Hinf*I i rozdziale elektroforetycznym w 0,9% żelu agarozowym wykonano hybrydyzację z sondą molekularną MS43A, a następnie autoradiografię. Pary bliźniąt jednozygotycznych – 17018 i 17019, 17024 i 17025, 17027 i 17028, dwuzygotycznych 17021 i 17022. Pierwsze trzy tory – rodzina, matka 16995, dziecko 16994, ojciec 16996.

4.1.4. Analiza polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych *PLA2A1*, *CYAR0*, *vWF*, *TPOX* i *TH01* u bliźniąt dwuzygotycznych i jednozygotycznych

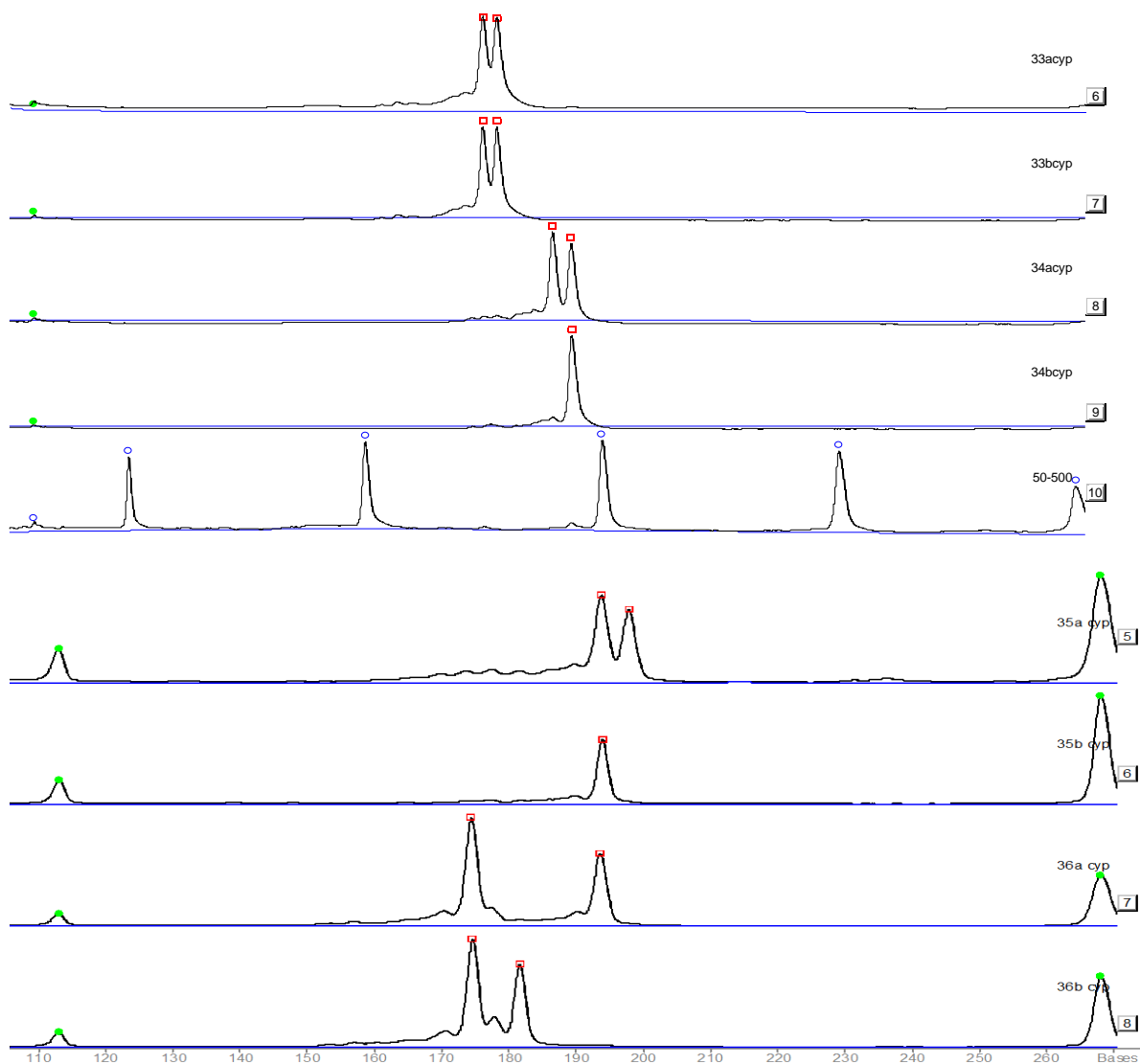
Analizę zygotyczności bliźniąt przeprowadzano także z zastosowaniem metody PCR, umożliwiającej określenie występowania polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych *PLA2A1* (fosfolipaza trzustkowa A-2), *CYAR0* (cytochrom P450), *vWF* (czynnik von Willebrandta), *TPOX* (peroksydaza tarczycy) oraz *TH01* (hydroksylaza tyrozynowa) człowieka. DNA amplifikowano z zastosowaniem odpowiednio starterów *PLA2A1F* i *PLA2A1R* oraz *CYP19F* i *CYP19R*, *VWFA31F* i *VWFA31R*; *TPOXF* i *TPOXR* oraz *TH01F* i *TH01R*. W *locus PLA2A1* badano powtórzenia trzech nukleotydów (AAT)_n, a w pozostałych powtórzenia 4 nukleotydów (AAAT)_n. Wiązanie starterów w reakcji PCR zachodziło w takiej samej temperaturze dla wszystkich par starterów - 58°C, wielkość amplifikowanych fragmentów zależała od liczby powtórzeń. Produkty PCR rozdzielano w 6% żelu poliakryloamidowym na zestawie ALFExpress w temperaturze 55°C. Allele identyfikowano przez określenie wielkości fragmentów i porównanie ich z drabiną alleli. Przykładowy wyniki analizy sekwencji mikrosatelitarnych u bliźniąt dwuzygotycznych i jednozygotycznych przedstawiono na ryc. 6-10.



Ryc. 6. Analiza polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych *PLA2A1* u bliźniąt dwuzygotycznych i jednozygotycznych.

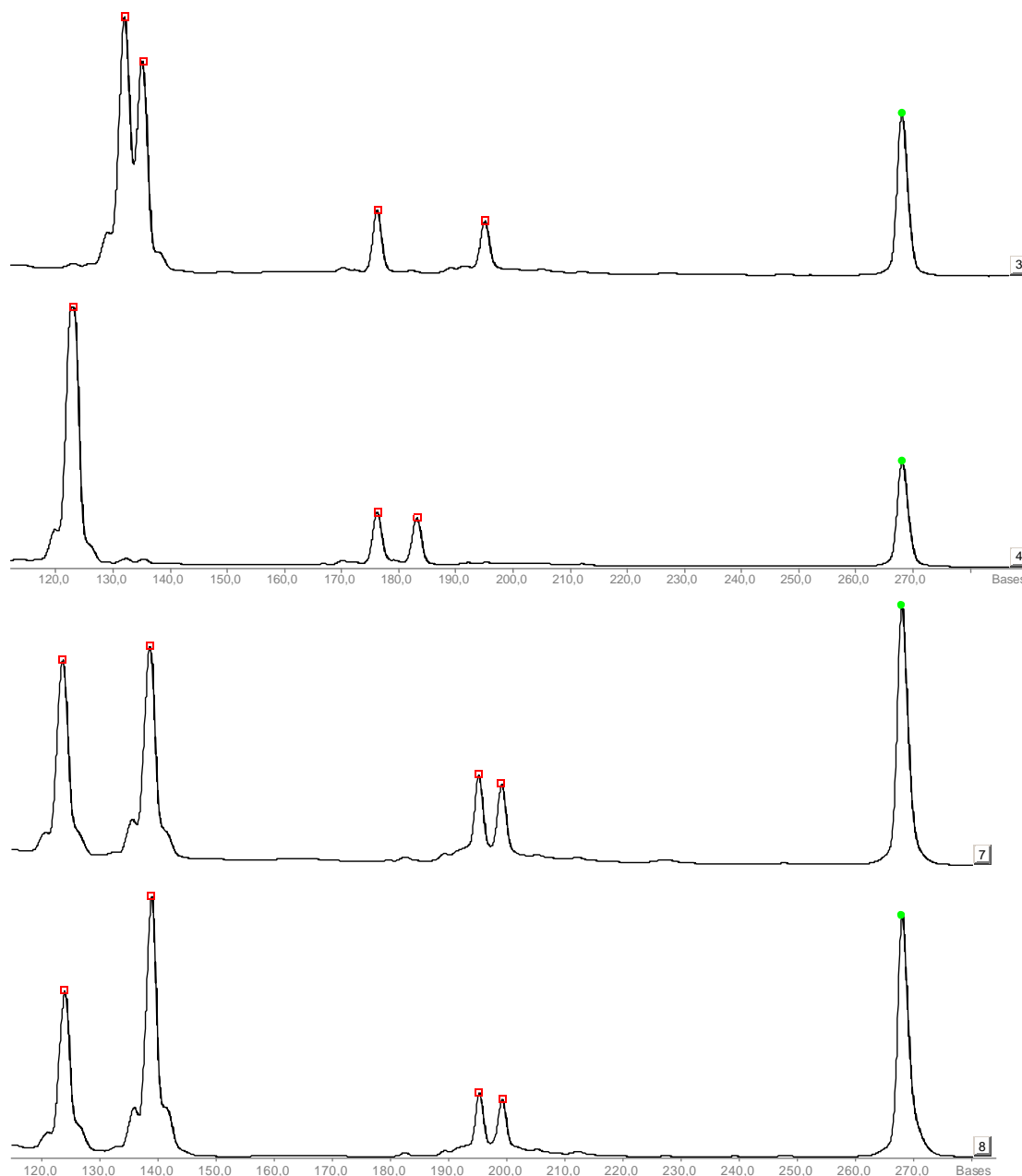
Locus PLA2A1 (fosfolipaza trzustkowa A-2) człowieka amplifikowano metodą PCR z zastosowaniem startera znakowanego Cy-5. Produkty PCR rozdzielano w 6% żelu poliakryloamidowym na zestawie ALFExpress. Allele identyfikowano przez określenie

wielkości fragmentów i porównanie ich z drabiną alleli. Każda próbka zawiera wzorce o wielkości 113 i 268 pz, oznaczone kolorem zielonym. Tory 7-8, bliźnięta jednozygotyczne; tory 9-10, bliźnięta dwuzygotyczne. Tory 11-12, bliźnięta dwuzygotyczne, tory 13-14, bliźnięta dwuzygotyczne. Przypisanie poszczególnych par bliźniąt do grupy jednozygotycznych lub dwuzygotycznych miało miejsce dopiero po wykonaniu pozostałych badań.



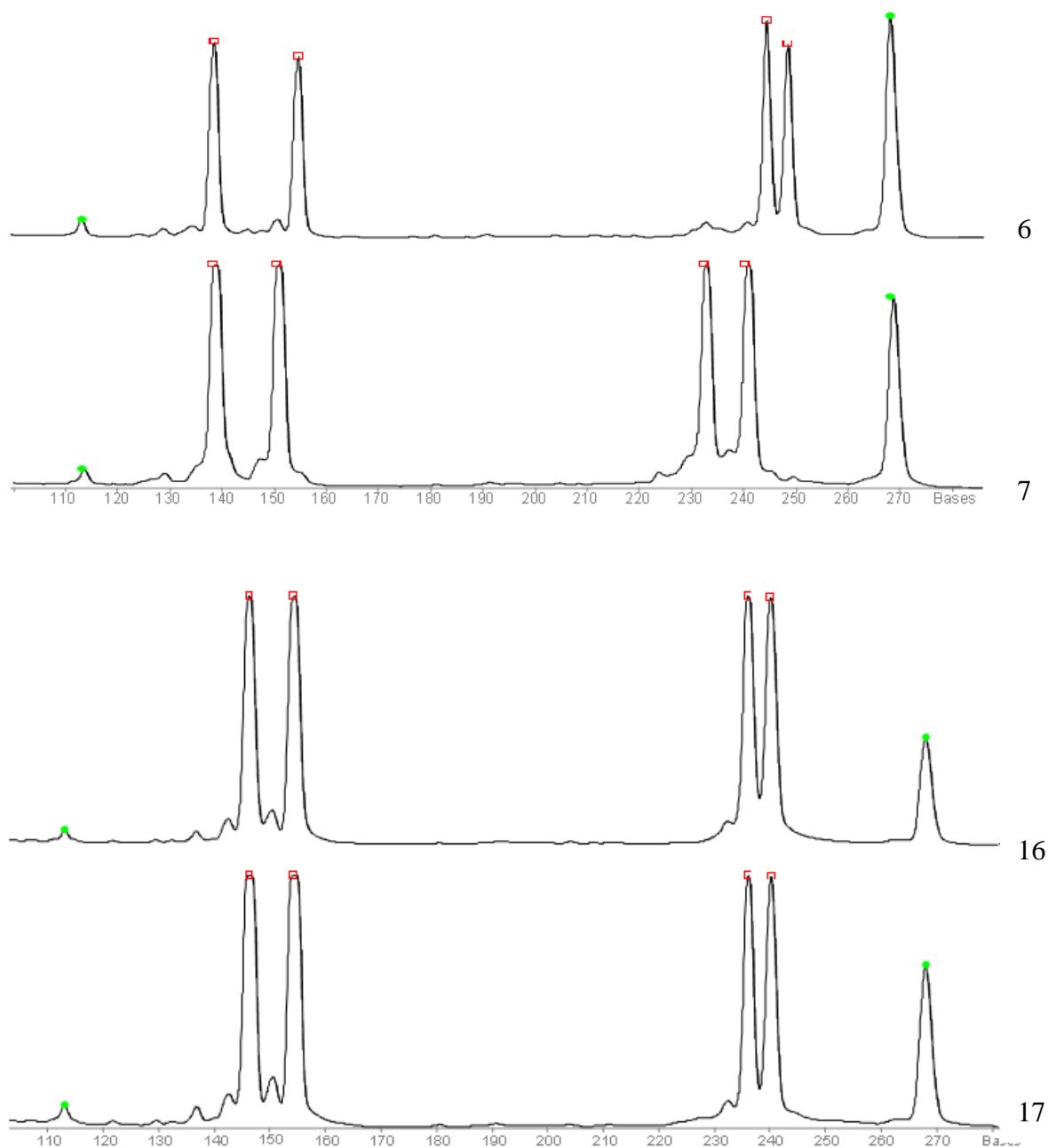
Ryc. 7. Analiza polimorfizmu *CYAR0* sekwencji mikrosatelitarnych u bliźniąt dwuzygotycznych i jednozygotycznych.

Locus CYAR0 (cytochrom P450) człowieka amplifikowano metodą PCR z zastosowaniem startera znakowanego Cy-5. Produkty PCR rozdzielano w 6% żelu poliakrylamidowym na zestawie ALFExpress. Allele identyfikowano przez określenie wielkości fragmentów i porównanie ich z drabiną alleli. Każda próbka zawiera wzorce o wielkości 113 i 268 pz. Część górna ryciny: tory 6-7, i 8-9, bliźnięta jednozygotyczne, tor 10, marker wielkości. Część dolna ryciny: tory 5-6 i 7-8, bliźnięta dwuzygotyczne.



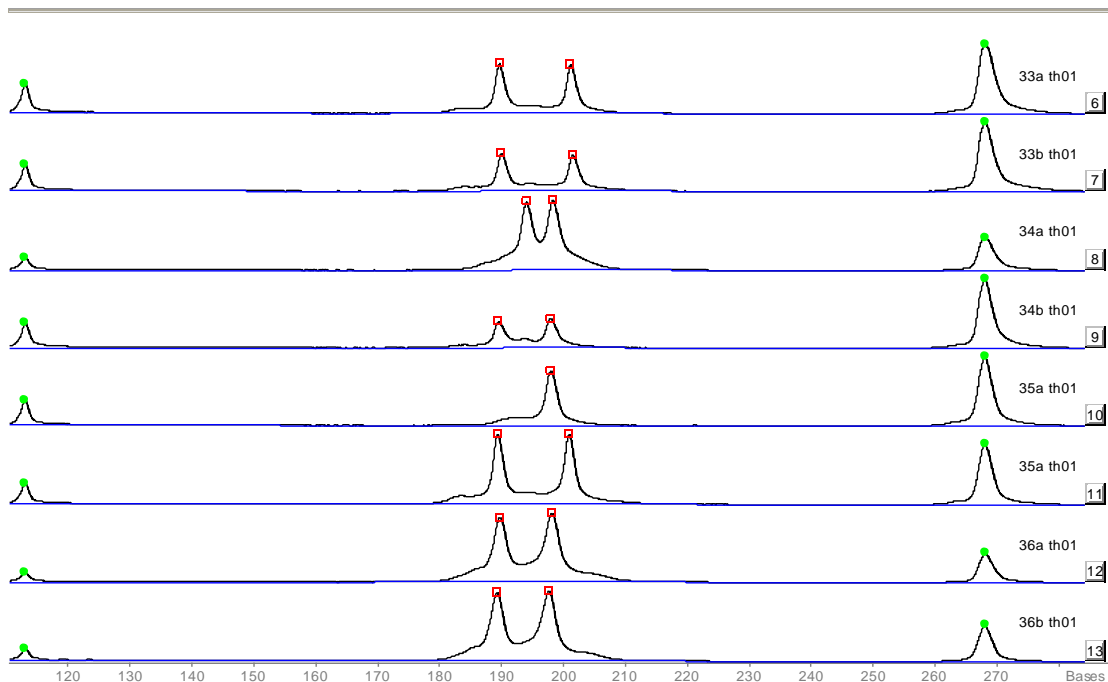
Ryc. 8. Analiza polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych *PLA2A1* i *CYARO* u bliźnięt dwuzygotycznych i jednozygotycznych.

Loci PLA2A1 (fosfolipaza trzustkowa A-2) oraz *CYARO* (cytochrom P450) człowieka amplifikowano metodą PCR z zastosowaniem startera znakowanego Cy-5. Produkty PCR rozdzielano w 6% żelu poliakrylamidowym na zestawie ALFExpress. Allele identyfikowano przez określenie wielkości fragmentów i porównanie ich z drabiną alleli. Z lewej strony ryciny widoczne są fragmenty odpowiadające *locus PLA2A1*, z prawej strony *locus CYARO*. Każda próbka zawiera wzorce o wielkości 113 i 268 pz, na rycinie widoczny jest wzorzec 268 pz. Tory 3-4, bliźnięta dwuzygotyczne; tory 7-8, bliźnięta jednozygotyczne. Bliźnięta dwuzygotyczne odziedziczyły po rodzicach różne allele, przy czym dziecko na torze 4, odziedziczyło od rodziców identyczne allele *PLA2A1*.



Ryc. 9. Analiza polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych *vWF* i *TPOX* u bliźniąt dwuzygotycznych i jednozygotycznych.

Loci vWF (czynnik von Willebrandta) i *TPOX* (peroksydaza z tarczycy) człowieka amplifikowano metodą PCR z zastosowaniem startera znakowanego Cy-5. Produkty PCR rozdzielano w 6% żelu poliakrylamidowym na zestawie ALFExpress. Allele identyfikowano przez określenie wielkości fragmentów i porównanie ich z drabiną alleli. Z lewej strony ryciny widoczne są fragmenty odpowiadające *locus vWF*, z prawej strony *locus TPOX*. Każda próbka zawierała wzorce o wielkości 113 i 268 pz, na rycinie widoczne są obydwa wzorce. Tory 6-7, bliźnięta dwuzygotyczne; tory 16-17, bliźnięta jednozygotyczne. W *loci vWF* i *TPOX* bliźnięta dwuzygotyczne odziedziczyły po rodzicach różne allele.

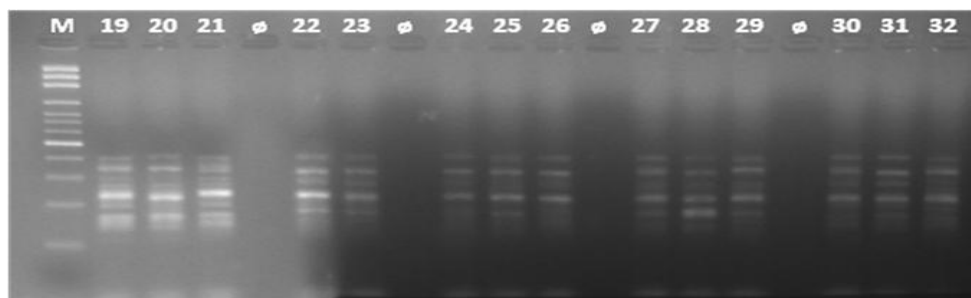


Ryc. 10. Analiza polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych *TH01* u bliźniąt dwuzygotycznych i jednozygotycznych.

Locus TH01 (hydroksylaza tyrozynowa) człowieka amplifikowano metodą PCR z zastosowaniem startera znakowanego Cy-5. Produkty PCR rozdzielano w 6% żelu poliakrylamidowym na zestawie ALFExpress. Allele identyfikowano przez określenie wielkości fragmentów i porównanie ich z drabiną alleli. Tory 6-7 i 12-13, bliźnięta jednozygotyczne; tory 8-9 i 10-11, bliźnięta dwuzygotyczne. Każda próbka zawierała wzorce o wielkości 113 i 268 pz, na rycinie widoczne są obydwa wzorce.

4.1.5. Przeprowadzenie analizy DNA bliźniąt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*

Ważnym etapem było genotypowanie 15 par bliźniąt z zastosowaniem zestawu do analizy multipleks PCR. Po każdej reakcji wykonanej dla próbek, oceniano reakcję PCR w żelach agarozowych przed badaniem próbek na sekwenatorze kapilarnym. Przykładowy wynik przedstawiono na ryc. 11.

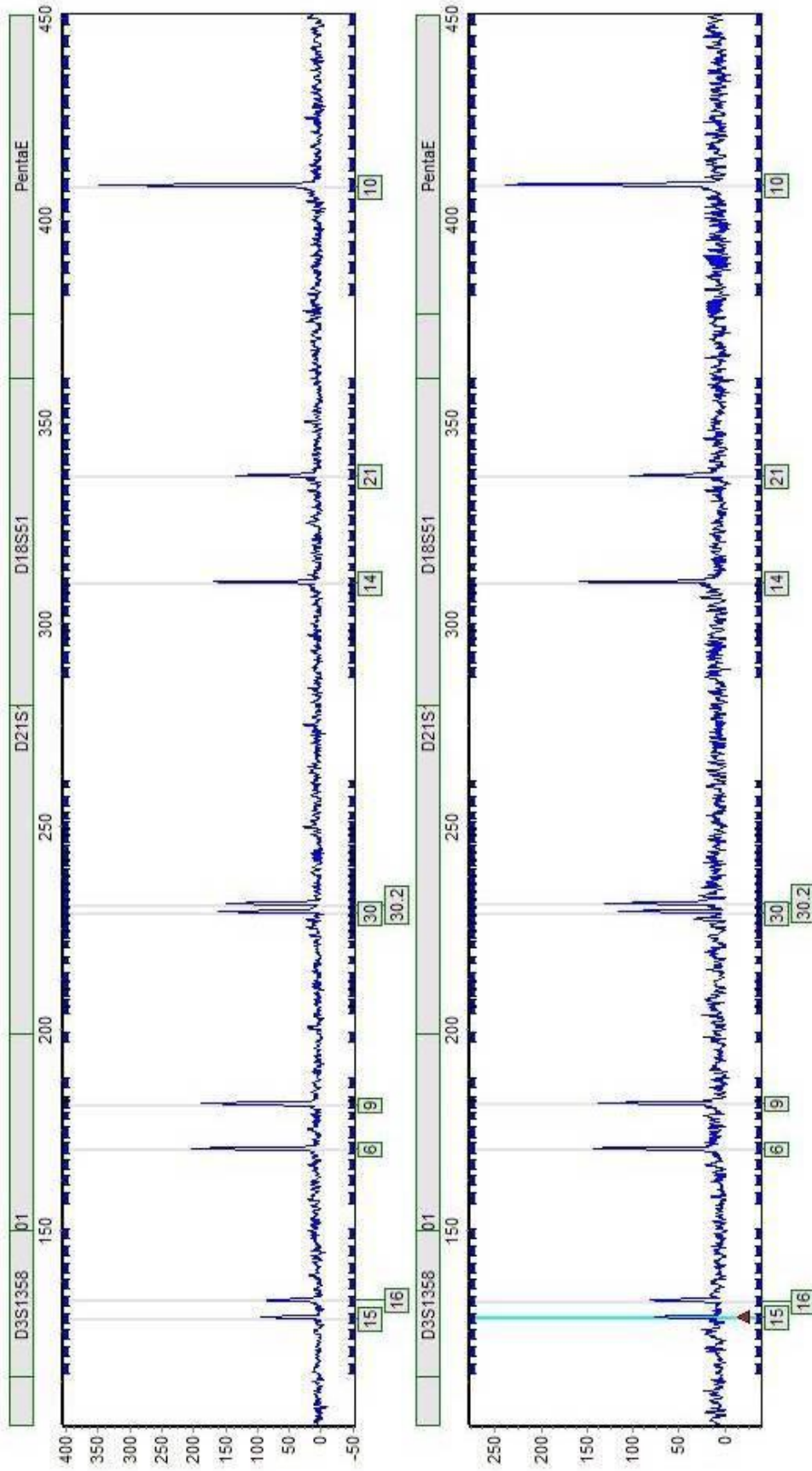


Ryc. 11. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji multipleks PCR z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*.

Wynik analizy informuje o przebiegu reakcji i uzyskaniu produktów, które w następnym etapie będą rozdzielane za pomocą elektroforezy kapilarnej. Badanie ma ograniczyć koszty, w przypadku braku produktu PCR. Tory 19-20-21, rodzina 1 (dziecko, matka, ojciec); tory 22-23, bliźnięta jednozygotyczne; tory 24-32, rodziny 2, 3 i 4 w układzie dziecko, matka, ojciec. M, marker wielkości, 100 bp. Rozdział prowadzono w 1,5% żelu agarozowym.

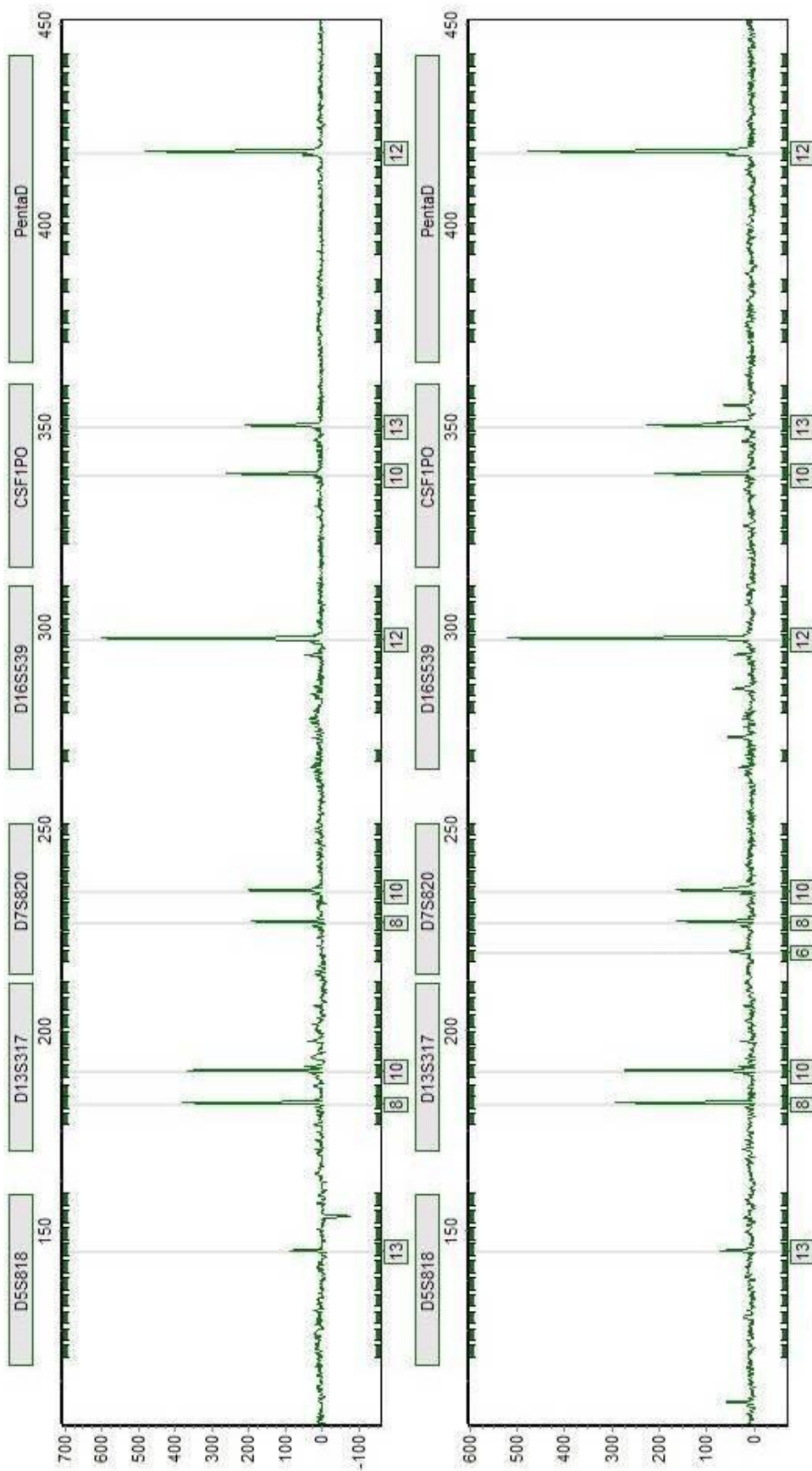
4.1.6. Rozdział produktów reakcji PCR z zastosowaniem sekwenatora kapilarnego

Dla wybranych par bliźniąt wykonano ustalenie zygotywności z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16* firmy Promega, wykorzystywanego do identyfikacji osób na cele medyczno-sądowe. Rozdział elektroforetyczny i ocenę wyniku prowadzono na zestawie do elektroforezy kapilarnej *MegaBACE* z wykorzystaniem oprogramowania producenta. Badanie wprowadzono jako cenne uzupełnienie metod wykorzystywanych w początkowej fazie realizacji rozprawy doktorskiej. Badania wprowadzono również dlatego, że zebrano już wcześniej interesujące przypadki występowania chimeryzmu krwi, zaobserwowane w badaniach z zastosowaniem analizy pojedynczych *loci*. Identyfikacja poszczególnych alleli miała miejsce na podstawie przypisania wykrytych alleli do drabiny alleli przygotowanej przez producenta zestawu. Przykład analizy przedstawiono na ryc. 12a-c. Kolejnym bardzo ważnym aspektem było określenie powtarzalności metody i sprawdzenie czy w przypadku chimeryzmu krwi możliwa jest analiza ilościowa. Przykład określenia powtarzalności wyników przedstawiono na ryc. 13.



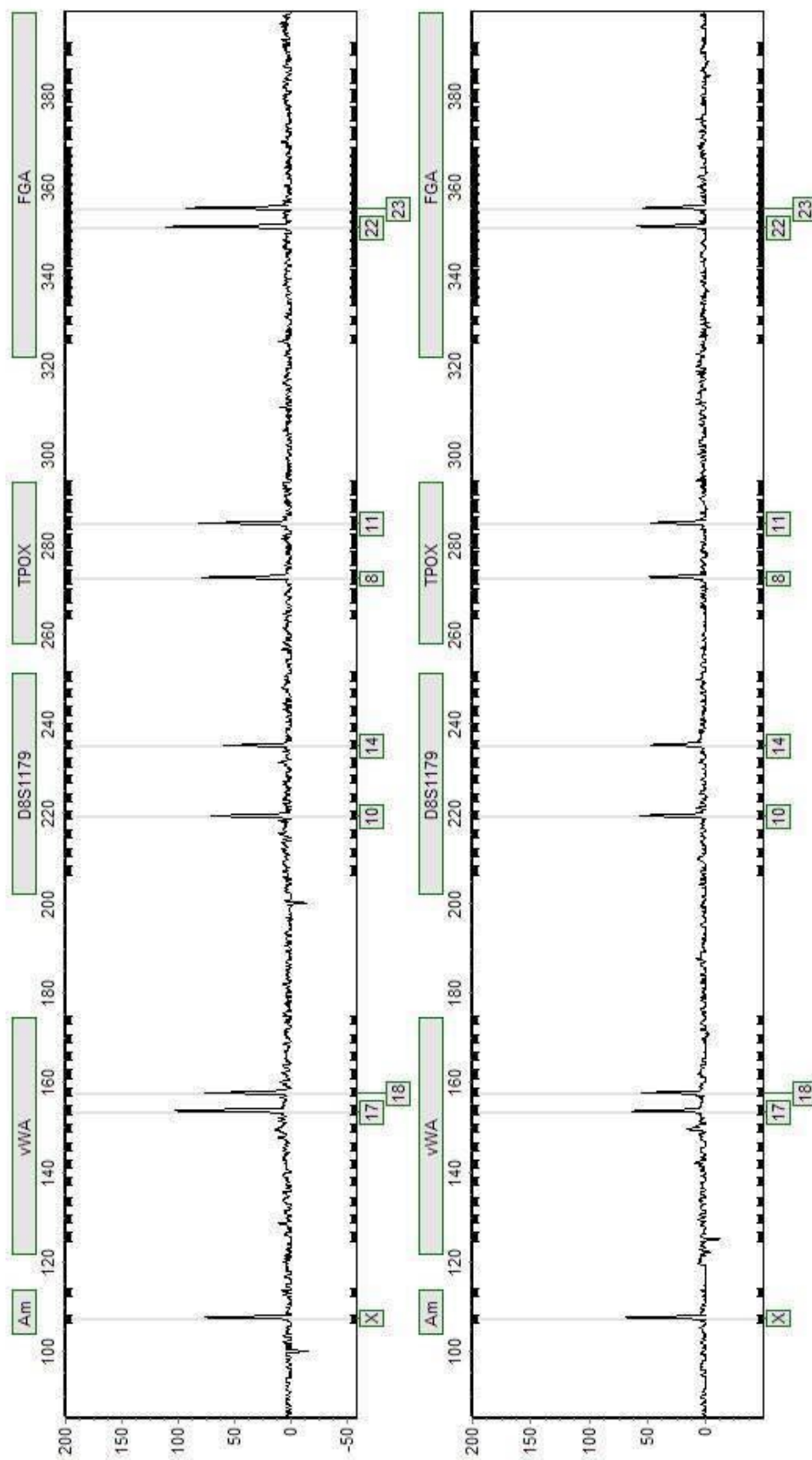
Ryc. 12a. Genotypowanie bliźniąt z zastosowaniem zestawu PowerPlex 16.

Analiza obejmowała 16 polimorficznych loci typu STR. Wszystkie analizowane cechy występują u obydwu bliźniąt, stąd wniosek, że są to bliźnięta jednozygotyczne. Startery dla loci *D3S1358* (allele 15 i 16), *TH01* (allele 6 i 9), *D21S11* (allele 30 i 30.2), *D18S51* (allele 14 i 21) i *Penta E* (allele 10-10) znakowano fluoresceiną (FL).



Ryc. 12b. Genotypowanie bliźniąt z zastosowaniem zestawu PowerPlex 16.

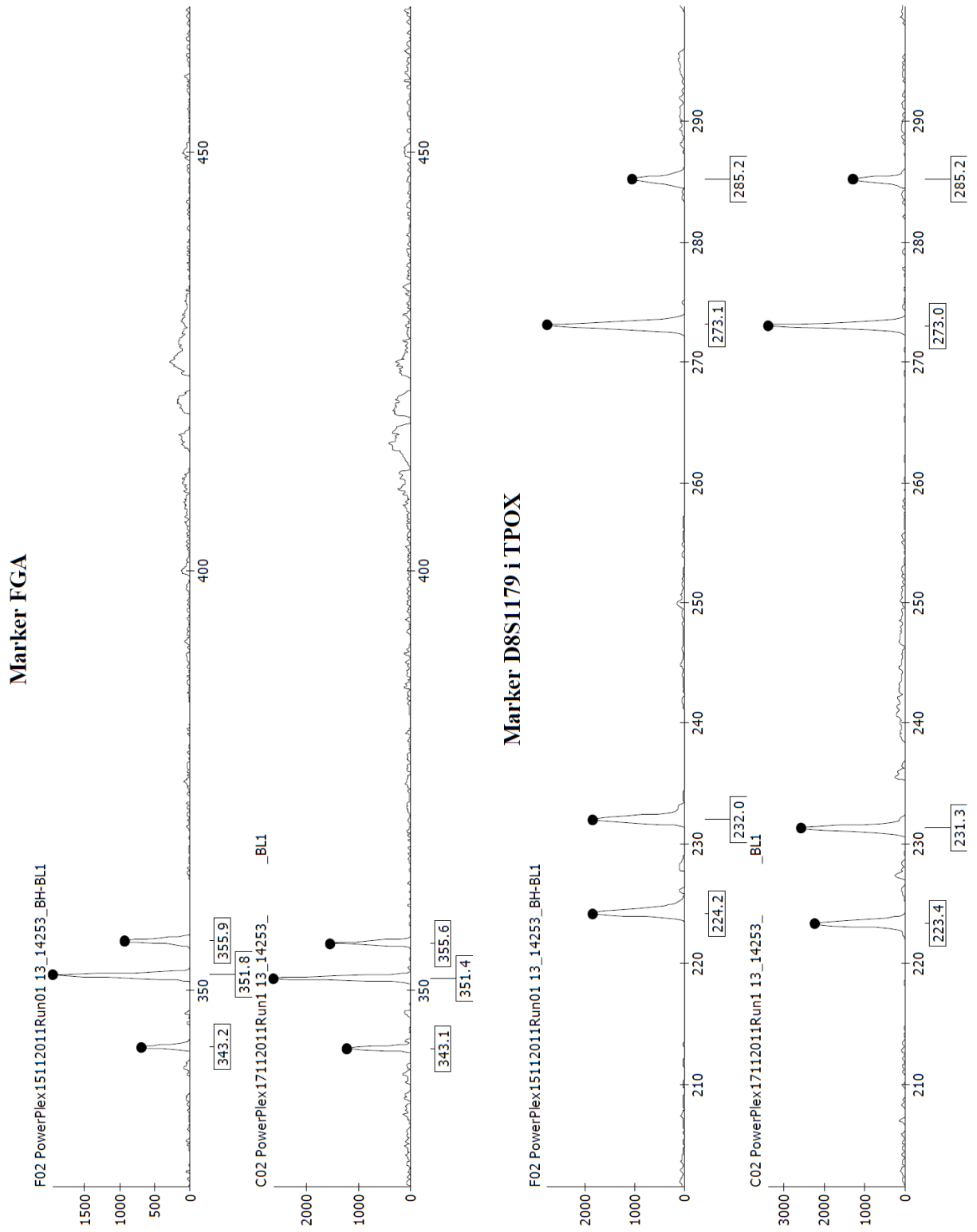
Analiza obejmowała 16 polimorficznych loci typu STR. Wszystkie analizowane cechy występują u obydwu bliźniąt, stąd wniosek, że są to bliźnięta jednozygotyczne. Startery dla loci *D5S818* (allele 13-13), *D13S317* (allele 13-13), *D7S820* (allele 8 i 10), *D16S539* (allele 12-12), *CSF1PO* (10 i 13) i *Penta D* (allele 12-12) są znakowane 6-karboksy-4',5'-dichloro-2',7'-dimetoksy-fluoresceiną (JOE). W przypadku locus *D7S820* program komputerowy zaznaczył jeszcze allel 6, który jednak jest artefaktem.



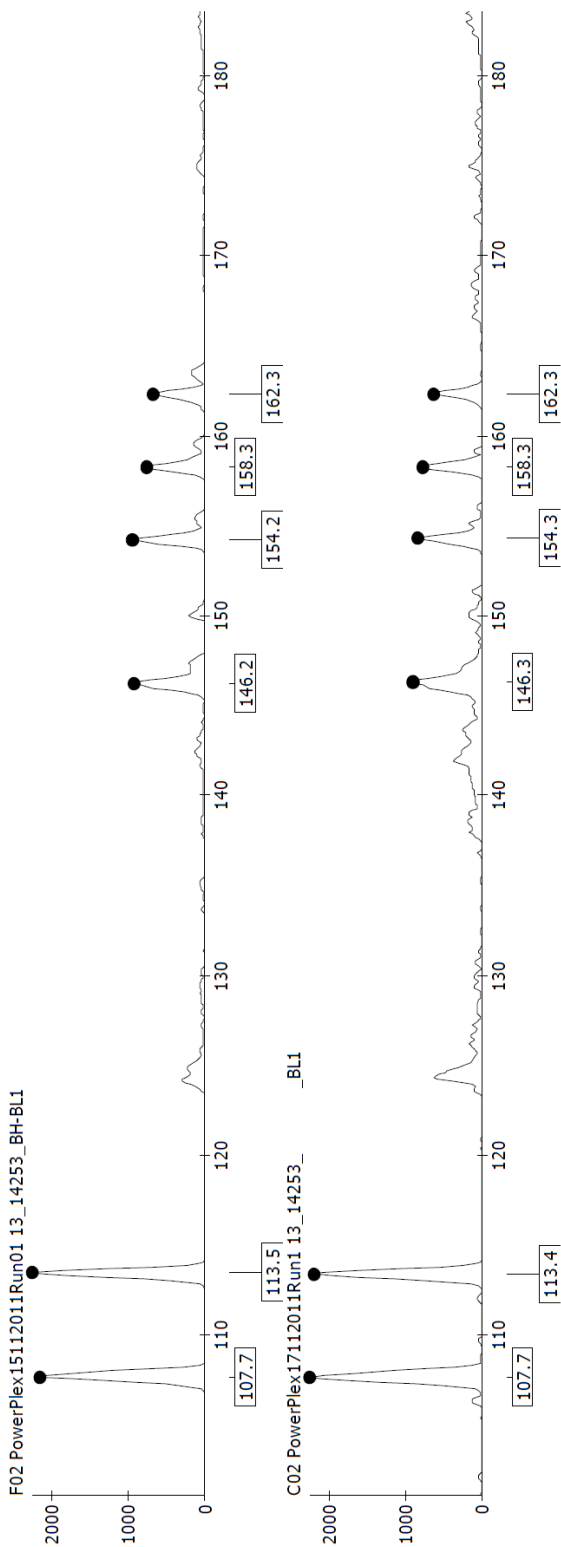
Ryc. 12c. Genotypowanie bliźniąt z zastosowaniem zestawu PowerPlex 16.

Analiza obejmowała 16 polimorficznych loci typu STR. Wszystkie analizowane cechy występują u obydwu bliźniąt, stąd wniosek, że są to bliźnięta jednozygotyczne. Startery dla loci amelogeniny (XX, płęć żeńska), vWA (allele 17 i 18), D8S1179 (allele 10 i 14), TPOX (allele 8 i 11) i FGA (allele 22 i 23) są znakowane karboksy-tetrametylorodaminą (TMR).

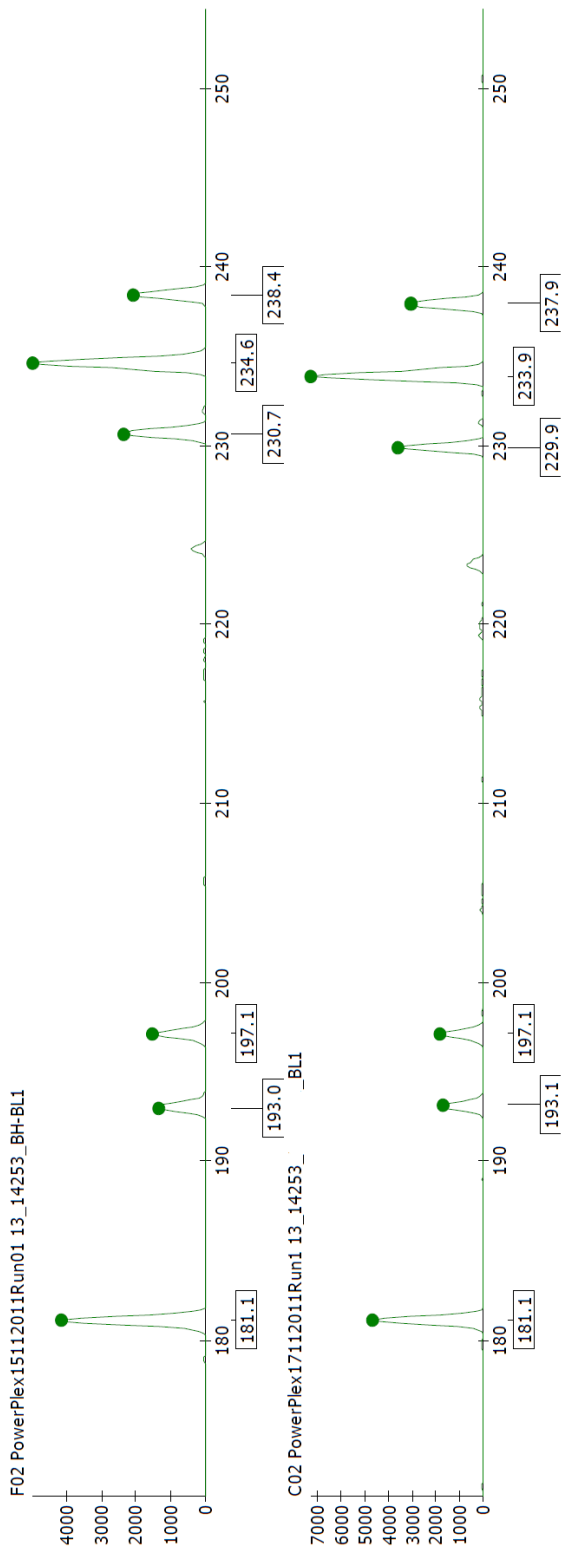
Na kolejnych stronach przedstawiono ocenę powtarzalności wyników genotypowania bliźniąt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*.

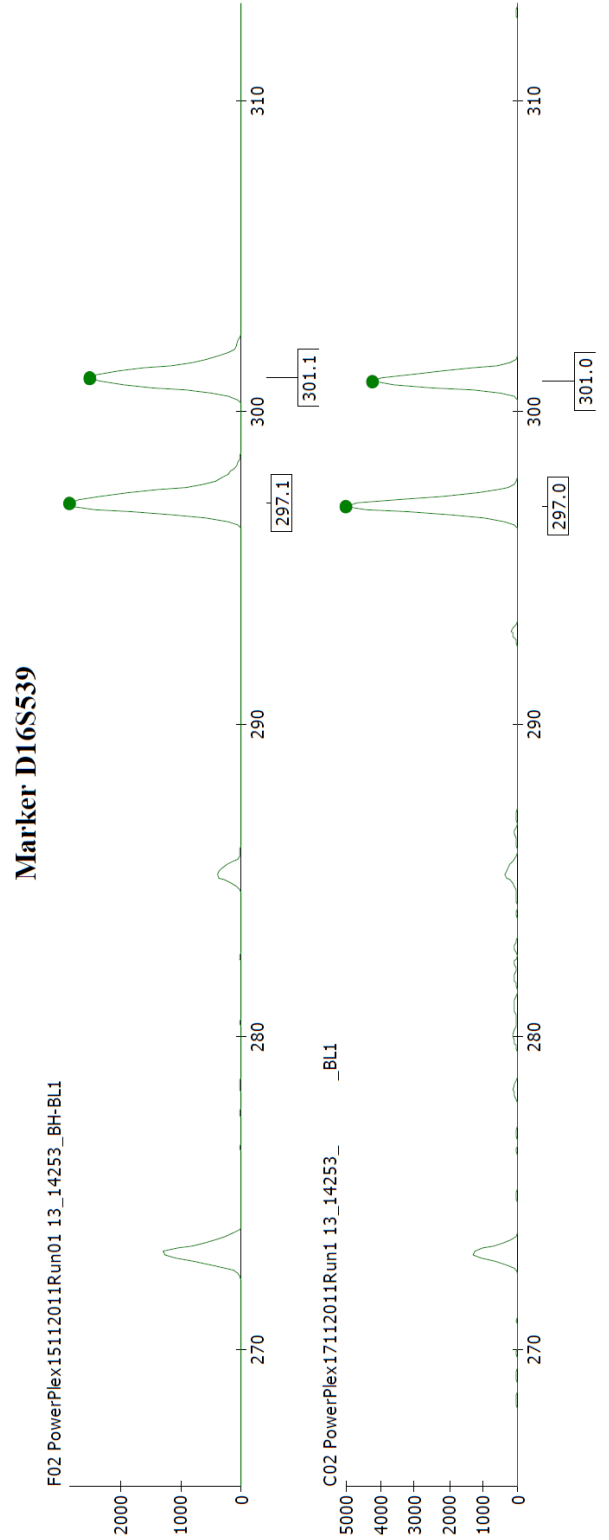
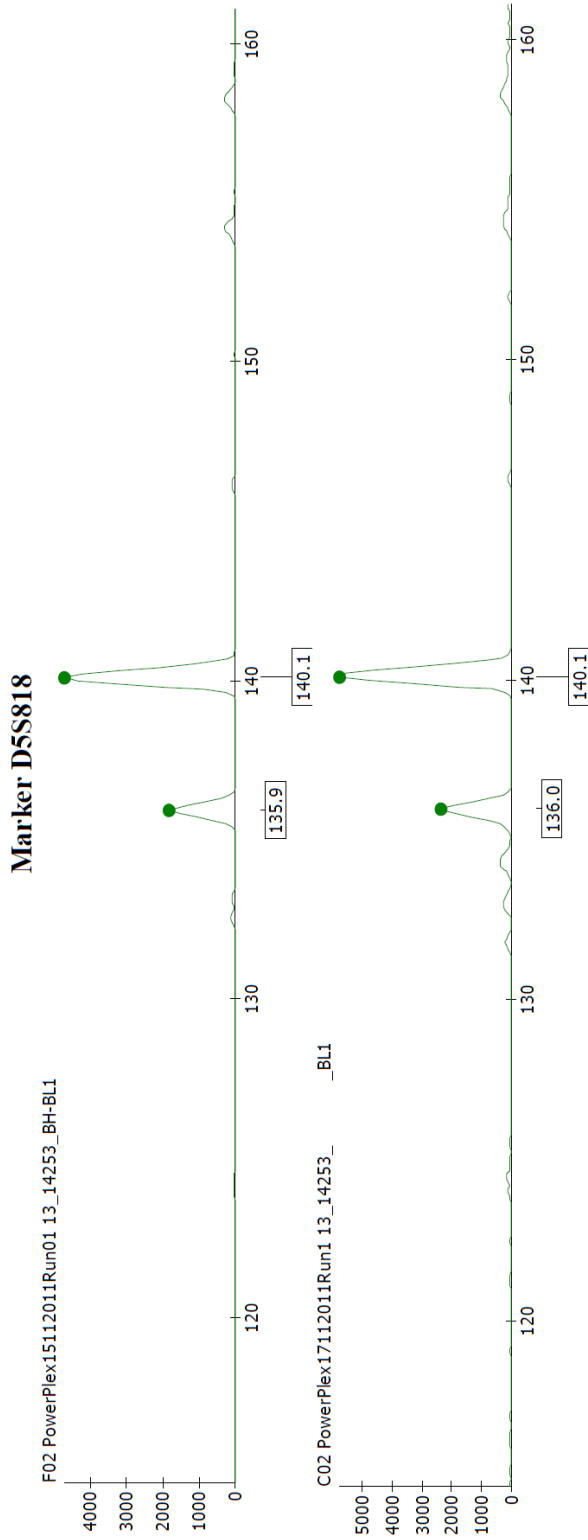


Marker Amelo i vWA

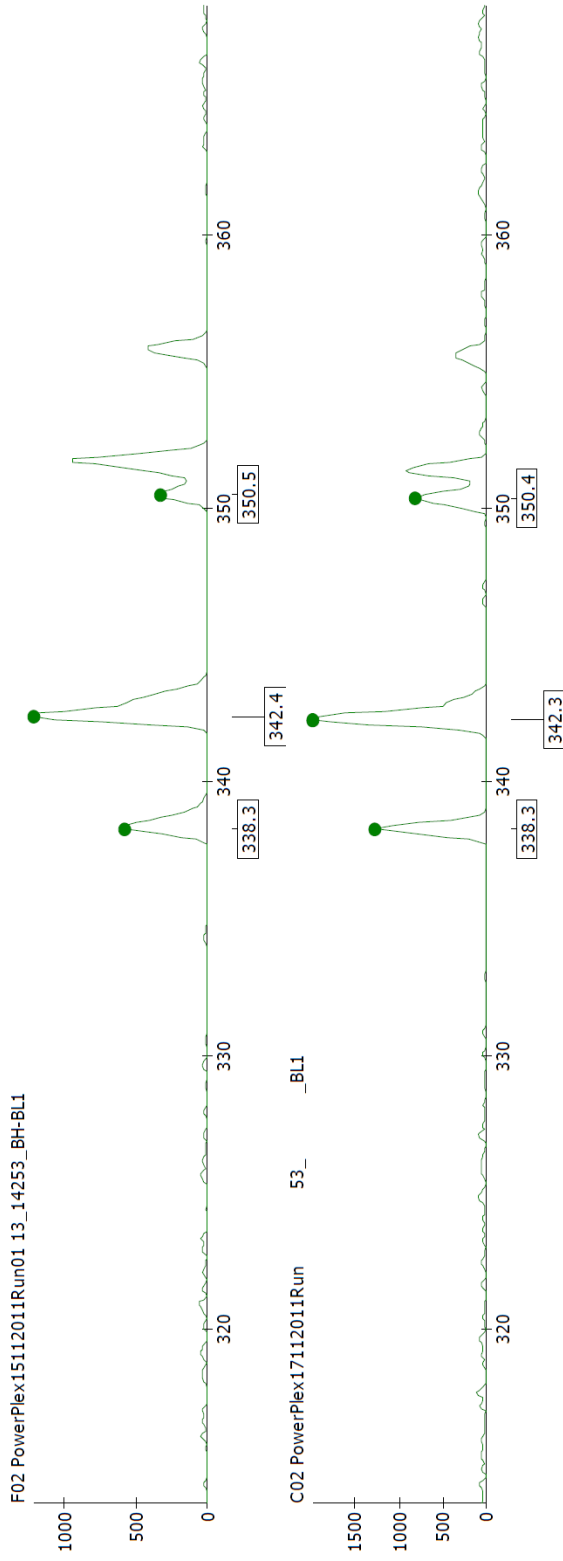


Marker D13S317 i D7S820

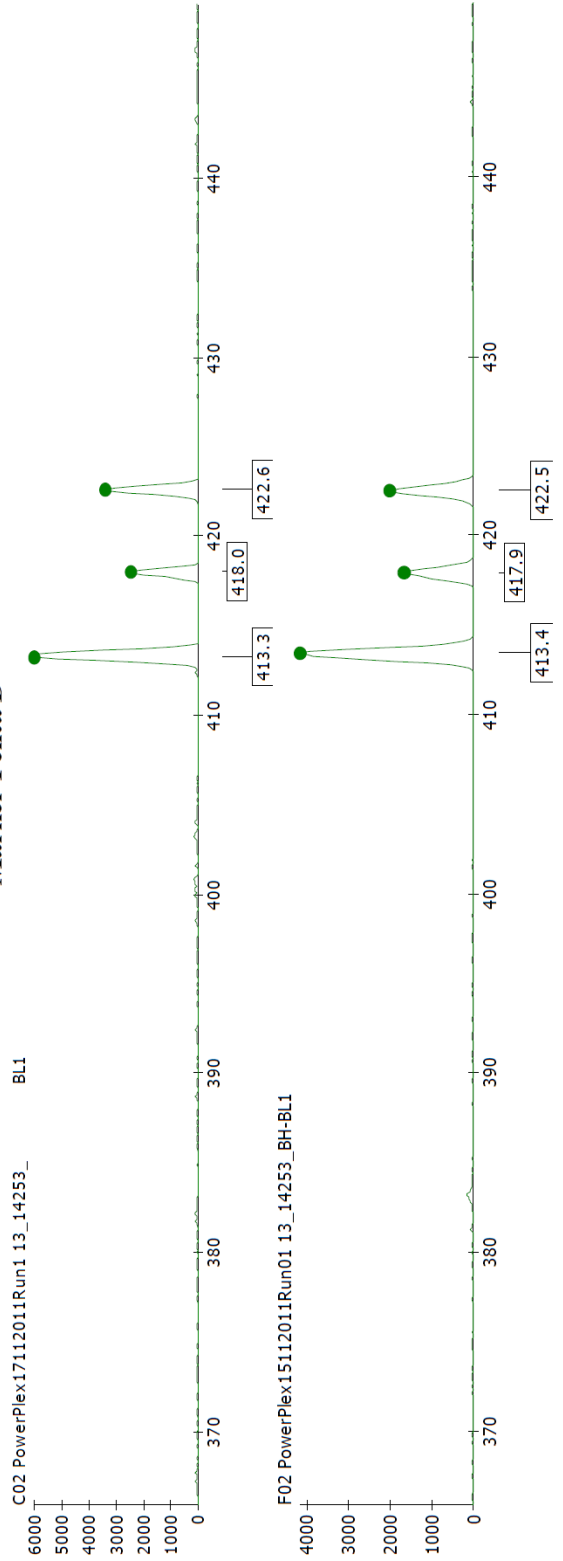




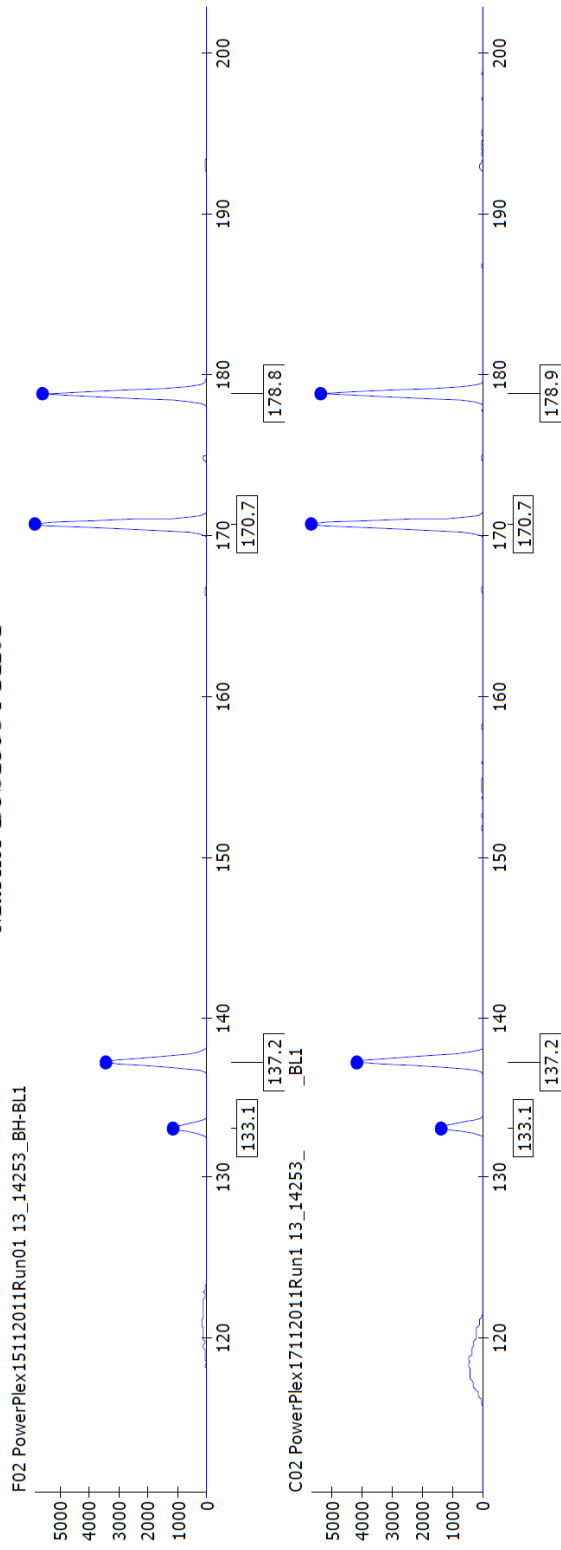
Marker CSFIPO



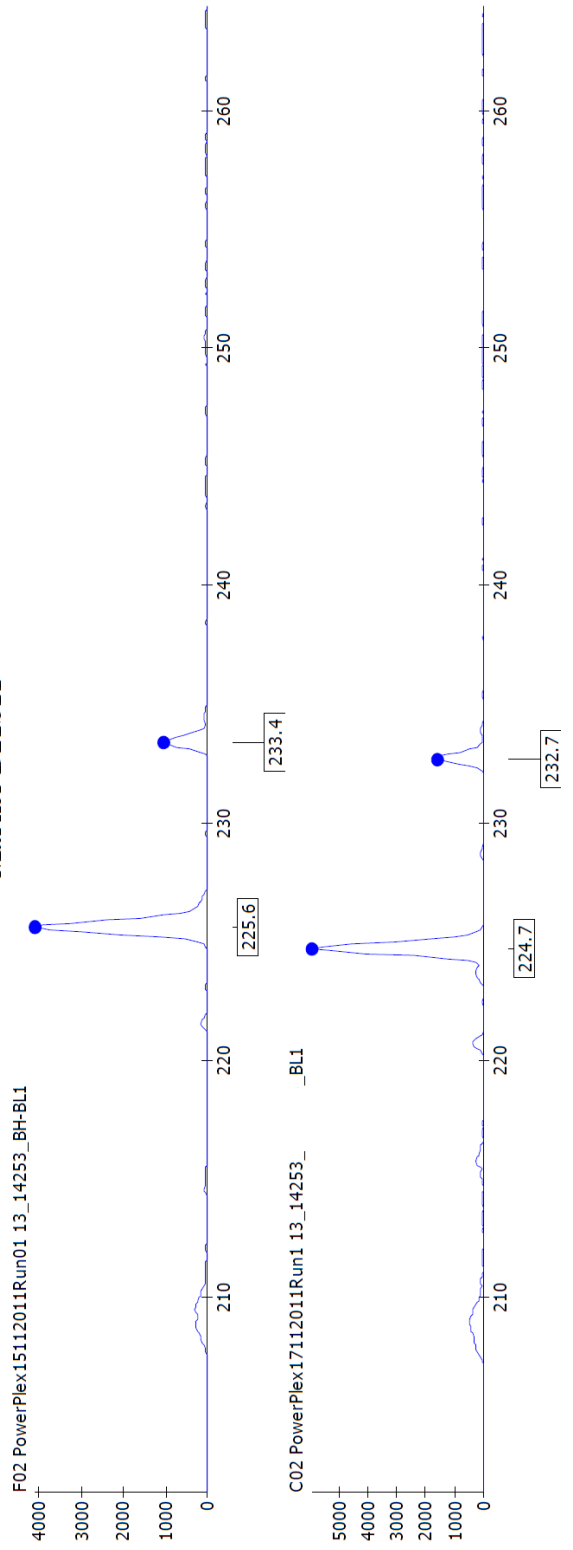
Marker Penta D

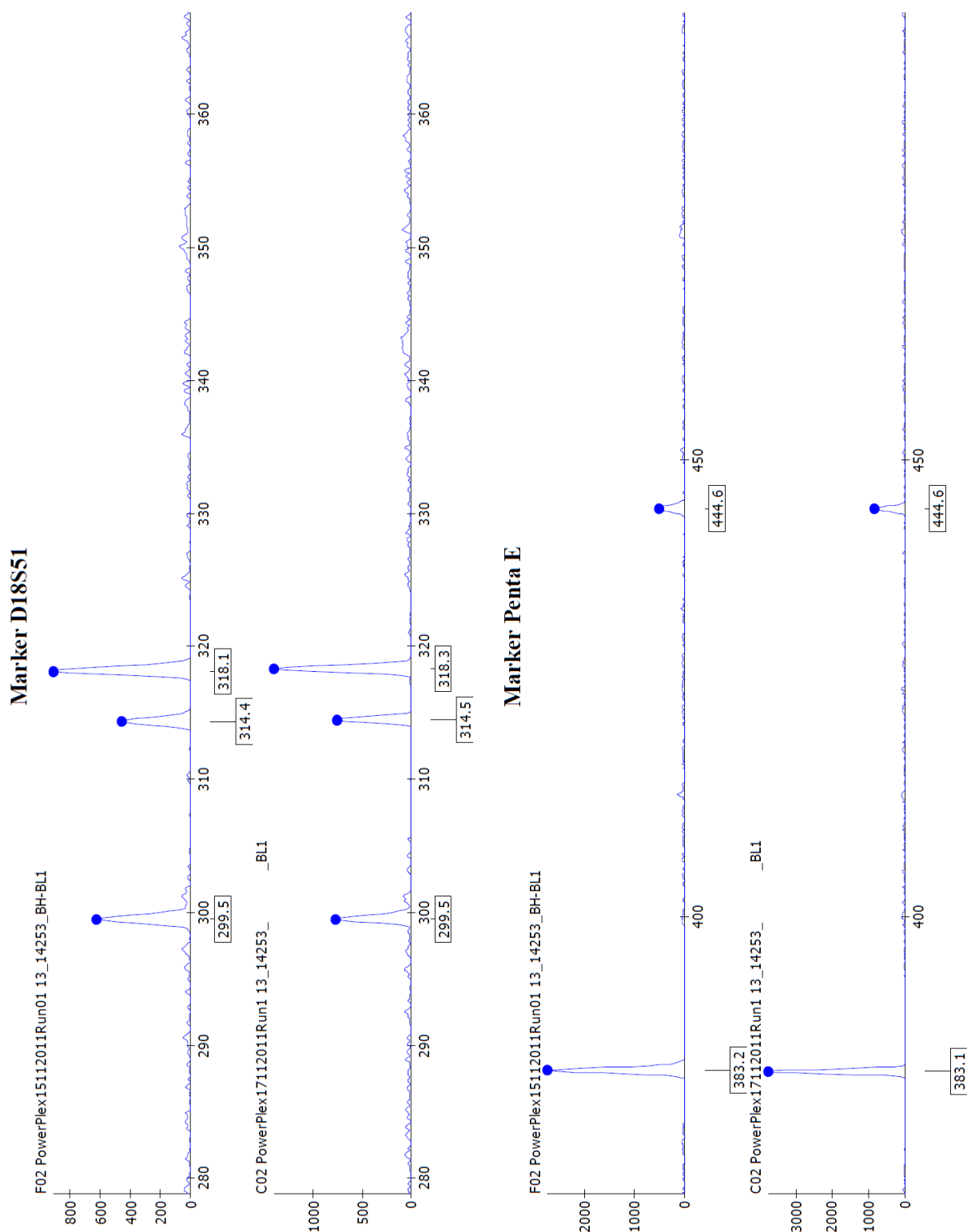


Marker D3S1358 i TH01



Marker D21S11

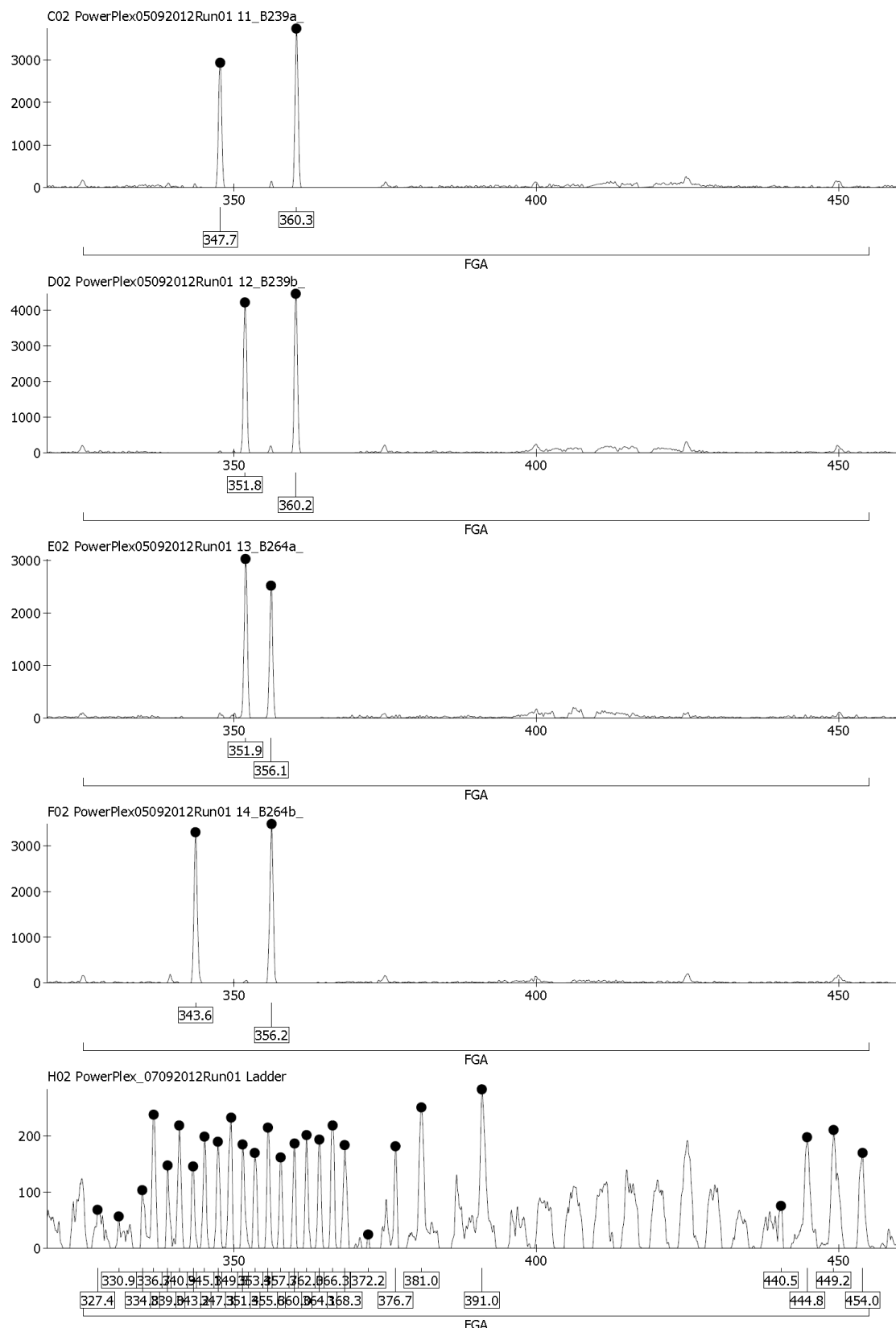




Ryc. 13. Sprawdzenie powtarzalności ilościowej i jakościowej analizy sekwencji mikrosatelitarnych z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*.

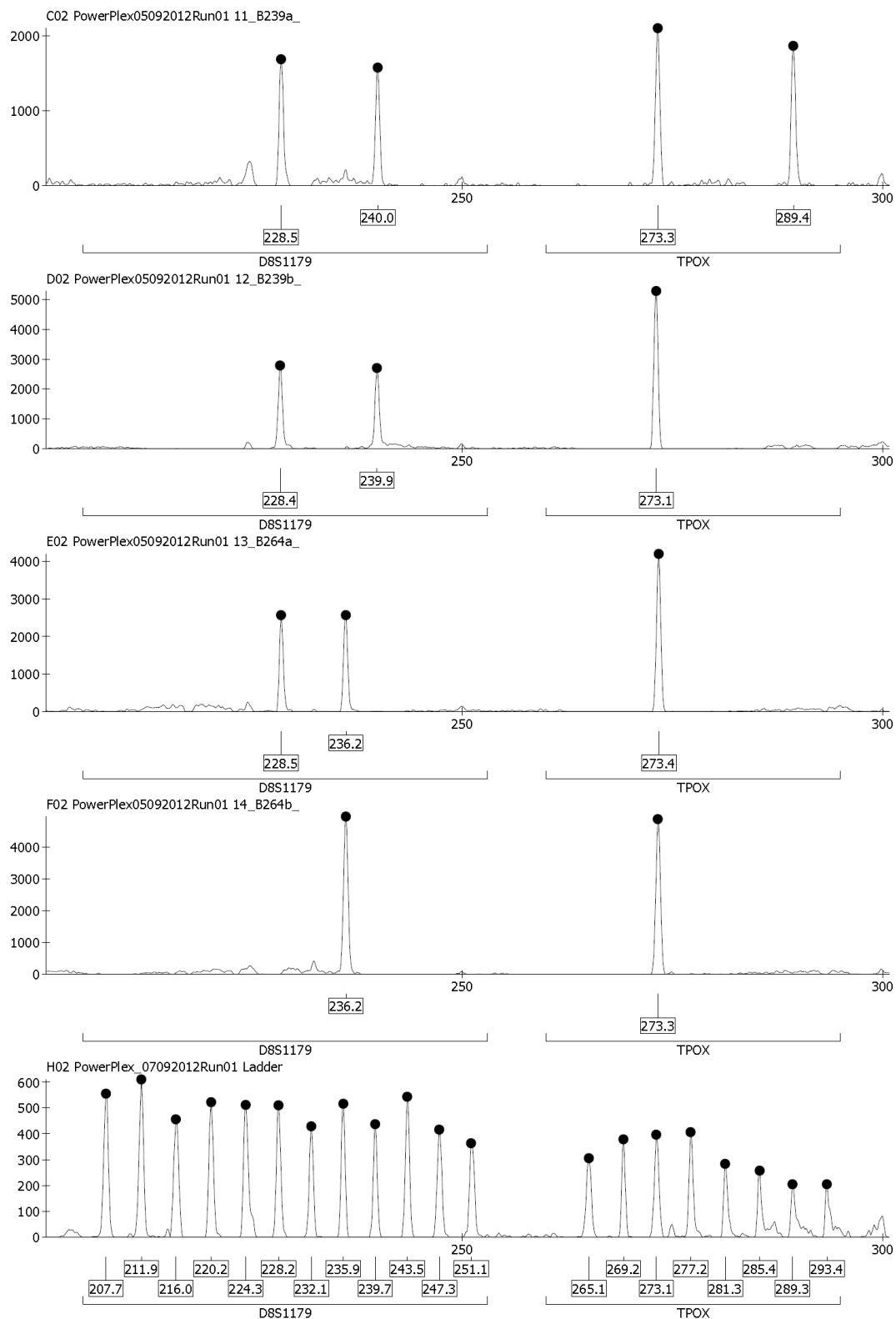
Wykonano reakcję multipleks PCR dwukrotnie dla tej samej próbki DNA i zaobserwowano wysoką powtarzalność wyniku uzyskanego na sekwenatorze kapilarnym *MegaBACE*. Ponadto zaobserwowano brak różnic w wysokości wierzchołków odpowiadających poszczególnym allelom.

Po wdrożeniu do badań zygotywności zestawu *PowerPlex 16* możliwe było wykonanie analiz dla 15 par bliźniąt. Zaobserwowano, że dla obniżenia kosztów analizy zalecić można wstępne sprawdzenie produktów PCR w żelu agarozowym w aspekcie wielkości i jakości. Ocena wykonania powtórzeń analizy uwzględniającej zarówno powtórzenie rozdziału jak i powtórzenie amplifikacji daje wysoce powtarzalne wyniki, co umożliwiło dalsze badania nad genotypowaniem bliźniąt i przypadkami występowania chimeryzmu krwi u bliźniąt. Przykładowe wyniki genotypowania bliźniąt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16* dla bliźniąt dwuzygotycznych i jednozygotycznych przedstawiono na rycinach 14a-i oraz 15a-i.



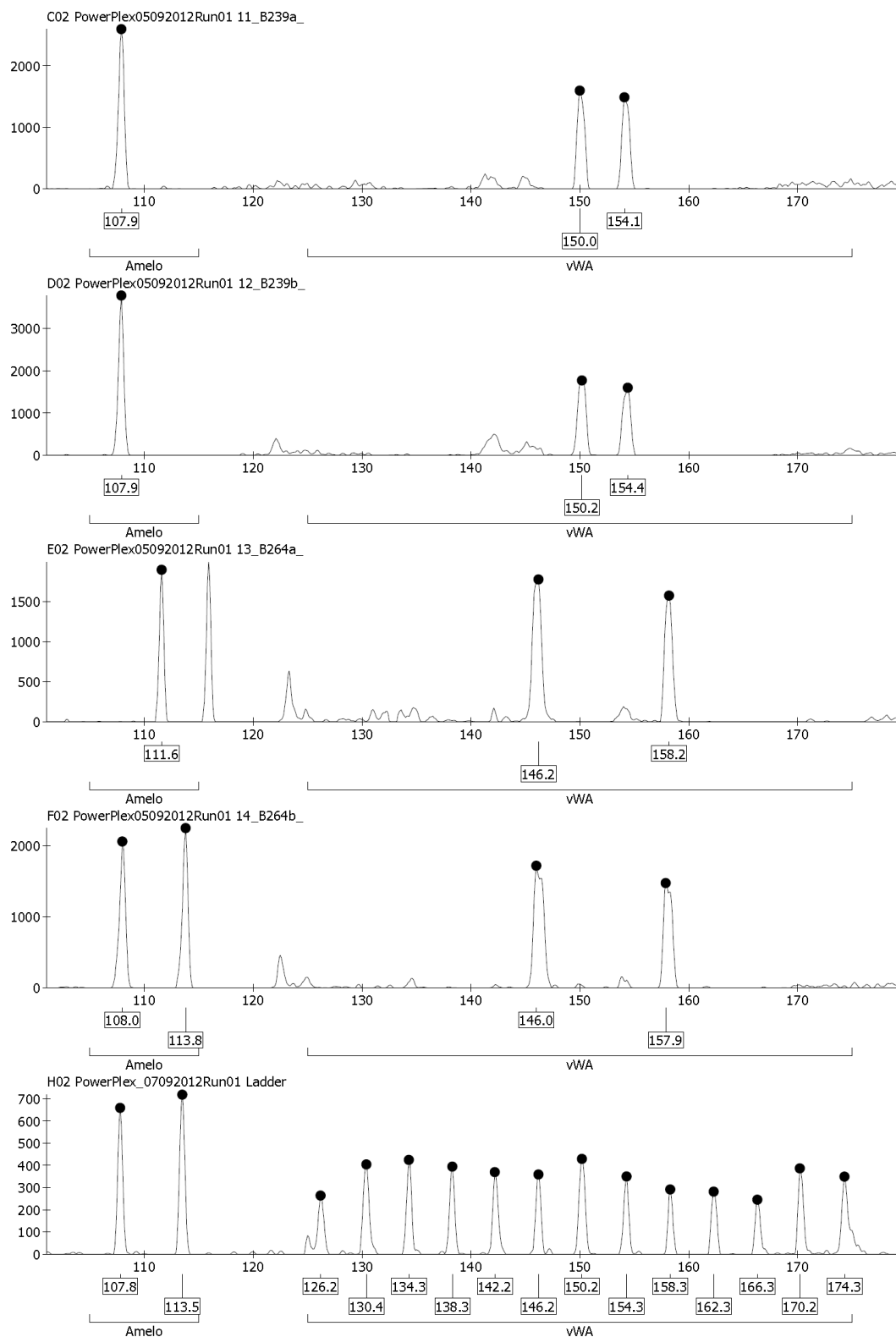
Ryc. 14a. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźniąt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*. Bliźnięta dwuzygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziału na sekwenatorze kapilarnym polimorficznych fragmentów *locus FGA*, w którym występuje 28 alleli. U badanych par bliźniąt zidentyfikowano następujące allele: 239a allele 21 i 24, 239b allele 22 i 24. Dla pary bliźniąt 264a i 264b, odpowiednio występują allele 22 i 23 oraz 20 i 23.



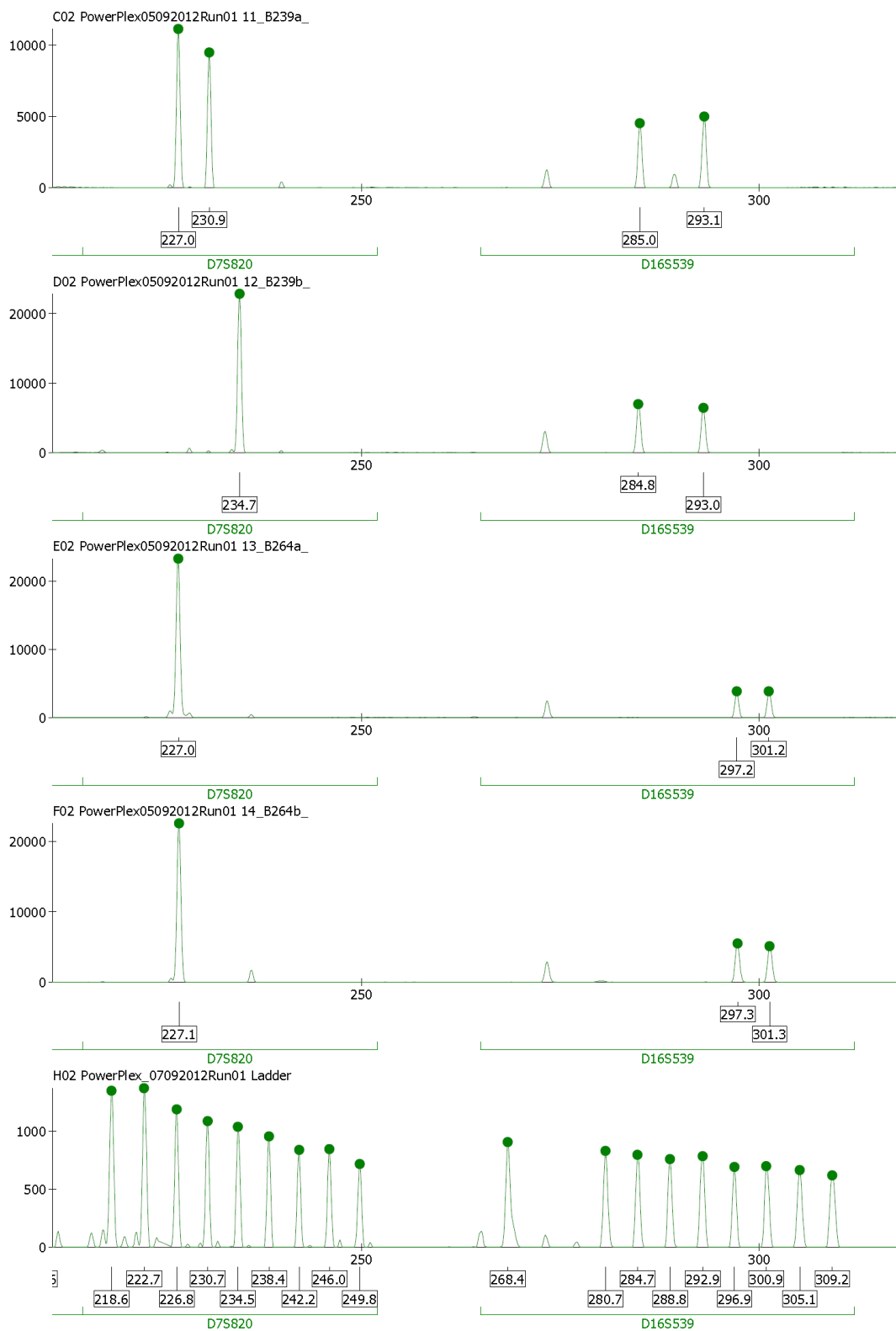
Ryc. 14b. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźnięt z zastosowaniem zestawu PowerPlex 16. Bliźnięta dwuzygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziału na sekwenatorze kapilarnym polimorficznych fragmentów *locus D8S1179*, w którym występuje 12 alleli i *locus TPOX*, w którym występuje 8 alleli. U badanych par bliźnięt w *locus D8S1179* zidentyfikowano dla pary 239a i 239b allele 12 i 15, dla pary bliźnięt 264a i 264b, odpowiednio występują allele 12 i 14 oraz 14-14. Dla *locus TPOX* dla bliźnięt 239a i 239b wskazano allele 8 i 12 oraz 12-12, a bliźnięta 264a i 264b są homozygotami dla allelu 8 (8-8).



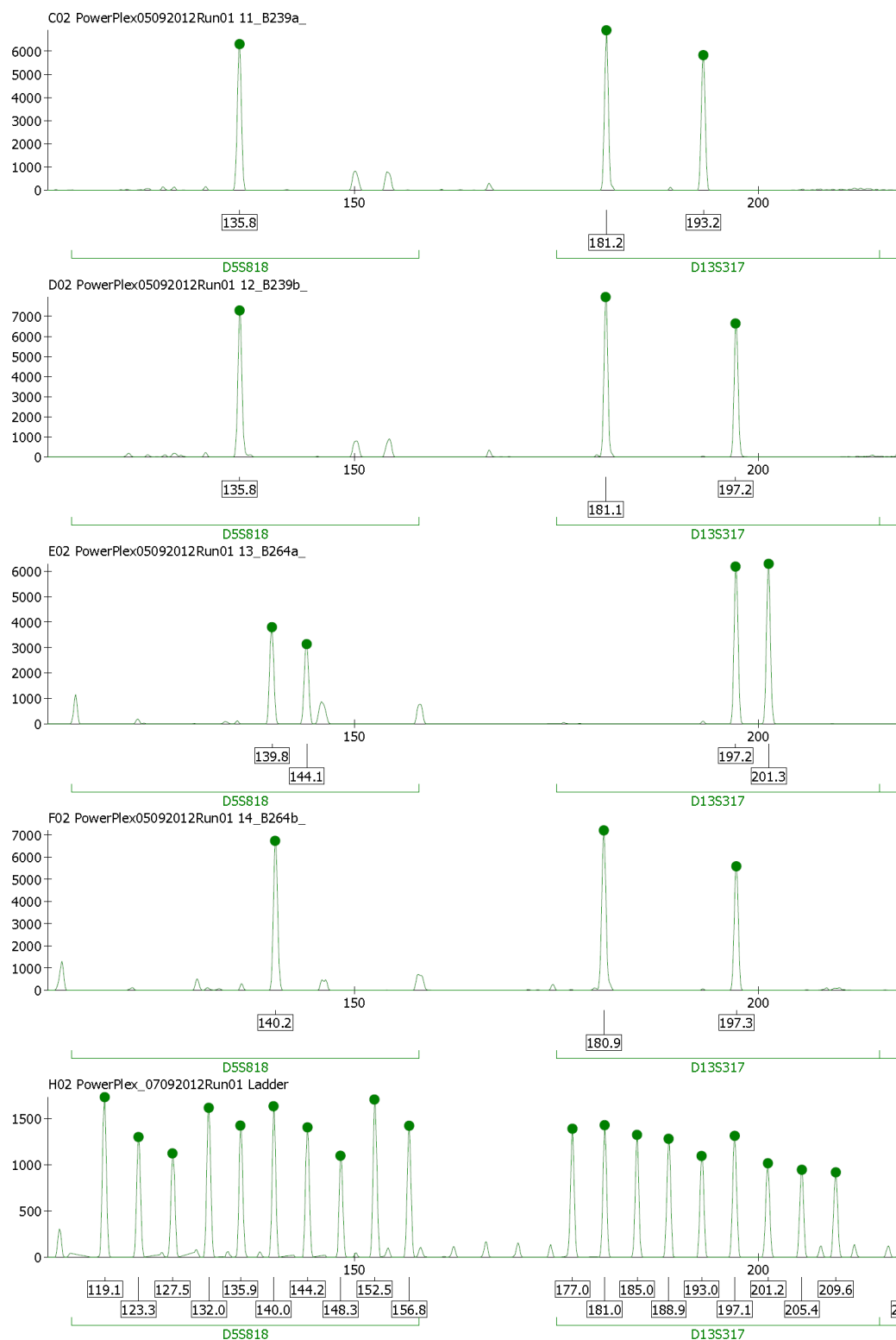
Ryc. 14c. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźnięt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*. Bliźnięta dwuzygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziału na sekwenatorze kapilarnym genu amelogeniny i polimorficznych fragmentów *locus vWA*, w którym występuje 13 alleli. Wykazano, że bliźnięta 239a i 239b są płci żeńskiej, a bliźnięta 264a i 264b są płci męskiej. Dla *locus vWA* dla bliźnięt 239a i 239b zidentyfikowano allele 16 i 17, a bliźnięta 264a i 264b są heterozygotami dla alleli 15 i 18.



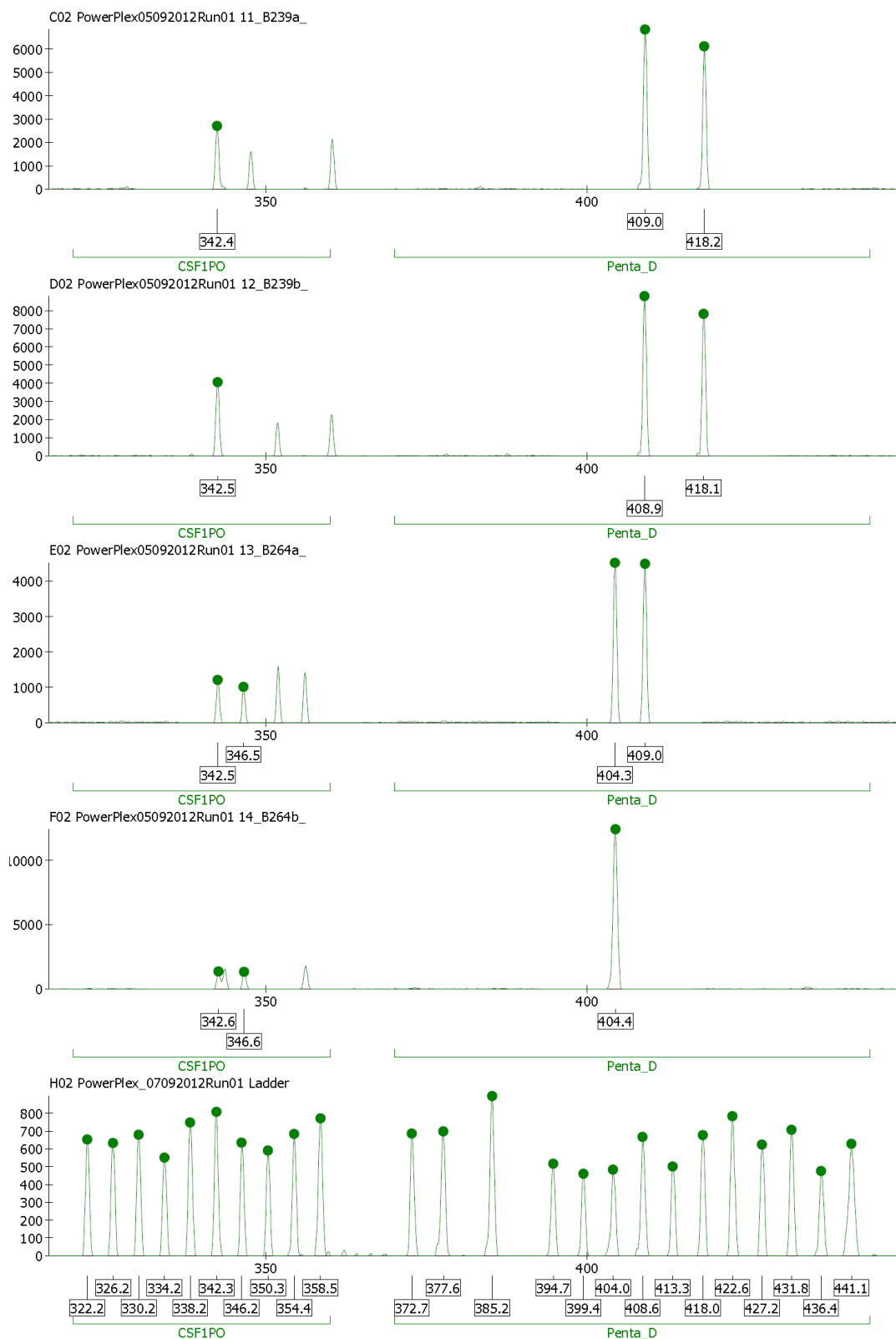
Ryc. 14d. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźniąt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*. Bliźnięta dwuzygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziału na sekwenatorze kapilarnym polimorficznych fragmentów *locus D7S820* oraz *locus D16S539*, w których występuje po 9 alleli. Wykazano, że dla *locus D7S820* bliźniak 239a posiada allele 8 i 9, a bliźniak 239b jest homozygotą dla allele 10 (10-10), w przypadku pary 264a i 264b, bliźnięta są homozygotami dla allele 8 (8-8). W *locus D16S539* dla bliźniąt 239a i 239b zidentyfikowano allele 9 i 11, a bliźnięta 264a i 264b są heterozygotami dla alleli 12 i 13.



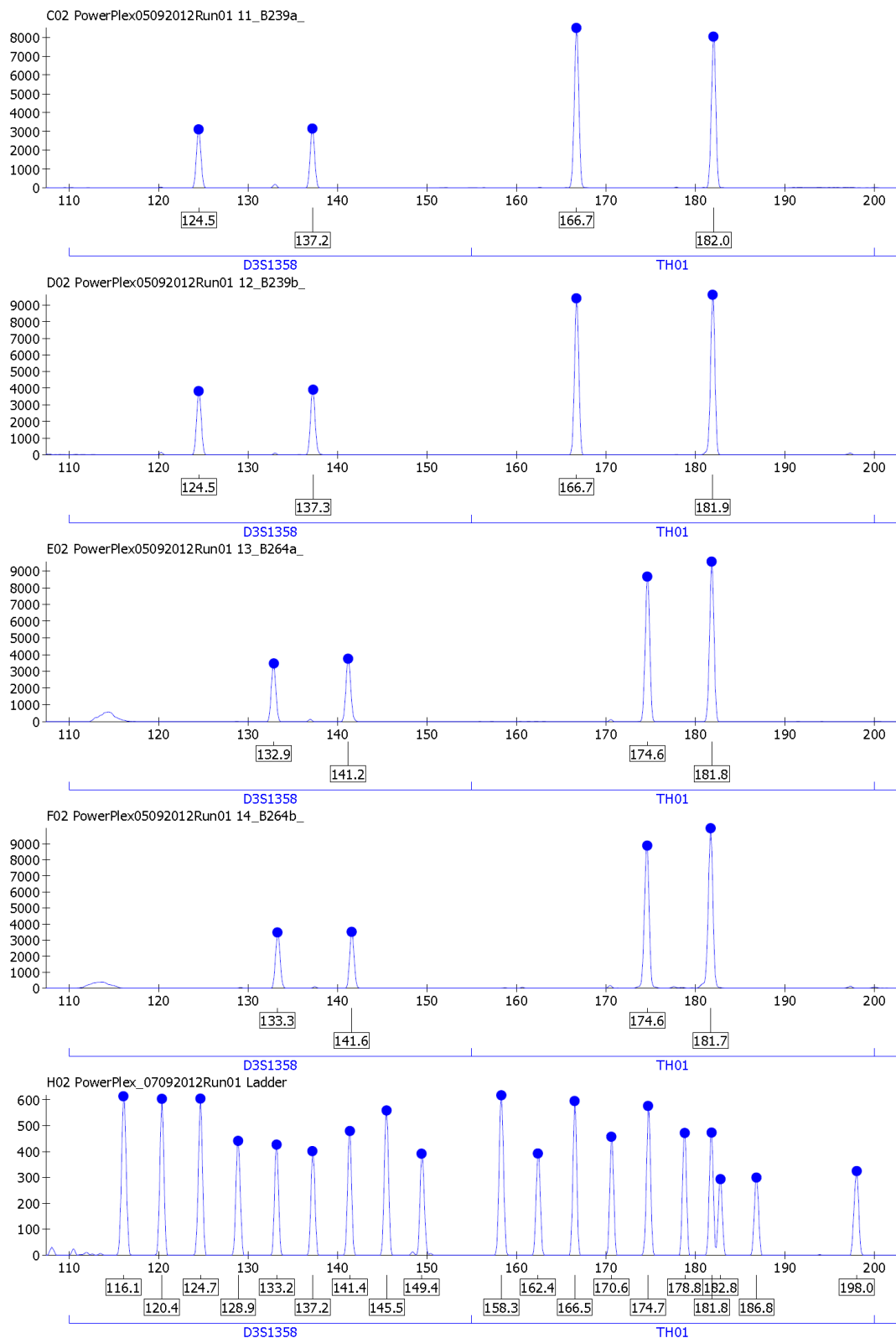
Ryc. 14e. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźnięt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*. Bliźnięta dwuzygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziału na sekwenatorze kapilarnym polimorficznych fragmentów *locus D5S818* (10 alleli) oraz *locus D13S317* (9 alleli). Wykazano, że dla *locus D5S818* bliźnięta 239a i 239b są homozygotami dla allelu 11 (11-11), w przypadku pary 264a i 264b, bliźniak 264a jest heterozygotą dla alleli 12 i 13, a bliźniak 264b jest homozygotą dla allelu 12 (12-12). W *locus D13S317*, bliźnięta 239a i 239b mają odpowiednie allele 8 i 11 oraz 8 i 12, a w przypadku pary 264a i 264b, bliźnięta są heterozygotami odpowiednio dla alleli 12 i 13 oraz 8 i 12.



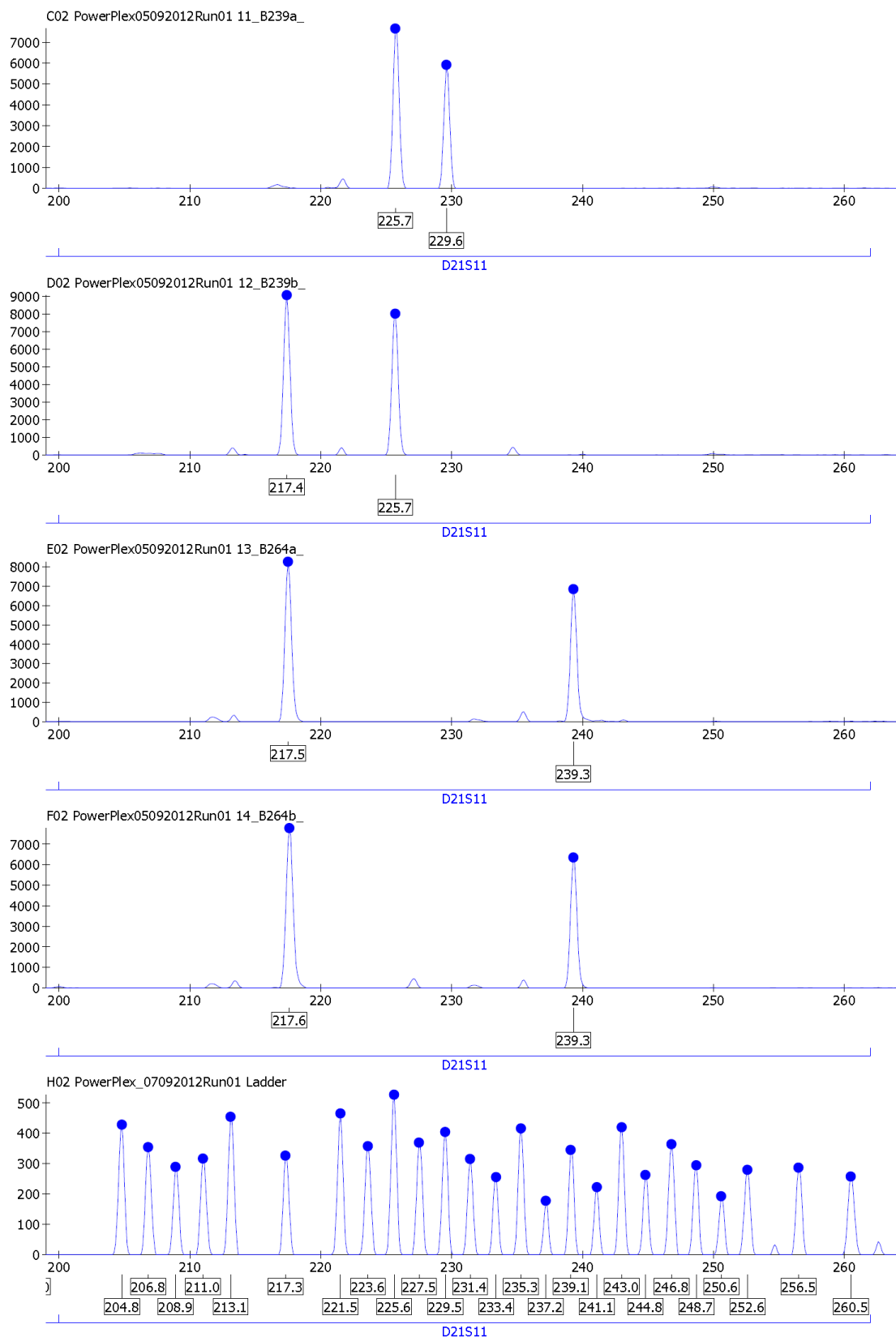
Ryc. 14f. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźniąt z zastosowaniem zestawu PowerPlex 16. Bliźnięta dwuzygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziału na sekwenatorze kapilarnym polimorficznych fragmentów *locus CSF1PO* (10 alleli) oraz *locus Penta D* (14 alleli). Wykazano, że dla *locus CSF1PO* bliźnięta 239a i 239b są homozygotami dla allelu 11 (11-11), w przypadku pary 264a i 264b, bliźnięta są heterozygotami dla alleli 11 i 12. W *locus Penta D*, bliźnięta 239a i 239b są heterozygotami dla alleli 10 i 12, a w przypadku pary 264a i 264b, bliźniak 264a jest heterozygotą dla alleli 9 i 10, a bliźniak 264b jest homozygotą dla allelu 9 (9-9).



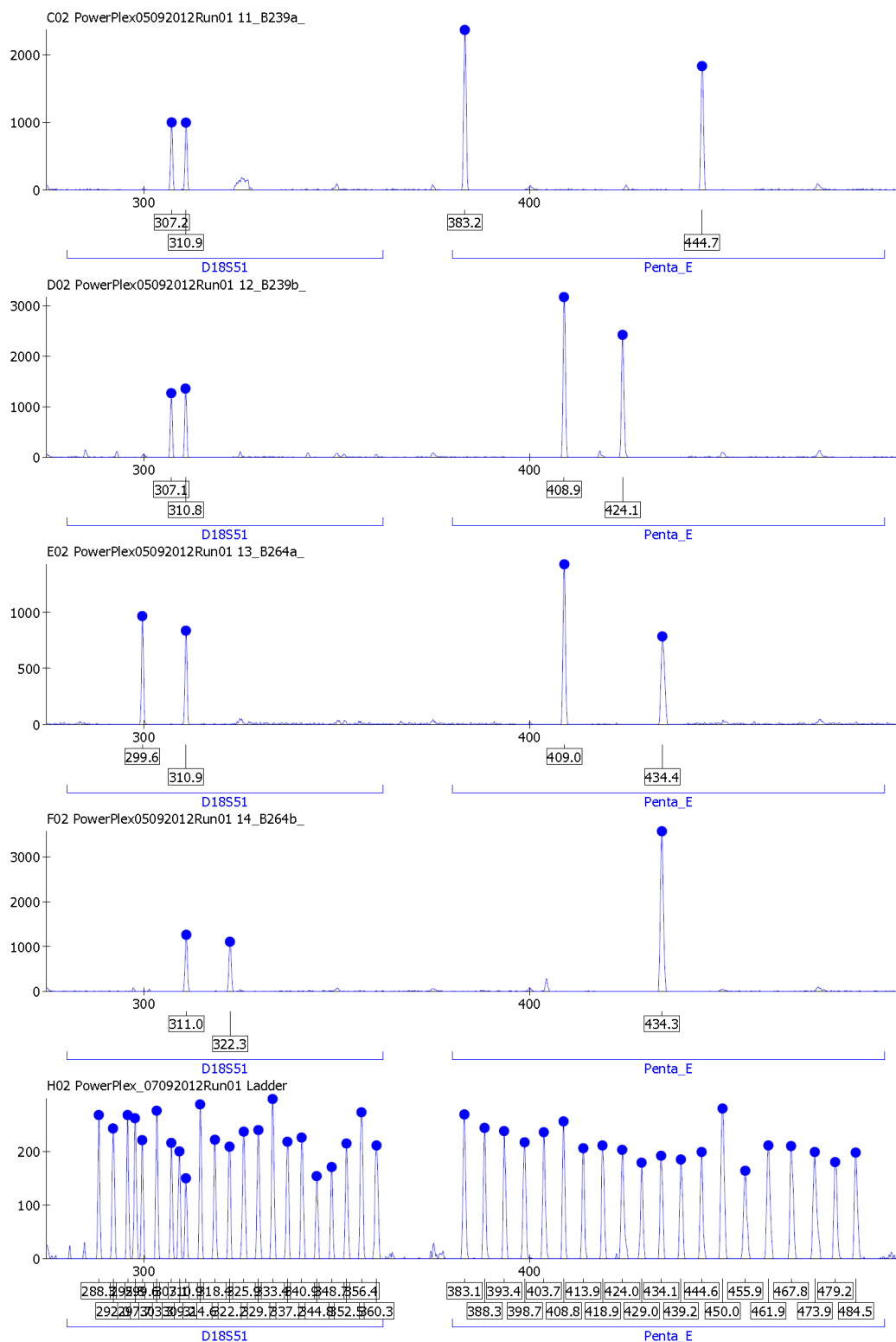
Ryc. 14g. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźnięt z zastosowaniem zestawu PowerPlex 16. Bliźnięta dwuzygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziału na sekwenatorze kapilarnym polimorficznych fragmentów *locus D3S1358* (9 alleli) oraz *locus TH01* (10 alleli). Wykazano, że dla *locus D3S1358* bliźnięta 239a i 239b są heterozygotami dla alleli 14 i 17, w przypadku pary 264a i 264b, bliźnięta są heterozygotami dla alleli 16 i 18. W *locus TH01*, bliźnięta 239a i 239b są heterozygotami dla alleli 6 i 9.3, a w przypadku pary 264a i 264b, bliźnięta są heterozygotami dla alleli 8 i 9.3.



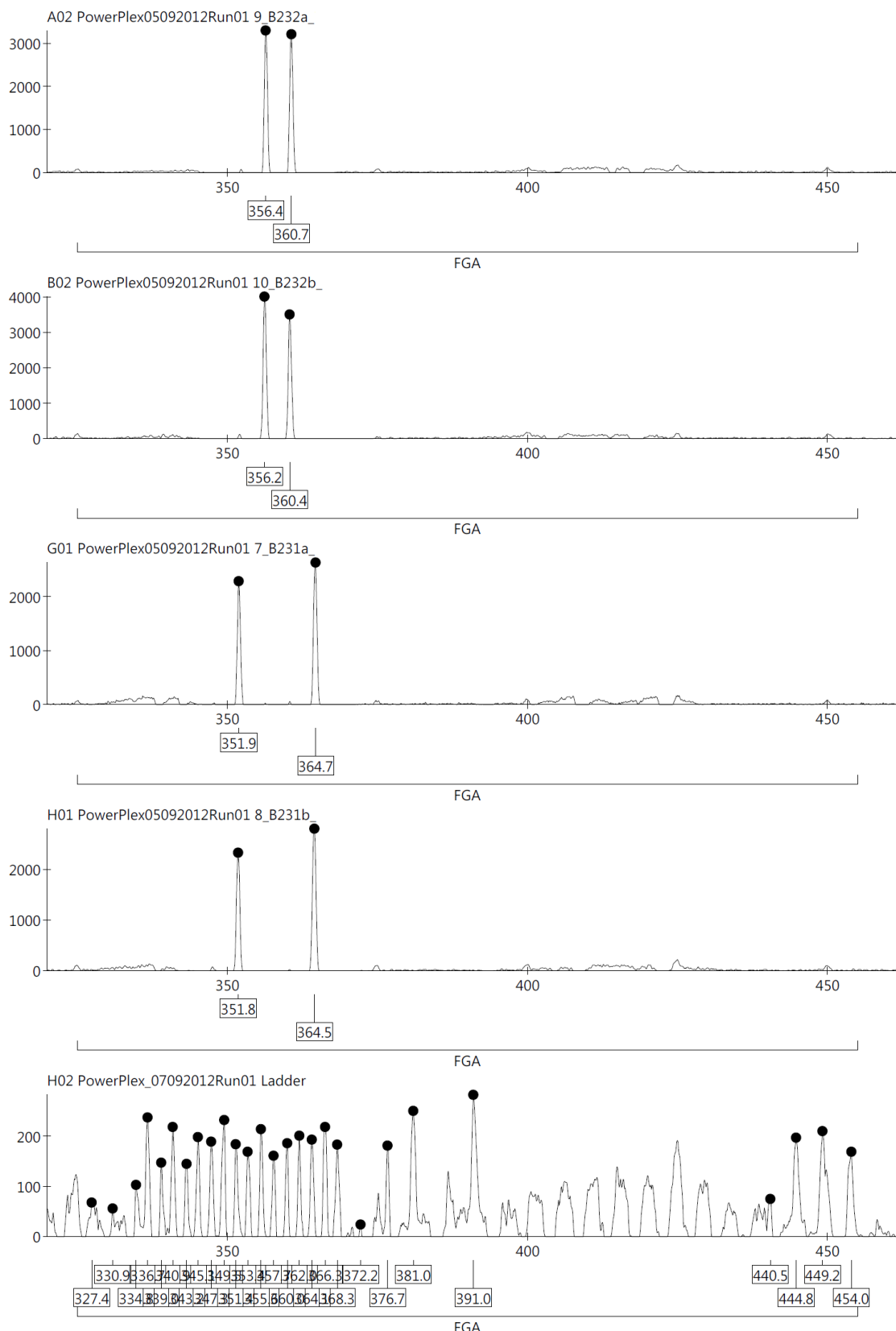
Ryc. 14h. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźnięt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*. Bliźnięta dwuzygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziału na sekwenatorze kapilarnym polimorficznych fragmentów *locus D21S11* (25 alleli). Wykazano, że dla *locus D21S11* bliźnięta 239a i 239b są heterozygotami odpowiednio dla alleli 29 i 30 oraz 27 i 29, a w przypadku pary 264a i 264b, bliźnięta są heterozygotami dla alleli 27 i 32.2.



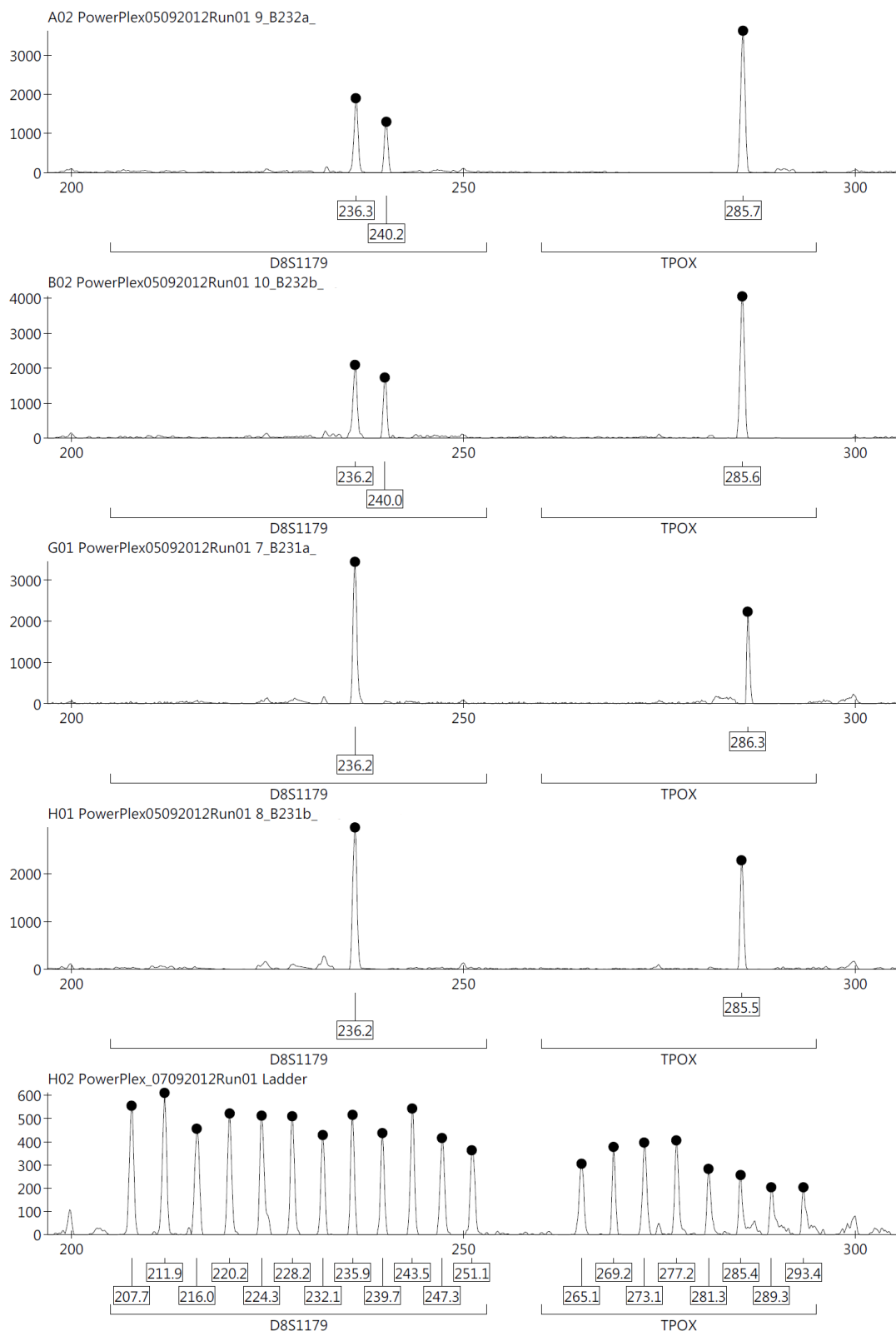
Ryc. 14i. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźniąt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*. Bliźnięta dwuzygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziału na sekwenatorze kapilarnym polimorficznych fragmentów *locus D21S11* (22 allele) oraz *locus Penta E* (20 allele). Wykazano, że dla *locus D21S11* bliźnięta 239a i 239b są heterozygotami dla alleli 13 i 14, a w przypadku pary 264a i 264b, bliźnięta są heterozygotami odpowiednio dla alleli 11 i 14 oraz 14 i 17. W *locus Penta E*, bliźnięta 239a i 239b są heterozygotami odpowiednio dla alleli 5 i 17 oraz 10 i 12, a w przypadku pary 264a i 264b, bliźniak 264a jest heterozygotą dla alleli 10 i 15, a bliźniak 264b jest homozygotą dla allelu 15 (15-15).



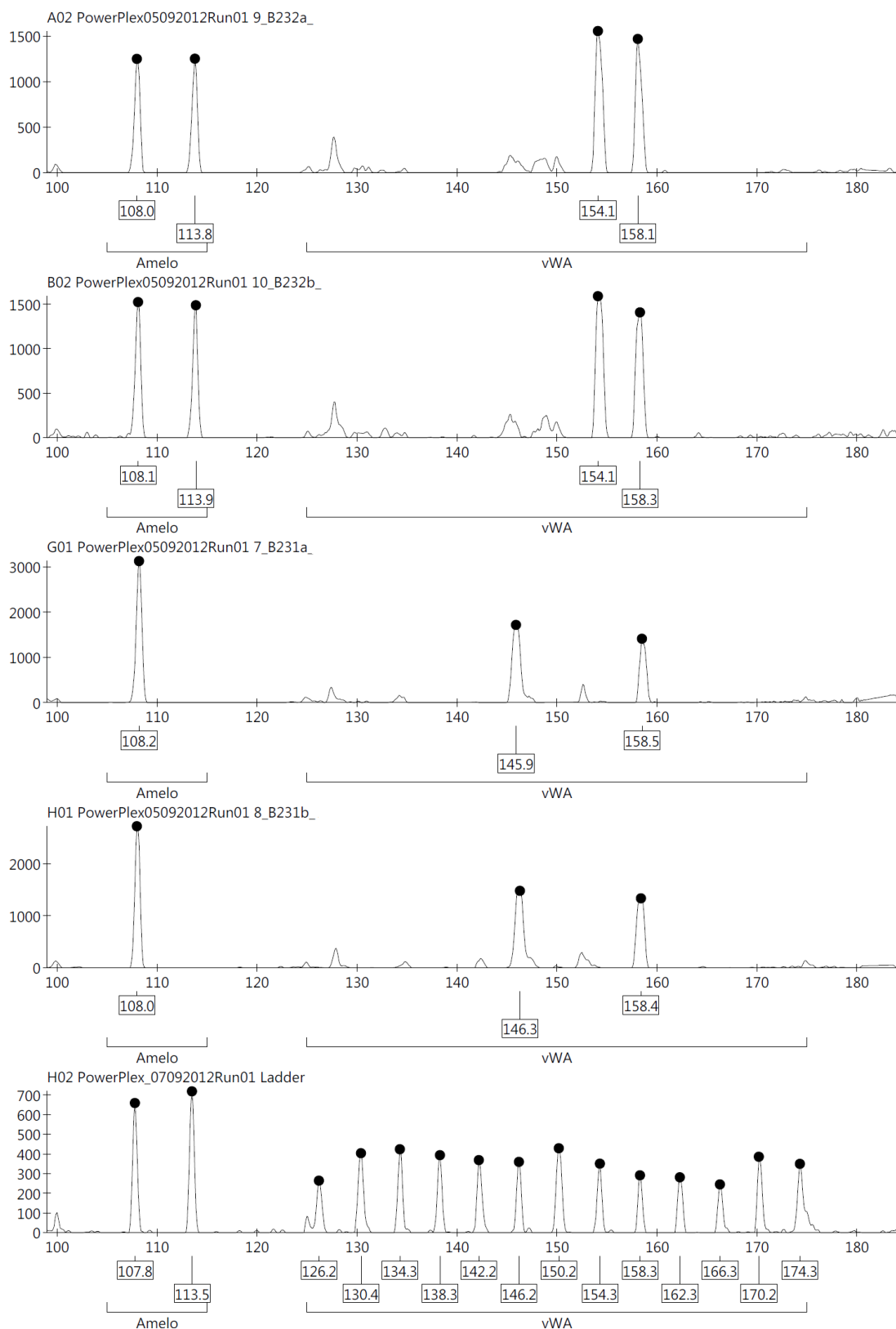
Ryc. 15a. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźnięt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*. Bliźnięta jednozygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziału na sekwenatorze kapilarnym polimorficznych fragmentów *locus FGA*, w którym występuje 28 alleli. U badanych par bliźnięt zidentyfikowano następujące allele: dla bliźnięt 231a i 231b allele 22 i 25. Dla pary bliźnięt 232a i 232b, występują allele 23 i 24. Badane bliźnięta są jednozygotyczne.



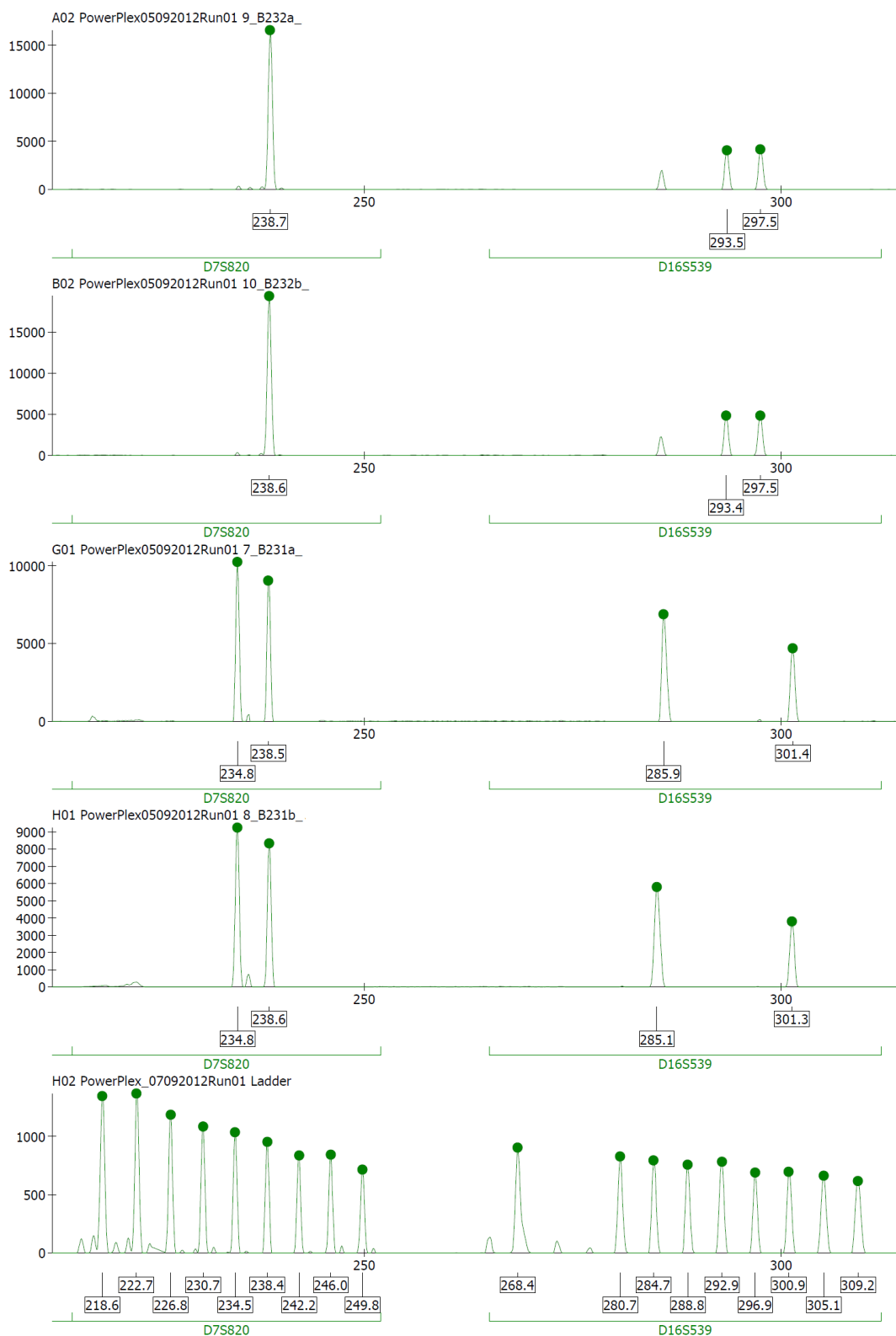
Ryc. 15b. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźnięt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*. Bliźnięta jednozygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziału na sekwenatorze kapilarnym polimorficznych fragmentów *locus D8S1179*, w którym występuje 12 alleli i *locus TPOX*, w którym występuje 8 alleli. U badanych par bliźnięt w *locus D8S1179* zidentyfikowano dla pary 231a i 231b allel 14 (14-14), dla pary bliźnięt 232a i 232b, występują allele 14 i 15. Dla *locus TPOX* obie pary bliźnięt 231a i 231b oraz 232a i 232b są homozygotami dla allelu 11 (11-11). Badane bliźnięta są jednozygotyczne.



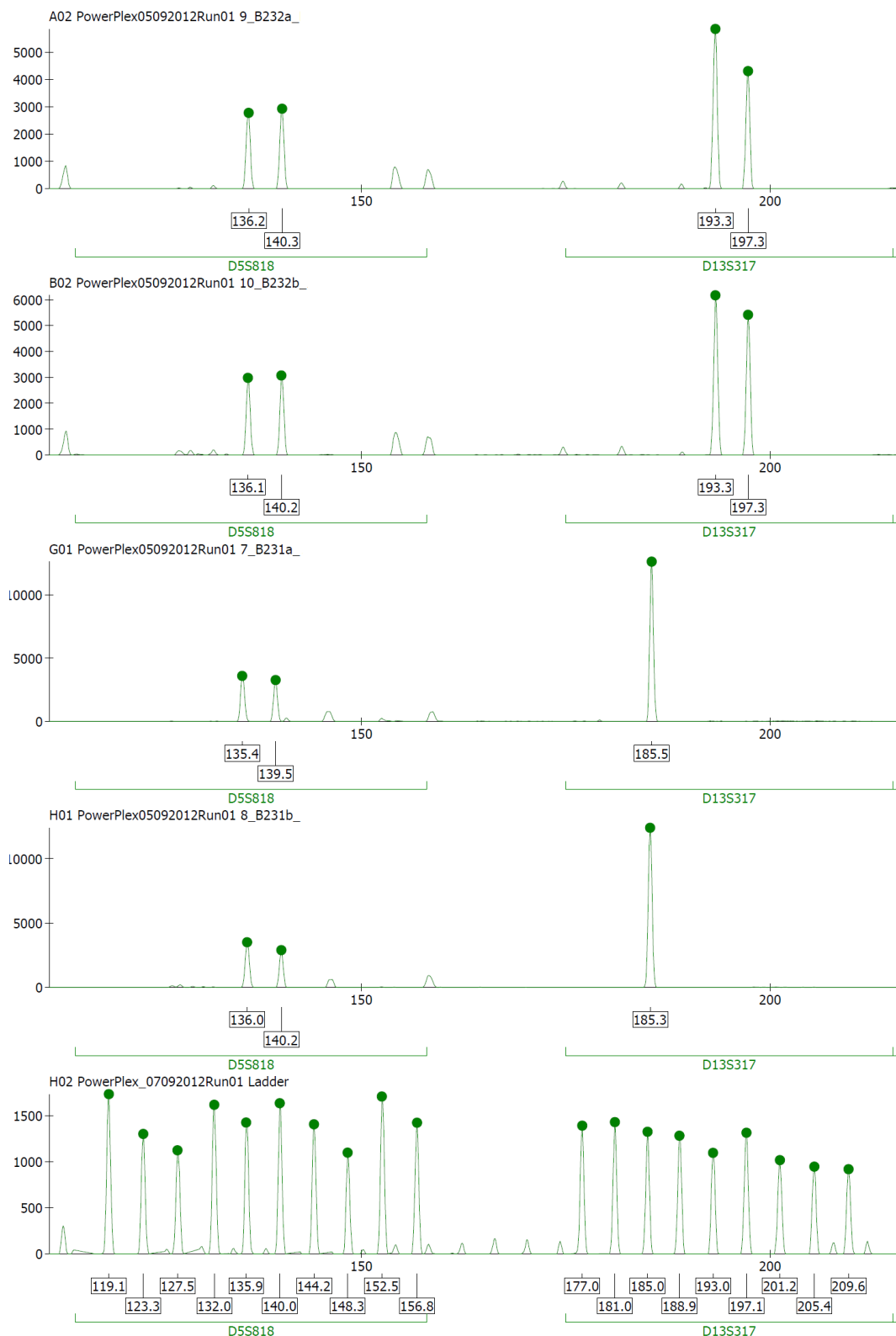
Ryc. 15c. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźnięt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*. Bliźnięta jednozygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziału na sekwenatorze kapilarnym genu amelogeniny i polimorficznych fragmentów *locus vWA*, w którym występuje 13 alleli. Wykazano, że bliźnięta 231a i 231b są płci żeńskiej, a bliźnięta 232a i 232b są płci męskiej. Dla *locus vWA* dla bliźnięt 231a i 231b zidentyfikowano allele 15 i 18, a bliźnięta 232a i 232b są heterozygotami dla alleli 17 i 18. Badane bliźnięta są jednozygotyczne.



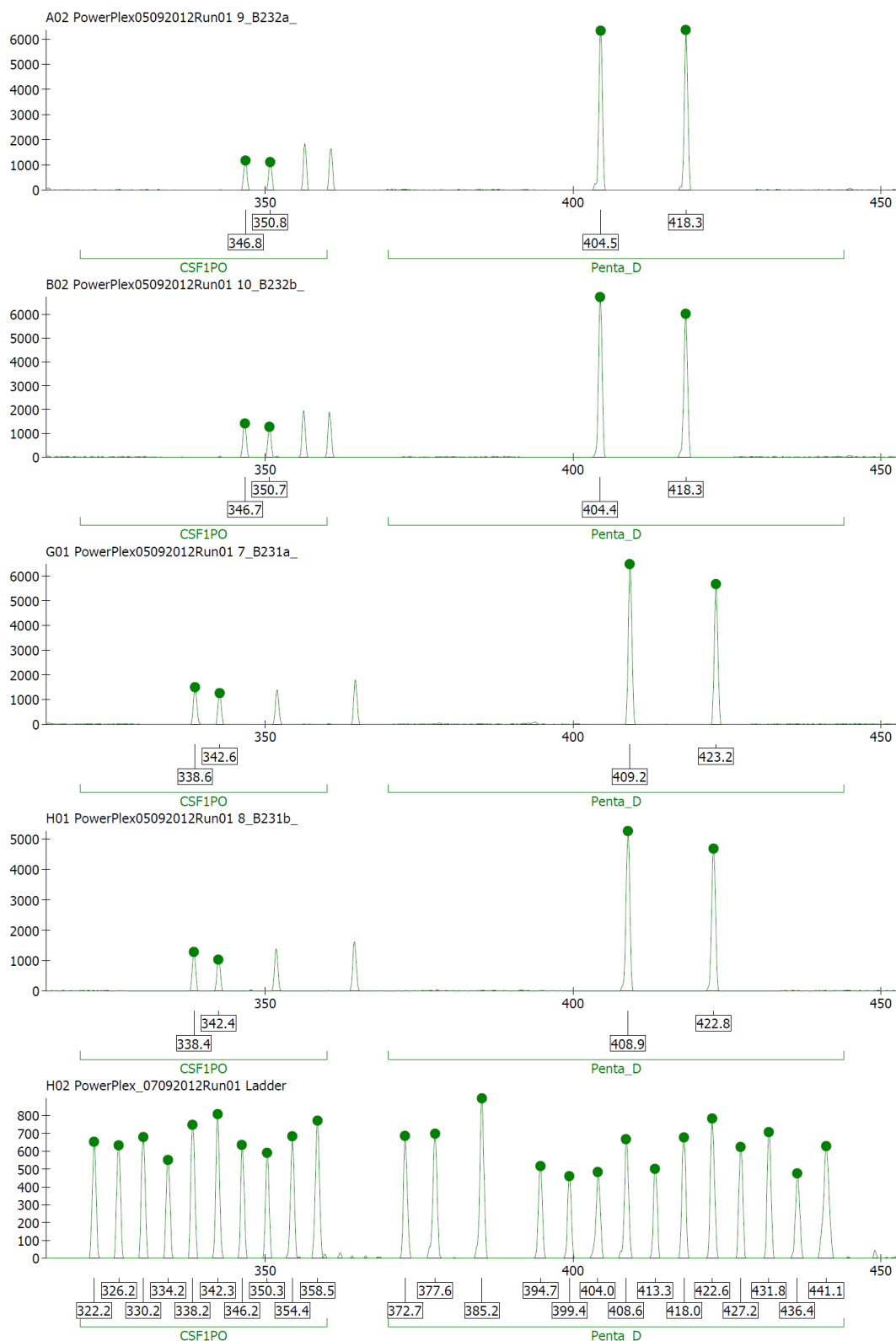
Ryc. 15d. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźnięt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*. Bliźnięta jednozygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziału na sekwenatorze kapilarnym polimorficznych fragmentów *locus D7S820* oraz *locus D16S539*, w których występuje po 9 alleli. Wykazano, że dla *locus D7S820* bliźnięta 231a i 231b posiadają allele 10 i 11, w przypadku pary 232a i 232b, bliźnięta są homozygotami dla allelu 11 (11-11). W *locus D16S539* dla bliźnięt 231a i 231b zidentyfikowano allele 9 i 13, a bliźnięta 232a i 232b są heterozygotami dla alleli 11 i 12. Badane bliźnięta są jednozygotyczne.



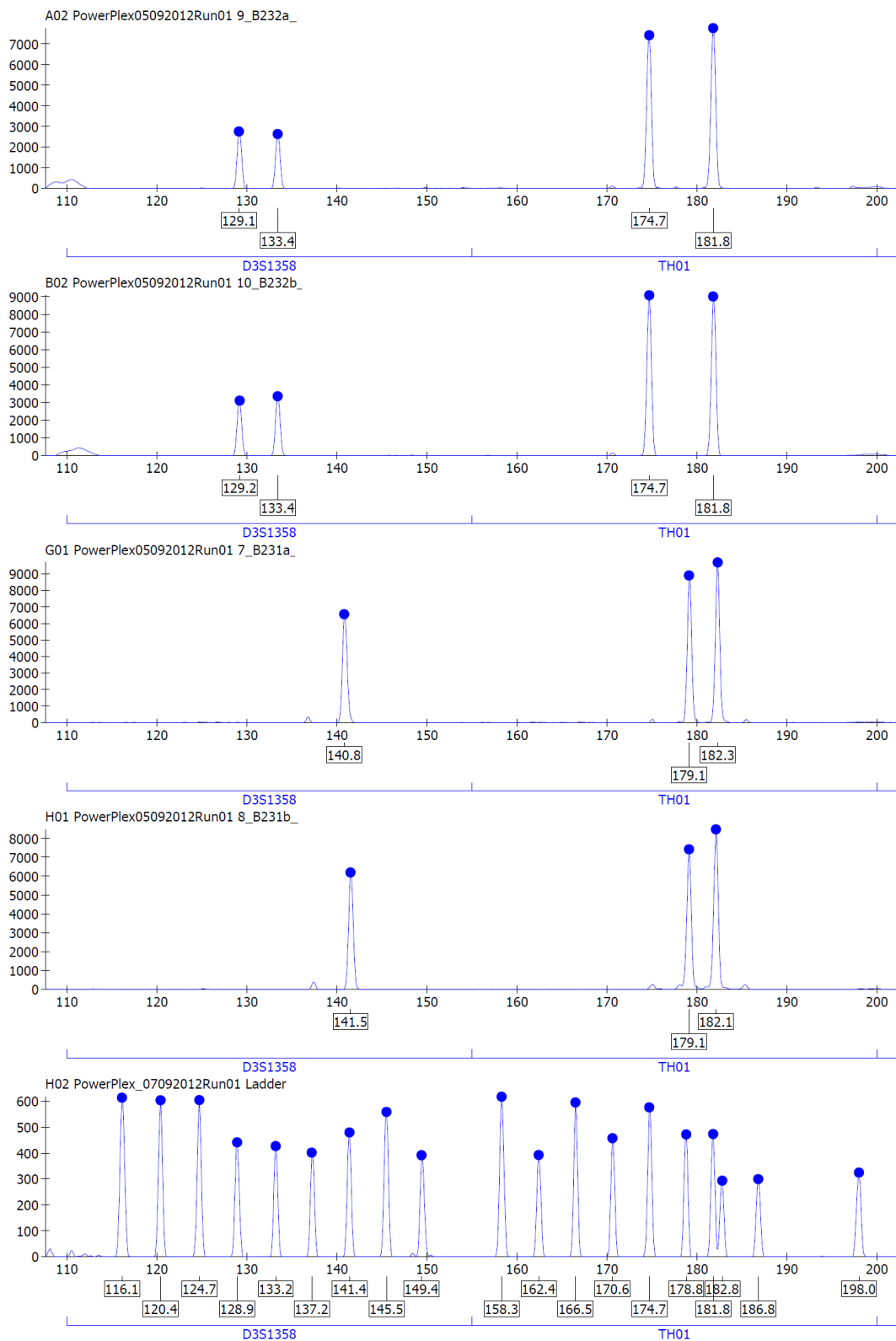
Ryc. 15e. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźnięt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*. Bliźnięta jednozygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziłu na sekwenatorze kapilarnym polimorficznych fragmentów *locus D5S818* (10 alleli) oraz *locus D13S317* (9 alleli). Wykazano, że dla *locus D5S818* bliźnięta 231a i 231b są heterozygotami dla alleli 11 i 12, w przypadku pary 232a i 232b, bliźnięta są również heterozygotami dla alleli 11 i 12. W *locus D13S317* bliźnięta 231a i 231b są homozygotami dla allelu 9 (9-9), a w przypadku pary 232a i 232b, bliźnięta są heterozygotami dla alleli 11 i 12. Badane bliźnięta są jednozygotyczne.



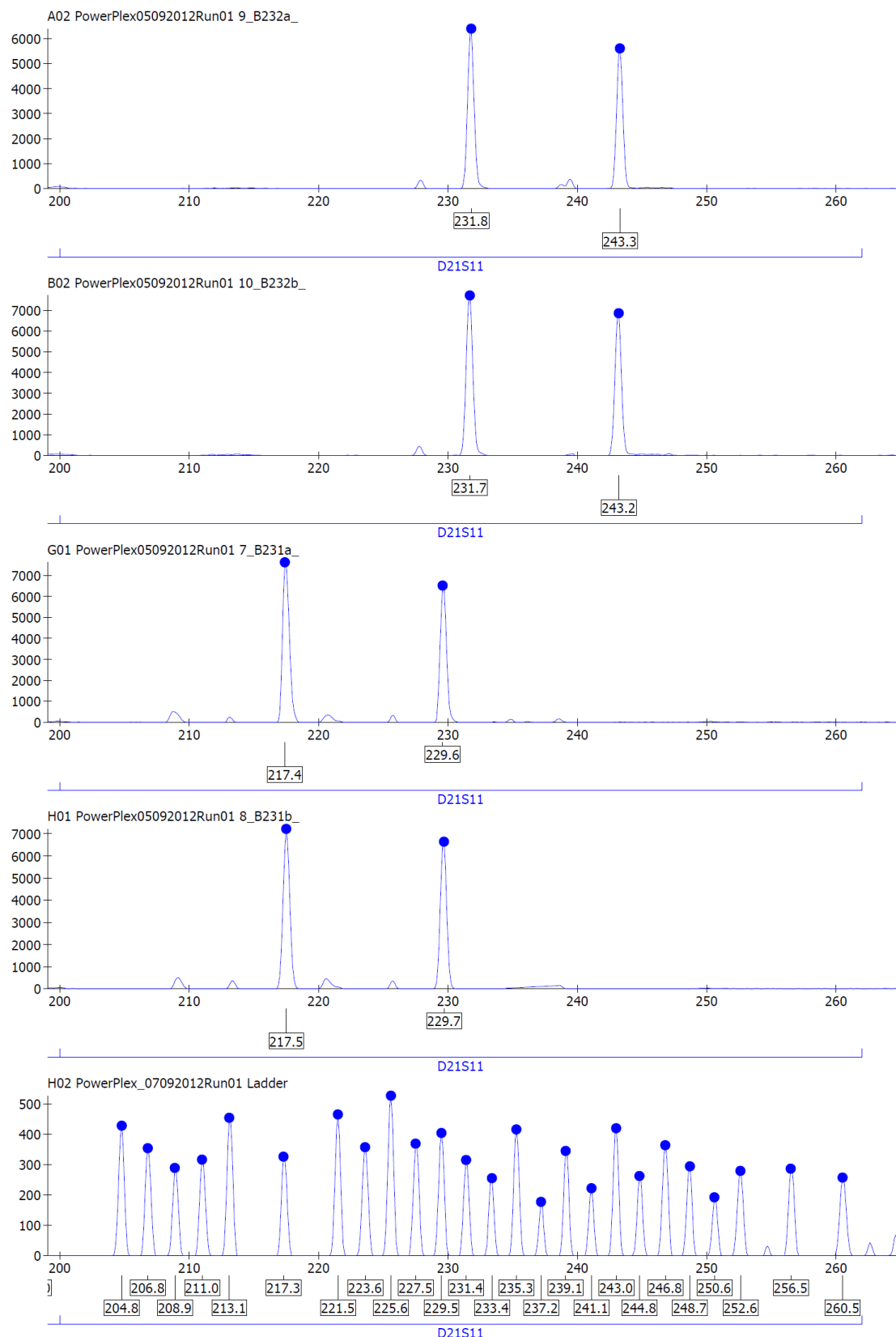
Ryc. 15f. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźnięt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*. Bliźnięta jednozygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziału na sekwenatorze kapilarnym polimorficznych fragmentów *locus CSF1PO* (10 alleli) oraz *locus Penta D* (14 alleli). Wykazano, że dla *locus CSF1PO* bliźnięta 231a i 231b są heterozygotami dla alleli 10 i 11, w przypadku pary 232a i 232b, bliźnięta są heterozygotami dla alleli 12 i 13. W *locus Penta D*, bliźnięta 231a i 231b oraz 232a i 232b są heterozygotami odpowiednio dla alleli 10 i 13 oraz 9 i 12. Badane bliźnięta są jednozygotyczne.



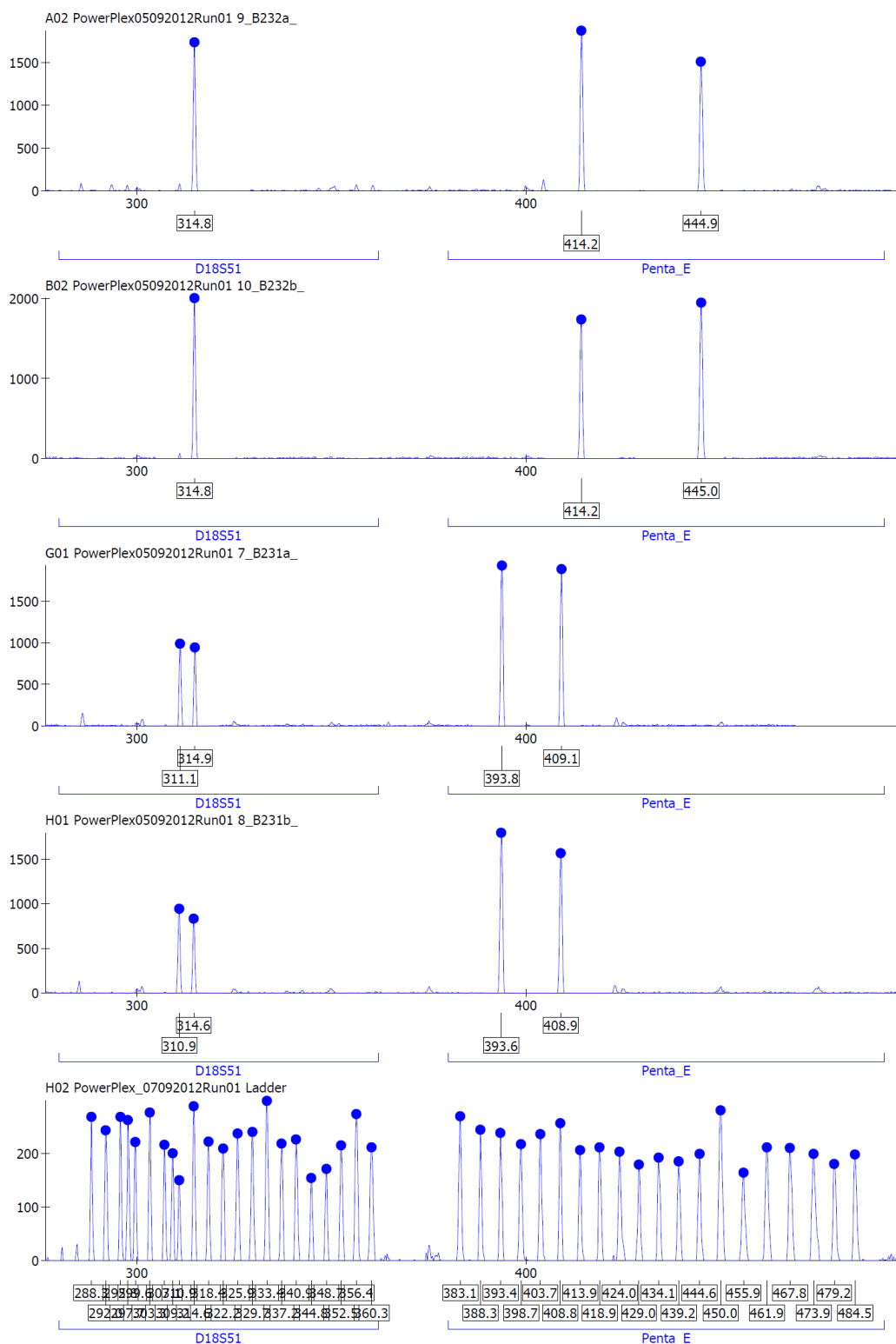
Ryc. 15g. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźnięt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*. Bliźnięta jednozygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziału na sekwenatorze kapilarnym polimorficznych fragmentów *locus D3S1358* (9 alleli) oraz *locus TH01* (10 alleli). Wykazano, że dla *locus D3S1358* bliźnięta 231a i 231b są homozygotami dla allelu 18 (18-18), w przypadku pary 232a i 232b, bliźnięta są heterozygotami dla alleli 15 i 16. W *locus TH01*, bliźnięta 231a i 231b są heterozygotami dla alleli 9 i 9.3, a w przypadku pary 232a i 232b, bliźnięta są heterozygotami dla alleli 8 i 9.3. Badane bliźnięta są jednozygotyczne.



Ryc. 15h. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźnięt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*. Bliźnięta jednozygotyczne.

Rycina przedstawia fragment rozdziału na sekwenatorze kapilarnym polimorficznych fragmentów *locus D21S11* (25 alleli). Wykazano, że dla *locus D21S11* bliźnięta 231a i 231b są heterozygotami odpowiednio dla alleli 27 i 30, a w przypadku pary 232a i 232b, bliźnięta są heterozygotami dla alleli 30.2 i 33.2. Badane bliźnięta są jednozygotyczne.



Ryc. 15i. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźnięt z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*. Bliźnięta jednozygotyczne.

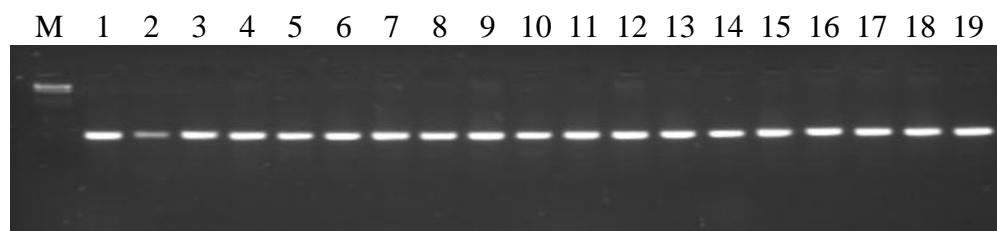
Rycina przedstawia fragment rozdzielania na sekwenatorze kapilarnym polimorficznych fragmentów *locus D21S11* (22 allele) oraz *locus Penta E* (20 allele). Wykazano, że dla *locus D21S11* bliźnięta 231a i 231b są heterozygotami dla alleli 14 i 15, a w przypadku pary 232a i 232b, bliźnięta są homozygotami dla allelu 15 (15-15). W *locus Penta E*, bliźnięta 231a i 231b są heterozygotami odpowiednio dla alleli 7 i 10, a w przypadku pary 232a i 232b bliźnięta są heterozygotami dla alleli 11 i 17. Badane bliźnięta są jednozygotyczne.

4.2. Amplifikacja regionu zmiennego mitochondrialnego DNA bliźniąt jednozygotycznych

Dla bliźniąt jednozygotycznych analizowano występowanie polimorfizmu regionu zmiennego mitochondrialnego DNA człowieka. Mitochondrialny DNA charakteryzuje się wysoką częstotliwością mutacji, 5-10 razy większą niż jądrowy DNA. Mutacje występują w indywidualnych mitochondriach, stąd w komórce współistnieją mitochondria typu dzikiego i zmutowanego (heteroplazmia) i od proporcji ich liczby zależy ujawnienie się mutacji w postaci chorób mitochondrialnych. U bliźniąt, również jednozygotycznych, mogą wystąpić pewne różnice w mitochondriach w związku z występowaniem zjawiska heteroplazmii i różnego rozdziału mitochondriów do komórek potomnych.

4.2.1. Amplifikacja fragmentu H2/L2 mitochondrialnego DNA bliźniąt jednozygotycznych

Badanie przeprowadzono z zastosowaniem reakcji PCR ze starterami H2 (H16401) i L2 (L15997tRNA-Pro). Do analizy wykorzystywano całkowity DNA izolowany z leukocytów krwi pępowinowej metodą z GTC. Produkty reakcji PCR wielkości 443 pz rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym w buforze 1x TBE z bromkiem etydyny (0,5 µg/ml) przy napięciu 100 V, przez 30 minut. Przykładowy rozdział produktów PCR przedstawiono na ryc. 16. Uzyskane produkty badano następnie metodami przesiewowymi poprzez analizę heterodupleksów (HD) i polimorfizmu konformacji jednoniciowych fragmentów DNA (SSCP). Fragmenty wykazujące odmienne układy prążków poddawano sekwencjonowaniu.

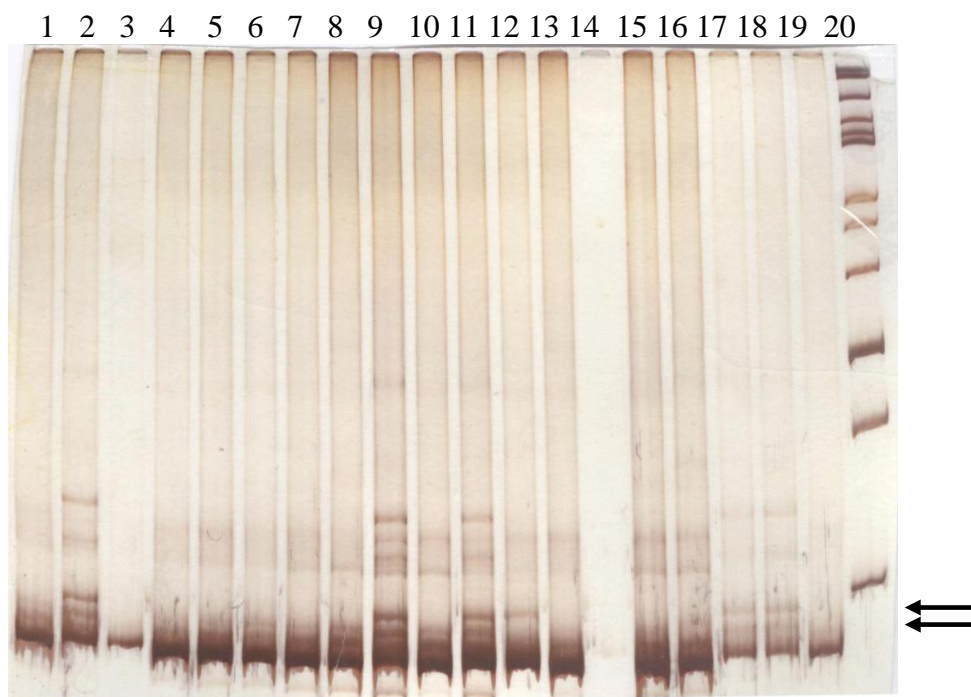


Ryc. 16. Amplifikacja fragmentów H2/L2 mtDNA człowieka.

Całkowity komórkowy DNA amplifikowano z zastosowaniem starterów specyficznych dla mtDNA (H2/L2). Fragmenty DNA rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym w buforze 1x TBE z bromkiem etydyny (0,5 µg/ml) przy napięciu 100 V, przez 30 minut. Tory 1-19, mtDNA bliźniąt; tor M, wzorzec wielkości λ /EcoRI+HindIII.

4.2.2. Analiza polimorfizmu mitochondrialnego DNA bliźniąt jednozygotycznych metodą analizy heterodupleksów

Metodą przesiewową umożliwiającą określenie polimorfizmu regionu zmiennego mtDNA bliźniąt jest analiza heterodupleksów (HD). Produkty reakcji PCR z zastosowaniem starterów H2/L2 denaturowano w temperaturze 95°C przez 5 minut, a następnie inkubowano w temperaturze 65°C przez 1 godzinę celem utworzenia heterodupleksów. Fragmenty mtDNA rozdzielano w 8% żelu poliakryloamidowym w buforze TBE przy napięciu 90 V, w temperaturze 20°C, przez 16 godzin. Żel wybarwiono metodą srebrową. Uzyskane fragmenty DNA, w których zaobserwowano polimorfizm poddawano sekwencjonowaniu. Przykładowy wynik analizy HD przedstawiono na ryc. 17. Podczas analizy HD na żel nakładano wzorzec wielkości i kontrolę negatywną.



Ryc. 17. Analiza polimorfizmu mtDNA człowieka metodą HD.

Mitochondrialny DNA człowieka amplifikowano metodą PCR z zastosowaniem starterów H2 (H16401) i L2 (L15997tRNA-Pro) uzyskując fragmenty DNA o wielkości 443 pz. Produkty PCR denaturowano i renaturowano celem utworzenia heterodupleksów. Fragmenty mtDNA rozdzielono w 8% żelu poliakryloamidowym i wybarwiono metodą srebrową. Tory 1-12 i 15-16, mtDNA bliźniąt, tor 13, kontrolny mtDNA; tor 14, kontrola negatywna reakcji; tory 17-19, mtDNA rodziny, matka, dziecko, ojciec. Tor 20, wzorzec wielkości λ /EcoRI+HindIII. Prążki heterodupleksów widoczne na torach, 1, 2, 9, 11, 12, 17, 18 wskazują na występowanie polimorfizmów w regionie pętli D mtDNA. Tory 1-2, 9-10, 11-12, mtDNA bliźniąt dwuzygotycznych. Strzałkami zaznaczono heterodupleksy.

4.3. Genotypowanie bliźniąt

Dla określenia zygotywności bliźniąt stosowano te same metody, które wykorzystywane są do identyfikacji indywidualnej opartej o badania DNA. Badaniem objęty został szczególny rodzaj DNA tzw. sekwencje powtórzone, najczęściej nie kodujące, cechujące się bardzo dużym polimorfizmem. Analizę przeprowadzono z zastosowaniem badań hybrydacyjnych i amplifikacyjnych. W badaniach korzystano z doświadczenia Laboratorium Genetyki Molekularnej w prowadzeniu analiz, dysponującego szczegółowymi protokołami wykonania analizy, przy czym zapewniona jest wysoka rozdzielczość i jakość wyniku.

4.3.1. Genotypowanie bliźniąt z zastosowaniem badań hybrydacyjnych

Badania hybrydacyjne zostały przeprowadzone łącznie dla 170 par bliźniąt, przy czym analiza odcisku genetycznego z zastosowaniem sondy GTG pozwoliła na dokładną identyfikację 87 par bliźniąt dwuzygotycznych i 83 par bliźniąt jednozygotycznych. Dla większości bliźniąt przeprowadzono analizę typu pojedynczego *locus* z sondami MS31 i MS43A, wyjątek stanowiło 13 par bliźniąt, dla których przeprowadzono tylko badanie odcisku genetycznego. Hybrydację z sondą MS31 przeprowadzono dla 157 par bliźniąt, a z sondą MS43A dla 155 par bliźniąt. Analizę z sondą MS1 przeprowadzono tylko dla dwóch par bliźniąt. U 8 par bliźniąt dwuzygotycznych jednoczesna analiza *loci* rozpoznawanych przez sondy MS31 i MS43A nie wykazała różnic. Przykład analizy z zastosowaniem sondy molekularnej GTG zamieszczono na ryc. 3, natomiast przykłady analiz hybrydacyjnych z zastosowaniem sond MS31 i MS43A przedstawiono na ryc. 4 i 5. Podobnie w przypadku jednej z wykorzystanych sond bliźnięta dwuzygotyczne posiadały te same allele w przypadku 14 par bliźniąt dla MS31 i 10 par bliźniąt dla MS43A. We wszystkich przypadkach badanie odcisku genetycznego dawało wynik rozstrzygający zygotywność. Przykładowe wyniki liczbowe zamieszczono w tabeli 7.

Tabela 7. Przykładowe zestawienie wyników analiz hybrydacyjnych z sondą molekularną dla 20 par bliźniąt.

W tabeli uwzględniono również pary bliźniąt, dla których wyniki hybrydacji przedstawiono na rycinach 3-5.

L.p.	Nr DNA	Zygodyczność	Odcisk genetyczny		MS1	MS31	MS43A
			Fragmenty DNA wspólne	Fragmenty DNA indywidualne			
1.	15864	DZ	21	15	1-2	1-3	1-3
2.	15865	DZ	21	15	2-3	1-2	2-3
3.	16048	DZ	10	26		1-2	1-2
4.	16049	DZ	10	26		1-2	1-2
5.	16066	DZ	20	23		1-2	1-3
6.	16067	DZ	20	23		1-2	2-4
7.	16115	DZ	22	15		1-2	1-2
8.	16116	DZ	22	15		2-3	1-2
9.	16069	MZ	28	0		1-2	1-2
10.	16070	MZ	28	0		1-2	1-2
11.	16091	MZ	19	0		1-2	1-2
12.	16092	MZ	19	0		1-2	1-2
13.	142A	DZ	14	26			
14.	142B	DZ	14	26			
15.	143A	DZ	19	16			
16.	143B	DZ	19	16			
17.	144A	DZ	8	26			
18.	144B	DZ	8	26			
19.	145A	MZ	21	0			
20.	145B	MZ	21	0			
21.	146A	DZ	8	31			
22.	146B	DZ	8	31			
23.	147A	DZ	14	21			
24.	147B	DZ	14	21			
25.	17222	DZ	8	23		1-4	1-2
26.	17223	DZ	8	23		2-3	1-3
27.	17225	MZ	23	0		1-2	1-2
28.	17226	MZ	23	0		1-2	1-2
29.	17228	MZ	24	0		1-2	1-2
30.	17229	MZ	24	0		1-2	1-2
31.	17231	DZ	12	15		2-3	1-3
32.	17232	DZ	12	15		1-2	2-3
33.	17018	MZ					1-2
34.	17019	MZ					1-2
35.	17021	DZ					1-4
36.	17022	DZ					2-3
37.	17024	MZ					1-2
38.	17025	MZ					1-2
39.	17027	MZ					1-2
40.	17028	MZ					1-2

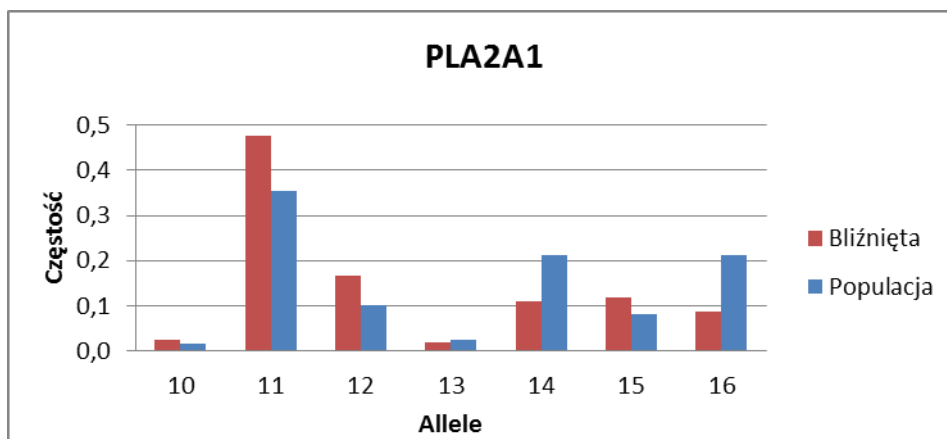
4.3.2. Genotypowanie bliźniąt z zastosowaniem amplifikacji pojedynczych loci

Zastosowanie metod amplifikacyjnych umożliwiło określenie zygotywności dla 56 par bliźniąt. Badaniom poddano następujące loci: *PLA2A1*, *CYARO*, *vWF*, *TPOX*, *TH01* i *DIS80*. Uzyskane rozkłady alleli przedstawiono w tabeli 8. Dla 7 par bliźniąt przeprowadzono jednocześnie analizę hybrydacyjną i reakcje PCR dla wybranych loci, wskazując na dużo większą informatywność badań hybrydacyjnych typu *multi locus*, chociaż wybrane markery umożliwiły rozróżnienie bliźniąt jednozygotycznych i dwuzygotycznych.

Tabela 8. Zestawienie częstości występowania alleli *PLA2A1*, *CYARO*, *vWF*, *TPOX*, *TH01* i *DIS80* u bliźniąt jednozygotycznych i dwuzygotycznych.

Allele	<i>PLA2A1</i>	<i>CYARO</i>	<i>vWF</i>	<i>TPOX</i>	<i>TH01</i>	<i>DIS80</i>
5		0,3476			0,018	
6		0,1707			0,2117	
7		0,1524			0,0766	
8				0,5	0,1532	
9		0,0305		0,125	0,1532	
9,3					0,3513	
10	0,0229	0,2744		0,0536	0,0360	
11	0,4771	0,0244		0,3214		
12	0,1651					
13	0,0183					
14	0,1101		0,1012			
15	0,1193		0,1191			
16	0,0872		0,2202			
17			0,2678			
18			0,2441			0,2338
19			0,0238			0,0519
20			0,0238			0,026
21						0,0065
22						0,1363
23						0,0844
24						0,3052
25						0,0454
26						0,013
27						
28						0,0325
29						0,039
30						0,013
31						
32						
33						0,0065
34						
35						0,0065

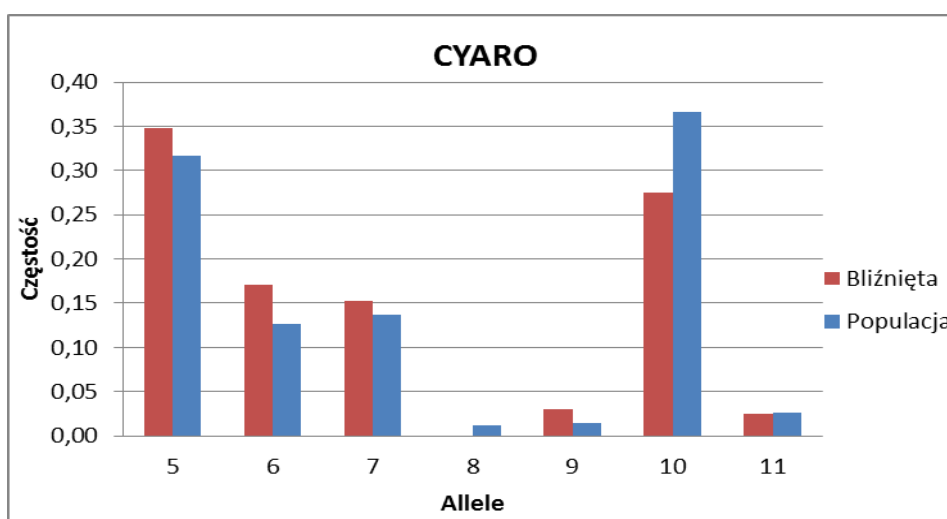
Analizę markera *PLA2A1* obejmującego powtórzenia trinukleotydu (AAT)_n fosfolipazy A2 grupy IB przeprowadzono dla 55 par bliźniąt, a otrzymany rozkład różnił się istotnie statystycznie w stosunku do własnej populacji osób niespokrewnionych ($\chi^2=23,533$, df 6, $p<0,0006$, test dwustronny) (ryc. 18).



Ryc. 18. Zestawienie częstości występowania alleli *PLA2A1* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt istotnie odbiega statystycznie od rozkładu w populacji. U bliźniąt zaobserwowano wszystkie allele występujące w populacji.

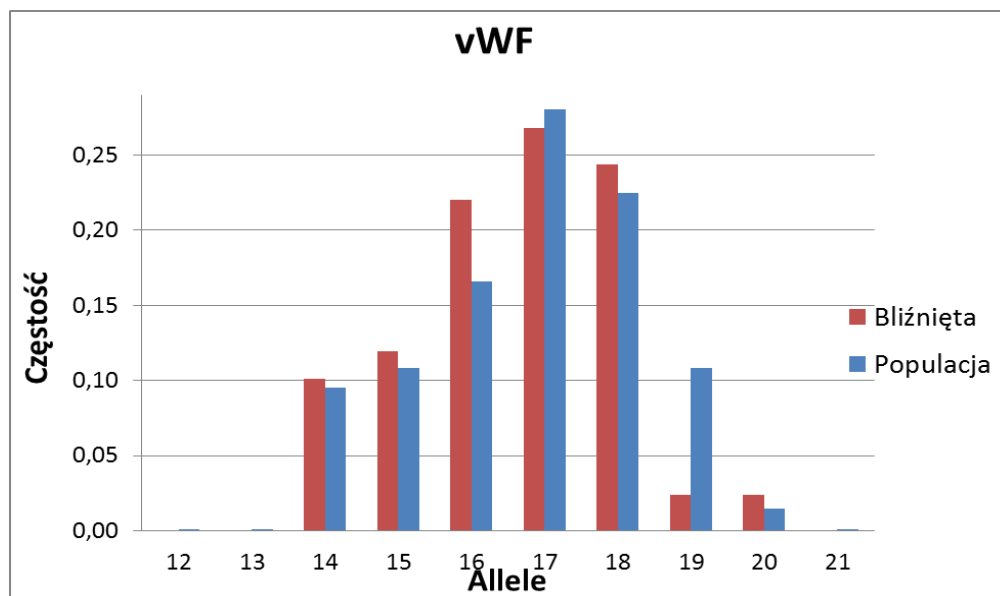
Analiza rozkładu częstości powtórzenia tetranukleotydu *CYARO* (AAAT)_n polipeptydu 1 cytochromu P450 (rodzina 19, podrodzina A) w badanej populacji bliźniąt obejmującej 41 par nie wykazała statystycznie istotnych różnic z populacją polską ($\chi^2=7,129$, df 6, $p=0,3091$, test dwustronny). Rozkład alleli dla *CYARO* przedstawiono na ryc. 19.



Ryc. 19. Zestawienie częstości występowania alleli *CYARO* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt nie odbiega statystycznie od rozkładu w populacji własnej. U bliźniąt nie zaobserwowano allelu 8.

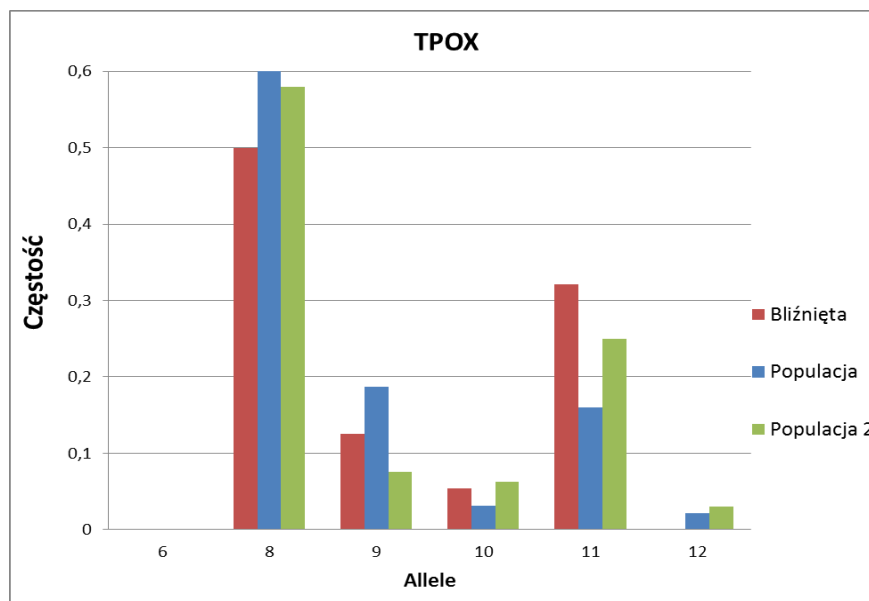
W przypadku badania powtórzeń czynnika von Willebrandta *vWF* analizie poddano 42 pary bliźniąt, a otrzymane częstości nie różniły się statystycznie od populacji polskiej ($\chi^2=9,518$, df 9, $p=0,3909$, test dwustronny)(Czarny i wsp., 2005). Rozkład częstości przedstawiono na rycinie 20.



Ryc. 20. Zestawienie częstości występowania alleli *vWF* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt nie odbiega statystycznie od rozkładu w populacji. U bliźniąt nie zaobserwowano alleli 12, 13 i 21, które w populacji występują z bardzo niewielką częstością 0,001.

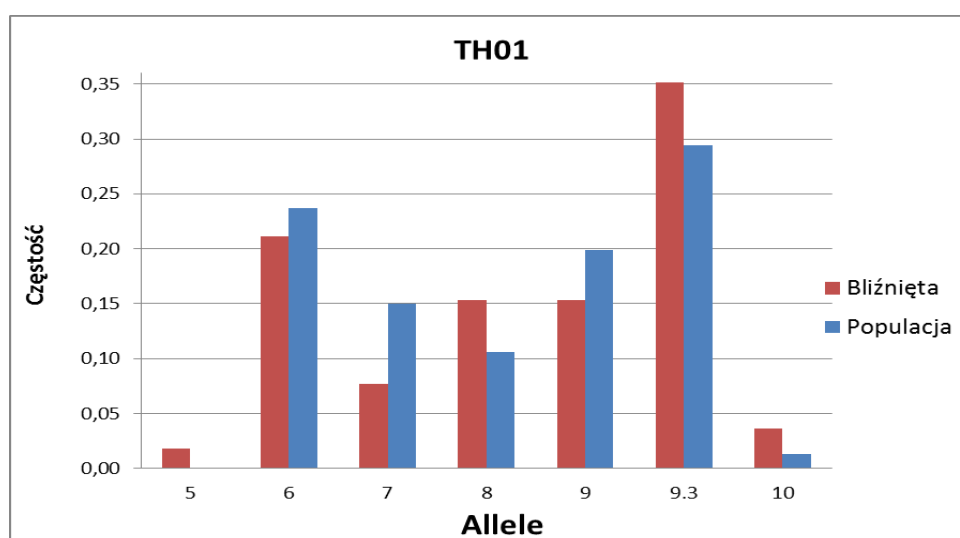
Kolejnym badanym markerem było powtórzenie tetranukleotydu peroksydazy tarczycy *TPOX(AATG)*n**, które analizowano dla 14 par bliźniąt, stąd wyniki mogą znacznie odbiegać od rozkładu typowego dla populacji polskiej. Porównanie przeprowadzono z własną populacją osób niespokrewnionych oraz z populacją polską (Czarny i wsp., 2005), uzyskując w pierwszym przypadku istotnie statystycznie różniący się rozkład bliźniąt ($\chi^2=23,664$, df 4, $p<0,0001$, test dwustronny), a dla szerszej populacji również obserwowano istotność statystyczną ($\chi^2=9,542$, df 5, $p=0,0893$, test dwustronny), co sugeruje konieczność zwiększenia liczby badanych bliźniąt. Przykładowy rozkład częstości *TPOX* przedstawiono na ryc. 21.



Ryc. 21. Zestawienie częstości występowania alleli *TPOX* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z własną populacją polską (populacja) oraz z populacją polską z pracy Czarny i wsp., 2005 (populacja 2).

Rozkład częstości u bliźniąt odbiega statystycznie od rozkładu w populacji własnej ($p < 0,0001$), podczas gdy w szerszej populacji różnice nie są już tak widoczne ($p = 0,0893$). U bliźniąt nie zaobserwowano alleli 6 i 12, a w populacji własnej allelu 6, który w szerszej populacji występuje z częstością 0,001.

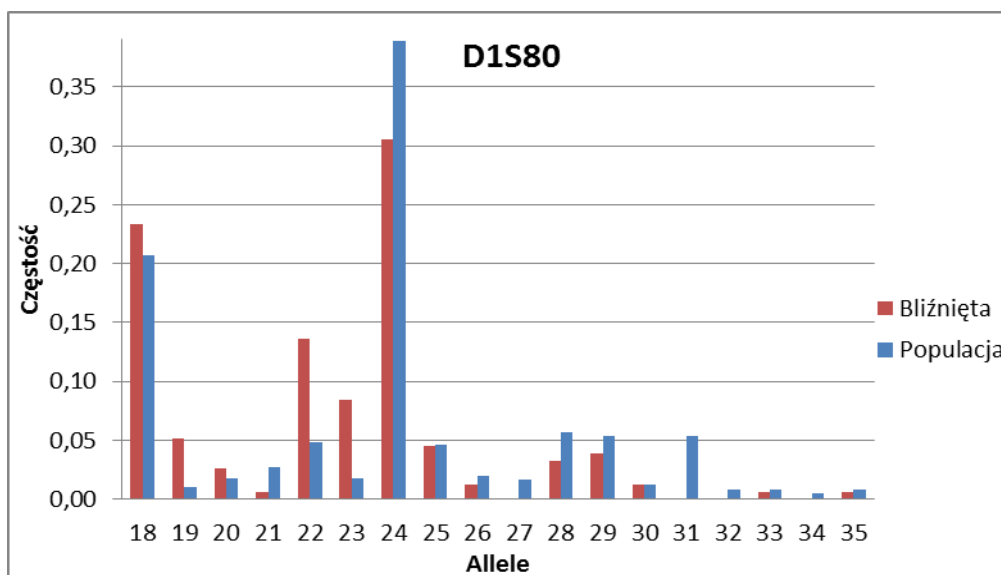
Analiza rozkładu częstości alleli dla powtórzenia tetranukleotydowego hydroksylazy tyrozynowej *TH01* (AATG)_n przeprowadzona dla 56 par bliźniąt, wskazuje na statystycznie istotne różnice w porównaniu z populacją polską (Sołtyszewski i wsp., 2006), ($\chi^2 = 41,104$, df 6, $p < 0,0001$, test dwustronny). Rozkład częstości przedstawiono na ryc. 22.



Ryc. 22. Zestawienie częstości występowania alleli *TH01* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt odbiega statystycznie od rozkładu w populacji ($p < 0,0001$). Allel 5 występuje w populacji z częstością 0,001 (Sołtyszewski i wsp., 2006).

W przypadku minisatelitarnego *locus DIS80* analizowano 39 par bliźniąt, uzyskując w porównaniu z populacją polską statystycznie istotne różnice w rozkładzie alleli ($\chi^2=70,375$, $df 17$, $p < 0,0001$, test dwustronny), co może wynikać ze stosunkowo małej liczby bliźniąt poddanych tej analizie. Rozkład częstości przedstawiono na poniższej rycinie 23. Badania *locus DIS80* były bardzo popularne na początku lat 90-tych XX wieku, a w okresie późniejszym zostały stopniowo wyparte przez markery mikrosatelitarne, dla których znacznie łatwiejsza okazała się identyfikacja poszczególnych alleli.



Ryc. 23. Zestawienie częstości występowania alleli *DIS80* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt odbiega statystycznie od rozkładu w populacji ($p < 0,0001$). Allele 27, 31, 32 i 34 nie występują w badanej populacji bliźniąt.

Przykładowe wyniki genotypowania bliźniąt z zastosowaniem wybranych do analizy pojedynczych *loci* metodą PCR przedstawiono w tabeli 9. Można zwrócić uwagę na różnicowanie bliźniąt tylko w jednym z analizowanych markerów, co często może być niewystarczającym potwierdzeniem dwuzygotyczności bliźniąt.

Tabela. 9. Przykładowe zestawienie wyników analizy zygotywności bliźniąt z zastosowaniem reakcji amplifikacji wybranych pojedynczych loci.

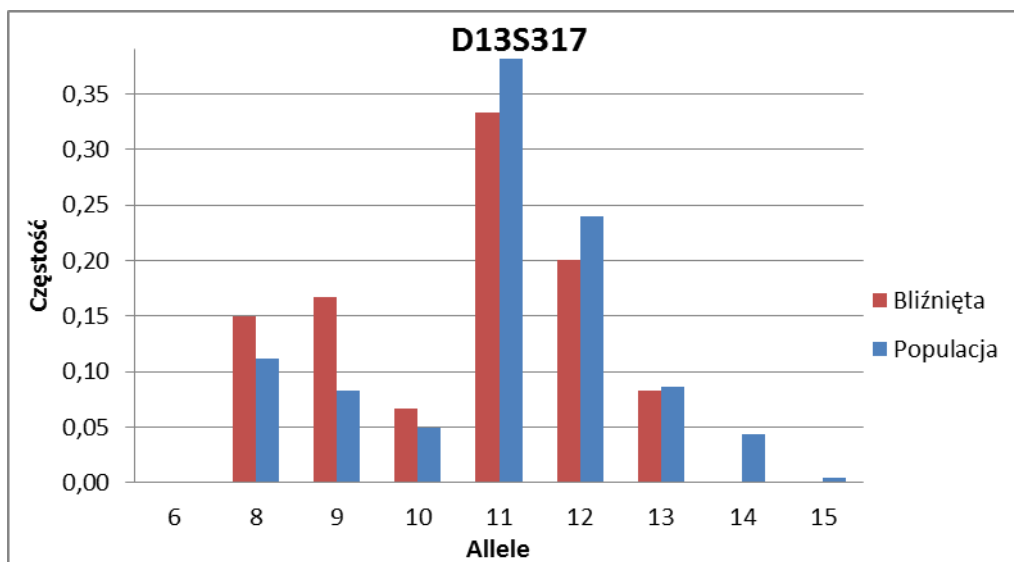
Nr	Nr DNA	Zygotywność	<i>PLA2A1</i>	<i>CYARO</i>	<i>vWF</i>	<i>TPOX</i>	<i>TH01</i>	<i>D1S80</i>
1.	270a	MZ	11-12	9-10	16-16		5-5	24-29
2.	270b	MZ	11-12	9-10	16-16		5-5	24-29
3.	272a	DZ	11-11	10-10	18-18		6-9.3	23-24
4.	272b	DZ	11-11	6-7	16-18		6-9.3	23-24
5.	15630	DZ	11-11	10-11	16-18	8-11	6-8	
6.	15631	DZ	11-11	10-10	14-16	8-10	8-9.3	
7.	15636	MZ	11-16	5-5	17-18	9-11	6-8	
8.	15637	MZ	11-16	5-5	17-18	9-11	6-8	

4.3.3. Genotypowanie bliźniąt z zastosowaniem reakcji multiplex PCR w oparciu o komercyjnie dostępny zestaw *PowerPlex 16*

W ramach rozprawy doktorskiej przeprowadzono również analizę z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów do identyfikacji osób. Zastosowanie analizy typu *PowerPlex 16* pozwoliło na dokładne wskazanie bliźniąt jednozygotycznych i dwuzygotycznych. Badaniom poddano 15 par bliźniąt, w tym 5 par bliźniąt dwuzygotycznych i 10 par bliźniąt jednozygotycznych. Analizowano 15 polimorficznych loci *vWA*, *D8S1179*, *TPOX*, *FGA*, *D3S1358*, *TH01*, *D21S11*, *D21S11*, *Penta E*, *D5S818*, *D13S317*, *D7S820*, *D16S539*, *CSF1PO*, *Penta D* oraz amelogeninę, co umożliwiło określenie płci. Ze względu na przeprowadzanie badań nad parami bliźniąt o tej samej płci dla potrzeb określenia zygotywności, ten parametr stanowił potwierdzenie poprawności wykonania badań. Otrzymane częstości występowania poszczególnych alleli przedstawiono w tabeli 10.

Allele	vWA	D8S1179	TPOX	FGA	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	Penta D
24				0,1525											
25				0,1356											
26															
27				0,0169			0,1000								
28							0,1333								
28,2							0,0167								
29							0,1500								
30							0,1833								
30,2							0,1333								
31							0,0833								
31,2							0,0667								
32															
32,2							0,0667								
33															
33,2							0,0667								
34,2															
39															

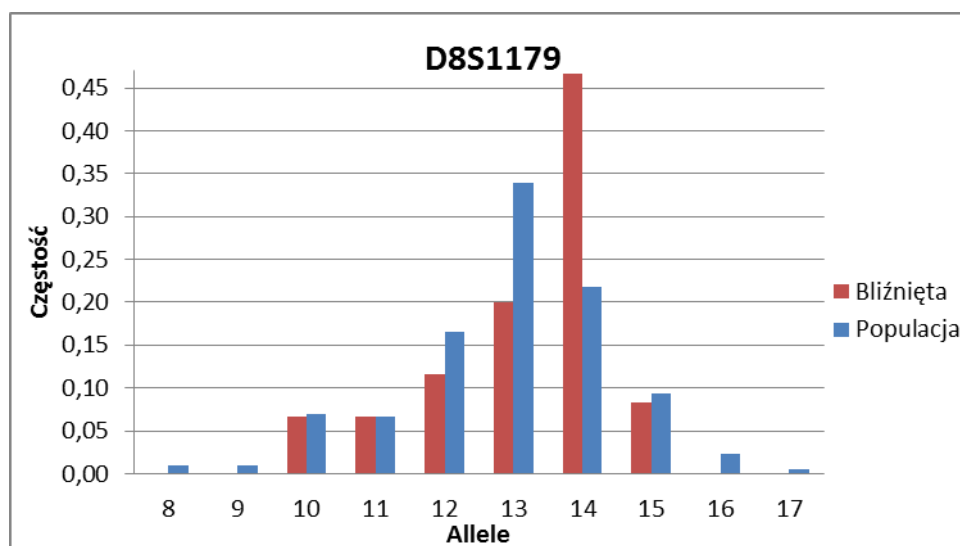
Analiza rozkładu częstości alleli markera *D13S317* (powtórzenie TATC, 13q22-q31) przeprowadzona dla 15 par bliźniąt, wskazuje na statystycznie istotne różnice w porównaniu z populacją polską ($\chi^2=16,547$, df 8, $p=0,0352$, test dwustronny). Rozkład częstości przedstawiono na ryc. 24.



Ryc. 24. Zestawienie częstości występowania alleli *D13S317* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt odbiega statystycznie od rozkładu w populacji ($p=0,0352$). Allele 6, 14 i 15 nie występują w badanej populacji bliźniąt.

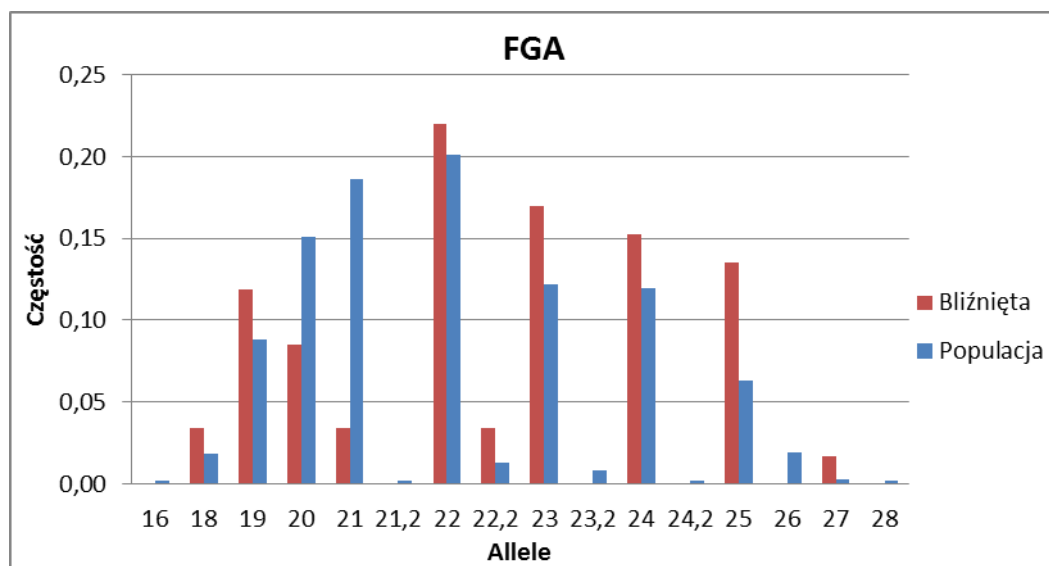
Kolejnym badanym markerem był *D8S1179* (złożone powtórzenie TCTA, 8q24.13), analizie poddano 15 par bliźniąt, uzyskując istotnie statystycznie różniący się rozkład bliźniąt ($\chi^2=40,361$, df 9, $p<0,0001$, test dwustronny). Przykładowy rozkład częstości *D8S1179* przedstawiono na poniższej ryc. 25.



Ryc. 25. Zestawienie częstości występowania alleli *D8S1179* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt odbiega istotnie statystycznie od rozkładu w populacji ($p < 0,0001$). U bliźniąt nie zaobserwowano alleli 8, 9, 16 i 17.

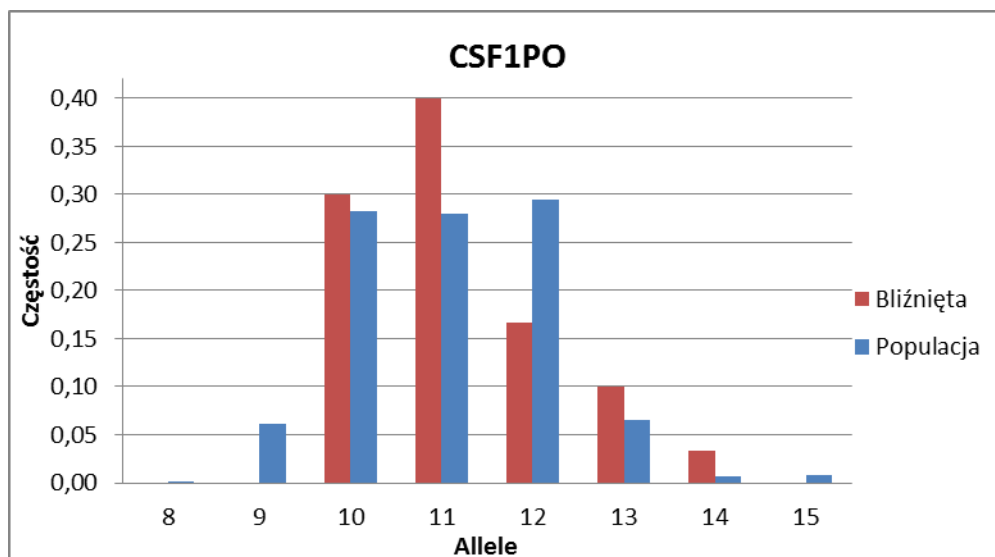
W przypadku genu łańcucha alfa fibrynogenu *FGA* (złożone powtórzenie TTTC, 4q28, *FIBRA*), analizowano 15 par bliźniąt, uzyskując w porównaniu z populacją polską statystycznie istotne różnice w rozkładzie alleli ($\chi^2=42,396$, df 15, $p=0,0002$, test dwustronny). Rozkład częstości przedstawiono na ryc. 26.



Ryc. 26. Zestawienie częstości występowania alleli *FGA* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt odbiega statystycznie od rozkładu w populacji ($p=0,0002$). Allele 16; 21,2; 23,2; 24,2; 26 oraz 28 nie występują w badanej populacji bliźniąt, natomiast allele 16; 21,2; 24,2 oraz 28 występują w populacji polskiej z częstością 0,002.

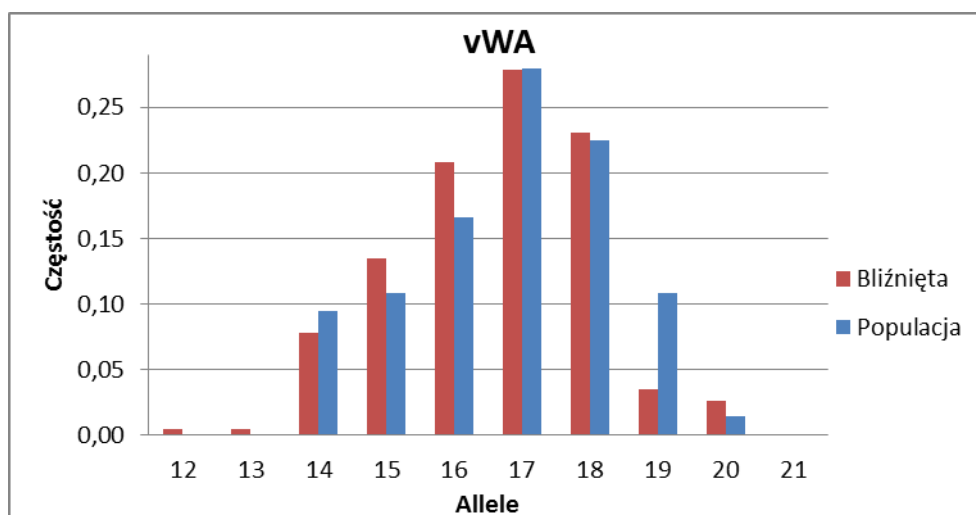
Analiza rozkładu częstości alleli markera *CSFIPO* (powtórzenie AGAT, *CSFIPO*, protoonkogen c-fms człowieka dla receptora genu CSF-1, 5q33.3-34) wykonana dla 15 par bliźniąt, wskazuje na statystycznie istotne różnice w porównaniu z populacją polską ($\chi^2=29,523$, df 7, $p=0,0001$, test dwustronny). Rozkład częstości przedstawiono na ryc. 27.



Ryc. 27. Zestawienie częstości występowania alleli *CSF1PO* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt odbiega istotnie statystycznie od rozkładu w populacji ($p=0,0001$). Allele 8, 9 i 15 nie występują w badanej populacji bliźniąt.

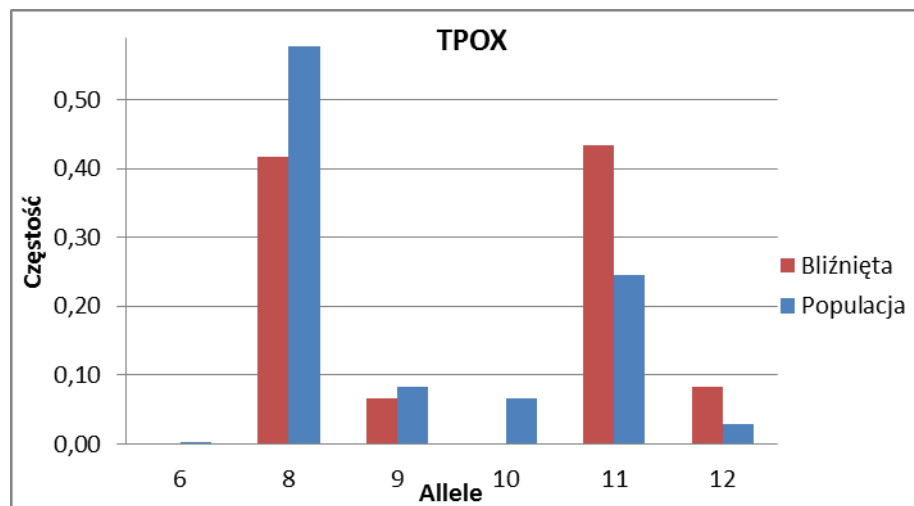
W przypadku markera *vWA* (złożone powtórzenie TCTA, *VWFA31*, gen czynnika von Willebrandta człowieka, 12p13.31) analizę przeprowadzono dla 15 par bliźniąt, uzyskując w porównaniu z populacją polską statystycznie nieistotne różnice w rozkładzie alleli ($\chi^2=10,132$, $df\ 9$, $p=0,3399$, test dwustronny). Rozkład częstości przedstawiono na ryc. 28.



Ryc. 28. Zestawienie częstości występowania alleli *vWA* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt nie odbiega statystycznie od rozkładu w populacji ($p=0,3399$). Allel 21 nie występuje w badanej populacji bliźniąt, a allele 12 i 13 występują z częstością 0,0043. Z kolei allele 12,13 i 21 w grupie populacyjnej występują z częstością 0,001.

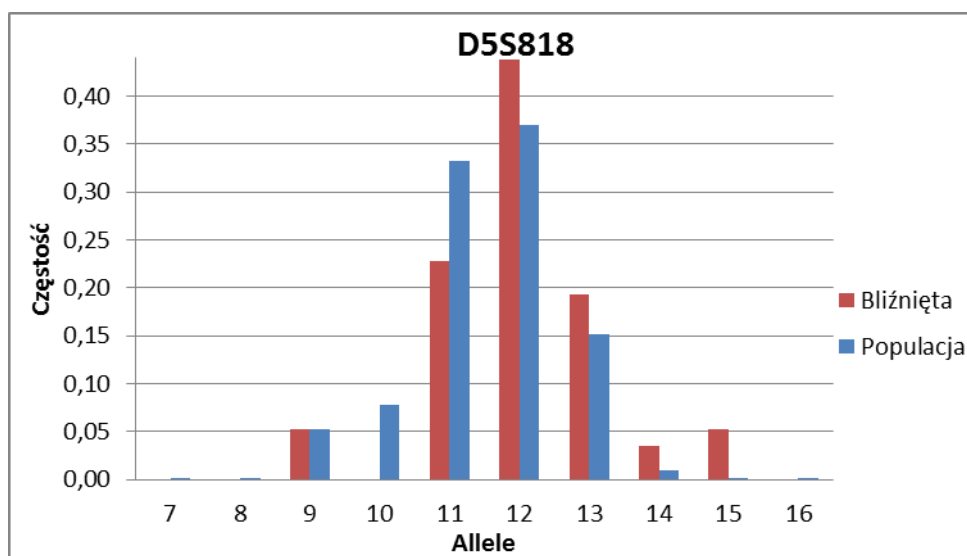
Analizie rozkładu częstości alleli genu peroksydazy tarczycy *TPOX* (powtórzenie AATG, 2p24-2pter, *TPOX*) poddano 15 par bliźnięt, wskazując na statystycznie istotne różnice w porównaniu z populacją polską ($\chi^2=36,469$, df 5, $p<0,0001$, test dwustronny). Rozkład częstości przedstawiono na ryc. 29.



Ryc. 29. Zestawienie częstości występowania alleli *TPOX* w badanej populacji bliźnięt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźnięt odbiega statystycznie od rozkładu w populacji ($p<0,0001$). Alleli 6 i 10 nie zaobserwowano w badanej populacji bliźnięt. Allel 6 w populacji polskiej występuje z częstością 0,0008.

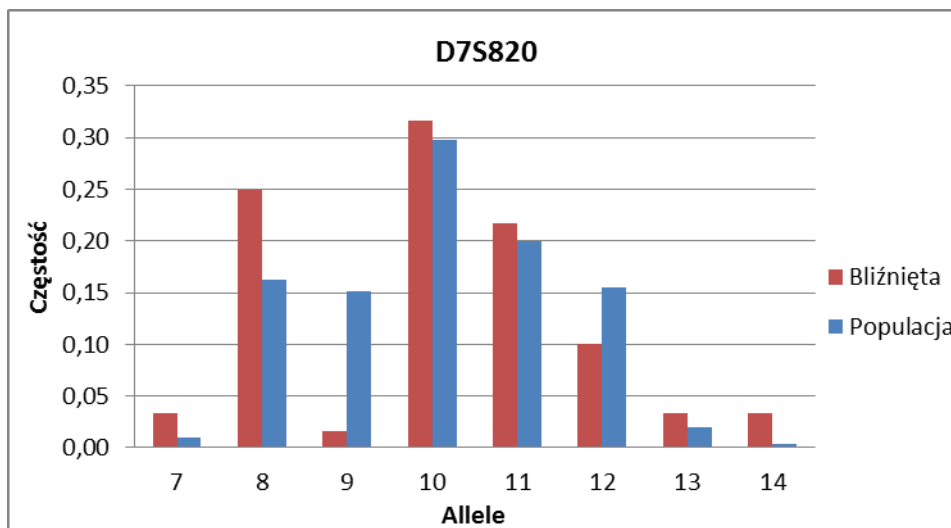
Kolejnym badanym markerem był *D5S818* (powtórzenie AGAT, 5q23.3–32), analizę przeprowadzono dla 14 par bliźnięt, uzyskując istotnie statystycznie różniący się rozkład bliźnięt ($\chi^2=148,148$, df 9, $p<0,0001$, test dwustronny). Przykładowy rozkład częstości *D5S818* przedstawiono na ryc. 30.



Ryc. 30. Zestawienie częstości występowania alleli *D5S818* w badanej populacji bliźnięt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt odbiega statystycznie od rozkładu w populacji ($p < 0,0001$). Alleli 7, 10 i 16 nie zaobserwowano w badanej populacji bliźniąt. Z kolei w populacji polskiej allele 7 i 15 występują z częstością 0,002, a allele 8 i 16 z częstością 0,001.

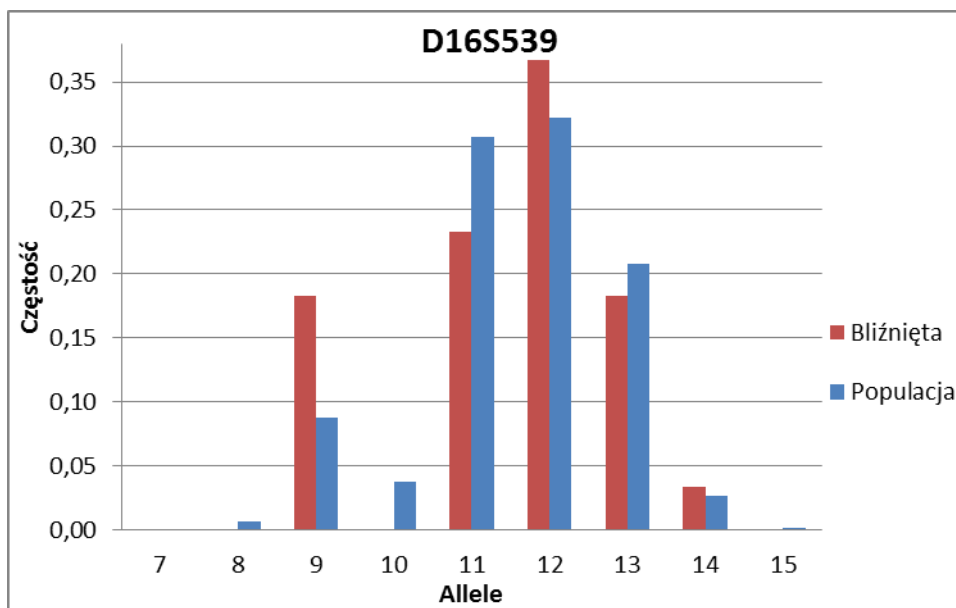
W przypadku markera *D7S820* (powtórzenie GATA, 7q11.21–22) analizowano 15 par bliźniąt, uzyskano w porównaniu z populacją polską statystycznie istotne różnice w rozkładzie alleli ($\chi^2 = 47,921$, df 7, $p < 0,0001$, test dwustronny). Rozkład częstości przedstawiono na ryc. 31.



Ryc. 31. Zestawienie częstości występowania alleli *D7S820* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt odbiega istotnie statystycznie od rozkładu w populacji ($p < 0,0001$). Wszystkie allele były reprezentowane w badanej populacji bliźniąt.

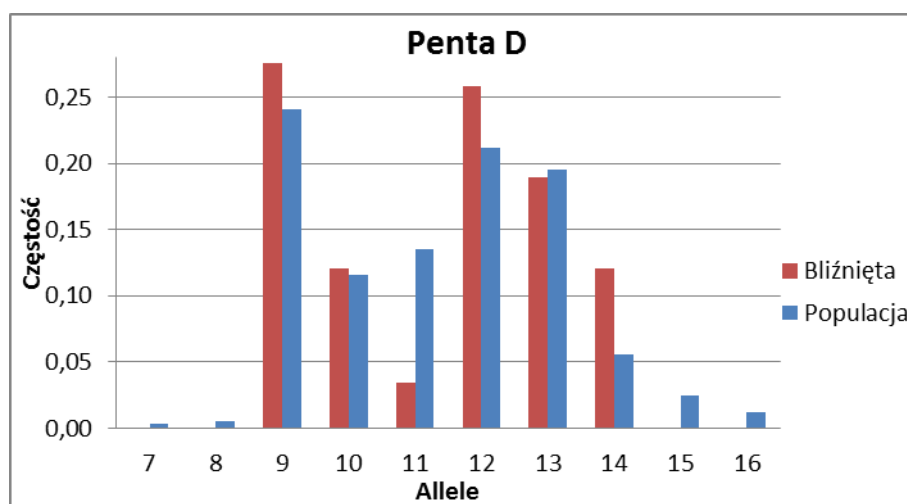
Analiza rozkładu częstości alleli markera *DI6S539* (powtórzenie GATA, 16q24.1) przeprowadzona dla 15 par bliźniąt, wskazuje na statystycznie istotne różnice w porównaniu z populacją polską ($\chi^2 = 17,972$, df 8, $p = 0,0214$, test dwustronny). Rozkład częstości przedstawiono na ryc. 32.



Ryc. 32. Zestawienie częstości występowania alleli *D16S539* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt odbiega statystycznie od rozkładu w populacji ($p=0,0214$). Allele 7, 8, 10 i 15 nie występują w badanej populacji bliźniąt. Allele 7 i 15 w populacji polskiej występują z częstością odpowiednio 0,001 i 0,002.

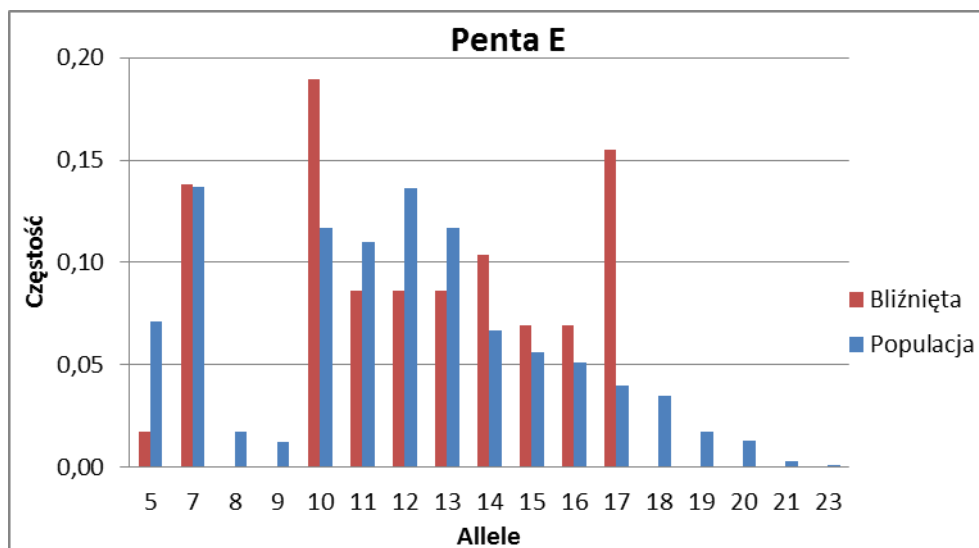
W przypadku rozkładu częstości alleli markera *Penta D* (powtórzenie AAAGA, 21q), analizie poddano 15 par bliźniąt, wykazując statystycznie istotne różnice w porównaniu z populacją polską ($\chi^2=21,021$, df 9, $p=0,0126$, test dwustronny). Rozkład częstości przedstawiono na ryc. 33.



Ryc. 33. Zestawienie częstości występowania alleli *Penta D* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt odbiega statystycznie od rozkładu w populacji ($p=0,0214$). Alleli 7, 8, 15 i 16 nie zaobserwowano w badanej populacji bliźniąt. Z kolei w populacji polskiej allel 7 występuje z częstością 0,003, a allel 8 z częstością 0,005.

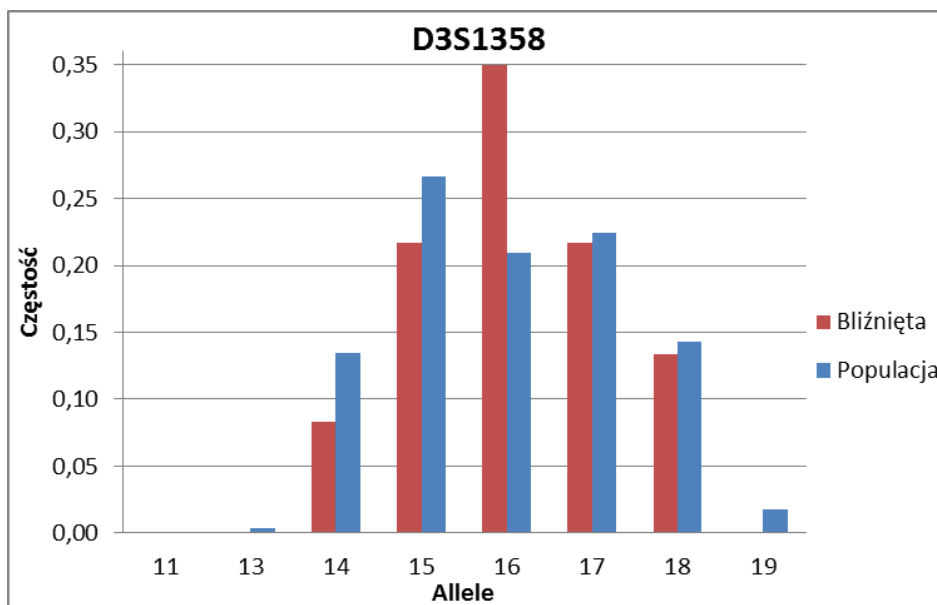
Następnym badanym markerem był *Penta E*, obejmujący powtórzenie pentanukleotydu (AAAGA, 15q). Analizowano 15 par bliźniąt, uzyskując istotnie statystycznie różniący się rozkład bliźniąt ($\chi^2=57,636$, df 16, $p<0,0001$, test dwustronny). Częstości *Penta E* przedstawiono na ryc. 34.



Ryc. 34. Zestawienie częstości występowania alleli *Penta E* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt odbiega statystycznie od rozkładu w populacji ($p<0,0001$). Alleli 8, 9, 18, 19, 20, 21 i 23 nie zaobserwowano w badanej populacji bliźniąt. Allel 23 występuje z częstością 0,001 w populacji polskiej.

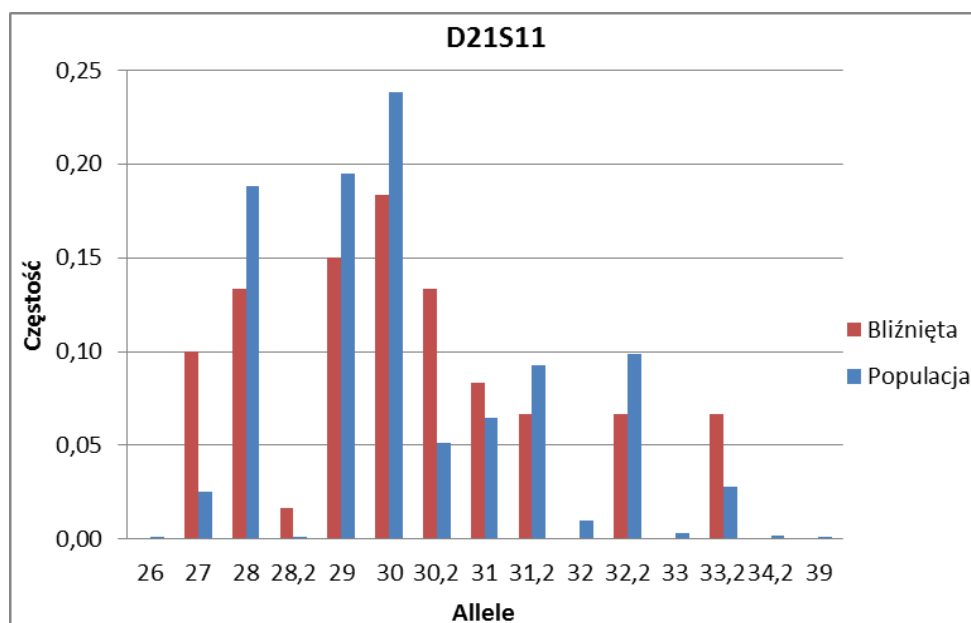
Dla markera *D3S1358* (złożone powtórzenie TCTA, 3p), analizę wykonano dla 15 par bliźniąt, uzyskując w porównaniu z populacją polską statystycznie istotne różnice w rozkładzie alleli ($\chi^2=14,796$, df 7, $p=0,0387$, test dwustronny). Rozkład częstości przedstawiono na ryc. 35.



Ryc. 35. Zestawienie częstości występowania alleli *D3S1358* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt odbiega statystycznie od rozkładu w populacji ($p=0,0387$). Allele 11, 13 i 19 nie występują w badanej populacji bliźniąt. Allel 11 w populacji polskiej występuje z częstością 0,001.

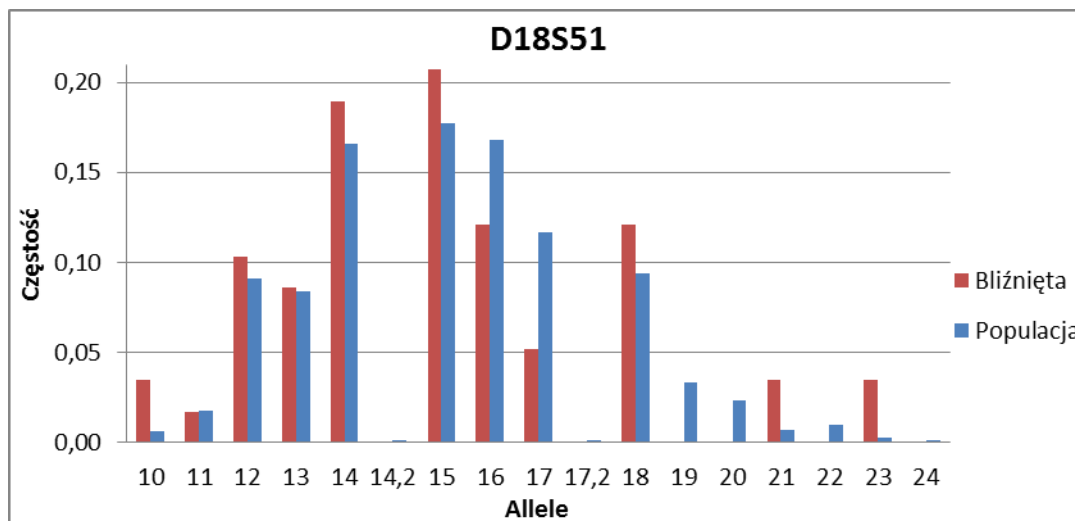
Analiza rozkładu częstości alleli *D21S11* (złożone powtórzenia TCTA, 21q11–21q21, *D21LOC*) dla 15 par bliźniąt, wskazuje na statystycznie istotne różnice w porównaniu z populacją polską ($\chi^2=73,679$, df 14, $p<0,0001$, test dwustronny). Rozkład częstości przedstawiono na ryc. 36.



Ryc. 36. Zestawienie częstości występowania alleli *D21S11* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt odbiega statystycznie od rozkładu w populacji ($p < 0,0001$). Alleli 26, 32, 33, 34,2 i 39 nie zaobserwowano w badanej populacji bliźniąt. Allele 26, 28,2 i 39 występują w populacji polskiej z częstością 0,001, a allel 34,2 z częstością 0,002.

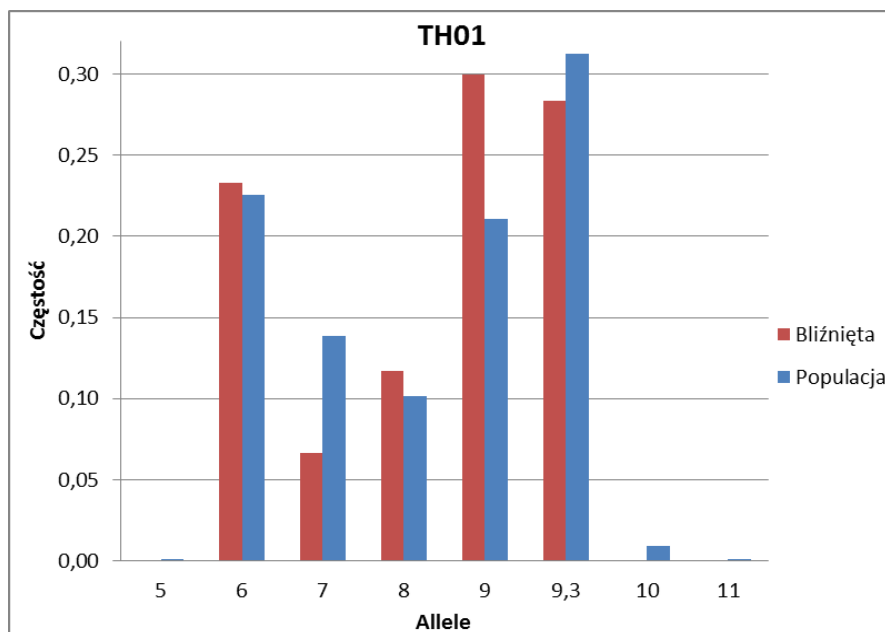
Dla markera *D18S51* obejmującego powtórzenie tetranukleotydu (AGAA, 18q21.3, *UT574*), analizując 15 par bliźniąt, uzyskano istotnie statystycznie różniący się rozkład częstości ($\chi^2=71,072$, df 16, $p < 0,0001$, test dwustronny). Częstości alleli *D18S51* przedstawiono na ryc. 37.



Ryc. 37. Zestawienie częstości występowania alleli *D18S51* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt odbiega statystycznie od rozkładu w populacji ($p < 0,0001$). Alleli 14,2; 17,2; 19; 20; 22 i 24 nie zaobserwowano w badanej populacji bliźniąt. Allele 14,2; 17,2 oraz 24 występują w populacji polskiej z częstością 0,001.

Analizę markera *TH01* (AATG, *TH01*, 11p15.5), przeprowadzono dla 15 par bliźniąt, uzyskując nieistotny statystycznie wynik rozkładu częstości alleli ($\chi^2=9,152$, df 7, $p=0,2420$, test dwustronny). Częstości *TH01* przedstawiono na ryc. 38.



Ryc. 38. Zestawienie częstości występowania alleli *TH01* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt nie odbiega statystycznie od rozkładu w populacji polskiej ($p=0,2420$). U bliźniąt nie występują allele 5, 10 i 11. Allele 5 i 11 występują w populacji polskiej z częstością 0,0013 i 0,0009.

Poniżej w tabeli 11. przedstawiono przykładowe wyniki uzyskane dla bliźniąt jednozygotycznych oraz bliźniąt dwuzzygotycznych.

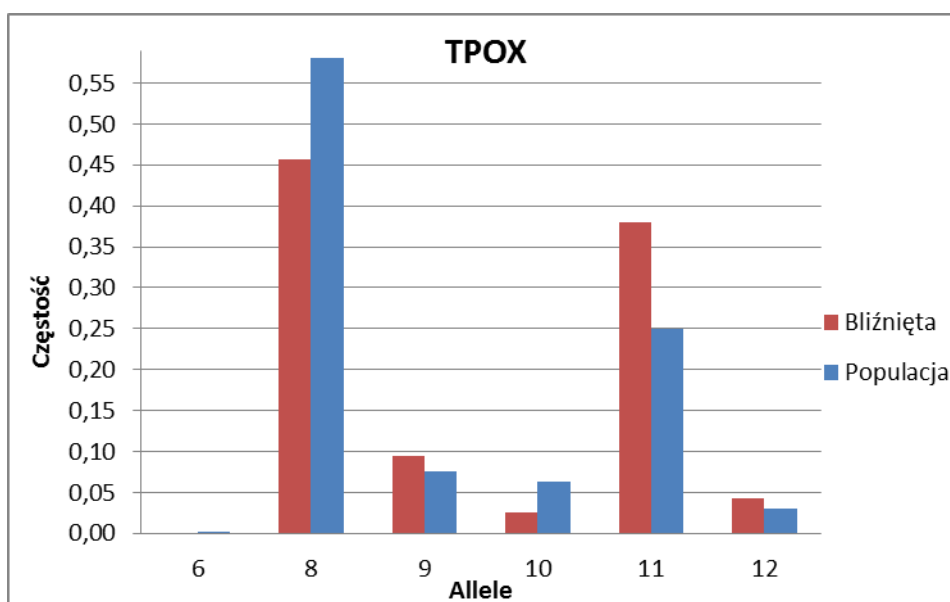
Tabela 11. Zestawienie przykładowych wyników analizy PowerPlex 16 dla bliźniąt. AMG – amelogenina. Pogrubiono allele umożliwiające rozróżnienie bliźniąt dwuzygotycznych.

Nr	Nr DNA	Zygotycz- ność	AMG	vWA	D8S1179	TPOX	FGA	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	PentaE	D5S818	D13S317	D7S820	DI6S539	CSF1PO	PentaD
1.	239a	DZ	XX	16-17	12-15	8-12	21-24	14-17	6-9,3	29-30	13-14	5-17	11-11	8-11	8-9	9-11	11-11	10-12
2.	239b	DZ	XX	16-17	12-15	12-12	22-24	14-17	6-9,3	27-29	13-14	10-12	11-11	8-12	10-10	9-11	11-11	10-12
3.	242a	DZ	XX	16-18	13-15	8-11	20-22	16-16	9-9,3	28-30,2	12-18	12-14	12-12	9-13	11-14	12-14	10-11	9-14
4.	242b	DZ	XX	16-18	13-14	8-11	22-24	14-18	6-9	28-30,2	12-15	12-14	12-12	11-13	10-11	11-11	10-11	9-12
5.	231a	MZ	XX	15-18	14-14	11-11	22-25	18-18	9-9,3	27-30	14-15	7-10	11-12	9-9	10-11	9-13	10-11	10-13
6.	231b	MZ	XX	15-18	14-14	11-11	22-25	18-18	9-9,3	27-30	14-15	7-10	11-12	9-9	10-11	9-13	10-11	10-13
7.	232a	MZ	XY	17-18	14-15	11-11	23-24	15-16	8-9,3	30,2-33,2	15-15	11-17	11-12	11-12	11-11	11-12	12-13	9-12
8.	232b	MZ	XY	17-18	14-15	11-11	23-24	15-16	8-9,3	30,2-33,2	15-15	11-17	11-12	11-12	11-11	11-12	12-13	9-12

4.3.4. Porównanie wyników uzyskanych różnymi metodami

W analizach przeprowadzono jednoczesne badanie czynnika von Willebrandta i hydroksylazy tyrozynowej z zastosowaniem tradycyjnej reakcji PCR (*vWF* i *TH01*) oraz w ramach reakcji multipleks w zestawie *PowerPlex 16* (*vWA* i *TH01*) dla pięciu par bliźniąt, nie wykazując rozbieżności w uzyskanych wynikach.

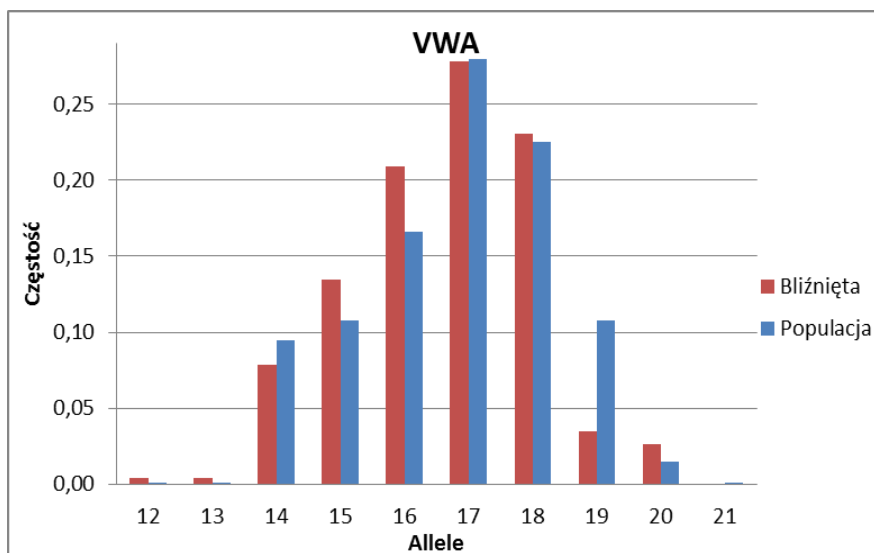
Z kolei połączona analiza danych dla bliźniąt z badań typu *PowerPlex 16* i PCR pozwoliła uzyskać wyniki dla markera *TPOX* dla 29 par bliźniąt. Wynik rozkładu częstości u bliźniąt był istotny statystycznie ($\chi^2=12,622$, df 5, $p=0,0272$, test dwustronny). Rozkład częstości alleli *TPOX* w populacji bliźniąt dla obydwu typów analiz przedstawiono na ryc. 39. Wyniki potwierdzają statystyczne różnice między populacją bliźniąt a populacją polską (Czarny i wsp., 2005).



Ryc. 39. Zestawienie częstości występowania alleli *TPOX* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt odbiega statystycznie od rozkładu w populacji polskiej ($p=0,0272$). U bliźniąt nie występuje allel 6, który w populacji polskiej występuje z częstością 0,001.

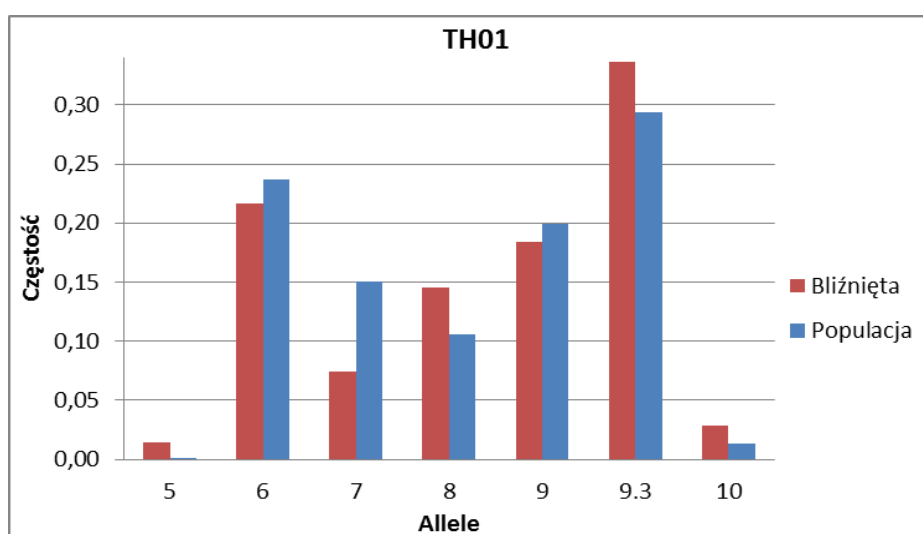
Podobna sytuacja wystąpiła w przypadku powtórzeń związanych z czynnikiem von Willebrandta, analizowanych metodami pojedynczej reakcji PCR (*vWF*) i reakcji *PowerPlex 16* (*vWA*). Analizie poddano łącznie 57 par bliźniąt, a uzyskane wyniki potwierdzają brak statystycznie istotnej różnicy między populacją bliźniąt a populacją polską ($\chi^2=10,132$, df 9, $p=0,3399$, test dwustronny). Rozkład częstości przedstawiono na ryc.40.



Ryc. 40. Zestawienie częstości występowania alleli *vWA* w badanej populacji bliźniąt w porównaniu z populacją polską.

Rozkład częstości u bliźniąt nie odbiega statystycznie od rozkładu w populacji polskiej ($p=0,3399$). U bliźniąt nie występuje allel 21, a populacji polskiej allele 12, 13 i 21 występują z częstością 0,001.

W przypadku powtórzeń związanych z markerem *TH01* (ryc. 41), badanych metodami pojedynczej reakcji PCR i reakcji *PowerPlex 16* analizie poddano łącznie 70 par bliźniąt, a uzyskane wyniki potwierdzają statystycznie istotne różnice między populacją bliźniąt a populacją polską ($\chi^2=25,437$, df 6, $p=0,0003$, test dwustronny), podobnie jak dla bliźniąt badanych z zastosowaniem pojedynczej reakcji PCR. Z kolei analiza alleli uzyskanych tylko w reakcji *PowerPlex 16* nie wykazywała istotności statystycznej.



Ryc. 41. Zestawienie częstości występowania alleli *TH01* w badanej populacji bliźniąt uzyskanych z wykorzystaniem tradycyjnej reakcji PCR i PCR typu multiplex w porównaniu z populacją polską.

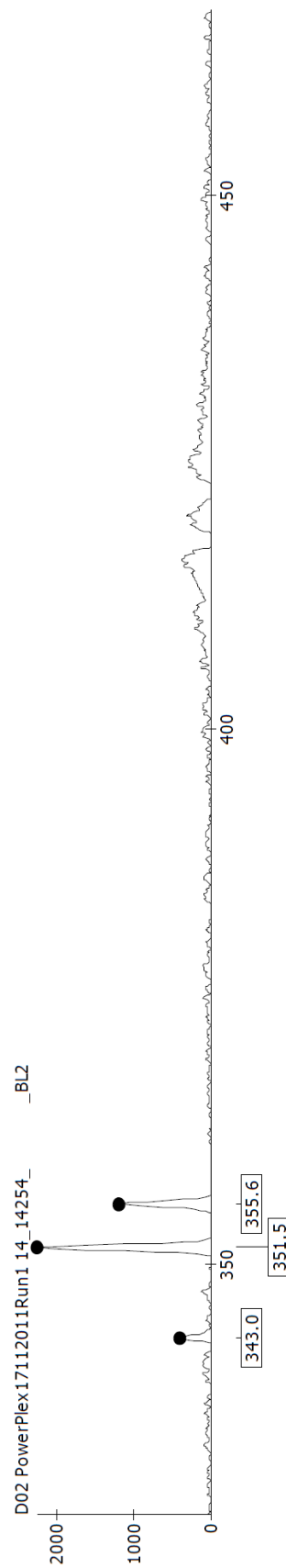
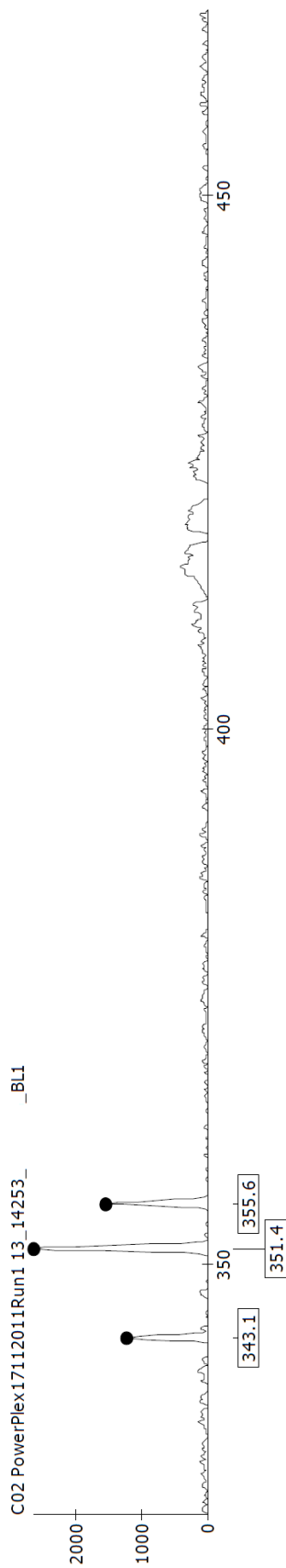
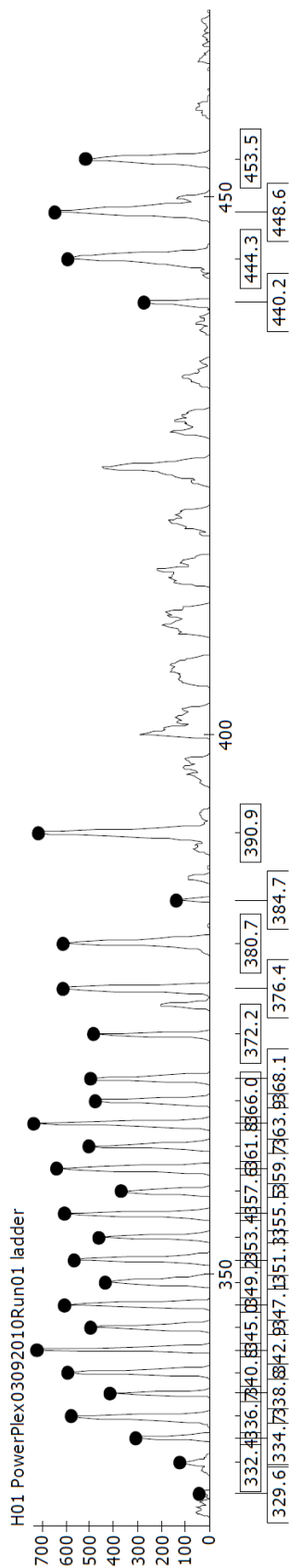
Rozkład częstości u bliźniąt odbiega statystycznie od rozkładu w populacji ($p=0,0003$). Allel 5 w populacji polskiej występuje z częstością 0,001.

4.4. Przypadki chimeryzmu u bliźniąt jednozygotycznych

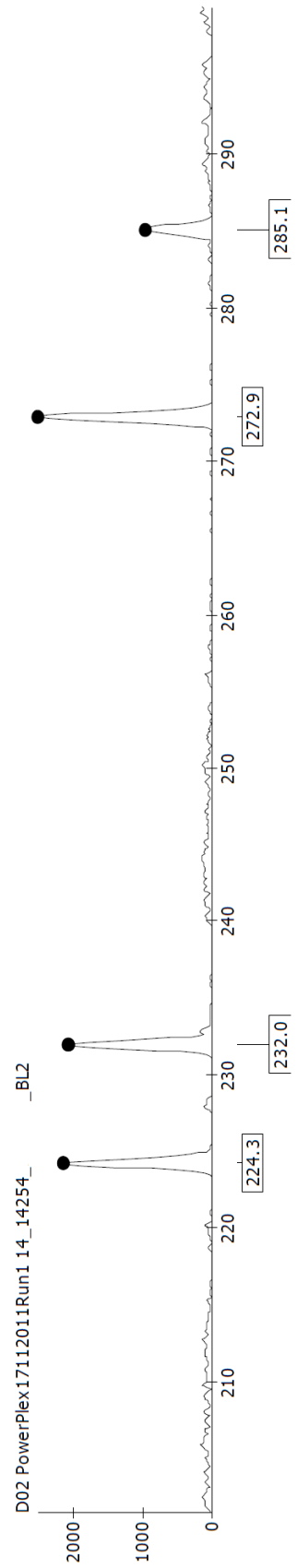
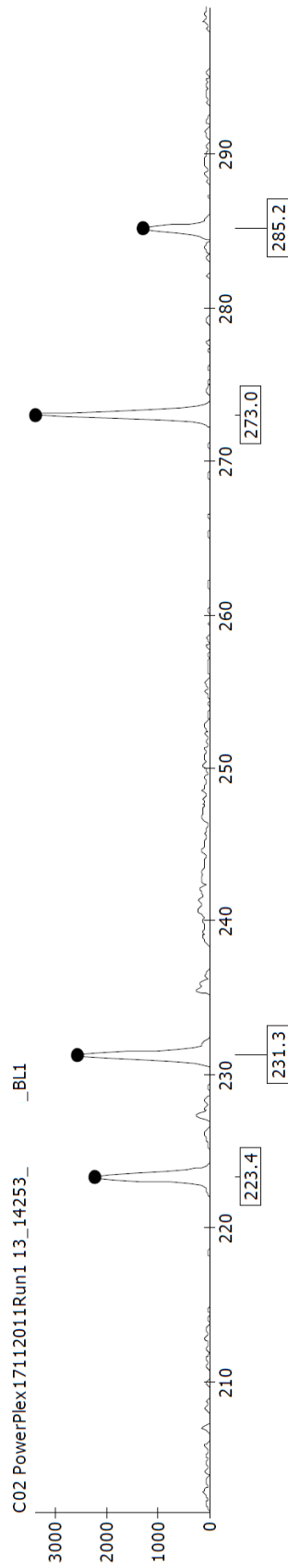
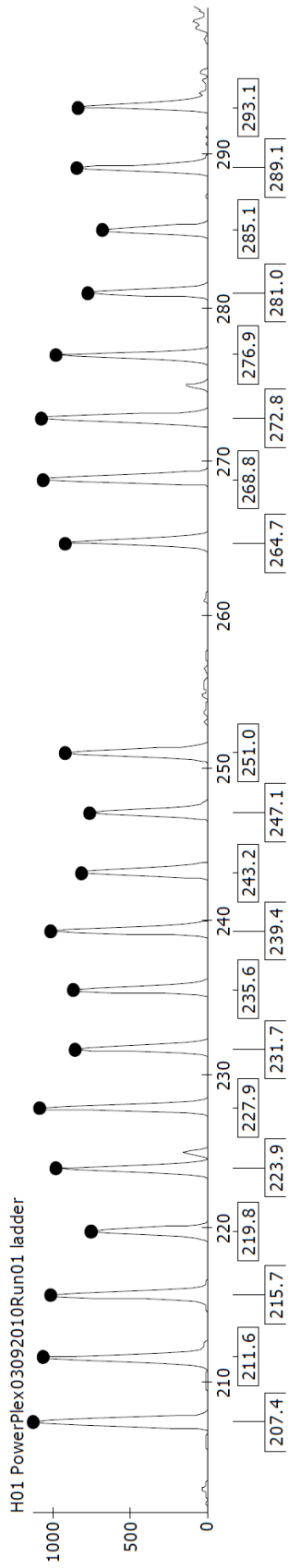
Podczas określania zygotyczności bliźniąt, u kilku par bliźniąt jednozygotycznych wykazano obecność dodatkowych fragmentów DNA. Wyniki otrzymane z wcześniejszych analiz hybrydizacyjnych świadczą o znacznym udziale dodatkowego materiału genetycznego. Zaistniałe zjawisko najprościej można wytłumaczyć transfuzją krwi i komórek macierzystych bliźniąt poprzez anastomozy obecne w łożysku, co doprowadziło do wystąpienia pseudomozaicyzmu (ang. *pseudomosaicism*) lub chimeryzmu, tzn. przeniesienia komórek macierzystych współbliźniaka do komórek szpiku podczas rozwoju zarodkowego. Wyjaśnienie to nie może być jednak w pełni satysfakcjonujące wobec domniemanej identyczności genetycznej bliźniąt. Jednoznaczne rozstrzygnięcie etiologii obecności dodatkowego materiału genetycznego u trzech par bliźniąt będzie możliwe dopiero po wykonaniu badań molekularnych nie tylko na DNA wyizolowanym z leukocytów, lecz również z innych tkanek. Badaniami powinni zostać objęte zarówno dzieci, jak i ich rodzice.

Wykonując analizy, których celem było rozstrzygnięcie zygotyczności bliźniąt, u trzech par bliźniąt jednozygotycznych stwierdzono obecność dodatkowych fragmentów DNA w leukocytach krwi obwodowej. Na ryc. 42 (str. 131-143) przedstawiono rozdział elektroforetyczny produktów reakcji multipleks PCR z wykorzystaniem zestawu *PowerPlex 16* dla pary bliźniąt. Bliźnięta wykazują obecność dodatkowych alleli dla siedmiu loci *vWA*, *FGA*, *D13S317*, *D7S820*, *CSF1PO*, *Penta D* oraz *D21S11*. Wiarygodność uzyskanych wyników została potwierdzona przez dwukrotne powtórzenie analizy. Na podstawie analizy *multi locus* omawiane pary bliźniąt uznano za jednozygotyczne.

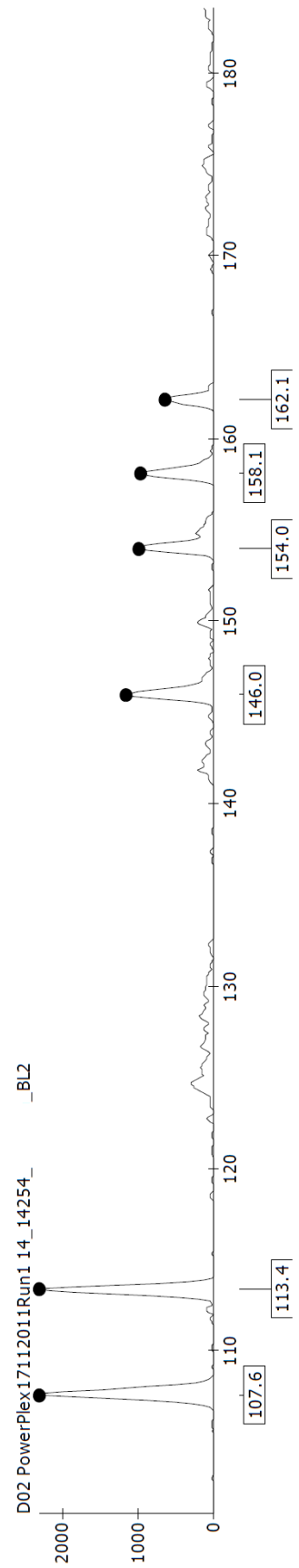
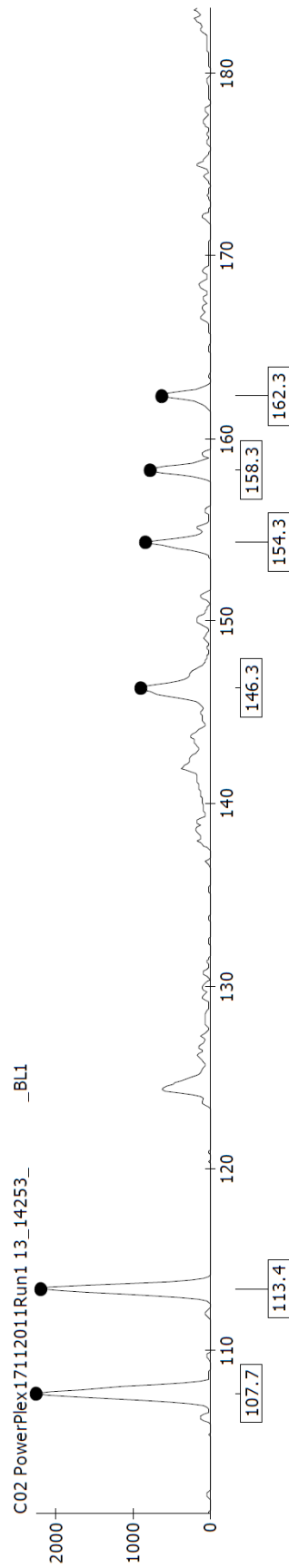
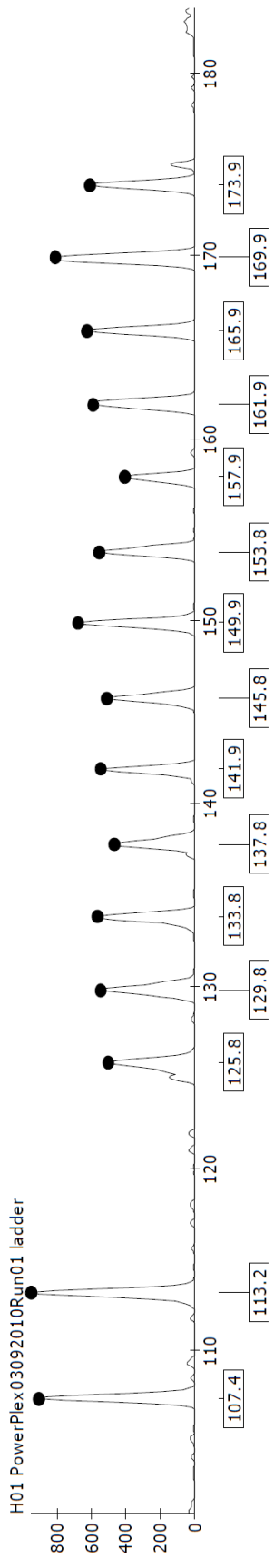
Marker FGA



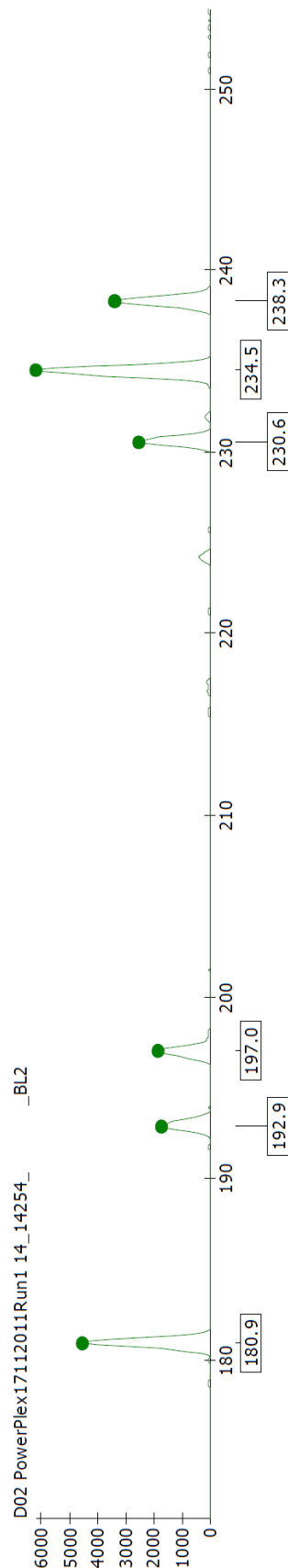
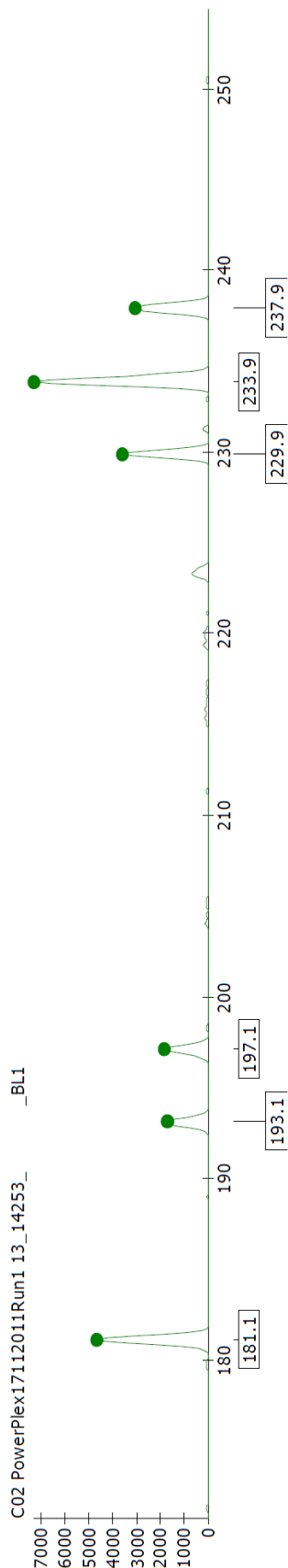
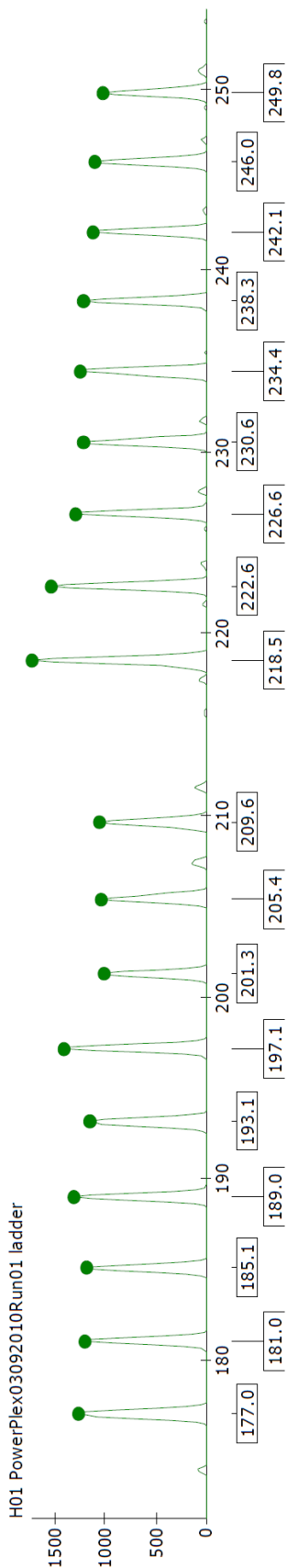
Marker D8S1179 i TPOX



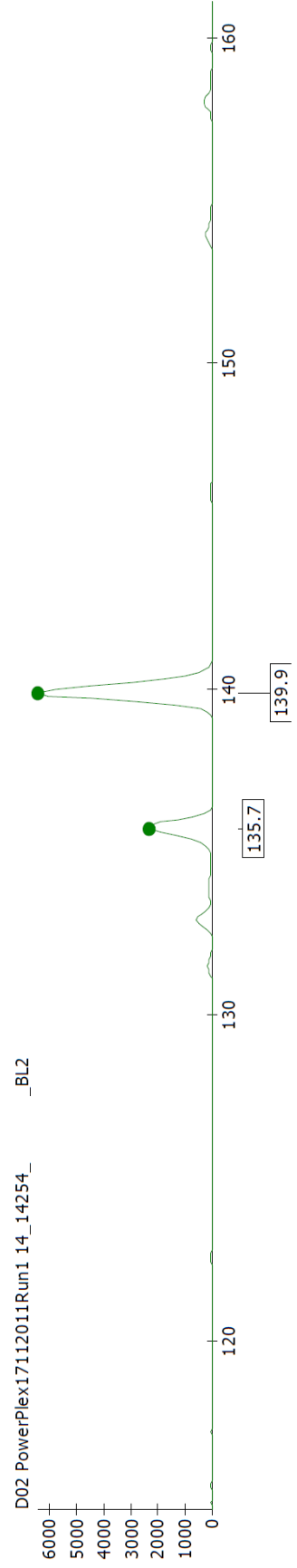
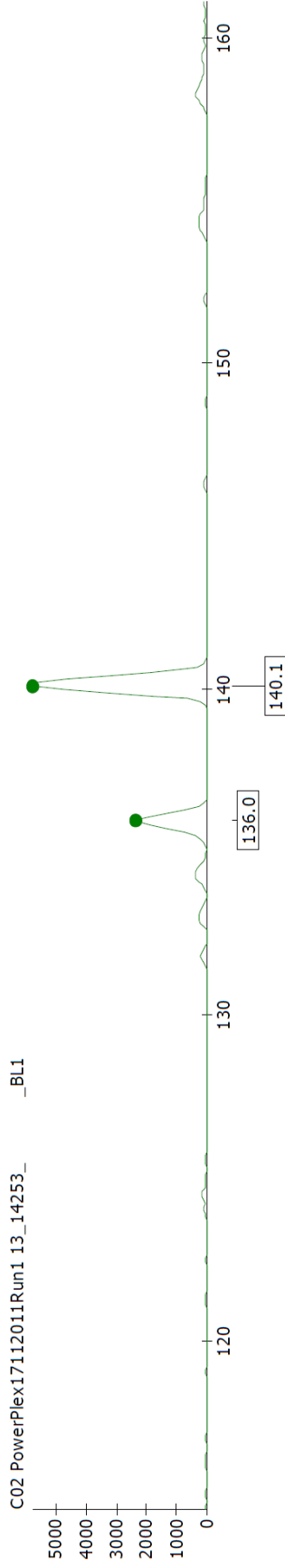
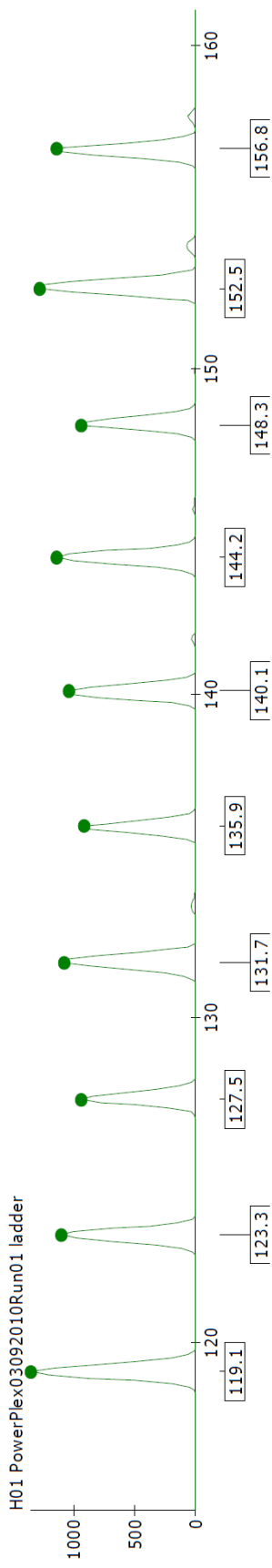
Marker Amelo i vWA



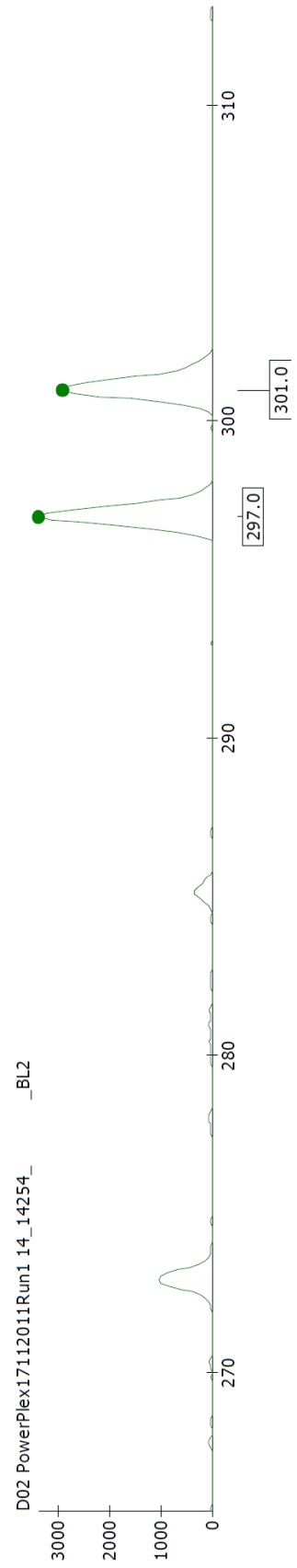
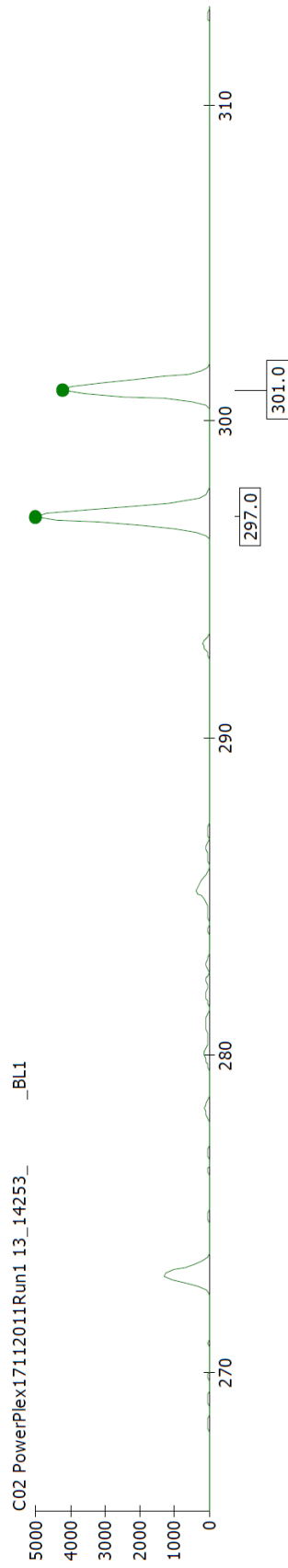
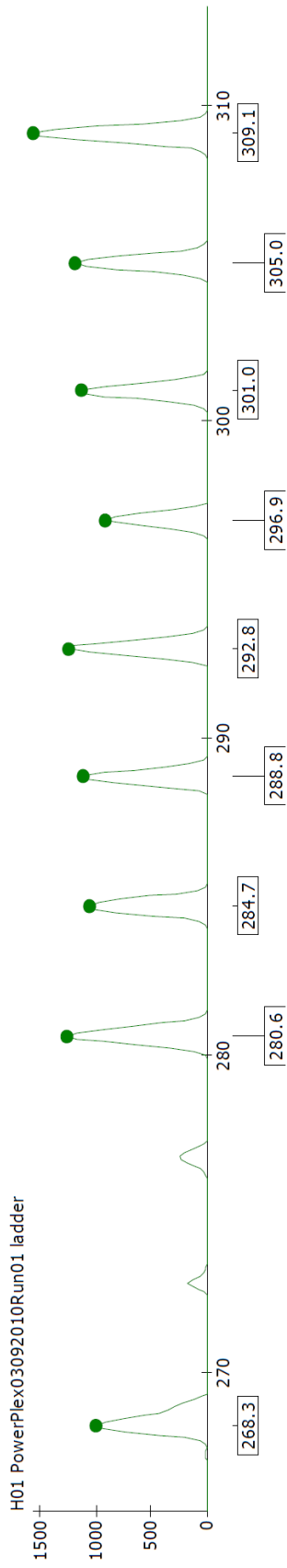
Marker D13S317 i D7S820



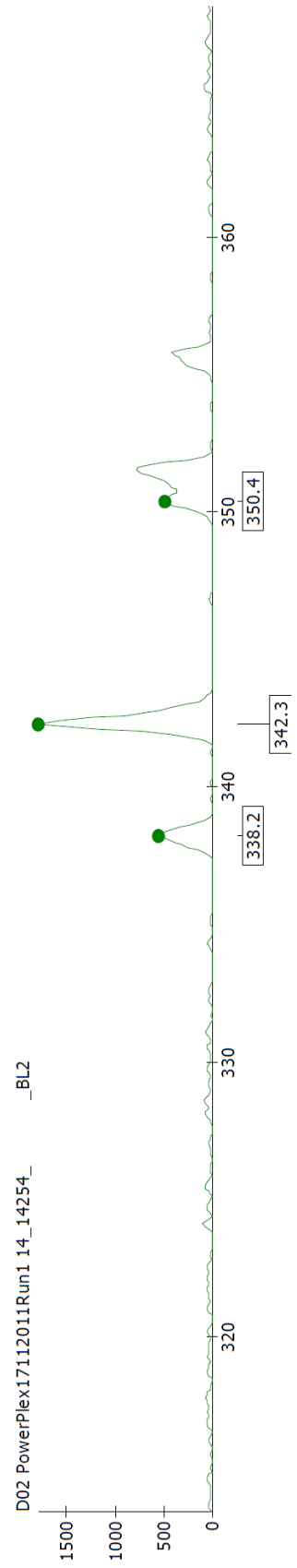
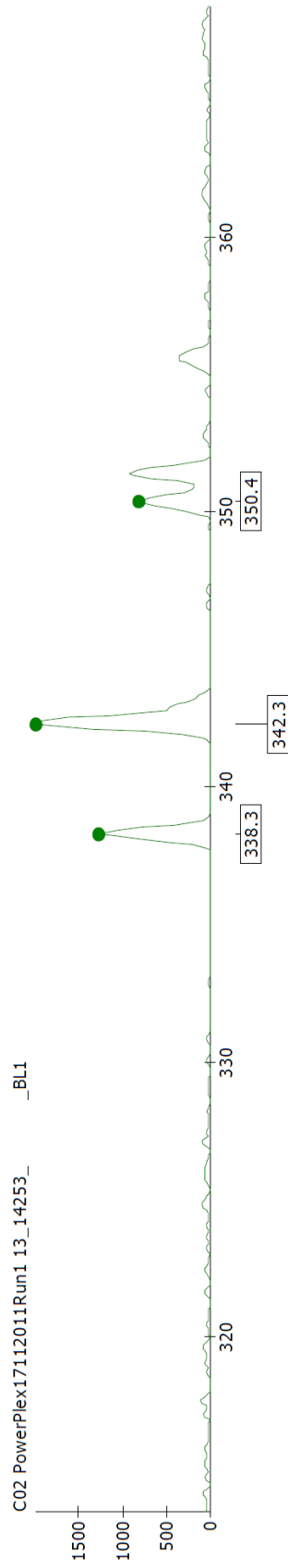
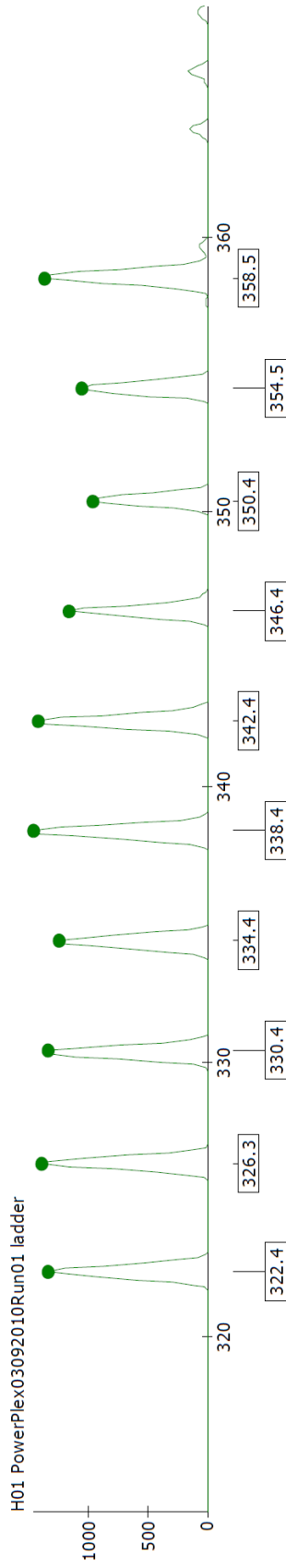
Marker D5S818



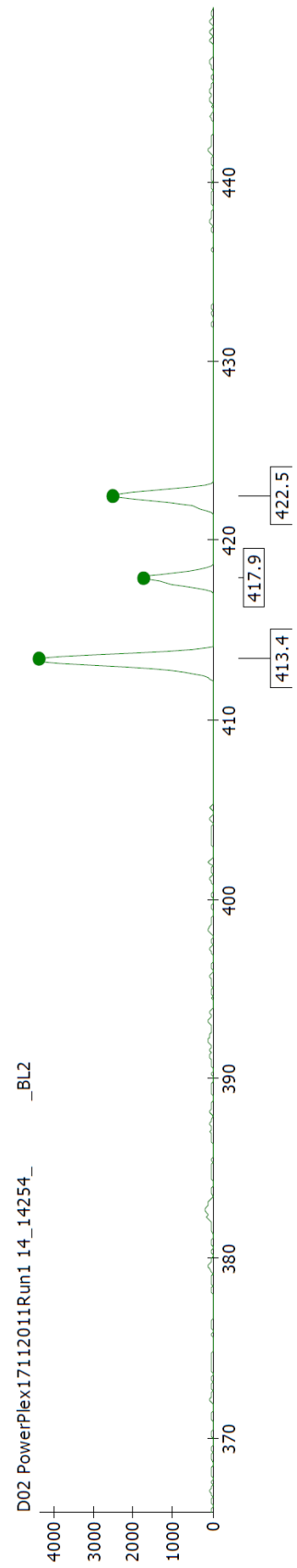
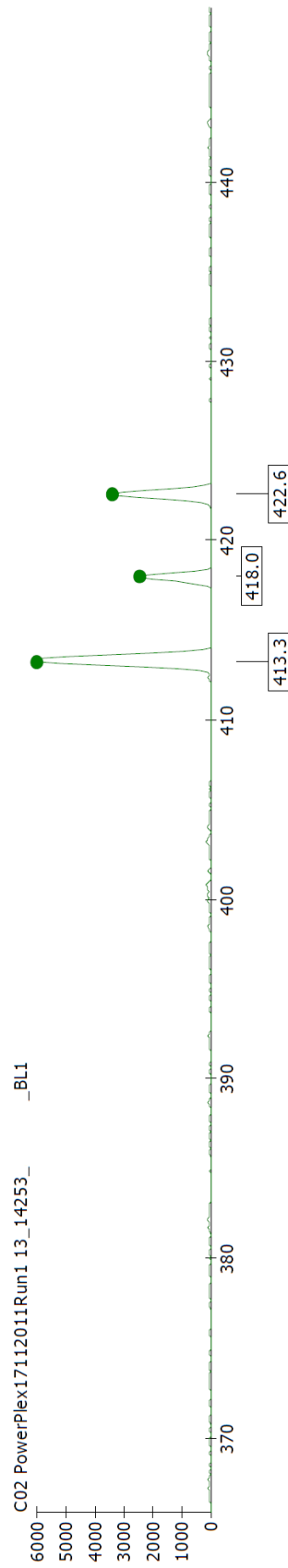
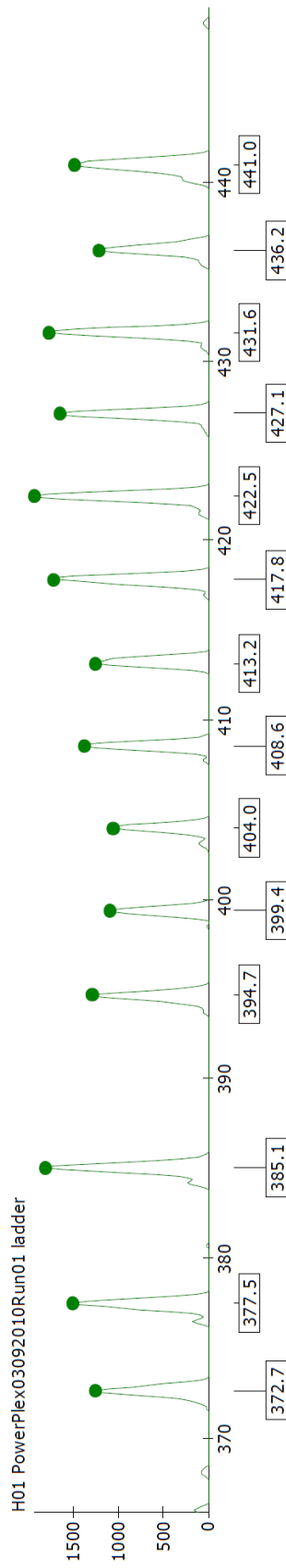
Marker DI6S539



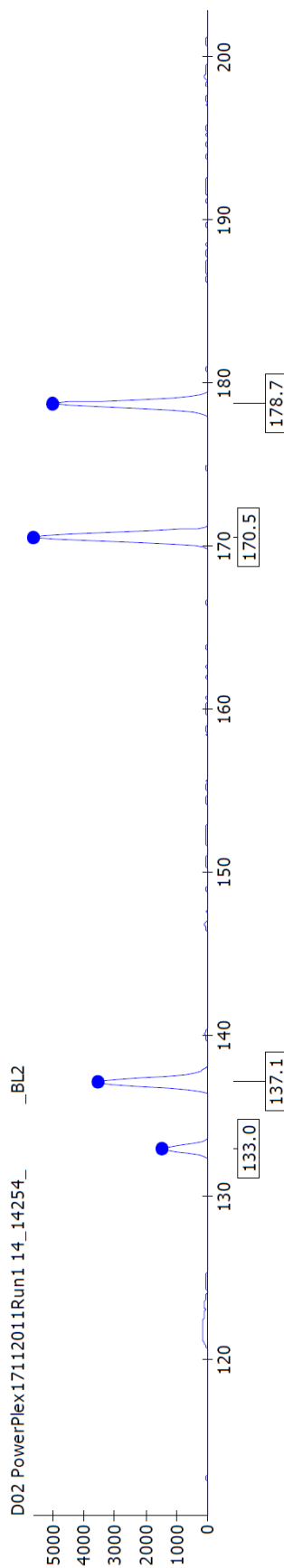
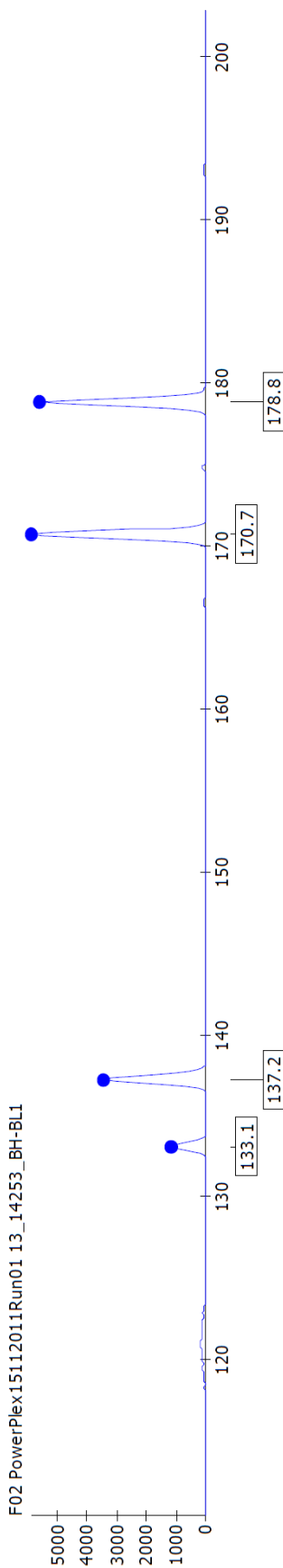
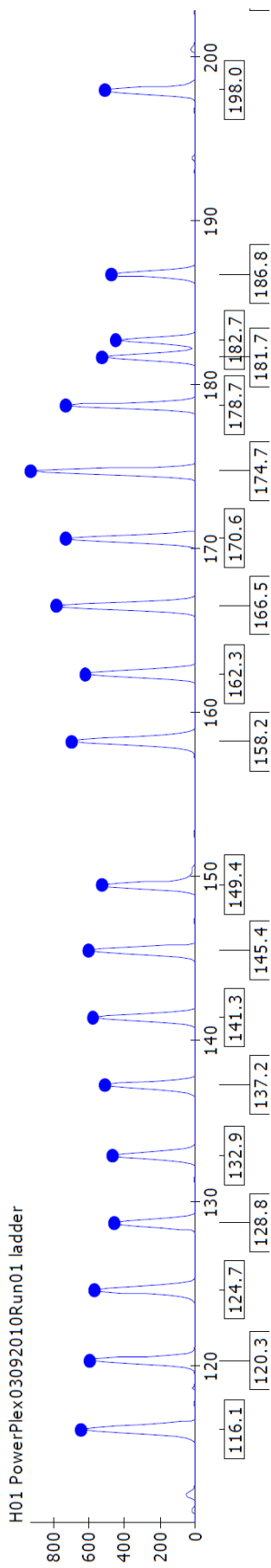
Marker CSF1PO



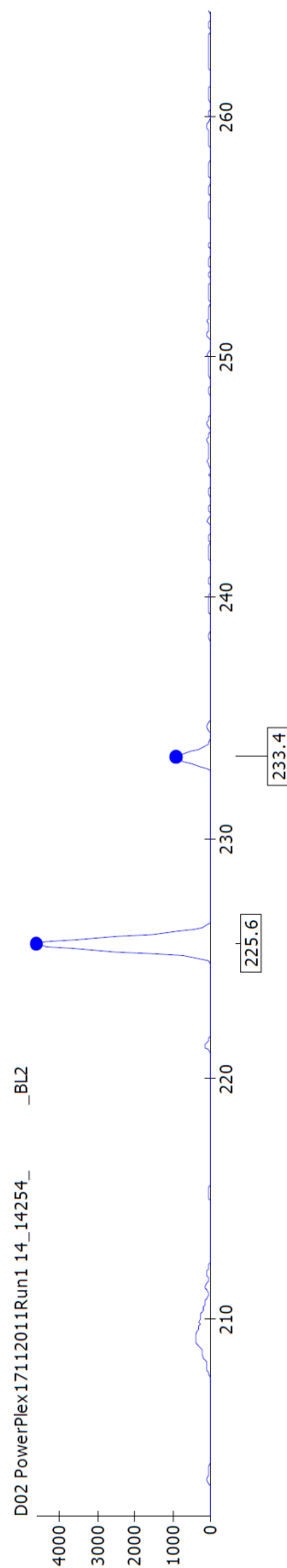
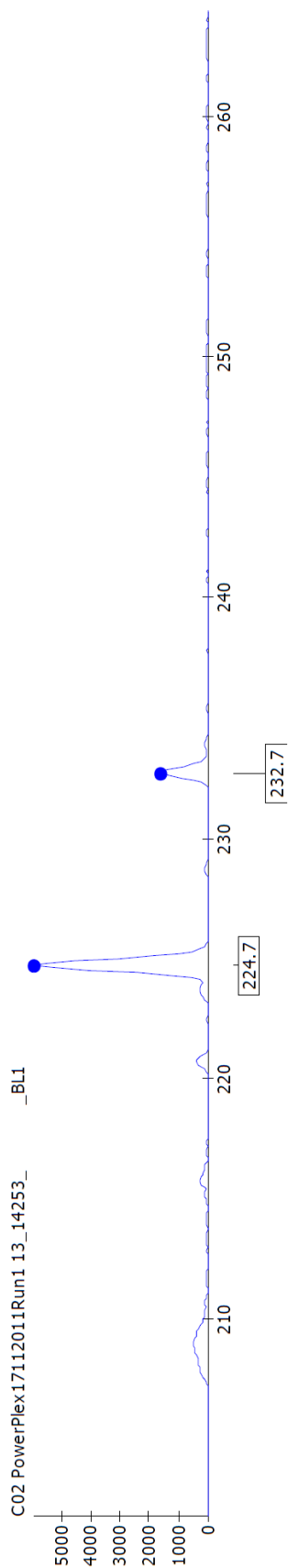
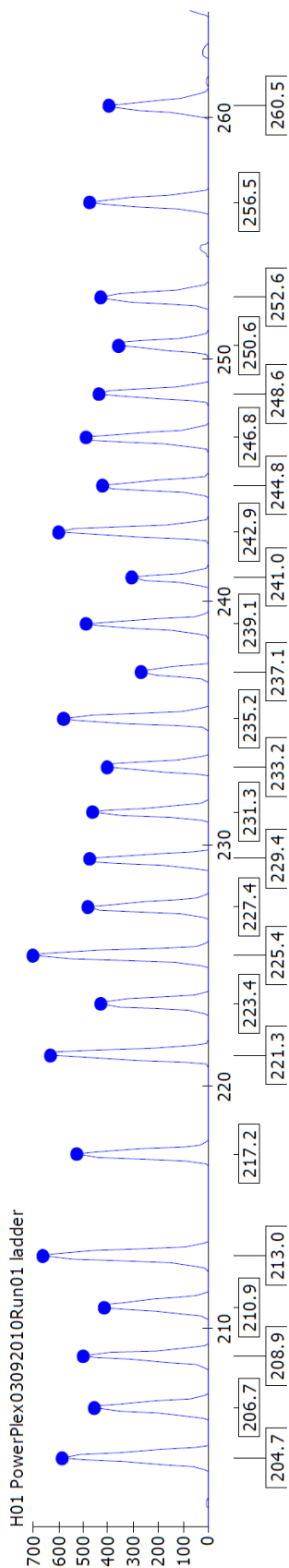
Marker Penta D



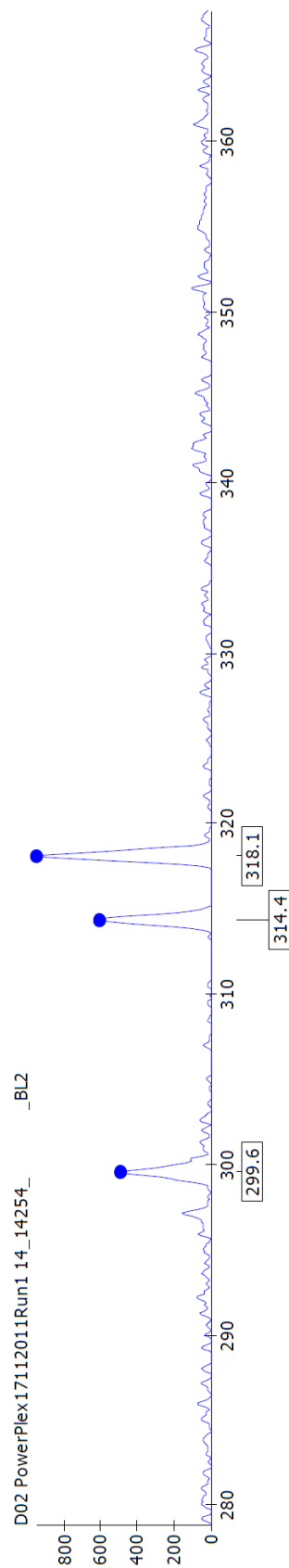
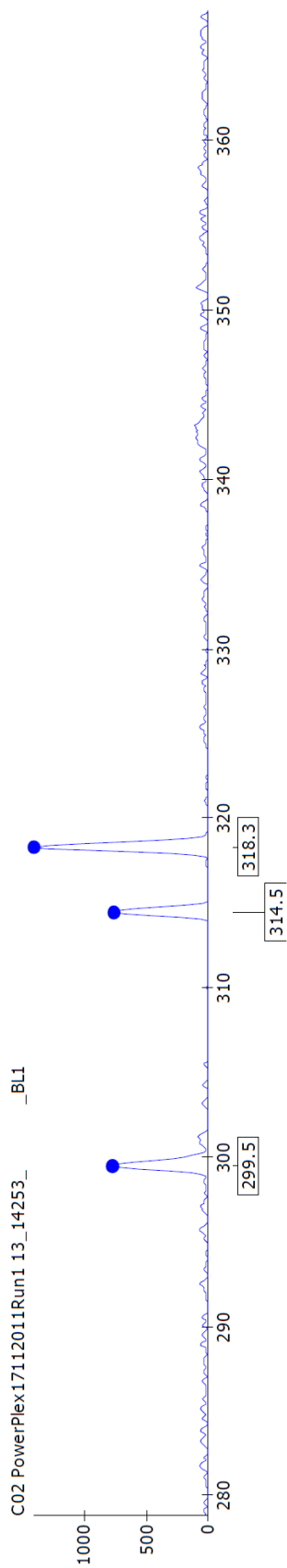
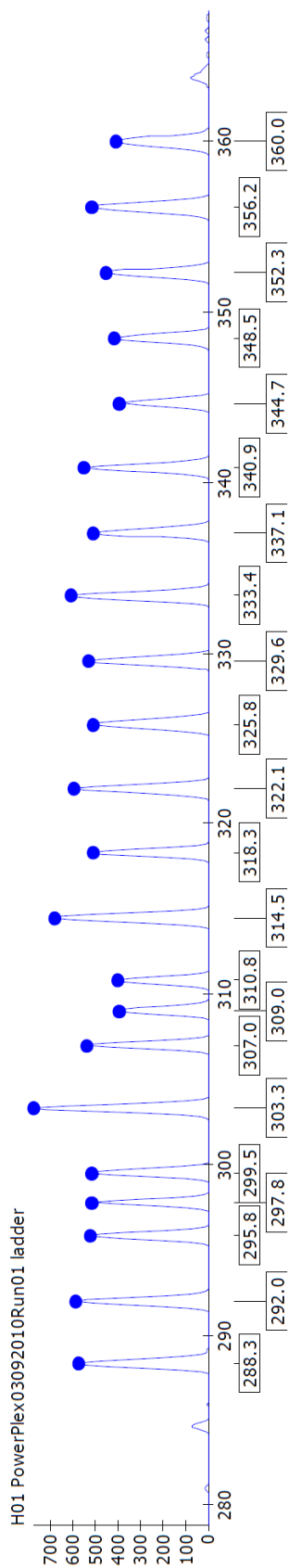
Marker D3S1358 i TH01

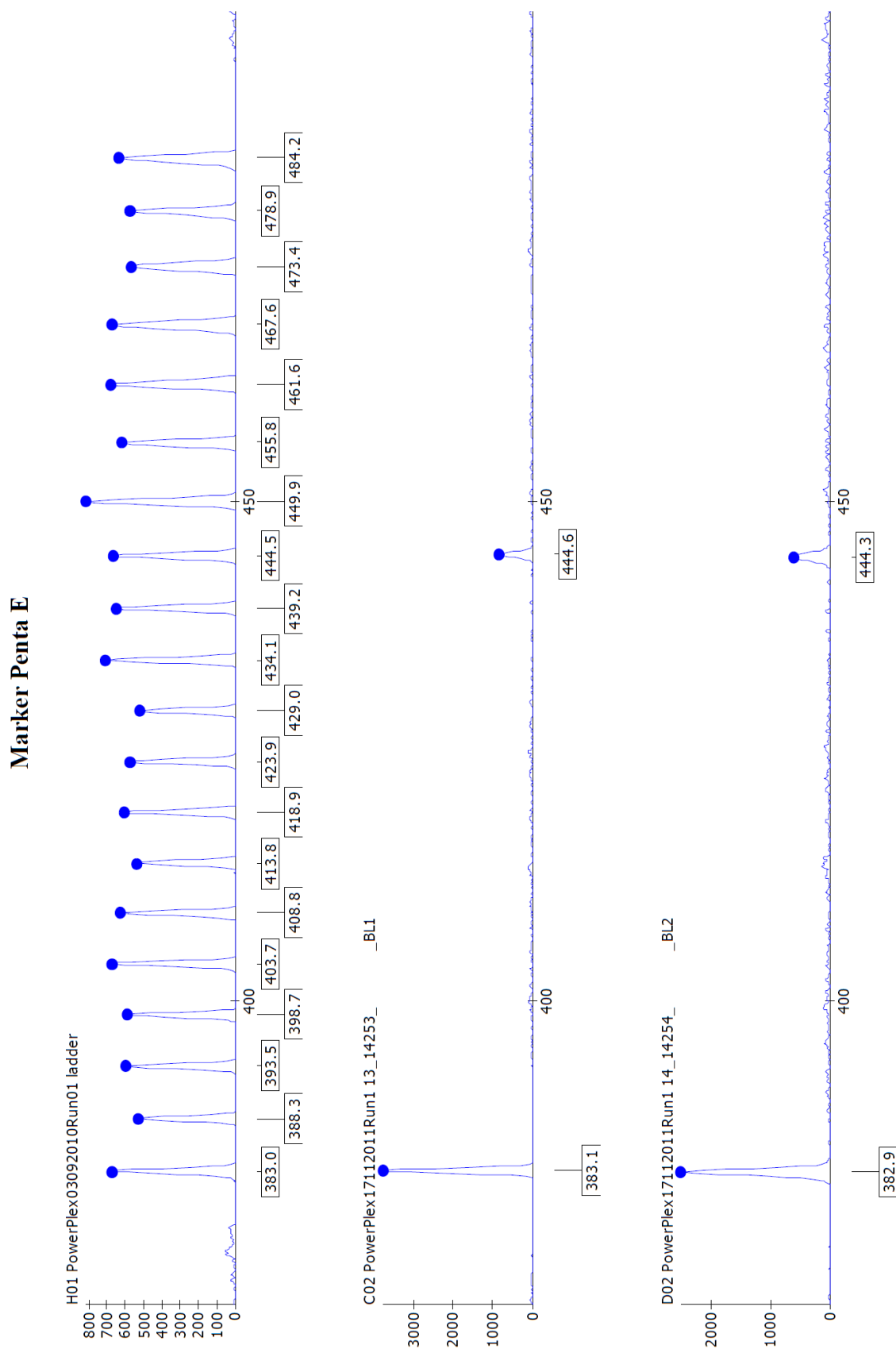


Marker D21S11



Marker D18S51





Ryc. 42. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźniąt z chimeryzmem krwi z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*.

Rycina przedstawia rozdział na sekwenatorze kapilarnym *locus* amelogeniny umożliwiające określenie płci (XY, płć męska) oraz polimorficznych fragmentów *loci* *vWA*, *D8S1179*, *TPOX*,

FGA, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, D3S1358, TH01, D21S11, D21S11 oraz *Penta E*. Bliźnięta wykazują obecność dodatkowych alleli dla *locus vWA* (4 allele, 15, 17, 18, 19) oraz po 3 allele dla *loci FGA* (20, 22 i 23), *D13S317* (8, 11 i 12), *D7S820* (9, 10 i 11), *CSF1PO* (10, 11 i 13), *Penta D* (11, 12 i 13) oraz *D21S11* (11, 15 i 16). Dla *locus D16S539* występują allele 12 i 13, dla *locus D21S11* allele 29 i 31, dla *locus D3S1358* allele 16 i 17, dla *locus TH01* allele 7 i 9, dla *locus D5S818* allele 11 i 12, dla *locus D8S1179* allele 11 i 13, dla *locus TPOX* allele 8 i 11, a dla *locus Penta E* allele 5 i 17. Bliźnięta jednozygotyczne.

5. DYSKUSJA

Materiał biologiczny pochodzący od bliźniąt jest materiałem trudnym do zebrania. Wynika to z faktu, że narodziny bliźniąt są dużym wydarzeniem dla rodziców i sprawa wykorzystania ich materiału genetycznego do badań naukowych schodzi na dalszy plan, a do przeprowadzenia badań potrzebna jest ich zgoda. Najlepszym materiałem wyjściowym do wykonania badań genetycznych pozostaje nadal krew obwodowa lub pępowinowa, nie korzystano z wymazów z jamy ustnej ze względu na możliwość wystąpienia błędu. Dla wykonania badań stosowano próbki DNA pochodzące z kilku źródeł, przy czym główny materiał pochodził z Laboratorium Genetyki Molekularnej prof. Ryszarda Słomskiego, w którym zgromadzono ponad 17 000 próbek DNA, w tym wiele od bliźniąt. Do badań pozyskiwano również materiał biologiczny od bliźniąt urodzonych w Ginekologiczno-Położniczym Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Oddziale Położniczo-Ginekologicznym Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego im. Ludwika Perzyny w Kaliszu.

Krew jest najlepszym materiałem wyjściowym do analiz genetycznych i na pewno długo takim pozostanie. Badaniu może podlegać zarówno jądrowy jak i mitochondrialny DNA, w rozprawie doktorskiej oparto się na procedurach analiz DNA opisanych w książce *Analiza DNA – Teoria i Praktyka* (Słomski, 2008). W grupie badawczej prof. Słomskiego badania DNA są wykonywane w sposób rutynowy od 40 lat, wszystkie procedury są zweryfikowane w praktyce, dlatego w niniejszej rozprawie nie podejmowano innych rozwiązań w postaci komercyjnych zestawów do izolacji DNA czy też podstawowej reakcji PCR. Jedynym wyjątkiem jest stosowanie zestawu *PowerPlex 16* do amplifikacji 16 *loci* i ten zestaw stosowano zgodnie z zaleceniami producenta, ponieważ został w pełni zwalidowany. Wszystkie preparaty DNA stosowane w badaniach zostały ocenione pod względem ilościowym i jakościowym (Słomski, 2008).

W różnych okresach realizacji rozprawy do ustalenia zygotywności bliźniąt stosowano różne metody, co wynikało z dostępności odczynników do badań jak i kosztocłonności. Do dyspozycji miałem metodę hybrydyzacji z sondą molekularną typu *multi locus*, metodę hybrydyzacji z dwoma sondami molekularnymi do badań pojedynczego *locus* – MS31 i MS43A, metodę PCR dla pojedynczego *locus* oraz metodę PCR do jednoczesnego badania 16 *loci*. Po uzyskaniu finansowania w postaci projektu badawczego ujednolicono wszystkie badania i wykonywano je z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*.

Badania hybrydyzacyjne zostały przeprowadzone łącznie dla 170 par bliźniąt, przy czym analiza odcisku genetycznego z zastosowaniem sondy GTG pozwoliła na dokładną identyfikację 87 par bliźniąt dwuzygotycznych i 83 par bliźniąt jednozygotycznych.

W badaniach z zastosowaniem reakcji PCR można wyróżnić w pracy dwa etapy. W pierwszym, dotyczącym *PLA2A1*, *CYARO*, *vWF*, *TPOX* i *TH01* amplifikowano pojedyncze *loci*, a w drugim po uzyskaniu finansowania w postaci grantu badawczego analizy mogły być wykonane z zastosowaniem zestawu *PowerPlex* dla 16 *loci*. Realizując te dwa etapy do rozdziału fragmentów PCR stosowano aparaturę z czytnikami laserowymi celem zwiększenia dokładności odczytu – sekwenator płytowy ALFExpress i sekwenator kapilarny MEGABace. Zastosowana aparatura umożliwiła identyfikację poszczególnych alleli, a zatem możliwe było wykorzystanie wszystkich wyników do oceny częstości występowania poszczególnych alleli.

5.1. Znaczenie badań zygotyczności

Badania bliźniąt dla potrzeb genetycznych prowadzone są od końca XIX w. (Zwijnenburg i wsp., 2010). W klasycznych badaniach bliźniąt, porównanie podobieństwa bliźniąt jednozygotycznych i dwuzygotycznych pod względem występowania choroby lub cech ilościowych ułatwia badania nad etiologią zmienności populacji. Bliźnięta jednozygotyczne wykazują znaczące podobieństwo w zachowaniu, zdrowiu i chorobie, do niedawna nazywane były bliźniętami genetycznie identycznymi. Obecnie pojawiają się coraz częściej dowody na występowanie różnic genetycznych i epigenetycznych w parach bliźniąt. Zwijnenburg i współpracownicy w 2010 r. opracowali dostępne w bazach danych *Web of Science* oraz *PubMed* informacje obejmujące 2016 publikacji i 439 raportów, zwracając uwagę na zmienność ekspresji fenotypowej, mechanizmów patogenetycznych, epigenetyki i mutacji postzygotycznych jako modeli badań defektów genetycznych.

Zygotyczność bliźniąt tej samej płci określano początkowo głównie na podstawie badań grup krwi, typowania głównego układu zgodności tkankowej człowieka, badań dermatoglifów i porównania cech fizycznych, obecnie stosowana jest głównie analiza polimorfizmów DNA, obejmujących markery satelitarne jak również analizę polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP). Z kolei w szeroko zakrojonych badaniach epidemiologicznych zygotyczność często ocenia się na podstawie zestawu odpowiednio dobranych pytań. Prawidłowe określenie zygotyczności ma olbrzymie znaczenie w poradnictwie genetycznym, w stosowaniu zapobiegawczych terapii czy opieki,

gdy u jednego z bliźniąt wystąpiła choroba. Nie bez znaczenia jest także możliwość przeprowadzenia dokładnych badań dla potrzeb transplantologii (Zwijnenburg i wsp., 2010).

Przyjmuje się, że dwie trzecie ciąży bliźniaczych stanowią bliźnięta dwuzygotyczne, wszystkie bliźnięta dwuzygotyczne są dwukosmówkowe. Z kolei bliźnięta jednozygotyczne mogą być jednokosmówkowe lub dwukosmówkowe, w zależności od czasu podziału mitotycznego po zapłodnieniu jednej komórki jajowej. Około 30% jednozygotycznych bliźniąt jest dwukosmówkowych, wszystkie bliźnięta jednokosmówkowe oraz 10% z dwukosmówkowym łożyskiem są jednozygotyczne (Carroll i wsp., 2005). Wiele badań wskazuje na większy wpływ kosmówkowości niż zygotywności na przebieg porodu i stan zdrowia bliźniąt, co w dużym stopniu związane jest z komplikacjami wynikającymi z występowania anastomoz naczyniowych u jednokosmówkowych bliźniąt jednozygotycznych. W przypadkach tych obserwuje się niższą masę urodzeniową oraz większe zróżnicowanie masy urodzeniowej u ponad 25% ciąży jednokosmówkowych. Takich różnic z kolei nie obserwowano w grupach bliźniąt jednozygotycznych dwukosmówkowych oraz bliźniąt dwuzygotycznych (Carroll i wsp., 2005).

Do określenia zygotywności bliźniąt od wielu lat wykorzystywana jest analiza grup krwi, lecz w niektórych przypadkach może prowadzić do nieprawidłowej klasyfikacji, ponadto nie wszystkie układy grupowe antygenów krwi podlegają wystarczającej ekspresji na wszystkich komórkach płodu. Zygotywność można również określić poprzez analizę DNA izolowanego z krwi pępowinowej lub błon płodowych z wykorzystaniem polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych, przy czym nie wszystkie dostępne prace informują o przeprowadzeniu oceny histologicznej dla określenia kosmówkowości (Carroll i wsp., 2005; Wielgus i wsp., 2008b).

W ciążach jednozygotycznych może wystąpić heterokariotypia związana z zaburzeniami chromosomowymi u jednego z płodów, wynikająca z braku postzygotycznego rozdziału, stąd wykrycie dwóch różnych kariotypów nie wskazuje z całą pewnością na dwuzygotywność, dlatego do oceny kosmówkowości konieczne jest przeprowadzenie badań na poziomie DNA. Określenie kosmówkowości powinno być przeprowadzone poprzez badania ultrasonograficzne w pierwszym trymestrze ciąży. Takie badanie w drugim trymestrze może być obarczone błędem, wówczas zalecane jest wykonanie badań DNA, analizy sekwencji mikrosatelitarnych do wskazania dwuzygotywności płodów i wykluczenia jednokosmówkowości (Carroll i wsp., 2005).

Badania przeprowadzone na 336 parach bliźniąt urodzonych w latach 2003-2009 w Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Sun Yat-Sen w Guangzhou w Chinach wskazują na jednokosmówkowość i jednozygotyczność jako czynniki ryzyka w wewnątrzmacicznym zahamowaniu wzrostu, ze szczególnym uwzględnieniem selektywnego zahamowania wzrostu płodów ($p < 0,01$) (Gao i wsp., 2012).

Z kolei ocena stanu zdrowia trojaczek w Holandii (346 dzieci z 116 ciąży) wskazuje, że niska masa urodzeniowa związana jest raczej z występowaniem wspólnej kosmówki, niż z jednozygotycznością dzieci. Jednozygotyczne jednokosmówkowe trojaczki miały znacznie niższą średnią masę urodzeniową niż dwuzygotyczne dwukosmówkowe trojaczki. W trójkach dwuzygotycznych, pary jednozygotyczne charakteryzowały się niższą średnią masą urodzeniową niż dwuzygotyczne rodzeństwo tylko w wypadku dzielenia przez parę kosmówki (Lamb i wsp., 2012).

Zwiększona częstość występowania przedwczesnych porodów u bliźniąt wymaga prowadzenia badań związanych z oceną ryzyka. Jedną z badanych cech jest zygocność określana często w oparciu o dane kliniczne obejmujące ocenę łożyska, tą samą płć oraz niezgodność masy urodzeniowej jako zastępcze kryteria w ocenie jednokosmówkowości i jednozygotyczności bliźniąt. Porównanie oceny zygocności w oparciu o dane kliniczne i badania genetyczne z przyczynami przedwczesnych porodów i stanem zdrowia bliźniąt z bardzo niską masą urodzeniową (< 1500 g) odnoszono do zygocności. W badaniach wielośrodkowych wybrano 176 par bliźniąt o tej samej płci i określono metodami genetycznymi zygocność. Spośród nich dla 123 par położnicy określili na podstawie danych klinicznych zygocność, uzyskując dla bliźniąt jednozygotycznych zgodność uzyskanych wyników na poziomie 62,7%, a w przypadku bliźniąt dwuzygotycznych 88,9%. Dwuzygotyczne bliźnięta częściej rodziły się przedwcześnie w wyniku zakażenia wewnątrzmacicznego (33% vs. 20% u bliźniąt jednozygotycznych, $p < 0,01$), ponadto częściej podawano ich matkom przed porodem antybiotyki (62% vs. 47% u bliźniąt jednozygotycznych, $p < 0,01$). Zespół przetoczenia krwi między płodami obserwowano zgodnie z założeniami tylko u bliźniąt jednozygotycznych (Spiegler i wsp., 2012).

Chociaż kliniczne znaczenie kosmówkowości w ciążach bliźniaczych podlega szerokim badaniom, to znaczenie okołoporodowego określenia zygocności w oparciu o metody genetyki molekularnej pozostaje dyskusyjne. Badania przeprowadzono na 569 parach bliźniąt, które urodziły się w Szpitalu Narodowego Uniwersytetu w Seulu w Korei w latach 1999-2008 (Lee i wsp., 2010). Kosmówkowość określano poprzez badania histologiczne, a

zygotyczność w oparciu o płeć noworodków, kosmówkowość i badania DNA izolowanego z krwi pępowinowej. Dwuzygotyczność wykazano w oparciu o różną płeć u 238 par bliźniąt oraz w oparciu o badania DNA u 166 par bliźniąt o identycznej płci (71%, 404/569 par bliźniąt). Spośród bliźniąt jednozygotycznych (29%, 165/569 par bliźniąt), 119 par (72,1%) stanowiły bliźnięta jednokosmówkowe, a 46 par (27,9%) bliźnięta dwukosmówkowe. Wśród bliźniąt poczętych naturalnie bliźnięta jednozygotyczne pojawiły się dwukrotnie częściej niż bliźnięta dwuzygotyczne, a jednozygotyczność bliźniąt związana była z prawie dwukrotnie większym ryzykiem wystąpienia niskiej masy urodzeniowej niż u bliźniąt dwuzygotycznych i dwukosmówkowych ($p < 0,05$). Badacze nie wykazali istotnej zależności między zygotycznością i kosmówkowością w odniesieniu do zaburzeń występujących u noworodków. Warto również zwrócić uwagę na jednozygotyczność bliźniąt w związku z ryzykiem śmierci okołoporodowej oraz przyszłościowego wykorzystania do transplantacji organów i badań bliźniąt.

Przyjmuje się, że bliźnięta stanowią cenne źródło badań nie tylko w zakresie porodów wieloraczków, ale także badań związanych z określeniem przyczyn występowania zmian fenotypowych u ludzi. Pomysłodawcą takiego spojrzenia na bliźnięta był Sir Francis Galton w 1865 r., jednak pierwsze rejestry obejmujące bliźnięta zaczęły pojawiać się w latach pięćdziesiątych XX wieku (Ohm Kyvik i Derom, 2006). Określenie zygotyczności i kosmówkowości wynika z przyczyn medycznych, osobistych i naukowych. Zygotyczność jest ważna dla wystąpienia ewentualnych przeszczepów i dziedziczenia specyficznych chorób, z kolei jednokosmówkowość związana jest ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia komplikacji obejmujących deformacje, zespół przetoczenia krwi, zaburzenia hemodynamiki, zaburzenia i ograniczenia wzrostu płodów. Występuje tutaj również zwiększona śmiertelność oraz trzy- do pięciokrotny wzrost zaburzeń w porównaniu z bliźniętami dwukosmówkowymi. Zygotyczność związana jest z życiem osobistym bliźniąt, trojaczków, ich rodzin oraz środowiska, w którym przebywają w związku z koniecznością identyfikacji poszczególnych osób. Z kolei badania bliźniąt mają długą historię wynikającą z określania udziału czynników środowiskowych i genetycznych na zdrowie i zachowanie człowieka. W badaniach tych wykorzystywane są porównania pomiędzy bliźniętami jednozygotycznymi, dwuzygotycznymi oraz osobami z ciąży pojedynczych (Ohm Kyvik i Derom, 2006).

Określenie zygotyczności jest ważne w ocenie występowania chorób uwarunkowanych genetycznie, jak i w określaniu ich podłoża. Lovelina i wsp. (2012) wykazała w oparciu o badania bliźniąt jednozygotycznych i dwuzygotycznych na duży udział

genów w etiologii próchnicy i chorób przyzębia. Z kolei w przypadku występowania stożka rogówki oprócz czynnika genetycznego (zgodność u bliźniąt jednozygotycznych) przyjmuje się także udział czynników środowiskowych modyfikujących poziom ekspresji choroby (Tuft i wsp., 2012).

Określenie zygotywności przed 1970 r. opierało się głównie na badaniach makroskopowych i mikroskopowych łożyska poporodowego, badania zostały ułatwione poprzez wykorzystanie ultrasonografii oraz badań DNA, co umożliwia ocenę kosmówkowości i zygotywności jeszcze przed porodem. Przyjmuje się, że wszystkie bliźnięta o różnej płci są bliźniętami dwuzygotycznymi. Z kolei jednokosmówkowość stanowi doskonałe potwierdzenie jednozygotyczności, przy czym bliźnięta jednokosmówkowe stanowią dwie trzecie wszystkich bliźniąt jednozygotycznych, stąd badanie błon płodowych podczas porodu lub przed porodem umożliwia uzyskanie niezbędnych informacji.

Badania ultrasonograficzne stanowią najlepszą technikę diagnostyczną dla identyfikacji łożyska w pierwszym tryestrze ciąży (prawie 100%), jednak badania prowadzone w późniejszym okresie ciąży wykazują się obniżoną czułością (Ohm Kyvik i Derom, 2006). Badanie łożyska po porodzie pozwala określić kosmówkowość jedynie podczas oceny przez doświadczoną osobę.

W przypadku bliźniąt tej samej płci, dwukosmówkowych lub z nieznaną kosmówkowością, dla określenia zygotywności prowadzi się badania markerów genetycznych. Określenie grupy krwi układu AB0, czynnika Rh oraz układu MNSs umożliwia wskazanie różnic u bliźniąt dwuzygotycznych, w przypadku braku różnic, bierze się pod uwagę jednozygotyczność bliźniąt (Ohm Kyvik i Derom, 2006). W ostatnich latach prowadzi się badania na poziomie DNA, w których określa się jakie allele poszczególnych *loci* występują u badanych dzieci. Przyjmuje się, że bliźnięta jednozygotyczne posiadają identyczny profil DNA, podczas gdy u bliźniąt dwuzygotycznych występują odmienne profile. Dla wykluczenia mutacji somatycznych, konieczne jest zaobserwowanie co najmniej dwóch różnic u bliźniąt dwuzygotycznych. Badanie odcisku genetycznego DNA umożliwia analizę niewielkiej ilości DNA uzyskanego z całego szeregu tkanek. Ze względu na potencjalnie nieograniczoną liczbę badanych *loci*, ryzyko wykluczenia dwuzygotywności, w przeciwieństwie do badania układów grupowych krwi, jest bardzo niewielkie (do 10^{-9}) (Ohm Kyvik i Derom, 2006). Badania prowadzone w ramach rozprawy doktorskiej oraz

wcześniejszych prac potwierdzają bardzo wysoką skuteczność analiz na poziomie DNA, tym bardziej, że badaniom poddawano bliźnięta o tej samej lub różnej płci.

W przypadkach braku możliwości przeprowadzenia badań biologicznych zygocności, wykorzystuje się ocenę w oparciu o odpowiednio dobrany zestaw pytań. Tego typu badania prowadzi się na bardzo dużych grupach bliźniąt, na pytania odpowiadają rodzice lub same bliźnięta. Kwestionariusz określa podobieństwo fizyczne i częstość, z którą występuje pomyłkowe wzięcie jednego z bliźniąt za drugie przez rodziców, krewnych i osoby niespokrewnione. Skuteczność uzyskanych wyników sięga 95%. Jednak 5% niezgodność oceny zygocności jest bardzo ważna, ponieważ brak podobieństwa u pary bliźniąt może być związany z wystąpieniem zaburzeń u jednego z bliźniąt, a zaburzenia mogą wynikać z zygocności i powstawania łożyska (Ohm Kyvik i Derom, 2006). Przy przygotowywaniu rozprawy nie opierano się na kwestionariuszach, ze względu na pobieranie materiału głównie bezpośrednio po urodzeniu się bliźniąt, stąd nie można się odnieść do skuteczności tego typu badań i zgodności otrzymanych danych z profilem genetycznym.

5.2. Polimorfizm DNA u bliźniąt

Niezgodność genotypów bliźniąt jednozygotycznych związana jest z wystąpieniem mutacji punktowej u jednego z bliźniąt (Zwijnenburg i wsp., 2010). Nieliczne opisane przypadki umożliwiają wykorzystanie bliźniąt jednozygotycznych do identyfikacji nowych genów. W przypadku cech złożonych, niezgodność wystąpienia chorób uwarunkowanych wielogenowo może być związana z dziedziczeniem pojedynczego recesywnego allelu genu z mutacją, a następnie z wystąpieniem mutacji somatycznej w prawidłowym allelu podczas rozwoju płodu. Część badań związanych jest z uwiarygodnieniem wyników badań molekularnych opierających się na wyborze *loci* umożliwiających jednoznaczne wskazanie bliźniąt dwuzygocnych, nawet w przypadku występowania bardzo zbliżonego genotypu i pojawienia się rzadkich alleli (Erickson, 2008). W badaniach własnych, które zostały potwierdzone podczas realizacji niniejszej rozprawy wskazano na dużo większą informatywność badań hybrydacyjnych z wykorzystaniem sond typu *multi locus*, które pozwalają na analizę większej liczby cech, niż w przypadku stosowania analiz typu PCR.

Innym czynnikiem związanym z występowaniem różnic u bliźniąt może być zmienna liczba powtórzeń, przy czym istotny wydaje się okres, w którym pojawiają się różnice w liczbie powtórzeń. Badania na bliźniętach przyczyniły się do poznania funkcji telomerów oraz

wskazania udziału czynników genetycznych oraz środowiskowych na skracanie długości telomerów wraz z wiekiem, jak również rozwojem chorób związanych ze starzeniem się (Zwijnenburg i wsp., 2010). Do tej pory nie wyjaśniono znaczenia występowania różnic w polimorfizmach pojedynczych nukleotydów (SNP) u bliźniąt jednozygotycznych. Przyjmuje się, że różnice na poziomie DNA występujące u bliźniąt jednozygotycznych mogą wynikać z wystąpienia postzygotycznych mutacji. Takie pary bliźniąt umożliwiają badanie cech i chorób uwarunkowanych wieloczynnikowo poprzez porównanie bliźniaka dotkniętego zmianą oraz bliźniaka, u którego tych zmian nie zaobserwowano (Zwijnenburg i wsp., 2010).

W badaniach własnych opierano się głównie na analizie wykorzystującej metody hybrydizacyjne (170 par bliźniąt), które mimo pracochłonności okazały się być metodami bardzo wiarygodnymi. Wprowadzenie metod amplifikacyjnych znacznie przyspieszyło prowadzenie badań, jednak trzeba było wykonać już kilka reakcji PCR (56 par bliźniąt) lub reakcję multipleks *PowerPlex 16* (15 par bliźniąt) dla określenia zygotywności bliźniąt, przy jednoczesnym wskazaniu genotypów bliźniąt. Badania prowadzono głównie dla bliźniąt o identycznej płci, wychodząc z założenia, że różna płeć pary bliźniąt jednoznacznie sugeruje dwuzygotyczność. Takie ograniczenie może prowadzić jednocześnie do utrudnienia badań statystycznych porównujących częstość alleli bliźniąt, w porównaniu z własną grupą populacyjną obejmującą niespokrewnionych mężczyzn i kobiety (Laboratorium Genetyki Molekularnej) oraz polskie grupy populacyjne przebadane głównie w oparciu o komercyjnie dostępne testy do identyfikacji osób (Czarny i wsp., 2005; Sołtyszewski i wsp., 2006). Do wszystkich badań starano się wykorzystać jedną populację, jednak w paru przypadkach, ze względu na brak analizowanych markerów lub brak wszystkich alleli w populacji polskiej, wykorzystywano grupę przeanalizowaną dla zachodniej Polski (Sołtyszewski i wsp., 2006).

Większość analizowanych alleli odznaczała się statystycznie istotnymi różnicami w rozkładzie częstości w porównaniu z populacją polską. Wprawdzie większość analiz przeprowadzono dla niewielkiej liczby bliźniąt (*PowerPlex 16* – 15 par bliźniąt), to jednak możliwość porównania wyników uzyskanych dla reakcji multipleks z reakcją dla pojedynczych *loci* dla czynnika von Willebrandta (*vWA*, *vWF*), peroksydazy tarczycy (*TPOX*) i hydroksylazy tyrozynowej (*TH01*), wskazują na możliwość wykorzystania takiej grupy do badań statystycznych. Oczywiście zalecane jest zwiększenie liczby badanych bliźniąt.

Jednocześnie przeprowadzone doświadczenia wskazują na skuteczność wybranych metod w określeniu zygotywności bliźniąt. Ze względu na odchodzenie od metod izotopowych, metoda odcisku genetycznego dająca jednoznaczną ocenę zygotywności,

wypierana zaczyna być przez metody amplifikacyjne, w tym przez komercyjne zestawy do identyfikacji osób w oparciu o zestawy od 10 do 16 analizowanych markerów. W przypadku analiz typu pojedynczego *locus*, zaleca się wykonanie kilku, powyżej 5 reakcji PCR, dla poprawnego określenia zygotywności.

Prowadzi się również badania występowania heteroplazmii mitochondrialnego DNA (Andrew i wsp., 2011). W chorobach wynikających z mutacji mitochondrialnego DNA, występowanie niezgodności fenotypu u bliźniąt wydaje się być związane z różnym poziomem heteroplazmii. Przyjmuje się, że właśnie różnice w mitochondrialnym DNA bliźniąt jednozygotycznych mogą prowadzić do występowania odmiennego nasilenia objawów chorób dziedziczonych autosomalnie dominująco. W oparciu o powyższe przesłanki przeprowadzono badania bliźniąt z różnym poziomem ekspresji nerwiakowłóknikowości typu 1, nie wykazano jednak różnic w mikrosatelitarnych sekwencjach pętli D mtDNA oraz poziomie heteroplazmii (Detjen i wsp., 2007). Podobnie brak zróżnicowania sekwencji pętli D obserwowano w pracach własnych w poszczególnych parach bliźniąt.

Zygotywność bliźniąt określana z zastosowaniem komercyjnie dostępnych zestawów do analizy krótkich sekwencji powtórzonych (ang. *short tandem repeats*, STR) pozwala na uzyskanie precyzyjnych wyników. Dostępne zestawy obejmują od 10 do 15 odrębnych *loci* oraz marker umożliwiający określenie płci – amelogeninę. W badaniach własnych wykorzystuje się również metodę hybrydyzacji z wielopunktowymi sondami molekularnymi, np. typu GTG_n, co pozwala na bardzo precyzyjne określenie zygotywności. Jest to jednak metoda wymagająca nakładów czasu i pracy z izotopami. Do badań stosowane są dodatkowo analizy pojedynczych *loci* metodą PCR. W przypadkach, w których obserwowano występowanie chimeryzmu, wyniki uzyskano także z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16* do identyfikacji osobniczej. Dane literaturowe wskazują, że badania molekularne pozwoliły na wykrycie u 48 par bliźniąt poczętych w wyniku zastosowania technik wspomaganego rozrodu oraz 25 par naturalnie poczętych bliźniąt odpowiednio 3 i 18 par bliźniąt jednozygotycznych. Badania kliniczne związane z oceną kosmówkowości i łożyska bliźniąt tej samej płci wskazywały na jednozygotyczność bliźniąt, gdy obserwowano bardzo duże łożysko u jednokosmówkowych bliźniąt o tej samej płci oraz gdy dwukosmówkowe bliźnięta tej samej płci miały odrębne łożyska (Yang i wsp., 2006).

Bardzo duże wyzwanie w diagnostyce stanowią cięższe trójaczki, pierwsze badania molekularne umożliwiające ocenę zygotywności i badania kosmówkowości przeprowadzono na dzieciach narodzonych w wyniku naturalnego zapłodnienia (18 trójek) oraz poczętych z

wykorzystaniem technik wspomaganego rozrodu (31 trójek) (ang. *assisted reproduction technology*, ART) (Guilherme i wsp., 2008). Zygotywność określano z wykorzystaniem analizy sekwencji mikrosatelitarnych, natomiast kosmówkowość poprzez badanie łożyska. U dzieci poczętych naturalnie częstość par bliźnięt jednozygotycznych wynosiła 48%, spośród dwukosmówkowych ciąży trojacznych 30% stanowiły bliźnięta jednozygotyczne, a 70% bliźnięta dwuzzygotyczne. Natomiast wśród trójkosmówkowych ciąży trojacznych 20% stanowiły płody dwuzzygotyczne, a 80% trójzygotyczne. Z kolei w ciążach trojacznych uzyskanych z zastosowaniem technik ART, częstość występowania bliźnięt jednozygotycznych jest dużo niższa i wynosi tylko 6,5%, wszystkie trojaczki dwukosmówkowe są dwuzzygotyczne i tylko 4% trójkosmówkowych ciąży trojacznych jest dwuzzygotyczna, a 96% stanowią trójzygotyczne trójkosmówkowe trojaczki (Guilherme i wsp., 2008). W badaniach własnych wprawdzie jeszcze nie zetknięto się z analizą trojaczek, tym nie mniej wdrożone metody pozwolą także na określenie ich zygotywności. Również dzięki stosowaniu zaawansowanych technik wspomaganego rozrodu i wzrostu wieku matek, należy spodziewać się pojawiania się wielu ciekawych przypadków.

5.3. Zygotywność bliźnięt

Zygotywność bliźnięt tej samej płci określana jest często poprzez wykorzystanie kwestionariusza i dla uwiarygodnienia tej metody sprawdza się uzyskane dane na poziomie DNA. Tego typu badania przeprowadzono na dwóch dużych grupach bliźnięt tej samej płci w Chinach, wskazując na dużą zgodność ankiet z badaniami genetycznymi (Chen i wsp., 2010). Badaniom poddano 471 par bliźnięt ze średnią wieku ok. 14 lat (345 jednozygotycznych, 126 dwuzzygotycznych) oraz 382 par w wieku ok. 12 lat (261 jednozygotycznych, 121 dwuzzygotycznych). Kwestionariusz obejmował 12 pytań związanych z podobieństwem oraz częstością pomyłek. Zgodność wyników z danymi genetycznymi zwiększono poprzez dodanie uwag rodziców i zastosowanie dwupunktowego formatu odpowiedzi. Badania DNA obejmowały 9 *loci* typu STR. Porównanie wszystkich danych wskazało na zgodność przewidywania z zastosowaniem trzypunktowego kwestionariusza wynoszącą 83,8%, dane od rodziców zwiększały dokładność o 3,9%, a zastosowanie dwupunktowej skali pozwalały na 4,6% wzrost skuteczności. Jednoczesne zastosowanie raportów od dzieci i rodziców pozwalało na wzrost czułości do 90,6%. Uzyskane wyniki sugerują, że nieznacznie zmienione kwestionariusze z dwupunktową skalą oraz uzyskanie wyników z kilku źródeł pozwoli na

skuteczne wykorzystanie tego typu badań w ocenie zygotywności dorosłych bliźniąt. Podobne badania prowadzono również wcześniej w Chinach, wskazując na dosyć dużą wydajność danych uzyskanych z kwestionariusza w stosunku do badania DNA w pięciu *loci* (Chen i wsp., 1999).

Jednozygotywność bliźniąt może wiązać się ze zgodnością występowania chorób uwarunkowanych genetycznie. Np. w przypadku choroby Leśniowskiego-Crohn'a, zgodność w tej grupie bliźniąt jest istotnie większa niż w przypadku bliźniąt dwuzygotywnych. Występowanie mutacji w genie *NOD2/CARD15* nie jest związane z koniecznością wystąpienia choroby Leśniowskiego-Crohna u obydwu bliźniąt. Badania duńskie przeprowadzone dla 103 par bliźniąt z chorobami zapalnymi jelita związane były ze śledzeniem losów par bliźniąt przez 13 lat. Zygotywność bliźniąt określona początkowo w oparciu o kwestionariusz została potwierdzona z wykorzystaniem metod molekularnych. Badaniom molekularnym poddano 123 bliźnięta, wykazując 63,6% zgodność pod względem występowania choroby wśród jednozygotywnych par bliźniąt i 3,6% spośród dwuzygotywnych. Więcej niż jedną mutację w genie *NOD2/CARD15* obserwowano u 44% pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, 2% pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i 19% zdrowych bliźniąt (Jess i wsp., 2005). Późniejsze badania potwierdziły mniejszy od przewidywanego wpływ tła genetycznego na występowanie choroby Leśniowskiego-Crohna u par bliźniąt (Halfvarson, 2011).

Jednozygotywnie bliźnięta rzadko są całkowicie identyczne, wpływają na to mechanizmy genetyczne, epigenetyczne, jak również postzygotywnie mechanizmy środowiska płodowego (Machin, 2009). Heterokaryotypia czy zaburzona inaktywacja chromosomu X mogą prowadzić do wystąpienia znaczących różnic wśród bliźniąt jednozygotywnych i nieprawidłowego określenia ich jako dwuzygotywnych. Określenie zygotywności jest istotne dla typowania tkanek dla potrzeb transplantacji, możliwości zapobiegania wystąpienia chorób nie ujawniających się u bliźniąt jednocześnie i odpowiedniej opieki nad bliźniętami. Bardziej dokładne określenie zygotywności jest niezbędne w przypadku par bliźniąt o nietypowym, złożonym pochodzeniu biologicznym, np. trigametyczne i tetragametyczne chimerowe bliźnięta dwuzygotywnie mogą być też jednokosmówkowe. Występowanie międzypłodowych anastomoz naczyniowych u bliźniąt jednokosmówkowych może przyczynić się do występowania zgodności na poziomie krwi, przy braku zgodności tkankowej innych organów (Machin, 2009). Ponieważ w niniejszej rozprawie do badań wykorzystywano krew pępowinową lub krew obwodową, zresztą jako

najczęstsze i bardzo wydajne źródło do izolacji materiału genetycznego, nie można było zaobserwować podobnych odchyłań.

Określenie zygotywności bliźniąt prowadzone jest często w oparciu o DNA uzyskany z nabłonka jamy ustnej czy krwi oraz analizę sekwencji mikrosatelitarnych, STR czy zmiennej liczby powtórzeń tandemowych (ang. *variable number tandem repeats*, VNTRs). Jednozygotyczne bliźnięta mogą być odmienne ze względu na różne procesy genetyczne, epigenetyczne czy środowisko płodowe, należy również rozważyć możliwość wystąpienia chimer jednokosmówkowych bliźniąt dwuzygotycznych. Postzygotyczne mutacje w badanych *loci* mogą prowadzić do wskazania bliźniąt jednozygotycznych jako dwuzygotycznych. Określenie kosmówkowości nie odzwierciedla w pełni potencjalnej zygotywności bliźniąt, jedna trzecia bliźniąt jednozygotycznych jest dwukosmówkowa, stąd dwukosmówkowe bliźnięta tej samej płci nie mogą być odgórnie uznane za dwuzygotyczne (Machin, 2009).

Genotypowanie ośmiu markerów mikrosatelitarnych powinno wystarczyć do wskazania bliźniąt dwuzygotycznych, jednak występowanie postzygotycznych mutacji w liczbie powtórzeń może komplikować uzyskanie wyników. Obecnie nie wiadomo jaka liczba niezgodnych sekwencji VNTR występuje u bliźniąt jednozygotycznych, stąd nie można wystandaryzować metody diagnostyki zygotywności. Warto przeprowadzić badania większej liczby polimorficznych *loci*. Ponadto nieprawidłowe wyniki można uzyskać z próbek DNA uzyskanych z krwi bliźniąt jednokosmówkowych. W diagnostyce prenatalnej zaleca się podwójną amniocentezę zamiast biopsji kosmówki, podobnie mylące wyniki można uzyskać w wyniku kordocentezy u bliźniąt jednokosmówkowych. Ponieważ podczas realizacji rozprawy nie zakładano wykorzystania próbek pobranych w trakcie trwania ciąży mnogich, nie można jednoznacznie potwierdzić skuteczności proponowanej powyżej metodyki. Badanie bliźniąt jednozygotycznych niezgodnych pod względem podejrzewanych chorób genetycznych i rozwojowych może być podważone przez występowanie mozaicyzmu krwi, chyba że występuje pewność co do dwukosmówkowości bliźniąt (Machin, 2009).

Za jedną z przyczyn występowania niezgodności w manifestacji cech i chorób u bliźniąt przyjmuje się występowanie heteroplazmii mitochondrialnego DNA (Avital i wsp., 2012). Badania prowadzono na jednozygotycznych bliźniętach zgodnych i niezgodnych pod względem występowania zależnej od wieku cukrzycy typu 2 (ang. *age-related type 2 diabetes mellitus*, T2DM). Występowanie dysfunkcji mitochondriów, pomimo występowania heteroplazmii nie było związane z rozwojem cukrzycy. Zaobserwowano jednak większy

udział mutacji związanych z heteroplazmią w mięśniach niż we krwi oraz wskazano na wpływ dziedziczenia na akumulację zmian i selekcję mutacji. Wiele mutacji mitochondrialnego DNA było unikalnych, jednak inne występowały w parach bliźniąt lub w różnych tkankach tej samej osoby. Zaobserwowano również większą częstość występowania zmian w sekwencjach niekodujących. Zjawisko heteroplazmii analizowano z wykorzystaniem najnowocześniejszych technik masowego sekwencjonowania i nie zaobserwowano różnic w poziomie heteroplazmii u bliźniąt z cukrzycą oraz u bliźniąt z grupy kontrolnej (Avital i wsp., 2012).

Badania własne pętli D mitochondrialnego DNA potwierdzają niewielki udział heteroplazmii u dzieci z ciąż mnogich. U bliźniąt jednozygotycznych nie wskazano zmienności, niewielki udział zmian był natomiast obserwowany u bliźniąt dwuzygotycznych.

5.4. Chimeryzm krwi

Chimeryzm obserwowano już w starożytności, w mitologii greckiej Chimera była istotą z ciałem lwa, głową kozy i ogonem węża. Obecnie wiadomo, że chimeryzm występuje w świecie zwierząt i ludzi, i związany jest z występowaniem dwóch genetycznie różnych typów komórek, pochodzących z więcej niż jedna genetycznie odrębna zygota. W przypadku mozaicyzmu występują też różne typy komórek, ale pochodzą one z pojedynczego zarodka. Zjawisko chimeryzmu może wystąpić podczas rozwoju płodu, w dzieciństwie, w życiu dorosłym, ale także może zajść podczas zapłodnienia czy embriogenezy (Abuelo, 2009).

Chimeryzm związany jest z występowaniem w jednym organizmie komórek pochodzących z dwóch lub więcej zygot. Pod względem tła genetycznego wyróżnić można cztery typy chimeryzmu. 1) Chimeryzm związany z komórkami płciowymi, występowaniem dwóch typów plemników lub chimeryzm tetragametyczny (ang. *dispermic or tetragametic chimerism*). Tego typu chimery powstają w wyniku wczesnej fuzji dwóch odrębnych i genetycznie różnych zygot, często charakteryzują się pełnym hermafrodytyzmem. 2) Sztuczny/indukowany chimeryzm (ang. *artificial chimerism*) występuje u ludzi po przeszczepie komórek macierzystych lub szpiku kostnego i charakteryzuje się pojawieniem się drugiej populacji komórek. 3) Mikrochimeryzm (ang. *microchimerism*) związany jest z przenikaniem komórek płodu do krwioobiegu matki przez łożysko. Zjawisko to może prowadzić do wystąpienia chorób autoimmunizacyjnych. 4) Chimeryzm bliźniąt zwany również chimeryzmem hematopoetycznym (ang. *twin chimerism, haematopoietic chimera*),

związany jest z występowaniem połączeń naczyniowych między płodami. Zjawisko to jest znane u dwuzygotycznych bliźniąt bydła, jednak kilka przypadków zaobserwowano także u człowieka (Bourthoumieu i wsp., 2006). Występowanie tego zjawiska o mechanizmie typowym dla wszystkich ssaków może nasilać się ze względu na częstość stosowania technik wspomaganego rozrodu (Burlingham, 2010).

Diagnostyka chimeryzmu ciągle stanowi duże wyzwanie, ponieważ laboratoria skupiają się głównie na typowaniu szpiku kostnego przed i po przeszczepie. Istotny jest udział laboratoriów badających DNA i odróżnienie przypadków mozaicyzmu od chimeryzmu. Mozaicyzm związany jest z jednokrotnym wkładem materiału matczynego i ojcowskiego wszystkich badanych markerów. Wykrycie dwóch lub więcej alleli sugeruje występowanie chimeryzmu, jednak wymagane są dalsze badania dla określenia mechanizmu powstawania chimeryzmu, analizowany jest również DNA izolowany z krwi, biopsji skóry czy wymazu z jamy ustnej (Abuelo, 2009).

Chimeryzm może wystąpić u bliźniąt jednozygotycznych, a bardzo niska wykrywalność związana jest z koniecznością wystąpienia odmiennych fenotypów. Dobry przykład stanowią bliźnięta jednokosmówkowe z niezgodną płcią czy bliźnięta jednozygotyczne niezgodne pod względem wystąpienia zespołu Downa. Komórki krwi obydwójga bliźniąt wykazywały obecność komórek prawidłowych i trisomicznych, wskazując na chimeryzm hematopetyczny. Z kolei badania skóry i komórek nabłonka jamy ustnej wskazały obecność tylko komórek z trisomią chromosomu 21, przy czym w przypadku zdrowego bliźniaka wszystkie komórki były prawidłowe. Badania zygotyczności z zastosowaniem analizy sekwencji mikrosatelitarnych genomowego DNA z krwi, wskazały na identyczność bliźniąt, a dodatkowy chromosom 21 był pochodzenia ojcowskiego. Prawdopodobny mechanizm powstania różnic obejmował prawidłowe zapłodnienie 46,XY wraz z postzygotycznym uzyskaniem dodatkowego chromosomu przez jedno z bliźniąt lub ojcowski błąd mejozy II wraz z mechanizmem ochrony przed trisomią (ang. *trisomy rescue*). Przypadek ten sugeruje określanie zygotyczności w oparciu nie tylko o komórki krwi, ale także wykorzystanie komórek fibroblastów w celu rozróżnienia chimeryzmu układu krwiotwórczego od mozaicyzmu (Abuelo, 2009). Z reguły materiał do badań w przypadku bliźniąt obejmuje krew obwodową, a wybór dodatkowej tkanki związany jest dopiero z koniecznością przeprowadzenia pogłębionej diagnostyki w ściśle uzasadnionych przypadkach.

Występowanie chimeryzmu u bliźniąt dwuzygotycznych dotyczy głównie bliźniąt jednokosmówkowych. Jeden z przypadków związany jest z bliźniętami jednokosmówkowymi, które dopiero w drugim trymestrze wykazały niezgodność płci. U dzieci wykryto chimeryzm krwi, mieszaninę komórek XX i XY, podczas gdy fibroblasty skóry były 46,XY u chłopca, a 46,XX u dziewczynki. Każde z bliźniąt posiadało dwie populacje limfocytów, większą populację komórek z kariotypem XY oraz mniejszą z kariotypem XX. Badania łożyska wykazały występowanie anastomoz na powierzchni płodów, a zapłodnienie *in vitro* uznano za czynnik ryzyka wystąpienia chimeryzmu. Chimeryzm bliźniąt dwuzygotycznych związany mógł być z fuzją trofoblastów zarodków przed implantacją. Drugi przypuszczalny mechanizm mógł obejmować podwójne zapłodnienie produktów mejozy pojedynczego oocytu dwoma plemnikami, co jednak zostało wykluczone przez badania DNA (Abuelo, 2009).

W przypadkach bliźniąt, u których nie występują zaburzenia fenotypu, chimeryzm może być ukryty. Dane literaturowe wskazują przypadek jednokosmówkowych bliźniąt uzyskanych w wyniku indukowanej owulacji, uznanych jako jednozygotyczne, a które wykazywały niezgodność grup krwi. Brak zgodności obejmował także limfocyty krwi i cebulki włosów, co wskazuje na chimeryzm bliźniąt dwuzygotycznych. Jednocześnie prowadzone badania sugerują konieczność prowadzenia bardzo dokładnych analiz dla bliźniąt poczętych z zastosowaniem technik wspomaganego rozrodu (Abuelo, 2009).

Jeszcze trudniejsze przypadki występują w mieszanych typach bliźniąt. Chimeryzm u naturalnie poczętych bliźniąt wykazano po badaniu dzieci, u których jedno z bliźniąt miało nie w pełni wykształcone genitalia. Analizy wykazały kariotyp 46,XX/46XY w limfocytach, fibroblastach skóry i komórkach rozrodczych, przy czym jeden zestaw genów pochodził od matki, a materiał od ojca został uzyskany dwukrotnie. Bliźnięta w ten sposób były bardziej podobne do siebie niż bliźnięta dwuzygotyczne, ale mniej zbliżone niż bliźnięta jednozygotyczne (Abuelo, 2009).

Przyjmuje się, że postnatalnie chimeryzm powinien być oczekiwany w przypadku bliźniąt jednokosmówkowych z niezgodnymi fenotypami czy grupą krwi. Również w przypadku stosowania technik wspomaganego rozrodu, występowanie nietypowych zjawisk jak pigmentacja skóry, sugerują wystąpienie chimeryzmu.

Niezbędnym elementem oceny kariotypu u bliźniąt jest ich dokładna analiza cytogenetyczna. Potwierdza to przypadek, w którym na skutek błędnej informacji cytogenetycznej dokonano niepotrzebnie usunięcia obu jajników u jednego z bliźniaków.

Wykonane uprzednio zarówno badanie ultrasonograficzne jak i amniopunkcja wykazały płęć męską obydwu płodów. W trakcie porodu okazało się jednak, że urodziły się bliźnięta odmiennej płci. U jednego z bliźniąt, u którego fenotyp odpowiadał płci żeńskiej stwierdzono dysgenezję gonad, na skutek czego usunięto gonady, aby zapobiec rozwojowi gonadoblastomy. Analiza fibroblastów pochodzących z biopsji skóry wykazała kariotyp 46,XX, natomiast badania histologiczne gonad potwierdziły obecność prawidłowych jajników. W rzeczywistości noworodek ten był kobietą z kariotypem 46,XX i chimeryzmem (Bourthoumieu i wsp., 2006).

Jednokosmówkowe dwuzygotyczne bliźnięta występują rzadko, ale częstość ich występowania wzrasta w przypadku stosowania metody wspomaganego rozrodu. Wśród bliźniąt jednokosmówkowych w ciąży powstałej w wyniku zapłodnienia *in vitro* zdiagnozowanych w pierwszym trymestrze ciąży, badania wymazów policzkowych wykazały dwuzygotyczność, natomiast badania DNA limfocytów krwi obwodowej potwierdziły obecność chimeryzmu krwi. Istnieją dowody, że po urodzeniu u bliźniąt można zaobserwować długoletnie występowanie chimeryzmu (Walker i wsp., 2007).

Bliźnięta od wielu lat wykorzystywane są do określenia udziału czynników genetycznych i środowiskowych (Erlich, 2011). Wydaje się ważne, aby do takich badań wykorzystywać materiał genetyczny uzyskany nie tylko z krwi obwodowej. Jednak krew wydaje się być ciągle najlepszym materiałem do izolacji DNA. Drugie źródło, często zresztą wykorzystywane, stanowią komórki nabłonka z jamy ustnej, które jednak mogą być obarczone błędem, związanym z możliwością zanieczyszczenia obcym DNA. Dostępne dane literaturowe podają, że badania całego genomu i epigenomu jednozygotycznych bliźniąt niezgodnych pod względem występowania stwardnienia rozsianego z wykorzystaniem DNA izolowanego z krwi nie wykazały różnic, co podważa stosowność wykorzystywania tej techniki do badania bliźniąt. Występowanie chimeryzmu krwi u bliźniąt prowadzi do znaczącego obniżenia czułości wykrywania różnic na poziomie jednonukleotydowych polimorfizmów typu SNP, w przypadku badań materiału genetycznego izolowanego z komórek krwi (Erlich, 2011). Wydaje się, także na podstawie badań własnych, że warto byłoby w takich przypadkach przeprowadzić również analizę z wykorzystaniem np. DNA izolowanego z komórek nabłonka (Wielgus i wsp., 2008a).

Mimo, że chimeryzm krwi u bliźniąt występuje w wyniku transferu komórek krwiotwórczych między płodami poprzez wspólne łożysko, wykryto także przypadek chimeryzmu krwi w ciąży bliźniaczej dwukosmówkowej dwuzygotycznej. Wnioski jakie

wysunięto dotyczyły pary bliźniąt urodzonych w 34 tygodniu ciąży, z których jedno płci męskiej urodziło się martwe. Badanie histopatologiczne potwierdziło obecność dwóch łożysk i dwóch owodni. Ocenę kariotypu noworodka płci żeńskiej dokonano w oparciu o próbkę krwi obwodowej, wykazując obecność mieszaniny komórek 46,XX i 46,XY. W przypadku wykrycia chimeryzmu w limfocytach krwi, konieczne jest dokładne przebadanie zewnętrznych narządów płciowych, narządów rozrodczych oraz innych tkanek w celu potwierdzenia chimeryzmu w tkankach innych niż hematopoetyczne. Jest to rzadki przypadek chimeryzmu krwi w łożyskach dwukosmówkowych, w przeciwieństwie do tego jaki ma miejsce w łożyskach jednokosmówkowych (Jang i wsp., 2010).

Chimeryzm krwi u człowieka charakteryzuje się występowaniem dwóch lub więcej typów komórek u tej samej osoby, które zawierają materiał genetyczny pochodzący od więcej niż jednej zygoty. Chimeryzm może być nabyty w wyniku transfuzji komórek dawcy lub wad wynikających z fuzji zarodków, bądź wystąpienia zespołu przetoczenia krwi między płodami dwuzygotycznymi (Yu i wsp., 2011; Biran i wsp., 2011). Przykładowo badania grupy krwi u 4-letniego chłopca wykazały występowanie układu AB, przy czym występowała nietypowa aglutynacja. Badania grup krwi rodziców pierwotnie wskazywały na to, że nie są biologicznymi rodzicami chłopca. Pełne wyjaśnienie nastąpiło po wskazaniu możliwości wystąpienia chimeryzmu. Analiza molekularna *locus* ABO leukocytów wskazała na występowanie dwóch heterozygotycznych genotypów A102/O01 i B101/O01. Pozostałe badane *loci* zawierały po 3 różne allele, wskazując na pochodzenie dwóch alleli albo od matki dziecka, albo od ojca dziecka. Badane dziecko stanowiło przypadek chimery tetragametycznej (Yu i wsp., 2011).

Za różnice w niezgodnych jednozygotycznych parach bliźniąt odpowiedzialne są zmiany w genach warunkujące występowanie określonych jednostek chorobowych. W przypadku bliźniąt można przeprowadzić dużo łatwiejsze poszukiwania, ze względu na brak zakłócającego obraz wpływu polimorfizmów. Badania nad niezgodnymi jednozygotycznymi parami bliźniąt mogą posłużyć do poszerzania wiedzy na temat spektrum chorób, czynników przyczyniających się do ich zmienności, mechanizmów chorobotwórczych, jak i postzygotycznej mutagenezy (Burlingham, 2010).

Wydaje się, że przypadki bliźniąt jednozygotycznych niezgodnych pod względem występowania różnych cech, chorób pozwolą na szybkie znalezienie genów związanych z chorobami uwarunkowanymi jednogenu, bez udziału wpływu polimorfizmów. Badania są obecnie bardzo ułatwione dzięki metodom sekwencjonowania nowych generacji. Należy

jednak ciągle pamiętać, że wyniki uzyskane na podstawie badań DNA izolowanego z krwi obwodowej mogą nie być w pełni informatywne. Tym nie mniej badania bliźniąt jednozygotycznych pozwolą na powiązanie występowania zmian w określonym genie z jednostką chorobową, fenotypem czy profilem transkrypcji (Zwijnenburg i wsp., 2010).

6. WNIOSKI

1. Analiza DNA wykonana dla par bliźniąt, obejmująca porównanie polimorfizmu sekwencji minisatelitarnych (techniki hybrydizacyjne) i mikrosatelitarnych (techniki amplifikacyjne) pozwoliła na jednoznaczne wskazanie bliźniąt jednozygotycznych i dwuzygotycznych.
2. Klasyczna analiza odcisku genetycznego (analiza typu MLS) okazała się metodą bezsporną i rozstrzygającą w aspekcie określania zygotyczności, jednakże jej stosowanie przebiega z zastosowaniem radioizotopów, co stanowi duże ograniczenie tej metody, podobnie jak konieczność stosowania wysokocząsteczkowych preparatów DNA i stosunkowo dużych ilości DNA (ok. 10 µg) w porównaniu z metodami amplifikacji.
3. Zakres analiz genetycznych wykonywanych dla bliźniąt powinien być zróżnicowany i dostosowany do sytuacji, w której występuje wysokie prawdopodobieństwo identyczności badanych sekwencji, a takie zachodzi u bliźniąt dwuzygotycznych. Określenia dwuzygotyczności jest pewne w momencie, gdy stwierdzi się różnice w poszczególnych allelach, lecz dla udowodnienia jednozygotyczności wymagane jest wykonanie kilkunastu analiz pojedynczych *loci*.
4. Zastosowanie analiz pojedynczego *locus* umożliwiło stwierdzenie u trzech par bliźniąt dodatkowych fragmentów DNA, co sugeruje wystąpienie u nich zjawiska chimeryzmu. Dostrzeżenie dodatkowych fragmentów DNA za pomocą analizy typu odcisk genetyczny nie jest możliwe.
5. Bardzo skuteczną metodą ustalania zygotyczności okazała się reakcja PCR z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*, który jest powszechnie stosowany w badaniach medyczno-sądowych i kryminalistycznych. Laboratorium stosujące tą metodę musi korzystać z wysokiej jakości polimerazy dla przeprowadzenia jednoczesnej amplifikacji 16 *loci*, a także musi być wyposażone w sekwenator kapilarny z możliwością wielobarwnego odczytu ze względu na nakładające się wielkości poszczególnych polimorficznych alleli.
6. Analiza sekwencji pętli D mitochondrialnego DNA potwierdziła wysoki polimorfizm tego regionu w badanej grupie bliźniąt, jednak nie zaobserwowano różnic w obrębie żadnej z par bliźniąt jednozygotycznych.

-
7. Częstość występowania polimorficznych alleli *D8S1179*, *TPOX*, *FGA*, *D3S1358*, *D21S11*, *D18S51*, *Penta E*, *D5S818*, *D13S317*, *D7S820*, *D16S539*, *CSF1PO*, *Penta D*, *PLA2A1* i *DIS80*, których obecność stwierdzono w badanej grupie bliźniąt odbiega od częstości ich występowania stwierdzonej w populacji polskiej. Wniosek ten dotyczy bliźniąt jednej płci.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Abuelo D. Clinical significance of chimerism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 151C(2), 148-151, 2009.
2. Al-Hendy A., Moshynska O., Saxena A., Feyles V. Association between mutations of the follicle-stimulating-hormone receptor and repeated twinning. *Lancet* 356, 914, 2000.
3. Ananth C.V, Chauhan S.P. Epidemiology of twinning in developed countries. *Semin Perinatol.* 36(3), 156-161, 2012.
4. Andrew T., Calloway C.D., Stuart S., Lee S.H., Gill R., Clement G., Chowienczyk P., Spector T.D., Valdes A.M. A twin study of mitochondrial DNA polymorphisms shows that heteroplasmy at multiple sites is associated with mtDNA variant 16093 but not with zygosity. *PLoS One.* 6(8), e22332, 2011.
5. Augias C. *Sekrety Rzymu: opowieści, miejsca i ludzie pewnej stolicy.* Wydawnictwo Literackie MUZA, Warszawa, 1-496, 2008.
6. Avital G., Buchshtav M., Zhidkov I., Tuval Feder J., Dadon S., Rubin E., Glass D., Spector T.D., Mishmar D. Mitochondrial DNA heteroplasmy in diabetes and normal adults: role of acquired and inherited mutational patterns in twins. *Hum Mol Genet.* 21(19), 4214-4224, 2012.
7. Badura M., Latos-Bieleńska A. Genetyczne podłoże ciąży bliźniaczych. W: *Ciąża wielopłodowa.* Red. Bręborowicz G. H., OWN, Poznań, 43-48. 2003.
8. Berkowitz R.L., Stone J.L., Eddleman K.A. One hundred consecutive cases of selective termination of an abnormal fetus in a multifetal gestation. *Obstet Gynecol.* 90(4 Pt 1), 606-610, 1997.
9. Biran V., Bornes M., Aboura A., Masmoudi S., Drunat S., Baumann C., Osimani S., Dalle J.H., Sterkers G., Verloes A., Farnoux C., Maury L., Schmitz T., Khung S., Baud O. A long-term competent chimeric immune system in a dizygotic dichorionic twin. *Pediatrics.* 128(2), e458-463, 2011.
10. Bobrowska K. Cholestaza wewnątrzwątrobowa w ciąży bliźniaczej. *Ginekol Pol.* 74, suplement II, 25, 2003.
11. Bourthoumieu S., Esclaire F., Yardin C. Chimerism in twins: caution is needed in interpretation of karyotypes. *Am J Med Genet A.* 140(5), 533-535, 2006.
12. Boylan K.B., Takahashi N., Diamond M., Hood L.E., Prusiner S.B. DNA length polymorphism located 5' to the human myelin basic protein gene. *Am J Hum Genet.* 40(5), 387-400, 1987.
13. Bręborowicz G.H. (red.). *Ciąża wysokiego ryzyka.* OWN, Poznań, 1-1083, 2006.
14. Bręborowicz G.H., Malinowski W., Ronin-Walkonowska E. (red.). *Ciąża wielopłodowa.* Monografia, OWN, Poznań, 1-439, 2003.
15. Budowle B., Chakraborty R., Giusti A.M., Eisenberg A.J., Allen R.C. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet.* 48(1), 137-144. 1991.
16. Burlingham W.J. Chimerism, tolerance, and twins. *Obstet Gynecol.* 116 Suppl 2, 475-476, 2010.
17. Capon D.J., Chen E.Y., Levinson A.D., Seeburg P.H., Goeddel D.V. Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature.* 302(5903), 33-37, 1983.
18. Carlin A., Alfirevic Z. Intrapartum fetal emergencies. *Sem. Fetal Neonatal Med.* 11, 150-157, 2006.
19. Carroll S.G., Tyfield L., Reeve L., Porter H., Soothill P., Kyle P.M. Is zygosity or chorionicity the main determinant of fetal outcome in twin pregnancies? *Am J Obstet Gynecol.* 193(3 Pt 1), 757-761, 2005.

20. Chen J., Li X., Chen Z., Yang X., Zhang J., Duan Q., Ge X. Optimization of zygosity determination by questionnaire and DNA genotyping in Chinese adolescent twins. *Twin Res Hum Genet.* 13(2), 194-200, 2010.
21. Chen W.J., Chang H.W., Wu M.Z., Lin C.C., Chang C., Chiu Y.N., Soong W.T. Diagnosis of zygosity by questionnaire and polymarker polymerase chain reaction in young twins. *Behav Genet.* 29(2), 115-123, 1999.
22. China S., Maaaita M., Bugg G. Postępy w terapii płodu (Advances in fetal therapy). *Położ Ginekol Med Rozrodu.* 1(1), 30-37, 2007.
23. Cuckle H. Down's syndrome screening in twins. *J Med Screen.* 5(1), 3-4, 1998.
24. Czarny J., Grzybowski T., Derenko MV, Malyarchuk BA, Sliwka DM. Genetic variation of 15 STR loci (D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, and D19S433) in populations of north and central Poland. *Forensic Sci Int.* 147(1), 97-100, 2005.
25. Czuba B., Włoch A., Borowski D., Wyrwas D., Cnota W., Sadowski K., Szaflik K., Respondek-Liberska M. Analiza wyników leczenia za pomocą seryjnych amnioredukcji w ciążyach bliźniaczych powikłanych TTTS – badania dwuośrodkowe. *Ginekol Pol.* 78(1), 3-11, 2007.
26. Dera A., Bręborowicz G.H., Keith L. Twin pregnancy – physiology, complications and the mode of delivery. *Arch Perinatal Med.* 13, 7-16, 2007.
27. Detjen A.K., Tinschert S., Kaufmann D., Algermissen B., Nürnberg P., Schuelke M. Analysis of mitochondrial DNA in discordant monozygotic twins with neurofibromatosis type 1. *Twin Res Hum Genet.* 10(3), 486-495, 2007.
28. Dodd J.M., Crowther C.A., Haslam R.R., Robinson J.S. Timing of birth for women with a twin pregnancy at term: a randomized controlled trial. *BMC Pregnancy Childbirth.* 10, 68, 2010.
29. Edwards A., Civitello A., Hammond H.A., Caskey C.T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet.* 49(4), 746-756, 1991.
30. Erickson S. A likelihood-ratio test of twin zygosity using molecular genetic markers. *Twin Res Hum Genet.* 11(1), 41-43, 2008.
31. Erlich Y. Blood ties: chimerism can mask twin discordance in high-throughput sequencing. *Twin Res Hum Genet.* 14(2), 137-143, 2011.
32. Gao Y., He Z., Luo Y., Sun H., Huang L., Li M., Zhou Y., Chen B., Fang Q. Selective and non-selective intrauterine growth restriction in twin pregnancies: high-risk factors and perinatal outcome. *Arch Gynecol Obstet.* 285(4), 973-978, 2012.
33. Ginsberg N.A., Levine E.M. Delivery of the second twin. *Int J Gynaecol Obstet.* 91(3), 217-220, 2005.
34. Girela E., Lorente J.A., Alvarez J.C., Rodrigo M.D., Lorente M., Villanueva E. Indisputable double paternity in dizygous twins. *Fertil Steril.* 67(6), 1159-1161, 1997.
35. Gonzalez M.C., Reyes H., Arrese M., Figueroa D., Lorca B., Andresen M., Segovia N., Molina C., Arce S. Intrahepatic cholestasis of pregnancy in twin pregnancies. *J Hepatol.* 9(1), 84-90, 1989.
36. Gromoll J., Simoni M. Follicle-stimulating-hormone receptor and twinning. *Lancet.* 357(9251), 230, 2001.
37. Grzesiak M., Hincz P., Bielak A., Gulczyńska E., Wilczyński J. Powikłania pępowinowe w ciąży bliźniaczej jednoowodniowej. *Ginekol Pol.* 2, 94, 2005.
38. Guilherme R., Drunat S., Delezoide A.L., Oury J.F., Luton D. Zygosity and chorionicity in triplet pregnancies: new data. *Hum Reprod.* 24(1), 100-105, 2008.
39. Halfvarson J. Genetics in twins with Crohn's disease: less pronounced than previously believed? *Inflamm Bowel Dis.* 17(1), 6-12, 2011.
40. Hall J.G. Twinning. *Lancet.* 362(9385), 735-743, 2003.

41. Henderson C.E., Scarpelli S., LaRosa D., Divon M.Y. Assessing the risk of gestational diabetes in twin gestation. *J Natl Med Assoc.* 87(10), 757-758, 1995.
42. Higgs D.R., Wainscoat J.S., Flint J., Hill A.V., Thein S.L., Nicholls R.D., Teal H., Ayyub H., Peto T.E., Falusi A.G., et al. Analysis of the human alpha-globin gene cluster reveals a highly informative genetic locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(14), 5165-5169, 1986.
43. Jang J.H., Jung H., Kim J.H., Park W.S., Kim S.H. Blood chimerism in a dizygotic dichorionic pregnancy. *Korean J Lab Med.* 30(5), 521-524, 2010.
44. Jeffreys A.J., MacLeod A., Tamaki K., Neil D.L., Monckton D.G. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature.* 354(6350), 204-209, 1991.
45. Jeffreys A.J., Neumann R., Wilson V. Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis. *Cell.* 60(3), 473-485, 1990.
46. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature.* 314(6006), 67-73, 1985a.
47. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature.* 316(6023), 76-79, 1985b.
48. Jess T., Riis L., Jespersgaard C., Hougs L., Andersen P.S., Orholm M.K., Binder V., Munkholm P. Disease concordance, zygosity, and NOD2/CARD15 status: follow-up of a population-based cohort of Danish twins with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 100(11), 2486-2492, 2005.
49. Kan Y.W., Dozy A.M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(11), 5631-5635, 1978.
50. Knott T.J., Wallis S.C., Pease R.J., Powell L.M., Scott J. A hypervariable region 3' to the human apolipoprotein B gene. *Nucleic Acids Res.* 14(22), 9215-9216, 1986.
51. Korszun P., Michalak M., Szymański P., Bręborowicz G., Moczko J. Hypertension in the twin pregnancy. *Gemellol Rev.* 5(1), 75-78, 2004.
52. Kot A., Mironiuk M., Sawicki W., Piękosz-Orzechowska B. Ocena wzrostu wewnątrzmacicznego i powikłań neonatologicznych w populacji noworodków z ciąży bliźniaczych. *Perinatol Neonatol Ginekol.* 2(1), 57-61, 2009.
53. Kwiatkowska J., Słomski R. Powtórzenia sekwencji mikrosatelitarnych w genomie człowieka. *Post Biol Kom.* 23, 19-29, 1996.
54. Kwiatkowska J., Trzeciak T., Słomski R. Powtórzenia DNA. *Post Bioch.* 41, 15-22, 1995.
55. Lamb D.J., Vink J.M., Middeldorp C.M., van Beijsterveldt C.E., Haak M.C., Overbeek L.I., Boomsma D.I. Effects of chorionicity and zygosity on triplet birth weight. *Twin Res Hum Genet.* 15(2), 149-157, 2012.
56. Lebeau-Le Guiner S., Guidet F., Bompoil T., Marka C., Pascal O. Two fathers for twin sisters. *Int Congress Series* 1239, 933-937, 2003.
57. Lee K.A., Oh K.J., Lee S.M., Kim A., Jun J.K. The frequency and clinical significance of twin gestations according to zygosity and chorionicity. *Twin Res Hum Genet.* 13(6), 609-619, 2010.
58. Lee Y.M. Delivery of twins. *Semin Perinatol.* 36(3), 195-200, 2012.
59. Leszczyńska-Gorzela B., Szymczyk G., Oleszczuk J. Cięża bliźniacza i stan przedzucawkowy. *Ginekol Pol.* 71, 11, 1422-1428, 2000.
60. Litt M., Luty J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet.* 44(3), 397-401, 1989.
61. Loat C.S., Asbury K., Galsworthy M.J., Plomin R., Craig I.W. X inactivation as a source of behavioural differences in monozygotic female twins. *Twin Res.* 7(1), 54-61, 2004.
62. Lovelina F.D., Shastri S.M., Kumar P.D. Assessment of the oral health status of monozygotic

- and dizygotic twins - a comparative study. *Oral Health Prev Dent.* 10(2), 135-139, 2012.
63. Lučovnik M, Tul N, Verdenik I, Novak Z, Blickstein I. Risk factors for preeclampsia in twin pregnancies: a population-based matched case-control study. *J Perinat Med.* 40(4), 379-382, 2012.
 64. Luke B., Brown M.B. Maternal morbidity and infant death in twin vs triplet and quadruplet pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 198(4), 401, e1-10, 2008.
 65. Machin G. Non-identical monozygotic twins, intermediate twin types, zygoty testing, and the non-random nature of monozygotic twinning: a review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 151C(2), 110-127, 2009.
 66. Malinowski W. Cięża wielopłodowa - diagnostyka, opieka przedporodowa, poród i połóg. Rozprawa habilitacyjna. Łódź, 1998.
 67. Malinowski W. Cięża wielopłodowa – etiologia, diagnostyka oraz zasady opieki okołoporodowej. *Med Prakt Ginekol Położ.* 2(54), 54-63, 2008.
 68. Malinowski W. Czy można zająć w kolejną ciążę, będąc już w ciąży? *Świat Nauki* 8 (240), 77, 2011a.
 69. Malinowski W. Premature rupture of membranes one fetus from a multiple pregnancy. *Ginekol Pol.* 82(10), 775-780, 2011b.
 70. Malinowski W. Ultrasonograficzna diagnostyka kosmówkowości i owodniowości. W: Cięża wielopłodowa. Red. Bręborowicz G. H., OWN, Poznań, 107-120, 2003.
 71. Malinowski W., Baś-Budecka E., Bilar M., Józwiak P., Kuś E., Ronin-Walknowska E. Cięża bliźniacza jednoowodniowa. Badanie wielośrodkowe. *Ginekol Pol.*, 77(1), 17-25, 2006.
 72. Malinowski W., Bożilow W. Mechanizmy powstawania ciąży wielopłodowej. W: Cięża wielopłodowa. Red. Bręborowicz G. H., OWN, Poznań, 33-42, 2003.
 73. Malinowski W., Dec W. Zespół „odwróconego przepływu krwi”. *Klin Perinatol Ginekol.*, 13, 132-142, 1995.
 74. Malinowski W., Dyrduła J. Amnioreduction in therapy of advanced twin-twin transfusion syndrome – case report. *Arch Perinatal Med.* 15(2), 114-115, 2009.
 75. Malinowski W., Koszada K. Wieloraczki w mitologii i historii. W: Cięża wielopłodowa. Red. Bręborowicz G. H., OWN, Poznań, 11-20, 2003.
 76. Malinowski W., Waszyński E. Superfecundation in etiology of twin pregnancy. *Ginekol Pol.* 77(10), 797-803, 2006.
 77. Manso P., Vaz A., Taborda A., Silva I.S. Chorionicity and perinatal complications in twin pregnancy: a 10 years case series. *Acta Med Port.* 24(5), 695-698, 2011.
 78. Marciniak B., Leszczyńska-Gorzela B., Grzechnik M., Szymula D., Oleszczuk J. Cięża bliźniacza powikłana zespołem „odwróconego przepływu krwi”. *Ginekol Pol.*, 71(11), 1391-1395, 2000.
 79. Morales W.J., O'Brien W.F., Knuppel R.A., Gaylord S., Hayes P. The effect of mode of delivery on the risk of intraventricular hemorrhage in nondiscordant twin gestations under 1500 g. *Obstet Gynecol.* 73(1), 107-110, 1989.
 80. Nakamura Y., Carlson M., Krapcho K., Kanamori M., White R. New approach for isolation of VNTR markers. *Am J Hum Genet.* 43(6), 854-859, 1988.
 81. Nakamura Y., Julier C., Wolff R., Holm T., O'Connell P., Leppert M., White R. Characterization of a human 'midisatellite' sequence. *Nucleic Acids Res.* 15(6), 2537-2547, 1987.
 82. Newman R.B., Luke B. Multifetal Pregnancy: A Handbook for Care of the Pregnant Patient. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1-288, 2000.
 83. Nissen E.D. Twins: collision, impaction, compaction, and interlocking. *Obstet Gynecol.* 11(5), 514-526, 1958.

84. Norwitz E.R., Edusa V., Park J.S. Maternal physiology and complications of multiple pregnancy. *Semin Perinatol.* 29(5), 338-348, 2005.
85. Ohm Kyvik K., Derom C. Data collection on multiple births -- establishing twin registers and determining zygosity. *Early Hum Dev.* 82(6), 357-363, 2006.
86. Oloyede O.A., Iketubosin F., Bamgbopa K. Spontaneous fetal reduction and early pregnancy complications in multiple pregnancies following in vitro fertilization. *Int J Gynaecol Obstet.* 119(1), 57-60, 2012.
87. Orkin S.H., Alter B.P., Altay C., Mahoney M.J., Lazarus H., Hobbins J.C., Nathan D.G. Application of endonuclease mapping to the analysis and prenatal diagnosis of thalassemias caused by globin-gene deletion. *N Engl J Med.* 299(4), 166-172, 1978.
88. Ory S. The American octuplet experience: a transformative event. *Fertil Steril.* 93(2), 337-338, 2010.
89. Oszukowski P. Poród przedwczesny – grupy ryzyka, rozpoznanie, leczenie. Materiały zjazdowe. Konferencja Aktualne postępowanie praktyczne w położnictwie i ginekologii. Wałbrzych, 3-4.09.2010 r.
90. Pena S.D.J., Chakraborty R., Epplen J.T., Jeffreys A.J. W DNA Fingerprinting, Wyd. S.D.J. Pena, R. Chakraborty, J.T. Epplen and A.J. Jeffreys, Birhauser Verlag, 1992.
91. Pieleś J., Jalinik K., Malinowska-Polubiec A., Zaręba-Szczudlik J., Czajkowski K. Ciąża bliźniacza jako czynnik ryzyka wystąpienia cukrzycy ciężarnych. *Ginekol Pol.*, suplement 75, 315-319, 2004.
92. Roach V.J., Lau T.K., Wilson D., Rogers M.S. The incidence of gestational diabetes in multiple pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 38(1), 56-57, 1998.
93. Ronin-Walknowska E. Powikłania w przebiegu ciąży wielopłodowej. W: Ciąża wielopłodowa. Red. Bręborowicz G. H., OWN, Poznań, 141-157, 2003.
94. Ropacka M. Diagnostyka ultrasonograficzna ciąży wielopłodowej. W: Ciąża wielopłodowa. Red. Bręborowicz G. H., OWN, Poznań, 65-86, 2003.
95. Rosenthal M.S. The Suleman octuplet case: an analysis of multiple ethical issues. *Womens Health Issues.* 20(4), 260-265, 2010.
96. Royle N.J., Clarkson R.E., Wong Z., Jeffreys A.J. Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosomes. *Genomics.* 3(4), 352-360, 1988.
97. Saftlas A.F., Olson D.R., Atrash H.K., Rochat R., Rowley D. National trends in the incidence of abruptio placentae, 1979-1987. *Obstet Gynecol.* 78(6), 1081-1086, 1991.
98. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230(4732), 1350-1354, 1985.
99. Sawicki K., Sawicka E. Porody z ciąży wielopłodowych w Polsce w latach 1981-2001 według danych głównego urzędu statystycznego. W: Ciąża wielopłodowa. Red. Bręborowicz G. H., OWN, Poznań, 21-26, 2003.
100. Schollen E., Matthijs G., Gewillig M., Fryns J.P., Legius E. PTPN11 mutation in a large family with Noonan syndrome and dizygous twinning. *Eur J Hum Genet.* 11(1), 85-88, 2003.
101. Schwartz D.B., Daoud Y., Zazula P., Goyert G., Bronsteen R., Wright D., Copes J. Gestational diabetes mellitus: metabolic and blood glucose parameters in singleton versus twin pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 181(4), 912-914, 1999.
102. Sebire N.J., Thornton S., Hughes K., Snijders R.J., Nicolaides K.H. The prevalence and consequences of missed abortion in twin pregnancies at 10 to 14 weeks of gestation. *Br J Obstet Gynaecol.* 104(7), 847-848, 1997.
103. Shrim A., Weisz B., Gindes L., Gagnon R. Parameters associated with outcome in third trimester monochorionic diamniotic twin pregnancies. *J Obstet Gynaecol Can.* 32(5), 429-434; 2010.

104. Siddiqui F., McEwan A. Cięża bliźniacza. *Położ Ginekol Med Rozrodu*. 2(4), 278-288, 2008.
105. Siemieniako B., Kwiatkowska J., Kaczmarek M., Słomski R. Zastosowanie badań hybrydacyjnych w diagnostyce molekularnej. *Post Biol Kom*. 27, 73-94, 2000.
106. Silva A.J., Johnson J.P., White R.L. Characterization of a highly polymorphic region 5' to JH in the human immunoglobulin heavy chain. *Nucleic Acids Res*. 15(9), 3845-3857, 1987.
107. Simoni M., Gromoll J., Höppner W., Kamischke A., Krafft T., Stähle D., Nieschlag E. Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *J Clin Endocrinol Metab*. 84(2), 751-755, 1999.
108. Słomski R. (red.) DNA – Teoria i Praktyka. Praca zbiorowa, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań, 1-573, 2008.
109. Słomski R. Trudne początki badań DNA w Polsce. W: Kryminalistyka dla prawników - prawo dla kryminalistyki. Red. V. Kwiatkowska-Wójcikiewicz, Wydawnictwo Dom Organizatora, Toruń, 37-47, 2010.
110. Słomski R., Chlebowska H., Reiss J. Zastosowanie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) w diagnostyce klinicznej. *Post Bioch*. 38, 75-80, 1992.
111. Słomski R., Chlebowska H., Siemieniako B., Napierała D., Słomska M. Współczesne poglądy na ustalanie spornego ojcostwa. W: Postępy Andrologii, Red. G.A. Szymczyński, Wyd. Andromeda Ltd., Bydgoszcz 2002, t. 4, 151-163, 2002.
112. Słomski R., Janiszewska H., Chlebowska H., Kwiatkowska J. Jednopunktowa a wielopunktowa analiza DNA: Własne obserwacje z badań nad dochodzeniem spornego ojcostwa z zastosowaniem wielopunktowej analizy DNA. *Arch Med Sąd Kryminol*. 44, 29-34, 1994.
113. Słomski R., Kwiatkowska J., Siemieniako B., Napierała D., Pławski A., Chlebowska H., Dziechciowska K., Słomska M. Zastosowanie analizy DNA w ustalaniu ojcostwa. *Post Biol Kom*. 25, 137-156, 1998a.
114. Słomski R., Napierała D., Kwiatkowska J. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) w badaniach naukowych i diagnostyce molekularnej. *Post Biol Kom*. 25, 195-217, 1998b.
115. Słomski R., Napierała D., Pławski A., Groniek P. Diagnostyka molekularna w biologii i medycynie. *Wiad Parazytol*. 44, 151-168, 1998c.
116. Słomski R., Wielgus K., Szalata M., Bręborowicz G. Wady wrodzone i anomalie chromosomalne płodów i noworodków w ciążyach wielopłodowych. Badania genetyczne. W: Cięża wielopłodowa. Red. Bręborowicz G. H., OWN, Poznań, 381-388, 2003a.
117. Słomski R., Wielgus K., Szalata M., Kowalska K., Siemieniako B., Bręborowicz G. H.. Diagnostyka zygoczości bliźniąt. W: Cięża wielopłodowa. Red. Bręborowicz G. H., OWN, Poznań, 121-128, 2003b.
118. Smith J.C., Newton C.R., Alves A., Anwar R., Jenner D., Markham A.F. Highly polymorphic minisatellite DNA probes. Further evaluation for individual identification and paternity testing. *J Forensic Sci Soc*. 30(1), 3-18. 1990.
119. Soltyszewski I., Pepinski W., Piatek J., Zuk J., Jozwiak R., Janica J. Genetic data on 10 STR loci a population of western Poland. *Forensic Sci Int*. 161(1), 69-71, 2006.
120. Spellacy W.N., Handler A., Ferre C.D. A case-control study of 1253 twin pregnancies from a 1982-1987 perinatal data base. *Obstet Gynecol*. 75(2), 168-171, 1990.
121. Spencer K., Nicolaidis K.H. Screening for trisomy 21 in twins using first trimester ultrasound and maternal serum biochemistry in a one-stop clinic: a review of three years experience. *BJOG*. 110(3), 276-280, 2003.
122. Spiegler J., Härtel C., Schulz L., von Wurmb-Schwark N., Hoehn T., Kribs A., Küster H., Siegel J., Wieg C., Weichert J., Herting E., Göpel W. the German Neonatal Network (GNN). Causes of Delivery and Outcomes of Very Preterm Twins Stratified to Zygosity. *Twin Res Hum Genet*. 15(4), 532-536, 2012.

123. Stoker N.G., Cheah K.S., Griffin J.R., Pope F.M., Solomon E. A highly polymorphic region 3' to the human type II collagen gene. *Nucleic Acids Res.* 13(13), 4613-4622, 1985.
124. Suchońska B., Bobrowska K., Szymańska M., Wielgoś M., Marianowski L. Przebieg ciąży i porodu w ciąży bliźniaczej w materiale I Kliniki Położnictwa i Ginekologii Akademii Medycznej w Warszawie. *Ginekol Pol.* 75(11), 840-846, 2004.
125. Sullivan C.A., Harkins D., Seago D.P., Roberts W.E., Morrison J.C. Cesarean delivery for the second twin in the vertex-vertex presentation: operative indications and predictability. *South Med J.* 91(2), 155-158, 1998.
126. Świątkowska-Freund M., Preis K. Kryteria rozpoznawania zespołu transfuzji między płodami. *Perinatol. Neonatol. Ginekol.* 3(2), 101-103, 2010a.
127. Świątkowska-Freund M., Preis K. Terapia zespołu transfuzji między płodami. *Perinatol. Neonatol. Ginekol.* 3(2), 104-107, 2010b.
128. Szymański W., Skublicki S., Fagas B., Marzec-Ostrowska J. Ciąża wielopłodowa jako przyczyna porodu przedwczesnego. *Ginekol Pol.* 71, 11, 1464-1468, 2000.
129. Taylor M., Rebarber A., Saltzman D.H., Klauser C.K., Roman A.S., Fox N.S. Induction of labor in twin compared with singleton pregnancies. *Obstet Gynecol.* 120(2 Pt 1), 297-301, 2012.
130. Tuft S.J., Hassan H., George S., Frazer D.G., Willoughby C.E., Liskova P. Keratoconus in 18 pairs of twins. *Acta Ophthalmol.* 90(6), e482-e486, 2012.
131. Vogt P. Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on a highly conserved "chromatin folding code". *Hum Genet.* 84(4), 301-336, 1990.
132. Walker S.P., Meagher S., White S.M. Confined blood chimerism in monochorionic dizygous (MCDZ) twins. *Prenat Diagn.* 27(4), 369-372, 2007.
133. Wax J.R., Steinfeld J.D., Ingardia C.J. Fetal triploidy: a unique cause of the stuck twin sign. *Obstet Gynecol.* 92(4 Pt 2), 714, 1998.
134. Weisz B., Hogen L., Yinon Y., Mazaki S., Schiff E., Lipitz S. Mode of delivery and neonatal outcome in uncomplicated monochorionic twin pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012.
135. Wielgus K., Cieślik K., Waszak M., Słomski R., Szalata M., Kempiak J., Bręborowicz G. Genetic differences in monozygotic twins. *Pol J Environ Stud.* 17, 435-439, 2008 a
136. Wielgus K., Waszak M., Cieślik K., Słomski R., Szalata M., Kempiak J., Bręborowicz G., Gadzinowski J. Determining zygosity in studies of twins. *Pol J Environ Stud.* 17, 440-445, 2008b
137. Williams C., Williamson R., Coutelle C., Loeffler F., Smith J., Ivinson A. Same-day, first-trimester antenatal diagnosis for cystic fibrosis by gene amplification. *Lancet.* 2(8602), 102-103, 1988.
138. Yang M.J., Tzeng C.H., Tseng J.Y., Huang C.Y. Determination of twin zygosity using a commercially available STR analysis of 15 unlinked loci and the gender-determining marker amelogenin--a preliminary report. *Hum Reprod.* 21(8), 2175-2179, 2006.
139. Yu Q., Li Q., Gao S., Su Y., Deng Z. Congenital tetragametic blood chimerism explains a case of questionable paternity. *J Forensic Sci.* 56(5), 1346-1348, 2011.
140. Zwijnenburg P.J., Meijers-Heijboer H., Boomsma D.I. Identical but not the same: the value of discordant monozygotic twins in genetic research. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 153B(6), 1134-1149, 2010.

8. STRESZCZENIE

W diagnostyce perinatalnej ciąży wielopłodowych bardzo ważne jest ustalenie, czy są to ciąży dwukosmówkowe czy jednokosmówkowe oraz jednoowodniowe, natomiast mniejsze znaczenie ma zygodyczność. Wynika to ze wzrostu ryzyka śmiertelności wraz z późniejszym podziałem płodów. Jednak informacja na temat zygodyczności może mieć znaczenie w przypadku wystąpienia konieczności leczenia noworodków. Genetyka molekularna wniosła do badań bliźniąt ułatwienie określenia zygodyczności oraz możliwość wydania wyniku nie budzącego wątpliwości. Badania porównawcze między bliźniętami jednozygotycznymi i dwuzygotycznymi są stosowane w ocenie idiopatogenezy zespołów chorobowych u płodów i noworodków.

Do oceny zygodyczności bliźniąt stosowano metodę hybrydyzacji z sondą molekularną typu *multi locus*, metodę hybrydyzacji z dwoma sondami molekularnymi do badań pojedynczego *locus* – MS31 i MS43A, metodę PCR dla pojedynczego *locus* oraz metodę PCR do jednoczesnego badania 16 *loci*.

Badania hybrydyzacyjne zostały przeprowadzone łącznie dla 170 par bliźniąt, przy czym analiza odcisku genetycznego z zastosowaniem sondy GTG pozwoliła na dokładną identyfikację 87 par bliźniąt dwuzygotycznych i 83 par bliźniąt jednozygotycznych.

W badaniach z zastosowaniem reakcji PCR można wyróżnić w pracy dwa etapy, dotyczące analizy pojedynczych *loci* *PLA2A1*, *CYARO*, *vWF*, *TPOX* i *TH01* oraz jednoczesnej analizy 16 *loci* z wykorzystaniem zestawu *PowerPlex 16*. Zastosowanie analiz pojedynczego *locus* umożliwiło stwierdzenie u trzech par bliźniąt dodatkowych fragmentów DNA, co sugeruje wystąpienie u nich zjawiska chimeryzmu. Dostrzeżenie dodatkowych fragmentów DNA za pomocą analizy typu odcisk genetyczny nie jest możliwe.

Analiza sekwencji pętli D mitochondrialnego DNA potwierdziła wysoki polimorfizm tego regionu w badanej grupie bliźniąt, jednak nie zaobserwowano różnic w obrębie żadnej z par bliźniąt jednozygotycznych.

Częstość występowania polimorficznych alleli *D8S1179*, *TPOX*, *FGA*, *D3S1358*, *D21S11*, *D18S51*, *Penta E*, *D5S818*, *D13S317*, *D7S820*, *D16S539*, *CSF1PO*, *Penta D*, *PLA2A1* i *DIS80*, których obecność stwierdzono w badanej grupie bliźniąt odbiega od częstości ich występowania stwierdzonej w populacji polskiej. Wniosek ten dotyczy bliźniąt jednej płci.

9. SUMMARY

The perinatal diagnostics of multiple pregnancies is very important for determination of type of pregnancy - monochorionic or dichorionic and monoamniotic and equally important is determination of zygosity. This is due to an increased risk of mortality with subsequent division of the fetuses. However, information on zygosity could be even more significant in the case of newborns needing medical treatment. Molecular genetics applied to the study of twins zygosity solves the problem and results are not questionable. Comparative studies between the dizygotic and monozygotic twins are used in the evaluation of idiopathogenesis of syndromes in fetuses and newborns.

For the evaluation of twin zygosity hybridization method using molecular probe of multi locus type, hybridization method with two molecular probes to study single locus - MS31 and MS43A, a PCR method for single locus and the PCR method for multiplex detection of 16 loci were used.

Hybridization studies were carried out for a total of 170 pairs of twins, the genetic fingerprint analysis using GTG probe allowed the accurate identification of 87 pairs of dizygotic twins and 83 pairs of monozygotic twins.

In studies using PCR two stages can be distinguish - the analysis of single loci *PLA2A1*, *CYAR0*, *vWF*, *TH01* and *TPOX* and simultaneous analysis of 16 loci using the *PowerPlex* kit. The use of a single locus analysis enabled the detection in three pairs of twins additional DNA fragments, suggesting the occurrence of chimerism. The detection of additional DNA fragments by DNA fingerprint was not possible.

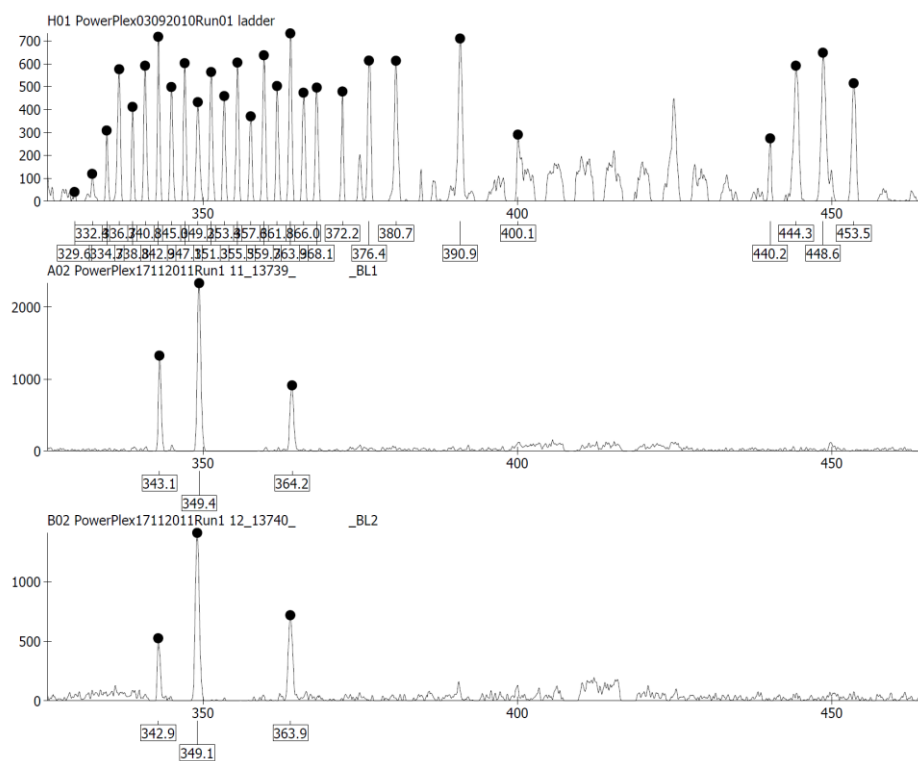
Sequence analysis of D-loop of mitochondrial DNA confirmed the high polymorphism of this region in the group of twins, but no differences were observed within any of the monozygotic pairs of twins.

The incidence of polymorphic alleles *D8S1179*, *TPOX*, *FGA*, *D3S1358*, *D21S11*, *D18S51*, *Penta E*, *D5S818*, *D13S317*, *D7S820*, *D16S539*, *CSF1PO*, *Penta D*, *PLA2A1* and *DIS80*, present in the group of twins was different from the frequency of their occurrence described for the Polish population. This conclusion applies to the twins of the same gender.

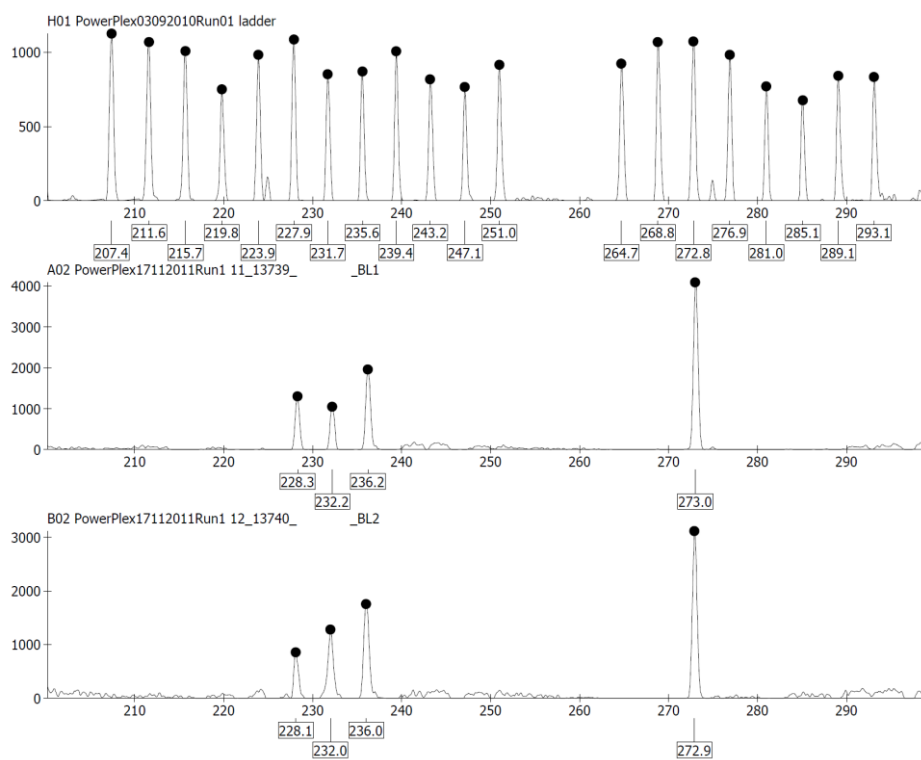
10. ANEKS

Analiza chimeryzmu krwi u bliźniąt.

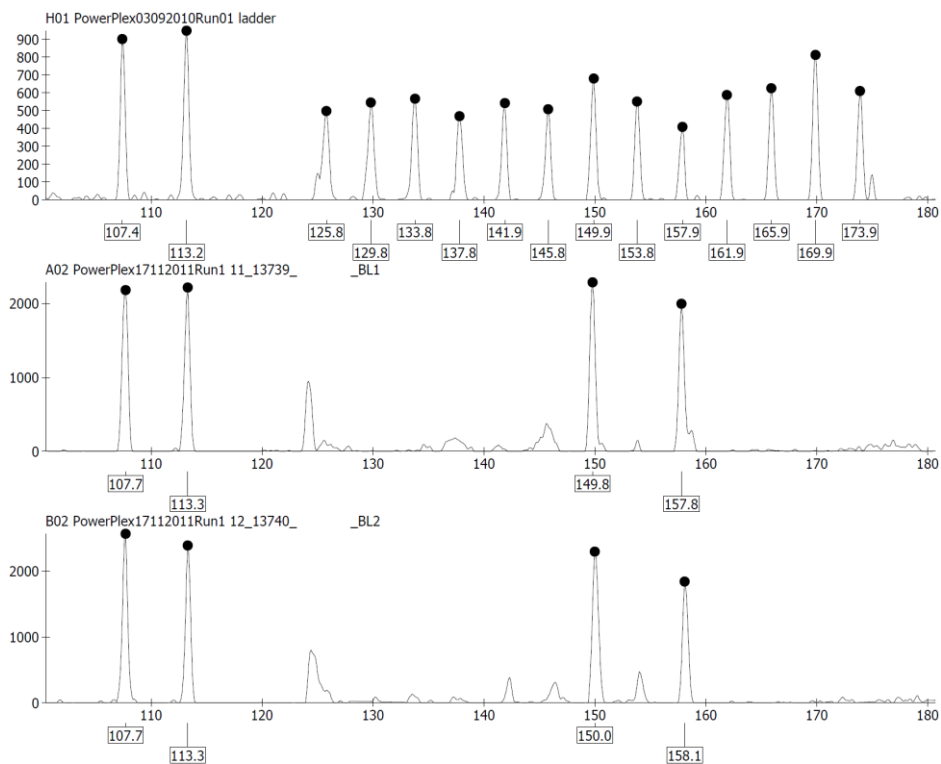
Marker FGA



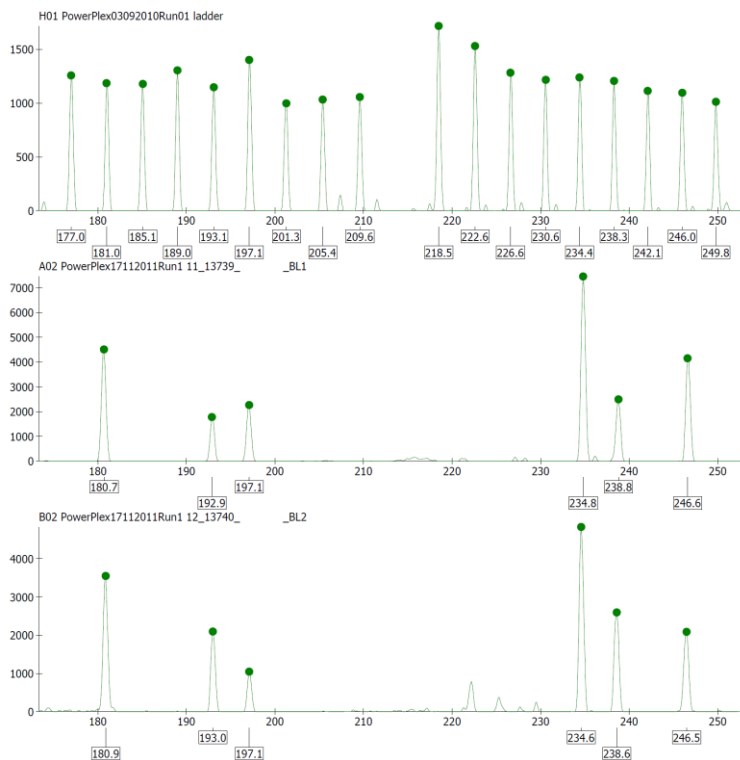
Marker D8S1179 i TPOX



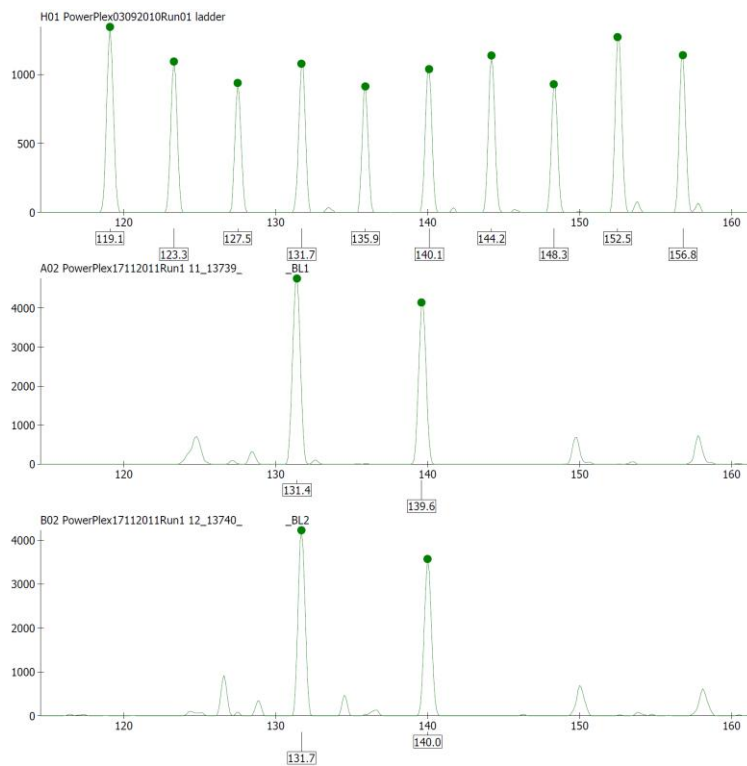
Amelogenina i marker vWA



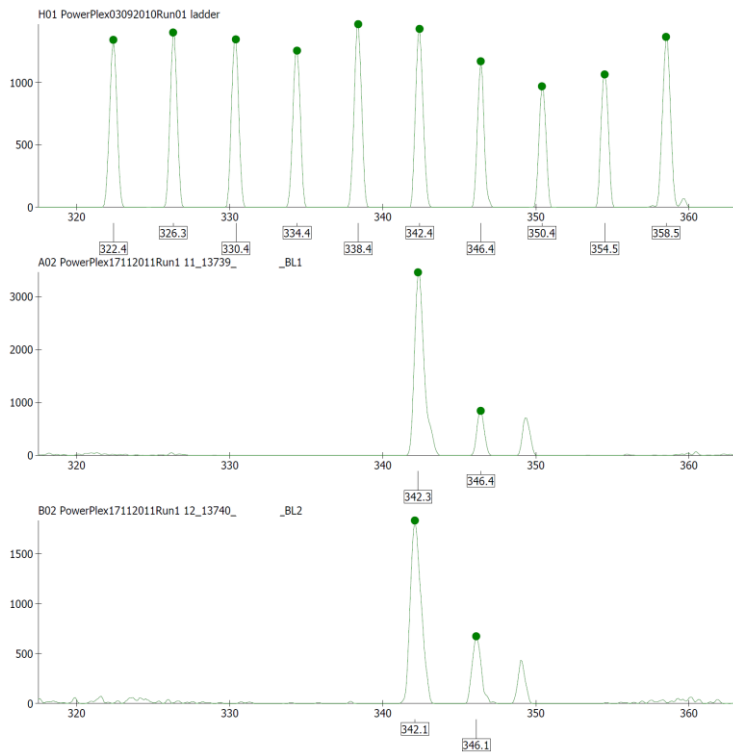
Marker D13S317 i D7S820



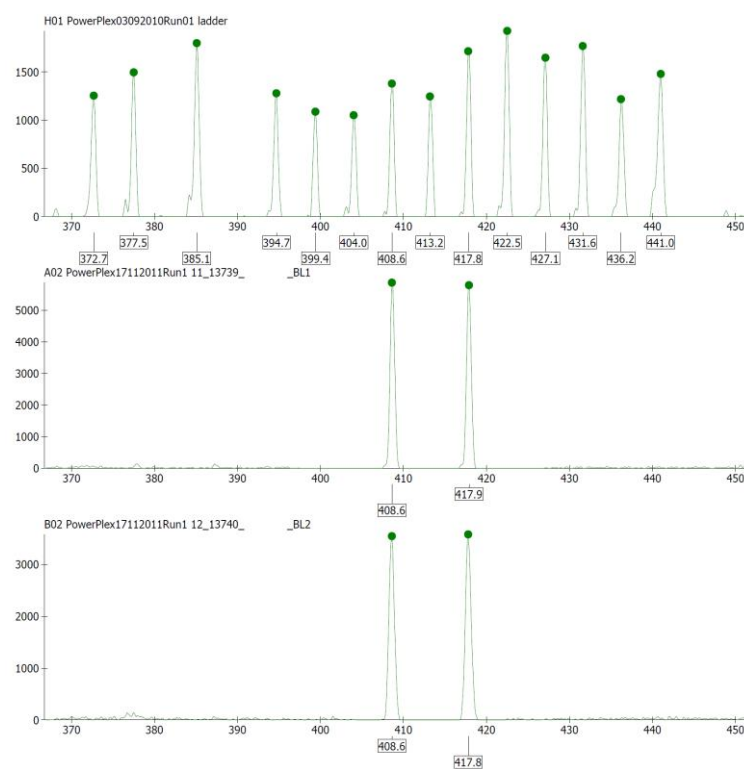
Marker D5S818



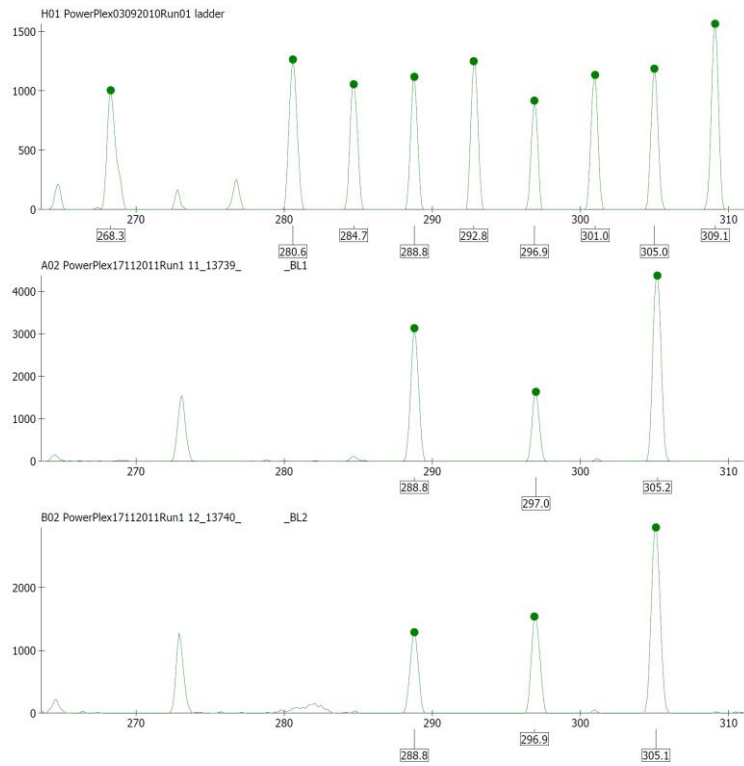
Marker CSF1PO



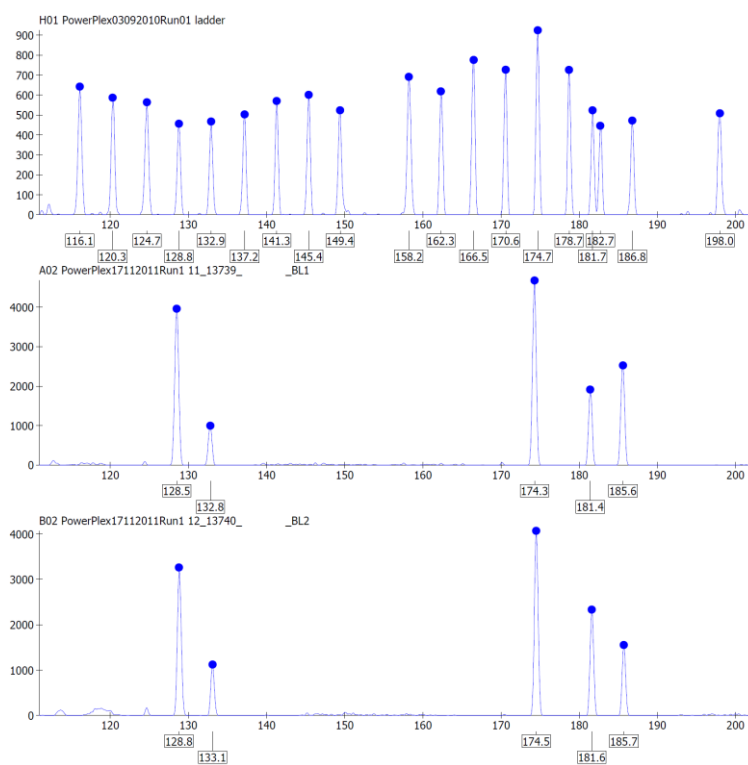
Marker Penta D



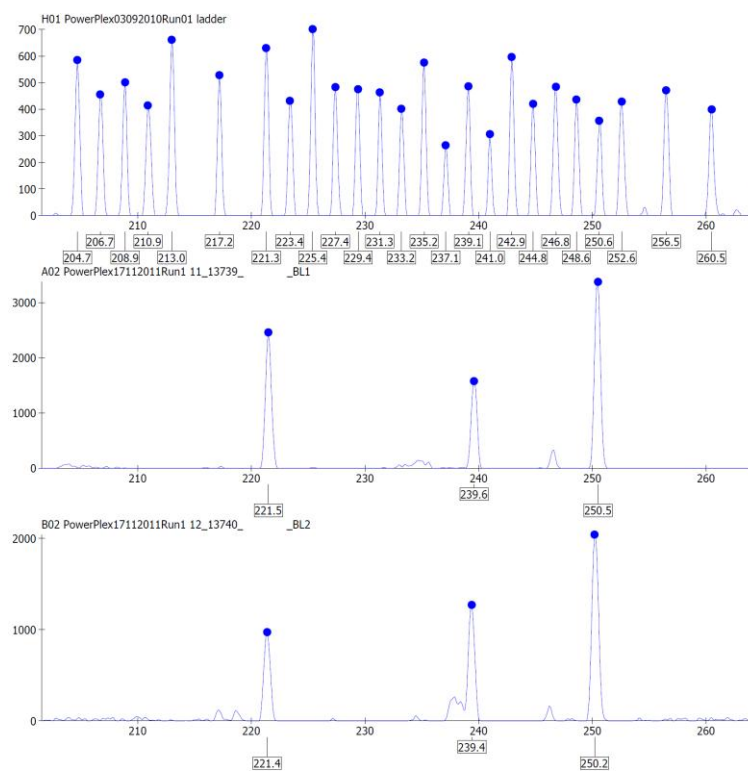
Marker D16S539

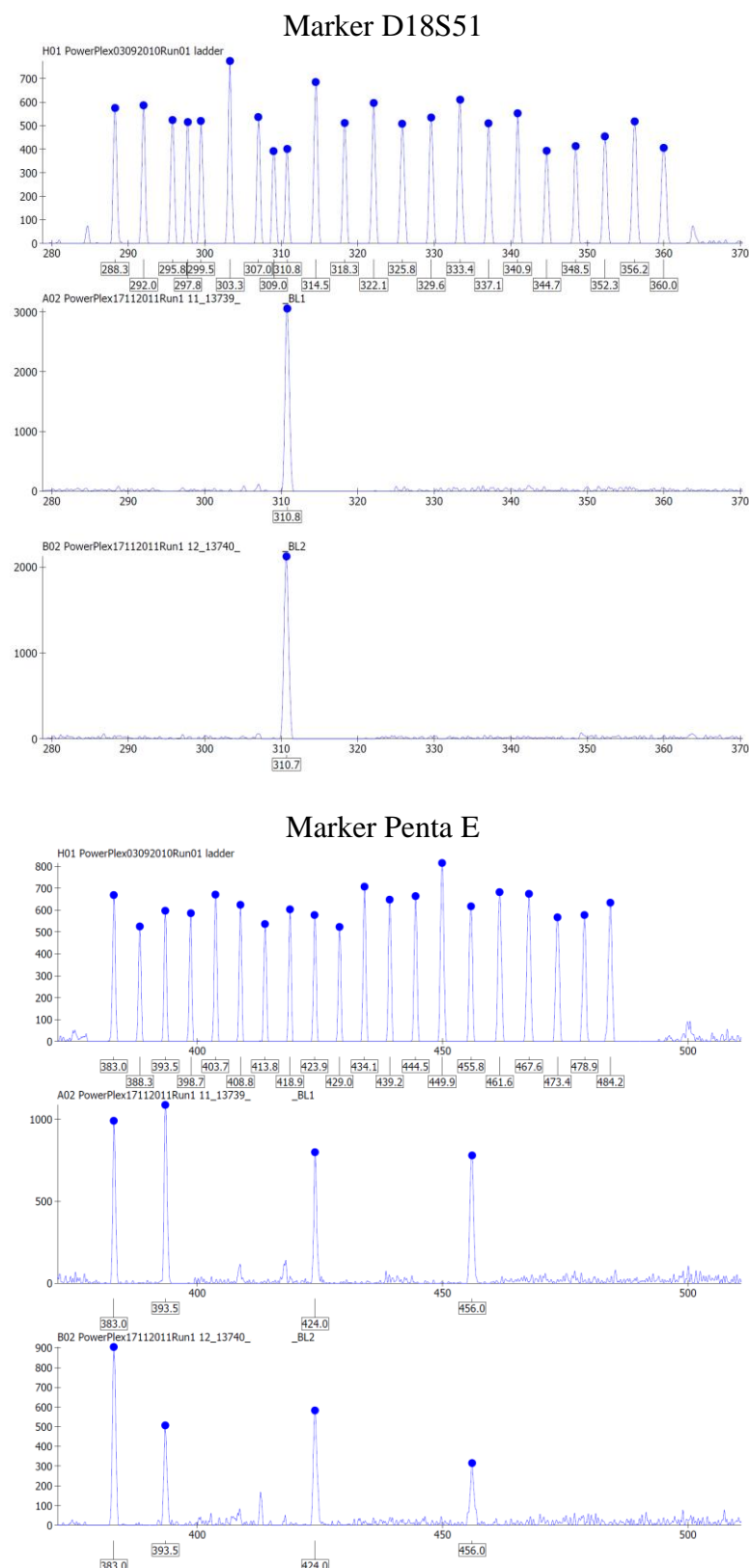


Marker D3S1358 i TH01



Marker D21S11



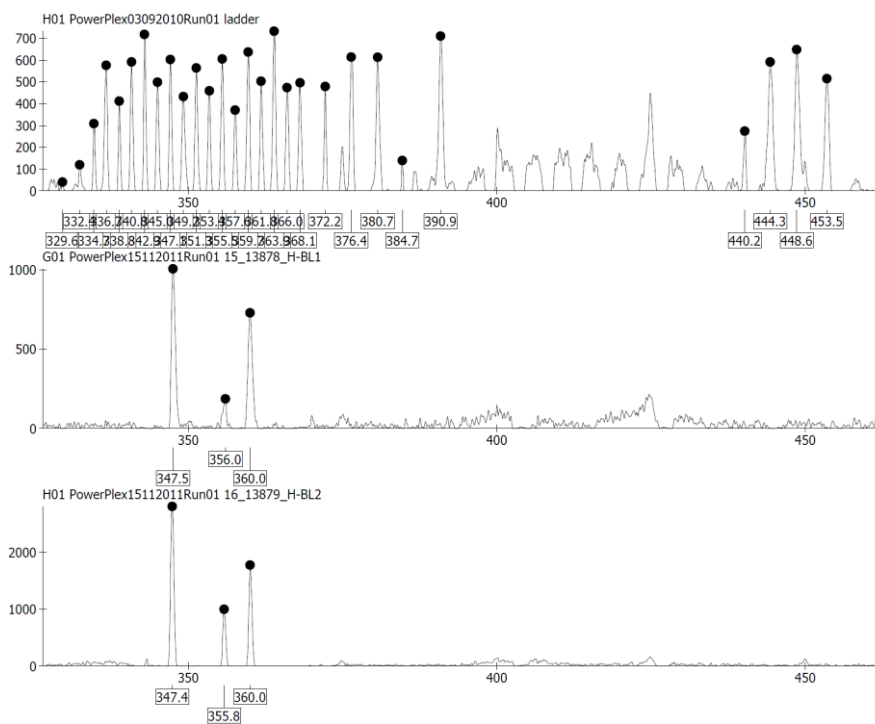


Ryc. 43. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźniąt z chimeryzmem krwi z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*.

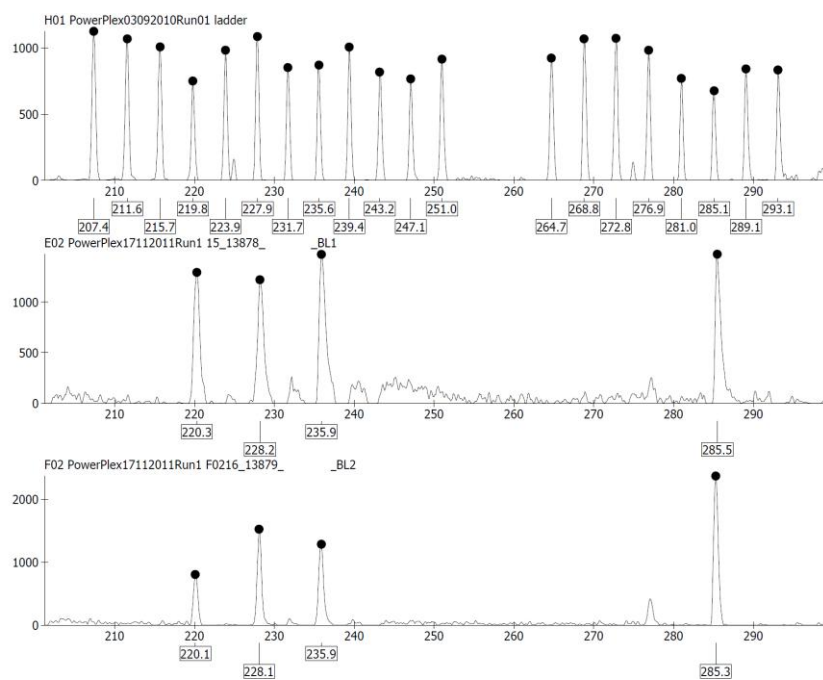
Rycina przedstawia rozdział na sekwenatorze kapilarnym *locus* amelogeniny umożliwiające określenie płci (XY, płć męska) oraz polimorficznych fragmentów *loci* *vWA*, *D8S1179*, *TPOX*, *FGA*, *D5S818*, *D13S317*, *D7S820*, *D16S539*, *CSF1PO*, *Penta D*, *D3S1358*, *TH01*, *D21S11*, *D18S51* oraz *Penta E*. Bliźnięta wykazują obecność dodatkowych alleli dla *locus* *Penta E* (4 allele, 5, 7, 13 i 19) oraz po 3 allele dla *loci* *D13S317* (allele 8, 11 i 12), *D7S820* (allele 10, 11 i

13), *DI6S539* (allele 10, 12 i 14), *D21S11* (allele 28, 32.2 i 35.2), *D8S1179* (allele 12, 13 i 14), *FGA* (allele 20, 21.2 i 25) i *TH01* (allele 8, 9.3 i 11). Dla *locus vWA* występują allele 16 i 18, dla *locus CSF1PO* allele 11 i 12, dla *locus D3S1358* allele 15 i 16, dla *locus D5S818* allele 10 i 12, a dla *locus Penta D* allele 10 i 12. Dla dwóch *loci* *D18S51* (allele 14-14) i *TPOX* (allele 8-8) bliźnięta są homozygotami. Bliźnięta jednozygotyczne.

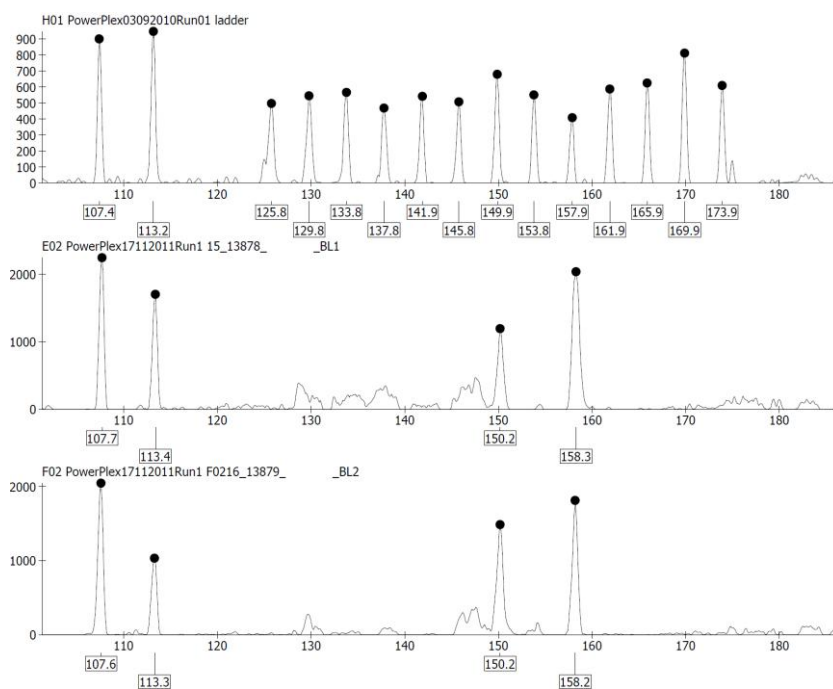
Marker FGA



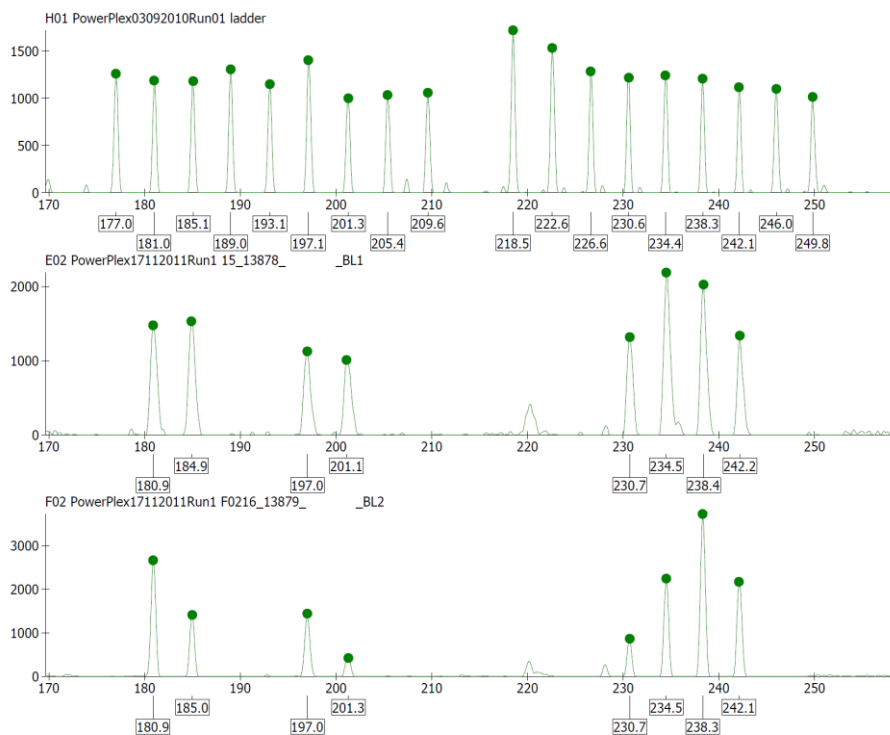
Marker D8S1179 i TPOX



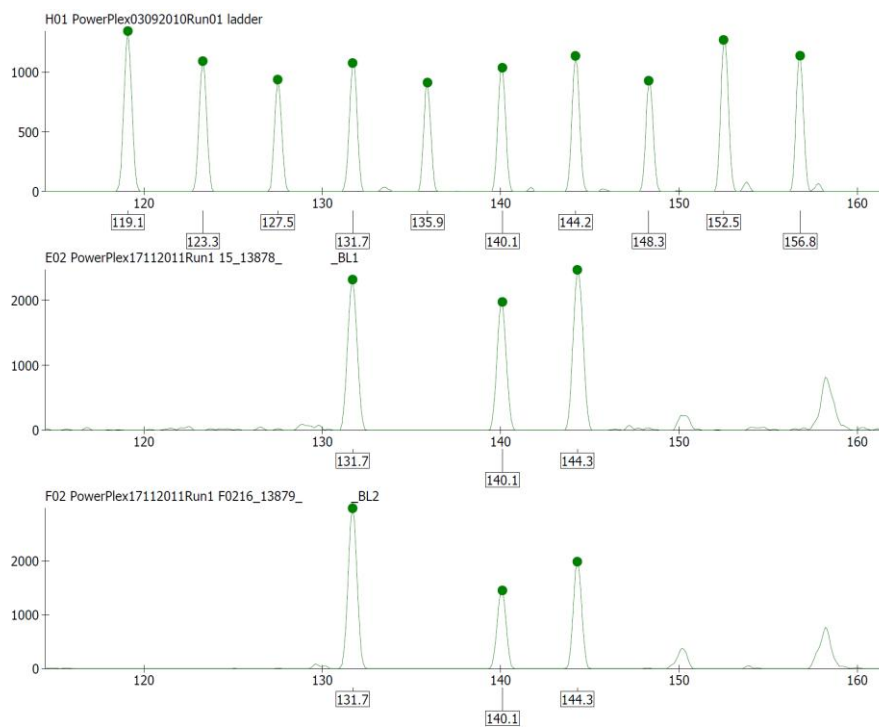
Amelogenina i marker vWA



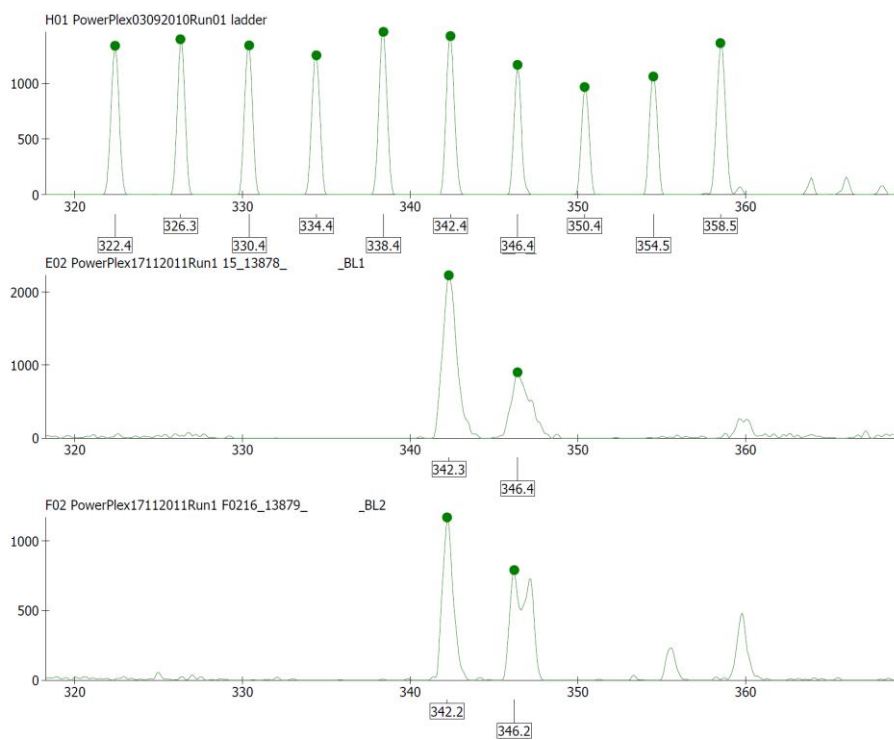
Marker D13S317 i D7S820



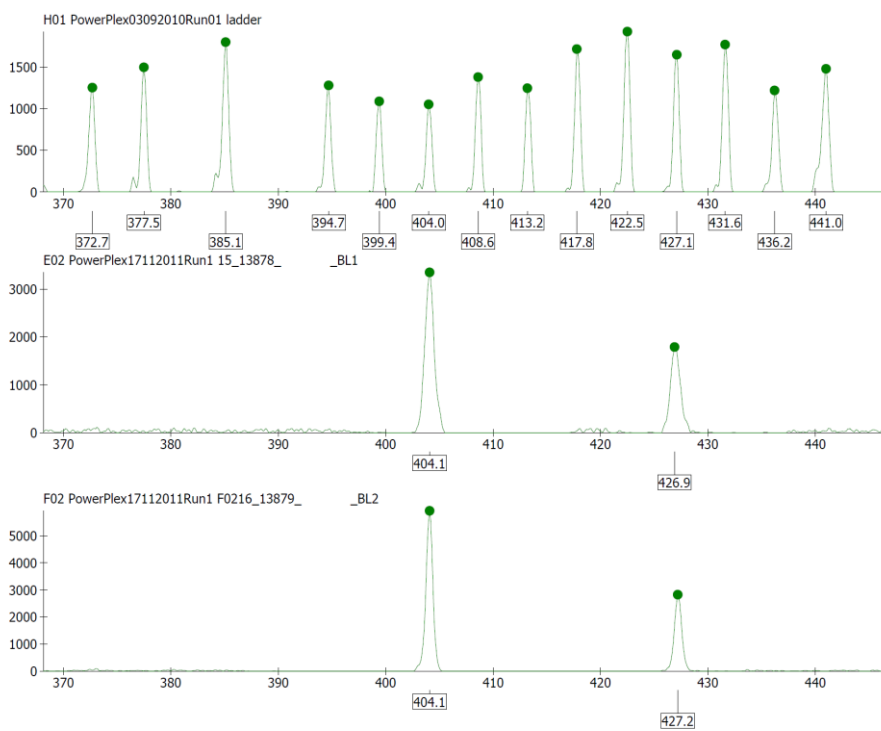
Marker D5S818



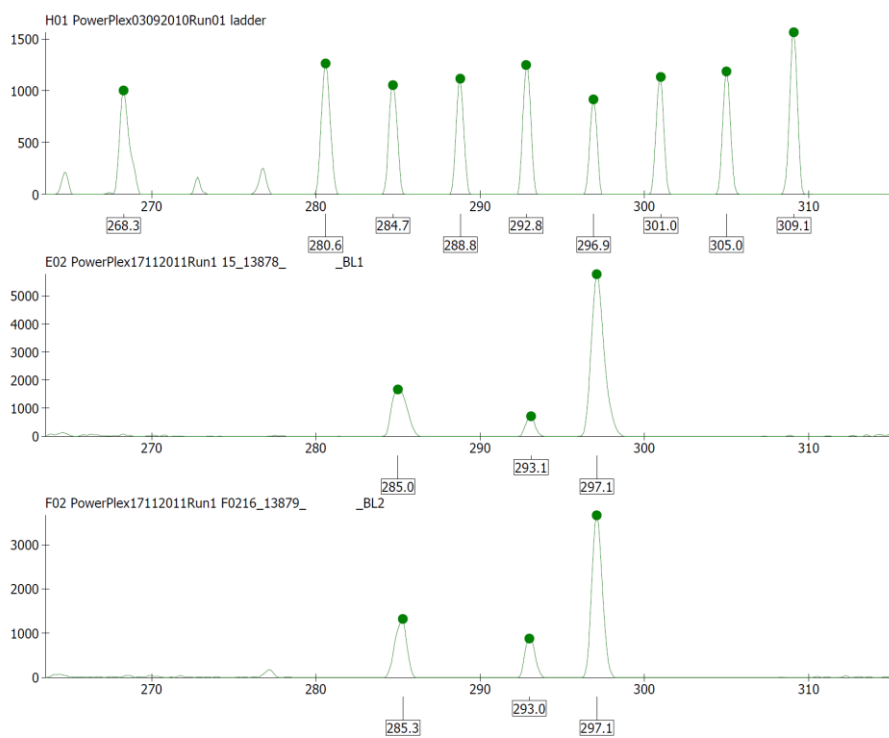
Marker CSF1PO



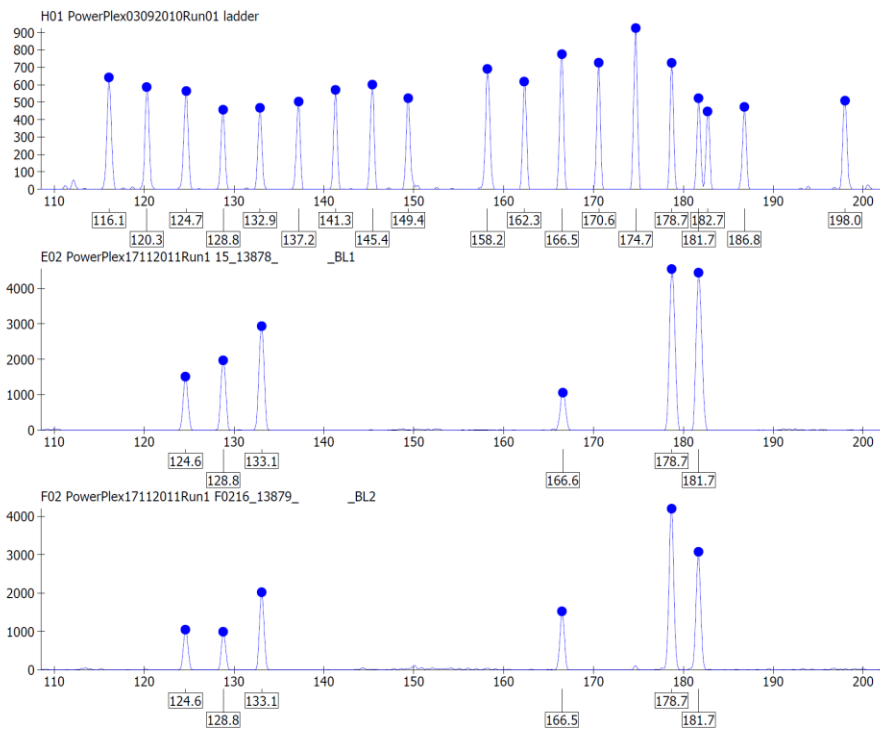
Marker Penta D



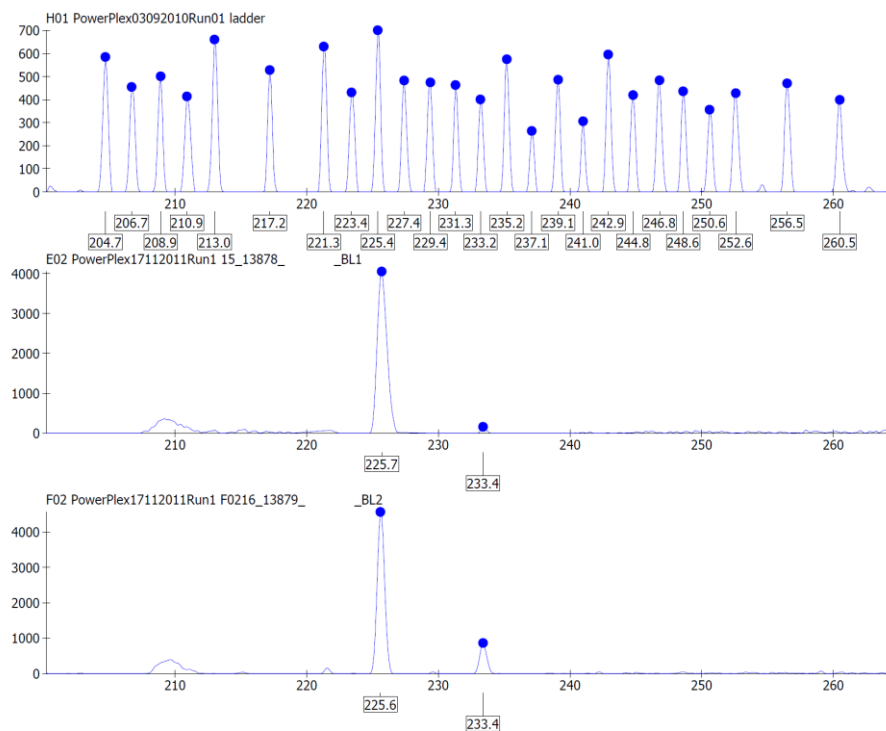
Marker D16S539



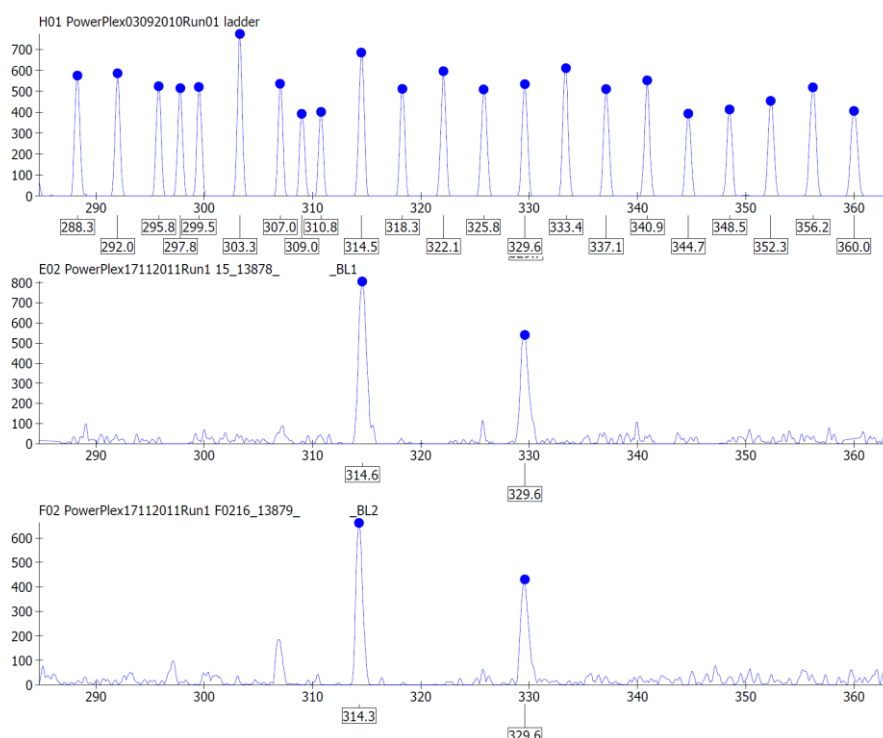
Marker D3S1358 i TH01



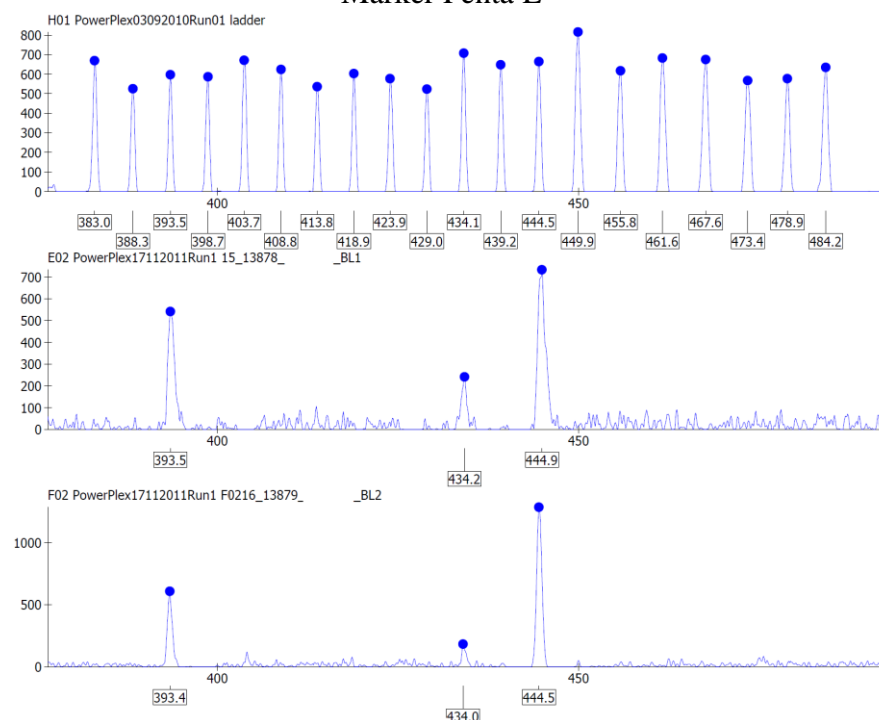
Marker D21S11



Marker D18S51



Marker Penta E



Ryc. 44. Analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego u bliźniąt z chimeryzmem krwi z zastosowaniem zestawu *PowerPlex 16*.

Rycina przedstawia rozdział na sekwenatorze kapilarnym *locus* amelogeniny umożliwiające określenie płci (XY, płęć męska) oraz polimorficznych fragmentów *loci* *vWA*, *D8S1179*, *TPOX*, *FGA*, *D5S818*, *D13S317*, *D7S820*, *D16S539*, *CSF1PO*, *Penta D*, *D3S1358*, *TH01*, *D21S11*, *D18S51* oraz *Penta E*. Bliźnięta wykazują obecność czterech alleli dla *loci* *D13S317* (allele 8, 9, 12 i 13) i *D7S820* (allele 9, 10, 11 i 12) oraz po trzy allele dla *loci* *D16S539* (allele 9, 11 i 12), *D3S1358* (allele 14, 15 i 16), *D5S818* (allele 10, 12 i 13), *D8S1179* (allele 10, 12 i 14), *FGA* (allele 21, 23 i 24), *Penta E* (allele 7, 15 i 17) oraz *TH01* (allele 6,9 i 9.3). Dla *locus* *vWA*

występują allele 16 i 18, dla *locus CSF1PO* allele 11 i 12, dla *locus D18S51* allele 15 i 19, dla *locus D21S11* allele 29 i 31, a dla *locus Penta D* allele 9 i 14. Dla *locus TPOX* bliźnięta są homozygotami (11-11). Bliźnięta jednozygotyczne.

11. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ NA PROWADZENIE BADAŃ



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 6
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 764/09

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 z zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 08 października 2009 r.

**rozpatrzyła wniosek, który przedstawił Pan:
prof. dr hab. Ryszard Słomski**

**w sprawie prowadzenia badań w
Instytucie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu**

Główny badacz: lek. med. Mariusz Nawrocki
**Członkowie zespołu
badawczego: dr n. med. Karolina Wielgus
mgr Marta Podralska
dr med. Joanna Kempniak
prof. dr hab. Krystyna Cieślak
dr Małgorzata Waszak
dr Marlena Szalata**

**Temat
badań: "Analiza zmienności genetycznej bliźniąt – polimorfizm
sekwencji mikrosatelitarnych DNA, heteroplazmia
mitochondrialnego DNA i występowanie chimeryzmu
komórek krwi".**

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski



UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

<i>Locus</i>	Chromosom	Sonda Gen	Motyw (pz)	Liczba alleli	Heterozygotyczność (%)	Metoda badań	Sekwencje starterów do PCR	Wielkość produktu (pz)
<i>Multi locus</i>		(CAC) ₅	15			H		
<i>DIS21</i>	7p22	MS31	21		97	H		3200-13300
<i>D12S11</i>	12q24.3	MS43A	45		96	H		3300-14300
<i>PLA2A1</i>	12q23	fosfolipaza trzustkowa	3	8	72-82	PCR	GGTTGTAAGCTCCATGAGGTTAGA TTGAGCACTTACTATGTGCCAGGCT	118-139
<i>CYP19</i>	15q21.1	cytochrom P450	4	8	57-78	PCR	GGTAAGCAGGTACTTAGTTAGCTAC GTTACAGTGAGCCAAGGTCGTGAG	173-201
<i>vWF</i>	12p13	czynnik von Willebrandta	4	8		PCR	GGACAGATGATAAAATACATAGGATGGATGG CCCTAGTGGATG ATAAGAATAATC	134-162
<i>TPOX</i>	2p23	peroksydaza tarczycy	4	10	75	PCR	ACTGGCACAGAACAGGCACCTTAGG GGAGGAACTGGGAACCCACACAGGT	220-256
<i>TH01</i>	11p15.5	hydroksylaza tyrozynowa	4	8	79	PCR	GTGGGCTGAAAAGCTCCCATTAT ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG	179-203

H – hybrydyzacja z sondą molekularną

Tabela 11. Zestawienie przykładowych wyników analizy PowerPlex 16 dla bliźniąt. AMG – amelogenina. Pogrubiono allele umożliwiające rozróżnienie bliźniąt dwuzygotycznych.

Nr	Nr DNA	Zygotyeczność	AMG	vWA	D8S1179	TPOX	FGA	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	PentaE	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	PentaD
1.	239a	DZ	XX	16-17	12-15	8-12	21-24	14-17	6-9,3	29-30	13-14	5-17	11-11	8-11	8-9	9-11	11-11	10-12
2.	239b	DZ	XX	16-17	12-15	12-12	22-24	14-17	6-9,3	27-29	13-14	10-12	11-11	8-12	10-10	9-11	11-11	10-12
3.	242a	DZ	XX	16-18	13-15	8-11	20-22	16-16	9-9,3	28-30,2	12-18	12-14	12-12	9-13	11-14	12-14	10-11	9-14
4.	242b	DZ	XX	16-18	13-14	8-11	22-24	14-18	6-9	28-30,2	12-15	12-14	12-12	11-13	10-11	11-11	10-11	9-12
5.	231a	MZ	XX	15-18	14-14	11-11	22-25	18-18	9-9,3	27-30	14-15	7-10	11-12	9-9	10-11	9-13	10-11	10-13
6.	231b	MZ	XX	15-18	14-14	11-11	22-25	18-18	9-9,3	27-30	14-15	7-10	11-12	9-9	10-11	9-13	10-11	10-13
7.	232a	MZ	XY	17-18	14-15	11-11	23-24	15-16	8-9,3	30,2-33,2	15-15	11-17	11-12	11-12	11-11	11-12	12-13	9-12
8.	232b	MZ	XY	17-18	14-15	11-11	23-24	15-16	8-9,3	30,2-33,2	15-15	11-17	11-12	11-12	11-11	11-12	12-13	9-12

PLA2A1





