

Badania cytogenetyczne w ocenie płodności kobiet

Według WHO za niepłodność uważa się niemożność poczęcia po roku regularnego współżycia seksualnego, bez stosowania antykoncepcji [1]. Około 10-15% ciąży rozpoznanych klinicznie w I trymestrze kończy się poronieniem samoistnym. Następujące po sobie co najmniej 3 poronienia określa się według definicji WHO jako poronienia nawykowe, ale już 2 poronienia są wskazaniem do badania cytogenetycznego obojga partnerów. Problem ten dotyczy 1-2% wszystkich par w wieku rozrodczym [2]. Ocenia się, iż wśród par doświadczających poronień nawracających średnio od 3,0 do 6,0% partnerów jest nosicielami aberracji struktury chromosomów, które dwa razy częściej występują w populacji kobiet niż mężczyzn [3,11]. Podczas gdy przed erą zapłodnienia *in vitro* (IVF) i wewnątrzcytoplazmatycznej iniekcji jądra plemnika (ICSI) określenie rodzaju nieprawidłowości chromosomowej nie odgrywało znaczącej roli, obecnie w okresie rozwoju technik wspomaganego rozrodu przeprowadzanie badań cytogenetycznych w celu wykrycia nieprawidłowości chromosomów zyskało na znaczeniu. Wykrycie aberracji chromosomowej jest istotne w przypadku diagnostyki niepłodności, wyboru leczenia, oszacowania ryzyka przekazania defektu przyszłemu potomstwu oraz zastosowania odpowiedniego nadzoru nad ciężarną kobietą [4]. Przyczyna niepłodności wpływa na dalsze rokowanie bez leczenia, ale oczywiście nie można jej ustalić bez odpowiednich badań [5]. Niewyjaśnioną niepłodność rozpoznaje się wówczas, gdy wszystkie standardowe elementy oceny dają prawidłowe wyniki. Minimalnymi wymogami takiego rozpoznania jest prawidłowy wynik badania nasienia, obiektywne dowody owulacji, prawidłowa jama macicy i drożność obu jajowodów. Kolejnym etapem diagnostyki jest wykonanie badań cytogenetycznych, ponieważ badania Mau Holzmann z 2005 roku wykazały, że u par z wielokrotnymi poronieniami w wywiadzie, częściej występowały translokacje zrównoważone lub inne nieprawidłowości chromosomalne, które nie wywierały wpływu na fenotyp, ale równocześnie mogły być letalne dla zygoty, u której wystąpił niezrównoważony kariotyp [6]. Tym samym zauważono korelację pomiędzy liczbą poronień a częstością nieprawidłowości chromosomalnych [3].

Długo debatowano nad zastosowaniem analizy kariotypu kobiet jako rutynowego badania diagnostycznego niepłodnych par [7]. Jako że aberracje chromosomowe mogą być przyczyną niepłodności zarówno u kobiet jak i u mężczyzn, większość autorów zauważa konieczność przeprowadzania screeningowych badań cytogenetycznych u obojga partnerów decydujących się na wspomaganą technikę rozrodu [1, 2].

Najczęstsze sytuacje kliniczne, w których wskazane jest określenie kariotypu pacjentki i jej partnera na oddziałach i w poradniach ginekologicznych, endokrynologii ginekologicznej i leczenia niepłodności, to:

- azoospermia lub znaczna oligozoospermia w badaniu nasienia (zespół Klinefeltera),
- wady rozwojowe u dziecka zmarłego po porodzie, obumarłego płodu (trisomie autosomów, niezrównoważona translokacja, delecja),
- wykrycie aberracji chromosomowej w badaniu prenatalnym lub nietypowego wariantu morfologicznego chromosomu u płodu pacjentki,
- niepłodność o nieznannej etiologii,
- nieprawidłowa budowa narządów płciowych, obojnactwo (zespół Turnera, kobiety XY),
- występowanie aberracji strukturalnej w rodzinie - konieczne jest zbadanie innych członków rodziny, aby określić ryzyko wystąpienia aberracji u potomstwa w tej rodzinie.

Ponadto analiza kariotypu jest wskazana u kobiet z:

- pierwotnym lub wtórnym brakiem miesiączki o nieustalonej etiologii albo przedwczesną menopauzą (podejrzanie zespołu Turnera, kobiety z dodatkowym chromosomem Y),
- znacznymi zaburzeniami wzrostu o nieznannej etiologii (zespół Turnera, zespół Klinefeltera, 47, XXY),
- występowanie choroby recesywnej związanej z chromosomem X

- dwa (lub więcej) poronienia samoistne w I trymestrze ciąży (kieruje się po wykluczeniu innych, częstszych przyczyn) albo nawracające poronienia również w późniejszym okresie ciąży [8].

Kolejnym ważnym wskazaniem do wykonania badania cytogenetycznego jest postępowanie diagnostyczne przed zastosowaniem wspomaganych technik rozrodu [9]. Nieprawidłowy wynik badania cytogenetycznego powinien być przekazywany pacjentowi w ramach porady genetycznej. Jego interpretacja wymaga nie tylko wiedzy na temat zespołów i aberracji chromosomowych, ale również dobrej znajomości techniki, jaką badanie zostało przeprowadzone oraz jej ograniczeń.

Badania cytogenetyczne, których celem jest wykrywanie nieprawidłowości chromosomów, mają ograniczone zastosowanie ze względu na swoją rozdzielczość. W konwencjonalnym badaniu cytogenetycznym o wysokiej rozdzielczości można uwidocznić aberracje na poziomie jednego prążka (długości do około 5 Mbp, czyli 5 000 000 par zasad (bp - base par), stosując zaś HR-CGH (tzw. high resolution Comparative genome hybridization), można uwidocznić mikroaberracje, tzn. delecje lub duplikacje obejmujące odcinki około 3Mbp. Dzięki technologii tworzenia mikromacierzy (ang. microarray) rozdzielczość badania może wynieść nawet 1.4 kbp. Obecnie stosuje się całogenomowe array-CGH, ale również macierze do badania zmian w pojedynczych chromosomach.

Mikromacierze zawierają zestawy pożądaných sklonowanych sekwencji DNA o wysokiej rozdzielczości lub oligonukleotydów, co pozwala na wykrywanie polimorfizmów w sekwencji DNA, tzw. SNP (ang. single nucleotide polymorphism).

Metody molekularne pozwalają na wykrywanie tak drobnych zmian, jak mutacje pojedynczych nukleotydów. W niektórych przypadkach, gdy pojawienie się danego zespołu może być uwarunkowane występowaniem mikroaberracji lub mutacjami genetycznymi, pełna diagnostyka genetyczna może składać się zarówno z klasycznego badania cytogenetycznego, jak i cytogenetycznego badania molekularnego (np. FISH). W przypadku schorzeń uwarunkowanych genetycznie, gdy podłożem ich wystąpienia nie są aberracje chromosomowe, lecz mutacje w obrębie jednego lub kilku genów, metodami cytogenetycznymi nie można wykryć takich zmian. Zastosowanie znajdują wówczas różnorodne metody biologii molekularnej. Znajomość etiologii danego zespołu genetycznego ułatwia zaplanowanie procesu diagnostycznego.

Uwzględniając rozwój nowoczesnych metod biologii molekularnej, techniki cytogenetyczne można podzielić na klasyczne i molekularne:

- Cytogenetyka klasyczna opiera się na metodach analizy prążków chromosomowych.
- Cytogenetyka molekularna wykorzystuje techniki biologii molekularnej do badania prawidłowości chromosomów.

Cytogenetyka molekularna w głównej mierze oparta jest na metodzie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. FISH - fluorescent *in situ* hybridization) przy wykorzystaniu tzw. sond do wykrywania określonych aberracji chromosomowych. Sondy te wykrywają określone sekwencje DNA. Mogą one być specyficzne dla centromerów, telomerów, określonych prążków lub nawet całych chromosomów. Główną ich zaletą jest możliwość wykrywania aberracji w jądrach interfazowych, bez konieczności hodowli *in vitro*, lecz jeszcze przed badaniem należy wybrać sondę wykrywającą określoną aberrację; tymczasem przy użyciu cytogenetyki klasycznej możliwa jest analiza liczbowa wszystkich chromosomów oraz wykrycie niepodjętej *a priori* aberracji.

Cytogenetyka molekularna uzupełnia badania wykonywane za pomocą metod cytogenetyki klasycznej, która stanowi podstawę warsztatu. Natomiast cytogenetyka molekularna jest zapleczem dla badań określonych aberracji lub rozwiązywania problemów diagnostycznych.

Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH).

Podstawą działania jest zasada komplementarności zasad w łańcuchach DNA. Każdy chromosom zbudowany jest

z dwóch chromatyd, a każda chromatyda z jednej cząsteczki DNA, czyli jednej podwójnej helisy DNA oraz białek. Możliwe jest przeprowadzenie denaturacji DNA chromosomów. Jednoniciowy DNA będzie dążyć do odszukania komplementarnej nici DNA oraz związania się z nią, czyli hybrydyzacji. Badanie FISH polega na hybrydyzacji krótkiego odcinka DNA o znanej sekwencji (sondy DNA) do nici DNA na chromosomie. Aby była możliwa obserwacja bardzo krótkich sond DNA, są one znakowane cząsteczką fluorescencyjną lub inną cząsteczką, którą wykrywa się za pomocą fluorescencyjnie znakowanych przeciwciał. Stąd nazwa fluorescencyjna hybrydyzacja, a jej wynik obserwuje się w mikroskopie fluorescencyjnym jako fluorescencyjne sygnały na chromosomach. FISH przeprowadza się na preparatach zawierających DNA w formie chromosomów. Badanie to umożliwia wykrywanie specyficznych sekwencji DNA na chromosomach, pojedynczych komórkach i tkankach. Klasyczna technika FISH polega na wykorzystaniu jednej do trzech różnie znakowanych sond. Jeżeli pacjent posiada translokację, to zaobserwuje się sygnał z sondy na innym chromosomie niż normalna lokalizacja danej sondy. W ten sposób, stosując odpowiednie kombinacje sond, można wykrywać zespoły mikrodelecji, potwierdzać translokacje, insercje i inne aberracje, a także rozwiązywać problemy diagnostyczne, które napotka cytogenetyk podczas interpretacji zmian chromosomowych podczas klasycznego badania cytogenetycznego.

Zastosowanie klasycznej metody FISH:

- badanie prawidłowości struktury chromosomu,
- diagnostyka aberracji strukturalnych chromosomów,
- dokładne określanie punktów złamań chromosomów w zdiagnozowanych aberracjach strukturalnych chromosomów,
- wykrywanie niewielkich delecji w przypadku pozornie cytogenetycznie zrównoważonych translokacji powstających *de novo*,
- identyfikacja aberracji subtelomerowych,
- diagnostyka cytogenetyczna komórek nowotworowych,
- rozwiązywanie problemów diagnostycznych wynikających z analizy prążków,
- określanie występowania niektórych wariantów morfologicznych chromosomów.

Cytogenetyka interfazowa.

Technika umożliwiająca badanie chromosomów w jądrze interfazowym dzięki zastosowaniu metod molekularnych. Wykrywanie określonych fragmentów DNA na jądrze interfazowym znacznie ułatwia i przyspiesza niektóre badania cytogenetyczne, gdyż nie jest konieczne uzyskiwanie dzielących się komórek w hodowli komórkowej do badania chromosomów. Cytogenetyka interfazowa znalazła zastosowanie głównie w badaniach prenatalnych, onkologicznych oraz hematoonkologicznych, a także w badaniach preimplantacyjnych.

Multicolor FISH.

Zasada działania tej techniki jest identyczna jak fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*. Badanie to jest właściwie odmianą FISH, gdzie stosuje się inne sondy DNA. Polega na jednoczesnym wybarwieniu wszystkich chromosomów na różne kolory. Każda para chromosomów homologicznych jest wybarwiona innym kolorem. Technika ta jest przydatna do analizy aberracji złożonych, zwłaszcza kiedy w translokacji bierze udział kilka chromosomów oraz gdy trudno jest rozróżnić, skąd pochodzą fragmenty wielokrotnie uszkodzonych chromosomów.

Porównawcza hybrydyzacja genomowa (ang. comparative genomic hybridization).

Technika CGH jest również jedną z modyfikacji metody FISH. Podczas badania CGH na preparacie zawierającym prawidłowe metafazy przeprowadza się hybrydyzację *in situ*. Jako sondy używa się znakowanego DNA:

- genomowego DNA pacjenta znakowanego kolorem zielonym,
- znakowanego genomowego DNA referencyjnego znakowanego kolorem czerwonym.

Najważniejszą zaletą tej techniki jest możliwość jej zastosowania na tkankach, z których nie udało się uzyskać dzielących się komórek, a mimo to możliwe jest zidentyfikowanie aberracji niezrównoważonych każdego chromosomu. Wadą tej techniki są: brak możliwości wykrywania aberracji zrównoważonych, takich jak translokacje czy inwersje oraz dość ograniczone możliwości badania aberracji telomerowych i mozaikowości.

Ze względu na rozwój cytogenetyki molekularnej do badania prawidłowości chromosomów stosuje się obecnie wiele technik molekularnych, które mogą służyć badaniom DNA. Jest to obszar cytogenetyki bardzo ściśle zazębiający się z genetyką molekularną. Wykorzystanie tych metod, podobnie jak metody FISH, pozwala na wykrywanie coraz drobniejszych delecji i duplikacji lub wykrywanie aneuploidii w komórkach tkanek bez procedury hodowli, podobnie jak ma to miejsce w metodzie CGH.

Array-CGH

Metoda array-CGH, jest nowoczesną metodą, w której jako sondy stosuje się genomowe DNA pacjenta oraz dla porównania DNA referencyjne. W tej technice hybrydyzację sond genomowych przeprowadza się na matrycy zawierającej klony DNA lub oligonukleotydy. Metoda ta jest z pewnością obecnie najdokładniejszą (o najwyższej rozdzielczości) metodą badania aberracji chromosomowych.

MLPA

Technika MLPA (ang. multiplex ligation-dependent probe amplification) w przeciwieństwie do wcześniej opisanych technik nie jest oparta na hybrydyzacji *in situ*, ale jest kombinacją hybrydyzacji oligonukleotydów do DNA pacjenta oraz techniki PCR. Odmową zaletą tej techniki jest możliwość użycia aż do 45 sond w jednej reakcji oraz ograniczonej ilości DNA (20ng-okolo 3300 komórek lub 1 ml płynu owodniowego), która jest niezbędna do przeprowadzenia reakcji. Sondy MLPA mogą rozpoznać nawet różnice w sekwencji DNA w postaci mutacji jednego nukleotydu, co pozwala na wykorzystanie techniki nie tylko do badań aberracji chromosomowych, ale również do badań molekularnych DNA. Metoda ta ma jednak swoje ograniczenia, mianowicie nie wykrywa zrównoważonych aberracji chromosomowych, a to jakie aberracje zostaną wykryte, zależy od użytego zestawu.

Po uzyskaniu wyniku badania należy ocenić czy dany prawidłowy wynik rzeczywiście zamyka konieczność dalszej diagnostyki, w przypadku patologicznego - odpowiednio go zinterpretować oraz udzielić pacjentowi i jego rodzinie właściwej porady genetycznej [10]. Warto w tym miejscu wspomnieć, iż pary doświadczające poronień nawracających, u których stwierdzono nieprawidłowości chromosomowe mają szansę na urodzenie zdrowego dziecka, lecz powinny być poinformowane o ryzyku kolejnego poronienia [3].

Badania wykazują, że za nawracające poronienia samoistne, wynikające z nieprawidłowości kariotypu potencjalnych rodziców, częściej odpowiedzialne jest nosicielstwo zrównoważonych aberracji strukturalnych przez kobiety niż przez mężczyzn [1,3]. Mężczyźni z niepłodnej pary ze wskazaniami do IVF wykazują 1,0% częstość występowania nieprawidłowości chromosomowych, zaś pacjenci ze wskazaniami do ICSI wykazują 4,6% anomalii kariotypu. Co ciekawe, kobiety ze wskazaniami do IVF wykazują siedmiokrotnie większą częstość występowania aberracji chromosomowych (4,0%), natomiast te ze wskazaniami do ICSI mają 5,0% częstość występowania nieprawidłowości kariotypu [9].

Przeprowadzane na kobietach badania cytogenetyczne, będące częścią rutynowych badań przed wspomaganymi technikami rozrodu, wykazują następujące nieprawidłowości:

- Zespół 47, XXX (zaledwie 0,1% przebadanych pacjentek)
- Zespół Turnera (45,X) (45,X/46,XX lub 45,X/47,XXX/46,XX itd.) będący najczęstszą aberracją chromosomową związaną z żeńską niepłodnością oraz niewydolnością jajników w badaniach wykrywa się częściej jako

gonadalny mozaicyzm (45,X/46,XX lub 45,X/47,XXX/46,XX itd.) niż monosomię (45,X). Takiego wyniku doszukuje się w związku z występowaniem charakterystycznego fenotypu (niski wzrost, brak drugorzędowych cech płciowych, brak miesiączki) w przypadku monosomii, a w związku z tym szybszej diagnostyki danej pacjentki.

- Strukturalne nieprawidłowości chromosomu X: i(Xq) oraz del(Xp), które są najczęstszą strukturalną aberracją chromosomową ze współistnieniem fenotypu zespołu Turnera. Zaburzenie polega na występowaniu izochromosomu, powstającego przez połączenie długich ramion chromosomu X. Szacuje się, że 15% karyotypowanych pacjentek z zespołem Turnera posiada i(Xq).
- Translokacje X-autosom powstające zazwyczaj *de novo*. Fenotyp i płodność pacjentki zależą od wielu czynników m.in. miejsca, w którym dojdzie do złamania chromosomu. Translokacja ta może być inaktywowana, gdy translokacyjny chromosom zachowuje centrum inaktywacji [12].
- Translokacje Robertsonowskie odnajdowane u niewielkiego (0,2%) odsetka przebadanych kobiet, nie odgrywają znaczącej roli w patogenezie żeńskiej niepłodności.
- Wzajemne autosomalne translokacje. Częstości występowania zarówno u kobiet jak i u mężczyzn nie różnią się znacząco. Tego typu aberracje występowały u 1,0% kobiet przed IVF, zaś przed ICSI u 0,7%.
- Kompleksowe aberracje chromosomowe (CCR) są to strukturalne nieprawidłowości chromosomowe dotyczące przynajmniej trzech chromosomów z trzema lub więcej miejscami złamań. Dokładne dane na temat częstości występowania w populacji ogólnej nie występują, wiadomo jednak, że większość przypadków tej nieprawidłowości, opisywanych do tej pory w literaturze, dotyczy kobiet. Mogą powstawać *de novo* lub być dziedziczone od matki.
- Inwersje, których rozpowszechnienie sięga 0,01-0,07% dla pericentrycznych i 0,01-0,05% dla paracentrycznych. Nosicielkami tej aberracji częściej są kobiety. Częstość występowania u przebadanych kobiet przed IVF wynosiła 0,4%, zaś przed ICSI 0,3%.

Wykrycie powyższych nieprawidłowości może wywrzeć znaczącą rolę w przebiegu zaplanowanego leczenia (IVF czy ICSI) oraz zakończeniu go sukcesem [9]. Dlatego niezwykle ważne jest wykonanie badań cytogenetycznych celem oceny płodności obu partnerów. Właściwe przeprowadzenie diagnostyki, a następnie udzielenie specjalistycznej porady genetycznej istotnie zwiększa szansę na prawidłowy rozwój ciąży u par z nieprawidłowym karyotypem [3].

Bibliografia:

1. Pasińska M., Haus O., Skonieczka K., Ślęzak R., Midro A.T., Stasiewicz-Jarocka B., Szczepania M., Adamczak R., Marcinkowska A., Bartusiak K., Wyniki badań cytogenetycznych i molekularnych u 35 par z niepłodnością pierwotną, *Wiadomości Lekarskie* 2006, LIX, 1-2
2. Pasińska M., Haus O., Adamczak R., Mucha B., Szymański W., Ferenc A., Ludwikowski G., Duszeńko E., Wyniki badań cytogenetycznych u 107 par z regionu kujawsko-pomorskiego z nawracającymi poronieniami samoistnymi, *Wiadomości Lekarskie* 2005, LVIII, 11-12
3. Kwinecka-Dimitriew B., Latos-Bielińska A., Skrzypczak J., Przebieg ciąży u par nosicieli aberracji chromosomowych, *Perinatol. Neonatol. Ginekol.*, 2010
4. I. Srebnia M., Tomaszewska A., *Badania cytogenetyczne w praktyce klinicznej*, PZWL, 2008, 171
5. Leon Sperof, M.D., Marc A. Fritz, MD. *Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility*, Seventh edition, 1179
6. Leon Sperof, M.D., Marc A. Fritz, MD. *Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility*, Seventh edition, 1230
7. Papanikolaou EG., Vernaev V., Kolibianakis E., Assche EV., Bonduelle M., Liebaers I., Van Steirteghem A., Devroey P., Is chromosome analysis mandatory in the initial investigation of normovulatory women seeking infertility treatment?, *Human Reproduction* 20 (10): 2899-903, 2005
8. I. Srebnia M., Tomaszewska A., *Badania cytogenetyczne w praktyce klinicznej*, PZWL, 2008, 50

9. U.A. Mau-Holzmann, Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women, *Cytogenet Genome Res* 111:317-336 (2005)
10. I. Srebrniak M., Tomaszewska A., *Badania cytogenetyczne w praktyce klinicznej*, PZWL, 2008, 49
11. Krzysztof Mrózek, Ewa Mrózek, Bogusław Nedoszytko, Małgorzata Babińska, Wojciech Gościński, Jerzy Mielnik, Janusz Limon, *Wiad. Lek.* 1989; t 42, nr 19/21, s. 1014-1018
12. Janusz Limon, Jadwiga Filipiuk, Bogusław Nedoszytko, Krzysztof Mrózek, M. Castren, M. Larramendy, Jadwiga Roszkiewicz, X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia and de novo t(X;1) in a female, *Hum. Genet.* 1991; vol. 87, nr 3, s. 338-340, bibliogr. 15 poz.