

PAWEŁ J. CHOMIAK, JACEK J. PIETRZYK<sup>1</sup>

(UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI)

OMÓWIENIE PROBLEMU WŁAŚCIWEJ INTERPRETACJI  
WYNIKÓW KARIOTYPU MOLEKULARNEGO  
PRZY PRÓBIE IDENTYFIKACJI OBSERWOWANYCH  
NIEZRÓWNOWAŻONYCH ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH  
U PACJENTÓW Z NIESPECYFICZNĄ NIEPEŁNOSPRAWNOŚCIĄ  
INTELEKTUALNĄ ORAZ ZESPOŁEM MNOGICH  
WAD WRODZONYCH

STRESZCZENIE

Ocena kariotypu pacjenta stanowi podstawę prawidłowej porady genetycznej mającej związek z podjętym leczeniem i/lub prewencją. W chwili obecnej laboratoria cytogenetyczne mają do dyspozycji ogromną liczbę metod diagnostycznych, w tym analizy kariotypu molekularnego oparte na metodach *CGH*. Metody *CGH* pozwalają na wykrywanie zmian zdecydowanie mniejszych, w porównaniu z klasycznymi technikami cytogenetycznymi takimi jak metoda GTG. Niestety, brak możliwości bezpośredniej analizy chromosomów pacjenta może prowadzić do przekłamania podczas interpretacji wyniku. W poniższym opracowaniu przedstawiono dwa przypadki obrazujące najczęstsze problemy pojawiające się podczas interpretacji wyników kariotypu molekularnego metodą *CGH*.

---

<sup>1</sup> Dr Paweł J. Chomiak, MSD Polska, Warszawa; e-mail: pchomiak@inar.pl.  
Prof. dr hab. Jacek J. Pietrzyk, Zakład Genetyki Medycznej, Polsko-Amerykański Instytut  
Pediatrii, Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński, Kraków.

## DIAGNOSTYKA CYTOGENETYCZNA NIEPEŁNOSPRAWNOŚCI INTELEKTUALNEJ I ZESPOŁÓW MNOGICH WAD WRODZONYCH – WPROWADZENIE

Jedną z przyczyn wystąpienia niespecyficznej niepełnosprawności intelektualnej oraz zespołu mnogich wad wrodzonych jest ogólnie pojęte zjawisko aberracji chromosomowych, polegające na zmianach liczby bądź struktury chromosomów somatycznych oraz chromosomów płci. W chwili obecnej ocenia się, iż częstość aberracji chromosomowych u pacjentów ze zdiagnozowaną niepełnosprawnością intelektualną oraz zespołem mnogich wad wrodzonych sięga nawet 6% [2, 3]. Do najczęściej obserwowanych zmian należą:

1. trisomia chromosomów 21. pary (zespół Downa), stanowiąca około 76% wszystkich zaburzeń chromosomowych u pacjentów z niespecyficzną niepełnosprawnością intelektualną oraz zespołem mnogich wad wrodzonych;
2. delecje chromosomowe wraz z zespołami mikrodelecyjnymi – 8%;
3. zmiany liczby chromosomów płci – 4%;
4. chromosomy koliste i chromosomy markerowe – 4%;
5. translokacje zrównoważone – 3%;
6. translokacje niezrównoważone – 3%;
7. duplikacje – 2%;
8. pozostałe aneuploidie autosomalne – 1%;
9. inne – 1%.

Zaburzenia liczby chromosomów (aneuploidie i poliploidie) lub ich struktury (aberracje strukturalne) pojawiające się podczas procesów rozwojowych są częste, o czym mogą świadczyć dane szacunkowe prezentowane w niektórych źródłach [3] dotyczących przyczyn poronień samoistnych obserwowanych w pierwszych tygodniach ciąży. Przyczyny wystąpienia zaburzeń można podzielić ze względu na ich pochodzenie i moment powstania. Do najczęstszych należą [2]:

1. zjawisko *nondysjunkcji chromosomowej* (nieprawidłowej segregacji chromosomów), występującej w trakcie podziałów mejotycznych procesów gamatogenezy. Częściej zaburzenia te pojawiają się w procesie oogenezy, a ryzyko związanych z nimi trisomicznych zygot rośnie wraz z wiekiem kobiety;
2. obecność *translokacji zrównoważonych* (np. translokacji robertsonowskich) u jednego z rodziców;
3. zaburzenia procesu mitozy w pierwszych etapach życia zarodkowego, np. wystąpienie zjawiska *nondysjunkcji*;
4. zmiany typu *de novo* powstałe pod wpływem działania czynników zewnętrznych (teratogenów) lub w wyniku niestabilności DNA.

Zespołem genetycznym, którego etiologię poznano najlepiej, jest zespół Downa. W 85% przypadków trisomia chromosomów 21. pary spowodowana jest nondysjunkcjami chromosomowymi w procesie oogenezy, w 5% przypadków dochodzi do nondysjunkcji chromosomowej w trakcie procesu spermatogenezy. Pozostałe to zaburzenia powstałe w trakcie pierwszych podziałów mitotycznych zapłodnionej komórki jajowej, a także obecność translokacji zrównoważonych u jednego z rodziców, jak również zmiany typu *de novo* i inne [3].

Rzetelnym kryterium weryfikacji i potwierdzenia zmian strukturalnych chromosomów pacjenta jest wykonanie badań cytogenetycznych. Kryterium doboru właściwego badania laboratoryjnego uzależnione jest w głównej mierze od postawionego rozpoznania oraz możliwości diagnostycznych ośrodka badawczego. Najczęściej podstawowe badania cytogenetyczne obejmują analizę kariotypu pacjenta z wykorzystaniem metody oceny prążkowej chromosomów – badanie prążkami G, zwane również badaniem GTG lub Giemza-Trypsyna-Giemza.

W badaniu GTG możliwa jest analiza zarówno liczby, jak i struktury chromosomów pacjenta. Istnieją również inne techniki umożliwiające bezpośrednią analizę kariotypu. Należą do nich takie metody, jak metoda prążków R, prążków Q, prążków C, srebrzenia organizatorów jąderka, metody prążkowe typu *HRT – high resolution technique* czy też klasyczne techniki *FISH – fluorescent in situ hybridization*, takie jak *FISH* z wykorzystaniem sond specyficznych do wybranych sekwencji DNA czy też *multicolor FISH*, stosowany najczęściej do analizy poszczególnych chromosomów lub całego kariotypu pacjenta.

Niedoskonałości wymienionych wyżej metod w głównej mierze dotyczą rozdzielczości oraz czułości wykrywania bardzo małych zmian strukturalnych. W przypadku technik *FISH* główny problem wynika z faktu, iż metoda stosowania specyficznych sond wymaga znajomości przez badacza konkretnego regionu zmiany. Techniki fluorescencyjne oparte na wielokolorowych mieszaninach ze względu na bardzo wysokie koszty przeprowadzanych analiz, jak również potrzebne zaplecze aparaturowe, przeprowadzane są zdecydowanie rzadziej podczas wykonywania pierwszej oceny kariotypu.

W przypadku klasycznych technik badawczych opartych na bezpośredniej analizie chromosomów w mikroskopie świetlnym bardzo dużym problemem jest właściwa interpretacja wyników w momencie, kiedy dojdzie do wykrycia niewielkiej aberracji chromosomowej. Niejednokrotnie stwierdzenie obecności „dodatkowego” materiału genetycznego wiąże się z brakiem możliwości dokładnej identyfikacji pochodzenia tego addytu chromosomowego.

Pod koniec lat 90. ubiegłego wieku pojawiły się nowe techniki analizy aberracji chromosomowych – metody typu *CGH (comparative genomic hybridization)* – porównawczej hybrydyzacji genomów, ponieważ około 7-8% [5, 6, 7, 8, 9] aberracji chromosomowych związanych jest ze zmianą ilości materiału genetycznego.

Głównym założeniem techniki *CGH* jest jednoczesna hybrydyzacja dwóch różnie znakowanych, ilościowo identycznych (w stosunku 1:1) próbek DNA genomowego. Jedna próbka pochodzi od pacjenta, druga – od osoby o prawidłowym kariotypie, a hybrydyzacja wykonywana jest na prawidłowej płytce metafazowej. Dzięki zastosowaniu hybrydyzacji typu *CGH* możliwe stało się badanie całego genomu. Niestety, ze względu na ilościowy charakter analizy techniką tą można analizować tylko aberracje niezrównoważone. Wraz z wprowadzeniem technik *CGH* typu *hr-CGH* – *high resolution CGH* oraz *array-CGH* pojawiło się nowe pojęcie w cytogenetyce molekularnej, zwane kariotypem molekularnym. Definicja kariotypu molekularnego jest pojęciem bardzo ogólnym i różnie określanym przez autorów prac badawczych. Dla potrzeb niniejszego opracowania przyjęto, iż kariotyp molekularny jest wygenerowanym obrazem komputerowym, stanowiącym odzwierciedlenie rzeczywistej, uśrednionej wartości stopnia hybrydyzacji kompetytywnej sekwencji znakowanego fluorescencyjnie genomowego DNA pacjenta w stosunku do znakowanego fluorescencyjnie DNA referencyjnego, przeprowadzonej na matrycy, jaką jest prawidłowa płytka metafazowa o zapisie 46,XY. Wynik badania kariotypu molekularnego nie jest efektem analizy bezpośredniej chromosomów pacjenta, ale DNA genomowego poddanego uprzednio preparatyce technikami biologii molekularnej [1].

Klasyczna technologia *CGH* umożliwia identyfikację zmian ilościowych w sekwencjach subtelerowych chromosomów. Ze względu na ograniczoną czułość technika ta nie ma zastosowania w identyfikacji zmian ilościowych sekwencji polimorficznych oraz repetytywnych chromosomów, takich jak centromery, satelity chromosomów grupy D, regiony heterochromatyny konstytutywnej oraz telomery. Technika *hr-CGH*, wykazująca większą czułość oraz specyficzność, umożliwia identyfikację większości zmian ilościowych. Jedynie zmiany sekwencji centromerowych nie są wykrywane przy użyciu tej metody.

W niniejszym opracowaniu na przykładzie dwóch przypadków opisano możliwości diagnostyczne i zasady interpretacji wyników uzyskiwanych podczas analizy kariotypu molekularnego wykonywanej z wykorzystaniem metody *hr-CGH*.

## IDENTYFIKACJA MIEJSCA POCHODZENIA CHROMOSOMU MARKEROWEGO

Zjawisko małych chromosomów markerowych (*SMCH*, ang. *supernumerary marker chromosome*) obserwowane jest w różnych zespołach genetycznych [4, 11]. Dokładna diagnostyka *SMCH* niejednokrotnie jest utrudniona ze względu na brak jednoznacznych wyników analiz cytogenetycznych. Chromosomy markerowe mogą pochodzić z każdego chromosomu obecnego w komórce (najczęściej powstają z chromosomów płci oraz akrocentrycznych chromosomów

grup D i G). *SMCH* w głównej mierze zbudowane są z heterochromatyny okołocentromerowej danego chromosomu oraz zawierają centromer, dzięki któremu mogą segregować w trakcie podziałów komórkowych. Identyfikacji *SMCH* dokonuje się najczęściej poprzez zastosowanie techniki *FISH* z wykorzystaniem sond centromerowych. Jednakże jest to technika, która nie zawsze pozwala na pełną identyfikację miejsca pochodzenia chromosomu (w badaniu identyfikowane są jedynie specyficzne centromery, budujące chromosom markerowy, niemożliwa jest więc identyfikacja sekwencji euchromatynowych, stanowiących również element chromosomu markerowego). Dzięki zastosowaniu techniki *hr-CGH* możliwa jest identyfikacja pochodzenia materiału chromosomowego, jednakże niemożliwa staje się identyfikacja samego centromeru. Zważywszy na wagę oraz potrzebę poznania aktywnych transkrypcyjnie regionów budujących *SMCH* oraz ich wpływ na obraz kliniczny pacjenta, zastosowanie metod analizy kariotypu molekularnego jest właściwą decyzją. Na rycinie poniżej przedstawiono wynik badania cytogenetycznego (w formie zapisu *ISCN* – *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) oraz idiogram obrazu kariotypu molekularnego u pacjenta ze stwierdzonym chromosomem markerowym.

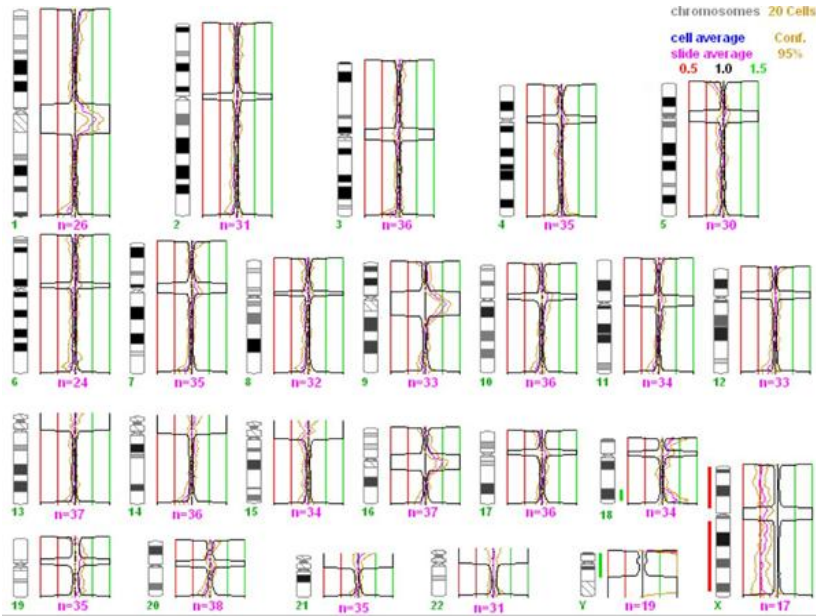
Wynik badania cytogenetycznego: GTG 550 46,XY [65%]/47,XY+mar(?) [35%].

Przeprowadzona analiza kariotypu molekularnego z wykorzystaniem metody *hr-CGH* pozwoliła ustalić, że dodatkowy materiał genetyczny pochodził z rejonu chromosomu 18. pary: ish *hr-CGH* dup18q22 (dokładny opis wyniku pod ryciną).

Uzupełniony zapis cytogenetyczny, uzyskany w oparciu o badania podstawowe, jak i molekularne, prezentuje się w następujący sposób:

ish *hr-CGH* 46,XY[65%]/47,XY + mar (18q22)[35%]

Rycina 1. Wynik analizy *hr-CGH*. Kolorem zielonym zaznaczone są miejsca obecności dodatkowego materiału genetycznego. Obecność sygnałów zielonego i czerwonego przy idiogramach chromosomów płci jest kontrolą w przeprowadzonej analizie. W założeniu, w przypadku materiału pochodzącego od pacjentów płci męskiej, hybrydyzacja jest tak prowadzona, aby uzyskać wynik pozytywnie fałszywej duplikacji chromosomu Y oraz delecji chromosomu X.



Jak wspomniano wcześniej, metoda *hr-CGH* nie pozwala na identyfikację regionów centromerowych, dlatego też nie uzyskano dodatkowych sygnałów świadczących o duplikacji w którymkolwiek z regionów centromerowych analizowanych chromosomów. Uzyskany wynik kariotypu molekularnego, stanowiący uzupełnienie klasycznego badania cytogenetycznego, w zupełności wystarczy do prowadzenia dalszych analiz genetycznych. Do takich analiz należy np. ocena stopnia ekspresji wybranych genów zlokalizowanych w regionie aberracji.

#### IDENTYFIKACJA DODATKOWEGO MATERIAŁU GENETYCZNEGO O NIEZNYM POCODZENIU

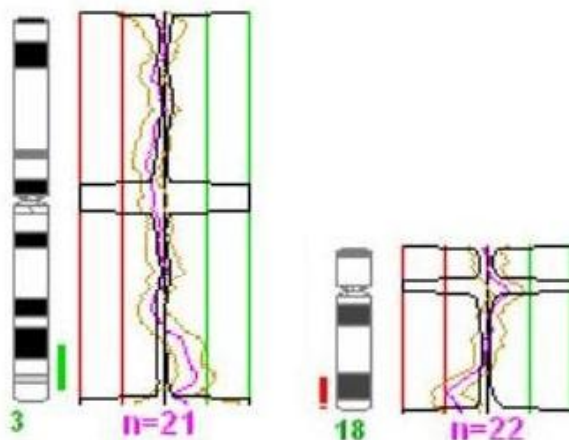
Kolejnym przykładem tego, że technika *hr-CGH* stanowi istotne uzupełnienie wyników klasycznego badania cytogenetycznego, jest identyfikacja dodatkowego materiału genetycznego o nieznanym pochodzeniu.

W przypadku wyniku cytogenetycznego o zapisie: GTG 500 46, XY, der (18q) stwierdza się u pacjenta obecność dodatkowego materiału genetycznego na jednym z chromosomów 18. pary. Podobnie jak we wcześniej opisywanej sytuacji, możliwe jest wykorzystanie różnych technik molekularnych, jednakże metoda *hr-CGH* jest uważana za jedną z najbardziej uniwersalnych.

Wynik analizy kariotypu molekularnego nie tylko pozwolił na wskazanie miejsca pochodzenia dodatkowej zmiany (zaznaczonej kolorem zielonym), ale również umożliwił wykazanie, iż chromosom 18. pary, biorący udział w translokacji, uległ częściowej delecji w dystalnej części długiego ramienia.

Ostateczny zapis aberracji podano w opisie Ryciny 2.

Rycina 2. Zapis wyniku: ish hr-CGH dup 3q27-28, del 18q22→ter, uzupełniony: ish hr-CGH 46,XY (der18)(dup3q27-28, del18q22→ter)



## KOMENTARZ

Interpretacja wyników kariotypu molekularnego nie opiera się wyłącznie na prostej analizie uzyskanych danych. W przypadku identyfikacji addytów genetycznych obecnych w formie chromosomów markerowych albo dodatkowych zmian w strukturach chromosomu wymagana jest szczególna uwaga.

Ponieważ analizy molekularne z zastosowaniem wszystkich metod *CGH* (jak również innych metod opartych np. na analizie mikromacierzy DNA) są analizami ilościowymi, a nie jakościowymi, umożliwiają więc one jedynie detekcję obecnych ubytków lub dodatkowych kopii danych sekwencji DNA. Przyjęte zapisy wyników analizy opierają się na stwierdzeniu obecności delecji (del) lub duplikacji (dup) sekwencji, co może przyczynić się do niewłaściwych inter-

pretacji wyników, a przynajmniej do niewłaściwego opisu obserwowanego zjawiska. Problem interpretacji wyników analizy kariotypu molekularnego staje się bardzo istotny zwłaszcza w przypadku braku informacji o wynikach wcześniejszych badań cytogenetycznych, polegających na bezpośredniej ocenie kariotypu pacjenta. Brak zrozumienia patogenezы obserwowanych zmian może doprowadzić do udzielenia nieprawidłowej porady genetycznej, a w rezultacie może zaburzyć przebieg dalszych badań diagnostycznych, jak również może przyczynić się do nieprawidłowej interpretacji charakteru samej zmiany. W opisywanych powyżej przypadkach analiza ilościowa z wykorzystaniem metody *hr-CGH* pozwoliła na identyfikację pochodzenia dodatkowego materiału genetycznego, co w rezultacie pozwoliło na postawienie ostatecznej diagnozy i właściwej opinii cytogenetycznej. Gdyby kariotyp obydwu pacjentów analizowano z wykorzystaniem samej metody *hr-CGH*, uzyskane wyniki byłyby nieprawidłowe. W przypadku pacjenta ze stwierdzonym chromosomem markerowym zmianę można zinterpretować jako duplikację fragmentu regionu 18q22. Dodatkowo u pacjenta niemożliwa była ocena częstości zmiany we frakcji komórek pobranych do badania. W drugim przypadku, opierając się wyłącznie na wynikach analizy molekularnej, otrzymano by informację o obecności dwóch zmian ilościowych, interpretowanych jako duplikacja i delecja (odpowiednio na chromosomie 3. i 18. pary), natomiast informacja o translokacji jako przyczynie obserwowanych zmian byłaby zupełnie nieosiągalna.

Reasumując, w przypadku analiz kariotypu molekularnego wskazana jest szczególna ostrożność w interpretacji obserwowanych zmian i nie dotyczy ona trafności samej analizy (badania kariotypu molekularnego wymagają weryfikacji innymi metodami molekularnymi czy cytomolekularnymi) co do sposobu określenia charakteru zmiany. Problemem metod cytomolekularnych opartych na zjawisku hybrydyzacji do specyficznego podłoża (chromosomu, macierzy DNA) jest absolutny brak możliwości bezpośredniej analizy samych chromosomów pacjenta, co uniemożliwia pełną i trafną ocenę struktury oraz liczby obserwowanych chromosomów, w tym chromosomów markerowych.

## ABSTRACT

Evaluation of the patient's karyotype is the basis for proper genetic counseling, and thus also for a treatment or prevention to be taken. At present, cytogenetic laboratories have at their disposal a large number of diagnostic methods, including molecular karyotype analysis based on CGH procedures. The CGH methods allow to detect much smaller changes than conventional cytogenetic techniques such as a GTG method. Unfortunately, lack of direct analysis of patient's chromosomes may lead to a distortion in interpreting the result. The following paper presents two cases illustrating the most common problems in interpreting the results of molecular karyotyping using the CGH procedure.



## BIBLIOGRAFIA

1. Chomiak P.J., *Analiza mikroaberracji chromosomowych u pacjentów z niespecyficzną niepełnosprawnością intelektualną i/lub zespołem mnogich wad wrodzonych z wykorzystaniem metody hr-CGH. Podjęcie próby określenia zależności genotyp-fenotyp. Badania wstępne*, praca doktorska CMUJ, 2011.
2. Cook D.J., *ISCN 2005. An International System for Human Cytogenetics Nomenclature*, "British Journal of Biomedical Science" 2006.
3. Gersen S.L., Keagle M.B., *The Principles of Clinical Cytogenetics. Second Edition*, „Humana Press” 2005.
4. Helszer Z., Kałużewski B., Constantinou M., *Male dodatkowe chromosomy markerowe (ESACs). Problemy diagnostyczne i znaczenie kliniczne*, „Diagnostyka Laboratoryjna” 2001, 37.
5. Kirchhoff M., Bisgaard A.M., Bryndorf T., Gerdes T., *MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williamse Beuren syndrome regions*, "European Journal of Medical Genetics" 2007, 50.
6. Kirchhoff M., Gerdes T., Brunebjerg S., Bryndorf T., *Investigation of Patients With Mental Retardation and Dysmorphic Features Using Comparative Genomic Hybridization and Subtelomeric Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification*, "American Journal of Medical Genetics" 2005, 139A.
7. Kirchhoff M., Gerdes T., Maahr J., Rose H., Bentz M., Lundsteen C., *Deletions Below 10 Megabasepairs are Detected in Comparative Genomic Hybridization by Standard Reference Intervals*, "Genes, Chromosomes & Cancer" 1999, 25.
8. Kirchhoff M., Pedersen S., Kjeldsen E., Rose H., Dunø M., Kølvrå S., Lundsteen C., *Prospective Study Comparing HR-CGH and Subtelomeric FISH for Investigation of Individuals With Mental Retardation and Dysmorphic Features and an Update of a Study Using Only HR-CGH*, "American Journal of Medical Genetics" 2004, 127A.
9. Kirchhoff M., Rose H., Lundsteen C., *High resolution comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics*, "Journal of Medical Genetics" 2001, 38.
10. Mckinlay Gardner R.J., Sutherland G.R., *Chromosome abnormalities and genetic counseling. Third edition*, Oxford University Press 2004.
11. Srebniak M.I., Tomaszewska A., *Badania cytogenetyczne w praktyce klinicznej*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008.

Paweł J. Chomiak, e-mail: pchomiak@inar.pl