

Profilowanie DNA jako metoda określania zygotywności w ciąży wieloraczej

DNA profiling as a method of zygosity determination in multiple pregnancy

Przemysław Adamski¹, Katarzyna Ciach¹, Bogumiła Kielbratowska¹, Zofia Szczerkowska²,
Krzysztof Preis¹

¹ Katedra Perinatologii, Klinika Położnictwa, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, Polska

² Katedra i Zakład Medycyny Sądowej, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, Polska

Streszczenie

Celem pracy jest przedstawienie metody określania zygotywności ciąży wielopłodowej. Badanie objęło noworodki, wszystkie tej samej płci, urodzone w efekcie samoistnej ciąży wielopłodowej – czworaczej. Zygotywność ciąży określona została poprzez profilowanie DNA. Wyniki określiły jednoznacznie ciążę jako polizygotywną. Profilowanie DNA może mieć zastosowanie w określaniu zygotywności ciąży wielopłodowej.

Słowa kluczowe: **profilowanie DNA / ciąża wielopłodowa / zygotywność /
/ czworaczki / płody tej samej płci /**

Abstract

The aim of the report was to present a method of zygosity determination in multiple pregnancy. The study was carried out on same-sex neonates born as a result of spontaneous quadruplet pregnancy. Zygosity was determined by DNA profiling. The pregnancy was confirmed to be polyzygotic. DNA profiling may be used as a method of zygosity determination in multiple pregnancy.

Key words: **DNA profiling / multiple pregnancy / zygosity / quadruplets /
/ same sex fetuses /**

Adres do korespondencji:

Przemysław Adamski
Katedra Perinatologii, Klinika Położnictwa, Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Kliniczna 1a, 80-402 Gdańsk, Polska
tel. 058 349 34 45, fax. 058 349 34 16
e-mail: padamski@gumed.edu.pl

Otrzymano: 15.08.2014
Zaakceptowano do druku: 30.03.2015

Wstęp

Określenie zygotywności i kosmówkowości ciąży wielopłodowej jest istotne w prowadzeniu właściwej opieki peri- i postnatalnej oraz niezbędne celem prowadzenia badań naukowych w dziedzinie ciąży wielopłodowej [1]. Międzynarodowe towarzystwo badań nad bliźniętami (International Society for Twin Studies) stworzyło deklarację praw oraz potrzeb bliźniąt i wieloraczków. Zawiera ona prawo każdego z bliźniąt oraz ich rodziców do informacji o kosmówkowości i określenia zygotywności w przypadku płodów tej samej płci [2]. Aktualnie rozpoznanie rodzaju ciąży wielopłodowej, a tym samym postępowanie, oparte jest o określenie kosmówkowości i owodniowości. W ciąży mnogiej ultrasonograficzne wykładniki kosmówkowości mogą być obecne albo nie dawać jednoznacznego rozpoznania, szczególnie w przypadku płodów tej samej płci. Określenie zygotywności metodami genetyki molekularnej jest pomocne w rozpoznaniu właściwego rodzaju ciąży i związanego z nim postępowania [3]. Głównymi powodami określenia zygotywności ciąży wielopłodowej są względy medyczne, tożsamościowe oraz naukowe. Identyfikacja zygotywności ma szczególne znaczenie w aspekcie transplantacji narządów oraz chorób dziedzicznych wieloczynnikowo. W przyszłości badania nad bliźniętami monozygotycznymi mają pomóc w wyjaśnieniu zagadnień epigenetyki – wpływu uwarunkowań środowiskowych zmiany w funkcji genów bez zmian w sekwencji DNA a tym samym wpływu środowiska na zdrowie i chorobę [4]. Profilowanie DNA analizuje bezpośrednio geny. Badanie tego typu analizuje kilka niepowiązanych loci genowych a otrzymany profil jest unikatowy dla każdej osoby. Profile bliźniąt monozygotycznych są identyczne. Zaletą metody jest małe zapotrzebowanie na materiał biologiczny. Wystarczające ilości DNA mogą być otrzymane z wielu tkanek takich jak: płyn owodniowy, łożysko, krew pępowinowa oraz żylna, wymaz z jamy ustnej, cebulki włosów. Ilość profilowanych loci jest teoretycznie nieograniczona tym samym ryzyko błędu jest bardzo małe w przeciwieństwie do historycznie wykorzystywanej metody oznaczania zygotywności w oparciu o badanie grup krwi.

Cel

Celem poniższej pracy jest przedstawienie zastosowania techniki profilowania DNA jako metody określania zygotywności.

Metoda

W badaniu wykorzystano materiał genetyczny pobrany od rodziców biologicznych oraz noworodków urodzonych w wyniku samoistnej ciąży wielopłodowej o wyższej krotności – czworaczce. W celu ustalenia zygotywności czworaczek, wszystkich płci żeńskiej, określono ich profile DNA oraz profile ich rodziców. Na podstawie badania USG wykonanego w pierwszym trymestrze ciąży określono jako czterokosmówkową, czteroowodniową w związku z czym nie było wskazań do określania zygotywności prenatalnie.

DNA izolowano z nabłonka jamy ustnej przy użyciu komercyjnego zestawu do Izolacji DNA „Sherlock AX” (I). Steżenie DNA określono metodą spektrofotometryczną. Amplifikację i typowanie badanych próbek wykonano przy użyciu systemu AmpFℓSTR® SEfiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) zgodnie z zaleceniem producenta (II). Produkty amplifikacji rozdzielono drogą elektroforezy kapilarnej na automatycznym se-

kwenatorze ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer. Jako standardu wewnętrznego wielkości DNA użyto markera GeneScan – 500 LIZ™ Size Standard (applied Biosystems). Genotypy określano w odniesieniu do drabin allelicznych przy użyciu oprogramowania komputerowego GeneMapper Dv3.2 Software (Applied Biosystems). Badanie objęło 12 markerów DNA. Jedenaście autosomalnych loci i locus amelogeniny (AMGXV) charakteryzujących płeć analizowanych próbek.

1. A&A Biotechnology, Poland, 2012. Zestaw do izolacji DNA ze śladów biologicznych „Sherlock AX”.
2. Applied Biosystems, AmpFℓSTR® SEfiler™ PCR Amplification Kit. User's Manual, Foster City, Part number 4335145 Rev. B, 09/2002.

Wyniki

Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli I.

Przeprowadzone badania DNA w zakresie locus amelogeniny (AMGXY) potwierdziły płeć genetyczną wszystkich dzieci jako żeńską.

Analiza 11 autosomalnych loci genowych wykazała cztery różne profile DNA. Różnice występujące w poszczególnych markerach DNA u badanych dzieci oznaczono różnymi odcieniami szarości.

Jednakowy kolor w danym locus świadczy o istnieniu identycznych genotypów (np. locus D18S51). W systemie VWA, u dziecka II wykazano allel mutacyjny (15). Częstość mutacji w locus VMA wynosi 0,16%.

Przeprowadzone badania obejmujące 12 różnych markerów typu STR (z locus AMGXY) pozwoliły na ustalenie, że omawiany przypadek czworaczek dotyczy dzieci pochodzących z ciąży polizygotycznej.

Dyskusja

Kosmówkowość odnosi się do rodzaju placencji w przeciwieństwie do zygotywności, która określona zostaje w momencie zapłodnienia. Kosmówkowość ciąży wielopłodowych była przedmiotem wielu badań, jednak w literaturze jest mało informacji o ich zygotywności.

Zygotywność wskazuje na to, czy płody rozwinęły się z jednej zapłodnionej komórki (monozygotyczne) czy z dwóch oocytów zapłodnionych przez dwa różne plemniki (dwozygotyczne) lub wielu oocytów i odpowiedniej ilości plemników (*polizygotyczne*). Rodzaj kosmówkowości zależy od czasu podziału zygoty na dwa genetycznie identyczne zarodki. Jeśli podział zygoty nastąpi w przeciągu trzech dni od zapłodnienia ciąża będzie dwukosmówkowa z rozdzielnymi lub połączonymi łożyskami. Podział zygoty następujący między czwartym a ósmym dniem od zapłodnienia skutkuje ciążą jednokosmówkową, dwuowodniową - płody dzielą wspólną płytę łożyska ale każdy posiada własny worek owodniowy. Podział zygoty zachodzący pomiędzy dniem 8 a 13 skutkuje ciążą jednokosmówkową, jednoowodniową - bliźnięta dzielą zarówno wspólną płytę łożyska jak i przestrzeń wewnątrz pojedynczego worka owodniowego. W ciążach wielopłodowych o wyższej krotności kosmówkowość i owodniowość ustala się poprzez porównanie sekwencyjne płodów. Płodu pierwszego z drugim, pierwszego z trzecim, drugiego z trzecim, itd. Literatura podaje zasadę, że wszystkie ciąży dwozygotyczne to ciąży dwukosmówkowe, natomiast ciąża jednokosmówkowa jest zawsze monozygotyczna [5].

Tabela I.

Locus	Matka	Dziecko I	Dziecko II	Dziecko III	Dziecko IV	Ojciec
D3S1358	15/15	15/17	15/17	14/15	15/17	14/17
VWA	14/18	14/14	15/18	18/18	14/14	14/18
D16S539	12/12	11/12	11/12	12/12	11/12	11/12
D2S1338	16/19	16/23	19/23	19/23	19/23	23/23
AMGY	XX	XX	XX	XX	XX	XY
D8S1179	10/12	12/17	10/13	10/13	10/17	13/17
SE33	21/27,2	18/27,2	18/27,2	18/21	18/27,2	18/19
D19S433	13/14	14/14	13/14	13/14	14/14	14/14
TH01	9/9	9/9	9/9	6/9	6/9	6/9
FGA	20/24	20/20	20/20	19/20	19/24	19/20
D21S11	28/28	28/30	28/28	28/30	28/28	28/30
D18S51	12/14	13/14	13/14	13/14	13/14	13/17

Jednakowy kolor w danym locus świadczy o istnieniu identycznych genotypów.

Nowe badania z zastosowaniem metod genetyki molekularnej pokazały, że nie zawsze jest to tak oczywiste. Ponadto zastosowanie technik wspomaganego rozrodu skutkuje wzrostem odsetka dwuzygotycznych ciąży jednokosmówkowych [6]. Innym aspektem jest fakt, że bliźnięta monozygotyczne nie muszą być identyczne. Odpowiadać za to może spektrum zjawisk od heterokaryotypii po inaktywację chromosomu X. Powoduje to błędną interpretację i błędne zakwalifikowanie niezupełnie identycznych bliźnięt do grupy dizygotycznych, co ma istotne znaczenie kliniczne [7, 8].

Niektórzy autorzy podają, że częstość występowania monozygotycznych ciąży wielopłodowych jest osmiokrotnie wyższa po zastosowaniu technik wspomaganego rozrodu w stosunku do ryzyka populacyjnego [9]. Ciąże o wyższej krotności charakteryzują się wyższym odsetkiem powikłań, w tym wyższą zachorowalnością i śmiertelnością matek oraz płodów. Powikłania matczyne to przede wszystkim: poród przedwczesny, przedwczesne pęknięcie pęcherza płodowego, stan przedrzucawkowy, zespół HELLP oraz krwotok poporodowy [10–13]. Do powikłań płodowych zalicza się przede wszystkim wcześniactwo i niską masę urodzeniową oraz zgon okołoporodowy w ich wyniku [14, 15].

Aktualnie rozpoznanie rodzaju ciąży wielopłodowej, a tym samym postępowanie, oparte jest o określenie kosmówkowości i owodniowości. Częstość powikłań, przebieg ciąży oraz odległe wyniki położnicze badane były najczęściej w oparciu o kosmówkowość ciąży [16, 17]. Stwierdzono jednoznaczny, negatywny wpływ jednokosmówkowości ciąży wielopłodowej na odległe wyniki położnicze w szczególności niską masę urodzeniową i obniżoną przeżywalność płodów [17, 18]. Ultrasonograficzne wykładniki kosmówkowości mogą być obecne albo nie dawać jednoznacznego rozpoznania, szczególnie w przypadku płodów tej samej płci. Historycznie używane metody określenia zyo-

tywności w oparciu o badanie grup krwi czy kariotyp płodów są obarczone błędem. Różnice w ekspresji antygenów na krwinkach płodów mogą prowadzić do błędów interpretacyjnych [19]. W przypadku wątpliwości zalecane jest badanie zygotywności metodami genetyki molekularnej celem wykluczenia jednokosmówkowości lub potwierdzenia dizygotywności [20]. Określenie zygotywności metodami genetyki molekularnej uznane zostało za niezbędne w rozpoznaniu właściwego rodzaju ciąży i związanego z nim postępowania [3]. Określenie zygotywności metodami genetyki molekularnej jest niezmiernie rzadko wykorzystywane, mimo, iż jest to najdokładniejsza metoda diagnostyczna [21].

Ustalenie częstości występowania ciąży monozygotycznych jest istotne z punktu widzenia nauki: biologii, psychologii i epidemiologii oraz praktyki klinicznej. Zygotywność jest istotnym czynnikiem w diagnostyce prenatalnej i poradnictwie genetycznym. Wiedza odnośnie zygotywności jest pomocna w przypadku, kiedy kosmówkowość pozostaje niemożliwa do oceny lub może wpłynąć na postępowanie kliniczne. Do takich sytuacji możemy zaliczyć inwazyjną diagnostykę prenatalną tj. diagnostykę chorób / zespołów genetycznych, postępowanie w przypadku wewnątrzmacicznego obumarcia płodu lub płodów czy przy redukcji płodów w ciążach o wyższej krotności. W niektórych ośrodkach, przy porodzie bliźnięt tej samej płci, zygotywność oznaczana jest rutynowo z materiału genetycznego pochodzącego z krwi pępowinowej lub fragmentu łożyska. Praktyka ta znalazła szerokie poparcie wśród genetyków klinicznych oraz epidemiologów z uwagi na fakt, że 8-10% ciąży dwukosmówkowych bliźnięt tej samej płci jest monozygotyczna [22]. Ponadto określenie zygotywności jest istotne z punktu widzenia diagnostyki genetycznej np. chorób dziedzicznych wieloczynnikowo takich jak niektóre nowotwory czy choroby układu krążenia.

Przemysław Adamski et al. *Profilowanie DNA jako metoda określania zygotywności w ciąży wieloraczej.*

Bliznięta, zwłaszcza monozygotyczne mają większe ryzyko wystąpienia wad strukturalnych zwłaszcza wrodzonych wad serca [23]. Kolejnym zastosowaniem oceny zygotywności jest ocena zgodności tkankowej np. przy transplantacji narządów. Wiedza o zygotywności ma również zastosowanie w opiece postnatalnej zarówno dla rodziców jak i pracowników ochrony zdrowia. Zygotywność ma również wpływ na poczucie tożsamości bliźniąt [7] [24]. Badanie zygotywności w ciąży o wyższej krotności w oparciu o zastosowanie analizy polimorficznych markerów DNA stało się złotym standardem diagnostycznym [25].

Wnioski

Oznaczenie zygotywności ciąży wielopłodowej w oparciu o profilowanie DNA powinno być oferowane rutynowo w przypadku stwierdzenia płodów tej samej płci.

Oświadczenie autorów:

1. Przemysław Adamski – autor koncepcji i założeń pracy, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Katarzyna Ciach – współautor tekstu pracy i protokołu, korekta i aktualizacja literatury, przygotowanie manuskryptu.
3. Bogumiła Kiełbratowska – zebranie materiału, przechowywanie dokumentacji.
4. Zofia Szczerkowska – uzyskanie funduszy na realizację badań laboratoryjnych, wykonanie badań laboratoryjnych, opracowanie wyników badań, autor analizy i interpretacji wyników, przygotowanie, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.
5. Krzysztof Preis – ostateczna weryfikacja i akceptacja manuskryptu.

Źródło finansowania:

Praca nie była finansowana przez żadną instytucję naukowo-badawczą, stowarzyszenie ani inny podmiot, autorzy nie otrzymali żadnego grantu.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Ohm Kyvik K, Derom C. Data collection on multiple births - establishing twin registers and determining zygosity. *Early Hum Dev.* 2006, 82 (6), 357-363.
2. Council of Multiple Birth Organizations - Declaration of rights and statement of needs of twins and higher order multiples. *Twin Res.* 1998, 1, 52-55.
3. Norton ME, D'Alton ME, Bianchi DW. Molecular zygosity studies aid in the management of discordant multiple gestations. *J Perinatol.* 1997, 17, 202-207.
4. Peltonen L. Genom EU twin: a strategy to identify genetic influences on health and disease. *Twin Res.* 2003, 6 (5), 354-360.
5. Ropacka-Lesiak M, Lebioda A, Bręborowicz GH. Koliżka pępowinowa w I trymestrze w ciąży bliźniaczej jednoowodniowej – czy naprawdę ma znaczenie? *Ginekol Pol.* 2012, 83, 708-712.
6. Chen K, Chmait RH, Vanderbilt D, [et al.]. Chimerism in monozygotyczne bliźnięta: case study and review. *Am J Med Genet A.* 2013, 161A (7), 1817-1824.
7. Machin G. Non-identical monozygotyczne bliźnięta, pośrednie typy bliźniąt, testy zygotywności, i nie-losowa natura monozygotycznego bliźniactwa: przegląd. *J Med Genet C Semin Med Genet.* 2009, 151C (2), 110-127.
8. Gou C, Gao Y, Chen B, Fang Q. Prenatal Diagnosis and Management of Monozygotyczne Bliźnięta Dyskordantne dla Turner Syndrome. *Fetal Diagn Ther.* 2014, 36 (3), 255-258.
9. Sills ES, Tucker MJ, Palermo GD. Assisted reproductive technologies and monozygotyczne bliźnięta: implications for future study and clinical practice. *Twin Res.* 2000, 3, 217-223.
10. Seoud MAF, Toner JP, Kruthoff C, Muasher SJ. Outcome of twin, triplet, and quadruplet in vitro fertilization pregnancies: the Norfolk experience. *Fertil Steril.* 1992, 57, 825-834.
11. Albrecht JL, Tomich PG. The maternal and neonatal outcome of triplet gestations. *Am J Obstet Gynecol.* 1996, 174, 1551-1556.
12. Malone FD, Kaufman GE, Chelmsow D, [et al.]. Maternal morbidity associated with triplet pregnancy. *Am J Perinatol.* 1998, 15, 73-77.
13. Multiple gestation: complicated twin, triplet, and high-order multifetal pregnancy. ACOG Practice Bulletin No. 56. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol.* 2004, 104, 4, 869-883.
14. Newman RB, Luke B. Management of triplet and other high order multiples. Multifetal Pregnancy. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins., 2000, 192-219.
15. Blickstein I, Keith LG. Outcome of triplets and high-order multiple pregnancies. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2003, 15, 113-117.
16. Salihi HM, Aliyu MH, Kirby RS, Alexander GR. Effect of advanced maternal age on early mortality among quadruplets and quintuplets. *Am J Obstet Gynecol.* 2004, 190, 383-388.
17. Adegbite AL, Ward BS, Bajoria R. Perinatal outcome of quadruplet pregnancies in relation to chorionicity. *J Perinatol.* 2007, 27, 15-21.
18. Dube J, Dodds L, Armon A. Does chorionicity or zygosity predict adverse perinatal outcomes in twins? *Am J Obstet Gynecol.* 2002, 186, 579-583.
19. Pollack MS, Heagney SD, Braaun D, O'Neill GJ. Technical and theoretical considerations in the HLA typing of amniotic fluid cells for prenatal diagnosis and paternity testing. *Prenat Diagn.* 1981, 1, 183-195.
20. Carroll SG, Soothill PW, Abdel-Fattah SA, [et al.]. Prediction of chorionicity in twin pregnancies at 10-14 weeks of gestation. *BJOG.* 2002, 109, 182-186.
21. Guilherme R, Drunat S, Delezoide AL, [et al.]. Zygosity and chorionicity in triplet pregnancies: new data. *Hum Reprod.* 2009, 24, 1, 100-105.
22. Derom R, Vlietinck RF, Derom C, [et al.]. Zygosity determination at birth: a plea to the obstetrician. *J Perinatal Med.* 1991, 19 (1), 234-404.
23. Herskind AM, Pederson DA, Christensen K. Increased prevalence of congenital heart defects in monozygotyczne and dizygotyczne bliźnięta. *Circulation.* 2013, 128 (11), 1182-1188.
24. Bajoria R, Kingdom J. The case for routine determination of chorionicity and zygosity in multiple pregnancy. *Prenat Diagn.* 1997, 17, 13, 1207-1225. (1997)
25. The East Flanders Prospective Twin Study (EFPTS). *Blickstein and Keith.* 2005.