

Opis w języku polskim

Wstęp

Terminem wrodzone wady rozwojowe (WWR) płodu nazywamy wszelkie wewnętrzne lub zewnętrzne nieprawidłowości anatomiczne, które powstają jeszcze w czasie życia wewnątrzmacicznego i są obecne po urodzeniu [1]. Wrodzone wady rozwojowe są jednym z najczęstszych i istotnych problemów współczesnej perinatologii i dotyczą ~2-3% żywo urodzonych, ~20% martwo urodzonych dzieci i 70% poronień samoistnych. Dlatego też, każde odstępstwo od prawidłowej budowy ciała powstałe jeszcze podczas złożonych procesów embriogenezy zaliczane jest do grupy wrodzonych wad rozwojowych (w tym: deformacje, malformacje, przerwania i dysplazje) [2].

Wrodzone wady rozwojowe mogą występować pojedynczo jako wady izolowane lub jako wady mnogie określane jako zespół wad wrodzonych lub wielowadzie. Szacuje się, że 2/3 wszystkich wad rozwojowych to wady izolowane, a pozostała 1/3 stanowią mnogie wady wrodzone. Według Polskiego Rejestru Wrodzonych Wad Rozwojowych (PRWWR) wada izolowana to jedna lub kilka wad w obrębie jednego układu. Zespół wad wrodzonych definiowany jest jako obecność dwóch lub więcej dużych wad rozwojowych dotyczących co najmniej dwóch z wymienionych układów: sercowo-naczyniowego, moczowo-płciowego, szkieletowego, pokarmowego, oddechowego lub ośrodkowego układu nerwowego [1].

Spośród szerokiej grupy wrodzonych wad rozwojowych, a w szczególności, gdy występują one w postaci mnogich wad rozwojowych, wiele ma charakter letalny, czyli skutkuje obumarciem ciąży lub wczesnym zgonem dziecka po urodzeniu. Przyczyny powstania wad wrodzonych są bardzo różne. Niektóre wady anatomiczne spowodowane są infekcjami wewnątrzmacicznymi, zażywaniem leków, ekspozycją na toksyczne substancje w pracy, piciem alkoholu, ekspozycją na dym tytoniowy, promieniowaniem jonizującym.

Obecnie szacuje się, że około 24% przypadków WWR u żywo urodzonych dzieci i 50-75% poronień samoistnych uwarunkowana jest aberracjami chromosomowymi, jednak wciąż identyfikowane są kolejne geny, których

uszkodzenie może prowadzić do nieprawidłowości na wczesnym etapie rozwoju płodu.

Według zaleceń Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników dotyczących postępowania w zakresie diagnostyki prenatalnej wszystkie kobiety ciężarne powinny mieć zaproponowane przesiewowe badania prenatalne, które określają ryzyko wystąpienia aberracji chromosomowych u płodu. Badania przesiewowe, takie jak badanie ultrasonograficzne między 11 a 13 i 18 a 24 tygodniem ciąży oraz badania biochemiczne I i II trymestru ciąży, umożliwiają poza oceną ryzyka wystąpienia aberracji chromosomowych, także rozpoznanie wielu wad wrodzonych u płodu. Genetyczne badania inwazyjne powinny być wykonane, gdy badania przesiewowe wykażą wyższe niż populacyjne ryzyko urodzenia dziecka z wadą genetyczną [3].

Zgodnie z wytycznymi wielu towarzystw, w tym Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników, Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka oraz m.in. Europejskiego Towarzystwa Cytogenetycznego i Amerykańskiego Kolegium Ginekologów i Położników, rutynowo wykonywanym badaniem w przypadku stwierdzenia wady anatomicznej u płodu powinno być badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH, *ang.* array comparative genomic hybridization). Zastosowanie tej metody w diagnostyce wrodzonych wad rozwojowych i wad letalnych, zwiększa wykrywanie submikroskopowych niezrównoważeń genomu, niemożliwych do wykrycia klasyczną metodą oceny kariotypu, o około 6-7% [4]. Metoda ta umożliwia identyfikację nowych regionów chromosomowych oraz genów, których uszkodzenie może mieć wpływ na powstawanie wrodzonych wad rozwojowych oraz wad prowadzących do obumarcia płodu. Określenie przyczyny nieprawidłowości anatomicznej występującej u płodu pozwala w optymalny sposób zaplanować czas, sposób i miejsce porodu – tak aby jak najlepiej pomóc dziecku, a rodzicom dać czas na przygotowanie się do jego przyjścia na świat [3,5].

Badania prenatalne metodą aCGH wykonywane są w Zakładzie Genetyki Medycznej IMiD (ZGM IMiD) od roku 2014. W chwili obecnej zbadano już ponad 9000 płodów skierowanych na badanie ze względu na: zaawansowany wiek matki (AMA), obawę pacjentki, obciążenie genetyczne w rodzinie, zwiększoną przezierność karkową (NT), podwyższone ryzyko w teście przesiewowym PAPP-A, obecność izolowanej wrodzonej wady rozwojowej lub zespołu wad mnogich,

weryfikację innych testów genetycznych, w tym nieinwazyjnego testu NIPT oraz wykluczenie obecności aberracji chromosomowej w materiale z poronienia samoistnego.

Stosując się do rekomendacji Europejskiego Towarzystwa Cytogenetycznego, wszystkie aberracje chromosomowe stwierdzone w badaniu aCGH zostały sklasyfikowane jako patogenne, potencjalnie patogenne, potencjalnie łagodne, łagodne i o niepewnym znaczeniu klinicznym (VOUS, *ang.* variants of uncertain significance). Największe wyzwanie diagnostyczne w badaniach prenatalnych stanowią aberracje o niepewnym znaczeniu klinicznym ze względu na obecność w tych regionach genów, których funkcji, według dotychczasowej wiedzy, nie można jednoznacznie powiązać z nieprawidłowościami stwierdzonymi w badaniu USG lub z poronieniem samoistnym. Ze względu na fakt, że w przypadkach stwierdzenia zmiany o niepewnym znaczeniu klinicznym, nie jest możliwe udzielenie rodzicom informacji o przyszłym rozwoju dziecka, zmiany te nie są umieszczane w wyniku diagnostycznym [5].

Identyfikacja zmian o niepewnym znaczeniu klinicznym ma jednak ogromne znaczenie w pogłębianiu wiedzy na temat etiologii wrodzonych wad rozwojowych. Opisywanie wariantów VOUS w literaturze oraz umieszczanie ich w bazach danych, umożliwi w przyszłości ich klasyfikację jako warianty patogenne lub łagodne. Ułatwi również identyfikację genów, których uszkodzenie prowadzi do wad wrodzonych u płodu. Dodatkowo, wykorzystanie technologii takiej jak sekwencjonowanie eksomowe (WES) lub sekwencjonowanie całego genomu (WGS), stwarza szansę na identyfikację patogennych wariantów w genach znajdujących się w obrębie aberracji o obecnie niepewnym znaczeniu klinicznym. Takie podejście pozwoli nie tylko na szersze poznanie etiologii wrodzonych wad rozwojowych i nawracających poronień, lecz również na opracowanie schematu postępowania diagnostycznego w przypadku stwierdzenia wad u płodu oraz odpowiedniej strategii dla par z nawracającymi poronieniami.

Cel badań

Istotnym elementem badań nad etiologią i patomechanizmem powstawania wad wrodzonych płodu lub obumarcia płodu jest identyfikacja, określenie rodzaju i charakterystyka odpowiedzialnych za nie aberracji chromosomowych. Badania za pomocą metody aCGH wykazały, że poza aberracjami liczbowymi, istotną rolę w etiopatogenezie wrodzonych wad rozwojowych i poronień samoistnych stanowią nie zrównoważenia submikroskopowe (CNVs, *ang.* copy-number variants). Analiza CNVs metodą aCGH w badaniach postnatalnych umożliwiła identyfikację wielu czynników genetycznych mających wpływ na ujawnienie się u pacjentów takich zaburzeń jak zaburzenia ze spektrum autyzmu, niepełnosprawność intelektualna czy padaczka. Wykorzystanie tej metody do badań prenatalnych umożliwiło identyfikację regionów chromosomów oraz genów związanych z wczesnym rozwojem płodowym.

Sformułowane zostały następujące szczegółowe cele badawcze:

1. Ocena znaczenia i częstości submikroskopowych nie zrównoważeń genomu w etiopatogenezie wrodzonych wad rozwojowych i wad letalnych u płodu.
2. Próba identyfikacji genów, których zaburzenie ekspresji prowadzi do powstania wrodzonych wad rozwojowych.
3. Próba określenia zależności genotypowo-fenotypowej u płodów ze stwierdzonymi w badaniu aberracjami chromosomowymi o niepewnym znaczeniu klinicznym.
4. Ocena przydatności i skuteczności metody aCGH w diagnostyce prenatalnej wrodzonych wad rozwojowych oraz aberracji powodujących poronienie samoistne.

Metodyka

Decyzja o kwalifikacji pacjentek do badań podejmowana była przez lekarzy genetyków klinicznych z Poradni Genetycznej ZGM IMiD lub lekarzy ginekologów z Kliniki Położnictwa i Ginekologii Instytutu Matki i Dziecka, a także z innych ośrodków w Polsce.

Do prenatalnego badania metodą aCGH zakwalifikowano 7400 pacjentek, natomiast badania materiału po poronieniu samoistnym wykonano w grupie 61 pacjentek.

W badaniu aCGH materiałem badanym był DNA wyizolowany z płynu owodniowego, hodowli amniocytów, utrwalonego osadu po hodowli komórkowej, trofoblastu, fibroblastów skóry płodu, moczu płodu lub krwi pępowinowej przy użyciu zestawu Sherlock (A&A Biotechnology).

Metoda porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy CGH umożliwia wykrycie zmian o charakterze nie zrównoważonym w materiale płodowym. Polega ona na hybrydyzacji badanego i referencyjnego DNA, wyznakowanych dwoma różnymi fluorochromami, do mikromacierzy. Wynik badania otrzymany jest przez analizę pomiaru stosunku intensywności fluorescencji obu sygnałów względem siebie.

Do badań prenatalnych zastosowano macierz całogenomową firmy Oxford Gene Technology, CytoSure Constitutional 8x60K, natomiast do badań materiału z poronień wykorzystano macierz całogenomową firmy Oxford Gene Technology, CytoSure Constitutional 4x180K. Analizę wyników przeprowadzono za pomocą programu CytoSure (firmy OGT), korzystając również z różnych baz danych np. OMIM, DECIPHER, ClinGen. Metoda aCGH umożliwiła analizę całego genomu w jednym badaniu ze średnią rozdzielczością ~120 kpz (mikromacierz 8x60K) lub ~24 kpz (mikromacierz 4x180K).

Stwierdzone zmiany były analizowane pod kątem obecności w nich genów (o znanej funkcji i genów kandydatów), których nieprawidłowa ekspresja może być odpowiedzialna za powstawanie wad wrodzonych lub poronienie samoistne. W przypadku identyfikacji aberracji u płodu, w celu określenia jej pochodzenia, przeprowadzone były klasyczne lub molekularne badania cytogenetyczne (kariotyp metodą GTG, FISH, MLPA lub aCGH), weryfikujące nosicielstwo aberracji u obojga rodziców.

Omówienie wyników przedstawionych w publikacji 1, 2, 3 i 4

Publikacja numer 1. Kowalczyk K, Smyk M, Bartnik-Głaska M, Plaskota I, Wiśniowiecka-Kowalnik B, Bernaciak J, Chojnacka M, Paczkowska M, Niemiec M, Dutkiewicz D, Kozar A, Magdziak R, Krawczyk W, Pietras G, Michalak E, Klepacka T, Obersztyn E, Bal J, Nowakowska BA. Application of array comparative genomic hybridization (aCGH) for identification of chromosomal aberrations in the recurrent pregnancy loss. J Assist Reprod Genet. 2022 Jan 26. doi: 10.1007/s10815-022-02400-8. Epub ahead of print. PMID: 35079943

Cykl publikacji otwiera manuskrypt dokumentujący wyniki zastosowania metody porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy, w identyfikacji aberracji chromosomowych w materiale z poronień nawracających. Jest to praca podsumowująca projekt naukowy Preludium 12, 2016/23/N/NZ2/02364, pt. „Zastosowanie metody porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH) do identyfikacji submikroskopowych aberracji chromosomowych i genów letalnych w materiale z poronień samoistnych”, realizowany w latach 2017-2020, dzięki finansowaniu przez Narodowe Centrum Nauki.

Badanie metodą aCGH wykonano u 61 pacjentek. Jedna pacjentka zgłosiła się z materiałem pochodzącym z ciąży bliźniaczej, w związku z tym analizie poddano 62 przypadki. Wiek najmłodszej zakwalifikowanej pacjentki to 27 lat, a najstarszej 45 lat. Średni wiek pacjentek wynosił 36 lat. Natomiast najliczniejszą grupę stanowiły pacjentki w wieku 30-39 lat. Do poronienia dochodziło najczęściej w 8 tygodniu ciąży. Równolegle, w celu wykluczenia obecności poliploidii chromosomowej u płodu płci żeńskiej, w 22 przypadkach zostało przeprowadzone badanie cytogenetyczne metodą Rapid-FISH.

Prawidłowe wyniki badania metodą aCGH otrzymano w 27 próbkach (43,5%). W 4 przypadkach uzyskano prawidłowy wynik badania aCGH natomiast badanie weryfikacyjne metodą Rapid-FISH wykazało nieprawidłowy kariotyp żeński z triploidią chromosomową. Ponadto, w jednym przypadku otrzymano prawidłowy wynik metodą aCGH (kariotyp żeński), natomiast w badaniu Rapid-FISH stwierdzono niskoprocentową, mozaikową tetrasomię z dodatkową 13 parą chromosomów.

Nieprawidłowe wyniki badania metodą aCGH uzyskano w 35 próbkach (56,5% przypadków). Największy odsetek stwierdzonych nieprawidłowości stanowiła trisomia chromosomów autosomalnych (65%). Najczęstszą identyfikowaną trisomią była trisomia chromosomów 14 i 16 pary (28,5%), następnie trisomia chromosomu 21 pary (8,5%) oraz trisomia chromosomu 18 pary (5,7%). Najrzadsze pojedynczo stwierdzone trisomie dotyczyły chromosomów: 3, 4, 5, 13, 15 i 22 pary.

Drugą najczęściej identyfikowaną nieprawidłowością była poliploidia chromosomowa, która stanowiła 14,3% (5/35) wszystkich stwierdzonych aberracji.

Aberracje strukturalne stanowiły 17,1% (6/35) wszystkich zidentyfikowanych nieprawidłowości chromosomowych. Aberracje strukturalne o charakterze patogennym zostały stwierdzone w 3 przypadkach, również w 3 przypadkach stwierdzono aberracje prawdopodobnie patogene. Do grupy aberracji odpowiedzialnych za poronienie zakwalifikowano delecję 7p22.3p12.3 i duplikację 9p24.3p13.2 będące pochodnymi ojcowskiej translokacji zrównoważonej, delecję 3q13.31q22.2 i delecję 3q22.3q23, delecję 17p13.1 oraz delecję 1q21.1q21.2.

Publikacja numer 2. Kowalczyk K, Bartnik-Głaska M, Smyk M, Plaskota I, Bernaciak J, Kędzior M, Wiśniowiecka-Kowalnik B, Jakubów-Durska K, Braun-Walicka N, Barczyk A, Geremek M, Castañeda J, Kutkowska-Kaźmierczak A, Własienko P, Dębska M, Kucińska-Chahwan A, Roszkowski T, Kozłowski S, Mikulska B, Issat T, Obersztyn E, Nowakowska BA. Prenatal Diagnosis by Array Comparative Genomic Hybridization in Fetuses with Cardiac Abnormalities. *Genes (Basel)*. 2021 Dec 19;12(12):2021. doi: 10.3390/genes12122021. PMID: 34946970; PMCID: PMC8701951.

W drugiej publikacji przedstawiono wyniki zastosowania macierzy aCGH w diagnostyce prenatalnej u 484 płodów z rozpoznanymi ultrasonograficznie wrodzonymi wadami serca (CHDs, *ang.* Congenital Heart Defects). Do badania zakwalifikowano 256 płodów z izolowanymi CHD i 228 płodów z CHD współistniejących z innymi wadami rozwojowymi, diagnozowanych w latach 2014-2019. Celem badania była identyfikacja aberracji odpowiedzialnych za

powstawanie wrodzonych wad serca a w szczególności nowych aberracji, w obrębie których znajdują się geny, których mutacje mogą powodować CHD.

Aberracje chromosomowe stwierdzono w 176 przypadkach (37%, 176/484) (74 u płodów z izolowaną wadą serca i 102 u płodów z CHD współistniejącej z innymi wadami rozwojowymi). Aneuploidię chromosomową wykryto w 102 przypadkach (21%, 102/484), a najczęstszą aberracją strukturalną była mikrodelecja w regionie 22q11.2, zidentyfikowana w 25 przypadkach (5%, 25/484). Spośród aneuploidii, najczęstszą stwierdzoną była trisomia chromosomu 21 pary (zespół Downa), następnie trisomia chromosomu 18 pary (zespół Edwardsa), kolejno trisomia chromosomu 13 pary (zespół Patau) i monosomia chromosomu X (zespół Turnera). Najbardziej charakterystyczne wady serca dla poszczególnej trisomii, takie jak ubytek przegrody przedsionkowo-komorowej (AVSD), ubytek przegrody międzykomorowej (VSD), tetralogia Fallota (TOF) oraz ubytek przegrody międzyprzedsionkowej (ASD) dla chromosomu 21 pary, wystąpiły u 91% analizowanych płodów z zespołem Downa, w 9% stwierdzono inne rzadkie nieprawidłowości budowy serca. Dla chromosomu 18 pary stwierdzono VSD, AVSD i dwuodpływową prawą komorę (DORV) u 79% płodów z zespołem Edwardsa, 21% stanowiły inne wady serca. Natomiast w przypadku trisomii chromosomu 13 pary (zespół Patau) VSD i ASD stwierdzono u 67% płodów, a pozostałe wrodzone wady serca stanowiły 33%. W przypadku mikrodelecji w regionie 22q11.2, najczęstszą stwierdzaną wadą serca była tetralogia Fallota obserwowana u 80% płodów, podczas gdy VSD obserwowano u 12%, a zespół hipoplazji lewego serca (HLHS) u 8% płodów z tą delecją.

Dodatkowo wykorzystując analizę metodą mikromacierzy CGH, zidentyfikowano mozaikowe trisomie chromosomów 16, 18 i 22 pary. Najmniejszy stopień mozaikowości, który został stwierdzony za pomocą metody aCGH był na poziomie 11% (trisomia mozaikowa chromosomu 22 pary) i został wykryty u płodu skierowanego ze względu na obecność izolowanej wady serca -VSD.

W naszym badaniu łącznie stwierdzono 60 różnych aberracji u 176 z 484 płodów z CHD. Pierwsza grupa zawierała 33 aberracje uważane za klinicznie patogenne. Najczęściej stwierdzane były aneuploidie (~58%): trisomia chromosomu 21 pary w 44 przypadkach, trisomia chromosomu 18 pary w 32 przypadkach i trisomia chromosomu 13 pary w 15 przypadkach. Ponadto, w grupie tej znajdowały się 22 patogenne aberracje strukturalne.

Druga grupa aberracji zawierała 18 potencjalnie patogennych aberracji strukturalnych, co w naszej grupie badanej stanowiło 36,7% (18/49) wszystkich zidentyfikowanych aberracji strukturalnych i 10% (18/176) wszystkich zidentyfikowanych nieprawidłowości chromosomowych.

Oprócz aberracji patogennych i potencjalnie patogennych, u 9 płodów stwierdzono obecność aberracji o niepewnym znaczeniu klinicznym, co stanowi 1,8% (9/484) wszystkich badanych płodów z CHD lub 5,1% (9/176) płodów ze stwierdzoną aberracją chromosomową.

Publikacja numer 3. Geremek M, Dudarewicz L, Obersztyń E, Paczkowska M, Smyk M, Sobecka K, Nowakowska B. Null variants in *AGRN* cause lethal fetal akinesia deformation sequence. *Clin Genet.* 2020 Apr;97(4):634-638. doi: 10.1111/cge.13677. Epub 2019 Dec 11. PMID: 31730230

Kolejną przedłożoną pracą jest manuskrypt opisujący przypadek płodu z obecnością patogennych wariantów na obu allelach w genie *AGRN*. Praca ta wykazuje jak pomocnym narzędziem w diagnostyce prenatalnej wrodzonych wad płodu jest metoda sekwencjonowania eksomowego (WES).

Do prenatalnego badania metodą aCGH zakwalifikowano, 27-letnią pacjentkę ze względu na nieprawidłowe badanie USG. Badanie to zostało wykonane w 21 tygodniu ciąży i wykazało szereg nieprawidłowości anatomicznych u płodu w tym: uogólniony obrzęk, pusty żołądek, widoczny płyn w świetle przełyku, brak widocznej perystaltyki przełyku, brak ruchów kończyn, przykurcze 4 kończyn, przykurcze palców, nieprawidłową pozycję palców u rąk i stóp, obrzęk podskórny stopy (podeszwowy i grzbietowy), nieprawidłowy obraz mięśni szkieletowych (brak mięśni szkieletowych o typowej budowie hipoechogenicznej), usta stale lekko otwarte, wielowodzie i wysięki do opłucnej oraz wysięki sugerujące hipoplazję płuc. Na podstawie obrazu ultrasonograficznego postawiono rozpoznanie sekwencji deformacyjnej akinezji płodu (FADS, OMIM 208150). Rodzice nie byli ze sobą spokrewnieni i nie potwierdzili obecności wad wrodzonych w rodzinie. W 30 tygodniu ciąży doszło do martwego urodzenia.

Badanie płodu metodą aCGH wykazało obecność interstycjalnej delecji w regionie 1p36.33 o wielkości 148 kbp obejmujące eksony 3-36 genu *AGRN* (OMIM 103320). Jednak ze względu na częstość występowania tej zmiany w populacji

ogólnej, aberracja ta została zakwalifikowana do zmian potencjalnie łagodnych i nie została wykazana w wyniku.

Dodatkowa analiza metodą WES wykazała obecność homozygotycznej delecji jednego nukleotydu, skutkującej przesunięciem ramki odczytu, w eksonie 27 genu *AGRN* (NM_198576: c.4657delT:p.C1553fs). Matka była heterozygotyczną nosicielką stwierdzonej mutacji, natomiast ojciec był nosicielem stwierdzonej u płodu delecji w regionie 1p36.33.

W dostępnej literaturze opisywane są warianty patogenne w genie *AGRN* w rodzinach z wrodzonym zespołem miastenicznym (CMS, OMIM 608931). Nasz przypadek jest najprawdopodobniej pierwszym opisanym z obecnością patogenicznego wariantu na obu allelach genu *AGRN* w zespole FADS.

Przedstawiony przypadek ukazuje jak kompleksowym i wieloetapowym procesem jest diagnostyka prenatalna. Chociaż delecja w regionie 1p36.33 została wykryta podczas analizy metodą aCGH, to zgodnie z obowiązującymi rekomendacjami nie uwzględniono jej w wyniku diagnostycznym. Dopiero w połączeniu z wynikiem otrzymanym metodą WES stwierdzono prawdopodobnie patogeniczny charakter tej zmiany.

Publikacja numer 4. Kowalczyk K, Bartnik-Głaska M, Smyk M, Plaskota I, Bernaciak J, Kędzior M, Wiśniowiecka-Kowalnik B, Deperas M, Domaradzka J, Łuszczek A, Dutkiewicz D, Kozar A, Grad D, Niemiec M, Ziemkiewicz K, Magdziak R, Braun-Walicka N, Barczyk A, Geremek M, Castañeda J, Kutkowska-Kaźmierczak A, Własienko P, Jakubów-Durska K, Dębska M, Kucińska-Chahwan A, Kozłowski S, Mikulska B, Issat T, Roszkowski T, Nawara-Baran A, Runge A, Jakubiuk-Tomaszuk A, Kruczek A, Kostyk E, Pietras G, Limon J, Zwoliński J, Ochman K, Szajner T, Węgrzyn P, Wielgoś M, Sąsiadek M, Obersztyn E, Nowakowska BA. Comparative Genomic Hybridization to Microarrays in Fetuses with High-Risk Prenatal Indications: Polish Experience with 7400 Pregnancies. *Genes*. 2022; 13(4):690. <https://doi.org/10.3390/genes13040690>

W ostatniej publikacji przedstawiono podsumowanie diagnostyki prenatalnej za pomocą mikromacierzy CGH wykonywanej w ZGM IMiD od stycznia 2014 do

września 2021 roku. W pracy tej skupiono się na ocenie użyteczności macierzy w diagnostyce prenatalnej w grupie 7400 ciąż w polskiej populacji. Nasze badania obejmowały dużą grupę badaną (ze względu na finansowanie ze środków publicznych oraz ściśle jednolite kryteria kwalifikacji pacjentek do badań inwazyjnych). Średni wiek zakwalifikowanej do badania pacjentki wynosił 35 lat (18-49 lat). W wielu przypadkach próbki DNA od obojga rodziców były również dostępne do badania, co istotnie pomogło w klasyfikacji wielu CNV trudnych w interpretacji. Porada genetyczna odbywała się zarówno przed badaniem inwazyjnym, jak i po uzyskaniu wyników badania.

Wszystkie otrzymane do naszego badania próbki zakwalifikowano do sześciu grup, według wskazań do inwazyjnej diagnostyki prenatalnej: nieprawidłowy wynik badania ultrasonograficznego, zaawansowany wiek matki, podwyższone NT, nieprawidłowy wynik testu PAPP-A oraz obawa, choroby genetyczne w rodzinie i weryfikacja wyników innych badań genetycznych.

Uzyskane wyniki badań wskazują na wysoką czułość metody aCGH w detekcji aberracji chromosomowych u płodów ze wskazaniem do diagnostyki inwazyjnej. Odsetek stwierdzonych nieprawidłowości wynosił 27,2% (2010/7400), w tym 71,2% (1431/2010) stanowiły liczbowe aberracje chromosomowe a 28,8% (579/2010) aberracje strukturalne.

Istotne klinicznie aberracje strukturalne (patogennie i potencjalnie patogennie) stanowiły 87% (505/579) wszystkich stwierdzonych CNV i obecne były u 6,8% (505/7400) wszystkich przebadanych płodów. Ponadto, stwierdzono 57 aberracji o niepewnym znaczeniu klinicznym.

Wskaźnik wykrywalności nieprawidłowości chromosomowych stwierdzonych przy użyciu metody mikromacierzy CGH był najwyższy, gdy wskazaniem do badania był obrzęk uogólniony i wynosił 48% (59/123), następnie, w grupie płodów ze zwiększoną przeziernością karkową wynosił 36,9% (212/573), wrodzonymi wadami serca 24% (285/1188), hipotrofią płodu 22,9% (19/83) oraz wadami ośrodkowego układu nerwowego wynosił 20,1% (31/154).

W naszych badaniach, klinicznie istotne aberracje strukturalne (patogennie i potencjalnie patogennie) wykryto u 7,7% (149/1931) płodów z izolowanymi wadami anatomicznymi, stwierdzonymi podczas badania USG (izolowane wady serca, OUN, układu moczowego, układu kostnego, twarzo-czaszki, hipotrofia

płodu, wytrzewienie, achondroplazja i przepuklina pępkowa). Natomiast w grupie płodów z zespołem wad wrodzonych, wskaźnik ten wynosił 8,2% (185/2245).

Najniższy wskaźnik wykrywalności stwierdzono w grupie płodów z izolowaną wadą układu moczowego i wynosił on 4,5% (6/134). W tej grupie badanej u trzech płodów stwierdzono obecność patogenicznej mikrodelecji w regionie 17q12.

W grupie, gdzie wskazaniem do badania inwazyjnego metodą aCGH był zaawansowany wiek matki, klinicznie istotne submikroskopowe CNVs zostały wykryte u 5,3% (18/336) płodów.

Ostatnią omawianą grupę stanowiły płody skierowane na inwazyjną diagnostykę genetyczną ze względu na nieprawidłowy wynik biochemicznego testu PAPP-A. W tej grupie, klinicznie istotne submikroskopowe CNV stwierdziliśmy u 3,1% (22/713) płodów.

Najczęstszą submikroskopową aberracją w naszej grupie 7400 płodów, była delecja regionu 22q11.2 (80/7400, 1,1%).

Przeprowadzone badania wykazały zróżnicowany wskaźnik wydajności metody CGH dla ciąż o różnych wskazaniach do inwazyjnej diagnostyki. Stosując tę metodę możliwa była ocena częstości występowania patogennych, potencjalnie patogennych oraz o niepewnym znaczeniu klinicznym niezrównoważeń genomu w badanej grupie.

Podsumowanie

Wrodzone wady rozwojowe (WWR) stwarzają poważne wyzwanie zarówno kliniczne i naukowe. Częstość występowania wrodzonych zaburzeń rozwojowych wśród żywo urodzonych noworodków wynosi w krajach rozwiniętych około ~2-3%, wśród martwo urodzonych do 20%. Ponadto około 70% płodów z ciężkimi wadami rozwojowymi ulega obumarciu i poronieniu samoistnemu na różnym etapie trwania ciąży. Główną rolę w patomechanizmie wrodzonych wad rozwojowych pełnią czynniki genetyczne, w tym aberracje chromosomowe.

Badania prowadzone w ostatnich latach wykazują, że istotną rolę w etiologii wrodzonych wad rozwojowych odgrywają zmiany liczby kopii fragmentów DNA (CNVs), do których należą submikroskopowe nie zrównoważenia genomu, możliwe do wykrycia metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH). Możliwość analizy całego genomu w jednym badaniu zrewolucjonizowała diagnostykę prenatalną, dlatego też metoda ta jest testem pierwszego wyboru w przypadku stwierdzenia u płodu nieprawidłowości anatomicznych. Celem pracy była ocena przydatności metody porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy CGH w diagnostyce wrodzonych wad rozwojowych płodu i wad letalnych.

Badaniami objęto grupę 7400 płodów skierowanych na badanie metodą aCGH ze względu na: nieprawidłowy wynik badania ultrasonograficznego, zaawansowany wiek matki, podwyższone NT, nieprawidłowy wynik przesiewowego testu PAPP-A oraz obawa, choroby genetyczne w rodzinie i weryfikacja wyników innych badań genetycznych. Do grupy badanej włączono również 62 materiały po poronieniu samoistnym. W chwili obecnej jest to największa, opisana w literaturze grupa badana. Wszystkie badania zostały przeprowadzone

w Zespole Pracowni Cytogenetyki Zakładu Genetyki Medycznej, IMiD. Do badań zastosowano całogenomową mikromacierz oligonukleotydową.

Wykorzystanie metody aCGH w diagnostyce prenatalnej, umożliwiło identyfikację 449 strukturalnych aberracji patogennych (446 w grupie prenatalnej i 3 w grupie poronień samoistnych) oraz 62 potencjalnie patogennych aberracji chromosomowych (59 w grupie prenatalnej i 3 w grupie poronień samoistnych). Warianty potencjalnie patogenne zawierały geny o znanej funkcji, które mogą być

odpowiedzialne za nieprawidłowości występujące u płodu. W badaniach stwierdzono 57 aberracji o niepewnym znaczeniu klinicznym. Znajdujące się tych regionach genu, trudno było powiązać ze wskazaniami do badania. Jednak, jak pokazuje Publikacja numer 3, w wielu przypadkach pomocnym narzędziem, umożliwiającym postawienie diagnozy może być technika WGS lub WES.

Badania przeprowadzone techniką aCGH w materiale z poronienia samoistnego wykazały, że metoda ta jest skutecznym narzędziem diagnostycznym do identyfikacji aberracji chromosomowych (17,1%), niemożliwych do wykrycia powszechnie stosowaną klasyczną oceną kariotypu metodą GTG.

Wyniki uzyskane w grupie 484 płodów z CHD wskazują, że metoda porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy CGH umożliwiła określenie etiologii wrodzonych wad serca spowodowanych aberracją strukturalną w 13,4% analizowanych przypadków, a w grupie 7400 analizowanych płodów, wskaźnik wykrywalności istotnych klinicznie aberracji strukturalnych wynosił 6,8%.

Wysoka skuteczność metody aCGH w identyfikacji nie zrównoważeń genomu wykazała jej przydatność w diagnostyce prenatalnej. Molekularna analiza genomu metodą aCGH wykazała istotną rolę CNVs w etiologii izolowanych i mnogich wad płodu oraz poronień samoistnych. Wyniki przeprowadzonych badań uzasadniają słuszność stosowania metody aCGH jako pierwszego testu w diagnostyce klinicznej wrodzonych wad płodu i wad letalnych oraz gdy wskazaniem do badania był zaawansowany wiek matki, podwyższone NT, nieprawidłowy wynik przesiewowego testu PAPP-A, obecność chorób genetycznych w rodzinie i weryfikacja wyników innych badań genetycznych. Natomiast gdy u płodu stwierdzono achondroplazję lub wytrzewienie, metoda aCGH nie wykazała nieprawidłowości chromosomowych.

Wnioski

Wyniki uzyskane w przeprowadzonych badaniach umożliwiły sformułowanie następujących wniosków:

1. Metoda porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH), jest skutecznym narzędziem badawczym umożliwiającym stwierdzenie patogenicznego, potencjalnie patogenicznego lub o niepewnym znaczeniu klinicznym niezrównoważenia genomu w przypadkach wrodzonych wad rozwojowych i wad letalnych płodu.
2. Wyniki badań przeprowadzonych za pomocą metody mikromacierzy CGH potwierdziły istotne znaczenie submikroskopowych zmian liczby kopii fragmentów DNA (CNVs) w etiopatogenezie wrodzonych wad rozwojowych i wad letalnych płodu.
3. Wykorzystanie metody aCGH, oprócz możliwości identyfikacji CNVs, umożliwia również wykrywanie niskoprocentowej mozaikowości chromosomowej.
4. Ocena znaczenia klinicznego stwierdzonych CNVs, w szczególności VOUS, często jest bardzo trudna i nie zawsze możliwe jest określenie korelacji genotypowo-fenotypowej.
5. Wysoka skuteczność identyfikacji aberracji chromosomowych metodą aCGH, w przypadkach: wrodzonych wad rozwojowych i wad letalnych płodu, a także zaawansowanego wieku matki, podwyższonego NT, nieprawidłowego wyniku testu przesiewowego PAPP-A, obecności chorób genetycznych w rodzinie i weryfikacji wyników innych badań genetycznych, uzasadnia zastosowanie tej metody jako pierwszego testu w diagnostyce prenatalnej.
6. W szczególnych przypadkach wskazane jest uzupełnienie diagnostyki prenatalnej metodą mikromacierzy CGH o technikę WES.
7. Najczęściej wykrywaną aberracją strukturalną była mikrodelecja w regionie 22q11.2.

Piśmiennictwo

1. <http://www.rejestrwad.pl/>
2. Korniszewski L. (2005) Typy wad wrodzonych. W: Dziecko z zespołem wad wrodzonych, red. Korniszewski L. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa
3. Sieroszewski P, Haus O, Zimmer M, Wielgos M, Latos-Bielenska A, Borowiec M, Borowski D, Cnota W, Czuba B, Dubiel M, Jakubowski L, Janiak K, Kaczmarek P, Kwiatkowski S, Nowakowska B, Pietryga M, Piotrowski K, Preis K, Ropacka-Lesiak M, Sasiadek MM, Swiatkowska-Freud M, Wegrzyn P, Wloch A, Moczulska H. Recommendations for prenatal diagnostics of the Polish Society of Gynaecologists and Obstetricians and the Polish Society of Human Genetics. *Ginekol Pol.* 2022 Mar 22. doi: 10.5603/GP.a2021.0255. Epub ahead of print. PMID: 35315029.
4. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, Savage M, Platt LD, Saltzman D, Grobman WA, Klugman S, Scholl T, Simpson JL, McCall K, Aggarwal VS, Bunke B, Nahum O, Patel A, Lamb AN, Thom EA, Beaudet AL, Ledbetter DH, Shaffer LG, Jackson L. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012 Dec 6;367(23):2175-84. doi: 10.1056/NEJMoa1203382. PMID: 23215555; PMCID: PMC3549418.
5. Committee Opinion No.682: Microarrays and Next-Generation Sequencing Technology: The Use of Advanced Genetic Diagnostic Tools in Obstetrics and Gynecology, *Obstetrics & Gynecology*: December 2016 - Volume 128 - Issue 6 - p e262-e268 doi: 10.1097/AOG.0000000000001817