

Ocena kariotypu niepłodnych par

Karyotype evaluation of infertile couples

Klaudia Mianowska¹, Magdalena Lewicka², Magdalena Sulima², Dorota Koczkodaj³, Artur Wdowiak⁴

¹ Studentka kierunku położnictwo, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska – projekt „MEDFUTURE – Medyczne zawody przyszłości”

² Zakład Położnictwa, Ginekologii i Pielęgniarstwa Położniczo-Ginekologicznego, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

³ Katedra Genetyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

⁴ Ovea Gabinet Ginekologiczno-Położniczy, Lublin, Pracownia Technik Diagnostycznych Wydział Nauk o Zdrowiu. Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

**European Journal
of Medical Technologies**
2015; 3(8): 49-56

Copyright © 2015 by ISASDMT
All rights reserved
www.medical-technologies.eu
Published online 10.11.2015

Adres do korespondencji:

dr n. med. Magdalena Lewicka
Zakład Położnictwa,
Ginekologii
i Pielęgniarstwa
Położniczo-
-Ginekologicznego,
Wydział Pielęgniarstwa
i Nauk o Zdrowiu,
Uniwersytet Medyczny
w Lublinie; ul. Chodźki
6, 20-093 Lublin
e-mail: m.lewicka@
umlub.pl

Streszczenie

Niepłodność według Światowej Organizacji Zdrowia jest uważana za chorobę społeczną. Przyczyny niepłodności są zależne od kobiety, mężczyzny lub obojga partnerów starających się o dziecko. Postępowanie diagnostyczne w przypadku par mających problemy z prokreacją oparte jest na rozważeniu, czy niepłodność nie jest uwarunkowana zmianami genetycznymi. Celem pracy była ocena kariotypu u niepłodnej pary.

Słowa kluczowe:

niepłodność,
kariotyp, genetyka

Badanie kariotypu wykonane u par z podejrzeniem genetycznego podłoża niepłodności pozwala na wykrycie ewentualnych zmian lub nieprawidłowości w strukturze i/lub liczbie chromosomów. Właściwe rozpoznanie i ograniczenie lub usunięcie czynników ryzyka wystąpienia niepłodności, wczesne i trafne rozpoznanie, a także wdrożenie odpowiedniego postępowania terapeutycznego dostosowanego do indywidualnego przypadku mogą rzutować na skuteczność rozrodu.

Summary

Infertility, according to the World Health Organization, is considered a social disease. The causes of infertility are dependent on a woman, man or both partners trying to have a baby. A diagnostic procedure in the case of couples with reproductive problems based on a consideration of whether infertility is not determined by genetic variations. The aim of the study was to evaluate the karyotype of infertile couples.

The karyotype, made in couples with suspected genetic basis of infertility, allows to detect any changes or abnormalities in the structure and / or number of chromosomes. A proper diagnosis and to reduce or remove the risk factors for infertility, early and accurate diagnosis, as well as implementation of appropriate therapeutic intervention, tailored to the individual case, it may affect the efficiency of breeding.

Key words:

infertility, genetics, karyotype

Wstęp

Niepłodność według Światowej Organizacji Zdrowia (*World Health Organization* – WHO) to brak wystąpienia ciąży pomimo dwunastomiesięcznego okresu współżycia seksualnego partnerów bez stosowania środków antykoncepcyjnych. Współcześnie uważana za chorobę społeczną. Dane szacunkowe pokazują, że w Polsce niepłodnych jest 10-15% par, co przekłada się na liczbę około 1,5 miliona [1,2,3,4].

Podział niepłodności

Jednym z rodzajów niepłodności jest trwała niemożność zajścia w ciążę – *sterilitas*. Jest to niepłodność pierwotna, kiedy kobieta jeszcze nigdy nie była w ciąży oraz mężczyzna nigdy nie doprowadził do poczęcia dziecka. Wyróżniamy też niepłodność wtórną, czyli kobieta była już w ciąży, a mężczyzna spowodował poczęcie dziecka, niezależnie jak dana ciąża się

zakończyła. Inny rodzaj to *infertilitas* (niemożność donoszenia ciąży), czyli sytuacja, w której dochodzi do zapłodnienia i zagnieżdżenia komórki jajowej, ale ciąża kończy się poronieniem, ciążą ektopową, ciążą obumarłą, porodem przedwczesnym lub występuje niewydolność cieśniowo-szyjkowa [5,6].

Przyczyny

Przyczyny niepłodności są zależne od kobiety, mężczyzny lub obojga partnerów starających się o dziecko. U kobiety można wyróżnić zaburzenia owulacji, które są najczęstszą przyczyną niepłodności, a także nieprawidłowości ze strony jajników, jajowodów, macicy, szyjki macicy oraz czynniki immunologiczne. U mężczyzny przyczyny niepłodności dzieli się na przedjądrowe, jądrowe i pozajądrowe, czyli zależnie od lokalizacji zaburzenia pierwotnego. Dodatkowo występuje niepłodność idiopatyczna, czyli taka, której przyczyny nie można ustalić [6,7,8,9,10].

Wśród przyczyn niepłodności należy również wymienić przyczyny genetyczne, do których należą [8,9,11,12,13,14,15,16]:

1. Aberracje chromosomowe:
 - aberracje chromosomowe strukturalne – translokacje robertsonowskie, aberracje strukturalne chromosomu X;
 - aberracje chromosomowe liczbowe – zespół Turnera (45,X), zespół Klinefeltera (47,XXY), kariotypy mozaikowe.
2. Mikrodelecje chromosomu Y – utrata szeregu genów, które są odpowiedzialne za kontrolę spermatogenezy (region AZF). Do regionu AZFa i AZFb należą geny: *DFRRY*, *DBY*, *UTY*, *TB4Y*, *BPY1*, *CDY*, *XKRY*, *RBM*, *SMCY(HYA)*, *EIF1AY*. Region AZFc i AZFd tworzą geny: *RBM*, *PRY*, *TTY2*, *DAZ*, *BPY2*, *CDY*.
3. Choroby jednogenowe odpowiedzialne za niepłodność męską:
 - dziedziczny autosomalnie recesywnie wrodzony, obustronny brak lub niedrożność nasieniowodów – powodowany jest przez homozygotyczne mutacje genu *CFTR*;
 - mutacja genu *SYCP3* odpowiedzialna za autosomalne recesywne zatrzymanie spermatogenezy;
 - mutacja genu *AMH* lub jej receptora, która powoduje zespół przetrwałych przewodów Müllera – zespół dziedziczny autosomalnie recesywnie;
 - dystrofia miotoniczna – choroba mięśniowa, która jest dziedziczona autosomalnie dominująco z zaznaczoną antycypacją w przypadku przekazania choroby przez matkę;
 - zespół Noonan;
 - niektóre hemoglobinopatie,
 - pierwotna dyskineza rzęsek (zespół Younga);
 - ataksja-teleangiektazja – to zespół Louis-Bar spowodowany mutacją w genie *ATM*, jest dziedziczny autosomalnie recesywnie.
4. Choroby jednogenowe odpowiedzialne za niepłodność kobiecą:
 - mutacje genów, których zadaniem jest kodowanie hormonów i ich receptorów;
 - czynniki genetyczne, które prowadzą do przedwczesnego wygasania czynności jajników,

np. uszkodzenie funkcji genu *FMRI*, czyli zespół łamliwego chromosomu X, w którym permutacja genu występuje u nosicieli, a pełna mutacja genu u osób chorych.

5. Choroby wieloczynnikowe – obecność niektórych antygenów układu HLA predysponuje wystąpienie u mężczyzn azoospermii nieobstrukcyjnej; u kobiet za niepłodność odpowiadają zespół policystycznych jajników i endometrioza.

Diagnostyka genetyczna

Postępowanie diagnostyczne w przypadku par mających problemy z prokreacją oparte jest na rozważeniu, czy niepłodność nie jest uwarunkowana zmianami genetycznymi oraz czy leczenie niepłodności nie wiąże się z ryzykiem występowania ciężkich powikłań uwarunkowanych genetycznie u potomstwa. Podstawowym elementem diagnostyki genetycznej w niepłodności jest właściwie zebrany wywiad, a następnie przeanalizowanie tła genetycznego kobiety i mężczyzny jako przyczyn niepłodności. U kobiet tło genetyczne niepowodzeń rozrodu należy podejrzewać w przypadku wystąpienia: wrodzonego hipogonadyzmu hipogonadotropowego, pierwotnego braku miesiączki uwarunkowanego brakiem funkcji jajników, przedwczesnego wygaśnięcia funkcji jajników, zaburzeń rozwoju narządów płciowych, nieprawidłowego rozwoju trzeciorzędowych cech płciowych, wrodzonych zmian morfologicznych budowy ciała, nawracających strat ciąż. U mężczyzn tło genetyczne należy podejrzewać, jeżeli stwierdza się: azoospermie, znacznego stopnia oligoastenoospermie, nawracające straty ciąż u partnerek [11,12,13,14,15,16,17].

Badanie kariotypu wykonane u par z podejrzeniem genetycznego podłoża niepłodności to inaczej badanie cytogenetyczne, które pozwala na wykrycie ewentualnych zmian lub nieprawidłowości w strukturze i/lub liczbie chromosomów, nazywanych aberracjami chromosomowymi. Kariotyp jest to zestaw chromosomów charakterystyczny dla określonego gatunku lub osobnika. Opisuje się go za pomocą znaków określających

liczbę chromosomów, ich rodzaj, a także ewentualne nieprawidłowości w nich występujące. Według ogólnych zasad określających sposoby klasyfikacji i identyfikacji chromosomów, a także rodzajów opisu kariotypu formuluje się kariogram. Jest to zestaw chromosomów pojedynczej komórki. Składa się z siedmiu grup oznaczonych literami alfabetu od A do G. Każda grupa zawiera chromosomy o podobnej wielkości i kształcie, uszeregowane według wielkości malejącej. Wyróżnia się 22 pary chromosomów, zwane autosomami, a także parę 23, zawierającą chromosomy płci [18,19].

Dodatkowe badania, które mogą okazać się konieczne w określeniu czynnika genetycznego niepłodności u kobiet, to badania związane z występującymi poronieniami. Wówczas chcąc określić przyczynę nawracających i samoistnych poronień, wykonuje się badania mutacji Leiden i 20210 G>A w genie protrombiny, a także badanie genu *IGF2* u partnerów. Natomiast w przypadku problemów z funkcją jajników (przedwczesne wygasanie ich czynności) zalecane jest wykonanie badania genu *FMRI*. W przypadku mężczyzny, aby rozpoznać czynnik genetyczny problemów z niepłodnością, najlepiej wykonać badanie pakietowe niepłodności męskiej, które obok badania kariotypu obejmuje badania najczęściej występujących mutacji genu *CFTR*, *AZF* [18,19].

Cele pracy

Ocena kariotypu u niepłodnej pary.

Opis badania

Badanie zostało przeprowadzone w ramach projektu „MEDFUTURE – Medyczne zawody przyszłości” Działanie 4.3 Program Operacyjny Kapitał Ludzki Uniwersytet Medyczny w Lublinie. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Lublinie – Uchwała numer KE-0254/60/2015.

Opis przypadku

Kobieta lat 30, mężczyzna lat 33, są małżeństwem od 9 lat. Oboje mieli wykształcenie wyższe, mieszkali w mieście. Kobieta pracowała jako kasjer, nie stwierdziła ekspozycji na czynniki mutagenne z tytułu wykonywanej pracy ani na żadne inne czynniki szkodliwe. Nie paliła papierosów oraz nie używała środków odurzających ani narkotyków, alkohol spożywała raz w tygodniu.

Kobieta regularnie miesiączkowała, nie miała żadnych operacji w obrębie jamy brzusznej i miednicy, nie miała problemu z nawracającymi zakażeniami narządów rodnych. Regularnie chodziła na wizyty do ginekologa, w przeszłości miała zdiagnozowaną endometriozę. Kobieta korzystała z leczenia hormonalnego, gdy zdiagnozowano niepłodność. Kobieta radziła sobie ze stresem, który był związany z problemami prokreacyjnymi. Na temat niepłodności szukała informacji w Internecie, interesowała się nowymi metodami leczenia oraz korzystała ze wszystkich porad lekarza prowadzącego. Dodatkowo problemy prokreacyjne wywoływały u kobiety lęk i niepokój, poczucie winy i niespełnienia, bezradność, smutek oraz żal.

Mężczyzna wykonywał pracę biurową, nie stwierdził ekspozycji na czynniki mutagenne wynikające ze środowiska pracy ani na inne czynniki szkodliwe. Nie palił papierosów, alkohol spożywał średnio raz w tygodniu, nie zażywał narkotyków ani innych środków odurzających. Mężczyzna miał w przeszłości zdiagnozowane niezstąpienie jądra, a obecnie nieprawidłowości nasienia. Mężczyzna podobnie jak jego żona radził sobie ze stresem oraz korzystał ze wszystkich porad lekarza prowadzącego. Problem niepłodności wywoływał u niego poczucie bezradności.

Para starała się o dziecko ponad 2 lata. Nie była ze sobą spokrewniona. U pary występowała niepłodność pierwotna, o nieustalonej przyczynie. Do tej pory zastosowano u pary leczenie farmakologiczne, jedną inseminację oraz jedno zapłodnienie in vitro. Małżeństwo nie korzystało z poradnictwa genetycznego. W rodzinie tej pary nie było chorób o podłożu genetycznym. Udział w projekcie umożliwił im wykonanie diagnostyki na poziomie badań genetycznych.

Badania zostały przeprowadzone w Katedrze Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

Przebieg badania cytogenetycznego

W celu uzyskania metafaz potrzebnych do analizy cytogenetycznej wykorzystuje się hodowlę limfocytów krwi obwodowej.

Materiałem do badań było 5-10 ml krwi pobranej do heparynizowanej strzykawki i jak najszybsze dostarczenie jej do pracowni cytogenetycznej. Strzykawkę ustawiono pod kątem, igłą skierowaną do góry (pozwoliło to utworzyć supernatant po ok. 2 godzinach), następnie rozdzielono frakcje [20].

Hodowla *in vitro* polegała na zawieszeniu w medium 0,5 ml uzyskanego sedymentu (osadu komórek) i umieszczeniu w butelce hodowlanej. W skład medium wchodziło 8,5 ml RPMI z antybiotykami, 1,5 ml surowicy FCS oraz 0,3 ml LF7. Hodowla trwała 72-96 godzin w inkubatorze z dopływem CO₂ w 37°C. Do medium dodawany był kolcemid o stężeniu 10 µg/ml w objętości 50 µl na 1-1,5 godz. przed zakończeniem hodowli. Następnie zawiesina komórkowa wirowana była 7-10 minut z prędkością 800 obr./min. Supernatant odlewany był w taki sposób, aby nad osadem komórkowym pozostała minimalna ilość medium. Wytrząsając, małymi porcjami dodawany był 0,075M KCl o temperaturze 37°C. Szok hipotoniczny przeprowadzany był w temperaturze 37°C przez 15 minut. W tym czasie przygotowano mieszaninę metanolu z kwasem octowym w stosunku 3:1 w objętości 100 ml i schłodzono do temperatury -20°C. Po szoku hipotonicznym zawiesina komórek wirowana była 7-10 minut z prędkością 800 obr./min. Supernatant zlano, a następnie kroplami dodawany był utrwalacz, z każdorazowym wstrząśnięciem próbki, po czym próbówka z zawiesiną była wirowana 7-10 minut z prędkością 800 obr./min. Po wirowaniu zlewany był utrwalacz i wlewany świeży. Czynność powtarzano trzy razy. Utrwalony materiał наносono na szkiełko podstawowe [20].

Preparaty wykonywano przez nakrapianie pipetką lekko opalizującej zawiesiny na szkiełko podstawowe po 1-2 krople z wysokości 10-20 cm. Jakość

preparatów sprawdzano pod mikroskopem. Suszenie przygotowanych preparatów odbywało się w temperaturze pokojowej, a następnie preparaty były barwione. Pozostała zawiesina była przechowywana w utrwalaczu w -20°C [20].

Metody barwienia prążkowego

Standardowe barwienie barwnikiem Giemsy trwa 3 minuty. Następnie preparat jest płukany pod bieżącą wodą i suszony. W skład tego roztworu barwiącego wchodzi 5 ml barwnika Giemsy, 5 ml buforu Sorensena oraz 40 ml wody destylowanej [20].

Technika prążkowania prążków GTG wykonywana jest na preparatach 14-dniowych lub jednodniowych po uprzednim wygrzaniu ich na płycie grzewczej o temperaturze ok. 90°C przez 1 godzinę. Inkubacja preparatu w roztworze trypsyny w PBS (10 ml 0,25% trypsyny, 40 ml PBS) przez 3-10 minut. Następnie dwukrotne płukanie w PBS. Barwienie barwnikiem Giemsy o pH 6,8 przez 4-6 minut. Preparat suszony pod wiatrakami [20].

Prążki RHG wykonywane są na preparatach około dwudniowych, które są inkubowane w roztworze fosforanowym (1M NaH₂PO₄) w temperaturze 86-88°C przez 10-20 minut. Następnie są płukane pod bieżącą wodą, barwione w roztworze Giemsy 8-10 minut i suszone pod wiatrakami [20].

W celu wybarwienia prążków QFQ preparaty są barwione 0,5% wodnym roztworem kwinakryny przez 15 minut, płukane trzy razy w PBS lub roztworze Sorensena (ostatnie płukanie przez 5 minut) i suszone pod wiatrakami. Następnie zamknięte pod szkiełkiem nakrywkowym w kropli gliceryny z PBS i oglądane w mikroskopie fluorescencyjnym [2].

Nakropienie na preparat 3 kropli 50% wodnego roztworu AgNO₃ o pH 4,5-5,0 pozwoli na prążkowanie prążków Ag-NOR. Następnie preparat zostaje zamknięty pod szkiełkiem nakrywkowym i umieszczony w zamkniętej komorze wilgotnej w temperaturze 37°C przez 18-20 godzin. Potem preparat jest płukany wodą destylowaną i barwiony 2% roztworem Giemsy w buforze Sorensena o pH 7,0 przez 20 sekund [20].

Wyniki oceny kariotypu badanej pary

Analiza chromosomów barwionych techniką GTG i RHG przy rozdzielczości 550 prążków pozwoliła określić u kobiety prawidłowy kariotyp żeński.

Analiza chromosomów barwionych techniką GTG, RHG oraz QFQ przy rozdzielczości 550 prążków określiła u mężczyzny występowanie prawidłowego kariotypu męskiego.

Podsumowanie

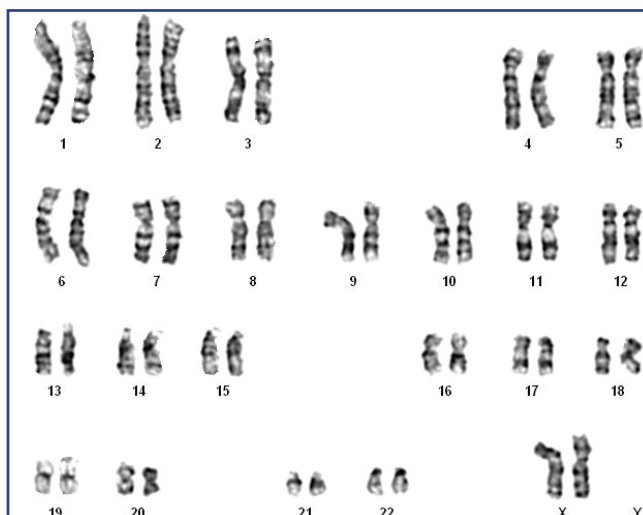
Posiadanie dziecka jest jednym z najważniejszych celów życiowych człowieka. Właściwe rozpoznanie i ograniczenie lub usunięcie czynników ryzyka wystąpienia niepłodności, wczesne i trafne rozpoznanie, a także wdrożenie odpowiedniego postępowania terapeutycznego dostosowanego do indywidualnego przypadku mogą rzutować na skuteczność rozrodo.

Możliwość skorzystania z diagnostyki genetycznej par z problemami prokreacji pozwala na ocenę kariotypu i na wykluczenie bądź potwierdzenie, przyczyny genetycznej jako powodu istnienia problemów z rozrodem.

Kobieta



Ryc. 1.
Metafaza. Prążki GTG.



Ryc. 2.
Kariotyp prawidłowy 46,XX. Prążki GTG.



Ryc. 3.
Metafaza. Prążki RHG.

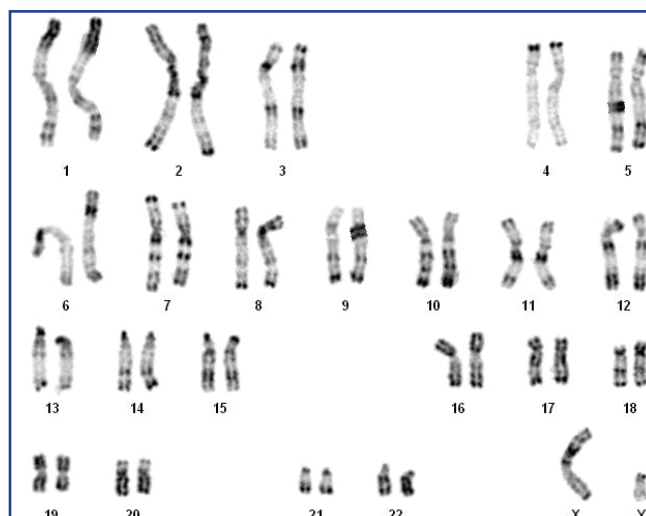


Ryc. 4.
Kariotyp prawidłowy 46,XX. Prążki RHG.

Mężczyzna



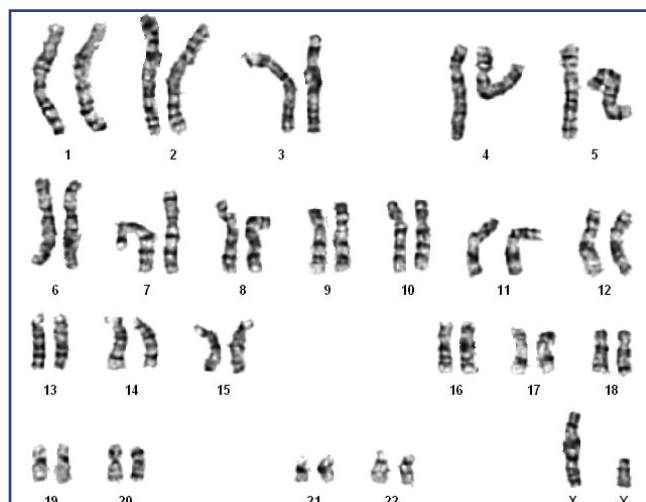
Ryc. 5.
Metafaza. Prążki RHG.



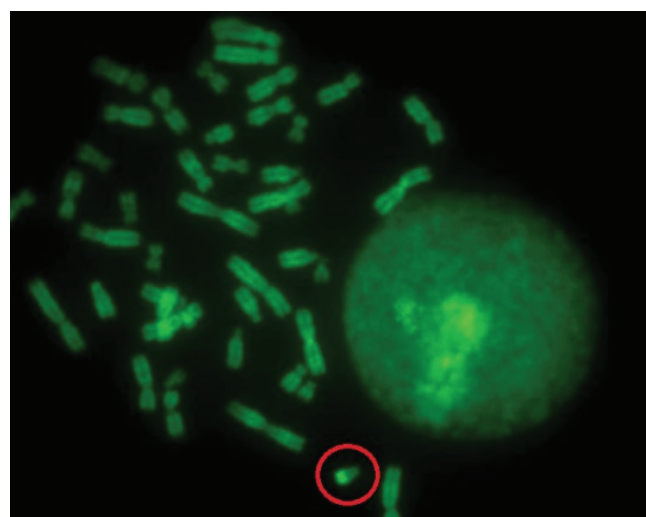
Ryc. 6.
Karyotyp prawidłowy 46,XY. Prążki RHG.



Ryc. 7.
Metafaza. Prążki GTG.



Ryc. 8.
Karyotyp prawidłowy 46,XY. Prążki GTG.



Ryc. 9.
Barwienie heterochromatyny chromosomu Y. Prążki QFQ. Widoczna intensywnie świecąca distalna część ramienia q chromosomu Y.

Piśmiennictwo

1. Bidzan M., Podolska M., Bidzan L., Smutek J.: Cechy osobowościowe a poczucie osamotnienia kobiet leczonych z powodu niepłodności. *Ginekol Pol*, 2011, 82 (7): 508-513.
2. Bączkowski T., Kurzawa R.: Diagnostyka i leczenie niepłodności w warunkach ambulatoryjnych. *Przew Lek* 2012; 1: 154-158.
3. Słomko Z.: *Ginekologia*. T.1. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2008.
4. Łepecka-Klusek C., Pilewska-Kozak A., Jakiel G.: Niepłodność w świetle definicji choroby podanej przez WHO. *Med Og Nauk Zdr* 2012; 18(2): 163-166.
5. Krasnodębski J., Ćwieklicki J.: Zapłodnienie pozaustrojowe – temat nadal aktualny. *Ginekol Prakt* 2009; 1: 36-39.
6. Kuczyński W., Kurzawa R., Oszukowski P., Pawelczyk L., Poręba R., Radowicki S., Szmatowicz M., Wołczyński S.: Rekomendacje dotyczące diagnostyki i leczenia niepłodności- skrót. *Ginekol Pol* 2012; 83(2): 149-154.
7. Janicka A., Spaczyński R., Kurzawa R.: Medycyna wspomaganego rozrodu w Polsce- raport za rok 2011 SPiN PTG. *Ginekol Pol* 2014; 85(7): 549-556.
8. Jędrzejczak P., Serdyńska M.: Niepłodność męska. [w:] Słomko Z.: *Ginekologia*, Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2008.
9. Jędrzejczak P., Sokalska A.: Niepłodność żeńska. [w:] Słomko Z.: *Ginekologia*, Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2008.
10. Kurzawa R., Kuczyński W., Pawelczyk L., Wołczyński S.: Analiza kosztów leczenia niezamierzonej bezdzietności metodą zapłodnienia pozaustrojowego. Porównanie terapii w różnych modelach prawnych. *Ginekol Pol* 2010, 81(2): 125-130.
11. Gordon J.D., Rydfors J., Druzin M., Tadir Y. i wsp.: Położnictwo, ginekologia i niepłodność. Podręcznik klinicysty. MediPage, Warszawa 2011.
12. Radwan J., Wołczyński S. (red.): Niepłodność i rozród wspomagany. Termedia Wyd. Med., Poznań 2011.
13. Kuczynski W., Kurzawa R., Oszukowski P., Pawelczyk L., Poreba R. i wsp.: Polish Gynecological Society and Polish Society for Reproductive Medicine. Polish Gynecological Society and Polish Society for Reproductive Medicine recommendations for the diagnosis and treatment of infertility. *Ginekol Pol* 2012; 83(2): 149-54
14. Wdowiak A., Bazylewicz A., Dolzhenko M.N., Nosenko N.N. i wsp.: Technologie medyczne w diagnostyce męskiej niepłodności. *Eur J Med Technol* 2015, 1 (6): 7-17.
15. Krawczyński M., Latos-Bieleńska A.: Podstawy genetyki dla ginekologów. Genetyczne przyczyny niepłodności i ich diagnostyka. [w:] Słomko Z.: *Ginekologia*, Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2008.
16. Jakubowski L.: Nieprawidłowości budowy i funkcji układu płciowego. [w:] Drewa G., Ferenc T. (red): *Genetyka medyczna. Podręcznik dla studentów*. Wyd. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2012.
17. Pacholczyk M., Ferenc T., Mordalska A.: Dziedziczenie jednogenowe u człowieka. [w:] Drewa G., Ferenc T. (red): *Genetyka medyczna. Podręcznik dla studentów*. Wyd. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2012.
18. Speroff L., Fritz M.A.: *Kliniczna endokrynologia ginekologiczna i niepłodność*. Medipage, Warszawa 2007.
19. Ferenc T., Mordalska A., Bratkowska W.: *Cytogenetyka*. [w:] Drewa G., Ferenc T. (red.): *Genetyka medyczna. Podręcznik dla studentów*. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2012.
20. Bocian J., Limon J.: *Metody badań cytogenetycznych*. [w:] Bala J. (red.): *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*. Wyd. PWN, Warszawa 2001: 95-115.