

# PRENATALNA DIJAGNOSTIKA - NAŠA ISKUSTVA

---

**Brajenović-Milić, Bojana; Vraneković, Jadranka; Petrović, Oleg;  
Masovčić, Jakov; Frković, Aleksandra; Pavešić, Danilo; Haller, Herman;  
Kapović, Miljenko**

*Source / Izvornik:* **Medicina, 2004, 42(40), 276 - 280**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:663900>

*Rights / Prava:* [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-26**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of  
Medicine - FMRI Repository](#)



## PRENATALNA DIJAGNOSTIKA – NAŠA ISKUSTVA

### PRENATAL DIAGNOSTICS – OUR EXPERIENCES

*Bojana Brajenović-Milić<sup>1</sup>, Jadranka Vraneković<sup>1</sup>, Oleg Petrović<sup>2</sup>, Jakov Masovčić<sup>2/2\*</sup>,  
Aleksandra Frković<sup>2/2\*</sup>, Danilo Pavešić<sup>2</sup>, Herman Haller<sup>2</sup>, Miljenko Kapović<sup>1</sup>*

#### SAŽETAK

Cilj je ovoga rada prikazati organizaciju prenatalne skrbi na području riječke regije te iznijeti rezultate dobivene primjenom neinvazivnih (biokemijski test probira za Downov sindrom – DS) i invazivnih metoda (rana amniocenteza – RAC) detekcije kromosomopatija u ploda tijekom drugog tromjesečja trudnoće.

Od svibnja 1986. do kolovoza 2004. izvedeno je 1856 RAC-a, a od 1996. godine biokemijskoj analizi seruma u svrhu procjene rizika za DS primjenom dvostrukog (MS-AFP i slobodni  $\beta$ -hCG) ili trostrukog testa (MS-AFP, slobodni  $\beta$ -hCG i nE) pristupilo je 10.057 trudnica.

Aberirani kariotip ustanovljen je u 2,6% provedenih RAC-a, odnosno analiza stanica plodove vode. U 73% detektiranih aberacija radilo se o numeričkoj promjeni kromosoma, a najčešća je to bila trisomija 21 (69%). Preostalih 27% aberacija odnosi se na strukturne promjene kromosoma, od kojih je 54% nastalo kao posljedica svježije mutacije (de novo), dok su ostale bile obiteljskog podrijetla. U 23% strukturnih aberacija radilo se o nebalansiranoj promjeni.

Stopa detekcije DS-a primjenom biokemijskog testa probira za DS u čitavom uzorku iznosila je 64% (14/22), a od 2000. godine, otkako se rabi trostruki test, iznosi 70% (7/10), uz 6,9% pozitivnih nalaza.

Respektabilan broj utvrđenih abnormalnih kariotipova u drugom tromjesečju trudnoće jasno upućuje na važnost primjene i invazivnih i neinvazivnih metoda prenatalne dijagnostike.

**KLJUČNE RIJEČI:** rana amniocenteza, prenatalni test probira za DS

#### UVOD

Cilj je ovog rada prikazati organizaciju prenatalne skrbi na području riječke regije te iznijeti rezultate dobivene primjenom neinvazivnih i invazivnih metoda detekcije kromosomopatija.

Ustanova: <sup>1</sup>Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, <sup>2</sup>Klinika za ginekologiju i porodništvo KBC-a Rijeka/<sup>2\*</sup>privatna praksa

Prispjelo: 3. 6. 2004.

Prihvaćeno: 30. 6. 2004.

Adresa za dopisivanje: Prof. dr. sc. Bojana Brajenović-Milić, Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Braće Branchetta 22, 5100 Rijeka. Tel. 051 651128. e-mail:bojana@medri.hr

#### ABSTRACT

The purpose of this paper was to present the organization of prenatal care in the city of Rijeka and to present the results obtained by non-invasive (biochemical screening for Down syndrome-DS) and invasive methods (amniocentesis-AC) for chromosomal aberration detection during the second trimester of pregnancies.

A total of 1856 AC were performed from May 1986 until August 2004 and 10,057 pregnant women underwent prenatal biochemical screening for DS using double (MS-AFP and free  $\beta$ -hCG) or triple tests (MS-AFP, free  $\beta$ -hCG and nE).

The frequency of abnormal karyotypes in the pregnancies that underwent AC was 2,6%. The most common aberration was numerical (73%) with trisomy 21 in great numbers (69%). Structural anomaly was found in 27% of all obtained aberrations and 54% of them were de novo mutation. Unbalanced structural abnormalities were present in 23% of all of them.

The detection rate for DS using non-invasive test was 64% (14/22), but from the year 2000 until now the detection rose to 70% (7/10), with the 6.9% screen positive rate.

The respectable number of abnormal karyotypes identified in our work clearly demonstrated that non-invasive as well as invasive methods should be used in prenatal diagnostics during the second trimester.

**KEY WORDS:** amniocentesis, prenatal screening for DS

Još 1986. godine, suradnjom Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i Klinike za ginekologiju i porodništvo KBC-a Rijeka, započela je primjena rane amniocenteze i, u jednom kraćem razdoblju, biopsije resica korion frondozuma u svrhu detekcije kromosomskih aberacija u ploda.<sup>1,2</sup> Do 1996. godine probir kromosomopatija provodio se na osnovi godina starosti ili osobnog/obiteljskoga genetičkog opterećenja, a početkom 1996. uvodi se i neinvazivan, biokemijski probir za trisomiju 21 (Downov sindrom – DS) kao najčešću aberaciju i uzrok mentalne retardacije

u ljudi.<sup>3,4</sup> Iako su u proteklom razdoblju primjene prenatalne dijagnostike postojali nešto drukčiji kriteriji odabira trudnoća za pojedinu metodu, danas možemo reći da postoje jasne odrednice (slika 1.). U mlađih trudnica (<35 godina) genetički neopterećene osobne ili obiteljske anamneze, preporučuje se neinvazivno testiranje, odnosno biokemijski i ultrazvučni probir za DS. Starijim (>35 godina) trudnicama ili pak trudnicama s genetičkim opterećenjem predlaže se invazivna dijagnostika, npr. rana amniocenteza, i to stoga što je rizik da stvarno dobiju aficirano dijete veći od rizika koji nosi sam zahvat.

## ISPITANICI I METODE

U razdoblju od 22. svibnja 1986. do 31. kolovoza 2004. godine na Klinici za ginekologiju i porodništvo KBC-a Rijeka izvedeno je 1856 ranih amniocenteza. RAC se uglavnom izvodio pod kontrolom ultrazvuka (UZV) (97%), *free hand* tehnikom, uz upotrebu igala od 18 do 20 G, između 16. i 20. tjedna trudnoće. Tjedan trudnoće određivao se na temelju datuma zadnje menstruacije, uz potvrdu ultrazvučnim pregledom.

Indikacije za RAC bile su: dob trudnice ( $\geq 35$  godina), DS u prethodnoj trudnoći, druge kromosomopatije u prethodnih trudnoća, DS u obitelji, numeričke ili strukturne aberacije u roditelja, pozitivan nalaz biokemijskog testa probira za DS, patološki UZV-nalaz i ostalo (zračenje, psihološki razlozi i sl.).

Indikaciju je postavio genetičar ili ginekolog. Sve su trudnice bile upoznate s načinom izvođenja zahvata i o mogućim komplikacijama. Konačnu odluku donosili su supružnici uz pismeni pristanak trudnice.

Kultivacija i citogenetička analiza stanica plodove vode dobivenoga RAC-a izvodila se na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Za identifikaciju kromosoma rabila se GTG-metoda oprugavanja.

U razdoblju od 1. siječnja 1996. do 31. svibnja 2004. godine prenatalnom testu probira za Downov sindrom, koji se izvodi na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, pristupilo je 10.057 trudnica. Trudnice su na testiranje upućivali ginekolozi Doma zdravlja Rijeka, Pula, Pazin, Rovinj, Poreč, Umag, Labin, Buzet, Opće bolnice Pula, Klinike za ginekologiju i porodništvo KBC-a Rijeka te ginekolozi privatnih ginekoloških ambulanti koje rade u tim područjima. Informaciju o svrsi, mogućnostima i načinu interpretacije rezultata ovog testa trudnice su dobile od svojih ginekologa i educiranog osoblja Zavoda za biologiju. Nakon obavljenog razgovora, trudnice su svojim potpisom dale pristanak za testiranje.

Biokemijska analiza seruma obavljena je između 15. i 18. tjedna trudnoće. Gestacijska dob je utvrđivana,

najčešće, na osnovi ultrazvučnog nalaza fetalne biometrije (96%), ali i na osnovi podatka o prvom danu zadnjega menstruacijskog ciklusa (4%).

Do kraja 1999. godine ispitivana su dva serumska biljega, MS-AFP i slobodni b-hCG (dvostruki test), i to imunoenzimatskom tehnikom (AFP EIACT<sup>TM</sup>; Fb-hCG EIACT<sup>TM</sup>; -CIS BIO international B.P.-91192 GIF-SUR YVETTE CEDEX, Francuska). Od početka 2000. godine mjere se tri biljega – MS-AFP, slobodni b-hCG i nE (T21 Screening ELISA; GAMMA, Belgija). Izračunavanje individualnog rizika za Downov sindrom izvedeno je primjenom predviđene programske podrške (*Free beta screen* (CIS BIO international B.P.-91192 GIF-SUR YVETTE CEDEX, Francuska i GAMMA T21 SOFT; GAMMA, Belgija). Proračun rizika temelji se na podatku o životnoj dobi trudnice na termin porođaja i izmjerenoj razini serumskih biljega transformiranih u odgovarajuće MoM-vrijednosti.

Kao pozitivan nalaz testa smatrao se rizik za Downov sindrom jednak ili viši od 1:250 (DS rizik  $\geq 1:250$ ). Trudnicama s povišenim rizikom za Downov sindrom, bila je preporučena amniocenteza. Osim procjene rizika za DS, provodila se i procjena rizika za oštećenje neuralne cijevi te, primjenom trostrukog testa za Edwardsov sindrom (ES). U slučajevima povišenog rizika za oštećenje neuralne cijevi kao i ES-a, trudnice su najprije upućivane na detaljan ultrazvučni pregled, a nakon toga, prema potrebi, i na RAC.

## REZULTATI

Prosječna životna dob trudnica koje su pristupile RAC-u bila je  $33,7 \pm 5,6$ , a srednja vrijednost gestacijske dobi kad je zahvat učinjen, iznosila je  $17,0 \pm 1,3$ . U uzorku od 1856 kariotipiziranih kultura stanica plodove vode, utvrđeno je 48 aberiranih kariotipova (2,6%). Broj amniocenteza, vrsta i učestalost aberacija u odnosu na pojedinu indikaciju, prikazan je u tablici 1. Važno je istaknuti da su vrlo često istodobno bile prisutne dvije indikacije za RAC (npr., dob i pozitivan nalaz probira za DS ili dob i patološki UZV-nalaz i sl.). U takvim smo se slučajevima, za potrebe prikaza rezultata, odlučivali samo za jednu indikaciju, i to onu koja je bila vodeća. Tako, npr., u slučajevima kada se radilo o indikaciji *dob i pozitivan nalaz probira za DS*, svrstavali smo ih pod indikaciju *dob trudnice*.

U 73% (n=35) utvrđenih aberacija radilo se o numeričkoj promjeni kromosoma, a najčešća je bila trisomija 21 (69%). U preostalih 27% (n=13) aberacija radilo se o strukturnoj promjeni kromosoma, a čak 54% nastalo je kao posljedica svježije mutacije (*de novo*), dok su ostale bile obiteljskog podrijetla. U 23% strukturnih aberacija radilo se o nebalansiranoj promjeni. Utvrđeno je 6 slučajeva Robertsonovih translokacija, 3 balansirane

recipročne translokacije, 2 marker-kromosoma te jedna adicija (12 p) i jedna inverzija (1 p). Iz rada su isključeni svi slučajevi pericentrične inverzije kromosoma broj 9. Najveći broj aberacija (81%) ustanovljen je kod trudnoća testiranih zbog podmakle dobi trudnice ( $\geq 35$  godina). Najčešća numerička aberacija bila je trisomija 21 (54%), a od 10 strukturnih aberacija, 6 ih je nastalo kao posljedica svježije mutacije, *de novo* (3 balansirane i 3 nebalansirane), a u preostala 4 slučaja radilo se o naslijeđenoj promjeni. Ostale su strukturne aberacije ( $n=3$ ), utvrđene vezano uz druge indikacije, bile balansirane, a jedna od njih nastala je *de novo*.

U 94% trudnoća s ustanovljenom numeričkom aberacijom ploda obavljen je prekid trudnoće na zahtjev roditelja, a u slučajevima strukturnih aberacija u 15% trudnoća.

Od ukupno 10.057 trudnoća koje su pristupile biokemijskom testu probira za DS, u 5165 slučaja mjereni su dva serumska biljega (MS-AFP i slobodni  $\beta$ -hCG; dvostruki test), a tri biljega (MS-AFP, slobodni  $\beta$ -hCG i nE; trostruki test) u preostale 4892 trudnoće. Prosječna životna dob trudnica bila je  $29,6 \pm 4,9$ . Srednja vrijednost

gestacijske dobi u vrijeme testiranja iznosila je  $16,1 \pm 1,5$ . Stopa detekcije DS-a uz granični rizik  $\geq 1:250$  iznosila je 64% (14/22).

Uz primjenu trostrukog testa koji se rabi od početka 2000. godine, stopa detekcije DS-a iznosi 70% (7/10), uz 6,9% pozitivnih nalaza. Stopa detekcije trisomije 21 u trudnica mlađih od 35 godina bila je 40%, uz 2,7% pozitivnih nalaza, a u starijih trudnica ( $\geq 35$  godina) 100%, uz 32% pozitivnih nalaza.

#### RASPRAVA

Na području riječke regije prenatalna dijagnostika kromosopatija sustavno se primjenjuje od 1986. godine. Uz invazivnu dijagnostiku kao što je rana amniocenteza, trudnice imaju mogućnost odabira i neinvazivnih testova probira za Downov sindrom, što je od posebnog značenja za žene mlađe dobi.

U proteklom razdoblju u našem je centru izvedeno 1856 ranih amniocenteza u svrhu detekcije kromosomskih promjena kod ploda. Učestalost aberacija iznosi 26/1000 učinjenih zahvata (2,6%), što znači da se aberi-

Tablica 1. Vrsta i učestalost kromosomskih aberacija u odnosu na indikaciju za RAC

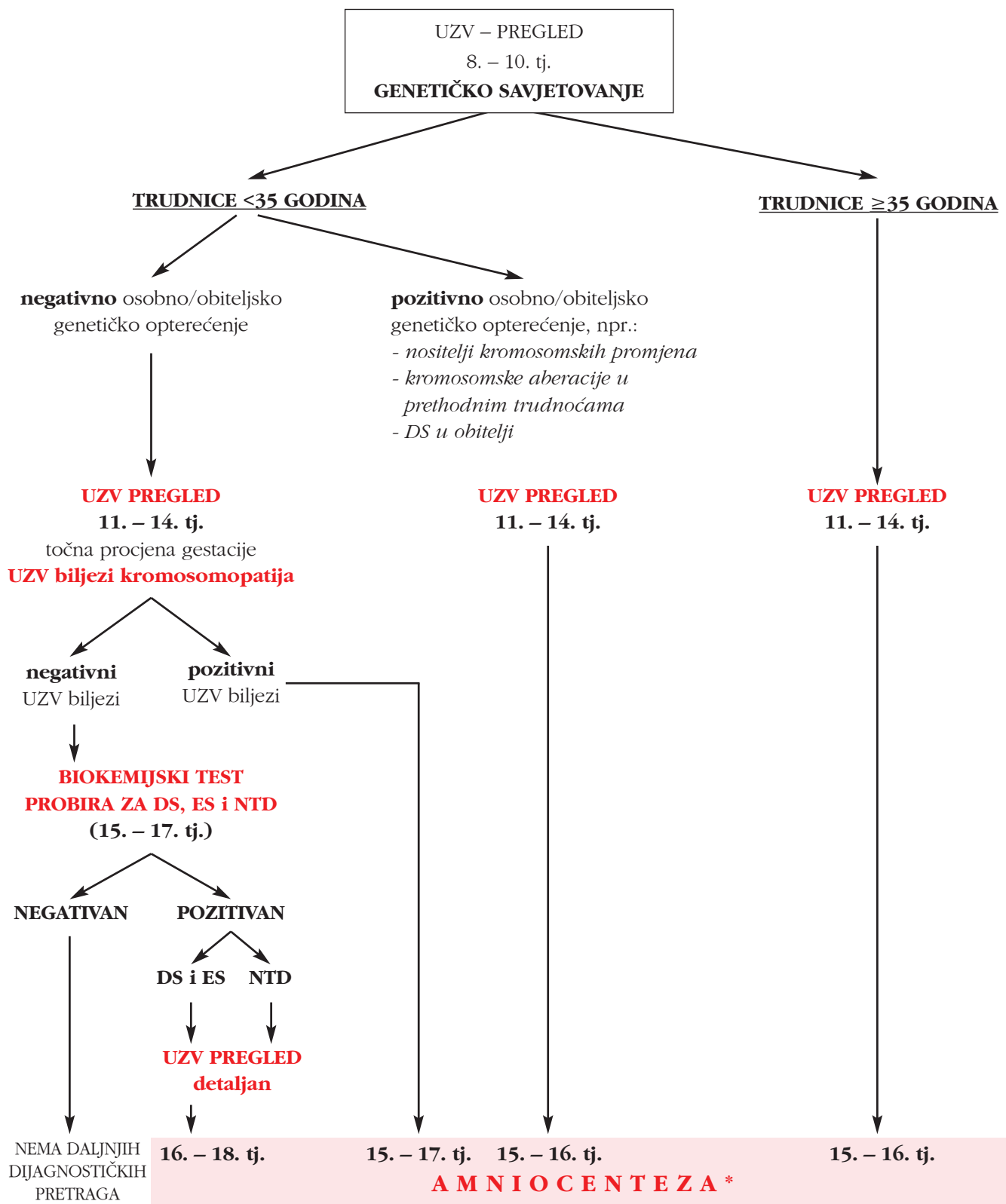
Table 1 Type and incidence of chromosomal aberrations regarding the indication for RAC

VRSTE ABERACIJA KROMOSOMA	INDIKACIJE ZA RANU AMNIOCENTEZU					
	Dob trudnice <i>n</i> =1445	Pozitivan nalaz testa probira za DS <i>n</i> =244	DS u obitelji <i>n</i> =63	DS i druge numeričke aberacije u prethodnoj trudnoći <i>n</i> =46	Numeričke i strukturne aberracije u roditelja <i>n</i> =10	UZV indikacija <i>n</i> =18
trisomija						
21	18	3		2*		1**
18	2					
13	1					
XXX	1					
XXY	3					
monosomija						
X0	1					
mozaicizam gonosoma	3					
strukturne aberracije	10	1	1		1	
UKUPNO	39(2,7)	4(1,6)	1(1,6)	2(4,3)	1(10)	1(5,6)

- pericentrična inverzija (9) isključena

\* u oba slučaja indikacija za RAC je bila: DS (regularni tip) u prethodnoj trudnoći

\*\* povećan nuhalni nabor; trudnica 23 godine starosti



Slika 1. Prenatalna dijagnostika i probir kromosomopatija  
Figure 1 Prenatal diagnostics and screening of cromosomopathy

\* Dodatne pretrage:

- KARIOTIPIZACIJA LIMFOCITA PERIFERNE KRVI RODITELJA
  - U slučajevima utvrđenih STRUKTURNIH ABERACIJA (balansirane i nebalansirane aberacije, delecije, adicije, marker kromosom i sl.)
  - Pretraga je gotova za 10-ak dana
- KULTURA STANICA PLODOVE VODE (ponavljanje amniocenteze)
  - pseudo- ili lažni MOZAIKIZAM
  - STRUKTURNE ABERACIJE
  - Pretraga je gotova za 2 tjedna

rani kariotip utvrđuje na svakih 38 analiza stanica plodove vode. Učestalost numeričkih aberacija iznosi 19/1000 (1,9%), a strukturnih 7/1000 (0,7%) analiza. U ovom radu nisu izneseni podaci o učestalosti pericentrične inverzije kromosoma broj 9 [per inv<sup>9</sup>] jer se radi o balansiranoj strukturnoj aberaciji prisutnoj u 0,85% – 1,65% ljudi i ne povezuje se s određenom promjenom fenotipa te se stoga smatra varijantom kromosoma, a ne abnormalnim kariotipom.<sup>5,6</sup>

Najčešća, ujedno i najsenzitivnija u smislu probira je indikacija *dob trudnice*. Najveći broj kromosomopatija, posebice trisomija, utvrđen je upravo u toj grupi ispitanih trudnoća. Takav je rezultat očekivan jer je u etiologiji tih poremećaja odavno poznat i dobro dokazan utjecaj godina majke/trudnice.<sup>7,8,9</sup> Isto tako, čak 77% svih ustanovljenih strukturnih aberacija, kao i onih nastalih *de novo* (86%), otkriveno je u starijih trudnica.

Indikacija kao što je DS u prethodnoj trudnoći iznimno je značajna u probiru kromosomskih poremećaja, što dokazuju i naša dva slučaja uzastopnih trudnoća s istim poremećajem, odnosno trisomijom 21 regularnog tipa u inače zdravih roditelja urednog kariotipa. U detekciji kromosomopatija nesumnjivo je značenje UZV-probira koji će, iako u našem radu još uvijek nije dovoljno zastupljen, s vremenom zasigurno postati jedan od vodećih neinvazivnih testova.

Od ostalih prikazanih indikacija za RAC, najmanju stopu detekcije ima indikacija *DS u obitelji*. Da bi opravdanost primjene te indikacije bila veća, valjalo bi razlučiti o kakvom se tipu trisomije 21 radi. U slučajevima regularnog tipa DS u obitelji, mogla bi se trudnicama najprije ponuditi neinvazivna dijagnostika, a tek u slučaju povećanog rizika i invazivna dijagnostika.

Uvođenjem biokemijskog testa probira za DS, značajno je unaprijeđena prenatalna skrb na riječkom području. Stopa detekcije Downova sindroma iznosi 64%, što je u skladu s rezultatima ostalih centara.<sup>10-12</sup> Primjenom trostrukog testa (MS-AFP, slobodni  $\beta$ -hCG i nE), stopa detekcije doseže 70% te omogućava procjenu rizika i za Edwardsov sindrom. Iako se možda stopa detekcije DS-a u mladih trudnica (40%) čini malom, ipak je to znatno više od 0% bez biokemijskog testa probira. Znatno bolja detekcija može se postići samo kombinacijom UZV i biokemijske analize seruma, i to u prvom tromjesečju trudnoće.

Kako su neinvazivne i invazivne metode prenatalne dijagnostike usko povezane i primjenjuju se jedna za drugom, važno je što prije (do 12.–13. tjedna trudnoće) provesti genetičko savjetovanje. O pravodobnoj obaviještenosti i odabiru pretrage značajno ovisi i vrijeme dobivanja konačnog nalaza, a to bitno utječe i na stupanj anksioznosti trudnice.<sup>13</sup> Uz to što valja razmišljati o psihičkom stanju trudnice, treba voditi brigu i o vremenu potrebnom za dodatne pretrage, dakako, u

slučajevima patoloških nalaza. Najčešće je prijeko potrebno obaviti kariotipizaciju roditelja, a katkad i ponoviti RAC poradi precizne dijagnostike i boljega genetičkog informiranja. Za dopunske pretrage potrebno je 7 do 14 dana. Stoga je jedino dobrom suradnjom jedinica Primarne zdravstvene zaštite žena, Klinike za ginekologiju i Laboratorija za citogenetiku moguća dobra i kvalitetna organizacija prenatalne skrbi.

## LITERATURA

1. Brajenović B, Stamatović M, Obersnel V. Chorionic villi biopsy as a method in prenatal diagnosis. *Medicina* 1987; 23:115-118
2. Brajenović-Milić B, Stamatović M, Masovčić J, Obersnel V. Prenatal chromosome studies in pregnancies at risk. *Acta Fac med Flum* 1991; 16 (3-4):173-176
3. Prodan M, Šojat S, Sandalj R, Manestar, Rački G, Frković A. Kratak osvrt na prenatalni probir i dijagnostiku Downova sindroma u riječkoj regiji. *Medicina* 2000; 37:69-74
4. Brajenović-Milić B, Tišlarić D, Bačić J, Paravić J, Slivar A, Kapović M i sur. Screening for Down's Syndrome and Neural Tube Defect in Croatia: A Regional Prospective Study. *Fetal Diagn Ther* 1998; 13:367-371
5. Serra A, Brahe C, Millington-Ward A, Neri G, Tedeschi B, Tassone F i sur. Pericentric inversion of chromosome 9: prevalence in 300 Down syndrome families and molecular studies of nondisjunction. *Am J Med Genet* 1990; 7:162-168
6. Yamada K. Population studies of inv(9) chromosomes in 4300 Japanese: incidence, sex difference and clinical significance. *Jpn J Hum Genet* 1992; 37:293-301
7. Penrose LS. The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. *J Genet* 1933; 27:219-24
8. Cuckle HS. Effect of maternal age curve of predicted detection rate in maternal serum screening for Down syndrome. *Prenat Diagn* 1998;18:1127-30
9. Brajenović-Milić B, Ristić S, Kapović M, Mojsović A, Medica I, Modrušan-Mozetić Z. Incidence of Down's Syndrome in the Municipality of Rijeka and Istrian Region. *Coll Antropol* 1996; 20 (Suppl): 1-5
10. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW i sur. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *BMJ* 1988; 297:883-7
11. Palomaki GE, Knight GJ, McCarthy J, Haddow JE, Donhowe JM. Maternal serum screening for Down syndrome in the United States: a 1995 survey. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:1046-51
12. Spencer K. Second trimester prenatal screening for Down's syndrome using alpha-fetoprotein and free beta hCG: A seven year review. *Br J Obstet Gynaecol* 1999; 106:1287-93
13. Paravić J, Brajenović-Milić B, Tišlarić D, Kapović M, Botica A, Milotti S. Maternal Serum Screening for Down Syndrome: A Survey of Pregnant Women's Views. *Community Genet* 1999; 82:109-112

## MIKRODELECije Y-KROMOSOMA U MUŠKARACA SMANJENE REPRODUKTIVNE SPOSOBNOSTI

### Y CHROMOSOME MICRODELETIONS IN SUBFERTILE MEN

*Alena Buretić-Tomljanović<sup>1</sup>, Ivan Vlastelić<sup>2</sup>, Ljiljana Randić<sup>2</sup>, Miljenko Kapović<sup>1</sup>,  
Anđelka Radojčić Badovinac<sup>1,2</sup>*

#### SAŽETAK

Mikrodelecije AZF-područja Y-kromosoma mogući su genetički čimbenik neplodnosti u muškaraca. Javljaju se u približno 7% muškaraca s idiopatskom neplodnošću. Molekularna analiza mikrodelecija općeprivačena je metoda koja dobiva sve veće značenje s obzirom na usavršavanje metoda potpomognute reprodukcije i prijenos mikrodelecija s očeva na sve sinove. Pacijenti s najvećim rizikom za mikrodelecije Y-kromosoma su oni s azoospermijom ili teškim oblikom oligozoospermije. Studije mikrodelecija Y-kromosoma važne su i za izbor odgovarajućeg načina genetičkog informiranja neplodnih parova. U radu je analizirano 75 ispitanika.

**KLJUČNE RIJEČI:** neplodnost muškaraca, mikrodelecije humanog Y-kromosoma

#### ABSTRACT

Microdeletions of the Y chromosome in the AZF region are a possible genetic factor of male infertility. They are found in about 7% of infertile men. The molecular detection of microdeletions is widely accepted in infertility treatments as there is an advance in methods of assisted reproduction and because microdeletions are transmitted to 100% of male offspring. Patients with the highest risk of microdeletion are those with azoospermia or severe oligozoospermia. The study of microdeletions is very useful in adopting an appropriate strategy in providing genetic counselling to the affected couples. We preliminary analysed 75 patients in the study.

**KEY WORDS:** male infertility, microdeletions of human Y chromosome

#### UVOD

Smanjena sposobnost reprodukcije javlja se u približno 15% bračnih parova.<sup>1-3</sup> Smatra se da je za polovicu tih slučajeva odgovoran neki čimbenik gametogeneze u muškaraca. Iako su poznati brojni uzroci smanjene reproduktivne sposobnosti muškaraca, kao npr. varikokela, opstrukcija sjemenovoda, aglutinacija spermija, hormonska neravnoteža ili genetički uzroci, oko 30% infertilnih muškaraca pati od idiopatskog infertiliteta.<sup>1</sup> Smanjena reproduktivna sposobnost muškaraca može se okarakterizirati kao azoospermija (potpun nedostatak spermija), oligozoospermija (smanjen broj spermija),

astenozoospermija (slaba pokretljivost spermija) ili teratozoospermija (abnormalna veličina ili oblik spermija). Genetički uzroci muškog infertiliteta mogu se razmatrati na razini kromosoma ili gena. Poznato je da se u muškaraca smanjene reproduktivne sposobnosti nađu kromosomske aberacije češće negoli u općoj populaciji. Učestalost kromosomskih aberacija najviša je u muškaraca s azoospermijom (do 14%), nešto je niža u onih s oligozoospermijom (5%–11%), dok se u općoj populaciji kreće oko 1%.<sup>4</sup> Najčešće kromosomske aberacije povezane sa smanjenom reproduktivnom sposobnošću muškaraca jesu numeričke i uključuju spolne kromosome. Radi se o trisomiji XXY ili Klinefelterovu sindromu kod kojega se u kliničkoj slici javlja odsutnost spermatogeneze, hipogonadizam i ginekomastija, ili o različitim oblicima mozaicizma (npr. 45,X/46,XY; 47,XXY/46,XY i drugi) koji u određenim slučajevima mogu biti posljedica nestabilnosti dicentričnog Y-kromosoma i udruženi s različitim stupnjem poremećaja

Ustanova: <sup>1</sup>Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, <sup>2</sup>Odjel za planiranje obitelji, Klinika za ginekologiju i porođništvo, Klinički bolnički centar Rijeka

Prispjelo: 2. 6. 2004.

Prihvaćeno: 30. 6. 2004.

Adresa za dopisivanje: Doc. dr. sc. Alena Buretić-Tomljanović, dipl. ing., Medicinski fakultet u Rijeci, Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Braće Branchetta 22, 51 000 Rijeka. e-mail: alena@medri.hr

spermatogeneze. Strukturne aberacije koje uzrokuju smanjenu plodnost muškaraca, zahvaćaju uglavnom Y-kromosom, a to su delecije del (Yq), prstenasti kromosom r(Y) ili izokromosom i(Yq). Reproduktivnu sposobnost muškaraca mogu umanjiti i Y-autosomske translokacije, druge recipročne translokacije, Robertsonove translokacije ili inverzije. Procjenjuje se da su za približno 10% muškog infertiliteta odgovorne mutacije gena uključenih u odvijanje spermatogeneze. Zasad je poznat određen broj gena na humanom Y-kromosomu, koji su uključeni u određivanje muškog spola i održavanje spermatogeneze. Na kratkom kraku mapiran je čimbenik determinacije testisa (SRY), dok je na dugom kraku određen čitav niz gena uključenih u složen proces spermatogeneze. Svi su ti geni mapirani u području Yq11 (OMIM). Dio njih naveden je u tablici 1. Mnogi od tih gena nalaze se u Yq11 području u multiprim kopijama, od kojih nisu sve funkcionalne. Područje Yq11 nazvano je i čimbenikom azoospermije (engl. – azoospermia factor, AZF) i podijeljeno je na 4 područja: AZFa, AZFb, AZFc i AZFd, od kojih se prva tri smatraju najvažnijima za odvijanje procesa spermatogeneze. AZFc područje nalazi se najviše distalno u eukromatinskom dijelu q kraka na granici prema heterokromatinskom bloku Y-kromosoma. Glavni geni kandidati za odvijanje spermatogeneze jesu geni DFFRY/USP9Y (AZFa), RBMY (AZFb) i DAZ (AZFc).<sup>1</sup>

#### MIKRODELECije Y-KROMOSOMA

Rezultati brojnih radova upućuju na povezanost mikrodelecija unutar AZF-područja sa smanjenom reproduktivnom sposobnošću muškaraca.<sup>5</sup> Geni u AZF-području Y-kromosoma vrlo su vjerojatno esencijalni za odvijanje spermatogeneze. Karakterizira ih specifična aktivnost u testisima, iako neki imaju i svoje gene homologe na autosomima. Osnovne funkcije AZF-gena nisu poznate, ali je činjenica da mikrodelecije Y-kromosoma nisu utvrđene u plodnih muškaraca, što potvrđuje njihovu važnost za spermatogenezu. Za detekciju mikrodelecija ispituju se brojni STS-markeri (engl. – sequence-tagged sites) koji su mapirani unutar gena AZF-područja i izvan njih. Učestalost mikrodelecija u različitim radovima znatno varira – od 1% do čak 55,5%. S obzirom na velike razlike u učestalosti mikrodelecija u studijama, vrlo je vjerojatno da na učestalost mikrodelecija utječu i neki okolišni čimbenici te da postoje međupopulacijske razlike. Mikrodelecije su u infertilnih muškaraca najučestalije unutar AZFc-područja. Proksimalne mikrodelecije (AZFa i AZFb) obično prate teži defekti spermatogeneze kao npr. Sindrom samo Sertolijevih stanica (engl. – Sertoly-cell-only syndrome – SCOS) gdje u zavijenim kanalčićima nema stanica zametnog epitela. Distalne mikrodelecije (AZFc) mogu biti udružene s oligozoospermijom

koja s vremenom može prijeći i u azoospermiju. Korelacija opsega mikrodelecija i fenotipa nije potpuno jasna. S pojavom SCOS-a mogu se povezati mikrodelecije gena USP9Y/DFFRY i DBY, dok se mikrodelecije AZFb-područja nađu i u slučajevima azoospermije, oligozoospermije i normozoospermije.<sup>1</sup> Analizom broja mikrodelecija prema kliničkim dijagnozama ispitanika utvrđeno je da se čak 66% mikrodelecija pojavljuje u muškaraca s azoospermijom, 28% u muškaraca s teškom oligozoospermijom te sporadično u muškaraca s koncentracijom spermija  $>5 \times 10^6/\text{ml}$  (6%). Prema tim je podacima očekivana učestalost mikrodelecija u selektiranoj grupi muškaraca smanjene fertiliteta oko 7%.<sup>5</sup>

U nastojanju da se mikrodelecije u infertilnih muškaraca otkriju te da se utvrdi njihov opseg, različiti su autori istraživali i do 60 STS-biljega unutar AZF-područja. Skupljanjem rezultata prof. Manuela Simoni i sur.<sup>5</sup> objavili su vodič za otkrivanje mikrodelecija Y-kromosoma. Autori su predložili rutinsko testiranje šest najčešće deletiranih STS-biljega (po dva u AZFa, AZFb i AZFc-području) čime se, prema njihovim saznanjima, može otkriti više od 90% mikrodelecija. Predložena grupa STS-biljega jesu jedinstveni i nepolimorfni sljedovi nukleotida na DNA-molekuli. Tek u slučaju pronalaska mikrodelecije, analiza se proširuje na veći broj STS-biljega kako bi se pobliže odredile granice mikrodelecije. Ista grupa upućuje i na to koje STS-biljege treba izbjegavati pri analizi mikrodelecija budući da su repetitivni i/ili raspršeni po čitavom Y-kromosomu te stoga nepouzdati za analizu. Potrebno je upozoriti da dijagnoza mikrodelecije Y-kromosoma u pacijenata nije dokaz da je smanjena reproduktivna sposobnost uzrokovana upravo mikrodelecijom, međutim, ta je uzročnopsljedična veza vrlo vjerojatna. STS-biljezi koji se rabe za rutinsku analizu mikrodelecija Y-kromosoma, navedeni su u tablici 2. Uz STS-biljege za analizu AZF-područja, analiziraju se kontrolni biljeg sY14 (SRY) te gen ZFX/ZFY koji se nalazi u pseudoautosomskom području X i Y-kromosoma. Tim su prijedlogom Simoni i sur.<sup>5</sup> nastojali standardizirati analizu mikrodelecija Y-kromosoma, čime bi bila olakšana usporedba i interpretacija rezultata različitih laboratorija.

#### MEHANIZAM NASTANKA MIKRODELECija

Boljim upoznavanjem organizacije AZF-područja može se razumjeti zašto je to područje podložno nastanku mikrodelecija *de novo*. AZF-područje bogato je ponavljanim sljedovima nukleotida organiziranih u palindrome, iako sadrži i jedinstvene sljedove. S obzirom na primjere mikrodelecija sličnog opsega u različitim individua, pretpostavljen je zajednički mehanizam njihova nastanka. U AZFa i AZFc-području utvrđen je mehanizam homologne rekombinacije između velikih po-