

# KROMOSOMSKE PROMJENE U PRENATALNOJ DIJAGNOSTICI

---

**Tadić, Ana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:104870>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-24**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET RIJEKA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ana Tadić

KROMOSOMSKE PROMJENE U PRENATALNOJ  
DIJAGNOSTICI

Završni rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET RIJEKA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ana Tadić

KROMOSOMSKE PROMJENE U PRENATALNOJ  
DIJAGNOSTICI

Završni rad

Rijeka, 2020.

Mentor rada: doc.dr.sc.Jadranka Vraneković

Završni rad obranjen je dana\_\_\_\_\_u/na\_\_\_\_\_,

pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv.prof. dr. sc. Nada Starčević Čizmarević, dipl.ing.sanit.
2. Doc.dr. sc. Jadranka Vraneković
3. Prof.dr. sc. Bojana Brajenović-Milić, dipl.ing.

Rad ima 45 stranica, 5 slika, 4 tablice i 37 literaturnih navoda.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Jadranki Vraneković na iskazanom povjerenju, svim stručnim savjetima i sugestijama tijekom izrade ovog završnog rada, te na iznimnoj ljubaznosti i strpljenju.

Također, hvala svom osoblju Zavoda za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Za kraj, veliko hvala mojim roditeljima i bratu što su mi pružili najveću potporu, podršku i razumijevanje u svakom trenutku mog obrazovanja.

## SAŽETAK

Kromosomske abnormalnosti vodeći su uzrok intelektualnog zaostajanja. Povezane su s kongenitalnim anomalijama koje mogu rezultirati perinatalnom smrću ili rođenjem djeteta s malformacijom. Cilj ovoga rada bio je prikazati učestalost numeričkih i strukturnih promjena kromosoma te opisati indikacije za prenatalnu dijagnostiku koja je provedena u laboratoriju za citogenetiku Zavoda za medicinsku biologiju i genetiku, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, u razdoblju od 01.01.2004. do 01.09.2020. godine. U ispitivanom razdoblju analizirano je 4054 uzoraka plodove vode. Uredan kariotip detektiran je u 3837 (94,6%) uzoraka, dok je u preostalih 217 (5,4%) utvrđen aberirani kariotip. Numeričke promjene kromosoma detektirane su u 51% ispitivanih uzoraka, a najčešća je bila trisomija 21 (67%). Strukturne promjene detektirane su u 49% slučajeva od toga vodeća promjena bila je pericentrična inverzija kromosoma 9 (75%). U preostalih 25% (26/106) uzoraka detektirana je balansirana recipročna translokacija, najčešće naslijeđena od majke. Robertsonova translokacija utvrđena je u 27% uzoraka plodove vode te je također bila najčešće naslijeđena od majke. Kao vodeća indikacija u 217 ispitivanih uzoraka s detektiranom kromosopatijom pokazala se dob majke (59%). Slijedi nalaz biokemijskog testa probira II tromjesečja (17%). Medijan starosne dobi ispitanica na dan zahvata iznosio je 37 godina (raspon od 19 do 48 godina), dok je medijan gestacijske dobi bio 17 tjedana (raspon od 11 do 28 tjedana). Rezultati rada prikazuju značajan pad broja analiziranih uzoraka plodove vode tijekom ispitivanog razdoblja, što je najvjerojatnije posljedica demografskih obilježja, ali i uvođenja osjetljivijih testova probira za kromosopatije, kao i novih metoda molekularne kariotipizacije. Međutim, konvencionalna kariotipizacija i dalje predstavlja zlatni standard dijagnostike, prvenstveno u detekciji balansiranih strukturnih promjena, ali i mozaičnog kariotipa niskog stupnja mozaicizma.

**Ključne riječi:** invazivne metode, numeričke i strukturne promjene kromosoma, prenatalna dijagnostika

## SUMMARY

Chromosomal abnormalities are the leading cause of intellectual disability. They are associated with congenital anomalies that may result in perinatal death or with the birth of a child with malformation. The aim of this study was to present the frequency of numerical and structural chromosomal aberrations and to list the indications for prenatal diagnosis in the cytogenetic laboratory at the Department of Medical Biology and Genetics, Faculty of Medicine, University of Rijeka, in the period from 1<sup>st</sup> January 2004 until 1<sup>st</sup> September 2020. In the observed period, 4054 samples of amniotic fluid were analyzed. Normal karyotype was detected in 3837 (94.6%) samples, while the remaining 217 (5.4%) samples showed an aberrant karyotype. Numerical chromosomal aberrations were determined in 51% samples. The most common aberration was trisomy 21 (67%). Structural chromosomal changes were detected in 49% samples. Leading one was a pericentric inversion of chromosome (75%) in rest of 26 samples balanced reciprocal translocation, was found in 58% of the samples and mostly inherited from the mother . Robertsonian translocation was found in 27% of amniotic fluid samples and was most commonly inherited from the mother, too. The leading indication among 217 examined samples with detected chromosomopathies was maternal age (59%), followed by the biochemical screening test of the second trimester (17%). The median age of the participants was 37 years (range 19 to 48 years), while the median gestational age was 17 weeks (range 11 to 28 weeks). The results indicate a significant decrease in the number of prenatal diagnostic samples which is most likely due to demographic circumstances, as well as development of more sensitive screening tests for aneuploidies and new methods of molecular karyotyping. However, conventional karyotyping still represents the gold standard, primarily for the detection of balanced structural changes, but also for detection of the mosaic karyotype with a low degree of mosaicism.



**Keywords:** invasive methods, numerical and structural chromosomal aberration, prenatal diagnosis

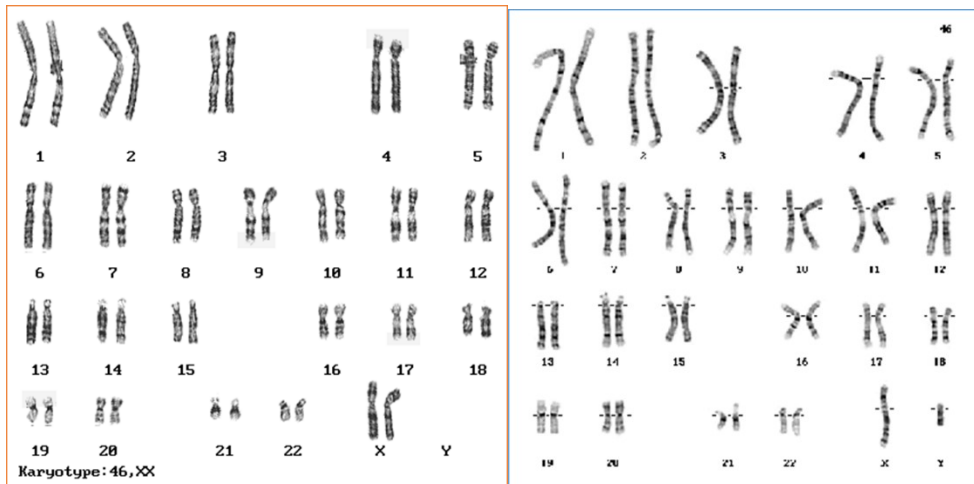
## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Humani kariotip.....	1
1.2. Promjene u broju kromosoma .....	2
1.4.Strukturne promjene kromosoma .....	4
1.4.1.Intrakromosomske strukturne promjene.....	5
1.4.2.Interkromosomske strukturne promjene.....	6
1.5. Prenatalna dijagnostika kromosomskih promjena.....	7
1.5.1 Invanzivne metode uzimanja uzoraka za citogenetičku analizu.....	7
1.5.2 Metode konvencionalne i molekularne kariotipizacije.....	8
2. CILJ RADA .....	11
3. ISPITANICI I METODE.....	12
3.1. Ispitanici .....	12
3.2.Konvencionalana kariotipizacija .....	12
3.2.1.Kultivacija stanica plodove vode.....	12
3.2.2.GTG-metoda oprugavanja kromosoma .....	13
3.3. Statistička obrada podataka.....	14
4. REZULTATI.....	15
5. RASPRAVA .....	25
6. ZAKLJUČAK.....	30
7. LITERATURA .....	31
8. POPIS KORIŠTENIH SKRAĆENICA .....	35
9. KRATKI ŽIVOTOPIS PRISTUPNIKA.....	36

# 1. UVOD

## 1.1. Humani kariotip

Kariotip predstavlja kompletnu garnituru kromosoma vrste što uključuje broj i izgled prometafaznih ili metafaznih kromosoma. Pojam humanog kariotipa definiran je kao kromosomski komplement jedne osobe. Prema međunarodnoj citogenetičkoj nomenklaturi (*engl. International System for Human Cytogenomic Nomenclature-ISCN*) humani kromosomi razvrstani su u grupe od A do G prema veličini i obliku. Tako u humanom kariotipu postoje tri tipa kromosoma: metacentrični (isti p i q krak), submetacentrični (kratki p i duži q krak) te akrocentrični kromosomi sa satelitima. U humanom kariotipu razlikujemo 22 para homolognih kromosoma koji spadaju u grupu autosoma i jedan par spolnih kromosoma. Žene imaju dva jednaka homologna submetacentrična kromosoma (XX), a muškarci su hemizigoti s dva spolna kromosoma različite veličine i oblika (XY). Humani kromosom Y spada u G grupu u kojoj se nalaze kratki akrocentrični kromosomi sa satelitima (kromosom 21 i 22) s tim da Y kromosom nema satelite. Važno je razlikovati pojam kariotip od pojma kariogram koji predstavlja kromosomsku garnituru jedne stanice. Ukoliko se kariogrami međusobno razlikuju radi se o tzv. mozaičnom kariotipu (1).



Slika 1. Prikaz muškog i ženskog humanog kariotipa.

Preuzeto sa: <https://www.sciencephoto.com/media/887488/view/human-chromosomes-male-vs-female-karyotype-illustration>

Pristupljeno: 13.9.2020.

## 1.2. Promjene u broju kromosoma

Numeričke aberacije kromosoma naziv su za svako odstupanje od normalnog broja kromosoma. U tjelesnim stanicama normalan broj kromosoma iznosi 46 (diploidan= $2n$ ), a u spolnim stanicama taj broj je haploidan ( $n$ ) i iznosi 23 (2). Poliploidija opisuje višestruki broj kromosoma cijele garniture koji odstupa od normalnog, diploidnog broja. Vrste poliploidije su triploidija ( $3n=69$ ), tetraploidija ( $4n=92$ ), pentaploidija ( $5n=115$ ), itd. Aneuploidija je promjena broja kromosoma unutar homolognog para kromosoma. Tipovi aneuploidije jesu polisomija i monosomija. Polisomija podrazumijeva višak kromosoma unutar homolognog para pa u humanoj populaciji postoje trisomija, tetrasomija i pentasomija. Monosomija opisuje prisustvo samo jednog kromosoma unutar homolognog para. Svaka aneuploidija mijenja i ukupan broj kromosoma te predstavlja nebalansirani kariotip. Poliploidije i aneuploidije karakteriziraju specifični simptomi pa se one nazivaju i sindromima. Rizični čimbenici koji se povezuju s humanim aneuploidijama

su u prvom redu dob majke, promjene rekombinacijskog obrasca između homologa kao i različiti genetički i okološni čimbenici. Najčešće aneuploidije u humanoj populaciji uključuju trisomije kromosoma 21, 13 i 18 te spolne kromosome (3).

Down sindrom (DS) ili trisomija 21 uglavnom se pojavljuje kao regularni tip DS što znači da svaka stanica u tijelu ima 3 kopije kromosoma 21 umjesto normalne dvije kopije. Ovaj tip DS najčešće je prisutan u humanoj populaciji, a nastaje kao posljedica nepravilnog razdvajanja kromosoma tijekom oogeneze, rjeđe tijekom spermatogeneze. DS može biti i posljedica kromosomskog mozaika što znači da jedna stanična linija ima trisomiju 21, a druga linija ima normalan broj kromosoma. Manji postotak, oko 4% oboljelih može imati tzv. translokacijski tip i to se radi o Robertsonovoj translokaciji koja može biti naslijeđena od roditelja ili nastati kao svježa mutacija (3). Karakterističan fenotip je vidljiv već u neonatalnoj dobi, a najznačajnije karakteristike su intelektualno zaostajanje, dismorfija lica i manja otpornost na infekcije. Bolest zahvaća i unutarnje organe čije su malformacije najveći uzrok skraćenog životnog vijeka. Povećanjem dobi majke raste i rizik rođenja djeteta s DS (4).

Patau sindrom (PS) ili trisomija 13 predstavlja numeričku kromosomsku aberaciju u kojoj svaka stanica u tijelu ima 3 kopije kromosoma 13. Ona je u 20 % slučajeva povezana s Robertsonovom translokacijom. Kao i kod DS postoji i mozaični oblik PS, a fenotip može varirati (5). Klinička slika uključuje teške malformacije mozga, očiju, probavnog sustava i polidaktiliju (višeprstost). U 95% slučajeva dolazi do spontanog pobačaja. Djeca koja se rode najčešće ne prežive dulje od godine dana jer su oštećenja unutarnjih organa preteška (3).

Sindrom Edwards (ES) ili trisomija 18 je najčešće posljedica nepravilnog razdvajanja kromosoma tijekom oogeneze (6). Po učestalosti slijedi odmah nakon Down sindroma. Djeca s ES rađaju se s

malom porođajnom težinom, mikrocefalijom i drugim malformacija. U prvim tjednima života pojavljuje se i karakteristično preklapanje prstiju. Smrtnost je izrazito visoka, uglavnom fetus ne preživi drugo ili treće tromjesečje trudnoće. Uzrok smrti su prevelike malformacije unutarnjih organa. Djeca koja prežive duže od godine dana uglavnom su invalidi i imaju naglašenu mentalnu zaostalost. Specifičnog liječenja nema (3).

Turner sindrom (TS) je kliničko stanje koje se javlja u 1:2500 novorođene ženske djece. Uzrokovan je nedostatkom drugog spolnog X kromosoma. Ponekad uzrok može biti delecija X kromosoma te izokromosom i dicentrični X kromosom. Osobe koje imaju Turner sindrom su niskog rasta, bez sekundarnih spolnih karakteristika, sa sterilitetom zbog insuficijencije jajnika te oko 15% bolesnica može imati koarktaciju aorte i prirođene srčane mane. Može se dijagnosticirati prenatalno, nakon rođenja i u odrasloj dobi. Kvaliteta života ovisi o prisutnosti anomalija srca i bubrega (7).

Klinefelterov sindrom (KS) se pojavljuje u 1:1000 muške novorođenčadi. Muška djeca imaju dodatan spolni X kromosom. Dječaci su uglavnom visoki, s neproporcionalno dugim rukama i nogama. Imaju male, čvrste testise, a moguća je i ginekomastija. Prisutne su poteškoće u učenju, obradi informacija i čitanju. Bolest ne mora biti prepoznata od rođenja tj. može se otkriti prilikom određivanja uzroka neplodnosti. Razlog tome je da muškarci s kariotipom 47,XXY mogu biti normalnog izgleda i mentalnog razvoja (8).

#### **1.4.Strukturne promjene kromosoma**

Strukturne promjene kromosoma nastaju uslijed lomova dijelova kromosoma. Međutim, ti odlomljeni dijelovi mogu biti premješteni na drugi kromosom, mogu zauzeti drugačiji položaj na kromosomu ili se pak mogu izgubiti tijekom procesa stanične diobe. Obzirom na to strukturne

promjene mogu biti balansirane i nebalansirane. Kod balansiranih promjena ne dolazi do gubitka genetičkog materijala, dok kod nebalansiranih aberacija dolazi ili do gubitka ili do viška genetičkog materijala. Balansirane aberacije uglavnom nemaju za posljedicu promjene fenotipskih obilježja. Promjene mogu nastati *de novo* (svježa mutacija) ili mogu biti naslijeđene od roditelja. Ovisno o tome je li došlo do premještanja segmenata unutar jednog kromosoma ili dolazi do izmjene segmanata između dva ili više kromosoma, aberacije mogu biti intrakromosomske i interkromosomske (3).

#### **1.4.1. Intrakromosomske strukturne promjene**

U intrakromosomske promjene spadaju delecije, inverzije i izokromosom.

Delecija nastaje zbog gubitka kromosomskog segmenta uzrokovan lomom kromosoma. Lom može biti na terminalnom kraju pa se radi o terminalnoj deleciji, ili u središnjem dijelu kraka te se onda naziva intersticijska delecija. Kada dođe do terminalne delecije obaju krakova acentrični ulomci se gube, a zaostali krajevi se spajaju i oblikuju prstenasti ili ring kromosom (3).

Inverzija je balansirana strukturna promjena koja nastaje dvostrukim lomom kromosoma, rotacijom segmenta za  $180^\circ$  i ponovnog spajanja. Invertirani segment kromosoma može obuhvaćati i centromeru pa se onda takva inverzija naziva pericentrična. U slučaju kada invertirani dio nije zahvatio centromeru, već samo dio jednog kraka onda se to naziva paracentrična inverzija. Pericentrična inverzija zbog zahvaćenosti centromere mijenja i izgled kromosoma, dok to kod paracentrične nije slučaj tj. oblik kromosoma ostaje nepromijenjen. Problem kod inverzija je taj što one ometaju konjugaciju homolognih kromosoma za vrijeme gametogeneze stvarajući inverzijsku petlju. Ako u području petlje dođe do *crossing-overa*, mogu uz balansirane nastati i nebalansirane gamete. Inverzije ne uzrokuju uvijek promjenu fenotipa, ali mogu izazvati metaboličke poremećaje, mentalnu retardaciju ili malformacije ukoliko se radi o *de novo* mutaciji.

Najčešće se otkrivaju kariotipizacijom kod osoba koje imaju poremećaj reprodukcije (9).

#### **1.4.2. Interkromosomske strukturne promjene**

Translokacije su interkromosomske strukturne aberacije. One su najčešće balansirane promjene, a osobe su mirni nosioci i nemaju fenotipskih promjena. Translokacija može biti recipročna ili Robertsonova. One se otkrivaju kada dolazi do učestalih pobačaja ili rođenja djeteta s nebalansiranim kariotipom (3).

Recipročna translokacija naziv je za recipročnu izmjenu segmenata dva ili više kromosoma. Za vrijeme konjugacije homolognih kromosoma u gametogenezi, spajaju se 4 kromosoma koji čine tetravalent u obliku križa. Ovisno o njihovom razdvajanju nastat će balansirane ili nebalansirane gamete (3). Ako je segregacija nasuprotna onda će sve gamete biti balansirane, a ako je susjedna onda će nastati nebalansirane gamete (9).

Robertsonova translokacija zahvaća samo akrocentrične kromosome (13,14,15,21,22) koji imaju lom na području centromere ili u njezinoj blizini. Kao posljedica loma q krakovi se spajaju, a p krakovi nestaju, no njihov nedostatak se nadoknađuje genima drugih p krakova. Kompenziranje njihovog gubitka čini ovu translokaciju balansiranom. Za vrijeme konjugacije homolognih kromosoma spajaju se tri kromosoma stvarajući trivalent. Ovisno kako će se trivalent razdvojiti, kao i kod recipročne translokacije, mogu nastati balansirane i nebalansirane gamete (3).



## **1.5. Prenatalna dijagnostika kromosomskih promjena**

U svakoj moderno organiziranoj prenatalnoj skrbi, neinvazivne i invazivne metode njen su sastavni dio. Neinvazivne metode, kao što su ultrazvuk te različiti testovi probira, namijenjeni su svim trudnicama bez obzira na osobnu ili obiteljsku anamnezu te imaju za cilj probirati trudnice s povećanim rizikom za kromosomopatije, ali i druge poremećaje. U slučaju povećanog rizika za kromosomopatiju u dogovoru s roditeljima preporučuje se prenatalna dijagnostika (10). Prenatalna dijagnostika kromosomskih promjena postala je neizostavni dio prenatalne skrbi u većini centara diljem svijeta, a izvodi se tijekom prvog ili drugog tromjesečja trudnoće. Dijagnostika kromosomopatija ubraja se u invazivne metode s rizikom za spontani pobačaj koji je manji od rizika za rađanje djeteta s kromosomopatijom u žena iznad 35 godina starosti. Sve invazivne metode uključuju ulazak igle kroz prednju trbušnu stijenku u maternicu pod kontrolom ultrazvuka. Koriste se kod trudnica s određenom indikacijom tj. kod trudnoće visokog rizika. Prihvaćene indikacije za invazivnu prenatalnu dijagnostiku su: dob majke iznad 35 godina, numeričke ili strukturne aberacije kromosoma u obitelji, trudnoće s dokazanim kromosomskim poremećajima, rođenje djeteta s malformacijama, učestali spontani pobačaji, abnormalan nalaz ultrazvuka, rizik utvrđen probirom, izlaganje teratogenim, kancerogenim ili mutagenim agensima te konsangvinitet roditelja (11).

Uzorak za prenatalnu dijagnostiku dobiva se ili biopsijom korionskih resica ili amniocentezom ili u rijetkim slučajevima kordocentezom. Uzorkovani materijal potrebno je kultivirati te nakon toga pripremiti za citogenetičku analizu.

### **1.5.1 Invazivne metode uzimanja uzoraka za citogenetičku analizu**

Biopsija korionskih resica je najstarija metoda invazivne prenatalne dijagnostike (12) koja se primjenjuje između 10. i 12. tjedna trudnoće. Izvodi se transabdominalno uz pomoć ultrazvuka

(UZV) (13). Uzimaju se stanice korionskih resica iz kojih se razvija posteljica koje su identične stanicama ploda (10). Uzorak može sadržavati stanice mukozne membrane maternice koje su majčinog podrijetla pa je prije obrade uzorka potrebno ukloniti majčino tkivo kako bi osigurali točnost i vjerodostojnost rezultata. Vrlo je pogodna metoda iz razloga što nije potrebna velika količina materijala te se uzorak dobiven jednim zahvatom može koristiti i za druge laboratorijske analize. Izvodi se već tijekom 10. gestacijskog tjedna pa omogućuje ispitivanje kromosomskih poremećaja u vrlo ranom embrionalnom razvoju. Nedostatak je što postoji rizik od spontanog pobačaja koji je nešto veći nego kod izvođenja amniocenteze (13).

Amniocenteza (ACZ) je najčešće primjenjivana invazivna metoda prenatalne dijagnostike te se uglavnom izvodi između 15. i 19. gestacijskog tjedna. Postupak obuhvaća uvođenje dugačke igle kroz trbušnu stijenku pomoću UZV-a radi aspiracije 10-20 ml plodove vode. Nedostatak metode je duga kultivacija stanica te rizik od spontanog pobačaja (13).

Kordocenteza je postupak transabdominalnog uzimanja krvi fetusa iz žila pupčane vrpce. Krv se koristi za analizu kromosoma kako bi se utvrdila prisutnost mozaicizma (14). Izvodi se nakon 21. tjedna trudnoće ako su malformacije ploda otkrivene krajem drugog tromjesečja. Za razliku od prethodno opisanih metoda, komplikacije su rijetka pojava, a jedino se može javiti refleksna fetalna bradikardija (15).

### **1.5.2 Metode konvencionalne i molekularne kariotipizacije**

Kariotipizacija je metoda kojom se stanice plodove vode ili korionskih resica kultiviraju u hranjivom mediju, obrađuju te se nakon pripreme mikroskopskih preparata analizira struktura i broj kromosoma. Kromosomski preparati se pripremaju za analizu različitim metodama bojenja i oprugavanja (3). Najčešće se izvodi GTG metoda oprugavanja kromosoma kojom se dobiva

karakterističan raspored tzv. G-pruga po kromosomu koje su odraz pakiranja i sastava DNA molekule pa se duž kromosoma razlikuju svijetle i tamne pruge (12). Iako se kariotipizacija primjenjuje već desetljećima, zbog male rezolucije, od 5-10 megabaza (Mb) u prenatalnu dijagnostiku uvode se i tehnološki naprednije metode (3).

Metoda fluorescentne *in situ* hibridizacije (*engl. fluorescence in situ hybridization - FISH*) detektira kromosomske promjene koje su manje od rezolucija G-pruga. To uključuje mikrodelecije i mikroduplicacije veličine ispod 3 Mb. Zasniva se na upotrebi fluorescentno obilježenih proba koje se vežu za specifične sekvence DNA u kromosomu po principu komplementarnosti. Tako obilježena DNA promatra se pod fluorescencijskim mikroskopom. Ukoliko na kromosomu postoji mikrodelecija proba se neće vezati te će signal izostati. Cilj specifičnih proba, osim metafaznih, mogu biti i prometafazni kromosomi ili interfazne jezgre. DNA proba može biti različite veličine pa tako može pokrivati samo par kilobaza (kb) nekog gena, cijeli gen, cijeli krak ili čitav kromosom (16).

Komparativna hibridizacija genoma na mikročipu (*engl. array comparative genome hybridization-aCGH/arrayCGH*) je metoda molekularne kariotipizacije kojom se otkrivaju promjene u broju sekvenci genoma (*engl. copy number variations-CNVs*). CNVs uključuje višak ili manjak DNA segmenta. Ovom metodom uspoređuje se genom od interesa s referentnim genomom te se identificiraju razlike među njima. Referentna i pacijentova DNA označavaju se bojom te se vežu za oligonukleotide (probe) u mikročipu. Mikročip sadrži klonirane sekvence DNA dugačke 100-200 kb s poznatim točnim mjestom na kromosomu. Hibridizacija DNA molekula s probama dovodi do promjene boje. Ovisno o intenzitetu boje određuje se razlika u broju sekvenci genoma. ArrayCGH se pokazao specifičnom, osjetljivom i brzom metodom sa značajnim prednostima u

usporedbi s konvencionalnom kariotipizacijom i FISH metodom, ali s nemogućnošću detekcije balansiranih promjena i niskog stupnja mozaicizma (ispod 10%) (17).

## **2. CILJ RADA**

Prenatalna dijagnostika na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci u suradnji sa Klinikom za ginekologiju i porodništvo KBC Rijeka izvodi se od 1986. godine. Laboratorij za citogenetiku radi prema Nacionalnim stručnim preporukama kao i preporukama Europskog udruženja citogenetičara. Od 2008. godine uključen je u kontrolu kvalitete od strane Europskog društva za citogenomiku (GenQA, [www.genqa.org](http://www.genqa.org)).

Cilj retrospektivnog istraživanja je prezentirati učestalost detektiranih numeričkih i strukturnih promjena kromosoma kao i opisati najčešće indikacije za prenatalnu dijagnostiku koja je provedena u razdoblju od siječnja 2004. do rujna 2020. godine na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku, Medicinskog fakulteta Rijeka.

### **3. ISPITANICI I METODE**

#### **3.1. Ispitanici**

U retrospektivno istraživanje uključeno je 217 ispitanica odnosno trudnica koje su s određenom indikacijom upućene na prenatalnu dijagnostiku u razdoblju od siječnja 2004. do rujna 2020 godine s detektiranom kromosomopatijom ploda. Svi uzorci za citogenetičku obradu dobiveni su amniocentezom koja se izvodila na Klinici za ginekologiju i porodništvo, KBC Rijeka. Pod kontrolom (UZV) aspirirano je 20 ml plodove vode iglom kroz trbušnu stijenk u između 15. i 20. tjedna trudnoće koji je određen na temelju zadnje menstruacije i UZV. Kao izvor podataka korištena je medicinska dokumentacija citogenetičkog laboratorija Zavoda za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Informacije koje su se koristile za ovaj rad su aberirani kariotip ploda, indikacija za prenatalnu dijagnostiku, tjedan trudnoće i dob majke u trenutku izvođenja ACZ.

#### **3.2. Konvencionalana kariotipizacija**

##### **3.2.1. Kultivacija stanica plodove vode**

Po 10 ml plodove vode iz šprice (20 ml) prebaci se u dvije sterilne epruvete te centrifugira 10 minuta na 2000 okretaja u minuti. Supernatant se odpipetira, a talog resuspendira. Sadržaj svake epruvete prebaci se u plastične sterilne bočice u koje se doda po 5 ml medija za kulturu tkiva (AmnioMAX II Complete-Gibco™ Invitrogen Corporation) te kultivira u termostatu s 5%-tnim ugljik (IV) oksidom šest dana na temperaturi od 37°C. Ovisno o rastu kolonija, prekid kulture uslijedi nakon dvije ili tri promjene hranilišta. Nakon kultivacije u svaku se bočicu doda 0,05 ml 0,04%-tne otopine kolhicina (Sigma) i inkubira u termostatu 10 minuta na temperaturi od 37°C. Nakon inkubacije, hranilište se odstranjuje i dodaje se 7 ml ugrijane (37°C) hipotonične otopine

kalij-klorida (0,072M) (Kemika) te se inkubira u termostatu 35 minuta na 37°C. Hipotonična otopina se zamjenjuje sa 7 ml svježe pripremljene otopine metanola i octene kiseline u omjeru 3:1 (fiksativ) (Kemika) i centrifugira se 10 minuta na 2000 okr/min. Zatim slijede tri promjene fiksativa i centrifugiranja 10 minuta na 2000 okr/min. Nakon posljednje promjene fiksativa uzorak se pohrani na 4°C/24h te se sljedeći dan iskapava na mikroskopska stakla s metafaznim kromosomima koja se koriste za oprugavanje kromosoma GTG-metodom. Za iskapavanje se koriste sterilna, vlažna stakla na koje se iskapaju 2 kapi uzorka. Stakla se zatim provuku 2-3 puta kroz plamen te se stavljaju u sušionik na sušenje na 100°C tijekom 30 minuta. Zatim se prebacuju u inkubator na 37°C preko noći. Na dan pruganja izvade se iz inkubatora kako bi se ohladili na sobnu temperaturu.

### **3.2.2.GTG-metoda oprugavanja kromosoma**

Kromosomski preparati dobiveni kultivacijom stanica plodove vode tretirani su 0,05%-tnom otopinom tripsina u jednakom vremenskom trajanju. Tripsin je otopljen u Dulbecco puferu (PBS/Natrij-klorid 0,17M, Kalij-dihidrogenfosfat 0,002M, Kalij-klorid 0,003M, Natrij-hidrogenfosfat-12-hidrat) (Gibco™Invitrogen Corporation). Nakon tretmana tripsinom, kromosomski su preparati ispirani u fiziološkoj otopini (0,9% NaCl). Slijedilo je bojanje kromosomskih preparata 5 minuta u 5%-tnoj otopini Giemse(Gibco™Invitrogen Corporation) te ispiranje u Garr puferu (Gibco™Invitrogen Corporation) i destiliranoj vodi, nakon čega su osušeni na sobnoj temperaturi.

Za analizu je korišten svjetlosni mikroskop Olympus BX51 s imerzijskim objektivom te kompjuterska programska podrška CytoVision (Applied Biosystem).

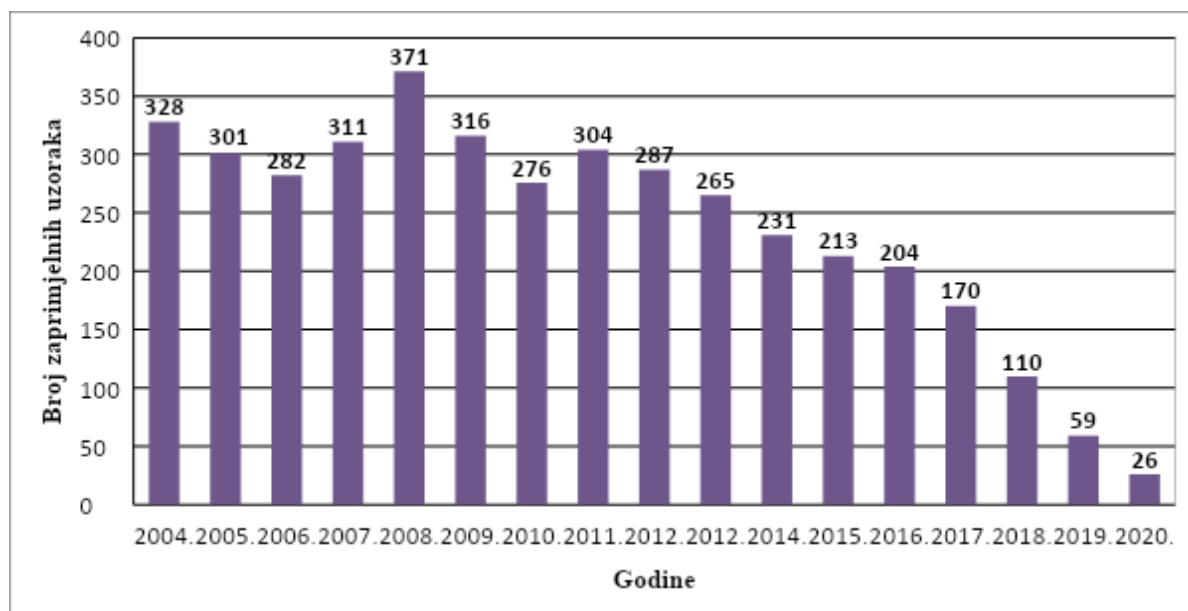
### **3.3. Statistička obrada podataka**

Za statističku obradu podataka korišten je računalni program Excel for Windows i Statistica for Windows inačica 13.3 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD). Rezultati su prikazani deskriptivnom statistikom odnosno apsolutnim i relativnim frekvencijama. Faktorijskim ANOVA testom ispitana je razlika u dobi majke u ispitanica s detektiranom trisomijom 21 i ostalih ispitanica. Razina statističke značajnosti potvrđena je na razini p vrijednosti manjoj od 0,05.



## 4. REZULTATI

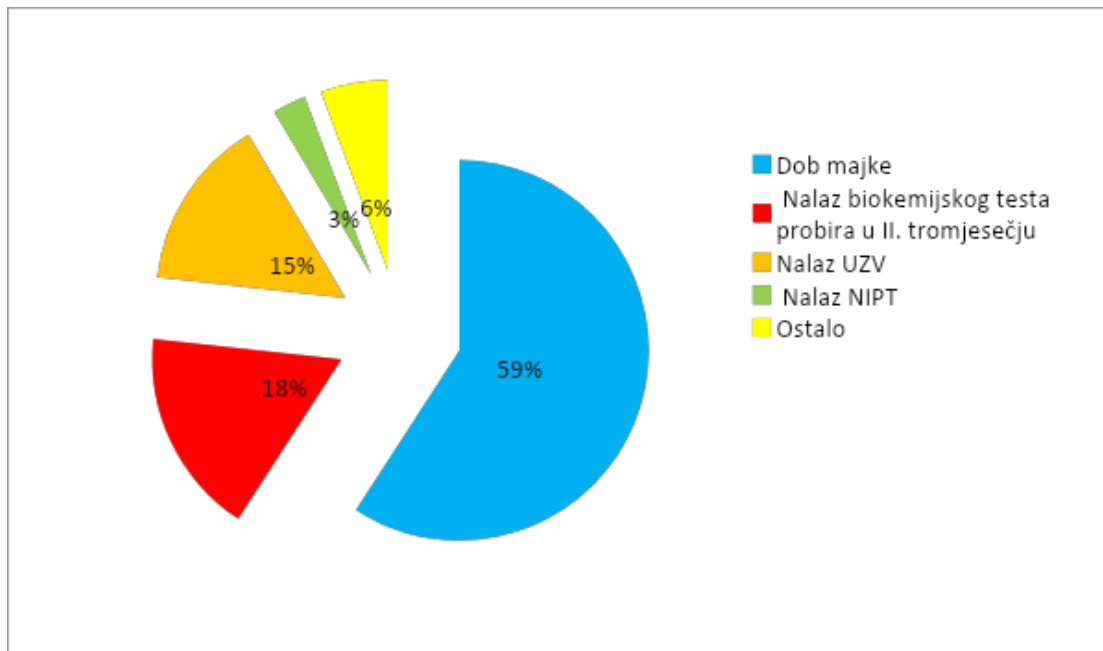
U razdoblju od siječnja 2004. do rujna 2020. godine u laboratorij za citogenetiku Zavoda za medicinsku biologiju i genetiku, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci zaprimljeno je ukupno 4054 uzoraka plodove vode dobivenih ACZ. Od ukupnog broja zaprimljenih uzoraka uredan kariotip detektiran je u 3837 (94,6%) uzoraka dok je u preostalim 217 utvrđena promjena u broju ili strukturi kromosoma. (Slika 2.)



Slika 2. Broj uzoraka ACZ zaprimljenih i analiziranih u laboratoriju za citogenetiku Medicinskog fakulteta Rijeka u razdoblju od siječnja 2004. do rujna 2020. godine.

Najčešća indikacija za ACZ u 217 analiziranih uzoraka s detektiranom kromosomopatijom je dob majke (59%). Zatim je na drugom mjestu pozitivan nalaz prenatalnog testa probira (II trimestar, kombinirani test) (17%), na trećem mjestu je UZV (15%). Sporadično rijede se pojavljuju i sljedeće indikacije: nalaz neinvaiznog tetsta probira slobodno cirkulirajuće DNA fetusa iz krvi majke (engl. noninvasive prenatal test, NIPT), DS u obitelji, DS u prethodnoj trudnoći, druge numeričke promjene u prethodnoj trudnoći, strukturne promjene u prethodnoj trudnoći, strukturne

promjene u oca, strukturne promjene u majke te psihološki razlozi. Najčešća kombinacija indikacija bila je dob majke i nalaz biokemijskog testa probira u II. tromjesečju (4,9%). (Slika 3.)



Slika 3. Učestalost indikacija za amniocentezu.

*\*Ostalo uključuje pojedinačne indikacije a to su: DS u obitelji, DS u prethodnoj trudnoći, druge numeričke promjene u prethodnoj trudnoći, strukturne promjene u prethodnoj trudnoći, strukturne promjene u oca, strukturne promjene u majke te psihološki razlozi.*

Medijan starosne dobi 217 ispitanica s detektiranom kromosopatijom na dan zahvata iznosio je 37 godina s rasponom od 19 do 48 godina, s tim da je njih 6 (2,8%) bilo mlađe od 25 godina, a 40 (18,4%) ih je dobi između 25 i 35 godina. Najveći broj trudnica, čak 171 (78,8%) bile su starije od 35 godina. Medijan gestacijske dobi ispitanica u trenutku izvođenja zahvata ACZ iznosio je 17 s rasponom od 11 do 28 tjedna.

Ukupna učestalost numeričkih promjena kromosoma u analiziranom razdoblju iznosi 51% (111/217) dok su strukturne promjene utvrđene u 49% (106/217). Dva uzorka sa izodicentričnim malim prekobrojnim kromosomom podrijetlom od kromosoma 15 nisu pribrojena niti u jednu

skupinu kromosomskih promjena. Mali prekobrojni kromosom ujedno je i strukturno promijenjeni kromosom a obzirom da se radi samo o dva uzorka nije pribrojen niti u jednu skupinu. Tablica 1. prikazuje ukupan broj i učestalost svih detektiranih kromosomopatija prema godinama.

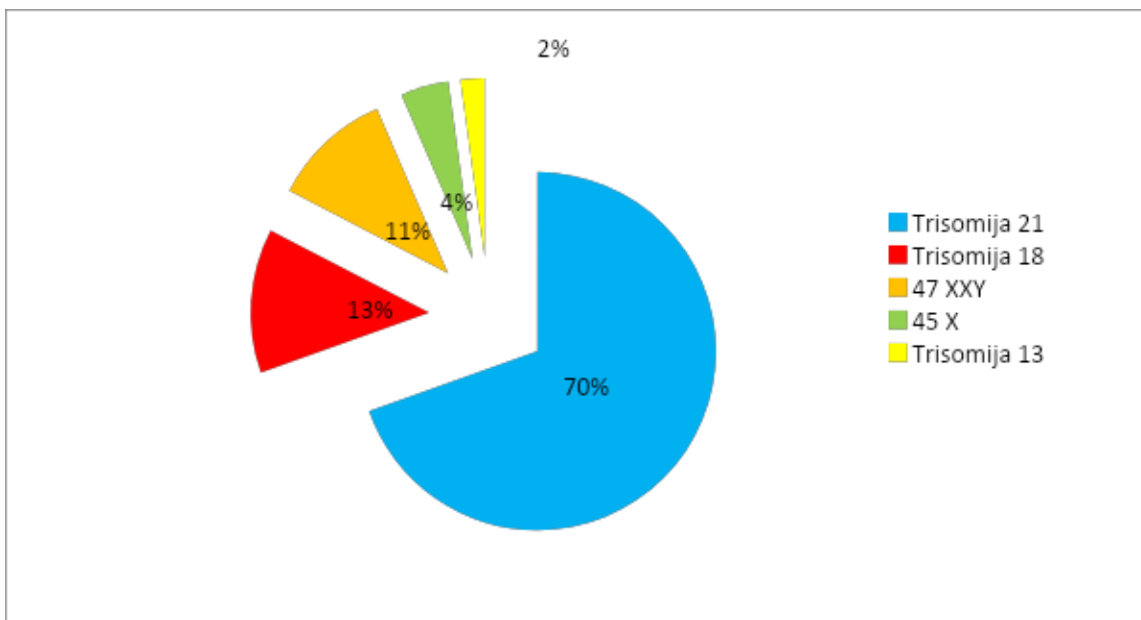
Tablica 1. Učestalost detektiranih numeričkih i strukturnih promjena kromosoma prema godinama u analiziranom razdoblju od siječnja 2004. do rujna 2020. godine.

GODINA	BROJ I UČESTALOST NUMERIČKIH I STRUKTURNIH PROMJENA KROMOSOMA N (%)
2004.	18 (5,5)
2005.	16 (5,3)
2006.	12 (4,3)
2007.	16 (5,1)
2008.	15(4,0)
2009.	16 (5,1)
2010.	10 (3,6)
2011.	19 (6,3)
2012.	8 (2,8)
2013.	18 (6,8)
2014.	13 (5,6)
2015.	17 (8)
2016.	9 (4,4)
2017.	10 (5,9)
2018.	10 (9,1)
2019.	5 (8,5)
2020.	5 (19,2)

U izračun ukupnog broja numeričkih promjena kromosoma uvršten je i mozaičan kariotip, ali je u daljnim analizama prikazan zasebno obzirom na veći postotak normalnih staničnih linija u svim uzorcima. Mozaični kariotip detektiran je u 15 uzoraka (14%) , dva uzorka odnosila su se na DS mozaičnog tipa. Detektiran je i jedan slučaj ES mozaičnog tipa, a ostali mozaični kariotipovi uključivali su spolne kromosome. Postotak mozaicizma potvrđen je metodom fluorescentne *in*

*situ* hibridizacije korištenjem odgovarajućih centromernih ili lokus specifičnih proba za pojedine kromosome.

Kada se izuzme mozaičan kariotip ostalih aneuploidija i poliploidija detektirano je u 96 (86%) uzoraka. Regularni tip trisomije 21 utvrđen je u 64 uzorka (67%), zatim slijedi trisomija 18 u 12 uzoraka (13%). Klinefelterov sindrom detektiran je u 10% (10/96) uzoraka, a Turner sindrom u 4% (4/96). U samo dva uzorka detektiran je PS (2%, 2/96) (Slika 4.). U preostalim 4% uzoraka u dva uzorka detektiran je kariotip 47,XXX, u jednom kariotip 47,XYY kao i jedna triploidija 69 XXX.



Slika 4. Prikaz detektiranih numeričkih promjena kromosoma s izuzetkom pojedinačnih kariotipova 47,XXX, 47,XYY i 69 XXX.

U ukupan broj strukturnih promjena kromosoma uvrštena je i pericentrična inverzija kromosoma 9 koja je utvrđena u 75% (80/106) uzoraka. Obzirom da se smatra varijantom u populaciji

isključena je iz daljnjih analiza. Stoga je u preostalih 26 (25%) uzoraka dalje raščlanjeno po tipovima utvrđenih strukturnih promjena kromosoma. Od toga je najčešće detektirana balansirana recipročna translokacija u 58% (15/26) uzoraka. Što se tiče podrijetla detektiranih translokacija 60% naslijeđeno je od majke, 13,3% od oca, kao posljedica svježe mutacije detektirano je 6,7%, a u preostalih 20% uzoraka podrijetlo je nepoznato zbog nedostupnosti roditelja (Tablica 2.). Robertsonova translokacija utvrđena je u 27% (7/26) uzoraka plodove vode, a 57,1% (4/7) ih je naslijeđeno od majke, 14,3% (1/7) od oca, a za 28,9% (2/7) nije poznato jesu li naslijeđene od roditelja ili su svježe mutacije. Zabilježen je i jedan translokacijski tip PS (Tablica 3.).

U preostalih 15% (4/26) uzoraka detektirana je po jedna inverzija kromosoma (46,XX,inv(12)(p13.3;q24.1)pat, (46,XX, inv(10)(p11.2;q21)pat), i duplikacija 4% (1/25) (46,XY,dup(2)(p23;p23)(ALK++)dn), a u jednom uzorku utvrđen je regularni tip DS ali i recipročna translokacija naslijeđena od oca (47, XY,t(5;6)(q11.2;p11.2)+21), pa se ovaj uzorak ubrojio i pod trisomiju 21 ali i pod recipročne translokacije.

Tablica 2. Podrijetlo detektiranih recipročnih translokacija

RECIPROČNA TRANSLOKACIJA
--------------------------

Naslijeđena od majke	Naslijeđena od oca	<i>De novo</i>	Nepoznato
46,XY,der(21)t(19;21) (q11;p13)mat	46,XX,t(11;22) (q23;q11.2)pat	46,XY,t(1;6)(p11; q24)dn	46,XX,t(1;5)(q25;q22)
46,XY,t(8;14) (q24.1;q24.3)mat	46,XY,ish t(3;5)(q29;p15.3)pat	-	46,XX,t(11;13)(p15;q22)
46,XX,t(3;7)(q23;p15)mat	47, XY,t(5;6)(q11.2;p11.2)+21,pat	-	46,XY,t(4;9)(q32.3;q22.1)
46,XX,t(3;5)(p24.2;q22) mat	-	-	-
46,XY,t(11;14)(p10;p10) mat	-	-	-
46,XY,t(2;20)(p21;p11.2) mat	-	-	-
46,XX,t(5;12)(q22;q22)mat	-	-	-
46,XX,t(12;18)(q15;q21.3)mat	-	-	-

Tablica 3. Podrijetlo detektiranih Robertsonovih translokacija.

ROBERTSONOVA TRANSLOKACIJA		
Naslijeđena od majke	Naslijeđena od oca	Nepoznato
45,XY,der(13q;14q)(q10;q10)mat	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)pat	45,XX,der(22;22)(q10;q10)
45,XY,t(13;14)(q10;q10)mat	-	46,XX,+13,der(13;14)(q10;q10)
45,XX,rob(13;14)(q10;q10)mat	-	-
45,XY,rob(14;21)(q10;q10)mat	-	-

U tablici 4. sumirane su indikacije za prenatalnu dijagnostiku kao i dob majke te gestacijski tjedan izvođenja zahvata ACZ obzirom na utvrđenu numeričku ili strukturnu promjenu kromosoma.

Tablica 4. Indikacije za prenatalnu dijagnostiku, srednja dob majke te gestacijska dob u uzorcima s detektiranim numeričkim i strukturnim promjena

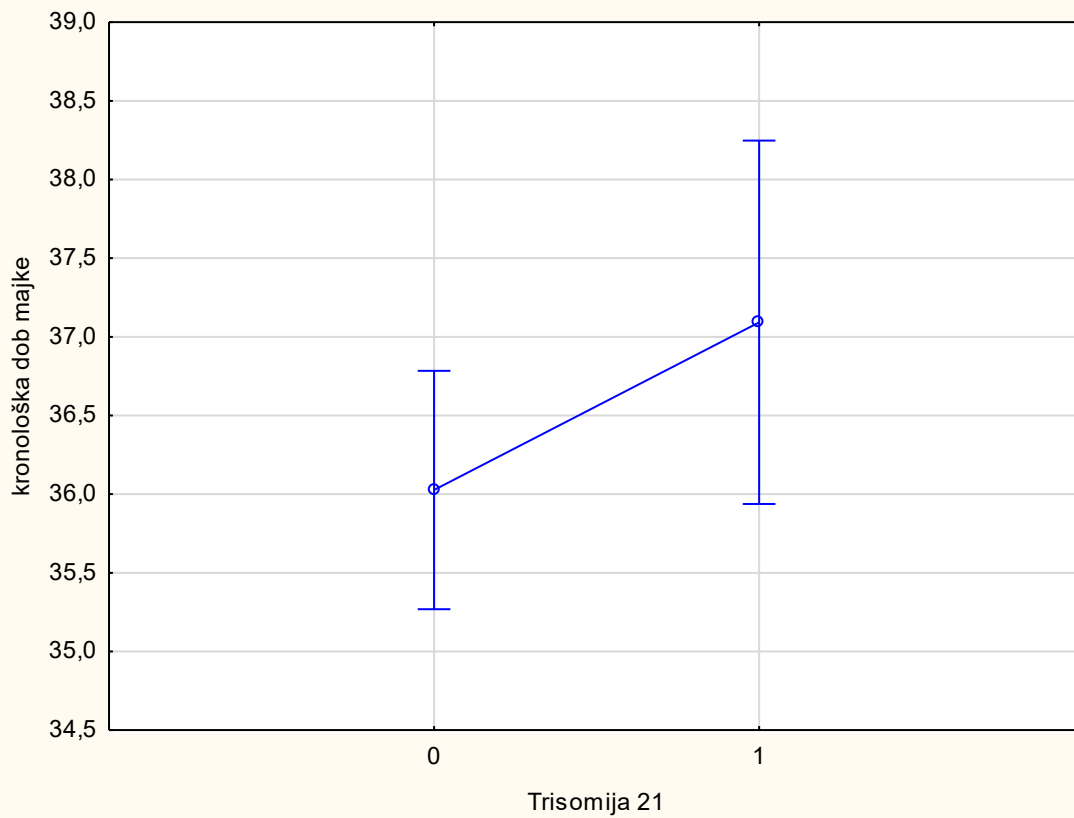
VRSTA KROMOSOMOPATIJE	INDIKACIJA (N)	DOB MAJKE srednja vrijednost±stardardana devijacija	SREDNJA VRIJEDNOST GESTACISKE DOBI
Trisomija 21	Dob majke (38) Biokemijski test probira II. tromjesečja (16) Nalaz UZV (6) NIPT (4)	37,09±4,03	16,75±1,56
Trisomija 18	Dob majke (5) Biokemijski test probira II. tromjesečja (3) Nalaz UZV (7)	36,91±3,98	17,75±4,08
Trisomija 13	Dob majke (2) Nalaz UZV (1)	40,00±0,00	17±1,41
Sindrom Klinefelter	Dob majke (8) Numeričke promjene u prethodnoj trudnoći (1) Biokemijski test probira II. tromjesečja (2)	36,5±4,35	16,80±0,63
Sindrom Turner	Psihološki razlozi (2) Nalaz UZV (2)	29,75±9,42	14,25±3,03

Sindrom dvostrukog Y kromosoma	Dob majke (1) NIPT (1)	42	
Triploidija xxx	Biokemijski test probira II. tromjesečja (1)	29	
Mozaični kariotip	Dob majke (12) DS u prethodnoj trudnoći (1) Biokemijski test probira II. tromjesečja (3) Nalaz UZV (1)	36,33±5,86	16,86±1,06
Pericentrična inverzija kromosoma 9	Dob majke (61) Biokemijski test probira II. tromjesečja (8) Nalaz UZV (3) Psihološki razlozi (1) DS u obitelji (2) DS u prethodnoj trudnoći (2)	36,35±4,53	16,82±0,94
Inverzija kromosoma 12 i 10	Dob majke (2)	36,00±0,00	
Duplikacija kromosoma 2	Biokemijski test probira II. tromjesečja (1)	30	
Recipročna translokacija	Dob majke (9) Biokemijski test probira II. tromjesečja (3) Nalaz UZV (3) Strukturne promjene u prethodnoj trudnoći (1) Strukturne promjene u majke (2)	34,86±5,75	16,60±0,91
Robertsonova translokacija	Dob majke (4)	34,71±4,19	



	Strukturne promjene u oca (1) Biokemijski test probira II. tromjesečja (1) Nalaz UZV (1)		16,71±0,95
Recipročna translokacija+ DS	Dob majke (1)	39	
Marker kromosom	Dob majke (1) Biokemijski test probira II. tromjesečja (1)	36	

Nije utvrđena statistički značajna razlika u dobi majke između ispitanica kojima je utvrđena trisomija 21 kao najčešća kromosopatija ispitivanog uzorka u odnosu na ispitanice s drugim kromosopatijama ( $p=0,130$ ) (Slika 5.).



Slika 5. Razlika u dobi majke između ispitanica s detektiranom trisomijom 21. kromosoma i ostalih ispitanica.

## 5.RASPRAVA

Prenatalna dijagnostika ima osnovni zadatak i namjenu ranog postavljanja dijagnoze kako bi se roditeljima pružile sve potrebne informacije o mogućim zdravstvenim problemima njihovog još nerođenog djeteta. Ona im daje mogućnost ranog i sigurnog prekida trudnoće ako za to postoji medicinski opravdan razlog. U suprotnom, ako žele zadržati dijete, osigurava im kvalitetnu prenatalnu skrb i vrijeme da se pripreme na sve uspone i padove s kojima će se suočavati nakon rođenja i u kasnijem životu.

Pod pojmom prenatalna dijagnostika najčešće se podrazumijeva niz radnji i postupaka s ciljem otkrivanja kromosomskih, ali i genetičkih poremećaja u ranom embrionalnom razvoju (18). U Republici Hrvatskoj u većini centara izvodi se amniocenteza u drugom tromjesečju trudnoće, a samo u jednom centru radi se i biopsija korionskih resica. U Primorsko-goranskoj županiji (PGŽ) zahvati ACZ izvode se na Klinici za ginekologiju i porodništvo KBC-a Rijeka dok je laboratorij za citogenetiku sastavni dio Zavoda za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Rijeka. Konvencionalna kariotipizacija primjenjuje se od 1986. godine, a od 2004. godine uvodi se i metoda molekularne citogenetike, FISH. Prenatalna skrb u PGŽ uključuje i testove probira koji su od 2018. godine dostupni svim trudnicama na uputnicu (kombinirani test probira I tromjesečja), a uz osobno plaćanje dostupno je nekoliko vrsta NIPT testova.

Cilj ovog rada bio je prikazati učestalost detektiranih kromosomopatija ploda te pripadajućih indikacija za ACZ u razdoblju od siječnja 2004. do rujna 2020. godine. U tom razdoblju prenatalna dijagnostika napravljena je na sveukupno 4054 uzoraka plodove vode. Najveći broj uzoraka obrađen je tijekom 2008. godine dok je 2019. godine obrađen značajno najmanji broj. Iz slike 1. je vidljivo da nakon 2011. godine broj uzoraka u prenatalnoj dijagnostici postepeno pada, a uzroka

koji dovode do takvih rezultata može biti više. Rezultati nisu iznenađujući jer se i u drugim prenatalnim centrima u Europi pa i svijetu uočava taj trend opadanja invanzivnih zahvata (19,20). Naime, rezultati mogu biti odraz socio-ekonomskih prilika u državi. U zadnjih nekoliko godina sve veći broj ljudi iseljava se u potrazi za boljim životnim i radnim uvjetima, naročito se to odnosi na PGŽ. Općenito je poznato da je već niz godina stopa nataliteta u Republici Hrvatskoj vrlo niska i zabrinjavajuća (21). Uzrok opadanja zahvata ACZ najvjerojatnije je i uvođenje kombiniranog testa probira prvog tromjesečja kao i neinvazivnih testova slobodno cirkulirajuće DNA fetusa u krvi majke. Ti noviji testovi probira imaju povećanu senzitivnost prvenstveno za trisomiju 21 u odnosu na biokemijski test probira drugog tromjesečja koji se izvodio intenzivno do 2017. godine. Nadalje, poboljšani i unaprijeđeni ultrazvučni probiri također ide u prilog opadanja zahvata ACZ (22). Međutim, valja naglasiti da testovi probira bez obzira na svoju senzitivnost i prediktivnu vrijednost ne mogu zamijeniti kako konvencionalnu kariotipizaciju tako ni molekularnu kariotipizaciju u detekciji kromosomopatija. Pad broja analiziranih uzoraka u 2020. godini vjerojatno je uzrokovan i pandemijom koronavirusa.

U analiziranoj grupi ispitanica, dob majke predstavlja najčešću indikaciju za ACZ (59%), a rezultati pokazuju da je više od polovice ispitanica bilo starije od 35 godina (Slika 2.). Najveći broj kromosomopatija, pogotovo trisomija utvrđen je upravo u toj najstarijoj grupi ispitanica. To je i očekivani rezultat jer je dob majke prvi i već dobro opisani rizični čimbenik za aneuploidije kod čovjeka (3). Isto tako dob majke najčešća je indikacija i kod svih detektiranih strukturnih promjena sa srednjom vrijednošću oko 36 godina. U nekim zemljama starija životna dob samostalno za sebe nije na popisu indikacija za prenatalnu dijagnostiku, već je u kombinaciji s UZV nalazima i biokemijskim testom probira I tromjesečja u tzv. kombiniranom testu probira (23,24). Rezultati ove studije u suprotnosti su s rezultatima studije Farcas i drugih koji navode da

je u 85,71% slučajeva s detektiranom strukturnom promjenom kromosoma dob majke bila manja od 35 godina, a najčešća indikacija pozitivan nalaz biokemijskog testa probira (25). Što se ostalih indikacija tiče biokemijski testovi probira i UZV imaju podjednaku zastupljenost. Takva raspodjela je očekivana kada uzmemo u obzir organizaciju prenatalne skrbi na području PGŽ koja se kontinuirano provodi od 1986 godine. Kao i činjenicu da je biokemijski test probira za DS II tromjesečja uveden davne 1996. godine, a da je kombinirani test probira dostupan svim trudnicama od 2017 (26).

Ovim istraživanjem potvrđeno je da podmakla životna dob majke predstavlja rizik za razvoj trisomije 21, ali i drugih numeričkih aberacija, što je u skladu s prethodno provedenim istraživanjima (22,23). Neka istraživanja su pokazala da majke mlađe od 26 godina imaju veći rizik za rođenje djeteta s DS nego majke u dobi od 26-35 godina (29). Mogući razlog su okolišni čimbenici što uključuje stresan i užurban način života, veću konzumaciju alkohola i drugih supstanci koje stvaraju ovisnost, ali i problemi s reproduktivnim organima što može utjecati i na rekombinaciju homolognih kromosoma (28). Od ostalih numeričkih poremećaja kromosoma, na drugom mjestu je trisomija 18, zatim slijedi sindrom Klinefelter. Na četvrtom mjestu po učestalosti je sindrom Turner, a trisomija 13 utvrđena je u najmanjem broju uzoraka. Analizirajući trisomije autosoma kao najčešće aneuploidije, druga najučestalija trisomija je ES, a slijedi ga PS (Tablica 4.). Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjima koja obuhvaćaju veći broj ispitanika (30). Aneuploidije spolnih kromosoma uključene su prema novoj klasifikaciju u bolesti s poremećajima spolnog razvoja (*engl. disorders of sex development- DSD*) (31). U ispitivanom uzorku svega su 4 uzorka sa sindromom Turner sa uobičajenom indikacijom patološkog nalaza UZV (ciste horionskog pleksusa), što je u korelaciji s publiciranim studijama (32). Životna dob tih ispitanica ispod je 30 godina što je niže od ostalih s drugim aneuploidijama te je u skladu s poznatim

znanstvenim spoznajama (27). Međutim, što se tiče mozaičnog kariotipa koji uključuje aberirane stanice s monosomijom X kromosoma, najčešća indikacija u toj grupi ispitanica je ipak životna dob. Očito je da udio stanica s monosomijom ima važnu ulogu u određivanju fenotipa, ali i ostali mehanizmi na molekularnoj razini mogu modulirati rizik za fetalne malformacije. Isto tako udio aberantnih stanica može varirati između tkiva, što može prenatalnu dijagnostiku učiniti limitirajućom obzirom na dostupnost fetalnih stanica. Međutim, starija životna dob indikacija je u većini slučajeva sindroma Klinefelter, što je u skladu s prijašnjim spoznajama (33,32).

Znatno veći udio numeričkih i strukturnih aberacija kromosoma detektirano je u analiziranom razdoblju u odnosu na razdoblje od 1986. godine do 2004.godine (26). Razlika je najvjerojatnije prisutna stoga što se u ovom radu uračunala i pericentrična inverzija kromosoma 9 koja nije uračunata u prijašnjem spomenutom razdoblju. Naime, iako se radi o balansiranoj strukturnoj promjeni koja se smatra varijantom kromosoma u populaciji i koja se prema smjernicama Europskog društva za citogenetiku ne treba pisati u ISCN kariotipu, uključena je u ukupan broj strukturnih promjena kromosoma (34). Zbog nedostatnih literaturnih podataka vrlo je teško procijeniti mogući utjecaj ove inverzije na fenotipsku ekspresiju tijekom trudnoće. Prema publikacijama iz postnatalne dijagnostike, značajna promjena u fenotipu detektirana je kod slučajeva konsangviniteta (35). Dob majke je i u ovih slučajeva bila vodeća indikacija za prenatalnu dijagnostiku. Od ostalih strukturnih promjena u najvećem postotku detektirane su balansirane recipročne translokacije naslijeđene od majke. Nekolicina je ostala neobrađena u smislu utvrđivanja podrijetla zbog nedostupnosti ili odbijanja dodatnih analiza od strane roditelja. S medicinskog stajališta i sa stajališta genetičkog informiranja to je loše jer genetičko informiranje ne može biti pravovaljano i potpuno. Prenatalna dijagnostika strukturnih promjena je dodatno kompliciranija jer zahtijeva i dodatno vrijeme i pretrage koje uključuju i biološke roditelje. Stoga

je genetičko informiranje prije samog zahvata od vrlo velike važnosti i potrebno ga je uključiti u prenatalnu skrb. Ista situacija je i kod Robertsonovih translokacija koja je u našem uzorku uglavnom uključivala najčešće kombinaciju kromosoma 13 i 14 i bila naslijeđena od majke (Tablica 3.). Detekcija balansiranih strukturnih promjena gotovo je nemoguća novijim metodama molekularne kariotipizacije, stoga će metode konvencionalne kariotipizacije i nadalje ostati jedini izbor za detekciju istih. Kod *de novo* balansiranih strukturnih aberacija uvijek treba imati na umu da se možda radi o prividno balansiranoj translokaciji kod koje je došlo do mikroduplicacije ili mikrodelecije kromosomskih segmenata u području točke loma. Naime u 6% *de novo* balansiranih recipročnih translokacija može doći do promjene u fenotipu ukoliko se radi o *de novo* promjenama (36). Prema novijim literaturnim podacima preporučuje se sekvenciranje u području točaka loma s ciljem detekcije nebalansiranih varijanti sekvence u svim slučajevima kada je točka loma izvan područja heterokromatina, odnosno pericentrične regije. Naime područja loma kod translokacija koja zahvaćaju pericentričnu regiju smatra se da predstavljaju manji rizik za promjenu fenotipa (37). Nastavno na novije znanstvene spoznaje, određivanje podrijetla prenatalno detektiranih strukturnih promjena neizostavni je dio pravovaljane prenatalne skrbi što omogućuje i pravilno genetičko informiranje. Kako bi se ono moglo adekvatno i provesti moderni citogenetički laboratorij mora biti opremljen i za izvođenje konvencionalne ali i molekularne kariotipizacije kako bi se na vrijeme mogle detektirati kako promjene na nivou kromosoma tako i promjene broja kopija ili same sekvence.

Sveobuhvatna prenatalna skrb kromosomopatija uz neinvazivne i invazivne metode mora uključiti i genetičko savjetovanje kako prije tako i poslije odrađene analize s ciljem što boljeg informiranja bioloških roditelja.

## 6.ZAKLJUČAK

Nakon provedenog retrospektivnog istraživanja detektiranih numeričkih i strukturnih promjena te indikacija za prenatalnu dijagnostiku provedenih u razdoblju od 2004. godine do rujna 2020. godine, zaključci su sljedeći:

- Od siječnja 2004. do rujna 2020. godine analizirano je 4054 uzoraka plodove vode, a u njih 217 utvrđena je numerička ili strukturna promjena kromosoma,
- Broj izvedenih zahvata smanjivao se od 2012. godine, a značajniji i nagli pad zahvata uočen je 2019. godine te se nastavlja i u 2020. godini,
- Najčešća indikacija za prenatalnu dijagnostiku je životna dob (59%) s medijanom 37 u rasponu od 19 do 48 godina, te slijede nalazi biokemijskog testa probira i NIPT-a,
- Medijan gestacijske dobi izvođenja amniocenteze je 17 tjedana s rasponom od 11 do 28 tjedna trudnoće,
- Učestalost numeričkih promjena kromosoma je 51% (111/217), a strukturnih promjena 49% (106/217),
- Mozaičan kariotip spolnih kromosoma utvrđen je u 14% (15/111) uzoraka, u preostalih 96 uzoraka trisomija 21 detektirana je u 69% (64/92) uzoraka, zatim slijedi trisomija 18 (13%) te sindrom Klinefelter (11%), a sindrom Turner i Patau zastupljeni su u svega nekoliko slučajeva kao i triplo X sindrom, sindrom dvostrukog Y te jedna poliploidija
- Najučestalija strukturna promjena kromosoma je pericentrična inverzija kromosoma 9 sa 75% (80/106), u preostalih 26 uzoraka u 58% utvrđena je balansirana recipročna translokacija, zatim slijedi Robertsonova translokacija u 27% te pojedinačne inverzije i duplikacije.



## 7. LITERATURA

1. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M, editors. ISCN 2016. 1st ed. ISCN 2016. Karger Publishers; 2016. 139 p.
2. Tjio JH, Levan A. THE CHROMOSOME NUMBER OF MAN. Hereditas. 1956;
3. Turnpenny PD, Ellard S. Chromosomes and Cell Division. In: Emery's Elements of Medical Genetics. 15th ed. ELSEVIER; 2017. p. 24–42.
4. Touraine R. Orphanet: Down syndrome [Internet]. 2019 [cited 2020 May 8]. Available from: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=EN&data\\_id=116&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=Down-syndrome&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Disease\(s\)/group of diseases=Down-syndrome&title=Down syndrome&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=116&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Down-syndrome&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Disease(s)/group of diseases=Down-syndrome&title=Down syndrome&search=Disease_Search_Simple)
5. Verloes A. Orphanet: Trisomy 13 [Internet]. 2008 [cited 2020 May 8]. Available from: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=EN&data\\_id=337&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=Patau-syndrome&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Disease\(s\)/group of diseases=Trisomy-13&title=Trisomy 13&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=337&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Patau-syndrome&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Disease(s)/group of diseases=Trisomy-13&title=Trisomy 13&search=Disease_Search_Simple)
6. Verloes A. Orphanet: Trisomy 18 [Internet]. 2008 [cited 2020 Sep 10]. Available from: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Lng=GB&Expert=3380](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=GB&Expert=3380)
7. Cabrol S. Orphanet: Turner syndrome [Internet]. 2007 [cited 2020 May 8]. Available from: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=EN&data\\_id=44&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=Turner-syndrome&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Disease\(s\)/group of diseases=Turner-syndrome&title=Turner syndrome&search=Disease\\_Search\\_S](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=44&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Turner-syndrome&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Disease(s)/group of diseases=Turner-syndrome&title=Turner syndrome&search=Disease_Search_S)
8. Ford CE, Hamerton JL. The chromosomes of man. Nature. 1956;
9. Pavlica M. Mrežni udžbenik iz Genetike, prof. dr. sc. Mirjana Pavlica [Internet]. Mrežni udžbenik iz Genetike. 2012 [cited 2020 May 6]. Available from: <http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl11.html>
10. Barić I, Stavljenić-Rukavina A. Racionalna dijagnostika nasljednih i prirođenih bolesti. Zagreb: Medicinska Naklada; 2005. 180 p.
11. Zergollern L. Razvoj prenatalne dijagnostike u Hrvatskoj. In: Kurjak A, Stavljenić-

- Rukavina A, Pavelić K, editors. Prenatalna dijagnostika i terapija. Varaždinske Toplice: Tonimir; 2000. p. 3–17.
12. Stipoljev F, Vičić A. Prednosti i ograničenja invazivne prenatalne dijagnostike. *Paediatr Croat.* 2015;59(2):130–7.
  13. Turnpenny PD, Ellard S. Prenatal Testing and Reproductive Genetics. In: Emery's Elements of Medical Genetics. 15th ed. ELSEVIER; 2017. p. 303–17.
  14. Mišković B, Kos M. Kordocenteza. In: Kurjak A, Stavljenić-Rukavina A, Pavelić K, editors. Prenatalna dijagnostika i terapija. Varaždinske Toplice: Tonimir; 2000. p. 131–42.
  15. Boulot P, Lefort G, Bachelard B, Humeau C, Hedon B, Laffargue F, et al. Cordocentesis versus amniocentesis for rapid fetal karyotyping in cases of late referral of women. *J Perinat Med.* 1992;
  16. Liehr T, Pellestor F. Molecular Cytogenetics: The Standard FISH and PRINS Procedure. In: Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) — Application Guide. 2009.
  17. Turnpenny PD, Ellard S. Kromosomi i dioba stanice. In: Emeryeve osnove medicinske genetike. 14th ed. Zagreb: Medicinska Naklada; 2011. p. 31–53.
  18. Bura I. Informiranost populacije o postupcima dijagnosticiranja za rano otkrivanje anomalija u trudnoći. 2017;
  19. Comas C, Echevarria M, Rodríguez I, Serra B, Cirigliano V. Prenatal invasive testing: A 13-year single institution experience. *J Matern Neonatal Med.* 2014;
  20. Jacobs M, Cooper SA, McGowan R, Nelson SM, Pell JP. Pregnancy outcome following prenatal diagnosis of chromosomal anomaly: A record linkage study of 26,261 pregnancies. *PLoS One.* 2016;
  21. PRIRODNO KRETANJE STANOVNIŠTVA REPUBLIKE HRVATSKE U 2019./NATURAL CHANGE IN POPULATION IN THE REPUBLIC OF CROATIA, 2019 [Internet]. [cited 2020 Aug 22]. Available from: [https://www.dzs.hr/Hrv\\_Eng/publication/2020/07-01-01\\_01\\_2020.htm](https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2020/07-01-01_01_2020.htm)
  22. Rao R, Platt LD. Ultrasound screening: Status of markers and efficacy of screening for structural abnormalities. *Seminars in Perinatology.* 2016.
  23. Fitzpatrick KE, Tuffnell D, Kurinczuk JJ, Knight M. Pregnancy at very advanced maternal age: a UK population-based cohort study. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2017;
  24. Fretts RC. Management of pregnancy in women of advanced age - UpToDate [Internet].

- uptodate.com. 2019 [cited 2020 Sep 13]. Available from:  
<https://www.uptodate.com/contents/management-of-pregnancy-in-women-of-advanced-age>
25. Farcaş S, Crişan CD, Andreescu N, Stoian M, Motoc AGM. Structural chromosomal anomalies detected by prenatal genetic diagnosis: Our experience. *Rom J Morphol Embryol.* 2013;
  26. Brajenović-Milić B, Vraneković J, Petrović O, Masov J, Frković A, Pavešić D, et al. Prenatal diagnostics – our experiences. *Medicina : glasilo Hrvatskoga liječničkoga zbora, Podružnica Rijeka,* 2004;42(41):276–80.
  27. Kurtovic-Kozaric A, Mehinovic L, Malesevic R, Mesanovic S, Jaros T, Stomornjak-Vukadin M, et al. Ten-year trends in prevalence of Down syndrome in a developing country: impact of the maternal age and prenatal screening. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2016;206:79–83. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.08.038>
  28. Shan D, Qiu PY, Wu YX, Chen Q, Li AL, Ramadoss S, et al. Pregnancy Outcomes in Women of Advanced Maternal Age: a Retrospective Cohort Study from China. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–9.
  29. Adams MM. Down's syndrome. Recent trends in the United States. *JAMA J Am Med Assoc* [Internet]. 1981 Aug 14 [cited 2020 Sep 10];246(7):758–60. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6454794/>
  30. Zhang H, Gao Y, Jiang F, Fu M, Yuan Y, Guo Y, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: Clinical experience from 146 958 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(5):530–8.
  31. Witchel SF. Disorders of sex development. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology.* 2018.
  32. Kurjak A, Bekavac I. Perinatal problems in developing countries: Lessons learned and future challenges. In: *Journal of Perinatal Medicine.* 2001.
  33. De Souza E, Morris JK, Dolk H, Nelen V, Mosquera-Tenreiro C, Francannet C, et al. Case-control analysis of paternal age and trisomic anomalies. *Arch Dis Child.* 2010;
  34. Association for Clinical Cytogenetics. Professional Guidelines for Clinical Cytogenetics Prenatal Diagnosis Best Practice Guidelines ( 2009 ). *Prenat Diagn.* 2009;(200):1–24.

35. Vlatkovic IB, Hafner T, Miskovic B, Vicic A, Poljak B, Stipoljev F. Prenatal diagnosis of sex chromosome aneuploidies and disorders of sex development-a retrospective analysis of 11-year data. *J Perinat Med.* 2014;
36. Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: Clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet.* 1991;
37. Halgren C, Nielsen NM, Nazaryan-Petersen L, Silahtaroglu A, Collins RL, Lowther C, et al. Risks and Recommendations in Prenatally Detected De Novo Balanced Chromosomal Rearrangements from Assessment of Long-Term Outcomes. *Am J Hum Genet.* 2018;

## **8.POPIS KORIŠTENIH SKRAĆENICA**

DS- Down sindrom

PS- Patau sindrom

ES- Edwards sindrom

TS- Turner sindrom

KS-Klinefelter sindrom

UZV-ultrazvuk

ACZ- amniocenteza

FISH- fluorescentna in situ hibridizacija

ArrayCGH- komparativna genomska hibridizacija na mikročipu

KBC- Klinički bolnički centar

## **9. KRATKI ŽIVOTOPIS PRISTUPNIKA**

### **OSOBNNE INFORMACIJE:**

**IME I PREZIME:**Ana Tadić

**DATUM I MJESTO ROĐENJA:**02.12.1998., Rijeka

**ADRESA STANOVANJA:**Mate Lovraka 18

**KONTAKT:**+385 98/952 6506

**MAIL:**tadicanci@gmail.com

### **OBRAZOVANJE:**

**2005.-2013.:**Osnovna škola Srdoči

**2013.-2017.:** Prva sušačka hrvatska gimnazija u Rijeci

**2017.-2020.:** Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva

Medicinski fakultet Rijeka