

# Prednosti i ograničenja invazivne prenatalne dijagnostike

Feodora Stipoljev<sup>1,2</sup>, Ana Vičić<sup>1</sup>

*Prenatalna dijagnostika kromosomskih poremećaja podrazumijeva citogenetičku analizu stanica ploda dobivenih jednom od rutinskih invazivnih tehnika - biopsijom korionskih resica, placentocentezom, amniocentezom ili kordocentezom. Izbor tipa invazivne dijagnostike ovisi ponajprije o individualnoj procjeni čimbenika rizika za rađanje kromosomski bolesnog djeteta, a zatim i o riziku lošeg ishoda, odnosno gubitka trudnoće kao najteže komplikacije invazivnog zahvata. Problemi koji se mogu javiti u prenatalnoj dijagnostici kromosomskih poremećaja su pojava kromosomskog mozaicizma te razlikovanje pravog od pseudomozaicizma, rizik neuočavanja suptilnih kromosomskih razmjesta zbog ograničenja razlučivanja svjetlosnog mikroskopa, nemogućnost detekcije kriptičkih mozaičnih oblika te zagađenje majčinim stanicama. U tim se slučajevima uz klasičnu citogenetičku analizu provodi i neka od metoda molekularne dijagnostike. Poseban izazov u prenatalnoj dijagnostici su blizanačke trudnoće. Uvođenjem metoda potpomognute oplodnje i novih protokola stimulacije, značajno se povećao broj višeplođnih trudnoća. Razlikovanje mono- i dizigotnih blizanaca kod dikorijalnih dijamnijskih blizanaca istog spola može se precizno odrediti usporednom analizom mikrosatelitnih lokusa. Mehanizmima kao što je postzigotno nerazdvajanje može doći do nastajanja različitih kromosomskih statusa, čak i kod mono- i dizigotnih blizanaca. Zato je amniocenteza tehnika izbora, a uzorci se trebaju uzeti iz svake amnijske vreće, posebice ako jedan ili oba blizanca imaju ultrazvučno dijagnosticirane abnormalnosti.*

**Ključne riječi:** kromosomski poremećaji; prenatalna dijagnoza; trudnoća, blizanci

## UVOD

Kromosomski poremećaji su teške kronične bolesti, koje nije moguće izliječiti. Zbog toga su veliki zdravstveni, ekonomski i sociološki problem šire i uže društvene zajednice. Postavljanje dijagnoze u ranoj trudnoći ima veliko značenje u njihovoj prevenciji. Prema EUROCAT-ovim podacima prevalencija kromosomopatija u Europi je u razdoblju od 2000. do 2006. godine iznosila 43,8 na 10 000 porođaja (1). Kromosomopatije obuhvaćaju numeričke i strukturne poremećaje kromosoma, koji su često udruženi s kongenitalnim abnormalnostima i intelektualnim poteškoćama, pa značajno povećavaju perinatalni morbiditet i mortalitet (2). Zasad jedini način potvrde kromosomopatija u trudnoći je citogenetičkom analizom stanica ploda. U okviru prenatalne dijagnostike kromosomskih poremećaja rutinski se rabi kultura korionskih resica, odnosno tkiva posteljice, stanica plodove vode ili krvi iz pupkovine. Prenatalni uzorci za kromosomsku analizu dobiju se jednom od rutinskih, invazivnih tehnika (biopsije korionskih resica, placentocenteze,

amniocenteze ili kordocenteze) pod kontrolom ultrazvuka. Uobičajen razlog probira Downovog sindroma kao najčešće kromosomopatije, ali i drugih kromosomopatija je dob trudnice. Probir je pomogao da se značajno smanji broj novorođenčadi s različitim oblicima kromosomskih poremećaja u skupini starijih trudnica. Time se pojavio biološko-statistički paradoks većeg rizika rađanja djeteta s antenatalno neotkrivenom kromosomopatijom u skupini trudnica mlađoj od trideset šest godina. Nametnula se potreba za uvođenjem novih neinvazivnih probirnih metoda u skupini mlađih trudnica koje nisu obuhvaćene indikacijama za pre-

<sup>1</sup> Citogenetski laboratorij, Klinika za ginekologiju i porodništvo, Klinička bolnica „Sveti Duh“, Zagreb

<sup>2</sup> Katedra za medicinsku biologiju i genetiku, Medicinski fakultet, Sveučilište u Osijeku, Osijek

### Adresa za dopisivanje:

Doc. dr. sc. Feodora Stipoljev, Citogenetski laboratorij, Klinika za ginekologiju i porodništvo, Klinička bolnica „Sveti Duh“, 10000 Zagreb, Sveti Duh 64, e-mail: stipoljev@yahoo.com

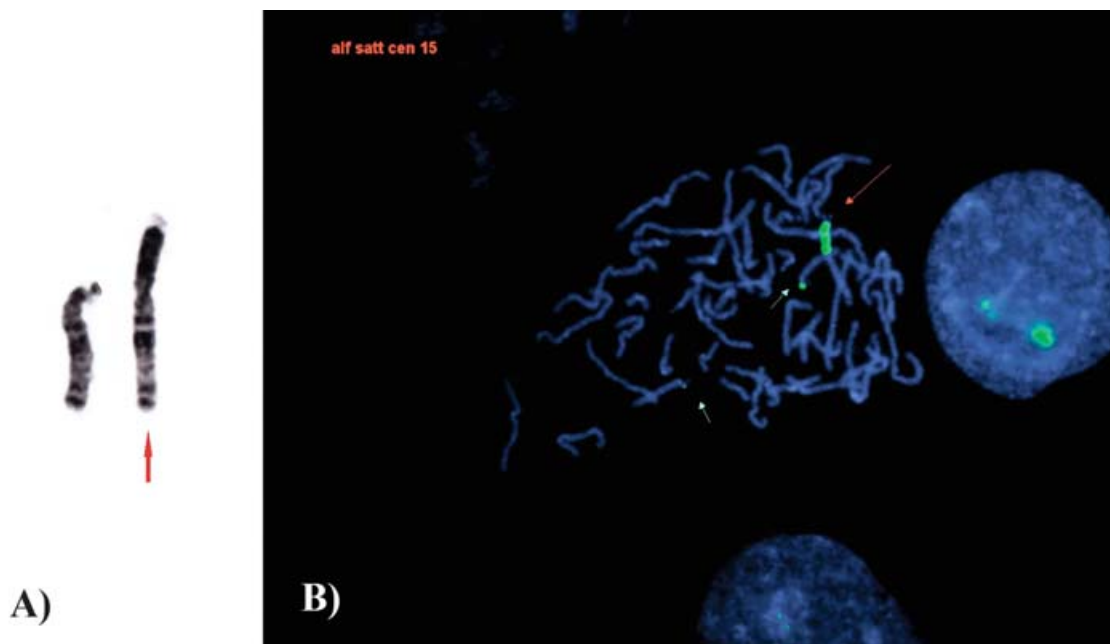
Primljeno/Received: 18. 2. 2015., Prihvaćeno/Accepted: 8. 5. 2015.

natalnu dijagnostiku. Uvođenje standardnog ultrazvučnog pregleda u prvom i drugom tromjesečju trudnoće pokazalo se kao izvrsna neinvazivna metoda probira fetusa s različitim tipovima kromosomskih poremećaja. Ultrazvukom prepoznatljivi poremećaji fetusa, pupkovine, posteljice ili količine plodove vode mogu upućivati na prisutnost različitih tipova kromosomopatija, a nazivaju se ultrazvučnim biljezima ili markerima kromosomopatija. Uz prenatalno otkrivanje kromosomopatija ultrazvuk je omogućio i antenatalnu dijagnostiku prirođenih anomalija, koje mogu biti izolirane ili dio malformacijskog sindroma. Individualni izračun rizika rađanja kromosomski bolesnog djeteta kod trudnice zasniva se na primjeni neinvazivnih metoda probira, koje uključuju kombinaciju biokemijskog i ultrazvučnog probira te podatke o majčinoj dobi i reproduktivnoj obiteljskoj anamnezi. Najčešće indikacije za invazivnu prenatalnu dijagnostiku su: majčina dob ( $\geq 36$  godina), povišeni biokemijski testovi probira prvog (kombinirani test) i drugog tromjesečja (dvostruki i trostruki test), prisutnosti ultrazvučnih fetalnih biljega te pozitivna obiteljska anamneza za kromosomopatije. Bez obzira na postojanje indikacije za invazivnu prenatalnu dijagnostiku, trudnica u dogovoru s ginekologom i kliničkim genetičarom donosi odluku o pristupanju invazivnom zahvatu ili bira neku od metoda neinvazivne dijagnostike, i to pošto je u potpunosti informirana o prednostima i ograničenjima probirnih i dijagnostičkih testova koji se rutinski rabe. Značajan čimbenik odluke je rizik lošeg ishoda, odnosno gubitka trudnoće kao najteže komplikacije invazivnog zahvata. Kod trudnica koje imaju iza sebe više neuspjelih pokušaja izvantjelesne oplodnje, a koje imaju čimbenik rizika dobi majke, odluke su vrlo teške i često usmjerene na primjenu neinvazivnih testova probira, kako bi na najmanju moguću mjeru svele rizik gubitka trudnoće.

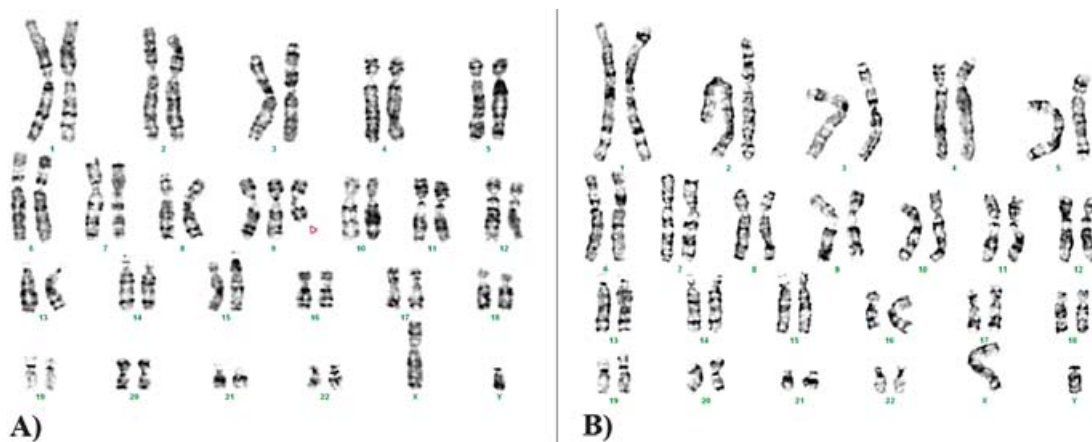
#### **PREDNOSTI I OGRANIČENJA ANALIZE FETALNIH STANICA ZA CITOGENETIČKU I MOLEKULARNU DIJAGNOSTIKU**

U prenatalnoj dijagnostici kromosomskih i genskih poremećaja postavlja se pitanje raspoloživosti različitih vrsta fetalnih stanica te izbor najprihvatljivijeg izvora stanica za analizu. Problemi koji se javljaju u prenatalnoj dijagnostici kromosomskih poremećaja, a koji su uvjetovani vrstom stanica što se analiziraju su: pojava kromosomskog mozaicizma, razlikovanje pravog od pseudomozaicizma, rizik neuočavanja suptilnih kromosomskih razmještanja zbog ograničenja razlučivanja svjetlosnog mikroskopa, nemogućnost detekcije kriptičkih mozaičnih oblika te zagađenje majčinim stanicama. Kromosomska analiza ploda izvodi se metodom klasične citogenetičke analize, koja podrazumijeva pripremu kromosomskih preparata nekom od metoda pruganja (najčešće G pruganjem ili rjeđe C ili R pruganjem) i njihovu

analizu pod svjetlosnim mikroskopom. U slučajevima gdje postoji rizik pronalaska strukturnih kromosomskih poremećaja (npr. roditelji nositelji balansirane translokacije) ili kromosomskih promjena koje se ne mogu uočiti klasičnom citogenetičkom analizom (npr. mikrodelecijski sindromi, subtelomerne promjene) primjenjuje se metoda fluorescencijske *in situ* hibridizacije (engl. fluorescence *in situ* hybridization, FISH) (3). S obzirom na to da FISH analiza omogućava brzu i jednostavnu analizu specifičnih promjena na velikom broju metafaza, ali i interfaznih jezgara, često se primjenjuje u slučajevima gdje postoji sumnja na mozaicizam. Zagađenje majčinim stanicama razrješava se usporednom analizom mikrosatelitnih lokusa ili STR lokusa (engl. *short tandem repeat*) iz majčine krvi i kulture fetalnih stanica (4). Analiza STR lokusa također omogućava i utvrđivanje podrijetla kromosoma u dijagnostici uniparentne disomije (engl. *uniparental disomy*, UPD) te brzu dijagnostiku najčešćih aneuploidija: trisomije 13, 18 i 21, triploidije te numeričkih poremećaja spolnih kromosoma (5). U određenim slučajevima teško je i razlikovati kromosomske varijante od patološkog oblika. Varijante kao što su pericentrična inverzija 9. kromosoma, promjene u duljini (peri)centromernog heterokromatinskog područja kromosoma 1, 9 i 16 ili manje promjene u duljini kratkog kraka akrocentrika ili Y kromosoma smatraju se čestim kromosomskim varijantama i ne zahtijevaju daljnju obradu. No u slučaju nalaza rijetkih varijanta, npr. pericentričnih inverzija drugih kromosoma, većih promjena u duljini p kraka akrocentrika (Slika 1) ili drugih heterokromatinskih promjena, obvezno se provodi kariotipizacija roditelja te daljnja analiza C pruganjem ili FISH metodom. Poseban izazov u interpretaciji nalaza su varijante u eukromatinskim područjima u koje pripadaju konstitucijske citogenetičke amplifikacije te delecije i duplikacije eukromatina koje ne utječu na fenotip ili njihov utjecaj nije sasvim poznat (6). Radi određivanja kliničke važnosti dijagnosticirane promjene u prvom se redu provodi citogenetička obrada roditelja te analiza FISH ili PCR metodom. U slučaju pronalaska iste promjene kod fenotipski normalnih roditelja i članova obitelji u urednog ultrazvučnog nalaza, smatra se da je riječ o eukromatinskoj varijanti. Do danas nije sasvim razjašnjeno zašto određene promjene eukromatina nemaju patološki učinak. Moguća objašnjenja su da je riječ o područjima koja sadržavaju manji broj gena, da su prisutni geni neaktivni, tj. da su pseudogeni ili da je na njihovu ekspresiju utjecala promjena položaja unutar kromosoma. Tako se smatra da se eukromatinski segment, translociran unutar heterokromatinskog područja, inaktivira zbog okolnog utjecaja heterokromatina (7). S obzirom na to da kromosomske varijante po definiciji ne utječu na fenotip, one nisu indikacija za prekid trudnoće. Ipak, u slučajevima rijetkih varijanta, *de novo* nastalih i eukromatinskih varijanta, prilikom genetičkog savjetovanja roditelji se informiraju o



SLIKA 1. Razlučivanje kromosomskih varijanta od patoloških oblika. A) parcijalni kariotip izrazito uvećanog kratkog kraka 15. kromosoma iz kulture stanica plodove vode, B) FISH analiza pokazuje da je riječ o neuobičajeno velikoj heterokromatinskoj varijanti naslijeđenoj od majke



SLIKA 2. Različiti kariotipovi blizanaca A) muški kariotip ploda s tetrasomijom kratkog kraka 9. kromosoma kod prvog blizanca, B) normalan muški kariotip kod drugog blizanca

moćnim nepovoljnim ishodima trudnoće, odnosno riziku rađanja djeteta s malformacijama te rizicima od ponovljenih spontanih pobačaja ili drugih reproduktivnih problema.

Najranija tehnika invazivne dijagnostike je biopsija korionskih resica (engl. *chorionic villus sampling*, CVS), koja se prema standardima primjenjuje od 11. do 14. tjedna trudnoće. U pravilu se dobije dosta materijala korionskih resica, tako da je ova tehnika posebno pogodna za molekularnu dijagnostiku genskih poremećaja u slučajevima pozitivne obiteljske anamneze i visokog rizika prijenosa na potomstvo. Uobičajena je direktna izolacija DNA-a, uz kontrolu zagađenja majčinih stanicama uzorka usporedbom mikrosa-

telitnih lokusa majke i ploda. Kod prenatalne dijagnostike genskih poremećaja standardni protokol uključuje i kromosomsku analizu iz istog uzorka (8). Metilacijski testovi se ne preporučuju iz uzorka korionskih resica, već isključivo iz plodove vode zbog još nedovoljno istraženih profila aktivacije gena u ranom embrionalnom razdoblju (9). Uzorak korionskih resica može se uzimati i nakon 14. tjedna trudnoće i takav se postupak naziva placentocentezom. Najčešće se rabi u slučajevima teškog oligohidramnija kad je ujedno i jedina izvediva tehnika prenatalne dijagnostike. Prilikom kultiviranja stanica uvijek se primjenjuje kombinacija dviju tehnika: kratkotrajne kulture citotrofoblasta (rezultati za 72

sata) i dugotrajne kulture mezenhimne strome (rezultati za otprilike dva tjedna). U slučaju kratkotrajne kulture stanica resice se kultiviraju u razdoblju od 24 sata, uz primjenu metode sinkronizacije stanične diobe premještanjem kulture na temperaturu od 4°C. Pri uspostavljanju dugotrajne kulture resice se mehanički usitnjavaju (maceriraju) i/ili enzimski obrađuju, kako bi se uklonio sloj stanica citotrofoblasta, te se uspostave dvije ili više primarnih staničnih kultura. Kultiviranje traje u pravilu od 10 do 14 dana, nakon čega se pripremaju preparati za kromosomsku analizu. Kako bi se postigla bolja razlučivost kromosoma, u jednoj od primarnih kultura provede se postupak sinkronizacije stanične diobe dodavanjem inhibitora sinteze DNA (bromodeoksiuridina (BrdU) i timidina). Kromosomski preparati se boje tehnikom G pruganja. Rizik gubitka trudnoće iznosi do 1% u tercijalnim centrima (2). Učestalost posteljiničnog mozaicizma iznosi 1-2%. Mozaicizam ograničen samo na posteljicu (engl. *confined placental mosaicism*, CPM) može utjecati na negativan ishod trudnoće, u smislu učinka aneuploidne linije na posteljicu disfunkciju (10). Trudnoće s posteljiničnim mozaicizmom imaju veći rizik razvoja intrauterinog zastoja rasta ploda, odnosno intrauterine smrti ploda a kao najgore komplikacije i gestacijske hipertenzije te preeklampsije (11). Istraživanjem utjecaja CPM-a na ishode trudnoće Baffero i sur- (12) uočili su pojavnost gestacijske hipertenzije u 10% trudnoća s dijagnosticiranim CPM-om u odnosu na 2% kod kontrolne skupine. Analizirajući svaki oblik mozaicizma zasebno, pokazalo se da najveći rizik za pojavu gestacijske hipertenzije nose tipovi 2(13%) i 3(20%). Nadalje, nalaz mozaicizma za trisomiju 16 nosi 3-4 puta veći rizik za razvoj preeklampsije (13). Svaki mozaični oblik koji znači razinu 2 ili 3, treba provjeravati iz uzorka plodove vode. U takvim je slučajevima vrlo važna ultrazvučna evaluacija morfologije ploda. Postojanje strukturne anomalije ploda značajno povećava vjerojatnost pravog fetalnog mozaicizma, iako sama promjena nije detektirana u ponovljenom uzorku plodove vode. U takvim slučajevima najvjerojatnije je riječ o tkivno specifičnom mozaicizmu. Određene aneuploidije kao što su trisomija 7 i 9 u pravilu su tkivno-specifične (14). Kod evaluacije kromosomskog mozaicizma, koji uključuje izokromosom 12p (sindrom Pallister-Killian) ili trisomiju 20, uputno je evaluaciju raditi iz kulture plodove vode, jer je u kulturi fetalne krvi izokromosom 12p nestabilna struktura, dok je trisomija 20 najčešće tkivno specifična (15).

Amniocenteza se rabi između 15. i 19. tjedna trudnoće. Zahvat se izvodi transabdominalnim putem pod kontrolom ultrazvuka, pri čemu se aspirira između 15 i 20 mL plodove vode. Istodobno se uspostavljaju dvije ili više primarnih staničnih kultura te se tijekom kultiviranja nadzire rast stanica pod invertnom lupom. U jednoj od staničnih kultura provede se sinkronizacija stanične diobe. Glavni nedostatak

ove metode je vremensko razdoblje potrebno za kultivaciju stanica plodove vode, kako za genske tako i za kromosomske poremećaje, koje iznosi od 10-14 dana. Kromosomski preparati se boje metodom G-pruganja, a prethodi joj tretiranje otopinom tripsina. Pojavnost mozaicizma je oko 0.3%. Stanice plodove vode su heterogena skupina koja sadrži stanice amnijskog epitela, fetalne kože ektodermalnog poddijetla te endodermalne strukture - stanice dišnog i urinarnog trakta. Sve ove strukture razvijaju se iz epiblasta, koji je embrionalna osnova. Rizik gubitka trudnoće iznosi oko 0.5% (2). Metilacijski testovi tijekom trudnoće isključivo se rade iz kulture plodove vode (16).

Kordocenteza ili perkutana aspiracija krvi pupkovine (engl. *percutaneous umbilical blood sampling*, PUBS) najčešće se provodi između 18. i 22. tjedna trudnoće. Udio fetalnih stanica u dobivenom uzorku određuje se Kleihauer-Betkeovim testom, nakon čega se krv nasađuje u kompletni hranjivi medij. Limfociti fetalne krvi kultiviraju se u razdoblju od 48-72 sata uz provedbu sinkronizacije stanične diobe dodavanjem florodeoksiuridina (FUdR) i timidina, a preparati se bojaju metodom G-pruganja. Rizik gubitka trudnoće je nešto viši nego kod CVS-a i amniocenteze te iznosi oko 1-2%. Stoga je to metoda koja se danas najrijeđe primjenjuje u prenatalnoj dijagnostici. Prednost kordocenteze je izravan pristup fetalnom tkivu i brzo dobivanje rezultata (17).

Sam izbor tipa invazivne dijagnostike ovisi o procjeni individualnog rizika za rađanje kromosomski ili genski bolesnog ploda. Biopsija korionskih resica je definitivno metoda izbora kod genskih poremećaja u obitelji koja ima poznatu mutaciju te kod ultrazvučnih biljega prvog tromjesečja trudnoće (prvenstveno se odnosi na povećanu nihalnu prozirnost). Trudnice koje u svojoj reproduktivnoj anamnezi imaju dijete ili su imale trudnoću s nekim tipom kromosomskog poremećaja, u pravilu biraju ranu dijagnostičku metodu.

Zagađenje majčinim stanicama javlja se u 1% dugotrajnih i u manje od 0,1% kratkotrajnih kultura korionskih resica. Porast majčinih stanica može se uočiti tijekom citogenetske analize, zbog prisutnosti dviju staničnih linija - jedne s normalnim ženskim i druge s normalnim muškim kariotipom kod muškog ploda ili mozaičnog kariotipa s kromosomski abnormalnom i normalnom staničnom linijom kod ženskog ploda. U manjem broju slučajeva može doći do potpunog prerastanja fetalne kulture majčinim stanicama. Kod ženskog se ploda ne može na osnovi morfologije kromosoma odrediti njihovo podrijetlo. Kod plodovih voda zagađenje majčinim stanicama se javlja u 0,17% kultura kod muških plodova i u 0,34% kultura kod ženskih. Izračunati rizik nalaženja samo majčinih stanica iz kulture plodove vode iznosi oko 0,008% (1/13 000). Kod trudnice s rizikom za rađanje djeteta s Downovim sindromom od 1/40, rizik nalaženja samo majčinih stanica iznosi 1/520 000. Kod nepodudaranja

spolnog kromosomskog komplementa i ultrazvučnog nalaza spola ploda moramo uzeti u obzir i mogućnost da je posrijedi poremećaj diferencijacije spola (18).

U slučaju dijagnostike kromosomskog ili genskog poremećaja ploda neizostavan dio postupnika u trudnoći je informiranje roditelja kroz genetičko savjetovanje. Roditeljima se pritom pruža informacija o prirodi, težini, prognozi i etiologiji promjene, mogućim rizicima i ishodima trudnoće, utjecaju na potomstvo te vjerojatnosti ponavljanja u idućim trudnoćama.

### INVAZIVNA DIJAGNOSTIKA KOD BLIZANAČKIH TRUDNOĆA

Blizanačke trudnoće su poseban izazov u prenatalnoj dijagnostici kromosomskih i genskih poremećaja. Uvođenjem metoda potpomognute oplodnje i novih protokola stimulacije, značajno se povećao broj višeplođnih trudnoća (19). Isto tako omogućilo se praćenje broja vraćenih zametaka, a time i mehanizama nastajanja blizanačkih trudnoća. S obzirom na to da su višeplođne trudnoće povezane s povećanim rizikom za prijevremeni porođaj, intrauterini zastoj u rastu ploda te perinatalni mortalitet i morbiditet, danas se praksa vraćanja većeg broja zametaka nakon postupaka medicinski potpomognute oplodnje sve više napušta (20). Iako su preporuke strukovnih društava da se u materijšte vrati samo jedan zametak, na zahtjev pacijenta mogu se vratiti i dva zametka, a u slučajevima ponavljanih neuspjelih postupaka kod žena starijih od 38 godina, žena s nepovoljnim testovima pričuve jajnika, onkoloških bolesnika i težih oblika muške neplodnosti dopušteno je vraćanje triju zametaka (21). Godine 2010. u Europi je udio blizanačkih trudnoća nakon postupaka IVF-a/ICSI-a iznosio 19,6%, nakon vraćanja zamrznutih zametaka 12,5%, a nakon intrauterine inseminacije 9,6% (22). Ipak, u razdoblju od 2000. do 2010. godine uočava se trend smanjenog broja višeplođnih trudnoća, i to sa 26,9% na 20,6% (23). Također je uočena dvostruko veća pojavnost monozigotnih blizanaca kod trudnoća začelih medicinski potpomognutom oplodnjom u odnosu na spontana začeca, što se pak povezuje s postupkom vraćanja blastociste u materijšte i primjenom metode intracitoplazmatske injekcije spermija (engl. *intracitoplazmatic sperm injection*, ICSI) (24). Oko 70% spontano začelih blizanačkih trudnoća je dizigotno, dok je oko 30% njih monozigotno. Pojavnost monozigotnih blizanaca iznosi 3-4 na 1000. Nastaju dijeljenjem zigote u ranom embrionalnom razdoblju; tijekom triju dana nakon oplodnje nastaju bikorijalni biamnijski (25-30%), između 4. i 8. dana monokorijalni biamnijski (70-75%) i nakon 8. dana monokorijalni monoamnijski blizanci (2-3%) (25). Pojam istovjetnosti monozigotnih blizanaca je zapravo upitan kad znamo da oni mogu biti različitog kromosomskog statusa kao posljedica mitotskog postzigot-

nog nerazdvajanja u ranom embrionalnom razdoblju (26). Monozigotni blizanci istovjetnog kromosomskog statusa mogu na molekularnoj razini biti različiti zbog epigenetskih mehanizama kontrole ekspresije gena i pojave UPD-a. Posebice je važno istaknuti problem interpretacije učinka nasumične inaktivacije kromosoma X kod monozigotnih blizanki, gdje je majka nositeljica X-vezane recesivne bolesti (27, 28).

Kod dizigotnih blizanaca također je utvrđena međusobna izmjena stanica u fetalnom razdoblju. Istraživanje Fidllera M. i sur. (29), primjenom FISH proba za najčešće trisomije i spolne kromosome, pokazalo je da kod dizigotnih blizanaca različitog spola fetalno-fetalna kontaminacija iznosi oko 11% nakon biopsije korionskih resica. Isto tako monozigotni blizanci pokazuju mikrokimerizam hematopoetskih stanica njihovom izmjenom kroz placentalne vaskularne anastomoze. Kordocenteza nije prava metoda izbora za citogenetičku analizu kod blizanačkih trudnoća. Postnatalna kromosomska analiza iz perifernih krvi monozigotnih blizanaca različitog kromosomskog statusa (mozaicizam u jednog blizanca dijagnosticiran tijekom trudnoće), može dati lažno pozitivan nalaz kod drugog blizanca naizgled urednog nalaza (30). Normalan kromosomski status kod drugog blizanca može biti naizgled uredan, jer ne možemo u potpunosti isključiti prisutnost kriптиčkog mozaicizma u drugim tkivima. Treba još jednom naglasiti da je mogućnost otkrivanja suprotnih kromosomskih poremećaja i tkivno specifičnog mozaicizma vrlo ograničena zbog ograničene rezolucije svjetlosnog mikroskopa i broja metafaza dostupnih za analizu. Usporedna analiza nakon rođenja može se provesti na obrisku bukalne sluznice primjenom FISH metode na ciljnu kromosomopatiju. Kyono (31) iznosi 30- godišnje iskustvo kliničkog embriologa, naglašavajući da nisu zamijetili spontanu diobu dvostaničnog zametka, kao mehanizam nastajanja jednojajčanih blizanaca, već je to vjerojatno proces koji se događa kasnije prije stadija blastociste. Knopman i sur. (32) imaju isto iskustvo u pogledu dijeljenja zametka kod monozigotnih bikorijalnih biamnijskih trudnoća. Monozigotni blizanci različitog kromosomskog statusa opisani su za trisomiju 13, 21, 18, različita strukturna razmještanja (prstenasti kromosom, delecije, nebalansirane translokacije) i anomalije spolnih kromosoma (33-36). U najvećem broju slučajeva su mozaični oblici, rijetko je riječ o naoko punoj trisomiji. Udio aneuploidnih stanica ovisi o vremenu kad se mutacijski događaj zbije. Što je udio aneuploidnih stanica veći, to je ranija faza njihovog nastajanja. Kod drugog naizgled normalnog blizanca ne možemo nikad u potpunosti isključiti tkivno specifičan mozaicizam, jer smo ograničeni vrstom fetalnih stanica za analizu. Kod prenatalne dijagnostike blizanačkih trudnoća, najbolja tehnika izbora je amniocenteza. Kao rani ultrazvučni biljeg korioniciteta određuje se postojanje  $\lambda$  znaka koji upućuje na dizigotnu trudnoću.



Amniocenteza je tehnika izbora, uzorci se trebaju uzeti iz svake amnijske vreće, ako jedan ili oba blizanca imaju ultrazvučno dijagnosticirane abnormalnosti, čak i kad su blizanci monozigotni. Ako se uzima uzorak plodove vode za kromosomsku analizu, uputno je dio uzorka poslati na analizu mikrosatelitnih lokusa za potvrdu zigociteta koja je zlatni standard.

## ZAKLJUČAK

Prenatalna dijagnostika kromosomopatija u trudnoći provodi se citogenetičkom analizom fetalnih stanica. Različiti tipovi stanica rabe se ovisno o tjednu trudnoće kad se dijagnostika provodi: kultura korionskih resica, odnosno tkiva posteljice, stanica plodove vode ili krvi iz pupkovine. Procjene indikacije za primjenu pojedine tehnike invazivne dijagnostike ovisi o izračunu individualnog rizika za rađanje kromosomski ili genski bolesnog djeteta. Kod visokih rizika prva metoda izbora je biopsija korionskih resica, kojom se iz nativnog uzorka dobivenog bioptata može izolirati dovoljna količina DNA za molekularne analize. Kromosomska analiza se primjenjuje u slučajevima povećane nuhalne prozirnosti ili drugog ranog biljeaga kromosomopatija ili majčine anksioznosti zbog prethodne trudnoće s kromosomopatijom. Amniocenteza je tehnika izbora kod primjene metilacijskih testova u prenatalnom razdoblju. Ona je i najraširenija tehnika citogenetičke dijagnostike, jer nosi najmanji rizik za najteže komplikacije i gubitak trudnoće nakon zahvata. Citogenetička i molekularna prenatalna dijagnostika kod blizanačkih trudnoća poseban je izazov. Pojam koji izjednačava monozigotne trudnoće s istovjetnim blizancima odavno je odbačen. Zbog različitih mehanizama nastajanja aneuploidije u postzigotnom razdoblju i monozigotni blizanci mogu se kromosomski razlikovati. Obično je riječ o mozaičnim oblicima. Monozigotni blizanci istovjetnog kromosomskog statusa mogu se razlikovati na molekularnoj razini zbog epigenetskih mehanizama kontrole ekspresije gena i pojave uniparentne disomije. Zbog pojave mikrokimerizma hematopoetskih stanica, kako u monozigotnih tako i u dizigotnih blizanaca, krv nije odgovarajući uzorak za citogenetičku analizu. Razlučivanje pravog od lažno pozitivnog mozaicizma kod blizanaca najbolje je provesti FISH ili molekularnom analizom stanica bukalne sluznice. Metoda izbora kariotipizacije blizanačkih trudnoća je amniocenteza, kojom se iz svake amnijske vreće uzima uzorak, posebice u slučajevima monozigotnih blizanaca, od kojih jedan pokazuje velike strukturne anomalije.

### Kratice:

CPM – engl. *confined placental mosaicism* - mozaicizam ograničen na posteljicu

CVS – engl. *chorionic villus sampling* - biopsija korionskih resica

FISH – engl. *fluorescence in situ hybridization*, fluorescencijska *in situ* - hibridizacija

IVF – engl. *in vitro fertilization* - izvantjelesna oplodnja

ICSI – engl. *intracytoplasmic sperm injection* - intracitoplazmatska injekcija spermija

UPD – engl. *uniparental disomy* - uniparentna disomija

PCR – engl. *polymerase chain reaction* - lančana reakcija polimeraze

STR – engl. *short tandem repeat* - kratka uzastopna ponavljanja

### NOVČANA POTPORA/FUNDING

Nema/None

### ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL

Nije potrebno/None

### DOPRINOSI AUTORA/DECLARATION OF AUTHORSHIP

Svi autori jednako su doprinijeli izradi rada/*All authors have equally contributed to a manuscript writing*

### SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST

Autori su popunili *the Unified Competing Interest form* na [www.icmje.org/coi\\_disclosure.pdf](http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf) (dostupno na zahtjev) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju financijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati na objavljeni rad./*All authors have completed the Unified Competing Interest form at www.icmje.org/coi\_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.*

## LITERATURA

1. Wellesley D, Dolk H, Boyd PA, et al. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population - based congenital anomaly registers in Europe. *Eur J Hum Genet.* 2012;20:521-6. <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2011.246>
2. Alfirevic Z, Sundberg K, Brigham S. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;3:CD003252. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd003252>
3. Cotter PD, Musci TJ, Norton ME. Rapid prenatal diagnosis in translocation carriers by interphase FISH with chromosome-specific subtelomere probes. *Am J Med Genet A.* 2003;122A:1-5. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.20233>
4. Pavlinić D, Džijan S, Stipoljev F, Wagner J, Čurić G, Lauc G. Quantitative fluorescent PCR- a rapid approach to prenatal diagnostics of common autosomal aneuploidies. *Acta Chem Croat* 2008;81:219-22.
5. Cirigliano V, Voglino G, Canadas MP, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18,000 consecutive clinical samples. *Mol Hum Reprod.* 2004;10:839-46. <http://dx.doi.org/10.1093/molehr/gah108>
6. Barber JCK. An investigation of euchromatic cytogenetic imbalances without phenotypic effect. PhD thesis. 2000. University of Southampton.
7. Gardner RJM, Sutherland GR. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling.* 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Oxford University Press; 2004.
8. Vičić A, Stipoljev F. Biopsija korionskih resica. *Paediatr Croat.* 2013;57:392-9.
9. Jorge P, Mota-Freitas MM, Santos R, Luz Silva M, Soares G, Fortuna AM. A 26-year experience in chorionic villus sampling prenatal genetic diagnosis. *J Clin Med.* 2014;3:838-48. <http://dx.doi.org/10.3390/jcm3030838>
10. Stipoljev F, Latin V, Kos M, Miskovic B, Kurjak A. Correlation of confined placental mosaicism with fetal intrauterine growth retardation. A case control study of placentas at delivery. *Fetal Diagn Ther.* 2001;16:4-9. <http://dx.doi.org/10.1159/000053871>

11. Robinson WP, Pe-aherrera MS, Jiang R, et al. Assessing the role of placental trisomy in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn.* 2010;30:1-8.
12. Baffero GM, Somigliana E, Crovetto F, et al. Confined placental mosaicism at chorionic villous sampling: risk factors and pregnancy outcome. *Prenat Diagn.* 2012;32:1102-8. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.3965>
13. Yong PJ1, Langlois S, von Dadelzen P, Robinson W. The association between preeclampsia and placental trisomy 16 mosaicism. *Prenat Diagn.* 2006;26:956-61. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.1534>
14. Wolstenholme J. Confined placental mosaicism for trisomies 2, 3, 7, 8, 9, 16, and 22: their incidence, likely origins, and mechanisms for cell lineage compartmentalization. *Prenat Diagn.* 1996;16:511-24. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0223\(199606\)16:6<511::AID-PD904>3.0.CO;2-8](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0223(199606)16:6<511::AID-PD904>3.0.CO;2-8)
15. Daniel A, Wu Z, Darmanian A, Malafiej P, et al. Issues arising from the prenatal diagnosis of some rare trisomy mosaics - the importance of cryptic fetal mosaicism. *Prenat Diagn.* 2004;24:524-36. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.936>
16. Kotzot D. Prenatal testing for uniparental disomy: indications and clinical relevance. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;31:100-5. <http://dx.doi.org/10.1002/uog.5133>
17. Piyamongkol W, Wanapirak C, Sirichotiyakul S, Srisupundit K, Tongsong T. A comparison of cordocentesis outcomes between early and conventional procedures. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25:2298-301. <http://dx.doi.org/10.3109/14767058.2012.691577>
18. Vlatkovic IB, Hafner T, Miskovic B, Vivic 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;17:1-6. <http://dx.doi.org/10.1515/jpm-2013-0279>
19. Blondel B, Kaminski M. Trends in the occurrence, determinants, and consequences of multiple births. *Semin Perinatol.* 2002;26:239-49. <http://dx.doi.org/10.1053/sper.2002.34775>
20. British Fertility Society, Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. In Vitro Fertilisation: Perinatal Risks and Early Childhood Outcomes. 2012; [https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/scientific-impact-papers/sip\\_8.pdf](https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/scientific-impact-papers/sip_8.pdf)
21. Zakon o medicinski potpomognutoj oplodnji, Narodne novine 86/2012.
22. Kupka MS, Ferraretti AP, de Mouzon J, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2014;29:2099-113. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deu175>
23. Andersen AN, Gianaroli L, Felberbaum R, de Mouzon J, Nygren KG; European IVF-monitoring programme (EIM), European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2005;20:1158-76. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deh755>
24. Vitthala S, Gelbaya TA, Brison DR, Fitzgerald CT, Nardo LG. The risk of monozygotic twins after assisted reproductive technology: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2009;15:45-55. <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmn045>
25. Redline RW. Nonidentical twins with a single placenta - Disproving dogma in perinatal pathology. *New Engl J Med.* 2003;349:111-4. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMp030097>
26. Machin G. Non-identical monozygotic twins, intermediate twin types, zygosity testing, and the non-random nature of monozygotic twinning: A review. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.* 2009;151C:110-27.
27. Smith AC, Rubin T, Shuman C, et al. New chromosome 11p15 epigenotypes identified in monozygotic twins with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Cytogenet Genome Res.* 2006;113:313-7. <http://dx.doi.org/10.1159/000090847>
28. Bennett CM, Boye E, Neufeld EJ. Female monozygotic twins discordant for hemophilia A due to nonrandom X-chromosome inactivation. *Am J Hematol.* 2008;83:778-80. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.21219>
29. Fiddler M, Frederickson MC, Chen PX, Pergament E. Assessment of fetal status in multiple gestation pregnancies using interphase FISH. *Prenat Diagn.* 2001;21:196-9. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0223\(200103\)21:3<196::AID-PD26>3.0.CO;2-I](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0223(200103)21:3<196::AID-PD26>3.0.CO;2-I)
30. Bourthoumieu S, Yardin C, Terro F, et al. Monozygotic twins concordant for blood karyotype, but phenotypically discordant: a case of "mosaic chimerism". *Am J Med Genet A.* 2005;135:190-4. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.30674>
31. Kyono K. The precise timing of embryo splitting for monozygotic dichorionic diamniotic twins: when does embryo splitting for monozygotic dichorionic diamniotic twins occur? Evidence for splitting at the morula/blastocyst stage from studies of the in vitro fertilization. *Twin Res Hum Genet* 2013;16:827-32. <http://dx.doi.org/10.1017/thg.2013.32>
32. Knopman J, Krey LC, Lee J, Fino ME, Novetsky AP, Noyes N. Monozygotic twinning: An eight-year experience at a large IVF center. *Fert Steril.* 2010;94:502-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.064>
33. Wong Ramsey K, Slavin TP, Graham G, Hirata GI, Balaraman V, Seaver LH. Monozygotic twins discordant for trisomy 13. *J Perinatol.* 2012;32:306-8. <http://dx.doi.org/10.1038/jp.2011.123>
34. Tauwinklova G, Gaillyova R, Travník P, et al. Monozygotic twins with discordant karyotypes following preimplantation genetic screening and single embryo transfer: case report. *J Assist Reprod Genet.* 2010;27:649-55. <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-010-9462-z>
35. Zeng S, Patil SR, Yankowitz J. Prenatal detection of mosaic trisomy 1q due to an unbalanced translocation in one fetus of a twin pregnancy following in vitro fertilization: A postzygotic error. *Am J Med Genet.* 2003;120A:464-9. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.20189>
36. Reuss A, Gerlach H, Bedow W, et al. Monozygotic twins discordant for trisomy 18. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;38:727-8. <http://dx.doi.org/10.1002/uog.8978>

## SUMMARY

## Advantages and limitations of invasive prenatal diagnosis

F. Stipoljev, A. Vičić

*Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities comprises cytogenetic analysis of fetal cells obtained after one of the routine invasive techniques, i.e. chorionic villus sampling, placentocentesis, amniocentesis, or cordocentesis. The choice of the type of invasive procedure is primarily based on individual combined calculation of all risk factors of having a chromosomally abnormal child. An important factor for the patient to decide to undergo an invasive procedure is the chance of pregnancy loss as the worst scenario. The problems that can arise in prenatal diagnosis of chromosomal disorders are different types of mosaic forms and difficulty to distinguish true fetal mosaicism from pseudomosaicism, the risk of missing a subtle anomaly due to the limitation of resolution of light microscopy, and maternal cell contamination. In these cases, some of molecular diagnostic procedures are performed. There is an increasing number of twin pregnancies after stimulation protocols and use of some of the techniques of in vitro fertilization procedures in the infertility treatment. Differentiation of monozygotic and dizygotic pregnancies is possible by applying microsatellite analysis. Chromosomal discordance in twin pregnancies in most cases is caused by postzygotic nondisjunction, and is recorded both in monozygotic and dizygotic twins. Amniocentesis is the technique of choice, and karyotyping from both amniotic sacs is recommended, especially in cases where one fetus has major structural malformations.*

**Keywords:** chromosome aberrations; prenatal diagnosis; pregnancy, twin