
Feodora
STIPOLJEV

TEHNIKE PRENATALNE I
PREIMPLANTACIJSKE
DIJAGNOSTIKE

Praktična primjena molekularne genetike u medicini počela je prije 15 godina, kad je 1985. godine Karl Mullis razvio tehniku nazvanu lančana reakcija polimeraze (*PCR-polymerase chain reaction*) koja je omogućila korištenje minimalnih uzoraka DNA i njihova umnožavanja milijun puta tako da uzorci mogu biti analizirani. Danas, genetičari razumiju metaboličku osnovu za nekoliko stotina nasljednih bolesti. Istraživači su izolirali mutantne gene za cističnu fibrozu, Duchenneovu mišićnu distrofiju, Huntingtonovu bolest, sindrom fragilnog X, neurofibromatozu, Alzheimerovu bolest, obiteljsku hiperkolesterolemiju, adultni oblik policistične bolesti bubrega i još mnogo drugih nasljednih bolesti. Također, istraživanja genetske osnove ponašanja i osobnosti čovjeka pokazala su da geni mogu imati važnu ulogu u poremećaju spolnosti i alkoholizmu. Odnedavno su poznati defektni geni koji su vezani za nastanak mentalnih bolesti, kao što su shizofrenija i manično-depresivna bolest.

Prenatalna dijagnostika

Prenatalna dijagnostika obuhvaća sve metode koje se koriste za otkrivanje nasljednih, stečenih, funkcijskih i morfoloških poremećaja ploda.

Downov sindrom, trisomija 21 ili mongolizam najzastupljeniji je kromosomski poremećaj među novorođenčadi. Na svakih 650 novorođenčadi rađa se jedno mongoloidno dijete, s neznatno većom zastupljenošću muške u odnosu na žensku djecu.

U oko 95% slučajeva radi se o slobodnom ili regularnom tipu Downova sindroma s prekobrojnim kromosomom 21. Slobodni oblik posljedica je nerazdvajanja homolognih kromosoma u mejotičkoj diobi spolnih stanica roditelja. To nerazdvajanje događa se prije oplodnje, a posljedica toga jest da sve stanice imaju 47 kromosoma. U 1-2% slučajeva nerazdvajanje se događa za vrijeme mitotskih

dioba stanica nakon oplodnje. Tada nastaje mozaični oblik Downova sindroma. Postoji i translokacijski oblik koji se nalazi u 3–4% djece s Downovim sindromom. Taj oblik nastaje na dva načina. Prvi je ako je jedan od roditelja nositelj balansirane translokacije u koju je uključen kromosom 21, te bolesno dijete nasljeđuje dva kromosoma 21 od oca i majke i još jedan kao višak kromosomske mase skriven translokacijom. Drugi je način ako su kariotipovi roditelja normalni, a translokacija je nastala *de novo*. Poseban je problem postojanje balansirane translokacije 21:21 kod jednog od roditelja bolesnog djeteta. Taj tip translokacije nosi 100% nasljeđivanje patološkog kariotipa i takvi roditelji nemaju šanse imati vlastito zdravo dijete. Ovisno o tome tko je od bračnih partnera nositelj takve translokacije može se savjetovati donacija sjemena ili jajne stanice nepoznata donatora.

Uočeno je da se učestalost određenih kromosomopatija, npr. sindrom Down, povećava s dobi majke, rastući eksponencijalno nakon 30. godine. Dob majke najčešća je indikacija prenatalne citogenetske dijagnostike (Tablica 1). Između 16. i 18. tjedna trudnoće pojava kromosomskih abnormalnosti je 30% veća nego kod živorođene djece zbog visoke učestalosti spontana gubitka takvih trudnoća.

Prenatalna dijagnostika obuhvaća sve trudnice koje imaju 35 i više godina u terminu poroda. Granična dob nije precizno određena i prenatalna dijagnostika može obuhvatiti i mlađe trudnice. Niska vrijednost α -fetoproteina u serumu majke može upozoravati na povećan rizik rađanja fetusa s Downovim sindromom, te takve trudnice također trebaju biti upućene u genetsko savjetovanje. U prenatalnu dijagnostiku uključene su obvezatno i trudnice koje su prethodno rodile dijete s Downovim sindromom. Posljednjih godina ultrazvuk se široko primjenjuje kao neinvazivna metoda probira fetusa s ultrazvučnim biljezima u populaciji žena mlađih od 35 godina, koji ukazuje na povećan rizik rađanja ploda s kromosomskim poremećajem.

Tehnike prenatalne dijagnostike su invazivne metode, ali s malim rizikom za zdravlje trudnice i ploda. Na našoj klinici udio spontanoga gubitka ploda nakon amniocenteze iznosi 0,4%, što je unutar svjetskog prosjeka.

Najčešća metoda prenatalne dijagnostike jest *rana amniocenteza*, kad se transabdominalnim putem punkтира plodova voda za daljnju analizu. Radi se između 15. i 20. tjedna trudnoće. Nakon 3 tjedna dobivamo numerički i strukturno određen kromosomski status ploda. U najvećem broju slučajeva kultiviraju se stanice plodove vode za cito-

Dob majke	Rizik za sindrom Down	Ukupan rizik za kromosomsku abnormalnost*
20	1/1667	1/526
21	1/1667	1/526
22	1/1429	1/500
23	1/1429	1/500
24	1/1250	1/476
25	1/1250	1/476
26	1/1176	1/476
27	1/1111	1/455
28	1/1053	1/435
29	1/1000	1/417
30	1/952	1/384
31	1/909	1/384
32	1/769	1/323
33	1/625	1/286
34	1/500	1/238
35	1/385	1/192
36	1/294	1/156
37	1/227	1/127
38	1/175	1/102
39	1/137	1/83
40	1/106	1/66
41	1/82	1/53
42	1/64	1/42
43	1/50	1/33
44	1/38	1/26
45	1/30	1/21
46	1/23	1/16
47	1/18	1/13
48	1/14	1/10
49	1/11	1/8

Tablica I.

Rizik dobivanja živorođenog djeteta sa sindromom Down ili drugom kromosomskom abnormalnošću

* 47, XXX nije uvrštena od 20. do 32. godine (podaci nisu dostupni)

Napomena: Podaci iz Hook, E. B. (1981), Rates of chromosome abnormalities at different maternal ages. *Obstetrics and Gynecology*, 58:282-285; and Hook, E. B., Cross P. K., Schreinemachers D. M. (1983), Chromosomal abnormality rates at amniocentesis and in live-born infants. *Journal of the American Medical Association*, 249:2034-2038.

Tablica 2.
Odabrane Mendelske bolesti
za koje je prenatalna
dijagnostika moguća*

Bolest	Učestalost	Naslijeđivanje	Prenatalna dijagnostika
Cistična fibroza	1/1500 u bijeloj populaciji	autosomno recesivno	molekularne tehnike na SAF ili CR; mikrovilni intestinalni enzim (plodova voda)
Kongenitalna adrenalna hiperplazija	1/10000	autosomno recesivna	molekularne tehnike na SPV ili CR; prenatalna terapija dostupna
Duchenne tip mišićne distrofije	1/3300 rođene muške djece	X-vezana recesivna	molekularne tehnike na SPV ili KR
Hemofilija A ili KR	1/8500 rođene muške djece	X-vezana recesivna	molekularne tehnike na SPV ili KR; rjeđe kordocenteza
Homozigotna α - i β -talasemija	velike varijacije, ali prisutna u skoro svim populacijama	autosomno recesivna	molekularne tehnike na SPV ili KR
Huntingtonova bolest	4–7/100,000	autosomno dominantna	molekularne tehnike na SPV ili KR
Bolest policističnih bubrega (adultni tip)	1/3000 sa kliničkom dijagnozom	autosomno dominantna	molekularne tehnike na SPV ili KR molekularne tehnike na SPV ili KR
Srpasta anemija	1/400 u Američkih crnaca	autosomno recesivna	direktna DNK analiza na SPV ili KR
Tay-Sachova bolest (GM2-gangliozidoza)	1/3600 Aškenazi židovi i francuski Kanađani; 1/400,000 druge populacije	autosomno recesivna	vrijednosti heksozaminidaze A u kultiviranim SPV ili KR

SPV = stanice plodove vode; KR = korionske resice

* za bolesti koje nisu navedene u tablici ne znači da prenatalna dijagnostika nije dostupna

Pripravljeno uz odobrenje iz Simpson J. L., Elias S. (1989), Prenatal diagnosis of genetic disorders, u: Creasy, R. K., Resnick, R. (eds.) *Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practise*, 2nd ed., Philadelphia: W. B. Saunders, pp 99–102.

genetsku obradu. Nedostatak te metode jest dugotrajnost kultiviranja.

Kordocenteza ili punkcija pupčane vene brza je metoda kariotipizacije ploda. Radi se u drugom trimestru trudnoće, a ponekad i u posljednjem da bi se procijenilo stanje fetusa u određenim patološkim stanjima.

Biopsija korionskih resica radi se u prvom trimestru, između 8. i 12. tjedna trudnoće. Postoje dva tipa kulture: kratkotrajna, kad se dobiju stanice citotrofoblasta i dugotrajna, kad se dobiju stanice stromalnog mezenhima resica. U kasnijim tjednima trudnoće koristi se biopsija posteljice (placentocenteza).

Biopsija kože fetusa tehnika je koja se relativno rijetko koristi, i to uglavnom u dijagnostici nasljednih kožnih bolesti.

U slučaju dobivenog patološkog kariotipa ploda, trudnica se ponovno upućuje na razgovor u genetsko savjetovanište. Ukupno je nađeno 2,52% patoloških kariotipova u skupini trudnica starijih od 35 godina. Najčešća kromosomska bolest bila je sindrom Down, a zatim razni tipovi gonosomopatija. Kad je indikacija za prenatalnu dijagnostiku bio abnormalan ultrazvučni nalaz ploda, udio patoloških kariotipova kretao se od 5 do 75%, ovisno o broju nađenih ultrazvučnih biljega. Najčešća nađena kromosomopatija bila je sindrom Edwards. Budući roditelji obavještavaju se o kvalitetnom i kvantitetnom oštećenju ploda te o mogućnostima liječenja i rehabilitacije bolesnog djeteta. Roditelji donose odluku o nastavku ili prekidu trudnoće s bolesnim plodom.

Preimplantacijska dijagnostika

Preimplantacijska dijagnostika, tj. dijagnostika u razdoblju prije negoli se oplođena jajna stanica ugnijezdila u maternici, počela se razvijati u posljednje 4 godine istodobno s novijim tehnikama medicinski potpomognute oplodnje. Iako tek u eksperimentalnoj fazi, ova metoda pokazuje velike mogućnosti dijagnostike i odabira genetski zdravih embrija. Znatno bi se smanjio rizik rađanja bolesnog djeteta, posebice za bračne parove koji nose veoma visok rizik na određenu genetsku bolest.

Pojam preimplantacijska dijagnostika odnosi se na genetsku analizu zametaka prije implantacije, te se dobiva informacija o majčinu i očevu genomu. Najzastupljenija je metoda biopsije i analize blastomere, gdje su sve stanice totipotentne. Provodi se analiza blastomere osmostaničnog zametka. Savjetuje se biopsija blastomere najkasnije do deseterostaničnog stadija da bi se spriječio poremećaj im-

plantacijskog procesa. Biopsija blastomere mora se napraviti tijekom 12 sati, a ako genetska analiza zahtijeva više vremena, zameti se mogu zamrznuti i vratiti u idućem spontanom ciklusu. Nedostatak te metode jest prisutnost veoma male količine genetskoga materijala. Mogućnost otkrivanja genetskih bolesti odmah nakon oplodnje svakako će dati novo značenje modernoj medicini, posebice ginekologiji. No, zasad se rezultati dobiveni preimplantacijskom dijagnostikom moraju provjeravati jednom od rutinskih invazivnih metoda prenatalne dijagnostike. Genetske bolesti kod kojih je napravljena preimplantacijska dijagnostika cistična fibroza, Tay-Sachsova bolest, srpasta anemija, β -talasemija, Duchenneova mišićna distrofija, hemofilija, Lesch-Nyhanov sindrom, adrenoleukodistrofija, X-vezana mentalna retardacija i α -1-antitripsin deficijencija.

Isolacija fetusnih stanica iz majčine krvi

Invazivne tehnike prenatalne dijagnostike općenito se koriste kod žena s povećanim relativnim rizikom za rađanje malformiranog čeda, utemeljene na obiteljskoj anamnezi, dobi ili testovima probira (AFP, triple-test, ultrasonografija). Da bi se dobio neinvazivni genetski test fetusa, treba zadovoljiti pet koraka: dobivanje odgovarajućeg uzorka majčine krvi koji sadrži fetusne stanice, izolacija fetusnih stanica, genetska analiza izoliranih stanica, prihvaćanje kriterija za vrednovanje testa i razvoj kvalitetnih standardnih kontrola i usporedba s drugim neinvazivnim metodama probira.

Prisutnost fetusnih stanica u majčinoj krvi tijekom trudnoće veoma je dobro poznata. Volumen fetusne krvi mijenja se tijekom gestacije, dok opća načela tog procesa ostaju nerazjašnjena. Većina istraživača smatra da je udio fetusnih stanica u majčinoj krvi 1 prema 1 milijun u 1cm^3 s velikim standardnim devijacijama i varijacijama utemeljenim na gestacijskoj dobi. U fetusnoj krvi najzastupljenija je eritroidna linija, koja je i primaran kandidat pri izolaciji fetusnih stanica. Fetusna je krv uglavnom sastavljena od nukleiranih eritroblasta i drugih ranijih stadija eritroidnih stanica, te se mogu razlikovati od većine majčinih stanica po veličini, konfiguraciji jezgre, hemoglobinskom tipu i površinskim biljezima. Potpuno odvajanje na osnovi morfoloških svojstava nije moguće jer odrasli također imaju nalik na fetusne eritroidne stanice u malom postotku.

Iako eritroidne stanice imaju niz prednosti, trofoblast može ponuditi jedinstvene biljege na površini stanice. Prisutnost trofoblastnih stanica u majčinoj cirkulaciji može se uglavnom objasniti kao rezultat invazivnog procesa za

vrijeme placentacije. Zbog njihova potencijala prema invazivnosti, većina tih stanica će biti mitotski inaktivirana u majčinu optoku. Multinukleirane i enukleirane trofoblastne stanice nisu prikladne za genetsku dijagnozu, te preostaju mononuklearne stanice citotrofoblasta. Međutim, trofoblastni mozaicizam koji nije vezan za fetus potencijalno je ograničenije u korištenju toga tipa stanica.

Danas se koristi više tehnika za izolaciju određenoga staničnog tipa. Protočna citometrija odvaja stanice na osnovi diferencijalnog obilježavanja stanične površine, te radi fluorescencijsku analizu pojedine stanice. Kod tehnike magnetskih mikrosfera stanična površina stanice obilježena je željeznim česticama konjugiranim s protutijelom koje odgovaraju na vanjsko magnetsko polje. Tehnika imobiliziranih čvrstih nosača koristi kolone s reaktivnim skupinama na koje se hvata određen tip stanica. Diferencijalni gradijenti jesu kontinuirani gradijenti specifične gustoće za stanice različite gustoće.

Brz razvoj tehnika molekularne biologije omogućio je i razvoj te metode. Dijagnoza kromosomske aneuploidije zahtijeva upotrebu PCR i FISH (*fluorescence in situ hybridization*) sa specifičnim DNK-probama za određene kromosome.

Najranija mogućnost postavljanja prenatalne dijagnoze jest u preimplantacijskom razdoblju. Dosadašnji mali broj preliminarnih studija napravljen je na jajnim stanicama i embrijima dobivenim iz postupaka izvantjelesne oplodnje kod žena s visokim rizikom za rađanje bolesnog potomstva. Najveći broj genetskih pogrešaka ne uzrokuje ozbiljnija oštećenja vijabilnosti embrija jer učinak monogenetskog defekta nije dovoljno jak da spriječi rani razvoj ploda. Međutim, kromosomski poremećaji, koji su veoma česti kod humanih embrija, teško su spojivi s pravilnim ranim razvojem ploda i u velikom broju slučajeva završavaju ranim spontanom pobačajima. Buduće potencijalno uvođenje preimplantacijske dijagnostike u rutinsku praksu značajno bi smanjilo i broj patoloških trudnoća i prekid takvih trudnoća, a također komplikacije koje mogu nastati nakon induciranog pobačaja ploda.

Istodobno se traži neinvazivna metoda prenatalne dijagnostike umjesto sadašnjih invazivnih metoda (amniocenteza, CVS, kordocenteza) i neinvazivnog biokemijskog probira trudnica pomoću dvohormonskog (double) i trohormonskog testa (triple). Posljednjih nekoliko godina počela se razvijati metoda izolacije fetusnih stanica iz majčine krvi, a zatim testiranja na postojanje aneuploidnih stanica. Temelji se na otkriću da već u 6. tjednu trudnoće fetusne stanice ulaze u optok majčine krvi. Osnovni je

problem te metode dosta visoka cijena jedne pretrage i veoma malo stanica ploda u majčinu optoku. Nadajmo se da će u idućih desetak godina tehnologija pojeftiniti te da će se naći jedinstven biljeg koji bi sa 100%-tnom sigurnošću izdvojio sve stanice ploda. U tom bi slučaju ova metoda postala metodom odabira.

U budućnosti najveći će dio monogenских bolesti biti moguće otkriti i spriječiti. Iznimka će biti nove mutacije jer se neće moći provoditi probir svih plodova na mnoge bolesti. Ali, zasigurno možemo računati da će se razviti bolje, jeftinije i manje agresivne metode za uočavanje fetalnih malformacija. Možemo biti sigurni da će ljudi zasigurno mnogo više razmišljati o etičkim dvojabama, a prvenstveno o svojoj privatnosti, kako saznanje o genetskom statusu nas i naše okoline postaje dostupno cijeloj zajednici.

LITERATURA

1. Verlinsky, Y., Ginsberg, N., Lifchez, A., Valle, J., Moise, J., Strom, C. M. (1990), Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis, *Hum. Reprod.*, 5(7):826-9.
2. Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Caskey, C. T. (1990), Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy, u: Innis, M., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds.), *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*, San Diego: Academic Press, 272-81.
3. Hardy, K., Winston, R. M. L., Handyside, A. H. (1991), Nuclear abnormalities and developmental arrest in human pre-implantation embryos in vitro, *Hum. Reprod.*, 6:152.
4. Bond, D. J., Chandley, A. C. (1983), Aneuploidy, *Oxford Monographs on Medical Genetics*, No. 11. Oxford: Oxford University Press.
5. Hardy, K., Martin, K. L., Leese, H. J., Winston, R. M. L., Handyside, A. H. (1990), Human pre-implantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at 8-cell stage, *Hum. Reprod.*, 5:708-14.
6. Wilton, L. J., Shaw, J. M., Trounson, A. O. (1989), Successful single cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos, *Fertility and Sterility*, 51:513-17.
7. Trounson, A., Mohr, L. (1983), Human pregnancies following cryopreservation, thawing and transfer of an 8-cell embryo, *Nature*, 305: 707-9.
8. Handyside, A. H. (1991), Pre-implantation diagnosis by DNA amplification, u: Chapman, M., Grudzinnnskas, G., Chard, T., Maxwell, D. (eds.), *The embryo: Normal and abnormal Development and growth*, London: Springer-Verlag, 81-90.
9. Verp, M. S., Simpson, J. L. (1985), Amniocentesis for cytogenetic studies, u: Filkins, K. J., Russo, J. F. (eds.), *Human prenatal diagnosis*, New York, 13.
10. Brambati, B., Oldrini, A. (1983), Aladerun. Methods of chorionic villi sampling in first trimester fetal diagnosis, u: Albertini, A. P., Rosignani, P. G. (eds.), *Progress in Perinatal Medicine*, Excerpta Medica, Amsterdam.