

Prenatalna dijagnostika

Izv.prof.dr.sc. Maja Barbalić

Prenatalna dijagnostika podrazumijeva provođenje različitih postupaka, neinvazivnih i invazivnih, kojima se može odrediti zdravstveno stanje ploda tijekom trudnoće s ciljem osiguranja optimalnih uvjeta za rast ploda, razvoj ploda, poroda zdravog novorođenčeta i očuvanja zdravlja trudnice. Uz današnji napredak tehnologije prenatalni dijagnostički postupci nose vrlo malu opasnost za majku i za plod.

Iako se u širem smislu prenatalna dijagnostika odnosi na sve postupke koji daju informaciju u embriju i fetusu, u užem smislu se koristi za otkrivanje različitih abnormalnosti ploda koji imaju genetsku podlogu. Napretkom tehnologija molekularne biologije, sve je veći broj genetskih oboljenja koji mogu biti dijagnosticirani prenatalno. Ovakav razvoj prenatalne dijagnostike također otvara pitanje o rasponu stanja za koje prenatalno testiranje treba biti omogućeno te vrlo često postavlja teške odluke pred buduće roditelje.

Genetski poremećaji koji se mogu dijagnosticirati prenatalno mogu se podijeliti u dvije šire grupe:

1. kromosopatije - poremećaji u broju i strukturi kromosoma
2. monogenske bolesti – bolesti uzrokovane mutacijom u jednom genu

Za dijagnozu bolesti, potreban je uzorak fetalnog tkiva koji se dobiva nekom od invazivnih metoda.

Amniocenteza

Amniocenteza je invazivna metoda koja podrazumijeva aspiraciju 10-20 ml plodove vode kroz trbušnu stijenku pod nadzorom ultrazvuka. U većini slučajeva postupak se izvodi oko 16. tjedna gestacije. Postupak amniocenteze nosi rizik za pobačaj od 0,5-1%. Unutar uzorka plodove vode se nalaze fetalne stanice, većinom stanice fetalne kože i epitela urinarnog trakta. Nakon aspiracije plodove vode uzorak se centrifugira kako bi se stanice odvojile od amnijske tekućine. Odvojene stanice se nasađuju na hranjivi medij (stanična kultura) koji stimulira rast stanica. Nakon otprilike 14 dana stanična kultura se može koristiti za analize, npr za kariotipizaciju.

Biopsija korionskih resica

Biopsija korionskih resica (engl. *Chorionic Villus Sampling-CVS*) se izvodi između 11. i 12. tjedna gestacije. Tijekom biopsije, uz ultrazvučno navođenje aspirira se tkivo korionskih resica uglavnom preko trbuha (transabdominalni put). Uzorak biopsije je fetalnog podrijetla, ali se u uzorku može naći i tkivo decidue (mukozna mebrana maternice) koje je majčinog podrijetla te je nužno njegovo uklanjanje prije bilo kakve obrade uzorka. Prednost biopsije korionskih resica je veća količina biološkog materijala te to što se provodi već u prvom tromjesečju trudnoće. Postupak biopsije korionskih resica nosi rizik za spontani pobačaj koji iznosi 1-2%.

Kordocenteza

Kordocenteza obuhvaća transabdominalnu aspiraciju fetalne krvi iz žila koje se nalaze u pupkovini. Izvodi se uglavnom nakon 21. tjedna trudnoće. Fetalna krv se može koristiti za analizu kromosoma kako bi se ispitala prisutnost mozaicizma (ustanovljenog nakon amniocenteze ili biopsije korionskih resica), ukoliko kultura stanica iz plodove vode nije uspjela ili u slučaju kad se kasno (krajem drugog tromjesečja) ustanove malformacije ploda.

Citogenetičke i molekularno-biološke metode prenatalne dijagnostike - kromosomopatije

Citogenetičke i molekularno-biološke metode se koriste za prenatalnu dijagnozu bolesti iz fetalnog uzorka dobivenog nekom od navedenih invazivnih postupaka. Metode se razlikuju po rezoluciji (tj. veličini genomskog segmenta koji se može detektirati) i pokrivenosti genoma (da li su 'ciljane' samo na određena područja ili su cjelogenomske).

Kariotipizacija

Kariotipizacija se danas univerzalno koristi u gotovo svakom citogenetičkom laboratoriju za analizu strukture i broja kromosoma. Kariotipizacija se provodi na staničnoj kulturi koja se dobiva nasađivanjem fetalnih stanica na hranjivi medij. Kromosomska analiza podrazumijeva pripremu kromosomskih preparata nekom od metoda pruganja (najčešće G pruganjem ili rjeđe C ili R pruganjem) i njihovu analizu pod svjetlosnim mikroskopom. Iako se kariotipizacija pokazala iznimno korisnom te se koristi unazad 40 godina, postoje određena ograničenja metode kao što je mala rezolucija (5-10 Mb) i mogućnost neuspjeha stanične kulture i tehničkih poteškoća tijekom postupka. Zbog navedenih nedostataka kariotipizacije, sustavno se razvijaju tehnološki naprednije metode.

Fluorescenta in situ hibridizacija (FISH)

Fluorescenta in situ hibridizacija (eng. *Fluorescent In Situ Hybridization*) se temelji na uporabi fluorescentnih proba koje se hibridiziraju na komplementarno mjesto na DNA. Hibridizacija probe i uzorka vidljiva je pod fluorescencijskim mikroskopom. FISH se uspješno koristi u kliničkom okruženju zadnjih 15 godina. Postoji cijeli niz različitih komercijalno dostupnih fluorescentnih proba, kao što su centromerne probe, jednostavne probe za pojedinačne kromosome i telomerne probe. FISH se koristi za analizu ciljanih kromosomskih promjena. Rezolucija FISH-a iznosi od 10 do 100 kilobaza te se koristi u slučajevima gdje postoji rizik pronalaska kromosomskih promjena koje se ne mogu uočiti klasičnom citogenetičkom analizom tj. kariotipizacijom (npr. mikrotelecijski sindromi, subtelomerne promjene), kao potvrdna metoda za već utvrđenu dijagnozu ili kao brza metode otkrivanja aneuploidija (uglavnom kao preliminarna analiza dok se čeka konačan nalaz kariotipa).

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

MLPA metoda (engl. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) omogućava istovremenu kvantifikaciju do 50 različitih DNA sekvenci veličine 50-60 nukleotidnih parova. Metoda se bazira na PCR metodi (lančana reakcija polimerazom – engl. *Polymerase Chain Reaction*), prilikom koje se umnaža proba dodana uzorku, a ne sama testna DNA tj. DNA

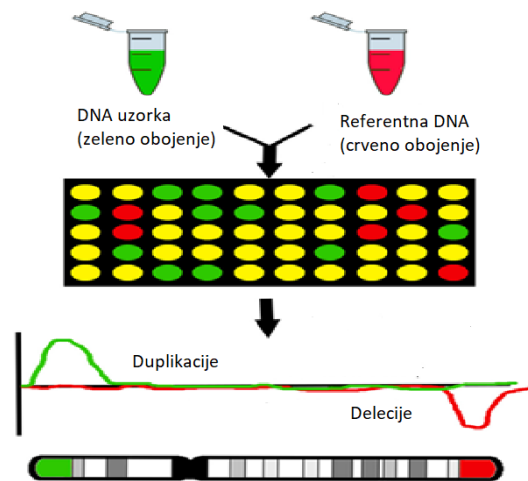
uzorka. Umnažanje probe isključivo ovisi o prisutnosti komplementarne sekvence DNA u uzorku. MLPA je ciljana metoda te može uspješno detektirati promjene u broju kopija genomskih segmenata. MLPA se može koristiti u prenatalnoj dijagnostici za detekciju mikrodelecijskih sindroma, subtelomernih promjena i identifikaciju marker kromosoma.

Kvantitativna fluorescentna lančana reakcija polimerazom (QF-PCR)

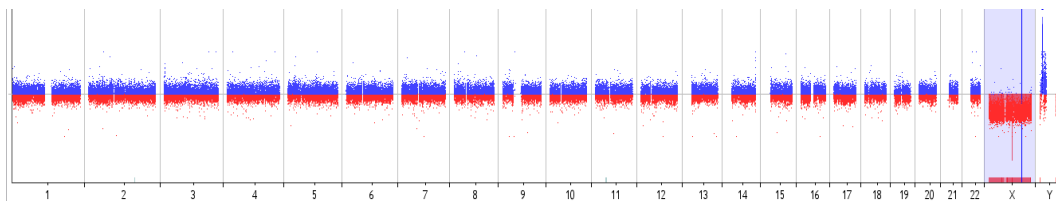
QF-PCR je metoda koja kombinira PCR (lančanu reakciju polimerazom) i fluorescentno obilježavanje u svrhu određivanja aneuploidija. Zasniva se na amplificiranju polimorfnih mikrosatelitnih sekvenci specifičnih za određeni kromosom. QF-PCR je uveden u prenatalnu dijagnostiku zbog potrebe za bržim detektiranjem autosomalnih trisomija (koje predstavljaju 80% značajnih kromosomskih poremećaja). Rezultati su gotovi u roku od 1-2 dana te se obično provode kao preliminarnе analize dok se čeka nalaz kariotipa. Prednost QF-PCR-a u odnosu na FISH je potreba za manjom količinom materijala i jednostavnost postupka.

Komparativna genomska hibridizacija na mikročipu (engl. - array Comparative Genomic Hybridization ; aCGH)

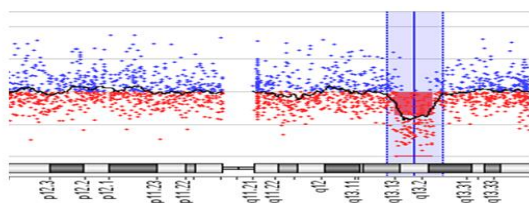
Komparativna genomska hibridizacija na mikročipu se najčešće koristi za analizu čitavog genoma. aCGH je kvantitativna metoda molekularne citogenetike koja otkriva varijacije u broju kopija genomskih segmenata, a koje se manifestiraju kao višak (duplikacije) ili manjak (delecije) genetičkog materijala. Metoda se temelji na fluorescentnom označavanju uzorka i referentne DNA različitim bojama, koje se potom istovremeno hibridiziraju na mikročipove s oligonukleotidima ("probe"). Mikročipovi s oligonukleotidima se sastoje od umjetno sintetiziranih kratkih specifičnih sljedova nukleotida, koji su jedinstvenog redoslijeda u genomu i predstavljaju specifičan odsječak humanog genoma. Razlika u hibridizaciji fluorescentno obojanog uzorka i referentne DNA se detektira kao razlika u intenzitetu boja, što je osnova za procjenu prisutnosti promjene u broju kopija genomskog segmenta. aCGH metoda ima vrlo visoku rezoluciju (do 100 kilobaza). Metoda molekularne kariotipizacije (aCGH) u usporedbi s klasičnom kariotipizacijom ima bolju rezoluciju, daje veću sigurnost pri interpretaciji rezultata, omogućava kraće vrijeme laboratorijskog postupka, ne zahtijeva staničnu kulturu ili određenu fazu diobe stanica. U usporedbi s FISH metodom prednosti aCGH metode su mogućnost analize cijelog genoma odjednom. Glavno ograničenje aCGH metode je nemogućnost otkrivanja balansiranih kromosomskih translokacija i inverzija. Također nedostatak metode predstavlja mogućnost dobivanja rezultata za koje se ne zna klinički značaj (varijante nepoznate značajnosti, engl. *variant of unknown significance*, VUS), što otežava interpretaciju konačnih rezultata.



Slika 1. Postupak komparativne genomske hibridizacije (preuzeto i modificirano od Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM), Lorraine Dugoff, Mary E. Norton, Jeffrey A. Kuller. The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis, American Journal of Obstetrics and Gynecology, Volume 215, Issue 4, Oct 2016)



Slika 2. Grafički rezultat komparativne genomske hibridizacije (primjer Turnerov sindrom)



Slika 3. Prikaz delecije na q kraku kromosoma 20 – rezultat komparativne genomske hibridizacije

Probir na kromosopatije

S obzirom da svi invazivni postupci nose određeni rizik od pobačaja, u praksi se koriste neinvazivne metode probira kao što su mjerenje nuhalnog nabora i biokemijski testovi u prvom i drugom tromjesečju, kojima se utvrđuju visokorizične trudnoće tj. rizik od kromosopatija ploda koji se smatra dovoljnim da opravda primjenu neke od invazivnih metoda. Najčešće se uzima, uz manje varijacije, granica rizika za kromosopatije od 1:250, koja opravdava primjenu neke od invazivnih metoda.

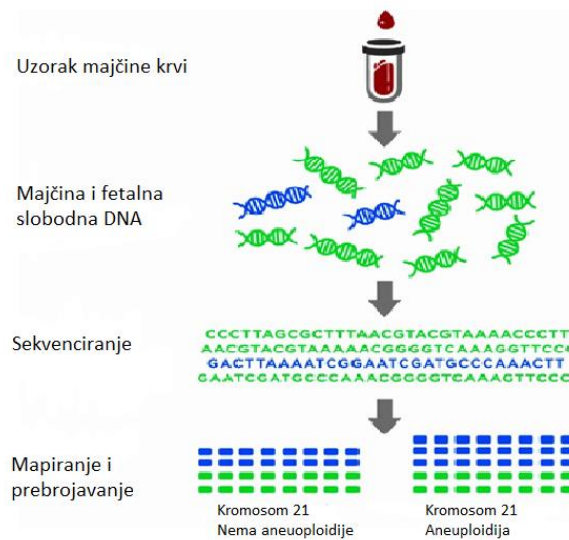
Najčešće se provodi tzv. kombinirani probir koji se provodi u prvom tromjesečju, a uzima u obzir vrijednosti PAPP-A (protein A pridružen trudnoći) i beta-hCG (humani beta korionski gonadotropin) te veličinu nuhalnog nabora. Vrijednosti mjerenja se također kombiniraju s dobi trudnoće (gestacijskom dobi) i životnom dobi trudnice s obzirom da rizik od aneuploidija raste s dobi trudnice. Osjetljivost kombiniranog probira je 85-90% uz 5% lažno pozitivnih rezultata. Ovo znači da će 5 % trudnoća biti pogrešno klasificirano kao visokorizične te će trudnice biti upućene na neki invazivni postupak. Zbog toga se sustavno razvijaju nove metode neinvazivnog probira s ciljem da se poveća pouzdanost probira. U zadnjem desetljeću je razvijena nova metoda neinvazivnog probira (engl. NIPT- *noninvasive prenatal testing*) koja se temelji na analizi slobodne DNA iz krvi majke, a koja pokazuje izuzetno visoku osjetljivost i specifičnost.

Neinvazivno prenatalno testiranje

Neinvazivni prenatalni test (NIPT- engl. *Noninvasive Prenatal Testing*) ispituje slobodnu DNA u majčinoj krvi da bi se odredio rizik za fetalne trisomije 21, 18 i 13. Prisutnost slobodne DNA (sDNA) u plazmi, otkriveno je još 1947. godine. Slobodna DNA nastaje raspadom stanica uslijed programirane stanične smrti (apoptoze) i cirkulira u plazmi u fragmentima veličine oko 200pb. Od 1997. godine je poznato da se u majčinoj krvi za vrijeme trudnoće, osim njene slobodne DNA-a, može naći i slobodna DNA fetusa, sfDNA. Većina sfDNA-a nastaje raspadom stanica posteljice. Ima vrlo kratak poluvijek (oko 16 min) te se vrlo brzo nakon poroda ne može više detektirati u krvi majke. Udio sfDNA u ukupnoj slobodnoj DNA u majčinoj cirkulaciji raste s gestacijskom dobi te iznosi od 3 do 30%.

Većina NIPT testova se zasniva na masivnom paralelnom genomskom sekvenciranju (engl. *massive parallel genomic sequencing*). Metoda podrazumijeva kvantificiranje sekvencioniranih fragmenata DNA. Prvi je korak umnažanje i sekvencioniranje milijuna malih fragmenata slobodne DNA iz majčine krvi (od koje je samo određeni udio fetalna DNA), nakon čega se sekvencionirani fragmenti mapiraju na referentni ljudski genom i kvantificiraju. Da bi se utvrdila aneuploidija, zbroj očitavanja fragmenata na ispitivanom kromosomu se uspoređuje s očekivanim zbrojem očitavanja koje podrazumijeva diploidno stanje npr. fragmenata euoploidnih uzoraka. Rezultati se, s obzirom na prethodno definirane granice, klasificiraju kao aneuploidni ili euoploidni. Razvijene su također ciljane metode, koje umjesto analize cijeloga genoma, selektivno analiziraju samo kromosome od interesa (npr. kromosom 21, 18 i 13).

Za testiranje se uzima 10-20 ml uzorka krvi trudnice, počevši od 10. tjedna trudnoće, kada je koncentracija fetalne DNA dovoljno visoka za laboratorijsku analizu (minimalna koncentracija fetalne DNA mora biti 4%). NIPT test je neinvazivan i izuzetno pouzdan s osjetljivošću i specifičnošću većom od 99%. Koliko god bila dobra osjetljivost i specifičnost NIPT-a, rezultat koji ukazuje na visoki rizik nužno je potvrditi nekom od invazivnih metoda, tj. kariotipizacijom nakon amniocenteze ili biopsije korionskih resica.



Slika 4. Osnove neinvazivnog prenatalnog testiranja (preuzeto i modificirano od http://www.edgc.com/wp-content/uploads/2013/10/be_img1.jpg)

Molekularno-biološke metode prenatalne dijagnostike – monogeneske bolesti

Monogeneske bolesti dijagnosticiraju se klasičnim molekularnim tehnikama poput PCR metode i sekvenciranja DNA izolirane iz fetalnog tkiva, koje služe da bi se potvrdila ili isključila prisutnost patogene mutacije. Zadnjih godina, razvijaju se neinvazivne prenatalne metode (NIPD, eng. *noninvasive prenatal diagnosis*) za ispitivanje poremećaja jednog gena, koje se, slično NIPT-u, zasnivaju na uzorkovanju majčine krvi te izolaciji slobodne DNA. S obzirom da je DNA fetusa tek manja frakcija ukupne slobodne DNA (3-30%), ova metoda još nema dovoljnu osjetljivost i specifičnost da bi bila primjenjiva u rutinskoj praksi.

Literatura:

Feodora Stipoljev, Ana Vičić. Prednosti i ograničenja invazivne prenatalne dijagnostike. *Paediatr Croat.* 2015;59:130-7.

Maja Barbalić, Erden Radončić. Neinvazivno prenatalno testiranje na kromosopatije. *Medix*, Broj 109/110, 2014.

Sian Ellard, Peter Turnpenny. *Emeryjeve osnove medicinske genetike*. 14. izdanje, Medicinska naklada, 2011.

Genetičko informiranje u praksi. Urednice: Vida Čulić, Jasminka Pavelić, Maja Radman. Medicinska naklada, 2016.

Raymond FL, Whittaker J, Jenkins L, Lench N, Chitty LS. Molecular prenatal diagnosis: the impact of modern technologies. *Prenat Diagn.* 2010 Jul;30(7):674-81. doi: 10.1002/pd.2575.

de Jong A, Dondorp WJ, Frints SG, de Die-Smulders CE, de Wert GM. Advances in prenatal screening: the ethical dimension. *Nat Rev Genet.* 2011 Aug 18;12(9):657-63. doi: 10.1038/nrg3036.

Mariluce Riegel. Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. *Genet Mol Biol.* 2014 Mar; 37(1 Suppl): 194–209.

Sparkes R, Johnson JA, Langlois S, Wilson RD, Allen V, Blight C, Désilets V, Gagnon A, Johnson JA, Langlois S, Summers A, Wyatt P. New molecular techniques for the prenatal detection of chromosomal aneuploidy. *J Obstet Gynaecol Can.* 2008 Jul;30(7):617-21, 622-7.