

# Značaj ukupne i fetalne slobodne DNA iz majčine krvi u neinvazivnom otkrivanju fetalnih aneuploidija

---

**Bekavac Vlatković, Ivanka**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2015**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:692277>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-29**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivanka Bekavac Vlatković**

**Značaj ukupne i fetalne slobodne DNA iz  
majčine krvi u neinvazivnom otkrivanju  
fetalnih aneuploidija**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2015.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivanka Bekavac Vlatković**

**Značaj ukupne i fetalne slobodne DNA iz  
majčine krvi u neinvazivnom otkrivanju  
fetalnih aneuploidija**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2015.

Disertacija je izrađena na Klinici za ginekologiju i porodništvo Kliničke bolnice Sveti Duh Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku.

Voditelj rada: doc. dr. sc. Feodora Stipoljev

Zahvaljujem mojoj mentorici, doc. dr.sc. Feodora Stipoljev na nesebičnoj pomoći koju mi je pružila tijekom izrade disertacije.

Hvala na stručnim savjetima prilikom izrade ovog rada.

Hvala doc. dr.sc. Jasenki Wagner.

Hvala Jeli, Bruni, Ani i mojem Bruni

## SADRŽAJ

### POPIS OZNAKA I KRATICA

<b>1. UVOD</b>	1
1.1. Neinvazivni probir fetalnih aneuploidija	3
1.11 Ultrazvučni probir prvog tromjesečja	7
1.12 Biokemijski probir prvog tromjesečja	9
1.2. Slobodna deoksiribonukleinska kiselina (DNA)	11
1.3 Fetalna slobodna deoksiribonukleinska kiselina (DNA)	12
1.31 Biologija fetalne slobodne DNA	14
1.4 Neinvazivna prenatalna dijagnostika korištenjem fetalne slobodne DNA	16
<b>2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA</b>	18
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	19
<b>4. ODABIR ISPITANICA I METODE ISTRAŽIVANJA</b>	20
4.1 Odabir ispitanica	20
4.2 Metode istraživanja	24
4.21 Biopsija korionskih resica	24
4.22 Uzorkovanje krvi i izdvajanje DNA	27
4.23 Kvantifikacija ukupne i fetalne slobodne DNA	28
<b>5. STATISTIČKA RAŠČLAMBA</b>	30
<b>6. REZULTATI</b>	31
<b>7. RASPRAVA</b>	52
<b>8. ZAKLJUČAK</b>	61

<b>9. SAŽETAK</b>	63
<b>10. SUMMARY</b>	64
<b>11. LITERATURA</b>	66
<b>12. ŽIVOTOPIS</b>	74

## POPIS OZNAKA I KRATICA

<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid	deoksiribonukleinska kiselina
<b>PAPP-A</b>	pregnancy associated plasma protein-A	trudnički plazmatski protein-A
<b>HCG</b>	human chorionic gonadotropin	humani korionski gonadotropin
<b>CVS</b>	chorionic villus sampling	biopsija korionskih resica
<b>αFP</b>	alpha-fetoprotein	alfa fetoprotein
<b>IGFBP</b>	insulin growth factor binding protein	protein koji se veže na inzulinu slične čimbenike rasta
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction	lančana reakcija polimeraze
<b>ACZ</b>	amniocentesis	amniocenteza
<b>RACZ</b>	early amniocentesis	rana amniocenteza
<b>MOM</b>	multiple of unaffected median	višekratnik medijana u neugroženim trudnoćama
<b>PLAC4</b>	placenta-specific gene 4	posteljlično-specifičan gen 4
<b>hTERT</b>	human telomerase reverse transcriptase	humana reverzna transkriptaza telomeraze

## 1. UVOD

Kromosomski poremećaji skupina su teških malformacijskih sindroma udruženih s razvojnim i mentalnim zaostajanjem. Zbog toga predstavljaju veliki zdravstveni, ekonomski i sociološki problem šire i uže društvene zajednice. Postavljanje dijagnoze u ranoj trudnoći veoma je važno za odgovarajuće genetsko savjetovanje i pružanje informacija o mogućim poteškoćama još nerođenog čeda. Prenatalna skrb značajnim dijelom obuhvaća metode probira u svrhu otkrivanja trudnica visokog rizika rađanja kromosomski bolesnog ploda. Prvotni probir koji je uključivao dob majke kao jedinu indikaciju za invazivnu prenatalnu dijagnostiku, značajno je smanjio broj novorođene djece s različitim oblicima kromosomskih poremećaja u skupini starijih trudnica. Time se pojavio biološko-statistički paradoks povećanog broja rađanja djece s antenatalno neotkrivenom kromosomopatijom u skupini trudnica mlađoj od trideset pet godina života. Nametnula se potreba za uvođenjem novih neinvazivnih probirnih metoda u skupini mlađih trudnica koje nisu obuhvaćene indikacijama za invazivnu prenatalnu dijagnostiku. Ukupna pojavnost različitih tipova kromosomskih poremećaja kod novorođenčadi iznosi oko 0.4-0.5% (1). Kromosomopatije obuhvaćaju numeričke i strukturne poremećaje, koji su često udruženi s kongenitalnim abnormalnostima i mentalnom retardacijom, te značajno povećavaju perinatalni morbiditet i mortalitet. Udio kromosomopatija u skupini pacijenata s kongenitalnim malformacijama dijagnosticiranim prije prve godine života iznosi 15%, a u skupini letalnih kongenitalnih malformacija kromosomopatije čine 25% perinatalnog mortaliteta (1). Najčešća je kromosomopatija Downov sindrom s pojavnošću od 1 na 700 novorođenih. Udio trudnoća sa sindromom Down je najveći u prvom tromjesečju trudnoće, i opada prema terminu, jer se značajan broj njih spontano pobaci. Od autosomnih aneuploidija slijede po pojavnosti i kliničkom značenju sindrom Edwards (trisomija 18) i sindrom Patau (trisomija 13). Zasebnu skupinu čine poremećaji broja spolnih kromosoma kao što su: sindrom Turner (najčešći oblik 45,X), sindrom trostrukog X kromosoma (47,XXX) kod žena, te Klinefelterov sindrom (47,XXY) i sindrom dvostrukog Y kromosoma (47,XYY) kod muškaraca. Zasebnu skupinu čine strukturni kromosomski poremećaji, koji predstavljaju 20-30% perinatalne patologije kromosomopatija.

Konačna dijagnostika kromosomskih poremećaja postavlja se analizom fetalnih stanica dobivenih biopsijom korionskih resica (engl. chorionic villus sampling- CVS) između 11-14 tjedana trudnoće, ili ranom amniocentezom (RACZ) od 15 do 18 tjedana trudnoće. Ovi postupci su invazivni, neugodni, skupi, tehnike izvođenja i interpretacije nalaza zahtijevaju



posebne vještine i stručnost osoblja, a za posljedicu nose rizik gubitka trudnoće u 0.5 do 1%, te su indicirane u trudnoćama visokog rizika rađanja djeteta s kromosomopatijom. Stoga u većini razvijenih zemalja standardni postupak izračuna individualnog rizika trudnice za rođenje djeteta s kromosomopatijom uključuje korištenje neke od neinvazivnih metoda probira (najčešće se radi o kombinaciji ultrazvučnog i biokemijskog probira), te postavljanje konačne dijagnoze uzimanjem fetalnog uzorka invazivnim zahvatom ukoliko individualni rizik prelazi zadanu granicu rizika od 1:250. Izračun individualnog rizika temelji se na podacima o majčinoj dobi, vrijednostima serumskih biokemijskih biljega i prisustvu/odsustvu ultrazvučnih biljega kromosomopatija (2,3). Srednja pojavnost trisomije 21, 18 i 13 ovisna je o dobi trudnice i trajanju trudnoće, npr. u 12. tjednu trudnoće iznosi 1/1000, 1/2500, 1/8000 kod trudnice od 20 godina u odnosu na 1/250, 1/600 i 1/1800 kod 35-godišnje trudnice, i smanjuje se trajanjem trudnoće, tako da je rizik rođenja djeteta s trisomijom 21 u terminu kod trudnice od 20 godina 1/1500, dok je kod trudnice od 35 godina 1/350 (4). Poremećaji broja spolnih kromosoma neovisni su o dobi majke. Skup majčinih biokemijskih i fetalnih ultrazvučnih biljega u određenoj dobi trajanja trudnoće imaju dokazanu kliničku vrijednost procjene rizika za aneuploidije (2,5). Pri tome trudnice prosuđuju težinu dva moguća nepoželjna ishoda: mogućnost rađanja djeteta sa sindromom Down (najčešća kromosomopatija), ako odbiju dijagnostički postupak ili mogućnost komplikacija trudnoće nakon invazivnog zahvata od kojih je svakako najteži gubitak trudnoće. Donošenje te odluke još je teže u trudnoćama iz postupka medicinski pomognute oplodnje, u žena koje prvi put rađaju u starijoj životnoj dobi ili su imale opetovane spontane pobačaje. Izračun niskog individualnog rizika većinu žena uvjeri da postoji mala vjerojatnost kako plod ima kromosomski poremećaj, te se prihvaćanjem takovog rizika smanjuje broj nepotrebnih invazivnih zahvata. Rezultati probira objašnjavaju se u kontekstu potrebitosti kao i korisnosti odnosno moguće štetnosti invazivne dijagnostike.

### 1.1. Neinvazivni probir fetalnih aneuploidija

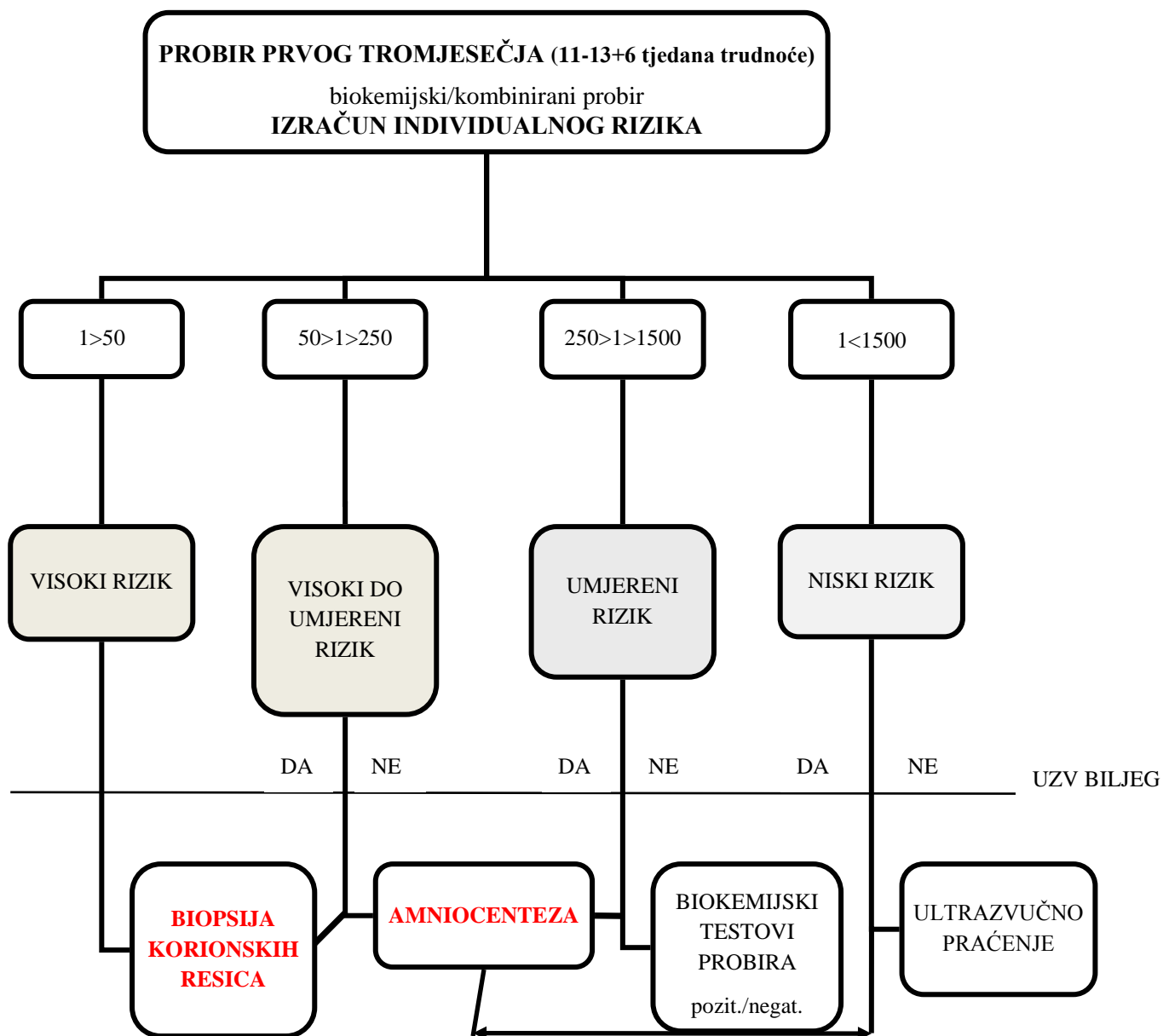
U ranim 1970-im, oko 5% trudnica bilo je starije od 35 godina, i u ovoj skupini rađalo se oko 30% od ukupnog broja živorođene djece sa sindromom Down. Posljednjih godina u razvijenim zemljama postoji trend ostvarivanja roditeljstva u starijoj životnoj dobi, tako da se udio trudnica s dobnim rizikom povećao na 20%. Primjenom modela otkrivanja fetalnih aneuploidija analizom stanica plodove vode kod trudnica starijih od 35 godina otkriti će se ne više od 50% aneuploidnih trudnoća. Stoga se u rutinskim perinatalnim postupnicima ne preporuča korištenje majčine dobi kao jedinog kriterija za procjenu rizika za aneuploidije. Prvi biljeg aneuploidije ploda u majčinom optoku otkriven je početkom osamdesetih u trudnice uključene u probir otvorenog oštećenja neuralne cijevi. Dijete je rođeno sa trisomijom 18, a retrospektivnom analizom je uočena niža razina alfa-fetoproteina (AFP) u trudnoći. Bogart je sa suradnicima 1987. godine pretpostavio da promijenjena funkcija posteljice kod trisomije 21 utječe na razinu biokemijskih biljega ploda u optoku majke (6). Fetalni dio posteljice istog je kromosomskog statusa kao i plod, što izaziva poremećaj funkcije i lučenja brojnih posteljičnih čimbenika. Tako su mogući biljezi aneuploidija u majčinom optoku svi proteini, lipidi i ugljikohidrati čeda koji se stvaraju ili metaboliziraju u posteljici. Unatoč opsežnim istraživanjima o mogućnostima i združenostima različitih postupnika probira nema jednoznačnog pristupa. Neinvazivni testovi fetalnih aneuploidija koji se koriste u prvom tromjesečju su biokemijski biljezi u serumu trudnice: trudnički plazmatski protein (engl. pregnancy-associated plasma protein PAPP-A), i slobodni humani korionski gonadotropin (slobodni  $\beta$ hCG), uz ultrazvučno izmjerenu debljinu nuhalne prozirnosti ploda, odnosno u drugom tromjesečju razne kombinacije fetalno-posteljičnih biokemijskih biljega (dvostruki test probira koji uključuje alfa-fetoprotein i slobodni  $\beta$ hCG; trostruki test koji uključuje alfa-fetoprotein, ukupni/slobodni  $\beta$ hCG i nekonjugirani estriol; četverostruki test koji uključuje: alfa-fetoprotein ukupni/slobodni  $\beta$ hCG, nekonjugirani estriol i inhibin A). Probir aneuploidija u prvom tromjesečju (kombinirani probirni test) ima više prednosti u odnosu na biokemijski probirni test u drugom tromjesečju (četverostruki test), ne samo zbog ranije dostupnosti rezultata testa već i zbog više stope otkrivanja (engl. detection rate) kromosopatija. Standardni testovi probira i stopa otkrivanja aneuploidija prikazani su u tablici 1 (3).

Tablica 1. Standardni testovi probira i stope otkrivanja najčešćih kromosopatija; (prvenstveno se odnosi na sindrom Down)

METODA PROBIRA	USPJEŠNOST OTKRIVANJA %	UDIO LAŽNO POZITIVNIH %
Dob majke	50	5
PRVO TROMJESEČJE		
DM+ fetalna NP	75-80	5
DM + serumski slobodni $\beta$ hCG i PAPP-A	60-70	5
DM+NP+serumski slobodni $\beta$ HCG i PAPP-A	85-95	5
kombinirani probir +NK ili DV ili TR	93-96	2,5
DRUGO TROMJESEČJE		
DM+serumski $\alpha$ FP, hCG (dvostruki probir)	55-60	5
DM+serumski $\alpha$ FP, slobodni $\beta$ hCG (dvostruki probir)	60-65	5
DM+ serumski $\alpha$ FP, slobodni $\beta$ hCG,E3 (trostruki probir)	65-70	5
DM+ serumski $\alpha$ FP, hCG, E3, inhibin A (četverostruki probir)	65-70	5
DM+ serumski $\alpha$ FP, slobodni $\beta$ hCG , E3, inhibin A (četverostruki probir)	70-75	5
DM+komb. probir + četverostruki probir	90-94	5

DM; dob majke; NP; nuhalna prozirnost;  $\beta$ HCG;  $\beta$  humani korionski gonadotropin; PAPP-A; trudnički plazmatski protein A;  $\alpha$ FP; alfafetoprotein; E3; estriol; DV ductus venosus; NK nosna kost; TR trikuspidalna regurgitacija

Združenost probira prvog i drugog tromjesečja postavile su temelje tzv. integriranog probira (7). Probir se provodi u dva koraka, u prvom tromjesečju kombiniranim probirom (biokemijski biljezi majke PAPP-A i  $\beta$ HCG uz ultrazvučno izmjerenu debljinu nuhalne prozirnosti), a potom se u drugom tromjesečju trudnice upućuju između 15 i 18 tjedana trudnoće na četverostruki test probira uz jedinstveni izračun rizika koji uključuje oba testa. Unatoč visokoj stopi otkrivanja sindroma Down (95% uz 5% lažno pozitivnih) za određen broj trudnica ovaj probirni test nije test izbora obzirom na kasne rezultate i nemogućnost rane dijagnostike biopsijom korionskih resica. Istraživanja su usmjerena i drugačijim protokolima objedinjavanja rezultata testova prvog i drugog tromjesečja (4). Trudnice koje izračunom kombiniranog probira prvog tromjesečja imaju umjeren rizik rađanja kromosomski bolesnog ploda ( $50 > 1 < 1500$ ), mogu imati koristi od provođenja testova probira u drugom tromjesečju tzv. uvjetovani sekvencijski probir (engl. contingent sequential screening). Nakon probira prvog tromjesečja trudnicama se priopće rezultati testa; onima s visokim rizikom preporuča se invazivni zahvat, a trudnice umjerenog rizika upućuju se na biokemijski test drugog tromjesečja, nakon čega im se predoči zajednički rezultat oba testa. Kod trudnica s niskim rizikom rađanja kromosomski bolesnog ploda ( $1 < 1500$ ) također mogu biti razmotreni dodatni probirni testovi (engl. step wise screening). Principom primjene "contingent" i "step-wise" postupnika, probir drugog tromjesečja objedinjuje rezultate i prvog i drugog tromjesečja u jedinstveni individualni izračun rizika. Neovisno o izboru protokola zbog nepotpune osjetljivosti metoda probira, pouzdanost za različite protokole iznosi od 80-95%, uz udio lažno pozitivnih od 3-5% (tablica 1). Uzimajući u obzir pojavnost sindroma Down, kod jedne od 16 probirom pozitivnih trudnica potvrditi će se trisomija 21, a 15 trudnica će biti podvrgnute nepotrebnom invazivnom zahvatu. Shematski prikaz standardnog postupka probira na Klinici za ginekologiju i porodništvo Kliničke bolnice Sveti Duh prikazuje slika1.



Slika1. Shematski prikaz postupnika probira trudnica visokog rizika rađanja kromosomski bolesnog ploda.

### 1.11 Ultrazvučni probir prvog tromjesečja

Točnost određivanja gestacijske dobi u trenutku uzimanja krvi ključan je dio biokemijskog probira jer se dinamika izlučivanja biljega tijekom trudnoće intenzivno mijenja iz tjedna u tjedan. Rizik se dobiva usporedbom individualnih vrijednosti biljega trudnice i srednjih vrijednosti biljega euploidnih trudnoća ovisnih o gestacijskoj dobi. Greška u određivanju gestacijske dobi od dva tjedna može dvostruko uvećati ili umanjiti izračunati rizik ovisno da li je trajanje trudnoće precijenjeno ili podcijenjeno. Nuhalna prozirnost opisuje abnormalno nakupljanje tekućine u potkožnom tkivu vratne regije što se ultrazvukom prepoznaje kao različito veliko, hipoehogeno područje smješteno straga u medijalnoj liniji vrata između kože i kralježnice. Još je 1866. godine Langdon Down objavio da je kod osoba s trisomijom 21 koža prevelika u odnosu na tijelo (8). Mjerenje debljine nuhalne prozirnosti u prvom tromjesečju metoda je probira koja otkriva oko 80% slučajeva trisomije 21 uz 5% lažno pozitivnih rezultata. Opsežnim istraživanjima posljednjih 20 godina uočava se kako je mjerenje nuhalne prozirnosti značajno ne samo za rani probir plodova s trisomijom 21 već i drugih aneuploidija. Vremenski okvir za mjerenje nuhalne prozirnosti je od 11. pa do kraja 13. tjedna trudnoće odnosno minimum udaljenosti tjeme-trtica 45 mm do najviše 84 mm. Donja granica određena je mogućnošću ultrazvučne dijagnostike velikih malformacija, a gornja granica mogućnošću ranijeg i sigurnijeg prekida trudnoće. Fetalna nuhalna prozirnost može se mjeriti transabdominalno ili transvaginalno s jednakom točnošću. Da bi se postigla ultrazvučna ujednačenost mjerenja potrebna je standardizacija pregleda i educiranost ultrasoničara. Terminološki i dijagnostički se razlikuju septirane i neseptirane promjene, na čemu se zasniva bazična morfološka podjela patološkog nakupljanja tekućine u nuhalnoj regiji. Nalaz septiranih promjena odgovara cističnom higromu (9,10). Nekoliko prospektivnih istraživanja na uzorku od stotine tisuća trudnoća pokazale su uspješnost mjerenja nuhalne prozirnosti u više od 99% trudnoća. Rizik kromosomopatija raste kod starijih trudnica s povećanjem nuhalne prozirnosti, dok normalne vrijednosti nuhalne prozirnosti smanjuju dobni rizik majke. Uz udio od 5% lažno pozitivnih rezultata, probir koji se zasniva samo na mjerenju nuhalne prozirnosti otkriva 75-80% plodova s trisomijom 21 i drugim klinički značajnim aneuploidijama (4,10). Uz nuhalnu prozirnost drugi ultrazvučni biljezi prvog tromjesečja s visokom osjetljivošću i specifičnošću su odsutnost nosne kosti, povišen otpor protoku kroz duktus venosus i trikuspidalna regurgitacija. Protok kroz venski duktus prikazuje se u polusagitalnoj projekciji tijela ili na poprečnome presjeku na izlasku iz umbilikalne vene, a poslije odvajanja ogranaka za jetru. Sistolički val nastaje za vrijeme

sistole ventrikula kada je najviši gradijent tlaka između desnog atrija i venskog bazena i tada krv ide najbrže prema fetalnom srcu. Drugi je val za vrijeme rane diastole kada se otvara atrio-ventrikularni zalistak i pasivno se puni ventrikul. Završetak ciklusa je za vrijeme atrijske kontrakcije kad je protok još pozitivan ali je brzina najniža. Nedostatak protoka ili nalaz povratnog protoka u venskom duktusu za vrijeme kontrakcije atrija, povezan je s kromosomopatijama, srčanim greškama i općenito lošim ishodom trudnoće. Svaki od navedenih biljega može se uklopiti u kombinirani probir prvog tromjesečja i povećati stopu otkrivanja aneuploidija na 93-96% uz smanjenje stope lažno pozitivnih rezultata na 2,5 % (10,11).

## 1.12 Biokemijski probir prvog tromjesečja

U posljednjem se desetljeću biokemijski probir pomaknuo u prvo tromjesečje budući da u kombinaciji s ultrazvučnim nalazom nuhalne prozirnosti ima veću osjetljivost otkrivanja kromosomopatija u odnosu na biokemijske probire drugog tromjesečja. Kod trudnoća s trisomijom 21, serumske koncentracije slobodne podjedinice  $\beta$ hCG-a su dvostruko veće u odnosu na euploidne trudnoće, dok je PAPP-A dvostruko manji. Korionski gonadotropin je glikoprotein mase 39 500 D građen od dvije nekovalentno vezane podjedinice. Alfa i beta lanac sintetiziraju se neovisno u stanicama sinciciotrofoblasta već za vrijeme implantacije. Nakon translacije svakom se polipeptidnom lancu dodaju dvije ugljikohidratne jedinice. Iz stanica posteljice otpuštaju se dimerni oblici (intaktni hCG), ali i slobodne podjedinice; slobodni  $\beta$ hCG i slobodna hiperglikolizirana  $\alpha$  podjedinica. Imunohistokemijske metode, ovisno o specifičnosti protutijela koja koriste, određuju ukupni  $\beta$ hCG, intaktni hCG ili njegovu slobodnu  $\beta$  podjedinicu. Za razliku od ukupnog i intaktnog  $\beta$ hCG-a, slobodna  $\beta$  podjedinica je biljeg fetalnih aneuploidija u prvom tromjesečju trudnoće. PAPP-A je značajan glikoprotein posteljičnog podrijetla. Vrijednost u krvi majke raste eksponencijalno do termina poroda. Tipično se ponaša kao enzim, odnosno proteinaza za proteine koji se vežu na inzulinu slične čimbenike rasta (engl. IGFBP; inzulin like growth factor binding protein), čime regulira razinu čimbenika rasta sličnih inzulinu. Važno je naglasiti da inzulinu slični čimbenici rasta reguliraju rast i diferencijaciju fetalnih stanica kao i invaziju trofoblasta. Određivanje vrijednosti PAPP-A u serumu majke ima ograničeno značenje u predviđanju komplikacija trudnoće poput zastoja rasta, preeklampsije ili prijetećeg pobačaja, ali je značajan biokemijski biljeg aneuploidija u prvom tromjesečju (12).

Individualna razina biljega u majčinom optoku dijeli se medijanom vrijednosti u neugroženim trudnoćama. Dobivena MoM vrijednost (MoM; multiple of unaffected median-višekratnik medijana u neugroženim trudnoćama) za svaki biljeg podliježe normalnoj raspodjeli i uvrštava se u formulu koja sadrži populacijske parametre razine biljega i koeficijente korelacije biljega. Na serumsku koncentraciju ovih produkata posteljičnog tkiva utječu obilježja majke, rasno podrijetlo, težina, pušenje kao i način zanošenja, tako da su u izračun rizika uključene majčine varijable da bi se definirali višekratnici medijana, prije poredbe zdravih s aneuploidnim trudnoćama. Kod euploidnih trudnoća prosječna vrijednost za slobodnu podjedinicu  $\beta$ hCG-a i PAPP-A je 1.0 MoM, dok je u trudnoćama s trisomijom 21 prosječna vrijednost slobodne podjedinice  $\beta$ hCG 2.0 MoM-a, a prosječna vrijednost



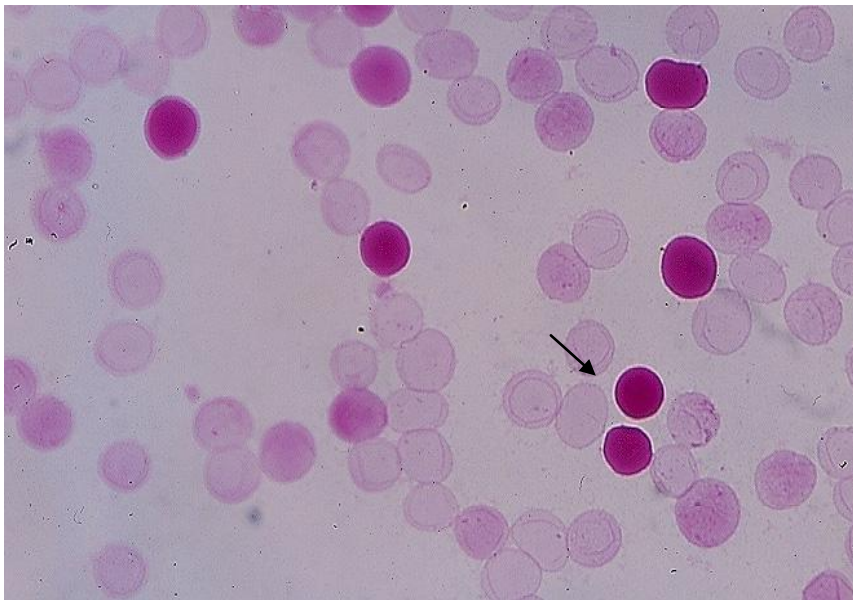
PAPP-A je 0.5 MoM-a. Probir za trisomiju 21 koji se zasniva na majčinoj dobi i serumskim vrijednostima slobodne podjedinice  $\beta$ hCG-a i PAPP-A ima stopu otkrivanja od 65%, uz udio lažno pozitivnih od 5% (13). Kod trudnoća s trisomijom 18 i 13 serumske vrijednosti slobodne podjedinice  $\beta$ hCG-a i PAPP-A su snižene (14). Kod spolnih aneuploidija majčine serumske vrijednosti slobodne podjedinice  $\beta$ hCG su normalne u odnosu na snižene vrijednosti PAPP-A.

## 1.2. Slobodna deoksiribonukleinska kiselina (DNA)

Kada su 1948. godine Mandel i Metais otkrili slobodnu DNA u optoku nisu pobudili značajniju pažnju znanstvene zajednice (15). Znatno veću pažnju privukao je rad iz 1977. godine kada se opisuje moguća primjena slobodne DNA u dijagnostici tumora i praćenju učinka terapije (16). Pojam "slobodna DNA" odnosi se na dijelove kratkih DNA fragmenata prisutnih u tkivnim tekućinama. Većina plazmatske DNA je dvostruka uzvojnica i sastoji se od DNA molekula veličine 0.18-21 kilobaza (17). Najčešće se izolira iz seruma i plazme, iako je otkrivena i u slini, stolici i sinovijalnoj tekućini (18,19,20). Uobičajena koncentracija slobodne DNA u zdravih ljudi iznosi od 0-100 ng/ml krvi, prosječne vrijednosti od 30ng/ml (21). Točno podrijetlo slobodne DNA istražuje se posljednjih 30-ak godina. Dio slobodne DNA oslobađa se iz živih stanica dok dio ulazi u optok kada stanica odumre bilo nekrozom ili apoptozom (22). Zdravi ljudi imaju niske vrijednosti slobodne DNA iz plazme budući da se mrtve stanice uspješno uklanjaju iz organizma fagocitozom. Povišena razina slobodne DNA u optoku posljedica je bilo pojačanog oslobađanja iz stanica ili njihovog oslabljenog uklanjanja. Značajan korak u istraživanju slobodne DNA postignut je otkrićem povišenih vrijednosti slobodne DNA u pacijenata s različitim tipovima tumora, a posebno onih s metastatskim tumorima. Većina istraživanja naglašava povišene vrijednosti slobodne DNA u onkoloških bolesnika u usporedbi sa zdravom populacijom, i ostavlja mogućnost korištenja slobodne DNA kao ranog tumorskog biljega (23,24). Budući da porast slobodne DNA nije samo specifičan za neoplazme, povišene vrijednosti se uočavaju i u različitim upalnim procesima (ciroza, hepatitis, sistemski lupus, reumatoidni artritis), tako da se ne može smatrati biljekom specifičnim za novotvorevine. Jaka trauma vezana uz sistemski i upalni odgovor koji za posljedicu može imati zatajenje organa i posljedično staničnu smrt ima za posljedicu povišenje slobodne DNA u optoku. Više istraživanja potvrdilo je kako rast slobodne DNA može ukazivati na razvoj teških stanja sepse, zatajenja organa i povišen mortalitet (25,26). Infarkt miokarda je patofiziološki kombinacija nekroze i apoptoze miocita. Vrijednosti slobodne DNA povišene su u pacijenata s akutim infarktom miokarda (27). Za razliku od srčanog udara gdje postoji više rutinski korištenih biokemijskih biljega, u slučaju moždanog udara ne postoje biljezi. Budući da je patofiziologija moždanog udara stanična smrt i disfunkcija moždane cirkulacije, pokazalo se da koncentracija slobodne DNA u plazmi korelira s jačinom moždanog udara i da može poslužiti kao predskazatelj mortaliteta i morbiditeta čak i kod stanja gdje nisu prisutne standardne radiološke promjene (28).

### 1.3 Fetalna slobodna deoksiribonukleinska kiselina (DNA)

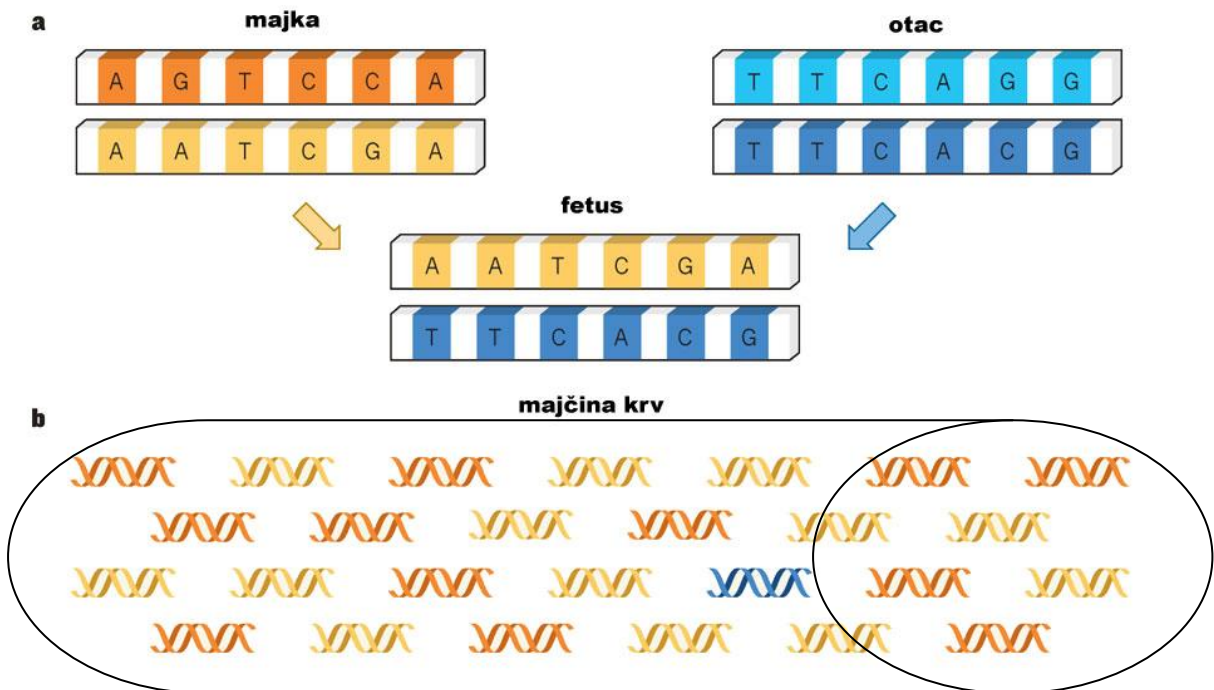
Posljednjih nekoliko desetljeća istraživanja su intenzivno usmjerena razvoju neinvazivne prenatalne dijagnostike izravnom analizom fetalnog genetskog materijala. U razdoblju od 1960. do 1990. godine, radovi su se temeljili na mogućnosti izolacije fetalnih stanica iz majčine krvi (29) (slika 2).



Slika 2. Kleihauer Betke-ovo bojanje fetalnih stanica u optoku majke (strelica označava fetalni eritrocit).

Međutim, fetalne stanice u majčinoj krvi nisu se pokazale pouzdanim izvorom fetalnog genetskog materijala iz nekoliko razloga. Prvi je nizak udio cirkulirajućih fetalnih stanica u majčinom optoku, a drugo njihova prisutnost godinama nakon trudnoće u optoku majke (30). Lo i suradnici su 1997. godine prvi otkrili prisutnost fetalne slobodne DNA otkrićem genskih sljedova specifičnih za Y kromosom u plazmi trudnica s muškim plodovima (31). Fetalna slobodna DNA sadrži najvećim dijelom kratke DNA fragmente manje od 193 parova baza koji se oslobađaju iz lizom apoptotičnih stanica ploda i trofoblasta posteljice (32). Dvosmjerna fetomaternalna komunikacija (prirodni mikrohimerizam) omogućava prijelaz i cirkulaciju fetalnih elemenata u majčin optok. Udio fetalne slobodne DNA značajno je manji u odnosu na ukupnu slobodnu majčinu DNA i iznosi od 5-10% ovisno o tjednu trudnoće. Fetalna slobodna DNA može se otkriti u majčinom optoku već po začecu. Standardnim PCR tehnikama (engl. PCR–polymerase chain reaction, lančana reakcija polimeraze) osjetljivost detekcije muškog spola iznosi 98-100% od sedmog tjedna trudnoće. (33,34). Za razliku od intaktnih fetalnih stanica koje mogu biti prisutne godinama, fetalna slobodna DNA brzo

nestaje iz majčinog optoka, s poluvremenom raspada od 16 minuta (35). Obzirom na navedene osobine, fetalna slobodna DNA obećavajući je izvor fetalnog genetskog materijala za neinvazivnu prenatalnu dijagnostiku (slika 3).



Slika 3. Varijacije slobodne DNA u optoku majke.

### 1.31 Biologija fetalne slobodne DNA

Značajan problem upotrebe fetalne slobodne DNA u prenatalnoj dijagnostici predstavlja tehnička nemogućnost odvajanja majčine od fetalne slobodne DNA. Budući da ne postoji pozitivna kontrola za izolaciju i umnažanje fetalne slobodne DNA, analiza je ovisna o spolu ploda i poznavanju očevog genotipa, te je moguće otkriti samo mutacije koje su naslijeđene od oca ili nastale *de novo*. Jedan od pristupa je otkrivanje specifičnih DNA sljedova i točkastih mutacija na autosomnim kromosomima naslijeđenih od oca, a koji su jedinstveni za plod. Ovakvi polimorfizmi jedino su korisni kao pozitivne kontrole ukoliko su odsutni u majčinom genomu, i ako se očev jedinstveni/informativan alel nalazi kod ploda (36). Daljnja eksperimentalna istraživanja usmjerena su prema tri cilja: povećanju količine/udjela fetalne slobodne DNA u majčinoj plazmi, pronalaženju fetalno specifičnih epigenetskih biljega, ili posteljичne glasničke RNA, te tehnološkom napredovanju. Različita tkiva mogu imati tkivno specifične obrasce metilacije. Metilacija DNA predstavlja jedan od mehanizama regulacije aktivnosti gena. Uočena je razlika u metilaciji DNA između tkiva majke i ploda. U odnosu na postojanje fetalnih DNA biljega koji prepoznaju sljedove Y kromosoma i genetske različitosti između majke i ploda, upotreba univerzalnih fetalnih DNA biljega poput hipermetiliranog RASFF1A (engl. ras association domain family A1 gene) neovisna je o spolu ploda (37). Identifikacija fetalne DNA korištenjem razlike u izražajnosti gena majke i rastućeg ploda naziva se epigenetska modifikacija. Budući da se ukupna genska izražajnost mijenja tijekom embriogeneze i organogeneze, metilacijski status određenih gena može se odrediti iz tkivno specifičnih uzoraka količine posteljичne ili fetalne glasničke RNA, poput posteljичne glasničke PLAC4 (engl. placent- specific 4) RNA nastale prepisivanjem gena na 21. kromosomu (38,39). Biološki problem razlikovanja fetalne od majčine slobodne DNA pokušava se riješiti i korištenjem novih molekularnih tehnika. Digitalni PCR, omogućava kvantifikaciju nukleinskih kiselina pojedinačnim brojanjem molekula, stoga je moguće precizno izraziti razliku vrijednosti ukupne količine slobodne nukleinske kiseline (majčine i fetalne) između aneuploidnih i euploidnih trudnoća. Najznačajniji nedostatak digitalnog PCR-a je velika količina uzorka potrebnog za svaku analizu (40). Tehnološki napredak ostvaruje se paralelnim sekvenciranjem (41). Korištenjem bioinformatike omogućava se fragmentiranje DNA majčine plazme, razlikovanje majčinih od fetalnih segmenata, identifikacija kromosomskog podrijetla svake DNA molekule i izračun udjela molekula kod potencijalnog aneuploidnog kromosoma, npr. kromosoma 21 (42). Moramo uzeti u obzir da

Ovakvi dijagnostički postupci nisu ušli u rutinsku praksu zbog dugotrajnih, te tehnološki zahtjevnih i dijagnostički skupih postupaka, koji ne opravdavaju širu kliničku primjenu.

#### 1.4 Neinvazivna prenatalna dijagnostika korištenjem fetalne slobodne DNA

Kako je tehnički nemoguće odvojiti majčinu od fetalne slobodne DNA gdje majčina slobodna DNA interferira s analizom fetalne DNA, jasno razlikovanje i kvantifikacija moguće je samo ukoliko se slijed fetalne slobodne DNA razlikuje od majčinog (npr. Y kromosom, RhD gen kada je majka RhD negativna) primjenom tehnika lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (43). Prenatalno određivanje fetalnog spola analizom slobodne DNA ušlo je u kliničku praksu (44). Analiza ima visoku pouzdanost od 7. tjedna trudnoće, i njena primjena je opravdana kada u obitelji postoji X-vezana recesivna bolest, kako bi se izbjegli nepotrebni invazivni zahvati kod ženskog ploda. Nadalje, u slučajevima ultrazvukom nejasnog ili dvojbenog spolovila kako bi se odredio genetski spol, te u slučajevima kongenitalne adrenalne hiperplazije, kako bi se izbjegla nepotrebna terapija kortikosteroidima kod muškog ploda (45). Osim u slučajevima potrebe određivanja spola, fetalna slobodna DNA se koristi rutinski kod određivanja RhD statusa ploda kod RhD negativnih majki da bi se izbjegla neselektivna antenatalna profilaksa imunoglobulinima. Određivanje RhD statusa ploda klinički je veoma značajno u slučajevima kada postoji sumnja na Rh izoimunizaciju, a ukoliko je otac djeteta heterozigot određivanjem RhD statusa ploda određuju se i daljnji tijek i postupci perinatalne skrbi (46). Ove analize dio su dostupne rutinske prakse u nekoliko europskih zemalja. Određivanje koncentracije slobodne DNA u majčinoj plazmi treći je način korištenja fetalne slobodne DNA. Za kvantifikaciju se koriste specifični sljedovi na Y kromosomu. Dosadašnja istraživanja pokazala su da su vrijednosti povišene u različitim patološkim stanjima (prijevremeni porod, idiopatski polihidramnij, zastoj u rastu ploda, preeklampsija, malplacentacija) tako da mogu služiti i kao mogući patološki biljezi komplikacija ili lošeg ishoda trudnoće (47,48). Neinvazivan pristup dijagnostici i probiru fetalnih aneuploidija analizom slobodnih fetalnih nukleinskih kiselina u majčinom optoku još uvijek se istražuje. Istraživanja pokazuju visoku osjetljivost i specifičnost neinvazivnih prenatalnih postupka koja nije jednako visoka za sve kromosome, što uz prisustvo lažno pozitivnih rezultata postupke definira ne kao dijagnostičke već postupke probira. Analiza fetalne slobodne DNA tehnološki superiornim paralelnim sekvenciranjem u majčinoj krvi otkriva više od 99% slučajeva s trisomijom 21 i 18 s udjelom lažno pozitivnih <1% (49,50). Osjetljivost za trisomiju 13 je manja i iznosi oko 85%. Većina komercijalnih laboratorija navodi i mogućnost prenatalnog neinvazivnog testiranja za monosomiju X (45,X) uz osjetljivost 90,5%. Navedena statistička značajnost pruža mogućnost uvođenja analize fetalne slobodne DNA u rutinsku kliničku praksu bilo kao dio univerzalnog probira prvog

tromjesečja ili kao dio dodatnog kontingent probira temeljen na rezultatima kombiniranog probira u prvom tromjesečju. Kako kliničko iskustvo raste s postojećim testovima pojavljuju se različita klinička, tehnološka kao i ekonomska pitanja. Ekonomska isplativost koja je dio osnove bilo kojeg zdravstveno-ekonomskog sustava računa se kao relativni trošak invazivne dijagnostike i postupka probira u usporedbi s troškovima analize fetalne slobodne DNA u odnosu na stopu otkrivanja trisomije 21. Trenutno su usporedivi troškovi analize fetalne slobodne DNA i i invazivne dijagnostike, i mogu se neutralizirati. Međutim da bi stopa detekcije bila 99% analiza stanično slobodne fetalne DNA trebala bi biti dio sveobuhvatnog probira, a ne dio kontingent probira što zapravo troškove čini ekonomici zdravstva neprihvatljivim. Nadalje osim potrebitosti za značajnim rezanjem troškova tehnologije prije implementacije i eventualne zamjene postojećih testova probira potrebna su istraživanja na općoj, niskorizičnoj populaciji. Uz ograničenja vremena, tehnike i troškova daljnje prepreke su i neuspjeli testovi kod niskog udjela slobodne fetalne DNA posebno kod pretilih trudnica, nejasni rezultati (kod mozaicizama), te lažno pozitivni rezultati (0,1-0,2%) (51). Dakle istraživanja su i dalje usmjerena određivanju gestacijske dobi uzimanja i interpretacije uzorka, nadalje definiranju skupine trudnica koje će se podvrgnuti postupku probira slobodne fetalne DNA, kao i korištenja probira slobodnom fetalnom DNA kao samostalnog testa ili u kombinaciji s postojećim testovima, kao i tehnologije koja se koristi (52,53,54).



## 2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Ukupna i fetalna slobodna DNA u krvi majke pogodan je biološki materijal za neinvazivne prenatalne dijagnostičke postupke. Kod muških plodova moguće je fetalnu slobodnu DNA odrediti direktno korištenjem specifičnih sljedova na Y kromosomu koji nisu prisutni u genomu majke. Kod ženskih plodova fetalna slobodna DNA određuje se indirektno preko ukupne (fetalna+majčina) slobodne DNA obzirom na odsustvo fetalnih specifičnih biljega. Kvantifikacijom fetalne slobodne DNA kod muških plodova, odnosno ukupne (fetalne +majčina) slobodne DNA kod muških i ženskih plodova moguće je razlučiti numeričke kromosomske poremećaje (aneuploidije/poliploidije) zbog promjene u ukupnoj količini genomske DNA u odnosu na euploidne trudnoće.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

#### Opći cilj

Određivanje značaja kvantifikacije fetalne i ukupne (fetalne+majčine) slobodne DNA iz majčine krvi za probir kromosomski bolesnih plodova u prvom tromjesečju trudnoće.

#### Specifični ciljevi

- a.) usporedba kvantitativnih rezultata fetalne i ukupne slobodne DNA iz majčine krvi prema količini nebalansiranog kromosomskog materijala (trisomije- $2n+1$ , triploidije  $3n$ ,  $n=23$  kromosoma)
- b.) određivanje kvantitativnih rezultata fetalne i ukupne slobodne DNA između 11-13+6 tjedana trudnoće
- c.) usporedba kvantitativnih rezultata fetalne i ukupne slobodne DNA s biometrijom ploda; veličinom nuhalne prozirnosti/cističnog higroma
- d.) usporedba kvantitativnih rezultata fetalne i ukupne slobodne DNA s vrijednostima serumskih biljega kombiniranog testa probira:  $\beta$  podjedinice humanog korionskog gonadotropina;  $\beta$ hCG i trudničkog plazmatskog proteina; PAPP-A.
- e.) usporedba kvantitativnih rezultata fetalne i ukupne slobodne DNA s citogenetskom analizom korionskih resica u ispitivanoj skupini.

## 4. OBABIR ISPITANICA I METODE ISTRAŽIVANJA

### 4.1 Odabir ispitanica

U istraživanje smo uključili trudnice s jednoplodnim trudnoćama upućene u ambulantu za visokorizičnu trudnoću Klinike za ginekologiju i porodništvo Kliničke bolnice Sveti Duh u razdoblju od siječnja 2010. godine do prosinca 2014. godine .

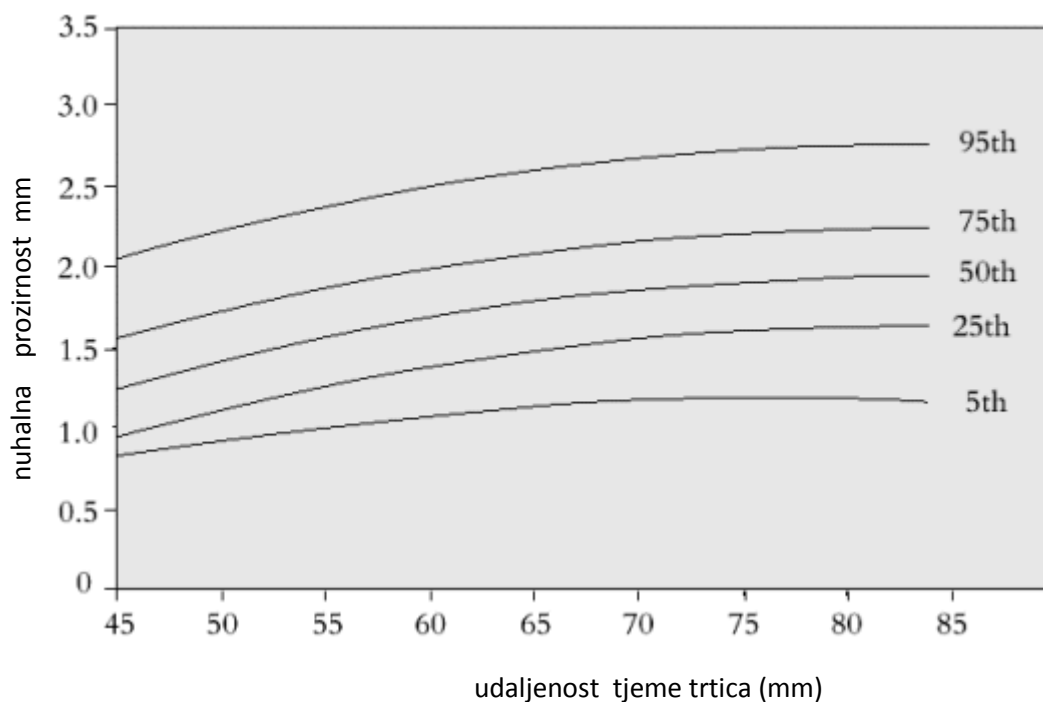
Ispitivana skupina obuhvatila je 56 pacijentica kod kojih je citogenetskom analizom bioptata korionskih resica dijagnosticiran kromosomski poremećaj ploda (aneuploidija/poliploidija).

Usporedna skupina obuhvatila je 56 trudnica s urednim ranim probirom, tijekom i ishodom trudnoće koje su praćene u našoj ustanovi. Uredan test kombiniranog probira definiran je kao rizik manji od 1:250.

Indikacija za biopsiju korionskih resica postavljena je temeljom abnormalnog ultrazvučnog nalaza (nuhalna prozirnost iznad 99-e centile u odnosu na udaljenost tjeme-trtica / prisustvo cističnog higroma), ili kombiniranog probira (ultrazvučni i serumski biljezi majke) s rizikom  $\geq 1:50$  što predstavlja standardni postupnik porodničke prakse.

Fetana nuhalna prozirnost mjerila se bilo transabdominalno ili transvaginalno u trenutku prikazivanja glave fetusa i gornjeg dijela prsnog koša pri najvećem povećanju slike i smanjenom osvjetljenju, od unutarnjeg ruba kože do ruba kralježnice. Mjerila se u neutralnom položaju ploda, vratnom dijelu kralježnice uzimajući najveću vrijednost više uzastopnih mjerenja. Veličina fetalne nuhalne prozirnosti usporedno je analizirana u odnosu na udaljenost tjeme-trtica (slika 4). Terminološki su odijeljeni septirani u odnosu na neseptirane oblike nuhalne prozirnosti. Septirani oblici tj. cistični higrom su se definirali kao septirana multicistična tvorba smještena straga medijalno u okcipito-cervikalnom dijelu. Fetalni hidrops ultrazvučno se prepoznavao kao nakupljanje tekućine u tjelesnim šupljinama i potkožnome tkivu (anasarca).

Povećan protok kroz venski duktus (ductus venosus) pri poprečnom presjeku kroz fetalni abdomen obilježen kao izostanak protoka ili povratni protok u vrijeme kontrakcije atrijsa i označavan je kao izostanak A vala ili negativan A val.



Slika 4. Odnos veličine nuhalne prozirnosti i udaljenosti tjeme-trtica (4)

Ispitivanoj skupini trudnica uzeto je 12 ml pune krvi na EDTA (Vacutainer), prije samog zahvata, budući da invazivni dijagnostički postupak povećava razinu slobodne DNA, u cilju izbjegavanja lažno pozitivnog rezultata.

Trudnicama iz usporedne skupine, uzeto je 12 ml pune krvi na EDTA (Vacutainer) iza rutinske fetalne ultrazvučne evaluacije između 11 i 13+6 tjedna trudnoće, i pojašnjenja nalaza probira prvog tromjesečja (slika 5).

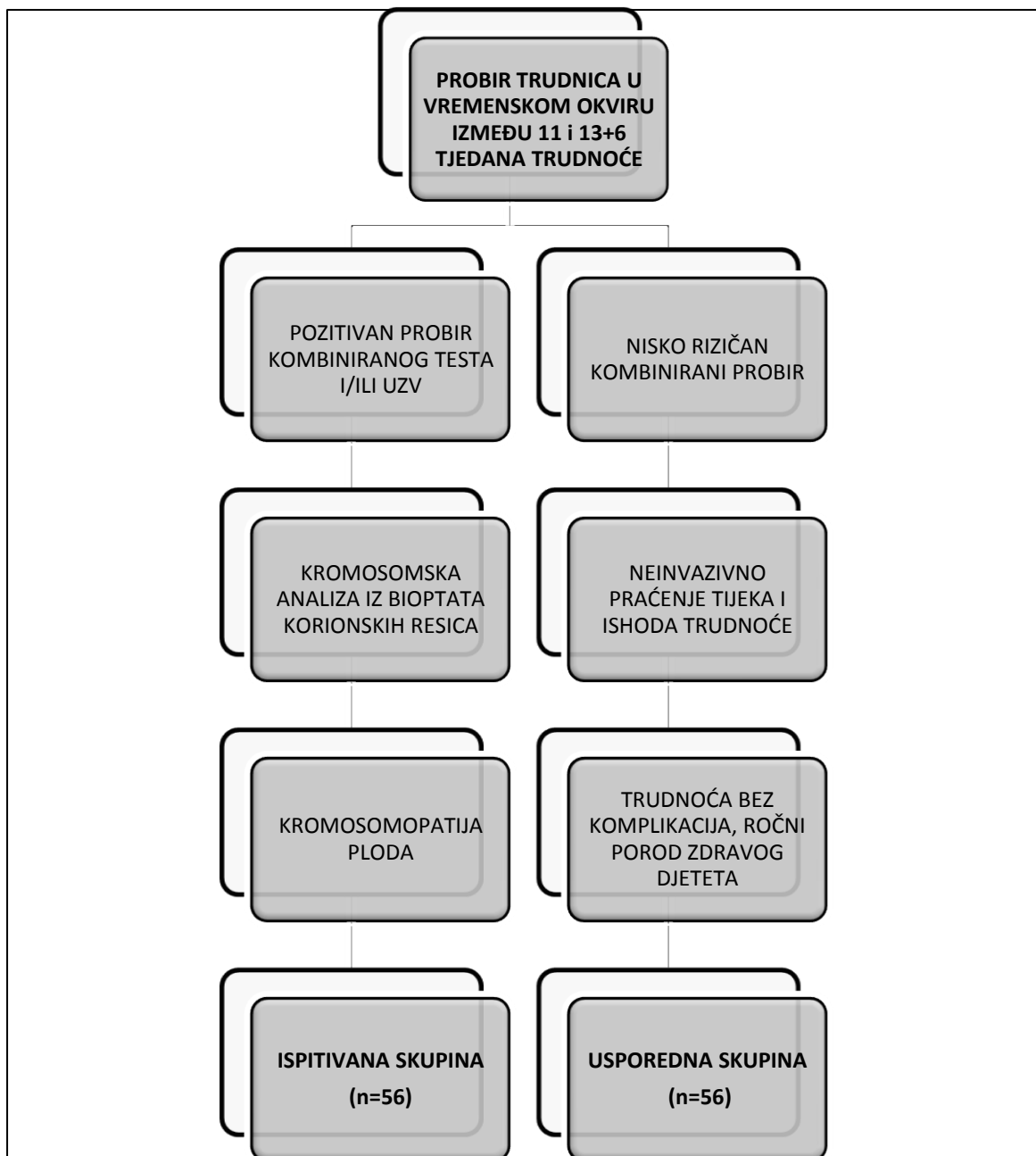
Trudnice s pozitivnim testom ranog probira, a normalnog nalaza citogenetske analize iz bioptata korionskih resica isključene su iz istraživanja.

Kriteriji isključenja iz istraživanja u obje skupine bila su stanja koja mogu utjecati na povišenu razinu slobodne DNA: pušenje trudnice, trudnoće iz postupka medicinski pomognute oplodnje, pozitivna osobna anamneza za autoimune bolesti, srčane i bolesti bubrega, trudnice koje su doživjele traumatu netom prije upućivanja na dijagnostiku, te pozitivna obiteljska anamneza za nasljedne poremećaje.

Sudjelovanje u istraživanju bilo je moguće tek nakon davanja pismene suglasnosti u vidu informiranog pristanka trudnice, koji podrazumijeva da je ispitanik dobio i razumio sve potrebne informacije o istraživanju (slika 6).

Biokemijski biljezi i korigirane MoM vrijednosti				
sl. $\beta$ -hCG	35,3	ng/ml	0,96	Korig. MoM
PAPP-A	2,46	mIU/ml	0,93	Korig. MoM
UZV podaci				
Datum UZV pregleda	05/04/2012	Nuhalni nabor	1,00	mm
CRL	59		0,65	MoM
Gestacijska dob prema CRL	12+ 2	##Nasal Bone		nepoznato
Gestacijska dob na dan vađenja krvi	12+ 2	Izmjerio		-
		Kvalificiranost za mjerenje NT		-
Rizici na dan vađenja krvi				
T21 (Biokem. rizik + NT)		Dobni rizik		
<1:10000		1:503		
rizik manji od graničnog				
Biokemijski test		Rizik za trisomiju 13/18 + NT		
1:2971		<1:10000		
rizik manji od graničnog		rizik manji od graničnog		

Slika 5. Izgled niskorizičnog nalaza kombiniranog probira



Slika 6. Shematski prikaz postupnika odabira trudnica iz ispitivane i usporedne skupine.

## 4.2 Metode istraživanja

### 4.21. Biopsija korionskih resica

Biopsija korionskih resica, izvodi se između 11. i 14. tjedana trudnoće transabdominalnim pristupom pod kontrolom ultrazvuka. Uzorak korionskih resica aspirira se u špricu od 20 mL koja sadrži 5 mL RPMI medija (engl. Roswell Park Memorial Institute), pod podtlakom uz dodatak antikoagulansa heparina. Aspirirani materijal mora sadržavati 5 do 20 mg korionskih resica. Uzorci manji od 5 mg nisu dostatni za kromosomsku analizu. Neposredno nakon zahvata uzorak se šalje u laboratorij gdje se pod invertnim mikroskopom pažljivo čisti i odvajaju se korionske resice od decidualnog tkiva. Očišćene i usitnjene resice se uspostavljaju u kulturu stanica, a u slučaju dijagnostike genskih ili metaboličkih poremećaja dio uzorka se odvaja u nativnom obliku i šalje se na daljnju analizu u odgovarajući laboratorij. Za citogenetsku analizu uspostavljaju se dva tipa kulture stanica: kratkotrajna kultura preko noći i dugotrajna kultura stanica.

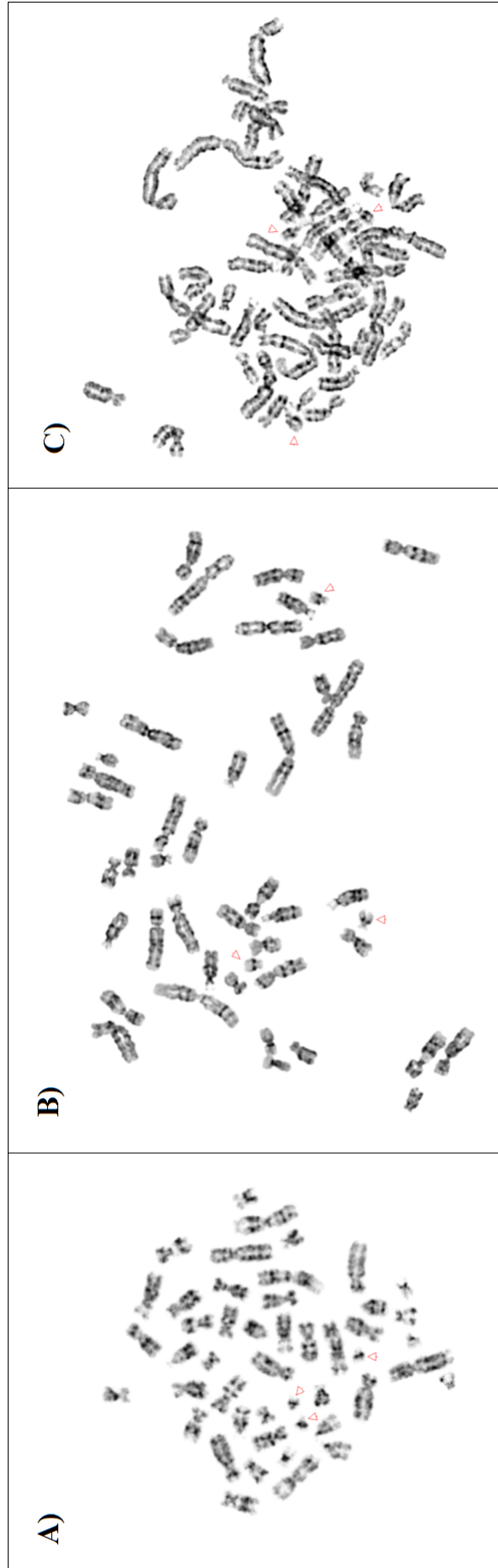
*Kratkotrajna kultura stanica* koristi površinski sloj stanica citotrofoblasta koje se brzo dijele. Očišćene resice prebacuju se u epruvete s 2 mL potpunog medija (Amniomax, Euroclone). Ovisno o količini dobivenog materijala nasaduje se 3-6 epruveta. Resice se inkubiraju 5 sati pri temperaturi od 37°C i 5% CO<sub>2</sub>, nakon čega se prebacuju na temperaturu od 4°C u frižider. Sutradan ujutro epruvete se prenose u inkubator na 37°C i 5% CO<sub>2</sub> narednih 5 sati. Zatim se u kulturu dodaje 80µL kolcemida (KaryoMAX COLCEMID, Gibco) i inkubira narednih 30 minuta. Epruvete s kulturama se centrifugiraju i dodaje se 1%-tna otopina Na-citrata (1 g Na-citrata otopljen u 100 mL destilirane vode, Sigma) te se ostavi jedan sat na sobnoj temperaturi. Stanična suspenzija ispire se dva puta s fiksativom koji sadrži metanol i octeua kiselinu u omjeru 2:1 (Merck). Centrifugira se, te se talog razbije dodatkom 0,2 mL 60%-tne octene kiseline. Nakon tri minute stanična suspenzija se nakapa na hladna i mokra predmetna stakla. Stakla se suše nad vodenom kupelji zagrijanom na 45°C. Preparati se boje metodom G pruganja koja uključuje tretiranje 0,25%-tnom otopinom tripsina (0,25% Trypsin (1X), Gibco) i bojenje Giemsa bojom (Merck).

*Dugotrajna kultura stanica* sadrži stanice mezenhimalne strome. Očišćene resice mehanički se usitnjavaju (maceriraju) i/ili enzimski obrađuju dodatkom 2 mL tripsina (0,25% Trypsin (1X), Gibco) zagrijanog na 37°C kako bi se uklonio površinski sloj stanica citotrofoblasta. Zatim slijedi inicijacija dviju ili više primarnih staničnih kultura koje se kultiviraju pri temperaturi od 37°C i 5% CO<sub>2</sub> u vremenskom periodu od sedam do 14 dana. Tijekom

kultiviranja nadzire se rast stanica pod invertnom lupom. Stanična dioba zaustavlja se dodavanjem kolcemida (KaryoMAX COLCEMID, Gibco) u trajanju od 20 minuta. Stanična suspenzija se centrifugira, a talog se otopi dodavanjem 4 – 5 mL 0,07M hipotonične otopine kalijevog klorida (KCl). Stanice se zatim fiksiraju ispiranjem tri puta fisativom načinjenim od ledene octene kiseline i metanola u omjeru 1 : 3 (Merck). Stanična suspenzija u 60% - tnoj octenoj kiselini se nakapava na hladna i mokra predmetna stakla. Stakla se suše nad vodenom kupelji.

Kako bi se postigla bolja razlučivost kromosoma, odnosno kako bi se dobili duži kromosomi s većim brojem pruga, u jednoj od primarnih kultura provede se postupak sinkronizacije stanične diobe dodavanjem inhibitora sinteze DNA (slika 7). Postupak sinkronizacije provodi se dodavanjem bromodeoksiuridina (BrdU5 – Bromo-2'-deoxyuridine, Sigma) konačne koncentracije 200 $\mu$ g/mL 24 sata prije prekida stanične kulture, kojeg slijedi dodavanje timidina (Thymidine, Sigma) u koncentraciji od 3 $\mu$ g/mL. Prekid kulture i bojenje preparata provode se kako je prethodno opisano. Prema postupniku Udruženja kliničkih citogenetičara Velike Britanije (Association for Clinical Cytogenetics) iz 2009. godine, prilikom citogenetske analize kromosomskih preparata potrebno je analizirati minimalno tri metafaze dobivene kratkotrajnom kulturom stanica i minimalno dvije metafaze s dobrom razlučivosti kromosoma iz dugotrajne kulture stanica (55). Radi što veće pouzdanosti ove metode u smislu postojanja mozaicizma pregledava se veći broj metafaza, a u slučaju pronalaska dvije ili više metafaza s istim tipom kromosomske aberacije dodatna procjena i analiza radi se prema postupnicima Hsua i Benna (56). Fluorescencijska *in situ* hibridizacija provodi se u slučajevima gdje postoji rizik pronalaska strukturnih kromosomskih poremećaja (npr. roditelji nositelji balansirane translokacije) ili kromosomskih promjena koje se ne mogu uočiti ili razlučiti njihovo podrijetlo klasičnom citogenetskom analizom.





Slika 7. Različite tehnike pripreme kromosomskih preparata iz uzorka korionskih resica u našem laboratoriju u slučaju trisomije A) kratkotrajna kultura stanica citotrofoblasta, B) dugotrajna kultura mezenhimalne strome, C) metoda sinkronizacije stanične diobe bromodeoksiuridinom/timidinom. Metafaze muškog ploda s trisomijom 21; strelicom su označena tri kromosoma 21.

#### 4.22 Uzorkovanje krvi i izdvajanje DNA

Vensku krv trudnica uzorkovani smo u epruvete s podtlakom kojima je dodan antikoagulans EDTA. Krvnu plazmu odvojili smo od krvnih stanica centrifugiranjem pri 1400 g tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Plazmu smo pažljivo prenijeli u novu sterilnu epruvetu pazeći da prilikom pipetiranja ne poremetimo sloj leukocita. Nakon toga, plazmu smo ponovo centrifugirali, ovaj put pri 4500 g tijekom 10 minuta, da bi uklonili eventualno zaostale stanice ili stanični sadržaj. Supernatant smo prenijeli u novu sterilnu epruvetu te pohranili pri  $-80^{\circ}\text{C}$  do analize. Za izdvajanje (izolaciju) DNA iz plazme koristili smo komercijalne kolone sa silika-membranom. Izdvajanje DNA na kolonama sa silika-membranom proveli smo pomoću *QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Midi Kit* (Qiagen Company) kompleta reagensa koji sadržava različite kemikalije i kolone za izdvajanje i pročišćavanje DNA. Pritom su napravljene manje izmjene originalnih uputa za izolaciju preporučenih od strane proizvođača (57). Početni volumen trudničke plazme iz kojeg smo izolirali DNA bio je 4 ml, a konačni volumen eluata 100  $\mu\text{L}$ . Izdvajanje DNA započeli smo inkubiranjem plazme u odgovarajućem puferu i uz prisutnost proteinaze K, koji se nalaze u sastavu kompleta. Nakon inkubiranja smjese u vremenu od 20 minuta pri  $70^{\circ}\text{C}$ , smjesu smo prebacili na tzv. silika-membranu unutar kolone. DNA se vezala za membranu, a ostatak smjese prolazio je kroz pore membrane. Nakon toga DNA smo pročišćavali različitim puferima te ispirali u posebne tubice korištenjem pufera koji cijepa veze između DNA i membrane. Izabrali smo ovu metodu jer je pogodna za izdvajanje DNA iz različitih bioloških uzoraka s minimalnom količinom DNA.

#### 4.23 Kvantifikacija ukupne i fetalne slobodne DNA

Kvantifikacija ukupne i fetalne slobodne DNA izvedena je primjenom dvaju komercijalno dostupnih kompleta reagensa tvrtke Applied Biosystems: *Quantifiler*<sup>®</sup> *Human DNA Quantification Kit* i *Quantifiler*<sup>®</sup> *Y Human Male DNA Quantification Kit*. Navedeni kompleti reagensa namijenjeni su primjeni u forenzici, no zbog njihove osjetljivosti, specifičnosti, robusnosti i optimiranosti, odlučili smo ih koristiti u ovom istraživanju. *Quantifiler Y* je, uz to, prvi komercijalno dostupan komplet reagensa namijenjen kvantifikaciji muške DNA u uzorku koji je smjesa muške i ženske DNA te smo smatrali da bi ovakav tip reagensa bio pogodan za analizu trudničke plazme (58). Kvantifikacija ukupne i fetalne (muške), slobodne DNA, rađena je instrumentom za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu *ABI PRISM 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems). PCR u stvarnom vremenu (eng. *real time PCR*) je varijanta metode PCR kod koje je moguće kontinuirano, tijekom odvijanja PCR reakcije, na monitoru uređaja pratiti nastajanje produkta. Usporedno s nastankom produkta, intenzitet oslobođene fluorescencije se bilježi, obrađuje i analizira te pohranjuje u samom instrumentu te su po završetku analize rezultati spremni za prenošenje i daljnju obradu. Prednost metode PCR u stvarnom vremenu pred konvencionalnom PCR metodom je što omogućava pouzdanu kvantifikaciju DNA (eliminira problem “plato”-faze prisutan kod kvantifikacije konvencionalnim PCR metodama) te što nema potrebe za dodatnom analizom PCR produkata. Kvantifikacija DNA primjenom *Quantifiler* reagensa koristi Taqman metodologiju koja se temelji na 5'-3' egzonukleaznoj aktivnosti *AmpliTaq Gold*<sup>®</sup> *DNA Polymerase*. Ona razgrađuje hibridiziranu Taqman sondu samo onda kada je sonda vezana za ciljni odsječak između uzvodne i nizvodne početnice, odnosno ukoliko se ciljni odsječak umnožava. To uzrokuje razdvajanje reporterske fluorescentne boje (vezane na 5'-kraju sonde) od nefluorescentnog prigušivača (vezanog na 3'-kraju sonde) što za posljedicu ima emitiranje fluorescencije određene valne duljine. Fragmenti sonde odstranjuju se s ciljnog odsječka DNA i nastavlja se polimerizacija. 3'-kraj sonde je blokiran da bi se izbjeglo produljenje sonde za vrijeme PCR reakcije. Do povećanja fluorescentnog signala doći će samo onda kada je ciljna sekvenca komplementarna sondi i amplificirana tijekom PCR reakcije. Na ovaj način se ne detektiraju nespecifična umnažanja. Intenzitet fluorescencije ovisi o količini nastalog PCR produkta. Primjenom različitih početnica i sondi obilježenih različitim fluorescentnim bojama, omogućava se višestruka (multipleks) analiza. *Quantifiler Human* kompletom reagensa kvantificirana je ukupna humana DNA umnažanjem nekodirajuće regije hTERT(engl. human telomerase reverse transcriptase) gena u

kromosomskoj regiji 5p15.33 duljine amplikona od 62 baze . *Quantifiler Y* kompletom reagensa dokazana je te ujedno i kvantificirana eventualno prisutna muška humana DNA umnažanjem nekodirajuće regije SRY (engl. sex determining region) gena u kromosomskoj regiji Yp11.3 duljine amplikona od 62 baze . Osim para početnica i sonde za ciljne (tražene) regije, oba kompleta sadrže i par početnica i odgovarajuću sondu za amplifikaciju kontrolne sintetske DNA prisutne u reagensu. Istovremena amplifikacija sintetske DNA i ciljne DNA služi kao kontrola uspješnosti PCR reakcije (ukazuje na prisutnost inhibitora PCR reakcije u uzorku) te prisutnosti DNA u uzorku. Koncentracija DNA u uzorcima određena je pomoću standardne krivulje koja je konstruirana uz svaku seriju analiza serijskim razrjeđivanjem 200 ng/μl matične otopine standarda iz kompleta. Pripremali smo sljedeće točke standardne krivulje: 16.7, 5.56, 1.85, 0.62, 0.21, 0.068, 0.023 i 0.0076 ng/μl. Svaki uzorak analizirali smo u triplikatu, a točke standardne krivulje u duplikatu. PCR reakcija odvijala se pri sljedećim uvjetima:  $95^{\circ}\text{C}/10\text{ minuta} \rightarrow 40\text{ ciklusa } (95^{\circ}\text{C}/15\text{ sekundi}, 60^{\circ}\text{C}/1\text{ minuta})$ .

## 5. STATISTIČKA RAŠČLAMBA

Podatci su prikazani tablično i grafički. Kategorijske i nominalne vrijednosti prikazane su kroz odgovarajuće frekvencije i udjele, dok su se kvantitativne vrijednosti prikazale kroz medijane i interkvartilne raspone. Kolmogorov-Smirnovljevim testom analizirana je raspodjela kvantitativnih podataka te su se shodno dobivenim podacima primijenili odgovarajući neparametrijski testovi. Usporedbe između kvantitativnih vrijednosti načinjene su Mann-Whitney U testom u slučajevima kada su se uspoređivale razlike između dviju skupina, dok su se razlike između više od dviju skupina (gestacijska dob) analizirale Kruskal-Wallisovim testom. Razlike u kategorijskim varijablama analizirane su  $X^2$  testom. Povezanost pojedinih kliničkih parametara s ukupnom slobodnom DNA i fetalnom slobodnom DNA kod muških plodova u ispitivanoj i kontrolnoj skupini analizirana je Spearmanovim koeficijentima korelacije. Analizom krivulje osjetljivosti (ROC analizom) odredila se granična vrijednost ukupne slobodne DNA u predikciji aneuploidija. Binarnom logističkom regresijom odredio se omjer šansi (OR) i odgovarajući 95% interval pouzdanosti pripadnosti skupini s aneuploidijama u odnosu na graničnu vrijednost ukupne slobodne DNA. Sve P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. Koristila se statistička podrška IBM SPSS Statistics, verzija 21.0 ([www.spss.com](http://www.spss.com)).

## 6. REZULTATI

Istraživanje je obuhvatilo 56 trudnica s različitim tipovima kromosomskih poremećaja u ispitivanoj i 56 trudnica s eutrofičnim ročnim porodom, normalnog tijeka trudnoće u usporednoj skupini.

Nije bilo statistički značajne razlike u dobi (Pearson  $\chi^2$  test=0.00;df=1; p=1,00) i tjelesnoj težini (Mann Whitely U test; p=1,04) trudnica između ispitivane i usporedne skupine. Srednja dob trudnica u ispitivanoj skupini iznosila je 32 godine, a u usporednoj skupini 35 godina. Prosječna tjelesna težina u usporednoj skupini je iznosila 65 kg, a u ispitivanoj 68 kg. Podjela trudnica prema gestacijskoj dobi uzimanja uzoraka u prvom tromjesečju trudnoće oblikovala je tri skupine: prva koja je obuhvatila 11. (11-11+6), druga 12. (12-12+6) i treća 13. (13-13+6) tjedan trudnoće.

Ispitivana skupina imala je oko 43% trudnica u 13. tjednu trudnoće u odnosu na usporednu skupinu gdje je 64% ispitanica bilo u 12. tjednu trudnoće (tablica 2). Raspodjela trudnica prema gestacijskoj dobi probira prvog tromjesečja u usporednoj i ispitivanoj skupini značajno se razlikovala i prikazana je na slici 8 (Pearson $\chi^2=15.1$ ; df=2;p=0,001).

Nije bilo statistički značajne razlike u raspodjeli fetalnog spola između ispitivane i usporedne skupine što pokazuje da su skupine dobro odabrane po kriterijima uključivanja u istraživanje (Pearson  $\chi^2=0,00$ ; df=1; p=1,00). U ispitivanoj skupini je ukupna i fetalna slobodna DNA izolirana kod 56 trudnica. Unutar usporedne skupine izolacija i kvantifikacija ukupne i fetalne slobodne DNA nije bila uspješna jedne trudnice.

Učestalost pojedinih tipova kromosomskih poremećaja u ispitivanoj skupini prikazuje slika 9. Od ukupnog broja aneuploidija najzastupljenija kromosopatija je bila trisomija 21 na koju se odnosi 41,1% ukupne kromosomske patologije. Druga po učestalosti bila je trisomija 18 s udjelom od 26,8%, te potom slijedi triploidija (10,7%), Udio najčešćih kromosomskih poremećaja (sindrom Down, sindrom Edwards i sindrom Patau) iznosio je 75%. Udio Robertsonovih translokacija koje uključuju kromosom 21 iznosio je oko 4% u skupini plodova sa sindromom Down. Radilo se o homolognoj Robertsonovoj translokaciji 21;21 *de novo* podrijetla (slika 10). Otkrivena su još tri strukturna kromosomska poremećaja. U sva tri slučaja roditelji su imali normalne kariotipove, te se radi o *de novo* promjenama. Poredbom srednje vrijednosti ukupne slobodne DNA od 0,02142 ng/ $\mu$ L sa srednjom vrijednošću za 13. tjedan trudnoće od 0,0684 ng/ $\mu$ L zamjećujemo značajno snižene vrijednosti u odnosu na usporednu skupinu. Radilo se o sljedećim strukturnim razmještanjima: mozaičnom obliku prekobrojnog kromosoma u 54% metafaza koji sadrži dio kromosoma 20 vezan u prsten

(47,XX,r(20)(p11.1q11.2)/46,XX dn) (slika 11); intersticijskoj deleciji 13. kromosoma koja uključuje i RB1 (eng. retinoblastoma 1) gen (46,XX,del(13)(q12.3;q22); i nebalansiranu recipročnu translokaciju između dugog kraka 13. kromosoma i kratkog kraka 18. kromosoma (46,XY,-13,+der(18)t(13;18)(q1?2);p11.3).

Kliničke, biokemijske i biološke osobitosti prema podskupinama gestacijske dobi kraja prvog tromjesečja u usporednoj skupini opisane su u tablici 3. Nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima ukupne i fetalne slobodne DNA unutar podskupina prema tjednim razdiobama gestacijske dobi od 11. do kraja 13. tjedna trudnoće. Udaljenost tjeme -trtica statistički je značajno pozitivno koreliralo s porastom gestacijske dobi (Kruskal-Wallis 29,48; df=2; p<0,001). Slika 12 prikazuje raspodjelu ukupne slobodne DNA u usporednoj skupini prema podskupinama gestacijske dobi kraja prvog tromjesečja. U navedenom vremenskom okviru povećanje gestacijske dobi pridonosi samo 0,6% ukupnoj varijabilnosti vrijednosti slobodne DNA. Ukupna slobodna DNA statistički je značajno negativno korelirala s veličinom nuhalne prozirnosti (Kruskal-Wallis 6,01; df=2; p=0,005) u usporednoj skupini. Nije bilo statistički značajne povezanosti ukupne i fetalne slobodne DNA s vrijednostima biokemijskih biljega majke PAPP-A i  $\beta$ HCG što je prikazano u tablici 4.

Kliničke, biokemijske i biološke osobitosti prema podskupinama gestacijske dobi kraja prvog tromjesečja u ispitivanoj skupini opisane su u tablici 5. Vrijednosti ukupne i fetalne slobodne DNA ne pokazuju značajne razlike u promatranom razdoblju trajanja trudnoće od 11. do kraja 13. tjedna. Za razliku od usporedne skupine u ispitivanoj skupini nije bilo znakovite povezanosti između ukupne slobodne DNA i veličine nuhalne prozirnosti. Nije bilo statističke značajne povezanosti niti sa serumskim biokemijskim biljezima majke kao i u usporednoj skupini (tablica 6).

Od 56 trudnica iz ispitivane skupine u 26 slučajeva je indikacija za kariotipizaciju postavljena temeljem ultrazvučnog nalaza septirane nuhalne prozirnosti odnosno cističnog higroma, što je činilo više od 46% indikacija za ranu kariotipizaciju. Generalizirani hidrops bio je prisutan u sedam slučajeva. Nije se našla statistički značajna razlika u vrijednostima ukupne ili fetalne slobodne DNA između septiranih i neseptiranih oblika nuhalne prozirnosti, dok razlike nije bilo niti između septiranih oblika ovisno da li su bili udruženi s generaliziranim hidropsom ili ne (tablica 7 i 8).

Ductus venosus uspješno se prikazao kod 21 trudnice u ispitivanoj skupini od čega je njih osam imalo izostanak ili povratni A val. Statističkom obradom nismo našli svezu ultrazvučnog prikaza A vala i vrijednosti bilo ukupne ili fetalne slobodne DNA (tablica 9).

Usporedba kliničkih, biokemijskih i bioloških osobitosti između ispitivane i usporedne skupine s vrijednostima fetalne i ukupne slobodne DNA prikazana je u tablici 10. Ispitivana skupina imala je statistički značajno niže vrijednosti ukupne slobodne DNA u odnosu na usporednu skupinu (slika 13,  $p=0,001$ ), dok nije bilo razlike u vrijednostima fetalne slobodne DNA. Osim po vrijednostima ukupne slobodne DNA skupine se međusobno razlikuju i po veličini nuhalne prozirnosti koja je statistički značajno viša u ispitivanoj skupini (slika 14,  $p<0,001$ ). Statistički je značajna razlika vrijednosti MoM PAPP-A, koja je bila snižena kod aneuploidnih trudnoća, između ispitivane i usporedne skupine ( $p<0,001$ ). Slika 15. prikazuje poredbu vrijednosti ukupne slobodne DNA između usporedne skupine i različitih tipova kromosomopatija u ispitivanoj skupini. Srednje vrijednosti ukupne slobodne DNA bile su snižene kod svih dijagnosticiranih tipova kromosomopatija. Najveća odstupanje pokazale su vrijednosti ukupne slobodne DNA kod sindroma Patau, triploidije i skupine strukturnih kromosomskih razmještanja. Unutar ispitivane skupine nije bilo razlika u vrijednostima ukupne slobodne DNA između najzastupljenijih tipova kromosomopatija (sindrom Down, sindrom Edwards i sindrom Patau, Tablica 11).

ROC (engl. Receiver operating characteristic) krivulja bila je značajna samo za ukupnu slobodnu DNA ( $p=0,002$ ). Utvrđena je granična vrijednost ukupne slobodne DNA koja opisuje rizik pripadanja skupini koja ima aneuploidiju (slika 16). Veličina površine ispod krivulje iznosila je 0,688, pokazujući da će vrijednosti ukupne slobodne DNA biti niže ukazujući na postojanje fetalne aneuploidije u odnosu na 68,8% trudnica s euploidnim trudnoćama. Granična vrijednost koncentracija slobodne ukupne DNA bila je  $\leq 0,0298$  ng/mL, pri čemu je osjetljivost metode bila 48,21%, a specifičnost 85,45%. Binarna logistička regresija pokazala je da trudnice čija je vrijednost ukupne slobodne DNA  $\leq 0,0298$  ng/ $\mu$ L imaju omjer izgleda 5,47 puta veći nositi aneuploidan ploda sa 95% intervalom pouzdanosti od 2,19 do 13,66 u odnosu na trudnice koje imaju više vrijednosti ukupne slobodne DNA ( $p<0,001$ ) (tablica 12).

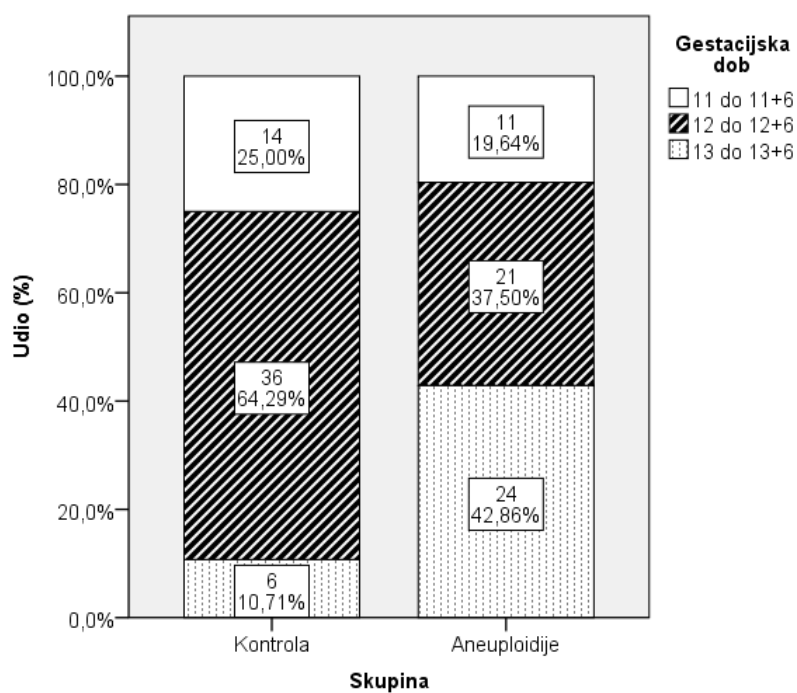
Fetalna frakcija koja predstavlja omjer vrijednosti fetalne slobodne DNA i ukupne slobodne DNA, određena je u trudnica koje su nosile muški plod. Udio slobodne fetalne DNA nije se razlikovao između usporedne skupine i skupine ispitanica i iznosio je oko 6% (tablica 13;  $p=0,621$ ). Također nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima fetalne frakcije među različitim tipovima kromosomopatija unutar skupine ispitanica ( $p=0,686$ ).



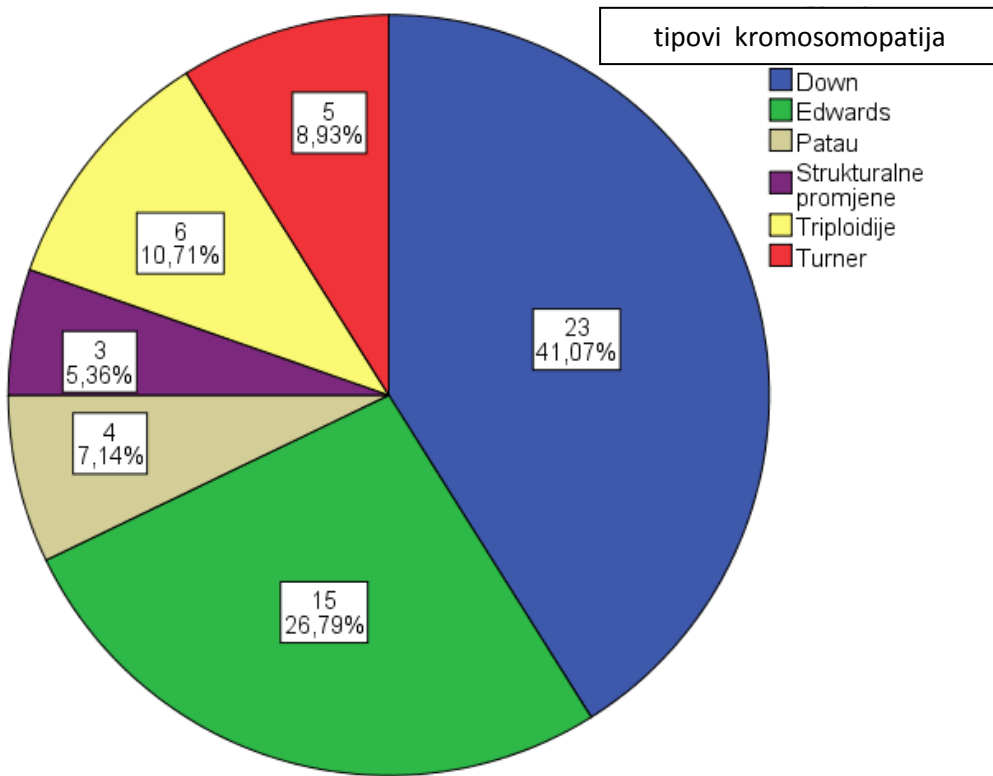
Tablica 2. Raspodjela trudnica prema gestacijskoj dobi probira u ispitivanoj i usporednoj skupini.

		Skupina			
		Usporedna		Aneuploidije	
		N	%	N	%
Gestacijska dob	11 do 11+6	14	25,0%	11	19,6%
	12 do 12+6	36	64,3%	21	37,5%
	13 do 13+6	6	10,7%	24	42,9%

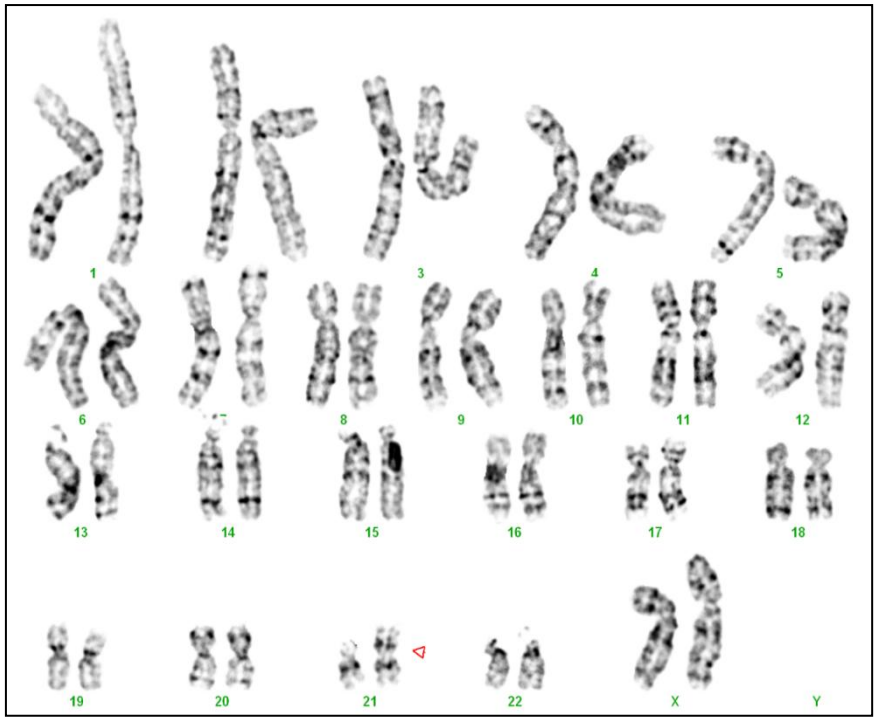
N, broj trudnica; Pearson  $X^2=15,1$ ;  $df=2$ ;  $p=0,001$



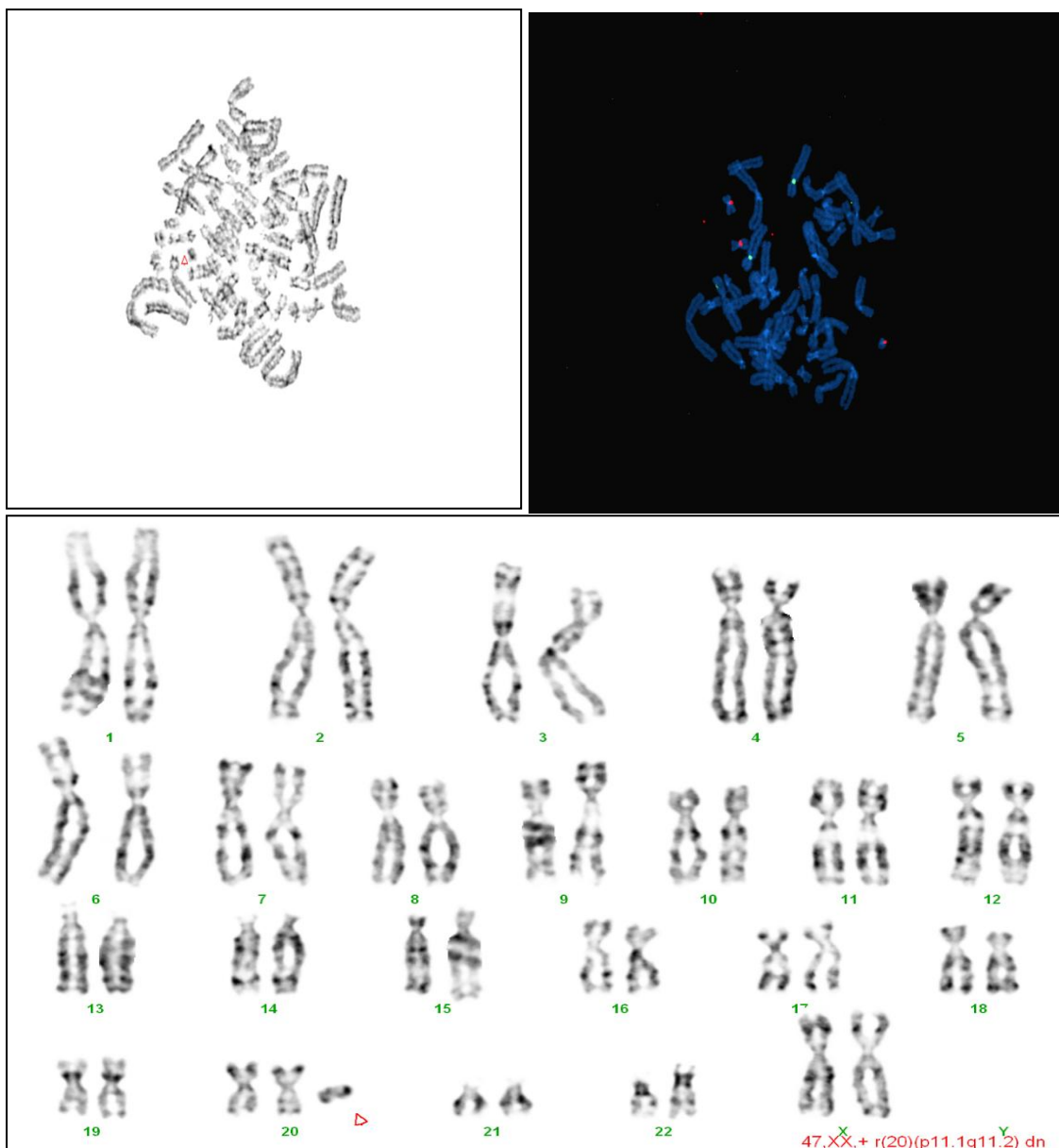
Slika 8. Raspodjela trudnica po gestacijskoj dobi između usporedne i ispitivane skupine.



Slika 9. Raspodjela pojedinih tipova kromosopatija u ispitivanoj skupini.



Slika 10. *De novo* homologna Robertsonova translokacija 21q;21q (strelica), kariotip 46,XX,der(21;21)(q10;q10),+21 dn.



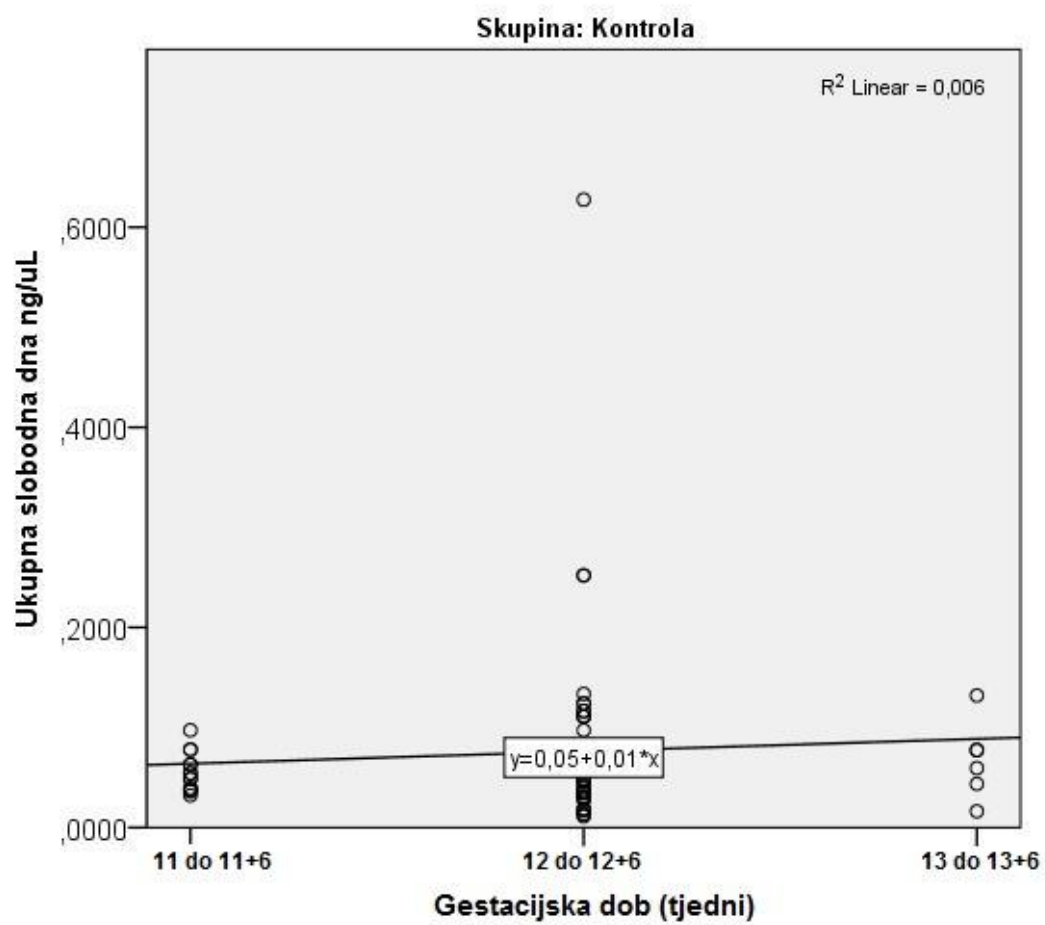
Slika 11. Mozaični oblik *de novo* prekobrojnog prstenastog kromosoma koji sadrži dio kromosoma 20. A) obje vrste kultura korionskih resica pokazale prisutnost prekobrojnog prstenastog kromosoma u 43% metafaza. B) FISH analiza za određivanje podrijetla prekobrojnog prstenastog kromosoma C) Kariotip iz kulture plodove vode: 47,XX,r(20)(p11.1q11.2)/46,XX dn; prekobrojni prstenasti kromosom (strelica) nalazi se u 54% metafaza.

Tablica 3. Kliničke biokemijske i biološke osobitosti prema podskupinama gestacijske dobi u usporednoj skupini.

Gestacijska dob	N	Min	Max	Percentile			
				25.	Medijan	75.	
Ukupna slobodna DNA ng/uL	11 - 11+6	14	0,0321	0,0973	0,0386	0,0518	0,0666
	12 - 12+6	35	0,0112	0,6276	0,0302	0,0419	0,1111
	13 - 13+6	6	0,0163	0,1320	0,0368	0,0684	0,0911
Fetalna slobodna DNA ng/uL (muški plo-vi)	11 - 11+6	5	0,0020	0,0048	0,0020	0,0041	0,0045
	12 - 12+6	19	0,0008	0,0111	0,0012	0,0031	0,0048
	13 - 13+6	2	0,0005	0,0026	0,0004	0,0016	0,0168
Nuhalna prozirnost (mm)	11 - 11+6	14	0,60	2,70	0,60	0,80	1,30
	12 - 12+6	36	0,12	2,70	0,90	1,30	1,58
	13 - 13+6	6	0,80	1,70	1,10	1,20	1,33
MoM PAPP	11 - 11+6	14	0,30	2,95	0,46	0,92	1,86
	12 - 12+6	36	0,30	3,00	0,69	1,12	1,52
	13 - 13+6	6	0,59	2,00	1,03	1,87	1,96
MoM $\beta$ HCG	11 - 11+6	14	0,41	3,74	1,03	1,42	1,99
	12 - 12+6	36	0,38	2,94	0,73	1,04	1,46
	13 - 13+6	6	0,60	2,20	0,71	1,27	1,88
udaljenost TT (mm)	11 - 11+6	14	45,00	55,00	48,00	51,00	52,75
	12 - 12+6	36	48,00	69,00	54,00	58,00	60,00
	13 - 13+6	6	65,00	70,00	66,50	68,50	70,00

	Kruskal-Wallis	df	P
Ukupna slobodna DNA ng/uL	0,74	2	0,689
Fetalna slobodna DNA ng/uL	2,03	2	0,363
Nuhalna prozirnost (mm)	6,01	2	0,050
MoM PAPP	2,71	2	0,257
MoM $\beta$ HCG	2,75	2	0,253
udaljenost TT mm	29,48	2	<0,001°

p<0,05; N, broj trudnica; MoM PAPP, višekratnik medijana u neugroženim trudnoćama za trudnički plazmatski protein-A; MOM  $\beta$ HCG, višekratnik medijana u neugroženim trudnoćama za humani korionski gonadotropin; TT, udaljenost tjeme - trtica.



Slika 12. Raspodjela ukupne slobodne DNA u usporednoj skupini prema tjednima trajanja trudnoće u ispitivanom razdoblju.

Tablica 4. Povezanost gestacijske dobi, ultrazvučnih i biokemijskih varijabli s ukupnom i fetalnom slobodnom DNA u usporednoj skupini.

USPOREDNA SKUPINA		Ukupna slobodna DNA ng/uL	Fetalna slobodna DNA ng/uL
Gestacijska dob	Korelacijski koeficijent rho	-0,004	-0,258
	P	0,977	0,203
	N	55	26
Nuhalna prozirnost (mm)	Korelacijski koeficijent rho	-0,370	-0,181
	P	0,005*	0,377
	N	55	26
MoM PAPP	Korelacijski koeficijent rho	0,027	0,026
	P	0,844	0,898
	N	55	26
MoM bHCG	Korelacijski koeficijent rho	0,230	-0,154
	P	0,091	0,451
	N	55	26
udaljenost TT( mm)	Korelacijski koeficijent rho	0,005	-0,109
	P	0,971	0,597
	N	55	26

Spearmanov korelacijski koeficijent; \* $p < 0,05$ ; MoM PAPP, višekratnik medijana u neugroženim trudnoćama za trudnički plazmatski protein; MOM  $\beta$ HCG, višekratnik medijana u neugroženim trudnoćama za humani korionski gonadotropin; TT, udaljenost tjeme - trtica.

Tablica 5. Kliničke, biokemijske i biološke osobitosti prema podskupinama gestacijske dobi u ispitivanoj skupini.

GESTACIJSKA DOB	N	Min	Max	Percentile			
				25.	Medijan	75.	
Ukupna slobodna DNA ng/uL	11 - 11+6	11	0,0154	0,0710	0,0206	0,0278	0,0440
	12 - 12+6	21	0,0031	0,1262	0,0247	0,0309	0,0509
	13 - 13+6	24	0,0027	0,1121	0,0186	0,0341	0,0528
Fetalna slobodna DNA ng/uL (muški plodovi)	11 - 11+6	4	0,0000	0,0081	0,0005	0,0040	0,0076
	12 - 12+6	7	0,0001	0,0087	0,0001	0,0026	0,0054
	13 - 13+6	15	0,0000	0,0197	0,0007	0,0015	0,0053
Nuhalna prozirnost (mm)	11 - 11+6	11	0,72	8,00	1,00	4,20	7,80
	12 - 12+6	21	1,70	9,00	3,00	4,80	6,00
	13 - 13+6	23	1,50	9,00	4,00	5,10	6,00
MoM PAPP	11 - 11+6	7	0,05	0,31	0,11	0,20	0,27
	12 - 12+6	9	0,10	1,73	0,18	0,52	1,06
	13 - 13+6	10	0,14	1,10	0,28	0,38	0,70
MoM bHCG	11 - 11+6	7	0,07	1,49	0,17	0,33	1,41
	12 - 12+6	9	0,09	17,30	0,39	1,80	3,47
	13 - 13+6	10	0,09	5,30	0,26	1,09	2,42
udaljenost TT ( mm)	11 - 11+6	11	45,00	60,00	45,00	47,00	50,00
	12 - 12+6	21	50,00	65,00	55,00	62,00	63,50
	13 - 13+6	24	63,00	80,00	65,50	70,00	75,75

	Kruskal-Wallis	df	P
Ukupna slobodna dna ng/uL	0,20	2	0,906
Fetalna slobodna dna ng/uL	0,73	2	0,693
Nuhalna prozirnost (mm)	1,36	2	0,505
MoM PAPP	5,93	2	0,051
MoM bHCG	2,78	2	0,250
udaljenost TT ( mm)	44,53	2	<0,001°

p<0,05; N, broj trudnica; MoM PAPP, višekratnik medijana u neugroženim trudnoćama za trudnički plazmatski protein; MOM βHCG, višekratnik medijana u neugroženim trudnoćama za humani korionski gonadotropin; TT, udaljenost tjeme - trtica.



Tablica 6. Povezanost gestacijske dobi, ultrazvučnih i biokemijskih varijabli s ukupnom i fetalnom slobodnom DNA u ispitivanoj skupini.

ANEUPLOIDIJE		Ukupna slobodna DNA ng/uL	Fetalna slobodna DNA ng/uL
Gestacijska dob	Korelacijski koeficijent rho	0,045	-0,165
	P	0,741	0,419
	N	56	26
Nuhalna prozirnost (mm)	Korelacijski koeficijent rho	0,186	0,355
	P	0,173	0,082
	N	55	25
MoM PAPP	Korelacijski koeficijent rho	0,209	0,211
	P	0,306	0,469
	N	26	14
MoM bHCG	Korelacijski koeficijent rho	0,248	0,225
	P	0,221	0,459
	N	26	13
udaljenost TT( mm)	Korelacijski koeficijent rho	0,134	-0,155
	P	0,326	0,450
	N	56	26

Spearmanov korelacijski koeficijent; MoM PAPP, višekratnik medijana u neugroženim trudnoćama za trudnički plazmatski protein; MOM  $\beta$ HCG, višekratnik medijana u neugroženim trudnoćama za humani korionski gonadotropin; TT, udaljenost tjeme - trtica.

Tablica 7. Vrijednosti koncentracije ukupne i fetalne slobodne DNA prema tipu nuhalne prozirnosti u ispitivanoj skupini.

SEPTIRANA NUHALNA PROZIRNOST		N	Min	Max	Percentile		
					25.	Medijan	75.
Ukupna slobodna DNA ng/uL	NE	30	0,0163	0,1262	0,0229	0,0287	0,0406
	DA	26	0,0027	0,1121	0,0178	0,0411	0,0607
Fetalna slobodna DNA ng/uL	NE	16	0,0000	0,0098	0,0001	0,0015	0,0054
	DA	10	0,0007	0,0197	0,0012	0,0023	0,0063

	Mann-Whitney U	Z	P
Ukupna slobodna DNA ng/uL	343,00	-0,77	0,440
Fetalna slobodna DNA ng/uL	58,00	-1,16	0,246

N; broj trudnica

Tablica 8. Poredba vrijednosti ukupne i fetalne slobodne DNA kod septiranih oblika nuhalne prozirnosti udruženih s generaliziranim hidropsom u ispitivanoj skupini.

Samo septirani oblici	Generalizirani hidrops	N	Min	Max	Percentile		
					25.	Medijan	75.
Ukupna slobodna DNA ng/uL	Ne	19	0,0027	0,1121	0,0167	0,0303	0,0537
	Da	7	0,0169	0,0710	0,0446	0,0605	0,0703
Fetalna slobodna DNA ng/uL	Ne	5	0,0007	0,0197	0,0011	0,0018	0,0056
	Da	2	0,0026	0,0081	0,0020	0,0054	0,0196

	Mann-Whitney U	Z	P
Ukupna slobodna DNA ng/uL	31,00	-1,76488	0,078
Fetalna slobodna DNA ng/uL	4,00	-1,04447	0,296

N; broj trudnica

Tablica 9. Usporedba ukupne i fetalne slobodne DNA u ispitivanoj skupini obzirom na obilježja ductus venosusa

	Ductus venosus	N	Min	Max	Percentile		
					25.	Medijan	75.
Ukupna slobodna DNA ng/uL	Ne	13	0,0169	0,0828	0,0318	0,0468	0,0639
	Da	8	0,0193	0,1121	0,0252	0,0394	0,0565
Fetalna slobodna DNA ng/uL	Ne	4	0,0001	0,0087	0,0015	0,0058	0,0080
	Da	5	0,0007	0,0197	0,0010	0,0017	0,0108

	Mann-Whitney U	Z	P
Ukupna slobodna DNA ng/uL	44,000	-,579	0,562
Fetalna slobodna DNA ng/uL	8,000	-,490	0,624

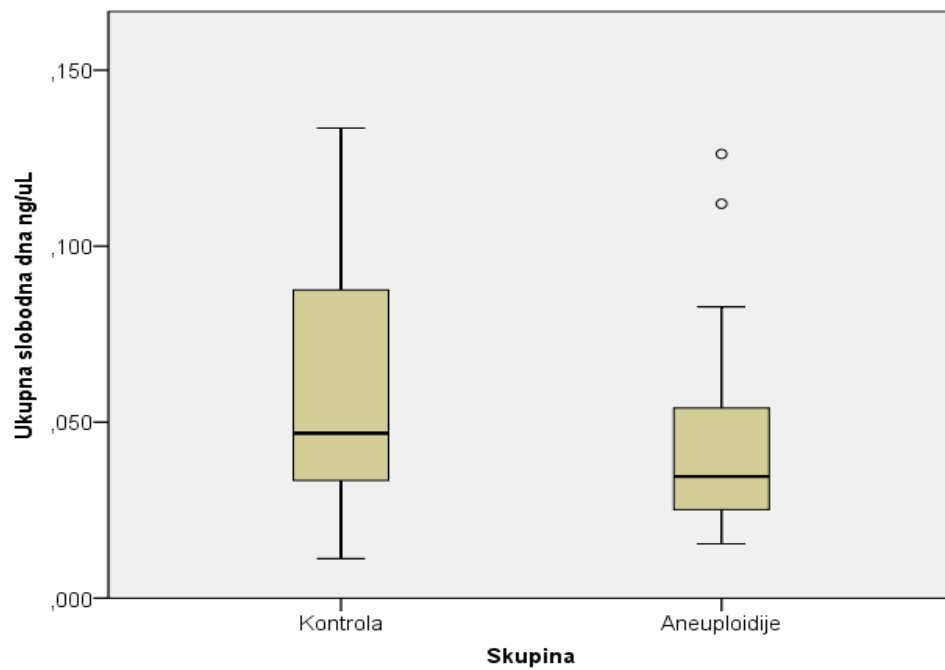
N; broj trudnica

Tablica 10. Usporedba kliničkih, biokemijskih i bioloških osobitosti između ispitivane i usporedne skupine.

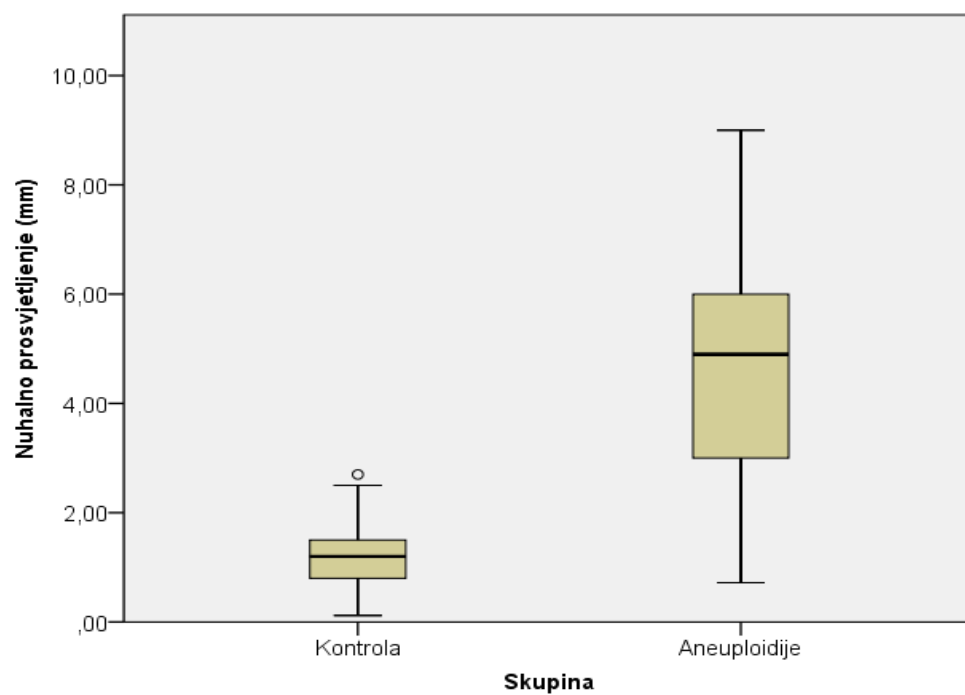
	Skupina	N	Min	Max	Percentile		
					25.	Medijan	75.
Ukupna slobodna DNA ng/uL	Kontrola	55	0,01121	0,62756	0,03481	0,04835	0,09729
	Aneuploidije	56	0,00266	0,12620	0,02064	0,03060	0,04969
Fetalna slobodna DNA ng/uL	Kontrola	26	0,00052	0,01113	0,00121	0,00288	0,00426
	Aneuploidije	26	0,00004	0,01973	0,00057	0,00178	0,00548
Dob majke (godine)	Kontrola	56	25,00	41,00	30,00	32,50	36,00
	Aneuploidije	56	21,00	43,00	30,25	35,00	38,75
Nuhalna prozirnost (mm)	Kontrola	56	0,12	2,70	0,80	1,20	1,50
	Aneuploidije	55	0,72	9,00	3,00	5,00	6,00
MoM PAPP	Kontrola	56	0,30	3,00	0,65	1,11	1,71
	Aneuploidije	26	0,05	1,73	0,16	0,31	0,54
MoM bHCG	Kontrola	56	0,38	3,74	0,75	1,09	1,73
	Aneuploidije	26	0,07	17,30	0,20	1,21	1,98
udaljenost TT (mm)	Kontrola	56	45,00	70,00	52,00	58,00	60,00
	Aneuploidije	56	45,00	80,00	52,50	63,50	70,00
Tjelesna težina (kg)	Kontrola	56	51,00	106,00	58,25	64,00	73,00
	Aneuploidije	56	47,00	97,00	62,25	70,00	79,00

	Mann-Whitney U	Z	P
Ukupna slobodna DNA ng/uL	960,000	-3,42	0,001°
Fetalna slobodna DNA ng/uL	293,000	-0,82	0,410
Dob majke (godine)	1260,000	-1,80	0,072
Nuhalna prozirnost (mm)	187,500	-7,99	<0,001°
MoM PAPP	195,000	-5,31	<0,001°
MoM bHCG	643,500	-0,84	0,400
udaljenost TT (mm)	1030,000	-3,14	0,002°
Tjelesna težina (kg)	1289,000	-1,62	0,104

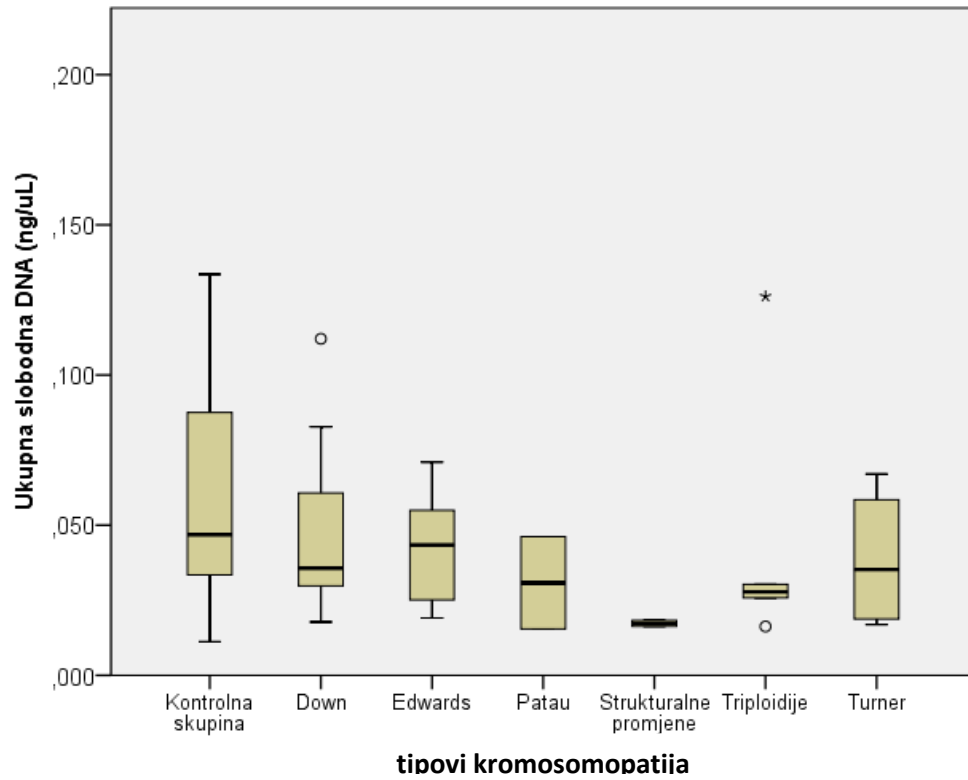
°p<0,05; N, broj trudnica; MoM PAPP, višekratnik medijana u neugroženim trudnoćama za trudnički plazmatski protein; MoM βHCG, višekratnik medijana u neugroženim trudnoćama za humani korionski gonadotropin; TT, udaljenost tjeme - trtica.



Slika 13. Razlike u vrijednostima ukupne slobodne DNA između ispitivane i usporedne skupine ( $p=0,001$ )



Slika 14. Razlike veličine nuhalne prozornosti između usporedne i ispitivane skupine ( $p<0,001$ ).



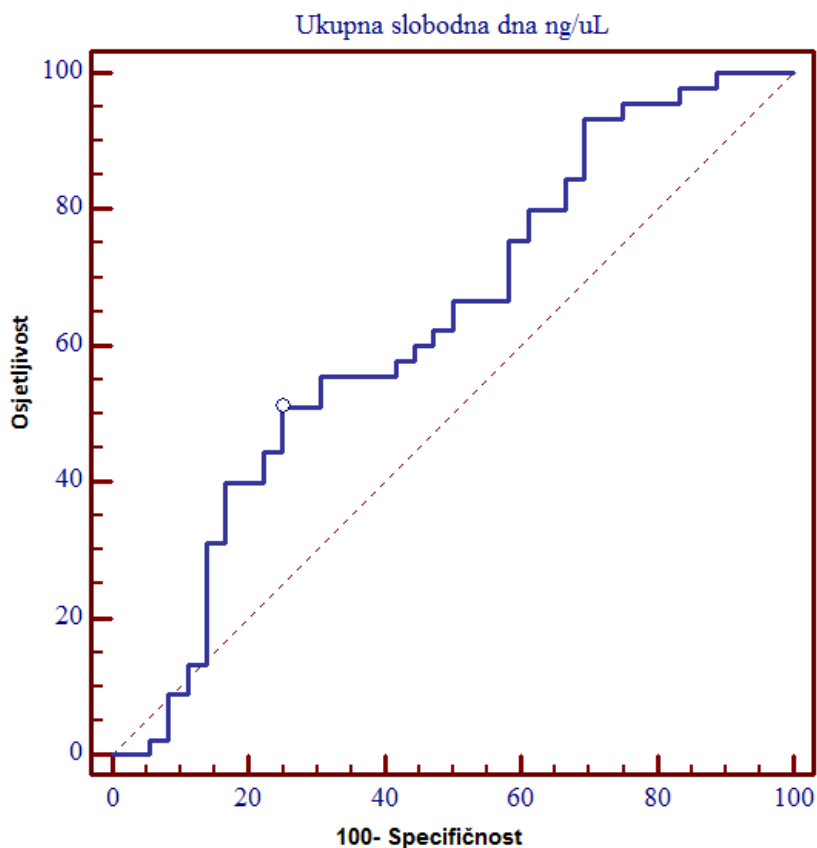
Slika 15. Raspodjela vrijednosti ukupne slobodne DNA između usporedne skupine i različitih tipova kromosomopatija.

Tablica 11. Razlike vrijednosti ukupne i fetalne slobodne DNA između najčešćih tipova kromosomopatija

	<b>Kariogram</b>	<b>N</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Percentile</b>		
					<b>25.</b>	<b>Medijan</b>	<b>75.</b>
Ukupna slobodna DNA ng/uL	Down	23	0,0027	0,1121	0,0260	0,0345	0,0493
	Edwards + Patau	19	0,0053	0,0710	0,0193	0,0428	0,0540
Fetalna slobodna DNA ng/uL	Down	12	0,0001	0,0197	0,0007	0,0015	0,0056
	Edwards + Patau	12	0,0000	0,0098	0,0012	0,0031	0,0074

	<b>Mann-Whitney U</b>	<b>Z</b>	<b>P</b>
Ukupna slobodna DNA ng/uL	217,0	-0,38	0,419
Fetalna slobodna DNA ng/uL	58,0	-0,81	0,686





Slika 16. ROC krivulja predikcije aneuploidija obzirom na ukupnu slobodnu DNA

Tablica 12. Rezultati ROC krivulje predikcije aneuploidija obzirom na ukupnu slobodnu DNA

<b>Površina ispod krivulje (AUC)</b>	0,688
<b>Standardna greška</b>	0,0508
<b>95% interval pouzdanosti</b>	0,593 to 0,773
<b>z statistika</b>	3,706
<b>Razina značajnosti P</b>	0,002
<b>Youden index J</b>	0,337
<b>Kriterij odabira (koncentracija slobodne DNA)</b>	$\leq 0,0298$
<b>Osjetljivost</b>	48,21%
<b>Specifičnost</b>	85,45%

Tablica 13. Vrijednosti fetalne frakcije u ispitivanoj i usporednoj skupini..

Skupina		N	Min	Max	Percentile		
					25.	Medijan	75.
Frakcija fetalne	Kontrola	26	0,74%	13,52%	2,27%	6,01%	10,00%
DNA	Aneuploidije	26	0,14%	54,84%	0,97%	6,60%	18,04%

Mann Whitney  $p=0,621$

## 7. RASPRAVA

Našim istraživanjem htjeli smo ispitati mogućnost ugradnje vrijednosti kvantitativnih promjena ukupne i fetalne slobodne DNA između euploidnih i aneuploidnih trudnoća u kombinirane ultrazvučne i biokemijske probire prvog tromjesečja koristeći tehnologiju lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu koja je lako primjenjiva. Neinvazivnim prenatalnim testiranjem dobivamo najviše informacija o najčešćim trisomijama i aneuploidijama spolnih kromosoma, na što otpada oko 70-80% patoloških nalaza iz prenatalne dijagnostike. Oko 20-30% odnosi se na atipične kromosomske poremećaje: numeričke promjene drugih kromosoma, strukturne kromosomske promjene, zatim mozaičke oblike gdje je udio abnormalnih stanica nizak, te se korištenjem molekularnih metoda ne mogu detektirati. Udio najčešćih kromosomskih poremećaja iznosio je 75% u našem istraživanju. Udio plodova s Robertsonovom translokacijom koja uključuje kromosom 21, iznosio je u našem istraživanju 4%. Razlikovanje regularnog od translokacijskog oblika sindroma Down moguće je jedino klasičnom citogenetskom analizom. Rizici dobivanja bolesnog potomstva su značajno viši u skupini obiteljskih strukturnih razmještanja nego *de novo* promjena. Postupnici evaluacije pozitivnih testova probira uključuju obvezno invazivno dijagnostičko testiranje koje obuhvaća biopsiju korionskih resica ili amniocentezu i kariotipizaciju ploda. Korištenjem neinvazivnih prenatalnih testova koji detektiraju najčešće oblike aneuploidija, značajan dio perinatalne patologije neće se dijagnosticirati. Današnja tehnologija cjelogenomskog sekvenciranja je veoma skupa i najvećim dijelom nedostupna općoj populaciji (59). Nadalje, interpretacija je u značajnom broju slučajeva otežana, ponekad nemoguća kod razdvajanja benigne varijante od patološke promjene. Dodatno ograničenje ovakvih testova su lažno pozitivni rezultati zbog kromosomskih poremećaja ograničenih na posteljicu (60). Moramo naglasiti da je izvor materijala za analizu najvećim dijelom posteljičnog podrijetla, te takove promjene predstavljaju fenomen ograničen na posteljicu. Tu je i fenomen nestajućeg blizanca (engl. *wanishing twin phenomenon*) u ranoj trudnoći gdje dolazi do spontanog odumiranja jednog blizanca u veoma ranoj trudnoći. U 2-5 % uzoraka test se ne može interpretirati zbog prisutne male količine slobodne fetalne DNA (61). Važno ograničenje testa probira koji koristi najnoviju genomsku tehnologiju je i nedostupnost najvećem broju trudnica zbog visoke cijene koju u Republici Hrvatskoj trudnica plaća sama.

U istraživanje smo uključili trudnice između 11. i kraja 13. tjedna trudnoće koje su pristupile probiru prvog tromjesečja kao dijelu rutinske antenatalne skrbi. U ispitivanoj skupini je neposredno po postavljanju indikacije bilo ultrazvukom ili kombiniranim probirom učinjena biopsija korionskih resica i kompletna dijagnostika je postavljena u okviru prvog tromjesečja. Naglašavamo značajnost vremenskog okvira ovog istraživanja budući da su posljednjeg desetljeća nastojanja dijagnostiku aneuploidija pomaknuti s drugog na prvo tromjesečje. Probir prvog tromjesečja predstavlja trenutno "zlatni standard" pristupa trudnoći i stoga je integralni dio bilo kojeg pristupa detekciji aneuploidija. Očekivano je ispitivana skupina imala značajno veći broj trudnica u 13. tjednu trudnoće, čemu uzrok nije strogo medicinski već organizacijski, budući da je kod dijela trudnica suspektan ultrazvučni nalaz ili nalaz probira uočen u primarnoj zdravstvenoj zaštiti nakon čega su upućene u tercijalni centar na daljnju dijagnostiku. Rezultati kvantifikacije ukupne i fetalne slobodne DNA i u ispitivanoj i usporednoj skupini nisu pokazali statistički značajnu razliku rasta po tjednima trudnoće kroz vremenski okvir gestacijske dobi od početka 11. do kraja 13. tjedna trudnoće. Pregledom literature nismo našli prikaz kvantitativnih vrijednosti bilo fetalne odnosno ukupne DNA kroz tjedne trudnoće u prvom tromjesečju. Od ispitivanih obilježja statističku značajnost porasta kroz gestacijsku dob u obje skupine pokazala je jedino biometrija ploda prikazana kao udaljenost tjeme-trtica.

Nadalje nismo našli povezanost fetalnih biometrijskih parametara rasta odnosno udaljenosti tjeme-trtica s vrijednostima ukupne i fetalne slobodne DNA u obje skupine. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima nedavnog istraživanja Ashoor i suradnika koje je proučavalo učinke fetalnih i majčinih čimbenika prvog tromjesečja na fetalnu slobodnu DNA, gdje nije nađena pozitivna sveza biometrijskih parametara rasta ploda i vrijednosti fetalne slobodne DNA (62). Autori nisu ustanovili svezu između veličine nuhalne prozirnosti i vrijednosti fetalnu slobodnu DNA, što je u skladu i s našim rezultatima. Rezultati ovog istraživanja podržavaju i stajalište Wanga i suradnika da je najznačajni čimbenik koji utječe na kvantitativne vrijednosti fetalne slobodne DNA sama gestacijska dob (63). Autori su istaknuli da se vrijednosti slobodne fetalne DNA povećavaju kroz trudnoću s inicijalnim porastom od 0,1% tjedno od 10 do 20 tjedana trudnoće, nakon 21. tjedna ide nagli porast od 1% tjedno do termina. Proturječna su izvješća da li se komplikacije trudnoće mogu predvidjeti ranim promjenama vrijednosti fetalne i ukupne slobodne DNA (64). Novija, neovisna istraživanja pokazala su da se razina slobodne DNA fetalnog i majčinog podrijetla u vremenskom okviru od 11. do kraja 13. tjedna trudnoće ne mijenjaju značajnije u trudnoćama

koje se kompliciraju zastojem u rastu ploda, preeklampsijom ili prijevremenim porodom (65). Značenje navedenih nalaza pretpostavlja nezavisnost i moguću jedinstvenu primjenu fetalne i ukupne slobodne DNA u probiru za aneuploidije u ranoj trudnoći neovisno o biometrijskim obilježjima ploda i mogućim komplikacijama kroz trudnoću.

U skupini ispitanica vrijednosti nuhalne prozirnosti su bile statistički značajno više u odnosu na usporednu skupinu ( $p < 0.001$ ). Vrijednost nuhalne prozirnosti na 95-oj centilnoj krivulji se linearno povećava s 2.1mm kod udaljenosti tjeme-trtica od 45 mm do 2,7 mm kod udaljenosti tjeme-trtica 84 mm, dok se vrijednost 99-e centile ne mijenja s udaljenošću tjeme-trtica i iznosi 3,5mm. Raspon vrijednosti veličine nuhalne prozirnosti u našem istraživanju unutar ispitivane skupine je bio velik sa srednjom vrijednošću od 5 mm. Biološki mehanizam nastanka i veličine nuhalne prozirnosti nije jasan a vjerojatno leži u tkivno staničnim promjenama. Kod plodova s trisomijom 21, 13 i 18 uočena je izrazito povećana ekspresija gena koji kodiraju alfa i beta lance kolagena tipa 4 i enzim superoksid dismutazu u koži vratne regije. Kolagen tipa 4 snažan je supstrat stanične adhezije. Poremećaj izvanstaničnog matriksa mogu uzrokovati poremećaje stanične migracije i poremećaje razvoja organa i organskih sustava. Nadalje, struktura i osobine kolagena tipa 4 u aneuploidnim plodovima uzrokuju naglašeno vezanje uz hijaluron i posljedično nakupljanje intersticijske tekućine što je još jedan mogući predloženi mehanizam nastanka povećane nuhalne prozirnosti. Enzim superoksid dismutaza je važan citoplazmatski antioksidans koji metabolizira slobodne radikale i sprečava toksičan učinak (66). Dodatno se raspravlja i o poremećaju limfangiogeneze bilo da je riječ o povećanju broja i dilataciji ili pak hipoplaziji limfnih žila vratne regije uz moguće osmotske učinke kao i zajednički vensko limfatični poremećaj diferencijacije. Unutar ispitivane skupine nismo našli statističku značajnu svezu veličine nuhalne prozirnosti i vrijednosti ukupne ili fetalne slobodne DNA, za razliku od usporedne skupine gdje je nađena statistički značajna negativna sveza veličine nuhalne prozirnosti i vrijednosti ukupne slobodne DNA. Važno je naglasiti da su Gerovasilli i suradnici prvi uspoređivali i našli negativnu svezu veličine nuhalnog prosvjetljenja i ukupne slobodne DNA. Za navedene rezultate nisu ponudili moguće obrazloženje (67). Smatramo da se unutar usporedne skupine radi o brojčano ujednačenim vrijednostima veličine uredne nuhalne prozirnosti (1,0-2,7mm) kod euploidnih trudnoća. Dobivena statistička sveza veličine nuhalne prozirnosti s vrijednostima ukupne slobodne DNA, predstavlja odraz očekivanih fizioloških procesa tijekom trudnoće. Potvrdu toga imamo u ročnom porodu eutrofičnih plodova bez komplikacija tijekom trudnoće koje bi nam mogle lažno pozitivno podignuti vrijednosti

slobodne DNA. Negativna sveza istih parametara nije dokazana u ispitivanoj skupini sa znatno većim i vrijednostima i rasponom vrijednosti nuhalne prozirnosti. Objašnjenje nalazimo u patološkim procesima koji se odvijaju takovim trudnoćama: nakupljanje tekućine u vratnom dijelu, u potkožnom tkivu, aneuploidno stanje posteljice s posljedičnim ubrzanim procesima apoptoze, isto tako i poremećenim procesima funkcije posteljice. Složena međudjelovanja ovakovih procesa mogla su zasigurno utjecati na vrijednosti ukupne i fetalne slobodne DNA i gubitak negativne sveze u ispitivanoj skupini. Kada smo uspoređivali skupinu neseptiranih zadebljanja u odnosu na septirane oblike odnosno cistične higrome, i skupinu sa generaliziranim hidropsom unutar ispitanica nismo našli statistički značajnu razliku u vrijednostima bilo fetalne ili ukupne slobodne DNA. Patološki obrazac u ductus venosusu na 8 ispitanica također nije pokazao utjecaj na promjene vrijednosti bilo fetalne ili ukupne slobodne DNA. Kako unutar ispitivane skupine nismo našli promjene vrijednosti fetalne ili ukupne slobodne DNA kod morfološki abnormalnih plodova, za razliku od usporedne skupine gdje su bile uredne vrijednosti veličine nuhalne prozirnosti, zaključujemo da je to zapravo još jedan dokaz veoma oskudnih spoznaja o različitim mehanizmima koji sudjeluju u razvoju patoloških stanja kao što je nakupljanje tekućine u potkožnim tkivima aneuploidnih trudnoća. Promjene vrijednosti ukupne i fetalne slobodne DNA u patološkim stanjima u trudnoći još uvijek predstavlja nedovoljno istraženo područje u fetalnoj medicini.

Unutar obje skupine ne nalazi se statistička značajna veza serumskih biokemijskih biljega majke PAPP-A i  $\beta$ HCG i vrijednosti ukupne ili slobodne fetalne DNA u prvom tromjesečju. Slobodna fetalna i ukupna DNA se proučavaju i kao biomarkeri posteljičnog razvoja. Posebno su zanimljiva istraživanja sveze vrijednosti PAPP-A i fetalne i ukupne slobodne DNA obzirom na posteljično podrijetlom oba biljega i biološkom funkcijom PAPP-A. PAPP-A je proteaza za vezujući protein čimbenika rasta inzulina 4 (eng. IGF1BP). Niže razine PAPP-a vezane su uz više razine vezujućeg proteina čimbenika rasta inzulina 4 čime se smanjuje razina inzulinu sličnog čimbenika rasta. Inzulinu sličan čimbenik rasta regulira rast fetusa preko stimulacije proliferacije i rasta stanica a i sudjeluje i u invaziji trofoblasta u deciduu čime se može objasniti utjecaj na placentaciju i rast (68). Vora i suradnici su našli u prvom tromjesečju statistički značajnu povezanost PAPP-A i vrijednosti fetalne i ukupne slobodne DNA što tumače zajedničkim posteljičnim podrijetlom oba biomarkera (69). Podrijetlo fetalne slobodne DNA u majčinoj krvi može biti posljedica lize intaktnih fetalnih stanica u majčinoj krvi, ali i oslobađanja fetalnog genetskog materijala kao posljedice rasta razvoja i apoptoze stanica posteljice. Kao što smo već prije naglasili postavlja se pitanje da li

trudnoće s lošom funkcijom posteljice različitog uzroka pokazuju porast vrijednosti ukupne ili fetalne DNA ili na te vrijednosti utječu i drugi produkti lučenja posteljice. U našem radu nismo našli direktnu značajnu vezu s posteljičnim biomarkerima, ali jesmo značajno niže vrijednosti ukupne slobodne DNA između aneuploidnih i euploidnih trudnoća. Međutim, također su pokazane statistički značajno snižene vrijednosti MoM PAPP-A u aneuploidnim trudnoćama u odnosu na usporednu skupinu ( $p < 0,001$ ), što se može objasniti abnormalnom funkcijom posteljice. Budući da se serumski biokemijski biljezi u postupcima probira odabiru na osnovu osobitosti neovisnih varijabli, nepostojanje direktne veze između vrijednosti ukupne slobodne DNA i serumskog biljega PAPP-A i u visokorizičnim i niskorizičnim trudnoćama omogućava hipotetsko pridruživanje u ovom slučaju i ukupne slobodne DNA biokemijskim postupcima probira, posebice obzirom na postojanje statistički značajne razlike u vrijednostima ukupne slobodne DNA između skupine zdravih trudnica i trudnica s aneuploidnim plodom. Naše istraživanje pokazalo je da vrijednosti ukupne slobodne DNA imaju sličan obrazac promjena kao i vrijednosti serumskog PAPP-A u aneuploidnim trudnoćama.

Hipoteza našeg rada zasniva se na postojanju razlike ukupne slobodne DNA između usporedne i aneuploidne skupine. Ispitivana skupina ima statistički značajno nižu vrijednost ukupne slobodne DNA, dok nema statističke značajnosti razlike fetalne slobodne DNA između ispitivane i usporedne skupine.

Rezultati drugih istraživanja o vrijednostima ukupne i fetalne slobodne DNA u aneuploidnim trudnoćama izrazito su heterogena. U nekim istraživanjima izračun kvantitativne vrijednosti fetalne slobodne DNA pokazuje 2-3 puta veću vrijednost u trudnoćama s trisomijom 21 u odnosu na euploidne trudnoće (70,71). Spencer i suradnici nisu potvrdili rezultate navedenih istraživanja postojanja razlika u vrijednosti fetalne slobodne DNA, ali nalaze statistički značajne razlike u vrijednostima količine ukupne slobodne DNA između aneuploidnih i euploidnih trudnoća (72). Watagenera i sur. našli su povišene vrijednosti fetalne slobodne DNA u optoku majke kod plodova s trisomijom 13, ali ne i trisomijom 18 (73). U svom istraživanju, Gerovassili i sur. nisu dokazali statistički značajne razlike u vrijednostima ukupne i fetalne slobodne DNA kod aneuploidnih trudnoća u odnosu na euploidne tijekom prvog tromjesečja (67). Različitost dobivenih rezultata možemo objasniti različitim kriterijima odabira pacijenata za istraživanja, broju analiziranih uzoraka, te različitim vrijednosti slobodne fetalne DNA ovisno o gestacijskoj dobi.

Rezultate našeg istraživanja odnosno značajno niže vrijednosti ukupne slobodne DNA u skupini ispitanica obrazlažemo primarno abnormalnostima razvoja posteljice u aneuploidnim trudnoćama. Ukoliko sagledavamo sa stanične razine, posteljica je izrazito dinamičan organ uz stalnu izmjenu stanica trofoblasta korionskih resica. Opisuje se fiziološki krug apoptoze u posteljici koji počinje proliferacijom i diferencijacijom stanica citotrofoblasta, na što se nastavlja fuzija citotrofoblasta i sinciciotrofoblasta, te daljnja diferencijacija i ekstruzija apoptotičnog materijala. U normalnim trudnoćama, grami posteljičnog materijala se dnevno otpuštaju u majčinu optok bez poticanja upalnih procesa. Kako je oslobađanje fetalne slobodne DNA u uskoj svezi s posteljičnom morfogenezom, stanja koja zahvaćaju posteljicu imaju direktan učinak na razinu tvari u majčinom optoku. Promjene koje zahvaćaju posteljicu u aneuploidnim trudnoćama utječu na veličinu posteljice, promjer i dismaturitet korionskih resica, te promjene vaskularizacije. Perivilozno odlaganje fibrina može dodatno imati za posljedicu smanjenje fetomaternalne komunikacije, a time i posljedično oslobađanje fetalne slobodne DNA u optok majke (74). To može dijelom objasniti naše rezultate, posebice kada znamo da je fetomaternalna komunikacija dvosmjerna. Naše istraživanje pokazalo je promjene ukupne slobodne DNA, uz nepromijenjenu fetalnu komponentu, što zapravo znači da je uzrok smanjenju ukupne slobodne DNA u skupini ispitanica primarno vezan uz dio koji se odnosi na majčinu slobodnu DNA. Kod žena koje nisu trudne najvjerojatniji mehanizam otpuštanju slobodne DNA u cirkulaciju je apoptoza ili neki drugi mehanizam stanične smrti koji se može značajno mijenjati u različitim patološkim stanjima. Slijedom navedenog, možemo zaključiti da sama trudnoća za sada nepoznatim mehanizmom utječe i na majčinu apoptozu i oslobađanje staničnih elemenata odnosno slobodne DNA u optok. Naše istraživanje smatra da promijenjena fetoplacentarna jedinica u aneuploidnim trudnoćama mijenja i smanjuje procese apoptoze kod majke.

Naše istraživanje pokazalo je graničnu vrijednost ukupne slobodne DNA ( $\leq 0,0298$  ng/ul), u procjeni rizika za fetalne kromosomopatije uz obrazloženje da trudnice koje imaju vrijednosti niže od navedene imaju 5,47 puta veću vjerojatnost da je plod aneuploidan. Između različitih kromosomopatija nismo našli statistički značajnu razliku vrijednosti fetalne ili ukupne slobodne DNA.

Mogućnost je lažno pozitivnih nalaza zbog kromosomskih poremećaja ograničenih samo na posteljicu, i fenomena nestajućeg blizanca u ranoj trudnoći. Pojavnost blizanačkih trudnoća je otprilike 1 na 30 porođaja, a sindrom nestajućeg blizanca se dešava u otprilike 30% rano dijagnosticiranih blizanačkih trudnoća. Nije jasno da li su veličina nestajućeg blizanca ili



amnijske šupljine u odnosnoj vezi sa količinom slobodne fetalne DNA u majčinom optoku. Nadalje, nejasno je da li sam događaj prestanka srčane akcije kod jednog od dvojaka dovodi do pojačanog otpuštanja fetalnih stanica u optok majke i samo trajanje tog procesa. Fetalna slobodna DNA u optoku majke nalazi se i do osmog tjedana po prestanku rada srčane akcije. Dodatno može zakomplicirati kromosomski status nestajućeg blizanca koji može biti aneuploidan, dok preostali dvojak može biti normalnog kromosomskog statusa što može dovesti do lažno pozitivne interpretacije rezultata (75). Kod višeplođnih trudnoća s dvije ili više gestacijskih vrećica interpretacija rezultata je kompleksna i zbog moguće nelinearne raspodjele udjela slobodne fetalne DNA različitog podrijetla. I standardi testovi probira prvog tromjesečja kod višeplođnih trudnoća imaju udio lažno pozitivnih rezultata koji su dva do tri puta veći u odnosu na jednoplođne trudnoće. Višeplođne trudnoće i sindrom nestajućeg blizanca predstavljaju ograničenja danas komercijalnim neinvazivnim testovima probira baziranim na slobodnoj fetalnoj DNA. Kako se u našem radu značajnom pokazala razlika ukupne a ne fetalne slobodne DNA u razlikovanju euploidnih od aneuploidnih trudnoća ovim pristupom se taj dio problema lažno pozitivnih rezultata može izbjeći. Preporuka je svakako ranim ultrazvučnim pregledom određivanje broja gestacijskih vrećica što određuje daljnje prenatalne postupke i savjetovanja o postupcima probira.

Potencijalni problem korištenja fetalne slobodne DNA kao univerzalnog dijela neinvazivnog prenatalnog probirnog testa ovisi ne samo o vrijednosti fetalne slobodne DNA već o relativnom udjelu fetalne slobodne DNA, tzv. fetalnom frakcijom. Minimalni udio fetalne frakcije potreban za komercijalne neinvazivne prenatalne testove probira je 3-4%. Ukoliko je frakcija niža osjetljive razlike u cirkulirajućoj fetalnoj slobodnoj DNA između trisomija i euploidnih trudnoća mogu proći nezamijećeno i biti uzrok lažno negativnih rezultata ili neuspjelog testa. Fetalna frakcija izražena kao omjer u izravnoj je ovisnosti ne samo o količini fetalne slobodne DNA već i majčine, odnosno ukupne slobodne DNA. Majčin čimbenik koji se nedvojbeno u više nezavisnih istraživanja pokazao kao značajan čimbenik razlika u majčinoj/ukupnoj slobodnoj DNA je konstitucija odnosno tjelesna težina majke (76). Snižena fetalna frakcija kod pretilih trudnica može biti posljedica hemodilucijskog čimbenika povećanog cirkulirajućeg volumena. Nadalje uzrok može biti i porast majčine slobodne DNA kao posljedica apoptoze/nekroze stromalnih stanica masnog tkiva (62,65). Npr. fetalna frakcija slobodne DNA iznosi oko 12% kod tjelesne težine 60 do oko 6% kod tjelesne težine 120 kg. U našem istraživanju izračunali smo fetalnu frakciju za našu populaciju u razdoblju od početka 11.-tog do kraja 13.-tog tjedna trudnoće. Isključeni su

biološki čimbenici koji mogu utjecati na razinu majčine odnosno ukupne slobodne DNA, odnosno trudnice koje puše, boluju od autoimunih i kroničnih bolesti, te trudnoće iz postupaka medicinski pomognute oplodnje. Ispitivana i usporedna skupina nisu se statistički značajno razlikovale po dobnoj raspodjeli niti tjelesnoj težini, što zapravo ujednačava vrijednosti ukupne slobodne DNA kao i dijela fetalne frakcije koja može biti promijenjena ovisno o vrijednostima ukupne slobodne DNA. Udio fetalne slobodne DNA izražen kao fetalna frakcija u našoj studiji iznosi oko 6 %, i nije nađena statistički značajna razlika između usporedne i ispitivane skupine. Kontradiktorni rezultati dobiveni su poredbom fetalne frakcije euploidnih plodova i plodova sa aneuploidijama. Neka od istraživanja pokazuju da fetusi s trisomijom 21 imaju povećanu fetalnu frakciju, dok plodovi s trisomijom 13 i 18 i monosomijom X imaju snižene vrijednosti fetalne frakcije (77). Suprotno tome drugo istraživanje ne nalazi značajnu razliku fetalne frakcije euploidnih trudnoća i trudnoća s trisomijom 21, dok je kod trudnoća s trisomijom 18 fetalna frakcija bila značajno niža. (65). Raznolikost objavljenih rezultata veličine fetalne frakcije među aneuploidijama može objasniti različitu osjetljivost i specifičnost neinvazivnih prenatalnih testova probira za različite aneuploidije. U nijednom istraživanju nije zabilježena snižena vrijednost fetalne frakcije kod trisomije 21 u odnosu na euploidne trudnoće i druge trisomije. Pretpostavka je da je zbog toga osjetljivost za detekciju trisomije 21 u komercijalnim neinvazivnim probirnim testovima gotovo 100% dok je kod druge dvije najčešće kromosopatije niža. U našem istraživanju između ispitivane i kontrolne skupine nije bilo statistički značajne razlike fetalne frakcije kao niti unutar ispitivane skupine između različitih vrsta aneuploidija. Obzirom na ujednačenost majčinih čimbenika u obje skupine i kriterije isključenja u obje skupine koji mogu mijenjati majčinu slobodnu DNA smatramo da je u našem istraživanju fetalna frakcija u prvom tromjesečju prvenstveno vezana uz gestacijsku dob, a ne druga moguća obilježja trudnoće. U praktičnom smislu u našoj populaciji je iznad 11 tjedana trudnoće dostatan udio fetalne frakcije za izvođenje postojećih komercijalnih testova neinvazivnog prenatalnog probira temeljenih na fetalnoj slobodnoj DNA neovisno da li je plod urednog kromosomskog statusa ili aneuploidan. Dobiveni rezultati su u skladu sa postojećim smjernicama i preporukama da se neinvazivni prenatalni testovi probira ne rabe prije navršenih 10 tjedana trudnoće.

U zaključku, predstavili smo za naše uvjete veliko istraživanje na 56 aneuploidnih trudnoća dijagnosticiranih u prvom tromjesečju trudnoće, s prospektivno skupljenim i analiziranim uzorcima ukupne i fetalne slobodne DNA u optoku majke. Nismo dokazali značenje fetalne

slobodne DNA u prvom tromjesečju u razlikovanju trudnoća urednog kromosomskog statusa u odnosu na aneuploidne. Naši rezultati pokazuju da kvantifikacija ukupne slobodne DNA u prvom tromjesečju može biti prognostički čimbenik kromosomalnih abnormalnosti korištenjem tehnike lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu. Budući da se fetalna slobodna DNA nije pokazala statistički značajnom ni u jednom dijelu istraživanja, promjene ukupne slobodne DNA temelje se primarno na promjeni majčine slobodne DNA. Postojanje veze kromosomskog statusa ploda i slobodne DNA majke upućuje na činjenicu da posteljčni čimbenici za sada nepoznatim mehanizmom utječu na stanične promjene majke uključujući i apoptozu stanica i otpuštanje slobodne DNA u optok majke.

Stabilne vrijednosti ukupne slobodne DNA kroz prvo tromjesečje i neovisnost o drugim serumskim biljezima majke čine ukupnu slobodnu DNA mogućim dodatnim čimbenikom probira u prvom tromjesečju trudnoće. Daljnja istraživanja potrebna su za bolje razumijevanje stvaranja, metabolizma i značenja vrijednosti ukupne i fetalne slobodne DNA, te promjene njihovih vrijednosti u normalnim i patološkim trudnoćama.

## 8. ZAKLJUČCI

U našem istraživanju htjeli smo utvrditi postojanje razlike u vrijednosti fetalne slobodne DNA, odnosno ukupne (fetalna+majčina) slobodne DNA u optoku majke između ispitanica urednog tijeka trudnoće i kromosomskog statusa ploda, i ispitanica kod kojih je citogenetskom analizom dokazana aneuploidija ploda. Usporedili smo vrijednosti ukupne i fetalne slobodne DNA s biometrijskim vrijednostima ploda, te serumskim biljezima majke.

Analizom i uspoređivanjem dobivenih rezultata, a na osnovi prethodno postavljenih ciljeva zaključili smo sljedeće:

- ukupna i fetalna slobodna DNA u optoku majke primarno ovise o gestacijskoj dobi i stabilne su tijekom prvog tromjesečja odnosno od početka 11. do kraja 13. tjedna trudnoće
- kod aneuploidnih plodova vrijednosti ukupne slobodne DNA ( $p=0,001$ ) u optoku majke statistički su značajno snižene u prvom tromjesečju u odnosu na euploidne trudnoće
- fetalna slobodna DNA nije se pokazala značajnom u razlikovanju aneuploidnih u odnosu na kromosomski normalne trudnoće
- trudnice čija je vrijednost ukupne slobodne DNA  $\leq 0,0298$  ng/ $\mu$ L imaju 5,47 puta veći rizik nositi aneuploidan ploda u odnosu na trudnice koje imaju više vrijednosti ukupne slobodne DNA
- postojanje statistički značajne povezanosti promjene ukupne slobodne DNA, što se prvenstveno odnosi na majčinu komponentu upućuje na značaj mehanizama placencije na apoptotičke procese i otpuštanje slobodne DNA majke
- ukupna slobodna DNA u optoku majke ne pokazuju značajnu vezu s drugim serumskim biljezima majke ( $\beta$ HCG i PAPP-A) i pokazuje se kao neovisan parametar kojeg je moguće kombinirati s postojećim biokemijskim biljezima prvog tromjesečja u postupcima probira

- fetalna frakcija u optoku majke u našoj populaciji u razdoblju od početka 11. do kraja 13. tjedna trudnoće iznosi 6% bez značajne razlike između skupine trudnica sa aneuploidnim plodom i usporedne skupine

## 9. SAŽETAK

**UVOD:** Prenatalna skrb značajnim dijelom obuhvaća metode probira u svrhu otkrivanja trudnica visokog rizika rađanja kromosomski bolesnog ploda. U većini razvijenih zemalja standardni postupak izračuna individualnog rizika rođenja djeteta s kromosomopatijom uključuje korištenje neke od neinvazivnih metoda probira (najčešće se radi o kombinaciji ultrazvučnog i biokemijskog probira), te postavljanje konačne dijagnoze uzimanjem fetalnog uzorka invazivnim zahvatom ukoliko individualni rizik prelazi zadanu granicu rizika od 1:250. Posljednje desetljeće značajno mjesto zauzimaju istraživanja o upotrebi slobodne fetalne i ukupne DNA u razlikovanju normalnih od patoloških trudnoća.

**CILJ:** Određivanje značaja kvantifikacije fetalne i ukupne (fetalne+majčine) slobodne DNA iz majčine krvi u procjeni rizika rađanja kromosomski bolesnog ploda u prvom tromjesečju trudnoće.

**REZULTATI:** Kod aneuploidnih plodova vrijednosti ukupne slobodne DNA u optoku majke su statistički značajno snižene u prvom tromjesečju u odnosu na trudnoće s urednim kromosomskim statusom ploda ( $p=0,001$ ). Trudnice čija je vrijednost ukupne slobodne DNA  $\leq 0,0298$  ng/ $\mu$ L imaju 5,47 puta veći rizik nositi aneuploidan plod u odnosu na trudnice koje imaju više vrijednosti ukupne slobodne DNA. Vrijednost ukupne slobodne DNA značajno je negativno korelirala s veličinom nuhalne prozirnosti u usporednoj skupini. U obje skupini nema značajne povezanost vrijednosti ukupne i fetalne slobodne DNA u optoku majke sa drugim serumskim biljezima majke ( $\beta$ HCG i PAPP-A). Fetalna frakcija u optoku majke u našoj populaciji u razdoblju od početka 11. do kraja 13. tjedna trudnoće iznosi 6% bez značajne razlike između skupine trudnica sa aneuploidnim plodom i usporedne skupine

**ZAKLJUČAK:** Postojanje statistički značajne povezanosti promjene ukupne slobodne DNA, što se prvenstveno odnosi na majčinu komponentu upućuje na značaj mehanizama placentacije na apoptotičke procese i otpuštanje slobodne DNA majke. Stabilne vrijednosti ukupne slobodne DNA i neovisnost o drugim serumskim biljezima majke čine ukupnu slobodnu DNA mogućim dodatnim čimbenikom probira u prvom tromjesečju trudnoće. Daljnja istraživanja potrebna su za bolje razumijevanje stvaranja, metabolizma i značenja vrijednosti ukupne i fetalne slobodne DNA, te promjene njihovih vrijednosti u normalnim i patološkim trudnoćama.

**Ključne riječi;** aneuploidije, testovi probira, fetalna slobodna DNA, ukupna slobodna DNA

## 10. SUMMARY

### **THE SIGNIFICANCE OF TOTAL AND FETAL CELL FREE DNA FROM MATERNAL BLOOD IN NONINVASIVE DETECTION OF FETAL ANEUPLOIDIES**

Ivanka Bekavac Vlatković, 2015.

#### INTRODUCTION:

Chromosomal abnormalities account for approximately 15% of the major congenital anomalies before the age 1 year in Europe, and are associated with 25% of perinatal deaths due to congenital anomalies. Maternal serum is routinely analyzed in pregnant women to screen for chromosomal abnormalities such as Down and Edwards syndrome. In addition there are many reports of an association between abnormal levels of individual analytes and poor fetal or placental health. A low pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) in the first trimester indicates a high risk for Down and Edwards syndrome while hCG is elevated in pregnancies with trisomy 21. It was realized that the great majority of fetuses with major aneuploidies can be identified by a combination of maternal age, fetal nuchal translucency thickness and maternal serum biochemical markers. With a false positive rate of 5% this approach identifies up to 90% of fetuses with trisomy 21 and other major aneuploidies. Since 1997, when fetal cfDNA in maternal circulation was discovered, a new field of research has emerged driven by its potential clinical application for noninvasive prenatal diagnosis. Quantitative aberrations of fetal and maternal cell free DNA were noticed in chromosomal aneuploidies. We aimed to quantify the levels of fetal and total cell free DNA on prospectively collected samples, to understand their correlation with other variables and clarify their diagnostic value.

**MATERIAL AND METHODS:** Total and fetal cell free DNA pre CVS was extracted from maternal plasma from 56 pregnancies with aneuploid fetuses and 56 samples from chromosomally normal group and quantified using real time PCR.

**RESULTS :** Analysis of total and fetal cell free DNA levels showed no correlation with crown-rump length. Furthermore there was no significant association between maternal serum biochemical markers in first trimester ( PAPP-a and  $\beta$ hCG) in both groups on cell free fetal or total DNA. Additionally, analysis of cell free total DNA revealed differences

between chromosomally normal and aneuploid fetuses, the median total DNA level in aneuploid group was significantly lower than in control group ( $p=0,001$ ). Furthermore fetal fraction was 6% and did not differ between control group and group with aneuploid fetuses.

**CONCLUSION:** Our results suggest that quantification of total cell free DNA might be a prognostic marker of chromosomal aberrations in first trimester pregnancy. Low correlation between first trimester maternal biochemical markers and total cell free DNA may improve screening performance. Furthermore high association between maternal cell free DNA levels and aneuploid fetuses suggest that placental factors are also affecting maternal cell death. However gaps exist what affects the production, metabolism and clearance of fetal and maternal cell free DNA.

**Key words:** cell free DNA, aneuploidies, first trimester screening



## 11. LITERATURA

1. Wellesley D, Dolk HA, Boyd P, Greenlees R, Haeusler M, Nelen V, Garne E, Khoshnood D, Doray B, Rissmenn A, Millaney C, Calzolari E, Bakker M, Salvador J, Addor MC, Draper E, Rankin J, Tucker D. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly register in Europe. *European Journal of Human Genetics* 2012; 20: 521-526.
2. Chuckle H, Benn P . Multianalyte maternal serum screening for chromosomal defects. In *Genetic disorders and the fetus: Diagnosis prevention and treatment (6th edn)*, Milunsky A, Milunsky JM (eds) Johns Hopkins University Press Baltimore 2010.
3. ISPD Position Statement Aneuploidy screening: a position statement from a committee on behalf of the board of the international Society for Prenatal Diagnosis. *Prenatal Diagn* 2011;31:519-522.
4. Nicolaides KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenatal Diagn* 2011;31:7-15.
5. Bekavac-Vlatkovic I, 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;42(4):529-534.
6. Bogart MH, Pandian MD, Jones OW. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosomal abnormalities. *Prenat Diagn* 1987;7:623-30.
7. Wald NJ, Rodeck C, Hackshaw AK, Walters J, Chitty J, Mackinson AM. First and second trimester antenatal screening for Down syndrome: the results of the serum, urine and ultrasound screening study (SURUSS) *Health technology Assess* 2003;7:1-7.
8. Langdon Down Observations on an ethnic classification on idiots. *Lond Hosp Rep* 1866;3:259-62.
9. Malone FD, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Saade GR, Berkowitz RL, Gross SJ, Dugoff L, Craigo SD, Timor-Tritsch IE, Carr SR, Wolfe HM, Dukes K, Canick

JA, Bianchi DW, D'Alton ME; First-trimester septated cystic hygroma: prevalence, natural history, and pediatric outcome, *Obstet Gynecol.* 2005;106(2):288-94.

10. Nicolaides KH. Nuchal translucency and other first trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *American Journal of Obstet and Gynecology.* 2004;191:45-67.

11. Kagan KO, Cicero S, Staboulidou I, Wright D, Nicolaides KH. Fetal nasal bone in screening for trisomies 21,18 i 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 33:259-264.

12. Fialova L, Malbohan IM. Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A): theoretical and clinical aspects. *Bratisl Lek listy* 2002;103(6):194-205.

13. Wright D, Spencer K, Kagan KO. First trimester combined screening for trisomy 21 at 7-14 weeks gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010;36:404-11.

14. Spencer K, Liao A, Skenotou H, Cicero S, Nicolaides KH. Screening for triploidy by fetal nuchal translucency and maternal serum free  $\beta$ hCG and PAPP-A at 10-14 weeks gestation. *Prenatal Diagn*2000; 20:411-16.

15. Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l Homme. *CR Acad Sci Paris* 1948;142:241-3.

16. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37:646-50.

17. Jahr S, Hentze H, English S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantization's and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001;61:1659-65.

18. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, Molyakova Y. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in organism. *Clin Chem* 2000;46:1078-84.

19. Diehl F, Schmidt K, Durkee KH, Moore KJ, Goodman SN, Shuber AP. Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology* 2008;135:489-98.

20. Garcia Moreira V, Prieto Garcia B, Baltar Martin JM, Ortega Suarez Alvarez FV. Cell free DNA as an noninvasive acute rejection marker in renal transplantation. *Clin Chem* 2009;55:1958-66.
21. Anker P, Stronum M. Circulating DNA in plasma or serum. *Medicina* 2000;60:699-702.
22. van der Vaart M, Pretorius PJ. The origin of circulating free DNA. *Clin Chem* 2007;53:2125-29.
23. Hohaus S, Giachelia M, Massini G, Manuseto G, Vannate B, Bozzoli V. Cell free circulating DNA in Hodgins and non Hodgkins lymphomas. *Ann Oncol* 2009;20:1408-13.
24. Ellinger J, Albers P, Muller SC, von Rucker A, Bastian PJ. Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as novel noninvasive diagnostic biomarker. *BJU Int* 2009;104:48-52.
25. Saukkonen K, Lakkisto P, Pettila V, Varpula M, Karlsson S, Roukonen E, Pulkki K. Cell free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock. *Clin Chem* 2008;54:1000-07.
26. Okkonen M, Lakkisto P, Karhonen AA, Parviainen I, Reinikainen M, Varpula T. Plasma cell free DNA in patients needing mechanical ventilation. *Crit Care* 2011;15:R196.
27. Destouni A, Vrettou C, Antonatos D, Chouliaras G, Traeger, Synodinos J, Patsilnakos S. Cell freeDNA levels in acute myocardial infarction patients during hospitalization. *Acta Cardiol* 2009;64:51-57.
28. Lam NY, Rainer TH, Wong LK, Lam W, Lo YM. Plasma DNA as a prognostic marker for stroke patients with negative neuroimaging within the first 24 hours of symptom onset. *Resuscitation* 2006;68:71-78.
29. Herzenberg LA, Bianchi DW, Schroder J, Cann HM, Iverson GM. Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proc Natl Acad Sci* 1979;76:1453-55.
30. Rust DW, Bianchi DW. Microchimerisam in endocrine pathology. *Endocr Pathol* 2009;20:11-16.

31. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW. Presence of fetal DNA in maternal and plasma serum. *Lancet* 1997;350(9076):485-7.
32. Lo YM, Tein MC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implication for noninvasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Gen* 1998;62:768-775.
33. Honda H, Miharuru N, Ohashi Y, Samura O, Kinutani M, Hara T, Ohama K. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implication for noninvasive prenatal diagnosis. *MHum Gen* 2002;110(1):75-9.
34. Wagner J, Džijan S, Pavan-Jukić D, Wagner J, Lauc G. Analysis of multiple loci can increase reliability of detection of fetal Y-chromosome DNA in maternal plasma. *Prenatal Diagnosis* 2008;28:412-416.
35. Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *AM J Hum Genet* 1999;64:218-24.
36. Chow KCK, Chiu RWK, Tsui NBY. Mass spectrometric detection of an SNP panel as an internal positive control for fetal DNA analysis in maternal plasma. *Clin Chem* 2007;53:141-2.
37. Chan KCA, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RWK, Leung TN. Hypermethylated RASSF1A: A universal fetal DNA marker. *Clin Chem* 2006;52:2211-8.
38. Tong YK, Jin S, Chiu RWK. Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome dosage approach. *Clin Chem* 2010;56:90-8.
39. Lo YMD, Tsui NB, Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Heung MM. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosome aneuploidy detection. *Nat Med* 2007;13:218-23.
40. Lo YMD, Lun FMF, Chan KCA. Digital PCR for molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:13116-21.

41. Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad USA* 2008;105:20458-63.
42. Gregg AR, Gross SJ, Best RG, Monaghan KG, Bajaj K, Skotko BG, Thompson BH, Watson MS. ACGM statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy. *Genetics in medicine*;2013;15(5):395-398.
43. Lo YM. Recent advances in fetal nucleic acid in maternal plasma. *J Histochem Cytochem* 2005;53:293-296.
44. Finning Km, Chitty LS. Non invasive fetal sex determination. Impact on clinical practice. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008;13:69-75.
45. Rijnerds JPR, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MAMJ, Christiansen GCML. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol* 2001;98:374-8.
46. Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti RHD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ* 2008;336:816-8.
47. Lazar L, Nagy B, Molvarec A, Rigo J Jr. Quantity of total cell free and cell free fetal DNA in pregnancies with no complications and preeclampsia 2010;15:784-7.
48. Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Matsuoka R, Okai T, Farina A. Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:480-4.
49. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP. Genome wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol* 2012;119:890-901.
50. Ashoor G, Sygelaki A, Wang E, Struble C, Oliphant A, Song K, Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome selective cell free DNA analysis method. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41:21-5.

51. Bianchi DW, Oepkes D, Ghidini A. Current controversies in prenatal diagnosis: should noninvasive DNA testing be the standard screening test for Down syndrome in all pregnant women? *Prenatal Diagnosis* 2013;33:1-6.
52. Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, Birdir C, Touzet G. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *AM J Obstet Gynecol* 2012;207:1-6.
53. Gil MM, Quezada MS, Bregant B, Ferraro M, Nicolaides KH. Implementation of maternal blood cell-free DNA testing in early screening for aneuploidies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;42:34-40.
54. Nicolaides KH, Wright D, Poon LC, Syngelaki A, Gil MM. First trimester contingent screening for trisomy 21 by biomarkers and maternal blood cell free DNA testing. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;42:41-50.
55. Association for Clinical Cytogenetics: Professional guidelines for clinical cytogenetic. Prenatal diagnosis best practice guidelines (2009). Available at: [http://www.cytogenetics.org.uk/prof\\_standards/professional\\_standards.htm](http://www.cytogenetics.org.uk/prof_standards/professional_standards.htm)
56. Hsu LYF, Benn PA. Revised Guidelines for the Diagnosis of Mosaicism in Amniocytes. *Prenat Diagn* 1999;19:1081-1082.
57. QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Handbook, Second Edition, January 2005, Qiagen Company.
58. Qualifier Kits - User manual, Applied Biosystems 2003.
59. Conner P, Gustafsson S, Kublickas M. First trimester contingent testing with either nuchal translucency or cell-free DNA. Cost efficiency and the role of ultrasound dating. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2015;94(4)368-75.
60. 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(1):4-9.

61. Wright D, Wright A, Nicolaides KH. A unified approach to risk assessment for fetal aneuploidies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:48-54.
62. Ashoor G, Syngelaky A, Poon LCY, Rezende JC, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free fetal DNA at 11-13 weeks gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41:26-32.
63. Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Olimhant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenatal Diagn.* 2013;33(7):662-667.
64. Levine RJ, Qian C, Leshane ES. Two stage elevation of cell free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:707-713.
65. Poon LCY, Musci T, Song K, Syngelaki A, Nicolaides KH. Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11-13 weeks gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcome. *Fetal Diagn Ther* 2013;33:215-223.
66. Chic-Ping Chen. Pathophysiology of increased nuchal translucency thickness. *Taiwan Obstet Gynecol* 2010;49:133-139.
67. Gerovassili A, Garner C, Nicolaides KH, Thein SL, Rees DC. Free fetal DNA in maternal circulation: a potential prognostic marker for chromosomal abnormalities 2007;27:104-110.
68. Huynh L, Kingdom J, Akhtar S. Low pregnancy-associated plasma protein A level in first trimester. *Can Fam Physician* 2014;60:899-903.
69. Vora LN, Kirby LJ, Lambert-Messerlian G, Tighiouart HM, Peter I, Urato AC, Bianchi DW. Relationship between cell-free DNA and serum analytes in first and second trimester of pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2010;116:673-678.
70. Lo YMD, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AMZ, Hjelm NM, Elmes RS, Bianchi DW. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem* 1999;45:1747-1751.

71. Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Jackson LR, Holzgeve W, Hahn S. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenatal Diagn* 2000;20:795-798.
72. Spencer K, de Kok JB, Ewinkels R. Increased total cell-free DNA in the serum of pregnant women carrying a fetus affected *Prenatal Diagn* 2003;2387:580-3.
73. Watagenera T, Lahane ES, Farina A, Messerlian GM, Lee T, Canik JA, Bianchi DW. Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. *Hum Genet* 2003;112:204-8.
74. Roberts L, Sebire NJ, Fowler D; Nicolaides KH. Histomorphological features of chorionic villy at 10-14 weeks gestation in trisomic and chromosomally normal pregnancies. *Placenta* 2000;21:678-683.
75. McAdoo S, Savage M, Hall MP, Zimmermann BM, Sigurjonson S, Demko A. A single nucleotide polymorphism-based approach to non-invasive prenatal testing identifies lingering fetal DNA in pregnancies with vanishing twins. *ASHG, Boston, MA* 2013.
76. Taglauer ES, Wilkins-Haug L, Bianchi DW. Review: Cell free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health mass. *Placenta* 2014;28:S64-S68.
77. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerilian GM, Haddow JE. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common anuploidies. *Prenatal Diagnosis* 2013;33(7):667-74.



## 12. ŽIVOTOPIS

Ivanka Bekavac Vlatković rođena je 28.2.1973. godine u Splitu.

Po završenoj osnovnoj školi i gimnaziji dolazi u Zagreb te 1991. godine upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Fakultet završava u roku (1991.-1997. godine) i stječe naziv doktora medicine.

1999. godine polaže državni ispit nakon odrađenog pripravničkog staža.

2000. godine na Klinici za ginekologiju i porodništvo Kliničke Bolnice Sveti Duh započinje specijalizaciju iz ginekologije i porodništva i 2007. godine stječe naziv specijaliste.

S položenim ispitom nastavlja s radom na Odjelu patologije trudnoće gdje slijedom rada i edukacije 2013. godine polaže subspecijalistički ispit iz fetalne medicine i porodništva.

Autor je i koautor više radova koji su objavljeni u indeksiranim časopisima.

Svakodnevno uz obaveze na odjelu sudjeluje u edukaciji studenata i kolega na tečajevima trajne edukacije.

Majka je dviju djevojčica, blizanki.