

# Analiza kromosomopatija kao uzročnika spontanog pobačaja u Hrvatskoj

---

**Petrović, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:023310>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-11**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Marija Petrović  
Analiza kromosomopatija kao uzročnika spontanog pobačaja u Hrvatskoj  
Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen na Odjelu za laboratorijsku citogenetiku Kliničke bolnice „*Sv. Duh*“ u Zagrebu, pod vodstvom izv.prof.dr.sc. Feodore Stipoljev i suvoditeljice izv.prof.dr.sc. Petre Korać. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

*Želim izraziti zahvalnost mentorici izv. prof. dr. sc. Feodori Stipoljev na ukazanom povjerenju i strpljenju tijekom izrade i pisanja ovog rada.*

*Zahvaljujem se suvoditeljici izv.prof.dr.sc. Petri Korać na svakom savjetu, pomoći i ukazanom razumjevanju. Hvala na trudu i stalnoj dostupnosti.*

*Zahvaljujem kolegama iz grupe Odjela za laboratorijsku citogenetiku Kliničke bolnice „Sv. Duh“ u Zagrebu koji su bili spremni priskočiti u pomoć kad god je trebalo.*

*Hvala mojoj obitelji i prijateljima na ljubavi i razumijevanju, posebno mojoj majci na podršci tijekom svih godina studija.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

### ANALIZA KROMOSOMOPATIJA KAO UZROČNIKA SPONTANOG POBAČAJA U HRVATSKOJ

Marija Petrović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Spontani pobačaj najčešća je komplikacija u trudnoći. Smatra se da 15% svih trudnoća završi gubitkom ploda. Više od 50% spontanih pobačaja uzrokuju kromosomske abnormalnosti. Među njima najčešće su: trisomije, poliploidije i monosomije. Najčešće korišteno tkivo za citogenetičku analizu, tj. kariotipizaciju su korionske resice i koža. Konvencionalne tehnike koje se koriste za kultiviranje tkiva korionskih resica i kože su dugotrajna i kratkotrajna metoda. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti učestalosti pojedinih kromosomopatija kod spontanih pobačaja, usporediti uspješnost pojedinih tehnika kultivacije, odrediti utječe li dob trudnica na pojavu pojedinih kromosomopatija i gestacijsku dob pobačenog ploda.

Analizom kariotipova 253 ploda, utvrđeno je da su najčešći uzroci spontanog pobačaja trisomija kromosoma 16, 18 i 22 te monosomija X-kromosoma. Utvrđeno je i da ne postoji povezanost dobi majke i gestacijske dobi pobačenog ploda, ali je dob majke u pozitivnoj korelaciji s pojavom trisomija. Usporedbom uspješnosti citogenetičke analize tkiva posteljice i tkiva kože utvrđeno je da je tkivo posteljice pouzdaniji materijal za analizu te da je dugotrajna metoda kultivacije uspješnija.

(40 stranica, 12 slika, 9 tablica, 37 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Centralnoj biološkoj biblioteci Prirodoslovno - matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb, Hrvatska

Ključne riječi: kromosomopatija, spontani pobačaj, dugotrajna kultura stanica, kratkotrajna kultura stanica

Voditelj: izv.prof.dr.sc. Feodora Stipoljev

Suvoditelj: izv.prof.dr.sc. Petra Korać

Ocjenitelji: izv.prof.dr.sc. Petra Korać, izv.prof.dr.sc. Vesna Benković, prof.dr.sc. Zlatko Liber,

Rad prihvaćen: 05.04.2018.

## BACIS DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Graduation Thesis

Faculty of Science

Division of Biology

### ANALYSIS OF CHROMOSOMOPATHIES AS A CAUSE OF SPONTANEOUS ABORTION IN CROATIA

Marija Petrović

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Spontaneous abortion is the most common complication in pregnancy. It is considered that 15% of all pregnancies end with spontaneous abortion. More than 50% of those cases are caused by chromosomal abnormalities. Main chromosomal abnormalities are: trisomy, polyploidy and monosomy. The most commonly used tissues for cytogenetic analysis (karyotyping) are coronal villi and skin tissues. Conventional techniques used to cultivate coronal villi and skin tissues are long-term and short-term methods. The basic aim of this study was to determine the incidence of individual chromosomal abnormalities in spontaneous abortion, to compare the success of different tissue cultivation techniques, and to determine possible effect of maternal age to the occurrence of individual chromosomal abnormalities and gestational age of aborted fetus.

Analysis of 253 fetuses, showed that the most common causes of spontaneous miscarriages are chromosome 16, 18 and 22 trisomies and chromosome X monosomy. It was found that there is no correlation of maternal and gestational age of aborted fetus, while maternal age was in positive correlation with the appearance of trisomies. By comparing the success of the cytogenetic analysis of placental tissue and skin tissue, it was found that the placental tissue was better samples for precise cytogenetic analysis and that the long-term method was more successful.

(40 pages, 12 figures, 9 tables, 37 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: chromosomal abnormalities, spontaneous abortion, long-term cell culture, short-term culture of cells

Supervisor: Dr. Feodora Stipoljev, Associate Professor

Cosupervisor: Dr. Petra Korać, Associate Professor

Reviewers: Dr. Petra Korać, Associate Professor, Dr. Zlatko Liber, Dr. Vesna Benković

Thesis accepted: 05.04. 2018.

1. UVOD .....	1
1.1. Povijest citogenetike .....	1
1.2. Kromosomske aberacije .....	2
1.2.1. Aneuploidije .....	5
1.2.1.1. Monosomija .....	5
1.2.1.2. Trisomija .....	6
1.2.1.3. Polisomije spolnih kromosoma .....	7
1.2.2. Poliploidije .....	8
1.2.2.1. Triploidija .....	8
1.2.2.2. Tetraploidija .....	8
1.3. Mozaicizam .....	9
1.4. Spontani pobačaj .....	9
1.4.1. Opetovani spontani pobačaj .....	10
1.4.2. Gestacijska dob i omjer spolova kod spontanih pobačaja .....	11
1.5. Faktori koji utječu na spontani pobačaj .....	12
1.5.1. Majčina dob .....	12
1.5.2. Pušenje i alkohol .....	13
1.6. Citogenetička analiza uzoraka spontanog pobačaja .....	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	16
3. MATERIJALI I METODE .....	17
3.1. Materijali .....	17
3.2. Metode .....	17
3.2.1. Dugotrajna kultura stanica korionskih resica i tkiva kože .....	17
3.2.1.1. Sinkronizacija uzorka .....	17
3.2.1.2. Prekid rasta kulture stanica korionskih resica i tkiva kože .....	18
3.2.1.3. Bojanje preparata .....	18
3.2.2. Kratkotrajna kultura stanica korionskih resica .....	19
3.2.3. Statistička obrada podataka .....	19
4. REZULTATI .....	21
4.1. Analiza broja spontanih pobačaja i poroda s obzirom na ukupni broj pacijentica i abnormalnost ploda .....	21
4.2. Analiza učestalosti kromosomskih aberacija koje uzrokuju spontane pobačaje .....	24
4.3. Analiza utjecaja majčine dobi na kromosomopatije ploda i gestacijsku dob pobačenog ploda .....	26

4.4. Analiza uspješnosti dugotrajne i kratkotrajne metode kod analize tkiva korionskih resica i tkiva kože .....	28
4.5. Analiza rezultata utjecaja pušenja i konzumacije alkohola na pojavnost spontanog pobačaja .....	30
5. RASPRAVA.....	31
6. ZAKLJUČAK .....	35
7. LITERATURA.....	36
8. ŽIVOTOPIS .....	40

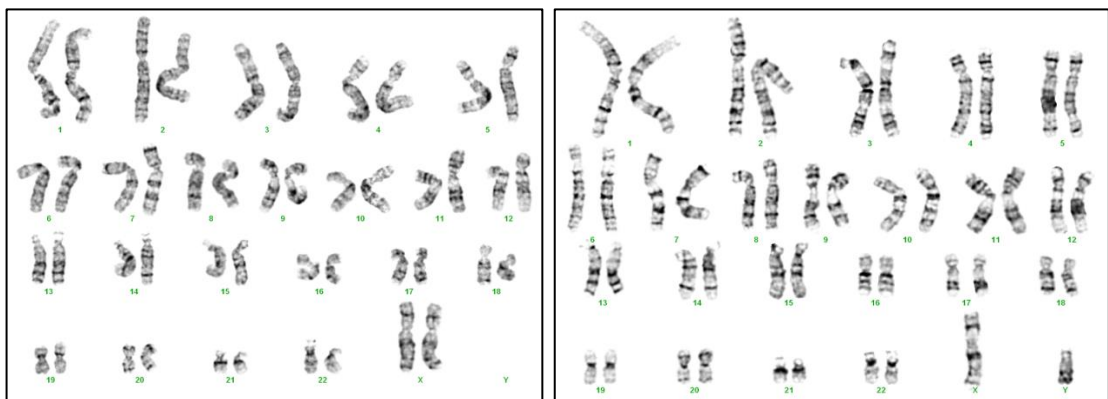


# 1. UVOD

## 1.1. Povijest citogenetike

Mehanizmi prijenosa svojstava i obilježja kroz generacije bili su nepoznati do postavljanja Mendelovih zakona koji su krajem 19. st. razjasnili kretanja kromosoma/informacija o nasljednim svojstvima tijekom diobe stanica. Dokaz o kromosomskoj teoriji nasljeđivanja bio je odlučujući događaj u biologiji koji je omogućio razvoj citogenetike. Citogenetika proučava svojstva i ponašanje kromosoma. Tijekom prve polovice 20-og stoljeća genetička istraživanja uglavnom su bila ograničena na biljne i životinjske vrste. Cyril Darlington, koji je bio biljni citogenetičar, dao je najveći doprinos istraživanju kromosoma u mejozi. Njegova su istraživanja potvrdila da su kromosomske strukture i ponašanja u somatskim i spolnim stanicama zajedničke svim biljkama i životinjama (Ferguson-Smith, 2015).

Međutim, u to je vrijeme bilo teško analizirati ljudske stanice. Normalan broj kromosoma u ljudskim stanicama nije bio poznat, sve dok znanstvenici Tjio i Levan 1956. godine nisu otkrili da ljudska stanica ima 46 kromosoma (Tjio i Levan, 1956) (Slika 1.). Ovo otkriće ukupnog broja kromosoma označilo je početak modernog doba ljudske citogenetike (Ferguson-Smith, 2015).



A.

B.

**Slika 1.** Normalni kariogrami. A) uredan ženski kariogram (46,XX) , B) uredan muški kariogram (46,XY). (Preuzeto iz arhive Odjela za laboratorijsku citogenetiku Kliničke bolnice „Sv. Duh“ u Zagrebu.)

Prvu kromosomsku aberaciju u čovjeka otkrili su znanstvenici Marthe Gautier i sur. sredinom 20-og stoljeća kada su pronašli dodatni kromosom u kulturi fibroblasta kod nekoliko djece s Downovim sindromom (Lejeune i sur., 1956). Sljedećih nekoliko godina otkriveni su: poremećaji broja spolnih kromosoma, Turnerov i Klinefelterov sindrom, i suvišak broja nekih autosomnih kromosoma kao što su kromosomi 13 i 18. Sve navedene kromosomske aberacije otkrivene su u stanicama fibroblasta ili u stanicama koštane srži (Ferguson-Smith, 2015). Daljnji razvoj citogenetike dogodio se u drugoj polovici 20-og stoljeća uvođenjem kulture limfocita i kromosomskog pruganja kao najznačajnije tehnike citogenetike. Najznačajnija otkrića dobivena ovom metodom bila su detekcija Philadelphijskog kromosoma u kroničnoj mijeloidnoj leukemiji, kao i translocirani oblik Downovog sindroma u tri generacije jedne obitelji. Razvoj staničnih kultura, posebice limfocitne kulture, korištenja kolhicina i hipotonične otopine dovele su do otkrića mnogih kromosomskih sindroma (Ferguson-Smith, 2015).

Uvođenje kromosomskog pruganja 70-tih godina 20. stoljeća jedan je od izuzetno važnih događaja koji je pridonio razvoju citogenetike. Znanstvenici Pardue i Gall istraživali su satelitnu DNA koju su radioaktivno obilježili, a koja se uspješno hibridizirala na centromerama denaturiranih kromosoma. Mjesta koja su hibridizirala su selektivno obojali Giemsom i dobili G-pruge (Sumner i sur., 1971). Ova metoda pruganja kasnije je doprinijela preciznosti mapiranja gena i otkrivanju citogenetičkih karakteristika tumora. Zech i Rowley su utvrdili da je Philadelphijski kromosom nebalansirana translokacija 9. i 22. kromosoma (Rowley, 1973).

Znanstvenici Pardue i Galla su dalje razvijali citogenetičke metode korištenjem hibridizacije *in situ* za mapiranje DNA sekvenci u kromosomima (Henderson i sur., 1972). Međutim, označavanje s radioizotopima je dugotrajan proces pa je nedugo potom zamijenjen fluorescentnim označavanjem i detekcijom fluorescencijskim mikroskopom. Fluorescencijska hibridizacija *in situ* (FISH, od eng. *fluorescent in situ hybridization*) postala je standardna metoda mapiranja (Ferguson-Smith, 2015).

## **1.2.Kromosomske aberacije**

Kromosomske aberacije pojave su koje uključuju sve promjene u strukturi i broju kromosoma. Nastanak kromosomskih aberacija uzrokuje jedan od četiri moguća mehanizma: pogreške u mejozi (tijekom gametogeneze), pogreške pri oplodnji ili mitozu nakon oplodnje i pojava strukturnih aberacija i razmjještanja kromosoma (Gersen i Keagle, 2005). Starost majke

i okolišni uvjeti povezani su s nastankom kromosomskih aberacija. Prenatalni probir i testiranje mogu se provesti za detekciju kromosoma fetusa i otkrivanje različitih vrsta kromosomskih aberacija (Haga i sur., 2009).

Kromosomske aberacije se dijele na numeričke i strukturne (Warburton, 1987).

Numeričke aberacije uzrokovane su nerazdvajanjem kromosoma i uzrokuju 95 % fetalnih smrti. One uključuju umnožavanje broja haploidnog kromosomskog seta (poliploidije) ili promjenu broja jednog ili više kromosoma (aneuploidije), što rezultira viškom ili manjkom kromosoma. Najčešće vrste numeričkih aberacija su: trisomija, triploidija i monosomija (Warburton, 1987). Nerazdvajanje kromosoma događa se kada se parovi homolognih kromosoma ili sestrinskih kromatida ne razdvoje tijekom mejoze I ili II, ili tijekom mitoze. Ukoliko se tijekom mejoze I homologni kromosomi ne razdvoje, u mejozi II doći će do nastanka aneuploidnih gameta. Također, nerazdvajanje se može dogoditi i u mejozi II kada se ne razdvajaju sestrinske kromatide pa i tada spolne gamete sadrže aneuploidni broj kromosoma (Dailey i sur., 1996).

Strukturne kromosomske aberacije rezultat su loma i razmještanja dijelova kromosoma nastalih najčešće pod utjecajem različitih štetnih spojeva ili radijacije. One nastaju *de novo* tijekom gametogeneze ili se nasljeđuju od roditelja koji je nositelj balansirane translokacije. Strukturna razmještanja mogu biti balansirana i nebalansirana. Balansirana razmještanja uključuju razmještanja kromosomskih segmenata bez gubitka ili suviška kromosomskog materijala, dok nebalansirana razmještanja uključuju duplikacije, insercije ili delecije kromosomskih segmenata. Bolest se može pojaviti i kao posljedica balansiranog razmještanja ako se točka loma nalazi unutar sekvence gena, što rezultira gubitkom ili nefunkcionalnošću proteina. Strukturne aberacije mogu uključivati lom samo jednog kromosoma, koji može dovesti do delecije ili insercije kromosomskog materijala (Slika 2.) (Gersen i Keagle, 2005).



**Slika 2.** Prikaz kariograma sa strukturnom aberacijom: delecija na p-kraku 18. kromosoma (označeno strelicom). (Preuzeto iz arhive Odjela za laboratorijsku citogenetiku Kliničke bolnice „Sv. Duh“ u Zagrebu.)

Ako kromosomsko razmještanje uključuje više kromosoma, rezultat je insercija ili translokacija. Translokacije se dijele na: Robertsonove i recipročne translokacije. Robertsonovom translokacijom nastaje fuzija akrocentričnih kromosoma (kromosomi 13, 14, 15, 21 i 22) s gubitkom kratkog dijela kromosoma, pri čemu nastaju strukture poput metacentričnih ili submetacentričnih kromosoma (Slika 3). Druga vrsta translokacija recipročne su translokacije kod kojih se izmjenjuje materijal dijelova kromosoma bez ukupne promjene broja kromosoma (Gersen i Keagle, 2005).



**Slika 3.** Prikaz kariotipa s Robertsonovom translokacijom kromosoma 14 i 21 (označeno strelicom). (Preuzeto iz arhive Odjela za laboratorijsku citogenetiku Kliničke bolnice „Sv. Duh“ u Zagrebu.)

Strukturne aberacije zbog kromosomskog razmještanja ili zbog gubitka dijela genetskog materijala uzrokuju 3 % spontanih pobačaja (Gersen i Keagle, 2005).

### **1.2.1. Aneuploidije**

Najčešće numeričke kromosomske aberacije kod spontanih pobačaja su one u kojima nedostaje određeni kromosom ili postoji višak jednog ili više kromosoma. Monosomija i trisomija najčešće se nalaze u materijalu spontanih pobačaja. Događaju se zbog nerazdvajanja tijekom prve i druge mejotičke diobe (Warburton, 1987). Neuspješan genski utisak može biti faktor koji doprinosi visokoj smrtnosti embrija zbog autosomnih monosomija. S druge strane, trisomije su relativno česte i dovode do spontanog gubitka trudnoće. Oko 25 % kariotipiziranih spontanih pobačaja su trisomije. U dosadašnjim istraživanjima proučavale su se sve autosomne trisomije, s jedinstvenim izuzetkom kromosoma 1, za koju se pretpostavlja da je letalna i prije implantacije zametka (Gersen i Keagle, 2005).

#### **1.2.1.1. Monosomija**

Monosomija je prisutnost samo jedne kopije kromosoma kromosomskog para, a najčešće je posljedica nerazdvajanja kromosoma (Gersen i Keagle, 2005). Autosomna monosomija dovodi do teške razvojne abnormalnosti ili letalnosti ploda. Kod ljudi, autosomna monosomija uglavnom uzrokuje spontane pobačaje. Pojava monosomije kod spolnih kromosoma je iznimka, budući da je monosomija kromosoma X jedina vijabilna monosomija. Ona je uzrok Turnerovog sindroma kod ljudi (Slika 4.). Smatra se da je zaostajanje Y-kromosoma kod mejoze oca čest uzrok Turnerova sindroma (Bruce i sur., 2014). Uzrok nastanka monosomije X-kromosoma može biti i postzigotno nerazdvajanje u ranoj embriogenezi, a većina takvih slučajeva (99 %) završava spontanim pobačajem (Gersen i Keagle, 2005). Autosomna monosomija ostalih kromosoma kod spontanih pobačaja vrlo je rijetka. U nekim istraživanjima pojavnost monosomije je 0,2 % (Jenderny, 2014).



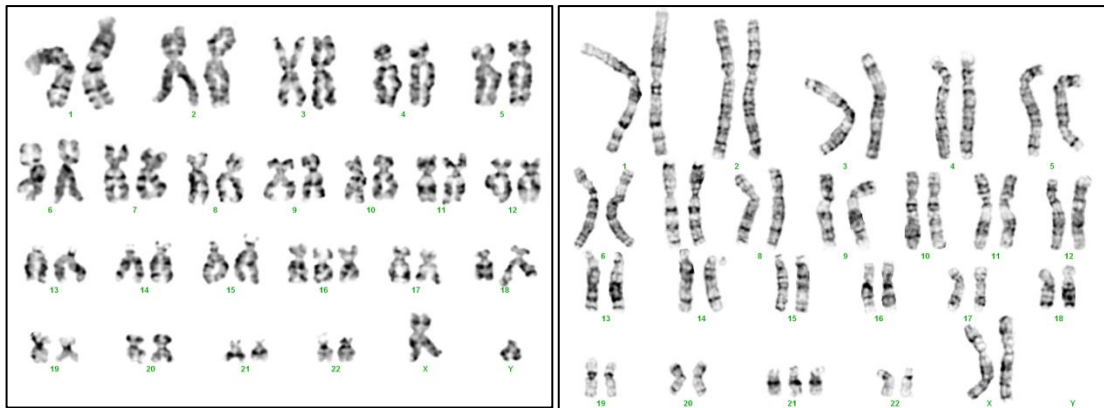
**Slika 4.** Prikaz kariograma s monosomijom X-kromosoma. (Preuzeto iz arhive Odjela za laboratorijsku citogenetiku Kliničke bolnice „Sv. Duh“ u Zagrebu.)

### 1.2.1.2. Trisomija

Trisomije su najveća pojedinačna skupina kromosomskih aberacija u spontanim pobačajima (Warburton, 1987). Najčešća trisomija u spontanim pobačajima je ona kromosoma 16, koja čini 31,0 % ukupnih trisomija i 7,27 % od različitih tipova kromosomskih aberacija u svim spontanim pobačajima (Slika 5; Slika A). Slijedi trisomija kromosoma 22, u 11,4 % ukupnih trisomija i u 2,26 % svih spontanih pobačaja. Trisomija kromosoma 21 treća je najčešća trisomija, a može se naći u 10,5 % svih trisomija i u 2,11 % svih spontanih pobačaja (Gersen i Keagle, 2005). Najrjeđe trisomije koje se nalaze u citogenetičkoj analizi spontanih pobačaja su trisomije kromosoma 1, 11 i 19. Razlog rijetkog pojavljivanja trisomija ovih kromosoma nije poznat, ali navedeni kromosomi sadrže veliki broj gena i njihova trisomija može uzrokovati najraniji gubitak ploda, čak i prije implantacije u maternici (Jernedy i sur., 2014).

Autosomne trisomije uglavnom završavaju smrću ploda, a od toga pravila odstupaju trisomije kromosoma 13, 18 i 21 (Warburton, 1987). Trisomija kromosoma 21 (uzrok Downovog sindroma) najčešći je kromosomski sindrom koji se nalazi u približno 1 od 700 živorođene djece (Slika 5; Slika B). Trisomija kromosoma 18 (uzrok Edwardovog sindroma) i trisomija kromosoma 13 (uzrok Patauovog sindroma) javljaju se u približno 1 u 6000 - 8000 i 1 u 12 000 živorođene djece. Identifikacija trisomnih zametaka od kliničke je važnosti zbog mogućeg povećanog rizika za aneuploidiju u kasnijim trudnoćama. Rizik ponavljanja gubitka

trudnoće za par s prethodnim gubitkom ploda uzrokovanim trisomijom je 1 % (Gersen i Keagle, 2005).



A.

B.

**Slika 5.** Prikaz kariograma s najčešćim trisomijama. A) trisomija kromosoma 16, B) trisomija kromsoma 21. (Preuzeto iz arhive Odjela za laboratorijsku citogenetiku Kliničke bolnice „Sv. Duh“ u Zagrebu.)

Učestalost trisomije povećava se porastom majčine dobi. Kod novorođenčadi s trisomijom uočeno je da su trisomije češće kod manjih kromosoma (Warburton, 1987). Česti su i slučajevi pojavljivanja dvostrukih trisomija kod spontanih pobačaja koji se povezuju s kasnijom majčinom dobi (Gersen i Keagle, 2005). Trisomiju mogu uzrokovati i nerazdvajanje kromosoma u drugoj mejotičkoj diobi te nerazdvajanje kromosoma u prvoj i drugoj mejotičkoj diobi kod muškaraca (Warburton, 1987).

### 1.2.1.3. Polisomije spolnih kromosoma

Trisomije spolnih kromosoma rijetko uzrokuju spontani gubitak trudnoće, ali su s obzirom na učestalost pojavljivanja, slične monosomiji kromosoma X (Gersen i Keagle., 2005). Kariotipovi 47,XXY ili 47,XYY pojavljuju se u 1 na 800 živorođenih dječaka, a 47,XXX kod 1 na 800 živorođenih djevojčica (Simpson i sur., 1990). Trisomije spolnih kromosoma obično nisu udružene s dismorfijom pa se često ne identificiraju prije citogenetičke analize. Pogreške u mejozi uzrokovane očinskim porijeklom odgovorne su za 44 % slučajeva kariotipova 47,XXY i 6 % slučajeva kariotipova 47,XXX. Učestalost trisomija spolnih kromosoma je 0,2 % od ukupnih spontanih pobačaja (Gersen i Keagle 2005).



## 1.2.2. Poliploidije

Poliploidija je prisutnost više od dva haploidna kromosomska seta. Najčešće pojavljivane poliploidije u spontanim pobačajima su triploidije ( $3n=69$ ) i tetraploidije ( $4n=92$ ) (Simpson i sur., 1990).

### 1.2.2.1. Triploidija

Triploidija predstavlja tri kopije haploidnog kromosomskog komplekta. Može nastati tijekom oplodnje diploidne gamete koja se tijekom mejoze nije reducirala na haploidni set kromosoma ili tijekom oplodnje haploidne jajne stanice s dva spermija (Slika 6.). Triploidija može imati spolni komplement XXX, XXY ili XYY, iako su se među spontanim pobačajima dosada pronašli samo XXX i XXY. Najveći dio triploidnih zametaka spontano se pobaci do 15. tjedna trudnoće, te se često na takvim embrijima mogu uočiti morfološke abnormalnosti (Warburton, 1987). U 99 % slučajeva triploidni plodovi spontano se pobace tijekom prvog i drugog tromjesečja trudnoće. Učestalost triploidije kod spontanih pobačaja iznosi 12 % (Jenderny, 2014).



**Slika 6.** Prikaz kariograma s triploidijom kromosoma. (Preuzeto iz arhive Odjela za laboratorijsku citogenetiku Kliničke bolnice „Sv. Duh“ u Zagrebu.)

### 1.2.2.2. Tetraploidija

Tetraploidija predstavlja četiri kopije svakog kromosoma, a događa se zbog pogreške mitotičke podjele u samom začetku razvoja zigote. Spontani se pobačaj u ovakvim slučajevima događa u prvom tromjesečju, točnije do petog tjedna trudnoće (Warburton, 1987). Stopa učestalosti tetraploidije kod spontanih pobačaja iznosi 3 %. (Jenderny, 2014).



### 1.3. Mozaicizam

Mozaicizam je postojanje dviju ili više staničnih linija s različitim kromosomskim setovima prisutnim u jednoj osobi. Fetalni dio posteljice i plod u pravilu imaju istu kromosomsku konstituciju, međutim u 1 do 2 % slučajeva događa se da u tkivu posteljice bude prisutna kromosomska aberacija. Ovakav slučaj naziva se mozaicizam ograničen na posteljicu (Vičić i Stipoljev, 2013). Stupanj mozaicizma ovisi o vremenu kada se pogreška dogodila. Ako se pogreška javlja rano u zigoti, postotak svake od staničnih linija može biti jednak (Hardy i Hardy, 2015). Postoji više načina koji uzrokuju nastajanje mozaicizma kao što su: postzigotno mitotsko nerazdvajanje kromosoma, postzigotno anafazno zaostajanje, te pojava popravaka pogreške broja kromosoma u aneuploidnoj zigoti tijekom prvih staničnih dioba (Vičić i Stipoljev, 2013).

### 1.4. Spontani pobačaj

Spontani gubitak ploda najčešća je komplikacija trudnoće. Spontani pobačaj uključuje gubitak ploda do 20-og tjedna trudnoće (Lorber Rolnik i sur., 2010). Stopa spontanog gubitka trudnoće kod žena iznosi 12-24 % (Jurković i sur., 2013). Prava stopa pobačaja vjerojatno je veća jer se mnogi gubitci pojavljuju pretklinički. Većina spontanih pobačaja događa se u prvom tromjesečju, a uzrokuju ih značajnim dijelom kromosomopatije (Lorber Rolnik i sur., 2010). Boué i sur. utvrdili su da je otprilike 2/3 gubitaka prije osmog tjedna trudnoće i gotovo 1/4 onih između 8 i 12 tjedana trudnoće uzrokovano kromosomskom aberacijom. Što je ranije došlo do spontanog gubitka trudnoće, to je vjerojatnije da je u plodu postojala kromosomska aberacija (Gersen i Keagle 2005). Iako se veći broj spontanih pobačaja događa ranije u trudnoći, gubitci u drugom i trećem tromjesečju nisu rijetki. Oko 2-5 % žena doživljavaju dva ili više spontanih gubitaka trudnoće. Više od 50 % ranih pobačenih plodova i 5 % mrtvorodenih plodova imaju abnormalne kariotipove (Gersen i Keagle, 2005). Većina spontanih pobačaja javlja se kod kromosomski normalnih roditelja (Berg i sur., 2012).

Citogenetička istraživanja pokazuju da su kromosomske aberacije koje uzrokuju spontane pobačaje većinom numeričke aberacije kromosoma (86 %), a manji dio strukturne kromosomske aberacije (6 %) i kromosomski mozaicizmi (8 %). Većina aberacija kromosoma u spontanim pobačajima događa se *de novo* ili su rezultat slučajnih pogrešaka nastalih tijekom gametogeneze i razvoja embrija (Berg i sur., 2012).

Pozitivna obiteljska anamneza bilo kojeg tipa kongenitalne anomalije, mentalne retardacije, neplodnosti, spontanog pobačaja ili perinatalne smrti značajna je, jer svaka od njih

može biti povezana s kromosomskom abnormalnošću. Postoji mali broj prihvaćenih etiologija za koje se smatra da uzrokuju opetovane spontane pobačaje (od eng. *recurrent pregnancy loss*, RPL), odnosno ponavljanje dva (tri) ili više uzastopnih spontanih pobačaja kod 1 % parova. Prihvaćene etiologije koje uzrokuju opetovani spontani pobačaj su: roditeljske kromosomske aberacije, neliječena hipotireoza, nekontroliran *diabetes melitus*, anatomske abnormalnosti uterusa i sindrom antifosfolipidnog antitijela (od eng. *antiphospholipid antibody syndrome*, APS). Ostale vjerojatne ili moguće etiologije uključuju dodatne endokrine poremećaje, nasljedne i/ili stečene trombofilije, imunološke poremećaje, infekcije i okolišne čimbenike (Ford i Schust, 2009).

U slučajevima kod kojih par ima dva ili više spontanih pobačaja ili dijete sa strukturnom kromosomskom anomalijom, treba provesti kromosomsku analizu obaju partnera. Utvrđivanje prisustva takvog kromosomskog razmještanja u jednog od roditelja osigurava objašnjenje uzroka pobačaja, podatke o riziku za živorođeno dijete s potencijalno ozbiljnim anomalijama, kao i rizik za buduće trudnoće i informacije za članove proširene obitelji koji mogu biti izloženi riziku nositeljstva kromosomskog strukturnog razmještanja (Bick i sur., 1999).

#### **1.4.1. Opetovani spontani pobačaj**

Najveći prijemor pri postavljanju kriterija potrebnih za dijagnozu RPL-a odnosi se na najmanji broj spontanih pobačaja. Prema smjernicama Europskoga društva za ljudsku reprodukciju (od eng. *European Society of Human Reproduction and Embryology*, ESHRE) i Kraljevskog zbora porodničara i ginekologa (od engl. *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists*, RCOG) to su barem tri spontana pobačaja, a prema smjernicama američkog udruženja za reproduktivnu medicinu (od engl. *American Society for Reproductive Medicine*, ASRM) dva spontana pobačaja. Definicija navedena u smjernicama društva ESHRE i RCOG obuhvaća uzastopne spontane pobačaje, dok redosljed u smjernicama društva ASRM nije preciziran (Pereza i sur., 2016). U ovisnosti o definiciji opetovanog spontanog pobačaja, postotak parova kod kojih se dogodio ponovljeni spontani pobačaj raste do 5 %. Rizik daljnjeg spontanog pobačaja povećava se približno do 50 % za žene s tri ili više pobačaja bez živorođene djece (Choi i sur., 2014).

Uzroci RPL-a mogu se pronaći u 40 – 50 % parova. Najčešći uzroci RPL-a kod žena su anomalije maternice i kromosomske aberacije u jednog od partnera (Pereza i sur., 2016). Broj zdravih jajnih stanica za reprodukciju kod starijih majki manji je nego kod mlađih, što

dovodi do češćeg pojavljivanja kromosomskih aberacija (Choi i sur., 2014). Jedan od uzroka ponavljajućeg spontanog pobačaja jest i balansirano strukturno razmještanje kromosoma u jednog od partnera. Nositelji strukturnih razmještanja kromosoma imaju povećani rizik nastajanja nebalansiranih gameta. Kada se takva nebalansirana gameta oplodi, vrlo često dolazi do spontanog pobačaja. Procijenjeno je da u 4 % parova s dva ili više pobačaja, jedan od partnera nosi balansiranu translokaciju (Gersen i Keagle, 2005). Rjeđi uzroci RPL-a su monogenske bolesti (alfa-talasemija i miotonična distrofija u jednog od partnera te specifične dominantne bolesti u žena vezane uz X-kromosom), kao i izloženost toksinima, neliječena hipotireoza i šećerna bolest tipa 2 u žena (Pereza i sur., 2016).

Uzroci RPL-a često su nepoznatog uzroka, tj. uzrokuju ga idiopatske raznovrsne skupine poremećaja pa se takva vrstu poremećaja naziva idiopatski ponavljajući spontani pobačaj (IPSP) i ovisna je o gestacijskom razdoblju u kojem se spontani pobačaji ponavljaju. Pretpostavka o genetskoj podložnosti za IPSP temelji se na činjenicama da se rizik od ponovnog gubitka trudnoće povećava s brojem prethodnih spontanijih pobačaja neovisno o dobi trudnice i da se u istog para spontani pobačaji većinom ponavljaju u istom gestacijskom razdoblju. Najveći dio genetičkih istraživanja obuhvaća istraživanja genetske povezanosti (od engl. *genetic association study*, ) u kojima se ispituje ovisnost između genetske varijabilnosti i IPSP-a, s ciljem utvrđivanja kandidatskih gena ili područja genoma koji bi mogli pridonijeti spontanijim pobačajima. Dosad ispitana varijabilnost detektirala je 180 kandidatnih gena. Produkti ovih gena većinom su proteini uključeni u funkciju imunskog i endokrinog sustava, koagulaciju, metabolizam, angiogenezu i kontrolu funkcije krvožilnog sustava (Pereza i sur., 2016).

#### **1.4.2. Gestacijska dob i omjer spolova kod spontanijih pobačaja**

Spontani pobačaj može se podijeliti prema gestacijskoj dobi u ovisnosti o tome je li se dogodio u prvom, drugom ili trećem tromjesečju. Prosječna gestacijska dob za pobačeni plod normalnog kariotipa je 17,8 tjedana, dok je za pobačeni plod abnormalnog kariotipa 15,4 tjedna. Gestacijska dob pobačenog ploda može se razlikovati s obzirom na vrstu poremećaja koji je uzrokovao spontani pobačaj, pa tako pobačeni plodovi s triploidijom, monosomijom kromosoma X te trisomijom kromosoma 13, 18 i 21 najčešće prežive dulje od 16. tjedna trudnoće. Kod triploidije uočava se razlika u odnosu na haploidno podrijetlo. Ukoliko je haploidni komplement očevog podrijetla, srednja dob preživljavanja ploda je 123 dana, a ukoliko je majčinskog porijekla onda je 69 dana (Hassold i Chiu, 1986). Gestacijska dob razlikuje se i kod majki s opetovanim spontanijim pobačajem. Spontani pobačaji u tim

slučajevima većinom se ponavljaju u istom gestacijskom razdoblju, od čega 90 % u prvom tromjesečju (Pereza i sur., 2016).

Omjer spolova kod spontanih pobačaja razlikuju se u različitim istraživanjima. Veća stopa ženskih pobačenih plodova s normalnim kariotipom povezuje se s kontaminacijom uzorka majčinih stanicama, što znači da uzorak prije analize vjerojatno nije bio temeljito očišćen. Omjer spolova XY:XX kod živorođene djece iznosi 1,06 (Cheng i sur., 2014), dok je omjer spolova za pobačene plodove 0,88 (Hassold i Chiu, 1986). Na omjer spolova može utjecati i metoda kojom se kultiviraju stanice. Metoda dugotrajne kulture stanica smatra se rizičnom za kontaminaciju majčinih stanicama jer sama kultivacija stanica traje od 7 do 14 dana, te postoji mogućnost za prikazivanje pogrešnog omjera prilikom detekcije spolova zbog rasta majčinih stanica. Metoda kratkotrajne kulture stanica manje je rizična jer je brža (priprema uzorka u roku od 24 sata) (Cheng i sur., 2014) i sadrži niži mitotski indeks stanica bazalne decidue (Vičić i Stipoljev, 2013).

## **1.5. Faktori koji utječu na spontani pobačaj**

Osim utjecaja majčine dobi na pojavu većine kromosomskih aberacija kod spontanih pobačaja, osobito pojavu trisomija (Warbuton, 1987), utječu i okolišni čimbenici poput pušenja i alkohola (Ford i Schust, 2009).

### **1.5.1. Majčina dob**

Majčina dob pokazuje pozitivnu korelaciju s učestalošću spontanih pobačaja. (Simpson, 1990), međutim dob majke razlikuje se s obzirom na to je li pobačeni plod bio normalnog ili abnormalnog kariotipa. Učestalost pobačaja kromosomskih normalnih plodova varira između 4-9 % kod žena do 30 godina, a porastom majčine dobi i dalje raste udio normalnih kromosomskih pobačaja (Hassold i Chiu, 1986).

Dob majke razlikuje se ovisno o kromosomskim aberacijama koje uzrokuju spontani pobačaj. Majčina dob ima najveći utjecaj kod trisomija koje uzrokuju spontani pobačaj. Učestalost svih trisomija umjereno se povećava do 30-ih godina majki, nakon čega naglo raste. Najveće neproporcionalno odstupanje trisomija je kod majki iznad 40. godine, kada se udio trisomija naglo povećava s 10 % na 30 %. Unutar grupe trisomija jedina iznimka uočava se kod trisomije 16 kod koje učestalost pojavljivanja nakon 30-e godine života majke naglo raste. Kod drugih kromosomskih aberacija majčina dob nije značajno povezana s nastankom aberacija (Hassold i Chiu, 1986). Učestalost pojavljivanja trisomije 13 najčešća je kod žena između 25 i 29 godina, dok je kod trisomije 21 najčešća između 30 i 35 godina, te

proporcionalno raste s porastom majčine dobi (Dai i sur., 2017; Hassold i Chiu, 1986). Trisomija 18 najčešće se pojavljuje nakon 25-e godine života majke i porast majčine dobi nema značajniji utjecaj na broj takvih slučajeva (Dai i sur., 2017). Za razliku od trisomija, monosomija X-kromosoma u pozitivnoj je korelaciji s mlađom životnom dobi majke (Hassold i Chiu, 1986).

Osim pojavljivanja kromosomskih aberacija kod žena starije životne dobi, veća je kumulativna izloženost toksinima, više je prilika za stjecanje infekcija te imaju slabije vaskulariziran endometriji maternice (Simpson i sur., 1990). Također, s obzirom da se prosječna dob žena koje nose prvo dijete povećala tijekom posljednja dva desetljeća u zapadnim zemljama, vjerojatno je da će fetalna trisomija postati češća (Berg i sur., 2012).

Majčina dob također je značajan čimbenik rizika za ponavljanje spontanog pobačaja. Majkama u dobi od 20 do 24 godina opetovani spontani pobačaj događa se u 8,9 % slučajeva, za razliku od majki u dobi od 42 godine kod kojih se pobačaj događa u više od polovice trudnoća. Najrizičnija skupina trudnica su žene starije od 45 godina koje imaju rizik za opetovani spontani pobačaj do 74,7 %. (Hardy i Hardy, 2015).

### **1.5.2. Pušenje i alkohol**

Pušenje predstavlja jedan od teratogenih faktora koji povećava rizik nastanka spontanog pobačaja. Prethodna istraživanja pokazala su da ne postoji povezanost između pušenja i pojave abnormalnih plodova, jer je većina analiziranih uzoraka bila normalnog kariotipa. Ipak u 95 % aberantnih kariotipova pušenje se smatra mogućim uzrokom nastanka aberacija ploda (Kline i sur., 1976).

U istraživanju Armstronga i sur., pušenje povećava rizik od spontanog pobačaja za 11 % (za one trudnice koje dnevno konzumiraju 20 cigareta i više) (Armstrong i sur., 1992.). Povećana perinatalna smrtnost kod pušačica djelomično je posljedica oštećenja posteljice, što uzrokuje stvaranje anoksije (Hutter i sur., 2010).

Istraživanja koja povezuju konzumaciju alkohola i spontanog pobačaja kod žena pokazala su da žene koje često konzumiraju alkohol imaju povećan rizik od prijevremenog poroda i mrtvorodenih plodova (Henriksen i sur., 2004). Harlap i sur. pronašli su povećani rizik kod žena koje konzumiraju alkohol u prvom tromjesečju, iako to povećanje nije doseglo statističku značajnost. Umjereno konzumiranje alkohola povećava rizik za spontani pobačaj do 1,26 puta. Ukoliko trudnica konzumira alkohol dva do šest puta tjedno, rizik za

spontani pobačaj povećava se za 2,33 puta. U istraživanju Armstronga i sur., pokazano je da konzumacija alkohola povećava rizik od spontanog pobačaja za 5 % (za one trudnice koje konzumiraju alkohol tri puta dnevno) (Armstrong i sur.,1992).

Konzumacija alkohola povezana je i s anomalijama spermija, a pobačeni plodovi često su abnormalnog kariotipa. Alkohol je prisutan u spermijima relativno kratko nakon konzumacije, a može izravno utjecati na implantaciju. Na ovaj način, muškarac konzumacijom alkohola može utjecati na rizik ranog gubitka ploda (Henriksen i sur., 2004).

## **1.6. Citogenetička analiza uzoraka spontanog pobačaja**

Konvencionalna kariotipizacija morfološka je karakterizacija kromosomskog komplementa pojedinca uključujući broj, oblik i veličinu kromosoma. Može otkriti abnormalnosti cijelog genoma na razini kromosoma i stoga se koristi kao standard za otkrivanje abnormalnosti kromosoma u uzorcima pobačaja. Još jedna od prednosti korištenja konvencionalnih metoda jest visoka specifičnost. Nedostatci konvencionalnih metoda ograničena su razlučivost (>3-5 Mb), mogućnost nerasta/infekcije kulture stanica ili kontaminacija uzorka ploda majčinim stanicama, složena laboratorijska procedura i dugo vremensko razdoblje kultiviranja i analiziranja stanica (Berg i sur., 2012). Rezultati analize uzoraka spontanog pobačaja omogućavaju uvid u mogući rizik od opetovanog spontanog pobačaja. Kod parova s plodom koji nosi trisomiju postoji povećani rizik za ponavljanje istoga rezultata. Ukoliko uzorak pobačenog ploda ima normalni kariotip, u većini slučajeva u idućoj trudnoći plod je normalnog kariotipa (Gardó i Bajnóczky, 1992).

Kromosomske aberacije u materijalu spontanih pobačaja mogu se detektirati analizom različitih tkivnih kultura. Kod ranih spontanih pobačaja može se dogoditi odsutnost ili dezorganizacija embrija. Nativno embrijsko ili fetalno tkivo poželjno je jer omogućuje brz rast stanica za analizu. Uspješnost kultiviranja tkiva pobačenog je ploda od 50 % do 80 % (Warburton, 1987). Ovisno o tome koje tkivo se koristi za citogenetičku analizu, uspješnost analize može se razlikovati. Najčešće korišteno tkivo za analizu spontanih pobačaja tkivo je kože ili posteljice. Kod analiziranja tkiva posteljice najčešće se kao uzorak koriste korionske resice koje se sastoje od tri sloja: unutarnji sloj mezenhimne strome, srednji sloj citotrofoblasta i vanjski sloj sinciotrofoblasta. U ovisnosti koja se citogenetička metoda primjenjuje za analizu stanica, koriste se različiti slojevi korionskih resica. Tako se za metodu kratkotrajne kulture stanica koriste stanice citotrofoblasta, dok se za metodu dugotrajne kulture stanica koriste stanice mezenhimalne strome (Vičić i Stipoljev, 2013).

Prema istraživanju Johnsona i sur., uspješnost kultiviranja tkiva kože manja je nego tkiva posteljice i iznosi 37,8 %, dok je kod posteljice 100 %. Jedan od mogućih razloga neuspješnosti kultiviranja kože ograničeno je vrijeme uzimanja uzorka. Tkivo kože smatra se nativnim ukoliko se uzorak uzima najviše jedan sat nakon spontanog pobačaja, u suprotnom se tkivo kože ne uzima u obradu. Osim toga, vrsta analiziranog tkiva utječe i na rezultate kariotipizacije. Pojavnost abnormalnog kariotipa kod analize tkiva posteljice u istraživanju Johnson i sur. iznosila je 92,3 %, dok je kod tkiva kože bila 42,9 %. Razlog je tome, osim u vrsti uzorka, u gestacijskoj dobi u kojoj se uzima tkivo za analizu. Tkivo kože uglavnom se uzima u kasnijem, a tkivo posteljice u ranijem gestacijskom razdoblju spontanog pobačaja, pa je tako veća vjerojatnost pojavljivanja abnormalnog kariotipa, kod ranijeg gubitka ploda (Johnson i sur., 1990).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj je ovog rada odrediti kromosomopatije koje su uzroci spontanih pobačaja u hrvatskoj populaciji i njihovu učestalost, te odrediti uspješnost pojedinih tehnika kultivacije tkiva.



## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

Podatci za 253 uzorka pobačenih plodova prikupljeni su iz baze podataka Odjela za laboratorijsku citogenetiku Kliničke bolnice „Sv. Duh“ u Zagrebu za razdoblje od veljače 2012. godine do srpnja 2017. godine. Podatci su sadržavali rezultate citogenetičke analize tkiva korionskih resica i tkiva kože. Analizirana su 182 uzoraka tkiva korionskih resica, od čega 60 metodom dugotrajne kulture stanica (od eng. *long-term culture*, LTC), 37 kratkotrajnom kulturom stanica (od eng. *short-term culutre*, STC) i 85 uzoraka objema metodama. 32 uzorka tkiva kože analizirana su metodom dugotrajne kulture stanica (od eng. *long-term culture*, LTC).

### 3.2. Metode

Za potrebe citogenetičke analize uzorak je sadržavao od 5 do 20 mg korionskih resica. Uzorak se očistio od mogućih zagađenja majčinim stanicama. Očišćene i usitnjene resice uzgajane su u kulturi stanica. Za potrebe kromosomske analize uspostavljene su dva tipa kulture stanica: kratkotrajna kultura stanica i dugotrajna kultura stanica.

#### 3.2.1. Dugotrajna kultura stanica korionskih resica i tkiva kože

Očišćeni i isprani uzorci korionskih resica od ostatka krvi, iglicama su usitnjeni na manje komadiće. Takvi uzorci prebačeni su u 2 ml tripsina (tripsin 0,25 %; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) i ostavljeni na 90 min u inkubatoru na 37 °C. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 5 min na 1000 o/min. Nastali talog ostavljen je u posudici i dodano je 4 ml kompletnog medija (Euroclone, Amniomed Plus, Milano, Italija) za kultivaciju stanica. Tako pripremljena kultura stanica ostavljena je sedam dana. Tijekom kultiviranja rast stanica praćen je invertnim mikroskopom. Kada je u kulturi naraslo dovoljno kolonija za analizu stanica, napravljena je promjena hranidbenog medija tako što je stari medij odbačen i dodano je 3 ml novog medija. Nakon što su stanice izložene novom mediju, u jednoj bočici napravljena je sinkronizacija uzorka, a u preostale dvije bočice prekid rasta kulture stanica korionskih resica.

##### 3.2.1.1 Sinkronizacija uzorka

Prije prekida rasta kulture stanica korionskih resica, u jednoj od tri bočice uzorka napravljena je sinkronizacija uzorka kako bi se što veći broj stanica doveo u istu fazu staničnog ciklusa te kako bi se dobio što veći broj prometafaznih kromosoma. Nakon što je kultura stanica izrasla, odbačen je hranidbeni medij i dodano je 2 ml MEM-a (od eng.

*Minimum Essential Medium*, MEM) (Gibco) i 2 ml tripsina (Gibco). Plastičnom strugalicom stanice su odstranjene s dna bočice i po 2 ml uzorka prebačeno je u dvije plastične bočice u koje je dodano 3 ml kompletnog medija (Euroclone). Nakon 24 sata dodano je 100 $\mu$ l BrDU (200  $\mu$ g/ml; 5-Bromo-2'-deoxyuridin, Sigma Aldrich, Švicarska) i uzorci su zamotani u aluminijsku foliju kako bi se spriječila izloženost svjetlu. Idući dan odstranjen je hranidbeni medij i isprana je plastična posuda s otopinom HBSS-a (od eng. *Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS) (Euroclone HBSS w/a Calcium & Magnesium –LIQUID 1X, Milano, Italija). Nakon ispiranja dodano je 3 ml kompletnog medija (Euroclone) i 18  $\mu$ l timidina (konačna koncentracija 3  $\mu$ g/ml) (Sigma Aldrich, Švicarska) te je zamotano u aluminijsku foliju i inkubirano 5 sati na 37 °C. Nakon inkubacije, dodano je 120  $\mu$ l kolcemida (Gibco KaryoMAX kolcemid (10  $\mu$ g/mL), Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) i inkubirano 20 min na 37 °C.

### 3.2.1.2. Prekid rasta kulture stanica korionskih resica i tkiva kože

U preostale dvije bočice s uzorcima, stavljeno je 3 kapi kolcemida (Gibco KaryoMAX) i ostavljeno 20 min na 37 °C u inkubatoru. Svaki je od uzoraka nakon 20 min (u omjeru 50:50) prebačen u dvije konusne epruvete. U praznu bočicu dodano je 3 ml tripsina (Gibco) i hranidbeni medij iz jedne epruvete. Plastičnom strugalicom stanice su odstranjene s dna bočice i sadržaj je prebačen u konične epruvete. Nakon toga, uzorci su centrifugirani 10 min na 1000 o/min. Nakon centrifuge, iz epruvete je otklonjen supernatant te je sav talog prebačen u jednu epruvetu. Dodano je 4 ml 0,07 M hipotonične otopine Nacitrata (Sigma Aldrich, Švicarska) čija je temperatura iznosila 37 °C, nakon čega je slijedila inkubacija 30 min na 37 °C. Nakon inkubacije je dodano 2 ml fiksativa (ledena octena kiselina i mentol u omjeru 1:3) pa su uzorci centrifugirani 10 min na 1500 o/min kako bi se talog isprao. Ovaj postupak ponavljan je dva puta. Zadnje ispiranje napravljeno je s 2 ml octene kiseline nakon čega su uzorci centrifugirani 10 min na 1500 o/min. Odbačen je supernatant i dobiveni talog podijeljen je na tri vlažna i hladna predmetna stakla. Kada su se predmetna stakalca osušila, stavljena su 40 min u inkubator na 100 °C.

### 3.2.1.3. Bojanje preparata

Poslije sušenja, preparati su bojeni Giemsom. Pripremljene su otopine:

1. posuda: 0,25 % tripsin (čuvan na 4 °C)
2. posuda: 200 ml Ringerove otopine
3. posuda: 160 ml fosfatnog pufera i 40 ml Giemse

4. posuda: 200 ml fosfatnog pufera
5. posuda: 200 ml destilirane vode

Preparat je u prvoj posudi držan dvije sekunde kako bi se tretirao tripsinom (Gibco) i potom je ispran u Ringerovoj otopini. Nakon ispiranja, obojen je Giemson (Gibco–Buffer Tablets „GURR“, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), inkubacijom 6 min. Nakon bojenja, preparat je stavljen u četvrtu posudu, na ispiranje fosfatnim puferom (Gibco–Buffer Tablets „GURR“,) i potom u destiliranom vodom. Ovako pripremljeni preparati osušeni su pri sobnoj temperaturi.

### **3.2.2. Kratkotrajna kultura stanica korionskih resica**

Očišćeni uzorci korionskih resica isprani su medijem RPMI (od eng. *Roswell Park Memorial Institute medium*, RPMI) (Euroclone, Milano, Italija) na sterilnom staklu pod invertnom lupom i usitnjeni sterilnim iglicama na komadiće. Usitnjene resice prebačene su u epruvete i dodano je 2 ml kompletnog medija (Euroclone). Takvi uzorci premješteni su u inkubator na 8 sati na 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>. Nakon inkubacije, zatvorene epruvete preko noći stavljene su u hladnjak na + 4 °C. Idući dan, epruvete su prebačene u inkubator 5 sati na 37°C. Nakon inkubacije u epruvete je dodano 80 µl kolcemida (Gibco KaryoMAX) ponovljena je inkubacija 30 min na 37°C. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani 5 min na 1000 o/min, odstranjen je supernatant i dodano je 4 ml Na-citrata (1 % otopina) (Sigma Aldrich). Takvi uzorci inkubirani su 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 5 min na 1000 o/min, nakon čega je dodano 3 ml fiksativa I (metanol:octena kiselina 2:1; metanol; Merck, Darmstadt, Njemačka) te su uzorci ostavljeni 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi uzorci su centrifugirani 5 min na 1000 o/min te isprani fikastivom I. Ponovno su centrifugirani 5 min na 1000 o/min. Nakon centrifugiranja, u svaku epruvetu dodano je 0,2 ml fiksativa II (60 % octena kiselina, tripsin 0,25 %; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) te su uzorci ostavljeni na sobnoj temperaturi 3 min. Ovako pripremljeni uzorci, nanijeti su na mokra i hladna stakla i ostavljeni 30 min na 100 °C. Poslije sušenja preparati su bojani Giemson (Gibco–Buffer Tablets „GURR“). Napravljeno je bojanje prema navedenom protokolu za bojanje preparata kao kod dugotrajne kulture stanica.

### **3.2.3. Statistička obrada podataka**

Prikupljeni podatci analizirani su u statističkom programu Statistica 13. Korištene su metode tabelarnog i grafičkog prikazivanja, korelacijska analiza, Kolmogorov–Smirnov test,

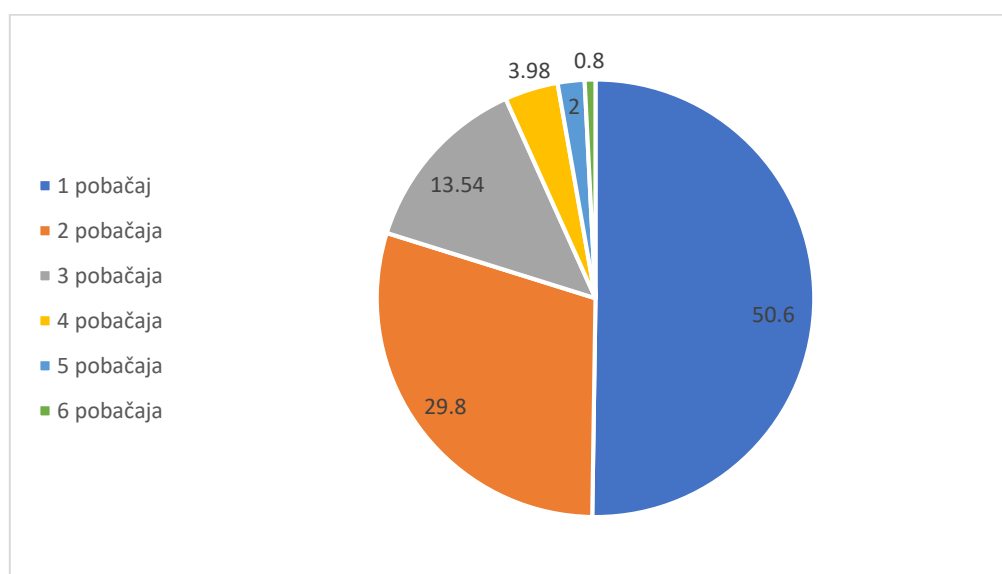
Mann-Whitney U-test i Hi-kvadrat test. Kolmogorov–Smirnov testom prikazana je distribucija dobi majke. Korelacijskom analizom testirano je kretanje vrijednosti brojčanih varijabli. Korelacijska analiza koristila se kod raspodjele strukturnih i numeričkih aberacija te kod utvrđivanja raspodjele numeričkih aberacija plodova. Mann-Whitney U-testom testirane su razlike u vrijednostima odabranih varijabli s obzirom na kategorijske varijable koje se pojavljuju u dva modaliteta. Mann-Whitney U-test koristio se kod utvrđivanja povezanosti broja spontanih pobačaja s obzirom na prethodne trudnoće pacijentica te kod utvrđivanja omjera spolova pobačenih plodova. Položajna centralna vrijednost, tj određivanje medijana koristila se kod utvrđivanja statistički značajne razlike između dobi majke i pojavljivanja numeričkih aneuploidija. Hi-kvadrat test korišten je kod utvrđivanja odstupaju li neke dobivene frekvencije od očekivanih vrijednosti. Hi-kvadrat test primjenjivao se kod utvrđivanja statistički značajne razlike u ovisnosti spola pobačenog ploda s obzirom na abnormalnost kariotipa i kod utvrđivanja uspješnosti analize s obzirom na korišteno tkivo.

## 4. REZULTATI

U razdoblju između 2012. i 2017. godine prikupljeno je 253 uzorka spontanih pobačaja. Od ukupnog broja uzoraka, 214 je uspješno analizirano, od čega je 51,4 % bilo normalnog kariotipa, a 48,6 % abnormalnog kariotipa. Zastupljenost ženskog spola iznosila je 54,67 %, dok je pobačaja muškoga spola bilo 55,33 %. Prosječna dob pacijentica bila je  $33,57 \pm 5,06$  godina.

### 4.1. Analiza broja spontanih pobačaja i poroda s obzirom na ukupni broj pacijentica i abnormalnost ploda

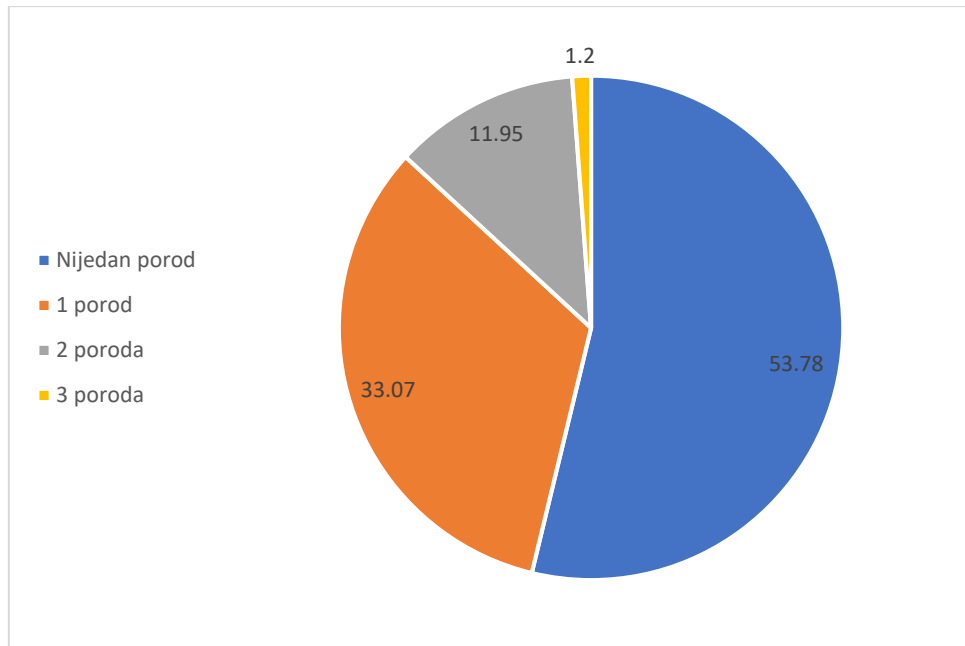
Analiza broja spontanih pobačaja u odnosu na ukupan broj pacijentica (Slika 7.) pokazala je da je najveći broj pacijentica imalo jedan spontani pobačaj (50,60 %), dva spontana pobačaja imalo je 29,8 % pacijentica, tri spontana pobačaja 13,54 % pacijentica, četiri spontana pobačaja 3,98 % pacijentica, pet spontanih pobačaja 2,00 % pacijentica, šest spontanih pobačaja 0,8 % pacijentica, dok su slučajevi s osam i devet spontanih pobačaja bili pojedinačni i njihov udio nije obuhvaćen analizom.



**Slika 7.** Udio pacijentica s obzirom na broj spontanih pobačaja.

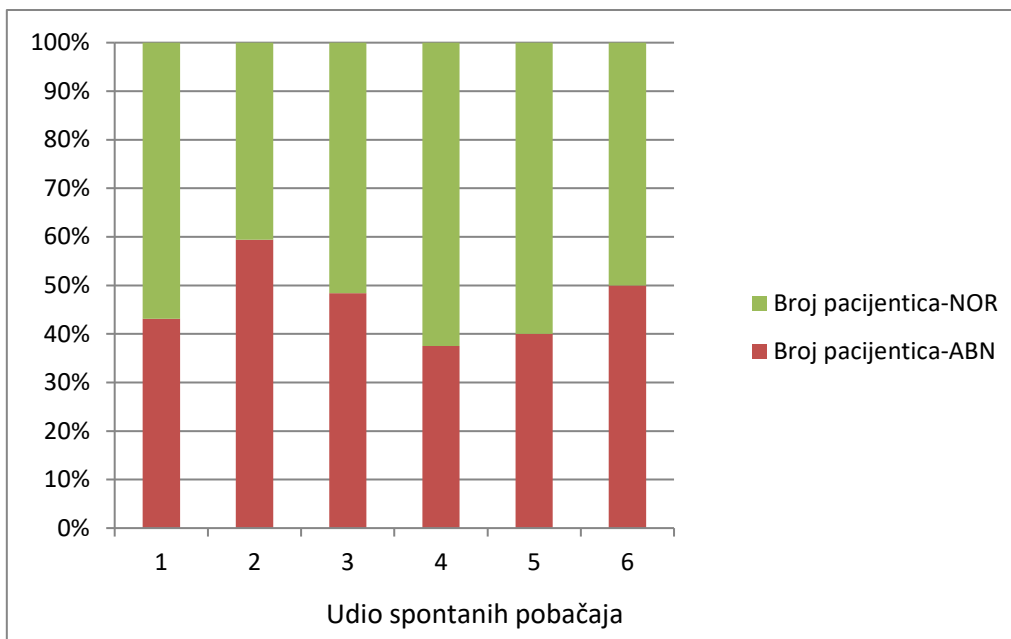
Analiza broja poroda u odnosu na ukupan broj pacijentica pokazala je da je najveći broj pacijentica nije imalo prethodni porod (53,78 %), jedan prethodni porod imalo je 33,07 % pacijentica, dva prethodna poroda imalo je 11,95 % pacijentica, tri prethodna poroda 1,20 %

pacijentica, dok su pacijentice s pet prethodnih poroda bili pojedinačni slučajevi koji nisu obuhvaćeni analizom (Slika 8.).



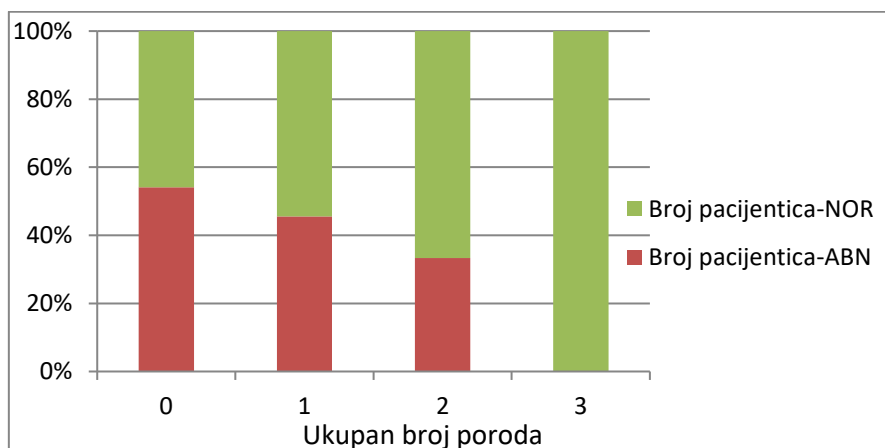
**Slika 8.** Raspodjela broja prethodnih poroda pacijentica u odnosu na ukupan broj pacijentica.

Analiza abnormalnosti kariotipiziranih uzoraka s obzirom na ukupni broj spontanijeh pobačaja pokazala je da je kod pacijentica s jednim spontanijeh pobačajem raspodjela takva da je 56,6 % plodova normalnog kariotipa, dok je njih 43,14 % abnormalnog kariotipa. Kod pacijentica s dva spontana pobačaja, 40,63 % plodova normalnog je kariotipa, a 59,38 % abnormalnog je kariotipa. Kod pacijentica s tri spontana pobačaja 51,61 % normalnog je kariotipa, a 48,39 % abnormalnog kariotipa. Uzorci pacijentica s četiri spontana pobačaja bili su 62,50 % plodova normalnog kariotipa i 37,50 % abnormalnog kariotipa. Kod pacijentica sa šest spontanijeh pobačaja 50 % normalnog je i 50 % plodova abnormalnog kariotipa. Pacijentice s osam i devet spontanijeh pobačaja nisu obuhvaćene analizom (Slika 9.).



**Slika 9.** Prikaz udjela plodova s abnormalnim i normalnim kariotipom s obzirom na broj spontanih pobačaja majke. Kratice: ABN-abnormalni kariotip ploda; NOR- normalni kariotip ploda; SP- spontani pobačaj

Kromosomska analiza ploda s obzirom na prethodni broj poroda pacijentica pokazala je da je kod pacijentica koje dosad nisu imale porod, zastupljenost normalnog kariotipa ploda 45,9 %, a abnormalnog kariotipa 54,1 % (Slika 10.). Kod pacijentica s jednim porodom, 54,41 % plodova normalnog je kariotipa, a 45,9 % plodova abnormalnog je kariotipa. Kod pacijentica s dva poroda 66,67 % plodova normalnog je kariotipa, dok je 33,33 % plodova abnormalnog kariotipa. Kod pacijentica s tri poroda uzorci su bili 100 % normalnog kariotipa. Pacijentice s četiri ili pet poroda nisu obuhvaćene analizom.



**Slika 10.** Grafički prikaz udjela kariotipova s obzirom na broj poroda. Kratice: ABN-abnormalni kariotip ploda; NOR- normalni kariotip ploda

Mann-Whitney U-test pokazao je da nema statistički značajne razlike ( $p=0.741$ ;  $p>0,05$ ) između broja spontanih pobačaja i broja prethodnih poroda pacijentica.

Analiza uzoraka s obzirom na spol ploda, pokazala je da je 54,67 % plodova ženskog spola, a 45,33 % muškog spola. Analiza učestalosti spolova kod abnormalnih i normalnih kariotipova plodova pokazala je da je kod normalnog kariotipa zastupljenost ženskog spola 58,18 %, a 41,82 % muškog spola, dok je kod abnormalnog kariotipa zastupljenost ženskog spola 50,96 % te 49,04 % muškog spola (Tablica 1.).

**Tablica 1.** Prikaz broja i postotka abnormalnih i normalnih kariotipova prema spolu pobačenog ploda. ABN- abnormalni kariotip ploda; NOR-normalni kariotip ploda; M-muški spol; Ž- ženski spol

	ABN	NOR	Ukupno
M	51	46	97
%	49,04	41,82	
Ž	53	64	117
%	50,96	58,18	
Ukupno	104	110	214

Hi-kvadrat test pokazao je da ne postoji statistički značajna razlika između spola ploda u ovisnosti o abnormalnosti kariotipa ( $p>0,05$ ;  $p=0,289$ ).

#### 4.2. Analiza učestalosti kromosomskih aberacija koje uzrokuju spontane pobačaje

Analiza svih strukturnih (strukturne aberacije i strukturni mozaicizam; STR i MOSSTR) i numeričkih aberacija (numeričke aberacije i numerički mozaicizam; NUM i MOSNUM) u ukupnom broju abnormalnih kariotipova, pokazala je da je zastupljenost numeričkih aberacija 94,23 %, dok je zastupljenost strukturnih aberacija 5,77 %. Analiza raspodjele unutar podskupina strukturnih (STR+MOSSTR) i numeričkih (NUM + MOSNUM) aberacija pokazuju da je 88,46 % abnormalnih kariotipova aneuploidija, 5,77 % numerički mozaicizam, 3,85 % strukturne aberacije i 1,92 % strukturni mozaicizmom (Tablica 2.).



**Tablica 2.** Raspodjela strukturnih i numeričkih aberacija. STR- strukturne aberacije; MOSSTR- strukturalni mozaicizam; NUM- numeričke aberacije; MOSNUM- numerički mozaicizam

	Broj pacijentica	%
MOSSTR	2	1,92
STR	4	3,85
MOSNUM	6	5,77
NUM	92	88,46
Ukupno	104	100,00

Analiza tipa numeričkih abnormalnosti s obzirom na moguće vrste aberacija, pokazala je da je zastupljenost svih trisomija 65,31 %, dvostrukih trisomija 4,08 %, monosomije X-kromosoma 16,33 %, tetraploidije 3,06 % i triploidije 12,24 % (Tablica 3.). Unutar grupe trisomija, najveća zastupljenost onih koji uzrokuju spontani pobačaj je trisomije kromosoma 18 (13,27 %), kromosoma 16 (10,21 %), kromosoma 22 (10,21 %) i kromosoma 13 (6,12 %). Detaljni prikaz zastupljenosti svih numeričkih aberacija prikazan je u Tablici 3.

**Tablica 3.** Učestalost numeričkih aberacija

Trisomija	Broj uzoraka	Udio (%)
+2	2	2,04
+5	1	1,02
+7	1	1,02
+8	2	2,04
+12	2	3,06
+13	6	6,12
+14	3	3,06
+15	2	2,04
+16	10	10,21
+17	1	1,02
+18	13	13,27
+20	1	1,02
+21	8	8,16
+22	10	10,21
47, XXY	1	1,02
<b>Dvostruka trisomija</b>	4	4,08
<b>Monosomija X</b>	16	16,33
<b>Tetraploidija</b>	3	3,06
<b>Triploidija</b>	12	12,24
<b>Ukupno</b>	98	100,00

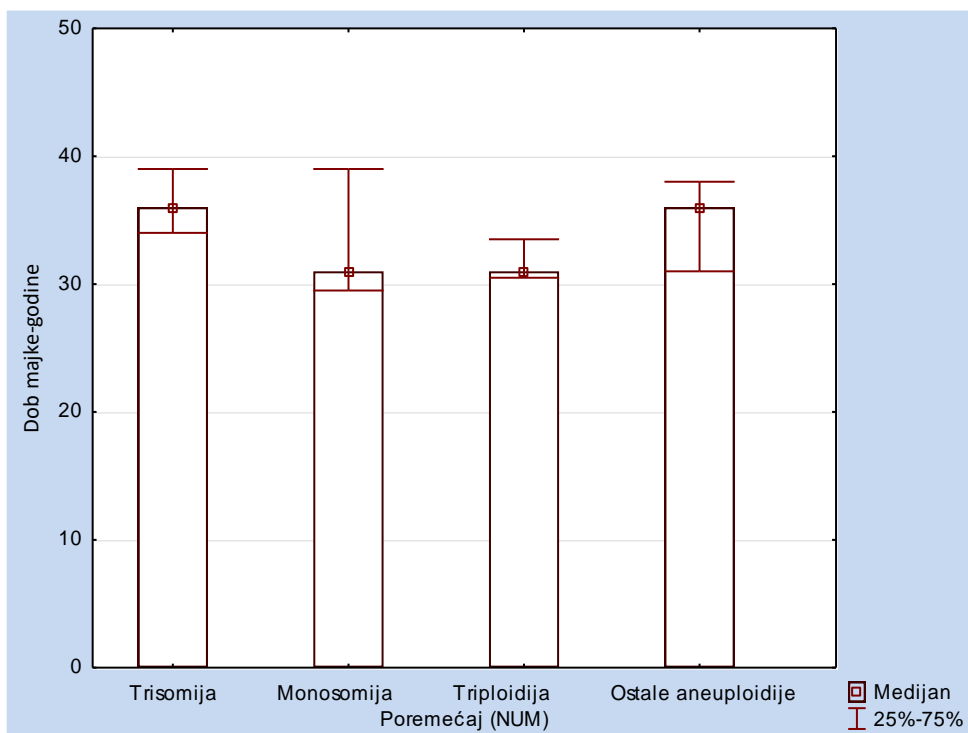
### 4.3. Analiza utjecaja majčine dobi na kromosomopatije ploda i gestacijsku dob pobačenog ploda

Analiza prosječne dobi majki s obzirom na kariotip najčešćih numeričkih aneuploidija pokazala je da su starije majke bile one čiji su uzorci imali trisomiju 18 (Tablica 4., Slika 11.). Njihova prosječna dob je 37 godina, dok su mlađe majke bile one čiji su uzorci imali monosomiju X-kromosoma i triploidiju te je njihova prosječna dob bila 31 godina. Prosječna dob majki kod svih trisomskih uzoraka je 36 godina, dok je dob majki čiji su kariotipizirani plodovi s trisomijom 13 iznosila 36,5 godina, a s trisomijom 21 je 35,5 godina. Kod ostalih aneuploidija, prosječna dob majke je 36 godina. Prema interkvartalnom rasponu (od eng. *interquartile range*, IQR) najveća razlika između najmanje i najveće srednje vrijednosti dobi majki zastupljena je kod monosomije X-kromosoma (23,0 - 41,0), kod triploidije IQR je 27,0 - 40,0 i kod trisomija je 26,0 - 41,0. Ostali interkvartalni rasponi prikazani su u tablici 4.

**Tablica 4.** Analiza rezultata različitih tipova numeričkih abnormalnosti s obzirom na prosječnu dob majke. NUM-numeričke aneuploidije; IQR-interkvartalni raspon

NUM-uzorci	Medijan - dob majka	IQR
Monosomija X	31,0	(23,0-41,0)
Triploidija	31,0	(27,0-40,0)
Trisomija (ukupno)	36,0	(26,0-41,0)
+13	36,50	(31,0-39,0)
+18	37,00	(35,0-40,0)
+21	35,50	(32,5-38,0)
Ostale aneuploidije	36,00	(31,0-38,0)

Određivanjem centralne položajne vrijednosti dobi majki, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u dobi majke s obzirom na numeričke aneuploidije monosomije X, triploidija i svih trisomija ( $p < 0,05$ ;  $p = 0,0235$ ).



**Slika 11.** Odnos dobi majke i numeričkih abnormalnosti ploda. NUM- numeričke aberacije.

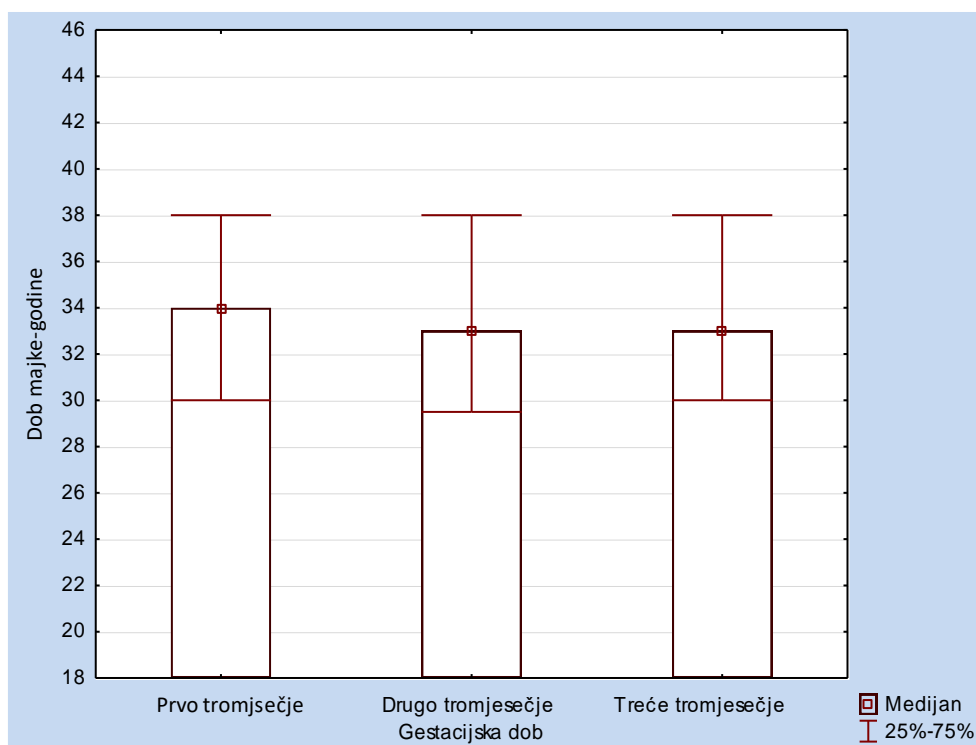
Analiza starosti majki čiji su plodovi bili normalnog kariotipa, pokazala je da je prosječna starost majke 33,5 godina.

Analiza broja spontanih pobačaja s obzirom na gestacijsku dob ploda pokazala je da se 64,03 % spontanih pobačaja dogodilo u prvom tromjesečju, 26,88 % u drugom tromjesečju i 9,09 % u trećem tromjesečju (Tablica 5.). Analiza prosječne dobi majke i IQR-a s obzirom na gestacijsku dob pobačenog ploda pokazala je da je prosječna dob majki koje su imale spontani pobačaj u prvom tromjesečju 34 godine, dok je u drugom tromjesečju i trećem tromjesečju prosječna dob majki 33 godine (Tablica 5; Slika 12.). IQR starosti majki koje su imale spontani pobačaj u prvom tromjesečju je u rasponu 30 - 38, u drugom 29,5 - 38 i u trećem 30 - 38 godina.

**Tablica 5.** Prikaz broja spontanih pobačaja i prosječne dobi majke s obzirom na gestacijsku dob pobačenog ploda. SP-spontani pobačaj; IQR-interkvartilni raspon

Prvo tromjesečje- do 13. tjedna; drugo tromjesečje- od 14. do 25. tjedna; treće tromjesečje od 26. do 40. tjedna

Gestacijska dob	Broj SP	%	Dob majke	IQR
Prvo tromjesečje	162	64,03	34	30-38
Drugo tromjesečje	68	26,88	33	29,5-38
Treće tromjesečje	23	9,09	33	30-38
Ukupno	253	100		



**Slika 12.** Grafički prikaz odnosa dobi majke s obzirom na gestacijsku dob pobačenog ploda

Prvo tromjesečje- do 13. tjedna; drugo tromjesečje- od 14. do 25. tjedna; treće tromjesečje- od 26. do 40. tjedna

#### 4.4. Analiza uspješnosti dugotrajne i kratkotrajne metode kod analize tkiva korionskih resica i tkiva kože

Analiza korištenih tkiva posteljice i tkiva kože pokazala je da je od ukupno 253 uzorka, 195 tkivo posteljice, 37 su uzorci kože dok su kod 21-nog uzorka analizirali i tkivo posteljice i tkivo kože (Tablica 6.).

**Tablica 6.** Prikaz raspodjele ukupnog broja uzoraka tkiva posteljice i tkiva kože za citogenetičku analizu

	Broj pacijentica	%
Posteljica	195	77.08
Koža	37	14.62
Posteljica i koža	21	8.30
Ukupno	253	100.00

Analiza uspješnosti korištenja tkiva posteljice ili tkiva kože za citogenetičku analizu, rađena je na ukupno 253 uzorka. Od ukupnog broja, 214 je uspješno, a 39 neuspješno analiziranih uzoraka. 100 %-tna uspješnost zastupljena je kod paralelne analize tkiva posteljice i tkiva kože, dok je kod korištenog tkiva posteljice uspješnost 93,85 %, a kod tkiva kože je 35,14 %. Neuspješnost analize tkiva posteljice iznosi 6,15 % , a kod tkiva kože 64.86 %.

**Tablica 7.** Prikaz uspješnosti korištenja tkiva posteljice i tkiva kože za citogenetičku analizu. NI- nerast/infekcija stanica, broj uzoraka tkiva koji nije analiziran

	Uspješnost citogenetičke analize	NI	Ukupno
Posteljica	182	13	195
%	93,85	6,15	
Oboje	21	0	21
%	100,00	0,00	
Koža	11	26	37
%	35,14	64,86	
Ukupno	214	39	253

Hi-kvadrat test pokazao je da postoji statistička značajnost razlika u uspješnosti citogenetičke analize između tkiva kože i uzoraka gdje su se koristila oba tkiva, te između tkiva posteljice i tkiva kože ( $p < 0,001$ ).

Analiza 182 uspješno analiziranih uzoraka posteljice s obzirom na metodu kultiviranja stanica pokazala je (Tablica 8.) da je 32,97 % kultivirano LTC metodom, 20,33 % STC metodom i 42,70 % objema metodama.

**Tablica 8.** Broj uzoraka tkiva posteljice koji su analizirani samo metodom kratkotrajne kulture stanica (STC) ili dugotrajne kulture stanica (LTC) ili objema metodama paralelno.

Metoda	Broj uzoraka	Udio (%)
LTC	60	32,97
STC	37	20,33
STC+LTC	85	42,70
Ukupno	182	100,00

#### 4.5. Analiza rezultata utjecaja pušenja i konzumacije alkohola na pojavnost spontanog pobačaja

Analiza kariotipova ploda s obzirom na pušenje trudnica pokazala je da je 47,09 % trudnica nepušačica imalo plod s abnormalnim kariotipom, dok je 60,00 % trudnica pušačica imalo plod s abnormalnim kariotipom. Kod trudnica nepušačica, normalni kariotip ploda utvrđen je u 52,91 % slučajeva, dok je kod trudnica pušačica normalan kariotip imalo 40,00 % plodova (Tablica 9.).

**Tablica 9.** Raspodjela kariotipova pobačenih plodova s obzirom na pušenje trudnica. ABN- abnormalni kariotip ploda; NOR- normalni kariotip ploda

	Pušenje - ne	Pušenje - da	Ukupno
ABN	89	15	104
%	47,09	60,00	
NOR	100	10	110
%	52,91	40,00	
Ukupno	189	25	214

## 5. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je najveći broj pacijentica imalo jedan spontani pobačaj (50,19 %). Manji broj pacijentica imale su dva (29,8 %) i tri (13,98 %) spontana pobačaja dok su pacijentice s četiri i više spontanih pobačaja najmanje zastupljene. Takvi rezultati podudaraju se s istraživanjem Hogge i sur. u kojem je većina pacijentica imala jedan spontani pobačaj, dok je najmanji broj pacijentica imalo tri ili više spontanih pobačaja (Hogge i sur., 2003).

Zastupljenost normalnog kariotipa (56,6 %) bila je najveća kod grupe pacijentica s jednim spontanim pobačajem i s tri spontana pobačaja (51,61 %), dok su pacijentice s dva spontana pobačaja imale uglavnom zastupljeniji abnormalni kariotip (59,38 %). Pacijentice s četiri spontana pobačaja (62,50 %) imale su zastupljeniji normalni kariotip, dok su one sa šest spontanih pobačaja imale jednako zastupljen i normalni (50 %) i abnormalni (50 %) kariotip, što nije u koleraciji s istraživanjem Hogga i sur. gdje su pacijentice s jednim spontanim pobačajem uglavnom imale abnormalne kariotipove (56,8 %), dok su omjeri normalnih i abnormalnih kariotipova kod pacijentica s tri i više spontanih pobačaja isti (50:50) (Hogg i sur., 2003).

Kariotipizirani uzorci su analizirani s obzirom na spol pobačenog ploda. Kariotipiziranih uzoraka ženskog spola bilo je 54,7 %, dok je zastupljenost muškog spola bila 45,3 %. S obzirom na abnormalne i normalne kariotipizirane uzorake, utvrđeno je da je ženski spol zastupljeniji i kod normalnog (58,18 %) i kod abnormalnog (50,96 %) kariotipa. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s rezultatima prethodnih istraživanja gdje je zastupljenost ženskog spola također veća i kod abnormalnih (64,23%) i normalnih kariotipova (69,39 %) (Cheng i sur., 2004). Na veću zastupljenost ženskog spola kod kromosomski normalnih kariotipova može utjecati i kontaminacija majčinim stanicama jer se na razini citogenetičke analize ne može razlikovati kromosomsko podrijetlo, odnosno da li se radi o majčinim stanicama ili stanicama ploda (Lathi i sur., 2007).

Prema 12-godišnjem istraživanju Menasha i sur. najveći broj citogenetičkih poremećaja koje uzrokuju spontani pobačaj numeričke su aneuploidije, dok je najmanji broj strukturnih aberacija. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju te rezultate (Menasha i sur., 2005) Također, analizom podskupina numeričkih i strukturnih aberacija utvrđeno je da su numeričke

aneuploidije najzastupljenije, dok su mozaicizmi (strukurni i numerički) najrjeđe zastupljeni. Analizom numeričkih aneuploidija, utvrđeno je da je najviše zastupljena trisomija kromosoma 16, 18 i 22, monosomija X-kromosoma i triploidija što je u skladu s Jendernyovim istraživanjem (Jenderny, 2014).

Kako bi se povezao utjecaj dobi majke na nastanak spontanog pobačaja i vrstu kromosomskih aberacija, analizirana je srednja vrijednost dobi. Istraživanje Hassolda i Chiu pokazuje da postoji utjecaj dobi majki s obzirom na kromosomsku abnormalnost. Najveći utjecaj dobi majke utvrđen je kod trisomija, dok je kod monosomije X-kromosoma i triploidije doba majke u negativnoj korelaciji sa starošću majke. Analizom prosječne dobi majki utvrđeno je da su starije trudnice bile one čiji su kariotipizirani uzorci imali trisomiju 18, dok su mlađe trudnice bile one čiji su pobačeni plodovi imali monosomiju X-kromosoma ili triploidiju što je u skladu s istraživanjem Hassolda i Chiu. Također, kod plodova s normalnim kariotipom srednja doba majki je 31 godina, što nije u skladu s prethodnim istraživanjem koje su objavili Menashe i sur., u kojem je srednja doba majki 35,1 godinu, a razlog tome vjerojatno je različit broj pacijentica koje su sudjelovanje u istraživanju (Menashe i sur. 2005)

Većina spontanih pobačaja događa se u prvom tromjesečju (do kraja 13 tjedna) pri čemu je visok udio citogenetički abnormalnih uzoraka, za razliku od spontanih pobačaja u drugom i trećem tromjesečju kada se broj spontanih pobačaja znatno smanjuje (Hardy i Hardy, 2015). Ovo istraživanje pokazalo je da se većina spontanih pobačaja dogodila u prvom tromjesečju (64,03 %) dok se najmanji broj spontanih pobačaja (9,09 %) dogodio u trećem tromjesečju što je u skladu s rezultatima Hardya. U ovom istraživanju napravljena je i analiza dobi majki s obzirom na gestacijsku doba pobačenih plodova. Analiza je pokazala da su majke koje su imale spontani pobačaj u prvom tromjesečju bile najstarije, dok se doba majki u drugom i trećem tromjesečju uglavnom ne razlikuje.

Većina uzoraka uspješno je kariotipizirana (84,58 %) što je u skladu s Jendernyovim istraživanjem (Jenderny, 2014). Rezultati preostalih neuspješno analiziranih uzoraka (15. 42 %), potvrdili su da se u većini slučajeva dogodio nerast stanica, a u manjem broju uzrok je bila infekcija. Uzrok infekcije stanica najčešće je bakterijska kontaminacija, bez obzira na dodane antibiotike (Warburton, 1987). S obzirom na vrstu analiziranog tkiva (tkivo



posteljice/tkivo kože), nerast stanica se dogodio najviše kod uzoraka tkiva kože (84 %) i manjim dijelom kod uzoraka tkiva posteljice (16 %) (Lodish i sur., 2000).

Analiza vrsta korištenog tkiva prilikom citogenetičke analize pokazala je da je najveći broj analiziranih uzoraka tkivo posteljice, dok su se u najmanjem broju analiza koristila oba tkiva. Veća uspješnost citogenetičke analize postignuta je kod tkiva posteljice nego kod tkiva kože, što je očekivano s obzirom na broj uzoraka kože i mitotski potencijal stanica posteljice. Za analizu rezultata uspješnosti citogenetičke analize, proveden je i Hi-kvadrat test čiji su rezultati pokazali da postoji statistička značajna razlika u uspješnosti citogenetičke analize između tkiva kože i uzoraka gdje su se koristila oba tkiva, te između tkiva posteljice i tkiva kože ( $p < 0,001$ ). Prema rezultatima ovog istraživanja, ako je veća dostupnost materijala za citogenetičku analizu najbolje je koristiti kombinaciju tkiva kože i tkiva posteljice, jer se pokazala se kao najuspješnijom za citogenetičku analizu. Ukoliko je dostupnost materijala za analizu ograničena, bolje je koristiti tkivo posteljice nego tkivo kože jer je veća uspješnost citogenetičke analize i manji je rizik od infekcije i nerasta stanica.

Osim analize uspješnosti korištenog tkiva, analizirana je i uspješnost dugotrajne i kratkotrajne metode kultiviranja stanica (STC i LTC) kod tkiva posteljice. Citogenetička analiza tkiva posteljice pokazala se uspješnom (99,3 %) što je u skladu s istraživanjem Ledbettera i sur. (99,6 %) (Ledbetter i sur., 1990). Analiza je pokazala da je većina stanica uspješno kultivirana objema metodama (42,70 %). Rezultati ovog istraživanja ne podudaraju se s istraživanjima Ledbettera i sur., a uzrok tome vjerojatno je puno veći broj analiziranih uzoraka korionskih resica kod Ledbettera i sur. (Ledbetter i sur., 1990). S obzirom na dostupni broj uzoraka posteljice za citogenetičku analizu u ovom istraživanju i analizu tkiva posteljice samo LTC ili samo STC metodom, veći broj uzoraka uspješno je analizirano LTC metodom (32,97 %), čime se LTC metoda pokazala uspješnijom od STC metode, koja se primijenila na 20,33 % uzoraka.

U ovo istraživanje uključena je i analiza utjecaja pušenja i konzumiranja alkohola tijekom trudnoće na spontani pobačaj. Analizom ukupnog broja trudnica, utvrđeno je da su većina pacijentica nepušačice, dok je manji dio pacijentica (11,68 %) pušačica. Analiza rezultata kariotipiziranih uzoraka pokazala je da pušenje nema znatnog učinka na abnormalnost ploda što je u skladu s rezultatima istraživanja Kline i sur. jer pušenje prema

tome istraživanju nema direktni utjecaj na spontani pobačaj, već se smatra jednim od teratogenih faktora koji bi mogao utjecati na abnormalnost ploda (Kline i sur.,1976).

Konsumacija alkohola direktno utječe na povećavanje rizika od spontanog pobačaja. U kombinaciji s pušenjem smatra se jednim od glavnih rizika za spontani pobačaj (Armstrong i sur, 1992). U ovom istraživanju dvije pacijentice potvrdno su odgovorile da su za vrijeme trudnoće konzumirale alkohol čime nije bilo dovoljno podataka za provedbu statističke analize.

## 6. ZAKLJUČAK

- Najveći broj spontanih pobačaja događa se u prvom tromjesečju i većinom se pojavljuju kod starijih majki
- Ne postoji povezanost dobi majke i gestacijske dobi pobačenog ploda
- Među kromosomski abnormalnim uzorcima najzastupljenije su numeričke aberacije
- Najčešće numeričke aberacije koje uzrokuju spontani pobačaj su trisomije kromosoma 18, 16 i 22 te monosomija X- kromosoma
- Broj prethodnih poroda nije statistički povezan s brojem spontanih pobačaja
- Pobačeni plodovi pacijentica koje su prethodno imale porod živorođene djece, 56,04 % su normalnog kariotipa i 45,96 % su abnormalnog kariotipa
- Majčina dob povezana je s pojavom trisomija, ali je u negativnoj koleraciji s pojavom monosomije X-kromosoma i triploidije kod pobačenih plodova
- Uspješnost citogenetičke analize veća je kod tkiva posteljice nego kod tkiva kože
- Metoda dugotrajne kulture stanica (LTC) je bolji izbor od metode kratkotrajne kulture stanica (STC) s obzirom na ograničenu dostupnost tkiva posteljice
- Pušenje značajno ne korelira s pojavom spontanog pobačaja i kromosomske abnormalnosti ploda

## 7. LITERATURA

Armstrong, B. G., McDonald, A. D., Sloan, M. (1992). Cigarette, alcohol, and coffee consumption and spontaneous abortion. *American Journal of Public Health*, 82(1), 85–87.

Bick R.L., Madden J., Heller K.B., Toofanian A (1999). Recurrent Miscarriage: Causes, Evaluation, and Treatment. *MedGenMed* 1(3).

Bruce M., Carlson M.D., (2014). Diagnosis and Treatment of Birth Defects PhD, in Human Embryology and Developmental Biology. University of Michigan. Michigan (Fifth Edition).

Cheng, H. H., Ou, C. Y., Tsai, C. C., Chang, S. D., Hsiao, P. Y., Lan, K. C., Hsu, T. Y. (2014). Chromosome distribution of early miscarriages with present or absent embryos: Female predominance. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(8), 1059–1064.

Choi, T. Y., Lee, H. M., Park, W. K., Jeong, S. Y., Moon, H. S. (2014). Spontaneous abortion and recurrent miscarriage: A comparison of cytogenetic diagnosis in 250 cases. *Obstetrics & Gynecology Science*, 57(6), 518.

Dai, R., Li, L., Zhu, H., Geng, D., Deng, S., Liu, R. (2017). Effect of maternal age on spontaneous abortion during the first trimester in Northeast China. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*.

Dailey, T., Dale, B., Cohen, J., Munné, S. (1996). Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *American Journal of Human Genetics*, 59(1), 176–184.

Ferguson-Smith, M. A. (2015). History and evolution of cytogenetics. *Molecular Cytogenetics*.8:19.

Ford, H. B., Schust, D. J. (2009). Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Reviews in Obstetrics & Gynecology*, 2(2), 76–83.

Gardó, S., Bajnóczky, K. (1992). Cytogenetic analysis of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 47(2), 117–120.

Gersen, S. L., Keagle, M. B. (2005). The principles of clinical cytogenetics. Springer-Verlag New York.

Haga, S. B., Bekendorf, J., Boughman, J., Dolan, S., Dujdinovic, L. (2009). Understanding Genetics: A New York - Mid-Atlantic Guide for Patients and Health Professionals. The New York - Mid-Atlantic Consortium For Genetic And Newborn Screening Services, (7), 105.

Hardy, K., Hardy, P. J. (2015). 1St Trimester Miscarriage: Four Decades of Study. *Translational Pediatrics*, 4(2), 189–200.

Hassold, T., Chiu, D. (1985). Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Human Genetics*, 70(1), 11–17.

Henderson, A. S., Warburton, D., Atwood, K. C. (1972). Location of Ribosomal DNA in the Human Chromosome Complement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(11), 3394–3398.

Henriksen, T. B., Hjollund, N. H., Jensen, T. K., Bonde, J. P., Andersson, A. M., Kolstad, H., Olsen, J. (2004). Alcohol consumption at the time of conception and spontaneous abortion. *American Journal of Epidemiology*, 160(7), 661–667

Hogge, W. A., Byrnes, A. L., Lanasa, M. C., Surti, U. (2003). The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 189(2), 397–400.

Hutter, D., Kingdom, J., Jaeggi, E. (2010). Causes and Mechanisms of Intrauterine Hypoxia and Its Impact on the Fetal Cardiovascular System: A Review. *International Journal of Pediatrics*, 2010, 1–9.

Jenderny, J. (2014). Chromosome aberrations in a large series of spontaneous miscarriages in the German population and review of the literature. *Molecular Cytogenetics*. 7:38.

Johnson, M. P., Drugan, A., Koppitch, F. C., Uhlmann, W. R., Evans, M. I. (1990). Postmortem chorionic villus sampling is a better method for cytogenetic evaluation of early fetal loss than culture of abortus material. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 163(5 PART 1), 1505–1510.

- Jurkovic, D., Overton, C., Bender-Atik, R. (2013). Diagnosis and management of first trimester miscarriage. *British Medical Journal*. 346:f3676.
- Kline, J., Stein, Z. A., Susser, M., Warburton, D. (1977). Smoking, a risk factor for spontaneous abortion. *New England Journal of Medicine*, 297(15).
- Lathi, R. B., Gustin, S. L. F., Keller, J., Maisenbacher, M. K., Sigurjonsson, S., Tao, R., Demko, Z. (2014). Reliability of 46,XX results on miscarriage specimens: A review of 1,222 first-trimester miscarriage specimens. *Fertility and Sterility*, 101(1), 178–182.
- Lathi, R. B., Mark, S. D., Westphal, L. M., Milki, A. A. (2007). Cytogenetic testing of anembryonic pregnancies compared to embryonic missed abortions. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(11), 521–524
- Ledbetter, D. H., Martin, A. O., Verlinsky, Y., Pergament, E., Jackson, L., Yang-Feng, T., Schlesselman, S. E. (1990). Cytogenetic results of chorionic villus sampling: High success rate and diagnostic accuracy in the United States collaborative study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 162(2), 495–501.
- Lejeune, J., Gautier, M., Turpin, R. (1959). Les chromosomes somatique des enfants mongoliens. *Comptes Rendus Des Seances de l'Academie Des Sciences*, 248(A), 1721–1722.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman.
- Lorber Rolnik D., Henrique Burlacchini de Carvalho M, Pereira Monteiro Catelani A M. , Almeida Rocha Pinto A. P , na Branco Gonçalves Lira J., Kiyomi Kusagari N, Belline P., de Lourdes Chauffai lle M.(2010) Cytogenetic analysis of miscarriage material. *Revista Da Associacao Medica Brasileira.*; 56(6): 681-3.
- Menasha, J., Levy, B., Hirschhorn, K., Kardon, N. B. (2005). Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: New insights from a 12-year study. *Genetics in Medicine*, 7(4), 251–263
- Pereza, N., Ostojić, S., Kapović, M., Peterlin, B. (2016). Genetics of recurrent spontaneous abortion: Advances and controversies. *Medicina Fluminensis*, 52(2).

Rowley, J. D. (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 243(5405), 290–293.

Simpson, J. L. (1990). Incidence and timing of pregnancy losses: Relevance to evaluating safety of early prenatal diagnosis. *American Journal of Medical Genetics*.

Sumner, A. T., Evans, H. J., Buckland, R. A. (1971). New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biology*, 232(27), 31–32.

Tjio, J. H., Levan, A. (1956). The chromosome number of man. *Hereditas*, 42(1–2), 1–6.

van den Berg, M. M. J., van Maarle, M. C., van Wely, M., Goddijn, M. (2012). Genetics of early miscarriage. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 1951–1959.

Vičić Ana, Stipoljev Feodora 2013. Biopsija korionskih resica. *Peadiatria Croatica* ;57:374-81.

Warburton D. (1987) Chromosomal causes of fetal death. *Clin Obstet Gynecol.*;30:268-77.

## 8. ŽIVOTOPIS

### OSOBNNE INFORMACIJE:

**Ime i prezime:** Marija Petrović

**Datum rođenja:** 01.06. 1992., Split (Hrvatska)

**E-mail:** marijapetrovic77@yahoo.com

### OBRAZOVANJE:

2015. - 2018. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu – Biološki odsjek, diplomski studij Molekularna biologija

2011. - 2015. Prirodoslovno- matematički fakultet u Splitu- preddiplomski studij Biologije i kemije

2007. – 2011. Opća gimnazija Vladimir Nazor

### ZNANJA I VJEŠTINE:

**Rad na računalu:** korištenje alata MS Office, Adobe za dokumente i multimediju

**Strani jezici:** Engleski jezik- B razina