

# Primjena mikročipova u otkrivanju genetskih uzroka spontanih gubitaka trudnoća

---

**Kauf, Lucija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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:217:769961>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Lucija Kauf

**Primjena mikročipova u otkrivanju genetskih  
uzroka spontanih gubitaka trudnoća**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Lucija Kauf

**Application of microarray in revealing of  
genetic causes of miscarriages**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Citogenetskom laboratoriju na Odjelu za laboratorijsku citogenetiku Klinike za ginekologiju i porodništvo KB Sveti Duh, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Feodore Stipoljev. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

*Zahvaljujem mentorici, izv. prof. dr. sc. Feodori Stipoljev, na svom izdvojenom vremenu, trudu i ukazanoj pomoći.*

*Zahvaljujem suvoditeljici, izv. prof. dr.sc. Petri Korać na svim savjetima i usmjeravanju.*

*Zahvaljujem dr. sc. Ani Vičić na strpljenju i odgovorima na sva moja pitanja.*

*Zahvaljujem svim zaposlenicama Odjela za laboratorijsku citogenetiku Kliničke bolnice „Sv. Duh“ u Zagrebu, što su me primile u svoj laboratorij i učinile moj boravak tamo najugodnijim mogućim.*

*Zahvaljujem sestri Zorici što me podsjetila da ništa ne može biti nerješivo.*

*Zahvaljujem se cijeloj svojoj obitelji na potpori tijekom cijelog studiranja i na podržavanju mojih ideja i želja.*

*Zahvaljujem se prijateljima koji su mi uljepšali cijelo studiranje i pružili prekrasne uspomene.*

*Zahvaljujem dragom, za sve.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Primjena mikročipova u otkrivanju genetskih uzroka spontanih gubitaka trudnoća

Lucija Kauf

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Smatra se da kromosomopatije uzrokuju više od 70% spontanih gubitaka trudnoće. U cilju otkrivanja genetskih uzroka gubitaka trudnoća, provodi se citogenetska analiza, a unatrag nekoliko godina i komparativna genomska hibridizacija na mikročipu (a-CGH). Za razliku od klasične citogenetske analize, ova a-CGH ne zahtjeva kultivaciju tkiva, već samo DNA uzorka, koja se može izolirati iz nativnih tkiva. Rezolucija mikročipa je veća u odnosu na citogenetsku analizu te se mogu detektirati manje patološke promjene nego citogenetskom analizom. Cilj istraživanja bilo je utvrditi postojanje suptilnih patoloških promjena broja kopija koristeći metodu a-CGH kod uzoraka spontanih gubitaka trudnoće kod kojih je klasična citogenetska analiza pokazala normalan kariotip ili kromosomski poremećaj te udio patoloških molekularnih kariotipova kod uzoraka bez informacija o kariotipu. Procijenjeno je značenje rezultata citogenomske analize za daljnje planiranje potomstva kod pacijentica.

Od 30 uzoraka, citogenetska analiza dala je rezultat za 22, dok je pomoću a-CGH dobiven rezultat kod svih uzoraka. Ukupna učestalost kromosomopatija iznosila je 33.3%. U skupini s normalnim kariotipom koristeći a-CGH otkriven je jedan uzorak s patološkom promjenom broja kopija, a u skupini bez rezultata citogenetske analize utvrđena je učestalost kromosomopatija od 50.0%. Majke plodova sa strukturnom kromosomskom aberacijom imaju najveći rizik u daljnjem planiranju trudnoća.

(57 stranica, 19 slika, 8 tablica, 62 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: a-CGH, spontani gubitak trudnoće, citogenetska analiza, kromosomske aberacije, varijante broja kopija

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. Silvija Černi, v. pred. dr. sc. Julija Erhardt

Rad prihvaćen: 15. 09. 2021.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

## Application of microarray in revealing of genetic causes of miscarriages

Lucija Kauf

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Chromosomopathies are considered to cause more than 70% of pregnancy losses. To reveal genetic causes of pregnancy loss, cytogenetic analysis and, in the last couple of years, microarray (a-CGH) is used. In contrast to cytogenetic analysis, a-CGH doesn't require cell culture, but only DNA of the sample, that can be extracted from the native tissue. Resolution of a-CGH is enhanced compared to cytogenetic analysis, which enables detection of smaller pathogenic changes. This study aimed to determine the share of subtle pathologic copy number variations in samples where cytogenetic analysis showed normal karyotype or chromosomal abnormality, and the percentage of pathological molecular karyotypes in the samples with no information about the karyotype, using a-CGH. The relevance of the results of the cytogenomic analysis in future pregnancy planning was estimated.

Out of 30 samples, cytogenetic analysis gave results for 22, while a-CGH was successful in all of them. The overall frequency of chromosomopathies was 33.3%. In the samples with normal karyotype, there was one sample with pathologic CNV, while the frequency of chromosomopathies in the samples with no results of cytogenetic analysis was 50.0%. Mothers whose products of conception had structural chromosomal aberrations had the highest risk in future pregnancy planning.

(57 pages, 19 figures, 8 tables, 62 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: a-CGH, pregnancy loss, cytogenetic analysis, chromosomal aberrations, copy number variations

Supervisor: Dr. Feodora Stipoljev, Associate Professor

Co-supervisor: Dr. Petra Korać, Associate Professor

Reviewers: Dr. Petra Korać, Associate Professor, Dr. Silvija Černi, Associate Professor, Dr. Julija Erhardt

Thesis accepted: 15.09.2021.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. SPONTANI GUBITAK TRUDNOĆE.....	1
1.2. EPIDEMIOLOGIJA SPONTANIH GUBITAKA TRUDNOĆE.....	2
1.2.1. SPORADIČNI GUBITAK TRUDNOĆE.....	2
1.2.2. PONAVLJAJUĆI GUBITAK TRUDNOĆE.....	3
1.3. KROMOSOMSKE ABERACIJE PLODA.....	3
1.3.1. NUMERIČKE KROMOSOMSKE ABERACIJE.....	5
1.3.1.1. POLIPLOIDIJE.....	5
1.3.1.2. ANEUPLOIDIJE.....	5
1.3.1.2.1. MONOSOMIJE.....	6
1.3.1.2.2. TRISOMIJE.....	7
1.3.1.2.3. POLISOMIJE SPOLNIH KROMOSOMA.....	8
1.3.2. STRUKTURNE KROMOSOMSKE ABERACIJE.....	8
1.3.3. MOZAICIZAM.....	9
1.4. VARIJACIJE U STRUKTURI DNA.....	10
1.4.1. POLIMORFIZMI JEDNOG NUKLEOTIDA.....	10
1.4.2. VARIJANTE BROJA KOPIJA.....	10
1.5. CITOGENOMSKA ANALIZA UZORAKA SPONTANIH GUBITAKA TRUDNOĆE..	11
1.5.1. KLASIČNA CITOGENETSKA ANALIZA.....	11
1.5.2. KROMOSOMSKI MIKROČIPOVI.....	12
1.5.2.1. A-CGH.....	12
1.5.2.2. SNP-MIKROČIP.....	14
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	16
3. MATERIJALI I METODE.....	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.2. METODE.....	18
3.2.1. IZOLACIJA GENOMSKE DNA.....	18
3.2.2. KOMPARATIVNA GENOMSKA HIBRIDIZACIJA NA MIKROČIPU.....	19
3.2.2.1. OZNAČAVANJE I HIBRIDIZACIJA UZORAKA.....	20



3.2.2.2.	PROČIŠĆAVANJE OZNAČENE gDNA i REFERENTNE DNA .....	21
3.2.2.3.	HIBRIDIZACIJA .....	22
3.2.2.4.	ISPIRANJE MIKROČIPA.....	23
3.2.3.	REZULTATI a-CGH .....	24
3.2.4.	STATISTIČKA ANALIZA .....	26
4.	REZULTATI.....	27
4.1.	ANALIZA REZULTATA CITOGENETSKE ANALIZE I a-CGH.....	27
4.1.1.	USPOREDBA USPJEŠNOSTI METODA .....	27
4.1.1.1.	USPJEŠNOST CITOGENOMSKE ANALIZE NA CIJELOM UZORKU .....	27
4.1.1.2.	USPJEŠNOST CITOGENOMSKE ANALIZE PO TROMJESEČJIMA TRUDNOĆE .....	28
4.1.2.	UJEDNAČENOST REZULTATA.....	29
4.2.	ANALIZA KROMOSOMOPATIJA .....	31
4.2.1.	SKUPINA S NORMALNIM KARIOTIPOM .....	31
4.2.2.	SKUPINA S NEUSPJEŠNOM CITOGENETSKOM ANALIZOM.....	32
4.2.3.	SKUPINA S KROMOSOMSKIM ABERACIJAMA.....	34
4.2.4.	UČESTALOST KROMOSOMOPATIJA NA CIJELOM UZORKU .....	38
4.3.	ANALIZA GESTACIJSKE DOBI .....	39
4.4.	ANALIZA PODATAKA IZ ANAMNEZE MAJKI.....	40
4.4.1.	ANALIZA BROJA USPJEŠNIH I IZGUBLJENIH TRUDNOĆA U ODNOSU NA ZABILJEŽENE KROMOSOMOPATIJE.....	40
4.4.2.	ANALIZA DOBI MAJKI U ODNOSU NA ZABILJEŽENE KROMOSOMOPATIJE	43
5.	RASPRAVA .....	45
5.1.	REZULTATI CITOGENETSKE ANALIZE I a-CGH-a .....	45
5.2.	PROCJENA RIZIKA KOD DALJNJEG PLANIRANJA TRUDNOĆE .....	48
6.	ZAKLJUČCI.....	50
7.	LITERATURA.....	51
8.	ŽIVOTOPIS .....	57

## POPIS KRATICA

abracija-n – numerička kromosomska abracija

abracija-s – strukturna kromosomska abracija

a-CGH – komparativna genomska hibridizacija na mikročipu, od engl. *array comparative genomic hybridization*

CMA – kromosomski mikročip, od engl. *chromosomal microarray*

CNV – varijacija broja kopija, od engl. *copy number variation*

gDNA – genomska DNA

HCG – ljudski korionski gonadotropin

IVF/ET – oplodnja *in vitro* i embriotransfer, od engl. *in vitro fertilization/embryo transfer*

RPL – učestali spontani gubici trudnoće, od engl. *recurrent pregnancy loss*

SNP – polimorfizam jednog nukleotida, od engl. *single-nucleotide polymorphism*

SNP-mikročip – SNP-array, od engl. *single-nucleotide polymorphism array*

# 1. UVOD

Spontani gubitak trudnoće, posebice dugo željene ili planirane, predstavlja veliki emocionalni i psihološki stres za obitelji koje na taj način izgube prinovu. Za žene koje izgube trudnoću, taj je događaj višestruko traumatičniji jer one proživljavaju i fiziološki stres, često praćen fizičkim bolom, bilo zbog uklanjanja posteljice iz maternice, bilo zbog poroda mrtvog djeteta ili drugih reproduktivnih posljedica. Otkrivanje uzroka spontanog gubitka trudnoće važna je zbog daljnjeg planiranja potomstva, emocionalnog zdravlja i psihološkog mira roditelja te određivanja individualnog i obiteljskog rizika za buduće spontane gubitke trudnoće. Unatoč velikom napretku medicine i znanosti, za veliki broj spontanih gubitaka trudnoća i danas je vrlo teško ili čak nemoguće sa sigurnošću odrediti uzrok. U cilju otkrivanja genetskih uzroka spontanih gubitaka trudnoća, uvode se nove laboratorijske metode i tehnike koje imaju mogućnosti otkrivanja malih patoloških promjena. Jedna od takvih metoda je i genomska hibridizacija na mikročipu, odnosno kromosomski mikročip (CMA, od engl. *chromosomal microarray*).

## 1.1. SPONTANI GUBITAK TRUDNOĆE

Termin „spontani gubitak trudnoće“ obuhvaća sve nenamjerne i neželjene gubitke trudnoće, bez obzira na starost ploda, odnosno trajanje trudnoće. Ovisno o trajanju trudnoće, u ginekologiji se razlikuje spontani pobačaj i mrtvorodenje, odnosno kasna smrt fetusa. Spontani pobačaj obuhvaća sve gubitke trudnoće prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, od engl. *World Health Organisation*) iz 1977. „manje od 20. tjedna gestacije i mase manje od 500 g“ (Hu i ostali 2018, World Health Organisation 1979). Svaki kasniji gubitak trudnoće smatra se kasnom smrću fetusa, ([www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/ginekologija/poremecaji-trudnoce/spontani-pobacaj](http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/ginekologija/poremecaji-trudnoce/spontani-pobacaj)).

U Hrvatskoj se u praksi spontanim pobačajem smatra svaki plod neuspjele trudnoće ispod 20 tjedana starosti ([www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/ginekologija/poremecaji-trudnoce/spontani-pobacaj](http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/ginekologija/poremecaji-trudnoce/spontani-pobacaj)). Gubici trudnoća dijele se najčešće na gubitke u prvom, drugom i trećem tromjesečju trudnoće. Prvim tromjesečjem smatraju se trudnoće do kraja 13. tjedna, drugim tromjesečjem do kraja 24. tjedna, a treće tromjesečje počinje s prvim danom 25. tjedna i traje do poroda ([www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/ginekologija](http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/ginekologija)).

## 1.2. EPIDEMIOLOGIJA SPONTANIH GUBITAKA TRUDNOĆE

Između 10 i 25% svih klinički prepoznatih trudnoća završi spontanim pobačajem (Strumpf i sur. 2021), od kojih oko 80% završe unutar prvih 12 tjedana, odnosno tijekom prvog tromjesečja (Pauta i sur. 2018). Uz spontane pobačaje, u neuspjele trudnoće također se ubrajaju i kasne smrti fetusa. Iako je kasna smrt fetusa mnogo manje zastupljeno od spontanih pobačaja, njihov broj nije zanemariv. Globalna učestalost mrtvorodenja je jedan na 72 poroda, pri čemu postoje značajne međuregionalne razlike. U Hrvatskoj se učestalost mrtvorodenja u posljednjih desetak godina kreće oko tri promila, odnosno tri mrtvorodenja na 1000 poroda (United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation 2020).

Kada se u obzir uzmu i biokemijske trudnoće, odnosno trudnoće koje su detektirane pomoću pozitivnog testa na ljudski korionski gonadotropin (HCG, od engl. *human chorionic gonadotropin*), ali bez kliničke potvrde (Zinaman i sur. 1996) te trudnoće koje su ostale neprepoznate, pretpostavlja se da je stvaran udio neuspjelih trudnoća višestruko veći (van den Berg i sur. 2012). Prema Zinamanu i sur. (1996) tek oko 30% svih začeca ima uspješan ishod.

Spontani gubitak trudnoće može se klasificirati kao sporadični ili ponavljajući (RPL, od engl. *recurrent pregnancy loss*) (Rai i Regan 2006).

### 1.2.1. SPORADIČNI GUBITAK TRUDNOĆE

Prema procjenama, tijekom života će sporadični spontani gubitak trudnoće, najčešće spontani pobačaj, doživjeti između 25 i 50% žena (van den Berg i sur. 2012; Rai i Regan 2006). Većina sporadičnih spontanih gubitaka trudnoće spada u tzv. fiziološke pobačaje, kod kojih su plodovi začeca nespojivi sa životom. Kao potvrda ove pretpostavke poslužila je studija u kojoj je uočeno da se u 85% sporadičnih spontanih pobačaja javljaju malformacije fetusa, a više od 70% ima neki tip kromosomopatije (Larsen i sur. 2013).

Majčina dob, kao i pušenje u trudnoći, najistraženiji su faktori rizika za sporadični gubitak trudnoće (Laisk i sur. 2020).

## 1.2.2. PONAVLJAJUĆI GUBITAK TRUDNOĆE

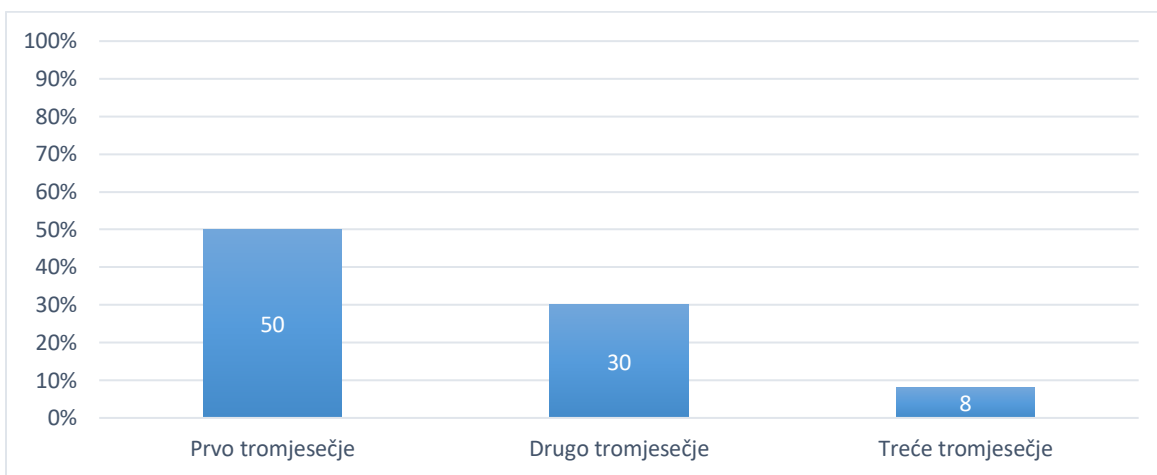
RPL podrazumijeva više od jednog spontanog pobačaja, no kriteriji za dijagnozu RPL-a nisu ujednačeni. Američko udruženje za reproduktivnu medicinu (ASRM, od engl. *American Society for Reproductive Medicine*) definira RPL kao minimalno dva spontana pobačaja, koji se ne moraju dogoditi uzastopno. S druge strane, Europsko društvo za ljudsku reprodukciju (ESHRE, od engl. *European Society of Human Reproduction and Embryology*), kao i Kraljevski zbor porodničara i ginekologa (RCOG, od engl. *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists*) definiraju RPL kao minimalno tri uzastopna spontana pobačaja (Pereza i sur. 2016). Učestalost dijagnoze RPL-a dakle uvelike ovisi o definiciji. Više od jednog spontanog gubitka trudnoće doživjet će između 4 i 5 % parova (van den Berg i sur. 2012; McQueen i Lathi 2019; Popescu i sur. 2018; Rai i Regan 2006), a više od dva, odnosno tri spontana gubitka trudnoće pojavit će se kod 1% parova (McQueen i Lathi 2019; Rai i Regan 2006; Sahoo i sur. 2017). Sukladno tome, i učestalost RPL-a varira između 1 i 5%.

Uzroci RPL-a mogu se definitivno utvrditi u 40 do 50% parova (Pereza i sur. 2016). Kromosomske aberacije fetusa spadaju među česte uzroke RPL-a, no učestalost kromosomskih aberacija fetusa opada s brojem izgubljenih trudnoća (Larsen i sur. 2013). Među česte uzroke RPL-a spadaju balansirane strukturne kromosomske aberacije kod jednog od partnera. Najčešći nekromosomski uzroci RPL-a su anomalije maternice i antifosfolipidni sindrom kod žena, a među nešto rjeđe uzroke spadaju i monogenetske bolesti, izloženost toksinima, neliječena hipotireoza i diabetes melitus tipa 2 kod žena (Pereza i sur. 2016). U preostalim 50 do 60% parova pretpostavlja se da bi uzrok mogla biti trombofilija kod žena, imunosni poremećaji, endokrini poremećaji ili infekcije reproduktivnog trakta (Pereza i sur. 2016; Rai i Regan 2006).

## 1.3. KROMOSOMSKE ABERACIJE PLODA

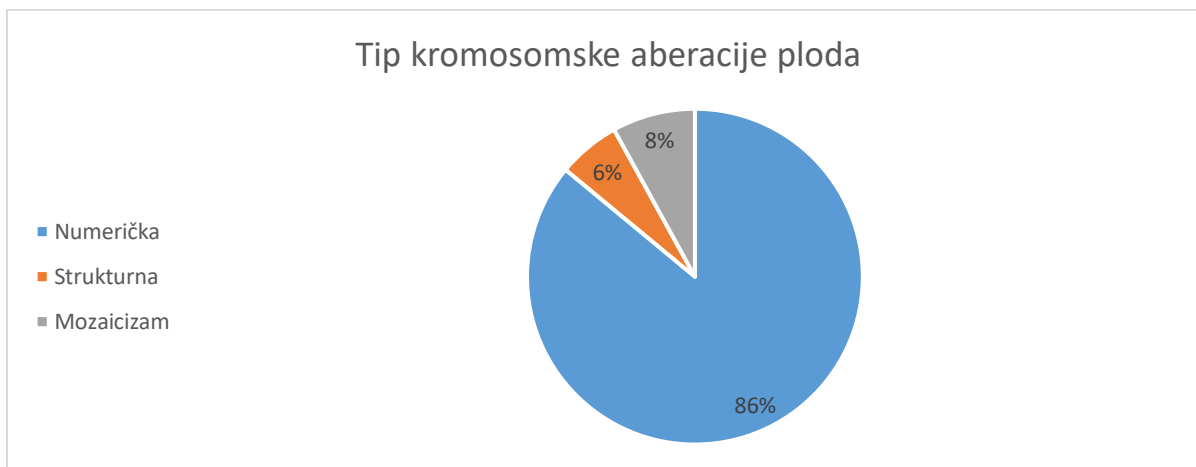
Kromosomske aberacije ploda obuhvaćaju bilo koju promjenu broja ili strukture kromosoma. One spadaju među najčešće uzroke spontanih gubitaka trudnoće te se smatra kako je između 65 i 70% svih spontanih gubitaka trudnoće uzrokovano nekim oblikom kromosomskih aberacija (McQueen i Lathi 2019). Zastupljenost ovih promjena kod spontanih gubitaka trudnoće u prvom tromjesečju iznosi nešto više od 50%, dok se ona u drugom tromjesečju smanjuje i iznosi oko 30% (Jenderny 2014). U trećem tromjesečju ovaj tip poremećaja zastupljen je u svega 8-13%

uzoraka spontano izgubljenih trudnoća (Rebele 2017). Slika 1.1. grafički prikazuje udio spontanih gubitaka trudnoće s kromosomskim aberacijama po tromjesečjima trudnoće.



Slika 1.1. Udio spontano izgubljenih trudnoća s kromosomskim aberacijama između svih spontano izgubljenih trudnoća, prema tromjesečjima. (prema Jenderny 2014; Rebele 2017)

Kromosomske aberacije dijele se na numeričke i strukturne kromosomske aberacije (Warburton 1987). Ponekad se izdvajaju i drugi poremećaji, najčešće mozaicizmi, odnosno pojava više populacija stanica ploda, s različitim kromosomskim poremećajima (Goddijn i Leschot 2000). Većina kromosomskih aberacija nastaju *de novo*, prilikom gametogeneze ili razvoja embrija (van den Berg i sur. 2012). Zastupljenost pojedinog tipa kromosomskih aberacija kod plodova spontano izgubljenih trudnoća uzrokovanih kromosomskim poremećajima prikazana je na Slici 1.2.



Slika 1.2. Zastupljenost numeričkih i strukturnih kromosomskih aberacija te mozaicizma u skupini spontano izgubljenih trudnoća uzrokovanih kromosomskim abnormalnostima (prema Goddijn i Leschot 2000).

### 1.3.1. NUMERIČKE KROMOSOMSKE ABERACIJE

Oko 86% spontanih gubitaka trudnoće uzrokovanih kromosomskim aberacijama otpada na ovaj tip poremećaja (Goddijn i Leschot 2000). Numeričke kromosomske aberacije uzrokovane su nerazdvajanjem kromosoma, tijekom gametogeneze (mejotičko) ili tijekom mitoze nakon oplodnje (Gersen i Keagle 2005).

Najjednostavnije se numeričke kromosomske aberacije dijele na poliploidije i aneuploidije. Kod poliploidija promjena broja zahvaća cijeli haploidni set kromosoma ( $n=23$ ), dok se kod aneuploidija mijenja broj pojedinih kromosoma. Najčešći tipovi numeričkih kromosomskih aberacija su trisomije i monosomije (Warburton 1987).

Numeričke kromosomske aberacije generalno završavaju spontanim pobačajem prije desetog tjedna trudnoće, uz izuzetak poremećaja spolnih kromosoma i trisomija kromosoma 13, 18 i 21 (McQueen i Lathi 2019).

#### 1.3.1.1. POLIPLIIDIJE

Normalna kromosomska konstitucija čovjeka iznosi  $2n = 46$ , pri čemu su 44 kromosoma autosomi, a preostala dva spolni – XX kod žena, a XY kod muškaraca. Kod poliploidija se cijeli haploidni set kromosoma ( $n = 23$ ) umnaža te zametak ima više od dva haploidna kromosomska seta. Kod uzoraka spontanih gubitaka trudnoće najzastupljenije poliploidije su triploidije, konstitucije  $3n = 69$  te tetraploidije, konstitucije  $4n = 92$  (Simpson 1990). Kada se zajedno zbroje, na poliploidije opada otprilike 21% spontanih gubitaka trudnoće uzrokovanih kromosomskim aberacijama (Goddijn i Leschot 2000).

Triploidija može nastati fuzijom haploidne (normalne) i diploidne gamete, ili pak fertilizacijom jajne stanice s dva spermija, dok tetraploidija gotovo isključivo nastaje kao rezultat neuspjele mitoze u stadiju zigote (Warburton 1987). Poliploidne trudnoće obično spontano završe do kraja sedmog tjedna trudnoće (Simpson 1990).

#### 1.3.1.2. ANEUPLOIDIJE

U aneuploidije spadaju promjene broja kromosoma koje ne zahvaćaju cijeli haploidni set, već samo specifični kromosom ili nekoliko kromosoma. Među najčešće aneuploidije spadaju trisomije, kod kojih se neki od kromosoma javlja u tri kopije, te monosomije, kod kojih se neki

od kromosoma javlja u jednoj kopiji. I trisomije i monosomije mogu biti višestruke, odnosno više kromosoma može biti zahvaćeno promjenom broja. U rijetkim slučajevima može se istovremeno dogoditi trisomija jednog i monosomija drugog kromosoma. Ova jedinka imat će jednak broj kromosoma kao i zdrava jedinka, ali zbog prisutnosti jednog kromosoma u tri, a jednog kromosoma u samo jednoj kopiji, ovaj poremećaj također spada u aneuploidije (Griffiths i sur. 2000).

#### 1.3.1.2.1. MONOSOMIJE

Monosomija je poremećaj kod koje postoji samo jedan kromosom iz kromosomskog para, odnosno kromosomskom setu nedostaje jedan kromosom. Jedina autosomalna monosomija zabilježena u uzorcima spontanih gubitaka trudnoće je monosomija kromosoma 21, s učestalošću manjom od 1% (Menasha i sur. 2005). Smatra se da monosomija ostalih autosoma dovodi do nemogućnosti implantacije ili propadanja ploda u veoma ranom stadiju blastociste (Simpson 1990).

Monosomija spolnih kromosoma, odnosno monosomija X, je jedina vijabilna monosomija kod ljudi. Monosomija X kromosoma uzrok je Turnerovog sindroma, koji se javlja kod jedne od 2 000 do jedne od 2 500 živorođene djevojčice (Cui i ostali 2018). Uzrok nastanka monosomije X je najčešće zaostajanje Y-kromosoma kod oca (Carlson 2014). Iako se Turnerov sindrom relativno često pojavljuje kod živorođenih djevojčica, više od 99% plodova s ovim poremećajem biva spontano pobačeno do kraja prvog tromjesečja (Warburton 1987). Otprilike 13% spontano izgubljenih trudnoća uzrokovanih kromosomskim aberacijama otpada na monosomiju X (Goddijn i Leschot 2000).

Zdrave ženske osobe imaju dvije kopije kromosoma X, dok zdravi muškarci imaju samo jednu kopiju. Kada ne bi postojao mehanizam kompenzacije doze, ekspresija gena kromosoma X bila bi dvostruko veća kod žena. Lionizacijom i inaktivacijom jednog X kromosoma kod ženskih osoba, koja počinje u 8-staničnom stadiju, ujednačava se razina genske ekspresije X kromosoma kod muškaraca i žena, a inaktivirani kromosom X kod žena vidljiv je kao Barrovo tjelešce (van den Berg i sur. 2009). Vijabilnost kod monosomije X objašnjava se ovim mehanizmom. Međutim, na oba spolna kromosoma postoje i pseudoautosomne regije, pod nazivom PAR1 i PAR2. Regija PAR1 veća je u odnosu na PAR2, no obje regije sadrže gene koji imaju svoje ekvivalente na kromosomu Y i kod zdravih žena ne podliježu inaktivaciji. Simptomi i znakovi Turnerovog



sindroma objašnjavaju se postojanjem samo jedne kopije gena iz ovih regija, odnosno haploinsuficijom PAR1 i PAR2 (Ibarra-Ramírez i Martínez-de-Villarreal 2016).

#### **1.3.1.2.2. TRISOMIJE**

Trisomije su najčešći tip kromosomskih aberacija, na koje otpada nešto više od 50% svih numeričkih kromosomskih poremećaja. Smatra se da uglavnom nastaju kao posljedica nerazdvajanja jednog kromosomskog para tijekom mejoze I kod majki ili nerazdvajanjem sestrinskih kromatida tijekom mejoze II. Među uzorcima spontanih pobačaja zabilježene su trisomije svih kromosoma (Menasha i sur. 2005). Najčešća trisomija kod ljudi je trisomija kromosoma 16, čija zastupljenost iznosi oko 30% svih trisomija kod spontano izgubljenih trudnoća (Goddijn i Leschot 2000) te oko 7% svih kromosomskih aberacija kod spontano izgubljenih trudnoća (Gersen i Keagle 2005). Druge često zabilježene trisomije su trisomije kromosoma 13, 18, 21 i 22 (Goddijn i Leschot 2000), kao i trisomija 15 (Menasha i sur. 2005; Simpson 1990). Najrjeđe zabilježene trisomije su trisomija kromosoma 1, 11 i 19 (Menasha i sur. 2005, Gersen i Keagle 2005). Pretpostavlja se da je razlog rijetkog pojavljivanja ovih trisomija u uzorcima spontano izgubljenih trudnoća sličan kao i kod monosomija autosoma – gubitak ploda u veoma ranoj fazi blastociste odnosno prije implantacije (Jenderny 2014).

Među trisomije spojive sa životom, kod čovjeka spadaju trisomije kromosoma 13, 18 i 21, uz zabilježeni slučaj živorođenog djeteta s trisomijom kromosoma 22 (Heinrich i sur. 2012).

Trisomija 13 uzrok je Patauovog sindroma, a trisomija 18 kromosomopatije pod nazivom Edwardsov sindrom. Patauov sindrom javlja se kod 1 od 10 000 živorođene djece, dok je učestalost Edwardsovog sindroma veća i iznosi oko 1 od 4 000 živorođenih (Hutaff-Lee i sur. 2013). Djeca s ovim sindromima umiru unutar prvih nekoliko mjeseci života. Trisomija 21 uzrok je Downovog sindroma, koji se javlja kod 1 od 700 živorođene djece. Nerazdvajanje kromosoma prilikom sazrijevanja oocite glavni je uzrok nastanka ovih kromosomopatija, no manji broj može biti uzrokovan i nebalansiranom translokacijom, naslijeđenom od roditelja s balansiranom translokacijom (Witters i sur. 2011).

Učestalost određenih tipova trisomija povezana je s dobi majki. Učestalost Downovog sindroma raste na 1 od 400 živorođene djece kod majki s 35 godina, preko 1 od 105 živorođene djece kod majki s 40 godina, sve do 1 od 12 živorođenih kod majki s 45 godina (Bunt i Bunt 2014).

Kod Edwardsovog i Patauovog sindroma učestalost također raste s dobi majke. Tako je učestalost Edwardsovog sindroma kod majki s 35 godina 1 od oko 3 500 živorođene djece, a Patauovog sindroma 1 od oko 5 000. Kod majki s 40 godina učestalost Edwardsovog sindroma raste na 1 od oko 700 živorođene djece, a Patauovog sindroma na 1 od oko 1 500. Majke s 45 godina imaju najveći rizik za Edwardsov kao i Patauov sindrom kod djece koji iznose redom 1 od oko 200 te 1 od oko 700 (Cuckle i Morris 2021).

Unatoč određenom broju živorođene djece s ovim trisomijama, većina plodova s ovim poremećajima završava spontanim gubitkom u gotovo svim stadijima trudnoće (Cavadino i Morris 2017).

### **1.3.1.2.3. POLISOMIJE SPOLNIH KROMOSOMA**

Trisomije spolnih kromosoma, kromosomske konstitucije 47,XXY, 47,XXX ili 47,XYY prisutne su u manje od 0,5% ukupnih spontanih gubitaka trudnoće (Gersen i Keagle 2005). Njihova pojavnost kod živorođene djece iznosi otprilike 1 na 800 živorođene djece (Simpson 1990). Kako ove kromosopatije nisu u pravilu udružene s malformacijama, najčešće se dijagnosticiraju tek nakon citogenetske analize indicirane drugim razlozima.

### **1.3.2. STRUKTURNE KROMOSOMSKE ABERACIJE**

Otprilike 6% spontanih gubitaka trudnoća uzrokovano je strukturnim kromosomskim aberacijama (Goddjin i Leschot 2000). Strukturne kromosomske aberacije obuhvaćaju kromosomske poremećaje kod kojih je broj kromosoma uredan, ali je došlo do razmjешtanja materijala između različitih kromosoma ili unutar istog. Najčešće nastaju pod utjecajem radijacije ili štetnih spojeva koji izazivaju dvostruke lomove na različitim kromosomima (Gersen i Keagle 2005).

Obzirom na očuvanost genetskog materijala, strukturne aberacije mogu biti balansirane i nebalansirane. Kod balansiranih aberacija, očuvan je cjelokupan genetski materijal, ali je njegov razmjешtaj različit od normalnog. U slučaju kromosomskog loma unutar sekvence gena ili premjешtanja sekvence gena u blizinu promotora s različitom izraženošću, bolest se može pojaviti i kao posljedica balansiranih translokacija. Kod nebalansiranih kromosomskih aberacija mijenja se cjelovitost genetskog materijala zbog delecije, duplikacije ili insercije određenog kromosomskog segmenta (Gersen i Keagle 2005).

Strukturna promjena može biti uzrokovana lomom samo jednog kromosoma, pri čemu nastaje delecija ili insercija, odnosno nebalansirana strukturna promjena. Kada se lom događa na više različitih kromosoma, dolazi do insercija ili translokacija. Translokacije također mogu biti balansirane, najčešće recipročne, ili nebalansirane, kada se jedan dio genetskog materijala gubi (Gersen i Keagle 2005).

Recipročne translokacije događaju se kada se nakon loma dva nehomologna kromosoma izmijene njihovi dijelovi – segmenti, te dva različita kromosoma izmijene mjesta. Ako se recipročna translokacija dogodi prilikom mejoze, a nastala spolna stanica sudjeluje u oplodnji, cijeli nastali organizam nosit će ovu translokaciju. Osobe nositelji translokacije najčešće nemaju simptome, no zbog neadekvatnog sparivanja homolognih kromosoma prilikom mejoze često su smanjeno plodni. Također, ove osobe producirat će gamete s nebalansiranim translokacijama, što može dovesti do učestalih spontanih gubitaka trudnoće ili potomaka s genetskim poremećajima. Ako se recipročna translokacija dogodi prilikom mitoze, samo stanice koje su direktni potomci zahvaćene stanice nosit će ovu translokaciju (Gersen i Keagle 2005).

Specifičan tip translokacije, pod nazivom Robertsonova translokacija, događa se između akrocentričnih kromosoma 13, 14, 15, 21 i 22. Prilikom Robertsonove translokacije dugi krak jednog akrocentričnog kromosoma translocira se na mjesto kratkog kraka drugog akrocentričnog kromosoma, ponekad uz gubitak kratkog kraka kromosoma. Pri tome nastaje struktura nalik na metacentrični ili submetacentrični kromosom. Kratki krakovi akrocentričnih kromosoma se gube tijekom dioba, i nemaju značaja jer sadrže samo heterokromatinske regije (Gersen i Keagle 2005).

### **1.3.3. MOZAICIZAM**

Između ostalih kromosomskih aberacija koje uzrokuju spontani gubitak trudnoće, često se navodi mozaicism. Mozaicism je detektiran u oko 8% uzoraka spontano izgubljenih trudnoća (Goddijn i Leschot 2000). Ovaj poremećaj podrazumijeva prisutnost dviju ili više staničnih linija s različitim kromosomskim poremećajima u jednoj jedinci. Mozaicism najčešće nastaje pogreškama u mitozu nakon oplodnje, a ovisno o pogrešci, u staničnim linijama mogu biti zastupljene različite kombinacije numeričkih kromosomskih aberacija (Vičić i Stipoljev 2013). Ovisno o vremenu nastanka mitotičke pogreške, zastupljenost svake od staničnih linija može biti različita (Hardy i Hardy 2015).

## 1.4. VARIJACIJE U STRUKTURI DNA

### 1.4.1. POLIMORFIZMI JEDNOG NUKLEOTIDA

Polimorfizmi jednog nukleotida (SNP, od engl. *single-nucleotide polymorphism*) obuhvaćaju promjene na jednom nukleotidu u slijedu DNA između različitih jedinki. Ovisno o poziciji u DNA na kojoj se nalaze, SNP-ovi mogu biti uzrok pojave različitih alela istog gena. Kako bi neka varijacija na specifičnom nukleotidu u slijedu DNA bila smatrana SNP-om, mora biti zastupljena u minimalno 1% populacije ([www.nature.com/scitable/definition/snp-295/](http://www.nature.com/scitable/definition/snp-295/)).

### 1.4.2. VARIJANTE BROJA KOPIJA

Varijante broja kopija (CNV, od engl. *copy-number variation*) označava pojavu kada u populaciji postoje razlike u broju kopija određenog segmenta DNA, veličine od 50 parova baza (pb) pa sve do nekoliko tisuća pb (Alkan i sur. 2011). Ove promjene veće su od SNP-ova, a mogu obuhvaćati jednostavna, tandemska ponavljanja, kao i kompleksne promjene gubitka ili dobitka heterozigotnosti, ali i umnažanja odnosno gubitke određenih segmenata DNA različitih veličina (Redon i sur. 2006).

Na temelju značaja u nastanku bolesti, CNV se mogu klasificirati kao patogene, vjerojatno patogene, varijante nepoznatog značenja, vjerojatno benigne i benigne. Patogene CNV su sve one varijante kod kojih postoji utvrđena uzročno-posljedična veza s nekom bolesti ili sindromom. Vjerojatno patogene su one varijante kod kojih postoji opravdana sumnja na povezanost s patogenim promjenama. Kod CNV nepoznatog značenja trenutno ne postoji dovoljno dobra argumentacija da bi se varijantu klasificiralo kao benignu ili kao patogenu. Vjerojatno benigne CNV su varijante kod kojih postoji argumentacija da nemaju patogenih učinaka, ali se ona ne može sa sigurnošću dokazati. Benignim CNV-ovima smatraju se oni koji nisu povezani sa pojavom patoloških promjena i obično se javljaju kao obiteljske polimorfne varijante (Ambry Genetics 2020).

Postoji veći broj internetskih baza CNV-a s njihovom klasifikacijom. Najčešće korištene su OMIM ([www.omim.org](http://www.omim.org)), UCSC ([genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/)), Decipher ([www.deciphergenomics.org](http://www.deciphergenomics.org)), DGV (od engl. *Database of Genomic Variants*, [dgv.tcag.ca/dgv/app/home](http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home)) i ClinVar

([www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar)). Prema ovim bazama, sve aneuploidije, poliploidije i većina nebalansiranih strukturnih kromosomskih aberacija spadat će među patogene CNV.

## 1.5. CITOGENOMSKA ANALIZA UZORAKA SPONTANIH GUBITAKA TRUDNOĆE

Citogenomska analiza kod spontanih gubitaka trudnoće provodi se kako bi se otkrio uzrok neuspjeha trudnoće. U Hrvatskoj se kao zlatni standard provodi klasična citogenetska analiza plodova, a u posljednjih nekoliko godina koristi se i komparativna genomska hibridizacija na mikročipu (a-CGH, od engl. *array comparative genomic hybridization*).

### 1.5.1. KLASIČNA CITOGENETSKA ANALIZA

Zbog svoje relativno niske cijene, dugotrajne primjene i relativno jednostavne izvedivosti, konvencionalna citogenetska analiza najčešći je dijagnostički postupak u prenatalnoj dijagnostici spontanih gubitaka trudnoće.

Citogenetska analiza spontanih gubitaka trudnoće zasniva se na konvencionalnoj kulturi stanica ploda ili posteljice i kariotipizaciji (Dória i sur. 2009). U idealnom slučaju, koristi se tkivo ploda, no kod ranih spontanih pobačaja tkivo ploda je često nevijabilno, dok je kod kasnih gubitaka trudnoće značajan stupanj maceracije fetalnog tkiva. Tkiva posteljice ostaju vijabilna dulje te su često jedini izvor stanica koje se mogu umnožiti u kulturi (Warburton 1987).

Prije provođenje analize, tkivo ploda ili posteljice, najčešće korionskih resica, odvaja se od majčinog tkiva, ispire i uzgaja u kulturi. Stanice se nakon nekoliko dana zaustavljaju u metafazi i bojuju po Geimsu (McQueen i Lathi 2019). Nakon bojenja, kromosomi se gledaju pod mikroskopom i određuje se njihov broj te broj i raspored pruga.

Ovom metodom mogu se otkriti svi tipovi aneuploidija i poliploidija, kao i balansirane translokacije, duplikacije i delecije veće od pet do deset megabaza (Mb) (McQueen i Lathi 2019). Međutim, glavni nedostatak ove metode je potreba za uspostavljanjem kulture stanica. Tkiva spontanih gubitaka trudnoće posebno su zahtjevna za kultivaciju, pri čemu se često javlja nemogućnost rasta kulture ili infekcija kulture. Često je tkivo ploda macerirano i nevijabilno te se u 20 do 40% slučajeva klasična citogenetska analiza uopće ne može provesti (McQueen i Lathi 2019; Pauta i sur. 2018; Sahoo i sur. 2017; Shah i sur. 2017). Dodatni nedostatak ove tehnike je

trajanje dijagnostičkog postupka koji se kreće između 10 i 21 dan (van den Berg i sur. 2012).

## 1.5.2. KROMOSOMSKI MIKROČIPOVI

Kromosomski mikročipovi, odnosno CMA, spada u metode molekularne citogenetike nove generacije koje omogućavaju premošćivanje ograničenja klasične citogenetske analize. Zasnivaju se na hibridizaciji DNA uzorka i kontrolne DNA na pločicama, mikročipovima. DNA uzorka i kontrolna DNA obilježene su različitim fluorescentnim bojama, tako da se prisutnost ili odsutnost određenog segmenta DNA uzorka određuje mjerenjem razlike intenziteta signala nakon hibridizacije (Azmanov i sur. 2007).

U najkorištenije CMA metode spadaju a-CGH i SNP-mikročip (SNP-array od engl. *single-nucleotide polymorphism array*).

### 1.5.2.1. A-CGH

Komparativna genomska hibridizacija na mikročipu, odnosno a-CGH, varijanta je CMA metode u kojoj se na mikročipu nalaze vezane specifične jednolančane sekvence DNA karakteristične za točno određene lokacije u genomu, raspoređene po kromosomima. Ovakav raspored DNA proba omogućava analizu cjelokupnog genoma, a rezolucija metode određena je razmakom između sekvenci DNA proba na kromosomima (McQueen i Lathi 2019). Za razliku od citogenetske analize, a-CGH ne zahtijeva vijabilne stanice, već samo staničnu DNA ploda koja se može ekstrahirati iz nativnog tkiva. Ova metoda može se provesti i kada je tkivo ploda nevijabilno ili čak macerirano, a može se provesti i kada se DNA izolira iz tkiva fiksiranog u formalinu ili parafinu (Sahoo i sur. 2017). Kod kasne smrti fetusa a-CGH od posebne je važnosti zbog stanja tkiva mrtvorodenčadi (Reddy i sur. 2012).

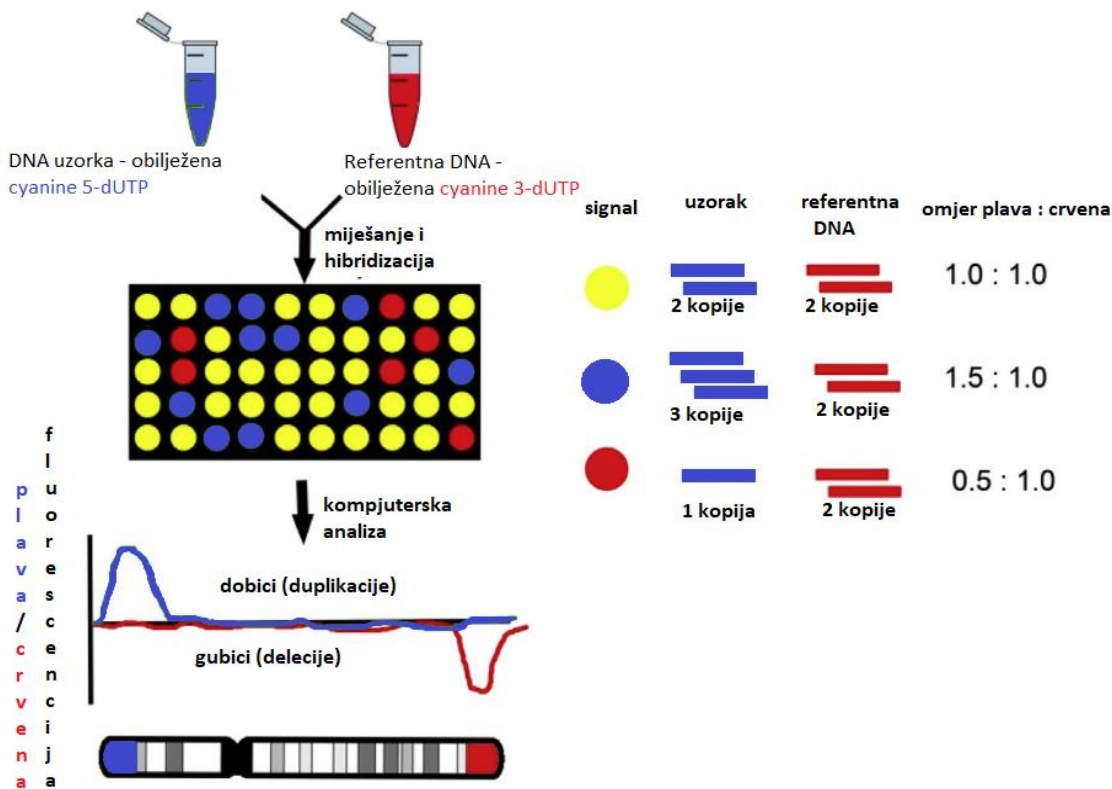
Ova metoda temelji se na usporedbi između referentne DNA i DNA uzorka, koji se obilježe različitim fluorescentnim bojama. Nakon obilježavanja i cijepanja specifičnom, istom endonukleazom, miješa je jednaka količina referentne DNA i DNA uzorka te se nakon hibridizacije uspoređuje intenzitet fluorescencije pomoću bioinformatičkih alata (Dugoff i sur. 2016).

Kao i kod citogenetske analize, a-CGH može detektirati aneuploidije, delecije i duplikacije uz minimalno raspoloživog tkiva (McQueen i Lathi 2019). Rezolucija detektabilnih delecija i duplikacija puno je veća i iznosi oko 200 kilobaza (kb), što omogućava detekciju suptilnih

patoloških promjena broja kopija (CNV, od engl. *copy number variation*) i kada klasična citogenetska analiza daje normalan nalaz (Hui i sur. 2021; Pauta i sur. 2018). Još jedna prednost ove metode je relativno kratki dijagnostički postupak (van den Berg i sur. 2012).

Najznačajnija mana ove tehnike je njezina vrlo visoka cijena, koja je mnogostruko viša od cijene klasične citogenetske analize (Chung i sur. 2020; Wordsworth i sur. 2007). Unatoč povećanoj rezoluciji kod mikrodelecija i mikroduplikacija, zbog samog mehanizma metode, nemoguće je detektirati balansirane translokacije, inverzije, kriptičnog mozaicizma, i poliploidije u uzorku (van den Berg i sur. 2012; Dória i sur. 2009; McQueen i Lathi 2019). Iako se mozaicizam generalno smatra nedetektibilnim pomoću a-CGH (McQueen i Lathi 2019), neka istraživanja pokazuju da se, u slučaju dovoljno velikog udjela obaju staničnih linija (oko 20%), mozaicizam može detektirati i ovom metodom (Ballif i sur. 2006). Također, u određenom broju slučajeva javljaju se varijante nepoznate važnosti koje kompliciraju interpretaciju nalaza (McQueen i Lathi 2019).

Shema protokola a-CGH prikaza je na slici 1.3.



Slika 1.3. Shema a-CGH. Preuzeto i prilagođeno prema Karampetsou i sur. (2014).



### 1.5.2.2. SNP-MIKROČIP

SNP-mikročip varijanta je CMA metode trenutno najveće rezolucije, do 20 kb (Sahoo i sur. 2017). Temelji se na detekciji različitih SNP-ova. Kao i kod a-CGH, za ovu provođenje ove metode nisu potrebne vijabilne stanice već samo visokokvalitetna DNA. Za razliku od a-CGH, kod ove metode hibridizira se samo DNA uzorka. Na mikročipu koji se koristi kod ove metode vezane su gusto raspoređene jednolančane DNA sekvence, specifične za određene regije genoma, u različitim SNP varijantama, kojima se omogućava detekcija različitih alela u testiranom uzorku. Na taj način omogućava se analiza cjelokupne DNA uzorka, uz mogućnost detekcije različitih alela pojedinih gena.

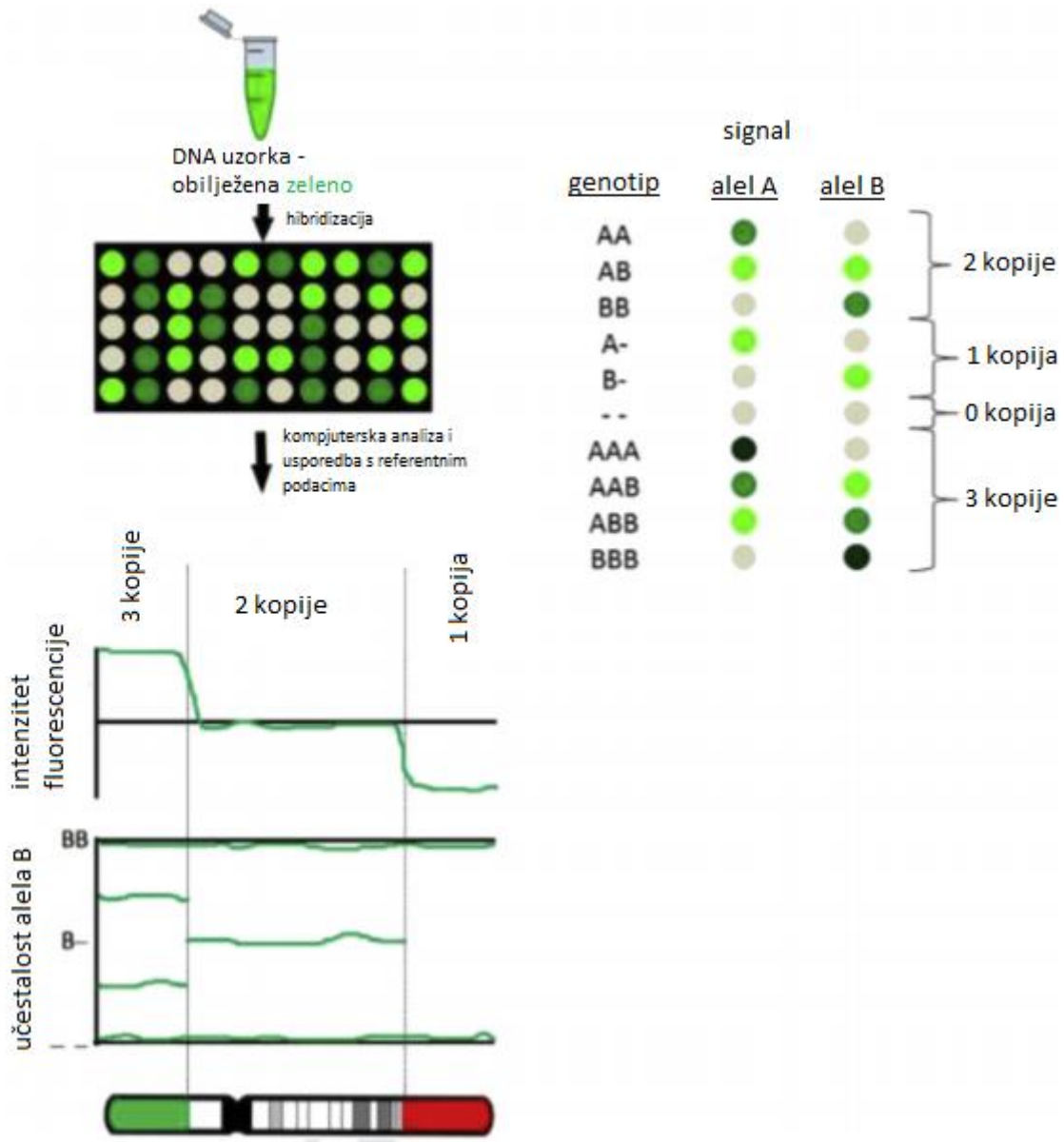
U slučaju prisutnosti dva alela u uzorku, pojavit će se dva signala za određeni SNP. Također, u slučaju pojave jednog signala na određenom SNP mjestu, moguće je utvrditi gubitak heterozigotnosti. Ovom metodom također je moguće detektirati i uniparentalnu disomiju – pojavu kod koje oba homologa jednog kromosoma dolaze od istog roditelja. Na cjelokupnom genomu postoje regije u kojima je očekivana homozigotnost alela kod svih jedinki, bez obzira na razinu srodnosti populacija. Međutim, kada je homozigotnost prisutna na cijelom kromosomu, može se s velikom pouzdanosti tvrditi prisutnost uniparentalne disomije (Dugoff i sur. 2016; Tucker i sur. 2012).

U slučaju očekivane kontaminacije, prisutnost više od jedne stanične linije može se odrediti modeliranjem vjerojatnosti pojave određenog raspona signala na specifičnim SNP mjestima ako je do kontaminacije stvarno došlo i usporedbom modela sa stvarnim očitanjem. Na isti način detektira se i mozaicizam. Triploidija se detektira pojavom signala pojačanog intenziteta duž cijelog genoma, dok se trisomija odnosno monosomija detektira pojačanim odnosno smanjenim intenzitetom signala duž cijelog kromosoma (Dugoff i sur. 2016; LaFramboise 2009; Srebniak i sur. 2011).

Ovom metodom premošćeni su veliki tehnički nedostaci a-CGH – nemogućnost detekcije kriptičnih mozaicizma, potencijalne kontaminacije uzorka drugim uzorkom DNA i triploidije (Iwamoto i sur. 2007).

Shema protokola SNP-mikročipa prikazana je na Slici 1.4.





Slika 1.4. Shema SNP-mikročipa. Preuzeto i prilagođeno prema Karampetsou i sur. (2014).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj rada je utvrditi postojanje suptilnih patoloških promjena broja kopija (CNV) koristeći metodu komparativne genomske hibridizacije na mikročipu kod uzoraka spontanih gubitaka trudnoće kod kojih je klasična citogenetska analiza pokazala normalan kariotip ili kromosomski poremećaj te udio patoloških molekularnih kariotipova kod uzoraka bez informacija o kariotipu.

Nakon hibridizacije, mikročipove ću skenirati i očitati pomoću softvera GytoGenomics. Rezultate ću usporediti među skupinama te s reproduktivnom anamnezom ispitanica i literaturnim podacima i procijeniti njihovo značenje u određivanju reproduktivnog rizika u daljnjem planiranju potomstva.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. MATERIJALI

Istraživanje je provedeno na 30 uzoraka tkiva spontanih pobačaja koji su u sklopu rutinske citogenetske obrade dostavljeni Odjelu za laboratorijsku citogenetiku Klinike za ginekologiju i porodništvo Kliničke bolnice (KB) „Sveti Duh“ u Zagrebu, u razdoblju od 2019. do 2021. godine. Uzorci na kojima je provedena analiza a-CGH odabrani su na temelju kliničkih indikacija i/ili neuspjeha kulture stanica za klasičnu citogenetsku obradu. Indikacije za a-CGH bile su: višestruke malformacije fetusa, učestali spontani pobačaj, učestali spontani pobačaj uz normalan kariogram, smrt ploda u drugom i trećem tromjesečju, pobačaj nakon oplodnje *in vitro* i embriotransfera (IVF/ET, od engl. *in vitro fertilisation/embryo transfer*), učestali pobačaji nakon IVF/ET, zastoj u rastu ploda, povišeni rizik za trisomiju 13 i 18 prema kombiniranom probiru te povećani nuhalni nabor. Među uzorcima kod kojih se kultura stanica nije mogla uspostaviti, kod dva uzorka postojala je klinička indikacija učestalih spontanih pobačaja, kod jednog je postojala klinička indikacija na temelju patohistološkog nalaza holoprocencefalije i ageneze žuljevitog tijela (lat. *Corpus callosum*), dok je kod ostalih pet uzoraka glavna indikacija bila neuspjeh kulture stanica.

Za analizu a-CGH korištena je genomska DNA, rutinski izolirana iz nativnih tkiva odmah po primitku uzorka iz korionskih resica (18 uzoraka) ili iz kože ploda (12 uzoraka). Genomska DNA nakon izolacije, a prije a-CGH bila je pohranjena u zamrzivaču na temperaturi od -20°C.

Klasična citogenetska analiza provedena je u sklopu rutinske obrade uzoraka spontanih pobačaja u laboratoriju te su u ovo istraživanje uključeni rezultati dobiveni retrogradnom analizom. Uzorci su podijeljeni na temelju klasične citogenetske analize u tri skupine: skupina s normalnim kariotipom (n=16), skupina s numeričkim i strukturnim kromosomskim abnormalnostima (n=6) te skupina nepoznatog kariotipa (n=8).

Reproduktivne anamneze ispitanica prikupljene su iz baze podataka Odjela za laboratorijsku citogenetiku. Podaci su sadržavali informacije o dobi i medicinskoj anamnezi majke i oca, gestacijskoj dobi ploda, spontanosti začeća, broju prethodnih trudnoća, broju zdrave djece, broju bolesne djece, broju spontanih pobačaja, broju induciranih pobačaja, broju mrtvorodne djece te o obiteljskoj anamnezi spontanih pobačaja u obiteljima majke i oca.

Prije citogenetske obrade uzorka sve pacijentice su informirane o postupku kariotipizacije i a-CGH analize, dok je istraživanje odobrilo Etičko povjerenstvo KB „Sveti Duh“.

## 3.2. METODE

Uzorci tkiva korionskih resica očišćeni su od tkiva i stanica majčina podrijetla ispiranjem u mediju RPMI (od engl. *Roswell Park Memorial Institute medium*) (Euroclone, Milano, Italija), kako bi se spriječila kontaminacija uzorka majčinom DNA.

Kod plodova kod kojih je korišteno tkivo kože ploda za izolaciju DNA, odrezan je mali komadić kožnog tkiva, koji je zatim također ispran. Tkiva su zatim pohranjena u mediju RPMI ili fosfatnom puferu 1x PBS (od engl. *phosphate buffer saline*), pri pH 7.1 te su zamrznuta na -20°C do izolacije, ako ona nije bila provedena odmah.

### 3.2.1. IZOLACIJA GENOMSKE DNA

Za izolaciju genomske DNA (gDNA) iz tkiva korionskih resica i kože ploda korišten je komercijalni set kemikalija za izolaciju DNA, QIAamp® DNA Micro Kit (Qiagen, Stanford, CA, SAD), prema protokolu prilagođenom za potrebe Odjela.

Korišteno je do 10 mg tkiva, koje je prije izolacije po potrebi odmrznuto do sobne temperature te premješteno u epruvetu od 1.5 mL. Tkiva koja su se nalazila u mediju centrifugirana su 5 minuta na 10 000 rpm, odliven je nadtalog, a zatim je dodano 500 µL PBS-a za ispiranje, ponovljeno je centrifugiranje na istim postavkama i nadtalog je ponovno odliven. Tkiva koja su se nalazila u PBS-u centrifugirana su na istim postavkama te je također nadtalog odliven.

Svi puferi, kao i proteinaza K, korišteni tijekom daljnjih koraka izolacije dio su komercijalnog seta QIAamp® DNA Micro Kit-a te su pripremljeni prema protokolu seta.

Na pripremljeni uzorak dodano je 180 µL pufera ATL za lizu tkiva. Zatim je dodano 20 µL proteinaze K te je smjesa promiješana pulsним vorteksiranjem tijekom 15 sekundi. Smjesa je zatim inkubirana u vodenoj kupelji na 56°C preko noći ili nekoliko sati, dok se uzorak nije potpuno lizirao.

Zatim je dodano 200 µL pufera AL za lizu stanica i smjesa je vorteksirana 15 sekundi. Dodano je 200 µL 96-100%-tnog etanola, ohlađenog na -20°C te je ponovljeno vorteksiranje 15

sekundi. Smjesa je inkubirana na sobnoj temperaturi 5 min i lagano centrifugirana kako bi se sadržaj spustio na dno epruvete (engl. *spin down*).

Uzorak iz epruvete pažljivo je pipetiranjem prenesen na QIAamp Micro-spin kolonu (sadržaj seta), smještenu u epruvetu za sakupljanje od 2 mL, bez da se smoči rub kolone. Poklopac epruvete je zatim zatvoren i uzorak je centrifugiran 1 min na 8 000 rpm. U slučaju da lizat nije prošao kroz kolonu, ponovljeno je centrifugiranje na većoj brzini, dok spin-kolona nije bila prazna.

Kolona je zatim premještena u novu epruvetu za sakupljanje od 2 mL, a epruveta s otopinom koja je isprala kolonu bačena je. Dodano je 500 µL pufera AW1 za ispiranje, epruveta je zatvorena i centrifugirana 1 min na 8 000 rpm. Kolona je zatim ponovno premještena u novu epruvetu, a epruveta s otopinom je bačena. Dodano je 500 µL pufera AW2 za ispiranje, epruveta je zatvorena i ponovljeno je centrifugiranje 1 min na 8 000 rpm.

Epruveta s otopinom koja je isprala membranu bačena je, a kolona je premještena u novu epruvetu za sakupljanje i centrifugirana 3 min pri 14 000 rpm kako bi se osušila membrana.

Kolona je zatim premještena u sterilnu epruvetu za mikrocentrifugu od 1.5 mL. Dodano je 20-100 µL pufera AE za eluciju DNA izravno na membranu kolone. Kolona je zatim inkubirana 1-5 min na sobnoj temperaturi i centrifugirana 1 min na 14 000 rpm. Ponovljeni su koraci dodavanja pufera AE, inkubacije i centrifugiranja.

Kvaliteta izolirane gDNA provjerena je mjerenjem koncentracije DNA te omjera apsorbancije pri valnim duljinama od 260 i 230 te 260 i 280 nm. Za mjerenje je korišten spektrofotometar Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, SAD).

U slučaju kada gDNA nakon provjere kvalitete nije bila odmah korištena, skladištena je u zamrzivaču na -20°C.

### **3.2.2. KOMPARATIVNA GENOMSKA HIBRIDIZACIJA NA MIKROČIPU**

A-CGH provedena je koristeći komercijalni stakleni mikročip s osam uzoraka i približno 55 000 oligonukleotidnih proba raspoređenih duž genoma (SurePrint G3 Unrestricted CGH ISCA

v2 (8x60K), Agilent, CA, SAD). Za samu hibridizaciju na mikročipu korišteni su komercijalni setovi kemikalija za hibridizaciju (Agilent), uz odgovarajući protokol prilagođen od strane Odjela.

Za hibridizaciju je korištena gDNA uzoraka i referentna muška, odnosno ženska DNA (Agilent Human Reference DNA Male odnosno Female). Referentna DNA dolazi u standardnoj koncentraciji od 200 ng/μL. Kako bi hibridizacija bila uspješna, koncentracija referentne DNA i gDNA uzorka morale su biti jednake.

Prilikom pripreme uzoraka i referentne DNA izmjerena je koncentraciju gDNA. U slučaju kada je koncentracija gDNA bila veća od koncentracije referentne DNA, uzorak je razrjeđivan s AE puferom korištenim u postupku izolacije DNA. Kada je koncentracija gDNA bila manja, na isti način je razrjeđivana referentna DNA. Minimalna ukupna količina gDNA za provođenje a-CGH iznosila je 0.2 μg po uzorku.

Dan prije hibridizacije stalak za PCR epruvetice stavljen je na led i pripremljene su vrećice s ledom. A-CGH se provodila tek kada se prikupilo osam uzoraka, bez obzira na dijagnostičku svrhu, kako bi se mikročip u potpunosti iskoristio.

U slučajevima kada se prije a-CGH znao spol ploda korištena je referentna DNA odgovarajućeg spola. Kada zbog neuspjeha kulture stanica spol ploda nije bio poznat, korištena je muška referentna DNA.

### **3.2.2.1. OZNAČAVANJE I HIBRIDIZACIJA UZORAKA**

U označene PCR epruvetice od 0.2 mL ispipetirano je 13 μL gDNA i 13 μL referentne DNA odgovarajućeg spola. Epruvetice su centrifugirane 1 minutu na 2,250 g. Komponente seta za enzimsko obilježavanje DNA (engl. *labelling*) i pročišćavanje obilježene DNA (SureTag Complete DNA Labelling Kit, Agilent) odmrznute su na sobnoj temperaturi i stavljene na led. U svaku od PCR epruvetice s gDNA dodano je 2.5 μL nasumičnih primera (Random Primers, Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific). Smjesa je zatim nježno promiješana uvlačenjem i ispuštanjem pipetom. Nakon miješanja, epruvetice su stavljene u termički cikler (engl. *thermal cycler*) na temperaturu od 98°C u trajanju od 10 minuta te minimalno 5 minuta na 4°C. Nakon kraja ciklusa epruvetice su centrifugirane 1 minutu na 2,250 g.

Smjesa kemikalija za enzimsko obilježavanje pripremljena je u zamračenoj prostoriji, koristeći kemikalije iz seta. Pripremljene su dvije smjese kemikalija, jedna za testnu gDNA, a druga za referentnu DNA, prema Tablici 3.1.

Tablica 3.1. Komponente smjese kemikalija za enzimsko obilježavanje referentne i testne gDNA, uz navedene količine. Za smjesu kemikalija za referentnu DNA korištena je crvena fluorescentna boja, dok je za smjesu kemikalija za testnu gDNA korištena plava fluorescentna boja.

<b>Komponenta</b>	<b>Količina (μL)</b>
<i>5x Reakcijski pufer</i>	42.5
<i>10xdNTPs</i>	21.25
<i>Cyanine 3-dUTP (referentna boja)</i>	12.75
<i>Cyanine 5-dUTP (testna boja)</i>	4.25
<i>Exo(-) Klenow</i>	4.25
<b>Ukupno</b>	<b>80.75</b>

Restriksijski enzim Exo(-) Klenow dodan je u smjesu kemikalija kako bi se gDNA i referentna DNA specifično pocijepale na istom mjestu. Komponente su dodavane u eprueticu na stalku koji drži hladnoću i nježno promiješane pipetiranjem uvlačenjem i ispuštanjem. Zatim je dodano 9.5 μL odgovarajuće smjese kemikalija u svaku od eprueticu s gDNA, odnosno referentnom DNA te je smjesa ponovno nježno promiješana pipetom. Eprueticice su zatim bile stavljene u termalni cikler, na sljedeći program: 2 sata na 37°C; zatim 10 min na 65°C; te 4°C do daljnjeg korištenja.

### **3.2.2.2. PROČIŠĆAVANJE OZNAČENE gDNA i REFERENTNE DNA**

Nakon označavanja i hibridizacije uzorka, uzorci su pročišćeni na purifikacijskim kolonama sadržanim u setu kemikalija za označavanje i pročišćavanje. Eprueticice su izvađene iz ciklera i centrifugirane 1 min na 2,250 g. Reakcijska smjesa je zatim prebačena u epruvete od 1.5 mL. U svaku reakcijsku epruvetu dodano je 450 μL 1xTris-EDTA pufera (TE Buffer, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) pH 8.0. Kolone za pročišćavanje umetnute su u epruvetu za skupljanje od 2 mL, a na kolone su nanoseni uzorci gDNA, odnosno referentne DNA koje je trebalo pročitati.

Epruvete su centrifugirane na sobnoj temperaturi 10 minuta na 14,000 g. Otopina koja je prošla kroz kolonu bačena je, a kolona je vraćena u epruvetu za skupljanje. U svaku od kolona zatim je dodano 480  $\mu$ L 1xTE pufera te je ponovljeno centrifugiranje.

Kolona je zatim stavljena u novu epruvetu za sakupljanje od 2 mL, okrenuta naopako, a epruveta s otopinom koja je isprala kolonu je bačena. Epruvete su centrifugirane 1 minutu na 1,000 g u mikrocentrifugi na sobnoj temperaturi kako bi se sakupili pročišćeni uzorci, u volumenu između 20 i 32  $\mu$ L. Uzorci su zatim koncentrirani vakuum koncentраторom u trajanju od 10 min na 35 °C na volumen od otprilike 9.5  $\mu$ L. Iz svakog uzorka uzeto je 1.5  $\mu$ L te je izmjerena koncentracija gDNA, odnosno referentne DNA, uz korekciju za boje cyanine-5 i cyanine-3.

### 3.2.2.3. HIBRIDIZACIJA

U novu PCR epruveticu od 0.2 mL dodano je 8  $\mu$ L uzorka gDNA i 8  $\mu$ L odgovarajuće referentne DNA.

Prije pripremanja smjese kemikalija za hibridizaciju, pripremljen je blokirajući reagens (Agilent). U bočicu koja sadrži liofilizirani 10x blokirajući reagens dodano je 1.350  $\mu$ L destilirane vode bez DNaze/RNaze. Smjesa je zatim ostavljena na sobnoj temperaturi 60 min te vorteksirana.

Hibridizacijska smjesa kemikalija pripremljen je za osam uzoraka, prema Tablici 3.2. Za pripremu hibridizacijske smjese kemikalija korišten je komercijalni set kemikalija za hibridizaciju uzoraka na mikročipu (Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization Kit, Agilent) i reagens za blokiranje nespecifične hibridizacije (Cot-1 Human DNA, Agilent).

Tablica 3.2. Hibridizacijska smjesa kemikalija za a-CGH, s navedenim količinama za osam uzoraka.

<b>Komponenta</b>	<b>Količina (<math>\mu</math>L)</b>
<i>Cot-1-DNA (1 mg/mL)</i>	18.7
<i>10xaCGH blokirajući reagens</i>	42.1
<i>2xHI-RPM hibridizacijski pufer</i>	210.36
<b>Ukupno</b>	<b>271.16</b>



U svaku od reakcijskih epruvetice s gDNA i referentnom DNA dodano je 29  $\mu\text{L}$  hibridizacijske smjese kemikalija. Smjesa je lagano promiješana pipetiranjem, a zatim su epruvetice centrifugirane 1 min na 2,250 g. Nakon toga epruvetice su prebačene u cikler, 3 min na 98°C i 30 min na 37°C, uz volumen reakcijske smjese od 45  $\mu\text{L}$ . Epruvetice su nakon toga izvađene iz ciklera i ponovno centrifugirane, 1 min na 2,250 g.

Hibridizacijsko stakalce za nanošenje uzoraka (Hybridization Gasket Slide Kit (5), Agilent) stavljeno je u nosač mikročipa, a zatim je u svaku od komorica stavljeno 40  $\mu\text{L}$  uzorka, pazeći da se ne naprave mjehurići. Mikročip je zatim stavljen na stakalce za nanošenje uzoraka, aktivnom stranom prema dolje. Nosač je poklopljen i dobro zategnut te je stavljen u hibridizacijsku pećnicu na 24 sata pri 67°C, s brzinom rotacije 19 rpm.

#### **3.2.2.4. ISPIRANJE MIKROČIPA**

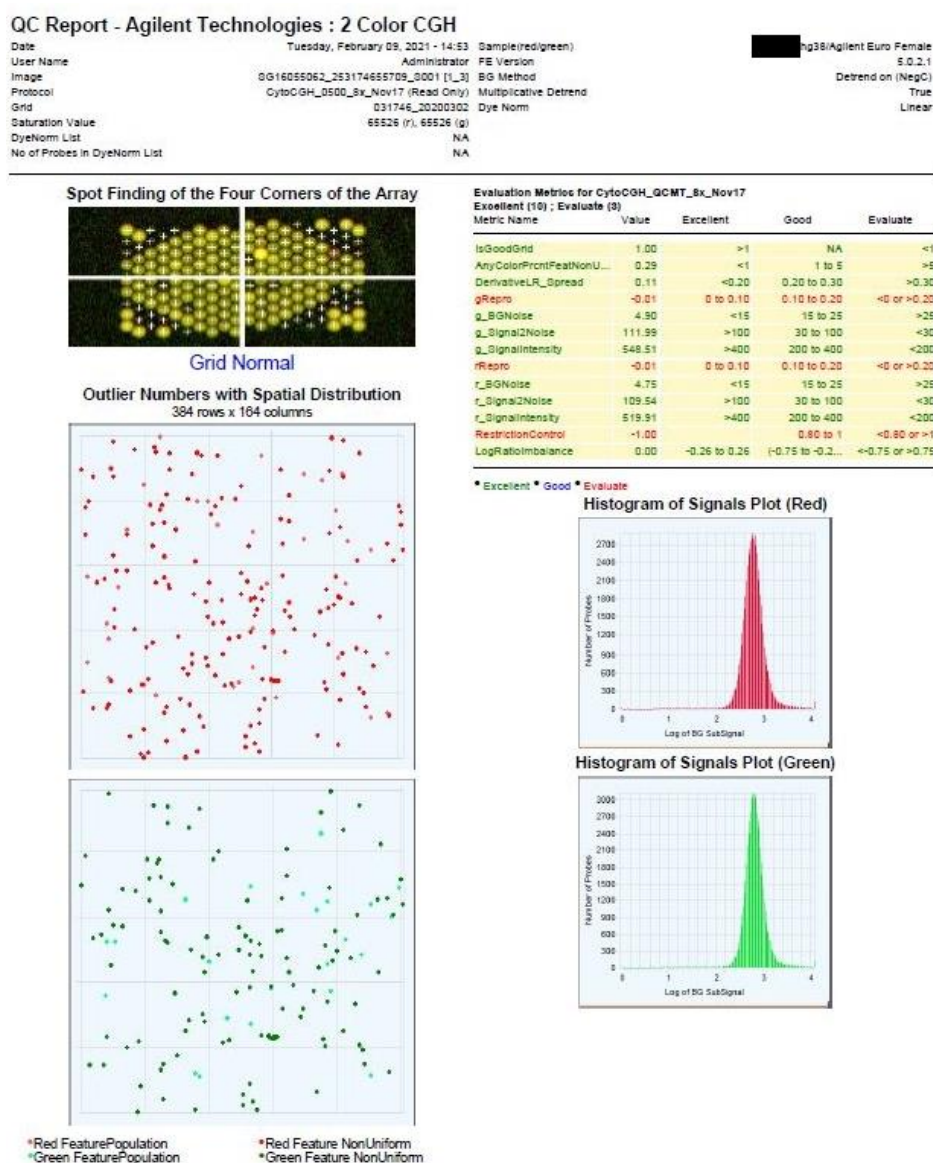
Prije ispiranja pripremljene su posude za bojanje, s puferom za ispiranje mikročipa 1 (Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1, Agilent) i puferom za ispiranje mikročipa 2 (Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2, Agilent). Boca s puferom 2 dan prije je zagrijana u inkubatoru na temperaturu od 37°C. Pripremljene su tri posude za ispiranje – posudu A i B s puferom 1, na sobnoj temperaturi i posuda C s puferom 2 na temperaturi od 37°C. Posuda C pripremljena je neposredno prije prijenosa mikročipa u pufer 2, a sama staklena posuda za ispiranje također je zagrijana u vodenoj kupelji na 37°C.

Nosač s mikročipom je nakon hibridizacije izvađen iz pećnice i ohlađen na sobnu temperaturu. Mikročip je izvađen i uronjen u posudu A, pri čemu je staklo čipa lagano odvojeno od stakla s komoricama. Posuda B nalazila se na magnetskoj miješalici, a u njoj je bio uronjen držač za stakla mikročipa (SureScan Microarray Scanner Slide Holders, Agilent). Mikročip se zatim prenio u posudu B, na držač, upaljena je magnetska miješalica te se inkubirao 5 min. Posuda C s neposredno prije pripremljenim puferom 2 stavljena je na magnetsku miješalicu zagrijanu na 37°C te je držač s mikročipom prenesen u nju i inkubiran 1 min. Držač s čipom polagano je izvađen iz pufera, pazeći da čip ostane potpuno suh. U slučaju zadržavanja kapljice na čipu, ponovno se uronio u pufer i polako izvadio.

Mikročip je zatim stavljen u nosač, zatvoren i stavljen na tamno mjesto do skeniranja, kako se ne bi izgubila fluorescencija.

### 3.2.3. REZULTATI a-CGH

Nakon provedene hibridizacije, mikročipovi su očitani skenerom, na uređaju SureScan Microarray Scanner (Agilent). Rezultati su očitani i spremljeni u .tif formatu. Nakon očitavanja mikročipa provjerila se kvaliteta provedenog a-CGH postupka analizom podataka dobivenih softverskim paketom Feature Extraction. Izvješće o kvaliteti a-CGH postupka (QC report, od engl. *Quality Control report*) sadržavalo je sljedeće parametre: BGNoise, Signal Intensity, Signal to Noise, Signal to Noise Reproducibility i DLRSD, zasebno za fluorokrome Cy3 i Cy5. Slika 3.1. prikazuje primjer QC reporta za uspješnu a-CGH analizu.



Slika 3.1. Prikaz QC-izvješća za uspješno provedenu a-CGH analizu iz programa CytoGenomics 5.1.1.15.

BGNoise (od engl. *BackGround Noise*) mjera je pozadinskog šuma, odnosno detektiranih signala koji nisu dobiveni očitanjem fluorokroma. Signal Intensity mjera je intenziteta signala pojedinog fluorokroma. Signal to Noise omjer je između signala detektiranog očitanjem fluorokroma i pozadinskog šuma. Ova mjera pokazuje koliko se jasno može očitati svaki od signala fluorokroma. Repro (od engl. *Reproducibility*) mjera je kojom se detektira koliko je konzistentan signal fluorokroma duž cijelog genoma. DLRSpread (od engl. *Derivative log ratio spread*) mjera je omjera logaritamskih vrijednosti šuma duž uzastopnih proba na mikročipu. Povećana DLRSpread vrijednost utječe na vjerodostojnost očitanih rezultata varijanti broja kopija (Goidin 2019). Vrijednosti parametara koje su morale biti zadovoljene kako bi se postupak smatrao pravovaljanim navedene su u Tablici 3.3.

Tablica 3.3. Vrijednosti parametara kvalitete kontrole provedenog a-CGH postupka, svrstane u tri kategorije: izvrsno, dobro i evaluirati.

	<b>Izvrсно</b>	<b>Dobro</b>	<b>Evaluirati</b>
<i>Pozadinski šum (BGNoise)</i>	<10	10-20	>20
<i>Intenzitet signala (Signal Intensity)</i>	>400	200-400	<200
<i>Omjer signala i šuma (Signal2Noise)</i>	>100	50-100	<50
<i>Repro</i>	0-0.10	0.10-0.20	<0 ili >0.20
<i>DLRSpread</i>	<0.20	0.20-0.30	>0.30

Nakon provjere kvalitete postupka, očitani podaci su analizirani na temelju omjera očitanih vrijednosti fluorescencija za referentnu DNA i DNA uzorka. Program za analizu podataka zove CytoGenomics 5.1.1.15. Tablica 3.4. prikazuje matematičku logiku programa kojom se analiziraju i prikazuju podaci nakon analize za najčešće detektirane oblike promjene broja kopija.

Nakon što je program zabilježio prosječnu vrijednost fluorescencije DNA uzorka, odnosno referentne DNA, izračunavan je njihov omjer te logaritam po bazi 2 od dobivenog omjera. Izlazni podatak, koji je program prikazivao, otprilike odgovara logaritamskoj vrijednosti, uz korekciju, a iznosio je vrijednost promjene u broju kopija, odnosno CNV (Goidin 2019).

Promjene u varijacijama broja kopija poznate patogenosti analizirane su prema bazama OMIM ([www.omim.org](http://www.omim.org)), UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>), Decipher ([www.deciphergenomics.org](http://www.deciphergenomics.org)), DGV ([dgv.tcag.ca/dgv/app/home](http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home)) i ClinVar ([www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar)).

Tablica 3.4. Matematička logika programa CytoGenomics 5.1.1.15. BK – broj kopija; U/R – omjer prosječnog broja kopija DNA uzorka i referentne DNA.

Opis	Prosječan BK uzorka	Prosječan BK referentne DNA	Omjer (U/R)	Log <sub>2</sub> (omjer)	Izlazni podatak
Diploid	2	2	1	0	0
Delecija	1	2	0.5	-1	-0.9
Trisomija	3	2	1.5	+0.58	+0.53
50%-tna mozaična delecija	1.5	2	0.75	-0.41	-0.37
50%-tna mozaična trisomija	2.5	2	1.25	+0.32	+0.29
20%-tna mozaična delecija	1.8	2	0.9	-0.15	-0.13
20%-tna mozaična trisomija	2.2	2	1.1	+0.14	+0.12

### 3.2.4. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza podataka provedena je u programu Statistica 13.3 i Microsoft Office Excel 2016. Korištene su metode tabelarnog i grafičkog prikaza rezultata, Barnardov test, Wilsonove intervale pouzdanosti, Shapiro-Wilkov test, Levenov test, ANOVA-u, t-test te  $\chi^2$ -test.

Izračunat je udio normalnih i aberantnih nalaza kod a-CGH i citogenetske analize, kao i udio uzoraka koji nisu dali rezultate kod citogenetske analize. Barnardov test korišten je kako bi se odredila značajnost razlika učestalosti dobivenih rezultata te značajnost razlike u broju detektiranih kromosomskih aberacija između citogenetske analize i a-CGH. Za određivanje granica pouzdanosti rezultata metoda korišteni su Wilsonove intervale. Za predstavljanje kategorijskih podataka korištene su tablice apsolutnih i relativnih frekvencija. Analiza frekvencija kromosopatija po gestacijskoj dobi provedena je koristeći  $\chi^2$ -test.

Podatci o gestacijskoj dobi plodova analizirani su prema skupinama temeljenim na rezultatima a-CGH, uz korekciju prema rezultatima citogenetske analize. Za procjenu rizika kod daljnjeg planiranja trudnoća korišteni su, uz rezultate a-CGH, podatci o ukupnom broju trudnoća, broju neuspjelih trudnoća i dobi majke.

Parametri koji su izračunati kod svih numeričkih podataka bili su: srednja vrijednost, medijan, standardna devijacija i interkvantilni raspon. Pomoću Shapiro-Wilkovog testa provjerena je normalnost distribucije podataka, a Leveneovim testom homogenost varijanci. Ovisno o rezultatima ova dva testa, podatci su po potrebi transformirani kako bi se ujednačile varijance. Analiza varijanci provedena je između više skupina ANOVA-om te t-testom između dviju skupina.

## 4. REZULTATI

### 4.1. ANALIZA REZULTATA CITOGENETSKE ANALIZE I a-CGH

#### 4.1.1. USPOREDBA USPJEŠNOSTI METODA

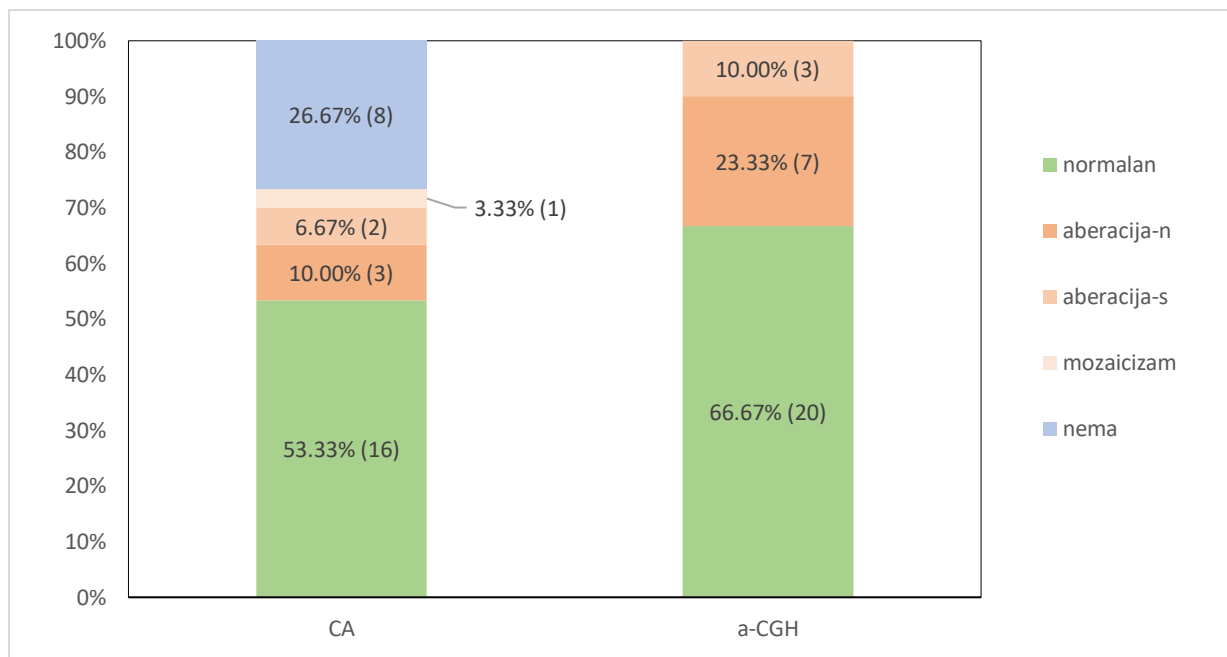
##### 4.1.1.1. USPJEŠNOST CITOGENOMSKE ANALIZE NA CIJELOM UZORKU

Citogenetska analiza dala je rezultate kod 22 uzorka (73.3%). Od ukupnog broja uzoraka kod kojih je analiza provedena 16 uzoraka (53.3%) imalo je normalan kariotip, dok je šest uzoraka (20.0%) imalo neki oblik kromosomske aberacije: tri uzorka (10.0%) imalo je numeričku kromosomsku aberaciju, dva uzorka (6.7%) imalo je strukturnu kromosomsku aberaciju, a kod jednog uzorka (3.3%) detektiran je mozaicizam. Detektirani mozaicizam bio je kombinacija strukturne i numeričke kromosomske aberacije. Od ukupnog broja, kod osam uzoraka (26.7%) nije se uspjela provesti citogenetska analiza.

Istovremeno, a-CGH bio je uspješan na svim uzorcima (100%) – 20 uzoraka (66.7%) pokazalo je normalan nalaz, a preostalih 10 uzoraka (33.3%) pokazalo je kromosomske aberacije: sedam uzoraka (23.3%) imalo je numeričku kromosomsku aberaciju, a tri (10.0%) strukturnu kromosomsku aberaciju. Od navedena tri uzorka sa strukturnom aberacijom, kod jednog je ona detektirana u mozaičnom obliku. Mozaicizam i balansirana strukturna kromosomska aberacija otkriveni citogenetskom analizom nisu detektirani pomoću a-CGH. Slika 4.1. prikazuje razlike između rezultata citogenetske analize i a-CGH s apsolutnim (u zagradi) i relativnim frekvencijama pojedinih rezultata.

Barnardov test pokazao je statističku značajnost razlike u uspješnosti a-CGH u odnosu na citogenetsku analizu ( $p=0.0027$ ).

Uspoređujući broj detektiranih kromosomskih aberacija u cjelokupnom uzorku, a-CGH detektirao je više kromosomopatija u odnosu na citogenetsku analizu – 30.0% nasuprot 20.0%. Međutim, Barnardov test nije pokazao je statističku značajnost ove razlike ( $p=0.27$ ).



Slika 4.1. Rezultati citogenetske analize (CA) i a-CGH po skupinama. Različite kromosomske aberacije prikazane su različitim nijansama narančaste boje. aberacija-s – strukturna aberacija; aberacija-n – numerička aberacija.

#### 4.1.1.2. USPJEŠNOST CITOGENOMSKE ANALIZE PO TROMJESEČJIMA TRUDNOĆE

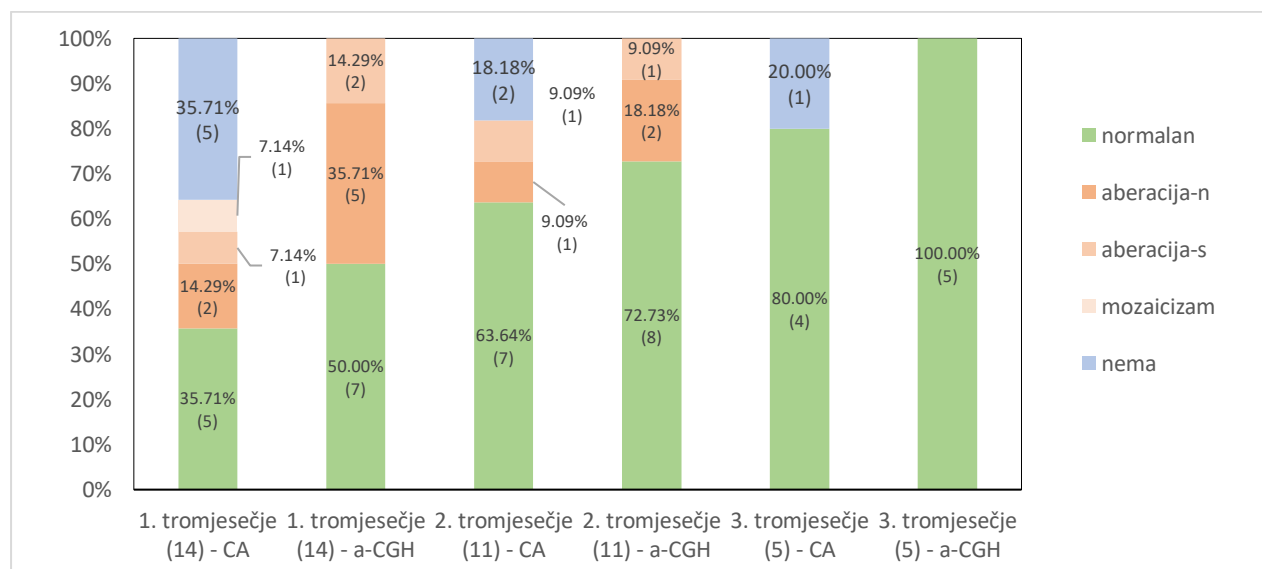
Analizirano je 14 plodova pobačenih u prvom, 11 plodova izgubljenih u drugom i pet plodova izgubljenih u trećem tromjesečju.

Pomoću citogenetske analize dobiveni su rezultati na devet uzoraka (64.3%) iz prvog, devet uzoraka (81.8%) iz drugog te četiri uzorka (80.0%) iz trećeg tromjesečja. U prvom tromjesečju detektirana je učestalost kromosomskih aberacija od 28.6%, u drugom tromjesečju od 18.2%, a u trećem tromjesečju kromosomske aberacije nisu detektirane.

Pomoću a-CGH u svim tromjesečjima dobiveni su rezultati u 100% slučajeva. U prvom tromjesečju detektirana je učestalost kromosomskih aberacija od 50.0%, u drugom tromjesečju od 27.3%, a u trećem tromjesečju kromosomske aberacije također nisu detektirane.

Barnardov test pokazao je statističku značajnost razlike u uspješnosti između a-CGH i citogenetske analize u prvom tromjesečju ( $p=0.017$ ), no razlika u uspješnosti ovih metoda u drugom i trećem tromjesečju nema statističke značajnosti ( $p=0.22$ ;  $p=0.52$ ).

Slika 4.2. prikazuje razlike između rezultata citogenetske analize i a-CGH, po tromjesečjima, s apsolutnim (u zagradi) i relativnim frekvencijama pojedinih rezultata.



Slika 4.2. Prikaz rezultata citogenetske analize (CA) i a-CGH po tromjesečjima. Različitim nijansama narančaste boje prikazane su različite kromosomske aberacije. aberacija-n – numerička aberacija; aberacija-s – strukturna aberacija.

Uspoređujući udio detektiranih kromosomskih aberacija po tromjesečjima, a-CGH detektirao je više kromosomopatija u odnosu na citogenetsku analizu u prvom i drugom tromjesečju – 50.0% u odnosu na 28.6% u prvom te 27.3% u odnosu na 18.2% u drugom tromjesečju. Barnardov test međutim nije pokazao je statističku značajnost ove razlike ( $p=0.29$ ;  $p=0.74$ ). Test nije proveden za rezultate trećeg tromjesečja, s obzirom da nije bilo detektiranih kromosomopatija.

#### 4.1.2. UJEDNAČENOST REZULTATA

Analiza ujednačenosti rezultata provedena je na uzorcima kod kojih su obje metode dale rezultat, odnosno na ukupno 22 uzorka. Apsolutne i relativne frekvencije ujednačenosti rezultata po skupinama, s podjelom aberacija na podskupine prikazane su u Tablici 4.1.

Rezultat citogenetske analize potvrđen je pomoću a-CGH u 19 uzoraka, što iznosi 86.4%. Obje metode pokazale su normalan kariotip kod 15 uzoraka (68.3%). Numerička aberacija kod obje metode detektirana je u tri slučaja (13.6%): jedna monosomija X – Turnerov sindrom, jedna

monosomija 21 te jedna trisomija 15. Strukturna aberacija kod obje metode detektirana je u jednom slučaju (4.5%). Ova aberacija obuhvaćala je nebalansiranu translokaciju između kromosoma 4 i 5.

U preostala tri uzorka (13.6%) rezultati citogenetske analize i a-CGH nisu se podudarali. Kod prvog uzorka citogenetska analiza pokazala je strukturnu aberaciju, balansiranu translokaciju između kromosoma 4 i 12, koja nije detektirana pomoću a-CGH. Kod drugog uzorka citogenetska analiza pokazala je normalan kariotip, dok je pomoću a-CGH zabilježena strukturna aberacija, gubitak segmenta kromosoma 19 u mozaičnom obliku. Kod trećeg uzorka citogenetska analiza pokazala je strukturni i numerički mozaicizam – jednu staničnu liniju s trisomijom 22 i drugu staničnu liniju s trisomijom 22 i deriviranim kromosomom 19. Pomoću a-CGH kod ovog uzorka detektirana je samo trisomija 22.

Tablica 4.1. Apsolutne i relativne frekvencije ujednačenosti rezultata. CA – citogenetska analiza; S – strukturna kromosomska aberacija; N – numerička kromosomska aberacija; M – mozaicizam. Crvenom bojom označeni su rezultati koji su se razlikovali između metoda.

<i>CA – a-CGH</i>	<i>Apsolutna frekvencija</i>	<i>Relativna frekvencija</i>
<b>Normalan - normalan</b>	<b>15</b>	<b>0.683</b>
<b>Aberacija - normalan</b>	<b>1</b>	<b>0.045</b>
<i>S-Normalan</i>		1 0.045
<i>N-Normalan</i>		0 0
<b>Normalan - aberacija</b>	<b>1</b>	<b>0.045</b>
<i>Normalan - N</i>		0 0
<i>Normalan - S</i>		1 0.045
<b>Aberacija - aberacija</b>	<b>5</b>	<b>0.227</b>
<i>N-N</i>		3 0.136
<i>S-S</i>		1 0.045
<i>M-N</i>		1 0.045
<i>N-S</i>		0 0
<i>S-N</i>		0 0
<i>M-S</i>		0 0
<b>Isti</b>	<b>19</b>	<b>0.864</b>
<b>Različiti</b>	<b>3</b>	<b>0.136</b>
<b>UKUPNO</b>	<b>22</b>	<b>1.00</b>

Na temelju udjela potvrđenih rezultata citogenetske analize, Wilsonovim intervalima određene su granice pouzdanosti ovih dviju metoda na analiziranom uzorku koje iznose 0.667 i 0.952.



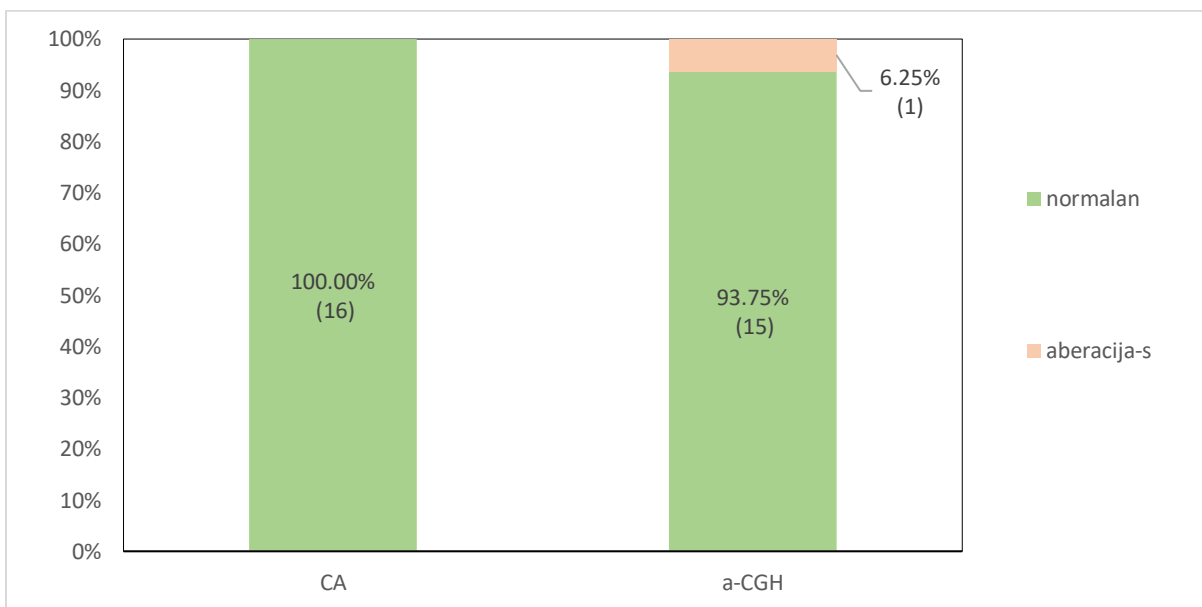
Između 22 uzoraka kod kojih su rezultati dobiveni i citogenetskom analizom i a-CGH ukupno je zabilježeno sedam (31.2%) kromosomskih aberacija.

## 4.2. ANALIZA KROMOSOMOPATIJA

### 4.2.1. SKUPINA S NORMALNIM KARIOTIPOM

U ovu skupinu uključeno je 16 uzoraka na temelju rezultata citogenetske analize.

Za izolaciju DNA za analizu a-CGH korištena je koža ploda kod sedam uzoraka i tkivo korionskih resica kod devet uzoraka. Nalaz citogenetske analize potvrđen je pomoću a-CGH kod 15 uzoraka, što iznosi 93.7%. U preostalom uzorku (6.3%) a-CGH je detektirao nebalansiranu strukturnu kromosomsku aberaciju u mozaičnom obliku te je ovaj uzorak svrstan u strukturne kromosomske aberacije. Slika 4.3 prikazuje rezultate citogenetske analize i a-CGH u ovoj skupini, s apsolutnim (u zagradi) i relativnim frekvencijama pojedinih rezultata.



Slika 4.3. Rezultati citogenetske analize (CA) i a-CGH u skupini s normalnih kariotipom. aberacija-s – strukturna aberacija.

Detektirana kromosomska aberacija obuhvaćala je terminalnu deleciju regije 19p13.3.p13.1, veličine oko 19.5 Mb. Delecija je detektirana u 40% stanica, odnosno u 40% izolirane DNA uzorka. Prema bazi OMIM, na zahvaćenim regijama nalazi se ukupno 94 morbidna gena te jedan delecijski sindrom, što ovu varijantu broja kopija svrstava među patogene.

Barnardov test nije pokazao statističku značajnost razlike u broju detektiranih kromosomskih aberacija u ovoj skupini ( $p=0.52$ ).

#### 4.2.2. SKUPINA S NEUSPJEŠNOM CITOGENETSKOM ANALIZOM

Ova skupinu uključuje osam uzoraka koji nisu dali rezultate citogenetske analize zbog nerasta kulture stanica.

Svi uzorci uspješno su analizirani pomoću a-CGH, što daje uspješnost metode u ovoj skupini od 100%. Za izolaciju DNA za analizu a-CGH korišteno je tkivo korionskih resica kod četiri slučaja i tkivo kože ploda kod četiri uzorka.

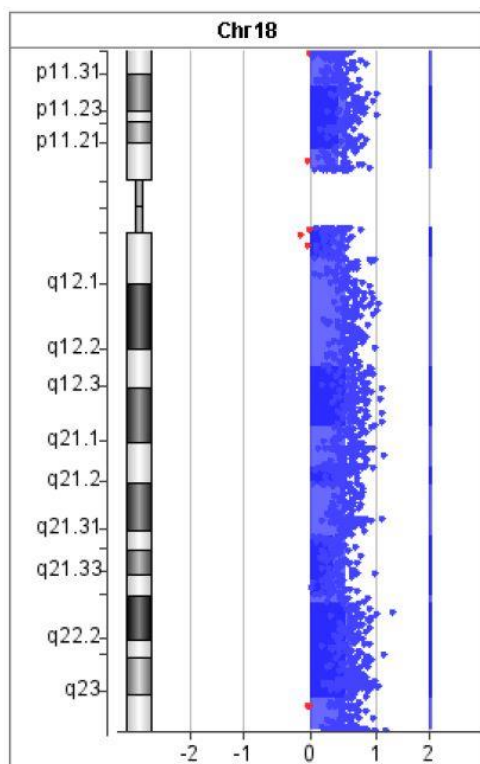
Kod četiri uzoraka (50.0%) pomoću a-CGH je detektiran normalan nalaz, dok je kod preostala četiri (50.0%) detektirana kromosomska aberacija. U odnosu na 22 uzorka gdje je citogenetska analiza bila uspješna, a udio patoloških kariotipa iznosio je 31.2%.

Numerička kromosomska aberacija detektirana je u tri slučaja (37.5%), a strukturna u jednom slučaju (12.5%). Udio numeričkih kromosomskih aberacija među svim kromosomskim aberacijama iznosio je 75.0%, a strukturnih 25.0%. Slika 4.4. prikazuje rezultate citogenetske analize i a-CGH u ovoj skupini, s apsolutnim (u zagradi) te relativnim frekvencijama pojedinih rezultata.



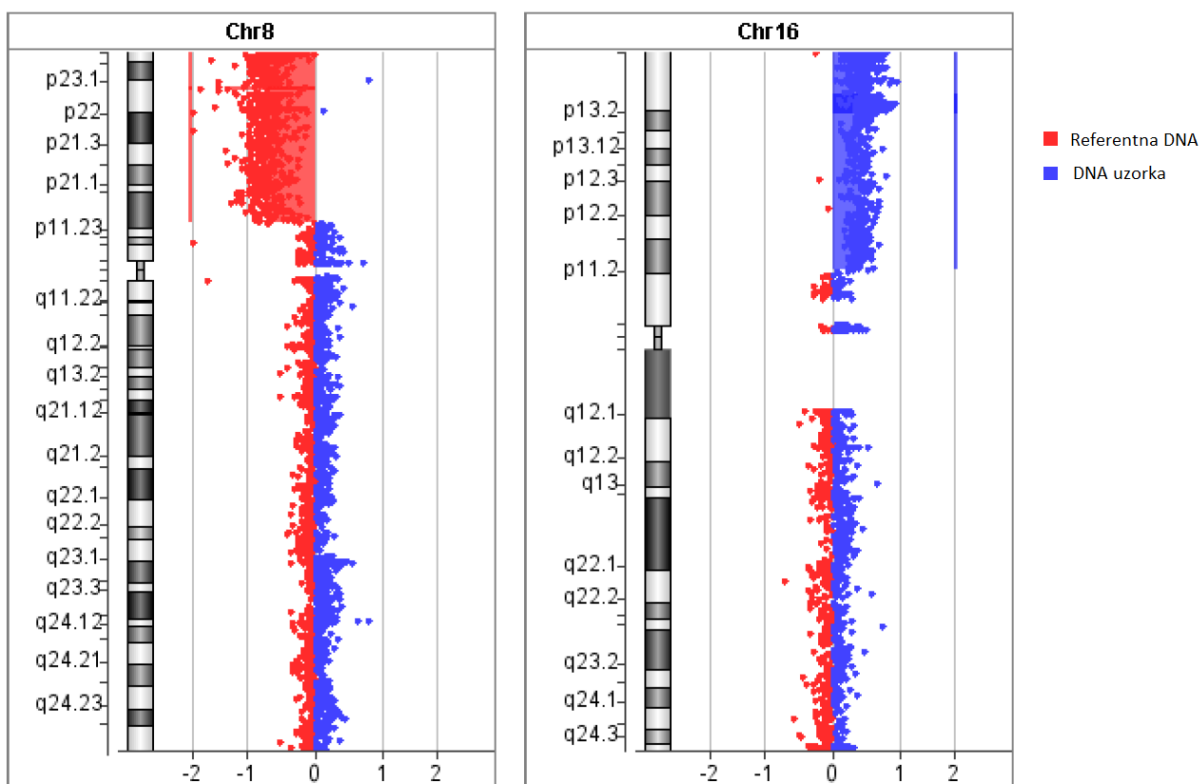
Slika 4.4. Rezultati citogenetske analize (CA) i a-CGH u skupini s normalnih kariotipom. aberacija-s – strukturna aberacija; aberacija-n – numerička aberacija.

Među numeričkim kromosomskim aberacijama zabilježena je jedna monosomija (monosomija X) i dvije trisomije (trisomija 11 i trisomija 18 – Edwardsov sindrom). Trisomija 18 prikazana je na Slici 4.5., gdje se vidi veliko odstupanje signala plavno označene DNA uzorka od središnje vrijednosti duž cijelog kromosoma 18, što ukazuje na dobitak jedne kopije cijelog kromosoma 18.



Slika 4.5. Prikaz trisomije kromosoma 18 detektirane pomoću a-CGH.

Zabilježena strukturna kromosomska aberacija terminalni je gubitak jedne kopije regije 8p23.3p12 veličine otprilike 35 Mb, uz terminalni dobitak jedne kopije regije 16p13.3-p12.1 veličine oko 28 Mb, na ženskom plodu. Veličina zahvaćene regije kromosoma 8 obuhvatila je gotovo cijeli kratki krak kromosoma 8. Slika 4.6. prikazuje kromosome 8 i 16, zahvaćene ovom strukturnom aberacijom. Na kromosomu 8 vidi se odstupanje signala crveno označene referentne DNA od središnje vrijednosti, ukazujući na gubitak ove regije, dok se na kromosomu 16 vidi odstupanje signala plavo označene DNA uzorka, ukazujući na dobitak ove regije.



Slika 4.6. Kromosom 8 i kromosom 16, zahvaćeni strukturnom kromosomskom aberacijom. Kromosom 8 pokazuje djelomičnu deleciju kratkog (p) kraka, a kromosom 16 djelomičnu duplikaciju kratkog (p) kraka.

Rezultat  $\chi^2$ -testa pokazao je da ne postoji statistički značajna razlika između učestalosti kromosomskih aberacija u skupini uzoraka kod kojih citogenetska analiza daje rezultat (31.2%) i u skupini kod kojih nije dobiven rezultat citogenetske analize (50.0%), no to se može objasniti malim brojem uzoraka ( $\chi^2=1.31$ , granična vrijednost za jedan stupanj slobode =3.84,  $p<0.05$ ).

#### 4.2.3. SKUPINA S KROMOSOMSKIM ABERACIJAMA

Na temelju rezultata citogenetske analize u ovu skupinu svrstano je šest uzoraka.

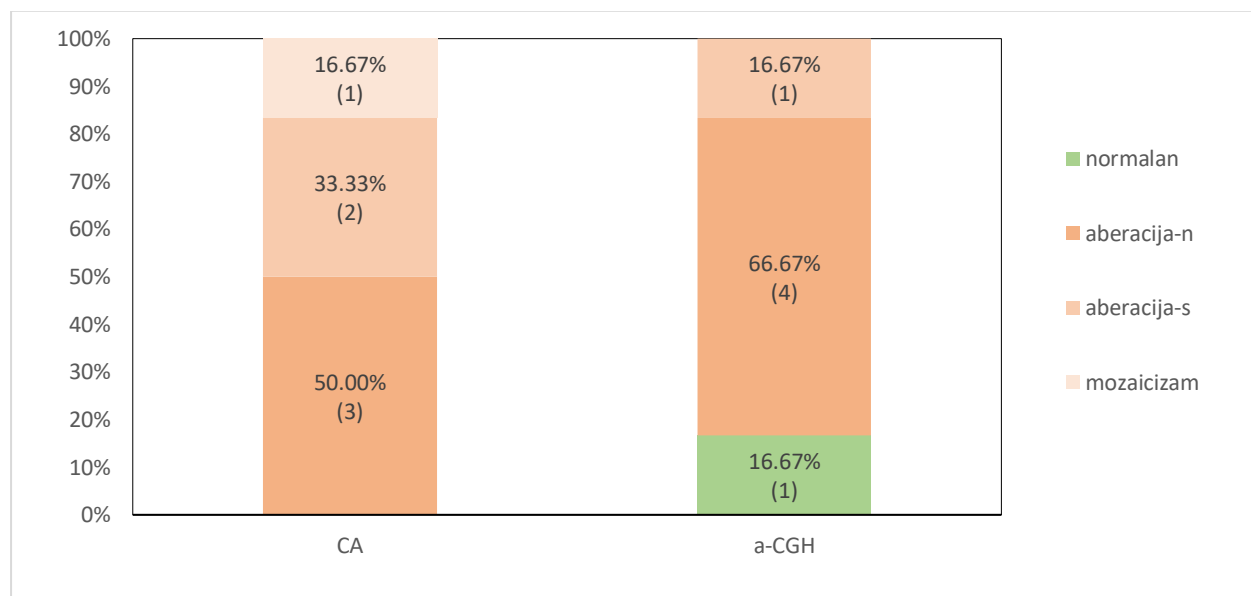
Za izolaciju DNA za analizu a-CGH korišteno je tkivo kože ploda kod jednog, a tkivo korionskih resica kod preostalih pet uzoraka. Nalaz citogenetske analize potvrđen je pomoću a-CGH u četiri slučaja (66.7%).

U jednom slučaju pomoću citogenetske analize detektiran je mozaicizam dvije linije trisomičnih stanica. Jedna linija imala je samo trisomiju 22, dok je u drugoj uz trisomiju 22 bio prisutan i derivirani kromosom 19. U 10% analiziranih metafaza nađena su ova dva tipa

kromosomskih poremećaja. Pomoću a-CGH na ovom uzorku utvrđena je samo numerička kromosomska aberacija, odnosno trisomija 22. Na temelju rezultata a-CGH ovaj uzorak svrstan je u numeričke aberacije.

U drugom slučaju pomoću citogenetske analize detektirana je recipročna naoko balansirana translokacija između kromosoma 4 i 12. Na temelju normalnog nalaza a-CGH dokazana je balansiranoost ove translokacije. Prema bazi DGV (Database of Genomic Variants), sve pronađene CNV svrstane su među benigne ([www.dgv.tcag.ca/dgv/app/home](http://www.dgv.tcag.ca/dgv/app/home)).

Slika 4.7. prikazuje rezultate citogenetske analize i a-CGH u ovoj skupini, s apsolutnim (u zagradi) i relativnim frekvencijama pojedinih rezultata.

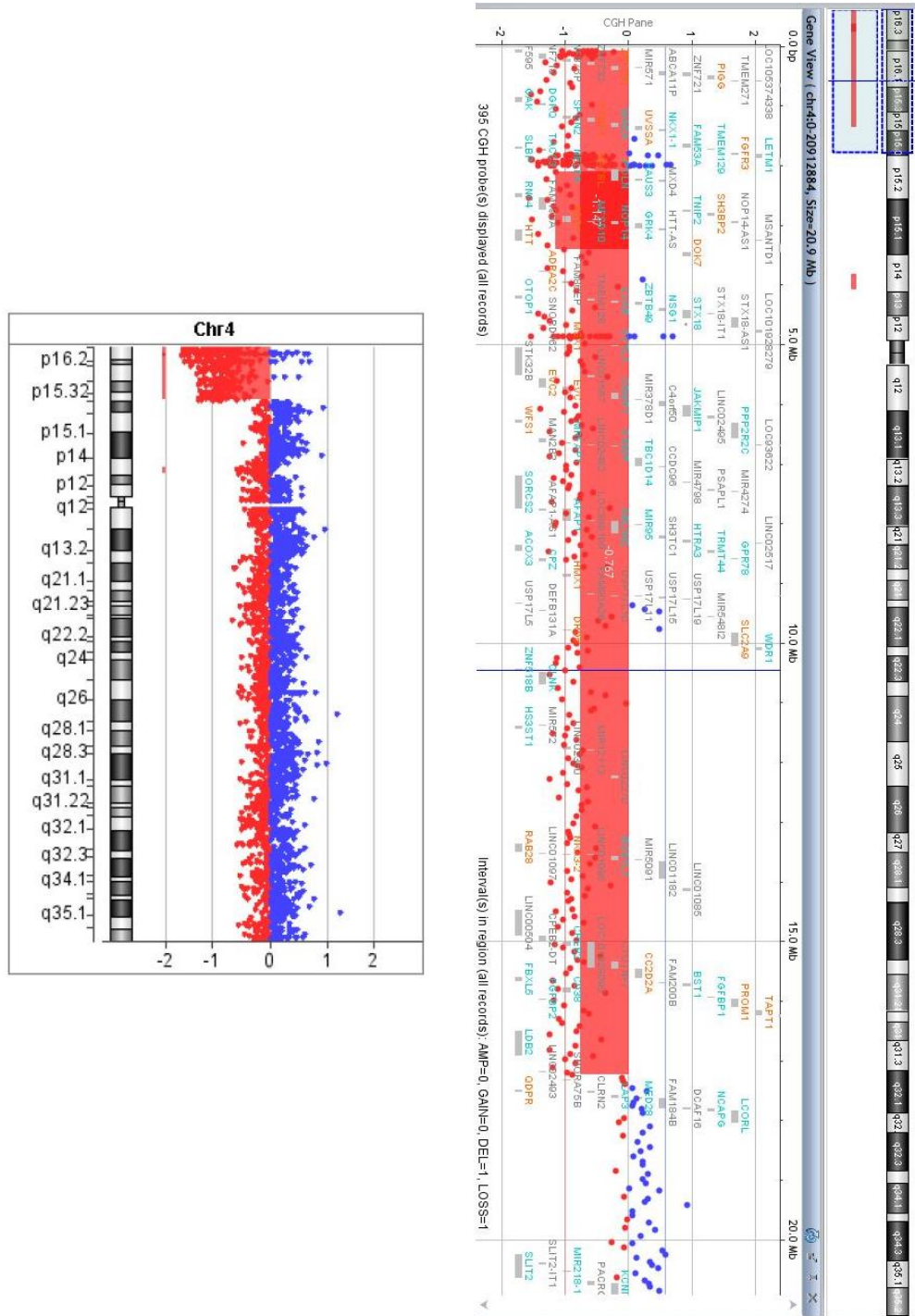


Slika 4.7. Rezultati citogenetske analize (CA) i a-CGH. aberacija-s – strukturna aberacija; aberacija-n – numerička aberacija.

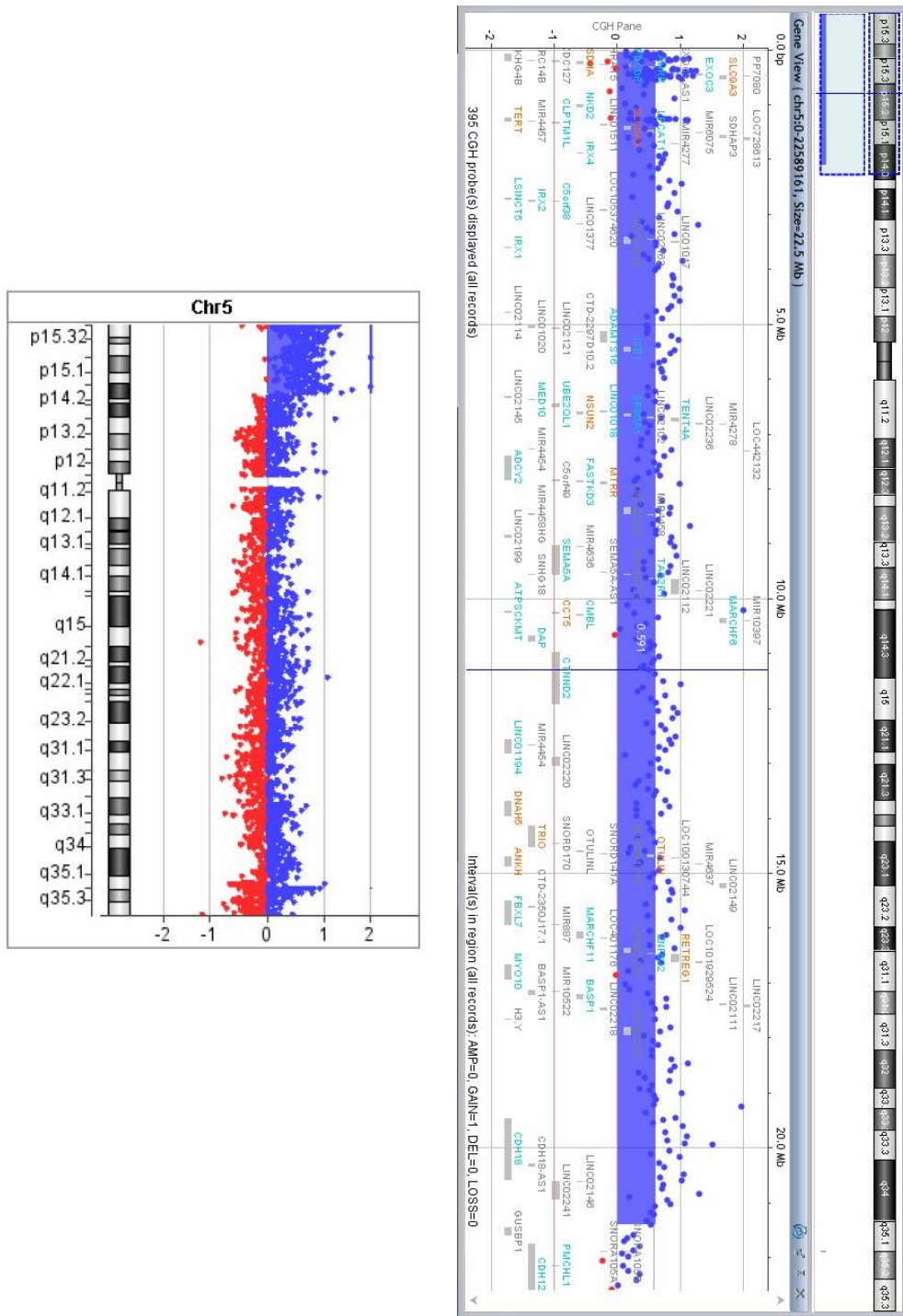
Numeričke kromosomske aberacije detektirane pomoću a-CGH bile su monosomija 21 kod jednog uzorka, monosomija X – Turnerov sindrom kod drugog te trisomija 15 kod trećeg uzorka, koje su potvrdile nalaz citogenetske analize. Analiza pomoću a-CGH isključila je i prisutnost manjih patoloških CNV u aneuploidnim uzorcima. Zastupljenost monosomija među numeričkim aberacijama iznosila je 50.0%, jednako kao i zastupljenost trisomija.

Strukturna kromosomska aberacija obuhvaćala je terminalnu deleciju jedne kopije regije 4p16.3-p15.32, veličine 17.1 Mb uz terminalni dobitak jedne kopije regije 5p15.33-p14.3 veličine

21,3 Mb na muškom plodu. Slika 4.8. prikazuje deleciju kratkog kraka kromosoma 4, uz detaljan prikaz gena zahvaćene regije. Slika 4.9. prikazuje parcijalnu duplikaciju kratkog kraka kromosoma 5, uz detaljan prikaz gena zahvaćene regije. Uvidom u bazu OMIM promjene na oba kromosoma svrstane su među patološke CNV.



Slika 4.8. Parcijalna delecija kratkog kraka kromosoma 4, uz detaljan prikaz gena zahvaćene regije.

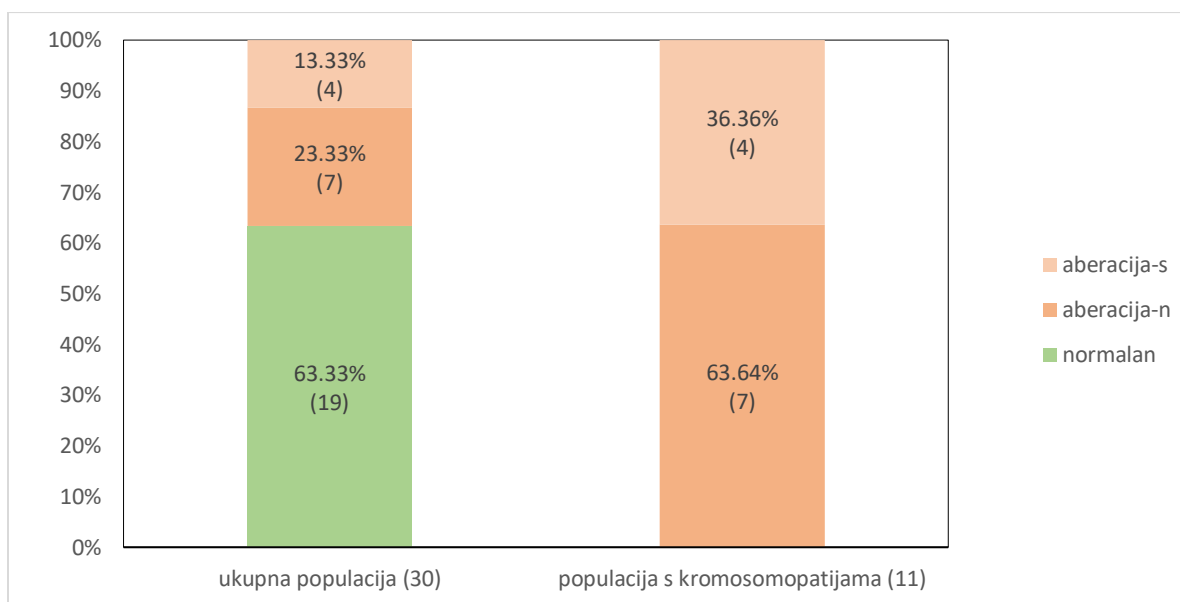


Slika 4.9. Parcijalna duplikacija kratkog kraka kromosoma 5, uz detaljan prikaz gena zahvaćene regije.

Barnardov test nije pokazao statističku značajnost razlike u broju detektiranih aberacija ( $p=0.52$ ).

#### 4.2.4. UČESTALOST KROMOSOMOPATIJA NA CIJELOM UZORKU

Koristeći obje metode, u ukupnom broju uzoraka je otkriveno 11 kromosomskih aberacija, što iznosi 36.7%. Numeričke kromosomske aberacije pronađene su kod sedam uzoraka, a strukturne kod četiri uzorka. Zastupljenost numeričkih aberacija u ukupnoj testiranoj populaciji iznosi 23.3%, a u uzorcima s kromosomskim aberacijama 63.6%. Zastupljenost strukturnih aberacija u ukupnoj populaciji iznosi 13.3%, a u uzorcima s aberacijama 36.4%. Slika 4.10. prikazuje raspodjelu kromosomskih aberacija, s apsolutnim (u zagradi) i relativnim frekvencijama.



Slika 4.10. Zastupljenost pojedinih kromosomopatija u ukupnoj populaciji i populaciji s kromosomopatijama. abercija-n – numerička abercija; abercija-s – strukturna abercija.

Statistička značajnost razlike između broja detektiranih kromosomskih aberacija korištenjem samo citogenetske analize u odnosu na kombinaciju citogenetske analize i a-CGH testirana je Barnardovim testom. Rezultat Barnardovog testa ( $p=0.20$ ) nije pokazao statističku značajnost, no snaga testa smanjena je zbog malog broja uzoraka.

Kombinacijom citogenetske analize i a-CGH u prvom tromjesečju otkriveno je osam uzoraka (61.5%) s kromosomskom aberacijom, dok su u drugom tromjesečju otkrivena tri uzorka s kromosomskom aberacijom (27.3%). Njihove apsolutne i relativne frekvencije prikazane su u Tablici 4.2.



$\chi^2$ -test pokazao je da postoji statistički značajna razlika između frekvencija kromosomskih aberacija i tromjesečja u kojima je trudnoća izgubljena ( $\chi^2=6.68$ ; granična vrijednost = 5.99 za dva stupnja slobode,  $p<0.05$ ).

Tablica 4.2. Apsolutne i relativne frekvencije kromosomskih aberacija po tromjesečju. KA – kromosomska aberacija; t – tromjesečje.

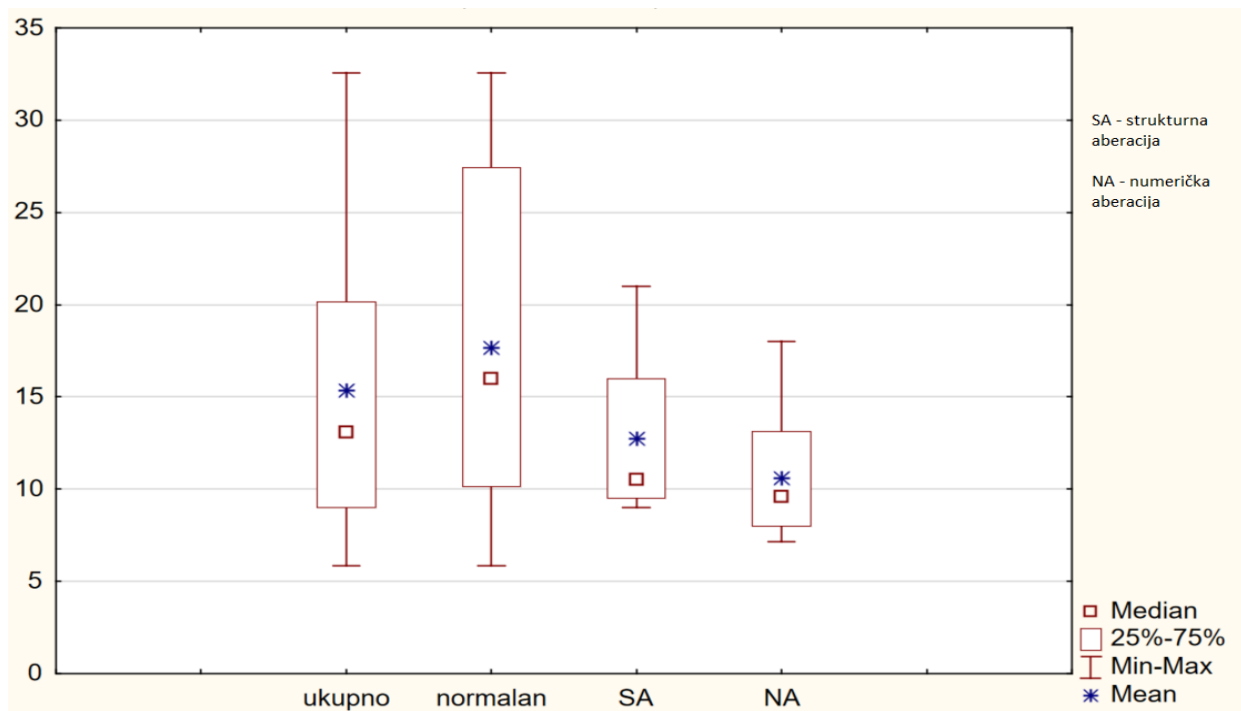
	<i>Broj KA</i>	<i>Broj trudnoća</i>	<i>Relativna frekvencija</i>
<i>Prvo t.</i>	8	13	0.615
<i>Drugo t.</i>	3	11	0.273
<i>Treće t.</i>	0	5	0

### 4.3. ANALIZA GESTACIJSKE DOBI

Kod analize gestacijske dobi za grupiranje uzoraka po skupinama kombinirani su rezultati citogenetske analize i a-CGH, pri čemu je mozaicizam detektiran citogenetskom analizom svrstan u numeričke kromosomske aberacije, a mozaicizam detektiran pomoću a-CGH u strukturne kromosomske aberacije. Podskupine numeričkih odnosno strukturnih kromosomskih aberacija nisu zasebno analizirane zbog malog broja uzoraka.

Srednja vrijednost gestacijske dobi svih plodova iznosila je  $15.35 \pm 8.04$  tjedana. Najvišu srednju vrijednost gestacijske dobi imali su plodovi s normalnim kariotipom ( $17.65 \pm 8.84$  tjedana), a najnižu plodovi s numeričkom kromosomskom aberacijom ( $10.59 \pm 3.80$  tjedana). Plodovi sa strukturnom kromosomskom aberacijom bili su srednje gestacijske dobi od  $12.75 \pm 5.56$  tjedana. Slika 4.11. prikazuje raspodjelu vrijednosti gestacijske dobi po navedenim skupinama.

Podaci su transformirani kako bi se ujednačila varijanca po skupinama te je provedena ANOVA koja nije pokazala statističku značajnost razlika gestacijske dobi između skupina ( $p=0.14$ ), no također treba uzeti u obzir mali broj uzoraka u pojedinim skupinama. Međutim, kada su numeričke i strukturne kromosomske aberacije grupirane zajedno, t-test pokazao je statistički značajnu razliku između gestacijske dobi plodova s normalnim rezultatom i onih s kromosomskom aberacijom ( $t=2.19$ ; granična vrijednost za 28 stupnjeva slobode = 2.05,  $p<0.05$ ).



Slika 4.11. Vrijednosti gestacijske dobi u tjednima. Prikazane su srednje vrijednosti (mean), medijan, minimalne i maksimalne vrijednosti te interkvantilni raspon.

## 4.4. ANALIZA PODATAKA IZ ANAMNEZE MAJKI

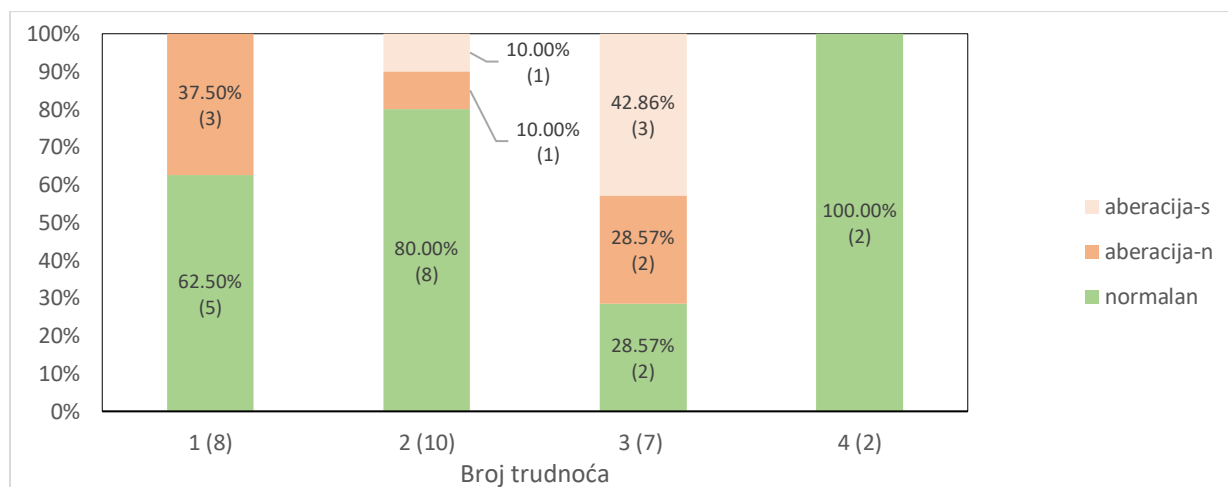
Kod analize podataka iz anamneza majki za grupiranje uzoraka po skupinama kombinirani su rezultati citogenetske analize i a-CGH, pri čemu je mozaicizam detektiran citogenetskom analizom svrstan u numeričke kromosomske aberacije, a mozaicizam detektiran pomoću a-CGH u strukturne kromosomske aberacije. Uzorci kod kojih nekih od podataka nije bilo, isključeni su iz analiza. Podskupine numeričkih odnosno strukturnih kromosomskih aberacija nisu zasebno analizirane zbog malog broja uzoraka.

### 4.4.1. ANALIZA BROJA USPJEŠNIH I IZGUBLJENIH TRUDNOĆA U ODNOSU NA ZABILJEŽENE KROMOSOMOPATIJE

Analiza je provedena na ukupnom broju od 27 uzoraka. Kod preostala tri uzorka nije bilo podataka o broju trudnoća i/ili broju neuspjelih trudnoća. Analiza je provedena na podacima prikupljenim iz formulara koje su majke, pacijentice, samostalno ispunile prilikom rutinske

obrade. Pacijentice su grupirane na temelju broja izgubljenih trudnoća i broja uspješnih trudnoća te na temelju kromosomopatija zabilježenih kod njihovih analiziranih plodova.

Slika 4.12. prikazuje raspodjelu apsolutnih (u zagradi) i relativnih frekvencija pojedinih aberacija po skupinama određenim na temelju broja izgubljenih trudnoća. Ukupno je osam pacijentica imalo jedan spontani gubitak trudnoće, a 10 pacijentica imalo je dva spontana gubitka trudnoće. Tri spontana gubitka trudnoće imalo je sedam pacijentica, dok su četiri spontana gubitka trudnoće imale dvije pacijentice.



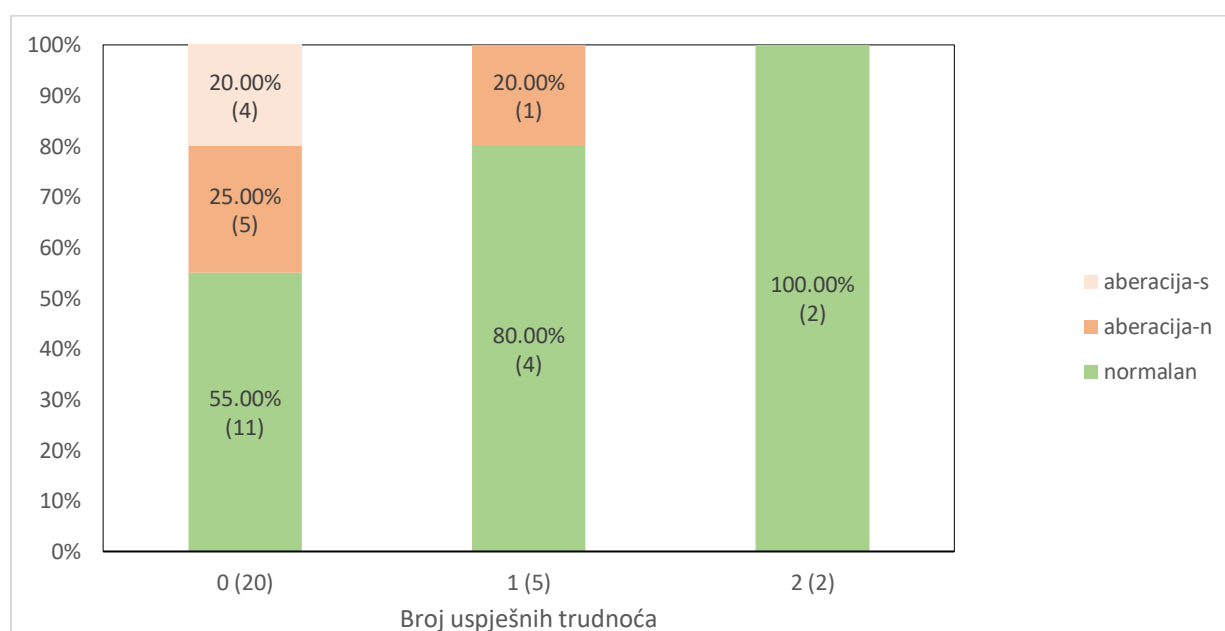
Slika 4.12. Apsolutne i relativne frekvencije pojedinih aberacija po skupinama određenim na temelju broja izgubljenih trudnoća. Aberacija-s – strukturna aberacija; aberacija-n – numerička aberacija.

Na temelju broja izgubljenih trudnoća 19 pacijentica (70.4%) može se svrstati u podskupinu s ponavljajućim spontanim gubicima trudnoća. Statistička značajnost ove frekvencije nije testirana jer je jedna od indikacija za provođenje citogenomske analize bila dijagnoza više spontanih pobačaja. Apsolutne i relativne frekvencije pacijentica s pojedinim rezultatom citogenomske analize u ovoj podskupini prikazane su u Tablici 4.3. Normalan kariotip ploda detektiran je u 63.2% uzoraka, numerička aberacija kod 21.0% uzoraka, a strukturna aberacija u 26.3% uzoraka.

Slika 4.13. prikazuje raspodjelu apsolutnih (u zagradi) i relativnih frekvencija pojedinih aberacija po skupinama određenim na temelju broja uspješnih trudnoća. Najveći broj pacijentica (20) nije imao uspješnih trudnoća, dok je pet pacijentica imalo jednu uspješnu trudnoću, a njih dvije imale su dvije uspješne trudnoće.

Tablica 4.3. Apsolutne i relativne frekvencije broja majki (pacijentica) u podskupini s ponavljajućim spontanom gubitkom trudnoće prema nalazu citogenomske analize. SA – strukturna aberacija, NA – numerička aberacija; k. – kariotip.

<i>Skupina</i>	<i>Broj pacijentica</i>	<i>Relativna frekvencija</i>
<i>Normalan k.</i>	12	0.632
<i>NA</i>	4	0.210
<i>SA</i>	4	0.210
<b>UKUPNO</b>	<b>19</b>	<b>1</b>



Slika 4.13. prikazuje raspodjelu apsolutnih (u zagradi) i relativnih frekvencija pojedinih aberacija po skupinama određenim na temelju broja uspješnih trudnoća. Aberacija-s – strukturna aberacija; aberacija-n – numerička aberacija.

Ukupno 20 pacijentica (74.1%) nije imalo uspješnih prethodnih trudnoća, dok je njih 7 (25.9%) imalo barem jednu uspješnu trudnoću. U skupini pacijentica kod čijih je plodova detektirana strukturna kromosomska aberacija udio onih koje nisu imale ni jednu uspješnu prethodnu trudnoću iznosio je 100.0%. Bez uspješnih prethodnih trudnoća u skupini s numeričkim kromosomskim aberacijama bilo je pet pacijentica (83.3%), a jedna pacijentica imala je jednu uspješnu trudnoću (16.7%). Kod jedne pacijentice iz skupine s numeričkim aberacijama nije bilo podataka te je ona isključena iz analize.

U skupini pacijentica kod čijeg je ploda zabilježen normalan kariotip, njih 11 (64.7%) nije imalo uspješnih trudnoća, no četiri pacijentice imale su jednu uspješnu (23.5%), a dvije pacijentice imale su dvije uspješne trudnoće (11.7%) što čini ukupno 6 pacijentica s uspješnim trudnoćama (35.3%). Za dvije pacijentice iz ove skupine nije bilo podataka te su isključene iz analize.

Udio pacijentica iz skupine s normalnim kariotipom među pacijenticama s uspješnim prethodnim trudnoćama iznosi 85.7%, a udio pacijentica iz skupine s numeričkim aberacijama iznosi 14.3%. Udio pacijentica iz skupine sa strukturnim aberacijama iznosi 0%. Tablica 4.4. prikazuje broj i relativne frekvencije broja pacijentica s uspješnim trudnoćama po skupinama.

Tablica 4.4. Apsolutne i relativne frekvencije broja majki (pacijentica) s barem jednom uspješnom trudnoćom po skupinama temeljenim na rezultatima citogenomske analize. SA – strukturna aberacija, NA – numerička aberacija; k. – kariotip.

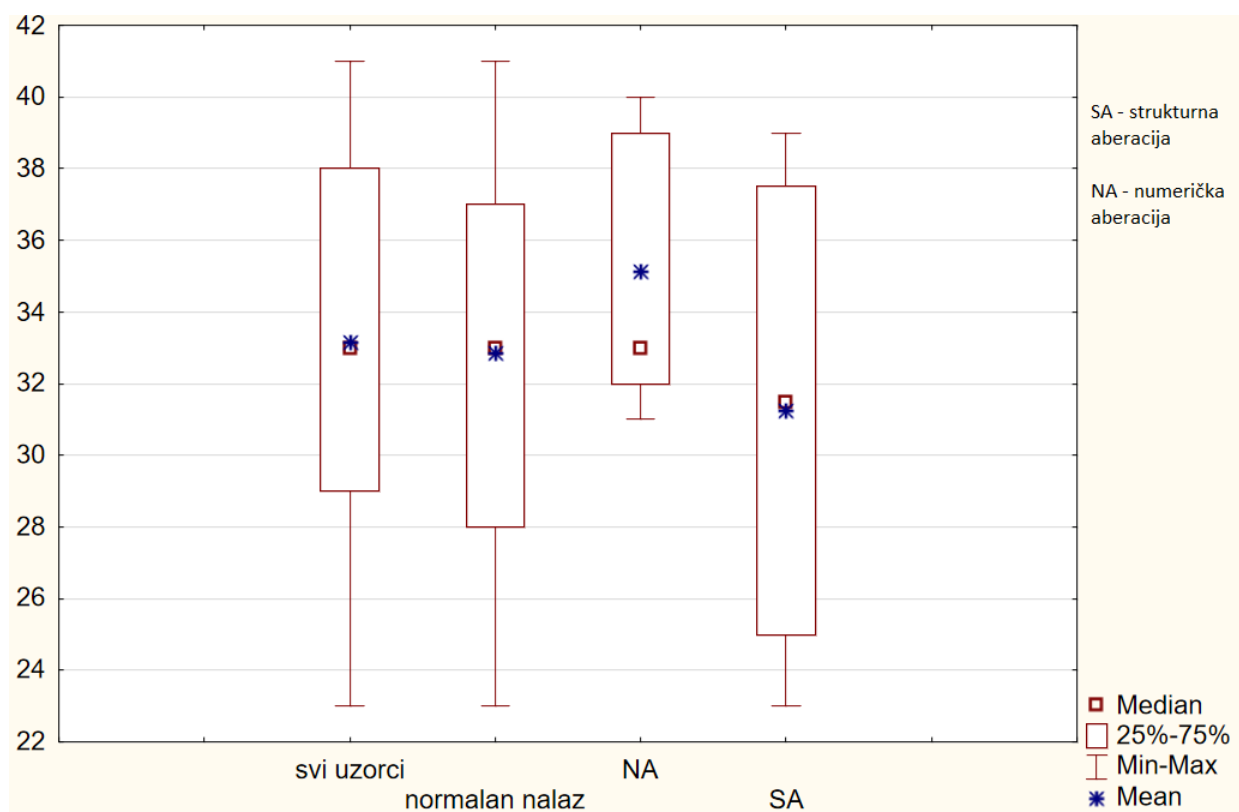
<i>Skupina</i>	<i>Broj pacijentica</i>	<i>Relativna frekvencija</i>
<i>Normalan k.</i>	<i>6</i>	<i>0.857</i>
<i>NA</i>	<i>1</i>	<i>0.143</i>
<i>SA</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<b><i>UKUPNO</i></b>	<b><i>7</i></b>	<b><i>1</i></b>

$\chi^2$ -test pokazao je da postoji statistički značajna razlika između frekvencija uspješnosti trudnoće i rezultata citogenomske analize ( $\chi^2=8.86$ ; granična vrijednost = 3.84 za jedan stupanj slobode,  $p<0.05$ ).

#### **4.4.2. ANALIZA DOBI MAJKI U ODNOSU NA ZABILJEŽENE KROMOSOMOPATIJE**

Analiza je provedena na ukupnom broju uzoraka. Srednja vrijednost dobi majki, odnosno pacijentica u svim skupinama zajedno iznosila je  $33.17\pm 5.19$  godina. Najvišu srednju vrijednost dobi imale su pacijentice u skupini s numeričkim kromosomskim aberacijama ploda, koja je iznosila  $35.14\pm 3.98$  godina, a najmanju srednju vrijednost dobi imale su pacijentice u skupini sa strukturnim kromosomskim aberacijama koja je iznosila  $31.25\pm 7.5$  godina. Pacijentice u skupini

s normalnim kariotipom ploda imale su srednju vrijednost dobi od  $32.74 \pm 5.01$  godina. Slika 4.14. prikazuje raspodjelu dobi pacijentica po navedenim skupinama.



Slika 4.14. Vrijednosti dobi majki, odnosno pacijenticama po skupinama. Prikazane su srednje vrijednosti (mean), medijan, minimalne i maksimalne vrijednosti te interkvantilni raspon.

Podaci su transformirani kako bi se ujednačila varijanca između skupina te je provedena ANOVA koja nije pokazala statističku značajnost razlika između skupinama ( $p=0.46$ ), no također valja uzeti u obzir mali broj uzoraka, posebno u skupini sa strukturnim aberacijama. Numeričke i strukturne aberacija zatim su grupirane zajedno te je proveden t-test između podataka u skupini s normalnim nalazom i skupini s kromosomskim aberacijama. T-test također nije pokazao statističku značajnost razlika između dobi majki u ovako grupiranim skupinama ( $p=0.40$ , granična vrijednost za 28 stupnjeva slobode  $=2.05$ ,  $p<0.05$ ).

## 5. RASPRAVA

### 5.1. REZULTATI CITOGENETSKE ANALIZE I a-CGH-a

Rezultati istraživanja pokazali su statistički značajnu razliku u uspješnosti između citogenetske analize (73.3%) i a-CGH (100%). Ovaj rezultat u skladu je s literaturnim podacima. Reddy i sur. (2012) proveli su istraživanje na kasnim spontano izgubljenim trudnoćama te je uspješnost citogenetske analize u njihovom istraživanju iznosila 70.5% u odnosu prema 87.4% uspješnosti a-CGH. Pauta i sur. (2018) u preglednom članku donose rezultate ukupno 23 studije koje su uspoređivale uspješnost citogenetske analize i tehnika molekularnih mikročipova na trudnoćama izgubljenim do 20. tjedna trudnoće. Uspješnost mikročipa u njihovom istraživanju iznosila je ukupno 95%, a uspješnost citogenetskih analiza 68%.

Povećana uspješnost a-CGH u ovom istraživanju djelomično se može pripisati razlikom u broju testiranih uzoraka.

Iako je na temelju literaturnih podataka bilo očekivano da će udio detektiranih kromosopatija pomoću a-CGH biti značajno veći od udjela kromosopatija detektiranih pomoću citogenetske analize (Pauta i sur. 2018; Sahoo i sur. 2017), statistička značajnost ovih razlika nije potvrđena. Međutim, udio kromosopatija detektiranih pomoću a-CGH iznosio je 30.0% u usporedbi s udjelom kromosopatija detektiranih pomoću citogenetske analize od 20.0%.

Značajna razlika u uspješnosti a-CGH u odnosu na citogenetsku analizu po tromjesečjima trudnoće dokazana je samo u prvom tromjesečju. Na temelju istraživanja Reddy i sur. (2012) očekivana je potvrda značajnosti i u drugom i trećem tromjesečju. Unatoč naoko velikih razlika u uspješnosti kada se gledaju udjeli uspješnih odnosno neuspješnih analiza, na dostupnom broju uzoraka nije bilo moguće dokazati statističku značajnost.

Usporedbom rezultata na pojedinim uzorcima potvrđene su glavne prednosti, ali i ograničenja a-CGH. Sukladno istraživanjima van den Berg i sur. (2012), Dórie i sur. (2009) te McQueen i Lathi (2019), pomoću a-CGH nije potvrđen nalaz mozaicizma detektiranog citogenetskom analizom kao ni balansirane strukturne aberacije. U slučaju balansirane strukturne kromosomske aberacije a-CGH služi za suptilnu analizu točaka loma da bi se potvrdila ili

isključila prisutnost malih patoloških delecija ili duplikacija. Normalan nalaz ove strukturne aberacije potvrdio je njezinu balansiranost. Pomoću a-CGH također je detektirana jedna strukturna aberacija u mozaičnom obliku koja je u temeljem citogenetske analize imala normalan kariotip, a zadovoljavajuća informacija dobivena je za svaki uzorak kod kojeg citogenetska analiza nije dala rezultat. Kod mozaičnih oblika kod a-CGH koristi se nativno tkivo za izolaciju DNA, dok se kod citogenetske analize u kulturi stanica pobačenog ploda mitotskim dijeljenjem može diskriminirati stanična linija sa strukturnom aberacijom zbog čega može ostati nedetektirana.

U skupini s normalnim kariotipom pomoći a-CGH pronađena je samo jedna strukturna kromosomska aberacija. Test statističke značajnosti proveden je, ali je njegova snaga u ovom slučaju izrazito mala. Udio ove detektirane kromosomske aberacije iznosio je 6.2%, što je usporedivo s rezultatima Shimokawe i sur. (2006) koji su detektirali 10.0% kromosomskih aberacija u jednako definiranoj skupini od 20 uzoraka. Ova strukturna aberacija bila je veličine 19.5 Mb.

U skupini bez rezultata citogenetske analize rezultati a-CGH pokazali su se posebno korisni. Udio kromosomskih aberacija bio je nešto viši nego u ostalim uzorcima (50.0% u odnosu na 31.2%). Međutim, zbog ograničenja metode, ne može se sa sigurnošću reći da uzorci kod kojih je rezultat a-CGH pokazao normalan kariotip nemaju balansiranu strukturnu kromosomsku aberaciju, mozaicizam ispod 20% ili triploidiju (van den Berg i sur. 2012; Dória i sur. 2009; McQueen i Lathi 2019). Na temelju rezultata a-CGH u ovoj skupini kod četiri pacijentice otkriven je najvjerojatniji uzrok spontanog gubitka trudnoće.

U skupini s detektiranim kromosomskim aberacijama potvrđen je nalaz za četiri uzorka. Preostala dva rezultata u skladu su s očekivanjima. Kod strukturne kromosomske aberacije detektirane pomoću citogenetske analize potvrđena je njezina nebalansiranost te su točke loma određene s većom preciznošću.

Ukupna učestalost kromosomskih aberacija u svim uzorcima iznosila je 36.7%, što je dvostruko manje od procjena prema McQueen i Lathi (McQueen i Lathi 2019). Međutim, kako navodi Warburton (1987), gotovo je nemoguće odrediti točan udio kromosomskih aberacija u rano izgubljenim trudnoćama. Zastupljenost numeričkih kromosomskih aberacija u odnosu na



sve aberacije (63.7%) manja je od zastupljenosti kod Goddjin i Leschot (86%), ali je veća u odnosu na zastupljenost u istraživanju Azmanova i sur. (31%). Zastupljenost strukturnih aberacija iznosi 36.3% i veća je od zastupljenosti od 17% prema Azmanova i sur. (2007) te svega 6% prema Goddjin i Leschot (2000). Mozaičke aberacije u ovom istraživanju svrstane su u numeričke odnosno strukturne, ovisno o tipu patološke promjene u staničnim linijama, što djelomično utječe na razlike u zastupljenosti aberacija. Još jedno od mogućih objašnjenja ovih razlika leži u dizajnu istraživanja i kriterijima za odabir pacijentica za a-CGH analizu.

Sukladno literaturnim podacima (Dória i sur. 2009), očekivano je da će razlika između broja detektiranih kromosopatija korištenjem kombinacije citogenetske analize i a-CGH i same citogenetske analize biti statistički značajna. U ovom istraživanju statistička značajnost nije dokazana.

Kada se uzorci grupiraju prema tromjesečju, zastupljenost kromosomskih aberacija u prvom tromjesečju iznosi 61.5%. Ovaj rezultat veći je od udjela od 50% koji navodi Jenderny (2014). Ova razlika u udjelu barem djelomično može se objasniti malim brojem uzoraka. Zastupljenost kromosomskih aberacija u drugom tromjesečju iznosi 27.3%, što je pak usporedivo s 30% prema Jenderny (2014). Suprotno istraživanju Rebele (2017), koji navodi učestalost kromosomskih aberacija u spontanim gubicima trudnoće u trećem tromjesečju od 8-13%, kromosomske aberacije u trećem tromjesečju nisu zabilježene.

Analiza gestacijske dobi spontanog gubitka trudnoće po skupinama usprkos rezultatu ANOVA testa pokazuje tendenciju najmanje gestacijske dobi kod plodova s numeričkim aberacijama, najveće gestacijske dobi kod plodova s normalnim kariotipom, dok plodovi sa strukturnim aberacijama po gestacijskoj dobi spadaju između ove dvije skupine.

Statistički značajna razlika između gestacijske dobi plodova s normalnim kariotipom i plodova s kromosomskim aberacijama u skladu je s rezultatima istraživanja Dórie i sur. (2009). Međutim, srednja vrijednosti gestacijske dobi u ovom istraživanju bile su nešto više: 18.2 tjedna kod uzoraka s normalnim kariotipom u odnosu 12.6 tjedana te 12.7 tjedana u odnosu na 9.6 tjedana (Dória i sur. 2009).

Najveći broj pacijentica u istraživanju imao je dvije izgubljene trudnoće. Ovakav rezultat nije u skladu s rezultatima prema Devall i Coomasamy (2020), prema kojima najveći broj žena

ima jedan spontani gubitak trudnoće. Međutim, pacijentice u ovom istraživanju ne predstavljaju opću populaciju te je jedan od kriterija odabira bio ponovljeni spontani gubitak trudnoće.

Normalan kariotip pojavljuje se u najvećem udjelu (63.2%) pacijentica u podskupini s ponavljajućim spontanim gubitkom trudnoće, što je u suglasnosti s očekivanjima prema Rai i Regan (2006). Kod ovih pacijentica, kao i kod pacijentica s jednom izgubljenom trudnoćom i rezultat citogenomske analize najmanje je informativan u daljnjem planiranju trudnoće.

Relativno veliki udio numeričkih kromosomskih aberacija kod pacijentica s jednom izgubljenom trudnoćom (37.5%; 50.0% svih numeričkih kromosomskih aberacija) može se objasniti *de novo* mehanizmima nastanka numeričkih aberacijama kod sporadičnih spontanih gubitaka trudnoće koje navode van den Berg i ostali (2012) te Goddjin i Leschot (2000).

Na temelju analize prethodnih trudnoća vidi se da majke, odnosno pacijentice čiji je plod temeljem citogenomske analize imao strukturnu kromosomsku aberaciju nisu ni u jednom slučaju imale uspješnu trudnoću. Sve ove pacijentice spadaju u podskupinu s ponavljajućim gubicima trudnoće te je za njih rezultat citogenomske analize najinformativniji u daljnjem planiranju trudnoće.

U ovom istraživanju nije pokazana povezanost dobi majke s tipom kromosomske aberacije, unatoč tome što se očekuje povećani broj numeričkih aberacija s porastom dobi majke (Bunt i Bunt 2014; Cuckle i Morris 2021). Međutim, može se primijetiti veći interkvantilni raspon dobi majki kod skupine sa strukturnim kromosomskim aberacijama.

## **5.2. PROCJENA RIZIKA KOD DALJNJEG PLANIRANJA TRUDNOĆE**

Tri pacijentice, kod čijih je plodova detektirana nebalansirana strukturna aberacija, upućene su na daljnju genetičku obradu i u genetsko savjetovalište.

Kod uzorka s gubitkom jedne kopije regije 8p23.3p12, uz dobitak jedne kopije regije 16p13.3-p12.1 utvrđeno je postojanje 40 morbidnih gena na zahvaćenoj regiji kromosoma 8 te 66 morbidnih gena na zahvaćenoj regiji kromosoma 16 prema bazi OMIM ([www.omim.org](http://www.omim.org)). Na temelju rezultata a-CGH provedena je naknadna analiza kariograma majke i oca ploda. Utvrđena

je naoko balansirana translokacija između kratkih krakova kromosoma 8 i 16 kod oca. Ovaj uzorak primjer je nebalansirane translokacije naslijeđene od oca s balansiranom recipročnom translokacijom.

Kod uzorka s gubitkom jedne kopije regije 4p16.3-p15.32, uz dobitak jedne kopije regije 5p15.33-p14.3 utvrđeno je postojanje 32 morbidna gena na zahvaćenoj regiji kromosoma 4 te 15 morbidnih gena na zahvaćenoj regiji kromosoma 5 prema bazi OMIM ([www.omim.org](http://www.omim.org)). Terminalni gubitak kraka 4p također uključuje i Wolf-Hirschhorn. Prema bazama Decipher i ClinVar opisano je više sličnih varijanti gubitka jedne kopije zahvaćene regije kromosoma 4, pri čemu su sve varijante opisane kao patogene. Varijante dobitka jedne kopije zahvaćene regije kromosoma 5 opisane u ovim bazama variraju u položaju, ali su također sve opisane kao patogene ([www.deciphergenomics.org](http://www.deciphergenomics.org), [www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar)). Naknadnom analizom kariotipa roditelja ploda utvrđena je naoko balansirana recipročna translokacija između kratkih krakova kromosoma 4 i 5 kod majke. Ovaj uzorak primjer je nebalansirane translokacije naslijeđene od majke s balansiranom recipročnom translokacijom.

Kod uzorka s gubitkom regije 19p13.3p13.1 u mozaičnom obliku utvrđeno je postojanje 94 morbidna gena opisanih u bazi OMIM. Uz terminalni gubitak kraka 19p opisuje se i 19p13.13 multigeniski delecijski sindrom ([www.omim.org](http://www.omim.org)). Roditeljima je preporučena citogenetska obrada kako bi se utvrdilo podrijetlo ove patogene varijante.

Pacijentice kod čijih je plodova detektirana numerička kromosomska aberacija kao i pacijentica kod čijeg je ploda detektiran mozaicizam citogenetskom analizom upućene su u genetsko savjetovalište radi utvrđivanja genetskog rizika u daljnjem planiranju trudnoće.

Kod pacijentica kod kojih su rezultati citogenomske analize bili normalni uzrok spontanih gubitaka trudnoće potrebno je potražiti u drugim uzrocima, sukladno preporukama (Devall i Coomarasamy 2020; Garrido-Gimenez i Alijotas-Reig 2015; Rai i Regan 2006; Stephenson i Kutteh 2007).

## 6. ZAKLJUČCI

- Uspješnost a-CGH kod analize (100%) uzoraka spontano izgubljenih trudnoća statistički značajno je viša od uspješnosti citogenetske analize
- Uspješnost a-CGH u odnosu na citogenetsku analizu kod uzoraka spontano izgubljenih trudnoća statistički značajno je veća samo u prvom tromjesečju trudnoće
- Uz pomoć a-CGH detektirana je samo jedna kromosomska aberacija s patogenim CNV u skupini s normalnim kariotipom
- A-CGH pokazala je udio kromosomskih aberacija od 50.0% na uzorcima na kojima citogenetska analiza nije dala rezultat
- Ukupna učestalost kromosomskih aberacija iznosila je 33.3%, uz najveći udio numeričkih aberacija
- Udio kromosomskih aberacija po tromjesečjima iznosi 61.5% u prvom, 27.3% u drugom i 0% kod trećeg tromjesečja
- Primijećena je tendencija rasta gestacijske dobi spontanog pobačaja ploda, gdje su uzorci s numeričkim aberacijama pobačeni ranije od uzoraka sa strukturnim aberacijama, a oni s normalnim kariotipom pobačeni su najkasnije
- Pacijentice s ponavljajućim spontanom gubitkom trudnoće imaju plodove s normalnim kariotipom (63.2%), a kod pacijentica s jednom izgubljenom trudnoćom povećan je udio numeričkih aberacija (37.5%)
- Pacijentice kod čijih je plodova detektirana strukturna kromosomska aberacija nisu imale uspješnih trudnoća
- Dob majki nije povezana s tipom kromosomske aberacije
- Najveći značaj u smislu prepoznavanja genetskog rizika za daljnje planiranje trudnoće imale su pacijentice kod čijih je plodova detektirana strukturna kromosomska aberacija, kako nositeljstvo istih nosi značajan rizik u idućim trudnoćama

## 7. LITERATURA

- Alkan C., Coe B.P., Eichler E.E. (2011): Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat. Rev. Genet.* **12**: 363–376.
- Ambry Genetics (2020). *Copy Number Variation ( CNV ) Classification Scheme* august 2020.
- Azmanov D.N., Milachich T. V., Zaharieva B.M., Michailova G.I., Dimitrova V.G., Karagiozova Z.H., Maznejkova V.T., Chernev T.A., Toncheva D.I. (2007): Profile of chromosomal aberrations in different gestational age spontaneous abortions detected by comparative genomic hybridization. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **131**: 127–131.
- Ballif B.C., Rorem E.A., Sundin K., Lincicum M., Gaskin S., Coppinger J., Kashork C.D., Shaffer L.G., Bejjani B.A. (2006): Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. *Am. J. Med. Genet. Part A* **140A**: 2757–2767.
- Berg I.M. van den, Laven J.S.E., Stevens M., Jonkers I., Galjaard R.J., Gribnau J., Hikke van Doorninck J. (2009): X Chromosome Inactivation Is Initiated in Human Preimplantation Embryos. *Am. J. Hum. Genet.* **84**: 771–779.
- Berg M.M.J. van den, Maarle M.C. van, Wely M. van, Goddijn M. (2012): Genetics of early miscarriage. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1822**: 1951–1959.
- Bunt C.W., Bunt S.K. (2014): Role of the Family Physician in the Care of Children with Down Syndrome. *Am. Fam. Physician* **90**: 851–858.
- Carlson B.M. (2014): *Diagnosis and Treatment of Birth Defects PhD, in Human Embryology and Developmental Biology.* University of Michigan. Michigan (Fifth Edition).
- Cavadino A., Morris J.K. (2017): Revised estimates of the risk of fetal loss following a prenatal diagnosis of trisomy 13 or trisomy 18. *Am. J. Med. Genet. Part A* **173**: 953–958.
- Chung C.C.Y., Chan K.Y.K., Hui P.W., Au P.K.C., Tam W.K., Li S.K.M., Leung G.K.C., Fung J.L.F., Chan M.C.Y., Luk H.M., Mak A.S.L., Leung K.Y., Tang M.H.Y., Chung B.H.Y., Kan A.S.Y. (2020): Cost-effectiveness analysis of chromosomal microarray as a primary test for prenatal diagnosis in Hong Kong. *BMC Pregnancy Childbirth* **20**: 1–15.

- Cuckle H., Morris J. (2021): Maternal age in the epidemiology of common autosomal trisomies. *Prenat. Diagn.* **41**: 573–583.
- Cui X., Cui Y., Shi L., Luan J., Zhou X., Han J. (2018): A basic understanding of Turner syndrome: Incidence, complications, diagnosis, and treatment. *Intractable Rare Dis. Res.* **7**: 223–228.
- Devall A.J., Coomarasamy A. (2020): Sporadic pregnancy loss and recurrent miscarriage. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **69**: 30–39.
- [dgv.tcag.ca/dgv/app/home](http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home) (pristupljeno 25.08.2021).
- Dória S., Carvalho F., Ramalho C., Lima V., Francisco T., Machado A.P., Brandão O., Sousa M., Matias A., Barros A. (2009): An efficient protocol for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous miscarriages or foetal deaths. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **147**: 144–150.
- Dugoff L., Norton M.E., Kuller J.A. (2016): The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **215**: B2–B9.
- Garrido-Gimenez C., Alijotas-Reig J. (2015): Recurrent miscarriage: Causes, evaluation and management. *Postgrad. Med. J.* **91**: 151–162.
- [genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/) (pristupljeno 24.08.2021).
- Gersen S. L., Keagle M. B. (2005): *The principles of clinical cytogenetics*. Springer-Verlag New York.
- Goddijn M., Leschot N.J. (2000): Genetic aspects of miscarriage. *Bailliere's Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **14**: 855–865.
- Goidin D. (2019): Quality Control and data analysis aCGH user meeting – Croatia.
- Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C., Gelbart W. (2000): *An Introduction to Genetic Analysis*. New York: W. H. Freeman 7th edition.
- Hardy K., Hardy P.J. (2015): 1(st) trimester miscarriage: four decades of study. *Transl. Pediatr.* **4**: 189–200.
- Heinrich T., Nanda I., Rehn M., Zollner U., Frieauff E., Wirbelauer J., Grimm T., Schmid M.

- (2012): Live-born trisomy 22: Patient report and review. *Mol. Syndromol.* **3**: 262–269.
- Hu X., Miao M., Bai Y., Cheng N., Ren X. (2018): Reproductive factors and risk of spontaneous abortion in the jinchang cohort. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **15**: 2444.
- Hui A.S., Chau M.H.K., Chan Y.M., Cao Y., Kwan A.H., Zhu X., Kwok Y.K., Chen Z., Lao T.T., Choy K.W., Leung T.Y. (2021): The role of chromosomal microarray analysis among fetuses with normal karyotype and single system anomaly or nonspecific sonographic findings. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **100**: 235–243.
- Hutaff-Lee C., Cordeiro L., Tartaglia N. (2013): *Handbook of Clinical Neurology*. U: Dulac O., Lasseonde M., Sarnat H. B. (ur) Cognitive and medical features of chromosomal aneuploidy. Elsevier, str. 273-279.
- Ibarra-Ramírez M., Martínez-de-Villarreal L.E. (2016): Clinical and genetic aspects of Turner's syndrome. *Med. Univ.* **18**: 42–48.
- Iwamoto K., Bundo M., Ueda J., Nakano Y., Ukai W. (2007): Detection of Chromosomal Structural Alterations in Single Cells by SNP Arrays: A Systematic Survey of Amplification Bias and Optimized Workflow. *PLoS One* **2**: 1306.
- Jenderny J. (2014): Chromosome aberrations in a large series of spontaneous miscarriages in the German population and review of the literature. *Mol. Cytogenet.* **7**: 38.
- Karampetsou E., Morrogh D., Chitty L. (2014): Microarray Technology for the Diagnosis of Fetal Chromosomal Aberrations: Which Platform Should We Use? *J. Clin. Med.* **3**: 663–678.
- LaFramboise T. (2009): Single nucleotide polymorphism arrays: A decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res.* **37**: 4181–4193.
- Laisk T., Soares A.L.G., Ferreira T., Painter J.N., Censin J.C., Laber S., Bacelis J., Chen C.Y., ... Lindgren C.M. (2020): The genetic architecture of sporadic and multiple consecutive miscarriage. *Nat. Commun.* **11**: 5980.
- Larsen E.C., Christiansen O.B., Kolte A.M., Macklon N. (2013): New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med.* **11**: 154.
- McQueen D.B., Lathi R.B. (2019): Miscarriage chromosome testing: Indications, benefits and

methodologies. *Semin. Perinatol.* **43**: 101–104.

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. *Genet. Med.* **7**: 251–263.

Pauta M., Grande M., Rodriguez-Revenga L., Kolomietz E., Borrell A. (2018): Added value of chromosomal microarray analysis over karyotyping in early pregnancy loss: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **51**: 453–462.

Pereza N., Peterlin B. Genetika ponavljajućih spontanijh pobačaja : napredci i prijepori Genetics of recurrent spontaneous abortion : advances and controversies. **52**: 203–210.

Popescu F., Jaslow C.R., Kutteh W.H. (2018): Recurrent pregnancy loss evaluation combined with 24-chromosome microarray of miscarriage tissue provides a probable or definite cause of pregnancy loss in over 90% of patients. *Hum. Reprod.* **33**: 579–587.

Rai R., Regan L. (2006): Recurrent miscarriage. *Lancet (London, England)* **368**: 601–611.

Rebele E.C. (2017): Third Trimester Fetal Loss. *Obstet. Care* 236–244

Reddy U.M., Page G.P., Saade G.R., Silver R.M., Thorsten V.R., Parker C.B., Pinar H., Willinger M., Stoll B.J., Heim-Hall J., Varner M.W., Goldenberg R.L., Bukowski R., Wapner R.J., Drews-Botsch C.D., O'Brien B.M., Dudley D.J., Levy B. (2012): Karyotype versus Microarray Testing for Genetic Abnormalities after Stillbirth. *N. Engl. J. Med.* **367**: 2185–2193.

Redon R., Ishikawa S., Fitch K.R., Feuk L., Perry G.H., Andrews T.D., Fiegler H., Shapero M.H., Carson A.R., Chen W., Cho E.K., Dallaire S., Freeman J.L., González J.R., Gratacòs M., Huang J., Kalaitzopoulos D., Komura D., MacDonald J.R., Marshall C.R., Mei R., Montgomery L., Nishimura K., Okamura K., Shen F., Somerville M.J., Tchinda J., Valsesia A., Woodwark C., Yang F., Zhang J., Zerjal T., Zhang J., Armengol L., Conrad D.F., Estivill X., Tyler-Smith C., Carter N.P., Aburatani H., Lee C., Jones K.W., Scherer S.W., Hurles M.E. (2006): Global variation in copy number in the human genome. *Nature* **444**: 444–454.

Sahoo T., Dzidic N., Strecker M.N., Commander S., Travis M.K., Doherty C., Weslie Tyson R.,



- Mendoza A.E., Stephenson M., Dise C.A., Benito C.W., Ziadie M.S., Hovanes K. (2017): Comprehensive genetic analysis of pregnancy loss by chromosomal microarrays: outcomes, benefits, and challenges. *Genet. Med.* **19**: 83–89.
- Shah M.S., Cinnioglu C., Maisenbacher M., Comstock I., Kort J., Lathi R.B. (2017): Comparison of cytogenetics and molecular karyotyping for chromosome testing of miscarriage specimens. *Fertil. Steril.* **107**: 1028–1033.
- Shimokawa O., Harada N., Miyake N., Satoh K., Mizuguchi T., Niikawa N., Matsumoto N. (2006): Array Comparative Genomic Hybridization Analysis in first-Trimester Spontaneous Abortions With „Normal“ Karyotypes. *Am. J. Hum. Genet.* **140A**: 1931–1935.
- Simpson J.L. (1990): Incidence and timing of pregnancy losses: Relevance to evaluating safety of early prenatal diagnosis. *Am. J. Med. Genet.* **35**: 165–173.
- Srebniak M., Boter M., Oudesluijs G., Joosten M., Govaerts L., Opstal D. Van, Galjaard R.J.H. (2011): Application of SNP array for rapid prenatal diagnosis: Implementation, genetic counselling and diagnostic flow. *Eur. J. Hum. Genet.* **19**: 1230–1237.
- Stephenson M., Kutteh W. (2007): Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss. *Clin. Obstet. Gynecol.* **50**: 132–145.
- Strumpf E., Lang A., Austin N., Derksen S.A., Bolton J.M., Brownell M.D., Chateau D., Gregory P., Heaman M.I. (2021): Prevalence and clinical, social, and health care predictors of miscarriage. *BMC Pregnancy Childbirth* **21**: 1–9.
- Tucker T., Schlade-Bartusiak K., Eydoux P., Nelson T.N., Brown L. (2012): Uniparental disomy: Can SNP array data be used for diagnosis? *Genet. Med.* **14**: 753–756.
- United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation, You D., Hug L., Mishra A., Blencowe H., Moran A., United Nations Children’s Fund, World Health Organization, World Bank Group, United Nations. Population division (2020). *A neglected tragedy : the global burden of stillbirths.*
- Vičić A., Stipoljev F. (2013): Biopsija korionskih resica. *Paediatr. Croat.* **57**: 374–381.
- Warburton D. (1987): Chromosomal causes of fetal death. *Clin Obstet Gynecol.* **30**: 268-77.

Witters G., Van Robays J., Willekes C., Coumans A., Peeters H., Gyselaers W., Fryns J. P. (2011): Trisomy 13, 18, 21, Triploidy and Turner syndrome: the 5T's. Look at the hands. *Facts, views & vision in ObGyn.* **3**: 15–21.

Wordsworth S., Buchanan J., Regan R., Davison V., Smith K., Dyer S., Campbell C., Blair E., Maher E., Taylor J., Knight S.J.L. (2007): Diagnosing idiopathic learning disability: A cost-effectiveness analysis of microarray technology in the National Health Service of the United Kingdom. *Genomic Med.* **1**: 35–45.

World Health Organization. *Manual of the International Statistical Classification of Diseases, Injuries and Causes of Death.* World Health Organization. Geneva, Switzerland, 1979.

[www.deciphergenomics.org](http://www.deciphergenomics.org) (pristupljeno 26.08.2021).

[www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/ginekologija/poremecaji-trudnoce/spontani-pobacaj](http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/ginekologija/poremecaji-trudnoce/spontani-pobacaj) (pristupljeno 10.08.2021).

[www.nature.com/scitable/definition/snp-295/](http://www.nature.com/scitable/definition/snp-295/) (pristupljeno 27.08.2021).

[www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar) (pristupljeno 15.08.2021).

[www.omim.org](http://www.omim.org) (pristupljeno 26.08.2021).

Zinaman M.J., O'Connor J., Clegg E.D., Selevan S.G., Brown C.C. (1996): Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil. Steril.* **65**: 503–509.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 14. prosinca 1993. godine u Zagrebu, gdje sam završila XV. gimnaziju 2012. godine. Nakon gimnazije upisala sam Medicinski fakultet u Zagrebu, gdje sam radila kao demonstrator na kolegijima Anatomija i Medicinska biologija. Nakon završene druge godine odlučila pauzirati godinu i promijeniti fakultet.

Tijekom 2014. godine provela sam dva tjedna kao student – volonter na Sveučilištu u Hohenheimu, u Stuttgartu u Njemačkoj. Akademske godine 2016/2017. upisala sam preddiplomski studij Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta. Tijekom ove razine studija provela sam semestar na Biološkom odsjeku Sveučilišta u Beču u sklopu studijskog boravka Erasmus programa. Preddiplomski studij završila sam s odličnim uspjehom, uz napomenu 'Cum Laude'. Akademske godine 2019/2020. upisala sam diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija.

Tijekom preddiplomskog studija radila sam kao demonstrator na kolegiju Mikrobiologija. Od 2017. godine članica sam Udruge studenata BIUS te sam prvo kao članica, a kasnije i kao jedna od voditeljica Sekcije za biospeleologiju, sudjelovala na istraživačkim projektima „Insula Tilagus 2017.“, „Insula Auris 2019.“ te „Žumberak 2020.“ U sklopu Sekcije za mrave sudjelovala sam na istraživačkom projektu „Šuma Žutica 2018.“ Također sam sudjelovala u studentskom projektu „Posjetitelji bez ulaznica“, a 2019. godine prisustvovala sam na Europskom simpoziju studenata biologije SymBioSE u Glasgowu, gdje sam održala prezentaciju o rezultatima rada Sekcije za biospeleologiju. Iste godine sudjelovala sam na studentskom seminaru o invazivnim vrstama Srbije (SIVS) te na Skupu speleologa, na kojem sam imala poster prezentaciju. Certifikat za rukovanje laboratorijskim životinjama dobila sam 2019. godine.

Honorarno radim kao instruktorka iskustvenog učenja u Hrvatskoj školi Outward Bound. Iskustvo rada s djecom i mladima kontinuirano stječem već dugi niz godina, kroz volontiranje u Odredu izviđača Javor, Zagreb.

Tečno govorim engleski jezik (C1), dok njemački koristim na nivou samostalnog korisnika (B1-B2). Odlično poznajem alate MS Office, a programima za obradu podataka rukujem na osnovnoj razini.