

АМНИОЦЕНТЕЗОМ ПОТВРЂЕН СЛУЧАЈ ТРИПЛОИДИЈЕ ФЕТУСА (69, XXX) НАКОН НЕИНВАЗИВНОГ СКРИНИНГ ТЕСТА СА ПОВЕЋАНИМ БИОХЕМИЈСКИМ РИЗИКОМ НА ХРОМОЗОМОПАТИЈЕ У ПРВОМ ТРИМЕСТРУ ТРУДНОЋЕ

Гордана Шошић¹, Ана Милошевић Ђерић², Тања Новаковић¹

¹Одсек цитогенетске дијагностике, Клиника за гинекологију и акушерство, Клинички центар „Крагујевац“, Крагујевац

²Општа болница, Здравствени центар, Ужице

THE CASE OF TRIPLOIDY OF FETUS (69, XXX) CONFIRMED BY AMNIOCENTESIS AFTER THE NON-INVASIVE SCREENING TEST WITH INCREASED BIOCHEMICAL RISK ON CHROMOSOMAL ANOMALIES IN THE FIRST THREE-MONTH PERIOD

Gordana Sosic¹, Ana Milosevic Djeric², Tanja Novakovic¹

¹Department for Cytogenetic Diagnosis, Clinic of Obstetrics and Gynecology, Clinical Center "Kragujevac", Kragujevac, Serbia

²General Hospital, Health Center, Uzice, Serbia

САЖЕТАК

Триплоидија је нумеричка хромозомска аберација с присутним екстрахромозомским хаплоидним сетом који по пореклу може бити матернални или патернални. У спонтаним побачајима у првом триместру трудноће триплоидија је једна од најзаступљенијих хромозомских аберација.

Пацијенткиња од 25 година, с првом трудноћом, без претходних спонтаних побачаја и без оптерећене личне и породичне анамнезе, примљена је у болницу у 17 недељи гестације због слабије виталности плода, едема плаценте, мултилокуларног тумефакта пореклом са јајника и повишених вредности Са 125. Ранији „дабл“ тест, у 12 недељи гестације, показао је повећан ризик за тризомију хромозома 21, иако су само биохемијски параметри узети у обзир. Установљено је да постоји триплоидија фетуса 69, XXX, уз високе вредности β-hCG (5,8261 МоМ), док су вредности PAPP биле благо повишене (1,4639 МоМ) у односу на умножак медијане (1 МоМ) за дату старост трудноће. Након спроведене дефинитивне дијагнозе, трудноћа је прекинута.

Неинвазивни пренатални скрининг тестови (Double и Triple тест) у случајевима триплоидије показују повећан ризик за хромозомопатије. Триплоидија се потврђује инвазивним пренаталним методама (биопсија хорионских ресица, амниоцентеза, кордоцентеза) и на основу клиничких налаза. Триплоидија фетуса је стање које је летално, а у пренаталној дијагностици представља редак цитогенетски налаз. Истраживање и проналажење биохемијских маркера који су специфични за ово стање омогућило би детекцију триплоидије у раној трудноћи.

Кључне речи: хромозомске аберације; триплоидија; пренатална дијагноза.

УВОД

Триплоидија је нумеричка хромозомска аберација код које је присутан екстра хаплоидан сет хромозома.

ABSTRACT

Triploidy is the numerical chromosome aberration with present extra chromosome haploid set which can be maternal or paternal by origin. In the case of miscarriages during the first three months (of the pregnancy) triploidy is one of the most usual chromosome aberrations.

Female patient aged 25 years with the first pregnancy, no previous miscarriages, no encumbered personal and family medical history, was admitted to a hospital in 17th gestational week due to lower fetal viability, placental edema, and multilocular tumefaction originating from the ovaries and elevated Ca125. Previous "Double" test, at 12th gestational week, had showed the increased risk for trisomy of chromosome 21, although only biochemical parameters had been taken into account. It was found that there was fetal triploidy 69, XXX, with high levels of β-hCG (MoM 5.8261), whereas PAPP were slightly elevated (1.4639 MoM) compared to multiple of the median (MoM 1) for the pregnancy term. Following the definite diagnosis, the pregnancy was terminated.

Non-invasive prenatal screening tests (Double, Triple test) in case of triploidy show increased risk for chromosomal anomalies. The triploidy is confirmed by invasive prenatal methods (chorionic villus sampling, amniocentesis, and cordocentesis) and on the basis of clinical analysis. The triploidy of fetus is the condition which is lethal. It also represents a rare cytogenetic medical finding during prenatal diagnostics. The research and finding of biochemical markers, which are specific for this kind of condition, would enable detection of triploidy in the early pregnancy.

Key words: chromosome aberrations; triploidy; prenatal diagnosis.

Уместо нормалног броја хромозома, који је у хуманим соматским ћелијама 46, триплоидан фетус поседује 69 хромозома. Екстра хромозомски сет може потицати од оца или мајке. Триплоидија фетуса је присутна у 1%

утврђених трудноћа и може се наћи у око 15% спонтаних побачаја узрокованих хромозомским аберацијама. Највећи број трудноћа са триплоидним фетусом завршава се спонтаним побачајима између 7. и 17. недеље гестације (1). Инциденца триплоидије износи око 1 : 50.000 живорођене деце (2). Већина живорођених триплоидних фетуса умире у раном постнаталном периоду, док их је само неколико преживело дуже од 60 дана (3). Триплоидија се пренатално дијагностификује цитогенетском анализом ћелија добијених инвазивним методама (CVS, AC и CC). Студије показују да се многи случајеви триплоидије откривају након урађене амниоцентезе која је индикована лошим вредностима неинвазивних пренаталних скрининг тестова (ултразвучно мерење NT-а, Double и Triple тест). Циљ овог рада је да прикаже редак случај пацијенткиње од 25 година, с првом трудноћом и присуством триплоидије, без претходних спонтаних побачаја и без оптерећене личне и породичне анамнезе.

ПРИКАЗ СЛУЧАЈА

Пацијенткиња од 25 година јавила се у Генетско саветовалиште КЦ Крагујевац у 14 NG. Пацијенткињи је то била прва трудноћа, без претходних побачаја и негативне личне и породичне анамнезе. Због лоших вредности пренаталног скрининг теста (Double теста) саветована јој је амниоцентеза.

Дабл тестом рађеним у 12+4 NG мерене су вредности серумских маркера мајке: free β -hCG и PAPP-A. Измерене вредности free β hCG-а биле су 193 mIU/ml (5,8261 MoM), а вредности PAPP 4725 mIU/l (1,4639 MoM). Мерени су и ултразвучни параметри: UZ CRL 61,5 mm (NG 12+5 по CRL). NT вредности нису мерене. На основу година мајке Дабл тестом израчунати ризик за тризомију 21. хромозома био је 1 : 832, индивидуални ризик срачунат на основу серумских маркера био је повишен и износио је 1 : 162 (референтна вредност 1 : 250). Комбиновани ризик за тризомију 13 и тризомију 18 био је 1 : 145165. Пренатални скрининг тест показао је постојање ризика за анеуплоидију (Down sy.).

Амниоцентеза је урађена у 17 NG. Узорак амнионске течности од 21 ml узоркован је трансабдоминално стерилним шприцем и под контролом ултразвука. Ћелије амнионске течности култивисане су у две културе с различитим медијумима, Amniotax и Quantum, 12 дана у in vitro условима. Након цитогенетске обраде материјала, хромозомски препарати су анализирани стандардним техникама: класичним бојењем Giemson и техником G трака. Цитогенетском анализом 30 метафаза из две ћелијске културе утврђено је присуство феталног

кариотипа са триплоидијом 69, XXX у свим ћелијама (слика 1).

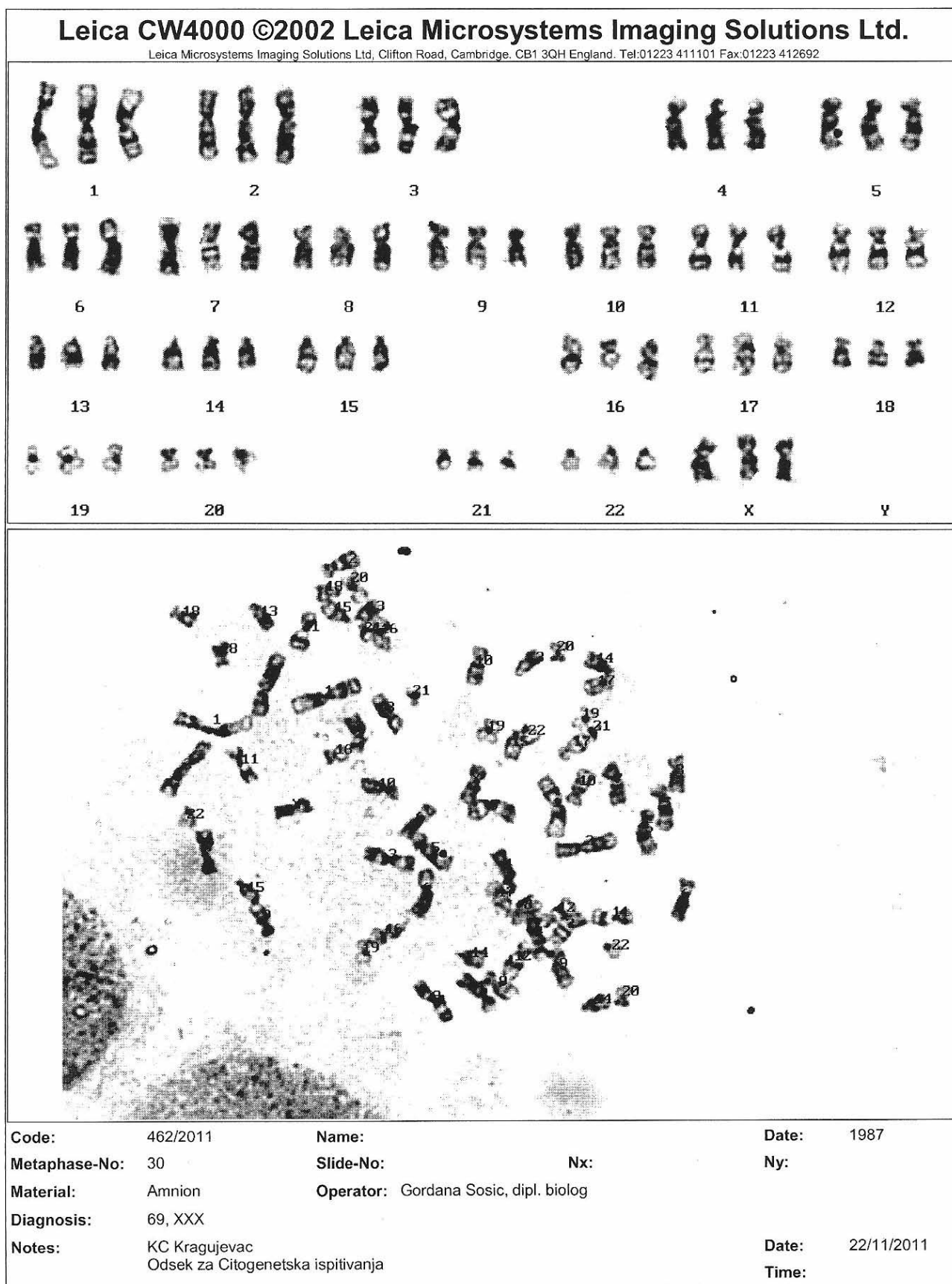
Пацијенткиња је примљена на Гинеколошко- акушерско одељење након РАЦ због УЗ налаза и слабије виталности плода (*Dg: Graviditas HBD XVII; St. Post RAC – oedema placentae, AB Imminens*). Укључени су бета миметици и саветовано је да се ураде β -hCG и контролни ултразвук. Након одрађеног прегледа труднице у 17 NG добијен је ултразвучни налаз: NG KL 17+3, NG UZ 16+6, BPD 34 mm, AC 117 mm, FI 24 mm, срце + постељица задњи зид. Мутилокуларни цистични тумефакт потиче са јајника промера преко 85 mm. Постељица без хематома. Такође су добијени и лабораторијски резултати пацијенткиње: Са 125: 65,40 U/ml (реф. вредности < 35,00); ККС: Le 8,2 x 10⁹/l; Ег 4,0 x 10¹²/l; Hgb 115 g/l; Hct 0,33 l/l; Tr 207 x 10⁹/l; глукоза 3,4 mmol/l; β -hCG 12 256 ml/l; налаз урина са доста бактерија.

На основу ултразвучног налаза и цитогенетски потврђене триплоидије 69, XXX изазван је прекид трудноће. Због одласка пацијенткиње на лечење у други здравствени центар и пресељења у иностранство немамо податке о патохистолошком резултату.

ДИСКУСИЈА

Хромозомске аберације су узрок приближно 50% спонтаних побачаја пре 15. недеље гестације (4). Триплоидија је поред аутозомних тризомија, монозомија, тетраплоидија и различитих хромозомских реаранжмана једна од најчешћих хромозомских аберација присутна код око 1% свих концептуса (5, 6). Према механизмима настанка постоје три главна пута која доводе до триплоидије: 1) диспермија – када долази до фертилизације нормалне хаплоидне ооците са два хаплоидна сперматозоида, при чему настају један матернални и два патернална пронуклеуса; 2) диандрија – када долази до фертилизације нормалне хаплоидне ооците са диплоидним сперматозоидом насталим нераздвајањем хромозома, најчешће у II мејози сперматогенезе; 3) дигинија – настаје фертилизацијом диплоидне ооците хаплоидним сперматозоидом. Диплоидна ооцита настаје ретенцијом секундарног поларног тела током II мејозе.

Проучавајући механизам настанка триплоидије запажа се да мушкарци с нормоспермијом чешће продукују триплоиде диспермијом, док сперма мушкараца с абнормалним семеним параметрима (олиго-крипто-азооспермија) има већу тенденцију стварања триплоидних ембриона механизмом диандрије. Такође је уочено да су „гигантске“ ооците, које су тетраплоидне пре мејозе и имају два пута већи



Слика 1. Фетални кариотип са триплоидијом 69, XXX (слика добијена помоћу система Leica CW 4000).

волумен од нормалне ооците, предиспониране да стварају триплодне ембрионе. Гигантске ооците настају ендцитозом (деоба једара без деобе цитоплазме) или цитоплазматском фузијом две ооците (7).

Механизми одбране од диспермије (полиспермије) јесу: брзи блок – деполаризација плазма мембране ооците и спори блок – кортикална реакција *zone pellucida* при реакцији са првим сперматозоидом, при чему се разлажу рецепторска места за везивање сперматозоида у *zoni pellucida* и она прелази из сол стања у гел стање и постаје непробојна за остале сперматозоиде (7–9). Поремећаји ових механизма могу довести до настанка триплоидних ембриона.

У *in vivo* студијама запажено је да дигинични триплоиди преживљавају дуже него диспермични. Објашњење ове појаве може се дати на основу понашања центрозома у ћелијском циклусу. Центрозом се састоји од пара центриола локализованих у аксијалној основи ћелије. Центриола имају улогу у формирању микротубула деобног вретена које усмеравају правилно мигрирање хромозома ка половима деобног вретена, што омогућава једнаку поделу генетског материјала на две ћерке ћелије. С обзиром на то да је центрозом у ооцити неактиван, центрозом из сперматозоида омогућава прву ћелијску деобу. Због тога је судбина дигиничног ембриона различита од судбине диспермичног ембриона. Дигинични триплоид има нормалан број центриола које су пореклом од једног сперматозоида јер су центриоле ооците неактивне, док диспермични триплоиди поседују два пара активних центриола. У 50% случајева код диспермичних триплоида настаје триполарно вретено, што доводи до дисорганизоване дистрибуције хромозома у свакој од бластомера и до великих анеуплоидија (7, 9). Овим се може објаснити и појава да диспермично оплођење „празне“ јајне ћелије (без хаплоидног сета хромозома) води у формирање анембрионалне хидатиформне моларне трудноће.

У складу с тим запажено је да у фетусима доминирају дигинични триплоиди, тако да је диандрија уобичајенија за случајеве спонтаних побачаја старијих од 8,5 недеља гестације док је дигинија присутна у ембрионима спонтаних побачаја гестације мање од 8,5 недеља.

Према пореклу триплоидије постоје два одвојена фенотипа: 1) тип I – према пореклу патернални, с нормалном величином фетуса или са лаким симетричним застојем у расту, без знакова адrenalне хипоплазије. Запажа се абнормално велика, цистична плацента са хистолошким налазом парцијалне хидатиформне моле. Повећани волумен плаценте и/или хиперплазија синциотиотрофобласта у

корелацији су са повећаним нивоом β -hCG; 2) тип II – према пореклу матернални, присутан је асиметрични интраутерин застој у расту, што је у вези са знатном адrenalном хипоплазијом. Дигинична плацента је мала и продукује низак ниво β -hCG. Остале присутне конгениталне аномалије (аномалије ЦНС-а, уринарног тракта, кардиоваскуларног система, гениталија, синдактилија трећег и четвртог прста, синдактилија прстију на ногама...) нису у стриктној вези са одређеним типом триплоидије (10).

Резултати скрининга мајчиног серума у првом триместру трудноће (двоструки тест) код триплоидних фетуса фенотипа II с малом нормалном плацентом и тешким асиметричним застојем у расту показују низак ниво β hCG. Случајеви триплоидије који су показали веома ниске нивое β -hCG и ниске нивое AFP-а и uE3 у неинвазивном скрининг тесту у другом триместру трудноће (трипл тест), што се у тесту протумачило као повећан ризик за тризомију хромозома 18, поседовали су екстра хромозомски сет мајчинског порекла и то је накнадно доказано помоћу QF-PCR на изолованој ДНА амнионске течности (11, 12).

У основи настанка фенотипа триплоидног фетуса јесте геномски импринтинг који регулише раст и развој ембриона и плаценте, тако да су поремећаји у овим механизмима важан етиолошки фактор у настанку патолошких трудноћа. Геномски импринтинг представља разлику у експресији гена у зависности од родитељског порекла и настаје епигенетском реверзибилном променом експресије гена на молекулу ДНА без промене у њеној структури. Главни механизми епигенетске модификације јесу ДНА метилација, хистонска модификација и ремоделирање хроматина. Истраживања показују да женски и мушки пронуклеус имају различите развојне потенцијале. Ово „означавање“ ДНА доводи до тога да су мушки и женски гамети неједнаки функционално у смислу генетске експресије. Судбина зигота који се састоје само из два очеве хаплоидна сета хромозома таква је да они у раној трудноћи пропадају без развоја ембриона и са прекомерним развојем плаценте. Зиготи који се састоје само од два мајчина хаплоидна сета показују развој ембриона и слабији развој плаценте.

Од односа мајчиних и очевих импринтованих гена зависи да ли ће се нормално развијати ембрион и плацента или ће настати патолошка промена. Код триплоидних ембриона постоји вишак генома, што ће резултирати или недовољном или прекомерном количином „уписаних“ гена, па ће постојати неправилна експресија импринтованих гена. Тако се као последица геномског импринтинга код триплоидних ембриона патерналног порекла развија хидатиформна мола (НМ), док се код триплоидија које

су мајчинског порекла подстиче развој феталног ткива, али се модулира пренос хранљивих материја преко смањења плаценте, што доводи до интраутериног застоја у развоју (13). Парцијална ХМ је гестациска трофобласна болест која има триплоидни кариотип 69, ХХУ у 59% случајева, 69, ХХХ у 40% случајева и 69, ХУУ у 2% случајева (14).

Случај триплоидије откривен амниоцентезом индикованом лошим налазима „дабл“ теста веома је редак налаз у инвазивној пренаталној дијагностици. У цитогенетској лабораторији ГАК КЦ Крагујевац од 2.056 анализираних кариотипова из амнионске течности узорковане између 16 и 18 NG нађено је 29 аберантних кариотипова од којих је само случај наше пацијенткиње триплоидија фетуса (1/2.056), док су подаци из узорка од 5.998 трудница анализираних у Институту за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић“ такви да је код 218 нађених аберантних кариотипова била присутна једна триплоидија (1/5.998) (15).

У приказаном случају реч је о триплоидији фетуса 69, ХХХ, што је праћено високим порастом β -hCG (5,8261 МоМ), док су вредности PAPP биле благо повишене (1,4639 МоМ) у односу на умножак медијане (1 МоМ) за 12 NG. „Дабл“ тест у 12 NG показао је повећан ризик за тризомију хромозома 21, иако су у обзир узети само биохемијски параметри (NT није мерено).

У приказаном случају реч је о младој пацијенткињи (25 година), што је у складу са студијама које су показале да инциденца триплоидије није у вези с годинама мајке, али је анализом полиплоидије у абортном материјалу закључено да триплоидија због диандррије настаје чешће код млађих жена, што се објашњава незрелошћу ооците или оштећеном кортикалном функцијом ооците, док се код старијих жена чешће запажа триплоидија због дигиније (16).

У нашем случају реч је о првој трудноћи пацијенткиње, без претходних спонтаних побачаја и оптерећене личне и породичне анамнезе. У литератури су забележени случајеви мултиплих узастопних трудноћа с триплоидијом дигиничном по пореклу, што је молекуларним анализама и доказано. У случајевима поновљених дигиничних триплоидних трудноћа вероватно је реч о наследном механизму који утиче на оогенезу (17). У приказаном случају због повишеног биохемијског ризика за тризомију хромозома 21 саветована је и урађена амниоцентеза. Ултразвучни налази у првом триместру трудноће нису показали никакав застој у развоју фетуса. Резултати цитогенетске анализе показали су постојање триплоидије 69, ХХХ у свим ћелијама из две различите културе, чиме је искључен псеудомозаицизам.

У 17 NG пацијенткиња је примљена на Гинеколошко акушерско одељење после АЦ због слабије виталности плода и едема плаценте. Ултразвучним прегледом примећен је мултилокуларни тумефакт пореклом са јајника. Серумски маркер Са 125 показао је повишене вредности. Остаје отворено питање повезаности присутног тумефакта и триплоидије. С обзиром на то да је у приказаном случају установљена трудноћа с триплоидним фетусом, код кога је кариотип 69, ХХХ присутан у свим ћелијама, што је стање код кога не постоји никакав третман и које је летално, на основу цитогенетског и ултразвучног налаза урађен је прекид трудноће.

У приказаном случају није урађена молекуларна дијагностика порекла екстра хаплоидног сета. На основу вредности биохемијских маркера одрађених из мајчиног серума (веома повећана вредност β -hCG у односу на референтне вредности) и ултразвучних налаза (*oedema placentae*), на основу година мајке, неоптерећене породичне анамнезе (у породици нису постојали случајеви поновљених спонтаних побачаја, нити случајеви триплоидије) претпостављамо да је реч о екстра хаплоидном хромозомском сету патерналног порекла.

Механизми који доводе до триплоидије су сложени и засновани на контролним механизмима на нивоу ДНА, на нивоу ћелијских органела, контроле ћелијске деобе и оплођења, и још увек су непотпуно истражени. Истраживање усмерено ка откривању нових биохемијских маркера требало би да повећа специфичност и омогући увођење нових скрининг тестова за детекцију анеуплоидија у раној трудноћи.

На основу вредности биохемијских скрининг тестова на анеуплоидије у првом и другом триместру трудноће, код пацијенткиња са цитогенетски потврђеном триплоидијом фетуса, и на основу података из литературе може се поставити хипотеза да триплоидија патерналног порекла показује повишени ризик за тризомију хромозома 21, док триплоидија матерналног порекла показује повишени ризик за тризомију хромозома 18. Прихватање или одбацивање ове хипотезе захтева студију у којој би био обухваћен већи узорак и у којој би се за доказивање порекла екстра хаплоидног сета користиле методе молекуларне дијагностике.

СКРАЋЕНИЦЕ

АВ – абортус

АС (ултразвучно) – обим абдомена

АС – амниоцентеза

AFP – алфа-фетопротеин

BPD – бипаријентални дијаметар
 Ca 125 – карцином антиген 125
 CC – кордоцентеза
 CRL – дужина теме–тртица
 CVS – биопсија хорионских ресица
 DNA – дезоксирибонуклеинска киселина
 Down sy. – Даунов синдром
 Eг – еритроцити
 FI – дужина бутне кости
 HBD – недеља трудноће
 Hct – хематокрит
 Hgb – хемоглобин
 HM – хидатиформна мола
 KKC – комплетна крвна слика
 Le – леукоцити
 МоМ – умножак медијане
 NG – недеља гестације
 NG KL – недеља гестације клиничка
 NG UZ – недеља гестације ултразвучна
 NT – нухални набор
 PAPP-A – плазма протеин-A везан за трудноћу
 QF- PCR – флуоресцентна ланчана полимеразна реакција
 RAC – рутинска амниоцентеза
 Tr – тромбоцити
 uE3 – некоњуговани естриол
 UZ – ултразвук
 β-hCG – хумани хорионски гонадотропин

ЛИТЕРАТУРА

- Chen H. Atlas of genetic diagnosis and counseling. New Jersey: Humana Press Inc., 2006.
- Schmid M, Blaicher W. Genetic of fetal disease. In: Prayer D. Fetal MRI, eds. Medical radiology. 1st ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2011: 489–505.
- Iliopoulos D, Vassiliou G, Sekerli E, et al. Long survival in a 69, XXX triploid infant in Greece. Genet Mol Res 2005; 4: 755–9.
- Petrović B, Ljubić A, Mičić M. Hromozomski rearanžmani kao uzrok habitualnih pobačaja. Srp Arh Celok Lek 2007; 135: 425–7.
- Zaragoza MV, Surti U, Redline WR, Millie E, Chakravarti A, Hassold TJ. Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. Am J Hum Genet 2000; 66: 1807–20.
- Fabro DA, Driul L, Anis O, et al. Fetal gender ratio in recurrent miscarriages. Int J Womens Health 2011; 3: 213–7.
- Kang HJ, Rosenwaks Z. Triploidy – the breakdown of monogamy between sperm and egg. Int J Dev Biol 2008; 52: 449–54.
- Nikolić RI, Rančić G, Radenković G, et al. Embriologija čoveka. Tekst i atlas. III izd. Beograd: Data Status, 2007.
- Pantić RV. Biologija ćelije. I izd. Beograd: Univerzitet u Beogradu, 1997.
- McFadden DE, Robinson WP. Phenotype of triploid embryos. J Med Genet 2006; 43: 609–12.
- Zaragoza E, Akolekar R, Poon LCY, Pepes S, Nicolaides KH. Maternal serum placental growth factor at 11–13 weeks in chromosomally abnormal pregnancies. Ultrasound Obstet Gynecol 2009; 33: 382–6.
- Liao C, Li DZ. Five cases of triploidy identified through antenatal screening programme. J Med Screen 2009; 16: 48–9.
- Pereza N, Ostojić S. Funkcionalna nejednakost roditeljskih genoma u etiologiji gestacijskih trofoblastičnih bolesti. Medicina 2008; 44: 22–37.
- Milenković V, Lazović B. Terapija i protokoli praćenja gestacijskih trofoblastnih bolesti. Med Čas 2012; 46: 35–40.
- Novaković T, Živanović A, Babić G, et al. Prikaz petogodišnjeg rada odseka za citogenetska ispitivanja GAK KC Kragujevac. Ginekologija i perinatologija 2011; 43: 26–7.
- Neuber M, Rehder H, Zuther C, Lettau R, Schwinger E. Polyploidies in abortion material decrease with maternal age. Hum Gen 1993; 91: 563–6.
- Brancati F, Mingarelli R, Dallapiccola B. Recurrent triploidy of maternal origin. Eur J Hum Genet 2003; 11: 972–4.