

Prosta plodova DNK in klinična uporabnost pri določevanju kromosomskih aneuploidij pri plodu

Darija Strah

V zadnjem desetletju smo priča zelo hitremu razvoju in novim dognanjem na področju uporabnosti proste fetalne DNK in RNK v materini plazmi v povezavi z odkrivanjem monogenetskih bolezni, neinvazivnim določevanjem spola pri plodu zaradi X spolno vezanih dednih bolezni, določevanjem Rhesus-D in RHCE genotipa ploda in klinično uporabnostjo pri kongenitalni adrenalni hiperplaziji ter hemolitični boleznini novorojenčka, povzročeni z anti-D, anti-c/C ali anti-E aloprotitelesi. Razvoj in raziskave na področju proste fetalne DNK so v zadnjih nekaj letih intenzivno usmerjene predvsem v razvoj metod prenatalnega neinvazivnega presejanja za najbolj pogoste avtosomne trisomije z visoko stopnjo odkrivanja in zelo nizkim odstotkom lažno pozitivnih primerov.

Uvod

V zadnjih 40 letih se je presejanje za aneuploidije pri plodu premaknilo iz drugega trimesečja, ko je indikacija za amniocentezo temeljila na podlagi materine starosti (stopnja odkrivanja DS 30% ob 5% FPR), v prvo trimesečje, ko lahko z biopsijo horionskih resic potrdimo ali ovrzemo presejalni test zgodnje morfologije z merjenjem nuhalne svetline in dvojnega hormonskega testa (stopnja odkrivanja DS do 90% ob 5% FPR). Občutljivost in specifičnost neinvazivnega prenatalnega testiranja na osnovi analiziranja proste fetalne DNK v plazmi nosečnice predstavlja nov mejnik presejanja za aneuploidije z visoko stopnjo odkrivanja (več kot 99% ob 0,1%FPR). Vendar ne smemo zamenjevati dveh pomensko povsem različnih besed: NIPT (testiranje-presejanje) in NIPD (diagnostika). Že nekaj časa se v strokovnih člankih, v katerih so objavljeni rezultati kliničnih študij, ki so bile opravljene večinoma na nosečnicah z visokim tveganjem in nekaj raziskavah na nosečnicah z nizkim tveganjem, sistematično uporablja nova definicija: NIPT je izjemno zanesljiv presejalni test, v anglosaksonskem prostoru imenovan advanced screening test za trisomijo 21 in 18 kromosoma, kar pa ne velja za ostale trisomije.

V Budimpešti so leta 2010 organizirali 1. centralno – vzhodno evropski simpozij pod pokroviteljstvom prof. Balint Nagya. Letošnjega so organizirali kolegi z Univerze Olomouc na Češkem in zanj pridobili tri izjemne strokovnjake s področja neinvazivnega prenatalnega presejanja: prof. Petra Benna, prof. Howarda Cuckla in častnega gosta prof. Denisa Loa, ki so nas izdatno poučili o novem znanstvenem področju

proste fetalne DNK. Prav prof. Lo je leta 1997 odkril in dokazal fragmente proste DNK, ki krožijo v materini krvi in pripadajo plodu. Njegovo predavanje je bilo vsekakor zelo dober razlog za udeležbo v starem, uglednem univerzitetnem mestu. Kot ginekologinja, ki se s presejalnimi testi v nosečnosti poglobljeno ukvarjam, sem se želela čim bolj izobraziti na tem področju. Z morebitnimi novimi algoritmi v nosečnosti v naslednjih letih se bomo srečevali poleg genetikov predvsem ginekologi, saj je skrb za nosečnice naša domena. Simpozija sta se udeležili tudi prof. Ksenija Geršak in prim. Anamarija Brezigar.

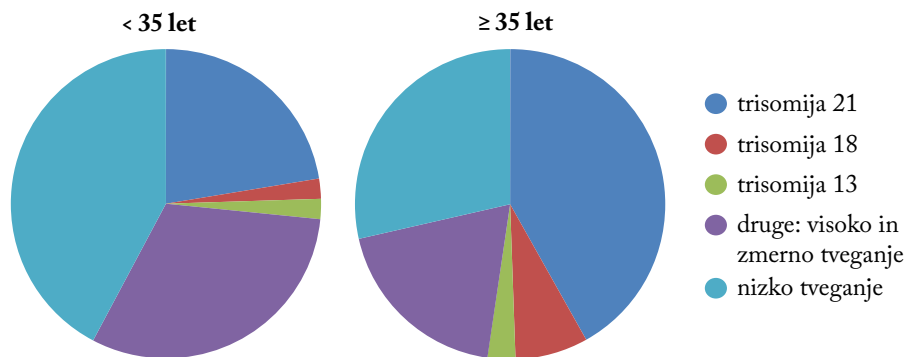
Pregled invazivne prenatalne diagnostike (prof. Peter Benn)

Prva kromosomska analiza plodovih celic, dobljenih z amniocentezo iz plodovnice je bila objavljena leta 1966 v Lancetu, avtorjev Stelle MW in Breg WR, izvajana je torej 50 let. Ponavadi je narejena v 16. tednu nosečnosti, tveganje za splav znaša 0,5-1% (Tabor, Alfirević), kromosomska analiza traja od 7 do 10 dni, je draga ter pri nosečnicah vzbuja zaskrbljenost in strah. Glede na definicijo je popolna, dokončna diagnostična metoda za vsa kromosomska stanja razen mozaičnih oblik kromosomopatij. Celice so večinoma plodove: pripadajo bodisi plodovi koži, urinarnem traktu ali gastrointestinalnem sistemu. Redke so ekstraembrionalne – amnijske ali trofoblastne celice. Zanesljivost znaša več kot 99,5%, možnost napake znaša med 0,01 in 0,02%. Napake nastanejo zaradi: laboratorijska napaka, napaka v izvidu, kontaminacija z maternalnimi



Predsedujoča zdravnica simpozija Ishraq Dhaifalah, častni predavatelj Denis Lo, Darija Strah (z leve).

Kromosomske nepravilnosti, ki jih odkrijemo z invazivnimi diagnostičnimi preiskavami



- (a) Visoko/zmerno tveganje: XO, 3n, druge avtosomne trisomije, neuravnotežene translokacije, pravi mozaicizem, de novo translokacije
- (b) Nizko tveganje: XXY, XXX, XYY, nizke stopnje mozaicizma, uravnotežene translokacije
- (c) Izvzete so mikroduplicacije/delekcije, ki so znano ali možno klinično pomembne, določene z DNK mikromrežo

Grati et al., AJMG 2010;152A:1434-42

Kromosomske nepravilnosti, ki jih dokažemo z invazivnima preiskavama, se razlikujejo po pojavnosti glede na starost nosečnice.

Prosta fetalna DNK je iz krvne plazme matere izolirana s klasičnimi metodami za izolacijo DNK. Nadaljnje rokovanje z izoliranim dednim materialom je odvisno od posamezne metode določevanja prisotnosti kromosomski aneuploidij. Z razvojem sekveniranja nove generacije in posledičnim padcem cene sekveniranja se je kot najbolj zanesljiva in tudi najpogosteje uporabljena uveljavila tako imenovana metoda masivnega paralelnega sekveniranja (massively parallel sequencing) in njene variacije.

Metoda temelji na določanju zaporedja fragmentov proste DNK. Določanje zaporedja poteka na osnovi detekcije vgrajevanja posameznih komplementarnih nukleotidov ob preiskovani molekuli DNK. Določanje zaporedja poteka istočasno v mnogih prostorsko ločenih in ob klonsko namnoženih DNK fragmentih. Na tak način

celicami (0,5%), nedokazani mozaicizem. Ponavadi so stanja različnih oblik mozaicizma med patološkimi kariotipi zastopana v deležu 15% oziroma v 0.25% vseh preiskav.

Biopsija horionskih resic je druga metoda, ki se izvaja transabdominalno ali transcervikalno. Izvaja se približno 30 let, med 11. In 14. tednom nosečnosti, tveganje za splav znaša enako kot za amniocentezo (Tabor, Alfirevič). Glede na definicijo je popolna, dokončna diagnostična metoda za vsa kromosomska stanja, vendar je manj zanesljiva od amniocenteze. V direktnem preparatu dobimo citotrofoblastne celice, v celični kulturi porastejo celice mezenhimalnega izvora. Kromosomska analiza traja enako, od 7 do 10 dni, je draga ter pri nosečnicah vzbuja zaskrbljenost in strah. Možnost napake znaša 0.1%. Napake nastanejo zaradi: delni mozaicizem placent, kontaminacija z maternalnimi celicami, laboratorijska napaka, napaka izvida in nediagnosticirana dizigotna nosečnost. Ponavadi so stanja različnih oblik mozaicizma med patološkimi kariotipi BHR zastopana v 0.8% vseh izvidov.

Metode neinvazivnega prenatalnega presejanja – NIPT

Prosta fetalna DNK izhaja iz placente. V materini krvi jo je moč izolirati od 7. gestacijskega tedna dalje, koncentracija je od poznega prvega trimesečja skozi drugo trimesečje približno enaka. Prosta fetalna DNK iz obtoka matere izgine v nekaj urah po porodu. Delci proste DNK so zelo majhni, večina ima manj kot 313 bp, povprečno 162 bp. V posameznem vzorcu imamo v povprečju od 10 do 15% proste fetalne DNK.

lahko danes rutinsko določimo zaporedje stotinam giga- oziroma celo tera-baznim nukleotidnim parom z eno samo napravo. Rezultat takega postopka so številna zaporedja krajših fragmentov DNK, pri čemer se isti fragment DNK prebere večkrat. To poimenujemo s terminom »pokritost«. Zaznavanje stopnje pokritosti je osnovni princip določanja kromosomskih nepravilnosti – v primeru trisomije 21 gre pričakovati, da bo pokritost fragmentov, ki izhajajo iz kromosoma 21, v primerjavi s fragmenti iz ostalih kromosomov, statistično značilno večja. Oziroma, povedano drugače, kadar fragment DNK iz kromosoma 21 preberemo statistično značilno večkrat kot običajno, lahko z več kot 99 % zanesljivostjo določimo prisotnost trisomije 21 kromosoma.

Poleg opisane metode so v razvoju tudi druge metode določanja kromosomskih aneuploidij, ki temeljijo na uporabi proste fetalne DNK. Nekatere med njimi so:

- MeDIP – ločevanje materine in plodove proste DNK poteka na osnovi epigenetskih razlik (metilacija). Prosta DNK ploda in matere je ločena s kombinacijo imunoprecipitacije hipermetiliranih regij DNK ter RT-PCR analize specifičnih predelov DNK, ki so hipermetilirani zgolj pri plodu.
- SNP mikromreže - metoda temelji na ločevanju materine in plodove DNK na osnovi specifičnega vzorca polimorfizmov posameznih nukleotidov.
- Digitalna PCR z dilucijo materine plazme do te mere, da je moč prešteti specifične fragmente nukleinskih kislin.

Vse te metode so obravnavane v strokovnih člankih, ki nastajajo v zadnjih nekaj letih in nekatere dokazujejo zelo dobro senzitivnost in nizek odstotek lažno pozitivnih rezultatov. Do sedaj z njimi dokazujemo aneuploidije 21., 18., nekateri laboratoriji tudi 13. kromosoma in spolnih kromosomov. V prihodnosti gre pričakovati, da nam bo razvoj omogočil določevanje še večjega spektra kromosomopatij in morda celo monogenjskih bolezni.

Sedanje omejitve NIPT (prof. Howard Cuckle)

NIPT tehnike v sedanjem razponu lahko z visoko občutljivostjo in majhno stopnjo lažno pozitivnih izvidov določijo trisomije 21., 18. in 13. kromosoma, vendar ne smemo pozabiti, da je večina študij opravljene pri nosečnicah z visokim tveganjem, enoplodno nosečnostjo, na evploidnih zarodkih ali zarodkih z nemozaično obliko trisomije. Delnega mozaicizma za omenjene tri kromosome ne moremo določiti.

Zelo bi bilo zaželeno, da bi lahko določevali stanja kot so Turnerjev in Klinefelterjev sindrom in druge na spolni kromosom vezane aneuploidije, vendar lastnosti kromosoma Y niso v prid trenutnim metodam NIPT. Le ta je majhen in vsebuje veliko enako ponovljivih sekvenc, obenem pa ima mnogo sekvenc, homolognih kromosomu X. Zaradi obeh lastnosti je težje določljiv. Pri nosečnici z normalnim kariotipom, vendar napredovalo starostjo, nastajajo posamezne celice z aneuploidijo X kromosoma. Zaradi tega lahko pride do lažno pozitivnega izvida, ki bi govoril v prid X vezani aneuploidiji. Aneuploidije spolnih kromosomov so pogosto oblike mozaicizma z bodisi normalno in/ali nepravilno celično linijo. Mozaicizem se zaradi nastanka in različne stopnje prizadetosti seveda ne more pravilno določiti pri nobenem od kromosomov.

V primeru, da se z NIPT določa druge zelo redke trisomije, npr. trisomije 8., 9. in 22. kromosoma, moramo vseeno računati na sicer nizko stopnjo lažno pozitivnih izvidov, vendar bodo le ti obstajali. Kadar je prevalenca v populaciji nizka, bodo tudi ob visoki specifičnosti in občutljivosti testa po vsej verjetnosti pozitivni izvidi lažni. To dejstvo je temeljnega pomena, da se NIPT zaenkrat ne bi izvajalo na nosečnicah z nizkim tveganjem, četudi zaključki objavljene Nicolaidesove študije nakazujejo, da je testiranje tako pri nosečnicah z visokim kot nizkim tveganjem enako učinkovito.

Do sedaj imamo premalo podatkov o testiranju NIPT pri dvo ali večplodni nosečnosti, še posebno pri diskordantnosti. Teoretično prisotnost DNK evploidnega zarodka lahko razredči aneuploidno DNK prizadetega zarodka v vzorcu in tako oteži oceno pravega stanja. Čeprav so začetni rezultati ohrabrujoči, je podatkov za priporočila uporabe še premalo.

Strnjeni podatki odkrivanja treh najpogostejših trisomij na osnovi 6 največjih raziskav pri nosečnicah z visokim tveganjem do sedaj so:

- stopnja odkrivanja trisomije 21 znaša 99.3% (95 interval zaupanja 98-100%) ob FPR 0.14% (0.1-0.6). Podatki na nosečnicah z nizkim tveganjem nakazujejo, da odkrivanje ne bo bistveno drugačno; pozitiven izvid bo zvečal tveganje za DS 700 krat, negativen izvid zmanjša tveganje za okoli 140 krat;
- stopnja odkrivanja trisomije 18 znaša 97.3% (93-99), ob FPR 0.13 (0.3-3.0);
- stopnja odkrivanja trisomije 13 znaša 78.6% (58-91), ob FPR 0.74 (0.4-1.2);
- stopnje odkrivanja drugih oblik aneuploidij so trenutno nesprejemljivo nizke.

Torej o NIPT ne moremo govoriti kot o diagnostični preiskavi temveč kot presejalnem testu. **Vsak pozitiven izvid NIPT moramo potrditi z enim od klasičnih oblik invazivne diagnostične metode.**

Priporočila za izvajanje NIPT

The American College of Obstetricians and Gynecologists, The Society for Maternal and Fetal Medicine in The International Society for Prenatal Diagnosis so sprejeli priporočila (december 2012) za presejanje z NIPT.

Indikacije:

- starost matere 35 let in več ob porodu,
- ultrazvočni izvid ploda, ki nakazuje možnost aneuploidije,
- anamneza predhodne nosečnosti z dokazano aneuploidijo,
- pozitiven presejalni test zgodnje morfologije in nuhalne svetline, dvojnega hormonskega testa, sekvenčni, integrirani presejalni test ali četverni hormonski test,
- uravnotežena Robertsonova translokacija pri starših s povišanim tveganjem za trisomijo 21 ali 13.

Testiranje mora vedno vsebovati **predtestno svetovanje**: natančno obrazložitev testa, njegove omejitve in zmožnosti ter ponovno razlago, da to ni diagnostičen test, morebitno oceno družinske anamneze za oceno tveganja nosečnice ter podpisano privolitev po pojasnilu po svetovanju. Testa naj zaenkrat ne bi opravile nosečnice z nizkim tveganjem, določenim z ultrazvočnim presejanjem ali nosečnice z večplodno nosečnostjo.

Test tako določi le stanje kromosoma 21 in 18 ter v nekaterih laboratorijih tudi kromosoma 13 in ne poda drugih pomembnih genetskih podatkov. V primeru ultrazvočno vidnih sumljivih znakov za aneuploidijo naj se takoj priporoči le genetski posvet in invazivna diagnostika. V primeru **pozitivnega testa NIPT** sledi napotitev za **genetski posvet** in invazivno diagnostiko. **Negativni izvid NIPT** ne zatrdi nosečnosti s kasnejšimi možnimi zapleti.

NIPT ni zamenjava za še vedno edini diagnostični metodi kot sta amniocenteza in biopsija horionskih resic.

Po besedah prof. Boruta Peterlina imamo pri nas delovni osnutek strokovnih sklepov, ki jih je predstavil na predavanju na Ginekološki kliniki 28.11.2012, vendar dokončno še niso sprejeti in potrjeni:

- testiranje je primerno za pare, ki imajo zvišano tveganje za rojstvo otroka s trisomijo 21,

- testiranje mora vsebovati pred- in potestno genetsko svetovanje, razlago testa, pozitivnega ali negativnega izvida in možnosti invazivne potrditvene diagnostike ter podpisano privolitev po pojasnilu,
- testiranje lahko izvajajo zdravniki institucij, ki so pod nadzorom Ministrstva za zdravje RS,
- testirane osebe s pozitivnim testom morajo imeti možnost, da se odločijo za potrditev diagnoze z invazivnimi diagnostičnimi metodami,
- priporoča se strokovna analiza učinkovitosti izvajanja.

Zaradi omejitve prispevka nisem povzela do sedaj podanih strokovnih ocen in predlogov, kako bi kar najbolje uvrstili NIPT v dosedanje algoritme vodenja nosečnosti in dosedanje odkrivanje DS. Vsekakor velja priporočilo vseh strokovnjakov, da ostane sprejeto presejanje za DS v obsegu, kot ga izvajamo do sedaj, invazivna diagnostika naj se opravi tudi, kadar je

NIPT kot univerzalno, rutinsko presejanje ne more nadomestiti ustaljenega presejanja za DS v 1. trimesečju, saj le to poleg ocene zgodnje morfologije in stanja ploda napoveduje tudi možnost zgodnje napovedi preeklampsije in drugih hudih zapletov v nosečnosti.

Tematiko sem povzela s predavanj kongresov, strokovnih člankov, osebnih pogovorov. Literature zaradi obširnosti nisem citirala. Vsi citati in literatura, na osnovi katerih je nastal prispevek, so dostopni. Teme sem se lotila z namenom, da vse novosti, ki sem jih z zanimanjem spremljala in študirala, podam svojim kolegom ginekologom in porodničarjem. Prispevek je povzet po že objavljenem članku v reviji ISIS januarja 2013.

E-naslov: darija@strah.si, darija.strah@siol.net