

Biopsija korionskih resica

Ana Vičić, Feodora Stipoljev*

Biopsija korionskih resica je invazivna metoda prenatalne dijagnostike koja se izvodi u prvom tromjesečju trudnoće, radi određivanja kromosomskih i genskih poremećaja ploda. Rutinski se provodi u većini tercijarnih centara te je uz amniocentezu najčešće primjenjivana invazivna metoda prenatalne dijagnostike. Biopsija korionskih resica kao metoda koja se provodi u prvom tromjesečju trudnoće, svakako je prvi izbor u slučajevima visokog rizika za kromosomske abnormalnosti, psihičkog opterećenja trudnice zbog prethodne trudnoće s kromosomopatijom te kod obitelji s genskim ili metaboličkim poremećajem poznatog molekularnog defekta s visokim rizikom rađanja bolesnog potomstva. Nalazi dobiveni u ranoj fazi trudnoće od iznimne su važnosti za roditelje, jer smanjuju napetost dugotrajnog iščekivanja rezultata, omogućavaju roditeljima dovoljno vremena za donošenje odluke o daljnjem tijeku trudnoće te u konačnici omogućuju prekid trudnoće u njoj vrlo ranoj fazi.

Ključne riječi: biopsija korionskih resica; kromosomski poremećaji; prenatalna dijagnostika; mozaicizam

UVOD

Biopsija korionskih resica (engl. *chorionic villus sampling*, CVS) invazivna je metoda prenatalne dijagnostike koja se izvodi u prvom tromjesečju trudnoće, a radi određivanja kromosomskih i genskih poremećaja ploda. Prvi pokušaji dobivanja uzoraka korionskih resica učinjeni su još 60-tih godina prošlog stoljeća. Uzimali su se transcervikalno (TC) bez nadzora ultrazvuka, a uz pomoć različitih endoskopskih instrumenata. Iako je kultivacija stanica bila uspješna, problem je bio veliki postotak spontanijih pobačaja (1, 2). Prvi izvještaj o nizu uspješno provedenih biopsija objavila je 1975. godine skupina kineskih istraživača koji su ovu metodu primjenjivali radi određivanja spola ploda. Zahvati su provedeni transcervikalnim uvođenjem tankog katetera u maternicu trudnice, također bez nadzora ultrazvuka, tj. bili su vođeni samo osjetom izvođača (3). No intenzivnija primjena biopsije korionskih resica počinje tek u 80-tim godinama, nakon uvođenja ultrazvuka. Danas se rutinski provodi u većini tercijarnih centara, a pri izvođenju zahvata najčešće se primjenjuje transabdominalni (TA) pristup. Kao metoda koja se provodi u prvom tromjesečju trudnoće, biopsija korionskih resica pokazala se idealnom u ranoj dijagnostici kromosomskih poremećaja.

INDIKACIJE

Godinama je u većini zemalja najčešća indikacija za primjenu invazivnih zahvata prenatalne dijagnostike bila starija

dob majke (viša od 35 godina). No razvojem neinvazivnih metoda kao što su ultrasonografija i biokemijski probiri iz majčine krvi, ali i unapređenjem laboratorijskih dijagnostičkih metoda, značajno se proširio opseg malformacijskih sindroma koji se danas utvrđuju prenatalnom dijagnostikom. Stoga se biopsija korionskih resica primjenjuje u dijagnostici niza kongenitalnih poremećaja u koje pripadaju:

- kromosomski poremećaji – strukturne i numeričke promjene kromosoma,
- genski poremećaji – spolno vezane i autosomne bolesti.

Indikacije za biopsiju korionskih resica donekle se razlikuju među pojedinim zemljama, a razlike mogu postojati čak i među centrima unutar jedne zemlje. Ipak, općeprihvaćene indikacije su:

- dob trudnice starija od 35 godina u terminu porođaja,
- abnormalni ultrazvučni nalaz,
- povišeni rizik nakon kombiniranog probira (rizik veći od 1:50),
- prethodna trudnoća s kromosomskim ili genskim poremećajem, koja nosi povećan rizik za trudnoće u tijeku

* Citogenetski laboratorij, Klinika za ginekologiju i porodništvo, Klinička bolnica „Sveti Duh“, Zagreb, Hrvatska

Adresa za dopisivanje:

Ana Vičić, dipl. ing. biol., Citogenetski laboratorij, Klinika za ginekologiju i porodništvo, Klinička bolnica „Sveti Duh“, Sveti Duh 64, 10000 Zagreb, E-mail: vicic.ana@gmail.com

Primljeno/Received: 27. 9. 2013., Prihvaćeno/Accepted: 18. 10. 2013.

- jedan od roditelja nositelj strukturne kromosomske promjene,
- roditelji nositelji genske mutacije.

Budući da je biopsija korionskih resica rizičniji invazivni zahvat od amniocenteze, najčešće se provodi u slučaju abnormalnog ultrazvučnog nalaza i izrazito povišenog rizika nakon biokemijskog ili kombiniranog probira.

TEHNIKE ZAHVATA I RIZICI

Biopsija korionskih resica najčešće se izvodi između 11. i 14. tjedna trudnoće, najčešće transabdominalnim putem uvođenjem igle do posteljice pod kontrolom ultrazvuka, pri čemu se aspirira dio posteljičnog tkiva za analizu. Posljednjih se godina metoda transcervikalnog CVS-a sve više napušta te se danas u nekim centrima gotovo i ne izvodi ili se izvodi iznimno rijetko, i to u slučajevima kad posteljica nije dostupna transabdominalnim putem. Nedostaci TC pristupa u usporedbi s TA pristupom su: veći postotak spontanog pobačaja (2% kod TC CVS-a u odnosu na 0,7% kod TA CVS-a), veći broj infekcija, veća vjerojatnost vaginalnog krvarenja (4), manja uspješnost postupka nakon prvog uvođenja igle te veći broj uzoraka neadekvatnih za analizu (5). U našem centru danas se primjenjuje isključivo transabdominalni pristup. Ranije izvođenje postupka ne preporuča se zbog povećanog rizika redukcijskih deformiteta ekstremiteta ploda, ali i zbog veće stope spontanog pobačaja u ranoj trudnoći (6).

Prema najnovijim istraživanjima rizik od spontanog pobačaja nakon transabdominalnog CVS-a gotovo je jednak riziku od pobačaja nakon amniocenteze provedene u drugom tromjesečju (rana amniocenteza) te iznosi između 0,3% i 1,0% (4, 7, 8). Mujezinović i Alfrević su 2007. godine objavili opširnu meta-analizu o pojavnosti komplikacija nakon amniocenteze i CVS-a, koja je obuhvatila 45 studija objavljenih nakon 1995. godine. Prema toj studiji rizici od pobačaja 14 dana nakon zahvata, prije 24. tjedna gestacije i ukupno, redom su iznosili – za amniocentezu 0,6%, 0,91% i 1,9%, a za CVS 0,7%, 1,3% i 2,0% (9). Smatra se da su stariji podatci prema kojima je rizik od pobačaja nakon CVS-a iznosio 1,5% do 2% bili posljedica neadekvatnog provođenja zahvata, lošijih instrumenata, ali i neiskustva liječnika (10). Osim spontanog pobačaja, moguće komplikacije nakon biopsije korionskih resica su: vaginalno krvarenje, infekcije, ruptura membrana, Rh imunizacija i povišena razina alfa-fetoproteina (AFP) u majčinom serumu (11).

METODE KULTIVIRANJA STANICA KORIONSKIH RESICA

U vrijeme izvođenja biopsije korionskih resica, odnosno u razdoblju između 11. i 14. tjedna trudnoće, resičasti korion

(chorion frondosum) deblji je od 6 mm, a tvore ga tercijarne resice koje slobodno plutaju u interviloznom prostoru. Tercijarne resice su građene od triju slojeva: unutarnjeg sloja mezenhimne strome, srednjeg sloja citotrofoblasta koji čine spontano mitotski aktivne stanice i vanjskog sloja sinciotrofoblasta. Slojevi korionskih resica različitog su embrijskog podrijetla, pri čemu je stroma razvojno bliža samom embriju. Naime, stanice citotrofoblasta i sinciotrofoblasta potječu od vanjskog sloja blastociste, trofoblasta, za razliku od mezenhimne strome koja potječe od ekstraembrionskog mezoderma i primitivnog embrionskog tračka. Oboje, ekstraembrionalni mezoderm i embrij, nastaju iz unutarnjih staničnih masa (12, 13).

Prilikom zahvata uzorak korionskih resica se aspirira u medicinsku štrcaljku koja sadrži Eagleov minimalni osnovni medij (engl. *Minimal Essential Medium*, MEM) ili RPMI medij (engl. *Roswell Park Memorial Institute*), uz dodatak antikoagulansa heparina. Za potrebe dijagnostičkih pretraga uzorak mora sadržavati 5 do 20 mg korionskih resica. Uzorci manji od 5 mg nisu dostatni za kromosomsku analizu. Neposredno nakon zahvata uzorak se šalje u laboratorij, gdje se pod invertnim mikroskopom pomno očisti od mogućih primjesa majčinog tkiva. Očišćene i usitnjene resice se uspostavljaju u kulturu stanica, a u slučaju dijagnostike genskih ili metaboličkih promjena dio uzorka se odvaja i u nativnom obliku se šalje na daljnju analizu. Za potrebe kromosomske analize uspostavljaju se dva tipa kulture stanica: direktna ili kratkotrajna kultura i dugotrajna kultura stanica.

Direktna i kratkotrajna kultura stanica – dijele se stanice citotrofoblasta. U slučaju direktne kulture sloj stanica citotrofoblasta enzimski se odvoji od strome resica te se dobivena stanična suspenzija odmah nakapa na predmetna stakalca. Kromosomski preparati dobiveni ovim načinom dostupni su za analizu 2 do 3 sata nakon uzimanja uzorka (14). No preparati dobiveni ovom metodom relativno su loše kakvoće u smislu loše razlučivosti kromosoma i malog broja metafaza. Stoga se danas uglavnom služi metodom kratkotrajne kulture stanica, pri čemu se resice kultiviraju u razdoblju od 24 sata, uz primjenu neke od metoda sinkronizacije stanične diobe. Postupak sinkronizacije najčešće se provodi uz uporabu florodeoksiuridina (FUdR) (15) ili zadržavanjem diobe stanica premještanjem kulture na temperaturu od 4°C (16). Kromosomski preparati se boje tehnikom G pruganja, a za analizu su dostupni nakon 48 sati (Slika 1a).

Dugotrajna kultura stanica – dijele se stanice mezenhimalne strome. Očišćene resice mehanički se usitnjavaju (maceriraju) i/ili enzimski obrađuju kako bi se uklonio sloj stanica citotrofoblasta. Zatim slijedi inicijacija dviju ili više primarnih staničnih kultura. Kultiviranje traje u pravilu od sedam do 14 dana, nakon čega se pripremaju preparati za kromosomsku



SLIKA 1. Prikaz kromosomskih preparata dobivenih u našem laboratoriju u slučaju trisomije 21. a) kratkotrajna kultura stanica citotrofoblasta, b) dugotrajna kultura mezenhimne strome, c) metoda sinkronizacije stanične diobe bromodeoksiuridinom/timidinom.

analizu (Slika 1b) (17). Kako bi se postigla bolja razlučivost kromosoma, odnosno da bi se dobili duži kromosomi s većim brojem pruga, u jednoj od primarnih kultura provede se postupak sinkronizacije stanične diobe dodavanjem nekog od inhibitora sinteze DNA (npr. bromodeoksiuridina (BrdU) i timidina) (Slika 1c) (18).

Prema postupniku Udruženja kliničkih citogenetičara Velike Britanije (*Association for Clinical Cytogenetics*) iz 2009. godine, prilikom citogenetske analize kromosomskih preparata potrebno je analizirati minimalno tri metafaze dobivene kratkotrajnom kulturom stanica i minimalno dvije metafaze s dobrom razlučivošću kromosoma iz dugotrajne kulture stanica (19). Radi isključivanja mozaicizma dodatno se pregledava veći broj metafaza, a u slučaju pronalaska jedne ili više metafaza s različitim kariotipom dodatna se analiza radi prema postupnicima *Hsua i Benna* (20).

Osim za potrebe kromosomske analize, preparati dobiveni kratkotrajnom ili dugotrajnom kultivacijom mogu se upotrijebiti i za analizu fluorescencijskom *in situ* hibridizacijom (FISH). Fluorescencijska *in situ* hibridizacija provodi se u slučajevima gdje postoji rizik pronalaska strukturnih kromosomskih poremećaja (npr. roditelji nositelji balansirane translokacije) ili kromosomskih promjena koje se ne mogu uočiti klasičnom citogenetskom analizom (npr. mikrolepcijski sindromi, subtelomerne promjene) (21). Budući da FISH analiza omogućava brzu i jednostavnu analizu specifičnih promjena na velikom broju metafaza, ali i interfaznih jezgara, često se primjenjuje u slučajevima gdje postoji sumnja na mozaicizam, a može se primijeniti kao metoda brzog probira za najčešće aneuploidije (22).

DIJAGNOSTIČKE DVOJBE

U samim početcima izvođenja biopsije korionskih resica, za potrebe kromosomske analize, primjenjivala se samo direktna ili kratkotrajna kultura, a poslije samo dugotrajna kul-

tura stanica. No takav pristup je rezultirao određenim brojem lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata te velikim brojem dvosmislenih rezultata, koji su zahtijevali ponavljanje invazivnog zahvata (3-5% provedenih zahvata), tj. provođenje amniocenteze ili kordocenteze (23, 24). Stoga se 90-tih godina takav pristup napušta i u većini laboratorija se u rutinsku praksu uvodi paralelno uspostavljanje kratkotrajne i dugotrajne kulture stanica (25). Na taj način je mogućnost pogrešne dijagnoze svedena na minimum pa se danas vjerodostojnost analize procjenjuje na otprilike 99,5% do 99,7%. Ponavljanje invazivnog zahvata provodi se u oko 1% slučajeva, najčešće zbog razjašnjavanja nalaza mozaicizma (26, 27). Istodobnim provođenjem obiju metoda kultiviranja gotovo je izbjegnuta mogućnost nedobivanja rezultata, tj. potreba za provođenjem novog invazivnog zahvata zbog nerasta kulture stanica. Iznimno, u slučaju nedovoljne količine uzorka korionskih resica, uspostavlja se samo jedan tip kulture stanica, i to u pravilu dugotrajna kultura mezenhimne strome zbog bližeg razvojnog podrijetla stanica strome i stanica ploda.

Dijagnostički problemi s kojima se danas najčešće suočavamo prilikom citogenetske analize su kontaminacija uzorka majčinih stanicama i nepodudaranje kariotipa dobivenog analizom korionskih resica i kariotipa ploda. Nepodudaranje kariotipa najčešće je posljedica mozaicizma ograničenog na posteljicu.

Kontaminacija majčinih stanicama

Svaki uzorak biopsije korionskih resica sadrži i različitu količinu tkiva bazalne decidue i majčinu krv. Unatoč temeljitom čišćenju i ispiranju resica, u oko 1-1,5% dugotrajnih kultura korionskih resica porastu i majčine stanice. Porast majčinih stanica se uočava tijekom analize, zbog nepodudarnosti spola kod muških plodova ili nepodudarnosti kariotipova u slučaju abnormalnog kariotipa ženskog ploda. Za razliku od dugotrajne kulture, majčine stanice u kratko-

trajnoj kulturi porastu u manje od 0,1% slučajeva (28). Razlog tome je nizak mitotski indeks stanica bazalne decidue. Stoga je uspostavljanje kratkotrajne kulture stanica od iznimne važnosti u rješavanju ovog dijagnostičkog problema. Ipak, kako bi se izbjegla mogućnost dijagnostičke pogreške, u slučaju ovakvog nalaza uputno je ultrazvučno provjeriti spol ploda te usporednom analizom mikrosatelitnih lokusa iz majčine krvi i kulture stanica potvrditi da je doista riječ o kontaminaciji majčinim stanicama (29).

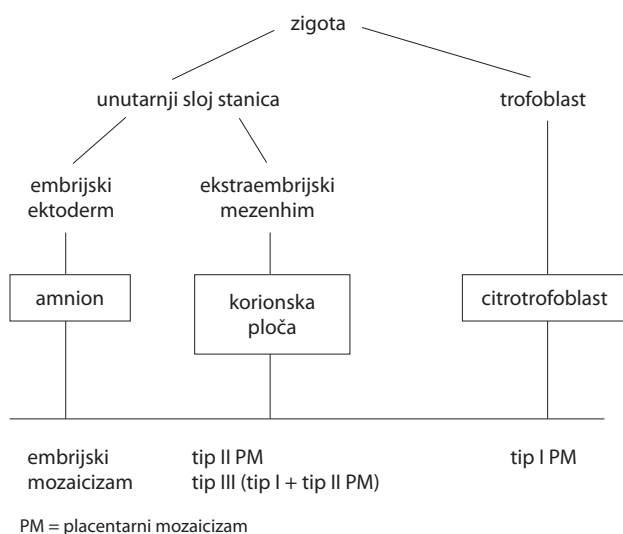
Mozaicizam ograničen na posteljicu (engl. *confined placental mosaicism, CPM*)

Iako plod i fetalni dio posteljice u pravilu imaju istu kromosomsku konstituciju, u oko 1 do 2% biopsija korionskih resica nađe se razlika, tj. uočena kromosomska abnormalnost prisutna samo u tkivu posteljice. Takav slučaj naziva se mozaicismom ograničenim na posteljicu. Sam pojam mozaicizma je postojanje dviju ili više staničnih linija s različitim kro-

mosomskom konstitucijom prisutnih u jedne osobe. Razlike u kromosomskoj konstituciji mogu se odnositi na razlike u broju autosoma, spolnih kromosoma ili postojanju strukturne kromosomske promjene. Postoji niz događaja koji mogu dovesti do pojave mozaicizma, no u osnovi se dijele na dva mehanizma. U prvom primjeru imamo zigotu s normalnim kariotipom, gdje mozaicizam nastaje kao posljedica post-zigotnog nerazdvajanja kromosoma ili *de novo* nastale strukturne promjene. U drugom primjeru imamo aneuploidnu zigotu kod koje tijekom staničnih dioba dođe do „popravlja pogreške“ broja kromosoma. Ovisno o razdoblju embrionalnog razvoja i vrsti stanica u kojima dolazi do promjene u kromosomskoj konstituciji, mozaicizam može biti prisutan samo u posteljičnom tkivu (Slika 2) ili i u posteljici i kod ploda, pa se u tom slučaju naziva pravim fetalnim mozaicismom (engl. *true fetal mosaicism, TFM*) (30).

Tijekom citogenetske analize kromosomska abnormalnost može se uočiti samo u kratkotrajnoj kulturi stanica citotrofoblasta, samo u dugotrajnoj kulturi mezenhimne strome ili u obje kulture. U sva tri slučaja nalaz može biti posljedica pravog fetalnog mozaicizma ili mozaicizma ograničenog na posteljicu, tj. postoji šest mogućih kombinacija, a prema tome i šest tipova mozaicizma (Tablica 1) (31).

U slučaju kad se abnormalan kariotip uoči samo u kulturi stanica citotrofoblasta, gotovo uvijek je riječ o mozaicismu ograničenom na posteljicu (tip I. mozaicizma). Tip I. može nastati kao posljedica nerazdvajanja kromosoma tijekom mejoze, nakon čega slijedi „popravlak pogreške“ tijekom mitotskih dioba stanica (tada je kromosomska promjena prisutna u svim stanicama citotrofoblasta) ili češće za vrijeme mitotskih dioba stanica (kromosomska promjena nalazi se samo u dijelu stanica) (32). Primjer tipa I. PM-a iz baze podataka našeg citogenetskog laboratorija opisuje mozaicizam iz kratkotrajne kulture stanica citotrofoblasta, gdje se u 83% metafaza nađe normalan muški kariotip, a u 17% metafaza homologna Robertsonova translokacija 13q;13q s kariotipom 46,XY,der(13;13)(q10;q10),+13, koji je translokacijski



SLIKA 2. Shematski prikaz podrijetla i raspodjele stanica kod različitih tipova mozaicizma ograničenog na posteljicu

TABLICA 1. Tipovi i učestalost mozaicizama uočeni nakon biopsije korionskih resica

Tip	Priroda mozaicizma	Kariotip			Relativna učestalost (%)
		Citotrofoblast	Mezenhimna stroma	Embrij/plod	
I	PM	Abnormalan	Normalan	Normalan	48
II	PM	Normalan	Abnormalan	Normalan	25
III	PM	Abnormalan	Abnormalan	Normalan	16
IV	FM	Abnormalan	Normalan	Abnormalan	0
V	FM	Normalan	Abnormalan	Abnormalan	4
VI	FM	Abnormalan	Abnormalan	Abnormalan	7

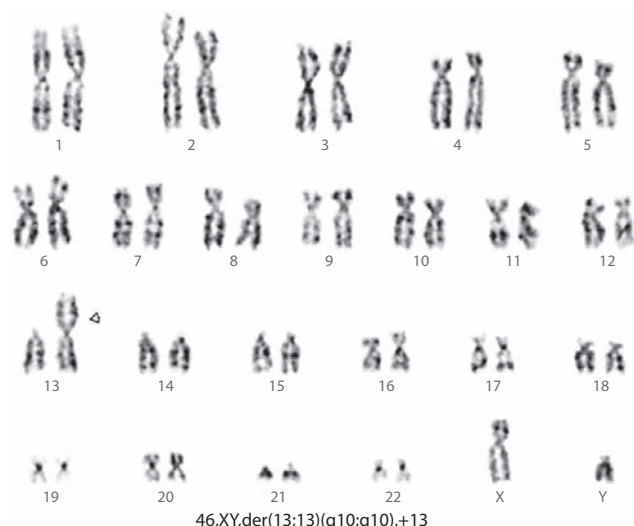
PM – placentni mozaicizam

FM – fetalni mozaicizam

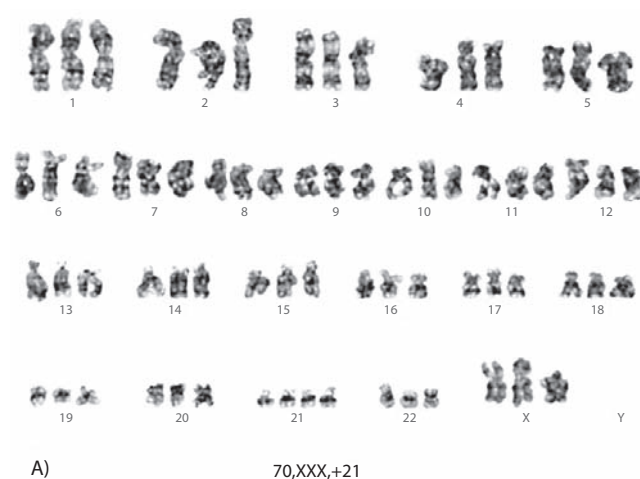
Izvor tablice: EUCHROMIC, Hahnemann i Vejerleslav (1997) (31)

oblik sindroma Patau (Slika 3). U kulturi stanica mezenhimne strome i plodove vode sve analizirane metafaze bile su normalnog kariotipa. Detaljni ultrazvučni pregledi tijekom trudnoće nisu pokazali odstupanje u rastu i morfologiji ploda. Trudnoća je nastavljena te je terminskim porođajem rođeno zdravo muško novorođenče.

U slučaju kad je mozaicizam prisutan u kulturi stanica mezenhimne strome, posrijedi može biti pravi fetalni mozaicizam (tip V. ili VI.) ili mozaicizam ograničen na posteljicu (tip II. ili III.). Tip II. mozaicizma ograničenog na posteljicu najčešće nastaje kao posljedica mitotske pogriješke, dok je tip III. mozaicizma uglavnom posljedica pogriješke do koje je došlo za vrijeme mejoze (33). Mozaicizam tipa III. imali smo kod trudnice s povišenim nalazom kombiniranog probira (rizik za trisomiju 21 1:9), gdje je analizom kratkotrajne i dugotrajne kulture stanica dobivena trisomija 16. Naime, triso-



SLIKA 3. Kariotip s nebalansiranom Robertsonovom translokacijom 13q;13q, dobivenog kratkotrajnom kulturom stanica



mija 16 fetalnog podrijetla je letalna i najčešće završava ranim spontanim pobačajem. Kad se nađe iz kulture korionskih resica, uz normalnu fetalnu morfologiju, uglavnom je ograničena na posteljicu. Citogenetskom analizom kulture plodove vode dobije se normalan ženski kariotip i isključi se uniparentna disomija (UPD) za kromosom 16. Ponovljeni ultrazvučni pregledi pokazali su normalne obrasce rasta te je zdravo žensko novorođenče rođeno u 38. tjednu trudnoće. Četverogodišnje praćenje pokazalo je djetetov normalan rast i razvoj. Zanimljiv slučaj mozaicizma tipa VI. (pravi fetalni mozaicizam) bio je nalaz hipertriploidije s dodatnim kromosomom 21. Biopsija korionskih resica napravi se u 13. tjednu trudnoće zbog ultrazvučnog nalaza septiranog cističnog higroma ploda, veličine 4,8 mm. Citogenetskom analizom kulture stanica citotrofoblasta u svim metafazama dobije se kariotip 70,XXX,+21 (hipertriploidija sa četiri kopije kromosoma 21) (Slika 4a), dok se u kulturi stanica mezenhimne strome u 90% metafaza dobije trisomija 21 (47,XX,+21), a u 10% metafaza kariotip 70,XXX,+21 (Slika 4b).

Kod pronalaska mozaicizma daljnji postupci u vođenju trudnoće ovisit će o raspodjeli stanica s kromosomskom promjenom, vrsti kromosomske promjene, ali i o ultrazvučnom nalazu. Ipak, kako bi se razjasnilo je li riječ o mozaicizmu ograničenom samo na posteljicu ili pravom fetalnom mozaicizmu, u većini slučajeva preporuča se ponavljanje invazivnog zahvata, i to amniocenteze ili rjeđe kordocenteze. Prema podacima iz literature pravi fetalni mozaicizam potvrdi se u svega 15% slučajeva (34, 35). U slučajevima mozaičnih nalaza koji uključuju trisomije autosoma, u obzir treba uzeti i mogućnost postojanja uniparentne disomije (35). Prema nekim autorima prisutnost abnormalnih stanica u tkivu posteljice povećava rizik od spontanog pobačaja (36), zatim može uzrokovati zaostajanje rasta ploda (37, 38), ali i povećava rizik za pojavu hipertenzije uzrokovane trudnoćom (39, 40).



SLIKA 4. Mozaični oblik hipertriploidije sa četiri kopije kromosoma 21 (70,XXX,+21) i trisomije 21. a) Kariotip 70,XXX,+21 dobiven kratkotrajnom kulturom stanica, b) kariotip 47,XX,+21 dobiven metodom sinkronizacije dugotrajne kulture stanica mezenhimne strome.

Kimerizam ograničen na posteljicu (engl. *Confined placental chimerism*)

Nalaz različitih kariotipova, osim dosad navedenog, može biti i posljedica kimerizma ograničenog samo na posteljicu. Pojam kimerizam je postojanje dviju ili više staničnih linija s različitim genetičkim materijalom prisutnih u jedne osobe, tj. postojanje više staničnih linija koje potječu od različitih zigota. Tijekom citogenetske analize najčešće se uočava iz mozaičnog nalaza s različitim spolnim komplementom ili nepodudarnošću spola određenog citogenetskom analizom i ultrazvučnim pregledom. Iako takav nalaz može upućivati i na pravi kimerizam, u većini slučajeva je ipak riječ o postojanju odumrlag dvojajčanog blizanca (engl. *vanishing twin*). U daljnjem vođenju trudnoće kod ovakvih slučajeva svakako se preporuča ponavljanje amniocenteze, ultrazvučna potvrda spola te molekularna analiza mikrosatelitnih lokusa radi isključivanja pravog kimerizma (41).

U našem centru imali smo primjer kimerizma ograničenog na posteljicu kod trudnice s blizanačkom trudnoćom iz postupka izvanmaterične oplodnje, gdje su embriotransferom vraćena tri zametka. Citogenetskom analizom uzorka blizanca kod kojeg je uočen povećan nuhalni nabor, dobije se kariotip 47,XXY (Klinefelterov sindrom), dok se kod morfološki urednog blizanca dobije normalan muški kariotip. No ultrazvučnim pregledom se kod blizanca s 47,XXY kariotipom utvrdi fenotipski ženski spol te se ponovi amniocenteza radi evaluacije nalaza. Citogenetskom analizom dobije se normalan ženski kariotip. Rođeno je muško i žensko novorođenče, urednog općeg statusa, a stanice s kariotipom 47,XXY, čija je prisutnost poslije potvrđena analizom uzorka terminske posteljice, najvjerojatnije su pripadale trećem odumrlom zametku.

ZAKLJUČAK

Unatoč svojim prednostima i uspješnom provođenju već u samim počecima, biopsija korionskih resica je dugo bila zanemarljiva metoda. Razlog tome bilo je to što se smatralo da sam zahvat nosi visoki rizik od spontanog pobačaja, a s druge strane da su laboratorijski postupci izrazito zahtjevni te da imaju relativno visoki postotak neuspješnih ili pogrešnih dijagnoza. Iako se danas zna da su i zahvat i dijagnostički postupci kompliciraniji od onih kod amniocenteze te da zahtijevaju izrazitu stručnost i iskustvo, kako ginekologa tako i citogenetičara, biopsija korionskih resica može se uspoređivati s amniocentezom, posebice kod trudnoća koje nose visoki rizik za kromosomske abnormalnosti. *Los i sur.* proveli su usporedbu dijagnostičke učinkovitosti i vjerodostojnosti rezultata dobivenih biopsijom korionskih resica i amniocentezom. Pritom su uspoređivali stopu neuspjeha laboratorijskog postupka, kakvoću kromo-

somskih preparata (duljinu kromosoma, stopu ponavljanja zahvata zbog loših preparata, broj pogrešnih rezultata uzrokovanih lošim preparatima) i vjerodostojnost dobivenih rezultata (učestalost ponavljanja zahvata i učestalost pogrešne dijagnoze). Rezultati su pokazali da u slučaju provođenja kratkotrajne i dugotrajne kulture korionskih resica nije bilo značajne razlike u kakvoći kromosomskih preparata dobivenih biopsijom korionskih resica i amniocentezom. No broj ponovljenih zahvata zbog nevjerodostojnih rezultata bio je značajno veći nakon biopsije korionskih resica (1,31%) nego nakon amniocenteze (0,1%) (42).

Biopsija korionskih resica kao metoda koja se provodi u prvom tromjesečju trudnoće svakako je prvi izbor u slučajevima visokog rizika za kromosomske abnormalnosti, zatim psihičkog opterećenja trudnice zbog prethodne trudnoće s kromosomopatijom te kod obitelji s genskim ili metaboličkim poremećajem poznatog molekularnog defekta s visokim rizikom rađanja bolesnog potomstva. Nalazi dobiveni u ranoj fazi trudnoće od iznimne su važnosti za roditelje, jer smanjuju napetost dugotrajnog iščekivanja rezultata, omogućavaju roditeljima dovoljno vremena za donošenje odluke o daljnjem tijeku trudnoće te u konačnici omogućuju prekid trudnoće u njenoj vrlo ranoj fazi.

NOVČANA POTPORA/FUNDING

Nema/None

ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL

Nije potrebno/None

DOPRINOSI AUTORA/DECLARATION OF AUTHORSHIP

Vičić A. – pretraživanje literature, izrada slika, pisanje rada/literature search, making pictures, writing papers

Stipoljev F. – pisanje rada, izrada slika, kritička prerada rada/paper writing, making pictures, critical review of the paper

SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST

Autori su popunili *the Unified Competing Interest form* na www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (dostupno na zahtjev) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju financijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati na objavljeni rad./All authors have completed the *Unified Competing Interest form* at www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

LITERATURA

1. Hahneemann N, Mohr J. Genetic diagnosis in the embryo by means of biopsy from extraembryonic membranes. *Bull Eur Soc Hum Genet.* 1968;2:23-9.
2. Kullander S, Sandahl B. Fetal chromosome analysis after transcervical placental biopsies during early pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1973;52:355-9.
<http://dx.doi.org/10.3109/00016347309157092>

3. Department of Obstetrics and Gynecology. Tietung Hospital of Anshan Iron and Steel Co. Anshan, China. Fetal sex prediction by sex chromatin of chorionic villi cells during early pregnancy. *Chin Med J. (Engl)* 1975;1:117-26.
4. Wijnberger LDE, van der Schouw YT, Christiaens GCML. Learning in medicine: chorionic villus sampling. *Prenat Diagn.* 2000;20:241-6. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0223\(200003\)20:3<241::AID-PD793>3.0.CO;2-X](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0223(200003)20:3<241::AID-PD793>3.0.CO;2-X)
5. Alfirevic Z, Sundberg K, Brigham S. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;(3): CD003252.
6. Firth HV, Boyd PA, Chamberlain PF, MacKenzie IZ, Morriss-Kay GM, Huson SM. Analysis of limb reduction defects in babies exposed to chorionic villus sampling. *Lancet.* 1994;343:1069-71. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)90182-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(94)90182-1)
7. Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther.* 2010;27:1-7. <http://dx.doi.org/10.1159/000271995> PMID:20051662
8. Enzensberger C, Pulvermacher C, Degenhardt J, et al. Fetal loss rate and associated risk factors after amniocentesis, chorionic villus sampling and fetal blood sampling. *Ultraschall Med.* 2012;33:E75-9. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1299388> PMID:22623130
9. Mujezinovic F, Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2007;110:687-94. <http://dx.doi.org/10.1097/01.AOG.0000278820.54029.e3> PMID:17766619
10. Caughey AB, Hopkins LM, Norton ME. Chorionic villus sampling compared with amniocentesis and the difference in the rate of pregnancy loss. *Obstet Gynecol.* 2006;108:612-6. <http://dx.doi.org/10.1097/01.AOG.0000232512.46869.fc> PMID:16946222
11. Blumenfeld YJ, Chueh J. Chorionic villus sampling: technique and training. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010;22(2):146-151. <http://dx.doi.org/10.1097/GCO.0b013e3283372365> PMID:20154617
12. Crane JP, Cheung SW. An embryogenic model to explain cytogenetic inconsistencies observed in chorionic villus versus fetal tissue. *Prenat Diagn.* 1988;8:119-29. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.1970080206>
13. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol.* 2008;61:1296-302. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2008.055277> PMID:18755720
14. Simoni G, Brambati B, Danesino C, et al. Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Hum Genet.* 1983;63:349. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00274761> PMID:6862440
15. Gibas LM, Grujic S, Barr MA, Jackson LG. A simple technique for obtaining high quality chromosome preparations from chorionic villus samples using FdU synchronization. *Prenat Diagn.* 1987;7:323-7. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.1970070505> PMID:2956585
16. Yu MT, Yu CY, Yu CX, Maidman J, Warburton D. Improved methods of direct and cultured chromosome preparations from chorionic villous samples. *Am J Hum Genet.* 1986;38:576-81. PMID:3706303 PMCID:PMC1684795
17. Smidt-Jensen S, Christensen B, Lind AM. Chorionic villus culture for prenatal diagnosis of chromosome defects: reduction of the long-term cultivation time. *Prenat Diagn.* 1989;9:309-9. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.1970090503> PMID:2657708
18. Qu J, Dallaire L, Lemieux N, Drouin R, Richer CL. Synchronization of amniotic fluid cells for high resolution cytogenetics. *Prenat Diagn.* 1989;9:49-56. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.1970090107> PMID:2748550
19. Association for Clinical Cytogenetics: Professional guidelines for clinical cytogenetics. Prenatal diagnosis best practice guidelines (2009). Available at: http://www.cytogenetics.org.uk/prof_standards/professional_standards.htm
20. Hsu LYF, Benn PA. Revised guidelines for the diagnosis of mosaicism in amniocytes. *Prenat Diagn.* 1999;19:1081-2. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0223\(199911\)19:11<1081::AID-PD682>3.0.CO;2-Z](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0223(199911)19:11<1081::AID-PD682>3.0.CO;2-Z)
21. Cotter PD, Musci TJ, Norton ME. Rapid prenatal diagnosis in translocation carriers by interphase FISH with chromosome-specific subtelomere probes. *Am J Med Genet A.* 2003;122A:1-5. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.20233> PMID:12949964
22. Toutain J, Epiney M, Begorre M, Dessuant H, Vandenbossche F, Horovitz J, Saura R. First-trimester prenatal diagnosis performed on pregnant women with fetal ultrasound abnormalities: the reliability of interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) on mesenchymal core for the main aneuploidies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;149:143-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.12.015> PMID:20045588
23. Cheung SW, Crane JP, Beaver HA, Burgess AC. Chromosome mosaicism and maternal cell contamination in chorionic villi. *Prenat Diagn.* 1987;7:535-42. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.1970070802> PMID:3684962
24. Martin AO, Simpson JL, Rosinsky BJ, Elias S. Chorionic villus sampling in continuing pregnancies. II. Cytogenetic reliability. *Am J Obstet Gynecol.* 1986;154:1353-62. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378\(86\)90724-6](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378(86)90724-6)
25. van den Berg C, Van Opstal D, Brandenburg H, et al. Accuracy of abnormal karyotypes after the analysis of both short- and long-term culture of chorionic villi. *Prenat Diagn.* 2000;20:956-69. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0223\(200012\)20:12<956::AID-PD956>3.0.CO;2-Y](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0223(200012)20:12<956::AID-PD956>3.0.CO;2-Y)
26. Ledbetter DH, Martin AO, Verlinsky Y, et al. Cytogenetic results of chorionic villus sampling: high success rate and diagnostic accuracy in the United States collaborative study. *Am J Obstet Gynecol.* 1990;162:495-501. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378\(90\)90419-8](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378(90)90419-8)
27. van den Berg C, Van Opstal D, Polak-Knook J, Galjaard RJ. (Potential) false-negative diagnoses in chorionic villi and a review of the literature. *Prenat Diagn.* 2006;26:401-8. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.1421> PMID:16538702
28. Ledbetter DH, Zachary JM, Simpson JL, et al. Cytogenetic results from the U.S. Collaborative Study on CVS. *Prenat Diagn.* 1992;12:317-45. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.1970120503> PMID:1523201
29. Stojilkovic-Mikic T, Mann K, Docherty Z, Mackie Ogilvie C. Maternal cell contamination of prenatal samples assessed by QF-PCR genotyping. *Prenat Diagn.* 2005;25:79-83. <http://dx.doi.org/10.1002/pd.1089> PMID:15662689
30. Kalusek DK, Vekemans M. Confined placental mosaicism. *J Med Genet.* 1996;33:529-33. <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.33.7.529>
31. Hahnemann JM, Vejerslev LO. European collaborative research on mosaicism in CVS (EUCROMIC) – fetal and extrafetal cell lineages in 192 gestations with CVS mosaicism involving single autosomal trisomy. *Am J Med Genet.* 1997;70:179-87. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19970516\)70:2<179::AID-AJMG15>3.0.CO;2-G](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19970516)70:2<179::AID-AJMG15>3.0.CO;2-G)

32. Wolstenholme J. Confined placental mosaicism for trisomies 2, 3, 7, 8, 9, 16, and 22: their incidence, likely origins, and mechanisms for cell lineage compartmentalization. *Prenat Diagn.* 1996;16:511-24.
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0223\(199606\)16:6<511::AID-PD904>3.0.CO;2-8](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0223(199606)16:6<511::AID-PD904>3.0.CO;2-8)
33. Toutain J, Labeau-Gaüzere C, Barnette T, Horovitz J, Saura R. Confined placental mosaicism and pregnancy outcome: a distinction needs to be made between types 2 and 3. *Prenat Diagn.* 2010;30:1155-64.
<http://dx.doi.org/10.1002/pd.2631>
PMid:20936639
34. Phillips OP, Tharapel AT, Lerner JL, et al. Risk of fetal mosaicism when placental mosaicism is diagnosed by chorionic villus sampling. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174:850-5.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9378\(96\)70312-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9378(96)70312-5)
35. Grati FR, Grimi B, Frascoli G, et al. Confirmation of mosaicism and uniparental disomy in amniocytes, after detection of mosaic chromosome abnormalities in chorionic villi. *Eur J Hum Genet.* 2006;14:282-8.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201564>
PMid:16418738
36. Lebedev IN, Ostroverkhova NV, Nikitina TV, Sukhanova NN, Nazarenko SA. Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis. *Eur J Hum Genet.* 2004;12:513-20.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201178>
PMid:15054396
37. Stipoljev F, Latin V, Kos M, Miskovic B, Kurjak A. Correlation of confined placental mosaicism with fetal intrauterine growth retardation. A case control study of placentas at delivery. *Fetal Diagn Ther.* 2001;16:4-9.
<http://dx.doi.org/10.1159/000053871>
PMid:11125243
38. Miura K, Yoshiura K, Miura S, et al. Clinical outcome of infants with confined placental mosaicism and intrauterine growth restriction of unknown cause. *Am J Med Genet A.* 2006;140A:1827-33.
<http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.31389>
PMid:16892301
39. Baffero GM, Somigliana E, Crovetto F, et al. Confined placental mosaicism at chorionic villous sampling: risk factors and pregnancy outcome. *Prenat Diagn.* 2012;32:1102-8.
<http://dx.doi.org/10.1002/pd.3965>
PMid:22961322
40. Robinson WP, Pe-aherrera MS, Jiang R, Avila L, Sloan J, McFadden DE, Langlois S, von Dadelzen P. Assessing the role of placental trisomy in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn.* 2010;30:1-8.
PMid:19918961
41. Falik-Borenstein TC, Korenberg JR, Schreck RR. Confined placental chimerism: prenatal and postnatal cytogenetic and molecular analysis, and pregnancy outcome. *Am J Med Genet.* 1994;50:51-6.
<http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.1320500112>
PMid:8160753
42. Los FJ, van Den Berg C, Wildschut HI, et al. The diagnostic performance of cytogenetic investigation in amniotic fluid cells and chorionic villi. *Prenat Diagn.* 2001;21:1150-8.
<http://dx.doi.org/10.1002/pd.194>
PMid:11787042

SUMMARY

Chorionic villus sampling

Ana Vičić, Feodora Stipoljev

Chorionic villus sampling is an invasive procedure in the first trimester prenatal diagnosis of chromosomal and genetic disorders. Besides amniocentesis, it is the most commonly used invasive technique, and it is routinely performed in most of tertiary medical centers. As a procedure that is used for prenatal diagnosis in the first trimester of pregnancy, it is a preferred technique in cases with a high risk of chromosomal abnormalities, in cases with maternal anxiety due to previous pregnancy with chromosomal aberration, and in couples with a family history of genetic or metabolic disorders of known genetic origin and a high risk of having an affected child. Getting results early in pregnancy is of huge importance for at risk couples due to reduction of anxiety, having more time to make decisions about their pregnancy, and finally getting an opportunity for early pregnancy termination.

Keywords: chorionic villi sampling; chromosome disorders; prenatal diagnosis; mosaicism