

Downov sindrom – laboratorijska diagnostika Down syndrome – laboratory diagnosis

Joško Osredkar*

Deskriptorji
Downov sindrom – diagnostika

Izvleček. V članku je pregledno podano nekaj vedenj o nosečnosti, patološki nosečnosti in najpogostejših kromosomskih boleznih pri ljudeh. Z določanjem koncentracij celokupnega horionskega gonadotropina, prostega estradiola in alfa fetoproteina v serumu nosečnic lahko posredno ugotovimo sestavljeno tveganje, da mati nosi prizadet plod. Koncentracije teh treh analitov v primeru Downovega sindroma značilno odstopajo od medianih vrednosti (za določen teden nosečnosti), ki veljajo za nosečnost z normalnim kariotipom.

Descriptors
Down syndrome – diagnosis

Abstract. Measurements of total chorionic gonadotropin, free estradiol and alpha-fetoprotein levels in the serum of pregnant women permit identification of a combined risk for congenital malformations of the foetus. In Down syndrome, the concentrations of these three parameters differ significantly from the median values in pregnancy with a normal karyotype (for a given gestation week).

Uvod

Downov sindrom (ali trisomija 21) je najbolj pogosta kromosomska bolezen pri ljudeh. Prizadene približno 1 na 600 do 1000 rojenih otrok, in je zato ena izmed najbolj pogostih genetsko določenih vzrokov mentalne zaostalosti v človeški populaciji in hkrati najpogostejši vzrok prirojenih srčnih napak (1).

Že leta 1930 so znanstveniki prišli do ugotovitve, da je Downov sindrom najverjetneje posledica neke kromosomske napake. To so leta 1959 potrdili, ko so dokazali, da imajo bolniki z Downovim sindromom še dodatno kopijo enega izmed najmanjših kromosomov, to je kromosoma 21. Iz tega je izhajala hipoteza, da so značilnosti Downovega sindroma povzročene s prisotnostjo treh kopij genov, lociranih na tem kromosomu, namesto normalnih dveh kopij (1).

Trenutno še nimamo na razpolago presejalnega testa, ki bi bil sposoben specifično zaznati predispozicijo staršev za spočetje otrok z Downovim sindromom. Poznane metode zaznavanja temeljijo na testiranju plodu. To pa opravimo ali neposredno z invazivnimi metodami ali posredno preko pokazateljev razvoja plodu (2).

Ena izmed zelo uporabnih neinvazivnih metod je presejalni test materinega seruma. Leta ne temelji na zaznavanju specifičnega označevalca za Downov sindrom, temveč na ocenjevanju večjega števila dejavnikov tveganja, da mati nosi prizadet plod (2).

*doc. dr. Joško Osredkar, dipl. ing. farm., Klinični center, Inštitut za klinično kemijo in klinično biokemijo, 1105 Ljubljana.

Normalna nosečnost

Oploditev

Oploditev imenujemo prodiranje normalnega spermija v zrelo jajčno celico ženske. To je prvo dejanje oploditve, ki mu sledi zlitje protoplazemskih in nuklearnih delov spolnih celic – gamet. Nato jajčece potuje skozi jajcevod do maternične votline, kjer se vgnezdí (nidira) v endometriju. Nosečnost se prične z vgnezdenjem oplojenega jajčeca v endometriju.

Predpogoj za oploditev in nosečnost je prisotnost zrelega jajčeca in spermija ter možnost njunega srečanja, tj. prehodnost notranjih spolnih organov ženske (maternice in jajcevodov). Razen te anatomske prehodnosti je neizbežen tudi niz sprememb v ženskih spolnih organih, ki omogočajo prodiranje spermijev, prehrano jajčeca, njegovo migracijo in vgnezditev.

Dozorevanje jajčeca pomeni, da en terciarni folikel dozori v Graafov folikel. Dozorevanje jajčeca hkrati pomeni, da v njem poteka redukcijska delitev – meioza. Druga redukcijska delitev pa poteče v zrelem Graafovem foliklu. Praviloma sodeluje pri oploditvi le en spermatozoid, včasih pa jih prodre v protoplazmo jajčeca tudi več. Zaradi viskoznosti ooplazme se spermatozoid počasi prebija skozi ooplazmo, dokler ne prispe v neposredno bližino pronukleusa jajčeca. Pri tem se glava spermatozoida spremeni in pretvori v moški pronukleus. Istočasno se konča druga meiozna delitev in nastane ženski pronukleus; jajčece je pripravljeno za oploditev.

Drugo dejanje oploditve in hkrati njen vrhunec pa je približanje, srečanje in spajanje pronukleusov. S spojitvijo jeter s polovičnim, haploidnim številom kromosomov nastane zigota, živo bitje z diploidnim številom kromosomov (3).

Blastogeneza

Proces oploditve poteka zunaj maternice, v ampularnem delu jajcevoda. Oplojeno jajčece (zigota) se mitotično razdeli v dve celici (blastomeri), ki sta identični z materino celico. Delitve si hitro sledijo, celice postajajo vse manjše. To je stadij morule. Stadij razvoja plodu, pri katerem se znotraj morule ustvari votlina, se imenuje blastocista. To se zgodi tretji dan po oploditvi in v tem času blastocista običajno prispe do maternične votline. Sekretorno spremenjen endometrij s številnimi žlezami, ki izločajo sekrete, vzdržuje razvoj blastociste pred vgnezditvijo, tj. pred vraščanjem v endometrij.

Peti dan ima blastocista že veliko votlino in se že da ločiti celice, ki tvorijo embrioblast – zametek embrija, in trofoblast – celice, ki tvorijo zunanjo plast (3).

Vgnezdenje – implantacija

Oplojeno jajčece je sposobno za vgnezdenje, ko doseže stadij blastociste. Proces implantacije v najzgodnejšem stadiju nastane z biokemično interakcijo med endometrijem in embrionalnim trofoblastom.

Sedmi dan so opazne znatne spremembe trofoblasta. Del trofoblasta, ki se vrašča v endometriju, je hiperplastičen, del endometrija, na katerem poteka vgnezdenje, pa atrofičen (3).

Placentacija

Trofoblast, ki je bil v začetku enoslojen, postaja večslojen, hiperplastičen. Njegov notranji del izgublja epitelni značaj in se pretvarja v vezivni retikulum s številnimi luknjicami. Imenuje se primarni mezoderm. Ta mezoderm predstavlja stik med trofoblastom in embrijem. Njegove celice verjetno dovajajo hrano zarodku, vse dokler se znotraj horionskih resic ne vzpostavi krvni obtok.

Na trofoblastu ločimo dva sloja. Vrhni sloj (materina stran) sestavljajo plasti celic, ki med seboj niso omejene. To je t. i. sincijski sloj. Pod njim se nahaja plast velikih kubičnih celic, t. i. Langhansove celice. Zaradi širine trofoblasta nastajajo na njem resice, ki se daljšajo in gubajo. To so primarne horionske resice.

Zaradi citolitičnega delovanja sincijskega sloja se okrog horionskih resic tvorijo votline. Le-te se širijo, ob tem prihaja do poškodbe materinih žil in skozi te horiodecidualne prostore okrog horionskih resic kroži materina kri.

Takoj po vgnezdenju se v primarnih resicah tvori horionski gonadotropin, ki prodira v materino kri in daje signal rumenemu telescu, naj še naprej raste in se spremeni v nosečno rumeno telesce, da bi se v njem tvorile vse večje količine estrogenov in progesterona (3).

Razvoj horionskih resic

V prvi fazi po implantaciji obstajajo le t. i. primarne resice trofoblasta. Sincijski in Langhansov sloj teh resic predeluje in absorbira hranljive snovi, ki se preko primarnega mezoderma prenesejo do embrija.

Z vraščanjem mezoderma v horionske resice nastanejo sekundarne horionske resice. V tej fazi njihovega razvoja okrog njih že obstajajo horiodecidualni sinusi, skozi katere kroži materina kri. Z vraščanjem krvnih žil s plodove strani nastajajo tercialne horionske resice. Krvne žile in krvne celice se razvijejo v primitivni rumenjaki vrečki, ki se hitro diferencira. Istočasno se razvijejo tudi krvne žile v resicah in horionski membrani. Ko se ta dva vaskularna sistema združita, začne v resicah krožiti kri. To se zgodi približno 24. dan po opoditvi. Ko se razvije krvni obtok v resicah, rumenjaka vrečka atrofira. Tedaj se začne plod prehranjevati preko krvi. Hranljive snovi, resorbirane iz matere krvi, se preko celic trofoblasta prenesejo v embrij z njegovim krvnim obtokom (3).

Hormoni v nosečnosti

V nosečnosti se v materinem telesu močno spremenita razmerje in koncentracija hormonov. Vzrok za to je endokrina dejavnost posteljice in dejstvo, da tudi nespolne endokrine materine žleze močno reagirajo na nosečnost (4).

Hormoni posteljice

V času nosečnosti tvori posteljica velike količine horionskega gonadotropina, estrogenov, progesterona in humanega horionskega somatotropina. Prvi trije, mogoče tudi četrtri, so nujno potrebni za vzdrževanje nosečnosti (4).

Humani horionski gonadotropin – hCG

hCG je glikoprotein z molekularno maso 47000 daltonov; sestavljata ga dve podenoti, označeni kot alfa in beta. hCG se najprej sintetizira v trofoblastu blastociste, v poznejši nosečnosti pa v horionskih resicah in v posteljici. Njegova najpomembnejša funkcija je, da preprečuje propad rumenega telesca. Hkrati tudi spodbuja rumeno telesce, da izloča vse večje količine svojih hormonov: progesterona in estrogenov. Ti hormoni povzročijo, da endometrij maternice nadaljuje z rastjo in shranjevanjem hranilnih snovi. Rezultat tega je, da celice, podobne decidua celicam, ki se razvijajo v endometriju v času normalnega spolnega ciklusa ženske, postanejo prave hranljive decidua celice kmalu po implantaciji zigote. Pod vplivom delovanja hCG rumeno telesce dvakratno poveča svojo velikost približno mesec dni po začetku nosečnosti. Nепrekinjeno izločanje estrogenov in progesterona iz rumenega telesca vzdržuje decidualno naravo endometrija maternice, kar je potrebno v prvih fazah razvoja posteljice in drugih tkiv plodu. Če se rumeno telesce odstrani pred 7. tednom nosečnosti, pride do spontanega splava. Včasih se to zgodi tudi v času do 12. tedna nosečnosti, po tem roku pa posteljica sama izloča dovolj velike količine progesterona in estrogenov. Po tretjem in četrtem mesecu nosečnosti prične rumeno telesce počasi propadati (4).

Estrogeni

Posteljica, skupaj z rumenim telescem, izloča estrogene in progesteron. Ti hormoni se izločajo v celicah sincicijskega trofoblasta. Pred koncem nosečnosti tvori posteljica 30-krat več estrogenov kot pred nosečnostjo.

Izločanje estrogenov iz posteljice se zelo razlikuje od izločanja iz jajčnikov:

- glavnino izločenih estrogenov predstavlja estriol, pri nenoseči ženski pa se tvori zelo malo le-tega;
- estrogeni posteljice se ne sintetizirajo »de novo« iz osnovnih spojin, temveč se androgena steroidna spojina dehidroepiandrosteron, ki nastaja v nadledvičnih žlezah matere in plodu, pretvarja v estradiol in estron, steroid 16-hidroksidehidroepiandrosteron pa se pretvarja v estriol (4).

Večje količine estrogenov v nosečnosti povzročajo:

- povečanje maternice,
- povečanje dojk in rast kanalčkov v njih ter
- povečanje zunanjšega spolovila ženske.

Predpostavljamo, da estrogeni vplivajo tudi na razvoj plodu v času nosečnosti, npr. z nadzorovanjem hitrosti, s katero se razmnožujejo celice v zgodnjih fazah embrionalnega razvoja (4).

Progesteron

Tudi progesteron je hormon, ki je v nosečnosti nujno potreben. Majhne količine le-tega izloča rumeno telesce v začetku nosečnosti, velike količine pa izloča posteljica.

Progesteron ima posebne učinke, ki so nujni za normalen potek nosečnosti:

- povzroča razvoj decidua celic v endometriju maternice,
- zmanjšuje kontraktilnost noseče maternice; na ta način preprečuje, da bi njene kontrakcije izzvale spontan splav,
- pomaga razvoju zigote še pred implantacijo, ker specifično poveča izločanje v jajcevodih in maternici in priskrbi primerne hranljive snovi za razvoj morule in blastociste in
- sodeluje v pripravi dojk na dojenje (4).

Humani horionski somatotropin

Ta hormon je protein z molekulsko maso 38000 daltonov. Začne se izločati okrog 5. tedna nosečnosti in se potem izloča v vedno večji količini, sorazmerno s težo posteljice.

Funkcije tega hormona še niso povsem jasne, ve pa se, da ima nekatere pomembne učinke:

- na poskusnih živalih povzroči razvijanje dojk in včasih vodi do laktacije;
- deluje kot rastni hormon, vendar šibkeje; povzroči prirast beljakovinskih tkiv. Tudi njegova zgradba je podobna zgradbi ravnega hormona, vendar je za vzpodbujanje rasti potrebno 100-krat več humanega horionskega somatotropina kot pa ravnega hormona;
- nedavno so odkrili, da humani horionski somatotropin vpliva na presnovo glukoze in maščob nosečnice; ti učinki pa bi bili lahko pomembni tudi za prehrano plodu. S tem hormonom se zmanjša občutljivost materinih tkiv na inzulin in poraba glukoze, plodu tako ostane na razpolago večja količina glukoze.

Ta hormon pomaga pri sproščanju prostih maščobnih kislin iz maščobnih zalog matere in tako prepušča materi za izvor energije v zameno za glukozo (4).

Ostali hormoni v nosečnosti

Na nosečnost močno reagirajo tudi skoraj vse nespolne endokrine žleze matere. Vzrok temu je povečana presnovna aktivnost matere in dejstvo, da hormoni posteljice delujejo na hipofizo in druge žleze (4).

Hormoni hipofize

Prednji režanj hipofize se v času nosečnosti poveča za 50 % in dvigne proizvodnjo kortikotropina, tireotropina in prolaktina. Po drugi strani pa je zaradi inhibicijskega učinka estrogenov in progesterona iz posteljice zmanjšana proizvodnja folikle stimulirajočega hormona (FSH) in luteinizirajočega hormona (LH) (4).

Hormoni nadledvičnih žlez

Zmerno se poveča izločanje glukokortikoidov iz skorje nadledvične žleze.

Povečano je tudi izločanje aldosterona, ki doseže svoj višek pred koncem nosečnosti. To privede do težnje po večji reabsorpciji natrija iz ledvičnih tubulov in kot posledica tega zadrževanje vode v telesu ter do hipertenzije (4).

Ščitnični hormoni

V času nosečnosti se ščitnica poveča za 50 % in v skladu s tem se poveča proizvodnja tiroksina. Povečana proizvodnja tiroksina je deloma posledica tireotropnega učinka hCG-ja (4).

Hormoni paratireoidnih žlez

Tudi paratireoidne žleze se v času nosečnosti povečajo, še posebej, če materina hrana ni dovolj bogata s kalcijem. Skladno s povečanjem žlez se poveča tudi njihova proizvodnja paratireoidnega hormona. Povečanje teh žlez in izločanja hormonov povzroča, da se iz materinih kosti absorbira kalcij. Namen tega je vzdrževanje normalne koncentracije kalcija v materini ekstracelularni tekočini, ki jo plod potrebuje za osifikacijo svojih kosti.

Za razliko od zgoraj naštetih hormonov ostane izločanje ravnega hormona nespremenjeno. Ravno tako ostane nespremenjeno izločanje kateholaminov (4).

Patološka nosečnost

Patološka stanja, nastala v toku intrauterinega življenja, so lahko posledica naslednjih dejavnikov:

- nenormalnosti, ki se prenašajo z dedovanjem. To so dedne bolezni, prisotne že ob rojstvu. Pri prirojelih napakah, ki se prenašajo genetsko, je lahko vzrok v strukturi ali številu kromosomov. Tip dedovanja ja lahko avtosomni (dominantni ali recesivni), spolni (preko X- ali Y-kromosoma) ali pa poligenski (multifaktorsko dedovanje). Kromosomske aberacije so lahko vzrok različnih sindromov (Downov sindrom, Turnerjev sindrom itd.). Morfološko enaka anomalija je lahko posledica napake v dedovanju, lahko pa nastane zaradi napake v razvoju embrija;
- napake v razviju plodu v času organogeneze (dismorfogeneze). Sem prištevamo vse razvojne anomalije, ki so nastale v času embriogeneze v prvih 10 do 12 tednih in niso dedne, npr. kongenitalni hidrocefalus, kongenitalna katarakta... Danes poznamo vzrok teh nenormalnosti le delno. Znano je, da jih lahko izzovejo razni virusi, rentgenski žarki, atomsko žarčenje, nekatera zdravila, kronične zastrupitve. Pri takem delovanju škodljivih dejavnikov so najbolj poškodovani tisti deli plodu, ki se v tem času najhitreje razvijajo in diferencirajo;
- poškodbe plodu, ki nastanejo po 3. mesecu nosečnosti (razne deformacije in vpliv kužnih in toksičnih dejavnikov na plod). Do deformacij plodu lahko pride zaradi pomanjkanja prostora v maternici. Sem prištevamo tudi okužbe, ki prizadanejo plod po 5. mesecu nosečnosti (3).

Malformacije plodu

Malformacije plodu se delijo na:

- nezdržljive z življenjem (npr. anencefalija, transpozicija velikih krvnih žil),
- težke (malformatio major), ki znatno zmanjšajo sposobnost otroka za življenje (npr. prirojene srčne napake) in
- blage (malformatio minor), ki ne vplivajo na normalne življenjske funkcije (npr. sindaktilija).

Vse te napake se ne odkrijejo ob rojstvu otroka, nekatere šele čez eno ali več let življenja.

Vzroki malformacij so različni. Lahko nastanejo zaradi kromosomskih napak (npr. Downov sindrom), nekatere so vezane na spol (npr. hemofilija). Večina malformacij pa nastane kot posledica škodljivih eksogenih dejavnikov, ki delujejo na jajčece v razvoju. Takšni škodljivi dejavniki so: okužbe, kemikalije, sevanja. Učinek ni odvisen od vrste škodljivega dejavnika, temveč od faze embriogeneze, v kateri deluje (3).

Diagnozo malformacij plodu postavimo na več načinov:

- zgodnja amniocenteza (pred 20. tednom nosečnosti): citogenetsko in biokemično analiziramo plodno vodo. Na ta način dobimo podatke o kromosomskih in biokemičnih napakah plodu. Analizo alfa-fetoproteina v plodni vodi uporabljamo za diagnozo anencefalije;
- amniografija, tj. rentgensko slikanje po predhodnem vbrizganju kontrastnega sredstva v amniotsko votlino. Je uporabna metoda za odkrivanje nepravilnosti nekaterih delov plodu;
- rentgenska slika omogoča diagnozo nepravilnosti kosti; predvsem glave (anencefalija) in okončin (amelija, fokomelija);
- fetoskopijo uporabljamo, če sumimo na nepravilnosti okončin. Pri tem uporabimo poseben instrument, ki ga skozi materin trebuh in prednjo steno maternice uvedemo v amniotsko votlino;
- elektrokardiografija, kardiokotografija sta uporabni za odkrivanje nepravilnosti plodovega srca (3).

Motnje kromosomov

Kromosomske spremembe se kažejo v dveh oblikah, in sicer kot nepravilnosti v številu kromosomov (numerične aberacije) oziroma kot nepravilnosti v zgradbi kromosomov (strukturne aberacije). Možne so tudi hkratne aberacije obeh vrst (5).

Nepravilnosti v številu kromosomov

Temeljno število kromosomov v vrsti je haploidno, takšno, kakršnega najdemo v spolnih celicah. Dve starševski garnituri dajeta ob oploditvi v zigoti dvojno ali diploidno število kromosomov – $2n$. Z njim navadno označujemo število kromosomov v neki vrsti.

Kromosomska števila, ki so drugačna od normalnega, imenujemo heteroploidna. Izvirajo iz poškodb v razporeditvi kromosomov ali kromatid v meiotični ali mitotični delitvi in jih imenujemo evploidna ali anevploidna (5).

Evplodija

Število kromosomov je mnogokratnik haploidnega števila (n). To so t. i. poliploidi, ki jih lahko označimo še bolj specifično, npr. kot triploide ($3n$), tetraploide ($4n$) itd.

Poliploidija nastane navadno zaradi tega, ker jedrni delitvi ali kariokinezi ne sledi tudi delitev celice (citokineza).

Če se delitev ne odvija pravilno, nastanejo v meiozi gametogeneze diploidne spolne celice. Po zlitju s haploidnimi celicami nastanejo triploidne zigote (5).

Anevplodija

Je pojav, kjer se število kromosomov poveča ali zmanjša za enega ali dva kromosoma (npr. $2n - 1$, $2n + 1$ itd.). Prvi primer ($2n - 1$) imenujemo monosomija, drugega pa trisomija ($2n + 1$). Anevplodija nastane zaradi nerazdvajanja (non-disjunction), ko parna kromosoma ali sestrski kromatidi ne gresta k nasprotnima poloma vretena v anafazi meioze ali mitoze. Posledica nerazdvajanja v mitozni bo ena trisomična in ena monosomična hčerinska celica (5).

Nerazdvajanje kromosomov se običajno pokaže v spolnih celicah z enim manjkajočim ali enim dodatnim kromosomom v primerjavi z normalnim komplementom. Ko so te spolne celice oplodjene, nastane monosomična ali trisomična zigota. Pri ljudeh monosomija ni znana, verjetno zato, ker je nezdržljiva z zgodnjim preživetjem. Trisomije so najbolj pogosto ugotovljene kromosomske nepravilnosti in se pojavijo pri najmanj 4 % vseh klinično prepoznanih nosečnosti. Trisomijo običajno povezujemo z enojnim dodanim kromosomom, poznamo pa tudi dvojno trisomijo in mozaično trisomijo. Nerazdvajanje pri človeških trisomijah poteka v prvi ali drugi meiotični delitvi pri materi ali pri očetu. Najpogosteje se to zgodi pri materini prvi meiotični delitvi.

Nerazdvajanje lahko zajame tudi celoten kromosomski komplement, pri čemer je nato spolna celica prazna, diploidna ali poredko poliploidna (5).

Mozaicizem

Beseda mozaik opisuje stanje nekega organizma, sestavljeno iz dveh ali več celičnih vrst, ki so genetično ali strukturno različne, toda izvirajo iz iste zigote. V genetiki imenujemo mozaicizem mikroploidijo takrat, ko imajo posamezne celice različno število ali zgradbo kromosomov. Bolj pogoste so numerične razlike, ki izvirajo iz nerazdvajanja v mitozni (5).

Himerizem

Tudi himera je organizem, ki ima več kot eno celično vrsto, toda v nasprotju z mozaikom sta to celični populaciji, ki izvirata iz različnih zigot. Himerizem nastopa v dveh oblikah. Pri prvi je to dispermija ali fuzija jedra prve blastomere z drugim polarnim telescem, zaradi česar nastane himera diploid/triploid ($2n/3n$). V drugo obliko pa sodijo mehhanizmi, ki omogočajo prenos ali izmenjavo celic med osebki, ki so po poreklu iz dveh različnih zigot. To so zgodnja fuzija dveh embrijev, placentalna križna cirkulacija med dizigotnimi dvojčki in transplacentalna izmenjava med materjo in plodom (5).

Nepravilnosti v zgradbi kromosmov

Strukturne preureditve kromosomov so posledica prečnega preloma enega ali več kromosomov, čemur sledi ponovno združenje pretrganih koncev tako, da se poškoduje linearno zaporedje dedne snovi. Prelom lahko nastane spontano ali pa ga povzročijo različni fizikalni, kemični ali biološki dejavniki (5).

Delecije

Deletiran je kromosom, ki je izgubil del svojega materiala. Odlomljen segment je lahko končni ali vmesni (5).

Obročasti kromosomi

Tudi tu gre pravzaprav za delecijo, ki nastane na obeh krakih kromosoma, pri čemer se izgubita končna segmenta, povežeta pa se oba pretrgana konca in se zaokrožita v obroč s centromerom (5).

Inverzije

Nastanek invertiranega kromosoma potrebuje dva preloma, ki sta lahko na isti ali pa na nasprotnih straneh centromera. Pretrgana konca se spojita tako, da se del kromosoma med prelomoma obrne (5).

Izokromosomi

Izokromosom je metacentričen kromosom, kjer sta oba kraka strukturno in genetično identična. Nastane zaradi prečne cepitve centromera in ponovne združitve sestrskih kromatid (5).

Translokacije

Če prelomu kromosoma sledi prenos odtrganega segmenta z običajnega na novi položaj, ki je navadno na drugem kromosomu, govorimo o translokaciji. V tem primeru vzajemne izmenjave segmenta med dvema kromosomoma, ko nastane uravnotežena translokacija, govorimo o recipročni translokaciji. Redkejša je nerekipročna translokacija, imenovana tudi transpozicija ali insercija.

Poseben primer recipročne translokacije je Robertsonova translokacija ali centrična fuzija, ki nastaja med dvema akrocentričnima kromosomoma. Prelom nastane v bližini centromera. Odlomljena konca se združita v velik metacentrični kromosom in majhen centrični fragment. Centrični fragment se ponavadi izgubi; s tem se zmanjša število kromosomov, fenotip pa ostane nespremenjen. Robertsonova translokacija je posebno pomembna v citogenetiki človeka, saj sodi med najpogostejše preureditve kromosomov pri človeku.

Strukturne preureditve se pokažejo tudi v meiozi, kjer lahko opazujemo najrazličnejše tvorbe, med katerimi imata najhujše posledice inverzija in recipročna translokacija (5).

Duplikacija

V tem primeru se del kromosoma podvoji. Včasih povzroči t. i. delno trisomijo, prav tako kot naj bi delecija vodila do delne monosomije zaradi manjkajočega segmenta (5).

Downov sindrom

Downov sindrom je najbolj pogosta kromosomska napaka pri novorojenih otrocih. Večina prizadetih otrok ima trisomijo kromosoma 21, katere vzrok je izpad kromosomske ločitve v času meioze. Manjši del, približno 4 % opazovanih primerov, pa je rezultat translokacije enega fragmenta kromosoma 21 na drug kromosom (najpogosteje na kromosom 14). Citogenetske študije v letih 1960–70 so privedle do identifikacije oseb z Downovim sindromom, pri katerih zasledimo translokacijo, delno trisomijo 21 in mozaično trisomijo 21. Oblika sindroma je povezana s številom genov, ki so vključeni pri napaki. Tako nekatere osebe izkazujejo šibke simptome, nekatere pa kompleten sindrom.

Simptomi, povezani z Downovim sindromom, vključujejo: duševno zaostalost, prirojene srčne napake, zmanjšan tonus mišičja, nepravilnosti v imunskem sistemu, malformacije prebavil in počasen fizični razvoj. Po 35. letu starosti imajo skoraj vse prizadete osebe poškodbe možgan, podobne tistim pri bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo.

Izčrpajoče posledice Downovega sindroma so povezane s skrajšano pričakovano življenjsko dobo prizadetih oseb. Študija življenjske dobe pri živorojenih otrocih z Downovim sindromom je prikazala, da je le 13,6 % oseb v skupini 1610 bolnikov z Downovim sindromom dočakalo starost 68 let. V normalni populaciji pa je to starost doseglo 78,4 % oseb v skupini 1.500.000 ljudi (6).

Za sedaj še nimamo na razpolago presejalnega testa, s katerim bi lahko specifično zaznali predispozicijo staršev za spočetje otrok z Downovim sindromom. Poznane metode zaznavanja temeljijo na testiranju plodu. To opravimo neposredno z invazivnimi tehnikami ali posredno preko pokazateljev plodu.

Presejalni test materinega seruma ne temelji na zaznavi specifičnega označevalca za Downov sindrom, temveč na ocenjevanju več dejavnikov tveganja, da mati nosi prizadet plod. Upoštevani dejavniki tveganja zajemajo materino starost, koncentracijo materinega serumskega alfa-fetoproteina (AFP), humanega horionskega gonadotropina (hCG) in nekonjugiranega prostega estriola (uE3). Pri neinvazivnih metodah gre za primerjavo relativnih meritev razvoja plodu s kromosomskimi napakami in s pričakovanim normalnim razvojem. Meritve se opravijo na enako starih plodovih. Te meritve so komplementarne, potrdimo jih še z invazivnimi metodami.

Humani kromosom 21

Kromosom 21 je najmanjši med človeškimi kromosomi in predstavlja približno 1,8 % celotnega genoma. V splošnem je sprejeto mnenje, da le trisomija dolgega kraka kromosoma ali le predela 21q22 zadostuje, da povzroči Downov sindrom. To pomeni, da je trisomija v velikosti manj kot 1 % genoma že dovolj, da povzroči sindrom.

Človeški genom vsebuje 3×10^9 baznih parov v DNA in ocenjeno je, da vsebuje 100.000 genov. Glede na to naj bi kromosom 21 vseboval približno $4,5 \times 10^7$ baznih parov v DNA in 1000–1500 genov. Če predpostavimo, da je razporeditev DNA in genov enakomerna, potem dolgi krak kromosoma zajema 3×10^7 baznih parov v DNA in približno 1000 genov.

S pomočjo teh podatkov so znanstveniki zavzeli stališče, da je treba za proučevanje Downovega sindroma identificirati gene in DNA-sekvence na kromosomu 21, te gene natančno mapirati na kromosom 21 in izolirati vsak gen ali predel kromosoma za kasnejše študije, npr. s prenosom v poskusne živali.

Razvijanje mape kromosoma 21 je posebno pomembno, odkar je razvidno, da je trisomija specifičnih področij kromosoma 21 lahko povezana s specifičnimi vidiki fenotipa Downovega sindroma. Natančna mapa tega kromosoma je nujno potrebna za razumevanje pomena teh povezav.

Izolacija vsake regije kromosoma 21 za natančne študije, vključno z vnosom teh regij v miši ali druge poskusne živali za študije njihovih učinkov na fenotip, bi lahko vodila do delitve zdravljenja za različne vidike Downovega sindroma (1).

Pogostost pojavljanja Downovega sindroma

Nevarnost rojstva otroka z Downovim sindromom je približno 0,13%. Ta podatek ustreza 5000 rojstvom letno v ZDA in 900 rojstvom v Veliki Britaniji (2).

Tveganje spočetja otroka z Downovim sindromom je značilno povezano z materino starostjo; eksponentno narašča s starostjo (tabela 1). Tveganje je npr. pri 35-letnicah 1 na 270. Vendar je tveganje, da bo mati donosila tak plod, le 1 na 380, ker 30% prizadetih plodov sponatno splavi (7, 8).

Po drugi strani pa se večina otrok rodi ženskam, mlajšim od 35 let (95%) in se zaradi tega večina otrok z Downovim sindromom rodi mlajšim ženskam (80%), čeprav je nevarnost večja pri starejših (8, 9, 10).

Tabela 1. Tveganje Downovega sindroma, izračunano na osnovi materine starosti (8). * – tveganje v času od 15. do 20. tedna nosečnosti.

Materina starost ob porodu (leta)	Tveganje Downovega sindroma*
21	1 na 1150
24	1 na 950
27	1 na 800
30	1 na 680
33	1 na 450
36	1 na 210
39	1 na 100
42	1 na 40

Diagnostika Downovega sindroma

Prvi presejalni testi za natančno določitev kromosomskih napak so temeljili na amniocentezi. Zaradi težav, povezanih z amniocentezo, so to metodo uporabljali le pri populaciji nosečnic z visokim tveganjem. Na razpolago je bila le ženskam, starim 35 let ali več. Gledano s tega stališča bi bilo lahko ugotovljenih le 20 % vseh nosečnosti z Downovim sindromom. V veliki Britaniji ugotovijo v praksi le 10 % Downovih nosečnosti, ker le manj kot polovici teh starjših žensk opravijo amniocentezo. Očitno je torej, da je katera koli strategija presejanja, ki temelji na populaciji z visokim tveganjem, neprimerna za presejalne teste Downovega sindroma, ker je pogostost prizadetih novorojenčkov večja med populacijo z manjšim tveganjem (11, 12).

Metode detekcije

Invazivne metode

Amniocenteza je metoda, kjer iz maternice odvmemo vzorec amnijske tekočine, ki obdaja plod. Plodove celice, ki so suspendirane v tekočini, nato kultiviramo in izvedemo presejalni test za genetske napake. Amniocenteza se navadno opravlja med 15. in 17. tednom nosečnosti. Pred tem časom vsebuje plodna voda premalo plodovih celic, hkrati pa je tudi količina plodne vode po 15. tednu večja. Zato je nevarnost, da bomo zabodli plod, manjša. Amniocenteza poveča nevarnost spontanega splava za 0,5–1 % (12).

Vzorčenje horionskih resic (CVS – chorionic villus sampling) je postopek, pri katerem odvmemo majhen delček horionske resice iz posteljice za kromosomske analize v prvem trimesečju nosečnosti. CVS se uporablja od leta 1984. Vzorce lahko dobimo s transcervikalnimi (prvotna metoda vzorčenja) ali s transabdominalnimi tehnikami. Primerjalna študija na 3999 ženskah v ZDA je pokazala, da sta transabdominalni in transcervikalni CVS enako varni metodi. Obe izkazujeta za približno 2,5 % povečano nevarnost spontane izgube plodu v prvih 28 tednih nosečnosti (13, 14).

Tveganje, povezano z invazivnimi metodami diagnosticiranja in stroški teh analiz, izključujejo uporabo obeh metod za masovne presejalne teste na nosečnicah.

Neinvazivne metode

Ultrasonografijo lahko uporabimo za detekcijo nepravilnosti, povezanih z Downovim sindromom v drugem trimesečju in za merjenje razmerja med dejansko in pričakovano dolžino stegenice. Kot kritično vrednost razmerja med obema dolžinama stegenice uporabimo 0,94, ki je diagnosticirana za približno tretjino primerov Downovega sindroma. Očitno je, da ultrasonografija ni praktična rešitev za presejalne teste Downovega sindroma, ker je odvisna od spretnosti in presoje operaterja (15–18).

Presejalni test materinega seruma temelji na merjenju multiplih biokemičnih markerjev (uE3, AFP, hCG) in na izračunu dejavnika tveganja, ki temelji na merjenih parametrih in na materini starosti. Na ta način lahko identificiramo ženske z visokim tveganjem rojstva otroka z Downovim sindromom in nato to potrdimo z uporabo ustrezne invazivne me-

tode. Ti presejalni testi ne predstavljajo dodatnega tveganja za plod in lahko temeljijo na avtomatiziranih metodah za določitev zahtevanih biokemičnih parametrov. Zato je možno izvajanje presejalnih testov tudi pri populaciji žensk, mlajših od 35 let. Ta način ponuja možnost zaznave Downovega sindroma v skupini z največjo pojavnostjo prizadetih otrok.

V vsakem primeru – rezultat presejalnih testov je ocenitev tveganja. Temu sledi svetovanje staršem, ki je bistvenega pomena, da si zagotovimo dovoljenje poučenih staršev za nadaljnje invazivno raziskovanje in za prekinitev nosečnosti, ki bi lahko sledila.

Na točnost presejalnih testov vplivajo številni dejavniki, vključno z določitvijo datuma zanositve in materino težo. Še več, zaznava in lažne pozitivne vrednosti so povezane z materino starostjo. To je treba upoštevati pri svetovanju (19).

Pomen točne določitve datuma zanositve

Plodovi z Downovim sindromom in njihove posteljice zaostajajo v razvoju v primerjavi z normalnimi plodovi iste gestacijske starosti. Ta zaostanek v razvoju je povezan s spremembami koncentracij številnih produktov plodu v materinem serumu. Sem sodijo: AFP, hCG, uE3 in prosti beta-hCG (20–26).

Serumske koncentracije vsake izmed teh komponent so tudi povezane z gestacijsko starostjo. Relativne spremembe v koncentraciji lahko nakazujejo Downov sindrom, kakor tudi druge nenormalnosti plodu ali posteljice (27–29).

Za izračun tveganja pojava Downovega sindroma preko meritev komponent v materinem serumu je ključna določitev datuma zanositve, to pa zato, ker izmerjene koncentracije teh komponent variirajo z gestacijsko starostjo. Vsaka izmerjena vrednost normalne populacije mora biti standardizirana glede na pričakovano medialno vrednost normalne populacije pri isti fazi gestacije. Izbira metode za določitev datuma zanositve bo torej imela velik vpliv na zanesljivost izračuna tveganja iz multivariantnega presejalnega testa (30).

Presejalni testi Downovega sindroma v drugem tromesečju nosečnosti

Označevalci v materinem serumu

Alfa-fetoprotein (AFP)

AFP je glikoprotein z molekularno maso 68000 daltonov, proizvajajo pa ga rumenjaka, vrečka in jetra plodu. Njegova funkcija je še zmeraj nejasna, je pa glavni plazemski protein plodu v zgodnji nosečnosti. Koncentracija v plazmi plodu naraste do maksimuma med 12. in 14. tednom nosečnosti (približno 3 g/l); nivoji v materinem serumu pa dosežejo svoj vrh okrog 30. tedna nosečnosti (približno 250 mg/l). Po rojstvu pa nivoji v materini in novorojenčkovi krvi hitro upadejo (31).

Potrjene so študije, ki so nakazovale, da je nivo AFP v materinem serumu pri nosečnicah, ki nosijo otroka z Downovim sindromom, nižji kot medialne vrednosti pri normal-

nih nosečnicah. Nivoji pri nosečnicah s prizadetimi otroki dosegajo 72 % normalnih vrednosti v času med 14. in 21. tednom (20, 21, 33, 34).

Koncentracije AFP v materinem serumu so odvisne od tedna nosečnosti, materine teže (recipročna soodvisnost: nižje vrednosti pri težjih ženskah) in od koncentracije inzulina (nižje vrednosti pri bolnicah s sladkorno boleznijo). Medialne vrednosti pri normalni nosečnosti za čas med 13. in 20. tednom za AFP (kIE/l) so 19,8–64,5 (naraščajoče). Populacijska mediana za AFP v materinem serumu za nosečnice z otroki z Downovim sindromom je določena kot 0,74 mnogokratnikov (normalne) mediane (MoM) v posamezni študiji. Geometrična srednja vrednost izhaja iz 24 različnih študij, ki so zajele 823 nosečnic s prizadetimi plodovi in je enaka 0,74 MoM (35, 36).

Humani horionski gonadotropin (hCG)

hCG sestavljata dve polipeptidni verigi, označeni z alfa in beta. Alfa podenota je v bistvu identična z alfa podenotami ostalih peptidnih hormonov hipofize, specifična biološka učinkovitost pa je podana z beta podenoto. Analitski testi, specifični za hCG, so izdelani tako, da prepoznajo beta podenoto, tudi če je test specifičen za celoten hCG. Tako se številni analitski testi za celokupni hCG nanašajo na analize celokupnega beta-hCG. Teh analitskih testov ne smemo mešati z analitskimi testi prostega beta-hCG, ki so narejeni le za detekcijo proste beta podenote. Za biološko učinkovitost beta podenote hCG-ja obstaja pomembna homolognost z beta podenoto lutinizirajočega hormona. Možno je, da imajo nekatere analize, ki se predpostavljajo kot specifične za beta-hCG, znatno navzkrižno reaktivnost z LH.

Serumske koncentracije hCG-ja eksponentno naraščajo med 3. in 10. tednom po zadnji menstruaciji. Koncentracije dosežejo vrh v času prvega trimesečja (okrog 100.000 IE/l) in nato upadejo v drugem in tretjem trimesečju (42).

Znanstveniki so sledili namigu, da je hCG v materinem serumu potencialno uporaben za presejalne teste Downovega sindroma in z nadaljnjimi študijami ugotovili visoke koncentracije hCG-ja v drugem trimesečju, ki ustrezajo približno 2-kratnim medialnim koncentracijam pri neproblematičnih nosečnostih (2, 21).

Medialne vrednosti pri normalnih nosečnostih v času od 13. do 20. tedna nosečnosti za celokupni beta-hCG so 47.100–20.700 (padajoče). Pri prizadetih nosečnostih varirajo koncentracije celokupnega beta-hCG v drugem trimesečju od 2,10 do 2,50 MoM ali več, v drugi seriji pa od 1,57 do 2,90 MoM. Geometrična srednja vrednost za prizadete nosečnosti, izražena v MoM in določena iz rezultatov 18 študij, ki so v celoti zajele 599 oseb, je bila 2,03 (2, 21).

Prosti estriol (uE3)

Estriol se sintetizira v posteljici iz materinih substratov (holesterol in pregnenolon). Estriol prehaja iz posteljice v materino kri, kjer ga lahko merimo kot prosti estriol. V normalnih nosečnostih naraščajo koncentracije uE3 od približno 4 nmol/l v 15. tednu nosečnosti do približno 40 nmol/l ob porodu.

Koncentracije uE3 v materinem serumu pri nosečnicah z Downovim sindromom dosežejo v drugem trimesečju približno 75 % vrednosti, pričakovanih v normalni nosečnosti. Podatki temeljijo na študiji 77 prizadetih in 385 normalnih nosečnosti (8, 24, 38).

Medialne vrednosti pri normalni nosečnosti za uE3 (nmol/l) v času od 13. do 20. tedna nosečnosti so bile 0,45–15,31 (naraščajoče). Vrednosti uE3 pri Downovem sindromu pa so bile 0,79 in 0,73 MoM. 0,73 MoM je geometrijska povprečna vrednost v materinem serumu, dobljena iz 363 primerov Downovega sindroma v 11 študijah (18, 33).

Mnenja o tem, ali vključitev uE3 v presejalne teste ugodno vpliva na ocenitev multivariantnega tveganja, so deljena. Pri nekaterih študijah je očitno, da uE3 dvigne detekcijsko točko pri presejalnem testu Downovega sindroma in drugih aneuploidij, drugi raziskovalci pa so ugotovili, da ugodno vpliva na presejalni test Downovega sindroma. Teoretično je dokazano, da vsaka dodatna analizirana snov, uporabljena v multivariantnih analizah, doda komponento napake, ki kmalu postane nesprejemljivo velika. Ta učinek lahko razumemo, če upoštevamo, da ima vsaka dodatna analiza možnost, da sama poda rezultat, ki lahko potrjuje diagnozo Downovega sindroma. Če uporabimo več analiz, naraste možnost, da bo ena od njih dala pozitiven rezultat. Nejasno je torej, ali je sploh smiselno uporabljati uE3 za presejalne teste. To bo postalo jasno, ko bomo imeli na razpolago več podatkov (39–42).

Prosti horionski gonadotropin

Pri normalnih nosečnostih najdemo v materinem serumu v drugem trimesečju intaktni hCG v vrednostih, ki variirajo od 20.000 IE/l do 50.000 IE/l. Koncentracije proste beta-hCG podenote dosegaajo povprečno 0,5 % koncentracije intaktnega hCG-ja. Medialne vrednosti za prosti beta-hCG v materinem serumu v času od 14. do 16. tedna so 16,3 mg/l za normalne nosečnosti in 34,7 mg/l za take z Downovim sindromom, v času od 17. do 18. tedna pa je medialna vrednost 10,9 mg/l za normalne in 19,9 mg/l za nosečnosti z Downovim sindromom (25, 26, 42).

Učinkovitost metodologij s prostim beta-hCG je bila potrjena kot boljša od tiste s celokupnim hCG pri presejalnem testu materinega seruma. Kakorkoli, točna ocenitev hCG-ja je pomemben dejavnik pri zanesljivosti metode. Ravno tako pomembna je dobra kontrola in ponovljivost testa. Vprašljiva je stabilnost prostega beta parametra, ker je bilo prikazano, da koncentracija prostega beta-hCG značilno naraste že po šestih urah pri sobni temperaturi. Nejasna je narava tega parametra, saj se je izkazalo, da različna protitelesa vstopajo v interakcije s prostim beta-hCG. Na podlagi tega so se nekateri centri odločili za metodo s celotnim hCG-jem pri presejalnem testu materinega seruma (43).

Kombinacije presejalnih testov

Presejalni test Downovega sindroma temelji na kombiniranju rezultatov iz materinega seruma s starostjo matere v zapleten matematični algoritem. Kakorkoli, vprašljivo je, kateri analit ima največji vpliv in katere kombinacije prinesejo najboljšo zaznavo (odstotek detekcije). Problem lahko oblikujemo v dve preprosti vprašanji: »Ali estriol značilno

doprinese k detekciji?« in »Ali je za detekcijo bolje uporabiti prosti beta-hCG ali celokupni beta-hCG?«. Podan bo kratek oris vsakega modela.

Dvojni test: AFP + celokupni hCG

Evaluacija podatkov, ki jih je zbral neki laboratorij na zahodu Škotske z rutinskimi presejalnimi testi, je pokazala, da je odstotek detekcije oseb z Downovim sindromom, če upoštevamo le materino starost, od 12 do 15 %. Če upoštevamo starost in AFP, znaša 43 %, in če upoštevamo kombinacijo starost + AFP + celokupni beta-hCG (dvojni test), znaša 73 %. Ti rezultati nam pokažejo bistveno izboljšavo odstotka detekcije, ki ga dosežemo z ustrezno izbiro multivariantne metodologije presejalnih testov (20).

Trojni test: uE3 + AFP + celokupni hCG

Kombinacija več analitov za izračun tveganja bi naj teoretično izboljšala odstotek detekcije oseb z Downovim sindromom. Praktično pa lahko težavnost skrbnega in reproducibilnega ocenjevanja multiplih parametrov zmanjša učinkovitost metod, ki temeljijo na metodologiji multiplih analiz.

S kombiniranjem materine starosti ter hCG, AFP in uE3 v materinem serumu dobimo metodo, ki je sposobna odkriti približno 60 % nosečnosti z Downovim sindromom, da je pa 5 % lažno pozitivnih rezultatov (2).

Dvoletna študija presejalnih testov materinega seruma s trojnim testom (hCG, AFP, uE3) na populaciji 9530 žensk z majhnim tveganjem (mlajše od 35 let) je prikazala 57 % občutljivost (odkriti so bili 4 od 7 primerov Downovega sindroma), pri tem pa je 3,2 % lažno pozitivnih rezultatov (11).

Analiza podatkov iz Južnega Walesa in Romforda pa je pokazala, da z dodatkom estriola k dvojnemu testu (AFP, celokupni hCG) ne dosežemo izboljšav (41).

Primerjava celokupnega hCG in prostega beta-hCG

Študije v več raziskovalnih središčih so pokazale, da je pri trojnem testu z uporabo celokupnega hCG odstotek detekcije 51,2 %, odstotek lažno pozitivnih rezultatov pa 5,3 %. Z uporabo prostega beta-hCG je odstotek detekcije enak 60 %, odstotek lažno pozitivnih rezultatov pa 5,1 % (44).

Iz drugih virov pa je razvidno, da z drugačno interpretacijo podatkov dobimo drugačne rezultate. Izračunan odstotek detekcije pri upoštevanju prostega beta-hCG in AFP naj bi bil 54 %. Z uporabo celokupnega hCG in AFP pa je odstotek detekcije enak 57 %. Izhajajoč iz teh virov je torej boljša uporaba kombinacije AFP in celokupnega hCG-ja (45).

Namen naše raziskave

Namen našega dela je za drugo trimesečje nosečnosti določiti medialne vrednosti naslednjih serumskih označevalcev: prostega estriola, alfa-fetoproteina in humanega horionskega gonadotropina, in sicer za populacijo nosečih žensk v Sloveniji. V prihodnosti naj bi se na osnovi teh podatkov izračunalo tveganje, da mati nosi plod z Downovim

sindromom. Mediane želimo primerjati z medialnimi vrednostmi, ki nam jih je posredovalo podjetje Logical Medcal Systems Ltd., ki je zasnovalo računalniški program, s katerim določamo tveganje. Na osnovi primerjave median se bomo odločili, ali je ta program uporaben za nas.

Razvrstitev v skupine

Več let smo zbirali kri nosečnic namenjeno za hormonske analize na področju celotne Slovenije. Kri smo odvzeli nosečnicam v času od 15. do 20. tedna nosečnosti, nosečnice so bile starejše od 35 let. To kri smo nato analizirali v hormonskem laboratoriju na Inštitutu za klinično kemijo in klinično biokemijo. Določali smo kvantitativne vrednosti treh serumskih označevalcev: uE3, AFP in hCG.

Vzorci smo razdelili glede na gestacijsko starost plodu. Le-to je določil ginekolog z ultrazvočnim pregledom in na podlagi datuma zadnje menstruacije.

Vzorci smo dobili iz populacije 174 nosečnic in smo jih razdelili v skupine, kot prikazuje tabela 2.

Tabela 2. Razvrstitev 174 serumskih vzorcev nosečnic v skupine.

Skupina	Gestacijska starost (teden)	Število vzorcev
1	15	40
2	16	44
3	17	25
4	18	22
5	19	24
6	20	19

Normalne vrednosti

Prosti estriol

Normalno je, da produkcija estriola, tako prostega kot celokupnega narašča hkrati z razvijanjem plodu. Njegova koncentracija narašča vse do poroda. Vrednosti v materini krvi variirajo od nosečnice do nosečnice. Normalno območje za določeno gestacijsko starost zajema vse nivoje estriola, ki odstopajo za 50 do 200 odstotkov od mediane za to starost.

Mediane za različne gestacijske starosti so navedene v tabeli 3.

Alfa-fetoprotein

V času nosečnosti koncentracija AFP v materinem serumu narašča, dokler ne doseže maksimuma v času med 28. in 32. tednom nosečnosti. Po 32. tednu prične koncentracija ponovno padati.

Medialne vrednosti za normalno nosečnost so podane v tabeli 3.

Horionski gonadotropin

Serumski nivoji hCG eksponentno naraščajo med 3. in 10. tednom po zadnji menstruaciji. Vrh dosežejo v času prvega trimesečja (okrog 100.000 IE/l) in nato v času drugega in tretjega upadajo.

Normalne mediane vrednosti za gestacijsko starost od 15. do 20. tedna so podane v tabeli 3.

Tabela 3. Normalne medialne vrednosti treh serumskih označevalcev (46). uE3 – prosti estriol, AFP – alfa-fetoprotein in hCG – humani horionski gonadotropin.

Gestacijska starost (tedni)	Medialne vrednosti		
	uE3 (nmol/l)	AFP (kIE/l)	hCG (IE/l)
15	3,89	19,3	29.900
16	4,48	24,9	27.900
17	5,07	31,5	21.600
18	6,46	39,2	19.600
19	7,46	48,1	18.400
20	8,86	58,1	19.500

Rezultati in razprava

Tabela 4. Medialne vrednosti treh serumskih označevalcev analiz vzorcev 174 slovenskih nosečnic. uE3 – prosti estriol, AFP – alfa-fetoprotein in hCG – humani horionski gonadotropin.

Gestacijska starost (tedni)	Medialne vrednosti		
	uE3 (nmol/l)	AFP (kIE/l)	hCG (IE/l)
15	4	21,7	29.693
16	4,5	27,9	26.039
17	5	33,7	21.045
18	6,5	39,8	19.226
19	7	49,5	17.730
20	9	60,8	16.758

Opazimo lahko, da se medialne vrednosti ujemajo z našimi pričakovanji. Pričakovali smo, da koncentracija uE3 v času od 15. do 20. tedna nosečnosti narašča. Enako velja tudi za AFP, za hCG pa smo pričakovali, da bodo koncentracije upadale. To se je v naših raziskavah tudi izkazalo.

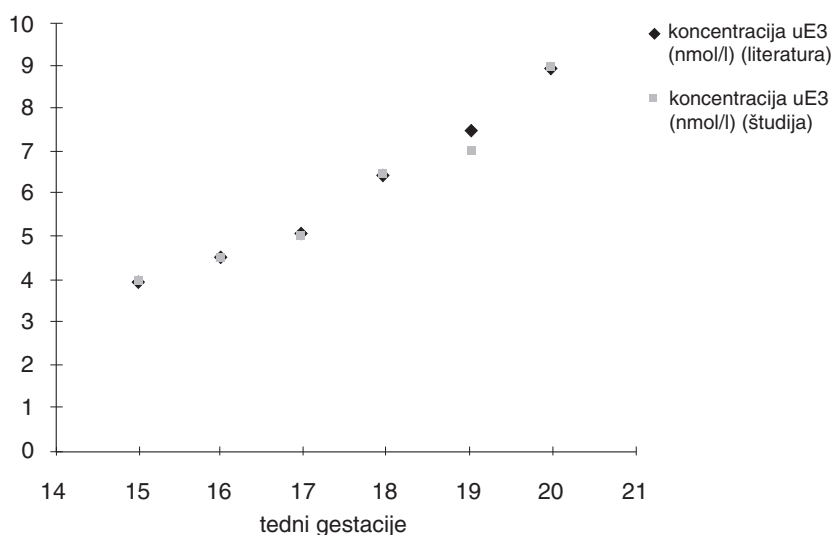
Zanimalo nas je še, ali se naše medialne vrednosti ujemajo s podatki iz literature. Ta primerjava je prikazana v tabeli 5.

Tabela 5. Primerjava median iz literature z našimi vrednostmi treh serumskih označevalcev. uE3 – prosti estriol, AFP – alfa-fetoprotein, hCG – humani horionski gonadotropin, literat. – vrednost mediane v literaturi, študija – vrednost mediane dobljena v naši študiji in % razl. – odstotek v katerem se naša vrednost mediane razlikuje od tiste iz literature.

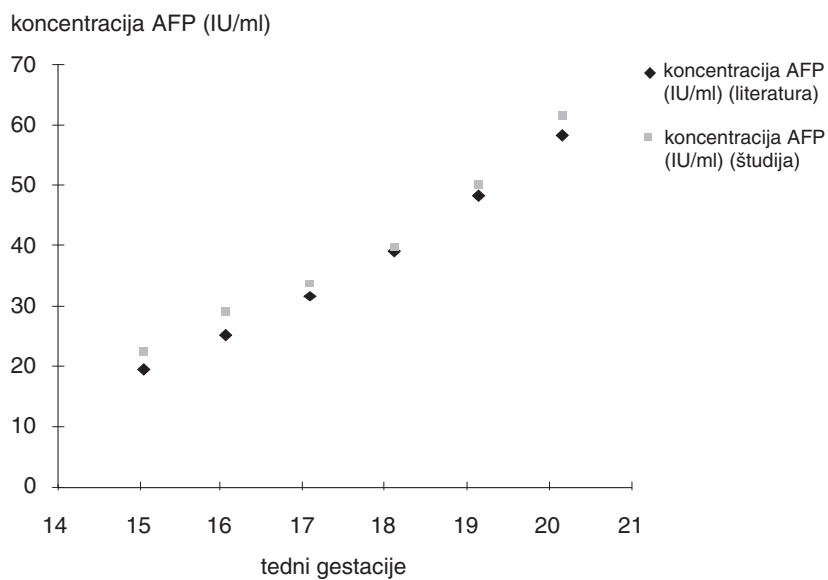
Gestacijski teden	uE3 (nmol/l)			AFP (kIE/l)			hCG (IE/l)		
	literat.	študija	% razl.	literat.	študija	% razl.	literat.	študija	% razl.
15	3,89	4	2,83	19,3	21,7	12,43	29.900	29.693	0,69
16	4,48	4,5	0,45	24,9	27,9	12,05	27.900	26.039	6,67
17	5,07	5	1,38	31,5	33,7	6,98	21.600	21.045	2,57
18	6,46	6,5	0,62	39,2	39,8	1,53	19.600	19.226	1,91
19	7,46	7	6,17	48,1	49,5	2,91	18.400	17.730	3,64
20	8,86	9	1,58	58,1	60,8	4,65	19.500	16.758	14,06

Odstopanje naših median od rezultatov iz literature je podano le z odstotkom razlike. Testa signifikantnosti nismo mogli izvesti, ker nismo imeli podatka o standardnih deviacijah in velikostih vzorcev za podatke iz literature. Zato smo za nazornejšo predstavitev ujemanja obeh vrst podatkov izdelali tri grafe. Na slikah 1, 2 in 3 je prikazana odvisnost

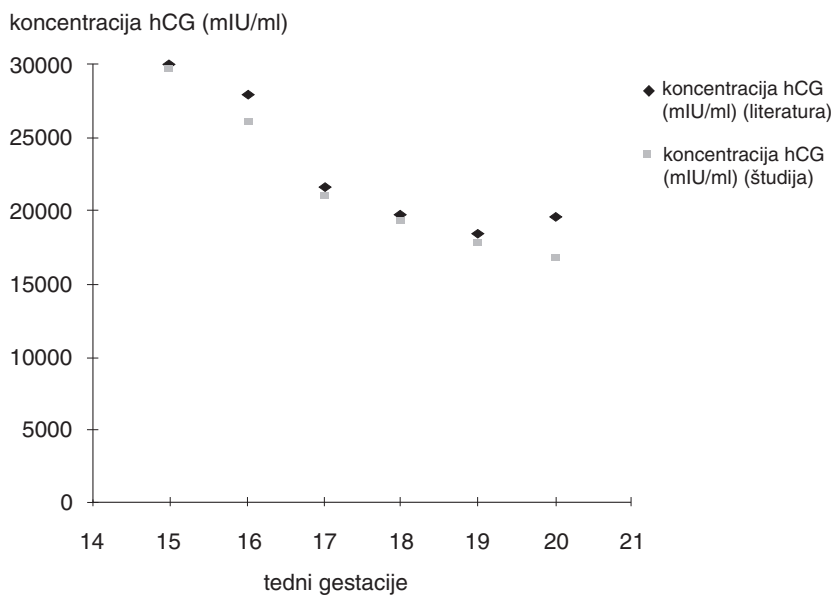
koncentracije uE3



Slika 1. Odvisnost koncentracije prostega estriola v materinem serumu od gestacijske starosti (primerjava podatkov iz literature s tistimi iz naše študije). uE3 – prosti estriol.



Slika 2. Odvisnost koncentracije alfa-fetoproteina v materinem serumu od gestacijske starosti (primerjava podatkov iz literature s tistimi iz naše študije). AFP – alfa-fetoprotein.



Slika 3. Odvisnost koncentracije humanega horionskega gonadotropina v materinem serumu od gestacijske starosti (primerjava podatkov iz literature s tistimi iz naše študije). hCG – humani horionski gonadotropin.

medailnih vrednosti treh serumskih označevalcev od gestacijske starosti – za naše vrednosti in vrednosti iz literature.

Iz grafov je razvidno, da je ujemanje največje pri medialnih vrednostih za uE3, saj se vrednosti iz literature skoraj ujemajo z našimi.

Na sliki 2 je opazno vzporedno naraščanje median z gestacijsko starostjo, tako za literaturne podatke kot za našo študijo. Hkrati je razvidno, da so medialne vrednosti za AFP v materinem serumu pri našem vzorcu višje.

Tudi za hCG velja, da je ujemanje median zadovoljivo; izstopata le mediani za 16. in 20. teden nosečnosti.

Predpostavljamo, da je vzrok tem odstopanjem majhnost našega vzorca. Vzorci za posamezne tedne nosečnosti so vsebovali od 10 do 44 enot, kar je premalo, da bi bili rezultati lahko prenosljivi na populacijo slovenskih nosečnic. Zato še vedno poteka zbiranje vzorcev krvi nosečnic iz celotne Slovenije. V prihodnosti bodo tudi ti vzorci zajeti v izračun median za slovensko populacijo.

Na podlagi naših rezultatov smo se odločili za uporabo računalniškega programa za izračun tveganja rojstva otroka z Downovim sindromom, saj so naše meritve primerljive s tistimi, ki jih je posredovalo podjetje LMS – program Alpha (Meditrade d.o.o.), ki je zasnovalo program (46). Ta program upošteva pri izračunu materino starost in serumske vrednosti treh označevalcev: uE3, AFP in hCG (trojni test), pri čemer je naš test zajel celokupni hCG.

Preverjanje učinkovitosti izbranega računalniškega programa je zahtevno, saj je pogostost pojavljanja Downovega sindroma majhna (1 na 600 do 1000 živorojenih otrok). Zaradi tega je verjetnost, da se bo v vzorcu 174 oseb pojavil kakšen prizadet plod, zelo majhna. Kljub temu pa je bil z našim presejalnim testom materinega seruma že ugotovljen en tak primer, ki so ga pozneje tudi potrdili z amniocentezo.

Metode, ki smo jih uporabili za kvantitativno določanje naštetih treh označevalcev, so visokospecifične in zelo občutljive. Pri vseh treh postopkih smo uporabili visokospecifična protitelesa, ki imajo majhno navzkrižno reaktivnost z ostalimi komponentami seruma, ki so bodisi fiziološko normalno prisotne ali pa so zdravilne učinkovine.

Visoka je tudi občutljivost uporabljenih testov. Pri uE3 je meja zaznave nad 0,15 ng/ml prostega estriola, za AFP je nad 0,5 IE/ml in za hCG 1 IE/l. Na osnovi tega lahko z veliko gotovostjo trdimo, da so dobljene vrednosti dokaj realne. Med individualnimi vrednostmi je opazna velika spremenljivost, zato je tvegano trditi, da so tudi določene mediane realne, saj je bil naš vzorec zelo majhen.

Mislim, da je vpeljevanje diagnosticiranja Downovega sindroma s presejalnimi testi materinega seruma zelo pomembno, saj omogoča cenejšo izvedbo testa ugotavljanja nosečnosti z Downovim sindromom in na ta način dostopnost večjemu številu nosečnic. Hkrati je ta metoda, v primerjavi z amniocentezo in drugimi invazivnimi metodami, zmanjšala nevarnost spontanega splava in poenostavila izvedbo testa.

Bistvo diagnosticiranja Downovega sindroma je v tem, da se nosečnicam, za katere ugotovimo visoko tveganje, da nosijo prizadet plod, svetuje prekinitve nosečnosti. Tukaj pa pridemo do točke, kjer dobi problematika širše razsežnosti, saj se dotaknemo področij etike, morale, verskega prepričanja...

Omeniti velja še to, da so stroški diagnosticiranja Downovega sindroma verjetno manjši od oskrbe in nege ljudi, prizadetih z Downovim sindromom. Zato je smotno vključevanje čim večjega števila nosečnic v presejalne teste Downovega sindroma.

Sklep

Koncentracije uE3 v materinem serumu naših vzorcev v času od 15. do 20. tedna nosečnosti naraščajo z gestacijsko starostjo. Enako velja tudi za AFP. Za hCG pa je odvisnost ravno obratna: z gestacijsko starostjo koncentracije upadajo. Tako povezavo med koncentracijami in gestacijsko starostjo smo pričakovali.

Mediane, ki smo jih določili iz naših vzorcev za posamezne tedne nosečnosti, se dobro ujemajo s podatki iz literature. Nekatera odstopanja so najverjetneje posledica premajhnega vzorca. Potrebno bo še nadaljnje zbiranje serumskih vzorcev nosečnic in vključitev tudi le-teh v izračun medialnih vrednosti.

Odločili smo se, da bomo tudi naprej uporabljali računalniški program za izračun tveganja, ali mati nosi plod z Downovim sindromom, ki ima v izračun zajeto materino starost in materine serumske koncentracije uE3, AFP in hCG.

Literatura

1. Patterson D, Epstein CJ. Molecular genetics of chromosome 21 and Down's syndrome. *Prog Clin Biol Res* 1989; 360: 1-2, 27-29.
2. Wald NJ, Cuckle HS, Densen JW, Nanchahal K, Royston P. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *BMJ* 1988; 297: 883-7.
3. Šulović V. *Poroditeljstvo*. Beograd, Zagreb: Medicinska knjiga, 1990: 33-41, 595-9, 130-4.
4. Guyton AC. *Medicinska fiziologija*. Beograd, Zagreb: Medicinska knjiga, 1989: 1407-11.
5. Schauer P. *Humana genetika*. Ljubljana: Dopsna delavska univerza Univerzum, 1981: 43-54.
6. Baird PA, Sadovnick AD. Life expectancy in Down's syndrome adults. *Lancet* 1988; 2: 1354-6.
7. Cuckle HS, Wald NJ, Thompson SG. Estimating a woman's risk of having pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. *Br J Obstet Gynaecol* 1987; 94: 387-402.
8. Schoenfeld Di Maio M, Baumgarten A, Greenstein RM, Saal HM, Mahoney MJ. Screening for fetal Down's syndrome in pregnancy by measuring maternal serum alpha-fetoprotein levels. *N Engl J Med* 1987; 317: 342-6.
9. Adams MM, Erickson JD, Layde PM, Oakley GP. Down's syndrome: recent trends in United States. *JAMA* 1981; 246: 758-60.
10. Youngs S, Gregson N, Jacobs P. The efficacy of maternal age screening for Down's syndrome in Wessex. *Prenat Diagn* 1991; 11: 419-25.
11. Philips OP, Elias S, Shulman LP, Andersen RN, Morgan CD. Maternal serum screening for fetal Down's syndrome in women less than 35 years of age using alpha-fetoprotein, hCG, and unconjugated estriol: a prospective 2-year study. *Obstet Gynecol* 1992; 80: 353-8.
12. Mueller U, Benz R, Krahnert-Pilat M, Terinde R. Prenatal serum screening for Down's syndrome. *Z Geburt u Perinat* 1992; 196: 129-33.

13. Jackson LG, Wagnser RA, Barr MA. Safety of chorionic villus biopsy. *Lancet* 1986; 1: 674–5.
14. Jackson LG, Wagnser RA, Barr MA. A randomised comparison of transcervical and transabdominal chorionic villus sampling. *N Engl J Med* 1992; 327: 594–8.
15. Benaceraff BR, Gelman R, Frigoletto FD. Sonographic identification of second trimester fetuses with Down's syndrome. *N Engl J Med* 1987; 317: 1371.
16. Lockwood C, Benacerraf B, Krinsky A, Blakemore K. A sonographic screening method for Down's syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157: 813.
17. Perella R, Duerinekx AJ, Giant EG, Tessler F. Second trimester sonographic analysis of Down's syndrome: role of femur length shortening and nuchalfold thickening. *Am J Radiol* 1988; 151: 981–5.
18. Cuckle HS. Ultrasound fetal femur length measurement in the screening for Down's syndrome. *Br J Obstet Gynecol* 1989; 96: 1373–8.
19. Reynolds TM, Nix AB, Dunstan FD, Dawson AJ. Age related detection rates in Down's syndrome screening: An aid to counselling. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 447–50.
20. Cuckle HS, Wald NJ, Lindenbaum RH. Maternal serum alpha-fetoprotein measurement: a screening test for Down's syndrome. *Lancet* 1984; 1: 926–9.
21. Bogart MH, Pandian MR, Jones OW. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat Diagn* 1987; 7: 623–30.
22. Petrocik E, Wassman E, Kelly J. Prenatal screening for Down's syndrome with maternal serum human chorionic levels. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 1168–73.
23. Cannick J, Knight G, Palomaki G, Haddow J, Cuckle H, Wald N. Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 1988; 95: 334–41.
24. Wald N, Cuckle H, Densem J, Nanchahal K, Canick J, Haddow J. Maternal serum oestriol as an antenatal screening test for Down's syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 1988; 95: 334–41.
25. Macri J, Kasturi R, Krantz D, Cook E, Moore N, Young J. Maternal serum Down screening: free β -protein is a more effective marker than human chorionic gonadotropin. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 1248–53.
26. Spencer K. Evaluation of an assay of the free beta subunit of choriogonadotropin and its potential value in screening for Down's syndrome. *Clin Chem* 1991; 37: 809–14.
27. Salafia CM, Silberman L, Herrera NE, Mahoney MJ. Placental pathology at term associated with elevated midtrimester maternal serum alpha-fetoprotein concentration. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 5: 1064–6.
28. Hay DL. Placental histology and the production of human choriogonadotropin and its subunits in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1988; 95: 1268–75.
29. Rochelson B. A quantitative analysis of placental vasculature in the third trimester fetuses with autosomal trisomy. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 59–63.
30. Reynolds T. Practical problems in Down's syndrome screening: What should we do about gestation dating? What is the effect of laboratory imprecision? *Commun Lab Med* 1992; 1: 31–8.
31. Gitlin D. Normal biology of alpha fetoprotein. *Ann N Y Acad Sci* 1975; 259: 7–16.
32. Fuhrmann W, Wendt P, Weitzel HK. Maternal serum AFP as screening test for Down's syndrome. *Lancet* 1984; 2: 413.
33. Baumgarten A, Schoenfeld M, Mahoney MJ, Greenstein RM, Saal HM. Prospective screening for Down's syndrome using maternal serum AFP. *Lancet* 1985; 1: 1280–1.
34. Palomaki GE, Haddow JE. Maternal serum alpha-fetoprotein, age and Down syndrome risk. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156: 460–3.
35. Wald N. The effect of maternal weight on maternal serum alpha-fetoprotein levels. *Br J Obstet Gynaecol* 1981; 88: 1094–6.
36. Wald N, Cuckle H, Boreham J, Stirrat GM, Turnbull AC. Maternal serum alpha-fetoprotein and diabetes mellitus. *Br J Obstet Gynaecol* 1979; 86: 101–5.
37. Chard T, Louings C, Kitau MJ. Alpha-fetoprotein and chorionic gonadotropin levels in relation to Down's syndrome. Letter. *Lancet* 1984; II: 750.
38. Norgaard-Pedersen B, Larsen SO, Arends J, Svenstruo B, Tabor A. Maternal serum markers in screening for Down's syndrome. *Clin Genet* 1990; 37: 35–43.

39. Staples AJ, Robertson EF, Ranieri E, Ryall RG, Haan EA. A maternal serum screen for trisomy 18: an extension of maternal serum screening for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 1025–33.
40. Crossley JA, Aitken DA, Connor JM. Second trimester unconjugated oestriol levels in maternal serum from chromosomally abnormal pregnancies using an optimized assay. *J Med Genet* 1991; 28: 569–70.
41. Reynolds T, John R, Spencer K. The utility of unconjugated estriol in Down's syndrome screening is unproven. *Clin Chem* 1993; 39: 2023–50.
42. Otzurk M. Differential production of human chorionic gonadotropin and free subunits in gestational trophoblastic disease. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158: 193–8.
43. Stevenson H, Leslie H, Sheridan B. Serum free b-human chorionic gonadotropin concentration increase in unseparated blood specimens. *Ann Clin Biochem* 1993; 30: 99–100.
44. Spencer K. Free beta human choriogonadotropin in Down's syndrome screening: a multicentre study of its role compared with other biochemical markers. *Ann Clin Biochem* 1992; 29: 506–18.
45. Wald N. Use of free beta-hCG in Down's syndrome screening. *Ann Clin Biochem* 1993; 30: 512–5.
46. Alpha Software, Logical Medical Systemes Ltd. London, Kodak, 1992.

Prispelo 25.9.1995