



DRUŠTVO ZA KLINIČKU GENETIKU HRVATSKE
Hrvatski institut za istraživanje mozga
Šalata 12, 10 000 Zagreb
Zagreb, 05-06.7.2007.

KLINIKA ZA NEUROLOGIJU KBC i MF Zagreb
PRAKTIČKI ASPEKTI GENETSKOG
SAVJETOVANJA

Poslijediplomski tečaj stjecanja znanja s
provjerom

Voditeljica tečaja
Prof.dr.sc.Nina Canki-Klain

Gost- predavač:
Dr.Susana QUIJANO-ROY,MD, PhD
Hôpital Raymond Poincaré, Garches, INSERM 582,
Institut de Myologie, GH Pitié-Salpêtrière, Paris

PRAKTIČKI ASPEKTI GENETSKOG SAVJETOVANJA

Urednica: Nina Canki-Klain

**DRUŠTVO ZA KLINIČKU GENETIKU HRVATSKE
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Hrvatski institut za istraživanje mozga
Šalata 12, 10 000 Zagreb**

**Izdavač
DRUŠTVO ZA KLINIČKU GENETIKU
HRVATSKE**

**Glavna urednica
Nina Canki-Klain (**

**Grafička oprema naslovne stranice
Nina Canki-Klain
Računalni unos teksta: Astrid Milić i Davor Lessel**

Tisak: COPY SERVIS, Kranjčevićeva 25, Zagreb

Tekstovi nisu lektorirani ni recenzirani

PRAKTIČKI ASPEKTI GENETSKOG SAVJETOVANJA

Priručno štivo
Poslijediplomski tečaj stjecanja znanja s provjerom

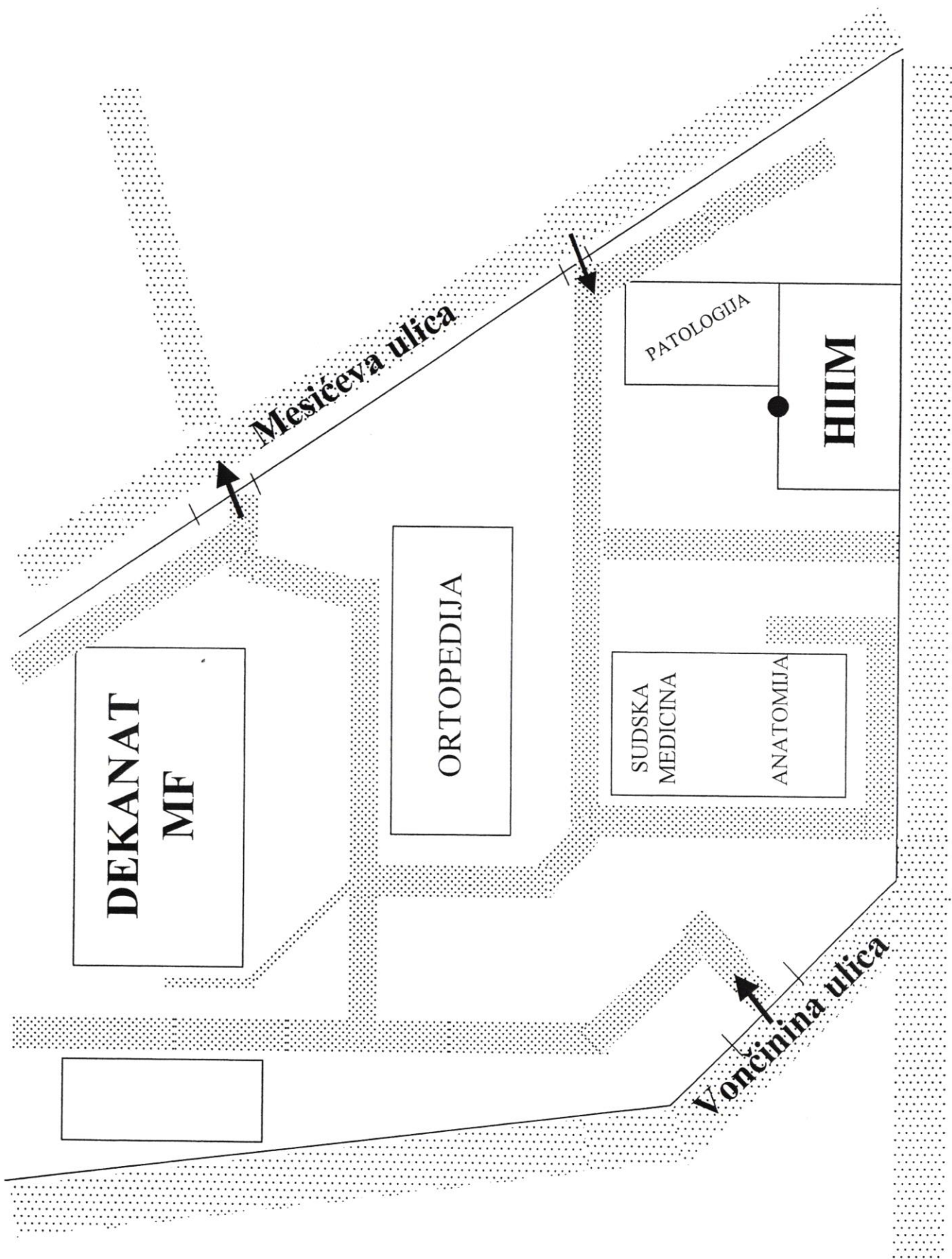
Organizator
DRUŠTVO ZA KLINIČKU GENETIKU HRVATSKE
KLINIKA ZA NEUROLOGIJU KBC I MF ZAGREB

Gost-predavač: Dr. Susana QUIJANO-ROY, MD, PhD
Hôpital Raymond Poincaré, Garches
Institut de Myologie-INSERM U.582, Hôpital Pitié-Salpêtrière
Paris, FRANCE

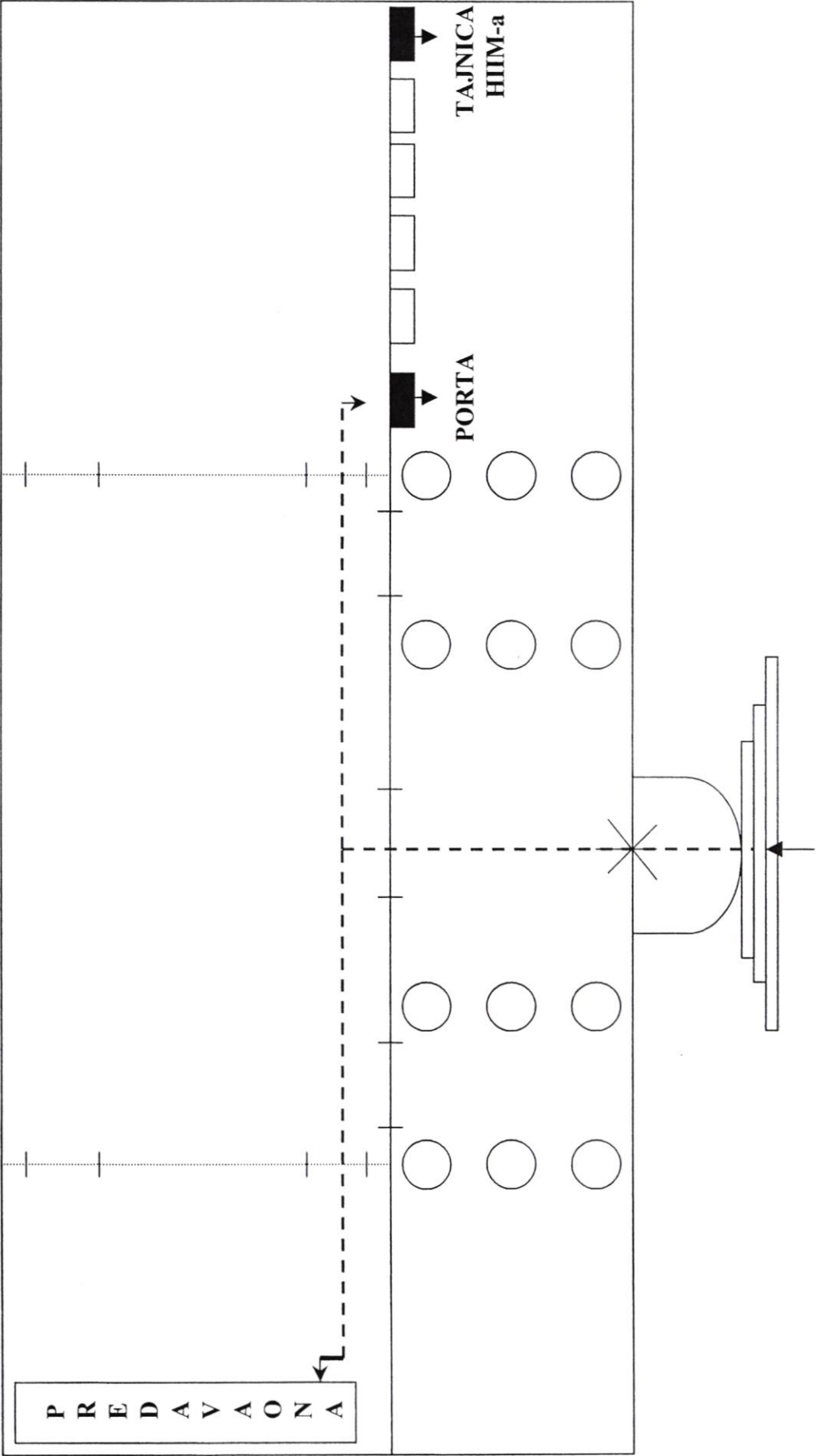
Voditelj tečaja
Prof.dr.sc. Nina Canki-Klain, dr.med.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Hrvatski institut za istraživanje mozga
Šalata 12, 10 000 Zagreb

Zagreb, 05-06.7.2007.



Hrvatski institut za istraživanje mozga



SADRŽAJ

Program poslijediplomskog tečaja
Popis sudionika tečaja

ŠTO JE GENETSKO SAVJETOVANJE

Nina Canki-Klain

ANALIZA RODOSLOVLJA

Astrid Milić

PROBLEMI PRI ODREĐIVANJU RIZIKA MONOGENSKIH BOLESTI

Nina Canki-Klain i Davor Lessel

PRIKAZI ISPITIVANIH OBITELJI

KLINIČKA SLIKA I GENETIKA RETINOBLASTOMA

Neda Stiglmayer, Jelena Juri, Davor Lessel

GENETSKO SAVJETOVANJE U SLUČJAU NEUROFIBROMATOZE TIP 1 I 2 I TUBEROZNE SKLEROZE

Romana Gjergja i Zlatko Sabol

GENETSKO SAVJETOVANJE U POJASNOJ MIŠIĆNOJ DISTROFIJI TIP 2A

Davorka Vranješ, Marija Žagar, Astrid Milić, Nina Canki-Klain

GENETSKO SAVJETOVANJE U FACIOSKAPULOHUEMRALNOJ MIŠIĆNOJ DISTROFIJI

Marija Žagar i Nina Canki-Klain

GENETSKO SAVJETOVANJE U PRENATALNOJ DIJAGNOSTICI

Romana Gjergja i Feodora Stipoljev

GENETSKO SAVJETOVANJE U CITOGENETICI

Vida Čulić

KLINIČKA SLIKA CISTIČNE FIBROZE I GENETSKO SAVJETOVANJE

Dorian Tješić-Drinković, Duška Tješić-Drinković, Nina Canki-Klain

ULOGA KLINIČKE TERATOLOGIJE U GENETSKOM SAVJETOVANJU

Romana Gjergja

GENETSKO SAVJETOVANJE I MALFORMIRANI PLOD

Nina Canki-Klain

PSIHOLOŠKI ASPEKTI GENETSKOG SAVJETOVANJA

Nataša Jokić-Begić

**Okrugli stol: MULTIDISCIPLINARNI PRISTUP BOLESNIKU S
HUNTIGTONOVOM BOLESTI I NJEGOVOJ OBITELJI**

Moderator: Nina Canki-Klain

Sudjeluju: Nataša Jokić-Begić, Ivan Bošnjak, Goran Dodig, Milka Kvakić, Dubravko
Marković, Juraj Sepčić, Jadranka Sertić, Osman Sinanović, Srđana Telarević,
Marina Titlić

Prikaz dva slučaja

Nina Canki-Klain

Kako pristupiti fenotipski zdravim članovima obitelji bolesnika s Huntigtonovom bolešću
Osman Sinanović

PRIKAZI GENETSKOG SAVJETOVANJA

Moderatori: Vida Čulić i Romana Gjergja

KONGENITALNI MIASTENIČNI SINDROM-PRIKAZ SLUČAJA

Antun Sasso, Kristina Lah-Tomulić, Sanja Zaputović

GENETSKO SAVJETOVANJE U SIALIDOZI

Dubravko Marković i Juraj Sepčić

**GENETSKO SAVJETOVANJE U RANOJ DIJAGNOSTICI PRIROĐENE
GLUHOĆE**

Sanja Zaputović, Antun Sasso, Smiljana Ristić, Vladimir Ahel

DIAGNOSTIC DILEMMA IN CYSTIC FIBROSIS

Marina Mencinger, Mira Šilar, Peter Korošec

**TRUDNOĆA I POROĐAJ BOLESNICE S NEPREPOZNATOM WILSONOVOM
BOLEŠĆU I PLANIRANJE SLIJEDEĆE TRUDNOĆE**

Srđana Telarović

RECENT ADVANCES IN CONGENITAL MUSCULAR DYSTROPHIES

Susana Quijano-Roy

PRIKAZI SLUČAJEVA SUDIONIKA TEČAJA (case reports)

Moderatori: Susana Quijano-Roy i Nina Canki-Klain

Prikaz slučaja

Radenka KUZMANIĆ ŠAMIJA

PRAKTIČKI ASPEKTI GENETSKOG SAVJETOVANJA

PROGRAM

ČETVRTAK, 05.7.2007.

- | | |
|--------------------|---|
| 08.00-09.00 | Registracija sudionika |
| 09.00-09.45 | ŠTO JE GENETSKO SAVJETOVANJE
Nina Canki-Klain |
| 09.45-10.00 | ANALIZA RODOSLOVLJA
Astrid Milić |
| 10.00-10.30 | PROBLEMI PRI ODREĐIVANJU RIZIKA MONOGENSKIH BOLESTI
Nina Canki-Klain i Davor Lessel |
| 10.30-10.45 | Rasprava |
| 11.45-11.15 | Odmor |
| 11.15-12.30 | PRIKAZI ISPTIVANIH OBITELJI <ul style="list-style-type: none">• KLINIČKA SLIKA I GENETIKA RETINOBLASTOMA
Neda Stiglmayer, Jelena Juri, Davor Lessel• GENETSKO SAVJETOVANJE U SLUČAJU NEUROFIBROMATOZE TIP1 i 2 i TUBEROZNE SKLEROZE
Romana Gjergja i Zlatko Sabol• GENETSKO SAVJETOVANJE U SLUČAJU POJASNE MIŠIĆNE DISTROFIJE TIP 2A (LGMD2A)
Davorka Vranješ, Marija Žagar, Astrid Milić, Nina Canki-Klain |

- **GENETSKO SAVJETOVANJE U
FACIOSKAPULOHUMERALNOJ MIŠIĆNOJ DISTROFIJI**
Marija Žagar i Nina Canki-Klain

12.30-12.45	Rasprava
12.45-13.15	GENETSKO SAVJETOVANJE U PRENATALNOJ DIJAGNOSTICI Romana Gjergja
13.15-13.30	Rasprava
13.30-15.00	Ručak (Klub HIIM-a)
15.00-15.45	GENETSKO SAVJETOVANJE U CITOGENETICI Vida Čulić
16.45-16.0	Rasprava
16.00-16.30	KLINIČKA SLIKA CISTIČNE FIBROZE I GENETSKO SAVJETO- VANJE Dorian Tješić-Drinković, Duška Tješić-Drinković, Nina Canki- Klain
16.30-16.45	Rasprava
16.45-17.0	Odmor
17.00-17.20	ULOGA KLINIČKE TERATOLOGIJE U GEN.SAVJETOVANJU Romana Gjergja
17.20-17.40	GENETSKO SAVJETOVANJE I MALFORMIRANI PLOD Nina Canki-Klain
17.40-17.50	Rasprava
17.50-18.30	PSIHOLOŠKI ASPEKTI GENETSKOG SAVJETOVANJA Nataša Jokić-Begić
18.30-19.00	Rasprava

PETAK, 06.7.2007.

09.00-11.00 Okrugli stol: MULTIDISCIPLINARNI PRISTUP BOLESNIKU S HUNTINGTONOVOM BOLESTI I NJEGOVOJ OBITELJI

Moderator: Nina Canki-Klain

Sudjeluju:

- Nataša Jokić-Begić
- Ivan Bošnjak
- Goran Dodig
- Milka Kvakić
- Dubravko Marković
- Juraj Sepčić
- Jadranka Sertić
- Osman Sinanović
- Srđana Telarović
- Marina Titlić

11.00-11.30 Odmor

11.30-13.00 PRIKAZI GENETSKOG SAVJETOVANJA

Moderatori: Vida Čulić i Romana Gjergja

- **KONGENITALNI MIASTENIČNI SINDROM-PRIKAZ SLUČAJA**
Antun Sasso, Kristina Lah-Tomulić, Sanja Zaputović
- **GENETSKO SAVJETOVANJE U SIALIDOZI**
Juraj Sepčić i Dubravko Marković
- **GENETSKO SAVJETOVANJE U RANOJ DIJAGNOSTICI PRIROĐENE GLUHOĆE**
Sanja Zaputović, Antun Sasso, Smiljana Ristić, V.Ahel
- **DIAGNOSTIC DILEMMA IN CYSTIC FIBROSIS**
Marina Mencinger, Mira Šilar, Peter Korošec
- **TRUDNOĆA I POROĐAJ BOLESNICE S NEPREPOZNATOM WILSONOVOM BOLEŠĆU I PLANIRANJE SLIJEDEĆE TRUDNOĆE**
Srđana Telarović

13.00-13.30 Rasprava

13.30-15.00 Ručak (Klub HIIM-a)

15.00-16.00	RECENT ADVANCES IN CONGENITAL M. DYSTROPHIES Susana Quijano-Roy
16.00-16.15	Odmor
16.15-17.30	Case reports and discussion Moderatori: Susana Quijano-Roy i Nina Canki-Klain • CASE REPORT Radenka Kuzmanić Šamija
17.30-18.15	Evaluacija tečaja i zaključna sjednica
18.15-19.00	Test provjere znanja

SUDIONICI TEČAJA

Ivan BOŠNJAK

mr.sc., dr.med., spec. neuropsihijatar
Psihijatrijska bolnica Vrapče
Radnička 44, 10 361 SES.KRALJEVAC
Tel: 091/891 2937
e-mail: dr.ivan.bosnjak@gmail.com

Nina CANKI-KLAIN

prof.dr.sc., spec. pedijatar
Profesor medicinske genetike
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
KBC Zagreb, Klinika za neurologiju* i
Hrvatski institut za istraživanje mozga
*Kišpatićeva 12, 10 000 ZAGREB
Tel: 01/ 23 88 356
Fax: 01/ 24 21 846
e-mail: nina.canki-klain@zg.t-com.hr

Tatjana DAMNJANOVIĆ

dr.med., specijalizant kl.genetike
Medicinski fakultet Univ. u Beogradu
Institut za humanu genetiku
Višegradska 26, 11 000 BEOGRAD
Tel: +381 11 361 5781
Fax: +381 11 361 5781
e-mail: tatjanadamnjanovic@yahoo.com

Mensuda HASANHODŽIĆ

dr.med, spec.pedijatar,
spec.med.genetike
Univerzitetski Klinički Centar Tuzla
Klinika za dječje bolesti
Trnovac 30, 75 000 TUZLA
Tel: +387 35 286 630
Fax: +387 35 251 469
e-mail: mensuda_h@yahoo.fr

Nada BOŽINA

dr.med.
KBC Zagreb
Klinički zavod za lab.dijagnostiku
Kišpatićeva 12, 10 000 ZAGREB
Tel: 01/ 4920 025
Fax: 01/ 4920 025
e-mail: nbozina@kbc-zagreb.hr

Vida ČULIĆ

prim.dr.sc., dr.med., spec. pedijatar,
subspec.med.genetičar
KB Split i Med.fakultet u Splitu
Klinika za dječje bolesti
Voditeljica Odsjeka za med.genetiku s
laboratorijem za humanu genetiku i
gen.savjetovalištem
Spinčićeva 1, 21 000 SPLIT
Tel: 021/ 556 111
Fax: 021/ 365 738
e-mail: vculic1@yahoo.com

Goran DODIG

prof.dr.sc., dr.med., spec.psihijatar
KB Split i Medicinski fakultet
Sveučilišta u Splitu
Klinika za psihijatriju
Spinčićeva 1, 21 000 SPLIT
Tel: 021/ 556 111
Fax: 021/ 365 738
e-mail: dodig@kbsplit.hr

Romana GJERGJA

mr.sc., dr.med., spec. pedijatar
KB «Sestre milosrdnice»
Klinika za dječje bolesti
Vinogradska 29, 10 000 ZAGREB
Tel: 01/ 3787 814/903
e-mail: romana.gjergja@zg.t-com.hr

Nataša JOKIĆ-BEGIĆ

doc.dr.sc., klin.psiholog
Sveučilište u Zagrebu
Filozofski fakultet
Odsjek za psihologiju
I.Lučića 3, 10 000 ZAGREB
Tel: 01/ 61 20 089
e-mail: njbegic@ffzg.hr

Ljiljana JURIČIĆ

spec.med.biokemije
Klinički zavod za lab.dijagnostiku
Kišpatićeva 12, 10 000 ZAGREB
Tel: 01/ 23 88 546
Fax: 01/ 23 12 079
e-mail: ljuricic@kbc-zagreb.hr

Milka KVAKIĆ

mr.sc., dipl.ing.soc.rada
KBC Zagreb
Klinika za psihološku medicinu
Kišpatićeva 12, 10 000 ZAGREB
Tel: 01/ 23 88 077

Davor LESSEL

dr.med.
Medicinski fakultet
Hrvatski institut za istraživanje mozga
Šalata 12, 10 000 ZAGREB
Tel: 01 /45 96 843
Fax: 01 / 45 96 942
e-mail: davor.lessel@gmail.com

Matija MARKOVIĆ

student medicine

Jelena JURI

dr.sc., dr.med., spec.oftalmolog
KBC Zagreb
Klinika za očne bolesti
Kišpatićeva 12, 10 000 ZAGREB
Tel: 098/ 411 466
Fax: 01/ 23 88 337
e-mail: jelena.juri@zg.htnet.hr

Zorica KRCUNOVIĆ

dipl.mol.biolog i fiziolog
Medicinski fakultet Univ. u Beogradu
Institut za humanu genetiku
Višegradska 26, 11 000 BEOGRAD
Tel: +381 11 361 5781
Fax: +381 11 361 5781
e-mail: z_law02@yahoo.com

Amina KURTOVIĆ

dr.sc.
Klinički centar Sarajevo
Institut za patologiju
Bolnička 25, 71 000 SARAJEVO
Tel: +387 33 298 364
Fax: +387 33 223 753
e-mail: amina.kurtovic@gmail.com

Nela MAKSIMOVIĆ

dipl.mol.biolog i fiziolog
Medicinski fakultet Univ. u Beogradu
Institut za humanu genetiku
Višegradska 26, 11 000 BEOGRAD
Tel: +381 11 361 5781
Fax: +381 11 361 5781
e-mail: jasna-m@eunet.yu

Marina MENCINGER

dr.med, dr.sc.
Klinični oddelek za pljučne bolezni
Bolnišnica Golnik, Golnik 36
4204 Golnik, SLOVENIJA
Tel: +386 40 393 069
e-mail: marina.mencinger@klinika-golnik.si

Astrid MILIĆ

dr.sc., dipl.ing.med.biokemije
Medicinski fakultet
Hrvatski institut za istraživanje mozga
Šalata 12, 10 000 ZAGREB
Tel: 01 / 45 96 843
Fax: 01 / 45 96 942
e-mail: amilic@hiim.hr

Ivana RAČIĆ

dipl.ing.biologije
KBC Zagreb i Med.fakultet u Zagrebu
Klinički zavod za lab.dijagnostiku
Kišpatićeva 12, 10 000 ZAGREB
Tel: 01/ 23 88 607
Fax: 01/ 2312 079
e-mail: ivanaracic@yahoo.com

Antun SASSO

prof.dr.sc., dr.med., spec.pedijatar
KBC Rijeka i Med.fakultet u Rijeci
Klinika za dječje bolesti
Istarska 43, 51 000 RIJEKA
e-mail: antun.sasso@medri.hr

Juraj SEPČIĆ

prof.dr.sc., dr.med., spec.neurolog i
psihijatar
umirovljenik KBC i MF Rijeka
e-mail: juraj.sepcic1@ri.t-com.hr

Neda STIGLMAYER

prof.dr.sc., dr.med., spec.oftalmolog
KBC Zagreb i Med.fakultet u Zagrebu
Klinika za očne bolesti
Kišpatićeva 12, 10 000 ZAGREB
Tel: 01/ 23 88 420
Fax: 01/ 23 88 337
e-mail: nedastig@mef.hr

Susana QUIJANO-ROY

MD, PhD, AHP
Service de Pédiatrie
Centre de Référence des Maladies
Neuromusculaires GNMH.H.Raymond
Poincaré, Garches, France i
INSERM 582, Institut de Myologie,
GH Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Zlatko SABOL

prim.mr.sc., dr.med., spec.pedijatar
Poliklinika za dječje bolesti
«Dr. Zlatko Sabol»
IV Cvjetno naselje 21, 10 000 ZAGREB
Tel: 01/ 619 00 80
Fax: 01/ 619 00 81
e-mail: poliklinika.sabol@zg.t-com.hr

Jadranka SERTIĆ

prof.dr.sc., spec.med.biokemije
KBC Zagreb i Med.fakultet u Zagrebu
Klinički zavod za lab.dijagnostiku
Kišpatićeva 12, 10 000 ZAGREB
Tel: 01/ 23 88 011
Fax: 01/ 2312 079
e-mail: jadranka.sertic@kbc-zagreb.hr

Osman SINANOVIĆ

prof.dr.sc., dr.med., spec.neurolog
Univerzitetski Klinički Centar Tuzla
Neurološka klinika
Trnovac bb, 75 000 TUZLA
BOSNA I HERCEGOVINA
Tel: + 387 35 261 148; 303 131
Fax: + 387 35 261 148; 250 474
e-mail: osman.s@ukctuzla.ba
sinhu@bih.net.ba

Meliha STOMORNJAK

prof.biologije
Klinički centar Sarajevo
Institut za patologiju
Bolnička 25, 71 000 SARAJEVO
Tel: +387 33 298 364
Fax: +387 33 223 753
e-mail: meliha.stomornjak@gmail.com

Srdana TELAROVIĆ

dr.sc., dr.med., spec.neurolog
KBC Zagreb
Klinika za neurologiju
Kišpatićeva 12, 10 000 ZAGREB
Tel: 01/ 23 88 345
Fax: 01/ 24 21 846
e-mail: srdjana.telarovic@post.t-com.hr

Marina TITLIĆ

doc.dr.sc., dr.med., spec.neurolog
KB Split
Klinika za neurologiju
Spinčićeva 1, 21 000 SPLIT
Tel: 021/ 556 426
Fax: 021/ 556 675
e-mail: marina.titlic@gmail.com

Duška TJEŠIĆ-DRINKOVIĆ

dr.sc., dr.med., spec.pedijatar
KBC Zagreb i Med.fakultet u Zagrebu
Klinika za pedijatriju
Šalata 2, 10 000 ZAGREB
e-mail: duska.tjesic-drinkovic@zg.htnet.hr

Sanja ZAPUTOVIĆ

dr.sc., dr.med., spec.pedijatar
KBC Rijeka
Klinika za dječje bolesti
Istarska 43, 51 000 RIJEKA
Tel: 051/ 659 159
Fax: 051/ 623 126
e-mail: sanjazaputovic@yahoo.com

Radenka ŠAMIJA

dr.med.
KB Split
Spinčićeva 1, 21 000 SPLIT
Tel: 098/ 831 217
e-mail: dada.samija@st.htnet.hr

Dorian TJEŠIĆ-DRINKOVIĆ

doc.dr.sc., dr.med., spec.pedijatar
KBC Zagreb i Med.fakultet u Zagrebu
Klinika za pedijatriju
Šalata 2, 10 000 ZAGREB

Davorka VRANJEŠ

mr.sc., dr.med., spec.neurolog
KBC Zagreb
Klinika za neurologiju
Kišpatićeva 12, 10 000 ZAGREB
Tel: 01/ 23 88 378
Fax: 01/ 24 21 846
e-mail: davorka.vranjes@zg.htnet.hr

Marija ŽAGAR

doc.dr.sc., dr.med., spec.neurolog
KBC Zagreb
Klinika za neurologiju
Kišpatićeva 12, 10 000 ZAGREB
Tel: 01/ 23 88 379
Fax: 01/ 24 21 846
e-mail: mzagar2000@yahoo.com

ŠTO JE GENETSKO SAVJETOVANJE?

Nina CANKI-KLAIN

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Neurološka klinika KBC Zagreb i Hrvatski
institut za istraživanje mozga

Sažetak. Genetsko savjetovanje je specijalizirani medicinski postupak koji u sebi sadrži racionalni i emocionalni dio, a obuhvaća proces komunikacije između liječnika-savjetnika i osobe ili para koji traži savjet u vezi pojave ili ponavljanja genetskog oštećenja u obitelji. Racionalni dio se odnosi na informaciju o prirodi, težini, prognozi, etiologiji, vjerojatnosti nastanka i mogućnostima sprečavanja pojave određene bolesti. Emocionalni dio vodi računa o psihološkom stanju osobe koja treba razumjeti saopćenje kako bi mogla donijeti odluku koja će biti najbolja za nju. Posebna pažnja je posvećena emocionalnom aspektu genetskog savjetovanja što zahtijeva od genetskog savjetnika poznavanje tzv. procesa svladavanja teškoća pacijenta „Coping process“ (1)

Nedovoljan broj educiranih medicinskih genetičara, uz neobično nagli i sve složeniji razvoj metoda koje omogućuju postavljanje točne etiološke dijagnoze idući od stanica blastociste do klinički još zdrave osobe koja nosi smrtonosan gen nalažu multidisciplinarni timski pristup stručnjaka različitih profila od liječnika specijalista, raznovrsnih znanstvenika do kliničkih psihologa i djelatnika socijalne skrbi. Posebno je potrebno naglasiti neophodnost bolje informiranosti liječnika specijalista u primarnoj zaštiti kao i medicinskih sestara i babica koji se uglavnom prvi susreću s osobom koja bi trebala dobiti genetsku informaciju.

UVOD

Genetsko savjetovanje je proces komunikacije između genetskog savjetnika i osobe ili para koji traži genetski savjet u vezi pojave ili ponavljanja genetskog oštećenja u obitelji (2-14). **Cilj** genetskog savjetovanja predstavlja procjenu rizika za pojavu ili ponavljanje neke bolesti ili razvojne anomalije u nekoj obitelji, da se osobi koja traži savjet (bolesnik, roditelji, član obitelji itd.) pruži što potpunije objašnjenje svih problema u vezi određene genetske bolesti te da se ukaže na postojeće mogućnosti izbora. Radi se o originalnom medicinskom postupku u kojem se najčešće:

- obraća paru, a ne pojedincu;
- odnosi se na treću osobu – plod ili dijete koje se treba roditi;
- najčešće ne omogućuje nikakvo liječenje
- sprječavanje se uglavnom svodi na prekid trudnoće ili rjeđe na oplodnju sjemenom davatelja, a još rjeđe umjetnom oplodnjom i izborom zametka. Svrha genetskog savjetovanja nije samo informiranje već i pomoć obitelji u procesu svladavanja teškoća uz bodrenje i podržavanje u donošenju odluke.

Prema tome genetsko savjetovanje je specijalizirani medicinski postupak koji u sebi sadrži racionalni i emocionalni dio. Racionalni se odnosi na informaciju o prirodi oštećenja, njegovoj težini i prognozi te o mogućnosti eventualnog liječenja. Neophodno je informirati o etiologiji oboljenja i objasniti ju ako je poznata, a ukoliko nije treba to istaknuti. Informira se o vjerojatnosti ponavljanja bolesti te o postojećim mogućnostima sprečavanja njene pojave ili ponavljanja.

Opće je poznato da je genetsko savjetovanje pružanje svih dostupnih podataka o genetskom oštećenju. Manje je poznata važnost emocionalnog pristupa osobi ili paru koji traži genetski savjet. Treba voditi računa da su osobe koje dolaze u savjetovanište frustrirane situacijom u kojoj se nalaze. One najčešće imaju svjestan ili nesvjestan osjećaj krivnje koji u nekim slučajevima mogu projicirati na partnera.

PRINCIPI GENETSKOG SAVJETOVANJA

I. Tko traži genetski savjet?

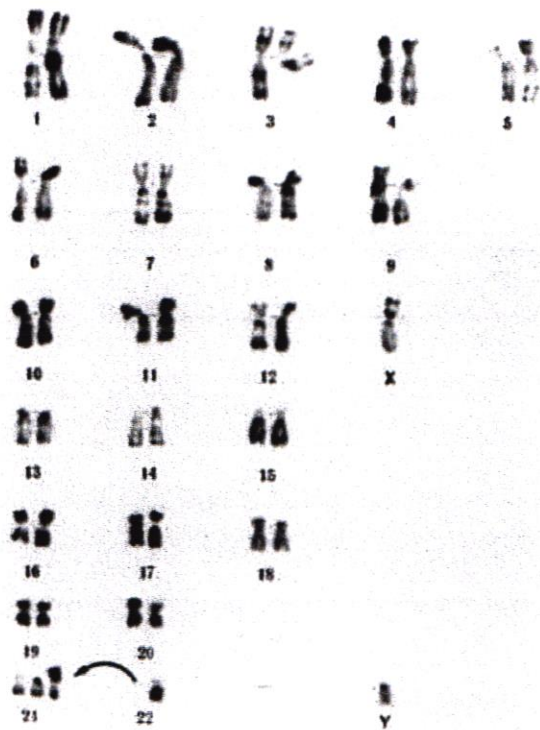
1. Najčešće su to roditelji koji dolaze nakon rođenja prvog djeteta s nekom mogućom genetskom bolešću, prirođenom razvojnom nepravilnošću ili zaostalošću u psihomotornom razvoju (Sl.1.-4).

R-401



47, XY, +21

Slika 1.



Slika 2.



Slika 3.

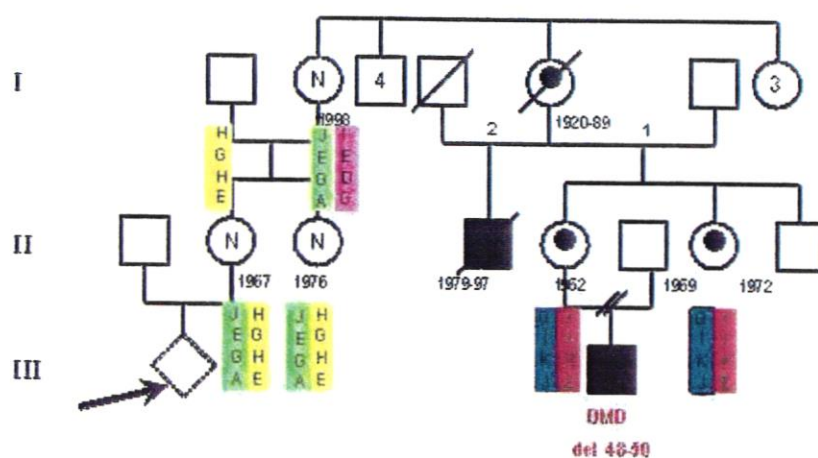


Slika 4.

2. Katkada se radi o poznatoj bolesti u obitelji-osobito bolesti vezane na X-kromosom koje se prenose preko zdravih nositeljica patološkog gena (Duchenneova mišićna distrofija; hemofilija;). Tada savjet traže ženski članovi obitelji premda koji puta dosta udaljeni (Sl.5)

Duchenneova mišićna distrofija (DMD) - korisnost metoda molekularne biologije u otkrivanju nositeljica i u prenatalnoj dijagnostici

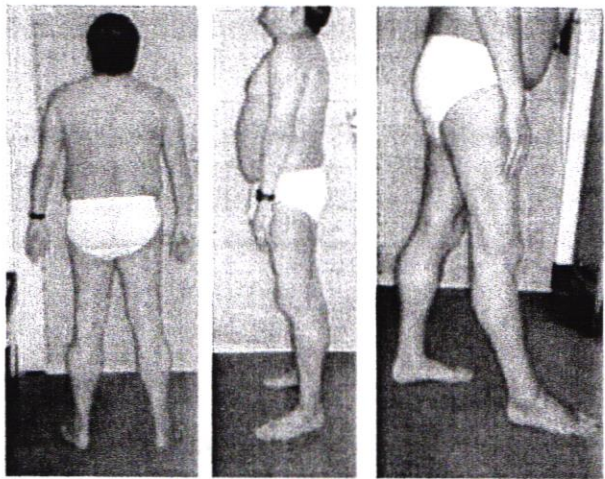
Obitelj br. 164



Slika 5.

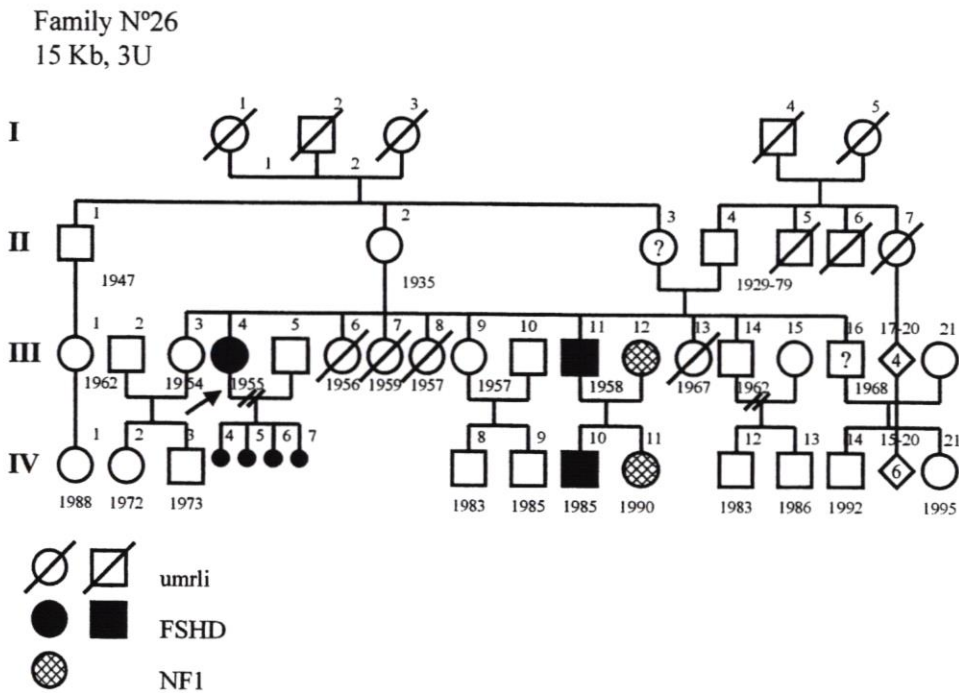
3. Rjeđe se radi o jednom od supružnika koji ima genetsku bolest i želi znati kakav je rizik da ju prenese na svoje potomstvo (Sl.6-7).

BMD Dys del 45-47



- U osnovnoj igrao košarku
- Bolest otkrivena pri novačenju
- CK 3XN u 36.god.

Slika 6.



Slika 7.

4. Napokon imamo novu kategoriju mladih, zdravih ali rizičnih osoba za pojavu bolesti u ranijoj ili kasnijoj odrasloj dobi (prototip predstavlja Huntingtnova bolest o kojoj će biti posebno govora.

II. Kada?

Bilo bi vrlo poželjno da se genetski savjet dobije prije trudnoće kako bi se imalo dovoljno vremena za postavljanje točne dijagnoze, što nerijetko zahtijeva pregled ostalih zdravih i možda bolesnih članova obitelji, izvođenje analiza koje nije moguće brzo napraviti (genetska heterogenost; specijalizirani laboratoriji u zemlji ili inozemstvu itd.) te psihološke pomoći paru pri njihovoj odluci.

Kada se radi o prvoj pojavi bolesnog djeteta u obitelji, idealno vrijeme je teško odrediti. Prerano savjetovanje neki roditelji mogu loše prihvatiti jer je njihova pažnja usmjerena isključivo na skrb o bolesnom djetetu. Ukoliko se kasni sa savjetovanjem, može doći do previda rizika i traženje genetskog savjeta tek tijekom nove trudnoće, što vrlo otežava postupak.

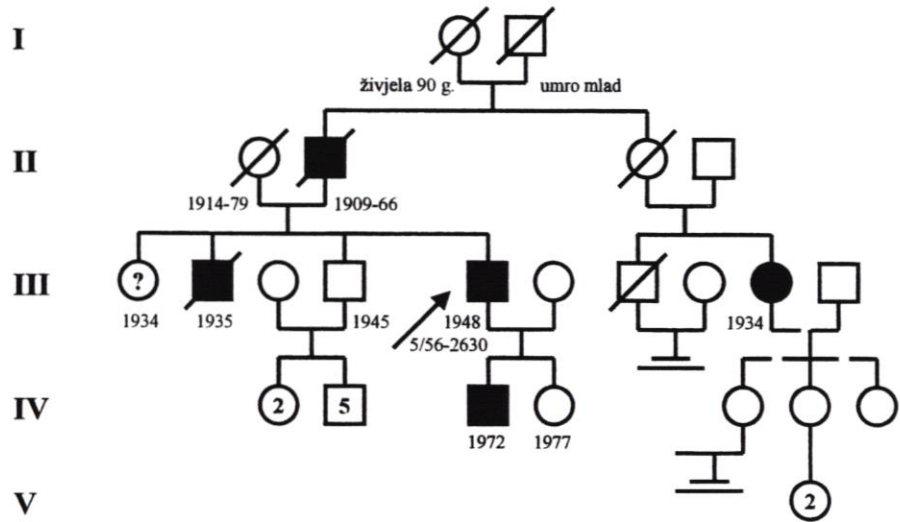
III. Tko treba dati genetski savjet?

Bilo bi poželjno da savjet daje liječnik-specijalist medicinski genetičar, a ne specijalist koji skrbi o bolesniku i čiji ispravni stavovi o realnom riziku i njegovom sprječavanju roditelji mogu loše prihvatiti. U svakom slučaju medicinski genetičar treba raspolagati maksimalnim znanjem o bolesti, o njezinoj prognozi i mogućim terapijskim perspektivama. Nadalje, uska suradnja liječnika koji brine o bolesniku, medicinskog genetičara i dijagnostičkih laboratorija omogućuje najbolju brigu o bolesniku i sprječavanju ponavljanja bolesti.

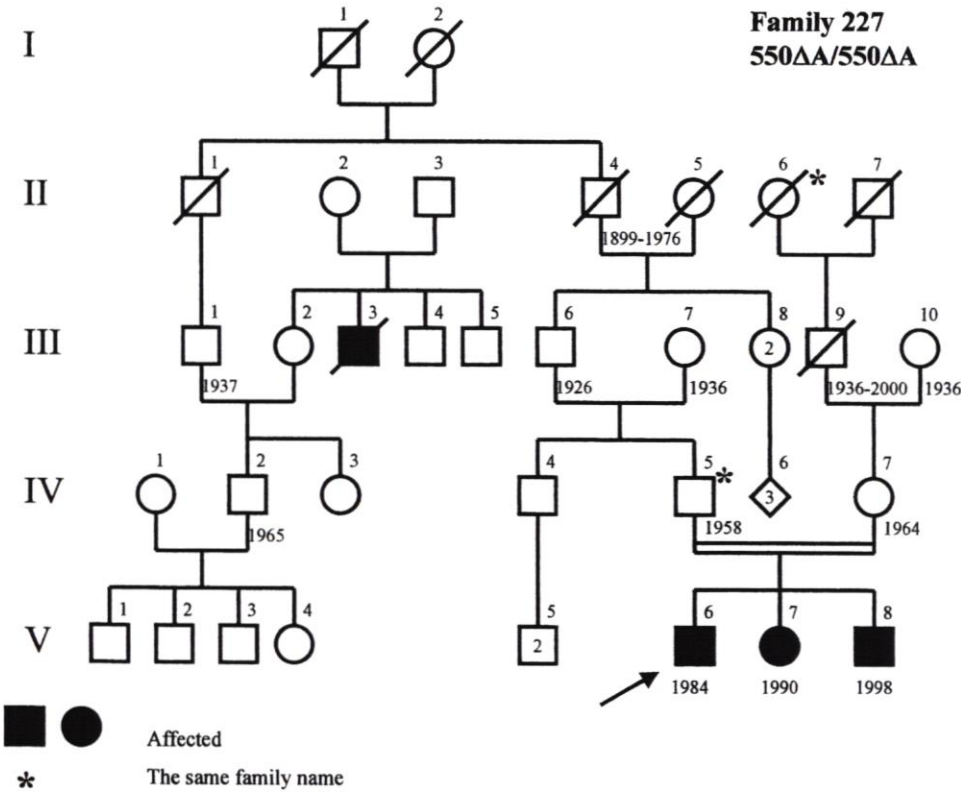
IV. Kako?

1. Obiteljski podaci predstavljaju prvu i jednu od najvažnijih etapa genetskog savjetovanja. Detaljno crtanje obiteljskog stabla (genealoška analiza) uz upotrebu međunarodnih simbola omogućuje jasan način prenošenja (Sl.8-9).
2. Postavljanje točne etiološke dijagnoze je osnova svakog genetskog savjetovanja.
 - Ako se radi o živom bolesniku, a uputna dijagnoza nije sigurna potrebno je nastaviti s ispitivanjima kako bi se došlo do što sigurnije dijagnoze.
 - Radi li se o sumnji na određenu bolest za koju medicinski genetičar nije kompetentan, bolesnika je potrebno uputiti specijalistu koji može potvrditi dijagnozu kako bi se dalo ispravno genetsko savjetovanje.
 - U slučaju bližeg ili daljeg srodstva između bolesnika i para koji traži savjet (ujak, bratić, nećak itd.) može se postaviti pitanje povjerljivosti podataka do kojih je liječnik došao na osnovi medicinske dokumentacije bez dozvole bolesnika ili njegove obitelji. U određenim slučajevima genetičar može dati genetski savjet bez otkrivanja identiteta indeks slučaja.

Nº 126
DM 5 / 56 - 2630 CTG



Slika 8.



Slika 9.

PROCJENA RIZIKA

1. Procjena rizika u slučaju monogenских bolesti nije teška pod pretpostavkom da je dijagnoza točna

Procjena se osniva na određivanju egzaktnе dijagnoze ili u nedostatku iste na osnovi obiteljskih podataka (vjerojatnost recesivne bolesti u slučaju srodstva, očito dominantan način nasljeđivanja ili X-vezan .

2. Procjena na osnovi iskustva - daje se na temelju poznatih podataka dobivenih opažanjem, a bez teorijskog modela.

Taj oblik procjene se upotrebljava pri anomalijama kromosoma (Sl.10) i multifaktorskim bolestima (česte malformacije: kardiopatija, rascjepi usana i nepca, disrafije središnjeg živčanog sustava. U takvoj se situaciji možemo nalaziti u slučaju:

- Genetske heterogenosti kada istu bolest može uzrokovati više gena koji se mogu nasljeđivati na više načina, a podaci kojima raspolažemo nam ne omogućuju točno određivanje nasljeđivanja
- Kada postoje ne genetski uzroci bolesti.

3. Uvjetni rizik

Ovdje se radi o usklađivanju a priori rizika uvrštavajući u njega obiteljske ili neke laboratorijske podatke. Npr. žena koja ima tri zdrava dječaka ima manji rizik da je nositeljica za neku X-vezanu bolest od žene koja nije imala dijete, premda obe a priori imaju iste rizike.

RASPODJELE, NASTANAK I RIZIKO ZA TRI 21 RAZNOVRSNIH TIPOVA TRANSLOKACIJA

TIP TRANSLO- KACIJE	t(Dq21q)	t(Gq Gq)	RCP. TRANSL.	t(Dq Dq)
%	52	41,5	3,5	3
„DE NOVO“	50%	88 %		58 %
NASLIJEDNO	50%	12 %		42 %
RIZIKO ZA tri 21 AKO JE NOSILAC	MAJKA	16 %	19%	5%
	OTAC	5 %		
				tri 21 2,5% tri 13 2,5%

Slika 10.

MOLEKULARNA BIOLOGIJA I GENETSKO SAVJETOVANJE

1. Identifikacija gena i otkriće njihovih štetnih mutacija koje uzrokuju genetske bolesti znatno je promijenila genetsko savjetovanje. Otada je postalo moguće direktno otkriti bolesnike ili rizične osobe da će oboljeti i tako vjerojatnost pretvorilo u izvjesnost. Ovdje je posebno potrebno naglasiti da je ipak poželjno da se prije genetskog testiranja ide na genetsko savjetovanje iz slijedećih razloga:
 - Dobije što iscrpnija informacija
 - Nakon koje zainteresirane osobe daju privolu
 - Kako bi se izbjeglo nepotrebno i nepodesno testiranje (npr. malodobna djeca)
2. Indirektan način pristupa genu uz pomoć genetskih markera bez poznavanja uzročne mutacije može dovesti do krivo postavljene prenatalne dijagnoze i rođenja bolesnog djeteta.

PERCEPCIJA RIZIKA

Bez obzira kako se iskazuje rizik u postocima ili relativno, par prilagođuje tu brojčanu točnost u kvalitativno poimanje t.j. prihvatljiv ili neprihvatljiv rizik. Svi liječnici s iskustvom genetskog savjetovanja znaju da je u istovjetnoj situaciji percepcija dva para ili osobe različita. Izuzevši intelektualnu i sociokulturnu razinu pacijenata, određeni čimbenici mijenjaju percepciju rizika. Ovdje treba spomenuti:

- Težinu bolesti i način na koji je ona primljena od okoline
- Mogući terapijski vidici i nadanje koje u njih daje obitelj
- Broj zdrave djece koju već ima par
- Mogućnost prenatalne dijagnostike
- Osobno iskustvo s bolešću (parovi heterozigoti za neku autosomnu recesivnu bolest koji su otkriveni sistematskim probirom poput hemoglobinopatija u mediteranskih populacija ili Tay-Sachsove bolesti u aškenaza)
- imaju drugačiji stav od parova čije dijete ima jednu od tih bolesti.

Ovisno o tome što su proživjeli i ovisno o vlastitoj percepciji rizika, par će trebati donijeti odluku da li da ima ili nema dijete. Nije rijetko da parovi traže od liječnika direktivan stav, istinski savjet. Međutim, genetski savjetnik mora dati najiscrpniju i najsuvremeniju informaciju, ali bez utjecanja na odluku.

ULOGA GENETSKOG SAVJETNIKA

Medicinski genetičar treba osim saopćenja medicinske i genetske informacije pomoći paru u donošenju odluke koja će biti najbolja za njih. To znači da bi genetski savjetnik uvijek morao

biti nedirektivan (15). Naime određena reakcija koja može jednoj osobi izgledati nerazborita za drugu osobu može biti naročito prihvatljiva. U slobodnom društvu je takav izbor povlastica pojedinca, ali pod uvjetom da je učinjen u punom poznavanju svih činjenica i uvažavanju mogućih posljedica.

PROBLEMI U SAVJETOVANJU

Potrebno je biti svjestan da su sve osobe koje dolaze na genetsko savjetovanje u stanju stresa. Zbog toga vrijeme odmah nakon priopćavanja teške dijagnoze bilo u zdravog nosioca, oboljelog ploda ili tek umrlog djeteta nije podesno za detaljno i opširno razlaganje pacijentu ili paru. Znati kada i koliko informacija saopćiti u momentu žalosti zahtijeva prilično iskustva i vještine.

Na psihološke aspekte genetskog savjetovanja prvi je ukazao Kallmann (16). Dosta kasnije Falek (1, 17) upućuje na važnost tzv. procesa svladavanja teškoća „the coping process“ kao načina na koji bi savjetnici mogli pacijentu saopćavati neizbježnu informaciju koju bi pacijent trebao razumjeti kako bi mogao donijeti odluku uz istovremeni povratak psihičke homeostaze.

PROCES SVLADAVANJA TEŠKOĆA

Ovaj proces tokom genetskog savjetovanja osniva se na poznatijem fenomenu svladavanja teškoća u stresu.

Odgovori osobe pod stresom se smatraju fenotipskim izražavanjima psiholoških mehanizama koji nastoje ponovo uspostaviti dinamičko trajno stanje. Slijed odgovora koji se uobičajeno opaža u osoba pod stresom je slijedeći: 1. šok i poricanje, 2. tjeskoba, 3. gnjev i/ili krivnja i 4. depresija. Te etape predstavljaju osnovne elemente odgovora osobe pri svladavanju teškoća nastalih stresom, a proživljavaju ih duže ili kraće i u raznom intenzitetu sve osobe kako bi postigle psihičku homeostazu t.j. ravnotežu fizioloških funkcija u organizmu. Novu informaciju treba primiti i usvojiti spoznajno i emocionalno prije nego što dođe do bilo kakve prilagodbe ponašanja.

1. Šok i poricanje

Početni odgovor osobe suočene sa stresnom situacijom je šok i nevjerovanje. Poricanjem i neprihvatanjem situacije pacijent nastoji zadržati psihičku ravnotežu. Poricanje se može javiti u raznim oblicima kao: zapanjenost, ošamućenost, odbijanje informacije itd. Trajanje te faze je različito dugo, ali je za genetskog savjetnika važno znati da je osoba koja traži genetski savjet/pacijent u tom periodu samo djelomično ili uopće nije u stanje akceptirati novu informaciju. To može biti razlog za djelomično sjećanje na saopćenje dobiveno pri genetskom savjetovanju u istom susretu kada je priopćena teška dijagnoza.

2. Tjeskoba

Pacijent/osoba koja traži savjet počinje biti svjestan realnosti kojoj se još nije psihički prilagodio te doživljava tjeskobu koja se izražava putem: nervoze, prekomjerne aktivnosti,

razdražljivosti, glavobolje, umora, nesanice, gubitka apetita itd. U tom periodu započinje s misaonim aktivnostima koje su usmjerene prema ponovnom uspostavljanju psihičke ravnoteže.

Ukoliko se ne radi o pretjeranoj tjeskobi genetski savjetnik će tokom tog perioda biti u stanju dati genetsku informaciju i započeti raspravu o alternativnim rješenjima. Savjetnik mora znati da će vrlo anksiozne osobe tokom tog stadija odbiti svaku informaciju te im zato treba pokušati dati vrlo kratko i sažeto saopćenje.

3. Gnjev i krivnja

Ukoliko pacijent emocionalno ne uspije prihvatiti informaciju pokušaj da se prilagodi novoj situaciji je bezuspješan. Kako samozavaravanjem ne uspijeva poništiti novu informaciju biva frustriran te može postati žučljiv i neprijateljski. Zbog toga je dužnost genetskog savjetnika da putem susreta pri savjetovanju zadrži u pacijenta razinu samopoštovanja. Stalno poricanje i dugotrajno izbjegavanje realnih problema rezultiraju ljutnjom i frustriranošću. Radi se o frustriranim osobama koje nisu u stanju prevladati ovu fazu u procesu svladavanja teškoća. One ne mogu prihvatiti novu informaciju i započeti adekvatno reagirati. Stvaraju se gnjevni ljudi koji vide svoju nesreću kao posljedicu okrutnog svijeta. Oni mogu biti neprijateljski raspoloženi bez ikakve racionalne osnove prema svima oko sebe uključujući medicinsko osoblje. Gnjev može biti isto tako usmjeren prema samome sebi što rezultira osjećajem krivnje. U takvim prilikama je za genetskog savjetnika bolje da se povuče, ali da ostavi otvorena vrata pacijentu da se može kasnije vratiti.

4. Depresija

Promjena osjećaja krivnje ili gnjeva u depresiju znak je da je pacijent ušao u slijedeću fazu svladavanja teškoća. Depresija nastaje uslijed ponavljajućih onemogućavanja u pokušajima da se riješi problem. Depresija je normalna faza u procesu svladavanja teškoća i nužna je pri konačnom prilagođavanju. Savjetnik mora osjetiti emocionalno stanje pacijenta koji može dati utisak osobe nezainteresirane za svoju okolinu i svoje uobičajene aktivnosti.

PSIHIČKA HOMEOSTAZA

Spoznajom da starim načinom reagiranja ne rješava postojeći problem pacijent počinje tražiti nove modele. Zadaća savjetnika je da pomogne pacijentu u njegovim nastojanjima da prosudi i odvagane razne mogućnosti izbora. Kako je u tom stadiju pacijent najprijemljiviji za nove ideje savjetnik mora biti oprezan kako svojim stavom ne bi utjecao na odluku pacijenta. Ovo je odlučan trenutak u procesu genetskog savjetovanja. Uloga genetskog savjetnika bi trebala biti da, kako smo već napomenuli, ohrabri pacijenta pri procjeni izbora u odnosu na ishod i pri izboru rješenja koje mu najviše odgovara.

GENETSKO SAVJETOVANJE I PRENATALNA DIJAGNOSTIKA

Iako se genetsko savjetovanje ubraja u djelokrug medicinskog genetičara, dužnost je svakog liječnika, a napose onoga koji ima na brizi trudnicu, da obavijesti buduće roditelje o eventualno povećanoj opasnosti za rođenje djeteta s genetskom bolešću ili razvojnom nepravilnošću kao i o mogućnostima koje im stoje na raspolaganju pri njihovom sprečavanju (18).

Sigurno je da se danas ne može očekivati od liječnika opće prakse ili porodničara da bude upoznat s preko 5000 monogenских nepravilnosti koje se nasljeđuju po Mendelovim zakonima i koje su osim toga vrlo rijetke, te na stotine opisanih kromosomskih oštećenja za koje postoje vrlo korisni klinički katalozi (19-21). Međutim, bolesnik od liječnika očekuje da ga uputi medicinskom genetičaru ako posumnja na genetsku bolest. Zbog toga bi prilikom prvog dolaska trudnice liječnik trebao doznati iz osobne i obiteljske anamneze za postojanje malformacija, duševne zaostalosti ili koje druge genetske bolesti među prije rođenom djecom i bližim članovima obitelji oba supružnika, a u medicinskoj dokumentaciji bi se trebao nalaziti odgovor na takva pitanja.

U ovom izlaganju se neću zadržati na indikacijama za genetsko savjetovanje u vezi prenatalne dijagnostike (14), već ću se ukratko osvrnuti na određene probleme savjetovanja koji su specifični za prenatalnu dijagnostiku.

Obzirom na indikaciju, sve trudnice koje se upućuju na prenatalnu dijagnostiku morale bi dobiti iscrpnu informaciju od ginekologa ili medicinskog genetičara o indikaciji za zahvat kao i o samom zahvatu.

Zbog nedovoljnog broja educiranih medicinskih genetičara u našoj sredini i sve većeg broja trudnica koje se upućuju na prenatalnu dijagnostiku, smatram da bi ginekolozi i medicinske sestre djelomično mogli preuzeti njihovu ulogu informirajući grupu trudnica čija je jedina indikacija dob starija od 36 godina. Ginekolozi bi trudnici i budućem ocu trebali dati informaciju o zahvatu koji se namjerava izvesti, o njegovim eventualnim opasnostima za majku i plod te o opravdanosti i dijagnostičkim granicama testa. U tom razgovoru bi trebalo spomenuti kakva je vjerojatnost abnormalnog rezultata i kakve su mogućnosti izbora. Potrebno je napomenuti da se osim teških kromosomskih nepravilnosti poput tri 21 (Downov sindrom) mogu naći i anomalije spolnih kromosoma: 45,X; 47,XXY; 47,XYY koje nužno ne predstavljaju teško oštećenje u djeteta. U slučaju naknadnog otkrića višestruke trudnoće, trudnicu bi trebalo ponovo informirati o povećanom riziku.

Sve ostale trudnice s povećanim rizikom za genetsko oštećenje trebalo bi uputiti u genetsko savjetovalište. Potrebno je naglasiti da ovisno o indikaciji i vrsti prenatalne dijagnostike proces savjetovanja pokatkad zahtijeva više kraćih ili dužih razgovora.

Za trudnicu je najteže vrijeme iščekivanja i neizvjesnosti od izvršene pretrage do saopćenja rezultata. Zbog toga je neophodno potrebno da je liječnik hitno (telefonom ili telegrafski) izvijesti o rezultatu.

U slučaju abnormalnog rezultata nužno je da medicinski genetičar i porodničar razgovaraju u više navrata s oba supružnika, kojima mogu ponuditi relevantnu literaturu kao i razgovor s drugim liječnicima kako bi bili što objektivnije informirani. Kao posebno delikatne situacije s kojima smo se susretali navodim otkriće kromosomske anomalije u jednog od dvojak (tri 21,

tri 18 i 47, XXY) te problem u vezi nalaza anomalije spolnih kromosoma: 47,XXX; 47,XXY; 47,XYY (22).

Odluče li se roditelji za prekid trudnoće, potrebno ih je ponovo pozvati nakon izvršenog pobačaja da bismo im saopćili potvrdu dijagnoze i započeli razgovor o budućim planovima.

Na kraju ističem da prema Shawu (23) ciljevi genetskog savjetovanja mogu biti upućeni bolesnoj osobi, roditeljima i društvu. Smatramo da je osnovni zadatak genetskih savjetnika pomoći bolesniku ili paru koji traži savjet.

Literatura:

1. Falek A. Use of the coping process to achieve psychological homeostasis in genetic conditions. In: Lubs HA, de la Cruz F eds. Genetic Counseling. New York: Raven Press, 1977:179-191.
2. Carter CO. Current status of genetic counselling and its assessment. In: Motulsky AG, Lenz W. eds. Birth Defects. Amsterdam: Excerpta Medica 1974:277-287.
3. Fraser FC. Genetic counselling. Am J Hum Genet 1974; 26:636-659.
4. Epstein CJ. Genetic counselling: present status and future prospects. In: Went LN, Vermeij-Keers Chr, van der Linden AGJM eds. Early diagnosis and prevention of genetic diseases. Leiden:Leiden University Press, 1975:110-131.
5. Milunsky A. Genetic counselling: principles and practice. In: Milunsky A ed. The prevention of genetic disease and mental retardation. Philadelphia: WB Saunders, 1975:84-89.
6. Murphy EA, Chase GA. Principles of Genetic Counselling. Chicago. Year Book Medical Publ 1975
7. Fuhrman W, Vogel F. Genetic Counselling. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1976.
8. Stevenson AC, Davison BCC. Genetic counselling. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott, 1976.
9. Canki N. Genetski nasvet. Medicinski razgledi 1979; 18:291-301.
10. Harper PS. Practical Genetic Counselling. Bristol: John Wright, 1981.
11. Skinner R. Genetic counselling. In: Emery AEH, Rimo D eds. Principles and Practice of Medical Genetics. Vol 2. Edinburgh: Churchill:Livingstone, 1983:1427-1436.
12. Emery EH. Introduction – the Principles of Genetic Counselling. In: Emery AE, Pullen IM eds. Psychological Aspects of Genetic Counselling. London: Academic Press, 1984:1-9.
13. Milunsky A. genetic counselling: Prelude to Prenatal Diagnosis. In: Milunsky A. ed. Genetic Disorders and the Fetus. Diagnosis, Prevention, and Treatment. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1988:1-29.
14. Canki. N. Genetika u reprodukciji. In: Šulović V, Berić B, Dražančić A, Andolšek L eds. Porodiljstvo. 9th ed. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga, 1990:135-152.
15. Anon. Directive counselling. Lancet 1982; ii:368-369.
16. Kallmann FJ. Psychiatric aspects of genetic counselling. Am J Hum Genet 1956; 8:97-101.
17. Falek A. Sequential Aspects of Coping and Other Issues in Decision Making in Genetic Counselling. In: Emery AE, Pullen I meds. Psychological Aspects of Genetic Counselling. London: Academic Press, 1984: 23-36.

18. Canki N, Rainer S. Genetika, pravo i porodiljstvo. Jugoslav ginek opstet 1983; 23:144-145.
19. McKusick VA. Mendelian inheritance in man. 7th ed. Baltimore. John Hopkins Press, 1986.
20. Grouchy de J, Turleau C. Atlas des maladies Chromosomiques. 2nd ed. Paris: Expansion Scientifique Française, 1982.
21. Schinzel A. Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in man. Berlin: Walter de Gruyter, 1984.
22. Donnai D. The management of the patient having fetal diagnosis. In: Rodeck Ch ed. Fetal Diagnosis of Genetic Defects. London: Baillière Tindall, 1987:737-745.
23. Shaw MW. Review of published studies of genetic counselling. A critique. In: Lubs HA, de la Cruz F eds. Genetic Counselling. New York: Raven Press, 1977:35-45.

ANALIZA RODOSLOVLJA

Astrid MILIĆ

**Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatski institut za istraživanje mozga,
Šalata 12, Zagreb**

Sastavljanje i analiza rodoslovlja (genealogija, obiteljsko stablo) sastavni je i nezaobilazni dio procesa genskog testiranja i genetskog savjetovanja. Rodoslovlje predstavlja svojevrsnu povijest obitelji koja, ukoliko je točno i precizno sastavljena, može pomoći kliničarima i osobama koje daju genetski savjet:

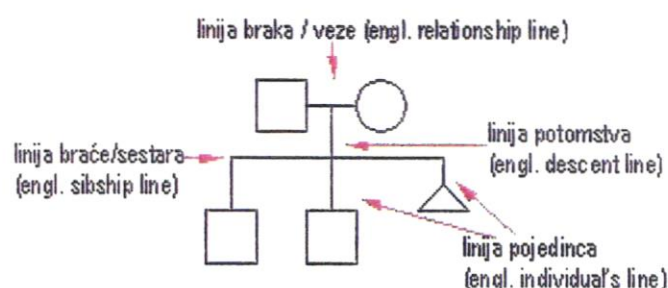
- u postavljanju dijagnoze,
- u otkrivanju načina nasljeđivanja određenih genskih karakteristika, odnosno nasljednih bolesti unutar obitelji,
- u otkrivanju osoba koje imaju stanoviti rizik za oboljevanje od određene nasljedne bolesti prisutne u obitelji.

Rodoslovlje je slikovni prikaz obitelji, gdje se korištenjem univerzalnog jezika simbola na jednostavan način prikazuju svi podaci potrebni za točno i svrsihodno gensko testiranje i savjetovanje. Američko nacionalno društvo genetskih savjetnika (National Society of Genetic Counselors, NSGC) uočilo je postojanje više različitih simbola za isti pojam što je u nekim slučajevima uzrokovalo pogreške prilikom "očitanja" podataka iz rodoslovlja. U želji za uspostavom općih, standardiziranih simbola i pravila sastavljanja rodoslovlja, NSGC je 1995. godine poslalo upitnike za izradu rodoslovlja na adresu svojih 437 članova. Na temelju ispunjenih i analiziranih upitnika određeni su standardizirani simboli i pravila koja se preporučuju pri izradi rodoslovlja (slike 1-4), bilo za "internu" upotrebu ili za znanstvene publikacije.

	muškarac	žena	nepoznat spol	pravila / komentari
				
Oboljele osobe				ukoliko u obitelji postoji više bolesti, precizirati legendom kako se svaka od njih označava
				
Prenositelji				kod bolesti s autosomno recesivnim načinom nasljeđivanja kod X-vezanih bolesti
				
Više osoba, poznatog broja				broj osoba uvijek upisani u simbol; nikada ne grupirati oboljele osobe
Više osoba, nepoznatog broja				za nepoznat broj bolje koristiti "n", nego "?"
Umrle osobe				za prikaz umrlih osoba izbjegavati oznaku križa (+); ako je poznato Napisati starost osobe (npr. u.55g) ako je riječ o mrtvorođenom djetetu, potrebno je naznačiti gestacijsku dob i koristiti kraticu SB (engl. stillbirth)
				
Proband				oboljeli član obitelji koji prvi dolazi kod liječnika
Konzultand				osoba koja traži genetsko testiranje i savjetovanje
Trudnoća				naznačiti gestacijsku dob; ako je fetus bolestan simbol se može osjenčati, te dodatno naznačiti u legendi
Spontani pobačaj				zdravi fetus
				ispod simbola naznačiti spol i gest. dob bolestan fetus
Prekid trudnoće				zdravi fetus
				ispod simbola naznačiti spol i gest. dob bolestan fetus

Slika 1. Prikaz simbola koje je potrebno koristiti pri izradi rodoslovlja.

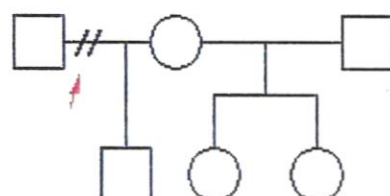
pravila / komentari



ukoliko je moguće muškarac uvijek treba biti lijevo od žene kod označavanja braka ili veze
djeca trebaju biti ucrtana od lijeva prema desno po starosti (najstariji prema najmlađem)
pri označavanju prekida trudnoće, linija pojedinca mora biti kraća

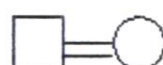
Linija braka / veze

Brak / veza



prekid linije braka / veze označava da spomenuti brak ili veza više ne postoje

Konsagvinitet



naznačiti stupanj konsagviniteta, ako nije očit iz rodoslovlja

Linija potomstva

Blizanci

dvojajčani

jednoajčani

nepoznato

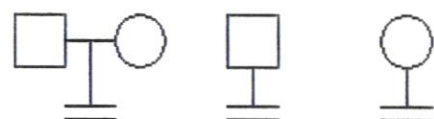


Brak / veza bez djece



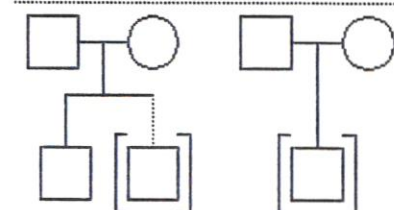
ukoliko postoji razlog, naznačiti ga u rodoslovlju (npr. vazektomija)

Neplodnost



ukoliko je poznat razlog, naznačiti ga u rodoslovlju (npr. azospermija, endometrioza)

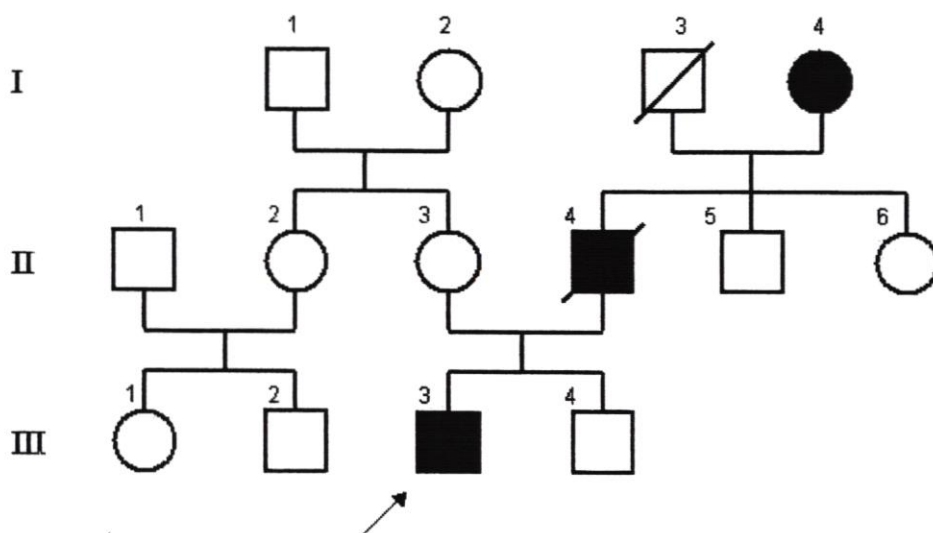
Posvojenje



za označavanje posvojenog djeteta koristiti zagradu; puna linija označava biološke roditelje, a prekinuta posvojitelje

Slika 2. Prikaz i definicija linija koje je potrebno koristiti pri izradi rodoslovlja.

U rodoslovlje se obavezno upisuju i rimski i arapski brojevi kojim se koristimo za opis svakog člana obitelji. Dok se rimski brojevi koriste za označavanje generacija, arapskim se brojevima označava položaj svakog člana obitelji unutar odgovarajuće generacije (slika 3).



Slika 3. Prikaz rodoslovlja. Proband je treća osoba u trećoj generaciji, pa se označava kao III, 3. Prikazano rodoslovlje ne sadrži nikakve dodatne podatke te bi se moglo koristiti za publiciranje.

Rodoslovlje treba sadržavati i dodatne podatke koji se upisuju ispod ili pokraj odgovarajućeg simbola uz izbjegavanje pisanja unutar simbola. Pod tim dodatnim podacima podrazumijevamo starost ili dob članova obitelji, inicijale pojedinih članova obitelji, kao i podatke o eventualnim genskim analizama i njihovim rezultatima (slika 4).

Isto tako, poželjno je da se uz rodoslovlje naznači:

- legenda koja opisuje određene podatke u rodoslovlju (npr. u slučaju prisutnosti dvije bolesti u obitelji potrebno je objasniti na koji se način prikazuje svaka od njih),
- ime i prezime osobe koja je rodoslovlje sastavila, odnosno ime i prezime osobe koja je dala podatke o obiteljskoj povijesti,
- datum sastavljanja rodoslovlja i datum eventualnih nadopuna podataka.

Iako je po mišljenju NSGC-a tek potrebno utvrditi etička načela pri sastavljanju rodoslovlja, smatra se da sve spomenute dodatne podatke (uz iznimku arapskih i rimskih brojeva) treba pisati samo na rodoslovlja za tzv. "internu" upotrebu, a nikako u slučaju korištenja rodoslovlja za stručne/znanstvene publikacije ili u slučaju ako se više osoba koristi istim rodoslovljem.

PRAVILA**- oznaka E (evaluacija) koristi se za prikazivanje rezultata genetskog testa**

- a. oznaka E mora biti objašnjena u legendi uz rodoslovlje
- b. rezultat analize mora biti napisan unutar zagrada
- c. koristiti "?" ako rezultat nije poznat ili nije dostupan

- dokumentirana evaluacija

- a. označava se zvjezdicom (*), koja se uvijek piše desno dolje od odgovarajućeg simbola
- b. evaluacija se smatra dokumentiranom samo ako je rezultat pregledan i provjeren

- simbol se ispunjava crnom bojom samo ako osoba već ima kliničke simptome**- u slučaju analize genske povezanosti (linkage analiza) rezultati haplotipa se upisuju ispod svake analizirane osobe; haplotip koji je "važan" treba biti lijevo od drugog haplotipa, te naglašen (npr. drugom bojom)****- ponavljajući slijedovi, povećanje broja trinukleotidnih slijedova pišu se tako da se prvo navodi "bolesni" alel napisan u zagradi****- ako je poznata mutacija u genu potrebno ju je napisati unutar zagrada****- preporučeni redoslijed informacija:**

- a. starost / dob
- b. podaci o rezultatima genskih analiza
- c. arapski brojevi

definicija	simbol	pravila / komentari
Dokumentirano gen. testiranje	 E-	osoba sa dok.evaluacijom (*), pri čemu je rezultat genetskog testa negativan (E-)
Asimptomatski ili presimptomatski prenositelji	 E+	osoba sa dok.evaluacijom (*), pri čemu je rezultat genetskog testa pozitivan (E+); trenutno nema simptoma pa simbol nije u potpunosti zacrnjen
Bolesnici s pozitivnom evaluacijom	 E+ (ΔF508/ ΔF508)	osoba sa dok.evaluacijom (*) i pozitivnim rezultatom genetskog testa (E+); u zagradi naznačena odgovorna mutacija
	 18 tj. E+ (tri 18)	muški fetus star 18 tjedana sa dokument. evaluacijom i naznačenim rezultatom (trisomija 18)

Slika 4. Pravila za upisivanje rezultata genskih testova u rodoslovlje

LITERATURA:

1. Bennett RL, Steinhaus KA, Uhrich SB i sur. Recommendations for standardized human pedigree nomenclature. *Am J Hum Genet* 1995; 56:745-52.
2. Gelehrter RD, Collins FS. *Principles of Medical Genetics*. Williams & Wilkins, 1990.

RETINOBLASTOM-TUMOR RETINE

Jelena Juri, Neda Stiglmayer

KBC Zagreb, Klinika za očne bolesti, Kišpatićeva 12, Zagreb

Retinoblastom je najčešći, primarni, maligni, intraokularni tumor dječje dobi i drugi po učestalosti tumor retine u svim drugim dobnim skupinama.

Unatoč tome, smatra se rijetkim i pojavljuje se u 1:15 000 do 1:20 000 živorođenih.

Ne postoji predilekcija po spolu, a u većine tumor postaje klinički uočljiv prije 3 godine života.

Genetski aspekt

Retinoblastom je rezultat maligne transformacije primitivnih retinalnih stanica prije konačne diferencijacije. Zbog nestanka tih primitivnih stanica unutar prvih par godina života, tumor se rijetko vidi nakon treće godine života.

Tumor može biti nasljedan i sporadičan po obliku pojavljivanja. Gen koji predisponira nastanak retinoblastoma tzv. Gen- RPE1, lokaliziran je na 14 lokusu dugog kraka kromosoma 13. (13q14)

Sporadični oblik čini oko 60 % svih slučajeva. U takvih bolesnika tumor nastaje na organskoj osnovi jedne retinalne stanice. Karakteristično je da 85% bolesnika sa unilateralnim tumorom spada u kategoriju sporadičnog nastanka, te da ti bolesnici razvijaju samo jedan tumor do 2 godine starosti i da ne prenose bolest na svoje potomke.

Nasljedni oblik retinoblastoma čini 40 % slučajeva. U tih bolesnika, primitivne retinalne stanice predisponirane su mutacijom na malignu transformaciju, koja se visokim stupnjem penetracije prenosi autosomno-dominantno. Unatoč tome, samo 6% pacijenata iz te skupine ima pozitivnu obiteljsku anamnezu.

85% bolesnika razvija bilateralnu prezentaciju, sa multiplim tumorima koji se manifestiraju ranije nego u bolesnika iz sporadične skupine, otprilike oko 18-tog mjeseca života. Međutim, 15% unilateralnih slučajeva također su nasljedni.

Rizik prenošenja bolesti na potomke je oko 50 %. U bolesnika sa pozitivnom obiteljskom anamnezom postoji predispozicija za razvoj sekundarnih malignoma, kao što su pinealoblastom i osteogeni sarkom. Sekundarni malignomi mogu se razviti na mjestu radioterapije retinoblastoma, ali isto tako i na drugim, iradijacijom, pošteđenim lokusima.

Pojava retinoma, benigne varijante retinoblastoma, ima iste genetske implikacije kao i retinoblastom.

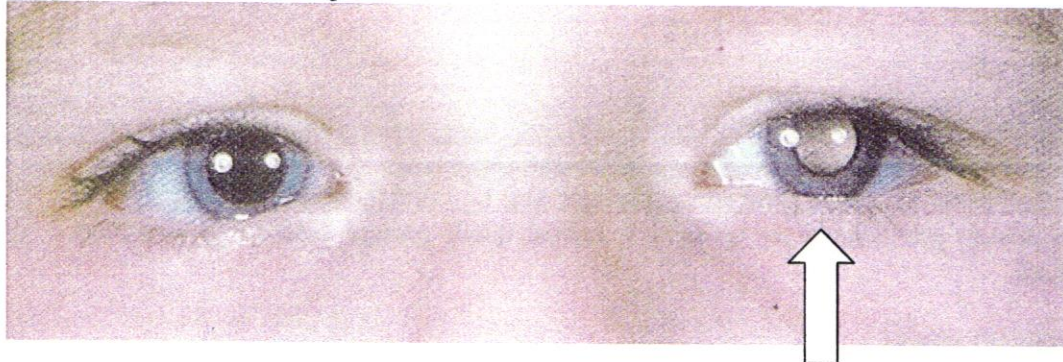
Genetsko savjetovanje može biti teško, te se ponekad visoko sofisticirana DNA analiza mora provesti kod pogodnih slučajeva.

Važeći su slijedeći principi u procjeni genetske zavisnosti:

1. zdravi roditelji, sa jednim bolesnim djetetom imaju otprilike 5% rizika da slijedeće dijete bude bolesno
2. u dva ili više bolesnih blizanaca, rizik da slijedeće dijete bude bolesno je 50%
3. bolesnik koji preživi nasljedni oblik retinoblastoma ima vjerojatnost oko 50% da će mu potomci također oboljeti.

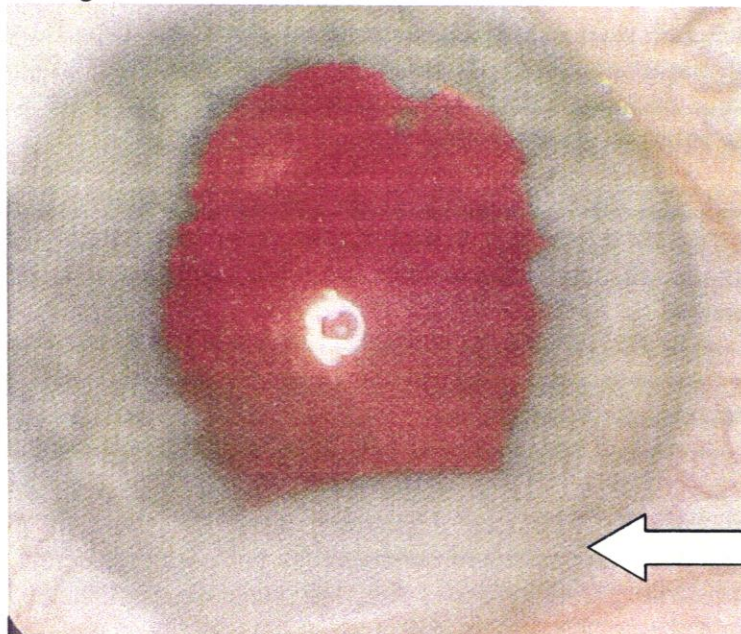
Prezentacija bolesti

Leukokorija –bijeli pupilarni refleks, je najčešći oblik prezentacije intarokularnog tumora i vidljiv je u oko 60 % slučajeva.



Strabizam je slijedeći najčešći oblik pojavnosti bolesti i vidljiv je u oko 20 % slučajeva, te upravo svojim visokim postotkom nužno zahtijeva detaljan pregled fundusa u svakog djeteta sa strabizmom.

Sekundarni glaukom, ponekad povezan sa buftalmusom, rjeđi je oblik pojavnosti bolesti kao i invazija tumora u prednji segment oka, koji se ako je prisutan, javlja u starije djece u dobi od oko 6 god.



Uveitis i pseudohypopion

Tumor je tada unilateralan, nema obiteljske anamneze, a klinički se manifestira sa multifokalnim infiltracijama irisa, pseudo-hipopionom i bolnim, crvenim okom. Zbog toga je u djece sa neobičnim oblikom kroničnog uveitisa potrebno diferencijalno dijagnostički isključiti retinoblastom.

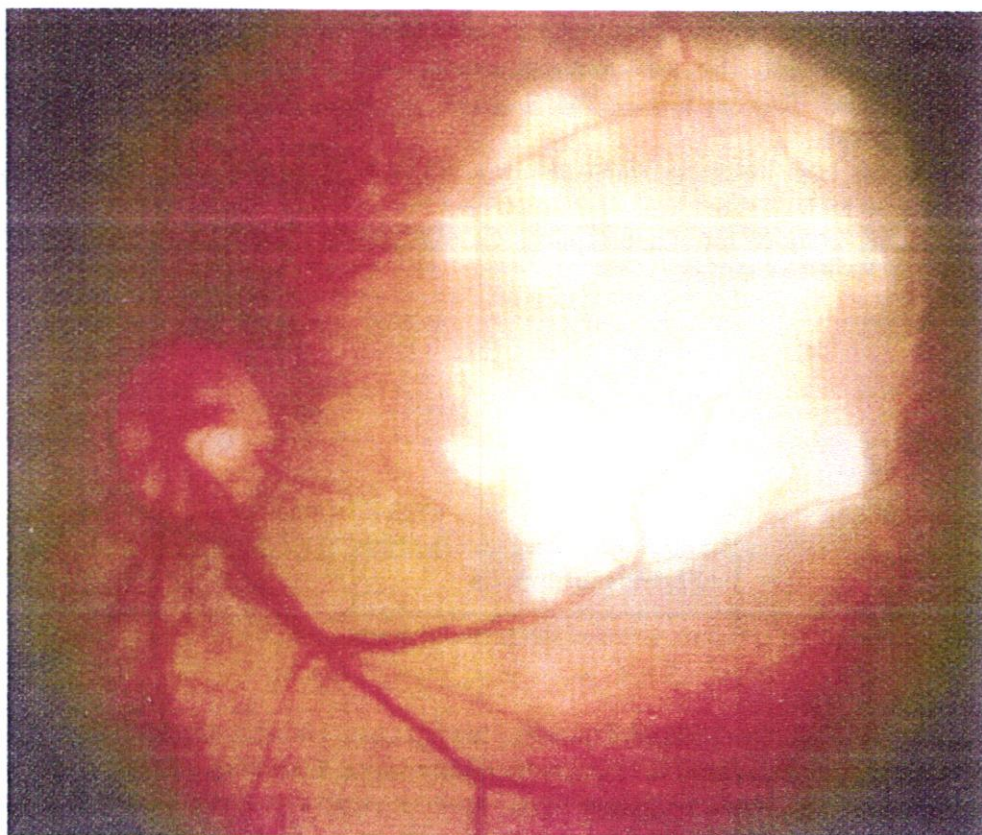
Orbitalna infiltracija koja imitira orbitalni celulitis može se javiti kod očiju sa nekrotičnim oblikom tumora, no ne implicira nužno ekstarokularnu ekstenziju.

Proptaza je rezultat orbitalne invazije u zapuštenim slučajevima. Tumor može metastazirati u regionalne limfne čvorove i mozak.

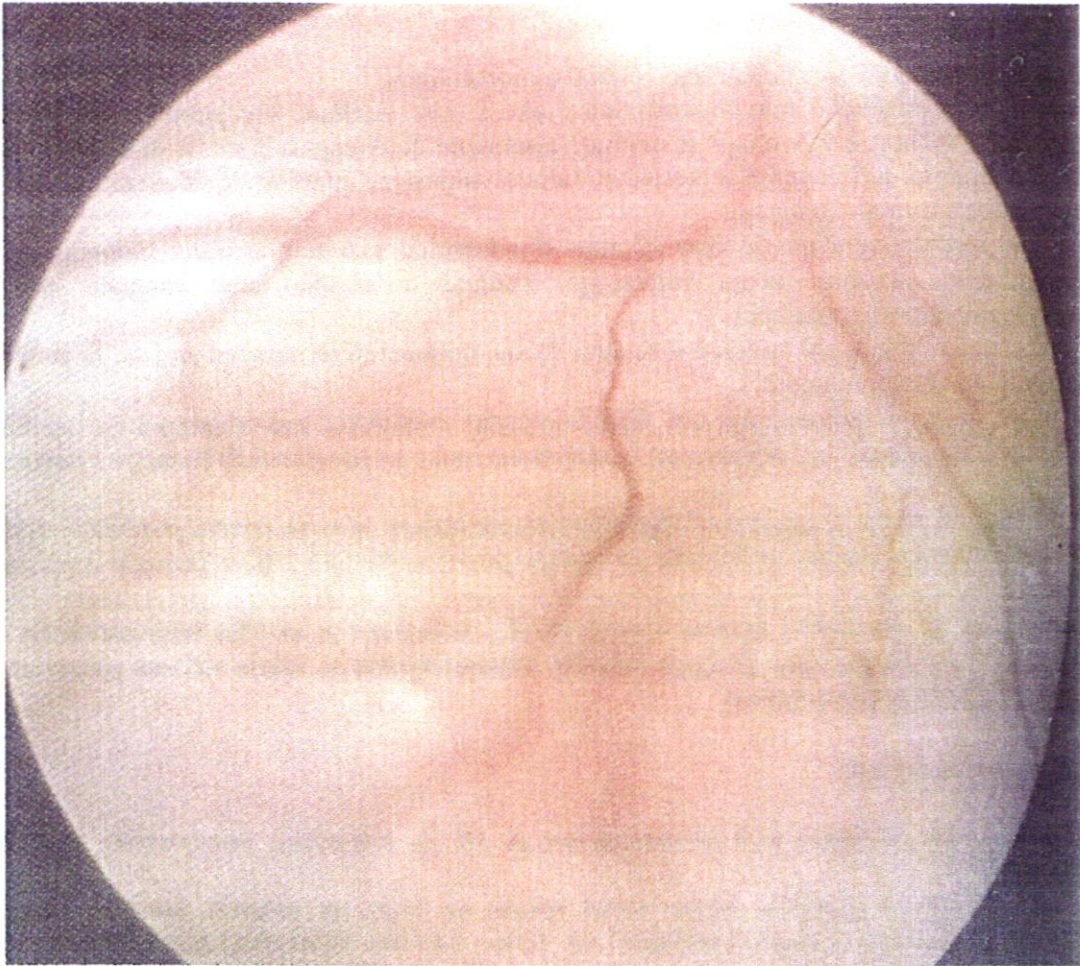


Orbitalna infiltracija

Klinički znakovi uvelike ovise o veličini tumora i načinu rasta. Ukoliko tumor uočimo u ranoj fazi nastanka on izgleda kao ravna ili okrugla bjeličasta lezija. Endofitični tumor projicira se sa retinalne površine kao rahla, bjeličasta masa, često povezana sa finim krvnim žilama na svojoj površini. Ukoliko postoje sekundarne kalcifikacije, tumor je jasno ograničen i nalikuje na švicarski sir.



Egzofitični tumor raste kao multiglobulirana bjeličasta masa sa preležećom ablacijom retine.



Dijagnostički postupci

Ultrazvučni pregled orbite i bulbusa detektira postojanje kalcifikata i mjeri dimenzije tumora. CT orbita također pokazuje kalcifikacije unutar tumora, ali će također pokazati i infiltraciju vidnog živca, orbitalnu ili CNS ekstenziju, kao i prisutnost pinealoblastoma. Međutim CT prikaz znači izlaganje visokim dozama zračenja što može biti opasno u bolesnika sa germinativnim mutacijama.

MRI, unatoč tome što ne pokazuje kalcifikate, superiornija je u prikazu infiltracije vidnog živca, osobito ako se koristi i kontrastno sredstvo.

Terapija

Mogućnosti terapije uvelike ovise o veličini tumorske mase.

Mali tumori od oko 4 mm dijametralno i oko 2 mm debljine, bez zamućenja viterusa i infiltracije vidnog živca mogu se tretirati laserskom fotokoagulacijom ili transpupilarnom termoterapijom. Krioterapija se koristi za tumore smještene anteriornije od ekvatora koji su teško dostupni fotokoagulaciji.

Tumori srednje veličine od oko 12 mm dijametralno i 6 mm debljine pogodni su za brahiterapiju, ukoliko nema infiltracije vitreusa i ukoliko nije moguće provesti fotokoagulaciju ili krioterapiju.

Kemoterapija slijedi nakon lokalne terapije krioterapijom ili termoterapijom da bi se dobila kontrola nad rastom tumora.

U obzir dolazi i radioterapija tzv. IMRT-intensity modulated radiotherapy-koja odabirom doze zračenja nastoji biti poštena za okolna tkiva i tako ne narušavajući funkciju i kozmetički efekt.

Veliki tumori se mogu podvrgnuti liječenju kemoterapijom u svrhu redukcije veličine tumora da bi se kasnija terapija primjenila na manju površinu tumora i tako izbjegla enukleacija bulbusa.

Enukleacija sa što dužim dijelom vidnog živca, indicirana je ukoliko kemoredukcija nije uspješna te u slučajevima liječenja difuznih retinoblastoma sa lošom vidnom prognozom i viskim rizikom recidiva bolesti.

Prognostički faktori

Ukupna stopa smrtnosti kod retinoblastoma je 10 %. Najvažniji prognostički faktori su slijedeći:

1. infiltracija optičkog živca- iznad razine na kojoj je moguća kirurška ekscizija povezana je sa stopom smrtnosti od 65% . Ukoliko vidni živac nije infiltriran stopa smrtnosti dramatično pada na 8%, ali ukoliko je zahvaćena lamina cribrosa raste na 15%.
2. koroidalna invazija- također predstavlja nepovoljan prognostički faktor
3. veličina i lokalizacija tumora su važni, jer manji tumori, smješteni posteriorno imaju najbolju stopu preživljenja od oko 70%, ali u prognostičkomj smislu nema razlike u obliku rasta tj. radi li se o endofitičnom ili egzofitičnom rastu.
4. stanična diferencijacija- ukoliko se radi o dobro diferenciranim stanicama stopa smrtnosti je 8% za razliku od loše diferenciranih stanica tumora sa stopom smrtnosti od 40%.
5. dob djeteta- starija dob u pravilu je povezana sa lošijim ishodom zbog kasnog postavljanja dijagnoze i proširenosti bolesti.

Reference:

1. JJ Kanski, Clinical Ophthalmology, Tumors of the retina, BH 4.izdanje 1999.
2. WP Chen, Oculoplastic surgery, Enucleation, Thieme, New York 2001.
3. J Rootman, Diseases of the orbit, Neoplasia, LWW, 2.izdanje Philadelphia 2003.

PROBLEMI PRI ODREĐIVANJU RIZIKA MONOGENSKIH BOLESTI

^{1,2} Nina CANKI-KLAIN I DAVOR LESSEL

¹ Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatski institut za istraživanje mozga,
Šalata 12, Zagreb

² KBC Zagreb, Klinika za neurologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

NČINI NASLJEĐIVANJA

I. MONOGENSKO (MONOFAKTORSKO, KLASIČNO NASLJEĐIVANJE PO MENDELOVIM ZAKONIMA

Autosomno dominatno

:

Karakteristike:

- Bolesnik ima obično bar jednog bolesnog rođaka
- Obolijevaju podjednako oba spola
- Prenosi se preko bilo kojeg spola
- Dijete bolesnika i zdrave osobe ima 50% rizik da bude bolesno

Teškoće pri analizi:

- Varijabilna ekspresija:
- Smanjena penetracija ("preskakanje generacije")
- De novo mutacije
- Kodominantnost
- Homozigotnost za dominantni znak

Autosomno recesivno:

Karakteristike:

- Bolesnici imaju obično zdrave roditelje
- Roditelji bolesnika su obično asimptomatski nosioci
- Postoji povećana učestalost srodstva roditelja
- Obolijevaju oba spola
- Nakon rođenja bolesna djeteta, sva slijedeća djeca imaju 25% rizik da obole

Teškoće pri analizi:

- Dokazati srodstvo
- Pseudodominantnost
- Složeni heterozigoti

X-vezano recesivno

Karakteristike :

- Oboljevaju praktički samo muški
- Oboljeli muški imaju obično zdrave roditelje; majka je obično asimptomatska nositeljica, a može imati bolesne muške rođake
- Ženske osobe mogu biti bolesne ako imaju bolesnog oca i majku koja je nositeljica ili povremeno kao posljedica "ne slučajne" ("iskriljene) X-inaktivacije
- Ne postoji prijenos s muške na mušku osobu ali brak bolesnog muškarca i žene koja nosi patološki X-vezani gen, može dati prividan izgled prijenosa s muškarca na muškarca

Teškoće pri analizi:

- Varijabilna ekspresija ženskih heterozigota
- Bolesne ženske osobe
 - kriva inaktivacija (više manifestnih nositeljica gena u nekoj obitelji)
 - numeričke anomalije X-kromosoma
 - translokacije X-autosom

X-vezano dominantno

Karakteristike:

- Oboljevaju oba spola, ali više ženski nego muški
- Žene su obično blaže ili varijabilnije oboljele od muških
- Dijete bolesne žene bez obzira na njegov spol ima 50% rizik da oboli
- Sve kćeri bolesnog oca su bolesne, a svi sinovi zdravi

Y-vezano (holandrično) nasljeđivanje

Karakteristike:

- Osobine vezane na Y kromosom su poznate, ali ne bolesti
- .Moguće je da ti geni daju informaciju za osobine ili za funkcije specifične za muškarca tako da se ne očekuju druga oštećenja osim muške neplodnosti

II. NE KLASIČAN NAČIN MONOGENSKOG NASLJEĐIVANJA

1. Mitohondrijsko

2. Mozaicizam

- placentni
- germinalni
- somatski

3.Genomski otisak

4.Uniparentna disomija

- izodisomija
- heterodisomija

TEŠKOĆE PRI ANALIZI RODOSLOVLJA

1.Nepenetrantnost

2.Kasni početak bolesti

3.Varijabilna ekspresija

4.Anticipacija

5.Mutacija de novo

6.Porijeklo naslijeđenog gena (od oca ili majke) “za utisnute” “imprinted”
Gene

7.Inaktivacija X-kromosoma

8.Letalitet muških plodova (X-vezane dominantne bolesti)

9.Heterogenost genetskih bolesti:

- Alelska heterogenost
- Lokusna

PRI UZIMANJU OBITELJSKIH PODATAKA OBRATITI PAZNJU NA:

1.Djevojačka prezimena

2.Kraj odakle potječu oba roditelja, oba djeda, obe bake, prabake

3.Izolirane grupe: geografski, religijski, etnički

4.Voditi računa o običajima(npr. brakovi među bratićima; stric-nećakinja)

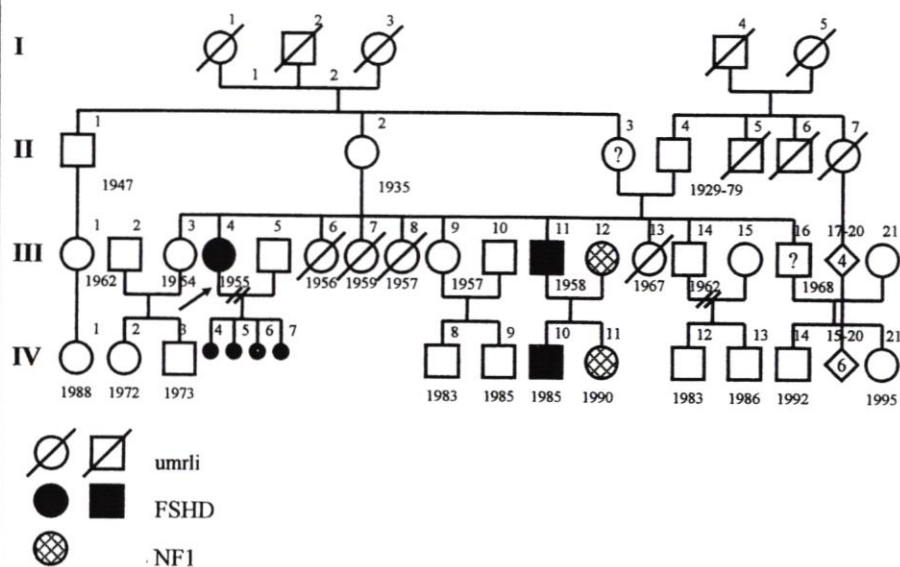
5.Porijeklo obitelji (npr.: Afrikaneri-porfirija varijegata)

6.Voditi računa o starosti potencijalnog bolesnika

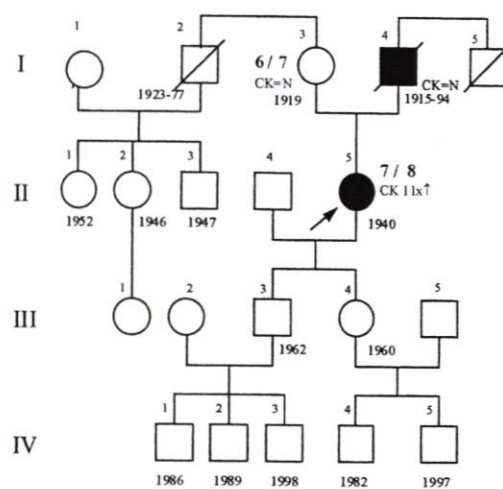
7.Egzogeni mutageni faktori

8.Lažno očinstvo naročito važno u molekularnoj analizi(cca 5% u bijeloj populaciji)

Family N°26
15 Kb, 3U



Family N°228
PABP2 GCG 6/7
7/8



OKULOFARINGEALNA MIŠIĆNA DISTROFIJA

(GCG)₈₋₁₃ u (PABP2) gene

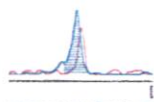
Definitivna DNA diagnoza

- ptoza
ekstremiteta
- disfagija
- nazalniglas

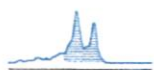
- proksimalna mišićna slabost donjih

- Početak u kasnijoj životnoj dobi (iza 40.g.)

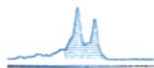
- AD nasleđivanje



• Control 6/6



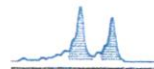
• Control 6/7



• Proband's
mother: 6/7



• Proband: 7/8



• Control 6/8



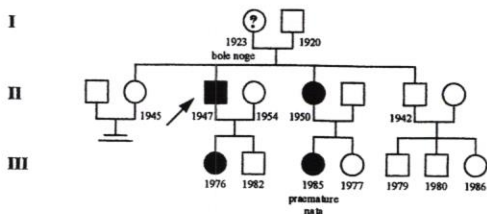
• Control 6/9



6/7 7/8 6/9 6/11 6/6

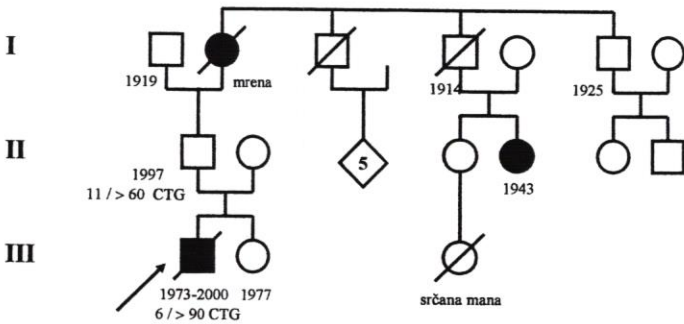
- Kolgenitalna miotonička distrofija ako je broj ponavljanja >1000+
- Gotovo uvijek se prenosi preko majke-važno za genetsko savjetovanje

N° 2
DM 28 / 900 - 1200 CTG



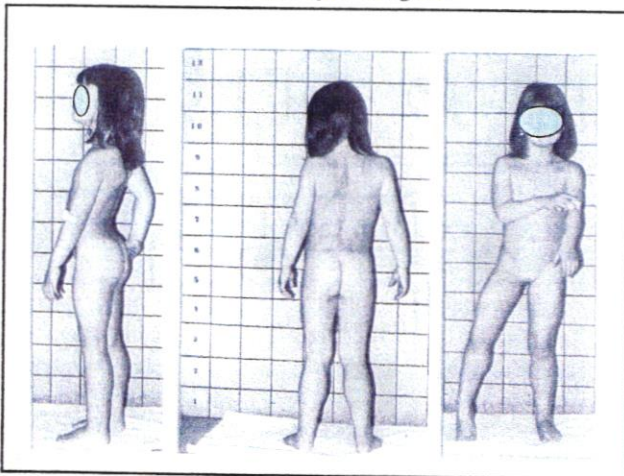
MIOTONICNA DISTROFIJA

N° 160 DM 6 / > 90
11 / > 60

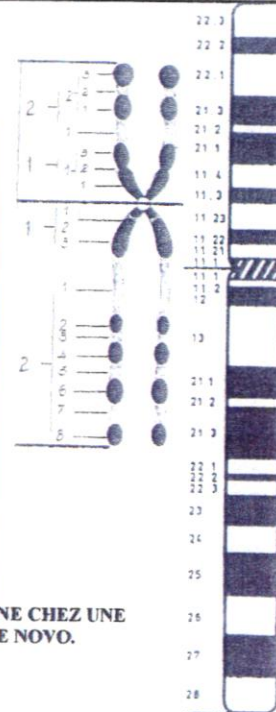


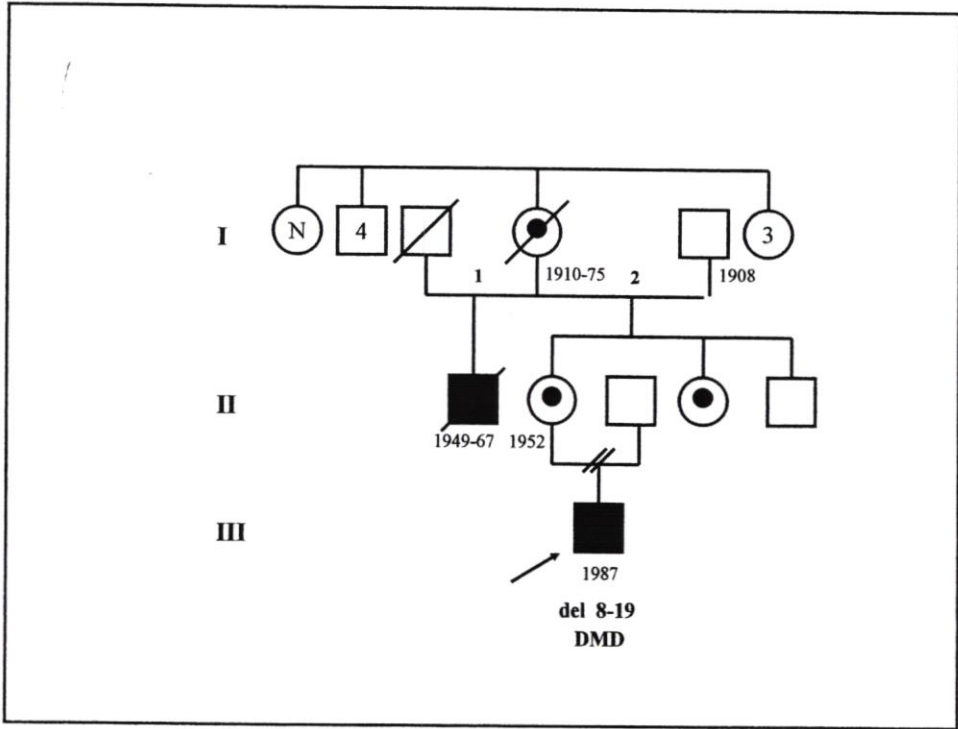
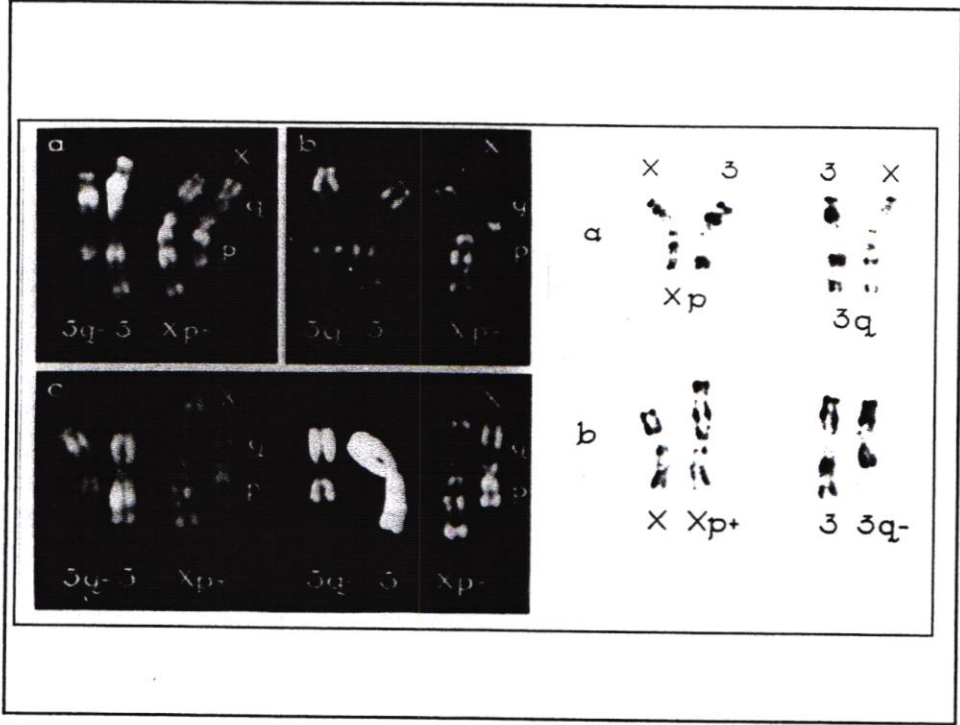


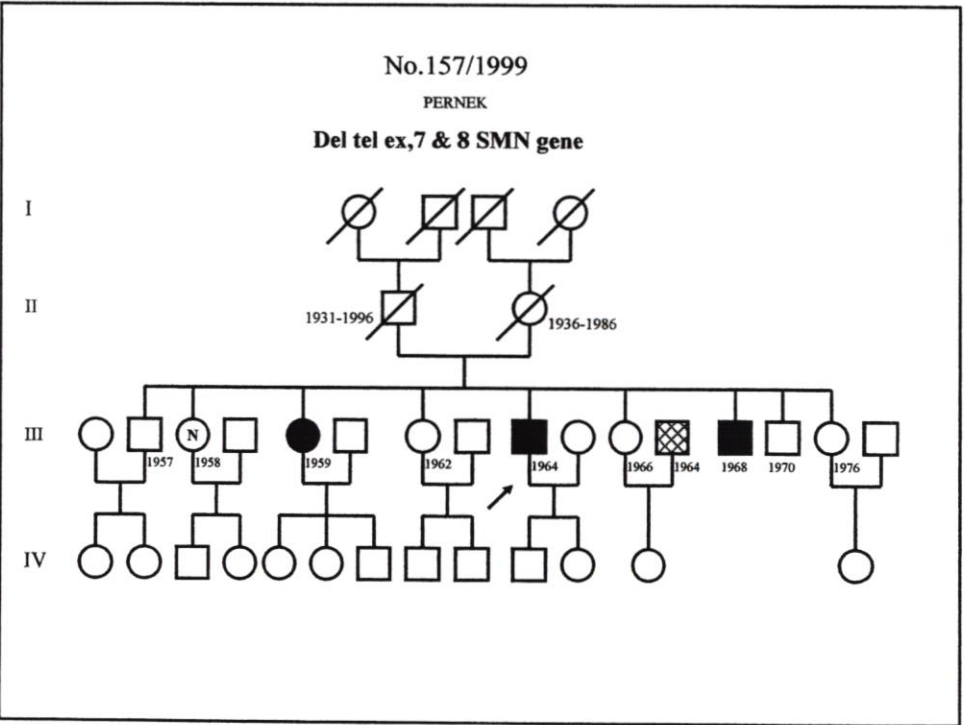
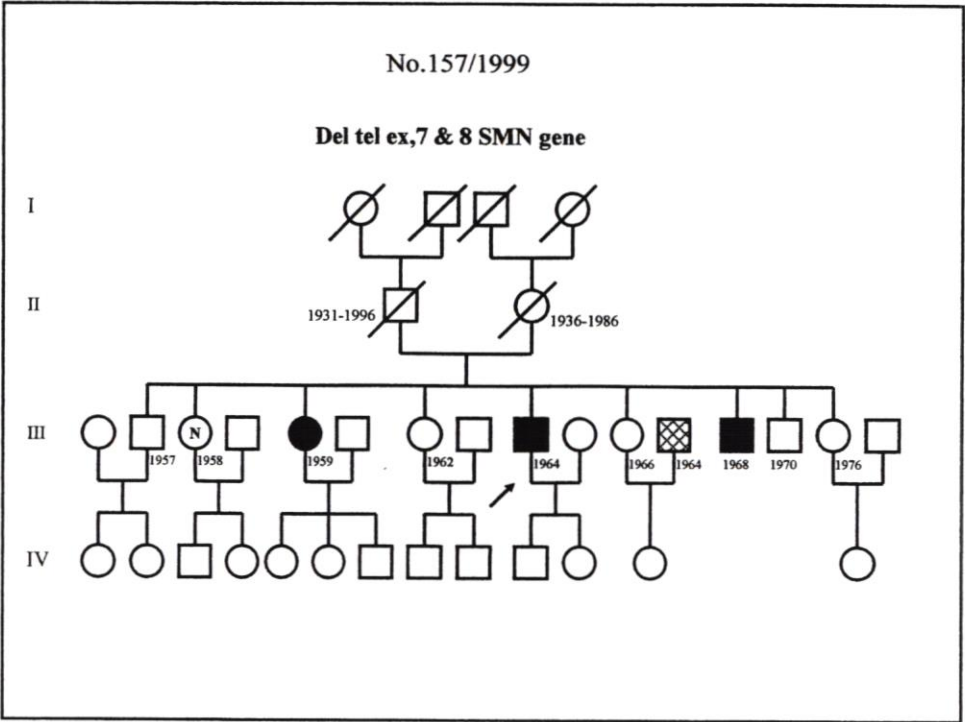
SMJEŠTAJ DMD lokusa je bio prvi korak u pozicijskom kloniranju DYS gena



Canki N, Dutriloux B, Tivadar I. DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE CHEZ UNE PETITE FILLE PORTEUSE D'UNE TRANSLOCATION t(X;3) (p21;q13) DE NOVO.
Ann Génét. 1979; 22/1: 135-39.



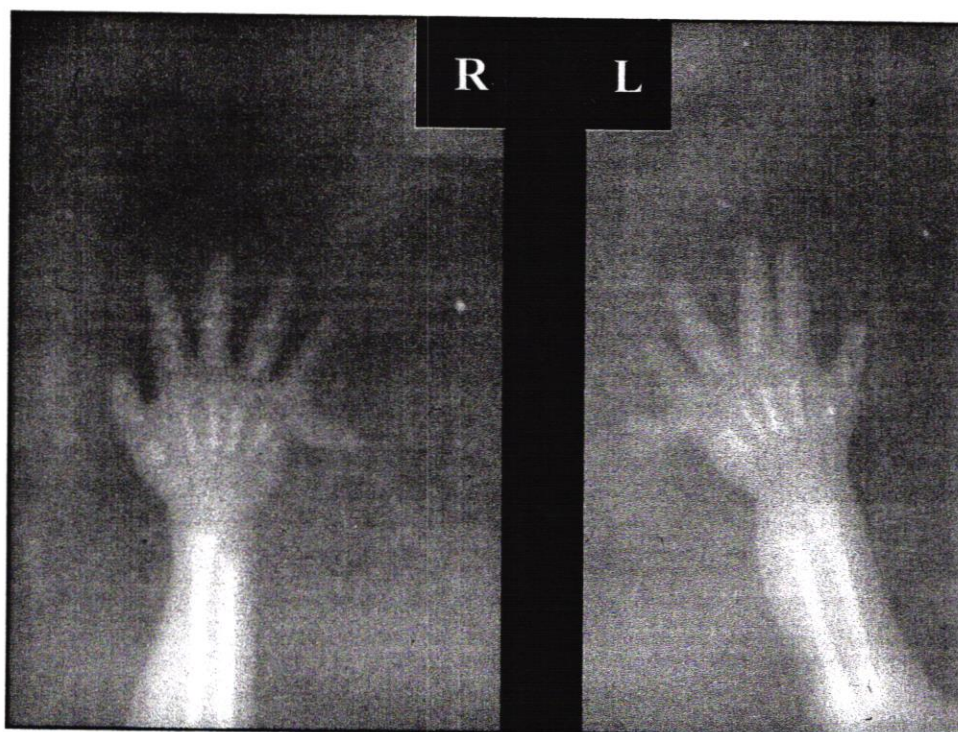


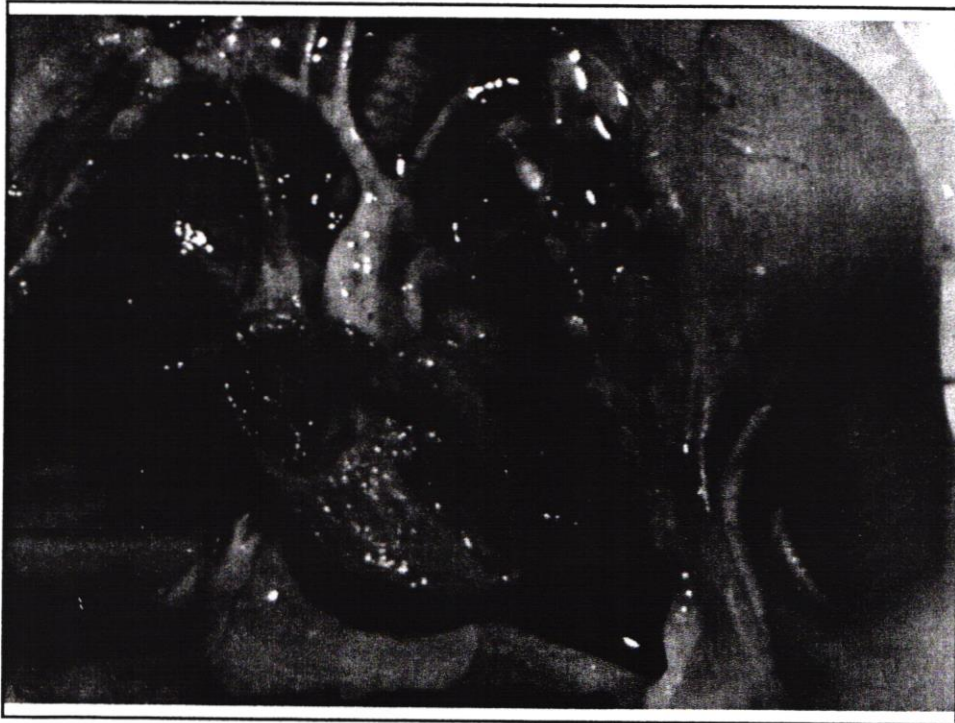




RUDIMENTARNA POSTAKSIALNA POLIDAKTILIJ

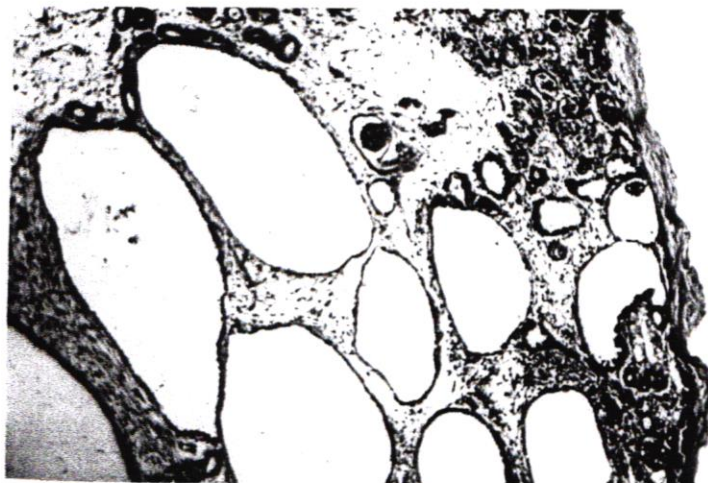
II, 2



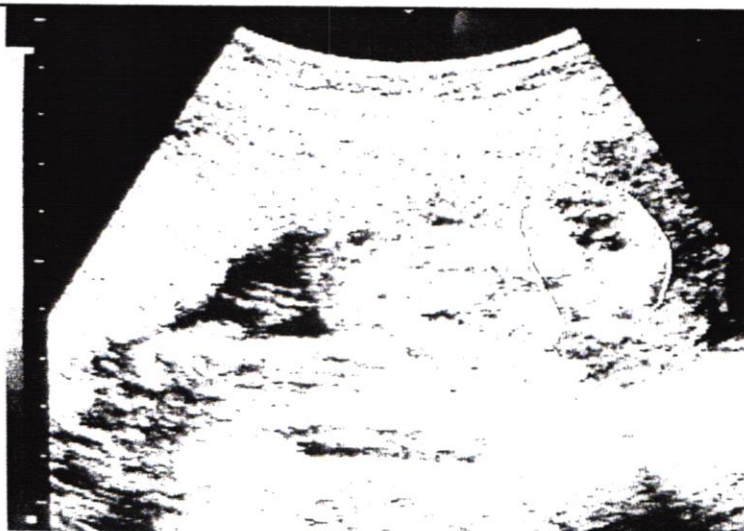


**OGROMNI POLICISTICNI
BUBREZI**

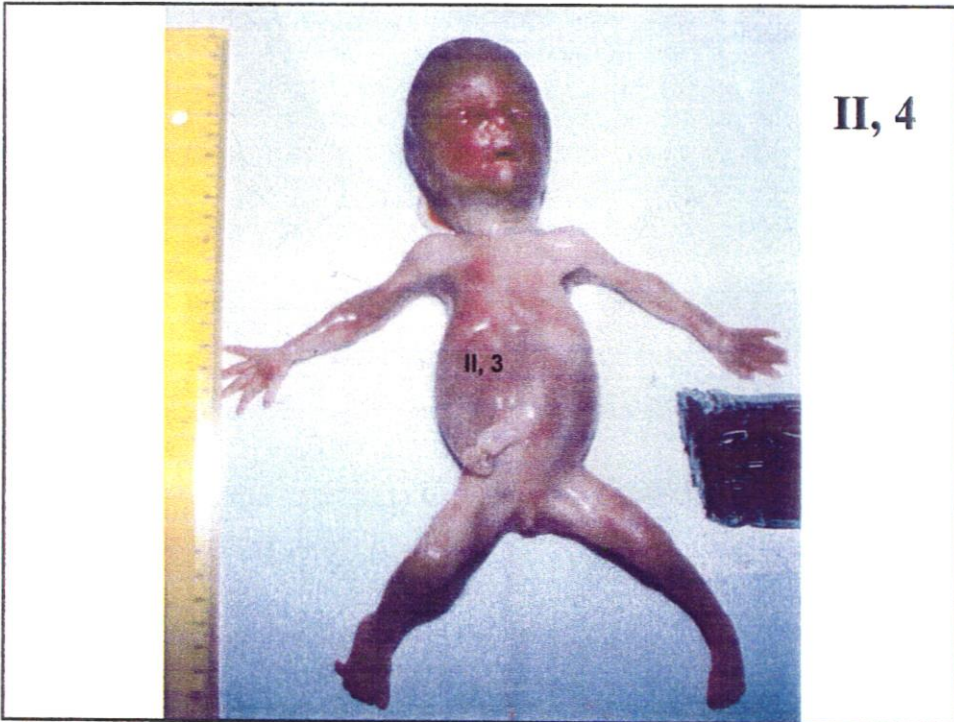
II, 3

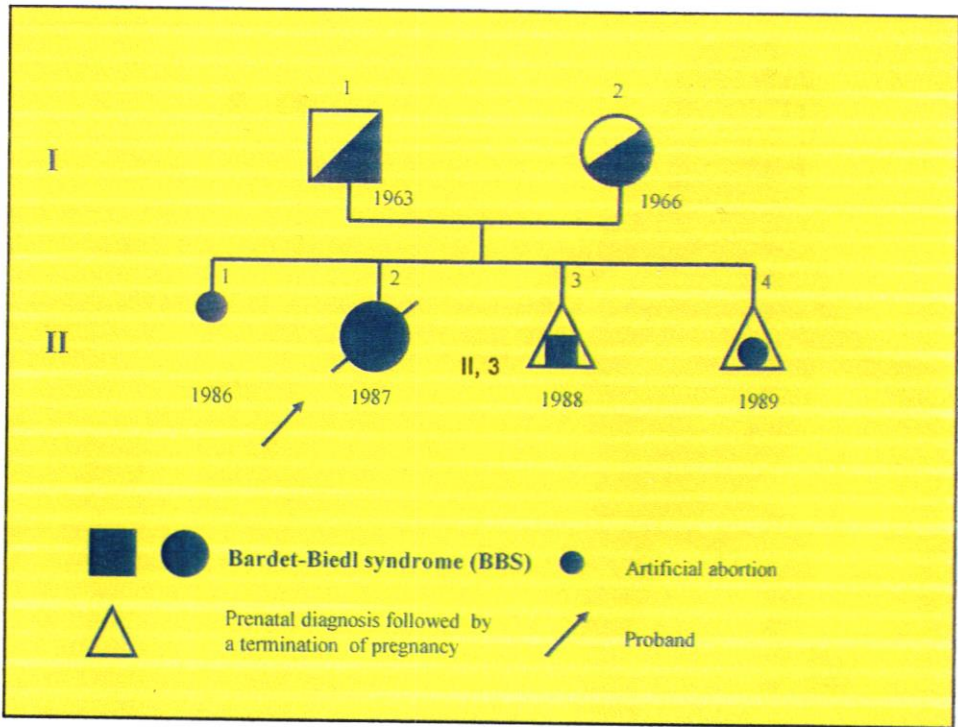


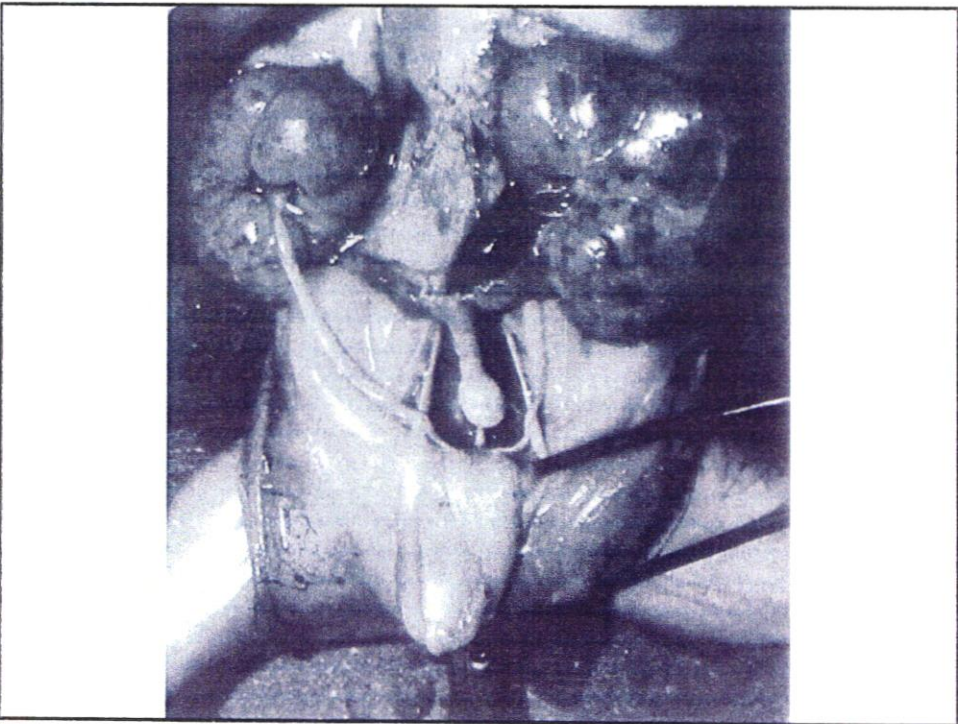
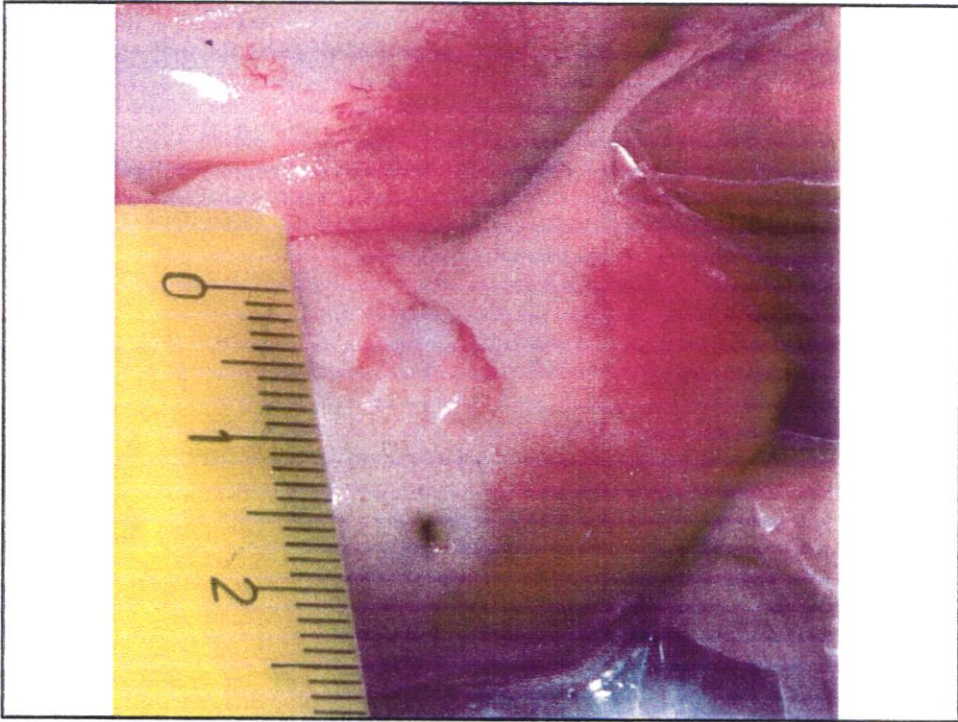
**CISTICNI BUBREZI TIP IV: MIKROSKOPSKA SLIKA POKAZUJE MULTIPLE CISTE
GLOMERULA I TUBULA
II, 3**

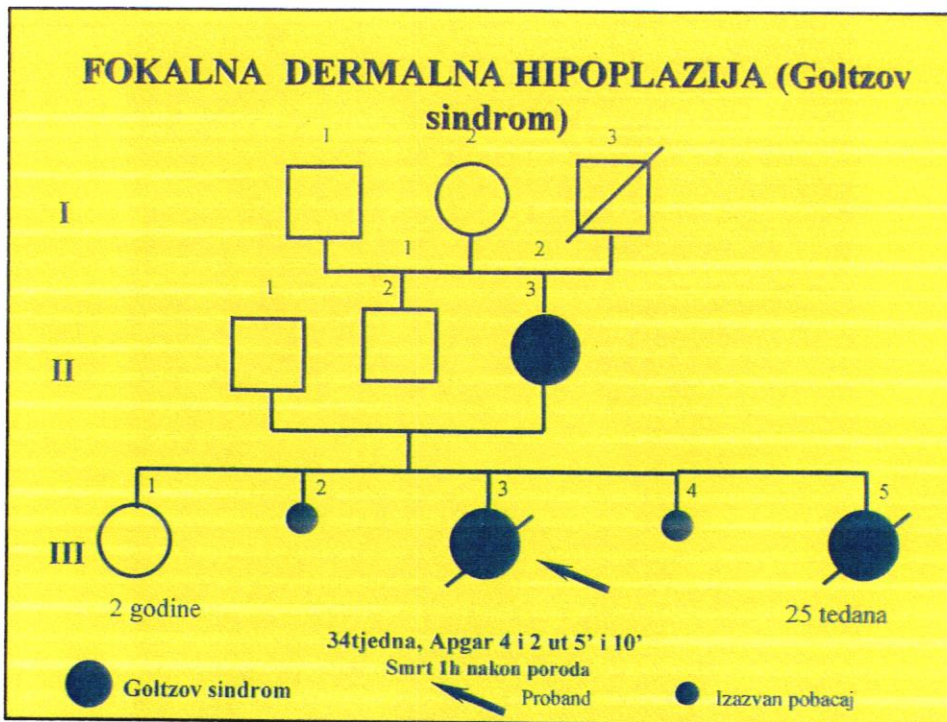


**TRANSVERZALNA UZ SLIKA BUBREGA PLODA U 21 TJEDNUTRUDNOCE POKAZUJE VRLO
POVEĆANA OBA BUBREGA S POVEĆANIM PARENCHIMAL EHOGENOCITETOM
PARENHIMA
II, 4**









NEDONOSCE(34 tj)



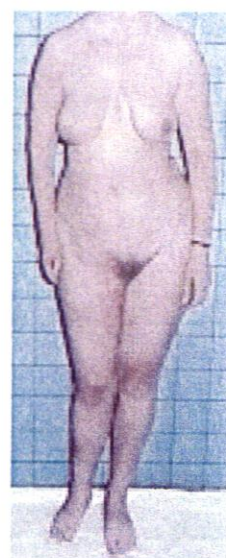
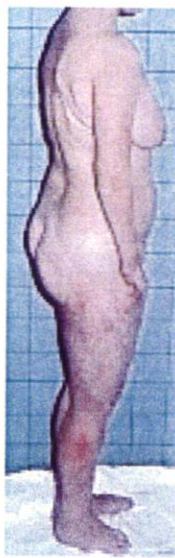
- Diseminirana područja pigmentiranih defekata kože
- Rascjep nepca
- Vrlo kratak filtrum
- Hipoplaziju donje celjusti
- Anoftalmija desno
- Blefarofimoza i
- Atrezija lakrimalnogkanala.



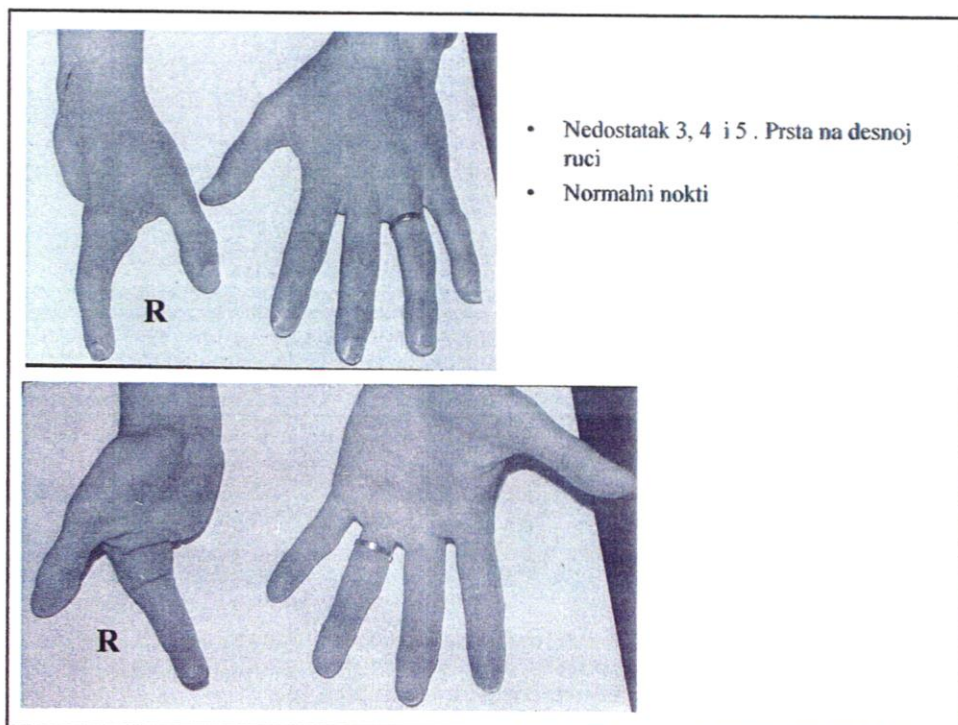
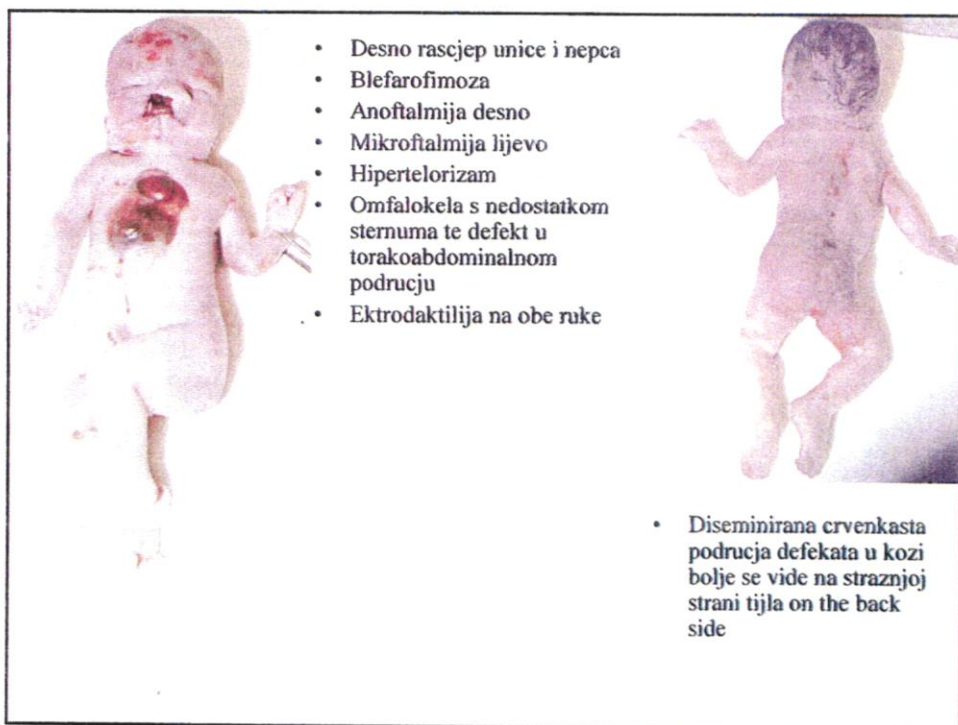
- Prsti obostranonormalni
- Nokti distrofici

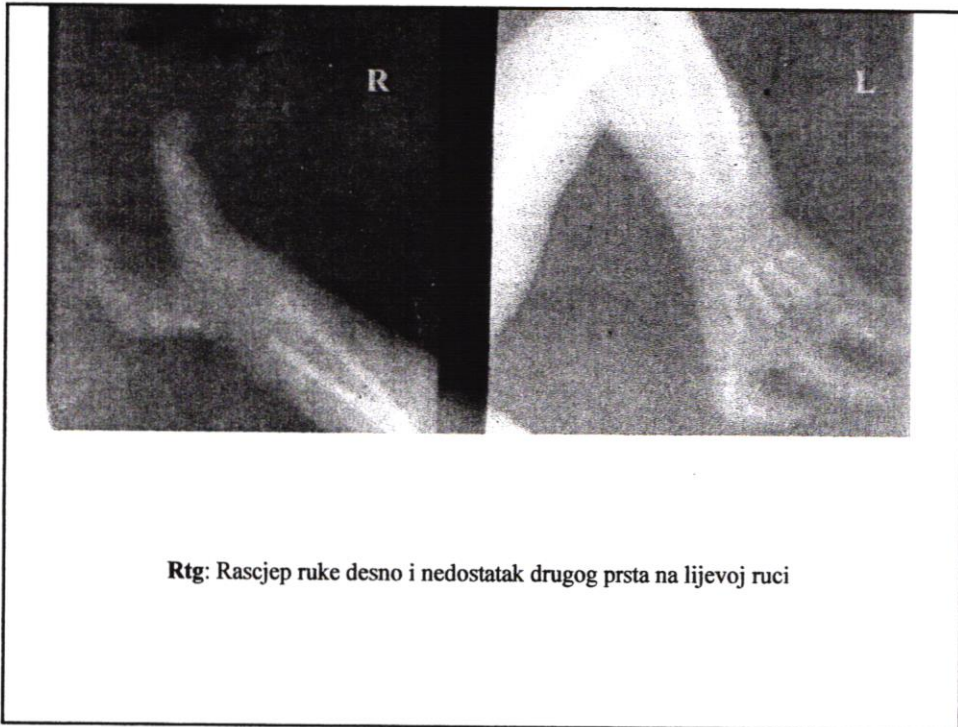


- Lezije kože na udovima i tijelu podsjećale na **incontinenciju pigmenti**.



Desno ektroraktilija ruke i noge, pigmenirane i displastice promjene kože slijede Blaschkoove linije, submukozni rascjep nepca i dijastaza gornja dva medjalna inciziva postavili su sumnju na Ektroraktiliju, ektodermalnu displaziju, rascjep nepca (EEC)





GENETIKA I GENETSKO SAVJETOVANJE RETINOBLASTOMA

Davor Lessel

**Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatski institut za istraživanje mozga,
Šalata 12, Zagreb**

Retinoblastom je maligni tumor nezrele retine, odnosno neuroektodermalne stanice retine, kod kojeg je bila prva opisana genetska etiologija karcinoma i prvi kod kojeg je otkriven tumorsupresorni gen. Knudson je 1971 godine postavio hipotezu po kojoj je retinoblastom oblik karcinoma koji nastaje zbog dva mutacijska procesa („Knudson's two-hit hypothesis“). Njegovo otkriće dovelo je do boljeg razumijevanja dva oblika retinoblastoma, germinalnog (hereditarnog) koji se prenosi autosomno-dominantno i ne-germinalnog (sporadičnog). Dokazao je da je za nastanak retinoblastoma potreban gubitak ili mutacija oba alela gena RB1, koji se nalazi na kromosomu 13q1.4. Dvostruka onkogenska mutacija javlja se između 3 mjeseca nakon začetka i 4 godine života. To je razdoblje između pojave i krajnje zrelosti retinoblasta. Prastanica u kojoj se javlja mutacija je najvjerojatnije ili preteča čunjastih fotoreceptornih stanica ili multipotentni retinoblast. Zbog tih razloga retinoblastom može nastati već u uterusu ili sve do 4 godine života.

U sporadičnom obliku, koji čini otprilike 60% svih slučajeva, oba RB1 alela su somatski inaktivirana u jednoj jedinjoj razvijajućoj retinalnoj prastanici. U tim slučajevima retinoblastom je uvijek unilateralan i unifokalan. U hereditarnom obliku, koji čini otprilike 40% svih slučajeva, pacijenti imaju inaktivirani RB1 alel u svim tjelesnim stanicama, budući da se defektni alel nalazi već u zametnoj stanici, i somatsku mutaciju drugog alela u stanicama retine. Germinalna mutacija se nasljeđuje od roditelja ili je „de novo“ nastala tijekom gametogeneze ili tijekom trudnoće. Kod hereditarnog oblika razlikujemo bilateralan i unilateralan retinoblastom.

Tablica 1. Razlike između hereditarnog i sporadičnog tipa retinoblastoma

Hereditarni tip	Sporadični tip
Ranija dijagnoza	Kasnija dijagnoza
Bi- i unilateralni oblik	Unilateralni oblik
Prva mutacija u zametnoj stanici	Obadvije mutacije somatske
Multifokalno žarište tumora	Unifokalno žarište tumora
Rizik nasljeđivanja 50%	Potomstvo zdravo
Povećan rizik razvoja ostalih tumora	Rizik razvoja ostalih tumora nije povećan

U 25-30% svih slučajeva retinoblastom je bilateralan i hereditaran, pokazuje visoku učestalost penetracije, budući da više od 90% nosioca razvija bolest, i visoku ekspresivnost, budući da nastaje više od 6 individualnih žarišta retinoblastoma, činjenica koja dodatno objašnjava

bilateralnu pojavu. 10-15% pacijenata razvija unilateralan i hereditaran retinoblastomom, bolest pokazuje smanjenu učestalost penetracije i ekspresivnosti, budući da manje od 75% nosioca razvija bolest i u prosjeku nastaju 2 žarišta tumora, što zovemo retinoblastom sa niskom učestalošću penetracije („low-penetrance retinoblastoma“). Ovi pacijenti razvijaju unilateralan, ali multifokalan retinoblastom. Nastanak unilateralno hereditarnog retinoblastoma objašnjava se dvjema vrstama mutacija „divljeg“ alela. Neki rijetki, mutirani, aleli koji kodiraju proteine zadržavaju dijelove funkcije „divljeg“ alela, budući da dolazi do djelomične mutacija pRB-a, te mutacije poznate su u literaturi kao „class 2“ mutacije. S druge strane kod „class 1“ mutacija određeni, mutirani aleli imaju smanjenu ekspresiju „divljeg“ alela i sukladno time je i količina kopija „divljeg“ alela smanjena.

Tablica 2. Prikaz najčešćih tipova germinalne mutacije

Tip mutacije	Bilateralni R.	Unilateralni R.	Prosječna dob kod dijagnoze
Preuranjeni stop kodon	53%	24%	10 mjeseci
Splice	26%	43%	14 mjeseci
Large rearrangements	15%	5%	17 mjeseci
Promoter	3%	9%	7.5 mjeseci
Missense	3%	19%	24 mjeseci

RB1 gen i pRB protein

RB1 gen, sastavljen od 27 egzona, kodira 110kD nuklearni fosfoprotein pRB, tumorsupresorni gen, koji je regulator staničnog ciklusa na nadzornoj točki između G1 i ulaska u S fazu. Fosforilacijski obrazac pRB-a mijenja se tokom staničnog ciklusa i postojeći model sugerira da se hipofosforilirani pRB veže na regulatore transkripcije koji potiču ulazak u S1 fazu. Ta funkcija pRB-a je inaktivirana fosforilacijom ili vezanjem virusnog onkogen na pRB. Kada je fosforiliran, pRB se izdvaja od transkripcijskog faktora E2F, oslobađajući E2F da se veže na DNA i stimulira transkripciju gena koji potiču progresiju kroz stanični ciklus. Gubitak normalne funkcije pRB-a, kao u slučaju tumora, vjerojatno uvjetuje nekontrolirani ulazak u S1 fazu i puno brže dijeljenje stanica. Brojna istraživanja pokazuju da su i drugi molekularni događaji, povrh gubitka normalne funkcije pRB-a, potrebni za razvoj tumora.

Postoje nove teorije o potencijalnom mehanizmu nastanka retinoblastoma u vezi spoznaje da je sporadični unilateralni retinoblastom češći u zemljama u razvoju. U istraživanju humanog-papiloma virusa zaključeno je da bi inaktivacija pRB-a mogla biti djelom uzrokovana djelovanjem onkoproteina HPV E7. Okružje je zbog male konzumacije folne kiseline u trudnoći također postavljeno kao moguć rizik za razvoj retinoblastoma budući da je pojačan postotak učestalosti u zemljama u razvoju.

Drugi ne-okularni primarni tumori

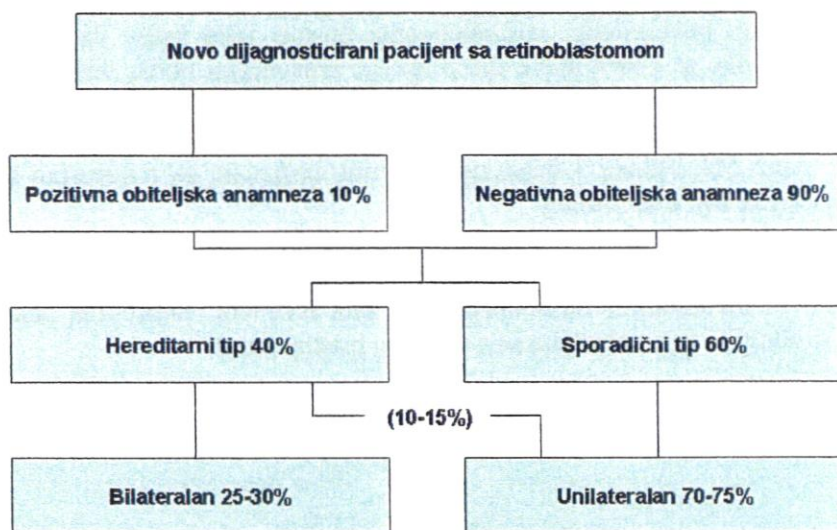
Kako je RB1 mutacija prisutna u svim stanicama pacijenata sa hereditarnim retinoblastomom kod njih postoji mogućnost razvoja drugih ne-okularnih primarnih tumora. Koji su zapravo najvažniji i najčešći razlog smrti u tih pacijenata. Redoslijedom najčešćih to su: osteosarkom lubanje i dugih kostiju, sarkomi mekih tkiva, pineoblastom, melanom, Morbus Hodgkin,

karcinom pluća i karcinom dojke. Također česta je pojava lipoma po cijelom tijelu, što je važna indikacija za nastanak ostalih tumora

Genetsko savjetovanje

Genetsko savjetovanje obitelji koje imaju pacijenta koji boluje od retinoblastoma je izrazito složeno i izazovno. Trebalo bi biti ponuđeno svakom roditelju čije dijete ima retinoblastom, kao i pacijentima u čijim obiteljima postoje članovi sa retinoblastomom. Za vrijeme savjetovanja obitelji bi trebalo objasniti tijek razvijanja retinoblastoma, rizik za prenošenje na potomstvo kao i rizik za pojavu sekundarnog tumora, i pripremiti ih za testiranje. Genetičar bi trebao analizirati djetetovu, kao i obiteljsku, povijest bolesti i učiniti direktno i indirektno molekularno istraživanje. Na slici 1. prikazana je vjerojatnost načina nasljeđivanja kod novo dijagnosticiranog pacijenta sa retinoblastomom.

Prikaz načina nasljeđivanja



Slika 1.

Rana dob kod dijagnoze, multifokalna priroda tumora, postojanje psiho-motoričke retardacije i malformacijskog sindroma, kao i prisutnost obiteljske povijesti bolesti od retinoblastoma ili retinoma nagoviještaju genetsku predispoziciju za bolest.

Tabela 3. Preuzeto iz Update on Retinoblastoma, DH.Abramson, AC.Scheffler., Retina. 2004 Dec;24(6):828-48.

GENETIC COUNSELING FOR RETINOBLASTOMA

If Parent Was	Bilateral				Unilateral				Unaffected			
Chance of offspring having retinoblastoma	45% affected		55% unaffected		7-15% affected		85-93% unaffected		<<1% affected		99% unaffected	
Laterality	85% bilateral		15% unilateral		0%	85% bilateral	15% unilateral		0%	33% bilateral	67% unilateral	
Focality	100% multifocal	96% multifocal	4% unifocal	0%	100% multifocal	96% multifocal	4% unifocal	0%	100% multifocal	15% multifocal	85% unifocal	0%
Chance of next sibling having retinoblastoma	45%	45%	45%	45%	45%	45%	45%	7-15%	6%	6%	6%	<1%
*If parent is a carrier, then 45%												

Tabela 3. Preuzeto iz Update on Retinoblastoma, DH.Abramson, AC.Scheffler., Retina. 2004 Dec;24(6):828-48.

Rizik za prenošenje je uvjetovan obiteljskom povijesti bolesti i tipom retinoblastoma. U slučaju hereditarnog, bilateralnog, retinoblastoma postoji 50% šanse da će i dijete imati retinoblastom. Ukoliko se kod njihove djece razvije unilateralni oblik, 96% te djece imat će multifokalne tumore koji će u većini slučajeva biti dijagnosticirani u prvih 6 mjeseci života. U slučaju unilateralnog, unifokalnog, ne familijarnog retinoblastoma, rizik prenošenja na potomstvo je samo 5%. Tabela 3. prikazuje detaljnu prognozu za potomstvo s obzirom na oblik retinoblastoma koji ima roditelj.

Genetska analiza bolesnika može biti direktna, što je poželjno, ali vrlo skupa, dugotrajna i u 20% bolesnika sa bilateralnim retinoblastomom bez rezultata. Indirektna analiza zahtjeva informativnost obitelji i nije pouzdana kao direktan pristup genu.

Literatura:

1. Humangenetik, J.Murken et al., Georg Thieme Verlag 2006
2. Pädiatrie, FC.Sitzmann et al., Georg Thieme Verlag 2002
3. Retinoblastoma, I.Aerts et al., Orphanet J Rare Dis. 2006 Aug 25;1:31.
4. Genotype-Phenotype Correlations in Hereditary Familial Retinoblastoma, M.Taylor et al., Human Mutation. 2007 Mar 28(3),284-293.
5. Update on Retinoblastoma, DH.Abramson, AC.Scheffler., Retina. 2004 Dec;24(6):828-48.
6. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, <http://atlasgeneticsoncology.org>
7. Molecular Basis of Low-Penetrance Retinoblastoma, JW.Harour, Arch Ophtalmol. 2001 Nov; 119(11):1699-704.

GENETSKO SAVJETOVANJE U NEUROFIBROMATOZAMA I TUBEROZNOJ SKLEROZI

¹Zlatko Sabol i ²Romana Gjergja

¹Poliklinika za dječje bolesti Dr. Sabol, Zagreb i ² Klinika za pedijatriju, KB Sestre milosrdnice, Zagreb

A GENETSKO SAVJETOVANJE U NEUROFIBROMATOZAMA

Dugo vremena se smatralo da je neurofibromatoza (NF) jedinstven klinički entitet s različitim kliničkim ispoljavanjem. Radi se o više bolesti s različitim kliničkim manifestacijama (iako se u nekima i preklapaju), načinima nasljeđivanja i prognozama. Prije dvadeset godina, otkrićima različitih gena, lokaliziranim na 17. kromosomu za neurofibromatozu tip 1 (NF1) (1) i na kromosomu 22 za neurofibromatozu tip 2 (NF2) (2), ove dvije bolesti su odijeljene u dva zasebna klinička i genetska entiteta.

I. NEUROFIBROMATOZA TIP 1 (VON RECKLINGHAUSENOVA BOLEST)

(OMIM +162200)

I.1. Uvod

NF1 (periferna neurofibromatoza ili von Recklinghausenova bolest) je jedna od najčešćih fakomatoza (neurokutanih bolesti). Javlja se u populaciji s učestalošću 1/3000–4000 novorođene djece, podjednako u oba spola i svim etničkim skupinama. Ova autosomno dominantno nasljedna bolest javlja se u polovine slučajeva kao familijarna bolest, a u druge polovine bolesnika nastaje zbog nove mutacije gena.

NF1 je primjer autosomno dominantne bolesti s izrazito različitim kliničkim ispoljavanjem koje može varirati od sasvim blagih kožnih promjena do dramatične slike s teškim komplikacijama koje ugrožavaju život bolesnika. Ne postoji niti jedna patognomonična promjena za NF1. U kliničkoj praksi široko su prihvaćeni dijagnostički kriteriji (3) koji su prikazani u tablici 1. Najmanje dva od navedenih kriterija potvrđuju kliničku dijagnozu bolesti.

Tablica 1. Klinički dijagnostički kriteriji za NF1

1. Šest i više pjega boje bijele kave (café au lait pjege) veće od 5 mm u najvećem promjeru u osoba prije puberteta i veće od 15 mm u najvećem promjeru u osoba poslije puberteta (slika 1)
2. Dva ili više neurofibroma bilo kojeg tipa ili jedan pleksiformni neurofibrom
3. Pjegavost aksilarnih ili ingvinalnih regija
4. Optički gliom
5. Dva ili više Lischovih nodula (iris hamartoma) (slika 2)
6. Različite koštane promjene poput displazije velikih krila sfenoidalne kosti, prorjeđenje korteksa i/ili savinuće digih kostiju s ili bez pseudoartroze
7. Rodak u prvom koljenu (roditelj, brat/sestra ili potomak) s NF1 koja zadovoljava gornje kriterije.

Pored navedenih, NF1 se ispoljava i brojnim drugim poremećajima (skolioza, niže kognitivne sposobnosti s poremećajima učenja i ponašanja, makrocefalija, epilepsija, tumori središnjeg živčanog sustava izvan optičkog trakta, spinalni neurofibromi, maligni tumori perifernih živaca-neurofibrosarkomi, maligni Schwannomi, angiosarkomi i dr.).

NF1-gen, smješten na dugom kraku 17. kromosoma na položaju 17q11.2, jedan je od najvećih ljudskih gena (megagen), dužine oko 350 kb genomske DNA, sadržava 60 eksona s 2818 aminokislina (4.). Gen NF1 okružuju tri mala gena u jednom od njegovih nekodiranih dijelova – intronu: oligodendrocitni mijelinski glikoprotein (Omgp), EV12A i EV12B (5,6). Produkt gena – neurofibromin predstavlja citoplazmatski protein koji u svojoj strukturi ima regiju koja je strukturno i funkcionalno homologna području GTP-aza aktivirajućeg proteina sisavaca (GAP) i genskih produkata kvasaca IRA1 i IRA2 – inhibitornih regulatora cikličkog adenozin-monofosfata onkogeni ras (ras-cAMP) (7). Smatra se da u tumorima ima ulogu supresora tumorskog rasta (8).

Do sada je otkriveno više stotina neovisnih promjena duž cijelog gena, a obuhvaćaju zamjene nukleotida (translokacije), duplikacije i točkaste mutacije. Ispitivanja metodom DNA genskog povezivanja pokazala su da većina novih mutacija nastaje na očevom alelu, u procesu spermatogeneze, u tijeku mitoze spolnih stanica ili ranije (9).

Suštinske točke svakog procesa genetskog savjetovanja sumirane su u slijedećoj definiciji Harpera (12): «Genetsko savjetovanje je proces u kojem su roditelji ili rođaci s rizikom za bolest koja može biti nasljedna, savjetovani o posljedicama bolesti, vjerojatnosti njenog razvoja, načinu nasljeđivanja, te načinima na koje se može ista prevenirati ili ublažiti.

1.2. Osnovna polazišta u genetskom savjetovanju

Liječnik prije davanja genetskog savjeta mora biti siguran da je dijagnoza bolesti koja je predmet savjetovanja – ispravna. Za NF1, klinička dijagnoza mora biti temeljena na prisustvu najmanje dva naprijed navedena kriterija. Kada se ista utvrdi u probanda, neophodan je klinički pregled svih članova uže obitelji (detaljan pregled kože na tipične pigmentne kožne promjene i kutane/

subkutane/ pleksiformne neurofibrome, pažljiv pregled koštanog sustava te biomikroskopski pregled vanjskog segmenta oka na Lischove nodule). Anamnestički podaci o prisustvu ili odsustvu NF1-znakova u članova obitelji nisu dovoljni za utvrđivanje tipa nasljeđivanja, jer su, iz bogatog vlastitog iskustva nerijetko nepouzdati, svjesno ili nesvjesno prešućivani ili minorizirani. Tek nakon pregleda svih članova uže obitelji i izrade rodoslovnog stabla utvrdit ćemo da li se radi o familijarnom obliku NF1 (nasljeđenoj autosomno dominantno maternalnom ili paternalnom transmisijom gena) ili sporadičkom obliku NF1 (nastaloj novom genskom mutacijom).

Informiranje bolesnika i članova njegove obitelji o različitim pojavama i komplikacijama NF1 je vrlo osjetljivo područje savjetovanja. Trebalo bi u tom procesu postepeno i s puno takta bolesniku priopćavati ispoljavanje bolesti da se izbjegne pretjerana zabrinutost i panika. Iz osobnog iskustva, ovisno o intelektualnom i socijalnom nivou bit će i različiti zahtjevi obitelji glede tog pitanja. Neke obitelji žele znati što je više moguće o njihovoj bolesti dok druge iracionalno odbijaju spoznaje kao frustrirajuće. Ima liječnika koji zagovaraju stav da raspravljanje o svim aspektima bolesti nije neophodno jer su teške komplikacije ipak rijetke i da spoznaja o njima može izazvati nepotreban strah i trajnu zabrinutost. To je teško izbjeći u vremenu globalne informatizacije kada je svaki bolesnik u mogućnosti preko sredstava javnog priopćavanja (novine, TV) ili interneta saznati sve informacije o svojoj bolesti i steći krivu sliku o njoj. U tim slučajevima bolesnik odlazi sa savjetovanja s osjećajem nepovjerenja i sumnjičavosti prema svojem liječniku koji mu nije dao «sve» informacije. U bolesnika to može pobudi tu sumnju o stručnosti liječnika i dovesti u pitanje njegova znanja o bolesti o kojoj savjetuje. Istraživanja u drugim kroničnim neurološkim bolestima (Huntingtonova bolest i multipla skleroza) pokazala su da otvorena i iskrena komunikacija između liječnika i bolesnika dovodi do željenog ponašanja i postavljanja prema bolesti, uključujući i razumijevanje i prihvaćanje bolesti u obitelji, afirmirajući pozitivnu ulogu savjetodavca (11).

I.3. Tumačenje prirode NF1 kao genetske bolesti

U objašnjavanju prirode NF1 obično počinjemo opisom velikih promjena po kojoj se bolest i dijagnosticira kao i vremena kada se one obično javljaju u bolesnika. Što se tiče komplikacija NF1, tek mali broj obitelji sposobno je prihvatiti njihovu brojnost i težinu, suočiti se s njima kao mogućnosti. U gotovo svakom razgovoru bolesnik će postavljati pitanja liječenja bolesti koje je simptomatsko.

Roditelji djece oboljele od NF1 poseban interes će pokazati za probleme kognitivnog razvoja i činjenicu da većina takve djece ima problema u procesima učenja. Mišljenja smo da je u priopćavanju promjena i komplikacija bolesti važno postići cilj da bolesnik i/ili njegov roditelj prihvate činjenicu da su najteže komplikacije bolesti (tumori mozga i kralješnične moždine, neurofibrosarkomi, teška iskrivljenja kralješnice koje zahtijevaju kirurško liječenje, teži stupnjevi mentalne retardacije i dr.) ipak rijetke.

I.3.1. Penetrantnost gena NF1

Smatra se da je penetrantnost NF1 u pravilu 100% u dobi oko šeste godine života u bolesnika pregledanih od iskusnog liječnika.

Do sada su zapaženi rijetki slučajevi bolesti u više djece istih roditelja koji su procijenjeni kao zdravi, bez promjena za NF1. Ova pojava mogla bi se objasniti gonadnim ili germinativnim mozaicizmom, neovisnim spontanom mutacijama ili lažnim paternitetom (12). Nakon procjene da roditelji nemaju NF1 u priopćavanju roditeljima treba istaknuti da ne postoji rizik ili da je beznačajan za ponavljanje bolesti u slijedećem potomstvu.

I.3.2. Stopa rizika za buduće roditelje

Bolesnik s NF1 kao autosomno dominantnom bolesti ima 50% rizika za prenošenje bolesnog gena na svoje potomstvo.

I.3.3. Ponavljanje rizika u roditelja sporadičkih slučajeva bolesti

S obzirom na mogućnost osoba s ograničenom (nepotpunom) kliničkom ekspresijom NF1- gena, u osoba koji su procijenjeni kao zdravi, a koji imaju dijete s NF1, prije genetskog savjetovanja, kao što je i prethodno navedeno, neophodan je detaljan kožni pregled i okulistički pregled šarenica procjepnom lampom. Ima slučajeva da roditelji djece, prividno sporadičkih slučajeva NF1, pokazuju neke znakove NF1, ali ne dovoljne za postavljanje sigurne kliničke dijagnoze (manje od šest café au lait pjega, rijetke Lishove nodule na šarenicama npr.). Radi se ili o segmentalnoj distribuciji NF1-promjena ili o slučajevima gonadalnog mozaicizma. U takvim situacijama nemoguće je predvidjeti rizik ponavljanja bolesti i obično uzimamo u obzir empirijsku mogućnost rizika od 5%.

I.3.4. Varijabilnost kliničke slike NF1

U savjetovanju je važno naglašavati da postoji vrlo varijabilno kliničko ispoljavanje bolesti ne samo među nesrodnicima već i članovima iste obitelji. Ovo je osobito važno u slučajevima da bolesni roditelj ima tešku komplikaciju i zabrinut je za mogućnost da se ista ponovi i u njegovog djeteta s NF1. U svakodnevnom savjetovanju priopćavanje mogućih komplikacija bolesti je najsloženije pitanje. Stoga je za genetsko savjetovanje važno znati stope rizika pojedinih komplikacija koje su prikazane u tablici 2:. Mogućnost najtežih komplikacija bolesti imat će utjecaj na odluku roditelja da zatraže genetsku potvrdu bolesti.

Tablica 2. Učestalosti komplikacija NF1 (13)

	%
Intelektualni hendikep	
umjerena/teška mentalna retardacija	3,2
laka mentalna retardacija/granični intelektualni nivo/poremećaj učenja	29,8
Opsežni pleksiformni neurofibromi glave i vrata	1,2
Skolioza koja zahtijeva operativno liječenje	5,2
Teška pseudoartroza	2,1
Stenoza akvedukta –hipertenzivni hidrocefalus	2,1
Epilepsija	4,2
Spinalni neurofibromi	2,1
Visceralni neurofibromi	2,1
Endokrini tumori	3,1
Stenoza arterije renalis	2,1
Optički gliomi	0,7
Drugi tumori SŽS-a	0,7-1,5
Rabdomiosarkomi	1,5
Maligni tumori perifernih živaca	1,5

I.3.5. Praćenje djece s rizikom za NF1

Kožne pigmentne promjene tipa café au lait pjege prisutne su u svih nosioca NF1-gena u dobi oko pete godine. U toj dobi mogu biti i jedini znak bolesti. U tim slučajevima se preporučuje kliničko praćenje djeteta – najmanje jedan detaljan klinički pregled godišnje (uz obvezan okulistički pregled šarenica procjepnom svjetiljkom). Roditelji djece s multiplim café au lait pjegama kao jednim znakom bolesti nerijetko će zatražiti gensku analizu. Navodimo vlastito iskustvo s jednojajčanim blizankama i koje su u dobi dvije godine imale samo multiple café au lait pjege i u kojih je učinjena DNA analiza metodom sekvencioniranja. U obje djevojčice nađena je c.4168C>T mutacija u exonu 24.Ova «novel» mutacija nije do sada uočena kod drugih bolesnika s NF1 i u tijeku je DNA analiza roditelja da bi se sa sigurnošću utvrdila nova mutacija i isključio eventualni gonadalni mozaicizam u jednog od roditelja.

I.4. Molekularna dijagnostika NF1

Molekularna ispitivanja za NF1, iako moguća, rijetko se rutinski primjenjuju u svakodnevnom kliničkom radu zbog nekoliko razloga. Klinička dijagnoza bolesti, osobito u osoba poslije puberteta neupitna je i ne zahtijeva molekularnu potvrdu. Zbog veličine NF1-gena i pojave velikog broja različitih genskih promjena (zamjene nukleotida – translokacije, duplikacije, točkaste mutacije), određivanje specifične mutacije u pojedinim bolesnika može biti teško. Molekularna ispitivanja dokazuju postojanje bolesti, ali nemaju prediktivnu vrijednosti za njezinu težinu i tijek. Metode zahtijevaju dosta vremena i skupe su.

Genetičko ispitivanje u obitelji u slučajevima NF1 temelji se na analizi genske povezanosti (engl. linkage analysis), za koju je potrebno imati barem dvije bolesne osobe u dvije uzastopne

generacije. Upotrebom brojnih visokoinformativnih biljega određuju se polimorfizmi NF1-gena odnosno haplotip kojim se bolest nasljeđuje u određenoj obitelji. Metoda se rabi i u našoj zemlji (Institut Ruđer Bošković) (14).

Dokazivanje specifičnih mutacija u bolesnika nije moguća u svih bolesnika zbog veličine gena (megagen), nepostojanja tzv. «vrućih» mjesta s pojavom veće učestalosti genskih mutacija na njima te vrlo raznolikim oblicima genskih promjena.

Poseban problem za gensku analizu su sporadični slučajevi, iako se i u njih mogu utvrditi velike delecije unutar gena upotrebom većeg broja visokoinformativnih intragenskih biljega. Danas je poznato da se najveći broj mutacija može dokazati u GAP srodnom području (eksoni 21 – 27) i susjednim eksonima 28 i 29. Testiranja se provode na DNA odnosno RNA izoliranoj iz limfocita periferne krvi.

O vrsti mutacije ovisi odabir metode. Ako se ispituju već poznate mutacije, najprije se metodom lančane reakcije polimerazom –PCR (od engl. polymerase chain reaction), ili metodom cijepanja s pomoću restrikcijskih enzima – RFLP (od eng. restriction fragment length polymorphism) ili analizom heterodupleksa (za delecije i insercije) umnoži dio NF1-gena, a nakon toga analizira mutacija

Za molekularnu dijagnozu novih mutacija rabi se analiza jednolančanih molekula DNA – SSCP (od engl. *single strand conformation polymorphism*) ranije umnožene DNA PCR-metodom, nakon čega slijedi postupak određivanja redoslijeda nukleotida odsječka gena – sekvencioniranje. Danas postoje komercijalne probe za genske mutacije NF1 poput PTT (od eng. *protein truncation test*) (15). Valja naglasiti da niti jedan test nije potpuno sigurna metoda.

Molekularna dijagnostika zahtijeva timsku suradnju liječnika-kliničara koji je postavio sumnju ili utvrdio kliničku dijagnozu i oblik NF1 (familijarna ili sporadična) i molekularnog genetičara koji prema objektivnim mogućnostima odabire način molekularnog testiranja.

I.5. Prenatalna i presimptomatska dijagnoza NF1

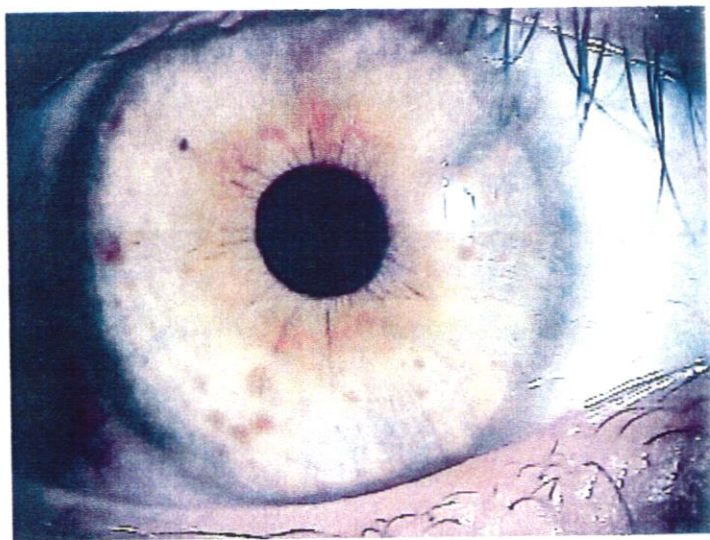
Prije primjene molekularnih genetskih tehnika nije postojala niti jedna metoda za dokazivanje prenatalne ili presimptomatske dijagnoze NF1. Klinička dijagnoza u ranom djetinjstvu bazira se na prisustvu multiplih café au lait pjega s ili bez drugih promjena bolesti. S obzirom da se teške komplikacije kao posljedica opsežnih strukturnih promjena rijetko viđaju na rođenju, od ultrazvučnog praćenja u tijeku trudnoće ne može se očekivati veća vrijednost u otkrivanju karakterističnih abnormalnosti povezanih s NF1.

U prenatalnoj dijagnozi koristimo metode molekularne dijagnostike navedene u poglavlju I.4. – analizira se DNA iz stanica fetusa dobivenih biopsijom korionskih resica u 10.-12. tjednu trudnoće ili stanica iz plodne vode dobivene ranom amniocentezom od 14. – 18. tjedna trudnoće. Za prenatalnu dijagnozu mora biti poznat haplotip ili genska mutacija bolesnog roditelja kojima se bolest nasljeđuje u obitelji.

Za presimptomatsku molekularnu dijagnozu NF1 - određivanje mutacije koristi se više metoda navedenih u prethodnom poglavlju. U budućnosti se može očekivati sve veća primjena ovih metoda kako u prenatalnoj tako i u presimptomatskoj dijagnostici bolesti.



Slika 1. Pjege boje bijele kave u bolesnika s NF tip I



Slika 2. Lischovi noduli u bolesnika s NF tip I

II NEUROFIBROMATOZA TIP 2 (BILATERALNI VESTIBULARNI NEUROMI)

(OMIM #101000)

II.1. Uvod

Neurofibromatoza tip 2 (NF2) je bolest koju karakterizira razvoj obostranih akustičkih neuroma ili vestibularnih švanoma ili živčanih tumora drugih lokalizacija, a odsustvo ili rijetka nazočnost tzv «perifernih» znakova neurofibromatoze – café au lait pjega ili perifernih neurofibroma.

Učestalost NF2 nije točno utvrđena, ali je značajno manja od NF1. Prevalencija se procjenjuje na 1:210000 (4.7-8.6/milijun) stanovnika opće populacije i odražava samo broj simptomatskih slučajeva dijagnosticiranih u određenom vremenskom razdoblju (16). Prava incidencija na rođenju je mnogo viša – 1:33000-40562. Prema najnovijim podacima stope učestalosti su čak i više od navedenih: za godišnju prevalenciju 1:85000 (11.8/milijun), a incidencija na rođenju 1:25000 (17). Razlike između viših učestalosti na rođenju i manjih prevalencija dijagnosticirane NF2 proizlaze iz činjenice da većina bolesnika ne razvije simptome i znakove bolesti do treće ili kasnijih decenija života, a mnogi i umiru prije početka kliničkog ispoljavanja bolesti.

Vodeći klinički znak NF2 su bilateralni akustički neurinomi ili vestibularni švanomi. Ovi tumori mogu se razviti i iz drugih kranijalnih, spinalnih ili perifernih živaca. Drugi tumori po učestalosti su intraspinalni i intrakranijalni meningeomi te niskodiferencirani moždani endolimfomi i gliomi.

Klinički dijagnostički kriteriji za NF2, općeprihvaćeni u svakodnevnome kliničkom radu, preporučeni od američkog Nacionalnog instituta za zdravlje, tzv. NIH kriteriji (18), a dopunjeni od Evansa i sur. (19) prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Dijagnostički kriteriji za NF2

NIH kriteriji (18)

1. Bilateralni tumor VIII živca evaluiran primjerenim tehnikama pregleda (CT i MR mozga) uz primjenu kontrastnog sredstva (gadolinijum)
ili
 2. Rodak u prvom koljenu (roditelj, brat/sestra, potomak) s NF2
+
a/ unilateralni tumor VIII živca ili
b/ bilo koja od slijedećih promjena: neurofibrom, meningeom, gliom, švanom, juvenilno stražnje
subkapsularno zamućenje leće
-

Dodatni kriteriji po Evansu i sur. (19)

1. Bilateralni vestibularni švanomi
ili
2. Pozitivna obiteljska anamneza za NF2
+

- a/ unilateralni vestibularni švanom ili
 - b/ bilo koji od slijedećih znakova: meningeom, gliom, neurofibrom, švanom i stražnja subkapsularna katarakta, cerebralne kalcifikacije ili
 - 3. Unilateralni vestibularni švanom
 - +
 - jedna ili više promjena navedenih pod b/ ili
 - 4. Multipli meningeomi (dva ili više)
 - +
 - unilateralni vestibularni švanom ili
 - 5. Multipli meningeomi (dva ili više)
 - +
 - jedna ili više promjena navedenih pod b/
-

Dosadašnja istraživanja pokazala su čvrstu intrafamilijarnu sličnost u kliničkom tijeku NF2. Osobito se to odnosi na dob bolesnika u vrijeme prvih simptoma i početka gubitka sluha te broj meningeoma (20). S obzirom na stupanj težine bolesti razlikuju se dva tipa NF2: 1. laki i umjereni oblik (Gardiner), prema bolesnicima obitelji opisane od Gardinera i Fraziera (21), s kasnijim razvojem i kliničkim ispoljavanjem bilateralnih vestibularnih švanoma, sporijom progresijom gubitka sluha i malim brojem (ne više od jednog) pridodanih drugih tumora kao što su spinalni tumori ili meningeomi; 2. teški oblik (Wishart) koji je imao bolesnik opisan od Wisharta (22), s ranim početkom razvoja bilateralnih vestibularnih švanoma, meningeoma i spinalnih tumora u velikom broju, brzim kliničkim razvojem bolesti koji dovodi do teškog invaliditeta. Premda se navedeni fenotipovi NF2 mogu povremeno potvrditi specifičnim genskim mutacijama, suvremena molekularna genetička ispitivanja u cilju određivanja fenotipno-genotipnih korelacija upućuju na mnogo veću promjenljivost kliničke ekspresije bolesti.

II.2. Genetski aspekti NF2

NF2 je autosomno dominantna bolest, s više od polovine bolesnika koje predstavljaju tzv. sporadične slučajeve s novom genskom mutacijom. One mogu nastati u germinativnim stanicama njihovih roditelja (tzv. prezigotične mutacije) ili u bilo kojoj stanici poslije fertilizacije i stanici u diobi u tijeku procesa kariokineze i citokineze (tzv. postzigotičke mutacije). Potonje mutacije mogu imati za posljedicu somatski mozaicizam koji se javlja u 25%-30% bolesnika s novom mutacijom NF2-gena (23).

Nalazi brojnih germinativnih delecija u bolesnika s NF2 doveli su i do otkrića proteina NF2-gena na mjestu 22q12.1, nazvanog švanomin ili merlin zbog velike sličnosti sa skupinom membranskih citoskeletnih proteina ERM (ezrin-radiksin-meozin proteini). Brojni nalazi bialeličke inaktivacije NF2-gena u švanomima, meningeomima i mezotheliomima upućuju na funkcije švanomina kao tumor supresorskoga gena. Gen je dužine 90 kb s najmanje 17 eksona sastavljenih od 595 aminokiselina (24).

II.2.1. Penetrantnost gena NF2

NF2 kao autosomno dominantna bolest ima penetraciju gena od približno 100% u dobi od 60 godina (16). Do sada je objavljeno nekoliko slučajeva genske nepenetrantnosti (25).

II.2.2. Stopa rizika za buduće roditelje

Kako se radi o autosomno dominantnoj bolesti, djeca bolesnika s NF2 imaju rizik od 50% za nasljeđivanje gena od roditelja.

II.2.3. Molekularna dijagnostika NF2

Standardnom DNA tehnologijom kao što su metoda analize jednolančanih molekula DNA – SSCP (od engl. single strand conformation polymorphism analysis), denaturirajuća gradijentna gel-elektroforeza – DGGE (od engl. denaturing gradient gel electrophoresis) ili metoda cijepanja eksona uz pomoć restrikcijskih enzima – RFLP (od engl. restriction fragment length polymorphism) moguće je utvrditi više od stotinu uzročnih mutacija u 35% - 66% bolesnika s NF2 (26,27). Većina ovih mutacija su germinativne točkaste mutacije, opisane za sve aksone NF2-gena, osim eksona 9 i translacijskog dijela eksona 16 i 17. Tipovi germinativnih promjena gena najčešće su missense/nonsense, frameshift ili zamjena nukleotida (splicing) koje rezultiraju skraćanjem ili odsutnošću C-terminalnog dijela genskog produkta švanomina. Do sada nisu zapažena tzv vruća mjesta na NF2-genu s češćim javljanjem mutacija.

Navedene tehnike genetičkih ispitivanja nisu pouzdane u svih bolesnika s NF2. Ne mogu se primijeniti u bolesnika bez bilateralnih vestibularnih švanoma zbog niskih nivoa mRNA u leukocitima. Njihova relativno niska učinkovitost (oko 60%) u otkrivanju konstitucionalnih NF2-mutacija u sporadičnih bolesnika s novim genskim promjenama može se objasniti somatskim mozaicizmom. U slučajevima somatskih mozaicizama u kojima samo dio stanica sadržava mutirane NF2-gene, konvencionalnom tehnikom cijepanja DNA leukocita metodom lančane reakcije polimerazom -PCR (od eng. polymerase chain reaction) dobivaj use preniski nivoi genskih produkata da bi se mogli detektirati i razlikovati od normalnih DNA odsječaka (28,29). U većini obitelji s više od jednog bolesnika s NF2 analiza genske povezanosti (linkage analysis) još uvijek predstavlja metodu izbora kojom se postiže gotovo stopostotna sigurnost genetičke dijagnoze NF2.

II.2.4. Genotipno-fenotipna korelacija

Ispitivanja povezanosti između kliničkog izražavanja bolesti i genskih mutacija bila su usmerena na težinu bolesti, dob početka simptoma NF2 te broja intrakranijalnih (meningeoma), spinalnih i perifernih živčanih tumora. Bolesnici s teškom kliničkom slikom (rani početak simptoma, veći broj tumora) češće imaju mutacije koje dovode do skraćanja proteina zbog insercija ili delecija (tzv frameshift i nonsense mutacije). Blaža i umjerena klinička slika rezultata je missense mutacija, strukturnih delecija ili DNA abnormalnosti koje se ne mogu otkriti standardnim metodama DNA tehnologije kao što je to slučaj u bolesnika s somatskim mozaicizmima (28,29-31).

Bolesnici s konstitucionalnim NF2-genskim promjenama tipa missense, velikih delecija, zamjena nukleotida i u slučajevim somatskog mozaicizma imaju značajno manji broj tumora od bolesnika s konstitucionalnim nonsense ili frameshift mutacijama. Također je uočena značajna intrafamilijarna korelacija za intrakranijalne meningeome i spinalne tumore (obično švanomi i meningeomi) (32).

Buduća istraživanja s ciljem utvrđivanja povezanosti tipa genskih mutacija i razvoja specifičnih vrsta tumora i drugih promjena bolesti mogla bi donijeti niz korisnih spoznaja koja bi se mogla koristiti u svakodnevnom kliničkom zbrinjavanju bolesnika s NF2.

II.3. Dijagnostički postupak kod sumnje na NF2

Oko polovice bolesnika ima negativnu obiteljsku anamnezu za NF2. Prije donošenja zaključka da li se radi o sporadičnom slučaju s novom genskom mutacijom ili familijarnom obliku bolesti, za svakog bolesnika važna je vrlo detaljna analiza rodoslovnog stabla i pregled njegovih roditelja (ako nisu stariji od 60 godina). Uz detaljan klinički dermatološki i oftalmološki pregled (uključujući indirektnu oftalmoskopiju i pregled procjepnom svjetiljkom) obvezatne su i pretrage ranih slušnih evociranih potencijala moždanog debla i MR mozga (16).

Dijagnostička sumnja na NF2 postavlja se na temelju dijagnostičkih kriterija navedenih u tablici 3. Rana dijagnoza bolesti od neprocjenjive je važnosti zbog činjenice da veličina tumora ima prediktivnu vrijednost za postoperativno očuvanje sluha koji bi trebao biti dovoljan za socijalnu komunikaciju i očuvanje ličnog živca. Ona je lako moguća u familijarnim oblicima kada se osoba klinički prati od ranog djetinjstva, a otežana u sporadičnih bolesnika s novom mutacijom gena.

Dijagnostička metoda izbora za otkrivanje i najmanjih (svega nekoliko mm) vestibularnih švanoma je MR mozga uz primjenu debljine slojeva od 3 mm kroz unutarnje slušne kanale bez i s primjenom kontrastnog sredstva (gadolinium-DTPA), u koronarnim i sagitalnim presjecima. Osim vestibularnih švanoma pretraga otkriva i tumore drugih lokalizacija – meningeome, gliome, kalcificirane hamartome i druge promjene povezane s NF2. Svi bolesnici u kojih se utvrdi dijagnoza NF2 trebaju pregled i cijele kralježnične moždine s kontrastnim sredstvom i bez njega. Ispitivanje ranih slušnih evociranih potencijala moždanog debla bolja je dijagnostička metoda od standardnih audiograma i vestibulograma, pogotovo u slučajevima malih tumora. Uz navedene pretrage bolesnik s sumnjom ili utvrđenom dijagnozom NF2 zahtijeva okulistički i dermatološki pregled radi otkrivanja perifernih znakova bolesti (katarakta, café au lait pjege, periferni neurofibromi, švanomi i dr.).

II.4. Otkrivanje rizičnih osoba za NF2

U dijagnostičkoj evaluaciji bolesti poseban problem predstavlja presimptomatska dijagnoza u osoba s rizikom za NF2: prvi rođaci bolesnika s utvrđenom dijagnozom, osobe s jednostranim vestibularnim švanomima mlađe od 30 godina, multiplim tumorima središnjeg živčanog sustava nepoznate etiologije, osobe s jednim ili više neurofibroma, rijetkim café au lait pjegama, a bez

Lischovih nodula šarenica, djeca s švanomom ili meningeomom, s izoliranom pojavom juvenilne stražnje katarakte ili retinalnim hamartomima koji su rijetki u općoj populaciji.

Djecu bolesnika, koja imaju rizik od 50% za nasljeđivanje NF2 treba pratiti praktički od rođenja.. S obzirom na činjenicu da samo 10% bolesnika ima simptome prije desete godine života (33) i sve druge osobe s rizikom za NF2 treba pratiti od ranog djetinjstva. Probir za vestibularne švanome, ispitivanje sluha evociranim ranim slušnim potencijalima jedanput godišnje trebalo bi započeti prije nastupa puberteta, od desete godine. Tumori rijetko daju simptome prije ove dobi, čak i u obiteljima s teškim oblicima bolesti.

U slučajevima klinički i audiološki utvrđenog slabljenja sluha, u takve osobe obvezatno treba učiniti MR mozga i pretragu ponavljati najmanje jedanput na godinu.

U rizičnih osoba urednog sluha inicijalnu neuroradiološku procjenu s MR mozga trebalo bi učiniti u dobi oko dvanaest godina. U slučaju nalaza tumora pretragu treba ponavljati jedanput na godinu, a u slučaju odsutnosti tumora u dobi od 15, 25 i 35 godina. U tim životnim dobima normalan nalaz MR mozga smanjuje rizik da je osoba naslijedila NF2-gen s početnih 50% na 30%, 10% odnosno 5% (19,34).

Razvoj tehnologija molekularne genetike i sve veće mogućnosti za sigurnu DNA dijagnozu NF2 potisnut će u skoroj budućnosti potrebu za kliničkim probirom i praćenje u većine rizičnih osoba.

II.5. Prenatalna i presimptomatska dijagnoza NF2

U današnje vrijeme, u zemljama koje imaju razvijene tehnologije molekularne dijagnostike, analize genske povezanosti (linkage analysis) s informativnim genskim biljezima mogu se primijeniti za presimptomatsku i prenatalnu dijagnozu NF2 u obiteljima s dva ili više bolesnika (35). DNA dijagnoza specifičnih genskih mutacija u obitelji bolesnika omogućiti će sigurnu dijagnozu NF2 i u rizičnih osoba tako da će se kliničkom probiru i praćenju podvrgavati samo nosioci NF2-gena (36,37).

III GENETSKO SAVJETOVANJE U TUBEROZNOJ SKLEROZI

(OMIM: #191100 - TUBEROUS SCLEROSIS; 191092 - TSC2 GENE; 605284 - TSC1 GENE)

1. UVOD

Tuberozna skleroza je autosomno dominantna nasljedna bolest koja uključuje specifične abnormalnosti kože, mozga, bubrega i srca.

Incidencija TS je 1 na 5800 živorođenih (38). Oko 2/3 oboljelih nose "de novo" mutaciju gena, TSC1 i TSC2, koji su do danas dva gena za koje je poznata povezanost s kompleksom tuberozne skleroze (39, 40). Od otkrića TSC1 i TSC2 gena do danas preko 1000 pacijenata i njihovih obitelji ima identificiranu mutaciju. Od svih probanada kod kojih je mutacija identificirana, 27% nosi mutacije u TSC1, a 73% u TSC2 genu.

Zbog različitosti simptoma i varijabilnosti učestalosti njihove zastupljenosti kod pojedinih bolesnika, za postavljanje kliničke dijagnoze TS koristimo dijagnostičke kriterije. Današnji važeći dijagnostički kriteriji za TS su oni revidirani 2004 godine (41) i prema tim kriterijima osobe koje imaju limfangiomatozu s pridruženim renalnim angiomiolipomima nemaju TS, a isključena su nespecifična obilježja kao što su infantilni spazmi te miokloni, tonički ili atonički napadaji, dok su neka obilježja specificirana kao što su npr. netraumatski ungualni i periungualni fibromi, te tri ili više hipomelanotičkih makula.

2. KLINIČKA SLIKA TS

Definitivnu dijagnozu TS čine: dva major obilježja ili jedno major obilježje i dva minor obilježja (tablica 1). Vjerojatnu dijagnozu TS čine jedno major obilježje i jedno minor obilježje, a moguću dijagnozu TS čine prisutnost jednog major obilježja ili dva ili više minor obilježja.

Tablica 1. Major i minor obilježja u dijagnostici TS:

Major obilježja:

Angiofibromi lica ili plak na čelu (adenoma sebaceum)

Netraumatski ungualni i periungualni fibromi (slika 2)

Hipomelanotične makule (3 ili više) (slika 3)

"Shagreen patch" madež vezivnog tkiva

Višestruki renalni nodularni hamartomi

Kortikalni tuberi ¹

Subependimalni noduli

Subependimalni atrociomi s gigantskim stanicama

Rabdomiomi srca, jedan ili multipli

Limfangiomioatoza ²

Renalni angiomiolipomi ²

Minor obilježja

Višestruka udubljenja na caklini zuba

Hamartomatozni rektalni polipi⁴

Ciste kostiju⁵

Radijalne migracijske linije u bijeloj tvari mozga^{1,3,5}

Fibromi gingiva

Nerenalni hamartomi⁴

“Achromic patch” na retini

Kožne lezije poput konfeta

Multiple renalne ciste⁴

1 Kada su cerebralna kortikalna displazija i migracijski traktovi bijele tvari prisutni – računaju se kao jedno obilježje

2 Kada su prisutni i limfangiomatoza i angiomiolipomi, tada i druga obilježja moraju biti pristupa prije dijagnoze

3 Migracijske linije u bijeloj tvari i fokalna kortikalna displazija često se vide kod pacijenata s TS, ali zbog toga što mogu biti i neovisne jedna o drugoj i zato što su relativno nespecifične, smatraju se minor dijagnostičkim kriterijima

4 Histološka

potvrda

je

potrebna.

5 Dovoljna je radiološka dijagnoza.

Kompleks tuberozne skleroze je varijabilan u kliničkim obilježjima čak i unutar iste obitelji, a može biti zahvaćen svaki organski sustav.

Koža. Koža je zahvaćena u 100% slučajeva i obično nalazimo: hipomelanotske makule (87%-100%), angiofibrome lica (47%-90%), “shagreen patches” (20%-80%), fibrozne plakove lica i fibrome nokata (17%-87%).

Središnji živčani sustav. Tumori SŽS su vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta. Lezije mozga uključuju subependimalne glijalne čvoriće (90%), kortikalne tubere (70%) i subependimalne astrocitome s gigantskim stanicama (6% to 14%) – opasni su jer su veliki i mogu uzrokovati opstrukciju protoka likvora s posljedičnim hidrocefalusom. Te se lezije mogu razlikovati slikovnim prikazima na CT i MR mozga. Goodman 1997 je predložio da broj kortikalnih tubera na MR bude prediktor težine disfunkcije cerebralnog tkiva (42). Srednje do teže oboljeli su imali 7 i više kortikalnih tubera na MR od onih s blažom kliničkom slikom. Više od 80% bolesnika s TSC imaju epileptičke napadaje. Za TS je poznata uzročna povezanost bolesti i infantilnih spazama (Westovog sindroma). Oko 50% bolesnika će imati razvojne poteškoće i mentalnu retardaciju (43). Glavni uzrok prijevremene smrti (32.5%) su komplikacije povezane s teškom mentalnom retardacijom, kao što su npr. status epilepticus i bronhopneumonija. Psihijatrijski poremećaji u TS uključuju pervazivni razvojni poremećaj i autizam, te ADHD i agresiju.

Bubrezi. Bubrežna bolest je drugi vodeći uzrok prijevremene smrti kod TS. Oko 80% djece s TS imaju identificiranu leziju bubrega do srednje dobi od 10.5 godina: benigni angiomiolipomi (70%), epitelijske ciste (20%-30%) onkocitomi (benigni adenomatozni hamartomi) (<1%), maligni angiomiolipomi (<1%) i karcinomi bubrežnih stanica.

Srce. Rabdomiomi srca su prisutni u 47% - 67% bolesnika s TS, a s vremenom se smanjuju, a mogu i nestati. Obično su najveći za vrijeme novorođenačkog razdoblja.

Pluća. Limfangiomatoza pluća se nalazi u 1%-6% i primarno zahvaća žene u dobi od 20 do 40 godina. Klinički se prezentiraju kratkoćom daha i hemoptizom. RTG pokazuje difuzni mrežasti uzorak, a CT pokazuje difuzne intersticijske promjene s infiltratima i cističnim promjenama. Pneumotoraks i hilotoraks mogu dovesti do respiratorne insuficijencije i smrti. Multifokalna mikronodularna pneumonocitna hiperplazija se također može naći u TSC

Oko. Retinalne lezije su hamartomi (uzdignute lezije ili lezije poput plakova) i akromni patches – slični hipopigmentiranim promjenama na koži. Jedna ili više ovih promjena na oku je prisutna u 75% oboljelih i riječ je o asimptomatskim lezijama.

Ekstrarenalni angioliipomi. U retrospektivnoj studiji UZV i CT nalaza (44) identificirano je 8 hepatalnih angioliipoma u 62 bolesnika s TS (13%).

3. DIJAGNOSTIKA TS

Preporuča se svim bolesnicima sa sumnjom na TS napraviti početnu evaluaciju (tablica 3) radi ustanovljavanja dijagnoze i pravovremenog otkrivanja komplikacija. Tablica 3. donosi program evaluacije ustanovljen konsenzusom stručnjaka 1998 (the Clinical Issues Panel, Panel 1, at the Tuberous Sclerosis Consensus Conference in July, 1998), a revidiran 2004. godine (41).

Tablica 3. Evaluacija bolesnika s TS

Povijest bolesti, pogotovo kliničke osobine TS
Obiteljska anamneza
Fizikalni pregled s Woodovom svjetiljkom
CT/MR mozga
UZV bubrega
Oftalmološki pregled
EKG i UZV srca
EEG
Neurorazvojna evaluacija
CT prsnog koša kod žena
Kliničko praćenje bolesnika.
UZV bubrega svake 1-3 godine
CT/MR bubrega ako su na UZV bubrega prisutne velike ili brojne tumorske tvorbe
Polugodišnji UZV bubrega s bolesnicima s angiomioliipomima manjim od 3.5 - 4.0 cm
CT/MRI mozga svakih 1-3 godine kod djece i adolescenata
Psihologijski status prema potrebi
UZV srca odnosno CT prsnog koša u slučaju simptoma

4. GENETSKO SAVJETOVANJE U TUBEROZNOJ SKLEROZI

Genetsko savjetovanje je proces pružanja informacija pojedincu i obitelji o prirodi, nasljeđivanju i posljedicama genetskih poremećaja kako bismo im pomogli u donošenju informiranih osobnih i medicinskih odluka.

Pri savjetovanju kod TS važno je znati da su nam poznati geni TSC1 i TSC2 te danas nam je u kliničkoj praksi dostupno molekularno genetsko testiranje za TS. Molekularnu dijagnostiku možemo koristiti kao potvrdni dijagnostički test, prenatalnu dijagnostiku te za genetsko savjetovanje - određivanje rizika ponavljanja. U kliničkoj uporabi je sekvencioniranje, FISH odnosno *microarray* analiza.

Sekvencioniranje. *TSC1* mutacije su primarno male delecije, insercije i nonsense mutacije koje možemo otkriti sekvencioniranjem, dok *TSC2* mutacije uključuju i velike delecije i promjene koje se ne mogu otkriti sekvencioniranjem. Molekularna dijagnostika *TSC1* i *TSC2* gena je komplicirana veličinom gena, velikim brojem mutacija i visokim postotkom somatskog mozaicizma (10%-25%) (45, 46). Somatski mozaicizam je otkriven u 26 (27%) obitelji s kombiniranim TSC/PKD fenotipom (AD policistična bolesti bubrega).

Genomska microarray analiza/FISH. Genomska microarray analiza uključuje evaluaciju brojnih klinički relevantnih lokusa upotrebom brojnih FISH BAC klonova za otkrivanje prisustva ili odsustva testirane regije DNA. Jedna testirana regija uključuje *TSC2* gen (~45 kb) na 16p13.3. Zbog veličine testiranog područja, genomska *microarray* analiza ili jedna FISH proba ne mogu odrediti veći dio *TSC2* delecija i duplikacija. Tako je genomska microarray analiza ili jedna FISH proba najbolja za testiranje DNA ljudi koji imaju TSC i druga obilježja u skladu s delecijama ili duplikacijama u sindromu susjednih gena (contiguous gene deletion ili duplication syndrome), i nije prikladna za testiranje ljudi koji imaju TSC bez drugih sindromskih obilježja.

Tablica 2. prikazuje metode i uspjeh molekularne dijagnostike za TS.

TSC podtip	Metoda	Stopa detekcije ¹	
		Obiteljski slučajevi	Jednostavni slučajevi
TSC1	Sekvencioniranje	~30%	~15%
TSC2		50%	~60%-70%

¹ 20%-30% bolesnika s TSC nemaju identificiranu mutaciju

Molekularna genetska patogeneza TS

TSC1 gen ima lokus na 9q34, a ime proteina je hamartin, dok je *TSC2* gen lociran na 16p13.3, s imenom proteina - tuberin. Hamartin i tuberin tvore heterodimere, tj. djeluju zajedno u regulaciji proliferacije stanica (47, 48). Nedavno je otkriveno da su tuberin i hamartin ključni regulatori AKT puta i da sudjeluju u nekoliko drugih signalnih puteva uključujući tzv. MAPK, AMPK, β -catenin, calmodulin, MTOR/S6Kinase, CDK u putevima ciklusa stanice (49, 50). Sve *TSC1* mutacije i 70%-80% *TSC2* mutacija stvaraju nefunkcionalne produkte koji ne mogu regulirati translaciju proteina i tako dovode do nekontroliranog rasta i proliferacije stanice (49). Varijabilnost TS fenotipa može dijelom biti objašnjena različitim tipovima mutacijama u u tuberinu i hamartinu što nam sugeriraju i studije genotip-fenotip korelacija (51, 52, 53).

TSC1 gen je 50 kb veličine i ima 23 egzona. Prva dva egzona nisu kodirajuća. Gen ima polimorfne varijante u kodirajućim regijama. Patološke alelne varijante se sastoje većinom od

jedinstvenih mutacija, ali ima tzv „vrućih mjesta” koja uključuju neke kodone u egzonu 15. Tablica 4 prikazuje tipove mutacija TSC1 prema postotku.

TSC2 je gen velik 50 kb te ima 41 egzon; također ima mnogo polimorfnih varijanti u kodirajućoj regiji. Oko 30% of *TSC2* mutacija je lokalizirano unutar egzona 32-41.

Tipovi mutacija prema postotku su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. TSC2 mutacije (n=863)	
Tip mutacije	% od <i>TSC2</i> mutacija
Male delecije i insercije	20%-32%
Missense	20%-27%
Nonsense	18%-24%
Splice	12%-15%
Velike delecije i <i>rearrangements</i>	1%-7%

Tablica 4. TSC1 mutacije (n=139)	
Tip mutacije	% od svih <i>TSC1</i> mutacija
Male delecije i insercije	45%-59%
Nonsense	33%-45%
Splice	7%-9%
Velike delecije i <i>rearrangements</i>	1%
Missense	0

Prema, Au 2004 (49), Dabora 2001 (51) Sancak 2005 (53), Jones 1997 (54)

Testiranje probanada. Dokazano je da viši postotak bolesnika s težim TS fenotipom ima *de novo* TSC2 mutaciju (51,53,54), a nema drugih fenotipova povezanih s TSC1 i TSC2 odnosno alelnih bolesti. Napominje se da DNA izolirana iz plućnog tkiva bolesnika sa sporadičnom plućnom limfangioleiomiomatozom (LAM) sadrži mutacije TSC2 i TSC1, ali nisu prisutne u germinativnom tkivu (55,56). Uloga TSC1 i TSC2 gena u tom procesu još nije razjašnjena.

Genotip-fenotip korelacija. Osim kod sindroma delecije susjednih gena, u početku je fenotip mutacija u oba gena smatran identičnim, ali s povećanjem broja bolesnika postalo je vidljivo da mutacije u TSC1 genu imaju nešto blaži fenotip u odnosu na TSC2 mutacije (51, 52, 53). Izuzetak su neke missense TSC2 mutacije koje su povezane sa srednje teškim fenotipom (57). Al-Saleem 1998 je prikazao veći rizik maligniteta bubrega u bolesnika s mutacijama u TSC2 (58). Jones je 1997 i 1999 (54, 59) opisao veću učestalost mentalne retardacije u bolesnika s mutacijama u TSC2 kao i manji udio bolesnika s TSC1 mutacijama među oboljelima od TS koji nemaju pozitivnu obiteljsku anamnezu na TS. Autizam, nizak IQ i infantilni spazmi su također češći kod TSC2 mutacija (52).

Penetrantnost. Danas se pretpostavlja da je penetrantnost TS 100%. Rijetki slučajevi suspektne nepenetrantnosti TS su opisani, ali je molekularna dijagnostika pokazala da se radi o različitim mutacijama u istoj obitelji i postojanje germinativnog mozaicizma (60).

Variabilna ekspresivnost. Nastaje zbog toga što je TSC AD na nivou organizma, ali recesivna na staničnom nivou. Oba TSC gena imaju osobine tumor supresorskih gena funkcionirajući pritom prema Knudsonovoj hipotezi o dva hica ("two hits" hypothesis) (61). Klinička varijabilnost nastaje kao posljedica slučajnog odabira drugog "hica" u bolesnika s germinativnim mutacijama.

Kod davanja genetskog savjeta za postojeći rizik TS moramo govoriti o probandu i različitim članovima njegove obitelji.

Roditelji probanda. Jedna trećina probanada s TS ima i jednog bolesnog roditelja, dok dvije trećine probanada imaju mutaciju TSC1 ili TSC2 gena kao rezultat *de novo* mutacije. Preporuke za evaluaciju roditelja uključuju pažljiv pregled kože, pregled retine, neuroimaging, UZV bubrega te molekularnu dijagnostiku ako je kod probanda nađena mutacija.

Braća i sestre probanda. Rizik za potomke obidi o genetskom statusu roditelja probanda. Ako roditelj probanda ima kliničke znakove TS ili ima identificiranu mutaciju rizik za potomke je 50%. Ako roditelj nema klinička obilježja TS, a nema niti određenu mutaciju gena, braća i sestre imaju 1-2% rizik ponavljanja zbog mogućnosti germinativnog mozaicizma.

Potomstvo probanda. Svako dijete bolesnika s TS ima 50% šanse za nasljeđivanje mutacije.

Ostali članovi obitelji probanda. Rizik drugih članova obitelji ovisi o njihovom genetskom statusu prema probandu. Ako je nađeno da je roditelj zahvaćen bolešću ili ima nađenu mutaciju, u riziku su članovi njegove obitelji.

Razmatranja kod obitelji s očitom "de novo" mutacijom. Kada roditelji probanda s AD bolesti nemaju nađenu mutaciju niti kliničku sliku bolesti vjerojatno je da se radi o *de novo*

mutaciji. Treba naravno isključiti i nemedicinske mogućnosti kao što su pitanje očinstva ili da li je riječ o usvojenom djetetu.

Planiranje obitelji. Optimalno vrijeme za određivanje rizika i diskusiju o mogućnosti prenatalne dijagnostike je prije trudnoće. Odluke o testiranju radi određivanja genetskog statusa u asimptomatskih članova obitelji je također potrebno učiniti prije trudnoće.

DNA banka. DNA banka je spremanje DNA (obično izolirane iz stanica krvi) za buduću upotrebu. Važna nam je zbog toga što je vjerojatno da će se metodologija, naša znanja o genima, mutacijama i bolestima poboljšati u budućnosti, a posebnu važnost ima i u situacijama gdje je senzitivnost sadašnjih dijagnostičkih genetskih metoda ispod 100% kao što je slučaj i s TS.

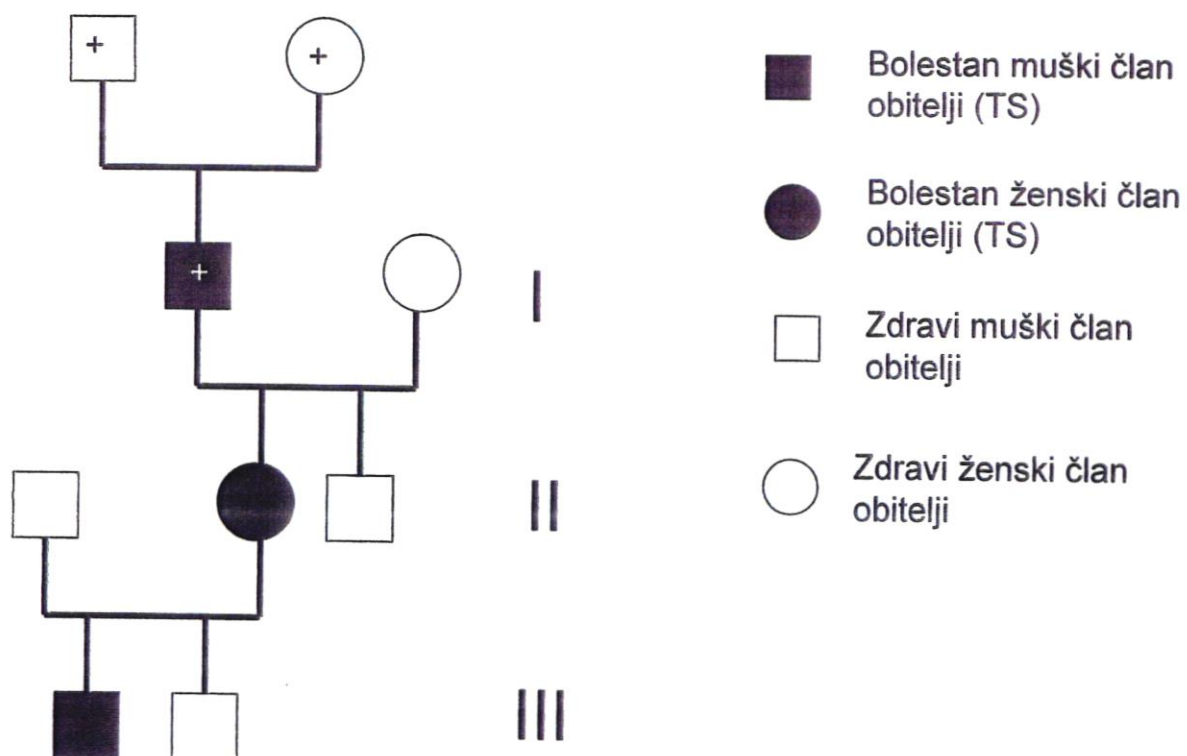
Prenatalna dijagnostika visoko rizičnih trudnoća.

Molekularno testiranje. Prenatalna dijagnoza u trudnoćama s visokim rizikom je moguća analizom DNA iz stanica fetusa dobivenih biopsijom korionskih resica u 10.-12. tjednu gestacije ili amniocentezom u 15.-18. tjednu gestacije. Naravno da alel koji je uzrok bolesti u bolesnog člana obitelji mora biti identificiran prije prenatalnog testiranja.

Fetalni imaging. U obiteljima gdje nije nađena mutacija gena, visoko rezolucijski UZV pregled mora biti obavljen u potrazi za tumorskim tvorbama fetusa. Fetalna MR može biti od koristi u evaluaciji TS kod fetusa s 50% rizikom za TS. Treba imati na umu da se tumori srca mogu vidjeti tek u 3. trimestru.

Prenatalna dijagnostika nisko rizičnih trudnoća. Kada se na rutinskom prenatalnom UZV srca u obitelji kod koje je negativna obiteljska anamneza na TS, zamijete lezije srca koje odgovaraju rabdomiomu, rizik za TS kod toga fetusa je 50%.

Preimplantacijska genetska dijagnoza je dostupna u nekim od genetskih laboratorija i koristi se za obitelji kod kojih je poznata mutacija jednog od roditelja.



Slika 1. Tri generacije obitelji s TS – primjer AD nasljeđivanja



Slika 2. Ungualni fibrom u bolesnika s TS



Slika 3. Hipomelanotičke
makule u bolesnika s TS

Literatura

1. Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LG i sur. Genetic linkage of von Recklinghausen neurofibromatosis to the nerve growth factor receptor gene. *Cell* 1987;49:589-94.
2. Rouleau GA, Seizinger BR, Wertelecki W i sur. Genetic linkage analysis of bilateral acoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22. *Nature* 1987;329:246-8.
3. National Institutes of Health Consensus Development Conference. Neurofibromatosis Conference Statement. *Arch Neurol* 1988;45:575-8
4. Cawthon RM, Weiss M, Xu G i sur. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell* 1990;62:193-201.
5. Viskochil D, Cawthon R, O'Connell P i sur. The gene encoding the oligodendrocyte-myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene. *Mol Cell Biol* 1991;11:906-12.
6. Cawthon RM, O'Connell P, Buchberg AM i sur. Identification and characterization of transcripts from the neurofibromatosis 1 region: The sequence and genomic structure of EV 12 and mapping of other transcripts. *Genomics* 1990;7:555-65.
7. De Clue JE, Cohen BD, Lowy DR i sur. Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 protein product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9914-8.
8. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-6.
9. Jadayel D, Fain P, Upadhyaya M i sur. Paternal origin of new mutations in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Nature* 1990;343:558-9.
10. Harper PS. Practical Genetic Counselling, 3rd ed, Wright, London 1988.
11. Power PW, Sax DS. The communication of information to the neurological patient: some implications for family coping. *J Chron Dis* 1978;31:57-65.
12. Riccardi VM, Lewis RA. Penetrance of von Recklinghausen neurofibromatosis: a distinction between predecessors and descendants. *Am J Hum Genet* 1988;42:284-9
13. Huson SM, Upadhyaya M. Neurofibromatosis 1: clinical management and genetic

- counselling. U: Huson SM, Hughes RAC,ur. The neurofibromatoses. A pathogenic and clinical overview. London: Chapman&Hall Medical 1994,str. 355-81.
14. Kapitanović S. Molecular diagnostics of neurofibromatosis type 1. *Period Biol* 1998;100:325-30.
 15. Upadhyaya M, Osborn M, Cooper DN. Detection of NF1 mutations utilizing the protein truncation test. *Methods Mol Biol* 2003;217:315-27.
 16. Evans DGR, Huson SM, Donnai D i sur. A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. I. Prevalence, mutation rate, fitness and confirmation of maternal transmission effect on severity. *J Med Genet* 1992;29:841-846.
 17. Evans DGR, Moran A, King A, Saeed S, Gurusinghe N, Ramsden R. Incidence of vestibular schwannoma and neurofibromatosis 2 in the North West of England over a 10-year period: higher incidence than previously thought. *Otol Neurotol* 2005; 26:93-97.
 18. National Institutes of Health Consensus Development Conference. Acoustic Neuroma: Consensus Statement 1991;9:1-24.
 19. Evans DGR, Huson SM, Donnai D i sur. A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. II. Guidelines for genetic counselling. *J Med Genet* 1992;29:847-52.
 20. Zhao Y, Kumar RA, Baser ME i sur. Intrafamilial correlation of clinical manifestations in neurofibromatosis 2 (NF2). *Genet Epidemiol* 2002;23:245-59.
 21. Gardiner WT, Frazier CH. Bilateral acoustic neurofibromas: a clinical study and field survey of a family of five generations with bilateral deafness in thirty eight members. *Arch Neurol Psychiatry* 1930;23:266-302.
 22. Wishart JH. Case of tumours in the skull, dura mater, and brain. *Edinburgh Med Surg J* 1822;18:393-7.
 23. Moyhuddin A, Baser ME, Watson C i sur. Somatic mosaicism in neurofibromatosis 2: prevalence and risk of disease transimission to offspring. *J Med Genet* 2003;40:459-63.
 24. Rouleau GA, Merel P, Lutcham M i sur. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type 2. *Nature* 1993;363:515-21.
 25. Young DR, Eldridge R, Gardiner WJ. Bilateral acoustic neuroma in a large kindred. *JAMA* 1970;214:347-53.
 26. Zucman-Rossi J, Legoix P, Der Sarkissian H i sur. NF2 gene in neurofibromatosis type 2 patients. *Hum Mol Genet* 1997; 7:2095-101.
 27. Ahronowitz I, Xin W, Kiely R, Sims K, MacCollin M, Nunes FP. Mutational spectrum of the NF2 gene: a meta-analysis of 12 years of research and diagnostic laboratory findings. *Hum Mutat* 2007;28:1-12.
 28. Kluwe L, Mautner VF. Mosaicism in sporadic neurofibromatosis 2 patients. *Hum Mol Genet* 1998;7:2051-5.
 29. Kluwe L, Mautner V, Heinrich B i sur. Molecular sudy of frequency of mosaicism in neurofibromatosis 2 patients with bilateral vestibular schwannomas. *J Med Genet* 2003;40:109-14.
 30. Bruder CE, Ichimura K, Blennow E i sur. Severe phenotype of neurofibromatosis type 2 in a patient with 7.4-MB constitutional deletion on chromosome 22: possible localization of a neurofibromatosis type 2 modifier gene ?. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25:184-90.
 31. Lopez-Correa C, Zucman-Rossi J, Brems H, Thomas G, Legins E. NF2 gene deletion in a family with a mild phenotype. *J Med Genet* 2000; 37:75-7.
 32. Baser ME, Kuramoto L, Joe H i sur. Genotype-phenotype correlations for nervous system tumors in neurofibromatosis 2: a population-based study. *Am J Hum Genet* 2004;75:231-

9.

33. Evans DGR, Huson SM, Donnai D i sur. A clinical study of type 2 neurofibromatosis. *Q J Med* 1992;304:603-18.
34. Evans DGR, Newton V, Neary W i sur. Use of MRI and audiological tests in presymptomatic diagnosis of type 2 neurofibromatosis (NF2). *J Med Genet* 2000;37:944-7.
35. Baser ME, Mautner VF, Ragge NK i sur. Presymptomatic diagnosis of neurofibromatosis 2 using linked genetic markers, neuroimaging, and ocular examination. *Neurology* 1996;47:1269-77.
36. Kluwe L, Friedrich RE, Tatagiba M, Mautner VF. Presymptomatic diagnosis for children of sporadic neurofibromatosis 2 patients: a method based on tumor analysis. *Genet Med* 2002;4:27-30.
37. Mohyuddin A, Neary WJ, Wallace A i sur. Molecular genetic analysis of the NF2 gene in young patients with unilateral vestibular schwannomas. *J Med Genet* 2002;39:315-22.
38. Osborne JP, Fryer A, Webb D. Epidemiology of tuberous sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1991;615:125-7
39. European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 1993;75:1305-15
40. van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C et al. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* 1997;277:805-8
41. Roach ES and Sparagana SP. Diagnosis of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 2004;19:643-9
42. Goodman M, Lamm SH, Engel A et al. Cortical tuber count: a biomarker indicating neurologic severity of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 1997;12:85-90
43. Gomez MR. *Tuberous Sclerosis*, 2 ed. Raven Press, New York, 1988.
44. Fricke BL, Donnelly LF, Casper KA, Bissler JJ. Frequency and imaging appearance of hepatic angiomyolipomas in pediatric and adult patients with tuberous sclerosis. *AJR Am J Roentgenol* 2004;182:1027-30
45. Sampson JR, Scahill SJ, Stephenson JB et al. Genetic aspects of tuberous sclerosis in the west of Scotland. *J Med Genet* 1989;26:28-31
46. Verhoef S, Bakker L, Tempelaars AM et al. High rate of mosaicism in tuberous sclerosis complex. *Am J Hum Genet* 1999;64:1632-7
47. Plank TL, Yeung RS, Henske EP. Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1 (TSC1) gene, interacts with tuberin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles. *Cancer Res* 1998;58:4766-70
48. van Slegtenhorst M, Nellist M, Nagelkerken B et al. Interaction between hamartin and tuberin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum Mol Genet* 1998;7:1053-7
49. Au KS, Williams AT, Gambello MJ, Northrup H. Molecular genetic basis of tuberous sclerosis complex: from bench to bedside. *J Child Neurol* 1994;19:699-709
50. Birchenall-Roberts MC, Fu T, Bang OS et al. Tuberous sclerosis complex 2 gene product interacts with human SMAD proteins. A molecular link of two tumor suppressor pathways. *J Biol Chem* 2004;279:25605-13
51. Dabora SL, Jozwiak S, Franz DN et al. Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs. *Am J Hum Genet* 2001;68:64-80
52. Lewis JC, Thomas HV, Murphy KC, Sampson JR. Genotype and psychological phenotype in tuberous sclerosis. *J Med Genet* 2004;41:203-7

53. Sancak O, Nellist M, Goedbloed M et al. Mutational analysis of the TSC1 and TSC2 genes in a diagnostic setting: genotype--phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in Tuberous Sclerosis Complex. *Eur J Hum Genet* 2005;13:731-41
54. Jones AC, Shyamsundar MM, Thomas MW et al. Comprehensive mutation analysis of TSC1 and TSC2-and phenotypic correlations in 150 families with tuberous sclerosis. *Am J Hum Genet* 1999;64:1305-15
55. Smolarek TA, Wessner LL, McCormack FX. Evidence that lymphangiomyomatosis is caused by TSC2 mutations: chromosome 16p13 loss of heterozygosity in angiomyolipomas and lymph nodes from women with lymphangiomyomatosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:810-5
56. Carsillo T, Astrinidis A, Henske EP. Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:6085-90
57. Khare L, Strizheva GD, Bailey JN et al. A novel missense mutation in the GTPase activating protein homology region of TSC2 in two large families with tuberous sclerosis complex. *J Med Genet* 2001;38:347-9
58. Al-Saleem T, Wessner LL, Scheithauer BW et al. Malignant tumors of the kidney, brain, and soft tissues in children and young adults with the tuberous sclerosis complex. *Cancer* 1998;83:2208-16.
59. Jones AC, Daniells CE, Snell RG et al. Molecular genetic and phenotypic analysis reveals differences between TSC1 and TSC2 associated familial and sporadic tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet* 1997;6:2155-61
60. Webb DW and Osborne JP. Non-penetrance in tuberous sclerosis. *J Med Genet* 1991;28:417-9
61. Knudson AG Jr Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:820-3.

GENSKO SAVJETOVANJE U POJASNOJ MIŠIČNOJ DISTROFIJI tip 2A (LGMD 2A)

¹Davorka Vranješ, ¹Marija Žagar, ²Astrid Milić, ^{1,2}Nina Canki-Klain

¹KBC Zagreb, Klinika za neurologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

**²Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatski institut za istraživanje mozga,
Šalata 12, Zagreb**

Pojasna mišićna distrofija (LGMD) tip 2A (kalpainopatija) je autosomno- recesivno nasljedna primarna bolest mišića uzrokovana mutacijama gena koji kodira kalpain 3 (CAPN3). Gen je lociran na kromosomu 15 odnosno regiji 15q 15.1-q21.1. Karakterizira je relativno veliki broj mutacija. Šest najčešćih mutacija u našoj populaciji su: 550delA, R541W, Y537X, delFWSAL, R49H, P82L.

Fardeau i suradnici 1996 god. izvjestili su o pojavi juvenilne pojasne mišićne distrofije u maloj zajednici na Reunion otočju u zapadnom dijelu Indijskog oceana te se koristio i termin mišićna distrofija Reunion otočja.

Kalpain-3 je nelizosomska kalcijum ovisna neutralna cistein proteaza. Za razliku od drugih kalpaina, kaplain 3 sastavljen je od jedne velike podjedinice i nalazi se gotovo isključivo u skeletnim mišićima. U mišićnoj stanici je lociran u miofibrilu i jezgri. Vrlo je podložan autokatalizi posebno in vitro, sa poluvremenom života manjim od jednog sata. Sastoji se od 821 aminokiseline molekularne težine 94 k.Udružen je sa konektinom (titin) koji je jedan od glavnih sastojaka sarkomere.

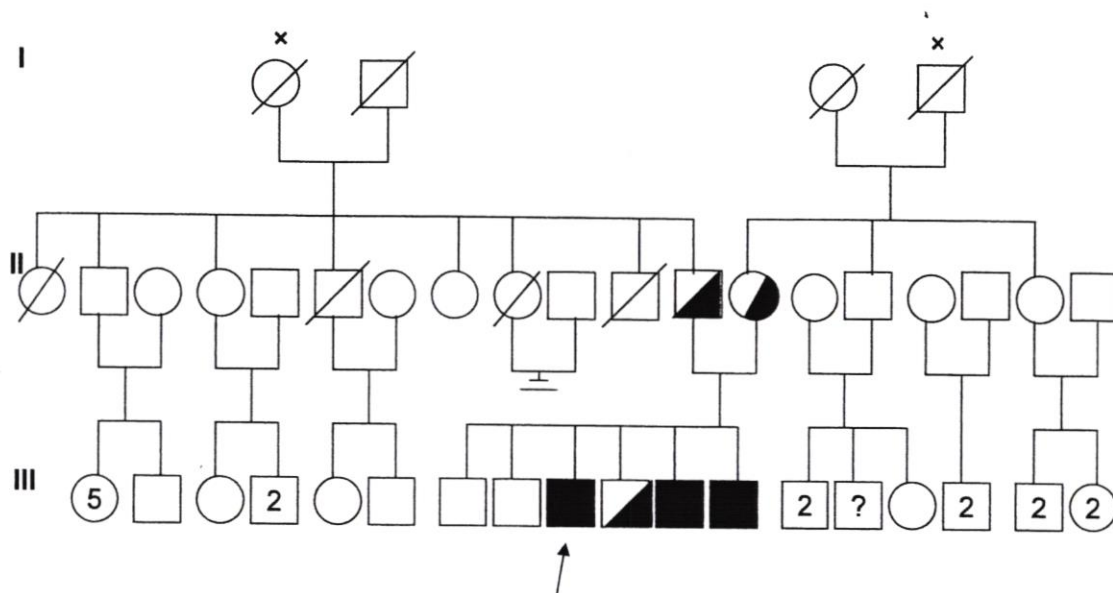
Bolesti se javlja u dobi od 3 do 30god. života, najčešće između 10-20 godine, nešto učestalije kod muškaraca (3:1). Tijek je sporo progresivan i može se podijeliti u tri stadija. Prvi stadij očituje se s teškoćama trčanja, a u kliničkom nalazu dominira slabost m. gluteus max. i mišića bedra, dok je m. quadrices femoris kroz duže vrijeme sačuvan. Česta je blaga hiperlordoza uz slabost abdominalnih mišića. Nešto kasnije se razvija slabost periskapularnih mišića, dok pseudohipertrofije listova nema, već zbog atrofije proksimalnih dijelova donjih ekstremiteta postoji dojam da su listovi jaci. U kasnijoj fazi dolazi do nemogućnosti penjanja uz stepenice i ustajanja iz čučnja. Kako bolest progredira mišićna slabost i atrofija zahvaćaju m. quadriceps femoris te distalne mišićne skupine, tako da bolesnici u dobi oko tridesete godine nisu u mogućnosti hodati. Mišići ruku posebica šaka su dugo pošteđeni kao i mišići lica. Česti je razoj kontraktura kukova, skocnog zgloba, rjede koljena i lakta. Nema zahvaćanja srčanog mišića, a intelektualni razvoj je neoštećen.

Vrijednosti CK su povišene preko deset puta narocito u dječje i rano odraslo doba te se kasnije smanjuju. EMG pokazuje tipičan miopatski uzorak uz uredne neurografske parametre.

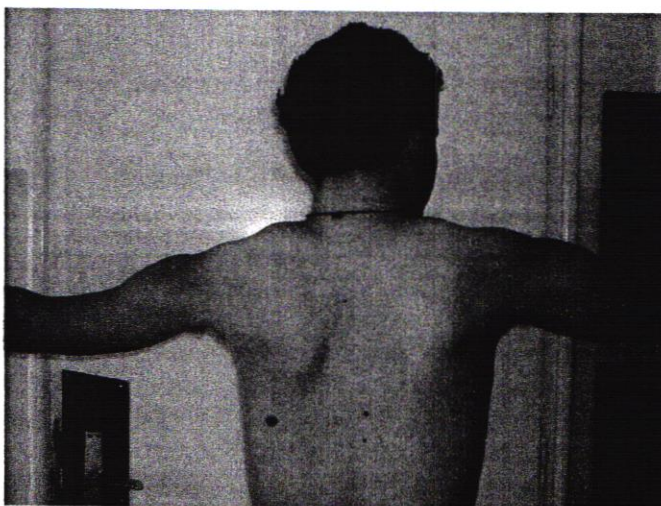
EKG i UZ obrada srca su uredni. Biopsija mišića pokazuje znakove kronične distrofične miopatije i nije specifična u odnosu na ostale tipove distrofija.

PRIKAZ OBITELJI:

Roditelji (otac rođ. 1953 god. majka rođ. 1957 godine) zdravi. Mogli bi biti u srodstvu, jer potječu iz dva obližnja sela, a djevojačko prezime bake po ocu te prezime djeda po majci je isto (Sl.1).



Sl.1. Obiteljsko stablo



Sl 2. G. P: 1984 god.

Trudnoća majke uredna, psihomotorni razvoj uredan. Završio je osmoljetku i prvi razred srednje škole. U dobi 12-13 god. zamjećuje klecanje nogu, često je padao. Pri hodu uz stepenice morao se držati rukohvata. U 16 godini morao je prekinuti školovanje zbog

nemogućnosti hoda do škole (udaljenost oko 3 km). Nešto kasnije javlja se i slabost mišića ruku.

Iz neurološkog statusa Nešto slabije pučenje usana. Dominira slabost mišića skapularne regije, ramena, zdjelice i pojasa. Abdukcija iz ramena moguća do oko 45 stupnjeva. Lopatice odignute i pomaknute prema lateralno i gore. Hod gegav s naglašenom hiperlordozom. Ne može samostalno ustati iz sjedećeg položaja. Na prste se postavlja uz pridržavanje. Lijevim stopalom ne može u potpunosti stati na pod (skraćenje lijeve Ahilove tetive).

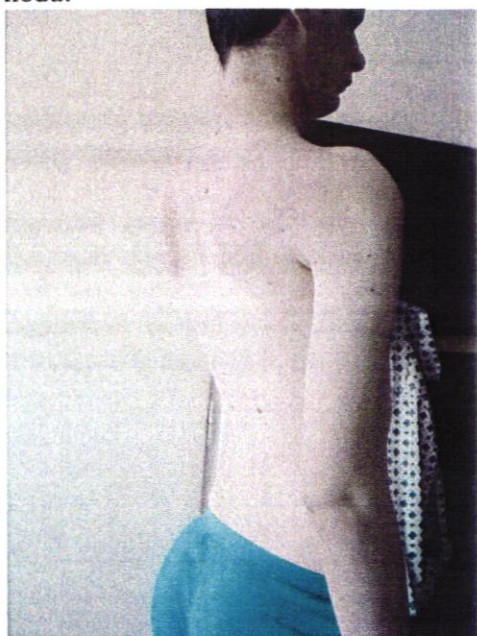
Lab. nalazi : CK 1226 U/L.

EMG: Miopatski uzorak u mišićima skapularne regije, m. biceps brachii, mišićima natkoljenica i potkoljenica uz relativnu očuvanost mišića stopala i m. triceps brachii.

Neurografski nalaz je uredna.

Braća: rođena 1979, 1981 i 1987 zdravi.

Brat P. F rođen 1989. Rani psihomororni razvoj uredan. Od 13 godine života teškoće pri hodu.



Iz neurološkog statusa: Slabije pučenja usana, ostala mimička muskulatura primjenjene funkcije. Gegajući hod sa naglašenom hiperlordozom. Skapule alate, abdukcija u ramenu moguća samo do horizontalne crte. Ne uspijeva se podići i spustiti u čučanj. Iz sjedećeg položaja se podiže uz pomoć ruku. Hod na petama ne izvodi, dok se na prste postavlja i izvodi nekoliko koraka.

CK 1160 U/L

EMG: Jasni znaci miopatije registrirani su u mišićima ramena, nadlaktica, a naglašenije u mišićima nogu.

Brat P. B. rođen 1993

U 12. godini primjetio da se teže uspinje uz stepenice.

Iz neurološkog statusa: Gegajući hod. Skapule alate obostrano. Abdukciju u ramenu izvodi. Pri ustajanju iz čučnja odupire se rukama o pod i svoje noge. Pri ustajanju iz sjedećeg

položaja odupire se rukama. Na prste se postavlja i hoda, na pete se postavlja, ali je hod vrlo nesiguran.

CK 968 U/L

EMG: Znaci miopatije u mišićima potkoljenica, natkoljenica, a relativno manje izraženi u mišićima nadlaktica i ramena. Neurografski nalaz je uredan.

Pozitivna obiteljska anamneza, dob kada su se javili prvi znakovi bolesti, kao i početak bolesti sa slabošćom mišića nogu, klinički nalaz te visoke vrijednosti CK upućivali su da se bolesnika radi o pojasnoj mišićnoj distrofiji. S obzirom da su roditelji zdravi, a troje od šestoro djece bolesni postavljena je sumnja na najčešću recesivnu mišićnu distrofiju **calpainopatiju LGMD 2A)**

Molekularna analiza: Učinjena u Laboratoriju za medicinsku kliničku neurogenetiku i mišićne bolesti Hrvatskog instituta za istraživanje mozga potvrdila je dijagnozu. Bolesnik je homozigot tj. nosi dvije iste mutacije CAPN3 gena:550delA/550delA

Literatura:

1. Ozawa E, Nonaka I. Limb-Girdle Muscular Dystrophy and Related Disorders, in Katirji B, Kaminski HJ, Preston DC, Ruff DC Shapiro BE, Neuromuscular Disorder in Clinical Practice Butterworth Heineman, Boston 2002.
2. Fardeau M, Eymard B, Mignard C, et al. Chromosome 15-linked limb-girdle muscular dystrophy: clinical phenotypes in Reunion Islands and French metropolitan communities. Neuromusc Disord 1996;6:447-453.
3. Canki-Klain N, Milić A, Kovač B, Trlaja A, Grgičević D, Zurak N et al. Prevalence of 550delA mutation in calpainopathy (LGMD 2A) in Croatia. American Journal of Medical Genetics Part A, 2003;125A,2:152-158.

MOLEKULARNA ANALIZA

Pojasna mišićna distrofija tip 2A (LGMD2A) uzrokovana je mutacijama CAPN3 gena u kojem je do sada opisano više od 280 različitih mutacija (www.dmd.nl) ravnomjerno raspoređenih uzduž cijelog gena. Iako su opisane CAPN3 mutacije koje se javljaju sa većom učestalošću, većina su tzv. privatne mutacije. Prema rezultatima analize CAPN3 gena u različitim populacijama, može se zaključiti da spektar mutacija prisutan u određenoj populaciji ovisi o njezinom geografskom i etničkom porijeklu.

Upotrebom specifične strategije u hrvatskoj je populaciji analizom tridesetak obitelji s pojasnom mišićnom distrofijom tip 2A pronađeno 6 različitih CAPN3 mutacija kojima se otkriva oko 96% patoloških CAPN3 kromosoma (tablica 1). Poznavanje spektra CAPN3 mutacija prisutnih u našoj populaciji omogućava jeftinu, brzu i neinvazivnu dijagnostiku LGMD2A bolesnika, korištenjem jednostavnih i brzih metoda molekularne biologije.

Tablica 1. CAPN3 mutacije prisutne u LMGD2A bolesnika iz Hrvatske (32 LGMD2A obitelji)

MUTACIJA	BROJ CAPN3 KROMOSOMA	UČESTALOST (%)
550delA	47 / 64	73,4
R541W	6 / 64	9,4
P82L	4 / 64	6,3
delFWSAL	2 / 64	3,1
Y537X	1 / 64	1,6
R49H	1 / 64	1,6
nepoznato	3 / 64	4,7

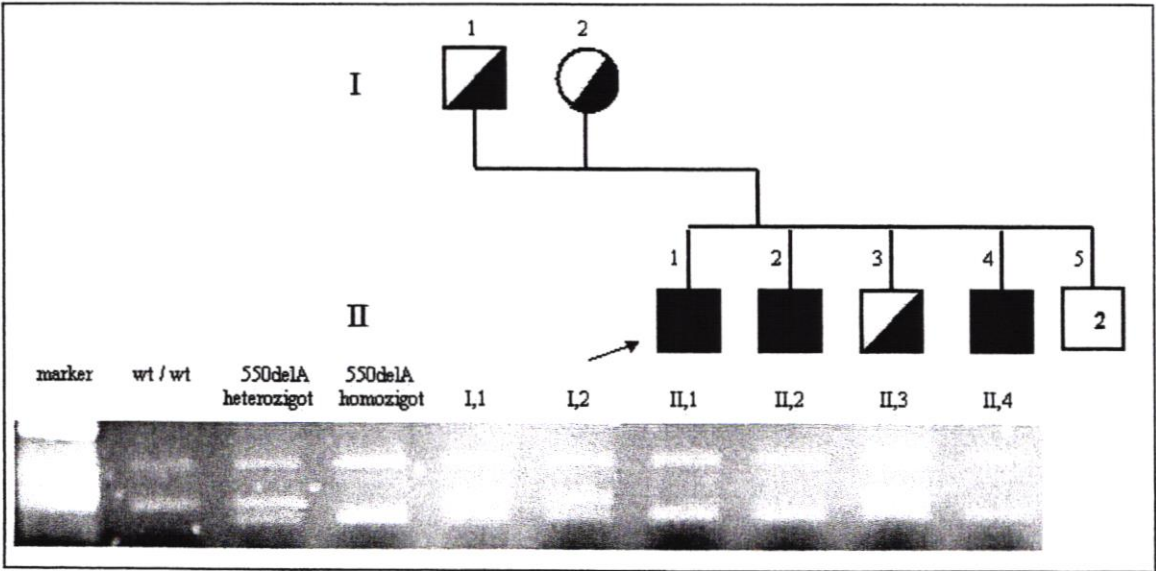
Obitelj P.

U laboratoriju je prvotno testiran uzorak periferne krvi probanda (II,1), a naknadno i drugi članovi njegove obitelji (slika 3).

Analiza svakog uzorka sastojala se od:

1. Izolacije DNA iz uzorka periferne krvi
2. Analize prisutnosti 6, prije spomenutih, CAPN3 mutacija (pri čemu se prvo analizira najučestalija mutacija) metodama molekularne biologije (PCR+RFLP ili alel specifičnim PCR-om)

Analiza najučestalije mutacije, 550delA, pokazala je da proband nosi spomenutu mutaciju u homozigotnom obliku, tj. 550delA/550delA (slika 3). Ovakav rezultat potvrdio je klinički postavljenu dijagnozu pojasne mišićne distrofije tip 2A. Naknadna analiza preostalih članova obitelji dala je rezultate prikazane na slici 3.



Slika 3. Prikaz rodoslovlja obitelji P. i rezultati genske analize za mutaciju 550delA. Proband (II,1) označen je strelicom. Prema rezultatima dobivenim za kontrolne uzorke (wt/wt, 550delA heterozigot i 550delA homozigot) može se zaključiti da su roditelji (I,1 i I,2) i jedan sin (II,3) prenositelji tj. 550delA heterozigoti. Proband i dva preostala sina (II,2 i II,4) su homozigoti za 550delA mutaciju.

Analiza 550delA mutacije sastoji se od alel specifične lančane reakcije polimerazom (ASA-PCR), te provjere produkata reakcije elektroforezom u agaroznom gelu. Lančana reakcija polimerazom je brza, specifična i jeftina metoda *in vitro* sinteze nukleinskih kiselina kojom se specifični odsječak DNA može umnožiti u velikom broju kopija. Reakcijska smjesa obavezno sadržava genomsku DNA, par oligonukleotidnih početnica, smjesu sva četiri deoksiribonukleotida, magnezij-klorid, PCR pufer i Taq DNA polimerazu. Reakcija umnažanja izvodi se u stroju za lančanu reakciju polimerazom, a uvjeti pod kojima se reakcija odvija ovise o karakteristikama regije koju želimo umnožiti. Općenito, jedan reakcijski ciklus se dijeli na tri dijela: denaturaciju (razdvajanje DNA lanaca), lijepljenje početnica (engl. *annealing*) i sintezu DNA. Alel specifični PCR varijacija je klasične lančane reakcije polimerazom, a omogućava detekciju mutacija uz pomoć dva para oligonukleotidnih početnica (vanjskih i unutarnjih). Vanjske početnice umnažaju regiju koja je njima omeđena (kao kod klasičnog PCR-a). Jedna unutarnja početnica ima normalan slijed nukleotida, dok druga ima slijed "mutirane" DNA. Ovisno o svojstvu ispitivane DNA (normalna ili mutirana) ovisiti će da li će se i koja će se od unutarnjih početnica vezati za DNA i umnažati određenu regiju. Alel specifični PCR je, u usporedbi sa klasičnim PCR-om, brža i jeftinija metoda jer provjerom rezultata alel specifičnog PCR-a elektroforezom u agaroznom gelu, moguće je odmah detektirati mutaciju, dok bi klasični PCR zahtijevao daljnju inkubaciju sa određenim restriktivnim enzimom.

Mutacija 550delA smještena je u četvrtoj kodirajućoj regiji (egzonu 4) CAPN3 gena i riječ je o deleciji jednog adenina na položaju 550. nukleotida. Mutacija mijenja okvir čitanja, što na razini proteina znači da je od mjesta delecije redoslijed aminokiselina promjenjen i da nastaje protein sa drugačijim slijedom aminokiselina koji je vjerojatno ubrzo nakon sinteze razgrađen putem ubikvitin/proteasomskog sustava razgradnje proteina. Mutacija 550ΔA već je prije opisana u nekoliko drugih europskih zemalja, a veća učestalost ove mutacije opisana je u populacijama Mediterana i istočne Evrope (Topaloglu et al, 1997; Pogoda et al, 2000; Todorova et al, 2003; Chrobakova et al, 2004; Canki-Klain et al, 2004; Fanin et al, 2005).

GENETSKO SAVJETOVANJE U FACIOSKAPULO- HUMERALNOJ MIŠIĆNOJ DISTROFIJI

¹Marija Žagar i ^{1,2}Nina Canki-Klain

¹KBC Zagreb, Klinika za neurologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

²Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatski institut za istraživanje mozga,
Šalata 12, Zagreb

Facioskapulohumeralna mišića distrofija (FSHD) je autosomno dominantna forma mišićne distrofije. Po učestalosti je na trećem mjestu. Prevalencija je oko 1/20 000 stanovnika, iako točna učestalost nije poznata.

Bolest zahvaća mišiće lica, skapularne regije i nadlaktica, kod nekih bolesnika su zahvaćeni i ostali mišići trupa i udova, s descendentnim širenjem i oko 20% bolesnika postaje nepokretno. Simptomi se razvijaju u ranijem djetinjstvu, ali su bolje vidljivi u doba puberteta kad počinje nagliji rast. Često je prisutna asimetrija. Od ostalih ne-muskularnih simptoma često je pridruženo oštećenje sluha (senzorna naglušnost) i retinalne teleangiektazije.

Klinički nalaz: lice lagano „obješeno“, maksimalni stisak očiju slabiji, slabije pučenje usana, nemogućnost fućkanja, „transveralni osmijeh“. Ekstraokularni i bulbarni mišići su pošteđeni. Dominira slabost mišića skapularne regije, posebno fiksatora skapule. Skapule su odignute i pomaknute prema gore i lateralno, tzv. scapulae alatae“. Prisutna je i slabost pektoralnih mišića, vrlo često asimetrična. Prisutna je slabost bicepsa i tricepsa uz pošteđenost deltoideusa. Slabost abdominalnih mišića dovodi do izbočenog trbuha i pojačane lumbalne lordoze. Kod nekih bolesnika postoji i slabost mišića zdjeličnog pojasa i nogu, više dorzifleksora stopala. Miokard je vrlo rijetko zahvaćen, ali su u 60% bolesnika opisani smetnje provođenja.

Postoji varijabilnost u kliničkom nalazu.

Neki bolesnici su gotovo asimptomatski.

Dijagnostika

- klinički nalaz, tijek bolesti, obiteljna anamneza
- CK (kreatin kinaza) je normalna ili povišena kod bolesnika s mišićnom slabošću, ali kod vrijednosti većih od 1500 U/l treba misliti na drugu dijagnozu
- EMNG: znaci miopatije u zahvaćenim mišićima, uz ponegdje više i šire potencijale što može upućivati i na suspektu neuropatiju
- biopsija mišića: nespecifične kronične miopatske promjene, moguće upalne promjene; danas se izvodi rijetko

Oko 70-90% bolesnika nasljeđuju deleciju od roditelja i oko 10-30% ima FSHD kao rezultat de novo delecije.

Molekularna dijagnostika

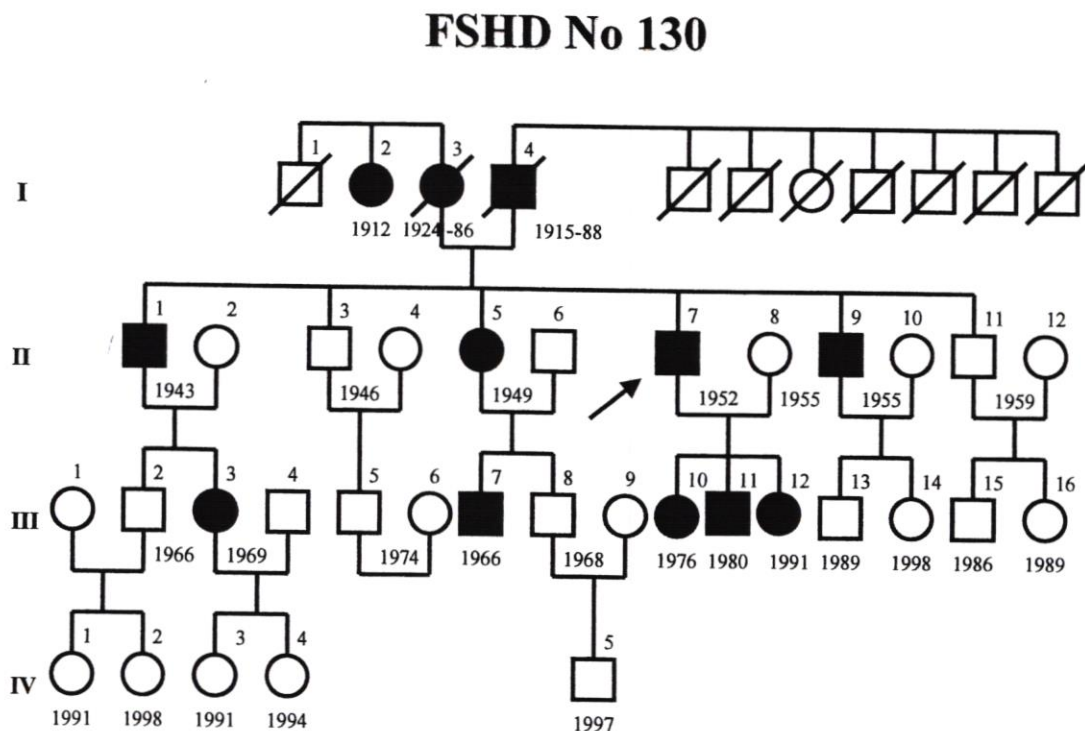
FSH je autosomno dominantni poremećaj vezan uz D4Z4 lokus na kromosomu 4q35, ali gen još nije izoliran. Udružen je s kratkim EcoRI/BlnI fragmentom (<35 kb). Fragment od 42 kb i više se smatraju normalnim, 38-41 kb graničnim, a manje od 34 abnormalnim.

95-100% bolesnika s FSHD ima deleciju unutar D4Z4 regije. Neki autori su našli korelaciju težine kliničke slike i ranog javljanja bolesti s većom delecijom unutar D4Z4 fragmenta, a neki nisu.

Diferencijalna dijagnoza: miofibrilarna (desmin-storage) miopatija, Inclusion body myopathy, kongenitalna miopatije, polimiozitis, pojasne miopatije, skapuloperonealna mišićna distrofija, miotonička distrofija.

Terapija: simptomatska, ortoze, kirurška terapija. Pokušana je terapija albuterolom, rezultati

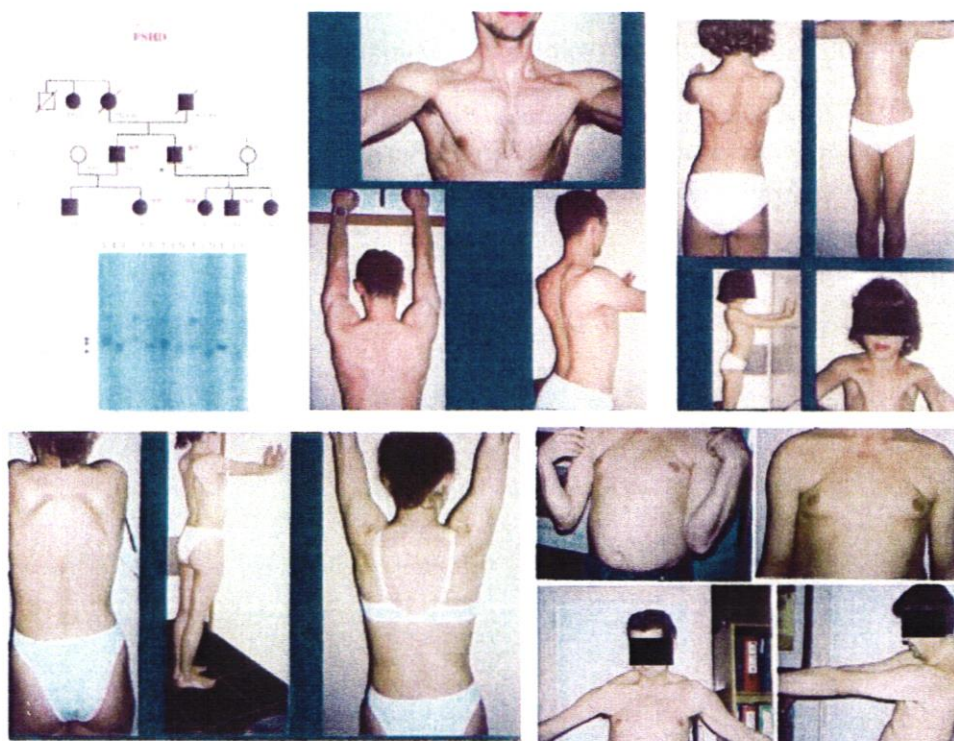
Prikaz obitelji s FSHD (SI.1)



Slika 1.

Proband 49 godina star bolesnik ima troje bolesne djece (SI.2).

U tri generacije (SI.1) ima 13 osoba sa sporo progredijentnom slabošću mišića lica, ramena, zdjeličnih mišića, s nešto kasnijim početkom i umjerenim oštećenjem sluha. Oba roditelja su imala anamnestički reducirani sluh.



Slika 2.



Sl.3 tipični izraz lica, oslabljeno pučenje i razvlačenje usana,(Sl.1, III,3) prisutna slabost mišića fiksatora skapule, deltoideus relativno dobar(Sl. 2, II,1).

Literatura:

1. http://en.wikipedia.org/wiki/facioscapulohumeral_muscular_dystrophy
2. <http://www.geneclinics.org/profiles/fsh/details.html>
3. Tawil R. Facioscapulohumeral dystrophy. In: Neuromuscular disorders in clinical practice. Ed. Katirji B, Kaminski HJ, Preston CD, Ruff LR, Shapiro EB. Butterworth Heinemann, 2002. p.1072-1077.

GENETSKO SAVJETOVANJE U PRENATALNOJ DIJAGNOSTICI

¹Romana GJERGJA i ²Feodora STIPOLJEV

¹KB Sestre milosrdnice, Klinika za pedijatriju, Vinogradska 29, Zagreb; ²OB Sveti Duh, Citogenetski laboratorij, Sv. Duh 64, Zagreb

Uvod

Jedan od većih napredaka medicinske genetike bio je razvitak prenatalnih dijagnostičkih tehnika koji je potpuno izmijenio ishod u obiteljima s rizikom za bolesno dijete i postao jedna od glavnih opcija pri genetskom savjetovanju. Prenatalne dijagnostičke tehnike razvijane su uz pomoć kliničara koji se aktivno bave genetskim savjetovanjem, a time i medicinskom etikom, pa se u skladu s tim te tehnike koriste odgovorno i profesionalno.

Negativna strana sve većeg korištenja različitih tehnika, pogotovo npr. ultrazvuka, rezultira upotrebom prenatalnih dijagnostičkih postupaka kao zamjene za pravo genetsko savjetovanje. Prenatalnu dijagnozu kao i druge kliničke i laboratorijske tehnike moramo provoditi uzimajući u obzir cijelu situaciju u trudnoći: rizik zahvaćenosti neke trudnoće genetskim poremećajem, otkrivanje nositelja bolesti, mogućnost liječenja te bolesti, te stavovi i želje roditelja. Takav pristup znači da bismo trebali planirati prenatalnu dijagnostiku prije same trudnoće. Iako je započinjanje prenatalne dijagnostike u samoj trudnoći nepoželjno, u nekim slučajevima je ipak neizbježno.

Jedan dio prenatalnog genetskog savjetovanja će svakako već obitelj dobiti od liječnika opće prakse, nadležnog ginekologa, a od kliničkog genetičara uvijek kada se radi o kompleksnijim slučajevima. Zbog toga je važan razvoj interdisciplinarnih društava koja se bave fetalnom medicinom i gdje se ginekolozi, radiolozi, medicinski genetičari i praktičari ostalih specijalnosti susreću redovito i raspravljaju o specifičnim slučajevima.

KRITERIJI I INDIKACIJE ZA PRENATALNU DIJAGNOSTIKU

Budući da prenatalna dijagnostika uključuje visoki stupanj zabrinutosti i anksioznosti u obitelji, a postupci prenatalne dijagnostike nose i određeni rizik za plod, potrebno je poštivati kriterije i indikacije za provođenje prenatalne dijagnostike.

Tablica 1. Kriteriji za prenatalnu dijagnostiku

1.	Da li težina same zahtijeva medicinski indicirani prekid trudnoće
2.	Da li su rezultati liječenja bolesti nezadovoljavajući ili liječenja nema
3.	Da li je prekid zahvaćene trudnoće prihvatljiv obitelji
4.	Postoji li točan prenatalni dijagnostički test
5.	Postoji li značajan genetski rizik za trudnoću

Ad 1. Pri razmatranju kriterija težine bolesti nema sumnje za većinu poremećaja gdje uobičajeno koristimo prenatalnu dijagnostiku, kao što su Downov sindrom, anomalije zatvaranje neuralne cijevi i rijetke neurodegenerativne metaboličke bolesti. Neke druge bolesti mogu biti upitne, pogotovo gdje fizičke abnormalnosti kao što su npr. rascjep usne i nepca mogu biti praćene s normalnim mentalnim razvojem i ishodom daljnjeg života. Npr. albinizam ima malo kriterija za prenatalnu dijagnostiku u predjelima Sjeverne Europe, dok je u tropskom području fatalna bolest zbog svoje povezanosti s karcinomom kože.

Ad 2. Danas npr. kod prenatalno učinjene molekularne dijagnostike fenilketonurije većina djece koja su liječena odmah od rođenja imati će praktički uredan razvoj i intelekt, dok je npr. kod galaktozemije nekad već pri rođenju prisutno oštećenje jetre te je neizvjesna prognoza bolesti. Postoji i mogućnost intrauterine terapije kao npr. kod prenatalno otkrivene kongenitalne adrenalne displazije u obitelji gdje je bilo već jedno dijete s tom bolešću.

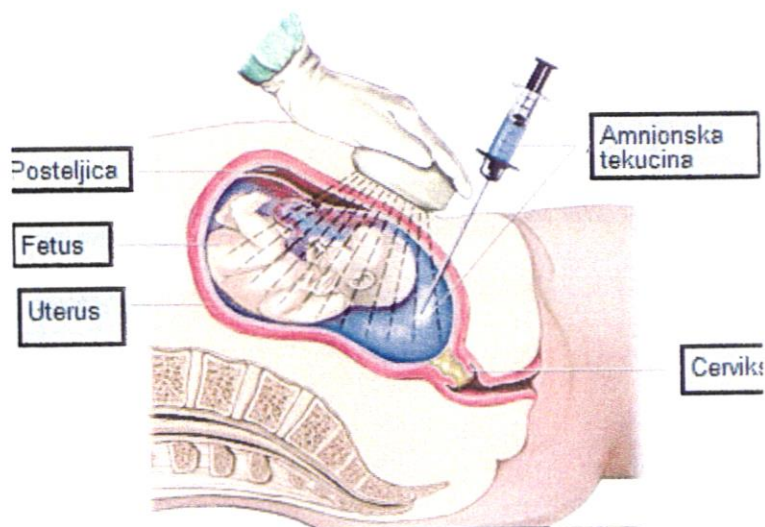
Ad 3. Prihvatljivost medicinski indiciranog pobačaja trebala bi postojati u obitelji prije započinjanja prenatalne dijagnostike, iako neprihvatljivost automatski ne isključuje dijagnostiku. Nekada je to neprihvatljivo iz religioznih razloga ili zbog prevladavajućeg stava u zajednici (npr. Malta). Ozbiljni potencijalni etički problemi nastaju kada je prenatalna dijagnoza učinjena za jednu od bolesti s kasnijim početkom, a trudnoća se nastavlja.

Ad 4. Točnost i mogućnosti dijagnostike su nešto što se brzo mijenja kako napreduje znanost i ne može se očekivati da će kliničar pri pružanju genetskog savjeta dati točno postavljenu genetsku dijagnozu, već samo mogućnost za to u određenom postotku kao što je to npr. 95% za NF I koristeći današnje mogućnosti dijagnostike. Ta problematika je posebno važna kod novijih molekularnih metoda rijetkih bolesti ili onih kod kojih točan gen/geni još nije ustanovljen sa sigurnošću, pa je još teško povući granice između istraživačkog i kliničkog ispitivanja u nekog pacijenta.

Ad 5. Moramo svakako točno procijeniti rizik od određene bolesti u ispitivanoj trudnoći prije počinjanja prenatalne dijagnostike. Kod izrazito niskog rizika za neku bolest, upitno je provođenje prenatalne dijagnostike.

METODE PRENATALNE DIJAGNOSTIKE

Amniocenteza. Ova pretraga je još uvijek najraširenija dijagnostička tehnika kojom se pod kontrolom ultrazvuka iz uterusa uzima uzorak plodove vode koja sadrži i stanice.



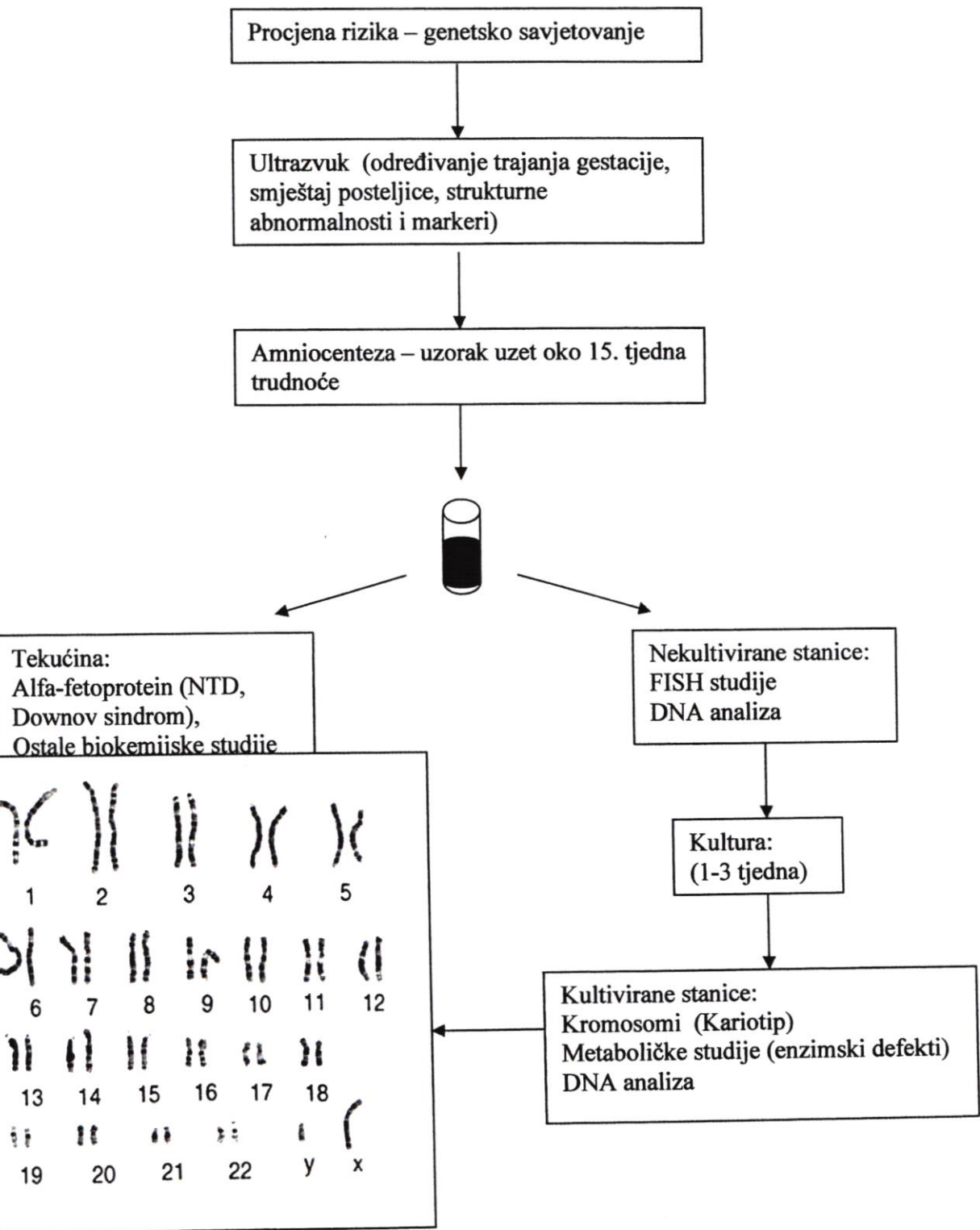
Slika 1. Postupak izvođenja amniocenteze

Uzorak dobiven amniocentezom sastoji se od tekućine u kojoj su stanice fetalnog porijekla koje možemo kultivirati za kromosomske, biokemijske ili molekularne studije, ili u nekim situacijama i analizirati ih direktno. Uzorak koji sadrži krv može značiti da je oštećena placenta, dok obojena tekućina može predstavljati i prijetecu ili nastalu smrt fetusa i važan je čimbenik, jer bi se u suprotnom pobačaj koji nakon takvog nalaza može uslijediti pripisao samom postupku amniocenteze. Oba ovakva nalaza umanjuju mogućnost uspješne kulture stanica.

Dobiveni uzorak se centrifugira. Tekući dio se može iskoristiti za procjenu alfafetoproteina, a rjeđe za metaboličke studije. Mnogi dijagnostički testovi međutim zahtijevaju kulturu stanica te obično prođe oko 3 tjedna do zadovoljavajuće kulture. Rast kulture stanica treba kontrolirati, a ako nažalost nije zadovoljavajući, savjetuje se ubrzo ponoviti postupak amniocenteze, a ne čekati dok nismo potpuno sigurni da nema rasta stanica, jer je tada često prekasno.

Važno je da kliničar koji upućuje trudnicu na amniocentezu zna neke praktičke aspekte samog postupka, a to su:

Optimalni tjedan trudnoće za amniocentezu. Najranije vrijeme za zadovoljavajući uzorak je 15.-16. tjedan gestacije, tako da bi obitelj morala biti pripremljena na ev. prekid trudnoće iza 18. tjedna. Nije neobično da se stavovi pacijenta mijenjaju za vrijeme trudnoće pogotovo kada počinju pokreti ploda. Ranija amniocenteza (12-14 tjedana) se izvodi u nekim centrima, ali dolazi do većeg rizika za gubitak trudnoće nego kod uobičajenog postupka.



Slika 2. shematski prikazuje podatke koje nam pruža amniocenteza

Tko izvodi zahvat. Naravno da su rizici veći ako to radi neiskusna osoba, te su rezultati svakako bolji u specijaliziranim centrima u kojima se obično provodi i genetsko savjetovanje i sam zahvat amniocenteze

Postupak. Neke pacijentice očekuju bolnost postupka i to ima predstavlja nepoželjan stres. Ubadanje iglom pod kontrolom UZV-a se može učiniti pod lokalnom anestezijom i postupak se obično izvodi ambulantno. Iznenaduje činjenica koliko je trudnica upućeno na zahvat bez pojašnjenja samog postupka

Rezultat i praćenje. Trudnica treba očekivati čekanje na rezultat oko 3-4 tjedna, a ponekad i dulje kod biokemijskih i DNA studija, kao i na mogućnost da se zahvat možda mora ponoviti. Povratna informacija nakon poroda je važna radi potvrde korektne dijagnoze.

Rizik amniocenteze. Amniocenteza nije bez rizika za trudnoću. Podaci dobiveni na temelju velikih studija su:

- pobačaj – dodani rizik je oko 0.5%, dok ponavljana amniocenteza nosi veći rizik oko 5-10% kao i izvođenje postupka od strane neiskusne osobe. Svaki veći centar obično ima svoje postotke.
- perinatalni problemi – nisu značajni, jedno istraživanje u VB je navelo povećanje posturalnih ortopedskih deformacija, ali to nije kasnije potvrđeno
- rizik za majku – minimalan je, osim mogućnosti Rh senzibilizacije (Rh negativne majke trebaju primiti antiD antitijelo).

Općenito se amniocenteza dokazala kao siguran i pouzdan postupak, ali je važno koristiti je selektivno i tamo gdje treba, te pažljivo objasniti rizike obitelji.

Biopsija korionskih resica. Prenatalna dijagnostika u prvom tromjesečju trudnoće koja koristi tkivo ploda dobiveno biopsijom korionskih resica pokazala se kao jako važan napredak u dijagnostici, pogotovo u molekularnoj dijagnostici, ali nije preuzela važnost amniocenteze u citogenetskim indikacijama.

Uzorci se dobiju ili transabdominalno ili transcervikalno u 10-11 tjednu pod kontrolom UZV-a. U tom razdoblju se korionsko tkivo još nije lokaliziralo u placenti. Teško je dobiti tkivo transcervikalno nakon 12. tjedna, iako je transabdominalno moguće dobiti tkivo placente i kasnije. Maternalno tkivo se mikroskopski odstrani, a ostatak resica s čistim fetalnim tkivom se može koristiti za različite dijagnostičke procedure:

- molekularna dijagnostika – nekultivirane korionske resice su najbolji uzorak i osiguravaju brzu i točnu prenatalnu dijagnozu za poremećaje s dostupnom analizom genskih mutacija.
- enzimske studije – normalni rasponi se mogu razlikovati od onih u stancicama iz plodove vode, a kod X vezanih bolesti – različita X inaktivacija može dati niske vrijednosti u ženskih heterozigota.

Danas postoji dosta veliko iskustvo s ovom metodom. Rizik pobačaja je viši nego kod amniocenteze (dodani rizik je 1-3%), pa amniocenteza i dalje ostaje primarni pristup u nisko rizičnim trudnoćama, dok je biopsija korionskih resica rezervirana za visoko rizične trudnoće i za molekularnu dijagnostiku.

Tablica 1. Najčešći kromosomski poremećaji kao indikacija za prenatalnu dijagnostiku:

Jedan roditelj nositelj balansirane autosomne translokacije
Starija dob majke
Promijenjen nalaz probira na Down sindrom
UZV nalaz suspektan na Down sindrom ili neki drugi kromosomski poremećaj
Prethodno dijete s autosomnom trisomijom ili sličnom abnormalnosti
Roditelj mozaik za kromosomski poremećaj
Sindromi kromosomske nestabilnosti

Starija dob majke. Rizik kod starije dobi majke je primarno povezan s Downovim sindromom uz niži rizik za druge trisomije. Treba svakako naglasiti razlike koje se odnose na rizik za dobivanje živorodjenog djeteta s abnormalnošću te na rizik za abnormalni nalaz koji dobijemo amniocentezom što možemo vidjeti u tablicama 2. i 3. Kojom tablicom ćemo se služiti pri davanju genetskog savjeta ovisi o situaciji. Pri donošenju odluke da li raditi ili ne amniocentezu u situacijama s relativno niskim rizikom korisna nam je tablica 2, a kada je odluka već donešena u korist potrebe za amniocentezom tada je relevantnija tablica 3.

Pri savjetovanju kod DS važno je znati da: incidencija u potomstvu žene od 25 godina i manje je vrlo niska (manje od 1 na 1000), može ponovno lagano rasti kod najmlađih majki; rizik ne raste iznad srednjeg rizika u populaciji dok je majčina dob do 30 godina; rizik doseže 1% kada je majčina dob iznad 40 godina, s laganim padom porasta u žena u kasnim 40-tim godinama.

Općenito je prihvaćeno da žene s 35 godina i više moramo informirati o rizicima za DS i preporučiti im amniocentezu. Na amniocentezu danas svakako utjecaj ima razvoj biokemijskih probirnih testova za DS u trećem tromjesečju, a sastoje se od kombinacije alfa-fetoproteina, humanog korionskog gonadotropina i estriola. Pomoću takvog probira postaje moguće modificirati dobni rizik tako da neke starije žene s vrlo niskim rizikom u tom probiru ne rade amniocentezu.

Tablica 2. Rizik za Downov sindrom u odnosu na majčinu dob (živorodeni)
(prema: Cuckle HS et al. Br J Obstet Gynaecol 1987;94:387-402.

Majčina dob u vrijeme poroda	Rizik 1:	Majčina dob u vrijeme poroda	Rizik 1:
15	1580	33	575
16	1570	34	475
17	1565	35	385
18	1560	36	305
19	1540	37	240
20	1530	38	190
21	1510	39	145
22	1480	40	110
23	1450	41	85
24	1400	42	65
25	1350	43	49
26	1290	44	37
27	1210	45	28
28	1120	46	21
29	1020	47	15
30	901	48	11
31	795	49	8
32	680	50	6

Tablica 3. Majčina dob i kromosomske abnormalnosti otkrivene amniocentezom (stopa na 1000),
prema: Ferguson-Smith MA. Br Med Bull 1983;39:355-364

Dob majke	Trisomija 21	Trisomija 18	Trisomija 13	XXY	Sve kromosomopatije
35	3.9	0.5	0.2	0.5	8.7
36	5.0	0.7	0.3	0.6	10.1
37	6.4	1.0	0.4	0.8	12.2
38	8.1	1.4	0.5	1.1	14.8
39	10.4	2.0	0.8	1.4	18.4
40	13.3	2.8	1.1	1.8	23.0
41	16.9	3.9	1.5	2.4	29.0
42	21.6	5.5	2.1	3.1	37.0
43	27.4	7.6		4.1	45.0
44	34.8			5.4	50.0
45	44.2			7.0	62.0
46	55.9			9.1	77.0
47	70.4			11.9	96.0

Translokacijski oblik DS. Rijedak oblik, ali s visokim rizikom čini samo 5% DS. Rizik za potomstvo kod nositelja balansirane translokacije ovisi o kromosomu koji je uključen zajedno s kromosomom 21. Kod visokog rizika prednost ima biopsija korionskih resica.

Kada su roditelji djeteta s translokacijskim oblikom DS urednog kariotipa rizik za bolesno dijete je nizak, vjerojatno sličan onom kod regularne trisomije. Razumno je ponuditi prenatalnu dijagnostiku takvoj obitelji, ali svakako ne pod pretpostavkom visokog rizika za DS.

Tablica 4. Rizici za potomstvo u obitelji s translokacijskim oblikom DS

Tip translokacije	Roditelj nositelj balansirane translokacije	Rizik u potomstvu (%)
14/21	Otac Majka Niti jedan roditelj	10 2.5 manji od 1
21/22	Jedan roditelj Niti jedan roditelj	Vjerojatno kao za 14/21 Nizak (manji od 1)
21/21	Jedan roditelj (bilo koji) Niti jedan roditelj	100 Nizak (manji od 1)

Trisomija 21 i ostale trisomije autosoma

Sva istraživanja se slažu da je rizik ponavljanja trisomija nizak osim kod vrlo rijetkih obitelji kod kojih može postojati gonadalni mozaicizam ili nerazdvajanje. U praksi, većina parova s jednim djetetom sa DS žele napraviti amniocentezu iako su dobili informaciju o niskom riziku.

Strukturne malformacije

Anomalija zatvaranja neuralne cijevi. Riječ je o ozbiljnoj malformaciji povezanoj s teškim invaliditetom ili smrću djeteta, ali danas zbog nekih čimbenika ipak ima manju incidenciju – zbog boljeg prehranbenog statusa trudnica, zbog primarne prevencije uzimanjem folne kiseline, zbog bolje rezolucije UZV, zbog probira majki na AFP.

Prvi je korak svakako bilo otkriće da takve trudnoće imaju povišen AFP u amnijskoj tekućini, pa se moglon odrediti visokorizične trudnoće. U područjima s populacijom niskog rizika preferira se UZV probir s visoko rezolucijskim aparatima, jer je u tim područjima moguća veća proporcija lažno pozitivnih AFP nalaza. Danas se amniocenteza često ne izvodi u slučajevima gdje je vidljiv ultrazvučno i pomoću probira patološki nalaz trudnoće.

Treba imati na umu da i drugi poremećaji mogu uzrokovati porast AFP u serumu: uredna blizanačka trudnoća (tu nam je važna acetilkolinesteraza koja je povišena u amnijskoj tekućini kod NTD), spontana intrauterina smrt, omfalokela i gastroshiza, atrezije crijeva i ezofagusa, Turner sindrom, kongenitalna nefroza (finski tip), sakrokocigealni teratom, ekstrofija mjehura, fokalna dermalna

hipoplazija, Meckelov sindrom. Nakon medicinski indiciranog pobačaja treba ići na obdukciju, jer uz NTD mogu biti povezani i brojni drugi sindromi.

Rizik ponavljanja za anencefaliju i spinu bifidu pokazuje tablica 5:

Zahvaćen član	Incidencija u populaciji		
	1/200	1/ 500	1/1000
Jedan potomak	5	3	2
Dva potomka	12	10	10
Jedan rođak u drugom koljenu	2	1	1
Jedan rođak u trećem koljenu	1	0.5-1	0.5
Jedan roditelj	4	4	4

Perikonceptijsko uzimanje visokih doza folne kiseline će smanjiti rizik ponavljanja kod žene koja već ima jedno dijete s NTD na 1%.

UZV probir u prenatalnoj dijagnostici

Danas je ultrasonografija široko dostupna i visoko senzitivna metoda prenatalne dijagnostike. Treba imati na umu da postoji razlika u rezultatima ekspertnih ustanova specijaliziranih za otkrivanje anomalija te radiologa ili ginekologa koji rade UZV općenito.

Tablica 6. Glavne indikacije za prenatalni UZV

Opće indikacije:

Točnija procjena gestacijske dobi

Višestruka trudnoća

Lokalizacija placente prije biopsije korionskih resica

Abnormalnosti središnjeg živčanog sustava:

Anencefalija

Spina bifida

Hidrocefalus i hidranencefalija

Mikrocefalija

Koštani defekti:

Teška koštana displazija (npr. ahondrogeneza)

Bolest krhkih kostiju (teške kongenitalne forme)

Anomalije udova (pogotovo prstiju)

Anomalije organa:

Srčani defekti
Renalna ageneza
Policistična bolesti bubrega
Teška opstruktivska uropatija
Omfalokela i gastroshiza
Fetalni tumori

Mogućnost za isključivanje ili otkrivanje određene anomalije u trudnoćama visokog rizika tj, u kojima znamo što tražimo je svakako drugačija nego kod UZV probira u niskorizičnim trudnoćama. Najbolje rezultate UZV postiže kada je kombiniran s drugim oblicima prenatalnog probira. Mnoge tzv UZV «abnormalnosti» ili «soft markeri» su prolazni i fiziološki, dok drugi mogu značiti patologiju u manjem broju slučajeva kao što je nuhalni edem kod trisomije 21, cista koroidnog pleksusa u trisomiji 18 itd.

Danas nam UZV biljezi pomažu u procjeni rizika za postojanje određenog poremećaja u trudnoći, a prema naravi biljega odlučujemo se i za ciljanu prenatalnu dijagnostiku. Nalaz hiperehogenog crijeva nam ukazuje da plod može bolovati od cistične fibroze, česte autosomno-recesivne bolesti, te prenatalno uz kromosomsku analizu moramo napraviti i analizu CFTR gena direktnom metodom iz plodove vode (slika 3). Polihidramnion (AFI>25) uz abnormalnosti položaja ekstremiteta (slabiji pokreti ploda) postavlja sumnju na miotonu distrofiju, a omfalokela i polihidramnion, te iza 25. tjedana polihidramnion uz ubrzani rast ploda postavlja radnu dijagnozu Beckwith Wiedemann sindroma te uz kromosomsku analizu treba napraviti i FISH analizu specifičnih lokusa 11p15 i 11p13.

Slika 3 Prenatalni UZV nalaz ploda s hiperehogenim crijevom



Probir majčine krvi na DS. Populacijski probir iz majčine krvi je počeo prvo u populacijama visokog rizika za NTD, a pritom su primijećeni niži nalazi AFP u trudnoćama koje su rezultirale s DS. Od kada su uz AFP pridružene i vrijednosti betahCG, estriola, i PAPP-A (A-plazma proteina povezanog s trudnoćom) - testovi poznati kao triple ili quadruple test imaju vrijednos mjesto u

prenatalnom probiru. Dodatni probir za DS je svakako mjerenje fetalnog nuhalnog nabora s UZV. Ovakvi probiri omogućavaju trudnicama bilo koje dobi mogućnost da naprave amniocentezu ako test probira prelazi dogovorenu razinu rizika (threshold of risk) koja je često 1:250, dok druge trudnice mogu izbjeći zahvat ako je nalaz probira daleko ispod te granice.

U praksi nije tako jednostavno, starije žene zbog dobi ipak idu na definitivne testove – amniocentezu, često i zbog mogućih zakonskih posljedica za ginekologa ako ih ne pošalje, jer imaju niski triple test. Također, veći broj učinjenih probira će napraviti i prenatalnost citogenetskih laboratorija, dok neke žene pak zabrinu i te male vrijednosti rizika za neki specifični poremećaj o kojem nisu niti znale prije probira pa također žele amniocentezu. Dokazi govore u prilog tome da će probir na DS kod trudnica izbjeći DS u 60-70% trudnoća za razliku od provođenja samo probira na DS kod majki starije dobi. Naravno da takva razmišljanja otvaraju pak mnoga druga pitanja od psiholoških, etičkih i financijskih pitanja.

X vezani poremećaji. U početku treba svakako razlučiti da li je žena nositelj bolesti ili ne, tj. da li je potrebna prenatalna dijagnostika. U trudnoćama visokog rizika za X-vezanu bolest, određivanje spola fetusa pruža mogućnost određivanja da li uopće postoji rizik za fetus. Danas je za većinu bolesti moguća direktna molekularna prenatalna dijagnostika muškog ploda, a ako i nije, povezani DNA markeri su često u upotrebi. Neki primjeri X vezanih bolesti su npr. mišićna distrofija (DMD/BMD) ili Fragilni X sindrom. Prenatalna selekcija spola je danas nezakonita u mnogima zemljama, kao što je npr. Velika Britanija. U nekim područjima je riječ o zlouporabi te metode u cilju pobačivanja ženskih plodova.

Nasljedne metaboličke bolesti. Tehnički razvitak prenatalne dijagnostike različitih nasljednih metaboličkih bolesti je jedno od glavnih dostignuća u humanoj genetici, iako je broj obitelji rizičnih za takve bolesti mali u odnosu na učestalost kromosomskih poremećaja kao što je npr. DS.

Pri genetskom savjetovanju treba svakako reći:

- da se većina nasljednih metaboličkih bolesti nasljeđuje autosomno recesivno, tako da su samo direktni potomci zahvaćenih roditelja u visokom riziku (1 od 4).
- da mnoge bolesti za dijagnozu zahtijevaju biopsiju korionskih resica ili kulturu stanica iz amnijske tekućine, ako se određeni enzimski defekt može odrediti iz kulture kožnih fibroblasta, može i u kulturi stanica plodove vode ili materijalu korionskih resica, iako se rasponi mogu značajno razlikovati.
- da je obično potreban veći broj stanica, te je zbog toga bolja biopsija korionskih resica, a potreba za kulturom stanica kod amniocenteze može nepotrebno produljiti vrijeme dijagnostike.
- da su mnoge od tehnika ispitivanja određenih enzima visoko specijalizirane i rade se samo u nekim laboratorijima. Pažljivo planiranje unaprijed je potrebno radi toga što stanice nekada moraju biti poslane na udaljena mjesta.
- da je kada je god moguće kod bolesnog djeteta pokušati pronaći enzimski defekt ili učiniti molekularnu dijagnostiku, pogotovo ako je dijete u riziku od smrti. Potrebno je izolirati i spremati DNA, kulturu stanica ili postmortem materijal, jer je to sve moguće upotrijebiti u budućnosti.

Neke nasljedne metaboličke bolesti se mogu dijagnosticirati direktno iz plodove vode, iako je uporaba kulture stanica poželjna kao «back up». Takve bolesti su organske acidurije (propionska i metilmalonska acidurija), mukopolisaharidoze, kongenitalna nefroza (povišen AFP u plodovoj vodi), kongenitalan adrenalna hiperplazija (21-hidroksilaza).

Molekularna prenatalna dijagnostika. Utjecaj molekularne genetike se osjetio u području prenatalne dijagnostike više nego bilo koje polje medicinske genetike. Za postoji mnogo razloga, uključujući neovisnost tehnike o gestacijskoj dobi i o specifičnosti tkiva, nema varijabilnosti kod heterozigota te su nalazi već u prvom trimestru vjerodostojni. Raspon mogućnosti molekularne dijagnostike se sastoji od analize mutacija, DNA polimorfizama, otkrivanja nositelja, prenatalne dijagnostike.

Danas se molekularna prenatalna dijagnostika temelji uglavnom na direktnom otkrivanju mutacija, tu su uključeni neki od najtežih mendelski nasljednih poremećaja kod kojih je gen izoliran ili mapiran. Uzorak korionskih resica predstavlja uzorak koji se može analizirati bez kulture stanica. Kada već znamo mutaciju kod bolesnog člana obitelji, to nam predstavlja izbjegavanje dodatne dijagnostike. Kada to nije moguće, potrebna je šira potraga za mutacijama, što nekada nije uspješno. Pri korištenju vezanih genetskih markera, intragenski markeri su pouzdani ako je obitelj informativna. Kod recesivnih bolesti nam je jako važan nalaz prvog bolesnog djeteta, pa treba stalno naglašavati potrebu uzimanja i spremanja materijala, bilo krvi, tkiva ili DNA. Ako koristimo povezane markere izvan gena, rizik pogreške zbog rekombinacija treba biti pažljivo procijenjen i prodiskutiran prije provođenja prenatalnog testiranja.

Dijagnostika iz krvi i tkiva fetusa. Direktno uzimanje uzorka iz pupkovine pod kontrolom UZV-a je zamijenilo aspiracije placente, jer je riječ o metodi s čistom fetalnom krvi, iako zahvaljujući DNA tehnika to sada više nije uvijek potrebno, kao što je npr. slučaj s hemoglobinopatijama i hemofilijama. Biopsija kože fetusa se pokazala kao pouzdana i sigurna u dijagnostici raznih stanja kao što su letalna i distrofična bulozna epidermoliza, eritroderma ihtiosiformis, Sjogren- Larsonov sindrom, okulokutani albinizam, a obično ne ostaje ožiljak. Kao što se događa s dijagnostikom iz krvi fetusa, tako DNA analiza iz korionskih resica potiskuje gore navedene načine dijagnostike.

Preimplantacijska dijagnostika. Za mnoge parove s visokim rizikom da nasljeđivanje teške nasljedne bolesti, to može pružiti mogućnost izbjegavanja prekida trudnoće radi bolesnog djeteta. Danas je moguće provesti molekularnu analizu stanica iz ranog embrija nakon in vitro oplodnje i učiniti transfer samo embrija koji imaju uredan genotip koji se ispituje. Zbog toga što se radi o novijoj metodi u kliničkoj praksi, do sada ipak nema dugotrajnijih istraživanja o mogućim štetnim posljedicama ove metode, nedostatak znanja o etiologiji određenih genetskih poremećaja, općenito limitiran uspjeh in vitro oplodnje.

Analiza stanica fetusa iz krvi majke. Dugo se zna da je mali broj stanica fetusa prisutan i u krvi majke, razvika tehnika koje bi ih mogle identificirati i odvojiti pružaju mogućnost DNA analize ili FISH tehnike kao neinvazivne prenatalne dijagnostike. Sadašnje istraživanje se koncentrira na upotrebi ove tehnike kao dijela primarnog probira za Downov sindrom.

Blizanci i prenatalna dijagnostika. Otkriće blizanačke trudnoće predstavlja posebnu problematiku u izvođenju amniocenteze, ali također i povećava genetski rizik, jer se ne radi o jednom plodu, već o

dva. Općenito su rizici značajno viši nego u jednoplodnoj trudnoći. Obitelj mora biti upoznata s ovakvim rizicima u trudnoći. Daljnja važna informacija je i da je normalan raspon AFP koncentracije u majčinom serumu povišen u blizanačkoj trudnoći te nam double ili triple test nisu relevantni.

Majčine bolesti u trudnoći i genetsko savjetovanje Iako se prenatalna dijagnostika u principu odnosi na fetus, genetsko savjetovanje u trudnoći također treba uzeti u obzir i majku. U mnogim dominantno nasljednim bolestima, majka je također bolesna, što utječe direktno na njezino zdravlje u trudnoći ili može prouzročiti obstetričke komplikacije. Najčešći genetski poremećaji u majke koji utječu na trudnoću su: cistična fibroza (respiratorna dekompenzacija), homocistunurija, srpasta anemija – trombotičke epizode, zatim opstetričke komplikacije – ahondroplazija (disproporcija zdjelice, miomi uterusa), Ehlers Danlos (prijevemena ruputura membrana), miotona distrofija (postpartalno krvarenje, problemi s anestezijom), deficijencija steroidne sulfataze (produljen porod, rizik mrtvorođenja).

Literatura

1. Abramsky L, Chapple J. Prenatal Diagnosis. The human Side, 2nd edition, 2003, London, Chapman and Hall.
2. Clarke A. Prenatal genetic screening. Paradigms and perspectives. In. Harper PS, Clarke A, Genetics Society and Clinical Practice, Oxford, BIOS, 1997;119-140.
3. Scriver CR et al. The metabolic and molecular bases of Inherited Disease. New York, 2001, McGraw Hill.
4. Harper PS. Practical genetic counselling. Edward Arnold, 6th edition. 2004;331-345.
5. McKinlay Gardner RJ, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. 3rd edition, 2004, Oxford University Press.
6. Gardner RJM, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. 2003, Oxford University Press.

GENETSKO SAVJETOVANJE U CITOGENETICI

Vida Čulić

**Klinička bolnica Split, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, Klinika za dječje bolesti,
Odsjek za medicinsku genetiku s laboratorijem za humanu genetiku i genetsko
savjetovalište, Spinčićeva 1, Split**

Uvod

Ljudsko tijelo izgrađuje približno 100 biljuna stanica, većina je promjera manjeg od desetinke milimetra. U svakoj stanici nalazi se jezgra, ona ima dva cjelovita ljudska genoma (osim u jajanim stanicama i spermatozoidima, koji imaju samo jednu kopiju genoma), jedan genomski skup potječe od majke a drugi od oca. U svakom se skupu nalazi istih 50.000 gena na istih 23 kromosoma. Na slijedeći se naraštaj prenosi samo jedan cjeloviti genomski skup, ali tek poslije zamjenjivanja dijelova očevih i majčinih kromosoma procesom rekombinacije. Tijekom jednog naraštaja ljudskih bića nakupi se stotinjak mutacija, ali jedna jedina može biti kobna ako se nalazi na krivom mjestu. Svaki kromosom je par (vrlo) dugih molekula DNA. Osnovna obilježja kromosoma su: broj, veličina, oblik, dužina krakova i njihov odnos, te položaj centromere. Broj i veličina kromosoma je konstantan i specifičan za svaku vrstu, npr. čovjek ima 46 kromosoma, pas 78, grah 12, a čovjekoliki majmuni 48. Usprkos stalnim strukturnim promjenama (sabijanja i rasplitanja) svaki kromosom zadrži svoj strukturni kontinuitet i individualnu razliku kroz sve slijedeće stanične cikluse i tako tijekom cijelog života svake jedinice.

Mitoza osigurava rast, zamjenu i popravak tjelesnih stanica i tkiva. Interfazni period je vrijeme najintenzivnije sinteze proteina i replikacije DNA. Na kraju interfaze nastupa mitozu. Značajni postotak nasljednih bolesti u čovjeka posljedica je prisustva kromosomskih konstitucijskih abnormalnosti. Među kromosomskim promjenama razlikujemo promjene u broju kromosoma ili numeričke i promjene u strukturi kromosoma, strukturne aberacije. Promjena u broju kromosoma nastaje kada je njihov broj manji ili veći od 46. Strukturne kromosomske promjene rezultat su kromosomskih lomova i često ponovnog spajanja slomljenih krajeva na isti ili izmijenjen način.

Učestalost pojedinih kromosomskih aberacija

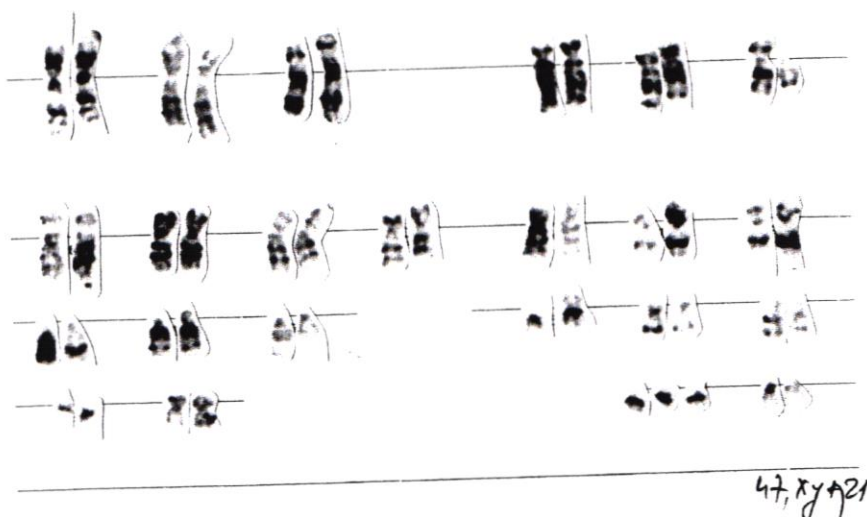
u spontanim pobačajima:	40-60 %
uz kasnu mrtvorodenost i perinatalnu smrt:	5-7 %
u živorođenih:	0,5%
gonosomopatije u muških:	1 : 400
gonosomopatije u ženskih:	1 : 700
autosomne trisomije:	1 : 500-800
trisomija 21 (sindrom Down)	1 : 10-1600
trisomija 18 (sindrom Edwards)	1 : 7500
trisomija 13 (sindrom Patau)	1 : 1500
strukturne aberacije kromosoma:	1 : 440
balansirane translokacije:	1 : 500
nebalansirane translokacije:	1 : 2400

KROMOSOMI

Kromosomi su kromatinske niti, otkrio ih je 1842 god. von Nägel, a naziv im potječe od grčke riječi koja znači obojeno tjelešce. Nalaze se u jezgri stanica, a izgrađeni su od jedne molekule DNA i brojnih proteina. Jerome Lejeune je 1959. godine prvi primjenio ovaj pronalazak u praksi i otkrio pojavu 47 kromosoma u osoba s mentalnom retardacijom, tj. sindromom Down. Kromosom je izgrađen od dva dijela (kromatida) odvojenih centromerom. Kratki krak označava se slovom «p» (prema francuskoj riječi petit = mali), a dugi krak s «q» prema slijedećem slovu abecede. Broj kromosoma je stalan i karakterističan za svaku vrstu. Čovjek ima 46 kromosoma, tj. žena 46, XX, a muškarac 46, XY. Kromosomi se, tj. parovi kromosoma, označavaju brojevima od 1 – 23. Prema veličini i položaju centromere svrstani su u slijedeće skupine: A (metacentrični veliki: 1-3), B (submetacentrični veliki: 4 i 5), C (submetacentrični manji: 6-12 i kromosom X), D (akrocentrični: 13-15), E (submetacentrični mali: 16-18), F (metacentrični mali: 19 i 20), G (akrocentrični mali: 21 i 22 i kromosom Y). Kromosomi označeni brojevima od 1- 22 nazivaju se autosomi, a kromosomi X i Y gonosomi. Nepravilan broj pojedinog para kromosoma nazivamo aneuploidija, tj. >46 i <46. Osnovi mehanizma nastanka aneuploidije je nerazdvajanje kromosoma tijekom mejoze ili mitoze. Javlja se u 4% svih klinički prepoznatih trudnoća. Vodeći su uzrok gubitka trudnoće i rođenja djeteta s višestrukim malformacijama i često mentalnom retardacijom.

Na završecima svakog kraka kromosoma (molekule DNA) nalaze se telomere. To su specijalizirani dijelovi DNA sastavljeni od uzastopno ponovljenih nizova nukleotida s bazama TTAGGG.

Centromera je poseban dio kromosoma, na koji se, tijekom mitoze vezuju niti diobenog vretena. Nitima diobenog vretena se kromatide tijekom anafaze mitoze odvajaju, odnosno «putuju» na suprotni pol stanice. Centromera je heterokromatin izgrađen od satelitne DNA.



Slika 1. Kariogram (47, XY+21) - trisomija 21, sindrom Down.

Interesantna je i činjenica da proces nastanka jajne stanice (početak mejoze, profaza I) započne već za vrijeme fetalnog razvitka ženskog djeteta – tijekom osmog mjeseca intrauterinog života. Zato se odmah nakon rođenja u jajnicima novorođenog ženskog djeteta već nalazi oko 3 milijuna oocita I reda u fazi profaze I mejoze. U ovom obliku ostaju sve do puberteta. Tek se u pubertetu mejoza oocita I reda nastavlja tijekom menstrualnih ciklusa.

Zametne stanice germinativnog epitela sjemenika ponašaju se različito. Tek u vrijeme puberteta iz njih, procesom mitoze, nastaju brojne spermatogonije, a potom i spermatocite I reda iz kojih, kontinuiranim mejozama, cijelog fertilnog perioda života muškarca, nastaju milijuni zrelih spermija.

Nerazdvajanje kromosoma homolognog para nakon *crossing over*-a je izrazito često tijekom stvaranja gameta u čovjeka. S obzirom da u tom slučaju jedna gameta dobije oba kromosoma jednog para (disomična gameta) a druga niti jedan (nulisomična gameta) čak je jedna trećina embrija nastalih od takvih gameta trisomična ili monosomična.

Nerazdvajanje se može dogoditi i u drugoj mejotskoj diobi, za vrijeme anafaze II, kada se kromatide jednog kromosoma u normalnim uvjetima razdvajaju da bi se napokon, našle u budućoj gameti. I u ovom slučaju nastaju disomične ili nulsomične gamete, koje ako sudjeluju u oplodnji uzrokuju razvitak trisomičnih ili monosomičnih embrija.

Uzroci nerazdvajanja još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Hipoteze uključuju nastanak prolongiranih sinapsi koje onda povlače oba kromosoma u istu stanicu – kćer, odnosno nedostatak pravilnih sinapsi zbog čega se kromosomi ne mogu poredati uz metafaznu ploču. Tijekom oogeneze većina se nerazdvajanja događa u prvoj mejotskoj diobi, najčešće u parovima

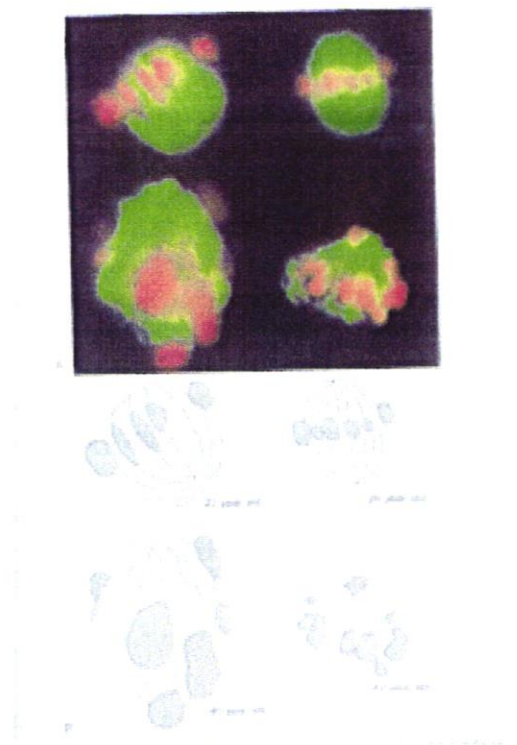
kromosoma brojeva 8, 13, 15, 16, 18, 21, 22 i X. Tijekom spermatogeneze česta je za 22. par kromosoma. Tijekom oogeneze češće je nerazdvajanje autosoma (prva mejotska dioba), a tijekom spermatogeneze nerazdvajanje gonosoma. Zbog toga je u muškaraca česta aneuploidija 47, XYY (dvostruki Y), odnosno 47, XXY (Klinefelterovim sindromom, u 50% slučajeva). Monosomija kromosoma X najčešće se zbiva zbog manjka očevog kromosoma X. Nerazdvajanje koje nastupa jedno iza drugog u obje mejotske diobe može dovesti do tetrasomije (polisomija X). Drugi način nastajanja dvostruke aneuploidije je nerazdvajanje istog para kromosoma u gametama roditelja. Ovo je rijetka ali ne i nepoznata pojava.

Nerazdvajanje kromatida može se dogoditi i za vrijeme mitoze. To je tzv. mitotsko (somatsko, postzigotno) nerazdvajanje. Uzrokom je nastanka mozaicizma.

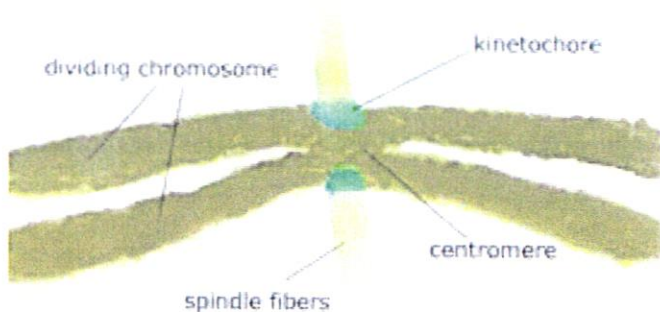
Prerano odvajanje kromatida je drugi način nastanka aneuploidije. Događa se zbog preranog odvajanja sestrinskih kromatida. Umjesto u anafazi II odvoje se u anafazi I, pa tako oocita u drugoj mejotičkoj diobi (do anafaze II) nosi 23 kromosoma izgrađenih od dvije kromatide plus još jednu kromatidu ($23 + \frac{1}{2}$). Polociti I reda stoga manjka jedna kromatida. To je tzv. nebalansirano prerano odvajanje kromatida. Ukoliko se isto (prerano odvajanje sestrinskih kromatida) dogodi s oba kromosoma koji čine homologni par kromosoma onda oocita tijekom druge mejotske diobe nosi 22 kromosoma sastavljena od još uvijek povezanih sestrinskih kromatida, plus još dvije zasebne kromatide. Ovo je balansirano prerano odvajanje kromatida.

Jedini dokazani uzrok nastanka prediobe i nerazdvajanja je dob; potvrđen je češćom pojavom u majki starijih od 35 godina. Prerano odvajanje je češći uzrok aneuploidije od klasičnog nerazdvajanja i češći je u starijih majki. Posebno veliki broj aneuploidija uzrokovanih nerazdvajanjem nastaje tijekom oogeneze, vjerojatno zbog propadanja, tijekom vremena, čimbenika koji podupiru adheziju homolognih kromosoma. Naime, za uspješno odvajanje homolognih kromosoma tijekom prve mejotske diobe nužno je održavanje fizičke veze (adhezije) između dva homologna kromosoma sve do anafaze I.

Druga teorija govori o važnosti "motornih proteina"; to su proteini centromera i diobenog vretena. Njima se centromere dviju sestrinskih kromatida vežu za niti diobenog vretena samo jednog (istog) pola stanice. S godinama starosti žene smanjuju se adhezija i djelovanje «motornih proteina». U kombinaciji s lokalnim čimbenicima (kao što je ostatak oocita u ovariju) i ostalim čimbenicima organizma (npr. promjena razine hormona hipofize s godinama života) uzrokuju oštećenje jedinstva procesa mejoze. Prema ovim saznanjima jasno je da starija žena ima veću sklonost stvaranju aneuploidnih zametaka.



Slika 2. Izgled diobenog vretena mlade i starije žene



Slika 3. način na koji su kromosomi «zahvaćeni» za diobeno vreteno

Razumijevanje mehanizama kojim se održava integritet jezgre te mehanizama kojima se reguliraju i koordiniraju zbivanja u jezgri gotovo su nesagledivi. Jedno je međutim sigurno. Virusne infekcije, ekspresija onkogena i nasljedne bolesti mogu prouzročiti duboke i specifične promjene u njejoj organizaciji i funkcioniranju. U jezgri pojedini kromosomi zauzimaju površine

koje nazivamo kromosomskim teritorijima (područjima). Ova su područja međusobno odijeljena kanalima, tzv. interkromosomskim područjima ili domenama. Aktivni geni koji se nalaze na kromosomima nastoje se grupirati na periferiji kromosomskih područja. Stoga se i molekule mRNA najčešće nalaze na površini tih teritorija. Od tuda prelaze u kanale interkromosomskih područja kojima «putuju» do pora membrane jezgre kroz koje izlaze u citoplazmu. Transkripcijski aktivni geni koji se repliciraju ranije za vrijeme S-faze interfaze dio su kromosoma koji nazivamo R-regijama. Suprotno tome transkripcijski slabije aktivni geni grupirani su u tzv. G-regijama. R-regije kromosoma nalaze se obično u unutrašnjosti jezgre (eukromatin), a G-regije smještene su u periferiji, uz membranu jezgre (heterokromatin).

U kromosomima su, zbog njihove izražene kondenziranosti, G- i R-pruge (regije) blizu jedne drugima. Na kraju mitoze, kada se kromosomi ponovo despiraliziraju i pretvaraju u kromatinske niti, razdvajanje R- i G-pruga u odvojene dijelove kromosomskih teritorija nije zanemariv proces. Kako tijekom pojedinih faza životnog ciklusa stanice neki geni mogu u jednom trenu biti transkripcijski aktivni, a u nekom drugom neaktivni, jasno je da se pregrupiranje dijelova kromatinskih niti, iz eukromatinskih u heterokromatinska područja i obrnuto, događa stalno, tijekom cijele interfaze.

Začeće i trudnoća su u isto vrijeme vrlo ranjiv i moćan proces. Ranjiv je zbog činjenice da veliki postotak zametaka nosi abnormalnosti kromosoma zbog kojih će trudnoća većinom završiti pobačajem. Moćan je zbog činjenice da više od 99% slučajeva trudnoća završi rođenjem zdravog djeteta (2).

Nebalansirane promjene kromosoma (aneuploidija) nalaze se u manje od 1% novorođene djece. Od svih ispitivanih vrsta, ljudi su najviše skloni stvaranju aneuploidnih spolnih stanica.

Brojčano, spermija se stvara znatno više nego jajnih stanica. Ipak, čak je 50% - 25% jajnih stanica citogenetski promijenjeno. Većinom se radi o hiperhaploidiji (24 kromosoma, jedan kromosom viška). U hipohaploidiji nedostaje jedan kromosom ($n = 22$). Ovakvim abnormalnostima mogu nastati zigote s trisomičnim i monosomičnim brojem kromosoma. Mogućnost nastanka aneuploidije raste sa starosnom dobi majke, a najčešće je uzrokovana nerazdvajanjem kromosoma.

Od 20 000 kariotipiziranih spermija zdravih osoba 10% nosi promjene kromosoma. Aneuploidija se nalazi u oko 1-3% spermija, a 5-10% ih nosi strukturne promjene kromosoma. Mnoge od tih promjena nastaju tijekom spermatogeneze kao neposredna postmitotska promjena. Ako aneuploidna gameta (nulsomična ili disomična) oplodi normalnu gametu nastaje aneuploidni zametak (monosomik ili trisomik). Diploidna gameta u kombinaciji s normalnom gametom stvara triploidni zametak. Ako pretpostavimo da otprilike 20% oocita može biti aneuploidno, a da 10% spermija nosi neku promjenu kromosoma, uz uvjet da imaju jednaku fertilizirajuću sposobnost, možemo očekivati oko 30% zametaka s nekom nenormalnošću kromosoma. Triploidija može

nastati i zbog dispermijske (dva spermija oplode jednu jajnu stanicu). Samo jedna nenormalna postziogotična stanična dioba stvara mozaicizam; ovo je česti slučaj.

Monosomija i jak mozaicizam mogu biti letalno i prije no što se morula pretvori u blastocistu, ili će samo dosegnuti stadij blastociste. Učestalost i udio aneuploidije u blastocisti jednaka je kao i u pobačaju koji se događa u kasnijem dijelu prvog tromjesečja trudnoće. U kasnijem dijelu prvog tromjesečja trudnoće (uglavnom pred kraj) događa se otprilike 10-15% kliničkih pobačaja ili spontanih pobačaja. U oko 50% takvih slučajeva pokazane su promjene kromosoma. Promjene kromosoma nađene su u još većem broju zametaka pobačenih prije 10.-tog tjedna trudnoće. U čak 60% spontano pobačenih zametaka nađene su trisomije. Najčešće su to trisomija kromosoma 16, monosomija kromosoma X i triploidija. Najčešći uzrok aneuploidije je nerazdvajanje kromosoma tijekom oogeneze; ovo se osobito odnosi na kromosome 13, 14, 16, 21 i 22. Triploidija može biti i odraz diandrije ili diginije - dvostruko učešće materijala koji dolazi od oca ili majke. Najveći broj triploidnih zametaka pobači se između 10.-tog i 20.-tog tjedna trudnoće. Većina ih je diandrična. Diandrija je uvijek posljedica oplodnje jedne jajne stanice s dva spermija (dispermija). Diginija najčešće nastaje zbog diploidne jajne stanice; može nastati zbog nerazdvajanja cijelog seta kromosoma u prvoj ili drugoj mejotskoj diobi, zadržavanjem polarnog tjelešca ili oplodnjom primarne oocite. Uniparnetalna disomija nije uzrok pobačaja.

Gubitak trudnoće sredinom drugog tromjesečja zove se intrauterina fetalna smrt; u čak 50% takvih slučajeva opažene su promjene broja kromosoma, najčešće trisomija kromosoma 18. I mrtvorođena djeca ili ona umrla u perinatalnom periodu često imaju promjene kromosoma. Nebalansirani kariotip se javlja i u živorođene djece s učestalošću od 1:250.

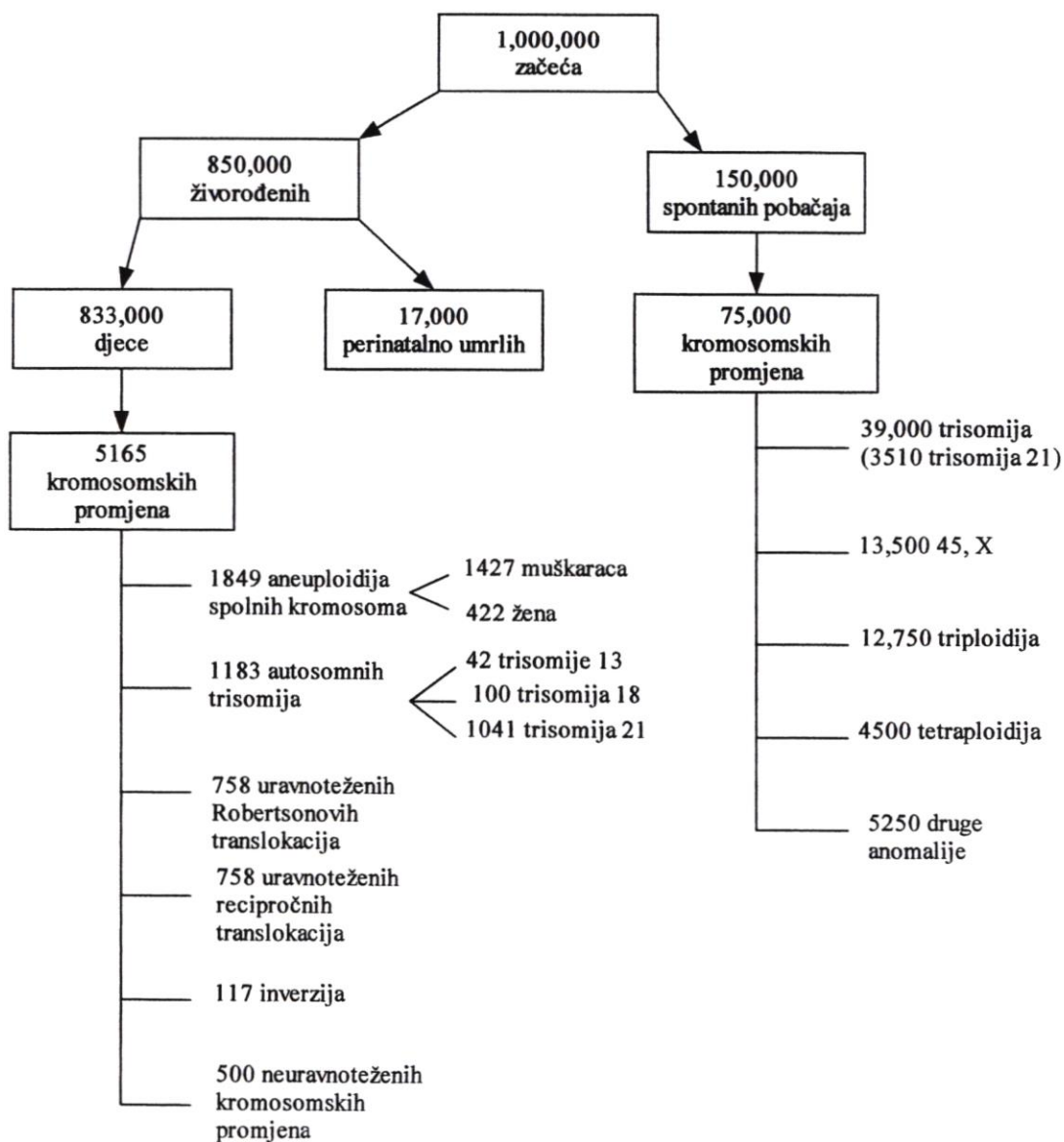
Učestali (rekurentni, habitualni) pobačaj događa se i u osoba urednog konstitucijskog kariotipa. Stvaran razlog tome je nepoznat. Smatra se, međutim, da takve osobe možda imaju neku predispoziciju za stvaranje aneuploidnih zametaka, kao što su npr. postojanje nekih recesivnih gena, abnormalnosti kromosoma roditelja, gonadni mozaicizam, pojačana asocijacija satelita kod akrocentričnih kromosoma, što se češće viđa u kariotipovima roditelja djece sa trisomijom 21. Pobačeni plod je često aneuploidan što ukazuje na aneuploidiju gameta. U čak 90% ispitanih slučajeva radilo se o aneuploidiji jajne stanice. Broj takvih gameta povećava se sa starošću majke. Trisomije se javljaju u 80% slučajeva. Najčešće su trisomije kromosoma 15, 16 i 21 (14%, 15% i 8%) i triploidije (u 13% slučajeva). U jednoj je studiji u kojoj su ispitivani embriji majki životne dobi između 30 – 36 godina dobiveni tijekom IVF-e (*in vitro* fertilizacija), ICSI-e (intracitoplazmatska spermalna injekcija) i PGD-e (preinplantacijska genetska dijagnoza), pokazano (metodom fluorescentne hibridizacije *in situ-FISH*) postojanje aneuploidije u čak 53% uzoraka. Najčešće su bile zastupljene nulisomije, monosomije, trisomije i tetrasomije autosoma (13, 16, 18, 21, 22). U 5% uzoraka nađene su promjene broja spolnih kromosoma: 45, X; 47, XXX; 47, XYY. *Hydatiformna mola* (HM, od engl. *Hydatiform mole*) je nenormalna trudnoća koju obilježava promijenjen (povećan) broj kromosoma oca (muškarca). Prema fenotipu i kariotipu razlikujemo nepotpunu i potpunu HM. Nepotpuni oblik HM nastaje kada: a) normalnu jajnu stanicu oplode dva normalna spermija (kariotip zigote je $3n$, $23+46 = 69$); b) normalnu jajnu stanicu oplodi abnormalni (diploidni, $2n$) spermij (kariotip zigote je $3n$, $23+46 = 69$). Potpuni oblik HM nastaje kada «praznu» jajnu stanicu (bez kromosoma) oplode dvije muške

predjezgre. U 90% takvih slučajeva se radi o monospermiji - jedan spermij oplodi jajnu stanicu nakon čega se muška predjezgra podijeli. U preostalim slučajevima «praznu» jajnu stanicu oplode predjezgre dvaju spermija (dispermija). Smatra se da je tome uzrok greška zone *pellucide* jajne stanice. Rezultat takve oplodnje je kariotip s normalnim brojem kromosoma (2n), ali isključivo muškog podrijetla. Ako spermiji nose kromosom X kariotip stanica HM (46, XX) oponaša normalni ženski raspored kromosoma. Prisustvo dva očeva haploida zove se diandrija. Fenotipske promjene HM odnose se uglavnom na korionske resice. Zbog proliferacije epitela koji pokriva korionske resice, stvaranja cističnih šupljina i promijenjenog krvožilja resica korion se pretvara u neorganiziranu masu ispunjenu tekućinom. Otuda i naziv *hydatiform mole* (*hydatid* – lat. kapljica vode; *hydatiform* – ono što sliči hidatidnoj cisti; *mole* – lat. masa bez neke posebne strukture). U slučaju potpune HM (svi su kromosomi očevi) fetus se niti ne razvija, a zloćudni je potencijal HM veoma visok. U slučajevima nepotpune HM (23 kromosoma od majke, 46 kromosoma od oca) fetus je prisutan ali nije živ, a zloćudni je potencijal HM vrlo nizak. Zbog HM poremećen je normalni fetalno-placentalni razvitak. Razvitku HM, naročito potpunog oblika, osobito su podložne žene na početku (mlađe od 20 godina) i kraju reproduktivnog razdoblja (starije od 40 godina) života. Učestalost potpune HM iznosi 1:2000 dijagnosticiranih trudnoća, ali postoje regionalne i etničke razlike. Etiologija ponovljenih oblika HM je nepoznata. Pobačaj djelomične HM naziva se *abortus incompletus* ili *missed abortion*. Javlja se krajem prvog tromjesječja trudnoće, najčešće 12.-tog tjedna. Učestalost djelomične HM je 1:700 trudnoća.

U oko 1-2% slučajeva placenta može imati različit broj kromosoma u odnosu na embrij; embrij ima normalan broj kromosoma, a tkivo placente je trisomično. Ovakvo se stanje naziva placentalni mozaicizam (1). Koristi se u prenatalnoj dijagnostici tijekom trećeg tromjesječja trudnoće.

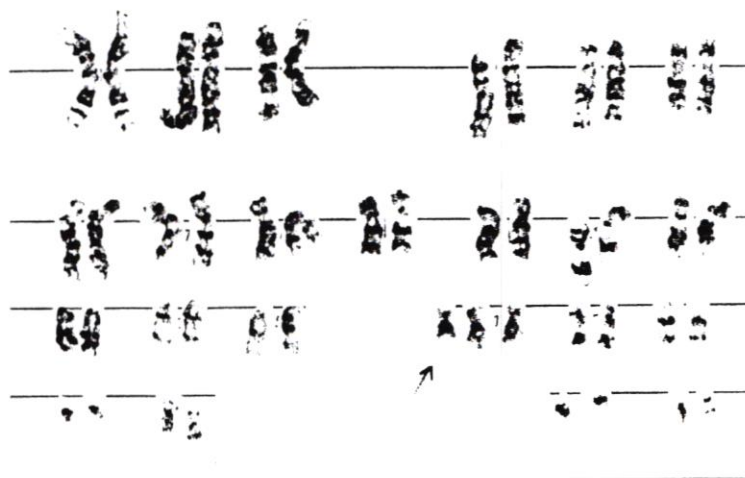
Od 1 000 000 začeća, 150 000 završi kao spontani pobačaji, dok ih 75 000 ima kromosomske aberacije. Abnormalnost kromosoma fetusa, koja je nespojiva sa životom, javlja se u 25 do 60% pobačaja.

Aneuploidija je najčešći oblik nenormalnosti broja kromosoma u ljudi. Prisutna je u 0,3% novorođenih i otprilike 50% spontanih pobačaja. Glavni je uzrok razvitka mentalne retardacije i gubitka trudnoće. Prvi put je opisana prije 35 godina. Usprkos velike učestalosti, kliničke važnosti i snažnog utjecaja na reprodukciju ljudi uzroci nastanka, posebice vanjski čimbenici, su nepoznati. Ipak, razvitkom rekombinantne tehnologije DNA, mogućnostima istraživanja na zamecima i pobačenom materijalu pokazano je da je većina trisomija majčinog podrijetla, uzrokovana, u majci, nerazdvajanjem kromosoma (kromatida) vezanim uz stariju životnu dob. Poremećeni su i broj i mjesta *crossing over*-a (1).



Slika 4. Učestalost promjena broja kromosoma na 1 000 000 začeca.

Svi kromosomi nisu jednako podložni nerazdvajanju tijekom mejoze. Ovom su procesu, izgleda, najpodložniji kromosom 16 i, općenito, akrocentrični kromosomi. Sklonost pojedinih kromosoma aneuploidiji određuju dužina kromosoma, dužina pericentričnog dijela, dužina ponavljajućih dijelova kromosoma i položaj centromere (1).



Slika 5. Trisomija 16

NAJČEŠĆE KROMOSOMSKE PROMJENE U SPONTANIM POBAČAJIMA

kromosom	%
1	-
2	4,48
3	1,12
4	1,90
5	-
6	0,53
7	3,72
8	3,72
9	3,72
10	2,13
11	-
12	-
13	2,36
14	6,05
15	10,04
16	32,11
17	-
18	5,48
19	-
20	1,90
21	12,54
22	9,76

Dob majke ne djeluje jednako, u smislu pojave aneuploidije, na sve kromosome. Npr., na velike kromosome grupe A (kromosomi 1-3) i B (kromosomi 4 i 5) dob majke ima mali učinak. Suprotno tome, učestalost aneuploidije kromosoma 16 prati porast životne dobi majke linearno, a učestalost aneuploidije kromosoma 21 pojačava se eksponencijalno s životnom dobi majke. Učestalost aneuploidije pojedinih kromosoma ovisi i o vremenu događanja nerazdvajanja kromosoma: prva ili druga mejotska dioba, mitotičko nerazdvajanje. Učestalost nerazdvajanja kromosoma (prva mejotička dioba) u izravnom su pozitivnom odnosu s životnom dobi majke; najčešće zahvaćaju autosome - trisomija autosoma. Aneuploidije spermija odnose se uglavnom na gonosome. Posljedica su nerazdvajanja kromatida tijekom druge mejotske diobe; u izravnoj su pozitivnoj vezi s životnom dobi oca. Trisomija kromosoma 18 jedina je posljedica greške nerazdvajanja autosoma oca tijekom II mejotske diobe.

Trisomija 47, XXY posljedica je viška jednog očevog kromosoma zbog greške nerazdvajanja tijekom prve mejotske diobe. Općenito, aneuploidija se javlja u oko 2-4% spermija, a vezana je uz stariju životnu dob. Aneuploidija je češća u žena. Javlja se u čak 8,6% oocita i, kao i kod muškaraca, povezuje se sa starijom životnom dobi majki. Česte su zbog nerazdvajanja kromatida u drugoj mejotskoj diobi.

Ove promjene pokazuju da konstitucijska aneuploidija nastaje pod utjecajem mnogostrukih mehanizama koji djeluju na: 1) vrijeme i narav stvaranja greške i u jajnoj stanici i u spermiju, 2) vrijeme nastanka nerazdvajanja – prva ili druga mejotska dioba, mitotičko nerazdvajanje, i 3) selekciju nekih specifičnih kromosomskih aneuploidija kroz embrionalni razvoj (1).

Na stvaranje pogrešaka kromosoma općenito, a posebice aneuploidija, utječe i rearanžman kromatinskih niti jezgre u interfazi. Važan mehanizam rearanžmana je fosforilacija histona 3 (H3). Započinje nepravilno u pericentromeričnom heterokromatinu u kasnoj G2-fazi interfeze diobe stanice i traje sve do početka kondenzacije kromatinskih niti kojima će se pretvoriti u kromosome kakvi se vide u profazi. Znači da postoji točan prostorni i vremenski odnos između H3-fosforilacije i početnog stadija kondenzacije kromosoma (1).

Trisomija kromosoma 2 najčešće je očeva podrijetla, dok trisomija kromosoma 7 nastaje postzigotično. Embriji s trisomijom očeva podrijetla pobaćuju se ranije od onih s trisomijom majčinog podrijetla. Vjerojatno stoga što aneuploidija očevog podrijetla snažnije djeluje na embrionalni stadij naročito podložan odbacivanju zametka. Ispitivanja na oocitima nakon IVF-e su pokazala, da na razvoj oocite nakon oplodnje djeluju različiti unutrašnji i vanjski čimbenici, kao npr. količina kisika u folikularnim stanicama. Ovaj je čimbenik udružen s nižim vrijednostima adenozin trifosfata (ATP) i smanjenjem unutarstanične vrijednosti pH tijekom metafaze II stadija oocite. U takvim se oocitima često događa aneuploidija, različite patološke promjene citoplazme, a imaju i slabiji razvojni potencijal (1).

Za sada nisu poznati svi uzroci mejotskog nerazdvajanja i nastanka aneuploidija. Istraživanja pokazuju da su potrebne dvije promjene (*two hits* model), koje u konačnici dovode do mejotskog nerazdvajanja. Prva nastupa tijekom profaze I "osjetljivog" bivalenta, a druga u metafazi I ili II.

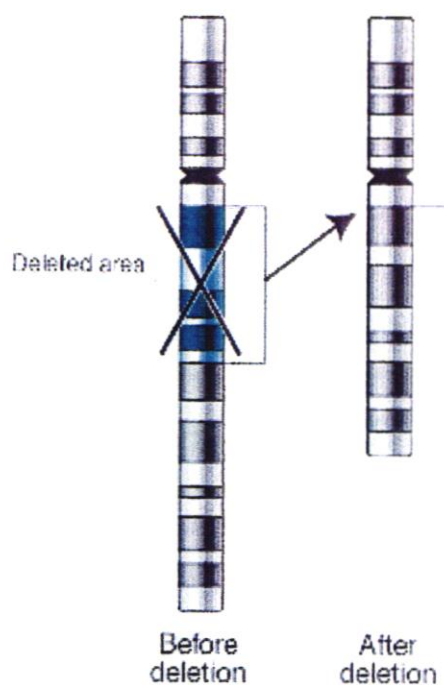
Kromosomi se prikazuju raznim metodama bojanja kao što su: *G*; *GTG*; *Q* (florescencija); *C*; *R-pruganje*; *High resolution banding* prometafazni kromosomi; *T*-(AgNO₃); *SCE* (*sister chromatide exchange*) izmjene sestara kromatida za ispitivanje mutageneze; *Fragilnost kromosoma*; FISH fluorescentna in situ hibridizacija.



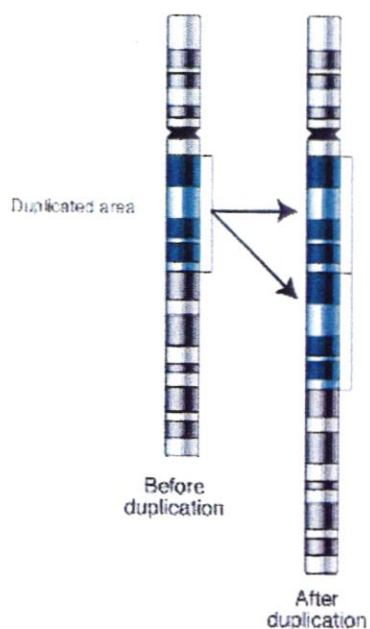
Slika 6. 1. Q (florescencija); 2. GTG; 3. R, 4 i 5. C-pruge

Nomenklatura u citogenetici (ISCN) (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature)

t	translokacija
ins	insercija
inv	inverzija
del	delecija
dup	duplikacija
i	izokromosom
r (ring)	prstenasti kromosom
der	derivirani kromosom
mar	marker kromosom
add	dodatak



Slika 7. Shematski prikaz nastanka delecije (del)

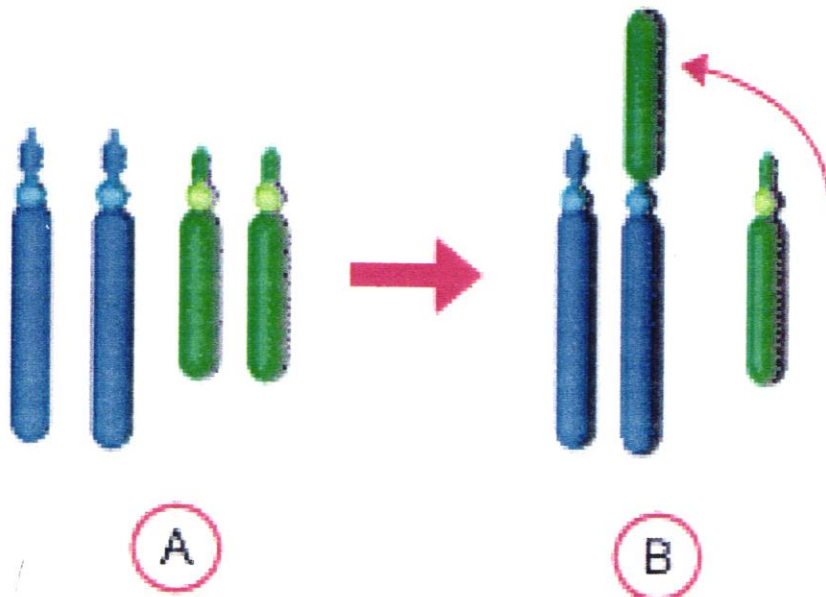


Slika 8. Shematski prikaz nastanka duplikacije (dup)

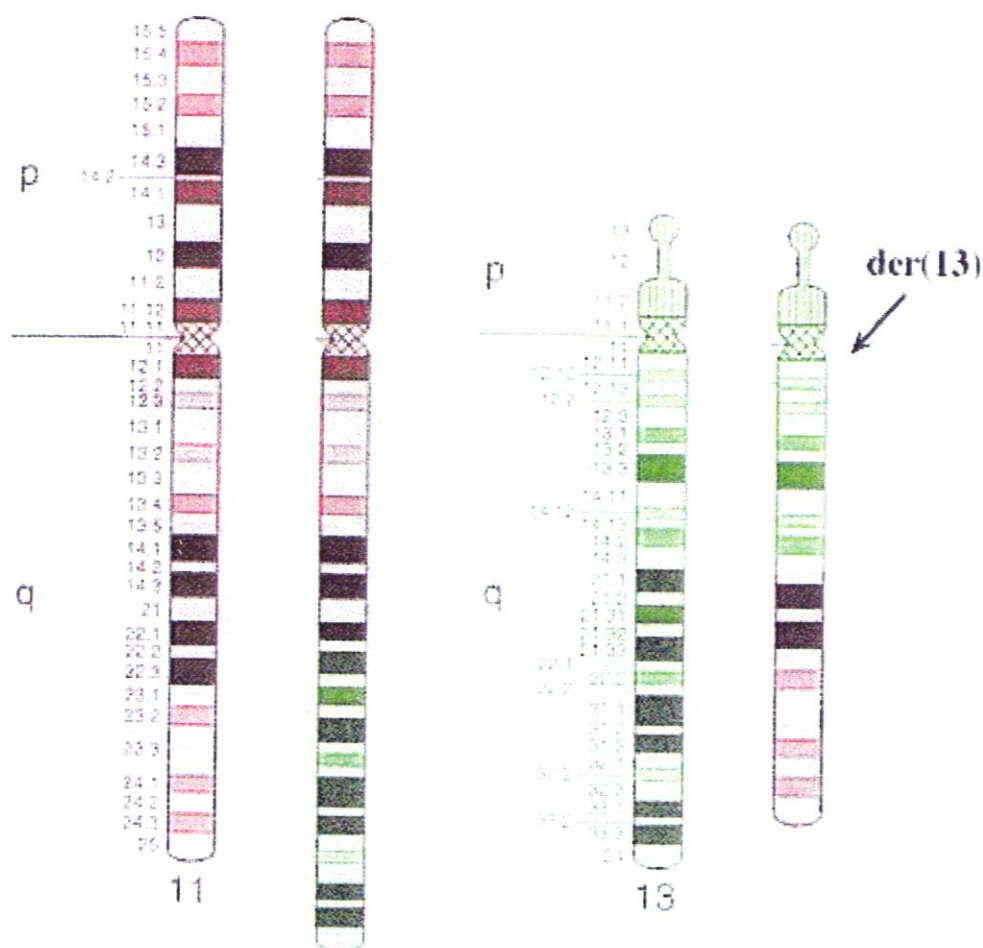
Euploidija ($2n$): modalni broj, aneuploidija $>$ ili $<$ od $2n$. Monosomije, trisomije, poliploidije, hiperploidije, hipoploidije.

Intrakromosomske promjene: delecija, inverzija, prstenasti kromosom, izokromosom

Interkromosomske promjene: translokacije (recipročne, Robertsonova, balansirana, nebalansirana).



Slika 9. Shematski prikaz nastanka Robertsonove translokacije



$t(11;13)(q21;q14.3)$

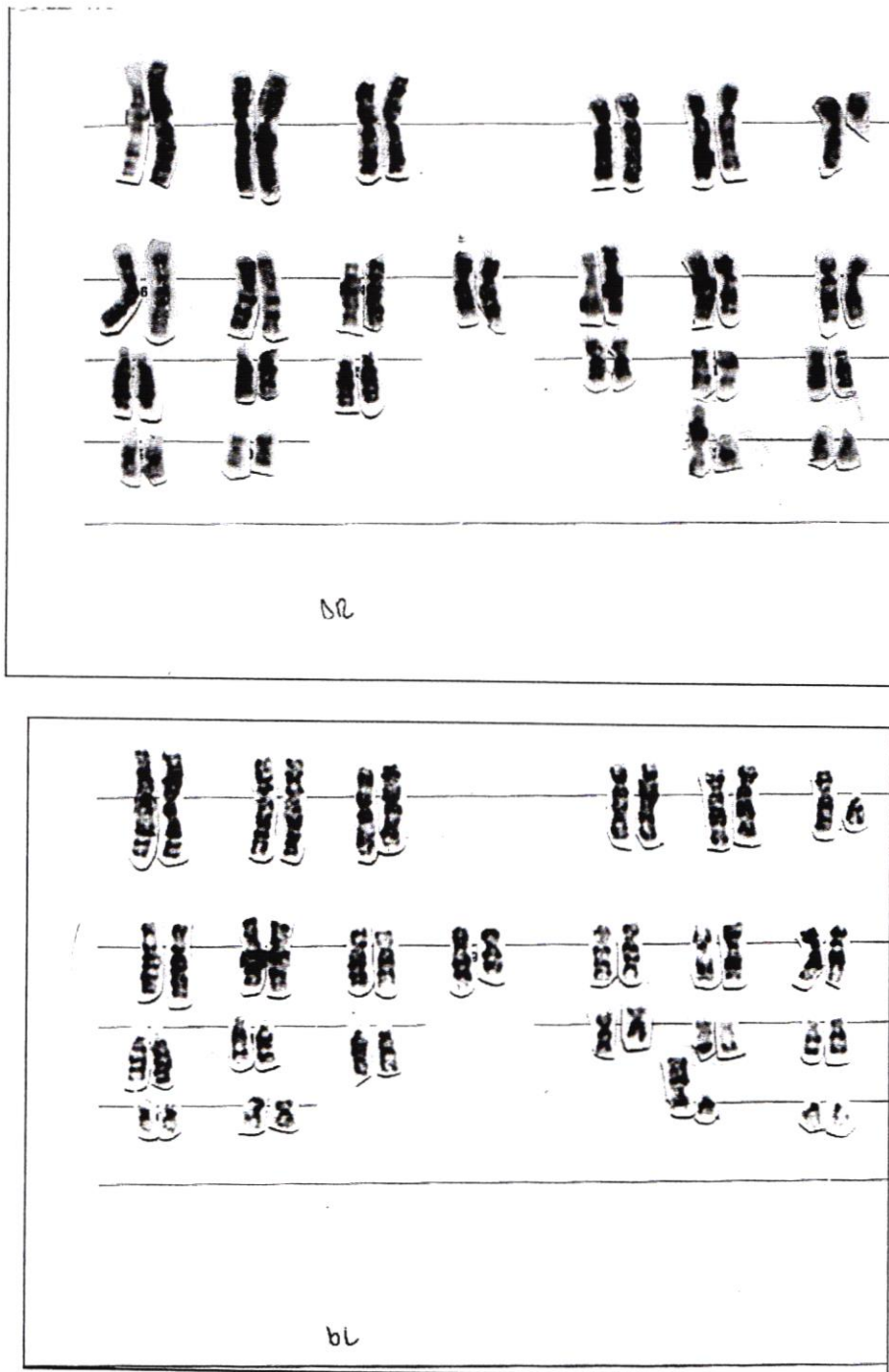
Slika 10. Shematski prikaz nastanka recipročne translokacije 11; 13

Ako nema manjka kromosomskih segmenata aberacija je balansirana.

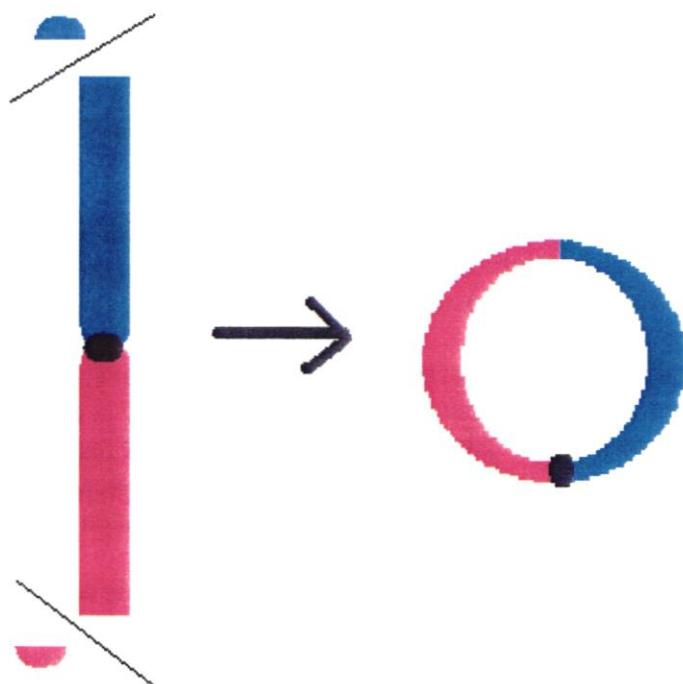
Ako dovodi do viška ili manjka kromosomskog materijala ona je nebalansirana

Nosioci balansiranih strukturnih aberacija, heterozigoti, nose visoki rizik za stvaranje potomaka s nebalansiranim promjenama.

Genetička informacija postala je bitni dio svakog suvremeno vođenog stručnog rada, posebno vezanog uz probleme budućih roditelja.



Slika 11. Primjer recipročne translokacije (BR) balansirane (X; 21) i nebalansirane (BL)



Slika 12. Shematski prikaz nastanka prstenastog kromosoma

Ponekad rizik od 1 % da se dobije nenormalno potomstvo može osobi koja traži pomoć biti veliki, dok za drugu osobu ni postotak od 50 % nije dovoljno velik razlog da se odrekne potomstva. Koga uputiti na genetičku informaciju:

1. Osobe iz rizičnih obitelji
2. Osobe čija su djeca rođena s nekom nasljednom bolešću ili kongenitalnom anomalijom.
3. Osobe s nekom kromosomopatijom ili enzimopatijom u obitelji
4. Mirni nosioci kromosomske aberacije ili recesivne nasljedne bolesti (heterozigoti)
5. Osobe s bolesnim djetetom iz predhodnog braka
6. Osobe s ponovljenim spontanim pobačajem
7. Osobe s primarnom ili sekundarnom amenorejom
8. Osobe s neodređenim vanjskim spolovilom
9. Osobe starije od 35 godina ženske i 35.g. muške koje žele potomstvo.
10. Sterilne ili infertilne osobe
11. Bračni parovi krvno povezani
12. Osobe izložene nekim vanjskim činioicima
13. Osobe iz braka gdje se javio defekt neuralne cijevi
14. Bračni par s mrtvorođenim djetetom

Deset posto trudnoća nosi indikaciju za ranu prenatalnu dijagnozu (RPD).

Metode u prenatalnoj dijagnozi su:

1. Amniocenteza ili biopsija korion frondoza

2. Kordocenteza

3. Ultrazvuk

Ranu amnicentezu (RAC) ginekolog vrši od 14.- 18. tjedna gestacije, a služi kod prenatalne dijagnoze kromosomski aberacija i monogenetskih bolesti. Korion frondoza metoda se vrši od 8.- 12. tjedna gestacije, a vrši se uz ultrazvučnu kontrolu transabdominalno ili aspiracijskom kanilom vaginalno.

Ultrazvuk se naročito koristi za utvrđivanje raznih anomalija ploda. Kordocentezom se dobije uzorak krvi ploda za analizu: kromosoma ili DNA. Rana prenatalna dijagnoza (RPD) upotrebljava nekoliko metoda i pomaže kod genetičkog informiranja trudnice.

Probir iz seruma trudnice: Za probir na anomalije središnjeg živčanog sustava (NTD) i kromosopatije služimo se vrijednostima AFP (alfa feto proteina) iz krvi trudnice ili urina i/ili plodove vode, kao i vrijednosti hCG, nekonjugiranog estriola (triple test), katkad se tim testovima doda i inhibin A pa je onda to "quadruple screen", pojedinačna mjerenja uzeta u obzir s dobi majke, visinom, težinom majke, tjednima trudnoće mogu se prikazati u obliku kompjutorskog izračuna mogućeg rizika.

U posljednjim godinama još jedan test se dodaje i može se raditi prije od 15-18 tj. To je PAPP-A test.

Alfa –feto protein (AFP) se stvara u dijelu uterusa koji zovemo yolk sac (žumanjčana vreća) i u fetalnoj jetri, ali jedan dio AFP nalazi se i u majčinoj krvi. U oštećenju neuralne cijevi (NTD-engl- neural tube defect), koža fetusa nije intaktna te velika količina fetalnog AFP prelazi u majčinu krv. Kod Downovog sindroma je smanjena količina AFP u majčinoj krvi tj. serumu, vjerojatno jer je žumanjčana vreća manja manja kao i fetus.

Primjeri visokog MSAFP: NTD, exomphalocella, gastroskiza, cystae ili hygromi, missed ab., više plodova, oligohidramnios, nefrotski sindrom finski tip, placentarna krv, bez abnormalnosti

Primjeri niskog MSAFP: Intrauterini zastoj rasta, malnutricija, oštećenje mozga do 23 tj. kromosopatije

Estriol je hormon kojeg stvara posteljica, uzimajući tvari koje stvara fetalna jetra i adrenalne žlijezde. Estriol je smanjen kod trudnoće s Downovim sindromom. Test na estriol ne mora biti uključen u sve testove probira trudnoće, ovisi o laboratoriju.

Humani korionski gonadotropin je hormon kojeg stvara posteljica, a upotrebljava se za utvrđivanje trudnoće. Mali dio hormona, koji se zove beta podjedinica je povećan kod trudnoće s Downovim sindromom.

Inhibin A je protein kojeg luči ovarij, a određen je za inhibiciju produkata hormona FSH pituitarne žlijezde. Razina inhibina A se povećava u krvi majke tijekom trudnoće s fetusom sa Downovim sindromom.

PAPP-A što znači (engl: pregnancy associated protein A), stvara se preko novo oplodjenog jajašca. U prvom trimestru, niske vrijednosti ovog proteina se nađu kod trudnoća sa Downovim sindromom.

Vrlo važan parametar za procjenu testa je dob fetusa tj. gestacijska starost, koju treba procijeniti ultrasonografski. Testovi se uspoređuju prema normalnoj gausovoj krivulji predhodno ispitane

populacije. Srednja vrijednost za normalnu populaciju zove se medijan te se taj dio opisuje kao Multiples of the Median (MoM). Zato su srednje vrijednosti označene kao 1, 0 MoM. Trudnoća s Downovim sindromom ima niže vrijednosti AFP i estriola, pa će vrijednosti biti niže od prosjeka, tj. manje od 0,1 MoM. hCG u Downovom sindromu će biti većih vrijednosti od 1,0 MoM. Rezultati će biti ovako izračunati ili će se prikazivati cijeli rizik složen prema softverskom programu. Kod izračunavanja rizika smatra se da ako je on manji od 1: 250 da se rodi dijete sa SD onda je nizak a ako je viši od 1: 250 je visok.

Kod računanja rizika dob manje ima veliku važnost. Npr. Tripl test pokaže normalan rizik od MoM 1,0, ako žena ima 25 godina rizik joj je 1: 1100 do 1: 440, a ako žena ima 35 godina njen rizik postaje 1: 250 do 1: 1000, a ako ima 45 godina rizik raste od 1: 20 do 1: 80. Sada slijedi primjer kada je to trudnoća s trisomijom 21. Ako je žena u dobi od 25 godina njezin skrining tests će biti od 1: 1100 do 1: 275. Kod žene od 36 godina od 1: 250 na 1: 62, a za ženu od 45 godina od 1: 20 na 1: 5.

Tako se vidi kako je dob majke i dalje najvažnija za izračun rizika i kada se određuje s krvnim probirom.

Kada se izvede test s četiri parametra ali i s tri parametra ima 5-8 % lažno pozitivnih, a isto tako 35-40% lažnonegativnih, tako da će se isključivo s probirom iz seruma trudnice otkriti samo 80% fetusa s Downovim sindromom.

Kako rizik je rizik za trisomiju 21 kod žena s 35. godina života ili više veći od 1: 250 smatra se potrebnim svim trudnicama u toj dobi ponuditi taj test.

Kroz posljednje 2 dekade skrining se radio između 15 i 20 tjedna trudnoće, ali sada češće između 16 i 18 tjedna trudnoće. Ipak to donosi probleme oko odluke o rezultatu, pa se u posljednjih 6 godina preporuča napraviti probir u prvom tromjesečju i tako omogućiti roditeljima dovoljno vremena kada je test pozitivan. Testiranje u prvom trimestru s četiri parametra serumski marker PAPP-A i ultrazvučno mjerenje kožnog nabora na vratu, nosi skoro i do 95% posto točnosti za Down sindrom i samo 5% lažno pozitivnih nalaza amniocentezom.

Ultrazvučni probir: glavna korist od ehosonografskog probira je potvrda gestacijske dobi fetusa, što je mnogo bolje od izračuna prema majčinom menstrualnom ciklusu. Druga korist je nalaz anomalija kod fetusa kao što je npr. srčana greška ili anomalija tankog crijeva, što omogućava vrlo ranu kiruršku korekciju nakon poroda. Pored toga uočilo se da nakupina tekućine na vratu kod fetusa s Downovim sindromom daje mogućnost mjerenja nauhalnog nabora, pa čak posebnom edukacijom u mjerenju ili softverskim programom mogućnost standardizacije tog mjerenja. Ipak samo osobe s posebnom edukacijom za fetalni ultrazvuk su u stanju dobro proračunati taj rizik zajedno s drugim gore navedenim parametrima.

Ima još nekih ultrazvučnih znakova koji se mogu povezati s Downovim sindromom ili drugim kromosopatijama kao što su ehogenost crijeva, ehogeno područje unutar srca, proširenje bubrega (pyelctasis), ali ti markeri se nađu i kod zdrave djece te je vrlo rizično se samo na osnovu toga odlučiti na dijagnozu. Specifičniji je marker mjerenje fetalnog nosa, tj. fetus sa SD imaju kraći nos. Ipak i dalje treba naglasiti da je kombinacija ultrazvuka s drugim testovima probira samo ukazivanje na moguću dijagnozu a ne potvrda dijagnoze te je jedina potvrda dijagnoze ispitivanje fetalnih kromosoma.

PRAKTIČKI ASPEKTI GENETSKOG SAVJETOVANJA, HIIM, Zagreb, 05. i 06. 7. 2007.

U ranim devedesetim Nicolaidides je uveo probir za trisomiju 21 uz pomoć fetalnog nuhalnog nabora, mjereći ga od 11-13 (+6) tjedana gestacije. Davne 1866 Longdon Down je opisao fenotipske karakteristike Downovog sindroma s zaravnjenim licem, udubljenim korjenom nosa, malim nosom i povećanim naborom kože na vratu.

Dok je otkrivanje trisomije 21 30 % za probir samo s majčinoj dobi, 65 % uz triple test, a kombinacija nuhalne transluminacije zajedno s majčinom dobi 75%, može se popeti do 90% ako se sve kombinira i s serumskim testovima (serumski B-humani chorionski gonadotropin i PAPP-A) u 11-13 (+6) tjedana. Dodatni «meki, engl : soft» markeri u prvom trimestru kao što je veličina nazalne kosti, Doplerska brzina stvaranja valova u ductusu venosusu i trikuspidalna regurgitacija, dužina humerusa i femura, povećana crijeva, hipoplastični peti prst (klinodaktilija): može povećati ratu otkrivanja trisomije 21. I neke druge kromosomopatije se mogu tako otkriti kao što je trisomija 13 i 18 i monosomija X te velike srčane greške i drugi genetski sindromi.

Amniocenteza: Ona služi za uzimanje amnijske tekućine iz majčinog uterusa. Iglom koja se uvlači kroz majčin trbuh uz ehosonografski nadzor. Otprilike uzima se maksimalno 20 ml tekućine i potrebno je 21 dan da se uzgoje fibroblasti i nakon toga se mogu analizirati kromosomi. Amniocenteza se obično izvodi između 14 i 18 tjedna gestacije, neki mogu to izvršiti i oko 13 tj. Nuspojave su grčevi, krvarenje, infekcija i istjecanje plodne vode. Postoji povećan rizik za spontani pobačaj od onog u općoj populaciji. Ako je on u općoj populaciji od 2-3%, kod amniocenteze se povećava za 0,5-1%. Amniocenteza se ne prporuča prije 14 tjedna gestacije jer je veća vjerojatnost za komplikacije.

Tko bi trebao izvršiti amniocentezu: žene koje imaju rizik za rođenje djeteta sa Downovim sindromom koja je veća od 1: 250. Ako se upotrijebi za račun vrijeme kada se testira rizik je veći od onog kod poroda, jer mnogi plodovi s Downovim sindromom se pobace u vrijeme testiranja.

Dob (godine)	Učestalost fetusa s Downovim sindromom uspoređeni s normalnim trudnoćama od 16 tjedana gestacije	Učestalost rođenih s Downovim sindromom uspoređeni s normalnim porodima
15 - 19	----	1 / 1250
20 - 24	----	1 / 1400
25 - 29	----	1 / 1100
30 - 31	----	1 / 900
32	----	1 / 750
33	1 / 420	1 / 625
34	1 / 325	1 / 500
35	1 / 250	1 / 350

PRAKTIČKI ASPEKTI GENETSKOG SAVJETOVANJA, HIIM, Zagreb, 05. i 06. 7. 2007.

36	1 / 200	1 / 275
37	1 / 150	1 / 225
38	1 / 120	1 / 175
39	1 / 100	1 / 140
40	1 / 75	1 / 100
41	1 / 60	1 / 85
42	1 / 45	1 / 65
43	1 / 35	1 / 50
44	1 / 30	1 / 40
45 i starije	1 / 20	1 / 25

Horion frondosum tehnika (CVS) Chorionic Villus Sampling: U ovom zahvatu umjesto plodove vode uzima se komadić tkiva posteljice (tkz horionski sloj). Te stanice sadržavaju fetalne stanice koje se mogu kromosomski ispitati. Ove se stanice mogu na isti način kao i amniocenteza uzimati ali i vaginalnim putem.

CVS se izvodi između 10 i 12 tjedna gestacije. Promjene za majku su slične kao kod amniocenteze, a rizik za pobačaj nakon CVS je malo veći nego za AC, tj. povećava normalni rizik za pobačaj na 3-5%. Studije su pokazale da što ginekolog češće radi CVS to je rizik za pobačaj manji. Indikacije za CVS su iste kao i za AC.

RIZIK U OPĆOJ POPULACIJI

- Da se rodi dijete s kongenitalnom anomalijom 1: 30
- Da se rodi dijete s ozbiljnim fizičkim ili mentalnim hendikepom 1:50
- Da trudnoća završi spontanim pobačajem 1:8
- Da nastupi perinatalna smrt 1: 30 do 1: 100
- Da dijete umre u prvoj godini 1:150
- Da je bračni par sterilan 1: 10

Najčešći klinički simptomi uz kromosomske aberacije su: mentalna retardacija, somatska retardacija, malformacije odnosno deformacije lica, šaka, stopala, unutrašnjih organa, abnormalnosti vanjskog spolovila, patološki dermatoglifi.

Mentalna retardacija se javlja kod aberacija svih autosoma i gonosoma osim kod monosomije X (s.Turner), kao kod XYY, XXX. A kod XXY se javlja promjena ponašanja. Nepravilan somatski razvoj izražen u obliku nepravilne porođajne mase i porođajne dužine.

Postupci u genetičkom savjetovalištu (informaciji)

A) pronalaženje rizika ponavljanja bolesti, specifičnog za osobu odnosno obitelj.

B) objašnjenje rizika

C) prijedlog racionalnog plana u svezi s postupkom, odnosno odlukom o rješenju postojećeg problema.

D) praćenje osobe ili obitelji kako bi se vidila ispravnost informacije kao i neposredni učinak na onoga komu je data.

Da bi se genetička informacija mogla odgovorno dati potrebno je ispuniti određene **Preduvjete.**

1. Postaviti točnu dijagnozu
2. Način nasljeđivanja s tim i rizik ponavljanja koji je za svaku pojedinu obitelj različit.
3. Prognoza, mogućnost života, kvaliteta života, terapija .
4. Ako je potrebno obaviti kliničko i laboratorijsko ispitivanje i drugih članova obitelji.
5. Roditeljstvo novim medicinskim metodama ili adopcijom.
6. Medicinski indiciran pobačaj. Obitelj je potrebno upoznati s metodom i rizikom terapijskog prekida trudnoće, kao i mogućnosti kontracepcije.
7. Etička komisija

Interpretacija rizika može imati vrlo subjektivnu notu.

Definitivnu odluku prepustiti obitelji, nakon provođenja gore navedenih postupaka.

Ponekad i rizik od 1 % za nenormalno potomstvo može osobi koja traži pomoć biti velik.

Dok za drugu osobu ni postotak od 50% nije dovoljno veliki razlog za odreći se potomstva.

Rizik od 5 % malen, od 10 % srednji, a onaj iznad 10 % visok.

Vrste trisomije 21, regularni tip zbog nerazdvajanja, translokacijski tip, mozaični tip.

Naslijedni oblici pojave u obitelji

Za obitelj koja ima dijete sa SD rizik je statistički značajniji u slijedećoj trudnoći, nego u općoj populaciji ako je majka bila mada ili ako je bilo u očevoj obitelji djece sa SD..

Ako je majka mlađa od 35.godina rizik je veći za 10-20 X.

Ako je dob supružnika veća od 35. god., rizik se povećava.

U oba slučaja potrebno je izvršiti prenatalnu dijagnozu AC (16-18 tj.) ili CHF (8-12tj).

VROJATNOST ZA SRODNIKE U OBITELJIMA S TRANSLOKACIJSKIM SINDROMOM DOWN

Tip translokacije srodnika (%)	Roditelj nosilac uravnotezene translokacije	Rizik	za
14/21	majka	10	
	otac	2,5	
	nijedan od roditelja	<1	nizak
21/22	jedan roditelj		kao kod
14/21			
	nitijedan roditelj	<1	nizak
21/21	jedan roditelj	100	
	nitijedan roditelj	<1	
nizak			

KRITERIJI ZA PRENATALNU DIJAGNOZU

1. Bolest dovoljno teška da je vrijedno prekinuti trudnoću
2. Liječenje nedostatno ili nemoguće
3. Prekid trudnoće prihvatljiv za oba bračna partnera
4. Siguran test za prenatalnu dijagnozu dostupan
5. Genetski rizik za trudnoću dovoljno visok

Što je to genetski savjet to je proces tijekom kojeg se ispituje obiteljska anamneza i medicinski nalazi, određuju se genetski testovi, procjenjuju testovi već učinjeni i pomaže se roditeljima u postupcima za sljedeću trudnoću

Neke bolesti se mogu naslijediti samo od jednog roditelja npr. Huntingtonova bolest, Marfanov sindrom to zoveo autozomno dominantnim načinom nasljeđivanja. Veliki broj bolesti nasljeđuje se i od majke i od oca kao npr. Cistična fibroza, dok roditelji nisu bolesni (autosomno recesivni tip nasljeđivanja). Druge genetske bolesti kao npr. Downov sindrom nisu nasljedne nego su nastale greškom u diobi stanica tijekom oplodnje ili neposredno nakon oplodnje.

Genetsko testiranje dovodi do saznanja o postojanju ili nepostojanju malformacije gena ili kromosoma, a objašnjenje takvog stanja zahtjeva genetsko savjetovanje.

Prije razgovora s genetskim savjetnikom potrebno je informirati se unutar obitelji o spontanim pobačajima, mrtvorodenim, nekim nasljednim bolestima, ponijeti sve nalaze vezane uz predhodne komplicirane ili neuspjele trudnoće, bolesti, sve ovo se odnosi i na muškarca i na ženu. Nakon pregleda svih nalaza, crtanja obiteljskog stabla možda će trebati napraviti još neke pretrage te nakon toga dobiti ćete informaciju o riziku ili vjerojatnosti da se stanje zbog kojeg ste zatražili genetski savjet ponovi. Nakon savjetovanja sami odlučujete o daljnjim postupcima zajedno s članovima vaše uže obitelji.

Ako se ustanovi da imate veliki ili značajni rizik za ponovni problem možete se odlučiti na

1. preimplantacijsku dijagnozu koja se postiže kada se jajašce oplodi in vitro izvan uterusa te se promjena testira kod 8- staničnog ploda u fazi blastociste, te se zdrava blastocista može implantirati u uterus i dalje normalno razvijati.
2. na donaciju sperme ili jajašca
3. na posvajanje djeteta

Ako se tijekom prenatalne dijagnoze uspostavi da će dijete biti teško oštećeno, najviše mentalno retardirano možete odlučiti:

1. pripremiti se za dijete i suočiti se sa svim problemima jer je to vaše dijete
2. ako je moguće napraviti operacijski zahvat na fetusu in utero što je vrlo kompleksno i komplicirano i za plod i za majku
3. odlučiti se na medicinski indiciran pobačaj kada je to medicinski opravdano

Genetski savjetnik ili u ovom obliku bolje informator može vam sniti o drugim obiteljima koje su imale slične ili iste slučajeve te navesti njihove odluke, ali on ne može za vas to odlučiti to odlučujete sami. Dobar genetski informator zna da što je dobro za jednu obitelj nije i za drugu makar imali iste probleme. U ovom momentu važna je pomoć cijele obitelji, zajednice, za donošenje odluke ili rješenje problema nakon poroda.

Primjeri:

1. Mlada majka nosilac balansirane Robertsonove translokacije 13; 14 rodila je jedno dijete s trisomijom 13 (sindrom Patau), tek tada se ustanovilo da je mirni nosilac Robertsonove translokacije. Prvu trudnoću izgubila je u 10 tjednu trudnoću, ali jedan pobačaj nije značio potrebu kromosomske analize. U svakoj slijedećoj trudnoći potrebna je AC zbog potvrde kromosomskog statusa ploda.
2. Mlada zdrava majka i mladi zdravi otac dobili su prvo dijete s trisomijom 21 translokacijskog oblika 21; 21, nakon kariotipizacije roditelja doznajemo da su oba zdrava, znači to je de novo translokacija nastala u trudnoći s ovim djetetom. Slijedeća trudnoća nosi malo veći rizik nego kod zdrave populacije te je potrebna AC.
3. Mlada trudnica s 27 godina i suprug 30 godina: zbroj godina = $57 : 2 = 28,5 < 35$, na genetskom savjetovanju zbog jednog djeteta s trisomijom 21 u obitelji. Tijekom ispitivanja doznajemo da je majka tog djeteta, inače tetka suprugova, imala 40 godina kada je rodila dijete sa Downovim sindromom. Zaključujemo da je rizik za ovu mladu obitelj kao u zdravoj populaciji te savjetujemo triple test uz ultrazvučni skrining na nuchalni nabor i mjere nosne kosti. Tetsovi pokazuju da je rizik unutar zdrave populacije za dob i tjedne trudnoće. Rađa se zdravo dijete.
4. Bračni par dolazi na genetski savjet jer je supruga trudna 12 tjedana s četvrtim djetetom. Majka ima 36 godina a otac 40 godina. Zbroj godina je $76 : 2 = 38$ tj $>$ od 35 te je indicirana analiza plodne vode. Obitelj zdrava nema podataka o spontanim pobačajima, mrtvorodenima, mentalnim retardacijama. Tijekom prvog razgovora doznajemo od majke, otac nije prisutan, da nije spremna prekinuti trudnoću ni u kojem slučaju. Savjetujemo probir iz seruma majke, te ultrazvučni pregled s Doplerom. Nakon izvršenih testiranja rizik za kromosomopatiju je u području od 1: 100 i 1: 250, nakon ponovnog razgovora u genetskom savjetovalištu, sada su prisutni i otac i majka odluču se na AC koja pokaže da se radi o Klinefelterovom sindromu 47, XXY, što nije indikacija za medicinski indiciarni pobačaj. Rađa se dječak sa znakovima koje smo očekivali, redovito se kontrolira te samo roditelji znaju za njegovu kromosomsku promjenu, upoznati su s problemima koji će nastupiti u pubertetu. Žive u malom mjestu i važno im je mišljenje okoline.
5. Mlada trudnica upućena je na genetsko savjetovanje u 15. tj. trudnoće jer je navela da u obitelji ima mentalno retardiranu osobu. Uzme se obiteljsko stablo u miru porazgovara s trudnicom, koja je vidno uplašena, pita o potrebi genetske analize, amniocenteze itd. Trudnoća se prati uredno, UZV nema znakova za neku anomaliju. Trudnica nije upoznata s naravi mentalne retardacije kod te osobe (to je daleki rođak njenog supruga kojeg nema na genetskom savjetu). Nakon razgovora i crtanja obiteljskog stabla, zaključujemo da je potrebno doznati kakva je to mentalna retardacija da bi eventualno mogli dati neki odgovor. Naučuje se slijedeći tjedan (16. tj.), dolazi i suprug. Donose izvod iz upitnika za postizanje invalidnosti za tu osobu. Iz priloženog se vidi da je urednog fizičkog izgleda, da slabo hoda, slabo govori, te da je vjerojatno oštećen u porodu. Mlada se obitelj umiri te preporuči probir na kromosomopatije iz seruma majke uz ultrazvučni pregled. Savjetuje se da nakon ove trudnoće pokušaju ispitati do kraja o kojoj se mentalnoj retardaciji radi kod rođaka, da se ne ponavljaju ovakvi šokovi tijekom trudnoće. Napomena o mentalnim retardacijama, anomalijama i drugim nasljednim bolestima potrebno je razgovarati u

obiteljskog liječnika, upoznati obiteljskog liječnika s tim problemima te će on poduzeti genetsko ispitivanje u obitelji za pripremu budućih brakova i trudnoća kod tih obitelji s opterećenim anamnezama. Često se dešava da se te bolesti taje u obitelji pa je potrebno u predbračnim dogovorima prije trudnoće sve razjasniti i doznati. U 15.-16 tj. trudnoće je nemoguće sve ispitati.

6. Mladi bračni par u prvoj trudnoći dobiju dijete s Edwardsovim sindromom (trisomija 18) koje umire u 6 mj. života. Roditelji imaju uredne karitipove, te napravi djelomična druga obrada, ali opet nastupa nova trudnoća. Ne žele amniocentezu, jer su njihovi kromosomi uredni, ali rađa se dijete s translokacijskim oblikom Patauovog sindroma 13;13. Teško bolesno i mentaln retardirano dijete njeguju neizmjereno pažljivo, ali i dalje postoji strah za novu trudnoću i bilo koju aktivnost vezanu uz analizu plodovog statusa. Savjetovala se amniocenteza, CVS ili preimplantacijska dijagnoza.
7. Mladi bračni par dolazi na genetski savjet, jer su imali dva spontana pobačaja u kojima je protočnom citometrijom potvrđeno da se radilo o aneuploidnim plodovima u oba navrata. Sada je trudnoća u tijeku 7 tjedana. Predhodni pobačaji bili su u dobi od 12 i 10 tjedana. Nakon izvršenog ispitivanja doznajemo da imaju uredan kromosomski status te da su u anamnezi imali podatke o spontanim pobačajim u obitelji. U međuvremenu nastupa pobačaj trudnoće u tijeku. Nastavlja se obrada. Gensko ispitivanje potvrdi podatke iz anamneze i obiteljskog stabla majka je nosilac mutacijskog gena MTHFR na C667T te ima povećanu sklonost prema spontanim pobačajima kao i rodbina njenog oca (očeva majka, sestre i tetke). Suprug ima urinarnu infekciju te jednom spermokulturu s gram negativnim klicama. Urolog je preporučio antibiotsku terapiju. Supruga je sideropenična s niskim vrijednostima feritina.

Do slijedeći trudnoće izlijeći se upala mokraćnih puteva supruge, negativizira spermokultura, a supruzi regulira vrijednost serumskog željeza i feritina. U slijedećoj trudnoći savjetuje se oprez pema sideropeniji, upali i zatraže serumski MSAFP uz ultrazvučni skrining. Zbog pobačaja u ranoj trudnoći oprezni smo s AC.

Literatura:

1. Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF i sur. Williams Obstetrics. 20. izd. Connecticut, SAD: Prentice- Hall International INC: 1997, str. 579-605.
2. Gardner RJM, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. 5. izd. Velika Britanija: Oxford University Press; 2004, str. 22-46; 83-87; 95; 291-300; 339-359.
3. Wyrobek AJ, Aardema M, Eichenlaub-Ritter U, Ferguson L, Marchetti F. Mechanisms and targets involved in maternal and paternal age effects on numerical aneuploidy. Environ Mol Mutagen 1996, 28: 254-64.
4. Christiansen, Michael, Larsen, Severin Olesen, Nørgaard-Pedersen, Bent. Antenatal screening policies for Down's syndrome: Serum screening for Down's syndrome is better than age screening [Letters]. British Medical Journal 2002, 325(7371)2:1034-1035
5. .Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Romano A, Romano C, Gueant JL. Methionine synthase (MTR) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. Am J Med Genet A. 2003 Sep 1;121(3):219-24
6. Spencer K. Bindra R. Nix AB. Heath V. Nicolaidis KHDelta NT or NT MoM: which is the most appropriate method for calculating accurate patient-specific risks for trisomy 21 in the first trimester?.Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. 22(2):142-8, 2003 Aug

PRAKTIČKI ASPEKTI GENETSKOG SAVJETOVANJA, HIIM, Zagreb, 05. i 06. 7. 2007.

7. Recommendations for genetic counselling related to genetic testing (www.eurogentest.org).
8. ACOG Practice Bulletin. Screening for fetal chromosomal abnormalities. *Obstet Gynecol.* 109(1), Jan 2007.
9. Prenatal Screening for Down Syndrome, by Len Leshin, MD, FAAP, Copyright 1998-2002, 2007.
10. Laurie Barclay, Désirée Lie. New Guidelines Recommend Universal Prenatal Screening for Down Syndrome CME/CE ACOG *Obstet Gynecol.* 2007;109:217-228.

ULOGA KLINIČKE TERATOLOGIJE U GENETSKOM SAVJETOVANJU

Romana GJERGJA

KB «Sestre milosrdnice», Klinika za pedijatriju, Vinogradska 29, Zagreb

UVOD

Teratogeni su čimbenici okoliša koji imaju negativan utjecaj na razvoj ploda tijekom trudnoće povećavajući rizik za nepovoljan ishod trudnoće tj. veću učestalost kongenitalnih anomalija, prijevremenih poroda ili pobačaja. Teratogeni su različiti lijekovi, kemijska sredstva, virusi ili zagađenja u prirodi. Zbog svojeg nepovoljnog ishoda na trudnoće nemaju samo negativan utjecaj na užu obitelj, već na društvo u cjelini i od velikog su javnozdravstvenog značaja.

Svaka žena, u svakoj svojoj trudnoći ima 3-4% rizika za rađanje djeteta sa značajnom kongenitalnom anomalijom. Oko 10% tih anomalija povezano je s lijekovima, kemijskim sredstvima, infekcijama ili poznatim bolestima majke.

Teratogene učinke trebamo uzeti u obzir i pri genetskom savjetovanju, pogotovo diferencijalno dijagnostički kod malformacijskih sindroma, npr moramo razmišljati o rubeoli kao mogućem uzroku kongenitalne katarakte. Kongenitalne infekcije imaju neka klinička obilježja koja možemo zamijeniti s primarnim razvojnim poremećajem ili metaboličkim uzrokom, kao što su npr. usporen razvoj ploda, mikrocefalija, bolest jetre.

Neki agensi u okolini su takodjer i mutageni, kao što je ionizirajuće zračenje koje može uzrokovati oštećenje u fetusa, uzrokujući i mutacije.

Zbog toga danas koristimo prenatalnu dijagnostiku takodjer i u trudnoćama koje su izložene različitim teratogenima, a zbog toga moramo pružiti i genetski savjet odnosno procijeniti stvarni rizik u takvoj trudnoći i savjetovati o ev. prenatalnoj dijagnostici izloženog ploda i majke.

KONGENITALNE INFEKCIJE

Tablica 1. Najčešće kongenitalne infekcije s uzročnicima i kliničkom slikom

Uzročnik	Klinička slika
Rubella	Katarakta, gluhoća, kongenitalne srčane greške
CMV virus	Mikrocefalija, korioretinitis, hepatosplenomegalija
Varicella	Mikrocefalija, korioretinitis, malformacije udova
Hepatitis virus	Bilijarna atrezija (?), oštećenje jetre
HIV	Imunološka deficijencija, moguće minor dismofija lica
Toxoplasma	Korioretinitis, mikrocefalija, hepatosplenomegalija
Syphilis	Abnormalnosti kostiju lica i drugih kostiju, keratitis

Neke od ovih infekcija ćemo opisati detaljnije u daljnjem tekstu.

Kongenitalna rubeola

Program obaveznog cijepljenja u RH smanjio je broj oboljelih, ali još uvijek ima slučajeva s kongenitalnom infekcijom rubeole. Glavne malformacije opisane u kongenitalnoj rubeoli su katarakta, perceptivna gluhoća, kongenitalne srčane greške (otvoreni duktus Botali) te mikrocefalija s mentalnom retardacijom. Budući da do kongenitalne rubeole može doći bez klinički vidljive bolesti u majke, o toj infekciji treba razmišljati diferencijalno-dijagnostički u prisustvu sindromskog obrasca s gore navedenim obilježjima.

Dijagnoza virusa putem specifičnih IgG, IgM antitijela i aviditeta IgG antitijela u majke nije uvijek moguća, a kada nađemo pozitivna IgM antitijela u ploda ne mora značiti da je plod inficiran. U slučaju infekcije u ranoj trudnoći za točnu informaciju o bolesti potrebno je učiniti PCR za specifičnu virusnu RNA putem biopsije korionskih resica ili, pak u nešto kasnijoj trudnoći - amniocenteze (i krv fetusa).

Općenit podatak kojim se služimo u procjeni rizika je da infekcija u prvom mjesecu gestacije nosi rizik od 60% za malformacije, a taj rizik pada na 25% ako je plod inficiran u drugom mjesecu, te na 8% u 3. mjesecu gestacije; kasnije je rizik praktički malen. Indikacije za prekid trudnoće su jasne u ranoj trudnoći, ali je odluka teža ako je to 3. mjesec gestacije ili više.

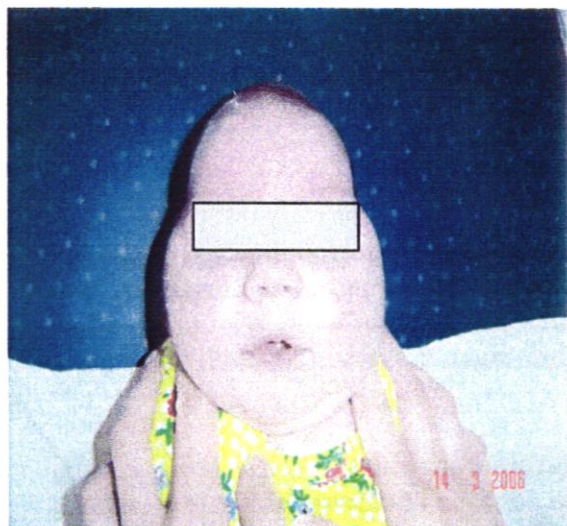
Rizik da će se i u slijedećoj trudnoći roditi dijete s kongenitalnom rubeolom je zanemariv. Najvažnije je dati točnu informaciju ženi koja je u svojoj trenutnoj trudnoći izložena infekciji ili ju je već razvila. Kada na temelju seroloških testova i podataka o cijepljenju znamo da je imunitet majke razvijen, rizik za plod je nemjerljivo malen. Kada nemamo tu informaciju, važno je odrediti postoji li infekcija ploda.

Kongenitalna citomegalovirusna (CMV) infekcija

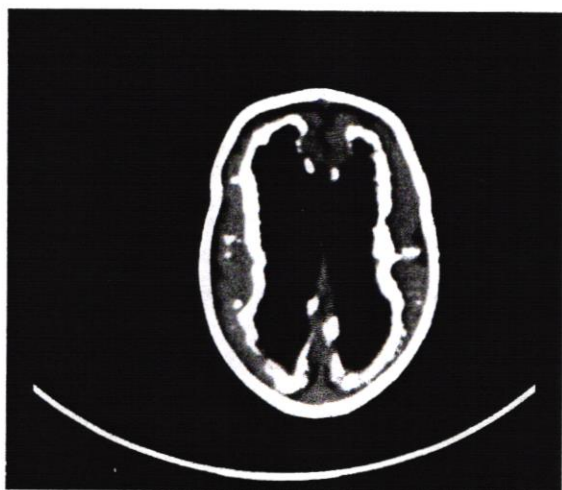
Kongenitalna CMV infekcija najčešći je uzrok kongenitalnih virusnih infekcija (oko 1% novorođenčadi). Glavni je uzrok mentalne i motorne retardacije kao i gubitka sluha i glavni uzrok

životno ugrožavajućih infekcija u imunokompromitiranih. Novija istraživanja pokazuju povezanost citomegalovirusne infekcije s aterosklerozom i karcinomom.

Infekcija nastaje transplacentarno u prvom, drugom ili trećem tromjesečju te perinatalno kontaktom s majčinim vaginalnim sekretom. Majka se tijekom trudnoće može inficirati kontaktom s izlučevinama akutno zaražene osobe (slina, suze, krv, majčino mlijeko, urin), a bolest majke je najčešće asimptomatska, a samo ponekada se očituje kliničkom slikom prehlade, curenja nosa, grloboljom. Oko 10% inficirane novorođenčadi ima citomegaličnu inkluzijsku multiorgansku bolest koju karakteriziraju: hepatomegalija >50%, splenomegalija 45%, ikterus 67%, petehije 71%, mikrocefalija 53%, korioretinitis 65% i fetalno zaostajanje u rastu 50% (slika 1). U 90% simptomatske i 10% asimptomatske novorođenčadi dolazi do sensorineuralnog gubitka sluha, poremećaja govora, korioretinitisa, atrofije n. opticus, mikrocefalije i mentalne retardacije.



Slika 1. Dojenče s kongenitalnom citomegalovirusnom bolesti uz teško oštećenje mozga te s posljedičnom mikrocefalijom, posljedičnom psihomotornom retardacijom, perceptivnom gluhoćom. Bolest smo dijagnosticirali nakon poroda serološkim pretragama i PCR detekcijom genoma virusa.



Slika 2. Nalaz CT mozga dojenčeta s kongenitalnom citomegalovirusnom infekcijom sa atrofijom moždanog tkiva, proširenim postraničnim komorama i opsežnim periventrikularnim kalcifikatima.

Dijagnostika se temelji na kliničkoj slici, detekciji specifičnih imunoglobulina uz usporedbu porasta titrova, molekularnoj dijagnostici – odnosno otkrivanju virusnog genoma pomoću PCR te izolaciji virusa pomoću CMV ranih antigena koristeći monoklonalna protutijela iz: urina, sline, bronhoalveolarnog ispirka, majčinog mlijeka, cervikalne sluzi, i tkiva dobivenih biopsijom, odnosno kulture amnionske tekućine.

Pri genetskom savjetovanju važno je znati da je to najčešća kongenitalna bolest te da je zbog težine posljedica koje donosi ova bolest važna prevencija odnosno adekvatno praćenje trudnoće i edukacija rizičnih skupina trudnica, poznavanje mogućih posljedica rane CMV infekcije te stručna skrb i praćenje bolesnika s dokazanom CMV infekcijom.

Rizik za infekciju svakako mogu smanjiti provođenje higijene, pogotovo pranje ruku nakon mijenjanja pelena, čišćenje igračaka i površina te pažljivo pripremanje hrane.

Varicella zoster virus

Trudnica koja do 5. mjeseca gestacije oboli od vodenih kozica u riziku je za kongenitalni varicella zoster sindrom – areali ožiljkasto promijenjene kože, hipoplazija kosti i mišića ekstremiteta, mikrocefalija, mentalna retardacija, katarakta, mikroftalmija, korioretinitis.

Parvovirus B19

Infekcije s parvovirusom su česte u djetinjstvu, a infekcija tijekom trudnoće, pogotovo u drugom trimestru ne mora biti klinički vidljiva, ali se može prezentirati kliničkom slikom hidropsa fetusa s teškom anemijom, kongenitivnom srčanom greškom, generaliziranim edemom i smrti fetusa.

Prospektivna studija simptomatskih i asimptomatskih infekcija majki imala je stopu smrtnog ishoda fetusa od 16% . Nema uvjeljivog dokaza da je B19 teratogen.

Virus humane imunodeficijencije (HIV)

Kongenitalna HIV infekcija je veliki problem u potomaka žena koje nose ovaj virus. Obično se infekcija ne prezentira značajnom dismorfijom ploda ili sindromskim obrascem, ali treba uvijek diferencijalno dijagnostički o tome razmišljati u slučajevima s imunodeficijencijom i rijetkim infekcijama novorodjenčeta.

Druge virusne infekcije

Prijenos hepatitisa C od majke na plod predstavlja visok rizik za kroničnu bolest jetre, uključujući karcinom jetre u kasnijem životu. Raspravlja se i o teratogenom učinku, a za sada je izvjesno da je virus hepatitisa uzrokovao bilijarnu atreziju u nekim slučajevima.

Kongenitalna herpes simplex virusna infekcija je danas rijetka, a uzrokuje smrt ploda - najčešće nakon primoinfekcije majke u prvom tromjesečju gestacije. Za influenca virus se također pretpostavljalo da je uzročnik cikličkog javljanja određenih malformacija kao što su npr defekti zatvaranja neuralne cijevi.

Toksoplazmoza

Glavna obilježja infekcije s *Toxoplasma gondii* su korioretinitis (koji može biti progresivan i ne uvijek prisutan pri rođenju), oštećenje središnjeg živčanog sustava s konvulzijama, hepatosplenomegalija, pneumonija, miokarditis, osip. Incidencija teške infekcije je oko 75% kod infekcije majke u prvom tromjesečju i ispod 5% ako se infekcija dogodi u trećem tromjesečju. Kasni razvoj mentalne retardacije i oštećenja sluha su također opisani. Majčina infekcija je najčešće asimptomatska i to putem domaćih životinja, najčešće mačke.

LIJEKOVI I TERATOGENOST

Žene reproduktivne dobi često su izložene lijekovima za vrijeme trudnoće i dojenja.

U SAD najmanje 45% žena uzima jedan lijek dobiven na recept, a velik dio ostalih uzima lijekove koji se prodaju bez recepta. U Velikoj Britaniji oko 10% trudnica uzima lijekove u ranoj trudnoći.

Pravilno prepisivanje lijekova u trudnoći mora osigurati maksimalnu sigurnost za fetus i terapijsku korist za majku. Nije moguće provoditi dvostruko-slijepu, randomiziranu, prospektivnu studiju sa svim lijekovima u trudnoći, jer su određena stanja izuzetno rijetka i jer to ne dozvoljavaju etički i zakonski principi.

Ranije smo napomenuli da je rizik za značajne kongenitalne malformacije u svakoj trudnoći 3-4%, a danas oko 2% tih defekata pripisujemo različitim lijekovima. Fiziološke promjene trudnoće

mogu izmijeniti farmakokinetiku lijekova zbog promjena u procesima eliminacije lijekova iz tijela putem jetre ili bubrega.

Danas je manji broj sigurno dokazanih teratogena u trudnoći – odnosno lijekova koji mogu svojim djelovanjem uzrokovati strukturne malformacije u ploda. Određeni teratogen djeluje u specifično vrijeme trudnoće i uzrokuje specifični obrazac malformacija, ovisno o najviše pogođenim organima i organskim sustavima u vrijeme njegovog djelovanja. Neki su lijekovi teratogeni samo pri određenim dozama («dose dependent teratogen»). Velike molekule s molekulskom masom većom od 1000 ne prolaze lako posteljicu, a danas sve više saznajemo o važnosti polariteta, topljivosti u lipidima i postojanju specifičnih proteinskih nosača te njihovom utjecaju na prijenos kroz posteljicu.

Učinak koji će neki teratogen imati na plod ovisi o vremenu gestacije kada je djelovao na plod. Razdoblje od koncepcije do implantacije je poznato pod nazivom «sve ili ništa» razdoblje kada će doći do ranog pobačaja ili neće biti nikakvog efekta na plod. Tada još nema diferenciranih stanica, pa se stanice mogu oporaviti multiplikacijom. Embrionalni period od 18. do (54)-60. dana nakon koncepcije je razdoblje organogeneze kada se tkiva brzo diferenciraju, a oštećenja uzrokovana teratogenima su konačna te su rezultat strukturne anomalije. Od kraja embrionalne faze, pa do poroda je fetalno razdoblje organi rastu i funkcionalno sazrijevaju. Izloženost teratogenima u ovom razdoblju može imati za posljedicu fetalnu toksičnost - intrauterini zastoj rasta fetusa i utjecaj na funkciju organa. Od posebnog je interesa učinak psihoaktivnih agensa (antidepresivi, antiepileptici, alkohol, droge) na središnji živčani sustav što je dovelo do razvoja novog polja u teratologiji – bihevijoralna teratologija. Mnogi organi nastavljaju svoje strukturno i funkcionalno sazrijevanje dugo nakon rođenja. Mnogi adenokarcinomi dijagnosticiraju se godinama nakon evidentirane izloženosti ploda sintetskom estrogenu (diethylstilbestrol) tijekom prvog trimestra.

Animalna istraživanja teratogenosti ne mogu nam pružiti točnu informaciju da li će neki lijek imati isti učinak i kod ljudi, ali su važna jer nam pokazuju mehanizme djelovanja određenog teratogena, a kada utvrdimo isti uzorak djelovanja teratogena na više životinjskih vrsta, možemo pretpostaviti sličan mehanizam djelovanja i kod ljudi.

Istraživanja teratogenosti na ljudima su iz etičkih razloga retrospektivna i često se svode na izvještaje o jednom slučaju («case reports») koji nam ne mogu dati procjenu rizika za neki teratogen.

Kriteriji za određivanje nekog agensa kao teratogena u ljudi su: prepoznatljiv uzorak anomalija, statistički viša prevalencija određene anomalije u pacijenata izloženih nekom lijeku u odnosu na kontrolnu skupinu, dokazana izloženost agensu za vrijeme organogeneze zahvaćenog organa, niža incidencija određene anomalije u populaciji prije uvođenja agensa, zabilježenost anomalije u eksperimentalnim animalnim studijama nakon davanja tog lijeka u određenom razdoblju organogeneze.

Lijekovi se prema FDA (Food and Drug Administration) od 1979. klasificiraju prema slovima abecede koja označavaju njihovo potencijalno djelovanje na plod tijekom trudnoće. Pod A su lijekovi kod kojih su kontrolirane studije isključile rizik, pod B lijekovi kod kojih nema dokaza za rizik u ljudi, bilo da su animalne studije pokazale rizik, ali kod ljudi ne. U C skupini su lijekovi kod kojih se rizik ne može isključiti, ali potencijalna dobrobit u trudnoći mora opravdati

potencijalni rizik. U skupini D su lijekovi s pozitivnim dokazima o riziku, ali potencijalna potreba za uzimanjem u trudnoći preteže taj rizik, te u skupini X su lijekovi kontraindicirani u trudnoći, kod kojih niti potencijalna dobrobit za trudnicu ne opravdava uzimanje lijeka u trudnoći.

TERATOGENI LIJEKOVI - GENETSKO SAVJETOVANJE

Pri savjetovanju trudnice izložene potencijalnom humanom teratogenu važno je odrediti značajnost izloženosti određivanjem duljine izloženosti, doze, vremena trudnoće, kao i izloženost drugim agensima za koje trudnica možda nije niti bila zabrinuta (alkohol, pušenje).

Savjetovanje mora uključiti bazični rizik za nastanak značajnih malformacija, da li je plod u povišenom riziku, koja je anomalija do sada povezana s lijekom za koji se pruža informacija, procjena aktuelnog rizika, metode prenatalne detekcije, da li je dovoljno podataka dostupno do sada o tom lijeku za procjenu rizika itd. Dodatni aspekti su i potencijalni rizici za pogoršanje bolesti majke koju liječimo tim lijekom, te mogućnost preventivnih mjera ako je to moguće (npr. davanje visokih doza folne kiseline kada se koristi karbamazepin itd).

DOKAZANI TERATOGENI U LJUDI

Alkohol. Fetalni alkoholni sindrom obilježavaju zastoj intrauterinog rasta ploda, što se nastavlja i postnatalno, mikrocefalija, mentalna retardacija, dismorfija lica s hipoplazijom srednjeg dijela lica, dugim plitkim filtrumom, malim očnim rasporcima, tankom gornjom usnom. Rascjep nepca i srčane anomalije su također opisane. Potpuna ekspresija tog sindroma nastaje kod kroničnog svakodnevnog uzimanja najmanje 2 g alkohola na kilogram težine. Potpuna klinička slika je prisutna u trećine slučajeva, dok je kod ostalih vidljiv parcijalni učinak alkohola.

Inhibitori konvertaze angiotenzina I (kaptopril, enalapril, lisinopril). Riječ je o snažnim antihipertenzivima čija upotreba u kasnoj trudnoći rezultira fetalnom toksičnošću uključujući intrauterinu renalnu insuficijenciju. Također se opisuju komplikacije zbog oligohidramniona (kontraktura ekstremiteta, hipoplazija pluća, kraniofacijalne malformacije), prematuriteta, intrauterinog zastoja rasta te smrt fetusa. Ovakvi učinci su povezani s hemodinamskim efektom ovih lijekova na fetus, dok je teratogeni rizik u prvom trimestru trudnoće nizak.

Antiepileptici. Žene s epilepsijom svakako su u većem riziku za nepovoljne ishode trudnoće zbog uzimanja različitih lijekova – potencijalnih teratogena i mogućnosti pogoršanja epileptičkih napadaja.

Valproati. Izloženost plodova valproatima u prvom trimestru povezana je s rascjepima neuralne cijevi i nosi rizik od 1-2% za nastanak lumbosakralne meningomijelokele. Danas je poznat naziv fetalni valproatni sindrom za skupinu opisanih malformacija – visolo čelo, epikantus, infra-orbitalne brazde, telekantus, udubljen korijen nosa, kratki nos s antevertiranim nosnicama, hipoplazija srednjeg dijela lica, dugački filtrum, tanki vermillion, mala usta, srčani defekti, dugi prsti, hiperkonveksni nokti na rukama i rascjep usne.

Karbamazepin. Izloženost karbamazepinu nosi povišen rizik za rascjepe neuralne cijevi - 1% (10 puta više od bazičnog rizika). Izgled malformacija je sličan hidantoinskom fetalnom sindromu.



Slika 3. Dječak pregledan u našem Savjetovalištu za trudnoću i epilepsije, u dobi 4 godine s kraniofacijalnom dismorfijom (majka je radi epilepsije tijekom trudnoće liječena s topiramatom i karbamazepinom te od 4. mjeseca gestacije s topiramatom i phenobarbitalom)

Kokain. Zloupotreba kokaina u trudnoći je povezana s abrupcijom posteljice, prematuritetom, smrću ploda, smanjenom porođajnom težinom, mikrocefalijom, anomalijama udova i slabijim intelektualnim napredovanjem. Teško je odrediti ulogu kokaina u incidenciji malformacija jer je često povezan i s uzimanjem drugih lijekova ili droga, alkoholom, pušenjem, lošim prehrambenim statusom i slabom prenatalnom skrbi. Eksperimentalne animalne studije i epidemiološki podaci na ljudima su pokazali da je rizik nastanka ozbiljnih malformacija vjerojatno nizak, ali su one tada iznimno teške.

Kumarinski antikoagulansi. Posljedica izloženosti kumarinskim derivatima u prvom trimestru je poznata pod terminom fetalni varfarinski sindrom – hipoplazija nosa i kalcifikacije epifiza, uz često pisan i intrauterini zastoj rasta, zastoj u psihomotoričkom razvoju zbog oštećenja SŽS, očne anomalije, gluhoća. Kritično razdoblje je između 6. i 9. tjedna gestacije. Oralni antikoagulansi su povezani i s visokom stopom pobačaja, a izloženost oralnim angikoalansima nakon 1. trimestra predstavlja rizik oštećenja SŽS zbog krvarnja. Za razliku od heparina, oni brzo prolaze kroz posteljicu.

Dietilstilbestrol. Upotrebljavao se u 50-tim i 60-tim godinama prošlog stoljeća pri dijagnozi ponavljanih pobačaja, dok nije nađena povezanost adenokarcinoma vagine ženskih plodova

nakon liječenja njihovih majki dietilstilbestrolom u prvom trimestru. Oko 90% karcinoma su dijagnosticirani i do 14 godina kasnije. Stopa pobačaja i prijevremenih porođaja je također bila značajno viša u grupi žena izloženih u trudnoći ovom lijeku. 27% muških fetusa je imalo genitalne lezije – ciste epididimisa, hipotrofiju testisa, kaspularnu induraciju testisa, ali nije bilo maligniteta.

Antagonisti folne kiseline: aminopterin i metotreksat. Od 1950 znamo da izloženost aminopterinu rezultira smrću fetusa što je dovelo do njegove zlouporabe kao sredstva za pobačaje. Fetalni aminopterinski sindrom je opisan na temelju anomalija u neuspješno pobačenih plodova koje uključuju – malformacije središnjeg živčanog sustava (hidrocefalus, meningomijelokela), anomalije lica (rascjep nepca, visoko nepce, mikrognatija, hipertelorizam, anomalije vanjskog uha), abnormalna osifikacija kostiju glave, IUGR, mentalna retardacija. Plodovi koji su bili izloženi metotreksatu (metilaminopterin) su rođena s aminopterinskim sindromom. Pretpostavljena doza za teratogeni učinak je iznad 10 mg tjedno, s kritičnim razdobljem od 6 do 8 tjedana nakon koncepcije.

Hidantoini (fenitoin i trimetadion). Hidantoini su povezani s prepoznatljivim obrascem malformacija pod nazivom fetalni hidantoinski sindrom – kraniofacijalna dismorfija (široko otvorena fontanela, hipertelorizam, metopička sutura, uleknut korijen nosa, kratke antevertirane nosnice, rascjep usne, nepca), kao i različiti stupnjevi hipoplazije distalnih falangi, hipoplazija noktiju, retardacija rasta, mentalna deficijencija i srčane anomalije.

Izotretinoin (13-cis-retinoična kiselina). Izotretinoin je derivat sintetskog vitamina A koji se koristi u liječenju akni za kojeg znamo da je moćan humani teratogen, kao i mogući bihevijoralni teratogen. Uzorak anomalija pod nazivom embriopatija retinoične kiseline povezana je s izotretinoinom, etretinatom kao i megadozama vitamina A. Klinička obilježja uključuju kraniofacijalne anomalije (mikrotija ili anotija, akscesorne parijetalne suture, usko čelo, mikrognatija, rascjep usne i nepca, hipertelorizam), srčani defekti (primarno konontrunkalne malformacije), abnormalnosti u razvoju timusa i SŽS. Rizik za pobačaj je 40%.

Litij. «International Registry of Lithium Babies» je retrospektivno skupio 225 novorođenčadi izloženih litijumu u prvom trimestru i podaci su pokazali veći rizik za ozbiljne malformacije odnosno specifičan rizik za teratogeno djelovanje u razvitku srca u ranoj gestaciji. Nađen je visok postotak djece s Ebsteinovom anomalijom, rijetkom malformacijom trikuspidne valvule te se pri praćenju trudnoće koja je izložena litiju u prvom trimestru preporuča fetalna ehokardiografija.

Misoprostol. Misoprostol je sintetski analog prostaglandina E1 korišten kod duodenalnih i želučanih ulceracija, a u Brazilu se koristio kao sredstvo za pobačaje. U Brazilu su opisana djeca izložena in utero misoprostolu, s anomalijama udova, sa ili bez Moebiusove sekvence. Kasnije su opisana i djeca s Moebiusovim sindromom od kojih je 49% majki uzimalo misoprostol in utero.

Tetraciklini. Upotrebom tetraciklina u kasnoj trudnoći zbog taloženja antibiotika u zubima u nastanku može nastati žuto-smeđa obojenost zubi. Rizik postoji nakon 17. tjedna kada počinju kalcificirati budući zubi.

Talidomid. Više nego bilo koji drugi događaj, talidomidska tragedija upozorila je svijet na teratogeni potencijal lijekova. Talidomid je uzrok malformacija u tkivima mezodermalnog porijekla, primarno udova, uha, kardiovaskularnog sustava i muskulature crijeva. Kritično razdoblje je od 27. dana do 40. dana gestacije. Kod malformacija udova tipično su gornji ekstremiteti jače zahvaćeni nego donji., a opisuju se fokomelija, polidaktilija, sindaktilija, oligodaktilija.

MOGUĆI TERATOGENI U LJUDI

D-penicilamin. Nekoliko opisanih pacijenara u trudnicama liječenih visokim dozama D-penicillamine bilo je povezano s poremećajima vezivnog tkiva (cutis laxa).

Metimazol. Povezan je s defektom kože na glavi (aplasia cutis congenita).

Diazepam. Izloženost diazepamu u prvom trimestru je u manjim studijama bila povezana s rascjepom nepca i usne, čak i gastroshize, ali veće studije nisu potvrdile tu povezanost.

IONIZIRAJUĆE ZRAČENJE

Ionizirajuće zračenje se sastoji od fotona visoke energije koji su sposobni oštetiti DNA stvarajući slobodne radikale. Doza fotona koju pacijent dobije ima mjerne jedinice – grey i rem, odnosno starija i češće korištena jedinica je - rad.

Velik broj trudnica je izložen ionizirajućem zračenju svake godine, bilo kao pacijentice ili kao zaposlenice na poslovima koji su povezani s korištenjem ionizirajućeg zračenja. Manjak znanja liječnika i pacijenata je čest krivac nepotrebne anksioznosti u tih žena i nepotrebnih prekida trudnoća. Za mnoge od tih žena je doza zračenja neznatna odnosno medicinski prihvatljiva i rizik za plod je minimalan.

Rizici ionizirajućeg zračenja za fetus su povezani s apsorbiranom dozom zračenja i vremenom kada je došlo do zračenja. Približnu dozu od 360 mRem dobijemo godišnje od prirodnog zračenja iz okoline, a prihvatljiva kumulativna doza za ionizirajuće zračenje za vrijeme trudnoće je čak 5 rada. Radijacijska doza za embrij/fetus u trudnih djelatnica zaposlenih na radiologiji odnosno radioterapiji ne smije prelaziti 0.5 Rem za svih 9 mjeseci trudnoće. Preporučene granične doze za fetus ne mogu se direktno usporediti s dozama izmjerenim na osobnim dozimetrima. Osobni dozimetar kojeg nose radiološki dijagnostičari odnosno terapeuti može precijeniti fetalnu dozu, jer ako se dozimetar nosi izvan olovne pregače pokazuje dozu 100 puta veću od fetalne doze. Djelatnici u neuklearnoj medicini i radijacijskoj terapiji obično ne nose pregače i izloženi su višim fotonskim energijama. Unatoč tome fetalne doze obično ne prelaze 25% od izmjerenih vrijednosti na osobnim dozimetrima.

Rizici za plod najznačajniji su za vrijeme organogeneze i u ranom fetalnom razdoblju. Malformacije inducirane ionizirajućim zračenjem imaju granicu od 10-20 rada (100-200 mGy ili više) i tipično zahvaćaju SŽS. Fetalne doze s 10 rada (100 mGy) nećemo dostići niti s 3 CT

snimka zdjelice ili 20 standardnih dijagnostičkih radioloških pregleda, ali ćemo ih doseći s fluoroskopskim intervencijskim procedurama zdjelice i radioterapijom.

Učinci na SŽS temelje se na činjenici da je od 8. do 25. tjedana nakon koncepcije SŽS posebno osjetljiv na zračenje. Fetalne doze koje prelaze 10 rada (100 mGy) mogu rezultirati redukcijom kvocijenta inteligencije, dok doze od 100 rada (1000 mGy) rezultiraju teškom mentalnom retardacijom i mikrocefalijom, pogotovo u vrijeme od 8.-15. tjedana gestacije, te u manjem omjeru od 16-25 tjedna.

Ionizirajuće zračenje povećava rizik za leukemiju i mnoge tipove karcinoma u odraslih i djece. Relativni rizik je oko 1.4 kada je fetalna doza 1 rad (10 mGy). Za osobu koja je bila in utero izložena 1 radu (10 mGy), apsolutni rizik za rak u dobi od 0-15 godina je 1 smrt od karcinoma više na 1.700.

Podaci iz istraživanja na preživjelim nakon atomske bombe i ljudi koji su u dječjoj dobi liječeni radioterapijom pokazali su da prekonceptijsko ozračivanje spolnih žlijezda ne rezultira povećanim rizikom za rak ili malformacije u potomaka.

Trudnica ima pravo znati kolika je jakost i kakav je potencijalni učinak određenog ionizirajućeg zračenja in utero. Kada dajemo genetski savjet za proceduru koja je <1 mGy za fetus dovoljno je reći da je rizik zanemariv, ali kada su fetalne doze iznad 1 mGy potrebno je detaljnije objašnjenje. Prenatalne doze većine dijagnostičkih procedura ne predstavljaju svojom dozom mjerljivo povećan rizik za smrt ploda, malformaciju ili mentalni deficit. Svi takvi pregled moraju biti medicinski opravdani, nastojati smanjiti fetalnu dozu na minimum.

Štitna žlijezda fetusa nakuplja jod nakon 10. tjedna gestacije te visoke doze radioaktivnog joda mogu rezultirati trajnim hipotiroidizmom. Dio radionuklida se izlučuje u majčinom mlijeku te se preporuča ne dojit: uopće nakon terapije s ¹³¹I, 3 tjedna nakon ¹²³I, ⁶⁷Ga, ²²Na i ²¹⁰Tl, 12 sati nakon ¹³¹I hipurata i ^{99m}Tc komponenata, 4 sata nakon ^{99m}Tc eritrocita, DTPA, i fosfonata.

Tablica 2. Fetalne doze pri različitim radiološkim tehnikama (prema Toppenberg K et al. American Family Physician, 1999.)

Tip radiološkog snimanja	Procijenjena fetalna doza po pregledu (rad)	Broj pregleda da bi se dobilo kumulativnu dozu od 5 rada
Kraniogram	0.004	1.250
Zubi	0.0001	50.000
Vratna kralješnica	0.002	2.500
Gornji ili donji ekstremitet	0.001	5.000
Prsni koš (AP i profil)	0.00007	71.429
Mamogram	0.020	250
Abdomen	0.245	20
Torakalna kralješnica	0.009	555

LS kralješnica	0.359	13
IV pijelografija	1.398	3
Zdjelica	0.040	125
Kuk (jedna snimka	0.213	23
CT (deblina presjeka 1 cm)		
Glava(10 presjeka)	Ispod 0.050	Preko 100
Prsa	Ispod 0.100	Preko 50
Abdomen	2.600	1
Lumbalna kralješnica	3.500	1
Fluoroskopija		
Gornji GI trakt	0.056	89
Tehnike nuklearne medicine		
Upotreba 99mTc	Ispod 0.500	Preko 10
Hepatobiliarni Tc HIDA	0.150	33

EUROPSKA MREŽA TERATOGENIH INFORMACIJSKIH SERVISA

Kako se povećavao broj saznanja o teratogenim rizicima u trudnoći i shvaćanje da i veliki dio zdravstvenog osoblja, a ne samo pacijenata ne zna procijeniti stvarne rizike od nekog teratogena, tako se pokazala potreba za osnivanjem teratogenih informacijskih centara koji su se 1990. godine u Milanu udružili u Europsku mrežu teratogenih informacijskih servisa (ENTIS).

Glavni ciljevi ENTIS-a su koordinacija i suradnja u aktivnostima različitih Teratogenih Informacijskih Servisa (TIS) te sakupljanje i evaluacija podataka. Na taj način doprinosimo primarnoj prevenciji mana pri porodu i razvojnih poremećaja. Anomalije pri porodu uzrokovane teratogenima možemo prevenirati, pa je glavni zadatak svakog TIS-a da otkrije rizične čimbenike s ciljem prevencije. Osoblje svakog TIS-a odgovara na individualne upite o izloženosti lijekovima i drugim egzogenim agensima za vrijeme trudnoće. Informacije koje osoblje pruža temelje se na dosadašnjim znanstvenim podacima. Neki centri u Europi pružaju informacije samo zdravstvenim radnicima, a većina i ostaloj populaciji (www.entis.org).

Jednom godišnje su sastanci ENTIS-a na kojima su prisutni svi stalni i pridruženi članovi. Na temelju vlastitog interesa, rada i mogućnosti određene službe u bilo kojoj zemlji Europe može se postati pridruženi član, a nakon 3 godine promatranja rada te službe od strane 2 već postojeća TIS-a, pridruženi član može postati i stalni član ENTIS-a. Plaćanjem jednogodišnje članarine dobije se i mogućnost korištenja baze Reprotox.

U sklopu Polikliničke službe i Neuropedijatrijskog odsjeka Klinike za pedijatriju KB Sr milosrdnice započeli smo 2004. godine s radom Savjetovališta gdje su se mogle obratiti trudnice čija je trudnoća bila u suspektnom riziku za neki teratogen. Trudnicama pružamo informacije o određenom riziku telefonski najkasnije unutar 24 sata, a prema potrebi ih upućujemo na daljnje konzultacije farmakologu, ginekologu itd. Svi podaci se bilježe u bazu podataka i nastojimo osigurati praćenje ishoda takve trudnoće. U okviru TIS-a Zagreb surađujemo s Citogenetskim

laboratorijem OB Sveti Duh gdje možemo direktno uputiti trudnicu na dogovor radi potrebe za ev. prenatalnom dijagnostikom.

Prvi put smo se 2004. godine pridružili godišnjem sastanku ENTIS-a i postali pridruženi član pod nazivom TIS Zagreb. Od lipnja 2007. godine smo kao TIS Zagreb, postali i punopravni član ENTIS-a.

Nadalje, ove godine je unutar naše bolnice osnovano i Savjetovalište za epilepsije i trudnoću gdje surađuju djelatnici Klinike za pedijatriju, Klinike za neurologiju i Klinike za ženske bolesti i porode. Na taj način trudnica s epilepsijom dobije brzu i preciznu informaciju te informirano donosi daljnje odluke. Organiziramo i javne tribine za trudnice na kojima im na pristupačan način objašnjavamo ne samo što su to potencijalni teratogeni rizici u trudnoći i kako ih izbjeći već općenito kako zdravo živjeti i hraniti se prije, tijekom i poslije same trudnoće.

Rad u takvom savjetovalištu zahtijeva i stalnu edukaciju svojih djelatnika te smo kontinuirano prisutni na kongresima, poslijediplomskim tečajevima, kao i na tečajevima iz teratologije u inozemstvu.

Literatura:

1. Harper PS. Practical genetic counselling. Edward Arnold, 6th edition. 2004;331-345.
2. Vrhovac B i sur. Farmakoterapijski priručnik. Medicinska naklada, 4. izdanje, Zagreb, 2003.
3. Tang JW, Aarons E, Hesketh LM, Strobel S et al. Prenatal diagnosis of congenital rubella infection in the second trimester of pregnancy. *Prenat Diagn.* 2003 Jun;23(6):509-12.
4. Keim SA, Klebanoff MA. Aspirin use and miscarriage risk. *Epidemiology* 2006;17:435-9.
5. Schardein JL. Current status of drugs as teratogens in man. *Prog Clin Biol Res* 1985;163c:181-90.
6. Rubin PC, Craig GF, Gavin K, Sumner D. Prospective survey of use of therapeutic drugs, alcohol, and cigarettes during pregnancy. *Br Med J* 1986;292:81-3.
7. Wilson JG. Present status of drugs as teratogens in man. *Teratology* 1973;7:3-15.
8. Shepard TH. Teratogenicity of therapeutic agents. *Curr Probl Pediatr* 1979;10:1-42.
9. Teratology Society Public Affairs Committee. FDA classification of drugs for teratogenic risk. *Teratology* 1994;49:446-7.
10. Shepard TH. "Proof" of human Teratogenicity [letter]. *Teratology* 1994;50:97-8.
11. Briggs GG, Freeman RK, Yaffe SJ. A Reference Guide to Fetal and Neonatal Risk. *Drugs in Pregnancy and Lactation*. 5th Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998.
12. Koren G. Maternal fetal toxicology: A clinician's guide. 2nd edition. New York Marcel Dekker Inc., 1994.
13. International Commission on Radiological Protection. Pregnancy and medical radiation. *Ann ICRP*, 2000;30(1):1-43.

GENETSKO SAVJETOVANJE I MALFORMIRANI PLOD

Nina CANKI-KLAIN

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Neurološka klinika KBC Zagreb i Hrvatski
institut za istraživanje mozga



European Journal of Obstetrics & Gynecology
and Reproductive Biology 55 (1994) 17



Medical geneticist and the abnormal fetus

N. Canki-Klain

*Division of Medical Genetics, Department of Gynecology and Obstetrics, University Medical School of Ljubljana,
Štajmerjeva 3, 61000 Ljubljana, Slovenia*

The birth of a polymalformed infant, a stillbirth, or even the detection of a fetus with single abnormality is an upsetting event for a family as well as for the medical staff caring for that pregnancy. This tragic event is handled best if the difficult psychological situation is dealt with in a straightforward way providing the family with appropriate genetic counselling [1].

Altered morphology accompanies at least 16% of early pregnancy losses [2,3] and up to 6% of births [4]. Despite this societal burden, the assessment of the abnormal stillbirth and the malformed fetus has been a neglected area of medicine for many years. However, it is well known that the etiology of previously lost malformed embryo, fetus or baby is mandatory for accurate genetic counselling to parents after such tragic pregnancy [5].

With the advent of many different techniques for prenatal diagnosis, we are increasingly presented with fetuses in which the diagnosis of a rare syndrome must be established or confirmed. The study of such specimens requires a combination of skills and knowledge spanning the field of embryology, pathology, teratology, clinical genetics and other specialities. For these reasons, since 1980 at our Division of Medical Genetics at Department of Gynecology and Obstetrics in Ljubljana we have organized a close collaboration with some of the above mentioned specialists [6]. In this paper I present a review of our experiences in this teamwork with emphasis on abnormal fetuses detected in utero.

Management of such fetus starts with the communication of results of prenatal diagnostic tests to parents and their decision on future action. It can be divided into two categories: one with the termination and the other with the continuation of pregnancy. In both categories the prenatal diagnosis should be confirmed by appropriate tests on the aborted fetus or live-born baby. In addition,

follow-up supportive and genetic counselling should be arranged for the family. This support should extend to subsequent pregnancies.

The diagnostic approach to a malformed fetus or stillbirth is conditioned by necessary investigations. Every malformed fetus should have (1) detailed anatomic examination, (2) photography, (3) roentgenographic studies, if necessary, (4) chromosomal analysis (blood, fetal tissues or its membranes) and (5) autopsy.

It is to be noted that specimens for metabolic, ultrastructural or other investigations should be utilized selectively. This information is necessary not only for accurate genetic counselling but also for the rational application of available prenatal diagnostic techniques such as ultrasound and amniocentesis in future pregnancies.

References

- 1 Hall JG. Developmental defects in stillborn and newborn infants. In: Dimmick JE, Kalousck DK, eds. Developmental pathology of the embryo and fetus. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1992: 111-142.
- 2 Byrne J, Warburton D, Kline J et al. Morphology of early fetal death and their chromosomal characteristics. Teratology 1985; 32: 297-315.
- 3 Warburton D, Byrne J, Canki N. Chromosome anomalies and prenatal development: an atlas. Oxford monographs on medical genetics No 21. New York: Oxford University Press, 1991.
- 4 Chung CS, Myrianthopoulos NC. Congenital anomalies: mortality and morbidity, burden and classification. Am J Med Genet 1987; 27: 505-523.
- 5 Canki N. The use of making a diagnosis of malformed abortuses stillborns and deceased newborns in genetics counselling. In: Second Symposium of the International College of Pediatrics, Rhodes, Greece, 1981; 78-79.
- 6 Canki N, Boué J, Cerar V et al. Uloga timskog rada u spretavanju rođenja abnormalne djece. Jugosl Ginekolo Opstet 1982; 22: 49-51.

PSIHOLOŠKI ASPEKTI GENETSKOG SAVJETOVANJA

Nataša Jokić-Begić

Sveučilište u Zagrebu, Filozofski fakultet, Odsjek za psihologiju, Zagreb

Strelovit napredak genetike doveo je do razvoja i primjene genetskih testova. Oni omogućuju otkrivanje nasljednih bolesti, odnosno rizičnih faktora za pojavu nekog patološkog procesa. U budućnosti će genetsko testiranje i savjetovanje vjerojatno biti sastavni dio zdravstvene skrbi (Lerman i sur., 2002), što nameće potrebu za boljim razumijevanjem psiholoških aspekata tog postupka (Patenaude i sur., 2002).

SUOČAVANJE S RANJIVOŠĆU I SMRTNOŠĆU

Kako bi bolje razumjeli psihološke aspekte genetskog savjetovanja, razmotrimo kako se ljudi suočavaju sa osobnom ranjivošću i smrtnošću. Iako je potpuno izvjesno da će svatko od nas jednom u budućnosti umrijeti, te činjenice nismo svjesni uvijek i stalno. Dapače, gotovo uvijek i gotovo stalno imamo *iluziju neranjivosti* koja je bitan dio našeg mentalnog zdravlja. Kada bi stalno bili svjesni nadolazeće smrti, brojni naši postupci ne bi imali smisla, osjećali bi se bespomoćno, apatično, depresivno i ustrašeno. Zbog toga je mehanizam *negacije* te potpuno izvjesne činjenice o našoj konačnosti bitan i nužan element kvalitetnog života. S druge strane, u ljudsku je prirodu ugrađena potreba predviđanja budućnosti. Na taj se način stječe dojam kontrole nad vlastitim životom i ublažava tjeskoba. Potrebu za predviđanjem događaja u okolini mnogi teoretičari stoga smatraju osnovnom motivacijom koja određuje spoznaju i ponašanje ljudi (Taylor i Shepperd, 1998). Ljudi se, međutim, u procesiranju osobno relevantnih informacija i u osobnim predikcijama nesvjesno služe pristranostima koje im održavaju samopoštovanje, vjeru u pravedan svijet i sretnu budućnost, te omogućuju negaciju činjenice o vlastitoj ranjivosti i smrtnosti. Postoje tri osnovne obrambene pristranosti: nerealistično pozitivno doživljavanje sebe, iluzija osobne kontrole i nerealističan

optimizam. Ove pristranosti u mišljenju održavaju mentalno zdravlje i kvalitetu života, a bez njih je život obojen tjeskobom i depresijom.

Nerealistično pozitivno doživljavanje sebe odnosi se na tendenciju ljudi da se vide boljima od drugih prosječnih vršnjaka. Većina ljudi tako procjenjuje da su za njih karakteristične pretežno pozitivne osobine, druge ljude smatraju manje zaslužnima za vlastiti uspjeh, a više odgovornim za vlastiti neuspjeh. Većina ljudi vidi sebe boljima nego što ih vide drugi.

Drugo područje u kojem ljudi izražavaju pristranost odnosi se na **iluziju osobne kontrole**. Većina ljudi smatra da ima veći stupanj kontrole nad događajima u okolini nego što je to objektivno, odnosno smatraju da je izvor očekivane posljedice u okvirima osobne kontrole (McKenna, 1993). Ljudi tako procjenjuju da je manja vjerojatnost da će u budućnosti doživjeti automobilsku nesreću ako oni voze auto, nego ako su suvozači (McKenna, 1993). Kad ljudi pak očekuju određeni ishod i kad se on dogodi, oni često precjenjuju stupanj u kojem su oni djelovali na njegovu pojavu (prema Taylor i Brown, 1988).

Uz pristranosti u doživljavanju sebe i osobne kontrole nad događajima većina ljudi u razmišljanjima o vlastitoj budućnosti smatra da će im budućnost biti dobra, dok za negativne i nepoželjne događaje smatraju da se neće dogoditi njima. Takva tendencija ljudi da vjeruju kako u budućnosti imaju, u usporedbi s drugima, veću vjerojatnost da će doživjeti pozitivne događaje i ishode, a da će izbjeći negativne događaje i ishode naziva se **nerealistični optimizam**. Nerealistični optimizam javlja se u svim dobnim skupinama, u različitim životnim područjima i uključuje vjerovanja o financijskim, profesionalnim, interpersonalnim događajima te događajima vezanim za kriminal i zdravlje (Kunda, 1987). Suočeni s tragičnim situacijama u svojoj okolini, ljudi pribjegavaju još jednom nerealnom vjerovanju – **vjerovanju u pravedan svijet**. Ovo je vjerovanje oblik obrambenog mišljenja na osnovi kojeg ljudi pretpostavljaju da se loše stvari događaju lošim ljudima, a dobre stvari dobrima. Kako ljudi sebe doživljavaju dobrima, vjeruju da se njima ne mogu dogoditi tragične situacije.

Sve nabrojeno iracionalnosti pomažu ljudima da životu daju smisao, a kroz svakodnevicu prolaze bez nepotrebne napetosti. Ljudi su na taj način odmaknuti od poteškoća koje se ne mogu riješiti, čime je ostavljen prostor i energija za poteškoće s kojima se mogu izboriti. Tako je očuvana kvaliteta života i opće mentalno zdravlje.

Kvaliteta života postala je istaknuti predmet interesa u psihologiji, biometriji, socijalnim znanostima, kliničkoj medicini i zdravstvenoj zaštiti. Integriranje biopsihosocijalnog pristupa

u razumijevanju zdravlja i bolesti i veća usmjerenost na pojedinca dovela je koncept subjektivne kvalitete života u fokus interesa istraživača. Mnoga istraživanja subjektivne kvalitete života pokazala su iznenađujuću podudarnost rezultata i njihovu stabilnost kroz vrijeme.

Istraživanja su pokazala da su ljudi uglavnom zadovoljni svojim životom bez obzira na okolnosti (Cummins, 2003). Srednje vrijednosti samoprocjena nalaze se gotovo uvijek u gornjoj polovini vrijednosti skale na kojoj se vrši samoprocjena, bez obzira kakvu se skalu koristilo. Uočena stabilnost subjektivne kvalitete života dovela je do postuliranja mehanizma psihološke homeostaze. Homeostatički sistem sličan je ravnoteži koja se javlja kod krvnog tlaka ili tjelesne temperature, koje se u normalnim okolnostima zadržavaju na optimalnoj razini za funkcioniranje organizma. Analogno tome, psihološka homeostaza bi kontrolirala doživljaj subjektivnog blagostanja s ciljem preveniranja ekstremnih nelagodnih stanja.

Rezultati istraživanja pokazuju da značajne promjene u životnim uvjetima (bolest, smrt, materijalni gubitak) dovode samo do privremene promjene u procjeni kvalitete života. Tijekom vremena dolazi do povratka procjene kvalitete života na prethodnu razinu, karakterističnu za dotičnog pojedinca (Cummins, 2003). Samo neka određena stanja kao što su kronični, jaki bolovi dovode do trajnog i značajnog smanjenja samoprocjene kvalitete života. Invaliditet, međutim, ne dovodi do trajnog smanjenja, jer se osobe preusmjere na druge vrijednosti i životna područja te nadomjestite nastali nedostatak.

Ovaj kratki pregled načina na koji se ljudi suočavaju s vlastitom ranjivošću i smrtnošću možemo rezimirati rečenicom: ono kako ljudi vide sebe i svijet oko sebe će odrediti kako će se osjećati, što će misliti i kako će se ponašati. Objektivna stvarnost se prelama kroz osobnu percepciju. Osobine ličnosti će odrediti način na koji će se objektivna stvarnost percipirati, a o toj će percepciji ovisiti psihofizičko funkcioniranje osobe.

Generalno pozitivni pogled na život je neophodan za normalno funkcioniranje pojedinca. Čak i u situacijama u kojima smo bolno svjesni vremenske ograničenosti života, odnosno u kojem smo suočeni sa osobnom ranjivosti i krhkosti (bolest, smrt) aktivirat će se obrambeni mehanizmi koji će sačuvati sliku sebe i svijeta. U situaciji bolesti ljudi vjeruju kako će kod njih ishod biti bolji nego kod ostalih oboljelih, kako će uvođenjem nekog oblika osobne kontrole povećati šanse za bolji ishod (u tome vjerojatno leži i dio objašnjenja zašto se ljudi obraćaju alternativnim pristupima) te kako su oni svojim dotadašnjim životom zaslužili ozdravljenje. Pozitivni osjećaji pobuđeni takvim načinom razmišljanja svakako pogoduju

ozdravljenju. Brojna psihoneuroimunološka istraživanja potvrdila su utjecaj mišljenja i emocija na zdravlje (Irwin i sur., 1986; Stowell, Kiecolt-Glaser, Glaser., 2001; Cohen, Herbert., 1996; Glaser, Kiecolt-Glaser, 1994).

No, što je s obrambenim mehanizmima u situaciji informacije o nasljednoj bolesti? Takva spoznaja govori kako je „sudbina u genima“, što je potpuno oprečno ljudskoj prirodi koja želi život imati pod kontrolom. Jedan vrlo ilustrativni citat iz „Genoma“ Matta Ridleya opisuje što znači spoznaja o nasljeđu Huntingtonove bolesti: „Huntingtonova bolest je čisti fatalizam, potpuno neovisan o bilo čemu iz okoline. Dobar život, izvrsna medicina, zdrava hrana, brižna obitelj i bogatstvo ne mogu pomoći. Vaša sudbina je u vašim genima i ništa ne možete učiniti da to spriječite“. Može li se u takvim okolnostima aktivirati pristranost o nerealističnom pozitivnom doživljaju sebe? Može li se u slučaju informacije o nelječivoj nasljednoj bolesti aktivirati iluzija kontrole? Što je s nerealističnim optimizmom i homeostatskim mehanizmom očuvanja kvalitete života?

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da je ljudski psihološki aparat dovoljno prilagodljiv da i u situaciji suočavanja s neizbježnom sudbinom aktivira obrambene snage, daje smisao životu i na taj ga način održava. Pri tome treba naglasiti da postoje velike interindividualne razlike koje su prije svega uvjetovane osobinama ličnosti. Nemaju svi pojedinci iste mogućnosti pozitivnog procesiranja informacija. Stoga je nužan interdisciplinarni pristup osobi prije pristupanja genetskom testiranju. Pažljiva procjena psihičkih karakteristika pojedinca omogućit će pravilnu implementaciju sofisticiranih medicinskih postupaka, pa i postupka genetskog testiranja. Ako, međutim, rezultati genetskog testiranja dovedu do trajnog pogoršanja subjektivne kvalitete života, onda se s pravom može postaviti pitanje koja im je svrha.

PSIHOLOŠKE POSLJEDICE GENETSKOG TESTIRANJA

Pod genetskim testiranjem se podrazumijeva otkrivanje neke osobitosti ispitanika koja može izazvati nastanak bolesti koja je u potpunosti ili djelomično genetske etiologije. Postoji nekoliko vrsta testiranja koja su danas u uporabi, a razlikuju se prije svega prema svrsi testiranja: prenatalno testiranje, genetsko testiranje bolesnika i prediktivno testiranje.

Prenatalno testiranje namijenjeno je utvrđivanju abnormalnosti ploda. Postupak nije bez rizika za trudnoću, ali istraživanja su pokazala kako sam postupak ne izaziva značajan psihološki stres kod žena (Lerman i sur., 2002). Zanimljiv je podatak kako odluka o pristanku na testiranje ovisi prije svega o percipiranom riziku po trudnoću, a ne o stvarnom riziku ili stupnju informiranosti žene (Marteau et al., 1991).

Genetsko testiranje bolesnika je testiranje osobe s određenim kliničkim simptomima radi utvrđivanja točne dijagnoze, odnosno radi utvrđivanja je li osoba „nositelj“ bolesti. Ovaj oblik savjetovanja ima svoju primjenu u planiranju potomstva.

Ispitivanje psiholoških osobitosti „nositelja“ i „ne-nositelja“ upućuju na neke razlike u razini anksioznosti i stavovima prema bolesti, no te su razlike male i gube se u funkciji vremena proteklog od saznavanja rezultata (Lerman i sur., 2002). Psihološke će reakcije više biti određene kulturalnim i socijalnim kontekstom (brojem članova obitelji koji trebaju saznati rezultate, brojem oboljelih članova u obitelji i sl.) nego samim rezultatima testiranja.

Pri genetskom testiranju treba voditi računa o psihološkim problemima koji proizlaze iz otkrića da se radi o nasljednoj bolesti (pogotovo ako je ona nelječiva i progresivna, kao što je slučaj kod Huntingtonove bolesti), kao i o posljedicama te informacije na bliske i dalje srodnike i njihovo potomstvo. (Canki-Klain, 1998). Treba obratiti pažnju na pojavu osjećaja krivnje („genetic guilt“) koji se javlja kako kod nositelja tako i kod onih koji nisu nositelji genetske mutacije («survival-guilt») (Smith i sur., 1999; Lodder i sur., 2001).

Prediktivno testiranje preporuča se osobama kod kojih se u obitelji javlja nasljedna bolest. Kod nekih bolesti rezultati testa će dati potpuno pouzdano predikciju (kod HB), dok će kod nekih bolesti dati samo vjerojatnost (rak dojke i/ili jajnika).

Pregled istraživanja psihičkih reakcija na testiranje i njegove rezultate ne upućuje na dugotrajan negativni učinak takvih informacija (Lerman i sur., 2002; Broadstock, Michie, Marteau, 2000). Meta-analize istraživanja psiholoških reakcija govore kako rezultati genetskog testa (je li osoba „nositelj“ ili „ne-nositelj“) nisu povezani s razinom anksioznosti i depresivnosti kod testiranih. Osobe koje su nositelji, neposredno nakon saznavanja rezultata, pokazuju povišeni stupanj stresa u usporedbi s ne-nositeljima (ovo je potvrđeno samo u nekim istraživanjima), ali već nakon par mjeseci dolazi do normaliziranja vrijednosti. Longitudinalna istraživanja provedena na osobama koje su testirane na HB govore kako ni

nakon 5 godina od testiranja nema razlike između nositelja i ne-nositelja u stupnju anksioznosti, depresivnosti i doživljaja stresa (Decruyenaere i sur., 2003).

Emocionalno stanje prije testiranja, očekivanja i motivi za provođenje testiranja su prediktor emocionalnog stanja nakon saznavanja rezultata. Osobe koje su prije testiranja pokazivale znakove psihičke nestabilnosti, kojima je osnovni motiv za testiranje bio smanjiti neizvjesnost, te osobe koje su podcijenile emocionalni značaj samog testiranja su ranjivije za razvoj psihičkih smetnji nakon testiranja (Decruyenaere i sur., 2003, Dorval i sur., 2000). Iskustva iz djetinjstva s oboljelim članom obitelji su važan čimbenik u psihološkom funkcioniranju – osobe koje su imale ekstremno negativna rana iskustva s roditeljem koji je obolio od HB češće pokazuju suicidalne ideacije i namjere (Lerman i sur., 2002).

Butow i sur. (2003) nalaze psihološke koristi od genetskog testiranja žena za karcinom dojke. One koje nisu bile nositelji su osjetile olakšanja, a kod nositeljica nije bilo pogoršanja psihičkog statusa nakon dobivanja rezultata.

Istraživanja su se bavila i promjenama u ponašanju nakon dobivanja rezultata genetskog testiranja. Smanjenje rizičnog ponašanja i učestalije kontrole je cilj genetskog testiranja, no istraživanja pokazuju da se taj cilj ne postiže (Botkin i sur., 2003). Žene ne odlaze češće na preglede nakon spoznaje o genetskom opterećenju za rak dojke (Lerman i sur., 2002). Informacija o genotipu koji bi mogao biti rizičan za pojavu raka pluća nije dovela do češćeg prestanka pušenja (Lerman i sur., 1997)

ZAVRŠNE PREPORUKE

Prikazani rezultati istraživanja govore kako su emocionalne posljedice genetskog testiranja daleko blaže nego što se u početku pretpostavljalo. U pravilu, obrambeni psihološki mehanizmi i u uvjetima suočavanja sa negativnim informacijama uspijevaju sačuvati psihičku ravnotežu. Nakon početnog pogoršanja emocionalnog stanja, dolazi do stabiliziranja i «vraćanja u kolosijek». Emocionalna stabilizacija je u svakom slučaju korisna, jer bi negativne emocije, kada bi bile dugotrajne, ostavile svoje posljedice na tjelesno i psihičko zdravlje. Na ponašajnoj se razini, međutim, ne događaju promjene radi kojih se testiranje i radilo, te o tome treba voditi računa u zdravstvenoj skrbi. Također treba biti svjestan individualnih čimbenika koji mogu utjecati na način suočavanja sa informacijom dobivenom testiranjem. Emocionalno stanje prije testiranja je glavni prediktor psihičke reakcije nakon testiranja. Stoga u timu treba biti uključen stručnjak za mentalno zdravlje koji će pažljivo procijeniti psihosocijalne osobitosti pojedinca. Već prije testiranja osobu treba razumljivo i i

ispravno informirati o kliničkim i genetskim obilježjima bolesti, o izravnim posljedicama testiranja za mogućeg nositelja i njegovo postojeće i buduće potomstvo, o terapijskim dometima i prognostičkim ishodima. Tek dobro informirana osoba, kojoj je dano dovoljno vremena za odluku, može sama prosuditi želi li genetsko testiranje ili ne. Prigodom priopćavanja rezultata potrebno je djelomice ponoviti objašnjenja koja su prethodila uzimanju uzorka. Informaciju o rezultatima testiranja treba pružiti na jasan način, vodeći računa o mogućim emocionalnim reakcijama. Stoga je korisna nazočnost bliske osobe. Ako se psihološka procjena prije testiranja dobro obavila i radi li se o psihički stabilnoj i zdravoj osobi, za očekivati je blaža anksiozno-depresivna reakcija u razdoblju neposredno nakon saznavanja rezultata, no ta će se reakcija s vremenom ublažiti. Testiranoj osobi i njezinim članovima obitelji treba svakako omogućiti konzultacije i praćenje, što bi trebao biti zadatak multidisciplinarnog tima.

U ovom novom i intrigantnom području brojna istraživačka, etička i praktična pitanja ostaju otvorena. Ovdje ćemo nabrojati neka u nadi da će se u multidisciplinarnim timovima pokušati naći odgovori:

- Kako odrastanje u obitelji s nasljednom bolešću utječe na identitet i opće psihičko funkcioniranje osobe?
- Kako informacije koje se dobiju genetskim testiranjem utječu na osobu koja je testirana i ostale članove obitelji?
- Kakva je obiteljska komunikacija o nasljednim bolestima i koji je njezin utjecaj na emocionalno, psihičko i socijalno funkcioniranje?
- Kako osobine ličnosti utječu na prihvaćanje i suočavanje s informacijama dobivenim genetskim testiranjem?
- Doprinosi li genetsko testiranje stigmatizaciji, diskriminaciji i gubitku privatnosti i kakve psihičke posljedice to može ostaviti?
- Što se, zapravo, želi postići genetskim testiranjem i postiže li se taj cilj?

LITERATURA:

1. Botkin, J.R., Smith, K.R., Croyle, R.T., Baty, B.J., Wylie, J.E., Dutson, D. et al (2003). Genetic testing for a BRCA1 mutation: Prophylactic surgery and screening behavior in women 2 years post testing. *American Journal of Medical Genetics*;118A:201-209.
2. Butow, P., Lobb, E., Meiser, B., Barratt, A. (2003). Psychological outcomes and risk perception after genetic testing and counseling in breast cancer: A systematic review. *Medical Journal of Australia*. 178, 77-81
3. Canki-Klain, N. (1998). Etički i psihološki aspekti molekularne dijagnostike Huntigtonove bolesti. *Neurologica Croatica*, 47(2), 159-64.
4. Cohen, S., Herbert, T.B. (1996). Health Psychology – Psychological Factors and Physical Disease from the Perspective of Human Psychoneuroimmunology. *Annual Review of Psychology*, 47:113-42.
5. Cummins, R. A. (2003). Normative life satisfaction: measurement issues and a homeostatic model. *Social Indicators Research*, 64, 225-256.
6. Decruyenaere, M., Evers-Kiebooms, G., Cloostermans, T., Boogaerts, A., Demyttenaere, K., Dom, R. i Fryns, J. P. (2003). Psychological distress in the 5-year period after predictive testing for Huntington's disease. *European Journal of Human Genetics*, 11, 30-38.
7. Dorval, M., Patenaude, A. F., Schneider, K. A., Kieffer, S. A., DiGianni, L., Kalkbrenner, K. J. i sur. (2000). Anticipated versus actual emotional reactions to disclosure of results of genetic tests for cancer susceptibility: findings from p53 and BRCA1 testing programs. *Journal of Clinical Oncology*, 18, 2135-2142.
8. Glaser, R., Kiecolt-Glaser, J. (1994). *Handbook of Human Stress and Immunity*. London: Academic Press
9. Irwin, M., Daniels, M., Bloom, E.T., Weiner, H. (1986). Life events, depression and natural killer cell activity. *Psychopharmacol Bull*; 22:1093-6.
10. Kunda, Z. (1987). Motivated inference: Self-serving generation and evaluation of causal theories. *Journal of Personality and Social Psychology*, 53, 636-647.
11. Lerman, C., Schwartz, M.D., Lin, T.H., Hughes, C., Narod, S., Lynch, H.T. (1997). The influence of psychological distress on use of genetic testing for cancer risk. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 65, 414-420.
12. Lerman, C., Croyle, R.T., Tercyak, K.P., Hamann, H. (2002). Genetic testing: psychological aspects and implications. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 70(3), 784-97.
13. Lodder, L., Frets, P.G., Trijsburg, R.W., Meijers-Heijboer, E.J., Klijn, J.G., Duivenvoorden, H.J., Tibben, A., Wagner, A., van der Meer, C.A., van den Ouweland, A.M. and Niermeijer, M.F., (2001). Psychological impact of receiving a BRCA1/BRCA2 test result. *American Journal of Medical Genetics*, 98, 15-24.
14. Marteau, T.M., Kidd, J., Cook, R., Michie, S., Johnston, M., Slack, J. Et al. (1991). Perceived risk not actual risk predicts uptake of amniocentesis. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 98, 282-6.
15. McKenna, F.P. (1993). It won't happen to me: Unrealistic optimism or illusion of control? *British Journal of Psychology*, 84, 39-50.
16. Patenaude, A.F., Guttmacher, A.E., Collins, F.S. (2002). Genetic testing and psychology: new roles, new responsibilities. *American Psychologist*, 57, 271-82

17. Smith, K. R., West, J., Croyle, R. T., & Botkin, J. R. (1999). The familial context of genetic testing for cancer susceptibility: The moderating effect of sibling test results on psychological distress following BRCA1 mutation testing. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 8, 385-392.
18. Stowell, J.R., Kiecolt-Glaser, J.K., Glaser, R. (2001). Perceived stress and cellular immunity: When coping counts, *J Behav Med*; 24: 323-39.
19. Taylor, S. E., Brown, J. D. (1988). Illusion and well-being: A social psychological perspective for mental health. *Psychological Bulletin*, 103, 193-210.
20. Taylor, S. E., Shepperd, J. A.(1998). Bracing for the worst: Severity, testing and feedback timing as moderators of the optimistic bias. *Personality and Social Psychology Bulletin*, 24, 915-926.

Okrugli stol: **MULTIDISCIPLINARNI PRISTUP BOLESNIKU S HUNTINGTONOVOM
BOLESTI I NJEGOVOJ OBITELJI**

PRIKAZ SLUČAJA

Nina Canki-Klain

**Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Neurološka klinika KBC Zagreb i Hrvatski
institut za istraživanje mozga**

Slučaj A.B.

30-godišnja Marija, tajnica u poduzeću, kći bolesnice s Huntingtonovom bolešću, majka dvoje djece dolazi samoinicijativno u Neurogenetsku ambulantu zbog potištenosti i depresivnog stanja koje se pogoršava od rođenja prvog djeteta prije 4 godine.

Mariju poznam sedam godina. Njezinu majku je u dobi od 44.god. uputio neurolog zajedno sa suprugom u Neurogenetsku ambulantu radi informacije i mogućnosti molekularne potvrde Huntingtonove bolesti. Bolesnica je imala karakterističnu kliničku sliku i pozitivnu obiteljsku anamnezu. Nakon razgovora (genetskog savjetovanja) tijekom kojeg je suprug bolesnice saznao da potvrda dijagnoze znači 50 postotni rizik za kćer koja to ne želi znati, te da potvrda dijagnoze zasada ne omogućava bolje liječenje, suprug je odbio molekularnu potvrdu dijagnoze.

Marija je vrlo vezana za majku koja živi s ocem oko 2 km dalje od nje. Ima dvoje male djece od 4 i 2 godine. Suprug je kvalificirani radnik. Ne pokazuje razumijevanje za njezine probleme. Marija ne vidi izlaza iz situacije. Pokušala je uzimati biljne lijekove za smirenje, ali joj ne pomažu. Navodno dobro spava. Liježe iza ponoći i diže se u 6 sati. Uvijek se budi umorna.

U ambulantu je došla zaplakana. Tijekom razgovora u više navrata plače. Nakon razgovora se umirila i normalno komunicirala. Želi pomoć psihijatra. Obećala sam joj pomoć u tome.

Obzirom na realnu situaciju, moguće je razumjeti Mariju. Ona ima 50 postotni rizik da nosi gen i da će oboljeti kao njezina majka. Ne znam da li je suprug ista osoba koja je Mariju prije 7 godina, kada sam vidjela bolesnu majku, nagovarao na testiranje, što je ona odbijala. Informaciju sam dobila telefonski od Marije koja me znala nazvati u nekoliko navrata kada joj je bilo teško. Moj prijedlog da dođe zajedno s partnerom nije ostvaren.

Marija ima u poduzeću pet godina stariju prijateljicu psihologinju s kojom se dobro razumije i koja ima dvije djevojčice u dobi od 9 i 2 god. Prijateljčina majka je umrla od Huntingtonove bolesti od koje je bolovala i njezina tetka (majčina sestra). Čini mi se da su psihologinja i Marija u nekom srodstvu koje mi nije mogla ili željela otkriti.

Slučaj D.Š.

D.Š. 40-god., zdrava zdravstvena djelatnica, majka dvoje djece u dobi od 14 i 17 god. ima fakultetski obrazovanog 45- godišnjeg supruga s molekularno potvrđenom dijagnozom Huntingtonove bolesti. Patološki alel sadrži 46 CAG tripleta.

Sadašnja bolest: Prvi simptomi- tikovi pojavili su se oko 36. godine. Navodno su uvijek govorili da je „trapav“. Momentano nije u stanju da bilo što samostalno radi. Vozi se malo na biciklu s kojeg zna pasti. Žena mu ne dozvoljava da vozi auto.

Obiteljska anameza: Jedinac. Otac bolesnika umro sa 62 god. od ciroze jetre. Bio je etilik i vrlo agresivan. Najvjerojatnije je bio bolestan. Njegova 62-god. supruga (bolesnikova majka) je zdrava. Očev brat se dva puta ženio. Umro je od Ca pluća u dobi od 69 godina. Također je bio etilik. Ima 43- godišnjeg sina iz prvog braka koji voli piti (bolestan?) i koji ima 15-godišnjeg sina. 33-godišnji sin iz drugog braka živi u inozemstvu te su podaci nepoznati. Bolesnikov djed je umro u dobi od oko 70 godina. Bio „senilan“.

Supruga bolesnika je na vlastitu inicijativu dala uzeti djeci krv koju su poslali u laboratorij na molekularnu analizu kako bi saznala da li djeca nose očev bolestan gen. Laboratorij je na osnovi datuma rođenja ustanovio da se radi o djeci te savjetovao liječniku da uputi D.Š na genetsko savjetovanje budući da se radi o zdravoj djeci i presimptomatskom testiranju koje nije dozvoljeno u maloljetnika.

**Okrugli stol: MULTIDISCIPLINARNI PRISTUP BOLESNIKU S HUNTINGTONOVOM
BOLESTI I NJEGOVOJ OBITELJI**

**KAKO PRISTUPITI FENOTIPSKI ZDRAVIM ČLANOVIMA OBITELJI BOLESNIKA
S HUNTINGTONOVOM BOLESTI**

Osman SINANOVIĆ

**Klinika za neurologiju, Univerzitetski klinički centar Tuzla, Medicinski fakultet
Univerziteta u Tuzli, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina**

Uvod

Huntingtonova bolest (HB) je nasljedna, neurodegenerativna bolest, koja se karakteriše progresivnom horejom i demencijom. Ime je dobila po Georgu Huntingtonu, ljekaru opšte prakse (Pomeroy, Ohio) koji je kao student medicine na poznatom Columbia University (SAD), koristeći se ljekarskom praksom svog oca i djeda u Istočnom Hamptonu, Long Island, a koji su pratili bolesnike sa karakterističnom kliničkom slikom kroz nekoliko generacija, 1872. godine napisao rad "O horeji". Zanimljivo je da je 1932. godine utvrđeno i publikovano da su praktično svi pacijenti sa ovom bolešću koji žive na istočnoj obali SAD, potomci šest osoba koje su emigrirale 1630. iz Engleske (Suffolk) u Salem, Massachusetts (1).

Riječ "horeja" je grčkog poprijekla i znači igra, ples, koreografija. Otuda se u starim udzbenicima, bolest označavala i kao «ples svetog Vida». Horejički pokreti su nevoljni, neritmčki, nepravilni, besciljni i nesimetrični. Brzi su i kratki. Mijenjaju mjesto pojave i vidljivi su na rukama, uglavnom na distalnim dijelovima, ali se mogu vidjeti i na nogama, ramenima, licu, jeziku, ustima, faringsu. Ometaju govor, hod, pisanje (1,2).

Huntingtonova bolest (M. Huntingtoni, Huntingtonova horeja) je najčešća nasljedna bolest bazalnih moždanih ganglija. To je progresivna neurodegenerativna bolest klinički obilježena nevoljnim horeičkim pokretima, psihičkim smetnjama i demencijom (2,3). Simptomi bolesti rezultat su progresivne neurodegeneracije bazalnih ganglija (4).

HB se javlja u svim rasama, s prevalencijom od 4-8 na 100.000 stanovnika u SAD i Evropi, a učestalost je deset puta manja u Japanu. Bolest pogađa podjednako i muškarce i žene i u većine bolesnika se počne razvijati u 4. ili 5. deceniji života. Tipične smetnje javljaju se najčešće između 35 i 45 godina (5). Dakle, bolest pogađa poglavito pojedince koji već imaju djecu; svako dijete oboljelog roditelja ima 50% šanse da naslijedi bolest. To jasno ukazuje na jedan od vrlo tragičnih vidova te bolesti: djeca bolesnika s neizlječivom Huntingtonovom bolešću žive u realnom strahu da su naslijedili tu bolest i da će od nje umrijeti, a da njihova djeca mogu također biti bolesna (1).

Genetika

HB se nasljeđuje autosomalno dominantno s potpunom penetracijom mutiranog gena. Gen odgovoran za bolest lociran je na kratkom kraku 4 hromosoma 1983. godine, a deset godina kasnije otkriven je i mehanizam mutacije. Bolest je uzrokovana višestruko umnoženom sekvencom trinukleotida citozinadenin-gvanin (CAG)(>36) u genu IT15 (4p16.3) (5,6). Broj trinukleotidnih CAG ponavljanja veći od 36 rezultira stvaranjem patološke verzije proteina huntingtina i nastajanjem bolesti (6,7). Ponavljanje je inače polimorfno sa rasponom 11-28 u zdravih, te 39-121 u oboljelih (8,9,10).

Analizom CAG ponavljanja u etnički raznih skupina bolesnika s HB dokazano je da je mehanizam mutacije uvijek povećanje broja trinukleotidnih CAG ponavljanja te da nema većeg odstupanja u broju ponavljanja unutar različitih populacija bolesnika (8,9,10,11). U zdravoj populaciji broj CAG ponavljanja varira od 11-28, dok je u oboljelih od HB taj broj znatno veći, od 40 do ak 120 ponavljanja. Broj trinukleotidnih ponavljanja negativno korelira s dobi pojave bolesti i klinikom progresijom (21). Bolesnici s očitovanjem bolesti u odrasloj dobi najčešće imaju od 40 do 50 CAG ponavljanja, dok je u juvenilnom obliku bolesti broj trinukleotidnih CAG ponavljanja znatno veći, od 60 i više puta (10).

Klinička slika

Klinička slika je obilježena je trijadom simptoma: nevoljnim horeičkim pokretima (koji mogu biti i horeoatetozni), smetnjama ponašanja i ličnosti, te progresivnim intelektualnim propadanjem do demencije (1,2,9).

Prvi znaci bolesti su netipični: odsutnost duha, razdražljivost i depresija, praćeni malenim trzajevima i meškoljenjem, nespretnošću ili iznenadnim padovima. Nekontrolirani horeički i/ili horeoatetozni pokreti postupno se pojačavaju dovodeći do otežanog gutanja hrane, sve težeg hoda i na kraju (za 10-15 godina) dovode bolesnika u invalidska kolica. Govor u početku postaje nejasan, potom nerazumljiv i na kraju nestaje, dok izrazi lica postaju iskrivljeni i groteskni. Psihičke smetnje, poput depresije i suicidalnog ponašanja, javljaju se istovremeno s motornim simptomima, ili im prethode. Afektivni poremećaji i promjene ličnosti u pojedinim bolesnika mogu napredovati do psihoze s deluzijama i halucinacijama (1,9,12,13).

Pojava prvih simptoma bolesti prije 20. godine života naziva se juvenilnim oblikom. U juvenilnih bolesnika klinički dominira ukočenost i bradikinezija, a horeički pokreti mogu potpuno nedostajati. Klinika progresija je ovdje brža i pacijenti umiru nakon 7 do 10 godina trajanja bolesti(1,9,14).

Broj trinukleotidnih ponavljanja se može znatno povećati kada se mutacija za Huntingtonovu bolest prenosi od oca. Time se objašnjava fenomen anticipacije, odnosno sve ranije pojave bolesti u sukcesivnim generacijama u kojima se mutacija nasljeđuje od oca. Juvenilni bolesnici, s velikim brojem CAG ponavljanja, u 80% slučajeva nasljeđuju bolest od oca (10,15).

Genetsko savjetovanje

Značajna otkrića na polju genetike su načinjena posljednjih decenija u medicini općenito a neurologiji posebice. Zahvaljujući tehnološkom razvoju i inventivnosti istraživača sve je manje nasljednih bolesti za koje ne znamo gensku mutaciju ili pak genski produkt, a akoro rutinska genetska dijagnoza je postala dostupna i u manje razvijenim zemljama svijeta pa i manjim kliničkim centrima u njima.

Vrše se opsežna istraživanja o genskoj terapiji, koja je doduše stalno tu „iza ugla“, a nikako da do nje dodjemo.

Rekli smo već da se u većini slučajeva HB ispoljava u 4. ili 5. deceniji života, godinama kada većina ljudi osnuje porodicu i ima djecu. Članovi porodica oboljelih od HB koji nisu klinički afektirani, a potencijalni su nosioci patološkog gena su, zbog straha od mogućeg obolijevanja pod svojevrsnim psihičkim pritiskom - da li formirati porodicu i imati djecu, da li će njihova djeca biti bolesna (2).

I pored usvojenih preporuka kada je genetsko savjetovanje u pitanju, pred kliničarom se uvijek postavlja čitav niz pitanja ili dilema (2). Prije svega treba čim prije postaviti tačnu dijagnozu iako za ovu bolest ne postoji adekvatna terapija. A potom odlučiti kako i kome sve dati tačnu informaciju, ne smao o vrsti bolesti i načinu nasljedjivanja, nego i o mogućnostima genetskog testiranja fenotipski zdravih članova porodice (2,8). Priatup mora biti multidisciplinaran iu slučaju „dobrih“ a pogotovu „loših vijesti“ nakon testiranja.

Literatura

1. Adams R, Victor M. Principles of Neurology. Forth Edition. New York: McGraw-Hill, Inc., 1989.
2. Terzić R, Tupković E, Logar N, Šehić A, Đurić E, Sinanović O, Peterlin B. Primjena DNA testa u dijagnostici Huntingtonove bolesti. Med Arh 2002; 56 (4): 187-189.
3. Quinn N, Schrag A. Huntington's disease and other choreas. J Neurol. 1998; 245: 709-716.
4. Vonsattel JP, Diiglia M. Huntington's disease. J Neuropath Exp Neurol 1998; 57: 369-384.
5. Penney JB, Young AB, Shoulson I, Starosta-Rubenstein S, Snodgrass SR, Sanchez-Ramos J, Ramos-Arroyo M, Penchaszadek G, Alvin J, Estevez J, DeQuirez I, Marsch N, Moreno H, Conneally PM, Bonilla E, Wexler NS. Huntington's disease in Venezuela, 7 years of follow-up on symptomatic and asymptomatic individuals. Mov Disord 1990; 5:93-99.
6. Reddy S, Housman D. The complex pathology of trinucleotide repeats. Curr Opin Cell Biology 1997; 9: 364-372.
7. Anonymous. Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosome. Cell 1993; 72: 971-983.

8. Simpson SA, Hardine AE. Predictive testing for Huntingtons disease after gene. *J Med Genet* 1993; 30: 1036-1038.
9. Tyler A, Crauford D. Presymptomatic resting for Huntington's disease in the United Kingdom. *Br Med J* 1992; 304: 1953-1956.
10. Relja M, Klepac N. Od gena do terapije – Huntingtonova koreja. *Biochemia medica* 2002; 12 (1-2): 35-38.
11. Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, Theilmann J, Telenius H, Zeisler J, Lin B, Bassett A, Almqvist E, Bird TD, Hayden MR. A worldwide study of the Huntington's disease mutation. *N Engl J Med* 1994; 330:1401-1406.
12. Zappacosta B, Monza D, Meoni C, Austoni L, Soliveri P, Gellera C, Alberti R, antero M, Penati G, Caraceni T. Psychiatric symptoms do not correlate with cognitive decline, motor symptoms or CAG repeat length in Huntington's disease. *Arch Neurol* 1996; 53: 493-497.
13. Haddad MS, Cummings JL. Huntington's disease. *The psychiatric clinics of North America. Neuropsychiatry of the basal ganglia* 1997; 20: 791-809.
14. Van Vugt JPP, Hilten JJ, Roos RAC. Hypokinesia in Huntington's disease. *Mov Disord* 1996; 11: 384-388.
15. Duyao M, Ambrose C, Myers R, Novelletto A. Trinucleotide reapeat leangth instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet* 1993; 4: 387-392.

GENETSKA I MOLEKULARNA RAZMATRANJA HUNTINGTONOVE BOLESTI

N. Canki-Klain, C. Dodé¹, N. Zurak, V. Brinar

SAŽETAK - Huntingtonova bolest (HB) je neumitno smrtonosna, neliječiva, nasljedna neurodegenerativna bolest koja se prenosi na autosoman dominantan način, a pojavljuje se u odraslo životno doba. Nastaje uslijed povećanja polimorfnog CAG trinukleotidnog niza čija je donja granica 35 ponavljanja i koji se nalazi unutar kodirajućeg dijela IT-15 gena. To povećanje ide na račun poliglutaminskog segmenta novog proteina nepoznate funkcije nazvanog huntingtin. Isti tip dinamičke mutacije, koji se prevodi u poliglutaminski niz u odgovarajućem proteinu sedam različitih gena, predstavlja osim u HB molekularnu osnovu sljedećih neurodegenerativnih bolesti: pet vrsta dominantnih spinocerebelarnih ataksija (SCA1-7), dominantne dentato-rubro-palido-luizijanske atrofije (DRPLA) i spinobulbarne mišićne atrofije (SBMA ili Kennedyjeva bolest). Mnoge pojave zapažene kod tih bolesti (somatski mozaicizam, utjecaj spola roditelja koji prenosi mutaciju, anticipacija) od praktične su važnosti za svakog neurologa, a svoje objašnjenje nalaze u dinamičkoj prirodi mutacije koja nastaje ponavljanjem trinukleotida, što predstavlja osnovu svake od tih bolesti. Identifikacija specifične mutacije odgovorne za HB po prvi puta omogućuje sigurnu i specifičnu dijagnostiku koja se može primijeniti u slučaju klinički nesigurne slike ili kada se prividno radi o sporadičnom slučaju u obitelji. Osim toga, molekularna dijagnostika omogućuje predsimptomatsko testiranje u zainteresirane osobe bez potrebe ispitivanja drugih članova obitelji te tako osigurava privatnost ispitivane osobe. Ipak, potrebno je naglasiti da dijagnoza mutacije i u kliničkoj praksi može izazvati ozbiljne probleme ako se testiranje obavi bez genetskog savjetovanja prije i poslije molekularne analize, kao i bez psihološke potpore ispitanika. Isto tako, postoji nepredvidiv rizik stigmatizacije s obzirom na životno osiguranje, zaposlenje, kao i međuljudske odnose. Primjena testiranja HB mutacije i u našoj svakidašnjoj kliničkoj praksi predstavlja velike izazove i moguće probleme za obitelj i stručnjake. Prikazom genetike HB, koji je ilustriran vlastitim podacima molekularne analize trojice bolesnika, želja je autora da približe čitateljstvu najnovija dostignuća na području genetike neuroloških bolesti uzrokovanih povećanjem CAG tripleta.

Ključne riječi: CAG ponavljanje, genetika, Huntingtonova bolest, nestabilna DNK

UVOD

Huntingtonova bolest (HB), koju je 1872. opisao George Huntington, je autosomna dominantna sporo progresivna neurodegenerativna bolest s potpu-

Klinika za neurologiju, Klinički bolnički centar, Zagreb, Hrvatska
Služba za biokemiju i genetiku, Bolnica Cochin-Maternités¹, Paris, Francuska

nom penetracijom u dobi od 70 godina. Tipični bolesnici pokazuju koreičke smetnje, promjene ličnosti i progresivnu demenciju. Početak se obično javlja u odraslo doba života s poprečnom starošću između 35-40 godina. Na taj način u vrijeme postavljanja dijagnoze većina bolesnika već ima potomstvo čiji rizik da oboli od HB iznosi 50%. Približno 5%-10% bolesnika s HB oboli prije 20. godine, dok je pojava bolesti nakon 70. godine rijetka. Oko 90% bolesnika u kojih se bolest pojavila u djetinjstvu dobilo je promijenjen (HB) alel od bolesnog oca. Klinički znaci HB s juvenilnim početkom općenito se vrlo razlikuju od karakterističnih znakova prisutnih u bolesnika s početkom bolesti u odraslo doba (23). Bolest neumoljivo napreduje dovodeći do smrti približno 15-20 godina nakon pojave simptoma, s velikim individualnim odstupanjima. Prevalencija u većini europskih i sjeverno američkih populacija iznosi između 3-7 na 100 000 ljudi, dok izgleda nešto niža (1/100 000 ili manje) u afričkih crnaca i azijata (pregled u 12).

GENETIKA HB

Originalni Huntingtonov opis iz 1872. jasno pokazuje dominantan način nasljeđivanja: "Jedan ili više potomaka gotovo uvijek obolijeva ukoliko dožive odraslu dob. Ali ako kojim slučajem ta djeca tijekom života ne pokažu simptome, veza se prekida te unuci i praunuci prvotnih bolesnika mogu biti razuvjereni da neće oboljeti" (citirano iz 12).

Osim ispunjenja osnovnih kriterija za autosomno dominantno nasljeđivanje, primjer HB dokazuje da Mendelov način nasljeđivanja može pokazivati znatno veća odstupanja nego što se to prije pretpostavljalo. Prva opaska je ukazivala na veliku varijabilnost životne dobi kada se pojavljuju prvi simptomi. Kasnije se uočila velika fenotipska raznolikost unutar obitelji i između generacija, što se danas razjašnjava nepostojanom prirodom HB mutacije. Na kraju se utvrdilo da osoba koja sadrži oba HB alela, tj. HB homozigot, ne pokazuje teži oblik bolesti od HB heterozigota, barem u slučaju kada se ista mutacija naslijedila od zajedničkog pretka (14, 18, 33).

Izoliranje HB gena

Gen koji uzrokuje HB su lokalizirali na distalni kraj kratkog kraka kromosoma 4 (10) u područje 4p16.3 samo tri godine nakon što se spoznala uloga RFLP* pri smještavanju genskih lokusa na kromosome. Godine 1980. Botstein i sur. (4) su pretpostavili da bi se mogla sastaviti cjelovita karta ljudskih gena koja bi se osnivala na povezivanju uz pomoć RFLP, te da bi se tako mogao locirati bilo koji gen odgovoran za neko ljudsko obilježje koje se nasljeđuje po Mendelovim zakonima. Značajna prednost RFLP u odnosu na klasične poli-

* restriction fragment length polymorphism-varijacije dužine fragmenta DNA koji se dobio cijepanjem genomske DNA pomoću restriktivskih enzima.

morfizme je u tome što se za tu analizu može upotrijebiti bilo koja stanica koja sadrži jezgru, budući da je građa DNK u biti ista u svim vrstama stanica.

Ipak, bilo je potrebno punih deset godina da se informacija dobivena o smještaju gena mogla upotrijebiti za konačno izoliranje gena pozicijskim kloniranjem*. Te su se teškoće kod HB povećale položajem gena, budući da je bilo teško identificirati biljege koji se nalaze s obje strane gena, što predstavlja važan korak pri pozicijskom kloniranju. Napokon su sam IT-15 gen izolirali iz cDNK biblioteke mozga (kore čeonog režnja odrasla čovjeka), u obliku 10-11 kb velikog prijepisa koji su također našli i u drugim tkivima. Njemu odgovarajući protein nazvan *huntingtin* ima molekularnu masu od 348 kilodaltona i ne sliči niti jednom poznatom proteinu (14).

Građa gena

IT-15 gen ima 67 egzona čija pojedinačna veličina iznosi od 43 do 341 parova baza (pb) i obuhvaća 180 kb genomske DNK. Blizu 5' kraja gena u prvom egzonu, identificirali su polimorfni (CAG)_n ponavljajući niz (koji kodira poliglutaminski dio), a iza kojega slijedi CCG ponavljajući niz koji kodira područje poliprolina. Na prvotno ispitivana 173 normalna alela našli su 11-34 CAG ponavljajuća niza, dok je 74 HB alela imalo povećanja od ≥ 42 CAG ponavljanja (14). Kasnije se pokazalo da se taj visoko polimorfni CAG ponavljajući niz kreće od 9-35 prijepisa na normalnim kromosomima, dok se na HB kromosomima povećava od 36-121(21). To je otkriće omogućilo razumijevanje različitih pojava koje su se dotada zapažale u HB i nekim drugim bolestima.

Genetska i molekularna osnova nepostojanosti trinukleotidnog ponavljanja

Uloga triplet ponavljajućih nizova u humanoj patologiji nije bila poznata sve do 1991., kada se otkrilo da veliki opseg povećanja vrlo nestabilnih trinukleotidnih ponavljanja uzrokuje fragilni X sindrom (31) i X-vezanu spinobulbarnu mišićnu atrofiju (SBMA ili Kennedyeva bolest) (16). Popis dodatnih bolesti koje uzrokuju povećanje ponavljanja trinukleotida brzo se povećava i dosada je već dosegao brojku 12.

Bolesti koje nastaju uslijed ponavljanja trinukleotida (tablica 1.) dijele se u dvije skupine na osnovi niza koji se ponavlja, stupnja nestabilnosti, smještaja unutar patološkog gena te mehanizma patogeneze bolesti. Značajke prve vrste bolesti su ponavljanja CAG trinukleotida koji se nalaze u kodirajućem dijelu odgovarajućih gena. Druga kategorija obuhvaća bolesti koje nastaju zbog ponavljanja trinukleotida koji se nalaze u nekodirajućim područjima (17).

U proteklih nekoliko godina taj novi tip genetske mutacije se pokazao kao uzročnik deset neurodegenerativnih bolesti (tablica 1.). Jedna od karakterističnih značajki tih bolesti je njihova nestabilna priroda, odakle i naziv *dinamička mutacija* (29). Jednu od najvažnijih kliničkih posljedica te nestabilnosti

* kloniranje gena koje jedino ovisi o položaju gena na određenom kromosomu

Tablica 1.

*Bolesti koje nastaju povećanjem trinukleotidnog ponavljanja
(modificirano prema Wilmont GR, Warren ST, 1998 (34))*

Bolest	MIM	Na- sljeđiva- nje	Krom. smještaj	Simbol Genski produkt	Niz koji se ponav- lja	Mjesto ponav- ljanja	Opseg povećanja		Utjecaj rodi- teljskog podrijet- la
							Nor- malan	Promijenjen	
Spinocerebelar- na ataksija tip 1	164 400	AD	6p23	SCA1 Ataksin-1	CAG	Kodirajuće	6-39	41-81	Očev
Spinocerebelar- na ataksija tip 2	183 090	AD	12q24.1	SCA2 Ataksin-2	CAG	Kodirajuće	14-31	35-64	Očev
Spinocerebelar- na ataksija tip 3 Machado-Josephova b.	109 150	AD	14q24	MJD(SCA3) Ataksin-3	CAG	Kodirajuće	12-41	40-84	Očev
Spinocerebelar- na ataksija tip 6 Episod. ataksija 2	183 086	AD	19p13	SCA6(CACN A1A) (kanal kalci- ja)	CAG	Kodirajuće	7-18	20-23(EA2) 21-27(SCA6)	Nije utvrđen
Spinocerebelar- na ataksija tip 7	164 500	AD	3p12	SCA7 Ataksin-7	CAG	Kodirajuće	7-17	38-130	Očev
Huntingtonova bolest	143 100	AD	4p16.3	IT-15 Huntingtin	CAG	Kodirajuće	6-39	36-121	Očev
Spinobulbarna mišićna atrofija (SBMA) Kennedyeva bolest	313 200	X-vezano recesivno	Xq13-21	AR Receptor an- drogena	CAG	Kodirajuće	11-33	38-66	Nije utvrđen
Dentatorubro- palidoluisian. atrofija (DRPLA)	125 370	AD	12p13	DRPLA(B37) Atrofin-1 (drplap)	CAG	Kodirajuće	6-35	51-88	Očev
Distrofična miotonijska	160 900	AD	19q13	DMPK Distrofična miotonijska protein kina- za	CTG	3'-UTR	5-37	50-3000	Majčin
Friedreichova ataksija	229 300	AR	9q13-21	X25 Frataksin	GAA	Intron 1	6-34	80 (predmu- tacija) 112-1700 (puna mutacija)	Majčin
Fragilni X sin- drom	309 550	X-vezano dominan- tno	Xq27.3	FMR1 (FRAXA) FMRP	CGG	5'-UTR	6-52	60-200 (pred- mutacija) 230-1000 (puna mutacija)	Majčin
Fragilna XE duševna zao- stalost	309 548	X-vezano dominan- tno ?	Xq28	FMR2 (FRAXE) FMR2 prote- in	GCC	5'-UTR	7-35	130-150 (pred- mutacija) 230-750 (puna mutacija)	Nije utvrđen

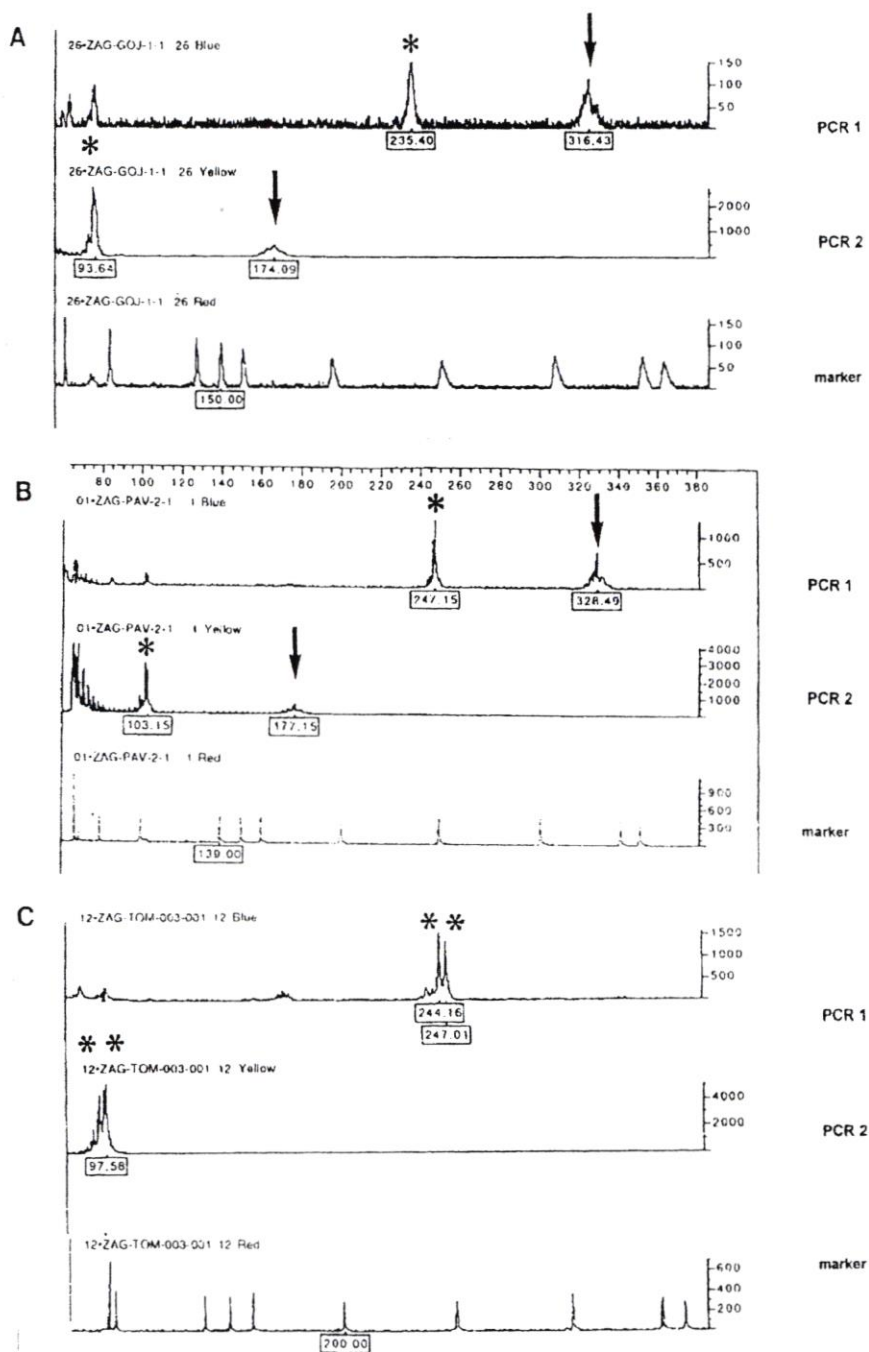
predstavlja variranje simptoma bolesti unutar obitelji i među generacijama. Povećana ponavljanja su nestabilna i često pokazuju varijacije u veličini unutar tkiva nekog bolesnika (*somatski mozaicizam, mitotska nestabilnost*). Njihova veličina se mijenja pri prijenosu s roditelja na djecu (*mejotska nestabilnost*). Na nestabilnost ponavljanja svih vrsta nizova trinukleotida utječe veličina ponavljanja koja postoji u roditelja od kojega se prenosi. U slučaju CAG ponavljanja nestabilna su samo povećanja ponavljanja u opsegu koji izaziva bolest, što ukazuje na postojanje praga prekoračenje kojega izaziva bolest. Položaj ponavljanja unutar gena predstavlja presudnu činjenicu u predviđanju nestabilnosti trinukleotidnog ponavljanja. Roditeljski učinak se očituje spolom roditelja koji prenosi trinukleotidna ponavljanja i čini se da predstavlja najbolji putokaz hoće li doći do povećanja ili promjene ponavljanja. U slučaju HB, prienos CAG ponavljanja s očeva HB alela pokazuje sklonost značajnom daljnjem povećanju. Ispitivanja su pokazala da poprečna promjena u dužini broja trinukleotida u slučaju prijenosa s oca pokazuje povećanje od 3-9 jedinica ponavljanja, dok uobičajena promjena u slučaju prijenosa s majke iznosi oko jednu jedinicu ponavljanja više ili manje (8, 24). Povremena opsežna povećanja jedinica ponavljanja (tj. > 20 tripleta) koja su opažena u HB bolesnika, gotovo su se uvijek naslijedila od oca. Ta sklonost daljnjem povećanju pri prijenosu preko oca obrazlaže približno deset godina raniju pojavu bolesti u djece bolesnih muškaraca, dok potomci HB bolesnica obolijevaju približno u istoj životnoj dobi kao i njihove bolesne majke (24, 28). Zbog tih je razloga 90% osoba s juvenilnim početkom HB naslijedilo povećani alel od bolesnog oca. Studije trinukleotidnih ponavljanja koja povećavanjem uzrokuju bolesti čovjeka su ustanovile da su prekidi slijedova unutar ponavljanja i nizovi koji se nalaze tik uz ponavljanja važni pri određivanju stabilnosti. Opisani *sporadički slučajevi HB* pokazuju da su nastali povećanjem CAG ponavljanja *prijelaznih alela (PA)* čija veličina iznosi 27-35 (21). Studije PA obitelji s novo nastalim mutacijama te PA u općoj populaciji dovele su u tijesnu vezu varijacije u 12 nukleotida koji se nalaze neposredno iza CAG područja, a ispred neznatno varijabilnog CCG predjela. Na osnovi samo jedne analize sperme (5) čini se da su PA koji sadrže te varijacije nestabilniji od PA koji ih nemaju. Nestabilnost ponavljanja je klinički važna pojava, budući da pruža molekularno objašnjenje *anticipacije* koju možemo definirati kao progresivno sve raniji početak bolesti uza sve težu kliničku sliku u sljedećim generacijama bolesnika (11).

Molekularno testiranje

Napredak direktne molekularne analize koja pokazuje značajan stupanj *osjetljivosti** i *specifičnosti*** radikalno su izmijenili dijagnostiku i predviđanje HB. U kratkom roku nakon prvotnog izvještaja o otkriću HB gena u ožujku 1993. (14) laboratoriji diljem svijeta su počeli analizirati svoje vlastite serije

* odnosi se na omjer slučajeva koji su otkriveni

** učestalost kojom neki test otkriva samo bolesne osobe



Sl. 1. Prikazane dužine CAG ponavljanja za bolesnike 1-3(A-C) upotrebom prajmera koji umnožavaju CAG i CCG ponavljanja (PCR1) i prajmera koji umnožavaju samo CAG ponavljanje (PCR2). Zvezdica označuje normalni alel, a strelica HD alel.

Druga PCR2 analiza, koja upotrebljava HD1 i HD3 prajmere (32), umnožava samo CAG područje, budući da se HD3 preklapa s CAG područjem. Taj se PCR upotrebljava kao kontrola prvom PCR-u.

Kombinacija PCR1 i PCR2 je vrlo korisna u slučaju ispitivanja obitelji, budući da istodobno može ispitivati neku povećanu CAG mutaciju i CCG polimorfizam, što omogućava izbjegavanje moguće pogreške između genomske DNK te potvrdu dijagnoze.

Pri oba testa jedan od dva prajmera se označi fluorokromom. Umnoženi DNK ulomci se odjeljuju na 6% poliakrilamidnom gelu uz pomoć aparata za kompjutorsku analizu nizova: Applied Biosystem 377 s Genescan programom, koji izravno izračunava dužinu DNA ulomka uspoređujući ga s jednim biljekom koji sadrži svaki test.

Broj CAG se izračunava na sljedeći način:

Za PCR1 dužina ulomka - 194 pb/3

Za PCR2 dužina ulomka - 47 pb/3

Ako postoji razlika između broja CAG što se dobije s oba PCR-a, izdaje se rezultat koji se osniva na broju CAG dobivenim PCR2, koji isključuje polimorfni broj CCG ponavljanja.

REZULTATI

Sl. 1. prikazuje dužine CAG ponavljanja koje su se dobile PCR1 i PCR2 analizom za trojicu bolesnika. Bolesnici 1 i 2 sa znakovitim kliničkim simptomima i pozitivnom obiteljskom anamnezom za HB pokazali su po jedan alel sa 16 (bolesnik 1) i 19 (bolesnik 2) CAG ponavljanja, što se nalazi unutar normalnih vrijednosti koje se kreću od 9-35 ponavljanja CAG trinukleotida. Drugi, tj. HD alel, u prvoga bolesnika je imao 42, a u drugoga 43 ponavljanja, što odgovara području bolesti koje se kreće od 36 do 121 ponavljanja. Treći bolesnik, koji nije imao pozitivnu obiteljsku HB anamnezu i čiji su klinički simptomi bili atipični, imao je dva normalna alela sa 7 CAG. PCR2 je pokazao samo jedan vrh s 97 nukleotida. PCR1 je pokazao dva vrha: jedan s 244 i drugi s 247 nukleotida s međusobnom razlikom od jednog CCG.

Analiza DNK je potvrdila dijagnozu u dvojice bolesnika s klasičnim simptomima i pozitivnom HB obiteljskom anamnezom, a isključila je HB u trećega bolesnika koji se još ispituje.

RASPRAVA

Postojanje istog mutacijskog mehanizma i istovrsnog tipa CAG povećanja ponavljanja, premda različitog opsega, u svim ispitivanim populacijama (15) od značajnog je praktičnog i epidemiološkog značenja. S praktične točke gledišta, analiza povećanja ponavljanja može se upotrijebiti u predviđanju pojave i dijagnozi bolesti bilo gdje u svijetu bez potrebe za modifikacijom na račun specifičnih lokalnih mutacija.

U drugu ruku, epidemiološki gledano, ta činjenica ne pomaže pri razjašnjenju zajedničkog pretka i podrijetla. Čini se sigurnim da svi očiti slučajevi *de novo* nastale HB obitelji potječu od zdravih osoba koje nose jedan PA (1,7,19). Ti podaci daju naslutiti da sposobnost uzrokovanja bolesti u tzv. bolestima s "dinamičkom mutacijom" ne predstavlja fenomen sve ili ništa. Nazivi "prijelazni" ili "neodređen" se upotrebljavaju za IT-15 alele s brojem ponavljanja koji predstavlja granično područje između normalnog i abnormalnog CAG ponavljanja. Nedavno su tu skupinu podijelili u dvije podskupine koje čine "promjenljivi" aleli i aleli s "umanjenom prodornošću" (21).

"Promjenljivi" aleli obuhvaćaju dužinu od 27-35 ponavljanja. Oni su normalni, ali iz njih mogu nastati *de novo* mutacije, vjerojatno mejotskom nestabilnošću udruženom s promjenama u nizu 12 nukleotida koji se nalaze odmah iza CAG područja, a ispred neznatno promjenljivog CCG područja (9).

Aleli s "umanjenom prodornošću" obuhvaćaju područje od 36-39 ponavljanja (27, pregled u 20, 21). Ti aleli mogu uzrokovati simptome bolesti, iako to uvijek ne čine unutar normalno dugo očekivanog životnog vijeka. Drugim riječima, neprodornost se može definirati kao nepostojanje kliničkih ili patoloških znakova bolesti u osoba koje žive iznad očekivanog normalnog ljudskog vijeka. Još nam nije poznat empirijski rizik za prodornost specifičnih dužina ponavljanja između 27-39 CAG ponavljanja (21).

Prividno sporadični HB bolesnici (7) zaslužuju posebno razmatranje. Podaci iz literature (pregled u 3) pokazuju kako na usamljene slučajeve otpada najviše 2% svih slučajeva ili 5% svih obitelji. Kada se primijene stroži kriteriji te vrijednosti padaju na 0,04% odnosno 0,1%. Otkako je otkrivena specifična mutacija, neki slučajevi mogućih novih mutacija su se ponovo ispitivali. U većini slučajeva relevantan roditelj ima broj ponavljanja od 27-35, što se nalazi unutar "prijelaznih alela" koji premošćuju normalne i HB alele. Potrebno je naglasiti da se u svim takvim dosada dokumentiranim slučajevima radilo o ocu koji je imao prijelazni alel. Vrlo je važno poznavati taj učinak roditeljskog podrijetla, budući da on objašnjava prividno *de novo* HB mutacije, kao i juvenilni oblik HB. Prepoznavanje usamljenog HB bolesnika od neobično velikog je značenja za genetsko savjetovanje, budući da taj sporadičan bolesnik ima isti genetski rizik za prijenos bolesti kao bilo koji drugi bolesnik s autosomnim dominantnim poremećajem, ali rizik također postoji za djecu takvog bolesnika i za njihovo potomstvo, za razliku od situacija kada se radi o drugim "nedinamičkim" mutacijama gdje je takav rizik praktički zanemarljiv.

Homozigomi oblik HB zahtijeva posebna razmatranja, pošto takvi bolesnici ne pokazuju kliničke razlike od HB heterozigota, po čemu se HB razlikuje od nekih drugih autosomnih dominantnih nasljednih bolesti poput ahondroplazije ili obiteljske hiperkolesterolemije u kojima homozigoti pokazuju mnogo teže znakove bolesti. Ti podaci govore u prilog hipotezi da osnovna biokemijska greška u HB nije rezultat gubitka funkcije normalnog HB gena, jer bi se u tom slučaju očekivala mnogo teža fenotipska slika kada su prisutne dvije kopije. Zbog toga bi bolje objašnjenje bilo da se radi o manjci koja ima za posljedicu

dobitak ili oštećenje funkcije, jer bi to bilo primjerljivo učinku koji je nastao uslijed jedne ili dviju kopija.

HB homozigoti su neobično rijetki, budući da postojanje homozigota zahtijeva jednu od triju izvanredno rijetkih situacija: 1) u osobe koja je naslijedila jedan HB gen od jednog roditelja trebalo bi doći do nove mutacije u normalnom alelu, 2) bolesnik bi mogao naslijediti dvije kopije HB gena od bolesnog roditelja preko uniparentne izodisomije, te niti jedan normalan gen od zdravog roditelja, 3) oba roditelja nose HB gen (14, 18, 33). Prepoznavanje ove posljednje mogućnosti ima praktične genetske posljedice. Naime, HB heterozigotni roditelji imaju tri od četiri mogućnosti da im potomak ima HB. Ako je jedan od roditelja HB homozigot, očekuje se da će sva djeca biti bolesna premda je drugi roditelj zdrav, jer će svi naslijediti jedan HD gen od homozigotnog roditelja.

Ako se osvrnemo na specifičnost, potrebno je znati može li se HB mutacija skrivati iza kliničkih entiteta za koje se obično misli da se razlikuju od HB. Specifičnost HB mutacije su potvrdili odsutnošću mutacije u seriji od 75 demenčnih starijih bolesnika, u skupini od 88 bolesnika s Alzheimerovom bolešću i u velikom nizu bolesnika sa shizofrenijom (pregled u 13). Čini se da je mutacija isto toliko specifična koliko je osjetljiva. Zbog toga, u slučaju kada se mutacija ne nađe, potrebno je misliti na drugu dijagnozu. Najviše zabune predstavlja zamjena HB s dentato-rubro-palidoluizijanskom atrofijom (DPRLA), koja nastaje zbog povećavanja CAG niza na kromozomu 12.

ZAKLJUČCI

Dinamička priroda CAG ponavljanja unutar kodirajućeg područja IT-15 gena objašnjava različite pojave znakovite za HB.

1. Blagi somatski mozaicizam koji nastaje uslijed blage mitotičke nestabilnosti.
2. Anticipaciju koju objašnjava mejotska nestabilnost.
3. Učinak roditeljskog podrijetla gena objašnjava juvenilni tip HB.
4. Prijelazni ili mutabilni aleli (27-35 ponavljanja) koji sami za sebe ne izazivaju simptome bolesti, ali mogu uzrokovati *de novo* mutacije, vjerojatno zbog mejotske nestabilnosti.
5. Aleli s umanjenom prodornošću (36-39 ponavljanja) mogu uzrokovati simptome bolesti, ali se to ne mora uvijek dogoditi za vrijeme normalno očekivane dužine trajanja života.

Analiza DNK je potvrdila dijagnozu u dvojice naših bolesnika s klasičnim simptomima i pozitivnom obiteljskom HB anamnezom, dok je isključila HD u trećega bolesnika. Ispitivanje ovoga bolesnika je još u tijeku.

LITERATURA

1. Alford RL, Ashizawa T, Jankovic J, Caskey CT, Richards CS. Molecular detection of new mutations, resolution of ambiguous results and complex genetic counseling issues in Huntington disease. *Am J Med Genet* 1996; 66: 281-6.
2. Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B et al. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 1993; 4: 398-403.
3. Barron LH, Rae A, Holloway S et al. A single allele from the polymorphic CCG rich sequence immediately 3' to the unstable CAG trinucleotide in the IT 15 cDNA shows almost complete disequilibrium with Huntington's disease chromosomes in the Scottish population. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 173-5.
4. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet* 1980; 32: 314-31.
5. Chong S, Almquist E, Telenius H et al. Contribution of DNA sequence and CAG size to mutation frequencies of intermediate alleles for Huntington disease: evidence from single sperm analyses. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 301-9.
6. Dodé C, Dürr A, Pecheux C et al. Huntington's disease in French families: CAG repeat expansion and linkage disequilibrium analysis. *Sci Vie* 1993; 316: 1374-80.
7. Dürr A, Dodé C, Hahn V et al. Diagnosis of "sporadic" Huntington's disease. *J Neurol Sci* 1995; 1129: 51-5.
8. Duyao M, Ambrose C, Myers R, et al. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet* 1993; 44: 387-92.
9. Goldberg YP, McMurray C, Zeisler J et al. Increased instability of intermediate alleles in families with sporadic Huntington disease compared to similar sized intermediate alleles in the general population. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1911-8.
10. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 1983; 306: 234-8.
11. Harper PS, Harley HG, Reardon W, Shaw DJ. Anticipation in myotonic dystrophy: new light on an old problem. *Am J Med Genet* 1992; 51: 10-6.
12. Harper PS. Huntington's disease. 2nd ed. London: WB Saunders, 1996; 201-239.
13. Harper PS, Shaw D. Huntington's disease: genetic and molecular studies. In: PS, ed. *Huntington's Disease* 2nd ed. London: WB Saunders, 1996, 241-92.
14. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993; 72: 971-83.
15. Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, et al. Worldwide study of the Huntington's disease mutation. *N Engl J Med* 1994; 330: 1401-6.
16. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck K. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991; 352: 77-9.
17. La Spada AR. Trinucleotide repeat instability: genetic features and molecular mechanisms. *Brain Pathol* 1997; 7: 943-63.
18. Myers RH, Leavitt J, Farrer L et al. Homozygote for Huntington's disease. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 615-8.

19. Myers RH, MacDonald ME, Koroshetz WJ, et al. *De novo* expansion of a (CAG)_n repeat in sporadic Huntington's disease. *Nat Genet* 1993; 5: 168-73.
20. Nance MA. Huntington disease - another chapter rewritten. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 1-6.
21. Nance MA. Clinical aspects of CAG repeat diseases. *Brain Pathol* 1997; 7: 881-900.
22. Pecheux C, Mouret J-F, Dürr A, Agid Y, Feingold J, Brice A, Dodé C, Kaplan JC. Sequence analysis of the CCG polymorphic region adjacent to the CAG triplet repeat of the HD gene in normal and HD chromosomes. *J Med Genet* 1995; 32: 399-400.
23. Quarrell O, Harper PS. The clinical neurology of Huntington's disease. In: Harper PS, ed. *Huntington's disease*. 2nd ed. London: W B Saunders, 1996; 31-72.
24. Ranen NG, Stine OC, Abbott MH et al. Anticipation and instability of IT-15 (CAG)_n repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 593-602.
25. Riess O, Noerremoele A, Soerensen SA et al. Improved PCR conditions for the stretch of (CAG)_n repeats causing Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 637.
26. Rubinsztein DC, Barton DE, Davison BC et al. Analysis of the Huntington gene reveals a trinucleotide-length polymorphism in the region of the gene that contains two CCG-rich stretches and a correlation between decreased age of onset of Huntington's disease and CAG repeat number. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1713-5.
27. Rubinsztein DC, Leggo J, Coles R, et al. Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington's disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 16-22.
28. Snell RG, MacMillan JC, Cheadle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P, et al. Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet* 1993; 4: 393-7.
29. Sutherland GR, Richards RI. Dynamic mutations on the move. *Med Genet* 1993; 30: 978-98.
30. Valdes JM, Tagle DA, Elmer LW, et al. A simple non-radioactive method for diagnosis of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 633-4.
31. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65: 905-14.
32. Warner JP, Barron LH, Brock DJ. A new polymerase chain reaction (PCR) assay for the trinucleotide repeat that is unstable and expanded on Huntington's disease chromosomes. *Mol Cell Prob* 1993; 7: 235-9.
33. Wexler NS, Young AB, Tanzi RE et al. Homozygotes for Huntington's disease. *Nature* 1987; 326: 194-7.
34. Wilmont GR, Warren ST. A new mutational basis for disease. In: Wells RD, Warren ST, eds. *Genetic instabilities and hereditary neurological diseases*. San Diego: Academic Press, 1998; 3-12.

ETIČKI I PSIHOLOŠKI ASPEKTI MOLEKULARNE DIJAGNOSTIKE HUNTINGTONOVE BOLESTI

N. Canki-Klain

SAŽETAK - Otkriće specifične i osjetljive mutacije koja je uzročnik Huntingto-
nove bolesti (HB) pruža osnovu za siguran genetski test koji može odrediti je li
HB mutacija prisutna u bolesnika ili u rizične osobe. Taj pronalazak ima ve-
liki značenje za članove obitelji bolesnika, kao i za sve stručnjake koji sudje-
luju u procesu testiranja. Mogućnost genetske dijagnostike ove bolesti i u
našoj sredini, navela je autoricu da istakne značenje genetskog savjetovanja
prije i poslije testiranja, kao i potrebu za pomoć osobama koje su se podvrgle
ispitivanju.

Ključne riječi: genetsko savjetovanje, etika, genetsko testiranje, Huntingtonova bo-
lest, psihologija

UVOD

Huntingtonova bolest (HB), (MIM*143 100) predstavlja prvu poznatu
smrtonosnu autosomnu dominantnu bolest koja se očituje u odrasloj životnoj
dobi neurološkim i psihičkim simptomima do demencije, za koju do danas ne
postoji nikakva mogućnost liječenja i čiji je IT-15 gen (13) danas moguće sigurno
dijagnosticirati metodama molekularne biologije (6,9,13,18). Potrebno je
naglasiti da se dijagnostika te bolesti može učiniti u vrlo različitim situacija-
ma. Prvu čini potvrda dijagnoze u bolesnika, dok se druga, presimptomatska,
tiče rizične ali još zdrave i asimptomatske osobe iz bolesnikove obitelji.

* MIM broj iz McKusick VA. Mendelian Inheritance in Man. Catalogs of autosomal dominant, au-
tosomal recessive and X linked phenotypes. 11th Ed. Baltimore: Johns Hopkins, University Press,
1994. Online version: OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) dostupan preko Interneta:
<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/OMim/searchomim.html>

GENETSKI TEST

Pod genetskim testom općenito podrazumijevamo otkrivanje neke osobi-
tosti ispitanika koja može izazvati nastanak bolesti koja je u potpunosti ili dje-
lomično genetske etiologije. Premda na prvi pogled izgleda da ne postoji bitna

Klinika za neurologiju, Klinički bolnički centar, Zagreb, Hrvatska

Primljeno: 13. ožujka 1998.

razlika između genetskog testa (DNA analiza) ili nekog drugog biološkog ispitivanja, ta razlika ipak može biti znatna. To naročito vrijedi za testiranje čiji je cilj predviđanje mogućeg nastanka bolesti bez obzira radi li se o genetskom statusu neke osobe ili riziku za njenu još nerođenu djecu. U tim prilikama ispitivati DNA znači pristupiti u najdublju nutrinu neke osobe čije pravo da sazna kao i da ne sazna, ako ne želi, treba biti posebno zaštićeno.

Određivanje značajki neke osobe ne ograničuje se samo na ispitivanje njezine DNA, već obuhvaća cjelokupan medicinski postupak koji je osoban koliko prije uzimanja uzorka (većinom krvi) toliko i prilikom priopćavanja rezultata. Kako se radi o kliničko-biološkom postupku, koji zauzima posebno mjesto u medicini, mnoge su zemlje zakonski odredile tko može zahtijevati i priopćavati rezultate takvog testiranja. Ilustracije radi navodim da je zahtjev za genetskim testom karcinoma dojke značajno različit od istog testa u slučaju HB.

Kako je molekularna dijagnostika HB moguća već neko vrijeme i u nas, potrebno je poznavati probleme koje sa sobom donosi zahtijevanje takvog genetskog testa.

Genetsko testiranje bolesnika

Već samo molekularno testiranje (11) sa svrhom potvrde dijagnoze klinički očite bolesti nalaže objašnjenu pismenu privolu bolesnika ili opunomoćene osobe ukoliko stanje bolesti ne dozvoljava da bolesnik donese odluku. Pri tom treba voditi računa o psihološkim problemima koji proizlaze iz otkrića da se radi o teškoj, neliječivoj i nasljednoj bolesti, kao i o posljedicama te informacije za bliske i dalje srodnike i njihovo potomstvo.

Genetsko savjetovanje može zatražiti osoba s određenim kliničkim simptomima koja se zanima za točnu dijagnozu ne zbog sebe već zbog svoje djece. Ako su djeca, već rođena, ali još maloljetna, čemu služi određivanje njihova genetskog statusa? Ukoliko bolesnik još nema potomstva, može se eventualno postaviti pitanje prenatalne dijagnostike ako dode do trudnoće. U tom slučaju dijagnostika se izvodi ne u interesu bolesnika, već njegove moguće buduće djece. Treba naglasiti da većina medicinskih genetičara ne brani samo interese bolesnika ograničujući se na njegovu osobnu korist, već vode računa o njegovoj obitelji, bilo da se radi o najbližim srođnicima ili njihovu potomstvu. U slučaju kada bi isto testiranje bilo korisno za daljeg rođaka, potrebno je prvenstveno braniti interese bolesnika.

Genetsko testiranje koje može značiti presimptomatski test za jednog od bolesnikovih roditelja

HB spada u posebnu skupinu neurodegenerativnih bolesti koje nastaju uslijed povećanja ponavljanja CAG trinukleotida preko određenog praga ovisnog o vrsti gena (4,15). To trinukleotidno ponavljanje je nestabilno i pokazuje tendenciju povećanju u slijedećim generacijama. Ono čini osnovu fenomena *anticipacije*, pod kojim se podrazumijeva sve teži oblik bolesti iz generacije u

generaciju te njeno pojavljivanje u sve ranijoj životnoj dobi. Zbog spomenutog je fenomena moguće, da u rijetkim slučajevima, molekularna potvrda dijagnoze u bolesnika ima neželjen učinak presimptomatske analize u još zdravog roditelja bolesnika koji ne želi znati nosi li patološki gen, tj. da će jednog dana u bližoj ili daljoj budućnosti oboljeti.

Presimptomatska dijagnostika

Određivanje genetskog statusa klinički zdrave, ali rizične osobe iz bolesnikove obitelji predstavlja presimptomatsku dijagnostiku (12). Premda to testiranje omogućuje obaviješteno i odgovorno planiranje obitelji, ono sa sobom donosi niz etičkih problema (3) koji do danas još nisu riješeni. The International Huntington Association (IHA) i World Federation of Neurology (WFN) Research Group on Huntington's Disease, potaknuti mnogobrojnim pitanjima i dvojabama, pripravili su dokument (14) koji određuje uvjete za prediktivnu dijagnostiku. U tom se tekstu naglašava načelo nezavisnosti, načelo suglasnosti nakon objašnjenja, načelo povjerljivosti te potreba za preuzimanjem multidisciplinarne, dugotrajne brige o testiranim osobama. Za ilustraciju navodim iskustvo jednog takvog tima koji čine genetičar, neurolog, psiholog, neuropsiholog, socijalni radnik i psihijatar, a koji djeluje u okviru bolnice Salpetriere u Parizu (7,8). U četiri godine postojanja centar je primio 238 molbi za presimptomatsku dijagnozu HB. Na kraju postupka koji se sastoji od dugotrajnog razmatranja svakog molitelja uz pomoć spomenutih članova tima, samo je 140 osoba tražilo da im se priopći rezultat, 98 ispitanika je odustalo od postupka, 71 od njih nakon prvog razgovora.

Testiranje malodobne osobe

Premda se čini normalnim upotrijebiti sve dijagnostičke mogućnosti, prema tome i metode molekularne biologije, kako bi se potvrdila ili isključila neka genetska bolest, možemo se pitati je li opravdano genetsko testiranje malodobne asimptomatske osobe na bolest za koju danas nema lijeka. Interes maloljetnika treba biti iznad interesa roditelja. Roditeljska tjeskoba i želja za negativnim rezultatom ne bi smjele natjerati roditelje na testiranje djece kojima takvo testiranje može više štetiti nego koristiti. Osim u iznimnim slučajevima, testiranje malodobnih osoba nije dozvoljeno. Posebno težak problem za izvođače testiranja predstavljaju molbe adolescenata koji aktivno traže presimptomatsku analizu (2).

Na kraju je potrebno spomenuti problem usvojenja. Iako je razumljivo da budući adoptivni roditelji žele zdravo dijete, pitanje testiranja djeteta bez obzira na čiji zahtjev (budućih roditelja ili ustanova koje posreduju u usvojenju) vrlo je prijeporno. Poznavanje obiteljskih podataka, posebno kada se radi o bolesti s pojavom u odraslo doba, može biti korisno. Međutim, treba li buduće roditelje izvijestiti o tom podatku? Je li potrebno testirati i usvajati samo djecu bez patološkog gena? "Roditelji ipak usvajaju dijete, a ne odraslu osobu !!!" (1).

ZAHTJEV ZA TESTIRANJE

Traženje molekularne dijagnostike HB dozvoljava se samo ako je u interesu bolesnika i to nakon objašnjenog pismenog pristanka. Vodeći računa o posljedicama za osobu koja pristaje na test, zahtjev za genetsku analizu treba biti strogo osoban. Čak i kada se radi o dijagnostičkom testu, bolesnika ili njegova opunomoćenika treba prije pristanka obavijestiti o posljedicama testa, premda nije prikladno bolesnika opterećivati potankostima.

Sasvim drugi, premda ne lakši slučaj predstavlja asimptomatski bolesnik koji zbog obiteljske anamneze traži testiranje. Kako se radi o već poznatoj genetskoj bolesti u obitelji, najprikladnije mjesto za traženje takvog testa trebalo bi biti u okviru specijaliziranog genetskog savjetovaništva.

Osobu koja traži takvo testiranje prije pismenog zahtjeva za taj test treba jasno obavijestiti o kliničkim i genetskim obilježjima bolesti (4,10), o izravnim posljedicama testiranja za mogućeg nositelja i njegovo postojeće ili buduće potomstvo, o današnjoj nemoći bilo kakvog liječenja te o dostupnosti pouzdane prenatalne dijagnostike.

Korist za bolesnika se ne procjenjuje samo sa stajališta fizičkog zdravlja ispitanika, već treba voditi računa o njegovu psihičkom stanju (5). Kako bi se što bolje moglo procijeniti je li osoba koja se želi testirati sposobna podnijeti za nju moguć nepovoljan rezultat, uporno se zahtijeva dugotrajna priprema ispitanika.

Jedino ako je razumljivo i ispravno informirana te ako je imala dovoljno vremena razmisliti o koristi, granicama i posljedicama testiranja, osoba s rizikom može sama prosuditi želi li uistinu to ispitivanje.

PRIOPĆAVANJE REZULTATA

Prigodom priopćavanja rezultata potrebno je djelomice ponoviti objašnjenja koja su prethodila uzimanju uzorka. Može se dogoditi, premda rijetko, da ispitanik odbije doznati rezultat ispitivanja. Takve su situacije rijetke ako je pripremno razdoblje bilo dovoljno dugo i pomognuto članovima multidisciplinarnog tima. Do trenutka usmenog priopćavanja testa ispitanik ima isključivo pravo saznati, ali isto tako i ne saznati istinu, zaželi li tako u zadnji čas. Na taj način ispitanik koji želi imati korist od testa može u potpunoj slobodi, bez pritiska okoline a osobito obitelji, saznati svoju vlastitu budućnost.

Kako svatko od nas različito reagira na udarce sudbine, pri zahtjevu za testiranje, kao i kod priopćavanja rezultata tijekom genetskog savjetovanja, korisna je nazočnost bliske osobe iz obitelji. U takvim slučajevima od velike bi koristi bio iskusan, psihoterapijski educiran psiholog, kojih, nažalost, nigdje nema dovoljno.

Rezultati testa ne smiju biti priopćeni trećoj osobi, čak ni liječniku bez izričite dozvole bolesnika. Potrebno je poduzeti sve mjere opreza kako rezultati genetskog testiranja ne bi bili očito navedeni u medicinskoj dokumentaciji ispitanika. I na kraju treba naglasiti striktno pridržavanje liječničke tajne.

PRAĆENJE BOLESNIKA

Bez obzira na ishod testa, nakon priopćavanja rezultata bolesniku ili ispitaniku treba osigurati psihološku potporu (16,17). Po mogućnosti tu bi pomoć trebalo organizirati već prilikom priprema za testiranje. Čak i normalan rezultat testa ne znači nužno da takva pomoć nije potrebna. Mnogo se očekuje od multidisciplinarnog tima, čija je uloga pomoći novoj kategoriji bolesnika - još zdravih nositelja gena teške bolesti, koji iz dana u dan sa strepnjom očekuju pojavu prvih znakova bolesti. Čak i ako se pokaže da osoba ne nosi gen, ispitanik se teško odvađa od svojih najbližih koji su bili lošije sreće od njega.

LITERATURA

1. Briard ML. La prescription de tests genetiques. 13eme Seminaire Genetique Clinique. Hopital des Enfants Malades, Paris, mars 1997, 41-46.
2. Binedell J, Soldan JR, Scourfield J., Harper PS. Huntington's disease predictive testing: the case for an assessment approach to requests from adolescents. *J. Med Genet* 1996; 33: 912-918.
3. Canki-Klain N. Etički problemi u humanojoj genetici. U: Švajger A, Medicinska etika. Priručno štivo. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 1996; 63-70.
4. Canki-Klain N, Dode C, Zurak N, Brinar V. Genetic and molecular studies of Huntington's disease. *Neurol Croat* 1998 (in press).
5. Canki-Klain N. Genetika i psihološka medicina. U: Klain E, ur. Psihološka medicina (in press).
6. Dode C, Durr A, Pecheux C, et al. Huntington's disease in French families: CAG repeat expansion and linkage disequilibrium analysis. *Sciences de la Vie* 1993 ; 316: 1374-1380.
7. Durr A. Diagnostic presymptomatique et la maladie de Huntington. 13eme Seminaire de Genetique Clinique, Hopital des Enfants Malades, Paris, mars 1997:79.
8. Feingold J, Durr A, Brice A, et al. Maladie de Huntington: genetique et diagnostic presymptomatique. *Mouvements anormaux*, Paris, 1994; 47-53.
9. Goldberg YP, Kremer B, Andrew SE, et al. Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects. *Nat Genet* 1993; 5:174-179.
10. Harper P. Huntington's disease, 2nd ed. London: WS Saunders, 1996.
11. Harper P, Shaw D. Huntington's disease: genetic and molecular studies. In: Harper P, ed. Huntington's disease, 2nd ed. London: WS Saunders, 1996; 241-292.
12. Harper P, Soldan J, Tyler A. Predictive test in Huntington's disease. In: Harper P, ed. Huntington's disease, 2nd ed. London: WS Saunders, 1996 : 395-424.
13. Huntington's Disease Collaborative Research Group: A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable in Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993; 72: 971- 978.
14. International Huntington's Association and World Federation of Neurology. Guidelines for the molecular genetic predictive test in Huntington's disease. *J Med Genet* 1994 ; 31 : 555-559.

15. La Spada AR. Trinucleotide repeat instability: genetic features and molecular mechanisms. *Brain Pathol* 1997; 7:943-963.
16. Lawson K, Wiggins S, Green T et al. Adverse psychological events occurring in the first year after predictive testing for Huntington's disease. *J Med Genet* 1996; 33: 856-862.
17. Tibben A, Duivenvoorden HJ, Vegter-van der Vlis et al. Presymptomatic DNA testing for Huntington disease: identifying the need for psychological intervention. *Am J Med Genet (Neuropsychiatric Genetics)* 1993; 48 :137-144.
18. Warner JP, Barron LH, Brock DK. A new polymerase chain reaction (PCR) assay for the trinucleotide repeat that is unstable and expanded on Huntington's disease chromosomes. *Mol Cell Probes* 1993; 7: 235-239.

Adresa autora: Prof. dr. sc. Nina Canki-Klain, Klinika za neurologiju, Klinički bolnički centar, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Croatia

ETHICAL AND PSYCHOLOGICAL ASPECTS OF HUNTINGTON'S DISEASE

N. Canki-Klain

ABSTRACT - The discovery of a specific and sensitive mutation responsible for Huntington's disease (HD) provides the basis for an accurate genetic test to determine whether or not the HD mutation is present in a patient or in a person at risk. This finding is of profound importance for HD family members as well as for those professionally involved. The possibility of such genetic testing in Croatia has stimulated the author to emphasize the need of pretest and aftertest counseling to provide those requesting HD genetic analysis with due preparation and support.

Key words: counseling, ethics, genetic testing, guidelines, Huntington's disease, psychology

INTRODUCTION

Huntington's disease (HD; MIM* 143 100) is the first lethal autosomal dominant disease that manifests at an adult age by neurologic and psychic symptoms ranging to dementia, for which there is no treatment available and whose IT-15 gene (13) can be positively diagnosed by the methods of molecular biology (6,9,13,18). It should be emphasized that two quite different situations can be encountered on making the diagnosis of the other, presymptomatic one, refers to the as yet healthy and asymptomatic member of the patient's family who is considered to be at risk of the disease development.

* MIM number according to: McKusick VA. Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes, 11th Ed. Baltimore: John Hopkins University Press, 1994. Online version: OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), available on Internet: <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.html>

GENETIC TESTING

A genetic test generally implies detection of the subject's specificity that may induce the onset of a disease with a completely or partially genetic etiology. Although it may at first sight seem that there is no basic difference

University Department of Neurology, University Hospital Centre, Zagreb, Croatia

Received: March 13, 1998

between genetic testing (DNA analysis) and some other biological study, the difference can be substantial. This especially implies to a test aiming at predicting the possible onset of a disease involving the genetic status of the person or the risk for the person's unborn children. In these situations, DNA testing implies approaching the most intimate part of the person whose right to know or not to know should be fully respected and protected.

Determination of the person's characteristics is not limited to his/her DNA studies, but includes complete work-up which is strictly personal both on obtaining test samples (usually blood) and on communicating test results. As it is a clinicobiological procedure that has a special place in medicine, many countries have issued legal provisions to regulate who is entitled to submit request for genetic testing. As illustration I state that molecular testing for breast carcinoma differs considerably from the same test in case of HD. As molecular diagnosis of HD has for some time been available in Croatia, all those involved should be informed on the array of issues entailed by requesting such a genetic test.

Genetic testing in a patient

Even the molecular testing (11) performed to verify the diagnosis of clinically overt disease requires an informed consent in writing from the patient or from his authorized person if the patient's condition prevents him to decide on it by himself. The psychological problems resulting from the detection of a severe, incurable and inheritable disease as well as the impact of this information on the patient's immediate and extended family members and their offspring should be very seriously considered.

Genetic counseling can be requested by a person with some clinical symptoms who wants to be informed on accurate diagnosis for the sake of his children rather than himself. If the children were already born and are still under age, what is the purpose of determining their genetic status? If the patient has not yet had any offspring of his own, the issue of prenatal diagnosis in case of pregnancy could possibly be considered. In this case, the diagnosis is made for the sake of the patient's children to be possibly born in the future rather than for the patient himself. It should be noted that most medical geneticists do not only protect the patient's well-being restricting to his own interest, but take care of his family, including both his close relatives and their offspring. However, may the testing be considered useful for a relative, the patient's interest should be protected first.

Genetic testing possibly implying presymptomatic testing of one of the patient's parents

HD belongs to a special group of neurodegenerative diseases that occur due to the increased CAG trinucleotide repeat beyond a certain threshold depending on the gene type (4,15). This trinucleotide repeat is unstable and shows an increasing tendency of vertical transmission. It makes the basis for the phenomenon of anticipation, implying the growing disease severity from

generation to generation and its occurrence at an ever earlier age. Due to this phenomenon, molecular verification of the diagnosis in a patient may in rare cases have an undesired effect of presymptomatic analysis in an as yet healthy parent of the patient, who does not want to be aware of carrying or not the pathologic gene, meaning that he/she will certainly develop the disease some day, sooner or later.

Presymptomatic analysis

Presymptomatic analysis is determination of the genetic status in a clinically healthy but at risk member of the patient's family (12). Although such testing allows for informed and responsible family planning, it is also associated with a number of ethical problems (3) that have not been solved to date. Stimulated by numerous questions and dilemmas, the International Huntington Association (IHA) and World Federation of Neurology (WFN) Research Group on Huntington's disease have prepared a document (14) defining conditions for predictive diagnosis. This document stresses the principles of independence, informed consent and confidentiality, and the need of providing longterm, multidisciplinary care of the tested subjects. This is illustrated by the experience of such a team consisting of a geneticist, neurologist, psychologist, neuropsychologist, social worker and psychiatrist, working at the Salpêtrière Hospital in Paris (7,8). During the four-year work, the center received 238 requests for presymptomatic diagnosis of HD. At the end of the procedure, which includes thorough and painstaking consideration of each individual applicant by the team members, only 140 individuals wanted to be told the result. There were 98 dropouts, 71 of them after the very first interview.

Testing in minors

Although it may seem normal to use all diagnostic tools available, including the methods of molecular biology, to confirm or exclude a genetic disease, justifiability of genetic testing in an asymptomatic minor for as yet incurable disease appears to be quite questionable indeed. The interest of the minor should be over the parents' interest. The parents' anxiety and wish for a negative result should not urge them to submit their children to a test procedure that may do them more harm than good. Except for some extreme cases, testing of minors is not allowed. Requests submitted by adolescents who actively ask for presymptomatic analysis present a very serious problem for the team (2).

And the last but not the least, the issue of adoption should be mentioned in this context. Although it is quite conceivable that future adoptive parents want a healthy child, testing a child, be it on whosever's request (of the adoptive parents or institution mediating the adoption), is a highly intriguing issue. Awareness of the family history data may prove useful, especially in case of a disease with an adult onset. On the other hand, should the future adoptive parents be informed accordingly? Should only the children free from the patholo-

gic gene be given the opportunity of being adopted? After all, the parents adopt a child, not an adult person (1)!

TEST REQUEST

The molecular diagnosis of HD can only be requested if it is strictly to the patient's advantage and upon obtaining his informed consent in writing. The request for genetic analysis must be strictly personal, with due consideration of its consequences for the person giving consent for the test. Even when the test is diagnostic by nature, the patient or his authorized person should be properly informed on the test consequences, without unnecessary oppressive detail, before obtaining his informed consent.

Quite different but by no means easier is the case of an asymptomatic patient applying for the testing because of his family history. As such a case includes a known genetic disease in the family, a specialized genetic counseling unit appears to be the most appropriate place to submit requests for this testing.

Before submitting the request in writing, the individual asking for testing should be explicitly informed on the clinical and genetic characteristics of the disease (4,10), immediate consequences of the test for the possible carrier and for his/her present or future offspring, current lack of any efficient treatment, and availability of reliable prenatal diagnosis.

The benefits for the patient should not only be assessed from the aspect of his physical health, but his mental state should also be seriously considered (5). Longterm preparation of the subject is persistingly required to allow the best possible assessment of his ability to cope with the possibly unfavorable test result.

If properly and comprehensively informed, and having been allowed to think thoroughly about the test benefits, limitations and consequences, the person at risk can judge by himself whether or not he or she really wants to undergo the test.

COMMUNICATING TEST RESULTS

On communicating test results, the explanations given before the samples were obtained should be briefly repeated, because it may happen, rarely though, that the person refuses to be informed on the test result. Such situations are rarely encountered if the period of preparation was long enough and with due support from the multidisciplinary team members. Until the very moment of verbal communication of the test result, the person has an exclusive right to know or not to know the truth, may he decide so in the last moment. In this way, an individual who wants to make use of the test performed can freely, without pressure from his environment and family, become aware of his own future.

As everybody responds differently to the strikes of fate, the presence of a close family member on both submission of the test request and on result disclosure during genetic counseling can prove helpful. In such cases, assistance of an experienced psychologist trained in psychotherapy would be highly useful. Unfortunately, such professionals are a rarity everywhere.

Test results should by no means be disclosed to a third person, not even to a fellow physician, without explicit patient's approval. Appropriate measures should be taken to prevent the results of genetic testing to be explicitly stated in the patient's medical records. It does not hurt to remind of the need of strict keeping the physician's secret.

PATIENT'S FOLLOW-UP

Upon the result communication, the patient or tested person should be provided with due psychological support, regardless of the test outcome (16,17). This support should best be organized as early as during the preparation for testing. A normal result does by no means preclude the need of such support. Much is expected from the multidisciplinary team, whose role is to help the new category of patients, i.e. as yet healthy carriers of the severe disease gene who wait in uneasy suspense the pending occurrence of initial disease symptoms, from day to day. Even if not found to carry the gene, it is hard for the individual to separate from a close relative of his who happened to be less lucky than he himself.

REFERENCES

1. Briard ML. La prescription de tests genetiques. 13eme Seminaire Genetique Clinique. Hopital des Enfants Malades, Paris, mars 1997, 41-46.
2. Binedell J, Soldan JR, Scourfield J, Harper PS. Huntington's disease predictive testing: the case for an assessment approach to requests from adolescents. *J. Med Genet* 1996; 33: 912-918.
3. Canki-Klain N. Etički problemi u humanoј genetici. U: Švajger A. Medicinska etika. Priručno štivo. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 1996; 63-70.
4. Canki-Klain N, Dode C, Zurak N, Brinar V. Genetic and molecular studies of Huntington's disease. *Neurol Croat* 1998 (in press).
5. Canki-Klain N. Genetika i psihološka medicina. U: Klain E, ur. Psihološka medicina (in press).
6. Dode C, Durr A, Pecheux C, et al. Huntington's disease in French families: CAG repeat expansion and linkage disequilibrium analysis. *Sciences de la Vie* 1993; 316: 1374-1380.
7. Durr A. Diagnostic presymptomatique et la maladie de Huntington. 13eme Seminaire de Genetique Clinique, Hopital des Enfants Malades, Paris, mars 1997:79.
8. Feingold J, Durr A, Brice A, et al. Maladie de Huntington : genetique et diagnostic presymptomatique. *Mouvements anormaux*, Paris, 1994; 47-53.

N. CANKI-KLAIN ETHICAL AND PSYCHOLOGICAL ASPECTS OF HUNTINGTON DISEASE

9. Goldberg YP, Kremer B, Andrew SE, et al. Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects. *Nat Genet* 1993; 5:174-179.
10. Harper P. Huntington's disease, 2nd ed. London: WS Saunders, 1996.
11. Harper P, Shaw D. Huntington's disease: genetic and molecular studies. In: Harper P, ed. Huntington's disease, 2nd ed. London: WS Saunders, 1996; 241-292.
12. Harper P, Soldan J, Tyler A. Predictive test in Huntington's disease. In: Harper P, ed. Huntington's disease, 2nd ed. London: WS Saunders, 1996 : 395-424.
13. Huntington's Disease Collaborative Research Group: A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable in Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993; 72: 971- 978.
14. International Huntington's Association and World Federation of Neurology. Guidelines for the molecular genetic predictive test in Huntington's disease. *J Med Genet* 1994; 31: 555-559.
15. La Spada AR. Trinucleotide repeat instability: genetic features and molecular mechanisms. *Brain Pathol* 1997; 7:943-963.
16. Lawson K, Wiggins S, Green Tet al. Adverse psychological events occurring in the first year after predictive testing for Huntington's disease. *J Med Genet* 1996 ; 33: 856-862.
17. Tibben A, Duivenvoorden HJ, Vegter-van der Vlis et al. Presymptomatic DNA testing for Huntington disease: identifying the need for psychological intervention. *Am J Med Genet (Neuropsychiatric Genetics)* 1993; 48 :137-144.
18. Warner JP, Barron LH, Brock DK. A new polymerase chain reaction (PCR) assay for the trinucleotide repeat that is unstable and expanded on Huntington's disease chromosomes. *Mol Cell Probes* 1993; 7: 235-239.

Address for correspondence: Professor Nina Canki-Klain, MD, PhD, University Department of Neurology, University Hospital Centre, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Croatia

Social and Behavioural Research in Clinical Genetics

Section Editor:

Barbara Bowles Biesecker, email: barbarab@mail.nih.gov

Young people's experiences of growing up in a family affected by Huntington's disease

Forrest Keenan K, Miedzybrodzka Z, van Teijlingen E, McKee L, Simpson SA. Young people's experiences of growing up in a family affected by Huntington's disease.

Clin Genet 2007; 71: 120–129. © Blackwell Munksgaard, 2007

Previous research and clinical experience suggest that Huntington's disease (HD) can considerably affect family life, particularly for young people (YP) at risk. The goal of this study was to describe the experiences of YP from families affected by HD. YP were identified through the regional genetics clinic and the Scottish Huntington's Association. In-depth interviews were used to explore YP's experiences of finding out about HD in the family; perceptions of their own risk; caring activities; protective or risk factors; and the impact of HD on relationships with siblings, parents, extended family members, and the wider community. Thirty-three YP between the ages of 9 and 28 years were interviewed. A qualitative thematic analysis was undertaken. The analysis revealed four main themes: YP as carers, the worried well, those who cope, and those at risk/in need. These themes highlight the varied experience of growing up in a family affected by HD. Whilst some YP successfully coped, others experienced considerable problems and were at risk of physical and/or emotional harm. In understanding why some cope better than others, our findings suggest protective and risk factors within these themes. In particular, participants who grew up knowing about HD from an early age seemed to cope better.

**K Forrest Keenan^a,
Z Miedzybrodzka^b, E van
Teijlingen^a, L McKee^c and
SA Simpson^b**

Departments of ^aPublic Health,
^bMedicine & Therapeutics, and
^cHealth Services Research Unit,
University of Aberdeen, UK

Key words: at risk – genetic services –
neurodegenerative disease – qualitative
study – risk factors – Scotland

Corresponding author: K Forrest Keenan,
Department of Public Health, University
of Aberdeen, Medical School,
Foresterhill, Aberdeen AB25 2ZD, UK.
Tel.: +44 (0)1224552495;
fax: +44 (0)1224550925;
e-mail: k.keenan@abdn.ac.uk

Received 31 August 2006, revised
and accepted for publication 7
December 2006

Huntington's disease (HD) is an incurable neurodegenerative disorder with autosomal dominant inheritance estimated to affect 1/7000 to 1/10,000 individuals in Scotland (1, 2). The average age of onset is between 30 and 45 years and life expectancy is approximately 15–20 years from onset. Symptoms include involuntary movements, changes in mood, behaviour and personality, and cognitive impairment (3). Increasingly affected individuals need help with day-to-day living, and ultimately become totally dependent on the help of others (2). Although HD is usually an adult-onset disorder, research and clinical experience suggest that young people (YP) growing up in

families affected by HD may experience social and emotional difficulties because the illness affects parenting and family life (4, 5).¹ As YP learn that they too may develop the parental disease this knowledge may lead to additional challenges, with some seeking predictive testing (6).

It is important to explore YP's experiences separately from that of adults because of cognitive and psychosocial differences in their development and socialization (7, 8). YP acquire knowledge gradually (7) and have different information needs from that of adults. Evolving stages of maturity and cognitive development may make YP more vulnerable to misunderstanding their parent's illness, e.g. very young children may attribute parental illness to some fault of their own (9). Adolescence is a critical

¹This paper does not address the psychosocial impact of juvenile HD on children and their families.

time for identity formation and living with a parent who has HD may have a considerable negative impact (5, 10). Other developmental stages of adolescence may be adversely affected, such as establishment of peer relations, transition to independence, and the initiation of intimate relationships (7).

Only a small body of research has described growing up in a family affected by HD (3, 5, 10–13), and much of it was undertaken years ago. Nevertheless these studies suggest that having a parent with HD can have a profoundly negative impact on YP. A child may live in a prolonged state of anxiety and experience multiple losses (10). When parenting is adversely affected this may have a detrimental effect upon the development of normal attachment between a parent and child, and may alter healthy functioning in later life (3). An affected parent has progressive symptoms that may lead to loss of social and economic support, e.g. from friends, spouse, extended family, and a lowered domestic income. This loss of resources may affect the children too, e.g. family break-up, embarrassment at taking friends home. Consequently, some YP may experience considerable social isolation (5, 12), which may also be compounded by a fear of alerting professionals (14). In contrast, more recent research highlights the considerable resilience of YP in families affected by HD, and in relation to predictive testing YP have demonstrated a capacity for decision making beyond what would be expected of their age group (11).

Although past research has described YP's experiences of living in a family affected by HD, there is a need to update this research. This study aims to describe the experiences of YP in families affected by HD and to use the findings to inform the development of effective strategies to help potentially vulnerable YP. Specifically, we explored (1) how participants found out about HD in the family; (2) their perceptions of their own risk; (3) any protective or risk factors they encountered; (4) any caring activities they undertook; and (5) the impact of HD on their relationships with siblings, parents, extended family members, and the wider community.

Methods

Recruitment and sampling

The clinical geneticists (S.A.S. and Z.M.) and the Scottish Huntington's Association (SHA) advisors invited YP to participate by providing a study information leaflet and consent form. We

did not invite participants who were considered by the clinicians and advisors as too vulnerable to participate (because of recent family bereavement or conflict). If the YP was under 18, a letter was sent to their parent(s) asking them to pass on the study leaflet to their child. Participants were recruited between August 2002 and November 2003. Three types of sampling approaches were followed. We used purposive sampling to include participants with as wide a range of demographic characteristics as possible (15, 16). Theoretical sampling was also drawn upon (17, 18) in order to invite individuals who were known to have experienced difficulties in their families as well as those who appeared to cope. In the first year it was hard to access and recruit participants so we also used snowball sampling (19), i.e. we asked participants and the SHA advisors to pass on a leaflet to other family members. We decided to stop recruiting participants after 15 months of data collection because data saturation had been reached (17) concerning the main issues related to YP's experiences of growing up in a family with HD.

Fifty-one YP were invited to take part by the clinical geneticists ($n = 16$), an SHA Advisor ($n = 23$), or a family member ($n = 12$), of whom 33 agreed and were interviewed. Sixteen participants were recruited through the two clinicians, 11 through the SHA Advisors, five through a relative, and one from the SHA website.

The study was approved by the Grampian Research Ethics Committee.

Data collection and analysis

As little contemporary research had been conducted, we followed an exploratory qualitative method for the process of data collection and analysis (16, 20) using some elements of a grounded theory approach (17, 21). Semi-structured interviews asked questions of interest but with flexibility to explore other emergent issues (15, 16). The interviewer (K.F.K.) used open-ended questions to elicit YP's narratives, and she was open and direct about possibly sensitive issues. For example, how does HD affect you and your family? How do you think you manage any anxiety/fear about HD? How did/will you feel about leaving home? We did not ask participants about their views of predictive testing or their own risk *per se* because we know of families where this information has been kept hidden from children. Instead we devised a set of indirect questions, which we anticipated would lead to the issues being raised if the participant

knew about them. For example, how does someone get HD? What do you know about options for yourself? What do you think about having a family of your own? We made sure that all participants had the opportunity to contact a genetic counsellor or SHA youth advisor after each interview.

Interviews took place in participants' homes, a genetic clinic, or a neutral public venue such as a café, and the majority were audiotaped with consent and fully transcribed. In three cases, the tape-recorder failed and notes were taken. In four cases the interview could not be taped as it was in a public place and notes were taken instead. The researcher explained that participants' names and any other identifiable details would be changed in any reports, e.g. name of village/town, gender/number of siblings.

The analysis was conducted in two main phases. In phase one, a thematic analysis of the transcripts and the interview notes were undertaken using the constant comparison method (17). K.F.K. identified themes by reading and rereading the transcripts and coded the main issues drawing upon aspects of Strauss and Corbin's (21) approach to coding qualitative data by using a system of open, *in vivo*, and axial coding. Different segments of the data were grouped together into separate categories, which allowed reflection on the major themes and the relationships among them. The analysis was an iterative process, which was ongoing throughout the fieldwork. A second coder (E.vT.) read the transcripts in their entirety and coded a subset of the transcripts independently. Any differences in the coding were minor and reconciled through discussion. Both coders agreed on the main themes and subthemes which emerged.

The initial analysis identified YP's coping strategies as a key theme. Consequently, the second phase of analysis sought to situate participant's accounts within theoretical models of coping behaviour (22, 23) and research that has explored adolescents' reactions to parents with a hereditary neurological illness (10, 11). Coping is generally defined as emotion-focused or problem-focused and both can be adaptive or maladaptive (23, 24). Hence, Easton (11) defines problem-focused coping as an 'individual who tries to change the situation for the better' and emotion-focused coping as actions 'one does or says to oneself to feel better' (pg. 50). We assessed coping strategies based on reports of implementing certain activities to manage the situation (problem-focused coping) or of engaging in supportive endeavours (emotion-focused coping).

The participants

Tables 1–3 summarize the risk characteristics, age range, and domestic situation of the participants. There were 21 female and 12 male participants, all described their ethnicity as 'white'.

We define YP as those aged 13–25 because the transition from youth to adulthood has become protracted in recent decades (25). Children were defined as aged 12 years and under, and adolescents aged 13–18 years.

Results

Overall, there were four main themes identified about the affects of living with a parent with HD on YP. These are summarized in Table 4. Participants often were experiencing more than one, or had experienced several in their lifetime.

YP as carers

Young carers

Over a third (12/33) of interviewees were, or had been, young carers of parents with HD (eight females, four males).² These were YP under 18 who carried out household tasks such as washing, ironing, shopping, cooking, and cleaning, and assumed a level of responsibility, which in usual circumstances an adult would do. Some participants also carried out personal care of a parent, e.g. washing or administering medication. If there were younger siblings or other relatives who were ill in the household, the young carer often also took responsibility for their care.

As Emma (age 17, 50% risk) described

The carers started two years ago. But before it was always me and my [younger] sister who would have to do everything. Before school we had to get my mum bathed, changed, get her breakfast, plus get us showered and changed. Plus you'd have to do all the tidying up before you went ... and then coming home tea would have to get made. I missed most of my third year at school because of it. I didn't like leaving mum here on her own during the day while me and my sister were at school and my dad was out working so some days I would skive off just to make sure she was all right.

²The terms 'caring', 'carers', and 'young carer' are commonly used in UK English [e.g. see reference (14)]. The North American equivalents are 'care taking' and 'young caretakers'.

Table 1. Risk status of study participants

	Clinic Male	Clinic Female	Other Male	Other Female	Total
Affected	0	0	1	0	1
50% risk	4	7	6	9	26
Carrier	0	1	0	0	1
No mutation	0	4	1	0	5
Total	4	12	8	9	33

And Chantelle (age 21, 50% risk)

I was having to take time off school to help her. And she had sciatica on her back as well. And she couldn't get out of bed, so I had to take about a week off school to help with the shopping, housework, cooking, cleaning. While my mum was in her bed, I would hold a bucket under her so that she could do the toilet ... I was about thirteen or fourteen.

And Sarah (age 13, 50% risk) asserted that

People should know what I live through. I'm not just an ordinary girl ... I used to care for my mum all the time until we got 24 hour care.

Whilst the young carers' parents received external support (e.g. paid carers or SHA advisor) all described difficulties in getting their parents and/or their own needs met. Our data suggest that the young carers who were most in need of additional support lived in a family where the other parent worked long hours, the other parent was also ill, or there was only the affected single parent.

Young adult carers

Another type of carer were those YP over 18 years of age who provided practical and emotional support to the person with HD and/or their primary carer. For example, Morag (age 26, non-carrier) described supporting her younger cousin (age 16, 50% risk) who lived with her affected mum (Morag's aunt) and younger brother (age 12, 50% risk):

I've tried to tell them if there's a problem come to me, not granny, but I'll be honest when my

Table 2. Age range of participants

Mean age, years (range)	20.5
Participants aged	n =
12 and under	2
13-18	12
19-25	14
25-28	5

Table 3. Domestic situation of participants

	N =
In parental home (both parents, one affected)	7
In parental home (lone affected parent)	6
In parental home (one affected parent and one step parent)	1
In parental home (both parents, one carrier)	4
In parental home (parent no longer at risk)	2
Participant married/cohabiting	10
Participant single	3
Total	33

gran was away on holiday I was about tearing my hair out ... They had been fighting, there was doors slamming, swearing, hitting ... anytime there's an argument, her mum storms out saying 'Oh I'm going to take pills, I'm going to kill myself,' stuff like this. And I'm like at my work thinking what the hell can I do? You see she hasn't got her husband anymore; he left, so there's just her and the two children. So I worry constantly about them because they have got no other support.

And Robert (age 18, 50% risk) described how:

My dad [affected] likes me to be there for company because he feels better, like without me things would be a lot harder to get through because my mum can be quite difficult with him.

Young adult carers seemed to act as a linchpin for the family system. For example, Chantelle (age 21, 50% risk) described the burden of fitting in twice-daily visits to her affected mum as well

Table 4. Main themes and sub themes arising from interviews

YP as carers	<i>Young carers</i> Can have detrimental impact on YP's daily life YP can be very isolated YP cope with appropriate professional and/or family support <i>Young adult carers</i> YP is linchpin for own/extended family YP can be very burdened
Worried well	Experience psychosocial problems Found out later about HD Have contact with genetics professionals, or not
Those who cope	Have social support Use successful coping strategies Found out earlier about HD
At risk/in need	If child neglect or abuse in family Of age appropriate information Of appropriate support

HD, Huntington's disease; YP, young people.

as looking after her 2-year-old daughter and working part-time:

... I love my mum to bits, I always want to help her as much as I can, but it just gets so much at times. I cry quite a lot and I've had a lot of time off work. And every time when I go in and open her door, I'm always dreading in case I see her lying there with a cracked skull.

Worried well

Detrimental impact of being at risk

Another subgroup worried about their own risk of HD, to such an extent that it had a detrimental impact on their daily life. This could manifest itself physically (e.g. tiredness), emotionally (lack of self-esteem, avoidance of relationships), or psychologically (excessive symptom searching, severe anxiety, panic attacks, insomnia).

For example, Kate (age 24, 50% risk) described how:

I actually have really bad nightmares. Ever since I found out [at 19], from the very first night ... it makes me as tired in the morning as when I went to bed, if not more so. ... I watch myself as well because I know it can start early in life.

And Kirsten (age 24, 50% risk)

It totally knocked my self confidence because I thought Jesus I didn't know this could ever happen. Now I've always got this nerves thing going on. I feel really queasy and panicky and anxious.

And Martin (21, 50% risk)

I've known I was at risk since I was 19 and it's hard.

Found out later about family history of HD

These 'worried well' ($n = 3$) had only found out about the family history of HD in their late teens or early twenties. All described finding out in an unexpected way (e.g. through a relative over the phone) or that it came as a complete shock to them.

Of these three participants, Kate had annual appointments with a geneticist. She described not wanting to get the predictive test but that she did want confirmation she had no symptoms.

I feel a lot better since I've spoken to her. I don't know sometimes ... I have watched my aunty and I have obviously picked up some hand movements that she does and I saw myself doing that, and I would literally stop and pull my hands away from what I was doing. And I was forgetting words – but I think that was to do with the tiredness – and I just, I needed to hear

her say 'no, don't be silly I would tell you'. And I felt a lot better after I went there and cried a bit. She said 'look you know I would tell you, you have no signs of Huntington's'. And I didn't say that to her at the time but I really just needed to hear her say that.

The other two participants had considered going for predictive testing when they first found out but had decided against it. They were not currently in contact with a genetics service.

As Kirsten described

I did talk to the genetic counsellor about it and went back and fore with it for a while about getting the test done. But I haven't got round to it yet (*laughs*). It's obviously not an easy decision to make. So I don't know when, or if, I'm going to manage to do it. I don't know ... probably just putting it off and putting it off.

Believe will get HD

Some participant's expressed anxiety about being the sibling who would develop the disease. For example, Jen (age 22, 50% risk) felt she was more likely to get the disease than her brother as she 'took after' her mum. Jen acknowledged it was 'silly' to think this but she had still felt jealous and resentful towards him. Chloe (16, 50% risk) also believed that she carried the gene and would develop HD, but her younger sister wouldn't because 'I am so like my [affected] dad, I have his hair and his mannerisms'.

Those at 50% risk all knew about their risk status but the majority of them did not (or could not) articulate their feelings about what this meant to them.

Successful copers

Social support

Those who appeared to cope successfully with their family situation and the knowledge of their own risk described protective factors such as having good systems of social support (one-to-one or group) and strong attachments within relationships.

For example, Terry (age 24, 50% risk) described her relationship with her sister as

Really really close. We confide an awful lot in one another ... and there's probably very little we wouldn't tell each other ... And when we've got stuff we need to deal with we deal with it together.

And Eilidh (23, 50% risk)

Since I was 13 or 14 I've been involved with the SHA. I went along to the fundraising events and

to their meetings. I got all my literature from them.

Coping strategies

Some described using particular strategies such as distancing, assimilation, problem solving, planning, having a positive attitude towards disability, and gaining certainty to cope.

For example Carla (age 21, 50% risk), whose dad was in the late stages of the disease, appeared to actively distance herself from the issue of HD. She described spending much of her adolescence out of the family home with her peers, and when she was at home she went to her room to watch the TV. She now works full time and left home at the age of 20 to move in with her boyfriend, she has never spoken with her brother (age 16) about their dad's illness (interview not taped, from fieldnotes).

Whereas Carla appeared to actively avoid the issue of HD, Jack explained that it was something he had taken on board and assimilated into his life, particularly as he had witnessed his grandfather's deterioration while he was growing up.

Jack (age 17, 50% risk, mum gene carrier) described how:

I mean I've grown up with it and it's always been there, it's sort of like, you always remember your own phone number, it's just kind of part of your life.

Some participants also tried to actively change the situation for the better. For example, Terry (aged 24, 50% risk) described how:

We're starting to change the structure of the house so that it's accessible for my mum, and the bathroom is not big enough. So these are all things that we're gradually changing and gradually looking at ... It's all about managing your parents – the tables have turned!

Having a positive attitude towards disability also appeared to help some participants cope. For example, Julie (age 17, 50% risk) asserted that

I don't want this to sound nasty but I see everybody else as different and my mum's normal because I've lived with it ... whereas everybody else would see my mum as different but I don't. My sister [15] gets upset about it quite a lot of the time. She would rather hide in a corner and cry about it ... She doesn't find it as easy as me ... I'll walk down the street with mum and not care what anybody else thinks but she won't.

Having certainty about one's carrier status (whether you are a gene carrier or not) also

helped a few participants to cope. Of the seven who knew their carrier status four had gone for their own predictive test, leaving two YP whose parents had received a non-carrier result and one participant who was diagnosed with HD. Of the four tested only one received a carrier result.

Laura (age 27, non-carrier), who had three siblings, one of whom had received a non-carrier result, described her reasons for taking the test:

That was one of the main reasons, I said that *I have to* get tested because each person's got a 50:50 chance and they do tend to say that out of a family of three or more there'll be one. So I definitely thought oh it'll be me, and it was scary.

There was only one pre-symptomatic carrier in the study and she seemed to be coping with her result. Clara (age 22, gene carrier) explained that

I had always known I was going to get the test ... I felt like I could handle whatever the results was going to be. I had my friends and people behind me. I knew I was in a stable relationship and I just felt it was right. I was 19 and a half ... At first, you know, you think about it all the time ... and then one day it just goes to the back of your mind.

Found out earlier about HD

Growing up knowing about HD also appeared to help participants cope. For example, Terry (age 24, 50% risk) described how:

We've never hid it from anybody, we've always been dead up front and my mum, she's the first to tell you she's got Huntington's disease. So it's always been there, always known about it ... And it's not a bad word in our house.

At the same time it was clear that others did not want to be overloaded with information about HD. As Julie (age 17, 50% risk) went on to explain

I don't really know that much about it, but I know enough ... I'm ok, I don't know if I would really like to find out any more, I'm happy with what I know just now. I think if mum was getting worse and worse, I think I would like to know more.

Overall, our results suggest that the majority of participants had been, or were, coping adaptively, with growing up in a family with HD, and with the knowledge of being at risk themselves. For example, all participants of school age were attending school and no one had been expelled (suggesting no serious behavioural problems being

displayed at school). At the same time we know that almost two-thirds of participants (21/33) had received support/information from a health professional about HD, i.e. a Counsellor, Psychologist, SHA Advisor, and/or Clinical Geneticist, which suggests that they did need professional help to cope with their family situation.

At risk/in need

The last theme 'at risk/in need' concerns participants who were at risk of harm from their caring activities, anxiety about their own risk, affected parenting or other aspects of their family situation, and those who stated their unmet need for help – be that from their families or professionals. Three YP were not receiving the support or information they needed and three others described past physical and/or sexual abuse.

In need of support and information

One YP (Morag's younger cousin, see above), described her feelings of helplessness and isolation when her mum was recently diagnosed with HD:

They're not offering help and you feel like you can speak to no-one. Nicola (age 16, 50% risk)

Importantly, while Nicola's close and extended family had a long history of contact with the SHA and the genetic clinic she felt that 'no-one' had offered her (or at that time her mum) appropriate support, e.g. someone neutral to talk to, nor, she admitted, could she speak openly about HD to anyone in her family.

Another participant, Daniel (age 16, 50% risk), described periodic feelings of intense anxiety and several fainting episodes. Daniel lived in a small rural village and was the sole carer for his affected dad, but he had no professional support of his own, nor any family who lived close by. Daniel explained the fainting episodes as being due to stress (interview not taped, from fieldnotes):

I fainted the other week ... and have had attacks where I feel really faint. I think its stress. It's happened about five times over the last year and once when I was at school, but I didn't tell anyone [like my cousin or sister].

A third participant, Carl (age 17, 50% risk), again lived alone with his increasingly affected mum, and although she received help from paid carers, he described knowing very little about her illness.

Well I know absolutely nothing. I don't know a lot about it, that's why I was hoping ... I knew

you were coming and I thought you were someone different. I thought you were with ... so you would know about it.

Although Carl had been recruited to the study through the Genetic Clinic it became clear that he wanted information from the researcher about HD and his own risk; he was given some information³ and referred to the Huntington's Association and his local Genetics Service.

Three young adults described particularly traumatic experiences of growing up with an affected relative.

Laura (age 27, non-carrier) reflected upon her experience of growing up with her affected mum. She had not known what was wrong with her mum and left home as soon as she could at 17.

One minute mum would be roaring and shouting, the next crying and sorry. She was violent and the arguments were terrible ... But I thought that's just what happens [in my family].

In need of child protection

Two of these participants disclosed that an affected family member had physically and sexually abused them.

Alison (28, 50% risk) described living with her [affected] dad who had physically abused her:

I dreaded going home because I got beaten up [by my dad] ... So I turned into a bit of a rebel at 15 – alcohol, drugs, coming home late.

Discussion

Our findings highlight that YP's experiences of growing up in a family with HD can be quite varied. While the majority appear to cope successfully, others experience considerable problems and may even be at risk of physical and/or emotional harm. Overall, the analysis revealed four main themes: YP as carers, the worried well, those who cope, and those at risk/in need. However, participants' experiences fall into more than one theme, and these are likely to change over time.

An important finding was the existence of a subgroup of young carers; children under 18 carrying out significant caring tasks and assuming a level of responsibility for an affected parent and/or sibling, which in normal circumstances would be undertaken by an adult (26). It is well recognized that such responsibilities can have a detrimental impact upon a young carer's education, health, family income, and social and

³Huntington's and me: a guide for YP' produced by the Wellington Association in New Zealand.

emotional well-being, although with appropriate professional and/or family support it is a role which YP can manage and value (26). If genetics professionals identify a young carer then they can refer them to other services for support, e.g. a Young Carers Project, a Huntington's Association Youth Service, or Social Work. At particular risk were young carers who lived in a family where the other parent worked long hours, the other parent was also ill, or there was only the affected single parent.

A related finding was the existence of young adult carers – YP over 18 who care for the person with HD and/or their primary carer. This was a considerably burdensome role and may be detrimental to the YP's own health and well-being. In addition, given YP's increased financial dependence on their parents beyond the age of 18 we found young carers who had become young adult carers. These participants may have little opportunity to 'escape' until the person with HD goes into full-time care, or they opt to abandon their caring role altogether.

At least three participants were particularly concerned about their own risk of developing HD. Two participants also described the notion of pre-selection: the belief that they would develop the disease in later life, whereas their sibling would escape it (27). These findings suggest that some YP are anxious about their risk, even though we did not ask them about this directly. In addition, the majority of our sample had sought professional help about HD, and as such the issue of their own risk would be raised as a concern. This warrants further investigation in any future study, particularly as YP are coming forward for predictive testing.

Our findings also highlight that YP growing up in a family with HD can cope successfully. Like Power (10) we found that participants who coped well used a mixture of 'emotion-focused' and 'problem-focused' coping strategies (23). Problem-focused coping involved strategies such as seeking information, actively changing one's life style, and planning for the future (24). Emotion-focused coping involved strategies such as avoidance, assimilation, and seeking social support (24). Good systems of social support (for the YP and the person with HD) (28, 29) and well-adjusted attachment relationships (30, 31) are factors, which are known to protect YP's development. Furthermore, like Easton (11), we found that participants drew on personal, interpersonal, and group styles of coping. For example, having a positive attitude towards disability (personal), talking to a sibling (interpersonal), or being involved with a support

group like the SHA (group). Clearly, the different coping strategies which YP pursue will significantly influence their experiences of growing up in a family with HD. However, it was outside the scope of this study to explore YP's coping strategies in depth. Further research is needed to understand the frequency and predictors of YP's successful coping in these families.

Study limitations

The extent to which we have comprehensively identified the important themes depends both on our analysis strategy, and on our sample of participants. We chose a qualitative thematic analysis using some elements of a grounded theory approach but acknowledge that a different theoretical perspective, such as that used by a health psychologist or family therapist, might illuminate different issues (24, 32). The small sample size and mean age of 20.5 are also likely to limit the study's conclusions.

Another potential limitation with the under 18 sample was that the study invitation had to be passed on by a parent, and some parents may not have done this. We do not know if there was anything notably different about those YP whose parents may not have told them about the study. The use of snowball sampling means that some members of the same family were recruited which could have reduced variation in the sample, although this was addressed to some extent with the use of purposeful sampling. All invited to participate by the clinicians took part, which may be because there was an established rapport suggesting a 'gratitude bias' (33), and again reflects the selected nature of the sample. Also not included were individuals considered by the researchers as too vulnerable to participate, and families who do not come into contact with any genetics services.

Issues for clinical practice

This study raises a number of issues that genetics professionals may want to consider when working with families who are affected by HD. First, previous research has highlighted the potentially traumatic experience for children and YP who grow up in a family with HD (5), and this was an important theme. At particular risk were YP who lived alone with an affected parent whose symptoms were increasingly unmanageable, or who was emotionally unavailable. However, we observed a number of barriers preventing YP

from accessing help. For example, YP may have little awareness about HD or be unable to articulate their views to their family or professionals, and subsequently not seek needed support. In addition, YP may be reluctant to get involved with professionals for fear of family break-up, and vulnerable YP may pursue unhealthy behaviour and not identify themselves as in need. Health and social care professionals may also encounter barriers to reaching this group because of parents protecting (or even neglecting) their children (4). Health and social care professionals may also reinforce such barriers themselves, for example, by not enquiring after younger family members, or not offering parents the chance for YP to have their own separate appointment, or not referring YP to other services.

Second, our findings draw particular attention to the issue of how and when YP find out about their family history of HD. The participants who grew up knowing about HD at an early age appeared to cope better than those who found out in their late teens/early twenties out of the blue, or from whom it was kept a secret. Being told at an earlier age may be a protective factor and would support findings from studies of disclosure to children and YP in other areas, e.g. adoption (34) and donor conception (35). However, caution is needed because of the small numbers in this subgroup and the time period when the older group were interviewed (i.e. only a few years post disclosure). As such the encouragement of early disclosure should be viewed as a tentative finding and is in need of further research.

Finally, a practical implication of this study is that it is difficult to judge to what extent the population of YP growing up in a family with HD are in need of professional support/information, or are at risk of serious harm. This raises the issue of whether services could adopt a 'reaching out' policy, where contact is actively made and support offered to any YP of an affected, or carrier parent. How and whether such programmes might proceed would require careful ethical consideration in conjunction with the HD community, particularly given recent findings which suggest that most families see disclosure of genetic risk information as their own responsibility (36).

Conclusion

This study confirms previous findings that growing up in a family affected by HD can be a varied experience for YP. While some YP cope

successfully, others experience emotional, psychological, and behavioural problems and may be at risk of emotional and/or physical harm. Those who coped successfully described using a mixture of problem-focused and emotion-focused coping strategies. At particular risk were YP who lived alone with an affected parent whose symptoms were increasingly unmanageable, or who was emotionally unavailable. Participants who grew up knowing about HD at an earlier age appeared to cope better. The issue of how best to identify, access, and provide effective interventions to those YP who are most vulnerable requires additional research.

Acknowledgements

We would like to thank all the study participants. We also thank Dr Debbie Hindle (Child Psychotherapist, Scottish Institute of Human Relations) for advice about conducting interviews with vulnerable YP. Lastly, we must thank the three referees and the section editor for their valuable comments and Jack and Annabel for proof reading. This study was funded by the Wellcome Trust's Programme in Biomedical Ethics.

Contributors

S.A.S. had the original idea for the study, which was designed by S.A.S., K.F.K., E.v.T., Z.M. and L.M. K.F.K. carried out the fieldwork, the data were analysed by K.F.K. and E.v.T. and all authors contributed to the interpretation of the findings. K.F.K. wrote the paper and all commented on each draft.

References

1. Simpson SA, Johnston AW. The prevalence and patterns of care of Huntington's chorea in Grampian region. *Br J Psychiatry* 1989; 155: 799-804.
2. Scottish Huntington's Association. Annual report 2003/4. Elderslie, UK: Scottish Huntington's Association, 2004.
3. Van der Meer L, Timman R, Trijsburg W et al. Attachment in families with Huntington's disease: a paradigm in clinical genetics. *Patient Educ Counsell* 2006; 63: 246-254.
4. Korner J, Fitzsimmons J. The effect of Huntington's chorea on family life. *Br J Soc Work* 1985; 15: 581-597.
5. Tyler A, Harper PS, Davies K, Newcome RG. Family break-down and stress in Huntington's chorea. *J Biosoc Sci* 1983; 15: 127-138.
6. Duncan RE, Savulescu J, Gillam L, Williamson R, Delatycki MB. An international survey of predictive testing in children for adult onset conditions. *Genet Med* 2005; 7 (6): 390-396.
7. Duncan RE, Delatycki MB. Predictive genetic testing in young people for adult-onset conditions: where is the evidence? *Clin Genet* 2006; 69: 8-16.
8. Steinberg L, Cauffman E. Maturity of judgement in adolescence: psychosocial factors in adolescent decision making. *Law Hum Behav* 1996; 20: 249-272.
9. Segal J, Simkins J. Helping children with ill or disabled parents: a guide for parents and professionals. London: Jessica Kingsley Publishers, 1996.

10. Power PW. The adolescent's reaction to chronic illness of a parent: some implications for family counseling. *Int J Fam Counsel* 1977; 5: 70-78.
11. Easton J. Self-understanding and identity: the experience of adolescents at risk for HD. Unpublished PhD thesis, University of British Columbia, 2003.
12. Korner JR, Fitzsimmons JS. Huntington's chorea and the young person at risk. *Br J Soc Work* 1987; 17: 521-534.
13. Folstein SE, Franz ML, Jensen BA, Chase GA, Folstein MF. Conduct disorder and affective disorder among the offspring of patients with Huntington's disease. *Psychol Med* 1983; 13: 45-52.
14. Banks P, Cogan N, Riddell S. Does the covert nature of caring prohibit the development of effective services for young carers? *Brit J Guid Counsel* 2002; 30 (3): 229-246.
15. van Teijlingen E, Forrest K. The range of qualitative research methods in family planning and reproductive health care. *J Fam Plan Reprod Health Care* 2004; 30: 171-173.
16. Mason J. Qualitative researching, 2nd edn. London: Sage, 2002.
17. Glaser B, Strauss AL. The discovery of grounded theory. Chicago: Aldine, 1967.
18. Mays N, Pope C. Qualitative research: rigour and qualitative research. *BMJ* 1995; 311: 109-112.
19. Atkinson R, Flint J. Accessing hidden and hard-to-reach populations: snowball research strategies. *Soc Res Update* 2001; 33. University of Surrey.
20. Silverman D. Doing qualitative research: a practical handbook. London: Sage, 2000.
21. Strauss AL, Corbin JM. Basics of qualitative research: grounded theory procedures and techniques. London: Sage, 1990.
22. Lazarus RS, Averill J, Opton E. The psychology of coping. In: Coelho GV, Hamburg DA, Adams JE, eds. Coping and adaptation. New York: Basic Books, 1974: 249-315.
23. Lazarus RS, Folkman S. Stress, appraisal and coping. New York: Springer, 1984.
24. Gooding HC, Organista K, Burack J, Biesecker BB. Genetic susceptibility testing from a stress and coping perspective. *Soc Sci Med* 2006; 62: 1880-1890.
25. Furlong A, Cartmel F. Young people and social change: individualization and risk in late modernity. Buckingham: Open University Press, 1987.
26. Clifton J, ed. Young carers' good practice guide. Edinburgh: The Princess Royal Trust for Carers, Scottish Executive, 2002: 6.
27. Kessler S. Invited essay on the psychological aspects of genetic counseling. V. Preselection: a family coping strategy in Huntington's disease. *Am J Med Genet* 1988; 31: 617-621.
28. Philip K. Mentoring: pitfalls and potential for young people. *Youth Policy* 2001; 71: 1-15.
29. Cohen S, Syme SL, eds. Social support and health. Orlando, FL: Academic Press, 1985.
30. Bowlby J. Attachment. 2nd edn. London: Penguin Books, 1989.
31. Bowlby J. A secure base: parent-child attachment and healthy human development. New York: Basic Books, 1988.
32. Brouer-DudokdeWit AC, Savenije A, Zoetewij MW et al. A hereditary disorder in the family and the family life cycle: Huntington disease as a paradigm. *Fam Proc* 2002; 41 (4): 677-692.
33. Øvretveit J. Health service quality. Oxford: Blackwell Scientific Press, 1992.
34. Morrison M. Talking about adoption to your adopted child: a guide for parents by adoption. London: British Association for Fostering and Adoption, 2004.
35. Families' experiences of sharing information about donor conception. *DC Network News*, 23, Spring, pp. 1-7. <http://www.dcnetwork.org/>.
36. Forrest K, Simpson SA, Wilson BJ et al. Barriers and facilitators in family communication about genetic risk. *Clin Genet* 2003; 64: 317-326.

CONGENITAL MYASTHENIC SYNDROME WITH EPISODIC APNEA IN A FEMALE INFANT CAUSED BY TWO DIFFERENT COMPOUND HETEROZYGOUS MUTATIONS OF THE CHAT-GENE

Antun Sasso, Kristina Lah-Tomulić, Sanja Zaputović-Brajnović

Department of Paediatrics, Children's Hospital Kantrida, Rijeka, Croatia

Introduction

Congenital myasthenic syndromes (CMS) are neuromuscular disorders, caused by gene mutations in proteins located in presynaptic, synaptic or postsynaptic part of neuromuscular junction. This group of disorders is characterized by negative test for anti- AChR antibodies, and the presence of the defect from birth, although the first clinical manifestations can appear in childhood, adolescence or even in adulthood.

Congenital myasthenic syndrome with episodic apnea (CMS-EA) is a presynaptic disorder of neuromuscular junction. Previously it was named familial infantile myasthenia (1). CMS-EA manifests at birth or early infancy. The clinical signs of the disease are ptosis, intermittent hypotonia and sudden respiratory insufficiency or apnea. In conditions such as infections, fever or overexertion there is a great risk of sudden death or anoxic brain damage. If the child survives the first year of life, the condition improves. (2) The cause of CMS-EA is recently identified mutation in the CHAT gene (1). Muscle biopsy in CMS-EA is normal. Electromyography in patients without symptoms revealed no decremental response on 2 Hz stimulation of motor nerves. Prolonged stimulation of muscle bundles at 10 Hz results in abnormal decrease of amplitude of the miniature end plate potentials (MEPPs) (3). This decrease of the amplitude on prolonged stimulation is a result of progressive decrease in the acetylcholine of the presynaptic vesicles. Choline acetyltransferase (ChAT) catalyses the reversible synthesis of acetylcholine (Ach) from acetyl CoA and choline at cholinergic synapses. The treatment with acetylcholinesterase inhibitors is effective, and it seems that pyridostigmine is the drug of choice (4.)

CASE REPORT

Nine months old female infant was admitted in hospital because of sudden apnea during bath. She recovered after few minutes. At that time she was febrile 37, 8 C and she had a respiratory infection.

The baby was a daughter of healthy, unrelated parents. The mother was 30 years old, the father was 37, and they have also a healthy 4 years old son.

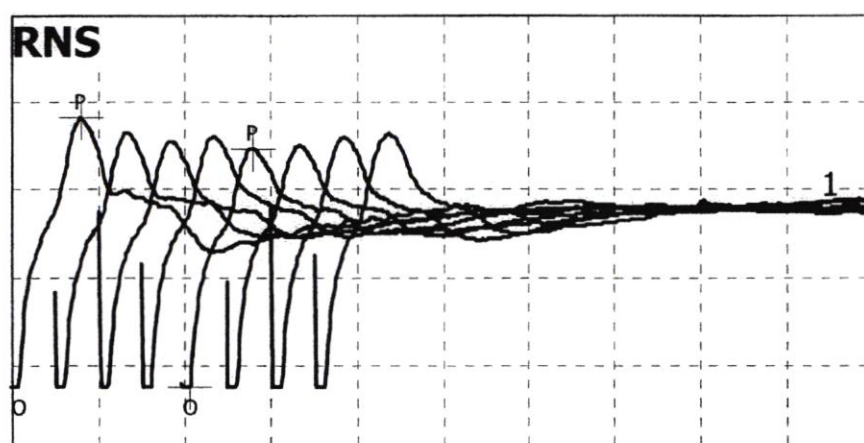
The history of pregnancy was uneventful. The baby girl was born in 37th week of gestation. The Apgar score was 4/3 because she was hypotonic and without spontaneous breathing, so the newborn was intubated and ventilated. After a few hours she recovered, she was extubated

and discharged from hospital after seven days. Mild developmental delay and intermittent ptosis, mostly in the evening have been noticed last two months.

Clinical examination showed mild bilateral ptosis and mild generalized muscle weakness. She was febrile and had viral respiratory infection. The laboratory analyses were all within normal ranges. After three days in hospital she had sudden apnea again, she was atonic and unconscious. She was intubated and ventilated. She recovered after few minutes, but in the same day she had two more attacks of apnea, so she was put on mechanical ventilation. Between crises the baby had ptosis and mild hypotonia.

Electroencephalography was normal. Electromyography on 2 Hz stimulation was normal, but after 10 Hz stimulation for 5 minutes there was a decremental response. (Picture1.). After two days the baby was extubated and she had no more attacks of apnea. Pyridostigmin was included in therapy with good results.

DNA analysis was done in Fridrich-Baur Institut und Genzentrum Ludwig-Maximilians-Universität München (Dr.Hans Lochmüller). In our patient CHAT gene on chromosome 10q11.2 encoding the presynaptic protein Choline O-acetyltransferase was analysed. By direct sequencing of the coding regions two compound heterozygous mutations of the CHAT-gene were identified: the mutation S694C in exon 18 (tct>tgt) and the mutation T354M in exon 10 (acg>atg).



Picture 1. Decremental response after repetitive 10 Hz stimulation for 5 minutes.

Both mutations are missense mutations leading to an amino acid exchange. The mutation S694 C has been described in a CMS family recently (4). The mutation T354M has not been described before.

The mother is heterozygous carrier of the mutation S694C, and the father is heterozygous carrier of the mutation T354M. The asymptomatic brother does not carry any of the mutation.

References

1. Ohno K, Tsujino A, Brengman JM, Harper CM, Bajzer Z, Udd B et al. Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:2017-2022
2. Kraner S, Laufenberg I, Strassburg HM, Sieb JP, Steinlein OK. Congenital Myasthenic Syndrome with episodic apnea in patients homozygous for a CHAT missense mutations. *Arch Neurol*. 2003;60:761-763

GENETSKO SAVJETOVANJE U SIJALIDOZI

Juraj Sepčić, Dubravko Marković

¹umirovljenik; ²OB Pula, Odjel za neurologiju, A.Negri 6, Pula

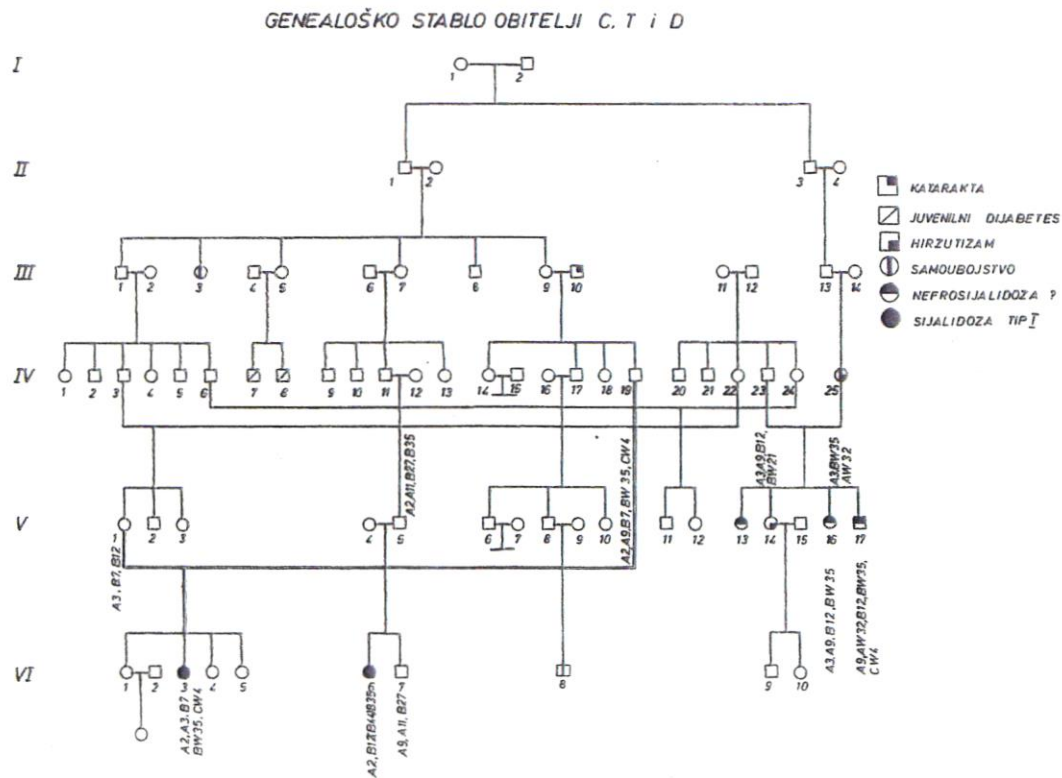
Među monogeniski nasljednim bolestima posebno se ističu bolesti gomilanja-tezaurizmoze (1, 3, 8, 9). Ove rijetke i zanimljive bolesti nastaju nakupljanjem i taloženjem nerazgrađenog produkta metabolizma, većinom lipida u raznovrsnim tkivima po čitavom organizmu (5, 6, 7). Tako se unutar stanica javlju brojne vakuole, a funkcije stanica, postupno i progresivno slabe i naposljetku ona umire. Sijalidoza je tezaurizmoza složenih šećera i često se susreće i pod pojmom mukopolidoza (ML). Početkom 2000-te otkriven je gen koji uzrokuje ML, MCOLN1 čija inaktivnost dovodi do manjka ili slabije funkcije produkcije proteina mukopolipina (2, 4, 9,10).

U razdoblju od 20 godina pratili smo tri srodne obitelji D, T i C (slika 1) u kojima je nedostatak jednoga lizosomskog enzima dovela do dvije potpuno različite genetske bolesti, progresivne miokloničke epilepsije (cherry red spot mioklonus sindroma) i zatajanje bubrega (nefrosijalidoze).

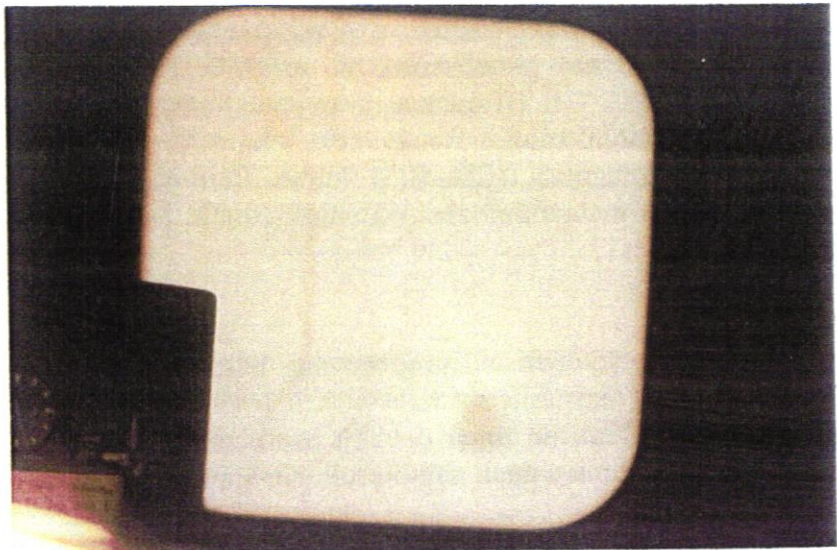
Dvije bolesnice (ZC (VI, 3) i DT (VI, 6) obitelji C i T)), sestrice začete, jedna sigurno, a druga vrlo vjerojatno u konsangvinom braku roditelja oboljele su u pubertetu od progresivne miokloničke epilepsije s cherry red spot promjenama na mrežnici (slika 2) i očuvanom inteligencijom. U starije sestrice (ZC (VI, 3)) nađena je uvećana jetra i slezena uz cistične promjene u epifizi bedrene kosti. Patohistološka obrada kože, konjunktive, sluznice rektuma i perifernoga živca dokazala je tezaurizmozu (slika 3). U kulturi fibroblasta kože, nađen je u obje bolesnice nedostatak alfa(2-6) neuraminidaze. Aktivnost ostalih lizosomskih enzima i beta-galaktozidaze bila je uredna.

U obitelji D, tri su bliska srodnika oboljela od progresivnog bubrežnog zatajenja, sve do liječenja na dijalizi. U bolesnice SD, najstarije sestre također je ustanovljen nedostatak istoga enzima alfa(2-6) neuraminidaze, identičan onom u dvije sestrice oboljele od epilepsije. Bolesnici s bubrežnim oblikom bolesti nisu imali neuroloških poremećaja.

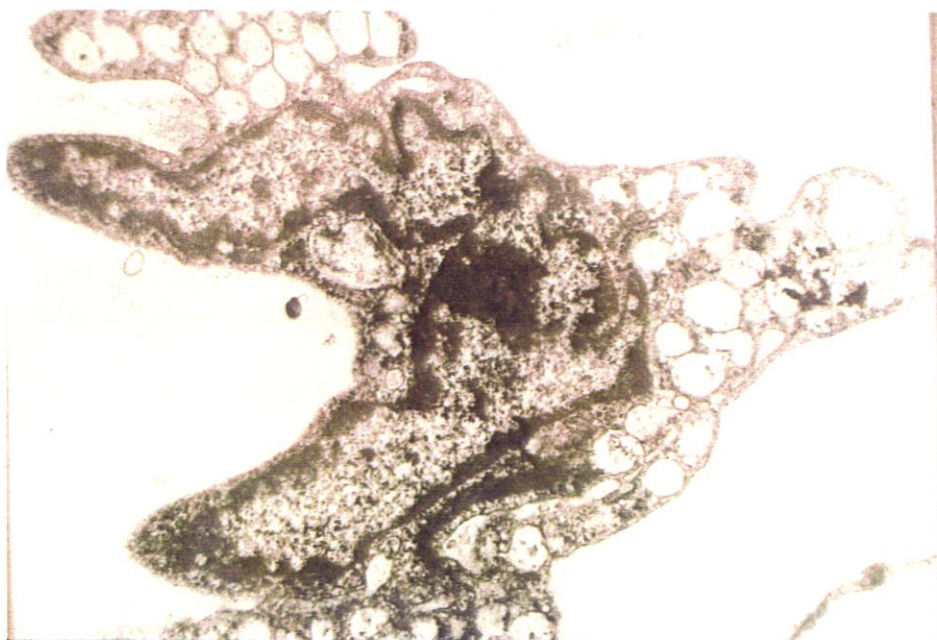
Metodom tankoslojne kromatografije urina bolesnica ZC(VI,3) i DT (VI,6) i u sedmorice njihovih rođaka uočeno je povećano izlučivanje sijaliloligosaharida . Manje količine ovih šećera nađene su i u urinu bolesnice (SD (molim oznaciti brojevima) s dokazanim manjkom enzima.



Slika 1. genealoško stablo obitelji C, T i D



Slika 2. desno dolje tipična mrlja boje trešnje na mrežnici pacijentice ZC (VI,3).



Slika 3. Elektronsvijetle inkluzije u stanici kože pacijentice ZC (VI,3) (EM 10 000 X).

Početkom 1980-tih nije postojala mogućnost DNA analiza i ona nikada nije učinjena. Znajući, kako se radi o recesivnom nasljeđivanju pratili smo i savjetovali sve rizične članove ovih triju obitelji, upozorili ih na rizik konsangviteta i nakon 1988. nismo registrirali nove slučajeve. Nažalost svih pet oboljelih umrlo je u razdoblju od 1990 do 2004-te. Zanimljivo jest, u obiteljima C, T i D nešto su učestalije pojave juvenilnoga dijabetesa i katarakte.

Danas je moguća prenatalna dijagnoza sijalidoza metodom analize enzimske aktivnosti u uzorcima horionskih resica u razdoblju od 8-10 tjedna gestacije. Također je moguća analiza DNA u MLIV direktno iz amniocita metodom amniocenteze (2, 10).

Literatura:

1. Amir N, Zlotogora J, Bach G. Mucopolidosis Type IV: Clinical spectrum and natural history. *Pediatrics* 1987;79:953-7.
2. Bargal R, Avidan N, Ben-Asher E, Olender Z, Zeigler M, Frumkin A, Raas-Rothschild A, Glusman G, Lancet D, Bach G. Identification of the gene causing Mucopolidosis type IV. *Nat Gen* 2001;26:118-21.
3. Bach G, Desnick RJ. Lysosomal accumulation of phospholipids in Mucopolidosis IV cultured fibroblasts. *Enzyme* 1988;40:40-5.
4. Ben Joseph Y, Mitschell DA, Yager RM, Wei JT, Chen TH, Shih LY Mucopolidoses II and variants with normal N-acetylglucosamine 1-phosphotransferase activity toward alpha-methylmannoside are due to nonallelic mutations. *Am J Hum Genet* 1992;50(1):137-44.
5. Cantz M, Gehler J, Spranler J. Mucopolidosis I: Increased sialic acid content and deficiency of an alpha N-acetylneuraminidase in cultured fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm* 1977;74:732-8.
6. Desnick JB, Dawson G, Desnick JS et al. Diagnosis of glycosphingolipidoses by urinary sediment anylsis. *N Eng J Med* 1971; 284/14:739-4.

7. Edelman L, Dong J, Desnick RJ, Kornreich R. Carrier screening for Mucopolidosis Type IV in the American Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 2002;70:1023-7.
8. Federico A, Cecio A, Apponi Battini G et al. Macular Cherry-red spot and myoclonus syndrome – Juvenile form of sialidosis. *J Neurol Sci* 1980;48:157-69.
9. Reis S, Sheffer R, Merin S, Luder A, Bach G. Mucopolidosis IV, a mild form with late onset. *Am J Med Genet* 1993;47:392-4.
10. Zeigler M, Bargal R, Suri V, Meidan B, Bach G. Mucopolidosis type IV: Accumulation of phospholipids and gangliosides in cultured amniotic cells. A tool for prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis* 1992;12:1037-42.

GENETSKO SAVJETOVANJE U RANOJ DIJAGNOSTICI PRIROĐENE GLUHOĆE

Sanja Zaputović¹, Antun Sasso¹, S. Ristić², V. Ahel¹

¹ Klinika za pedijatriju, KBC Rijeka, ² Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

UVOD

Oštećenje sluha je najčešći senzorni poremećaj. Rano, prirođeno oštećenje sluha nepovoljno djeluje na razvoj govora i spoznajnih procesa, stoga pravovremena dijagnostika osigurava i uspješnu habilitaciju u razvoju govora i komunikacije (1).

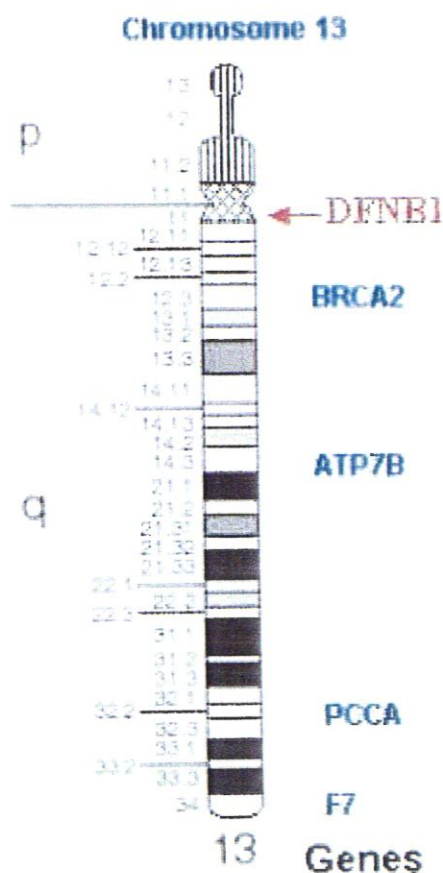
Incidencija prirođenog oštećenja sluha je najmanje 1/1000 novorođene djece, a čak 1/300 ima određeni stupanj naglušnosti (2). Učestalost prirođenog oštećenja sluha, kao i činjenica da intervencija prije šestog mjeseca života značajno poboljšava uspjeh u liječenju osoba oštećenog sluha razlog su nastojanja što ranije i preciznije dijagnostike.

Prema nastanku oštećenje sluha se dijeli na prirođeno i stećeno (3). Kod nasljedne gluhoće, genska promjena može uzrokovati poremećen razvoj stanica unutarnjeg uha ili biti posljedica progresivne degeneracije normalo formiranih struktura unutarnjeg uha. Nasljedno oštećenje sluha može biti progresivno ili neprogresivno, jednostrano ili obostrano, promjenjivog intenziteta i audiometrijske krivulje, sindromsko ili nesindromsko (2,3). Sve spomenute mogućnosti važne su u obradi djeteta u kojega se sumnja na mogućnost nasljedne gluhoće. Oko polovice oštećenja sluha je nasljedno, od čega se trećina javlja u sklopu različitih sindroma (sindromska gluhoća), a u dvije trećine slučajeva gluhoća je jedini simptom (nesindromska gluhoća). Smatra se da više stotina različitih gena uzrokuje pojedine oblike nasljedne gluhoće. Razvoj molekularne genetike omogućio je značajan napredak u detekciji i lokalizaciji ovih gena (4). Geni koji sudjeluju u oštećenju sluha mogu se podijeliti u šest osnovnih skupina:

1. Geni koji sudjeluju u homeostazi iona;
2. Geni koji kodiraju bjelančevine staničnog kostura;
3. Geni koji kodiraju bjelančevine izvanstaničnog matriksa;
4. Geni koji reguliraju čimbenike transkripcije;
5. Mitohondrijski geni;
6. Modificirajući geni;

Koneksini su skupina povezanih gena koji kodiraju podjedinice proteina potrebnih za formiranje submikroskopskih kanala, nazvanih pukotinska spojišta, odnosno zjapne veze (gap junctions), koji omogućuju da ioni i male molekule slobodno teku između susjednih stanica. Najčešća je mutacija koneksina-26 u lokusu DFNB1. Osim mutacija u ovom genu nađeni su i drugi geni. Koneksin-30 (GJB3), koneksin-31 (GJB6) i koneksin-43 (GJA1), koji sudjeluju u

građi zjapnih veza. Mutacije u genu GJB2 za koneksin-26 su najčešće, dosad ih je opisano oko stotinjak, a pokazuju različitu regionalnu i etničku raspodjelu. Mutacije u GJB3 i GJB6 također mogu uzrokovati naglušost smanjenjem endokohlearnog potencijala i apoptozom osjetnog epitela, koji nastaje kao rezultat izvanstaničnog nakupljanja kalijevih iona oko dlakavih stanica i depolarizacije stanične membrane (5). Guilford je 1994. prvi opisao autosomno recesivnu gluhoću u lokusu DFNB1 13q11-q12 na 13. kromosomu (Slika 1) (6).

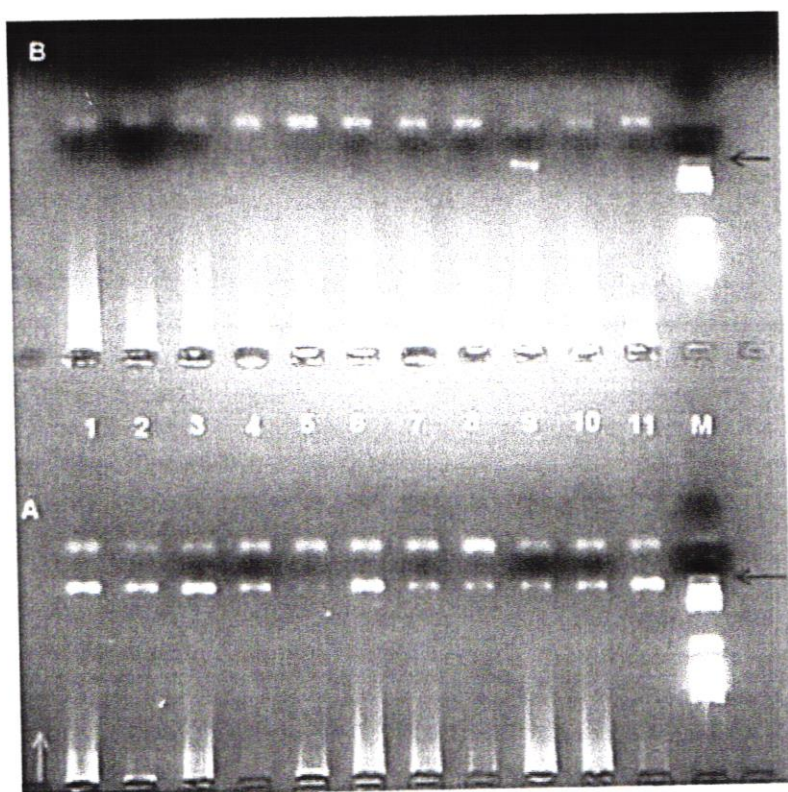


Slika 1. Prikaz kromosoma 13 i smjestaj nekih gena

Nedugo nakon toga u lokusu DFNB1 identificiran je gen Gap Junction Protein B - GJB2, koji kodira bjelančevinu koneksin-26, sastavni dio zjapnih veza. Uloga koneksina-26 je u recikliranju kalijevih iona od baze dlakavih stanica, preko potpornih stanica i fibroblasta do strije vaskularis, odakle se posebnim kanalima izbacuje u endolimfu. Mutacije u bilo kojem od gena koji kodiraju koneksine mijenja ionski sastav osjetnih stanica i rezultira nastankom gluhoće (11).

Nakon identifikacije gena, uslijedilo je utvrđivanje učestalosti mutacije u raznim etničkim i nacionalnim studijama mediteranskih naroda, kao i Sjeverne Amerike i Japana. U svim tim studijama nađeno je da je mutacija 35delG u homozigotnom statusu najčešći uzrok gluhoće. Učestalost nositelja ove mutacije posebno je visoka u Južnoj Europi- Grčka 3,5% i Italija 3,1% (7). Visoki postotak ove mutacije u Europi ukazao je i na potrebu ispitivanja učestalosti ove mutacije u Hrvatskoj.

Tijekom 2005. učinjena je studija na novorođenčadi rođenoj u Klinici za Ginekologiju i porodništvo KBC Rijeka, sa ciljem da se odredi učestalost mutacije 35delG/GJB2 za koneksin 26. Molekularno-genetskim ispitivanjem 1048 novorođenčadi, mutacija je nađena u homozigotnom obliku u jednog djeteta (8). Nedavno ispitivanje incidencije mutacije 35delG u homozigotnom obliku u istraživanju provedenom na novorođenčadi iz pulskog i riječkog rodilišta za razdoblje od godinu dana (2002./2003.) pokazalo je incidenciju od 1/1091 što je gotovo istovjetnom našem rezultatu od 1/1048 (9). Molekularno-genetičko ispitivanje navedene novorođenčadi otkrilo je i 13 (1,24%) heterozigota., čime bi Hrvatska dodatno potvrdila već dokazani gradijent jug-sjever, postavivši se sa svojim rezultatom između dviju krajnosti. Na osnovu ovih rezultata ustanovljena je očekivana frekvencija homozigota u općoj populaciji 1/20.000, što znači da u gradi kao što je Rijeka od 200.000 stanovnika, temeljem broja heterozigota u novorođenčadi, a s pretpostavkom da nema genetičkog pomaka ni selektivne prednosti, može se očekivati 10 gluhih homozigota za ispitivanu mutaciju (Slika2)(8).



Slika 2. Identifikacija mutacije 35delG/GJB2 PCR analizom

Djeca u koje je ustanovljena mutacija 35delG/GJB2 uključena su u sustav rada ambulate «Rizične djece» Odjela dječje Neurologije, Klinike za Pedijatriju KBC-a Rijeka, koja sa zavidnim uspjehom djeluje punih 25 godina. Zadatak je kontinuirano, timsko, multidisciplinarno praćenje sa ciljem ranog uočavanja i dijagnostike mogućih poteškoća u razvoj svakog pojedinca. Veliki značaj i ulogu u pristupu gluhom pacijentu ima i genetičar, sastavni dio našeg tima, jer pruža mogućnost informiranog genetičkog savjetovanja i procjene rizika pojave iste smetnje u obitelji, mogućnost prognoziranja daljnjeg razvoja gluhoće, tj. težine kliničke slike, a tajkođer i konkretnu opravdanost operativnog zahvata (10).

U Rijeci je, od siječnja 2007., postignut značajan napredak u molekularno-genetskoj dijagnostici gluhoće, jer se na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta-Rijeka ispituju dvije najčešće mutacije koneksin-26(GJB2) i koneksin-30(GJB3) gena. U pacijenata u kojih postoji sumnja na genetsku gluhoću ispituju se navedene mutacije, nakon čega im se pruža potrebno genetsko savjetovalište. Na ovaj način, ukoliko se postavi dijagnoza senzoričkoneuralnog gubitka sluha, odmah započnemo sa ranom edukacijom i audiološkom habilitacijom koje su ključne za djetetovu kasniju osposobljenost u njegovom sveukupnom obrazovanju. Praksa je potvrdila ukoliko se postavi rana dijagnoza gluhoće, posebno prije dobi od tri godine, moguće je očekivati kasniju veću govornu sposobnost. Rana dijagnostika znači i mogućnost rane intervencije, primjene slušnih pomagala prije dobi od tri godine, s većom sposobnosti djece u govornom izražavanju. Slušna pomagala kao koštani implantati smještaju se na temporalnu kost te omogućuju direktnu stimulaciju kohleje preko mastoidnog korteksa. Kohlearni implantati se dana koriste u djece s teškim senzoričkoneuralnim gubitkom sluha. Upravo gluhoća uzrokovana genetski, ali nesindromski, najadekvatniji je izbor za implantaciju umjetne pužnice.

Literatura

1. Chu K, Elimian A, Barbera J, Ogburn P, Sitzler A, Quirk JG. Antecedents of newborn hearing loss. *Obstet Gynecol* 2003;101:584-8.
2. Morton N. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann NY Acad Sci* 1991;630:16-31.
3. Paparella MM, Fox RY, Schachern PA. Diagnosis and treatment of sensorineural hearing loss in children. *Otolaryngol Clin North Am* 1989;22:51-74.
4. Mhatre AN, Lalwani AK. Molecular genetics of deafness. *Otolaryngol Clin North Am* 1996;29:421-35.
5. Teubner B, Micher V, Pesch J, Lauterman J, Winterhager E, Herbenhold C et al. Connexin30 (GJB6)-deficiency cause severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum Mol Genet* 2003;12:13-21.
6. Barišić I, Sansović I, Knežević J, Pavelić J. Genetički uzroci oštećenja sluha. *Pediatr Croat* 2004;48(Suppl. 1.):123-30.
7. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G et al. The genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in Europe populations. *Eur J Hum Genet* 2000;8:19-23.
8. Brajnović-Zaputović S. Klinički i genetički probir na prirođenu gluhoću. Doktorska disertacija. Sveučilište u Rijeci. Rijeka: 2006.
9. Medica I, Rudolf G, Prpić I, Stanojević M, Peterlin B. Incidence of the del35G/GJB2 mutations in Croatian newborns with hearing impairment. *Med Sci Monit* 2005;11:CR533-5.
10. Zaputović S, Štimac T, Prpić I, Mahulja-Stamenković V, Medica I, Peterlin B. Molecular analysis in diagnostic procedure of hearing impairment in newborns. *Croat Med J* 2005;46:797-800.

Diagnostic dilemma in Cystic Fibrosis

Clinical department for Pulmonary and Allergic diseases Golnik, Slovenia

Mencinger Marina, Šilar Mira, Korošec Peter



65 Roses is what some children with CF call their disease because the words are much easier for them to pronounce

Life expectancy in CF has increased mainly due to aggressive antibiotic treatment of pulmonary infections, respiratory physiotherapy and improved nutritional state of patients.

Early diagnosis is important to provide patients with a proper medical care.

DIAGNOSTIC criteria for CF (Rosenstein BJ, Cutting et al.,

J Pediatr 1998): CONSENSUS

1. One or more clinical signs:

Chronic sinopulmonary disease
Gastrointestinal and nutritional abnormalities
Salt loss syndrome
Male urogenital abnormalitis, obstructive azoospermia

OR

A history of CF in siblings

OR

A positive newborn screening test (immunoreactive trypsin)

AND

2 Evidence of CFTR dysfunction:

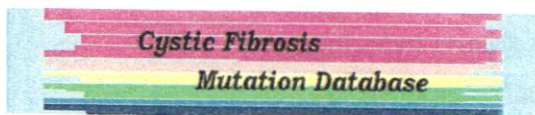
Elevated sweat chloride concentration (60mM)

Presence of 2 CF- producing mutations

Characteristic abnormalities of nasal potential difference

CF is an autosomal recessive disease due to mutations in the CFTR gene

More > 1400 mutations found in cftr gene



<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>

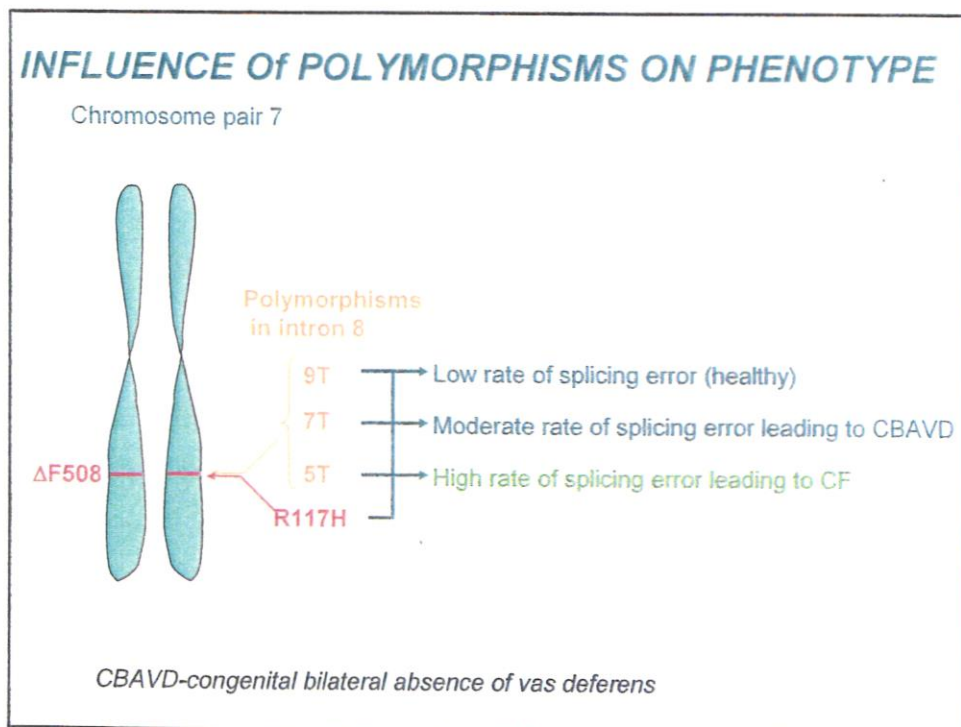
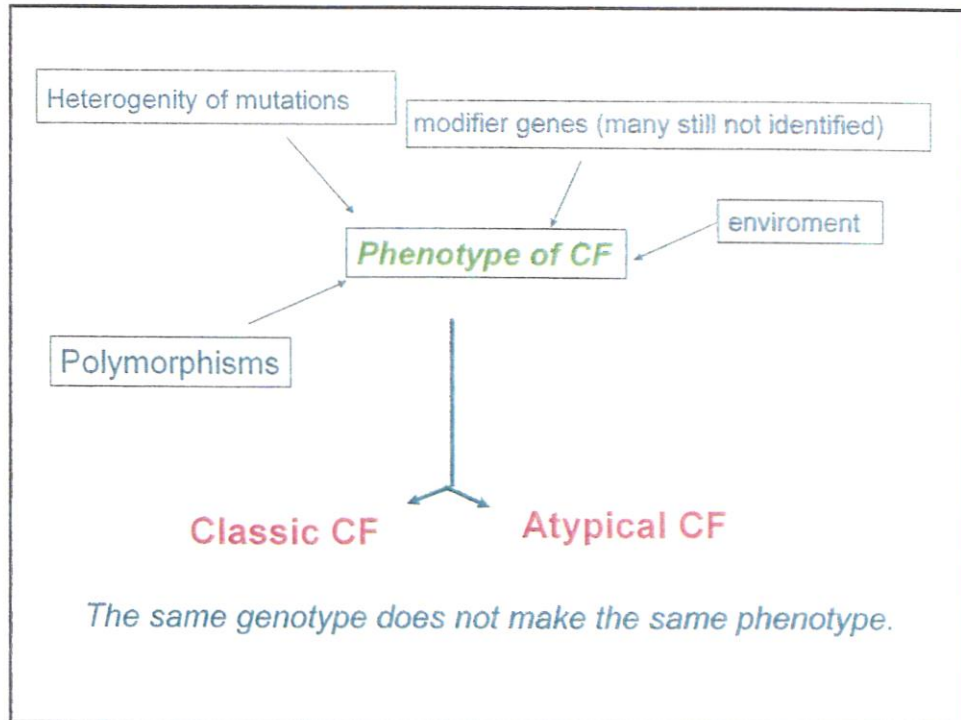
CFTR gen

20%

~80%

Frequency of mutations

**Routine genetic testing,
performed in KOPA
Golnik, Slovenia: 29 mutations
Method: multiplex PCR (1)**



What is atypical CF?

- one/less organ-s involved, mild symptoms*
- manifestation of the disease in adulthood*
- sweat test negative*
- two, one or none detectable mutations or polymorphisms in the CFTR gene*

METHOD (KOPA Golnik, Slovenia):

Allele specific polymerase reaction
ARMS (amplification refractory mutation system)

- multiplex PCR
- 29 mutations
- differentiates homo and heterozygote in case of $\Delta F508$

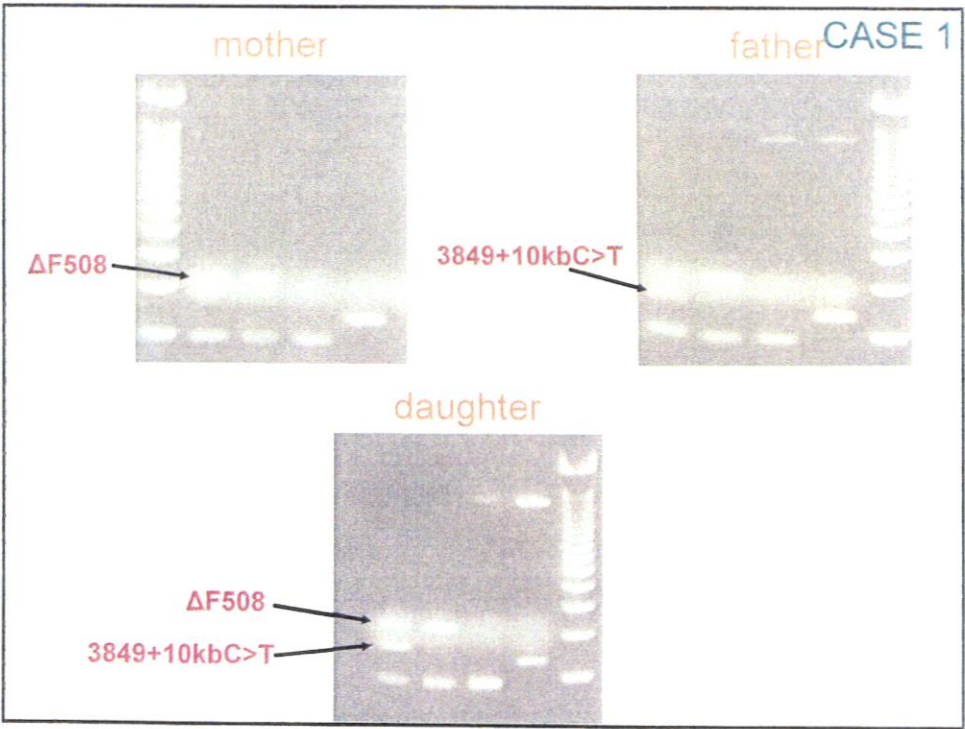
CASE 1

Case 1:

First hospitalization -16 years at 1994
2 times pneumonia with sepsis, nose polyposis
bronhiectasis on HRCT
Pilocarpine iontophoresis neg.
colonisation of with *Staphyloccocus aureus* from 1996,
colonisaton wirh *Pseudomonas aeruginosa* from 2004
No other organs involved.

Lung function VC 2300ml (67%), FEV11350ml (49%),
diffusion capacity 62%.

Genotype: $\Delta F508/3849+10kbC>T$



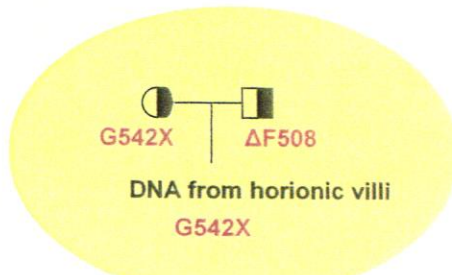
CASE 1

Information to the family:

$\Delta F508/3849+10kbC>T$ is associated with a mild disease. A sister of our patient does not carry any mutation in the *cftr* gene.

CASE 2

Pregnant woman –wish to test herself and the fetus because of the case of CF in her family.



Picture 2. Family tree

Size marker



ΔF508
heterozygote

controls

- Pregnant woman with G542X
- Asymptomatic partner ΔF508
- DNA from horionic tissue- G542X

CASE 2

Information to the family:

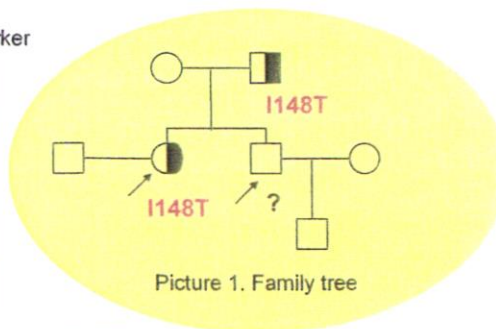
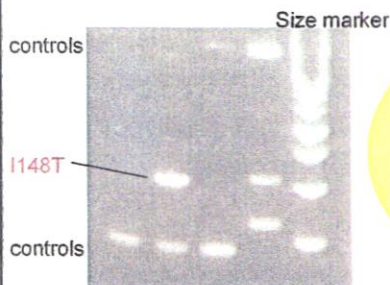
If both parents carry one mutation, a child has $\frac{1}{4}$ risk to inherit both mutations. We found G542X in horionic villi, which means that the fetus carries only the mutation inherited from the mother.

CASE 3

Brother and sister.

Clinical picture: bronhiectasis, colonisation with *Pseudomonas aeruginosa*, osteoporosis, nasal polyps. BMI normal.
VC (31%;39%), FEV1 (21%; 24%).

GENETIC testing



- ↗ ● Female patient, heterozygote I148T
- ▣ Father, no symptoms I148T
- ↗ □ Male patient, no mutation was found

Information to the family

Literature:

-I148T is more common in healthy family members (2)

- I148T is important only in cis (on the same chromosome) association with c3199del6 or with c3395_3396insA (3,4)

-c3199del6 and c3395_3396insA are mutations.

I148T is probably only polymorphism (5)

We did not prove dysfunction of CFTR. A complete gene sequencing of cftr is suggested to reveal possible rare mutations or polymorphisms associated with CF.

CONCLUSION

Genetic testing in CF is a valuable tool to confirm the diagnosis, particularly in atypical cases.

In cases where only one or no mutation was detected a necessity of whole gene sequencing is indicated upon revaluations of clinical data. if CFTR dysfunction can not be demonstrated a definitive diagnosis and the decision to monitor or treat patient should be based on clinical presentation of a patient.

LITERATURA:

1. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). Nucleic Acids Res:2503-2516 (1989)
2. Strom CM et al.. Cystic fibrosis screening using the College panel platform comparison and lessons learned from the first 20,000 samples. Genet Med 2002; 4: 289-96.
3. Monaghan KG et al. Genotype-phenotype correlation and frequency of the 3199del6 cystic fibrosis mutation among I148T carriers: results from a collaborative study. Genet Med 2004; 6: 421-5.
4. Rohlfis EM, et al.. The I148T CFTR allele occurs on multiple haplotypes a complex allele is associated with cystic fibrosis. Genet Med 2002; 4: 319-23.
5. Claustres M, et al Are p.I148T, p.R74W and p.D1270N cystic fibrosis causing mutations? BMC Med Genet 2004; 5: 19.

TRUDNOĆA I POROĐAJ BOLESNICE S NEPREPOZNATOM WILSONOVOM BOLEŠĆU I PLANIRANJE SLIJEDEĆE TRUDNOĆE

Srđana Telarović

KBC Zagreb, Klinika za neurologiju, Kišpatićeva 12, Zagreb

Hepatolentikularna degeneracija (Mb Wilson) nasljedni je poremećaj metabolizma bakra koji primarno oštećuje jetru i bazalne ganglije iako su mogući poremećaji gotovo svih organa. To, nažalost, izaziva česte dijagnostičke pogreške. Kako bolest, ukoliko se ne prepozna i pravodobno i adekvatno ne liječi, završava smrtno, neophodno je ukazati na značenje njezinog ranog otkrivanja.

Opis 24-godišnje bolesnice (po zanimanju medicinska sestra) do sada je nezabilježen slučaj bolesnice koja je zatrudnjela i rodila muško dijete u uznapredovalom stadiju neprepoznate Wilsonove bolesti. Do naše konzultacije koja je uslijedila tjedan dana nakon porođaja muškog djeteta, liječena je primarno kao psihoza i moguća mijastenija gravis. Temeljem anamnestičkih podataka (preboljela u dva navrata hepatitis, liječena radi amenoreje i steriliteta), heteroanamnestičkih podataka (otac prebolio hepatitis), kliničkog statusa (disfonija, dizatrija, disfagija, tremor) i obrade (parametri metabolizma bakra, koagulogram, Kayser-Flaisherov prsten, MRI mozga) postavljena je dijagnoza hepatolentikularne degeneracije. Započeto je liječenje d-penicilaminom, a klinički oporavak majke zabilježen je nakon šest mjeseci od početka liječenja uz početno blaže kliničko pogoršanje karakteristično za inicijaciju terapije kelatnim spojevima. Sam porođaj protekao je u terminu i uredno, s neposredno vidljivim manjim smetnjama u djeteta. U kasnijem tijeku u djeteta je zabilježeno blago usporenje razvoja motoričkih funkcija, no uz adekvatan program rehabilitacije dijete je u školskoj dobi praktički bez smetnji uz pohađanje standardnog školskog programa.

S bolesnicom, suprugom, roditeljima i bratom obavljen je razgovor uz informacije o vrsti bolesti, genetskoj osnovi i mogućnostima liječenja. Bolesnica je u daljnjem tijeku neurološki praćena, a uz redovitu terapiju neurološki je status bio praktički uredan.

U dobi od 36 godina bolesnica je zatražila konzultaciju radi planiranja druge trudnoće. Obzirom na opisanu mogućnost teratogenog djeovanja d-penicilamina u bolesnice je postupno uz pojačano laboratorijsko i kliničko praćenje d-penicilamin zamijenjen cinkovom soli (Zn acetatis). Po začeću upućena je u nadležnu ginekološku kliniku uz preporuku pojačanog nadzora tijekom trudnoće i porođaja uz također učestale neurološke kontrole. Trudnoća i porođaj bolesnice protekli su bez komplikacija te je bolesnica nešto prije termina carskim rezom rodila zdravu djevojčicu.

Ovaj slučaj predstavlja do sada nezabilježeno praćenje trudnoće, poroda, stanja majke i djeteta u bolesnice sa teškim oblikom Wilsonove bolesti. Od neobične je važnosti ne samo zbog spoznaje o mogućnosti uspješne terapije u uznapredovalom stadiju bolesti, već i radi daljnjeg praćenja stanja potomstva.

Original article

Brain MRI abnormalities in muscular dystrophy due to FKRP mutations

Susana Quijano-Roy^{a,b,1,2,*}, Itxaso Martí-Carrera^{a,1}, Samira Makri^c, Michèle Mayer^d,
Svetlana Maugendre^b, Pascale Richard^{b,e}, Carole Berard^f, Louis Viollet^a, Bruno Leheup^g,
Pascale Guicheney^b, Jean-Marc Pinard^a, Brigitte Estournet^a, Robert Y. Carlier^h

^aUnité de Neurologie Pédiatrique, Service de Pédiatrie, Rééducation et Réanimation Neurorespiratoire, Hôpital Raymond Poincaré, 92380, Garches, France

^bINSERM U582, Institut de Myologie, IFR 14, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière (AP-HP); Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Paris, France

^cEtablissement Hospitalier Spécialisé Ali Ait Idir, Hahad, Alger, Algeria

^dService de Néuropédiatrie, Hôpital Saint Vincent de Paul, Paris, France

^eUF Cardio-Myogénétique, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

^fService de Rééducation, CH Lyon-Sud, Lyon, France

^gService de Médecine Infantile et Génétique Clinique, Hôpital d'Enfants, Vandoeuvre les Nancy, France

^hService d'Imagerie Médicale, Hôpital Raymond Poincaré (AP-HP), Garches, France.

Received 12 April 2005; received in revised form 12 August 2005; accepted 17 August 2005

Abstract

Introduction: FKRP mutations cause a muscular dystrophy which may present in the neonatal period (MDC1C) or later in life (LGMD2I). Intelligence and brain imaging have been previously reported as being normal in FKRP-associated muscular dystrophy, except in rare cases presenting with mental retardation associated with structural brain abnormalities. **Patients and methods:** We studied cerebral MRIs in twelve patients with FKRP-associated muscular dystrophy presenting in infancy or early childhood, at ages between 14 months and 43 years. Two patients had severe cognitive deficits, four had mild-moderate mental retardation and the rest were considered to have normal intelligence. All, but one were wheelchair-bound and 7 were mechanically ventilated. **Results:** Brain MRI was abnormal in 9 of 12 patients. Brain atrophy was seen in 8 patients. One child had isolated ventricular enlargement at 4 years. Cortical atrophy involved predominantly temporal and frontal lobes and was most important at later ages. In two cases with serial images this atrophy seemed progressive. Three patients, two with severe and one with moderate mental retardation, showed structural abnormalities of the posterior fossa with hypoplasia of the vermis and pons, and cerebellar hemispheric cysts. These abnormalities were stable with time. Two of these three patients also showed diffuse white matter abnormalities in early childhood, which regressed with time. **Conclusions:** MRI abnormalities are common in patients with FKRP-associated muscular dystrophy presenting at birth or in early childhood. Progressive brain atrophy is the most frequent finding. Posterior fossa malformations and transient white matter changes may be seen in patients with associated mental retardation.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: FKRP; Brain MRI; Congenital muscular dystrophy; Alpha-dystroglycan; Mental retardation

1. Introduction

Mutations in the FKRP (fukutin-related protein) gene were first identified in 2001 in a series of children with congenital muscular dystrophy (CMD), very high CK levels, progressive weakness and muscle hypertrophy [1,2]. Soon after, mutations in the same gene were also found in a number of patients with a milder, later-onset form of limb-girdle muscular dystrophy [3], previously known as LGMD2I and linked to the FKRP locus on chromosome 19q13.3 [4] and in an intermediate phenotype with a Duchenne-like picture [5].

* Corresponding author. Unité de Neurologie Pédiatrique, Service de Pédiatrie, Rééducation et Réanimation Neurorespiratoire, Hôpital Raymond Poincaré, 92380, Garches, France. Tel.: +33 147107890; fax: +33 147 107 883.

E-mail address: susana.quijano-roy@rpc.aphp.fr (S. Quijano-Roy).

¹ Both authors have contributed equally in the study.

² Home address: 24 Rue Lecourbe, 75015 Paris, France.

The CMDs have autosomal recessive inheritance and are clinically very heterogeneous. In Western countries, most patients show clinical features derived from the muscle involvement and are classified as 'classical' CMDs, to distinguish them from rare forms of CMD-associated with severe mental retardation and structural malformations of the central nervous system (CNS). In Europe, more than one third of patients with a classical form of CMD are due to mutations in the LAMA2 (laminin alpha-2 chain of merosin) gene, resulting in a primary defect of merosin (MDC1A in the international classification of CMDs). Intelligence is usually considered normal in these patients, although diffuse white matter signal abnormalities are observed on the brain MRI [6–10]. Other well defined classical forms of CMD include RSMD1 (rigid spine muscular dystrophy type 1) due to mutations in the selenoprotein N1 [11], UCMD (Ullrich CMD) due to mutations in collagen VI subunits [12,13], and MDC1C (muscular dystrophy, congenital type 1C) due to FKRP mutations [1,2].

The group of CMD syndromes associated with severe CNS malformations and mental retardation includes Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD), the Muscle–Eye–Brain Syndrome (MEB), the Walker Warburg syndrome (WWS), and a recently identified form, designated as MDC1D [14]. These disorders are associated with a wide spectrum of brain malformations and variable eye involvement. Immunocytochemical studies in all of these disorders show a reduction in the immunolabeling of alpha-dystroglycan (alpha-DG), but not of beta-DG [15–17], and therefore, they are now classified as secondary dystroglycanopathies. Their underlying genetic defects are mutations in genes coding for known or putative glycosyltransferases (fukutin, POMGnT1, POMT1 and LARGE, respectively) [14,18–20], suggesting that abnormal protein glycosylation may underlie muscle and CNS involvement in these entities. Patients with muscular dystrophy due to FKRP mutations (MDC1C and LGMD2I) show also reduced alpha-DG glycosylation in muscle. This is not surprising, since FKRP is a fukutin-like enzyme which is also considered to be involved in protein-glycosylation processes [1].

Although intelligence and brain imaging in FKRP patients were initially thought to be normal, we previously reported cognitive impairment and brain atrophy in several cases with MDC1C [2]. More recently, mutations in the FKRP gene have been identified in a number of mentally retarded children with posterior fossa malformations [21,22], and a smaller number of cases with severe structural brain involvement typical of MEB or WWS [23]. To better address this issue, we systematically investigated for abnormalities on cerebral MRI in twelve FKRP mutated patients with muscular dystrophy presenting in infancy or early childhood, with or without clinical cognitive impairment, and found that CNS involvement is much more frequent than expected in such cases.

2. Patients and methods

Patients with muscular dystrophy due to FKRP mutations were collected through the French research network on congenital muscular dystrophies. To study the relationship between neurological and motor involvement, the patients were ordered by their best motor function ability (maximal motor acquisition), from the most to the less severely affected individuals. To study correlation between CNS abnormal structure and function, we distinguished three groups regarding to the cognitive level (a: severe mental retardation; b: mild-moderate impairment or cognitive difficulties; c: normal), and reviewed their clinical and complementary data.

Brain MRI examinations were performed between 1994 and 2004 as part of the diagnostic protocol of the multicentre research network. The examinations were performed with 0.5 or 1.5 T magnet systems, and all included sagittal T1-weighted, axial SE or TSE T2-weighted and frontal inversion-recovery or GE T1-weighted sequences. Some recent examinations included more sequences, but only comparable sequences were taken into account for radiological analysis. Brain MRI images were systematically analysed. An experienced neuroradiologist and two experienced paediatric neurologists analysed all scans independently. Results were subsequently compared and a consensus found in cases of disagreement.

Analysis focused on detection and localization of supratentorial abnormalities (white matter abnormal signal, cortical or subcortical atrophy, migration defects, malformation), and brainstem and cerebellar findings (atrophy or hypoplasia, cerebellar cysts). Scoring of abnormalities was as follows: 0 (no abnormality); 1 (mild); 2 (moderate or intermediate); 3 (severe abnormalities). White matter changes were graded with respect to severity, region involved (frontal; temporal; parietal; occipital; internal capsule; corpus callosum; cerebellum; brainstem), and their extent (punctate, patchy; lobar; diffuse). Diffuse involvement was noted if the frontal, temporal, occipital and parietal lobes were all affected. Margins of white matter lesions and age-appropriateness of myelination were also analyzed. Signs of atrophy or hypoplasia were assessed in brain, cerebellum and brainstem. In the absence of an automatized volumetric measurement of brain and ventricles, we followed the method described by Hirashima to quantify brain atrophy [24]. According with this author, subcortical atrophy was diagnosed and graded measuring the width of the anterior horn of the lateral ventricles. In addition, marked deep sulci and enlarged subarachnoid spaces were considered as signs of cortical atrophy. Atrophy was considered of cortical predominance if the enlargement of sulci and subarachnoid spaces were more pronounced than that of the ventricles. It was of subcortical predominance if the relationship was inversed. The size of paranasal sinuses and mastoid cells was also noted if they were pneumatized (patients over 10 years of age).

3. Results

Twelve patients from 11 unrelated families were recruited, 8 girls and 4 boys, aged 1–43 years. Ten patients had an onset at birth or in the first year of life, while patients 11 and 12, who were siblings, presented with proximal weakness at a later age during early childhood.

All the patients showed dystrophic changes on muscle biopsy.

3.1. Genetic results

Seven unrelated patients harboured a homozygous FKRP mutation, four had compound heterozygous mutations, and in one patient (case 7) only a single heterozygous mutation was identified (Table 1). This patient showed the typical

clinical picture of MDC1C patients at an advanced stage of the disease. All FKRP mutations were missense. Several of them were previously reported (patients 2 [22], 4, 8, 10 [1,2], 11 and 12 [5]).

Six of the seven patients who carried homozygous mutations had parents who were first cousins, originating from Morocco, Tunisia, Algeria, Sudan and Turkey (see Table 1). No consanguinity was noted for case 8, who carried also a homozygous mutation and came from the Antilles Islands.

Interestingly, the founder Tunisian mutation, A455D, initially described by Louhichi et al. [22], was identified in two patients, one from Tunisia and the second from Morocco. Both patients had severe phenotypes with central and peripheral involvement. The two Algerian patients from unrelated families shared the same novel mutation, R110P,

Table 1
Clinical and complementary data of the 12 patients with FKRP gene mutations

Patients	Age	Sex	Origin	Onset of symptoms	Max. motor milestone (age)	Respiratory Function/ Treatment	Cognitive performance/ Function	HC	FKRP Mutations
1	14 m	F	Morocco	Birth	Head support (2 y)	NE/No treatment	Severe encephalopathy/NE	−1.5SD (18 m)	A455D Homoz
2	12 y	F	Tunisia	Birth	Sitting (5 y)	Restrictive insufficiency TRCH at 12 y	Severe retardation/NE	−2SD (12 y)	A455D Homoz
3	3 y	F	Algeria	<3 m	Move on the buttocks (3 y)	NE/No treatment	Speech delay DQ=60	−1SD (3 y)	R110P Homoz
4	9 y	M	Sudan	<2 m	Move on the buttocks	Restrictive insufficiency TRCH at 11 y	Speech delay IQ=67	−0.5 SD (14 y)	P217T Homoz
5	9 y	F	Turkey	<3 m	Move on the buttocks	VC=50% at 9 y	Speech delay IQ=62	−1SD (5 y)	R323H Homoz
6	3 y	M	Algeria	<3 m	Walking with calipers (3 y)	NE/No treatment	Speech delay DQ=60	N (3 y)	R110P Homoz
7	22 y	F	France	<6 m	Walking with calipers (from 2 to 5 y)	Restrictive insufficiency NNV at 16 y; TRCH at 22 y	High school/NE	N (16 y)	S174C Heteroz
8	18 y	F	Antilles	<1 y	Walking (from 3 to 6 y)	Restrictive insufficiency NNV at 13 y; TRCH at 17 y	Elementary school/NE	N (18 y)	Y465S Homoz
9	4 y	M	France	<6 m	Walking (3 y)	Normal/No treatment	Elementary school/NE	N	L276I P89L
10	25 y	F	France	<1 y	Walking (from 18 m to 7 y)	Restrictive insufficiency NNV at 10 y; TRCH at 12 y	Elementary school/NE	−2SD (25 y)	P316R Y328S
11	35 y	F	France	3 y	Walking (from 1 to 11 y)	Restrictive insufficiency NNV at 23 y; TRCH at 25 y	Elementary school/NE	−2SD (35 y)	L276I P316S
12	43 y	M	France	5 y	Walking (from 1 to 17 y)	Restrictive insufficiency VNN at 39 y (TRCH refused)	Elementary school/NE	N (41 y)	L276I P316S

Symbols: DQ, developmental quotient with Brunet-Levine test; F, female; HC, head circumference; Heteroz, heterozygous mutation; Homoz, homozygous mutation; IQ, intelligence quotient with Wechsler scale; m, months; M, male; NNV, nasal nocturnal ventilation; NE, not evaluated; SD, standard deviation; TRCH, tracheostomy; VC, vital capacity; y, years.

which may be a founder mutation and which was associated with a milder muscular and neurological picture, but the two patients are only 3-year-old.

Of the remaining five patients with heterozygous mutations, patient 9 and the siblings 11 and 12 shared a C826A (Leu276Ile) heterozygous mutation, which is frequently observed in a homozygous state in milder patients with LGMD2I and in a compound heterozygote state in those with an intermediate (Duchenne-like) phenotype [5].

3.2. Clinical results

Detailed clinical data are showed in Table 1.

Regarding the cognitive level, patients were classified in three groups as follows:

Group 1. Marked mental retardation, (estimated IQ < 50): Patients 1 and 2 had hypotonia and weakness since birth, and showed severe psychomotor delay. Patient 1 could not sit unsupported, had a poor visual contact and had no speech at 2 years of age. Patient 2 was able to sit at 5 years, but never walked. Her language at 12 years consisted of a few single-word sentences; she never learned to count, read or write and had difficulties understanding and remembering simple concepts and following orders. At the end of the first decade of life she developed severe progressive motor impairment and a restrictive respiratory insufficiency which led to tracheostomy at 12 years. She had a sibling previously dead at the age of 3, also affected with CMD and mental retardation.

Group 2. Mild-moderate cognitive impairment (speech delay, estimated IQ or DQ between 80 and 50): Patients 3–6 presented with muscular hypotonia at birth or in the first 6 months of life. They had delayed psychomotor development. Patients 3, 4 and 5 were able to move on their buttocks for a period of years, but never stand; patient 6 could stand and walked with support at 3 years of age. In addition to motor and neurological symptoms, patient 3 had eye involvement (strabismus, myopic choroidosis with severe myopia of –20 dioptres). Regarding cognitive performances, all patients had speech delay and IQ or DQ between 60 and 67. Patient 4 showed a psychotic behaviour, and psychometric tests of patient 5 detected a significant deficit in comprehension and time of execution at 11 years. A very progressive motor and respiratory impairment, typical of the advanced stages of the disease, was observed in the two older patients. Patient 4 underwent tracheostomy at age 11 years and had a dilated myocardiopathy. Patient 5 had a moderate restrictive respiratory insufficiency at 9 years when the study was performed, with normal blood gas exchange.

Group 3. Normal cognitive performance: Patients 7–12 acquired normal verbal and written language and were able to attend regular school. None had evident cognitive impairment, but no psychometric testing was performed. Patient 12 was treated with valproic acid during childhood due to partial seizures. Concerning motor abilities, patient 7 was able to walk with callipers, patients 8, 9 and 10 walked independently at a late age with a waddling gait, and

patients 11 and 12 acquired normal walking at an early age, were able to run transiently, and presented with proximal weakness at 3 and 5 years, respectively. At the time of the study, all the patients were wheelchair-bound and required continuous mechanical ventilation, excepting patient 9 who was only 4 years old. Patients 8, 10 and 11 were mechanically ventilated 24 h a day through a tracheostomy, which allowed maintenance of normal blood gases. Patient 12 was ventilated by nasal mask, but refused tracheotomy despite severe hypercapnia.

3.3. Neuroradiological results

Brain MRI showed abnormal findings in 9 out of the 12 patients. Individual MRI findings are summarised in Table 2.

3.3.1. Brain atrophy

Signs of cortical or subcortical atrophy were observed in the MRIs of 8 patients (cases 1, 2, 4, 6, 8, 10, 11 and 12) at ages which varied from 11 months to 43 years. Increased subarachnoid spaces were never associated with macrocephaly, the head circumference in all cases being between normal and –2SD. Isolated ventricular enlargement was detected in patient 9 at 4 years. Brain atrophy was observed in all three patient groups: in both patients with severe cognitive involvement (group 1), in 2 of 4 patients with mild-moderate mental retardation (group 2), and in 4 of 6 patients with normal cognitive function (group 3). It was detected much earlier in the mentally retarded patients, especially those who showed also CNS malformation, but was much more severe in the older patients, who lacked cognitive impairment or CNS malformation. Virtually all MRIs performed beyond the age of 10 years revealed cortically predominant atrophy involving mainly the temporal and frontal lobes (Fig. 1) (case 2 at 12 years, case 8 at 14 and 18 years, case 10 at 25 years, case 11 at 35 years, case 12 at 43 years). In contrast, earlier examinations showed no differential involvement of cortical or subcortical regions (case 2 at 11 months and 4 years, case 6 at 3 years) or discrete subcortical predominance (case 1 at 14 months, case 4 at 9 years and case 9 at 4 years). In patients 2 and 8, who had previous MRI examinations, atrophy showed progression of cerebral atrophy between the ages of 4 and 12 years, and 14 and 18 years, respectively (Figs. 2 and 3). The atrophy seemed to be initially localised in temporal lobes, spreading later to other regions.

3.3.2. White matter abnormalities:

MRI revealed striking hyperintensity of the supratentorial white matter on T2-weighted sequences only in the two patients with severe mental retardation. The abnormal signal was diffuse, periventricular, and spared the corpus callosum, the internal capsule and the cerebellum. These lesions, which were detected in the first 14 months of life, showed a significant regression in the older case at the age

Table 2
Brain MRI findings of the 12 patients with FKRP gene mutations

Patient	Age	WMC	Localization of WMC	Cortical atrophy (degree, localization)	Ventricle enlargement	Vermis hypoplasia	Cerebellar cysts	Brainstem hypoplasia	Cranial sinus pneumatization
1	14 m	3	Diffuse	1, temporal	2	3	3	3	Not developed
2	11 m	3	Diffuse	1, temporal	1	3	1	2	Not developed
	4 y	2	Patchy, Fronto-temporal	1, temporal	1	3	1	2	Not developed
	12 y	1	Punctate, Frontal	2, diffuse	1	3	1	2	2
3	3 y	0	0	0	0	0	0	0	Not developed
4	9 y	0	0	1, temporal	2	0	0	0	1
5	9 y	0	0	0	0	0	0	0	0
6	3 y	0	0	1, temporal	1	2	1	1	Not developed
7	15 y	0	0	0	0	0	0	0	2
	22 y	3	Punctate, Splenium	0	0	0	0	0	2
8	14 y	0	0	1, temporal	0	0	0	0	2
	18 y	0	0	2, fronto-temporal	1	0	0	0	2
9	4 y	0	0	0	1	0	0	0	Not developed
10	25 y	0	0	2, fronto-temporal	1	0	0	0	3
11	35 y	0	0	3, fronto-temporal	1	0	0	0	3
12	43 y	0	0	1, temporal	1	0	0	0	2

Symbols: C–S atrophy, cortico–subcortical atrophy; m, months; WMC, white matter changes; y, years; 0, no abnormality; 1, mild; 2, moderate or intermediate; 3, severe abnormalities.

of 4 years, and were practically absent at 12 years, being only observed on FLAIR sequence (Fig. 3).

No other cases with diffuse white matter abnormalities were observed, but patient 7 showed at 22 years a small well-limited lesion in the splenium of corpus callosum which was hyperintense in T2 and FLAIR and hypointense in T1 sequences. This finding was not present in an earlier MRI at 15 years and was of unclear significance.

3.3.3. Structural brain abnormalities

In this study, no evidence of migration defect or cortical malformation was found on MR imaging.

3.3.4. Posterior fossa malformation

Three mentally retarded patients, 1, 2, and 6, showed similar structural abnormalities of the posterior fossa. The cerebellum and brainstem had a reduced size, mainly affecting the inferior lobe of the cerebellar vermis and the pons. In addition, well-demarcated T1 hypointense–T2 hyperintense lesions resembling cysts were observed at the subcortical level in the cerebellar hemispheres of all three patients, but they were much more marked in case 1 (Fig. 4). Posterior fossa abnormalities were detected as early as 11 months and did not show significant changes at different ages in case 2 (Fig. 4).

3.4. Additional MR results

All patients over 10 years of age had a striking increase in the size of frontal, sphenoidal and maxillary sinuses (Figs. 1–3).

Tongue MRI was performed in case 7 at 22 years and showed enlargement and an abnormal signal suggesting fibrotic changes.

4. Discussion

We report the neuroradiological aspects on MRI and their correlation to cognitive, motor, and genetic findings in a series of 12 patients affected with muscular dystrophy due to FKRP mutations. The patients were not selected for the study considering their intellectual abilities; they were recruited by the French research network over a period of 10 years. The series was heterogeneous with respect to the geographic origin of the patients, the nature of the mutations, and the psychomotor performances of the patients. Onset of myopathic symptoms was in most cases at birth or during infancy, and in only two siblings during early childhood.

The systematic and exhaustive review of the MRI images in these cases revealed abnormal findings in most patients, including those without cognitive impairment. Conversely, cognitive impairment was not always associated with an abnormal MRI. In fact, MRI was normal in two patients with moderate mental retardation.

Three kinds of MRI abnormalities were found in our series: brain atrophy, posterior fossa malformation and supratentorial white matter changes. The most frequent abnormality was brain atrophy, which was detected in 8 patients. A 4-year-old boy had isolated lateral ventricle enlargement. Atrophy was observed as early as the end of

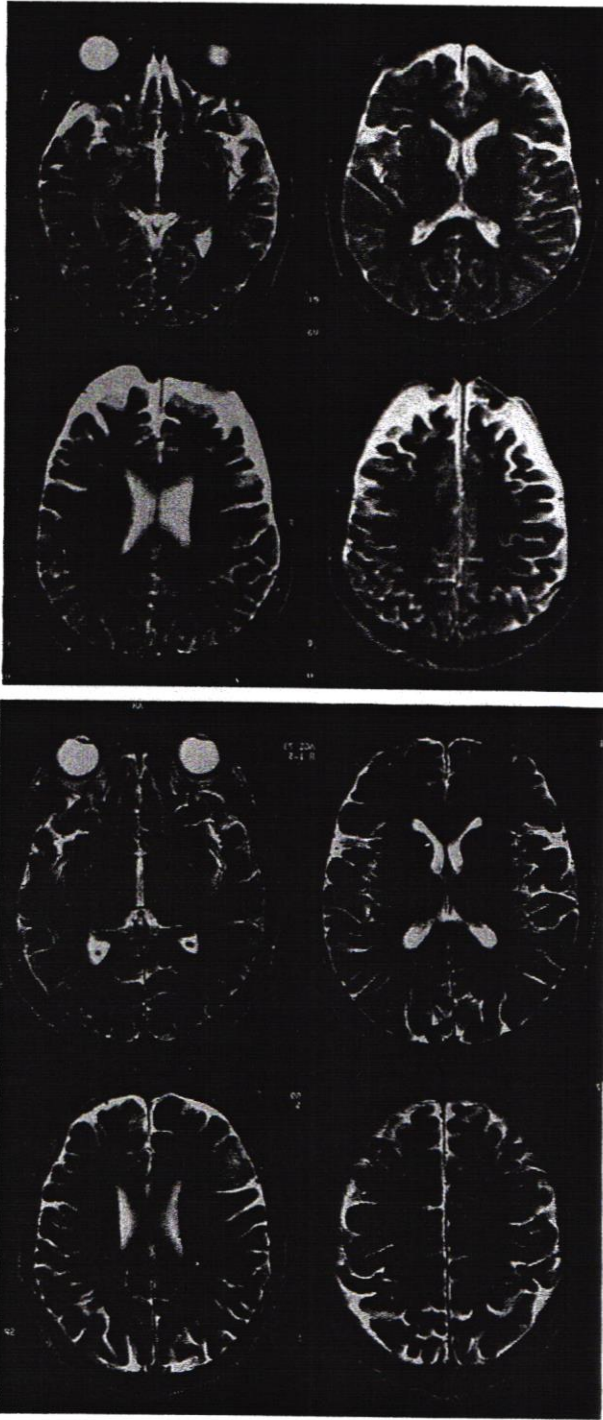


Fig. 1. Axial T2-weighted sequences of brain MRI of the two adult siblings showing variable brain atrophy with cortical predominance. Upper panel: Patient 11 at 35 years. Marked fronto-temporal atrophy is present with frontal sinus enlargement. Lower panel: Patient 12 at 43 years. Slight atrophy is observed in temporal lobes. Frontal sinus enlargement is also present.

the first year of life in patients with severe mental retardation and CNS malformation, but also as an isolated finding later in life in patients with milder cognitive impairment without CNS malformation, and even in

individuals with normal intellectual performances. Progressive cerebral atrophy was apparent in those patients undergoing serial examinations. It seemed to start in temporal lobes, extending later to the frontal lobes or becoming generalised. MRIs performed after the age of 10 years revealed a marked cortical predominance of this cerebral atrophy, involving mainly the frontal and temporal lobes. Before this age, the studies showed a mild predilection for subcortical involvement or no regional differences. There was variability in the degree of atrophy in patients harbouring the same genetic defect, even comparing between siblings.

Although a few publications have described major CNS malformations in several cases with mutations of FKRP gene and severe mental retardation [21–23], the presence of signs of cortical or subcortical brain atrophy in large series of FKRP mutated patients has never been specifically studied before. We have already noted the presence of brain atrophy in a previous publication which included three of the patients of this series [2]. Since all had a very advanced disease and were tetraplegic and mechanically ventilated, it was not clear if brain atrophy in those cases was secondary to hypoxic events, immobility, or if it was a primary consequence of the disease. Although the origin of atrophy is likely multifactorial and may be influenced by external factors such as hypoxia or age, the results of this study strongly suggest, at least partially, a primary aetiology: (1) Brain atrophy was observed at early ages in all the cases with associated CNS malformation and mental retardation; (2) Atrophy showed a selective localization (temporal and frontal lobes); (3) Isolated brain atrophy was detected in several patients before the occurrence of a significant deterioration of the respiratory function leading to hypoventilation and abnormal gas exchange; (4) Brain atrophy was less significant in the older of two siblings, who refused adequate ventilatory treatment and had therefore chronic hypercapnia and hypoxia, while his sister, mechanically ventilated through tracheotomy and with normal gas exchange showed severe brain atrophy at a similar age; (5) Brain atrophy was absent in a 22-year-old intelligent patient, mechanically ventilated since age 16; (6) The significant enlargement of paranasal bone sinuses observed in the older patients may be an indirect sign of reduced brain growth during the first years of life, as has been studied by Auque et al. [25], moreover in the absence of macrocephaly. Our results suggest that brain atrophy has probably been underestimated previously and could itself be a consequence of FKRP dysfunction within the CNS. Because of the progressive course and the occurrence at a late age, cerebral atrophy may not be detected in series of patients scanned early in life, especially those without mental retardation or with a late onset of myopathic symptoms (LGMD2I). Due to the long period of the study and the impossibility to perform volumetric measurements with the modern available techniques in all the patients, we followed an indirect method to estimate the brain atrophy [24].

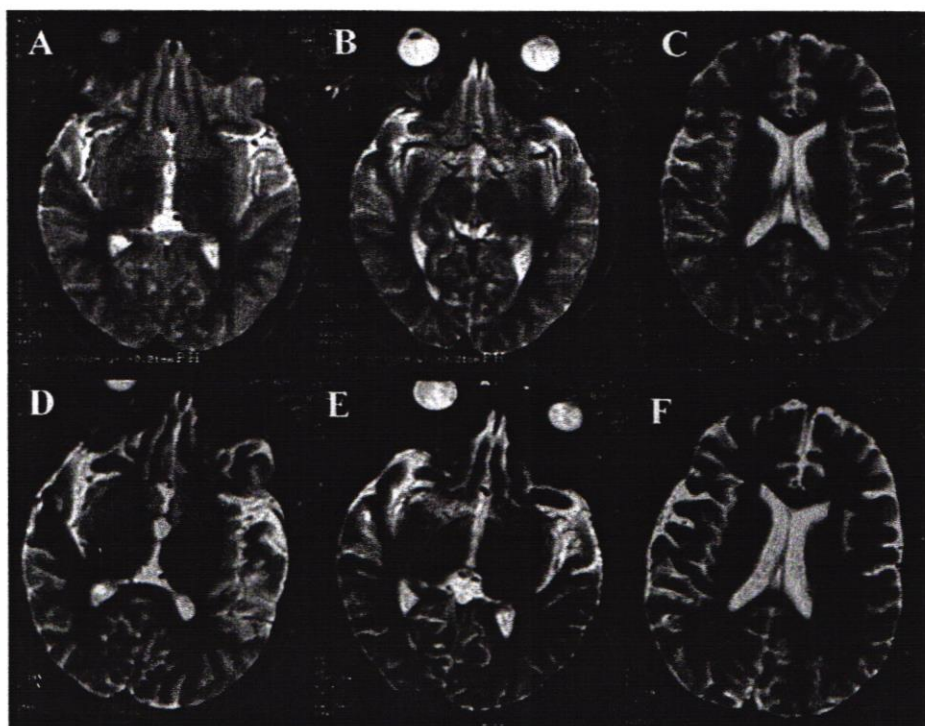


Fig. 2. Axial T2-weighted sequences of serial MRIs of patient 8 at 14 years (A–C) and 18 years (D–F) showing enlarged ventricles and minimal temporal atrophy at 14 years; cortical atrophy is more important and also affects frontal lobes at the age of 18.

Therefore, further research is required to confirm these findings, using modern magnetic systems which allow tridimensional volumetric quantification of brain and ventricles.

No structural brain abnormalities were observed in this series in which an MRI scanner with 0.5 and 1.5 T capacity was used. However, we cannot exclude that images with greater resolution obtained using more powerful machines could detect the presence of subtle migration defects or malformation. In fact, one patient with late onset of weakness had partial seizures during childhood, but the relationship of this finding to the disease could not be proved. Diffusion-weighted imaging (DWI) and proton magnetic resonance spectroscopy (MRS) are other new available techniques which could be used to complete 'classical' MR studies.

Although less frequent than supratentorial atrophy, the most striking feature of the study was posterior fossa malformation, which was found in three of the patients, always in association with severe or moderate mental retardation. It consisted mainly in pontocerebellar hypoplasia which most markedly involved the inferior lobe of the vermis. In addition, hemispheric cerebellar cysts were variably observed. Hypoplasia and cerebellar cysts were more prominent in the two patients with severe mental retardation, who shared the same homozygous A455D mutation. The third patient with abnormal posterior fossa had similar although less marked MRI findings and his cognitive and muscular performances reached also a better level. These changes

were seen very early in life and did not change in the only patient undergoing serial MRI examinations, suggesting that they more likely relate to hypoplasia (congenital, static) rather than atrophy. This same malformation of the posterior fossa has been previously reported in several patients from Turkey [21], Tunis and Algeria [22], all of them carrying homozygous FKRP gene mutations and presenting mental retardation. In particular, the A455D mutation is known to be a founder Tunisian mutation associated with a homogeneous severe clinical and neuroradiological phenotype. Since we found the same mutation in a Moroccan patient with identical clinical and neuroradiological picture, our results confirm previous data and, in addition, indicate that the A455D mutation is not exclusive to Tunisian patients and should be searched in any North-African CMD mentally retarded patient, especially in the presence of the typical MRI lesions. In contrast to this founder mutation, which seems to lead systematically to CNS dysfunction and malformation, we observed discordance between a given mutation and the presence of posterior fossa malformation in two other Algerian patients who shared a homozygous R110P change. Although cognitive impairment was similar in both (speech delay and DQ of 60), MRI at 3 years of age revealed vermis cerebellar and pons hypoplasia in one case, but was normal in the other. Two additional patients with similar cognitive profile showed normal MRI or brain atrophy as isolated finding.

Posterior fossa hypoplasia and cerebellar cysts are not exclusive to FKRP mutations, and they have also been reported in CMD patients with other secondary alpha-

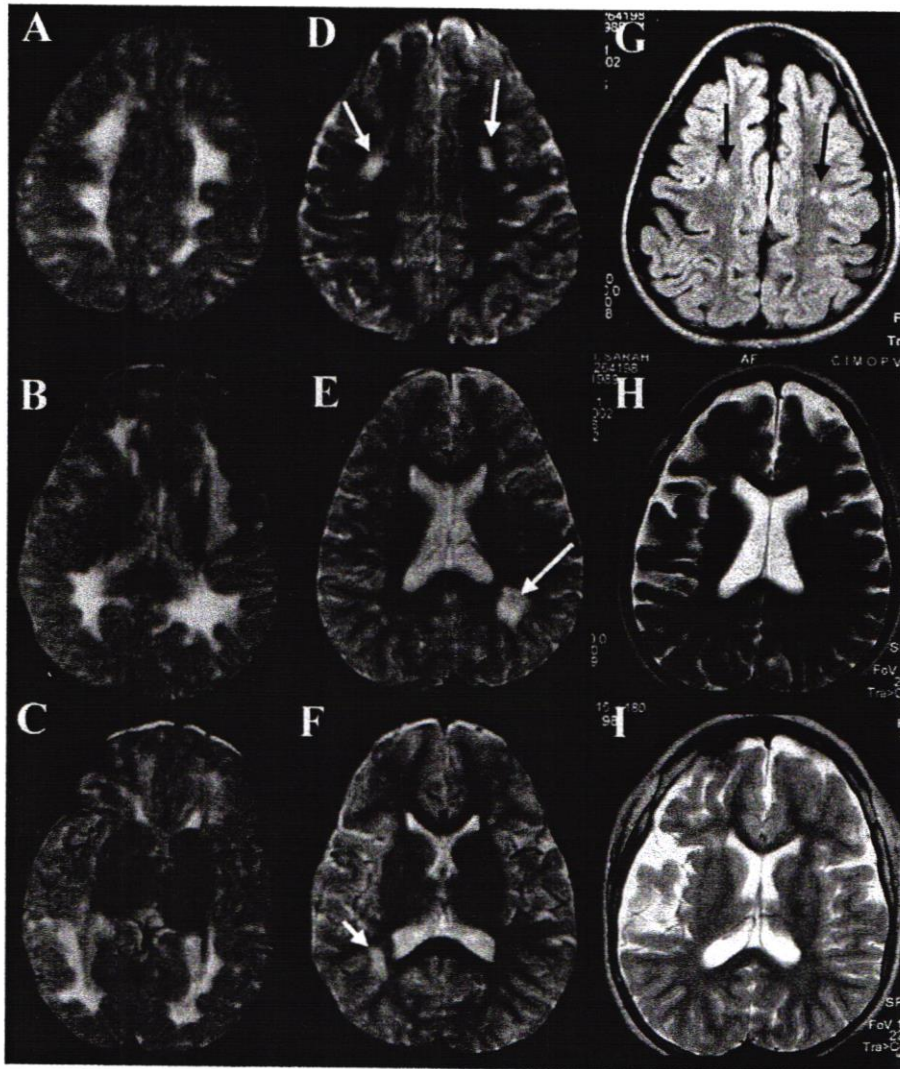


Fig. 3. Serial brain MRI of patient 2 at 11 months (A–C), at 4 years (D–F) and at 12 years of age (G–I). They are all T2-weighted sequences except for one FLAIR-weighted sequence (G). MRI at 11 months showed diffused white matter abnormalities respecting the corpus callosum and the internal capsule, which partially regressed at 4 years, only resting several patchy images in frontal and parietal lobes (white arrows). These lesions almost disappeared at 12 years of age and they were only visible in FLAIR sequences in the frontal lobe (black arrows). It can also be observed progressive brain atrophy with cortical predominance, which is evident when comparing images at 4 and 12 years.

dystroglycanopathies associated with mental retardation. Conversely, two patients with typical neuroradiological and clinical findings of MEB and WWS have been found to carry mutations of the FKR_P gene [23], suggesting that the CNS involvement due to FKR_P mutations is much larger than suspected. The review of previous data suggests a likely role of glycosylation in the CNS development. Our results, in addition, indicate that abnormal expression of FKR_P may have also an impact on intellectual function, even in the absence of neuroradiological evidence of abnormal developmental of the brain, cerebellum or brainstem. Moreover, these results raise the question of the possibility of minor or selective cognitive deficits in the subgroup of patients with 'normal' intellectual performances, as a consequence of a milder degree of abnormal

CNS glycosylation. In fact, several of our results support this hypothesis. Firstly, whenever brain atrophy was observed, it was localised in the same areas and followed a similar progressive course. Secondly, the only case who attended high school had no significant brain atrophy at 22 years, while atrophy was very striking in the others who had only achieved elementary school. Since no psychometric tests were performed in our patients belonging to the 'normal' group, further investigation is required to better address this issue.

In addition to the structural abnormalities, MRI detected early severe white matter changes in the two children with the Tunisian mutation. Localization of the lesion mimicked initially the typical MRI image of primary merosin-deficient CMD (MDC1A), but, in contrast with this type of CMD,

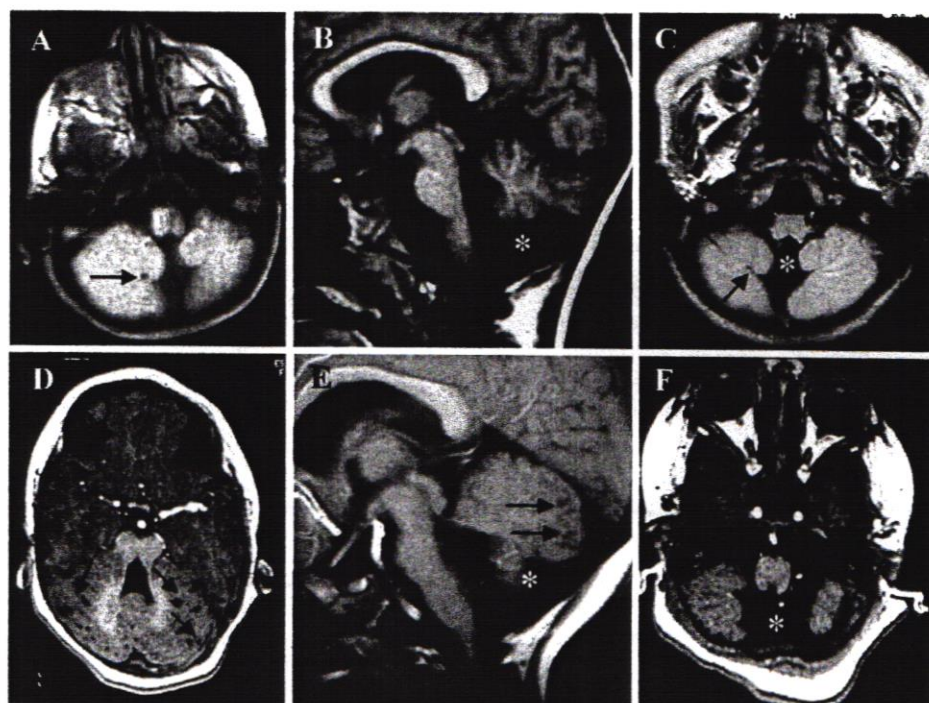


Fig. 4. T1-weighted sequences of brain MRI of patient 2 at 11 months (A), 4 years (B) and 12 years of age (C), and of patient 1 at 13 months of age (D–F), showing the malformation of posterior fossa. This malformation consists in inferior vermis hypoplasia (*) and cerebellar cysts (black arrows). Serial MRI at different ages in patient 1 (A,C) show that this malformation is not progressive with age.

serial examinations revealed progressive regression of the lesions, which were virtually absent in the second decade. Interestingly, transient white matter abnormal signal has also been observed not only in FKRP mentally retarded patients, but also in other alpha-dystroglycanopathies [14, 26, 27], suggesting that abnormal glycosylation may play a role in myelination or in the abnormal development of supratentorial white matter.

Concerning muscular involvement, there was a real continuum in the spectrum of phenotypes, from very severe congenital deficit with very poor motor development, to milder cases with normal motor development and weakness appearing in childhood. To correlate the severity of CNS versus muscular disease, we compared the maximal motor milestones and the age of their acquisition to MRI and cognitive findings. We found that the degree of abnormality in motor acquisitions correlated better with the degree of abnormality of mental function than with the presence of CNS structural abnormalities, although the most retarded patients were also those with the most abnormal MRI findings.

The analysis of all data here discussed indicates that FKRP mutations have a wide neurological, muscular and neuroradiological spectrum, which nonetheless seems to follow a physiopathological pattern: In the most severe extreme, mutations with a very deleterious effect result in phenotypes characterised by the presence of congenital CNS malformation (WWS, MEB or posterior fossa

malformation), in association with a severe static encephalopathy and severe motor deficit, although occasional patients with relatively mild developmental malformations isolated to the posterior fossa may have better cognitive and motor performances (one of our cases had moderate mental retardation and was able to walk with support). Mutations with intermediate severity lead to CMD phenotypes without evident structural malformation, but still presenting moderate or mild intellectual impairment (i.e. speech delay). These patients use to have some motor acquisitions (sitting, moving on their buttocks), but do not walk. Finally, less severely affected patients have no CNS malformation or mental retardation, are able to walk independently, but may develop progressive brain atrophy later in their disease course. Concerning molecular findings, patients carrying homozygous mutations presented a more severe phenotype than those with two different mutational changes. However, we cannot consider homozygosity itself as a unique feature leading to a more severe phenotype because the homozygous L276I change is known to be associated with a late-onset limb girdle phenotype. This milder mutation was identified in three of our four heterozygotic cases. All these three patients were able to walk, confirming that the presence of this particular mutation seems to be related with a milder severity. Finally, our series only involved patients with onset in infancy or early childhood, who otherwise showed a similar end-stage with a very severe paralytic picture. It is

unknown if brain atrophy appears late in the course of the disease in patients with juvenile and adult onset FKRP-related muscular dystrophies.

5. Conclusions

A majority of patients with muscular dystrophy of early onset due to FKRP mutations showed MRI abnormalities, even in the absence of cognitive deficit. Brain atrophy was the most frequent finding, while a subset of mentally retarded patients had congenital non-progressive posterior fossa malformations and transient white matter abnormalities. On the other hand, mental impairment was observed in some patients with normal neuroimaging.

This study broadens the spectrum of CNS involvement in this disease and raises the question of the impact of abnormal glycosylation not only in CNS development, but also in its function. Further studies are required to investigate in greater detail cognitive function in FKRP mutated patients, especially in those without major structural or intellectual impairment. In addition, this study highlights the need for use of newer neuroradiological technologies to perform volumetric quantification of brain and ventricles and to exclude the presence of minor migration defects in this and other muscular dystrophies associated with alpha-dystroglycan abnormalities. DWI and MRS seem promising techniques to complete classical MR studies.

Acknowledgements

We thank the patients and their families for their participation, Dr N. B. Romero, Dr D. Tiberghien, and Dr F. Feillet for their contribution to the study on morpho-immunohistological, psychometric and clinical data, respectively; Mme Céline Ledeuil for her technical assistance in genetic molecular diagnosis, and Dr V. Gonzalez and A. Ferreira and Monique Ryan for their critical review of the manuscript. This work was supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Association Française contre les Myopathies (AFM), and the GIS-Institut des Maladies Rares.

References

- [1] Brockington M, Blake DJ, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, et al. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet* 2001;69(6):1198–209.
- [2] Quijano-Roy S, Galan L, Ferreira A, Cheliout-Héaut F, Gray F, Fardeau M, et al. Severe progressive form of congenital muscular dystrophy with calf pseudohypertrophy, macroglossia and respiratory insufficiency. *Neuromuscul Disord* 2002;12(5):466–75.
- [3] Brockington M, Yuva Y, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, et al. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet* 2001;10(25):2851–9.
- [4] Driss A, Amouri R, Ben Hamida C, Souilem S, Gouider-Khouja N, Ben Hamida M, et al. A new locus for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in a large consanguineous tunisian family maps to chromosome 19q13.3. *Neuromuscul Disord* 2000;10(4–5):240–6.
- [5] Mercuri E, Brockington M, Straub V, Quijano-Roy S, Yuva Y, Herrmann R, et al. Phenotypic spectrum associated with mutations in the fukutin-related protein gene. *Ann Neurol* 2003;53(4):537–42.
- [6] Tomé FM, Evangelista T, Leclerc A, Sunada Y, Manole E, Estourmet B, et al. Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *C R Acad Sci, Paris* 1994;317(4):351–7.
- [7] Vainzof M, Marie SK, Reed UC, Schwartzman JS, Pavanello RC, Passos-Bueno MR, et al. Deficiency of merosin (laminin M or alpha-2) in congenital muscular dystrophy associated with cerebral white matter alterations. *Neuropediatrics* 1995;26(6):293–7.
- [8] Philpot J, Sewry C, Pennock J, Dubowitz V. Clinical phenotype in congenital muscular dystrophy: correlation with expression of merosin in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 1995;5(4):301–5.
- [9] Fardeau M, Tomé FM, Helbling-Leclerc A, Evangelista T, Ottolini A, Chevallay M, et al. Dystrophie musculaire congénitale avec déficience en mérosine: analyse clinique, histopathologique, immunocytochimique et génétique. *Rev Neurol (Paris)* 1996;152(1):11–19.
- [10] Lamer S, Carlier RY, Pinard JM, Mompoint D, Bagard C, Burdairon E, et al. Congenital muscular dystrophy: use of brain MR imaging findings to predict merosin deficiency. *Radiology* 1998;206(3):811–6.
- [11] Moghadaszadeh B, Petit N, Jaillard C, Brockington M, Roy SQ, Merlini L, et al. Mutations in SEPN1 cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat Genet* 2001;29(1):17–18.
- [12] Camacho Vanegas O, Bertini E, Zhang RZ, Petrini S, Minosse C, Sabatelli P, et al. Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98(13):7516–21.
- [13] Demir E, Sabatelli P, Allamand V, Ferreira A, Moghadaszadeh B, Makrelouf M, et al. Mutations in COL6A3 cause severe and mild phenotypes of ullrich congenital muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 2002;70(6):1446–58.
- [14] Longman C, Brockington M, Torelli S, Jimenez-Mallebrera C, Kennedy C, Khalil N, et al. Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum Mol Genet* 2003;12(21):2853–61.
- [15] Jimenez-Mallebrera C, Torelli S, Brown SC, Feng L, Brockington M, Sewry CA, et al. Profound skeletal muscle depletion of alpha-dystroglycan in Walker-Warburg syndrome. *Eur J Paediatr Neurol* 2003;7(3):129–37.
- [16] Hayashi YK, Ogawa M, Tagawa K, Noguchi S, Ishihara T, Nonaka I, et al. Selective deficiency of alpha-dystroglycan in fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Neurology* 2001;57(1):115–21.
- [17] Kano H, Kobayashi K, Herrmann R, Tachikawa M, Many H, Nishino I, et al. Deficiency of alpha-dystroglycan in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291(5):1283–6.
- [18] Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Lida E, Nomura Y, et al. An ancient retrotransposon insertion causes fukuyama type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998;394(6691):388–92.

- [19] Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, et al. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 2001;5:717–24.
- [20] Beltrán-Valero de Bernabé D, Currier S, Steinbrecher A, Celli J, van Beusekom E, van der Zwaag B, et al. Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet* 2002;71(5):1033–43.
- [21] Topaloglu H, Brockington M, Yuva Y, Talim B, Haliloglu G, Blake D, et al. FKRP gene mutations cause congenital muscular dystrophy, mental retardation and cerebellar cysts. *Neurology* 2003;60(6):988–92.
- [22] Louhichi N, Triki C, Quijano-Roy S, Richard P, Makri S, Meziou M, et al. New FKRP mutations causing congenital muscular dystrophy associated with mental retardation and central nervous system abnormalities. Identification of a founder mutation in tunisian families. *Neurogenetics* 2004;5(1):27–34.
- [23] Beltran-Valero de Bernabe D, Voit T, Longman C, Steinbrecher A, Straub V, Yuva Y, et al. Mutations in the FKRP gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* 2004;41(5):61–6.
- [24] Hirashima Y, Shindo K, Endo S. Measurement of the area of the anterior horn of the right lateral ventricle for the diagnosis of brain atrophy by CT. Correlation with several ventricular indices. *Neuroradiology* 1983;25(1):23–7.
- [25] Auque J, Bracard S, Roland J, Sakka M. Effects of intracranial pressure on frontal sinus development. *Bull Assoc Anat (Nancy)* 1987;71(212):31–5.
- [26] Voit T, Cohn RD, Sperner J, Leube B, Sorokin L, Toda T, et al. Merosin-positive congenital muscular dystrophy with transient brain dysmyelination, pontocerebellar hypoplasia and mental retardation. *Neuromuscul Disord* 1999;9(2):95–101.
- [27] Aihara M, Tanabe Y, Kato K. Serial MRI in fukuyama type congenital muscular dystrophy. *Neuroradiology* 1992;34(5):396–8.

CASE REPORT

Radenka KUZMANIĆ ŠAMIJA

KB Split, Klinika za dječje bolesti, Spinčićeve 1, Split

Case report:

Two brothers were born to non-consanguineous parents, without any family history of neuro-muscular condition.

The younger brother, T.K., was born after an uneventful pregnancy and he had respiratory and feeding problems. Now he is 16 years old. Hypotonia and weakness were present since birth, muscle weakness involving facial musculature. His earlier motor milestones had been mildly delayed; head and sitting control were achieved by 4 and 7 months, respectively, and he walked unsupported at 16 months. He had episodes of convulsions and the child is currently under anti-epileptic therapy of carbamazepin.

Physical examination at the age of 13 years disclosed hypotonia and generalized muscle weakness. Tendon reflex were barely obtainable. The child walked unaided, but he was unable to climb stairs or get from the ground. Marked kyphoscoliosis, pectus carinatum, and bilateral flexion contractures of the elbows, knees were present. Also he had tendo-Achilles contracture, so he underwent surgical treatment. He is moderately retarded.

He has malocclusions.

The disease course followed a mildly progressive over the next 4 years. He had numerous respiratory infections with respiratory failure and cardiomyopathy. His forced vital capacity (FVC) was 73% of the predicted values.

Routine laboratory examinations shows a high serum creatine kinase level (1360 UI/l). Ophthalmologic examinations was normal. Muscle biopsy in 7. years disclosed a replacement of muscle by fibroadipose tissue.

We excluded Duchenne muscular dystrophy by PCR analysis.

In addition, the two brothers were found to have inherited different maternal X – chromosome, thus excluding the possibility of an X linkage progressive neuromuscular disorder.

The older brother has a little bit milder course of disease.

His CK level was repeatedly high (4000 UI/l). Ophthalmologic examinations showed astigmatism myopic. He is mildly retarded. He was still able to walk for an unlimited distance on the flat, and was able to run slowly. He rose from the floor with Gowers maneuvers in 4 s. He had mild contractures of the tendo-Achilles and of the long finger flexor.

Electrophysiological studies

EMG revealed myogenic pattern, Motor NCV were mildly delayed in both brothers (I.K. aged 19 years: median nerve 41m/s, peroneal nerve 34 m/s; T.K. aged 13 years: median nerve 46m/s, peroneal nerve 43 m/s;) Sensory nerve conduction velocity was also mildly delayed. (I.K. aged 19 years: ulnar nerve 40m/s, sural nerve 39 m/s; T.K. aged 13 years: ulnar nerve 36m/s, sural nerve 41 m/s;)

Brain magnetic resonance imaging

Brain magnetic resonance imaging (MRI) was performed in both brothers. The MRIs showed a striking increase signal of the white matter on T2-weighted, involving the frontal and occipital lobes. The corpus calosum was thinning. Basal ganglia, internal capsule, brainstem and cerebellum were unaffected. The distribution and location of lesions was similar in these 2 brothers, while the degree of white matter involvement was more severe in the T.K.



Recommendations for genetic counselling related to genetic testing (Draft 2)

1. Introduction:

The main goal of the EuroGentest Network of Excellence is to improve the quality of genetic testing. As patients' understanding of the results and consequences of the test is an integral part of genetic testing, EuroGentest also aims at improving the quality of genetic counselling services associated with genetic testing, across Europe. One of the goals is to establish recommendations for genetic counselling in connection with different testing situations.

2. Method:

To achieve this, the group assigned by EuroGentest for this task (Unit 3 WP 3.1,) has collected and analyzed international and European non-national guidelines and policies related to genetic counselling, as well as some relevant national recommendations and other documents. Also, legislation related to genetic counselling in EU countries has been collected (www.eurogentest.org). Two workshops of experts on genetic counselling have been organized (May 2005, September 2006). In addition, data has been and is collected with the help of surveys. The first draft of the guidelines was distributed to European clinical geneticists and genetic counsellors for comments and the present version was drafted taking these comments into consideration.

3. Background:

3.1. Analysis of European legislation related to genetic counselling

Article 12 of the European Convention on Human Rights and Biomedicine (Council of Europe, 1997) requires appropriate genetic counselling prior to predictive genetic testing (including carrier and susceptibility testing), but it has not yet been ratified by all Member States

(<http://conventions.coe.int/Treaty/Commun/ListeTraites.asp?MA=9&CM=7&CL=ENG>).

Most Member States as well as other European countries do not have specific legal provisions on genetic counselling. Exceptions include Austria, France, Germany, Norway, Portugal and Switzerland.

3.2. Analysis of international recommendations

Analysis of the international guidelines and policies related to genetic counselling identified several issues that were consistently cited as important. The most commonly mentioned were (1) appropriate training for the counsellors, (2) content of the information, (3) counselees understanding of the information, (4) psychological support, (5) problems related to disclosure to the relatives, (6) need for consent, (7) autonomy, (8) confidentiality, and (9) fear of discrimination.

3.3. Analysis of opinions among European Human Genetic Societies

A survey on legislation, guidelines and generally applied practices in genetic counselling performed among the human genetic societies of 38 European countries, in 2005-2006, found that there is no legislation directly related to genetic counselling in the great majority of these countries. There are, however, some professional guidelines related to counselling in some of the countries that do not have that legislation. Only six countries have neither legislation nor guidelines. About half of the respondents considered that more regulation would be needed, but 10 respondents considered the existing national or international guidelines to be sufficient.

4. Definitions:

This paper defines genetic counselling as follows:

Genetic counselling is a communication process that deals with the occurrence, or risk of occurrence, of a (possibly) genetic disorder in the family. The process involves an attempt by appropriately trained person(s) to help the individual or the family to (1) understand the medical facts of the disorder; (2) appreciate how heredity contributes to the disorder and the risk of recurrence in specified relatives; (3) understand the options of dealing with the disorder; (4) use this genetic information in a personally meaningful way that minimizes psychological distress and increases personal control; (5) choose the course of action which seems appropriate to them in the view of their risk and their family goals, and act in accordance with that decision; and (6) make the best possible adjustment to the disorder in an affected family member and/or to the risk of recurrence of that disorder (modified from Frazer FC: Genetic counselling. *Am J Hum Genet* 1974;26:636-661).

The “appropriately trained person” that gives the genetic counselling is usually a genetic health care professional (clinical/medical geneticist, genetic counsellor or genetic nurse). In some situations, he or she can be another professional trained for a specific genetic counselling task, such as an obstetrician in the case of pre-test counselling for risk of aneuploidy due to increased maternal age.

The term genetic test is used mainly for tests performed in genetic testing laboratories (cytogenetics, molecular genetics and biochemical genetics) as part of genetic services, but it realizes that the same need for genetic counselling may exist when analysing other elements that may disclose equivalent genetic information (histological, imaging, family history, etc).

5. Different types of genetic testing situations and need for genetic counselling

The following chapters 5.1.-5.7. briefly present the need for pre- and post-test genetic counselling in different testing situations; however, depending on the context, the disease being tested and the implications for the individual and his or her relatives, there may be different needs. This paper focuses on the average situations, but realizes that there may be exceptions in each category.

5.1. Diagnostic testing means a genetic test performed in a symptomatic individual to diagnose or rule out a genetic condition. This is not, in principle, very different from other medical tests performed in order to achieve a diagnosis, except for its possible implications for relatives. Pre-test genetic counselling may not be necessary. As in case of any medical test, there should be free and informed consent which includes pre-test information, minimally what the test is for and what are its implications for the tested and for the family. If the test result is positive, the patient and the relatives will need genetic counselling.

5.2. Presymptomatic testing means genetic testing in a healthy high-risk family member for a later-onset monogenic disorder, including high risk familial cancers. Even if the family has already been counselled, further pre- and post-test genetic counselling has to be offered, often accompanied by psychosocial evaluation and support.

5.3. Susceptibility testing means a genetic test that gives a mere indication of an increased or decreased risk for a multifactorial condition. It may also mean simultaneous testing of several genetic markers which together give information of the risk (sometimes referred to as risk profiling). Risk profiling for diseases of complex aetiology is only emerging. The validity and utility of these tests needs to be proven. At present, it seems very likely, that they will be prescribed mainly by specialists other than clinical geneticists; and the need for proper genetic counselling by a genetic specialist will depend on the possible implications of the results of the test for the person and his/her near relatives. The same applies to pharmacogenetic testing, which tests for a genetic susceptibility for adverse drug reactions or for the efficacy of a drug treatment with a given genotype.

5.4. Carrier testing means a genetic test that detects a gene mutation that will not have any consequence to the health of that individual; however, if inherited, alone (in case of X-linked inheritance, autosomal dominant premutation or chromosomal translocation) or in combination with another mutation in the same gene from the other parent (in case of autosomal recessive inheritance), it may confer a high risk of disease in the offspring. Pre- and post-test genetic counselling needs to be offered.

5.5. Prenatal testing means a genetic test (often chromosomal) performed during a pregnancy, where there is increased risk for a certain condition in the foetus. Pre- and post-test genetic counselling for the prospective parents needs to be offered.

5.6. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) means testing the presence of a mutation or chromosomal change in one or two cells of an embryo in a family with a previously known risk for a Mendelian or chromosomal disorder in order to select the unaffected embryos to be implanted. Pre- and post-test genetic counselling for the prospective parents has to be offered. This should be differentiated from preimplantation genetic screening (PGS), which aims at improved results of infertility treatment in families with no known genetic risks. In case of PGS, reproductive counselling by assisted reproduction professionals is usually appropriate.

5.7. Genetic screening means testing where the target is not the high risk families, but the general population or a part of it (e.g. newborns, young adults, an ethnic group, etc.). All of the previously mentioned testing types can, in principle, be performed either in families at risk or as screening programs in different parts of the population. In screening programs, pre-test information and post-test information has to be an integral part of the program, though the extent to which it needs to be made and the professionals involved may vary. Those who are found to be in a high-risk group, as a result of screening, should then be offered genetic counselling.

6. General recommendations for genetic counselling

- Genetic counselling cannot be compulsory, no more than any other medical act. It should, however, be offered and strongly recommended in the testing situations mentioned above. If an individual insists on having a test without genetic counselling, the medical facts and possible consequences should be briefly discussed by the clinician ordering the test. According to good clinical practice, presymptomatic tests for future severe illnesses with no options for treatment or prevention should never be performed without pre- and post-test genetic counselling, as well as psychosocial evaluation and follow-up.

- Genetic counselling has to be provided or supervised by a health-care professional appropriately trained for genetic counselling.

- Genetic counselling should be given in the individual's own language. When this is not possible, options like using an interpreter should be offered to the counsellee.

- Before actual testing takes place, there should be free and informed consent. In situations, where testing children, or other persons who are not able to give informed consent, is considered, those individuals should be involved in genetic counselling and in the decision-making process, according to their capacities. Adequate authorisation for genetic testing of children or persons who are not able to give informed consent is required from their parents or legal representatives.

- The resources needed to perform genetic tests and to provide the appropriate pre- and post-test counselling should be developed and put in place simultaneously.

6.1. Pre-test genetic counselling

- a) Pre-test genetic counselling has to inform the individuals what the test is for, include up-to-date, reliable description about symptoms and natural history of the disease, prospects of prevention or treatment, inheritance pattern, the risk of disease in the counsellee's situation, available reproductive choices, reliability and limitations of the test concerned, and possible psychological impact and other consequences of the test result to the counsellee and his/her family/relatives. Privacy and confidentiality of the results, as well as possible consequences related to its disclosure to third parties, such as insurance companies and employers, have to be discussed, when appropriate. The counsellor should not be coercive in any way; this principle should also be explained to the counsellee.
- b) Possible uncertainties due to present lack of knowledge should be declared.
- c) Pre-test counselling should include discussion about the free choice and the right not-to-know as well as issues related to confidentiality.
- d) The discussion about the need to inform relatives about the test result, as well as the best

- ways to do this, should be initiated already in pre-test counselling.
- e) Depending on the resources available, as well as the context and the disease being tested, a consultation with a psychologist and/or the possibility of further genetic counselling sessions should be offered. The possibility to contact a social worker and patient organisations should also be offered, where applicable.
 - f) Written materials and/or reliable Internet addresses related to the subject should be offered when available.
 - g) The counsellor should offer assistance in decision making, and encourage the counsellee to take ample time for it, whenever possible.
 - h) A written summary of the discussion should be prepared, if the counsellee so wishes.

6.2. Post-test genetic counselling

- a) Points a) and b) from pre-test genetic counselling may have to be repeated.
- b) A plan to inform relatives has to be agreed with the counsellee (or, if necessary, a decision to discuss this further, after a time to reflect).
- c) Implications to the individual (including a follow-up plan, when relevant) and his/her near relatives should be discussed.
- d) Depending on the resources available, as well as the context and the disease being tested, a consultation with a psychologist and/or follow-up contacts with the genetic counselling unit should be offered. The possibility to contact a social worker and patient organisations should also be offered.
- f) A written summary of the test result and issues discussed during the counselling should be, as a rule, given to the counsellee. Also, written material to help the counsellee to spread the information in the family may be offered.

6.3. Information/counselling in screening programs

When a genetic test is offered within a genetic screening program to the general population, the situation is very different from that of genetic testing in at-risk families. Most importantly, the individuals in a screening program have not personally requested the test, and they may not know anything about the condition being tested.

For these reasons, it is extremely important to inform the public properly about the condition to be screened for, and the issues related to the screening program, including testing methods and their reliability, the implications of both "positive" and "negative" test results to the individual and his/her near relatives, the need for a confirmatory test, as well as the freedom of choosing to participate. This may be achieved using different methods, including media, leaflets, programs in schools, etc. Individual pre-test genetic counselling is, as a rule, not possible to organize, but should be made available for those who feel a need for it.

Communication with the population or population groups and individuals to whom screening is offered may be performed by health care professionals, other than clinical geneticists/genetic counsellors/genetic nurses, provided that the professionals involved are appropriately trained and educated for the screening programme. This should be performed or supervised by a clinical geneticist, whenever possible.

If the resources do not allow for such comprehensive and well planned pre-screening information, the screening program should not be implemented at all (with rare exceptions

confining unquestioned health benefits to the individuals being screened, e.g. newborn screening for PKU).

Acknowledgements:

We want to thank the Unit 3 Expert Group, especially Heather Skirton, Aad Tibben, Andrew Faucett, Luis Pérez Jurado, Gerry Evers-Kiebooms, Claire Julian-Reyner, Angus Clarke, Kris Dierickx, Michal Witt, Beverly Searle, Ron Zimmern and Shirley Hodgson

EuroGentest Unit 3

Helena Kääriäinen, Marja Hietala, Ulf Kristoffersson, Irma Nippert, Elina Rantanen, Jorge Sequeiros, Joerg Schmidtke Contact: Helena Kääriäinen, E-mail: firstname.surname@ktl.fi

VARIJABILNOST KLINIČKE SLIKE U CISTIČNOJ FIBROZI

¹Dorian Tješić-Dribnković, ¹Duška Tješić-Drinković, ²Nina Canki-Klain

¹Klinika za pedijatriju, Medicinski fakultet u Zagreb, KBC Zagreb, Šalata 4;

²Neurološka klinika, Medicinski fakultet u Zagreb, KBC Zagreb i Hrvatski institut za istraživanje mozga Zagreb

Cistična fibroza (CF) ili mukoviscidoza je najčešća nasljedna smrtonosna bolest bijele rase koja se nasljeđuje autosomalno recesivno. Učestalost bolesti se kreće u bijeloj rasi od 1:2000 - 4000, a računa se da je zastupljenost heterozigota u općoj populaciji 3-4%. Učestalost bolesti je daleko manja u crne i žute rase .

Bolest je uzrokovana mutacijama *CFTR* gena (od engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene*). Danas je poznato više od 1500 registriranih mutacija i polimorfizama koje se povezuju s CF . Mutacija $\Delta F508$ je najčešća mutacija u općoj populaciji bolesnika s CF s učestalošću većom od 66% .

Produkt *CFTR* gena je protein koji djeluje kao prenosilac iona Cl^- kroz membranu epitelnih stanica. Poremećaj tog transporta uzrokuje u bolesnika multisistemsku bolest koja zahvaća prvenstveno različite epitelne organe, posebno egzokrine žlijezde. To je i primjer bolesti u čijem su nazivu sažeto obuhvaćene posljedice histološko patoloških promjena i patofizioloških poremećaja u zahvaćenim organima bolesnika.

Bolest je poznata stoljećima kao bolest djece slanog poljupca i kratkog životnog vijeka ali je tek prije nepunih 70 godina ušla u medicinsku literaturu pod nazivom cistična fibroza .

U prepoznavanju i razumijevanju ekspresije bolesti pomogle su mnoge spoznaje koje su otkrivene zadnjih desetljeća. Unatoč tome što je etiologija CF poznata i dalje postoji izazov u razumijevanju varijabilnosti ishoda bolesti. Razloge za te varijabilnosti danas tražimo u različitoj ekspresiji samog *CFTR* proteina ali i utjecaja drugih čimbenika koji mogu biti važni u određivanju težine i konačnog ishoda CF.

Varijabilnost kliničke ekspresije CF

Godine 1938. gospođa dr. D.H. Anderson je opisala cistično fibrozne promjene pankreasa u dojenčadi koje je izdvojila iz skupine djece koja su umrla zbog malapsorpcijskog sindroma te je na taj način uvela u medicinsku literaturu pojam cistične fibroze.

Od tada do danas dogodile su se mnoge spoznaje koje su utjecale na razumijevanje patogeneze i liječenje same bolesti te koje su dovele do značajnog produljenja životnog vijeka. Prije nepunih 70 godina bolesnici su umirali prije svog prvog rođendana da bi danas mnogi doživjeli 40. i 50. godine s medijanom preživljavanja 36,8 godina.

Unatoč značajnom napretku i dalje je prisutna velika varijabilnost u životnom vijeku između pojedinih bolesnika tako da neki umiru već prije svog 10 rođendana dok drugi dožive i 60 godine života.

Zahvaljujući prehrambenim supstitucijskim intervencijama plućna bolest u CF je postala danas glavni prediktor preživljavanja i smatra se da zbog nje umire više od 90% bolesnika. Međutim, u ekspresiji plućne bolesti među bolesnicima postoje velike različitosti. Mnogi razviju vrlo rano promjene i redukciju plućne funkcije uz pojavu kolonizacije *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aerug.*) te gljivične i infekcije atipičnim mikrobakterijama. Nasuprot tome, neki bolesnici imaju dugo vremena tek oskudnu simptomatologiju dišnog puta uz urednu funkciju ili imaju samo simptome kroničnog rinosinitisa i polipoze nosa. Većina od njih ipak u trećoj dekadi života razvije značajne plućne promjene i komplikacije uz pad plućne funkcije i konačno potrebu za transplantacijom pluća.

Poremećaj funkcije gušterače prisutan je kod većine bolesnika s CF. Većina od njih ima teški manjak funkcije gušterače koji zahtjeva nadoknadu enzimima. Svega mali broj bolesnika (5-10%) ima održanu apsorpciju masti, ugljikohidrata i bjelančevina te ne treba supstituciju enzimima gušterače. Bolesnici s održanom funkcijom gušterače obično imaju blaži tijek bolesti uz blaže promjene na plućima, blaže komplikacije sa strane probavnog puta te manje povišene vrijednosti Cl^{-} u znoju. Ipak, unatoč tome u mnogih od njih se vremenom razvije se insuficijencija gušterače, značajne promjene na plućima te potreba za transplantacijom pluća.

Kako danas većina bolesnika s CF doživi odraslu dob, sve je češća pojava poremećaja i endokrine funkcije gušterače. Mnoga djeca iza puberteta ima intoleranciju glukoze, a iza 35 godine života oko 30% bolesnika razvija dijabetes u sklopu CF (CFRD, prema eng. *cystic fibrosis related diabetes*). Pojava CFRD se smatra lošim prediktivnim znakom, jer je praćena progresijom promjena na plućima i smanjenom plućnom funkcijom uz skraćenje životnog vijeka bolesnika.

Druge promjene vezane uz probavni trakt uključuju jetrenu bolest i crijevnu opstrukciju. Kod mnogih bolesnika prilikom obdukcije nađeni su znakovi jetrene bolesti različitog stupnja ali svega je mali postotak bolesnika koji razvija tešku jetrenu bolest s manifestacijom ciroze, portalne hipertenzije i varikoziteta jednjaka. Navedene promjene odgovorne su za uzrok smrti kod oko 2% bolesnika.

Intestinalna opstrukcija u neonatalnom periodu, mekonijski ileus, pojava je koja se javlja kod oko 15% bolesnika s CF. Ona se obično rješava kirurškim putem ili rjeđe primjenom klizma

gastrografina. Slične smetnje, tzv. distalni intestinalni opstruktivni sindrom (tzv. DIOS), zapažene su tijekom života u 7-40% starije djece i odraslih. Bolesnici koji su imali mekonijijski ileus imaju i češću manifestaciju DIOS-a što može ukazivati na zajedničku etiologiju smetnji.

Povećana vrijednosti Cl^- u znoju desetljećima predstavlja jedan od ključnih dijagnostičkih testova za CF. U većine bolesnika s CF vrijednosti Cl^- u znoju su više od 60 mmol/L, s prosjekom oko 105 mmol/L. Neke zdrave odrasle osobe mogu imati vrijednosti Cl^- između 40-60 mmol/L, tj. u rasponu vrijednosti koje u dječjoj dobi mogu upućivati na blažu, atipičnu ekspresiju bolesti.

Povećani gubitak iona znojem, pogotovo u dojenčadi i male djece, može uzrokovati gubitak soli i hiponatremijsku dehidraciju (tzv. pseudo Bartterov sindrom) te predstavljati i jednu od prvih manifestacija bolesti.

Muški bolesnici s CF su svi ili skoro svi neplodni (98%). Razlog tome je u odsutnosti vas deferens (tzv. *CBAVD prema eng. congenital bilateral absence of the vas deferens*) ili u abnormalnostima u sjemenim vrećicama. Također je često zapažen i poremećaj u motilitetu i morfologiji samih spolnih stanica, iako je moguće njihovom aspiracijom iz spolne žlijezde izvršiti oplodnju.

Doprinos CFTR genotipa kliničkoj ekspresiji bolesti

Nakon kloniranja CFTR gena i prepoznavanja njegovog genskog produkta kao Cl^- kanala ovisnog o c-AMP-u (16), shvatilo se da su mu funkcije mnogo šire te da ima značajnu ulogu u interakciji i kontroli drugih ionskih kanala, primjerice drugih Cl^- kanala te posebno epitelnog Na^+ kanala osjetljivog na amilorid (ENaC).

CFTR ima centralno mjesto u regulaciji transporta vode i soli kroz epitel. Ako je nedjelotvoran dolazi do dehidracije sekreta u izvodnim kanalima što uzrokuje njihovu opstrukciju (pankreas, žučnih putova, bronha i vas deferens) te posljedično i poremećenu funkciju zahvaćenog organa (egzokrina pankreasna insuficijencija, ciroza, bronhiektazije, muška neplodnost).

Po izvještaju *CF Genetic Analysis Consortium* danas je poznato preko 1500 mutacija CFTR gena (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). Unatoč takvoj raznovrsnosti mutacija ΔF508 (delecija fenilalanin na poziciji 508 sekvencijskog slijeda amino kiselina) zastupljena je oko 70% u populaciji bolesnika s CF. Mutacija je dominantna u bijeloj populaciji s različitom učestalošću (20-90%) koja raste od mediteranskog bazena prema sjevernim zemljama Europe. Dodatnih 5-20 mutacija zastupljeno je u idućih 10-20% CF bolesnika, dok su druge mutacije zastupljene rijetko i različito ovisno o specifičnostima pojedinih populacija. Visoka učestalost ΔF508 mutacije razlogom je što više od polovice CF bolesnika ima isti CFTR genotip, tj $\Delta\text{F08}/\Delta\text{F508}$.

Na molekularnom nivou razlikujemo pet klasa mutacija CFTR proteina ovisno o stupnju sinteze i funkcije samog proteina. Prve tri klase mutacija (poremećaj u translaciji, procesuiranju i regulaciji proteina) povezane su s teškom kliničkom ekspresijom bolesti uz izraženu insuficijenciju gušterače, jetrenu bolest, dijabetes, više vrijednosti Cl^- u znoju i jače izražene promjene na plućima, te ih nazivamo težim mutacijama. Četvrtu i petu klasu mutacija karakterizira manjkava funkcija Cl^- kanala, odnosno smanjena sinteza funkcionalnog CFTR proteina uz blažu kliničku ekspresiju bolesti te ih smatramo blagim mutacijama.

Treba istaknuti da je ekspresija kliničke slike u bolesnika s kombinacijom blage i teže mutacije izražena po blažoj mutaciji. Zapaženo je da postoje određene varijabilnosti i unutar iste klase mutacija (npr. u težini plućne bolesti) ali bez prepoznatog pridruženog molekularnog mehanizma koji bi bio odgovoran za takve razlike.

Treba istaknuti odnos CFTR genotipa i pridružene kliničke ekspresije po organskim sistemima. Općenito, nivo Cl^- u znoju, egzokrina funkcija pankreasa i reproduktivna sposobnost muškaraca dobro koreliraju s CFTR genotipom. Tako bolesnici s dvije teške mutacije imaju insuficijenciju gušterače, više vrijednosti Cl^- u znoju, a muški su neplodni. Rjeđe kliničke ekspresije, kao što su CFRD, jetrena bolest i mekonijijski ileus češće su uz teži nego uz blaži CFTR genotip. Nasuprot tome, ekspresija bolesti kao izolirani pankreatitis vezana je obično barem za jednu blažu mutaciju. Bolesnici koji nose blažu mutaciju obično imaju lakšu plućnu bolest i rjeđu kolonizaciju s *P. aerug.* nego bolesnici koji imaju teže mutacije. Ipak, postoje velike individualne varijabilnosti plućne bolesti u svim genotipskim skupinama tako da težina i progresija plućne bolesti samo djelomično korelira s CFTR genotipom.

Također CFTR genotip djelomično kolerira s vrijednošću Cl^- u znoju i općenito se preklapa s funkcijom gušterače. Tako bolesnici s blagim mutacijama i sa djelomično održanom funkcijom gušterače imaju manja odstupanja od normale u vrijednostima Cl^- u znoju.

Abnormalnost reproduktivnog sistema kod muškarca značajno je povezana s CFTR genotipom. Iako je, u pravilu infertilitet muškarca izražen uz daleko manji gubitak aktivnog CFTR-a u odnosu na potrebni manjak aktivnosti CFTR-a za ekspresiju bolesti na drugim organskim sistemima (npr. gušterače i pluća) mutacija *3849+10kbC-T* je primjer mutacije kod koje je održan fertilitet muškarca ali su prisutne i značajne promjene na plućima karakteristične za CF.

Doprinos modificirajućih gena kliničkoj ekspresiji CF

Iako postoje opažanja o povezanosti pojedine CF mutacije i plućne bolesti, primjerice kod mutacije *R117H* koja ima uredan plućni nalaz uz prisutnost CBVD ili kod mutacije *A455E* gdje postoji izražena blaga plućna bolest uz održanu funkciju gušterače, načelno se može kazati da većina CFTR genotipa nije prediktivna za stanje plućne funkcije. Drugim riječima, uz isti CFTR genotip može se zapaziti velika varijabilnost u plućnoj funkciji i težini promjena na plućima. Navedena opažanja ukazuju da osim CFTR genotipa postoji još čimbenika koji mogu utjecati na ekspresiju i varijabilnost plućne bolesti. Isto vrijedi i za uhranjenost bolesnika.

U ispitivanju uloge genetskih čimbenika na varijabilnost ekspresije bolesti koriste se obično studije u obiteljima s više djece s CF. U takvim studijama može se procijeniti uloga nekih genetskih čimbenika na učestalost komplikacija koje su češće u braće nego u nesrodnih bolesnika. Primjerice, u obitelji u kojoj postoji dijete s CF koje je imalo mekonijijski ileus vjerojatnost za pojavu mekonijjskog ileusa kod idućeg djeteta s CF je povećana i iznosi 25% u odnosu na 15% vjerojatnosti u općoj populaciji bolesnika. Sličan paralelizam u pojavi češćih komplikacija može se zapaziti kod braće s CF za funkciju gušterače, jetrenu bolest i infekciju s *P. aerug.* Utjecaj nasljednih čimbenika, bolje dolazi do izražaja u studijama kod jednojajčanih (100% zajedničkog genskog nasljeđa) i dvojajčanih (50% zajedničkog genskog nasljeđa) blizanaca. Ipak, treba istaknuti i činjenicu da braća dijele i okolišne uvjete tako da češća

pojavnost nekih komplikacija nije nužno uvijek i genetski uvjetovana. Može se kazati da je kod jednojajčanih blizanaca utjecaj izvanjskih čimbenika podjednako izražen prije i nakon rođenja. Kod dvojajčanih blizanaca utjecaj izvanjskih čimbenika je isti do rođenja nakon čega njihovi utjecaji djeluju različito. U neblizanačke braće izvanjski utjecaji se razlikuju prije i nakon rođenja.

Drugi pristup u prepoznavanju potencijalnih modificirajućih gena je prepoznavanje važnih zbivanja u patofiziologiji CF koja mogu utjecati na tijek bolesti i koja su pod genskom kontrolom. Većina takvih zapažanja odnosi se na moguće utjecaje na tijek plućne bolesti kao glavnog prediktora preživljavanja ali i na crijevne komplikacije te razvoj jetrene bolesti. Takva su istraživanja usmjerena prema genima koji reguliraju druge ionske kanale, one gene koji imaju ulogu u obrambenim procesima u organizmu, zatim procesima upale, sekrecije sluzi, obnove epitela te reaktivnosti dišnog puta.

Zahvaljujući spoznajama i istraživanjima vezanim uz neklasične oblike CF danas se kao potencijalni modificirajući geni spominju geni za α -1-antiproteaze, angiotenzin konvertirajući enzim, β -2 adrenergički receptor, glutamin-S transferazu, interleukin-10, MBL 2 (prema eng. *mannosa binding lectin 2*), NO-sintetazu 1 i 3, TGF- β (prema eng. *tissue growth factor*), TMF- α (prema eng. *tumor necrosis factor*) i HLA (prema eng. *human leucocyte antigen*).

Postoji više studija s relativno manjim brojem ispitanika, a rezultati su za pojedine ispitivane gene suprotni ili bez utjecaja na praćene parametre što može biti posljedica teškoća u formiranju adekvatnog i usklađenog uzorka ispitanika kao i razlika u životnoj dobi bolesnika. U studiji M.L. Drumm-a i suradnika iz 2005. god., u kojoj je obuhvaćen veliki broj CF bolesnika, analizirani su mogući utjecaji navedenih potencijalnih modificirajućih gena na bolest. Rezultati studije su pokazali jedino značajnu statističku povezanost između polimorfizma TGF- β 1 (kodon 10CC) i teške ekspresije plućne bolesti u CF. Dobiveni rezultat tako podržava i hipotezu o ulozi TGF- β 1 gena u plućnoj bolesti te povezanosti TGF- β 1 i ekspresije astme. Znakovito je opažanje da polimorfizam TGF- β 1 alela djeluje protektivno u kroničnoj opstruktivnoj plućnoj bolesti uzrokovanoj pušenjem. Takvo zapažanje nam pokazuje da utjecaj gena modifikatora nije jednoznačan nego da mogu djelovati protektivno ili štetno ovisno o okolnostima okruženja i međudjelovanju drugih genskih čimbenika.

Utjecaj okolišnih čimbenika na ekspresiju CF

Napredak u dužini životnog vijeka zadnjih desetljeća sigurno je posljedica utjecaja vanjskih čimbenika, a manje rezultat pozitivnog utjecaja pojedini modificirajućih gena.

Multidisciplinarni terapijski pristup bolesnicima, pogotovo u CF centrima, iz temelja je promijenio sudbinu bolesnika omogućavajući tako optimalnu i uniformnu njegu CF bolesnika.

Mnogi čimbenici iz neposrednog životnog okruženja imaju negativan utjecaj na tijek bolesti i stanje bolesnika. Među njima treba istaknuti aktivno pušenje ali i izloženost bolesnika pasivnom pušenju, zatim izloženost alergenima i zagađenom zraku. S druge strane, pokazalo se da adekvatna izbalansirana prehrana može pozitivno utjecati na tijek same bolesti. Različitosti u odgovoru na nutricionalnu podršku također upućuje da i drugi čimbenici okruženja i nasljeđa imaju utjecaj na ekspresiju bolesti.

Izloženost virusnim i bakterijskim infekcijama u ranoj životnoj dobi kao i kolonizacija dišnog puta s *P. aerug.* i *Burkholderia cepacia* također mogu biti posredovani okruženjem i utjecati na životni vijek bolesnika. Preventivnim cijepljenjem i intervencijama u okolišu, npr. kontrolom infekcije u i izvan bolnice, možemo potencijalno spriječiti nove infekcije i komplikacije kao i širenje virulentnih i rezistentnih sojeva bakterija.

Vrlo važnu ulogu ima i socioekonomski status bolesnika i njegove obitelji. Također nikako ne treba zanemariti civilizacijske, kulturološke i religiozne aspekte u društvu koji mogu utjecati na suradnju, provođenje terapije i percepciju bolesti te time značajno odrediti tijek i ishod same bolesti.

Zaključak

Danas više nije moguće razmatrati kliničku sliku CF kao isključivo monogenske bolesti, a da se ne uzme u obzir osim doprinosa same mutacije CFTR gena i mogućnost utjecaja modificirajućih gena i okruženja u kojem živi bolesnik.

Prepoznavanje među tim utjecajima one ključne čimbenike potencijalno pruža bolje razumijevanje same ekspresije bolesti i podlogu za moguće terapijske intervencije, odnosno utjecaj na sam tijek bolesti te time i na životni vijek bolesnika.

Genetsko savjetovanje u cističnoj fibrozi (CF)

Na osnovi iznijetih podataka možemo zaključiti da je CF jedna od najcesćih bolesti u Europljana ili njihovih potomaka u drugim sredinama. Ako znamo da je bolesnik s CF **homozigot** (dvije iste mutacije) ili **složeni heterozigot** (dvije različite mutacije) za mutirani CFTR gen onda možemo očekivati da u prije spomenutim populacijama učešćalost zdravih heterozigota (nositelja neke od mutacija CFTR gena) iznosi između 1/23-1/45. Radi se o autosomnoj recesivnoj bolesti što znači da se javlja jednako često u oba spola, ne ovisi o dobi majke, broja poroda ili godišnjeg doba rođenja. Bolest prenose roditelji od kojih svaki ima jedan mutirani CFTR gen (nositelj/nositeljica ili heterozigot za CF). Potrebno je napomenuti da usprkos velikog napretka molekularne biologije zasad ne postoji jednostavna pretraga za otkrivanje heterozigota za CF, iako na osnovi učešćalosti bolesti u nekoj populaciji, možemo zaključiti kakva je njihova učešćalost. Ako pretpostavimo da je učešćalost bolesti u Hrvatskoj 1:5000 zivorodjene djece, možemo očekivati da je 1 od 37 ljudi u nasoj populaciji nositelj mutiranog gena. U slučaju da su oba roditelja heterozigota za CF mutaciju postoji 25% rizik da se rodi bolesno dijete (Sl.1). Teoretski je moguće da zdravi heterozigot za CF sa zdravim homozigotom (t.j. osobom koja nema mutaciju u CFTR genu) dobije bolesno dijete uslijed **de novo** nastale mutacije ili **uniparentne izodisomije**. Budući da su de novo mutacije za CFTR gen kao i uniparentna izodisomija za kromosom 7 izvanredno rijetki, vjerojatnost da su oba roditelja djeteta zdravi heterozigoti iznosi najmanje 99,9% (13). Zbog toga je rizik za roditelje s jednim bolesnim djetetom 25% u svakoj trudnoći (Sl.1). Potrebno je naglasiti da se rizik ne mijenja s brojem bolesne djece. Isto je tako potrebno upozoriti da je rizik za rođenje bolesnog djeteta povećan ukoliko budući roditelji imaju brata ili sestru s CF (Sl.2) ili su u oba roditelja braca molekularno dokazani heterozigoti za jednu od CFTR mutacija (Sl. 3). U navedenim

slučajevima rizik za pojavu ili ponavljanje bolesti ne ovisi o učestalosti gena u općoj populaciji, već o vjerojatnosti da su budući roditelji nositelji patološke mutacije CFTR gena. Rizik možemo izračunati prema priloženim shemama (Sl.1-3) (14).

U obiteljima u kojima postoji samo jedno bolesno dijete, izuzevši situaciju (Sl.1) , rizik za ponavljanje bolesti ovisi o učestalosti patoloških mutacija u CFTR genu u određenoj populaciji (Sl.4-7).

Ukoliko poznamo incidenciju bolesti (q^2), učestalost heterozigota ($2pq$) možemo izračunati iz Hardy-Weinbergove jednadžbe: $p+q=1$ (p =učestalost divljeg tipa alela; q =učestalost mutiranog alela).

Ako je incidencija CF (q^2)=1: 3000 novorodjencadi, učestalost gena za CF (CFTR gena)= $\sqrt{q^2}=1/55$ ili 0.018. Učestalost zdravog alela $p=1-1/55=54/55$ ili 0.98. Učestalost heterozigota ili nositelja/nositeljicu patološkog alela za CF ($2pq$) iznosi $2 \cdot (54/55 \times 1/55) = 2 \cdot (54/3025) = 108/3025 = 1/28$ ili 0.036

Napredak molekularne genetike danas omogućava u velikom broju prepoznavanje nositelja patoloških alela u obiteljima bolesnika. Otkrice CFTR gena odnosno njihovih različitih mutacija otvara nove mogućnosti molekularne dijagnostike bolesti, ukazuje na patofiziološki mehanizam i pruža nadu za djelotvorno liječenje. Kako se danas produžava život bolesnika, možemo očekivati da će i oni željeti imati potomstvo (Sl.4), što im treba omogućiti uz adekvatno genetsko savjetovanje i mogućnost testiranja partnera na najčešće mutacije u populaciji iz koje on potječe.

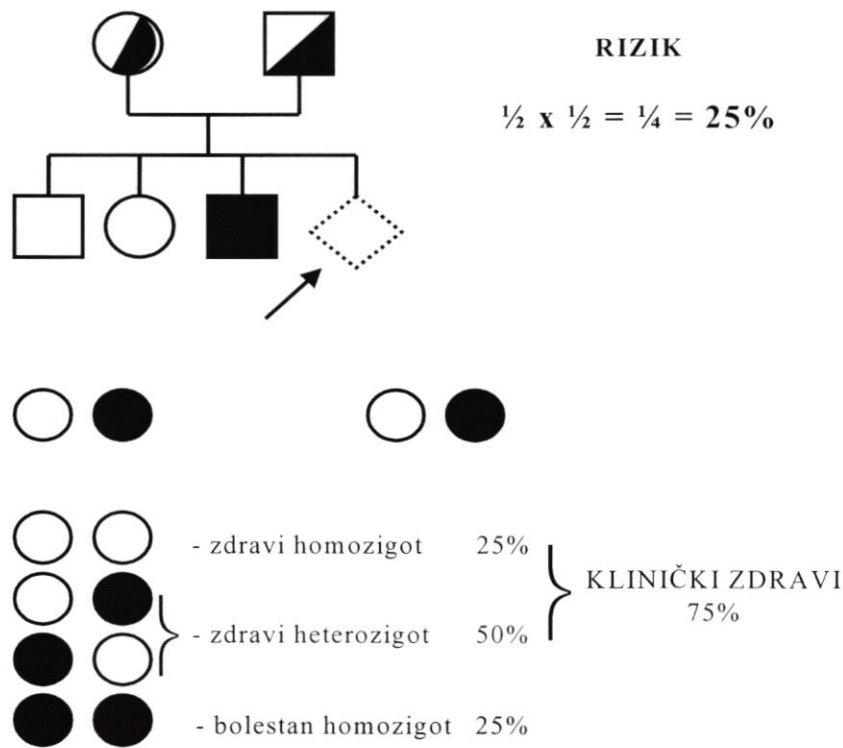
Genetsko savjetovanje obuhvaća genetsku prognozu i psihološko razumijevanje postojećeg problema. Ono mora biti individualizirano što znači da trebamo voditi računa o težini bolesti, dobi roditelja, mogućoj trudnoći i njenom trajanju, broju već rođene zdrave, bolesne ili umrle djece. Osim toga, moramo voditi računa o psihološkoj uravnoteženosti partnera, njihovom intelektualnom, socijalnom i posebno religioznom stajalištu. Nadalje, genetsko savjetovanje mora biti jasno i nedirektivno.

Savjetovanje partnerima koji imaju povećani rizik za rođenje djeteta s CF moralo bi biti prije zanosjenja i trebalo bi sadržavati slijedeće elemente:

1. Teoretsku procjenu rizika obzirom na obiteljsku situaciju (Sl. 1-7).
2. Varijabilnost kliničke slike. Potrebno je podsjetiti da postoji 50% vjerojatnost za ponovno javljanje mekonijskog ileusa u bolesnika, ako je to imalo prethodno dijete, inače je rizik 10% (15).
3. Teška priroda bolesti
4. Suvremene mogućnosti i teskoće pri liječenju; bolja prognoza za preživljavanje
5. Mogućnosti izbora:
 - Usvajanje djeteta
 - Umjetna oplodnja sjemenom davatelja. Potrebno napomenuti korisnost DNA analize na najčešće CFTR mutacije davatelja sjemena (16).
 - Prenatalna dijagnostika (PND) uz pomoć DNA analize na uzorku korionskih resica (8-12 tjedan) ili na uzorku amniocita (16 tjedan). U nekim zemljama

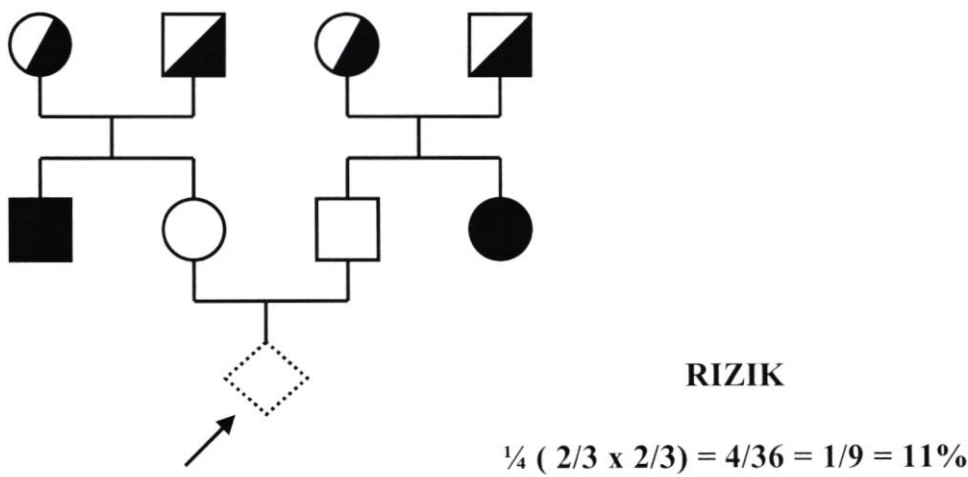
(Velika Britanija) postoji mogućnost preimplantacijske dijagnostike nakon in vitro oplodnje.

RODITELJI IMAJU JEDNO ILI VIŠE OBOLJELE DJECE S CF



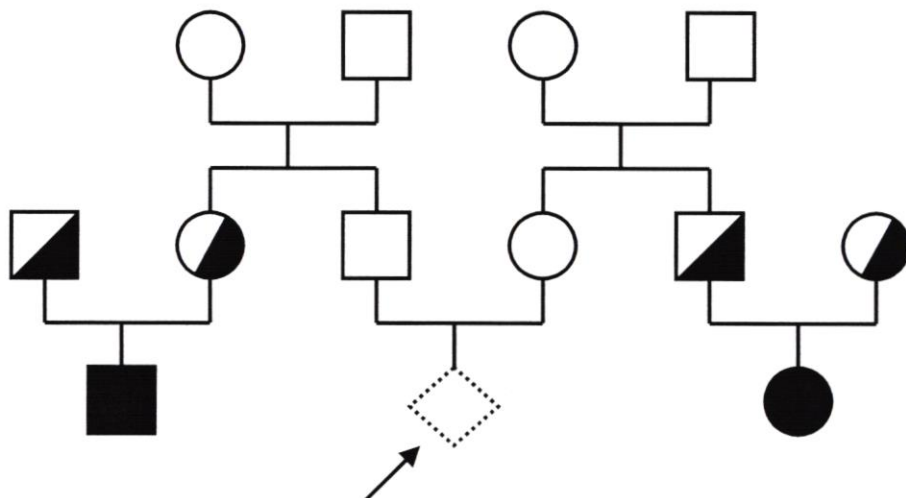
Slika 1.

OBA RODITELJA IMAJU BRATA ILI SESTRU S CF



Slika 2.

OBA RODITELJA IMAJU BRATA ILI SESTRU HETEROZIGOTA ZA CF

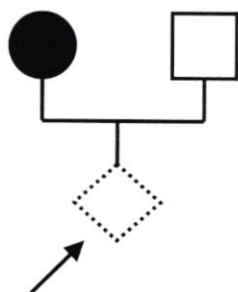


RIZIK $\frac{1}{4} \left(\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \right) = \frac{1}{16} = 6\%$

Slika 3.

RIZIK ZA POJAVU CF AKO JE UČESTALOST PATOLOŠKIH MUTACIJA ZA CF
1/55 ili 0.018

A. BOLESTAN JEDAN OD RODITELJA



RIZIK $\frac{1}{2} \left(1 \times \frac{1}{28} \right) = \frac{1}{56} = 1,7 \%$

Slika 4.

**RIZIK ZA POJAVU CF AKO JE UČESTALOST PATOLOŠKIH MUTACIJA ZA CF
1/55 ili 0.018**

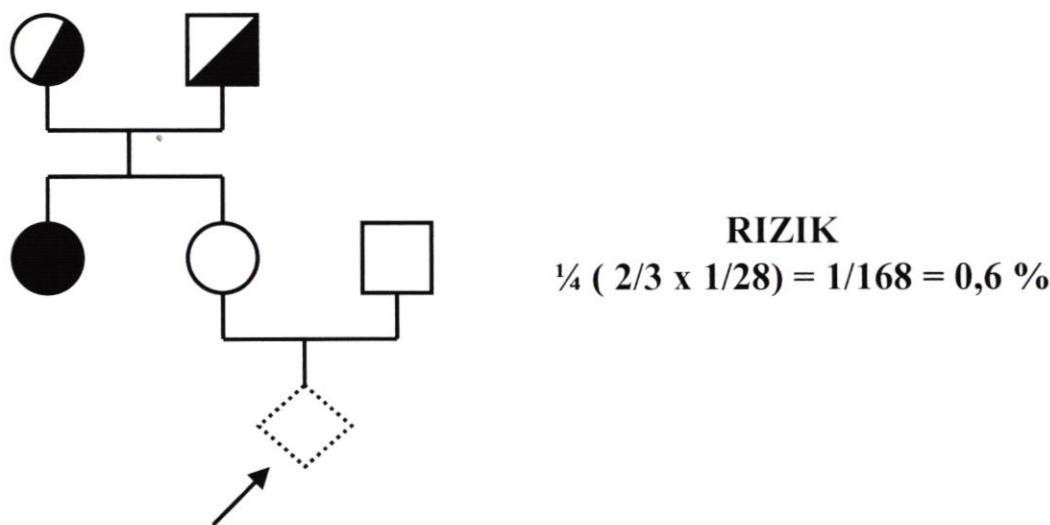
B. JEDAN OD BUDUĆIH RODITELJA IMA DIJETE S CF IZ PRIJAŠNJEG BRAKA



Slika 5.

**RIZIK ZA POJAVU CF AKO JE UČESTALOST PATOLOŠKIH MUTACIJA ZA CF
1/55 ili 0.018**

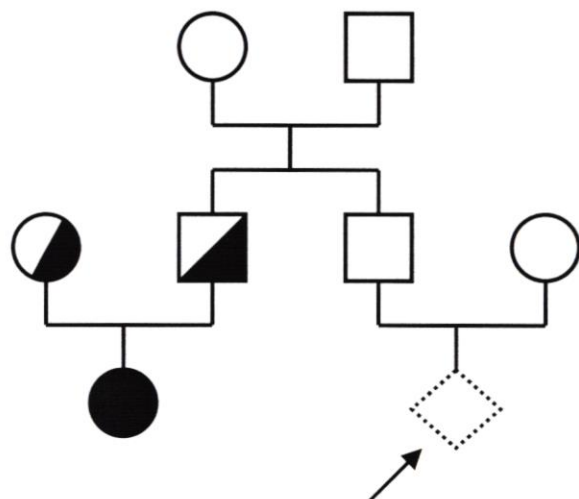
C. JEDAN OD BUDUĆIH RODITELJA IMA BRATA ILI SESTRU S CF



Slika 6.

**RIZIK ZA POJAVU CF AKO JE UČESTALOST PATOLOŠKIH MUTACIJA ZA CF
1/55 ili 0.018**

D. JEDAN OD BUDUĆIH RODITELJA IMA BRATA ILI SESTRU HETEROZIGOTA ZA CF



RIZIK
 $\frac{1}{4} \left(\frac{1}{2} \times \frac{1}{28} \right) = \frac{1}{224} = 0,4 \%$

Slika 7.

Literatura:

1. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1996;154:1229-56.
2. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. Lancet 2003;361:681-89.
3. Mehta A. CFTR: More than just a chloride channel. Pediatr Pulmonol 2004;38:4-10
4. Tsui L-C. The spectrum of cystic fibrosis mutations. Trends Genet 1992; 8:392-8.
5. Consortium TCFG-P: Correlation between genotype and phenotype in patient with cystic fibrosis. The Cystic fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. N Engl J Med 1993; 329:1308-13
6. Gan KH, Veeze HJ, van de Oudweland AMW, et al. A cystic fibrosis mutation associated with mild lung disease. N Engl J Med 1995; 333:95-9.
7. Zielinski J. Genotype-Phenotype in Cystic Fibrosis. Respiration 2000; 67:117-133.
8. Mekus F, Ballmann M, Bronseveld I, et al. Categories of deltaF508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics. Twin Res 2000;3:277-93.
9. Cutting GR. CF modifiers: Comparing variations between siblings. Pediatr pulmonol 2004;27(suppl):140.
10. Davies JC, Griesenbach U, Alton E: Modifier Genes in Cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 2005;39:383-91.
11. Knowles M. Gene modifiers of lung disease. Curr Opin Pulm Med 2006;12:416-21.

12. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter M, et al. Genetic Modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 353:1443-53.
13. Read AP. Principles of DNA –based prenatal diagnosis of cystic fibrosis: an introduction of the clinician. *JR SocMed* 1987; 80(Suppl 15): 9-12.
14. Brock DJH. Fetal diagnosis of cystic fibrosis. *Baillier's Clinical Obstetrics and Gynecology* 1987; 1: 677-96.
15. Super M. Genetic counseling and antenatal diagnosis of cystic fibrosis. *JR Soc Med* 1987; 80 (Suppl 15): 13-5.
16. Ten Kate LP, Meerman GJ, Buys CH. Effectiveness of prevention of cystic fibrosis by artificial insemination by donor can be markedly improved by DNA-analysis of sperm donors. *Am J Med Genet* 1989; 32: 148-9.