

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21. maja 2018. godine, odlukom broj 5940/16-BP imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**“ZNAČAJ KARIOTIPIZACIJE FETUSA SA IZOLOVANOM ANOMALIJOM
OTKRIVENOM ULTRAZVUČNIM PREGLEDOM”**

kandidata **dr Bojane Petrović**, kliničkog genetičara u Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Mentor ove teze je Prof. dr Olivera Kontić-Vučinić, a komentor Prof. dr Ivana Novaković.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. **Prof. dr Jelena Stamenković**, vanredni profesor na katedri ginekologije i akušerstva, Klinika za ginekologiju i akušerstvo, Klinički centar Srbije, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. **Prof. dr Momčilo Ristanović**, vanredni profesor na katedri humane genetike, Institut za humanu genetiku, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. **Prof. dr Nenad Šulović**, redovni profesor na katedri ginekologije i akušerstva, Univerzitet u Prištini, Medicinski fakultet u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, Komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Bojane Petrović je napisana na 117 strana i podeljena na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi i hipoteze, materijal i metode rada, rezultati, diskusija, zaključak i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 13 slika, 20 tabela i 10 grafikona. Doktorska disertacija sadrži podatke o komisiji, sažetak na srpskom i engleskom jeziku i biografiju kandidata.

Uvod disertacije je podeljen na nekoliko delova. Najpre su definisane kongenitalne anomalije i njihova podela, zatim etiološki faktori, prevashodno genetička osnova, kao i mogućnosti prenatalne dijagnostike. U narednom delu, posebna je pažnja posvećena opisu hromozoma, mehanizmima nastanka i tipovima hromozomskih aberacija. Takođe, opisane su i hromozomopatije, bolesti koje nastaju kao posledica hromozomskih aberacija, sa detaljnim opisom najčešćih hromozomopatija. Zatim su opisane savremene mogućnosti skrininga hromozomskih aberacija fetusa. Posebna pažnja posvećena je ultrazvučnom skriningu i ultrazvučnim markerima hromozomskih aberacija fetusa kroz sva tri trimestra trudnoće. Nadalje u uvodu su opisane metode za dijagnostikovanje hromozomskih aberacija fetusa. Najpre su pažljivo opisane invazivne metode za uzimanje uzoraka u prenatalnoj dijagnostici, indikacije, vreme i način uzorkovanja, kao i rizici od mogućih komplikacija. Detaljno su opisane mogućnosti vizuelizacije i analize hromozoma sa posebnim osvrtom na tehniku kariotipizacije i bojenja hromozoma G-tehnikom traka. Na kraju uvodnog dela opisane su savremene mogućnosti dijagnostike hromozomskih aberacija visokih rezolucija korišćenjem komparativne genomske hibridizacije sa upotrebom mikromreža, tj. molekularne kariotipizacije ili tehnike hromozomskih mikronizova (engl. array-based comparative genomic hybridization – aCGH ili chromosomal microarray analysis - CMA).

Ciljevi studije su jasno definisani:

1. Analiza učestalosti hromozomskih aberacija fetusa u odnosu na tip izolovanog ultrazvučnog markera (major anomalija ili "soft" marker) i zahvaćenost organskog ili tkivnog sistema.

2. Utvrđivanje i komparacija empirijskog rizika za nalaz hromozomske aberacije i rizika od komplikacija nakon intervencije (invazivnog uzimanja uzorka za kariotipizaciju) u slučajevima detekcije izolovane fetalne anomalije ili izolovanog "soft" markera.

3. Komparacija efikasnosti citogenetičkih metoda (kariotipizacija versus tehnika hromozomskih mikronizova) na primeru pet izolovanih anomalija centralnog nervnog sistema fetusa (umerena ventrikulomegalija).

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da je straživanje, koje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, sprovedeno u dve etape. Prvi deo istraživanja predstavlja studiju preseka, sprovedenu u Klinici za ginekologiju i akušerstvo, Kliničkog centra Srbije, u kojoj su prikupljeni podaci o 3000 ultrazvučnih nalaza fetusa i 500 kliničkih nalaza novorođenčadi, ispitivanih u periodu od 16 godina, od januara 2000. godine do januara 2016. godine, u kabinetu za citogenetiku Klinike za ginekologiju i akušerstvo. Precizno su definisani kriterijumi uključivanja i isključivanja iz studije. Detaljno je prikazana metodologija prikupljanja podataka, kao i elementi statističke obrade dobijenih podataka. Drugi deo istraživanja sproveden je u Institutu za humanu genetiku, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Pet fetusa sa izolovanom umerenom ventrikulomegalijom, kao najčešćom anomalijom centralnog nervnog sistema, i normalnim kariotipom, ispitano je i na molekularno-genetičkom nivou, tehnikom analize hromozomskih mikronizova (chromosomal microarray analysis-CMA).

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati kroz 13 grafikona, 19 tabela i 4 slike.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključak sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Pokazano je da se hromozomske aberacije mogu detektovati kod 6% fetusa sa ultrazvučno otkrivenom izolovanom major anomalijom i 12% fetusa sa ultrazvučno otkrivenim izolovanim "soft" markerom. Izolovane anomalije i izolovani "soft" markeri vrata, srca i koštanog sistema fetusa imaju najveći značaj u predikciji patološkog kariotipa fetusa. Izolovane anomalije i izolovani "soft" markeri urogenitalnog trakta i tumori fetusa ne predstavljaju indikaciju za kariotipizaciju, jer se samo koincidentalno mogu naći udruženi sa hromozomskim aberacijama. Detekcija bilo kakvog fetalnog defekta zahteva brzu, detaljnu ultrazvučnu evaluaciju fetusa u cilju otkrivanja mogućih udruženih anomalija. U svim slučajevima nalaza izolovanog ultrazvučnog markera, bilo major anomalije ili "soft" markera, u proceni potrebe za kariotipizacijom fetusa, potrebna je evaluacija individualnog rizika za hromozomopatije, koja uključuje pozitivni odnos verodostojnosti (LR+) za detektovani marker. U evaluaciji fetusa sa izolovanom anomalijom i normalnim kariotipom, neophodna je dalja genetička dijagnostika, koja bi obuhvatila molekularno-citogenetičke i/ili molekularno genetičke metode. Takođe je pokazano, da u slučajevima umerene fetalne ventrikulomegalije analiza hromozomskih mikronizova nije imala veću informativnost od kariotipizacije, obzirom da su nađene varijante u regionima gena za koje nije utvrđeno da učestvuju u neurogenezi, ali su dobijeni rezultati osnov za dalja istraživanja genetičke osnove ventrikulomegalije.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 238 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U istraživanju dr Bojane Petrović, od 3000 ispitivanih fetusa, kod 1832 (61,5%) kariotip je analiziran zbog pozitivnog ultrazvučnog skrininga. Od 1832 fetusa sa pozitivnim nalazom ultrazvučnog skrininga kod 1493 (81,5%) nađena je izolovana major anomalija ili izolovani "soft" marker, dok je 267 (14,6%) imalo multiple anomalije, a 72 (3,9%) multiple "soft" markere. Zastupljenost hromozomskih aberacija kod fetusa sa izolovanim major anomalijama ili izolovanim "soft" markerima bila je 6,9% (103 slučaja). Sa najvećom učestalošću nađene su numeričke hromozomske aberacije (80,6%), i to aneuploidije, među kojima je najfrekventnija bila trizomija 21 (50,5%). Major anomalije nađene su kod 1016 (82,3%), a "soft" markeri kod 218 (17,7%) fetusa sa izolovanim ultrazvučnim markerom. Patološki kariotip kod fetusa sa major izolovanom anomalijom nađen je u 56 (5,5%) slučajeva. Kod fetusa sa izolovanim "soft" markerima hromozomske aberacije su otkrivene u 12,4% slučajeva.

Major izolovane anomalije centralnog nervnog sistema fetusa nađene su u 85% slučajeva, od čega je 3,2% fetusa imalo hromozomsku aberaciju, u 75% slučajeva numeričku i 25% slučajeva strukturnu. Fetusi sa major izolovanim anomalijama glave, lica i vrata imali su hromozomske aberacije u 24,3% slučajeva i sve su bile numeričke, dok je kod fetusa sa "soft" markerom, zadebljanjem vratnog nabora, patološki kariotip otkriven je u 50% slučajeva. U 53,3% fetusa sa izolovanim zadebljanjem vratnog nabora i hromozomskim aberacijama nađena je trizomija 21. Kod fetusa sa izolovanom major anomalijom kardiovaskularnog sistema hromozomske aberacije nađene su u 10,7% slučajeva, i bile su numeričke u 83,3% slučajeva, a strukturne u 16,7% slučajeva. U ovoj grupi fetusa najučestalije je detektovana trizomija hromozoma 21 (75%). Svi fetusi kod kojih je ultrazvučni pregled srca otkrio izolovani soft marker, hiperehogeni fokus, imali su normalan kariotip. Fetusi sa major izolovanom anomalijom gastrointestinalnog trakta imali su hromozomske aberacije u 4,9% slučajeva, i sve su bile numeričke. Kod fetusa sa izolovanim "soft" markerom gastrointestinalnog trakta hromozomske aberacije su detektovane u 7,5% slučajeva, i u svim slučajevima se radilo o trizomiji 21. U grupi fetusa sa izolovanim ultrazvučnim markerima urogenitalnog trakta hromozomske aberacije nađene su samo kod 1,2% fetusa sa major anomalijom. Samo kod jednog fetusa sa izolovanom major anomalijom na koštano-mišićno-zglobnom sistemu nađen je patološki kariotip, dok je u 10,4% slučajeva fetusa sa izolovanim "soft" markerima koštano-mišićno-zglobnog sistema nađena hromozomska aberacija. U grupi fetusa sa drugim major izolovanim anomalijama (intrauterusni zastoje u rastu, hidrops) hromozomske aberacije su nađene u 6,5% slučajeva. Najučestalije je detektovana prosta trizomija 21. Fetusi sa izolovanim "soft" markerom, jednom umbilikalnom arterijom, imali su patološki kariotip u 25% slučajeva. Fetusi sa izolovanim poremećajima u količini plodove vode imali su patološki kariotip u 6,2% slučajeva. U grupi fetusa sa izolovanim polihidroamniom hromozomske aberacije detektovane su u 9,8% slučajeva, od čega je u 60% slučajeva otkrivena trizomija 21.

Kod fetusa sa ultrazvučno otkrivenim izolovanim anomalijama ili izolovanim "soft" markerima, hromozomske aberacije najčešće su detektovane u slučajevima intrauterusnog zastoja u rastu i poremećajima u količini plodove vode, u po 15,5% slučajeva. Zatim su se po učestalosti hromozomske aberacije javljale kod fetusa sa uvećanjem nuhalne translucence (>NT) u 14,5%, cističnim higromom 8,7% i ventrikularnim septalnim defektom (VSD) u 7,7% slučajeva. Sa manjom frekvencom od 5% nađen je patološki kariotip kod fetusa sa hidropsom, hidrocefalusom i skraćenim femurom, u po 3,9%, jednom umbikalnom arterijom (SUAS) u 2,9%, omfalokelom, hiperehogenim crevima, ventrikulomegalijom i Tetralogijom Fallot u po 1,9% slučajeva. Sa učestalošću od po 1%, hromozomske aberacije nađene su u slučajevima koštane displazije, fokomelije, skraćenih dugih kostiju, spine bifide, agenezije korpusa kalozuma, ciste horoidnog pleksusa, mikrocefalije, kongenitalne cistične adenomatoidne malformacije (CCAM), tumora placente, atrio-ventrikularnog septalnog defekta (AVSD), transpozicije velikih krvnih sudova, atrezije ezofagusa, hepatomegalije, kalcifikata jetre, policističnih bubrega i Poterovog sindroma.

Nađena je statistički značajna razlika u učestalostima hromozomskih aberacija kod fetusa sa izolovanim anomalijama ili izolovanim "soft" markerima, fetusa sa multiplim anomalijama, fetusa sa multiplim "soft" markerima i novorođenčadi sa izolovanim anomalijama ($\chi^2= 80,311$; $p<0,05$). Patološki kariotip je sa najvećom frekvencom detektovan kod fetusa sa multiplim anomalijama, a sa najmanjom frekvencom kod fetusa sa multiplim "soft" markerima. Nađena je i statistički značajna razlika u distribuciji numeričkih i strukturnih hromozomskih aberacija u ovim grupama, gde je najveća zatupljenost numeričkih hromozomskih aberacija bila u grupi fetusa sa multiplim anomalijama, a strukturnih hromozomskih aberacija u grupi fetusa sa multiplim "soft" markerima ($\chi^2= 15,623$; $p<0,05$).

Ultrasonografija za major izolovane fetalne anomalije imala je umerenu senzitivnost, ali nisku specifičnost i PPV, kao i dijagnostičku tačnost od samo 20%, LR+ 0,8, ali visoku NPV i LR- 1,9 u predikciji fetalnih aberacija, dok je za izolovane "soft" markere pokazala nisku senzitivnost i PPV, a visoku specifičnost i NPV, kao i LR+ 1,9, uz dijagnostičku tačnost od 80%. Nalaz izolovane major anomalije nije pokazao značajno povećanje rizika za hromozomske aberacije fetusa, dok se nalaz izolovanog "soft" markera pokazao kao statistički značajan prediktor, koji povećava rizik za hromozomske aberacije fetusa više od dva puta (OR 2,4).

Ultrasonografija izolovanih fetalnih anomalija i izolovanih "soft" markera posmatranih u sklopu organskih sistema pokazala je nisku senzitivnost, ispod 10%, u predikciji hromozomskih aberacija, kao i nisku PPV i nizak LR+, i visoku specifičnost, NPV i dijagnostičku tačnost. Najveći rizik za nalaz patološkog kariotipa imali su fetusi kod kojih su otkrivene izolovane anomalije ili izolovani "soft" markeri glave, lica i vrata (OR 10,1). Rizik za hromozomske aberacije nađen je i kod fetusa sa izolovanim anomalijama

ili izolovanim "soft" markerima kardiovaskularnog (OR 1,5) i koštano-mišićno-zglobnog sistema (OR 1,5). Izolovane anomalije ili izolovani "soft" markeri na ostalim organskim sistemima nisu se pokazale kao značajan prediktor hromozomskih aberacija fetusa.

Ultrasonografija za sve izabrane pojedinačne izolovane fetalne anomalije i izolovane "soft" markere imala je nisku senzitivnost, a visoku specifičnost, NPV i dijagnostičku tačnost u predikciji hromozomskih aberacija. Umerena PPV nađena je kod uvećanja nuhalne translucence, cističnog higroma, ventrikularnog septalnog defekta i tetralogije Fallot. Najveću verovatnoću u predikciji hromozomskih aberacija imali su uvećanje nuhalne translucence (LR+ 14.1), cistični higrom (LR+ 14.1), ventrikularni septalni defekt (LR+ 8.04) i tetralogija Fallot (LR+ 7.04), jedna umbilikalna arterija (LR+ 4.7), skraćen femur (LR+ 2.1) i fetalni hidrops (LR+ 2.01). Najveći rizik za hromozomske aberacije fetusa povezan je sa izolovanim uvećanjem nuhalne translucence (OR 16,4) i cističnim higromom (OR 15,4), zatim ventrikularnim septalnim defektom (OR 8,7), tetralogijom Fallot (OR 7,2) i jednom umbilikalnom arterijom (OR 4,8). Za određene parametre, kao što su dijafragmalna hernija, hiperehogeni fokus u srcu, gastrošize i obostrana hidronefroza nije bilo moguće izračunati OR jer kod fetusa kod kojih su nađene ove izolovane anomalije nisu otkrivene hromozomske aberacije.

Ultrasonografija izolovanih poremećaja u količini plodove vode pokazala je nisku senzitivnost i PPV, a visoku specifičnost, NPV i dijagnostičku tačnost. Samo je izolovani polihidroamnion (LR+ 1,54 i OR 1,6) imao značaja u predikciji fetalnih hromozomskih aberacija.

ArrayCGH (CMA-analiza hromozomskih mikronizova) analiza sprovedena je kod 5 fetusa sa ultrazvučno otkrivenom izolovanom umerenom ventrikulomegalijom, uz uredan nalaz kariotipa. Kod 4 fetusa (80%) utvrđene su varijante (mikrodelecije/mikroduplicacije) koje su upoređene sa podacima u bioinformatičkim bazama podataka NCBI ClinVar (baza kliničkih varijanti), DECIPHER (engl. Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources), OMIM (eng. Online Mendelian Inheritance in Man) i ENSEMBL.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Dosadašnje studije bazirale su se uopšteno na otkrivanje ultrazvučnih markera hromozomskih aberacija, i malo je literaturnih podataka o udelu hromozomskih aberacija u etiologiji izolovanih fetalnih defekata. Međutim, dilema o invazivnoj prenatalnoj dijagnostici nastaje upravo kada se ultrazvučnim pregledom otkrije izolovana fetalna anomalija, imajući u vidu da su invazivne procedure povezane sa rizikom od pobačaja od oko 1% (Cicero i sar., 2003).

U studiji dr Bojane Petrović izolovane major anomalije nađene su kod 82,3% fetusa, a izolovani "soft" markeri kod 17,7% fetusa sa izolovanim ultrazvučnim markerom. Takođe u 17,2% fetusa otkriveni su poremećaji u količini plodove vode kao izolovan nalaz. U istraživanju Liu i sar., stopa identifikacije major strukturnih anomalija fetusa bila je duplo veća u poređenju sa "soft" markerima, 54,4% prema 26,5% (Liu i sar., 2017). Rydberg i Tunon našli su major anomalije u 55% fetusa (Rydberg i Tunon, 2017). Izolovani "soft" markeri kod fetusa nađeni su u 5,1% slučajeva u istraživanju Ahman i saradnika (Ahman i sar., 2014).

Simsek i sar. pronašli su patološki kariotip, pretežno aneuploidije, kod 17,1% fetusa sa ultrazvučno otkrivenom izolovanom anomalijom ili izolovanim "soft" markerom (Simsek i sar., 2013). Zastupljenost hromozomskih aberacija kod fetusa sa izolovanim anomalijama ili izolovanim "soft" markerima, u istraživanju dr Bojane Petrović bila je 6,9%.

Neke studije su pokazale da fetusi sa trizomijom 18 imaju bar jednu major anomaliju u 90% slučajeva, fetusi sa trizomijom 13 u 75%-80% slučajeva, dok fetusi sa trizomijom 21 imaju bar jedan major defekt u 50% slučajeva (Cho i sar., 2009; Sepúlveda i sar., 1999). U istraživanju dr Bojane Petrović patološki kariotip imalo je 5,5% fetusa sa major izolovanom anomalijom. Sa najvećom učestalošću nađene se trizomija 21 u 50%, trizomija 18 u 10,7%, trizomija 13 u 8,9% i Robertsonova translokacija 13;14 u 7,1% slučajeva. Ultrazvučni nalaz major izolovane fetalne anomalije u studiji dr Bojane Petrović pokazao je umerenu senzitivnost, ali nisku specifičnost i nisku PPV, kao i dijagnostičku tačnost od samo 20%, i LR+ 0,8 u predikciji hromozomskih aberacija. Takođe, nalaz izolovane major anomalije nije pokazao značajno povećanje rizika za hromozomske aberacije fetusa (OR 0,4). U studiji Bottalico i sar., o efikasnosti ultrazvučnog skrininga hromozomskih aberacija u drugom trimestru nalaz major anomalije imao je umerenu senzitivnost i PPV, ali visoku specifičnost i LR+ 13,4 (Bottalico i sar., 2009).

Kod fetusa sa izolovanim "soft" markerima u istraživanju dr Bojane Petrović hromozomske aberacije su otkrivene u 12,4% slučajeva. Numeričke aberacije su nađene u 70,4%, a strukturne u 29,6%, najučestalije su detektovane trizomija 21 u 48,2%, zatim 18 u 11,1%, trizomija 13, monozomija X i Robertsonova translokacija 13;14 u po 7,4% slučajeva. Ultrazvučni nalaz izolovanog "soft" markera u studiji dr Bojane Petrović, pokazao je nisku senzitivnost i PPV, a visoku specifičnost i LR+ 1,9, uz dijagnostičku tačnost od 80%. Nalaz izolovanog "soft" markera pokazao se kao statistički značajan prediktor, koji povećava rizik za hromozomske aberacije fetusa više od dva puta (OR 2,4). Ovi rezultati koreliraju sa nalazima u studiji Bottalico i sar., o efikasnosti ultrazvučnog skrininga hromozomskih aberacija u drugom trimestru, gde je nalaz "soft" markera imao umerenu senzitivnost i nisku PPV, ali visoku specifičnost i LR+ 2,6.

Većina prethodnih istraživanja bazirala se na efikasnosti ultrazvučnog skrininga u detekciji najčešćih aneuploidija, uopšteno ili pojedinačno, sa posebnim akcentom na „soft“ markerima, i objavljeni rezultati su varijabilni. Tako su Ahman i sar. pokazali da ultrazvučno otkriveni izolovani „soft“ marker ima LR+ 5.6 (95% CI 0.94-10.3) i RR 23.3 (95%CI 8.9-30.5) za trizomiju 21 (Ahman i sar.,2014). Nasuprot njima Ratanasiri i sar. našli su senzitivnost od 25.6% i LR+ 0.89 (95% CI 0.536-1.493) za trizomiju 21 kod fetusa sa ultrazvučno detektovanim izolovanim „soft“ markerom (Ratanasiri i sar., 2014). Paradoksalno, istraživanje dr Bojane Petrović je pokazalo da fetusi sa izolovanim "soft" markerima imaju znatno veći rizik za hromozomske aberacije od fetusa sa izolovanim major anomalijama, što je objašnjeno činjenicom da je ova retrospektivna studija obuhvatila period od prethodnih 16 godina, kada nije postajao nacionalni vodič za genetička testiranja, zbog čega su nadležni lekari donosili odluku o fetalnoj dijagnostici po sopstvenoj proceni. Shodno tome, vrlo je verovatno da su tokom ultrazvučnog pregleda fetusa u slučaju nalaza i samo jednog "soft" markera koji bi mogao biti deo genetičkog sindroma donosili odluku o kariotipizaciji fetusa, bez daljeg traganja za dodatnim defektima.

Ranijim studijama pokazano je da postoje dva tipa ultrazvučnih markera koji sugerišu postojanje aneuploidija kod fetusa. Prva grupa uključuje markere koji imaju visoku stopu asocijacije sa hromozomskim aberacijama fetusa, bilo da se nađu kao izolovani ili u sklopu multiplih anomalija. Ovoj grupi markera pripadaju cistični higrom 52% (izolovan) vs 71% (u kombinaciji sa drugim anomalijama), uvećana NT 19% vs 45% i anomalije srca 16% vs 66%. Drugu grupu čine markeri koji su češće u asocijaciji sa aberacijama hromozoma kada se nađu u kombinaciji sa drugim anomalijama. U ovu grupu markera spadaju ventrikulomegalija 2% (izolovana) vs 17% (u kombinaciji sa drugim anomalijama), cista horoidnog pleksusa 1% vs 48%; dijafragmalna hernija 2% vs 49%; hiperehogena creva 7% vs 42%, anomalije bubrega 3% vs 24% i omfalokela 8% vs 46% (Daniel i sar. 2003; Snijders i sar., 1996). Podaci dobijeni u istraživanju dr Bojane Petrović potkrepljuju prethodne nalaze. Najveću verovatnoću za nalaz patološkog kariotipa imali su fetusi sa izolovanim anomalijama ili izolovanim "soft" markerima glave, lica i vrata (LR+ 7,9; OR 10,1), zatim kardiovaskularnog (LR+ 1,5; OR 1,5) i koštano-mišićno-zglobnog sistema (LR+ 1,5; OR 1,5). Najmanji rizik za hromozomske aberacije nađen je kod fetusa sa izolovanim anomalijama ili izolovanim "soft" markerima CNS-a (LR+0,44; OR 0,4) i urogenitalnog trakta (LR+ 0,14; OR 0,12).

U studiji dr Bojane Petrović patološki kariotip imalo je 1,9% fetusa sa izolovanom ventrikulomegalijom, tako da je ovakav ultrazvučni nalaz imao veoma nisku senzitivnost i LR+ 0,3, i nije imao značaja u predikciji hromozomskih aberacija fetusa (OR 0,3). Suprotno ovim nalazima Goetzinger i sar. pronašli su značajnu udruženost izolovane fetalne ventrikulomegalije sa trizomijom 21, LR+ 2 (Goetzinger i sar. 2008). Goetzinger i sar. objavili su značajnu udruženost izolovane agenezije korpusa kalozuma (LR+ 3) i

izolovane spine bifide (LR+ 3) sa trizomijom 13, LR+ 2 (Goetzinger i sar. 2008). I u studiji dr Bojane Petrović nalaz izolovane spine bifide kod fetusa imao je značaj u predikciji hromozomskih aberacija (LR+ 1,4).

Multicentrične studije su pokazale da i do 80% fetusa sa aneuploidijom ima uvećanje nuhalne translucence (NT) (Hixon i sar., 2015). Od izolovanih nalaza fetalnih anomalija, uvećanje nuhalne translucence ima najveći LR+ za aneuploidije (Raniga i sar., 2006). Cicero i sar. objavili su LR+ 9,8 za patološki kariotip kod fetusa sa izolovanim uvećanjem nuhalne translucence (Cicero i sar., 2003). I u istraživanju dr Bojane Petrović, od svih nalaza izolovanih defekata, izolovani ultrazvučni nalaz uvećanja nuhalne translucence imao je najveći LR+ 14,1 za hromozomske aberacije fetusa. Kod fetusa sa cističnim higromom Shimada i sar. našli su visok rizik (OR 4,9), za nalaz patološkog kariotipa (Shimada i sar., 2009). U studiji dr Bojane Petrović ultrazvučni nalaz izolovanog cističnog higroma fetusa imao je veoma visok predikcijski značaj, LR+ 14 i OR 15,4, za hromozomske aberacije.

Istraživanje dr Bojane Petrović pokazalo je da je nalaz izolovanog fetalnog hidropsa visoko specifičan prediktor patološkog kariotipa fetusa, sa visokom tačnošću, LR+2 i OR 2,1. I Shimada i sar. našli su povećan rizik (OR 2,7), za hromozomske aberacije kod fetusa sa ultrazvučno detektovanim hidropsom (Shimada i sar., 2009).

Izolovane anomalije kardiovaskularnog sistema u studiji dr Bojane Petrović, su imale LR+ 1,5 i OR 1,5 u predikciji patološkog kariotipa. Pokazano je da su nalazi izolovanog ventrikularnog septalnog defekta (LR+ 8 i OR 8,7) i tetralogije Fallot (LR+ 7 i OR 7,2) značajni prediktori hromozomskih aberacija fetusa. U svim slučajevima izolovanog ventrikularnog septalnog defekta kod fetusa je otkrivena trizomija 21, što je korelaciji sa nalazima Acevedo-Gallegos i sar., koji su našli trizomiju 21 kod 75% fetusa sa izolovanom anomalijom srca (Acevedo-Gallegos i sar., 2013). Suprotno tome Bao i sar. objavili su da su otkrili aneuploidije u samo 16,8% fetusa sa srčanom manom, među kojim je najzastupljenija bila trizomija 18 (Bao i sar., 2013). Takođe, Shen i sar. sugerisali su da izolovani ventrikularni septalni defekt nije udružen sa trizomijom 21 (Shen i sar., 2014). U ranijim studijama objavljeno je da je prototip srčane mane kod fetusa sa trizomijom 21 atrioventrikularni septalni defekt, a kod Turner sindroma koarktacija aorte (Fahed i sar. 2013). Benacerraf je objavio da su specifične srčane mane udružene sa trizomijom 21, prvenstveno disproporcija ventrikula i ventrikularni septalni defekt (Benacerraf, 2010). U istraživanju dr Bojane Petrović nisu nađene hromozomske aberacije kod fetusa sa izolovanom hipoplazijom leve komore, kao ni kod kod fetusa sa izolovanim hiperehogenim fokusom srca. Time rezultati dr Bojane Petrović koreliraju sa nalazima ranijih studija koje su utvrdile da nalaz hiperehogenog fokusa srca ne povećava rizik za trizomiju 21 (Shanks i sar., 2009).

U studiji dr Bojane Petrović nađeno je da je izolovana omfalokela značajan prognostički faktor za hromozomske aberacije fetusa sa OR 1,3. Shimada i sar. našli su OR 1,9 za nalaz patološkog kariotipa kod fetusa sa omfalokelom (Shimada i sar., 2009). Acevedo-Gallegos i sar. otkrili su patološki kariotip u samo 11,5% fetusa sa izolovanom omfalokelom. Suprotno ovim nalazima Blazer i sar. nisu našli aberacije hromozoma kod fetusa sa izolovanom omfalokelom, (Blazer i sar. 2004)

U nekim prethodnim studijama nisu otkrivene hromozomske aberacije kod fetusa sa izolovanim skraćenjem femura (Todros i sar., 2004; Morales-Rosello i sar., 2012; Chaudhury i Mukherjee, 2016;). Rezultati istraživanja dr Bojane Petrović ukazuju upravo suprotno, da je ultrazvučni nalaz skraćenog femura kod fetusa značajan prediktor patološkog kariotipa (OR 2). Bottalico i sar. takođe su objavili da ultrazvučni nalaz skraćenog femura značajno povećava rizik za hromozomske aberacije, LR+ 5,6 (Bottalico i sar., 2009).

Smatra se da nalaz jedne umbilikalne arterije (SUAS) nije značajno povezan sa fetalnim aneuploidijama (Geipel i sar., 2000). Međutim nalazi dr Bojane Petrović ukazuju upravo na suprotno, pošto se SUAS pokazao kao visoko specifičan prediktor hromozomskih aberacija sa LR+ 4,7 i OR 4,8. Interesantna je asocijacija SUAS sa retkim hromozomskim aberacijama, kao što su triple X, del 5p i sSMC nađena u ovom istraživanju.

Dashe i sar. otkrili su aneuploidije u samo 1% izolovanog i 10% polihidramniona udruženog sa nekom fetalnom anomalijom (Dashe i sar., 2002). Za razliku od njih, Shimada i sar. otkrili su patološki kariotip u 23,4%, a Zahn i sar. u 22,2% fetusa sa izolovanim polihidramnionom (Shimada i sar., 2009; Zahn i sar., 1993). Brady i sar. su našli incidencu hromozomskih aberacija od 3,2% u slučajevima idiopatskog polihidramniona, i preporučili analizu kariotipa fetusa u svim ovakvim slučajevima (Brady i sar., 1992). I u studiji dr Bojane Petrović nađeno je da je izolovani polihidramnion povezan sa povećanim rizikom za aberacije hromozoma fetusa (LR+1,5 i OR 1,6).

Smatra se da se, ukoliko se ultrazvučnim pregledom otkrije jedna krupna strukturna anomalija, preporučuje kariotipizacija fetusa, iako je to izolovani defekt, dok "soft" markere kao izolovani nalaz uvek treba procenjivati u odnosu na starost trudnice i biohemijski rizik za hromozomske aberacije (Raniga i sar., 2006). Rezultata istraživanja dr Bojane Petrović u saglasnosti su sa ranijim studijama koje su pokazale da neki "soft" markeri samostalno ne predstavljaju značajne faktore rizika, i mogu imati mnogo veći značaj ukoliko se nađu udruženi (Bromley i sar., 2002; Sohl i sar., 1999). Međutim, studija dr Bojane Petrović pokazuje da većina izolovanih major defekata nije u korelaciji sa hromozomskim aberacijama, i u takvim slučajevima rizik za pobačaj nakon invazivne intervencije radi uzimanja uzorka za kariotipizaciju, veći je od rizika za nalaz patološkog kariotipa kod fetusa.

Rezultati studije dr Bojane Petrović pokazuju da preko 90% fetusa sa izolovanom anomalijom nema krupne hromozomske aberacije. Pokazano je da analiza hromozomskih mikronizova (CMA) ima veću stopu detekcije hromozoskih aberacija nego konvencionalna kariotipizacija. Trenutno, u prenatalnoj dijagnostici, CMA ima najveću korist u evaluaciji fetusa sa multiplim anomalijama (Leavitt i sar., 2016). Međutim, pokazano je da je CMA dijagnostički korisniji od kariotipizacije i u slučajevima određenih izolovanih fetalnih anomalija. Meta-analiza rezultata CMA u slučajevima izolovanih fetalnih defekata indikuje stopu patoloških varijanti od približno 5%. Najveća stopa pozitivnih rezultata nađena je kod izolovanih anomalija centralnog nervnog sistema (oko 6%), gastrointestinalnog (oko 7%) i muskuloskeletnog sistema (oko 8%) i srca (oko 7%). Visoka stopa detekcije patoloških varijanti uočena je kod individualnih malformacija uključujući holoprocencefaliju, hipoplaziju cerebeluma, hipoplaziju levog srca, rasep usne i/ili nepca i omfalokelu. (Shaffer i sar., 2012; De Wit i sar., 2014; Jansen i sar., 2015). Nasuprot tome, patološki rezultati CMA kod fetusa sa određenim izolovanim anomalijama, kao što su ventrikularni septalni defekt, gastrošiza, agenezija bubrega i opstrukcije donjeg urinarnog trakta, do sada nisu referisani (Armour i sar., 2018). Skorašnjom meta-analizom pokazana je dodatna dijagnostička korist CMA od 4%, kod fetusa sa izolovanim uvećanjem nuhalne translucence i normalnim kariotipom (Grande i sar., 2015). Skorašnji vodiči iz nekoliko internacionalnih i nacionalnih društava preporučili su selektivnu upotrebu CMA u prenatalnom testiranju.

Analizom rezultata array CGH u programu Agilent CytoGenomics v.2.7., te pretraživanjem baza podataka NCBI ClinVar, DECIPHER, OMIM i ENSEMBL na slične varijante kao kod ispitivanih fetusa u studiji dr Bojane Petrović, nisu utvrđene varijante gena koji mogu biti povezani s razvojem ventrikulomegalije. Kod četiri ispitivana fetusa otkrivene su mikrodelecije/mikroduplicacije koje za sada u literaturi nisu opisane i definisane kao sindromi. Zhang i sar. su metodom hromozomskih mikronizova pronašli aberacije kod 9.5% fetusa sa izolovanom ventrikulomegalijom (Zhang i sar., 2015). Li i sar. otkrili su potencijalno patogene varijacije u broju ponovaka (CNV) kod 6,7% fetusa sa ventrikulomegalijom, međutim utvrdili su da ne postoji značajna korelacija između ventrikulomegalije i patogenih varijacija u broju ponovaka (Li i sar., 2017).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije:

1. **Petrović B**, Ljubić A, Komnenić M, Joksimović V, Lekić Miladinović O. Fetal ultrasound findings in trisomy18 at midpregnacy. *Genetika* 2015; 47(3):833 -838.
2. **Petrović B**, Dukanac-Stamenković J. Confined placental mosaicism in short term culture. *Genetika* 2016; 48(3):955 -961.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija "**Značaj kariotipizacije fetusa sa izolovanom anomalijom otkrivenom ultrazvučnim pregledom**", kandidata **dr Bojane Petrović**, predstavlja originalni naučni doprinos u proceni validnosti izolovanih ultrazvučnih nalaza (major anomalija ili "soft" markera) kao markera u skriningu hromozomskih aberacija fetusa. Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj tezi mogu biti od velikog značaja za izbor optimalnog genetičkog testa kod fetusa sa izolovanim major anomalijama ili izolovanim "soft" markerima i adekvatno genetičko savetovanje pacijenata pogođenih istraživanim problemom, i korisni su za dalja istraživanja u ovoj oblasti.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Bojane Petrović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Beograd, 26. jun 2018. godine

Članovi komisije:

Prof. dr Jelena Stamenković

Mentor

Prof. dr Olivera Kontić-Vučinić

Prof. dr Momčilo Ristanović

Komentor

Prof. dr Nenad Šulović

Prof. dr Ivana Novaković