



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ  
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ – ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΠΟΒΟΛΩΝ**

**ΛΑΛΟΥ Σ. ΗΛΙΑΝΑ**  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2012**



**«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παραγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»**

**Ημερομηνία αίτησης της κ. Λάλου Ηλιάνας:** 20-11-2007

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 628<sup>α</sup>/12-2-2008

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπουσα

Καλανταρίδου Σοφία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαιευτικής –Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ενδοκρινολογία, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Πασχόπουλος Μηνάς Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σύρρου Μαρίκα Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας –Ιατρικής Γενετικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 3-3-2008

*«Μοριακή Διερεύνηση αποβολών»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :** 725<sup>α</sup>/6-12-2011

<b>Μαλάμου -Μήτση Βασιλική</b>	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Στέφος Θεόδωρος</b>	Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας με έμφαση στην Εμβρυομητρική Ιατρική, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Καλανταρίδου Σοφία</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαιευτικής –Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ενδοκρινολογία, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μπατιστάτου Άννα</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Πασχόπουλος Μηνάς</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής -Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Σύρρου Μαρίκα</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας –Ιατρικής Γενετικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Αφέντρα Αμαλία</b>	Λέκτορας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών , Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 16-2-2012

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

Μαργαρίτα Τζαφλίδου  
Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



Η Γραμματέας της Σχολής  
*Μαρία Καπτοπούλου*  
ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΤΟΠΟΥΛΟΥ

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες προς την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαιευτικής/Γυναικολογίας κυρία Καλανταρίδου Σοφία για την ανάθεση της διατριβής μου, την στήριξη και την συμπαράσταση της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου. Η συμβολή της υπήρξε καθοριστική. Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της συμβουλευτικής μου επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής κυρία Σύρρου Μαρίκα, για όλη τη βοήθεια και τις συμβουλές που μου παρείχε απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής/Γυναικολογίας κύριο Μηνα Πασχόπουλο για όλες τις συμβουλές και την στήριξη που μου πρόσφερε όλο αυτό το διαστημα

Απευθύνω τις ευχαριστίες μου για τη συμβολή τους στην επιτυχή έκβαση της διατριβής μου στα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, κυρία Μαλάμου Μήτση Βασιλική Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, τον κύριο Στέφο Θεόδωρο Καθηγητή Μαιευτική-Γυναικολογίας, την κυρία Ματιστάτου Άννα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας και την κυρία Αφέντρα Αμαλία Λέκτορας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη ΔΕΠ και ΕΤΕΠ του εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας για την βοήθεια και την φιλική συμπεριφορά τους. Ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους μου Δημητριάδου Ευτυχία, Κασιούμη Γιώτα, Μάντζιου Στεφανία, Ντουχανιάρη Αλέκα, Μαλταμπέ Βιολέτα, Καλαϊτζάκη Αλέξανδρο και Μαρκόπουλο Γιώργο για την ηθική στήριξη και την βοήθεια που μου παρείχαν όποτε τους ζητήθηκε. Σίγουρα χωρίς αυτούς όλα αυτά τα χρόνια θα περνούσαν λιγότερο ευχάριστα. Ευχαριστώ θερμά τη νεότερη συνάδελφο του εργαστηρίου μου Βλάϊκου Μαριάντζελα και της ευχομαι καλή συνέχεια στο εργο της.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για όλη την υπομονή που έδειξαν και την ουσιαστική ψυχική συμπαράσταση τους στο δύσκολο έργο που ανέλαβα.

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>σελ.</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>9</b>
<b>1. ΑΠΟΒΟΛΕΣ.....</b>	<b>10</b>
1.1 Διάκριση αποβολών με βάση την εμβρυϊκή ανάπτυξη.....	10
1.2 Καθ' ἑξίν αποβολές.....	11
1.2.1 Πρωτοπαθείς και δευτεροπαθείς καθ' ἑξίν αποβολές .....	11
1.3 Αιτίες Αποβολών .....	12
1.3.1 Χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου.....	13
1.3.1.1 Αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες .....	14
1.3.1.2 Δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες.....	16
1.3.1.2.1 Μη ισοζυγισμένες δομικές ανωμαλίες.....	17
1.3.1.2.2 Ισοζυγισμένες δομικές ανωμαλίες.....	18
1.3.2 Ηλικία της Μητέρας.....	22
1.3.3 Μωσαϊκισμός .....	22
<b>2. ΜΟΝΟΓΟΝΕΪΚΗ ΔΙΣΩΜΙΑ (ΜΓΔ) (Uniparental disomy-UPD).....</b>	<b>24</b>
2.1 Ετεροδισωμία – Ισοδισωμία.....	24
2.2 Μηχανισμοί δημιουργίας της ΜΓΔ .....	25
2.2.1 Διάσωση .....	26
2.2.1.1 Διάσωση Τρισωμίας.....	27
2.2.1.2 Διάσωση Μονοσωμίας.....	29
2.2.2 Σφάλμα μετά την γονιμοποίηση (postfertilization error).....	30
2.2.3 Συμπληρωματικότητα γαμετών (gamete complementation).....	30
2.3 Σύνθετη και τμηματική ΜΓΔ (Complex and segmental UPD).....	30
2.4 Αποτελέσματα δημιουργίας ΜΓΔ .....	32
2.5 Προβλήματα που σχετίζονται με την εμφάνιση της ΜΓΔ .....	32
2.5.1 Γονιδιακή αποτύπωση (Genomic Imprinting) .....	32
2.5.1.1 Συνέπειες της διαταραχής της γονιδιακής αποτύπωσης.....	33
2.5.1.2 Γονιδιακή αποτύπωση και ΜΓΔ .....	34
2.5.1.3 Κλινικά Σύνδρομα και ΜΓΔ .....	36
2.5.1.4 Γονίδια με αποτύπωση στον άνθρωπο και στον ποντικό.....	41
2.5.2 Τρισωμικός μωσαϊκισμός .....	42
2.5.3 Ομοζυγωτία πιθανών υπολειπόμενων κληρονομήσιμων μεταλλάξεων	44
<b>3.ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.</b>	<b>45</b>

<b>3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR).....</b>	<b>45</b>
3.1.1 Αρχή της μεθόδου.....	45
3.1.2 Στάδια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	46
3.1.3 Σχεδιασμός των εκκινητών .....	47
<b>3.2 Ηλεκτροφόρηση.....</b>	<b>48</b>
3.2.1 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης .....	49
3.2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης .....	51
<b>4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>53</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....</b>	<b>54</b>
1. Δείγματα.....	55
2. Πολυμορφικοί δείκτες DNA.....	55
3. Αλληλουχίες εκκινητών για τις μεταλλάξεις ASO-IVS8 και Thr93Met(ex4) του γονιδίου DHCR7.....	57
4. Αλληλουχίες εξονίων του γονιδίου GNAS1.....	58
5. Διαλύματα.....	58
5.1 Για την κυτταρογενετική ανάλυση.....	58
5.2 Για την μοριακή ανάλυση.....	59
<b>ΜΕΘΟΔΟΙ- ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....</b>	<b>61</b>
1. Μέθοδοι διάγνωσης ανευπλοειδιών σε προϊόντα αποβολών.....	62
1.1 Κυτταρογενετική ανάλυση .....	62
1.2 Μοριακές τεχνικές .....	63
2. Πειραματική διαδικασία.....	64
2.1. Κυτταρογενετική ανάλυση .....	64
2.1.1 Καλλιέργεια κυττάρων από ιστό πλακούντα και εμβρύου.....	64
2.1.2 Ανάλυση καλλιέργειας κυττάρων από ιστό πλακούντα και εμβρύου με χρώση Giemsa.....	66
2.2 Μοριακή ανάλυση.....	67
2.2.1 Απομόνωση DNA.....	68
2.2.1.1 Απομόνωση DNA από λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος.....	68
2.2.1.2 Απομόνωση DNA από ιστό πλακούντα ή/ και εμβρύου.....	70
2.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	72
2.2.2.1 Διάγνωση φύλου των προϊόντων αποβολής.....	72

2.2.2.2 Ενίσχυση χρωμοσωμικών περιοχών με χρήση πολυμορφικών δεικτών.....	73
2.2.2.3 Ενίσχυση των περιοχών των εξωνίων 1-13 του γονιδίου GNAS1 ..	75
2.2.2.4 Ενίσχυση της περιοχής 11q13 του χρωμοσώματος 11 για την ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου DHCR7 .....	77
2.2.3 Ηλεκτροφόρηση .....	78
2.2.3.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Agarose gel electrophoresis)	78
2.2.3.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE).....	79
2.2.3.2.1 Πρότυπα ζώνωσης των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου....	81
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>85</b>
1. Γενικά.....	86
2. Μητρική ηλικία και αποβολές.....	86
3. Αποτελέσματα κυτταρογενετικής ανάλυσης .....	87
4.Μοριακός έλεγχος των δειγμάτων για μητρική επιμόλυνση.....	89
5. Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης.....	92
5.1 Διάγνωση μητρικής ΜΓΔ.....	92
5.1.1 Διάγνωση μητΜΓΔ (matUPD) σε ένα μόνο χρωμόσωμα.....	94
5.1.2 Διάγνωση μητΜΓΔ σε περισσότερα από ένα χρωμοσώματα.....	101
5.1.3 Διάγνωση μητΜΓΔ και τρισωμίας.....	110
5.2 Διάγνωση τρισωμιών.....	112
5.3 Διάγνωση πατρικής ΜΓΔ.....	119
5.4 Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δειγμάτων ελέγχου.....	126
5.5 Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης για την ανίχνευση μεταλλάξεων των εξωνίων 1-13 του γονιδίου GNAS1.....	128
5.6 Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των μεταλλάξεων :α) ASO IVS8 και β) Thr93Met ex4 του γονιδίου DHCR7. ....	129
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>131</b>
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>139</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>141</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>143</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>145</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....</b>	<b>153</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ.....</b>	<b>154</b>



<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2: ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....</b>	<b>156</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3: ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ.....</b>	<b>159</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4: ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΑ ΦΥΛΛΑΔΙΑ.....</b>	<b>161</b>

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1. ΑΠΟΒΟΛΕΣ

Για την επίτευξη μιας επιτυχούς εγκυμοσύνης, απαραίτητη είναι η γονιμοποίηση ενός χρωμοσωμικά φυσιολογικού ωαρίου με ένα φυσιολογικό σπερματοζωάριο. Τότε τα χρωμοσώματα συνδυάζονται με τέτοιο τρόπο που να επιτρέπουν την επιτυχή εμφύτευση του εμβρύου στη μήτρα καθώς και την ανάπτυξη του.

Το 10%-15% των διαπιστωμένων κήσεων καταλήγουν σε αυτόματη αποβολή. Οι αυτόματες αποβολές είναι τυχαίες αποβολές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της κύησης και αφορούν 1 στα 8 ζευγάρια αναπαραγωγικής ηλικίας. Αναφέρονται στην αποβολή των προϊόντων της σύλληψης από τη μήτρα πριν από τη 20<sup>η</sup> ολοκληρωμένη εβδομάδα της κύησης. Ποσοστό 30-50% των γονιμοποιημένων ωαρίων πιστεύεται πως αποβάλλεται μέσα στις πρώτες εβδομάδες, αλλά πολλές αποβολές δε γίνονται καν αντιληπτές, επειδή συμπίπτουν με τη χρονική περίοδο της αναμενόμενης εμμήνου ρύσεως. Η μεγαλύτερη συχνότητα αυτομάτων αποβολών (> 80%) συμβαίνει μεταξύ 8ης και 12ης εβδομάδας (πρώτο τρίμηνο). (Fritz et al.,2001; Tsukishiro S et al.,2005; D Kotzot 2002; Solveig M.V 2005; Horne AW et al.,2005).

### 1.1 Διάκριση αποβολών με βάση την εμβρυϊκή ανάπτυξη

Είναι χρήσιμο να γίνει διάκριση των αποβολών, με βάση την εβδομάδα κύησης διότι τα αίτια των αποβολών διαφέρουν με την πάροδο της κύησης π.χ. κατά το πρώτο τρίμηνο είναι συχνές οι αποβολές εμβρύων με χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Η εμβρυϊκή ανάπτυξη διακρίνεται στις παρακάτω περιόδους:

1. προεμβρυϊκή περίοδο που διαρκεί από την πρώτη ημέρα της τελευταίας εμμήνου ρύσεως μέχρι την 5<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης,
2. εμβρυϊκή περίοδος, από την 6<sup>η</sup> έως την 9<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης και
3. μεταεμβρυϊκή περίοδος που ξεκινά από την 10<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης και διαρκεί μέχρι την ολοκλήρωση.

Αποβολές πριν την ανάπτυξη του εμβρύου μπορεί να χαρακτηριστούν ως αποβολές χωρίς να υπάρχει ανάπτυξη εμβρύου (anembryonic). Αποβολές εμβρύων χαρακτηρίζονται οι περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει καρδιακή δραστηριότητα μεταξύ της 6<sup>ης</sup> και της 10<sup>ης</sup> εβδομάδας της κύησης, ενώ αποβολές μετά τη 10<sup>η</sup> εβδομάδα χαρακτηρίζονται ως εμβρυϊκοί θάνατοι (Warren JE et al.,2008; Solveig M.V 2005).

## **1.2 Καθ' έξιν αποβολές**

Το ποσοστό των αυτομάτων αποβολών αυξάνει σημαντικά όταν υπάρχει προηγούμενο ιστορικό μίας ή περισσότερων αποβολών. Εάν συμβεί για πρώτη φορά αυτόματη αποβολή, οι πιθανότητες να συμβεί για δεύτερη ανέρχονται στο 25%, για τρίτη στο 40% και για τέταρτη στο 70% περίπου (Frias et al.,2004).

Οι επαναλαμβανόμενες αποβολές ή καθ' έξιν αποβολές ορίζονται ως η απώλεια τριών ή περισσότερων συνεχόμενων κυήσεων, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 1% του συνόλου των κυήσεων. Η συχνότητα εμφάνισης είναι 1-3% στον γυναικείο πληθυσμό (Rai R et al.,2006; Horne AW et al.,2005 ).

Ο κίνδυνος αποβολής σε γυναίκες με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών του πρώτου τριμήνου είναι περίπου 25% -30% σε γυναίκες που έχουν παιδί από προηγούμενη κύηση και 50% σε γυναίκες χωρίς προηγούμενη γέννηση παιδιού (Frias et al.,2004; Warren JE et al.,2008). Ωστόσο, οι γυναίκες αυτές έχουν 60 με 70% πιθανότητες για μια επόμενη επιτυχημένη εγκυμοσύνη (Frias et al.,2004). Η πιθανότητα μιας επιτυχούς εγκυμοσύνης μετά από δύο αποβολές είναι περίπου 80%, ενώ μετά από τρεις αποβολές έχει μειωθεί στο 55-75% (Warren JE et al.,2008). Ο κίνδυνος για τυχαίο εμβρυϊκό θάνατο ανέρχεται στο 5%. Αποβολές που σχετίζονται με ανεπάρκεια του πλακούντα, πρόωρη γέννηση ή με γενετικές αιτίες είναι πιο πιθανόν να συμβούν. Οι γυναίκες με καθ' έξιν εμβρυϊκούς θανάτους διατρέχουν πολύ μεγαλύτερο κίνδυνο από εκείνες με τυχαίες αποβολές για τις επόμενες κυήσεις (Frias et al.,2004; Warren JE et al.,2008; Rai R et al.,2006; Horne AW et al.,2005).

### **1.2.1 Πρωτοπαθείς και δευτεροπαθείς καθ' έξιν αποβολές**

Οι καθ' έξιν αποβολές ταξινομούνται σε πρωτοπαθείς και δευτεροπαθείς. Ο όρος πρωτοπαθείς αποβολές αναφέρεται σε γυναίκες που έχουν τρεις ή περισσότερες συνεχόμενες αυτόματες αποβολές, με τον ίδιο σύντροφο και καμία κύηση μετά την 20ή εβδομάδα. Η κατάσταση αυτή συναντάται σε μία στις 150 κυήσεις και είναι υπεύθυνη για το 6% των εμβρυϊκών απωλειών. Ο όρος δευτεροπαθείς αποβολές αναφέρεται σε γυναίκες που είχαν τρεις ή και περισσότερες αυτόματες αποβολές, με τον ίδιο σύντροφο, μετά την γέννηση ενός παιδιού ή μετά από έναν ενδομήτριο θάνατο. Η κατάσταση αυτή συναντάται σε μία στις 500 κυήσεις και είναι υπεύθυνη για το 1,5% των εμβρυϊκών απωλειών (Rai R et al.,2006).

### 1.3 Αιτίες Αποβολών

Οι αποβολές εμφανίζουν ετερογένεια και μπορεί να οφείλονται σε πολλές αιτίες (γενετικοί παράγοντες, ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας ,ανεπάρκεια τραχήλου, ανοσολογικοί, ορμονικοί και ενδοκρινικοί παράγοντες)

Είναι γνωστό ότι περίπου 50-60% των αυτόματων αποβολών οφείλεται σε κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορεί να είναι αριθμητικές (με μη φυσιολογικό αριθμό χρωματοσωμάτων -ανευπλοειδίες). ή δομικές (ευπλοειδία). Στις δομικές ανωμαλίες ανήκουν και οι ισοζυγισμένες μεταθέσεις. (Zhang YX et al.,2009; Horne AW et al.,2005) (πίνακας 1).

**Πίνακας 1. Γενετικές αιτίες των αποβολών**

<b>Γενετικές αιτίες</b>	<b>%</b>	<b>Αναφορές</b>
<b><u>Χρωμοσωμικές Ανωμαλίες</u></b>		
1. Δομικές	≤10%	Zhang YX et al.,2009, Solveig M.V 2005
2. Αριθμητικές	≥90%	Warren JE et al.2008, Nagaishi M et al.2004, Solveig M.V 2005
Μονοσωμία X	20%	Warren JE et al.2008
Πολυπλοειδίες	20%	
Τριπλοειδίες	6%	Ostrer H. et al.,2006
Αυτοσωμικές Τρισωμίες	60%	Warren JE et al.2008, Nagaishi M et al.2004, Solveig M.V 2005
Τρισωμία 16	20%-30%	Warren JE et al.2008
Τρισωμία 21	20%	Warren JE et al.2008 Nagaishi M et al.2004, Zhang YX et al.,2009
Τρισωμία 22	20%	
3. Γονικές Ισοζ. Μεταθέσεις	3%-6%	Warren JE et al.2008
<b><u>Πλακουντικός μωσαϊκισμός (CPM)</u></b>	20%	Warren JE et al.2008, Hansen WF. et al.,1997
<b><u>Μονογονιδιακές Διαταραχές</u></b>	10%	Warren JE et al.2008 , Zhang YX et al.,2009
Θρομβοφιλία	10%	Werner EF et al.,2010 Rai R et al.2006
Φυλοσύνδετες στο X διαταραχές	10%	Zhang YX et al.,2009

CPM: Αντιπροσωπεύει τη διαφορά στη σύσταση των χρωμοσωμάτων στα κύτταρα του εμβρύου και στα κύτταρα του πλακούντα.

Ακόμα παράγοντες που σχετίζονται με την μητέρα όπως η μεγάλη ηλικία (άνω των 40 ετών), μολύνσεις του γεννητικού και ουροποιητικού συστήματος, λοιμώξεις των εσωτερικών γεννητικών οργάνων, ασυμβατότητα των ομάδων αίματος ABO, κάπνισμα, αλκοόλ, υπερβολική κατανάλωση καφέ, ακτινοβολία κ.α. καθώς και κάποιες ενδοκρινολογικές παθήσεις όπως ο διαβήτης μπορεί να ευθύνονται για τις αποβολές. Σε περίπου 40-60% των περιπτώσεων ανακαλύπτονται παθολογικές αιτίες (θρομβοφιλία, αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας και του τραχήλου, ορμονικά και μικροβιακά αίτια) (Kondo Y. et al.,2004; Fritz et al.,2001; Tsukishiro S et al.,2005; D Kotzot 2002; Warren JE et al.,2008; Nagaishi M et al.,2004; Horne AW. et al.,2005).

Η περιορισμένη ενδομήτρια ανάπτυξη (IUGR) ενός εμβρύου αποτελεί επίσης μια από τις κυριότερες αιτίες εμβρυϊκής και νεογνικής θνησιμότητας και χαρακτηρίζεται από την αδυναμία του εμβρύου να έχει τη φυσιολογική ενδομήτρια αύξηση (Monk D. et al.,2004; Gudrun E. Moore et al.1997). Έμβρυα με περιορισμένη ενδομήτρια ανάπτυξη χαρακτηρίζονται εκείνα που το βάρος γέννησης τους είναι λιγότερο από 2500g ή βάρος λιγότερο από το 10 % του φυσιολογικού βάρους ανά εβδομάδα κύησης (Monk D. et al.,2004; Eggermann et al.,2002).

Ένα έμβρυο μπορεί να αποβληθεί εξαιτίας: μη καλής ανάπτυξης του πλακούντα, από ασθένειες που προκαλούνται από διάφορους μικροοργανισμούς ή ιούς, από κάποια σοβαρή ασθένεια όπως ο καρκίνος.

Παρόλο που το 65%-70% των αποβολών θεωρείται αποτέλεσμα χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου, στο 40% περίπου δεν ανευρίσκεται η αιτία της αποβολής και χαρακτηρίζονται ως «αγνώστου αιτιολογίας». (Kondo Yuko et al.,2004; Fritz et al.,2001; Tsukishiro S et al.,2005).

### **1.3.1 Χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου**

Οι περισσότερες αυτόματες αποβολές σχετίζονται με ανωμαλίες της ανάπτυξης του γονιμοποιημένου ωαρίου, του εμβρύου και του πλακούντα. Υπολογίζεται ότι το 65%-70% των αυτομάτων αποβολών οφείλεται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου (Tsukishiro S et al.,2005; Solveig M.V 2005).

Περίπου το 75% των περιπτώσεων των αποβολών, κυρίως του πρώτου τριμήνου, έχουν μη φυσιολογικό καρυότυπο, (εμφανίζουν κυρίως τρισωμίες, έλλειμμα ολόκληρου ή τμήμα χρωμοσώματος, διπλασιασμοί, μεταθέσεις ή άλλες ανωμαλίες), ενώ στις υπόλοιπες ο καρυότυπος είναι φυσιολογικός (στο 18% των περιπτώσεων υπάρχουν μορφολογικές ανωμαλίες και στο 7% όχι) (Kondo Y. et al.,2004; Oster H. et al.,2006).

Στις κύσεις που χάνονται αργότερα, υπάρχει επίσης ένα υψηλό ποσοστό χρωμοσωμικών ανωμαλιών, κατά προσέγγιση 30% στο δεύτερο και 5% στο τρίτο τρίμηνο. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες βρέθηκαν σε ποσοστό μέχρι και 90% σε δείγματα χωρίς ανάπτυξη εμβρύου (anembryonic), περίπου 50% μεταξύ της 8<sup>ης</sup> και 11<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης και περίπου 30% σε αποβολές εμβρύων μεταξύ 16<sup>ης</sup> έως 19<sup>ης</sup> εβδομάδας (Geraedts JPM. et al.,1996). Επίσης, χρωμοσωμικές ανωμαλίες βρέθηκαν σε ποσοστό 6% έως 12% σε νεκρά έμβρυα 20 εβδομάδων και άνω (Warner RJ et al.,2002; Nagaishi M et al.,2004) (Πίνακας 2).

Στη συντριπτική πλειοψηφία πρόκειται για de novo, σποραδικές μεταλλάξεις που συνέβησαν αυτόματα, χωρίς να έχει κληρονομηθεί κάποιο πρόβλημα από τους γονείς. Ουσιαστικά βλέπουμε την πρόνοια της φύσης, που επιλέγει να τερματίσει μια εγκυμοσύνη στην αρχή (Nagaishi M et al.,2004).

**Πίνακας 2.** Ποσοστά εμφάνισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών ανάλογα με την περίοδο κύησης

Περίοδοι κύησης	Χρονικά διαστήματα	%	Αναφορές
Προεμβρυϊκή	≤ 6 εβδομάδες	90%	Warren JE 2008 ; Geraedts JPM. et al 1996; Yong, P.J et al 2002 ; Nagaishi M et al. 2004 ; Solveig M.V 2005
Εμβρυϊκή	8-11 εβδομάδες	50%	
	16-19 εβδομάδες	30%	
Μεταεμβρυϊκή	Νεκρά έμβρυα 20 εβδομάδων και πάνω	6-12%	Wapner RJ 2002, Nagaishi M et al 2004

Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορεί να αφορούν ανωμαλίες στον αριθμό ή στην δομή των χρωμοσωμάτων και χαρακτηρίζονται αριθμητικές και δομικές ανωμαλίες αντίστοιχα.

### 1.3.1.1 Αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες

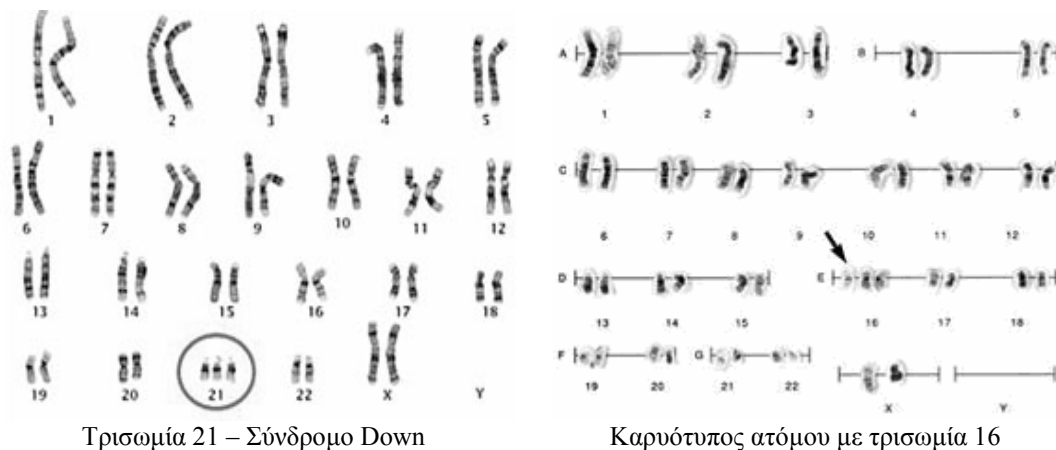
Φυσιολογικά, τα ανθρώπινα κύτταρα, εκτός από τους γαμέτες, έχουν στον πυρήνα τους δύο αντίγραφα από το κάθε ένα από τα 22 αυτοσωμικά χρωμοσώματα και δύο αντίγραφα από το X χρωμόσωμα (θήλυ) ή ένα X και ένα Y χρωμόσωμα (άρρεν). Ο συνολικός αριθμός των χρωμοσωμάτων στον άνθρωπο λοιπόν είναι  $2n = 46$ , από τα οποία 23 κληρονομούνται από την μητέρα και 23 από τον πατέρα (το Y χρωμόσωμα κληρονομείται μόνο από τον πατέρα). Αποκλίσεις από τον φυσιολογικό αριθμό των χρωμοσωμάτων και συγκεκριμένα στις περιπτώσεις όπου σε σωματικά κύτταρα ο αριθμός των χρωμοσωμάτων είναι διαφορετικός από  $2n$ , ορίζονται ως ανευπλοειδίες και αφορούν συνήθως την απώλεια του ενός αντιγράφου (μονοσωμία) ή την παρουσία ακόμη ενός αντιγράφου (τρισωμία) συγκεκριμένου χρωμοσώματος, γεγονότα που οδηγούν σε φαινοτυπικές ανωμαλίες ή σύνδρομα.

Η ανευπλοειδία είναι συνήθως αποτέλεσμα του μη διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων, και συνήθως συμβαίνει κατά την διάρκεια της μείωσης στους γαμέτες. Ο μειωτικός μη διαχωρισμός μπορεί να συμβεί είτε στην πρώτη είτε στην δεύτερη μειωτική διαίρεση. Έχει βρεθεί ότι ο κίνδυνος να συμβεί αυτό αυξάνει όσο αυξάνεται η ηλικία της μητέρας. Το αποτέλεσμα του μειωτικού μη διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων είναι η παρουσία μη φυσιολογικού αριθμού χρωμοσωμικών

αντιγράφων στους γαμέτες. Η γονιμοποίηση ενός φυσιολογικού γαμέτη από έναν μη φυσιολογικό, οδηγεί στον σχηματισμό ανευπλοειδικού εμβρύου.

Οι αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι δύο ειδών: πολυπλοειδίες με ανωμαλίες στο σύνολο των χρωμοσωμάτων και ανευπλοειδίες με ανωμαλίες στον αριθμό συγκεκριμένων χρωμοσωμάτων (τρισωμίες και μονοσωμίες). Οι πιο συχνές αριθμητικές ανωμαλίες που εμφανίζονται σε αυτόματες αποβολές (άνω του 90%) είναι τρισωμία αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων (60%), μονοσωμία X (20%) και πολυπλοειδίες (20%) (Warren JE et al., 2008; Nagaishi M et al., 2004; Solveig M.V 2005).

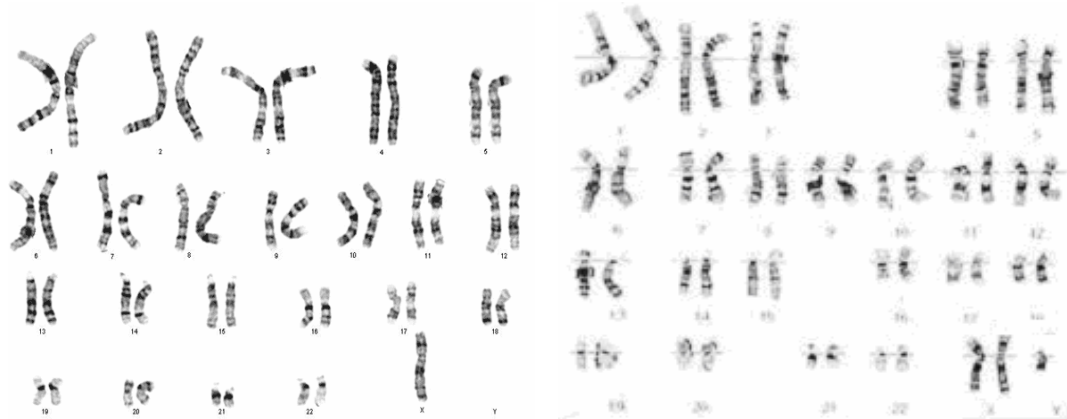
Τρισωμία υπάρχει όταν το κύτταρο έχει τρία αντίγραφα ενός συγκεκριμένου χρωμοσώματος αντί για δύο που είναι το φυσιολογικό. Εάν η τρισωμία είναι αποτέλεσμα μη διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων στην πρώτη μειωτική διαίρεση το ζυγωτό κύτταρο που προκύπτει θα περιέχει 3 διαφορετικά αντίγραφα του συγκεκριμένου χρωμοσώματος (1+1+1) ενώ αν είναι αποτέλεσμα μη διαχωρισμού στην δεύτερη μειωτική διαίρεση, δύο από τα τρία αντίγραφα θα είναι όμοια (2+1). Στον άνθρωπο, περίπου το 70% των μη διαχωρισμών συμβαίνει στην πρώτη μειωτική διαίρεση (Zhang YX et al.,2009). Οι περισσότερες είναι αυτοσωμικές τρισωμίες, με συχνότερες των χρωμοσωμάτων 13, 16, 18, 21 και 22. Η πιο συνηθισμένη τρισωμία είναι η τρισωμία 16, αντιπροσωπεύοντας το 20% έως 30% του συνόλου των τρισωμιών που παρατηρήθηκαν σε αποβαλλόμενα δείγματα. Τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 21 και 22 είναι οι επόμενες πιο συχνές, σε ποσοστό περίπου 20% των τρισωμιών που εμφανίζονται στις αποβολές (Εικ. 1). Τρισωμίες των υπολοίπων χρωμοσωμάτων είναι σπάνιες. (Warren JE et al.,2008; Nagaishi M et al.,2004; Zhang YX et al.,2009; Solveig M.V 2005)( Πίνακας 1).



**Εικ. 1.** Αυτοσωμικές τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 21 και 16



Η μονοσωμία προκύπτει όταν λείπει το ένα από τα δύο χρωμοσώματα ενός ζεύγους χρωμοσωμάτων (παρουσία ενός μόνο αντίγραφου ενός συγκεκριμένου χρωμοσώματος). Οι μονοσωμίες αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων είναι πολύ λιγότερο συμβατές με τη ζωή από ότι είναι οι τρισωμίες. Βιώσιμα έμβρυα είναι μόνο εκείνα όταν το χρωμόσωμα που λείπει είναι ένα από τα δύο X χρωμοσώματα. Η μονοσωμία X (45, X) είναι υπεύθυνη για το 18% των αυτόματων αποβολών (Tompson & tompson). Λιγότερο συχνές είναι η ανευπλοειδία φυλετικών χρωμοσωμάτων (47, XXX ή 47, XXY) (Solveig M.V 2005)(Εικ. 3).



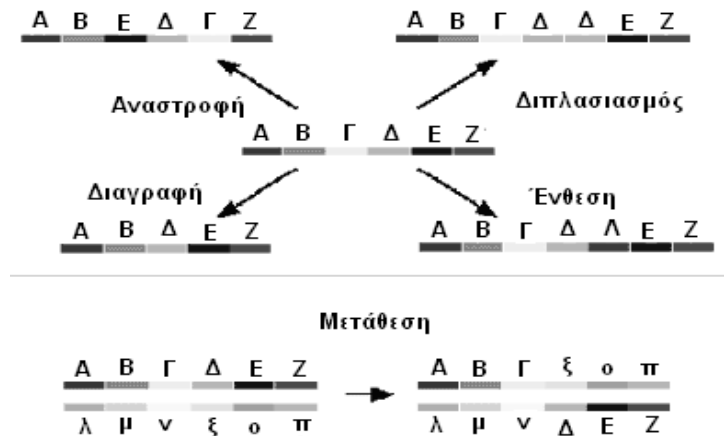
**Εικ. 2.** Καρυότυπος ατόμου με μονοσωμία X **Εικ. 3.** Καρυότυπος XXY - σύνδρομο Klinefelter

### 1.3.1.2 Δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

Οι δομικές ανωμαλίες είναι αποτέλεσμα χρωμοσωμικής θραύσης και μπορεί να αφορούν ένα ή δύο ή περισσότερα χρωμοσώματα.. Όταν ένα χρωμόσωμα υφίσταται θραύση, δημιουργούνται δύο ασταθή άκρα. Συνήθως, οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA επανασυνδέουν τα δύο άκρα. Ωστόσο, αν συμβούν περισσότερες από μια θραύσεις στο χρωμόσωμα, οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης δεν μπορούν να διακρίνουν τα διαφορετικά άκρα με αποτέλεσμα να υπάρχει η πιθανότητα λάθους στην επανασύνδεση.

Οι δομικές ανωμαλίες χρωμοσωμάτων περιλαμβάνουν: α) ελλείμματα (απώλεια τμήματος χρωμοσώματος), β) ενθέσεις (προσθήκη τμήματος χρωμοσώματος) γ) αναστροφές, δ) διπλασιασμούς (διπλασιασμός ενός τμήματος χρωμοσώματος στο ίδιο χρωμόσωμα), ε) μετατοπίσεις ή μεταθέσεις (αμοιβαίες και κατά Robertson), στ) δακτυλιοειδή χρωμοσώματα που προκύπτουν από δύο σπασίματα σε κάθε έναν από τους δύο βραχίονες και ζ) ισοχρωμοσώματα, τα οποία είναι αποτέλεσμα μη διαίρεσης του κεντρομεριδίου ώστε να δώσει ένα χρωμόσωμα με δύο p ή δύο q βραχίονες, μερικά από τα οποία περιέχουν επίσης διπλασιασμούς ή

ελλείμματα. Οι πιο κοινές δομικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων εμφανίζονται στην εικόνα 4.



**Εικ. 4.** Κύρια είδη δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών.

Οι δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορεί να είναι μη ισοζυγισμένες (unbalanced) εάν τα χρωμοσώματα που συμμετέχουν φέρουν περισσότερη ή λιγότερη γενετική πληροφορία από το φυσιολογικό, ή ισοζυγισμένες (balanced) αν η γενετική πληροφορία που βρίσκεται στα χρωμοσώματα που συμμετέχουν δεν αλλάζει (Tompson & tompson).

### 1.3.1.2.1 Μη ισοζυγισμένες δομικές ανωμαλίες (unbalanced chromosome abnormalities)

Στις μη ισοζυγισμένες δομικές ανωμαλίες όπως είναι α) τα ελλείμματα, β) οι διπλασιασμοί τμήματος ενός χρωμοσώματος και γ) τα δακτυλιοειδή χρωμοσώματα., ο φαινότυπος συνήθως είναι παθολογικός και το αποτέλεσμα θα είναι μερική μονοσωμία για το χρωμόσωμα που φέρει το έλλειμμα και μερική τρισωμία για το χρωμόσωμα που έχει γίνει διπλασιασμός.

Έλλειμμα είναι η απώλεια τμήματος χρωμοσώματος που μπορεί να είναι ενδιάμεσο ή τελομερικό. Μεγάλου μεγέθους ελλείμματα (> 5Mb) μπορεί να διαγνωστούν με κυτταρογενετικές τεχνικές αλλά ελλείμματα μικρού μεγέθους είναι δυνατόν να διαγνωστούν μόνο με μοριακές τεχνικές. Οι κλινικές επιπτώσεις εξαρτώνται από το μέγεθος του τμήματος που λείπει καθώς και από τον αριθμό και τις λειτουργίες των γονιδίων που περιέχει (Tompson & tompson), π.χ εάν στην περιοχή του ελλείμματος υπάρχουν γονίδια που συμβάλουν στην σωστή αύξηση και

ανάπτυξη του εμβρύου, τότε τα γονίδια αυτά θα χαθούν και μπορεί να προκληθεί αποβολή.

Οι διπλασιασμοί συνδυάζονται με παθολογικό φαινότυπο όταν χάνουν την λειτουργικότητά τους γονίδια που βρίσκονται στην περιοχή που γίνεται ο διπλασιασμός ή/ και η θραύση του χρωμοσώματος

Τα δακτυλιοειδή χρωμοσώματα δημιουργούνται όταν ένα χρωμόσωμα υποστεί θραύση σε δυο σημεία, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα δακτύλιο. Αν το κεντρομερίδιο βρίσκεται μέσα στο δακτύλιο, τα δυο ακραία τμήματα θα χαθούν μαζί με τη γενετική πληροφορία που φέρουν.

#### **1.3.1.2.2 Ισοζυγισμένες δομικές ανωμαλίες(balanced chromosome abnormalities)**

Οι ισοζυγισμένες δομικές ανωμαλίες όπως είναι οι αναστροφές και οι μεταθέσεις, δεν έχουν συνήθως επιπτώσεις στο φαινότυπο, γιατί υπάρχει ολόκληρη η γενετική πληροφορία αν και είναι διαταγμένη διαφορετικά πάνω στα χρωμοσώματα και μπορεί να είναι συμβατές με την κανονική ανάπτυξη του εμβρύου. Εάν μετά από εξέταση των γονέων αποδειχθεί πως ο ένας από αυτούς έχει την ίδια ισοζυγισμένη χρωμοσωμική ανακατάταξη με το έμβρυο, τότε και το έμβρυο πιθανότατα να είναι φυσιολογικό. Παρόλα αυτά η συχνότητα εμφάνισης ισοζυγισμένων χρωμοσωμικών ανακατατάξεων σε ζευγάρια με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών είναι μεγάλη (Kalitsis P et al.,1993; Farcas S. et al., 2007).

Αναστροφή εμφανίζεται όταν ένα χρωμόσωμα υποστεί δυο θραύσεις και ανασυντεθεί με ανεστραμμένο το τμήμα μεταξύ των δυο σημείων θραύσεως. Μια αναστροφή δεν προκαλεί συνήθως φαινοτυπικές ανωμαλίες στους φορείς, έχει όμως κλινική σημασία για τους απογόνους. Ένας φορέας οποιουδήποτε τύπου αναστροφής μπορεί να δώσει ανώμαλους γαμέτες, οι οποίοι μπορεί να δημιουργήσουν απογόνους με μη ισοζυγισμένη χρωμοσωμική σύσταση και να προκληθεί αποβολή (Jacobs et al.,1975). Οι αναστροφές διακρίνονται σε (Εικ 5):

α) «παρακεντρικές» κατά τις οποίες και τα δύο σημεία θραύσης βρίσκονται στον ίδιο βραχίονα χωρίς να περιλαμβάνει τη περιοχή γύρω από το κεντρομερίδιο. Οι παρακεντρικές αναστροφές είναι σπάνιες και επειδή δεν αλλάζουν την αναλογία των βραχιόνων των χρωμοσωμάτων, μπορούν να αναγνωριστούν μόνο με τεχνικές ζώνωσης των χρωμοσωμάτων. Ένας φορέας που φέρει μια παρακεντρική αναστροφή θα παράγει μη ισοζυγισμένους γαμέτες όπου είναι σχεδόν αδύνατον να οδηγήσουν σε

βιώσιμο έμβρυο με αποτέλεσμα οι κυήσεις τέτοιων φορέων να καταλήγουν σε πολύ πρώιμες αποβολές. (The ESHRE Capri Workshop Group 2008; Jacobs et al.,1975)

β) «περικεντρικές» κατά τις οποίες οι αλλαγές περιλαμβάνουν το κεντρομερίδιο και την περιοχή περιμετρικά του κεντρομεριδίου. Μπορεί να διαγνωστούν και με κυτταρογενετικές τεχνικές διότι συνήθως μεταβάλλουν όχι μόνο την αναλογία των βραχιόνων αλλά και το πρότυπο ζώνωσης. Μια περικεντρική αναστροφή μπορεί να οδηγήσει σε μη ισοζυγισμένους γαμέτες στους οποίους συγχρόνως υπάρχει διπλασιασμός και έλλειμμα ορισμένων χρωμοσωμικών τμημάτων.



**Εικ. 5.** Σχηματισμός παρακεντρικών και περικεντρικών αναστροφών

Ο κίνδυνος ενός φορέα να αποκτήσει απόγονο με μη ισοζυγισμένο χρωμοσωμικό υλικό είναι 1%-10%. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε έμβρυα με γενετικές ανωμαλίες ή και ανώμαλη ανάπτυξη ή αυξημένο κίνδυνο αποβολής. Εκτός από την πιθανότητα της αποβολής, αν η αναστροφή γίνει στα χρωμοσώματα της γυναίκας, έχουμε 8% πιθανότητα να γεννηθεί νεογνό με συγγενή ανωμαλία ενώ εάν να είναι στον άντρα η πιθανότητα είναι 5%. (Gardner RJM 1989).

Στις μεταθέσεις έχουμε ανταλλαγή χρωμοσωμικών τμημάτων μεταξύ ομόλογων και μη ομόλογων χρωμοσωμάτων. Στις ισοζυγισμένες χρωμοσωμικές μεταθέσεις τα τμήματα των χρωμοσωμάτων αλλάζουν τη γεωγραφική θέση τους χωρίς οποιαδήποτε απώλεια ή κέρδος του γενετικού υλικού. Ένα στα 600 νεογέννητα θα εμφανίσουν μια ισοζυγισμένη χρωμοσωμική μετάθεση (The ESHRE Capri Workshop Group 2008). Αποτελούν μια σημαντική αιτία των επαναλαμβανόμενων αποβολών επειδή είναι συνήθειες. Σε ποσοστό 4%-7% ζευγαριών που έχουν καθ' έξιν αποβολές, ο ένας από τους δύο θα εμφανίσει κάποιο είδος μετάθεσης (Rai R et al.,2006; Farcas S. et al.,2007). Υπάρχουν δυο κύριοι τύποι μεταθέσεων:

α) κατά Robertson. Στις μεταθέσεις κατά Robertson, παίρνουν μέρος δύο ακροκεντρικά χρωμοσώματα (13, 14, 15, 21 και 22) όπου έχουμε ένωση των μεγάλων βραχιόνων (q) κοντά στην περιοχή του κεντρομερούς, με ταυτόχρονη απώλεια των μικρών βραχιόνων τους (p), με αποτέλεσμα το χρωμόσωμα που φέρει τη μετάθεση να αποτελείται από τους μεγάλους βραχίονες των δυο ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων. Επειδή οι μικροί βραχίονες περιέχουν πολλά αντίγραφα γονιδίων που εκφράζουν ριβοσωμικό RNA η απώλεια τους δεν είναι επιβλαβείς. Το 90% των μεταθέσεων κατά Robertson συμβαίνουν μεταξύ μη ομόλογων χρωμοσωμάτων ενώ το 10% ανάμεσα σε ομόλογα χρωμοσώματα. (Kim SR et al.,2002).

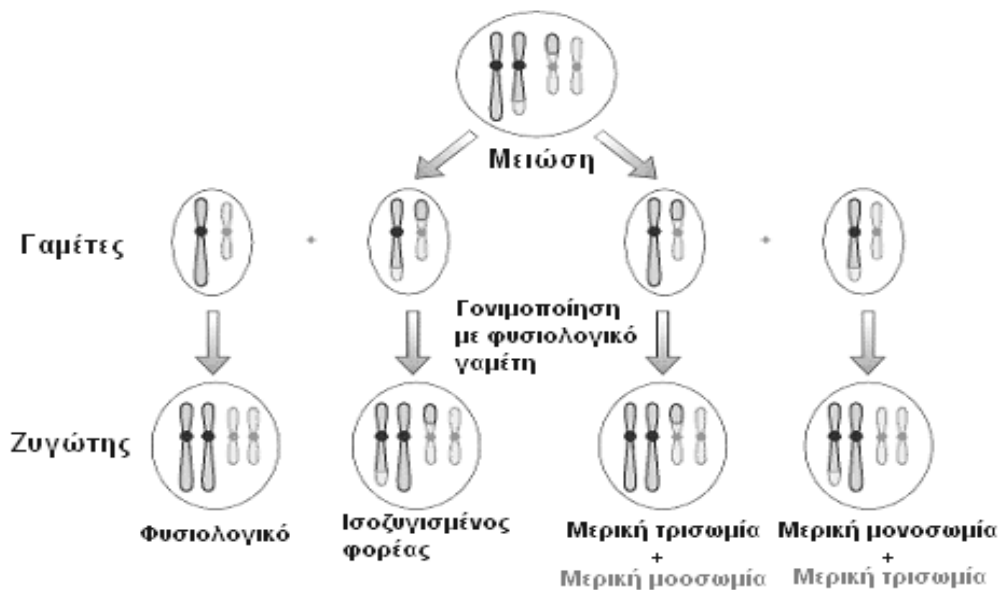
Περίπου 1/1000 άτομα φέρουν μια μετάθεση κατά Robertson (Hamerton et al.,1975; Kim SR et al.,2002) καθιστώντας αυτό το είδος μετάθεσης την πιο συχνή δομική ανωμαλία. Παρά το γεγονός ότι φορείς τέτοιων μεταθέσεων είναι φαινομενικά φυσιολογικοί, υπάρχει μεγάλος κίνδυνος να παράγουν ανώμαλους γαμέτες με αποτέλεσμα να προκύψει μη φυσιολογικός απόγονος με τρισωμία ή ΜΓΔ λόγω μη σωστού διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων (Berend et al.,2000, Kim SR et al.,2002).

Οι μεταθέσεις κατά Robertson μεταξύ των χρωμοσωμάτων 14q21q και 13q14q αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό όλων των παρατηρούμενων μεταθέσεων κατά Robertson στο γενικό πληθυσμό (Shaffer et al.,2000, Kim SR et al.,2002).

Η μετάθεση 14q21q αντιπροσωπεύει το 82-85% των περιπτώσεων.(Kim SR et al.,2002; Chen CP. et al.,2010). Το 69% των μεταθέσεων 14q21q είναι de novo και το 31% προέρχονται από μεταθέσεις των γονέων. (Chen CP. et al.,2010). Οι Daniel et al αναφέρουν ότι σε μεταθέσεις κατά Robertson που περιλαμβάνουν το χρωμόσωμα 21 και τα ένα από τα χρωμοσώματα 13, 14 και 15, όταν φορέας της μετάθεσης είναι η μητέρα το ποσοστό εμφάνισης τρισωμίας 21 στον απόγονο είναι 10-15%, ενώ όταν φορέας της μετάθεσης είναι ο πατέρας το ποσοστό ανέρχεται στο 2-5% (Chen CP. et al.,2010). Η συχνότητα εμφάνισης της μετάθεση 13q14q στον πληθυσμό είναι 76%. Όλοι οι άλλοι τύποι μεταθέσεων κατά Robertson εμφανίζονται σε ποσοστό 15% στον πληθυσμό (Shaffer LG. et al.,2000).Φορείς τέτοιων μεταθέσεων έχουν υψηλό κίνδυνο να αποκτήσουν απογόνους με τρισωμία 21 ή τρισωμία 13 (Kalitsis P et al., 1993).

Οι απόγονοι ατόμων που είναι φορείς μεταθέσεων κατά Robertson των χρωμοσωμάτων 13q14q, μπορεί να είναι φαινοτυπικά φυσιολογικοί (χωρίς μετάθεση ή φορείς ισοζυγισμένης μετάθεσης) ή παθολογικοί (τρिसωμία 13, μονοσωμία 13, τρισωμία 14, μονοσωμία 14) (Kalitsis P et al.,1993). Το ίδιο ισχύει και για τις άλλες

μεταθέσεις μεταξύ μη ομόλογων χρωμοσωμάτων (Εικ.6). Περίπου το 43% των εμβρύων με τρισωμία 13 χάνονται μέχρι την 16η εβδομάδα της κύησης, και το ποσοστό είναι ουσιαστικά υψηλότερο στο πρώτο τρίμηνο, ενώ το 50% των παιδιών που γεννιούνται με τρισωμία 13 πεθαίνουν κατά τον πρώτο μήνα της ζωής τους (Jacobs PA et al.,1987). Η τρισωμία 14 δεν δίνει βιώσιμο έμβρυο (Kim SR et al.,2002). Ο κίνδυνος να προκύψει ένα παθολογικό έμβρυο όταν οι γονείς είναι φορείς μιας τέτοιας μετάθεσης είναι 1% (Kim SR et al.,2002; Silverstein S. et al.,2002).



**Εικ. 6.** Αποτέλεσμα κατά Robertson μετάθεσης μεταξύ δυο ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων

β) «αμοιβαίες», οι οποίες είναι αποτέλεσμα δύο θραύσεων που συμβαίνουν σε δυο μη ομόλογα χρωμοσώματα και αμοιβαίας ανταλλαγής των τμημάτων. Επειδή η ανταλλαγή των τμημάτων είμαι αμοιβαία ο αριθμός των χρωμοσωμάτων παραμένει αναλλοίωτος. Οι αμοιβαίες μεταθέσεις δεν έχουν συνήθως κλινική/ φαινοτυπική σημασία για το άτομο που τις φέρει, αλλά συνδέονται με υψηλό κίνδυνο παραγωγής μη ισοζυγισμένων γαμετών και κατ' επέκταση παθολογικά έμβρυα.

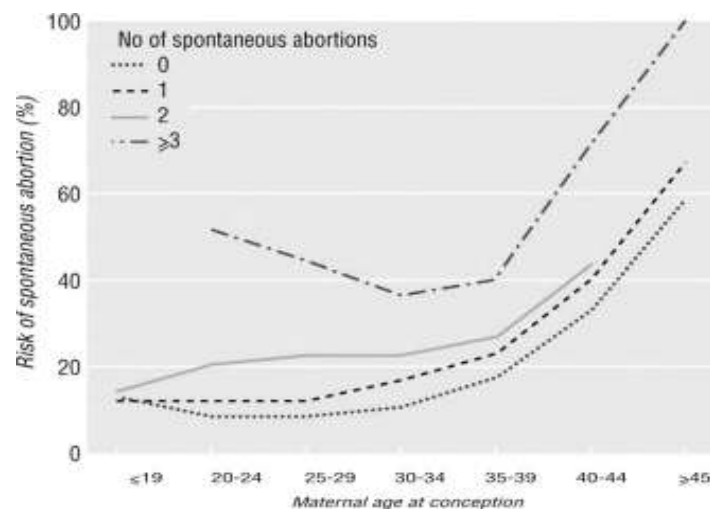
Όταν ένας γονέας φέρνει μια ισοζυγισμένη χρωμοσωμική μετάθεση, η πιθανότητα γέννησης ενός ζωντανού βρέφους με μη ισοζυγισμένη χρωμοσωμική σύσταση (έλλειμμα ή περίσσεια) είναι συνήθως περίπου 1%-15%. Ο ακριβής κίνδυνος εξαρτάται από τα συγκεκριμένα χρωμοσώματα, το μέγεθος του τμήματος που περιλαμβάνεται στην μετάθεση, το φύλο του γονέα και το οικογενειακό ιστορικό. Επίσης η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση των παθολογικών χρωμοσωμάτων παίζει ορισμένες φορές, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις πολύ μικρών ή

σύνθετων ανακατατάξεων, σημαντικό ρόλο για τον υπολογισμό του κινδύνου (Thompson & Thompson; Farcas S. et al., 2007).

### 1.3.2 Ηλικία της Μητέρας

Η ηλικία της μητέρας συσχετίζεται με την εμφάνιση συγκεκριμένων χρωμοσωμικών ανωμαλιών στις αυτόματες αποβολές. Σε γυναίκες άνω των 35 ετών, η ποιότητα των ωαρίων ελαττώνεται δραματικά, οι τυχαίες χρωμοσωμικές ανωμαλίες γίνονται πιο συχνές και συνεπώς ο κίνδυνος της αποβολής αυξάνει.

Π.χ ο κίνδυνος αποβολής σε μια κλινικά αναγνωρισμένη κύηση αυξάνεται από 12% σε γυναίκες ηλικίας άνω των 20 ετών σε 26% σε γυναίκες ηλικίας άνω των 40 ετών (Okuyama K.1992). Το ποσοστό των χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε αποβαλλόμενα έμβρυα των γυναικών κάτω των 40 ετών φέρεται να είναι 48-65%. Το ποσοστό αυξάνεται σε 92% σε γυναίκες ηλικίας άνω των 40 ετών (Okuyama K. 1992; Saton K.1991; Nybo Andersen et al.,2000).



**Εικ. 7.** Κίνδυνος αποβολής εμβρύου σύμφωνα με την μητρική ηλικία στη σύλληψη (Nybo Andersen et al.,2000)

### 1.3.3 Μωσαϊκισμός

Στις χρωμοσωμικές ανωμαλίες που έχουν κλινική σημασία περιλαμβάνονται και οι μωσαϊκές χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες.

Ο μωσαϊκισμός μπορεί να προκύψει εάν ο μη διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων συμβεί μετά τη γονιμοποίηση δυο φυσιολογικών γαμετών, δηλαδή στις μιτωτικές διαιρέσεις που ακολουθούν την δημιουργία του ζυγωτού, όπου και θα προκύψουν ανευπλοειδικές κυτταρικές σειρές. Τότε το έμβρυο θα αποτελείται

συγχρόνως από κυτταρικές σειρές με ανευλοειδικά και φυσιολογικά κύτταρα. (Solveig M.V 2005)

Ο μωσαϊκισμός συναντάται στο 5% των περιπτώσεων τρισωμίας 21 και δεν σχετίζεται με την ηλικία της μητέρας. Είναι γνωστό ότι το 30%-70% των συλλήψεων με τρισωμία 21 θα χαθούν κατά την διάρκεια της κύησης και έχει προταθεί ότι τα έμβρυα με τρισωμία 21 που επιβιώνουν πιθανόν εμφανίζουν κάποιο ποσοστό μωσαϊκισμού με φυσιολογική γενετική σύσταση.



## **2. ΜΟΝΟΓΟΝΕΪΚΗ ΔΙΣΩΜΙΑ (ΜΓΔ) (Uniparental disomy-UPD)**

Η έννοια της μονογονεϊκής δισωμίας (ΜΓΔ) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Engel το 1980. Είναι η μεταβίβαση και των δύο ομόλογων χρωμοσωμάτων από τον ένα μόνο γονέα στο παιδί, χωρίς να υπάρχει καθόλου συμμετοχή του χρωμοσώματος του άλλου γονέα.. Η ΜΓΔ μπορεί να είναι μητρική ή πατρική. Μητρική μονογονεϊκή δισωμία (μητΜΓΔ-matUPD) όταν και τα δύο αλληλόμορφα κληρονομούνται από την μητέρα και πατρική μονογονεϊκή δισωμία (πατΜΓΔ-patUPD) όταν και τα δύο αλληλόμορφα κληρονομούνται από τον πατέρα.

Η πρώτη κλινική περίπτωση ΜΓΔ που δημοσιεύτηκε ήταν το 1988 και αφορούσε ένα κορίτσι με κυστική ίνωση και με ασυνήθιστα χαμηλό ανάστημα που εμφάνισε δύο αντίγραφα μητρικής προελεύσεως του χρωμοσώματος 7 (μητΜΓΔ7) (Spence JE 1988). Λίγο αργότερα δημοσιεύτηκε μια ακόμα περίπτωση μητΜΓΔ15 σε παιδί με φαινότυπο του συνδρόμου Prader-Willi (PWS) (Nicholls RD. et al.,1989). Ακολούθησε μια ακόμη περίπτωση πατΜΓΔ15 η οποία αφορούσε παιδί με σύνδρομο Angelman (Nicholls RD. et al.,1992; Nicholls RD. 1993 ).

Τόσο η μητρική όσο και η πατρική ΜΓΔ έχει αναφερθεί για τα περισσότερα χρωμοσώματα στον άνθρωπο εκτός από τα χρωμοσώματα 19 και Y για μητΜΓΔ και 4,17,18 και 19 για πατΜΓΔ (Liehr T. 2010). Η ΜΓΔ εμφανίζεται πιο συχνά στα χρωμοσώματα 15,11,7 και 16 αλλά μεγαλύτερη συχνότητα εμφανίζει το χρωμόσωμα 15 (D. Kotzot 2008). Στα χρωμοσώματα 1, 2 και 6 εμφανίζεται λιγότερο συχνά, ενώ τα υπόλοιπα χρωμοσώματα εμφανίζουν ΜΓΔ σπάνια. (Liehr T. 2010). Η συχνότητα της μονογονεϊκής δισωμίας έχει υπολογιστεί περίπου στις 2.8/10.000 γεννήσεις (Engel E. 1980,). Παθολογικά ευρήματα έχουν συνδεθεί με ΜΓΔ στα χρωμοσώματα 6,7, 11,14,15 και 22 (Kotzot D. 2008).

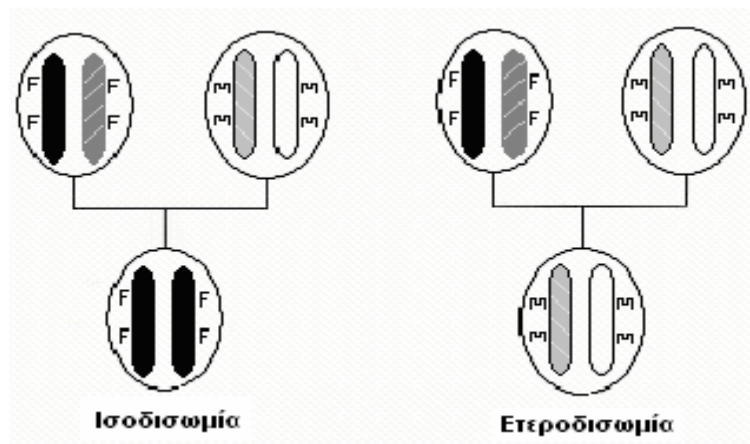
### **2.1 Ετεροδισωμία – Ισοδισωμία**

Σημαντικό ρόλο παίζει τότε και με ποίο τρόπο κληρονομείται η ΜΓΔ. Η ΜΓΔ μπορεί να συμβεί τόσο κατά την πρώτη όσο και κατά την δεύτερη μειωτική διαίρεση ή ακόμα και μεταζυγωτικά.. Υπάρχουν δύο τύποι ΜΓΔ ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο κληρονομείται: μονογονεϊκή ετεροδισωμία (heterodisomy) και μονογονεϊκή ισοδισωμία (isodisomy).

Ετεροδισωμία (hUPD) είναι η κληρονόμηση ενός ζεύγους ομόλογων χρωμοσωμάτων (διαφορετική σύσταση DNA ή δύο διαφορετικά αλληλόμορφα

γονίδια) από τον ίδιο γονέα, ως αποτέλεσμα μη διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση και αφορά ολόκληρα χρωμοσώματα ή μεταθέσεις κατά Robertson.

Ισοδισωμία (iUPD) είναι η μη φυσιολογική κληρονόμηση του ίδιου ομόλογου χρωμοσώματος (ίδια σύσταση DNA και ίδια αλληλόμορφα γονίδια) από τον έναν μόνο γονέα ως αποτέλεσμα μη διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων κατά την δεύτερη μειωτική διαίρεση. Η ισοδισωμία είναι το αποτέλεσμα μειωτικού ή μιτωτικού διπλασιασμού του ενός γονεϊκού χρωμοσώματος και αφορά και ισοχρωμοσώματα (εικόνα 8) (Kotzot D. 1999; Kotzot D. 2004; Preece MA et al.,2000; Eggermann T et al.,2002; Nikitina T.V et al.,2004).



**Εικ. 8: Ισοδισωμία (iUPD):** η μεταβίβαση του ενός αλληλομόρφου από τον ένα γονέα, **Ετεροδισωμία (hUPD):** η μεταβίβαση των δύο διαφορετικών ομόλογων χρωμοσωμάτων από τον ένα γονέα.

## 2.2 Μηχανισμοί δημιουργίας της ΜΓΔ

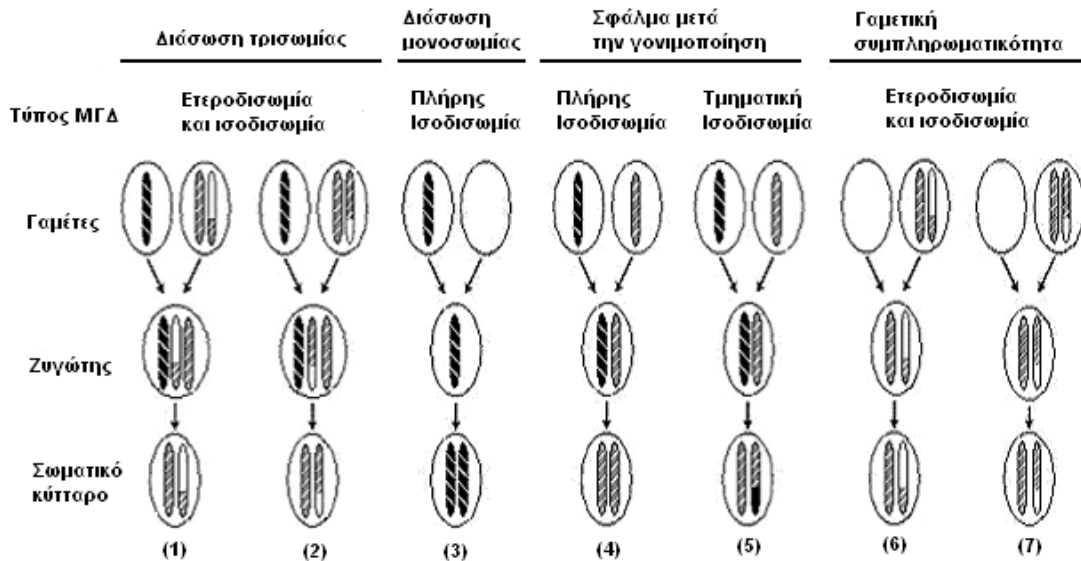
Διάφοροι μηχανισμοί σε συνδυασμό με λάθη κατά τον μιτωτικό ή μειωτικό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων έχουν αναφερθεί για την δημιουργία ΜΓΔ (Εικ.9):

α) Διάσωση τρισωμίας (trisomic zygote rescue) στα πρώτα στάδια δημιουργίας του ζυγωτού.

β) Διάσωση μονοσωμίας (monosomy rescue) στα πρώτα στάδια της κύησης (στο ζυγωτό) με διπλασιασμό του χρωμοσώματος

γ) Σφάλμα μετά την γονιμοποίηση (postfertilization error) και

δ) Συμπληρωματικότητα των γαμετών. Γονιμοποίηση ενός δισωμικού ωαρίου (ή σπερματοζωαρίου) με ένα σπερματοζωάριο (ή ωάριο) στο οποίο απουσιάζει το ίδιο χρωμόσωμα. (gamete complementation).



**Εικ. 9.** Μηχανισμοί που οδηγούν σε ΜΓΔ.. 1) και 2) διάσωση τρισωμίας: η γονιμοποίηση ενός δισωμικού γαμέτη από ένα φυσιολογικό γαμέτη που ακολουθείται από την απώλεια ενός χρωμοσώματος για το σχηματισμό ενός φυσιολογικού γαμέτη, 3) διάσωση μονοσωμίας: η γονιμοποίηση ενός φυσιολογικού γαμέτη από έναν γαμέτη χωρίς κανένα χρωμόσωμα και διπλασιασμός του μονοσωμικού χρωμοσώματος, 4) σφάλμα μετά την γονιμοποίηση: μη σωστός διαχωρισμός κατά την μιτωτική διαίρεση και διπλασιασμός του ίδιου χρωμοσώματος, 5) σφάλμα μετά την γονιμοποίηση: μιτωτικός ανασυνδυασμός ή μετατροπή γονιδίων, 6) και 7) γαμετική συμπληρωματικότητα: η γονιμοποίηση ενός δισωμικού γαμέτη από γαμέτη χωρίς κανένα χρωμόσωμα. Οι μηχανισμοί 3), 4) και 5) μπορεί να συμβούν μόνο κατά τη μίτωση. Οι μηχανισμοί 1) και 6) μπορεί να συμβούν κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση και οι 2), 7) στην δεύτερη μειωτική διαίρεση. Γεγονότα μωσαϊκισμού είναι δυνατόν να συμβούν κατά τον 1), 2), 4) και 5) μηχανισμό δημιουργίας της ΜΓΔ. (Yamazawa K. et al., 2010)

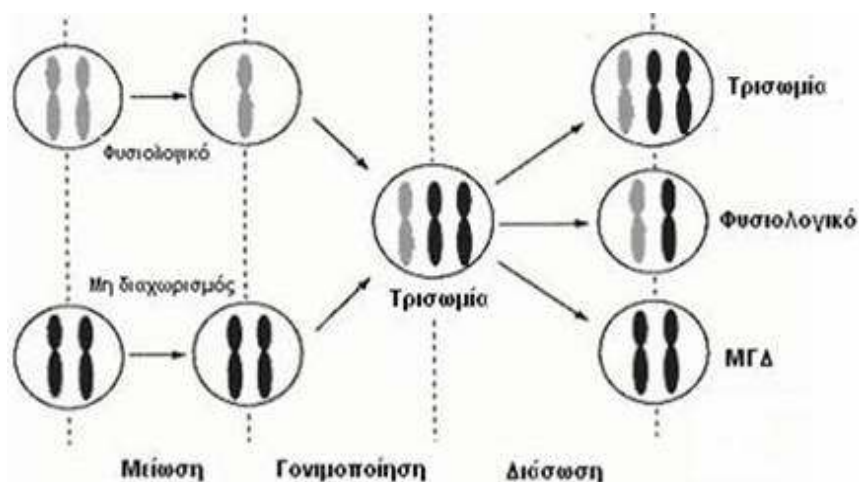
Οι πιο πιθανοί μηχανισμοί για τον σχηματισμό της ΜΓΔ είναι η διάσωση τρισωμίας και μονοσωμίας. Οι μηχανισμοί: σφάλμα μετά τη γονιμοποίηση και γαμετική συμπληρωματικότητα συμβάλλουν επίσης στο σχηματισμό της ΜΓΔ, αλλά είναι σπάνιοι (Kotzot D. 1999; Shaffer et al., 2001; Preece MA et al., 2000; Eggermann T et al., 2002).

## 2.2.1 Διάσωση

Κατά την διάσωση ενός τρισωμικού ή μονοσωμικού γαμέτη προς σχηματισμό του φυσιολογικού, τέσσερα πράγματα μπορεί να συμβούν: (a) διάσωση με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός υπολειπόμενου χαρακτηριστικού, (b) διάσωση με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαταραχής με εμφανή κλινικά χαρακτηριστικά συνδρόμων με αποτύπωση, (c) διάσωση με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαταραχών και των δύο παραπάνω και (d) διάσωση με αποτέλεσμα την δημιουργία φυσιολογικού γαμέτη (Engel E 2006).

### 2.2.1.1 Διάσωση Τρισωμίας

Είναι γνωστό ότι η πλειοψηφία μη διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων συμβαίνει στην πρώτη μειωτική διαίρεση της μητέρας. Το αποτέλεσμα είναι να προκύψουν σε ποσοστό 50% δισωμικοί θηλυκοί γαμέτες και 50% γαμέτες χωρίς κανένα χρωμόσωμα. Αν γονιμοποιηθεί ο δισωμικός θηλυκός γαμέτης με φυσιολογικό σπερματοζώαριο (απλοειδές) τότε θα προκύψει τρισωμικός ζυγώτης (εμφάνιση τρισωμίας) (Kotzot D. 1999; Preece MA et al.,2000; Kotzot D 2001, Shaffer et al.,2001; Zhang YX et al.,2009). Συνεπώς είναι πιο πιθανό η τρισωμία να αποτελείται από δύο μητρικά και ένα πατρικό χρωμόσωμα (Dawson AJ et al.,2011). Η διάσωση τρισωμίας (trisomy rescue) αναφέρεται στο φαινόμενο όπου το έμβρυο ξεκινά σαν τρισωμικό και στην πορεία χάνεται το ένα από τα τρία χρωμοσώματα. Εάν τα χρωμοσώματα που διατηρούνται μετά την διάσωση προέρχονται από τον ένα μόνο γονέα τότε το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ΜΓΔ. (Εικ 10). Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί τον πιο συχνό μηχανισμό δημιουργίας ΜΓΔ. Η τρισωμία φαίνεται να συμβαίνει συχνότερα σε κάποια χρωμοσώματα από ότι σε άλλα (32% των περιπτώσεων τρισωμίας αφορούν το χρωμόσωμα 16, 13% το χρωμόσωμα 21, 10% το χρωμόσωμα 15) (Matei J. et al.,1979).



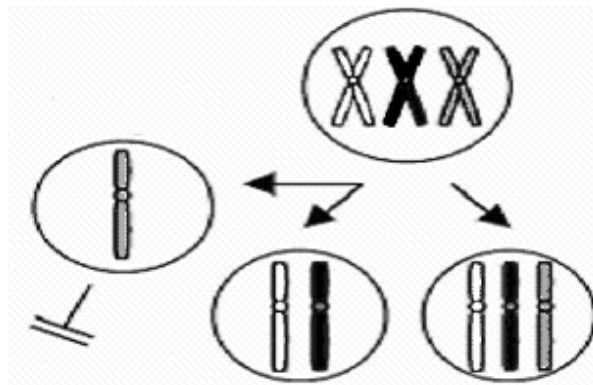
**Εικ.10.** Εμφάνιση ΜΓΔ μετά από δημιουργία τρισωμικού ζυγώτη (trisomy rescue). Τα χρωμοσώματα μητρικής προέλευσης εμφανίζονται με μαύρο χρώμα, ενώ τα πατρικής προέλευσης με γκρι χρώμα.

Το αποτέλεσμα της διάσωσης του τρισωμικού ζυγώτη μπορεί να διαφέρει και εξαρτάται από το αν το λάθος συμβεί στην πρώτη ή τη δεύτερη μειωτική διαδικασία και να έχουμε εμφάνιση ετεροδισωμίας ή ισοδισωμίας αντίστοιχα (εικ. 11 και 12).

Μη σωστός διαχωρισμός στην 1<sup>η</sup> μειωτική διαίρεση δημιουργεί έναν γαμέτη με δύο ομόλογα, μη όμοια χρωμοσώματα. Αν χαθεί το χρωμόσωμα πατρικής

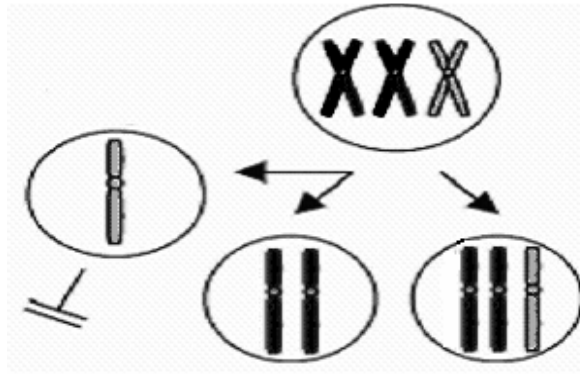
προέλευσης λόγω τρισωμικής διάσωσης τότε θα σχηματιστεί μητΜΓΔ και επειδή το σφάλμα γίνεται στην πρώτη μειωτική διαίρεση η ΜΓΔ που θα προκύψει θα είναι ετεροδισωμία. (Shaffer LG et al.,2001; Dawson AJ et al.,2011).

Στην εικόνα 11 το γκρι χρωμόσωμα είναι πατρικής προελεύσεως, ενώ το λευκό και το μαύρο μητρικής προελεύσεως. Το λευκό και το μαύρο χρωμόσωμα προέρχονται μετά από σφάλμα στην πρώτη μειωτική διαίρεση. Ο τρισωμικός γαμέτης περιέχει τρία αντίγραφα χρωμοσωμάτων, δύο μητρικά και ένα πατρικό. Υπάρχουν τρεις πιθανές επιλογές για τον τρισωμικό ζυγότυπο: 1) το ένα μητρικό (π.χ λευκό) χρωμόσωμα μπορεί να αποβληθεί, αφήνοντας το άλλο μητρικό (μαύρο) και το πατρικό (γκρι) χρωμόσωμα, με αποτέλεσμα την δημιουργία φυσιολογικού γαμέτη, 2) να αποβληθεί το μητρικό (μαύρο) χρωμόσωμα, αφήνοντας το άλλο μητρικό (λευκό) και το πατρικό (γκρι) χρωμόσωμα, με αποτέλεσμα την δημιουργία φυσιολογικού γαμέτη, ή 3) να αποβληθεί το πατρικό (γκρι) χρωμόσωμα, αφήνοντας τα δύο μητρικά (λευκό και μαύρο) χρωμοσώματα με αποτέλεσμα την δημιουργία μητΜΓΔ. Τα δύο πρώτα μοντέλα οδηγούν στη διγονεϊκή δισωμία (biparental disomy (BPD)). Υπάρχει πιθανότητα 1 στις 3 ο τρισωμικός γαμέτης να οδηγήσει σε ΜΓΔ.



**Εικ. 11.** Διάσωση τρισωμίας μετά από σφάλμα στην 1<sup>η</sup> μειωτική διαδικασία.

Εάν ο τρισωμικός ζυγότυπος προκύψει μετά από μη σωστό διαχωρισμό στην 2<sup>η</sup> μειωτική διαίρεση (εικόνα 12), ομοίως η απώλεια του γκρι χρωμοσώματος οδηγεί σε μητΜΓΔ, μόνο που αυτή τη φορά τα μητρικά χρωμοσώματα είναι όμοια και η ΜΓΔ που προκύπτει είναι ισοδισωμία.



**Εικ 12.** Διάσωση τρισωμίας μετά από σφάλμα στην 2<sup>η</sup> μειωτική διαδικασία

Η τρισωμία που σχετίζεται με μεταθέσεις κατά Robertson μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία ΜΓΔ μετά από απώλεια ενός χρωμοσώματος λόγω τρισωμικής διάσωσης στο 50% των περιπτώσεων (Shaffer LG et al.,2001).

### 2.2.1.2 Διάσωση Μονοσωμίας

Μετά από σφάλμα στην πρώτη μειωτική διαίρεση της μητέρας, σε ποσοστό 50% θα προκύψει γαμέτης χωρίς κανένα χρωμόσωμα. Γονιμοποίηση αυτού του γαμέτη με φυσιολογικό σπερματοζωάριο (απλοειδές) θα δώσει ένα μονοσωμικό ζυγότη.

Οι αυτοσωμικές μονοσωμίες είναι μη βιώσιμες και μονοσωμικά έμβρυα αποβάλλονται νωρίς κατά την εμβρυογένεση (Shaffer et al.,2000; Nikitina T.V et al.,2004). Βιώσιμο έμβρυο θα μπορούσε να προκύψει μέσω μεταζυγωτικού διπλασιασμού του μονοσωμικού χρωμοσώματος. Συνεπώς, η διάσωση του μονοσωμικού ζυγότη θα γίνει με διπλασιασμό του πατρικού χρωμοσώματος.

Η σχετικά σπάνια διάσωση μονοσωμίας μετά από διπλασιασμό του μονοσωμικού χρωμοσώματος κατά την διάρκεια της μίτωσης οδηγεί σε ισοδισωμία. Επομένως η πατΜΓΔ είναι πιο πιθανό να εμφανίζεται ως ισοδισωμία (Berend SA et al.,2000; Shaffer LG et al.,2001; Kim SR et al.,2002; Zhang YX et al.,2009; Dawson AJ et al.,2011). Εκτός από μια περίπτωση ετεροδισωμίας, όλες οι πατΜΓΔ είναι ισοδισωμίες (Kotzot D. 2008). Ακόμα ο μηχανισμός αυτός έχει προταθεί για τις περισσότερες περιπτώσεις του συνδρόμου Angelman με ΜΓΔ και σε μια περίπτωση ΜΓΔ21 σε αυτόματη αποβολή. Η διάσωση μονοσωμίας σχετίζεται και με την εμφάνιση ισοχρωμοσώματος. (Nikitina T.V et al.,2004)

### **2.2.2 Σφάλμα μετά την γονιμοποίηση (postfertilization error)**

Αυτός ο μηχανισμός (postfertilization error) προκύπτει όταν ένας φυσιολογικός γαμέτης γονιμοποιείται από άλλον φυσιολογικό γαμέτη, αλλά στη συνέχεια το ένα ομόλογο χρωμόσωμα χάνεται και το άλλο διπλασιάζεται και αντίστροφα (Kotzot D. 1999; Kotzot D. 2001).

### **2.2.3 Συμπληρωματικότητα γαμετών (gamete complementation)**

Η γαμετική συμπληρωματικότητα, προκύπτει όταν ένας γαμέτης που έχει προκύψει μετά από διπλό σφάλμα κατά την μειωτική διαίρεση, γονιμοποιηθεί από γαμέτη χωρίς κανένα χρωμόσωμα. Αυτός ο μηχανισμός πιθανώς είναι αρκετά σπάνιος διότι περιλαμβάνει τον μη διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και στη μητρική και στην πατρική γαμετογένεση, δηλαδή κατά τον σχηματισμό του μητρικού και του πατρικού γαμέτη, και στη συνέχεια ένωση αυτών των δύο ανευπλοειδικών γαμετών προς σχηματισμό του διπλοειδούς ζυγώτη (Kotzot D. 1999; Kotzot D. 2001).

## **2.3 Σύνθετη και τμηματική ΜΓΔ (Complex and segmental UPD)**

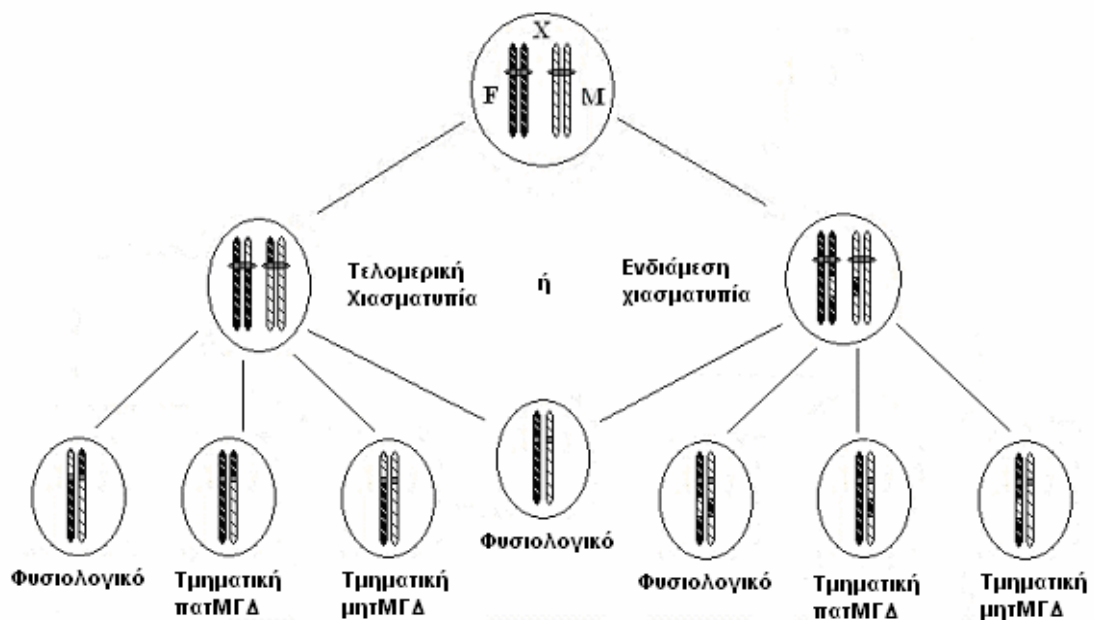
Η μονογονεϊκή δισωμία δεν αφορά αποκλειστικά ολόκληρο το χρωμόσωμα αλλά μπορεί να περιλαμβάνει και τμήμα χρωμοσώματος (ενδιάμεσο ή τελομερικό) και χαρακτηρίζεται ως τμηματική ΜΓΔ ή ολόκληρο το χρωμόσωμα σε συνδυασμό με χρωμοσωμικές ανακατατάξεις όπου χαρακτηρίζεται ως σύνθετη ΜΓΔ.

Η σύνθετη ΜΓΔ υποδιαιρείται σε έξι ομάδες: α) ΜΓΔ ενός ολόκληρου χρωμοσώματος που περιλαμβάνει μια απλή μετάθεση ή μεταθέσεις κατά Robertson σε δύο μη ομόλογα ακροκεντρικά χρωμοσώματα, β) ΜΓΔ με μεταθέσεις κατά Robertson μεταξύ ομόλογων ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων, γ) ΜΓΔ που συνδέεται με ισοχρωμοσώματα του μικρού και του μεγάλου βραχίονα ενός μη ακροκεντρικού χρωμοσώματος δ) ΜΓΔ δακτυλιοειδούς χρωμοσώματος, ε) "sensu strictu" σύνθετη ΜΓΔ που ορίζεται ως η ΜΓΔ ενός τμήματος ή ολόκληρου χρωμοσώματος άμεσα συνδεδεμένη με δομική ή αριθμητική ανωμαλία και τέλος ζ) μωσαϊκισμός μητρικής ή πατρικής ΜΓΔ όλου του γενώματος.

Η σύνθετη ΜΓΔ μπορεί να προκύψει σύμφωνα με τους μηχανισμούς της γαμετικής συμπληρωματικότητας, διάσωση τρισωμίας και μονοσωμίας, κατά την διάρκεια μιτωτικού σφάλματος σε συνδυασμό με απλές μεταθέσεις ή μεταθέσεις κατά Robertson και κατά τον σχηματισμό ισοχρωμοσώματος (Liehr T. 2010; Kotzot D. 2008).

Τμηματική ΜΓΔ ορίζεται η ΜΓΔ ενός τμήματος του χρωμοσώματος (ενδιάμεσο ή τελομερικό) που προέρχεται μόνο από τον ένα γονέα, σε συνδυασμό με την φυσιολογική κληρονόμηση του υπόλοιπου χρωμοσωμικού υλικού (εικ. 13) Τμηματική ΜΓΔ μπορεί να προκύψει λόγω μεταζυγωτικών σωματικών ανασυνδυασμών μεταξύ του μητρικού και του πατρικού ομολόγου (ως αποτέλεσμα ίσης σωματικής χιασματυπίας), ή σε συνδυασμό με αριθμητικές ή και δομικές χρωμοσωμικές ανακατατάξεις. Ανασυνδυασμός στο τελικό άκρο του χρωμοσώματος (τελομερές) γίνεται με ένα μόνο συμμετρικό σπάσιμο κατά μήκος του χρωμοσώματος, ενώ για τον ενδιάμεσο ανασυνδυασμό απαιτούνται δύο σπασίματα. Μόλις συμβεί αυτό, εμφανίζεται μια μωσαϊκή χρωμοσωμική κατάσταση με ταυτόχρονη παρουσία του αρχικού τμήματος του χρωμοσώματος και τμημάτων των χρωμοσωμάτων που προέκυψαν από τον ανασυνδυασμό (Engel E. 2006; Kotzot D. 2008).

Οι περισσότερες περιπτώσεις τμηματικής ΜΓΔ έχουν διαγνωστεί κατά τύχη, όπως στην περίπτωση ομοζυγωτίας πιθανών κληρονομήσιμων μεταλλάξεων στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα του ενός γονέα ή σε ασθενείς με εμφανή κλινικά χαρακτηριστικά συνδρόμων με αποτύπωση (Kotzot D. 2008).



Εικ. 13. Δημιουργία τμηματικής ΜΓΔ τελομερικού ή ενδιάμεσου τμήματος χρωμοσώματος.



## 2.4 Αποτελέσματα δημιουργίας ΜΓΔ

Η ύπαρξη δισωμίας σε τμήμα ή ολόκληρο το χρωμόσωμα μπορεί να οδηγήσει:

1. Σε γέννηση παιδιού με αυτοσωμικό υπολειπόμενο νόσημα, εάν απουσιάζει το υγιές αλληλόμορφο
2. Μετάδοση φυλοσύνδετου νοσήματος από τον πατέρα στον γιο ή στην εκδήλωση φυλοσύνδετου υπολειπόμενου νοσήματος σε θηλυκό άτομο
3. Την ανάπτυξη παθολογικού φαινοτύπου όταν αφορά τμήμα του γονιδιώματος που υφίσταται γονιδιακή αποτύπωση.

## 2.5 Προβλήματα που σχετίζονται με την εμφάνιση της ΜΓΔ

Η μονογονεϊκή δισωμία δεν έχει κλινική εμφάνιση αλλά μπορεί να σχετίζεται με προβλήματα όπως: α) ο πλακουντικός ή ακόμα και εμβρυϊκός μωσαϊκισμός συνήθως λόγω της τρισωμικής διάσωσης, 2) ομοζυγωτία πιθανών κληρονομήσιμων μεταλλάξεων στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα, και 3) ανωμαλίες που σχετίζονται με την γονιδιακή αποτύπωση (genomic imprinting).

### 2.5.1 Γονιδιακή αποτύπωση (Genomic Imprinting)

Τα δύο γονιδιώματα (μητρικό-πατρικό) είναι απαραίτητα αλλά όχι ισοδύναμα.. Αποτύπωση είναι η διαφορετική έκφραση γονιδίου, ανάλογα με τη γονεϊκή προέλευση (μητρική ή πατρική). Η γονιδιακή αποτύπωση αποτελεί έναν επιγενετικό μηχανισμό γονιδιακής ρύθμισης, ο οποίος καθορίζει την διαφορετική έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων από το ένα μόνο αλληλόμορφο, πατρικής ή μητρικής προέλευσης. Στην περίπτωση αυτή και τα δύο αλληλόμορφα είναι παρόντα (μητρικό και πατρικό), αλλά λειτουργικά ενεργό είναι μόνο το ένα. Στην περίπτωση που ένα γονίδιο εκφράζεται μόνο από το πατρικό χρωμόσωμα το μητρικό αλληλόμορφο είναι αδρανοποιημένο, ενώ ένα γονίδιο που εκφράζεται μόνο στο μητρικό χρωμόσωμα το πατρικό αλληλόμορφο είναι αδρανοποιημένο.

Έχει παρατηρηθεί ότι τα αποτυπωμένα γονίδια καθώς και οι χρωμοσωμικές περιοχές που εντοπίζονται εμφανίζουν κοινά φυσικοχημικά, γενετικά και επιγενετικά χαρακτηριστικά. Τα αποτυπωμένα γονίδια συγκεντρώνονται συνήθως σε συγκεκριμένες χρωμοσωμικές περιοχές, σχηματίζοντας ομάδες γονιδίων (gene clusters). Αυτό το πρότυπο οργάνωσης πιστεύεται ότι αντανακλά μία συντονισμένη ρύθμιση των γονιδίων της συγκεκριμένης περιοχής. Σε αρκετές από αυτές τις χρωμοσωμικές περιοχές έχει εντοπιστεί ένα κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης

(Imprinting Centre- IC), το οποίο είναι απαραίτητο για τον έλεγχο της γονιδιακής αποτύπωσης και την ρύθμιση της έκφρασης των αποτυπωμένων γονιδίων. Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής των αλληλουχιών των περιοχών αυτών, έδειξε την ύπαρξη δύο στοιχείων λειτουργικής σημασίας: οι περιοχές αυτές είναι πλούσιες σε CpG νησίδες, καθώς και σε επιπλέον νουκλεοτιδικές επαναλήψεις, οι οποίες εντοπίζονται γύρω από τις CpG νησίδες. Η ύπαρξη των χαρακτηριστικών αυτών δομών φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην διατήρηση του διαφορετικού προτύπου μεθυλίωσης του αποτυπωμένου αλληλομόρφου (Rek W. Et al.,2001).

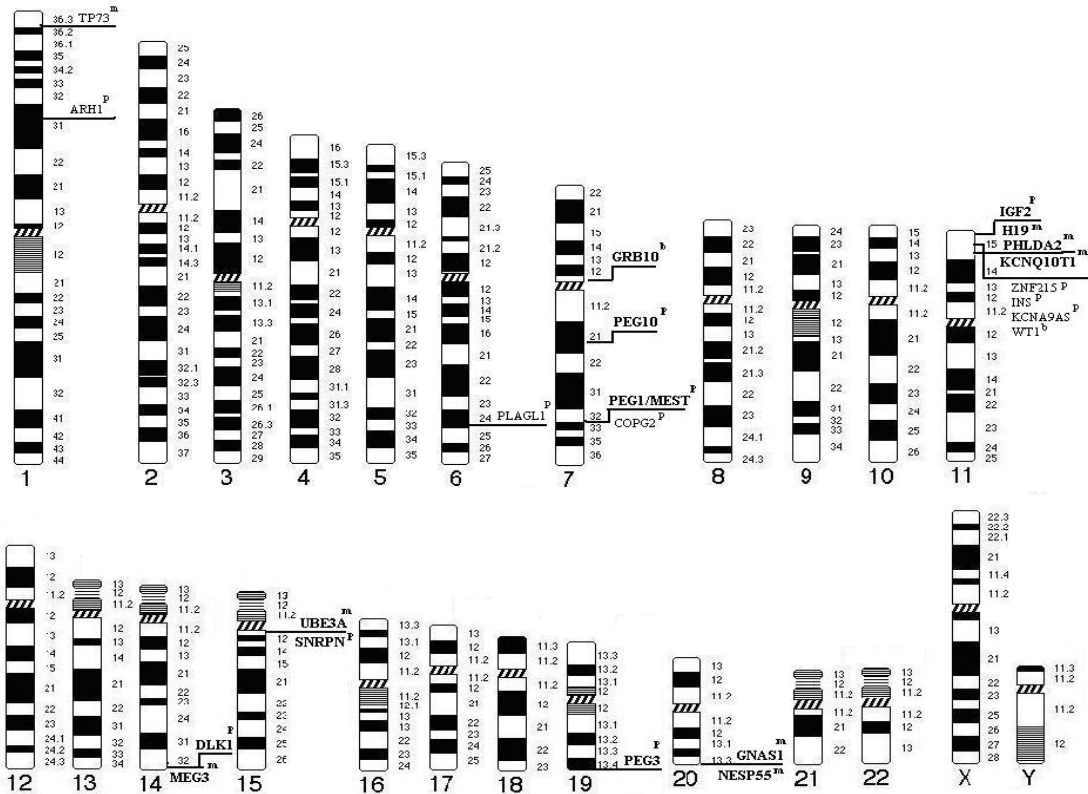
Το μητρικό και το πατρικό αλληλόμορφο ενός αποτυπωμένου γονιδίου, έχουν διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης. Αυτές οι διαφορετικά μεθυλωμένες περιοχές είναι γνωστές ως DMRs (Differentially Methylated Regions) και φαίνεται να διαθέτουν διαφορετικές ιδιότητες και διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης κατά την διάρκεια της ανάπτυξης τόσο στα γαμετικά όσο και στα σωματικά κύτταρα. Ελλείψεις στις DMRs έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια της γονιδιακής αποτύπωσης (Loss of imprinting-LOI) (Scarano et al.,2005).

Από την άλλη, τα γονιδιακά προϊόντα των αποτυπωμένων γονιδίων εμφανίζουν ομοιότητες μόνο σε λειτουργικό επίπεδο, λαμβάνοντας υπόψη τον ρόλο που παίζουν στην εμβρυϊκή ανάπτυξη.

### **2.5.1.1 Συνέπειες διαταραχών της γονιδιακής αποτύπωσης**

Αλλαγές στην έκφραση των αποτυπωμένων γονιδίων αποτελεί την αιτία για 10 περίπου σύνδρομα και ασθένειες του ανθρώπου. Ελλείψεις και αλλοιωμένο πρότυπο μεθυλίωσης στην περιοχή του IC έχει συσχετισθεί με απώλεια της γονιδιακής αποτύπωσης και την εκδήλωση ασθενειών (σύνδρομα Prader Willi και Angelman) (Morison et al.,2005). Τα χρωμοσώματα που περιέχουν και το μεγαλύτερο ποσοστό αποτυπωμένων γονιδίων είναι τα χρωμοσώματα 6,7,11,14 και 15 (Εικ. 14).

Τα πιο γνωστά σύνδρομα που οφείλονται σε μεγάλο ποσοστό σε διαταραχές της ρύθμισης των αποτυπωμένων γονιδίων είναι τα σύνδρομα PWS και AS. Η μελέτη των μοριακών μηχανισμών παθογένεσης των δύο συνδρόμων έχει συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση βιολογικών φαινομένων όπως η γονιδιακή αποτύπωση και η ΜΓΔ.



**Εικ.14.** Χρωμοσωμικός χάρτης αποτυπωμένων γονιδίων. **p:** εκφράζονται από τον πατέρα, **m:** εκφράζονται από την μητέρα, **b:** εκφράζονται και από τους δύο γονείς

### 2.5.1.2 Γονιδιακή αποτύπωση και ΜΓΔ

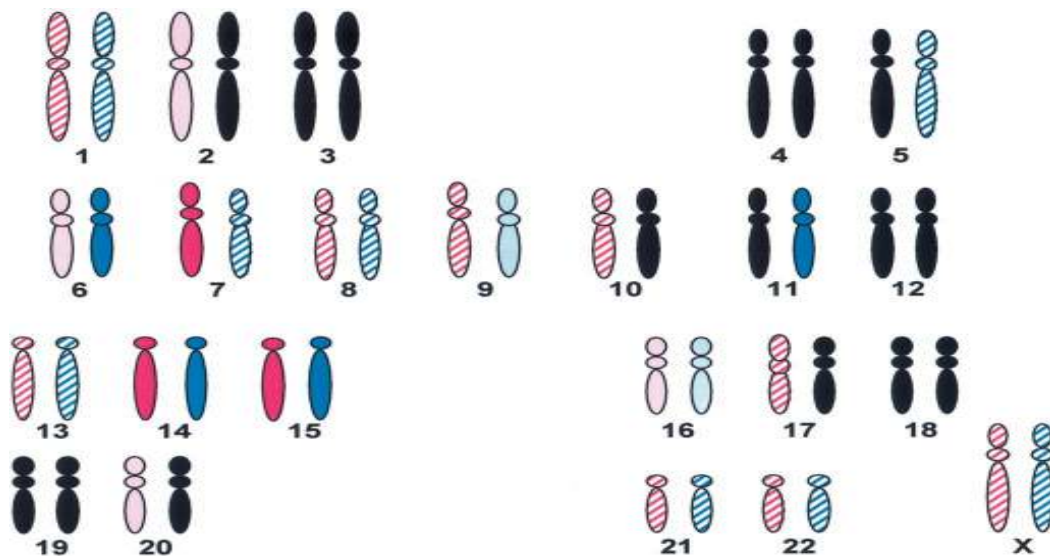
Η ιδέα ότι ένας μηχανισμός όπως η γονιδιακή αποτύπωση μπορεί να εξηγήσει λειτουργικές διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ του μητρικού και του πατρικού γονιδιώματος, προτάθηκε το 1984 από δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες (McGrath and Solter, 1984; Surani et al., 1984) οι οποίες έδειξαν ότι έμβρυα που έχουν είτε μόνο 2 θηλυκούς είτε μόνο 2 αρσενικούς προπυρήνες, εμφανίζουν πρόιμη εμβρυϊκή θνησιμότητα και σε καμία περίπτωση δεν ολοκληρώνεται η ανάπτυξή τους. Επομένως η συμβολή της μητρικής και της πατρικής γενετικής πληροφορίας είναι απαραίτητη για την φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Μελέτες έχουν δείξει ότι γονίδια τα οποία ρυθμίζονται επιγενετικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της τροφοβλάστης και των εμβρυϊκών ιστών στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης και είναι σημαντικά για την εμβρυϊκή ανάπτυξη κατά την εμβρυϊκή αλλά και την νεογνική περίοδο και συγκεκριμένα, όταν είναι πατρικής προελεύσεως συμβάλουν στην φυσιολογική αύξηση του εμβρύου και στην σωστή ανάπτυξη του πλακούντα ενώ όταν είναι μητρικής προελεύσεως, στον περιορισμό της αύξησης του εμβρύου. (Kondo Y. et al., 2004; Tsukishiro S et

al.,2005; McMinn J. et al.,2005; Kotzot D. 2008; Barton SC et al.,1984; McGrath and Solter, 1984).

Η εμφάνιση της ΜΓΔ σε χρωμοσώματα όπου δεν υπάρχουν αποτυπωμένα γονίδια δεν επιφέρει σοβαρές συνέπειες στο φαινότυπο ενώ η ΜΓΔ χρωμοσωμάτων που φέρουν αποτυπωμένα γονίδια μπορεί να οδηγήσει σε υπερέκφραση ή υποέκφραση των γονιδίων αυτών και στην εμφάνιση κλινικών φαινοτύπων ή συνδρόμων (Warren JE. et al.,2008; Nikitina T.V et al.,2004).

Στην εικόνα 15 φαίνονται τα χρωμοσώματα στα οποία έχει αναφερθεί η ΜΓΔ με ή χωρίς γονίδια με αποτύπωση.



**Εικ. 15.** Σχηματική αναπαράσταση των χρωμοσωμάτων στα οποία έχει αναφερθεί ΜΓΔ και γονίδια με αποτύπωση. Μαύρο: όχι ΜΓΔ, Φούξια και μπλε: ΜΓΔ και αποτυπωμένα γονίδια, Ροζ και γαλάζιο: ΜΓΔ και πιθανόν και αποτυπωμένα γονίδια, Ριγέ ροζ και μπλε: ΜΓΔ χωρίς αποτυπωμένα γονίδια.. Ροζ : χρωμόσωμα μητρικής προέλευσης. Μπλε: χρωμόσωμα πατρικής προέλευσης (Ledbetter and Engel,1995).

Επομένως αν έχουμε ΜΓΔ σε περιοχή του γονιδιώματος που υπάρχουν γονίδια με «αποτύπωση» τότε θα υπάρχει σίγουρα διαταραχή του προτύπου έκφρασής τους και κλινικές επιπτώσεις. Δηλαδή π.χ. αν έχουμε πατρική ΜΓΔ δεν θα εκφράζονται τα γονίδια που αναμένεται να εκφραστούν από τη μητέρα κ.ο.κ.. Η μη φυσιολογική αποτύπωση μπορεί να οδηγήσει σε γενετικές διαταραχές στον άνθρωπο (Kondo Y. et al.,2004; Tsukishiro S et al.,2005; Eggermann et al.,2002).

Εφόσον η εμφάνιση της ΜΓΔ σε χρωμοσώματα που φέρουν αποτυπωμένα γονίδια επηρεάζει τη φυσιολογική ανάπτυξη, μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι αυτόματες αποβολές αποτελούν μία από τις ομάδες όπου παρατηρείται αυξημένη συχνότητα ΜΓΔ (Nikitina T.V et al.,2004). Η υπόθεση αυτή βασίζεται στο ότι το 40-

50% των αποβαλλόμενων εμβρύων έχουν φυσιολογικό καρυότυπο. Επειδή όμως ο καρυότυπος δεν μπορεί να ανιχνεύσει ανωμαλίες των αποτυπωμένων γονιδίων, δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι ορισμένα έμβρυα μπορούν να έχουν ταυτόχρονα φυσιολογικό καρυότυπο και ΜΓΔ για ένα συγκεκριμένο χρωμόσωμα (Mitter D.2006; Nikitina T.V et al.,2004).

### 2.5.1.3 Κλινικά Σύνδρομα και ΜΓΔ

Οι τελευταίες δύο δεκαετίες αποκαλύπτουν κλινική συσχέτιση της ΜΓΔ με διαταραχές αποτύπωσης, όπως τα κλινικά σύνδρομα: α) Prader–Willy (PWS) (μητΜΓΔ15) και Angelman (AS) (πατΜΓΔ15), β) Silver Russell (SRS) (μητΜΓΔ7), γ) Beckwith–Wiedemann (BWS) (πατΜΓΔ11), δ) νεογνικός σακχαρώδης διαβήτης (DMTN) (πατΜΓΔ6) κ.α.(Giardina E. et al.,2008; Shaffer et al.,2001) (πίνακας 3).

**Πίνακας 3.** ΜΓΔ και κλινικά σύνδρομα

Χρωμόσωμα	ΜΓΔ-αναφερθείσες περιπτώσεις ή % ποσοστό	Φαινότυπος	Αναφορά
6	Π 20	Νεογνικός σακχαρώδης διαβήτης ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης (IUGR )και μακρογλωσσία	Kotzot D. 2005
7	M 50% 5%	Προ και μετα γενετική καθυστέρηση ανάπτυξης, ήπια νοητική καθυστέρηση και δυσμορφίες προσώπου. Σύνδρομο Silver-Russel	Kotzot D. 2000 Kotzot D. 2008, Kotzot D. 2005
11	Π ΜΓΔ11 20%	Προ και μετα γενετική αύξηση, αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης εμβρυονικών νεοπλασμάτων. Σύνδρομο Beckwith-Wiedemann	Kotzot D. 2005
14	M 50	Νοητική υστέρηση, ψυχοκινητικά προβλήματα	Kotzot D. 2005
	Π 20	Ομόλογες και μη ομόλογες μεταθέσεις κατά Robertson Οι πιο πολλές περιπτώσεις πεθαίνουν λίγο μετά τη γέννηση ή λίγο αργότερα. Σχετίζεται με ομόλογες ή μη μεταθέσεις κατά Robertson	Kotzot D. 2005, Curtis L et al. 2006
15	M 25-30%	Σύνδρομο Prader-Willi	Kotzot D. 2008
	Π 2%-3%	Σύνδρομο Angelman	
16	M,Π	Νοητική υστέρηση, δυσμορφίες προσώπου	Kotzot D. 2008
	M 50	IUGR	
20	Π 50	Τρισωμικός μωσαϊκισμός (θνησιγενές για τον άνθρωπο)	Kotzot D. 2005
	M 4	Σε συνδυασμό με αριθμητικές και δομικές ανακατατάξεις.	
	Π 1	ΑΗΟ, ψευδουποπαραθυρεοειδισμός	Kotzot D. 2008

M: μητρική, Π: πατρική

### **α) Σύνδρομο Prader–Willi και Angelman**

Τα σύνδρομα αυτά προκύπτουν κυρίως από την απώλεια έκφρασης αποτυπωμένων γονιδίων της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13. Η περιοχή 15q11-q13 αποτελεί μία από τις καλύτερα μελετημένες περιοχές αποτυπωμένων γονιδίων. Απώλεια της γονιδιακής έκφρασης της περιοχής 15q11-q13 του πατρικού αλληλομόρφου οδηγεί στην εκδήλωση του PWS, ενώ αντίστοιχα απώλεια των αποτυπωμένων γονιδίων της συγκεκριμένης χρωμοσωμικής περιοχής στο μητρικό αλληλόμορφο, αποτελεί την αιτία εμφάνισης του AS. Η έλλειψη αυτή ευθύνεται για το 70% των ασθενών με PWS και για το 65- 70% των ασθενών με AS (Giardina E. et al.,2008; Nicholls RD.1993).

Τα κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του PWS περιλαμβάνουν αναπτυξιακή καθυστέρηση, κοντό ανάστημα, κοντά άκρα, ήπια διανοητική καθυστέρηση με μαθησιακές δυσκολίες, υπογοναδισμός καθώς και συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του προσώπου (αμυγδαλοειδές σχήμα ματιών και στενό μέτωπο). Η συχνότητα του συνδρόμου υπολογίζεται ~1/ 10.000- 1/ 15.000 (Williams CA et al.,1995; Nicholls RD.1993).

Τα κλινικά χαρακτηριστικά του AS στα πρώτα χρόνια ζωής του ασθενούς είναι παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται στο PWS και για τον λόγο αυτό είναι συχνά δύσκολη η διάγνωση μεταξύ των 2 αυτών συνδρόμων. Τα πρώτα συμπτώματα του AS είναι καθυστέρηση ομιλίας, μυϊκή υποτονία, αδυναμία συγχρονισμού των κινήσεων, σοβαρή αναπτυξιακή διαταραχή καθώς και διανοητική καθυστέρηση, συχνό γέλιο, χαρούμενη διάθεση καθώς και διαταραχές ύπνου. Τυπικά χαρακτηριστικά του προσώπου παιδιών με AS, περιλαμβάνουν μικροκεφαλία, προεξέχουσα γλώσσα, προγναθισμό και συχνά στραβισμό. Η συχνότητα του συνδρόμου υπολογίζεται ~ 1/15.000 – 1/ 20.000 (Williams CA et al.,1995).

Ποσοστό ίσο με 25-30% των ασθενών με PWS οφείλεται στην εμφάνιση μητρικής ΜΓΔ15 (Kotzot D. 2008) ενώ σε ποσοστό 1-3% έχει βρεθεί ότι φέρουν μεταλλάξεις στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης (imprinting centre) της περιοχής 15q11-q13. Στις μισές από αυτές τις περιπτώσεις, οι μεταλλάξεις οφείλονται σε μικρή έλλειψη που εντοπίζεται στο γονίδιο SNRPN (Πιν. 4) (Ohta T. et al.,1999; Giardina E. et al.,2008; Shaffer et al.,2001; Nicholls RD. 1993).

Σε ποσοστό 3-5% των ασθενών με AS οφείλεται στην εμφάνιση πατρικής ΜΓΔ15 (Kotzot D. 2008) ενώ σε ποσοστό 7-9% φέρουν αλλαγές στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης της περιοχής 15q11-q13. Το 4-6% των ασθενών με AS

φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο UBE3A (Πιν. 4) ενώ ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με AS (10-14%) δεν εντοπίζεται καμία διαταραχή στην περιοχή 15q11-q13. (Jiang Y. et al,1998; Giardina E. et al.,2008; Shaffer et al.,2001; Nicholls RD.1993).

### **β) Σύνδρομο Silver–Russell**

Το σύνδρομο Silver-Russell (SRS) σχετίζεται με προγενετική και μεταγενετική καθυστέρηση ανάπτυξης, τριγωνικό πρόσωπο και άλλα δυσμορφικά χαρακτηριστικά. Η συχνότητα του συνδρόμου είναι 1/75000 γεννήσεις (Butler MG. 2009). Σε ποσοστό 10% των περιπτώσεων με περιορισμένη ενδομήτρια αύξηση (IUGR) εμφανίζουν μητΜΓΔ7, η οποία είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση του συνδρόμου SRS. Στην πατΜΓΔ7 η ενδομήτρια αύξηση είναι φυσιολογική. Έχουν βρεθεί δύο κρίσιμες περιοχές του χρωμοσώματος 7 που περιέχουν γονίδια που ρυθμίζονται επιγενετικά και περιλαμβάνουν διπλασιασμό της περιοχής 7q11.2–p13 και 7q32–qter μητρικής προελεύσεως που σχετίζονται με περιορισμένη ενδομήτρια αύξηση. Άλλες περιπτώσεις εμφανίζουν διπλασιασμούς της περιοχής 7p11.2-p13 που εντοπίζεται το γονίδιο GRB10 στο χρωμόσωμα 7 ή μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού. Ακόμα τα αποτυπωμένα γονίδια MEST και PEG1 (Πιν. 4) που βρίσκονται στην περιοχή 7p13 παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη. Η περιοχή αυτή περιέχει πλήθος αποτυπωμένων γονιδίων που ελέγχουν την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Shaffer et al.,2001; Butler MG. 2009).

### **γ) Σύνδρομο Beckwith–Wiedemann**

Το σύνδρομο BWS σε ποσοστό 20% οφείλεται σε διαταραχή των αποτυπωμένων γονιδίων IGF2, H19 (Πιν. 4) και p57<sup>KIP2</sup> που εντοπίζονται στην χρωμοσωμική περιοχή 11p15. Το BWS μπορεί ακόμα να προκύψει μετά από μεταλλάξεις του γονιδίου p<sup>57KIP2</sup> ή μετά την δημιουργία τμηματικής πατΜΓΔ11. Τα χαρακτηριστικά του συνδρόμου είναι αυξημένη ανάπτυξη, μακρογλωσσία, ομφαλοκύλη και ανάπτυξη εμβρυϊκών όγκων. Σε ελάχιστες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί ισορροπημένες μεταθέσεις και αναστροφές στην συγκεκριμένη περιοχή όπου προέρχονταν από ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων της μητέρας. (Kotzot D. 2005; Shaffer et al.,2001)

#### **δ) Νεογνικός σακχαρώδης διαβήτης**

Η συχνότητα εμφάνισης του DMTN είναι 1/400000 ή 1/500000 νεογνά σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Σε μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων δεν ανευρίσκεται κάποια συγκεκριμένη αιτία, αλλά σε λίγες περιπτώσεις έχει βρεθεί διπλασιασμός του μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 6. Το 20% των περιπτώσεων εμφανίζουν πατΜΓΔ6. Το γονίδιο ZAC/PLAGL1 είναι αποτυπωμένο και φαίνεται να σχετίζεται με την εμφάνιση του συνδρόμου (Shaffer et al.,2001).

#### **ε) Σύνδρομο χρωμοσώματος 14**

Η χρωμοσωμική περιοχή 14q23–14q24.2 του χρωμοσώματος 14 περιέχει αποτυπωμένα γονίδια και άτομα με μητΜΓΔ14 της περιοχής αυτής εμφανίζουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά όπως ήπια νοητική υστέρηση, ήπια δυσμορφικά χαρακτηριστικά, σκολίωση, δυσμορφικά χαρακτηριστικά προσώπου κ.α. Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις μητΜΓΔ14 σε σχέση με μωσαϊκισμό, μεταθέσεις κατά Robertson και ισοχρωμοσώματα. Άτομα με πατΜΓΔ14 εμφανίζουν πιο σοβαρά χαρακτηριστικά σε σχέση με άτομα με μητΜΓΔ14, όπως νοητική υστέρηση, σκελετικές ανωμαλίες, μικρό θώρακα, αναπνευστικές δυσλειτουργίες, δυσμορφικά χαρακτηριστικά προσώπου και σκολίωση (Shaffer et al.,2001). Ακόμα η μητΜΓΔ14 έχει συνδεθεί με καθυστέρηση ανάπτυξης εμβρύου και πρόσφατα έχει προταθεί ότι πιθανόν να πρόκειται για μια μη καλά αξιολογημένη αιτία με μεγαλύτερη συχνότητα. Αποτυπωμένα γονίδια όπως τα DLK1 (Πιν. 4) και GTL2 που εντοπίζονται στην περιοχή 14q32 φαίνεται επίσης πως σχετίζονται άμεσα με την εκδήλωση των παραπάνω χαρακτηριστικών (Butler MG. 2009).

#### **στ) Σύνδρομα που συσχετίζονται με το γονίδιο GNAS1**

Το γονίδιο GNAS1 είναι υπεύθυνο για τη σωστή σωματική και σκελετική ανάπτυξη. Περιέχει 13 εξώνια, τα οποία κωδικοποιούν την πρωτεΐνη G και εντοπίζονται στην περιοχή 20q13.11 του χρωμοσώματος 20. Συγκεκριμένα είναι υπεύθυνα για την έκφραση της υπομονάδας “α” της πρωτεΐνης G. Μεταλλάξεις σε κάποιο εξώνιο του γονιδίου αυτού έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση της γενετικής διαταραχής Albright’s hereditary osteodystrophy (AHO). Η AHO οφείλεται σε μειωμένη έκφραση της υπομονάδας α της πρωτεΐνης G και χαρακτηρίζεται από μειωμένη ανάπτυξη και δυσμορφικά χαρακτηριστικά, που συχνά οφείλονται σε ανθεκτικότητα της παραθυρεοειδούς ορμόνης καθώς και σε άλλες που αναφέρονται



σε ψευδοϋποπαραθυροϊδισμό τύπου 1α (PHP). Η οστεοποίηση σε άτομα με ΑΗΟ είναι πιο ήπια σε σχέση με άτομα που παρουσιάζουν Progressive osseous heteroplasia (PHO) (Levine MA et al., 1991; Bastepe Murat et al., 2001).

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 6 περιπτώσεις ατόμων με PHP που εμφάνισαν πατΜΓΔ στην περιοχή 20q13.11 του χρωμοσώματος 20. Εμφάνιση μητΜΓΔ20 πιθανόν δεν σχετίζεται με την εμφάνιση του συνδρόμου. (Velissariou V. et al., 2002; Bastepe Murat et al., 2001, Fernández-Rebollo Eduardo et al., 2010)

**Πίνακας 4:** Αποτυπωμένα γονίδια και ΜΓΔ

Γονίδιο	Περιοχή	Έκφ	UPD	Ρόλος και συνέπειες	Σύνδρομο
GRB10	7q12.2	b	M	-	SRS
PEG1/MEST	7q32.2	Π	M	Ανάπτυξη πλακούντα και εμβρύου	SRS, IUGR
PEG10	7q21	Π	M	Υποέκφραση προκαλεί αποβολή	SRS
IGF2	11p15.5	Π	Π	Εμβρυϊκή ανάπτυξη	BWS, SRS
H19	11p15.5	M	Π	Ανάπτυξη εμβρυϊκών και εξωεμβρυϊκών ιστών	SRS
PHLDA2	11p15.5	M		Έλεγχος ανάπτυξης πλακούντα και εμβρύου	IUGR
KCNQ10T1	11p15.4	M	Π	Συμμετέχει στην ανάπτυξη του πλακούντα και του εμβρύου. Έλλειψη προκαλεί εμβρυϊκή θνησιμότητα στα ποντίκια (10%)	BWS
MEG3/GTL2	14q32.2	M	Π	Οργάνωση και ανάπτυξη πλακούντα, προγενετική θνησιμότητα στα ποντίκια	Φαινότυπος πατΜΓΔ14
DLK1	14q32.2	Π	M	Play a role in neuroendocrine differentiation	Φαινότυπος μητΜΓΔ14
UBE3A	15q11.2	M	Π		AS
SNRPN	15q11.2	Π	M		PWS
PEG3	19q13.4	Π	M	Δυσπλασία πλακούντα και διακοπή ανάπτυξης	
GNAS	20q13.32	b	Π	-	AHO

Π: πατρική, M: μητρική, b: διγονική, SRS: Σύνδρομο Silver –Russell, BWS: Σύνδρομο Beckwith-Wiedemann, IUGR: Περιορισμένη ενδομήτρια ανάπτυξη, AS: Σύνδρομο Angelmann, PWS: Σύνδρομο Prader-Willy, AHO: Albright’s hereditary osteodystrophy

## **Z) Σύνδρομο Smith-Lemli-Opitz**

Το σύνδρομο Smith-Lemli-Opitz (SLOS syndrome) είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή που προκύπτει από μεταλλάξεις του γονιδίου DHCR7 που βρίσκεται στην περιοχή 11q13 του χρωμοσώματος 11. Το γονίδιο DHCR7 είναι υπεύθυνο για την ρύθμιση της σύνθεσης της χοληστερόλης. Έχουν βρεθεί πάνω από 100 μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού, ενώ τα άτομα που φέρουν τέτοιες μεταλλάξεις χαρακτηρίζονται από νοητική υστέρηση, χαρακτηριστικό προσωπείο, καθυστέρηση ανάπτυξης, υποτονία, και άλλα δυσμορφικά χαρακτηριστικά όπως συνδακτυλία, πολυδακτυλία κ.τ.λ. Η συχνότητα εμφάνισης του συνδρόμου είναι 1/15000 και 1/60000 γεννήσεις. Η διαφορά στην συχνότητα των μεταλλάξεων μπορεί να

οφείλεται μερικώς στην αποβολή κατά το πρώτο τρίμηνο προσβεβλημένων εμβρύων που φέρουν μεταλλάξεις του γονιδίου DHCR7 τα οποία όμως δεν εξετάζονταν.(Waye JS. et al.,2007)

#### **2.5.1.4 Γονίδια με αποτύπωση στον άνθρωπο και στον ποντικό**

Βασισμένοι σε μελέτες που υπολογίζουν ότι στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν περίπου 29.000 CpG νησίδες, ο αριθμός των αποτυπωμένων γονιδίων ανέρχεται στα 100. Το πρώτο αποτυπωμένο γονίδιο στο γονιδίωμα των θηλαστικών ταυτοποιήθηκε το 1991 (DeChiara TM. et al.,1991). Πρόκειται για το γονίδιο Igf2 (Insulin- like growth factor 2).

Υπάρχουν περιοχές στα χρωμοσώματα του ανθρώπου που είναι κοινές με περιοχές των χρωμοσωμάτων του ποντικού. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 83 αποτυπωμένα γονίδια στο γονιδίωμα του ανθρώπου και του ποντικού και έχουν εντοπιστεί σε 27 συνολικά χρωμοσωμικές περιοχές, από τις οποίες οι 13 αποτελούν γονιδιακά αποτυπωμένες περιοχές που περιέχουν ομάδες αποτυπωμένων γονιδίων. Από τα ήδη ταυτοποιημένα αποτυπωμένα γονίδια, τα 63 κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Τα υπόλοιπα (25 συνολικά) κωδικοποιούν μη μεταφραζόμενα RNA, ορισμένα από τα οποία φαίνεται να συμμετέχουν έμμεσα στην γονιδιακή αποτύπωση, ρυθμίζοντας την έκφραση άλλων αποτυπωμένων γονιδίων (Morison IM et al.,2005).

Τα αποτελέσματα της διαταραχή της αποτύπωσης, σε σχέση με την εμφάνιση της ΜΓΔ, έχει μελετηθεί εκτενώς στα ποντίκια και περίπου τα μισά από αυτά σχετίζονται με εμβρυϊκή θνησιμότητα (Nikitina T.V et al.,2004). Συνεπώς, μπορεί η εμφάνιση ΜΓΔ σε ορισμένα χρωμοσώματα στο άνθρωπο να προκαλέσει πρόωρη εμβρυϊκή θνησιμότητα. Τα χρωμοσώματα αυτά είναι τα 2, 9, 11, 16, 19, 20 και 21 (πίνακας 5) (Nikitina T.V et al.,2004).

Το χρωμόσωμα 2 του ανθρώπου έχει κοινές περιοχές με τα χρωμοσώματα 2 και 11 του ποντικού. Στα ποντίκια, η εμφάνιση ΜΓΔ2 σχετίζεται με πρόωρη εμβρυϊκή θνησιμότητα, ενώ η εμφάνιση της ΜΓΔ11 συνδέεται με περιορισμένη ανάπτυξη του εμβρύου (Nikitina T.V et al.,2004; Cattanach B.M et al.,1994). Το χρωμόσωμα 7 του ποντικού έχει κοινές περιοχές με τα χρωμοσώματα 11, 15 και 16 του ανθρώπου. Η δημιουργία μητΜΓΔ στο άνω ακραίο τμήμα του χρωμοσώματος 7 του ποντικού οδηγεί στο θάνατο των εμβρύων στο μέσο της κύησης, ενώ η δημιουργία πατΜΓΔ οδηγεί σε πρόωρη εμβρυϊκή θνησιμότητα. Εμφάνιση μητΜΓΔ του κεντρικού τμήματος του χρωμοσώματος 7 του ποντικού οδηγεί σε νεογνικό

θάνατο, όπως επίσης και η μητΜΓΔ του κάτω ακραίου τμήματος του χρωμοσώματος 7 του ποντικού, ενώ εμφάνιση πατΜΓΔ στην περιοχή αυτή οδηγεί σε μείωση του χρόνου επιβίωσης σε μεταγεννητικό στάδιο. Δημιουργία μητΜΓΔ στην αντίστοιχη περιοχή 19q13.4 του ανθρώπου στον ποντικό που περιέχει το γονίδιο *reg3* μπορεί να οδηγήσει σε νεογνική θνησιμότητα (Nikitina T.V et al.,2004; Kuroiwa Y. et al.,1996). Το χρωμόσωμα 20 του ανθρώπου περιέχει ομόλογες περιοχές με το κάτω τμήμα του χρωμοσώματος 2 του ποντικού, όπου εμφάνιση ΜΓΔ οδηγεί σε θάνατο μετά τη γέννηση (Nikitina T.V et al.,2004).

**Πίνακας 5:** ΜΓΔ και εμβρυϊκή θνησιμότητα

Χρ	ΜΓΔ	Φαινότυπος – Χαρακτηριστικά	Αναφορές
2	M	Ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης, υποθυρεοειδισμός	Hansen W.f. et al. 1997, Nikitina T.V et al., 2004
9	M	1 περίπτωση σε συνδυασμό με CPM	Fritz B. 2001, Slater H.R.2000
	P	Θνησιμότητα	Nikitina T.V et al., 2004
11	M	Θάνατος στα πρώτα στάδια της ενδομήτριας ανάπτυξης	Nikitina T.V et al., 2004, Webb A. et al 1995
	P	BWS, 1 περίπτωση : εμβρυϊκός θάνατος στις 19 –20 εβδομάδες	
16	M	Ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης , μωσαϊκή τρισωμία 16 στον πλακούντα (πάνω από 50 περιπτώσεις)	Yong PJ. 2002
	P	Μια περίπτωση χωρίς φαινοτυπικές διαφορές	Nikitina T.V et al., 2004
19	-	Σπάνιο σε αυτόματες αποβολές. Σχετίζεται με πρόωρη εμβρυϊκή θνησιμότητα ακόμα και σε προεμφύτευτικό στάδιο.	Hassold T. 1980, Nikitina T.V et al., 2004
20	M	Προ και μεταγενετική καθυστέρηση ανάπτυξης, έχει περιγραφεί κυρίως σε μωσαϊκή κατάσταση σε συνδυασμό με τρισωμία 20	Chudoba I et al. 1999, Eggermann T. 2001
	P	Ολική: δυσμορφικά χαρακτηριστικά προσώπου Τμηματική: ψευδουποπααραθυρεοειδισμός	Nikitina T.V et al., 2004
21	M	3 περιπτώσεις αυτόματων αποβολών	Fritz B. et al. 2001, Hederson DJ. 1994

M : μητρική ΜΓΔ, P: πατρική ΜΓΔ

### 2.5.2 Τρισωμικός μωσαϊκισμός

Ο τρισωμικός μωσαϊκισμός μπορεί να εμφανιστεί μετά από τη δημιουργία ΜΓΔ, (ετερο ή ισοδισωμίας) συχνά με την ανευπλοειδική κυτταρική σειρά να περιορίζεται στον πλακούντα. Παρόλο που ο μωσαϊκισμός μπορεί να οδηγεί σε αποβολή (Kotzot D. 2000), ο πραγματικός μωσαϊκισμός αντιπροσωπεύει μόνο το 0.125–0.2% των πρόωρων αποβολών (Liehr T. 2010; Zhang YX. et al.,2009). Στις περισσότερες περιπτώσεις ο μωσαϊκισμός αναφέρεται ως μωσαϊκισμός περιορισμένος

στον πλακούντα (CPM) σε ποσοστό 0,7-2% (Henderson DJ. 1994; Opstal D. et al.,1998).

Ο CPM είναι μια ειδική μορφή χρωμοσωμικού μωσαϊκισμού και αντιπροσωπεύει τη διαφορά στη γενετική σύσταση μεταξύ των κυττάρων του πλακούντα και του εμβρύου. Συγκεκριμένα παρατηρείται στους ιστούς του πλακούντα και όχι στους ιστούς του εμβρύου (Zhang YX. et al.,2009). Μπορεί να συμβεί στην μίτωση ή στην μείωση. Είναι πιθανότερο να συμβεί ως αποτέλεσμα της άνισης κατανομής των προγονικών κυττάρων του εμβρύου και του πλακούντα σε μια μωσαϊκή βλαστοκύστη (Opstal D. et al.,1998). Μεταζυγωτικά, μη σωστός διαχωρισμός στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του μοριδίου έχει ως αποτέλεσμα μεταγενέστερες διαιρέσεις των τρισωμικών κυττάρων. Ο διαχωρισμός των κυττάρων που ακολουθεί οδηγεί στη δημιουργία ευπλοειδικού εμβρύου και μωσαϊκού πλακούντα (Warren JE et al.,2008).

Σε ένα δεύτερο μηχανισμό, σφάλμα στη μειωτική διαίρεση κατά την διάρκεια της γαμετογένεσης οδηγεί στη δημιουργία τρισωμίας ακολουθούμενη από τρισωμική διάσωση σε ορισμένα κύτταρα και τον σχηματισμό δισωμίας σε αυτά. Το μορίδιο σε αυτή την περίπτωση περιέχει και ευπλοειδικά και ανευπλοειδικά κύτταρα που διαχωρίζονται τυχαία. Η διάσωση τρισωμίας αποτελεί τον κύριο μηχανισμό δημιουργίας της ΜΓΔ. Προκύπτει λοιπόν πως η ΜΓΔ σχετίζεται άμεσα με την εμφάνιση του CPM (Warren JE et al.,2008).

Η εμφάνιση του CPM ή του πραγματικού μωσαϊκισμού σε πολλές περιπτώσεις της ΜΓΔ δείχνουν ότι η τρισωμική διάσωση μπορεί να οφείλεται σε μη διαχωρισμό των χρωματίδων στη μετάφαση και στην ανάφαση κατά την πρώτη διαίρεση του ζυγώτη ή και αργότερα, με την διατήρηση της αρχικής χρωμοσωμικής σύστασης του ζυγώτη σε κάποια κύτταρα (Fritz B. et al.,1996; Robinson W.P. 1997;Opstal D. et al.,1998; Nikitina T.V et al.,2004).

Κάποια χρωμοσώματα φαίνεται να είναι πιο επιρρεπή στην εμφάνιση του CPM από κάποια άλλα και χρωμοσώματα που περιέχουν αποτυπωμένα γονίδια θα πρέπει να αξιολογούνται με μεγαλύτερη προσοχή σε σύγκριση με χρωμοσώματα που δεν φέρουν αποτυπωμένα γονίδια.

Ο CPM οδηγεί σε αποβολή και σε περιορισμένη ενδομήτρια ανάπτυξη σε ποσοστό μέχρι και 20% των περιπτώσεων (Warren JE et al.,2008; Saton K. et al.,1991; Hansen W.F. et al.,1997). Ο CPM με τρισωμία 16 έχει το υψηλότερο ποσοστό αποβολών (Warren JE et al.,2008).

### 2.5.3 Ομοζυγωτία πιθανών υπολειπόμενων κληρονομήσιμων μεταλλάξεων.

Μια ενδιαφέρουσα συνέπεια της μονογονεϊκής δισωμίας είναι ότι μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση μιας αυτοσωμικής υπολειπόμενης διαταραχής όταν μόνον ο ένας γονέας είναι φορέας για την εν λόγω διαταραχή. Εάν ένας γονέας (η μητέρα ή ο πατέρας) φέρει ένα χρωμόσωμα που περιέχει ένα υπολειπόμενο αλληλόμορφο σε ετερόζυγη κατάσταση τότε ο γονέας χαρακτηρίζεται φορέας και δεν εκδηλώνει τα χαρακτηριστικά της εν λόγω διαταραχής. Όταν όμως λόγω την δημιουργίας ΜΓΔ και συγκεκριμένα ισοδισωμίας, το υπολειπόμενο αλληλόμορφο κληρονομείται σε ομόζυγη κατάσταση στον απόγονο, τότε ο απόγονος θα κληρονομήσει δύο πανομοιότυπα αντίγραφα αυτού του αλληλομόρφου και θα εκδηλώσει την εν λόγω διαταραχή (Spence JE. et al.,1988; Voss R et al.,1989).

Το ποσοστό των περιπτώσεων στις οποίες μια αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή οφείλεται στην δημιουργία της μονογονεϊκής δισωμίας και όχι στην κληρονόμηση του υπολειπόμενου γονιδίου όταν και οι δύο γονείς είναι ετεροζυγώτες στο εν λόγω γονίδιο είναι άγνωστο.

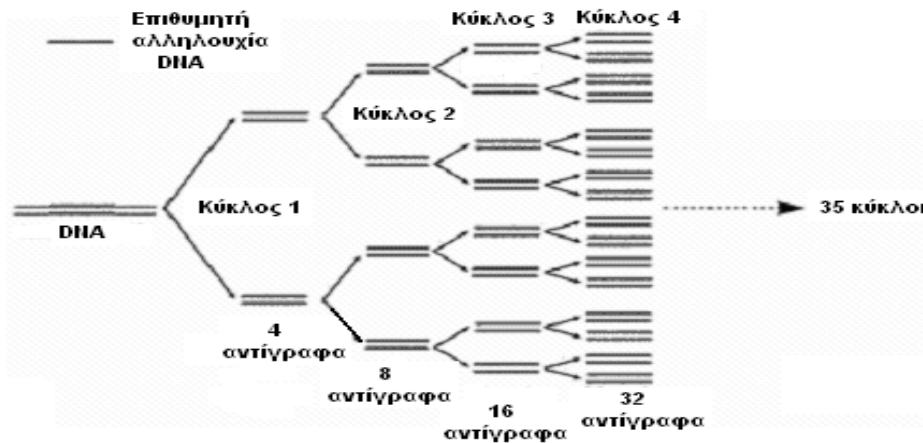
Παρόμοια κατάσταση προκύπτει και όταν συμμετέχουν όχι αυτοσωμικά αλλά φυλετικά χρωμοσώματα. Για παράδειγμα όταν ένας θηλυκός απόγονος κληρονομήσει δύο αντίγραφα ενός X χρωμοσώματος από τον ένα μόνο γονέα (μητέρα ή πατέρα) που φέρει ένα υπολειπόμενο αλληλόμορφο, όπου σε ομόζυγη κατάσταση προκαλεί την εκδήλωση μιας διαταραχής, τότε ο απόγονος θα εμφανίσει μια στο X φυλοσύνδετη υπολειπόμενη διαταραχή (Engel E. et al., 1991).

Είναι φανερό ότι ο κίνδυνος της ισοδισωμίας είναι η μετάδοση ενός κλινικά σημαντικού μεταλλαγμένου γονιδίου σε ένα διπλασιασμένο χρωμόσωμα ή χρωμοσωμική περιοχή. Η δημιουργία ισοδισωμίας ως αιτία για την εκδήλωση μιας υπολειπόμενης διαταραχής έχει αναφερθεί περισσότερο για τα χρωμοσώματα 1, 2 και 7. Για το χρωμόσωμα 1 έχουν αναφερθεί 5 περιπτώσεις μητΜΓΔ και 8 περιπτώσεις πατΜΓΔ. Για το χρωμόσωμα 2 έχουν αναφερθεί 2 μητΜΓΔ και 3 πατΜΓΔ ενώ για το χρωμόσωμα 7 έχουν αναφερθεί 4 μητΜΓΔ και 2 πατΜΓΔ. Μεταλλάξεις σε γονίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης, η εμφάνιση της ΜΓΔ μπορεί να οδηγήσει σε διακοπή ή καθυστέρηση της ενδομήτριας ανάπτυξης του εμβρύου ή σε αυτόματη αποβολή. (Engel E. 2006)

### 3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

#### 3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία ενζυμική μέθοδος που επιτρέπει τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA (ή αλληλουχιών DNA) ανάμεσα από έναν ετερογενή πληθυσμό αλληλουχιών DNA (π.χ. ολικό γενωμικό DNA ή πληθυσμό cDNA), χωρίς την μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου. Η μέθοδος αυτή είναι εξαιρετικά ευαίσθητη. Μέσω αυτής δίνεται η δυνατότητα γρήγορης ανάλυσης ειδικών περιοχών DNA που περιέχονται σε ένα πολύ μικρό δείγμα. Με την αντίδραση PCR παράγονται πολλαπλά αντίγραφα της συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA (μεγέθους από 50 ως 2000 ζεύγη βάσεων), σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών. (εικ.16)



Εικ. 16: Μηχανισμός λειτουργίας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

##### 3.1.1 Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου, η οποία αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1987 από τον K. Mullis και τους συνεργάτες του, βασίζεται στην χρησιμοποίηση ειδικής θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq polymerase). Το ένζυμο απομονώνεται από το θερμοφιλό βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι ανθεκτικό μέχρι και την θερμοκρασία 94°C, με καλύτερη απόδοση σε θερμοκρασία 80°C. Οι DNA πολυμεράσες συνθέτουν συμπληρωματική αλυσίδα DNA σε κατεύθυνση 5'-3' χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μονόκλωνο DNA. Η αντίδραση απαιτεί την παρουσία συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, που παίζουν τον ρόλο εκκινήτων (primers). Οι εκκινήτες έχουν μήκος 15-25 νουκλεοτίδια και είναι συμπληρωματικοί με τις δύο αντίθετες αλυσίδες του υποστρώματος DNA. Ο σχεδιασμός τους απαιτεί την γνώση μέρους της αλληλουχίας που πρόκειται να

πολλαπλασιαστεί και σχεδιάζονται έτσι ώστε σε κάθε αντίδραση να συντίθεται DNA σε κατεύθυνση προς τον αντίθετο εκκινητή. Έτσι, το τμήμα του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί οριοθετείται από τους δύο εκκινητές. Με την παρουσία της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, των εκκινητών, του υποστρώματος και των κατάλληλων δεοξυτριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) σε ιδανικές συνθήκες που παρέχει κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα συγκεκριμένης συγκέντρωσης ιόντων μαγνησίου αρχίζει η σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων DNA.

### 3.1.2 Στάδια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ολοκληρώνεται σε τρία στάδια (εικ 17) τα οποία -μετά την αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA- επαναλαμβάνονται για 20-30 κύκλους:

#### 1. Αποδιάταξη του υποστρώματος DNA (template denaturation)

Αρχικά το DNA αποδιατάσσεται σε μονές αλυσίδες με θέρμανση στους 93-97<sup>o</sup> C για 30-90 sec

#### 2. Υβριδισμός των εκκινητών με την συμπληρωματική αλληλουχία στο DNA υπόστρωμα (primer annealing)

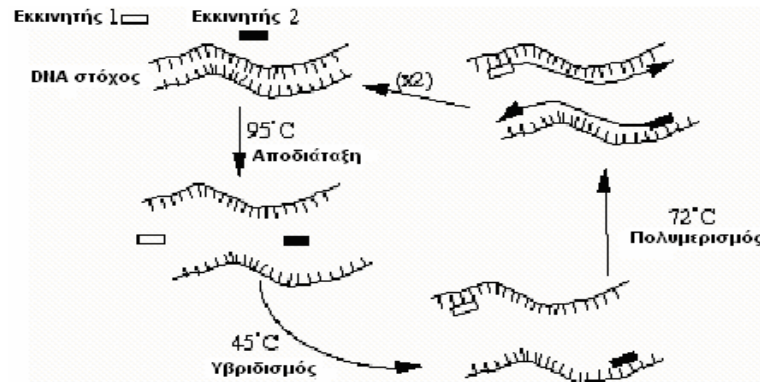
Κατά το δεύτερο στάδιο οι δύο εκκινητές συνδέονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες (για τις οποίες έχουν συντεθεί). Ο υβριδισμός των εκκινητών με το υπόστρωμα πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες 50-70<sup>o</sup> C για 30 sec-3 λεπτά. Η θερμοκρασία υβριδισμού είναι καθοριστική για την επιτυχία της αντίδρασης και καθορίζεται αποκλειστικά από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων των εκκινητών (2<sup>o</sup> C για κάθε θυμίνη (T) και αδενίνη (A), 4<sup>o</sup> C για κάθε γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C)).

#### 3. Επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών (primer extension)

Στο τρίτο στάδιο πραγματοποιείται η σύνθεση DNA με επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών. Η σύνθεση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 70-75<sup>o</sup> C για 30sec-3 λεπτά.

Στο τέλος κάθε κύκλου οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες DNA αποτελούν εκ νέου υπόστρωμα για τη σύνθεση DNA (αλυσιδωτή αντίδραση). Σε κάθε αντίδραση PCR

έχουμε εκθετική αύξηση του αρχικού υποστρώματος μέχρι και  $2^{20}$  φορές μετά από 20 κύκλους.



**Εικ. 17.** Τα τρία βήματα του πρώτου κύκλου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

### 3.1.3 Σχεδιασμός των εκκινητών

Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στάδια για την επιτυχή αντίδραση πολλαπλασιασμού. Η ειδικότητα με την οποία θα πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός της επιλεγμένης αλληλουχίας DNA, εξαρτάται από την «ικανότητα» των εκκινητών να αναγνωρίσουν και να προσδεθούν στην επιθυμητή αλληλουχία για την οποία έχουν σχεδιαστεί. Οι μεταβλητές οι οποίες πρέπει να ληφθούν υπ όψιν κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών, περιλαμβάνουν τα εξής:

1. Μήκος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων: Γενικά, ολιγονουκλεοτίδια με μήκος 18-24 βάσεις είναι ειδικά ως προς την πρόσδεσή τους στην αλληλουχία στόχο. Για πολύπλοκες πηγές DNA (όπως ολικό γενομικό DNA), ένα μέσο μήκος εκκινητών είναι περίπου 20 βάσεις.

2. Σύσταση των βάσεων: Γενικά πρέπει να αποφεύγονται επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες μειώνουν δραστικά την ειδικότητα του υβριδισμού των εκκινητών στις αλληλουχίες στόχο. Η σύσταση των βάσεων των εκκινητών πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 45-55% GC. Η σύσταση των βάσεων ρυθμίζει τη θερμοκρασία τήξης  $T_m$  που υπολογίζεται με βάση τον τύπο:  $T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$ . Ο προσεκτικός υπολογισμός της θερμοκρασίας  $T_m$  είναι σημαντικός, δεδομένου ότι από αυτή καθορίζεται η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing temperature) των εκκινητών σύμφωνα με την σχέση  $T_m - 5^\circ C$ . Σημειώνεται ότι η θερμοκρασία τήξης των δύο εκκινητών θα πρέπει να είναι παρόμοια, έτσι ώστε να μην υπάρχουν μεγάλες αποκλίσεις κατά τον υπολογισμό της θερμοκρασίας υβριδισμού.



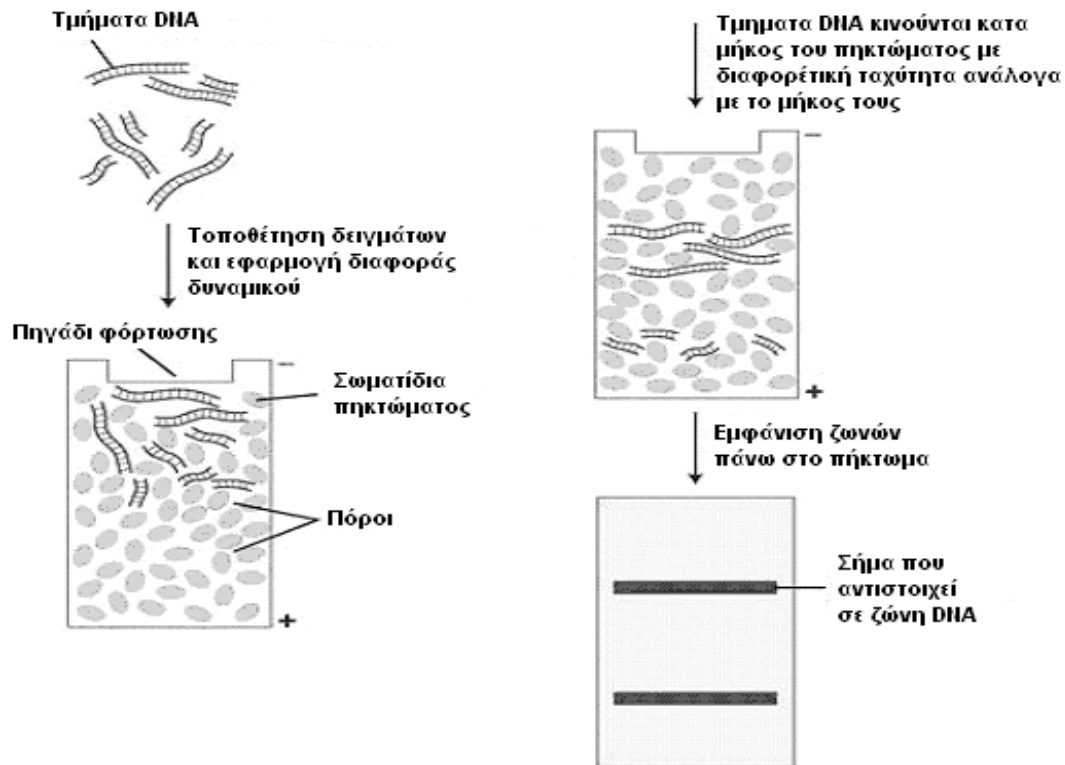
### 3.2 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση ίσως είναι σήμερα η κύρια τεχνική που χρησιμοποιείται στα βιολογικά εργαστήρια και αποτελεί τη βάση μιας πολύ χρήσιμης αναλυτικής μεθοδολογίας για τον καθαρισμό, το διαχωρισμό ή την ταυτοποίηση πολλών βιολογικών μορίων (πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα κ.τ.λ). Το γεγονός αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ευρύτητα των εφαρμογών της, τη σχετική ευκολία στην εκτέλεση της και το μικρό κόστος της. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε οριζόντια (gel αγαρόζης) είτε σε κατακόρυφα (κάθετα: gel ακρυλαμίδης) συστήματα ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με ειδικό εξοπλισμό που συνίσταται από δύο μέρη: τη μονάδα τάσης (τροφοδοτικό) και τη μονάδα ηλεκτροφόρησης.

Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει σε μια διάσταση ή σε δύο διαστάσεις. Η ηλεκτροφόρηση μιας διάστασης χρησιμοποιείται για τους περισσότερους κοινούς διαχωρισμούς πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων εφαρμόζεται στην ανάλυση αποτύπωσης πρωτεϊνών. Το μέσο στήριξης μπορεί να σχηματιστεί ως πηκτή (gel) εντός σωλήνα ή μπορεί να στρωθεί σε επίπεδες οριζόντιες ή κάθετες πλάκες. Τα πηκτώματα εντός σωλήνα χρησιμοποιούνται για εύκολους διαχωρισμούς μιας διάστασης, ενώ τα πηκτώματα πλακών που έχουν μεγάλη επιφάνεια είναι καταλληλότερα για ηλεκτροφορητικούς διαχωρισμούς δύο διαστάσεων.

Η μονάδα τάσης παρέχει διαφορά δυναμικού στους δύο πόλους (ηλεκτρόδια) της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (1X TBE), το οποίο είναι απαραίτητο για τη διατήρηση σταθερού βαθμού ιονισμού των μορίων που διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά. Η ηλεκτροφορητική ταχύτητα επηρεάζεται πάρα πολύ από την ιοντική ισχύ του μέσου στο οποίο γίνεται ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός. Ρυθμιστικά διαλύματα ασθενούς ιοντικής ισχύος επιτρέπουν την ανάπτυξη μεγάλης ηλεκτροφορητικής ταχύτητας, με μικρές εξατμίσεις λόγω αύξησης της θερμοκρασίας. Αντίθετα διαλύματα μεγάλης ιοντικής ισχύος, έχουν ως αποτέλεσμα μικρές ταχύτητες μετακίνησης και μεγάλες εξατμίσεις εξαιτίας των θερμοκρασιών που εμφανίζονται αυξημένες. Όμως τα διαλύματα αυτά έχουν το πλεονέκτημα ότι οι ηλεκτροφορητικές ζώνες των διαχωριζόμενων ουσιών είναι περισσότερο συγκεντρωμένες.

Γενικά αυτό που συμβαίνει έχει ως εξής : Αρχικώς τα μόρια που επιθυμούμε να διαχωριστούν τοποθετούνται μέσα στα ειδικά πηγαδάκια που έχουν σχηματιστεί στη πηκτή (gel). Στη συνέχεια η μονάδα τάσης τίθεται σε λειτουργία και το ηλεκτρικό ρεύμα μεταφέρεται μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων κυρίως με τα ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος και μερικώς με τα ιόντα των δειγμάτων. Όταν λοιπόν εφαρμοστεί μια διαφορά δυναμικού, τα μόρια με διαφορετικό καθαρό φορτίο αρχίζουν να διαχωρίζονται λόγω της διαφορετικής ηλεκτροφορητικής κινητικότητάς τους. Ακόμη και μόρια με το ίδιο φορτίο αρχίζουν να διαχωρίζονται αν έχουν διαφορετικό μέγεθος. Τα μόρια που έχουν διαχωριστεί στη συνέχεια ανιχνεύονται με κατάλληλη χρώση ή αυτοραδιογραφία στην περίπτωση που είναι ιχνηθετημένα με ραδιενέργεια.(εικ 18)

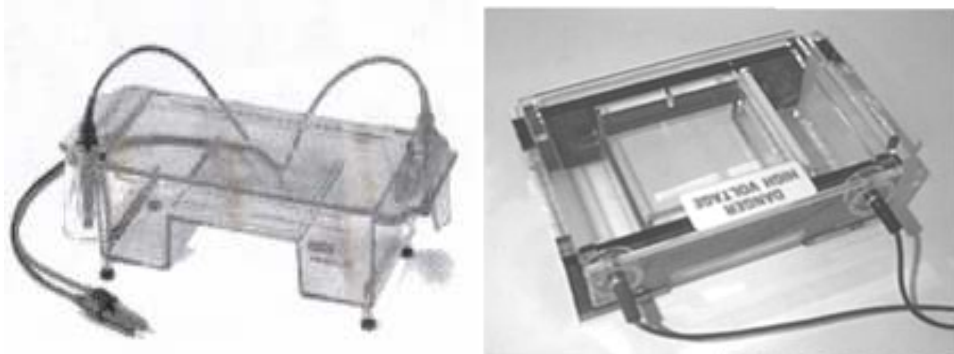


**Εικ. 18.** Σχηματική παράσταση διαχωρισμού τμημάτων DNA με την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης (κατακόρυφη) και εμφάνιση των αποτελεσμάτων πάνω στο πήκτωμα.

#### 4.1 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της μεθόδου PCR τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές, το οποίο αποτελείται από D-γαλακτόζη και ομάδες 3, 6- άνυδρο -L-γαλακτόζης. Είναι συστατικό του άγαρ, το οποίο λαμβάνεται κυρίως από ροδοφύκη

των γενών *Gracilaria* και *Gelidium*, καθώς και *Pterocladia* (N. Ζηλανδία). Έχει την τάση να σχηματίζει πηκτώματα, γεγονός το οποίο οφείλεται στην δημιουργία διπλής έλικας σε τμήματα του μορίου της. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα δίκτυο που περιέχει δεσμευμένο νερό. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού τμημάτων DNA με βάση το μέγεθός τους. Πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης (Εικ 19) και βασίζεται στο ότι το DNA έχει αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα να κινείται προς το θετικό πόλο όταν βρεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο.

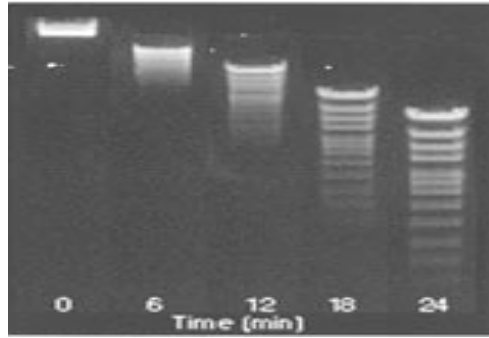


**Εικ. 19.** Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την μετακίνηση του DNA στο πήκτωμα της αγαρόζης είναι οι εξής: 1) το μέγεθος του τμήματος DNA, 2) η συγκέντρωση της αγαρόζης, 3) η τάση πεδίου και 4) η διαμόρφωση του DNA (κυκλικό ή γραμμικό).

Για την ανίχνευση των νουκλεϊκών οξέων στα πηκτώματα αγαρόζης χρησιμοποιείται κυρίως η χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο έχει την ικανότητα πρόσδεσης μεταξύ των βάσεων του DNA. Η χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου απαιτεί μεγάλη προσοχή για το λόγο ότι είναι καρκινογόνο, και για αυτό η χρήση γαντιών είναι απαραίτητη πάντα. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβαίνει στην διπλή έλικα του DNA και τροποποιεί την υπερελικωμένη δομή του.

Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ηλεκτροφορούνται στο πήκτωμα μαζί με ειδική χρωστική (Loading dye) και κατά τον διαχωρισμό βάφονται με βρωμιούχο αιθίδιο. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Για να είναι δυνατή η αξιολόγηση του προϊόντος ηλεκτροφορείται παράλληλα και ένα μείγμα θραυσμάτων DNA γνωστού μεγέθους (ladder)(εικ.20)

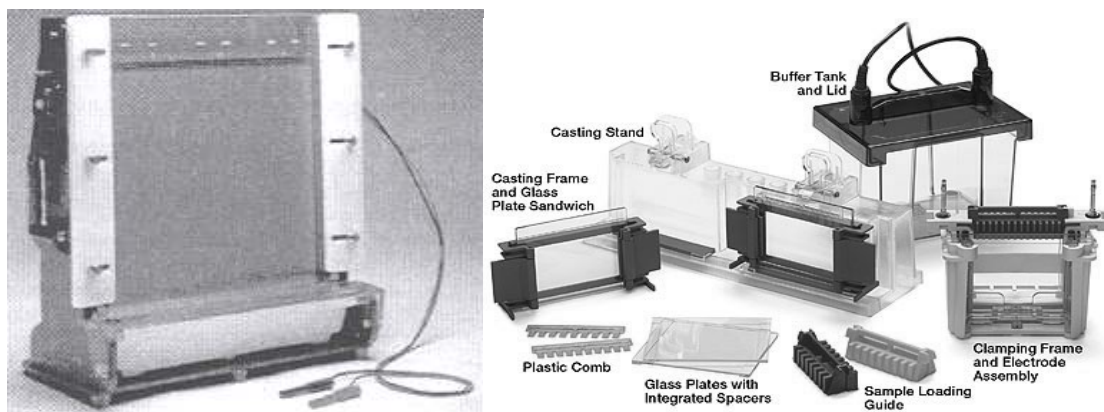


**Εικ. 20.** Εμφάνιση ζωνών διαχωρισμού μορίων DNA με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης. Φαίνεται χαρακτηριστικά ο διαχωρισμός του μορίου ανάλογα με τον χρόνο της ηλεκτροφόρησης (χρόνος 0). Στην αρχή της τεχνικής το DNA παρουσιάζεται σε μια παχιά ζώνη αλλά μετά από 24 λεπτά φαίνεται καθαρά ο διαχωρισμός των επιμέρους ζωνών ανάλογα με μέγεθός τους.

#### 4.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης

Τα κατακόρυφα συστήματα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιούνται συνήθως για το διαχωρισμό πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου. Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου γίνεται επίσης ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των νουκλεϊκών οξέων. Το πήκτωμα (gel) σχηματίζεται μεταξύ δύο γυάλινων πλακών οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους χωρίς όμως να έρχονται σε επαφή (χρησιμοποιούνται ειδικά πλαστικά στα άκρα).

Τα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αποτελούνται συνήθως από τρία μέρη: α) Το πήκτωμα διαχωρισμού (running gel), που έχει την απαιτούμενη συγκέντρωση ή κλίση συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου για το διαχωρισμό, β) το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel), στο οποίο γίνεται η συγκέντρωση του δείγματος και γ) το πήκτωμα φόρτωσης του δείγματος (sample gel). (Εικ.21)



**Εικ. 21.** Κατακόρυφη συσκευή ηλεκτροφόρησης (αριστερά) και διάφορα μεγέθη συσκευών κάθετης ηλεκτροφόρησης (δεξιά) μαζί με τα απαιτούμενα εξαρτήματα για την διαδικασία (πλαστικά άκρα, τζάμια και πηγαδάκια για την φόρτωση των δειγμάτων)

Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου είναι προϊόντα συν-πολυμερισμού του μονομερούς ακρυλαμιδίου με το N,N-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο (Bis ακρυλαμίδιο), το οποίο είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία των διασταυρωτών δεσμών μεταξύ των αλυσίδων. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου είναι ηλεκτρικά ουδέτερα, υδρόφιλα, τρισδιάστατα πλέγματα. Ο διαχωρισμός των μορίων εντός των πηκτωμάτων επιτυγχάνεται από το μέγεθος των πόρων που σχηματίζονται εντός του πηκτώματος. Το μέγεθος των πόρων προσδιορίζεται από δύο παράγοντες : την ολική ποσότητα του ακρυλαμιδίου (ακρυλαμίδιο και δισ-ακρυλαμίδιο), εκφραζόμενη ως %T και την ποσότητα του παράγοντα δημιουργίας διασταυρωτών δεσμών (δισ-ακρυλαμίδιο), εκφραζόμενη ως %C. Όσο αυξάνεται η ολική συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου τόσο μειώνεται το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος.

Τα πηκτώματα χαρακτηρίζονται από τη συγκέντρωση τους ως διαλύματα και έχουν δύο χαρακτηριστικά: 1) Την ολική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου εκφραζόμενη ως %T. Έτσι 7,5%T σημαίνει ότι υπάρχουν συνολικά 7,5 g ακρυλαμιδίου και δισ-ακρυλαμιδίου σε 100 ml πηκτώματος. 2) Την συγκέντρωση του παράγοντα δημιουργίας διασταυρωτών δεσμών (δισ-ακρυλαμίδιο), εκφραζόμενη ως %C. Ένα πηκτώμα πολυακρυλαμιδίου 7,5%T και 5%C σημαίνει ότι υπάρχουν συνολικά 7,5 g ακρυλαμιδίου και δισ-ακρυλαμιδίου σε 100 ml πηκτώματος, εκ των οποίων 5g δισ-ακρυλαμιδίου και 2,5 g ακρυλαμιδίου.

#### 4. ΣΚΟΠΟΣ

Κυτταρογενετικές μελέτες σε προϊόντα αποβολών του πρώτου τριμήνου έχουν δείξει ότι μεγάλος αριθμός των αποβληθέντων εμβρύων είναι τρισωμικά .Η δημιουργία τρισωμικού ζυγώτη και στη συνέχεια απώλεια του ενός χρωμοσώματος, αποτελεί τον κύριο μηχανισμό εμφάνισης ΜΓΔ. Έχει προταθεί ότι πιθανόν η ΜΓΔ να παίζει σημαντικό ρόλο στις αποβολές (Shaffer et al.,2001; Preece et al.,2000).

Επίσης είναι γνωστό σήμερα ότι υπάρχουν γονίδια των οποίων η έκφραση εξαρτάται από το αν κληρονομήθηκαν από την μητέρα ή από τον πατέρα. (γονιδιωματική αποτύπωση) και τόσο η μητρική όσο και η πατρική γενετική πληροφορία είναι απαραίτητες για την φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η ΜΓΔ ορισμένων ανθρώπινων χρωμοσωμάτων (π.χ. 15, 11 κλ.π) είναι γνωστό ότι αποτελεί την αιτία εμφάνισης γενετικών συνδρόμων (PraderWilli, Angelman, Silver-Russell κ.α), ενώ η σχέση της ΜΓΔ με τις αποβολές βρίσκεται υπό διερεύνηση.

Σκοπός της έρευνας αυτής ήταν να μελετηθούν προϊόντα αποβολών κυρίως πρώτου τριμήνου για μονογονεϊκή δισωμία (ΜΓΔ) με μοριακές τεχνικές και χρήση πολυμορφικών δεικτών DNA και να βρεθεί το ποσοστό της ΜΓΔ στα προϊόντα αποβολών.

Στόχοι της διατριβής είναι:

1. Να μελετηθούν προϊόντα αποβολών για ΜΓΔ
2. Να εξαχθούν συμπεράσματα για το αν αποτελεί αιτία αποβολής ή όχι
3. Να βρεθεί το ποσοστό της ΜΓΔ στα προϊόντα αποβολών

Επιμέρους στόχοι της διατριβής είναι

1. Να βρεθεί αν η ΜΓΔ σε χρωμοσώματα ή περιοχές του γονιδιώματος που υπάρχουν γονίδια με «αποτύπωση», όπως τα χρωμοσώματα 7 και 14, συνδέεται με αποβολές ή αποτελεί αιτία αποβολής,
2. Να βρεθεί ο ρόλος της ΜΓΔ στις αποβολές
3. Να βρεθούν πρόσθετοι γενετικοί αιτιολογικοί παράγοντες των αυτόματων αποβολών
4. Να εξαχθούν συμπεράσματα για την εμφάνιση ετεροδισωμίας και ισοδισωμίας στις αποβολές και
5. Να εξαχθούν συμπεράσματα για το ποσοστό εμφάνισης της μητρικής σε σχέση με την πατρική ΜΓΔ στις αποβολές.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

## 1. Δείγματα

Για την μοριακή ανίχνευση και διάγνωση της ΜΓΔ χρησιμοποιήθηκαν 72 δείγματα ιστών πλακούντα, όπου σε 5 από αυτά ήταν δυνατόν να συλλεχθεί και ιστός εμβρύου, καθώς και δείγματα περιφερικού αίματος των γονέων. Το DNA από περιφερικό αίμα των γονέων θα χρησιμοποιηθεί για τη συγκριτική ανάλυση των χρωμοσωμάτων. Επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε ιστό πλακούντα από την μητέρα για το λόγο ότι τα κύτταρα αυτά μπορούν εύκολα να αναπτυχθούν σε καλλιέργεια.

Θέλοντας να ελέγξουμε το ποσοστό εμφάνισης της ΜΓΔ και να συγκρίνουμε τα αποτελέσματά μας με έμβρυα τα οποία δεν έχουν αποβληθεί, χρησιμοποιήσαμε ως δείγματα ελέγχου 5 δείγματα εμβρύων προερχόμενα από διακοπές κύησης, καθώς και για την συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων δείγματα περιφερικού αίματος των γονέων. Τα δείγματα αυτά δεν παρουσίασαν κανένα κλινικό εύρημα μετά από υπερηχογραφική εξέταση.

Η λήψη των δειγμάτων περιφερικού αίματος των γονέων καθώς και οι ιστοί του πλακούντα της μητέρας και οι ιστοί των αποβαλόμενων εμβρύων έγινε από το εκπαιδευμένο Ιατρικό προσωπικό της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου των Ιωαννίνων. Τα προϊόντα αποβολής που λαμβάνονται βρίσκονται κατά μέσο όρο μεταξύ της 7<sup>η</sup> και 12<sup>η</sup> εβδομάδας της κύησης. Σε όλες τις περιπτώσεις οι γονείς ενημερώθηκαν για τους σκοπούς της παρούσης έρευνας και έδωσαν την συγκατάθεσή τους πριν από τη δειγματοληψία.

## 2. Πολυμορφικοί δείκτες DNA

Για τον μοριακό έλεγχο των προϊόντων αποβολής χρησιμοποιήθηκαν πολυμορφικοί δείκτες DNA: α) χρωμοσωμάτων όπου έχει αναφερθεί η εμφάνιση τρισωμιών, όπως τα χρωμοσώματα 13, 16, 18 και 21, β) σε συγκεκριμένες περιοχές χρωμοσωμάτων όπου υπάρχουν γονίδια με αποτύπωση όπως τα χρωμοσώματα 7, 14, 20 και 22 και γ) ένας δείκτης DNA που εντοπίζεται στην περιοχή του γονιδίου SRY του χρωμοσώματος Y, υπεύθυνο για τον καθορισμό του φύλου στον άνθρωπο όπου χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό φύλου των αποβληθέντων εμβρύων.

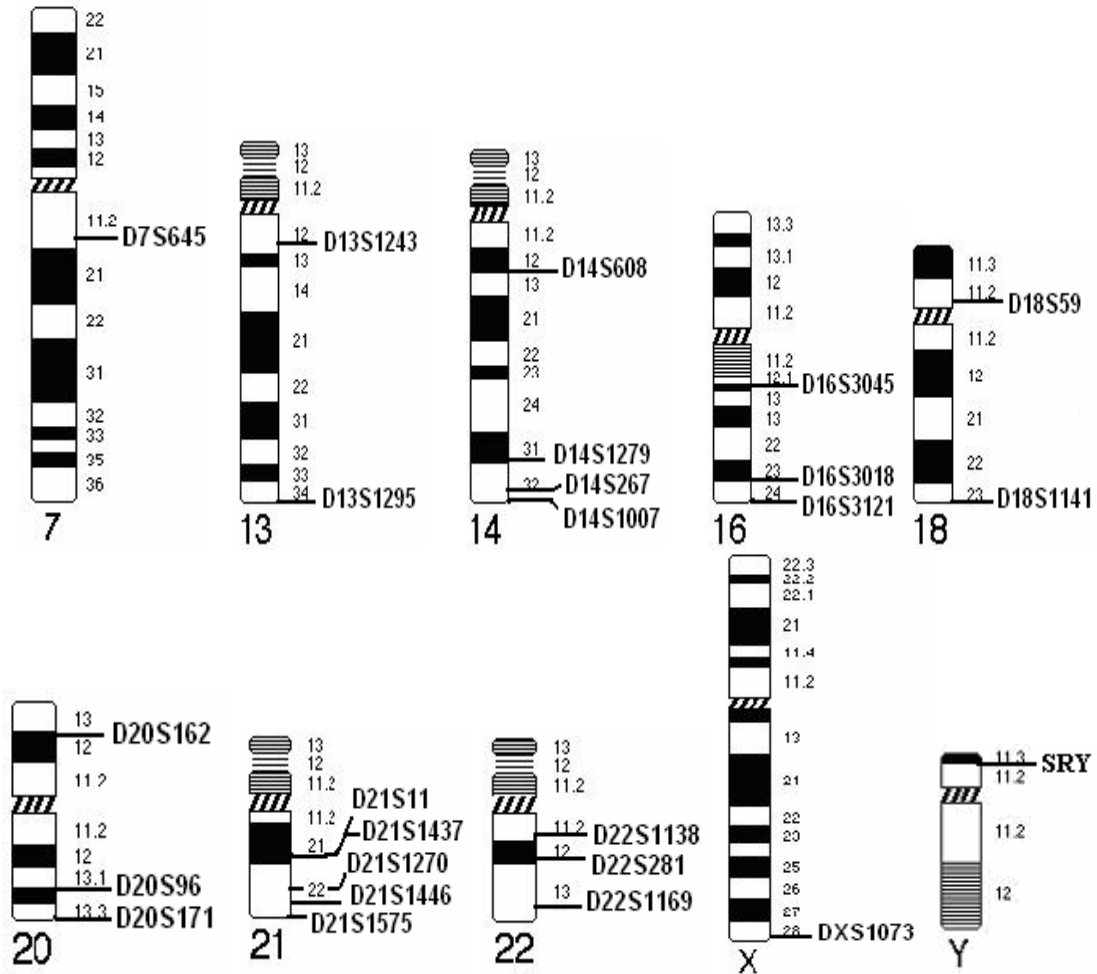
Οι πολυμορφικοί δείκτες DNA που χρησιμοποιήθηκαν αφορούν τα χρωμοσώματα 7, 13, 14, 15, 16, 20, 21, 22, και είναι: για το χρωμόσωμα 7 ο δείκτης D7S645, για το χρωμόσωμα 13: D13S1243, D13S1295, για το χρωμόσωμα 14: D14S267, D14S608, D14S1279, D14S1007, για το χρωμόσωμα 16: D16S3018, D16S3045, D16S3121, για το χρωμόσωμα 18: D18S59, D18S1141, για το



χρωμόσωμα 20: D20S171, D20S162, D20S96, για το χρωμόσωμα 21: D21S1446, D21S11, D21S1437, D21S1270, D21S1575 και για το χρωμόσωμα 22: D22S281, D22S1169, D22S1138. Για τα φυλετικά χρωμοσώματα X και Y χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες DXS1073 και SRY αντίστοιχα. Η χρωμοσωμική θέση (Εικ. 22), η αλληλουχία, η θερμοκρασία πολυμερισμού καθώς και το μέγεθος του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης κάθε δείκτη που χρησιμοποιήθηκε αναφέρονται στον πίνακα 6.

**Πίνακας 6.** Πολυμορφικοί δείκτες DNA

Χρ.	Δείκτης	Περιοχή	Αλληλουχία	T πολυμερισμού	Προϊόν PCR (bp)
7	D7S645	7q11.22	F' GTGACAGAATGAGACCCTGA R' GAACAATGCAACCAACCTTA	55	145
13	D13S1295	13q34	F' GCCCTTAGTCAGCAAATCTT R' TGCAGAAAGACACTACTCGA	55	96-120
	D13S1243	13q12.12	F' TGCTGACAGGCTACAGAACTTT R' CTCTTGTCAGGTATAGGGG	55	244-258
14	D14S267	14q32.2	F' TTAATGCCCACTGAATGCT R' AAGGCAGCCCTGGTTT	50	193-225
	D14S608	14q12	F' TAAAGGTTTATCCATGCTGTAGC R' ACGTGGTACAGGTAGATAAATGG	55	188-224
	D14S1279	14q31.3	F' GGACACAGAGCGAAAACATA R' ATCAAGGGACTTCTCAGCCT	55	107-143
	D14S1007	14qter	F' AGCTCCTATATGTCTTCACACAG R' CTCCATTCCCATACGTCC	55	114-132
16	D16S3045	16p12.3	F' ATGTAGNACGGCTGAATGTC R' GGCCAGATCACATAGTCTCA	60	235-247
	D16S3018	16q23	F' GGATAAACATAGAGCGACAGTTC R' AGACAGAGTCCCAGGCATT	55	244-270
	D16S3121	16q24.3	F' CATGTTGTACATCGTGATGC R' AGCTTTTATTTCCAGGGGT	55	79-85
18	D18S59	18p11.32	F' GGGGCAC AAGACAGATAGAT R' CCTACCAGAATGTGAACGAC	55	150
	D18S1141	18q23	F' TCTTTTGACAAATAACCCC R' GGACAGTGCAGACCT	55	263-293
20	D20S96	20q13.1	F' GGTGATACAGTGAGACCCTTC R' CTGGAGAGTTTCCAGTCTT	60	156
	D20S162	20p12.2	F' CTCCAACCTGACAGCTAGG R' CCGTCACTTCCGTATAGCC	55	246
	D20S171	20q13.32	F' TATAGGTGAGGACCCTGAGG R' ACACCAAGCCATGTAACCTG	55	123-149
21	D21S1270	21q22	F' CCCACTGTATTATTCAGGGC R' ACACACACACACACATGC	55	174-194
	D21S1437	21q21.1	F' ATGTACATGTGTCTGGGAAGG R' TTCTCTACATATTTACTGCCAACA	55	119-143
	D21S1446	21q22.3	F' ATGTACGATACGTAATACTTGACAA R' GTCCCAAAGGACCTGCTC	55	209-223
	D21S11	21q21	F' ATATGTGAGTCAATTCCCAAG R' TGTATTAGTCAATGTTCTCCAG	55	202-260
	D21S1575	21qter	F' GAAACCCATCTCACATGCAG R' GAAGTGCTTAAGAAGCTGC	55	311
22	D22S281	22q12	F' GCTCAAACAACCTGCAAGTGGTTCT R' TGTCTTCAAATACTTTGGGGTCC	60	135-151
	D22S1138	22q11.21	F' GATTACACAGGGTCTCTGCTTG R' ATGATCCCAGGTGACTCAGATTC	62	161
	D22S1169	22q13.32	F' GCACACACATGCACATAATC R' AACAACCTCCAGCAGACG	55	118-134
X	DXS1073	Xq28	F' GGCTGACTCCAGAGGC R' CCGAGTTATTACAAAGAAGCAC	55	217-243
Y	SRY	Yp11.3	F' GAATATTCCCGCTCTCCGGA R' GCTGGTGCTCCATTATTGAG	61	470-472



**Εικ. 22** Χρωμοσωμική θέση των δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν για την μοριακή ανάλυση των χρωμοσωμάτων 7,13,14,16,18,20,21,22, X και Y.

### 3. Αλληλουχίες εκκινητών για τις μεταλλάξεις ASO-IVS8 και Thr93Met(ex4) του γονιδίου DHCR7.

Οι εκκινιτές που χρησιμοποιήθηκαν για την διάγνωση των μεταλλάξεων ASO-IVS8 και Thr93Met(ex4) του γονιδίου DHCR7 παρουσιάζονται στον πίνακα 7. Για την μετάλλαξη ASO-IVS8 χρησιμοποιήθηκε εκκινιτής και για το μεταλλαγμένο αλλά και για το αγρίου τύπου γονίδιο.

**Πίνακας 7.** Αλληλουχίες εκκινητών για μεταλλάξεις του γονιδίου DHCR7.

Μετάλλαξη	Εκκινιτής	Αλληλουχία
ASO-IVS8	RET-F'	AGAGAATGGTCAGTAGGGACACT
	RET-R'	GGACCTCAGATGTGCTGTT
	IVS8-F' (wt)	CCCCTCGCCCCCAG
	IVS8-F' (mut)	CCCCTCGCCCCCAC
	IVS8-R'	GCGGGCCACGCCCCAGAA
Thr93Met(ex4)	Thr93Met-F'	CCCAGTGTGACTTGCATCCG
	Thr93Met-R'	TATAGAGCTGGGCGGCTTTCCTTA

#### 4. Αλληλουχίες εξωνίων του γονιδίου GNAS1

Για τον μοριακό έλεγχο με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και την ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου GNAS1 χρησιμοποιήθηκαν μοριακοί δείκτες DNA που εντοπίζονται στις περιοχές των εξωνίων 1, 2, 6, 8, 9, 10, 12 και 13 του γονιδίου (Πίνακας 8) (Mantovani G et al., 2000).

**Πίνακας 8.** Αλληλουχίες εξωνίων του γονιδίου GNAS1

Εξώνιο	Αλληλουχία	T πολυμερισμού.
1	F' ATGGGCTGCCTCGGGAACAG R' TTACCCAGCAGCAGCAGGCG	66
2	F' AAAATGCCTCCTTCATAACCTGA R' GCCCACCTATACTTCCTAAAG	56
3	F' ATGGTTGAGGAATGTAGAGAGACTG R' CAGTATGATCTTCATGTTTGTGTTG	56
4-5	F' ATGAAAGCAGTACTCCTAACTGA R' TGGATGCTCCTGCCCATGTG	58
6	F' ATTAGTTC AAGCTCTTGCCTTTC R' TTGTCTGTTTTATGTGCTGATGG	58
7	F' TGCTGCATAACTGTGGGACG R' GTAGTTTGGAAAGAGGGCTCAG	58
8	F' GTTGGCTTTGGTGAGATCCA R' AGAAACCATGATCTCTGTTATA	56
9	F' ACAGAGATCATGGTTTCTTG R' TTAACCAAAGAGAGCAAAGC	54
10	F' TGTTAGGGATCAGGGTTCGCTG R' AACAGTGCAGACCAGGGCCTCCTG	66
11	F' CAGGAGGCCCTGGTCTGCACTGTT R' AGAACCACCGCAATGAACAGCC	66
12	F' AGACTTCAGGAGCTACAGAGA R' AGAGGAGGAACAAGAGAGGAA	58
13	F' CATCAGAGGCTGGCTGACAGCG R' AAGGCTTTAATTAATTTGGG	58

#### 5. Διαλύματα

Συνοπτικά τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

##### 5.1 Για την κυτταρογενετική ανάλυση

α) Για τη μεταφορά των δειγμάτων: 1) 100ml θρεπτικό υλικό RPMI ή D-MEM 1X 2) αντιβιοτικά: πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Pen-Str 10u/ml) 1.5ml, ηπαρίνη (Heparin 5000u/ml heparin) 1ml και αμπικιλίνη (Ampicillin 10mg/ml) 0.2ml.

β) Για την καλλιέργεια των κυττάρων από ιστό εμβρύου και πλακούντα: 1) διάλυμα πλύσης 1x HBSS χωρίς ορρό (GIBCO -14170-088 500 ml), 2) κολλαγενάση (1mg/ ml collagenase Sigma C-9891/1A σε PBS), 3) τρυψίνη-EDTA 1X (Ethylene-diamine-tetraacetic acid) (GIBCO-25300-054 100 ml), 4) θρεπτικό υλικό Amniogrow

Plus (Cytogen 100ml), 5) κολχικίνη (colsemid GIBCO 10μg /ml), 6) υποτονικό διάλυμα KCl (0,075 M) και 7) μονιμοποιητικό διάλυμα (μεθανόλη :οξικό 3:1).

γ) Για την ανάλυση των μεταφάσεων των κυττάρων ιστού εμβρύου και πλακούντα μετά την καλλιέργεια : 1) διάλυμα χρώσης Giemsa, 2) τρυψίνη-EDTA, γ) φυσιολογικό ορό (NaCl 0.9%) και δ) διάλυμα HCl.

## 5.2 Για την μοριακή ανάλυση

α) Για την απομόνωση DNA από τα δείγματα περιφερικού αίματος των γονέων: 1) διάλυμα TKM, 2) IGEPAL (CA-630 SIGMA 50ml), 3) διάλυμα SDS 10%, 4) διάλυμα NaCl 6 M, 5) διάλυμα απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης και 6) διάλυμα TE.

β) Για τον καθαρισμό των ιστών πλακούντα της μητέρας το διάλυμα PBS

γ) Για την απομόνωση DNA από τα δείγματα ιστού πλακούντα της μητέρας: 1) χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα διαλύματα που περιέχονται στο εμπορικό σκεύασμα QIAamp Blood Mini Kit της εταιρίας QIAGEN το οποίο αποτελεί πακέτο διαλυμάτων που περιέχει τα εξής : τα Buffers ALT, AL, AW1, AW2 και AE, πρωτεΐνάση K, συλλεκτικοί σωλήνες των 2 ml, και QIAamp Spin Columns, 2) διάλυμα απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης.

δ) Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης: 1) 10x ρυθμιστικό διάλυμα , 2) διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου ( $MgCl_2$  25mM), 3) διάλυμα εκκινητών των πολυμορφικών δεικτών DNA, 4) Ltd πολυμεράση από την εταιρία Hytest και ταq πολυμεράση από την εταιρία Invitrogen.

ε) Για την προετοιμασία των πηκτωμάτων αγαρόζης: 1) διάλυμα αγαρόζης, 2) διάλυμα 1x TBE και 3) διάλυμα Βρωμιούχου αιθιδίου

ς) Για την προετοιμασία των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου: 1) διάλυμα ακρυλαμίδης 30%, 2) διάλυμα TBE 1x, 3) διάλυμα APS (Ammonium Persulfate SIGMA A3678-25G), 4) TEMED (Fluka N,N,N',N'-Tertramethylethylenediamine 100ml).

η) Για την φόρτωση των δειγμάτων στην συσκευή ηλεκτροφόρησης: 1) Χρωστική (loading dye), b) μείγμα θραυσμάτων DNA μεγέθους 100bp (DNA ladder Invitrogen).

θ) Για την χρώση των πηκτωμάτων: 1) διάλυμα οξικού οξέως, 2) διάλυμα απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης 3) διάλυμα νιτρικού αργύρου ( $AgNO_3$ ) (Silver Nitrate SIGMA S-6506 25G), 4) διάλυμα φορμαλδεΰδης (Formaldehyde SIGMA 33220

500ml), 5) πέλλετς βάσης του νατρίου (NaOH) (Sodium Hydroxide pellets Panreac 1Kg), 6) εμφανιστικό (Sodium Borohydride Fluka 71320 25G).

Αναλυτικά η σύσταση όλων των διαλυμάτων αναφέρεται στο παράρτημα 3 «Παρασκευή Διαλυμάτων».

## **ΜΕΘΟΔΟΙ- ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

## **1. Μέθοδοι διάγνωσης ανευπλοειδιών σε προϊόντα αποβολών.**

Τα τελευταία χρόνια, η πρόοδος που έχει σημειωθεί στην ανάλυση και διάγνωση των ανευπλοειδιών είναι σημαντική, και οφείλεται κυρίως: στις νέες τεχνικές και μεθόδους στην κυτταρογενετική ανάλυση και στην εισαγωγή νέων λεπτομερέστερων μεθόδων μοριακής ανάλυσης.

### **1.1 Κυτταρογενετική ανάλυση**

Η κυτταρογενετική ανάλυση αποβαλλόμενων εμβρύων για την διάγνωση ανευπλοειδιών, περιλαμβάνει την καλλιέργεια εμβρυϊκών κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια «συλλαμβάνονται» στη μετάφαση του κυτταρικού κύκλου. Η ανάλυση των μεταφασικών χρωμοσωμάτων με ζώνες οι οποίες προκύπτουν ύστερα από κατάλληλη χρώση, είναι η πιο συνηθισμένη τεχνική που χρησιμοποιείται στην προγεννητική διάγνωση και μπορεί να ανιχνεύσει με υψηλή αξιοπιστία, ένα ευρύ φάσμα παρεκκλίσεων από τον φυσιολογικό καρυότυπο (κυρίως μεγάλης κλίμακας δομικές ανωμαλίες και αριθμητικές ανωμαλίες στα χρωμοσώματα).

Η κλασική κυτταρογενετική ανάλυση έχει την δυνατότητα ελέγχου όλων των χρωμοσωμάτων και διάγνωσης των χρωμοσωμικών ανωμαλιών με μέγεθος >5Mb, αλλά η ειδικότητα και η ευαισθησία της μεθόδου στηρίζεται στην ποιότητα της ανάλυσης των ζωνών των χρωμοσωμάτων και στον αριθμό των μεταφάσεων που ελέγχονται. Δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες πολύ μικρού μεγέθους, όπως ελλείμματα ή διπλασιασμοί πολύ μικρών περιοχών των χρωμοσωμάτων, είναι αδύνατον να διαγνωστούν με τον συμβατικό καρυότυπο. Σε αυτές τις περιπτώσεις ο καρυότυπος θα εμφανίζεται φυσιολογικός, και υπάρχει η πιθανότητα άλλοι γενετικοί παράγοντες να ευθύνονται για τις αποβολές. (μονογονιδιακές διαταραχές, μικροελλείμματα κ.τ.λ.).

Συνήθως η εξέταση του καρυότυπου του εμβρύου γίνεται σε έμβρυα που αποβάλλονται μετά την 10<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης. Ο καρυότυπος ιστών αποβαλλόμενων εμβρύων μπορεί να είναι ανεπιτυχής όταν εξετάζονται διότι μπορεί να προκύψουν προβλήματα όπως: α) η χρονοβόρος καλλιέργεια των εμβρυϊκών κυττάρων, β) η πιθανή αποτυχία ή μόλυνση της καλλιέργειας λόγω του μεγάλου χρονικού διαστήματος που μπορεί να υπάρχει μεταξύ της δειγματοληψίας και της καλλιέργειας, γ) η επιλεκτική ανάπτυξη μητρικών κυττάρων σε ποσοστό 4.7% έως 11.8% (Lomax B et al.,2000, Bell KA et al.,1999), καθώς και δ) ένα καθορισμένο ποσοστό παρουσίας φαινομένων μωσαϊκισμού και ψευδομωσαϊκισμού έπειτα από την

καλλιέργεια, τα οποία αποτελούν τα βασικά μειονεκτήματα της κλασσικής κυτταρογενετικής ανάλυσης. (Warren JE et al.,2008).

## 1.2 Μοριακές τεχνικές

Με την ανάλυση του κλασσικού καρυότυπου δεν είναι δυνατόν να γίνουν αντιληπτές ορισμένες γενετικές ανωμαλίες όπως για παράδειγμα: 1) Η μονογονεϊκή δισωμία (ΜΓΔ), επειδή δεν φαίνεται στον καρυότυπο θα πρέπει να γίνει μοριακή ανάλυση με χρήση πολυμορφικών δεικτών DNA. Μέχρι στιγμής από όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες σε αποβληθέντα έμβρυα και επομένως η συχνότητά της ΜΓΔ δεν είναι γνωστή, και 2) ανωμαλίες που σχετίζονται με την γονιδιακή αποτύπωση (genomic imprinting). Τα δύο γονιδιώματα (μητρικό-πατρικό) είναι απαραίτητα αλλά όχι ισοδύναμα. Αποτύπωση είναι η διαφορετική έκφραση γονιδίου, ανάλογα με τη γονεϊκή προέλευση. Επομένως αν έχουμε ΜΓΔ σε περιοχή του γονιδιώματος που υπάρχουν γονίδια με «αποτύπωση» τότε θα υπάρχει σίγουρα διαταραχή του προτύπου έκφρασής τους και κλινικές επιπτώσεις. (Kondo Y. et al.,2004; Tsukishiro S et al.,2005; Eggermann et al.,2002).

Τα μειονεκτήματα της κυτταρογενετικής ανάλυσης μπορούν να ξεπεραστούν με μοριακές τεχνικές όπως είναι η τεχνική φθορίζων υβριδισμός *in situ* σε μεσοφασικούς πυρήνες (fluorescence *in situ* hybridization FISH), κυτταρομετρία ροής (flow cytometry), πολλαπλή ενίσχυση ανιχνευτών υβριδοποιημένων στο γονιδίωμα (multiplex ligation-dependent probe amplification MLPA), συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση (comparative genomic hybridization CGH) και ανάλυση με πολυμορφικούς δείκτες DNA. (Lomax B et al.,2000).

Η ανάλυση με πολυμορφικούς δείκτες DNA είναι απαραίτητη όταν εξετάζουμε για ΜΓΔ. Οι πολυμορφικοί δείκτες DNA αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες CA και βρίσκονται διάσπαρτοι στο γονιδίωμα. Οι περισσότεροι από αυτούς εμφανίζουν μεγάλη ετεροζυγωτία (δηλαδή μεγάλη διαφορά στη συχνότητα των αλληλομόρφων μέσα στο πληθυσμό) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, επιτρέποντας τον έλεγχο 2-4 διαφορετικών περιοχών ταυτόχρονα. Για τον έλεγχο εμβρύων είναι απαραίτητο περιφερικό αίμα και των δύο γονέων, γιατί τα αποτελέσματα της ανάλυσης του εμβρύου είναι συγκριτικά με τα αποτελέσματα των γονέων (Shaffer LG et al.,2001). Πολλοί δείκτες θα πρέπει να ελέγχονται κατά μήκος των χρωμοσωμάτων. Σύμφωνα με τις συστάσεις της Αμερικανικής εταιρίας Γενετικής



του Ανθρώπου (American Society of Human Genetics) τουλάχιστον δύο πολυμορφικοί δείκτες DNA για κάθε χρωμόσωμα είναι απαραίτητοι για τον έλεγχο της ΜΓΔ (ετερο και ισοδισωμίας αλλά για την τμηματική και σύνθετη ΜΓΔ) (D Kotzot 2008).

## **2. Πειραματική διαδικασία**

Η όλη διαδικασία αποτελείται από συγκεκριμένα πρωτόκολλα. Αρχικά γίνεται καταγραφή των ιατρικών και ιστορικών στοιχείων όλων των δειγμάτων που λαμβάνονται.

Στη συνέχεια ακολουθεί ανάλυση καρυοτύπου μετά από καλλιέργεια των κυττάρων των ιστών του εμβρύου και του πλακούντα με σκοπό την ανίχνευση ανωμαλιών των χρωμοσωμάτων.

Παράλληλα πραγματοποιείται απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα των γονέων, από εμβρυϊκό ιστό και ιστό από τον πλακούντα της μητέρας για την μοριακή ανάλυση. Το DNA από περιφερικό αίμα των γονέων θα χρησιμοποιηθεί για τη συγκριτική ανάλυση των χρωμοσωμάτων.

### **2.1. Κυτταρογενετική ανάλυση**

#### **2.1.1 Καλλιέργεια κυττάρων από ιστό πλακούντα και εμβρύου**

Το έμβρυο παραλαμβάνεται από την γυναικολογική κλινική του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Ιωαννίνων υπό τη μορφή ξασμάτων ενδομήτριου μέσα σε δοχείο το οποίο περιέχει θρεπτικό υλικό μαζί με αντιβιοτικά. Για τη μεταφορά χρησιμοποιούμε 100ml θρεπτικό υλικό RPMI ή D-MEM 1X μαζί με τα αντιβιοτικά: 1,5ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (10u/ml), 1ml ηπαρίνη (5000u/ml heparin) και 0,2ml αμπικιλίνη (10mg/ml Ampicillin).

Το δείγμα περιλαμβάνει εκτός από τον ιστό εμβρύου και ιστό πλακούντα, χοριακές λάχνες και αίμα. Για το λόγο αυτό ο ιστός θα πρέπει να καθαριστεί και να ξεπλυθεί με ειδικό υλικό (1x HBSS (GIBCO -14170-088 500 ml)) χωρίς ορρό. Η διαδικασία έχει ως εξής:

#### **α) Προετοιμασία και καθαρισμός του δείγματος**

Το δείγμα τοποθετείται μέσα σε τρυβλίο Petri και ξεπλένεται 3-5 φορές με 1x HBSS χωρίς ορρό (GIBCO -14170-088 500 ml). Αφού καθαριστεί ο ιστός κόβεται σε μικρά κομμάτια και στη συνέχεια αφαιρούμε το υλικό.

Προσθέτουμε 2ml κολλαγενάση (1mg/ ml collagenase Sigma C-9891/1A σε PBS) και αφήνουμε για 10 λεπτά στους 37°C .

Αφαιρούμε την κολλαγενάση από το Petri και προσθέτουμε 2ml τρυψίνη-EDTA 1X (Ethylene-diamine-tetraacetic acid) (ροζ) (GIBCO -25300-054 100 ml) και αφήνουμε μέσα στον επαγωγό για 10 λεπτά. Τα τρυψίνη βοηθά στην αποκόλληση των κυττάρων

Αφαιρούμε την τρυψίνη και ξεπλένουμε 2-3 φορές με HBSS χωρίς ορρό. Παίρνουμε τα κομματάκια ιστού και τα βάζουμε στο κέντρο μιας φλάσκας 50ml. Αφήνουμε την φλάσκα υπό κλίση 15 μοιρών και περιμένουμε για 10-15 λεπτά. Τα κύτταρα θα πρέπει να έχουν κολλήσει στο κάτω μέρος της φλάσκας.

Αφαιρούμε όποια ποσότητα υγρού έχει μείνει στη φλάσκα, προσθέτουμε 5ml θρεπτικό υλικό Amniogrow Plus (Cytogen 100ml) και τοποθετείται στους 37°C μέσα στον κλίβανο για 72 ώρες.

#### **β) Επώαση της καλλιέργειας και ανάπτυξη των κυττάρων**

Μετά από 3 ημέρες ελέγχουμε να δούμε αν έχουν αναπτυχθεί τα κύτταρα. Αφαιρούμε 2ml από το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε άλλα 2ml φρέσκο θρεπτικό υλικό. Αφήνουμε να αναπτυχθούν τα κύτταρα και ελέγχουμε κάθε δύο μέρες .

Όταν δούμε ότι έχουμε ικανοποιητικό αριθμό κυττάρων (περίπου μετά από 5 ημέρες) προσθέτουμε 2ml φρέσκο θρεπτικό υλικό και την επόμενη μέρα συλλέγουμε τα κύτταρα.

#### **γ) Συλλογή κυττάρων**

Για την συλλογή των κυττάρων αρχικά προσθέτουμε δύο σταγόνες κολχικίνη (colsemid GIBCO 10μg /ml) μέσα στη φλάσκα και αφήνουμε στους 37°C για επώαση περίπου 3-3,5 ώρες. Η κολχικίνη σταματά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στη φάση της μετάφασης όπου τα χρωμοσώματα είναι πλήρως συμπυκνωμένα και ευδιάκριτα.

Στη συνέχεια αφαιρούμε το καλλιεργητικό υλικό με την κολχικίνη και προσθέτουμε 0,5ml τρυψίνη (άσπρη). Χτυπάμε τη φλάσκα για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα και επωάζουμε στους 37°C για 5 λεπτά. Η τρυψίνη βοηθά στον συντονισμό των κυττάρων.

Στη συνέχεια ελέγχουμε στο μικροσκόπιο τα κύτταρα. Θα πρέπει να έχουν ξεκολλήσει από τη φλάσκα και να έχουν γίνει στρογγυλά. Εάν δεν έχουν ξεκολλήσει όλα τα κύτταρα επαναλαμβάνουμε με τρυψίνη και επώαση στους 37°C για 5 λεπτά

εφόσον έχουμε πρώτα αφαιρέσει την τρυψίνη με τα κύτταρα που έχουν ξεκολλήσει και τα έχουμε τοποθετήσει σε falcon των 10ml.

Εφόσον έχουν ξεκολλήσει όλα τα κύτταρα προσθέτουμε HBSS χωρίς ορρό και γίνεται ξέπλυμα της φλάσκας από τα κύτταρα. Όλο το HBSS χωρίς ορρό μαζί με την τρυψίνη και τα κύτταρα μεταφέρεται σε σωληνάρια falcon των 10ml.

#### **δ) Προετοιμασία και αποθήκευση κυττάρων**

Τα σωληνάρια φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά. Μετά απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 5 ml υποτονικό διάλυμα KCl (0,075 M) και γίνεται ήπια ανάδευση με πλαστική πιπέτα Pasteur. Ακολουθεί επώαση για 35 λεπτά στους 37°C. Το KCl βοηθά να σπάσουν οι μεμβράνες των κυττάρων και να διαχυθούν τα χρωμοσώματα στο μεσοκυττάριο χώρο.

Τα σωληνάρια φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά μετά την επώαση και το υπερκείμενο απορρίπτεται.

Στη συνέχεια προσθέτουμε 5ml μονιμοποιητικό διάλυμα (μεθανόλη :οξικό 3:1) με σύγχρονη ανάδευση σε vortex και τα σωληνάρια τοποθετούνται στους -20°C μέχρι να αναλυθούν.

### **2.1.2 Ανάλυση καλλιέργειας κυττάρων από ιστό πλακούντα και εμβρύου με χρώση Giemsa**

Τα σωληνάκια falcon 10ml της καλλιέργειας βρίσκονται αποθηκευμένα στους -20°C. Για την ανάλυση των κυττάρων τα σωληνάκια φυγοκεντρώνονται για 7 λεπτά στις 1500 στροφές. Μετά την φυγοκέντρηση τοποθετούνται στον πάγο.

Χρησιμοποιούμε αντικειμενοφόρες πλάκες (microscope slides), τις οποίες έχουμε πρώτα τοποθετήσει μέσα σε διάλυμα αλκοόλης ή μεθανόλης για μικρό χρονικό διάστημα (5-10 λεπτά). Τις αφήνουμε να στεγνώσουν και σημειώνουμε τον αριθμό δείγματος της καλλιέργειας και την ημερομηνία.

Παίρνουμε τα σωληνάκια της καλλιέργειας από τον πάγο και μια πλαστική πιπέτα Pasteur αφαιρούμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το ίζημα (κύτταρα) μαζί με ελάχιστη ποσότητα μονιμοποιητικού διαλύματος. Με τη βοήθεια πλαστικής πιπέτας Pasteur ρίχνουμε πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα μία σταγόνα, περίπου στο κέντρο της πλάκας και το αφήνουμε να στεγνώσει. Η σταγόνα θα πρέπει να έχει ανοίξει καλά πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα για να είναι πιο ευδιάκριτα τα χρωμοσώματα.. Μόλις στεγνώσει ελέγχουμε στο μικροσκόπιο αν υπάρχουν μεταφάσεις.

Αφού διαπιστώσουμε ότι υπάρχει ικανοποιητικός αριθμός μεταφάσεων γίνεται χρώση με Giemsa για να βάψουν τα χρωμοσώματα και να γίνουν ορατά κάτω από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Μπορούμε τις πλάκες να τις βάψουμε απλά μόνο με Giemsa όπου μπορούμε να διακρίνουμε τα χρωμοσώματα χωρίς τις ζώνες ευχρωματίνης–ετεροχρωματίνης ή να κάνουμε μπάντες με χρώση Giemsa, όπου είναι δυνατή η διάκριση των ζωνών ευχρωματίνης–ετεροχρωματίνης πάνω στα χρωμοσώματα.

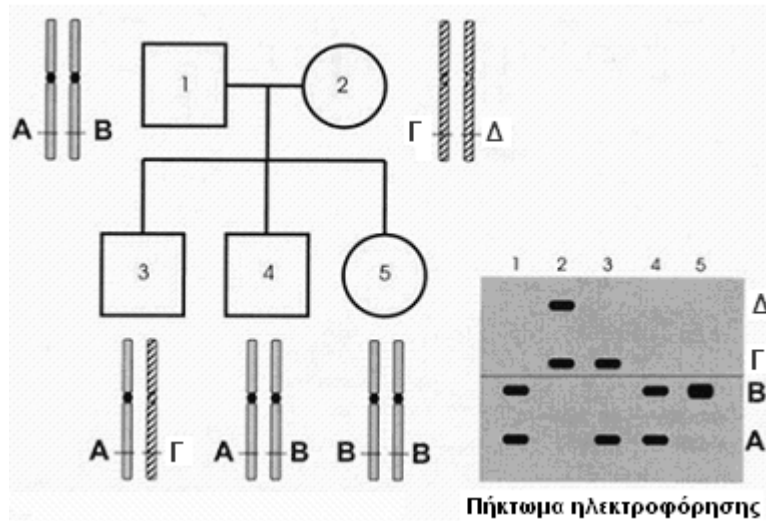
Για το απλό βάψιμο με Giemsa οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται για 3 λεπτά περίπου μέσα σε διάλυμα Giemsa, ξεπλένονται με νερό βρύσης και αφήνονται να στεγνώσουν.

Για χρώση των ζωνών ευχρωματίνης–ετεροχρωματίνης με χρώση Giemsa χρησιμοποιούμε Τρυψίνη –EDTA, φυσιολογικό ορό (NaCl 0.9%) και HCl. Πρώτα ετοιμάζουμε την τρυψίνη με 40ml φυσιολογικό ορό, 10ml τρυψίνη και μια σταγόνα HCl. Αρχικά οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται μέσα στο διάλυμα Τρυψίνη –EDTA για χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από 1-3 λεπτά. Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλένονται εις διπλούν σε διάλυμα φυσιολογικού ορού (NaCl 0.9%) και μετά με νερό βρύσης. Οι πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν και εν συνεχεία παρατηρούνται, μετρούνται και αναλύονται οι μεταφάσεις των χρωμοσωμάτων κάτω από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

## **2.2. Μοριακή ανάλυση**

Η όλη διαδικασία αποτελείται από διάφορες τεχνικές και συγκεκριμένα πρωτόκολλα. Μετά το τέλος της όλης διαδικασίας είναι δυνατή η εμφάνιση των αποτελεσμάτων και ο έλεγχος των συγκεκριμένων περιοχών των δειγμάτων στα συγκεκριμένα χρωμοσώματα για πιθανή εμφάνιση ανωμαλιών, όπως είναι η μονογονεϊκή δισωμία, την οποία εξετάζουμε. Η διαδικασία έχει ως εξής: Αρχικά πραγματοποιείται απομόνωση DNA από ολικό αίμα και από ιστό πλακούντα ή/και εμβρύου Στο DNA που απομονώθηκε γίνεται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στην περιοχή του γονιδίου SRY του χρωμοσώματος Y για τον καθορισμό του φύλου και ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης. Ακολουθεί αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης για να ελεγχθεί εάν όντως η αντίδραση έχει πραγματοποιηθεί. Τέλος πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε gel ακρυλαμιδίου για την εμφάνιση των ζωνών με καλύτερη ευκρίνεια μεγέθους

δισωμίας. Τα πηκτώματα ακρυλαμιδίου φωτογραφίζονται και μελετώνται. Η μοριακή ανάλυση με χρήση πολυμορφικών δεικτών DNA για την ανίχνευση της ΜΓΔ παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 23.



**Εικ. 23.** Διαγραμματική απεικόνιση της ανίχνευσης μονογονεϊκής δισωμίας με την ανάλυση πολυμορφικών δεικτών. Ο πατέρας διαθέτει δύο διαφορετικά αλληλόμορφα (Α και Β) για την πολυμορφική θέση η οποία μελετάται και η μητέρα δύο επίσης διαφορετικά αλληλόμορφα (Γ και Δ). Στο παιδί 3 ανιχνεύονται δύο διαφορετικοί πολυμορφικοί δείκτες (Α και Γ) , που έχουν κληρονομηθεί από τον πατέρα και από την μητέρα αντίστοιχα. Είναι ένας φυσιολογικός άρρεν απόγονος. Το παιδί 4 έχει κληρονομήσει και τα δύο αλληλόμορφα (Α και Β) από τον πατέρα, ενώ δεν φέρει κανένα αλληλόμορφο της μητέρας για την συγκεκριμένη θέση. Το παιδί αυτό παρουσιάζει πατρική μονογονεϊκή ετεροδισωμία (ετεροδισωμία λόγω της ύπαρξης και των δύο διαφορετικών αλληλομόρφων του ενός γονέα). Στο άτομο 5, υπάρχει ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο Β, που οδηγεί στην διάγνωση πατρικής μονογονεϊκής ισοδισωμίας (ισοδισωμία λόγω της κληρονόμησης δύο αντιγράφων ενός αλληλομόρφου από τον ένα μόνο γονέα) (Από Engel E and Antonarakis SE).

### 2.2.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA από τους ιστούς πλακούντα και εμβρύου έγινε με τη χρήση του εμπορικού σκευάσματος QIAamp Blood Mini kit (QIAGEN). Η απομόνωση DNA από τα λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος των γονέων έγινε σύμφωνα με την μέθοδο εξαλάτωσης NaCl (“salting out”).

#### 2.2.1.1 Απομόνωση DNA από λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος

Συλλέγονται δείγματα από περιφερικό αίμα και από τους δύο γονείς. Τα δείγματα εάν δεν επεξεργαστούν αμέσως τοποθετούνται στο ψυγείο και ψύχονται στους -20°C. Η διαδικασία απομόνωσης DNA από λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1) Τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου να αποψυχθούν, εάν προηγουμένως έχουν τοποθετηθεί σε ψυγείο. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε erppendorf των 1,5ml 700μl αίμα και προσθέτονται, 700 μl διαλύματος TKM και δύο σταγόνες IGEPAL. Ακολουθεί ανάδευση με το χέρι και με Vortex και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 10000 στροφές με στόχο την απομόνωση των λευκών αιμοσφαιρίων που συκκρατούνται στο ίζημα.

Το DNA εξάγεται από εμπύρηννα κύτταρα κυρίως λευκοκύτταρα, διότι ως γνωστών τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι απύρηννα. Το διάλυμα TKM βοηθά στην λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, τα οποία παραμένουν στο υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση. Το IGEPAL είναι διάλυμα με ελαιώδη σύσταση, με την βοήθεια του οποίου γίνεται η καθίζηση των λευκοκυττάρων, και βοηθά παράλληλα στην λύση των ερυθρών.

2) Μετά την φυγοκέντρηση αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθενται 500μl TKM. Ακολουθεί ανάδευση μέχρι να σπάσει τελείως το ίζημα και το δείγμα φυγοκεντρείται για 1sec στις 10000 στροφές. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται μέχρις ότου το ίζημα να μην περιέχει καθόλου κόκκινο χρώμα. Χρειάζονται περίπου 3-4 πλυσίματα.

Για την απομάκρυνση του υπερκείμενου δεν χρησιμοποιείται πιπέτα. Το ίζημα είναι απαραίτητο να διαλυθεί πολύ καλά για να διαχωριστούν τα λευκοκύτταρα από τα ερυθρά και τελικώς να απομακρυνθούν και να απορριφθούν τα ερυθρά. Στην ουσία το βήμα αυτό αποτελεί τη διαδικασία " πλυσίματος " .

3) Όταν από το ίζημα φύγει το κόκκινο χρώμα, απομακρύνεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προσθέτονται 200μl TKM. Γίνεται ανάδευση πολύ καλά για να διαλυθεί το ίζημα και μετά προσθέτονται 15 μl SDS 10%. Γίνεται ανάδευση και πάλι και το δείγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 55°C για 5 λεπτά τουλάχιστον. Στη συνέχεια, και αφού το δείγμα βγει από το υδατόλουτρο, προσθέτονται 85μl NaCl 6M, γίνεται ανάδευση και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 12000 στροφές. Κατά το στάδιο αυτό επιτυγχάνεται λύση της κυτταρικής και πυρηνικής μεμβράνης των λευκών κυττάρων και αποδέσμευση των μορίων DNA από τις ενδοπυρηνικές πρωτεΐνες.

Όταν προστίθεται το SDS 10% πρέπει να γίνει πολύ καλή ανάδευση μέχρι να σχηματιστεί αφρός. Το SDS 10% μαζί με το TKM βοηθά στην λύση των λευκοκυττάρων. Το NaCl συμβάλει στην μετουσίωση και στην κατακρήμνιση των ιστώνων. Με την λύση των λευκοκυττάρων απελευθερώνεται το DNA, ενώ οι ιστόνες

που το περιβάλουν καθιζάνουν ως ίζημα. Σε αυτή τη φάση το DNA βρίσκεται στην υπερκείμενη παχύρρευστη στιβάδα σε μορφή διαλύματος.

4) Μετά την φυγοκέντρηση μεταφέρεται προσεκτικά το υπερκείμενο σε νέο erpendorf των 1,5ml προσέχοντας να μην μεταφερθεί καθόλου από το ίζημα και προσθέτονται στη συνέχεια 750μl απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης, η οποία βρίσκεται στους -20°C.

Η απόλυτη αιθυλική αλκοόλη προκαλεί αφυδάτωση του DNA, την συρρίκνωση του και τέλος το καθιστά ορατό, απαραίτητο για την συλλογή του. Η καθαρότητα του DNA καθορίζεται κατά την συλλογή του στην οποία δεν πρέπει να μεταφερθεί καθόλου από το ίζημα, το οποίο περιέχει πρωτεΐνες και άλλα συστατικά.

5) Γίνεται ανάδευση και στη συνέχεια συλλέγεται το DNA, το οποίο τοποθετείται και διαλύεται σε νέο erpendorf των 1,5ml που περιέχει 50μl διαλύματος TE.

Το TE είναι ένα διάλυμα το οποίο διαλύει το DNA και έτσι μπορεί να αποθηκευτεί για κάποιο χρονικό διάστημα.. Το δείγμα τοποθετείται σε ψυχρό δωμάτιο ή στη συντήρηση (4°C), όπου και διατηρείται για κάποιο χρονικό διάστημα μέχρι να επεξεργαστεί. Για αρκετά μεγάλα χρονικά διαστήματα αποθήκευσης το δείγμα τοποθετείται στους -20°C και αποθηκεύεται μέχρι να επεξεργαστεί.

#### **2.2.1.2 Απομόνωση DNA από ιστό πλακούντα ή/ και εμβρύου.**

Για την απομόνωση DNA από ιστό πλακούντα ή/ και εμβρύου χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της QIAamp Blood Mini Kit. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια που είναι σύμφωνα με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο. Αρχικά γίνεται προετοιμασία των διαλυμάτων που περιέχονται στο QIAamp Blood Mini Kit, όπως για παράδειγμα τα Buffers AW1 και AW2 όπως περιγράφονται στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο. Η διαδικασία απομόνωσης DNA περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1) Σε περίπτωση που ο ιστός έχει προηγουμένως ψυχθεί, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να αποψυχθεί πλήρως. Ο ιστός στη συνέχεια κόβεται σε πολύ μικρά κομμάτια, περίπου ποσότητα 25 mg ιστού μέσα σε μικρή ποσότητα διαλύματος PBS και κάτω από πλήρης στείρες συνθήκες. Τα 25 mg ιστού τοποθετούνται στη συνέχεια σε erpendorf των 1,5ml και προστίθενται 180μl από το Buffer ALT.

Ο ιστός πρέπει να κοπεί σε πολύ μικρά κομμάτια για να μειωθεί ο χρόνος λύσης του ιστού. Σε περίπτωση που ο ιστός είχε προηγουμένως ψυχθεί και αποψυχθεί, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί η συγκεκριμένη διαδικασία και δεν πρέπει το δείγμα να ψυχθεί για δεύτερη φορά. Ένα mg ιστού αποδίδει περίπου 0,2-1,2 μg DNA.

2) Στη συνέχεια προσθέτονται 20μl πρωτεΐνάση K, γίνεται ανάδευση με Vortex και το δείγμα επώάζεται στους 56°C σε υδατόλουτρο ή σε θερμαινόμενη πλάκα (Heat Block) μέχρι ο ιστός να λυθεί τελείως. Σταδιακά γίνεται ανάδευση με Vortex.

Ο χρόνος λύσης του ιστού εξαρτάται από τον τύπο ιστού, συνήθως ολοκληρώνεται μέσα σε 1-3 ώρες μετά την τοποθέτηση στο υδατόλουτρο για επώαση. Είναι δυνατή επίσης επώαση για 12 ώρες (overnight), δηλαδή λύση όλη τη νύχτα, και δεν επηρεάζει την παρακάτω διαδικασία. Ανάδευση σε Vortex είναι απαραίτητη κατά την διάρκεια της επώασης διότι βοηθά στην διάχυση του ιστού μέσα στο διάλυμα και στην διευκόλυνση της λύσης του.

3) Στη συνέχεια προστίθενται 200μl από το Buffer AL γίνεται ανάδευση με Vortex για 15sec και ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στους 70°C σε υδατόλουτρο ή σε θερμαινόμενη πλάκα (Heat Block).

Η ανάδευση είναι απαραίτητη για την ομογενοποίηση των διαλυμάτων. Υπάρχει πιθανότητα σχηματισμού άσπρου ιζήματος μετά την προσθήκη του Buffer AL, το οποίο όμως διαλύεται κατά την επώαση στους 70 °C και δεν επηρεάζει την περαιτέρω διαδικασία.

4) Μετά την επώαση προσθέτονται 200μl αιθανόλης (96-100%) και γίνεται ανάδευση με Vortex για 15 sec. Μπορεί να γίνει φυγοκέντρηση για 1sec σε περίπτωση που υπάρχουν σταγόνες στα τοιχώματα του σωλήνα.

Η ανάδευση είναι απαραίτητη για την ομογενοποίηση των διαλυμάτων. Υπάρχει πιθανότητα σχηματισμού άσπρου ιζήματος μετά την προσθήκη της αιθανόλης το οποίο όμως δεν επηρεάζει την περαιτέρω διαδικασία.

5) Τοποθετούμαι προσεκτικά το μίγμα από το erpendorf (μαζί με το άσπρο ιζήμα) στη QIAamp Spin Column, η οποία βρίσκεται τοποθετημένη μέσα σε ένα συλλεκτικό σωλήνα των 2ml. Κλείνουμε το καπάκι και το μίγμα φυγοκεντρείται στις 6000 στροφές για 1 λεπτό. Μετά την φυγοκέντρηση η QIAamp Spin Column τοποθετείται σε νέο συλλεκτικό σωλήνα των 2ml.



Είναι απαραίτητο όλο το μίγμα να μεταφερθεί από το erpendorf στην QIAamp Spin Column ακόμα και το άσπρο ίζημα. Μεγαλύτερη ταχύτητα κατά την φυγοκέντρηση είναι δυνατή. Σε περίπτωση που το μίγμα δεν έχει περάσει όλο την μεμβράνη της QIAamp Spin Column γίνεται ξανά φυγοκέντρηση. Η QIAamp Spin Column μπορεί να επανατοποθετηθεί στο ίδιο συλλεκτικό σωλήνα, για οικονομία υλικών, αφού πρώτα όμως απορριφθεί το υγρό μετά την φυγοκέντρηση.

6) Στη συνέχεια ανοίγουμε προσεκτικά τη QIAamp Spin Column και προσθέτουμε 500μl Buffer AW1. Κλείνουμε το καπάκι και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 1 λεπτό. Μετά την φυγοκέντρηση η QIAamp Spin Column τοποθετείται σε νέο συλλεκτικό σωλήνα των 2ml.

7) Ανοίγουμε πάλι προσεκτικά τη QIAamp Spin Column και προσθέτουμε 500μl Buffer AW2. Κλείνουμε το καπάκι και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά.

Σε περίπτωση που το Buffer AW2 κατά την διάρκεια της φυγοκέντρησης βρέξει την QIAamp Spin Column τότε η QIAamp Spin Column τοποθετείται σε νέο συλλεκτικό σωλήνα και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.

8) Στη συνέχεια η QIAamp Spin Column τοποθετείται σε ένα erpendorf των 1,5ml και προσθέτουμε 200μl απεσταγμένο νερό ή Buffer AE. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 1 λεπτό.

9) Επαναλαμβάνουμε το βήμα 8 με το ίδιο απεσταγμένο νερό ή το Buffer AE.

10) Τέλος απορρίπτεται η QIAamp Spin Column και κρατείται το υγρό που βρίσκεται μέσα σε erpendorf των 1,5ml.

Το δείγμα τοποθετείται σε ψυχρό δωμάτιο ή στην συντήρηση (4°C), όπου και διατηρείται για κάποιο χρονικό διάστημα μέχρι να επεξεργαστεί. Για αρκετά μεγάλα χρονικά διαστήματα αποθήκευσης του DNA απαιτείται η χρήση του Buffer AE και θερμοκρασίας -20 °C.

## **2.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

### **2.2.2.1 Διάγνωση φύλου των προϊόντων αποβολής**

Για να καθορίσουμε το φύλο των αποβληθέντων εμβρύων, στα δείγματα DNA που απομονώθηκαν από ιστό πλακούντα ή εμβρύου, έγινε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με χρήση του δείκτη που εντοπίζεται σε περιοχή του γονιδίου του χρωμοσώματος Y (SRY) Το μίγμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και

πρόγραμμα εναλλαγής της θερμοκρασίας για τον δείκτη SRY παρουσιάζεται στον πίνακα 9.

**Πίνακας 9.** Μίγμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και πρόγραμμα εναλλαγής θερμοκρασίας για τον δείκτη SRY.

<b>DNA</b>	1 μl	1.	<b>Αρχική αποδιάταξη DNA</b>	94 °C για 2 λεπτά
<b>10x Buffer</b>	2.5 μl	2.	<b>Αποδιάταξη</b>	94 °C για 1 λεπτό
<b>25mM MgCl<sub>2</sub></b>	0,8 μl	3.	<b>Πρόσδεση εκκινητών</b>	61 °C για 2 λεπτά
<b>2.5 mM dNTPs</b>	0.5 μl	4.	<b>Πολυμερισμός</b>	72 °C για 1 λεπτό
<b>10μM F'</b>	0.5 μl	5.		βήμα 2 - 4 x 28 φορές
<b>10μM R'</b>	0.5 μl	6.	<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72 °C για 10 λεπτά
<b>5U/μl Taq</b>	0.3 μl	7.		4 °C
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	18,9 μl			
<b>Tot</b>	25 μl			

Ο έλεγχος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης γίνεται σε πηκτή αγαρόζης 2%. Για τον καθορισμό του φύλου χρησιμοποιείται ως δείγμα ελέγχου DNA από άρρεν άτομο, όπου είναι γνωστό ότι θα εμφανίσει ζώνη που αντιστοιχεί στην περιοχή του γονιδίου SRY. Για τον ίδιο λόγο, τα δείγματα εκείνα που εμφανίζουν ζώνη στην πηκτή αγαρόζης χαρακτηρίζονται άρρενα, ενώ εκείνα που δεν εμφανίζουν ζώνη ως θήλεα.

#### 2.2.2.2 Ενίσχυση χρωμοσωμικών περιοχών με χρήση πολυμορφικών δεικτών

Στα δείγματα DNA που απομονώθηκαν από ολικό περιφερικό αίμα των γονέων και από ιστό πλακούντα ή εμβρύου σύμφωνα με τα παραπάνω πρωτόκολλα, έγινε ενίσχυση των συγκεκριμένων χρωμοσωμικών περιοχών των πολυμορφικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Το μίγμα αντίδρασης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης συνολικού όγκου 25μl περιείχε: 1μl από το δείγμα DNA, 0,5-3μl από κάθε διάλυμα εκκινητή (πρόσθιου και αντιστρόφου) συγκέντρωσης 10μM, 2,5μl από διάλυμα μίγματος dNTPs συγκέντρωσης 2,5mM, 0,5-2.5μl διαλύματος MgCl<sub>2</sub> συγκέντρωσης 25mM, 2.5μl από 10x ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιείχε Tris-HCl, pH 8.4 (10x Buffer), 0,25-0.3μl διαλύματος Taq DNA πολυμεράσης συγκέντρωσης 5Units/μl, και συμπλήρωση με αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό μέχρι τα 25μl (Πίνακες 10 και 11). Σταθερός σε κάθε αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης ήταν ο όγκος του

δείγματος DNA, ο όγκος του μίγματος dNTPs και ο όγκος του 10x ρυθμιστικού διαλύματος.

**Πίνακας 10.** Μίγμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

	<b>D7S645</b>	<b>D14S267</b>	<b>D16S3045</b>	<b>D20S96</b>	<b>D22S281</b>
<b>DNA</b>	1 μl				
<b>10x Buffer</b>	2.5 μl				
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	1 μl	0.5 μl	0.5 μl	0.5 μl	1 μl
<b>dNTPs (2.5 mM)</b>	2.5 μl				
<b>F' (10μM)</b>	3 μl	2.6 μl	1.15 μl	0.56 μl	1.52 μl
<b>R' (10μM)</b>	3 μl	2.4 μl	1.23 μl	0.56 μl	1.3 μl
<b>Taq (5U/μl)</b>	0.3 μl	0.25 μl			
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	11.7 μl	13 μl	15.92 μl	17.13 μl	14.93 μl
<b>Tot</b>	25 μl				

**Πίνακας 11.** Μίγμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

	<b>D20S171</b>	<b>D22S1138</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>Γ</b>
<b>DNA</b>	1 μl				
<b>10x Buffer</b>	2.5 μl				
<b>25mM MgCl<sub>2</sub></b>	1.5 μl	2.5 μl	1 μl	1.5 μl	0.5 μl
<b>2.5 mM dNTPs</b>	2.5 μl				
<b>10μM F'</b>	2.5 μl			3 μl	
<b>10μM R'</b>	2.5 μl			3 μl	
<b>5U/μl Taq</b>	0.3 μl				
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	12.2 μl	11.2 μl	12.7 μl	11.2 μl	12.2 μl
<b>Tot</b>	25 μl				

**A:** D13S1243, D13S1295, D14S1007, D16S3018, D16S3121, D18S59, D18S1141, D20S162, D21S1575, D22S1169, DXS1073

**B:** D14S608, D21S1437, D21S1446, D21S11

**Γ:** D14S1279, D21S1270

Το πρόγραμμα εναλλαγής θερμοκρασίας για του δείκτες D22S281, D16S3045 και D20S96 ήταν: (1) αρχική αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 5 λεπτά, (2) 30 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, πρόσδεσης στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνσης στους 72°C για 90 δευτερόλεπτα και (3) τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά και πτώση της θερμοκρασίας στους 4°C (Πίνακας 12).

Το πρόγραμμα εναλλαγής θερμοκρασίας για τον δείκτη D14S267 ήταν: (1) αρχική αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 5 λεπτά, (2) 30 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, πρόσδεσης στους 50°C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνσης στους 72°C για 90 δευτερόλεπτα και (3) τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά και πτώση της θερμοκρασίας στους 4°C (Πίνακας 12).

Το πρόγραμμα εναλλαγής θερμοκρασίας για τους δείκτες (A) ήταν: (1) αρχική αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 5 λεπτά, (2) 27 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, πρόσδεσης στους 55°C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνσης στους 72°C για 90 δευτερόλεπτα και (3) τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά και πτώση της θερμοκρασίας στους 4°C (Πίνακας 12).

Το πρόγραμμα εναλλαγής θερμοκρασίας για τους δείκτες (B) ήταν: (1) αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 5 λεπτά, (2) 27 κύκλοι αποδιάταξης στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, πρόσδεσης στους 55°C για 75 δευτερόλεπτα και επιμήκυνσης στους 72°C για 15 δευτερόλεπτα και (3) τελική επιμήκυνση στους 72°C για 6 λεπτά και πτώση της θερμοκρασίας στους 4°C (Πίνακας 12).

**Πίνακας 12.** Πρόγραμμα κυκλοποίησης για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

	D16S3045, D20S96, D22S281	D14S267	A	B
1.	Αρχική αποδιάταξη DNA			94 °C για 5 λεπτά
2.	Αποδιάταξη			94 °C για 30 sec
3.	Πρόσδεση εκκινητών	60 °C για 30 sec	50 °C για 30 sec	55 °C για 30 sec
4.	Πολυμερισμός			72 °C για 15 sec
5.	βήμα 2 - 4 x 30 φορές		βήμα 2 - 4 x 27 φορές	
6.	Τελική επιμήκυνση		72 °C για 7 λεπτά	72 °C για 6 λεπτά
7.	4 °C			

A: D14S608, D16S3121, D18S59, D18S1141, D20S162, D20S171, D21S1437, D21S1446, DXS1037  
 B: D13S1243, D13S1295, D14S1007, D14S1279, D16S3018, D21S11, D21S1270, D21S1575, D22S1169

Ο έλεγχος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης γίνεται σε πηκτική αγαρόζης 2%. Η διάγνωση της ΜΓΔ αλλά και των τρισωμιών επιτυγχάνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική ακρυλαμίδιου 12% και 14% ανάλογα με τη μήκος σε ζεύγη βάσεων (bp) των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. .

### 2.2.2.3 Ενίσχυση των περιοχών των εξονίων 1-13 του γονιδίου GNAS1

Έγινε μοριακός έλεγχος με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-SSCP (Polymerase Chain Reaction–Single Strand Conformation Polymorphism) και χρήση μοριακών δεικτών στις περιοχές των εξονίων 1–13 του γονιδίου GNAS1 για την εύρεση μεταλλάξεων στις παραπάνω περιοχές.

Το μίγμα αντίδρασης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης συνολικού όγκου 50μl περιείχε: 1μl από το δείγμα DNA, 4μl από κάθε διάλυμα εκκινητή

(πρόσθιου και αντιστρόφου) συγκέντρωσης 10μM, 2,5μl από διάλυμα μίγματος dNTPs συγκέντρωσης 2mM, 2μl διαλύματος MgCl<sub>2</sub> συγκέντρωσης 25mM, 5 μl και 10μl από 5x ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιείχε Tris-HCl, pH 8.4 (5x Buffer), 0.3μl διαλύματος Taq DNA πολυμεράσης συγκέντρωσης 5Units/μl, και συμπλήρωση με αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό μέχρι τα 50μl (Πίνακας 13).

**Πίνακας 13.** Μίγμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για τα εξώνια του γονιδίου GNAS1

	<b>Εξώνια 1-12</b>	<b>Εξώνιο 13</b>
<b>DNA</b>	1 μl	1 μl
<b>5x Buffer</b>	10 μl	5 μl
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	2μl	2μl
<b>dNTPs (2.5 mM)</b>	2,5μl	2,5μl
<b>F' (10μM)</b>	4μl	4μl
<b>R' (10μM)</b>	4μl	4μl
<b>Taq (5U/μl)</b>	0.3μl	0.3μl
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	26,2 μl	31,2 μl
<b>Tot</b>	50μl	50μl

Το πρόγραμμα εναλλαγής θερμοκρασίας ήταν: (1) αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 3 λεπτά, (2) 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 94°C για 45 δευτερόλεπτα, πρόσδεσης στους 54°C, 56 °C, 58 °C και 66 °C για 45 δευτερόλεπτα και επιμήκυνσης στους 72°C για 45 δευτερόλεπτα και (3) τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά και πτώση της θερμοκρασίας στους 4°C (Πίνακας 14).

**Πίνακας 14.** Πρόγραμμα κυκλοποίησης για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης του γονιδίου GNAS1.

		<b>Εξ. 1,10,11</b>	<b>Εξ. 2,3,8</b>	<b>Εξ. 9</b>	<b>Εξ 4-5, 6,7,12,13</b>
1.	<b>Αρχική αποδιάταξη DNA</b>	94 °C για 3 λεπτά			
2.	<b>Αποδιάταξη</b>	94 °C για 45 sec			
3.	<b>Πρόσδεση εκκινητών</b>	66 °C για 45 sec	56 °C για 45 sec	54 °C για 45 sec	58 °C για 45 sec
4.	<b>Πολυμερισμός</b>	72 °C για 45 sec			
5.		βήμα 2 - 4 x 35 φορές			
6.	<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72 °C για 10 λεπτά			
7.		4 °C			

Ο έλεγχος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης γίνεται σε πηκτή αγαρόζης 3%. Τα αποτελέσματα είναι εμφανή μετά από αποδιάταξη των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου 12% και χρώση με νιτρικό άργυρο.

#### 2.2.2.4 Ενίσχυση της περιοχής 11q13 του χρωμοσώματος 11 για την ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου DHCR7

Έγινε μοριακός έλεγχος με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) της περιοχής 11q13 του χρωμοσώματος 11 για την ανίχνευση δύο μεταλλάξεων του γονιδίου DHCR7, της μετάλλαξης ASO-IVS8 και της Thr93Met(ex4). Το μίγμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης καθώς και το πρόγραμμα εναλλαγής θερμοκρασίας για την ανίχνευση των δύο μεταλλάξεων παρουσιάζονται στους πίνακες 15 και 16.

Για την μετάλλαξη ASO-IVS8 χρησιμοποιούνται δύο μίγματα, ένα που περιέχει τον αγρίου τύπου δείκτη της μετάλλαξης (ASO-IVS8 wt) μαζί με τον αντίστροφο ASO-IVS8 R' και ένα που περιέχει τον μεταλλαγμένο δείκτη (ASO-IVS8 mut) μαζί με τον αντίστροφο ASO-IVS8 R'. Και στα δύο μίγματα χρησιμοποιείτε ο δείκτης RET, ο οποίος λειτουργεί ως εσωτερικός δείκτης για τον έλεγχο της αντίδρασης Σε περίπτωση που δεν έχει εμφανιστεί ο RET στην πηκτή αγαρόζης, τότε η αντίδραση δεν έχει πραγματοποιηθεί.

**Πίνακας 15.** Μίγμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και πρόγραμμα εναλλαγής θερμοκρασίας για την ανίχνευση της μετάλλαξης ASO-IVS8 του γονιδίου DHCR7.

<b>DNA</b>	1 μl	1.	<b>Αρχική αποδιάταξη DNA</b>	95 °C για 5 λεπτά
<b>10x Buffer</b>	2.5 μl	2.	<b>Αποδιάταξη</b>	95 °C για 45 sec
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	0,5 μl	3.	<b>Πρόσδεση εκκινητών</b>	60 °C για 45 sec
<b>dNTPs (2.5 mM)</b>	1 μl	4.	<b>Πολυμερισμός</b>	72 °C για 45 sec
<b>RET F' (10μM)</b>	1 μl	5.		βήμα 2-4 x 35 φορές
<b>RET R' (10μM)</b>	1 μl	6.	<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72 °C για 10 λεπτά
<b>ASO-IVS8 wt</b>	1 μl	7.		4 °C
<b>ASO-IVS8 mut</b>	1 μl			
<b>ASO-IVS8 R'</b>	1 μl			
<b>Taq (5U/μl)</b>	0.15 μl			
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	15,85 μl			
<b>Tot</b>	25 μl			

Για την μετάλλαξη Thr93Met(ex4) χρησιμοποιούνται δύο ζεύγη δεικτών, τα οποία τοποθετούνται στο ίδιο μίγμα αντίδρασης, ενώ χρησιμοποιείται επίσης και DMSO το οποίο δεν επιτρέπει την δημιουργία δευτεροταγών δομών στο τμήμα του DNA ή στους εκκινητές της αλυσιδωτής αντίδρασης.

**Πίνακας 16.** Μίγμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και πρόγραμμα εναλλαγής θερμοκρασίας για την ανίχνευση της μετάλλαξης Thr93Met(ex4) του γονιδίου DHCR7.

<b>DNA</b>	1 μl	1.	<b>Αρχική αποδιάταξη DNA</b>	95 °C για 5 λεπτά
<b>10x Buffer</b>	2.5 μl	2.	<b>Αποδιάταξη</b>	95 °C για 45 sec
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	1,5 μl	3.	<b>Πρόσδεση εκκινητών</b>	63 °C για 45 sec
<b>dNTPs (2.5 mM)</b>	1 μl	4.	<b>Πολυμερισμός</b>	72 °C για 45 sec
<b>DMSO</b>	1,25 μl	5.		βήμα 2-4 x 40 φορές
<b>RET F' (10μM)</b>	1 μl	6.	<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72 °C για 10 λεπτά
<b>RET R' (10μM)</b>	1 μl	7.		4 °C
<b>Ex4 F' (10μM)</b>	1 μl			
<b>Ex4 R' (10μM)</b>	1 μl			
<b>Taq (5U/μl)</b>	0.1 μl			
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	13,65 μl			
<b>Tot</b>	25 μl			

Η διάγνωση των δύο μεταλλάξεων γίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης συγκέντρωσης 1%. Πάντα μαζί με τα δείγματα της αντίδρασης ηλεκτροφορούνται και θετικά δείγματα ελέγχου που έχουν την μετάλλαξη αλλά και αρνητικά δείγματα ελέγχου που δεν έχουν την μετάλλαξη.

## 2.2.3 Ηλεκτροφόρηση

### 2.2.3.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης (Agarose gel electrophoresis)

Εφόσον έχει ολοκληρωθεί η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, στη συνέχεια γίνεται ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης. Με την τεχνική αυτή βλέπουμε σε ποια από τα δείγματα έχει γίνει ο πολυμερισμός.

Μέσα στην ειδική οριζόντια πλάκα (βάση) τοποθετούνται τα χτενάκια μέσα στα οποία θα φορτωθούν τα δείγματα, και στη συνέχεια τοποθετείται η πηκτική, η οποία βρίσκεται σε υγρή μορφή και αφήνεται να σταθεροποιηθεί.

Για την προετοιμασία των πηκτωμάτων αγαρόζης 2%, 3% (του γονιδίου GNAS1) και 1% (για την ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου DHCR7) χρησιμοποιούμε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1x , 2gr, 3gr και 1gr αγαρόζης αντίστοιχα και 5ml βρωμιούχου αιθιδίου. Αρχικά μέσα σε μία κωνική φιάλη προσθέτουμε την αγαρόζη μαζί με το TBE, την τοποθετούμε σε φούρνο μικροκυμάτων και περιμένουμε μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Στην συνέχεια περιμένουμε λίγο να πέσει η θερμοκρασία και προσθέτουμε το βρωμιούχο αιθίδιο. Αναδεύουμε ελαφρά και ρίχνουμε την πηκτική αγαρόζης στην οριζόντια πλάκα και περιμένουμε μέχρι να σταθεροποιηθεί.

Αφού έχει σταθεροποιηθεί η πηκτή αγαρόζης την τοποθετούμε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Πρέπει να καλύπτεται πλήρως με ρυθμιστικό διάλυμα, που στην περίπτωση μας είναι το 1x TBE, εάν όχι τότε συμπληρώνουμε την συσκευή με ρυθμιστικό διάλυμα.

Για την φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιούμε πιπέτα και ποσότητες που αντιστοιχούν σε 5μl δείγματος και 2μl χρωστικής. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται μείγμα θραυσμάτων DNA μεγέθους 100bp σε ποσότητα των 5μl.

Μετά την φόρτωση των δειγμάτων συνδέουμε τη συσκευή με το τροφοδοτικό και περιμένουμε περίπου 30 λεπτά να τρέξουν τα δείγματα. Για την ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου DHCR7, ο χρόνος παραμονής των δειγμάτων στη συσκευή ηλεκτροφόρησης είναι περίπου μια ώρα. Λόγω της χρήσης του βρωμιούχου αιθιδίου τα πηκτώματα μπορούν να παρατηρηθούν κάτω από λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας UV.

### **2.2.3.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)**

Αφού λοιπόν ελεγχθούν τα δείγματα σε πηκτή αγαρόζης και παρατηρήσουμε ότι έχει γίνει πολυμερισμός με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) τότε μπορούμε να προσδιορίσουμε τις συγκεκριμένες περιοχές των δεικτών στα δείγματα κάνοντας ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου, η οποία θα μας εμφανίσει τις ζώνες των αντίστοιχων περιοχών των χρωμοσωμάτων. Η διαδικασία έχει ως εξής:

#### **α) Προετοιμασία της συσκευής ηλεκτροφόρησης**

Οι γυάλινες πλάκες ενώνονται μεταξύ τους με ταινία, παρεμβάλλοντας τα ειδικά πλαστικά στα άκρα. Το δέσιμο των πλακών είναι απαραίτητο για την αποφυγή τρεξίματος της πηκτής μετά την τοποθέτηση του. Αφού έχουν ετοιμαστεί οι γυάλινες πλάκες φτιάχνονται τα πηκτώματα (gel).

#### **β) Προετοιμασία των πηκτωμάτων**

Για την ανίχνευση τρισωμιών και ΜΓΔ χρησιμοποιούνται πηκτώματα ακρυλαμιδής 12% με δυνατότητα διαχωρισμού ζωνών 40-200bp και 14% με δυνατότητα διαχωρισμού ζωνών 25-150bp, τα οποία προκύπτουν από διάλυμα ακρυλαμιδής stock 30%.



Για την πηκτή ακρυλαμιδίου 12% χρησιμοποιούνται οι ποσότητες: 18ml stock ακρυλαμίδης 30%, 27ml TBE 1x , 285μl APS και 57μl TEMED.

Για την πηκτή ακρυλαμιδίου 14% χρησιμοποιούνται οι ποσότητες: 21ml stock ακρυλαμίδης 30%, 24 ml TBE 1x , 285μl APS και 57μl TEMED.

Για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα εξόνια του γονιδίου GNAS1 χρησιμοποιείτε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12% το οποίο περιέχει: 16ml stock ακρυλαμίδης 30%, 22ml TBE 1x , 2ml γλυκερόλη (5%), 285μl APS και 57μl TEMED.

Στη συνέχεια ρίχνουμε με προσοχή την πηκτή ανάμεσα από τις δύο γυάλινες πλάκες και τοποθετούμε το ειδικό χτενάκι με τα πηγαδάκια, μέσα στα οποία γίνεται η φόρτωση των δειγμάτων. Περιμένουμε περίπου μια ώρα μέχρι να σταθεροποιηθεί η πηκτή και φορτώνουμε τα δείγματα.

#### **γ) Φόρτωση των δειγμάτων**

Αφού δούμε ότι τα πηκτώματα έχουν σταθεροποιηθεί, αφαιρούμε την ταινία από τις γυάλινες πλάκες και τα χτενάκια. Οι γυάλινες πλάκες στη συνέχεια τοποθετούνται στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Για την φόρτωση των δειγμάτων χρησιμοποιούμε 3μl δείγματος και 2μl χρωστικής. Συνδέουμε τη συσκευή και αφήνουμε τα δείγματα να τρέξουν μέχρι την επόμενη μέρα το πρωί (περίπου 18 ώρες). Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται μείγμα θραυσμάτων DNA μεγέθους 100bp σε ποσότητα των 5μl.

#### **δ) Χρώση με νιτρικό άργυρο και εμφάνιση αποτελεσμάτων**

Την επόμενη μέρα το πρωί κλείνουμε τη συσκευή και αφαιρούμε τις δυο γυάλινες πλάκες από τη βάση τους. Αρχίζουμε να φτιάχνουμε τα διαλύματα για τη εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα ακρυλαμιδίου. Έχουμε τρία διαλύματα: Το (Α) αποτελείται από 400ml H<sub>2</sub>O, 40ml αιθανόλη και 2ml οξικού οξέος, το (Β) αποτελείται από 200ml νιτρικού αργύρου (AgNO<sub>3</sub>), ενώ το (Γ) αποτελείται 200ml H<sub>2</sub>O, ένας κόκκος εμφανιστικού, 2ml φορμαλδεΰδη και 4gr NaOH.

Στη συνέχεια μετά την προετοιμασία των παραπάνω διαλυμάτων η πηκτή αφαιρείται με προσοχή από τις δυο γυάλινες πλάκες και τοποθετείται μέσα σε δοχείο.

Ρίχνουμε το διάλυμα (Α) από 200ml για δύο φορές και περιμένουμε για 3 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου αφαιρούμε το διάλυμα με την βοήθεια της απορρόφησης υπό κενό και προσθέτουμε το διάλυμα (Β). Αφήνουμε να δράσει ο νιτρικός άργυρος για 10 λεπτά και στη συνέχεια απορροφούμε το διάλυμα και ξεπλένουμε με νερό. Ο νιτρικός άργυρος θέλει πολύ προσοχή γιατί λερώνει πολύ ενώ

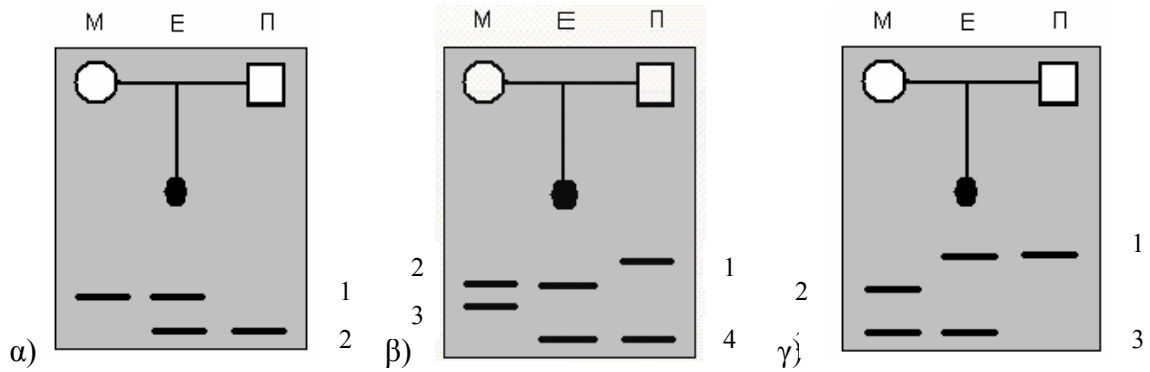
αυτό που κάνει είναι να εισχωρήσει μέσα στις ζώνες της πηκτής. Τέλος προσθέτουμε και το διάλυμα (Γ) και περιμένουμε 20 λεπτά να εμφανιστούν οι ζώνες, απορροφούμε και ξεπλένουμε με νερό.

Το εμφανιστικό μαζί με την φορμαλδεύδη αντιδρούν με τον νιτρικό άργυρο του διαλύματος (Β) με αποτέλεσμα την εμφάνιση των χαρακτηριστικών ζωνών πάνω στο πήκτωμα ακρυλαμίδης. Τέλος το πήκτωμα φωτογραφίζεται και επεξεργάζεται αναλυτικά.

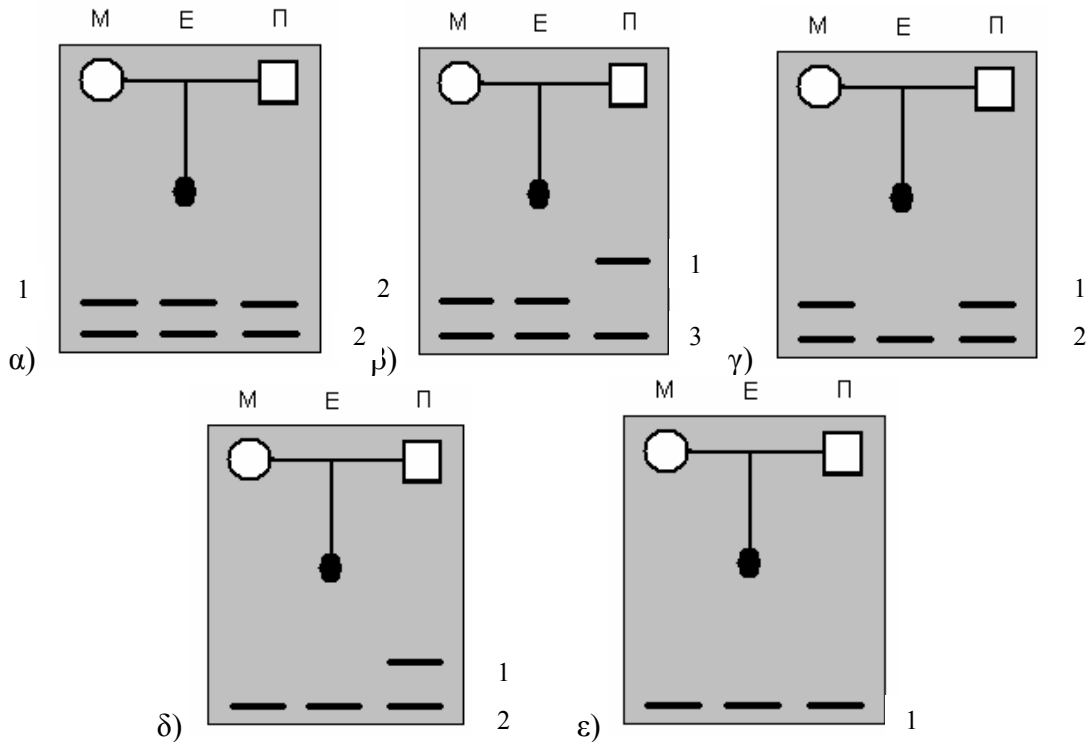
#### **2.2.3.2.1 Πρότυπα ζώνωσης των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου**

Είναι γνωστό ότι το έμβryo φυσιολογικά θα πρέπει να έχει 46 χρωμοσώματα από τα οποία 23 τα έχει κληρονομήσει από την μητέρα και χαρακτηρίζονται ως μητρικής προελεύσεως και 23 από τον πατέρα και χαρακτηρίζονται ως πατρικής προελεύσεως. Για το λόγο αυτό, η ανάλυση των ζωνών του εμβρύου που εμφανίζονται στα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου γίνεται συγκριτικά με τις ζώνες των γονέων. Οι ζώνες που εμφανίζονται μετά την χρώση αργύρου στα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου εμφανίζουν χαρακτηριστικά πρότυπα που εξαρτώνται άμεσα από το αν οι γονείς ή και το έμβryo είναι ετεροζυγώτες, (περιέχουν δύο αλληλόμορφα ή εμφανίζουν δύο ζώνες μετά από χρώση των πηκτωμάτων με νιτρικό άργυρο) ή αν είναι ομοζυγώτες (περιέχουν μόνο ένα αλληλόμορφο ή εμφανίζουν μια ζώνη μετά από χρώση των πηκτωμάτων με νιτρικό άργυρο) στην περιοχή του πολυμορφικού δείκτη DNA που εξετάζονται.

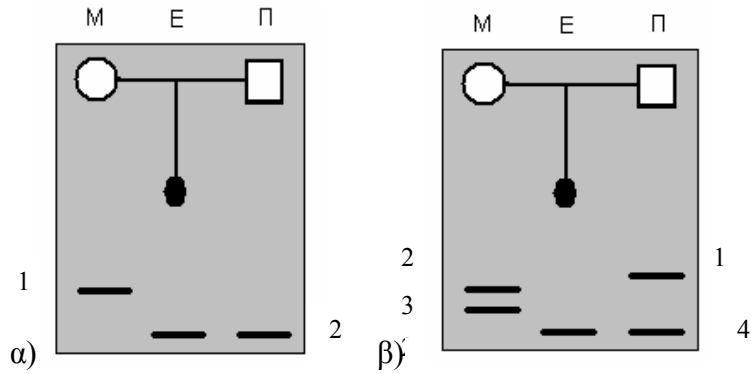
Στις εικόνες 24-29 παρουσιάζονται σχηματικά τα χαρακτηριστικά πρότυπα ζώνωσης των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου. Τα πρότυπα ζώνωσης που μπορούν να προκύψουν είναι: α) Φυσιολογικό: όταν οι ζώνες του εμβρύου αντιστοιχούν στις ζώνες και των δύο γονέων (εικ.24), β) μη πληροφοριακό: όταν οι ζώνες του εμβρύου εμφανίζονται με τέτοιο τρόπο ώστε δεν είναι εμφανές από ποιο γονέα προέρχονται (εικ.25), γ) έλλειμμα ή μονοσωμία: όταν λείπει κάποια ζώνη που αντιστοιχεί σε έναν από τους δύο γονείς (εικ.26), δ) μητρική ΜΓΔ: όταν οι ζώνες του εμβρύου είναι αποκλειστικά μητρικής προελεύσεως (εικ.27), ε) πατρική ΜΓΔ: όταν οι ζώνες του εμβρύου είναι αποκλειστικά πατρικής προελεύσεως (εικ.28) και ζ) τρισωμία: όταν υπάρχουν τρεις ζώνες του εμβρύου δυο της μητέρας και μια του πατέρα ή και αντίστροφα.(εικ. 29)



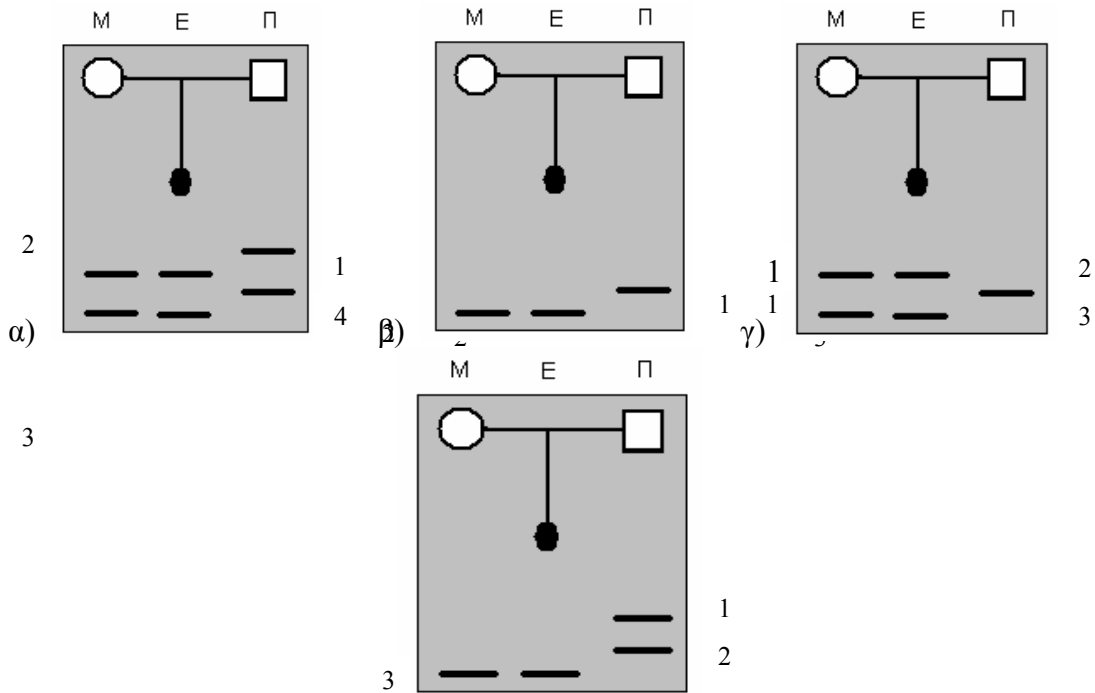
**Εικ. 24.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα ζώνωσης φυσιολογικού προτύπου. α) Όταν οι δύο γονείς είναι ομόζυγοι, τότε το έμβryo είναι ετερόζυγο και φέρει και τις δύο ζώνες των γονέων. β) Όταν οι δύο γονείς είναι ετερόζυγοι, τότε το έμβryo φέρει τη μία από τις δύο ζώνες κάθε γονέα. γ) Όταν ο ένας γονέας είναι ετερόζυγος (π.χ η μητέρα) και ο άλλος γονέας (πατέρας) είναι ομόζυγος, τότε το έμβryo σίγουρα θα έχει τη ζώνη του ομόζυγου γονέα και τη μια από τις δύο ζώνες του ετερόζυγου γονέα.



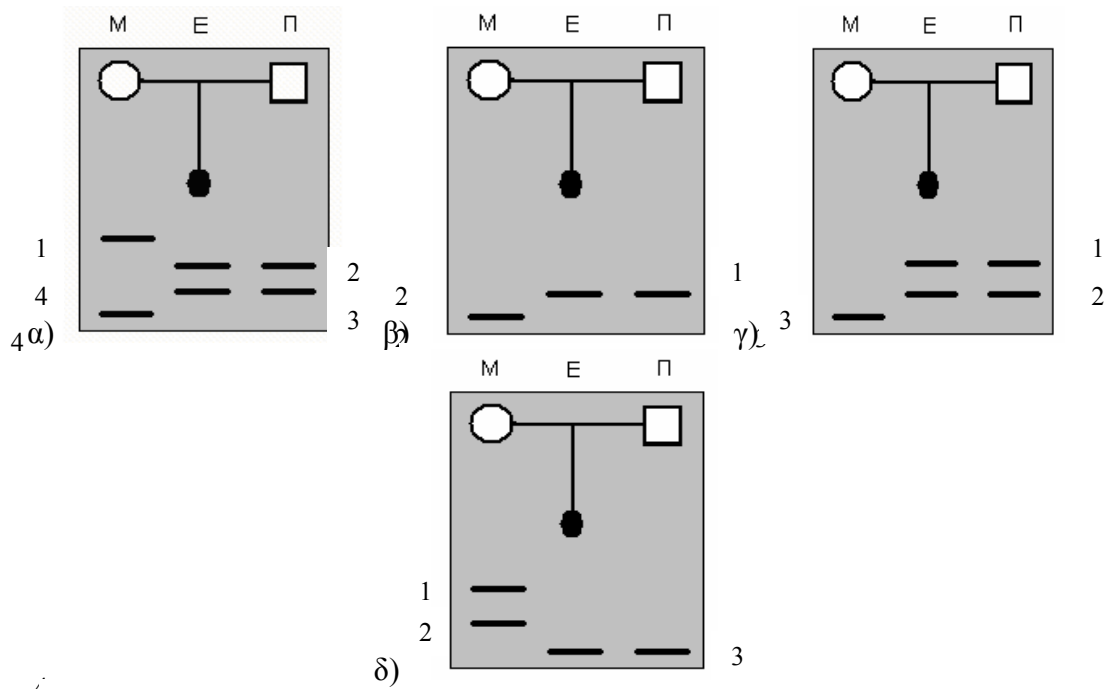
**Εικ. 25.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα ζώνωσης μη πληροφοριακού προτύπου. α) Όταν οι γονείς και το έμβryo είναι ετεροζυγώτες, αλλά οι ζώνες του εμβρύου αντιστοιχούν ακριβώς στις ζώνες και των δύο γονέων και δεν μπορούμε να εξάγουμε κανένα συμπέρασμα. β) Όταν οι γονείς και το έμβryo είναι ετεροζυγώτες, και η μια από τις δύο ζώνες του εμβρύου είναι εμφανές ότι προέρχεται από τον έναν γονέα (π.χ μητέρα) αλλά δεν είναι δυνατόν να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για την δεύτερη ζώνη του εμβρύου. γ) Όταν οι γονείς είναι ετεροζυγώτες και το έμβryo είναι ομόζυγώτης, αλλά η ζώνη του εμβρύου αντιστοιχεί ακριβώς στις ζώνες και των δύο γονέων και δεν μπορούμε να εξάγουμε κανένα συμπέρασμα. δ) Όταν ο ένας γονέας είναι ετερόζυγος (π.χ ο πατέρας) και ο άλλος γονέας (μητέρα) είναι ομόζυγος και το έμβryo είναι επίσης ομόζυγο, αλλά η ζώνη του εμβρύου αντιστοιχεί ακριβώς στις ζώνες και των δύο γονέων και δεν μπορούμε να εξάγουμε κανένα συμπέρασμα. ε) Όταν οι γονείς και το έμβryo είναι ομόζυγώτες, αλλά η ζώνη του εμβρύου αντιστοιχεί ακριβώς στις ζώνες και των δύο γονέων και δεν μπορούμε να εξάγουμε κανένα συμπέρασμα.



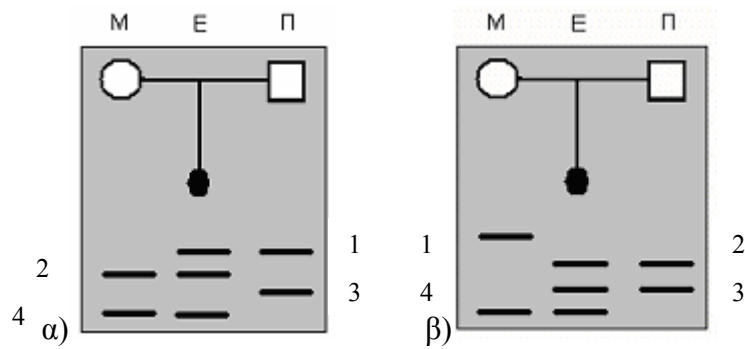
**Εικ. 26.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα ζώνωσης προτύπου μονοσωμίας ή ελλείμματος. Όταν οι γονείς είναι ομοζυγώτες (α), ή ετεροζυγώτες (β) και έχουμε την εμφάνιση μιας μόνο ζώνης του εμβρύου που να αντιστοιχεί στη μια ζώνη είτε του ενός είτε του άλλου γονέα τότε υπάρχουν δύο περιπτώσεις, είτε και το έμβryo να είναι ομοζυγώτης με αποτέλεσμα να εμφανίζει μητρική ή πατρική ΜΓΔ, ανάλογα σε ποια ζώνη από τους δύο γονείς αντιστοιχεί, είτε το έμβryo είναι ετεροζυγώτης και παρουσιάζει έλλειμμα.



**Εικ. 27.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα ζώνωσης προτύπου μητΜΓΔ. α) Οι γονείς και το έμβryo είναι ετεροζυγώτες. Οι ζώνες του εμβρύου αντιστοιχούν μόνο στις ζώνες της μητέρας με αποτέλεσμα μητΜΓΔ. β) Οι γονείς και το έμβryo είναι ομοζυγώτες. Η ζώνη του εμβρύου αντιστοιχεί μόνο στη ζώνη της μητέρας. γ) Όταν η μητέρα και το έμβryo είναι ετεροζυγώτες και ο πατέρας ομοζυγώτης. δ) Όταν η μητέρα και το έμβryo είναι ομοζυγώτης και ο πατέρας ετεροζυγώτης.



**Εικ. 28.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα ζώνωσης προτύπου πατΜΓΔ. α) Οι γονείς και το έμβryo είναι ετεροζυγώτες. Οι ζώνες του εμβρύου αντιστοιχούν μόνο στις ζώνες του πατέρα με αποτέλεσμα πατΜΓΔ. β) Οι γονείς και το έμβryo είναι ομοζυγώτες. Η ζώνη του εμβρύου αντιστοιχεί μόνο στη ζώνη του πατέρα. γ) Όταν ο πατέρας και το έμβryo είναι ετεροζυγώτες και η μητέρα ομοζυγώτης. δ) Όταν ο πατέρας και το έμβryo είναι ομοζυγώτης και η μητέρα ετεροζυγώτης.



**Εικ. 29.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα ζώνωσης προτύπου τρισωμίας. α) τρισωμία μητρικής προέλευσης, όπου το έμβryo παρουσιάζει δυο ζώνες της μητέρας και μια του πατέρα, β) τρισωμία πατρικής προέλευσης όπου το έμβryo παρουσιάζει μια ζώνη της μητέρας και δυο του πατέρα.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## 1. Γενικά

Εξετάστηκαν 72 έμβρυα από τα οποία τα 61 προέρχονταν από παλίνδρομες κύσεις (84,7%) χωρίς εμφανή κλινικά χαρακτηριστικά, ενώ τα υπόλοιπα 11 εμφάνιζαν κλινικά χαρακτηριστικά τα οποία είτε οδήγησαν σε ενδομήτριο θάνατο ή σε διακοπές των κύσεων (15,3%) (πίνακα 17).

**Πίνακας 17.** Κλινικά στοιχεία των δειγμάτων αποβολής

Σύνολο δειγμάτων		Αρ Δείγματος	Τρίμηνο κύησης	Ιστορικό
♀	♂			
48	10		1 <sup>ο</sup>	Παλίνδρομη Κύηση
1	3		2 <sup>ο</sup>	Παλίνδρομη Κύηση
-	1	107	1 <sup>ο</sup>	Εξόγκωμα παρεγκεφαλίδας, ραϊβοιπποποδία, γαστρόσχιση, σκολίωση
1	-	116	2 <sup>ο</sup>	Εξόγκωμα παρεγκεφαλίδας, σκολίωση σπονδυλικής, δυσπλασία πλευρών θώρακα
1	-	119	2 <sup>ο</sup>	Προβoscίδα προσώπου, ανοφθαλμία, ολοπροσεγκεφαλία, κυστικό κρανίο (Διακοπή κύησης)
1	-	128	1 <sup>ο</sup>	Σιαμαία ( 2 χέρια, 4 πόδια, μονόφθαλμα, ενωμένα στο κεφάλι)
1	-	131	1 <sup>ο</sup>	Καρδιακή ανεπάρκεια , κυστική αδενωματούδης νόσος
1	-	144	3 <sup>ο</sup>	Ενδομήτριος θάνατος
-	1	150	1 <sup>ο</sup>	Έλλειψη μεσολόβιου παρεγκεφαλίδας
-	1	177	2 <sup>ο</sup>	Διασταυρωμένα πόδια , αγενεσία αρ.νεφρού, ατρησία οισοφάγου, αρθρογρύπωση
1	-	201	1 <sup>ο</sup>	Σύνδρομο κενού σάκου
-	1	207	1 <sup>ο</sup>	Αυξημένη αυχενική διαφάνεια (Διακοπή κύησης)

## 2. Μητρική ηλικία και αποβολές

Έχει παρατηρηθεί πως γυναίκες μεγαλύτερες των 35 χρόνων εμφανίζουν μεγαλύτερο ποσοστό τυχαίων αποβολών (Okuyama K. 1992, Saton K. 1991). Οι ηλικίες των μητέρων των δειγμάτων που μελετήθηκαν στα πλαίσια της μελέτης αυτής κυμαίνονταν μεταξύ 19-44 ετών. Θέλοντας να ελέγξουμε το ποσοστό εμφάνισης των αποβολών ανάλογα με την ηλικία της μητέρας, δημιουργήσαμε 5 διαστήματα ηλικιών, 19-25 ετών, 26-30 ετών, 31-35 ετών, 36-40 ετών και 41-45 ετών.

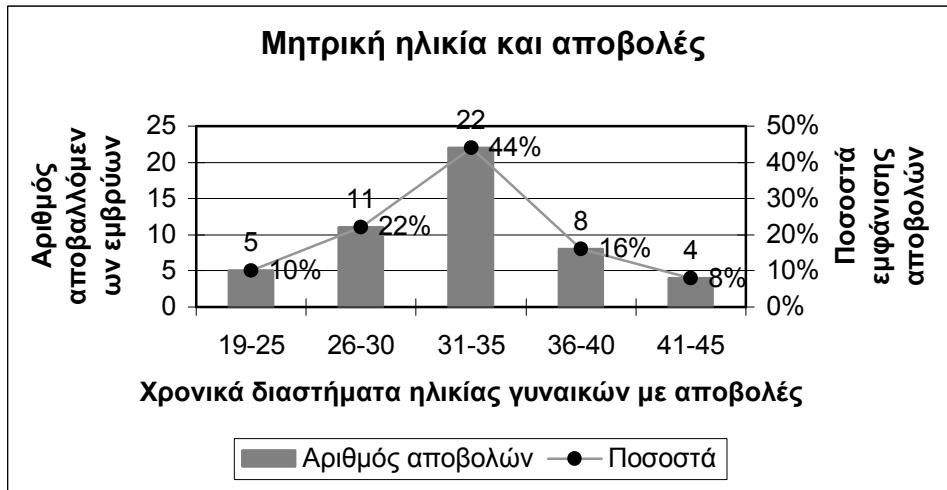
Αναλυτικά: -19-25 ετών (10%) = 5 αποβολές

- 26-30 ετών (22%) = 11 αποβολές

- 31-35 ετών (44%) = 22 αποβολές

- 36-40 ετών (16%) = 8 αποβολές

- 41-45 ετών (8%) = 4 αποβολές (διάγραμμα 1).



**Διάγραμμα 1.** Ποσοστά εμφάνισης αποβολών ανάλογα με την ηλικία της μητέρας.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία το μεγαλύτερο ποσοστό (49,7%) αυτόματων αποβολών εμφανίζεται στην ηλικιακή ομάδα 25 έως 30 ετών. Ακολουθεί ποσοστό 40,5% σε γυναίκες με ηλικία μεγαλύτερη των 30 χρονών και ποσοστό 11,6% σε γυναίκες με ηλικία κάτω από 25 χρονών (Okuyama K. 1992, Saton K. 1991, Nybo Andersen et al. 2000). Είναι γνωστό ότι γυναίκες ηλικίας άνω των 40 ετών εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό (περίπου 90%) ανευπλοειδικών εμβρύων που συχνά οδηγούν σε αποβολή (Okuyama K. 1992).

Το μεγαλύτερο ποσοστό (44%) που παρατηρήθηκε στην συγκεκριμένη μελέτη εμφανίζεται σε γυναίκες ηλικίας 31-35 ετών. Το ποσοστό αυτό πλησιάζει κατά πολύ αυτό που αναφέρεται στην βιβλιογραφία (40,5%). Ακόμα παρατηρούμε πως το ποσοστό σε γυναίκες ηλικίας 19-20 ετών (10%) είναι περίπου ίδιο με το ποσοστό των γυναικών με αποβολές ηλικίας κάτω των 20 ετών (11,6%) που παρατηρείται στην βιβλιογραφία. Παρατηρούμε ότι τα ποσοστά αποβολών για τις ηλικιακές ομάδες 36-40 και 41-45 είναι αρκετά χαμηλά στον δικό μας πληθυσμό. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι γυναίκες ηλικίας άνω των 40 ετών εμφανίζουν πρόβλημα στην σύλληψη και συχνά αδυνατούν να κυοφορήσουν.

### 3. Αποτελέσματα κυτταρογενετικής ανάλυσης

Από τα 72 δείγματα έγινε δυνατή η πλήρης κυτταρογενετική ανάλυση σε 36 δείγματα (50%). Στα 20 από αυτά (ποσοστό 55,6%) η ανάλυση δεν ήταν επιτυχής, είτε γιατί τα κύτταρα δεν αναπτύχθηκαν, είτε γιατί παρόλο που υπήρχε ανάπτυξη των κυττάρων ο αριθμός των μεταφάσεων που επρόκειτο να αναλυθούν δεν ήταν ικανοποιητικός.



Σε 16 δείγματα (ποσοστό 44,4%) η ανάλυση ήταν επιτυχής και έδωσαν αποτελέσματα όπως αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 18.

Αναλυτικά :

- Φυσιολογικός (31,25%) = 5 δείγματα (4 θήλεα και 1 άρρεν)
- τρισωμία 21 (31,25%) = 5 δείγματα (1 θήλυ και 4 άρρενα)
- τρισωμία 13 (12,5%) = 2 θήλεα δείγματα
- τρισωμία 18 (6,25%) = 1 άρρεν δείγμα
- τετραπλοειδία (12,5%) = 2 δείγματα (1 θήλυ και 1 άρρεν) και
- μονοσωμία 21 (6,25%) = 1 άρρεν δείγμα.

**Πίνακας 18.** Αποτελέσματα κυτταρογενετικής ανάλυσης

Αριθμός δείγματος	Σύνολο Δειγμάτων	Καρύοτυπος
128	4	46,XX
189		
198		
222		
171	1	46,XY
144	1	47,XX + 21
216	4	47,XY + 21
225		
228		
234		
116	2	47,XX + 13
231		
183	1	47,XY + 18
180	1	92,XXXX
174	1	92,XXYY
107	1	45,XY - 21

Από τα στοιχεία της κυτταρογενετικής ανάλυσης, διαπιστώσαμε ότι η τρισωμία 21 παρατηρήθηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με άλλες τρισωμίες. Οι τρεις στις 5 τρισωμίες 21 παρατηρήθηκαν σε έμβρυα 2<sup>ου</sup> τριμήνου. Παρατηρήθηκαν επίσης δυο περιπτώσεις τρισωμίας 13, η μια από αυτές σε έμβρυο πρώτου τριμήνου και τρισωμίας 18 (2<sup>ο</sup> τρίμηνο). Στα συγκεκριμένα δείγματά μας δεν ανιχνεύτηκε τρισωμία 16. Παρόλο που ο αριθμός των δειγμάτων που αναλύθηκαν είναι αρκετά μικρός και δεν μπορούμε να εξάγουμε κανένα συμπέρασμα, τα ευρήματα της κυτταρογενετικής ανάλυσης συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.

#### 4. Μοριακός έλεγχος των δειγμάτων για μητρική επιμόλυνση

Ένα από τα προβλήματα τα οποία καλούμαστε να αντιμετωπίσουμε όταν εξετάζουμε ιστούς εμβρύων είναι η μητρική επιμόλυνση, δηλαδή η ανάπτυξη και εξέταση μητρικών κυττάρων και όχι εμβρυϊκών όπως θα ήταν αναμενόμενο.

Αρχικά ένας τρόπος να αποκλείσουμε την μητρική επιμόλυνση σε ιστούς εμβρύων είναι να ελέγξουμε την περιοχή του γονιδίου SRY που είναι υπεύθυνη για τον καθορισμό του φύλου στον άνθρωπο. Για τον λόγο αυτό έγινε μοριακή ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και των 72 δειγμάτων με τον δείκτη DNA που βρίσκεται στην περιοχή του γονιδίου του υπεύθυνου για τον καθορισμό του φύλου (SRY) του χρωμοσώματος Y, όπου στα 55 δείγματα (76,4%) δεν ανιχνεύτηκε η περιοχή αυτή (♀) ενώ στα υπόλοιπα 17 (23,6%) ανιχνεύτηκε (♂).

Από το σύνολο των δειγμάτων λοιπόν μπορούμε να αποκλείσουμε την μητρική επιμόλυνση σε: α) όλα τα αρρενα δείγματα, για το λόγο ότι φέρουν το χρωμόσωμα Y το οποίο κληρονομείται αποκλειστικά από τον πατέρα, β) δείγματα τα οποία έχουν εμφανίσει είτε μετά από μοριακή ανάλυση με πολυμορφικούς δείκτες DNA είτε μετά από κυτταρογενετική ανάλυση τρισωμία σε κάποιο χρωμόσωμα, γ) δείγματα τα οποία μετά από μοριακή ανάλυση φέρουν ζώνες που αντιστοιχούν σε ζώνες πατρικής προέλευσης σε κάποιον δείκτη ενός ή περισσότερων χρωμοσωμάτων και δ) δείγματα 46,XX που εμφάνισαν πατΜΓΔ.

Όμως δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την ύπαρξη μητρικής επιμόλυνσης σε ορισμένα θήλεα έμβρυα τα οποία εμφανίζουν μητρική μονογονεϊκή δισωμία (μητΜΓΔ) και φυσιολογικό καρυότυπο (46,XX).

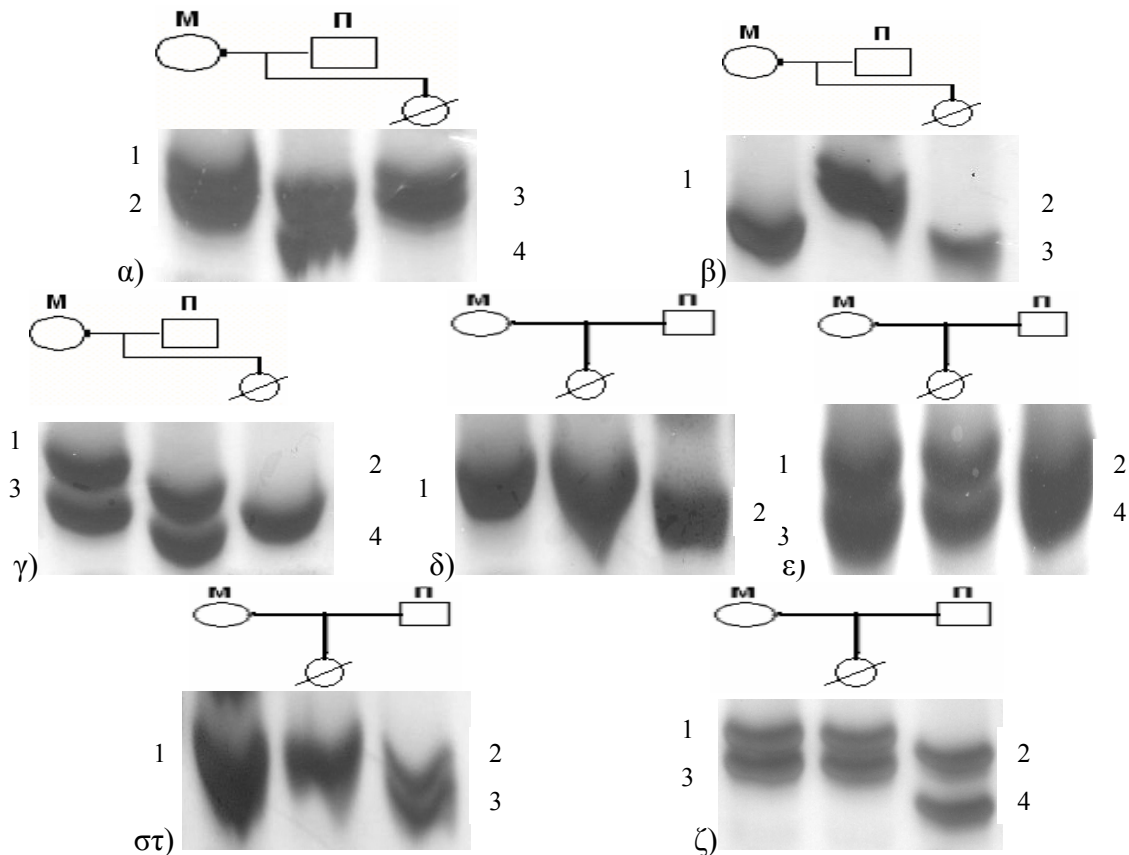
Για το λόγο αυτό ελέγξαμε δείγματα για μητρική επιμόλυνση τα οποία εμφανίζουν μητΜΓΔ σε περισσότερα από ένα χρωμοσώματα. Τα δείγματα αυτά δεν έφεραν εμφανείς ζώνες πατρικής προελεύσεως όταν εξετάστηκαν με πολυμορφικούς δείκτες DNA και δεν ήταν εφικτή η ανάλυση καρυοτύπου.

Για τον έλεγχο των δειγμάτων για μητρική επιμόλυνση χρησιμοποιήθηκε ο πολυμορφικός δείκτης DNA D21S11 ο οποίος βρίσκεται στην περιοχή 21q21 του χρωμοσώματος 21. Ο δείκτης αυτός εμφανίζει μεγάλη ετεροζυγωτία στον γενικό πληθυσμό και είναι ένας από τους δείκτες που χρησιμοποιείται στην μοριακή ανάλυση για τον έλεγχο της μητρικής επιμόλυνσης. Εξετάστηκαν 9 δείγματα (81 90, 110, 128, 162, 189, 219, 240 και 234) (πίνακας 19). Από αυτά μητΜΓΔ21 εμφάνισαν 7 δείγματα (Εικ.30).

**Πίνακας 19.** Εξέταση για μητρική επιμόλυνση μετά από μοριακή ανάλυση με τον πολυμορφικό δείκτη DNA D21S11 του χρωμοσώματος 21.

Αρ. Δείγματος	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα	Μητρική επιμόλυνση
81	1,3	2,4	1,3	μητΜΓΔ21	ΝΑΙ
90	2,2	1,1	2,2	μητΜΓΔ21	ΝΑΙ
110	2,2	1,2	2,2	ΝΙ	Όχι
128	1,3	2,4	3,3	μητΜΓΔ21	ΝΑΙ
162	2,4	1,3	1,2,4	Τρ21	Όχι
189	1,1	2,2	1,1	μητΜΓΔ21	ΝΑΙ
219	1,3	2,4	1,3	μητΜΓΔ21	ΝΑΙ
240	1,1	2,3	1,1	μητΜΓΔ21	ΝΑΙ
243	1,3	2,4	1,3	μητΜΓΔ21	ΝΑΙ

ΝΙ: Μη πληροφοριακό, μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ



**Εικ. 30.** Εμφάνιση μητΜΓΔ21 στον δείκτη D21S11 των δειγμάτων: α) 81, β) 90, γ) 128, δ) 189, ε) 219 στ) 240 και ζ) 243.

Επίσης έγινε έλεγχος για μητρική επιμόλυνση με τον δείκτη DXS1073 της περιοχής Xq28 του χρωμοσώματος X. Είναι γνωστό ότι ένα θήλυ έμβryo περιέχει δύο X χρωμοσώματα ένα μητρικής και ένα πατρικής προέλευσης. Εάν στα δείγματα που εξετάζονται για μητρική επιμόλυνση εμφανίσουν μητΜΓΔ στον δείκτη DXS1073 τότε ο ιστός που εξετάστηκε είναι πιθανόν μητρικός. Εάν ο δείκτης DXS1073 εμφανίσει το φυσιολογικό πρότυπο τότε μπορούμε να αποκλείσουμε την μητρική

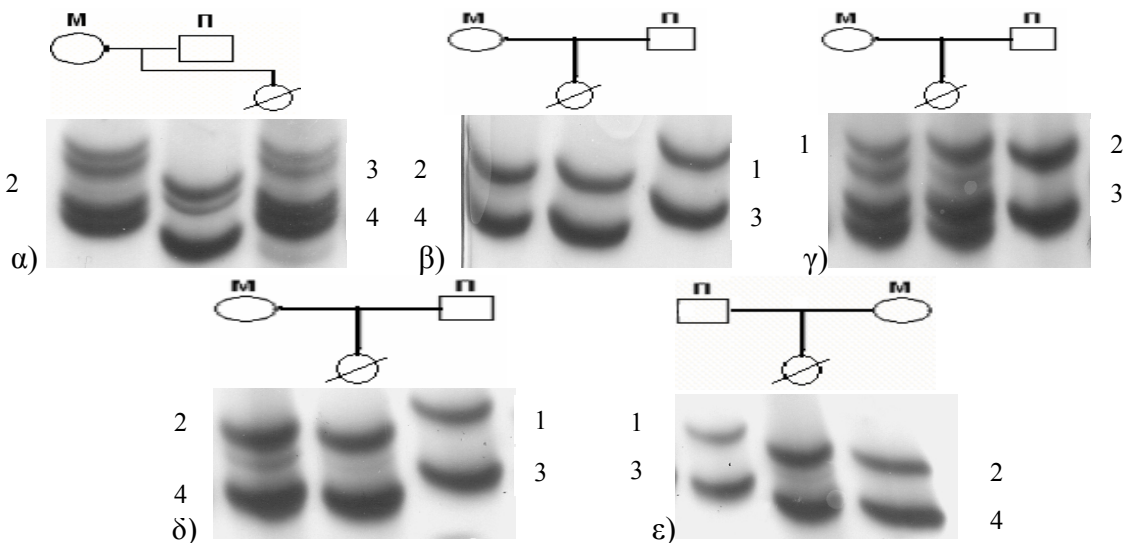
επιμόλυνση, ενώ εάν εμφανιστεί ως μη πληροφοριακός τότε το αποτέλεσμα παραμένει ως έχει.

Εξετάστηκαν 9 δείγματα για μητρική επιμόλυνση με τον δείκτη DXS1073, και 5 από αυτά εμφάνισαν μητΜΓΔ στον δείκτη DXS1073 του χρωμοσώματος X (Εικ. 31). Τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης για τον πολυμορφικό δείκτη DXS1073 παρουσιάζονται στον πίνακα 20.

**Πίνακας 20.** Εξέταση για μητρική επιμόλυνση μετά από μοριακή ανάλυση με τον πολυμορφικό δείκτη DXS1073 του χρωμοσώματος X.

Αρ. Δείγματος	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα	Μητρική επιμόλυνση
81	1,2	3,3	1,2	μητΜΓΔΧ	ΝΑΙ
90	1,2	1,2	1,2	ΝΙ	Πιθανή
96	1,2	1,2	2,2	ΝΙ	Πιθανή
128	2,2	1,1	2,2	μητΜΓΔΧ	ΝΑΙ
162	1,3	2,2	1,3	μητΜΓΔΧ	ΝΑΙ
189	1,2	1,2	1,2	ΝΙ	Πιθανή
219	1,2	1,2	1,2	ΝΙ	Πιθανή
240	2,2	1,1	2,2	μητΜΓΔΧ	ΝΑΙ
243	2,2	1,1	2,2	μητΜΓΔΧ	ΝΑΙ

ΝΙ: Μη πληροφοριακό μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ



**Εικ. 31.** Εμφάνιση μητΜΓΔΧ στον δείκτη DXS1073 των δειγμάτων : α) 81, β) 128, γ) 162, δ) 240 και ε) 243.

Από τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης και για τους δυο δείκτες (D21S11, DXS1073) που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της μητρικής επιμόλυνσης μπορούμε να αποκλείσουμε 7 δείγματα με μητρική επιμόλυνση. Αυτά είναι τα δείγματα 81, 90, 128, 189, 219, 240 και 243. Το δείγμα 162 εμφάνισε μητΜΓΔ στον δείκτη DXS1073 αλλά λόγω της διάγνωσης τρισωμίας στον δείκτη D21S11, η μητρική επιμόλυνση αποκλείστηκε.

## 5. Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης

Από τα 72 δείγματα που παραλάβαμε, επιτυχής μοριακή ανάλυση έγινε δυνατή σε 68 δείγματα. Σε 4 από τα 72 δείγματα δεν ήταν εφικτή η μοριακή ανάλυση. Στα 3 από τα 4 αυτά δείγματα (2 θήλεα και 1 άρρεν) δεν είχαμε στην διάθεσή μας περιφερικό αίμα από τον ένα ή και τους δύο γονείς που είναι απαραίτητο για την ανάλυση αυτή η οποία είναι συγκριτική, ενώ στο 4<sup>ο</sup> (άρρεν) δείγμα λόγω μόλυνσης δεν ήταν δυνατή η απομόνωση DNA.

Από τα 68 δείγματα τα 22 (32,4%) (14 θήλεα και 8 άρρενα) εμφάνισαν το φυσιολογικό πρότυπο ή ήταν μη πληροφοριακά στους μοριακούς δείκτες όπου εξετάστηκαν. Παθολογικά μοριακά ευρήματα ανιχνεύτηκαν σε 46 δείγματα (67,6%).

### Αναλυτικά

- μητρική μονογονεϊκή δισωμία (μητΜΓΔ- matUPD) (41,18%) = 28 έμβρυα (26 θήλεα και 4 άρρενα),
- μητΜΓΔ και τρισωμία (2,94%) = 2 έμβρυα (1 θήλυ και 1 άρρεν)
- τρισωμία (14,7%) = 10 έμβρυα (8 θήλεα και 2 άρρενα)
- πατρική μονογονεϊκή δισωμία (πατΜΓΔ- patUPD) (8,8%) = 6 έμβρυα (5 θήλεα και 1 άρρεν) (Πίνακας 21).

**Πίνακας 21.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης

Αριθμός δειγμάτων			Αποτέλεσμα
♀	♂	tot	
14	8	22	Φυσιολογικά- Μη πληροφοριακά
26	4	30	matUPD
5	1	6	patUPD
1	-	1	Τρισωμία 13
1	-	1	Τρισωμία 16
5	3	8	Τρισωμία 21
1	-	1	Τρισωμία 14 και 21
1	-	1	Τρισωμία 14, 21 και 22

### 5.1 Διάγνωση μητρικής ΜΓΔ

Από τα 68 δείγματα που εξετάστηκαν με μοριακές τεχνικές, τα 28 (44,1%) εμφάνισαν μητΜΓΔ (matUPD). Από αυτά αποκλείσαμε λόγω μητρικής επιμόλυνσης 7 δείγματα. Αυτά είναι τα δείγματα 81, 90, 128, 189, 219, 240 και 243. Συνολικά λοιπόν μητΜΓΔ ανιχνεύτηκε σε 21 δείγματα όπως αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 22.

**Πίνακας 22.** Εμφάνιση μητΜΓΔ μετά από μοριακή ανάλυση με πολυμορφικούς δείκτες DNA

Αρ. Δείγματος	Φύλο	Χρωμόσωμα	Δείκτης	Αποτέλεσμα	Καρυότυπος
25	♀	14	D14S608	μητΜΓΔ14	-
		21	D21S1437	μητΜΓΔ21	
28	♀	20	D20S96	μητΜΓΔ20	-
		21	D21S1437	μητΜΓΔ21	
			D21D1446		
22	D22S281	μητΜΓΔ22			
34	♀	20	D20S96	μητΜΓΔ20	-
		21	D21S1437	μητΜΓΔ21	
		22	D22S281	μητΜΓΔ22	
37	♀	14	D14S608	μητΜΓΔ14	-
		20	D20S96	μητΜΓΔ20	
		22	D22S281	μητΜΓΔ22	
40	♀	22	D22S281	μητΜΓΔ22	-
50	♀	21	D21S1437	μητΜΓΔ21	-
62	♀	21	D21S1446	μητΜΓΔ21	-
			D21S1437		
			D21S1270		
68	♀	14	D14S608	μητΜΓΔ14	-
76	♀	14	D14S608	μητΜΓΔ14	-
		21	D21S1446	μητΜΓΔ21	
			D21S1437		
93	♂	21	D21S1437	μητΜΓΔ21	-
96	♀	14	D14S608	μητΜΓΔ14	-
		16	D16S3018	μητΜΓΔ16	
99	♀	21	D21S1437	μητΜΓΔ21	-
110	♀	21	D21S1437	μητΜΓΔ21	-
			D21S1446		
113	♀	21	D21S1446	μητΜΓΔ21	-
119	♀	14	D14S608	μητΜΓΔ14	47,XX + 13
134	♂	14	D14S1279	μητΜΓΔ14	-
156	♀	7	D7S645	μητΜΓΔ7	-
		15	D15S542	μητΜΓΔ15	
168	♂	13	D13S1243	μητΜΓΔ13	-
		14	D14S608	μητΜΓΔ14	
			D14S1279		
			D14S1007		
		15	D15S542	μητΜΓΔ15	
D15S543					
21	D21S1437	μητΜΓΔ21			
222	♀	14	D14S1279	μητΜΓΔ14	46,XX
		22	D22S1169	μητΜΓΔ22	
231	♀	13	D13S1295	μητΜΓΔ13	47,XX + 13
		16	D16S321	μητΜΓΔ16	
		21	D21S1437	μητΜΓΔ21	
D21S1446					
237	♀	18	D18S59	μητΜΓΔ18	-

### 5.1.1 Διάγνωση μητΜΓΔ (matUPD) σε ένα μόνο χρωμόσωμα

Από τα 21 δείγματα με μητΜΓΔ τα 11 εμφάνισαν μητΜΓΔ σε ένα μόνο χρωμόσωμα που εξετάστηκαν. Από αυτές επιβεβαιώνονται μόνο για τα δείγματα 62 και 110 που εμφάνισαν μητΜΓΔ σε περισσότερους από δύο δείκτες κατά μήκος του χρωμοσώματος 21. (πίνακας 23)

**Πίνακας 23.** Δείγματα που εμφάνισαν μητΜΓΔ σε ένα μόνο χρωμόσωμα

Αρ. Δείγματος	Φύλο	Χρωμόσωμα	Δείκτης	Αποτέλεσμα	Ισο/Ετε	Καρύοτυπος
40	♀	22	D22S281	μητΜΓΔ22	E	-
50	♀	21	D21S1437	μητΜΓΔ21	E	-
62	♀	21	D21S1446	μητΜΓΔ21	E	-
			D21S1437		E	
			D21S1270		E	
68	♀	14	D14S608	μητΜΓΔ14	E	-
93	♂	21	D21S1437	μητΜΓΔ21	E	-
99	♀	21	D21S1437	μητΜΓΔ21	E	-
110	♀	21	D21S1437	μητΜΓΔ21	E	-
			D21S1446		I	
113	♀	21	D21S1446	μητΜΓΔ21	I	-
119	♀	14	D14S608	μητΜΓΔ14	E	47,XX + 13
134	♂	14	D14S1279	μητΜΓΔ14	I	-
237	♀	18	D18S59	μητΜΓΔ18	E	-

I: Ισοδιωμία E:Ετεροδιωμία

- Το δείγμα 40 εμφάνισε μητΜΓΔ στην περιοχή 22q12 του χρωμοσώματος 22 (εικ. 43). Οι δείκτες στους οποίους εξετάστηκε καθώς και το αποτέλεσμα που προκύπτει από την συγκριτική ανάλυση των ζωνών του πλακούντα με αυτές των γονέων παρουσιάζονται στον πίνακα 24.

**Πίνακας 24.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 40

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	1,1	1,2	1,1	NI
D20S96	1,2	1,2	1,2	NI
D21S1437	1,1	1,2	1,1	NI
D21S1446	1,2	2,2	1,2	NI
D22S281	2,4	1,3	2,4	μητΜΓΔ22

NI: Μη πληροφοριακό μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ

- Το δείγμα 50 εμφάνισε μητΜΓΔ στην περιοχή 21q21.1 του χρωμοσώματος 21 (εικ. 43). Έγινε μοριακός έλεγχος και σε έναν ακόμα δείκτη του χρωμοσώματος 21 αλλά ήταν μη πληροφοριακός (πίνακας 25).

**Πίνακας 25.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 50

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	1,2	1,2	1,2	NI
D21S1437	1,4	2,3	1,4	μητΜΓΔ21
D21S1446	1,2	1,2	1,2	NI

NI: Μη πληροφοριακό, μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ

- Το δείγμα 68 εμφάνισε μητΜΓΔ στην περιοχή 14q12 του χρωμοσώματος 14 (εικ. 26). Στον πίνακα 45 παρουσιάζονται οι δείκτες στους οποίους εξετάστηκε το δείγμα μαζί με τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης.

**Πίνακας 26.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 68

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	3,4	1,2	3,4	μητΜΓΔ14
D21S1437	2,2	1,2	1,2	NI
D21S1446	1,1	2,3	1,3	Φ
D22S1138	1,1	1,1	1,1	NI

Φ : Φυσιολογικό NI: Μη πληροφοριακό μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ

- Το δείγμα 93 εμφάνισε μητΜΓΔ στην περιοχή 21q21.1 του χρωμοσώματος 21 (εικ. 43). Το συγκεκριμένο δείγμα εξετάστηκε και σε ακόμα έναν δείκτη του χρωμοσώματος 21, ο οποίος εμφάνισε το φυσιολογικό πρότυπο (πίνακας 27). Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το συγκεκριμένο δείγμα εμφανίζει τμηματική ΜΓΔ για το χρωμόσωμα 21 στην περιοχή του δείκτη D21S1437 και επειδή η μητΜΓΔ21 εμφανίζεται ως ετεροδισωμία μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το σφάλμα έγινε στην πρώτη μειωτική διαίρεση της μητέρας.

**Πίνακας 27.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 93

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D7S645	2,2	1,2	2,2	NI
D14S608	1,3	2,3	1,2	Φ
D16S3018	1,2	1,2	1,2	NI
D21S1437	1,2	3,3	1,2	μητΜΓΔ21
D21S1446	1,3	2,2	2,3	Φ
D22S1138	1,1	1,1	1,1	NI
D22S281	1,2	1,2	1,2	NI

Φ : Φυσιολογικό NI: Μη πληροφοριακό μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ

- Το δείγμα 99 εμφάνισε μητΜΓΔ στην περιοχή 21q21.1 χρωμοσώματος 21 (εικ. 43). Το συγκεκριμένο δείγμα εξετάστηκε και σε ακόμα έναν δείκτη του χρωμοσώματος 21, ο οποίος εμφάνισε το φυσιολογικό πρότυπο (πίνακας 28). Και το



δείγμα 99 εμφανίζει τμηματική ΜΓΔ για το χρωμόσωμα 21 στην περιοχή του δείκτη D21S1437.

**Πίνακας 28.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 99

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	2,3	1,1	1,3	Φ
D21S1437	1,3	2,2	1,3	μητΜΓΔ21
D21S1446	2,3	1,4	1,2	Φ
D22S1138	1,1	1,1	1,1	NI

Φ : Φυσιολογικό NI: Μη πληροφοριακό μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ

- Το δείγμα 113 εμφάνισε μητΜΓΔ σ την περιοχή 21q22.3 του χρωμοσώματος 21 (εικ. 43). Το συγκεκριμένο δείγμα εξετάστηκε και σε ακόμα δυο δείκτες του χρωμοσώματος 21, όπου ο ένας εμφάνισε το φυσιολογικό πρότυπο και ο άλλος ήταν μη πληροφοριακός (πίνακας 29). Το δείγμα 113 εμφανίζει τμηματική ΜΓΔ στην παραπάνω περιοχή για το χρωμόσωμα 21 .

**Πίνακας 29.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 113

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	1,3	2,3	1,3	NI
D21S11	1,2	2,3	1,2	NI
D21S1437	2,2	1,3	2,3	Φ
D21S1446	2,2	1,3	2,2	μητΜΓΔ21
D21S1270	1,1	1,1	1,1	NI
D22S1138	1,1	1,1	1,1	NI

Φ : Φυσιολογικό NI: Μη πληροφοριακό μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ

- Το δείγμα 134 εμφάνισε μητΜΓΔ στην περιοχή 14q31.3 του χρωμοσώματος 14 (εικ. 43). Το συγκεκριμένο δείγμα εξετάστηκε και σε ακόμα έναν δείκτη του χρωμοσώματος 14, ο οποίος εμφάνισε το φυσιολογικό πρότυπο (πίνακας 30). Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το συγκεκριμένο δείγμα εμφανίζει τμηματική ΜΓΔ για το χρωμόσωμα 14 στην περιοχή του δείκτη D14S1279.

**Πίνακας 30.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 134

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	2,2	1,1	1,2	Φ
D14S1279	1,1	2,2	1,1	μητΜΓΔ14
D21S1437	1,2	1,2	1,2	NI
D21S1446	1,3	2,4	1,4	Φ
D22S281	1,1	1,1	1,1	NI

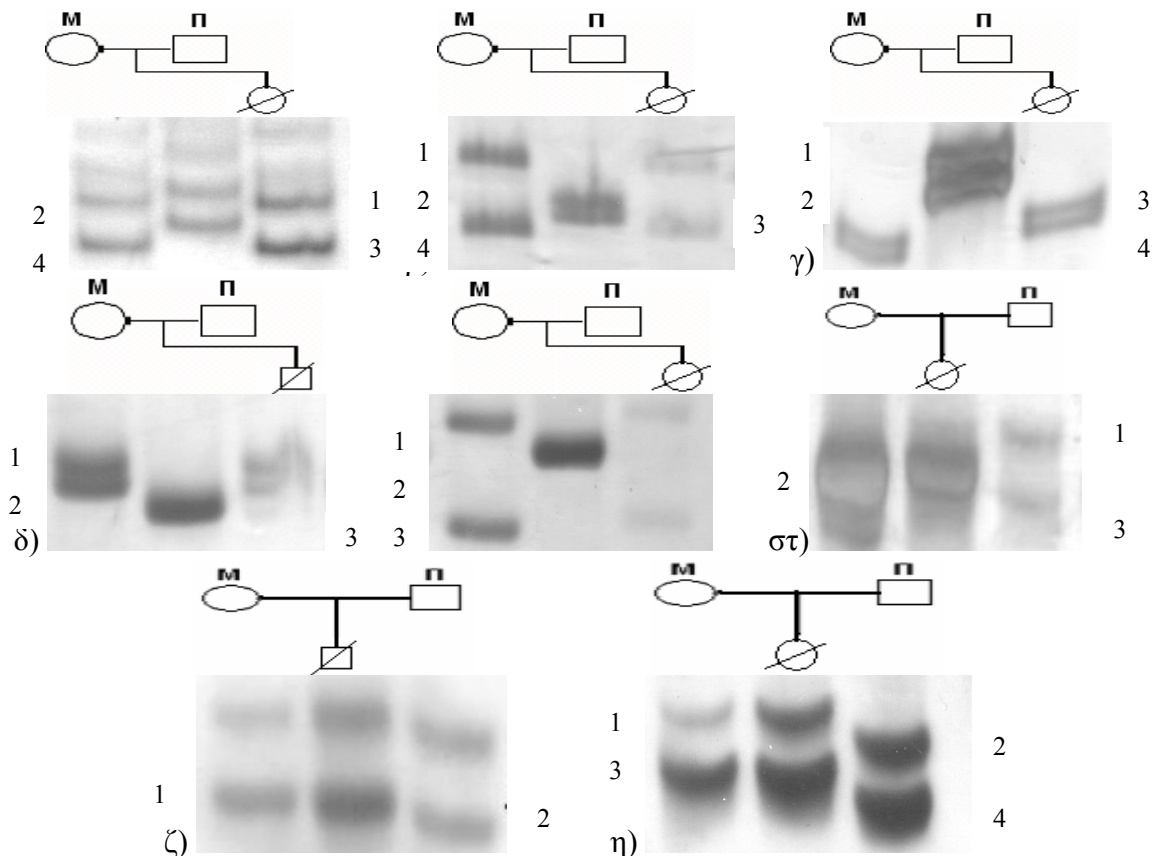
Φ : Φυσιολογικό, NI: Μη πληροφοριακό, μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ

- Το δείγμα 237 εμφάνισε μητΜΓΔ στην περιοχή 18p11.32 του χρωμοσώματος 18 (εικ. 32). Το συγκεκριμένο δείγμα εξετάστηκε και σε ακόμα έναν δείκτη του χρωμοσώματος 18, ο οποίος ήταν μη πληροφοριακός (πίνακας 31). Το δείγμα 237 εμφανίζει τμηματική ΜΓΔ για το χρωμόσωμα 18 στην περιοχή του δείκτη D18S59.

**Πίνακας 31.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 237

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D13S1243	2,2	1,2	1,2	NI
D13S1295	2,3	1,2	2,3	NI
D16S3121	2,2	1,2	1,2	NI
D16S3018	1,2	1,2	1,2	NI
D18S1141	1,2	1,2	1,2	NI
D18S59	1,3	2,4	1,3	μητΜΓΔ18
D21S1270	1,1	1,1	1,1	NI
D21S1437	1,2	2,3	1,2	NI
D21S1446	1,2	1,2	1,2	NI

NI: Μη πληροφοριακό, μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ



**Εικ. 32.** Φωτογραφίες πηκτωμάτων ακρυλαμίδης μετά από χρώση με νιτρικό άργγρο των δειγμάτων : α) 40, β) 50, γ) 68, δ) 93, ε) 99, στ) 113 ζ) 134 και η) 237 στους δείκτες όπου ανιχνεύτηκε μητΜΓΔ σε μια μόνο περιοχή ενός χρωμοσώματος.

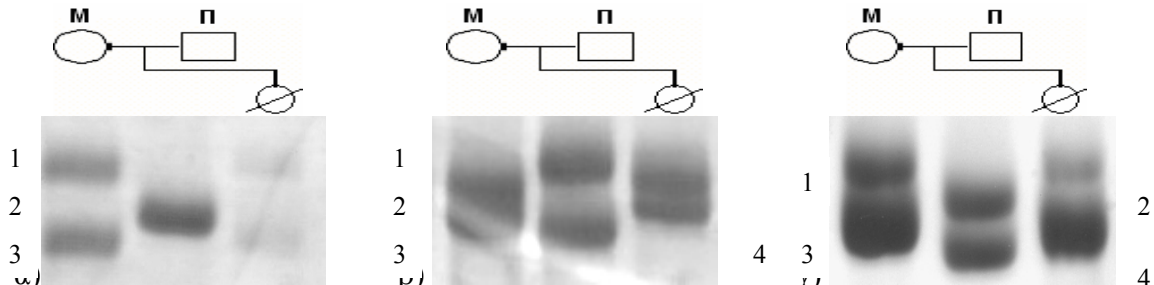
Για τα παραπάνω δείγματα που έχουν εμφανίσει μητΜΓΔ σε έναν μόνο δείκτη κάποιου χρωμοσώματος το αποτέλεσμα δεν επιβεβαιώνεται. Θα πρέπει να γίνει μοριακή ανάλυση περισσότερων δεικτών κατά μήκος των χρωμοσωμάτων για να επιβεβαιωθεί η μητΜΓΔ. Επιβεβαιώνεται μόνο η ύπαρξη τμηματικής μητΜΓΔ σε αυτά τα χρωμοσώματα.

- Το δείγμα 62 εμφάνισε μητΜΓΔ σε τρεις περιοχές 21q21.1 (D21S1437), 21q22.3 (D21S1446) και 21q22 (D21S1270) του χρωμοσώματος 21. Και στις τρεις περιοχές η μητΜΓΔ εμφανίστηκε ως ετεροδισωμία, άρα πρέπει να συνέβη σφάλμα στην πρώτη μειωτική διαίρεση της μητέρας (εικ. 33). Το αποτέλεσμα των τριών δεικτών επαρκεί για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη μητΜΓΔ στο χρωμόσωμα 21. Οι δείκτες που εξετάστηκαν και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 32.

**Πίνακας 32.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 62

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	2,3	1,3	2,3	NI
D21S1270	1,3	2,3	1,3	μητΜΓΔ21
D21S1437	1,3	2,2	1,3	μητΜΓΔ21
D21S1446	2,3	1,4	2,2	μητΜΓΔ21

NI: Μη πληροφοριακό, μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ



**Εικ. 33.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών : α) D21S1437, β) D21S1446 και γ) D21S1270 για το δείγμα 62.

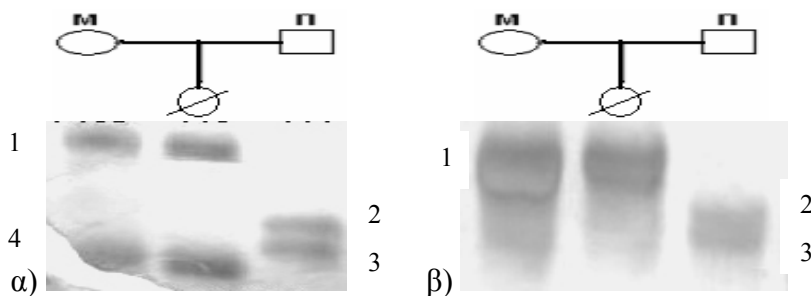
- Το δείγμα 110 εμφάνισε μητΜΓΔ στις περιοχές 21q21.1 και 21q22.3 του χρωμοσώματος 21 (εικ. 34). Το αποτέλεσμα των δεικτών επαρκεί για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη μητΜΓΔ στο χρωμόσωμα 21. Οι δείκτες που εξετάστηκαν και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 33.

**Πίνακας 33.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 110

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	2,2	1,2	2,2	NI
D21S1437	1,4	2,3	1,4	μητΜΓΔ21
D21S1446	1,1	2,3	1,1	μητΜΓΔ21
D22S1138	1,1	1,1	1,1	NI
D21S11	2,2	1,2	2,2	NI

NI: Μη πληροφοριακό, μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ

Ο δείκτης D21S1437 εμφάνισε ετεροδισωμία και ο δείκτης D21S1446 ισοδισωμία. Θα πρέπει να συνέβησαν δυο σφάλματα κατά τη μειωτική διαίρεση και στην 1<sup>η</sup> και στην 2<sup>η</sup>. Στο συγκεκριμένο δείγμα δεν ανιχνεύτηκε καμία ζώνη πατρικής προέλευσης και στα αποτελέσματα δεν εμφανίστηκε το φυσιολογικό πρότυπο σε κανέναν από τους δείκτες στους οποίους εξετάστηκε. Για το λόγο αυτό έγινε μοριακός έλεγχος για μητρική επιμόλυνση αλλά ο δείκτης D21S11 εμφανίστηκε μη πληροφοριακός και δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη μητρικής επιμόλυνσης. Φωτογραφίες των πηκτωμάτων ακρυλαμιδίου παρουσιάζονται στην εικόνα 45.



**Εικ. 34.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D21S1437 και β) D21S1446 για το δείγμα 110.

- Το δείγμα 119 εμφάνισε μητΜΓΔ στην περιοχή 14q12 του χρωμοσώματος 14 (εικ 35). Το δείγμα αυτό εξετάστηκε σε άλλους τρεις δείκτες κατά μήκος του χρωμοσώματος 14, το αποτέλεσμα όμως της μοριακής ανάλυσης για αυτούς δείκτες ήταν μη πληροφοριακό (πίνακας 34). Για την μοριακή ανάλυση είχαμε την δυνατότητα να συλλέξουμε ιστό και από τον πλακούντα της μητέρας αλλά και από το έμβρυο.

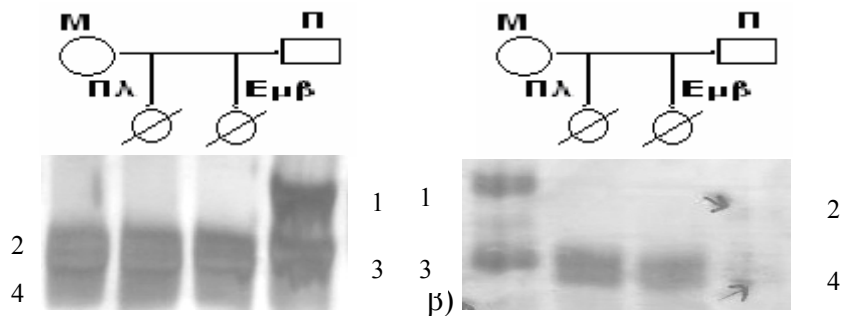
**Πίνακας 34.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 119

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Έμβρυο	Αποτέλεσμα
D7S645	1,2	1,2	1,2	1,2	NI
D13S1243	1,2	1,2	1,2	1,2	NI
D13S1295	1,1	1,1	1,1	1,1	NI
D14S608	2,4	1,3	2,4	2,4	μητΜΓΔ14
D14S267	1,2	1,2	1,2	1,2	NI
D14S1007	1,2	1,2	1,2	1,2	NI
D14S1279	1,2	1,1	1,2	1,2	NI
D16S3018	1,2	1,2	1,2	1,2	NI
D21S11	1,1	1,1	1,1	1,1	NI
D21S1437	1,3	2,4	3,4	3,4	Φ
D21S1446	2,2	1,2	1,2	1,2	NI
D22S1138	1,1	1,1	1,1	1,1	NI

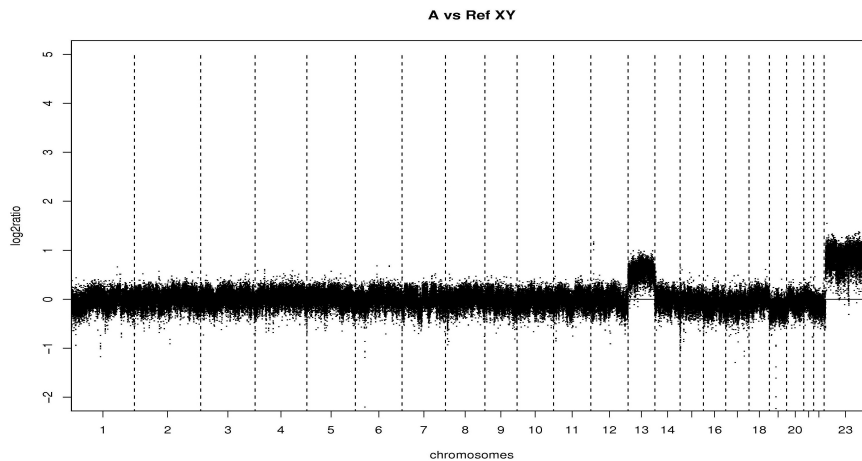
Φ : Φυσιολογικό, NI: Μη πληροφοριακό, μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ

Τα κλινικά χαρακτηριστικά του δείγματος αυτού ήταν η εμφάνιση προβοσκίδας προσώπου, ολοπροσεγκεφαλία, ανοφθαλμία, ανώμαλα γενετικά όργανα, χέρια αφύσικα κ.τ.λ.. Θέλοντας να δούμε αν υπάρχει συσχέτιση της μητΜΓΔ στο χρωμόσωμα 14 με τα κλινικά στοιχεία, καθώς επίσης για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος, το δείγμα εστάλη για μοριακή ανάλυση με μικροσυστοιχίες DNA (aCGH). Το αποτέλεσμα αυτής της εξέτασης ήταν η εμφάνιση τρισωμίας 13 (Εικ. 36).

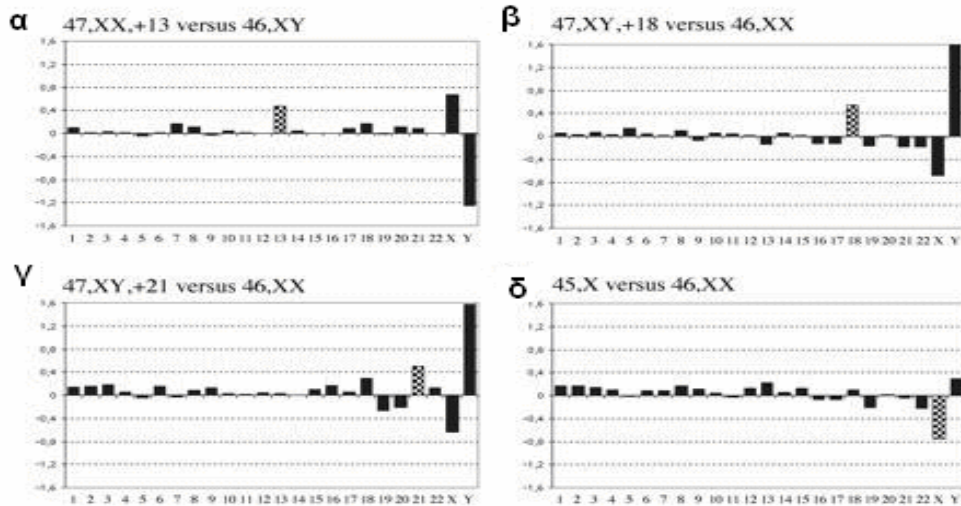
Σύμφωνα με την βιβλιογραφία η τρισωμία 13 μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση ολοπροσεγκεφαλίας και των άλλων κλινικών στοιχείων που ευρέθησαν στο συγκεκριμένο δείγμα. Παρόλα αυτά από την συγκεκριμένη μοριακή εξέταση δεν επιβεβαιώθηκε η εμφάνιση μητΜΓΔ, πιθανώς γιατί περιλαμβάνει πολύ μικρό τμήμα του χρωμοσώματος 14 (τμηματική ΜΓΔ), με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να διαγνωστεί. Ακόμα η τρισωμία 13 που εμφανίστηκε με την τεχνική της aCGH, δεν διαγνώστηκε με την μοριακή ανάλυση με πολυμορφικούς δείκτες DNA για το λόγο ότι το δείγμα έφερε ζώνες του χρωμοσώματος 13 σε ομόζυγη κατάσταση, με αποτέλεσμα δυο ζώνες να εμφανίζονται στο πήκτωμα ακρυλαμίδης ως μια.



**Εικ. 35.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S608 και β) D21S1437 για το δείγμα 119.



**Εικ. 36.** Αποτέλεσμα μοριακής ανάλυσης με μικροσυστοιχίες aCGH του δείγματος 119.



**Εικ. 37.** Πρότυπα aCGH. α) τρισωμία 13, β) τρισωμία 18, γ) τρισωμία 21 και δ) 45,X (σύνδρομο Turner).

Πιθανόν το αποτέλεσμα να προέκυψε μετά από μετάθεση κατά Roberson μεταξύ των περιοχών των δυο ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων 13 και 14.

### 5.1.2 Διάγνωση μητΜΓΔ σε περισσότερα από ένα χρωμοσώματα

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί από τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης, από τα 21 δείγματα που εμφάνισαν μητΜΓΔ 10 έμβρυα που εξετάστηκαν, εμφανίζουν μητΜΓΔ σε περισσότερα από ένα χρωμοσώματα, κυρίως στα χρωμοσώματα 14, 20, 21 και 22, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 35.

**Πίνακας 35.** Δείγματα που εμφάνισαν μητΜΓΔ σε περισσότερα από ένα χρωμοσώματα

Αρ. Δείγματος	Φύλο	Χρωμόσωμα	Δείκτης	Αποτέλεσμα	Ισο/Ετε	Καρυότυπος
25	♀	14	D14S608	μητΜΓΔ14	I	-
		21	D21S1437	μητΜΓΔ21		
28	♀	20	D20S96	μητΜΓΔ20	E	-
			21	D21S1437	μητΜΓΔ21	
		D21S1446		I		
		22	D22S281	μητΜΓΔ22	I	
34	♀	20	D20S96	μητΜΓΔ20	E	-
		21	D21S1437	μητΜΓΔ21		
		22	D22S281	μητΜΓΔ22		
37	♀	14	D14S608	μητΜΓΔ14	E	-
		20	D20S96	μητΜΓΔ20		
		22	D22S281	μητΜΓΔ22		
76	♀	14	D14S608	μητΜΓΔ14	E	-
			21	D21S1437	μητΜΓΔ21	
D21S1446	E					
96	♀	14	D14S608	μητΜΓΔ14	I	-
		16	D16S3018	μητΜΓΔ16	E	
156	♀	7	D7S645	μητΜΓΔ7	E	-
		15	D15S1295	μητΜΓΔ15		

**Πίνακας 35.** Δείγματα που εμφάνισαν μητΜΓΔ σε περισσότερα από ένα χρωμοσώματα (συνέχεια)

168	♂	13	D13S1243	μητΜΓΔ13		
		14	D14S608	μητΜΓΔ14		
			D14S1279			
			D14S1007			
		15	D15S542	μητΜΓΔ15		
D15S543						
21	D21S1437	μητΜΓΔ21				
222	♀	14	D14S1279	μητΜΓΔ14	I	46,XX
		22	D22S1169	μητΜΓΔ22	E	
231	♀	13	D13S1295	μητΜΓΔ13	E	47,XX + 13
		16	D16S3121	μητΜΓΔ16		
		21	D21S1437	μητΜΓΔ21		
			D21S1446			

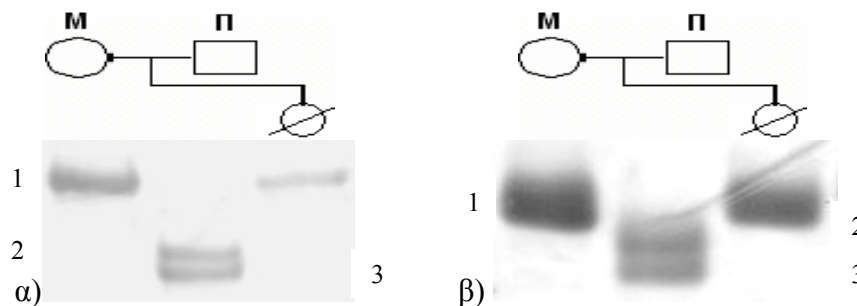
I: Ισοδισωμία E:Ετεροδισωμία

- Το δείγμα 25 εμφάνισε μητΜΓΔ στις περιοχές 14q12 του χρωμοσώματος 14 και 21q21.1 του χρωμοσώματος 21 (εικ. 38). Άλλοι δείκτες που εξετάστηκαν σε αυτά τα χρωμοσώματα ήταν μη πληροφοριακοί (πίνακας 36).

**Πίνακας 36.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 25

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	1,1	2,3	1,1	μητΜΓΔ14
D21S1446	1,2	1,2	1,2	NI
D21S1437	1,1	2,3	1,1	μητΜΓΔ21

NI: Μη πληροφοριακό μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ



**Εικ. 38.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S608 και β) D21S1437 για το δείγμα 25.

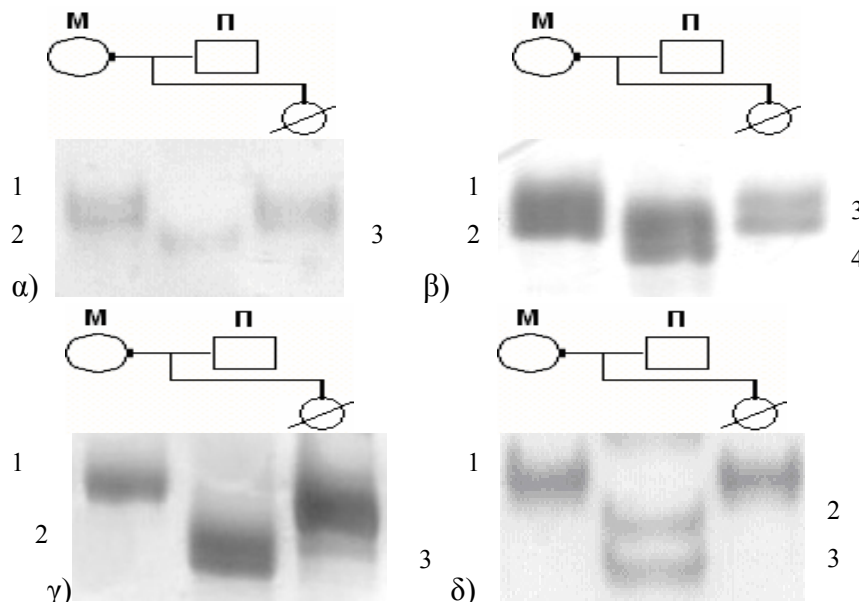
Το αποτέλεσμα της μοριακής ανάλυσης οφείλεται σε πιθανή μετάθεση t(14;21) Όπως μπορεί να παρατηρηθεί και από την εικόνα, στον δείκτη D14S608 μπορεί να υπάρχει έλλειμμα στην συγκεκριμένη περιοχή του χρωμοσώματος 14, το οποίο όμως λόγω του ότι η μητέρα είναι ομόζυγη στην συγκεκριμένη περιοχή, το έλλειμμα δεν μπορεί να διαγνωστεί.

- Το δείγμα 28 εμφάνισε μητΜΓΔ σε τέσσερις περιοχές: 20q13.1 του χρωμοσώματος 20, 21q21.1 και 21q22.3 του χρωμοσώματος 21 και 22q12 του χρωμοσώματος 22 (Εικ.39). Επιβεβαιώνεται μόνο η ύπαρξη της μητΜΓΔ21 αφού δυο δείκτες έχουν εμφανίσει αυτό το αποτέλεσμα (πίνακας 37). Στους δείκτες D20S96 και D21S1437 η μητΜΓΔ εμφανίστηκε ως ετεροδισωμία, πράγμα που σημαίνει ότι το λάθος έγινε στην πρώτη μειωτική διαίρεση της μητέρας. Στους δείκτες D21S1446 και D22S281 η μητέρα είναι ομόζυγη και η μητΜΓΔ εμφανίστηκε ως ισοδισωμία, παρόλα αυτά το λάθος στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων στις περιοχές των δεικτών αυτών μπορεί να συνέβη είτε στην πρώτη είτε στην δεύτερη μειωτική διαίρεση. Πιθανών να πρόκειται για σύνθετη ανακατάταξη που περιλαμβάνει τις παραπάνω περιοχές των δεικτών για τα χρωμόσωμα 20, 21 και 22. Οι δείκτες στους οποίους εξετάστηκε παρουσιάζονται στον πίνακα 37.

**Πίνακας 37.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 28

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	1,3	1,2	1,2	NI
D20S96	1,2	3,3	1,2	μητΜΓΔ20
D21S1446	1,1	2,3	1,1	μητΜΓΔ21
D21S1437	1,3	2,4	1,3	μητΜΓΔ21
D22S281	1,1	3,4	1,1	μητΜΓΔ22

NI: Μη πληροφοριακό μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ



**Εικ. 39.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D20S96, β) D21S1437, γ) D21S1446 και δ) D22S281 για το δείγμα 28.

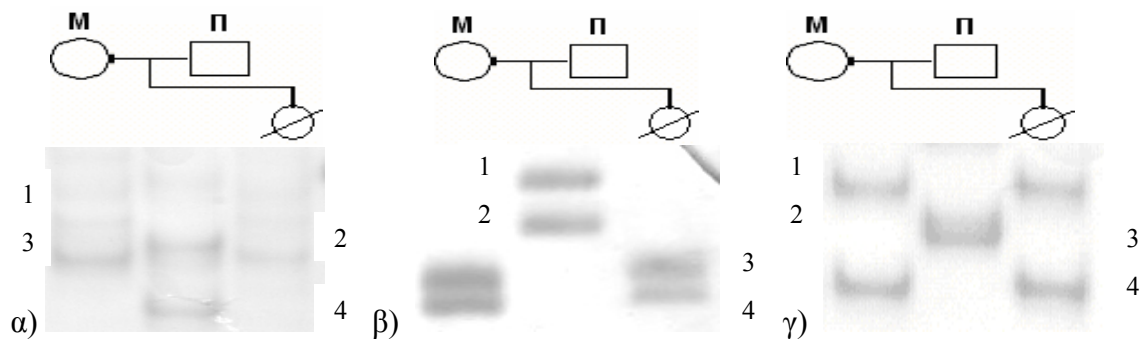


- Το δείγμα 34 εμφάνισε μητΜΓΔ σε τρεις περιοχές 20q13.1, 21q21.1 και 22q12 των χρωμοσωμάτων 20, 21 και 22 αντίστοιχα (Εικ.40). Πιθανών να πρόκειται για σύνθετη ανακατάταξη που περιλαμβάνει τις παραπάνω περιοχές των χρωμοσωμάτων 20, 21 και 22. Οι δείκτες στους οποίους εξετάστηκε παρουσιάζονται στον πίνακα 38.

**Πίνακας 38.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 34

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	1,2	1,1	1,2	NI
D20S96	1,3	2,4	1,3	μητΜΓΔ20
D21S1446	1,1	1,1	1,1	NI
D21S1437	3,4	1,2	3,4	μητΜΓΔ21
D22S281	1,4	2,4	1,4	μητΜΓΔ22

NI: Μη πληροφοριακό μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ

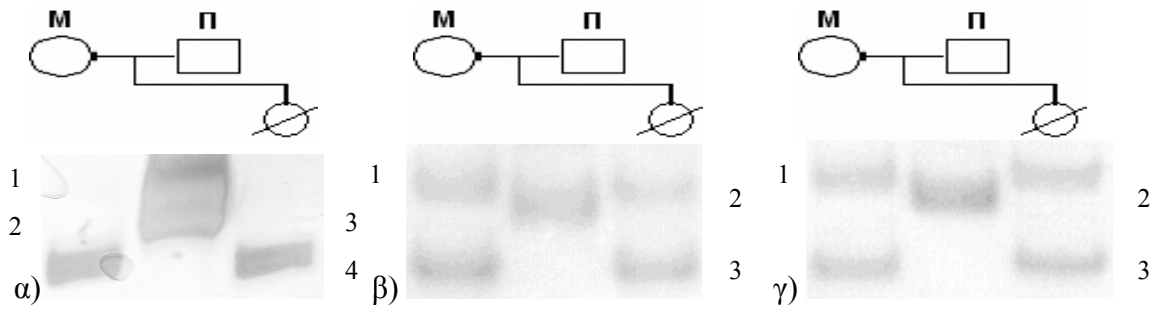


**Εικ.40.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D20S96 και β) D21S1437 και γ) D22S281 για το δείγμα 34.

- Το δείγμα 37 εμφάνισε μητΜΓΔ σε τρεις περιοχές 14q12, 20q13.1 και 22q12 των χρωμοσωμάτων 14, 20 και 22 αντίστοιχα (Εικ.41). Πιθανών να πρόκειται για σύνθετη ανακατάταξη που περιλαμβάνει τις παραπάνω περιοχές των χρωμοσωμάτων 14, 20 και 22. Και στους τρεις δείκτες η μητΜΓΔ δηλαδή το σφάλμα συνέβη στην πρώτη μειωτική διαίρεση της μητέρας. Οι δείκτες στους οποίους εξετάστηκε καθώς και το αποτέλεσμα που προκύπτει από την συγκριτική ανάλυση των ζωνών του πλακούντα με αυτές των γονέων παρουσιάζονται στον πίνακα 39.

**Πίνακας 39.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 37

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	3,4	1,2	3,4	μητΜΓΔ14
D20S96	1,3	2,2	1,3	μητΜΓΔ20
D21S1446	2,3	1,2	1,3	Φ
D21S1437	1,2	1,1	1,2	NI
D22S281	1,3	2,2	1,3	μητΜΓΔ22



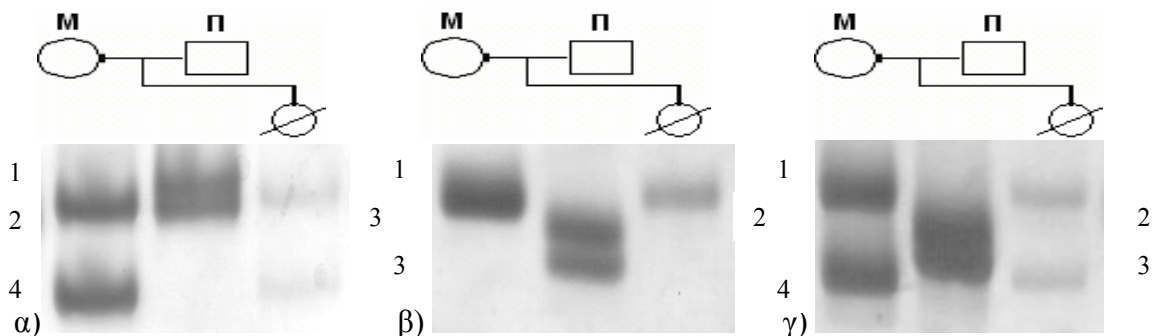
**Εικ. 41.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S608, β) D20S96 και γ) D22S281 για το δείγμα 37.

- Το δείγμα 76 εμφάνισε μητΜΓΔ στην περιοχή 14q12 του χρωμοσώματος 14 και στις περιοχές 21q21.1 και 21q22.3 του χρωμοσώματος 21 (Εικ.42). Το αποτέλεσμα της μοριακής ανάλυσης οφείλεται σε πιθανή μετάθεση t(14;21). Ενώ επιβεβαιώνεται μόνο η ύπαρξη μητΜΓΔ στο χρωμόσωμα 21 όπου μητΜΓΔ ανιχνεύτηκε σε δύο περιοχές. Για το χρωμόσωμα 21 ο ένας δείκτης εμφάνισε ετεροδισωμία και ο άλλος πιθανόν ισοδισωμία γιατί η μητέρα είναι ομόζυγη στην συγκεκριμένη περιοχή. Μπορεί λοιπόν να συνέβησαν δύο διαφορετικά συμβάντα ένα στην πρώτη και ένα στην δεύτερη μειωτική διαίρεση της μητέρας. Στην πρώτη μειωτική διαίρεση μπορεί να συνέβη η μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 14 και 21 και στην δεύτερη μειωτική διαίρεση να έγινε διπλασιασμός της περιοχής 21q21.1 και να προέκυψε η ισοδισωμία. Οι δείκτες στους οποίους εξετάστηκε παρουσιάζονται στον πίνακα 40.

**Πίνακας 40.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 76

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	2,4	1,3	2,4	μητΜΓΔ14
D21S1446	1,4	2,3	1,4	μητΜΓΔ21
D21S1437	1,1	2,3	1,1	μητΜΓΔ21
D22S1138	1,1	1,1	1,1	NI

NI: Μη πληροφοριακό μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ



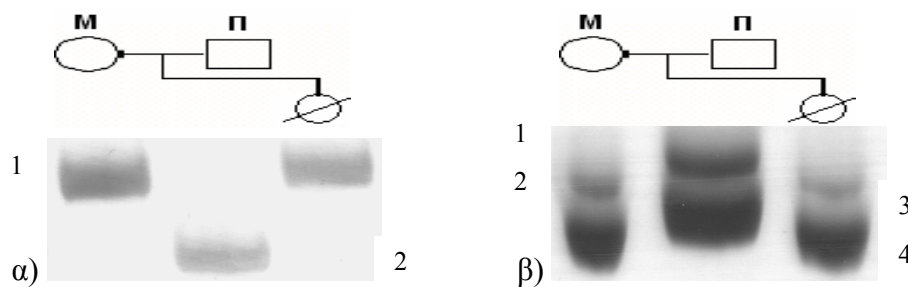
**Εικ. 42.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S608 β) D21S1437 και γ) D21S1446 για το δείγμα 76.

- Το δείγμα 96 εμφάνισε μητΜΓΔ σε δύο περιοχές 14q12 και 16q23 των χρωμοσωμάτων 14 και 16 αντίστοιχα (Εικ. 43). Η μητΜΓΔ14 εμφανίζεται ως ισοδισωμία ενώ η μητΜΓΔ16 ως ετεροδισωμία. Συνεπώς πρόκειται για δυο διαφορετικά συμβάντα κατά τη μειωτική διαίρεση της μητέρας. Οι δείκτες στους οποίους εξετάστηκε παρουσιάζονται στον πίνακα 41.

**Πίνακας 41.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 96

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D7S645	1,1	1,1	1,1	NI
D14S608	1,1	2,2	1,1	μητΜΓΔ14
D16S3018	1,3	2,4	1,3	μητΜΓΔ16
D21S1446	1,2	1,2	1,2	NI
D21S1437	1,1	1,2	1,1	NI
D22S281	1,3	2,3	3,3	NI
D22S1138	1,1	1,1	1,1	NI
DXS1073	1,2	1,2	1,2	NI

NI: Μη πληροφοριακό μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ



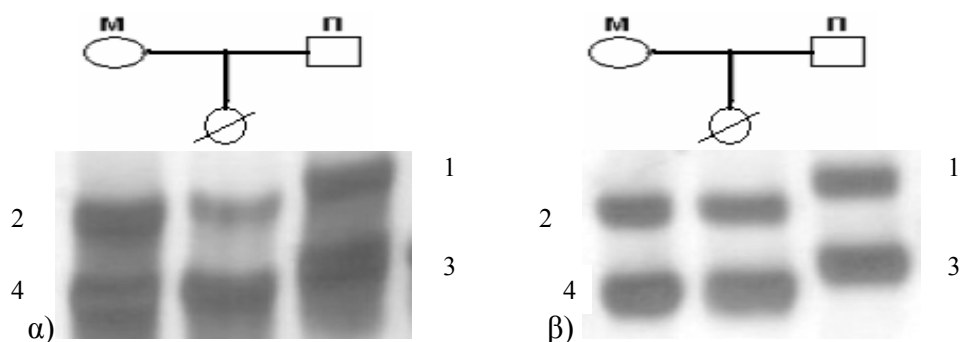
**Εικ. 43.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S608 και β) D16S3018 για το δείγμα 96.

- Το δείγμα 156 εμφάνισε μητΜΓΔ σε δυο περιοχές 7q11.22 και 15q11,2 των χρωμοσωμάτων 7 και 15 αντίστοιχα (Εικ.44). Οι δείκτες στους οποίους εξετάστηκε παρουσιάζονται στον πίνακα 42.

**Πίνακας 42.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 156

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D7S645	2,4	1,3	2,4	μητΜΓΔ7
D14S608	1,2	1,1	1,2	NI
D15S542	2,4	1,3	2,4	μητΜΓΔ15
D15S543	1,3	2,3	1,3	NI
GABRB3	1,2	1,2	1,2	NI
D16S3018	1,2	1,2	1,2	NI
D21S1446	1,1	1,1	1,1	NI
D21S1437	1,1	1,2	1,1	NI
D21S1270	2,3	1,2	1,2	NI
D21S11	2,3	2,3	1,3	NI
D22S39	1,1	1,1	1,1	NI
D22S1138	1,1	1,1	1,1	NI

NI: Μη πληροφοριακό μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ



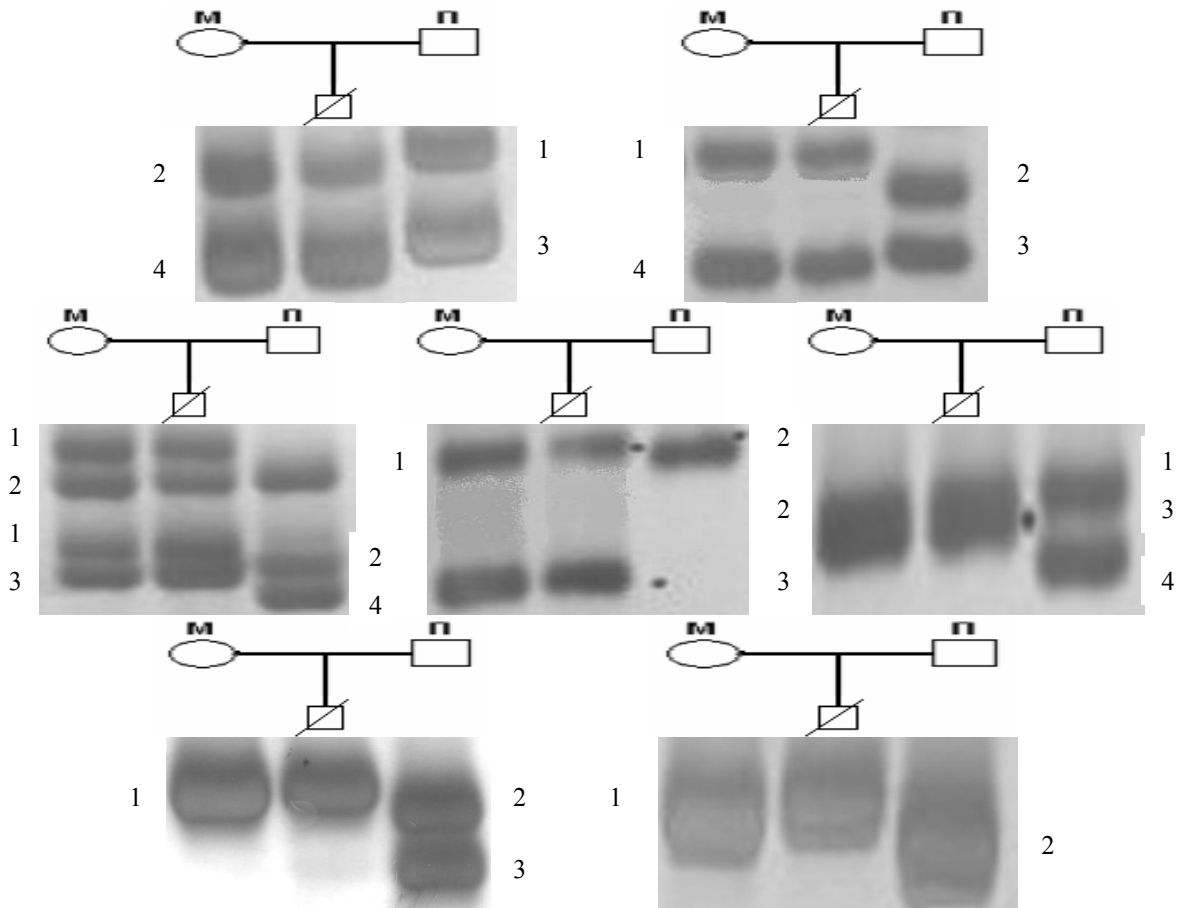
**Εικ 44.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D7S645 και β) D15S542 για το δείγμα 156.

- Το δείγμα 168 εμφάνισε μητΜΓΔ στις περιοχές 7q11.22 του χρωμοσώματος 7, 15q11,2 του χρωμοσώματος 15, 14q31.3 και 14qter του χρωμοσώματος 14 και 21q22.3 και 21q21.1 του χρωμοσώματος 21. Επιβεβαιώνεται μόνο η μητΜΓΔ για τα χρωμοσώματα 14, 15 και 21 αφού δύο δείκτες εμφάνισαν μητΜΓΔ σε κάθε χρωμόσωμα (Εικ. 45). Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε και στον πίνακα 43, πολλοί δείκτες ήταν μη πληροφοριακοί για το συγκεκριμένο δείγμα. Το δείγμα ήταν άρρεν άρα μπορούμε να αποκλείσουμε την μητρική επιμόλυνση. Πιθανόν να πρόκειται για σύνθετες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις ή εμφάνιση μητΜΓΔ όλου του γενώματος.

**Πίνακας 43.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 168

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D7S645	2,4	1,3	2,4	μητΜΓΔ7
D13S1243	2,3	1,3	2,3	NI
D14S608	2,3	1,2	2,2	NI
D14S1279	1,2/1,3	2,2/2,4	1,2/1,3	NI / μητΜΓΔ14
D14S1007	1,4	2,3	1,4	μητΜΓΔ14
D15S542	1,3	2,2	1,3	μητΜΓΔ15
D15S543	2,3	1,4	2,3	μητΜΓΔ15
D15S966	2,2	1,2	2,2	NI
GABRB3	1,3	2,3	1,3	NI
D16S3018	1,2	1,2	1,2	NI
D21S11	1,2	1,2	1,1	NI
D21S1270	1,1	1,2	1,1	NI
D21S1446	1,1	2,2	1,1	μητΜΓΔ21
D21S1437	1,1	2,3	1,1	μητΜΓΔ21
D22S281	2,3	1,3	2,3	NI

NI: Μη πληροφοριακό μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ



**Εικ. 45.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D7S645, β) D14S1007, γ) D14S1279, δ) D15S542, ε) D15S543, ζ) D21S1437, και η) D21S1446 για το δείγμα 222

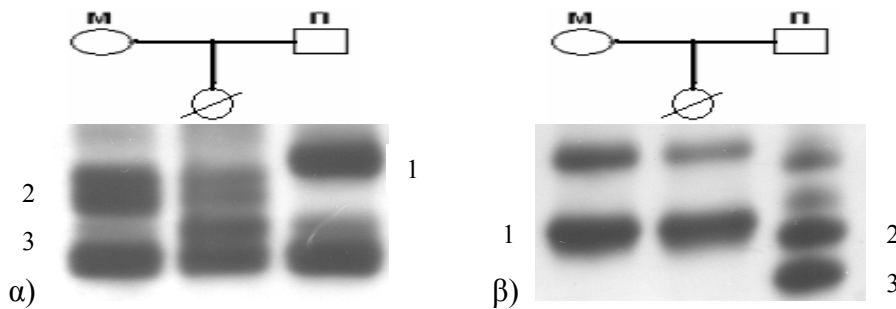
-Το δείγμα 222 εμφάνισε μητΜΓΔ σε δυο περιοχές 14q31.3 και 22q13.32 των χρωμοσωμάτων 14 και 22 αντίστοιχα (Εικ. 46). Στον πίνακα 44 παρουσιάζονται οι δείκτες στους οποίους εξετάστηκε καθώς και το αποτέλεσμα που προκύπτει από την συγκριτική ανάλυση των ζωνών του πλακούντα με αυτές των γονέων.

**Πίνακας 44.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 222

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D13S1243	1,2	1,2	1,2	NI
D14S1279	2,3/2,2	1,1/1,2	2,3/1,2	μητΜΓΔ14/ NI
D18S59	2,3	1,2	2,3	NI
D20S162	1,1	1,1	1,1	NI
D20S171	1,2	1,2	1,2	NI
D21S1446	1,2	1,2	1,2	NI
D21S1437	1,2	1,2	1,2	NI
D22S1169	1,1	2,3	1,1	μητΜΓΔ22
DXS1073	1,2	1,2	1,2	NI

NI: Μη πληροφοριακό μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ

Το δείγμα αυτό εξετάστηκε και για μητρική επιμόλυνση με τον δείκτη DXS1073, ο οποίος όμως εμφανίστηκε ως μη πληροφοριακός. Παρόλα αυτά, όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από το αποτέλεσμα του δείκτη D14S1279, υπάρχει ζώνη πατρικής προέλευσης, κάτι που σημαίνει ότι το δείγμα δεν μπορεί να έχει μητρική επιμόλυνση. Πιθανόν να συνέβη μετάθεση μεταξύ των μη ομόλογων χρωμοσωμάτων 14 και 22.



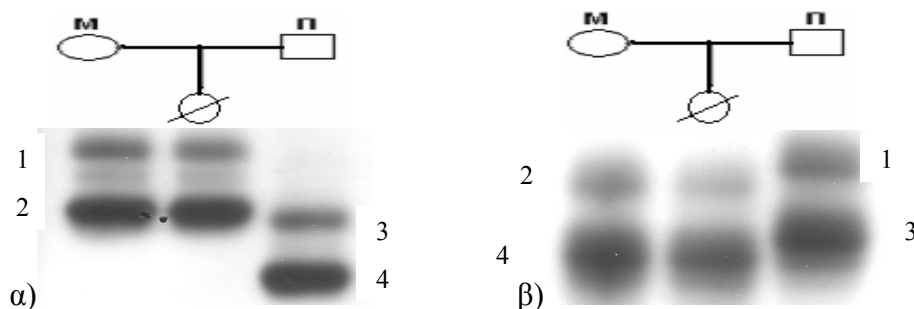
**Εικ. 46.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S1279 και β) D22S1169 για το δείγμα 222.

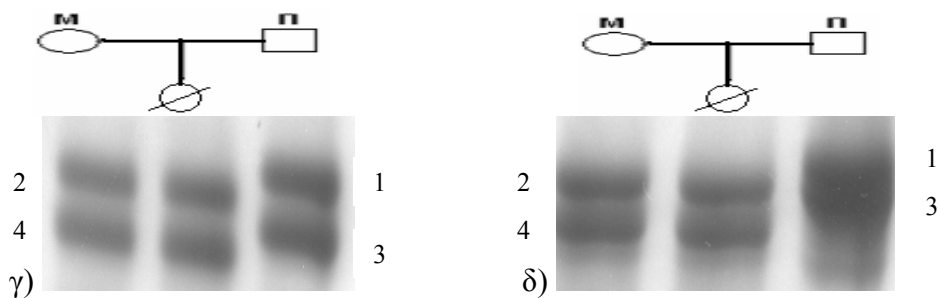
-Το δείγμα 231 εμφάνισε μητΜΓΔ στις περιοχές 13q34 και 16q24.3 των χρωμοσωμάτων 13 και 16 αντίστοιχα και στις περιοχές 21q21.1 και 21q22.3 του χρωμοσώματος 21 (Εικ.47). Στον πίνακα 45 παρουσιάζονται οι δείκτες στους οποίους εξετάστηκε καθώς και το αποτέλεσμα που προκύπτει από την συγκριτική ανάλυση των ζωνών του πλακούντα με αυτές των γονέων.

**Πίνακας 45.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 231

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D13S1295	1,2	3,4	1,2	μητΜΓΔ13
D13S1243	1,2	1,2	1,2	NI
D16S3121	2,4	1,3	2,4	μητΜΓΔ16
D16S3018	1,2	1,2	1,2	NI
D18S59	1,3	2,3	1,3	NI
D18S1141	1,2	1,2	1,2	NI
D21S1446	2,4	1,3	2,4	μητΜΓΔ21
D21S1437	2,4	1,3	2,4	μητΜΓΔ21
D21S1270	1,3	1,2	1,3	NI

NI: Μη πληροφοριακό μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ





**Εικ. 47.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D13S1295, β) D16S3121, γ) D21S1437 και δ) D21S1446 για το δείγμα 231.

Στο συγκεκριμένο δείγμα έγινε και κυτταρογενετική ανάλυση που αποκάλυψε την ύπαρξη τρισωμίας 13. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί από το αποτέλεσμα του δείκτη D13S1295, μπορεί να υπάρχει μια ζώνη που να αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο 3 του πατέρα χωρίς όμως να μπορούμε να το διαγνώσουμε γιατί καλύπτετε από την ζώνη του αλληλόμορφου 2 της μητέρας. Για το λόγω αυτό μπορούμε να αναφέρουμε μόνο την ύπαρξη μητΜΓΔ και όχι της τρισωμίας. Έγινε έλεγχος και σε έναν άλλο δείκτη του χρωμοσώματος 13 αλλά ήταν μη πληροφοριακός. Για το χρωμόσωμα 21 επιβεβαιώνεται μητΜΓΔ21 αφού εμφανίστηκε σε δύο δείκτες κατά μήκος του χρωμοσώματος 21. Πιθανόν να πρόκειται για σύνθετη ανακατάταξη που περιλαμβάνει τις παραπάνω περιοχές των χρωμοσωμάτων 13, 16 και 21.

### 5.1.3 Διάγνωση μητΜΓΔ και τρισωμίας

Τα δείγματα 162 και 225 εμφάνισαν μητΜΓΔ σε δυο ή περισσότερα χρωμοσώματα και τρισωμία στο χρωμόσωμα 21 (πίνακας 46).

**Πίνακας 46.** Εμφάνιση μητΜΓΔ και τρισωμίας μετά από μοριακή ανάλυση με πολυμορφικούς δείκτες DNA

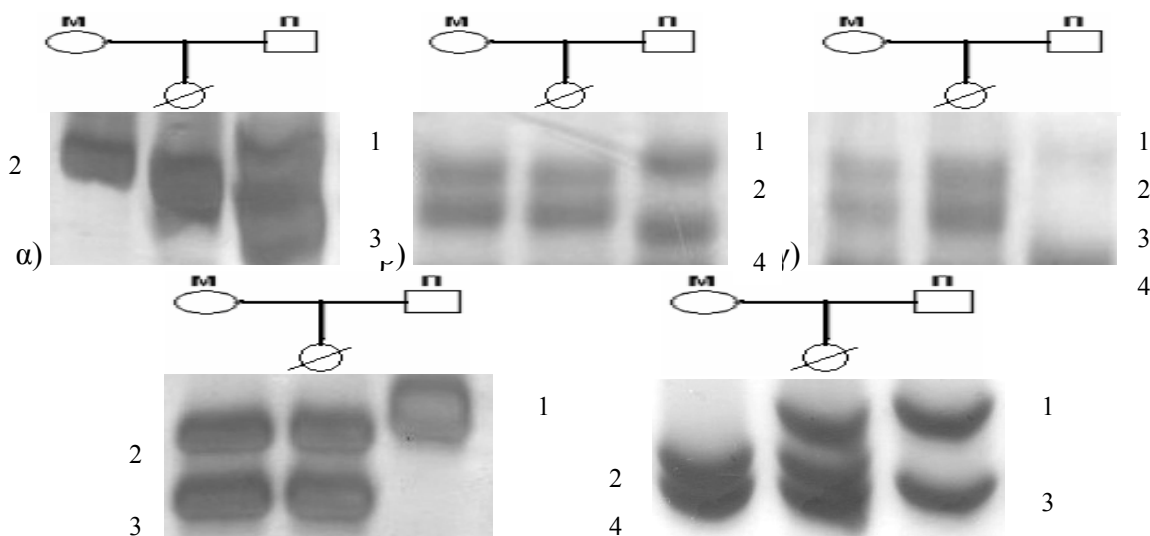
Αρ. Δείγματος	Φύλο	Χρωμόσωμα	Δείκτης	Αποτέλεσμα	Καρυότυπος
162	♀	14	D14S608	μητΜΓΔ14	-
		15	D15S542	μητΜΓΔ15	
			GABRB3		
		21	D21S1437	μητΜΓΔ21	
D21S11	Trp21				
225	♂	18	D18S59	μητΜΓΔ18	47,XY + 21
		20	D20S162	μητΜΓΔ20	
		21	DD21S1437	Trp21	

-Το δείγμα 162 εμφάνισε μητΜΓΔ στις περιοχές 14q12 του χρωμοσώματος 14, 15q11-13 του χρωμοσώματος 15, 21q21.1 του χρωμοσώματος 21 και Xq28 του χρωμοσώματος X. Παράλληλα εμφάνισε και τρισωμία 21 στην περιοχή 21q21 του

χρωμοσώματος 21 (δείκτης D21S11) (Εικ. 48) χωρίς όμως να επιβεβαιώνεται με την κυτταρογενετική ανάλυση (πίνακας 47). Πιθανόν πρόκειται για σύνθετη χρωμοσωμική ανακατάταξη που οδήγησε το έμβρυο σε αποβολή

**Πίνακας 47.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 162

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D7S645	1,2	1,2	1,2	NI
D13S1243	1,2	1,2	1,2	NI
D14S608	2,2	1,3	2,2	μητΜΓΔ
D14S1279	2,2/1,2	1,1/1,2	1,2/1,2	NI
D15S542	2,3	1,4	2,3	μητΜΓΔ
D15S543	1,2	1,2	1,2	NI
GABRB3	2,3	1,4	2,3	μητΜΓΔ
D16S3018	1,2	1,2	1,2	NI
D21S11	2,4	1,3	1,2,4	Tr21
D21S1270	1,2	1,1	1,2	NI
D21S1446	1,2	1,2	1,2	NI
D21S1437	2,3	1,1	2,3	μητΜΓΔ
D22S281	1,2	2,3	1,2	NI
DXS1073	1,3	2,2	1,3	μητΜΓΔ



**Εικ. 48.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών : α) D14S608, β) D15S542, γ) GABRB3, δ) D21S1437 και ε) D21S11 για το δείγμα 162.

-Για το δείγμα 225 η μοριακή ανάλυση αποκάλυψε τρισωμία στην περιοχή 21q21.1 του χρωμοσώματος 21 (πίνακας 48). Το αποτέλεσμα της κυτταρογενετικής ανάλυσης επιβεβαιώνει την ύπαρξη τρισωμίας για το χρωμόσωμα 21. Ακόμα το συγκεκριμένο δείγμα εμφάνισε και μητΜΓΔ18 στην περιοχή 18p11.32 του χρωμοσώματος 18 και μητΜΓΔ20 στην περιοχή 20p12.2 του χρωμοσώματος 20, κάτι που επιβεβαιώνει ότι με τον συμβατικό καρυότυπο δεν είναι δυνατή η ανίχνευση

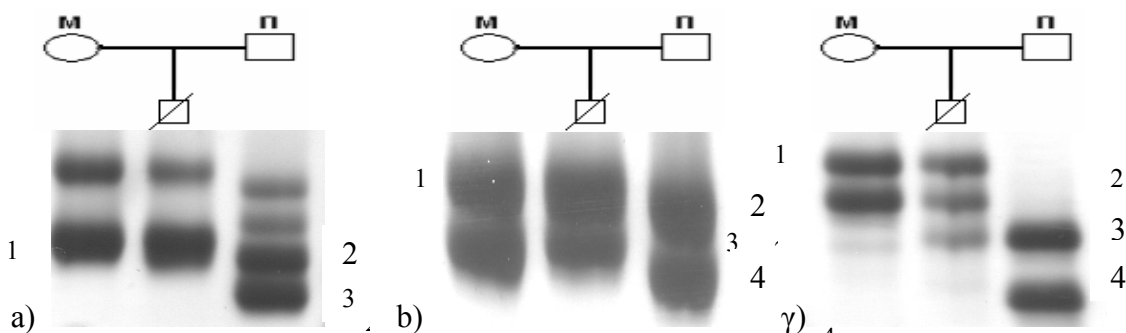


πολύ μικρού εύρους χρωμοσωμικών διαταραχών όπως είναι και η ΜΓΔ. Πιθανόν πρόκειται για σύνθετη χρωμοσωμική ανακατάταξη που οδήγησε το έμβρυο σε αποβολή. Τα αποτελέσματα έτσι όπως εμφανίστηκαν στο πήκτωμα ακρυλαμιδίου παρουσιάζονται στην εικόνα 49.

**Πίνακας 48.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 225

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D13S1243	1,2	1,2	1,2	NI
D14S1279	1,1/1,2	1,1/1,2	1,1/1,2	NI
D18S59	1,1	2,3	1,1	μητΜΓΔ
D20S162	1,3	2,4	1,3	μητΜΓΔ
D20S171	2,3	1,3	2,3	NI
D21S1446	2,2	1,2	1,2	NI
D21S1437	1,2	3,4	1,2,3	Tr21
D22S1169	1,2	1,2	1,2	NI

μητΜΓΔ : Μητρική ΜΓΔ NI: Μη πληροφοριακό Tr : Τρισωμία



**Εικ. 49.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών : α) D18S59, β) D20S162 και γ) D21S1437 για το δείγμα 225.

## 5.2 Διάγνωση τρισωμιών

Τρισωμία διαγνώσθηκε σε 10 δείγματα αποβολών (14,7%) όπως αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 49. Σε μεγαλύτερο ποσοστό εμφανίστηκαν τρισωμίες του χρωμοσώματος 21 (8 δείγματα) ενώ βρέθηκε μόνο μια περίπτωση τρισωμίας 16 σε ένα δείκτη και μια περίπτωση τρισωμίας 13. Βρέθηκαν επίσης δυο περιπτώσεις τρισωμίας 14 και μια περίπτωση τρισωμίας 22. Μπορεί να επιβεβαιωθεί μόνο η τρισωμία 21 των δειγμάτων 87, 125, 144, 165, 225, 228 και 234 γιατί εμφανίστηκαν σε δυο δείκτες κατά μήκος του χρωμοσώματος 21 και η τρισωμία 13 για το δείγμα 116 που επιβεβαιώνεται από την κυτταρογενετική ανάλυση.

**Πίνακας 49.** Εμφάνιση τρισωμιών μετά από μοριακή ανάλυση με πολυμορφικούς δείκτες DNA

Αρ. Δείγματος	Φύλο	Χρωμόσωμα	Δείκτης	Αποτέλεσμα	Καρυότυπος
87	♀	14	D14S608	Tr14	-
		21	D21S1446 D21S1437	Tr21	
		22	D22S281	Tr22	
116	♀	13	D13S1243	Tr13	47,XX + 13
125	♀	21	D21S1437 D21S1446	Tr21	-
144	♀	21	D21S1270 D21S1437	Tr21	47,XX + 21
165	♀	21	D21S1446 D21S11	Tr21	-
192	♀	16	D16S3121	Tr16	-
201	♀	14	D14S608	Tr14	-
		21	D21S1446	Tr21	
213	♀	21	D21S1446	Tr21	-
228	♂	21	D21S1437 D21S1446	Tr21	47,XY + 21
234	♂	21	D21S11	Tr21	47,XY + 21

- Το δείγμα με τον αριθμό 87 εμφάνισε τρισωμία στα χρωμοσώματα 14, 21 και 22, πράγμα που σημαίνει ότι πιθανόν να εμφανίζει: α) τριπλοειδία δηλαδή περιέχει όλα τα χρωμοσώματα τρεις φορές, β) τρισωμία για τα τρία αυτά χρωμοσώματα ή γ) να πρόκειται για σύνθετη ανακατάταξη που περιλαμβάνει τις περιοχές των δεικτών 14q12 για το χρωμόσωμα 14, 21q22,3 και 21q21,1 για το χρωμόσωμα 21 και 22q12 για το χρωμόσωμα 22. Στο συγκεκριμένο δείγμα δεν έγινε κυτταρογενετική ανάλυση, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα. Ενώ επιβεβαιώνεται μόνο το αποτέλεσμα για την τρισωμία 21 αφού δυο δείκτες είναι αρκετοί για να επιβεβαιώσουν το αποτέλεσμα της μοριακής ανάλυσης (Πίνακας 50). Η τρισωμία 14 δεν δίνει βιώσιμους απογόνους (Shaffer et al.,2002). Έμβρυα που εμφανίζουν τριπλοειδία αποβάλλονται νωρίς κατά την εμβρυογένεση.

**Πίνακας 50.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 87.

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	1,2	2,3	1,2,3	Tr14
D21S1437	1,3	2,4	2,3,4	Tr21
D21S1446	1,1	2,2	1,2,2	Tr21
D22S281	2,3	1,1	1,2,3	Tr22
D22S1138	1,1	1,1	1,1	NI

Tr : Τρισωμία NI: Μη πληροφοριακό

- Για το δείγμα 116 η μοριακή ανάλυση αποκάλυψε τρισωμία 13 για την περιοχή 13q12.12 (D13S1243) του χρωμοσώματος 13. Το αποτέλεσμα του καρυότυπου στηρίζει και συμφωνεί με το αποτέλεσμα της μοριακής ανάλυσης και το δείγμα εμφανίζει τρισωμία του χρωμοσώματος 13. Το συγκεκριμένο δείγμα εμφάνιζε κλινικά χαρακτηριστικά όπως αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 17. Με βάση τη βιβλιογραφία τα κλινικά χαρακτηριστικά του δείγματος αυτού αποδίδονται και στην εμφάνιση τρισωμίας 13. Τα άτομα αυτά πεθαίνουν λίγο μετά την γέννηση τους.

Οι δείκτες στους οποίους εξετάστηκε το δείγμα, οι ζώνες των αλληλομόρφων, καθώς και το αποτέλεσμα που προκύπτει από την συγκριτική ανάλυση των ζωνών του πλακούντα με αυτές των γονέων παρουσιάζονται στον πίνακα 51.

**Πίνακας 51.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 116

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D7S645	2,4	1,3	1,2	Φ
D13S1243	1,2	2,4	1,2,2	Tr13
D14S608	1,3	1,2	2,3	Φ
D16S3018	1,2	1,2	1,2	NI
D21S11	2,3	1,2	2,2	Φ
D21S1437	2,2	1,2	1,2	NI
D21S1446	2,2	1,1	1,2	Φ
D22S1138	1,1	1,1	1,1	NI
D22S39	1,1	1,1	1,1	NI

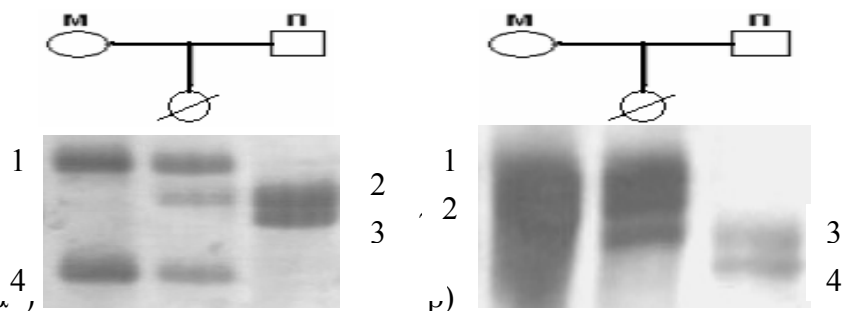
Φ : Φυσιολογικό NI: Μη πληροφοριακό Tr : Τρισωμία

- Το δείγμα 125 εμφάνισε τρισωμία 21 σε δύο δείκτες DNA που αντιστοιχούν στις περιοχές 21q21,1 (D21S1437) και 21q22,3 (D21S1446) (Εικ. 50) του χρωμοσώματος 21 (Πίνακας 52). Αν και δεν υπάρχει καρυότυπος να στηρίζει το αποτέλεσμα της μοριακής ανάλυσης, δύο δείκτες κατά μήκος του χρωμοσώματος 21 είναι αρκετοί για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη τρισωμίας στο χρωμόσωμα 21.

**Πίνακας 52.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 125.

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	1,2	1,2	1,2	NI
D21S1437	1,4	2,3	1,2,4	Tr21
D21S1446	1,2	3,4	1,2,3	Tr21
D22S1138	1,1	1,1	1,1	NI

Tr : Τρισωμία NI: Μη πληροφοριακό



**Εικ 50.** Εμφάνιση τρισωμίας στους δείκτες α) D21S1437 και β) D21S1446 του δείγματος 125.

- Το δείγμα 144 εμφάνισε τρισωμία 21 σε τρεις δείκτες DNA που αντιστοιχούν στις περιοχές 21q22,3 (D21S1446), 21q21,1 (D21S1437) και 21q22 (D21S1270) του χρωμοσώματος 21 (Πίνακας 53). Δύο δείκτες κατά μήκος του χρωμοσώματος 21 είναι αρκετοί για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη τρισωμίας στο χρωμόσωμα 21. Το αποτέλεσμα του καρυοτύπου στηρίζει και συμφωνεί με το αποτέλεσμα της μοριακής ανάλυσης.

**Πίνακας 53.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 144

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Έμβryo	Αποτέλεσμα
D14S608	1,3	2,3	2,3	2,3	NI
D16S3121	2,2	1,1	1,2	1,2	Φ
D21S1270	1,4	2,3	1,3,4	1,3,4	Tr21
D21S1437	1,2	3,3	1,2,3	1,2,3	Tr21
D21S1446	2,2	1,1	1,2,2	1,2,2	Tr21
D22S1138	1,1	1,1	1,1	1,1	NI

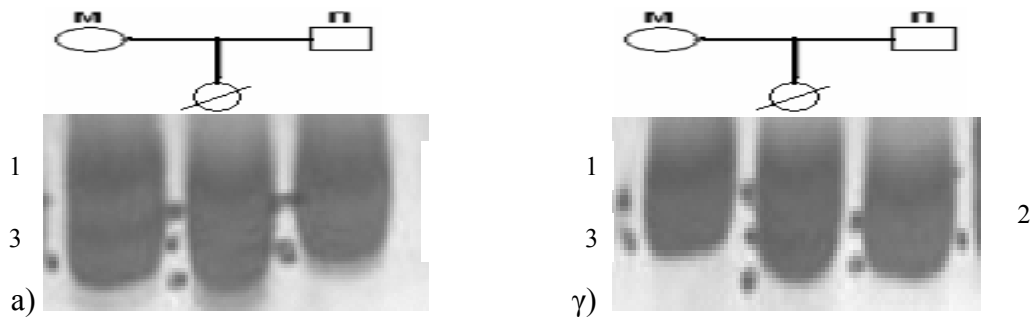
Φ : Φυσιολογικό NI: Μη πληροφοριακό Tr : Τρισωμία

- Το δείγμα 165 εμφάνισε τρισωμία 21 σε δύο δείκτες DNA που αντιστοιχούν στις περιοχές 21q21 (D21S11) και 21q22,3 (D21S1446) του χρωμοσώματος 21 (Πίνακας 54). Στην εικόνα 51 παρουσιάζονται φωτογραφίες των ηλεκτροφόρων ακρυλαμιδίου των δεικτών για τα χρωμοσώματα 14 και 21.

**Πίνακας 54.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 165

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D7S645	1,2	1,2	1,2	NI
D13S1243	1,2	1,2	1,2	NI
D14S608	1,2	2,3	1,2	Φ
D14S1279	1,2 / 4,5	2,3 / 4,5	1,3 / 4,5	Φ / NI
D16S3018	1,2	1,2	1,2	NI
D21S11	1,3	1,2	1,2,3	Tr21
D21S1437	1,2	1,2	1,2	NI
D21S1446	1,2	2,3	1,2,3	Tr21
D21S1270	1,1	1,1	1,1	NI
D22S281	1,2	1,2	1,2	NI

Φ : Φυσιολογικό NI: Μη πληροφοριακό Tr : Τρισωμία



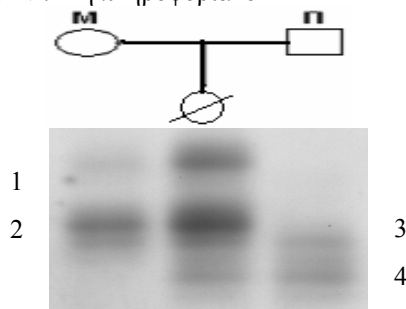
**Εικ. 51.** Εμφάνιση αποτελεσμάτων α) D21S11 και β) D21S1446 για το δείγμα 165.

- Το δείγμα 192 εμφάνισε τρισωμία 16 σε έναν δείκτη DNA που αντιστοιχούν στην περιοχή 16q24.3 (D16S3121) (Εικ. 52) του χρωμοσώματος 16 (πίνακας 55). Καρυότυπος που να στηρίζει αυτό το αποτέλεσμα δεν υπάρχει. Τουλάχιστον δύο δείκτες σε κάθε χρωμόσωμα είναι απαραίτητοι για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα της μοριακής ανάλυσης. Σε τέτοιες περιπτώσεις θα πρέπει να γίνεται έλεγχος με περισσότερους δείκτες κατά μήκος του χρωμοσώματος που εξετάζεται για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος.

**Πίνακας 55.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 192

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	1,3	2,3	1,3	NI
D16S3121	1,2	3,4	1,2,4	Tr16
D18S59	1,3	2,3	1,3	NI
D20S162	1,2	1,1	1,2	NI
D21S1446	1,2	1,2	1,2	NI
D22S281	2,3	1,3	2,3	NI

Tr : Τρισωμία NI: Μη πληροφοριακό



**Εικ. 52.** Εμφάνιση τρισωμίας 16 στον δείκτη D16S3121 για το δείγμα 192.

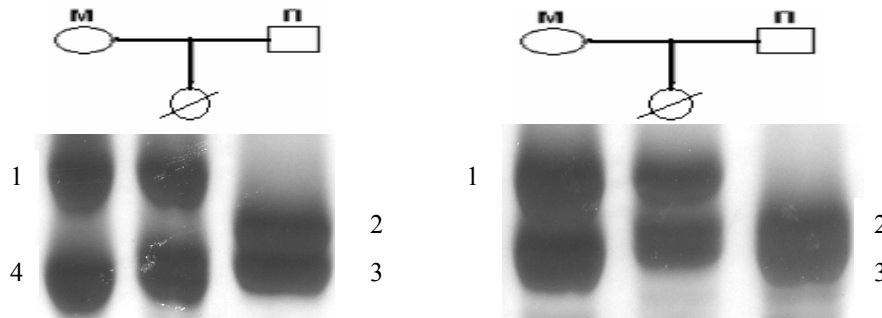
- Το δείγμα 201 εμφάνισε τρισωμία στις περιοχές 14q12 και 21q22.3 των χρωμοσωμάτων 14 και 21 (Εικ. 53). Το δείγμα 201 πιθανόν να εμφάνισε τρισωμία για τα δύο αυτά χρωμοσώματα ή να πρόκειται για σύνθετη ανακατάταξη που περιλαμβάνει τις περιοχές των δεικτών 14q12 για το χρωμόσωμα 14, και 21q22,3 για το χρωμόσωμα 21 (πίνακας 56).

**Πίνακας 56.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 201

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	1,4	2,3	1,3,4	Tr14
D16S3121	1,2	1,2	1,2	NI
D18S59	1,2	2,3	1,2	NI
D20S171	1,2	1,2	2,2	NI
D21S1446	1,3	2,3	1,2,3	Tr21
D22S281	1,2	1,2	1,2	NI

Tr : Τρισωμία NI: Μη πληροφοριακό

Στο συγκεκριμένο δείγμα δεν υπήρχε έμβρυο (σύνδρομο κενού σάκου). Ο ιστός ήταν αποκλειστικά από πλακούντα της μητέρας. Έγινε καλλιέργεια των κυττάρων του ιστού του πλακούντα αλλά τα κύτταρα δεν αναπτύχθηκαν με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η κυτταρογενετική ανάλυση. Η τρισωμία 14 δεν δίνει βιώσιμους απογόνους.



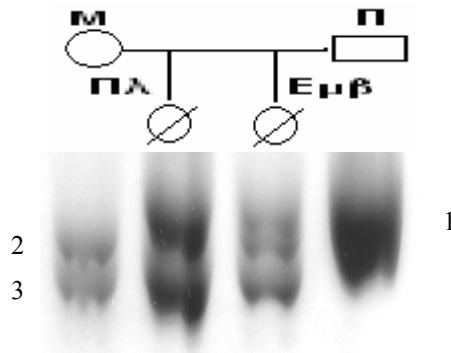
**Εικ. 53.** Εμφάνιση τρισωμίας 14 στον δείκτη D14S608 και τρισωμίας 21 στον δείκτη D21S1446 για το δείγμα 201.

- Για το δείγμα 213 η μοριακή ανάλυση αποκάλυψε την ύπαρξη τρισωμίας για την περιοχή 21q22,3 του χρωμοσώματος 21. Καρυότυπος που να στηρίζει αυτό το αποτέλεσμα δεν υπάρχει. (Πίνακας 57). Για το συγκεκριμένο δείγμα είχαμε την δυνατότητα να απομονώσουμε DNA από ιστό εμβρύου και από ιστό πλακούντα. (Εικ. 54).

**Πίνακας 57.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 213

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Έμβρυο	Αποτέλεσμα
D13S1243	2,2	1,2	1,2	2,2	NI
D18S59	1,2	1,3	1,3	1,3	NI
D21S1270	1,1	1,1	1,1	1,1	NI
D21S1446	2,3	1,2	1,3	1,2,3	Tr21

Tr : Τρισωμία NI: Μη πληροφοριακό



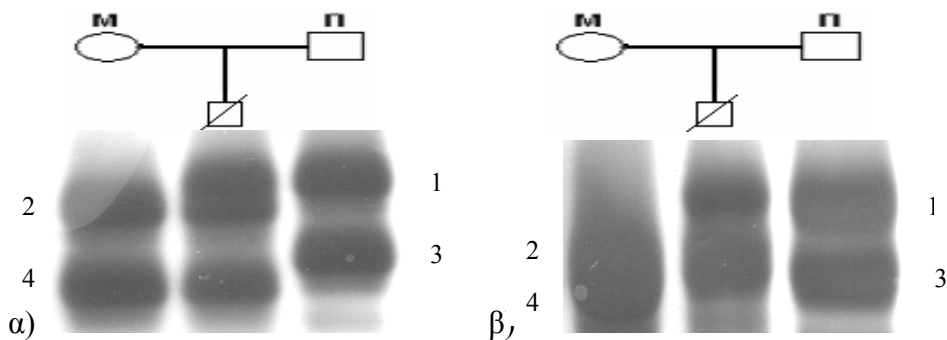
**Εικ. 54.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείκτη D21S1446 για το δείγμα 213.

- Το δείγμα 228 εμφάνισε τρισωμία σε δύο περιοχές 21q21.1 (D21S1437) και 21q22,3 (D21S1446) του χρωμοσώματος 21 (πίνακας 58). Δύο δείκτες κατά μήκος του χρωμοσώματος 21 είναι αρκετοί για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη τρισωμίας 21. Το αποτέλεσμα του καρυοτύπου στηρίζει και συμφωνεί με το αποτέλεσμα της μοριακής ανάλυσης. Τα αποτελέσματα των πηκτωμάτων ακρυλαμιδίου παρουσιάζονται στην εικόνα 55.

**Πίνακας 58.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 228

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D13S1243	1,2	1,2	1,2	NI
D13S1295	1,1	1,2	1,2	NI
D18S59	1,1	2,2	1,2	Φ
D18S1141	1,2	1,2	1,2	NI
D21S1446	2,4	1,3	1,2,3	Tr21
D21S1437	2,4	1,3	1,2,4	Tr21

Φ : Φυσιολογικό NI: Μη πληροφοριακό Tr : Τρισωμία



**Εικ. 55.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών : α) D21S1437, β) D21S1446 για το δείγμα 228.

- Το δείγμα 234 εμφάνισε τρισωμία 21 στην περιοχή 21q21 του χρωμοσώματος 21. Χρησιμοποιήθηκαν άλλοι 3 δείκτες κατά μήκος του χρωμοσώματος 21 αλλά εμφάνισαν το φυσιολογικό πρότυπο ενώ ο ένα από αυτούς

ήταν μη πληροφοριακός (πίνακας 59). Το αποτέλεσμα του καρυοτύπου στηρίζει και συμφωνεί με το αποτέλεσμα της μοριακής ανάλυσης.

**Πίνακας 59.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 234

<b>Δείκτες</b>	<b>Μητέρα</b>	<b>Πατέρας</b>	<b>Πλακούντας</b>	<b>Αποτέλεσμα</b>
D13S1243	1,2	1,2	1,2	NI
D13S1295	1,3	2,3	3,3	NI
D16S3018	1,2	1,2	1,2	NI
D16S3121	1,1	1,1	1,1	NI
D18S59	1,2	2,3	2,3	NI
D18S1141	1,2	1,2	1,2	NI
D21S11	1,2	3,3	1,2,3	Tr21
D21S1270	2,2	1,3	2,3	Φ
D21S1446	2,2	1,3	1,2	Φ
D21S1437	1,2	2,2	1,2	NI

Φ : Φυσιολογικό NI: Μη πληροφοριακό Tr : Τρισωμία

Οι δείκτες D21S1270 και D21S1446 εμφάνισαν το φυσιολογικό πρότυπο. Αλλά όπως μπορούμε να δούμε και στον πίνακα των αλληλομόρφων, η μητέρα είναι ομόζυγη για τον συγκεκριμένο δείκτη. Που σημαίνει ότι στο πήκτωμα ακρυλαμιδίου εμφανίζεται μια διπλή ζώνη και όχι δυο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα και στο έμβρυο η μία ζώνη να καλύπτεται και οι τρεις ζώνες να εμφανίζονται ως δυο. Για το λόγο αυτό η κυτταρογενετική ανάλυση είναι πάντα απαραίτητη όταν εξετάζονται έμβρυα αποβολής με μοριακές μεθόδους και χρήση πολυμορφικών δεικτών DNA, για να επιβεβαιώνεται η ύπαρξη τρισωμιών.

### 5.3 Διάγνωση πατρικής ΜΓΔ

ΠατΜΓΔ (patUPD) σε ένα ή σε περισσότερα χρωμοσώματα. εμφανίστηκε σε ποσοστό 8.8% σε 6 έμβρυα. Μόνο για το χρωμόσωμα 21 επιβεβαιώνεται η πατΜΓΔ στα δείγματα 65, 147 και 216.

Συνολικά από την μοριακή ανάλυση βρέθηκαν 9 περιπτώσεις πατΜΓΔ21 (5 ισοδισωμίες: 4 ετεροδισωμίες), 4 περιπτώσεις πατΜΓΔ14 (3 ισοδισωμίες : 1 ετεροδισωμία), μια περίπτωση πατΜΓΔ16 (ετεροδισωμία), μια περίπτωση πατΜΓΔ18 (ετεροδισωμία), μια περίπτωση πατΜΓΔ20 (ισοδισωμία) και μια περίπτωση πατΜΓΔ22 (ετεροδισωμία) όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 60.



**Πίνακας 60.** Εμφάνιση πατΜΓΔ μετά από μοριακή ανάλυση με πολυμορφικούς δείκτες DNA

Αρ. Δείγματος	Φύλο	Χρωμόσωμα	Δείκτης	Αποτέλεσμα	Ισο/Ετε	Καρυότυπος
56	♀	14	D14S608	πατΜΓΔ14	I	-
65	♀	21	D21S1437	πατΜΓΔ21	I	-
			D21S1446		I	
102	♀	14	D14S608	πατΜΓΔ14	E	-
		21	D21S1437	πατΜΓΔ21	E	
147	♀	16	D16S3018	πατΜΓΔ16	E	-
		21	D21S1437	πατΜΓΔ21	I	
			D21S1446		I	
198	♀	14	D14S608	πατΜΓΔ14	E	46,XX
		18	D18S59	πατΜΓΔ18	E	
		21	D21S1446	πατΜΓΔ21	E	
		22	D22S281	πατΜΓΔ22	E	
216	♂	14	D14S1279	πατΜΓΔ14	I	47,XY + 21
		20	D20S171	πατΜΓΔ20	I	
		21	D21S1270	πατΜΓΔ21	I	
			D21S11		E	
			D21S1446		E	

I: ισοδισωμία, E: Ετεροδισωμία

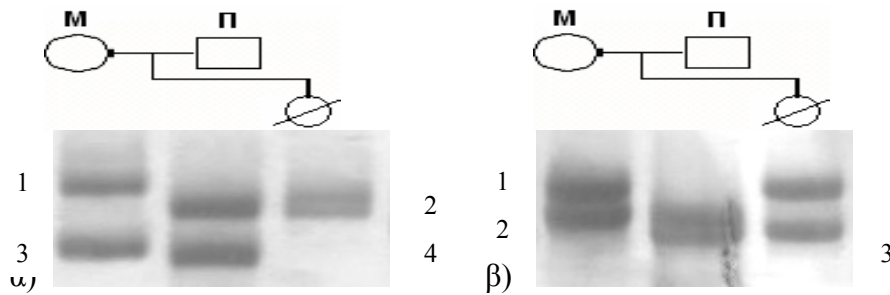
- Το δείγμα 56 εμφάνισε τμηματική πατΜΓΔ (ισοδισωμία) στην περιοχή 14q12 (D14S608) του χρωμοσώματος 14 (Εικ. 56). Παρακάτω παρουσιάζονται οι δείκτες στους οποίους εξετάστηκε το δείγμα, οι ζώνες των αλληλομόρφων όπως αυτές εμφανίστηκαν μετά από την μοριακή ανάλυση, καθώς και το αποτέλεσμα που προκύπτει από την συγκριτική ανάλυση των ζωνών του πλακούντα με αυτές των γονέων (Πίνακας 61).

**Πίνακας 61.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 56

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	1,3	2,4	2,2	πατΜΓΔ14
D14S1007	1,1	1,2	1,1	NI
D14S1279	3,3/1,2	1,2/1,2	2,3/,12	Φ/NI
D21S1446	1,2	2,3	1,3	Φ
D21S1437	2,3	1,2	2,2	NI

Φ : Φυσιολογικό, NI: Μη πληροφοριακό, πατΜΓΔ: πατρική ΜΓΔ

Παρόλο που το συγκεκριμένο δείγμα εξετάστηκε και σε άλλους 2 δείκτες κατά μήκος του χρωμοσώματος 14, το αποτέλεσμα δεν επιβεβαιώθηκε για το λόγο ότι το αποτέλεσμα των δεικτών αυτών ήταν φυσιολογικό ή μη πληροφοριακό.



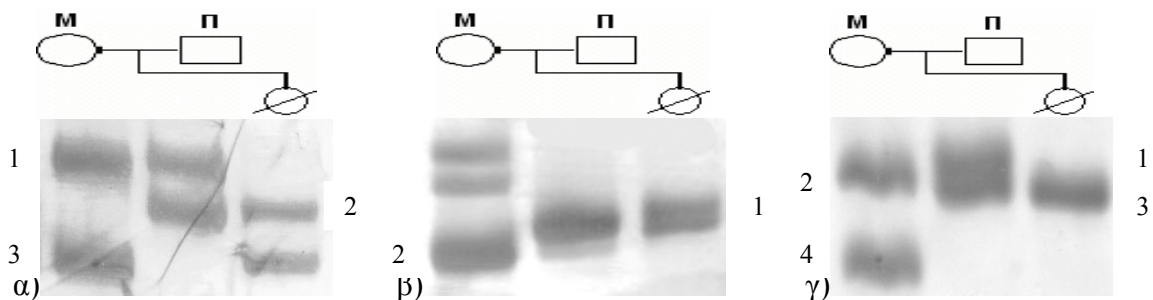
**Εικ. 56.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών : α) D14S608, β) D21S1446 για το δείγμα 56.

- ΠατΜΓΔ21 σε δυο περιοχές (21q22,3 και 21q21,1) του χρωμοσώματος 21 (ισοδισωμία) (Εικ.57) εμφάνισε το δείγμα 65 όπως αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 62. Το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται για το χρωμόσωμα 21. Πιθανός μηχανισμός δημιουργίας της πατΜΓΔ του δείγματος αυτού είναι η διάσωση μονοσωμίας.

**Πίνακας 62.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 65

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D7S645	1,2	1,1	1,1	NI
D14S608	1,3	1,2	2,3	Φ
D16S3018	1,2	1,1	1,2	NI
D21S1270	1,2	1,2	1,2	NI
D21S1446	2,2	1,1	1,1	πατΜΓΔ21
D21S1437	2,4	1,3	3,3	πατΜΓΔ21
D22S281	2,2	1,2	2,2	NI

Φ : Φυσιολογικό NI: Μη πληροφοριακό πατΜΓΔ: πατρική ΜΓΔ



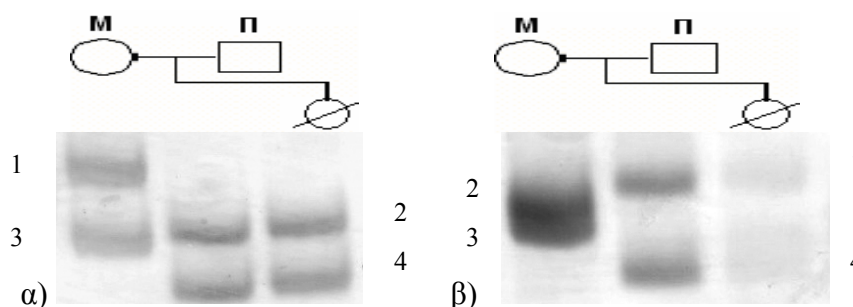
**Εικ. 57.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών : α) D14S608, β) D21S1446 και γ) D21S1437 για το δείγμα 65.

- Το δείγμα 102 εμφάνισε πατΜΓΔ στις περιοχές 14q12 του χρωμοσώματος 14 και 21q21.1 του χρωμοσώματος 21(πίνακας 63). Και οι δυο περιπτώσεις εμφανίσθηκαν ως ετεροδισωμία (Εικ. 58). Παρόλο που το δείγμα εξετάστηκε και σε άλλους δείκτες του χρωμοσώματος 21, το αποτέλεσμα δεν επιβεβαιώθηκε γιατί ήταν μη πληροφοριακοί. Πιθανόν να έχει συμβεί μετάθεση κατά Robertson στις περιοχές αυτές μεταξύ των μη ομόλογων χρωμοσωμάτων 14 και 21 και επειδή η πατΜΓΔ εμφανίζεται ως ετεροδισωμία το σφάλμα συνέβη στην πρώτη μειωτική διαίρεση του πατέρα.

**Πίνακας 63.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 102

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	1,3	2,4	2,4	πατΜΓΔ14
D21S1575	1,2	1,1	1,1	NI
D21S1446	1,3	2,3	2,3	NI
D21S1437	2,3	1,4	1,4	πατΜΓΔ21
D22S1138	1,1	1,1	1,1	NI
D22S1169	1,1	1,2	1,2	NI

NI: Μη πληροφοριακό πατΜΓΔ: πατρική ΜΓΔ



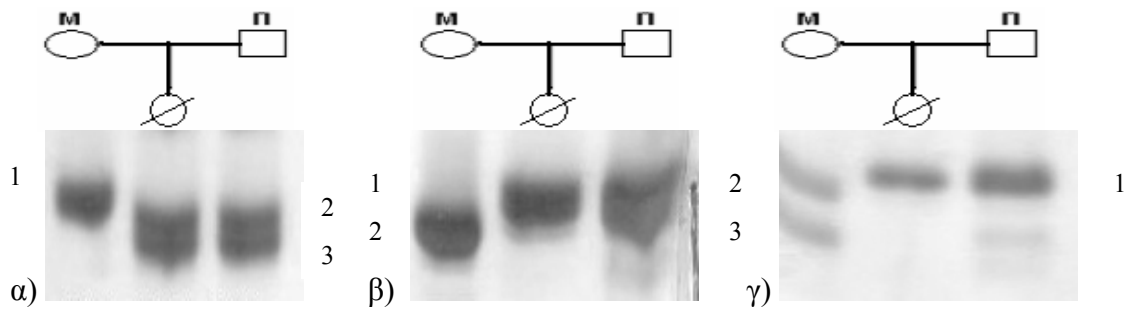
**Εικ.58.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών : α) D14S608 και β) D21S1437 για το δείγμα 102.

- Το δείγμα 147 εμφάνισε πατΜΓΔ στην περιοχή 16q23 του χρωμοσώματος 16 και σε δυο περιοχές 21q21.1 και 21q22.3 του χρωμοσώματος 21 (Εικ. 59). Το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται μόνο για το χρωμόσωμα 21. Οι δείκτες στους οποίους εξετάστηκε το δείγμα παρουσιάζονται στον πίνακα 64. Η πατΜΓΔ που ανιχνεύτηκε και στις δύο περιοχές του χρωμοσώματος 21 είναι ισοδισωμία που σημαίνει ότι το σφάλμα έγινε στην 2<sup>η</sup> μειωτική διαίρεση. Ενώ η πατΜΓΔ στην περιοχή του χρωμοσώματος 16 είναι ετεροδισωμία και μπορεί να προέκυψε μετά από σφάλμα στην 1<sup>η</sup> μειωτική διαίρεση ή να έγινε διπλασιασμός της συγκεκριμένης περιοχής. Θα πρέπει λοιπόν στην προκειμένη περίπτωση να έχουν συμβεί δυο διαφορετικά γεγονότα μη διαχωρισμού και στην πρώτη και στην δεύτερη μειωτική διαίρεση για να προκύψει το παραπάνω αποτέλεσμα.

**Πίνακας 64.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 147

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D7S645	1,2	2,3	1,2	NI
D13S1243	1,1	1,1	1,1	NI
D14S608	1,1	1,1	1,1	NI
D16S3018	1,1	2,3	2,3	πατΜΓΔ16
D21S1437	2,2	1,1	1,1	πατΜΓΔ21
D21S1446	2,3	1,3	1,1	πατΜΓΔ21
D22S39	2,2	1,2	1,2	NI
D22S1138	1,2	2,2	2,2	NI

NI: Μη πληροφοριακό πατΜΓΔ: πατρική ΜΓΔ



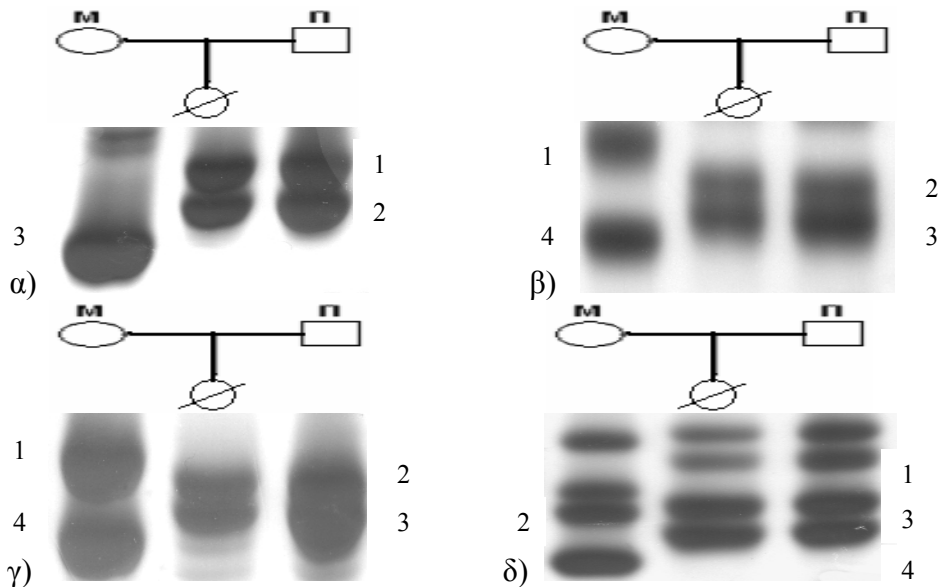
**Εικ. 59.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών : α) D16S3018 β) D21S1437 και γ) D21S1446 για το δείγμα 147.

- Το δείγμα 198 εμφάνισε πατΜΓΔ στις περιοχές 14q12, 18p11.32, 21q22.3 και 22q12 των χρωμοσωμάτων 14, 18, 21 και 22 αντίστοιχα (Εικ. 60). Στο συγκεκριμένο δείγμα έγινε και κυτταρογενετική ανάλυση και ο καρυότυπος ήταν φυσιολογικός (46,XX).

**Πίνακας 65.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 198

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	3,3	1,2	1,2	πατΜΓΔ14
D16S3121	2,3	1,2	1,2	NI
D18S59	1,4	2,3	2,3	πατΜΓΔ18
D20S171	1,2	1,2	1,2	NI
D21S1446	1,4	2,3	2,3	πατΜΓΔ21
D22S281	2,4	1,3	1,3	πατΜΓΔ22

NI: Μη πληροφοριακό πατΜΓΔ: πατρική ΜΓΔ



**Εικ. 60.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών : α) D14S608, β) D18S59 γ) D21S1446 και δ) D22S281 για το δείγμα 198.

Και οι τέσσερις δείκτες εμφάνισαν ετεροδισωμία. Που σημαίνει ότι το σφάλμα έχει γίνει στην πρώτη μειωτική διαίρεση του πατέρα. Πιθανόν να

εμφανίζεται πατΜΓΔ όλου του γενώματος ή να πρόκειται για σύνθετη ανακατάταξη που περιλαμβάνει τις περιοχές των δεικτών 14q12 για το χρωμόσωμα 14, 18p11.32 για το χρωμόσωμα 18, 21q22,3 για το χρωμόσωμα 21, και 22q12 για το χρωμόσωμα 22.

- Το δείγμα 216 εμφάνισε πατΜΓΔ στις περιοχές 14q31.3, 20q13.32, 21q22.3, 21q21 και 21q22 των χρωμοσωμάτων 14, 20 και 21 αντίστοιχα όπως φαίνεται και στον πίνακα 66. Το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται μόνο για το χρωμόσωμα 21, όπου τρεις δείκτες εμφάνισαν πατΜΓΔ.

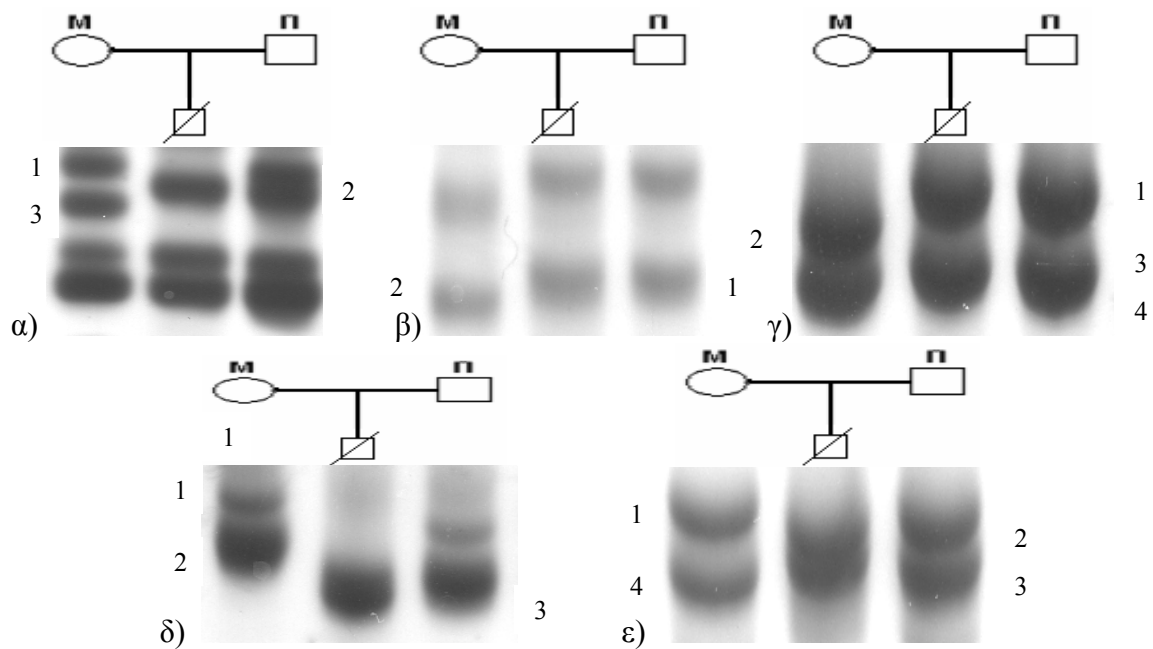
Στο χρωμόσωμα 14 εμφανίζεται τμηματική μητΜΓΔ14 μιας και η ο δείκτης D14S608 που βρίσκεται στην περιοχή 14q12 εμφάνισε το φυσιολογικό πρότυπο. Στο συγκεκριμένο δείγμα έγινε κυτταρογενετική ανάλυση, η οποία ήταν επιτυχής, και ο καρυότυπος αποκάλυψε τρισωμία στο χρωμόσωμα 21. Η μοριακή ανάλυση δεν αποκάλυψε την ύπαρξη τρισωμίας 21. Κατά συνέπεια πιθανών η μια ζώνη να βρίσκεται σε ομοζυγωτία με αποτέλεσμα η τρισωμία να εμφανίζεται ως πατΜΓΔ21. Στην περίπτωση αυτή βέβαια η τρισωμία θα πρέπει αποκλειστικά να αποτελείται από τρία πατρικά χρωμοσώματα.

Ισοδισωμία εμφανίστηκε στους δείκτες D14S1279, D20S171 και D21S1270 ενώ οι δείκτες D21S1446 και D21S11 εμφάνισαν ετεροδισωμία.(Εικ. 61). Θα πρέπει λοιπόν στην προκειμένη περίπτωση να έχουν συμβεί δυο διαφορετικά γεγονότα μη διαχωρισμού και στην πρώτη και στην δεύτερη μειωτική διαίρεση για να προκύψει το παραπάνω αποτέλεσμα.

**Πίνακας 66.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 216

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D7S645	1,2	1,2	1,2	NI
D13S1243	1,2	1,2	1,2	NI
D14S608	1,1	2,2	1,2	Φ
D14S1279	1,3/1,2	1,2/1,2	2,2/1,2	πατΜΓΔ14/NI
D16S3121	1,1	2,2	1,2	Φ
D18S59	1,3	2,2	1,2	Φ
D20S171	2,2	1,1	1,1	πατΜΓΔ20
D21S1437	1,2	2,3	2,3	NI
D21S1446	1,4	2,3	2,3	πατΜΓΔ21
D21S11	2,4	1,3	1,3	πατΜΓΔ21
D21S1270	1,2	2,3	3,3	πατΜΓΔ21
D22S21169	1,2	1,2	1,3	NI

Φ : Φυσιολογικό NI: Μη πληροφοριακό πατΜΓΔ: πατρική ΜΓΔ



**Εικ. 61.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S1279, β) D20S171 γ) D21S11 δ) D21S1270 και ε) D21S1446 για το δείγμα 216.

Συνοπτικά οι μοριακοί δείκτες των χρωμοσωμάτων που εξετάστηκαν, καθώς και οι περιπτώσεις μητρικής ΜΓΔ, πατρικής ΜΓΔ και τρισωμίας που εμφανίστηκαν μετά από την μοριακή ανάλυση φαίνονται στον πίνακα 67. Παρατηρούμε πως περισσότερες περιπτώσεις ΜΓΔ βρέθηκαν για τα χρωμοσώματα 14 και 21.

Παρουσιάζονται επίσης σε κάθε δείκτη τα ποσοστά ανάλογα με το πόσο πληροφοριακός ή όχι ήταν ο κάθε δείκτης στον πληθυσμό της Ηπείρου. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από τον πίνακα, αρκετοί δείκτες DNA που χρησιμοποιήθηκαν σε κάποια χρωμοσώματα, όπως οι δείκτες D18S1141 και D22S1138, ήταν μη πληροφοριακοί για το σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν. Οι δείκτες αυτοί παρόλο που παρουσίαζαν μεγάλη ετεροζυγωτία στον γενικό πληθυσμό σύμφωνα με τις επιστημονικές βάσεις δεδομένων από όπου και επιλέχτηκαν ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) και [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)), στον πληθυσμό της Ηπείρου σε ένα μεγάλο ποσοστό εμφανίστηκαν ως μη πληροφοριακοί.

**Πίνακας 67.** Περιπτώσεις ΜΓΔ και τρισωμίας που ευρέθησαν

Χρ	Δείκτης	Χρ. περιοχή	Αριθμός εξεταζόμενων εμβρύων						IN %	NI %
			N	ΜΓΔ		Tr	NI	tot		
				μητ	πατ					
7	D7S645	7q11.22	1	1	0	0	11	13	15.4%	84.6%
13	D13S1295	13q34	1	1	0	0	6	8	25%	75%
	D13S1243	13q12.12	0	1	0	1	18	20	10%	90%
14	D14S608	14q12	15	12	3	2	23	55	58%	42%
	D14S1279	14q31.3	1	2	1	0	7	11	36.4%	63.6%
	D14S267	14q32.2	10	0	0	0	1	11	91%	9%
15	D15S542	15q11.2	0	2	0	0	0	2	100%	0%
	GABRB3	15q12	0	1	0	0	1	2	50%	50%
16	D16S3121	16q24.3	1	2	0	1	7	11	36.4%	63.6%
	D16S3045	16p12.3	10	0	0	0	0	10	100%	0%
	D16S3018	16q23	2	2	1	0	14	19	26,3%	73,7%
18	D18S59	18p11.32	4	4	1	0	10	19	47,4%	52,6%
	D18S1141	18q23	0	0	0	0	7	7	0%	100%
20	D20S96	20q13.1	5	3	0	0	2	10	80%	20%
	D20S171	20q13.32	0	1	1	0	7	9	39.5%	60.5%
	D20S162	20p12.2	0	1	0	0	3	4	25%	75%
21	D21S11	21q21	2	7	1	3	4	17	76,5%	23,5%
	D21S1437	21q21.1	5	13	3	5	29	55	47,3%	52,7%
	D21S1446	21q22.3	17	9	3	6	29	64	54.7%	45.3%
	D21S1270	21q22	2	1	1	1	10	15	33,4%	66,6%
22	D22S1138	22q11.21	0	0	0	0	25	25	0%	100%
	D22S1169	22q13.32	0	1	0	0	4	5	20%	80%
	D22S281	22q12	7	5	1	1	9	23	61%	39%
tot			83	66	16	20	227			

N: Φυσιολογικό Tr: Τρισωμία, NI: Μη πληροφοριακό IN: Πληροφοριακό

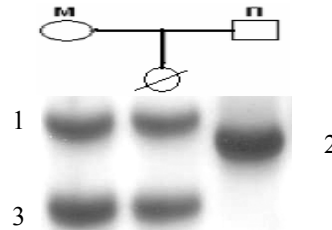
#### 5.4 Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δειγμάτων ελέγχου.

Εξετάστηκαν 5 δείγματα ελέγχου, που προέρχονταν από διακοπές κυήσεων χωρίς εμφανή κλινικά χαρακτηριστικά. Στα 3 από αυτά δεν είχαμε στην διάθεση μας περιφερικό αίμα του πατέρα, και για αυτό έγινε μοριακός έλεγχος μόνο για την διάγνωση τρισωμιών και όχι για ΜΓΔ. Τα 4 δείγματα ήταν φυσιολογικά ή μη πληροφοριακά στις περιοχές των δεικτών όπου και εξετάστηκαν. Το δείγμα C1 εμφάνισε μητΜΓΔ στην περιοχή 21q21.1 (D21S1437). Παρόλα αυτά ο αριθμός των δειγμάτων ελέγχου ήταν αρκετά μικρός και δεν μπορούμε να εξάγουμε κανένα συμπέρασμα. Στους πίνακες 68-72 παρουσιάζονται αντίστοιχα οι δείκτες στους οποίους εξετάστηκαν καθώς και το αποτέλεσμα που προκύπτει από την συγκριτική ανάλυση των ζωνών του πλακούντα με αυτές των γονέων. Στην εικόνα 62 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της μοριακής για το δείγμα ελέγχου C1 που εμφάνισε μητΜΓΔ στην περιοχή του δείκτη D21S1437.

**Πίνακας 68.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος ελέγχου C1

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	1,3	2,3	1,3	NI
D21S1437	1,3	2,2	1,3	μητΜΓΔ
D21S1446	1,2	1,2	1,2	NI
D22S281	1,2	1,3	1,2	NI

NI: Μη πληροφοριακό μητΜΓΔ: μητρική ΜΓΔ



**Εικ. 62.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείκτη D21S1437 για το δείγμα ελέγχου C1.

**Πίνακας 69.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος ελέγχου C2

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D14S608	1,1	1,1	1,1	NI
D21S1437	1,2	1,3	2,3	Φ
D21S1446	1,2	1,2	1,2	NI
D22S281	1,2	1,1	1,2	NI

Φ : Φυσιολογικό NI: Μη πληροφοριακό

**Πίνακας 70.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος ελέγχου C3

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D13S1295	1,2	-	1,2	NI
D13S1243	1,2	-	1,2	NI
D16S3018	1,1	-	1,2	Φ/NI
D18S59	1,2	-	2,2	NI
D21S1446	1,2	-	1,2	NI
D21S11	2,3	-	1,2	Φ/NI

Φ : Φυσιολογικό NI: Μη πληροφοριακό

**Πίνακας 71.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος ελέγχου C4

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D13S1295	1,2	-	1,2	NI
D13S1243	1,2	-	1,2	NI
D16S3018	1,2	-	1,2	NI
D18S59	1,2	-	1,2	NI
D21S1446	1,2	-	1,2	NI
D21S11	1,2	-	2,3	NI

NI: Μη πληροφοριακό

**Πίνακας 72.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος ελέγχου C5

Δείκτες	Μητέρα	Πατέρας	Πλακούντας	Αποτέλεσμα
D13S1295	1,2	-	1,2	NI
D13S1243	1,2	-	1,2	NI
D16S3018	1,2	-	1,2	NI
D18S59	1,2	-	1,2	NI
D21S1446	1,1	-	1,1	NI
D21S11	1,2	-	1,2	NI

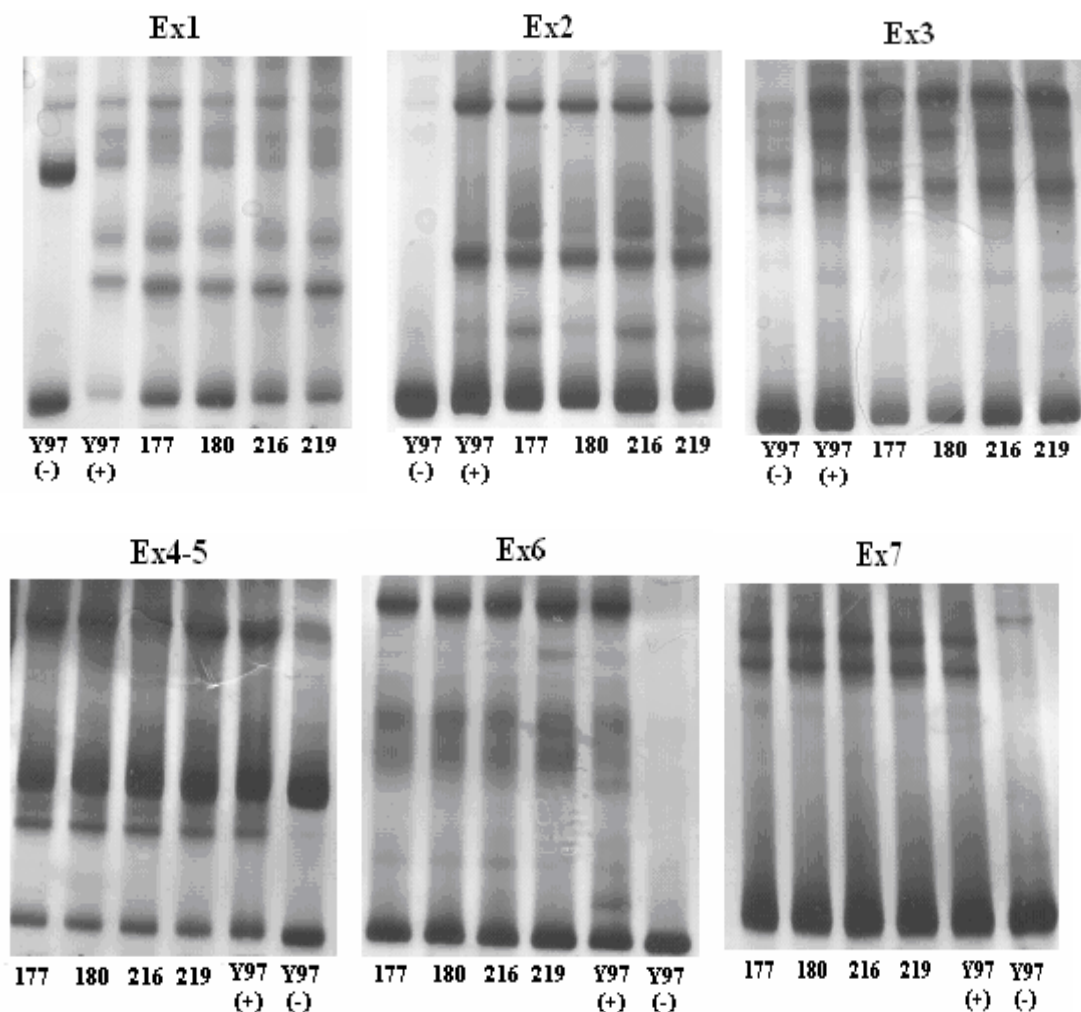
Φ : Φυσιολογικό NI: Μη πληροφοριακό

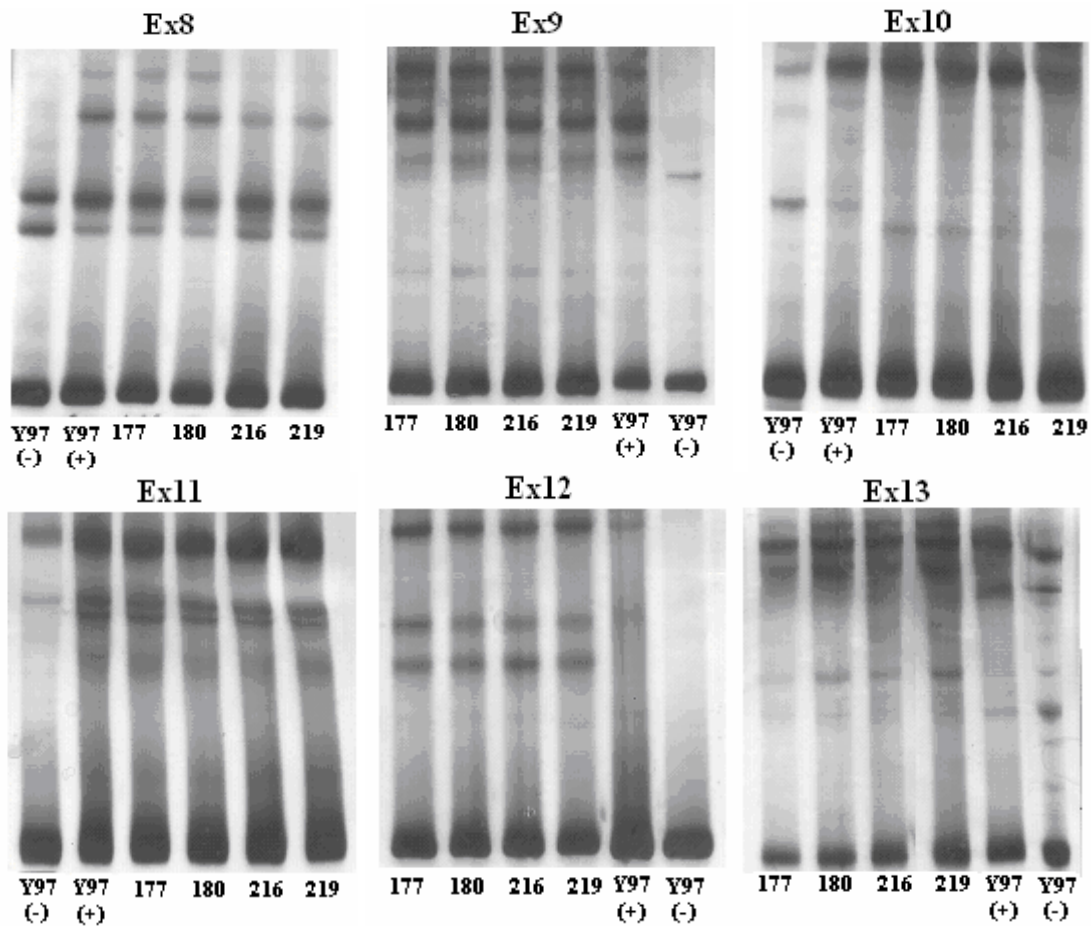


### 5.5 Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης για την ανίχνευση μεταλλάξεων των εξονίων 1-13 του γονιδίου GNAS1.

Εξετάστηκαν 4 δείγματα για ανίχνευση πιθανών μεταλλάξεων στις περιοχές των εξονίων 1-13 του γονιδίου GNAS1, τα οποία παρουσίαζαν κλινικά στοιχεία όπως σκελετικές ανωμαλίες αλλά εμφάνισαν επίσης μετά από μοριακή ανάλυση με πολυμορφικούς δείκτες DNA μητρική ή πατρική ΜΓΔ στο χρωμόσωμα 20. Τα δείγματα αυτά που εξετάστηκαν είναι τα 177, 180, 216 και 219. Σε κανένα από τα τέσσερα αυτά δείγματα δεν ανιχνεύτηκε κάποια μετάλλαξη στις περιοχές των εξονίων 1-13 του γονιδίου GNAS1.

Παρακάτω παρουσιάζονται φωτογραφίες των πηκτωμάτων ακρυλαμίδης έτσι όπως προέκυψαν μετά από αποδιάταξη των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12% και χρώση με νιτρικό άργυρο. Για τον έλεγχο των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε δείγμα ελέγχου χωρίς να φέρει καμία μετάλλαξη (Y<sub>97</sub>) σε αποδιαταγμένη (Y<sub>97</sub>(+)) και σε μη αποδιαταγμένη (Y<sub>97</sub>(-)) μορφή (Εικ.63).

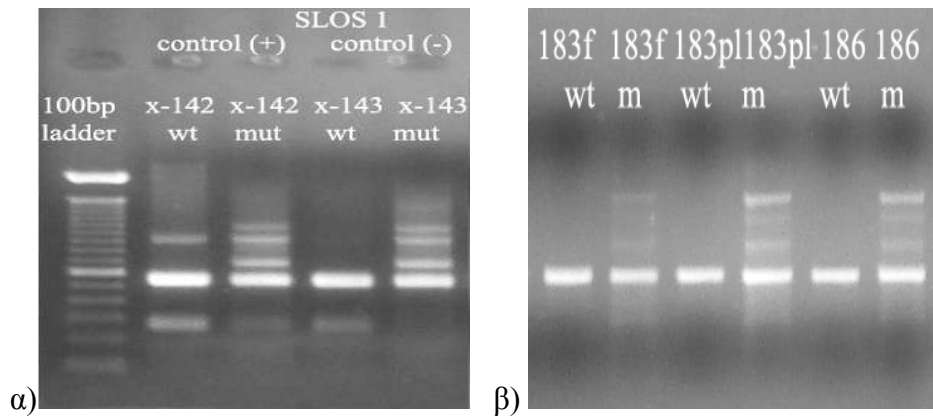




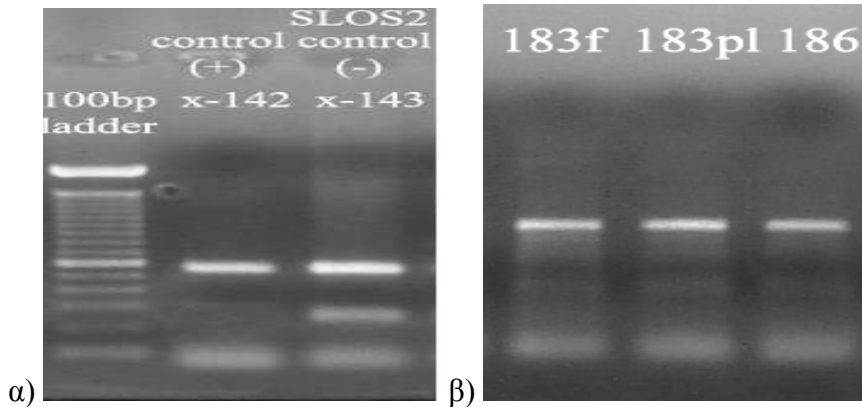
**Εικ. 63.** Εμφάνιση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων 177, 180, 216 και 219 στα εξώνια 1-13 του γονιδίου GNAS1. Παρουσιάζετε επίσης δείγμα ελέγχου (Y97) αρνητικό για μεταλλάξεις των εξωνίων 1-13 του γονιδίου GNAS1 σε αποδιαταγμένη (+) και μη (-) μορφή.

### 5.6 Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των μεταλλάξεων :α) ASO IVS8 και β) Thr93Met ex4 του γονιδίου DHCR7.

Εξετάσθηκαν δυο μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού: α) η μετάλλαξη ASO IVS8 και β) η μετάλλαξη Thr93Met ex4. Η μοριακή ανάλυση έδειξε ότι δεν φέρουν τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις. Εξετάσθηκαν στις παραπάνω μεταλλάξεις 2 δείγματα τα 183 και 186. Το δείγμα 183 εξετάστηκε και στον ιστό από πλακούντα αλλά και στον ιστό εμβρύου. Για το δείγμα 186 δεν ήταν εφικτή η μοριακή ανάλυση γιατί δεν είχαμε στην διάθεση μας περιφερικό αίμα των γονέων. Παρακάτω παρουσιάζονται τα πηκτώματα αγαρόζης 1% όπως προέκυψαν μετά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τις δυο μεταλλάξεις του γονιδίου DHCR7. (Εικ 64 και Εικ. 65)



**Εικ. 64.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης για την μετάλλαξη ASO IVS8. α) Δείγμα ελέγχου (control). Παρουσιάζονται το δείγμα ελέγχου X-142 σε αγρίου τύπου (wt) και μεταλλαγμένη μορφή (mut), θετικό (+) για την μετάλλαξη και το δείγμα ελέγχου X-143 σε αγρίου τύπου (wt) και μεταλλαγμένη μορφή (mut), αρνητικό (-) για την μετάλλαξη. β) Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων 183f (ιστός εμβρύου), 183pl (ιστός πλακούντα) και 186 σε μορφή αγρίου τύπου και μεταλλαγμένη.



**Εικ. 65.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης για την μετάλλαξη Thr93Met ex4. α) Δείγμα ελέγχου (control). Παρουσιάζονται το δείγμα ελέγχου X-142 θετικό (+) για την μετάλλαξη και το δείγμα ελέγχου X-143 αρνητικό (-) για την μετάλλαξη, β) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων 183f (ιστός εμβρύου), 183pl (ιστός πλακούντα) και 186.

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία η ΜΓΔ εμφανίζεται σε ποσοστό 0,8% έως 12% των κήσεων σε διαφορετικούς πληθυσμούς (Kotzot 2008). Μέχρι το 2008 οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες που αφορούσαν τη διερεύνηση αποβολών γινόταν με κυτταρογενετικές τεχνικές και τα αποτελέσματα αφορούσαν κυρίως διάγνωση τρισωμιών και χρωμοσωμικών ανακατατάξεων αλλά όχι για ΜΓΔ. Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί πάλι ότι η ΜΓΔ δεν μπορεί να διαγνωστεί από τον καρυότυπο αλλά απαιτεί τη μελέτη με μοριακές τεχνικές.

Οι πρώτες μελέτες διερεύνησης για ΜΓΔ έγιναν σε κλινικά αναγνωρισμένους πληθυσμούς, όπως 18 αναφορές για σύνδρομο Silver Russell και αναπτυξιακή καθυστέρηση (IUGR), 6 αναφορές για πολλαπλές συγγενείς ανωμαλίες, 12 αναφορές για σπάνια σύνδρομα (Σύνδρομο Sotos, σύνδρομο Weaver, σύνδρομο Branchmann-de Lange και σύνδρομο Rett κ.α), 13 αναφορές για πλακουντικού μωσαϊκισμού, 7 αναφορές για αυτόματες αποβολές (πίνακας 74), 15 αναφορές για πρόσθετους χρωμοσωμικών δεικτών, 5 αναφορές για ΜΓΔ και μεταθέσεις κατά Robertson και φυσιολογικό καρυότυπο (μεταγεννητικά) και τέλος 12 αναφορές για ΜΓΔ και μεταθέσεις κατά Robertson (προγεννητικά) (Πίνακας 73) (Kotzot D. 2002).

**Πίνακας 73.** Μελέτες που έχουν γίνει για ΜΓΔ σε κλινικά αναγνωρισμένους πληθυσμούς μέχρι το 2002.

Πληθυσμός	Αρ. Ατόμων που περιλήφθησαν στη μελέτη	ΜΓΔ	No	Αναφορές
SRS και IUGR	638	μητΜΓΔ7 μητΜΓΔ14 μητΜΓΔ16 μητΜΓΔ20	35 1 2 1	18
Πολλαπλές συγγενείς ανωμαλίες	382	μητΜΓΔ7 μητΜΓΔ14 πατΜΓΔ15 μητΜΓΔ16 πατΜΓΔX	1	6
Σπάνια σύνδρομα	397	-	-	12
Πλακουντικός Μωσαϊκισμός	332	μητΜΓΔ7 μητΜΓΔ15 μητΜΓΔ16 μητΜΓΔ22	2 4 20 2	13
Παρουσία χρωμοσωμικών δεικτών	259	μητΜΓΔ6 μητΜΓΔ9 μητΜΓΔ15	1 1 4	15
Μεταθέσεων κατά Robertson και φυσιολογικό φαινότυπος (μεταγεννητικά)	59	rob(21/21) rob(22/22)	1 1	5
Μεταθέσεων κατά Robertson (προγεννητικά)	458	rob(13/14) rob(13/13) rob(14/14)	2 2 3	12

SRS: Σύνδρομο Silver-Russel, IUGR: Περιορισμένη ενδομήτρια ανάπτυξη

Έχουν αναφερθεί κλινικά χαρακτηριστικά και μητρικής και πατρικής ΜΓΔ των χρωμοσωμάτων 14 και 15, μητΜΓΔ για τα χρωμοσώματα 2, 7 και 16 και πατΜΓΔ για τα χρωμοσώματα 6 και 11. Εμφάνιση ΜΓΔ στα χρωμοσώματα 7,14 και 16 ανέρχεται περίπου στο 63%, ενώ μόνο για το χρωμόσωμα 16 εμφανίζεται σε ποσοστό 23%. Για το χρωμόσωμα 15 η μητρική δισωμία εμφανίζεται σε ποσοστό 25% και η πατρική 2%. Αντίθετα, δεν έχουν αναφερθεί κλινικά χαρακτηριστικά μετά από εμφάνιση ΜΓΔ (μητρική και πατρική) των χρωμοσωμάτων 1,13,21, και 22. (Kotzot D. 1999, Shaffer LG et al., 2001, Preece MA et al., 2000, Kotzot D. 2002, Kotzot D. 2008).

Μέχρι το 2008 είχαν αναφερθεί 26 περιπτώσεις τμηματικής ΜΓΔ με φυσιολογικό καρυότυπο (46,XX, 46,XY), 38 περιπτώσεις ΜΓΔ ολόκληρου χρωμοσώματος με αμοιβαία ή κατά Robertson μετάθεση μεταξύ μη ομόλογων χρωμοσωμάτων, 42 περιπτώσεις ΜΓΔ σε συνδυασμό με την παρουσία ισοχρωμοσώματος και 17 περιπτώσεις ΜΓΔ τμήματος ή ολόκληρου χρωμοσώματος με σύνθετες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις.

Συνολικά έχουν αναφερθεί 20 περιπτώσεις ΜΓΔ6, 50 περιπτώσεις ΜΓΔ7, 50 περιπτώσεις μητΜΓΔ14 και 20 περιπτώσεις πατΜΓΔ14, 50 περιπτώσεις ΜΓΔ16 πολλές από αυτές μετά από διάγνωση τρισωμικού μωσαϊκισμού και τέλος 4 περιπτώσεις μητΜΓΔ20 και μια περίπτωση πατΜΓΔ20 όλες σε συνδυασμό με αριθμητικές και δομικές χρωμοσωμικές ανακατατάξεις. Καμία περίπτωση ΜΓΔ των χρωμοσωμάτων 3,12,17 και 19 δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα (Kotzot D. 2008).

Η ΜΓΔ πολλών ανθρώπινων χρωμοσωμάτων που περιέχουν γονίδια με αποτύπωση έχει συσχετιστεί με κλινικά σύνδρομα (PraderWilli, Angelman, Silver-Russell κ.τ.λ) αλλά δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί αν η ΜΓΔ και η διαταραχή του προτύπου έκφρασης κάποιου γονιδίου με «αποτύπωση» μπορεί να αποτελέσει την βασική αιτία αποβολής. (Kotzot D. 1999, Shaffer LG et al., 2001, Preece MA et al., 2000, Kotzot D. 2002).

Σήμερα είναι γνωστό ότι στην ανάπτυξη του πλακούντα – εμβρύου συμμετέχουν πολλά γονίδια με αποτύπωση. Αρχικά αποτελέσματα μελέτης σε ποντίκια έδειξαν ότι ΜΓΔ σε περιοχές με γονίδια με αποτύπωση επηρεάζει την ανάπτυξη του εμβρύου και του πλακούντα (Ferguson-Smith et al., 1991), αλλά στον άνθρωπο δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως εάν η ΜΓΔ μπορεί να επηρεάσει την εμβρυογένεση και την ανάπτυξη του εμβρύου και να οδηγήσει σε αποβολή. (Tsukishiro S. et al., 2005).

Στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να διερευνηθεί η ύπαρξη ΜΓΔ σε περιοχές με γονίδια με αποτύπωση σε προϊόντα αποβολών και να εξαχθούν συμπεράσματα για το αν αποτελεί αιτία αποβολής.

Η ΜΓΔ μπορεί να σχετίζεται με τις αποβολές διότι:

α) Περίπου το 20% όλων των κήσεων στον άνθρωπο είναι τρισωμικές (Hassold and Jacobs 1984, Shaffer LG. et al., 1998). Συνεπώς η εμφάνιση τρισωμίας είναι συχνό φαινόμενο των αυτόματων αποβολών. Η διάσωση τρισωμίας είναι ο πιο συχνός μηχανισμός δημιουργίας της ΜΓΔ.

β) Δημιουργία ΜΓΔ σε συγκεκριμένα χρωμοσώματα (2, 7, 9, 11, 16, 19, 20 και 21) στον ποντικό οδηγούν σε εμβρυϊκή θνησιμότητα. Εμφάνιση ΜΓΔ σε αντίστοιχες περιοχές σε αυτά τα χρωμοσώματα στον άνθρωπο έχουν συσχετιστεί με καθυστέρηση ανάπτυξης, πρόωρη εμβρυϊκή θνησιμότητα και νεογνική θνησιμότητα. (Shaffer LG. et al., 1998; Nikitina T.V et al., 2004).

Μέχρι σήμερα οι υπάρχουσες μελέτες σε αποβαλλόμενα έμβρυα είναι περιορισμένες και δεν έχει πλήρως διασαφηνιστεί ο ρόλος της ΜΓΔ στις αποβολές. Στην βιβλιογραφία υπάρχουν μόνο 8 αναφορές για διερεύνηση της ΜΓΔ σε αποβολές και σύμφωνα με αυτές το ποσοστό της ΜΓΔ είναι 1,69% - 2,8% (Πίνακας 74).

**Πίνακας 74.** Μελέτες για ΜΓΔ σε αυτόματες αποβολές

Χαρακτηριστικά δειγμάτων	Αριθμός εξεταζόμενων εμβρύων	ΜΓΔ	Αναφορά
Πρώτο τρίμηνο -Όχι καρύοτυπος	23	-μητΜΓΔ21 -μητΜΓΔ21 (με τρ. 7 και 9)	Hederson et al., 1994
Πρώτο τρίμηνο -Όχι καρύοτυπος	18	-	Shaffer et al., 1994
Φυσιολογικός καρύοτυπος	35	-	Smith et al., 1998
Εμβρυα με καρύοτυπο 46,XX	52	-	Evdokimova and Nazarenko, 2000
6-22 εβδομάδων με φυσιολογικό καρύοτυπο	71	-μητΜΓΔ9 -μητΜΓΔ21	Fritz et al., 2001
Φυσιολογικός καρύοτυπος (χρ. 2,9,11,15,16,19,20 και 21)	87	-	Nikitina et al., 2004
Πρώτο τρίμηνο-25 με φυσιολογικό καρύοτυπο	52	-μητΜΓΔ16	Kondo Y. et al., 2004
Πρώτο τρίμηνο	164	-πατΜΓΔ14 -πατΜΓΔ7	Tsukishiro S. et al., 2004

Αν ληφθεί υπ' όψιν ότι: α) η βασική εξέταση που γίνεται στα έμβρυα που αποβάλλονται είναι ο καρύοτυπος και ότι στον καρύοτυπο δεν φαίνεται η ΜΓΔ, β) ότι συχνά υπάρχει υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου που καταλήγει αργότερα σε

αποβολή και γ) ακόμα ότι συχνά οι πολύ πρώιμες αποβολές δεν εξετάζονται, πιθανόν το ποσοστό αυτό να είναι στην πραγματικότητα υψηλότερο και η ΜΓΔ να αποτελεί τη βασική αιτία αυτόματων αποβολών. (Kondo Y. et al.,2004 ; Kotzot D. 2002 ; Shaffer LG. et al.,2001 ; Tsukishiro S. et al.,2005 ; Fritz B. et al.,2001 ; Preece et al.,2000; Nikitina T.V 2004).

Η μελέτη μας είχε σκοπό την εξέταση ιστών από αποβαλλόμενα έμβρυα, κυρίως πρώτου τριμήνου, με κυτταρογενετικές τεχνικές για ανίχνευση τρισωμιών και με μοριακές τεχνικές για ανίχνευση α) τρισωμιών σε χρωμοσώματα τα οποία εμφανίζουν τρισωμίες και β) ΜΓΔ σε χρωμοσώματα που περιέχουν γονίδια με αποτύπωση.

Η Τρισωμία 21 (20%) είναι η δεύτερη σε σειρά τρισωμία που ανιχνεύεται σε αυτόματες αποβολές μετά την τρισωμία 16 (20-30%) (Hassold and Jacobs 1984; Nagaishi M et al.,2004). Από τα αποτελέσματά μας προκύπτει ότι η τρισωμία 21 εμφανίστηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με άλλες τρισωμίες. Κάτι που συμφωνεί και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Μπορούμε επίσης να παρατηρήσουμε ότι όλες οι τρισωμίες που βρέθηκαν αποτελούνται από δύο ζώνες μητρικής και μια πατρικής προέλευσης. Όπως αναφέρεται στην εισαγωγή (2.2.1.1 Διάσωση Τρισωμίας), αυτό σημαίνει ότι ο μη διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων των δειγμάτων αυτών είναι πιθανότερο να έγινε κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση της μητέρας.

Δυο δείγματα (87 και 201) εμφάνισαν αντίστοιχα τριπλή τρισωμία στα χρωμοσώματα 14, 21 και 22 και διπλή τρισωμία στα χρωμοσώματα 14 και 21. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία η εμφάνιση διπλής και τριπλής τρισωμίας είναι σπάνια γεγονότα που εμφανίζονται σε ποσοστό 1,38% για την διπλή τρισωμία και 0,05% για την τριπλή τρισωμία.(Lebedev I.N et.al 2004).

Συνολικά από τις προηγούμενες μελέτες για την διάγνωση της ΜΓΔ σε ιστούς αποβαλλόμενων εμβρύων βρέθηκαν μόνο 7 περιπτώσεις ΜΓΔ των χρωμοσωμάτων 9, 14, 16, 21, 7. Για το χρωμόσωμα 21 βρέθηκαν 3 περιπτώσεις, η μία σε συνδυασμό με τρισωμία 7 και 9, ενώ για το χρωμόσωμα 7 βρέθηκε τμηματική πατΜΓΔ7. Οι περιπτώσεις μητρικής και πατρικής ΜΓΔ που βρέθηκαν στην μελέτη αυτή είναι πολύ περισσότερες από αυτές που έχουν αναφερθεί στις προηγούμενες μελέτες με έμβρυα αποβολών.

Συνολικά 35 δείγματα εμφάνισαν ΜΓΔ από τα οποία το μεγαλύτερο ποσοστό ήταν μητρικές σε αναλογία περίπου 6:1 (6 μητρικές : 1 πατρική). Βρέθηκαν 69 περιπτώσεις μητΜΓΔ και 16 περιπτώσεις πατΜΓΔ (Πίνακας 67). Κυρίως αφορούν



ΜΓΔ τμήματος χρωμοσώματος (τμηματική ΜΓΔ) στα χρωμοσώματα 7, 13, 14, 16, 18, 20, 21 και 22 ή και ολόκληρου χρωμοσώματος για το χρωμόσωμα 21. Περισσότερες περιπτώσεις ΜΓΔ βρέθηκαν για τα χρωμοσώματα 21 και 14. Πολλές από αυτές βρέθηκαν σε συνδυασμό και με τα χρωμοσώματα 13, 20 και 22.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία το ποσοστό των παρατηρούμενων μητΜΓΔ σε σχέση με τις πατΜΓΔ είναι μεγαλύτερο, κάτι που επιβεβαιώνεται και από τα δικά μας αποτελέσματα (Kotzot D. 2008). Η διαφορά αυτή στην συχνότητα της μητρικής και της πατρικής ΜΓΔ οφείλεται στο γεγονός ότι περισσότερα συμβάντα μη διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων στη μείωση συμβαίνουν κατά τον σχηματισμό των ωαρίων σε ποσοστό περίπου 50% (μητρική μείωση I) παρά των σπερματοζωαρίων (5%) (Ginsburg C. et al., 2000; Preece MA et al., 2000).

Σύμφωνα με τον D Kotzot (2005) η ετεροδισωμία πατρικής προέλευσης εμφανίζεται σε ποσοστό 21% ενώ η ετεροδισωμία μητρικής προέλευσης σε ποσοστό 67%. Η συχνότητα εμφάνισης της μητρικής ετεροδισωμίας είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την πατρική ετεροδισωμία έτσι όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα μας κάτι που συμφωνεί με τα ως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Από τα αποτελέσματα των δειγμάτων με μητΜΓΔ προκύπτει ότι η μητρική ετεροδισωμία εμφανίζεται συχνότερα από ότι η μητρική ισοδισωμία. Βρέθηκαν συνολικά 36 περιπτώσεις ετεροδισωμίας και 15 περιπτώσεις ισοδισωμίας. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία η μητρική ετεροδισωμίας σε σχέση με την μητρική ισοδισωμίας εμφανίζεται σε αναλογία 2:1 (Kotzot D. 2008). Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με την βιβλιογραφία.

Όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή, ο πιο κοινός μηχανισμός δημιουργίας της πατΜΓΔ είναι η διάσωση μονοσωμίας και διπλασιασμός του μοναδικού πατρικού χρωμοσώματος που προέκυψε μετά από σφάλμα στην πρώτη μειωτική διαίρεση της μητέρας. Γι αυτό και το μεγαλύτερο ποσοστό των πατΜΓΔ είναι ισοδισωμίες (Dawson AJ et al., 2011). Θα περίμενε κανείς λοιπόν η πατρική ισοδισωμία να εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα από ότι η πατρική ετεροδισωμία. Παρόλα αυτά παρατηρούμε πως η ισοδισωμία και η ετεροδισωμία εμφανίζεται περίπου με την ίδια συχνότητα (9 ισοδισωμίες : 8 ετεροδισωμίες) στα δείγματά με πατΜΓΔ.

Για το χρωμόσωμα 21 βρέθηκαν 38 περιπτώσεις ΜΓΔ21, 30 μητΜΓΔ21 και 8 πατΜΓΔ21 (πίνακας 67). Από αυτές επιβεβαιώνεται η ύπαρξη μητΜΓΔ21 ολόκληρου του χρωμοσώματος για 6 δείγματα αποβολής (28, 62, 76, 110, 162, 231) και πατΜΓΔ21 ολόκληρου του χρωμοσώματος σε 3 δείγματα αποβολής (65, 147, 216).

Γνωρίζοντας ότι η διάσωση τρισωμίας είναι ο πιο κοινός μηχανισμός της δημιουργίας της ΜΓΔ, επομένως είναι αναμενόμενο πως και η ΜΓΔ21 θα είναι συχνή στις αποβολές.

Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η συχνότητα της πατΜΓΔ14 σε νεογνά είναι μικρότερη σε σχέση με την συχνότητα της μητΜΓΔ14 και αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι η πατρική ΜΓΔ14 εμφανίζεται πιο συχνά στις αυτόματες αποβολές από ότι η μητΜΓΔ14 (Tsukishiro S. et al., 2004). Εμείς βρήκαμε 14 περιπτώσεις μητΜΓΔ14 και 4 μόνο περιπτώσεις πατΜΓΔ14. Με βάση λοιπόν τα δικά μας αποτελέσματα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η συχνότητα της πατΜΓΔ για το χρωμόσωμα 14 δεν είναι μεγαλύτερη στις αποβολές από ότι στα νεογνά.

Το 50% περίπου των περιπτώσεων με ΜΓΔ14 αφορούν μεταθέσεις κατά Robertson μεταξύ ομόλογων και μη ομόλογων χρωμοσωμάτων (Kotzot D. 2008; Grati FR. 2006; Mitter D. 2006). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία ο κίνδυνος εμφάνισης ΜΓΔ σε έμβρυο φορέα μετάθεσης μη ομόλογων ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων είναι 0,6%, ενώ ο κίνδυνος εμφάνισης ΜΓΔ σε έμβρυο φορέα μετάθεσης μεταξύ ομόλογων ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων είναι 66% (Berend SA et al. 2000; Shaffer LG. et al. 2000; Shaffer LG. et al. 2001). Το υψηλό ποσοστό της ΜΓΔ που εμφανίζεται σε έμβρυα με μεταθέσεις μεταξύ ομόλογων ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων σχετίζεται με την δημιουργία ισοχρωμοσώματος. Αποτέλεσμα της δημιουργίας ισοχρωμοσώματος είναι πάντα ΜΓΔ.

Από τα αποτελέσματα μπορούμε να υποθέσουμε 4 πιθανές περιπτώσεις μετάθεσης μεταξύ των χρωμοσωμάτων 14 και 21, 2 πατρικής προέλευσης (δείγματα 102 και 216) και 2 μητρικής προέλευσης (δείγματα 25 και 76) και μια πιθανή μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 14 και 13 (δείγμα 119). Όλες οι περιπτώσεις πατΜΓΔ που σχετίζονται με μεταθέσεις κατά Robertson μεταξύ μη ομόλογων χρωμοσωμάτων έχουν κληρονομηθεί από τον πατέρα (Kotzot D. 2008).

Πιθανός μηχανισμός δημιουργίας αυτών των μεταθέσεων είναι η διάσωση τρισωμικού ζυγώτη. Μη διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων κατά την 1<sup>η</sup> μειωτική διαίρεση ατόμου με μετάθεση κατά Robertson θα δώσει έναν δισωμικό γαμέτη και ένα γαμέτη χωρίς κανένα χρωμόσωμα. Ένωση του δισωμικού γαμέτη με έναν φυσιολογικό οδηγεί σε απόγονο με τρισωμία και μετάθεση κατά Robertson. Με διάσωση τρισωμίας 50% των απογόνων θα είναι φυσιολογικοί και 50% θα εμφανίζουν ΜΓΔ από μετάθεση (Kim SR et al., 2002).

Από την μοριακή ανάλυση βρέθηκαν επίσης 6 περιπτώσεις ΜΓΔ22 (5 μητρικές και 1 πατρική) σε συνδυασμό με τα χρωμοσώματα 14, 20 και 21. Ισοζυγισμένες μεταθέσεις κατά Robertson ανάμεσα σε αυτά τα χρωμοσώματα δηλώνει την εμφάνιση τρισωμικού μωσαϊκισμού ή ομοζυγωτία αυτοσωμικών υπολειπόμενων κληρονομήσιμων μεταλλάξεων (Kotzot D. 2008).

Βρέθηκαν επίσης 4 περιπτώσεις μητΜΓΔ18 και 1 περίπτωση πατΜΓΔ18. Στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί κυρίως περιπτώσεις τρισωμίας 18 σε αποβολές και δυο μόνο περιπτώσεις μετάθεσης 18/21, σε μια από αυτές με εμφάνιση μητρικής ισοδισωμίας 18, ενώ πρόσφατα έχει αναφερθεί μια περίπτωση τμηματικής ΜΓΔ18. (Thomy J.L et al.,2001; Binkert F et al.,1990; Kariminejad A et al.,2011).

Μέχρι τώρα, έχουν αναφερθεί 3 περιπτώσεις μωσαϊκής μητΜΓΔ και 13 περιπτώσεις μωσαϊκής πατΜΓΔ όλου του γονιδιώματος σε κάποιους ιστούς ή κύτταρα σε συνδυασμό με διγονεϊκή δισωμία σε ζώντα νεογνά. 6 περιπτώσεις εμφανίζουν πατΜΓΔ όλου του γονιδιώματος μόνο στον πλακούντα. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία πατΜΓΔ όλου του γονιδιώματος σε ποσοστό 60% έχει αναφερθεί ότι εμφανίζεται στον πλακούντα (Kotzot D. 2008).

Δύο δείγματα (168 και 198) εμφάνισαν μητΜΓΔ και πατΜΓΔ αντίστοιχα σε περισσότερα από 3 χρωμοσώματα και πιθανόν να εμφανίζουν αντίστοιχα μητΜΓΔ και πατΜΓΔ όλου του γονιδιώματος ή πιθανόν να έχει συμβεί λάθος στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων με αποτέλεσμα την εμφάνιση τρισωμιών που καταλήγουν μετά από τρισωμική διάσωση σε ΜΓΔ.

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

❖ Ο πιο συχνός μηχανισμός δημιουργίας της ΜΓΔ είναι η διάσωση τρισωμίας. Επομένως, η ΜΓΔ που εμφανίζεται σε πολλά από τα δείγματα μας μπορεί να οφείλεται στην επιδιόρθωση του τρισωμικού ζυγώτη με απώλεια του ενός από τα τρία χρωμοσώματα. Σε αυτή την περίπτωση οι αποβολές πιθανών να οφείλονται σε τρισωμίες και στον μη σωστό διαχωρισμό του τρισωμικού ζυγώτη οι οποίες τελικά οδηγούν στην εμφάνιση ΜΓΔ.

❖ Το ποσοστό των παρατηρούμενων μητΜΓΔ σε σχέση με τις πατΜΓΔ είναι μεγαλύτερο.

❖ Η συχνότητα εμφάνισης της μητρικής ετεροδισωμίας είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την πατρική ετεροδισωμία

❖ Η μητρική ετεροδισωμία εμφανίζεται συχνότερα από ότι η μητρική ισοδισωμία.

❖ Η συχνότητα της πατΜΓΔ δεν είναι μεγαλύτερη στις αποβολές από ότι στα νεογνά (Tsukishiro S. et al., 2004).

❖ Η πατρική ισοδισωμία και η ετεροδισωμία εμφανίζεται περίπου με την ίδια συχνότητα (9 ισοδισωμίες : 8 ετεροδισωμίες) στα δείγματά με πατΜΓΔ.

❖ Στα δείγματα μας η τρισωμία 21 είναι η πιο συχνή τρισωμία που παρατηρήθηκε όπως επίσης και με μεγαλύτερη συχνότητα εμφανίστηκε ΜΓΔ21, όπου μπορεί να είναι το αποτέλεσμα διάσωσης της τρισωμίας 21.

❖ Τα δείγματα μας εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό τυχαίων χρωμοσωμικών ανακατατάξεων.

❖ Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η ΜΓΔ μπορεί να αποτελέσει αιτία των αποβολών εάν εντοπίζεται σε περιοχές των χρωμοσωμάτων που υπάρχουν γονίδια με αποτύπωση όπου ελέγχουν την εμβρυογένεση και την ανάπτυξη του εμβρύου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Περίπου το 10-15 % των κήσεων καταλήγουν σε αυτόματες αποβολές. Οι αυτόματες αποβολές είναι τυχαίες αποβολές πριν από τη 20<sup>η</sup> ολοκληρωμένη εβδομάδα της κύησης. Είναι γνωστό ότι περίπου 50-60% των αυτόματων αποβολών οφείλεται σε κυτταρογενετικές ανωμαλίες, όμως το 40%, παραμένει αγνώστου αιτιολογίας (Nagaishi M. et al.,2004, Zhang YX et al.,2009, Warren JE. 2008).

Κυτταρογενετικές μελέτες σε προϊόντα αποβολών του πρώτου τριμήνου έχουν δείξει ότι το 50% των εμβρύων είναι τρισωμικά. Η δημιουργία τρισωμικού ζυγώτη και στη συνέχεια απώλεια του ενός χρωμοσώματος, αποτελεί τον κύριο μηχανισμό εμφάνισης μονογονεϊκής δισωμίας. Επομένως πιθανόν η ΜΓΔ να παίζει σημαντικό ρόλο στις αποβολές (Shaffer et al., 2001, Preece et al.,2000).

Μονογονεϊκή δισωμία (ΜΓΔ) ορίζεται η μεταβίβαση και των δύο ομόλογων χρωμοσωμάτων από τον ένα μόνο γονέα στο παιδί. Η συχνότητα της ΜΓΔ έχει υπολογιστεί περίπου στις 2.8/10.000 γεννήσεις και έχει αναφερθεί για όλα τα χρωμοσώματα εκτός από τα 3, 12, 17 και 19 (Engel 1980) αλλά μέχρι σήμερα οι υπάρχουσες μελέτες σε προϊόντα αποβολών είναι λίγες και δεν έχει διαλευκανθεί αν η ΜΓΔ μπορεί να αποτελέσει αιτία αποβολής (D Kotzot 2002, Tsukishiro S et al.,2005).

Στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να μελετηθούν προϊόντα αποβολών κυρίως πρώτου τριμήνου για μονογονεϊκή δισωμία (ΜΓΔ) με μοριακές τεχνικές και χρήση πολυμορφικών δεικτών DNA και να βρεθεί το ποσοστό της ΜΓΔ στα προϊόντα αποβολών.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 68 ιστοί αποβαλλόμενων εμβρύων. Για την διάγνωση της ΜΓΔ χρησιμοποιήσαμε πολυμορφικούς δείκτες σε περιοχές χρωμοσωμάτων που περιέχουν γονίδια με αποτύπωση. Οι πολυμορφικοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν εντοπίζονταν σε περιοχές των χρωμοσωμάτων 7, 14, 20, 21 και 22.

Ένα από τα προβλήματα τα οποία καλούμαστε να αντιμετωπίσουμε όταν εξετάζουμε ιστούς εμβρύων είναι η μητρική επιμόλυνση, δηλαδή η ανάπτυξη και εξέταση μητρικών κυττάρων και όχι εμβρυϊκών όπως θα ήταν αναμενόμενο. Για να αποκλείσουμε την μητρική επιμόλυνση των δειγμάτων ελέγχθηκε το φύλο των δειγμάτων, χρησιμοποιώντας έναν δείκτη DNA που εντοπίζεται στην περιοχή του

γονιδίου SRY του χρωμοσώματος Y που καθορίζει το φύλο στον άνθρωπο όπου στα 55 δείγματα (76,4%) δεν ανιχνεύτηκε η περιοχή αυτή (♀) ενώ στα υπόλοιπα 17 (23,6%) ανιχνεύτηκε (♂).

Η μοριακή ανάλυση των 68 δειγμάτων με χρήση πολυμορφικών δεικτών DNA αποκάλυψε: σε ποσοστό 41,18% μητΜΓΔ (28 δείγματα), σε ποσοστό 14,7% τρισωμία σε κάποιο από τα χρωμοσώματα που ελέγχθησαν (10 δείγματα), σε ποσοστό 8,8% πατΜΓΔ (6 δείγματα) και τέλος μητΜΓΔ σε συνδυασμό με τρισωμία σε κάποιο χρωμόσωμα σε ποσοστό 2,94%, ενώ σε ποσοστό 32,4% (22 δείγματα) εμφάνισαν το φυσιολογικό πρότυπο ή ήταν μη πληροφοριακά στις περιοχές των δεικτών όπου και μελετήθηκαν.

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης, τα δείγματα μας εμφάνισαν μεγάλο ποσοστό τυχαίων χρωμοσωμικών ανακατατάξεων.

Συνεπώς, η ΜΓΔ που εμφανίζεται σε πολλά από τα δείγματα μας μπορεί να οφείλεται στην επιδιόρθωση του τρισωμικού ζυγώτη με απώλεια του ενός από τα τρία χρωμοσώματα. Σε αυτή την περίπτωση οι αποβολές πιθανών να οφείλονται σε τρισωμίες και στον μη σωστό διαχωρισμό του τρισωμικού ζυγώτη οι οποίες τελικά οδηγούν στην εμφάνιση ΜΓΔ.

Τέλος, η ΜΓΔ μπορεί να αποτελέσει αιτία των αποβολών εάν εντοπίζεται σε περιοχές των χρωμοσωμάτων που υπάρχουν γονίδια με αποτύπωση όπου ελέγχουν την εμβρυογένεση και την ανάπτυξη του εμβρύου.

## SUMMARY

About 10-15% of all recognized pregnancies end in spontaneous abortions. Spontaneous abortions are defined as the loss of an embryo or fetus before the 20th week of gestation. It is well known that chromosomal abnormalities are the major factor underlying spontaneous abortions in about 50-60% of all conceptions, but in the 40% the cause of the abortion is unknown (Nagaishi M. et al., 2004, Zhang YX et al., 2009, Warren JE. 2008).

Cytogenetic studies in first trimester abortions have shown that most of 50% of the embryos are trisomic. Formation of trisomic zygote and subsequent loss of the one chromosome is the most seen mechanism of UPD. So probably UPD may be related to abortions (Shaffer et al., 2001, Preece et al., 2000).

Uniparental disomy (UPD) is the inheritance of a pair of chromosomes derived unilaterally from the one instead of both parents. The frequency of UPD is about 2.8/10.000 gestations and has been reported for all chromosomes except for 3, 12, 17 and 19 (Engel 1980) but until today the reports in products of abortions are few and it is not known whether UPD can be a cause for abortions (D Kotzot 2002, Tsukishiro S et al., 2005).

The purpose of this study was to examine products of mainly first trimester abortions for UPD with molecular techniques and use of polymorphic DNA markers and found the rate of UPD in products of abortions.

In this study were examined tissues of 68 aborted fetuses. For the diagnosis of UPD were used polymorphic markers in chromosomal regions containing imprinted genes. The polymorphic markers used were located in regions of the chromosomes 7, 14, 20, 21, and 22.

One of the problems that we face when examining fetal tissues is the presence of maternal contamination, namely the development and examination of maternal rather embryonic cells as would be expected. To exclude maternal contamination the samples were tested with a DNA marker localized to the region of the SRY gene in chromosome Y that determines sex in humans, were in 55 samples (76,4%) this region was not detected (♀) while in the remaining 17 (23,6%) was detected (♂).

The molecular analysis of 68 samples using polymorphic DNA markers revealed: a percentage of 41,18% matUPD (28 samples), at a rate of 14,7% trisomy



(10 samples), at 8,8% patUPD (6 samples) and finally matUPD combined with trisomy at a rate 2,94%, while 32,4% (22 samples) showed a normal pattern or were non informative in the areas of markers where they tested.

As we can see from the results of molecular analysis, our samples showed high rate of random chromosomal rearrangements.

Therefore, the UPD occurring in many of our samples may be due to repair of trisomic zygote with the loss of one of the three chromosomes. In this case, abortions may be due to trisomies and to abnormal separation of trisomic zygote which eventually lead to UPD.

Finally, UPD can be a cause of miscarriages if found in regions of chromosomes that exist imprinted genes which control embryogenesis and fetal development.

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Antonarakis SE**, Adelsberger PA, Petersen MB, Binkert F, Schinzel AA Analysis of DNA polymorphisms suggests that most de novo dup(21q) chromosomes in patients with Down syndrome are isochromosomes and not translocations. *Am J Hum Genet.* **1990**; 47(6):968-72.
- Berend SA**, Horwitz J, McCaskill C, et al.: Identification of uniparental disomy following prenatal detection of Robertsonian translocations and isochromosomes. *Am J Hum Genet* **2000**; 66(6):1787-93.
- Binkert F.**, Stranzinger J., Schinzel A.: Partial trisomy of chromosome 18(pter→q12) following a familial 18;21 translocation rcp(18;21)(q12;q11), *Hum. Hered* **40** **1990**; 81–84.
- Bell KA**, Van Deerlin PG, Haddad BR, et al.: Cytogenetic diagnosis of "normal 46,XX" karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading. *Fertil Steril.* **1999**; 71(2):334-41.
- Barton SC**, Surani MA, Norris ML: Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* **1984**; 311(5984):374-6.
- Butler MG**: Genomic imprinting disorders in humans: a mini-review. *J Assist Reprod Genet* **2009**;26(9-10):477-86.
- Berend SA**, Bejjani BA, McCaskill C, et al. Identification of uniparental disomy in phenotypically abnormal carriers of isochromosomes or Robertsonian translocations. *Am J Med Genet.* **2002**; 111(4):362-5.
- Bastepe Murat**, Andrew H. Lane, and Harald Ju"ppner: Paternal Uniparental Isodisomy of Chromosome 20q—and the Resulting Changes in GNAS1 Methylation—as a Plausible Cause of Pseudohypoparathyroidism *Am. J. Hum. Genet.* **2001** 68:1283–1289,
- Curtis L**, Antonelli E, Vial Y, et al. Prenatal diagnostic indicators of paternal uniparental disomy 14. *Prenat Diagn* **2006**; 26: 662–666.
- Cattanach B.M.** and Jones J.: Genetic Imprinting in the Mouse: Implications for Gene Regulation, *J. Inher. Metabol. Diseas.* **1994**; 17 (4): 403–421.
- Chudoba I.**, Franke Y., Senger G., et al.: Maternal UPD 20 in a Hyperactive Child with Severe Growth Retardation, *Eur. J. Hum. Genet* **1999**; (7):533–540.
- Chen CP**, Chern SR, Wu PC, et al.: Unbalanced and balanced heterologous acrocentric rearrangements involving chromosome 21 at amniocentesis. *Taiwan J Obstet Gynecol.* **2010**; 49(1):62-8.

- Dawson AJ**, Chernos J, McGowan-Jordan J et al.: CCMG guidelines: prenatal and postnatal diagnostic testing for uniparental disomy. *Clin Genet.* **2011**; 79(2):118-24.
- DeChiara TM**, Robertson EJ, Efstratiadis A: Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* **1991**; 64(4):849-59.
- De Grouchy J**, Turleau C: Microcytogenetics 1984. *Experientia* **1986**; 42(10):1090-7.
- Engel E.**: A new genetic concept: the uniparental disomy and its potential effect, the isodisomy. *J Genet Hum.* **1980**; 28(1):11-22.
- Engel E.**: A fascination with chromosome rescue in uniparental disomy: Mendelian recessive outlaws and imprinting copyrights infringements. *Eur J Hum Genet* **2006**; 14(11):1158-69.
- Engel E.** and DeLozier-Blanchet, C.D.: Uniparental Disomy, Isodisomy, and Imprinting: Probable Effects in Man and Strategies for Their Detections. *Am. J. Hum. Genet* **1991**; (40):432-439.
- Eggermann, T.**: Identification of Interstitial Maternal Uniparental Disomy (UPD) (14) and Complete Maternal UPD (20) in a Cohort of Growth Retarded Patients. *J. Med. Genet.*, **2001**; (38):86-89.
- Eggermann T**, Zerres K, Eggermann K, et al.: Uniparental disomy: clinical indications for testing in growth retardation. *Eur J Pediatr.* **2002**; 161(6):305-12.
- Evdokimova VN**, Nazarenko SA.: The absence of uniparental X-chromosome inheritance in spontaneous abortuses with a 46,XX karyotype. *Ontogenez*.**2000**; 31(3):201-4
- Frias AE**, Luikenaar RA, Sullivan AE, et al.: Poor obstetric outcome in subsequent pregnancies in women with prior fetal death. *Obstet Gynecol.* **2004**;104 (3):521-6.
- Fritz B**, Aslan M, Kalscheuer V, et al.: Low incidence of UPD in spontaneous abortions beyond the 5th gestational week. *Eur J Hum Genet.* **2001**;9 (12):910-6.
- Fritz B**, Van Oorschot B, Latta E, et al.: Possibilities for false-negative findings in trisomy 21 screening with FISH. *Geburtshilfe Neonatol.* **1996**; 200(5):191-8.
- Ferguson-Smith AC**, Cattanach BM, Barton SC, et al.: Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7. *Nature* **1991**; 351(6328):667-70.
- Farcas S.**, Valerica Belengeanu, Cristina Popa, et al. Role of chromosomal translocations in recurrent spontaneous abortion. Department of Medical Genetics, 2007 Original articles

- Fernández-Rebollo Eduardo**, Beatriz Lecumberri, Intza Garin: New mechanisms involved in paternal 20q disomy associated with pseudohypoparathyroidism Accepted Preprint first posted on 13 September **2010** as Manuscript EJE-10-0435
- Geraedts JPM**: Chromosomal anomalies and recurrent miscarriage. *Infertil Reprod Med Clin North Am.* **1996**;7:677–688.
- Gardner RJM**: *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. New York, Oxford University Press, 1989.
- Giardina E**, Peconi C, Cascella R, et al.: A multiplex molecular assay for the detection of uniparental disomy for human chromosome 15. *Electrophoresis* **2008**; 29(23):4775-9
- Ginsburg C**, Fokstuen S, Schinzel A.: The contribution of uniparental disomy to congenital development defects in children born to mothers at advanced childbearing age. *Am J Med Genet* **2000**;95(5):454-60
- Grati FR**, Grimi B, Frascoli G, et al.: Confirmation of mosaicism and uniparental disomy in amniocytes, after detection of mosaic chromosome abnormalities in chorionic villi. *Eur J Hum Genet* **2006**; 14(3):282-8.
- Grasso M**, Giovannucci Uzielli ML, Pierluigi M, et al.: Isochromosome not translocation in trisomy 21q21q. *Hum Genet.* **1989**; 84(1):63-5.
- Gudrun E. Moore**, PhD, Zehra Ali, MSc, Rehan U. Khan, BSc, et al.: The incidence of uniparental disomy associated with intrauterine growth retardation in a cohort of thirty-five severely affected babies. *Am J Obstet Gyn* **1997**;176:294-9.
- Henderson, D.J.**: Early Embryonic Failure Associated with Uniparental Disomy for Human Chromosome 21. *Hum. Mol. Genet.*, **1994**; (3)(8):1373–1376.
- Hansen, W.F**, Bernard LE, Langlois S, et al.: Maternal Uniparental Disomy of Chromosome 2 and Confined Placental Mosaicism for Trisomy 2 in a Fetus with Intrauterine Growth Restriction, Hypospadias, and Oligohydramnios. *Prenat Diagn.* **1997**;17(5):443-50
- Hassold T**: A Cytogenetic Study of 1000 Spontaneous Abortions. *Ann. Hum. Genet* **1980**; (44):151–178
- Hassold T**: Chromosome abnormalities in human reproductive wastage. *Trends Genet* **1989** 2: 105-110
- Hassold TJ**, Jacobs PA.: Trisomy in man. *Annu Rev Genet* **1984** 18: 69-97
- Hamerton JL**, Canning N, Ray M, et al.: A cytogenetic survey of 14,069 newborn infants. I. Incidence of chromosome abnormalities. *Clin Genet.* **1975**;8(4):223-43.
- Horne Andrew W**, Claire I Alexander Recurrent miscarriage *J Fam Plann Reprod Health Care* **2005**; 31(2): 103–107

- Jacobs PA**, Hassold TJ, Henry A, et al.: Trisomy 13 ascertained in a survey of spontaneous abortions. *J Med Genet* **1987**; 24(12):721-4
- Jiang Y**, Tsai TF, Bressler J, Beaudet AL. Imprinting in Angelman and Prader Willi syndromes. *Curr Opin Genet* **1998** ; 334- 342
- Kotzot D.**: Abnormal phenotypes in uniparental disomy (UPD): fundamental aspects and a critical review with bibliography of UPD other than 15. *Am J Med Genet* **1999**; 82(3):265-74
- Kotzot D**, Balmer D, Baumer A, et al.: Maternal uniparental disomy 7 review and further delineation of the phenotype. *Eur J Pediatr.* **2000**; 159(4):247-56.
- Kotzot D.**: Complex and segmental uniparental disomy (UPD) – review and lessons from rare chromosomal complements. *J Med Genet* **2001**; 38(8):497-507.
- Kotzot D.**: Supernumerary marker chromosomes (SMC) and uniparental disomy (UPD) – coincidence or consequence? *J Med Genet* **2002**; 39(10):775-8.
- Kotzot D.**: Review and meta-analysis of systematic searches for uniparental disomy (UPD) other than UPD 15. *Am J Med Genet* **2002**;111(4):366-75.
- Kotzot D.**: Review and meta-analysis of systematic searches for uniparental disomy (UPD) other than UPD 15. *Am J Med Genet* **2002**; 111(4):366-75.
- Kotzot D.**: Maternal uniparental disomy 14 dissection of the phenotype with respect to rare autosomal recessively inherited traits, trisomy mosaicism, and genomic imprinting. *Ann Genet.* **2004**; 47(3):251-60
- Kotzot D.**, Utermann G: Uniparental disomy (UPD) other than 15: Phenotypes and bibliography updated. *Am J Med Genet A.* **2005**; 136(3):287-305.
- Kotzot D.**: Prenatal testing for uniparental disomy: indications and clinical relevance. *Ultrasound Obstet Gynecol.* **2008**; 31(1):100-5
- Kotzot D.**: Complex and segmental uniparental disomy updated. *J Med Genet* **2008**; 45(9):545-56.
- Kuroiwa, Y.**, Kaneko-Ishino, T., Kagitani, F., et al.: Peg3 Imprinted Gene on Proximal Chromosome 7 Encodes for a Zinc Finger Protein, *Nature Genet* **1996**; 12:186–190.
- Kariminejad A**, Kariminejad R, Moshtagh A, et al.: Pericentric inversion of chromosome 18 in parents leading to a phenotypically normal child with segmental uniparental disomy 18. *Eur J Hum Genet* **2011**; 19(5):555-60.
- Kondo Y**, Tsukishiro S, Tanemura M, et al.: Maternal uniparental disomy of chromosome 16 in a case of spontaneous abortion. *J Hum Genet* **2004** 49(4):177-81.

- Kim SR**, Shaffer LG.: Robertsonian translocations: mechanisms of formation, aneuploidy, and uniparental disomy and diagnostic considerations. *Genet Test.* **2002**; 6(3):163-8.
- Kalitsis P**, Earle E, Vissel B, et al.: A chromosome 13-specific human satellite I DNA subfamily with minor presence on chromosome 21: further studies on Robertsonian translocations. *Genomics* **1993**; 16(1):104-12
- Lomax B**, Tang S, Separovic E, et al.: Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* **2000**; 66(5):1516-21
- Ledbetter DH**, Engel E.: Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. *Hum Mol Genet.* **1995** 4 Spec No: 1757-64
- Levine MA.**: The McCune-Albright syndrome. The ways and wherefores of abnormal signal transduction. *N Engl J Med.* **1991**; 325(24):1738-40.
- Lebedev I.N**, Nadezhda V Ostroverkhova, Tatyana V Nikitina et.al: Features of chromosomal abnormalities inspontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis.*Eur J of Hum. Gen.* **2004** 12, 513–520
- Liehr T.**: Cytogenetic contribution to uniparental disomy (UPD). *Mol Cytogenet* **2010**; 29;3:8
- Martin RH**: Distribution of aneuploidy in human gametes. Comparison between human sperm and oocytes. *Am J Med Genet* **1991**; 39: 321
- Mitter D**, Buiting K, v. Eggeling F, et al.: Is there a higher incidence of maternal uniparental disomy 14 [upd(14)mat]?Detection of 10 new patients by methylationspecific PCR. *Am J Med Genet* **2006**; 140A: 2039–2049.
- Mantovani G**, et al.: Mutational analysis of GNAS1 in patients with pseudohypoparathyroidism: identification of two novel mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* **2000**; 85(11):4243-8
- Monk D**, Moore GE.: Intrauterine growth restriction--genetic causes and consequences. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2004; 9(5):371-8.
- Mattei J**, Mattei M, Ayme S, et al.: Origin of the extra chromosome in trisomy 21. *Hum Genet* **1979**; 46: 107- 110
- Morison IM**, Ramsay JP, Spencer HG.: A census of mammalian imprinting. *Trends in Genet* 21 **2005**; (8): 457- 465
- McGrath J**, Solter D.: Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell.* **1984**; 37(1):179-83.

- McMinn J**, Wei M, Schupf N, et al.: Unbalanced placental expression of imprinted genes in human intrauterine growth restriction. *Placenta*. **2006**; (6-7):540-9.
- Nagaishi M**, Yamamoto T, Iinuma K, et al.: Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **2004**; 3: 237–241
- Nybo Andersen AM**, Wohlfahrt J, Christens P, et al.: Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ*. **2000**; 320(7251):1708-12.
- Nicholls RD.**: Genomic imprinting and uniparental disomy in Angelman and Prader-Willi syndromes *Am J Med Genet.* **1993**; 46(1):16-25.
- Nicholls RD**, Knoll JH, Butler MG, et al.: Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non deletion Prader-Willi syndrome. *Nature* **1989**; 342(6247):281-5.
- Nicholls RD**, Pai GS, Gottlieb W, et al.: Paternal uniparental disomy of chromosome 15 in a child with Angelman syndrome. *Ann Neurol.* **1992**; 32(4):512-8.
- Nikitina TV**, Sazhenova EA, Sukhanova NN, et al.: Evaluation of the Role of Uniparental Disomy in Early Embryoletality of Man. *Ontogenez.* **2004**; 35(4):297-306.
- Okuyama K**: Miscarriage and maternal age. *Shusanki Igaku* **1992**; 22: 1227–1231
- Opstal D.**, Van Den Berg C., Deelen W.H. et al.: Prospective Prenatal Investigations on Potential Uniparental Disomy in Cases of Confined Placental Trisomy. *Prenat. Diagn* **1998**; 18(1):35–44.
- Ostrer H**, Wilson DI, Hangley NA: Human embryo and early fetus research. *Clin.Genet.* **2006**;70(2):98-107
- Ohta T**, Buiting K, Kokkonen H, et al.: Molecular mechanism of Angelman syndrome in two large families involves an imprinting mutation. *Am J Hum Genet* **1999**; 64: 385- 396
- Preece MA**, Moore GE.: Genomic imprinting, uniparental disomy and foetal growth. *Trends Endocrinol Metab* **2000**; 11(7):270-5
- Robinson, W.P.**: Meiotic Origin of Trisomy in Confined Placental Mosaicism Is Correlated with Presence of Fetal Uniparental Disomy, High Levels of Trisomy in Trophoblast, and Increased Risk of Fetal Intrauterine Growth Restriction, *Am. J. Hum. Genet.*, **1997**; 60(4):917–927.;
- Robinson, W.P**: Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. *Bioessays* 2000 May;22(5): 452-9
- Rai R**, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet.* **2006**; 368(9535):601-11.

- Ralph Adrienne**, Fergus Scott, Catherine Tiernan, et al.: Maternal Uniparental Isodisomy for Chromosome 14 Detected Prenatally. *Prenat. Diagn.* **1999**;19: 681–684
- Reik W**, Walter J. : Genomic imprinting: Parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* **2001**; 2: 21- 32
- Satoh K**: Cytogenetic study of spontaneous abortion with high rate of success in chromosome analysis. *Jpn J Fertil Steril* **1991**; 36: 792–798
- Slater, H.R.**, Ralph, A., Daniel, A., et al.: A Case of Maternal Uniparental Disomy of Chromosome 9 Diagnosed Prenatally and the Related Problem of Residual Trisomy, *Prenat. Diagn.*, **2000**; 20:930–932.
- Shaffer LG**, Agan N, Goldberg JD, et al.: American College of Medical Genetics statement of diagnostic testing for uniparental disomy. *Genet Med.* **2001**; 3(3):206-11
- Spence JE**, Perciaccante RG, Greig GM, et al.: Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease. *Am J Hum Genet* **1988**; 42(2):217-26
- Smith, M.**, Creasy M.R., Clarke A., et al.: Sex Ratio and Absence of Uniparental Disomy in Spontaneous Abortions with a Normal Karyotype. *Clin Genet.* **1998**; 53(4):258-61
- Shaffer LG**, Lupski JR: Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet.* **2000**; 34:297-329
- Shaffer LG**, Overhauser J, Jackson LG, et al.: Genetic syndromes and uniparental disomy: a study of 16 cases of Brachmann-de Lange syndrome. *Am J Med Genet.* **1993**; 47(3):383-6
- Solveig M V**. PFlueger: Cytogenetics of Spontaneous Abortion. *The Principles of Clinical Cytogenetics* **2005**, III, 323-345
- Silverstein S**, Lerer I, Sagi M, et al.: Uniparental disomy in fetuses diagnosed with balanced Robertsonian translocations: risk estimate. *Prenat Diagn.* **2002**; 22(8):649-51
- Scarano MI**, Strazzullo M, Matarazzo MR, et al.: DNA Methylation 40 years later: its role in human health and disease. *J Cell Physiol* **2005**; 204: 21- 35
- Surani MA**, Barton SC, Norris ML.: Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* **1984**; 308(5959):548-50
- Tsukishiro S**, Li QY, Tanemura M, et al.: Paternal uniparental disomy of chromosome 14 and unique exchange of chromosome 7 in cases of spontaneous abortion. *J Hum Genet.* **2005**; 50(3):112-7



- Thomy J.L.** de Ravel, Gert Matthijs, et al.: An unbalanced translocation 46,XX,+der(18)t(18;21)(q12.2;q11.2)mat,-21 associated with maternal isodisomy 18pter→18q12.2 *Annales de Génétique* 44 **2001** 63–66
- The ESHRE Capri Workshop Group:** Genetic aspects of female reproduction *Human Reproduction Update*, **2008**;14,(4) 293–307
- Vianna-Morgante Angela M.** and The Human Cytogenetic Study Group: The ratio of maternal to paternal UPD associated with recessive diseases. *Human Genetics* © Springer-Verlag **2005** 10.1007/s00439-005-1311-2
- Voss R,** Ben-Simon E, Avital A, et al.: Isodisomy of chromosome 7 in a patient with cystic fibrosis: could uniparental disomy be common in humans? *Am J Hum Genet.* **1989**; 45(3):373-80.
- Velissariou Voula,** Thalia Antoniadis, Jolanda Gyftodimou et al.,: Maternal uniparental isodisomy 20 in a foetus with trisomy 20 mosaicism: clinical, cytogenetic and molecular analysis. *Eur J. of Hum Gen.* **2002** 10, 694 – 698
- Wapner RJ,** Lewis D: Genetics and metabolic causes of stillbirth. *Semin Perinatol.* **2002**; 26(1):70-4.
- Webb, A.,** Beard, J., Wright, C et al.: A Case of Paternal Uniparental Disomy for Chromosome 11. *Prenat. Diagn* **1995**;15 (8):773–777.
- Warren JE,** Silver RM: Genetics of pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol.* **2008**; 51(1):84-95
- Werner EF.,** Lockwood CJ.: Thrombophilias and Stillbirth *Clin Obstet Gynecol.* **2010**; 53(3):617-27.
- Williams CA,** Angelman H, Clayton- Smith J, et al.: Angelman syndrome: consensus for diagnosis criteria. *Am J Med Genet* **1995**; 56: 237- 243
- Waye JS,** Eng B, Potter MA, et al.: De novo mutation of the DHCR7 gene in a fetus with severe Smith-Lemli-Opitz (or RSH) syndrome. *Am J Med Genet A.* **2007**; 143A(15):1799-801.
- Yong, P.J.,** Marion, S.A., Barrett, I.J., et al.: Evidence for Imprinting on Chromosome 16: The Effect of Uniparental Disomy on the Outcome of Mosaic Trisomy 16 Pregnancies. *Am J Med Genet* **2002**; 112(2):123-32.
- Yamazawa K.,** Tsutomu Ogata, Anne C. Ferguson-Smith: Uniparental Disomy and Human Disease. *Am. J. of Med Gen Part C* **2010** 154C:329–334.
- Zhang YX,** Zhang YP, Gu Y, et al.: Genetic analysis of first-trimester miscarriages with a combination of cytogenetic karyotyping, microsatellite genotyping and arrayCGH. *Clin Genet.* **2009**; 75(2):133-40.

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ**

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1: ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1.** Γενετικές αιτίες των αποβολών
- Πίνακας 2.** Ποσοστά εμφάνισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών ανάλογα με την περίοδο κύησης
- Πίνακας 3.** ΜΓΔ και κλινικά σύνδρομα
- Πίνακας 4:** Αποτυπωμένα γονίδια και ΜΓΔ
- Πίνακας 5 :** ΜΓΔ και εμβρυϊκή θνησιμότητα
- Πίνακας 6.** Πολυμορφικοί δείκτες DNA
- Πίνακας 7.** Αλληλουχίες εκκινητών για μεταλλάξεις του γονιδίου DHCR7.
- Πίνακας 8.** Αλληλουχίες εξωνίων του γονιδίου GNAS1
- Πίνακας 9.** Μίγμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και πρόγραμμα εναλλαγής θερμοκρασίας για τον δείκτη SRY.
- Πίνακας 10.** Μίγμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης
- Πίνακας 11.** Μίγμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης
- Πίνακας 12.** Πρόγραμμα κυκλοποίησης για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
- Πίνακας 13.** Μίγμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για τα εξώνια του γονιδίου GNAS1
- Πίνακας 14.** Πρόγραμμα κυκλοποίησης για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης του γονιδίου GNAS1.
- Πίνακας 15.** Μίγμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και πρόγραμμα εναλλαγής θερμοκρασίας για την ανίχνευση της μετάλλαξης ASO-IVS8 του γονιδίου DHCR7.
- Πίνακας 16.** Μίγμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και πρόγραμμα εναλλαγής θερμοκρασίας για την ανίχνευση της μετάλλαξης Thr93Met(ex4) του γονιδίου DHCR7.
- Πίνακας 17.** Κλινικά στοιχεία των δειγμάτων αποβολής
- Πίνακας 18.** Αποτελέσματα κυτταρογενετικής ανάλυσης
- Πίνακας 19.** Εξέταση για μητρική επιμόλυνση μετά από μοριακή ανάλυση με τον πολυμορφικό δείκτη DNA D21S11 του χρωμοσώματος 21.
- Πίνακας 20.** Εξέταση για μητρική επιμόλυνση μετά από μοριακή ανάλυση με τον πολυμορφικό δείκτη DXS1073 του χρωμοσώματος X.
- Πίνακας 21.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης
- Πίνακας 22.** Εμφάνιση μητΜΓΔ μετά από μοριακή ανάλυση με πολυμορφικούς δείκτες DNA
- Πίνακας 23.** Δείγματα που εμφάνισαν μητΜΓΔ σε ένα μόνο χρωμόσωμα
- Πίνακας 24.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 40
- Πίνακας 25.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 50
- Πίνακας 26.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 68
- Πίνακας 27.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 93
- Πίνακας 28.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 99
- Πίνακας 29.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 113
- Πίνακας 30.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 134
- Πίνακας 31.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 237
- Πίνακας 32.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 62
- Πίνακας 33.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 110
- Πίνακας 34.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 119
- Πίνακας 35.** Δείγματα που εμφάνισαν μητΜΓΔ σε περισσότερα από ένα χρωμοσώματα
- Πίνακας 36.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 25

- Πίνακας 37.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 28
- Πίνακας 38.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 34
- Πίνακας 39.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 37
- Πίνακας 40.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 76
- Πίνακας 41.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 96
- Πίνακας 42.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 156
- Πίνακας 43.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 168
- Πίνακας 44.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 222
- Πίνακας 45.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 231
- Πίνακας 46.** Εμφάνιση μητΜΓΔ και τρισωμίας μετά από μοριακή ανάλυση με πολυμορφικούς δείκτες DNA
- Πίνακας 47.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 162
- Πίνακας 48.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 225
- Πίνακας 49.** Εμφάνιση τρισωμιών μετά από μοριακή ανάλυση με πολυμορφικούς δείκτες DNA
- Πίνακας 50.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 87.
- Πίνακας 51.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 11
- Πίνακας 52.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 125
- Πίνακας 53.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 144
- Πίνακας 54.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 165
- Πίνακας 55.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 192
- Πίνακας 56.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 201
- Πίνακας 57.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 213
- Πίνακας 58.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 228
- Πίνακας 59.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 234
- Πίνακας 60.** Εμφάνιση πατΜΓΔ μετά από μοριακή ανάλυση με πολυμορφικούς δείκτες DNA
- Πίνακας 61.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 56
- Πίνακας 62.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 65
- Πίνακας 63.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 102
- Πίνακας 64.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 147
- Πίνακας 65.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 198
- Πίνακας 66.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος 216
- Πίνακας 67.** Περιπτώσεις ΜΓΔ και τρισωμίας που ευρέθησαν
- Πίνακας 68.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος ελέγχου C1
- Πίνακας 69.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος ελέγχου C2
- Πίνακας 70.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος ελέγχου C3
- Πίνακας 71.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος ελέγχου C4
- Πίνακας 72.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείγματος ελέγχου C5
- Πίνακας 73.** Μελέτες που έχουν γίνει για ΜΓΔ σε κλινικά αναγνωρισμένους πληθυσμούς μέχρι το 2002.
- Πίνακας 74.** Μελέτες για ΜΓΔ σε αυτόματες αποβολές

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2: ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικ. 1.** Αυτοσωμικές τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 21 και 16
- Εικ. 2.** Καρυότυπος ατόμου με μονοσωμία X (45, X)
- Εικ. 3.** Καρυότυπος XXY - σύνδρομο Klinefelter
- Εικ. 4.** Κύρια είδη δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών
- Εικ. 5.** Σχηματισμός παρακεντρικών και περικεντρικών αναστροφών
- Εικ. 6.** Αποτέλεσμα κατά Robertson μετάθεσης μεταξύ δυο ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων
- Εικ. 7.** Κίνδυνος αποβολής εμβρύου σύμφωνα με την μητρική ηλικία στη σύλληψη
- Εικ. 8:** **Ισοδισωμία** (iUPD): η μεταβίβαση του ενός αλληλομόρφου από τον ένα γονέα, **Ετεροδισωμία** (hUPD): η μεταβίβαση των δύο διαφορετικών ομόλογων χρωμοσωμάτων από τον ένα γονέα.
- Εικ. 9.** Μηχανισμοί που οδηγούν σε ΜΓΔ
- Εικ.10.** Εμφάνιση ΜΓΔ μετά από δημιουργία τρισωμικού ζυγώτη (trisomy rescue). Τα χρωμοσώματα μητρικής προέλευσης εμφανίζονται με μαύρο χρώμα, ενώ τα πατρικής προέλευσης με γκρι χρώμα.
- Εικ. 11.** Διάσωση τρισωμίας μετά από σφάλμα στην 1<sup>η</sup> μειωτική διαδικασία
- Εικ 12.** Διάσωση τρισωμίας μετά από σφάλμα στην 2<sup>η</sup> μειωτική διαδικασία
- Εικ. 13.** Δημιουργία τμηματικής ΜΓΔ τελομερικού ή ενδιάμεσου τμήματος χρωμοσώματος.
- Εικ. 14.** Χρωμοσωμικός χάρτης αποτυπωμένων γονιδίων. **p**: εκφράζονται από τον πατέρα, **m**: εκφράζονται από την μητέρα, **b**: εκφράζονται και από τους δύο γονείς
- Εικ. 15.** Σχηματική αναπαράσταση των χρωμοσωμάτων στα οποία έχει αναφερθεί ΜΓΔ και γονίδια με αποτύπωση.
- Εικ. 16:** Μηχανισμός λειτουργίας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)
- Εικ. 17.** Τα τρία βήματα του πρώτου κύκλου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)
- Εικ. 18.** Σχηματική παράσταση διαχωρισμού τμημάτων DNA με την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης (κατακόρυφη) και εμφάνιση των αποτελεσμάτων πάνω στο πήκτωμα.
- Εικ. 19.** Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Εικ. 20.** Εμφάνιση ζωνών διαχωρισμού μορίων DNA με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης.
- Εικ. 21.** Κατακόρυφη συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Εικ. 22** Χρωμοσωμική θέση των δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν για την μοριακή ανάλυση των χρωμοσωμάτων 7,13,14,16,18,20,21,22, X και Y.
- Εικ. 23.** Διαγραμματική απεικόνιση της ανίχνευσης μονογονεϊκής δισωμίας με την ανάλυση πολυμορφικών δεικτών..
- Εικ. 24.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα ζώνωσης φυσιολογικού προτύπου
- Εικ. 25.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα ζώνωσης μη πληροφοριακού προτύπου
- Εικ. 26.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα ζώνωσης προτύπου μονοσωμίας ή ελλείμματος
- Εικ. 27.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα ζώνωσης προτύπου μητΜΓΔ
- Εικ. 28.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα ζώνωσης προτύπου πατΜΓΔ
- Εικ. 29.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα ζώνωσης προτύπου τρισωμίας
- Εικ. 30.** Εμφάνιση μητΜΓΔ21 στον δείκτη D21S11 των δειγμάτων: α) 81, β) 90, γ) 128, δ) 189, ε) 219 στ) 240 και ζ) 243.

- Εικ. 31.** Εμφάνιση μητΜΓΔΧ στον δείκτη DXS1073 των δειγμάτων : α) 81, β) 128, γ) 162, δ) 240 και ε) 243.
- Εικ. 32.** Φωτογραφίες πηκτωμάτων ακρυλαμίδης μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο των δειγμάτων α) 40, β) 50, γ) 68, δ) 93, ε) 99, στ) 113 ζ) 134 και η) 237 στους δείκτες όπου ανιχνεύτηκε μητΜΓΔ σε μια μόνο περιοχή ενός χρωμοσώματος.
- Εικ. 33.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών : α) D21S1437, β) D21S1446 και γ) D21S1270 για το δείγμα 62.
- Εικ. 34.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D21S1437 και β) D21S1446 για το δείγμα 110
- Εικ. 35.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S608 και β) D21S1437 για το δείγμα 119.
- Εικ. 36.** Αποτέλεσμα μοριακής ανάλυσης με μικροσυστοιχίες aCGH του δείγματος 119.
- Εικ. 37.** Πρότυπα aCGH. α) τρισωμία 13, β) τρισωμία18, γ) τρισωμία 21 και δ) 45,X (σύνδρομο Turner).
- Εικ. 38.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S608 και β) D21S1437 για το δείγμα 25.
- Εικ. 39.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D20S96, β) D21S1437, γ) D21S1446 και δ) D22S281 για το δείγμα 28.
- Εικ.40.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D20S96 και β) D21S1437 και γ) D22S281 για το δείγμα 34.
- Εικ. 41.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S608, β) D20S96 και γ) D22S281 για το δείγμα 37.
- Εικ. 42.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S608 β) D21S1437 και γ) D21S1446 για το δείγμα 76.
- Εικ. 43.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S608 και β) D16S3018 για το δείγμα 96.
- Εικ 44.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D7S645 και β) D15S542 για το δείγμα 156.
- Εικ. 45.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D7S645, β) D14S1007, γ) D14S1279, δ) D15S542, ε) D15S543, ζ) D21S1437, και η) D21S1446 για το δείγμα 222
- Εικ. 46.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S1279 και β) D22S1169 για το δείγμα 222.
- Εικ. 47.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D13S1295, β) D16S3121, γ) D21S1437 και δ) D21S1446 για το δείγμα 231.
- Εικ. 48.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών : α) D14S608, β) D15S542, γ) GABRB3, δ) D21S1437 και ε) D21S11 για το δείγμα 162.
- Εικ. 49.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών : α) D18S59, β) D20S162 και γ) D21S1437 για το δείγμα 225.
- Εικ 50.** Εμφάνιση τρισωμίας στους δείκτες α) D21S1437 και β) D21S1446 του δείγματος 125.
- Εικ. 51.** Εμφάνιση αποτελεσμάτων α) D21S11 και β) D21S1446 για το δείγμα 165.
- Εικ. 52.** Εμφάνιση τρισωμίας 16 στον δείκτη D16S3121 για το δείγμα 192.
- Εικ. 53.** Εμφάνιση τρισωμίας 14 στον δείκτη D14S608 και τρισωμίας 21 στον δείκτη D21S1446 για το δείγμα 201.
- Εικ. 54.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείκτη D21S1446 για το δείγμα 213.
- Εικ. 55.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D21S1437, β) D21S1446 για το δείγμα 228.

- Εικ. 56.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών : α) D14S608, β) D21S1446 για το δείγμα 56.
- Εικ. 57.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S608, β) D21S1446 και γ) D21S1437 για το δείγμα 65.
- Εικ. 58.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S608 και β) D21S1437 για το δείγμα 102.
- Εικ. 59.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D16S3018 β) D21S1437 και γ) D21S1446 για το δείγμα 147.
- Εικ. 60.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S608, β) D18S59 γ) D21S1446 και δ) D22S281 για το δείγμα 198.
- Εικ. 61.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης των δεικτών: α) D14S1279, β) D20S171 γ) D21S11 δ) D21S1270 και ε) D21S1446 για το δείγμα 216.
- Εικ. 62.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης του δείκτη D21S1437 για το δείγμα ελέγχου C1.
- Εικ. 63.** Εμφάνιση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων 177, 180, 216 και 219 στα εξώνια 1-13 του γονιδίου GNAS1
- Εικ. 64.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης για την μετάλλαξη ASO IVS8.
- Εικ. 65.** Αποτελέσματα μοριακής ανάλυσης για την μετάλλαξη Thr93Met ex4

### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3: ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

**1) Διάλυμα νιτρικού αργύρου ( $\text{AgNO}_3$ )**

1gr  $\text{AgNO}_3$  σε 1 lt δις απεσταγμένο νερό

**2) Διάλυμα ammonium persulfate (sigma)**

2 gr APS σε τελικό όγκο 10ml δις απεσταγμένο νερό

**3) Διάλυμα ακρυλαμίδης 30%**

Ζυγίζουμε 29 gr ακρυλαμίδης και 1 gr bis ακρυλαμίδη σε τελικό όγκο 100 ml δις απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί ανάδευση με μαγνήτη και διήθηση με διηθητικό χαρτί. Τοποθετείται σε μπουκάλι που δεν διαπερνάται από το φως (σκούρο ή τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο)

**4) Διάλυμα TBE 10X**

Ζυγίζουμε 108 gr Tris , 55 gr βορικό οξύ και 7,44 gr EDTA και προσθέτουμε σε ποτήρι ζέσεως των 1000 ml δις απεσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 1 lt.

**5) Διάλυμα TKM**

Σε 100 ml δις απεσταγμένο νερό διαλύουμε 1 ml Tris- HCl PH 7.8 1M, 1 ml KCl 1M, 400μl EDTA 0.5M και 400 μl  $\text{MgCl}_2$  1M.

**6) Διάλυμα  $\text{MgCl}_2$  1M**

Σε τελικό όγκο 100 ml δις απεσταγμένο νερό ζυγίζουμε και προσθέτουμε 9,52 gr  $\text{MgCl}_2$ .

**7) Διάλυμα TE**

Σε τελικό όγκο 500 ml δις απεσταγμένο νερό διαλύουμε 5 ml Tris- HCl PH 7.8 10mM και EDTA PH 8 1m M

**8) Διάλυμα NaOH 3mM**

Σε τελικό όγκο 100 ml δις απεσταγμένο νερό διαλύουμε 12 gr NaOH

**9) Διάλυμα NaOH 10M**

Σε τελικό όγκο 10 ml δις απεσταγμένο νερό διαλύουμε 4 gr NaOH

**10) Διάλυμα NaCl 6M**

Σε δις απεσταγμένο νερό βάζουμε τόσο NaCl μέχρι να παραμένει αδιάλυτο όσο και να το ανακατέψουμε. Για 4M NaCl σε 100 ml δις απεσταγμένο νερό προσθέτουμε 23,4 gr NaCl. Για 6M NaCl σε 100 ml δις απεσταγμένο νερό προσθέτουμε 35,1 gr NaCl.

**11) Διάλυμα SDS 10%.**

Σε 10 ml δις απεσταγμένο νερό διαλύω 1 gr SDS. Γίνεται πολύ καλή ανάδευση και την επόμενη μέρα γίνεται διαυγές και μπορεί να χρησιμοποιηθεί.

**12) Διάλυμα KCl 0.075M**

Σε 500 ml δις απεσταγμένο νερό διαλύω 2,425 gr KCl.



**13) 100bp ladder**

Σε eppendorf των προσθέτουμε 20 μl χρωστική, 20 μl ladder 100 bp και 60 μl δις απεσταγμένο νερό. Γίνεται ανάδευση και είναι έτοιμο προς χρήση.

**14) Χρωστική για πήκτωμα αγαρόζης και ακρυλαμίδης**

Σε σωλήνα 50 ml προσθέτουμε 14,9 ml δις απεσταγμένο νερό και προσθέτουμε σιγά σιγά: 5 gr ficoll 25%, 0.05 gr Bromophenol Blue 0.25% και 0.05 gr xylene cyanol 0.25% για τελικό όγκο 20 ml. Θα προκύψει ένα πηχτό μίγμα το οποίο το αφήνουμε να αναδεύεται όλη νύχτα και την επόμενη μέρα είναι έτοιμο προς χρήση.

**15) Προετοιμασία δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTP's) για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Αρχική συγκέντρωση 100 mM dNTP's .Για τελική συγκέντρωση 2mM dNTP's σε τελικό όγκο 500 μl αναμειγνύουμε 10 μl από το κάθε ένα ( GTP, ATP,CTP,TTP)

**16) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS**

(11.5g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.96g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 5.84g/L NaCl)

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4: ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΑ ΦΥΛΛΑΔΙΑ

Ενημερωτικό φυλλάδιο για τις αποβολές  
(προς κάθε ενδιαφερόμενο)

### Αποβολές

Ο άνθρωπος έχει 46 χρωμοσώματα σε κάθε σωματικό του κύτταρο. Μισά από αυτά τα έχει κληρονομήσει από τη μητέρα του και τα άλλα μισά από τον πατέρα του. Τα χρωμοσώματα βρίσκονται ανά ζεύγη σχηματίζοντας 23 ζευγάρια. Από τα 23 αυτά ζευγάρια χρωμοσωμάτων, τα 22 είναι μορφολογικά ίδια στα αρσενικά και στα θηλυκά άτομα και ονομάζονται αυτοσωμικά. Το 23ο ζευγάρι αποτελεί τα φυλετικά χρωμοσώματα που συμβολίζονται με X και Y. Τα κύτταρα των θηλυκών ατόμων περιέχουν δύο χρωμοσώματα X, ενώ τα κύτταρα των αρσενικών ατόμων ένα X και ένα μικρότερο Y χρωμόσωμα.



Για την επίτευξη μιας επιτυχούς εγκυμοσύνης, απαραίτητη είναι η σύναψη ενός χρωμοσωμικά φυσιολογικού ωαρίου με ένα χρωμοσωμικά φυσιολογικό σπερματοζώαριο που να επιτρέπουν την επιτυχή εμφύτευση του εμβρύου στην μήτρα καθώς και την ανάπτυξή του σε αυτήν.



Το 10%-15% των κυήσεων καταλήγουν σε αποβολές.

**Αυτόματες αποβολές** είναι τυχαίες αποβολές πριν από τη 20<sup>η</sup> ολοκληρωμένη εβδομάδα της κύησης. Η μεγαλύτερη συχνότητα αυτομάτων αποβολών συμβαίνει μεταξύ 8ης και 12ης εβδομάδας ( 1<sup>ο</sup> τρίμηνο).

**Καθ' ἑξίν αποβολές:** τρεις ή και περισσότερες διαδοχικές αποβολές πριν από την 20<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης. Η συχνότητα εμφάνισης είναι 1-3% στον γυναικείο πληθυσμό. Ταξινομούνται σε:

### A) Πρωτοπαθείς

- τρεις ή περισσότερες συνεχόμενες αυτόματες αποβολές, με τον ίδιο σύντροφο και καμία κύηση μετά την 20ή εβδομάδα
- Συχνότητα : 1 στις 150 κυήσεις
- είναι υπεύθυνη για το 6% των εμβρυϊκών απωλειών.

### B) Δευτεροπαθείς

- τουλάχιστον τρεις αυτόματες αποβολές, με τον ίδιο σύντροφο, μετά την γέννηση ενός παιδιού ή μετά από έναν ενδομήτριο θάνατο.
- Συχνότητα : 1 στις 500 κυήσεις
- είναι υπεύθυνη για το 1,5% των εμβρυϊκών απωλειών.

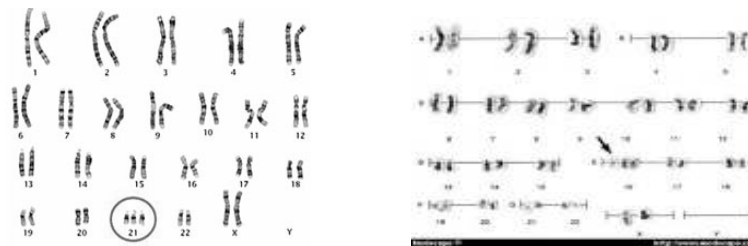
### Αιτίες αποβολών:

- Χρωμοσωμικές ή γονιδιακές ανωμαλίες του εμβρύου (65%-70%)
- Χρωμοσωμικές ανακατατάξεις στους γονείς (3%-6%)
- Ασυμβατότητα των ομάδων αίματος ABO
- Ανωμαλίες της μήτρας και του τραχήλου
- Μολύνσεις του γεννητικού και ουροποιητικού συστήματος
- Ενδοκρινολογικές παθήσεις όπως ο διαβήτης
- Η μεγάλη ηλικία της μητέρας (άνω των 40 ετών)
- Σε ορισμένες περιπτώσεις η αιτιολογία είναι άγνωστη (40%)

### Χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου

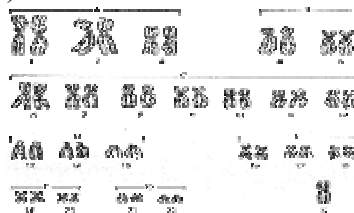
A) Ανωμαλίες με παθολογικό αριθμό χρωματοσωμάτων (ανεupλοειδία):

- αυτοσωμικές τρισωμίες, (τρिसωμίες των χρωμοσωμάτων 13, 16, 18, 21 και 22 (50%))



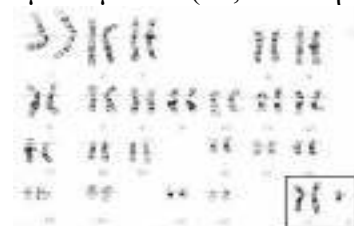
Καρυότυπος ατόμου Τρισωμία 21 – Σύνδρομο Down Καρυότυπος ατόμου με τρισωμία 16

- μονοσωμία X (45, X) (25%)



Καρυότυπος ατόμου με μονοσωμία X

- ανεupλοειδία φυλετικών χρωμοσωμάτων (47, XXX ή 47, XXY)



Καρυότυπος ατόμου με καρυότυπο XXY - σύνδρομο Klinefelter

B) Ανωμαλίες με φυσιολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων (ευπλοειδία) όπως:

- ισορροπημένες μεταθέσεις
- επίδραση πολυγονιδιακών παραγόντων και
- μητρικοί παράγοντες και
- ορισμένοι πατρικοί παράγοντες.

### ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Το σύνολο των εξετάσεων, που γίνονται πριν τη γέννηση, με σκοπό να διαπιστωθούν πιθανές παθολογικές ανωμαλίες στο έμβρυο.

**Σκοπός του προγεννητικού ελέγχου είναι:**

- Ανίχνευση ανωμαλιών απευθείας στο έμβρυο (αφορούν αλλαγές στον αριθμό ή την δομή των χρωμοσωμάτων του εμβρύου)
- Προσδιορισμός της πιθανότητας που έχει το έμβρυο να πάσχει από κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία.
- Η ανίχνευση παθήσεων της μητέρας που μπορεί να επηρεάσουν την υγεία του εμβρύου.

**Κλασικές αιτίες προγεννητικού χρωμοσωμικού ελέγχου είναι:**

- Προχωρημένη ηλικία της μητέρας >35 ετών,
- Αποτέλεσμα υπερηχογραφικού ελέγχου (π.χ αυχενική διαφάνεια, συγγενείς ανωμαλίες)
- ή/ και προγεννητικού βιοχημικού ελέγχου (Papp-A, τριπλό τεστ)
- Η μητέρα ή ο πατέρας είναι γνωστό ότι είναι φορέας κάποιας μορφής χρωμοσωμικής ανωμαλίας,
- προηγούμενο παιδί ή κύηση με χρωμοσωμική ανωμαλία,
- ιστορικό καθ' εξιν αποβολών,
- υπογονιμότητας,
- διάγνωση φύλου (φυλοσύνδετα νοσήματα).

### Εξετάσεις προγεννητικού ελέγχου

#### A) Επεμβατικές:

1) Αμνιοπαρακέντηση (διαδικασία λήψης αμνιακού υγρού)

- Γίνεται στο 2ο τρίμηνο της κύησης, ( 17η - 22η εβδομάδα )
- Η πιθανότητα επιπλοκών είναι <0,5% και η λήψη θεωρείται ασφαλής.
- Μας δείχνει αν το έμβρυο πάσχει από κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία
- Μπορούμε να μετρήσουμε ουσίες που είναι μέσα στο αμνιακό υγρό και βοηθούν να ανιχνεύσουμε κάποια μεταβολικά νοσήματα
- Μπορούμε να απομονώσουμε DNA και να μελετήσουμε κάποιο γονίδιο που μας ενδιαφέρει



## 2) Λήψη χοριονικών λαχνών (μέρος του πλακούντα)

Οι λάχνες έχουν το ίδιο γενετικό υλικό (χρωμοσώματα) με το έμβρυο, για αυτό και εξετάζοντας τη χοριονική λάχνη είναι σαν να εξετάζουμε το ίδιο το έμβρυο.

- Γίνεται στο 1ο τρίμηνο της κύησης ( 11η-13η εβδομάδα)
- Η πιθανότητα επιπλοκών είναι <1% και η λήψη θεωρείται ασφαλής.
- Μας δείχνει αν το έμβρυο πάσχει από κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία
- Μπορούμε να απομονώσουμε DNA από τα κύτταρα και να μελετήσουμε κάποιο γονίδιο που μας ενδιαφέρει.
- Γίνεται με δύο τρόπους : α) Μέσω του κόλπου. β) Μέσω του κοιλιακού τοιχώματος



## 3) Λήψη εμβρυϊκού αίματος

- Γίνεται στο 3ο τρίμηνο της κύησης
  - Λήψη αίματος διαδερμικά από τον ομφάλιο λώρο (καθοδήγηση υπερηχογράφου)
  - Καλλιέργεια κυττάρων (χρωμοσωμική ανάλυση, αιματολογικές εξετάσεις)
- Παρέχει γρήγορα αποτελέσματα σε περίπτωση αποτυχίας αμνιοπαρακέντησης και όταν απαιτούνται βιοχημικές εξετάσεις για κάποια ανωμαλία

## **B) Μη-επεμβατικές, όπως:**

- υπερηχογράφημα,
- μέτρηση βιοχημικών δεικτών στο αίμα της μητέρας
- έλεγχος καρυστύπου ζεύγους (ανάλυση της δομής και του αριθμού των χρωμοσωμάτων των γονέων)

## **Διάγνωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών**

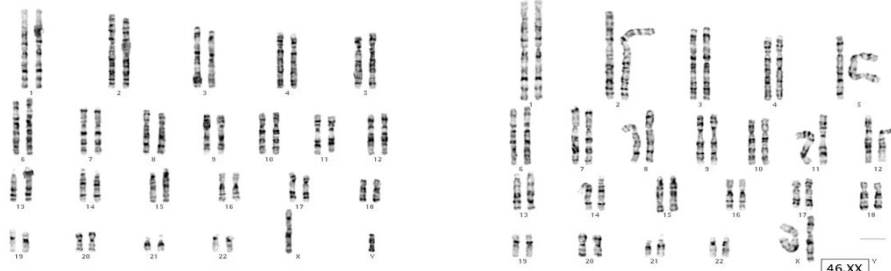
### **A) με μοριακές μεθόδους**

- χρήση μοριακών δεικτών DNA σε συγκεκριμένες περιοχές των χρωμοσωμάτων, που μπορούν να αποκαλύψουν την ύπαρξη αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών (τρισωμίες, μονοσωμίες, ελλείματα, μονογονεϊκή δισωμία)
- Fluorescent in-situ hybridization (FISH), όπου μπορούν να ταυτοποιηθούν πολύπλοκες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις ή μεταθέσεις, με ειδικούς σημασμένους χρωμοσωμικούς δείκτες.
- Συγκριτική Γονιδιακή Υβριδοποίηση (CGH) ,όπου επιτρέπει την ανάλυση ολόκληρης της χρωμοσωμικής σειράς σε ένα μόνο κύτταρο
- Η ποσοτική φθορίζουσα αντίδραση της πολυμεράσης (QF-PCR: quantitative fluorescent polymerase chain reaction)
- Η πολλαπλή ενίσχυση ανιχνευτών εξαρτώμενη από την αντίδραση λιγάσης (MLPA: multiplex ligation-dependent probe amplification), που εφαρμόζεται για τη

διερεύνηση μεγάλου αριθμού νοσημάτων των οποίων η αιτιολόγηση περιλαμβάνει μικροελλείμματα ή/και μικροδιπλασιασμούς.

## **B) με κυτταρογενετικές μεθόδους**

- Ανάλυση καρυότυπου (γονέων – εμβρύου (όπου είναι δυνατόν)). Καρυότυπος είναι η ταξινόμηση των χρωμοσωμάτων ενός ατόμου σύμφωνα με το μέγεθος και το σχήμα.



46, XY - φυσιολογικός καρυότυπος άρρενος

46,XX – φυσιολογικός καρυότυπος θήλεος

**Ο καρυότυπος μπορεί να αποκαλύψει:**

### **A) Μεταθέσεις** γενετικού υλικού ανάμεσα σε χρωμοσώματα:

- «Robertsonian», κατά την οποία έχουμε την κεντρική ένωση και το χάσιμο των κοντών βραχιόνων των χρωμοσωμάτων που συμμετέχουν.

- «αμοιβαίες», κατά τις οποίες γίνονται ανταλλαγές μετά από τη θραύση του γενετικού υλικού μεταξύ των διαφορετικών χρωμοσωμάτων έτσι ώστε το συνολικό ποσό χρωμοσωμάτων να παραμένει αναλλοίωτο.

Οι ισορροπημένες χρωμοσωμικές μεταθέσεις, στις οποίες τα τμήματα των χρωμοσωμάτων αλλάζουν τη θέση τους στο χρωμόσωμα χωρίς οποιαδήποτε απώλεια ή κέρδος γενετικού υλικού, είναι μια σημαντική αιτία των επαναλαμβανόμενων αποβολών επειδή είναι συνηθείς. Ένας στους 500 ανθρώπους φέρνει μια ισορροπημένη χρωμοσωμική μετάθεση.

### **B) Αναστροφές** των γονιδίων μέσα στο ίδιο χρωμόσωμα:

#### 1) «παρακεντρικές»

- συμβαίνει θραύση ενός τμήματος χρωμοσώματος και μετά επανασυνδέεται σε μια διαφορετική περιοχή, με εξαίρεση το κεντρομερίδιο.

- είναι σπάνιες
- δύσκολο να αναγνωριστούν
- αν συμβούν καταλήγουν σε πολύ πρώιμες αποβολές

#### 2) «περικεντρικές»

- συμβαίνουν αναδιοργανώσεις μέσα σε ένα χρωμόσωμα που περιλαμβάνουν το κεντρομερίδιο.

- αποτελούν αιτία των καθ' έξιν αποβολών (0.1%)
- Αναγνωρίζονται εύκολα
- αν γίνει στα χρωμοσώματα της γυναίκας, έχουμε 8% πιθανότητα να γεννηθεί νεογνό με συγγενή ανωμαλία ενώ
- εάν είναι στον άντρα η πιθανότητα είναι 5%.

## **Θεραπεία**

Εάν υπάρχει πρόβλημα στον καρύοτυπο των γονέων, θεραπευτικά δεν έχουμε δυνατότητα παρέμβασης, αλλά, μπορούμε να συμβουλευτούμε το ζευγάρι, ανάλογα με το είδος του προβλήματος. Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD) έχει χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία αυτών των φορέων.

## **Προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (ΠΓΔ)**

Η ΠΓΔ είναι μια κλινική διαγνωστική μέθοδος που επιτρέπει τον έλεγχο των εμβρύων για γενετικές ή χρωμοσωμικές ανωμαλίες πριν την είσοδο τους στην μήτρα και την επίτευξη της εγκυμοσύνης.

- εφαρμόζεται σε γόνιμα ζευγάρια με αυξημένο αναπαραγωγικό κίνδυνο
- σε υπογόνιμα όταν υπάρχει υποψία ανευπλοειδίας
- ελέγχει γενετικές ανωμαλίες, όπως χρωμοσωμικές διαταραχές (με χρήση της τεχνικής φθορίζοντος υβριδισμού (FISH) και γονιδιακές διαταραχές (με χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

## **Στόχος της ΠΓΔ**

- η εμφύτευση μόνο των υγιών εμβρύων και η βελτίωση των αποτελεσμάτων της IVF
- η διάγνωση γενετικών ή χρωμοσωμικών ανωμαλιών που είναι υπεύθυνες για την αποτυχία εμφύτευσης του εμβρύου ή την αποτυχία ολοκλήρωσης της κύησης ή την γέννηση ενός παιδιού με διανοητική ή σωματική ασθένεια

## **Ενδείξεις για PGD**

- Αμφότεροι οι σύζυγοι φέρουν την ίδια αυτοσωμική υπολειπόμενη γενετική διαταραχή
- Το θήλυ άτομο φέρει μια φυλοσύνδετη υπολειπόμενη διαταραχή
- Ο ένας εκ των δύο συζύγων φέρει μία ισοζυγισμένη χρωμοσωμική μετάθεση
- Η μητέρα είναι άνω των 38 ετών
- ζευγάρια που βρίσκονται σε αναπαραγωγικό κίνδυνο και παρουσιάζουν προβλήματα γονιμότητας
- ζευγάρια με απογόνους ή κήσεις εμβρύων με χρωμοσωμική διαταραχή
- ζευγάρια με επαναλαμβανόμενες αποβολές/ διακοπές κύησης λόγω ασθένειας του εμβρύου
- ζευγάρια με ιστορικό πολλαπλών αποτυχιών IVF

## **Η ΠΓΔ μπορεί να εφαρμοστεί σε 3 ομάδες γενετικών νόσων:**

- Μονογονιδιακά νοσήματα,
- Φυλοσύνδετα νοσήματα,
- Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

## **Πλεονεκτήματα ΠΓΔ**

- μειώνεται το ποσοστό των γεννημένων παιδιών με τρισωμίες 13, 18, 21.(0,4%)
- μειώνεται το ποσοστό των αυτόματων αποβολών (από 23% σε 9%)
- αύξηση του ποσοστού εμφύτευσης σε ζευγάρια που πραγματοποιούν εξωσωματική γονιμοποίηση.

## **Περιορισμοί ΠΓΔ**

- περιορισμένος αριθμός χρωμοσωμάτων (έως 10) που μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα με την μέθοδο FISH
- η μέθοδος FISH ανιχνεύει μόλις το 69% των ανωμαλιών που ανιχνεύονται με την τεχνική CGH
- δεν μπορεί να ανιχνεύσει φαινόμενα μωσαϊκισμού
- το κύτταρο που λαμβάνεται μπορεί να μην αντιπροσωπεύει το γενετικό υλικό του εμβρύου
- ΠΓΔ σε 1 κύτταρο: μεγαλύτερη πιθανότητα λάθους
- ΠΓΔ σε 2 κύτταρα: πιο ασφαλής, αλλά ίσως επηρεάζει το έμβρυο και συνεπώς τα ποσοστά εμφύτευσης.



## Ενημερωτικό φυλλάδιο για τις αποβολές (προς ιατρούς γυναικολόγους και ειδικευόμενους)

### Αποβολές

Για την επίτευξη μιας επιτυχούς εγκυμοσύνης, απαραίτητη είναι η σύναψη ενός χρωμοσωμικά φυσιολογικού ωαρίου με ένα χρωμοσωμικά φυσιολογικό σπερματοζώαριο που να επιτρέπουν την επιτυχή εμφύτευση του εμβρύου στην μήτρα καθώς και την ανάπτυξή του σε αυτήν.



Το 10%-15% των κύσεων καταλήγουν σε αποβολές.

**Αυτόματες αποβολές** είναι τυχαίες αποβολές πριν από τη 20<sup>η</sup> ολοκληρωμένη εβδομάδα της κύησης. Η μεγαλύτερη συχνότητα αυτομάτων αποβολών συμβαίνει μεταξύ 8ης και 12ης εβδομάδας ( 1<sup>ο</sup> τρίμηνο).

**Καθ' έξιν αποβολές:** τρεις ή και περισσότερες διαδοχικές αποβολές πριν από την 20<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης. Η συχνότητα εμφάνισης είναι 1-3% στον γυναικείο πληθυσμό. Ταξινομούνται σε:

#### **A) Πρωτοπαθείς**

- τρεις ή περισσότερες συνεχόμενες αυτόματες αποβολές, με τον ίδιο σύντροφο και καμία κύηση μετά την 20<sup>η</sup> εβδομάδα
- Συχνότητα : 1 στις 150 κύσεις
- είναι υπεύθυνη για το 6% των εμβρυϊκών απωλειών.

#### **B) Δευτεροπαθείς**

- τουλάχιστον τρεις αυτόματες αποβολές, με τον ίδιο σύντροφο, μετά την γέννηση ενός παιδιού ή μετά από έναν ενδομήτριο θάνατο.
- Συχνότητα : 1 στις 500 κύσεις
- είναι υπεύθυνη για το 1,5% των εμβρυϊκών απωλειών.

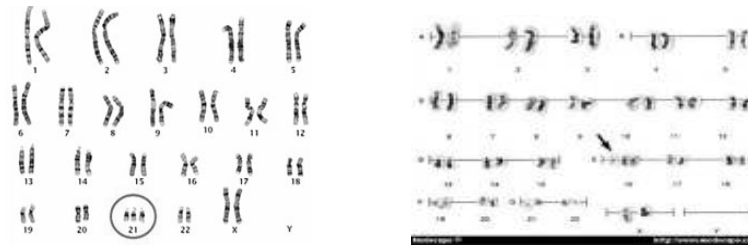
#### **Αιτίες αποβολών:**

- Χρωμοσωμικές ή γονιδιακές ανωμαλίες του εμβρύου (65%-70%)
- Χρωμοσωμικές ανακατατάξεις στους γονείς (3%-6%)
- Ασυμβατότητα των ομάδων αίματος ABO
- Ανωμαλίες της μήτρας και του τραχήλου
- Μολύνσεις του γεννητικού και ουροποιητικού συστήματος
- Ενδοκρινολογικές παθήσεις όπως ο διαβήτης
- Η μεγάλη ηλικία της μητέρας (άνω των 40 ετών)
- Σε ορισμένες περιπτώσεις η αιτιολογία είναι άγνωστη (40%)

### Χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου

A) Ανωμαλίες με παθολογικό αριθμό χρωματοσωμάτων (ανεupλοειδία):

- αυτοσωμικές τρισωμίες, (τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 13, 16, 18, 21 και 22 (50%))



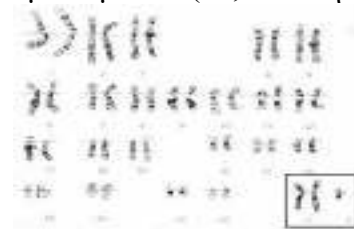
Καρύοτυπος ατόμου Τρισωμία 21 – Σύνδρομο Down Καρύοτυπος ατόμου με τρισωμία 16

- μονοσωμία X (45, X) (25%)



Καρύοτυπος ατόμου με μονοσωμία X

- ανεupλοειδία φυλετικών χρωμοσωμάτων (47, XXX ή 47, XXY)



Καρύοτυπος ατόμου με καρύοτυπο XXY - σύνδρομο Klinefelter

B) Ανωμαλίες με φυσιολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων (ευπλοειδία) όπως:

- ισορροπημένες μεταθέσεις
- επίδραση πολυγονιδιακών παραγόντων και
- μητρικοί παράγοντες και
- ορισμένοι πατρικοί παράγοντες.

### ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Το σύνολο των εξετάσεων, που γίνονται πριν τη γέννηση, με σκοπό να διαπιστωθούν πιθανές παθολογικές ανωμαλίες στο έμβρυο.

**Σκοπός του προγεννητικού έλεγχου είναι:**

- Ανίχνευση ανωμαλιών απευθείας στο έμβρυο (αφορούν αλλαγές στον αριθμό ή την δομή των χρωμοσωμάτων του εμβρύου)
- Προσδιορισμός της πιθανότητας που έχει το έμβρυο να πάσχει από κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία.
- Η ανίχνευση παθήσεων της μητέρας που μπορεί να επηρεάσουν την υγεία του εμβρύου.

**Κλασσικές αιτίες προγεννητικού χρωμοσωμικού ελέγχου είναι:**

- Προχωρημένη ηλικία της μητέρας >35 ετών,

- Αποτέλεσμα υπερηχογραφικού ελέγχου (π.χ αυχενική διαφάνεια, συγγενείς ανωμαλίες)
- ή/ και προγεννητικού βιοχημικού ελέγχου (Papp-A, τριπλό τεστ)
- Η μητέρα ή ο πατέρας είναι γνωστό ότι είναι φορέας κάποιας μορφής χρωμοσωμικής ανωμαλίας,
- προηγούμενο παιδί ή κύηση με χρωμοσωμική ανωμαλία,
- ιστορικό καθ' εξιν αποβολών,
- υπογονιμότητας,
- διάγνωση φύλου (φυλοσύνδετα νοσήματα).

## Εξετάσεις προγεννητικού ελέγχου

### A) Επεμβατικές:

#### 1) Αμνιοπαρακέντηση (διαδικασία λήψης αμνιακού υγρού)

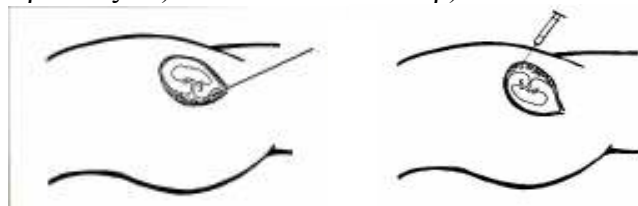
- Γίνεται στο 2ο τρίμηνο της κύησης, ( 17η - 22η εβδομάδα )
- Η πιθανότητα επιπλοκών είναι <0,5% και η λήψη θεωρείται ασφαλής.
- Μας δείχνει αν το έμβρυο πάσχει από κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία
- Μπορούμε να μετρήσουμε ουσίες που είναι μέσα στο αμνιακό υγρό και βοηθούν να ανιχνεύσουμε κάποια μεταβολικά νοσήματα
- Μπορούμε να απομονώσουμε DNA και να μελετήσουμε κάποιο γονίδιο που μας ενδιαφέρει



#### 2) Λήψη χοριονικών λαχνών (μέρος του πλακούντα)

Οι λάχνες έχουν το ίδιο γενετικό υλικό (χρωμοσώματα) με το έμβρυο, για αυτό και εξετάζοντας τη χοριονική λάχνη είναι σαν να εξετάζουμε το ίδιο το έμβρυο.

- Γίνεται στο 1ο τρίμηνο της κύησης ( 11η-13η εβδομάδα)
- Η πιθανότητα επιπλοκών είναι <1% και η λήψη θεωρείται ασφαλής.
- Μας δείχνει αν το έμβρυο πάσχει από κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία
- Μπορούμε να απομονώσουμε DNA από τα κύτταρα και να μελετήσουμε κάποιο γονίδιο που μας ενδιαφέρει.
- Γίνεται με δύο τρόπους : α) Μέσω του κόλπου. β) Μέσω του κοιλιακού τοιχώματος



#### 3) Λήψη εμβρυϊκού αίματος

- Γίνεται στο 3ο τρίμηνο της κύησης
- Λήψη αίματος διαδερμικά από τον ομφάλιο λώρο (καθοδήγηση υπερηχογράφου)

- Καλλιέργεια κυττάρων (χρωμοσωμική ανάλυση, αιματολογικές εξετάσεις)  
Παρέχει γρήγορα αποτελέσματα σε περίπτωση αποτυχίας αμνιοπαρακέντησης και όταν απαιτούνται βιοχημικές εξετάσεις για κάποια ανωμαλία

### **B) Μη-επεμβατικές, όπως:**

- υπερηχογράφημα,
- μέτρηση βιοχημικών δεικτών στο αίμα της μητέρας
- έλεγχος καρυότυπου ζεύγους (ανάλυση της δομής και του αριθμού των χρωμοσωμάτων των γονέων)

### **Διάγνωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών**

#### **A) με μοριακές μεθόδους**

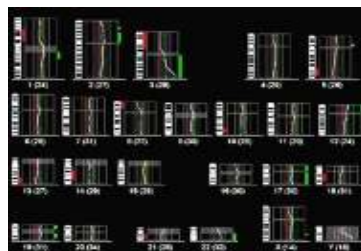
- χρήση μοριακών δεικτών DNA σε συγκεκριμένες περιοχές των χρωμοσωμάτων, που μπορούν να αποκαλύψουν την ύπαρξη αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών (τρισωμίες, μονοσωμίες, ελλείματα, μονογονεϊκή δισωμία)

- Fluorescent in-situ hybridization (FISH), όπου μπορούν να ταυτοποιηθούν πολύπλοκες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις ή μεταθέσεις, με ειδικούς σημασμένους χρωμοσωμικούς δείκτες. Ανιχνεύονται υπομικροσκοπικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες που δε φαίνονται στον καρυότυπο και μπορεί να εφαρμοσθεί σε μη καλλιιεργημένους μεσοφασικούς πυρήνες αμνιακού υγρού όπου επιτρέπει την ταχεία προγεννητική διάγνωση των συχνότερων χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου.



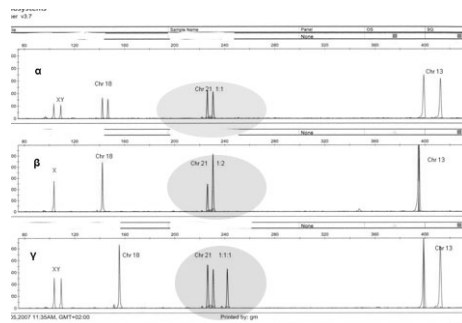
Διάγνωση του μικροελλείματος 22q11 στο σύνδρομο *di George* με FISH

- Συγκριτική Γονιδιακή Υβριδοποίηση (CGH), όπου επιτρέπει την ανάλυση ολόκληρης της χρωμοσωμικής σειράς σε ένα μόνο κύτταρο. Οι ιστοί που είναι κατάλληλοι είναι ο πλακούντας, το χόριο, το άμνιο, το δέρμα ή εσωτερικά όργανα όπως ήπαρ, πνεύμονες, νεφροί ή σπλήνας. Δεν μπορεί να ανιχνεύσει μετατροπές που δεν περιλαμβάνουν προσθήκη ή έλλειψη γενετικού υλικού και το ποσοστό επιτυχίας είναι της τάξης του 85%.



Ιδεόγραμμα των χρωμοσωμάτων σε ανάλυση CGH. Οι πράσινες μπάρες δείχνουν αύξηση του γενετικού υλικού και οι κόκκινες έλλειψη.

- Η ποσοτική φθορίζουσα αντίδραση της πολυμεράσης (QF-PCR: quantitative fluorescent polymerase chain reaction). Βασιζεται στη σχετική ποσοτικοποίηση μικροδορυφορικών αλληλομόρφων για τον καθορισμό επαναλήψεων που ποικίλλουν από άτομο σε άτομο. Επιτρέπει την ταχεία διάγνωση των συχνοτέρων χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου. Πολλαπλασιάζεται το DNA με τη χρήση φθορίζοντων εκκινητών και στη συνέχεια διαχωρίζεται βάση μεγέθους με την εμφάνιση χαρακτηριστικών κορυφών. Σε φυσιολογικούς ετεροζυγώτες η αναλογία φθορισμού των δύο κορυφών που αναλογούν στα προϊόντα της PCR πρέπει να είναι 0,8-1,4 (δισωμικό διαλληλικό). Μικρός αριθμός ομοζυγωτών εμφανίζει μια κορυφή (δισωμικό μονοαλληλικό). Σε ασθενείς με τρισωμία ανιχνεύονται είτε δύο κορυφές με αναλογία 1:2, είτε τρεις κορυφές με αναλογία 1:1:1 (τρिसωμικά τριαλληλικά).



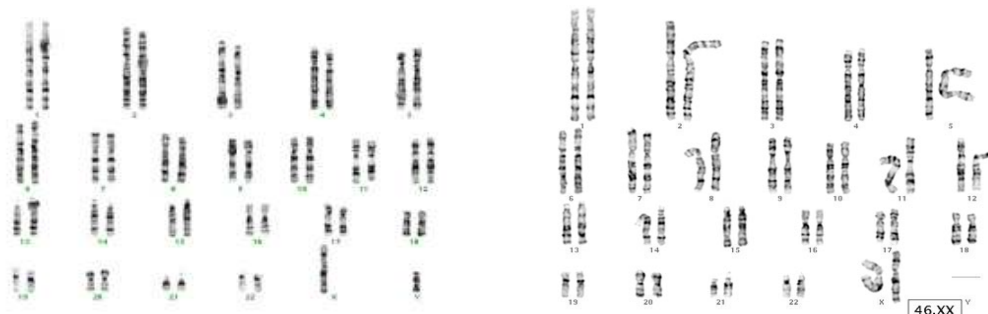
Ηλεκτροφορογραφήματα δειγμάτων αμνιακού υγρού με τη μέθοδο QF-PCR α. δισωμικό άρρεν β. τρισωμικό θήλυ γ. τρισωμικό άρρεν

- Η πολλαπλή ενίσχυση ανιχνευτών εξαρτώμενη από την αντίδραση λιγάσης (MLPA: multiplex ligation-dependent probe amplification), που εφαρμόζεται για τη διερεύνηση μεγάλου αριθμού νοσημάτων των οποίων η αιτιολόγηση περιλαμβάνει μικροελλείμματα ή/και μικροδιπλασιασμούς.

Ο έλεγχος με *MLPA* συνιστάται σε περιπτώσεις που στο έμβρυο παρατηρούνται :1) σοβαρά υπερηχογραφικά ευρήματα, όπως:καρδιακές ανωμαλίες, αυξημένη αυχενική διαφάνεια, υπολειπομένη ανάπτυξη κ.α. ενώ ο καρυότυπος είναι φυσιολογικός και 2) de novo χρωμοσωμικές ανακατατάξεις που δεν ανιχνεύονται στους γονείς

## B) με κυτταρογενετικές μεθόδους

- Ανάλυση καρυότυπου ( γονέων – εμβρύου (όπου είναι δυνατόν).Καρυότυπος είναι η ταξινόμηση των χρωμοσωμάτων ενός ατόμου σύμφωνα με το μέγεθος και το σχήμα.



46, XY - φυσιολογικός καρυότυπος άρρενος

46,XX – φυσιολογικός καρυότυπος θήλεος

## **Ο καρυότυπος μπορεί να αποκαλύψει:**

### **A) Μεταθέσεις γενετικού υλικού ανάμεσα σε χρωμοσώματα:**

- «Robertsonian», κατά την οποία έχουμε την κεντρική ένωση και το χάσιμο των κοντών βραχιόνων των χρωμοσωμάτων που συμμετέχουν.
- «αμοιβαίες», κατά τις οποίες γίνονται ανταλλαγές μετά από τη θραύση του γενετικού υλικού μεταξύ των διαφορετικών χρωμοσωμάτων έτσι ώστε το συνολικό ποσό χρωμοσωμάτων να παραμένει αναλλοίωτο.

Οι ισορροπημένες χρωμοσωμικές μεταθέσεις, στις οποίες τα τμήματα των χρωμοσωμάτων αλλάζουν τη θέση τους στο χρωμόσωμα χωρίς οποιαδήποτε απώλεια ή κέρδος γενετικού υλικού, είναι μια σημαντική αιτία των επαναλαμβανόμενων αποβολών επειδή είναι συνήθεις. Ένας στους 500 ανθρώπους φέρνει μια ισορροπημένη χρωμοσωμική μετάθεση.

### **B) Αναστροφές των γονιδίων μέσα στο ίδιο χρωμόσωμα:**

#### **1) «παρακεντρικές»**

- συμβαίνει θραύση ενός τμήματος χρωμοσώματος και μετά επανασυνδέεται σε μια διαφορετική περιοχή, με εξαίρεση το κεντρομερίδιο.
- είναι σπάνιες
- δύσκολο να αναγνωριστούν
- αν συμβούν καταλήγουν σε πολύ πρώιμες αποβολές

#### **2) «περικεντρικές»**

- συμβαίνουν αναδιοργανώσεις μέσα σε ένα χρωμόσωμα που περιλαμβάνουν το κεντρομερίδιο.
- αποτελούν αιτία των καθ' ἑξίν αποβολών (0.1%)
- Αναγνωρίζονται εύκολα
- αν γίνει στα χρωμοσώματα της γυναίκας, έχουμε 8% πιθανότητα να γεννηθεί νεογνό με συγγενή ανωμαλία ενώ
- εάν είναι στον άντρα η πιθανότητα είναι 5%.

## **Θεραπεία**

Εάν υπάρχει πρόβλημα στον καρυότυπο των γονέων, θεραπευτικά δεν έχουμε δυνατότητα παρέμβασης, αλλά, μπορούμε να συμβουλευτούμε το ζευγάρι, ανάλογα με το είδος του προβλήματος. Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD) έχει χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία αυτών των φορέων.

## **Προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (ΠΓΔ)**

Η ΠΓΔ είναι μια κλινική διαγνωστική μέθοδος που επιτρέπει τον έλεγχο των εμβρύων για γενετικές ή χρωμοσωμικές ανωμαλίες πριν την είσοδο τους στην μήτρα και την επίτευξη της εγκυμοσύνης.

- εφαρμόζεται σε γόνιμα ζευγάρια με αυξημένο αναπαραγωγικό κίνδυνο
- σε υπογόνιμα όταν υπάρχει υποψία ανευπλοειδίας

-ελέγχει γενετικές ανωμαλίες, όπως χρωμοσωμικές διαταραχές (με χρήση της τεχνικής φθορίζοντος υβριδισμού (FISH) και γονιδιακές διαταραχές (με χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

### **Στόχος της ΠΓΔ**

- η εμφύτευση μόνο των υγιών εμβρύων και η βελτίωση των αποτελεσμάτων της IVF  
- η διάγνωση γενετικών ή χρωμοσωμικών ανωμαλιών που είναι υπεύθυνες για την αποτυχία εμφύτευσης του εμβρύου ή την αποτυχία ολοκλήρωσης της κύησης ή την γέννηση ενός παιδιού με διανοητική ή σωματική ασθένεια

### **Ενδείξεις για PGD**

- Αμφότεροι οι σύζυγοι φέρουν την ίδια αυτοσωμική υπολειπόμενη γενετική διαταραχή  
- Το θήλυ άτομο φέρει μια φυλοσύνδετη υπολειπόμενη διαταραχή  
- Ο ένας εκ των δύο συζύγων φέρει μία ισοζυγισμένη χρωμοσωμική μετάθεση  
- Η μητέρα είναι άνω των 38 ετών  
- ζευγάρια που βρίσκονται σε αναπαραγωγικό κίνδυνο και παρουσιάζουν προβλήματα γονιμότητας  
- ζευγάρια με απογόνους ή κύσεις εμβρύων με χρωμοσωμική διαταραχή  
- ζευγάρια με επαναλαμβανόμενες αποβολές/ διακοπές κύησης λόγω ασθένειας του εμβρύου  
- ζευγάρια με ιστορικό πολλαπλών αποτυχιών IVF

### **Η ΠΓΔ μπορεί να εφαρμοστεί σε 3 ομάδες γενετικών νόσων:**

- Μονογονιδιακά νοσήματα,  
- Φυλοσύνδετα νοσήματα,  
- Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

### **Πλεονεκτήματα ΠΓΔ**

- μειώνεται το ποσοστό των γεννημένων παιδιών με τρισωμίες 13, 18, 21.(0,4%)  
- μειώνεται το ποσοστό των αυτόματων αποβολών (από 23% σε 9%)  
- αύξηση του ποσοστού εμφύτευσης σε ζευγάρια που πραγματοποιούν εξωσωματική γονιμοποίηση.

### **Περιορισμοί ΠΓΔ**

- περιορισμένος αριθμός χρωμοσωμάτων (έως 10) που μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα με την μέθοδο FISH  
- η μέθοδος FISH ανιχνεύει μόλις το 69% των ανωμαλιών που ανιχνεύονται με την τεχνική CGH  
-δεν μπορεί να ανιχνεύσει φαινόμενα μωσαϊκισμού  
- το κύτταρο που λαμβάνεται μπορεί να μην αντιπροσωπεύει το γενετικό υλικό του εμβρύου  
- ΠΓΔ σε 1 κύτταρο: μεγαλύτερη πιθανότητα λάθους  
- ΠΓΔ σε 2 κύτταρα: πιο ασφαλής, αλλά ίσως επηρεάζει το έμβρυο και συνεπώς τα ποσοστά εμφύτευσης.