



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ. ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ

ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ DAZL ΣΕ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΤΑ
ΑΠΟ CVS**

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΣΠ. ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

Ειδικευόμενος Ιατρός Μαιευτικής & Γυναικολογίας

Επιβλέπων: Στεφανίδης Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας

ΑΘΗΝΑ

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2016

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
Αναπαραγωγική-Αναγεννητική Ιατρική

Διπλωματική Εργασία
*«Έκφραση του γονιδίου DAZL σε τροφοβλαστικά κύτταρα μετά από
CVS»*

Γεώργιος Σπ. Ασημακόπουλος
Ειδικευόμενος Ιατρός Μαιευτικής & Γυναικολογίας

Επιβλέπων Καθηγητής

- **Στεφανίδης Κωνσταντίνος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Α΄ Μαιευτική & Γυναικολογική Κλινική Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Λουτράδης Δημήτριος**, Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθυντής της Α΄ Μαιευτικής & Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
- **Στεφανίδης Κωνσταντίνος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Α΄ Μαιευτική & Γυναικολογική Κλινική Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
- **Δρακάκης Πέτρος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Α΄ Μαιευτική & Γυναικολογική Κλινική Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

Αθήνα, Νοέμβριος 2016

Στους γονείς μου, Σπύρο και Βασιλική.

Στον αδερφό μου, Κώστα.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών “Αναπαραγωγική - Αναγεννητική Ιατρική” της Ιατρικής Σχολής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το πειραματικό μέρος διενεργήθηκε στο εργαστήριο Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α. “Αλεξάνδρα”, ενώ η λήψη των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Προγεννητικού Ελέγχου της ίδιας Κλινικής.

Η παρούσα προσπάθεια διεκπεραιώθηκε με τη βοήθεια και την καθοδήγηση από εξαιρετικούς επιστήμονες της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α. “Αλεξάνδρα”, οι οποίοι ήταν συνεχώς διαθέσιμοι καθόλη τη διαδικασία εκπόνησής της.

Θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθυντή της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ, κύριο Δημήτριο Λουτράδη, που μου προσέφερε τη δυνατότητα να συμμετάσχω στο συγκεκριμένο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών. Η συμμετοχή μου στο συγκεκριμένο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα ήταν μια πρωτόγνωρη εμπειρία που, πέρα από τις ανεκτίμητες γνώσεις που μου προσέφερε, συνέβαλε σημαντικά στην αλλαγή του τρόπου σκέψης μου πάνω στην έρευνα και την επιστήμη της Αναπαραγωγικής και Αναγεννητικής Ιατρικής.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Αναπληρωτή Καθηγητή της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κύριο Κωνσταντίνο Στεφανίδη για την επίβλεψη της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η συνεχής επιστημονική καθοδήγηση και η διαρκής ουσιαστική υποστήριξη που μου προσέφερε, συνέβαλαν καθοριστικά σε όλες τις φάσεις εκπόνησης της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Αναπληρωτές Καθηγητές της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κύριο Κωνσταντίνο Καλλιανίδη και κύριο Πέτρο Δρακάκη, οι οποίοι, πέρα από την επιστημονική γνώση που μας προσέφεραν απλόχερα, συνέβαλαν στην άριστη διεξαγωγή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών. Επιπλέον, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές που συμμετείχαν στο διδακτικό μέρος του συγκεκριμένου Προγράμματος Σπουδών για τα επιστημονικά εφόδια που μας παρείχαν.

Ευχαριστώ θερμά την Δρ. Δέσποινα Μαυρογιάννη, Μοριακή Βιολόγο του εργαστηρίου Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, της Α΄ Μαιευτικής & Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ, για την αμέριστη βοήθεια, επιστημονική γνώση και υποστήριξη που προσέφερε, με τη συνεχή παρουσία της στο χώρο του εργαστηρίου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το επιστημονικό προσωπικό του Τμήματος Προγεννητικού Ελέγχου της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κύριο Γεώργιο Δασκαλάκη, τον Διευθυντή ΕΣΥ κύριο Σύνδο Μιχαήλ, την Λέκτορα κυρία Μαριάννα Θεοδωρά και τον Πανεπιστημιακό Υπότροφο κύριο Πάνο Αντσακλή, για την ουσιαστική και καθοριστική βοήθειά τους στη συλλογή των απαραίτητων για την εργασία δειγμάτων και τις γνώσεις που μου προσέφεραν πάνω στο συγκεκριμένο μέρος της εργασίας.

Αδιαμφισβήτητα οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια και βιολόγο Τζέσικα Πάττα για την καθοριστική συμβολή της στην πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους της εργασίας και τη συνεχή συμπαράσταση και καθοδήγηση κατά τη συγγραφή της.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω όλο το εργαστηριακό και μαιευτικό προσωπικό της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής και του Τμήματος Προγεννητικού Ελέγχου του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα για την ουσιαστική βοήθεια που προσέφεραν στη συλλογή των δειγμάτων και την πειραματική διαδικασία της εργασίας.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω και τη Γραμματέα του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών, κυρία Μυρτιά Μποχρίνη, η οποία ήταν συνεχώς διαθέσιμη να εξυπηρετήσει για οποιοδήποτε ζήτημα προέκυπτε, συμβάλλοντας έτσι στην άρτια διαξαγωγή του Προγράμματος Σπουδών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γονίδιο DAZL αποτελεί δείκτη των γεννητικών κυττάρων και εκφράζεται σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. Τα τελευταία χρόνια, η επιστημονική κοινότητα αναζητά τη σημασία της έκφρασής του σε διάφορους εμβρυϊκούς και εξωεμβρυϊκούς ιστούς. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου DAZL και ειδικότερα η εύρεση έκφρασης ή όχι σε τροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα. Τα κύτταρα αυτά ελήφθησαν με βιοψία χοριακών λαχνών, στα πλαίσια του προγεννητικού ελέγχου στο τέλος του 1^{ου} τριμήνου της κύησης. Η έκφραση του γονιδίου DAZL στα τροφοβλαστικά κύτταρα μελετήθηκε με την τεχνική Real – Time PCR και διαπιστώθηκε ελάχιστη θετική έκφραση, διαφορετική του μηδενός, η οποία δε μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα. Η σύγκριση με τα αποτελέσματα άλλων αντίστοιχων μελετών έδειξε συμφωνία των αποτελεσμάτων. Συνεπώς, η εύρεση έκφρασης του γονιδίου DAZL στα τροφοβλαστικά κύτταρα φαίνεται να σχετίζεται με τη δυνητική ικανότητα διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών σε γεννητικά κύτταρα κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες, ανοίγωντας έτσι νέα μονοπάτια στους τομείς της έρευνας και της αναγεννητικής ιατρικής.

ABSTRACT

The DAZL gene is a germ cell marker and it is expressed in embryonic stem cells. In recent years, the scientific community is looking for the importance of its expression in various embryonic and extra-embryonic tissues. The purpose of this study was to search the expression of DAZL gene and, in particular, the finding of gene expression or not in trophoblastic cells of the placenta. These cells were obtained by chorionic villus sampling (CVS), in the context of prenatal diagnostic testing at the end of the first trimester of pregnancy. The DAZL gene expression in trophoblastic cells was measured with the Real - Time PCR technique and demonstrated minimal gene expression, different from zero, which cannot be considered negligible. The comparison with other relevant studies revealed agreement of the results. Therefore, the finding of DAZL gene expression in trophoblastic cells seems to be related to the potential capacity of these cells to differentiate into germ cells under appropriate conditions, opening new paths in the fields of research and regenerative medicine.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο : ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1 ΠΛΑΚΟΥΝΤΟΠΟΙΗΣΗ	13
1.1.1 Ανάπτυξη του πλακούντα	13
1.1.1.A Σχηματισμός των λαχνών	15
1.1.1.B Μητρογενής μοίρα του πλακούντα	15
1.1.1.Γ Ο ώριμος πλακούντας	16
1.1.1.Δ Χοριακές λάχνες	18
1.1.1.E Ταξινόμηση των χοριακών λαχνών	20
1.1.1.ΣΤ Στρώμα λαχνών	21
1.1.1.Z Μεσολάχνιος χώρος	22
1.1.2 Πλακουντιακή κυκλοφορία	22
1.1.3 Λειτουργίες του πλακούντα	23
1.2 ΓΑΜΕΤΟΓΕΝΕΣΗ	24
1.2.1 Σπερματογένεση	26
1.2.2 Ωογένεση	27
1.3 ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	29
1.3.1 Ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων	30
1.3.2 Εξέλιξη βλαστικών κυττάρων – Κατηγορίες	31
1.3.2.A Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα	34
1.3.2.B Ενήλικα βλαστικά κύτταρα	36
1.3.2.Γ Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα	38

1.4 ΠΛΑΚΟΥΝΤΑΣ ΚΑΙ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	39
1.4.1 Πλακουντιακά μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα	40
1.4.2 Εμβρυϊκού τύπου βλαστικά κύτταρα	41
1.4.3 Βλαστικά κύτταρα-Πλακούντας πρώτου τριμήνου της κύησης	42
1.5 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ DAZ	46
1.5.1 Έκφραση των γονιδίων της οικογένειας DAZ	49
1.5.2 Έκφραση του γονιδίου DAZL	52
1.5.3 DAZL και σπερματογένεση	53
1.5.4 DAZL και ωογένεση	54
1.5.5 DAZL και καρκίνος	56
1.6 ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	56
1.6.1 Μέθοδοι επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου	59
1.6.1.A Βιοψία χοριακών λαχνών (CVS)	59
1.6.1.B Αμνιοπαρακέντηση	61
1.6.1.Γ Λήψη εμβρυϊκού αίματος (Ομφαλιδοπαρακέντηση)	63

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	64
----------------------------	----

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	66
2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	67

2.2 ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	68
2.3 ΕΞΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ RNA	69
2.3.1 Αντιδραστήρια – Εξοπλισμός	69
2.3.2 Διαδικασία – Πρωτόκολλο	70
2.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (cDNA)	72
2.4.1 Αντιδραστήρια – Εξοπλισμός	74
2.4.2 Διαδικασία – Πρωτόκολλο	75
2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	77
2.5.1 Στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)	80
2.5.2 Ποιοτική – Ποσοτική PCR	82
2.5.3 Μέθοδοι Ποσοτικής Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (qPCR)	82
2.6 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ (Real-Time PCR ή Real-Time qPCR)	83
2.6.1 Τεχνικές ανίχνευσης φθορισμού στην RT – PCR	83
2.6.1.A Ανίχνευση μέσω ανεξάρτητων-μη ειδικών αλληλουχιών (Sequence-Independent Detection Assay)	84
2.6.1.B Ανίχνευση μέσω ειδικών αλληλουχιών-ανιχνευτών (Sequence-Specific Probe Binding Assay)	85

2.6.2 Επεξεργασία εκπεμπόμενης ποσότητας φθορισμού	88
---	-----------

2.6.3 Ποσοτικοποίηση μέσω της τεχνικής Real-Time PCR	89
---	-----------

2.6.3.A Απόλυτος Ποσοτικός Προσδιορισμός (Absolute Quantification)	90
--	----

2.6.3.B Σχετικός Ποσοτικός Προσδιορισμός (Relative Quantification)	90
--	----

2.6.4 Διαδικασία – Πρωτόκολλο	90
--	-----------

2.6.4.A Αντιδραστήρια – Εξοπλισμός	90
--	----

2.6.4.B Πρωτόκολλο	92
--------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	95
--	-----------

3.1 G6PD	95
-----------------------	-----------

3.2 Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ DAZL ΣΕ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ CVS	96
--	-----------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : ΣΥΖΗΤΗΣΗ	100
--	------------

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	105
-------------------------	------------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	106
--	------------

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο - ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΠΛΑΚΟΥΝΤΟΠΟΙΗΣΗ

Το έμβρυο, κατά τη διάρκεια της σύντομης ενδομήτριας παραμονής του, εξαρτάται από τον πλακούντα. Η ιδιαίτερη ανατομική σχέση του πλακούντα με το έμβρυο και τη μητέρα επιτρέπει στο όργανο αυτό να αναλαμβάνει λειτουργίες ζωτικές για το έμβρυο, υποκαθιστώντας έτσι την ανώριμη λειτουργία των εμβρυϊκών οργάνων. Επομένως, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ο πλακούντας εμπλέκεται στις ακόλουθες λειτουργίες :

- 1) Ανταλλαγή αερίων (όπως οι πνεύμονες)
- 2) Ισοζύγιο ύδατος και ηλεκτρολυτών, απέκκριση, ρύθμιση του pH (όπως οι νεφροί)
- 3) Καταβολισμός, απορρόφηση (όπως το έντερο)
- 4) Μεταβολισμός ουσιών (όπως το ήπαρ)
- 5) Συνθετική και εκκριτική δραστηριότητα ορμονικής φύσεως (όπως οι ενδοκρινείς αδένες)
- 6) Εξωμυελική αιμοποίηση κατά τις πρώτες 12 εβδομάδες (όπως ο μυελός των οστών)
- 7) Θερμορρύθμιση (όπως το δέρμα) και
- 8) Ανοσολογικές ιδιότητες (όπως το ανοσοποιητικό σύστημα)

1.1.1 Ανάπτυξη του πλακούντα

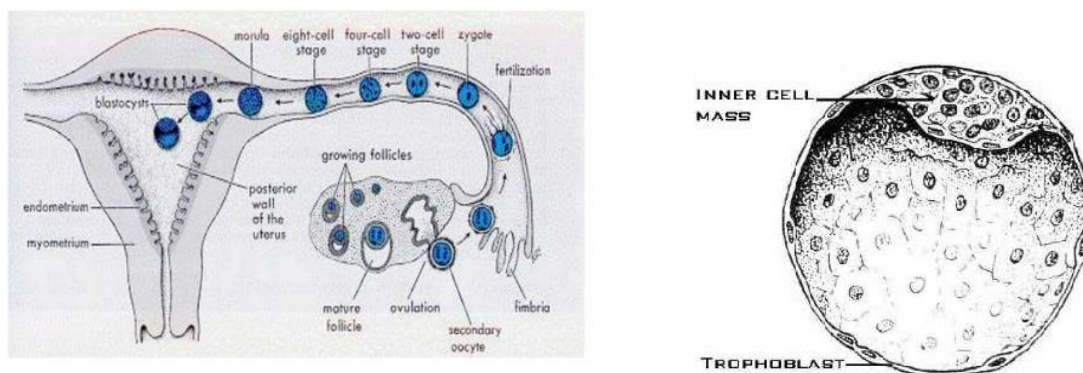
Η ανάπτυξη του πλακούντα είναι τόσο περίπλοκη όσο και η ανάπτυξη του εμβρύου και ξεκινάει μετά την εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο [1].

Η συνένωση του ωαρίου με το σπερματοζωάριο στη λήκυθο του ωαγωγού οδηγεί στη δημιουργία του ζygωτού. Κατά τη μεταφορά του γονιμοποιημένου ωαρίου προς τη μητρική κοιλότητα και μέσα από μια σειρά κυτταρικών διαιρέσεων, ο ζygώτης μετατρέπεται διαδοχικά σε έμβρυο 2-4 κυττάρων, 6-8 κυττάρων και 12-16 κυττάρων (μορίδιο). Στο στάδιο του μοριδίου, το έμβρυο εισέρχεται στην ενδομητρική κοιλότητα. Η ενδοσαλπγγική μεταφορά διαρκεί περίπου 3-4 ημέρες (Εικόνα 1.1.α).

Στη συνέχεια, το έμβρυο αναπτύσσεται στο στάδιο της βλαστοκύστης καθώς αιωρείται ελεύθερα στην ενδομητρική κοιλότητα 90-150 ώρες μετά τη σύλληψη. Η βλαστοκύστη είναι το στάδιο κατά το οποίο θα γίνει η εμφύτευση του εμβρύου στη μήτρα. Επομένως, η

εμφύτευση αρχίζει 2-3 ημέρες μετά την είσοδο του μοριδίου στην ενδομητρική κοιλότητα, δηλαδή 6-7 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση.

Η βλαστοκύστη έχει διάμετρο 0,1 – 0,2 mm και εμφυτεύεται στο ενδομήτριο, το οποίο έχει μετατραπεί ιστολογικά στο φθαρτό. Η βλαστοκύστη αποτελείται από δύο ομάδες κυττάρων, που συνιστούν την έσω κυτταρική μάζα ή εμβρυοβλάστη και την έξω κυτταρική μάζα ή τροφοβλάστη (Εικόνα 1.1.β). Από την έσω κυτταρική μάζα θα προκύψει το έμβρυο και από την έξω κυτταρική μάζα θα προκύψουν εξωεμβρυϊκές δομές (πλακούντας, εμβρυϊκές μεμβράνες). Η τροφοβλάστη συνιστά την εξωτερική επένδυση της βλαστοκύστης, ενώ η εμβρυοβλάστη εμφανίζεται ως μια ομάδα κυττάρων στον ένα πόλο της (εμβρυϊκός πόλος). Ο προσανατολισμός της βλαστοκύστης είναι τέτοιος ώστε ο εμβρυϊκός πόλος να είναι ο πρώτος που έρχεται σε επαφή με το ενδομήτριο.



Εικόνα 1.1. α) Γονιμοποίηση και διαίρεση του ζυγώτη κατά τη πορεία του προς την ενδομητρική κοιλότητα (ΑΡ).
β) Βλαστοκύστη – Έσω κυτταρική μάζα και τροφοβλάστη (ΔΕ).

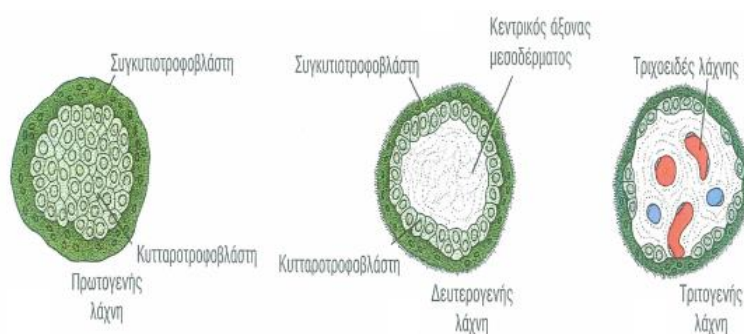
Την 8^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, η βλαστοκύστη έχει εμφυτευθεί μερικώς στο ενδομήτριο και η τροφοβλάστη έχει διαφοροποιηθεί σε δύο στιβάδες στην περιοχή άνωθεν της εμβρυοβλάστης. Οι στιβάδες αυτές είναι η κυτταροτροφοβλάστη και η συγκυτιοτροφοβλάστη. Η κυτταροτροφοβλάστη συνιστά μια στιβάδα κυττάρων με στρογγυλούς πυρήνες και σαφή κυτταροπλασματικά όρια και χαρακτηρίζεται από μιτωτική δραστηριότητα. Η συγκυτιοτροφοβλάστη συνιστά μια ενιαία κυτταρική στιβάδα με μικρούς πυκνοχρωματικούς πυρήνες και άφθονο, πολλές φορές κενοτοπιώδες κυτταροπλάσμα. Η συγκυτιοτροφοβλάστη δε διακρίνεται σε κύτταρα, αλλά συνιστά ένα συγκύτιο με μικρολαχνώδη παρυφή χωρίς μεσοκυττάρια διαστήματα και χωρίς μιτωτική δραστηριότητα. Η στιβάδα αυτή αποτελεί την τελική μορφή διαφοροποίησης της τροφοβλάστης, έχοντας την ευθύνη της μεταφοράς ουσιών και παραγωγής ορμονών.

Η συγκυτιοτροφοβλάστη εξαπλώνεται σταδιακά και τελικά περιβάλλει ολόκληρη τη βλαστοκύστη κατά τη 12^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση. Η βλαστοκύστη διεισδύει εξ' ολοκλήρου στο στρώμα της συμπαγούς μοίρας του ενδομητρικού βλεννογόνου. Το υπερκείμενο επιθηλιακό έλλειμμα καλύπτεται από αιματοπήγματα. Αντίστοιχα προς τον πόλο της εμφύτευσης, η συγκυτιοτροφοβλάστη εμφανίζει αυξημένο πάχος και θα

αποτελέσει τον πλακούντα, σε αντίθεση με το απέναντι τμήμα της συγκυτιοτροφοβλάστης που θα υποστραφεί σε λείο χόριο [2].

1.1.1.A Σχηματισμός των λαχνών

Την 8^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, η συγκυτιοτροφοβλάστη χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση μικρών κυστιδίων που συρρέουν μεταξύ τους και σχηματίζουν αύλακες, δημιουργώντας τους πρωτογενείς μεσολάχνιους χώρους. Αίμα, προερχόμενο από τα διαβρωθέντα από τα τροφοβλαστικά κύτταρα άκρα των μητρικών φλεβών, ρέει εντός των αυλάκων. Οι αιματολίμνες της συγκυτιοτροφοβλάστης διευρύνονται και αφορίζουν τμήματα τροφοβλάστης, τις πρωτογενείς λάχνες, στις οποίες η κυτταροτροφοβλάστη εντοπίζεται κεντρικά και περιβάλλεται από συγκυτιοτροφοβλάστη. Από τη 15^η ημέρα με τη διαφοροποίηση των βλαστικών δερμάτων, οι πρωτογενείς λάχνες αποκτούν μεσεγγυματικό στοιχείο που πρόέρχεται από το μεσόδερμα. Το διάμεσο συνδετικό υπόστρωμα των δευτερογενών λαχνών θα δώσει γένεση σε αγγεία και οι δευτερογενείς λάχνες θα διαφοροποιηθούν σε τριτογενείς ή οριστικές λάχνες, οι οποίες τελικά είναι αυτές που θα συνδεθούν με την εμβρυϊκή κυκλοφορία. Τα πρώτα εμβρυϊκά τριχοειδή κάνουν την εμφάνισή τους περί τη 18^η με 20^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση [2] (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2. Ταξινόμηση των λαχνών σε πρωτογενείς, δευτερογενείς και τριτογενείς.

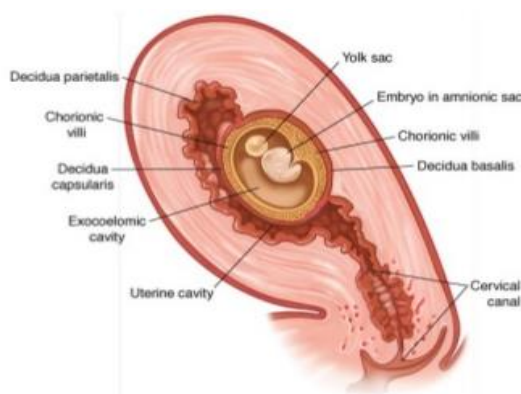
1.1.1.B Μητρογενής μοίρα του πλακούντα

Το επιπολής τμήμα του ενδομητρικού βλεννογόνου μετατρέπεται σε φθαρτό μετά την εμφύτευση. Ανάλογα με τη θέση του φθαρτού σε σχέση με το σημείο εμφύτευσης του εμβρύου, ο φθαρτός διακρίνεται στο βασικό φθαρτό, στο θυλακοειδή φθαρτό και στο γνήσιο φθαρτό (Εικόνα 1.3).

Ο βασικός φθαρτός εντοπίζεται στη θέση της εμφύτευσης και παρεμβάλλεται ανάμεσα στο κύημα και το υποκείμενο μυομήτριο. Η μικροσκοπική του εικόνα χαρακτηρίζεται από μεγάλα φθαρτοειδή κύτταρα πλούσια σε γλυκογόνο και λιπίδια και υπολείμματα ενδομήτριων αδένων.

Ο θυλακοειδής φθαρτός εντοπίζεται μεταξύ της επιφάνειας του εμβρυϊκού σάκου και της μητρικής κοιλότητας.

Ο γνήσιος φθαρτός είναι εκείνος που καλύπτει την υπόλοιπη μητρική κοιλότητα.



Εικόνα 1.3. Διάκριση του φθαρτού στο βασικό φθαρτό (decidua basalis), στο θυλακοειδή φθαρτό (decidua capsularis) και στο γνήσιο φθαρτό (decidua parietalis).

Κατά τον 4^ο μήνα της κύησης, ο θυλακοειδής φθαρτός επικάθεται στο γνήσιο φθαρτό και η ενδομητρική κοιλότητα εξαλείφεται λόγω του αυξανόμενου μεγέθους του εμβρύου. Οι λάχνες του θυλακοειδούς φθαρτού συμπιέζονται και υφίστανται εκφύλιση, οδηγώντας στη δημιουργία του λείου χορίου, σε αντίθεση με τις λάχνες του βασικού φθαρτού, οι οποίες υφίστανται πολλαπλασιασμό και υπερπλασία και χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση διακλαδώσεων, οδηγώντας στη δημιουργία του λαχνωτού χορίου που συνιστά την εμβρυϊκή μοίρα του πλακούντα [2].

1.1.1.Γ Ο ώριμος πλακούντας

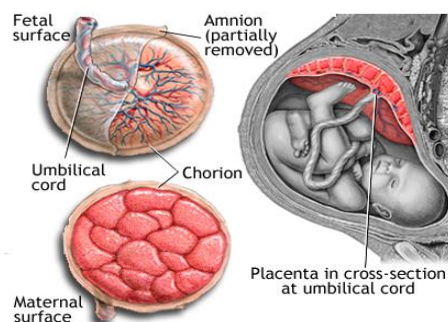
Κατά τη διάρκεια της κύησης, το μέγεθος και το βάρος του πλακούντα παρουσιάζει αύξηση, η οποία επιτυγχάνεται μέσω του αυξανόμενου μεγέθους των στελεχιαίων λαχνών και του αριθμού των τελικών λαχνών. Ο ώριμος πλακούντας εμφανίζει δισκοειδές σχήμα, με μέση διάμετρο περί τα 185 mm (150-200mm) και μέσο βάρος περί τα 500 gr (200-800gr). Το κεντρικό τμήμα του ώριμου πλακούντα έχει πάχος περί τα 2,3 cm, με σταδιακή μείωση προς τη περιφέρεια μέχρι τη μετάπτωση στο χοριακό πέταλο. Η επιφάνεια του πλακούντα

αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της μήτρας και καλύπτει το 25-30% αυτής. Το βάρος του πλακούντα σε σχέση με το βάρος του εμβρύου εμφανίζει μια αναλογία 1 / 6,3 – 7,9.

Η μακροσκοπική σύσταση του ώριμου πλακούντα είναι μαλακή, σπογγώδης και εύθρυπτη. Ο πλακούντας έχει δύο επιφάνειες, τη μητρική και την εμβρυϊκή (Εικόνα 1.4).

Η μητρική επιφάνεια είναι αυτή που βρίσκεται σε επαφή με το φθαρτό. Η επιφάνεια αυτή περιλαμβάνει τη συγκυτιακή πλευρά κάθε χοριακής λάχνης, που καλύπτεται από τη λειτουργική ή συμπαγή στιβάδα του βασικού φθαρτού και συνιστά τη βάση των μεσολάχνιων χώρων. Η μητρική επιφάνεια έχει λοβωτή όψη και βαθυερυθρά χροιά. Φέρει 12 – 15 πολυγωνικές, υπόκυρτες περιοχές που χωρίζονται με αύλακες και ονομάζονται κοτυληδόνες. Η κοτυληδόνα αποτελεί τη λειτουργική μονάδα και περιέχει τον αριθμό των λαχνών που διαβρέχονται από μια σπειροειδή αρτηρία. Η μητρική επιφάνεια του πλακούντα καλύπτεται από το βασικό πέταλο, το οποίο χαρακτηρίζεται από υφή φθαρτού [2].

Η εμβρυϊκή επιφάνεια του πλακούντα εντοπίζεται στην πλευρά της αμνιακής κοιλότητας και καλύπτεται από το άμνιο. Χαρακτηρίζεται από λεία και στιλπνή όψη και έχει λευκωπή χροιά. Κάτω από το άμνιο διακρίνονται τα ομφαλικά αγγεία με ακτινωτή διάταξη και σύγκλιση προς τον ομφάλιο λώρο.



Εικόνα 1.4. Μητρική και εμβρυϊκή επιφάνεια του πλακούντα

Ο πλακούντας διαμορφώνεται από το βασικό και το χοριακό πέταλο, μεταξύ των οποίων ανευρίσκονται οι χοριακές λάχνες με τις διακλαδώσεις τους και ο μεσολάχνιος χώρος (Εικόνα 1.5.α, Εικόνα 1.5.β).

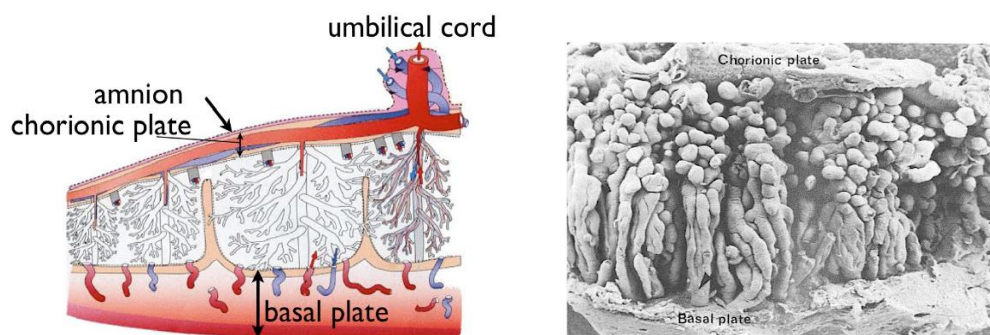
Με κατεύθυνση από την εμβρυϊκή επιφάνεια, το βασικό πέταλο αποτελείται από [3] :

- A) Το συγκύτιο, που καθορίζει το εξωτερικό τοίχωμα του μεσολάχνιου χώρου
- B) Τη μεμβράνη του Roh
- Γ) Υπολείμματα τροφοβλαστικού ιστού
- Δ) Τη μεμβράνη του Nitabuch και
- Ε) Το φθαρτό

Η μεμβράνη του Nitabuch δημιουργείται στα σημεία επαφής εμβρυϊκών και μητρικών στοιχείων από την εναπόθεση ινιδοειδούς. Στη θέση αυτή λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός του πλακούντα κατά τη φάση του τοκετού.

Από το βασικό πέταλο του πλακούντα εξορμούνται τα πλακουντιακά διαφράγματα. Κατά το δεύτερο μισό της κύησης, το βασικό πέταλο παρουσιάζει λέπτυνση και σταδιακά αυξανόμενη εναπόθεση ινικής.

Το χοριακό πέταλο του πλακούντα αποτελείται από συνδετικό ιστό και περικλείει τα ομφαλικά αγγεία, τα οποία προέρχονται από τον ομφάλιο λώρο και εισχωρούν στις λάχνες. Η εμβρυϊκή πλευρά του χοριακού πετάλου καλύπτεται από το άμνιο, ενώ η μητρική πλευρά καλύπτεται από μια λεπτή στιβάδα τροφοβλαστικών κυττάρων και το εσωτερικό συγκυτιακό τοίχωμα του μεσολάχνιου χώρου [3].



Εικόνα 1.5. α) Βασικό και χοριακό πέταλο του πλακούντα. β) Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

1.1.1.Δ Χοριακές λάχνες

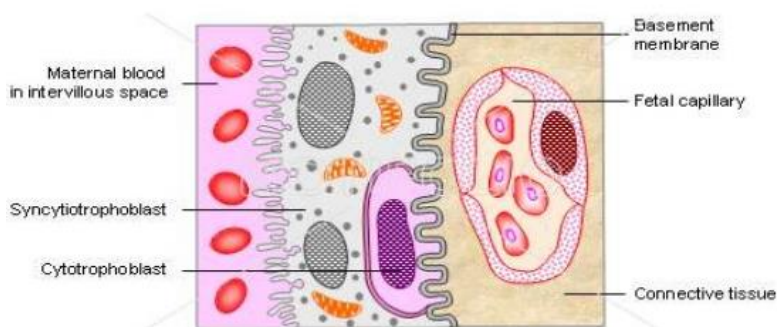
Οι χοριακές λάχνες αναδύονται από το χοριακό πέταλο ως στελεχιαίες λάχνες (Εικόνα 1.6), οι οποίες διακλαδίζονται σε μικρότερους κλάδους μέσα στη αιματολίμνη του πλακούντα. Οι διακλαδώσεις αυτές των στελεχιαίων λαχνών παρουσιάζουν πολλαπλές αναστομώσεις. Συνιστούν το μεγαλύτερο μέρος του πάχους του πλακούντα και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της ανταλλαγής αερίων και ουσιών μεταξύ της μητέρας και του εμβρύου.

Η δομή των λαχνών χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός πυρήνα συνδετικού ιστού που φέρει εμβρυϊκά τριχοειδή. Η επιφάνεια των ώριμων λαχνών καλύπτεται από ένα λεπτό στρώμα συγκυτιακών κυττάρων, τα οποία συρρέουν κατά τόπους, σχηματίζοντας συγκυτιακούς κόμβους, ενώ παραμένουν μεμονωμένα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα.



Εικόνα 1.6. Εικόνα λάχνης με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Ο διαχωρισμός μεταξύ της εμβρυϊκής και της μητρικής κυκλοφορίας στηρίζεται στον πλακούντιο φραγμό (placental barrier), που αποτελείται από : 1) τη στιβάδα της συγκυτιοτροφοβλάστης, που καλύπτει τις λάχνες και βρίσκεται σε άμεση επαφή με το μεσολάχινο χώρο και τη μητρική κυκλοφορία, 2) την αμέσως υποκείμενη στιβάδα των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων (η στιβάδα αυτή χαρακτηρίζεται από συνέχεια κατά το πρώτο τρίμηνο, ενώ καθίσταται ασυνεχής και δυσδιάκριτη κατά το δεύτερο και τρίτο τρίμηνο της κύησης), 3) τη βασική μεμβράνη της τροφοβλάστης, 4) το συνδετικό ιστό του λαχνικού στρώματος, 5) το ενδοθήλιο των εμβρυϊκών τριχοειδών, το οποίο, κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης, αποτελείται μόνο από τη βασική μεμβράνη (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7. Πλακούντιος φραγμός

Το συνολικό πάχος της διαχωριστικής στιβάδας παρουσιάζει μείωση κατά την εξέλιξη της κύησης, καθιστώντας ευκολότερη την εμβρυομητρική επικοινωνία, δεδομένων των αυξανόμενων διατροφικών αναγκών του εμβρύου. Η ελάττωση του πάχους του πλακούντιου φραγμού επιτυγχάνεται με τη σταδιακή ωρίμανση των λαχνών, κατά την οποία μειώνεται το πάχος της συγκυτιοτροφοβλάστης, ο αριθμός και η συνέχεια της στιβάδας των κυττάρων της ενδολάχνιας τροφοβλάστης, καθώς και η διάμετρος των

λαχνών. Η ωρίμανση των λαχνών διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη στενότερη επικοινωνία μεταξύ των εμβρυϊκών τριχοειδών των λαχνών και του μεσολάχνιου χώρου με την μητρική κυκλοφορία [4].

1.1.1.E Ταξινόμηση των χοριακών λαχνών

Κατά τη διάρκεια της κύησης, οι χοριακές λάχνες παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές στα πλαίσια ωρίμανσης του πλακούντα. Οι διακλαδώσεις των λαχνωτών δέντρων αποτελούνται από διαφορετικούς τύπους χοριακών λαχνών που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη διάμετρο, τη σύσταση του στρώματος, τη δομή των αγγείων και την εντόπιση στον πλακούντα. Ο Kaufman διακρίνει πέντε τύπους χοριακών λαχνών, που προέρχονται από τις τριτογενείς λάχνες των πρώτων εβδομάδων, οι οποίες ονομάζονται μεσεγγυματογενείς. Έτσι διακρίνουμε : α) τις μεσεγγυματογενείς λάχνες, β) τις διάμεσες ανώριμες λάχνες, γ) τις στελεχιαίες λάχνες, δ) τις ώριμες διάμεσες λάχνες και ε) τις τελικές λάχνες [5].

Οι μεσεγγυματογενείς λάχνες είναι τριτογενείς λάχνες με χαλαρό μεσεγγυματογενές στρώμα και κεντρικά τριχοειδή αγγεία. Αντιπροσωπεύουν τα κεντρικά 2/3 του πλακούντα κατά την 6^η εβδομάδα της κύησης [6]. Η περιφέρεια του ανώριμου πλακούντα φέρει ακόμα πρωτογενείς λάχνες. Οι μεσεγγυματογενείς λάχνες καλύπτονται από αυξημένου πάχους συγκυτιοτροφοβλαστική στιβάδα και συνεχή εσωτερική κυτταροτροφοβλαστική στιβάδα. Κατά την περίοδο αυτή, παρατηρούνται προσεκβολές της συγκυτιοτροφοβλάστης στην περιφέρεια των τριτογενών λαχνών και στο μεσολάχνιο χώρο, δίνοντας γένεση σε νέες μεσεγγυματογενείς λάχνες. Ο αριθμός των μεσεγγυματογενών λαχνών ελαττώνεται προοδευτικά με την εξέλιξη της κύησης, οι οποίες καταλήγουν να συνιστούν λιγότερο από το 1% του συνόλου των λαχνών στον τελειόμηνο πλακούντα. Ωστόσο, η συνεχής παρουσία των μεσεγγυματογενών λαχνών υποδηλώνει τη συνεχή επέκταση των λαχνωτών δέντρων καθόλη τη φυσιολογική κύηση.

Περί την 7^η - 8^η εβδομάδα της κύησης, οι μεσεγγυματογενείς λάχνες αρχίζουν να δίνουν γένεση στις διάμεσες ανώριμες λάχνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη διάμετρο και χαλαρό δικτυωτό στρώμα με άφθονα εμβρυϊκά μακροφάγα κύτταρα Hofbauer [6]. Η συγκυτιοτροφοβλάστη παρουσιάζει ελάττωση του πάχους της, ενώ η κυτταροτροφοβλάστη παρουσιάζει ελάττωση των κυττάρων. Οι διάμεσες ανώριμες λάχνες συνιστούν τη βασική ομάδα χοριακών λαχνών κατά το δεύτερο τρίμηνο, κυρίως μεταξύ 14^{ης} και 20^{ης} εβδομάδας της κύησης.

Μέχρι το τέλος του πρώτου μήνα της κύησης, παρατηρείται αύξηση των διαστάσεων των λαχνών, που αποτελούν τους κεντρικούς κορμούς των λαχνωτών δέντρων και από τους οποίους αυξάνει διαρκώς το παρέγχυμα του πλακούντα. Σους κεντρικούς κορμούς και συγκεκριμένα περίξ των διατομών των αγγείων, αρχίζουν να διαγράφονται μυϊκά τοιχώματα, εύρημα το οποίο χαρακτηρίζει τις στελεχιαίες λάχνες. Η δημιουργία των στελεχιαίων λαχνών κάνει την εμφάνισή της κατά την 8^η εβδομάδα της κύησης [6], όπου τα κεντρικά αγγεία του στρώματος των διάμεσων ανώριμων λαχνών αρχίζουν να διαφοροποιούνται σε αρτηρίες και φλέβες με το σχηματισμό μυϊκού χιτώνα στο τοίχωμά τους. Περικεντρικά αυτών εμφανίζεται ίνωση του χαλαρού δικτυωτού στρώματος με

διατήρηση τμήματος αυτού στην περιφέρεια. Οι στελεχιαίες λάχνες αντιπροσωπεύουν περίπου το 20 – 25% του τελειόμηνου πλακούντα και αναπτύσσονται κατά κύριο λόγο κάτω από το χοριακό πέταλο. Αποτελούν το σκελετό των λαχνών, μεταφέρουν αίμα αλλά δε συμμετέχουν ουσιαστικά στην ανταλλαγή αερίων και θρεπτικών στοιχείων. Ορισμένες από τις στελεχιαίες λάχνες εισέρχονται στο βασικό πέταλο του πλακούντα, επιτυγχάνοντας σταθερή σύνδεση του πλακούντα και του μυομητρίου. Το σύμπλεγμα των λαχνών που παράγεται από τις διακλαδώσεις των στελεχιαίων λαχνών δημιουργεί την κοτυληδόνα.

Μέχρι το τέλος του δεύτερου τριμήνου, η δημιουργία νέων διάμεσων ανώριμων λαχνών προοδευτικά ελαττώνεται, αλλά η μετατροπή τους σε στελεχιαίες λάχνες εξακολουθεί να υφίσταται, εύρημα το οποίο εξηγεί την ύπαρξη τους και στα κεντρικά τμήματα του τελειόμηνου πλακούντα.

Κατά τη 24^η – 26^η εβδομάδα της κύησης, οι διάμεσες ανώριμες λάχνες μετατρέπονται σε στελεχιαίες λάχνες και παράλληλα οι μεσεγγυματογενείς λάχνες αρχίζουν πλέον να μετατρέπονται απευθείας σε διάμεσες ώριμες λάχνες, από τις οποίες θα προκύψουν οι τελικές λάχνες. Οι διάμεσες ώριμες λάχνες είναι λεπτές και επιμήκεις και χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη πολλών αγγείων και τριχοειδών στο στρώμα. Οι διάμεσες ώριμες λάχνες συνιστούν περίπου το 25% των λαχνών του τελειόμηνου πλακούντα.

Οι τελικές λάχνες αποτελούν το τελικό στάδιο ωρίμανσης και σχηματίζονται από τις προσεκβολές της συγκυτιοτροφοβλάστης κατά μήκος της περιφέρειας των διάμεσων ώριμων λαχνών, κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης. Χαρακτηρίζονται από μικρότερη διάμετρο σε σχέση με τις διάμεσες ώριμες λάχνες και φέρουν κολποειδή τριχοειδή, τα οποία καλύπτουν περισσότερο από το 50% τους στρώματος. Τα τριχοειδή έρχονται σε άμεση επαφή με τη βασική μεμβράνη της συγκυτιοτροφοβλάστης, δημιουργώντας τις αγγειοσυγκυτιακές μεμβράνες και επιτρέποντας έτσι τη στενή επαφή της μητρικής και της εμβρυϊκής κυκλοφορίας και την ανταλλαγή αερίων και θρεπτικών συστατικών. Οι τελικές λάχνες συνιστούν περισσότερο από το 50% των λαχνών του τελειόμηνου πλακούντα.

1.1.1.ΣΤ Στρώμα λαχνών

Το στρώμα των λαχνών περιλαμβάνει κύτταρα συνδετικού ιστού, μεγάλα φαγοκύτταρα (Hofbauer), πλασματοκύτταρα, ελεύθερα λιπίδια και εμβρυϊκά αγγεία, τα οποία είναι αρτηρίες και φλέβες στις μεγάλες λάχνες και τριχοειδή και κόλποι στις μικρότερες λάχνες.

Μετά το δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, λαμβάνουν χώρα εναποθέσεις ινιδοειδούς, που αποτελεί μια άμορφη ηωσινοφιλική ουσία, οι οποίες χαρακτηρίζονται από προοδευτική αύξηση του πάχους τους και είναι δυνατόν να καλύψουν ακόμα και το 30% της πλακουντιακής επιφάνειας χωρίς να επηρεάσουν τη λειτουργία του πλακούντα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, δεν υπερβαίνουν το 10 – 20% του πλακουντιακού όγκου στο τέλος της εγκυμοσύνης. Η εμφάνισή τους φαίνεται να σχετίζεται με μικροτραυματισμούς της συγκυτιοτροφοβλάστης. Συγκεκριμένα, η επαφή του μητρικού αίματος με τα σημεία τραυματισμού διεγείρει την ενεργοποίηση ενός τοπικού μηχανισμού πήξης, που με τη σειρά του ευθύνεται για την εναπόθεση του ινιδοειδούς. Τέτοιες εναποθέσεις καλύπτουν μικρορρήξεις που σχετίζονται με τη γήρανση του πλακούντα και δύνανται να αποφράξουν

των αυλό ενός ή περισσότερων αγγείων, οδηγώντας στη δημιουργία μακροσκοπικά ορατών λευκών εμφράκτων. Οι εναποθέσεις ινδοειδούς ενδεχομένως να διαδραματίζουν ένα ρόλο ανοσολογικού φραγμού μεταξύ μητρικού και εμβρυϊκού ιστού.

Τα κύτταρα Hofbauer είναι μεγάλα στρογγυλά ή ωοειδή κύτταρα που χαρακτηρίζονται από στρογγυλούς πυρήνες με αυξημένου πάχους πυρηνική μεμβράνη, κοκκιώδες κυτταρόπλασμα και μεγάλα κενοτόπια. Τα κύτταρα αυτά κάνουν την εμφάνισή τους περί τη 18^η ημέρα της κύησης και παραμένουν μέχρι την ολοκλήρωσή αυτής. Η συμπίεση του στρώματος των λαχνών μετά τον 4^ο μήνα της κύησης καθιστά δυσχερή την αναγνώριση των κυττάρων Hofbauer, με συνέπεια την ανάγκη εφαρμογής τεχνικών ανοσοϊστοχημείας με αντισώματα που αναγνωρίζουν μακροφάγα (CD68). Τα κύτταρα Hofbauer κάνουν την εμφάνισή τους στις λάχνες πριν την έναρξη της εμβρυϊκής κυκλοφορίας, εύρημα πάνω στο οποίο έχει βασιστεί η άποψη ότι η προέλευσή τους είναι τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα των λαχνών στην αρχή της κύησης και τα εβρυϊκά μονοκύτταρα στα επόμενα στάδια της εγκυμοσύνης. Δρουν σαν ιστικά μακροφάγα, φαγοκυτταρώνοντας κυτταρικά υπολείμματα, καθώς και σαν αντιγονικοί παρουσιαστές στις περιπτώσεις λοιμογόνου προσβολής και φλεγμονής. Παράγουν κυτταροκίνες και διάφορα ένζυμα που εμπλέκονται στην παραγωγή προσταγλανδινών. Υπάρχουν μελέτες που προσδίδουν στα κύτταρα Hofbauer σημαντικό ρόλο στη γένεση του πλακούντα και την αγγειογένεση αυτού. Αποδεικτικό εύρημα υπέρ της αγγειογενετικής ικανότητας αυτών των κυττάρων αποτελεί η έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor, VEGF) σε επίπεδα υψηλότερα από εκείνα των μακροφάγων του περιτοναίου.

Όσον αφορά τα αγγεία των λαχνών, κάθε λάχνη περιέχει 2 – 6 τριχοειδή αγγεία στον ώριμο πλακούντα. Η μείωση του αριθμού τους ή/και η πλήρης εξαφάνισή τους υποδηλώνει θρόμβωση και απόφραξη των εμβρυϊκών αρτηριών (π.χ. χρόνια φλεγμονή).

1.1.1.2 Μεσολάχνιος χώρος

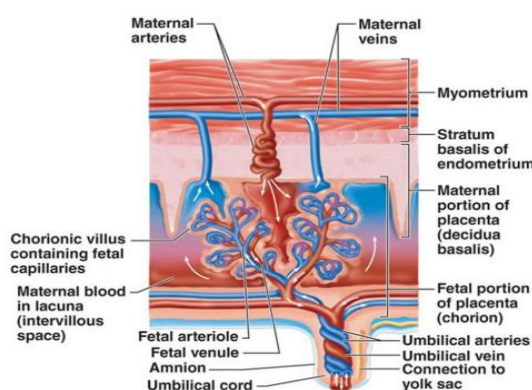
Ο μεσολάχνιος χώρος είναι πλήρης από αίμα προερχόμενο από κοιλότητες που έχουν δημιουργηθεί στη συγκυτιοτροφοβλάστη κατά τη 2^η εβδομάδα της κύησης. Η περαιτέρω διάβρωση του φθαρτού από την τροφοβλάστη διευρύνει τις κοιλότητες αυτές, σχηματίζοντας έναν ενιαίο χώρο που ονομάζεται μεσολάχνιος χώρος και περιβάλλεται από το χοριακό πέταλο και το βασικό φθαρτό. Το περιφερικό τμήμα του χώρου αυτού ορίζεται ως περιφερικός κόλπος ή λίμνη [2].

1.1.2 Πλακουντιακή κυκλοφορία

Μετά την πρόσφυση του ομφαλίου λώρου στην εμβρυϊκή επιφάνεια του πλακούντα, οι ομφαλικές αρτηρίες διακλαδίζονται και πορεύονται σε ακτινωτή διάταξη σε όλη την έκταση του πλακούντα. Ακολούθως, οι κλάδοι αυτοί υποδιαιρούνται σε μικρότερα αρτηρίδια,

καθένα για κάθε χοριακή λάχνη και κατόπιν χωρίς να αναστομώνονται μεταξύ τους μεταπίπτουν σε φλεβίδια που επιστρέφουν το αίμα στην ομφαλική φλέβα.

Το αίμα του μεσολάχνιου χώρου προέρχεται από τη μητρική κυκλοφορία και συγκεκριμένα από αγγεία που διέρχονται μέσω του μυομητρίου και καταλήγουν στο βασικό φθαρτό. Στο σημείο εμφύτευσης, τα αγγεία αυτά, που ονομάζονται σπειροειδείς αρτηρίες, διαφοροποιούνται με αντικατάσταση των λείων μυϊκών κυττάρων από την κυτταροτροφοβλάστη και του κολλαγόνου του μέσου χιτώνα από ινώδες υλικό. Οι μητροπλακουντιακές αρτηρίες αποτελούν τελικούς κλάδους των σπειροειδών αρτηριών του ενδομητρίου και σχηματίζουν την αιμολίμνη και τους μικρότερους αιμοκόλπους, σε καθέναν από τους οποίους εισέρχεται μια στελεχιαία λάχνη με τους κλάδους της. Οι αιμοκόλποι επικοινωνούν μεταξύ τους και δημιουργούν ένα λαβύρινθο από σχισμοειδείς χώρους, που συνιστά το μεσολάχνιο χώρο. Ο μεσολάχνιος χώρος τροφοδοτείται με αίμα από περίπου 20 σπειροειδή αρτηρίδια. Το αίμα που κυκλοφορεί στο μεσολάχνιο χώρο περιβρέχει τις λάχνες πριν την επιστροφή του στην κυκλοφορία της μητέρας με τις μητριάιες φλέβες [2] (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8. Πλακουντιακή κυκλοφορία

1.1.3 Λειτουργίες του πλακούντα

A) Μεταβολισμός

Στα αρχικά στάδια της εγκυμοσύνης, ο πλακούντας συνθέτει λιπαρά οξέα, χοληστερόλη και γλυκογόνο, τα οποία είναι χρήσιμα ως πηγές ενέργειας και θρεπτικών στοιχείων για το έμβρυο [7].

B) Μεταφορά αερίων και θρεπτικών συστατικών

Η μεγάλη επιφάνεια του πλακούντα συμβάλλει στη μεταφορά ουσιών και προς τις δύο κατευθύνσεις. Η επιφάνεια του πλακούντα περί τις 28 εβδομάδες της κύησης εκτιμάται

περίπου στα 5 m², ενώ στο τέλος της κύησης περίπου στα 11 m². Οι ουσίες που κυρίως μεταφέρονται από τη μητέρα στο έμβρυο αφορούν οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, ενώ αντιστοίχως από το έμβρυο προς τη μητέρα αποβάλλονται CO₂ και μεταβολικά προϊόντα, όπως ουρία. Ο πλακούντας χαρακτηρίζεται επίσης από διαπερατότητα στη γλυκόζη και, σε μικρότερο βαθμό, στη φρουκτόζη και σε άλλους δισακχαρίτες. Η μεταφορά των αμινοξέων επιτυγχάνεται μέσω ειδικών υποδοχέων, ενώ η μεταφορά ορισμένων πρωτεϊνών επιτελείται μέσω της διαδικασίας της πινοκύττωσης. Η μεταφορά ανοσοσφαιρινών από τη μητέρα (κυρίως IgG) παίζει σημαντικό ρόλο στην παθητική ανοσία του νεογνού. Επιπλέον, ο πλακούντας είναι περισσότερο διαπερατός στις στεροειδείς ορμόνες σε σύγκριση με τις πρωτεϊνικές ορμόνες, των οποίων η μεταφορά είναι πιο περιορισμένη [8].

Γ) Ενδοκρινική δράση

Η συγκυτιοτροφοβλάστη αποτελεί ένα σημαντικό ενδοκρινή αδένά [9]. Οι κύριες πλακουντιακές ορμόνες περιλαμβάνουν τις :

- Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη : η παραγωγή της ξεκινά πριν την εμφύτευση και παίζει ρόλο στη διάσωση του ωχρού σωματίου.
- Οιστρογόνα / Προγεστερόνη : μέχρι το τέλος του πρώτου τριμήνου, ο πλακούντας συνθέτει σημαντική ποσότητα αυτών των ορμονών για τη διατήρηση της εγκυμοσύνης.
- Πλακουντιακό γαλακτογόνο : επηρεάζει την ανάπτυξη του μαζικού αδένά και το μεταβολισμό των υδατανθράκων και των λιπιδίων.
- Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας : προάγει την ανάπτυξη της τροφοβλάστης
- Αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης : ενεργοποιεί την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση της τροφοβλάστης.
- Ρελαξίνη : παράγεται από τα κύτταρα του φθαρτού και χαλαρώνει τους πυελικούς συνδέσμους, στα πλαίσια προετοιμασίας για τον τοκετό.

1.2 ΓΑΜΕΤΟΓΕΝΕΣΗ

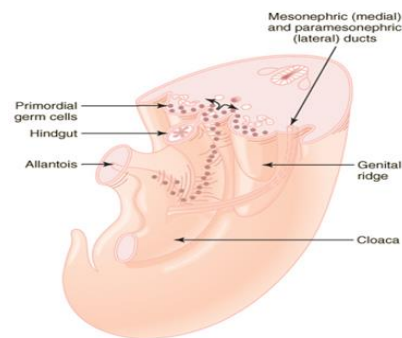
Ως γαμετογένεση ορίζεται η διαδικασία παραγωγής αρσενικών (σπερματογένεση) ή θηλυκών (ωογένεση) γαμετών από τα βλαστικά κύτταρα (germ cells).

Χαρακτηρίζεται από 4 φάσεις:

- 1) Τη μετανάστευση των βλαστικών κυττάρων στις γονάδες.
- 2) Τον πολλαπλασιασμό με μίτωση των βλαστικών κυττάρων στις γονάδες.
- 3) Την διαδικασία της μείωσης κατά την οποία ο αριθμός των χρωμοσωμάτων υποδιπλασιάζεται και προκύπτουν οι γαμέτες και

4) Τα τελικά στάδια ωρίμανσης και διαφοροποίησης των γαμετών σε σπερματοζώαρια και ωάρια.

Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα ή γονοκύτταρα προέρχονται από το λεκιθικό ασκό του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Συγκεκριμένα, εμφανίζονται, σε ένα πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης, ανάμεσα στα ενδοδερμικά κύτταρα στο τοίχωμα του λεκιθικού ασκού κοντά στην αλλαντοΐδα. Ο αριθμός τους παρουσιάζει αύξηση, ξεκινώντας από περίπου 100 την 8^η ημέρα και φτάνει στα 2500-5000 γονοκύτταρα την 12^η ημέρα [10-12]. Στη συνέχεια, τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα μεταναστεύουν με αμοιβαδοειδείς κινήσεις κατά μήκος του ραχιαίου μεσεντερίου του οπισθίου εντέρου και φθάνουν στις αρχέγονες γονάδες στην αρχή της 5^{ης} εβδομάδας και εισχωρούν στους γεννητικούς κρημνούς την 6^η εβδομάδα της ανάπτυξης (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9. Η μετανάστευση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων

Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται με ταχύ ρυθμό, ωθώντας σε πολλαπλασιασμό και τα κύτταρα του μεσόνεφρου και του παρακείμενου κοιλωματικού επιθηλίου, με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ζεύγους γεννητικών ταινιών σε αμέσως εσωτερική θέση ως προς τους αναπτυσσόμενους μεσόνεφρους.

Μετά την 6^η εβδομάδα, η αρχέγονη γονάδα αρχίζει να διαφοροποιείται σε ανδρική ή γυναικεία. Ο καθορισμός του φύλου της γονάδας εξαρτάται από την παρουσία ή όχι του χρωμοσώματος Y. Συγκεκριμένα, το γονίδιο SRY (Sex-determining region, Y chromosome), το οποίο περιέχεται στο Y χρωμόσωμα, κωδικοποιεί ένα ρυθμιστή, ο οποίος φαίνεται να πυροδοτεί μια αλληλουχία γεγονότων που οδηγεί στη δημιουργία των όρχεων. Το γονιδιακό προϊόν του γονιδίου SRY είναι ο μεταγραφικός παράγοντας TDF (Testis-determining factor). Η παρουσία του παράγοντα TDF προάγει τη διαφοροποίηση της πρωτογενούς γεννητικής χορδής και το σχηματισμό των σπερματοδόχων κύστεων, την παραγωγή ανδρογόνων και την παραγωγή αντιμυλλέριου ορμόνης (AMH). Αντιθέτως, η απουσία του γονιδιακού προϊόντος του SRY οδηγεί σε απόπτωση της πρωτογενούς γεννητικής χορδής και σχηματισμό των δευτερογενών γεννητικών χορδών (πρόγονοι ωαρίων). Συνεπώς, το γονίδιο SRY θεωρείται απαραίτητο αλλά και αρκετό για τον καθορισμό του αρρένος [13, 14].

Έτσι, τα γονοκύτταρα θα διαφοροποιηθούν είτε σε σπερματογόνια είτε σε ωογόνια, τα οποία, με τη σειρά τους, θα οδηγήσουν στη δημιουργία των αντίστοιχων γαμετών μέσω της διαδικασίας της σπερματογένεσης ή της ωογένεσης αντίστοιχα.

Τα διπλοειδή γαμετογόνα κύτταρα (ωογόνια και σπερματογόνια) υφίστανται μειωτική κυτταρική διαίρεση με αποτέλεσμα την παραγωγή ώριμων απλοειδών γαμετοκυττάρων (ωάρια και σπερματοζωάρια). Με τη συνένωση του ωαρίου με το σπερματοζωάριο, κατά τη γονιμοποίηση, αποκαθίσταται ο διπλοειδής αριθμός των χρωμοσωμάτων στο γονιμοποιημένο ωάριο.

1.2.1 Σπερματογένεση

Ως σπερματογένεση ορίζεται η διαδικασία παραγωγής ώριμων αρσενικών γεννητικών κυττάρων. Η διαδικασία αυτή ξεκινάει με την έναρξη της ήβης και συνεχίζεται μέχρι και το γήρας. Η διάρκεια ενός κύκλου σπερματογένεσης είναι περίπου 72 – 74 ημέρες. Ο κύκλος της σπερματογένεσης διακρίνεται σε 3 φάσεις (Εικόνα 1.10).

A) Πολλαπλασιασμός των σπερματογονίων

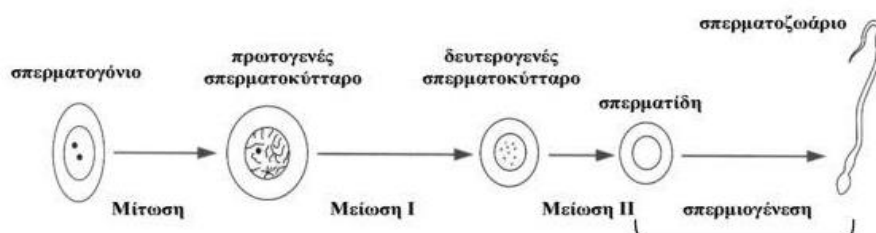
Τα σπερματογόνια συνιστούν αδιαφοροποίητα γεννητικά κύτταρα, τα οποία αρχίζουν να διαιρούνται μιτωτικά με την έναρξη της ήβης. Τα κύτταρα, που προκύπτουν από την πρώτη διαίρεση, διαιρούνται περαιτέρω μέχρι έναν αριθμό μιτωτικών διαιρέσεων, ώστε να προκύψουν κλώνοι κάθε αρχικού σπερματογονίου. Παράλληλα, τα σπερματογόνια αρχίζουν να διαφοροποιούνται. Τα κύτταρα που προκύπτουν από αυτή τη διαδικασία μιτώσεων και διαφοροποίησης ονομάζονται πρωτογενή σπερματοκύτταρα. Εάν όλα τα κύτταρα κάθε κλώνου, που προέρχεται από κάθε σπερματογόνο, υποβάλλονταν στη διαδικασία μιτώσεων και διαφοροποίησης τότε όλα τα σπερματογόνια θα διαφοροποιούνταν σε πρωτογενή σπερματοκύτταρα. Παρόλα αυτά, ένα κύτταρο κάθε κλώνου δε συμμετέχει σε αυτή τη διαδικασία, παραμένοντας ως αρχέγονο σπερματογόνο που θα εισέλθει αργότερα στην παραπάνω διαδικασία. Με τον τρόπο αυτό, ο αριθμός των σπερματογονίων διατηρείται σταθερός.

B) Μειωτική διαίρεση των πρωτογενών σπερματοκυττάρων

Τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα αυξάνουν σημαντικά σε μέγεθος και διαιρούνται μειωτικά (1^η μειωτική διαίρεση), οδηγώντας στο σχηματισμό δύο δευτερογενών σπερματοκυττάρων ανά διαιρούμενο πρωτογενές σπερματοκύτταρο. Κατόπιν, κάθε δευτερογενές σπερματοκύτταρο ή προ-σπερματίδα υφίσταται νέα μειωτική διαίρεση (2^η μειωτική διαίρεση), οδηγώντας στο σχηματισμό δύο σπερματίδων. Συνεπώς, κάθε πρωτογενές σπερματοκύτταρο, που περιέχει 46 χρωμοσώματα, οδηγεί στην παραγωγή τεσσάρων σπερματίδων, κάθε μία από τις οποίες περιέχει 23 χρωμοσώματα [15].

Γ) Σπερμιογένεση

Η τελευταία φάση της σπερματογένεσης περιλαμβάνει τη διαφοροποίηση των στρογγυλών σπερματίδων σε σπερματοζωάρια. Κατά το στάδιο αυτό, λαμβάνει χώρα κυτταρική αναδιαμόρφωση με επιμήκυνση των σπερματίδων, χωρίς ωστόσο να συμβαίνουν επιπλέον κυτταρικές διαιρέσεις. Κάθε διαφοροποιημένο σπερματογόνο παράγει 8 ώριμα σπερματοζωάρια. Κατά την εκσπερμάτιση, τα σπερματοζωάρια έχουν την ικανότητα μόνο να κινούνται, αλλά αδυνατούν να προσδεθούν και να γονιμοποιήσουν ένα ωάριο. Αυτό το στάδιο ωρίμανσης του σπερματοζωαρίου πραγματοποιείται μετά την εκσπερμάτιση και ενώ ήδη βρίσκεται για κάποιο διάστημα μέσα στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα.

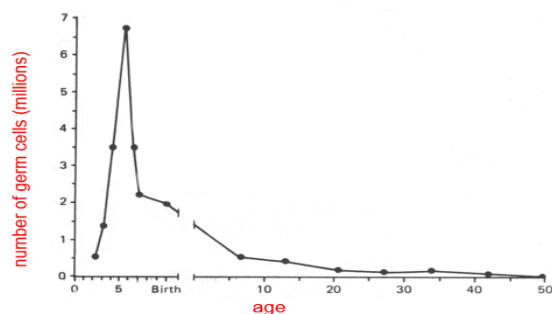


Εικόνα 1.10. Τα στάδια της σπερματογένεσης

1.2.2 Ωογένεση

Ως ωογένεση ορίζεται η διαδικασία παραγωγής θηλυκών γεννητικών κυττάρων. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα κατά την εμβρυϊκή ζωή, ενώ η ωρίμανση των ωαρίων πραγματοποιείται κυκλικά από την εφηβεία έως την εμμηνόπαυση.

Τα γεννητικά κύτταρα, μετά την εγκατάστασή τους στις γονάδες, πολλαπλασιάζονται μιτωτικά και ο αριθμός τους αυξάνει σημαντικά. Κατά την 6η-7η εβδομάδα της κύησης, υπάρχουν περίπου 10.000 ωογόνια. Την 8η εβδομάδα της κύησης, τα ωογόνια φθάνουν περίπου τα 600.000. Στις 20 εβδομάδες της εμβρυϊκής ζωής παρατηρείται ο μεγαλύτερος αριθμός γεννητικών κυττάρων που υπολογίζεται περίπου στα 7 εκατομμύρια. Στη συνέχεια, υπό την επίδραση αποπτωτικών μηχανισμών (ατρησία), ο αριθμός αυτός μειώνεται με έντονο ρυθμό, οδηγώντας σε μια απώλεια της τάξεως περίπου του 80% κατά τη γέννηση, όπου εκτιμάται περίπου στα 1-2 εκατομμύρια γεννητικά κύτταρα. Η μείωση αυτή των γεννητικών κυττάρων συνεχίζεται, με αποτέλεσμα ο εναπομένοντας αριθμός αρχέγονων ωοθυλακίων στην εφηβεία να εκτιμάται περίπου στα 300.000-400.000. Από αυτά, ο αριθμός που θα προχωρήσει στην ωορρηξία κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής εκτιμάται σε λιγότερο του 1% του συνόλου, δηλαδή 400-500 ωοθυλάκια. Η συνεχής αποπτωτική δραστηριότητα έχει ως αποτέλεσμα την παραμονή μόνο 1000 ωοθυλακίων κατά τη μέση ηλικία της εμμηνόπαυσης, τα οποία και αυτά προοδευτικά αποπύπτουν [16, 17] (Εικόνα 1.11).

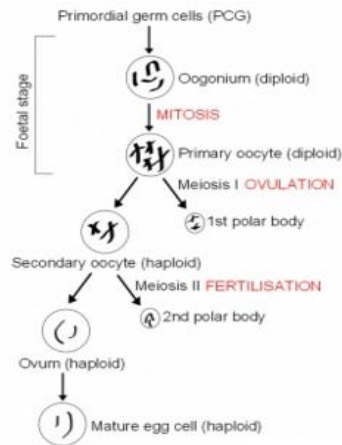


Εικόνα 1.11. Ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων σε συνάρτηση με την ηλικία στα θήλεα.

Τα γεννητικά κύτταρα εισέρχονται στην πρώτη μειωτική διαίρεση πριν τη γέννηση και, πιο συγκεκριμένα, εισέρχονται στην πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης προς το τέλος του 1ου τρίμηνου και πλέον καλούνται πρωτογενή ωκύτταρα [18]. Αυτά παραμένουν στο στάδιο της διπλοταινίας της πρόφασης της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης μέχρι περίπου ένα μήνα πριν την ωοθυλακιορρηξία, όπου ολοκληρώνεται η πρώτη μειωτική διαίρεση. Κατά το διάστημα αυτό, παρατηρείται έντονη μεταγραφική δραστηριότητα και αύξηση του μεγέθους. Από την 1^η μειωτική διαίρεση προκύπτουν δύο θυγατρικά κύτταρα με απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων, εκ των οποίων το ένα θυγατρικό κύτταρο διατηρεί όλο σχεδόν το κυτταρόπλασμα (δευτερογενές ωκύτταρο) και το άλλο είναι πολύ μικρότερο και αποτελεί το πρώτο πολικό σωματίο.

Στη συνέχεια ξεκινάει η 2^η μειωτική διαίρεση, η οποία εξελίσσεται μέχρι το στάδιο της μετάφασης της 2^{ης} μειωτικής διαίρεσης και ολοκληρώνεται μόλις λάβει χώρα η γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζώαριο. Κατά τη 2^η μειωτική διαίρεση, το δευτερογενές ωκύτταρο διαιρείται στο ώριμο ωάριο (προπυρήνας) και το δεύτερο πολικό σωματίο. Το καθένα περιέχει απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων. Τα δύο πολικά σωματίδια τελικά εκφυλίζονται (Εικόνα 1.12).

Για κάποια αρχέγονα γεννητικά κύτταρα, η ολοκλήρωση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης μπορεί να καθυστερήσει και για περισσότερο από 50 χρόνια [19, 20].



Εικόνα 1.12. Τα στάδια της μείωσης κατά την ωογένεση

1.3 ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα βλαστικά κύτταρα (Stem cells, SCs) αποτελούν ένα σημαντικό πεδίο έρευνας τα τελευταία χρόνια. Η διερεύνηση και η κατανόηση των μοναδικών ιδιοτήτων τους αναμένεται να συμβάλει σημαντικά στην ερμηνεία των κυτταρικών βιολογικών μηχανισμών, ενώ η δυνατότητα στοχευμένης χρήσης τους θα εξυπηρετήσει την ανεύρεση δυνητικών θεραπειών αναγεννητικής ιατρικής.

Τα βλαστικά κύτταρα συνιστούν μία κατηγορία μη διαφοροποιημένων κυττάρων που χαρακτηρίζονται από τις μοναδικές ιδιότητες της αυτοανανέωσης για απεριόριστο χρονικό διάστημα και της διαφοροποίησης σε εξειδικευμένους τύπους κυττάρων [21, 22]. Συνεπώς, τα βλαστικά κύτταρα διαθέτουν την ικανότητα αυτοανανέωσης, οδηγώντας στη γένεση θυγατρικών κυττάρων ομοίων με τα πατρικά καθώς και την ικανότητα διαφοροποίησης, οδηγώντας στη δημιουργία διαφόρων κυτταρικών τύπων υπό τις κατάλληλες συνθήκες. Παρόλο που τα περισσότερα ενήλικα κύτταρα είναι ήδη διαφοροποιημένα, τα βλαστικά κύτταρα εξυπηρετούν ποικίλες λειτουργίες, όπως η συνεχής αναπλήρωση πληθυσμών ώριμων κυττάρων (π.χ. αιμοποιητικά) και η αποκατάσταση διαφοροποιημένων κυττάρων στην περίπτωση ιστικής βλάβης [23].

Η απομόνωση των βλαστικών κυττάρων για πρώτη φορά έγινε το 1981 από έμβρυο ποντικού, ενώ η απομόνωσή τους στον άνθρωπο για πρώτη φορά έγινε το 1998 από τον Thomson και τους συνεργάτες του. [24-26].

1.3.1 Ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων

Τα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από τις παρακάτω ιδιότητες (Εικόνα 1.13, Εικόνα 1.16) :

- 1) Τα βλαστικά κύτταρα είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα.
- 2) Τα βλαστικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται, οδηγώντας στη γένεση ομοίων αδιαφοροποίητων κυττάρων.
- 3) Τα βλαστικά κύτταρα έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους.

Συνεπώς τα βλαστικά κύτταρα διαθέτουν τη δυνατότητα να αυτοανανεώνονται για απεριόριστο χρονικό διάστημα χωρίς να εμφανίζουν γήρανση [21], διατηρώντας, με τον τρόπο αυτό, τον πληθυσμό τους μέσα στον οργανισμό.

Επιπλέον, κατά τη διαφοροποίηση ενός βλαστικού κυττάρου, τα ειδικά χαρακτηριστικά ενός συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου εκδηλώνονται σε αυτό, οδηγώντας στη δημιουργία προγονικών κυττάρων αυτού του κυτταρικού τύπου και τελικά στη γένεση πλήρως διαφοροποιημένων κυττάρων. Στην περίπτωση που η ικανότητα διαφοροποίησης δεν περιορίζεται στα κύτταρα ενός μόνο ιστού, τα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται ως πολυδύναμα.

Τα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού λόγω των υψηλών επιπέδων δραστηρικής τελομεράσης, οδηγώντας στη δημιουργία ενός τεράστιου αριθμού ενός τουλάχιστον τύπου λειτουργικών απογονικών κυττάρων [24].

Επομένως, τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία πανομοιότυπων κυττάρων (αυτοανανέωση) ή κυττάρων με περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης (προβαθμίδες διαφοροποιημένων κυττάρων).



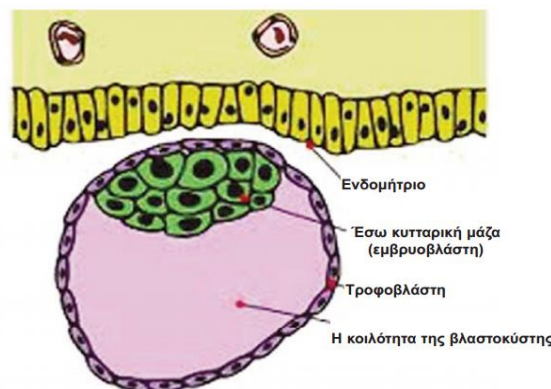
Εικόνα 1.13. Ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων

1.3.2 Εξέλιξη βλαστικών κυττάρων – Κατηγορίες

Τα βλαστικά κύτταρα παρουσιάζουν σημαντική ανομοιομορφία ως προς την πολυδυναμία κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της οντογένεσης και διακρίνονται σε παντοδύναμα, ολοδύναμα, πολυδύναμα και μονοδύναμα κύτταρα (Εικόνα 1.17).

Τα αρχικά κύτταρα ονομάζονται παντοδύναμα (totipotent) και προέρχονται από το ζυγώτη και τα παράγωγα των δύο πρώτων κυτταρικών διαιρέσεων του εμβρύου (στάδιο του μοριδίου). Τα παντοδύναμα κύτταρα χαρακτηρίζονται από απεριόριστο δυναμικό και έχουν την ικανότητα να δώσουν γένεση σε όλους τους εμβρυϊκούς ιστούς, τους εξωεμβρυϊκούς ιστούς (τροφοβλάστη) και όλους τους μετεμβρυϊκούς ιστούς και όργανα [24, 27].

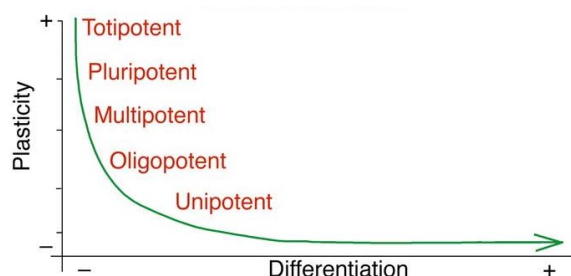
Κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, εμφανίζεται η έσω κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης, από την οποία προέρχονται τα ολοδύναμα ή πλειοδύναμα (pluripotent) κύτταρα (Εικόνα 1.14). Τα κύτταρα αυτά, που ονομάζονται και αρχέγονα εμβρυικά ή εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, έχουν την ικανότητα να δώσουν γένεση σε όλους τους εμβρυϊκούς ιστούς και διαφοροποιούνται προς τα τρία βλαστικά δέρματα (εξώδερμα / μεσόδερμα / ενδόδερμα) και προς τα γαμετικά κύτταρα, όχι όμως προς ολόκληρο το έμβρυο καθώς δεν έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν τον πλακούντα και τους υποστηριζόμενους ιστούς του [24].



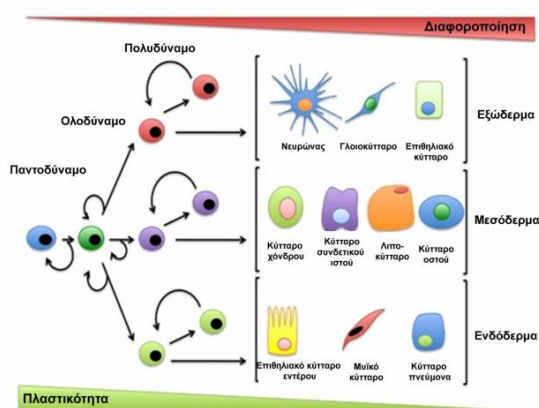
Εικόνα 1.14. Η έσω κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης αποτελεί την πηγή των ολοδύναμων (pluripotent) βλαστικών κυττάρων.

Η επόμενη κατηγορία στην πυραμίδα εξέλιξης των βλαστικών κυττάρων είναι τα πολυδύναμα (multipotent) βλαστικά κύτταρα, τα οποία απαντώνται σε ενήλικες ιστούς και χαρακτηρίζονται από περιορισμένου εύρους ικανότητα διαφοροποίησης σε κυτταρικές σειρές, κυρίως ανάλογες των ιστών στους οποίους ανήκουν [24, 28]. Ωστόσο τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται και από την ιδιότητα της πλαστικότητας που τους δίνει την ικανότητα διαφοροποίησης και προς άλλους ιστικούς κυτταρικούς τύπους [29] (Εικόνα 1.15). Ανευρίσκονται ανάμεσα σε διαφοροποιημένα κύτταρα στους διάφορους ιστούς και

συμβάλλουν στην αποκατάστασή τους [24]. Τέτοια κύτταρα απαντώνται στο μυελό των οστών, τον εγκέφαλο, το ήπαρ και άλλους ιστούς.

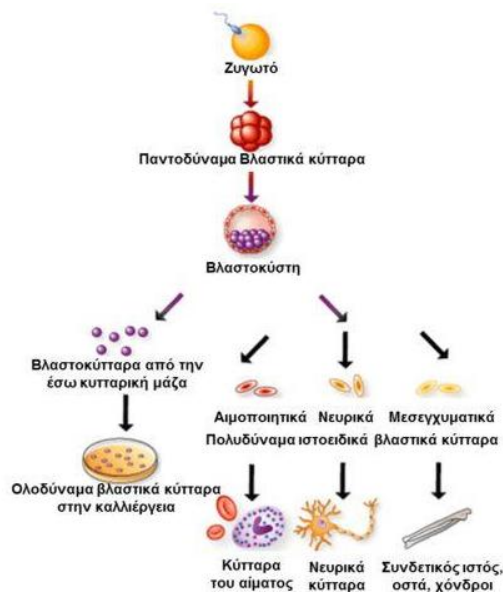


Εικόνα 1.15. Οι ποιοτικές μεταβολές στο φαινότυπο του κυττάρου που προκύπτουν από τη σύνθεση νέων γονιδιακών προϊόντων ονομάζεται διαφοροποίηση. Η ικανότητα διαφοροποίησης προς άλλους κυτταρικούς τύπους, διαφορετικών ιστών ή οργάνων ονομάζεται πλαστικότητα. Η ικανότητα αυτή είναι υψηλότερη για τα παντοδύναμα (totipotent) βλαστικά κύτταρα και μικρότερη για τα μονοδύναμα (unipotent) βλαστικά κύτταρα. [30]



Εικόνα 1.16. Διαφοροποίηση και πλαστικότητα των βλαστικών κυττάρων

Τέλος, στη βάση της πυραμίδας εξέλιξης των βλαστικών κυττάρων υπάρχουν τα μονοδύναμα (unipotent) βλαστικά κύτταρα, τα οποία απαντώνται στους ενήλικες και έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε ένα μόνο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο [24, 31]. Τέτοια κύτταρα είναι τα σπερματογόνια βλαστικά κύτταρα των όρχεων και τα βλαστικά κύτταρα της βασικής επιδερμίδας που διαφοροποιούνται στα κερατινοποιημένα πλακώδη κύτταρα [24, 32].



Εικόνα 1.17. Η πυραμίδα εξέλιξης των βλαστικών κυττάρων

Επιπλέον, τα βλαστικά κύτταρα κατηγοριοποιούνται σε εμβρυονικού (embryonic stem cells, ESCs) και ενήλικου (adult stem cells, ASCs) σταδίου. Οι κατηγορίες αυτές, με τη σειρά τους, υποδιαιρούνται σε υποκατηγορίες αναλόγως του ιστού από τον οποίο προέρχονται και αναλόγως του ιστού προς τον οποίο δύνανται να διαφοροποιηθούν.

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ή αρχέγονα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα απομονώθηκαν πρόσφατα από ανθρώπινες βλαστοκύστες και πληρούν όλες τις ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων [33]. Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα θεωρητικά φέρουν τις ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων, αν και χαρακτηρίζονται από περιορισμένη ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης σε σχέση με τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα [33, 34]. Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα απομονώνονται από πολλούς ιστούς (π.χ. μυελός των οστών, λιπώδης ιστός, κ.α.) και, λόγω της ικανότητάς τους για αυτόλογη μεταμόσχευση χωρίς τον κίνδυνο ανοσοαπόρριψης, μελετάται η πιθανή θεραπευτική χρήση τους σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις [35-37].

Συνοπτικά, οι διαφορές μεταξύ των εμβρυονικών και ενήλικων βλαστικών κυττάρων είναι:

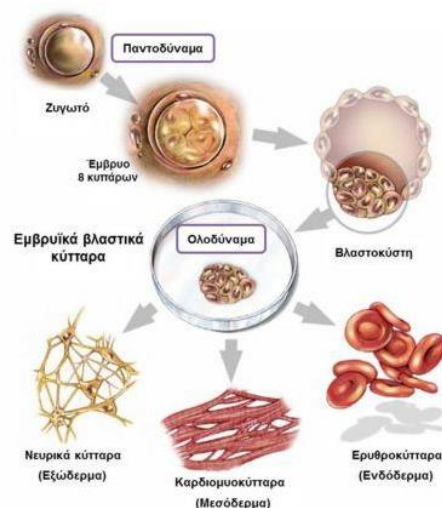
- 1) Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο δυναμικό διαφοροποίησης, σε σχέση με τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα που το δυναμικό τους είναι περιορισμένο.
- 2) Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα δίνουν γένεση σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του ανθρώπινου σώματος, σε αντίθεση με τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα που έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε κύτταρα του ιστού από τον οποίο προέρχονται.
- 3) Η *in vitro* καλλιέργεια των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί σε μεγάλες ποσότητες, σε αντίθεση με τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα, τα οποία ανευρίσκονται σε μικρό ποσοστό στους ιστούς και συχνά η απομόνωση και η *in vitro* καλλιέργειά τους είναι δυσχερής.

4) Κατά τη θεραπευτική χρήση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων υπάρχει ο κίνδυνος για "απόρριψη μοσχεύματος / ανοσοαπόρριψη", σε αντίθεση με τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα που στερούνται του κινδύνου ανοσοαπόρριψης και παρέχουν τη δυνατότητα "αυτόλογης μεταμόσχευσης".

Πρόσφατα, μια επιπλέον κατηγορία βλαστικών κυττάρων έχει προστεθεί στις προϋπάρχουσες κατηγορίες των εμβρυονικών και ενήλικων βλαστικών κυττάρων. Η κατηγορία αυτή είναι τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (fetal stem cells, FSCs), τα οποία απομονώνονται από διάφορους ιστούς κατά τη διάρκεια της κύησης, όπως ο μυελός των οστών, το ήπαρ, οι νεφροί και το αίμα του εμβρύου, καθώς επίσης και από διάφορους εξω-εμβρυϊκούς ιστούς, όπως το αμνιακό υγρό και ο πλακούντας [38, 39]. Με βάση το δυναμικό διαφοροποίησης και την κυτταρική πλαστικότητα, η κατηγορία αυτή τοποθετείται ανάμεσα στις δύο προϋπάρχουσες κατηγορίες, παρουσιάζοντας χαμηλότερο δυναμικό διαφοροποίησης και χαμηλότερη πλαστικότητα σε σχέση με τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και, παράλληλα, υψηλότερο δυναμικό διαφοροποίησης και υψηλότερη πλαστικότητα σε σχέση με τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα. Ωστόσο, σημαντικό πλεονέκτημα αυτών των κυττάρων, που απομονώνονται από εξω-εμβρυϊκούς ιστούς, σε σχέση με τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα αποτελεί η απουσία ηθικών ζητημάτων ως προς τη διαδικασία λήψης τους. Μια σειρά από πρόσφατες μελέτες πάνω στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτών των κυττάρων στοχεύουν στον καθορισμό των θεραπευτικών δυνατοτήτων τους στις διάφορες εφαρμογές της Αναγεννητικής Ιατρικής [38, 39].

1.3.2.A Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα

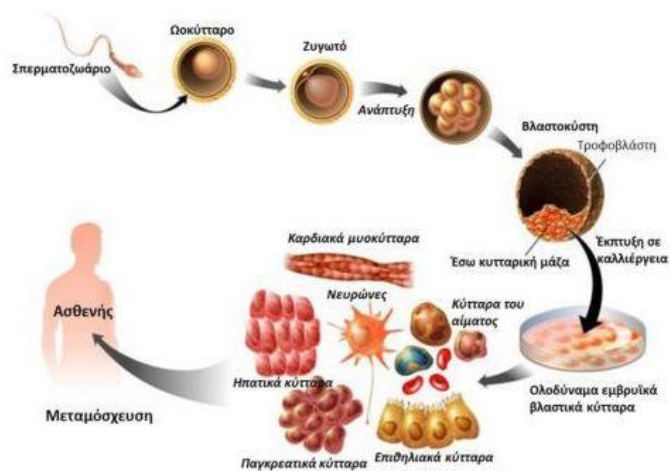
Τα εμβρυονικά ή αρχέγονα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (embryonic stem cells, ESCs) προέρχονται από την έσω κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης, η οποία δημιουργείται κατά την πέμπτη ημέρα μετά την γονιμοποίηση. Τα κύτταρα αυτά είναι ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα που χαρακτηρίζονται από την ικανότητα αυτοανανέωσης, είτε διαιρούμενα συμμετρικώς, οδηγώντας στο σχηματισμό δύο κυττάρων πανομοιότυπων με το αρχικό είτε διαιρούμενα ασύμμετρα οδηγώντας στο σχηματισμό ενός κυττάρου πανομοιότυπου με το αρχικό και ενός κυττάρου προγραμματισμένου να διαφοροποιηθεί κατά συγκεκριμένο τρόπο σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, όπως π.χ. νευρικό ή μυϊκό κύτταρο [40, 41] (Εικόνα 1.18). Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να δίνουν γένεση και στις τρεις βλαστικές στιβάδες, καθώς επίσης και στα γαμετικά κύτταρα των γονάδων, τα οποία προορίζονται για το σχηματισμό των απλοειδών γαμετών [25, 33].



Εικόνα 1.18. Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από την έκφραση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων και μορίων επιφανείας. Η διατήρηση της πολυδυναμικότητας και η ταυτόχρονη καταστολή της διαφοροποίησης επιτυγχάνεται με την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων, όπως το OCT4, το NANOG και το SOX2 [42]. Το γονίδιο OCT4 χαρακτηρίζεται ως δείκτης πολυδυναμίας των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. Για την ταυτοποίηση αυτών των κυττάρων αναζητούνται τα μόρια επιφανείας SSEA3 και SSEA4 καθώς και αντιγόνα, όπως το TRA-160 και το TRA-1-81. Επιπλέον δείκτες βρίσκονται υπό διερεύνηση για την ταυτοποίηση αυτών των κυττάρων [43].

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν *in vitro* για μεγάλο χρονικό διάστημα, διατηρώντας την ικανότητα διαφοροποίησης και υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορούν να πολλαπλασιάζονται επ' αόριστον. Η εμφύτευσή τους σε ένα έμβρυο μπορεί να δώσει γένεση σε προγονικά κύτταρα, ικανά να σχηματίσουν όλους τους εμβρυϊκούς ιστούς, όχι όμως ολόκληρο το έμβρυο. Αυτές οι ιδιότητες των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων έχουν επικεντρώσει το επιστημονικό ενδιαφέρον στην προσπάθεια αξιοποίησης αυτών των κυττάρων στην αντικατάσταση κατεστραμμένων ή νοσούντων κυττάρων ή ιστών (Εικόνα 1.19). Με τον τρόπο αυτό, θα επιτευχθεί η δυνατότητα χρήσης των κυττάρων αυτών στη δημιουργία κυτταρικών πληθυσμών, ιστών και οργάνων διαθέσιμων προς μεταμόσχευση με πλήρη συμβατότητα με τον ασθενή, δίνοντας έτσι ώθηση στην επιστήμη της Αναγεννητικής Ιατρικής. Μελέτες σε ζώα έχουν δείξει το πιθανό ρόλο των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων στη θεραπεία χρόνιων παθήσεων, όπως η μυοπάθεια Duchenne, η καρδιακή μυοπάθεια, ο σακχαρώδης διαβήτης, η νόσος Parkinson, η νόσος Alzheimer και η ατελής οστεογένεση [44-47]. Παρόλα αυτά, σημαντικά ηθικά και νομικά ζητήματα προκύπτουν ως προς τη χρήση τους σε θεραπευτικές και ερευνητικές εφαρμογές, λόγω της χρήσης ανθρωπίνων εμβρύων [48, 49]. Για το λόγο αυτό, η ερευνητική προσπάθεια επικεντρώνεται στην αναζήτηση και τη χρήση βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από ενήλικους ιστούς.

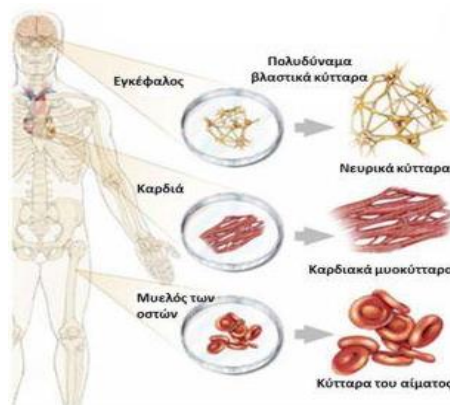


Εικόνα 1.19. Μεταμόσχευση κυττάρων σε ασθενείς με καρδιακή μυοπάθεια, σακχαρώδη διαβήτη, νόσο Parkinson, νόσο Alzheimer, αιματολογικά και άλλα νοσήματα [44-47].

1.3.2.B Ενήλικα βλαστικά κύτταρα

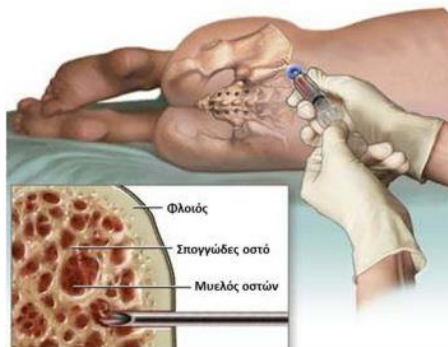
Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα (adult stem cells, ASCs) συνιστούν πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα που έχουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και αυτοανανέωσης, χωρίς να διαφοροποιούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα (long term self renewal), καθώς και την ικανότητα γένεσης ώριμων κυττάρων με ειδικές λειτουργίες [34, 50, 51]. Σε σύγκριση με τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, χαρακτηρίζονται από μικρότερη ικανότητα αυτοανανέωσης και μικρότερο δυναμικό διαφοροποίησης. Συμβάλλουν στη συνεχή αναπλήρωση ώριμων κυτταρικών πληθυσμών, όπως τα αιμοποιητικά κύτταρα, καθώς και στην αντικατάσταση διαφοροποιημένων κυττάρων στη περίπτωση ιστικής βλάβης [51].

Η απομόνωση των ενήλικων βλαστικών κυττάρων έχει επιτευχθεί από σχεδόν όλα τα ενήλικα όργανα και ιστούς, εκτός των γονάδων. Διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες, όπως αιμοποιητικά, μεσεγχυματικά, ηπατικά, νευρικά και επιδερμικά βλαστικά κύτταρα [52-54]. Εντοπίζονται μετά τη γέννηση μεταξύ διαφοροποιημένων κυττάρων σε διάφορους ιστούς και όργανα, όπως ο μυελός των οστών, ο λιπώδης ιστός, το περιφερικό αίμα, ο εγκέφαλος, ο αμφιβληστροειδής, ο οδοντικός πολφός, οι σκελετικοί μύες, η αρθρική μεμβράνη, το περιόστεο, το δέρμα, το τριχωτό της κεφαλής, το ήπαρ, το πάγκρεας και το εντερικό επιθήλιο [34, 55-65] (Εικόνα 1.20).



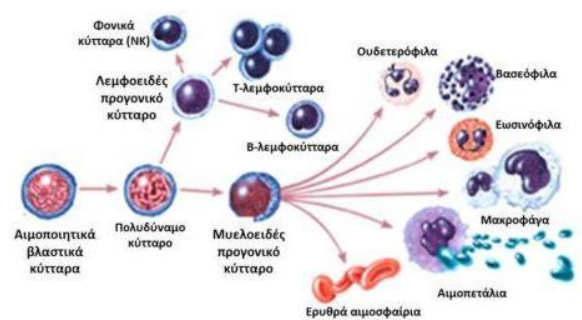
Εικόνα 1.20. Ενήλικα βλαστικά κύτταρα

Μια καλά μελετημένη πηγή ενήλικων βλαστικών κυττάρων συνιστά ο μυελός των οστών, από τον οποίον έχουν απομονωθεί δύο κατηγορίες βλαστικών κυττάρων, τα αιμοποιητικά και τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Εικόνα 1.21).

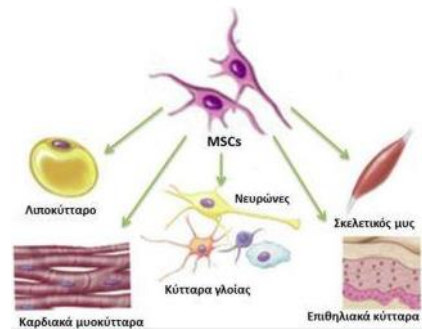


Εικόνα 1.21. Απομόνωση μυελού των οστών

Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών οδηγούν στη γένεση των κυττάρων του αίματος, καθώς και του ανοσοποιητικού συστήματος (Εικόνα 1.22), ενώ τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα οδηγούν στη γένεση των κυττάρων του λιπώδους ιστού, του οστίτη ιστού, των χόνδρων και των μυών, έχοντας παράλληλα την ικανότητα στρωματικής υποστήριξης του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των αιμοποιητικών κυττάρων [34, 66]. Επιπλέον, υπάρχουν αρκετές μελέτες που έχουν δείξει ότι, εκτός από ιστούς μεσοδερμικής προέλευσης, τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα διαθέτουν την ικανότητα *in vitro* διαφοροποίησης σε κύτταρα προερχόμενα από άλλες εμβρυϊκές στιβάδες όπως ηπατοκύτταρα, καρδιακά κύτταρα, νευρικά κύτταρα, σκελετικά κύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, του εντέρου, του σπλήνα και του πνεύμονα [67-70] (Εικόνα 1.23).



Εικόνα 1.22. Αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα



Εικόνα 1.23. Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα

Δεδομένου ότι προέρχονται από δείγματα ενήλικων ιστών και όχι από την καταστροφή εμβρύων, η χρήση των ενήλικων βλαστικών κυττάρων στην έρευνα και τη θεραπεία πλεονεκτεί έναντι των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων όσον αφορά τα ηθικά και νομικά ζητήματα που προκύπτουν σε σχέση με την προέλευσή τους [71].

1.3.2.Γ Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (fetal stem cells, FSCs) συνιστούν μια κατηγορία πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων με χαρακτηριστικά ενδιάμεσα των εμβρυονικών και των ενήλικων βλαστικών κυττάρων [39] (Εικόνα 1.24). Χαρακτηρίζονται από περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης σε σχέση με τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, ωστόσο υπερτερούν ως προς την ικανότητα πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης σε σύγκριση με τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα.



Εικόνα 1.24. Ιεραρχική κατάταξη των βλαστικών κυττάρων με βάση την πολυδυναμικότητα και το δυναμικό διαφοροποίησης.

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα απομονώνονται από ποικίλους ιστούς κατά τη διάρκεια της κύησης, όπως ο μυελός των οστών, το αίμα και το ήπαρ του εμβρύου, καθώς και από εξωεμβρυϊκούς ιστούς, όπως ο πλακούντας, το αμνιακό υγρό, η αμνιακή μεμβράνη και το έλυτρο του Wharton [38, 39, 72] (Εικόνα 1.25). Οι εξωεμβρυϊκοί ιστοί παρέχουν το πλεονέκτημα άμεσης διάθεσης μετά τον τοκετό, καθώς επίσης και κατά τη διάρκεια επεμβατικών εξετάσεων προγεννητικού ελέγχου, όπως η βιοψία χοριακών λαχνών και η αμνιοπαρακέντηση [73].



Εικόνα 1.25. Πηγές εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα δεν σχηματίζουν τερατώματα σε *in vivo* μοντέλα και διατηρούν σταθερό καρυότυπο κατά την *in vitro* καλλιέργειά τους. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από χαμηλή ανοσογονικότητα, γεγονός που τους παρέχει πλεονέκτημα σε ενδεχόμενες εφαρμογές κυτταρικής θεραπείας.

Η κατανόηση των βιολογικών μηχανισμών των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων αποτελεί αντικείμενο έρευνας πολλών μελετών, με σκοπό τη δυνατότητα αξιοποίησης αυτών σε εφαρμογές κυτταρικής θεραπείας και αναγεννητικής ιατρικής [38, 39].

1.4 ΠΛΑΚΟΥΝΤΑΣ ΚΑΙ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η εμφάνιση των πλακουντιακών λαχνών περιλαμβάνει την ανάπτυξη τόσο των τροφοβλαστικών όσο και των μεσεγγυματικών ιστικών στοιχείων κατά ένα συντονισμένο τρόπο. Η περαιτέρω διαφοροποίηση των μεσεγγυματικών λαχνών σε ανώριμες ενδιάμεσες

λάχνες ή σε ώριμες ενδιάμεσες λάχνες αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την αύξηση και την ωρίμανση του πλακούντα και, συνεπώς, έχει άμεσο αντίκτυπο στους κυτταρικούς τύπους που μπορούν να απομονωθούν από τον πλακούντα σε διαφορετικές ηλικίες κύησης.

Οι γενετικοί και μοριακοί μηχανισμοί πίσω από την ανάπτυξη του πλακούντα φαίνεται να έχουν σχέση με την πολυδυναμικότητα των πλακουντιακών κυττάρων. Είναι ενδιαφέρον ότι, σε αντίθεση με την κλασσική πρακτική αναζήτησης ειδικών για τον πλακούντα γονιδίων που σχετίζονται με τον έλεγχο αυτής της διαδικασίας, είναι πλέον σαφές ότι τα περισσότερα γονίδια που έχει φανεί να είναι απαραίτητα για την πλακουντιακή ανάπτυξη εμπλέκονται επίσης στην ανάπτυξη και άλλων οργάνων [74]. Μόνο ένας περιορισμένος αριθμός γονιδίων εκφράζονται αποκλειστικά στον πλακούντα [74].

Δεδομένου ότι μεγάλο μέρος του πλακούντα προέρχεται από την έσω κυτταρική μάζα του μοριδίου, η παρουσία εμβρυϊκών προγονικών κυττάρων στον πλακούντα έχει προταθεί από καιρό [75]. Συγκεκριμένα είδη βλαστικών κυττάρων, όπως τροφοβλαστικά, αιμοποιητικά, και μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, έχουν περιγραφεί στον πλακούντα [76-80]. Τα τροφοβλαστικά βλαστικά κύτταρα, γνωστά και ως τροφοενδοδερμικά βλαστικά κύτταρα, ορίζονται ως κύτταρα με δυναμικό να δώσουν γένεση σε όλους τους διαφοροποιημένους τροφοβλαστικούς κυτταρικούς υπότυπους [74, 81]. Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί η ενδεχόμενη δυνατότητα ενός τροφοβλαστικού υποπληθυσμού, των κυτταροτροφοβλαστών του βασικού φθαρτού, να υπόκειται σε πλήρη μετάβαση σε μεσεγχυματικό φαινότυπο όταν διηθούν το μητρικό μεσεγχυματικής προέλευσης στρώμα της μήτρας και τα τοιχώματα των αρτηριών [82]. Κατά το χρόνο αυτό, τα τροφοβλαστικά βλαστικά κύτταρα έχουν περιορισμένο προβλεπόμενο δυναμικό για κλινική εφαρμογή.

1.4.1 Πλακουντιακά μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο πλακούντας χαρακτηρίζεται από σημαντικό μεσεγχυματικό στοιχείο. Ο ρόλος αυτού του στοιχείου στην ανάπτυξη του πλακούντα εξακολουθεί να έχει κάποιες άγνωστες πτυχές, ωστόσο είναι γνωστό ότι σχετίζεται, εν μέρει, με την πολυδυναμικότητα των πλακουντιακών μεσεγχυματικών κυττάρων. Για παράδειγμα, η επιστράτευση αυτών των κυττάρων στηρίζει την αποκαλούμενη αγγειογένεση, η οποία λαμβάνει χώρα κατά την αγγείωση των λαχνών, σε συνδυασμό με την αγγειογένεση που βασίζεται στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών προδρομικών κυττάρων [83]. Αυτά τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα έχουν επίσης και άλλους ρόλους στην ανάπτυξη του πλακούντα, όπως η αποστολή παρακρινών σημάτων για τον έλεγχο της σταθερότητας της κυτταροτροφοβλαστικής σειράς, η οποία με τη σειρά της προσδιορίζει το βαθμό διεισδυτικότητας της τροφοβλάστης [84]. Ωστόσο, ένα σημαντικό μέρος της γνώσης σχετικά με το μεσεγχυματικό πυρήνα του πλακούντα εξακολουθεί να χρειάζεται περαιτέρω διαλεύκανση.

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα του πλακούντα φέρουν μια σειρά από ασυνήθιστα χαρακτηριστικά σε σύγκριση με άλλα μεσεγχυματικά κύτταρα. Πολλαπλασιάζονται πιο γρήγορα σε μια καλλιέργεια σε σύγκριση με κύτταρα που συλλέγονται από εμβρυικό ή

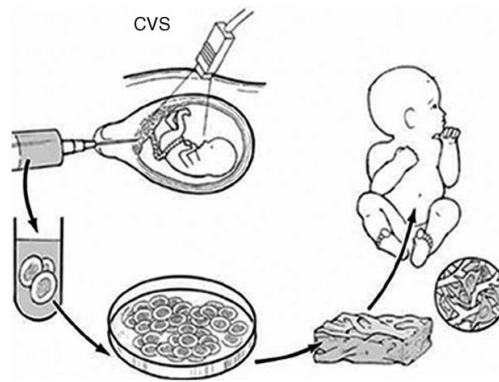
ενήλικο ιστό και με παρόμοιο ρυθμό με αυτόν των μεσεγχυματικών αμνιοκυττάρων [77]. Επίσης, παρόμοια με τα μεσεγχυματικά αμνιοκύτταρα, τα πλακουντιακά μεσεγχυματικά κύτταρα συχνά χρωματίζονται με μονοκλωνικά αντισώματα κυτοκερατίνης, εύρημα το οποίο είναι σπάνιο σε ώριμα μεσεγχυματικά κύτταρα, αλλά σύνηθες σε εμβρυϊκά και ομφαλικά στρωματικά κύτταρα, όγκους λείων μυών και στρωματικά κύτταρα που σχετίζονται με επανορθωτικές επουλωτικές διαδικασίες [77, 85, 86]. Παραμένει ασαφές εάν αυτή η ανοσοαντιδραστικότητα είναι αποτέλεσμα διασταυρούμενης αντίδρασης με ένα κοινό επίτοπο που ανευρίσκεται σε λεία μυϊκά κύτταρα, ινομυοβλάστες και ενδιάμεσου μεγέθους νημάτια κυτοκερατίνης, ή αν πράγματι υποδηλώνει έκφραση κυτοκερατίνης σε μη επιθηλιακά κύτταρα [77, 85].

Εκτός από την ικανότητα διαφοροποίησής τους σε λεία μυϊκά κύτταρα κατά την διάρκεια ανάπτυξης του πλακούντα, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η ικανότητα των πλακουντιακών μεσεγχυματικών κυττάρων να διαφοροποιούνται σε πολλαπλές κυτταρικές σειρές, σύμφωνα με το γνωστό προφίλ των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, παραμένει να καθιερωθεί, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

1.4.2 Εμβρυϊκού τύπου βλαστικά κύτταρα

Η εμβρυονική προέλευση του πλακούντα σχετίζεται με την ιδιότητά του να αποτελεί ένα φυσικό υποψήφιο για την παρουσία δεξαμενής εμβρυικών βλαστικών κυττάρων [75]. Με βάση τις σχετικά λίγες προσπάθειες απομόνωσής τους από τον πλακούντα, τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα φαίνεται να είναι παρόντα στο 0 - <1 % του συνόλου των κυττάρων που είναι παρόντα σε δείγματα πλακούντα [87]. Αυτά τα κύτταρα έχουν κυρίως ταυτοποιηθεί μέσω δεικτών, όπως το CD34, το CD105 και το c-Kit, οι οποίοι δε βρέθηκε να εκφράζονται απαραίτητως ταυτόχρονα και επίσης δεν αποτελούν αποκλειστικούς δείκτες των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων.

Αυτά τα πολυδύναμα κύτταρα παρουσίασαν δυναμικό αυτοανανέωσης, αλλά όσον αφορά το δυναμικό διαφοροποίησης αυτών των κυττάρων χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Μέχρι στιγμής, κάποια από αυτά τα κύτταρα έχει βρεθεί ότι μπορούν να διαφοροποιούνται σε μυϊκά, λιπώδη, οστεογενή, νεφρογενή, νευρικά και ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά δε συνιστούν απαραίτητως έναν ομοιόμορφο πληθυσμό αδιαφοροποίητων κυττάρων [87]. Ο πλακούντας είναι πλούσιος σε αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, τα οποία είναι γνωστό ότι δεν είναι δεσμευμένα αποκλειστικά για την αιμοποιητική σειρά. Εκτός από τα κύτταρα του αίματος, τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα μπορούν επίσης να δώσουν γένεση, τουλάχιστον, σε νευρώνες, ηπατοκύτταρα και μυϊκά κύτταρα και ενδεχομένως να έχουν συμβάλει στα ευρήματα που έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής σχετικά με τη διαφοροποίηση των πλακουντιακών εμβρυϊκού τύπου βλαστικών κυττάρων [70, 88, 89] (Εικόνα 1.26).



Εικόνα 1.26. Μηχανική εμβρυικών ιστών - Χρήση πλακουντιακών κυττάρων για τη χειρουργική αντιμετώπιση συγγενών ανωμαλιών. Τα εμβρυικά κύτταρα που λαμβάνονται μέσω της βιοψίας χοριακών λαχνών (CVS) πολλαπλασιάζονται *in vitro* και τοποθετούνται πάνω σε ένα εμφυτεύσιμο υπόστρωμα. Η προκύπτουσα αυτόλογη βιοπρόσθεση είναι πλέον διαθέσιμη προς εμφύτευση σύντομα μετά τη γέννηση του νεογνού ή ενδομητρίως εάν είναι απαραίτητο [87].

1.4.3 Βλαστικά κύτταρα - Πλακούντας πρώτου τριμήνου της κύησης

Αρκετές μελέτες έχουν αναφερθεί στην παρουσία κυτταρικών πληθυσμών με χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων, τόσο στο αμνιακό υγρό όσο και σε μια σειρά εμβρυϊκών ιστών, όπως στο αίμα ομφάλιου λώρου, το ήπαρ, το μυελό των οστών και τον τελειόμηνο πλακούντα [90-92]. Αυτά τα μεσεγχυματικής προέλευσης εμβρυικά βλαστικά κύτταρα έχουν την ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης σε πολλαπλούς τύπους ιστών [93, 94]. Επιπλέον, αυτός ο τύπος βλαστικών κυττάρων δεν σχετίζεται με την ανάπτυξη τερατώματος όταν εγχέεται σε ενήλικες και είναι είτε μη ανοσογόνος είτε ελάχιστα ανοσογόνος, καθιστώντας τον ιδιαίτερα κατάλληλο για μεταμόσχευση [92]. Αυτά τα χαρακτηριστικά και η σχετική απουσία ηθικών ζητημάτων που σχετίζονται με τη χρήση τους καθιστούν τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ως έναν κατάλληλο τύπο βλαστικών κυττάρων για την επιδιόρθωση νοσούντων ή κατεστραμμένων ιστών [95, 96]. Μάλιστα, η ικανότητα απομόνωσης τέτοιων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της κύησης φαίνεται να παρέχει το πλεονέκτημα έγκαιρης θεραπείας συγγενών ανωμαλιών ή γενετικών ασθενειών στα νεογνά.

Εκτός από τους παραπάνω ιστούς, η παρουσία τέτοιων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων έχει αποδειχθεί και σε χοριακές λάχνες από πλακούντα πρώτου τριμήνου [97-101]. Η βιοψία χοριακών λαχνών (CVS) στα πλαίσια του προγεννητικού ελέγχου εξασφαλίζει τη λήψη αυτών των κυττάρων χωρίς την ανάγκη επιπλέον επεμβατικών διαδικασιών.

Ο Spitalieri και οι συνεργάτες του [100] μελέτησαν την παρουσία κυττάρων με φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων σε βιοψίες χοριακών λαχνών που ελήφθησαν μεταξύ 9^{ης} και 12^{ης} εβδομάδας της κύησης στα πλαίσια του προγεννητικού ελέγχου και απέδειξαν την ύπαρξη ενός τέτοιου κυτταρικού πληθυσμού που χαρακτηρίζεται από την έκφραση γονιδίων ενδεικτικών των βλαστικών κυττάρων (OCT4, SSEA4+, NANOG, SOX2) με δυνατότητα διαφοροποίησης *in vivo* (σε αιμοποιητικά κύτταρα) και *in vitro* (σε νευρωνικά, μυογενή και παγκρεατικά κύτταρα). Οι συγγραφείς καταλήγουν

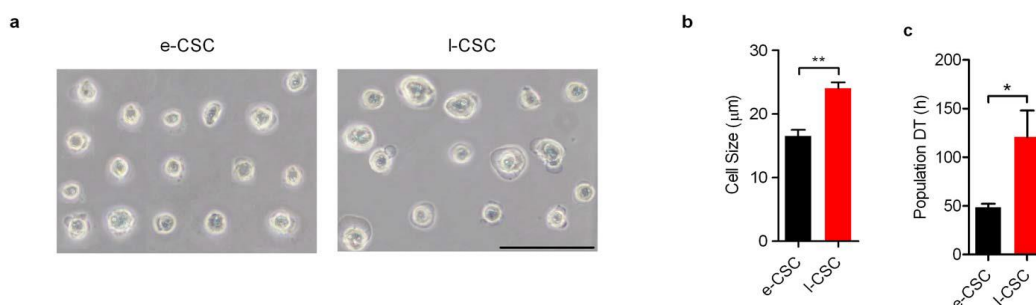
στο συμπέρασμα ότι αυτά τα κύτταρα έχουν μοναδικές ιδιότητες για θεραπευτική εφαρμογή, ειδικά για ενδομήτρια θεραπεία, στην οποία επιδιορθωμένα κύτταρα μπορούν να επανεισαχθούν (με ή χωρίς προηγηθείσα *in vitro* διαφοροποίηση) σε ένα προσβεβλημένο έμβρυο χωρίς τον κίνδυνο τερατογενούς δράσεως.

Ανάλογη μελέτη σε δείγματα χοριακών λαχνών πρώτου τριμήνου, μετά από βιοψίες (CVS), έγινε από τους Rolonι και συνεργάτες του [99], όπου έδειξαν την παρουσία κυττάρων που εκφράζουν δείκτες πολυδυναμικότητας (OCT4, REX1, GATA4), αναπτύσσονται ταχέως και έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους *in vitro* τόσο μεσεγχυματικής σειράς (κυρίως οστεογενής και χονδρογενής σειρά και λιγότερο λιπογενής σειρά) όσο και εξωμεσεγχυματικής σειράς (νευρωνική σειρά). Τα χοριακά βλαστικά κύτταρα παρουσιάζουν υψηλότερο δυναμικό οστεογενούς, χονδρογενούς και νευρογενούς διαφοροποίησης σε σχέση με αντίστοιχα κύτταρα από αμνιακό υγρό, ενώ τα αμνιακά κύτταρα υπερέχουν των χοριακών ως προς το δυναμικό λιπογενούς διαφοροποίησης [92, 102, 103]. Η μελέτη καταλήγει στο συμπέρασμα ότι τα χοριακά βλαστικά κύτταρα παρουσιάζουν λειτουργικά χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα των ενηλίκων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (μυελός των οστών), διαθέτοντας όμως υψηλότερο δυναμικό ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα δεύτερα, καθιστώντας τα ως μια πηγή κυτταρικής θεραπείας και αναγεννητικής ιατρικής χωρίς ηθικούς περιορισμούς.

Τα πρώιμα πλακουντιακά μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, όπως αυτά του πρώτου τριμήνου της κύησης, χαρακτηρίζονται από κάποια πλεονεκτήματα σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα ενός πιο προχωρημένου σταδίου της κύησης καθώς και από τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα [97-99, 104-108].

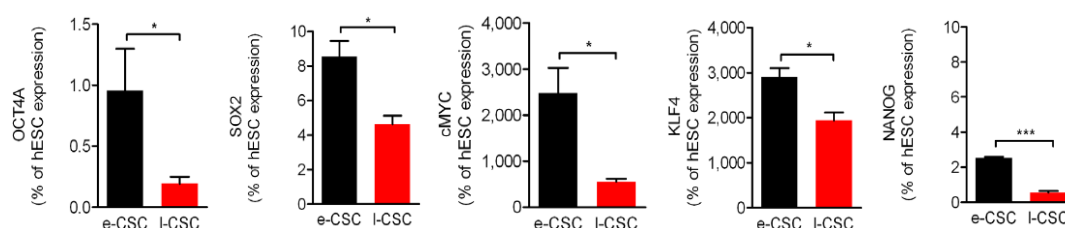
Μια μελέτη των Jones και συνεργατών του [97] διερεύνησε αν τα ανθρώπινα πλακουντιακά χοριακά βλαστικά κύτταρα του πρώτου τριμήνου της κύησης υπερέχουν των αντίστοιχων κυττάρων του τρίτου τριμήνου της κύησης ως προς τις αναγεννητικές τους ικανότητες. Από τη συγκεκριμένη μελέτη φάνηκε ότι τα βλαστικά κύτταρα του πρώτου τριμήνου έφεραν τα χαρακτηριστικά ενός πιο πρώιμου σταδίου της σειράς των βλαστικών κυττάρων και πλεονεκτούσαν σε σύγκριση με τα αντίστοιχα βλαστικά κύτταρα του τρίτου τριμήνου ως προς την πολυδυναμικότητα και την αναγεννητική ικανότητα.

Έτσι, οι Jones και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι τα βλαστικά κύτταρα του πρώτου τριμήνου της κύησης χαρακτηρίζονταν από μικρότερο μέγεθος και ταχύτερη ανάπτυξη (Εικόνα 1.27).



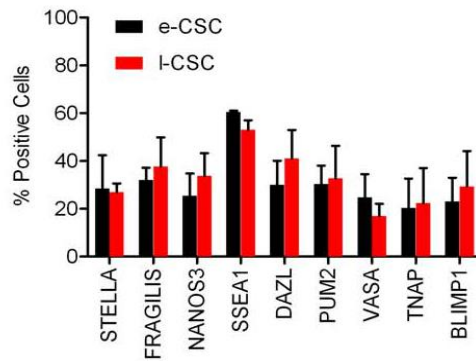
Εικόνα 1.27. Τα χοριακά βλαστικά κύτταρα πρώτου τριμήνου (e-CSC) παρουσιάζουν μικρότερο μέγεθος (a,b) και ταχύτερη ανάπτυξη (c) σε σχέση με τα χοριακά βλαστικά κύτταρα τρίτου τριμήνου (l-CSC). Στο διάγραμμα c, όπου απεικονίζεται ο χρόνος που απαιτείται για το διπλασιασμό ενός πληθυσμού κυττάρων, παρατηρείται ότι τα e-CSC έχουν ταχύτερη ανάπτυξη και χρειάζονται λιγότερο χρόνο για το διπλασιασμό του πληθυσμού τους σε σύγκριση με τα l-CSC [97].

Επιπλέον φάνηκε ότι τα βλαστικά κύτταρα του πρώτου τριμήνου χαρακτηρίζονται από υψηλότερα επίπεδα έκφρασης δεικτών πολυδυναμικότητας (OCT4A, SOX2, c-MYC, KLF4, NANOG) (Εικόνα 1.28) και παράλληλα έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν εμβρυοειδή σωμάτια και να διαφοροποιούνται σε σειρές και των τριών βλαστικών δερμάτων *in vitro*, εύρημα το οποίο δεν παρατηρήθηκε στα βλαστικά κύτταρα του τρίτου τριμήνου. Συγκεκριμένα, τα εμβρυοειδή σωμάτια από τα βλαστικά κύτταρα του πρώτου τριμήνου παρουσίασαν έκφραση δεικτών διαφοροποίησης αντιπροσωπευτικών και των τριών βλαστικών δερμάτων (Nestin και PAX6 για το εξώδερμα, CK3, CK19 και GATA6 για το ενδόδερμα, BMP4 για μεσόδερμα). Η αδυναμία των βλαστικών κυττάρων του τρίτου τριμήνου να σχηματίσουν εμβρυοειδή σωμάτια πιθανόν να σχετίζεται με την απουσία έκφρασης της OCT4A1 ισομορφής, η οποία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση πολυδυναμικότητας [109, 110].



Εικόνα 1.28. Τα χοριακά βλαστικά κύτταρα πρώτου τριμήνου (e-CSC) παρουσιάζουν υψηλότερη έκφραση των γονιδίων πολυδυναμικότητας (OCT4A, SOX2, c-MYC, KLF4, NANOG) σε σχέση με τα χοριακά βλαστικά κύτταρα τρίτου τριμήνου (l-CSC)[97].

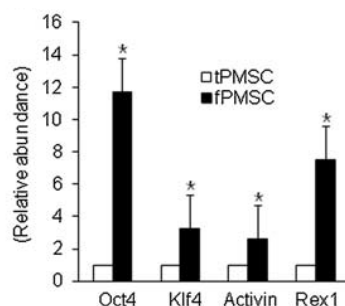
Μια άλλη παρατήρηση της συγκεκριμένης μελέτης ήταν ότι τόσο τα βλαστικά κύτταρα του πρώτου τριμήνου της κύησης όσο και τα βλαστικά κύτταρα του τρίτου τριμήνου βρέθηκαν να εκφράζουν δείκτες που σχετίζονται με τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα (DAZL, STELLA, FRAGILIS, NANOS3, SSEA1 και PUM2) (Εικόνα 1.29) και συνεπώς αυτό το εύρημα μπορεί να υποδηλώνει την κοινή αναπτυξιακή προέλευση αυτών των κυττάρων.



Εικόνα 1.29. Τα χοριακά βλαστικά κύτταρα πρώτου τριμήνου (e-CSC) και τα αντίστοιχα κύτταρα τρίτου τριμήνου (l-CSC) παρουσιάζουν έκφραση δεικτών που απαντώνται στα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα [97].

Τέλος, διαπιστώθηκε ότι τα βλαστικά κύτταρα του πρώτου τριμήνου παρουσιάζουν υψηλότερη επανορθωτική δράση στους ιστούς *in vivo*. Συγκεκριμένα, η μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων πρώτου τριμήνου σε ποντίκια πάσχοντα από ατελή οστεογένεση βελτίωσε την ποιότητα και την πλαστικότητα των οστών, ενώ η εφαρμογή τους σε ένα δερματικό τραύμα επιτάχυνε την επούλωσή του σε σύγκριση με τα βλαστικά κύτταρα τρίτου τριμήνου. Αυτό ίσως να οφείλεται σε ανώτερη ικανότητα ειδικής διαφοροποίησης ή/και εντονότερη παρακρινή δράση των βλαστικών κυττάρων πρώτου τριμήνου. Οι συγγραφείς καταλήγουν στην παρατήρηση ότι ο φαινότυπος των βλαστικών κυττάρων που απομονώνονται από πλακουντιακό χοριακό ιστό εξελίσσεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, με παράλληλη μείωση της πλαστικότητας και αρνητική ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων πολυδυναμικότητας.

Σε ανάλογα συμπεράσματα κατέληξε και η μελέτη των Park και συνεργατών [98], όπου φάνηκε ότι τα χοριακά βλαστικά κύτταρα πρώτου τριμήνου υπερείχαν των αντίστοιχων κυττάρων του τρίτου τριμήνου ως προς τις προοπτικές πολυδυναμικότητας. Πιο συγκεκριμένα, τα χοριακά κύτταρα πρώτου τριμήνου μπορούσαν να καλλιεργηθούν *in vitro* για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από εκείνα του τρίτου τριμήνου και, παράλληλα, παρουσίαζαν 2 έως 11 φορές υψηλότερη έκφραση των γονιδίων πολυδυναμικότητας σε σύγκριση με τα κύτταρα του τρίτου τριμήνου, εύρημα το οποίο υποδηλώνει μεγαλύτερο δυναμικό διαφοροποίησης (Εικόνα 1.30).

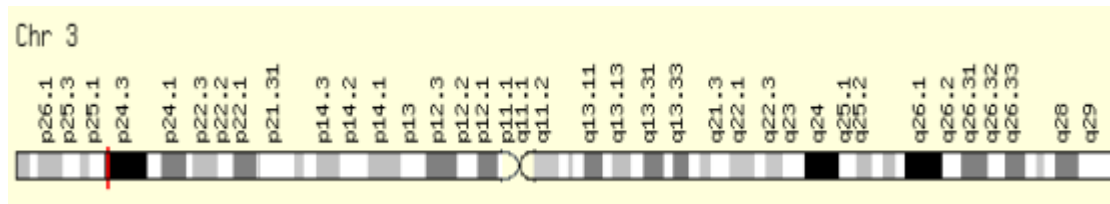


Εικόνα 1.30. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του Oct4, Klf4, Activin και Rex1 mRNA ήταν 2-11 φορές υψηλότερα στα χοριακά βλαστικά κύτταρα πρώτου τριμήνου σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα τρίτου τριμήνου, υποδηλώνοντας ένα υψηλότερο επίπεδο δυναμικού διαφοροποίησης [98].

Αξίζει να αναφέρουμε τη μελέτη των Arakawa και συνεργατών [101], σύμφωνα με την οποία τα χοριακά βλαστικά κύτταρα πρώτου τριμήνου φάνηκε να αποτελούν μια υποσχόμενη επιλογή για την κυτταρική θεραπεία της μυϊκής δυστροφίας Duchenne, για την οποία δεν υπάρχει κάποια αποτελεσματική θεραπεία. Οι χοριακές λάχνες πρώτου τριμήνου αποτελούν το πρωιμότερο εμβρυικό υλικό που μπορεί να ληφθεί για την προγεννητική διάγνωση εμβρυικών ανωμαλιών όπως η μυϊκή δυστροφία Duchenne. Η μυϊκή δυστροφία Duchenne είναι ένα φυλοσύνδετο νόσημα που χαρακτηρίζεται από την έλλειψη δυστροφίνης. Οι συγγραφείς έδειξαν ότι αυτά τα χοριακά κύτταρα εκφράζουν δείκτες πολυδυναμικότητας (NANOG, SOX2) και μπορούν να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε μυϊκά κύτταρα μετά από μυογενή επαγωγή, κατά την οποία η έκφραση των δεικτών NANOG και SOX2 ελαττώνεται ενώ αυξάνει η έκφραση των δεικτών MyoD, Myogenin, Desmin και Dystrophin. Η μελέτη καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η παραγωγή τέτοιων μυϊκών κυττάρων που εκφράζουν τη δυστροφίνη από χοριακά βλαστικά κύτταρα πρώτου τριμήνου δημιουργεί νέες δυνατότητες στη θεραπευτική προσέγγιση της μυϊκής δυστροφίας Duchenne και ενδεχομένως και άλλων νευρομυϊκών διαταραχών.

1.5 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ DAZ

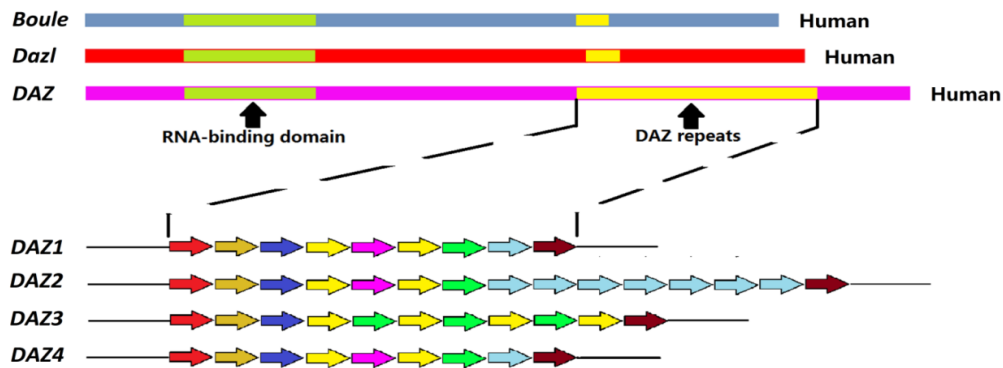
Το γονίδιο DAZL ή DAZLA ανήκει στην οικογένεια DAZ (Deleted In Azoospermia), η οποία περιλαμβάνει άλλα δύο μέλη, το γονίδιο DAZ και το γονίδιο BOULE (ή BOLL). Τα γονίδια αυτά θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες γονιμότητας σε πολλούς οργανισμούς μεταξύ των οποίων και ο άνθρωπος [111]. Το προγονικό μέλος αυτής της οικογένειας είναι το γονίδιο BOULE, το οποίο οδήγησε στη γένεση των άλλων δύο γονιδίων. Πριν από το διαχωρισμό μεταξύ σπονδυλωτών και ασπόνδυλων οργανισμών, προέκυψε το γονίδιο DAZL μέσω διπλασιασμού του γονιδίου BOULE. Αργότερα, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των πρωτεύοντων θηλαστικών, το γονίδιο DAZL οδήγησε στη γένεση του γονιδίου DAZ μέσω πολύπλοκων μηχανισμών (μετάθεση, ενίσχυση) [111-114]. Έτσι, το προγονικό μέλος BOULE εκφράζεται από τις θαλάσσιες ανεμώνες μέχρι και τον άνθρωπο, ενώ το DAZL ανευρίσκεται στα σπονδυλωτά. Το DAZ είναι παρών μόνο σε ανώτερα πρωτεύοντα, ενώ κανένα ομόλογο DAZ δεν ανευρίσκεται σε μονοκύτταρους οργανισμούς [111]. Στα διάφορα είδη, το BOULE και το DAZL ανευρίσκονται σε μονά αντίγραφα σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα (το BOULE ανευρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 και το DAZL στο χρωμόσωμα 3) (Εικόνα 1.31), ενώ το γονίδιο DAZ ανευρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα στο χρωμόσωμα Y [111]. Τα γονίδια αυτής της οικογένειας είναι ιδιαίτερα συντηρημένα. Στους άρρενες, τα γονίδια DAZL και DAZ παρουσιάζουν υψηλή ομολογία, περίπου 90% [113], γεγονός που μαρτυρά την κοινή προέλευσή τους.



Εικόνα 1.31. Η θέση του γονιδίου DAZL στο χρωμόσωμα 3 (3p24).

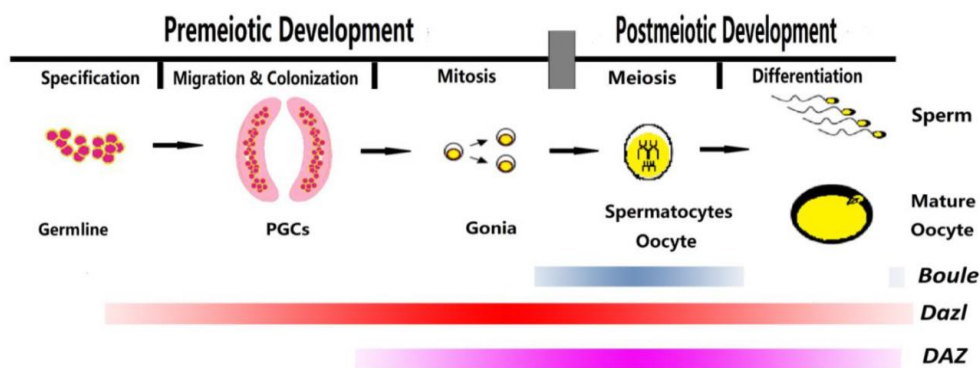
Τα μέλη της οικογένειας DAZ κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συνδέονται με RNA, οι οποίες ανευρίσκονται στον πυρήνα ή / και στο κυτταρόπλασμα των αρσενικών και θηλυκών γεννητικών κυττάρων σε διάφορα στάδια ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης. Η εντόπισή τους φαίνεται ότι σχετίζεται με το ρόλο τους στη ρύθμιση της μετάφρασης των αγγελιοφόρων RNAs (mRNAs) που λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας DAZ θεωρείται ότι δρουν στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης των mRNAs, αλληλεπιδρώντας με RNA ομοπολυμερή μέσω του μοτίβου αναγνώρισης RNA (RRM) και δημιουργώντας σύμπλοκα μεταξύ τους, ή με πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεταφορά και τοποθέτηση των mRNAs ή με τη μετάφραση των mRNAs [115]. Το DAZL συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης, μεταφοράς και τοποθέτησης των mRNAs εκείνων που μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, οι οποίες ελέγχουν τη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη και την ωρίμανση των γεννητικών κυττάρων. Ο συνδυασμός των πρωτεϊνών της οικογένειας DAZ με άλλες πρωτεΐνες διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη γαμετογένεση και στη διατήρησή της κατά τη διάρκεια της εξέλιξης.

Οι πρωτεΐνες αυτές χαρακτηρίζονται από ένα ιδιαίτερα συντηρημένο μοτίβο αναγνώρισης RNA (RRM) και ένα χαρακτηριστικό αριθμό επαναλήψεων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας. Η αλληλουχία αυτή ονομάζεται DAZ, αποτελείται από 24 αμινοξέα και είναι πλούσια σε ασπαραγίνη, τυροσίνη και γλουταμίνη. Οι πρωτεΐνες DAZL και BOULE έχουν ένα μόνο αντίγραφο της αλληλουχίας DAZ, ενώ οι πρωτεΐνες DAZ περιέχουν από 9 έως 15 αντίγραφα της αλληλουχίας. Στα άρρενα πρωτεύοντα ανευρίσκονται πολλαπλά γονίδια DAZ με ποικίλο αριθμό επαναλήψεων της αλληλουχίας DAZ [116] (Εικόνα 1.32). Η αλληλουχία DAZ θεωρείται ότι εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες [117]. Το μοτίβο αναγνώρισης RNA (RRM) συνδέεται με mRNAs αντίστοιχα στις μη μεταφραζόμενες περιοχές τους (UnTranslated Regions – UTRs) [118]. Εκτός από την υψηλή ομολογία ανάμεσα στις πρωτεΐνες DAZL και DAZ, ομολογία παρατηρείται και ανάμεσα στην πρωτεΐνη BOULE και τις άλλες δύο πρωτεΐνες, η οποία εκτιμάται περίπου στο 50-60%. Επιπλέον, η πρωτεΐνη BOULE έχει βρεθεί όμοια ανάμεσα στον άνθρωπο, το ποντίκι και τα ασπόνδυλα. Η πρωτεΐνη DAZL παρουσιάζει ομοιότητα, ως προς την αλληλουχία της, ανάμεσα στον άνθρωπο και το ποντίκι σε ποσοστό περίπου 85% [113].



Εικόνα 1.32. Απεικόνιση της δομής των γονιδίων DAZ στον άνθρωπο. Όλα τα γονίδια (BOULE, DAZL, DAZ) περιέχουν την περιοχή σύνδεσης με RNA και την αλληλουχία DAZ. Στον άνθρωπο ανευρίσκονται πολλαπλά γονίδια DAZ (DAZ1, DAZ2, DAZ3, DAZ4) με ποικίλο αριθμό επαναλήψεων της αλληλουχίας DAZ [111].

Τα γονίδια της οικογένειας DAZ χωρίζονται σε δύο υποομάδες (DAZL υποομάδα και BOULE υποομάδα), ανάλογα με την αλληλουχία τους, την έκφρασή τους και των τύπο των γεννητικών κυττάρων στα οποία εκφράζονται. Η DAZL υποομάδα περιλαμβάνει τα γονίδια DAZ και DAZL. Το γονίδιο DAZL είναι απαραίτητο καθόλη την ανάπτυξη των γεννητικών κυττάρων, ενώ το γονίδιο DAZ είναι λειτουργικό σε αρσενικά γεννητικά κύτταρα όπως γονοκύτταρα/προσπερματογόνια, σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα και σπερματίδες. Η υποομάδα BOULE περιλαμβάνει το γονίδιο BOULE, το οποίο στα περισσότερα είδη εκφράζεται σε μειωτικά κύτταρα [119] (Εικόνα 1.33).



Εικόνα 1.33. Έκφραση των γονιδίων BOULE, DAZL και DAZ κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης στον άνθρωπο [111].

1.5.1 Έκφραση των γονιδίων της οικογένειας DAZ

Τα γονίδια της οικογένειας DAZ εκφράζονται σε συγκεκριμένα είδη και σε διαφορετικά στάδια της γαμετογένεσης των γεννητικών κυττάρων.

Το γονίδιο BOULE εκφράζεται κυρίως κατά το στάδιο της πρόφασης της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης και στα δύο φύλα στα περισσότερα είδη, αν και σε κάποια ασπόνδυλα είδη εμπλέκεται στον καθορισμό της γεννητικής σειράς (germline specification) [120, 121].

Το γονίδιο DAZL παίζει καθοριστικό ρόλο στην ικανότητα των γεννητικών κυττάρων να διαφοροποιούνται ως προς το φύλο είτε σε ωογόνια είτε σε σπερματογόνια [122-125]. Παράλληλα, συμμετέχει στην εξέλιξη της πρόφασης της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης και την ωρίμανση των ωοκυττάρων [126, 127] και των αρσενικών γεννητικών κυττάρων [128-130].

Το γονίδιο DAZ εμπλέκεται στον έλεγχο προμειωτικών και πρώιμων μειωτικών διαδικασιών κατά τη σπερματογένεση στα πρωτεύοντα είδη.

Drosophila

Το μοναδικό μέλος της οικογένειας DAZ που εκφράζεται στη *Drosophila* είναι το γονίδιο BOULE. Η έκφρασή του περιορίζεται στα άρρενα. Επί μεταλλάξεων του γονιδίου, τα σπερματοκύτταρα σχηματίζονται αλλά αποτυγχάνουν να ξεκινήσουν μειωτικές διαιρέσεις [120, 121, 131]. Πιο συγκεκριμένα, η μειωτική πρόφαση είναι φυσιολογική σε μεταλλάξεις του γονιδίου BOULE, αλλά τα επόμενα στάδια της μείωσης είναι ανώμαλα. Η πρωτεΐνη του γονιδίου BOULE εντοπίζεται στον πυρήνα των προμειωτικών γεννητικών κυττάρων και, στη συνέχεια, μετακινείται στο κυτταρόπλασμα κατά την έναρξη της μείωσης [132]. Η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική μετάφραση του γονιδίου *Twine*, το οποίο αποτελεί ομόλογο του γονιδίου *Cdc25*. Το γονίδιο *Cdc25* κωδικοποιεί μια φωσφατάση, η οποία ενεργοποιεί την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω της απομάκρυνσης των φωσφατιδικών ομάδων από τη κινάση CDC2. Η κινάση CDC2 είναι μια κυκλικο-εξαρτώμενη κινάση που σχηματίζει ετεροδιμερή με την Κυκλίνη A και την Κυκλίνη B. Παρόλο που οι πρωτεΐνες της οικογένειας DAZ φαίνεται να έχουν πυρηνικές λειτουργίες, η έξοδος της πρωτεΐνης BOULE από τον πυρήνα της *Drosophila* δεν καταλήγει σε παθολογικό φαινότυπο [132].

Ποντίκι και Αρουραίος

Ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου DAZL είναι άγονα, στερούμενα σχηματισμού σπερματοζωαρίων ή ωοκυττάρων. Η εισαγωγή του ανθρώπινου γονιδίου DAZ σε ένα DAZL-/- ποντίκι ανακτά μερικώς τις ανωμαλίες του αρσενικού φαινότυπου [133]. Η πρωτεΐνη DAZL εκφράζεται στα XX και XY αρχέγονα γεννητικά κύτταρα, μετά τη μετανάστευσή τους στις αρχέγονες γονάδες. Η έκφρασή της ξεκινά περίπου 11,5 ημέρες μετά τη σύλληψη και προτού λάβει χώρα η φυλετική διαφοροποίηση [125]. Σε έμβρυα με απουσία του γονιδίου DAZL από αμιγώς ίδιες γονοτυπικές σειρές ποντικών (inbred lines), τα XX ή XY αρχέγονα γεννητικά κύτταρα μεταναστεύουν στις γονάδες και παραμένουν σε μια φυλετικά αδιαφοροποίητη κατάσταση, χωρίς να αναπτύσσουν αρσενικά ή θηλυκά

χαρακτηριστικά, αποτυγχάνουν να εξελιχθούν και τελικά αποπίπτουν [122-124]. Επιπλέον, στα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα, η μεθυλίωση του DNA ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του DAZL [134]. Η διαφοροποίηση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων σε κύτταρα παρόμοια των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων (PGC-like cells) εξαρτάται από το γονίδιο DAZL [123]. Η απουσία του γονιδίου DAZL διαταράσσει τη συνέχεια των βασικών γενετικών και επιγενετικών γεγονότων της μετα-μεταναστευτικής ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων *in vivo* και *in vitro*. Επιπλέον, η απουσία του γονιδίου DAZL καταλήγει σε μείωση του αριθμού των μετα-μεταναστευτικών γεννητικών κυττάρων, ανώμαλη έκφραση των δεικτών πολυδυναμικότητας και διαφοροποίησης, αποτυχία εκτέλεσης πυρηνικού επαναπρογραμματισμού και παραγωγής εμβρυικών γεννητικών κυττάρων και αδυναμία προόδου στη μείωση [123]. Μελέτες σε ποντίκια με μεικτό γονοτυπικό υπόβαθρο (mixed strain background) δεν έδειξαν ανωμαλίες σε XY DAZL-/- γεννητικά κύτταρα στις 15,5 ημέρες μετά τη σύλληψη [129]. Σε αυτά τα ποντίκια, τα σπερματογόνια παραμένουν στους DAZL-/- όρχεις και αναπτύσσονται σε σπερματοκύτταρα σε λίγες περιπτώσεις. Ωστόσο, ακόμα και αυτά τα κύτταρα τελικά υφίστανται απόπτωση και ποτέ δεν αναπτύσσονται πέρα από το στάδιο των παχυταινίας [130]. Στους ενήλικες όρχεις, η πρωτεΐνη DAZL εμφανίζεται στον πυρήνα των μιτωτικών σπερματογόνιων, φθάνει τα υψηλότερα επίπεδα στο κυτταρόπλασμα των σπερματοκυττάρων στο στάδιο της παχυταινίας και ελαττώνεται στα τελευταία στάδια της σπερματογένεσης [128, 129]. Στα θήλεα, 13,5 ημέρες μετά τη σύλληψη, παρατηρούνται γεννητικά κύτταρα θετικά για το DAZL στην ωοθήκη, τα οποία διασπείρονται ομοιόμορφα στο όργανο περίπου 15,5 ημέρες μετά τη σύλληψη. Στις 18,5 ημέρες μετά τη σύλληψη και την ημέρα 0 μετά τη γέννηση, τα θετικά για το DAZL ωοκύτταρα εντοπίζονται κυρίως στην περιφέρεια της ωοθήκης [127]. Η έκφραση του γονιδίου DAZL παραμένει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ωοκυττάρων και της μειωτικής ωρίμανσης [126]. Αποσιώπηση του γονιδίου DAZL σε ωοκύτταρα ποντικών που βρίσκονται στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου οδηγεί σε ανωμαλίες στην ωρίμανση των ωοκυττάρων, ενώ αποσιώπηση του γονιδίου DAZL σε ωάρια οδηγεί σε ανωμαλίες της μετάβασης από το ωάριο στο ζυγώτη [126]. Οι όψιμες λειτουργίες του DAZL στα ωοκύτταρα φαίνεται να διατηρούνται και σε άλλα σπονδυλωτά είδη, καθώς το γονίδιο DAZL εκφράζεται κατά την όψιμη ωογένεση στους χοίρους και στο είδος *Xenopus* [135, 136]. Ο χρόνος απώλειας των θηλυκών γεννητικών κυττάρων εξαρτάται από το γενετικό υπόβαθρο. Έτσι, σε αμιγώς ίδιες γονοτυπικές σειρές ποντικών (inbred lines), παρατηρήθηκε σημαντική απώλεια των γεννητικών κυττάρων στις 14,5 ημέρες μετά τη σύλληψη. Ωστόσο, σε θηλυκά ποντίκια με μεικτό γονοτυπικό υπόβαθρο (mixed strain background), τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα που στερούνται του γονιδίου DAZL (DAZL null) πολλαπλασιάζονται και εισέρχονται στη μείωση κανονικά. Από την 17,5 ημέρα μετά τη σύλληψη και μετά, παρατηρείται σημαντική απώλεια των ωοκυττάρων. Κατά την 4^η ημέρα μετά τη γέννηση, δεν υπάρχουν ωοκύτταρα στις ωοθήκες λόγω αποτυχίας προόδου μέσω της μειωτικής πρόφασης.

Εκλεκτική αναστολή του γονιδίου BOULE οδηγεί σε αρσενική στειρότητα, λόγω διακοπής της σπερματογένεσης στο στάδιο της στρογγυλής σπερματίδας, ενώ τα θηλυκά παραμένουν γόνιμα. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο BOULE δεν είναι απαραίτητο για την ωογένεση στα ποντίκια [137].

Στους αρουραίους, η έκφραση των γονιδίων DAZ έχει μελετηθεί μόνο στους ενήλικους όρχεις. Η πρωτεΐνη DAZL εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα στο κυτταρόπλασμα των σπερματοκυττάρων στο στάδιο της παχυταινίας όταν σχηματίζεται το συναπτονημικό σύμπλεγμα. Κατόπιν η πρωτεΐνη DAZL εξαφανίζεται στα σπερματοκύτταρα στο στάδιο της διπλοταινίας όταν τα χρωμοσώματα αποσυνάπτονται [138].

Άνθρωπος

Στο πρώτο τρίμηνο, η πρωτεΐνη DAZL εντοπίζεται στον πυρήνα των γεννητικών κυττάρων (ωογονίων και προσπερματογονίων) στις γονάδες και των δύο φύλων. Στο δεύτερο τρίμηνο, στις ωοθήκες, η πρωτεΐνη DAZL εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των ωοκυττάρων που βρίσκονται στη μείωση, ενώ στους εμβρυικούς όρχεις, η πρωτεΐνη DAZL ανιχνεύεται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των γονοκυττάρων. Τα ωοκύτταρα των αρχέγονων ωοθυλακίων παρουσιάζουν χαμηλή ή καθόλου έκφραση του γονιδίου DAZL [137, 139]. Έκφραση του γονιδίου DAZL παρατηρήθηκε στα κοκκώδη κύτταρα από τους Brekhman και συνεργάτες [139]. Η έκφραση των πρωτεϊνών DAZL και BOULE στα θηλυκά γεννητικά κύτταρα, κατά τη διάρκεια της εμβρυικής περιόδου, μελετήθηκε από τους He και συνεργάτες [127], οι οποίοι επιβεβαίωσαν την έκφραση του DAZL στα ωογόνια και στα μειωτικά ωοκύτταρα και επιπλέον παρατήρησαν ότι η πρωτεΐνη BOULE εκφράζεται παροδικά σε ωοκύτταρα πιο προχωρημένων μειωτικών σταδίων. Πιο σπάνια, παρατήρησαν γεννητικά κύτταρα, στα οποία εκφράζονταν τόσο η πρωτεΐνη DAZL όσο και η πρωτεΐνη BOULE. Σε αντίθεση με την πρωτεΐνη BOULE, η πρωτεΐνη DAZL συνεχίζει να εκφράζεται σε ωοκύτταρα εντός των αρχέγονων ωοθυλακίων. Υπάρχουν και άλλες μελέτες που περιγράφουν την παρουσία μεταγράφων BOULE στις ανθρώπινες εμβρυικές ωοθήκες [137, 140]. Έκφραση του γονιδίου DAZL έχει παρατηρηθεί σε ωοκύτταρα διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων της ενήλικης ωοθήκης [112], ενώ η πρωτεΐνη DAZL έχει ανιχνευθεί στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων της έσω θήκης των ωοθυλακίων και των ωχρινοποιημένων κυττάρων του ωχρού σωματίου [141].

Στους άνδρες, η πρωτεΐνη BOULE ανιχνεύθηκε στο κυτταρόπλασμα σπερματοκυττάρων στο στάδιο της παχυταινίας στους ενήλικους όρχεις. Η έκφρασή της επιμένει κατά τη διάρκεια της μείωσης και ελαττώνεται στις πρώιμες σπερματίδες. Η πρωτεΐνη DAZ εκφράζεται στα σπερματογόνια, στα σπερματοκύτταρα και στα μεταμειωτικά γεννητικά κύτταρα μέχρι τα σπερματοζωάρια [142, 143]. Σύμφωνα με κάποιες μελέτες, σε πλήρη έλλειψη των γονιδίων DAZ, η παραγωγή σπερματοζωαρίων συνεχίζεται σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα, ενώ έχουν αναφερθεί και σπάνιες περιπτώσεις φυσικών συλλήψεων. Ενδεχομένως, αυτό μπορεί εν μέρει να ερμηνευθεί από την ύπαρξη λειτουργικής επικάλυψης ανάμεσα στις πρωτεΐνες DAZ και DAZL [144-149].

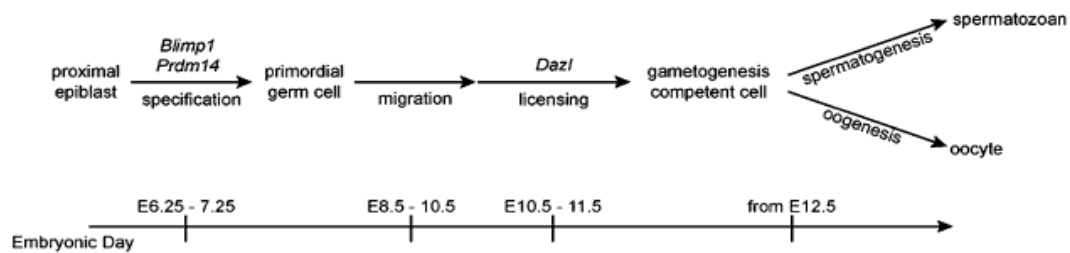
Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών DAZL, BOULE και DAZ ωθεί τόσο τα ανθρώπινα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (ES), όσο και τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPS) να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα παρόμοια των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων (PGC-like cells) και ευνοεί την επακόλουθη ωρίμανση και πρόοδο τους διαμέσου της μείωσης [140, 150], καταδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο τον ρόλο αυτών των γονιδίων στον καθορισμό των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων στα θηλαστικά.

1.5.2 Έκφραση του γονιδίου DAZL

Το γονίδιο DAZL είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των γεννητικών κυττάρων σε διάφορα είδη. Η έκφραση του γονιδίου DAZL κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων της γαμετογένεσης ενδεχομένως να συνεπάγεται το σημαντικό ρόλο αυτού του γονιδίου στη ρύθμιση της ανδρικής και γυναικείας αναπαραγωγής από την ανάπτυξη των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων μέχρι τη διαφοροποίηση και ωρίμανση των γεννητικών κυττάρων από τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα.

Στους ανθρώπους, το γονίδιο DAZL εκφράζεται νωρίς στα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα στις εμβρυικές γονάδες [119] και στη συνέχεια καθόλη τη γαμετογένεση [125, 139, 142, 151]. Στο γένος *Xenopus*, η αναστολή του XDAZL οδηγεί σε ελαττωματική μετανάστευση και σε μείωση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων [152]. Στα ποντίκια, η αποσιώπηση του γονιδίου DAZL οδηγεί σε διακοπή της μείωσης των αρσενικών και θηλυκών γεννητικών κυττάρων [129]. Ο φαινότυπος των γεννητικών κυττάρων των ποντικών μπορεί εν μέρει να ανακτηθεί μέσω ενός ανθρώπινου DAZ διαγονιδίου (transgene) [133].

Σύμφωνα με μια μελέτη των Gill και συνεργατών (2011), η «αδειοδότηση» για τη διαδικασία της γαμετογένεσης εξαρτάται από την πρωτεΐνη DAZL, η οποία λειτουργεί ως κλειδί που καθορίζει τη φυλετική διαφοροποίηση των εμβρυικών γεννητικών κυττάρων. Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα μεταναστεύουν στις αναπτυσσόμενες γονάδες και διαφοροποιούνται σε ωκύτταρα ή σπερματοζωάρια. Ο φυλετικός προορισμός τους δεν καθορίζεται από τη χρωμοσωμική σύσταση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων (XX ή XY), αλλά από τη φυλετική ταυτότητα της εμβρυικής γονάδας στην οποία εισέρχονται. Μελέτησαν *in vivo* το ρόλο του γονιδίου DAZL τόσο σε ωθηκικά όσο και σε ορχικά γεννητικά κύτταρα. Διαπιστώθηκε ότι τα γεννητικά κύτταρα σε C57BL/6 DAZL^{-/-} έμβρυα ποντικών (είτε XX είτε XY) μεταναστεύουν στις γονάδες αλλά παραμένουν σε μια φυλετικά αδιαφοροποίητη κατάσταση όμοια με εκείνη των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων, χωρίς να αναπτύσσουν ούτε αρσενικά ούτε θηλυκά χαρακτηριστικά. Έτσι, παρόλο που οι προηγούμενες διαδικασίες του καθορισμού των γεννητικών κυττάρων και της μετανάστευσης δεν επηρεάζονται από την απουσία του γονιδίου DAZL, τα γεννητικά κύτταρα στα C57BL/6 DAZL^{-/-} έμβρυα δεν παρουσιάζουν ανταπόκριση στα φυλοκαθοριστικά ερεθίσματα από την ωθήκη ή τον όρχι. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα τόσο στα XX όσο και στα XY έμβρυα υποβάλλονται σε μια βιολογική διαδικασία «αδειοδότησης», η οποία ενεργοποιεί την αποτελεσματική γαμετογένεση επιτρέποντας την ανταπόκριση των γεννητικών κυττάρων σε θηλεοποιητικά ή αρρενοποιητικά ερεθίσματα που προέρχονται από την εμβρυική ωθήκη ή όρχι και την έναρξη αποτελεσματικής ωογένεσης ή σπερματογένεσης. Η «αδειοδότηση» αυτή λειτουργεί ως κλειδί για το πέρασμα από τις κοινές για τα δύο φύλα εμβρυικές διαδικασίες – καθορισμός των γεννητικών κυττάρων και μετανάστευση- στις ειδικές για το φύλο διαδικασίες της ωογένεσης και σπερματογένεσης [122] (Εικόνα 1.34).



Εικόνα 1.34. Μονοπάτι της *in vivo* ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων. Καθορισμός των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων από επιβλαστικά κύτταρα μέσω εξωκυττάρων οδών σηματοδότησης και της δραστηριότητας καθοριστικών για τα γεννητικά κύτταρα παραγόντων όπως του Blimp1 και Prdm14 [153-155]. Μετανάστευση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων στην αναπτυσσόμενη γονάδα. Έκφραση του γονιδίου DAZL από τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα και εξασφάλιση «αδειοδότησης». Σχηματισμός κυττάρων ικανών για γαμετογένεση, τα οποία είναι αρχικά αδιαφοροποίητα ως προς το φύλο, αλλά έχουν τη δυνατότητα έναρξης σπερματογένεσης ή ωογένεσης κάτω από την επίδραση αρρενοποιητικών ή θηλεοποιητικών ερεθισμάτων από τη γονάδα [122].

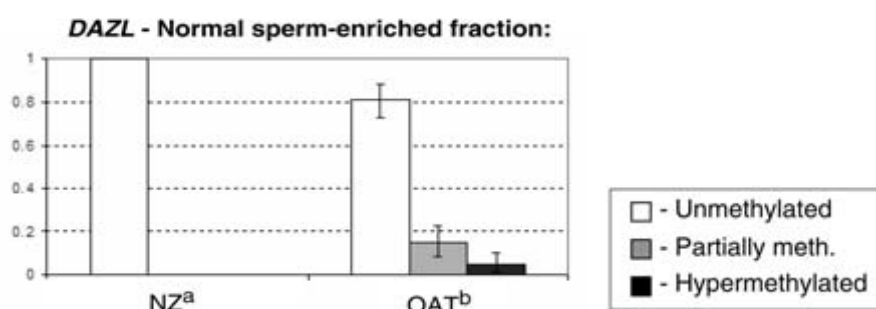
1.5.3 DAZL και σπερματογένεση

Κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, έκφραση του γονιδίου έχει παρατηρηθεί στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των γονοκυττάρων, των σπερματογονίων και των πρωτογενών σπερματοκυττάρων [156]. Με την έναρξη της μείωσης, η έκφραση του DAZL μετατοπίζεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Συνεπώς η πρωτεΐνη DAZL εντοπίζεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα των δευτερογενών σπερματοκυττάρων, σπερματίδων και σπερματοζωαρίων [151, 157]. Επιπλέον, μετάγραφα του γονιδίου DAZL έχουν ανιχνευθεί σε κύτταρα Sertoli [158-160].

Το ποσό των μεταγραφικών προϊόντων του γονιδίου DAZL ελαττώνεται στους όρχεις αζωοσπερμικών ανδρών σε σύγκριση με τους γόνιμους άνδρες [160]. Μια μελέτη των Teng και συνεργατών έδειξε ότι ένας πολυμορφισμός (T54A) στην περιοχή σύνδεσης του RNA της πρωτεΐνης DAZL έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία των Ταϊβανών στην εμφάνιση σοβαρής δυσλειτουργίας της σπερματογένεσης [161, 162], κάτι το οποίο δεν ισχύει για την Καυκάσια φυλή [162-164]. Σε μεταλλαγμένα άρρενα ποντίκια που στερούνται της δράσης του γονιδίου DAZL, τα γεννητικά κύτταρα εξαφανίζονται μεταξύ της 15^{ης} και 19^{ης} ημέρας της εμβρυικής ανάπτυξης [151], αρκετά πριν την έναρξη της σπερματογένεσης. Η πλήρης έλλειψη DAZL αντιγράφων, όπως συμβαίνει σε πλήρεις ελλείψεις της περιοχής AZFc του Υ χρωμοσώματος, οδηγεί σε υποσπερματογένεση [165], ενώ αντίστοιχες ανωμαλίες του γονιδίου DAZL οδηγούν σε διακοπή της σπερματογένεσης [124, 129, 130].

Ο Paulo Navarro-Costa με τους συνεργάτες του (2010) διερεύνησαν τη σχέση ανάμεσα στην ανώμαλη σπερματογένεση και σε επιγενετικές διαταραχές σε γονίδια ειδικά για τη γεννητική σειρά. Η απόλυτα ισορροπημένη επίδραση των επιγενετικών παραγόντων, από το στάδιο του αρχέγονου γεννητικού κυττάρου, είναι απαραίτητη για την εγκατάσταση, τη διατήρηση και την εξέλιξη της γεννητικής σειράς [131]. Προγραμματισμένες αλλαγές των γεννητικών κυττάρων ως προς το επίπεδο μεθυλίωσης του DNA λειτουργούν ως έναυσμα για τη γαμετογένεση, έτσι όπως φαίνεται από τα δύο κύματα απομεθυλίωσης που

εμφανίζουν τα αναπτυσσόμενα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα [166]. Μετά το αρχικό κύμα απομεθυλίωσης στα μεταναστεύοντα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα, ένα δεύτερο κύμα επαναπρογραμματισμού λαμβάνει χώρα σύντομα μετά την εγκατάστασή τους στις αναπτυσσόμενες γονάδες [134]. Το δεύτερο αυτό κύμα αφορά στην ενεργοποίηση των υπεύθυνων για τη διαφοροποίηση των γεννητικών κυττάρων γονιδίων μέσω απομεθυλίωσης του DNA των CpG νησιδίων (CGIs) του υποκινητή (promoter) τους. Συνεπώς, η έναρξη της έκφρασης των ειδικών για τη γεννητική σειρά γονιδίων εξαρτάται από την εκδήλωση κατάλληλων επιγενετικών γεγονότων. Τα γεγονότα αυτά θα πρέπει να λαμβάνουν χώρα καθόλη την εμβρυική ανάπτυξη, καθώς και μετά τη γέννηση προκειμένου να επιτευχθεί φυσιολογική σπερματογένεση. Όσον αφορά το γονίδιο DAZL, ο υποκινητής CGI του γονιδίου εμφανίζεται απομεθυλιωμένος στα γεννητικά κύτταρα [115, 167]. Πειράματα σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η έκφραση του γονιδίου DAZL επάγεται μετά από την εκλεκτική απομεθυλίωση του DNA των υπεύθυνων για τη διαφοροποίηση των γεννητικών κυττάρων γονιδίων στα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα που έχουν εγκατασταθεί στις γονάδες [123, 134]. Στην παρούσα μελέτη των Paulo Navarro-Costa και συνεργατών, παρατηρήθηκε ότι οι επιγενετικές διαταραχές του γονιδίου DAZL, με τη μορφή της αυξημένης μεθυλίωσης, σχετίζονται με την εμφάνιση ολιγοασθενοτερατοσπερμίας [168] (Εικόνα 1.35).



Εικόνα 1.35. Μη μεθυλιωμένο (Unmethylated) : <20 % μεθυλιωμένων CpGs. Μερικώς μεθυλιωμένο (Partially meth.) : 20-80 % μεθυλίωση. Υπερμεθυλιωμένο (Hypermethylated) : > 80 % μεθυλίωση. Κατά τη σύγκριση κάθε κατηγορίας μεθυλίωσης ανάμεσα στις δύο συγκρινόμενες ομάδες (νορμοζωοσπερμία vs ολιγοασθενοτερατοσπερμία), παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,001$ – Fisher's exact test) [168].

1.5.4 DAZL και ωογένεση

Κατά τη διάρκεια της ωογένεσης, το γονίδιο DAZL εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα των ωογονίων και των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων στις εμβρυικές και ενήλικες ωοθήκες [139, 142, 169, 170].

Επιπλέον, έκφραση του γονιδίου DAZL έχει διαπιστωθεί στα κοκκώδη κύτταρα των αρχέγονων ωοθυλακίων [139, 142], στα κύτταρα της θήκης των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων [169] και στα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα του ωχρού σωματίου [141].

Μια μελέτη των Cauffman και συνεργατών (2005) ανέδειξε τη μεταγραφή του γονιδίου DAZL στα τελευταία στάδια ωρίμανσης του ωαρίου, στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα και κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη. Η ανεύρεση μεταγράφων του γονιδίου DAZL στα τελευταία στάδια της ωογένεσης και κατά τους δυο πρώτους κυτταρικούς κύκλους της προεμφυτευτικής ανάπτυξης (στάδιο των τεσσάρων κυττάρων) ήταν αναμενόμενη καθώς το γονίδιο DAZL είναι ένας δείκτης γεννητικών κυττάρων. Τα μετάγραφα που ανευρέθηκαν σε αυτή τη φάση προέρχονταν από το μητρικό γονιδίωμα. Κατά τη διάρκεια του τρίτου κυτταρικού κύκλου, το γονίδιο DAZL παρουσίασε ένα μεταβαλλόμενο πρότυπο έκφρασης με μεταγραφή του γονιδίου DAZL σε μερικά μόνο από τα βλαστομερίδια, κάτι το οποίο ενδεχομένως να σχετίζεται με τη μετάβαση από το μητρικό στον εμβρυϊκό έλεγχο έκφρασης και τις αντίστοιχες μεταβολές στα επίπεδα του mRNA. Μετά τον τρίτο κυτταρικό κύκλο (στάδιο των οκτώ κυττάρων), παρατηρήθηκε συνεχής παρουσία μεταγράφων DAZL, γεγονός που υποδηλώνει τον εμβρυϊκό έλεγχο της μεταγραφής του γονιδίου DAZL. Συνεπώς, μετάγραφα του DAZL ανιχνεύθηκαν τόσο σε ωάρια, ζυγώτες και έμβρυα μέχρι το στάδιο των τεσσάρων κυττάρων όσο και σε έμβρυα με περισσότερα από οκτώ κύτταρα. Αυτό υποδηλώνει ότι η έκφραση του γονιδίου DAZL δεν περιορίζεται στο μητρικό έλεγχο, αλλά υπόκειται και στον έλεγχο από το εμβρυϊκό γονιδίωμα. Όσον αφορά τις βλαστοκύστες, τα μετάγραφα ανιχνεύονταν μόνο σε καλής ποιότητας βλαστοκύστες και συγκεκριμένα στην πολυδύναμη εσωτερική κυτταρική μάζα (που θα οδηγήσει στην ανάπτυξη του εμβρύου *in vivo*, ενώ μπορεί να οδηγήσει και στο σχηματισμό εμβρυικών βλαστικών κυττάρων *in vitro*) και στο διαφοροποιημένο τροφοεκτόδερμα (που θα οδηγήσει στην ανάπτυξη του πλακούντα). Η ανεύρεση των DAZL μεταγράφων στην εσωτερική κυτταρική μάζα και στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ήταν αναμενόμενη καθώς και οι δύο τύποι κυττάρων μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό γεννητικών κυττάρων, κάτι το οποίο όμως δεν ισχύει για τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος. Συνεπώς η σχετιζόμενη με την ποιότητα έκφραση του γονιδίου DAZL στις βλαστοκύστες, και ιδιαίτερα η μη αναμενόμενη έκφρασή του στα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος, ενδεχομένως να υποδηλώνει τη συμμετοχή του γονιδίου και σε άλλες λειτουργίες εκτός της ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων [112].

Μια μελέτη του Tung και των συνεργατών του (2006) συσχέτισε πολυμορφισμούς και ελλείψεις του γονιδίου DAZL με μεταβολές της γονιμότητας στους ανθρώπους και σε άλλους οργανισμούς και, συγκεκριμένα, συσχέτισε αυτές τις μεταλλάξεις με την ηλικία εμμηνόπαυσης ή / και τον αριθμό των σπερματοζωαρίων. Συγκεκριμένα, η μελέτη αυτή έδειξε ότι η ομοζυγωτία ως προς τον πολυμορφισμό Arg115Gly σε γυναίκα ασθενή οδήγησε σε 46XX αυτόματη πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια στην ηλικία των 34 ετών, χωρίς την ικανότητα τεκνοποίησης προ της εγκατάστασης της ωοθηκικής ανεπάρκειας. Επιπλέον, η ομοζυγωτία ως προς τον πολυμορφισμό Asn10Cys σε άντρα ασθενή οδήγησε σε αζωοσπερμία [171]. Οι παραπάνω παρατηρήσεις έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από την μελέτη των Ruggiu και συνεργατών (1997), όπου ποντίκια ετερόζυγα με έλλειψη του DAZL στο ένα αλληλίο είναι γόνιμα (ή τουλάχιστον υπογόνιμα), ενώ τα ποντίκια που είναι ομόζυγα με έλλειψη του DAZL και στα δύο αλληλία είναι μη γόνιμα και στα δύο φύλα [129].

1.5.5 DAZL και καρκίνος

Οι Lifschitz-Mercer και συνεργάτες έδειξαν την παρουσία σταθερής πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου DAZL σε διάσπαρτα κύτταρα μη ταξινομημένου τύπου νεοπλασιών γεννητικών κυττάρων των ορχικών σωληναρίων (Intratubular germ cell neoplasias –IGCN- of the unclassified type), καθώς και σε ορισμένα σεμινώματα των σπερματικών σωληναρίων. Έκφραση του γονιδίου DAZL φάνηκε και σε καθαρά σεμινώματα, ενώ η ύπαρξη μονήρων ανοσοθετικών κυττάρων διαπιστώθηκε σε περιοχές σεμινωμάτων μεικτών νεοπλασιών γεννητικών κυττάρων. Έκφραση του γονιδίου DAZL δεν παρατηρήθηκε σε μη σεμινώματα [172].

Μια μελέτη της Elise Ruark με τους συνεργάτες της έδειξε την ύπαρξη εννέα διαφορετικών γονιδιακών θέσεων που παρουσιάζουν συσχέτιση με τον καρκίνο των όρχεων. Μεταξύ αυτών των θέσεων περιλαμβάνεται και το γονίδιο DAZL, όπου ένας πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου (SNP) αυτού του γονιδίου (rs10510452 A/G) βρέθηκε να εμφανίζεται σε νεαρούς άνδρες ασθενείς. Συνεπώς, ο πολυμορφισμός αυτός του γονιδίου DAZL εμπλέκεται στον καρκίνο των όρχεων και μαζί με τους υπόλοιπους οκτώ πολυμορφισμούς άλλων γονιδίων αντιπροσωπεύουν ένα επιπλέον ποσοστό της τάξεως του 4 – 6 % του οικογενούς κινδύνου ανάπτυξης ορχικού καρκίνου [173].

Έκφραση του γονιδίου DAZL, καθώς επίσης και άλλων γονιδίων δεικτών των ανθρωπίνων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, όπως το OCT4, SOX2, NANOG, STELLAR και GDF3, διαπιστώθηκε σε δείγματα σεμινωμάτων και καρκίνου του μαστού. Μια τέτοια παρατήρηση υποδηλώνει ότι τα γονίδια των βλαστικών κυττάρων, μεταξύ των οποίων και το DAZL, ενδεχομένως να παίζουν ρόλο στην εξέλιξη ορισμένων τύπων καρκινώματος ή να συνιστούν σημαντικούς δείκτες ογκογένεσης [174].

Τέλος, με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού και τη χρήση αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης DAZL, φάνηκε η έκφραση του γονιδίου DAZL σε κάποιους τύπους καρκίνου, ενώ δεν παρατηρείται στους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς, με εξαίρεση τους όρχεις. Έτσι, τα επίπεδα χρώσης βρέθηκαν υψηλά σε δείγματα από καρκίνο των όρχεων, ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα ήταν μεσαίου βαθμού σε δείγματα από καρκίνο του παχέος εντέρους, του ενδομητρίου, του μαστού και του ήπατος, σε αντίθεση με τον καρκίνο των ωοθηκών και του προστάτη, όπου τα επίπεδα χρώσης βρέθηκαν χαμηλά [175, 176].

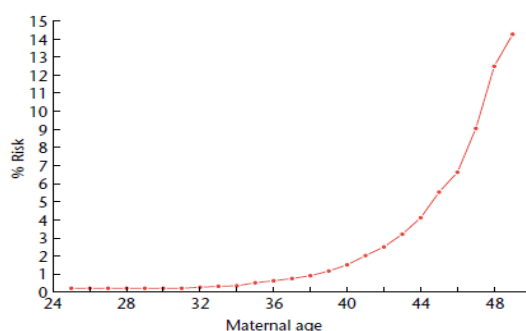
1.6 ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ως προγεννητικός έλεγχος ορίζεται η διαδικασία ελέγχου πιθανής ύπαρξης εμβρυϊκών ανωμαλιών ή γενετικών διαταραχών με σκοπό την παροχή πληροφοριών χρήσιμων για τη διαχείριση μιας κύησης καθώς και για την κατάλληλη μεταγεννητική φροντίδα.

Οι ενδείξεις για τη διενέργεια προγεννητικού ελέγχου [177, 178] είναι :

- 1) Προχωρημένη ηλικία μητέρας (≥ 35 έτη)
- 2) Εθνικότητα υψηλού κινδύνου για γενετική νόσο (π.χ. εβραϊκή φυλή Ashkenazi για νόσο Tay-Sachs)
- 3) Πολλαπλές απώλειες κύσεων – καθ' ἑξιν αποβολές (≥ 3)
- 4) Παθολογικά υπερηχογραφικά ευρήματα
- 5) Παθολογικοί βιοχημικοί δείκτες της μητέρας
- 6) Δυσμενές αποτέλεσμα μη-επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου (υψηλός κίνδυνος)
- 7) Γνωστό ή πιθανό οικογενειακό ιστορικό χρωμοσωμικής ανωμαλίας
 - A) Γονείς με χρωμοσωμικές ανωμαλίες
 - B) Προηγούμενο παιδί με χρωμοσωμική ανωμαλία
 - Γ) Προηγούμενο παιδί με δυσμορφία
- 8) Υψηλός κίνδυνος μονογονιδιακών νοσημάτων (π.χ. κυστική ίνωση, νόσος Huntington, μεσογειακή αναιμία, δρεπανοκυτταρική αναιμία)
- 9) Φυλοσύνδετα νοσήματα (π.χ. μυϊκή δυστροφία Duchenne, αιμορροφιλία)
- 10) Συγγενής διαταραχή του μεταβολισμού (π.χ. φαινυλκετονουρία)
- 11) Συγγενείς λοιμώξεις (ερυθρά, τοξοπλάσμωση, κυτταρομεγαλοϊός)
- 12) Άγχος μητέρας, επιθυμία γονέων
- 13) Έκθεση σε τερατογόνους παράγοντες
- 14) Υποβοηθούμενη αναπαραγωγή με εφαρμογή της τεχνικής της μικρογονιμοποίησης (ICSI)

Μια από τις κυριότερες ενδείξεις επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου αποτελεί η προχωρημένη ηλικία της μητέρας. Αυξανόμενης της ηλικίας της μητέρας, αυξάνεται και ο κίνδυνος χρωμοσωμικής ανευπλοειδίας του εμβρύου (Εικόνα 1.36).



Εικόνα 1.36. Ο κίνδυνος χρωμοσωμικών ανωμαλιών με βάση την ηλικία της μητέρας [179-181].

Οι ανευπλοειδίες δεν αποτελούν ένα σπάνιο φαινόμενο, ωστόσο η πλειοψηφία αυτών παλινδρομούν κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης [182]. Το 50% των χρωμοσωμικά ανώμαλων εμβρύων είναι τρισωμικά και η τρισωμία 16 συνιστά την πιο συχνή τρισωμία. Η

ανευπλοειδία είναι το αποτέλεσμα μη-διαχωρισμού των ομόλογων χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση, με συνέπεια τη δημιουργία γαμετών που φέρουν και τα δύο ομόλογα χρωμόσωματα, καθώς και γαμετών που δε φέρουν κανένα ομόλογο χρωμόσωμα. Η συμμετοχή τέτοιων γαμετών στη γονιμοποίηση οδηγεί σε έμβρυα τρισωμικά ή μονοσωμικά αντίστοιχα. Θεωρητικά, ο μη-διαχωρισμός μπορεί να αφορά οποιοδήποτε από τα 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων, ωστόσο στη πλειοψηφία των περιπτώσεων λαμβάνει χώρα αυτόματη αποβολή. Ανευπλοειδίες που μπορεί να οδηγήσουν σε ζων έμβρυο είναι οι τρισωμίες 13, 18, 21 και οι μονοσωμίες και τρισωμίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων, αν και οι τρισωμίες 13 και 18 σχετίζονται με σημαντικά αυξημένη περιγεννητική θνητότητα [182]. Κατά τον έλεγχο του καρυότυπου, μπορεί επίσης να αποκαλυφθούν δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως μεταθέσεις, αναστροφές, προσθήκες, ελλείψεις, κ.α. Η πιθανότητα επανεμφάνισης ανευπλοειδίας σε επόμενη κύηση δεν είναι σημαντική και σε γυναίκες μικρότερες των 35 ετών εκτιμάται περίπου 1%, ενώ σε γυναίκες μεγαλύτερες των 35 ετών αντιστοιχεί στο σχετιζόμενο με τη μητρική ηλικία κίνδυνο [182].

Τα αίτια των καθ' ἑξιν αποβολών μπορεί να είναι χρωμοσωμικά, ανατομικά, ανοσολογικά ή ορμονικά. Περίπου στις μισές περιπτώσεις, το αίτιο είναι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες [182], εκ των οποίων το 2% σχετίζεται με μη ισοζυγισμένες μεταθέσεις. Προκειμένου να αποκλειστεί η παρουσία κληρονομούμενων μεταθέσεων, μπορεί να χρειαστεί η διενέργεια επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου του καρυότυπου.

Η ανάγκη έγκαιρης διάγνωσης των παθολογικών εμβρύων οδήγησε στην καθιέρωση μιας σειράς υπερηχογραφικών και βιοχημικών δεικτών στο α' και β' τρίμηνο που συμβάλλουν στην :

- ανίχνευση κυήσεων υψηλού κινδύνου για χρωμοσωμική ανωμαλία.
- εντόπιση συγγενών ανωμαλιών διαπλάσεως και γενετικών συνδρόμων.
- ανίχνευση κυήσεων υψηλού κινδύνου για άλλες παθολογικές καταστάσεις (προεκλαμψία, IUGR, κυστική ίνωση, συγγενείς λοιμώξεις).

Οι υπερηχογραφικοί και βιοχημικοί δείκτες συνιστούν ευρήματα που συσχετίζονται με εμβρυϊκές ανευπλοειδίες. Η παρουσία τους αυξάνει τον κίνδυνο χρωμοσωμικής ανωμαλίας, ενώ η απουσία τους δεν υποδηλώνει απαραίτητα φυσιολογικό έμβρυο. Οι δείκτες α' και β' τριμήνου αποτελούν screening test για διάκριση των κυήσεων υψηλού κινδύνου και δεν είναι διαγνωστικοί εμβρυϊκών χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Η μόνη ασφαλής διάγνωση μπορεί να γίνει με επεμβατικές μεθόδους. Συνεπώς, η ανεύρεση παθολογικών υπερηχογραφικών ευρημάτων μπορεί να έχει ένδειξη για επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο εάν τα ευρήματα αυτά σχετίζονται με χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Αναλόγως, η ανεύρεση παθολογικών βιοχημικών δεικτών μπορεί επίσης να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο απόκτησης παιδιού με ανευπλοειδία και επομένως προκύπτει η ανάγκη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου [177].

Τα μονογονιδιακά νοσήματα επηρεάζουν περίπου το 1% των ζώντων κυήσεων. Αυτά τα νοσήματα χαρακτηρίζονται από υψηλό κίνδυνο επανεμφάνισης (25 – 50 %) και, συχνά, η αντιμετώπισή τους είναι αναποτελεσματική, εγείροντας έτσι την ενδεχόμενη επιθυμία τερματισμού μιας κύησης με επιβεβαιωμένη διάγνωση τέτοιου νοσήματος [183].

Η έκθεση των ανδρών σε θεραπευτική ακτινοβολία σχετίζεται με σημαντική αύξηση τόσο των αριθμητικών όσο και των δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών στο σπέρμα, ακόμα και

χρόνια μετά τη θεραπεία [184]. Σε αυτήν την περίπτωση, ο επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος θα μπορούσε να συνεισφέρει στη διαπίστωση πιθανής χρωμοσωμικής ανωμαλίας στο έμβρυο.

Τέλος, ο επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος μπορεί να έχει εφαρμογή και στις κυήσεις που έχουν επιτευχθεί μετά από μικρογονιμοποίηση (ICSI). Ο λόγος είναι ότι, σε τέτοιες κυήσεις, έχουν παρατηρηθεί ανωμαλίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων σε ποσοστό περίπου 1% [185].

1.6.1 Μέθοδοι επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου

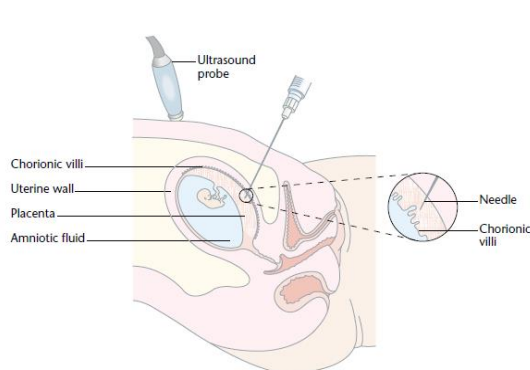
Οι μέθοδοι επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου περιλαμβάνουν :

- 1) Βιοψία χοριακών λαχνών (CVS)
- 2) Αμνιοπαρακέντηση
- 3) Λήψη εμβρυϊκού αίματος (Ομφαλιδοπαρακέντηση)

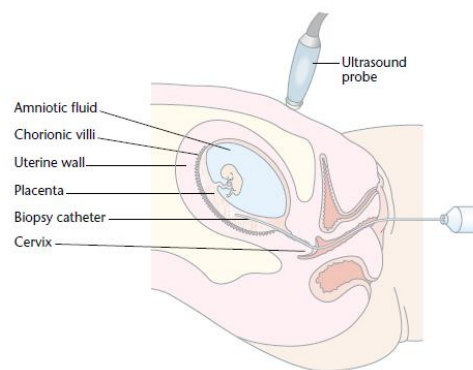
1.6.1.A Βιοψία χοριακών λαχνών (CVS)

Η βιοψία χοριακών λαχνών εφαρμόστηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1970. Παρέχει πληροφορίες για τα εμβρυϊκά χρωμοσώματα, για τη διάγνωση μονογονιδιακών νοσημάτων (μέσω της μεθόδου FISH - φθορίζων in situ υβριδισμός) καθώς και για τη διάγνωση συγγενών νοσημάτων του μεταβολισμού. Η βιοψία χοριακών λαχνών παρέχει τη δυνατότητα μελέτης του εμβρυϊκού καρυότυπου, δεδομένου ότι τόσο ο πλακούντας όσο και το έμβρυο χαρακτηρίζονται από κοινή προέλευση. Όταν η λήψη των χοριακών λαχνών πραγματοποιείται σωστά, η ακρίβεια των αποτελεσμάτων από την ανάλυση του καρυότυπου είναι > 99% και θεωρείται διαγνωστική [177].

Η βιοψία χοριακών λαχνών διενεργείται μετά την 9^η εβδομάδα της κύησης και συνήθως μεταξύ 10^{ης} και 12^{ης} εβδομάδας. Οι χοριακές λάχνες μπορούν να ανακτηθούν μέσω διακοιλιακής ή διατραχηλικής προσπέλασης του πλακούντα (Εικόνα 1.37, Εικόνα 1.38). Δεν παρατηρείται διαφορά στα ποσοστά εμβρυϊκής απώλειας μεταξύ των δύο τύπων προσπέλασης [186].



Εικόνα 1.37. Διακοιλιακή βιοψία χοριακών λαχνών [177]



Εικόνα 1.38. Διατραχηλική βιοψία χοριακών λαχνών [177]

Το χρονικό διάστημα που απαιτείται για τη λήψη των αποτελεσμάτων μετά από CVS εξαρτάται από τον τύπο της κυτταρικής σειράς που πρόκειται να αναλυθεί. Τα τροφοβλαστικά κύτταρα, τα οποία είναι τα πρώτα κύτταρα που διαφοροποιούνται από το μορίδιο, μπορούν να αναλυθούν άμεσα την ίδια ημέρα ή μετά από βραχείας διάρκειας καλλιέργεια (1 – 2 ημέρες). Ο πυρήνας των λαχνών, που περιέχει τα τριχοειδή αγγεία, χρήζει μακράς διάρκειας καλλιέργεια, καθώς αποτελείται από περαιτέρω διαφοροποιημένα κύτταρα. Τα αποτελέσματα μετά από μακράς διάρκειας καλλιέργεια είναι διαθέσιμα περίπου μετά από 2 εβδομάδες και συχνά χρησιμοποιούνται για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της βραχείας διάρκειας καλλιέργειας [177].

Κύριο πλεονέκτημα της βιοψίας χοριακών λαχνών έναντι της αμνιοπαρακέντησης είναι η δυνατότητα διάγνωσης σε πρωιμότερο στάδιο της κύησης, προσφέροντας έτσι στους γονείς τη γνώση ύπαρξης μιας φυσιολογικής κύησης ή, στη περίπτωση διάγνωσης πάσχοντος εμβρύου, τη δυνατότητα πρωιμότερης και ασφαλέστερης διαδικασίας τερματισμού της κύησης.

Μέχρι πρόσφατα, επικρατούσε η άποψη ότι το συνολικό ποσοστό απώλειας κύησης μετά από βιοψία χοριακών λαχνών είναι υψηλότερο από εκείνο της αμνιοπαρακέντησης, αλλά το εύρημα αυτό φαίνεται να σχετίζεται με τον αυξημένο προϋπάρχων βασικό κίνδυνο αυτόματης αποβολής που χαρακτηρίζει το διάστημα μεταξύ της 9^{ης} και της 16^{ης} εβδομάδας της κύησης. Συνεπώς, το πραγματικό ποσοστό απώλειας κύησης που σχετίζεται με τη διαδικασία της βιοψίας χοριακών λαχνών φαίνεται να είναι περίπου το ίδιο με το αντίστοιχο ποσοστό της αμνιοπαρακέντησης [187-190]. Παρόλα αυτά, η παραπάνω παρατήρηση ισχύει εφόσον η διαδικασία της βιοψίας διενεργείται από έμπειρο ιατρικό προσωπικό, δεδομένου ότι η ασφαλής εκτέλεση της βιοψίας απαιτεί μια σημαντική καμπύλη εκμάθησης και συνεχή εμπειρία [191, 192].

Υπάρχουν αναφορές που συσχετίζουν τη βιοψία χοριακών λαχνών με ανωμαλίες διαπλάσεως των μελών του εμβρύου και ιδιαίτερα με υποπλασία των φαλάγγων των δακτύλων, καθώς και με ανωμαλίες της στοματογοναθικής περιοχής. Εντούτοις, ο κίνδυνος εμφάνισης τέτοιων ανωμαλιών δεν είναι σαφής [193]. Σύμφωνα με μια μελέτη του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, η συχνότητα των ανωμαλιών διαπλάσεως των εμβρυϊκών μελών μετά από CVS υπολογίστηκε στα 6 περιστατικά ανά 10.000 επεμβάσεις CVS, η οποία δε διέφερε σημαντικά από την αντίστοιχη συχνότητα στο γενικό πληθυσμό [194]. Παρόλα

αυτά, μια μελέτη από τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής έδειξε ότι τα εγκάρσια οστικά ελλείμματα των άκρων φαίνεται να είναι πιο συχνά μετά από βιοψία χοριακών λαχνών. Η συχνότητα αυτών των ανωμαλιών είναι υψηλότερη όταν η επέμβαση διενεργείται πριν τις 9 εβδομάδες της κύησης [195, 196]. Επιπλέον, μια άλλη μελέτη υπό την εποπτεία του Εθνικού Ινστιτούτου Παιδικής Υγείας και Ανάπτυξης και του Αμερικάνικου Κολλέγιου Μαιευτήρων και Γυναικολόγων έδειξε ότι η υποπλασία των άκρων και της στοματογοναθικής περιοχής φαίνεται να είναι πιο συχνή σε βρέφη που είχαν εκτεθεί σε βιοψία χοριακών λαχνών και επίσης φάνηκε να σχετίζεται με τη διενέργεια CVS πριν τις 7 εβδομάδες της κύησης [193].

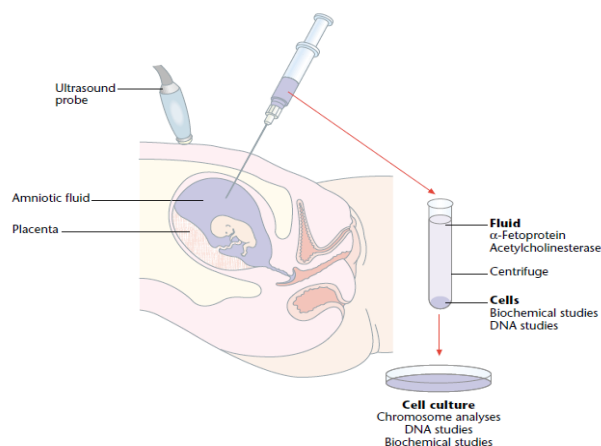
Γυναίκες που πρόκειται να υποβληθούν σε βιοψία χοριακών λαχνών και έχουν το άγχος των προαναφερθέντων επιπλοκών, θα πρέπει να διαβεβαιώνονται ότι ο κίνδυνος ανωμαλιών διάπλασης των άκρων είναι χαμηλός και πιθανότατα παρόμοιος με εκείνο του γενικού πληθυσμού, όταν η επέμβαση διενεργείται μετά τις 9 εβδομάδες της κύησης.

Άλλη επιπλοκή που σχετίζεται με τη βιοψία χοριακών λαχνών αφορά την εκδήλωση κολπικής αιμόρροιας ή σταγονοειδούς αιμόρροιας, που μπορεί να συμβεί σε ποσοστό έως 32,2% μετά από διατραχηλική προσπέλαση και σε μικρότερο ποσοστό μετά από διακοιλιακή προσπέλαση [197]. Η εμφάνιση συμπτωματικών υποχοριονικών πλακουντιακών αιματωμάτων είναι εξαιρετικά σπάνια, ενώ μικρότερα αιματώματα συνήθως υποχωρούν εντός ολίγων εβδομάδων και δε σχετίζονται με δυσμενή έκβαση της κύησης [198]. Η συχνότητα άλλων επιπλοκών, όπως η πρώιμη ρήξη υμένων, η χοριοαμνιονίτιδα ή η αποτυχία καλλιέργειας του υλικού της βιοψίας, εκτιμάται σε λιγότερο από 0,5% [197]. Προς αποφυγή Rh ευαισθητοποίησης, συνιστάται η προφυλακτική χορήγηση αντι D γ-σφαιρίνης σε Rh αρνητικές εγκύους.

1.6.1.B Αμνιοπαρακέντηση

Η αμνιοπαρακέντηση εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1952 για τη διάγνωση της αιμολυτικής νόσου προγεννητικά. Στα μέσα της δεκαετίας του 1970, καθιερώθηκε ως μέθοδος εκλογής για τον έλεγχο του εμβρυϊκού καρυότυπου. Το αμνιακό υγρό περιέχει εμβρυϊκά κύτταρα, τα οποία μπορούν να καλλιεργηθούν και να αποκαλύψουν τον εμβρυϊκό καρυότυπο, ενώ υπάρχει και η δυνατότητα βιοχημικού ελέγχου και μοριακής ανάλυσης. Επιπλέον, εκτός από τη δυνατότητα ελέγχου των εμβρυϊκών κυττάρων, η αμνιοπαρακέντηση παρέχει τη δυνατότητα μέτρησης των επιπέδων της αλφα-φετοπρωτεΐνης (AFP) για τον έλεγχο ύπαρξης ανωμαλιών του νευρικού σωλήνα και του κοιλιακού τοιχώματος. Αυξημένα επίπεδα της AFP στο αμνιακό υγρό ενδεχομένως να υποδηλώνουν την παρουσία τέτοιων συγγενών ανωμαλιών και ο προσεκτικός υπερηχογραφικός έλεγχος σε συνδυασμό με την αναζήτηση ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) στο αμνιακό υγρό μπορούν να διευκρινίσουν αν υπάρχει κάποια ανωμαλία του νευρικού σωλήνα ή του κοιλιακού τοιχώματος [177] (Εικόνα 1.39).

Η αμνιοπαρακέντηση διενεργείται μετά τη 15^η εβδομάδα της κύησης. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση του καρυότυπου είναι συνήθως διαθέσιμα εντός 10 – 14 ημερών.



Εικόνα 1.39. Προγεννητικός έλεγχος με τη μέθοδο της αμνιοπαρακέντησης [177]

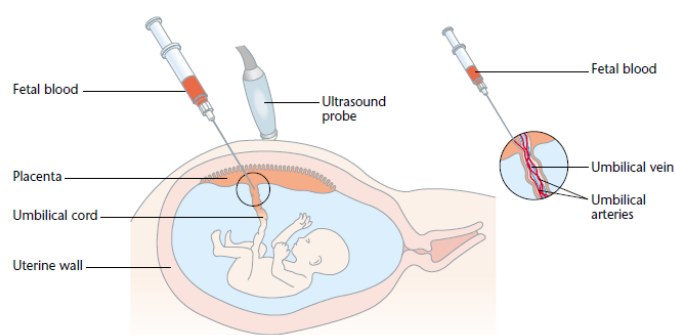
Μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την ασφάλεια της μεθόδου της αμνιοπαρακέντησης, καθώς και τη διαγνωστική της ακρίβεια (> 99%) [199]. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι το ποσοστό απώλειας κύησης μετά από αμνιοπαρακέντηση είναι περίπου 1 απώλεια στις 300-500 επεμβάσεις και το ποσοστό αυτό θα μπορούσε να είναι ακόμα μικρότερο όταν οι επεμβάσεις αυτές διενεργούνται από έμπειρο ιατρικό προσωπικό [200, 201]. Επιπλοκές που παρατηρούνται σπανίως περιλαμβάνουν την παροδική κοιλιακή σταγονοειδή αιμόρροια και την πρώιμη ρήξη υμένων σε ένα ποσοστό περίπου 1-2% και τη χοριοαμνιονίτιδα σε ένα ποσοστό μικρότερο του 1‰ . Το ποσοστό περιγεννητικής επιβίωσης στις περιπτώσεις πρώιμης ρήξης υμένων μετά από αμνιοπαρακέντηση είναι υψηλότερο από 90% [202]. Τραυματισμοί του εμβρύου από τη βελόνα της αμνιοπαρακέντησης έχουν αναφερθεί , αλλά είναι πολύ σπάνιοι όταν η αμνιοπαρακέντηση διενεργείται υπό συνεχή υπερηχογραφική παρακολούθηση. Αποτυχία καλλιέργειας των κυττάρων του αμνιακού υγρού συμβαίνει στο 0,1% των δειγμάτων. Διάφορες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι η πιθανότητα απώλειας της κύησης, πρώιμης ρήξης των υμένων, ανάμιξης των δειγμάτων με αίμα και ανάγκης για περισσότερες της μιας προσπάθειες λήψης αμνιακού υγρού, σχετίζεται με την εμπειρία του ιατρικού προσωπικού, τη χρήση του κατάλληλου εξοπλισμού (κατάλληλο μέγεθος του καθετήρα αμνιοπαρακέντησης) και τη σωστή υπερηχογραφική καθοδήγηση [203-205].

Η διενέργεια πρώιμης αμνιοπαρακέντησης από την 11^η έως τη 13^η εβδομάδα της κύησης έχει μελετηθεί εκτενώς και η τεχνική είναι παρόμοια με την κλασσική αμνιοπαρακέντηση [206-208]. Ωστόσο, η διενέργεια πρώιμης αμνιοπαρακέντησης σχετίζεται με σημαντικά υψηλότερα ποσοστά εμβρυϊκής απώλειας και άλλων επιπλοκών σε σύγκριση με την παραδοσιακή αμνιοπαρακέντηση. Σύμφωνα με μια πολυκεντρική τυχαιοποιημένη μελέτη, το ποσοστό αυτόματης απώλειας κύησης μετά από πρώιμη αμνιοπαρακέντηση εκτιμήθηκε στο 2,5%, σε σύγκριση με αντίστοιχο ποσοστό της κλασσικής αμνιοπαρακέντησης που κυμαινόταν στο 0,7% [209]. Η συνολική συχνότητα της στρεβλοποδία (συγγενής διαμαρτία του άκρου του ποδιού με συστροφή της θέσης ή του σχήματος του) υπολογίστηκε στο 1,4% μετά από πρώιμη αμνιοπαρακέντηση, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για την παραδοσιακή αμνιοπαρακέντηση ήταν 0,1%. Επίσης η πρώιμη ρήξη υμένων ήταν πιο πιθανή μετά από

πρώιμη αμνιοπαρακέντηση. Η διενέργεια αμνιοπαρακέντησης σε πρώιμα στάδια της κύησης χαρακτηριζόταν από σημαντικά υψηλότερη συχνότητα αποτυχίας καλλιέργειας του αμνιακού υγρού, καθιστώντας έτσι αναγκαία τη διενέργεια επιπρόσθετης επεμβατικής πράξης για την επίτευξη της διάγνωσης. Συνεπώς, η πρώιμη αμνιοπαρακέντηση πριν τις 14 εβδομάδες της κύησης δε θα πρέπει να διενεργείται [199].

1.6.1.Γ Λήψη εμβρυϊκού αίματος (Ομφαλιδοπαρακέντηση)

Η ομφαλιδοπαρακέντηση συνιστά μια μέθοδο λήψης εμβρυϊκού αίματος από την ομφαλική φλέβα υπό υπερηχογραφική παρακολούθηση (Εικόνα 1.40). Συνήθως διενεργείται μετά τη 18^η εβδομάδα της κύησης.



Εικόνα 1.40. Λήψη εμβρυϊκού αίματος (ομφαλιδοπαρακέντηση) [177]

Η ανάλυση του καρυότυπου του εμβρυϊκού αίματος συνήθως ολοκληρώνεται εντός 24 – 48 ωρών. Το ποσοστό εμβρυϊκής απώλειας μετά από ομφαλιδοπαρακέντηση κυμαίνεται στο 1-2% [210, 211]. Η συγκεκριμένη επέμβαση είναι χρήσιμη στη διάγνωση της εμβρυϊκής τοξοπλάσμωσης και διαφόρων αιματολογικών διαταραχών, μέσω της μέτρησης συγκεκριμένων παραγόντων του αίματος. Επίσης, η ομφαλιδοπαρακέντηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διάγνωση συνδρόμων χρωμοσωμικής αστάθειας (όπως η αναιμία Fanconi), συγγενών λοιμώξεων καθώς και ανευπλοειδίας. Επιπλέον, συχνά χρησιμοποιείται για τη διενέργεια ενδομητρικών μεταγγίσεων [177].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου DAZL και ειδικότερα την εύρεση έκφρασής του ή όχι σε τροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα. Τα κύτταρα αυτά λαμβάνονται με βιοψία χοριακών λαχνών, μια τεχνική που πραγματοποιείται στα πλαίσια του προγεννητικού ελέγχου στο τέλος του 1^{ου} τριμήνου της κύησης.

Το γονίδιο DAZL μελετάται τα τελευταία χρόνια και η επιστημονική κοινότητα αναζητά τη σημασία της έκφρασής του σε διάφορους εμβρυϊκούς και εξωεμβρυϊκούς ιστούς, καθώς παρατηρείται σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα αποτελώντας πλέον και μοριακό δείκτη τους. Επιπλέον, το γονίδιο DAZL έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί δείκτη γεννητικών κυττάρων. Στην εργασία αυτή, σχεδιάζοντας ένα αποτελεσματικό πρωτόκολλο απομόνωσης γενετικού υλικού από τροφοβλαστικά κύτταρα χοριακών λαχνών, στοχεύουμε στην ανίχνευση και μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου DAZL με τη βοήθεια της Real-time PCR.

Μια τέτοια παρατήρηση θα καθιστούσε τα τροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα ως μια πιθανή σημαντική πηγή γεννητικών κυττάρων, διαθέσιμων προς έρευνα και θεραπευτική εφαρμογή στα πλαίσια της Αναγεννητικής Ιατρικής.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου DAZL (DAZL mRNA) σε τροφοβλαστικά κύτταρα εξετάσθηκαν δείγματα χοριακών λαχνών από 20 γυναίκες που υποβλήθηκαν σε επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο 1^{ου} τριμήνου με βιοψία χοριακών λαχνών.

Τα δείγματα ελήφθησαν από ασθενείς που προσήλθαν στο Τμήμα Προγεννητικού Ελέγχου της Α' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών "Αλεξάνδρα" και αφορούν την χρονική περίοδο από 17/02/2014 έως 16/06/2014. Η διενέργεια του πειραματικού μέρους της εργασίας έγινε στο Εργαστήριο Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών "Αλεξάνδρα".

Πριν την εισαγωγή στη μελέτη, κάθε ασθενής υπέγραφε φόρμα ενημερωμένης συγκατάθεσης.

Τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη περιλαμβάνουν :

- Ηλικία ασθενούς ≥ 18 έτη.
- Βιοψία χοριακών λαχνών στα πλαίσια επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου.
- Λεπτομερής ενημέρωση ασθενών και υπογραφή σχετικού έντυπου συγκατάθεσης.

Ο Πίνακας 2.1 παρουσιάζει βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη.

Σύνολο ασθενών	20
Ηλικία (έτη) (μέση ηλικία και εύρος ηλικιών)	34,7 (23 - 44)
Σωματομετρικά χαρακτηριστικά ασθενών	
(μέσος όρος και εύρος τιμών)	
Ύψος (cm)	162,8 (156 – 173)
Βάρος (kg)	62,1 (50 – 98)
Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI) (kg/m²)	23,5 (18,1 – 39,8)
Αριθμός κυήσεων (μέση τιμή και εύρος τιμών)	2,7 (1 – 6)
Κεφαλοουραίο μήκος εμβρύου (CRL)	55,1 (45 – 66,1)
(μέση τιμή και εύρος τιμών)	
Ηλικία κύησης βάσει CRL (μέση τιμή και εύρος τιμών)	11⁺⁶ (11⁺¹ – 12⁺⁵)

Πίνακας 2.1. Βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη.

Ο Πίνακας 2.2 παρουσιάζει συγκεντρωτικά τις ενδείξεις επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη.

Ένδειξη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου	Αριθμός ασθενών
Μεσογειακή αναιμία	8
Ηλικία μητέρας	7
Αυξημένος κίνδυνος χρωμοσωμικής ανωμαλίας από δοκιμασία διαλογής α' τριμήνου	2
Ινοκυστική νόσος	3
ΣΥΝΟΛΟ	20

Πίνακας 2.2. Ενδείξεις επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη.

2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Όπως αναφέρθηκε, η λήψη χοριακών λαχνών πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προγεννητικού ελέγχου γονιδιακών μεταλλάξεων και καρυότυπου. Προ της βιοψίας των χοριακών λαχνών, διενεργείται υπερηχογραφικός έλεγχος της κύησης.

Συγκεκριμένα, ελέγχονται :

- ο αριθμός των εμβρύων,
- η βιωσιμότητα του/των εμβρύου/ων (με έλεγχο της καρδιακής λειτουργίας),
- το εμβρυϊκό κεφαλοουραίο μήκος (CRL) για προσδιορισμό της υπερηχογραφικής ηλικίας κύησης και επιβεβαίωση ότι η εξέταση πραγματοποιείται την κατάλληλη ηλικία κύησης,
- η αδρή ανατομία του/των εμβρύου/ων για τυχόν παρουσία ανατομικών ανωμαλιών,
- η αυχενική διαφάνεια (NT) του/των εμβρύου/ων, δεδομένου ότι η ανεύρεση αυξημένης τιμής σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου,
- ο αριθμός και η θέση του/των πλακούντα/ων.
- η ποσότητα του αμνιακού υγρού.

Κατόπιν του υπερηχογραφικού ελέγχου, ακολουθεί καθαρισμός και αντισηψία του πεδίου άνωθεν της ηβικής σύμφυσης, μέσω του οποίου θα πραγματοποιηθεί η είσοδος του καθετήρα βιοψίας των χοριακών λαχνών. Η επέμβαση αυτή πραγματοποιείται υπό άσηπτες συνθήκες. Ο καθετήρας που χρησιμοποιείται είναι κίτρινος Gauze 20G διαμέτρου 0,90mm.

Καθόλη τη διάρκεια της επέμβασης, η πορεία του καθετήρα παρακολουθείται υπερηχογραφικά. Ο υπερηχογενής καθετήρας φέρεται στον πλακούντα και γίνεται η αναρρόφηση των χοριακών λαχνών με την βοήθεια σύριγγας, με την οποία είναι συνδεδεμένος ο καθετήρας. Η σύριγγα περιέχει ισότονο προς τους ιστούς διάλυμα αλάτων. Στη συνέχεια, οι χοριακές λάχνες μεταφέρονται στα κατάλληλα φιαλίδια του προγεννητικού ελέγχου και μικρή ποσότητα λαχνών μεταφέρεται σε σωληνάριο φυγόκεντρου τύπου Falcon για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας. Παράλληλα, γίνεται οπτικός έλεγχος για επιβεβαίωση λήψης της απαιτούμενης για τον προγεννητικό έλεγχο ποσότητας χοριακών λαχνών. Μετά την έξοδο του καθετήρα, ακολουθεί τοπική αντισηψία του σημείου εισόδου και υπερηχογραφικός έλεγχος της καρδιακής λειτουργίας του εμβρύου.

Τόσο τα φιαλίδια του προγεννητικού ελέγχου, όσο και τα σωληνάρια φυγόκεντρου τύπου Falcon (που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας), όπου μεταφέρθηκαν οι χοριακές λάχνες, περιείχαν ισότονο προς τους ιστούς διάλυμα αλάτων «Hank 's Balanced Salt Solution» με προσθήκη ηπαρίνης για την αποφυγή δημιουργίας πηγμάτων και αντιβιοτικών (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη) για την αποφυγή επιμόλυνσης. Η παρασκευή του ανωτέρω διαλύματος γίνεται από το Τμήμα Γενετικής του νοσοκομείου “Αλεξάνδρα” και περιλαμβάνει την προσθήκη 0,5 ml ηπαρίνης και 0,5 ml πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης σε 100 ml του ισότονου διαλύματος αλάτων. Κάθε φιαλίδιο προγεννητικού

ελέγχου περιέχει περίπου 10 – 15 ml του παραπάνω διαλύματος, ενώ τα σωληνάρια φυγόκεντρου τύπου Falcon περιέχουν περίπου 2 – 3 ml του διαλύματος.

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της βιοψίας, δίνονται οδηγίες στην έγκυο για κατάκλιση τις πρώτες ημέρες μετά τη επέμβαση και αποφυγή άρσης βάρους, σεξουαλικής επαφής και έκθεσης της κοιλιακής χώρας σε ενδεχόμενη κάκωση για το επόμενο χρονικό διάστημα. Επίσης, δίνονται οδηγίες για λήψη αντιβιοτικής αγωγής, σπασμολυτικών και προγεστερόνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι αν η γυναίκα είναι Rh αρνητική, τότε χορηγείται αντι – Rh ανοσοσφαιρίνη για πρόληψη έναντι ενδεχόμενης Rh ευαισθητοποίησης.

2.2 ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα σωληνάρια φυγόκεντρου τύπου Falcon με τις χοριακές λάχνες μεταφέρθηκαν στο Τμήμα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής και υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρωση των 1500 – 2000 στροφών/λεπτό για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, με τη χρήση πλαστικής πιπέτας, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και διατηρήθηκε το ίζημα (ιστός). Στο παραμένον δείγμα έγινε προσθήκη 1 ml διαλύματος RNAlater.

Το διάλυμα RNAlater [212] είναι ένα αντιδραστήριο άμεσης σταθεροποίησης του RNA των ιστών, το οποίο προσφέρει :

- άμεση σταθεροποίηση του RNA και προστασία αυτού,
- αξιόπιστα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης,
- ασφαλείς χειρισμούς σε θερμοκρασία δωματίου,
- χωρίς ανάγκη για υγρό άζωτο ή ξηρό πάγο,
- δυνατότητα αποθήκευσης του ιστού χωρίς τον κίνδυνο υποβάθμισης του RNA.

Μετά την προσθήκη του RNAlater, τα δείγματα τοποθετούνται στο ψυγείο στους 4 °C για 24 ώρες και, στη συνέχεια, μεταφέρονται στη βαθιά κατάψυξη στους -80 °C, όπου μπορούν να συντηρηθούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

2.3 ΕΞΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ RNA

Το RNA περιέχει τη γενετική πληροφορία σχετικά με την κατεύθυνση της σύνθεσης ειδικών πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών, επιτρέποντας έτσι τη στοχευμένη επιλογή γενετικού υλικού προς έλεγχο. Μέσω του DNA, όλα τα κύτταρα φέρουν ολόκληρη τη γενετική πληροφορία, συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου-στόχου (το γονίδιο DAZL στην παρούσα μελέτη). Ωστόσο, η ανίχνευση μέσω του RNA αφορά συγκεκριμένα κύτταρα, στα οποία μεταγράφεται το γονίδιο-στόχος, καθώς στα υπόλοιπα κύτταρα το γονίδιο-στόχος παραμένει αδρανές.

Στην παρούσα μελέτη, η εξαγωγή και η απομόνωση του RNA επιτεύχθηκε με τη χρήση του RNeasy Mini Kit της εταιρείας Qiagen (Εικόνα 2.1), το οποίο επιτρέπει την απομόνωση ολικού RNA με τη χρήση ειδικών στηλών από δείγματα που περιέχουν μέχρι και 100μg RNA [213].



Εικόνα 2.1. RNeasy Mini Kit της εταιρείας Qiagen [213].

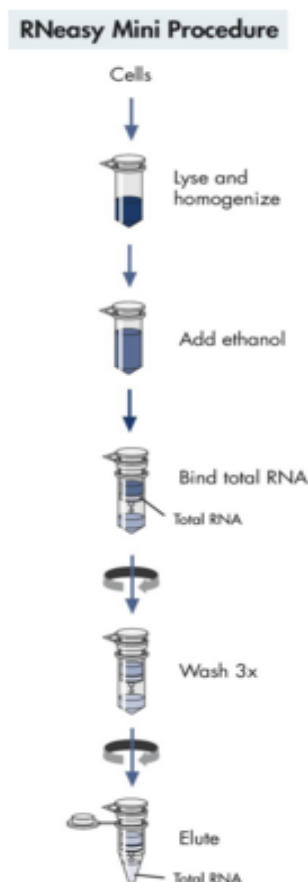
2.3.1 Αντιδραστήρια – Εξοπλισμός

- Φυγόκεντρος για σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5ml
- Διάλυμα λύσης buffer RLT + b-Mercaptoethanol
Επιτρέπει τη λύση και ομογενοποίηση του δείγματος με ένα ισχυρό αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει ισοθειοκυανική γουανιδίνη, η οποία απενεργοποιεί τις RNAσες, ώστε να απομονωθεί άθικτα το RNA.

- Αιθανόλη
Επιτρέπει τη δημιουργία βέλτιστων συνθηκών πρόσδεσης στη μεμβράνη πυριτίου της στήλης.
- RW1 και RPE
Διαλύματα εκπλύσεων που στοχεύουν στην απομάκρυνση από τη μεμβράνη πιθανών υπολειμμάτων.
- RNase free water
Διάλυμα ύδατος ελεύθερο από RNασες, ώστε να εκλουσθεί το ολικό RNA από τη μεμβράνη και να το παραλάβουμε στο πάτο του σωληναρίου Eppendorf.

2.3.2 Διαδικασία – Πρωτόκολλο

Η διαδικασία απομόνωσης του RNA παρουσιάζεται συνοπτικά στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 2.2) :



Εικόνα 2.2. Απομόνωση του RNA [213].

Το πρωτόκολλο απομόνωσης του RNA με τη χρήση του RNeasy Mini Kit της Qiagen περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

- Φυγοκέντρηση του δείγματος των κυττάρων στις 2500 rpm για 5 λεπτά.
- Έλεγχος του ιζήματος και προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου, στο βαθμό που είναι εφικτό.
- Προσθήκη 350μl buffer RLT + β-Mercaptoethanol.
- Καλή ανάδευση με τη χρήση της πιπέτας.
- Μεταφορά του δείγματος σε μια στήλη, QIAshredder spin column και φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 3 λεπτά.
- Απόρριψη της στήλης που περιέχει το φίλτρο, απομακρύνοντας έτσι το DNA, και προσθήκη στη βάση (flow-thr) 350μl αιθανόλης 70%, στην οποία προσδένεται το RNA.
- Μεταφορά του δείγματος στη στήλη RNeasy spin column.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 1 λεπτό.
- Απόρριψη του υγρού της βάσης (flow-thr) και προσθήκη 700μl buffer RW1.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 1 λεπτό.
- Απόρριψη του υγρού της βάσης (flow-thr) και προσθήκη 500μl buffer RPE.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 1 λεπτό.
- Απόρριψη του υγρού της βάσης (flow-thr) και προσθήκη 500μl buffer RPE.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 2 λεπτά.
- Απόρριψη της βάσης και μεταφορά του φίλτρου της στήλης σε νέα βάση.
- Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 2 λεπτά.
- Απόρριψη της βάσης, τοποθέτηση του φίλτρου της στήλης σε σωληνάριο τύπου erppendorf και προσθήκη προσεκτικά στο κέντρο 40μl Rnase free water.
- Αναμονή για 5 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 2 λεπτά.
- Απόρριψη του φίλτρου της στήλης και διατήρηση του σωληναρίου erppendorf, το οποίο περιέχει το απομονωμένο RNA.
- Αποθήκευση του δείγματος στους -80°C.

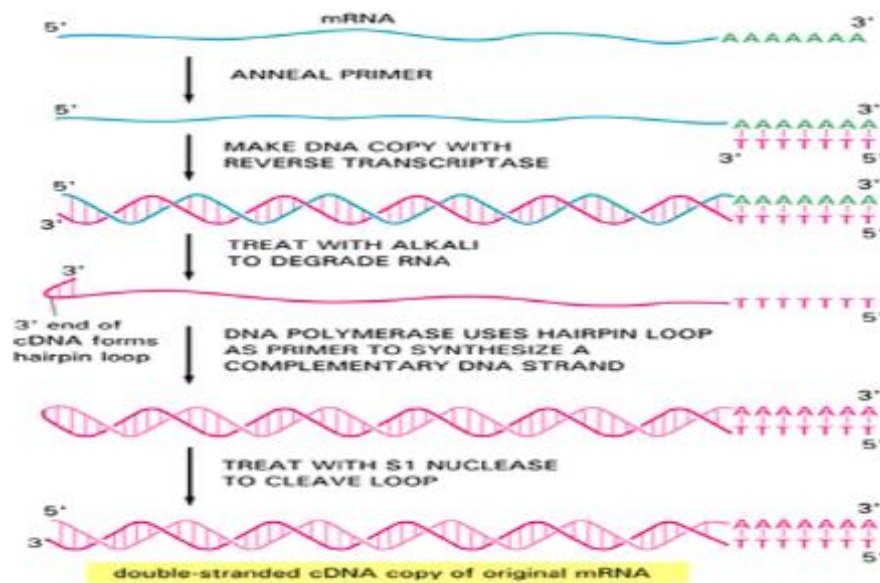
2.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (cDNA)

Το RNA είναι μονόκλωνο μόριο και δε μπορεί να πολλαπλασιαστεί με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), που αποτελεί το τελικό στάδιο του πειράματος. Το μονόκλωνο RNA θα πρέπει πρώτα να μετατραπεί σε συμπληρωματικό δίκλωνο μόριο DNA και, στη συνέχεια, μπορεί να ενισχυθεί με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Η σύνθεση του συμπληρωματικού δίκλωνου μορίου DNA βασίζεται στη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Το ένζυμο αυτό είναι ιικής προέλευσης και παρέχει σε κάποιους RNA ιούς (ρετροϊούς) την ικανότητα να συνθέτουν DNA από το ιικό RNA γενετικό υλικό, με σκοπό τον πολλαπλασιασμό τους στο κύτταρο-ξενιστή.

Κατά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, ένα μικρό ολιγονουκλεοτίδιο που είναι συμπληρωματικό με την πολύ(A) ουρά του 3' άκρου του mRNA συνδέεται με το μονόκλωνο RNA και λειτουργεί ως εκκινητής για το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Το ένζυμο αυτό παράγει μια αλυσίδα DNA συμπληρωματική προς το RNA, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας υβριδικής έλικας DNA/RNA. Η έκθεση της υβριδικής έλικας DNA/RNA σε αλκαλικό διάλυμα έχει ως συνέπεια την αποδόμηση του RNA κλώνου και την παραμονή του συμπληρωματικού DNA κλώνου.

Στη συνέχεια, το 3' άκρο του μονόκλωνου DNA (συμπληρωματικό DNA - cDNA) μπορεί να διπλωθεί στο άκρο του, δημιουργώντας έτσι μια θηλιά και σχηματίζοντας λίγα τυχαία ζεύγη συμπληρωματικών βάσεων, τα οποία λειτουργούν ως εκκινητής για το ένζυμο DNA πολυμεράση. Το ένζυμο αυτό αντιγράφει το μονόκλωνο cDNA και οδηγεί έτσι στη δημιουργία δίκλωνου cDNA (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA [214].

Στην παρούσα μελέτη, η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) επιτεύχθηκε με τη χρήση του SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR της εταιρείας Invitrogen (Εικόνα 2.4) με τυχαίους εκκινητές (Random hexamers primers).

Το συγκεκριμένο kit μπορεί να εφαρμοστεί σε δείγματα από 1ng μέχρι 5μg ολικού RNA. Για τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν, εκτός από τυχαίοι εκκινητές, και ολιγο(dT) εκκινητές, καθώς και ειδικοί για την αλληλουχία ενδιαφέροντος εκκινητές [215].

Η τεχνική των τυχαίων εκκινητών συνιστά μια μη ειδική τεχνική που έχει εφαρμογή σε περιπτώσεις με χαμηλή συγκέντρωση RNA.



Εικόνα 2.4. SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR της εταιρείας Invitrogen [215].

2.4.1 Αντιδραστήρια – Εξοπλισμός

- Θερμικός κυκλοποιητής

Επιτρέπει την επώαση των δειγμάτων σε συγκεκριμένη θερμοκρασία για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

- Random hexamers (50ng/μl)

Μη ειδικοί εκκινητές που επιτρέπουν τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) με πρότυπο όλα τα RNA του δείγματος.

- 10 Mm dNTP mix

Δεοξυριβονουκλεοτίδια, τα οποία αποτελούν τις μονάδες σύνθεσης της αλυσίδας DNA.

- 10xRTbuffer

Ρυθμιστικό διάλυμα.

- 25 mM MgCl₂

Λειτουργεί ως συμπράγοντας της αντίστροφης μεταγραφάσης ώστε να εξισορροπεί τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες.

- 0,1 M DTT

Διασπά και εμποδίζει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των RNAσών, που είναι απαραίτητοι για τη σταθερότητά τους και, με τον τρόπο αυτό, αναστέλλει τη δράση των RNAσών και διατηρεί το mRNA για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής.

- RNaseOUT (40 U/μl)

Ενισχύει τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης.

- SuperScript II RT

Αντίστροφη μεταγραφάση.

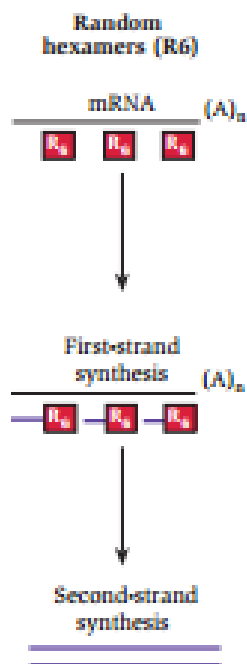
- RNase H

Αποδιατάσσει τυχόν RNA που παραμένουν στο τέλος της αντίδρασης επειδή δε μετατράπηκαν σε cDNA.

- Σωληνάρια τύπου Errendorf και πιπέτες

2.4.2 Διαδικασία – Πρωτόκολλο

Η διαδικασία σύνθεσης του συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τυχαίους εκκινητές παρουσιάζεται συνοπτικά στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 2.5) :



Εικόνα 2.5. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τυχαίους εκκινητές [215].

Το πρωτόκολλο σύνθεσης του συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τη χρήση του SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR της εταιρείας Invitrogen με τυχαίους εκκινητές (Random hexamers primers) περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

- Απόψυξη των αποθηκευμένων σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) δειγμάτων mRNA.
- Προσθήκη σε ένα σωληνάριο Eppendorf: 5μl Random hexamers

και 1μl dNTP mix

}

x n

n = αριθμός δειγμάτων
- Μεταφορά 6μl αυτού του μίγματος σε μικρά σωληνάκια Eppendorf και προσθήκη 4μl από το RNA κάθε δείγματος.
- Επώαση στο θερμοκυκλοποιητή για 5 λεπτά στους 65°C, με σκοπό την αποδιάταξη της δευτεροταγούς δομής του μονόκλωνου mRNA και τη μετατροπή του σε ένα, όσο το δυνατόν, πιο γραμμικό μόριο προκειμένου να συνδεθούν σε αυτό οι τυχαίοι εκκινητές.
- Μεταφορά στους -20°C μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης προς αποφυγή αποδόμησης του RNA, το οποίο είναι εξαιρετικά ευαίσθητο σε θερμοκρασία δωματίου, με μέγιστη διάρκεια παραμονής 1 λεπτό.
- Προσθήκη σε ένα σωληνάριο Eppendorf: 2μl 10xRTbuffer

και 4μl 25mM MgCl₂

και 2μl 0,1M DTT

και 1μl RNaseOUT (40 U/μl)

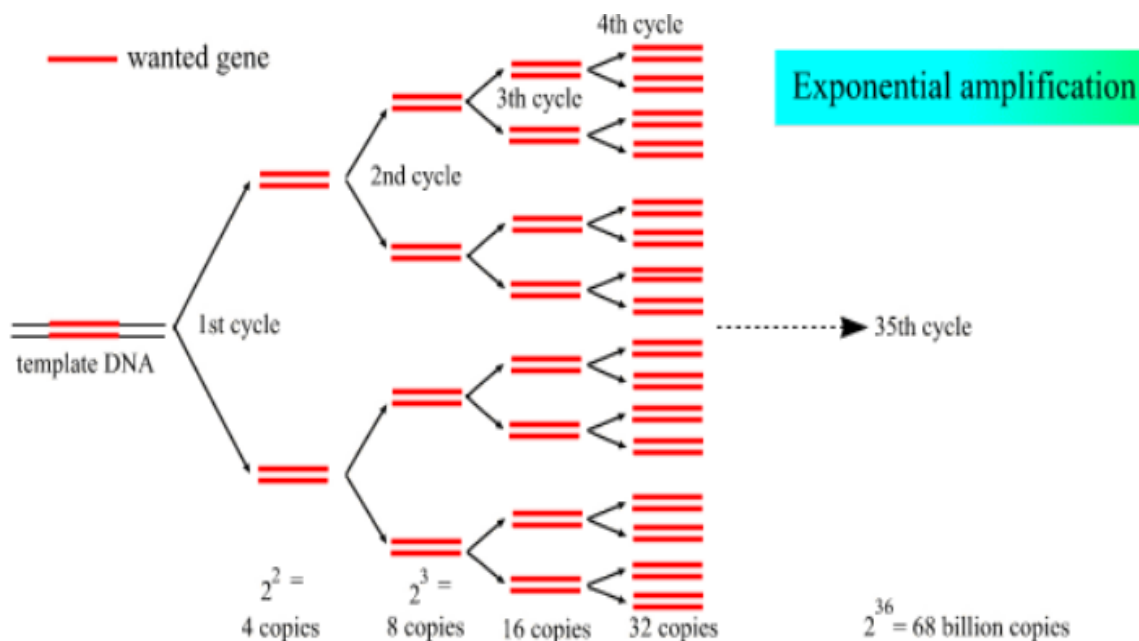
}

x n
- Προσθήκη 9μl αυτού του δευτέρου μίγματος στα υπάρχοντα μικρά σωληνάκια Eppendorf που περιέχουν το RNA κάθε δείγματος και καλή ανάδευση με τη χρήση πιπέτας.
- Επώαση στο θερμοκυκλοποιητή για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (≈ 25°C).
- Προσθήκη 1 μl SuperScript II RT.
- Επώαση στο θερμοκυκλοποιητή για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (≈ 25°C).
- Επώαση στο θερμοκυκλοποιητή για 50 λεπτά στους 42°C.
- Επώαση στο θερμοκυκλοποιητή για 15 λεπτά στους 70°C.
- Μεταφορά των σωληναρίων Eppendorf στον πάγο.
- Προσθήκη 1μl RNase για την απομάκρυνση τυχόν εναπομείναντος RNA και τη σταθεροποίηση του τελικού μορίου.
- Επώαση στο θερμοκυκλοποιητή για 20 λεπτά στους 37°C.
- Τοποθέτηση των σωληναρίων Eppendorf-δειγμάτων, που περιέχουν πλέον το συμπληρωματικό DNA (cDNA), στους -20°C.

2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Μία από τις πιο επαναστατικές ανακαλύψεις του 20^{ου} αιώνα αποτελεί η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR). Η πειραματική αυτή μέθοδος ανακαλύφθηκε από τον Dr. Karry Banks Mullis το 1983 [216], χάρη στην οποία βραβεύτηκε το 1993 με το βραβείο Νόμπελ Χημείας. Πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής αποτελούν η ταχύτητα, η ευκολία, η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου. Η αυτοματοποίηση της PCR κατέστησε την τεχνική αυτή ευρέως εφαρμοζόμενη στον τομέα της έρευνας και της διαγνωστικής προσέγγισης.

Η βασική αρχή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αφορά την *in vitro* εκλεκτική ενζυμική ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA (100 – 600 bp) μέσα από επαναλαμβανόμενους κύκλους κατευθυνόμενης σύνθεσης DNA (25 – 40 κύκλοι). Βασίζεται στην εφαρμογή διαδοχικών μεταβολών της θερμοκρασίας που οδηγούν στα τρία στάδια της τεχνικής PCR, δηλαδή την αποδιάταξη του DNA, την υβριδοποίηση των εκκινητών και την επιμήκυνση των εκκινητών. Οι αλυσίδες του DNA χαρακτηρίζονται από την ιδιότητα να αποχωρίζονται σε υψηλότερη θερμοκρασία και να επανενώνονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία και εν συνεχεία να αντιγράφονται. Για τον σκοπό αυτό, απαραίτητη είναι η χρήση δύο ολιγονουκλεοτιδίων, εκκινητών (primers), μήκους συνήθως 20 – 30 bp, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί προς αλληλουχίες αντίθετων κατευθύνσεων (sense – antisense) εκατέρωθεν της υπό μελέτη αλληλουχίας DNA, με τις οποίες υβριδίζονται. Κατόπιν, οι εκκινητές επιμηκύνονται ενζυμικά μέσω της DNA πολυμεράσης, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία αντιγράφων της συγκεκριμένης αλληλουχίας. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός και παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Εφόσον ο πολλαπλασιασμός της υπό μελέτη αλληλουχίας DNA προκύπτει από ενίσχυση των ήδη υπαρχόντων αντιγράφων μετά από κάθε κύκλο, τα αντίγραφα της συγκεκριμένης αλληλουχίας αυξάνουν εκθετικά, δηλαδή ξεκινούν από ένα μόριο DNA και καταλήγουν μετά από (n) επαναλήψεις του κύκλου σε 2ⁿ αντίγραφα. [217] (Εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6. Εκθετική αύξηση των αντιγράφων της αλληλουχίας DNA – στόχου [217].

Στην προσπάθεια αυτοματοποίησης της διαδικασίας εναλλαγής της θερμοκρασίας και συνεπώς βελτίωσης της απόδοσης της τεχνικής PCR, χρησιμοποιείται θερμοκυκλοποιητής, ο οποίος επιτρέπει την άμεση μεταβολή και διατήρηση της θερμοκρασίας για καθορισμένα χρονικά διαστήματα, προκειμένου να ολοκληρωθεί επιτυχώς η όλη διαδικασία.

Τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την διεκπεραίωση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης περιλαμβάνουν:

- Την αλληλουχία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί (DNA target ή template DNA)
- Ένα ζεύγος εκκινητών (primers)
Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια 20 – 30 βάσεων, συμπληρωματικά με τα 5' και 3' άκρα της διπλής έλικας του τμήματος DNA που προορίζεται προς ενίσχυση, στα οποία προσδένεται η DNA πολυμεράση με σκοπό τον πολυμερισμό της αλληλουχίας-στόχου και την παραγωγή των τελικών προϊόντων της αντίδρασης. Η συγκέντρωση κάθε εκκινητή στην αντίδραση είναι 0,1 – 0,5 μM (pmol/μl) [218]. Η θερμοκρασία τήξης (T_m) κάθε εκκινητή, δηλαδή η θερμοκρασία στην οποία ένας εκκινητής αδυνατεί πλέον να σχηματίσει σταθερά δίκλινα μόρια με την συμπληρωματική του αλληλουχία-στόχο, θα πρέπει να κυμαίνεται περίπου 50 - 72°C, ενώ οι θερμοκρασίες τήξης (T_m) των δύο εκκινητών δε θα πρέπει να παρουσιάζουν διαφορά μεταξύ τους μεγαλύτερη των 5°C [218]. Η θερμοκρασία τήξης (T_m) του εκκινητή επηρεάζεται τόσο από το μέγεθος του εκκινητή όσο και από την περιεκτικότητά του σε δεοξυριβονουκλεοτίδια γουανίνης G και κυτοσίνης

C, τα οποία συγκριτικά με εκείνα της αδενίνης A και της θυμίνης T, προκαλούν αύξηση της Tm. Η περιεκτικότητα των εκκινητών σε ζεύγη βάσεων G-C εκτείνεται από 40% μέχρι 60% και είναι συνήθως 50%. Επίσης, οι εκκινητές δε θα πρέπει να δημιουργούν δευτεροταγείς δομές (π.χ. δομές φουρκέτας) ή ομοδιμερή/ετεροδιμερή λόγω συμπληρωματικότητας των βάσεων τους [218].

- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)
Τα συστατικά που προσθέτει η DNA πολυμεράση προκειμένου να σχηματίσει τις νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Η ιδανική συγκέντρωση των χρησιμοποιούμενων dNTPs είναι περίπου 200 μM για το καθένα. Επί χαμηλότερης συγκέντρωσης, παρατηρείται βελτίωση της πιστότητας του πολυμερισμού αλλά μείωση της απόδοσης της αντίδρασης. Επί υψηλότερης συγκέντρωσης, αυξάνεται η απόδοση της αντίδρασης αλλά ελαττώνεται η πιστότητα [218].
- Η Taq DNA πολυμεράση
Απομονώθηκε από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* το 1976 και συνιστά μια θερμοανθεκτική πολυμεράση με την ιδιότητα να μην αποδιατάσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες. Η ιδιότητα αυτή επιτρέπει τη δράση της σε ένα εύρος θερμοκρασιών 55°C - 75°C, ενώ ο χρόνος ημιζωής του ενζύμου ανέρχεται έως και 50 κύκλους σε θερμοκρασία των 95°C. Η απαιτούμενη για την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων άνοδος της θερμοκρασίας κατά την PCR καθιστά την Taq πολυμεράση απαραίτητο συστατικό της αντίδρασης [217]. Πριν την ανακάλυψη της Taq πολυμεράσης, η απαιτούμενη για την PCR άνοδος της θερμοκρασίας, εκτός από την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, είχε ως συνέπεια και την αποδιάταξη της DNA πολυμεράσης με επακόλουθη απώλεια της δραστητικότητάς της. Το γεγονός αυτό καθιστούσε αναγκαία την εκ νέου προσθήκη DNA πολυμεράσης σε κάθε νέο κύκλο πολλαπλασιασμού. Η ανακάλυψη της θερμοανθεκτικής Taq πολυμεράσης, η οποία παραμένει αναλλοίωτη στους 95°C, βελτίωσε σημαντικά την αποτελεσματικότητα της μεθόδου PCR, χωρίς να είναι πλέον απαραίτητη η εκ νέου προσθήκη DNA πολυμεράσης σε κάθε κύκλο της PCR, συμβάλλοντας έτσι στην αυτοματοποίηση της τεχνικής.
- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution)
Παρέχει τις κατάλληλες συνθήκες pH και αλατότητας για την καλύτερη δυνατή σταθερότητα και δραστητικότητα της DNA πολυμεράσης.
- Ιόντα μαγνησίου υπό τη μορφή χλωριούχου μαγνησίου (MgCl₂)
Συνιστούν συμπαραγόντα της πολυμεράσης και επηρεάζουν τη δραστητικότητά της. Η συγκέντρωση των ιόντων Mg κυμαίνεται συνήθως από 1,5mM έως 2,0mM. Η παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης ιόντων Mg επηρεάζει αρνητικά τη δραστηριότητα της πολυμεράσης, αλλά αυξάνει την ειδικότητά της, ενώ η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ιόντων Mg αυξάνει τη δραστηριότητα της πολυμεράσης εις βάρος της ειδικότητάς της [218]. Επιπλέον, συμμετέχουν στο υπόστρωμα του ενζύμου, σχηματίζοντας διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs και καθιστούν το δίκλωνο DNA σταθερότερο, μέσω αύξησης της Tm, ενώ αυξάνουν έτσι και την ειδικότητα των εκκινητών. Η ύπαρξη παραγόντων, όπως το EDTA, που δεσμεύουν τα ιόντα Mg στο DNA ή στο διάλυμα των εκκινητών επηρεάζει τη συγκέντρωση του μαγνησίου.

2.5.1 Στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης περιλαμβάνει τρία στάδια που καθένα χαρακτηρίζεται από διαφορετική θερμοκρασία και διαφορετικό χρόνο και τα οποία επαναλαμβάνονται κυκλικά (Εικόνα 2.7), (Εικόνα 2.8).

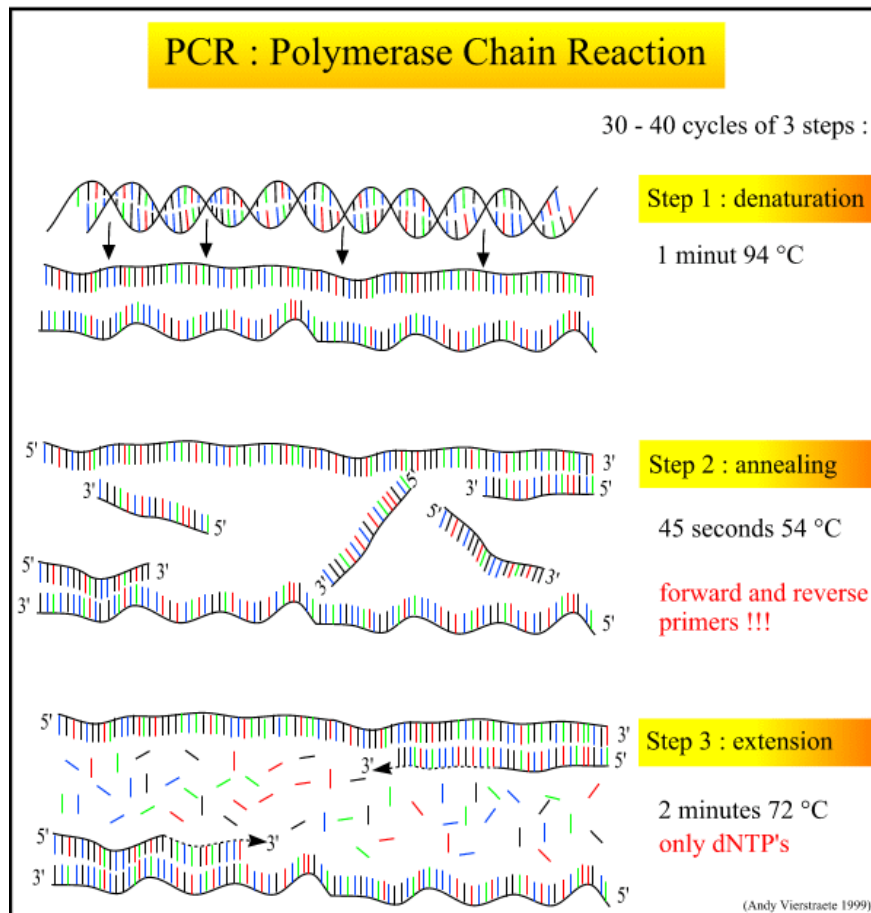
Το πρώτο στάδιο είναι η αποδιάταξη ή μετουσίωση (denaturation) του δίκλωνου μορίου DNA, το οποίο πραγματοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία, περί τους 95°C, με σκοπό τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων και το διαχωρισμό των δύο αλυσίδων του DNA.

Το δεύτερο στάδιο είναι η υβριδοποίηση των εκκινητών (primer annealing) στις αντίστοιχες 5' και 3' συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου, το οποίο πραγματοποιείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία που προσαρμόζεται ανάλογα με το σημείο τήξης (T_m) των εκκινητών. Τυπικά, η θερμοκρασία υβριδοποίησης προσαρμόζεται περίπου 3 - 5°C κάτω από το σημείο τήξης (T_m) των χρησιμοποιούμενων εκκινητών. Επί χαμηλότερης της ιδανικής θερμοκρασίας, η πρόσδεση του εκκινητή μπορεί να μην είναι τέλεια ως προς τη συμπληρωματικότητα, ενώ επί υψηλότερης θερμοκρασίας, η πρόσδεση του εκκινητή μπορεί να μην είναι εφικτή. Η αποτελεσματικότητα και η ειδικότητα της αντίδρασης PCR εξαρτώνται από τη θερμοκρασία υβριδοποίησης και επί λανθασμένης θερμοκρασίας υβριδοποίησης προκύπτουν σφάλματα στη δοκιμασία.

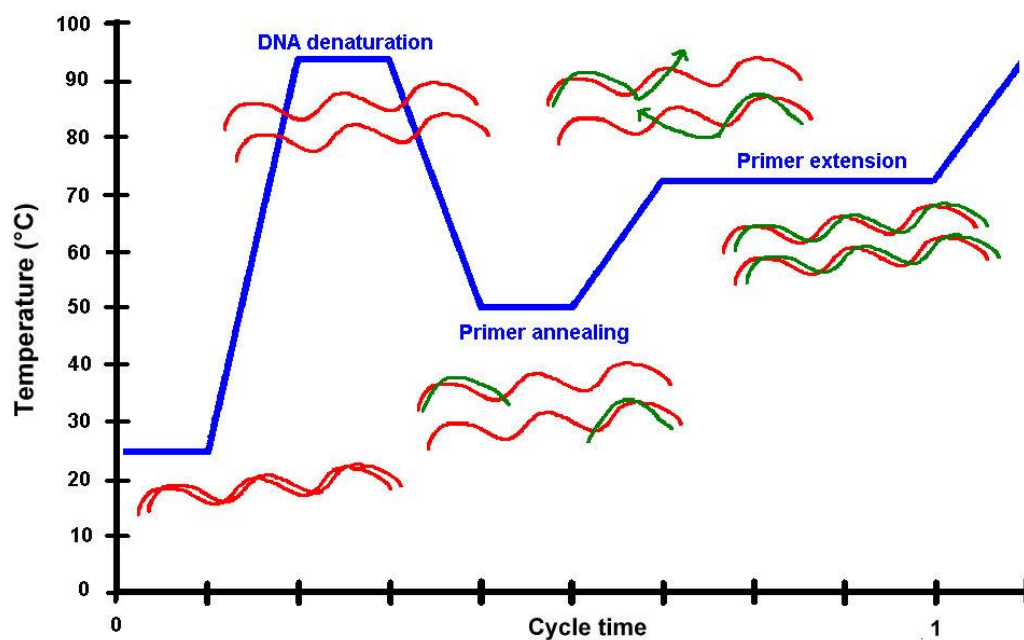
Το τρίτο και τελευταίο στάδιο είναι η επιμήκυνση των εκκινητών (extension), το οποίο πραγματοποιείται με αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C. Το στάδιο αυτό βασίζεται στη δράση της Taq DNA πολυμεράσης, η οποία παρουσιάζει μέγιστη δραστηριότητα σε αυτή τη θερμοκρασία (ιδανικά περί τους 75°C). Κατά το στάδιο αυτό, η Taq DNA πολυμεράση προσθέτει δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών με κατεύθυνση 5' προς 3', οδηγώντας έτσι στην παραγωγή των συμπληρωματικών νέων αλυσίδων DNA.

Μετά το πέρας του παραπάνω κύκλου τριών σταδίων ακολουθεί εκ νέου αποδιάταξη των προϊόντων, όπου οι νέες μικρές αλληλουχίες DNA που παράχθηκαν θα πρέπει να αποχωριστούν, προκειμένου να αποτελέσουν τα εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο της αντίδρασης. Για το σκοπό αυτό, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 94°C.

Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται κυκλικά για 25-40 κύκλους, ανάλογα με την επιθυμητή ποσότητα του υπό μελέτη προϊόντος.



Εικόνα 2.7. Τα τρία στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) [219].



Εικόνα 2.8. Οι απαιτούμενες μεταβολές της θερμοκρασίας ανάλογα με το κάθε στάδιο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης κατά τη διάρκεια ενός κύκλου [220].

2.5.2 Ποιοτική – Ποσοτική PCR

Η ποιοτική PCR (Qualitative PCR) χρησιμεύει στην ανίχνευση της παρουσίας ή απουσίας μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Έχει εφαρμογή σε περιπτώσεις, όπως η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών ή ιών.

Η ποσοτική PCR (Quantitative PCR, qPCR) χρησιμεύει στον ποσοτικό προσδιορισμό του παραγόμενου προϊόντος. Η ποσότητα γενετικού υλικού που εντοπίζεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σχετίζεται με την ποσότητα του γενετικού υλικού στο αρχικό δείγμα.

2.5.3 Μέθοδοι Ποσοτικής Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (qPCR)

Αναφέρονται διάφοροι μέθοδοι ποσοτικής PCR. Οι κυριότερες μέθοδοι είναι [221]:

- Ποσοτική συναγωνιστική PCR.
Σε αυτήν την μέθοδο, είναι απαραίτητη η παράλληλη ενίσχυση του άγνωστου δείγματος μαζί με ένα «συναγωνιστή», δηλαδή μια ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία παρόμοια με αυτή του DNA ή RNA στόχου.
- Ποσοτική PCR τελικού σημείου.
Σε αυτήν την μέθοδο, η ποσότητα του προϊόντος υπολογίζεται στο τέλος της αντίδρασης. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από ελάττωση της αξιοπιστίας της ποσοτικοποίησης, δεδομένου ότι, στο τέλος της αντίδρασης, τα αντιδρώντα έχουν καταναλωθεί, ενώ αναστολείς έχουν συσσωρευτεί.
- Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο.
Σε αυτήν την μέθοδο, η συγκέντρωση των αντιγράφων υπολογίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, με τη βοήθεια της κινητικής αντίδρασης φθορισμού. Σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, γίνεται μέτρηση του εκπέμποντος φθορισμού και σχηματίζεται μια καμπύλη καταγραφής, γνωστή ως καμπύλη ενίσχυσης, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα παρακολούθησης της όλης αντίδρασης, ενώ βρίσκεται σε εξέλιξη.

2.6 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ

ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ (Real-Time PCR ή Real-Time qPCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR) αποτελεί παραλλαγή της κλασσικής PCR, που ανακαλύφθηκε από τον Higuchi, το 1992 [222], η οποία επιτρέπει τον αξιόπιστο ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, καθώς επίσης και τη μελέτη αλλαγών ενός νουκλεοτιδίου (γονοτύπηση). Η δυνατότητα ενίσχυσης συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, την ανίχνευση των σχηματιζόμενων προϊόντων και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους καθιστούν τη μέθοδο αυτή ως ένα απαραίτητο εργαλείο στην έρευνα, που χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και επαναληψιμότητα.

Άλλα πλεονεκτήματα της μεθόδου έναντι της κλασσικής PCR περιλαμβάνουν την ταχύτερη πραγματοποίηση της αντίδρασης, τη δυνατότητα αποτελέσματος με μικρότερη ποσότητα αρχικού γενετικού υλικού, την ανίχνευση ακόμα και πολύ μικρού βαθμού ενίσχυσης, την απουσία σφαλμάτων από τη μετά-PCR επεξεργασία των προϊόντων (π.χ. ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης) που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα ή και επιμόλυνση και, τέλος, το κόστος, το οποίο δεν είναι πολύ μεγάλο συγκριτικά με την κλασσική PCR, εφόσον βέβαια είναι διαθέσιμος ο ανάλογος εξοπλισμός.

Κατά τη Real-Time PCR, ο ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου προϊόντος διενεργείται καθ'όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, γεγονός που θέτει αυτή την τεχνική σε πλεονεκτική θέση έναντι της κλασσικής PCR. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων επιτυγχάνεται μέσω ανίχνευσης του αυξημένου φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού αυξάνει ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος και έχει σχέση με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Κατόπιν, με το τέλος της αντίδρασης, κατάλληλο λογισμικό επεξεργάζεται την εκπεμπόμενη ποσότητα φθορισμού.

2.6.1 Τεχνικές ανίχνευσης φθορισμού στην RT – PCR

Η παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο με την ταυτόχρονη ανίχνευση των προϊόντων καθίσταται εφικτή με την καταγραφή σημάτων φθορισμού που προέρχονται από φθορίζουσες χρωστικές που αλληλεπιδρούν με το DNA. Τα σήματα φθορισμού που παράγονται κατά τη διάρκεια της Real-Time PCR παρουσιάζουν συσχέτιση με την ποσότητα του προϊόντος που υπάρχει στην αντίδραση, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα άμεσου προσδιορισμού του αριθμού των αντιγράφων της υπό μελέτη αλληλουχίας.

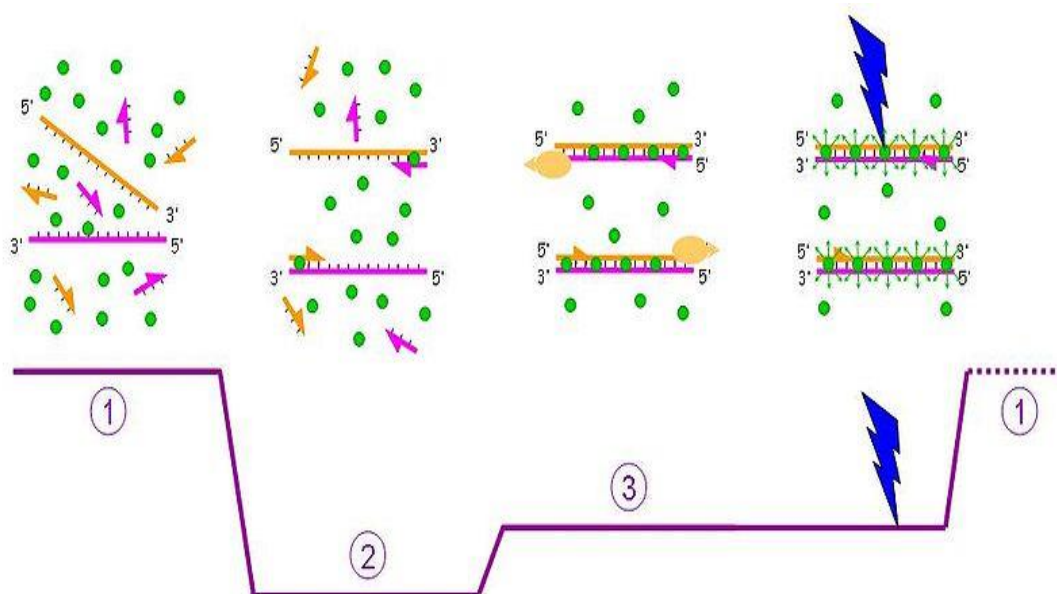
Διακρίνονται δύο τεχνικές ανίχνευσης φθορισμού της προς ενίσχυση αλληλουχίας-στόχου:

- 1) Ανίχνευση μέσω ανεξάρτητων-μη ειδικών αλληλουχιών
Οι μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές είναι ελεύθερες στο διάλυμα PCR και προσδένονται σε οποιαδήποτε διπλή έλικα του μορίου DNA (double-stranded DNA), ανιχνεύοντας έτσι όλα τα δίκλινα μόρια DNA που ενισχύονται κατά την αντίδραση, ανεξαρτήτως αλληλουχίας.
- 2) Ανίχνευση μέσω ειδικών αλληλουχιών-ανιχνευτών.
Οι φθορίζουσες χρωστικές είναι δεσμευμένες σε ειδικές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, τους ανιχνευτές (probes), οι οποίοι υβριδίζονται με την συμπληρωματική τους αλληλουχία στο DNA, η οποία είναι η αλληλουχία – στόχος. Με τη συγκεκριμένη τεχνική ανίχνευσης καθίσταται δυνατός ο διαχωρισμός της ενισχυόμενης υπό μελέτη αλληλουχίας από άλλα μη ειδικά προϊόντα, που μπορεί να ενισχύονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, καθώς και από ενδεχόμενα διμερή των εκκινητών [223].

2.6.1.A Ανίχνευση μέσω ανεξάρτητων-μη ειδικών αλληλουχιών (Sequence-Independent Detection Assay)

Η πιο συνήθης μη ειδική φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιείται σε αυτήν την μέθοδο, είναι η SYBR green I χρωστική, η οποία διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 488 nm και εκπέμπει σε μήκος κύματος 522 nm.

Η SYBR green I χρωστική είναι μια κυανιούχος χρωστική, η οποία προσδένεται σε δίκλινα μόρια DNA (dsDNA). Όταν προσδεθεί στο dsDNA, παράγεται αυξημένος φθορισμός. Αντιθέτως, όταν η SYBR green I χρωστική είναι ελεύθερη στο διάλυμα PCR εκπέμπει ελάχιστο ή καθόλου φθορισμό. Επομένως, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, η ένταση φθορισμού της SYBR green I χρωστικής είναι ευθέως ανάλογη προς τη συγκέντρωση του ενισχυόμενου προϊόντος [224] (Εικόνα 2.9).



Εικόνα 2.9. Ανίχνευση μέσω της μη ειδικής φθορίζουσας χρωστικής SYBR green I. 1) Στο στάδιο της αποδιάταξης, υπάρχουν μονόκλιωνα μόρια DNA, με τα οποία δεν αλληλεπιδρά η χρωστική και επομένως δεν εκπέμπεται φθορισμός. 2) Στο στάδιο υβριδοποίησης των εκκινητών, οι PCR εκκινητές υβριδίζονται με την αλληλουχία-στόχο, σχηματίζοντας μικρές περιοχές dsDNA, με τις οποίες αλληλεπιδρά η χρωστική, αυξάνοντας ελαφρώς το σήμα φθορισμού. 3) Στη φάση επιμήκυνσης, σχηματίζεται περισσότερο dsDNA, το οποίο αλληλεπιδρά με περισσότερη χρωστική, αυξάνοντας περαιτέρω το σήμα φθορισμού. 4) Στο τέλος της φάσης επιμήκυνσης, όλο το DNA γίνεται δίκλωνο, αλληλεπιδρώντας με τη μέγιστη ποσότητα χρωστικής. Η μέτρηση του φθορισμού (522nm) πραγματοποιείται στο τέλος κάθε φάσης επιμήκυνσης [225].

Η τεχνική αυτή αποτελεί μια οικονομική μέθοδο με χαμηλή όμως ευαισθησία. Η δυνατότητα εφαρμογής της με οποιοδήποτε ζεύγος εκκινητών προς ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας – στόχου μειώνει σημαντικά το οικονομικό κόστος. Ωστόσο, η SYBR green I χρωστική δεσμεύεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA, εκπέμποντας φθορισμό, ανεξαρτήτως αν πρόκειται για το προϊόν – στόχος ή άλλα μη ειδικά προϊόντα ή διμερή των εκκινητών. Το γεγονός αυτό μειώνει την ευαισθησία της τεχνικής, καθώς μπορεί να έχει ως συνέπεια υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της υπό μελέτη αλληλουχίας.

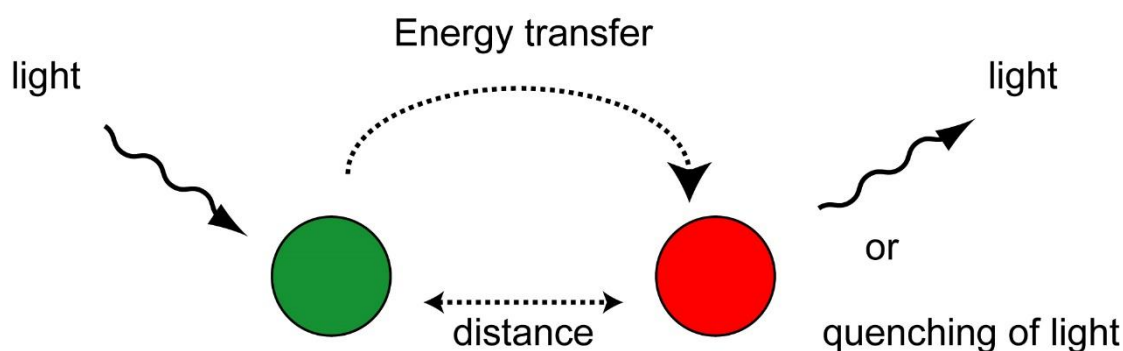
2.6.1.B Ανίχνευση μέσω ειδικών αλληλουχιών-ανιχνευτών (Sequence-Specific Probe Binding Assay)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στη χρήση ανιχνευτή (probe) ειδικού για την υπό μελέτη αλληλουχία, με την οποία είναι συμπληρωματικός. Ως ανιχνευτής ορίζεται μια αλληλουχία γενετικού υλικού 100-1000bp συμπληρωματική με την αλληλουχία που μελετάται και μόνο με την οποία μπορεί να υβριδισθεί. Προκειμένου να επιτευχθεί η σύνδεση ανιχνευτή και αλληλουχίας-στόχου, η αλληλουχία αυτή θα πρέπει να έχει υποστεί αποδιάταξη και να είναι σε μονόκλωνη μορφή. Ο ανιχνευτής μπορεί να σημανθεί με διάφορες φθορίζουσες

χρωστικές, οι οποίες διεγείρονται και εκπέμπουν σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα σαφούς διαχωρισμού τους. Ο εκπέμπων φθορισμός λαμβάνεται από το μηχανήμα και καταγράφεται μέσω κατάλληλου λογισμικού.

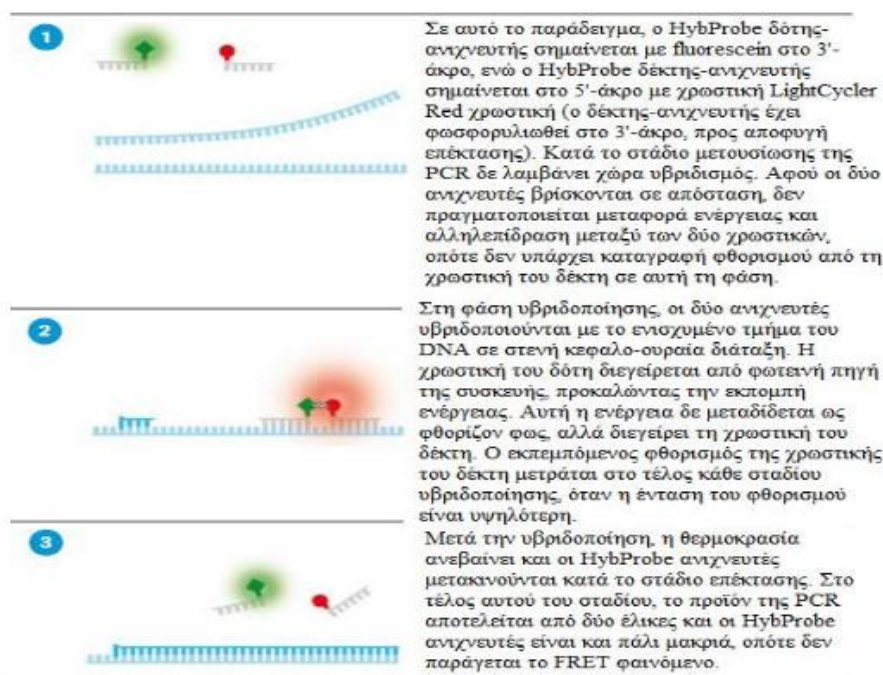
Σε αυτή την κατηγορία ανιχνευτών, που χρησιμοποιούνται για αυτή την τεχνική, περιλαμβάνονται οι ανιχνευτές υβριδοποίησης Hybridization probes (HybProbe probes), οι ανιχνευτές υδρόλυσης Taqman probes (Hydrolisis Probes), οι ανιχνευτές Molecular beacon και οι ανιχνευτές Scorpions.

Η λειτουργία των ανιχνευτών υβριδοποίησης (Hybridization probes) (Εικόνα 2.10) και των ανιχνευτών υδρόλυσης (Hydrolisis Probes) (Εικόνα 2.11) βασίζεται στην αρχή μεταφοράς ενέργειας με απορρόφηση φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer- FRET), σύμφωνα με την οποία η ενέργεια μεταφέρεται από έναν φθορίζοντα δότη (donor) σε έναν παρακαείμενο φθορίζοντα δέκτη (acceptor) (Εικόνα 2.12).

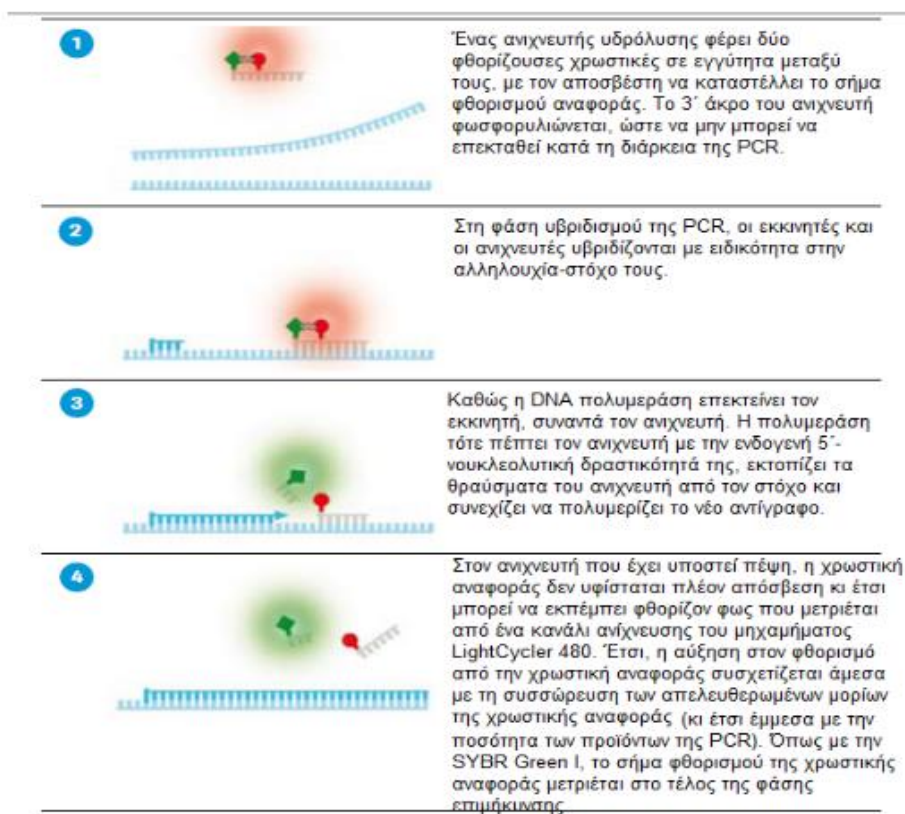


Εικόνα 2.12. Φαινόμενο FRET. Η μεταφορά ενέργειας με απορρόφηση φθορισμού εξαρτάται σημαντικά από την απόσταση μεταξύ των δύο φθορίζουσων χρωστικών, οι οποίες θα πρέπει να βρίσκονται σε στενή απόσταση η μια από την άλλη (απόσταση 3-4 νουκλεοτιδίων). Επιπλέον, η αποτελεσματική μεταφορά ενέργειας με απορρόφηση φθορισμού απαιτεί ικανοποιητική αλληλοεπικάλυψη (> 30%) ανάμεσα στο φάσμα εκπομπής του φθορίζοντα δότη και στο φάσμα απορρόφησης του φθορίζοντα δέκτη [226].

Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται τέσσερα ολιγονουκλεοτίδια, δηλαδή δύο εκκινητές (primers) και δύο ανιχνευτές (probes). Οι ανιχνευτές είναι ειδικοί να υβριδίζονται με την αλληλουχία-στόχο σε κοντινές μεταξύ τους θέσεις (διαφορά 3-4 νουκλεοτίδια). Ο πρώτος ανιχνευτής είναι σημασμένος με φθορίζουσα χρωστική (φλουορεσκεΐνη- fluorescein, FL) στο 3' άκρο του. Η φθορίζουσα χρωστική διεγείρεται από ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, μήκους κύματος 483nm, που εκπέμπεται από πηγή φωτός του μηχανήματος Real-Time PCR και εκπέμπει φθορίζον φως σε μεγαλύτερο και συγκεκριμένο μήκος κύματος. Ο ανιχνευτής αυτός δρα ως δότης ενέργειας (donor) για το δεύτερο ανιχνευτή, ο οποίος επίσης είναι σημασμένος με φθορίζουσα χρωστική (Light Cyclor Red 640, LC) στο 5' άκρο του και δρα ως δέκτης ενέργειας (acceptor). Επομένως όταν οι δυο ανιχνευτές βρεθούν ο ένας δίπλα στον άλλον, κατά τη διάρκεια του υβριδισμού, ο ανιχνευτής-δότης εκπέμπει συγκεκριμένο μήκος κύματος που διεγείρει τον ανιχνευτή-δέκτη, ο οποίος, κατά την αποδιέγερσή του, εκπέμπει κόκκινο φθορίζον φως σε ένα ακόμα μεγαλύτερο μήκος κύματος.



Εικόνα 2.10. Μηχανισμός λειτουργίας των ανιχνευτών υβριδοποίησης (Hybridization probes) [224].



Εικόνα 2.11. Μηχανισμός λειτουργίας των ανιχνευτών υδρόλυσης (Hydrolisis Probes) [224].

Επομένως, κατά την εξέλιξη της αντίδρασης, παρατηρείται μεταφορά ενέργειας από τη φθορίζουσα χρωστική του δότη στη φθορίζουσα χρωστική του δέκτη, με αποτέλεσμα την εκπομπή φθορισμού διαφορετικού μήκους κύματος. Η μεταβολή του μήκους κύματος του φθορισμού ανιχνεύεται από τον θερμοκυκλοποιητή, ο οποίος καταγράφει το σήμα φθορισμού. Το σήμα φθορισμού αυξάνει ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου DNA και είναι αντιστρόφως ανάλογο του χρόνου της αντίδρασης.

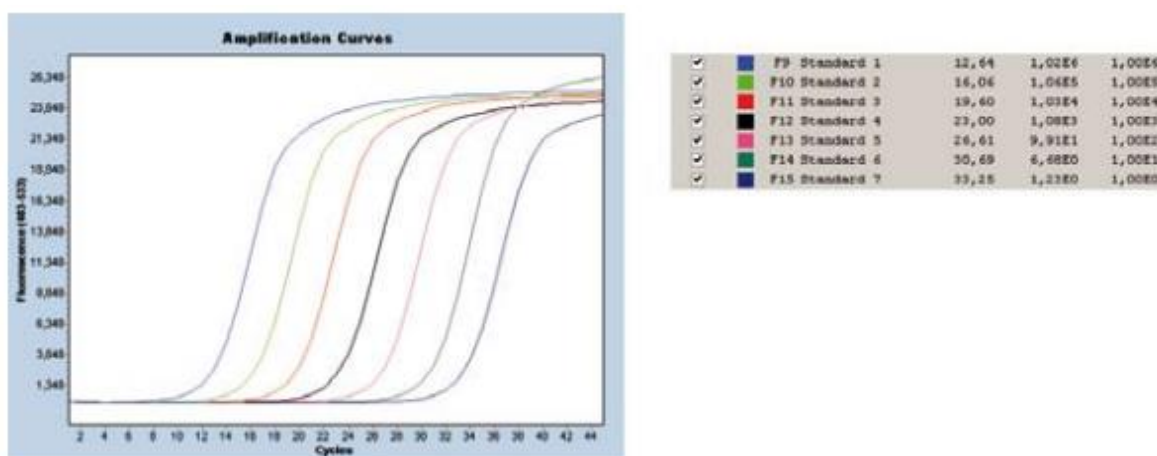
2.6.2 Επεξεργασία εκπεμπόμενης ποσότητας φθορισμού

Μετά από κάθε κύκλο Real-Time PCR, παράγεται μια καμπύλη γνωστή ως καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), η οποία αντικατοπτρίζει τον εκπέμποντα φθορισμό. Με τον τρόπο αυτό, παρέχεται η δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, δίνοντας πληροφορίες ανά πάσα στιγμή.

Διακρίνονται τρεις φάσεις κατά την ποσοτική Real-Time PCR [224] (Εικόνα 2.13) :

- Αρχική/Λανθάνουσα ή Background Φάση (Initial Lag Phase)
Η φάση αυτή εκτείνεται μέχρι το σημείο εκείνο όπου το σήμα φθορισμού του προϊόντος της PCR γίνεται μεγαλύτερο από το σήμα φθορισμού του μη-ειδικού σήματος υποβάθρου.
Το σημείο αυτό ορίζεται ως C_p (crossing point) και χαρακτηρίζεται από ένταση φθορισμού αντίστοιχη με το δεκαπλάσιο της τυπικής απόκλισης του ανιχνεύσιμου σήματος. Αντιστοιχεί σε έναν αριθμό κύκλων αντίδρασης και χρησιμεύει στην ποσοτική ανάλυση. Η τιμή του C_p είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος, δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του C_p , τόσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος.
- Εκθετική Φάση (Exponential Phase)
Η φάση αυτή εκτείνεται από το σημείο εκείνο όπου έχει συσσωρευτεί σημαντική ποσότητα προϊόντος, ώστε να ανιχνεύεται πάνω από το background, μέχρι το σημείο όπου η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης αρχίζει να ελαττώνεται.
Κατά τη φάση αυτή, υπάρχουν όλα τα αναγκαία αντιδραστήρια σε επαρκή βαθμό, με αποτέλεσμα τον ακριβή διπλασιασμό της αλληλουχίας-στόχο σε κάθε κύκλο της αντίδρασης.
- Φάση Κορεσμού (Plateau Phase)
Η φάση αυτή ξεκινάει από το σημείο όπου η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης αρχίζει να ελαττώνεται και τελειώνει όταν η καμπύλη φτάσει σε σημείο κορεσμού, όπου η αντίδραση σταματάει.
Η φάση αυτή σχετίζεται με την προοδευτική εξάντληση των αντιδραστηρίων και την ταυτόχρονη συσσώρευση αναστολέων της αντίδρασης, μετά από αρκετούς κύκλους

της αντίδρασης, με αποτέλεσμα την προοδευτική μείωση της ταχύτητας της αντίδρασης και της παραγόμενης ποσότητας της επιθυμητής αλληλουχίας.



Εικόνα 2.13. Καμπύλη ενίσχυσης. Διακρίνονται οι τρεις φάσεις της ποσοτικής Real-Time PCR: η αρχική Λανθάνουσα φάση, η Εκθετική φάση και η φάση Κορεσμού. Ο αριθμός των κύκλων, μετά τον οποίον η κάθε αντίδραση αυξάνει πάνω από το background, εξαρτάται από την αρχική ποσότητα του υποστρώματος. Το σημείο, στο οποίο το σήμα φθορισμού ενός δείγματος αυξάνει πάνω από το σήμα φθορισμού του υπόβαθρου (background), ορίζεται ως σημείο Cp (Crossing point) του δείγματος [224].

Τα αποτελέσματα από τη μετά-PCR ανάλυση των σημάτων φθορισμού, υπό τη μορφή της καμπύλης τήξεως (melting curve), μπορούν να χρησιμεύσουν τόσο για το χαρακτηρισμό του προϊόντος, όσο και για τον προσδιορισμό του γονότυπου [224].

2.6.3 Ποσοτικοποίηση μέσω της τεχνικής Real-Time PCR

Όπως έχει αναφερθεί, η μέθοδος της Real-Time PCR παρέχει τη δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, με παράλληλο ποσοτικό προσδιορισμό των σχηματιζόμενων προϊόντων. Ο ποσοτικός προσδιορισμός μπορεί να είναι απόλυτος ή σχετικός. Ο απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός υπολογίζει την ποσότητα των αντιγράφων του δείγματος με τη βοήθεια μιας καμπύλης αναφοράς. Ο σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός υπολογίζει το ρυθμό έκφρασης ενός γονιδίου-στόχου σε σχέση με το ρυθμό παραγωγής mRNA του κυττάρου.

2.6.3.A Απόλυτος Ποσοτικός Προσδιορισμός (Absolute Quantification)

Ο απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός εκφράζεται ως απόλυτες τιμές (αντίγραφα ανά ml) και γίνεται με τη βοήθεια μιας καμπύλης αναφοράς, η οποία σχεδιάζεται με συνεχόμενες αραιώσεις ενός δείγματος αναφοράς, του οποίου η συγκέντρωση είναι γνωστή. Η ενίσχυση του δείγματος αναφοράς πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο σε σχέση με το υπό μελέτη δείγμα, δηλαδή ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας, ίδια συγκέντρωση αντιδραστηρίων, ίδιους εκκινητές και ίδια απόδοση. Σκοπός της καμπύλης αναφοράς είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός άγνωστων δειγμάτων γενετικού υλικού [224]. (Εικόνα 37).

2.6.3.B Σχετικός Ποσοτικός Προσδιορισμός (Relative Quantification)

Ο σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός επιτρέπει τον υπολογισμό των μεταβολών στα επίπεδα mRNA ενός γονιδίου ως προς το επίπεδο έκφρασης ενός γονιδίου αναφοράς. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως κλάσμα επιπέδων έκφρασης δύο γονιδίων. Το γονίδιο αναφοράς είναι συνήθως ένα διατηρημένο γονίδιο με σταθερή έκφραση σε όλα τα κύτταρα και τους ιστούς ενός οργανισμού και σχετίζεται με ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες.

2.6.4 Διαδικασία – Πρωτόκολλο

Στην παρούσα μελέτη διενεργήθηκε ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time qPCR) με τη χρήση ανιχνευτών υβριδοποίησης (Hybridisation probes).

2.6.4.A Αντιδραστήρια – Εξοπλισμός

- Κυκλοθερμοποιητής Light Cycler 480 της εταιρείας Roche (Εικόνα 2.14)
Σύνδεση με ηλεκτρονικό υπολογιστή που φέρει κατάλληλο λογισμικό για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 2.14. Κυκλοθερμοποιητής Light Cyclor 480 (Roche)

- LightCycler 480 Genotyping Master mix
- LightCycler 480 H₂O
- LightCycler 480 MgCl₂
- Εκκινητές (Primers)
- Ανιχνευτές (Hybridisation probes)
- Μικροπλακέτες των 96 θέσεων (Εικόνα 2.15) και ταινίες επικόλλησης (Εικόνα 2.16)



Εικόνα 2.15. LightCycler 480 Multiwell Plate 96 white



Εικόνα 2.16 LightCycler 480 Sealing Foil

- Πιπέτες των 5, 10, 20, 100 και 200 μ l
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf

Το Master mix περιέχει την DNA Taq πολυμεράση και μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων (dNTPs mix), τα οποία είναι απαραίτητα στο στάδιο επιμήκυνσης της αντίδρασης, καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα (buffer).

Οι εκκινητές (primers) και οι ανιχνευτές (probes) που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, σχεδιάστηκαν ειδικά από την TIB-MOLBIOL. Οι αλληλουχίες των εκκινητών (primers) (sense και antisense) και των ανιχνευτών (probes) (FL και LC) φαίνονται στον Πίνακα 2.3.

mRNA	Sequence	T _m
DAZL Sense	5'-GCT ATG TTG TAC CTC CGG CTT A-3'	57.1 ⁰ C
DAZL Antisense	5'-GCC CGA CTT CTT CTA AAG TGA TG-3'	57.6 ⁰ C
DAZL (probe)	5' - LC640-ACT GAA CAT TCA TTT GGC ACA ACT TCA GCT --PH	65.2 ⁰ C
DAZL (probe)	5' - TTT CCA GAG GGT GGA GTA GCT TCA TG - FL	63.4 ⁰ C

Πίνακας 2.3. Εκκινητές και ανιχνευτές της Real-Time PCR για το γονίδιο-στόχο DAZL.

2.6.4.B Πρωτόκολλο

Στο παρόν πείραμα, εφαρμόστηκε η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν τα κατάλληλα αντιδραστήρια τόσο για το γονίδιο-στόχο DAZL όσο και για το γονίδιο αναφοράς G6PD.

Τα βήματα του πειράματος παραμένουν ίδια, με μοναδική διαφοροποίηση στις ποσότητες του κάθε διαλύματος για την αντίδραση κάθε γονιδίου.

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

- 1) Προσθήκη σε ένα σωληνάριο eppendorf (μίγμα 1): 2,0μl Master mix
4,0μl Primer mix
2,4μl MgCl₂
και 6,6μl H₂O

όσον αφορά το γονίδιο αναφοράς G6PD.

- 2) Προσθήκη σε άλλο σωληνάριο eppendorf (μίγμα 2): 4,0μl Master mix
- 0,5μl Primer 1 (Sense)
- 0,5μl Primer 2 (Antisense)
- 0,2μl Hyprobe 1 (FL)
- 0,2μl Hyprobe 2 (LC640)
- και 9,6μl H₂O

όσον αφορά το γονίδιο DAZL.

Οι παραπάνω ποσότητες προστίθενται επί η, όπου η αντιστοιχεί στον αριθμό των υπό μελέτη δειγμάτων.

- 3) Καλή ανάδευση των αντιδραστηρίων και μεταφορά 15μl του μίγματος 2 σε διαφορετική θέση στη μικροπλακέτα για κάθε δείγμα που μελετάται.
- 4) Προσθήκη 5μl cDNA του υπό μελέτη δείγματος σε κάθε θέση της μικροπλακέτας που φέρει το μίγμα 2.
- 5) Μεταφορά των 15μl του μίγματος 1 σε συγκεκριμένη θέση της μικροπλακέτας και προσθήκη 5μl δείγματος γνωστής συγκέντρωσης για το γονίδιο αναφοράς G6PD στην ίδια θέση.
- 6) Προσεκτική τοποθέτηση κολλητικής διαφάνειας στη μικροπλακέτα (Εικόνα 2.17).



Εικόνα 2.17. Τοποθέτηση κολλητικής διαφάνειας στη μικροπλακέτα

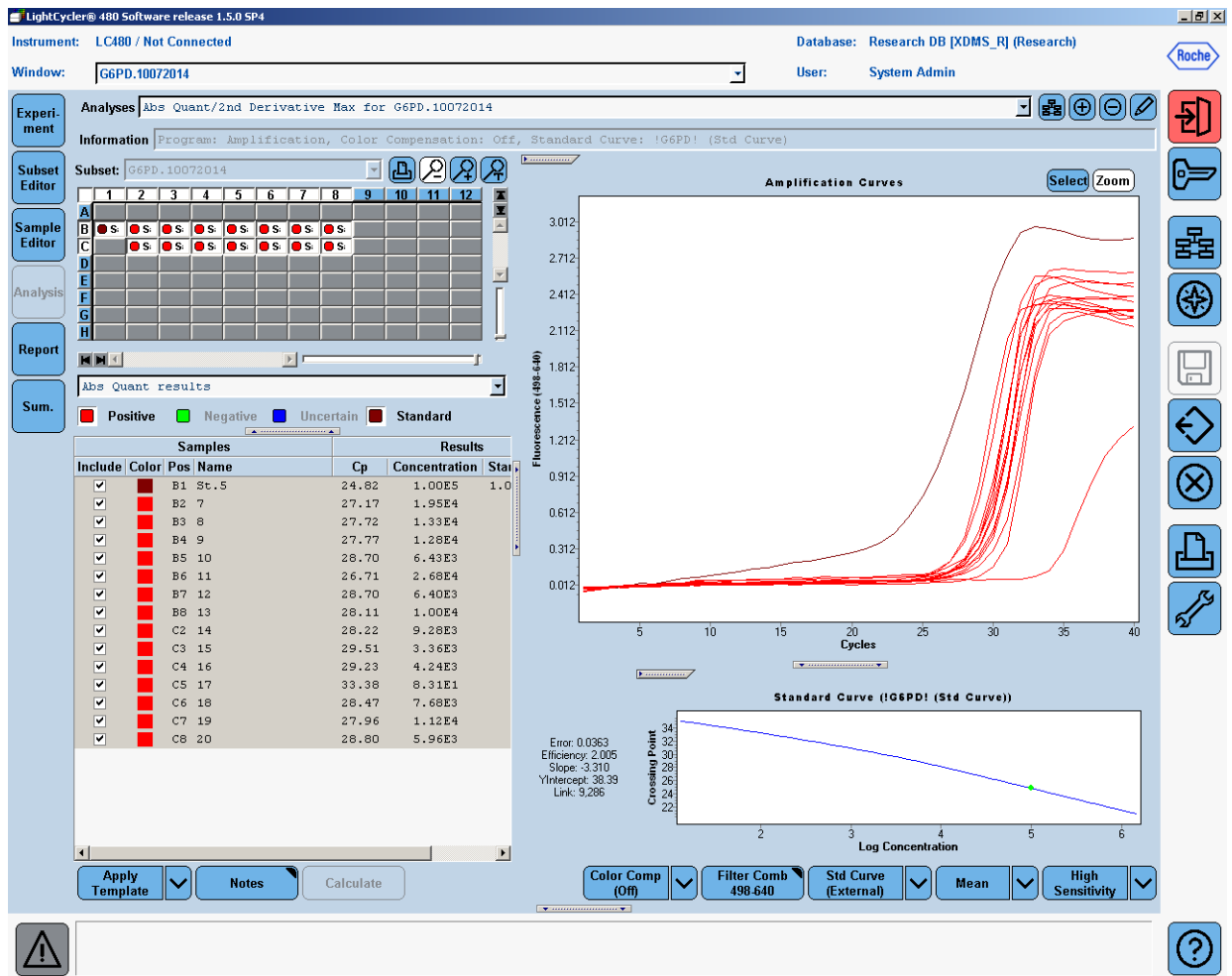
- 7) Φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές για 1 λεπτό, στους 25°C.
- 8) Τοποθέτηση της μικροπλακέτας στον κυκλοθερμοποιητή LightCycler 480 και εκτέλεση της αντίδρασης με το κατάλληλο λογισμικό.
- 9) Εκτέλεση 40 κύκλων της αντίδρασης, μετά τους οποίους θα προκύψουν τα ποσοτικά αποτελέσματα συγκριτικά με την καμπύλη αναφοράς του γονιδίου αναφοράς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ανίχνευση της ποσοτικής έκφρασης του γονιδίου DAZL πραγματοποιείται σε 20 δείγματα τροφοβλαστικών κυττάρων μετά από βιοψία χοριακών λαχνών (CVS) . Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται υπό τη μορφή πινάκων και εικόνων από το λογισμικό της τεχνικής Real - Time PCR.

3.1 G6PD

Το ένζυμο G6PD ή αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης συνιστά ένα εξειδικευμένο ένζυμο που καταλύει μια ενδιάμεση αντίδραση κατά την οξειδωτική φάση της πορείας των φωσφορικών πεντοζών και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στο μεταβολισμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Το ένζυμο αυτό κωδικοποιείται από ένα γονίδιο, για το οποίο είναι γνωστό ότι είναι πάντα παρόν στο γενετικό υλικό όλων των κυττάρων. Συνεπώς το γονίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για το πείραμα της παρούσας μελέτης, δηλώνοντας, με την παρουσία έκφρασής του, την ύπαρξη γενετικού υλικού στο υπό μελέτη δείγμα των κυττάρων, το οποίο μπορεί να μελετηθεί για την ανίχνευση και την ποσοτική έκφραση και άλλων γονιδίων (Εικόνα 3.1).



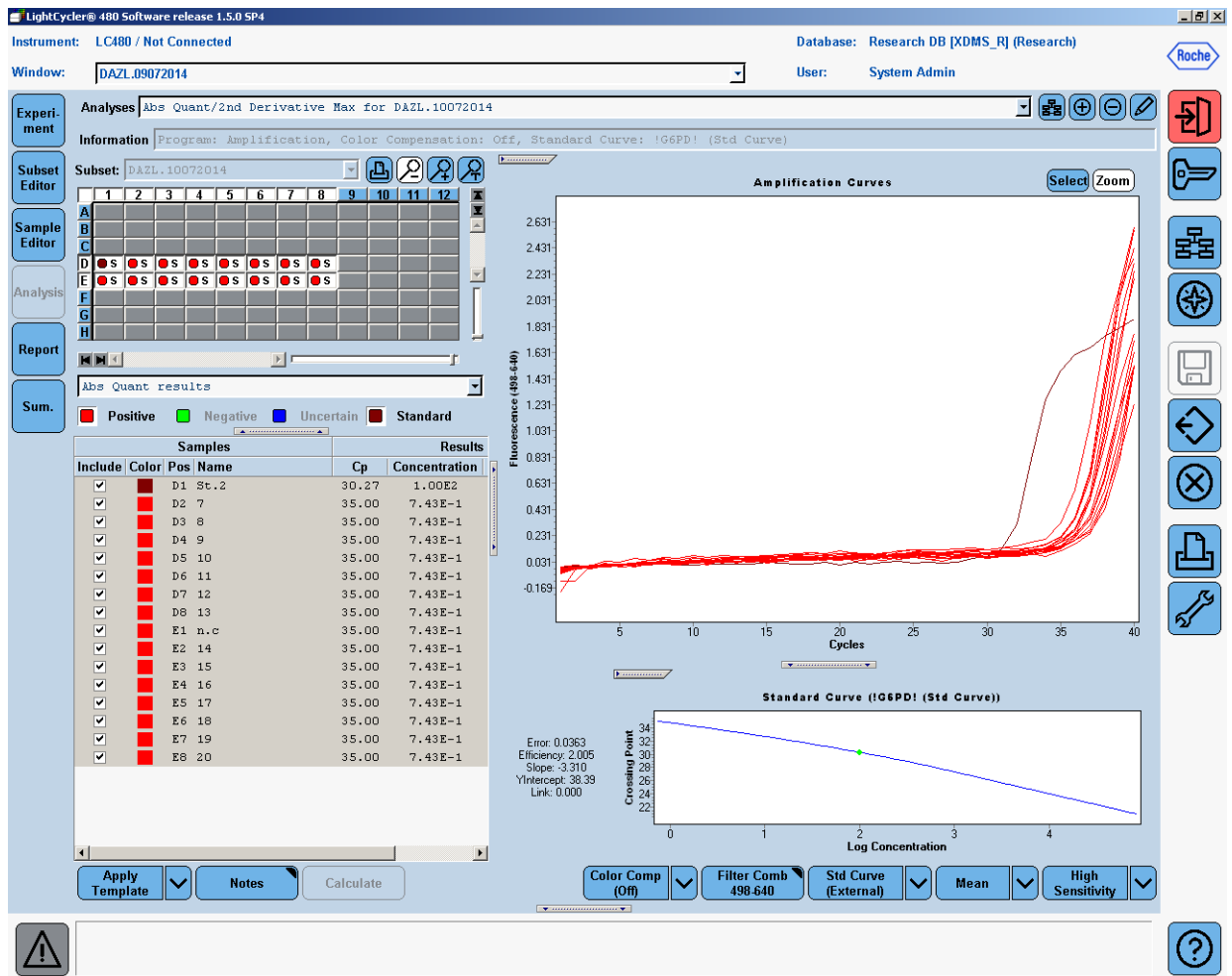
Εικόνα 3.1. Ενδεικτικές τιμές Cp και συγκεντρώσεων για το γονίδιο αναφοράς, όπως απεικονίζονται από το λογισμικό πρόγραμμα μετά το πέρας του πειράματος. Οι κόκκινες καμπύλες του διαγράμματος αντιστοιχούν στα δείγματα που εκφράζουν το γονίδιο G6PD και η καφέ καμπύλη αντιστοιχεί σε δείγμα γνωστής συγκεντρώσεως για το γονίδιο.

3.2 Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ DAZL ΣΕ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ CVS

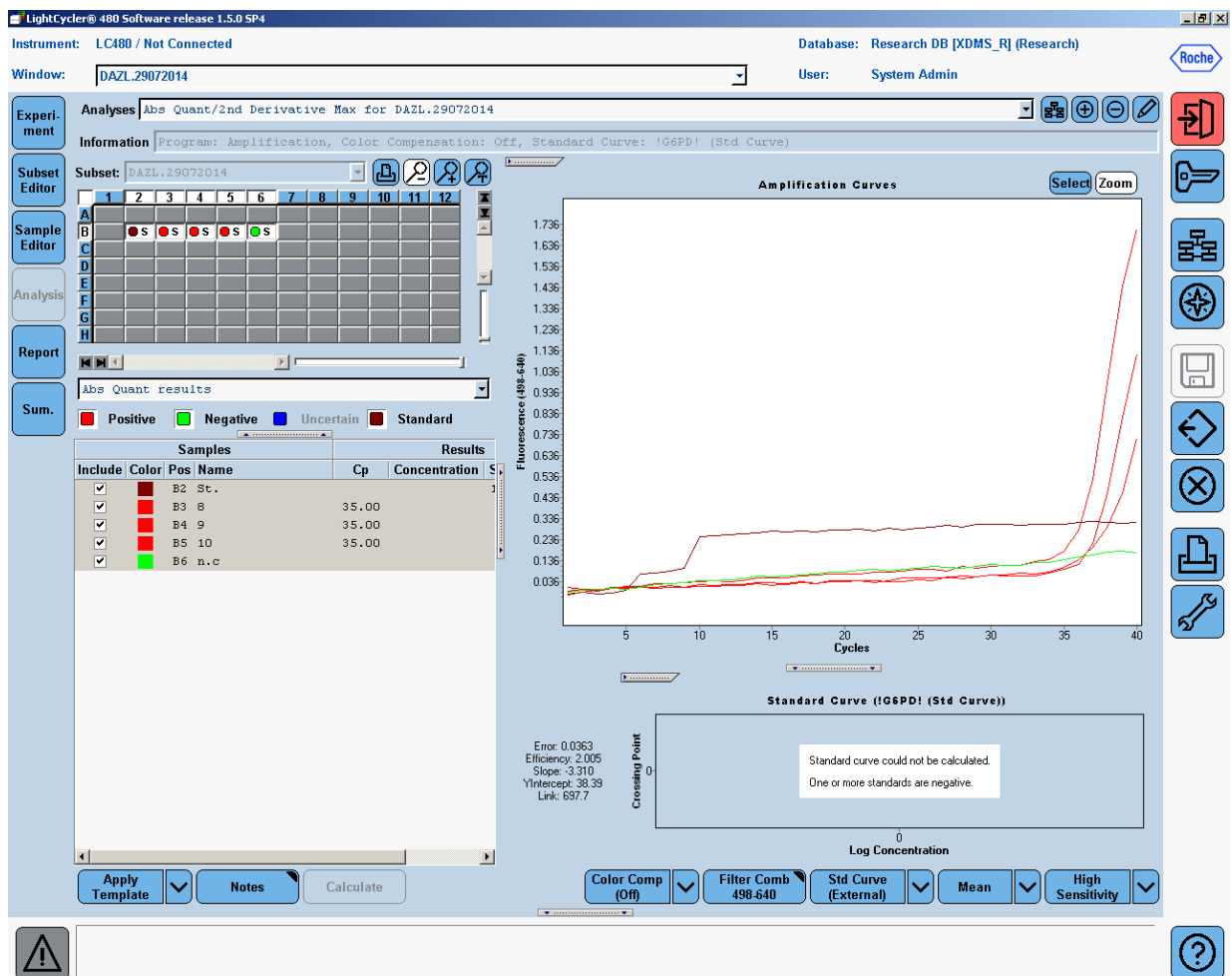
Το γονίδιο DAZL παρουσίασε ελάχιστη θετική έκφραση σε όλα τα δείγματα της μελέτης, η οποία επαληθεύτηκε με εκτέλεση της αντίδρασης Real – Time PCR σε όλα τα δείγματα για δεύτερη φορά. Επομένως, όλα τα δείγματα παρουσίασαν μια ελάχιστη έκφραση του γονιδίου DAZL, διαφορετική του μηδενός, η οποία δε μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα, δεδομένης της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων (Πίνακας 3.1, Εικόνα 3.2, Εικόνα 3.3).

Δείγμα	Έκφραση	Cp	Concentration
1	+	35,00	2
2	+	33,53	16
3	+	34,46	5
4	+	33,82	11
5	+	35,00	3
6	+	33,91	11
7	+	35,00	7
8	+	35,00	7
9	+	35,00	7
10	+	35,00	7
11	+	35,00	7
12	+	35,00	7
13	+	35,00	7
14	+	35,00	7
15	+	35,00	7
16	+	35,00	7
17	+	35,00	7
18	+	35,00	7
19	+	35,00	7
20	+	35,00	7

Πίνακας 3.1. Αποτελέσματα ποσοτικής έκφρασης του γονιδίου DAZL στα 20 δείγματα της παρούσας μελέτης. Η έκφραση του γονιδίου είναι θετική αλλά με μικρό αριθμό αντιγράφων/ml.



Εικόνα 3.2. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων από το λογισμικό πρόγραμμα. Οι κόκκινες καμπύλες του διαγράμματος αντιστοιχούν στα δείγματα που εκφράζουν το γονίδιο DAZL και η καφέ καμπύλη αντιστοιχεί σε δείγμα γνωστής συγκέντρωσης για το γονίδιο αναφοράς G6PD (κάτω-δεξιά: πρότυπη καμπύλη του γονιδίου αναφοράς G6PD).



Εικόνα 3.3. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων από το λογισμικό πρόγραμμα. Η πράσινη καμπύλη αντιστοιχεί σε δείγμα, όπου δεν εκφράζεται το υπό μελέτη γονίδιο. Ειδικότερα, στο παρόν πείραμα, η πράσινη καμπύλη αντιπροσωπεύει τον αρνητικό μάρτυρα (n.c = negative control), ο οποίος αναμενόταν να μην παρουσιάσει έκφραση του γονιδίου, δεδομένου ότι είχε προστεθεί νερό αντί για δείγμα μαζί με τα αντιδραστήρια της Real - Time PCR, με σκοπό την επιβεβαίωση της ορθής λειτουργίας των αντιδραστηρίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου DAZL σε τροφοβλαστικά κύτταρα που λαμβάνονται με βιοψία χοριακών λαχνών στα πλαίσια του προγεννητικού ελέγχου στο τέλος του 1^{ου} τριμήνου της κύησης. Με την ολοκλήρωση του πειράματος, παρατηρήθηκε ελάχιστη έκφραση του γονιδίου DAZL, διαφορετική του μηδενός, η οποία δε μπορεί να θεωρηθεί ως αμελητέα.

Η έκφραση του γονιδίου DAZL έχει μελετηθεί σε διάφορους εμβρυϊκούς και εξωεμβρυϊκούς ιστούς.

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που έχουν δείξει την έκφραση του γονιδίου DAZL στους εμβρυϊκούς όρχεις και στις εμβρυϊκές ωοθήκες [119, 125, 139, 142, 151]. Η ανεύρεση έκφρασης του γονιδίου DAZL σε αυτούς τους εμβρυϊκούς ιστούς ήταν αναμενόμενη, καθώς το γονίδιο DAZL είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των γεννητικών κυττάρων σε διάφορα είδη. Η έκφραση του γονιδίου DAZL κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων της γαμετογένεσης αντικατοπτρίζει το σημαντικό ρόλο αυτού του γονιδίου στη ρύθμιση της ανδρικής και γυναικείας αναπαραγωγής από την ανάπτυξη των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων μέχρι τη διαφοροποίηση και ωρίμανση των γεννητικών κυττάρων από τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα. Το γονίδιο DAZL εμπλέκεται καθοριστικά στην ικανότητα των γεννητικών κυττάρων να διαφοροποιούνται ως προς το φύλο είτε σε ωογόνια είτε σε σπερματογόνια [122-125].

Ωστόσο, εκτός από τους εμβρυϊκούς ιστούς, έκφραση του γονιδίου DAZL έχει παρατηρηθεί και σε εξωεμβρυϊκούς ιστούς, όπως ο πλακούντας, το αμνιακό υγρό, η αμνιακή μεμβράνη και το έλυτρο του Wharton του ομφαλίου λώρου.

Οι Jones και συνεργάτες, το 2012, έδειξαν την έκφραση γονιδίων-δεικτών των γεννητικών κυττάρων, μεταξύ των οποίων και του γονιδίου DAZL, σε χοριακά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα τόσο από πλακούντα πρώτου τριμήνου, όσο και από πλακούντα τρίτου τριμήνου [97]. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνεται από την παρούσα μελέτη, που επίσης έδειξε την έκφραση του γονιδίου DAZL σε χοριακές λάχνες πρώτου τριμήνου. Η παρατήρηση αυτή πιθανώς να σχετίζεται με την ύπαρξη κυττάρων αρχέγονης προέλευσης στις χοριακές λάχνες, τα οποία έχουν παραμείνει στον πλακουντιακό ιστό πριν από την έναρξη της μετανάστευσης στις αρχέγονες γονάδες.

Εκτός όμως από τον πλακουντιακό ιστό, έκφραση του γονιδίου έχει βρεθεί και στο αμνιακό υγρό. Το 2008, οι Στεφανίδης και συνεργάτες έδειξαν, για πρώτη φορά, την έκφραση του γονιδίου DAZL σε κύτταρα αμνιακού υγρού που ελήφθησαν με αμνιοπαρακέντηση μετά τη 18^η εβδομάδα της κύησης [227]. Παρόμοια παρατήρηση έκαναν και οι Lai και συνεργάτες, το 2013 που, επίσης, έδειξαν έκφραση του γονιδίου DAZL σε κύτταρα αμνιακού υγρού [228] και, ακολούθως, το 2014, οι Yu και συνεργάτες διαπίστωσαν ανάλογη έκφραση του γονιδίου στο αμνιακό υγρό [229].

Το 2012, οι Enron και συνεργάτες μελέτησαν μεμβράνες αμνίου από πλακούντες μετά από φυσιολογικό τοκετό ή καισαρική τομή και παρατήρησαν έκφραση του γονιδίου DAZL στα

κύτταρα των αμνιακών μεμβρανών [230]. Παρόμοια μελέτη έκαναν και οι Wang και συνεργάτες ένα χρόνο αργότερα, το 2013, και επίσης έδειξαν την mRNA έκφραση του γονιδίου DAZL σε αμνιακές μεμβράνες μετά από καισαρική τομή [231].

Το 2015, οι Amidi και συνεργάτες παρατήρησαν την έκφραση του γονιδίου DAZL σε βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από το έλυτρο του Wharton από ομφάλιους λώρους άρρενων νεογνών μετά από καισαρική τομή [232].

Η ανεύρεση έκφρασης του γονιδίου DAZL από βλαστικά κύτταρα εξωεμβρυϊκών ιστών (πλακούντας, αμνιακό υγρό, αμνιακή μεμβράνη, έλυτρο του Wharton του ομφαλίου λώρου), όπως φάνηκε από την παρούσα μελέτη καθώς και από τις προαναφερθείσες μελέτες, πιθανότατα να σχετίζεται με την ιδιότητα αυτών των κυττάρων να διαφοροποιούνται σε γεννητικά κύτταρα, όταν τεθούν κάτω από τις κατάλληλες καλλιεργητικές συνθήκες, με τα κατάλληλα καλλιεργητικά μέσα.

Η πρωτεΐνη DAZL συνιστά μια RNA-προσδένουσα πρωτεΐνη, οποία εμπλέκεται στη μετά-μεταφραστική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των γεννητικών κυττάρων. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη DAZL διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των γεννητικών κυττάρων [124, 129, 233].

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τη δυνατότητα διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων σε γεννητικά κύτταρα [228-230, 232, 234-241]. Η έκθεση αυτών των κυττάρων σε ειδικές καλλιεργητικές συνθήκες και ειδικά καλλιεργητικά μέσα μπορεί να οδηγήσει στη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων σε γεννητικά κύτταρα.

Μια άλλη σημαντική παρατήρηση της παρούσας μελέτης που συμφωνεί με αντίστοιχες μελέτες έκφρασης του γονιδίου DAZL σε εξωεμβρυϊκούς ιστούς αφορά στο πρότυπο έκφρασης του γονιδίου, όσον αφορά το βαθμό έκφρασής του, το οποίο φαίνεται να είναι κοινό για τα κύτταρα των εξωεμβρυϊκών ιστών.

Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε ελάχιστη έκφραση του γονιδίου DAZL στα κύτταρα των χοριακών λαχνών, εύρημα το οποίο έχει διαπιστωθεί και σε άλλες μελέτες. Οι Yu και συνεργάτες διαπίστωσαν την έκφραση του γονιδίου DAZL σε βλαστικά κύτταρα αμνιακού υγρού σε ελάχιστο βαθμό [229]. Επίσης, ελάχιστη έκφραση του γονιδίου DAZL στα βλαστικά κύτταρα αμνιακού υγρού παρατηρήθηκε και από τους Lai και συνεργάτες [228]. Ως συνέχεια τόσο της μελέτης των Yu και συνεργατών όσο και των Lai και συνεργατών, η έκφραση του γονιδίου DAZL ανευρέθηκε αυξημένη στα γεννητικά κύτταρα που πρόεκυψαν μετά από κατευθυνόμενη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων του αμνιακού υγρού. Ανάλογα ευρήματα προέκυψαν και από τη μελέτη των Enron και συνεργατών, όπου η έκφραση του γονιδίου DAZL ήταν αρχικά ελάχιστη στα κύτταρα της αμνιακής μεμβράνης, ενώ, μετά από καλλιέργειά τους στα κατάλληλα μέσα που επάγουν τη διαφοροποίησή τους σε γεννητικά κύτταρα, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου DAZL [230]. Χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου DAZL σε κύτταρα αμνιακής μεμβράνης, επίσης, παρατηρήθηκαν από τους Wang και συνεργάτες [231]. Παρομοίως χαμηλού βαθμού έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε στα βλαστικά κύτταρα του ελύτρου του Wharton του ομφαλίου λώρου από τους Amidi και συνεργάτες, ενώ η καλλιέργεια των κυττάρων με κατάλληλα καλλιεργητικά μέσα οδήγησε στη διαφοροποίησή τους σε γεννητικά κύτταρα με αυξημένη έκφραση του γονιδίου DAZL [232].

Τα αρχικά ελάχιστα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου DAZL που παρατηρήθηκαν τόσο στα βλαστικά κύτταρα των χοριακών λαχνών της παρούσας μελέτης, όσο και στα βλαστικά

κύτταρα του αμνιακού υγρού, της αμνιακής μεμβράνης και του ελύτρου του Wharton ομφαλίου λώρου των προαναφερθείσων μελετών [228-232], ενδεχομένως να σχετίζονται με την ιδιότητα των κυττάρων αυτών να κατέχουν ένα δυναμικό διαφοροποίησης σε γεννητικά κύτταρα που εκφράζουν ειδικούς για τα γεννητικά κύτταρα δείκτες, όταν καλλιεργηθούν με τα κατάλληλα μέσα και υπό κατάλληλες συνθήκες. Στη συνέχεια, η αυξημένη έκφραση του γονιδίου DAZL που παρατηρήθηκε στα γεννητικά κύτταρα, μετά από διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων [228-230, 232], ήταν αναμενόμενη μιας και το γονίδιο DAZL είναι δείκτης των γεννητικών κυττάρων. Αντιστοίχως, ανάλογες μεταβολές στην έκφραση του γονιδίου DAZL πιθανότατα θα προκύψουν στην περίπτωση διαφοροποίησης των χοριακών βλαστικών κυττάρων της παρούσας μελέτης σε γεννητικά κύτταρα με τη χρήση των κατάλληλων καλλιεργητικών υλικών και πρωτοκόλλων.

Παρόλο που ένας σημαντικός αριθμός ειδικών για τα γεννητικά κύτταρα γονιδίων έχουν αναγνωριστεί (DAZL, BLIMP1, STELLA, VASA, STRA8, SCP1, SCP3, c-MOS, ZPA, ZPC, GDF9, κ.α.), οι μοριακοί μηχανισμοί και τα μοριακά δίκτυα που εμπλέκονται στη ρύθμιση της διαφοροποίησης και της ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστα. Η δυνατότητα δημιουργίας και μελέτης ενός *in vitro* συστήματος γεννητικών κυττάρων προερχόμενων από διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων, όπως τα χοριακά βλαστικά κύτταρα, θα μπορούσε να δώσει κάποιες απαντήσεις σε αναπάντητα έως τώρα ερωτήματα σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς της γαμετογένεσης.

Σημαντικό πλεονέκτημα των εξωεμβρυϊκών ιστών, όπως οι χοριακές λάχνες πρώτου τριμήνου, αποτελεί η δυνατότητα άμεσης διάθεσης είτε κατά τη διάρκεια επεμβατικών εξετάσεων προγεννητικού ελέγχου (βιοψία χοριακών λαχνών, αμνιοπαρακέντηση) είτε μετά τον τοκετό (πλακούντας, ομφάλιος λώρος, αμνιακές μεμβράνες).

Επιπλέον, δεν υφίστανται ηθικά ζητήματα από μια τέτοια διαδικασία λήψης εξωεμβρυϊκών ιστών, όπως οι χοριακές λάχνες πρώτου τριμήνου, δεδομένου ότι οι χοριακές λάχνες λαμβάνονται στα πλαίσια προγεννητικού ελέγχου χωρίς την ανάγκη τερματισμού μιας κύησης ή βιοψίας του εμβρύου με κίνδυνο εμβρυϊκού θανάτου.

Η διαθεσιμότητα αυτών των κυττάρων, στα πλαίσια του προγεννητικού ελέγχου χωρίς την ανάγκη επιπλέον επεμβατικών διαδικασιών, σε συνδυασμό με την έλλειψη ηθικών περιορισμών στο συγκεκριμένο τρόπο λήψης αυτών, καθιστά τα χοριακά κύτταρα του πρώτου τριμήνου ως μια υποσχόμενη πηγή κυττάρων διαθέσιμων για διάφορες θεραπευτικές εφαρμογές, πέρα από τους ερευνητικούς σκοπούς. Μάλιστα, η δυνατότητα απομόνωσης τέτοιων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης παρέχει το πλεονέκτημα έγκαιρης θεραπείας συγγενών ανωμαλιών ή γενετικών ασθενειών στα νεογνά.

Τα πρώιμα πλακουντιακά μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, όπως τα χοριακά βλαστικά κύτταρα του πρώτου τριμήνου της κύησης, χαρακτηρίζονται από κάποια πλεονεκτήματα, συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα ενός πιο προχωρημένου σταδίου της κύησης καθώς και από τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα. Τα βλαστικά κύτταρα του πρώτου τριμήνου αντιστοιχούν σε ένα πιο πρώιμο στάδιο της σειράς των βλαστικών κυττάρων και πλεονεκτούν σε σύγκριση με τα αντίστοιχα βλαστικά κύτταρα του τρίτου τριμήνου ως προς την πολυδυναμικότητα και την αναγεννητική ικανότητα, παρουσιάζοντας υψηλότερα επίπεδα έκφρασης δεικτών πολυδυναμικότητας (OCT4A, SOX2, c-MYC, KLF4, NANOG), καθώς και υψηλότερη επανορθωτική δράση στους ιστούς *in vivo* μετά από μεταμόσχευση [97]. Επιπλέον, αυτός ο τύπος βλαστικών κυττάρων δεν σχετίζεται με την ανάπτυξη

τερατώματος, όντας είτε μη ανοσογονός είτε ελάχιστα ανοσογόνος, γεγονός που τον καθιστά ιδιαίτερα κατάλληλο για μεταμόσχευση [92].

Υπάρχουν πολλές μελέτες που έχουν δείξει τις θεραπευτικές δυνατότητες των πλακουντιακών βλαστικών κυττάρων σε νόσους, όπως νευρολογικές (ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο [242], νόσος Alzheimer [243]), ηπατικές (τραύμα ήπατος [244]), παγκρεατικές (ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης [245-247]), καρδιακές (έμφραγμα μυοκαρδίου [248], συγγενείς βαλβιδοπάθειες [249]), μυϊκές (μυϊκή δυστροφία Duchenne [101], νωτιαία μυϊκή ατροφία [100]), πνευμονικές (πνευμονική ίνωση [250, 251]), οστικές (ατελής οστεογένεση [252], οστεολυτικές βλάβες λόγω πολλαπλού μυελώματος [253]), διαφραγματοκήλη [254].

Η εφαρμογή των θεραπευτικών δυνατοτήτων των χοριακών βλαστικών κυττάρων δεν περιορίζεται μόνο στη μεταγεννητική περίοδο της ζωής, η οποία επιτυγχάνεται με την κρυσσυντήρηση των βλαστικών κυττάρων, αλλά και στην ενδομήτρια περίοδο. Υπάρχουν αναφορές για θεραπευτική εφαρμογή των βλαστικών κυττάρων *in utero*. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η ενδομήτρια επιδιόρθωση της δισχιδούς ράχης με τη συνοδό μνηνιγομυελοκήλη συνοδεύεται από μικρότερη εμβρυϊκή και νεογνική θνησιμότητα, καθώς και καλύτερα νευρολογικά και κινητικά αποτελέσματα σε σύγκριση με τη μετά τη γέννηση χειρουργική θεραπεία [255]. Μελέτες έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα από το συνδυασμό χειρουργικής θεραπείας της δισχιδούς ράχης και χορήγησης νευρικών βλαστικών κυττάρων στο νωτιαίο μυελό, τα οποία αποικίζουν τις κατεστραμμένες περιοχές της σπονδυλικής στήλης, παράγουν ουσίες που προστατεύουν τον παρακείμενο νευρικό ιστό και βοηθούν στην επιδιόρθωση του νευρικού ιστού [256]. Δεδομένου ότι η *in utero* επιδιόρθωση της δισχιδούς ράχης τυπικά πραγματοποιείται πριν τις 26 εβδομάδες της κύησης [257], η δυνατότητα λήψης χοριακών βλαστικών κυττάρων στο πρώτο τρίμηνο, ικανών να διαφοροποιούνται σε νευρωνικού τύπου κύτταρα [99, 100, 258], επιτρέπει την παραγωγή επαρκούς ποσότητας νευρικών βλαστικών κυττάρων διαθέσιμων κατά το χρόνο της *in utero* χειρουργικής παρέμβασης.

Όσον αφορά τις θεραπευτικές δυνατότητες που προκύπτουν από το δυναμικό διαφοροποίησης των χοριακών βλαστικών κυττάρων σε γεννητικά κύτταρα, δεν είναι λίγες οι μελέτες που υποστηρίζουν την δυνητική ικανότητα τέτοιων κρυσσυντηρημένων εξωεμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων στην ανάκτηση της ωοθυλακιογένεσης και, συνεπώς, της γονιμοποιητικής ικανότητας ασθενών μετά από χημειοθεραπεία ή λόγω προώρης ωοθηκικής ανεπάρκειας [228, 231].

Στην παρούσα μελέτη, ο προϋπάρχων κίνδυνος αποβολής, λόγω της επεμβατικής πράξης (CVS), καθιστούσε τις γυναίκες αρκετά επιφυλακτικές για συμμετοχή σε μια μελέτη που απαιτούσε επιπλέον χοριακές λάχνες. Ο φόβος αυτός είχε ως αποτέλεσμα το τελικό μέγεθος του υπό μελέτη δείγματος να είναι μικρό (20 γυναίκες). Μια πιο μεγάλη μελέτη με περισσότερες συμμετέχουσες γυναίκες θα μπορούσε να αυξήσει την ισχύ της μελέτης, δίνοντας έτσι περισσότερο σαφή αποτελέσματα και συμπεράσματα.

Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται προκειμένου να εξακριβωθούν πλήρως οι ακριβείς μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την έναρξη διαφοροποίησης των χοριακών βλαστικών κυττάρων σε γεννητικά κύτταρα, μεταξύ των οποίων και ο ακριβής ρόλος του γονιδίου DAZL σε όλη αυτή τη διαδικασία. Επιπλέον, περαιτέρω μελέτες χρειάζονται προκειμένου να ελεγχθεί ή/και να βελτιωθεί η ποιότητα των γεννητικών κυττάρων που προκύπτουν *in vitro*

από διαφοροποίηση των χοριακών βλαστικών κυττάρων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ικανά για γονιμοποίηση γεννητικά κύτταρα που παράγονται in vivo.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Οι παρατηρήσεις μιας τέτοιας μελέτης θέτουν τις βάσεις για σημαντικά μονοπάτια στον τομέα της έρευνας και της αναγεννητικής ιατρικής, όσον αφορά τη θεραπευτική προσέγγιση της υπογονιμότητας, χωρίς τους ηθικούς περιορισμούς από τη χρησιμοποίηση των εμβρυϊκών ιστών.

Η δυνατότητα διαφοροποίησης των χοριακών κυττάρων σε γεννητικά κύτταρα, κάτω από τις κατάλληλες καλλιεργητικές συνθήκες, καθιστά τις χοριακές λάχνες του πρώτου τριμήνου ως μια σημαντική πηγή γεννητικών κυττάρων διαθέσιμων προς έρευνα και μελέτη των άγνωστων ως ένα βαθμό πτυχών της γαμετογένεσης. Η δυνατότητα δημιουργίας ενός ιδανικού *in vitro* μοντέλου για τη μελέτη των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της γεννητικής σειράς θα μπορούσε να προσφέρει σημαντικές γνώσεις στη μελέτη της γαμετογένεσης.

Περαιτέρω έρευνα πάνω στη δυνατότητα διαφοροποίησης των χοριακών κυττάρων σε γεννητικά κύτταρα ικανών για ανάκτηση της γονιμοποιητικής ικανότητας υπογόνιμων ασθενών θα μπορούσε να θέσει νέες βάσεις στη θεραπευτική προσέγγιση της υπογονιμότητας.

Τέλος, χάρη στη δυνατότητα λήψης χοριακών βλαστικών κυττάρων νωρίς στην κύηση σε συνδυασμό με όλες τις θεραπευτικές δυνατότητες που μπορούν να προσφέρουν αυτά τα κύτταρα, παρέχεται το πλεονέκτημα εφαρμογής θεραπευτικών παρεμβάσεων αμέσως μετά τη γέννηση ή ακόμα και *in utero*, βελτιώνοντας έτσι το περιγεννητικό αποτέλεσμα και την ποιότητα ζωής πάσχοντων νεογνών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Benirschke, K., G.J. Burton, and R.N. Baergen, *Early Development of the Human Placenta*, in *Pathology of the Human Placenta*. 2012, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 41-53.
2. Κρεατσάς, Γ.Κ., *Σύγχρονη γυναικολογία και μαιευτική*. 2009, Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης.
3. Fritsch, M.K. *Placental pathology*. 2014; Available from: <https://pathology.uchicago.edu/sites/pathology.uchicago.edu/files/uploads/PDFs/Placental%20Pathology%20Notes%20Aspen%202014%20-Fritsch%20final.pdf>.
4. Χαβάκη, Σ. *Πλακούντας*. Available from: <http://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/MED164/%CE%95%CE%BC%CE%B2%CF%81%CF%85%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%AF%CE%B1/%CE%A0%CE%BB%CE%B1%CE%BA%CE%BF%CF%8D%CE%BD%CF%84%CE%B1%CF%82.pdf>.
5. Baergen, R.N., *Chorionic Villi: Histology and Villous Development*, in *Manual of Pathology of the Human Placenta: Second Edition*. 2011, Springer US: Boston, MA. p. 69-83.
6. Benirschke, K., P. Kaufmann, and R.N. Baergen, *Pathology of the human placenta*. 5th ed. 2006, New York: Springer. xx, 1050 p.
7. Illsley, N.P., *Placental Metabolism*, in *The Placenta*. 2011, Wiley-Blackwell. p. 50-56.
8. Wright, C. and C.P. Sibley, *Placental Transfer in Health and Disease*, in *The Placenta*. 2011, Wiley-Blackwell. p. 66-74.
9. McNamara, J.M. and H.H. Kay, *Placental Hormones: Physiology, Disease, and Prenatal Diagnosis*, in *The Placenta*. 2011, Wiley-Blackwell. p. 57-65.
10. Chiquoine, A.D., *The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo*. Anat Rec, 1954. **118**(2): p. 135-46.
11. McCoshen, J.A. and D.J. McCallion, *A study of the primordial germ cells during their migratory phase in Steel mutant mice*. Experientia, 1975. **31**(5): p. 589-90.
12. Spiegelman, M. and D. Bennett, *A light- and electron-microscopic study of primordial germ cells in the early mouse embryo*. J Embryol Exp Morphol, 1973. **30**(1): p. 97-118.
13. Berta, P., et al., *Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor*. Nature, 1990. **348**(6300): p. 448-50.
14. Kashimada, K. and P. Koopman, *Sry: the master switch in mammalian sex determination*. Development, 2010. **137**(23): p. 3921-30.
15. Egozcue, S., et al., *Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion*. Hum Reprod Update, 2000. **6**(1): p. 93-105.
16. Faddy, M.J., et al., *Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause*. Hum Reprod, 1992. **7**(10): p. 1342-6.
17. Gougeon, A., R. Ecochard, and J.C. Thalabard, *Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women*. Biol Reprod, 1994. **50**(3): p. 653-63.
18. Pinkerton, J.H., et al., *Development of the human ovary--a study using histochemical technics*. Obstet Gynecol, 1961. **18**: p. 152-81.
19. Sagata, N., *Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanisms and biological significance*. Trends Cell Biol, 1996. **6**(1): p. 22-8.

20. Von Stetina, J.R. and T.L. Orr-Weaver, *Developmental control of oocyte maturation and egg activation in metazoan models*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(10): p. a005553.
21. Deans, R.J. and A.B. Moseley, *Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses*. Exp Hematol, 2000. **28**(8): p. 875-84.
22. Fuchs, E. and J.A. Segre, *Stem cells: a new lease on life*. Cell, 2000. **100**(1): p. 143-55.
23. Gang, E.J., et al., *SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1743-51.
24. Gargett, C.E., *Stem cells in gynaecology*. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2004. **44**(5): p. 380-6.
25. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
26. Weissman, I.L., *Stem cells--scientific, medical, and political issues*. N Engl J Med, 2002. **346**(20): p. 1576-9.
27. Donovan, P.J. and J. Gearhart, *The end of the beginning for pluripotent stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 92-7.
28. Preston, S.L., et al., *The new stem cell biology: something for everyone*. Mol Pathol, 2003. **56**(2): p. 86-96.
29. Martin-Rendon, E. and S.M. Watt, *Stem cell plasticity*. Br J Haematol, 2003. **122**(6): p. 877-91.
30. Wagers, A.J. and I.L. Weissman, *Plasticity of adult stem cells*. Cell, 2004. **116**(5): p. 639-48.
31. Overturf, K., et al., *Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes*. Am J Pathol, 1997. **151**(5): p. 1273-80.
32. Alison, M.R. and S. Islam, *Attributes of adult stem cells*. J Pathol, 2009. **217**(2): p. 144-60.
33. Verfaillie, C., *Pluripotent stem cells*. Transfus Clin Biol, 2009. **16**(2): p. 65-9.
34. Verfaillie, C.M., *Adult stem cells: assessing the case for pluripotency*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(11): p. 502-8.
35. de Wynter, E.A., A.J. Emmerson, and N.G. Testa, *Properties of peripheral blood and cord blood stem cells*. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol, 1999. **12**(1-2): p. 1-17.
36. Rao, M.S., *Multipotent and restricted precursors in the central nervous system*. Anat Rec, 1999. **257**(4): p. 137-48.
37. Totey, S., et al., *Adult stem cells: a clinical update*. J Stem Cells, 2009. **4**(2): p. 105-21.
38. Abdulrazzak, H., et al., *Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues*. J R Soc Interface, 2010. **7 Suppl 6**: p. S689-706.
39. Pappa, K.I. and N.P. Anagnou, *Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum?* Regen Med, 2009. **4**(3): p. 423-33.
40. Lin, H., *The tao of stem cells in the germline*. Annu Rev Genet, 1997. **31**: p. 455-91.
41. Wray, J., T. Kalkan, and A.G. Smith, *The ground state of pluripotency*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(4): p. 1027-32.
42. Boyer, L.A., et al., *Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells*. Cell, 2005. **122**(6): p. 947-56.
43. Adewumi, O., et al., *Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(7): p. 803-16.
44. Tutter, A.V., G.A. Baltus, and S. Kadam, *Embryonic stem cells: a great hope for a new era of medicine*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2006. **9**(2): p. 169-75.
45. Brustle, O., et al., *Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants*. Science, 1999. **285**(5428): p. 754-6.
46. Klug, M.G., et al., *Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts*. J Clin Invest, 1996. **98**(1): p. 216-24.

47. Lumelsky, N., et al., *Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets*. Science, 2001. **292**(5520): p. 1389-94.
48. Aboody, K., et al., *Translating stem cell studies to the clinic for CNS repair: current state of the art and the need for a Rosetta stone*. Neuron, 2011. **70**(4): p. 597-613.
49. Puri, M.C. and A. Nagy, *Concise review: Embryonic stem cells versus induced pluripotent stem cells: the game is on*. Stem Cells, 2012. **30**(1): p. 10-4.
50. Gao, L., K. Thilakavathy, and N. Nordin, *A plethora of human pluripotent stem cells*. Cell Biol Int, 2013. **37**(9): p. 875-87.
51. Shanthly, N., et al., *Stem cells: a regenerative pharmaceutical*. Q J Nucl Med Mol Imaging, 2006. **50**(3): p. 205-16.
52. Barker, N., et al., *Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5*. Nature, 2007. **449**(7165): p. 1003-7.
53. Gupta, S., et al., *Isolation and characterization of kidney-derived stem cells*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(11): p. 3028-40.
54. Lyngbaek, S., et al., *Cardiac regeneration by resident stem and progenitor cells in the adult heart*. Basic Res Cardiol, 2007. **102**(2): p. 101-14.
55. Caplan, A.L., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
56. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1433-8.
57. Toma, J.G., et al., *Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(9): p. 778-84.
58. Zuk, P.A., *The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(11): p. 1783-7.
59. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
60. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng, 2001. **7**(2): p. 211-28.
61. Brazelton, T.R., et al., *From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1775-9.
62. De Bari, C., F. Dell'Accio, and F.P. Luyten, *Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(1): p. 85-95.
63. De Bari, C., et al., *Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(8): p. 1928-42.
64. Mezey, E., et al., *Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1779-82.
65. Wagner, W., et al., *The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations--evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes*. Exp Hematol, 2006. **34**(4): p. 536-48.
66. He, Q., C. Wan, and G. Li, *Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood*. Stem Cells, 2007. **25**(1): p. 69-77.
67. Antonitsis, P., et al., *In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2007. **6**(5): p. 593-7.
68. Chamberlain, G., et al., *Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing*. Stem Cells, 2007. **25**(11): p. 2739-49.
69. Deng, Y.B., et al., *Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: evidence from a study in rhesus monkeys*. Cytotherapy, 2006. **8**(3): p. 210-4.
70. Ferrari, G., et al., *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors*. Science, 1998. **279**(5356): p. 1528-30.

71. Bajada, S., et al., *Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine*. J Tissue Eng Regen Med, 2008. **2**(4): p. 169-83.
72. Bitsika, V., A. Vlahou, and M.G. Roubelakis, *Fetal mesenchymal stem cells in cancer therapy*. Curr Stem Cell Res Ther, 2013. **8**(2): p. 133-43.
73. Marcus, A.J. and D. Woodbury, *Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(3): p. 730-42.
74. Cross, J.C., et al., *Genes, development and evolution of the placenta*. Placenta, 2003. **24**(2-3): p. 123-30.
75. Crane, J.P. and S.W. Cheung, *An embryogenic model to explain cytogenetic inconsistencies observed in chorionic villus versus fetal tissue*. Prenat Diagn, 1988. **8**(2): p. 119-29.
76. Amos, T.A. and M.Y. Gordon, *Sources of human hematopoietic stem cells for transplantation--a review*. Cell Transplant, 1995. **4**(6): p. 547-69.
77. Kaviani, A., et al., *The placenta as a cell source in fetal tissue engineering*. J Pediatr Surg, 2002. **37**(7): p. 995-9; discussion 995-9.
78. Romanov, Y.A., V.A. Svintsitskaya, and V.N. Smirnov, *Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord*. Stem Cells, 2003. **21**(1): p. 105-10.
79. Rubinstein, P., et al., *Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors*. N Engl J Med, 1998. **339**(22): p. 1565-77.
80. Smith, C. and B. Storms, *Hematopoietic stem cells*. Clin Orthop Relat Res, 2000(379 Suppl): p. S91-7.
81. De, S.K., D.B. Larsen, and M.J. Soares, *Trophoendodermal stem cell-derived extracellular matrices: absence of detectable entactin and presence of multiple laminin species*. Placenta, 1995. **16**(8): p. 701-18.
82. Vicovac, L. and J.D. Aplin, *Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation*. Acta Anat (Basel), 1996. **156**(3): p. 202-16.
83. Castellucci, M., et al., *Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development*. Hum Reprod Update, 2000. **6**(5): p. 485-94.
84. Aplin, J.D., et al., *Tissue interactions in the control of trophoblast invasion*. J Reprod Fertil Suppl, 2000. **55**: p. 57-64.
85. Beham, A., H. Denk, and G. Desoye, *The distribution of intermediate filament proteins, actin and desmoplakins in human placental tissue as revealed by polyclonal and monoclonal antibodies*. Placenta, 1988. **9**(5): p. 479-92.
86. Haigh, T., et al., *Studies of mesenchymal cells from 1st trimester human placenta: expression of cytokeratin outside the trophoblast lineage*. Placenta, 1999. **20**(8): p. 615-25.
87. Fauza, D., *Amniotic fluid and placental stem cells*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004. **18**(6): p. 877-91.
88. Gussoni, E., et al., *Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation*. Nature, 1999. **401**(6751): p. 390-4.
89. Petersen, B.E., et al., *Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells*. Science, 1999. **284**(5417): p. 1168-70.
90. Miki, T., et al., *Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells*. Stem Cells, 2005. **23**(10): p. 1549-59.
91. Prusa, A.R. and M. Hengstschlager, *Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection*. Med Sci Monit, 2002. **8**(11): p. Ra253-7.
92. De Coppi, P., et al., *Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(1): p. 100-6.
93. Sakuragawa, N., et al., *Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells*. J Neurosci Res, 2004. **78**(2): p. 208-14.

94. Tsai, M.S., et al., *Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol*. Hum Reprod, 2004. **19**(6): p. 1450-6.
95. In 't Anker, P.S., et al., *Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1548-9.
96. Kakishita, K., et al., *Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions*. Brain Res, 2003. **980**(1): p. 48-56.
97. Jones, G.N., et al., *Ontological differences in first compared to third trimester human fetal placental chorionic stem cells*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e43395.
98. Park, S., et al., *Comparison of human first and third trimester placental mesenchymal stem cell*. Cell Biol Int, 2013. **37**(3): p. 242-9.
99. Poloni, A., et al., *Characterization and expansion of mesenchymal progenitor cells from first-trimester chorionic villi of human placenta*. Cytotherapy, 2008. **10**(7): p. 690-7.
100. Spitalieri, P., et al., *Identification of multipotent cytotrophoblast cells from human first trimester chorionic villi*. Cloning Stem Cells, 2009. **11**(4): p. 535-56.
101. Arakawa, R., et al., *Human first-trimester chorionic villi have a myogenic potential*. Cell Tissue Res, 2012. **348**(1): p. 189-97.
102. Portmann-Lanz, C.B., et al., *Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration*. Am J Obstet Gynecol, 2006. **194**(3): p. 664-73.
103. Sessarego, N., et al., *Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application*. Haematologica, 2008. **93**(3): p. 339-46.
104. Ryan, J.M., et al., *Transcriptional ontogeny of first trimester human fetal and placental mesenchymal stem cells: Gestational age versus niche*. Genom Data, 2014. **2**: p. 382-5.
105. Guillot, P.V., et al., *Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC*. Stem Cells, 2007. **25**(3): p. 646-54.
106. Izumi, M., et al., *Quantitative comparison of stem cell marker-positive cells in fetal and term human amnion*. J Reprod Immunol, 2009. **81**(1): p. 39-43.
107. Poloni, A., et al., *Human AB serum for generation of mesenchymal stem cells from human chorionic villi: comparison with other source and other media including platelet lysate*. Cell Prolif, 2012. **45**(1): p. 66-75.
108. Zhang, Z.Y., et al., *Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2009. **27**(1): p. 126-37.
109. Atlasi, Y., et al., *OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells*. Stem Cells, 2008. **26**(12): p. 3068-74.
110. Ryan, J.M., et al., *Unravelling the pluripotency paradox in fetal and placental mesenchymal stem cells: Oct-4 expression and the case of The Emperor's New Clothes*. Stem Cell Rev, 2013. **9**(4): p. 408-21.
111. Fu, X.F., et al., *DAZ Family Proteins, Key Players for Germ Cell Development*. Int J Biol Sci, 2015. **11**(10): p. 1226-35.
112. Cauffman, G., et al., *DAZL expression in human oocytes, preimplantation embryos and embryonic stem cells*. Mol Hum Reprod, 2005. **11**(6): p. 405-11.
113. Saxena, R., et al., *The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned*. Nat Genet, 1996. **14**(3): p. 292-9.

114. Seboun, E., et al., *Gene sequence, localization, and evolutionary conservation of DAZLA, a candidate male sterility gene*. Genomics, 1997. **41**(2): p. 227-35.
115. Yen, P.H., *Putative biological functions of the DAZ family*. Int J Androl, 2004. **27**(3): p. 125-9.
116. Yen, P.H., N.N. Chai, and E.C. Salido, *The human DAZ genes, a putative male infertility factor on the Y chromosome, are highly polymorphic in the DAZ repeat regions*. Mamm Genome, 1997. **8**(10): p. 756-9.
117. Tsui, S., et al., *Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZL1*. Genomics, 2000. **65**(3): p. 266-73.
118. Avis, J.M., et al., *Solution structure of the N-terminal RNP domain of U1A protein: the role of C-terminal residues in structure stability and RNA binding*. J Mol Biol, 1996. **257**(2): p. 398-411.
119. Xu, E.Y., F.L. Moore, and R.A. Pera, *A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7414-9.
120. Castrillon, D.H., et al., *Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in Drosophila melanogaster: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis*. Genetics, 1993. **135**(2): p. 489-505.
121. Eberhart, C.G., J.Z. Maines, and S.A. Wasserman, *Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human Deleted in Azoospermia*. Nature, 1996. **381**(6585): p. 783-5.
122. Gill, M.E., et al., *Licensing of gametogenesis, dependent on RNA binding protein DAZL, as a gateway to sexual differentiation of fetal germ cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(18): p. 7443-8.
123. Haston, K.M., J.Y. Tung, and R.A. Reijo Pera, *Dazl functions in maintenance of pluripotency and genetic and epigenetic programs of differentiation in mouse primordial germ cells in vivo and in vitro*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5654.
124. Lin, Y. and D.C. Page, *Dazl deficiency leads to embryonic arrest of germ cell development in XY C57BL/6 mice*. Dev Biol, 2005. **288**(2): p. 309-16.
125. Seligman, J. and D.C. Page, *The Dazh gene is expressed in male and female embryonic gonads before germ cell sex differentiation*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **245**(3): p. 878-82.
126. Chen, J., et al., *Genome-wide analysis of translation reveals a critical role for deleted in azoospermia-like (Dazl) at the oocyte-to-zygote transition*. Genes Dev, 2011. **25**(7): p. 755-66.
127. He, J., et al., *Correction: A Developmental Stage-Specific Switch from DAZL to BOLL Occurs during Fetal Oogenesis in Humans, but Not Mice*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0136009.
128. Niederberger, C., et al., *In situ hybridization shows that Dazla expression in mouse testis is restricted to premeiotic stages IV-VI of spermatogenesis*. Mamm Genome, 1997. **8**(4): p. 277-8.
129. Ruggiu, M., et al., *The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis*. Nature, 1997. **389**(6646): p. 73-7.
130. Schrans-Stassen, B.H., et al., *Nature of the spermatogenic arrest in Dazl -/- mice*. Biol Reprod, 2001. **65**(3): p. 771-6.
131. Santel, A., et al., *The Drosophila don juan (dj) gene encodes a novel sperm specific protein component characterized by an unusual domain of a repetitive amino acid motif*. Mech Dev, 1997. **64**(1-2): p. 19-30.
132. Cheng, M.H., J.Z. Maines, and S.A. Wasserman, *Biphasic subcellular localization of the DAZL-related protein boule in Drosophila spermatogenesis*. Dev Biol, 1998. **204**(2): p. 567-76.

133. Slee, R., et al., *A human DAZ transgene confers partial rescue of the mouse Dazl null phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 8040-5.
134. Maatouk, D.M., et al., *DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ cell genes in both germ cell and somatic cell lineages*. Development, 2006. **133**(17): p. 3411-8.
135. Liu, J., K. Linher, and J. Li, *Porcine DAZL messenger RNA: its expression and regulation during oocyte maturation*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **311**(1-2): p. 101-8.
136. Mita, K. and M. Yamashita, *Expression of Xenopus Daz-like protein during gametogenesis and embryogenesis*. Mech Dev, 2000. **94**(1-2): p. 251-5.
137. Shah, C., et al., *Widespread presence of human BOULE homologs among animals and conservation of their ancient reproductive function*. PLoS Genet, 2010. **6**(7): p. e1001022.
138. Rocchietti-March, M., et al., *Dazl protein expression in adult rat testis is up-regulated at meiosis and not hormonally regulated*. Int J Androl, 2000. **23**(1): p. 51-6.
139. Brekhman, V., et al., *The DAZL1 gene is expressed in human male and female embryonic gonads before meiosis*. Mol Hum Reprod, 2000. **6**(5): p. 465-8.
140. Kee, K., et al., *Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation*. Nature, 2009. **462**(7270): p. 222-5.
141. Pan, H.A., et al., *Expression of DAZL protein in the human corpus luteum*. Mol Hum Reprod, 2002. **8**(6): p. 540-5.
142. Dorfman, D.M., D.R. Genest, and R.A. Reijo Pera, *Human DAZL1 encodes a candidate fertility factor in women that localizes to the prenatal and postnatal germ cells*. Hum Reprod, 1999. **14**(10): p. 2531-6.
143. Habermann, B., et al., *DAZ (Deleted in AZoospermia) genes encode proteins located in human late spermatids and in sperm tails*. Hum Reprod, 1998. **13**(2): p. 363-9.
144. Calogero, A.E., et al., *Spontaneous transmission from a father to his son of a Y chromosome microdeletion involving the deleted in azoospermia (DAZ) gene*. J Endocrinol Invest, 2002. **25**(7): p. 631-4.
145. Ferlin, A., et al., *Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 762-70.
146. Kuhnert, B., et al., *Case report: natural transmission of an AZFc Y-chromosomal microdeletion from father to his sons*. Hum Reprod, 2004. **19**(4): p. 886-8.
147. Navarro-Costa, P., C.E. Plancha, and J. Goncalves, *Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility?* J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 936569.
148. Simoni, M., et al., *Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Munster experience*. Reprod Biomed Online, 2008. **16**(2): p. 289-303.
149. Xia, X.Y., et al., *[Analysis of an AZFc deletion family with natural transmission]*. Zhonghua Nan Ke Xue, 2006. **12**(8): p. 720-2.
150. Medrano, J.V., et al., *Divergent RNA-binding proteins, DAZL and VASA, induce meiotic progression in human germ cells derived in vitro*. Stem Cells, 2012. **30**(3): p. 441-51.
151. Reijo, R.A., et al., *DAZ family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice*. Biol Reprod, 2000. **63**(5): p. 1490-6.
152. Houston, D.W. and M.L. King, *A critical role for Xdazl, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in Xenopus*. Development, 2000. **127**(3): p. 447-56.
153. Ohinata, Y., et al., *A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice*. Cell, 2009. **137**(3): p. 571-84.

154. Ohinata, Y., et al., *Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice*. Nature, 2005. **436**(7048): p. 207-13.
155. Yamaji, M., et al., *Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice*. Nat Genet, 2008. **40**(8): p. 1016-22.
156. Ruggiu, M., P.T. Saunders, and H.J. Cooke, *Dynamic subcellular distribution of the DAZL protein is confined to primate male germ cells*. J Androl, 2000. **21**(3): p. 470-7.
157. Lin, Y.M., et al., *Presence of DAZL transcript and protein in mature human spermatozoa*. Fertil Steril, 2002. **77**(3): p. 626-9.
158. Kuo, P.L., et al., *Expression profiles of the DAZ gene family in human testis with and without spermatogenic failure*. Fertil Steril, 2004. **81**(4): p. 1034-40.
159. Lee, J.H., et al., *Expression of DAZ (deleted in azoospermia), DAZL1 (DAZ-like) and protamine-2 in testis and its application for diagnosis of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia*. Mol Hum Reprod, 1998. **4**(9): p. 827-34.
160. Lin, Y.M., et al., *Expression patterns and transcript concentrations of the autosomal DAZL gene in testes of azoospermic men*. Mol Hum Reprod, 2001. **7**(11): p. 1015-22.
161. Teng, Y.N., et al., *Association of a single-nucleotide polymorphism of the deleted-in-azoospermia-like gene with susceptibility to spermatogenic failure*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(11): p. 5258-64.
162. Zhang, S., et al., *Association between DAZL polymorphisms and susceptibility to male infertility: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 4642.
163. Bartoloni, L., et al., *Lack of the T54A polymorphism of the DAZL gene in infertile Italian patients*. Mol Hum Reprod, 2004. **10**(8): p. 613-5.
164. Becherini, L., et al., *DAZL polymorphisms and susceptibility to spermatogenic failure: an example of remarkable ethnic differences*. Int J Androl, 2004. **27**(6): p. 375-81.
165. Navarro-Costa, P., J. Goncalves, and C.E. Plancha, *The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility*. Hum Reprod Update, 2010. **16**(5): p. 525-42.
166. Hajkova, P., et al., *Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells*. Mech Dev, 2002. **117**(1-2): p. 15-23.
167. Chai, N.N., et al., *A putative human male infertility gene DAZLA: genomic structure and methylation status*. Mol Hum Reprod, 1997. **3**(8): p. 705-8.
168. Navarro-Costa, P., et al., *Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm*. Hum Reprod, 2010. **25**(10): p. 2647-54.
169. Nishi, S., et al., *Existence of human DAZLA protein in the cytoplasm of human oocytes*. Mol Hum Reprod, 1999. **5**(6): p. 495-7.
170. Tsai, M.Y., et al., *The expression of DAZL1 in the ovary of the human female fetus*. Fertil Steril, 2000. **73**(3): p. 627-30.
171. Tung, J.Y., et al., *Novel missense mutations of the Deleted-in-AZoospermia-Like (DAZL) gene in infertile women and men*. Reprod Biol Endocrinol, 2006. **4**: p. 40.
172. Lifschitz-Mercer, B., et al., *Localization of a specific germ cell marker, DAZL1, in testicular germ cell neoplasias*. Virchows Arch, 2002. **440**(4): p. 387-91.
173. Ruark, E., et al., *Identification of nine new susceptibility loci for testicular cancer, including variants near DAZL and PRDM14*. Nat Genet, 2013. **45**(6): p. 686-9.
174. Ezech, U.I., et al., *Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma*. Cancer, 2005. **104**(10): p. 2255-65.
175. *The Human Protein Atlas*. Available from: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000092345-DAZL/cancer>.
176. Uhlen, M., et al., *A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(12): p. 1920-32.

177. Binns, V. and N. Hsu, *Prenatal Diagnosis*, in eLS. 2001, John Wiley & Sons, Ltd.
178. Monni, G., et al., *How to perform transabdominal chorionic villus sampling: a practical guideline*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2015: p. 1-7.
179. Ferguson-Smith, M.A. and J.R. Yates, *Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative european study on 52 965 amniocenteses*. Prenat Diagn, 1984. **4 Spec No**: p. 5-44.
180. Hook, E.B., *Rates of chromosome abnormalities at different maternal ages*. Obstet Gynecol, 1981. **58**(3): p. 282-5.
181. Hook, E.B., *Chromosome abnormalities in older women by maternal age: evaluation of regression-derived rates in chorionic villus biopsy specimens*. Am J Med Genet, 1990. **35**(2): p. 184-7.
182. Gardner, R.J.M., G.R. Sutherland, and L.G. Shaffer, *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. 4th ed. Oxford monographs on medical genetics. 2012, Oxford: Oxford University Press. xiv, 634 p.
183. Cao, A., et al., *Screening for thalassemia: a model of success*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2002. **29**(2): p. 305-28, vi-vii.
184. Martin, R.H., et al., *An increased frequency of human sperm chromosomal abnormalities after radiotherapy*. Mutat Res, 1986. **174**(3): p. 219-25.
185. Martin, R.H., *The risk of chromosomal abnormalities following ICSI*. Hum Reprod, 1996. **11**(5): p. 924-5.
186. Jackson, L.G., et al., *A randomized comparison of transcervical and transabdominal chorionic-villous sampling. The U.S. National Institute of Child Health and Human Development Chorionic-Villous Sampling and Amniocentesis Study Group*. N Engl J Med, 1992. **327**(9): p. 594-8.
187. *Multicentre randomised clinical trial of chorion villus sampling and amniocentesis. First report. Canadian Collaborative CVS-Amniocentesis Clinical Trial Group*. Lancet, 1989. **1**(8628): p. 1-6.
188. Caughey, A.B., L.M. Hopkins, and M.E. Norton, *Chorionic villus sampling compared with amniocentesis and the difference in the rate of pregnancy loss*. Obstet Gynecol, 2006. **108**(3 Pt 1): p. 612-6.
189. Mujezinovic, F. and Z. Alfirovic, *Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review*. Obstet Gynecol, 2007. **110**(3): p. 687-94.
190. Rhoads, G.G., et al., *The safety and efficacy of chorionic villus sampling for early prenatal diagnosis of cytogenetic abnormalities*. N Engl J Med, 1989. **320**(10): p. 609-17.
191. Silver, R.K., et al., *An evaluation of the chorionic villus sampling learning curve*. Am J Obstet Gynecol, 1990. **163**(3): p. 917-22.
192. Wijnberger, L.D., Y.T. van der Schouw, and G.C. Christiaens, *Learning in medicine: chorionic villus sampling*. Prenat Diagn, 2000. **20**(3): p. 241-6.
193. Holmes, L.B., *Report of National Institute of Child Health and Human Development Workshop on Chorionic Villus Sampling and Limb and Other Defects, October 20, 1992*. Teratology, 1993. **48**(1): p. 7-13.
194. Kuliev, A., et al., *Chorionic villus sampling safety. Report of World Health Organization/EURO meeting in association with the Seventh International Conference on Early Prenatal Diagnosis of Genetic Diseases, Tel-Aviv, Israel, May 21, 1994*. Am J Obstet Gynecol, 1996. **174**(3): p. 807-11.
195. *Chorionic villus sampling and amniocentesis: recommendations for prenatal counseling. Centers for Disease Control and Prevention*. MMWR Recomm Rep, 1995. **44**(Rr-9): p. 1-12.

196. Botto, L.D., et al., *Chorionic villus sampling and transverse digital deficiencies: evidence for anatomic and gestational-age specificity of the digital deficiencies in two studies*. Am J Med Genet, 1996. **62**(2): p. 173-8.
197. Milunsky, A., *Genetic disorders and the fetus : diagnosis, prevention, and treatment*. 5th ed. 2004, Baltimore: Johns Hopkins University Press. xviii, 1224 p.
198. Farina, A., *Nonabortal pregnancy complications of chorionic villous sampling*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2011. **23**(2): p. 129-34.
199. ACOG Practice Bulletin No. 88, December 2007. *Invasive prenatal testing for aneuploidy*. Obstet Gynecol, 2007. **110**(6): p. 1459-67.
200. Eddleman, K.A., et al., *Pregnancy loss rates after midtrimester amniocentesis*. Obstet Gynecol, 2006. **108**(5): p. 1067-72.
201. Mazza, V., et al., *Age-specific risk of fetal loss post second trimester amniocentesis: analysis of 5043 cases*. Prenat Diagn, 2007. **27**(2): p. 180-3.
202. Borgida, A.F., et al., *Outcome of pregnancies complicated by ruptured membranes after genetic amniocentesis*. Am J Obstet Gynecol, 2000. **183**(4): p. 937-9.
203. Leschot, N.J., M. Verjaal, and P.E. Treffers, *Risks of midtrimester amniocentesis; assessment in 3000 pregnancies*. Br J Obstet Gynaecol, 1985. **92**(8): p. 804-7.
204. Mennuti, M.T., et al., *Fetal-maternal bleeding associated with genetic amniocentesis: real-time versus static ultrasound*. Obstet Gynecol, 1983. **62**(1): p. 26-30.
205. Romero, R., et al., *Sonographically monitored amniocentesis to decrease intraoperative complications*. Obstet Gynecol, 1985. **65**(3): p. 426-30.
206. Johnson, J.M., et al., *The early amniocentesis study: a randomized clinical trial of early amniocentesis versus midtrimester amniocentesis*. Fetal Diagn Ther, 1996. **11**(2): p. 85-93.
207. Nicolaides, K., et al., *Comparison of chorionic villus sampling and amniocentesis for fetal karyotyping at 10-13 weeks' gestation*. Lancet, 1994. **344**(8920): p. 435-9.
208. Sundberg, K., et al., *Randomised study of risk of fetal loss related to early amniocentesis versus chorionic villus sampling*. Lancet, 1997. **350**(9079): p. 697-703.
209. *Randomised trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis. The Canadian Early and Mid-trimester Amniocentesis Trial (CEMAT) Group*. Lancet, 1998. **351**(9098): p. 242-7.
210. Ghidini, A., et al., *Complications of fetal blood sampling*. Am J Obstet Gynecol, 1993. **168**(5): p. 1339-44.
211. Tongsong, T., et al., *Cordocentesis at 16-24 weeks of gestation: experience of 1,320 cases*. Prenat Diagn, 2000. **20**(3): p. 224-8.
212. Qiagen. *RNAlater*. Available from: <https://www.qiagen.com/gr/shop/sample-technologies/rna/rna-preparation/rnalater-rna-stabilization-reagent#orderinginformation>.
213. Qiagen. *RNeasy Mini Kit*. Available from: <https://www.qiagen.com/fi/shop/sample-technologies/rna/rneasy-mini-kit/#orderinginformation>.
214. Alberts, B., *Essential cell biology*. 2nd ed. 2004, New York, NY: Garland Science Pub. xxi, 740, 102 p.
215. Invitrogen. *SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR* Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11904018>.
216. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
217. Bartlett, J.M. and D. Stirling, *A short history of the polymerase chain reaction*. Methods Mol Biol, 2003. **226**: p. 3-6.

218. BioLabs, N.E. *Guidelines for PCR Optimization with Taq DNA Polymerase*. Available from: <https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/guidelines-for-pcr-optimization-with-taq-dna-polymerase>.
219. Andy, V. *Principle of the PCR*. 1999; Available from: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.
220. Biosistemika. *REAL-TIME PCR TECHNOLOGY BASICS*. Available from: <http://biosistemika.com/workshops/qpcr-basics/>.
221. Σκορίλας, Α., *Αρχές κλινικής χημείας και μοριακής διαγνωστικής*. 2009: Συμμετρία. 368.
222. Higuchi, R., et al., *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. Biotechnology (N Y), 1992. **10**(4): p. 413-7.
223. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. **25**(2): p. 169-93.
224. GmbH, R.D. *LightCycler® 480 Instrument Operator's Manual Software Version 1.5*, 2008. 2008; Available from: http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/bio-chem/Core%20Facilities/Data/R401-core/LightCycler480%20II_Manual_V1.5.pdf.
225. Ygonaar. *PCR cycle with SYBR green dye*. 2006; Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR_with_SYBR_green.jpg.
226. New Jersey Medical School - Rutgers, T.S.U.o.N.J. *Modes of energy transfer between fluorophores and quenchers*. 2016; Available from: http://www.molecular-beacons.org/toto/Marras_energy_transfer.html.
227. Stefanidis, K., et al., *Deleted in Azoospermia-Like (DAZL) gene-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for germ cells research?* Fertil Steril, 2008. **90**(3): p. 798-804.
228. Lai, D., et al., *Human amniotic fluid stem cells have a potential to recover ovarian function in mice with chemotherapy-induced sterility*. BMC Dev Biol, 2013. **13**: p. 34.
229. Yu, X., et al., *Human amniotic fluid stem cells possess the potential to differentiate into primordial follicle oocytes in vitro*. Biol Reprod, 2014. **90**(4): p. 73.
230. Evron, A., S. Goldman, and E. Shalev, *Human amniotic epithelial cells differentiate into cells expressing germ cell specific markers when cultured in medium containing serum substitute supplement*. Reprod Biol Endocrinol, 2012. **10**: p. 108.
231. Wang, F., et al., *Human amniotic epithelial cells can differentiate into granulosa cells and restore folliculogenesis in a mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure*. Stem Cell Res Ther, 2013. **4**(5): p. 124.
232. Amidi, F., et al., *In vitro differentiation process of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells to male germ cells in the presence of gonadal and non-gonadal conditioned media with retinoic acid*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2015. **51**(10): p. 1093-101.
233. Lin, Y., et al., *Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos*. Science, 2008. **322**(5908): p. 1685-7.
234. Yu, Z., et al., *Dazl promotes germ cell differentiation from embryonic stem cells*. J Mol Cell Biol, 2009. **1**(2): p. 93-103.
235. Hu, X., et al., *Stem cells derived from human first-trimester umbilical cord have the potential to differentiate into oocyte-like cells in vitro*. Int J Mol Med, 2015. **35**(5): p. 1219-29.
236. Wang, F., et al., *[Preliminary research on the differentiation of human amniotic epithelial cells into female germ cells]*. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2013. **44**(3): p. 357-61.
237. Clark, A.T., et al., *Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(7): p. 727-39.

238. Geijsen, N., et al., *Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells*. Nature, 2004. **427**(6970): p. 148-54.
239. Hubner, K., et al., *Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells*. Science, 2003. **300**(5623): p. 1251-6.
240. Nayernia, K., et al., *In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice*. Dev Cell, 2006. **11**(1): p. 125-32.
241. Toyooka, Y., et al., *Embryonic stem cells can form germ cells in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11457-62.
242. Chen, J., et al., *Neuroprotective effect of human placenta-derived cell treatment of stroke in rats*. Cell Transplant, 2013. **22**(5): p. 871-9.
243. Kim, K.S., et al., *Long-term immunomodulatory effect of amniotic stem cells in an Alzheimer's disease model*. Neurobiol Aging, 2013. **34**(10): p. 2408-20.
244. Jung, J., et al., *Human placenta-derived mesenchymal stem cells promote hepatic regeneration in CCl4 -injured rat liver model via increased autophagic mechanism*. Stem Cells, 2013. **31**(8): p. 1584-96.
245. Chang, C.M., et al., *Placenta-derived multipotent stem cells induced to differentiate into insulin-positive cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **357**(2): p. 414-20.
246. Kadam, S., et al., *Human placenta-derived mesenchymal stem cells and islet-like cell clusters generated from these cells as a novel source for stem cell therapy in diabetes*. Rev Diabet Stud, 2010. **7**(2): p. 168-82.
247. Sun, N.Z. and H.S. Ji, *In vitro differentiation of human placenta-derived adherent cells into insulin-producing cells*. J Int Med Res, 2009. **37**(2): p. 400-6.
248. Simioniuc, A., et al., *Placental stem cells pre-treated with a hyaluronan mixed ester of butyric and retinoic acid to cure infarcted pig hearts: a multimodal study*. Cardiovasc Res, 2011. **90**(3): p. 546-56.
249. Schmidt, D., et al., *Living autologous heart valves engineered from human prenatally harvested progenitors*. Circulation, 2006. **114**(1 Suppl): p. I125-31.
250. Cargnoni, A., et al., *Transplantation of allogeneic and xenogeneic placenta-derived cells reduces bleomycin-induced lung fibrosis*. Cell Transplant, 2009. **18**(4): p. 405-22.
251. Chambers, D.C., et al., *A phase 1b study of placenta-derived mesenchymal stromal cells in patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. Respirology, 2014. **19**(7): p. 1013-8.
252. Jones, G.N., et al., *Potential of human fetal chorionic stem cells for the treatment of osteogenesis imperfecta*. Stem Cells Dev, 2014. **23**(3): p. 262-76.
253. Li, X., et al., *Human placenta-derived adherent cells prevent bone loss, stimulate bone formation, and suppress growth of multiple myeloma in bone*. Stem Cells, 2011. **29**(2): p. 263-73.
254. Fuchs, J.R., et al., *Diaphragmatic reconstruction with autologous tendon engineered from mesenchymal amniocytes*. J Pediatr Surg, 2004. **39**(6): p. 834-8; discussion 834-8.
255. Adzick, N.S., et al., *A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele*. N Engl J Med, 2011. **364**(11): p. 993-1004.
256. Fauza, D.O., et al., *Neural stem cell delivery to the spinal cord in an ovine model of fetal surgery for spina bifida*. Surgery, 2008. **144**(3): p. 367-73.
257. Saadai, P., T. Runyon, and D.L. Farmer, *Fetal neurosurgery: current state of the art*. Future Neurol, 2011. **6**(2): p. 165-171.
258. Li, Z., et al., *Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cell-induced neural stem cells to treat spinal cord injury*. Neural Regen Res, 2014. **9**(24): p. 2197-204.