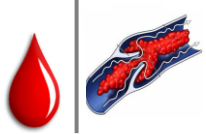




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΘΡΟΜΒΩΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΕΩΝ

Επιστημονική Υπεύθυνη: Καθηγήτρια Ωρ. Σ. Τραυλού

Διπλωματική Εργασία

**«Εφαρμογή Μοριακών Τεχνικών στον
Προγεννητικό Έλεγχο Αιμορροφιλίας»**

ΟΝΟΜΑ: Αρετή Συλλιγαρδάκη- Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: Αργυρή Γιαλεράκη – Επίκουρη καθηγήτρια Ιατρικής σχολής ΕΚΠΑ

Ακαδημαϊκό Έτος : 2009-2010

ΕΚΠΑ: ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Μ.Δ.Ε: «ΘΡΟΜΒΩΣΗ - ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΕΩΝ»

Αιμορροφιλία

Εφαρμογή Μοριακών Τεχνικών
στον προγεννητικό έλεγχο Αιμορροφιλίας.

Αρετή Συλλιγαρδάκη
Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	σελ. 3
Περίληψη.....	σελ. 4
Abstract.....	σελ. 5
Πρόλογος.....	σελ. 7
Γενικό μέρος.....	σελ. 9
1. Προγεννητικός έλεγχος.....	σελ. 10
1.1. Τι είναι ο προγεννητικός έλεγχος.....	σελ. 11
1.2. Προγεννητικός έλεγχος ρουτίνας.....	σελ. 11
1.3. Προγεννητικός έλεγχος βάσει ενδείξεων.....	σελ. 13
1.4. Τεχνικές επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου.....	σελ. 15
2. Στοιχεία Γενετικής.....	σελ. 16
2.1. Αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα.....	σελ. 17
2.2. Αυτοσωμική επικρατής κληρονομικότητα.....	σελ. 18
2.3. Φυλοσύνδετη κληρονομικότητα.....	σελ. 19
2.4. Μετάλλαξη.....	σελ. 20
2.4.1. Γονιδιακές μεταλλάξεις.....	σελ. 21
2.4.2. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες.....	σελ. 22
2.5. Πολυμορφισμοί.....	σελ. 24
3. Αιμόσταση – Μηχανισμός της Αιμόστασης.....	σελ. 26
3.1. Ενδογενής οδός.....	σελ. 29
3.2. Εξωγενής οδός.....	σελ. 29
3.3. Κυτταρικό μοντέλο της πήξης.....	σελ. 29
Ειδικό μέρος.....	σελ. 33
1. Αιμορροφιλία.....	σελ. 34
α) Συχνότητα.....	σελ. 36
β) Ιστορικά και επιδημιολογικά στοιχεία.....	σελ. 37
γ) Αιτιολογία – Κλινική εικόνα.....	σελ. 38
δ) Διαφορική διάγνωση.....	σελ. 40
ε) Θεραπεία.....	σελ. 40

I.	Θεραπεία υποκατάστασης.....σελ.	40
II.	Εναλλακτικές θεραπείες.....σελ.	42
III.	Γονιδιακή θεραπεία.....σελ.	43
1.1.	Αιμορροφιλία Α.....σελ.	45
α)	Ο παράγοντας πήξης VIII (FVIII).....σελ.	45
β)	Το μόριο του παράγοντα VIII.....σελ.	46
γ)	Μοριακές βλάβες στο γονίδιο του παράγοντα VIII.....σελ.	46
1.2.	Αιμορροφιλία Β.....σελ.	48
Ο	παράγοντας πήξης ΙΧ.....σελ.	48
2.	Ο προγεννητικός έλεγχος στην Αιμορροφιλία.....σελ.	50
2.1.	Γονοτυπική διάγνωση.....σελ.	52
2.2.	Ανάλυση με την τεχνική των RFLPs.....σελ.	53
Υλικά & Μέθοδοι.....σελ.		55
Υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.....σελ.		55
Μοριακές Μέθοδοι.....σελ.		57
1.	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA.....σελ.	57
2.	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....σελ.	60
Συνθήκες PCR.....σελ.		60
I.	PCR για Bcl-I.....σελ.	61
II.	PCR για ST-14.....σελ.	62
III.	PCR για CA-13.....σελ.	62
IV.	PCR για Taq-I, XmnI.....σελ.	62
V.	PCR για XhaI.....σελ.	62
VI.	PCR για DdeI.....σελ.	63
3.	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....σελ.	63
4.	Αποδιατακτική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (Denaturing High Performance Liquid Chromatography, DHPLC).....σελ.	65

5. Διερεύνηση του Intron 22.....σελ.	67
Πειραματικό μέρος.....σελ.	68
1. Εργαστηριακή διερεύνηση Αιμορροφιλίας Α και έλεγχος φορέας.....σελ.	69
Ανάλυση Υ χρωμοσώματος.....σελ.	71
Ανάλυση Bcl-Iσελ.	72
Πέψη με Bcl-I.....σελ.	73
Εξωγονιδιακό RFLP - St-14.....σελ.	74
Πολυμορφισμός CA-13.....σελ.	75
Πειραματικό μέρος για inversion 22.....σελ.	77
2. Εργαστηριακή διερεύνηση Αιμορροφιλίας Β και έλεγχος φορέας.....σελ.	79
Ανάλυση Dde- I.....σελ.	80
Ανάλυση Taq – Iσελ.	81
Πέψη με Taq – I.....σελ.	81
Ανάλυση XmnI.....σελ.	83
Πέψη με XmnI.....σελ.	83
Ανάλυση Hha - Iσελ.	84
Πέψη με HHa – I.....σελ.	84
Συμπεράσματα.....σελ.	85
Επίλογος.....σελ.	86
Βιβλιογραφικές αναφορές.....σελ.	87

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιστημονική Υπεύθυνη του Μ. Δ. Ε. «Θρόμβωση – Αιμορραγία – Ιατρική των Μεταγγίσεων», Καθηγήτρια Ωραιάνθη Σ. Τραυλού για τη συμβολή και την αφοσίωσή της όσον αφορά την ομαλή λειτουργία και την εξέλιξη του Μεταπτυχιακού, καθώς και για την άριστη συνεργασία μας. Επίσης, ευχαριστώ πολύ την επιβλέπουσα της παρούσης διατριβής, κυρία Γαλεράκη Αργυρή – Επίκουρη καθηγήτρια Ιατρικής σχολής ΕΚΠΑ, για την άψογη συνεργασία που είχαμε καθώς και για τη συμβολή της στην εκπόνηση του μεταπτυχιακού. Ευχαριστώ πολύ και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, τον καθηγητή Β΄ Μαιευτικής–Γυναικολογικής Κλινικής του Αρεταίειου Νοσοκομείου του Πανεπιστημίου Αθηνών, κύριο Κρεατσά Γεώργιο που δέχτηκε να συμμετάσχει και την κυρία Κώτση Παρασκευή - Ειδική Αιματολόγο, Επιμελήτρια Α΄ Λαϊκό Νοσοκομείο, η οποία επέβλεπε την πορεία του πειραματικού μέρους. Οι συμβουλές και οι υποδείξεις της ήταν κάτι παραπάνω απο χρήσιμες.

Ακόμη, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη βιολόγο του εργαστηρίου του μοριακού ελέγχου της Αιμορροφιλίας κ. Θυμιανού Σωτηρία, η οποία αφιερώνοντας αρκετό από τον επαγγελματικό και προσωπικό της χρόνο, με κατατόπισε πλήρως στις τεχνικές του μοριακού ελέγχου για την προγεννητική διάγνωση αιμορροφιλίας.

Επίσης, να ευχαριστήσω πολύ την οικογένειά μου, για τη στήριξη και τη συμπαράστασή τους όλο αυτό το διάστημα.

Ένα τελευταίο ευχαριστώ σε έναν άλλο σημαντικό άνθρωπο της ζωής μου, τη μητέρα μου, στη μνήμη της οποίας αφιερώνω την παρούσα διατριβή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής διατριβής, είναι η εφαρμογή των μοριακών τεχνικών στη διάγνωση της φορείας της Αιμορροφιλίας Α και Β σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό, καθώς και ο προγεννητικός έλεγχος των κυημάτων αυτών. Κατά την εκπόνησή της, μελετήθηκαν οικογένειες με ιστορικό Αιμορροφιλίας Α, σε ορισμένες εκ των οποίων πραγματοποιήθηκε και προγεννητικός έλεγχος των κυημάτων. Επιπροσθέτως, εξετάστηκαν και περιπτώσεις με ιστορικό Αιμορροφιλίας Β. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA
2. Polymerase Chain Reaction (PCR)
3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης
4. Αποδιατακτική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (DHPLC)
5. Διερεύνηση του Inversion 22
6. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)- ανάλυση των γενετικών δεικτών ώστε να ακολουθήσει την κληρονομικότητα των μη φυσιολογικών αλληλομόρφων.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων για την Αιμορροφιλία Α στη μια από τις οικογένειες που μελετήθηκαν και η οποία παρουσιάζεται στο πειραματικό μέρος της εργασίας, επιβεβαιώνουν ετεροζυγωτία της μέλλουσας μητέρας κατά το ST-14 και γι' αυτό το λόγο διενεργήθηκε προγεννητικός έλεγχος του εμβρύου, το οποίο αποδεικνύεται υγιές.

Για την Αιμορροφιλία Β, στην οικογένεια που παρουσιάζεται, ασθενής είναι ο θείος της οικογένειας και στο εργαστήριο προσήλθαν για εξέταση η αδελφή και τα ανίψια του – ο έλεγχος γίνεται κύριως για την κόρη της αδελφής του, όπου στο Dde-I, φαίνεται καθαρά ότι δεν έχει κληρονομήσει το πάσχον γονίδιο.

ABSTRACT

Haemophilia is an x linked hereditary hemorrhagic disorder with extremely heterogenic molecular basis, require laboratory approach with linkage analysis since direct detection of the molecular basis and following of the inheritance cannot be easily and rapidly detected in every family and thus prenatal diagnosis not feasible.

The present M. Sc thesis aims at evaluating the usefulness and applicability of Molecular based Techniques in the prenatal diagnosis and the identification of carriers in Haemophilia A and B.

The Molecular Techniques that were applied are:

- a) DNA extraction
- b) PCR (Polymerase Chain Reaction)
- c) Electrophoresis in Agarose gel
- d) DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)
- e) Investigation of Inversion 22
- f) RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis of genetic markers in order to follow the inheritance of abnormal alleles.

One family with Haemophilia A and one with Haemophilia B are included.

The results in the first family suggest that the male foetus of the propositus who is a carrier, is not affected. The results in the second family suggest that the sister of the Haemophiliac is not a carrier and thus carriership is also excluded for her daughter.

Molecular testing is rapid, timely and effective diagnostic method.

Genetic counseling should be done by specialized centers and scientists who should aim exclusively at informing families about the benefits and restrictions of the laboratory results rather than prompting them to specific options.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα γενετικά νοσήματα οφείλονται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες ή γονιδιακές μεταλλάξεις. Τέτοιες βλάβες του γενετικού υλικού, μπορούν να οδηγήσουν σε νοσήματα που εμφανίζονται ήδη από την ενδομήτρια ζωή ή σε νοσήματα που εμφανίζονται αργότερα στη διάρκεια της παιδικής ή της ενήλικης ζωής.

Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 6.000 γενετικά νοσήματα. Νοσήματα όπως η μεσογειακή αναιμία, η κυστική ίνωση, η οικογενής υπερχοληστεριναιμία κ.ά., προκαλούνται από μετάλλαξη ενός συγκεκριμένου γονιδίου, και ονομάζονται μονογονιδιακά,. Νοσήματα που οφείλονται σε μεταλλάξεις περισσότερων του ενός γονιδίου, σε συνδυασμό με άλλους επιβαρυντικούς παράγοντες, όπως το κάπνισμα και τις κακές διατροφικές συνήθειες ονομάζονται πολυπαραγοντικά (π.χ. ο καρκίνος του μαστού/ωοθηκών, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο σακχαρώδης διαβήτης, κ.ά.)

Υπολογίζεται ότι το 2-3% των νεογνών παρουσιάζουν μια τουλάχιστον μείζονα ή ελάσσονα συγγενή ανωμαλία, όχι απαραίτητα ασύμβατη με τη ζωή, αλλά αιτία σωματικής αναπηρίας ή νοητικής υστέρησης. Γενετικές ανωμαλίες ευθύνονται για το μεγαλύτερο ποσοστό των αποβολών καθώς και των ενδομήτριων θανάτων.

Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί τεράστια πρόοδος στη γενετική του ανθρώπου. Η ολοκλήρωση της χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος αποτέλεσε ένα εκπληκτικό επίτευγμα που δίνει τεράστια ώθηση στη μελέτη των γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου και κατά συνέπεια και στον προγεννητικό τους έλεγχο. Τα μέχρι σήμερα γνωστά, γενετικώς καθοριζόμενα νοσήματα, υπολογίζονται σε 6.000, τα περισσότερα από τα οποία ευτυχώς είναι σπάνια. Για την πρόληψη ή την έγκυρη διάγνωση των νοσημάτων αυτών, απαιτείται έλεγχος στο ζευγάρι πριν ή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ένα από τα νοσήματα που διενεργείται ο προγεννητικός έλεγχος, όταν απαιτείται από τις συνθήκες,(όπως όταν υπάρχει οικογενειακό ιστορικό), είναι η **Αιμορροφιλία**.

Η Αιμορροφιλία, είναι ένα φυλοσύνδετο νόσημα, το οποίο μεταβιβάζεται από τη μητέρα στα άρρενα τέκνα με τον υπολειπόμενο τρόπο κληρονομησης, καθώς και από τον πατέρα-ασθενή στην κόρη η οποία είναι φορέας της νόσου.

Παλιότερα στον όρο αυτό συγκαταλλέγονταν κληρονομικά νοσήματα που σχετίζονταν με έλλειψη παραγόντων πήξης. Έτσι, ανάλογα με τον παράγοντα που έλειπε (ή η παραγωγή του ήταν ελαττωμένη), η Αιμορροφιλία διακρινόταν σε: Αιμορροφιλία Α (έλλειψη του παράγοντα VIII), την Αιμορροφιλία Β (έλλειψη του παράγοντα IX) και την Αιμορροφιλία C (έλλειψη του παράγοντα XI).

Σήμερα στον όρο Αιμορροφιλία περιλαμβάνονται η Αιμορροφιλία Α και Β, που μοιράζονται κοινή κλινική εικόνα και τρόπο μεταβίβασης. Η εκδήλωση της νόσου, χαρακτηρίζεται από αιμορραγικά επεισόδια έντασης ανάλογης με τη βαρύτητα της νόσου και συνεπώς η ζωή ενός αιμορροφιλικού ατόμου για να είναι φυσιολογική, απαιτεί τη χορήγηση παραγόντων υποκατάστασης του ελλείποντος παράγοντα, με τις πιθανές επιπλοκές και επιπτώσεις που έχει αυτό στη ζωή των ασθενών και των οικογενειών τους. Για τον λόγο αυτό, η διερεύνηση και ο προγεννητικός έλεγχος σε οικογένειες με ιστορικό αιμορροφιλίας κρίνεται σκόπιμος εφόσον και η οικογένεια το επιθυμεί.

Σκοπός τη εργασίας αυτής είναι η εφαρμογή των μοριακών τεχνικών στη διάγνωση της φορείας της αιμορροφιλίας Α και Β σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό, καθώς και ο προγεννητικός έλεγχος στα κυήματα των γυναικών αυτών.



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

1.1. Τι είναι ο προγεννητικός έλεγχος;

Ο προγεννητικός έλεγχος προσφέρει στους γονείς και τους ιατρούς τη δυνατότητα έγκαιρης ενημέρωσης για την κατάσταση της υγείας του εμβρύου, οικογενειακού προγραμματισμού και αποφυγής της απόκτησης παιδιού με γενετικό νόσημα ή συγγενή ανωμαλία με ελάχιστο κίνδυνο για το κύημα και τη μητέρα.

Αποτελείται από μια σειρά εξετάσεων κατά τη διάρκεια της κυήσεως, που αφορούν το έμβρυο και τη μητέρα, με σκοπό τη γέννηση υγιών παιδιών και την ομαλή εξέλιξη της κυήσεως.

Ο προγεννητικός έλεγχος που παρέχεται σήμερα στα ζευγάρια έχει τη δυνατότητα να διαγνώσει ένα σημαντικό ποσοστό νοσημάτων, και ιδιαίτερα αυτών που εμφανίζουν ανατομικές ανωμαλίες και συνεπώς μπορούν να διαγνωσθούν με τη χρήση της υπερηχογραφίας, καθώς και εκείνων με γνωστή γενετική βάση όπου μπορούν να διαγνωστούν με την εφαρμογή τεχνικών Κυτταρογενετικής ή Μοριακής Βιολογίας. Αναμφισβήτητα η πρόοδος τα τελευταία χρόνια στην ποιότητα και επάρκεια του παρεχόμενου προγεννητικού ελέγχου είναι εντυπωσιακή, και οφείλεται σε μια σειρά από παράγοντες όπως:

α) την τεράστια συμβολή της υπερηχογραφίας και τη διαρκή βελτίωσή της που οφείλεται στην ολοένα καλύτερη απεικόνιση που παρέχουν τα νέα μηχανήματα, στην μεγάλη εμπειρία που έχει αποκτηθεί, στην εξειδίκευση του προσωπικού, και στην εισαγωγή νέων δυνατοτήτων (τρισδιάστατη ή real-time 4D υπερηχογραφία).

β) την πρόοδο της κυτταρογενετικής, και κυρίως την εισαγωγή νεότερων μεθόδων της Μοριακής Βιολογίας (PCR, FISH, κá)

γ) τις νέες δυνατότητες που προσφέρει σήμερα η χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος και η αναγνώριση της γενετικής βάσης ολοένα και μεγαλύτερου αριθμού νοσημάτων και συνδρόμων

δ) την εισαγωγή νέων μεθόδων προγεννητικού ελέγχου χάρη στην πρόοδο της Βιοτεχνολογίας, άλλων που έχουν ήδη καθιερωθεί στην κλινική πράξη (προεμφυτευτική γενετική διάγνωση) και άλλων που ευρίσκονται ακόμη σε ερευνητικό στάδιο (εμβρυϊκά κύτταρα και ελεύθερο εμβρυϊκό DNA στη μητρική κυκλοφορία).

ε) την ανάπτυξη και καθιέρωση προγραμμάτων (screening) ελέγχου του μαιευτικού πληθυσμού για την ανίχνευση ανευπλοειδιών και κυρίως του συνδρόμου Down.

Ο προγεννητικός έλεγχος που παρέχεται σήμερα στην Ελλάδα διακρίνεται σε «έλεγχο ρουτίνας» που αφορά όλα τα ζευγάρια, και σε «έλεγχο βάσει ενδείξεων» που αφορά κυήσεις όπου απαιτείται η διεξαγωγή εξειδικευμένων τεχνικών για την ανίχνευση συγκεκριμένων νοσημάτων.

1.2. Προγεννητικός έλεγχος ρουτίνας

Συνιστάται σε όλες τις έγκυες γυναίκες και στηρίζεται κυρίως:

α) **σε εξετάσεις αίματος** για την ανίχνευση ύποπτων περιπτώσεων για λοιμώξεις από εμβρυοπαθογόνους μικροοργανισμούς (ερυθρά, μεγαλοκυτταροίος, τοξόπλασμα) καθώς και στην αναζήτηση ετεροζυγωτίας για β-μεσογειακή αναιμία και τελευταία και για την κυστική ίνωση (ΗΠΑ) με συχνότητα εμφάνισης ετεροζυγωτών στην Ελλάδα περίπου 1/330 υγιή άτομα.

β) **στον υπερηχογραφικό έλεγχο** της ανατομίας και της ανάπτυξης του εμβρύου σε συνδυασμό με βιοχημικούς δείκτες για τα δύο πρώτα τρίμηνα της κύησης,

γ) **στις ανιχνευτικές δοκιμασίες** μαζικού ελέγχου (screening tests) για την εκτίμηση της πιθανότητας ανευπλοειδίας του εμβρύου. Αυξημένος κίνδυνος οδηγεί σε περαιτέρω έλεγχο, συνήθως με την εκτέλεση επεμβατικών τεχνικών.

Συνδυασμός αυχενικής διαφάνειας & βιοχημικών δεικτών α' τριμήνου

Ο προσδιορισμός του εύρους της αυχενικής διαφάνειας την 11^η-13^η εβδομάδα της κύησης σε συνδυασμό με την ηλικία της μητέρας και τις τιμές της β-χοριακής γοναδοτροπίνης (β-hCG) και της Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-a) στο μητρικό πλάσμα, μπορεί να ανιχνεύσει έως και το 92% των κυήσεων με σύνδρομο Down (Nicolaidis et al, 2005).

Η αυχενική διαφάνεια αναγνωρίζεται υπερηχογραφικά και οφείλεται στην παρουσία λέμφου κάτω από το δέρμα της περιοχής του αυχένα του εμβρύου. Φυσιολογικά έχει εύρος <3χιλ, ενώ μεγαλύτερες τιμές αποτελούν ένδειξη για υποκείμενη εμβρυϊκή ανωμαλία (ανευπλοειδία, συγγενείς ανωμαλίες, γενετικά σύνδρομα).

Με την προσθήκη και άλλων υπερηχογραφικών δεικτών (απουσία/υποπλασία ρινικού οστού, Doppler στο φλεβώδη πόρο και στην τριγλώχινα βαλβίδα, εκτίμηση γωνίας άνω γνάθου και προσώπου) υποστηρίζεται ότι μπορούν να αναγνωρισθούν μέχρι και το 97% των κυήσεων με σύνδρομο Down.

Βιοχημικοί δείκτες β' τριμήνου κύησης

Ο προσδιορισμός στο μητρικό ορό της β-hCG, της α-φετοπρωτεΐνης και της οιστραδιόλης μεταξύ της 16^{ης}-18^{ης} εβδομάδας της κύησης σε συνδυασμό με την ηλικία της μητέρας μπορεί να αναγνωρίσει το 67% των κυήσεων με σύνδρομο Down καθώς και ένα σημαντικό ποσοστό της τρισωμίας 18 και 13.

Το ανατομικό υπερηχογράφημα

Ο υπερηχογραφικός ανατομικός έλεγχος του εμβρύου εκτελείται την 20^η-23^η εβδομάδα της κύησης και στοχεύει στον αποκλεισμό των συγγενών ανωμαλιών του εμβρύου (μειζόνων ή ελασσόνων, πολλαπλών ή μεμονωμένων, σχετιζόμενων ή όχι με χρωμοσωματική ανωμαλία ή γενετικό σύνδρομο). Με τον έλεγχο αυτό μπορούν να αποκλεισθούν περίπου το 70-80% των συγγενών ανωμαλιών του εμβρύου. Η τρισδιάστατη υπερηχογραφία συμβάλλει στη βελτίωση της διαγνωστικής ευαισθησίας. Παράλληλα με τον έλεγχο της ανατομίας του εμβρύου ελέγχονται η εμβρυϊκή ανάπτυξη (αποκλεισμός ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης) και το ενδομήτριο περιβάλλον (πλακούς, αμνιακό υγρό, αιμάτωση με Doppler υπερηχογραφία).

1.3. Προγεννητικός έλεγχος επί ενδείξεων

Με βάση τα μέχρι τώρα δεδομένα μια σειρά από ενδείξεις υπαγορεύουν την ανάγκη για προγεννητικό έλεγχο, συνήθως επεμβατικό, σε αρκετά μεγάλο αριθμό κυήσεων. Οι ενδείξεις αυτές είναι:

- Ηλικία μητέρας άνω των 35 ετών

- Άτομα- φορείς γενετικών ασθενειών
- Άτομα με οικογενειακό ιστορικό γενετικών ασθενειών
- Γυναίκες με ιστορικό αποβολών

Έλεγχος χρωμοσωματικών ανωμαλιών

Συνήθως η ανάγκη για τον έλεγχο των χρωμοσωμάτων του εμβρύου προκύπτει κατά τη διάρκεια του προγεννητικού ελέγχου ρουτίνας, σε έγκυες γυναίκες με ελεύθερο ιστορικό, μετά την εφαρμογή των διαφόρων ανιχνευτικών μεθόδων που αναφέρθηκαν παραπάνω. Υπάρχουν όμως περιπτώσεις όπου εκ των προτέρων επιβάλλεται η ανάγκη καρυοτυπικού ελέγχου του εμβρύου όπως: α) προηγούμενη κύηση με χρωμοσωματική ανωμαλία β) γονέας φορέας ισοζυγισμένης μετάθεσης (Κατά τη μετάθεση παρατηρείται μια ασυνήθιστη αλλαγή στη δομή των χρωμοσωμάτων - σπάνε και επανενώνονται - η οποία μπορεί να προκύψει με δύο τρόπους: i) κατά το σχηματισμό του ωαρίου ή του σπερματοζωαρίου ή ii) να κληρονομηθεί από τη μητέρα ή τον πατέρα χωρίς όμως να αλλάξει η ποσότητα του γενετικού υλικού.

Έλεγχος μονογονιδιακών νοσημάτων

Τα ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν στη διαδικασία προγεννητικού ελέγχου των μονογονιδιακών νοσημάτων είναι:

α) Ποιά είναι η πιθανότητα κληρονόμησης στο έμβρυο με βάση τους νόμους του Mendel; προϋποθέτει την ταξινόμηση του νοσήματος στις γνωστές κατηγορίες κληρονομικότητας: αυτοσωματική κυρίαρχη, αυτοσωματική υπολειπόμενη και φυλοσύνδετη κληρονομικότητα.

β) Υπάρχει δυνατότητα προγεννητικού ελέγχου; Η απάντηση στο ερώτημα αυτό προϋποθέτει την ακριβή αναγνώριση του νοσήματος, την γνώση της γενετικής του βάσης και την παρουσία μετάλλαξης που αποτελεί το αίτιο του νοσήματος και η οποία δύναται να ελεγχθεί με τις διαθέσιμες τεχνικές Μοριακής Βιολογίας. Σημειώνεται πως σε μια σειρά από μονογονιδιακά νοσήματα κυρίως στα νοσήματα μεταβολισμού, ο προγεννητικός έλεγχος γίνεται με την ανίχνευση παθολογικών τιμών της υπεύθυνης πρωτεΐνης ή ενζύμου στο υπό εξέταση υλικό

(λάχνες, αμνιακό υγρό, εμβρυϊκό αίμα), ακόμη και αν δεν είναι γνωστή η ακριβής μετάλλαξη.

γ) Ποιές είναι οι πιθανές επιλογές αν διαγνωσθεί η παρουσία πάσχοντος εμβρύου. Στα μονογονιδιακά νοσήματα η βαρύτητα του κλινικού φαινότυπου επηρεάζεται και από φαινόμενα, όπως η υπερπήδηση γενεών, η ποικίλη εκφραστικότητα, η ατελής διεισδυτικότητα και η γενετική ετερογένεια. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη σε κάθε περίπτωση η γενετική συμβουλευτική προς το ζευγάρι. Η απάντηση στην ερώτηση αυτή βαρύνει στην τελική απόφαση του ζευγαριού για τη συνέχιση ή τη διακοπή της κύησης.

Η παρουσία ασταθών μεταλλάξεων και η παρουσία πολλαπλών και διαφορετικών μεταλλάξεων στο ίδιο γονίδιο (όπως π.χ. στην κυστική ίνωση) δημιουργεί δυσκολίες στην παροχή επαρκούς προγεννητικού ελέγχου.

Σήμερα είναι εφικτός ο έλεγχος σε ολόένα και μεγαλύτερο αριθμό μονογονιδιακών νοσημάτων.

Έλεγχος συγγενών λοιμώξεων

Η ανάγκη ελέγχου για τυχόν συγγενείς λοιμώξεις (ηπατίτιδες, CMV, HIV) προκύπτει συνήθως από την ανίχνευση ορολογικών δεικτών στο μητρικό αίμα. Η περαιτέρω παρακολούθηση των κυήσεων αυτών στηρίζεται:

- α) στην παρακολούθηση των μεταβολών των ορολογικών δεικτών,
- β) στην εκτέλεση αμνιοπαρακέντησης και στην αναζήτηση (με PCR) του εμβρυοπαθογόνου οργανισμού στο αμνιακό υγρό,
- γ) στην υπερηχογραφική παρακολούθηση των εμβρύων για ανίχνευση ευρημάτων ενδεικτικών προσβολής,
- δ) στην μαγνητική τομογραφία για την αναζήτηση βλαβών στον εγκέφαλο του εμβρύου
- ε) στην γενετική συμβουλευτική, όπου παρατίθενται στο ζευγάρι αναλυτικά στοιχεία για την πιθανότητα νόσησης του εμβρύου, καθώς και τις δυνατότητες-περιορισμούς στον πλήρη έλεγχο της περίπτωσης. Το τοξόπλασμα και ο μεγαλοκυτταροϊός είναι οι μικροοργανισμοί που συνήθως αναζητούνται.

1.4. Τεχνικές επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου

Οι κυριότερες και συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου είναι:

α) η βιοψία τροφοβλάστης. Λήψη χοριακών λαχνών. Γίνεται την 10^η-13^η εβδομάδα από την τελευταία έμμηνο ρύση και η πιθανότητα εμβρυικής απώλειας είναι 1-1.5%.

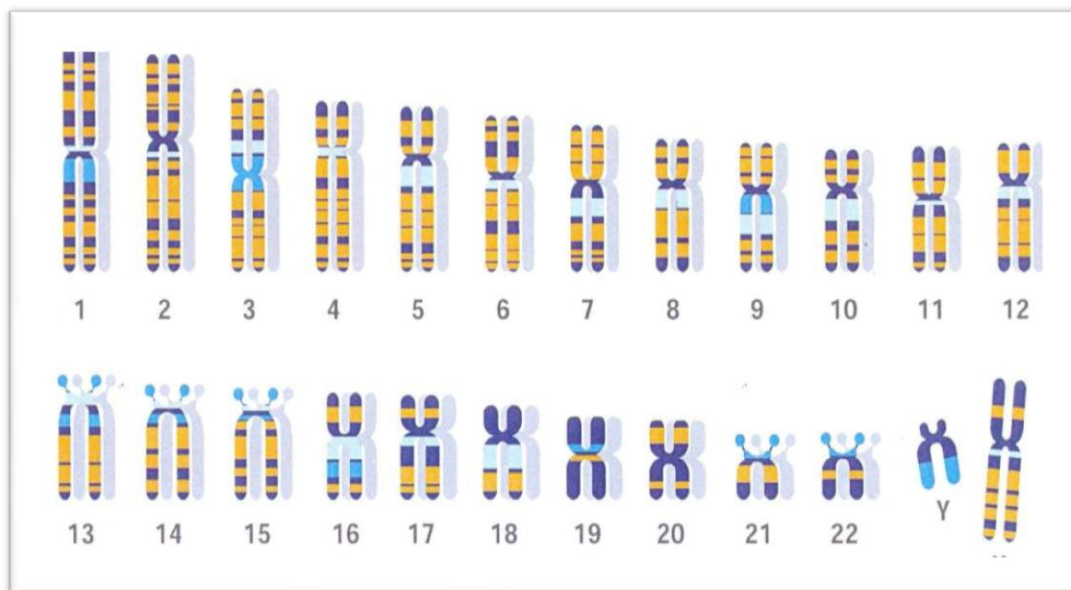
β) η αμνιοπαρακέντηση. Λήψη αμνιακού υγρού. Διεξάγεται συνήθως μεταξύ της 14^{ης} και της 20^{ης} εβδομάδας της κύησης. Ο κίνδυνος εμβρυικής απώλειας είναι 0.5-1%.

γ) η εμβρυοσκόπηση. Λήψη εμβρυικού αίματος. Η τεχνική εκτελείται την 20^η – 22^η εβδομάδα της κύησης και μπορεί κάτω από αυστηρά προτυπωμένες συνθήκες να γίνει προσδιορισμός επιπέδων ελλείποντος παράγοντα στο κύημα λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές αναφοράς επιπέδων παράγοντα στα κύματα που είναι πολύ διαφορετικές από τους ενήλικες. Από τη λήψη εμβρυϊκού αίματος ελέγχουμε τον εμβρυϊκό καρυότυπο ή και τον προσδιορισμό Hb, αντισωμάτων, ενζύμων και πρωτεϊνών. Ο κίνδυνος εμβρυικής απώλειας είναι 1.5-3.5%.

2. Στοιχεία Γενετικής

Ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελείται από 6×10^9 κύτταρα περίπου. Τα σωματικά κύτταρα έχουν 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων, από τα οποία τα 22 ζεύγη είναι αυτοσωμικά και το 23ο ζεύγος αποτελεί το ζεύγος των φυλετικών χρωμοσωμάτων (XX για τις γυναίκες και XY για τους άνδρες). Τα κύτταρα της γαμετικής σειράς (ωάρια, σπερματοζωάρια) είναι απλοειδή και φέρουν τη μισή

ποσότητα γενετικού υλικού, δηλ. 23 χρωμοσώματα (ένα χρωμόσωμα από το κάθε ζεύγος ομολόγων).



Εικόνα 1: Τα 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων και τα φυλετικά χρωμοσώματα X,Y.

Στα σωματικά κύτταρα, τα χρωμοσώματα κάθε ζεύγους ονομάζονται **ομόλογα** και το ένα χρωμόσωμα προέρχεται από το θηλυκό γονέα ενώ το άλλο από τον αρσενικό. Αποτελούνται από DNA (δεσοξυριβονουκλεϊνικό οξύ) και πρωτεΐνες.

Στο DNA περιέχονται όλες οι πληροφορίες που καθορίζουν τα χαρακτηριστικά ενός οργανισμού, οι οποίες οργανώνονται σε λειτουργικές μονάδες, τα γονίδια. Τα γονίδια φέρουν την αναγκαία πληροφορία για την παραγωγή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών. Όλα τα κληρονομικά χαρακτηριστικά ελέγχονται από γονίδια. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο ανθρώπινος οργανισμός έχει περίπου 50-100.000 γονίδια. Υπάρχουν περιπτώσεις που η κληρονόμηση ενός χαρακτηριστικού ελέγχεται από ένα μόνο γονίδιο – μονογονιδιακός τρόπος κληρονόμησης.

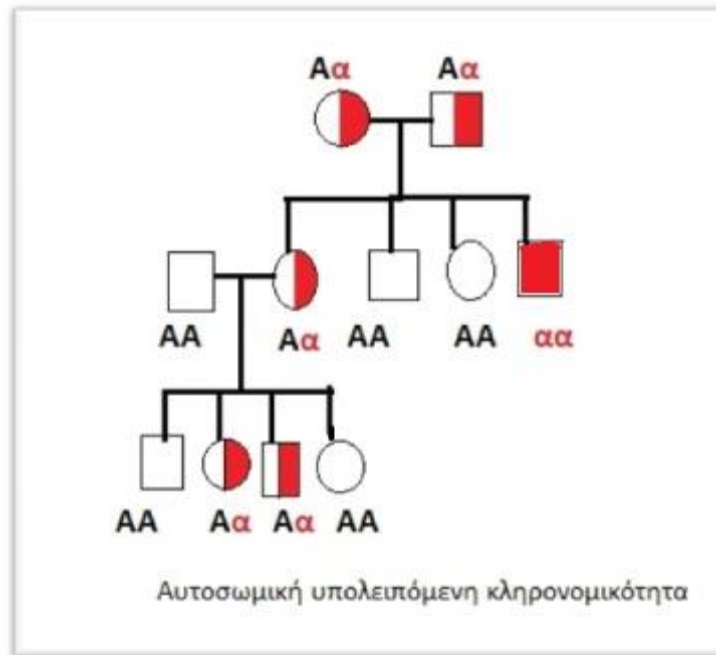
Περίπου 4.000 ασθένειες στον άνθρωπο οφείλονται σε αλλαγές ενός μόνο γονιδίου όπως έχει ήδη αναφερθεί (μονογονιδιακές). Οι περισσότερες από αυτές είναι σπάνιες, αρκετές όμως ευθύνονται για σοβαρές παθήσεις και συχνά οδηγούν σε πρόωρο θάνατο. Ο συνολικός αριθμός των ατόμων που προσβάλλεται από γενετικές ασθένειες κάθε χρόνο είναι σημαντικός και αντιστοιχεί περίπου στο 2% των γεννήσεων και σπάνια εμφανίζονται μεμονωμένα.

Σήμερα, για τις περισσότερες από αυτές δεν υπάρχει αποτελεσματική αντιμετώπιση ή θεραπευτική αγωγή. Οι περισσότερες γενετικές διαταραχές διατηρούνται στους πληθυσμούς από τη μεταβίβαση από τους γονείς στα παιδιά και από μια σταθερή πρόκληση νέων μεταλλάξεων (de novo). Ωστόσο, δεν είναι κληρονομικές όλες οι γενετικές διαταραχές. Μερικές νοσογόνες μεταλλάξεις όπως και μερικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες προκύπτουν κατά τη διάρκεια της δημιουργίας των γαμετών (ωάρια και σπερματοζωάρια) ή στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου.

Τα πρότυπα κληρονόμησης ταξινομούνται σε τρεις κυρίως κατηγορίες:

2.1. Αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα

Ορισμένες ασθένειες προκαλούνται από υπολειπόμενα αλληλόμορφα των γονιδίων (τροποποιημένες μορφές του κανονικού γονιδίου): ένα άτομο για να πάσχει, θα πρέπει να φέρει το αλληλόμορφο και στα δύο ομόλογα χρωμοσώματα. Για παράδειγμα, η δρεπανοκυτταρική αναιμία εκδηλώνεται σε άτομο που έχει κληρονομήσει δυο αντίγραφα του ίδιου μεταλλαγμένου αλληλομόρφου για ένα από τα γονίδια της β αλύσου της αιμοσφαιρίνης. Το υπεύθυνο αλληλόμορφο για τη δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι υπολειπόμενο. Άτομα που φέρουν ένα μόνο αντίγραφο συγκεκριμένου υπολειπόμενου αλληλόμορφου ονομάζονται "φορείς" γιατί αν και οι ίδιοι δεν πάσχουν, μπορούν να μεταβιβάσουν το αλληλόμορφο στα παιδιά τους. Αυτοί οι απόγονοι θα πάσχουν μόνο στην περίπτωση που κληρονομήσουν το μη φυσιολογικό αλληλόμορφο και από τους δυο γονείς.

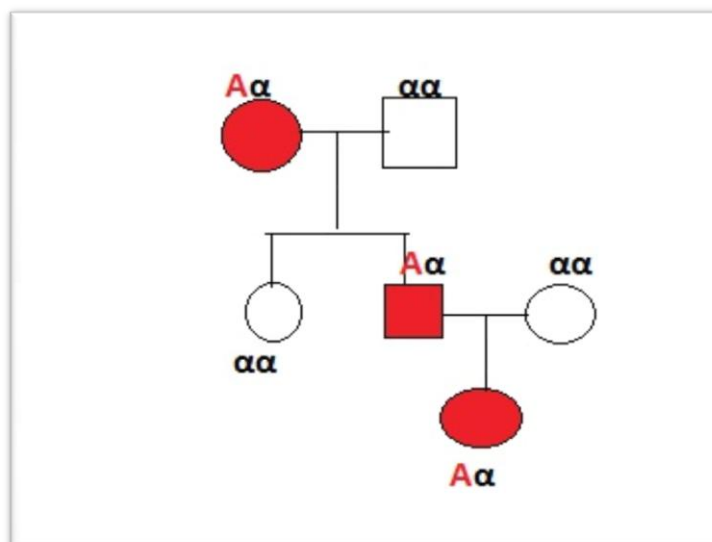


Εικόνα 2: Τρόπος κληρονόμησης με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα, όπου **A**: επικρατές φυσιολογικό γονίδιο και **α**: υπολειπόμενο αυτοσωμικό

2.2. Αυτοσωμική επικρατής κληρονομικότητα

Όταν μια ασθένεια οφείλεται σε επικρατές αλληλόμορφο ενός γονιδίου, αρκεί το άτομο να κληρονομήσει μόνο το συγκεκριμένο αλληλόμορφο, για να εκδηλώσει την ασθένεια. Εάν κάποιο από τα παιδιά ενός ατόμου που πάσχει, κληρονομήσει το υπεύθυνο για την ασθένεια αλληλόμορφο, θα πάσχει και αυτό και έχει 50% πιθανότητες να το μεταβιβάσει στους απογόνους του.

Ένα ιδιαίτερο πρόβλημα με τις ασθένειες που προκαλούνται από επικρατή αλληλόμορφα, είναι ότι αν εκδηλώνονται σε προχωρημένη ηλικία, υπάρχει πιθανότητα οι γονείς να τις μεταβιβάσουν εν αγνοία τους στους απογόνους. Παράδειγμα ασθένειας που κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα, είναι η *Αχονδροπλασία* και μεταβιβάζεται από το γονέα στους απογόνους.

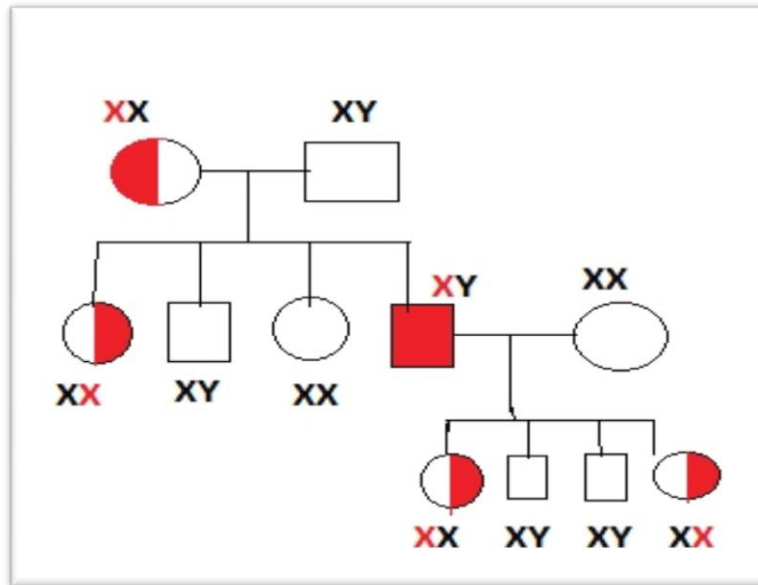


Εικόνα 3: Τρόπος κληρονόμησης αυτοσωμικού επικρατή χαρακτήρα. **A:** επικρατές παθολογικό γονίδιο και **a:** φυσιολογικό υπολειπόμενο

2.3. Φυλοσύνδετη κληρονομικότητα

Από τα 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων που υπάρχουν στον άνθρωπο, τα 22 ονομάζονται **αυτοσωμικά** είναι μορφολογικά ίδια και περιέχουν τον ίδιο αριθμό γονιδίων στα αρσενικά και στα θηλυκά άτομα, ενώ το 23^ο ζεύγος αποτελείται από δύο X χρωμοσώματα στα θηλυκά και ένα X και ένα Y στα αρσενικά και δεν είναι μορφολογικά ίδια, ούτε περιέχουν τον ίδιο αριθμό γονιδίων και ονομάζονται **φυλετικά χρωμοσώματα**.

Τα γονίδια που βρίσκονται στο X χρωμόσωμα και δεν έχουν αλληλόμορφα στο Y, ονομάζονται **φυλοσύνδετα** και γι' αυτό οι γενετικές παθήσεις που οφείλονται σε αυτά, εκδηλώνονται κυρίως στους άνδρες.



Εικόνα 3: Φυλοσύνδετος τρόπος κληρονομίσης: Βλέπουμε ότι από τη μητέρα-φορέα προήλθαν δυο απόγονοι που φέρουν το πάσχον γονίδιο με το αρσενικό να νοσεί και το θηλυκό να είναι φορέας. Έπειτα, το αρσενικό-ασθενής, μεταβιβάζει στις κόρες του το γονίδιο καθιστώντας τις φορείς.

Το χρωμόσωμα Y στους άνδρες δεν καθορίζει μόνο το φύλο αλλά φέρει και γονίδια που σχετίζονται με παραγωγή πρωτεϊνών που έχουν άλλες δράσεις, όπως είναι το γονίδιο **MIC2**. Είναι το πρώτο δομικό γονίδιο που ανιχνεύθηκε στο Y χρωμόσωμα. Βρίσκεται στην ομόλογη περιοχή, δηλαδή υπάρχει και στο Y και στο X χρωμόσωμα και κωδικοποιεί αντιγόνα των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

2.4. Μετάλλαξη

Ως μετάλλαξη ορίζεται η αλλαγή (η μετατροπή) του γενετικού υλικού (DNA) ενός οργανισμού. Ποσοτικές ή ποιοτικές αλλαγές σε επίπεδο γονιδίου, δηλαδή αλλαγή του αριθμού των βάσεων (πχ προσθήκη ή έλλειψη) ή αντικατάσταση μιας βάσης με άλλη βάση αντίστοιχα, ονομάζονται **γονιδιακές μεταλλάξεις**, ενώ αλλαγές σε μεγαλύτερο μέρος των χρωμοσωμάτων καλούνται **χρωμοσωμικές ανωμαλίες (μεταλλάξεις)**. Και οι δύο τύποι μεταλλάξεων εμφανίζονται με αξιόλογες συχνότητες και αποτελούν το γεννησιουργό αίτιο όχι μόνο όλων των γενετικών ή κληρονομικών νοσημάτων, αλλά και πολλών περιπτώσεων καρκίνου, καθώς και της ποικιλότητας. Οι φαινοτυπικές επιπτώσεις κάποιας μετάλλαξης ενδέχεται να είναι τόσο ανεπαίσθητες ώστε να χρειάζονται εξειδικευμένες

βιοχημικές τεχνικές για να βρεθεί κάποια διαφορά από τον φυσικό τύπο, ή τόσο σοβαρές ώστε να προκαλούν οφθαλμοφανείς μορφολογικές ανωμαλίες ή ακόμα και τον θάνατο.

Οι μεταλλάξεις είναι δυνατόν να δημιουργηθούν είτε φυσικά (αυτόματα) είτε τεχνητά. Οι φυσικές μεταλλάξεις δημιουργούνται όχι μόνο από την επίδραση της κοσμικής ακτινοβολίας, αλλά και από λάθη κατά την αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA. Οι τεχνητές μεταλλάξεις δημιουργούνται με την επίδραση μεταλλαξιόγόνων παραγόντων (π.χ. ακτίνες X, χημικές ενώσεις) πάνω στους οργανισμούς. Επίσης μεταλλάξεις μπορεί να συμβούν σε οποιοδήποτε στάδιο της ανάπτυξης του ατόμου, σε γεννητικά κύτταρα (γεννητικές μεταλλάξεις) ή σε σωματικά κύτταρα (σωματικές μεταλλάξεις).

2.4.1. Γονιδιακές μεταλλάξεις

Είναι οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με την αλλαγή ενός μόνο γονιδίου με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα νέο αλληλόμορφο. Έχουν την αρχή τους σε αλλαγή της αλληλουχίας των βάσεων του DNA που μπορεί να επέλθει από αντικατάσταση, αφαίρεση ή προσθήκη ενός ή περισσότερων νουκλεοτιδίων.

Από όλο το DNA μόνο ένα ποσοστό 10 - 20% κωδικοποιεί την βιοσύνθεση πρωτεϊνών. Επομένως, λάθη στο υπόλοιπο DNA συνήθως δεν οδηγούν σε διαφορετικό φαινότυπο. Αλλαγή στην αλληλουχία των βάσεων του DNA, μπορεί να συνεπάγεται αλλαγή στο μεταφραστικό πλαίσιο του γενετικού κώδικα, με αποτέλεσμα την παραγωγή "ελαττωματικών" πρωτεϊνών.

Επειδή ο αριθμός των αμινοξέων που συγκροτούν τις πρωτεΐνες είναι είκοσι (20) και αντίστοιχα ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που συγκροτούν το RNA είναι τέσσερα (4), θεωρήθηκε πιθανό ότι τρία νουκλεοτίδια αντιστοιχούν σε ένα αμινοξύ (κωδικόνιο) και γι' αυτό ο γενετικός κώδικας, ονομάστηκε **κώδικας τριπλέτας** (βλέπε πίνακα 1.) Χαρακτηριστικό του, είναι ότι διαθέτει **κωδικόνιο έναρξης** και **κωδικόνιο λήξης**. Το κωδικόνιο έναρξης σε όλους τους οργανισμούς είναι το **AUG** και κωδικοποιεί το αμινοξύ μεθειονίνη, ενώ τα κωδικόνια λήξης είναι τρία: **UGA**, **UAG** και **UAA**. Η παρουσία τους στο μόριο του mRNA σημαίνει τη λήξη της σύνθεσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

		second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Stop UAG } Stop	UGU } Cys UGC } UGA } Trp UGG } Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } Ile AUC } AUA } Met AUG }	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Stop AGG } Stop	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Πίνακας 1: Γενετικός κώδικας τριπλέτας

Ακόμη όμως και μετάλλαξη μέσα σε κάποιο γονίδιο, δεν οδηγεί πάντοτε στη βιοσύνθεση διαφορετικής πολυπεπτιδικής αλυσίδας, διότι ο γενετικός κώδικας είναι **εκφυλισμένος**. Δηλαδή ένα αμινοξύ μπορεί να κωδικοποιείται από περισσότερες από μια τριπλέτες (κωδικόνια). Τα κωδικόνια που κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ, ονομάζονται **συνώνυμα**. Συνεπώς, οι αλλαγές που συμβαίνουν σε ένα γονίδιο, δεν οδηγούν πάντα σε αλλαγή της αλληλουχίας των αμινοξέων της παραγόμενης πρωτεΐνης και οι μεταλλάξεις αυτού του είδους ονομάζονται **σιωπηλές**.

Το ευκαρυωτικό γονίδιο είναι ασυνεχές, αποτελείται δηλαδή από περιοχές που μεταγράφονται και μεταφράζονται (εξώνια, 5-10%) και από περιοχές που μεταγράφονται αλλά δεν μεταφράζονται (εσώνια, 90%).

Ασθένειες που οφείλονται σε γονιδιακές μεταλλάξεις είναι οι αιμοσφαιρινοπάθειες, η αιμορροφιλία A και B, η έλλειψη του ενζύμου G6PD, κ.α.

2.4.2. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

Τα σωματικά κύτταρα του ανθρώπου έχουν διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων ($2n=46$) ενώ οι ώριμοι γαμέτες (ωάρια ή σπερματοζωάρια) έχουν απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων ($n=23$). Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης κάθε θυγατρικό κύτταρο παίρνει είτε ένα αντίγραφο κάθε χρωμοσώματος (στη μίτωση) και τότε προκύπτουν θυγατρικά κύτταρα όμοια με το γονεϊκό, είτε ένα χρωμόσωμα από κάθε ομόλογο ζευγάρι (στη μείωση) οπότε

προκύπτουν κύτταρα με απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων (γαμέτες). Αν κατά τη μίτωση παρεμποδιστεί ο σχηματισμός της ατράκτου, τότε ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα μπορεί να μην μετακινηθούν σωστά κατά το στάδιο της ανάφασης. Μια τέτοια ανωμαλία (μη αποχωρισμός των ομόλογων χρωμοσωμάτων) θα έχει ως αποτέλεσμα να προκύψουν θυγατρικοί μιτωτικοί πυρήνες και κύτταρα, που θα περιέχουν και τα δυο ομόλογα χρωμοσώματα ή κανένα ομόλογο χρωμόσωμα. Παρόμοια, η καθυστερημένη μετακίνηση ενός χρωμοσώματος καταλήγει μερικές φορές σε αποκλεισμό αυτού του χρωμοσώματος από ένα θυγατρικό κύτταρο. Οι ανωμαλίες που έχουν σχέση με τον **αριθμό** των χρωμοσωμάτων, ταξινομούνται σε δυο κυρίως κλάσεις, τις **ευπλοειδίες** και τις **ανευπλοειδίες**.

Το ζυγωτό που προέρχεται από έναν ανώμαλο γαμέτη, με περίσσεια ή έλλειμα ενός ή περισσοτέρων χρωμοσωμάτων, καθώς και όλα τα κύτταρα του ατόμου που μπορεί να προκύψουν από ένα τέτοιο ζυγωτό, χαρακτηρίζονται ανευπλοειδή.

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες παρατηρούνται και μελετώνται σε πολλές περιπτώσεις στον άνθρωπο, όπως σε νεογέννητα, σε παιδιά με πνευματική καθυστέρηση και πολλαπλές συγγενείς δυσμορφίες, σε ασθενείς με σύνδρομα που επιδρούν στα φυλετικά χρωμοσώματα προκαλώντας μη ομαλή ανάπτυξη της σεξουαλικότητας των ατόμων (s.turner, s. Klinefelter κ.α), σε έμβρυα από πρόωρες αποβολές. Οι προσθήκες ή οι αφαιρέσεις μεγάλων χρωμοσωμάτων σχεδόν πάντοτε είναι θνησιγόνες ή οδηγούν στην αυτόματη αποβολή του εμβρύου. Αντίθετα έμβρυα με επιπλέον μικρά χρωμοσώματα δείχνουν διάφορες μορφολογικές δυσμορφίες ή πνευματικές διαταραχές. Οι πολλαπλές αυτές ανωμαλίες οφείλονται σε ανισορροπία του γενετικού υλικού.

Ανευπλοειδίες μπορούν να συμβούν τόσο στα αυτοσωμικά όσο και στα φυλετικά χρωμοσώματα. Οι πιο συχνά παρατηρούμενες ανωμαλίες των αυτοσωμάτων είναι η τρισωμία 21 (σύνδρομο Down) με συχνότητα εμφάνισης 1/800 γεννήσεις υγιών παιδιών, η τρισωμία 13 (σύνδρομο Patau) με συχνότητα εμφάνισης 1/25.000 γεννήσεις υγιών παιδιών και η τρισωμία 18 (σύνδρομο Edwards) με συχνότητα εμφάνισης 1/8000 γεννήσεις υγιών παιδιών.

Άλλες χρωμοσωμικές ανωμαλίες που αφορούν τα φυλετικά χρωμοσώματα, είναι το σύνδρομο Turner (45 X), το σύνδρομο Klinefelter (47 XXY), το σύνδρομο των τριών X (47 XXX) και η τρισωμία 47 XYY.

2.5. Πολυμορφισμοί

Όπως είναι γνωστό, το γενετικό υλικό δεν είναι πανομοιότυπο σε όλους τους οργανισμούς. Έτσι, είναι πολύ συχνό να εμφανίζονται 2 ή 3 φυσιολογικά αλληλόμορφα σε έναν πληθυσμό. Οι διαφορετικοί αυτοί γονότυποι που ακολουθούν τον απλό τρόπο κληρονομίσης κατά Mendel, καλούνται **πολυμορφισμοί**. Οι πολυμορφισμοί είναι διάσπαρτοι στο γονιδίωμα και η πλειονότητά τους απαντάται στις μη κωδικοποιούσες περιοχές του DNA. Συμβατικά, για να θεωρηθεί ένας γενετικός τόπος πολυμορφικός, θα πρέπει το λιγότερο συχνό αλληλόμορφο του να έχει συχνότητα 1% στο γενικό πληθυσμό.

Η φύση των πολυμορφισμών είναι ίδια με των μεταλλάξεων: προσθήκη, έλλειψη ή αντικατάσταση βάσεων καθώς και διάφορες επαναλήψεις αλληλουχιών.

Τα συχνότερα είδη πολυμορφισμών είναι:

- i. Μίκρο-δορυφορικές αλληλουχίες (mikrosatellites) ή SSR (Simple Sequence Repeat):** Είναι πολλαπλές επαναλήψεις δι-, τρι-νουκλεοτιδίων στο γονιδίωμα. Αποτελούν πολυμορφισμούς γιατί ο αριθμός των επαναλήψεων που υπάρχουν σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο, διαφέρει στα άτομα ενός πληθυσμού και χρησιμεύουν για τη μελέτη οικογενειών, για τον έλεγχο πατρότητας και στην ιατροδικαστική.
- ii. Μίνι-δορυφορικές αλληλουχίες (minisatellites) ή VNTR (Variable Number of Tandem Repeats):** Είναι επαναλαμβανόμενα τμήματα DNA μεγέθους 1kb τοποθετημένα έτσι ώστε το τέλος της μιας να είναι η αρχή της άλλης.
- iii. Διαφορές ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism (SNP) :** Είναι οι συχνότεροι τύποι πολυμορφισμών. Υπολογίζεται ότι υπάρχει ένα (1) SNP σε κάθε 1.000 βάσεις. Χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση και μελέτη γενετικών νοσημάτων ιδιαίτερα των πολυγονιδιακών.
- iv. Πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικού θραύσματος ή RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism):** Επιτρέπουν την ανάδειξη πολυμορφισμών τύπου SNP.

Οι πολυμορφισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την προγεννητική διάγνωση και ανίχνευση φορέων για διάφορα γενετικά νοσήματα,όπως είναι η Αιμορροφιλία που θα αναλύσουμε παρακάτω.

3. ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ – ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ

Με τον όρο Αιμόσταση περιγράφεται ένα πολύπλοκο σύστημα που περιλαμβάνει τόσο τα στοιχεία και τους παράγοντες πήξης του αίματος όσο και τους περιβάλλοντες ιστούς που συμμετέχουν στη διαδικασία της πήξης του αίματος. Αποσκοπεί στην παρεμπόδιση της αιμορραγίας επι αγγειακής ρήξης και στη διατήρηση της ομαλής κυκλοφορίας του αίματος. Η έναρξη του αιμοστατικού

μηχανισμού αρχίζει αμέσως μετά από βλάβη του ενδοθηλίου σε περιπτώση τραυματισμού του αγγείου.

Οι τρεις κύριοι παράγοντες που συμμετέχουν στη διαδικασία της αιμόστασης είναι: **το ενδοθήλιο, οι παράγοντες πήξης και τα αιμοπετάλια.**

Η αιμόσταση διενεργείται σε δύο φάσεις:

A). Πρωτογενής αιμόσταση

Η αρχική αιμόσταση περιλαμβάνει:

- Αγγειοσύσπαση
- Προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο τραυματισμένο ενδοθήλιο
- Αντίδραση απελευθέρωσης
- Συσσώρευση αιμοπεταλίων

B). Δευτερογενής αιμόσταση

- Ενεργοποίηση των παραγόντων της πήξης
- Συσσώρευση περισσότερων αιμοπεταλίων και δημιουργία ενός σταθερού θρόμβου ινώδους.

Γ). Ινωδόλυση

Παράλληλα με τη δημιουργία του θρόμβου δραστηριοποιείται το ινωδολυτικό σύστημα, που έχει σα σκοπό τη λύση του θρόμβου και την αποκατάσταση της κυκλοφορίας στο αγγείο.

Βασική ουσία της ινωδόλυσης είναι μια β2-σφαιρίνη του αίματος, το πλασμινογόνο, που παράγεται στο ήπαρ και κυκλοφορεί στο αίμα προσκολλημένο πάνω στο ινωδογόνο, πράγμα που ερμηνεύει και την παρουσία του στο εσωτερικό του θρόμβου.

- Το ινωδογόνο και το ινώδες αποτελούν το υπόστρωμα δράσης του.
- Για να εκδηλωθεί η δράση του πλασμινογόνου πρέπει να ενεργοποιηθεί από διάφορες ουσίες, τους ενεργοποιητές του πλασμινογόνου, και να σχηματισθεί ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, η πλασμίνη.

Η πλασμίνη δρα:

- Αδρανοποιώντας με διάσπαση τους παράγοντες V, VIII, XIII.

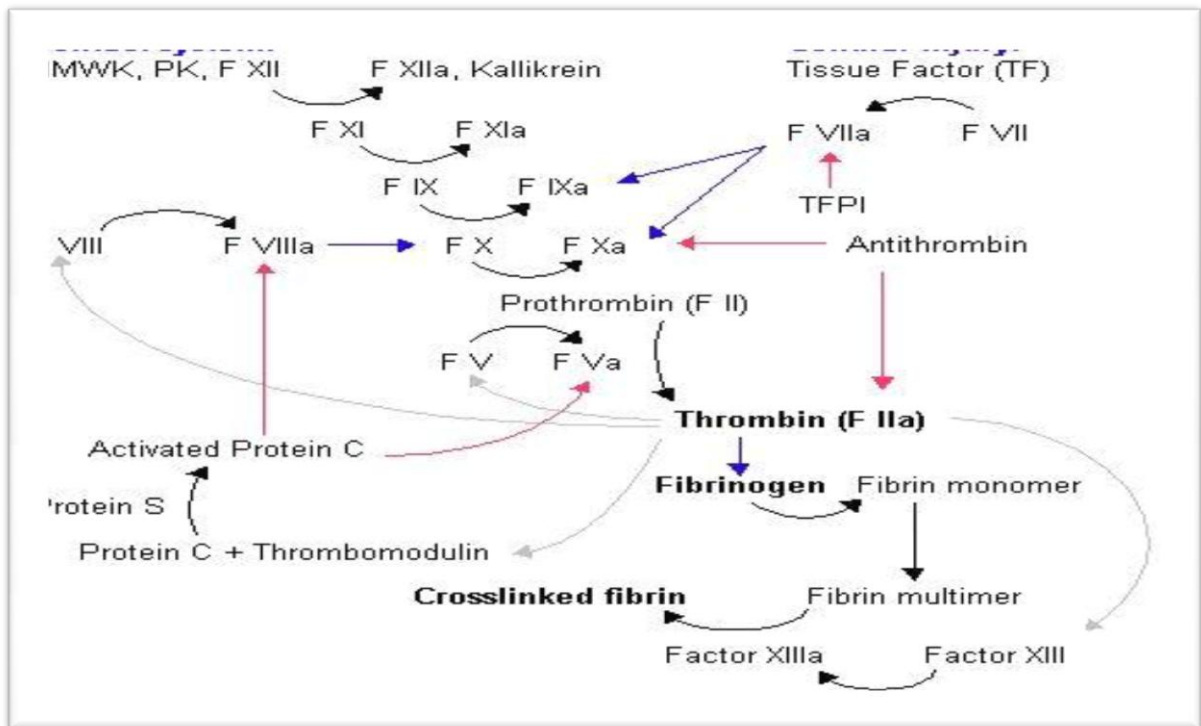
- Η κύρια όμως δράση της εξασκείται στο ινωδογόνο και στο ινώδες.

Το κύριο συστατικό του θρόμβου είναι η ινική. Η ινική παράγεται από το ινωδογόνο (παράγοντας I) μέσω της ενζυμικής δράσης της θρομβίνης (ενεργοποιημένος παράγων II). Η διαδικασία αυτή ακολουθεί την αντίδραση των παραγόντων πήξης που προκαλείται από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την ευαισθητοποίηση της επιφάνειας των λιπιδίων τους. Στην πλειοψηφία των παραγόντων πήξης έχουν δοθεί λατινικοί αριθμοί, με τη σειρά που ανακαλύφθηκαν:

Παράγοντας I	Ινωδογόνο
Παράγοντας II	Προθρομβίνη
Παράγοντας III	Ιστική θρομβοπλασίνη
Παράγοντας IV	Ασβεστιο
Παράγοντας V	Προκαλλικρεΐνη
Παράγοντας VII	Προκονβερντίνη
Παράγοντας VIII	Αντιαιμορροφιλικός παράγοντας A
Παράγοντας IX	Αντιαιμορροφιλικός παράγοντας B
Παράγοντας X	Παράγοντας Stewart
Παράγοντας XI	Αντιαιμορροφιλικός παράγοντας C
Παράγοντας XII	Παράγοντας Hageman
Παράγοντας XIII	Σταθεροποιητής του ινωδογόνου

Οι παράγοντες κυκλοφορούν στο πλάσμα σε πρόδρομη ανενεργό μορφή. Όταν ενεργοποιηθούν μετατρέπονται σε ένζυμα του συστήματος πήξης. Η ενεργοποίηση περιλαμβάνει διάσπαση ενός ή δύο πεπτιδικών δεσμών μέσω της δράσης ενζύμων που ονομάζονται πρωτεάσες σερίνης, προκαλούν πέψη της πολυπεπτιδικής αλυσίδας μιας πρωτεΐνης σε μια περιοχή που φέρει το αμινοξύ

σερίνη. Ο μηχανισμός της πήξης ακολουθεί δύο οδούς **την ενδογενή** και **την εξωγενή**. Οι δυο οδοί συνδέονται με τον παράγοντα X και συμμετέχουν και οι δυο στην διαδικασία της αιμόστασης.



Ο γνωστός «καταρράκτης της πήξης» και η σύνδεση των δυο οδών της.

3.1. Ενδογενής οδός

Η πρώτη πρωτεΐνη του πλάσματος που δρα στην ενδογενή οδό λέγεται παράγοντας XII. Μπορεί να ενεργοποιηθεί σε παράγοντα XIIa όταν έλθει σε επαφή με συγκεκριμένου τύπου επιφάνειες, όπως είναι οι ίνες κολλαγόνου που βρίσκονται κάτω από το κατεστραμμένο ενδοθήλιο. Ο παράγοντας XIIa καταλύει στη συνέχεια την ενεργοποίηση του παράγοντα XI σε XIa, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί τον παράγοντα IX σε IXa. Ο τελευταίος παράγοντας ενεργοποιεί τον παράγοντα X σε Xa, που είναι το ένζυμο που μετατρέπει την προθρομβίνη σε θρομβίνη.

3.2. Εξωγενής οδός

Η οδός αυτή πυροδοτεί μια πρωτεΐνη, που λέγεται ιστικός παράγοντας (Tissue Factor, TF) και εντοπίζεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης διαφόρων ιστικών κυττάρων. Όταν η αγγειακή βλάβη προκαλεί διακοπή της συνέχειας του ενδοθηλίου, αποκαλύπτεται ιστικός παράγοντας δεσμεύει μια πρωτεΐνη του πλάσματος, τον παράγοντα VII, η οποία ενεργοποιείται σε παράγοντα VIIa. Το σύμπλεγμα του ιστικού παράγοντα και του παράγοντα VIIa καταλύει την ενεργοποίηση του παράγοντα X. Επιπλέον, καταλύει την ενεργοποίηση του παράγοντα IX, ο οποίος με τη σειρά του συμβάλλει στην περαιτέρω ενεργοποίηση του παράγοντα X συμμετέχοντας στην ενδογενή οδό.

3.3. Κυτταρικό μοντέλο της πήξης

Σήμερα, το μοντέλο καταρράκτη είναι χρήσιμο για εκπαιδευτικούς σκοπούς και αδρά συσχτίζεται με τα screening tests αλλά αδυνατεί να εξηγήσει ερωτήματα της καθημερινής ζωής με σημαντικότερο το ερώτημα **«γιατί οι αιμορροφιλικό αιμορραγούν;»**. Ήταν όμως μια πολύ καλή αρχική θεώρηση για την κατανόηση της λειτουργίας των παραγόντων πήξης.

Αντίθετα, ισχύει το κυτταρικό μοντέλο της πήξης (πήξη in vivo), σύμφωνα με το οποίο, η διαδικασία της πήξης, ξεκινά στην κυτταρική επιφάνεια των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων, που λειτουργούν ως υπόστρωμα. Εξελίσσεται, και σύμφωνα με το **Κυτταρικό Μοντέλο**, η πήξη διενεργείται σε τρία αλληλεπικαλυπτόμενα στάδια:

1^ο στάδιο: Έναρξη της διαδικασίας με τη **δράση του ιστικού παράγοντα (TF)**. Ο ιστικός παράγοντας είναι μεμβρανική πρωτεΐνη που λειτουργεί ως απαραίτητος συμπαράγοντας για την ενεργοποίηση του παράγοντα πήξης X από τον παράγοντα VIIa.

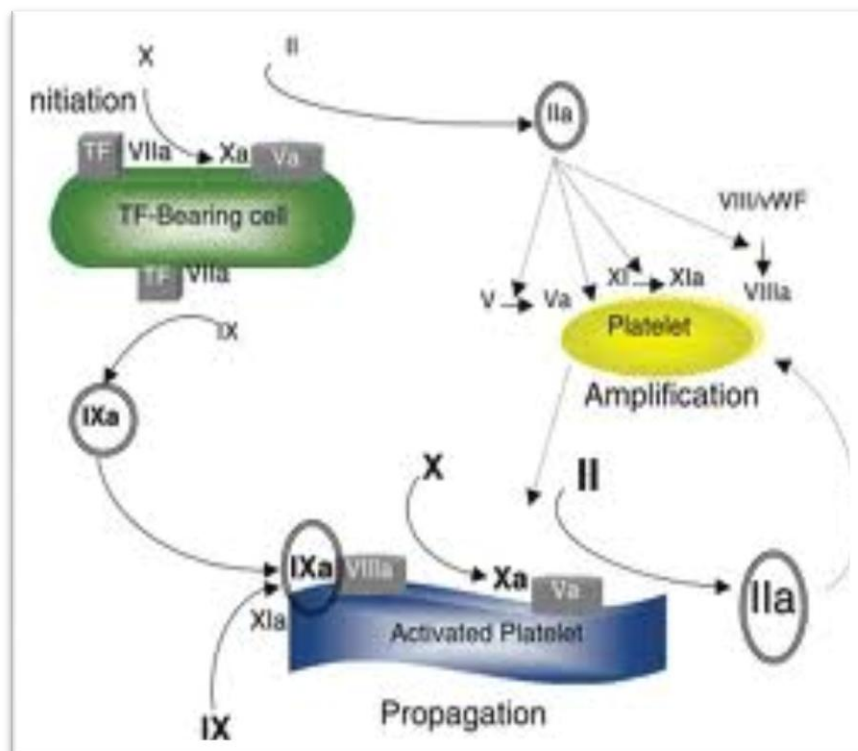
Ο παράγοντας Xa (με την βοήθεια του συμπαράγοντα του παράγοντα Va) μετατρέπει την προθρομβίνη στην ενεργό θρομβίνη.

Ο ιστικός παράγοντας εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα μακροφάγα καθώς και στα λευκά αιμοσφαίρια αλλά σε χαμηλά επίπεδα. Όταν τραυματίζεται

το αγγειακό τοίχωμα , ο ιστικός παράγοντας συνδέεται με τον παράγοντα VII και ενεργοποιεί την διαδικασία της αιμόστασης στο σημείο της βλάβης. Ακόμη, ο ιστικός παράγοντας εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα σε διεγερμένα από κυτοκίνες ενδοθηλιακά κύτταρα. Το γεγονός αυτό πιθανόν να συντελεί στην γρηγορότερη παραγωγή της θρομβίνης.(Shaun R. Coughlin. *Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology, Journal of Thrombosis and Haemostasis, 3: 1800–1814, 2005*)

2° στάδιο: Φάση ενισχύσεως στην οποία ενεργοποιούνται τα αιμοπετάλια και οι συμπαράγοντες έτσι ώστε να παραχθεί η μέγιστη ποσότητα θρομβίνης.

3° στάδιο: Πολλαπλασιασμός. Οι μεγάλες ποσότητες θρομβίνης που έχουν παραχθεί στην προηγούμενη φάση οδηγούν αφενός στην ανατροφοδότηση του κυκλώματος παραγωγής θρομβίνης και αφετέρου ενεργοποιείται ο FXIII για τη δημιουργία σταθερού θρόμβου ινικής.



A cell based model of coagulation

Συνοψίζοντας, η θρόμβωση μπορεί να επιτευχθεί είτε με την ενεργοποίηση του παράγοντα XII, είτε με τη δημιουργία του συμπλέγματος ιστικού παράγοντα-παράγοντα VIIa. Οι δύο οδοί συγχωνεύονται στον παράγοντα Xa, που καταλύει τη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη, η οποία καταλύει κατόπιν τη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες. Επιπλέον, η θρομβίνη συμβάλλει στην ενεργοποίηση των παραγόντων XI, VIII (ενδογενής οδός) και του παράγοντα V, με τη δημιουργία του παράγοντα Va, που χρησιμεύει ως συνένζυμο για τον παράγοντα Xa. Πρέπει να τονιστεί ότι διάφοροι συμπαράγοντες είναι απαραίτητοι για την πήξη του αίματος. Ο πιο σημαντικός είναι το ασβέστιο. Εάν τα ιόντα ασβεστίου στο αίμα απομακρυνθούν ή δεσμευθούν, δε θα συντελεσθεί η πήξη του αίματος.

Καταλαβαίνουμε λοιπόν τη χρησιμότητα των παραγόντων VIII και IX στη διαδικασία της αιμόστασης, όταν η δραστηκότητά τους είναι περιορισμένη σε βαθμό ώστε να τους καθιστά αδρανείς. Η μη ενεργοποίηση του TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor) και του FXIII καθιστούν μη ανθεκτικό τον θρόμβο της ινικής στην πρώιμη ινωδόλυση.

Συνεπώς, η απάντηση στο ερώτημα «γιατί οι αιμορροφιλικοί αιμορραγούν;» είναι ότι η ποσότητα της θρομβίνης που παράγεται, είναι τόσο μικρή ώστε δεν επαρκεί για να καλύψει αιμορραγικά επεισόδια.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Αιμορροφιλία

Είναι συγγενής αιμορραγική πάθηση και μεταβιβάζεται με υπολειπόμενο φυλοσύνδετο τρόπο κληρονόμησης. Οφείλεται είτε στην έλλειψη του παράγοντα VIII (αιμορροφιλία Α), ο οποίος λέγεται και αντ αιμορροφιλική σφαιρίνη Α είτε στην έλλειψη του παράγοντα IX (αιμορροφιλία Β) αντ αιμορροφιλική σφαιρίνη Β. Τα γονίδια που κωδικοποιούν την παραγωγή των παραγόντων VIII και IX, βρίσκονται στο χρωμόσωμα Χ.

Τα θηλυκά άτομα είναι συνήθως φορείς της νόσου και σπάνια νοσοούν. Νωρίς κατά την εμβρυογένεση, όταν το θηλυκό έμβρυο αποτελείται από λίγα μόνο κύτταρα, σε κάθε κύτταρο συμβαίνει **τυχαία** απενεργοποίηση του ενός Χ χρωμοσώματος από τα δυο που έχει, έτσι ώστε να προκύψει ποσοτική εξισορρόπηση της έκφρασης των φυλετικών γονιδίων στα θηλυκά, φαινόμενο που είναι γνωστό ως **υπόθεση Lyon** (Lyon M..F (1961). Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.)). *Nature* **190** (4773): 372–3). Σε βαμμένους ιστούς, στο μικροσκόπιο το απενεργοποιημένο Χ χρωμόσωμα διακρίνεται, στην άκρη του πυρήνα σαν μια πυκνή μικρή μάζα (σωμάτιο Barr). Ως

απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος, ορίζεται η μεταγραφική καταστολή του συνόλου των γονιδίων του ενός αντιγράφου του X χρωμοσώματος στα φυσιολογικά θήλεα XX, με ορατό αποτέλεσμα τη μετάβαση αυτού του αδρανοποιημένου χρωμοσώματος σε καθεστώς συστατικής ετεροχρωματίνης (το λεγόμενο σωματίο Barr). Το φαινόμενο της απενεργοποίησης του ενός X χρωμοσώματος είναι ένα μη αντιστρεπτό γεγονός στη ζωή ενός κυττάρου. Συνεπώς όλοι οι απόγονοι του κυττάρου με το συγκεκριμένο απενεργοποιημένο X χρωμόσωμα, θα έχουν απενεργοποιημένο το ίδιο X. Η απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος είναι μια επιγενετική αλλαγή που έχει σαν αποτέλεσμα την έκφραση διαφορετικού φαινότυπου αλλά δεν αντανακλά αλλαγές στον γονότυπο των θηλυκών ατόμων. Κατ' αυτή την έννοια, για ένα συγκεκριμένο είδος κυττάρου ή κυτταρική σειρά, το φαινόμενο της απενεργοποίησης του X χρωμοσώματος είναι κατά κάποιο τρόπο «η τάση» ή «μη τυχαίο γεγονός» και αυτό μπορεί να προκαλέσει την έκφραση ήπιων συμπτωμάτων στους θηλυκούς φορείς γενετικών νοσημάτων συνδεδεμένων με το X χρωμόσωμα (Puck, J; Willard, HF (1998). "X Inactivation in Females with X-Linked Disease". *N. Engl. J. Med.* **338** (5): 325–8)

Συνεπώς, τα θηλυκά άτομα συνήθως είναι μωσαϊκά στα σωματικά τους κύτταρα, γιατί μερικά έχουν ενεργό το πατρικής προέλευσης χρωμόσωμα ενώ άλλα έχουν ενεργό το μητρικής προέλευσης X χρωμόσωμα. Ανεξάρτητα με το ποιο είναι το πρότυπο απενεργοποίησης του X χρωμοσώματος στα σωματικά διπλοειδή κύτταρα, τα μισά των ώριμων απλοειδών ωκυττάρων φέρουν ένα πατρικής προέλευσης X χρωμόσωμα και τα άλλα μισά ένα X μητρικής προέλευσης.

Δεν είναι πλήρως κατανοητό το πώς επιλέγεται ένα X χρωμόσωμα για να απενεργοποιηθεί. Αλληλουχίες που βρίσκονται πάνω στο Κέντρο Απενεργοποίησης του X χρωμοσώματος (X inactivation center, XIC), ρυθμίζουν τη «σιωπή» του X χρωμοσώματος. Υποτίθεται ότι υπάρχει ένας αυτοσωμικά κωδικοποιούμενος «blocking factor» ο οποίος δεσμεύεται στο XIC και εμποδίζει την απενεργοποίησή του.

Μερικές γυναίκες παρουσιάζουν μη-τυχαία απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος γεγονός που μοιάζει σαν «προδιάθεση» απενεργοποίησης ενός συγκεκριμένου X χρωμοσώματος. Αυτό πιθανά να οφείλεται α) σε μεταλλάξεις που έχουν τα γονίδια που κωδικοποιούν τους ρυθμιστικούς παράγοντες που προκαλούν απενεργοποίηση β) στο ότι το X χρωμόσωμα που έχει ένα πολύ

επιβλαβές γονίδιο επιλέγεται για να απενεργοποιηθεί αν και αρχικά η απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος είναι τυχαία αλλά στον ώριμο οργανισμό πια οργανισμό μοιάζει να είναι μη τυχαία. Για παράδειγμα, ένα X χρωμόσωμα που φέρει ένα μετρίως βλαβερό γονίδιο που προκαλεί αργοπορία της κυτταρικής διαίρεσης. Κύτταρα με το άλλο υγιές X χρωμόσωμα, αντιγράφονται πιο γρήγορα και έτσι γίνονται κυρίαρχα.

Στα θηλυκά άτομα έχουν βρεθεί πολύ λίγες περιπτώσεις αιμορροφιλίας (**Wollina K**, Bowen DJ, Syrbe G, *et al.* Female twins with severe Christmas disease (hemophilia B). *Thromb Haemost* 1993; 70:774–6 & **Ingerslev J**, Schwartz M, Lamm LU, *et al.* Female haemophilia A in a family with seeming extreme bidirectional lyonization tendency: abnormal premature X-chromosome inactivation? *Clin. Genet.* 1989; 35:41–8).. Αυτές μπορεί να οφείλονται είτε σε ομολογία μιας μετάλλαξης των γονιδίων που κωδικοποιούν τους παράγοντες FVIII ή FIX είτε στη μη τυχαία απενεργοποίηση του υγιούς X χρωμοσώματος. Αυτή η μη τυχαία απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν μια πρωταρχική ερμηνεία για τα συμπτώματα αιμορροφιλίας σε γνωστούς φορείς. Πρόσφατα δεδομένα όμως προτείνουν, ότι η απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος δεν συσχετίζεται με τις συγκεντρώσεις του παράγοντα VIII στο πλάσμα, σε φορείς αιμορροφιλίας A και B (**Orstavik K.H.**, Scheibel E., Ingerslev J, *et al.* Absence of correlation between X chromosome inactivation pattern and plasma concentration of factor VIII and factor IX in carriers of haemophilia A and B. *Thromb. Haemost.* 2000; 83 :433–7).

Στον όρο αιμορροφιλία περιλαμβάνονταν όλες οι κληρονομικές διαταραχές που αφορούσαν την έλλειψη παραγόντων πήξης. Μετά όμως την ανακάλυψη και κατηγοριοποίηση των παραγόντων αυτών, η Αιμορροφιλία ταξινομήθηκε σε δύο μεγάλες κατηγορίες: την **Αιμορροφιλία A** (έλλειψη του παράγοντα VIII) και την **Αιμορροφιλία B** (έλλειψη του παράγοντα IX)

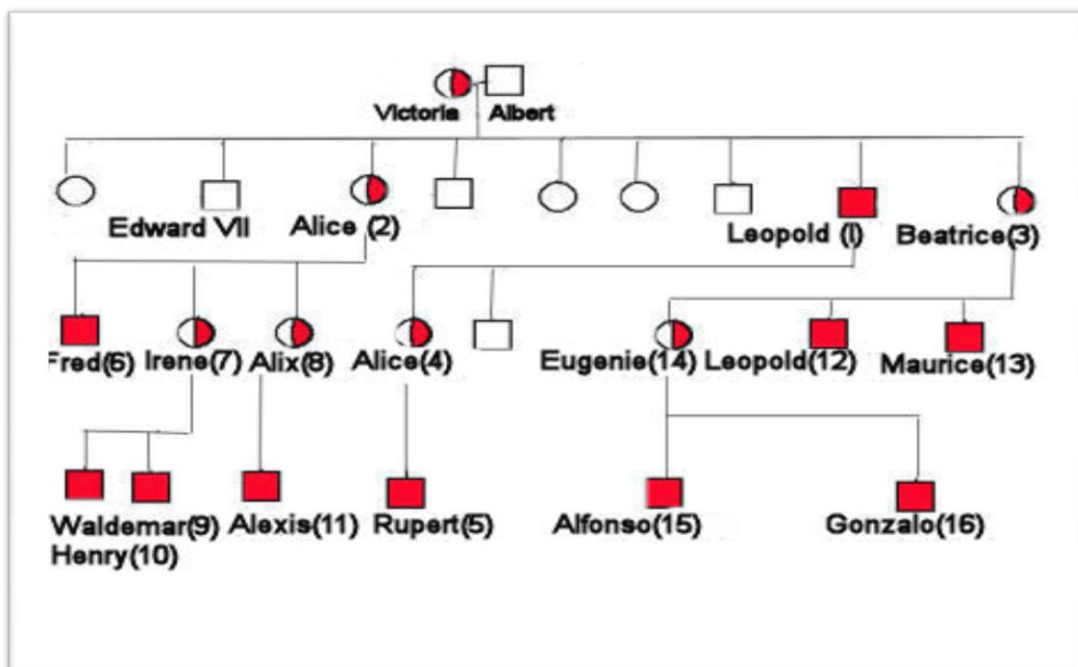
Ανάλογα με τη δραστηριότητα των παραγόντων VIII και IX, η Αιμορροφιλία A και B, διακρίνονται σε σοβαρή (FVIII/FIX<1%) - αυτόματα αιμορραγικά επεισόδια, μέτρια (FVIII/FIX: 1- 5%) - προκλητές αιμορραγίες και ελαφριά (FVIII/FIX: 5- 50%) - αιμορραγικά επεισόδια μετά από τραυματισμό ή χειρουργείο.

α) Συχνότητα

Όπως προαναφέρθηκε η Αιμορροφιλία, προσβάλλει σχεδόν πάντα τους άνδρες. Οι γυναίκες είναι ετεροζυγώτες και μεταβιβάζουν τη νόσο και σπάνια είναι συμπτωματικές. Η Αιμορροφιλία Α έχει συχνότητα 1:5.000-10.000 άνδρες και αποτελεί την πιο συχνή συγγενή διαταραχή της πήξης. Η σχέση μεταξύ αιμορροφιλίας Α και Β είναι 4:1 και δεν φαίνεται να υπάρχουν διαφορές, εθνικές ή γεωγραφικές. Είναι κλινικά ταυτόσημη με την αιμορροφιλία Α, γι' αυτό και περιγράφονται μαζί.

β) Ιστορικά και επιδημιολογικά στοιχεία

Η πρώτη γραπτή αναφορά στη νόσο ανάγεται στις εβραϊκές γραφές. Η πιο διάσημη φορέας αιμορροφιλίας είναι η βασίλισσα Βικτώρια και ο πιο γνωστός αιμορροφιλικός, ο εγγονός της Αλέξης, γιος του Τσάρου της Ρωσίας.



Γενεαλογικό δέντρο της βασιλικής οικογένειας.

Μέχρι και πριν 30 χρόνια, η αιμορροφιλία ήταν συνυφασμένη με αναπηρία, απόρροια των επαναλαμβανόμενων αιμορραγιών στις αρθρώσεις και το προσδόκιμο επιβίωσης των αιμορροφιλικών δεν ξεπερνούσε τα 20 χρόνια. Η εισαγωγή των παραγόντων υποκατάστασης, στην αντιμετώπιση των αιμορραγικών επεισοδίων, άλλαξε ριζικά την εικόνα του αιμορροφιλικού και αύξησε το προσδόκιμο επιβίωσης. Από τη δεκαετία του '80, οι αιμορροφιλικοί αντιμετωπίζονταν σε εξωτερική βάση, στο νοσοκομείο ή στο σπίτι (home treatment). Πλην όμως, η χρήση των κλασικών παραγόντων παραγόντων είχε περαιτέρω επιπτώσεις στην υγεία των αιμορροφιλικών, όπως μόλυνση με τους ιούς της ηπατίτιδας A, B ή C και φυσικά το HIV. Αυτό συνέβαινε γιατί οι παράγοντες υποκατάστασης παρασκευάζονταν από μια μεγάλη δεξαμενή η οποία περιείχε πλάσματα από πολλούς δότες και αν έστω και ένα ήταν μολυσμένο, τότε μολύνονταν όλα τα πλάσματα που περιέχονταν στη δεξαμενή. Σήμερα, είναι υποχρεωτική πλέον σε όλες σχεδόν τις ανεπτυγμένες χώρες, η τεχνική νουκλεϊνικού οξέος Nucleic Acid Technic (NAT) με την οποία ανιχνεύονται ποσοτικά τα νουκλεϊνικά οξέα του HIV, HBV και HVC.

γ) Αιτιολογία – Κλινική εικόνα

Η βιολογική διαταραχή της νόσου συνίσταται στην ανεπάρκεια του παράγοντα VIII της πήξης. Και η κλινική συνδρομή είναι ανάλογη του βαθμού της έκπτωσης του παράγοντα αυτού. Έτσι στη βαριάς μορφής αιμορροφιλία, <1% (40%), οι αιμορραγικές εκδηλώσεις είναι βαριές: αυτόματες αιμορραγίες στις αρθρώσεις, τους μυς και τα εσωτερικά όργανα. Στην μέτριας βαρύτητας μορφή, 1-10% (30% των περιπτώσεων), σπανιότερα αυτόματες αιμορραγίες, συνήθως μετά από τραυματισμό ή χειρουργική επέμβαση.



Χρόνιοι αίμαρθροι και στα δυο γόνατα αιμορροφιλικού.

Τέλος, στην ελαφριάς μορφής αιμορροφιλία(10-30%), αιμορραγία παρατηρείται μόνο μετά από τραυματισμό ή εγχείρηση. Από τις εκδηλώσεις που αναφέρθηκαν, οι πιο συχνές και σοβαρές για την δραστηριότητα του ασθενούς, είναι τα αίμαθρα, γιατί καθλώνουν τον ασθενή για αρκετό διάστημα και μάλιστα στη νεαρή και την μαθητική συνήθως ηλικία, γιατί σε ένα ποσοστό περιπτώσεων προκαλούν μονιμότερη δυσλειτουργία των αρθρώσεων και αναπηρία. Συχνές είναι και οι αιμορραγίες στους μυς. Από αυτές σημαντικότερη μπορεί να θεωρηθεί η αιμορραγία στην περιοχή του ψοίτη μυός, γιατί μπορεί να οδηγήσει σε νευροπάθεια.

Λιγότερο συχνή εκδήλωση είναι η αιματουρία, συνήθως ανώδυνη, αλλά πολύ ενοχλητική για τον ασθενή. Βαρύτερη για τις συνέπειες της είναι η αιμορραγία από το ανώτερο πεπτικό, με πιο συνήθη αιτία το έλκος του δωδεκαδακτύλου.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αιμορραγίες στη στοματοφαρυγγική κοιλότητα. Η αιμορραγία της γλώσσας δύσκολα αντιμετωπίζεται λόγω της αναγκαστικής κινητικότητας του οργάνου, αλλά και της αυξημένης τοπικής ινωδόλυσης από τον σίελο, ενώ η αιμορραγία στον φάρυγγα, μπορεί επεκτεινόμενη μέσω των ιστών, να οδηγήσει σε απόφραξη της αεροφόρου οδού.

Η αιμορραγία στο κεντρικό νευρικό σύστημα, που αποτελεί την πιο συχνή αιτία θανάτου στους ασθενείς αυτούς, παρατηρείται ευτυχώς σπανιότερα και συνήθως μετά από τοπική βία.

Αιμορραγικές εκδηλώσεις στη νεογνική ηλικία

Γίνεται αναφορά στις εκδηλώσεις αυτές, γιατί σε αντίθεση μ' εκείνες των άλλων ηλικιών, τα νεογνά παρουσιάζουν την αιμορραγία ως σύμπτωμα για "πρώτη φορά", και συνεπώς η διαγνωστική αρχή (αξία) της επανάληψης του ενοχλήματος "στο παρελθόν" δεν μπορεί να εφαρμοστεί. Τα αιμορροφιλικά νεογνά εκδηλώνουν αιμορραγίες με "ασήμαντη αφορμή" κατά ή και μετά τον τοκετό. Αυτές εντοπίζονται στα μαλακά μόρια (41%), μετά από ενδομυϊκή (im) ή ενδοφλέβια (iv) ένεση ή και μετά από μικροεπεμβάσεις (16%), καθώς και ως αιμορραγίες στις ενδοκοιλιακές κοιλότητες (11%). Αντίθετα οι αιμορραγίες στους μύς και στις αρθρώσεις είναι πολύ σπάνιες όπως και κατά την οδοντοφυΐα και την περιτομή.

Σημειώνεται ότι μόνο το 10% των παιδιών παρουσιάζει μεγάλη αιμορραγία μέχρι το τέλος της νεογνικής περιόδου. Επίσης, έχουν περιγραφεί αιμορραγικές εκδηλώσεις με ποσοστό 1-2%, απότοκες κακώσεων κατά τη διάρκεια ή μετά από τον τοκετό σε αιμορροφιλικά καθώς και σε φυσιολογικά νεογνά. Τέτοιες επιπλοκές είναι το κεφαλαιμάτωμα και οι ενδοκράνιες αιμορραγίες, οι οποίες εκδηλώνονται ως οξέα υποσκληρίδια αιματώματα. Στα φυσιολογικά νεογνά οι επιπλοκές αυτές εμφανίζονται ως απότοκες μεγάλου βάρους, προωρότητας και εργώδους χειρουργικού τοκετού, ενώ στα αιμορροφιλικά χωρίς ιδιαίτερο ερέθισμα.

δ) Διαφορική διάγνωση

Όταν το κλινικό ή και το οικογενειακό ιστορικό είναι ασαφές η διαφορική διάγνωση πρέπει να γίνει μεταξύ της αιμορροφιλίας A ή B των επίκτητων ανασταλτών και της νόσου von Willebrand. Ανασταλτές των παραγόντων πήξης έχουν αναφερθεί σε συσχέτισμό με ανοσολογικές διαταραχές, όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος, η γενικευμένη καρκινωμάτωση, τα εκτεταμένα εγκαύματα, η τοξιναιμία της κυήσεως, η κακοήθεια, η ελκώδης κολίτιδα, καθώς και οι μονοκλωνικές ανοσοσφαιρινοπάθειες.

ε) Θεραπεία

I. Θεραπεία υποκατάστασης

Η θεραπεία της αιμορροφιλίας A και B έχει στόχο την αποκατάσταση του παράγοντα πήξης που λείπει. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε με χορήγηση πρόσφατα κατεψυγμένου πλάσματος (FFP) και κρυοκαθιζήματος είτε με σκευάσματα συμπυκνωμένων παραγόντων πήξης ανθρώπινης προέλευσης ή παρασκευασμένα με την τεχνική του ανασυνδυασμού. Η εισαγωγή των τελευταίων στην αρχή της δεκαετίας του 1970 άλλαξε ριζικά την εξέλιξη της θεραπείας των ασθενών και βελτίωσε την ποιότητα της ζωής τους με τίμημα δυστυχώς την μετάδοση σε μεγάλο ποσοστό ιογενών λοιμώξεων. Από το 1985 χρησιμοποιούνται αποκλειστικά σκευάσματα συμπυκνωμένων παραγόντων τα οποία έχουν υποστεί κατάλληλη επεξεργασία ώστε είναι ασφαλή ως προς τη μετάδοση ιών, ενώ έχει αρχίσει να γίνεται όλο και περισσότερο εκτεταμένη η χρήση σκευασμάτων ανασυνδυασμένων παραγόντων.

Η θεραπεία υποκατάστασης γίνεται με δύο τρόπους:

- α) Κατ' επίκληση**, όταν θεραπεύεται ένα αιμορραγικό επεισόδιο
- β) Προφυλακτική**, η οποία έχει σαν στόχο την πρόληψη ενός αιμορραγικού επεισοδίου και δίνεται: **i) εφ'άπαξ**, πριν από κάποιο συμβάν που πιθανά να προκαλέσει αιμορραγία, **ii) βραχυχρόνια**, ώστε να ελαττωθούν τα αιμορραγικά επεισόδια σε διάρκεια μιας συγκεκριμένης περιόδου,
- γ) μακροχρόνια (συνεχής) προφύλαξη**, η οποία έχει σαν κύριο στόχο την πρόληψη της αιμορροφιλικής αρθροπάθειας. Η ποσότητα του παράγοντα η οποία χορηγείται κάθε φορά, εξαρτάται από την επιθυμητή για την κλινική κατάσταση αύξηση του παράγοντα πήξης και μπορεί να υπολογισθεί με τον τύπο:

Χορηγούμενος παράγοντας (IU) = β.σ(kg)×Επιθυμητή αύξηση παράγοντα / Κ

(Όπου Κ σταθερά που σχετίζεται με την ανάκτηση του κάθε παράγοντα (π.χ. Κ=1 για τον FIX και Κ=2 για τον FVIII), ενώ τα μεσοδιαστήματα στα οποία χορηγείται εξαρτώνται από τον χρόνο ημίσειας ζωής των παραγόντων στο πλάσμα και είναι 8-20 ώρες για τον FVIII και 18-30 ώρες για το FIX.

Πίνακας 1.

Θέση αιμορραγίας	Επιθυμητά επίπεδα παράγοντα (U/kg)	Δόση (i.u./kg FVIII)	FIX	Συχνότητα σε 24 ώρες	Μέρες
Αίμαρθρο	30-50	15-25	30-50	1-2	1-2
Μυικό Αιμάτωμα	30-50	15-25	30-50	1-2	1-2
Οπισθοπεριτοναϊκό Αιμάτωμα	30-50	15-25	30-50	1-2	3-4
Εγκεφαλική Αιμορραγία	60-80	30-40	60-80	1-3	7-10
Αιματουρία	20-30	10-20	20-30	1-2	1-2
Οπισθοφαρυγγικό Αιμάτωμα	40-60	20-30	40-60	1-2	3-4

Η μεγάλη πρόοδος στην αντιμετώπιση των προβλημάτων των αιμορροφιλικών ασθενών και η βελτίωση της ποιότητας της ζωής τους οφείλεται στην εισαγωγή της θεραπείας κατ'οίκον και της αυτομετάγγισης, που τους επιτρέπουν να ζουν φυσιολογική ζωή, με πλήρη δραστηριότητα. Η συνεχής θεραπεία προφύλαξης αρχίζει πολύ νωρίς με την εμφάνιση του πρώτου αιμάρθρου δηλαδή σε ηλικία 1-2 ετών και συνεχίζεται περίπου μέχρι την ηλικία των 18-20 ετών, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η εμφάνιση αιμορροφιλικής αρθροπάθειας.

Επιπλοκές θεραπείας υποκατάστασης

Όπως ήδη έχουμε πει, κύρια παρενέργεια της αγωγής υποκατάστασης ήταν η μετάδοση των νοσημάτων των μεταδομένων με το πλάσμα (HAV, HBV, HIV) η οποία σήμερα έχει σχεδόν αποκλειστεί με τη χρήση των τεχνικών αδρανοποίησης και των ανασυνδυασμένων σκευασμάτων. Πολύ σπάνια οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν αλλεργικές αντιδράσεις αναφυλακτοειδούς τύπου, οι οποίες συνήθως είναι πολύ ήπιες. Περίπου όμως το 10-15% των ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία υποκατάστασης θα εμφανίσουν 'ανασταλτές' (αντισώματα) έναντι των χορηγούμενων παραγόντων πήξης.

Οι ανασταλτές έναντι των FVIII ή FIX, ειδικά όταν βρίσκονται σε υψηλό τίτλο, επιπλέκουν σοβαρά τη θεραπεία των ασθενών. Στις περιπτώσεις αυτές οι ασθενείς υποβάλλονται σε πρωτόκολλα απευαισθητοποίησης και για την αντιμετώπιση των αιμορραγικών επεισοδίων μεταγγίζονται με σκευάσματα προθρομβινικού συμπλέγματος ή ενεργοποιημένο παράγοντα VII (FVIIa).

II. Εναλλακτικές Θεραπείες

Χορήγηση DDAVP (1,8-Desamino-D-Arginine-Vasopressin, Desmopressin). Κατά τη διάρκεια του 1970, Ευρωπαίοι ερευνητές ανακάλυψαν ότι το DDAVP προκαλεί πρόσκαιρη αύξηση του FVIII τόσο σε υγιή άτομα, όσο και σε ασθενείς με αιμορροφιλία A ελαφράς ή μέσης βαρύτητας. Οι ασθενείς με αιμορροφιλία A βαρείας μορφής δεν απαντούν στο DDAVP.

EACA και το τρανεξαμικό οξύ: Αντι-ινωδολυτικά - ισχυροί ανασταλτές της ενεργοποίησης του πλασμινογόνου. Έχουν χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της αιμοστάσεως στους αιμορροφιλικούς. Μπορούν να δοθούν ως συμπληρωματική θεραπεία για την αιμορραγία των βλεννογόνων και τη μηνορραγία, είναι δε ιδιαίτερα χρήσιμα ως συμπληρωματική θεραπεία σε οδοντιατρικές επεμβάσεις. Η αντι-ινωδολυτική θεραπεία αντενδείκνυται επί αιματοουρίας.

III. Γονιδιακή Θεραπεία

Η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί το "όνειρο" και τη μεγάλη "προσδοκία" ασθενών και ιατρών. Γονιδιακή θεραπεία σημαίνει εισαγωγή και έκφραση αντιγράφου γονιδίου σε σωματικά κύτταρα. Προκειμένου για την αιμορροφιλία, γονιδιακή θεραπεία σημαίνει διόρθωση της γενετικής διαταραχής, εισάγοντας στα κύτταρα του ατόμου λειτουργικά γονίδια.

Προϋποθέσεις για τη γονιδιακή θεραπεία αποτελούν:

α) το γονίδιο πρέπει να εμφυτευτεί σε κύτταρα που θα αποδώσουν τον παράγοντα VIII ή IX στην κυκλοφορία,

β) το γονίδιο πρέπει να είναι λειτουργικό επί μακρόν ή τα κύτταρα στα οποία θα εμφυτευτεί να ζουν επί μακρόν (ηπατικά, μυϊκά κύτταρα), ή να έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρουν το γονίδιο σε μελλοντικές γενεές κυττάρων,

- γ)** τα εμφυτευόμενα γονίδια (transgenes) πρέπει να παράγουν ικανή ποσότητα παράγοντα που θα διασφαλίζει ικανοποιητική αιμόσταση,
- δ)** η εμφύτευση γονιδίου δεν πρέπει να βλάπτει το φυσιολογικό DNA ή να ενεργοποιεί σιωπηλά γονίδια, που ενδεχομένως θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου,
- ε)** η εμφύτευση του γονιδίου δεν πρέπει να προκαλέσει ανοσολογική αντίδραση που περιορίζει την αποτελεσματικότητα του γονιδίου, παρεμποδίζει μελλοντικές θεραπείες ή προκαλεί σοβαρές επιπλοκές και
- στ)** η τεχνική της εμφύτευσης πρέπει να είναι απλή στην εφαρμογή και επιτυχής σε όλα τα άτομα με αιμορροφιλία.

Οι προσπάθειες για γονιδιακή θεραπεία σε διάφορα γενετικώς μεταβιβαζόμενα νοσήματα έχουν ξεκινήσει εδώ και 30 χρόνια. Τα προβλήματα ήταν πολλά στην πορεία, άλλα από αυτά λύθηκαν, κάποια αποτελούν ακόμη "πονοκέφαλο" για τους ερευνητές.

Η αιμορροφιλία ως γενετικό νόσημα προσφέρεται για γονιδιακή θεραπεία γιατί είναι "μονογονιδιακή" νόσος, υπάρχει μεγάλη δυνατότητα επιλογής ιστών-στόχων, υπάρχουν διαθέσιμα "μοντέλα" πειραματοζώων για προκλινικές μελέτες (knockout ποντίκια, αιμορροφιλικά σκυλιά, πίθηκοι) και επιπλέον, η επίτευξη ακόμη και μικρής αύξησης του ανεπαρκούντος παράγοντα VIII ή IX διασφαλίζει ηπιότερη κλινική έκφραση της νόσου. Οι δυσκολίες στην εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας απορρέουν κυρίως από το μεγάλο γονίδιο του παράγοντα VIII και την επιλογή του κατάλληλου μεταφορέα (vector), που θα μεταφέρει το γονίδιο και δεν θα είναι νοσογόνος για τον αιμορροφιλικό.

Οι προκλινικές μελέτες για την αιμορροφιλία A (FVIII) ή B (FIX) έγιναν σε ποντίκια, σκύλους ή πιθήκους. Ως "φορείς" (vectors) χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι ιοί (ρετροϊοί, μινι-αδενοϊοί, και αδενοσχετιζόμενοι ιοί - adeno-associated virus). Σε κάποιες από αυτές τις μελέτες, η προσπάθεια ήταν επιτυχής σε άλλες όχι. Η διάρκεια έκφρασης του παράγοντα κυμαινόταν από ημέρες μέχρι ένα χρόνο.

Στη φάση I των κλινικών μελετών στον άνθρωπο, ελέγχεται η τοξικότητα και ασφάλεια, έστω και αν η δοσολογία του εμφυτευόμενου γονιδίου είναι μικρότερη από εκείνη που θα μπορούσε να προσφέρει σημαντικό θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Στις περισσότερες κλινικές μελέτες, κάποιοι ασθενείς ανέφεραν μείωση των αιμορραγικών επεισοδίων, που ενδεχομένως ήταν απόρροια ψυχολογικού

επηηρεασμού των ασθενών και όχι αποτέλεσμα πραγματικής αύξησης των επιπέδων του παράγοντα. Άλλωστε, τα υψηλότερα επίπεδα του παράγοντα που αναφέρθηκαν σε ένα ασθενή ήταν 4% κι αυτά παροδικά.

Επομένως, με τα μέχρι σήμερα δεδομένα, παραμένει το ερώτημα "πόσο ψηλά επίπεδα μπορούν να επιτευχθούν και για πόσο διάστημα". Όπως κι αν έχει, η γονιδιακή θεραπεία έχει δρομολογηθεί και υπάρχουν ενδείξεις πως η εφαρμογή της είναι θέμα χρόνου. Όμως, θα αποτελέσει θεραπεία προσπελάσιμη για τους αιμορροφιλικούς παγκοσμίως, ή θα αποτελέσει προνόμιο των αιμορροφιλικών των ανεπτυγμένων χωρών που μπορούν να αντέξουν το κόστος της θεραπείας, όπως γίνεται ήδη με τη διαθεσιμότητα των ανασυνδυασμένων παραγόντων; Το πόσο συχνά θα πρέπει να επαναλαμβάνεται η γονιδιακή θεραπεία (2-3 φορές το χρόνο; κάθε 5-10 χρόνια) αν και εφόσον γίνει πραγματικότητα, θα προσδιορίσει και το εύρος εφαρμογής της. Κάνοντας τη διαδρομή από τις εβραϊκές γραφές στο 2003, διαπιστώνομε ότι η ιστορία της αιμορροφιλίας έχει ζοφερές περιόδους, αλλά τα επιτεύγματα της επιστήμης συνεχώς ανοίγουν καινούργιους δρόμους που διασφαλίζουν τουλάχιστον "καλύτερη ποιότητα ζωής".

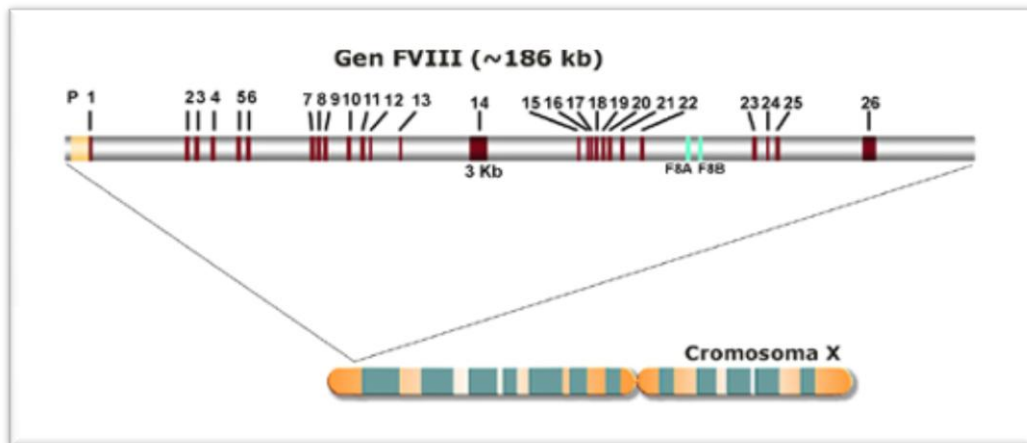
1.1 . Αιμορροφιλία Α

α) Ο παράγοντας πήξης VIII (FVIII)

Το γονίδιο του FVIII της πήξης είναι εξαιρετικά μεγάλο (~186 kb) και τοποθετείται στο άκρο του μακριού βραχίονα του Χ χρωμοσώματος, στη θέση Xq28.

Η διάρκεια ημιζωής του είναι 12 ώρες, ενώ όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή η διάρκεια μειώνεται στις 2,4 ώρες, γεγονός που επιβεβαιώνει το ρόλο του παράγοντα von Willebrand στο να σταθεροποιεί τον παράγοντα VIII στην κυκλοφορία.

Αποτελείται από 26 εξώνια (exons) και 25 εσώνια (introns) τα οποία κωδικοποιούν ένα mRNA μήκους 8,8kb. Στην πλειοψηφία τους τα exons και τα introns είναι πολύ μικρά, με εξαίρεση το exon 14 το οποίο έχει μέγεθος 3kb και κωδικοποιεί την μεγάλη περιοχή του γονιδίου (περιοχή Β). Τα intron 1 και 22 έχουν αξιοσημείωτα μεγάλο μέγεθος καθώς και αρκετές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες απαντώνται και αλλού στο Χ χρωμόσωμα και ευθύνονται για σοβαρές μεταλλάξεις, όπως το Inversion 22, που θα αναλύσουμε παρακάτω.



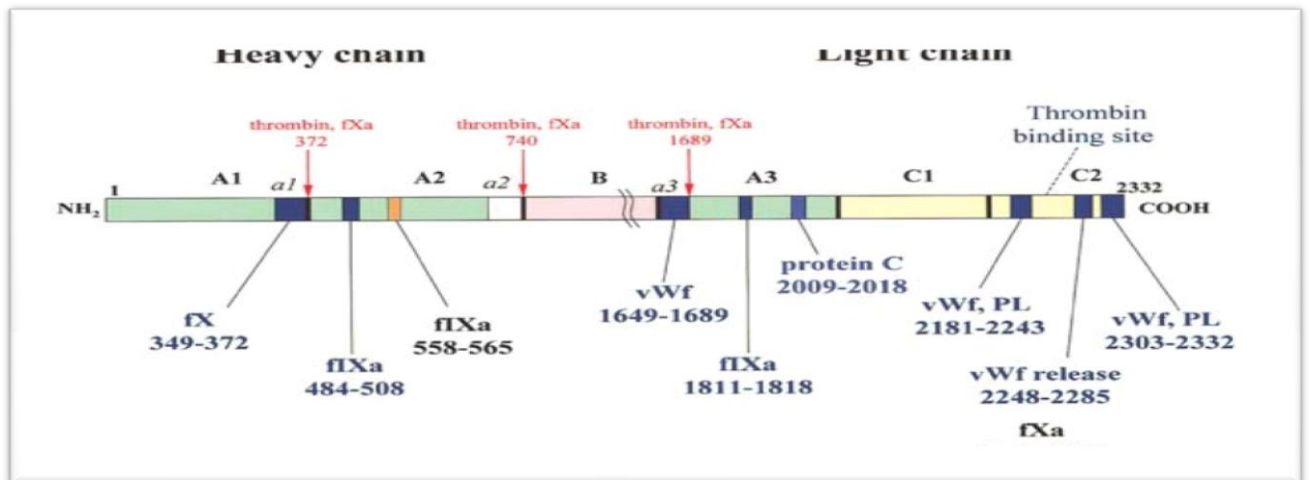
Το γονίδιο του FVIII

Η κύρια παραγωγή του FVIII είναι στο ήπαρ και στα ενδοθηλιακά κύτταρα RNA του οποίου όμως ανιχνεύθηκε και στους λεμφαδένες, το σπλήνα, τους πνεύμονες και τα αιμοπετάλια. Το μόριο του FVIII, λόγω της αστάθειάς του κυκλοφορεί ως σύμπλεγμα με παράγοντα Von Willebrand. Η ενεργοποίηση του FVIII τον απελευθερώνει και του επιτρέπει να δράσει στο ενδογενές σύστημα του καταρράκτη της πήξης ως συμπαράγοντας του IX, προκαλώντας την ενεργοποίηση του παράγοντα X σε παράγοντα Xα. Σε περίπτωση που ο FvW απουσιάζει, ο FVIII δε θα μπορέσει να λειτουργήσει (νόσος v.W type 3).

β) Το μόριο του παράγοντα VIII

Είναι πρωτεΐνη αποτελούμενη από μια βαριά αλυσίδα MB 188 kDa και μια ελαφριά αλυσίδα MB 80kDa. Περιλαμβάνει 6 διαφορετικές περιοχές :

A1, A2, A3, B, C1, C2. Η A1 και A2 περιοχές της βαρείας αλυσού περιλαμβάνουν τις θέσεις σύνδεσης της θρομβίνης, ενώ η A3 την θέση σύνδεσης με τον FvW και την πρωτεΐνη C. Η B είναι η μεγάλη περιοχή, η οποία αποκόπτεται με την ενεργοποίηση του FVIII και αντικαθίσταται από ιόντα Ca^{++} . Η λειτουργία της είναι άγνωστη. Οι περιοχές C είναι πανομοιότυπες μεταξύ τους και η κρυσταλλική δομή ενός ανασυνδυασμένου ανθρώπινου τμήματος C2 είναι γνωστό ότι χρησιμεύει ως καλούπι για τη σύνθεση της περιοχής C1.



Το μόριο του FVIII

γ) Μοριακές βλάβες στο γονίδιο του παράγοντα VIII

Από τη στιγμή που πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του γονιδίου του παράγοντα VIII, άρχισε να σχηματίζεται μια βάση δεδομένων με τα πρότυπα από την ανάλυση κάθε παθολογικού DNA των ασθενών (<http://europium.mrc.rpms.ac.uk>). Οι μοριακές βλάβες του γονιδίου έχουν ομαδοποιηθεί και διακρίνονται σε σημειακές μεταλλάξεις, σε μεγάλες ανακατατάξεις και σε απροσδιόριστες μεταλλάξεις εκ των οποίων 43 μικρές και 78 μεγάλες ελλείψεις, 138 διάφορες αντικαταστάσεις αμινοξέων και 24 ασυνθετικές μεταλλάξεις, ενώ το 25% των απλών αντικαταστάσεων αναφέρεται στην αντικατάσταση της βάσης (ζεύγος) C- T σε CpG, ο συνολικός αριθμός των οποίων ανέρχεται σε 258 μεταλλάξεις.

Στην κατηγορία των μεγάλων ανακατατάξεων το 90 % είναι κοινές αναστροφές και προκαλούν ήπια ή μέσης βαρύτητας μορφή αιμορροφιλίας A. Το υπόλοιπο 10% εισάγει σε βαριά αιμορροφιλία. Από το αυτό ποσοστό μόνο το 40% των περιπτώσεων τους ανήκει σε αναστροφή της διεύθυνσης κωδικοποίησης ολόκληρου τμήματος του γονιδίου που περιλαμβάνεται μεταξύ των εξωνίων 22 και 23. Στην κατηγορία των μεγάλων ελλείψεων αναφέρεται ότι το 5% των ασθενών με αιμορροφιλία A παρουσιάζει ελλείψεις σε περιοχές που περιλαμβάνουν 100 και πλέον νουκλεοτίδια. Μέχρι στιγμής έχουν καταγραφεί

τουλάχιστον 66 τέτοιες μεγάλες ελλείψεις. Σε 22 από τους ασθενείς αυτούς ή στο 39% αναπτύχθηκαν ανασταλτές του παράγοντα FVIII μετά από τη θεραπεία.

Επίσης, έχουν αναφερθεί και μεγάλες προσθήκες τμημάτων στο γονίδιο του παράγοντα VIII. Έτσι, αναφέρεται προσθήκη τμήματος 3,8 κιλοβάσεων στο εξώνιο 14, όπως και ενός άλλου τμήματος από 2,1 κιλοβάσεις σε άλλο ασθενή και σε άλλο σημείο πάλι του εξωνίου 14. Μια άλλη διαταραχή στην ίδια κατηγορία βλάβης είναι ο αναδιπλασιασμός που έχει περιγραφεί σε δυο τουλάχιστον ασθενείς. Από αυτούς ο ένας παρουσίασε ένα αναδιπλασιασμό από 23 κιλοβάσεις, ο οποίος προστέθηκε στο εξώνιο 23 και 25, ενώ ο δεύτερος παρατηρήθηκε στο εξώνιο 13. Τέλος, παρατηρήθηκε μια χρωμοσωμική μετάθεση σε γυναίκα που παρουσίασε βαριά αιμορροφιλία A. Πρόκειται για πλήρη de novo μετάθεση του χρωμοσώματος X στο χρωμόσωμα 17 [46,X,t(X,17)]. Το ένα χρωμόσωμα X παράγει φυσιολογικές ποσότητες του παράγοντα VIII, ενώ το άλλο που έχει ενσωματωθεί στο χρωμόσωμα 17 παρουσιάζει ελλείψεις των εξωνίων 1-15. Τα εξώνια 16-26 έχουν ενσωματωθεί σε άλλο σωματικό χρωμόσωμα.

Και τέλος η σημαντικότερη μετάλλαξη που έχει παρατηρηθεί στο 40-50% των περιπτώσεων βαριάς αιμορροφιλίας, είναι η αναστροφή (inversion) που συμβαίνει στο intron 22 την οποία θα αναλύσουμε στο πειραματικό μέρος της εργασίας.

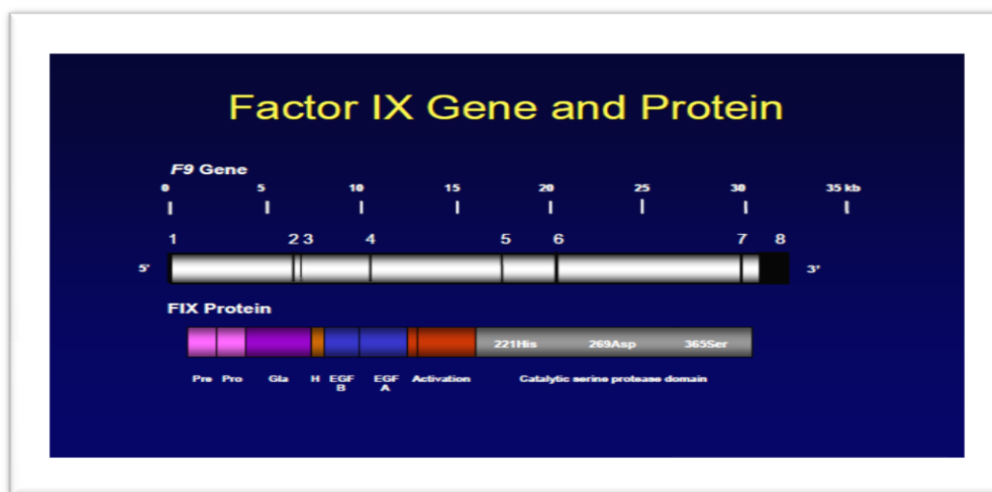
1.2. Αιμορροφιλία B

Ο παράγοντας πήξης IX

Ο παράγοντας IX αποτελείται από μια απλή γλυκοπρωτεϊνική πολυπεπτιδική αλυσίδα 415 αμινοξέων, μοριακού βάρους 56000, ενώ η διάρκεια ημιζωής του είναι 20-24 ώρες.

Παράγεται στο ήπαρ και το γονίδιό του εδράζεται επίσης στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος X σε διαφορετικό αλληλόμορφο από τον παράγοντα VIII και συνεπώς οι δυο αυτές γενετικές βλάβες, δεν μπορούν να κληρονομηθούν μαζί. Το γονίδιο του παράγοντα IX είναι πολύ μικρότερο από αυτό του παράγοντα VIII, καλύπτοντας μόνο 35kb γονιδιωματικού DNA. Έχει 8 εξώνια τα οποία κωδικοποιούν ένα ένζυμο που είναι πρωτεάση της σερίνης

υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του παράγοντα X, μέσω της ενδογενούς οδού της πήξης από τον παράγοντα XI, ή απευθείας από την εξωγενή οδό μέσω συμπλέγματος ιστικού παράγοντα και ενεργοποιημένου FVII.



Το γονίδιο και η πρωτεΐνη του παράγοντα IX

Ο παράγοντας IX, είναι μια πρωτεΐνη εξαρτώμενη από τη βιταμίνη K και παίρνει μέρος στην ενδογενή οδό της πήξης. Οι ενεργοποιημένοι παράγοντες VIIa και XIa προκαλούν την ενεργοποίηση του παράγοντα IX σε IXa. Ο ενεργοποιημένος παράγοντας IX (IXa) δρα ως ένζυμο παρουσία του συμπαράγοντα VIIIa και προκαλεί την ενεργοποίηση του παράγοντα X σε Xa. Η απουσία ή η έλλειψη δραστηριότητας του παράγοντα IX οδηγεί σε αιμορροφιλία B, που χαρακτηρίζεται από παρατεταμένο χρόνο μερικής θρομβοπλαστίνης (APTT) σε συνδυασμό με φυσιολογικό χρόνο προθρομβίνης (PT) και φυσιολογικό χρόνο ροής (bleeding time).

Έχουν αναγνωρισθεί πάνω από 900 μεταλλάξεις στο γονίδιο του FIX, οι πιο κοινές των οποίων σχετίζονται με αλλαγές στη δομή των βάσεων.

Αρκετές μεταλλάξεις κοντά στην αρχή της αλληλουχίας του γονιδίου FIX, προκαλούν μια ασυνήθιστη μορφή της αιμορροφιλίας γνωστή ως αιμορροφιλία B-Leyden. Τα άτομα με αυτές τις μεταλλάξεις έχουν γεννηθεί με πολύ χαμηλά επίπεδα λειτουργικού παράγοντα πήξης IX, αλλά οι ορμονικές αλλαγές προκαλούν τα επίπεδα αυτής της πρωτεΐνης, για να αυξηθεί σταδιακά κατά την εφηβεία.

Ως αποτέλεσμα, ενήλικες με έλλειψη του παράγοντα Leyden σπάνια αιμορραγούν χωρίς κάποιο ιδιαίτερο ερέθισμα.

Άλλες διαταραχές που προκαλούνται από μεταλλάξεις στο γονίδιο του παράγοντα IX, είναι η λεγόμενη υπερευαισθησία στη βαρφαρίνη. Η βαρφαρίνη, είναι ένα αντιπηκτικό, το οποίο χρησιμοποιείται για να εμποδίσει το σχηματισμό ή την ανάπτυξη των θρόμβων αίματος. Δρα μειώνοντας την ποσότητα του δραστικού παράγοντα IX και τρεις άλλες πρωτεΐνες πήξεως.

Οι μεταλλάξεις που είναι υπεύθυνες για την υπερευαισθησία στη βαρφαρίνη αφορούν αλλαγή ενός μόνο ζεύγος βάσεων στο γονίδιο FIX. Αυτές οι μεταλλάξεις δεν προκαλούν αιμορροφιλία Β, και οι άνθρωποι με αυτές τις γενετικές αλλαγές έχουν μόνο προβλήματα αιμορραγίας εάν έχουν υποστεί φαρμακευτική αγωγή με βαρφαρίνη, διότι μειώνει πολύ τα επίπεδα δραστηριότητας του παράγοντα IX.

2. Ο ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΗΝ ΑΙΜΟΡΡΟΦΙΛΙΑ

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, ο προγεννητικός έλεγχος μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για την υγεία τόσο του εμβρύου, όσο και της μητέρας καλύπτοντας ένα μεγάλο φάσμα νοσημάτων. Η Αιμορροφιλία βρίσκεται σε αυτά τα νοσήματα και με την εφαρμογή των τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας, μπορούμε να μειώσουμε σημαντικά τον κίνδυνο για τη γέννηση αιμορροφιλικών κυρίως αγοριών σε περίπτωση οικογενειακού ιστορικού αιμορροφιλίας από τη μεριά της μητέρας.

Κριτήρια για διερεύνηση φορείας για αιμορροφιλία Α ή Β της μέλλουσας μητέρας, αποτελούν το οικογενειακό ιστορικό, αν δηλαδή υπάρχει έστω και ένα άτομο στον οικογενειακό κύκλο που να πάσχει από αιμορροφιλία ή να φέρει το παθολόγο γονίδιο ή αν οι αρχικές αιματολογικές εξετάσεις δείχνουν κάτι από τα εργαστηριακά ευρήματα που αφορούν την αιμορροφιλία, (π.χ. παράταση APTT).

Περίπου οι μισές γυναίκες φορείς έχουν επίπεδα παράγοντα VIII <50 u/dl. Αν μια γυναίκα έχει σχέση VIII C : VIII RAg <0.5 μπορεί να είναι φορέας.

Οι πολυμορφισμοί αποτελούν μια έμμεση μέθοδο προσδιορισμού γυναικών-φορέων της νόσου. Όμως, ενδεχομένως η γυναίκα να μην είναι "πληροφοριακή"

(informative), δηλαδή, η μελέτη της μητέρας με τεχνικές DNA δεν δίνει τις πληροφορίες που χρειάζονται για τον προγεννητικό έλεγχο του εμβρύου. Επιπλέον, επί σποραδικών περιπτώσεων ή όταν λείπουν άτομα κλειδιά από το οικογενειακό δένδρο, δεν είναι δυνατός ο χαρακτηρισμός φορέων. Η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων (sequencing) αποτελεί άμεση μέθοδο προσδιορισμού φορέων, ωστόσο είναι τεχνική επίπονη και χρονοβόρα, διότι το γονίδιο του παράγοντα VIII είναι μεγάλο, παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια και απαιτεί ειδικό εξοπλισμό και εξειδικευμένο προσωπικό για την ανίχνευση της μετάλλαξης. Η πιο συχνή γονιδιακή μετάλλαξη είναι το inversion 22, που συμβαίνει σε 40-50% των παιδιών με βαριά αιμορροφιλία.

Η προγεννητική διάγνωση της αιμορροφιλίας ακολούθησε τις εξελίξεις της γενετικής. Αρχικά, η αμνιοκέντηση γινόταν τη 16η εβδομάδα κύησης και σε δείγμα αμνιακού υγρού προσδιοριζόταν το φύλο. Επί άρρενος εμβρύου, ακολουθούσε διακοπή κύησης κι έτσι ενδεχομένως θυσιάζονταν το 50% των μη-αιμορροφιλικών αγοριών.

Αργότερα, ο προγεννητικός έλεγχος επί άρρενος εμβρύου γινόταν την 20η εβδομάδα κύησης σε εμβρυϊκό αίμα που λαμβανόταν από τα μεγάλα αγγεία του πλακούντα ή από τον ομφάλιο λώρο (εμβρυοκέντηση), στο οποίο προσδιοριζόταν οι δραστηριότητες του παράγοντα VIII. Όταν το έμβρυο αποδεικνυόταν αιμορροφιλικό, η μητέρα ήταν προετοιμασμένη να προβεί σε διακοπή κύησης. Από τα μέσα της δεκαετίας του '90, η προγεννητική διάγνωση της αιμορροφιλίας με τεχνικές DNA γίνεται σε δείγμα τροφοβλάστης που λαμβάνεται τη 10η - 12η εβδομάδα κύησης, οπότε η διακοπή κύησης επί αιμορροφιλικού εμβρύου γίνεται νωρίτερα.

Η διερεύνηση για την διάγνωση της αιμορροφιλίας γίνεται με **φαινοτυπική** και **γονοτυπική** εργαστηριακή διάγνωση. Έτσι σε επίπεδο αρχικής αιμόστασης, αν τα ευρήματα είναι φυσιολογικά, αυτό σημαίνει ότι τα αιμοπετάλια είναι φυσιολογικά ως προς τον αριθμό και τη λειτουργικότητά τους, όπως επίσης φυσιολογικός είναι και ο χρόνος ροής (κύρια δοκιμασία ελέγχου της λειτουργικής επάρκειας των αιμοπεταλίων in vivo).

Οι ασθενείς, που πάσχουν από αιμορροφιλία, εμφανίζουν παράταση του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (APTT), παθολογική δοκιμασία καταναλώσεως προθρομβίνης και παράταση του χρόνου πήξεως ολικού αίματος.

Η οριστική, όμως, διάγνωση της νόσου στηρίζεται σε ειδικές δοκιμασίες ελέγχου του FVIII, που βασίζονται στην μελέτη τόσο της δραστικότητας, όσο και της αντιγονικότητάς του. Η δραστικότητα του FVIII είναι η ικανότητά του να συμβάλλει στην πήξη του πλάσματος, βρίσκεται δε ελαττωμένη στην Αιμορροφιλία Α σε βαθμό ανάλογο προς την βαρύτητα της νόσου. Το αντιγόνο του FVIII ελέγχεται με ανοσολογικές μεθόδους, συνηθέστερη των οποίων είναι η ανοσοηλεκτροφόρηση. Στην κλασική Αιμορροφιλία Α ο λόγος FVIII : Ag είναι φυσιολογικός.

Σε ότι αφορά την αναλυτική μεθοδολογία, ένας σημαντικός αριθμός μεθόδων χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των παραγόντων της πήξης. Έτσι εφαρμόζονται μέθοδοι αμιγώς πηξιολογικές, χρωμογονικές (με τη χρήση χρωμογόνου υποστρώματος) και ανοσολογικές. Με τους προσδιορισμούς αυτούς λαμβάνονται πληροφορίες για τις ποιοτικές και ποσοτικές ελλείψεις των παραγόντων. Η ποσοτική ελάττωση του πηκτικού παράγοντα VIII αποτελεί το καθοριστικό εργαστηριακό εύρημα για τη διάγνωση της νόσου, ενώ ο αντιγονικός παράγοντας Willebrand όπως και ο λειτουργικός παράγοντας Willebrand είναι φυσιολογικοί (vWFAg =100%, vWF =100%). Είναι χαρακτηριστικό, ότι όλες οι παθολογικές δοκιμασίες και οι ποσοτικοί προσδιορισμοί διορθώνονται, όταν αναμειχθούν με φυσιολογικό πλάσμα. Στις δοκιμασίες αυτές στηρίζεται και η αποτελεσματικότητα της θεραπείας υποκατάστασης. Σημειώνεται επίσης ότι το πλάσμα του αιμορροφιλικού αρρώστου διορθώνει τις παθολογικές δοκιμασίες της νόσου Willebrand και ανάλογα της αιμορροφιλίας Β. Φαινοτυπικά καθορίζεται και η προγενετική διάγνωση της αιμορροφιλίας με μετρήσεις των συγκεκριμένων παραγόντων στο εμβρυικό αίμα που λαμβάνεται από τον ομφάλιο λώρο με εμβρυοσκόπηση ή με υπερηχογραφική καθοδήγηση.

2.1. Γονοτυπική Διάγνωση

Η διάγνωση αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση των φορέων και στην προγενετική διάγνωση της αιμορροφιλίας. Η πρόοδος στην τεχνολογική εξέλιξη της μοριακής βιολογίας συντόμευσε σημαντικά τη χρονική δυνατότητα της προγενετικής διάγνωσης (κατά 8-10 εβδομάδες, γεγονός που ελαχιστοποίησε τις επιπλοκές από την παρέμβαση στη διάρκεια προχωρημένης κύησης). Έτσι την 8-10 εβδομάδα της κύησης λαμβάνεται τμήμα τροφοβλάστης από τη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη (chorionic villus sample, CVS). Η διάγνωση στηρίζεται

στην ανάλυση του DNA του παράγοντα VIII:C και πραγματοποιείται με δυο τρόπους:

- 1) με απομόνωση του γονιδίου, χρησιμοποιώντας ενδογονιδιακό ή εξωγονιδιακό πολυμορφισμό του DNA, (γενικά αναφέρεται ως RFLP) και
- 2) με ανίχνευση της πραγματικής γενετικής βλάβης (της υπεύθυνης για την ασθένεια) στον πάσχοντα, στη συνέχεια στους συγγενείς του, άρα και στις γυναίκες-φορείς, όπως και στα άρρενα έμβρυα.

2.2. Ανάλυση με την τεχνική των "RFLPs":

Η ανάλυση αυτή χρησιμοποιεί με επιτυχία πέντε ενδογονιδιακά και δυο εξωγονιδιακά τμήματα συνδεδεμένα με το DNA. Αυτά συχνά είναι αλληλόμορφα και παρουσιάζουν ετεροζυγωτική κατανομή. Το 70-75 % των γυναικών είναι ετεροζυγώτες τουλάχιστον σε ένα από αυτά τα κομμάτια που καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Γονίδιο του παράγοντα VIII:C και ανάλυση "RFLPs"

ένζυμα	ανιχνευτές	Κομμάτια	Ετεροζυγώτης
		(k.b.)	(%)
BclI	p114.12	1.1/0.8	42
BglI	c-DNA	20/5	24
XbaI	p486.2	6.2/4.8 (1.4)	49
MspI	p624.3	7.5/4.3	43
HindIII	p114.12	2.7/2.6	42
BglII	DX13(L)	5.8/2.8	50
TaqI	ST14(L)	Various	70

Πολυμορφισμός CA στο intron 13 του γονιδίου του παράγοντα VIII (CA13). Πρόκειται για μικρο-δορυφορικό πολυμορφισμό του δι-νουκλεοτιδίου CA από 16-24 φορές (58 αλληλόμορφα CA) και γι' αυτό είναι γνωστός ως πολυμορφισμός (CA)_n.

CA επανάληψη	Ποσοστό εμφάνισης
(CA) ₂₄	
(CA) ₂₃	5%
(CA) ₂₂	11%
(CA) ₂₁	29%
(CA)₂₀	45%
(CA) ₁₉	7%

Αυτός ο πολυμορφισμός έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του μήκους του intron 13 και συνεπώς του γονιδίου του παράοντα VIII κατά 2 ή περισσότερα νουκλεοτίδια (n).

Οι 20 επαναλήψεις του CA είναι η πιο συχνή των περιπτώσεων επιμήκυνσης του intron 13.

Στα αρσενικά, στο ηλεκτροφόρημα των προϊόντων της PCR, παρουσιάζεται μια μόνο ζώνη (1 X χρωμόσωμα), ενώ στα θηλυκά, 2 ζώνες - συνήθως ετεροζυγώτες για CA.

Η αναμενόμενη συχνότητα ετεροζυγωτίας για την επανάληψη CA του intron 13 είναι 71% (με βάση τη συχνότητα των αλληλόμορφων στα θηλυκά της οικογένειας).

Στο πειραματικό μέρος, θα αναλύσουμε τις 2 από τις 3 οικογένειες που μελετήσαμε με ιστορικό Αιμορροφιλίας Α στην πρώτη περίπτωση και έλεγχο φορείας στη μητέρα, καθώς και για τον προγεννητικό έλεγχο του κυήματος, ενώ στη δεύτερη περίπτωση έχουμε τον έλεγχο των μελών οικογένειας, όπου ο θείος πάσχει από Αιμορροφιλία Β.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν

- Υδατόλουτρο
- Falcons
- Ολικό αίμα των εξεταζόμενων ατόμων σε EDTA
- Agarose
- Buffer AW1,
- Buffer AW2
- Protease
- Proteinase K
- PCR Buffer 10x NS4
- PCR Buffer 10x NS3,
- Taq polymerase (
- Optimase Taq polymerase (,
- Expand Long (Roche) polymerase
- 50mM MgCl₂
- MgSO₄
- 10 mM dNTPs
- 5 mM dNTPs
- DMSO
- 1X TAE

Ζεύγη Εκκινητών (Primers)

- **CA13 - Primers**

Forward : 5' - CGA TTC AAC TGT ACA TAA TGT ATC TTT – 3'

Reverse: 5' - CCA AAT TTA CAG ATT GAA TAA GCC TAG – 3'

- **ST14 - Primers**

Forward: 5' - CAC CAC TGC CCT CAC GTC CAC TT – 3'

Reverse: 5' – GGC ATC TCA TCA CCT CTC TCA TGT – 3'

- **BclI - Primers**

Forward: 5' – GGC ACT GTA CAA TCT CTA TCC – 3'

Reverse: 5' – ATT ATC CAT TTA TTC TGT TCT ATT – 3'

- **Dde- Primers**

Forward: 5'- AAC CTT ATG CGA CCA CTG TC - 3'

Reverse: 5'- AGT CTG AAG AGA CAC TCC TG - 3'

- **XmnI Primers**

Forward: 5' - AGT AAA ATC AGA GAC TGC TG - 3'

Reverse: 5' - CAG TGT GCG AGG AGA GAA GT - 3'

- **Primers HhaI**

Forward: 5' - ACA GGC ACC TGC CAT CAC CTT - 3'

Reverse: 5' - AGA TTT CAA GCT ACC AAC AT - 3'

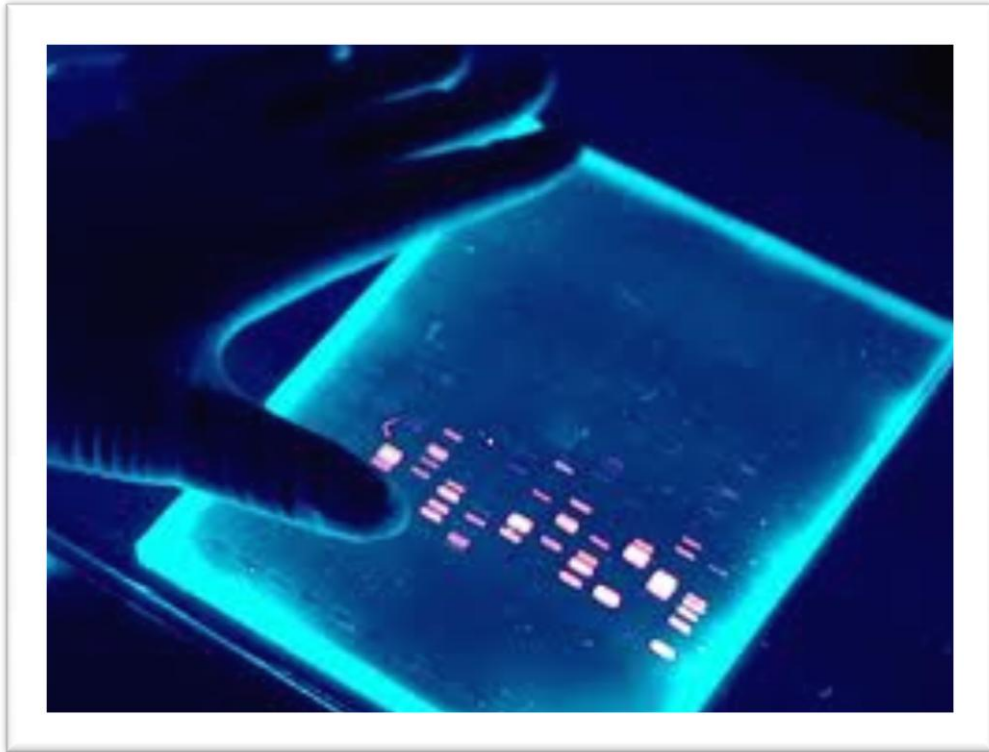
- **TaqI Primers**

- Forward: 5' - ACC ACT TCA TAT GCT AAA CT - 3'

- Reverse: 5' - GGA AAA AGA AAT AAT CTA GG - 3'

- **inversion 22**

- **Markers:** FX174 Hae, 1kb plus



ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (QIAGEN: QIAamp DNA Blood Midi Kit)

Αντιδραστήρια

1. Protease Stock διάλυμα (αποθήκευση στους 2-8°C ή στους -20°C)

2. Διάλυμα AL (Διατήρηση σε R.T., 15 – 25°C)

Καλή ανάμιξη με ανάδευση, πρίν τη χρήση. Το διάλυμα είναι σταθερό για τουλάχιστον έναν χρόνο, αν διατηρείται σε R.T.

3. Διάλυμα AW1 (Διατήρηση σε R.T., 15 – 25°C)

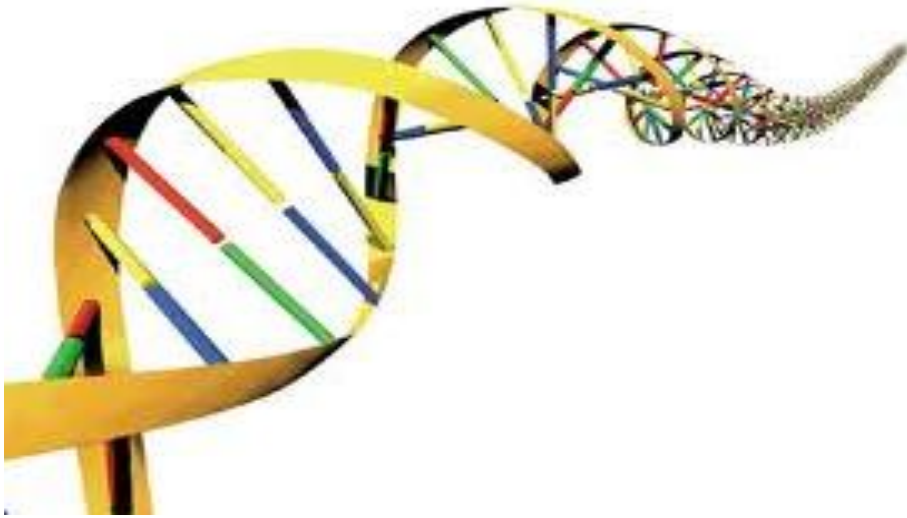
Προσθήκη του κατάλληλου όγκου EtOH (96-100%), στο πυκνό διάλυμα AW1, πριν την πρώτη χρήση

Το διάλυμα διατηρείται σταθερό για τουλάχιστον έναν χρόνο, αν αποθηκεύεται σε R.T.

4. Διάλυμα AW2 (Διατήρηση σε R.T., 15 – 25°C)

Προσθήκη του κατάλληλου όγκου EtOH (96-100%), στο πυκνό διάλυμα AW1, πριν την πρώτη χρήση

Το διάλυμα διατηρείται σταθερό για τουλάχιστον έναν χρόνο, αν αποθηκεύεται σε R.T.



Πρωτόκολλο Απομόνωσης

Πορεία

1. Προσθήκη ▲ 100 µl ή ● 200 µl **Protease**_{QIAGEN} σε falcon των 15 ml.
 2. Προσθήκη ▲ 0.3 – 1 ml ή ● 1 - 2 ml **αίματος** – σύντομη ανάμιξη.
Αν ο όγκος του αίματος που προστίθεται **δεν είναι** ▲ 1 ml ή ● 2 ml, συμπληρώνουμε μέχρι τους όγκους αυτούς με PBS, **πριν** την προσθήκη του αίματος στο falcon των 15 ml που περιέχει την πρωτεάση.
Σημείωση: **Protease**_{QIAGEN} (ή η Proteinase K), μπορεί να προστεθεί σε δείγματα που έχουν ήδη διαμοιραστεί σε σωληνάκια φυγοκέντρησης. Στην περίπτωση αυτή όμως, είναι σημαντικό να ακολουθήσει πολύ καλή ανάδευση μετά την προσθήκη του ενζύμου.
 3. Προσθήκη ▲ 1.2 ml ή ● 2.4 ml **AL Buffer** - πολύ καλή ανάδευση, με **αναστροφή** του σωληναρίου **15 X – vortex** (έντονο κούνημα) για **τουλάχιστον 1 min**.
Για να εξασφαλιστεί ικανή λύση των κυττάρων, το δείγμα θα πρέπει να αναμιχθεί πλήρως με το **AL Buffer**, και να προκύψει ένα ομοιογενές διάλυμα.
Σημείωση: Η **Protease**_{QIAGEN} **δεν** πρέπει να προστίθεται απευθείας στο **AL Buffer**.
 4. Επώαση στους **70⁰C** για **30 min** (για τουλάχιστον 10 min).
Η απόδοση σε DNA γίνεται μέγιστη μετά από λύση στους 70⁰C για 10 min, αλλά εκτεταμένοι χρόνοι επώασης δεν μειώνουν την απόδοση της μεθόδου.
 5. Προσθήκη ▲ 1 ml ή ● 2 ml **EtOH (96-100%)** - πολύ καλή ανάδευση, με **αναστροφή** του σωληναρίου **10 X – vortex**
Για να εξασφαλιστεί αποτελεσματική δέσμευση του DNA στη στήλη, είναι σημαντική η πολύ καλή ανάμιξη του δείγματος μετά την προσθήκη της EtOH, έτσι ώστε να έχουμε ένα ομοιογενές διάλυμα (μίγμα).
Σημείωση: απαιτείται χρήση **μόνο** 96-100% EtOH. Χρήση άλλων αλκοολών μπορεί να επιφέρουν μείωση της απόδοσης και της καθαρότητας. Απαγορεύεται η χρήση denatured EtOH, που περιέχει προσμίξεις μεθανόλης ή μεθυλ-ακετόνης.
- Προσεκτική μεταφορά ▲ **όλου** ή ● **του μισού** ομογενοποιημένου του **βήματος** 5 στη στήλη QIAamp Midi (χωρίς να υγρανθούν τα χείλη αυτής) – φυγοκέντρηση στα 3000 rpm (1850 X g) για 3 min.

6. Απομάκρυνση της στήλης από τον σωλήνα φυγοκέντρου (falcon των 15 ml) - απόρριψη του εκλούσματος – επανατοποθέτηση της στήλης στο **ίδιο** σωληνάριο φυγοκέντρου των 15 ml.
7. Προσθήκη στη στήλη **2 ml AW1 Buffer** – βίδωμα του πώματος – φυγοκέντρηση στα **5000 rpm** (4500 X g) για **1 min**.
Σημείωση: στο βήμα αυτό το έκλουσμα δεν απορρίπτεται (ο όγκος είναι μικρός) και προχωρούμε απευθείας στο Βήμα 10.
8. Προσθήκη στη στήλη **2 ml AW2 Buffer** – βίδωμα του πώματος – φυγοκέντρηση στα **5000 rpm** (4500 X g) για **15 min**.
9. Απόρριψη του εκλούσματος & τοποθέτηση της στήλης σε **καθαρό** falcon των 15 ml (πριν την τοποθέτηση της στήλης στο νέο falcon, το ακροφύσιό της σκουπίζεται στήλης μ' ένα υγρό χαρτί, για την απομάκρυνση κάθε ίχνους υγρού).
10. Προσθήκη **▲ 200 μl** ή **● 300 μl AE Buffer** ή **dH₂O**, εξισορροπημένου σε R.T. (15-25°C), ακριβώς πάνω στη μεμβράνη της στήλης – κλείσιμο του πώματος – Επώαση στους **40°C** (ή σε R.T.) για **5 min** - φυγοκέντρηση στα **5000 rpm** (4500 X g) για **2 min**.
Αν πρόκειται να γίνει μακροχρόνια αποθήκευση του DNA, συνίσταται έκλουσή του σε AE Buffer και διατηρήσή του σε κλάσματα στους -20°C, δεδομένου ότι το DNA υφίσταται όξινη υδρόλυση όταν διαλύεται σε H₂O.

11. Έκλουση DNA μεγάλης συγκέντρωσης: BHMA 11a / Έκλουση μέγιστης απόδοσης σε DNA, BHMA 11b.

Σημείωση: σε εφαρμογές όπως πέψη με περιοριστικές νουκλεάσες και σε μεταφορά κατά Southern (Southern blotting) μπορεί να απαιτείται DNA μεγάλης συγκέντρωσης. Για άλλες εφαρμογές μπορεί να χρειάζεται αύξηση της απόδοσης της μεθόδου σε DNA (βλέπε Πίνακες 2A & 2B).

11a. Έκλουση DNA μεγάλης συγκέντρωσης:

Επαναφόρτωση του εκλούσματος του **βήματος 12** (~**▲ 200 μl** ή **● 300 μl**) πάνω στη μεμβράνη της στήλης QIAamp Midi. Πωματισμός - Επώαση στους σε R.T. για **5 min** - φυγοκέντρηση στα **5000 rpm** (4500 X g) για **2 min**.

Σημείωση: μετά τη φυγοκέντρηση, ο όγκος του DNA που εκλούεται, μπορεί να είναι μικρότερος από τον όγκο του διαλύματος έκλουσης (AE buffer ή dH₂O) που φορτώθηκε στη στήλη (▲ 200 μl ή ● 300 μl). Αυτό δεν έχει κανένα αποτέλεσμα στην απόδοση σε DNA.

11b Έκλουση μέγιστης απόδοσης σε DNA:

Προσθήκη ▲ 200 μl ή ● 300 μl φρέσκου AE Buffer ή dH₂O, εξισορροπημένου σε R.T. (15-25°C), ακριβώς πάνω στη μεμβράνη της στήλης – κλείσιμο του πώματος – Επώαση στους 40°C (ή σε R.T.) για 5 min - φυγοκέντρηση στα 5000 rpm (4500 X g) για 2 min. (ίδια σημείωση με 13a).

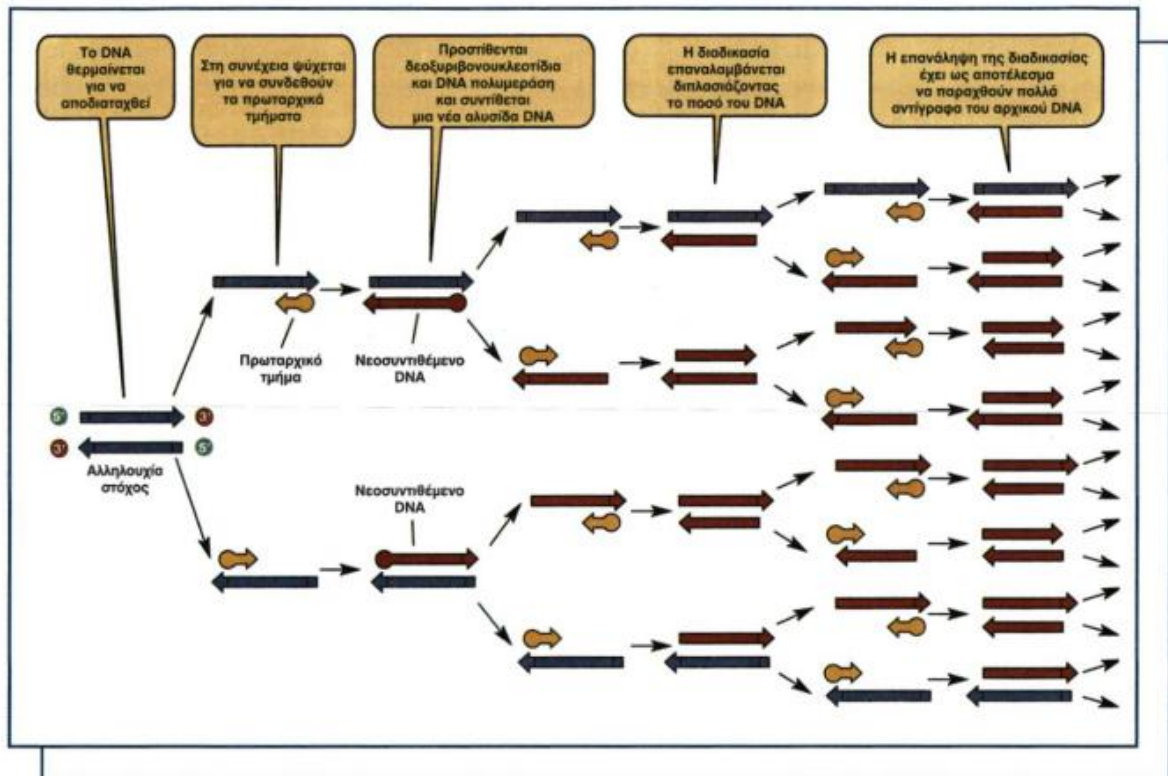
2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - (polymerase chain reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δίνει την δυνατότητα πολλαπλασιασμού και ανίχνευσης απειροελάχιστων τμημάτων DNA στο υπό εξέταση βιολογικό υλικό. Σήμερα χρησιμοποιείται πλέον ευρύτατα στην ανίχνευση ανευπλοειδικών κυήσεων, μεταλλάξεων ή εμβρυοπαθογόνων μικροοργανισμών στο αίμα, το αμνιακό υγρό. Διακρίνεται για την εξαιρετική της ευαισθησία και ολοένα γίνεται απλούστερη στη χρήση καθώς και οικονομικότερη.

Για να εφαρμόσουμε τη μέθοδο PCR πρέπει να γνωρίζουμε τη σειρά των νουκλεοτιδίων που βρίσκονται στα άκρα του τμήματος DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε (ενισχύσουμε). Η γνωστή αλληλουχία χρησιμοποιείται για τη χημική σύνθεση δύο ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές, primers) συμπληρωματικών προς τα άκρα κάθε αλυσίδας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά λειτουργούν ως πρωταρχικά τμήματα για τη σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση καταλύεται από μια ειδική DNA πολυμεράση, όπως η Taq πολυμεράση, η οποία είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες.

Η μέθοδος PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη. Επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση ειδικών περιοχών DNA που βρίσκονται σε απειροελάχιστη ποσότητα.

Η Αρχή μεθόδου της PCR φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



ΣΥΝΟΨΗΚΕΣ PCR

i. PCR για BclI

- | | | |
|-----------------------|---------------|---------------------------|
| 1. Αποδιάταξη: | 95°C → 2 min | } x16 -0.5°C/cycle |
| 2. Αποδιάταξη: | 95°C → 30 sec | |
| 3. Επαναδιάταξη: | 57°C → 30 sec | |
| 4. Επιμήκυνση: | 72°C → 30 sec | |
| 5. Αποδιάταξη: | 95°C → 30 sec | } x19 cycles |
| 6. Επαναδιάταξη: | 50°C → 30 sec | |
| 7. Επιμήκυνση: | 72°C → 30 sec | |
| 8. Τελική Επιμήκυνση: | 72°C → 5 min | |

ii. PCR για ST-14

- | | | |
|------------------|--------------|--------------------|
| 1. Αποδιάταξη: | 94°C → 4 min | } <u>35</u> cycles |
| 2. Αποδιάταξη: | 94°C → 1" | |
| 3. Επαναδιάταξη: | 59°C → 40" | |

4. Επιμήκυνση: $68^{\circ}\text{C} \rightarrow 3.30''$
5. Τελική Επιμήκυνση: $68^{\circ}\text{C} \rightarrow 10 \text{ min}$

iii. PCR για CA-13

- | | | | |
|------------------------------------------------------------|----------------------------------------|---|-----------|
| Αποδιάταξη: | $94^{\circ} \rightarrow 5 \text{ min}$ | } | 35 cycles |
| Αποδιάταξη: | $94^{\circ} \rightarrow 30''$ | | |
| PCR Επαναδιάταξη: | $56^{\circ} \rightarrow 30''$ | | |
| Επιμήκυνση: | $72^{\circ} \rightarrow 45''$ | | |
| Τελική επιμήκυνση: $72^{\circ} \rightarrow 10 \text{ min}$ | | | |

iv. PCR για TaqI, XmnI

- | | | | |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---|------------|
| 1. Αποδιάταξη: | $95^{\circ}\text{C} \rightarrow 5 \text{ min}$ | } | x35 cycles |
| 2. Αποδιάταξη: | $94^{\circ}\text{C} \rightarrow 30 \text{ sec}$ | | |
| 3. Επαναδιάταξη: | $49^{\circ}\text{C} \rightarrow 30 \text{ sec}$ | | |
| 4. Επιμήκυνση: | $72^{\circ}\text{C} \rightarrow 40 \text{ sec}$ | | |
| 5. Τελική Επιμήκυνση: $72^{\circ}\text{C} \rightarrow 7 \text{ min}$ | | | |

v. PCR για XbaI

- | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---|-----|
| 1. Αποδιάταξη: | $95^{\circ}\text{C} \rightarrow 4 \text{ min}$ | } | x3 |
| 2. Αποδιάταξη: | $95^{\circ}\text{C} \rightarrow 30 \text{ sec}$ | | |
| 3. Επαναδιάταξη: | $57^{\circ}\text{C} \rightarrow 30 \text{ sec}$ | | |
| 4. Επιμήκυνση: | $72^{\circ}\text{C} \rightarrow 40 \text{ sec}$ | | |
| 5. Αποδιάταξη: | $95^{\circ}\text{C} \rightarrow 30 \text{ sec}$ | } | x3 |
| 6. Επαναδιάταξη: | $55^{\circ}\text{C} \rightarrow 30 \text{ sec}$ | | |
| 7. Επιμήκυνση: | $72^{\circ}\text{C} \rightarrow 40 \text{ sec}$ | | |
| 8. Αποδιάταξη: | $95^{\circ}\text{C} \rightarrow 30 \text{ sec}$ | } | x35 |
| 9. Επαναδιάταξη: | $55^{\circ}\text{C} \rightarrow 30 \text{ sec}$ | | |
| 10. Επιμήκυνση: | $72^{\circ}\text{C} \rightarrow 40 \text{ sec}$ | | |
| 11. Τελική Επιμήκυνση: $72^{\circ}\text{C} \rightarrow 7 \text{ min}$ | | | |

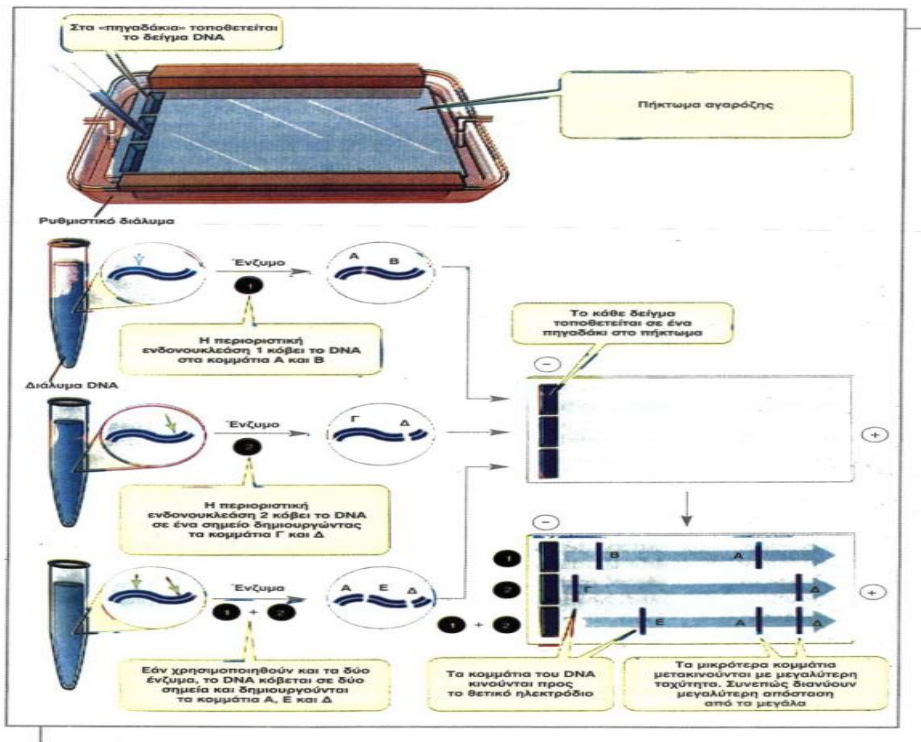
vi. PCR για Dde-I

- | | | | |
|------------------|-------------------------------------------------|---|-----|
| 1. Αποδιάταξη: | $95^{\circ}\text{C} \rightarrow 4 \text{ min}$ | } | x 3 |
| 2. Αποδιάταξη: | $95^{\circ}\text{C} \rightarrow 30 \text{ sec}$ | | |
| 3. Επαναδιάταξη: | $59^{\circ}\text{C} \rightarrow 30 \text{ sec}$ | | |

4. Επιμήκυνση:	72 ⁰ C →40 sec	
5. Αποδιάταξη:	95 ⁰ C →30 sec	} x 3
6. Επαναδιάταξη:	57 ⁰ C →30 sec	
7. Επιμήκυνση:	72 ⁰ C →40 sec	
8. Αποδιάταξη:	95 ⁰ C →30 sec	} x 35
9. Επαναδιάταξη:	55 ⁰ C →30 sec	
10.Επιμήκυνση:	72 ⁰ C →40 sec	
11.Τελική Επιμήκυνση:	72 ⁰ C →7 min	

3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Το DNA είναι ένα μόριο αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό. Αυτό, όπως και οι πρωτεΐνες, όταν βρεθεί μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο κινείται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθος του και το σχήμα του. Η τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάλυση του DNA, είναι η ηλεκτροφόρηση. Στην περίπτωση του DNA χρησιμοποιείται η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.



Σχηματική απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης σε gel αγαρόζης

Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης που, σε κατάλληλες συνθήκες, δημιουργεί ένα πορώδες πήκτωμα. Οι πόροι που δημιουργούνται στα πήκτωμα αγαρόζης είναι πολύ μεγαλύτεροι από εκείνους της πολυακρυλαμίδης, γιατί το DNA είναι πολύ μεγαλύτερο σε μέγεθος από τις πρωτεΐνες. Η συγκέντρωση της αγαρόζης καθορίζει το μέγεθος των πόρων, άρα και το μέγεθος των κομματιών DNA που μπορούν να διαχωριστούν. Το DNA απομονώνεται από έναν οργανισμό ή ιστό, κόβεται σε κομμάτια με μία ή συνδυασμό περισσότερων περιοριστικών ενδονουκλεασών, και το μείγμα των κομματιών αυτών τοποθετείται σε ένα πήκτωμα αγαρόζης, στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο. Το DNA μετακινείται προς την κάθοδο, με τα μικρότερα κομμάτια να κινούνται γρηγορότερα και τα μεγαλύτερα αργότερα. Η χρώση των νουκλεϊκών οξέων γίνεται με Βρωμιούχο Αιθίδιο (EtBr) το οποίο προστίθεται κατά τον πολυμερισμό της.

3. ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΗ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

(DHPLC, Denaturing High Performance Liquid Chromatography)

Η μέθοδος αυτή έχει περιγραφεί σχετικά πρόσφατα για την εξέταση δειγμάτων DNA για μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών και κληρονομούμενων μεταλλάξεων, όπως η αιμορροφιλία. Έχει αναδειχθεί ως η πιο ευαίσθητη μέθοδος στην ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων σε τμήματα DNA μέχρι και 700bp και επίσης παρέχει υψηλό βαθμό αυτοματοποίησης και απόδοσης.

Η DHPLC ανιχνεύει με επιτυχία ενός νουκλεοτιδίου αντικαταστάσεις, διαγραφές, προσθήκες και γενικά μεταλλάξεις. Έχει χαμηλό κόστος συγκριτικά με οποιαδήποτε άλλη μέθοδο screening και η ευρεία εφαρμογή της, την καθιστά κατάλληλη για προ και μετά-γεννητική διάγνωση. Είναι γρήγορη και επιτρέπει την ανάλυση άνω των 200 δειγμάτων ανα ημέρα.

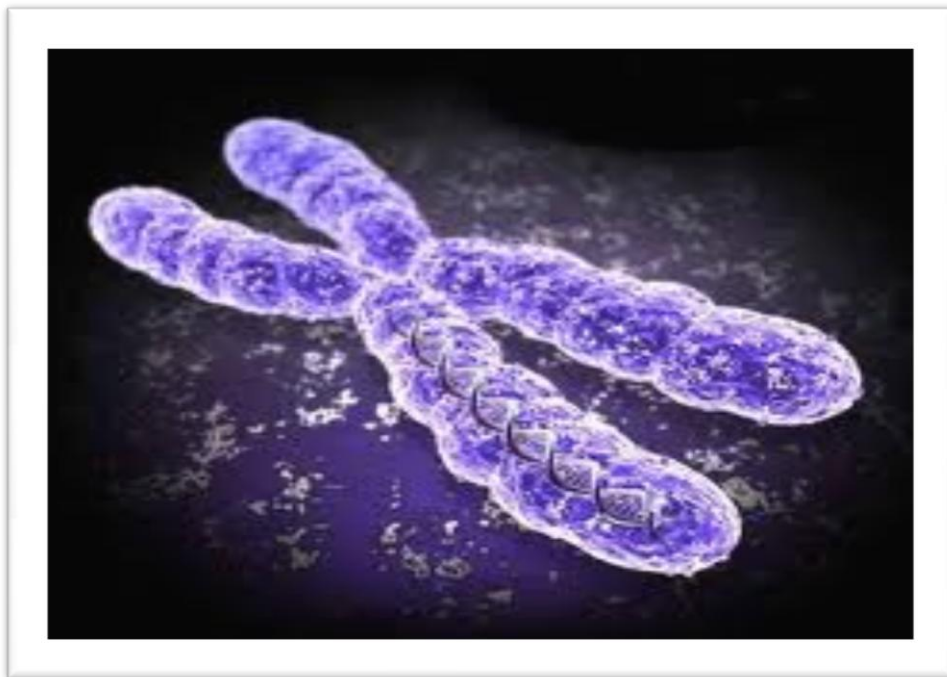
Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων γίνεται μέσω του σχηματισμού ετεροδιμερών (heteroduplexes) DNA, τα οποία σχηματίζονται μεταξύ του κανονικού κλώνου DNA (wild – type) και ενός μεταλλαγμένου κλώνου με μερική θερμική αποδιάταξη των κλώνων του DNA (O'Donovan et al, 1998; Oefner et al, 1998).

Τα ετεροδιμερή διαχωρίζονται από τα ομοδιμερή μόρια μέσω ιοντο-συζευγμένης (ion-pair) υγρής χρωματογραφίας ανεστραμμένης φάσης, σε μια στήλη που περιέχει μια στατική μη πορώδη αλκυλιωμένη φάση. Κάτω από συνθήκες μερικής θερμικής αποδιάταξης (50 - 70°C) και με μια γραμμική διαβάθμιση ακετονιτριλίου (υγρή φάση), τα ετεροδιμερή που σχηματίζονται στα δείγματα της PCR, και που έχουν διαφορετικές αλληλουχίες και παρουσιάζουν διαφορετικό περιεχόμενο σε GC, παρουσιάζουν μικρότερο χρόνο υστέρησης σε σχέση με τα ομοδιμερή.

Κλειδί για την σταθερή απόδοση είναι μια στατική φάση που αποτελείται από μη πορώδη αλκυλιωμένα σωματίδια, ηλεκτρικά ουδέτερα και υδρόφοβα.

Η θερμοκρασία είναι η σημαντικότερη παράμετρος που επηρεάζει την ευαισθησία της μεθόδου στην ανίχνευση των μεταλλάξεων. Σε θερμοκρασίες < 50°C η έκλυση γίνεται με βάση το **μήκος** του δίκλωνου μορίου DNA. Σε

θερμοκρασίες $> 50^{\circ}\text{C}$ όμως, τα δίκλινα μόρια αρχίζουν να αποδιατάσσονται και να διασπώνται στις συμπληρωματικές μονόκλωνες αλυσίδες τους. Η διαδικασία αυτή διευκολύνεται από την παρουσία ακετονιτριλίου στην κινητή φάση.

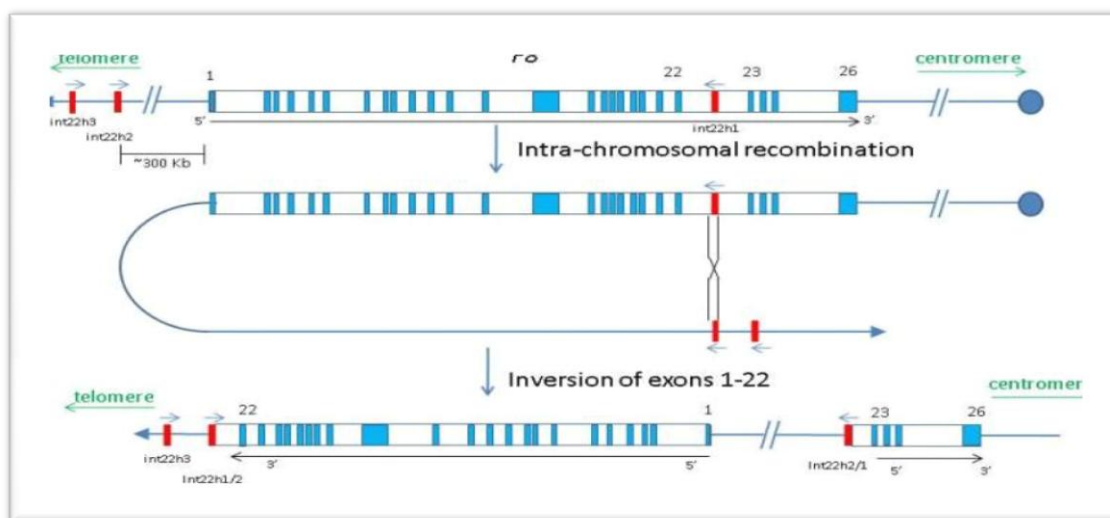


4. Διερεύνηση του Intron 22

Η διερεύνηση στο εσώνιο 22 καθίσταται απαραίτητη στις περιπτώσεις βαριών αιμορροφιλιών και στην περίπτωση που οι προαναφερθείσες μέθοδοι δεν δίνουν κάποιο βέβαιο αποτέλεσμα προς διάγνωση.

Στο χρωμόσωμα X, εντός του γονιδίου του παράγοντα VIII, υπάρχει μια περιοχή (intron 22h1) η οποία επαναλαμβάνεται εις διπλούν και έξω από το γονίδιο. Οι εξωγονιδιακές αυτές ομόλογες περιοχές, έχουν ονομαστεί (intron 22h2) και (intron 22h3) αντίστοιχα. Εάν κατά τη μείωση συμβεί αναδίπλωση στο X χρωμόσωμα, η περιοχή του intron 22h1 μπορεί να ανασυνδυαστεί με μια από τις εξωγονιδιακές ομόλογές της (την περιοχή 2 ή 3), με αποτέλεσμα την ανταλλαγή γενετικού υλικού και τη δημιουργία νέων χρωμοσωματικών προϊόντων ανασυνδυασμού τα οποία και έχουν διαφορετικό μέγεθος από τα κανονικά.

Ένα 10% των θηλυκών ετεροζυγωτών, εκτός από την ήδη υπάρχουσα μετάλλαξη για τη μειωμένη ή καθόλου παραγωγή του παράγοντα VIII, φέρουν και τη μετάλλαξη αυτή στο ιντρόνιο 22 του γονιδίου F8.



Σχηματική απεικόνιση του inversion 22

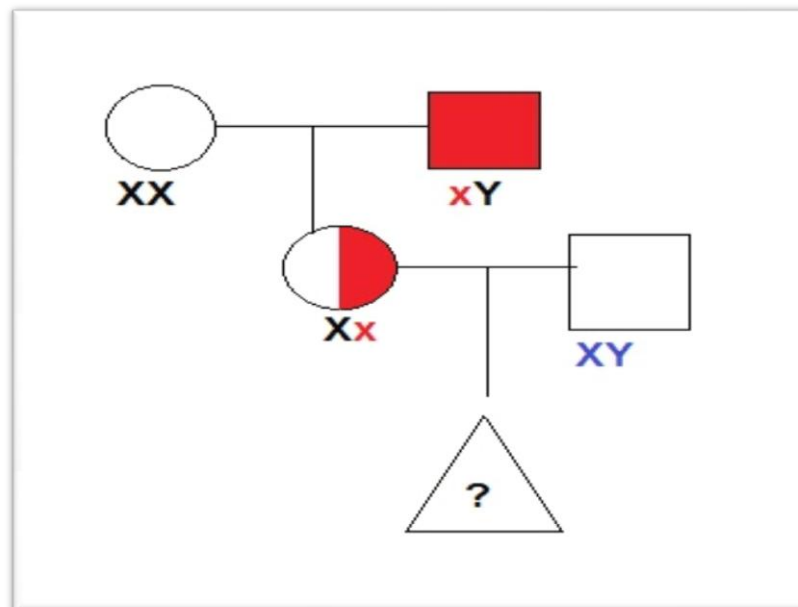
Έτσι, κατά την ανάλυση σε ένα φυσιολογικό αρσενικό άτομο περιμένουμε την εμφάνιση δυο ζωνών μεγέθους 10kb και 12kb, ενώ στο θηλυκό ετεροζυγώτη θα πρέπει να έχουμε τρεις ζώνες μεγέθους 10kb, 11kb και 12kb. Σε περίπτωση που η ανάλυση αρσενικού ατόμου δώσει ζώνες μεγέθους 10kb και 11kb θα χαρακτηριστεί ως παθολογικό.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΙΜΟΡΡΟΦΟΦΙΛΙΑΣ Α ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΦΟΡΕΙΑΣ

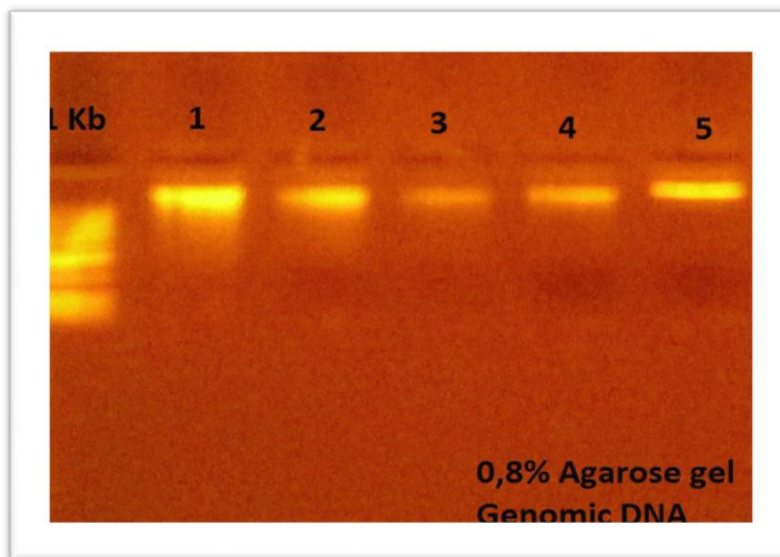
Στο intron 18 ελέγχεται το Bcl -I, στο intron 13 ελέγχεται ο πολυμορφισμός CA-13 και ακολουθεί και έλεγχος του εξωγονιδιακού τόπου ST-14. Στην περίπτωση που κανένα απο τα παραπάνω δεν μας δώσει κάποια πληροφορία, μόνο τότε προχωράμε σε διερεύνηση του Inversion 22 εκτός και αν γνωρίζουμε εξ' αρχής ότι υπάρχει βαριά αιμορροφιλία στην οικογένεια, οπότε προχωράμε σίγουρα στη διερεύνηση του Inversion 22.

Παραθέτουμε το παράδειγμα της μιας εκ των δύο οικογενειών που μελετήθηκαν με ιστορικό μέτριας αιμορροφιλίας A από τον πατέρα και εξετάσαμε την κόρη του η οποία βρισκόταν σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Αφού ελέγξαμε αν η κόρη είναι φορέας, προχωρήσαμε έπειτα στον προγεννητικό έλεγχο του εμβρύου. Το γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας A, φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Σχηματική απεικόνιση του γενεαλογικού δέντρου της οικογένειας που μελετήσαμε. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται ο αιμορροφιλικός πατέρας της εξεταζόμενης.

Αφού απομονωθεί το γονιδιωματικό DNA, ακολουθεί ανάλυσή του σε 0,7% πήκτωμα αγαρόζης για την επιβεβαίωση ύπαρξης γονιδιωματικού DNA



Εικόνα 1. Marker 1kb, Δείγματα 1: DNA Παππού αιμορροφιλικού 2: DNA Γιαγιά 3. DNA Μητέρας κυοφορούσας, κόρης του αιμορροφιλικού παππού κύημα 3: DNA κήματος (QIAGEN-mini) 4. DNA κήματος (ROCHE).

Προετοιμασία δειγμάτων για PCR

Για τον έλεγχο ύπαρξης επιμολύνσεων στις αντιδράσεις PCR, χρησιμοποιούμε πάντα και ένα αρνητικό control, το οποίο περιέχει αντί γενετικού υλικού, απεσταγμένο νερό.

Κατά την ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της PCR καθώς και των προϊόντων πέψης, χρησιμοποιούνται και μάρτυρες μοριακών βαρών (Molecular Weight Markers) που μας βοηθούν να προσδιορίσουμε το μέγεθος των τμημάτων του DNA που έχουν ενισχυθεί.

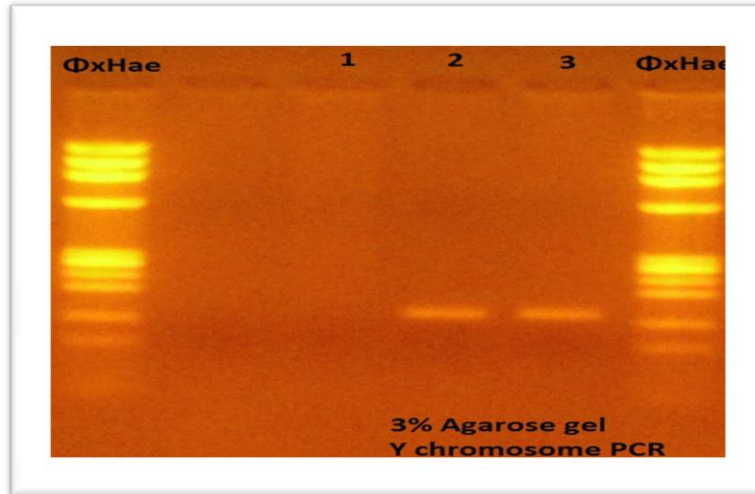
Φορτώνουμε τα δείγματα στα ειδικά πηγαδάκια και ξεκινάμε την ηλεκτροφόρηση.

Αφού επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη γενετικού υλικού, προχωράμε στην ανάλυση του Y χρωμοσώματος ώστε να δούμε το φύλο του εμβρύου, γιατί σύμφωνα με το νόμο του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων, το κύημα θα φέρει ένα χρωμόσωμα από τον πατέρα(υγιής) και ένα από τη μητέρα (φορέας). Άρα σύμφωνα με το νόμο του Mendel, οι πιθανότητα να γεννηθεί παιδί που θα νοσεί είναι 50% σε περίπτωση που θα είναι αγόρι. Εάν το κύημα αποδειχθεί θήλυ, δεν υπάρχει λόγος συνέχισης της διερεύνησης.

Ανάλυση Y χρωμοσώματος σε 3% Agarose gel.

Το αποτέλεσμα θα μας δείξει το φύλο του κηλήματος.

1. Μητέρα
2. Κύημα (QIAGEN)
3. Κύημα (ROCHE)



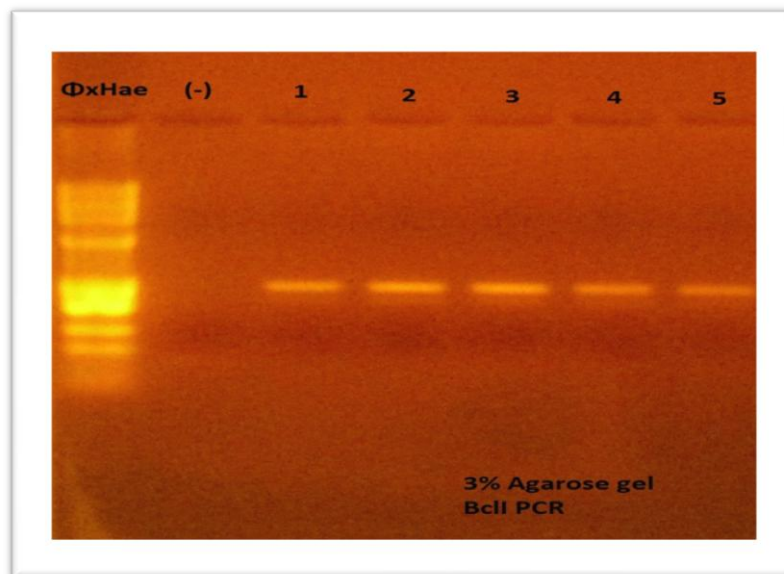
Από την ανάλυση αποδεικνύεται ότι το κύημα είναι άρρεν. Προχωράμε λοιπόν κανονικά στις διαδικασίες προγεννητικού ελέγχου για την Αιμορροφιλία Α.

BCL-I (258bp → 140 +118)
Intron 18 (Ενδογονιδιακό RFLP)

Αντίδραση PCR

DNA (200 ng):	X	μl
10X Buffer Taq:	5	μl
MgCl ₂ (50mM):	1.5	μl
BclI Forward Primer:	1.5	μl
BclI Reverse Primer:	1.5	μl
dNTPs (100 mM):	1	μl
Taq (5 U/μl)(Invitrogen):	1	μl
<u>ddH₂O</u> :	Μέχρι 50 μl	
Total	50	μl

Σε κάθε σωληνάριο προστίθενται 10μl reaction mix. Το αποτέλεσμα που παίρνουμε είναι:



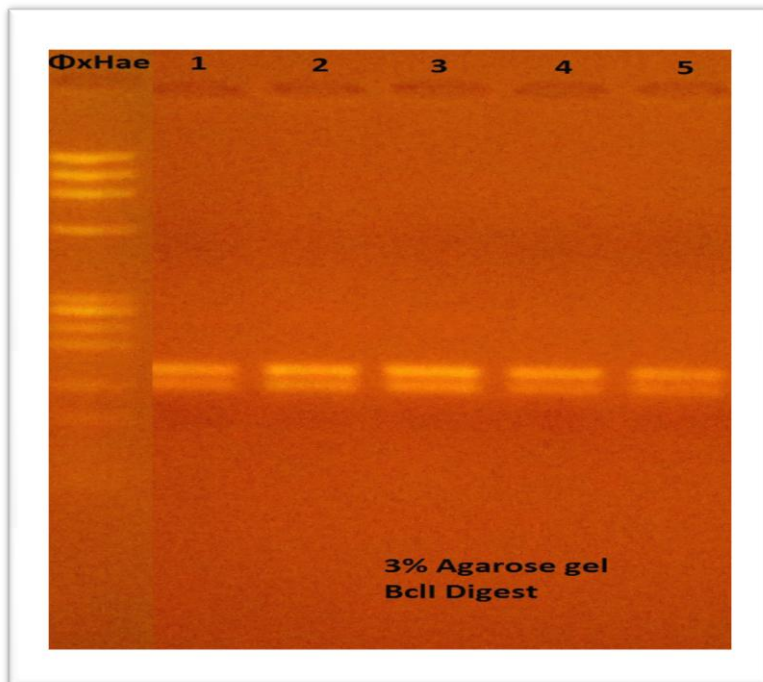
Εικόνα 2. ΦΧΗαε, (-) control, 1. παππούς, 2. Γιαγιά, 3. Μητέρα, 4. Κύημα (qiagen), 5. Κύημα(Roche)

ΠΕΨΗ με BclI (50°C)

Ολικός όγκος ανά αντίδραση: 50 μl	
	1 αντίδραση

BclI PCR Product:	17 μ l
10X BclI Buf:	3 μ l
BclI (5 U/ μ l):	5 μ l
ddH ₂ O:	5 μ l
Total	30 μl
Επώαση στους 50^oC για τουλάχιστον 4 hrs.	

Ανάλυση 15 μ l των BclI Digests σε 3% Agarose gel



Εικόνα 3. ΦX Hae, 1. Παππούς, 2. Γιαγιά, 3. Μητέρα, 4. Κύημα(Qiagen) 5. Κύημα(Roche).

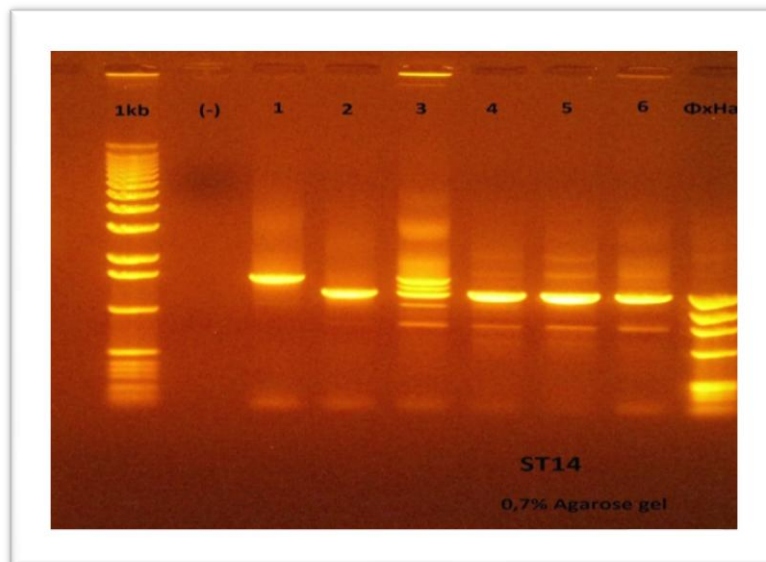
Από την ανάλυση Bcl-I δεν μπορούμε να βγάλουμε κάποιο συμπέρασμα καθώς το αποτέλεσμα είναι ομοιόμορφο. Προχωράμε σε ανάλυση ST-14.

DXS 52 (Εξωγονιδιακό RFLP)
(ST 14) = 60 bps repeat + 650 bps flanking sequence

Ολικός όγκος ανά αντίδραση: 25 μl	
	1 αντίδραση

DNA	7 μ l
Buffer 2 (27,5 mM MgCl ₂)	2,5 μ l
Primer F (10 pmol)	0,5 μ l
Primer B (10 pmol):	0,5 μ l
dNTP's (100 mM)	0,5 μ l
Taq Expand Long (Roche cat1681834) (5 u/ μ l)	0,5 μ l
ddH ₂ O	13,5 μ l
Total	25 μl
Μοιράζω από 18 μl/tube και προσθέτω 7 μl DNA από κάθε δείγμα.	

Ανάλυση 10 μ l ST14 PCR product σε 0.8 % Agarose gel



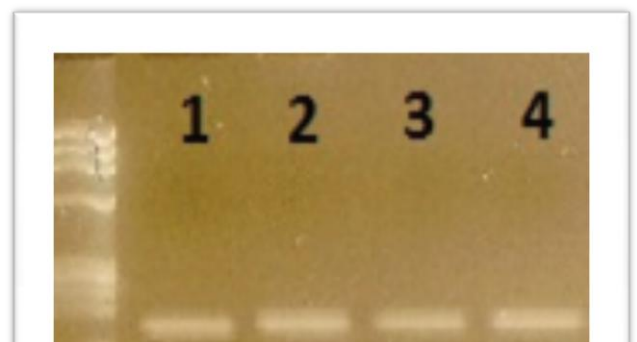
Εικόνα 4: 1kb: marker 1Kb, (-) control, 1. Παππούς(1630 bps) , 2. Γιαγιά(1570 bps), 3. Μητέρα(1630/1570) 4. Κύημα(Qiagen)- 1570 bps, 5. Κύημα(Roche)- 1570 bps 6.Κύημα(Qiagen)- 1570 bps, Φx Hae

ST14 ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΟ!!! Το κύημα φέρει τη ζώνη **1570 bps** της μητέρας του!!

CA 13 (F1R1 153 bps= 141+12) Intron 13 (CA tandem repeat)

PCR CA13

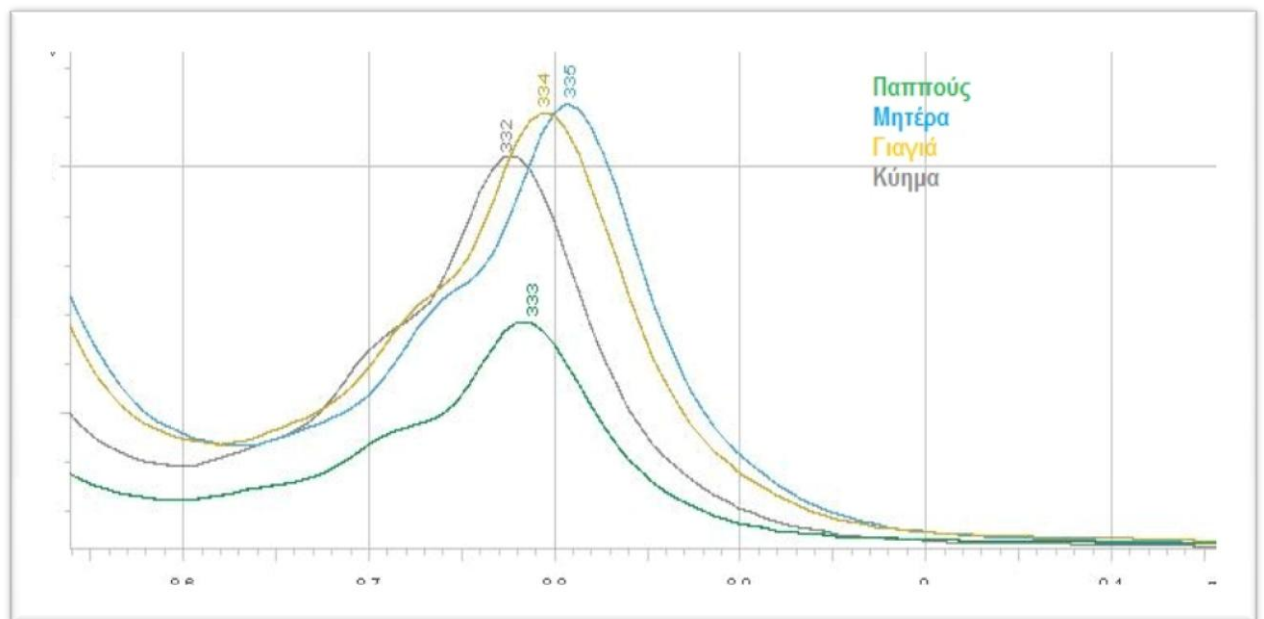
	1 αντίδραση
DNA (male: 100 ng/fem: 150 ng)	

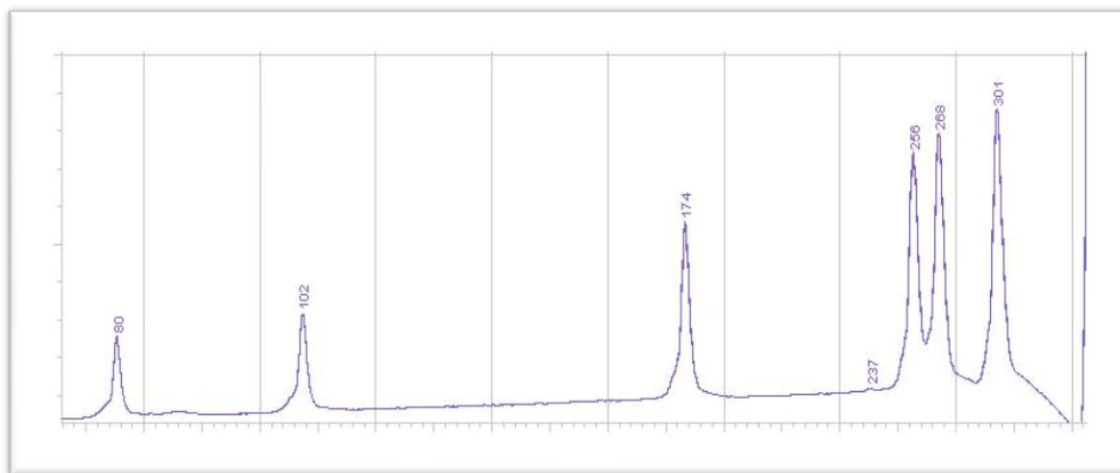


10X Optimase Buffer	5 μ l
MgSO ₄ (15 mM)	4 μ l
CA13 F1 (10 pM)	2 μ l
CA13 R1 (10 pM)	2 μ l
dNTPs (100 mM)	1 μ l
TaqOptimase (2.5 U/ μ l)	1 μ l
ddH ₂ O	μέχρι 50 μ l
Total	50 μl

Ανάλυση των προϊόντων της PCR στο Transgenomic

10 μ l από τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν στον γενετικό αναλυτή Transgenomic





Size Standard

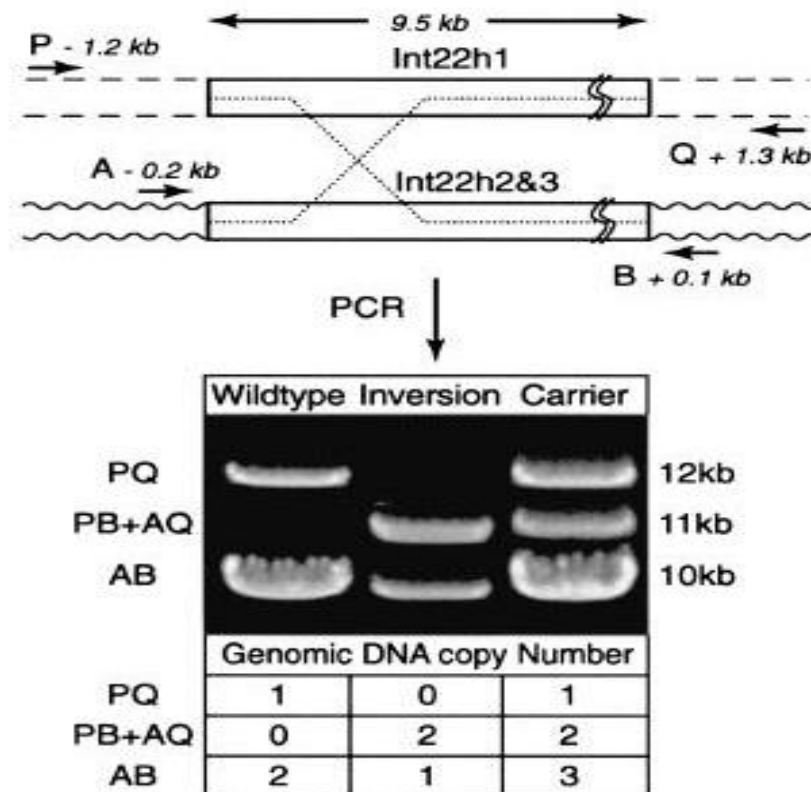
Ο αριθμός των επαναλήψεων του πολυμορφισμού CA-13 που υπάρχουν στο κύημα διαφέρουν από τον αριθμό των επαναλήψεων που φέρει ο ασθενής.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΓΙΑ Inversion 22

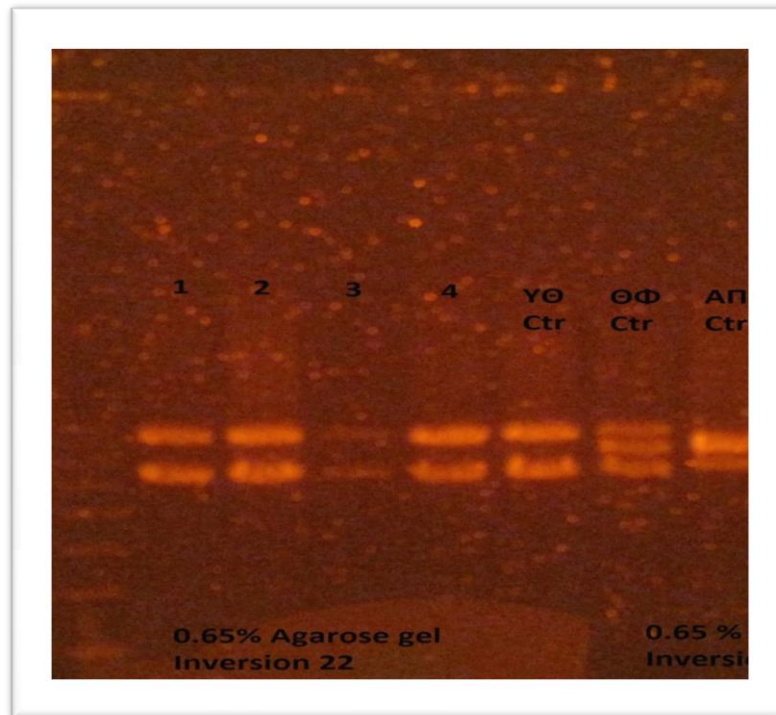
Παρότι ο αλγόριθμος δεν περιλαμβάνει τη διερεύνηση του Inversion 22 σε ήπιας μορφής Αιμορροφιλία, προχωρήσαμε στη διαδικασία καθαρά για διδακτικούς λόγους.

Σε τελικό όγκο 25 μl χρησιμοποιώ reaction mix το οποίο περιλαμβάνει ειδικούς primers P/Q και A/B για τη διεξαγωγή PCR για το Inversion 22. Η διαδικασία της PCR διαρκεί 10 ώρες. Ακολούθως 3μl των προϊόντων της PCR αναλύονται σε 0,65% πήκτωμα αγαρόζης. Σαν marker χρησιμοποιείται ο 1kb.

Στο ακόλουθο σχήμα, φαίνεται η διαδικασία που γίνεται κατά την αναδίπλωση του χρωμοσώματος X στις περιοχές που εκφράζεται ο παράγοντας VIII, καθώς και οι primers A/B και P/Q οι οποίοι στο gel αγαρόζης μας δίνουν και τις αντίστοιχες μπάντες. Στην κορυφή, οι θέσεις των τεσσάρων εκκινητών εκπροσωπούνται με βέλη και οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τις αλληλουχίες των εκκινητών (primers).



Το αποτέλεσμα της PCR για το inversion 22, στα δείγματα της οικογένειας που εξετάσαμε, είναι:



Εικόνα 5: 1: παππούς (9803) 2:μητέρα (9802) 3: Κύημα (QIAGEN) 4:Κύημα (ROCHE) 5: Υγιές Θηλυκό (YΘ Ctr) 6:Θηλυκό άτομο Φορέας (Θ.Φ. Ctr) 7:Άρρεν άτομο που Νοσεί (ΑΠ) .

Επιβεβαιώνουμε λοιπόν το αποτέλεσμα. Παρατηρούμε και εδώ ότι το κύημα είναι άρρεν και **δεν** φέρει την παθολογική ζώνη 11Kb. Συνεπώς είναι υγιές.

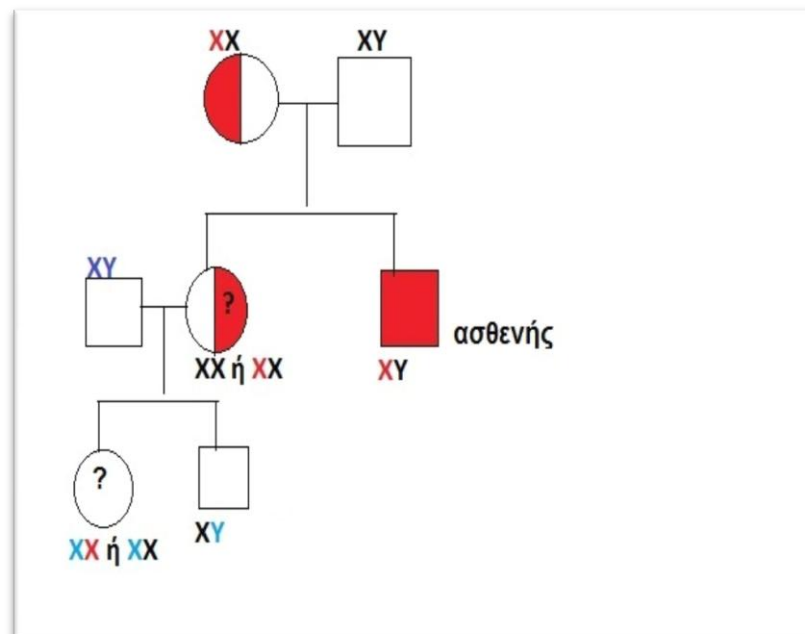
Εδώ ολοκληρώνεται η εργαστηριακή διερεύνηση για την Αιμορροφιλία Α.

2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΙΜΟΡΡΟΦΙΛΙΑΣ Β ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ

ΦΟΡΕΙΑΣ

Ο εργαστηριακός έλεγχος για την αιμορροφιλία Β είναι πιο απλός, καθ'ότι μας δίνεται η δυνατότητα να διερευνήσουμε ταυτόχρονα τέσσερις περιοχές εντός του γονιδίου του παράγοντα ΙΧ, οι οποίες είναι: **TaqI**, **XhaI**, **XmnI** και **Ddel**.

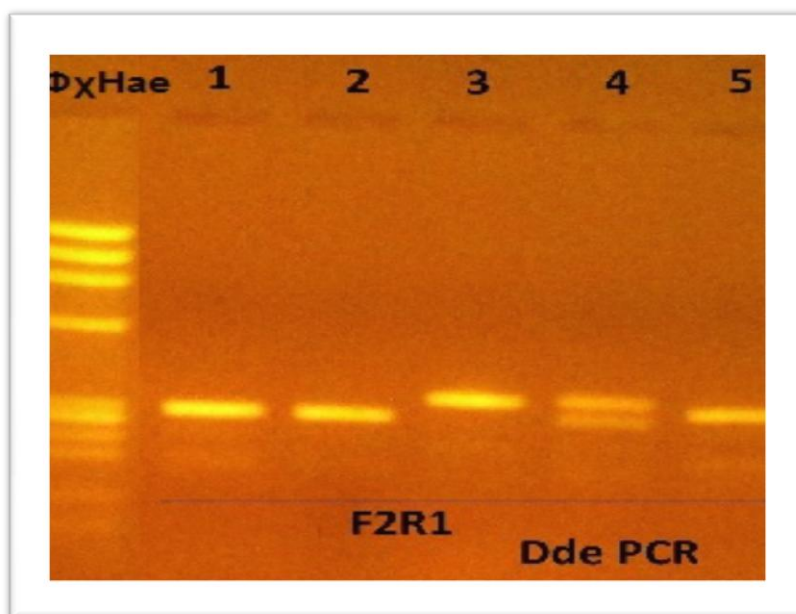
Παραθέτουμε το παράδειγμα της δεύτερης οικογένειας που μελετήσαμε για αιμορροφιλία Β, όπου ασθενής με Αιμορροφιλία Β ήταν ο θείος της οικογένειας. Ελέγξαμε την αδελφή του και τα παιδιά της. Το γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, όπου με κόκκινο χαρακτηρίζουμε τον ασθενή και με **x** το πάσχον γονίδιο το οποίο προφανώς το έχει κληρονομήσει από τη μητέρα του που ήταν φορέας.



Dde-I (330- 380pbs)

PCR Dde-I

Ολικός όγκος ανά αντίδραση: 50 μ l	
DNA (100 ng)	
10X Buffer Taq:	5 μ l
MgCl ₂ (50mM):	1.5 μ l
HhaI Forward Primer:	1 μ l
HhaI Reverse Primer:	1 μ l
dNTPs (100 Mm):	1 μ l
Taq (5 U/ μ l)(Invitrogen):	1 μ l
ddH ₂ O	μέχρι τα 50 μ l



Εικόνα 4: Ανάλυση Dde-I: Δείγματα: 1. Αδελφή αιμορροφιλικού (xx) 2. Γιος της 1 (x) 3. Σύζυγος της 1 (X) 4. Κόρη της 1 (Xx) – **ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ** 5. Αδελφός της 1 - ΑΙΜΟΡΡΟΦΙΛΙΚΟΣ (X)

Βλέπουμε ότι η αδελφή του ασθενούς φέρει κοινή ζώνη με αυτόν. Άρα πρέπει να συνεχίσουμε τη διερεύνηση ώστε να διαπιστωθεί ότι η αδελφή του δεν είναι φορέας. Τότε και μόνο θα μπορέσουμε να πούμε με ασφάλεια ότι η κοπέλα δεν είναι φορέας του πάσχοντος γονιδίου και αυτή.

1. TaqI

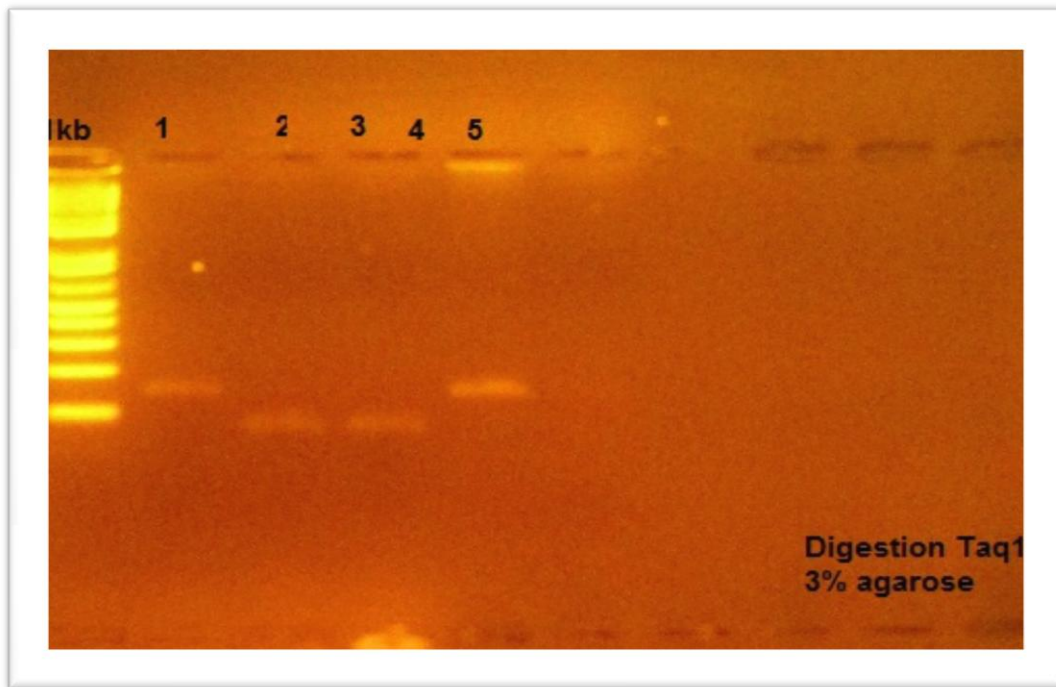
PCR

Ολικός όγκος ανά αντίδραση: 50 μl

- DNA (100 ng):
- 10X Buffer Taq: 5 μl
- MgCl₂ (50mM): 3 μl
- TaqI Forward Primer: 1 μl
- TaqI Reverse Primer: 1 μl
- dNTPs (100 Mm): 1 μl
- Taq (5 U/μl)(Invitrogen): 0.5 μl
- ddH₂O: μέχρι 50 μl

ΠΕΨΗ με TaqI I (65°C)

Ολικός όγκος ανά αντίδραση: 50 μl	
TaqI PCR Product:	10 μl
10X NS3 Buf:	3 μl
TaqI (5 U/μl):	3 μl
BSA	0,3 μl
ddH ₂ O	μέχρι τα 50 μl
Επώαση στους 65°C για τουλάχιστον 3 ώρες	



Εικόνα 1: Ανάλυση του PCR TaqI & του TaqI Digest σε 3% Agarose gel

Δείγματα: marker 1kb, 1. Αδελφή αιμορροφιλικού (tt) 2. Γιος της 1 (t) 3. Σύζυγος της 1 (T) 4. Κόρη της 1 (Tt) – ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ 5. Αδελφός της 1 - ΑΙΜΟΡΡΟΦΙΛΙΚΟΣ (T)

TaqI ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΟ!!! Αιμορροφιλικός = T, ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ = Tt

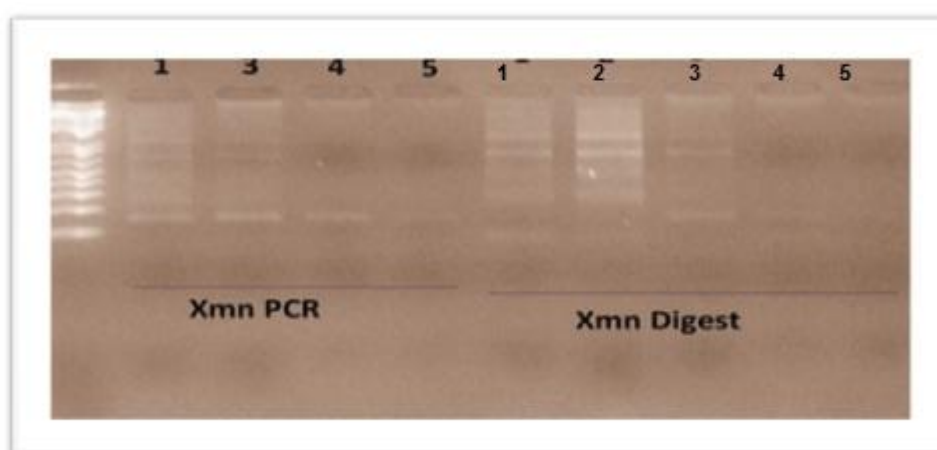
2. Xmn-I = 150 bps (75 + 75)

Ολικός όγκος ανά αντίδραση: 50 μ l			
DNA (100 ng)			
10X Buffer Taq:	5	μ l	
MgCl ₂ (50mM):	3	μ l	
TaqI Forward Primer:	1	μ l	
TaqI Reverse Primer:	1	μ l	
dNTPs (100 Mm):	1	μ l	
Taq (5 U/ μ l)(Invitrogen):	0.5	μ l	
ddH ₂ O	Μέχρι	50	μ l

ΠΕΨΗ με Xmn - I (37°C) για 3 ώρες

Ολικός όγκος ανά αντίδραση: 20 μ l			
Προϊόν XmnI PCR	13	μ l	
10X NS4 Buf:	2	μ l	
XmnI (5 U/ μ l):	2	μ l	
BSA	0,2	μ l	
ddH ₂ O	μέχρι	20	μ l

Ανάλυση 15 μ l Xmn-I Digest σε 3% Agarose gel



Εικόνα 2 : 1. Αδελφή αιμορροφιλικού (xx) 2. Γιος της 1 (x) 3. Σύζυγος της 1 (X) 4. Κόρη της 1 (Xx) – ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ 5. Αδελφός της 1 - ΑΙΜΟΡΡΟΦΙΛΙΚΟΣ (X)

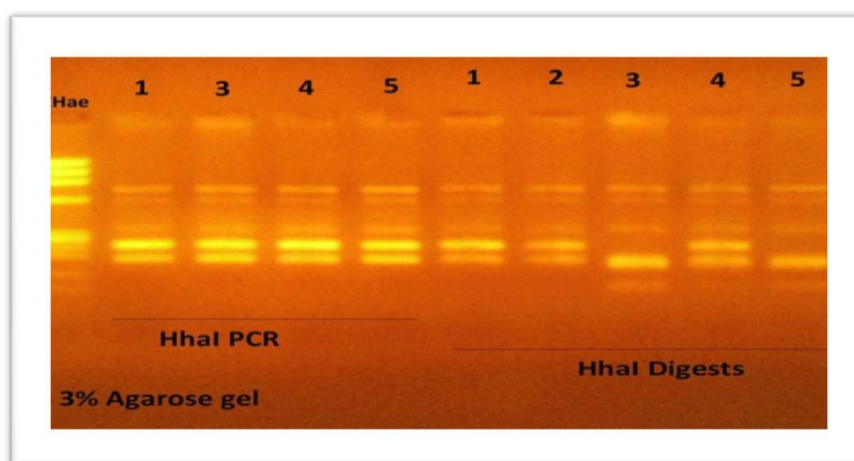
XmnI Πληροφοριακό!!!

3. Hha-I = 230 bps (150 + 80 bps)

Ολικός όγκος ανά αντίδραση: 50 μ l	
	1 reaction
DNA (100 ng)	1.1 μ l
10X Buffer Taq:	5 μ l
MgCl ₂ (50mM):	3 μ l
HhaI Forward Primer:	1 μ l
HhaI Reverse Primer:	1 μ l
dNTPs (100 Mm):	1 μ l
Taq (5 U/ μ l)	0.5 μ l
ddH ₂ O	μέχρι τα 50 μ l

ΠΕΨΗ με Hha-I (37°C) για 3 hours

Total Volume ανά αντίδραση: 20 μ l	
HhaI PCR Product:	13 μ l
10X NS4 Buf:	2 μ l
HhaI (5 U/ μ l):	2 μ l
BSA	0,2 μ l
ddH ₂ O	μέχρι 20 μ l



Ανάλυση των PCR products και digest σε gel agarose 3%

Εικόνα 3 : 1. Αδελφή αιμορροφιλικού (**Hh**), 2. Γιος της 1 (**H**), 3. Σύζυγος της 1 (**h**), 4. Κόρη της 1 (**Hh**) – **ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ**, 5. Αδελφός της 1 - **ΑΙΜΟΡΡΟΦΙΛΙΚΟΣ** (**h**)

HhaI Πληροφοριακό!!!

Εδώ ολοκληρώθηκε η διερεύνηση για την Αιμορροφιλία Β.

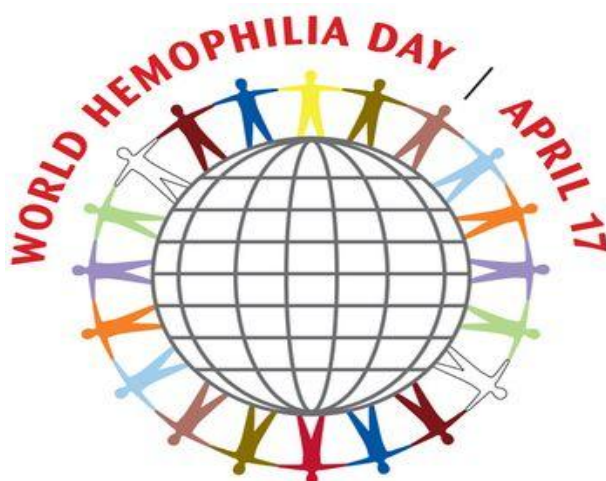
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Για τη διεξαγωγή της παρούσης διατριβής στο εργαστήριο του Μοριακού Ελέγχου Αιμορροφιλίας του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών, μελετήθηκαν τρεις οικογένειες με ιστορικό Αιμορροφιλίας. Οι δύο ελέγχθηκαν για Αιμορροφιλία Α και η τρίτη για Αιμορροφιλία Β.

Παρουσιάσαμε τα δεδομένα και τα αποτελέσματα της μιας οικογένειας που εξετάσαμε για Αιμορροφιλία Α, στην οποία ασθενής ήταν ο πατέρας με μέτριας βαρύτητας αιμορροφιλία. Ελέγξαμε την κόρη του για φορεία, η οποία αποδείχθηκε θετική και έπειτα προχωρήσαμε σε προγεννητικό έλεγχο του κυήματος αυτής, το οποίο αν και άρρεν δεν έφερε το πάσχον γονίδιο.

Στην δεύτερη οικογένεια που παρουσιάσαμε στο κομμάτι της Αιμορροφιλίας Β, ασθενής ήταν ο θείος με ελαφριάς μορφής Αιμορροφιλία Β, αδελφός της μητέρας που προσήλθε για εξέταση στον εργαστήριο μαζί με το σύζυγο, το γιό και την κόρη της.

Τα αποτελέσματα, αρχικά δείχνουν να είναι φορέας η μητέρα, στην ανάλυση του Dde-I, διότι φαίνεται να φέρει κοινή ζώνη με τον αδελφό της, όμως στις επόμενες αναλύσεις αποδεικνύεται μη-φορεία της μητέρας και συνεπώς και της κόρης της.



Σαν γενικότερα συμπεράσματα μπορούμε να πούμε ότι:

- Η πρόληψη είναι η ασφαλέστερη μέθοδος για τον έλεγχο κληροδότησης γενετικών νοσημάτων.
- Ο μοριακός έλεγχος αποτελεί ταχεία, αξιόπιστη, έγκαιρη και αποτελεσματική μέθοδο διάγνωσης.
- Τα γενετικά νοσήματα με ετερογενή βάση, απαιτούν εργαστηριακή προσέγγιση με ανάλυση σύνδεσης και έχουν πιθανότητα ανασυνδυασμού εάν ο γενετικός δείκτης που χρησιμοποιείται είναι συνδεδεμένος.

Η γενετική συμβουλευτική πρέπει να γίνεται από εξειδικευμένα κέντρα και επιστήμονες, με στόχο την ενημέρωση των οικογενειών για τα οφέλη και τους κινδύνους και όχι την προτροπή για συγκεκριμένες επιλογές.

Τα επόμενα χρόνια αναμένονται εξελίξεις που θα βελτιώσουν τη δυνατότητα παροχής επαρκέστερου προγεννητικού ελέγχου με σκοπό τη γέννηση όσο το δυνατόν υγιών παιδιών.

Μελλοντικές εξελίξεις στον προγεννητικό έλεγχο

Τα επόμενα χρόνια αναμένονται εξελίξεις που θα βελτιώσουν τη δυνατότητα παροχής επαρκέστερου προγεννητικού ελέγχου.

i) η αξιόπιστη χρησιμοποίηση των εμβρυϊκών κυττάρων & του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA που απομονώνονται από το μητρικό αίμα. **ii)** η περαιτέρω αξιοποίηση της ολοκλήρωσης του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project), που επιτρέπει την αναγνώριση ολοένα και περισσότερων γενετικών νοσημάτων και συνδρόμων, **iii)** η αξιοποίηση των μικροσυστοιχιών (microarrays) που επιτρέπει την πολλαπλή αναζήτηση μεταλλάξεων σε ένα δείγμα βιολογικού υλικού. **iv)** η συνεχής πρόοδος στον τομέα της Ιατρικής του εμβρύου, που επιτρέπει την ενδομήτρια αντιμετώπιση-θεραπεία αρκετών συγγενών ανωμαλιών, καθιστώντας συζητήσιμη από το ζευγάρι τη διατήρηση της κύησης, **v)** η γονιδιακή θεραπεία που μέσω της οποίας το νόσημα επιδέχεται αντιμετώπισης και περιορίζει ή εξαφανίζει τις συνέπειές στη ζωή του ατόμου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) J. OLDENBURG,* N. M. ANANYEVA_ and E. L. SAENKO Haemophilia (2004), (Suppl. 4), 133–139 Molecular basis of haemophilia A.
- 2) Paula H., Bolton-Maggs B., Pasi K. J. (2003). The Lancet • Vol 361 • May 24, www.thelancet.com
- 3) Keeney S., Mitchell M., Goodeve A. (2005). The molecular analysis of haemophilia A: a guideline from the UK haemophilia centre. Haemophilia (11): 387–397.
- 4) M. Hoffman, D. M. Monroe III - A Cell-based Model of Hemostasis - Thromb Haemost 2001; 85: 958–65.
- 5) M. Hoffman, D. M. Monroe, R. HR – Cellular Interactions in Hemostasis – Hemostasis 1996: 26:12-6.
- 6) Pier M. Mannucci, MD*. Hemophilia and related bleeding disorders: A story of dismay and success. Hematology 2002.
- 7) Maureane Hoffman, Dougald M. Monroe III. A Cell-based Model of Hemostasis. Thromb Haemost 2001: 85: 958–65.
- 8) Miao HZ, Sirachainan N, Palmer L et al. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion. Blood 2004: 103: 3412–9.
- 9) Pipe SW, Miao H, Tendulkar R et al. Asparaginelinked sites within the B domain of coagulation factor VIII improve secretion efficiency. Blood 2001; 98: 705a. 138 J. OLDENBURG et al.
- 10) Bowen DJ. Mol Pathol 2002: 55:1–18. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights.
- 11) S. KEENEY,* M. MITCHELL_ and A. GOODEVE. The molecular analysis of haemophilia A: a guideline from the UK haemophilia centre doctors_ organization haemophilia genetics laboratory network. Haemophilia (2005), 11, 387–397.
- 12) Oefner PJ, Underhill PA. Comparative DNA sequence by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). Am J Hum Genet 1995: 57: A266.
- 13) PV Jenkins, PW Collins, E Goldman et al. Analysis of intron 22 inversions of the factor VIII gene in severe hemophilia A: implications for genetic counseling. Blood, Vol 84, No 7 (October I), 1994: pp 2197-2201.

- 14) Nancy B. Y. Tsui, Rezan A. Kadir, K. C. Allen Chan et al. BLOOD, 31 MARCH 2011. VOLUME 117, NUMBER 13. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA.
- 15) Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. Hum Reprod Update. 2009; 15(1):139-151.
- 16) Bolton-Maggs and Pasi. Hemophilias A and B. Lancet 2003, 361:1801-09.
- 17) T. Sivakumaran*, K. Kucheria and P. Oefner*. Denaturing High Performance Liquid Chromatography in the molecular diagnosis of genetic disorders. Current science, vol. 84, No 3, 10/02/2003.
- 18) M. Lalloz, J. McVey, J. Pattinson et al. Haemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. Lancet 1991; 338:207-11.
- 19) Lau TK, Leung TY, Fung TY, Chan LW, Sahota DS, Leung DN. Outcome of 1355 consecutive transabdominal chorionic villus samplings in 1351 patients. Chin Med J. 2005;118:1675-1688.
- 20) Kadir RA, Sabin CA, Goldman E, Pollard D, et al. Reproductive choices of women in families with haemophilia. Haemophilia. 2000; 6(1):33-40.
- 21) Kolkman JA, Christophe OD, Lenting PJ et al. Surface loop 199–204 in blood coagulation factor IX is a cofactor-dependent site involved in macromolecular substrate interaction. J Biol Chem 1999; 274: 29087–93.
- 22) Saenko EL, Ananyeva NM, Tuddenham EG et al. Factor VIII – novel insights into form and function. Br J Haematol 2002; 119: 323–31.
- 23) Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE et al. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. Nat Genet 1993; 5: 236–41.
- 24) Pattinson JK, Millar DS, McVey JH et al. The molecular genetic analysis of hemophilia A: a direct search strategy for the detection of point mutations in the factor VIII gene. Blood 1990; 76: 2242–8.

25) Shaun R. Coughlin. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology, Journal of Thrombosis and Haemostasis, 3:1800–1814, 2005

1) <http://europium.csc.mrc.ac.uk/WebPages/Main/main.htm>

2) <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html>

3) <http://www.hemophilia.org.uk/>

4) <http://panacea.med.uoa.gr/topic.aspx?id=458>