



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

———— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 ————

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε δείγματα
προγεννητικού ελέγχου**

Ελεάνα Λ. Φίτση

Επιβλέπουσα : Ιωάννα Traeger Συνοδινού, Καθηγήτρια Γενετικής

ΑΘΗΝΑ
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2019



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
———— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 ————

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε δείγματα
προγεννητικού ελέγχου**

Ελεάνα Λ. Φίτση

Επιβλέπουσα : Ιωάννα Traeger Συνοδινού, Καθηγήτρια Γενετικής

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2019

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε δείγματα προγεννητικού ελέγχου

Ελεάνα Λ. Φίτση

A.M.: 20160657

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: Ιωάννα Traeger Συνοδινού, Καθηγήτρια Γενετικής

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: Ιωάννα Traeger Συνοδινού, Καθηγήτρια Γενετικής

Ελένη Φρυσίρα, Καθηγήτρια Κλινικής Γενετικής

Μαρία Τζέτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής

Φεβρουάριος 2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως αντικείμενο, τη μελέτη χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε δείγματα αμνιακού υγρού και χοριακών λαχνών κατά τον προγεννητικό έλεγχο.

Ο προγεννητικός έλεγχος χρωμοσωμικών ανωμαλιών με τον κλασσικό καρυότυπο ανιχνεύει αριθμητικές ανωμαλίες καθώς και δομικές, μεγέθους $\geq 3-5$ Mb και έχει κλινική εφαρμογή στα πλαίσια της παρακολούθησης της ανάπτυξης του εμβρύου καθώς και της γενετικής συμβουλευτικής [25].

Η μελέτη αυτή έλαβε χώρα στο εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, στο τμήμα προγεννητικού ελέγχου χρωμοσωμικών ανωμαλιών, με έδρα το Χωρέμιο ερευνητικό εργαστήριο του νοσοκομείου Παιδών «Αγία Σοφία»,. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αμνιακού υγρού και χοριακών λαχνών από περιστατικά που παραπέμφθηκαν στο εργαστήριο για προγεννητική διάγνωση.

Σκοπός της παρούσα διπλωματικής εργασίας είναι:

- η εκμάθηση των χρωμοσωμάτων και αναγνώριση χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε δείγματα προγεννητικού ελέγχου. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν 46 ήδη αναλυμένα δείγματα που παρουσιάζουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες και έγινε κυτταρογενετική μελέτη μικροσκοπικών παρασκευασμάτων καθώς και ψηφιακών εικόνων μεταφάσεων.
- η μελέτη χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε δείγματα χοριακών λαχνών και αμνιακού υγρού. Να μελετηθεί δηλαδή η συχνότητα εμφάνισης των χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε δείγματα προγεννητικού ελέγχου, καθώς και το είδος της χρωμοσωμικής ανωμαλίας που εντοπίστηκε. Για το λόγο αυτό συγκεντρώθηκαν 1315 περιστατικά από τα έτη 2014, 2015, 2016.
- η εκτίμηση του ποσοστού επιβεβαίωσης των βιοχημικών και υπερηχογραφικών ευρημάτων που προέκυψαν ύστερα από τον προγεννητικό έλεγχο της εκάστοτε εγκύου κατά το 1^{ου} τρίμηνο της κύησης και ήταν η αιτία παραπομπής τους για περαιτέρω επεμβατικό έλεγχο με σκοπό την κυτταρογενετική ανάλυση του εμβρύου.

Για το σκοπό αυτό, επελέγησαν 194 περιστατικά που παραπέμφθηκαν για κυτταρογενετικό έλεγχο λόγω παθολογικού αποτελέσματος κατά τον βιοχημικό ή/ και τον υπερηχογραφικό έλεγχο και υπολογίστηκε το ποσοστό επιβεβαίωσης των εν λόγω δεικτών.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Εργαστήριο ιατρικής γενετικής του ΕΚΠΑ, τμήμα Κυτταρογενετικής του Χωρεμίου ερευνητικού εργαστηρίου Αθηνών του παιδών Αγία Σοφία.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Κυτταρογενετική, προγεννητικός έλεγχος, χρωμοσωμικές ανωμαλίες, συχνότητα εμφάνισης, εκτίμηση του ποσοστού επιβεβαίωσης.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the study of chromosomal abnormalities in samples of amniotic fluid and chorionic villi during prenatal cytogenetic testing.

Conventional cytogenetic analysis detects numerical as well as structural abnormalities of ≥ 3 -5 Mb in size and is clinically valuable in the context of fetal development monitoring and genetic counseling.

This study was carried out in the Department of Prenatal Cytogenetics, Medical Genetics Laboratory of the University of Athens, in Choremio Research Laboratory of the "Agia Sophia" Children's Hospital. Samples of amniotic fluid and chorionic villi were used from cases referred to the laboratory for prenatal diagnosis.

The scope of this work is:

- the identification to become familiar with chromosomes and chromosomal abnormalities in 46 analyzed samples referred for prenatal cytogenetic testing. The study involved microscope slide preparations as well as metaphase digital images.
- to study chromosomal abnormalities in samples from chorionic villus and amniotic fluid. The incidence of chromosomal abnormalities in prenatal cytogenetic testing, as well as the frequency for each type of chromosomal abnormality individually, will be calculated. For this reason 1315 cases were collected from years 2014, 2015 and 2016.
- to estimate the predictive value of the ultrasound and biochemical 1st trimester markers, by using samples from pregnant women that have been referred for further invasive testing for the purpose of cytogenetic analysis of the fetus. 194 cases of chorionic villus and amniotic fluid samples with pathologic ultrasonographic and biochemical results and an increased risk for a pathological fetus were selected.

THEMATIC AREA: Laboratory of Medical Genetics of the National Academy of Sciences in Athens (EKPA), Choremio cytogenetics division of the Athens research faction of the children's hospital "Agia Sophia".

KEYWORDS: Cytogenetics, prenatal control, numerical-structural anomalies, incidence, assessment of prenatal invasive and non-invasive methods

*Η διπλωματική μου εργασία είναι αφιερωμένη σε μία κοπέλα που είχα την
τύχη να συναντήσω το 2016.
Σε εσένα Αναστασίου Ξένια.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά την κα Traeger Συνοδινού Ιωάννα Καθηγήτρια γενετικής, που μου έδωσε την ευκαιρία μέσω της πραγματοποίησης αυτής της διπλωματικής εργασίας να γνωρίσω καλύτερα την κυτταρογενετική. Επίσης ευχαριστώ και την κα Τσαρουχά Χαρούλα για την βοήθεια της. Ήταν τιμή και κέρδος για εμένα που σας γνώρισα και συνεργάστηκα μαζί σας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	12
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ Ιστορική αναδρομή στον προγεννητικό έλεγχο.....	13
1.1 Προγεννητικός έλεγχος.....	16
1.1.1 Ενδείξεις για επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο.....	20
1.1.2 Μέθοδοι που περιλαμβάνονται στον προγεννητικό έλεγχο.....	22
1.1.2.1 Μη επεμβατικοί μέθοδοι.....	22
1.1.2.2 Επεμβατικοί μέθοδοι.....	28
1.2 Κυτταρογενετική Κυτταρογενετική του ανθρώπου.....	33
1.2.1 Γενικά.....	33
1.2.2 Τι είναι τα χρωμοσώματα.....	34
1.2.3 Διαδικασία και στάδια της κυτταρικής διαίρεσης- Κυτταρικός κύκλος.....	38
1.2.4 Είδη χρωμοσωμικών ανωμαλιών.....	40
1.2.5 Μωσαϊκισμός	47
1.2.6 Εφαρμογές της κυτταρογενετικής	47
1.2.6.1 FISH (Fluorescence in situ hybridization).....	48
1.2.6.2 Array-CGH (array- Comparative Genomic Hybridization).....	50
1.3 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας.....	53
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	56
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	62
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	76
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	78
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	80
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	81

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Απεικόνιση ποσοστιαίας αναλογίας των δειγμάτων που προσήλθαν έπειτα από αμνιοπαρακέντηση έναντι αυτών που προσήλθαν έπειτα από λήψη τροφοβλάστης και αναλύθηκαν στο κυτταρογενετικό εργαστήριο του Χωρεμείου ερευνητικού κέντρου για τα έτη 2014-2016.....	63
Σχήμα 2: Ποσοστιαία αναλογία για τα είδη των ανωμαλιών που ανιχνεύθηκαν.....	66
Σχήμα 3: Συχνότητα εμφάνισης αριθμητικών ανωμαλιών που εντοπίστηκαν μετά την κυτταρογενετική ανάλυση επί του συνόλου των περιστατικών που παραπέμφθηκαν 24/1315.....	67
Σχήμα 4: Συχνότητα εμφάνισης δομικών ανωμαλιών που εντοπίστηκαν μετά την κυτταρογενετική ανάλυση επί του συνόλου των περιστατικών που παραπέμφθηκαν 16/1315.....	68
Σχήμα 5: Απεικόνιση συχνοτήτων παθολογικών περιστατικών που επιβεβαιώθηκαν με την κυτταρογενετική ανάλυση.....	72

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1α: Καρυότυπος θήλεος με σύνδρομο Down, 47,XX,+21.....	17
Εικόνα 1β: Καρυότυπος άρρενος με σύνδρομο Down, 47,XY,+21.....	17
Εικόνα 2: Καρυότυπος ατόμου με σύνδρομο Klinefelter, 47, XXY.....	18
Εικόνα 3: Καρυότυπος θήλεος με σύνδρομο Turner, 45,X.....	18
Εικόνα 4: Καρυότυπος θήλεος με σύνδρομο Patau, 47,XX,+13.....	19
Εικόνα 5: Καρυότυπος άρρενος με σύνδρομο Edwards, 47,XX,+18.....	19
Εικόνα 6: Συσχέτιση της ηλικίας της μητέρας με την ανίχνευση του συνδρόμου Down.....	20
Εικόνα 7: Απεικόνιση του πάχους του αυχένος του εμβρύου όπως μετριέται κατά τον u/s της NT.....	23
Εικόνα 8: Διοχέτευση των εμβρυϊκών κυττάρων στη μητρική κυκλοφορία.....	27
Εικόνα 9: Απεικόνιση της μορφής και της θέσης της τροφοβλάστης και των χοριακών λαχνών.....	29
Εικόνα 10: Απεικόνιση διαδικασίας λήψης τροφοβλάστης	29
Εικόνα 11: Απεικόνιση του τρόπου που γίνεται η αμνιοπαρακέντηση κάτω από υπερηχογραφική παρακολούθηση.....	30
Εικόνα 12: Διαδικασία λήψης αμνιακού υγρού με αμνιοπαρακέντηση.....	31
Εικόνα 13: Φυσιολογικός καρυότυπος θήλεος: 46,XX.....	34
Εικόνα 14: Φυσιολογικός καρυότυπος άρρενος: 46,XY.....	35
Εικόνα 15: Πρότυπο ζώνωσης των ανθρώπινων μεταφασικών χρωμοσωμάτων.....	36
Εικόνα 16: Κατηγορίες χρωμοσωμάτων με βάση τη θέση του κεντρομεριδίου α. Μετακεντρικό β. Υπομετακεντρικό γ. Ακροκεντρικό.....	37
Εικόνα 17: Φάσεις του κυτταρικού κύκλου.....	39
Εικόνα 18: Στάδια που συμβαίνουν κατά την φάση της μεσόφασης.....	39
Εικόνα 19: Απεικόνιση ανώμαλου χρωμοσωμικού διαχωρισμού.....	40
Εικόνα 20: Απεικόνιση διαδικασίας κατά την οποία προκύπτουν οι δομικές ανωμαλίες.....	42
Εικόνα 21: Απεικόνιση αμοιβαίας μετάθεσης. Αμοιβαία χρωμοσωμική μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 3 και 21.....	42
Εικόνα 22: Μετάθεση ροβερτσιανού τύπου μεταξύ των χρωμοσωμάτων 13 και 14.....	43
Εικόνα 23: Απεικόνιση ένθεσης του χρωμοσώματος 4 στο χρωμόσωμα 20.....	43
Εικόνα 24: Απεικόνιση δημιουργίας έλλειψης σε ένα χρωμόσωμα.....	44
Εικόνα 25: Απεικόνιση των τρόπων σχηματισμού του δακτυλοειδούς χρωμοσώματος.....	45
Εικόνα 26: Απεικόνιση του τρόπου σχηματισμού του ισοχρωμοσώματος.....	45
Εικόνα 27α: Αρχή μεθόδου in situ υβριδισμού FISH.....	49
Εικόνα 27β: Ηδη probe ανιχνευτων της μεθόδου FISH:.....	49

Εικόνα 28: Απεικόνιση μεταφασής όπως φαίνεται κατά την μικροσκοπική παρατήρηση και αναγνώριση των χρωμοσωμάτων.....	61
Εικόνα 29: Χοριακές λάχνες με καρυότυπο 47,XY,+2/46,XY.....	73
Εικόνα 30: Χοριακές λάχνες με καρυότυπο 47,XX,+16.....	74
Εικόνα 31: Έμβρυο με καρυότυπο 47,XY,+mar de novo.....	75

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Επιδημιολογία συνδρόμων.....	16
Πίνακας 2α: Κίνδυνος εμφάνισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών ανάλογα με την ηλικία της μητέρας.....	21
Πίνακας 2β: Κίνδυνος εμφάνισης μη ισοζυγισμένων χρωμοσωμικών ανωμαλιών ανάλογα με την ηλικία της μητέρας.....	21
Πίνακας 3: Βιοχημικοί δείκτες που αναλύονται ανά τρίμηνο κυήσεως.....	26
Πίνακας 4: Κατάταξη των χρωμοσωμάτων με βάση την ομάδα, το μέγεθος και τη θέση του κεντρομεριδίου τους.....	36
Πίνακας 5: Παράθεση συμβόλων που χρησιμοποιούνται στην ονοματολογία.....	46
Πίνακας 6: Περιστατικά που χρησιμοποιήθηκαν τα μικροσκοπικά τους παρασκευάσματα για την εκμάθηση.....	54
Πίνακας 7: Παθολογικά περιστατικά που μελετήθηκαν για τα τρία έτη.....	63
Πίνακας 8: Συχνότητες εμφάνισης ανωμαλιών μητρικής, πατρικής προέλευσης και de novo.....	68
Πίνακας 9: Συχνότητα εμφάνισης αριθμητικών ανωμαλιών που εντοπίστηκαν.....	69
Πίνακας 10: Συχνότητα εμφάνισης δομικών ανωμαλιών που εντοπίστηκαν.....	70
Πίνακας 11: Παράθεση παθολογικών περιστατικών που αναλύθηκαν κυτταρογενετικά και τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την ανάλυση.....	71
Πίνακας 12: Περιστατικά με παθολογικό καρυότυπο που είχαν αυξημένες πιθανότητες για ανωμαλία κατά τον προγεννητικό έλεγχο.....	72

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, στο τμήμα προγεννητικού ελέγχου χρωμοσωμικών ανωμαλιών με έδρα το Χωρέμιο ερευνητικό εργαστήριο στο νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία», στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Ιατρική Γενετική κλινική και Εργαστηριακή κατεύθυνση», του τμήματος της Ιατρικής του ΕΚΠΑ κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2016-2018, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας κας Traeger Συνοδινού Ιωάννας.

Το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, λειτουργεί από το 1965, αρχικά ως τμήμα της Α΄ Παιδιατρικής Κλινικής, και από το 1999 ως ανεξάρτητο Εργαστήριο της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Διαθέτει μακρόχρονη εμπειρία και αποτελεί κέντρο αναφοράς σε θέματα που αφορούν τη αντιμετώπιση, διάγνωση και πρόληψη γενετικών νοσημάτων.

Θα γίνει μια εκτενής παρουσίαση της σημασίας της κυτταρογενετικής και του προγεννητικού ελέγχου, των εξετάσεων (screening tests) και των μεθόδων που χρησιμοποιούνται, για διάγνωση ανωμαλιών του εμβρύου στην εγκυμοσύνη, καθώς επίσης και της σημασίας της χρήσης των νέων τεχνικών όπως είναι η μέθοδος FISH, αλλά και η χρησιμότητα της εφαρμογής του μοριακού καρυστύπου για την διαγνωστική, ανίχνευση και ταυτοποίηση ανωμαλιών.

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η μελέτη χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε δείγματα προγεννητικού ελέγχου, δηλαδή σε δείγματα αμνιακού υγρού και χοριακών λαχνών.

Πιο συγκεκριμένα, θα μελετηθεί το είδος και η συχνότητα των χρωμοσωμικών ανωμαλιών κατά τον προγεννητικό έλεγχο, ενώ θα πραγματοποιηθεί και η εκτίμηση του ποσοστού επιβεβαίωσης των βιοχημικών και υπερηχογραφικών αποτελεσμάτων του 1^{ου} τριμήνου όπως συλλέχθηκαν από τα ιστορικά των περιστατικών του Χωρεμίου ερευνητικού κέντρου..

Τέλος, θα διερευνηθεί σε πόσες από τις περιπτώσεις που παραπέμφθηκαν λόγω αυξημένου κινδύνου με βάση τους παραπάνω δείκτες, ταυτοποιήθηκε τελικά χρωμοσωμική ανωμαλία του εμβρύου.

Τα δείγματα που θα μελετηθούν στο σύνολο τους ανέρχονται στα 1315, με διάφορους λόγους παραπομπής όπως, η ηλικία της μητέρας, παθολογικοί βιοχημικοί δείκτες και u/s ευρήματα 1^{ου} τριμήνου, προηγούμενη κύηση με έμβρυο με χρωμοσωμική ανωμαλία, οικογενειακό ιστορικό ανωμαλίας/νοσημάτων, καθ'έξιν αποβολές κ.α.

Από την μελέτη αυτή προέκυψε πως τα παθολογικά περιστατικά που εντοπίστηκαν στο σύνολο τους ανέρχονται σε 44 (περιστατικά), εκ των οποίων τα 11 (περιστατικά) αφορούν την κατηγορία που μελετάμε, (παθολογικοί βιοχημικοί δείκτες και u/s ευρήματα 1^{ου} τριμήνου).

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΣΤΟΝ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ

Οι διαγνωστικές τεχνικές στον προγεννητικό έλεγχο είναι η λήψη χοριακών λαχνών, η αμνιοπαρακέντηση και η λήψη εμβρυϊκού αίματος.

Η πρώτη αμνιοπαρακέντηση πραγματοποιήθηκε στη Γερμανία στις αρχές της δεκαετίας του 1880 από τον Von Schatz, ο οποίος επιχείρησε τη διακοιλιακή παρακέντηση αμνιακού υγρού στο τρίτο τρίμηνο κύησης με στόχο τη θεραπεία υδραμνίου. Η διαδικασία της μεθόδου περιλάμβανε την είσοδο λεπτής βελόνας στη μήτρα της εγκύου για την αναρρόφηση του αμνιακού υγρού. Το σημείο εισόδου της βελόνας επιλεγόταν μετά από ψηλάφηση των ορίων της μήτρας [1][2]. Η τυφλή παρακέντηση της μήτρας, αφού δεν ήταν διαδεδομένη η χρήση των υπερήχων εκείνη την περίοδο, ήταν μια επισφαλής μέθοδος με αρκετές επιπλοκές όπως ο τραυματισμός του εμβρύου, του πλακούντα ακόμα και αιμορραγία της μήτρας.

Η πρώτη εφαρμογή των υπερήχων στην ιατρική έγινε το 1927 από τους R.W.Wood και A.L.Loomis όχι όμως για διαγνωστικό αλλά για θεραπευτικό σκοπό [3]. Η σπουδαιότερη εφαρμογή των υπερήχων στη γυναικολογία έγινε από τον καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας Ian Donald [4], ενώ μετά το 1972 άρχισε πλέον να διαδίδεται και να χρησιμοποιείται ευρέως η υπερηχογραφικά καθοδηγούμενη αμνιοπαρακέντηση.

Το 1959 από τη διερεύνηση της γενετικής βάσης συγκεκριμένων συνδρόμων προέκυψαν οι ακόλουθες ανακαλύψεις :

- Leujeune et al ότι το σύνδρομο Down χαρακτηρίζεται από ένα υπεράριθμο χρωμόσωμα 21 (τρισωμία 21), (θήλυ 47,XX+21) ή (άρρεν 47,XY+21),
- Jacobs and Strong ότι το σύνδρομο Klinefelter χαρακτηρίζεται από την παρουσία 47 χρωμοσωμάτων και σύνθεση χρωμοσωμάτων φύλου XXY (καρυότυπος: 47,XXY),
- Ford et al ότι το σύνδρομο Turner χαρακτηρίζεται από μονοσωμία του χρωμοσώματος X (καρυότυπος: 45,X).

Το 1960 οι Patau et al απέδειξαν ότι το σύνδρομο Patau χαρακτηρίζεται από τρισωμία του χρωμοσώματος 13, (θήλυ 47,XX+13), ή (άρρεν 47,XY+13) και οι Edwards et al ότι το σύνδρομο Edwards χαρακτηρίζεται από τρισωμία του χρωμοσώματος 18, (θήλυ 47,XX+18) ή (άρρεν 47,XY+18).

Από το 1960 και μετά ήταν δυνατή η προγεννητική διάγνωση σε έμβρυα τα οποία έφεραν φυλοσύνδετα κληρονομούμενα νοσήματα όπως για παράδειγμα είναι η αιμορροφιλία το 1960 και η μυϊκή δυστροφία Duchenne το 1964. Οι Steele και Breg το 1966 κατέστησαν δυνατή την καλλιέργεια κυττάρων αμνιακού υγρού με στόχο τη μελέτη καρυότυπου [5].

Από το 1970 η αμνιοπαρακέντηση είχε καθιερωθεί ως η κύρια μέθοδος προγεννητικής διάγνωσης και έως το 1988 πραγματοποιούνταν και στο πρώτο τρίμηνο κύησης (11η-14η εβδομάδα, πρώιμη αμνιοπαρακέντηση) όμως οι Benacerraf BR et al παρατήρησαν ότι τα ποσοστά αυτόματης αποβολής άγγιζαν το 2,3% και για αυτό το λόγο άρχισε να εφαρμόζεται σε μεγαλύτερες ηλικίες κύησης [6].

Το 1983 ο Dr.F.Daffos δημοσίευσε έρευνα στην οποία περιέγραφε την υπερηχογραφικά καθοδηγούμενη ομφαλιδοκέντηση και λήψη εμβρυϊκού αίματος [7], η μέθοδος αυτή ονομάστηκε “percutaneous umbilical blood sampling” (PUBS) από την ομάδα του Hobbins το 1988 και αντικατέστησε την εμβρυοσκόπηση, η οποία ήταν διαδεδομένη έως τότε. Ο Δρ. Νικολαΐδης χρησιμοποίησε ευρέως τη μέθοδο της ομφαλοκέντησης και

εξέλιξε τον τρόπο εφαρμογής της από ένα μόνο άτομο [8]. Σήμερα χρησιμοποιείται κυρίως όταν είναι απαραίτητη η άμεση λήψη εμβρυϊκού αίματος, συνήθως για την πραγματοποίηση ανάλυσης καρυότυπου.

Η ανάγκη για προγεννητική διάγνωση στο πρώτο τρίμηνο κύησης οδήγησε στην ανάπτυξη άλλων εφαρμογών προγεννητικής διάγνωσης, όπως η λήψη χοριακών λαχνών (Chorionic Villus Sampling). Η πρώτη εφαρμογή της μεθόδου έγινε διατραχηλικά με χρήση ενδοσκοπίου. Είχε μεγάλο ποσοστό επιτυχίας στη λήψη του δείγματος, αλλά είχε και μεγάλα ποσοστά επιπλοκών όπως αιμορραγία της μήτρας και λοίμωξη της εγκύου. Η πρώτη επιτυχημένη λήψη χοριακών λαχνών για διαγνωστικούς λόγους έγινε το 1975 στο Νοσοκομείο Tietung της πόλης Ashan στην Κίνα, και πραγματοποιήθηκε για προγεννητική επιλογή φύλου του εμβρύου. Η δειγματοληψία αυτή γινόταν «τυφλά», χωρίς δηλαδή υπερηχογραφική παρακολούθηση και για αυτό παρατηρούνταν αυξημένα ποσοστά επιπλοκών. Ο Brambati το 1983 πραγματοποίησε διατραχηλική λήψη χοριακών λαχνών υπό συνεχή υπερηχογραφικό έλεγχο και τα ποσοστά επιπλοκών μειώθηκαν σημαντικά. Η τεχνική του αύξησε τα ποσοστά επιτυχίας της μεθόδου από 75% στο 95% και χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα [9].

Η ανάγκη η οποία υπήρχε για την έγκαιρη και έγκυρη ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών και γενετικών συνδρόμων του εμβρύου (προγεννητικά) οδήγησε στην πραγματοποίηση μιας σειράς εξετάσεων πληθυσμιακού ελέγχου (screening tests) που αποτελούν το αποτέλεσμα της εξέλιξης μεθόδων ή συνδυασμών αυτών με σκοπό την αύξηση του ποσοστού ανίχνευσης ανωμαλιών (αύξηση ευαισθησίας μεθόδου), αλλά και τη μείωση του ποσοστού των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε και μια σειρά υπερηχογραφικών εξετάσεων και βιοχημικών δεικτών.

Το 1984 μια σειρά μελετών απέδειξε τη συσχέτιση της γλυκοπρωτεΐνης α-φетоπρωτεΐνης (α-FP) με ανατομικές ανωμαλίες του εμβρύου αλλά και με το σύνδρομο Down (τρισωμία 21), ενώ το 1987 από τους Bogart et al υπήρξε η τεκμηρίωση της συσχέτισης της εμφάνισης αυξημένης συγκέντρωσης της β-χοριακής γοναδοτροπίνης (β-hCG) στο αίμα της εγκύου σε κυήσεις με ύπαρξη συνδρόμου Down. Οι δύο αυτοί βιοχημικοί δείκτες εισήχθησαν και εφαρμόστηκαν για πρώτη φορά στο Ηνωμένο Βασίλειο ως εξετάσεις προγεννητικού ελέγχου κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης με ευαισθησία μεθόδου σε ποσοστό 60% [10] και λίγο αργότερα έπειτα από μελέτες παρατηρήθηκε πως η μείωση της μη συζευγμένης οιστριόλης (uE3) στο αίμα της εγκύου σχετίζεται με περιπτώσεις παθολογικών κυήσεων. Αυτή η απόδειξη οδήγησε στη δημιουργία ενός άλλου βιοχημικού τεστ, του τριπλού τεστ το οποίο γίνεται στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης [11], [12].

Στις αρχές του 1990 ο βιοχημικός δείκτης β-χοριακή γοναδοτροπίνη (β-hCG) αντικαταστάθηκε με μια υπομονάδα της, την ελεύθερη β-υπομονάδα της χοριακής γοναδοτροπίνης (free β-hCG) και εν συνεχεία προστέθηκε και η ινχιμπίνη Α (DIA) μετατρέποντας το τριπλό τεστ σε ένα τετραπλό τεστ, με ευαισθησία μεθόδου σε ποσοστό 75% [13].

Από το 1990 και μετά υπήρξε η έκφραση της ανάγκης για την εφαρμογή και χρήση μεθόδων που θα προέβλεπαν την πιθανότητα εμφάνισης ανωμαλιών στο έμβρυο κατά το πρώτο τρίμηνο της κυήσεως ώστε, και με την εφαρμογή των επεμβατικών μεθόδων, στις περιπτώσεις που επιβεβαιώνονταν η ύπαρξη ανωμαλιών στο έμβρυο, να μπορούσε να γίνει η διακοπή της κύησης αν και εφόσον κρίνονταν απαραίτητο. Το 1991 μελέτες έδειξαν πως η σχετιζόμενη με την κύηση πρωτεΐνη πλάσματος-Α (PAPP-A, pregnancy associated plasma protein A) εμφανίζεται μειωμένη σε κυήσεις με σύνδρομο Down (τρισωμία 21) και χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με την μέτρηση της β-χοριακής γοναδοτροπίνης (β-hCG), στο πρώτο τρίμηνο της κύησης με ποσοστό ευαισθησίας 60%-70% [14], [15], [16].

Μετά την εφαρμογή των παραπάνω βιοχημικών δεικτών ο Δρ Νικολαΐδης και η ομάδα του, το 1992 και 1994 [17] ανέδειξε πως η υπερηχογραφική εξέταση της αυχενικής

διαφάνειας (NT, Nuchal Translucency) είναι μια έγκυρη εξέταση προγεννητικού ελέγχου που διενεργείται κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης, όπου σε συνδυασμό με την μέτρηση των ανωτέρω βιοχημικών δεικτών (PAPP-A και β-hCG) και την ηλικία της μητέρας, έχει ποσοστό ευαισθησίας 85%-90% ως προς την ανίχνευση ανωμαλιών του εμβρύου και εφαρμόζεται από το 1997 έως και σήμερα [18], [19], [20], [21], [22].

1.1 Προγεννητικός έλεγχος

Ο προγεννητικός έλεγχος κατά την διάρκεια της κύησης μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες στους γονείς και τον θεράποντα ιατρό για την υγεία του εμβρύου από τους πρώτους κιόλας μήνες. Στην Ελλάδα ο προγεννητικός έλεγχος λαμβάνει χώρα από το 1970 και διακρίνεται στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο και στον επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο [1].

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος ρουτίνας, αφορά όλες τις κυήσεις και περιλαμβάνει τα υπερηχογραφήματα 1^{ου}, 2^{ου} και 3^{ου} τριμήνου (συμπεριλαμβάνεται και η μέτρηση της αυχενικής διαφάνειας, NT), τη μέτρηση των βιοχημικών δεικτών στο αίμα της εγκύου (PAPP-A, β-hCG, α-Fp, free β-hCG, uE3, Inhibin A), αλλά και το NIPT (Μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος από το αίμα της εγκύου, Non Invasive Prenatal Testing) [1]. Η αξία των μη επεμβατικών μεθόδων έγκειται στο ότι μπορεί να εκτιμηθεί ο πιθανός κίνδυνος που μπορεί να έχει το έμβρυο για κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία.

Η επιβεβαίωση ή όχι των παθολογικών ευρημάτων που μπορεί να προκύψουν από τις μη επεμβατικές μεθόδους επιτυγχάνεται με τη διενέργεια εξετάσεων με επεμβατικές μεθόδους.

Οι επεμβατικές μέθοδοι αποκαλύπτουν την γενετική σύσταση του εμβρύου και είναι:

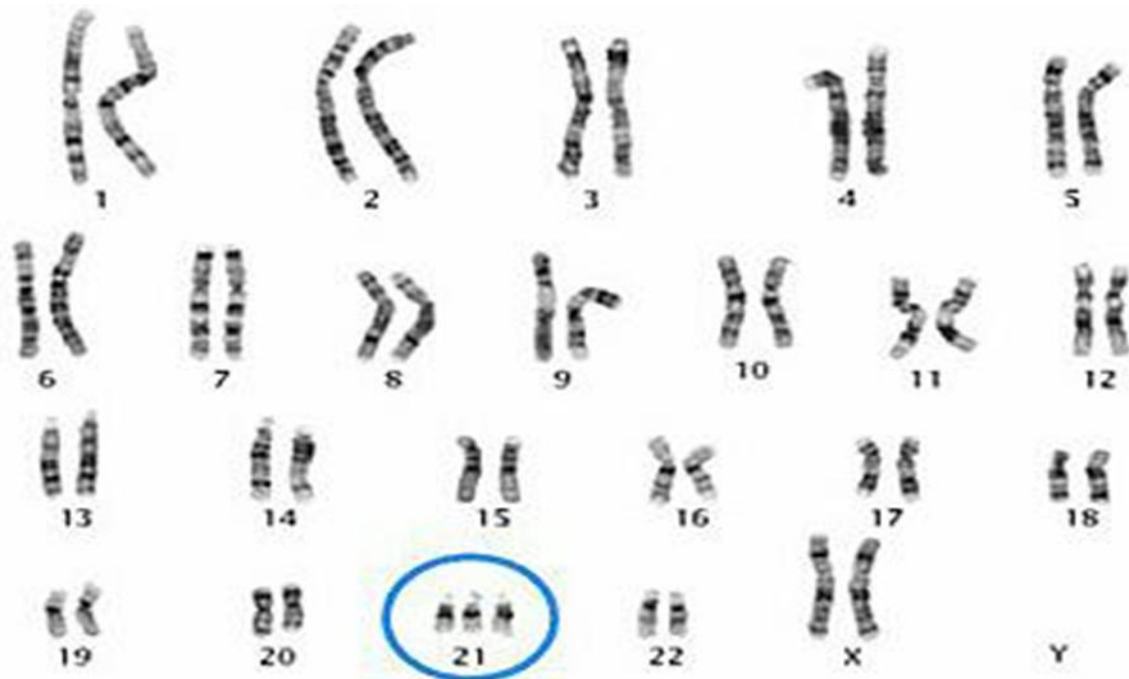
- Η λήψη χοριακών λαχνών CVS (λήψη τροφοβλάστης) 10η με 14η εβδομάδα κύησης,
 - Η λήψη αμνιακού υγρού με την αμνιοπαρακέντηση 15η με 22η εβδομάδα κύησης,
- ~ Αυτές οι επεμβατικές μέθοδοι ενέχουν κίνδυνο αποβολής 0,5%–1% [1], [23],
- Η λήψη εμβρυϊκού αίματος (cffDNA) με ομφαλιδοκέντηση 20η με 28η εβδομάδα κύησης. (percutaneous umbilical blood sampling, PUBS)
- Αυτή η επεμβατική μέθοδος ενέχει κίνδυνο αποβολής 3%-5% [1].

Ορισμένα από τα σύνδρομα που οφείλονται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες και ανιχνεύονται κατά τον προγεννητικό έλεγχο παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα με φθίνουσα σειρά συμφωνά με τη συχνότητα εμφάνισης τους και είναι: (Πίνακας 1)

Πίνακας 1: Επιδημιολογία συνδρόμων

ΣΥΝΔΡΟΜΑ	ΔΙΕΘΝΩΣ
Σύνδρομο Down [24],[1]	1/729
Σύνδρομο Klinefelter [1]	1/1.000
Σύνδρομο Turner [1]	1/7.168
Σύνδρομο Patau [27]	1/5.000
Σύνδρομο Edwards [27],[28]	1/6.000

- Το σύνδρομο Down με συχνότητα εμφάνισης 1/729 γεννήσεις, είναι η κλινική εκδήλωση της τρισωμίας 21 που χαρακτηρίζεται από ένα υπεράριθμο χρωμόσωμα 21, (47,XX,+21 για θήλυ με σύνδρομο Down ή 47,XY,+21 για άρρεν με σύνδρομο Down) [1], [29]. (Εικόνα 1α, Εικόνα 1β)

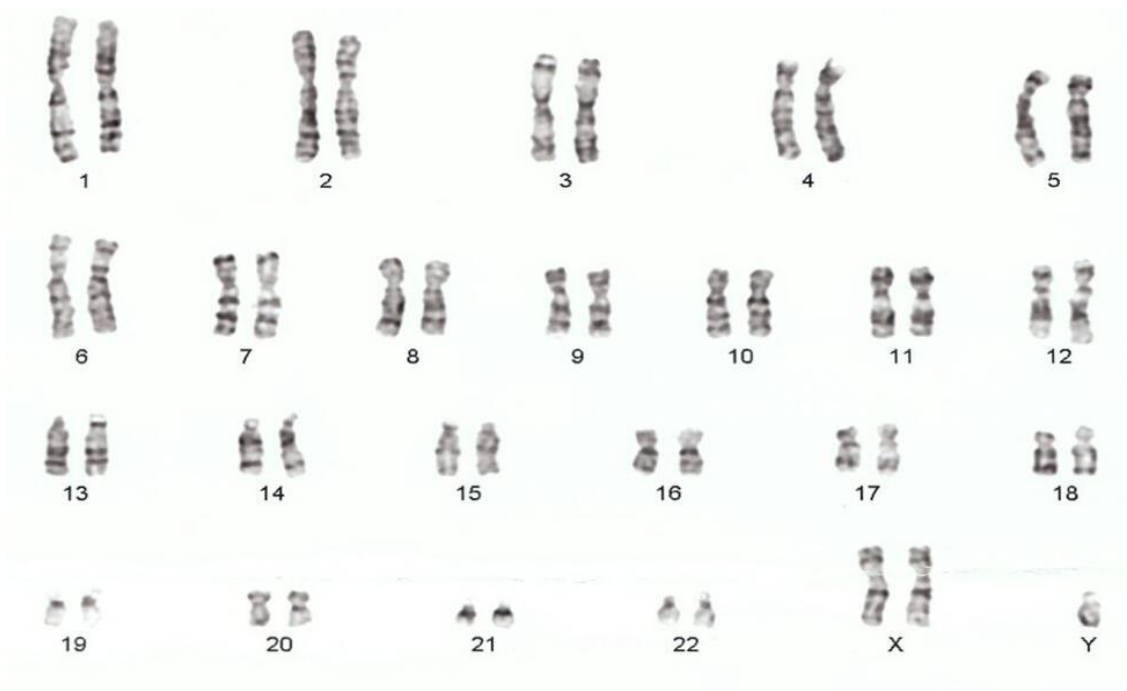


Εικόνα 1α: Καρυότυπος θήλεος με σύνδρομο Down, 47,XX,+21 [30]



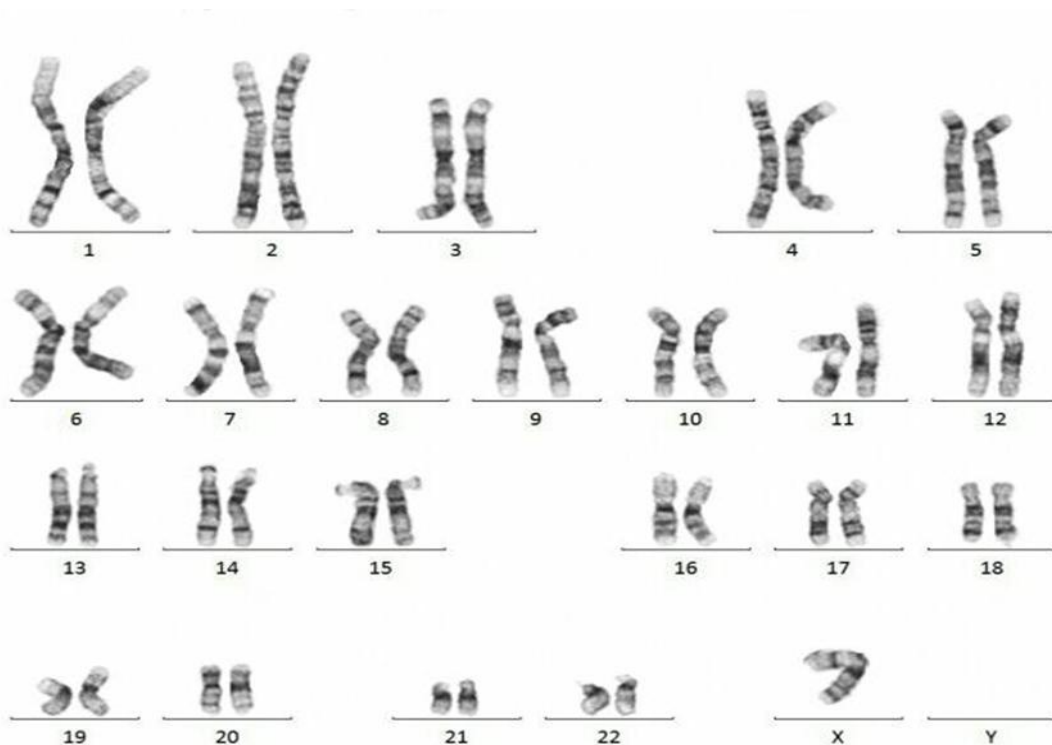
Εικόνα 1β: Καρυότυπος άρρενος με σύνδρομο Down, 47,XY,+21 [31]

-Το σύνδρομο Klinefelter με συχνότητα εμφάνισης 1:1.000, χαρακτηρίζεται από την παρουσία 47 χρωμοσωμάτων και σύνθεση χρωμοσωμάτων του φύλου XXY (καρυότυπος: 47,XXY) [32]. (Εικόνα 2)



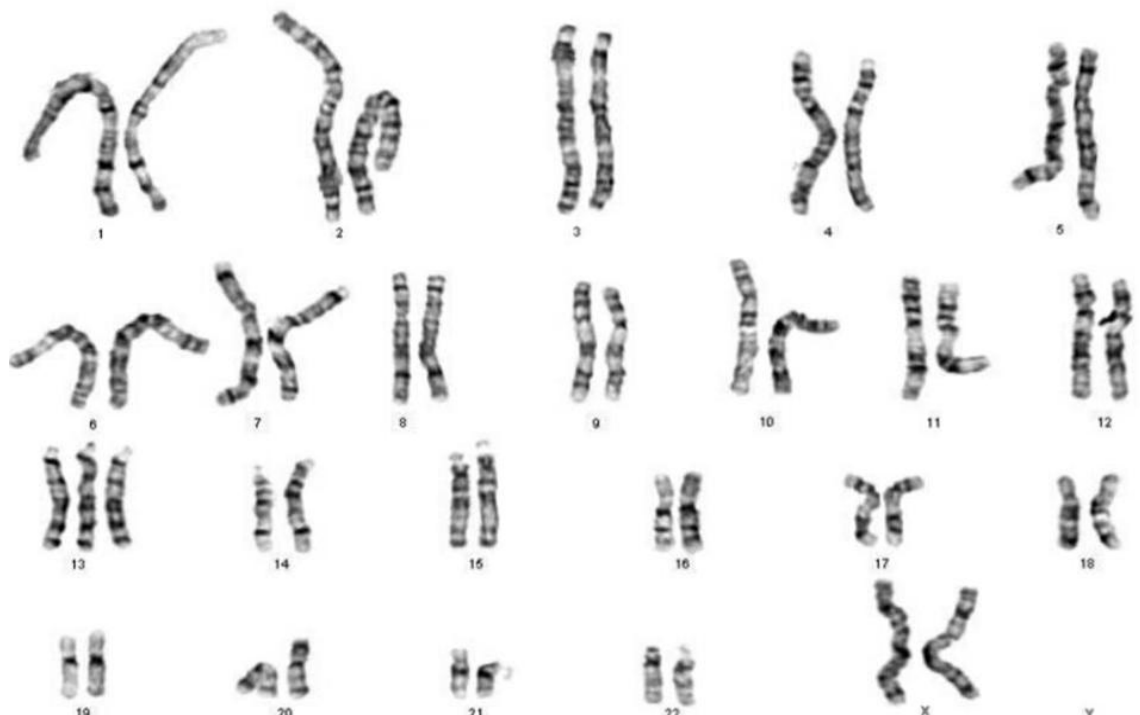
Εικόνα 2: Καρυότυπος ατόμου με σύνδρομο Klinefelter, 47, XXY [33]

-Το σύνδρομο Turner με συχνότητα εμφάνισης 1:7.168 χαρακτηρίζεται από μονοσωμία του χρωμοσώματος X (καρυότυπος: 45,X) [1],[34]. (Εικόνα 3)



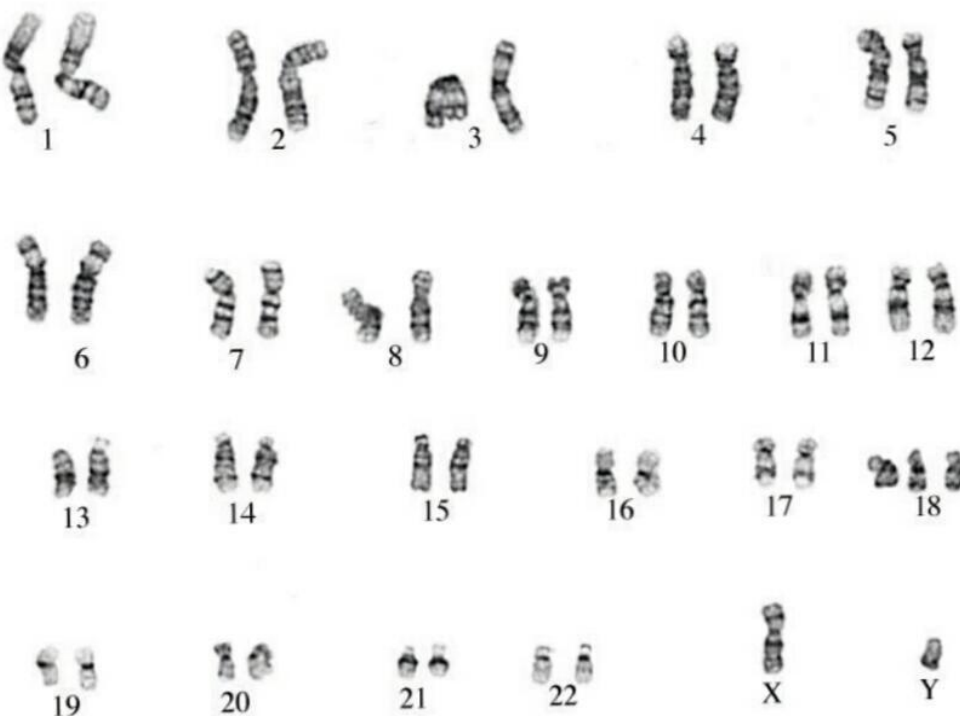
Εικόνα 3: Καρυότυπος θήλεος με σύνδρομο Turner, 45,X [35]

-Το σύνδρομο Patau με συχνότητα εμφάνισης 1:5.000 χαρακτηρίζεται από τρισωμία του χρωμοσώματος 13, (47,XX,+13 για θήλυ με σύνδρομο Patau ή 47,XY,+13 για άρρεν με σύνδρομο Patau) [36]. (Εικόνα 4)



Εικόνα 4: Καρυότυπος θήλεος με σύνδρομο Patau, 47,XX,+13 [37]

-Το σύνδρομο Edwards με συχνότητα εμφάνισης 1:6.000 χαρακτηρίζεται από τρισωμία του χρωμοσώματος 18, (47,XX,+18 για θήλυ με σύνδρομο Edwards ή 47,XY,+18 για άρρεν με σύνδρομο Edwards) [38]. (Εικόνα 5)



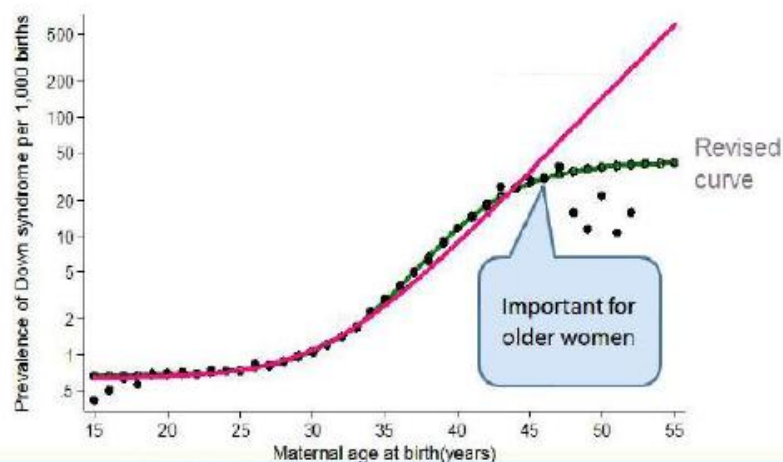
Εικόνα 5: Καρυότυπος άρρενος με σύνδρομο Edwards, 47,XX,+18 [38].

1.1.1 Ενδείξεις για επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο

Οι επεμβατικές μέθοδοι, προγεννητικού ελέγχου γίνονται συνήθως σε κυήσεις που χαρακτηρίζονται ως υψηλού κινδύνου κατόπιν ενδείξεων. Εντούτοις, θα πρέπει να σημειωθεί ότι για το γενικό πλυθησμό η πιθανότητα εμφάνισης χρωμοσωμικής ανωμαλίας σε νεογνά είναι 1/120 γεννήσεις.

Στις μέρες μας όμως καθώς οι επεμβατικές μέθοδοι έχουν εξελιχθεί οι πιθανότητες επιπλοκών για την έγκυο ή το έμβρυο είναι πολύ μικρές. Οι ενδείξεις για τη διενέργεια επεμβατικής μεθόδου προγεννητικού ελέγχου είναι οι εξής:

- Η ηλικία της μητέρας, κυρίως όταν είναι σε «προχωρημένη» αναπαραγωγική ηλικία >35 ετών. Σημειώνεται πως ο κίνδυνος για εμφάνιση του συνδρόμου Down (τρισωμία 21) αυξάνεται όσο αυξάνει η ηλικία της μητέρας. (Εικόνα 6)



Εικόνα 6: Σύσχέτιση της ηλικία της μητέρας με την ανίχνευση του συνδρόμου Down [39]

- Υπερηχογραφικά ευρήματα, όπως αυξημένη αυχενική διαφάνεια, υποπλαστικό ρινικό οστό, καρδιακές ανωμαλίες, ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης του εμβρύου (IUGR) ή διαταραχές στην ποσότητα του αμνιακού υγρού, διαφορά ανατομικά ευρήματα όπως λαγόχειλο κ.α.
- Ενδείξεις στον βιοχημικό προγεννητικό έλεγχο του 1^{ου} και 2^{ου} τριμήνου.
- Οικογενειακό ιστορικό με ύπαρξη γνωστής χρωμοσωμικής ανωμαλίας.
- Προηγούμενη κύηση με παθολογικά ευρήματα στον καρυότυπο του εμβρύου.
- Όταν κάποιος από τους δύο γονείς είναι φορέας δομικής ισοζυγισμένης χρωμοσωμικής μετάθεσης ή άλλης χρωμοσωμικής ανωμαλίας [40], [41], [42].

Από το 1970 αποδείχθηκε πως εγκυμονούσες γυναίκες άνω των 35 ετών έχουν περισσότερες πιθανότητες να γεννήσουν παιδί με χρωμοσωμική ανωμαλία [43], [44]. Είναι πλέον σαφές ότι ο κίνδυνος γέννησης εμβρύου με χρωμοσωμική ανωμαλία αυξάνει με την αύξηση της ηλικίας της εγκύου [1], [45], [46]. (Πίνακας 2α, Πίνακας 2β)

Πίνακας 2α: Κίνδυνος εμφάνισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών ανάλογα με την ηλικία της μητέρας [1]

Ηλικία Μητέρας	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ ΣΕ ΝΕΟΓΝΑ %
35	0,52
36	0,63
37	0,77
38	0,96
39	1,21
40	1,55
41	1,98
42	2,56
43	3,31
44	4,29
45	5,57

Πίνακας 2β: Κίνδυνος εμφάνισης μη ισοζυγισμένων χρωμοσωμικών ανωμαλιών ανάλογα με την ηλικία της μητέρας [47]

Ηλικία Μητέρας σε Έτη	Δείγμα Χοριακών λαχνών		Δείγμα Αμνιοπαρακέντησης	
	%	1 στα	%	1 στα
35	0,9	115	0,8	120
36	1,2	85	1,0	100
37	1,5	65	1,2	80
38	2,0	50	1,5	65
39	2,5	40	2,0	50
40	3,5	30	2,5	40
41	4,5	22	3	33
42	6,0	17	4	25
43	7,5	13	5	20
44	10	10	6	17
45	13	8	7	14

1.1.2 Μέθοδοι που περιλαμβάνονται στον προγεννητικό έλεγχο

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στον προγεννητικό έλεγχο διακρίνονται στις μη επεμβατικές και στις επεμβατικές και περιγράφονται στη συνέχεια.

1.1.2.1 Μη επεμβατικές μέθοδοι

Μη επεμβατικές μέθοδοι:

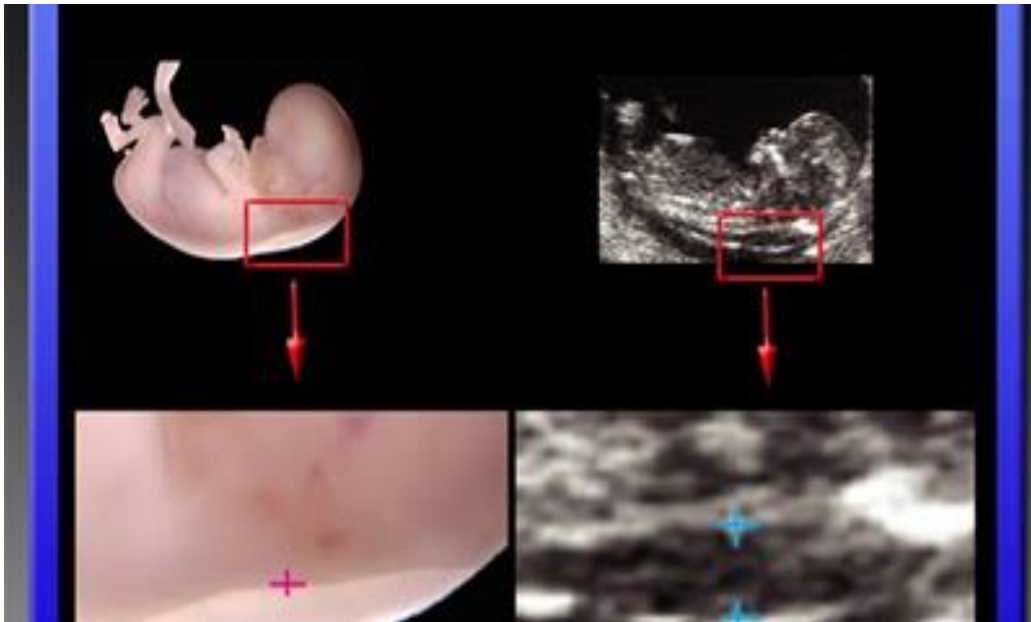
A) Υπερηχογραφήματα 1^{ου}, 2^{ου} και 3^{ου} τριμήνου της κύησης.

Το υπερηχογράφημα ανήκει στις μη επεμβατικές διαγνωστικές μεθόδους και επιτυγχάνεται με τη χρήση ηχητικών κυμάτων πολύ υψηλής συχνότητας, δηλαδή τους υπέρηχους και χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της διάγνωσης της φυσιολογικά εξελισσόμενης ενδομήτριας κήσεως [3].

Κατά τη διάρκεια της κύησης ο πρώτος υπέρηχος γίνεται την 6η με 11η εβδομάδα κήσεως για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή μη της εγκυμοσύνης με την παρουσία ή όχι του εμβρυϊκού σάκου, για τη διάγνωση μονήρους ή πολύδυμης κήσεως, με βάση το κεφαλουριαίο μήκος του εμβρύου, για τον υπολογισμό της ηλικίας της κήσεως, όπως και για την ανίχνευση της εμβρυϊκής καρδιακής λειτουργίας.

Ακολουθεί ο υπέρηχος Α επιπέδου, που πραγματοποιείται κατά την 11η με 13η εβδομάδα κήσεως για την μέτρηση της αυχενικής διαφάνειας (NT, Nuchal Translucency), δηλαδή της συγκέντρωσης υποδόριου υγρού στην περιοχή του αυχένα του εμβρύου, ενώ γίνεται και έλεγχος της ανατομίας του εμβρύου και των μορφολογικών χαρακτηριστικών του προσώπου του δηλαδή, τη μέτρηση του ρινικού οστού, τη μέτρηση των δακτύλων, την μέτρηση του μηριαίου οστού, το μήκος της άνω γνάθου, το κεφαλουριαίο μήκος. Σε όσα έμβρυα βρεθεί να έχουν αυξημένη ποσότητα υποδόριου υγρού στην περιοχή του αυχένα σε συνδιασμό με διάφορα υπερηχογραφικά ευρήματα, συνιστάται να γίνει περαιτέρω έλεγχος για την πιθανότητα παρουσίας συνδρόμου Down ή κάποιας άλλης χρωμοσωμικής ανωμαλίας [1]. Η αξιοπιστία της μεθόδου στην ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών ανέρχεται σε ποσοστό 90% ενώ υπάρχει και ένα ποσοστό της τάξεως του 5% ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων [48]. (Εικόνα 7)

Τα ευρήματα αυτού του υπερηχογραφικού ελέγχου σε συνδυασμό με την ηλικία της μητέρας, το βάρος της και το αποτέλεσμα από την μέτρηση δύο βιοχημικών δεικτών στο αίμα της εγκύου PAPP-A και β-hCG δίνουν τη συνδυασμένη στατιστική πιθανότητα το έμβρυο να πάσχει από τρισωμία 21 ή άλλη χρωμοσωμική ανωμαλία (παρατίθεται αναλυτικότερα παρακάτω) [49], [50].



Εικόνα 7: Απεικόνιση του πάχους του αυχένος του εμβρύου όπως μετρείται κατά τον u/s της NT [51]

Στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης πραγματοποιείται ο υπερηχογραφικός έλεγχος Β' επιπέδου κατά την 21η έως την 24η εβδομάδα κύησης που κατέχει βασικό ρόλο στον έλεγχο της ανατομίας του εμβρύου στον οποίο πρέπει να υποβάλλονται όλες οι εγκυμονούσες από εξειδικευμένο στην Εμβρυομητρική Ιατρική Μαιευτήρα Γυναικολόγο με χρήση κατάλληλου εξοπλισμού για να μελετηθούν λεπτομερώς η ανατομία του εμβρύου για τον έλεγχο της ύπαρξης συγγενών ανωμαλιών, σκελετικών ανωμαλιών, καρδιολογικών ανωμαλιών, νεφρικών ανωμαλιών, ανωμαλίες στη διάπλαση του εγκεφάλου. Επίσης γίνεται εκτενής υπερηχογραφικός έλεγχος σε περίπτωση αμφίβολων έξω γεννητικών οργάνων του εμβρύου. Ο σκοπός του πληθυσμιακού αυτού ελέγχου είναι η πιθανή εντόπιση υφιστάμενων ανατομικών ανωμαλιών του εμβρύου, ώστε να δοθεί εν συνεχεία στους γονείς η δυνατότητα κατάλληλης συμβουλευτικής. Τέλος, ακολουθεί το υπερηχογράφημα ανάπτυξης (Doppler), το οποίο δύναται να γίνει κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης από την 24η έως την 40η εβδομάδα κύησης και μελετά την ανάπτυξη και θρέψη του εμβρύου.

B) Έλεγχος Βιοχημικών δεικτών

Γίνεται στον ορό του μητρικού αίματος κατά το 1^ο και 2^ο τρίμηνο της εγκυμοσύνης και προσδιορίζονται βιοχημικοί δείκτες που μεταβάλλονται στο αίμα της εγκύου κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης. Με την μέτρηση αυτών των δεικτών μπορούμε να εξαγάγουμε χρήσιμες πληροφορίες για την υγεία του εμβρύου ώστε να αποφασισθεί αν χρειάζεται να γίνει περαιτέρω επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος ή όχι. Ο έλεγχος βιοχημικών δεικτών, παρέχει μόνο ενδείξεις (screening test) για πιθανή παθολογία του εμβρύου για αυτό επί θετικών παθολογικών ενδείξεων απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση με επεμβατικές μεθόδους.

Τα επίπεδα των βιοχημικών δεικτών σε συνδυασμό με την ηλικία της εγκύου, το βάρος της εγκύου και την ακριβή εβδομάδα κύησης μπορούν να προσδιορίσουν τον κίνδυνο να φέρει το έμβρυο κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία (όπως τρισωμία 21, τρισωμία 18, τρισωμία 13, σύνδρομο Turner) είτε κάποια βλάβη του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως είναι η ανεγκεφαλία και η δισχιδής ράχη.

Αυτοί οι βιοχημικοί δείκτες είναι:

- Η σχετιζόμενη με την κύηση πρωτεΐνη πλάσματος-A (PAPP-A) είναι ένα πρωτεϊνικό μόριο παραγόμενο από το πλακούντα. Η μέτρηση της γίνεται με την αιμοληψία της εγκύου κατά την 11η με 13η εβδομάδα κύησης, (1^ο τρίμηνο της κύησης) την ίδια ημέρα που γίνεται και η υπερηχογραφική εξέταση για την μέτρηση της αυχενικής διαφάνειας του εμβρύου.
- Η ελεύθερη β-χοριακή γοναδοτροπίνη (free β-hCG), μπορεί να μετρηθεί κατά το 1^ο αλλά και στο 2^ο τρίμηνο της κύησης και παράγεται από τον πλακούντα.
- Η μητρική ελεύθερη οιστριόλη (uE3) παράγεται από τον πλακούντα και δύναται να μετρηθεί και στα τρία τρίμηνα της κύησης και ανάλογα με τις τιμές που προκύπτουν εξάγονται τα απαιτούμενα συμπεράσματα για την υγεία του εμβρύου, σύμφωνα πάντα με την εβδομάδα της κύησης κατά την οποία μετρήθηκε.
- Η ινχιμπίνη-A (DIA) μετριέται μετά την 13η εβδομάδα κύησης.
- Η α-εμβρυϊκή πρωτεΐνη (α-FP), η οποία παράγεται από το λεκιθικό σάκο και το εμβρυϊκό ήπαρ και εκκρίνεται στον εμβρυϊκό ορό από όπου διέρχεται στο αμνιακό υγρό και καταλήγει στη μητρική κυκλοφορία [52].

Στο μητρικό αίμα η συγκέντρωση της αυξάνεται σημαντικά μεταξύ 10ης-32ης εβδομάδας. Στο αμνιακό υγρό η μέγιστη τιμή της παρατηρείται την 13η εβδομάδα. Μέτρηση της α-FP στο μητρικό ορό γίνεται τη 16η-18η εβδομάδα όπου με ευαισθησία μεθόδου της τάξεως του 62% έως 67% μπορεί να εκτιμηθεί η πιθανότητα ύπαρξης του συνδρόμου Down. Καθώς και βλαβών του κεντρικού νευρικού σωλήνα [1].

Υπάρχουν και άλλες περιπτώσεις εκτός από τις παραπάνω που η α-FP ανιχνεύεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στη μητρική κυκλοφορία όπως:

- Σε περιπτώσεις ανεπάρκειας του εμβρυϊκού ήπατος,
- Σε περιπτώσεις ενδομήτριου θανάτου του εμβρύου,
- Σε περιπτώσεις που το βάρος της κυοφορούσας είναι μεγαλύτερο ή μικρότερο από το επιθυμητό,
- Σε περιπτώσεις δίδυμης ή πολύδυμης κύησης,
- Εξαιτίας λανθασμένου υπολογισμού της ηλικίας της κύησης.

B.1) ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΣΤΟ 1^ο ΤΡΙΜΗΝΟ ΤΗΣ ΚΥΗΣΕΩΣ, 11η με 13η ΕΒΔΟΜΑΔΑ ΚΥΗΣΕΩΣ

Η υπερηχογραφική εξέταση στο πρώτο τρίμηνο της κύησης (όπως έχει ήδη αναφερθεί) με το συνδυασμό της μητρικής ηλικίας, και των βιοχημικών δεικτών ελεύθερη β-hCG και της PAPP-A δίνουν μια εκτίμηση για την πιθανότητα εμφάνισης ανωμαλιών στο έμβρυο με ποσοστό ανίχνευσης που αγγίζει το 89% και ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων που ανέρχονται σε ποσοστό 5% [53].

Σημειώνεται ότι, σε κύσεις με τρισωμία 21, η συγκέντρωση στον ορό της μητέρας της ελεύθερης β-hCG είναι υψηλότερη από ότι σε φυσιολογικές κυήσεις, ενώ η PAPP-A είναι χαμηλότερη, ενώ στις τρισωμίες 18 και 13, η ελεύθερη β-hCG και η PAPP-A είναι ελαττωμένες.

B.2) ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΣΤΟ 2^ο ΤΡΙΜΗΝΟ ΤΗΣ ΚΥΗΣΕΩΣ

ΤΟ ΤΡΙΠΛΟ ΤΕΣΤ (ALPHA TEST) 15^η – 20^η ΕΒΔΟΜΑΔΑ ΚΥΗΣΕΩΣ ΚΑΙ ΤΟ ΤΕΤΡΑΠΛΟ ΤΕΣΤ 15^η και 22^η ΕΒΔΟΜΑΔΑ ΚΥΗΣΕΩΣ

Ο έλεγχος ανατομίας του εμβρύου κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης δεν υποκαθιστά το υπερηχογράφημα αυχενικής διαφάνειας ως προς την αξία του στον πληθυσμιακό έλεγχο για το σύνδρομο Down και άλλες τρισωμίες. Εάν η έγκυος δεν υποβληθεί στον πρώτο πληθυσμιακό προγεννητικό έλεγχο, τότε θα πρέπει να ακολουθήσει το 'τριπλό τεστ', μεταξύ 15ης – 20ης εβδομάδας κύησης (ιδανικά μεταξύ της 16ης και 18ης εβδομάδας) της κύησης, κατά το οποίο η μέτρηση της ελεύθερης β-χοριακής γοναδοτροπίνης (free β-hCG) σε συνδυασμό με την μέτρηση της ελεύθερης οιστριόλης (uE3) και της η α-εμβρυϊκής πρωτεΐνης (α-FP) δίνουν χρήσιμες πληροφορίες για την πιθανή παρουσία τρισωμίας του εμβρύου.

Οι τρεις βιοχημικοί δείκτες που συνθέτουν το τριπλό τεστ (alpha test) συναρτῆσει με την ηλικία της μητέρας και ένα υπερηχογράφημα ανάπτυξης του εμβρύου, κατά το οποίο γίνεται ο προσδιορισμός της ηλικίας της κύησης (με βάση την αμφιβρεγματική διάμετρο της κεφαλής του εμβρύου, BPD) είναι:

- η α-εμβρυϊκή πρωτεΐνη (α-FP),
- η ελεύθερη οιστριόλη (uE3) και
- η ελεύθερη β χοριακή γοναδοτροπίνη (free β-hCG).

Αν σε αυτές προστεθεί και η ινχιμπίνη Α τότε προκύπτει το τετραπλό τεστ το οποίο θεωρείται το πιο αποτελεσματικό τεστ για τον εντοπισμό του συνδρόμου Down ή και άλλης χρωμοσωμικής ανωμαλίας ή βλάβης του κεντρικού νευρικού συστήματος του εμβρύου κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης μεταξύ 15ης και 22ης εβδομάδας (ιδανικά μεταξύ της 16ης και 18ης εβδομάδας) της κύησης.

Και για τις δυο αυτές μεθόδους, το τριπλό τεστ (alpha test) και το τετραπλό τεστ, τα αποτελέσματα εξάγονται από τον μέσο όρο των τιμών των βιοχημικών δεικτών, την εμβρυϊκή ηλικία και το βάρος της μητέρας, τα οποία χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του πιθανού κινδύνου του εμβρύου να φέρει κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία.

Η ακρίβεια του τριπλού τεστ (alpha test) για βλάβη του κεντρικού νευρικού συστήματος κυμαίνεται γύρω στο 90% ενώ σε ενδείξεις για χρωμοσωμικές ανωμαλίες η ακρίβεια του κυμαίνεται γύρω στο 65%. Υπάρχουν όμως και ψευδώς θετικά αποτελέσματα που ανέρχονται στο 5%-10% [54].

Το τετραπλό τεστ ανιχνεύει το σύνδρομο Down (τρισωμία 21), με ακρίβεια της τάξεως του 81,5%, αλλά και με την παρουσία ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων που ανέρχονται στο 6,9% [43]. Όταν όμως συνδυαστεί και με την εφαρμογή υπερηχογραφήματων (μέτρηση αυχενικής διαφάνειας), τότε το ποσοστό ακρίβειας της μεθόδου για την ανίχνευση του συνδρόμου Down (τρισωμία 21), αυξάνεται στο 90% και μειώνεται αντίστοιχα το ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων στο 3,1% [55]. (Πίνακας 3)

Πίνακας 3: Βιοχημικοί δείκτες που αναλύονται ανά τρίμηνο κύησης

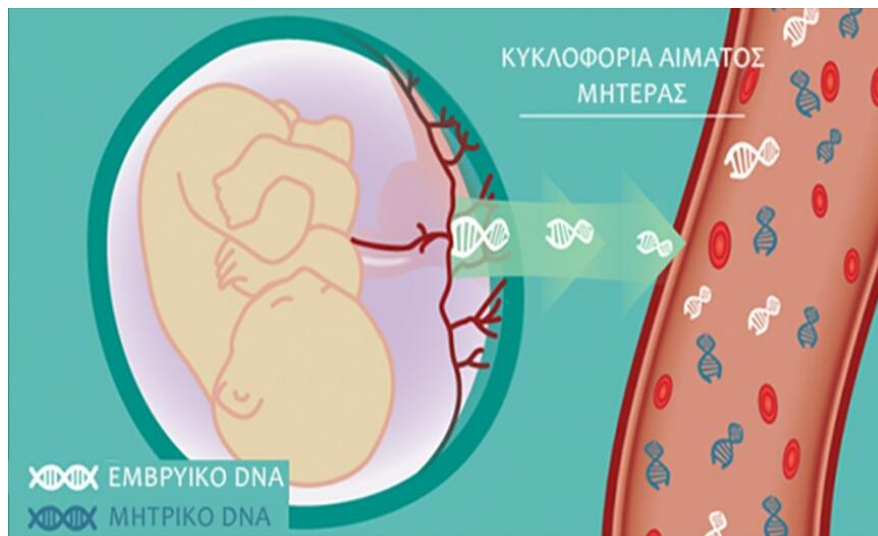
1ου Τριμήνου (11η-13η εβδομάδα)	<ul style="list-style-type: none"> • η σχετιζόμενη με την κύηση πρωτεΐνη πλάσματος-A (PAPP-A) • η ελεύθερη β χοριακή γοναδοτροπίνη (free β-hCG)
2ου Τριμήνου Alpha test (15η-20η εβδομάδα)	<ul style="list-style-type: none"> • η ελεύθερη β χοριακή γοναδοτροπίνη (free β-hCG) • η ελεύθερη οιστριόλη (uE3) • η α-εμβρυϊκή πρωτεΐνη (a-FP)
2ου Τριμήνου Τετραπλό ΤΕΣΤ (15η-22η εβδομάδα)	<ul style="list-style-type: none"> • η ελεύθερη β χοριακή γοναδοτροπίνη (free β-hCG) • η ελεύθερη οιστριόλη (uE3) • η α-εμβρυϊκή πρωτεΐνη (a-FP) • η ινχιμπίνη-A (DIA)

Γ) Μη Επεμβατικός Προγεννητικός Έλεγχος από το αίμα της εγκύου NIPT (Non Invasive Prenatal Testing) για κυήσεις > των 9 εβδομάδων

Το NIPT εφαρμόζεται για τον έλεγχο χρωμοσωμικών ανευπλοειδιών του εμβρύου αλλά και για ανωμαλίες του φύλου X και Y. Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται για την κατηγορία των εγκύων από τον κίνδυνο που προκύπτει εξαιτίας ευρημάτων από το υπερηχογράφημα του 1^{ου} τριμήνου (αυχενική διαφάνεια, NT), σε συνδυασμό με τους βιοχημικούς δείκτες και την ηλικία της μητέρας. Γίνεται με μια απλή αιμοληψία της μητέρας συνήθως την 10η εβδομάδα κύησης διότι το εμβρυϊκό DNA βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο μητρικό περιφερικό αίμα. Βασίστηκε στην ανακάλυψη του καθηγητή Dennis Lo και των συνεργατών του το 1997, ότι στο ολικό DNA του μητρικού πλάσματος εντοπίζεται και εμβρυϊκό DNA (cffDNA σε ποσοστό 3,4%-6,2%). Σκοπός αυτής της μη επεμβατικής μεθόδου είναι να δώσει, χωρίς τον κίνδυνο της αυτόματης αποβολής, μια ισχυρή ένδειξη εάν το έμβρυο έχει υψηλή ή μειωμένη πιθανότητα να φέρει κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία, όπως το σύνδρομο Down (τρισωμία 21), σύνδρομο Edwards (τρισωμία 18), σύνδρομο Patau (τρισωμία 13), καθώς χρωμοσωμικές ανωμαλίες του φύλου X και Y [56], [57]. Το 99% του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA προέρχεται από κύτταρα του πλακούντα τα οποία αποδομούνται με αποτέλεσμα το γενετικό υλικό του εμβρύου να εισέρχεται στην κυκλοφορία της μητέρας ενώ το ελεύθερο γενωμικό DNA της εγκύου είναι κυρίως αιμοποιητικής προέλευσης. [57], [58]. (Εικόνα 8)

Το ελεύθερο DNA (cfDNA) στον ορό της εγκύου αποτελεί μια μίξη ελεύθερου μητρικού και ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (cffDNA). Το εμβρυϊκό DNA (σε αντίθεση με τα περισσότερα DNA, τα οποία βρίσκονται μέσα στον πυρήνα ενός κυττάρου), υπάρχει θραυσματοποιημένο και ελεύθερο στον ορό της εγκύου στη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Τόσο το μητρικό όσο και το εμβρυϊκό ελεύθερο DNA είναι αλληλουχίες λίγων βάσεων, λιγότερο από 200 ζεύγη βάσεων, με το εμβρυϊκό να είναι ακόμα μικρότερο από το

μητρικό με μέσω όρο μεγέθους τις 145 βάσεις και μπορεί να ανιχνευθεί με τεχνολογία PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR) από την 18η ημέρα της κύησης. [59], [60], [61].



Εικόνα 8: Διοχέτευση των εμβρυϊκών κυττάρων στη μητρική κυκλοφορία [62]

Η μέθοδος αυτή μπορεί να εκτιμήσει μόνο τον πιθανό κίνδυνο για την παρουσία κάποιας ανωμαλίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα αποτελέσματα του NIPT υποδεικνύουν αυξημένο κίνδυνο για μια γενετική ανωμαλία όταν το έμβρυο είναι υγιές (ψευδώς θετικό) ή τα αποτελέσματα δείχνουν μειωμένο κίνδυνο γενετικής ανωμαλίας όταν το έμβρυο φέρει κάποια ανωμαλία (ψευδώς αρνητικό). Αυτό το σφάλμα συμβαίνει επειδή η NIPT αναλύει τόσο το εμβρυϊκό όσο και το μητρικό cfDNA, με αποτέλεσμα το αποτέλεσμα της εξέτασης να έχει ανιχνεύσει τη γενετική κατάσταση της μητέρας. Για την αποφυγή αυτού του σφάλματος θα πρέπει η εξέταση να εκτελείται όταν υπάρχει αρκετό εμβρυϊκό DNA στην κυκλοφορία του αίματος της μητέρας ώστε η μέθοδος να μπορεί να εντοπίσει τις ανωμαλίες του εμβρύου. Τα χαμηλά κλάσματα εμβρυϊκού DNA μπορούν να οδηγήσουν σε αδυναμία εκτέλεσης της εξέτασης ή σε ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα.

Η εξέταση συνιστάται σε όλες τις εγκύους για τον έλεγχο της υγείας του εμβρύου αλλά και σε κυήσεις που χαρακτηρίζονται ως υψηλού κινδύνου λόγω υπερηχογραφικών ευρημάτων ή παθολογικών βιοχημικών δεικτών αλλά και στις περιπτώσεις που αντενδείκνυται ο επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος, όπως είναι οι περιπτώσεις που υπάρχει αποκόλληση του πλακούντα ή αυξημένη πιθανότητα αποβολής του εμβρύου λόγω επιπλοκών στην κύηση [63], [64].

Πλεονέκτημα της μεθοδού είναι η εξαιρετική ακρίβεια στην ανεύρεση των συχνότερων εμβρυϊκών τρισωμιών καθώς ανιχνεύονται >98% των εμβρύων με τρισωμία 21, >98% των εμβρύων με τρισωμία 18 και >90% των εμβρύων με τρισωμία 13. Ενώ το μειονέκτημα της είναι η πιθανότητα ψευδώς θετικού αποτελέσματος λόγω ή μωσαϊκισμού του πλακούντα ή της ύπαρξης μητρικής χρωμοσωμικής ανωμαλίας, ή η ύπαρξη υπολειμμάτων από δίδυμο έμβρυο που σταμάτησε να αναπτύσσεται, καθώς επίσης και η πιθανότητα εργαστηριακού σφάλματος είναι υπαρκτή [65], [66], [67].

Μειονεκτήματα της μεθοδού είναι ότι τα θετικά ευρήματα χρήζουν επιβεβαίωσης με επεμβατική μέθοδο, η αδυναμία εφαρμογής της σε δίδυμες και πολύδυμες κυήσεις καθώς και ότι δεν δύναται να ανιχνεύσει χρωμοσωμικές ανωμαλίες μετά την 24η εβδομάδα της κύησης.

1.1.2.2 Οι επεμβατικές μέθοδοι

Οι επεμβατικές μέθοδοι προγεννητικού ελέγχου εφαρμόζονται για τη διάγνωση μεγάλου αριθμού μονογονιδιακών νοσημάτων, όπως αιμοσφαιρινοπάθειες, κυστική ίνωση, νευρομυϊκά νοσήματα καθώς και για τον έλεγχο χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου. Η λήψη του υλικού που δύνανται να εξετασθεί με αυτές τις μεθόδους θα πρέπει να γίνεται από έναν έμπειρο γυναικολόγο ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος επιπλοκών της κυήσεως και το δείγμα μπορεί να προκύψει, δείγμα έπειτα από λήψη χοριακών λαχνών (τροφοβλάστη, CVS) ή από αμνιοπαρακέντηση (αμνιακό υγρό).

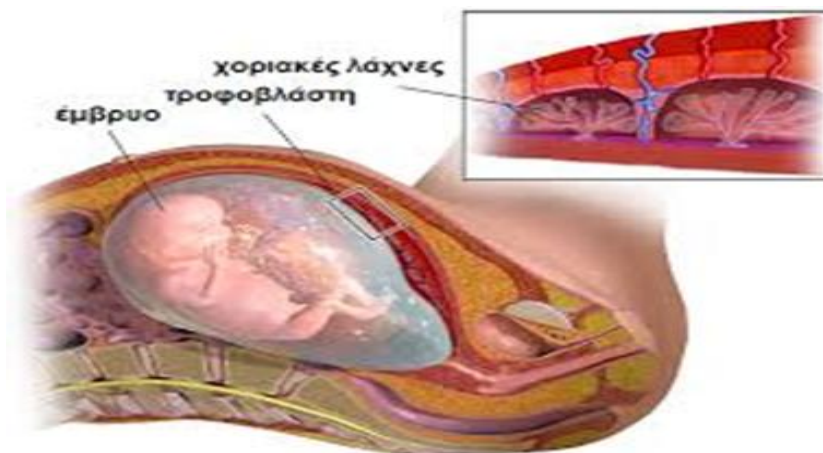
- Λήψη χοριακών λαχνών (Τροφοβλάστη, CVS, Chorionic Villus Sampling), πραγματοποιείται κατά την 10η με 14η εβδομάδα κύησης

Η λήψη τροφοβλάστης γίνεται από την 10η εβδομάδα της εγκυμοσύνης έως και την 14η εβδομάδα [1]. Πρώτη αναφορά έγινε το 1968 από τον Mohr αλλά επίσημα άρχισε να πραγματοποιείται μετά το 1980 [68], [69], [70]. Οι χοριακές λάχνες αποτελούν μικρές προεκβολές του πλακούντα και έχουν κύτταρα, που περιέχουν το ίδιο γενετικό υλικό με το έμβρυο, αφού προέρχονται από το ίδιο αρχικό γονιμοποιημένο ωάριο. Κατά τον πολλαπλασιασμό αυτού κάποια κύτταρα διαφοροποιούνται για να σχηματίσουν τους ιστούς του εμβρύου και αποτελούν την κυτταροτροφοβλάστη ή εμβρυοβλάστη, ενώ άλλα σχηματίζουν τον πλακούντα και λέγονται συγκυτιοτροφοβλάστη ή ενίοτε απλά "τροφοβλάστη". (Εικόνα 9) Τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης διαιρούνται πολύ γρήγορα και κατά συνέπεια μπορούν χρησιμοποιηθούν για χρωμοσωμική ανάλυση, χωρίς να καλλιεργηθούν [71]. Ο κίνδυνος αποβολής εξαιτίας της μεθόδου είναι 0,5%-1%. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι γίνεται νωρίτερα από την αμνιοπαρακέντηση, στο πρώτο τρίμηνο της κύησης και επιτρέπει την νωρίτερη διάγνωση κάποιας ανωμαλίας. Το μειονέκτημα της είναι ότι δεν είναι πάντα δυνατή η εκτέλεση της λήψης λόγω ανατομικών συνθηκών (θέση μήτρας, θέση πλακούντα, σωματική διάπλαση της εγκύου). Η λήψη τροφοβλάστης συνίσταται να εκτελείται μετά την 10η εβδομάδα διότι σε μικρότερες ηλικίες κύησης, η μέθοδος έχει ενοχοποιηθεί για ανωμαλίες των άκρων του εμβρύου [72].

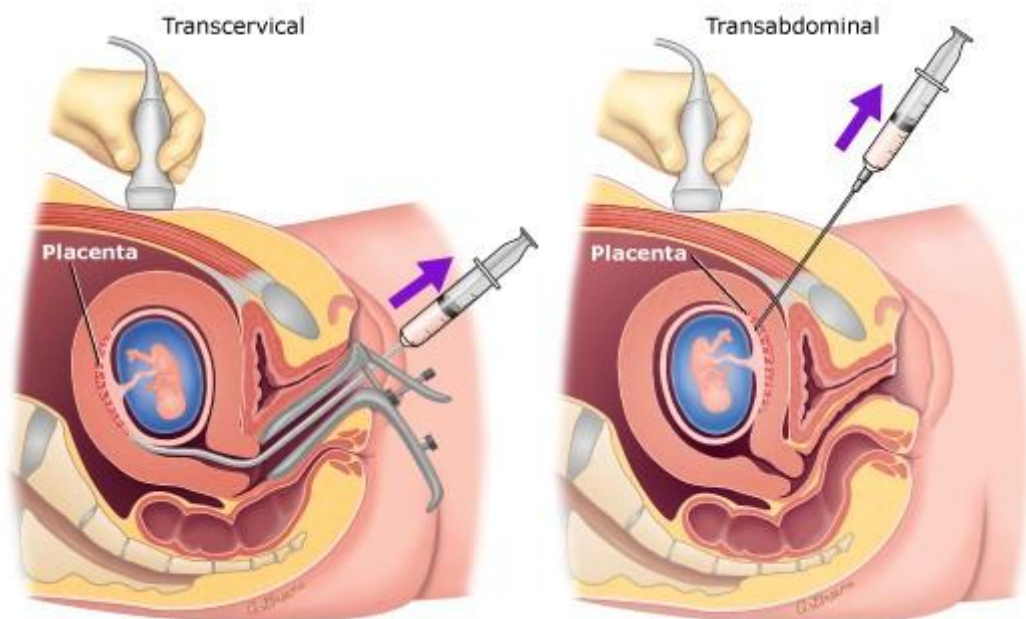
Η βιοψία της τροφοβλάστης ή αλλιώς η βιοψία των χοριακών λαχνών είναι η επεμβατική προγεννητική μέθοδος κατά την οποία λαμβάνεται τροφοβλαστικός ιστός διακοιλιακά ή διατραχηλικά. Η διακοιλιακή προσπέλαση θεωρήθηκε μια καλή μέθοδος λήψης τροφοβλάστης στις πρώτες εβδομάδες της κύησης με ένα ευρύ φάσμα ενδείξεων, υψηλά ποσοστά επιτυχίας περίπου 99,5% και δυνατότητα λήψης επαρκούς και αξιόπιστης ποσότητας δείγματος. Υπάρχουν όμως και ορισμένοι περιορισμοί ως προς την εφαρμογή της μεθόδου όπως για παράδειγμα η ύπαρξη ινομυωμάτων στη μήτρα της εγκύου που βρίσκονται σε τέτοια θέση (συνήθως στο πρόσθιο τοίχωμα) και έχουν τέτοιο μέγεθος που θα έκαναν αδύνατη ή πολύ τραυματική την προσπάθεια λήψης, επίσης εξαιτίας ανατομικών δυσκολιών της εγκύου όπως, στις περιπτώσεις οπίσθιας θέσης του πλακούντα με έντονη οπίσθια κλίση και κάμψη της μήτρας, καθώς και λόγω παχυσαρκίας της εγκύου. Σε αυτές τις περιπτώσεις επιλέγεται η διατραχηλική λήψη, η οποία με τη σειρά της δεν συνίσταται σε περιπτώσεις στένωσης του τραχηλικού στομίου της μήτρας, πρόσφατη κολπική αιμορραγία και σε περιπτώσεις έντονης φλεγμονής του τραχήλου της μήτρας (τραχηλίτιδα).

Κατά την διαδικασία της λήψης τροφοβλάστης εισάγεται διακοιλιακά μια ειδική βελόνα στην περιοχή των λαχνών του χορίου ή προωθείται διατραχηλικά ένας ειδικός εύκαμπτος καθετήρας στην ίδια περιοχή του χορίου (ανάλογα με την μέθοδο που έχει επιλεγεί να γίνει) και αναρροφάται τροφοβλαστικός ιστός 5-10mg υπό την καθοδήγηση πάντοτε των υπερήχων. Στις δύο αυτές τεχνικές βιοψίας τροφοβλάστης αλλά κυρίως στην περίπτωση της διατραχηλικής τεχνικής, υπάρχει ο κίνδυνος για λοίμωξη,

πρόκληση αιμορραγίας ή ακόμα και αποκόλλησης του πλακούντα για αυτό και προτιμάται λιγότερο [1].(Εικόνα 10)



Εικόνα 9: Απεικόνιση της μορφής και της θέσης της τροφοβλάστης και των χοριακών λαχνών [73]



Εικόνα 10: Απεικόνιση διαδικασίας λήψης τροφοβλάστης [74]

- Λήψη αμνιακού υγρού (αμνιοπαρακέντηση) πραγματοποιείται κατά την 15η με 22η εβδομάδα κύησης

Αμνιοπαρακέντηση έγινε για πρώτη φορά στη Γερμανία στις αρχές της δεκαετίας του 1880 [70], [72].

Το αμνιακό υγρό προστατεύει και τρέφει το έμβρυο κατά τη διάρκεια της κύησης. Ο όγκος του μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της κύησης (περί την 8η εβδομάδα ογκός του είναι 5ml-10ml, ενώ περίπου 250ml στην 20η εβδομάδα). Μεταξύ άλλων, περιέχει

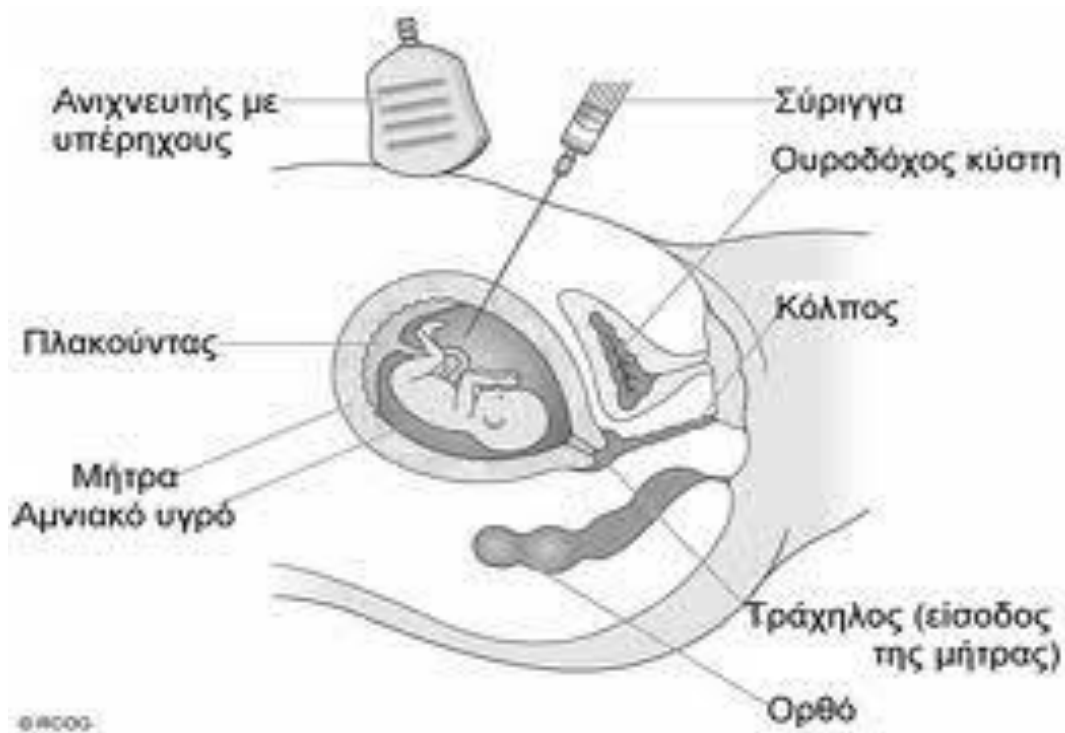
κύτταρα που προέρχονται από το δέρμα, τη στοματοφαρυγγική κοιλότητα και το ουροποιητικό σύστημα του εμβρύου.

Η αμνιοπαρακέντηση πρέπει να πραγματοποιείται από ιατρό μαιευτήρα γυναικολόγο που έχει μεγάλη εμπειρία σε αυτή την τεχνική, να διαθέτει υπέρηχο υψηλής ευκρίνειας και να είναι σε θέση να αντιμετωπίσει όλες τις πιθανές επιπλοκές που μπορεί να συμβούν εξαιτίας της λήψης. Δύναται να γίνει μετά από την 15η εβδομάδα μέχρι την 22η εβδομάδα αλλά και έως το τέλος της κύησης. Κατά την 15η με 16η εβδομάδα το αμνιακό υγρό βρίσκεται σε επαρκή ποσότητα και έτσι δύναται να αναρροφηθούν με ασφάλεια για την πραγματοποίηση της εξέτασης 20-30 ml. Η λήψη του αμνιακού υγρού γίνεται με την εισαγωγή μίας λεπτής βελόνας στην κοιλιά της εγκύου που εισέρχεται στον αμνιακό σάκο, υπό συνεχή υπερηχογραφική παρακολούθηση για την λήψη του αμνιακού υγρού που περιέχει κύτταρα που προέρχονται από ιστούς του ουροποιητικού, αναπνευστικού συστήματος του εμβρύου καθώς και το δέρμα του [1], [75]. (Εικόνα 11, Εικόνα 12)



Εικόνα 11: Απεικόνιση του τρόπου που γίνεται η αμνιοπαρακέντηση κάτω από υπερηχογραφική παρακολούθηση [76]

Ο κίνδυνος αποβολής εξαιτίας της αμνιοπαρακέντησης ανέρχεται σε ποσοστό 0,5%-1% [1]. Εκτός από την αυτόματη αποβολή μπορεί επίσης να προκληθεί μόλυνση, τραυματισμός ή αιμορραγία του εμβρύου όπως επίσης και εκροή αμνιακού υγρού, ο κίνδυνος αυτός είναι ουσιαστικά αμελητέος και εξαρτάται από την εμπειρία του γυναικολόγου ιατρού που εκτελεί την μέθοδο [77]. Πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου αποτελεί η πρώιμη διάγνωση βλαβών του εμβρύου, γεγονός που επιτρέπει έγκαιρη, παρέμβαση.



Εικόνα 12: Διαδικασία λήψης αμνιακού υγρού με αμνιοπαρακέντηση [78]

- Πρώιμη αμνιοπαρακέντηση <14 εβδομάδες κύησης

Μετά την αρχική έκθεση των Hanson et al το 1987 έχουν καταγραφεί αρκετές περιπτώσεις επιτυχούς εφαρμογής της μεθόδου πιθανόν εξαιτίας της θέλησής να υπάρχει μια μέθοδος κατά το πρώτο τρίμηνο που να μπορούσε να συγκριθεί με αυτή της λήψης τροφοβλάστης. Η διαδικασία είναι ίδια με αυτή της αμνιοπαρακέντησης, αλλά αναρροφάται μικρότερη ποσότητα αμνιακού υγρού αφού εξαιτίας της μικρής ηλικίας κύησης η συγκέντρωση του αμνιακού υγρού είναι μικρότερη, επομένως ανάλογα με την εβδομάδα της κύησης που εκτελούνταν η λήψη, λαμβάνονταν και η αντίστοιχη ποσότητα η οποία αντιστοιχεί σε 1 ml για κάθε εβδομάδα κύησης [1], [79], [80], [81]. Η πρώιμη αμνιοπαρακέντηση εφαρμόζονταν με πρόθεση να παραληφθεί η λήψη χοριακών λαχνών σε περίπτωση που υπήρχαν παθολογικά υπερηχογραφικά ευρήματα εξαιτίας της αδυναμίας της μεθόδου σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως η υποψία μωσαϊκισμού του πλακούντα, να χρήζει επιβεβαίωσης από αμνιοπαρακέντηση, αλλά δεν χρησιμοποιείται πλέον εξαιτίας του αυξημένου κινδύνου αποβολών και τραυματισμού του εμβρύου και ανωμαλίες των άκρων (δακτύλων), καθώς έχει συσχετισθεί και με πνευμονική υποπλασία [82].

- Λήψη εμβρυϊκού αίματος (PFBS, periumbilical fetal blood sampling, ομφαλιδοκέντηση), 19η-28η εβδομάδα κύησης

Η λήψη δείγματος εμβρυϊκού αίματος εφαρμόζεται σχετικά σπάνια και είναι δυνατή με την ομφαλιδοκέντηση. Η ομφαλιδοκέντηση είναι μία μέθοδος παρακέντησης της εμβρυϊκής κυκλοφορίας κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης. Η ανάλυση αυτή γίνεται μετά την 19η εβδομάδα της κύησης, κατόπιν λήψης εμβρυϊκού αίματος από την ομφαλική φλέβα, η ποσότητα του αίματος που αναρροφάται εξαρτάται από την ένδειξη που χρήζει διάγνωση αλλά δεν ξεπερνά τα 5 ml, υπό συνεχή υπερηχογραφική παρακολούθηση εισάγεται μια λεπτή βελόνα στον ομφάλιο λώρο με σκοπό την λήψη του εμβρυϊκού αίματος για τον εκτέλεση κυτταρογενετικών ή μοριακών εξετάσεων που εξασφαλίζουν την διάγνωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών ή άλλων παθήσεων του εμβρύου (κυρίως

καρδιολογικών παθήσεων), σε περιπτώσεις καθυστέρησης της ενδομήτριας ανάπτυξης (Intra Uterine Growth Restriction-IUGR) του εμβρύου, για διάγνωση αιματολογικών νοσημάτων (δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, β-θαλασσαιμίας ή άλλες αιμοσφαιρινοπάθειες), ταυτοποίηση πιθανής μόλυνσης του εμβρύου από ιογενείς, βακτηριακές ή παρασιτικές λοιμώξεις, καθώς και προς επιβεβαίωση ή όχι ευρημάτων μωσαϊκισμού του εμβρύου που ανιχνεύθηκαν μετά από αμνιοπαρακέντηση ή λήψη χοριακών λαχνών [83].

Το ποσοστό αυτόματης αποβολής για το έμβρυο ανέρχεται σε ποσοστό 1,4% εάν η μέθοδος εφαρμοστεί πριν την 28η εβδομάδα, αλλά και μετά την 28η εβδομάδα υπάρχει ένα ποσοστό της τάξεως του 1,4% περιγεννητικού θανάτου. Επομένως το συνολικό ποσοστό επιπλοκών ανέρχεται στο 2,8%, συμφωνά με έρευνα του 1993 που έγινε από τους Ghidini et al [84], [85]. Ωστόσο η στατιστική σύγκριση κινδύνου της ομφαλιδοκέντησης με τις άλλες επεμβατικές μεθόδους είναι δύσκολη αν και ενέχει μεγαλύτερο κίνδυνο από ότι φέρουν οι άλλες δυο μέθοδοι (CVS και αμνιοπαρακέντηση) καθώς τα έμβρυα που υποβάλλονται σε λήψη εμβρυϊκού αίματος (PFBS) εμφανίζουν ήδη αυξημένο κίνδυνο περιγεννητικού θανάτου.

1.2 ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

1.2.1 Γενικά

Η κυτταρογενετική είναι η επιστήμη που μελετά τον αριθμό και τη δομή των χρωμοσωμάτων του ανθρώπου. Χρονολογείται αρκετά παλιά καθώς ο όρος “χρωμόσωμα” αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1888 από τον Waldeyer. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες απαντώνται στο ~1% (περίπου) των νεογέννητων βρεφών, στο 2% περίπου όλων των κυήσεων γυναικών άνω των 35 ετών, οι οποίες υπόκεινται σε προγεννητικό έλεγχο, καθώς και στο 50% όλων των αποβολών που σημειώνονται στο πρώτο τρίμηνο της κύησης [86].

Το 1956 οι Tjio και Levan βρήκαν και δημοσίευσαν πρώτοι ότι ο σωστός αριθμός των χρωμοσωμάτων του ανθρώπου είναι 46 (23 ζεύγη) και όχι 48 όπως πίστευαν μέχρι τότε. Τα 22 ζεύγη, που είναι κοινά σε αρσενικά και θηλυκά άτομα, καλούνται αυτοσωμικά ενώ το 23ο είναι το φυλετικό ζευγάρι, που αποτελείται από τα χρωμοσώματα X και Y στα αρσενικά και δύο χρωμοσώματα X στα θηλυκά άτομα. Τα μέλη ενός ζεύγους (τα οποία ονομάζονται ομόλογα χρωμοσώματα) φέρουν την ίδια γενετική πληροφορία, δηλαδή έχουν τους ίδιους γενετικούς τόπους με την ίδια διάταξη, αν και σε κάθε γενετικό τόπο μπορεί να έχουν είτε πανομοιότυπες είτε ελαφρώς διαφορετικές μορφές, οι οποίες ονομάζονται αλληλόμορφα. Το ένα μέλος κάθε ζεύγους κληρονομείται από τον πατέρα, ενώ το άλλο από τη μητέρα [87], [88].

Η ανάλυση των χρωμοσωμάτων του ανθρώπου απαιτεί διαιρούμενα κύτταρα στο στάδιο που τα χρωμοσώματα έχουν τον υψηλότερο βαθμό συμπύκνωσης δηλαδή στην μετάφαση. Αυτό επιτεύχθηκε με την επεξεργασία των κυττάρων με κολχικίνη η οποία παρεμποδίζει την ολοκλήρωση της κυτταρικής διαίρεσης [89].

Η ανάπτυξη και εφαρμογή τεχνικών χρώσης και ταινιοποίησης (κυρίως των ταινιών G) έκανε εφικτή την αναγνώριση των χρωμοσωμάτων καθώς και των χρωμοσωμικών αλλαγών με μεγάλη λεπτομέρεια. Άλλες τεχνικές χρώσης που χρησιμοποιούνται εκτός των ταινιών G, είναι οι ταινίες Q, ταινίες R, χρώση NOR και χρώση C. Πιο αναλυτικά:

Οι ταινίες G: Επιτυγχάνονται με χρήση του ενζύμου θρυψίνη και κατάλληλης χρωστικής (συνήθως Giemsa). Οι σκουρόχρωμες ταινίες ζώνες G, είναι πλούσιες σε Αδενίνη και Θυμίνη (A,T) και αντιπροσωπεύουν συνήθως ετεροχρωματίνη ή περιοχές που περιέχουν λίγα γονίδια. Οι ανοιχτόχρωμες ταινίες G είναι πλούσιες σε Κυτοσίνη και Γουανίνη (CG) και αντιπροσωπεύουν συνήθως ετεροχρωματίνη και είναι πλούσιες σε γονίδια.

Οι ταινίες Q: Γίνεται με την χρωστική κινακρίνη (quinacrine). Το χρωμόσωμα παρουσιάζει σκοτεινές και φωτεινές ζώνες. Οι χρωμοσωμικές περιοχές πλούσιες σε Αδενίνη και Θυμίνη δεσμεύουν περισσότερη κινακρίνη και φθορίζουν πιο έντονα.

Οι ταινίες R: Στην τεχνική αυτή τα χρωμοσώματα παρουσιάζουν ζώνωση αντίστροφη από αυτήν των ζωνών G και Q.

Η χρώση NOR: Απεικονίζει τους δορυφόρους των ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων.

Η χρώση C: Απεικονίζει επιλεκτικά περιοχές ετεροχρωματίνης όπως για παράδειγμα το κεντρομερίδιο των χρωμοσωμάτων [90].

1.2.2 Τι είναι τα χρωμοσώματα

Το γενετικό υλικό στον άνθρωπο είναι οργανωμένο σε χρωμοσώματα που βρίσκονται στον πυρήνα κάθε κυττάρου και αποτελούνται από DNA και πρωτεΐνες. Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης στο στάδιο της μετάφασης, τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται τόσο ώστε να είναι ορατά με το μικροσκόπιο απλού φωτός και έτσι είναι δυνατή η παρατήρησή τους. Κάθε χρωμόσωμα αποτελείται από δύο αδερφές χρωματίδες οι οποίες ενώνονται στο κεντρομερίδιο (centromere) που είναι ορατό ως μια περίσφιξη κατά μήκος του χρωμοσώματος [91], [92].

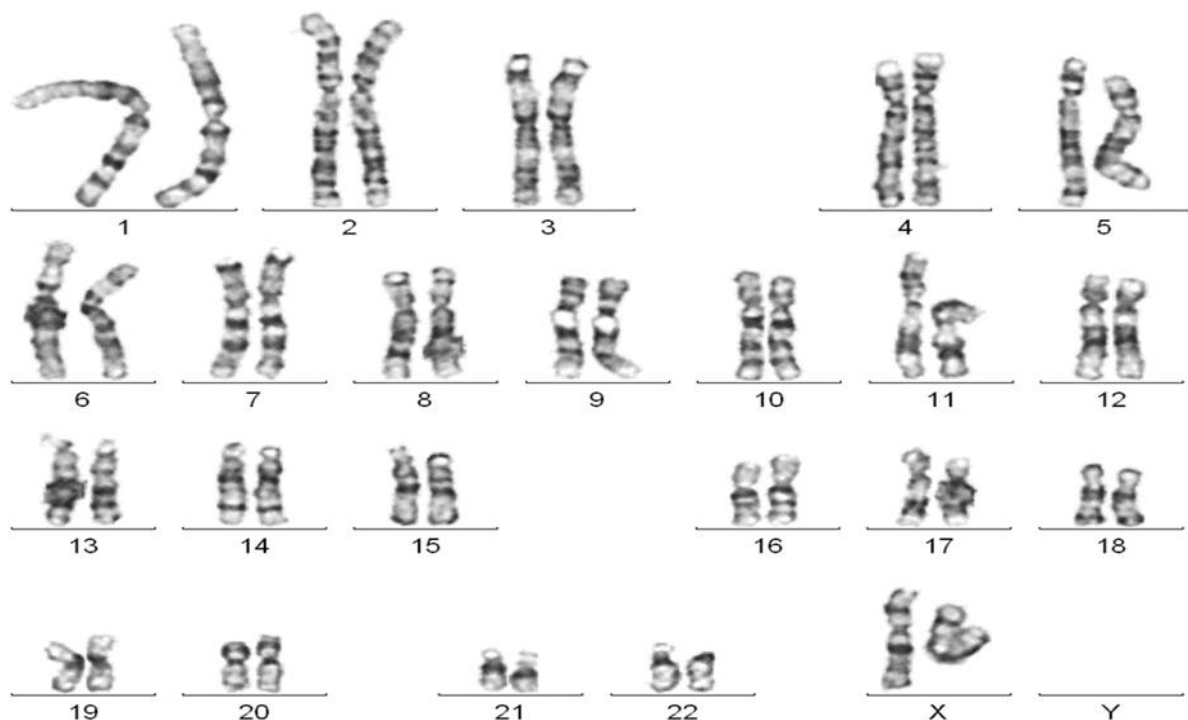
Κάθε σωματικό κύτταρο του ανθρώπινου οργανισμού υπό φυσιολογικές συνθήκες περιέχει 46 χρωμοσώματα που ταξινομούνται σε 22 ζεύγη αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων και ένα ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων X και Y.

Τα χρωμοσώματα ταξινομούνται με βάση το μέγεθος και τη θέση του κεντρομεριδίου στις ακόλουθες ομάδες:

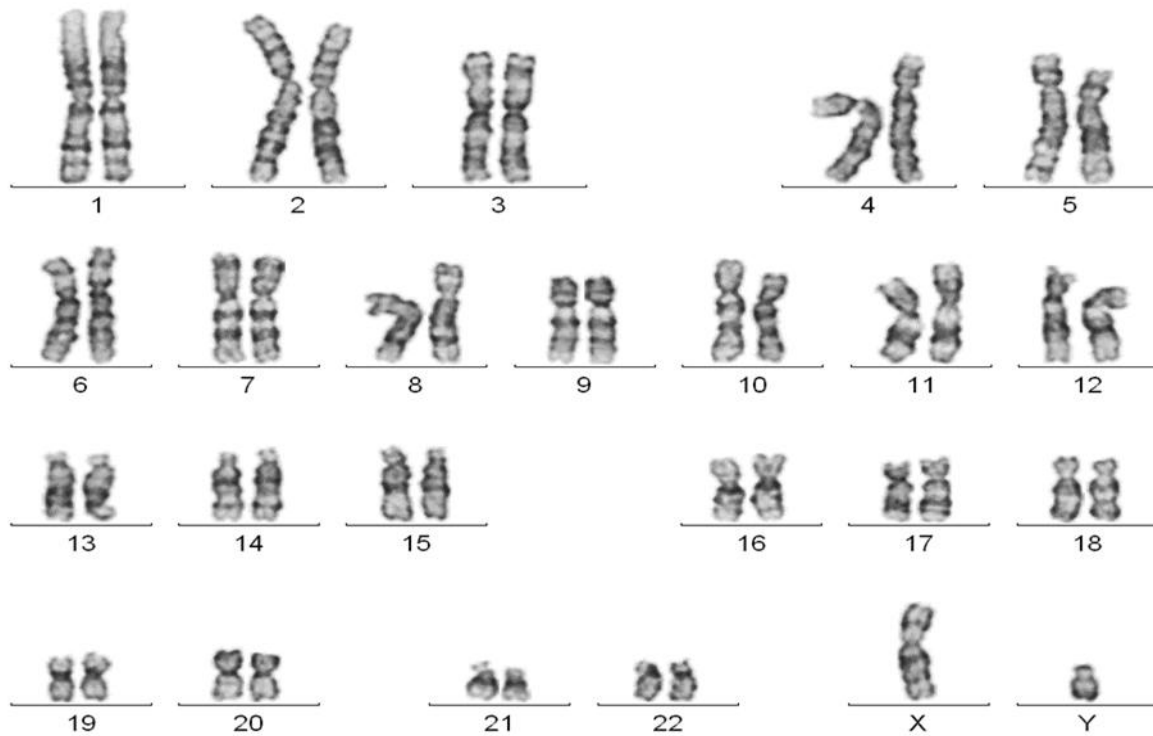
- **Ομάδα A:** 1^ο έως και 3^ο χρωμόσωμα.
- **Ομάδα B:** 4^ο έως και 5^ο χρωμόσωμα.
- **Ομάδα C:** 6^ο έως και 12^ο χρωμόσωμα και το φυλετικό χρωμόσωμα X.
- **Ομάδα D:** 13^ο έως και 15^ο χρωμόσωμα.
- **Ομάδα E:** 16^ο έως και 18^ο χρωμόσωμα.
- **Ομάδα F:** 19^ο έως και 20^ο χρωμόσωμα.
- **Ομάδα G:** 21^ο έως και 22^ο χρωμόσωμα και το φυλετικό χρωμόσωμα Y. [93]

Η ταξινόμηση των χρωμοσωμάτων ανά δυο σε ομόλογα ζεύγη και η πλήρης περιγραφή της χρωμοσωμικής σύστασης του κυττάρου ονομάζεται καρυότυπος.

Ο φυσιολογικός καρυότυπος θήλεος περιγράφεται: 46,XX και ο φυσιολογικός καρυότυπος άρρενος 46,XY [76] [78] [94]. (Εικόνα 13, Εικόνα 14)



Εικόνα 13: Φυσιολογικός καρυότυπος θήλεος: 46,XX [95]



Εικόνα 14: Φυσιολογικός καρυότυπος άρρενος: 46,XY [95]

Τα χρωμοσώματα αναγνωρίζονται και ξεχωρίζουν μεταξύ τους με βάση τα ακόλουθα χαρακτηριστικά τους :

α. Το μέγεθος τους,

β. Θέση κεντομεριδίου: Με βάση τη θέση του κεντρομεριδίου τα χρωμοσώματα διακρίνονται σε: (Εικόνα 16)

- Μετακεντρικά: το κεντρομερίδιο βρίσκεται στη μέση του χρωμοσώματος και χωρίζει το χρωμόσωμα σε δυο σχεδόν ισομεγέθεις βραχίονες (p και q).

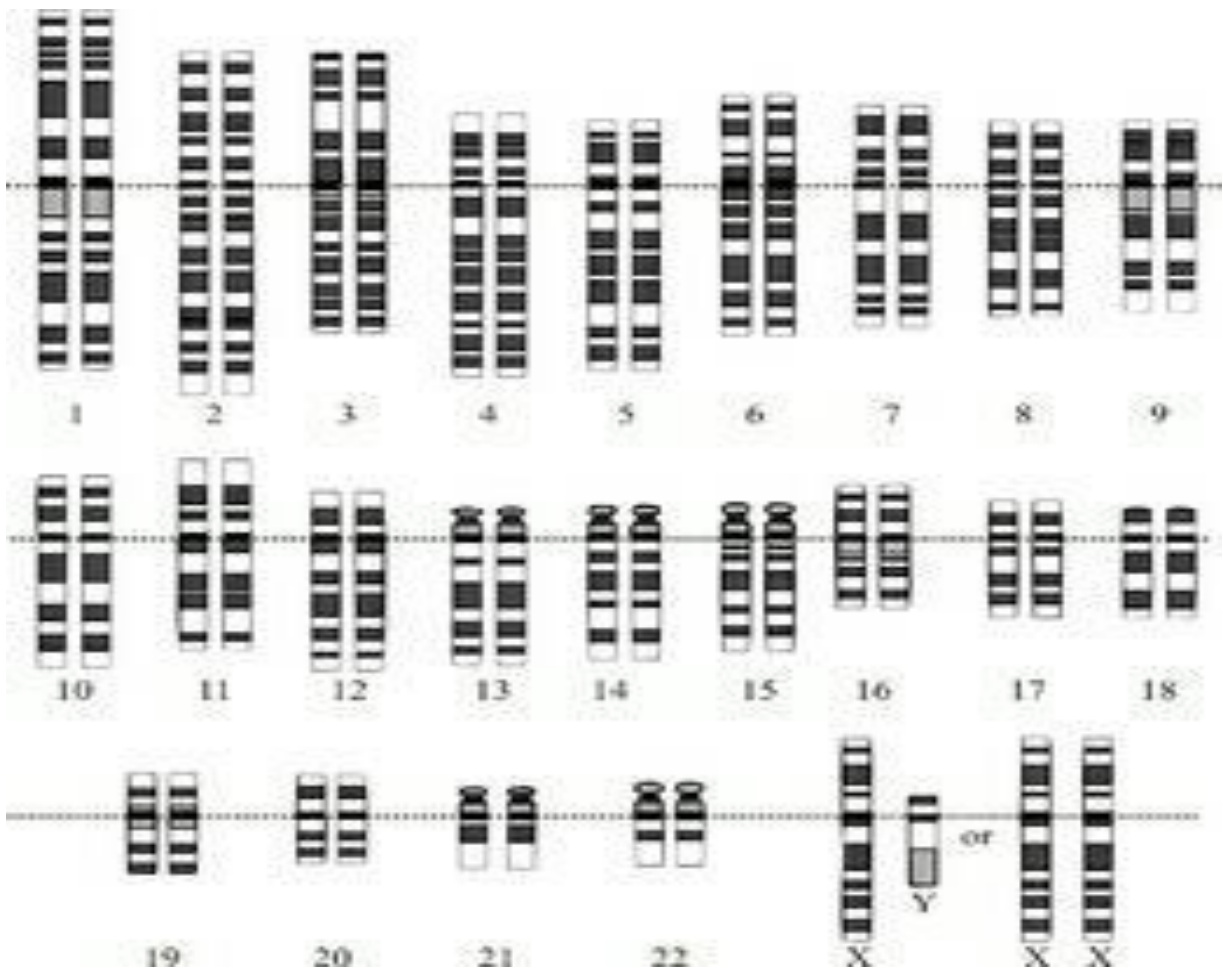
- Υπομετακεντρικά: το κεντρομερίδιο χωρίζει το χρωμόσωμα σε δύο ανισομεγεθείς βραχίονες. Έναν μικρό (p-retit) και έναν μεγάλο (q-queue).

- Ακροκεντρικά: Το κεντρομερίδιο βρίσκεται σχεδόν στο ένα άκρο του χρωμοσώματος. (Πίνακας 4)

γ. Πρότυπο ζώνωσης. Με την εφαρμογή συγκεκριμένων τεχνικών χρώσης, διαμορφώνεται κατά μήκος κάθε χρωμοσώματος ένα μοναδικό πρότυπο εναλλασσόμενων σκουρόχρωμων και ανοιχτόχρωμων ταινιών (ζωνών), με βάση το οποίο κάθε χρωμόσωμα ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα και ταυτοποιείται [93], [95]. (Εικόνα 15)

Πίνακας 4: Κατάταξη των χρωμοσωμάτων με βάση την ομάδα, το μέγεθος και τη θέση του κεντρομεριδίου τους.

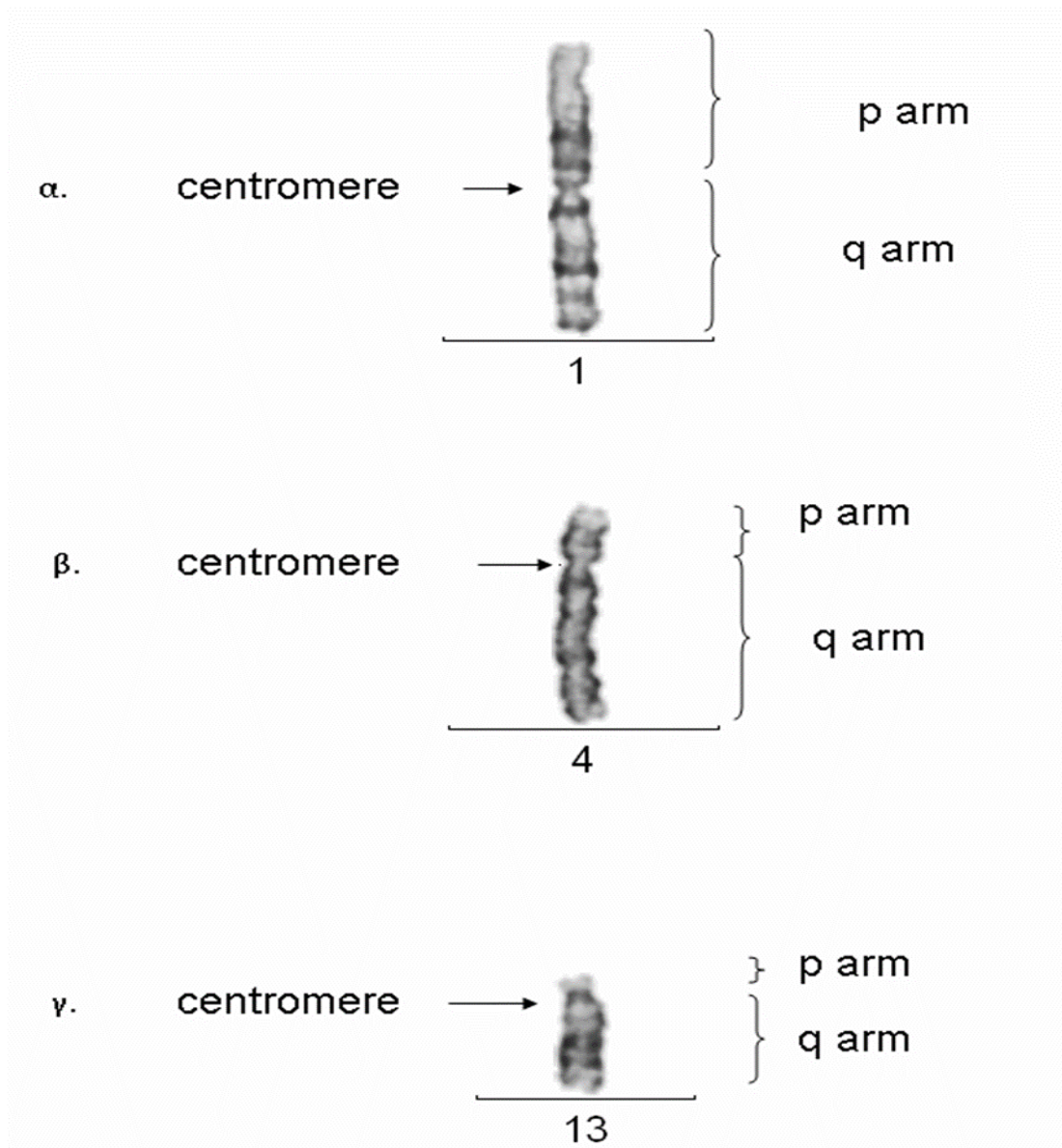
ΟΜΑΔΕΣ	ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΘΕΣΗ ΚΕΝΤΡΟΜΕΡΙΔΙΟΥ
A	1-3	Μεγάλα Μετακεντρικά
B	4,5	Μεγάλα Υπομετακεντρικά
C	6-12, X	Μεσαία Υπομετακεντρικά
D	13-15	Μεσαία Ακροκεντρικά
E	16-18	Μικρά Υπομετακεντρικά
F	19, 20	Μικρά Μετακεντρικά
G	21, 22, Y	Πολύ μικρά, Ακροκεντρικά



Εικόνα 15: Πρότυπο ζώνωσης των ανθρώπινων μεταφασικών χρωμοσωμάτων [96]

- **Ταινία** ή ζώνη (band) ορίζεται το τμήμα εκείνο του χρωμοσώματος που διακρίνεται καθαρά από τα διπλανά του με κριτήριο την σκοτεινότερη ή φωτεινότερη ένταση του.

Τα επιμέρους πρότυπα ζώνωσης για κάθε χρωμόσωμα είναι καταχωρημένα και απεικονίζονται με ιδεογράμματα στο διεθνώς αποδεκτό σύστημα ονοματολογίας ISCN 2016 (ISCN – An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2016) [97].



Εικόνα 16: Κατηγορίες χρωμοσωμάτων με βάση τη θέση του κεντρομεριδίου

α. Μετακεντρικό β. Υπομετακεντρικό γ. Ακροκεντρικό

Όπως φαίνεται στην εικόνα, κάθε χρωμόσωμα διακρίνεται επίσης και με βάση το δικό του ξεχωριστό πρότυπο εναλλασσόμενων σκουρόχρωμων και ανοιχτόχρωμων ταινιών (banding pattern) [95].

1.2.3 Διαδικασία και στάδια της κυτταρικής διαίρεσης

Κυτταρικός κύκλος, Περιγραφή γενικά

Η δημιουργία μιας ανθρώπινης οντότητας ξεκινά με τη γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζώαριο. Το γονιμοποιημένο αυτό ωάριο είναι το ζυγωτό, δηλαδή είναι ένα διπλοειδές κύτταρο, από το οποίο προκύπτουν τα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος έπειτα από επαναλαμβανόμενους κύκλους κυτταρικής ανάπτυξης και διαίρεσης (κυτταρικός κύκλος). (Εικόνα 17)

Η διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης διακρίνεται στο στάδιο της μίτωσης (πυρηνική διαίρεση) και στο στάδιο της κυτταροκίνησης (διαίρεση κυτταροπλάσματος).

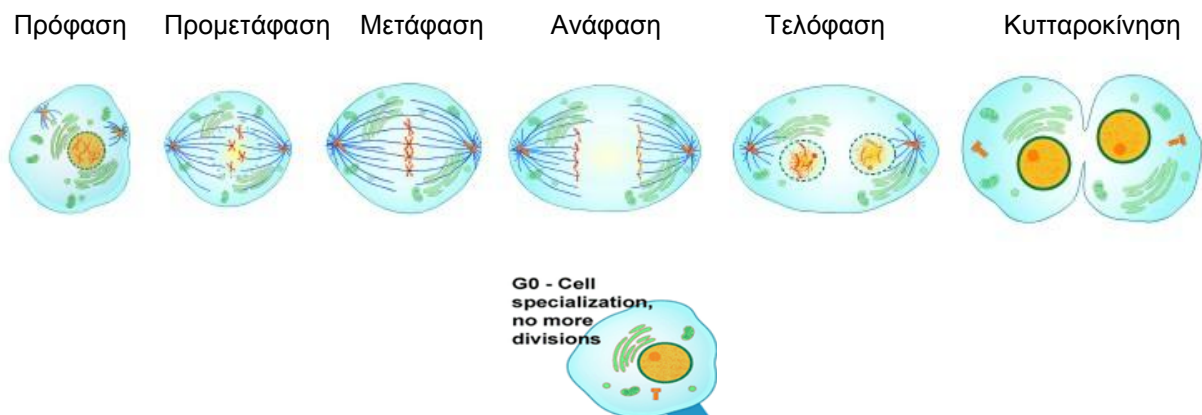
Αναλυτικότερα τα στάδια της διαίρεσης είναι η:

1. Πρόφαση (είναι το μεγαλύτερο σε διάρκεια στάδιο):
 - τα ινίδια της χρωματίνης αρχίζουν να περιελλίσσονται και να συμπυκνώνονται για να πάρουν τη χαρακτηριστική μορφή των χρωμοσωμάτων, γίνονται ορατά με το οπτικό μικροσκόπιο.
 - οι άξονες της ατράκτου εξέρχονται από τα κεντροσωμάτια,
 - ο πυρηνικός φάκελος αποδιοργανώνεται,
 - οι πυρηνίσκοιο εξαφανίζονται.
2. Προμετάφαση:
 - τα χρωμοσώματα συνεχίζουν να είναι συμπηκνωμένα,
 - οι μικροσωληνίσκοι της μιτωτικής ατράκτου ενώνονται με τα κεντρομερίδια των χρωμοσωμάτων
 - τα κεντροσωμάτια κινούνται προς αντίθετους πόλους.
3. Μετάφαση:
 - η μιτωτική άτρακτος είναι πλήρως ανεπτυγμένη, τα κεντροσωμάτια βρίσκονται στους αντίθετους πόλους του κυττάρου,
 - τα χρωμοσώματα εγκαταλείπουν τις τυχαίες θέσεις που κατέλαβαν κατά την πρόφαση,
 - κάθε αδερφή χρωματίδα αρχίζει να μετακινείται κατά μήκος των νηματίων της ατράκτου προς το ισημερινό επίπεδο του κυττάρου και τοποθετείται παράλληλα προς αυτό.
- Κατά την μετάφαση συνεχίζεται η συμπήκνωση της χρωματίνης. Στο τέλος τα χρωμοσώματα έχουν μέγιστο βαθμό συμπύκνωσης για αυτό είναι περισσότερο διακριτά από όσο σε κάθε άλλη φάση του κυτταρικού κύκλου και προτιμούνται κατά την κυτταρογενετική ανάλυση.
4. Ανάφαση:
 - διαίρεση του κεντρομεριδίου κάθε χρωμοσώματος,
 - κάθε αδερφή χρωματίδα ανεξαρτητοποιείται από την άλλη,
 - οι μικροσωληνίσκοι της ατράκτου ασκούν αντίθετη έλξη στα κεντρομερίδια,
 - οι αδερφές χρωματίδες αποχωρίζονται και κινούνται προς αντίθετο πόλο και γίνονται ανεξάρτητα χρωμοσώματα.
5. Τελοφαση:
 - τα χρωμοσώματα που δημιουργήθηκαν κατά την ανάφαση φθάνουν στον πόλο του κυττάρου στον οποίο κατευθύνονταν,
 - αποδιοργανώνεται η άτρακτος,
 - επανεμφανίζονται οι πυρηνικοί φάκελοι,
 - δημιουργούνται δύο θυγατρικοί πυρήνες,
 - τα χρωμοσώματα επανέρχονται στη μορφή του δικτύου χρωματίνης της μεσόφασης και επανασχηματίζεται ο πυρηνίσκος.

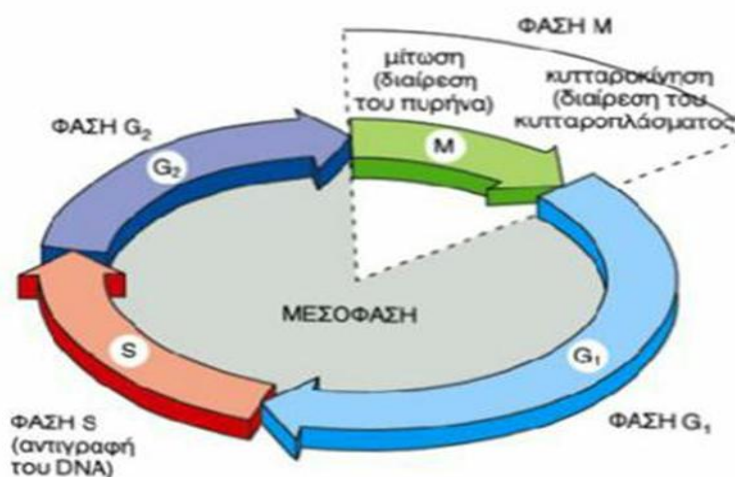
Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της κυτταρικής διαίρεσης, κυτταροκίνηση, όπου:

- γίνεται η πυρηνική διαίρεση,
- δημιουργούνται πανομοιότυποι πυρήνες που μοιράζονται το ίδιο κυτταρόπλασμα,
- γίνεται διαίρεση του κυτταροπλάσματος,
- σχηματίζονται δύο αυτοτελεί θυγατρικά κύτταρα.

Σημειώνεται ότι η μίτωση και η κυτταροκίνηση που αποτελούν το στάδιο της μεσόφασης καλύπτουν σχεδόν το 95% της διάρκειας του κυτταρικού κύκλου [86]. Οι φάσεις G₁, G₂ και η φάση S αποτελούν τη μεσόφαση η οποία είναι η περίοδος ανάμεσα σε δύο διαδοχικές μιτώσεις. Η φάσεις G₁ και G₂ είναι οι φάσεις ανάπτυξης του κυτάρου στις οποίες συντίθενται οι πρωτεΐνες και παράγονται τα κυτταρικά οργανίδια, ενώ κατά τη διάρκεια της φάσης S πραγματοποιείται η αντιγραφή του DNA. (Εικόνα 18) Σε περίπτωση που οι συνθήκες του περιβάλλοντος δεν είναι κατάλληλες για διαίρεση του κυτάρου, τα κύτταρα καθυστερούν την είσοδο στην φάση G₁ και οδηγούνται σε φάση ηρεμίας την φάση G₀, στην οποία μπορούν να παραμείνουν για αρκετό διάστημα [86], [93].



Εικόνα 17: Στάδια του κυτταρικού κύκλου [98]



Εικόνα 18: Στάδια που συμβαίνουν κατά την φάση της μεσόφασης [99]

1.2.4 Είδη Χρωμοσωμικών ανωμαλιών

Οποιαδήποτε αλλαγή των χρωμοσωμάτων σε σχέση με το φυσιολογικό, χαρακτηρίζεται ως χρωμοσωμική ανωμαλία.

Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες διακρίνονται σε αριθμητικές και δομικές. Αρκετές φορές, οι χρωμοσωμικές αλλαγές μπορεί να είναι αρκετά πολύπλοκες και να διαταράσσουν το ισοζύγιο του γενετικού υλικού στο κύτταρο. (Εικόνα 19)

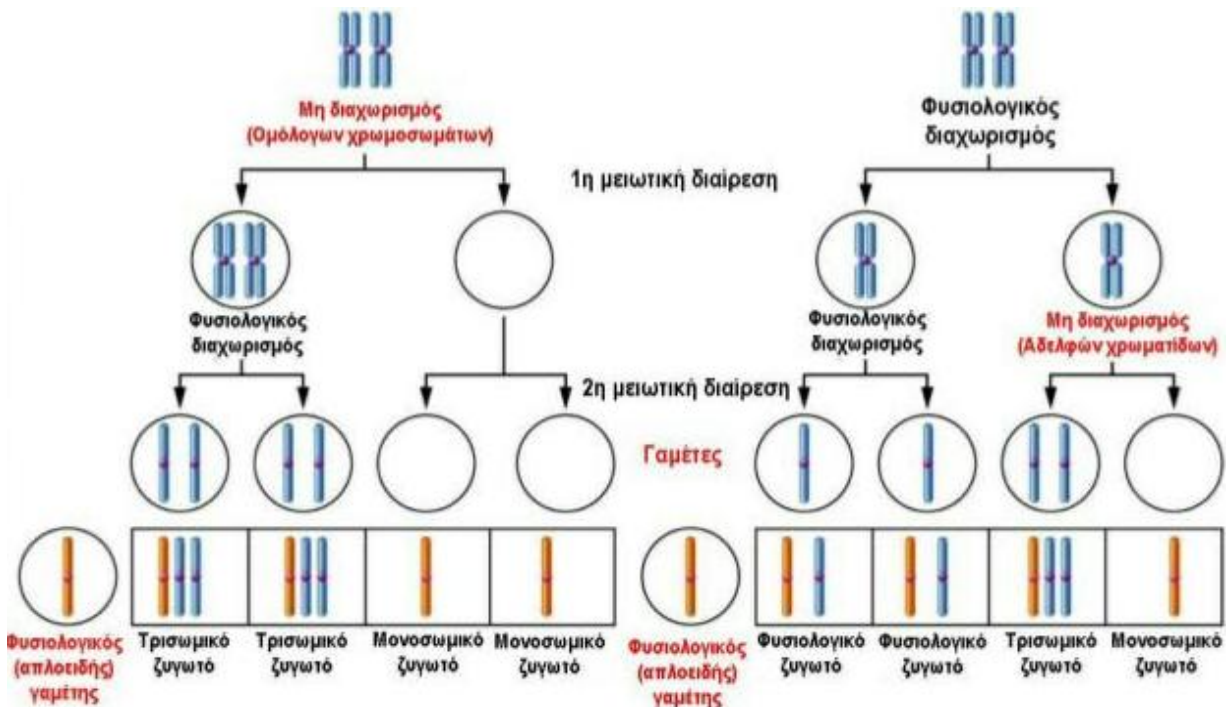
➤ Αριθμητικές ανωμαλίες: Οποιαδήποτε απόκλιση από τον φυσιολογικό αριθμό των χρωμοσωμάτων χαρακτηρίζεται ως αριθμητική ανωμαλία. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αριθμητικών ανωμαλιών είναι η τρισωμία 21 (σύνδρομο Down), τρισωμία 18 (σύνδρομο Edwards) τρισωμία 13, (σύνδρομο Patau) το σύνδρομο Klinefelter (47,XXY), το σύνδρομο Turner (45,X) [100] [101] [102].

Τριπλοειδία και Τετραπλοειδία

Μια σπάνια περίπτωση χρωμοσωμικής ανωμαλίας μη συμβατής με τη ζωή είναι η τριπλοειδία. Τα έμβρυα που φέρουν αυτή την ανωμαλία, ακόμα και αν φθάσουν ως την γέννηση αποβιώνουν σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Αντιθέτως τα έμβρυα που φέρουν τετραπλοειδίες δεν φτάνουν ως την γέννηση τους και για αυτό αυτή η ανωμαλία έχει ταυτοποιηθεί μόνο σε προϊόντα αποβολής καθώς δεν είναι συμβατή με τη ζωή [88].

Τα έμβρυα που φέρουν μια τέτοια ανωμαλία δεν δύναται να φτάσουν έως το τέλος του πρώτου τριμήνου της κύησης. Οι αιτίες που προκαλούν αυτές τις ανωμαλίες στο έμβρυο συμβαίνουν λόγω:

- γονιμοποίησης του ωαρίου από δύο σπερματοζωάρια (δισπερμία).
- αποτυχίας μιας εκ των δύο μειωτικών διαιρέσεων, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός διπλοειδούς ωαρίου ή σπερματοζωαρίου.



Εικόνα 19: Απεικόνιση ανώμαλου χρωμοσωμικού διαχωρισμού [103]

➤ **Δομικές ανωμαλίες:** Οποιαδήποτε απόκλιση της δομής των χρωμοσωμάτων από το φυσιολογικό πρότυπο χαρακτηρίζεται ως δομική ανωμαλία. Οι αλλαγές αυτές στη δομή ενός οι περισσότερων χρωμοσωμάτων σχετίζονται και με αλλαγές της γονιδιακής σύστασης του χρωμοσώματος και όσο πιο μεγάλο τμήμα του χρωμοσώματος αφορά η αλλαγή αυτή τόσο περισσότερα γονίδια συμπεριλαμβάνει. (Εικόνα 20) Οι δομικές ανωμαλίες μπορεί να είναι ισοζυγισμένες (όταν δεν διαταράσσουν το ποσοτικό ισοζύγιο του γενετικού υλικού στο κύτταρο) ή μη ισοζυγισμένες (όταν διαταράσσουν το ποσοτικό ισοζύγιο του γενετικού υλικού στο κύτταρο) [10] [104].

Οι δομικές ανωμαλίες μπορεί να οφείλονται στην θραύση τμήματος των χρωμοσωμάτων και την λανθασμένη επαναδιάταξη αυτών των χρωμοσωμικών θραυσμάτων. Οι παράγοντες που ενοχοποιούνται για την πρόκληση δομικών ανωμαλιών είναι η ιονίζουσα ακτινοβολία, ορισμένοι ιοί που προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις, η έκθεση σε διάφορες χημικές ουσίες, κ.α.

Όπως οι αριθμητικές έτσι και οι δομικές ανωμαλίες μπορεί να εμφανίζονται σε όλα τα κύτταρα ενός ατόμου ή σε μωσαϊκή μορφή (δύο κυτταρικές σειρές ή και παραπάνω).

Μερικές αναδιατάξεις είναι σταθερές και μπορεί να μεταβιβάζονται στις επόμενες γενιές αναλλοίωτες κατά την μείωση ή τη μίτωση ενώ άλλες είναι ασταθείς [87].

Διάφοροι τύποι δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι οι:

➤ **Ισοζυγισμένες Αναδιατάξεις**

Τα χρωμοσώματα στο σύνολό τους περιέχουν τη σωστή ποσότητα γενετικού υλικού (σωστή γενετική πληροφορία), για αυτό συνήθως δεν έχουν επιπτώσεις στο φαινότυπο του ατόμου αλλά υπάρχει πιθανότητα εμφάνισης σοβαρών προβλημάτων στους απόγονους τους και αυτό διότι οι φορείς ισοζυγισμένων αναδιατάξεων είναι δυνατόν να παράγουν μη ισοζυγισμένους γαμέτες επομένως διατρέχουν τον κίνδυνο να αποκτήσουν απογόνους με μη ισοζυγισμένους καρυότυπους. Επίσης, υπάρχει πιθανότητα κάποιο από τα σημεία χρωμοσωμικής θραύσης να διακόψει ένα γονίδιο και έτσι να διαταραχθεί η φυσιολογική λειτουργία του εκάστοτε γονιδίου [87].

- **Αναστροφή (inversion-inv):** συμβαίνει όταν ένα χρωμόσωμα σπάει σε συγκεκριμένα σημεία θραύσης και το τμήμα που αποκόπτεται, επανενώνεται ανεστραμμένο με το χρωμόσωμα.

Οι αναστροφές διακρίνονται σε:

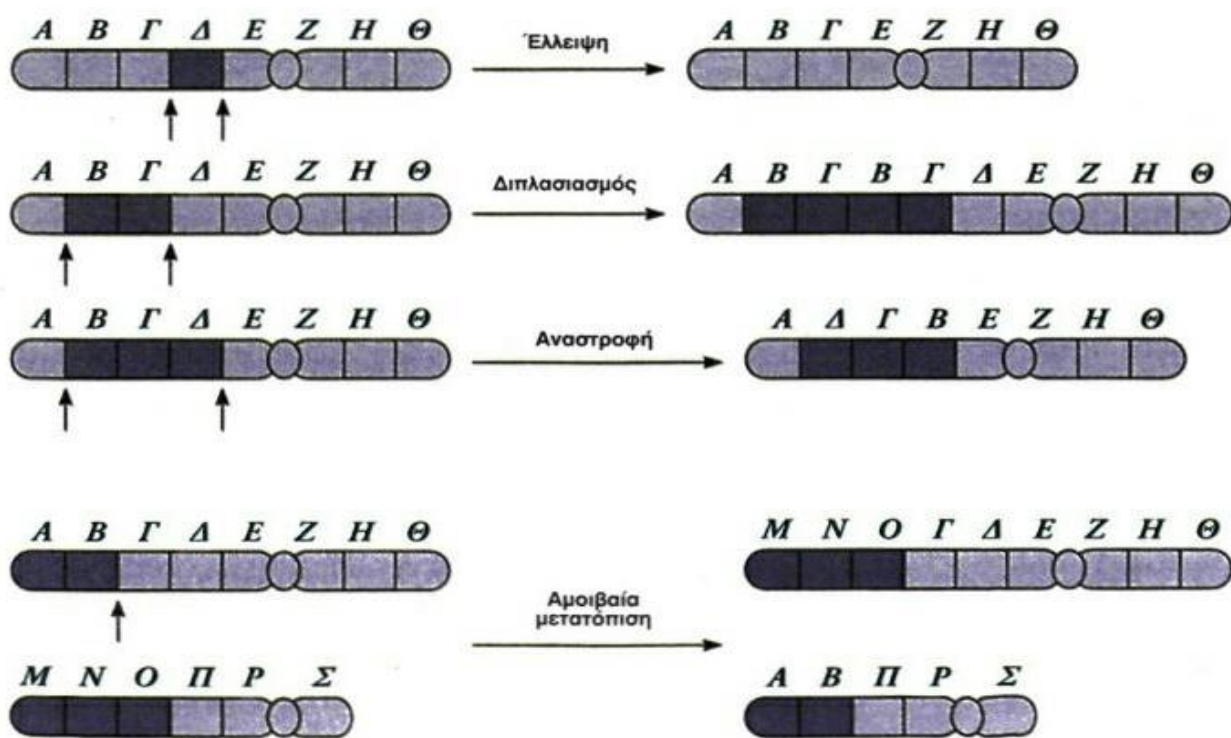
-περικεντρικές, όταν η χρωμοσωμική περιοχή που αναστρέφεται περιλαμβάνει και το κεντρομερίδιο και

-παρακεντρικές, όταν η χρωμοσωμική περιοχή που αναστρέφεται δεν περιλαμβάνει το κεντρομερίδιο.

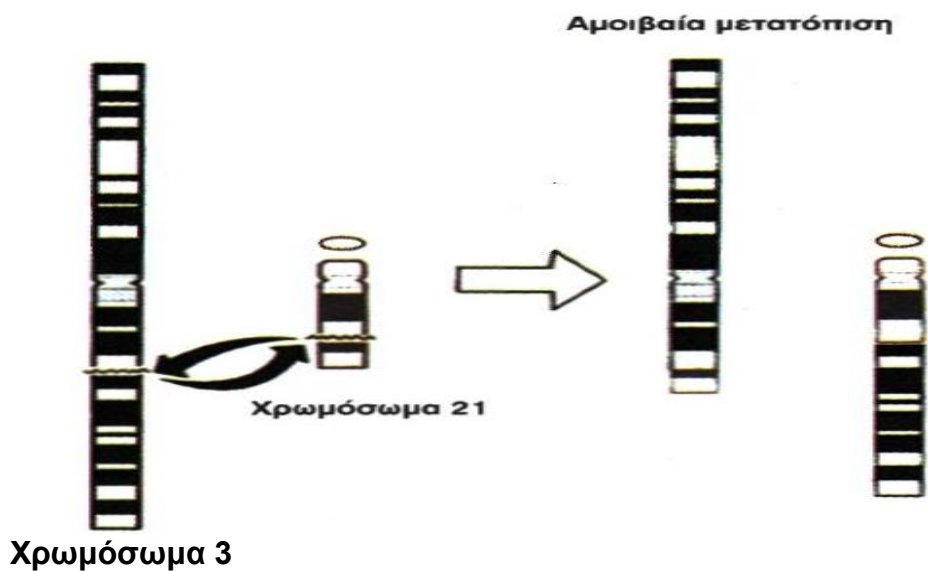
- **Μετάθεση (translocation-t) ή αλλιώς αμοιβαία μετατόπιση:** συμβαίνει όταν μεταξύ δύο, ή και περισσότερων χρωμοσωμάτων, συγκεκριμένα τμήματα αλλάζουν θέση.(Εικόνα 21)

➤ **Μετάθεση ροβερτιανού τύπου (robertsonian translocation-rob)** είναι ένας ειδικός τύπος μετάθεσης που αφορά τα ακροκεντρικά χρωμοσώματα 13, 14, 15, 21, 22. Οι δύο μεγάλοι βραχίονες αυτών των ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων μέσω της μετάθεσης συνενώνονται και προκύπτει ένα μεγάλο χρωμόσωμα. (Εικόνα 22)

- **Ένθεση (insertion-ins):** συμβαίνει όταν σε συγκεκριμένο σημείο του χρωμοσώματος εισέρχεται ένα τμήμα άλλου χρωμοσώματος [95].(Εικόνα 23)



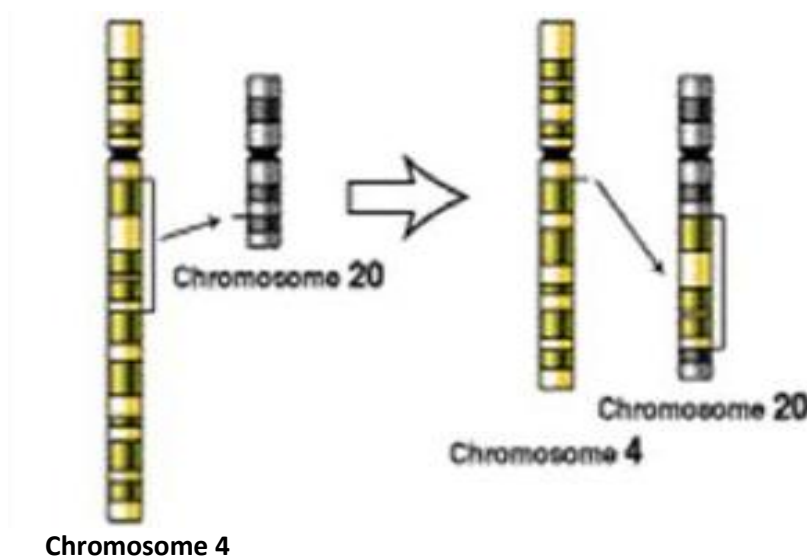
Εικόνα 20: Απεικόνιση διαδικασίας κατά την οποία προκύπτουν οι δομικές ανωμαλίες [105]



Εικόνα 21: Απεικόνιση αμοιβαίας μετάθεσης. Αμοιβαία χρωμοσωμική μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 3 και 21 [106]



Εικόνα 22: Μετάθεση ροβερτιανού τύπου μεταξύ των χρωμοσωμάτων 13 και 14 (Robertsonian translocation) [95]



Εικόνα 23: Απεικόνιση ένθεσης του χρωμοσώματος 4 στο χρωμόσωμα 20 [107]

➤ Μη ισοζυγισμένες Αναδιατάξεις

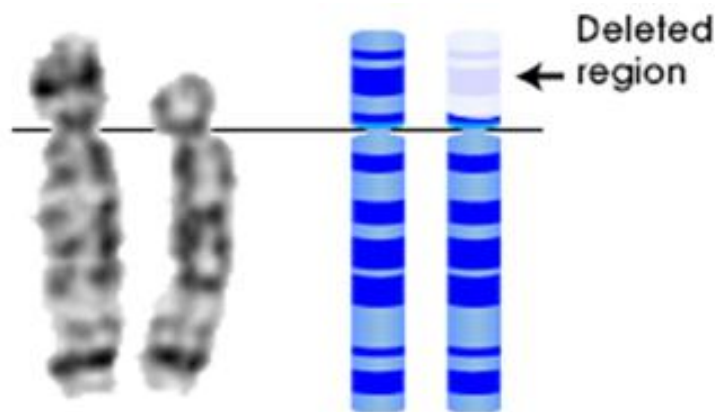
Όταν σε ένα χρωμόσωμα υπάρχει ελλιπής (ελλείμματα, όταν τα κομμάτια που έσπασαν χαθούν) ή πλεονάζουσα πληροφορία (διπλασιασμός), ο φαινότυπός του ατόμου θα είναι παθολογικός. Ο διπλασιασμός μιας χρωμοσωμικής περιοχής οδηγεί σε μερική τρισωμία, ενώ το έλλειμά της σε μερική μονοσωμία. Το άτομο που φέρει μια μη ισοζυγισμένη μετάθεση μπορεί να παρουσιάζει μαθησιακές δυσκολίες, αναπτυξιακή καθυστέρηση κ.α. Τα διάφορα τμήματα ενός χρωμοσώματος φέρουν γονίδια με διαφορετικές λειτουργίες, επομένως η σοβαρότητα του φαινότυπου που θα εμφανίσει το άτομο φορέας μη ισοζυγισμένης αναδιάταξης εξαρτάται από το ποια ακριβώς τμήματα των χρωμοσωμάτων εμπλέκονται και πόσο χρωμοσωμικό υλικό απουσιάζει ή βρίσκεται σε περίσσεια.

- Έλλειψη (deletion-del): συμβαίνει όταν ένα τμήμα του χρωμοσώματος αποκόπτεται και χάνεται (απαλείφεται). (Εικόνα 24)
- Διπλασιασμός (duplication-dup): συμβαίνει όταν ένα τμήμα του χρωμοσώματος διπλασιάζεται. [40]

- Δακτυλιοειδή Χρωμοσώματα (ring chromosomes: το ανώμαλο χρωμόσωμα έχει μορφή δακτυλίου). Τα δακτυλιοειδή χρωμοσώματα μπορούν να σχηματιστούν με δύο τρόπους:

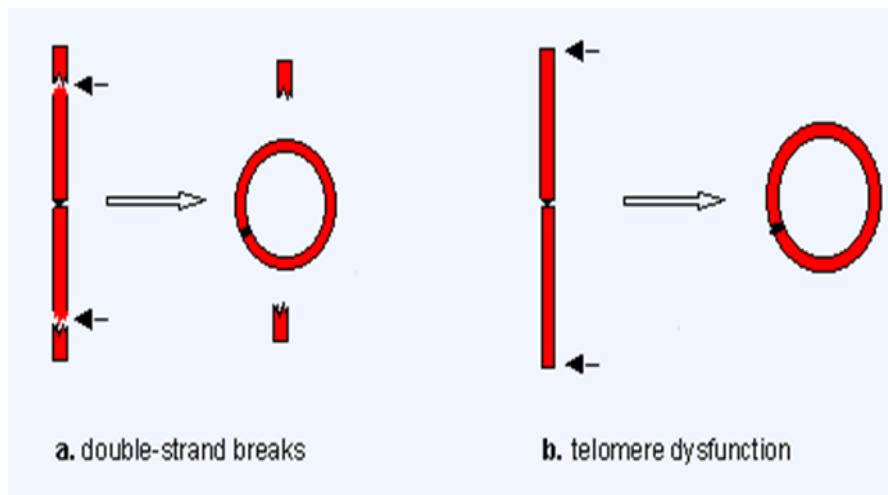
A. μέσω δύο σημείων θραύσης του DNA, μια για κάθε βραχίονα του ίδιου χρωμοσώματος, οι οποίες ακολουθούνται από την σύντηξη των δύο εγγύτερων θραυσμένων άκρων. Οι αιτίες αυτών των θραύσεων στο DNA είναι συνήθως άγνωστες, όπως και ο μηχανισμός ένωσης τους σε σχήμα δακτυλίου. Είναι πιθανό να παίζει ρόλο ο μηχανισμός σύνδεσης των ομόλογων άκρων. Ένα δακτυλιοειδές χρωμόσωμα μπορεί επίσης να σχηματιστεί μέσω σύνταξης δύο σημείων θραύσης στον ίδιο βραχίονα του χρωμοσώματος. Παρόλα αυτά, μόνο λίγα παραδείγματα τέτοιων δακτυλιοειδών χρωμοσωμάτων έχουν περιγραφεί. Πιθανώς αυτό συμβαίνει γιατί τα χρωμοσώματα αυτά είναι ακεντρικά και δεν φέρουν σημεία προσδέσεως κατά την διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης με αποτέλεσμα να χάνονται στην ακόλουθη μιτωτική διαίρεση του κυττάρου.

B. μέσω σύντηξης των δύο άκρων των βραχίωνων του ίδιου χρωμοσώματος, εξαιτίας της δυσλειτουργίας των τελομερών τους με αποτέλεσμα να δημιουργήτε η σύντηξη τους χωρίς σημαντική απώλεια γενετικού υλικού. Αρκετές εργαστηριακές μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η μείωση του μήκους των επαναλήψεων στο τελομεριακό DNA οδηγεί σε αποκόλληση των πρωστατευτικών πρωτεϊνών από τα χρωμοσωμικά άκρα. Το γεγονός αυτό καθιστά τα χρωμοσωμικά άκρα επιρρεπή σε ανασυνδιασμό με DNA ή από άλλα χρωμοσώματα οδηγώντας έτσι στην δημιουργία ενός δίκεντρικού χρωμοσώματος ή με τον άλλο βραχίονα του ίδιου χρωμοσώματος ώστε να οδηγεί στη δημιουργία ενός δακτυλιοειδούς χρωμοσώματος [108]. (Εικόνα 25)



Cri du chat : έλλειψη στο χρωμόσωμα 5.

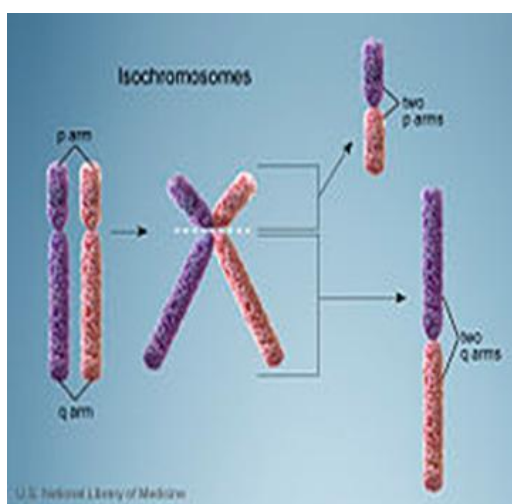
Εικόνα 24: Απεικόνιση δημιουργίας έλλειψης σε ένα χρωμόσωμα [109]



Εικόνα 25: Απεικόνιση των τρόπων σχηματισμού του δακτυλιοειδούς χρωμοσώματος [108]

- Χρωμοσώματα δείκτες (marker). Τα χρωμοσώματα δείκτες αποτελούν χρωμοσώματα μη ταυτοποιήσιμα με την κλασική κυταρογενετική.
- Δικεντρικά χρωμοσώματα: Τα δικεντρικά χρωμοσώματα διαθέτουν δυο κεντρομερίδια.
- Ισοχρωμοσώματα. (isochromosomes) το ανώμαλο χρωμόσωμα αποτελείται από δυο ίδιους βραχίονες. Έχει σχηματιστεί δηλαδή ένα νέο χρωμόσωμα στο οποίο ο ένας βραχίονας απουσιάζει, ενώ ο άλλος έχει διπλασιασθεί [93]. (Εικόνα 26)

Η παρουσία ενός ισοχρωμοσώματος σε ένα κύτταρο οδηγεί σε μερική τρισωμία του υπάρχοντος χρωμοσωμικού βραχίονα και σε μερική μονοσωμία του χρωμοσωμικού βραχίονα που απουσιάζει.



Εικόνα 26: Απεικόνιση σχηματισμού του ισοχρωμοσώματος [110]

Πίνακας 5: Παράθεση συμβόλων που χρησιμοποιούνται στην ονοματολογία [93]

Συμβολισμός	Επεξήγηση συμβόλων
A-G	Ομάδες χρωμοσωμάτων
1-22	Αρίθμηση χρωμοσωμάτων
X, Y	Φυλετικά χρωμοσώματα
p	Μικρός βραχίονας
q	Μεγάλος βραχίονας
cen	Κεντρομερίδιο
del	Έλλειμμα
der	Παράγωγο χρωμόσωμα
dic	Δικεντρικό χρωμόσωμα
dup	Διπλασιασμός
fra	Εύθραυστη θέση
i	Ισοχρωμόσωμα
ins	Ένθεση
inv	Αναστροφή
mar	Marker
r	Δακτυλοειδούς χρωμόσωμα
t	Μετάθεση
Ph	Χρωμόσωμα Philadelphia
::	Θραύση και επανένωση
rob	Μετάθεση κατά Robertson
mos	Μωσαϊκισμός

1.2.5 Μωσαϊκισμός

Μωσαϊκισμός είναι το φαινόμενο κατά το οποίο στο ίδιο δείγμα, η κυτταρογενετική ανάλυση εντοπίζει δύο ή περισσότερους κυτταρικούς πληθυσμούς με διαφορετική χρωμοσωμική σύσταση.

Η διερεύνηση και ερμηνεία του μωσαϊκισμού κατά τον προγεννητικό έλεγχο χρωμοσωμικών ανωμαλιών αποτελεί κρίσιμο ζήτημα για την σωστή γενετική συμβουλευτική.

Αναλυτικότερα, είναι απαραίτητο να αποσαφηνισθεί εάν πρόκειται για αληθή μωσαϊκισμό ή για ψευδομωσαϊκισμό.

Επιπλέον, σημειώνεται ότι όταν κατά την κυτταρογενετική μελέτη δείγματος χοριακών λαχνών διαπιστώνεται μωσαϊκισμός, είναι απαραίτητο να αποσαφηνισθεί εάν αυτός εντοπίζεται μόνο στον πλακούντα (confined placental mosaicism), φαινόμενο που συναντάται σε ποσοστό ~1% - 2% των δειγμάτων χοριακών λαχνών, ή αφορά και το έμβρυο (αληθής μωσαϊκισμός του εμβρύου) και για αυτό συνιστάται η περαιτέρω ανάλυση με αμνιοπαρακέντηση [47], [71], [93]. Σε δείγματα αμνιακού υγρού το φαινόμενο του μωσαϊκισμού συναντάται σε ποσοστό 0,1%-0,3%.

Ο μωσαϊκισμός προκύπτει έπειτα από ένα σφάλμα μη αποχωρισμού κατά τη διάρκεια της μιτωτικής διαίρεσης του κυττάρου ή στο στάδιο της μείωσης ακολουθούμενη από διόρθωση της ανευπλοειδίας μεταζυγωτικά.

Κατά την ανίχνευση μωσαϊκισμού σε δείγμα χοριακών λαχνών σημειώνεται ότι δεν έχουν όλες οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες τις ίδιες πιθανότητες επιβεβαίωσης κατά την ανάλυση αμνιακού υγρού. Συγκεκριμένα, μεταξύ των χρωμοσωμικών αλλαγών που εντοπίζονται σε μωσαϊκισμό στις χοριακές λάχνες μεγαλύτερη πιθανότητα επιβεβαίωσης (31,6%) κατά την κυτταρογενετική μελέτη αμνιακού υγρού έχουν τα χρωμοσώματα δείκτες (mar) και ακολουθούν οι αριθμητικές ανωμαλίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων με πιθανότητα επιβεβαίωσης 26%.

Επιπρόσθετα, σημειώνεται ότι όταν σε δείγμα χοριακών λαχνών εντοπίζεται τρισωμία αυτοσωμικού χρωμοσώματος τότε μεγαλύτερη πιθανότητα επιβεβαίωσης κατά την κυτταρογενετική μελέτη αμνιακού υγρού καταγράφεται για τα χρωμοσώματα 21,8, 9, 12, 13, 15, 18 και 20 [47], [71], [93].

1.2.6 Εφαρμογές της κυτταρογενετικής

Η κυτταρογενετική είναι η επιστήμη που ασχολείται με τον αριθμό και τη δομή των χρωμοσωμάτων.

Οι σημαντικότερες εφαρμογές της κυτταρογενετικής στην κλινική πρακτική είναι:

- Προγεννητικός έλεγχος: Ενδείξεις για προγεννητικό έλεγχο χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι: η ηλικία της μητέρας >35 ετών, υπερηχογραφικά ευρήματα, (π.χ. αυξημένη αυχενική διαφάνεια, καρδιακές ανωμαλίες, ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης του εμβρύου), παθολογικό αποτέλεσμα στον βιοχημικό προγεννητικό έλεγχο του 1^{ου} και 2^{ου} τριμήνου, οικογενειακό ιστορικό με γνωστή χρωμοσωμική ανωμαλία κ.α. Για την ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί δείγμα χοριακών λαχνών και αμνιακού υγρού.

- Μεταγεννητικός έλεγχος: Η μελέτη των χρωμοσωμάτων από δείγμα περιφερικού αίματος αξιοποιείται για την ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε περιπτώσεις συνδρόμων καθώς και για την διερεύνηση μωσαϊκισμού (εναλλακτικά και από δείγμα ινοβλαστών), υπογονιμότητας, καθ' ἑξίν αποβολών, κοντού αναστήματος, αμφίβολου φύλου, κ.λ.π.
- Έλεγχος αποβληθέντος ιστού (προϊόντων αποβολής): Γίνεται ανάλυση αποβληθέντος ιστού για τη διάγνωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών και την διερεύνηση των αιτιών αποβολής.
- Νεοπλασίες: Ο εντοπισμός χρωμοσωμικών ανωμαλιών μπορεί να έχει διαγνωστική προγνωστική καθώς και θεραπευτική σημασία. Η ανάλυση μπορεί να γίνει σε δείγμα μυελού των οστών αλλά και ιστοτεμαχίου συμπαγούς όγκου μετά από βιοψία.

Κατά τον έλεγχο των χρωμοσωμάτων στο μικροσκόπιο είναι δυνατό να εντοπισθούν ανακατατάξεις μεγέθους 5-10 Mb (διακριτικό όριο κυτταρογενετικής). Για γενετικές ανακατατάξεις μικρότερου μεγέθους μπορεί να εφαρμοστούν τεχνικές με χαμηλότερο διακριτικό όριο, όπως για παράδειγμα οι τεχνικές μοριακής κυτταρογενετικής και μοριακού καρυότυπου (Fluorescent in situ Hybridization-Fish, array-CGH). [95]

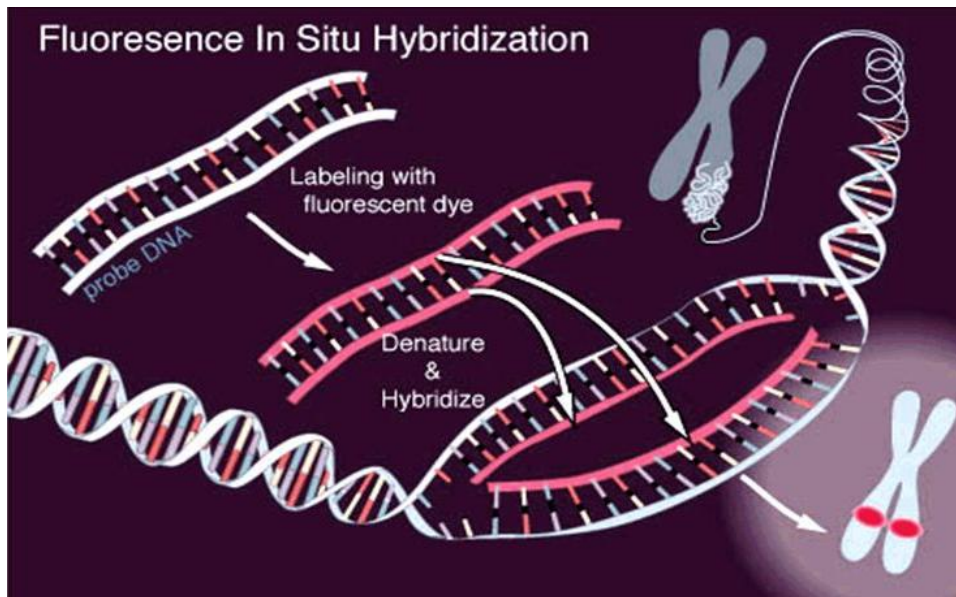
Επίσης μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ανωμαλιών είναι η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, QF-PCR, (Quantitative-Fluorescence Real Time Polymerase Chain Reaction) ως μέθοδος ταχείας ανίχνευσης ανευπλοειδιών στον προγεννητικό έλεγχο. Δύναται να ανιχνεύσει αριθμητικές ανωμαλίες στα χρωμοσώματα 13, 18, 21 και στα φυλετικά X και Y. Αντιθέτως, ο καρυότυπος παρέχει πληροφορίες για όλα τα χρωμοσώματα τόσο ως προς τον αριθμό όσο και ως προς τη δομή τους.

1.2.6.1 FISH (Fluorescence in situ hybridization)

Η ανάγκη για αυξημένη ταχύτητα και ακρίβεια όσον αφορά την λήψη αποτελεσμάτων της χρωμοσωμικής ανάλυσης, οδήγησε στην ανάπτυξη νέων τεχνικών όπως της μοριακής κυτταρογενετικής μεθόδου του φθορίζον in situ υβριδισμού (FISH). Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την κλασική κυτταρογενετική για τον εντοπισμό κοινών αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών όπως την τρισωμία 21, 13, 18 και των φυλετικών χρωμοσωμάτων X και Y. Επίσης χρησιμοποιείται για τον έλεγχο δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών όπως ελλείψεων, διπλασιασμών, ισοζυγισμένων μεταθέσεων κ.α. Επιπρόσθετα δύναται να ταυτοποιήσει υπομικροσκοπικές ελλείψεις και χρωμοσωμικές αναδιατάξεις υπεύθυνες για νοητική υστέρηση αγνώστης αιτιολογίας καθώς επίσης και να επιτύχει την ταυτοποίηση των χρωμοσωμάτων δεικτών marker. Τέλος η τεχνική αυτή με τη χρήση των κατάλληλων ανιχνευτών μπορεί να επιτύχει την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης στα νεοπλάσματα και να ανιχνεύσει υπολειπόμενη νόσο. Το μειονέκτημα της είναι ότι κάθε φορά μπορούν να εξεταστούν μόνο μερικές περιοχές, ενώ το σημαντικό πλεονέκτημα της είναι ότι διαθέτει μεγάλη διακριτική ικανότητα γιατί μπορεί να εφαρμοσθεί και σε πυρήνες (interphase FISH), οπότε δεν εξαρτάται από την παρουσία διαιρούμενων κυττάρων (μεταφάσεων) στο υπό εξέταση δείγμα [93], [115].

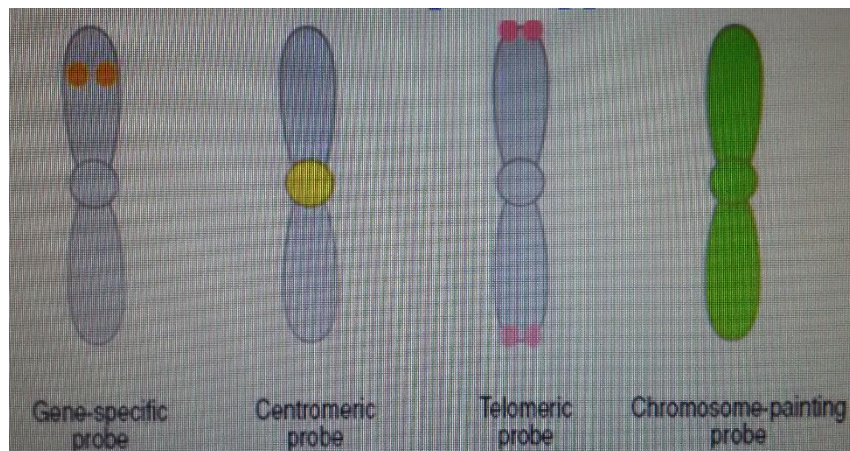
Η τεχνική του φθορίζοντος in situ υβριδισμού (FISH) συνδυάζει την κλασική κυτταρογενετική με τη μοριακή γενετική και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον εντοπισμό συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA σε ένα χρωμόσωμα. Η τεχνική βασίζεται στην έκθεση των χρωμοσωμάτων σε μια μικρή αλληλουχία DNA που ονομάζεται ανιχνευτής (probe), και ένα φθορίζον μόριο το οποίο επισυνάπτεται σε αυτήν. Η αλληλουχία του ανιχνευτή (probe) συνδέεται με την αντίστοιχη συμπληρωματική αλληλουχία του DNA στο χρωμόσωμα. Βασίζεται δηλαδή στην ικανότητα που έχει ένα

συγκεκριμένο τμήμα DNA (π.χ.probe, ανιχνευτής) να συνδέεται με τη συμπληρωματική αλληλουχία στόχο όπου και αν βρίσκεται αυτή και κατά συνέπεια να ανιχνεύει την αναζητούμενη αλληλουχία αν και εφόσον υπάρχει, σύμφωνα με την αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων [112]. (Εικόνα 27α)



Εικόνα 27α: Αρχή μεθόδου in situ υβριδισμού FISH

Για να κατασκευαστούν οι ανιχνευτές, οι ακολουθίες του DNA επισημαίνονται, με φθορίζουσες χρωστικές. Οι ακολουθίες του DNA μπορούν να επισημανθούν με ένα χρώμα, δύο ή και περισσότερα. Για κάθε υβριδισμό μπορούν να χρησιμοποιηθούν ένας ή και περισσότεροι ανιχνευτές [112], [113]. (Εικόνα 27β)



Εικόνα 27β: Ηδη probe ανιχνευτων της μεθόδου FISH [111]

1.2.6.2 Array-CGH (array-Comparative Genomic Hybridization)

Οι κλασικές κυτταρογενετικές τεχνικές σε σχέση με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (array-CGH) εμφανίζουν περιορισμούς αρχικά εξαιτίας της χαμηλής διακριτικής ικανότητας τους όσο αναφορά την ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών, με μέγεθος <5Mb (3-5Mb), αλλά και ότι δεν δύναται να αναλύσουν ολόκληρο το γονιδίωμα [95].

Για την εκτέλεση της μεθόδου χρειάζεται ένα ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό, καθώς ο ανθρώπινος παράγοντας έχει άμεση σχέση με την σωστή εκτέλεση του πρωτοκόλλου και τη διαχείριση του δείγματος έως ότου προκύψει το τελικό μικροσκοπικό παρασκεύασμα προς ανάλυση. Επίσης ο υψηλός βαθμός αποτυχίας της καλλιέργειας των κυττάρων, η πιθανή προσμύξη του δείγματος με μητρικά κύτταρα κατά την δειγματοληψία, αλλά και η κακή μορφολογία των χρωμοσωμάτων μπορεί να συνδράμουν στην αποτυχία της μεθόδου. Ένας ακόμα περιορισμός της εφαρμογής της τεχνικής της κυτταρογενετικής ανάλυσης των μεταφασικών χρωμοσωμάτων με ταινίες G είναι ότι είναι δύσκολο να εντοπισθούν οι μικρές υποτελομεριδιακές αναδιατάξεις καθώς τα άκρα των χρωμοσωμάτων στερούνται διακριτών G ταινιών [95].

Οι μικροσυστοιχίες συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (array-Comparative Genomic Hybridization) είναι μέθοδος που χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα, ευαισθησία και διακριτική ευκρίνεια 10-1000 φορές μεγαλύτερη από το συμβατικό καρυότυπο. Επιτρέπει την αναγνώριση και τον εντοπισμό μικροελλείψεων, μικροδιπλασιασμών, ανευπλοειδιών, μη ισοζυγισμένων μεταθέσεων και αναστροφών με ποσοτική αλλαγή, θραύσματα (markers), καθώς και την ταυτοποίηση και μέτρηση αλλαγών στον αριθμό των αντιγράφων (πολυμορφισμοί, CNVs) οπουδήποτε στο γονιδίωμα, τόσο προγεννητικά όσο και μετά τη γέννηση [23], [114]. Ο έλεγχος γονεϊκών δειγμάτων (δηλαδή η ανάλυση με τον ίδιο τρόπο και την ίδια μικροσυστοιχία και των δύο γονέων) κρίνεται απαραίτητος όταν βρεθεί κλινικής σημασίας CNV, ώστε να διαπιστωθεί εάν είναι de novo ή έχει κληρονομηθεί. Με αυτόν τον τρόπο δύναται να δοθεί σωστή γενετική συμβουλευτική καθοδήγηση για τις μελλοντικές εγκυμοσύνες αλλά και τον έλεγχο των συγγενών ατόμων [23], [95], [114].

Οι μικροσυστοιχίες συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (array-Comparative Genomic Hybridization), αποτελούν σε μεγάλο βαθμό μια αυτοματοποιημένη μοριακή μέθοδο που δεν απαιτεί διαιρούμενα κύτταρα και για αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για μελέτες βιοψικού υλικού. Γενικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση DNA που προέρχεται από φρέσκους ή μονιμοποιημένους ιστούς, κυτταρικές σειρές, ολικό αίμα, σε δείγμα από αμνιοπαρακέντηση (αμνιακό υγρό), σε δείγμα από λήψη τροφοβλάστης (χοριακές λάχνες). Έχουν αναπτυχθεί διάφορες πλατφόρμες μικροσυστοιχιών με ανιχνευτές κλώνους βακτηριακών τεχνητών χρωμοσωμάτων, Bacterial Artificial Chromosomes (BACs), τεχνητών χρωμοσωμάτων ζύμης, Yeast Artificial Chromosomes (YACs), και κλώνους cDNA μεγέθους >1Mb [95].

Οι μικροσυστοιχίες συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (array-CGH) ή αλλιώς μοριακός καρυότυπος εφαρμόζεται στην γενετική διάγνωση και έρευνα. Στη διάγνωση δύναται να μελετήσει άτομα με νοητική υστέρηση/αναπτυξιακή καθυστέρηση αγνώστου αιτιολογίας με ή χωρίς διαταραχές στο φάσμα του αυτισμού, με πολλαπλές συγγενείς ανωμαλίες ή/και επιληψία-σπασμούς.

Ενώ όσο αναφορά την έρευνα, δύναται να διαγνώσει αιματολογικές κακοήθειες ή να τις εντοπίσει αλλά και σε προγνωστικό επίπεδο να μπορέσει να παρέχει πληροφορίες σε μοριακό επίπεδο για τη φύση του όγκου που μελετά [95].

- **Η σημασία των Copy Number Variations (CNVs) και γιατί συμβάλει στην ενίσχυση της εφαρμογής της Array Comparative Genomic Hybridization (ARRAY-CGH) στον προγεννητικό έλεγχο**

Οι διάφορες αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων (copy number variation- CNVs) από προσθήκες ή απώλειες (gains and losses) γενετικού υλικού σε διάφορες περιοχές του γονιδιώματος, προκαλεί γενετική ποικιλομορφία στον πληθυσμό (π.χ. SNPs). Μπορεί να υπάρχουν ως φυσιολογικοί πολυμορφισμοί ή παθολογικοί και να προκαλούν κλινικό φαινότυπο για παράδειγμα νοητική υστέρηση, αναπτυξιακή καθυστέρηση, δυσμορφίες, γενετική διαταραχή, κ.α.

Τα CNVs που βρίσκονται καταχωρούνται στις βάσεις δεδομένων (Decipher, Database, Ensemble, UCSC, SFARI κ.α.) για να μπορεί να γίνει διαχωρισμός των μη παθολογικών, (γνωστοί πολυμορφισμοί αριθμού αντιγράφων) τα οποία εμφανίζονται στον πληθυσμό σε ποσοστό 1%, των πιθανώς παθολογικών ή αβέβαιης κλινικής σημασίας μη καταγεγραμμένα ή καταγεγραμμένα ως VOUS, αλλά και στα γνωστά κλινικά σύνδρομα μικροελλείψεων και μικροδιπλασιασμών [115], [116], [117].

Τα CNVs μπορεί να κληρονομηθούν από τους γονείς και τις περισσότερες φορές δεν προκαλούν παθολογικό φαινότυπο ενώ κάποια εμφανίζονται de novo. Η αξιολόγηση για το αν ένα CNV είναι παθολογικό ή όχι, γίνεται με βάση το πρότυπο κληρονόμησης και την σύγκριση γονοτύπου με φαινότυπο. Αν υγιείς γονείς φέρουν την ίδια αλλαγή, το πιθανότερο είναι αυτή να είναι πολυμορφισμός [118]. Αν όμως το έμβρυο που τη φέρει εμφανίζει κάποια κλινική ένδειξη όπως δυσμορφία και έχει γονείς υγιείς με φυσιολογικό καρυότυπο, η συγκεκριμένη αλλαγή είναι de novo και είναι πολύ πιθανό να είναι παθολογική και να είναι η αιτία του φαινοτύπου. Φυσικά και υπάρχουν εξαιρέσεις όπου μερικά de novo CNVs είναι φυσιολογικά και κάποια που κληρονομούνται από υγιείς γονείς δύναται να είναι παθολογικά [119], [120], [121].

➤ Πλεονεκτήματα της τεχνικής a-CGH έναντι της FISH είναι:

- Ανιχνεύει αναδιατάξεις σε όλο το γονιδίωμα, χωρίς να απαιτείται προηγούμενη ένδειξη, δηλαδή ψάχνει στα τυφλά όλο το γονιδίωμα και εντοπίζει υπομικροσκοπικές διαταραχές στον αριθμό των αντιγράφων του DNA τμημάτων [23], [122]. Ενώ με τη FISH αναλύονται συγκεκριμένες περιοχές στα χρωμοσώματα, ανάλογα με τους ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται, οι οποίοι σχεδιάζονται σύμφωνα με τις ενδείξεις των προηγούμενων εξετάσεων (βιοχημικές εξετάσεις στον ορό της μητέρας, διάφορα ευρήματα στον υπέρηχο, ηλικία της μητέρας ή οικογενειακό ιστορικό).

- Η FISH δεν μπορεί να εκτιμήσει το μέγεθος των αναδιατάξεων (διπλασιασμών ή ελλείψεων) εφόσον υπάρχουν, ενώ τα arrays δίνουν το ακριβές μέγεθος.

- Άλλος ένας λόγος για τον οποίο τα array-CGH θα πρέπει να θεωρηθούν βασικό όργανο προγεννητικού ελέγχου είναι ότι μπορούν να ανιχνεύσουν υπεράριθμα marker χρωμοσώματα άγνωστης προέλευσης και δομικές ανωμαλίες οι οποίες δεν μπορούν να ταξινομηθούν ως πολυμορφισμοί χωρίς κλινική συνάφεια. Για παράδειγμα σε μια περίπτωση αμνιοπαρακέντησης με FISH βρέθηκε ένα σήμα για το σύνδρομο Prader Willi/ Angelman ενώ στην ίδια περίπτωση βρέθηκε με array-CGH πως ένα κομμάτι (1,4 Mb) με ψευδογονίδια πολλαπλασιάστηκε τόσες φορές που πλέον ήταν ορατό με το μικροσκόπιο. Το marker αυτό είχε εμφανιστεί σε πολλά υγιή άτομα με φυσιολογικό καρυότυπο [122].

➤ Συμπερασματικά αναφέρεται ότι η ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε παιδιά με νοητική υστέρηση ή/και πολλαπλές συγγενείς ανωμαλίες εκτιμάται σε 3-5% μέσω

του συμβατικού καρυότυπου, 5-6% μέσω του υποτελομεριδιακού FISH και επιπλέον 5-20% μέσω των μικροσυστοιχιών-CGH, υπολογίζοντας συνολική απόδοση διάγνωσης 13-31% με τη χρήση όλων των τεχνικών [95].

1.3 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω οι λόγοι που οδηγείται η έγκυος στην διενέργεια επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου είναι:

- Η ηλικία της μητέρας, >35 ετών.
- Υπερηχογραφικά ευρήματα,
- Ενδείξεις στον βιοχημικό προγεννητικό έλεγχο του 1^{ου} και 2^{ου} τριμήνου.
- Οικογενειακό ιστορικό με ύπαρξη γνωστής χρωμοσωμικής ανωμαλίας.
- Προηγούμενη κύηση με παθολογικά ευρήματα στον καρυότυπο του εμβρύου.
- Όταν κάποιος από τους δύο γονείς είναι φορέας δομικής ισοζυγισμένης χρωμοσωμικής μετάθεσης ή άλλης χρωμοσωμικής ανωμαλίας.

Η παρούσα διπλωματική εργασία θα μελετήσει τα δείγματα επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου, δείγματα αμνιακού υγρού και χοριακών λαχνών, που προσήλθαν στο κυτταρογενετικό εργαστήριο του Χωρέμειου ερευνητικού εργαστηρίου για κυτταρογενετική ανάλυση εξαιτίας αυξημένης πιθανότητας εμφάνισης ανωμαλιών του εμβρύου όπως προέκυψε λόγω ηλικίας της μητέρας ή έπειτα από τον έλεγχο με μη επεμβατικές μεθόδους, υπερηχογραφήματα και βιοχημικούς δείκτες, κατά τον προγεννητικό έλεγχο του 1^{ου} και 2^{ου} τριμήνου.

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι:

A. η εκμάθηση των χρωμοσωμάτων και η μελέτη χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε δείγματα χοριακών λαχνών και αμνιακού υγρού.

Θα μελετηθεί το είδος και η συχνότητα των χρωμοσωμικών ανωμαλιών κατά τον προγεννητικό έλεγχο.

B. η εκτίμηση του ποσοστού επιβεβαίωσης των βιοχημικών και υπερηχογραφικών αποτελεσμάτων α' τριμήνου.

Θα διερευνηθεί σε πόσες από τις περιπτώσεις που παραπέμφθηκαν λόγω αυξημένου κινδύνου με βάση τους παραπάνω δείκτες, ταυτοποιήθηκε τελικά χρωμοσωμική ανωμαλία.

Όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, μέρος του σκοπού της διπλωματικής εργασίας ήταν και η εκμάθηση των χρωμοσωμάτων ώστε να γίνεται δυνατή η αναγνώριση τους, για να μπορεί να προκύψει ο καρυότυπος του εμβρύου, από την κυτταρογενετική ανάλυση μεταφασικών χρωμοσωμάτων που προέρχονταν από καλλιέργειες δειγμάτων τροφοβλάστης και αμνιακού υγρού. Τα περιστατικά που μελετήθηκαν για το σκοπό αυτό λήφθηκαν από το αρχείο που φυλάσσεται στο κυτταρογενετικό εργαστήριο του Χωρέμειου. Πρόκειται δηλαδή, για ήδη αναλυμένα δείγματα (είχε δοθεί η τελική απάντηση στον ενδιαφερόμενο) δηλαδή είχαν ήδη καλλιεργηθεί και είχαν γίνει μικροσκοπικά παρασκευάσματα. Τα δείγματα αυτά είναι 46 και παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 6)

Πίνακας 6: Περιστατικά που χρησιμοποιήθηκαν τα μικροσκοπικά τους παρασκευάσματα για την εκμάθηση των χρωμοσωμάτων

α/α	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ	ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ
1	A18-6	46,XY
2	A15-1	46,XX
3	A15-2	46,XY
4	A14-12	47,XX,+21
5	A14-425	45,X
6	A17-44	47,XXY
7	A18-38	46,XY
8	A14-140	46,XY/46,XY,der(1)ins(1;?)(q32;?)
9	Tr18-28	46,XX
10	A18-18	46,XY
11	Tr18-34	47,XX,+9
12	A18-14	46,XX
13	A14-178 EMB-1	45,XX,der(13;14)(q10;q10)pat
14	A14-417	46,XY,inv(10)(q21.2q22.3)mat
15	A14-157	46,XX,inv(13)(q14.3q31.2)mat
16	Tr12-74	45,X/46,X
17	A14-352	46,XX,inv(9)(p22q22)pat
18	A15-121	46,X,t(Y;3)(q12.3;q13.2)de novo
19	Tr15-4	mos45,X/46,X,+mar
20	A18-119	47,XY,+21
21	A15-114	47,XY,+mar de novo
22	A16-137	46,XX[?der(17)ins(17;?)(p11.2;?)]
23	A17-38	46,XY,add(8)(p21.3)de novo
24	A14-53	47,XX,+21
25	A14-126	47,XY,+21
26	A17-44	47,XXY
27	A15-79	47,XX,+21
28	A15-93	47,XY,+21
29	A15-154	47,XY,+21
30	A16-45	47,XX,+21
31	A15-119	47,XY,+21
32	A15-79	47,XX,+21

Μελέτη χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε δείγματα προγεννητικού ελέγχου

33	A15-93	47,XY,+21
34	A14-313	47,XY,+21
35	A14-56	45,X /46,XX
36	A15-37	47,XXY
37	A14-201	47,XX,+21
38	A14-403	69,XXX
39	A15-34	45X/46,XX
40	A15-246	47,XY,+21
41	Trp16-12	47,XY,+21
42	Trp15-55	47,XY,+21
43	Trp17-49	47,XY,+10/46,XY
44	Trp16-1	47,XX,+16
45	A15-164	46,XY,inv(13)(q21q31)mat
46	A14-346	46,XX,inv(3)(p12.2p14.2)mat

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. Καλλιέργεια αμνιακού υγρού

Μέθοδος: Καλλιέργεια μικρής διάρκειας εμβρυϊκών κυττάρων από δείγμα αμνιακού υγρού και μελέτη των χρωμοσωμάτων με ταινίες G.

Περιγραφή Μεθόδου

1. Παραλαβή δείγματος. Στο κατάλληλο έντυπο καταγράφονται τα στοιχεία της εγκύου, οικογενειακό ιστορικό, αιτία παραπομπής, αιτούμενες εξετάσεις. Ελέγχεται η καταλληλότητα του δείγματος (ποσότητα, ποιότητα) και στο δείγμα αποδίδεται μοναδικός εργαστηριακός κωδικός.
2. Η παραπάνω διαδικασία γίνεται στο δωμάτιο κυτταροκαλλιεργειών δειγμάτων προγεννητικού ελέγχου σε άσηπτες συνθήκες σε απαγωγό εστία νηματικής ροής και με τη βοήθεια εργαστηριακού λύχνου και τη χρήση αποστειρωμένων ορολογικών πιπτετών μιας χρήσεως. Σημειώνεται ότι τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος της εργασίας στην απαγωγό εστία νηματικής ροής, καθαρίζεται καλά η επιφάνεια της με υδρόφιλο βαμβάκι και μόνο με αιθανόλη. Επίσης τηρούνται όλοι οι κανόνες απολύμανσης των χεριών.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του φιαλιδίου στα 1500 rpm για 10 λεπτά.
4. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης, αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο (να μην αναταραχθεί το ίζημα) και απορρίπτεται έως ότου στο φιαλίδιο μείνουν 1,5-2 ml υγρού και ιζήματος.
5. Με τη βοήθεια ορολογικής πιπέτας μιας χρήσης το εναπομείναν αμνιακό υγρό διαμοιράζεται εξίσου σε τρεις φιάλες κυτταροκαλλιέργειας .
6. Πάνω σε κάθε φιάλη αναγράφεται ο εργαστηριακός κωδικός του δείγματος, ο δείκτης που δηλώνει τον αριθμό της φιάλης καλλιέργειας καθώς και ο δείκτης A μόνο για τις φιάλες που θα προστεθεί το καλλιεργητικό υλικό, ampmomax.
7. Οι φιάλες μεταφέρονται σε κλίβανο CO₂, θερμοκρασίας 37°C και υγρασίας και αφήνονται για επώαση με χαλαρά πώματα για περίπου μια εβδομάδα (για λόγους ασφαλείας οι φιάλες κυτταροκαλλιέργειας δεν τοποθετούνται όλες στον ίδιο κλίβανο αλλά διαμοιράζονται σε δυο διαφορετικούς κλιβάνους σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες).
8. Μετά από μια περίπου εβδομάδα οι φιάλες ελέγχονται στο ανάστροφο μικροσκόπιο και καταγράφεται η ανάπτυξη των κυττάρων.
9. Ακολουθεί για κάθε φιάλη απόρριψη του παλαιού θρεπτικού υλικού και προσθήκη ίσης ποσότητας φρέσκου.
10. Οι φιάλες επιστρέφονται στον κλίβανο για επώαση όπου και παραμένουν για περίπου τρεις-τέσσερις μέρες.
11. Μετά το πέρας του κατάλληλου χρονικού διαστήματος που προαναφέρθηκε γίνεται έλεγχος των φιαλών κυτταροκαλλιέργειας και επιλέγονται οι καταλληλότερες για ανακαλλιέργεια. Για κάθε δείγμα ανακαλλιεργούνται δυο φιάλες. Σημείωση: Οι ανακαλλιέργειες για το ίδιο δείγμα δεν γίνονται ποτέ την ίδια μέρα και για τις δυο φιάλες. Θα πρέπει η μια φιάλη να ανακαλλιεργείται σε διαφορετική μέρα από την άλλη.
12. Όταν επιλέξουμε την κατάλληλη φιάλη για ανακαλλιέργεια ακολουθείται η εξής διαδικασία: Σε άσηπτες συνθήκες, στην απαγωγό εστία κάθετης νηματικής ροής γίνεται έκπλυση της φιάλης με διάλυμα Hank's, απορρίπτεται το έκπλυμα στο δοχείο βιολογικών αποβλήτων και στη συνέχεια προστίθεται θρυψίνη (Trypsin EDTA). Ελέγχουμε την καλλιέργεια στο ανάστροφο μικροσκόπιο (αφού έχουμε χτυπήσει την φιάλη ελαφρά και υπό γωνία) για να δούμε αν έχουν αποκολληθεί τα κύτταρα. Σε περίπτωση που έχουν αποκολληθεί όλα προσθέτουμε καλλιεργητικό υλικό και αφήνουμε στον κλίβανο.

13. Τέλος απορρίπτεται το περιεχόμενο της φιάλης καλλιέργειας και προστίθενται 3ml φρέσκου καλλιεργητικού υλικού.
14. Η φιάλη παραμένει στον κλίβανο overnight και την επόμενη μέρα το πρωί γίνεται έλεγχος για καταλληλότητα για προσθήκη κολχικίνης.
15. Αν υπάρχει ο απαιτούμενος αριθμός διαιρούμενων κυττάρων, αν τα κύτταρα καλύπτουν περίπου το 80% της επιφάνειας της φιάλης είναι έτοιμα για συγκομιδή, προστίθεται κολχικίνη σε άσηπτες συνθήκες και η φιάλη παραμένει στον κλίβανο για 2 ώρες και 45 λεπτά.
16. Με το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος ξεκινά η διαδικασία συγκομιδής των χρωμοσωμάτων (harvest). Η φιάλη μεταφέρεται στην απαγωγό εστία νηματικής ροής και γίνεται μεταφορά του περιεχομένου της σε φιαλίδιο falcon 15ml.
17. Στη συνέχεια γίνεται έκπλυση της φιάλης με Hank's και το περιεχόμενο της φιάλης μεταφέρεται επίσης στο σωλήνα falcon.
18. Στη φιάλη προστίθεται Trypsin EDTA και η μεταφέρεται στον κλίβανο (37°C, 5%CO₂) για 2-5 λεπτά.
19. Χτύπημα της φλάσκας για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα και ελέγχουμε την καλλιέργεια στο ανάστροφο μικροσκόπιο για να δούμε αν έχουν αποκολληθεί τα κύτταρα. Εάν έχουν αποκολληθεί όλα, στη φιάλη προστίθενται καλλιεργητικό υλικό και το περιεχόμενο μεταφέρεται στο φιαλίδιο falcon.
20. Το φιαλίδιο φυγοκεντρείται στα 1500 rpm για 10 λεπτά.
21. Με πλαστική πιπέτα Pasteur απορρίπτεται το υπερκείμενο στο δοχείο βιολογικών αποβλήτων και απομένει περίπου μισό ml πάνω από το ίζημα. Στη συνέχεια με πλαστική πιπέτα Pasteur προσθέτουμε 3 ml υπότονου διαλύματος και αναδεύουμε έντονα για να σπάσουν τα συσσωματώματα των κυττάρων.
22. Προσθέτουμε ως τα 5ml υπότονο διάλυμα και μεταφέρουμε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 15 λεπτά.
23. Μετά τα 15 λεπτά προσθέτουμε 6 σταγόνες παγωμένου μονιμοποιητικού διαλύματος μεθανόλης/οξικό οξύ 3:1 ήπια και φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στα 1500 rpm.
24. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης απορρίπτεται το υπερκείμενο μέχρι περίπου τη χαραγή του κώνου και προστίθενται 6 σταγόνες παγωμένου μονιμοποιητικού διαλύματος ήπια. Το ίζημα αναδεύεται απαλά και προστίθεται ήπια παγωμένο μονιμοποιητικό διάλυμα ως τα 2ml.
25. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 1500 rpm. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης απορρίπτεται το υπερκείμενο και στη συνέχεια προστίθενται 6 σταγόνες παγωμένου μονιμοποιητικού διαλύματος ήπια. Το ίζημα αναδεύεται απαλά και προστίθεται ήπια παγωμένο μονιμοποιητικό διάλυμα ως τα 2ml. Το φιαλίδιο falcon διατηρείται στο ψυγείο.
26. Την επόμενη μέρα το φιαλίδιο φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 1500 rpm. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθεται ήπια φρέσκο παγωμένο μονιμοποιητικό. Το ίζημα αναδεύεται και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 1500 rpm.
27. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα που απέμεινε θα πρέπει να αραιωθεί με 1-2 σταγόνες (ανάλογα με την ποσότητά του) παγωμένο μονιμοποιητικό διάλυμα για να γίνει επίστρωση σε αντικειμενοφόρους πλάκες.
28. Κατά την επίστρωση ακολουθείται η εξής διαδικασία:
29. Η αντικειμενοφόρος εμβαπτίζεται σε δοχείο με μεθανόλη και στεγνώνεται με χειροπετσέτα. Αναγράφεται στο περιθώριο ο κωδικός του δείγματος και η φλάσκα από την οποία προέρχεται το δείγμα και στη συνέχεια με γυάλινη πιπέτα Pasteur επιστρώνονται ομοιόμορφα 3-4 σταγόνες από το υλικό σε κάθε αντικειμενοφόρο.
30. Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι ελέγχονται σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων για την πυκνότητά τους και τον αριθμό των μεταφάσεων.
31. Επιστρώνονται συνήθως περίπου 3 αντικειμενοφόροι από κάθε περιστατικό.

32. Καταγράφουμε σε κατάλληλο έντυπο τον αριθμό των αντικειμενοφόρων που επιστρώσαμε και την ημερομηνία επίστρωσης.
33. Οι αντικειμενοφόροι αφού στεγνώσουν παραμένουν σε κλίβανο 90°C για 90 λεπτά και ακολουθεί η χρώση για τη δημιουργία ταινιών G.
34. Για την διαδικασία της χρώσης χρειαζόμαστε ένα βαθμονομημένο θερμόμετρο και πάγο μέσα στον οποίο εμβαπτίζεται δοχείο με Trypsin έτσι ώστε να βρίσκεται σε θερμοκρασία 17°C. Επιπλέον σε δυο ποτήρια ζέσεως των 50ml τοποθετείται 0.9% NaCl για την έκπλυση των αντικειμενοφόρων μετά την παραμονή τους στο δοχείο με την Trypsin.
35. Η διαδικασία χρώσης ξεκινά με την εμβάπτιση της αντικειμενοφόρου στο δοχείο με την Trypsin 17°C όπου παραμένει για συγκεκριμένο χρόνο (ελέγχεται με χρονόμετρο).
36. Μετά την Trypsin η αντικειμενοφόρος εμβαπτίζεται διαδοχικά σε δυο ποτήρια ζέσεως των 50ml που περιέχουν 0.9% NaCl, για να εκπλυθεί από το ένζυμο και στη συνέχεια γίνεται χρώση. Τοποθετούμε την αντικειμενοφόρο σε οριζόντια θέση και την καλύπτουμε με την χρωστική (0,5ml Leishman's stain & 1,5ml Gurr buffer αναμιγνύονται μέσα σε σύριγγα των 2,5ml). Ελέγχουμε το χρόνο της χρώσης με timer και ξεπλύνουμε μετά το πέρας του απαιτούμενου χρόνου με Water for Injection.
37. Αφήνουμε να στεγνώσει σε όρθια θέση.
38. Καλύπτουμε με 3 σταγόνες Entellan mounting και καλυπτρίδα 26x50mm.
39. Ελέγχουμε στο μικροσκόπιο την ποιότητα των χρωμοσωμάτων και προσαρμόζουμε ανάλογα το χρόνο παραμονής στο ένζυμο και τη χρώση.
40. Ακολουθεί παρατήρηση και ανάλυση στο μικροσκόπιο. Σε κανονικές συνθήκες αναλύονται 20 μεταφάσεις από δυο καλλιέργειες. Κάθε μετάφραση που αναλύεται καταγράφεται σε ειδικό έντυπο και σημειώνονται οι συντεταγμένες της θέσης της για λόγους ιχνηλασιμότητας [123].

B. Καλλιέργεια χοριακών λαχνών

Μέθοδος: Καλλιέργεια κυτάρων από δείγμα χοριακών λαχνών και μελέτη των χρωμοσωμάτων με ταινίες G.

Περιγραφή μεθόδου

1. Παραλαβή δείγματος. Στο κατάλληλο έντυπο καταγράφονται στοιχεία της εγκύου, οικογενειακό ιστορικό, αιτία παραπομπής, αιτούμενες εξετάσεις. Ελέγχεται η καταλληλότητα του δείγματος (ποσότητα, ποιότητα) και στο δείγμα αποδίδεται μοναδικός εργαστηριακός κωδικός.
2. Η παραπάνω διαδικασία γίνεται στο δωμάτιο κυτταροκαλλιέργειών δειγμάτων προγεννητικού ελέγχου σε άσηπτες συνθήκες σε απαγωγό εστία νηματικής ροής και με τη βοήθεια εργαστηριακού λύχνου και τη χρήση αποστειρωμένων ορολογικών πιπετών μιας χρήσεως. Σημειώνεται ότι τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος της εργασίας στην απαγωγό εστία νηματικής ροής, καθαρίζεται καλά η επιφάνεια της με υδρόφιλο βαμβάκι και μόνο με αιθανόλη. Επίσης τηρούνται όλοι οι κανόνες απολύμανσης των χεριών.
3. Αδειάζουμε το περιεχόμενο του φιαλιδίου Universal που παραλάβαμε και περιέχει τις λάχνες σε αποστειρωμένο τριβλίο Petri και αφήνουμε σε ηρεμία για αρκετή ώρα για να ξεχωρίσουν οι λάχνες.
4. Μετά από αρκετή ώρα, σε δεύτερο τριβλίο προσθέτουμε διάλυμα Hank's για να γίνει η έκπλυση των λαχνών πριν την αποδιάταξη τους. Παίρνουμε τις λάχνες με αποστειρωμένη γυάλινη πιπέτα Pasteur από το αρχικό τριβλίο και μεταφέρουμε στο τριβλίο με το Hank's για να τις καθαρίσουμε.
5. Όταν ολοκληρωθεί ο καθαρισμός, σε τριβλίο προσθέτουμε Trypsin και μεταφέρουμε τις λάχνες για να τις κόψουμε με χειρουργικό αποστειρωμένο

- ψαλίδι. Αφού τις κόψουμε τοποθετούμε το τρυβλίο στον επωαστικό κλίβανο CO₂ για 90 λεπτά.
6. Μετά τα 90 λεπτά βγάζουμε το τρυβλίο από τον κλίβανο και το μεταφέρουμε στην απαγωγό εστία κάθετης νηματικής ροής. Παίρνουμε δύο φιάλες καλλιέργειας και γράφουμε πάνω σε κάθε φιάλη τον εργαστηριακό κωδικό του δείγματος και ως δείκτη τον αύξοντα αριθμό της καλλιέργειας. Με αποστειρωμένη γυάλινη πιπέτα Pasteur παίρνουμε τις λάχνες από το τρυβλίο και τις μεταφέρουμε στην φιάλη καλλιέργειας προσέχοντας να μην αφήνουμε πολύ ένζυμο μέσα στην φιάλη. Τοποθετούμε αρκετές λάχνες στην φιάλη, ξεκινώντας από τις γωνίες. Δημιουργούμε έτσι δύο φιάλες καλλιέργειας.
 7. Σε κάθε φιάλη προσθέτουμε 1ml complete chang medium προσεκτικά από το πλάι. Απλώνουμε το υλικό σε όλη την επιφάνεια της φιάλης απαλά και μεταφέρουμε στον επωαστικό κλίβανο CO₂, θερμοκρασία 37°C και υγρασίας. Αφήνουμε να αναπτυχθεί για μια εβδομάδα χαλαρά πώματα.
 8. Μετά από μια εβδομάδα ελέγχουμε την ανάπτυξη στο ανάστροφο μικροσκόπιο και προσθέτουμε 1 ml complete chang medium απαλά από το πλάι.
 9. Οι φιάλες επιστρέφονται στον κλίβανο για επώαση όπου και παραμένουν για περίπου τρεις με τέσσερις ημέρες.
 10. Μετά το πέρας του κατάλληλου χρονικού διαστήματος γίνεται έλεγχος των φιαλών κυτταροκαλλιέργειας και επιλέγονται οι καταλληλότερες για ανακαλλιέργεια και οι δυο φιάλες σε διαφορετικές ημέρες.
 11. Όταν επιλέξουμε την κατάλληλη φιάλη για ανακαλλιέργεια ακολουθείται η εξής διαδικασία: Σε άσηπτες συνθήκες, στην απαγωγό εστία κάθετης νηματικής ροής γίνεται έκπλυση της φιάλης με διάλυμα Hank's, απορρίπτεται το έκπλυμα στο δοχείο βιολογικών αποβλήτων και στη συνέχεια προστίθεται θρυψίνη (Trypsin EDTA). Ελέγχουμε την καλλιέργεια στο ανάστροφο μικροσκόπιο (αφού έχουμε χτυπήσει την φιάλη ελαφρά και υπό γωνία) για να δούμε αν έχουν αποκολληθεί τα κύτταρα. Σε περίπτωση που έχουν αποκολληθεί όλα προσθέτουμε καλλιεργητικό υλικό και αφήνουμε στον κλίβανο για περίπου 4 ώρες.
 12. Τέλος απορρίπτεται το περιεχόμενο της φιάλης καλλιέργειας και προστίθενται 3ml φρέσκου καλλιεργητικού υλικού complete HAM'S.
 13. Η φιάλη παραμένει στον κλίβανο overnight και την επόμενη μέρα το πρωί γίνεται έλεγχος για καταλληλότητα και προσθήκη κολχικίνης.
 14. Αν υπάρχει ο απαιτούμενος αριθμός διαιρούμενων κυττάρων προστίθενται 6 σταγόνες κολχικίνης με σύριγγα σε άσηπτες συνθήκες και η φιάλη που περιέχει την κολχικίνη σημαίνεται κατάλληλα. Παραμένει στον κλίβανο για 2 ώρες και 45 λεπτά.
 15. Με το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος ξεκινά η διαδικασία συγκομιδής των χρωμοσωμάτων (harvest).
 16. Η φιάλη μεταφέρεται στην απαγωγό εστία νηματικής ροής και γίνεται μεταφορά του περιεχομένου της σε φιαλίδιο falcon 15ml.
 17. Στη συνέχεια γίνεται έκπλυση της φιάλης με Hank's και το περιεχόμενο της φιάλης μεταφέρεται επίσης στο σωλήνα falcon.
 18. Στη φιάλη προστίθεται Trypsin EDTA και η μεταφέρεται στον κλίβανο (37°C, 5%CO₂) για 6 λεπτά.
 19. Χτύπημα της φλάσκας για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα και ελέγχουμε την καλλιέργεια στο ανάστροφο μικροσκόπιο για να δούμε αν έχουν αποκολληθεί τα κύτταρα. Εάν έχουν αποκολληθεί όλα, στη φιάλη προστίθενται καλλιεργητικό υλικό (3 ml complete HAM'S) και το περιεχόμενο μεταφέρεται στο φιαλίδιο falcon.
 20. Το φιαλίδιο φυγοκεντρείται στα 1500 rpm για 10 λεπτά.
 21. Με πλαστική πιπέτα Pasteur απορρίπτεται το υπερκείμενο στο δοχείο βιολογικών αποβλήτων και απομένει περίπου μισό ml πάνω από το ίζημα. Στη

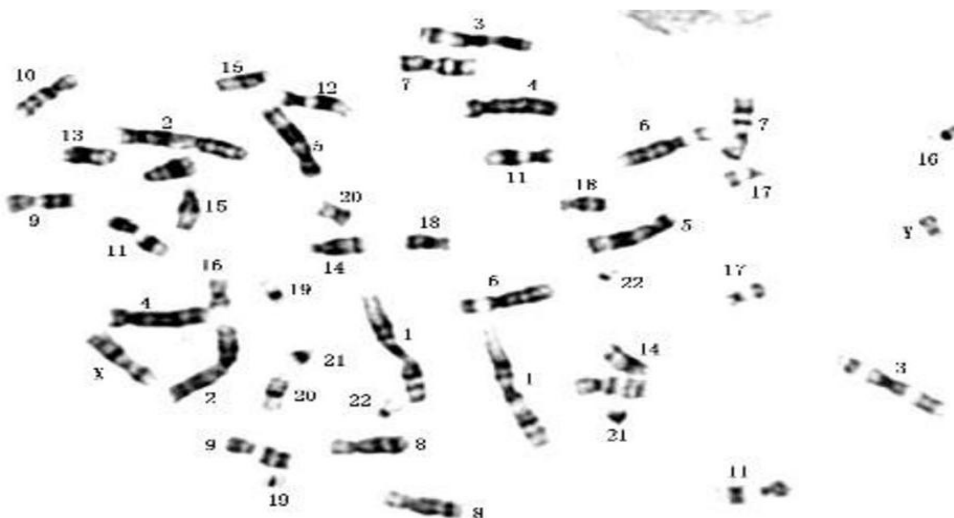
- συνέχεια με πλαστική πιπέτα Pasteur προσθέτουμε 3 ml υπότονου διαλύματος και αναδεύουμε έντονα για να σπάσουν τα συσσωματώματα των κυττάρων.
22. Προσθέτουμε ως τα 5ml υπότονο διάλυμα και μεταφέρουμε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 15 λεπτά.
 23. Μετά τα 15 λεπτά προσθέτουμε 6 σταγόνες παγωμένου μονιμοποιητικού διαλύματος μεθανόλης/οξικό οξύ 3:1 ήπια και φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στα 1500 rpm.
 24. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης απορρίπτεται το υπερκείμενο μέχρι περίπου τη χαραγή του κώνου και προστίθενται 6 σταγόνες παγωμένου μονιμοποιητικού διαλύματος ήπια. Το ίζημα αναδεύεται απαλά και προστίθεται ήπια παγωμένο μονιμοποιητικό διάλυμα ως τα 2ml.
 25. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 1500 rpm. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης απορρίπτεται το υπερκείμενο και στη συνέχεια προστίθενται 6 σταγόνες παγωμένου μονιμοποιητικού διαλύματος ήπια. Το ίζημα αναδεύεται απαλά και προστίθεται ήπια παγωμένο μονιμοποιητικό διάλυμα ως τα 2ml. Το φιαλίδιο falcon διατηρείται στο ψυγείο.
 26. Την επόμενη μέρα το φιαλίδιο φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 1500 rpm. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθεται ήπια φρέσκο παγωμένο μονιμοποιητικό. Το ίζημα αναδεύεται και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 1500 rpm.
 27. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα που απέμεινε θα πρέπει να αραιωθεί με 1-2 σταγόνες (ανάλογα με την ποσότητά του) παγωμένο μονιμοποιητικό διάλυμα για να γίνει επίστρωση σε αντικειμενοφόρους πλάκες.
 28. Κατά την επίστρωση ακολουθείται η εξής διαδικασία:
 29. Η αντικειμενοφόρος εμβαπτίζεται σε δοχείο με μεθανόλη και στεγνώνεται με χειροπετσέτα. Αναγράφεται στο περιθώριο ο κωδικός του δείγματος και η φλάσκα από την οποία προέρχεται το δείγμα και στη συνέχεια με γυάλινη πιπέτα Pasteur επιστρώνονται ομοιόμορφα 3-4 σταγόνες από το υλικό σε κάθε αντικειμενοφόρο.
 30. Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι ελέγχονται σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων για την πυκνότητά τους και τον αριθμό των μεταφάσεων.
 31. Επιστρώνονται συνήθως περίπου 3 αντικειμενοφόροι από κάθε περιστατικό.
 32. Καταγράφουμε σε κατάλληλο έντυπο τον αριθμό των αντικειμενοφόρων που επιστρώσαμε και την ημερομηνία επίστρωσης.
 33. Οι αντικειμενοφόροι αφού στεγνώσουν παραμένουν σε κλίβανο 90°C για 90 λεπτά και ακολουθεί η χρώση για τη δημιουργία ταινιών G.
 34. Για την διαδικασία της χρώσης χρειαζόμαστε ένα βαθμονομημένο θερμόμετρο και πάγο μέσα στον οποίο εμβαπτίζεται δοχείο με Trypsin έτσι ώστε να βρίσκεται σε θερμοκρασία 16° C. Επιπλέον σε δυο ποτήρια ζέσεως των 50ml τοποθετείται 0.9% NaCl για την έκπλυση των αντικειμενοφόρων μετά την παραμονή τους στο δοχείο με την Trypsin.
 35. Η διαδικασία χρώσης ξεκινά με την εμβάπτιση της αντικειμενοφόρου στο δοχείο με την Trypsin 16°C όπου παραμένει για συγκεκριμένο χρόνο (ελέγχεται με χρονόμετρο).
 36. Μετά την Trypsin η αντικειμενοφόρος εμβαπτίζεται διαδοχικά σε δυο ποτήρια ζέσεως των 50ml που περιέχουν 0.9% NaCl, για να εκπλυθεί από το ένζυμο και στη συνέχεια γίνεται χρώση. Τοποθετούμε την αντικειμενοφόρο σε οριζόντια θέση και την καλύπτουμε με την χρωστική (0,5ml Leishman's stain & 1,5ml Gurr buffer αναμιγνύονται μέσα σε σύριγγα των 2,5ml). Ελέγχουμε το χρόνο της χρώσης με timer και ξεπλένουμε μετά το πέρας του απαιτούμενου χρόνου με Water for Injection.
 37. Αφήνουμε να στεγνώσει σε όρθια θέση.

38. Καλύπτουμε με 3 σταγόνες Entellan mounting και καλυπτρίδα 26x50mm.
39. Ελέγχουμε στο μικροσκόπιο την ποιότητα των χρωμοσωμάτων και προσαρμόζουμε ανάλογα το χρόνο παραμονής στο ένζυμο και τη χρώση.
40. Ακολουθεί παρατήρηση και ανάλυση στο μικροσκόπιο. Σε κανονικές συνθήκες αναλύονται 20 μεταφάσεις από δυο καλλιέργειες. Κάθε μετάφαση που αναλύεται καταγράφεται σε ειδικό έντυπο και σημειώνονται οι συντεταγμένες της θέσης της για λόγους ιχνηλασιμότητας. [124]

Μικροσκοπική παρατήρηση

Αναλυτικότερα στη φάση της μικροσκοπικής παρατήρησης, η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετείται στο μικροσκόπιο, αρχικά γίνεται η εστίαση με τον φακό 10× για να εντοπιστεί το πεδίο που θα μελετηθεί, σε αυτό το σημείο στο ειδικό έντυπό που αναγράφονται τα στοιχεία του δείγματος γίνεται η καταγραφή των συντεταγμένων για την μετάφαση που θα τεθεί για ανάλυση (αυτή η διαδικασία ακολουθείτε για την καταγραφή όλων των μεταφάσεων που θα αναλυθούν για το εκάστοτε περιστατικό), όταν εντοπιστεί η μετάφαση και καταγραφεί, για να επιτευχθεί η ανάλυση των χρωμοσωμάτων γίνεται η μέγιστη εστίαση του πεδίου επιλέγοντας τον φακό 100× του μικροσκοπίου. (Εικόνα 28)

Σε αυτό το σημείο έχει βοηθήσει και η τεχνολογία καθώς με τη χρήση ειδικού λογισμικού (Ikaros, αυτό χρησιμοποιεί το Χωρέμιο ερευνητικό κέντρο) και ηλεκτρονικού υπολογιστή μπορεί να γίνει αποθήκευση των φωτογραφιών των μεταφάσεων που μελετήθηκαν για την διευκόλυνση στην αρχειοθέτηση των περιστατικών που αναλύονται, υπάρχει δηλαδή η δυνατότητα με μια κάμερα που είναι συνδεδεμένη με το μικροσκόπιο το οπτικό πεδίο να μεταφερθεί στην οθόνη του υπολογιστή και με τις ενέργειες του χρήστη (κυτταρογενετιστή), δύναται να επιτευχθεί η ταξινόμηση των χρωμοσωμάτων ώστε να αποδοθεί ο καρυότυπος του εμβρύου. Τέλος, γίνεται η περιγραφή, ονοματολογία του καρυότυπου σύμφωνα με τους διεθνείς κανόνες του συστήματος International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 2016.



Εικόνα 28: Απεικόνιση μετάφασης όπως φαίνεται κατά την μικροσκοπική παρατήρηση και αναγνώριση των χρωμοσωμάτων [125]

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας αξιοποιήθηκαν όλα τα δείγματα προγεννητικού ελέγχου που προσήλθαν για κυτταρογενετικό έλεγχο στο κυτταρογενετικό εργαστήριο του Χωρέμειου ερευνητικού εργαστηρίου για τα έτη 2014, 2015, 2016 και αφορούν δείγματα χοριακών λαχνών και αμνιακού υγρού. Ο αριθμός των δειγμάτων ανέρχεται στα 1315 περιστατικά τα οποία παραπέμφθηκαν λόγω διάφορων αιτιών για κυτταρογενετικό έλεγχο όπως, λόγω της αυξημένης ηλικίας της μητέρας, την ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού (γονέας φορέας ανωμαλίας) ή προηγούμενη κύηση με έμβρυο που έφερε ανωμαλία ή τέκνο με ανωμαλία, περιπτώσεις με καθ' έξιν αποβολές (που οφείλονται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες), αλλά και 194 περιστατικά εξ' αυτών (1315) λόγω υπαρξής παθολογικών ευρημάτων κατά τον προγεννητικό έλεγχο 1^{ου} τριμήνου όπως, αυξημένη αυχενική διαφάνεια (NT) ή παθολογικοί βιοχημικοί και υπερηχογραφικοί δείκτες (αυξημένες πιθανότητες κινδύνου για εμφάνιση ανωμαλίας του εμβρύου). Από το σύνολο των περιστατικών (1315) που παραπέμφθηκαν για κυτταρογενετική ανάλυση και έγινε η περιγραφή του καρυοτύπου του εμβρύου ταυτοποιήθηκαν αριθμητικές καθώς και δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε 48 περιστατικά.

Από τα 48 παθολογικά περιστατικά που ανιχνεύθηκαν από την κυτταρογενετική ανάλυση επιλέχθηκε η παρούσα μελέτη να αναλύσει τα ευρήματα των 44 περιστατικών καθώς τα 4 περιστατικά που αποφασίστηκε να παραληφθούν, αφορούν μωσαϊκά που βρέθηκαν έπειτα από την ανάλυση δείγματος τροφοβλάστης και δεν είναι βέβαιο για το αν υπάρχει μωσαϊκισμός του εμβρύου ή μωσαϊκισμός του πλακούντα, καθώς δεν είχε καταγραφεί στο αρχείο του εργαστηρίου να προσήλθαν για περαιτέρω κυτταρογενετικό έλεγχο έπειτα από λήψη αμνιακού υγρού. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε να μην υπολογισθούν στην περαιτέρω ανάλυση καθώς είναι δυνητικά φυσιολογικά περιστατικά αν ο μωσαϊκισμός αφορά μωσαϊκισμό του πλακούντα.

Στην συνέχεια θα εξετασθεί μεμονωμένα και ενδελεχώς η ομάδα που αφορά τα περιστατικά που παραπέμφθηκαν για κυτταρογενετική ανάλυση εξαιτίας παθολογικών ευρημάτων με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ανωμαλιών του εμβρύου από τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο, δηλαδή τα 194 περιστατικά (από τα 1315). Από το σύνολο των δειγμάτων αυτών αυτά που επιβεβαιώθηκαν να φέρουν κάποια ανωμαλία μετά την κυτταρογενετική ανάλυση ανέρχονται σε 11 περιστατικά, τα οποία συμπεριλαμβάνονται στα 44 δείγματα που προανέφερα.

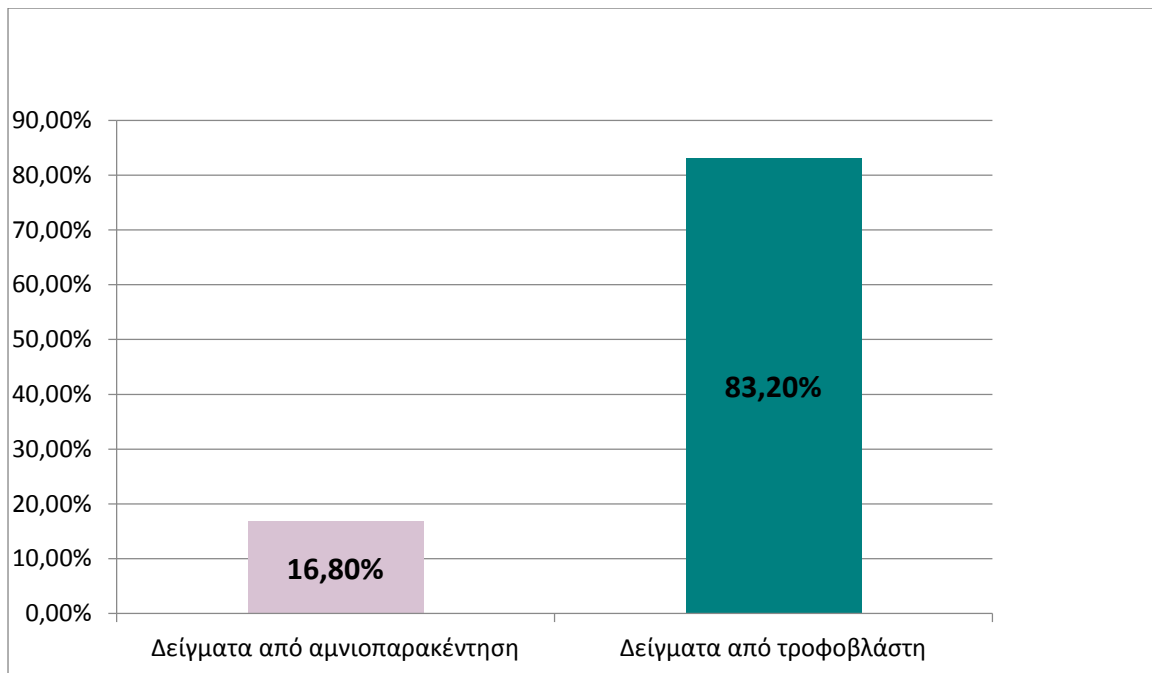
Επομένως, συνοψίζοντας προκύπτει πως από το σύνολο των 1315 περιστατικών τα 194 προσήλθαν εξαιτίας ευρημάτων κατά τον προγεννητικό έλεγχο 1^{ου} τριμήνου, ενώ τα υπόλοιπα εξαιτίας άλλων παραγόντων που δύναται να θέσουν την κύηση ως υψηλού κινδύνου για την παρουσία κάποιας ανωμαλίας στο έμβρυο. Από το σύνολο των παραπάνω περιστατικών τα 48 είχαν παθολογικό καρυότυπο. Από αυτά η μελέτη θα αναλύσει τα 44 περιστατικά για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, με τα 11 περιστατικά από αυτά να αφορούν την κατηγορία που εξετάζουμε.

3.2 Υπολογισμός συχνότητας χρωμοσωμικών ανωμαλιών.

A. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που προέρχονται από περιστατικά που προσήλθαν στο κυτταρογενετικό εργαστήριο του Χωρεμείου και αναλύθηκαν σε διάστημα τριών ετών (2014-2016), ώστε να υπάρξει ένα ικανοποιητικό δείγμα (ως προς τον αριθμό), με σκοπό να προκύψει ένα ασφαλές συμπέρασμα.

Αναλυτικότερα από το σύνολο των δειγμάτων (1315 δείγματα) προγεννητικού ελέγχου που αναλύθηκαν και τα τρία έτη τα 1094 αφορούσαν δείγματα αμνιακού υγρού και τα 221 δείγματα χοριακών λαχνών, δηλαδή το:

- 83,2% αφορούσε δείγματα από αμνιοπαρακέντηση (αμνιακό υγρό) και το
- 16,8% αφορούσε δείγματα από τροφοβλάστη (χοριακών λαχνών). (Σχήμα1)



Σχήμα 1: Απεικόνιση ποσοστιαίας αναλογίας των δειγμάτων που προσήλθαν έπειτα από αμνιοπαρακέντηση έναντι αυτών που προσήλθαν έπειτα από λήψη τροφοβλάστης και αναλύθηκαν στο κυτταρογενετικό εργαστήριο του Χωρεμείου ερευνητικού κέντρου για τα έτη 2014-2016

Από το σύνολο αυτών των δειγμάτων που παρελήφθησαν τα παθολογικά δείγματα που ταυτοποιήθηκαν ύστερα από εργαστηριακή ανάλυση και μελέτη είναι 48 και παραθέτονται στον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 7)

Πίνακας 7: Παθολογικά περιστατικά που μελετήθηκαν για τα τρία έτη

α/α	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ	ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ
1	A14-12	47,XX,+21
2	A14-53	47,XX,+21

3	A14-56	45,X/46,XX
4	A14-126	47,XY,+21
5	A14-201	47,XX,+21
6	A14-313	47,XY,+21
7	A14-346	46,XX,inv(3)(p12.2p14.2)mat
8	A14-352	46,XX,inv(9)(p22q22)pat
9	A14-403	69,XXX
10	A14-417	46,XY,inv(10)(q21.2q22.3)mat
11	A14-425	45,X
12	A14-124	45,XX,rob(13;14)(q10;p10)mat
13	A14-140	46,XY,der(1)ins(1;?)(q32;?)/ 46,XY
14	A14-157	46,XX,inv(13)(q14.3q31.2)mat
15	A14-178	45,XX,der(13;14)(q10;q10)pat
16	Trp14-1	47,XY,+21
17	Trp14-22	46,XX,ins(2;1)(2pter->2q21.3::1p22.3 ->1p21::2q21.3->2qter;1pter->1p22.3:: 1p21->1qter)mat
18	A15-27	47,XY,+21
19	A15-258	47,XYY
20	A15-34	45,X/46,XX
21	A15-37	47,XXY
22	A15-67	47,XY,+21
23	A15-73	45,XX,der(13;14)(q10;q10)pat
24	A15-79	47,XX,+21
25	A15-84	47,XYY
26	A15-93	47,XY,+21

27	A15-114	47,XY,+mar de novo
28	A15-119	47,XY,+21
29	A15-121	46,X,t(Y;3)(q12.3;q13.2) de novo
30	A15-154	47,XY,+21
31	A15-164	46,XY,inv(13)(q21q31)mat
32	A15-190	45,X /47,XXX
33	A15-246	47,XY,+21
34	Trp15-4	mos45,X/46,X,+mar
35	Trp15-55	47,XY,+21
36	Trp15-62	47,XX,+9/46,XX
37	Trp16-60	46,XY,t(5;21)(p15.1;q22.1)mat
38	A16-19	45,XY,der(14;22)(q10;q10)pat
39	A16-24	45,XX,der(13;14)(q10;q10)mat
40	A16-45	47,XY,+21
41	A16-137	46,XX, [der(17)ins(17;?)(p11.2;?)]pat
42	A16-148	47,XX,+21
43	A16-168	46,XX,inv(19)(p11p13.11)mat
44	Trp16-1	47,XX,+16
45	Trp16-12	47,XY,+21
46	Trp16-44	47,XY,+2/46,XY
47	Trp16-50	47,XX,+2/46,XX
48	A16-230	47,XXY

Συνοψίζοντας τα στοιχεία που παραθέτονται στον παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι για αυτά τα τρία έτη επιβεβαιώθηκαν ότι 48 περιστατικά φέρουν κάποια ανωμαλία. (Πίνακας 3)

Από αυτά τα 48 παθολογικά περιστατικά:

- αριθμητικές ανωμαλίες εμφανίζουν τα 24,
- δομικές ανωμαλίες εμφανίζουν τα 16 και
- μωσαϊκισμό εμφανίζουν τα 8.

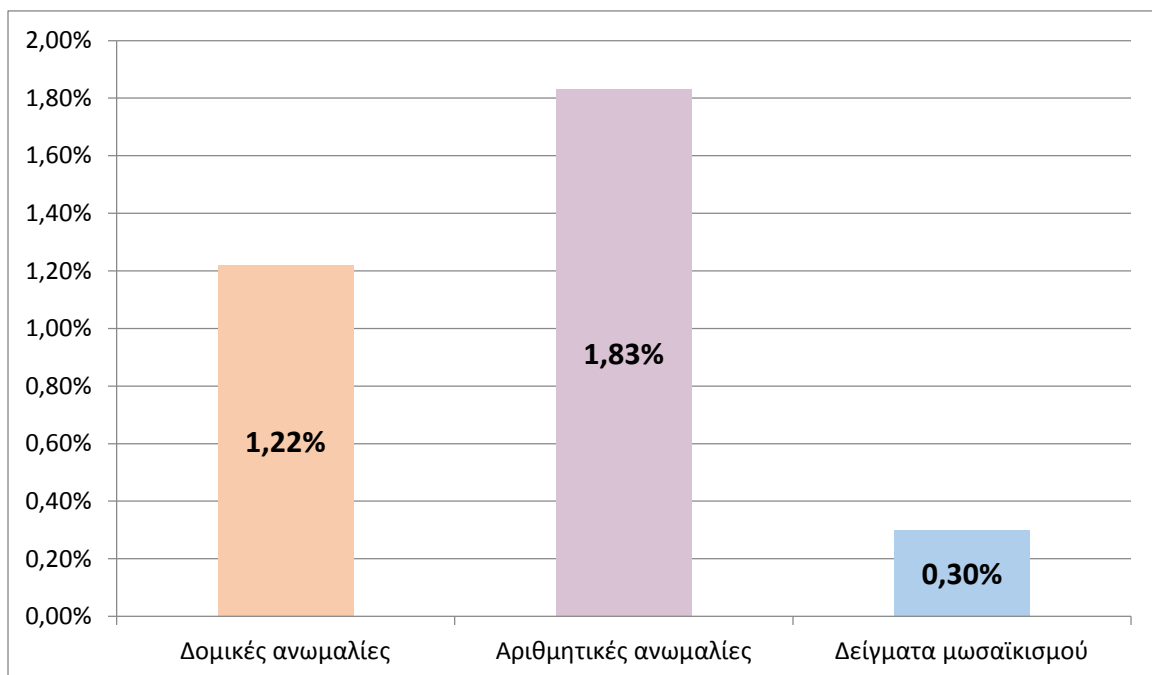
Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να επισημανθεί πως από τα 8 περιστατικά μωσαϊκισμού τα 4 αφορούν αποτελέσματα που έχουν δοθεί έπειτα από την ανάλυση τροφοβλάστης και τα 4 αφορούν αποτελέσματα που δόθηκαν έπειτα από ανάλυση αμνιακού υγρού. Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω τα περιστατικά που προέρχονται από λήψη τροφοβλάστης επιλέχθηκε να μην υπολογισθούν στην περαιτέρω ανάλυση καθώς είναι δυνητικά φυσιολογικά περιστατικά αν ο μωσαϊκισμός αφορά μωσαϊκισμό του πλακούντα (είναι τα περιστατικά που στον παραπάνω πίνακα είναι σημασμένα με κόκκινο χρώμα).

Επομένως το σύνολο των περιστατικών για τα οποία θα γίνει η μελέτη και μπορούν με βεβαιότητα να χαρακτηρισθούν ως παθολογικά είναι τα 44 περιστατικά. Επομένως προκύπτει ότι:

- αριθμητικές ανωμαλίες εμφανίζουν τα 24,
- δομικές ανωμαλίες εμφανίζουν τα 16 και
- αληθή μωσαϊκισμό (true mosaicism detected in amniotic fluid) εμφανίζουν τα 4.

Και έτσι προκύπτει ότι για το σύνολο των περιστατικών που αναλύθηκαν η συχνότητα εμφάνισης των ανωμαλιών που ταυτοποιήθηκαν αντιστοιχεί σε:

- 1,83%, για τις αριθμητικές ανωμαλίες (24/1315),
- 1,22% για τις δομικές ανωμαλίες (16/1315) και
- 0,3% για μωσαϊκισμό (4/1315).

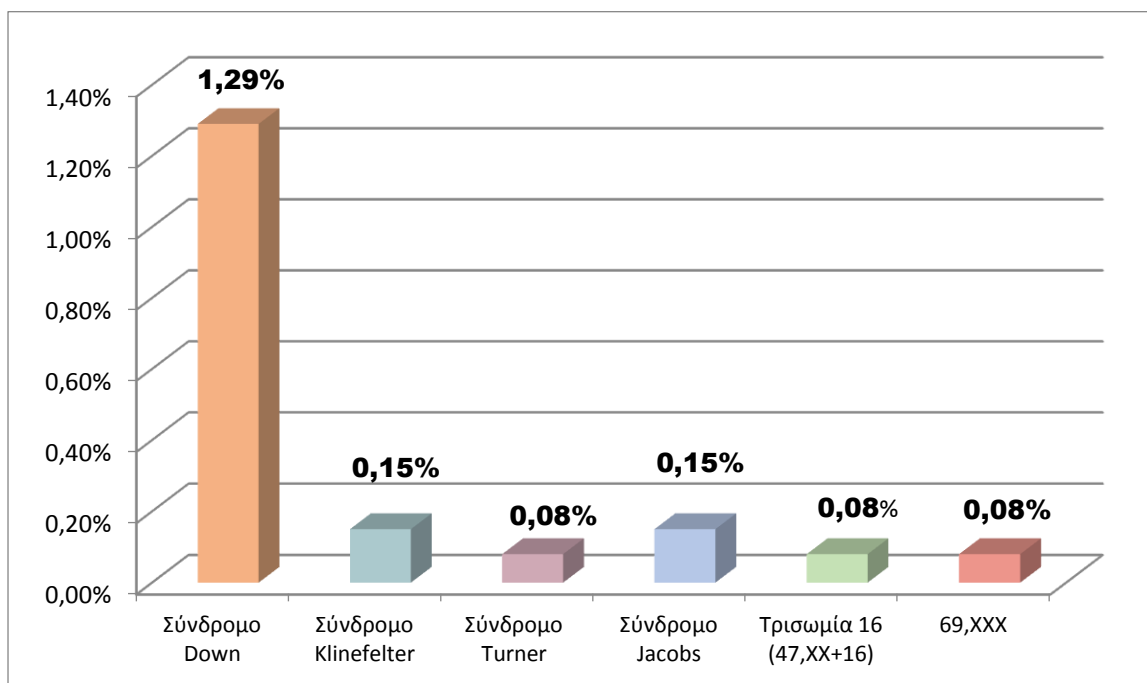


Σχήμα 2: Ποσοστιαία αναλογία για τα είδη των ανωμαλιών που ανιχνεύθηκαν

Στη συνέχεια μελετάται η συχνότητα εμφάνισης των ανωμαλιών που αναλύθηκαν κυτταρογενετικά, ανάλογα με το είδος τους. Έτσι προκύπτει ότι από τις 24 αριθμητικές ανωμαλίες που εντοπίστηκαν οι:

- 17 περιπτώσεις αφορούν σύνδρομο Down (+ Chr 21) δηλαδή το 1,29%,
- 2 περιπτώσεις αφορούν σύνδρομο Klinefelter (47,XXY) δηλαδή το 0,15%,
- 1 περίπτωση αφορά σύνδρομο Turner (45,X) δηλαδή το 0,08%,
- 2 περιπτώσεις αφορούν σύνδρομο Jacobs (47,XY₂) δηλαδή το 0,15%,
- 1 περίπτωση αφορά τρισωμία 16 (47,XX,+16) δηλαδή το 0,08% και
- 1 περίπτωση είχε καρυότυπο 69,XXX δηλαδή το 0,08%. (Σχήμα 3)

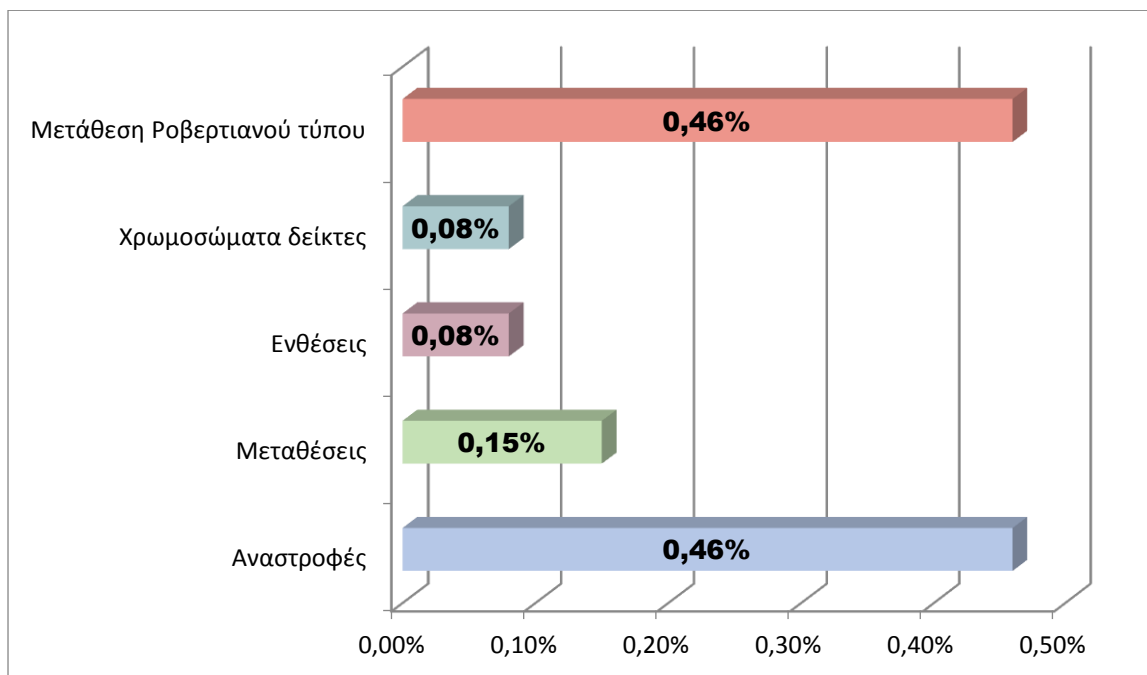
Η τρισωμία 16 έχει προκύψει έπειτα από ανάλυση δείγματος που έχει προέλθει από λήψη χοριακών λαχνών. Η έγκυος κατόπιν υποβλήθηκε σε αμνιοπαρακέντηση και πρόεκυψε έμβρυο με φυσιολογικό καρυότυπο. Το περιστατικό θα παρουσιαστεί παρακάτω.



Σχήμα 3: Συχνότητα εμφάνισης αριθμητικών ανωμαλιών που εντοπίστηκαν μετά την κυτταρογενετική ανάλυση επί του συνόλου των περιστατικών που παραπέμφθηκαν 24/1315

Ενώ, για τις δομικές ανωμαλίες από τα 16 περιστατικά που εντοπίστηκαν οι:

- 6 ήταν αναστροφές δηλαδή το 0,46%,
- 2 ήταν μεταθέσεις δηλαδή το 0,15%,
- 1 ήταν ένθεση δηλαδή το 0,08%,
- 1 ήταν χρωμοσωμικός δείκτης (marker) δηλαδή το 0,08%,
- 6 ήταν μεταθέσεις Ροβερτιανού τύπου δηλαδή το 0,46%. (Σχήμα 4)



Σχήμα 4: Συχνότητα εμφάνισης δομικών ανωμαλιών που εντοπίστηκαν μετά την κυτταρογενετική ανάλυση επί του συνόλου των περιστατικών που παραπέμφθηκαν 16/1315

Από τις παραπάνω δομικές ανωμαλίες που εντοπίστηκαν:

- οι 9 ήταν μητρικής προέλευσης, δηλαδή το 0,68%,
- οι 5 πατρικής προέλευσης δηλαδή το 0,38%,
- οι υπόλοιπες 2 ήταν de novo δηλαδή το 0,15%. (Πίνακας 8)

Πίνακας 8: Συχνότητες εμφάνισης ανωμαλιών μητρικής, πατρικής προέλευσης και de novo

Προέλευση δομικών ανωμαλιών	Από τα 1315 περιστατικά που παραπέμφθηκαν για κυτταρογενετική ανάλυση
Οι 9 μητρικής προέλευσης	0,68%
Οι 5 πατρικής προέλευσης	0,38%
Οι 2 ήταν de novo	0,15%

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι:

- οι αριθμητικές ανωμαλίες είχαν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης έναντι των δομικών ανωμαλιών σε ποσοστό 1,83% έναντι 1,22%, ενώ
- η συχνότητα εμφάνισης των μωσαϊκών ανέρχεται στο 0,3%.
- Η δομικές ανωμαλίες που παρουσιάζουν την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης είναι τα παράγωγα χρωμοσώματα (0,46%) και οι αναστροφές (0,46%) ενώ η αριθμητική ανωμαλία με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης είναι το σύνδρομο Down σε ποσοστό 1,29%.

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα παραπάνω ευρήματα είναι σημαντικό να υπολογισθεί συνολικά η συχνότητα εμφάνισης ανωμαλιών για κυήσεις αυξημένου κινδύνου που εντοπίστηκαν και αναλύθηκαν αυτά τα τρία έτη (1315 περιστατικά).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι ότι:

- η συχνότητα εμφάνισης ανωμαλιών για κυήσεις αυξημένου κινδύνου ανέρχεται στο 3,3% (44/1315).

Η συχνότητα εμφάνισης για την κάθε ανωμαλία που εντοπίστηκε και για τα τρία έτη αποτυπώνεται στους παρακάτω πίνακες. (Πίνακας 9, Πίνακας 10)

Πίνακας 9: Συχνότητα εμφάνισης αριθμητικών ανωμαλιών που εντοπίστηκαν

α/α	ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ
1	Σύνδρομο Down (+21)	1,29%
2	Σύνδρομο Klinefelter (47,XXY)	0,15%
3	Σύνδρομο Turner (45,X)	0,08%
4	Σύνδρομο Jacobs (47,XYY)	0,15%
5	Τρισωμία 16 (47,XX,+16)	0,08%
6	69,XXX	0,08%

Πίνακας 10: Συχνότητα εμφάνισης δομικών ανωμαλιών που εντοπίστηκαν

α/α	ΔΟΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ
1	Χρωμοσωμικοί δείκτες	0,08%
2	Αναστροφή	0,46%
3	Μετάθεση	0,15%
4	Ένθεση	0,08%
5	Μετάθεση Ροβερτιανού τύπου	0,46%

B. Στην συνέχεια από το σύνολο των περιστατικών που αναλύθηκαν για αυτά τα τρία έτη (1315), επιλέχθηκαν 194 περιστατικά που είχαν αυξημένο ποσοστό εμφάνισης για κάποια ανωμαλία με βάση τον εργαστηριακό βιοχημικό έλεγχο ή υπερηχογραφικό προγεννητικό έλεγχο 1^{ου} τριμήνου (μη επεμβατικό έλεγχο), με σκοπό:

- να υπολογισθεί ο αριθμός των περιστατικών για τα οποία επιβεβαιώθηκε ο κίνδυνος εμφάνισης κάποιας ανωμαλίας,
- ποιά ανωμαλία προέκυψε ύστερα από τον κυτταρογενετικό έλεγχο.

Από τα 194 περιστατικά που παραπέμφθηκαν για κυτταρογενετική ανάλυση εξαιτίας αυξημένου κινδύνου εμφάνισης κάποιας χρωμοσωμικής ανωμαλίας, αποδείχθηκε πως μόνο τα 11 περιστατικά έφεραν κάποια ανωμαλία. Δηλαδή μόνο το 5,67%.

Στον παρακάτω πίνακα παραθέτονται: (Πίνακας 11)

- τα παθολογικά περιστατικά που επιβεβαιώθηκαν μετά την κυτταρογενετική ανάλυση,
- ο δείκτης 1^{ου} τριμήνου που χρησιμοποιήθηκε,
- το αποτέλεσμα την κυτταρογενετικής ανάλυσης.

Πίνακας 11: Παράθεση παθολογικών περιστατικών που αναλύθηκαν κυτταρογενετικά και το αποτέλεσμα που προέκυψαν μετά την ανάλυση

α/α	ΚΩΔΙΚΟΣ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ	ΕΞΕΤΑΣΗ	ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑ ΚΙΝΥΝΟΥ ΓΙΑ ΑΝΩΜΑΛΙΑ	ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ
1	A14-53	NT	1/270 για Down	47,XX,+21
2	A14-126	NT	-----	47,XX,+21
3	A14-313	NT	1/44 για Down	47,XY,+21
4	A15-246	PAPP-A	1/107 για Down	47,XY,+21
5	A15-154	NT	-----	47,XY,+21
6	A16-45	NT	-----	47,XX,+21
7	A15-119	NT	1/27 για Down	47,XY,+21
8	A15-79	NT	1/393 για Down	47,XX,+21
9	A15-93	NT	-----	47,XY,+21
10	A16-148	NT PAPP-A	1/210 για Down	47,XX,+21
11	A16-230	NT	1/40 για Down	47,XXY

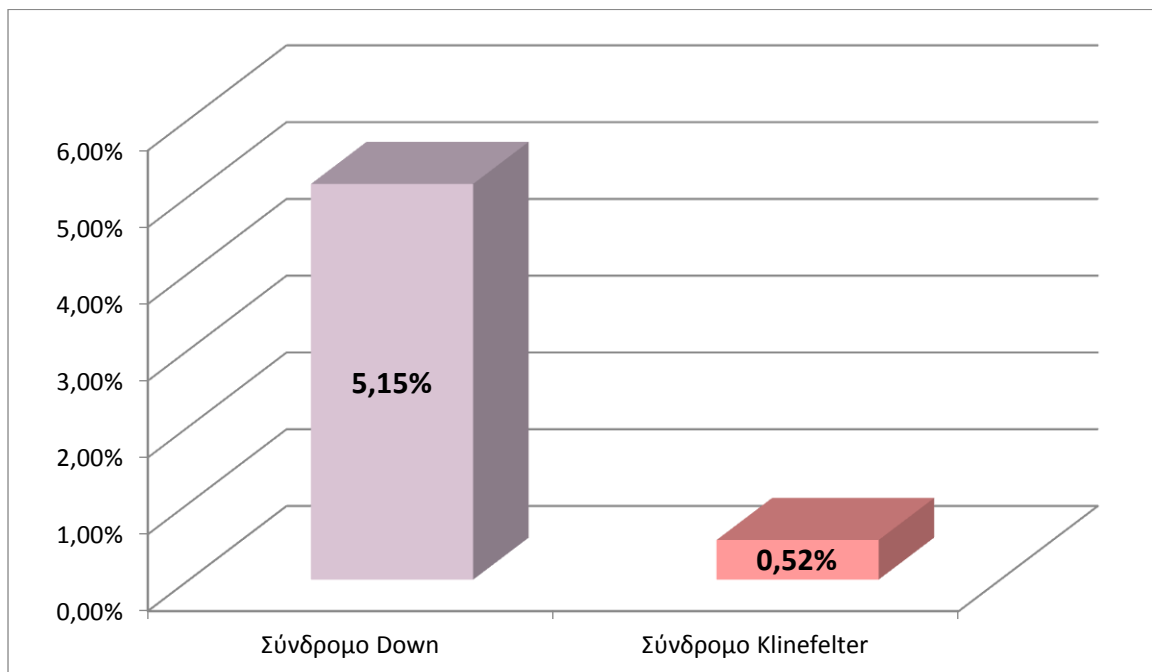
Συνοψίζοντας παραθέτονται οι ανωμαλίες που εντοπίστηκαν στα 11 περιστατικά στον παρακάτω πίνακα.(Πίνακας 12)

Πίνακας 12: Περιστατικά με παθολογικό καρυότυπο που είχαν αυξημένες πιθανότητες για ανωμαλία κατά τον προγεννητικό έλεγχο

α/α	ΑΝΩΜΑΛΙΑ ΠΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΤΗΚΕ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ
1	Σύνδρομο Down	10
2	Σύνδρομο Klinefelter 47,XXY	1

Από το σύνολο των παθολογικών περιστατικών, δηλαδή από το 5,67% (11 περιστατικά), οι ανωμαλίες που εντοπίστηκαν αντιστοιχούν σε:

- Σύνδρομο Down (Τρισωμία 21) σε ποσοστό 5,1546%,
- Σύνδρομο Klinefelter (47,XXY) σε ποσοστό 0,515% (Σχήμα 5)



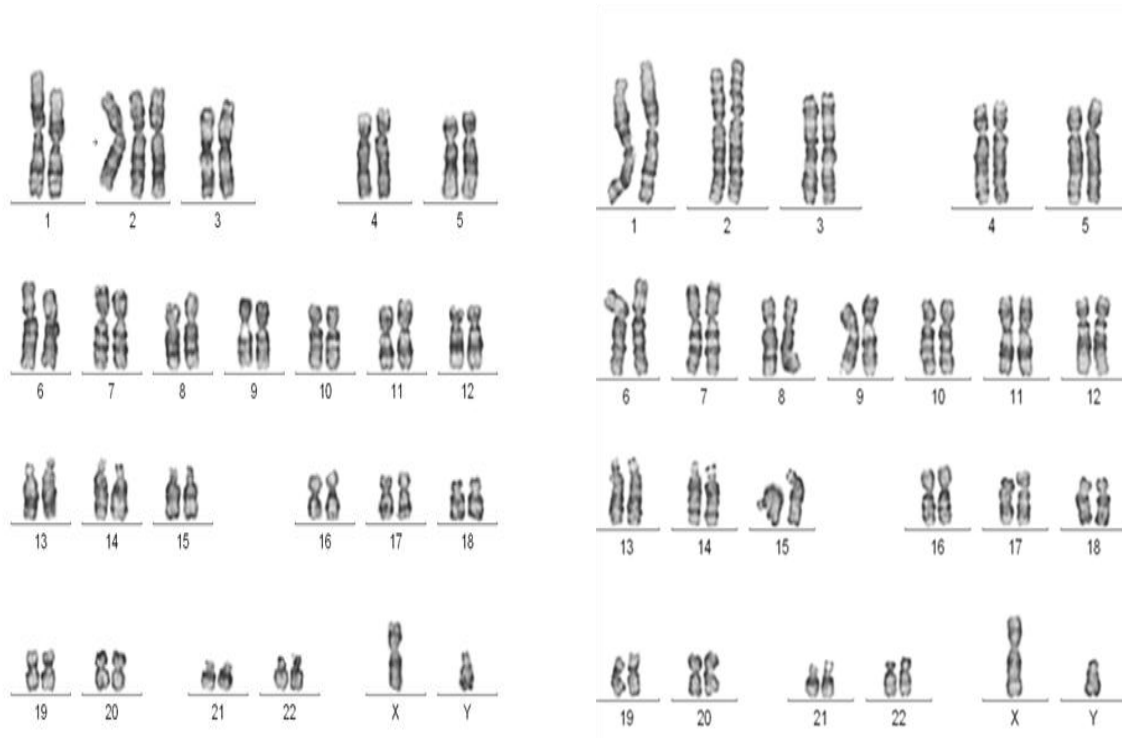
Σχήμα 5: Απεικόνιση συχνοτήτων παθολογικών περιστατικών που επιβεβαιώθηκαν με την κυτταρογενετική ανάλυση

Ενδεικτά παρατίθενται παρακάτω ορισμένα περιστατικά ανάλυσης που αναλύθηκαν σε αυτή την μελέτη αναφέροντας το ιατρικό ιστορικό (αίτια παραπομπής), το αποτέλεσμα

της κυτταρογενετικής ανάλυσης, καθώς και τι αναφέρει η διεθνή βιβλιογραφία για τέτοιου είδους περιστατικά.

α. Αποτέλεσμα κυτταρογενετικής ανάλυσης σε δείγμα χοριακών λαχνών μετά από παραπομπή λόγω αυξημένης ηλικίας και ιστορικό προηγούμενης κύησης με τρισωμία 21. Διαπιστώθηκε καρυότυπος άρρενος εμβρύου με μωσαϊκισμό μιας φυσιολογικής κυτταρικής σειράς και δεύτερης κυτταρικής σειράς με τρισωμία του χρωμοσώματος 2. (Εικόνα 29) Σύμφωνα με τα διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα ο μωσαϊκισμός του χρωμοσώματος 2 είναι από τα συχνότερα ευρήματα σε καλλιέργειες χοριακών λαχνών (1,2/1000) αλλά σχεδόν πάντα ο μωσαϊκισμός αυτός αφορά αποκλειστικά τον πλακούντα (confined placental mosaicism) και όχι το έμβρυο.

Με σκοπό να διερευνηθεί περαιτέρω ο εν λόγω μωσαϊκισμός πραγματοποιήθηκε μελέτη του καρυότυπου του εμβρύου σε κύτταρα από δείγμα αμνιακού υγρού και προέκυψε φυσιολογικός καρυότυπος άρρενος.



Εικόνα 29: Χοριακές λάχνες με καρυότυπο 47,XY,+2/46,XY

β. Η μελέτη δείγματος χοριακών λαχνών με αιτία παραπομπής την αυξημένη ηλικία της μητέρας εντόπισε σε όλα τα κύτταρα από το ίδιο δείγμα και για τις δυο καλλιέργειες που δημιουργήθηκαν, τρισωμία του χρωμοσώματος 16. (Εικόνα 30)



Εικόνα 30: Χοριακές λάχνες με καρυότυπο 47,XX,+16

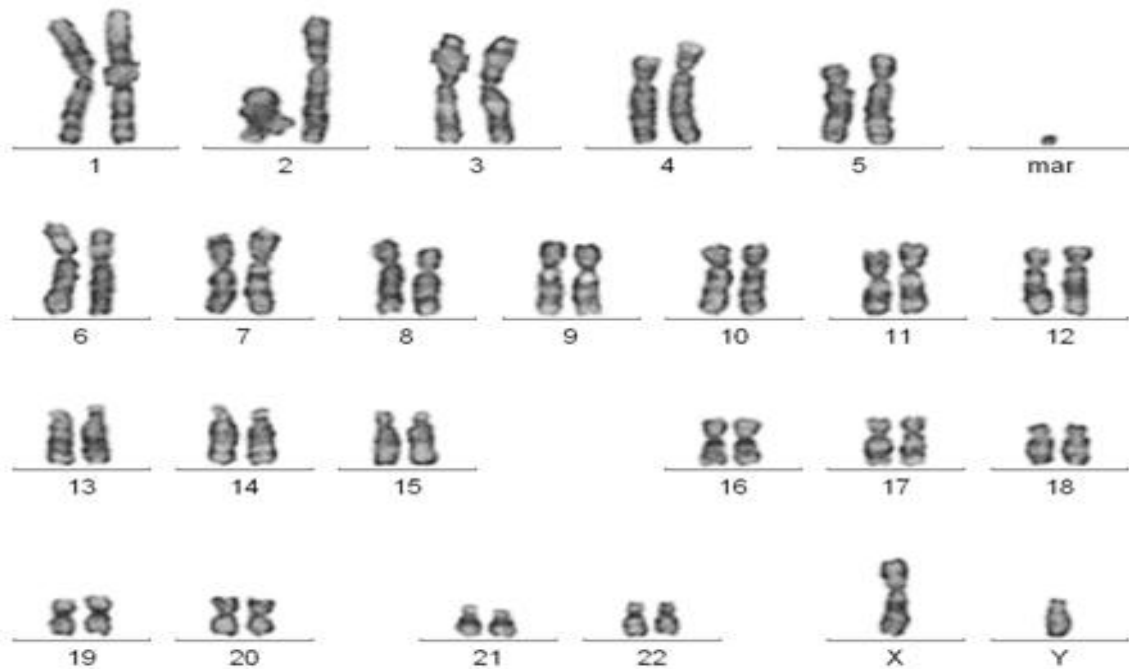
➤ Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία ο εντοπισμός τρισωμίας του χρωμοσώματος 16 κατά τον προγεννητικό έλεγχο μπορεί να συσχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα για:

- πρόωρο τοκετό,
- καθυστέρηση της ενδομήτριας ανάπτυξης (IUGR),
- παρουσία εμβρυϊκών ανωμαλιών καθώς και
- εμβρυϊκό θάνατο.

Όταν κατά τον προγεννητικό έλεγχο η κυτταρογενετική ανάλυση δείγματος χοριακών λαχνών εντοπίζει τρισωμία του χρωμοσώματος 16, συνιστάται περαιτέρω διερεύνηση και έλεγχος σε δείγμα από άλλο ιστό του εμβρύου (για παράδειγμα ανάλυση κυττάρων από αμνιακό υγρό) καθώς και ενδεδειγμένη υπερηχογραφικός και καρδιολογικός έλεγχος του εμβρύου. Ο περαιτέρω επεμβατικός έλεγχος με λήψη αμνιακού υγρού που ακολούθησε ήταν φυσιολογικός για όλα τα χρωμοσώματα και δεν προέκυψε τρισωμία του χρωμοσώματος 16.

γ. Κατά την κυτταρογενετική μελέτη δείγματος αμνιακού υγρού με αιτία παραπομπής την αυξημένη ηλικία της μητέρας προέκυψε καρυότυπος εμβρύου με ένα μικρό υπεράριθμο χρωμόσωμα (sSMC-mar) η προέλευση του οποίου δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί με την κλασική κυτταρογενετική. Προκειμένου να διερευνηθεί εάν το εν λόγω εύρημα προϋπάρχει στην οικογένεια, έγινε κυτταρογενετικός έλεγχος περιφερικού αίματος των γονέων και προέκυψε ότι το μικρό υπεράριθμο χρωμόσωμα που εντοπίστηκε στο έμβρυο δεν προϋπάρχει στην οικογένεια αλλά είναι νέα ανακατάταξη (de novo-dn). (Εικόνα 31) Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η συχνότητα εμφάνισης τέτοιων περιπτώσεων κατά τον προγεννητικό έλεγχο είναι 0,08% και ο κίνδυνος εμφάνισης παθολογικού φαινοτύπου σε αυτές τις περιπτώσεις είναι ~13% (αναλυτικότερα, ανάλογα με την προέλευση του χρωμοσώματος marker ο κίνδυνος εμφάνισης παθολογικού φαινοτύπου μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 7% και 28%) [121].

Περαιτέρω διερεύνηση με την τεχνική του μοριακού καρυότυπου καθώς και με την τεχνική του Φθορίζον Υβριδισμού (FISH), που έγινε στο Χωρέμιο ερευνητικό κέντρο έδειξε ότι το ως άνω εύρημα αποτελεί ετεροχρωματίνη προερχόμενη από το χρωμόσωμα 15 χωρίς αναμενόμενη επίπτωση στο φαινότυπο.



Εικόνα 31: Έμβρυο με καρυότυπο 47,XY,+mar de novo

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκαν χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε δείγματα χοριακών λαχνών και αμνιακού υγρού που παραπέμφθηκαν για προγεννητικό έλεγχο.

Ταυτοποιήθηκαν αριθμητικές καθώς και δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (ισοζυγισμένες και μη). Επιπλέον, μελετήθηκαν περιστατικά χοριακών λαχνών και αμνιακού υγρού που παρουσίασαν το φαινόμενο του μωσαϊκισμού. Σε όλες τις περιπτώσεις μωσαϊκισμού ακολουθήθηκαν οι διεθνείς οδηγίες και ειδικά για μωσαϊκισμό σε χοριακές λάχνες συστήθηκε περαιτέρω έλεγχος σε δείγμα αμνιακού υγρού για να αποσαφηνισθεί εάν πρόκειται για αληθή μωσαϊκισμό του εμβρύου.

Σε όλες τις περιπτώσεις φαινομενικά ισοζυγισμένων ανακατατάξεων που εντοπίστηκαν (π.χ. αμοιβαίες μεταθέσεις, μεταθέσεις ροβερτιανού τύπου και αναστροφές) σημειώνεται ότι συνεστήθη και πραγματοποιήθηκε κυτταρογενετικός έλεγχος περιφερικού αίματος των γονέων με σκοπό να διερευνηθεί εάν οι εν λόγω ανακατατάξεις προϋπάρχουν στην οικογένεια ή χαρακτηρίζονται *de novo*. Επιπλέον, ειδικά για τις μεταθέσεις ροβερτιανού τύπου που περιλαμβάνουν τα χρωμοσώματα 14 και 15 σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες ενδείκνυται και έλεγχος μονογονεϊκής δισωμίας (Uniparental Disomy –UPD).

Στα πλαίσια της γενετικής συμβουλευτικής εάν οι χρωμοσωμικές ανακατατάξεις που ανιχνεύονται στο έμβρυο προϋπάρχουν στην οικογένεια δεν αναμένεται να έχουν επιπτώσεις στο φαινότυπο του εμβρύου όπως και στους φαινοτυπικά φυσιολογικούς γονείς του. Εάν όμως μια χρωμοσωμική ανακατάταξη δεν προϋπάρχει στην οικογένεια και εμφανίζεται *ex novo* (de novo) η εκτίμηση κινδύνου για παθολογικό φαινότυπο του εμβρύου αλλάζει. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα (Warburton 1991), αμοιβαίες μεταθέσεις που εμφανίζονται *de novo* έχουν πιθανότητα 6% για παθολογικό έμβρυο ενώ εάν πρόκειται για αναστροφή ο κίνδυνος εκτιμάται σε 9,4%.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ακόμα και για φαινομενικά ισοζυγισμένες χρωμοσωμικές αλλαγές (π.χ. αναστροφές) η πιθανότητα ανακατατάξεων σε υπομικροσκοπικό επίπεδο δεν μπορεί να αποκλεισθεί με τον κλασικό καρυότυπο και μπορεί να ελεγχθεί με τεχνικές μοριακής κυτταρογενετικής όπως η FISH και η array-CGH. Τέλος, σε περίπτωση που ανιχνεύεται χρωμόσωμα δείκτης (mar) απαιτείται διερεύνηση με τεχνικές μοριακής κυτταρογενετικής όπως η FISH και η array-CGH, προκειμένου να ταυτοποιηθεί πλήρως το γενετικό περιεχόμενο του χρωμοσώματος δείκτη (mar).

Αληθής μωσαϊκισμός του εμβρύου εντοπίστηκε σε ποσοστό 0,3% σε σχετική συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία που αναφέρει συχνότητα 0,2%. Ο υπολογισμός της συχνότητας μωσαϊκισμού του πλακούντα δεν ήταν εφικτός διότι από τα περιστατικά χοριακών λαχνών στα οποία εντοπίστηκε μωσαϊκισμός παρότι συνεστήθη περαιτέρω έλεγχος σε αμνιακό υγρό οι ενδιαφερόμενοι δεν προσήλθαν.

Η συχνότητα χρωμοσωμικών ανωμαλιών στην παρούσα μελέτη υπολογίστηκε στο 3,3%. Βιβλιογραφικά δεδομένα σημειώνουν ότι η συχνότητα εμφάνισης ανωμαλιών σε νεογνά είναι ~1 στα 120 (0,83%). Συγκρίνοντας τη συχνότητα της παρούσας μελέτης φαίνεται ότι αυτή είναι αρκετά μεγαλύτερη και αυτό δικαιολογείται γιατί τα δείγματα που μελετήθηκαν προέρχονται από κυήσεις με ενδείξεις όπως αυξημένη ηλικία μητέρας, υπερηχογραφικά και βιοχημικά ευρήματα οικογενειακό ιστορικό κ.α που ενέχουν αυξημένη πιθανότητα ύπαρξης χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Σε συμφωνία με διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα η τρισωμία 21 είναι η συχνότερα απαντώμενη χρωμοσωμική ανωμαλία.

Σε ότι αφορά την μελέτη του ποσοστού επιβεβαίωσης των δεικτών υπερηχογραφικού ή βιοχημικού ελέγχου 1^{ου} τριμήνου παρατηρήθηκε ότι μόνο 11 από τις 194

γυναίκες (ποσοστό 5,67%) με παθολογικό αποτέλεσμα κατά τον έλεγχο 1^{ου} τριμήνου παρουσίασαν έμβρυο με παθολογικό καρυότυπο. Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με την βιβλιογραφία που αναφέρει ότι ο συνδυαστικός έλεγχος πρώτου τριμήνου έχει θετική διαγνωστική αξία (Positive Predictive Value-PPV) που μπορεί να φτάσει έως και το 8%. Σε κάθε περίπτωση η ερμηνεία του ως άνω αποτελέσματος έγινε με προσοχή και συνυπολογίζοντας το γεγονός ότι η παράθεση των πληροφοριών κατά την λήψη ιστορικού δεν ήταν η πληρέστερη και σαφέστερη δυνατή. Για αυτό και το ως άνω συμπέρασμα παρατίθεται με επιφύλαξη και κατεκτίμηση.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας προκύπτει ότι η κλασική κυτταρογενετική ανάλυση κατέχει βασικό ρόλο κατά τον προγεννητικό έλεγχο και πλέον συμπληρώνεται από περαιτέρω έλεγχο με μεθόδους μοριακής γενετικής καθώς και μοριακής κυτταρογενετικής με σκοπό την πλήρη ταυτοποίηση της χρωμοσωμικής σύστασης του εμβρύου και την παροχή κατάλληλης γενετικής συμβουλευτικής.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΟΣ ΌΡΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΌΡΟΣ
FISH	Φθορίζουσα υβριδοποίηση
NT	Αυχενική διαφάνεια
PAPP-A	Πλασματοπρωτεΐνη
Mitosis	Μίτωση
Cytokineses	Κυτταροκίνηση
Mb	Μεγαβάσεις
Chromosomes harvesting	Συγκομιδή των χρωμοσωμάτων
Translocation	Μετάθεση, Μετατόπιση
Inversion	Αναστροφή
Insertion	Ένθεση
Duplication	Διπλασιασμός
Deletion	Έλλειψη
Devirative chromosome	Παράγωγο χρωμόσωμα
Mosaicism	Μωσαϊκισμός
Petit	Μικρό
Queue	Μεγάλο
Band	Ζώνη
β-hCG	β- χοριακή γοναδοτροπίνη
Free β-hCH	Ελεύθερη β- χοριακή γοναδοτροπίνη
uE3	Ελεύθερη οιστριόλη (μη συζευγμένη)
CVS	Λήψη Χοριακών Λαχνών (Τροφοβλάστης)
NTS	Καρδιοτοκογράφημα

NIPT	Μη επεμβατική προγεννητική εξέταση
Screening Test	Δοκιμασίες ελέγχου (διαγνωστικές δοκιμασίες)
a-FP	Άλφα εμβρυϊκή πρωτεΐνη
DIA	Ινχιμπίνη Α
DNA	Δεσοξυριβοζονουκλεϊνικό οξύ
CMV	Μεγαλοκυτταροϊός
IUGR	Καθυστερημένη ενδομήτρια ανάπτυξη
Centromere	Κεντρομερίδιο
Isochromosome	Ισοχρωμόσωμα
Ring chromosome	Δακτυλιοειδή χρωμόσωμα
Array-CGH	Συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός με μικροσυστοιχίες
PFBS	Λήψη εμβρυϊκού αίματος

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
ISCN	An Internatinal System for Human Cytogenetic Nomenclature
NIPT	Non Inrasive Prenatal Test
IUGR	Intrauterine Growth Restriction
mFISH	Multi colour FISH
Array-CGH	Array-Comparative Genomic Hybridization
cffDNA	Cell Free Fetal Deoxyribonucleic acid
NTS	Non Stress Test
CVS	Chorionic Villus Sampling
uE3	Unconjugated estriol
NT	Nuchal Translucency
PAPP-A	Pregnancy Associated Plasma Protein
PFBS	Periumbilical Fetal Blood Sampling

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] Genetic Disorders and the Fetus Diagnosis, Prevention, and Treatment SEVENTH EDITION EDITED BY Aubrey Milunsky MB BCh, DSc, FRCP,FACMG, DCH 23/11/2015
- [2] Von Schatz F: Gine besondere art von einseitiger polyhydramnie mit anderseitiger oligohydramnie bie eineiigen zwilligen. Arch Gynaecol 19:329, 1882
- [3] R.W. Wood – A.L. Loomis, «The physical and biological effects of high-frequency sound waves of greatintensity», Phys. Rev. (1927), σελ. 373
- [4] A.M.K. Thomas – A.K. Banerjee – U. Busch (εκδ.), Classic Papers in Modern Diagnostic Radiology,εκδόσεις Springer, Βερολίνο 2005, σελ. 139.
- [5] Steele MW, Breg WR Jr: Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. Lancet Feb 19;1(7434):383-5, 1966
- [6] Benacerraf BR, Greene MF, Saltzman DH, Barss VA, Penso CA, Nadel AS, Heffner LJ, Stryker JM, Sandstrom MM, Frigoletto FD: Early amniocentesis for prenatal cytogenetic evaluation. Radiology 169:3 709-10, 1988
- [7] Daffos, F., Cappella-Pavlovsky, M. and Forestier, F: Fetal blood sampling via the umbilical cord using a needle guided by ultrasound. Report of 66 cases. Prenat. Diagn. 3,271-7, 1983
- [8] Nicolaides, K.H., Soothill, P.W., Rodeck, C.H. and Campbell, S: Ultrasound-guided sampling of umbilical cord and placental blood to assess fetal wellbeing. Lancet, 1,1065-7, 1986
- [9] Smidt-Jensen S, Hahnemann N, Jensen PKA, et al: Experience with find needle biopsy in the first trimester-an alternative to amniocentesis. Clin Genet 26:272, 1984
- [10] Prenat Diagn. 1987 Nov;7(9):623-30. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosomal abnnormalities. Bogart MH1, Pandian MR, Jones OW.
- [11] Am J Obstet Gynecol. 1984 Apr 1;148(7):886-94. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN, Johnson WE.
- [12] Prenat Diagn. 1998 Aug;18(8):842-5. Alternative methods of maternal weight adjustment in maternal serum screening for Down syndrome and neural tube defects. Watt HC1 , Wald NJ
- [13] Pediatr Cardiol. 2011 Dec;32(8):1147-57. doi: 10.1007/s00246-011-0034-5. Epub 2011 Jul 5. The contribution of chromosomal abnormalities to congenital heart defects: a population-based study. Hartman RJ1 , Rasmussen SA, Botto LD, Riehle-Colarusso T, Martin CL, Cragan JD, Shin M, Correa A.
- [14] Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2000 Sep;92(1):97-101.Biochemical screening for Down syndrome. Cuckle H 1 .
- [15] Ann Clin Biochem. 2005 Jan;42(Pt 1):30-40.First trimester maternal serum screening for Down's syndrome: an evaluation of the DPC Immulite 2000 free beta-hCG and pregnancy-associated plasma protein-A assays. Spencer K1 .

- [16] Prenat Diagn. 1999 Nov;19(11):1035-42. Screening for trisomy 18 by fetal nuchal translucency and maternal serum free beta-hCG and PAPP-A at 10-14 weeks of gestation. Tul N 1 , Spencer K, Noble P, Chan C, Nicolaides K.
- [17] BMJ. 1992 Apr 4;304(6831):867-9. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. Nicolaides KH1 , Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K.
- [18] Kagan KO, Wright D, Valencia C, Maiz N, Nicolaides KH: Screening for trisomies 21, 18 and 13 by maternal age, fetal nuchal translucency, fetal heart rate, free β -hCG and pregnancy-associated plasma protein-A. Hum Reprod 2008;23:1968–1975.
- [19] Snijders RJM, Holzgreve W, Cuckle H, Nicolaides KH. 1994. Maternal age specific risks for trisomies at 9–14 weeks gestation. Prenat Diagn 14:543–552.
- [20] Snijders RJM, Sebire NJ, Cuckle H, Nicolaides KH. 1995. Maternal age and gestational age-specific risks for chromosomal defects. Fetal Diagn Ther 10:56–367.
- [21] Snijders RJ, Noble P, Sebire N, Souka A, Nicolaides KH. Fetal Medicine Foundation First Trimester Screening Group. 1998. UK Multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. Lancet 352: 343–346
- [22] Spencer K, Souter V, Tul N, Snijders R, Nicolaides KH. 1999. A screening program for trisomy 21 at 10–14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free β -human chorionic gonadotropin and pregnancy associated plasma protein-A. Ultrasound Obstet Gynecol 231–237.
- [23] ACOG Practice Bulletin No. 77: Screening for fetal chromosomal abnormalities. Obstet Gynecol. 2007; 109(1):σελ 217-227
- [24] Song DK, Sawada M, Yokota S, Kuroda K, Uenishi H, Kanazawa T, Ogata H, Ihara H, Nagai T, Shimoda K, Comparative analysis of autistic traits and behavioral disorders in Prader-Willi syndrome and Asperger disorder, Am J Med Genet A. 2015, 167 (1), 64-8
- [25] Uta Frith, Η Νοημοσύνη των Αυτιστικών Παιδιών, Αυτισμός (Β΄ Έκδοση), Ελληνικά Γράμματα, Αθήνα, 1996, 98-120, 137-149.
- [26] Quincy Zhong, Lawrence C Layman, Genetic considerations in the patient with Turner syndrome--45,X with or without mosaicism, Fertil Steril, 2012, 98 (4), σελ 775-9.
- [27] Morris JK, Savva GM: The risk of fetal loss following a prenatal diagnosis of trisomy 13 or trisomy 18. Am J Med Genet 2008, 146A, σελ 827-832.
- [28] Matthews AL: Chromosomal abnormalities: Trisomy 18, trisomy 13, deletions, and microdeletions. J Perinat Neonatal Nurs 1999, σελ 13, 59-75
- [29] J. Lejeune, M. Gautier, and R. Turpin, "Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children", C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., vol. 248, no. 11, σελ 1721–1722, Mar. 1959.
- [30] <https://heamalab.gr>
- [31] <https://www.embryogenesis.gr/images/apovoli-1-triminou.jpg>
- [32] P. A. Jacobs and J. A. Strong, "A case of human intersexuality having a possible XXY sexdetermining mechanism," Nature, vol. 183, no. 4657, σελ. 302–303, Jan. 1959.

- [33] File: Human chromosomesXXY01.PNG-Wikipedia Commons, 5 March 2009
- [34] C. E. Ford, K. W. Jones, P. E. Polani, et al., "A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome)," *Lancet*, vol. 1, no. 7075, σελ. 711–713, Apr. 1959.
- [35] www.genlab.gr Καρυότυπός περιφερικού αίματος-Genlab.gr
- [36] K. Patau, D. W. Smith, E. Therman, et al., "Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome," *Lancet*, vol. 1, no. 7128, σελ. 790–793, Apr. 1960.
- [37] Produced by the Centre for Genetics Education, <http://www.genetics.edu.au>
- [38] J. H. Edwards, D. G. Harnden, A. H. Cameron, et al., "A new trisomic syndrome," *Lancet*, vol. 1, no. 7128, σελ. 787–790, Apr. 196
- [39] www.smd.qmul.ac.uk
- [40] Σταυρούλα Χριστοπούλου, Γεωργία Χριστοπούλου, Ζακλίν Ντόνοχιου, Μαργαρίτα Καρκαλέτση, Ευαγγελία Μανίσαλη, Αναστασία Σπρινγκ, Θωμαΐς Τσεβά, Βούλα Βελισσαρίου. Προγεννητική διάγνωση χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου. Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας ΜΗΤΕΡΑ, Νοέμβριος 2012
- [41] Δαβάνος Νικόλαος. Συμβολή στη μοριακή προγεννητική διάγνωση ανευπλοειδιών και φύλου με χρήση της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Πάτρα. 2007; 2: σελ 15-24
- [42] Manning M, Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med* 2010, σελ 12, 742–5
- [43] Egan JFX, Benn PA, Borgida A, et al. Efficacy of screening for fetal Down syndrome in the US from 1974 to 1997. *Obstetrics and Gynecology* 2000; 96: 979.
- [44] Wu J, Morris JK. Trends in the maternal age distribution and the live birth prevalence of Down's syndrome in England and Wales: 1938–2010. *Europe J Hum Genet* 2013; 21: 943
- [45] Morris JK, Albeman E, Scott C, Jacobs P. Is the prevalence of Klinefelter syndrome increasing? *Europ J Human Genet* 2008; 16: 163.
- [46] Savva GM, Walker K, Morris JK. The maternal age-specific live birth prevalence of trisomies 13 and 18 compared to trisomy 21 (Down syndrome). *Prenat Diagn* 2010.30; 57.
- [47] Gardner, R.J.M., Sutherland, G.R., Shaffer, L.G. (2012). *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling* (4th Edition). Oxford Monographs on Medical Genetics n0. 61. Oxford University Press.
- [48] K.H. Nicolaides – K. Spencer – K. Avgidou – S. Faiola – O. Falcon, «Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening», *UOG* 25, τεύχος 3 (2005), σελ. 221-6.
- [49] Di George E, et al Large cryptic genomic rearrangements with apparently normal karyotypew detected by array-CGH. 2014;7 (82)
- [50] Zhao C et al, Detection of fetal subchromosomal abnormalities by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma 2015 Apr; 61(4):608-616

- [51] <http://1.bp.blogspot.com/GRXuWNxPCb4/UaHFWC2PEI/AAAAAAAAAEE/wKwFmgqNxlA/w1200-h630-p-k-no-nu/free+beta.jpg>
- [52] Α.Π.Καλογερόπουλου, Μαιευτική, University Studio Press, Θεσσαλονίκη 1992, σελ 144
- [53] A screening program for trisomy 21 at 10-14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. Spencer K1, Souter V, Tul N, Snijders R, Nicolaides KH. April 1999
- [54] Ι. Ν. Μπόντης, University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 2η έκδοση, 2007, σελ 208
- [55] P.A. Benn – L.M. Kaminsky – J. Ying – A.F. Borgida – J.F.X. Egan, «Combined Second-Trimester Biochemical and Ultrasound Screening for Down Syndrome», J.Obstet. Gynaec. 100, τεύχος 6 (Δεκέμβριος 2002), σελ. 1168-1176.
- [56] Liao, G. J., Gronowski, A. M., & Zhao, Z. (2014). Non-invasive prenatal testing using cell-free fetal DNA in maternal circulation. Clin Chim Acta, 428, 44-50
- [57] Lamvu G, Kuller JA. Prenatal diagnosis using fetal cells from the maternal circulation. Obstetr gynecolog survey 1997, σελ 52, (7): 433-7.
- [58] Torricelli F, Pescucci C. Isolation of total cells from the maternal circulation: prospects for the noninvasive prenatal diagnosis. Clin Chemistry and Lab Med 2001, 39: σελ 494-500
- [59] Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy. Obstet Gynecol.2015Sep;126(3):e317.doi:10.1097/AOG.0000000000001051.PubMed: 26287791
- [60] Dondorp W, de Wert G, Bombard Y, Bianchi DW, Bergmann C, Borry P, Chitty LS, Fellmann F, Forzano F, Hall A, Henneman L, Howard HC, Lucassen A, Ormond K, Peterlin B, Radojkovic D, Rogowski W, Soller M, Tibben A, Tranebjærg L, van El CG, Cornel MC. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. Summary and recommendations. Eur J Hum Genet. 2015 Apr 1.doi: 10.1038/ejhg.2015.56. [Epub ahead of print] PubMed: 25828867.
- [61] Goldwaser T, Klugman S. Cell-free DNA for the detection of fetal aneuploidy. Fertil Steril.2018Feb;109(2):195-200.doi:10.1016/j.fertnstert.2017.12.019.PubMed: 29447662.
- [62] <https://www.ivfgreece.com/it/services/prenatal-diagnosis>
- [63] Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, Monaghan KG, Bajaj K, Best RG, Klugman S, Watson MS. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. Genet Med. 2016 Oct;18(10):1056-65.doi: 10.1038/gim.2016.97. Epub 2016 Jul 28. PubMed: 27467454.
- [64] Skrzypek H, Hui L. Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy and single gene disorders. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2017 Jul;42:26-38. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.02.007. Epub 2017 Feb 28. PubMed: 28342726.
- [65] Benn, P. Non-invasive prenatal testing using cell free DNA in maternal plasma: recent developments and future prospects. J Clin Med 2014; 3:537.

- [66] The American College of Obstetricians and Gynecologists and the Society for Maternal-Fetal Medicine. Committee Opinion on Noninvasive Prenatal Testing for Fetal Aneuploidy. Number 545, December 2012; 120:1532.
- [67] Bianchi D 2018. Sequencing of Circulating Cell-free DNA during Pregnancy 2/8/2018 REVIEW
- [68] Gadow EC. Reaching the fetal environment: a tribute to Dr. Hermogenes Alvarez. *Prenat Diagn* 1998; 18:870.
- [69] Mohr J. Foetal genetic diagnosis: development of techniques for early sampling of foetal cells. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1968; 73(1):73.
- [70] Aburel ME. Le declenchement du travail par injections intraamniotique de serum sale hypertonique. *Gynecol Obstet* 1937; 36:398.
- [71] M.W. Thompson – R.R. McInnes – H.F. Willard, Thomson & Thompson Ιατρική Γενετική, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2001, σελ 23
- [72] Liu J, Wang H, Xi H, Jia Z, Zhou Y, Wu L, Application of next-generation DNA sequencing for prenatal testing of fetal chromosomal aneuploidies, *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2015, σελ 32 σελ 533-7
- [73]https://www.google.com/search?q=χοριακων+λαχνων&client=tablet-android-samsung&tbm=isch&prmd=inv&source=lnms&sa=X&ved=0ahUKEwjcle6Vr7PgAhX8wAIHHdOcCXIQ_AUIECgB#imgsrc=8tONYII7nQdqzM
- [74]https://www.google.com/search?q=χοριακων+λαχνων&client=tablet-android-samsung&tbm=isch&prmd=inv&source=lnms&sa=X&ved=0ahUKEwjcle6Vr7PgAhX8wAIHHdOcCXIQ_AUIECgB#imgsrc=PQr4iZVDPEJtgM
- [75] Lambl D. Ein seltener fall von hydramnios. *Zentralbl Gynaekol* 1881;5:329.
- [76] Μολφέτας Σπύρος, Ευθύμιος Λεωνίδας, Elizabeth Ball, Χρωμοσωμικές Ανωμαλίες, Βιολογία-Το Γενετικό Υλικό και η Έκφρασή του, Τόμος 2, Καστανιώτη, Αθήνα, 1994,σελ 97-113.
- [77] Schatz F. Eine besondere art von ein seitiger polyhdramnic mit anderseitiger oligohydramnie bei zwilligen. *Arch Gynecol* 1882; 19:392.
- [78] James Wynbrandt, Mark D. Ludman, Abnormalities, James Wynbrandt, The Encyclopedia of Genetic Disorders and Birth Defects (third edition), Infobase Publishing, New York, 2009,σελ 82-106.
- [79] Tabor A, Philip J, Bang J, et al. Needle size and risk of miscarriage after amniocentesis. *Lancet* 1988;i: 183.
- [80] Sikkema-Raddatz B, van Echten J, van der Vlag J, et al.Minimal volume of amniotic fluid for reliable prenatal cytogenetic diagnosis. *Prenat Diagn* 2002; 22:164.
- [81] Guven M, Ceylaner G, Coskun A. Volume of sampled amniotic fluid and prenatal cytogenetic diagnosis. *Int J Gynecol Obstet* 2006; 95:157.
- [82] Li, D. Z., & Yang, Y. D. (2016). Invasive prenatal diagnosis of fetal thalassemia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*.doi: 10.1016/j.bpobgyn.2016.10.011 69
- [83] Gosden C, Nicolaidis KH, Rodeck CH. Fetal blood sampling in investigation of chromosome mosaicism in amniotic fluid culture. *Lancet* 1988; 2:613.

- [84] Forestier F, Daffos F, Rainau M, et al. Blood chemistry of normal human fetuses at midtrimester of pregnancy. *Pediatr Res* 1987;21:579.
- [85] Buscaglia M, Ghisoni L, Bellotti M, et al. Percutaneous umbilical blood sampling: indication, changes, and procedure loss rates in nine years' experience. *Fetal Diagn Ther* 1996; 1: 106.
- [86] Robert L. Nussbaum, Roderick R. McInnes, Huntighton F. Willard. Thompson & Thompson Ιατρική Γενετική. Αθήνα, 2011. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. ISBN 9781416030805.
- [87] Θεοχάρης Αλ. Παταργιάς, Βασιλική Γ. Αλεπόρου. Γενετική Ανθρώπου. Αθήνα 1998. Εκδόσεις Συμμετρία.
- [88] Joe Hin Tjio, Albert Levan, "The Chromosome Number of Man" First published: May 1956
- [89] T. Hsu and C. Pomerat, "Mammalian chromosomes in vitro ii: a method for spreading the chromosomes of cells in tissue culture." *Journal of Heredity*, vol. 44, σελ 23–29, 1953
- [90] Lisa G. Shaffer and Niels Tommerup ISCN 2005. An international system of human cytogenetic nomenclature σελ 6-7, 69-73.
- [91] Αλαχιώτης Σταμάτης Ν., Εισαγωγή στη Γενετική, Α. Α. Λιβάνη, Αθήνα 2011.
- [92] Ζιουδρού Χριστίνα, Σίδερης Ελευθέριος, Γονίδια και Χρωμοσώματα, Η Βιολογική Επιστήμη, Κυανής Εκδόσεως, BSCS, Αθήνα 1990, σελ 292-307.
- [93] Peter D. Turnpenny and Sian Ellard 2005. Emery's Elements of medical genetics 14th edition Imprint: Churchill Livingstone Published Date: 1st March 2011 σελ 31-51
- [94] Page SL, Hawley RS, Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 2003, σελ 301, 785-789.
- [95] Μ. Τζέτη και Χ. Τσαρουχά, Μελέτη των χρωμοσωμάτων του ανθρώπου, εκδόσεις Καλλιπός 2015, σελ 47-53
- [96] <https://el.m.wikipedia.org>
- [97] ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016) Editor(s): McGowan-Jordan J. Simons A. Schmid M
- [98] <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/en/ch/8/bc/vlu/zellbio/zellcyclus.vlu.html>
- [99] <http://eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/>
- [100] Munne S, Marquez C, Magli MC et al, Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes XY, 13, 16, 18 and 21. *Molecular Human Reproduction*, 1998, σελ 4, 863–870.
- [101] Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, et al, Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, σελ 409, 860-921.
- [102] Munne S, Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *Reproductive BioMedicine Online*, 2002, σελ 4, 183–196.
- [103] <https://www.slideshare.net/mobile/peilatis/ss-72595730>

- [104] Jobanputra V, Sobrino A, Kinney A et al, Multiplex interphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions. *Human Reproduction*, 2002, σελ 17, 1166–1170.
- [105]http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGLC112/52/390,1509/images/img6_13.jpg
- [106] <http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-C112/479/3165,12735/>
- [107] <http://photodentro.edu.gr/ugc/r/8525/333?locale=el>
- [108] David Gisselsson Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology, Ring Chromosomes: vicious circles at the end and beginning of life. December 2001
- [109]<http://eclass.theiath.gr>file.php>TIE172> Καρυότυπός-theiath open eclass
- [110]http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e9/Isochromosome_Formation.jpg/220px-Isochromosome_Formation.jpg
- [111] Ευγενία Γ.Στεφανου Εισαγωγή στην κλινική κυτταρογενετική 22-11-2017
- [112] Molecular cytogenetics protocols and applications: Yao-Shan Fan, Humana Press, 1 October 2002
- [113] Fluorescence in situ hybridization: past, present and future Jeffrey M. Levsky and Robert H. Singer* Department of Anatomy and Structural Biology, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Avenue, Bronx, NY 10461, USA. *Journal of Cell Science* 116, 2833-2838 © 2003 The Company of Biologists Ltd doi:10.1242/jcs.00633.
- [114] ACOG Practice Bulletin No. 88, December 2007. Invasive prenatal testing for aneuploidy. *Obstet Gynecol* 110:1459–1467.
- [115] Levy S, Sutton G, Ng PC, et al. 2007. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol* 5: e254
- [116] Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, et al. 2008. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 452: 872–876.
- [117] De Vries BBA, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C. 2003. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *JMedGenet* 40: 385– 398. 21. Dhami P, Coffey AJ, Abbs S, et al. Exon array CGH: detection of copy number changes at the resolution of individual exons in the human genome. *Am J Hum Genet* 2005; 76:750–762. This is the first description of an exon array used for copy number analysis. This was a limited array, but the data in this paper promise that this will be a useful platform for future genome-wide arrays
- [118] Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR: Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet* 2007, 39: S48-54
- [119] Sebat J, Lakshmi B, Troge J, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 2004; 305:525–528. References 21 and 22 use slightly different approaches to demonstrate that the human genome contains hundreds of segmental duplications and deletions, interpreted as normal copy number variation, but the true significance of all of them is unknown. Interestingly, there is little overlap between the identified segments in both papers, suggesting that there may be many more such regions.

[120] Redon R, Rio M, Gregory SG, et al. Tiling path resolution mapping of constitutional 1p36 deletions by array-CGH: contiguous gene deletion or "deletion with positional effect" syndrome? *J Med Genet* 2005; 42:166–171. References 26, 28 and 29 show that region-specific tiling microarrays are a powerful tool to better define boundaries of microdeletion and duplication syndromes and to study the correlation with phenotypes. Unusual phenotypes and new features of known microdeletion syndromes can be found. This is relevant for counseling about the predicted phenotype if array-CGH is used for prenatal diagnosis.

[121] Lupski J. 2007. Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nat Genet* 39: S43–S47.

[122] Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC, et al. 2005. Use of array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: is less more? *Am J Med Genet A* 134: 259–267.

[123] Οδηγία εργασίας για καλλιέργεια αμνιακού υγρού και κυτταρογενετικό έλεγχο χρωμοσωμικών ανωμαλιών version 1.0

[124] Οδηγία εργασίας για καλλιέργεια χοριακών λαχνών και κυτταρογενετικό έλεγχο χρωμοσωμικών ανωμαλιών version 1.0

[125] <https://docplayer.gr/8268718-Hromosomikes-anomalies.html>