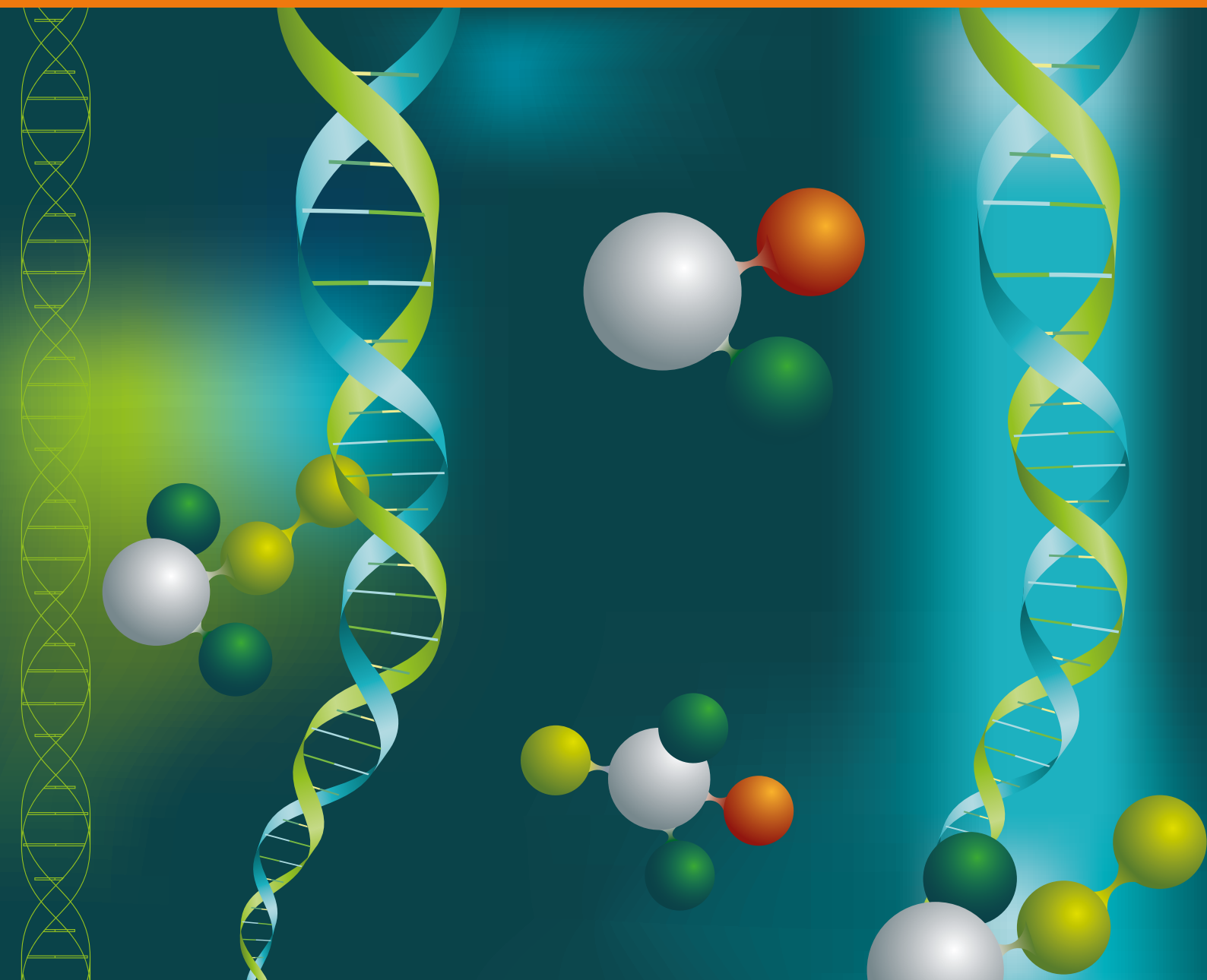


ιατρικά ανάλεκτα

Τόμος Γ' Τεύχος 15 Ιούλιος - Σεπτέμβριος 2012



Αφιέρωμα στη Γενετική



ΟΜΙΛΟΣ ΥΓΕΙΑ



υγεία



ΜΗΤΕΡΑ



μαιευτήριο
ρήγιω

ISSN 1790-4045

Τριμηνιαία Έκδοση των ΥΓΕΙΑ, ΜΗΤΕΡΑ & ΛΗΤΩ του Ομίλου ΥΓΕΙΑ

Διανέμεται δωρεάν

ιατρικά ανάλεκτα



ΟΜΙΛΟΣ ΥΓΕΙΑ



Τριμηνιαία έκδοση των ΥΓΕΙΑ, ΜΗΤΕΡΑ, ΛΗΤΩ
του Ομίλου ΥΓΕΙΑ
ISSN 1790-4045

Επιτροπή Σύνταξης

Κωστής Γεωργιάδης

Παθολόγος - Λοιμωξιολόγος,

Διευθυντής Β' Παθολογικής Κλινικής του ΥΓΕΙΑ

Ελπίδοφόρος Δουράτσος

Μαιευτήρας - Γυναικολόγος,

Πρόεδρος Επιστημονικού Συμβουλίου του ΛΗΤΩ

Γεώργιος Καλλιπολίτης

Μαιευτήρας - Γυναικολόγος,

Πρόεδρος Επιστημονικού Συμβουλίου του ΜΗΤΕΡΑ

Χρήστος Μπαρτσόκας

Παιδίατρος,

Διευθυντής Ιατρικής Υπηρεσίας Παιδών ΜΗΤΕΡΑ

Διευθυντής Σύνταξης

Ιωάννης Αποστολάκης

Παθολόγος,

Διευθυντής Α' Παθολογικής Κλινικής του ΥΓΕΙΑ

(i.apostolakis@hygeia.gr)

Αναπληρωτής Διευθυντής Σύνταξης

Βασίλειος Σεϊτανίδης

Αιματολόγος,

Επίτιμος Διευθυντής

Αιματολογικής Κλινικής του ΥΓΕΙΑ

(v.seitanidis@hygeia.gr)

Βοηθοί Διευθυντή Σύνταξης

Εμμανουήλ Δ. Παπαδάκης

Ειδικός Παθολόγος του ΥΓΕΙΑ

(e.papadakis@hygeia.gr)

Ιωάννης Πατούλης

Χειρουργός του ΥΓΕΙΑ

(ipatoulis@hygeia.gr)

Δημοσιογραφική Επιμέλεια

Μαριλένα Καραμήτρου

Δημοσιογράφος,

Υπεύθυνη Γραφείου Τύπου Ομίλου ΥΓΕΙΑ

(m.karamitrou@hygeia.gr, τηλ.: 210 6867044)

Commercial Management

Γιώργος Σώρας

(e-mail: g.soras@hygeia.gr,

τηλ.: 210 6867230, fax: 210 6867624)

www.hygeia.gr, www.mitera.gr, www.letto.gr

Εκδότис

Media2day Εκδοτική Α.Ε.

Υπεύθυνος

Χρήστος Ζαρίφης (zarifis@media2day.gr)

Δημιουργικό

Τάσος Λοβέρδος, Άντζελα Σοφιανοπούλου

Επιμέλεια Ύλης

Χρήστος Γαδ

Διεύθυνση Παραγωγής

Πέτρος Μαρίνης

Παραγωγή

MEDIA2DAY ΕΚΔΟΤΙΚΗ Α.Ε.

Παπανικολή 50, Χαλάνδρι 15232

Τηλ.: 210 6856120 | fax: 210 6843704

Άρθρα

674

Προεμφυτευτική γενετική διάγνωση
Λ. Φλωρεντίν

678

Προγεννητική διάγνωση χρωμο-
σωματικών ανωμαλιών του εμβρύου
Στ. Χριστοπούλου, Γ. Χριστοπούλου, Ζ.
Ντόνοχιου, Μ. Καρκαλέτση, Ευ. Μανίσαλη,
Αν. Σπρινγκ, Θ. Τσεβά, Β. Βελισσαρίου

683

Διευρυμένος προγεννητικός έλεγχος
χρωμοσωματικών ανωμαλιών
του εμβρύου με τη μοριακή μέθοδο
ανίχνευσης μικροελλειμμάτων
και μικροδιπλασιασμών MLPA
Γ. Χριστοπούλου, Θ. Τσεβά, Αγγ. Χατζάκη,
Β. Βελισσαρίου

688

Γενετική και μοριακή διάγνωση
κρανιοσκελετικών δυσπλασιών
Δ. Αποστολοπούλου, Αγγ. Χατζάκη,
Ο. Καΐρα, Κ. Παναγόπουλος,
Α. Στρατουδάκης, Στ. Σηφάκης

695

Γενετικά αίτια αυξημένης συχνηκής
διαφάνειας κατά την κύηση
Αν. Σπρινγκ, Γ. Χριστοπούλου, Θ. Τσεβά, Στ.
Χριστοπούλου, Ζ. Ντόνοχιου, Μ. Καρκαλέτση,
Ευ. Μανίσαλη, Β. Βελισσαρίου

699

Σύνδρομο εύθραυστου Χ και νοητική
υστέρηση: μεθοδολογία προσέγγισης
και μοριακή διάγνωση
Δ. Μπουζαρέλου, Στ. Αμνέντα, Αγγ. Χατζάκη

702

Η γενετική του τύπου 1
σακχαρώδη διαβήτη
Χρ. Σπ. Μπαρτσόκας

706

Η γενετική του τύπου 2 σακχαρώδη
διαβήτη: νεότερα στοιχεία
Χρ. Σπ. Μπαρτσόκας

709

Γενετική της υπογονιμότητας
Μ. Καρκαλέτση, Αγγ. Χατζάκη, Β.
Βελισσαρίου

713

Το μέλλον στην προγεννητική
διάγνωση των γενετικών νόσων του
εμβρύου: μη επεμβατική διάγνωση σε
ελεύθερο DNA στο αίμα της εγκύου
Β. Βελισσαρίου, Φ. Πατσαλής

718

Γενετική του καρκίνου
Λ. Φλωρεντίν, Γ. Δ. Λύπας

724

Η κλινική γενετική στην καθημερινή
ιατρική πράξη
Στ. Αμνέντα-Κυριαζή

727

Γενετική συμβουλευτική
Λ. Κατσιχτη

731

Λεξιλόγιο γενετικών όρων

Οδηγίες προς τους συγγραφείς

Τα ΙΑΤΡΙΚΑ ΑΝΑΛΕΚΤΑ είναι τριμηνιαίο περιοδικό γενικής ύλης και απευθύνεται στους γιατρούς κάθε ειδικότητας. Δεκτά για δημοσίευση είναι άρθρα γραμμένα από γιατρούς των Νοσοκομείων του Ομίλου ΥΓΕΙΑ και από επιστήμονες συναφών επαγγελμάτων. Τα άρθρα πρέπει να έχουν επίκαιρο επιστημονικό ενδιαφέρον, να είναι βιβλιογραφικά πλήρως τεκμηριωμένα, σύντομα, μέχρι 1.200 λέξεις, γραμμένα με σαφήνεια, κατανοητά από γιατρούς όλων των ειδικοτήτων, όχι μόνο από τους ειδικούς επί του θέματος που πραγματεύονται. Κύριο κομμάτι του περιοδικού αποτελούν οι ανακοινώσεις περιπτώσεων, οι σύντομες ανασκοπήσεις, τα επίκαιρα θέματα. Δεκτές, επίσης, διδακτικές απεικονίσεις, κουίζ, δοκιμασίες αυτοελέγχου. Για τη μορφή του άρθρου και την αναγραφή της βιβλιογραφίας παρακαλούνται οι συγγραφείς να συμβουλευθούν προηγούμενα τεύχη του περιοδικού.

Όλα τα άρθρα ελέγχονται από συντακτική επιτροπή, η οποία κρίνει αν το άρθρο είναι κατάλληλο προς δημοσίευση ως έχει ή ύστερα από υποδεικνυόμενες τροποποιήσεις. Μετά την έγκριση της συντακτικής επιτροπής, το άρθρο υπόκειται σε συντακτικές και γραμματικές διορθώσεις, οι οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν και περικοπές φράσεων ή ολόκληρων παραγράφων, ώστε να γίνει περισσότερο περιεκτικό και εύληπτο.

Γράμμα από τη σύνταξη

Η γενετική έχει πλέον επεκταθεί και στην κλινική πράξη κατακτώντας όλο και περισσότερα πεδία εφαρμογής.

Η συντακτική επιτροπή των «Ιατρικών Αναλόκτων» εκτιμώντας τη σημασία της ανέθεσε σε γενετιστές του ΜΗΤΕΡΑ και του ΛΗΤΩ να οργανώσουν το παρόν αφιέρωμα.

Το παρακάτω προλογικό σημείωμά τους περιγράφει κατά κύριο λόγο τη συμβολή της γενετικής στην, ακόμη και προ της εμφυτεύσεως, έγκαιρη αναγνώριση γενετικών ανωμαλιών και εν τέλει στην εξάλειψη κληρονομικών παθήσεων.

Ιωάννης Αποστολάκης

Στις πλέον αξιόλογες και εντυπωσιακές ανακαλύψεις του 20ού αιώνα (πυρηνική ενέργεια, ηλεκτρονικοί υπολογιστές, αντιβιοτικά, κατάκτηση του διαστήματος), πρωτεύουσα σημασία έχει η γενετική. Συνεχείς ερευνητικές δραστηριότητες των γενετιστών κατά τις τελευταίες δεκαετίες αποκάλυψαν τους πιο βασικούς μηχανισμούς και τις πλέον ειδικές λειτουργίες του κυττάρου, που οδηγούν σε επαναστατικές εφαρμογές όχι μόνο στη διάγνωση και στην πρόληψη, αλλά και στη θεραπεία των κληρονομούμενων νοσημάτων.

Καταρράκτης ανακαλύψεων ακολούθησε την αποκάλυψη της δομής της διπλής έλικας του DNA, από τους J. Watson και Fr. Crick, στη συνέχεια δε των χρωμοσωματικών ανωμαλιών του ανθρώπου (Tjio & Levan, Lejeune, Edwards) και των μεταβολικών νοσημάτων (αιμοσφαιρινοπάθειες, λυσοσωμικά κ.ά.). Κορωνίδα των προόδων στη γενετική αποτέλεσε η δυνατότητα χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος στη δεκαετία του 1990 (Human Genome Project) και τώρα οι εξελίξεις συνεχίζονται με ταχύ ρυθμό.

Η πρόληψη των γενετικών νοσημάτων με προγεννητική διάγνωση, αλλά και με την παρακολούθηση με ανιχνευτικά προγράμματα κατά τη διάρκεια της περιγεννητικής περιόδου, αποτέλεσε πρωτεύον μέλημα της πρωτοποριακής φροντίδας και προστασίας που παρέχεται στην έγκυο, στο έμβρυό της και στο νεογνό της, στα δυο μαιευτήρια του Ομίλου ΥΓΕΙΑ, στο ΜΗΤΕΡΑ και το ΛΗΤΩ.

Όπως η μάστιγα της μεσογειακής αναιμίας εξελίχθηκε με την πρόοδο της επιστήμης σε σπάνιο νόσημα, σειρά άλλων κληρονομικών παθήσεων (π.χ. ινοκυστική νόσος, μυοπάθειες, καρδιοπάθειες) διαγιγνώσκονται in utero, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η πρόληψη συγγενών ανωμαλιών και νοητικής καθυστέρησης και συνεπώς και τα τραγικά αποτελέσματα από ατέλειες της φύσεως, αποτέλεσμα γονιδιακών ή χρωμοσωματικών βλαβών.

Εδώ πρέπει να τονιστεί και η συμμετοχή του ΜΗΤΕΡΑ στη νέα τεχνική διάγνωσης χρωμοσωματικής ανωμαλίας (συνδρόμου Down) σε αίμα της μητέρας. Είθε η τεχνική αυτή να αποτελέσει βάση για τη διάγνωση κληρονομικών παθήσεων του εμβρύου στο αίμα της εγκύου. Η ερευνητική προσπάθεια των τμημάτων Γενετικής του Ομίλου ΥΓΕΙΑ είναι εμφανής στις λίγες σελίδες του αφιερώματος αυτού των «Ιατρικών Αναλόκτων».

Χρήστος Σπ. Μπαρτσόκας

Ομότιμος Καθηγητής Παιδιατρικής,
Διευθυντής Ιατρικής Υπηρεσίας ΠΑΙΔΩΝ ΜΗΤΕΡΑ

Βούλα Βελισσαρίου, PhD

Κλινική Εργαστηριακή Γενετίστρια,
Διευθύντρια Τμήματος Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας ΜΗΤΕΡΑ

Αγγελική Χατζάκη, PhD

Μοριακή Βιολόγος-Γενετίστρια,
Υπεύθυνη Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας ΜΗΤΕΡΑ

Προεμφυτευτική γενετική διάγνωση

Λίνα Φλωρεντίν, B.Sc., Ph.D.

Μοριακή Βιολόγος - Κυτταρογενετίστρια,

Διευθύντρια ΑλφαLab, Κέντρο Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής

lflorentin@leto.gr

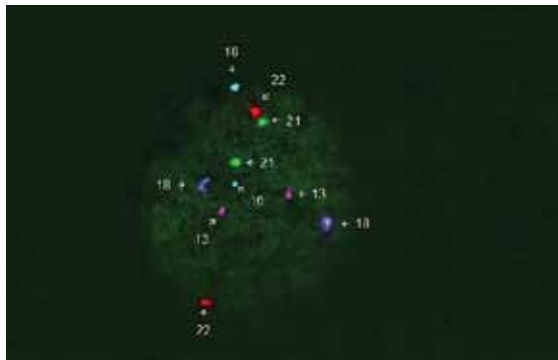
Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (Preimplantation Genetic Diagnosis) είναι μια μέθοδος με την οποία είναι δυνατή η διάγνωση μιας χρωμοσωματικής ανωμαλίας ή ενός γενετικού νοσήματος σε ένα κύτταρο ή σε μερικά κύτταρα τα οποία απομονώνονται από ένα έμβρυο (σε κάποιες περιπτώσεις και στα πολικά σωμάτια που απελευθερώνονται από το ωάριο) πριν από την εμφύτευσή του στη μήτρα έπειτα από διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Από την εφαρμογή της μεθόδου αυτής ωφελούνται 4 ομάδες ζευγαριών:

1. Τα ζευγάρια που αντιμετωπίζουν ανεξήγητα προβλήματα γονιμότητας, επαναλαμβανόμενες αποβολές, ανεπιτυχείς προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης ή αν ένας εκ των δύο είναι φορέας χρωμοσωματικής αναδιάταξης.
2. Τα ζευγάρια όπου ο ένας ή και οι δύο είναι φορείς ενός γενετικού νοσήματος, όπως η μεσογειακή αναιμία, η ινοκυστική νόσος, ο καρκίνος του παχέος εντέρου κ.ά., και διατρέχουν τον κίνδυνο να το μεταφέρουν στην επόμενη γενιά.
3. Γονείς που έχουν αποκτήσει παιδί που χρειάζεται μεταμόσχευση και επιλέγουν αυτήν την μέθοδο για να φέρουν στον κόσμο παιδί που θα είναι ιστοσυμβατό με το πάσχον τέκνο τους, όπως σε κάποιες περιπτώσεις λευχαιμιών.
4. Γονείς που έχουν ένα παιδί που πάσχει από γενετικό νόσημα και χρήζει μεταμόσχευσης μυελού, οπότε με τη μέθοδο αυτή επιλέγεται έμβρυο που είναι ιστοσυμβατό με το πάσχον παιδί και δεν πάσχει το ίδιο από το γενετικό νόσημα της οικογένειας, όπως στη μεσογειακή αναιμία και στην αναιμία Fanconi.

Υπογονιμότητα, καθ' ἑξιν αποβολές και προεμφυτευτική γενετική διάγνωση χρωμοσωματικών ανωμαλιών (PGS/PGD)

Αναφορικά με την πρώτη ομάδα, έχει αποδειχθεί ότι το 20% περίπου των αζωοσπερμικών ή ολιγοσπερμικών ανδρών και το 15% των υπογόνιμων γυναικών είναι επίσης φορείς χρωμοσωματικής αναδιάταξης. Τα έμβρυα των φορέων έχουν αυξημένη πιθανότητα να φέρουν υψηλό ποσοστό μη ισοζυγισμένων παραγώγων της χρωμοσωμα-

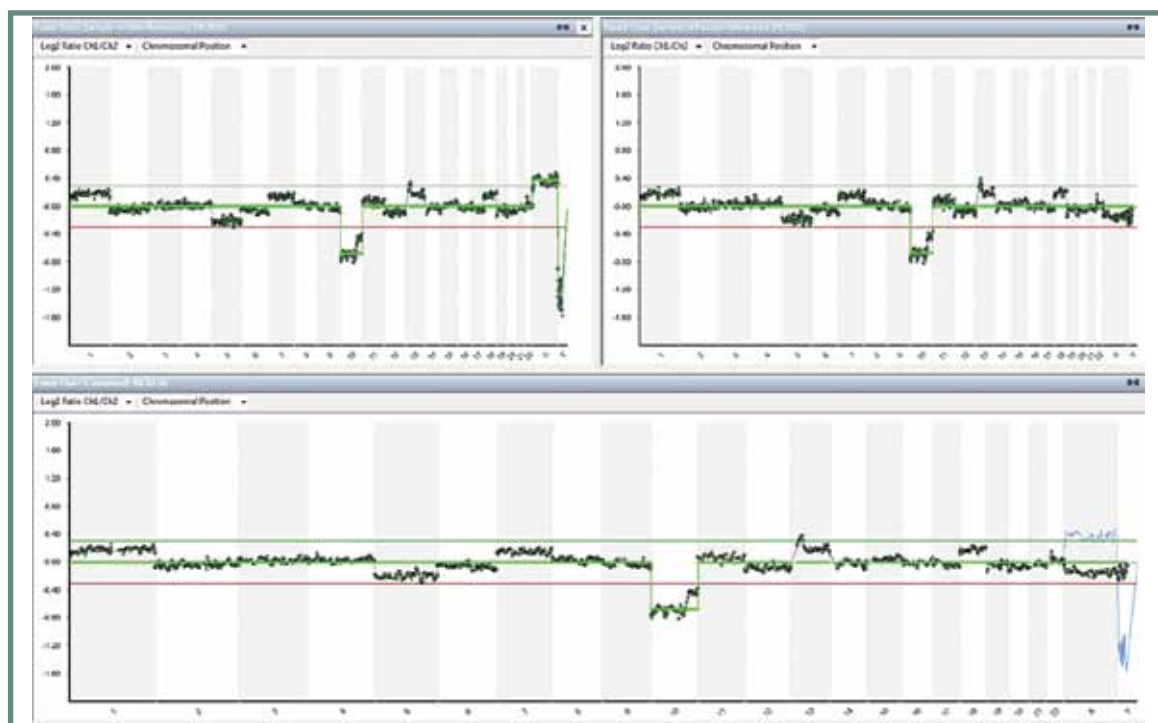


Εικ. 1. Βλαστομερίδιο φυσιολογικό για χρωμοσώματα 13, 18, 21, 22, 16 με τεχνική FISH.

τικής αναδιάταξης και άλλων χρωμοσωματικών ανευπλοειδιών. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η αιτία πολλών αποβολών, καθώς και ανεξήγητης υπογονιμότητας, είναι οι ποικίλες χρωμοσωματικές ανωμαλίες (συνήθως ανευπλοειδίες, δηλαδή περισσότερα ή λιγότερα χρωμοσώματα) που φέρουν τα έμβρυα, ενώ ο καρυότυπος (η χρωμοσωματική σύσταση του κυττάρου) των γονέων είναι φυσιολογικός. Και στις δύο κατηγορίες ζευγαριών έχει αποδειχθεί ότι με την εφαρμογή της προεμφυτευτικής γενετικής γίνεται διάγνωση εκείνων των εμβρύων που φέρουν χρωμοσωματικές ανωμαλίες, οπότε επιλέγονται για εμβρυομεταφορά τα έμβρυα που φαίνονται ότι έχουν φυσιολογική χρωμοσωματική σύσταση και άρα επιτυγχάνεται αύξηση του ποσοστού κύησης σε αυτές τις κατηγορίες υπογόνιμων ζευγαριών.

Μεθοδολογίες ανίχνευσης χρωμοσωματικών ανωμαλιών στην προεμφυτευτική διάγνωση

Μέχρι πρόσφατα η τεχνική που επικρατούσε στη διάγνωση χρωμοσωματικών ανωμαλιών ήταν η FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), με την οποία επιλεγμένοι φθορίζοντες ανιχνευτές χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της μη ισοζυγισμένης χρωμοσωματικής αναδιάταξης που φέρει ένας γονέας, ή φθορίζοντες ανιχνευτές χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των πιο συχνών χρωμοσωματικών ανευπλοειδιών όπως αυτές των χρωμοσωμάτων 13, 18, 21, 16, 22 και αυτές των χρωμοσωμάτων του φύλου. Είναι γνωστό ότι ανευπλοειδίες των παραπάνω χρωμοσωμάτων



Εικ. 2. Παθολογικό βλαστομερίδιο με τεχνική συστοιχίων CGH.

είναι οι πιο συχνά εμπλεκόμενες στις αποβολές, καθώς και στη μη εμφύτευση εμβρύων έπειτα από εξωσωματική γονιμοποίηση. Όμως, εκτεταμένες μελέτες έδειξαν ότι τα έμβρυα φέρουν και άλλες χρωμοσωματικές ανευπλοειδίες που δεν εμπεριέχονται σε αυτήν την ομάδα, οπότε πρόσφατα έχει κερδίσει έδαφος η τεχνική του συγκριτικού γονιδιωματικού με μικροσυστοιχίες (CGH microarrays), με την οποία είναι δυνατή η ανίχνευση ανευπλοειδιών και των 24 χρωμοσωμάτων, καθώς και των μη ισοζυγισμένων παραγώγων των φορέων χρωμοσωματικών ανακατατάξεων. Από την εφαρμογή της υπερασύγχρονης αυτής μεθόδου, φάνηκε ότι τόσο το ποσοστό επιτυχών εμφυτεύσεων έπειτα από εξωσωματική γονιμοποίηση όσο και τα ποσοστά υγιών αναφορικά με τα χρωμοσώματα παιδιών που γεννιούνται έχει αυξηθεί σημαντικά στα υπογόνιμα ζευγάρια που δέχονται να γίνει στα έμβρυά τους προεμφυτευτική γενετική διάγνωση.

Οικογενειακό ιστορικό γενετικού νοσήματος και προεμφυτευτική γενετική διάγνωση

Από την προσέγγιση αυτή ωφελούνται ακόμη οι φορείς γενετικού νοσήματος όπως:

1. Τα ζευγάρια όπου ο ένας εκ των δύο είναι φορέας ενός γενετικού νοσήματος που κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα. Στην περίπτωση αυτή ο φορέας εμφανίζει συνήθως τη νόσο με μεγάλη πιθανότητα κατά τη διάρκεια της ζωής του και τα παιδιά του έχουν 50% πιθανότητα να φέρουν το παθολογικό γονίδιο, άρα και μεγάλη πιθανότητα να εμφανίσουν και αυτά τη νόσο. Παραδείγματα είναι οι φορείς της οικογενούς πολυποδίας

της του παχέος εντέρου (APL), οι φορείς του οικογενούς χωρίς πολυποδίαση καρκίνου του παχέος εντέρου (σύνδρομο Lynch - HNPILL), οι φορείς του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς (MEN2), οι φορείς ή οι έχοντες οικογενειακό ιστορικό με χορεία του Huntington, πολυκυστικούς νεφρούς ενηλίκου τύπου (ADPKD), νευροϊνωμάτωση (NF1 - von Recklinghausen) κ.λπ.

2. Τα ζευγάρια όπου η γυναίκα είναι φορέας φυλοσύνδετων νοσημάτων όπως η αιμορροφιλία, η μυϊκή δυστροφία Duchenne/Becker, στα οποία τα αρρένα παιδιά των φορέων γυναικών έχουν 50% πιθανότητα να πάσχουν, ενώ τα θήλεα άτομα φορείς σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να εμφανίσουν ελαφρύτερη εικόνα της νόσου.

3. Τα ζευγάρια όπου και οι δύο είναι φορείς γενετικών νοσημάτων που κληρονομούνται με τον υπολειπόμενο χαρακτήρα, όπως η μεσογειακή αναιμία, η ινοκυστική νόσος, η νωτιαία μυϊκή ατροφία, στα οποία οι υγιείς, αλλά φορείς γονείς έχουν 25% πιθανότητα σε κάθε κύηση να αποκτήσουν παιδί με το νόσημα αυτό.

Προεμφυτευτική γενετική διάγνωση για HLA ιστοσυμβατότητα

Στις περιπτώσεις όπου ένα παιδί πάσχει από κακοήγη νόσο, όπως η λευχαιμία, ή από γενετική νόσο, όπως η μεσογειακή αναιμία, που μπορεί να θεραπευτεί με μεταμόσχευση μυελού των οστών ή αίμα ομφαλίου λώρου, μελετώνται γονείς και πάσχον παιδί τόσο για το γενετικό νόσημα όσο και για την HLA ιστοσυμβατότητα. Κατά την προεμφυτευτική διάγνωση εντοπίζονται και γίνεται εμβρυομεταφορά σε εκείνα τα έμβρυα που είναι HLA ιστοσυμβατά με το

πάσχον παιδί, ή εκείνα τα έμβρυα που δεν πάσχουν από το γενετικό νόσημα της οικογένειας και είναι ισοσυμβατά με το πάσχον παιδί.

Αξίζει να σημειωθεί ότι προεμφυτευτική γενετική διάγνωση μπορεί να γίνει σε οποιοδήποτε γενετικό νόσημα είναι γνωστό το γονίδιο που εμπλέκεται και έχει εντοπιστεί η βλάβη. Το εργαστήριο Γενετικής που αναλαμβάνει την προεμφυτευτική διάγνωση πρέπει να είναι εξαιρετικά έμπειρο στο σχεδιασμό του ελέγχου οποιουδήποτε γενετικού νοσήματος πληροί τις προδιαγραφές που προαναφέρονται και συνήθως χρειάζεται περίπου 1-2 μήνες για να προετοιμαστεί, μια διαδικασία η οποία είναι απαραίτητη.

Εν συντομία, η διαδικασία που συμπεριλαμβάνει την προεμφυτευτική γενετική διάγνωση, εφαρμόζεται έπειτα από εξωσωματική γονιμοποίηση κατά την οποία, με διέγερση, παράγονται ωάρια τα οποία στη συνέχεια γονιμοποιούνται με το σπέρμα του συζύγου. Συνήθως την τρίτη μέρα και στο στάδιο των 6-8 κυττάρων του μοριδίου ο εξειδικευμένος εμβρυολόγος αφαιρεί 1-2 κύτταρα από κάθε έμβρυο, τα οποία δίνονται στο Εργαστήριο Γενετικής για την ανάλυση. Η διάγνωση ολοκληρώνεται συνήθως

εντός 24 ωρών και προσδιορίζονται τα μορίδια που δε φέρουν τη χρωμοσωμική ή γενετική ανωμαλία. Αναλόγως, όμως, με την περίπτωση, είναι δυνατόν να γίνει βιοψία πρώτου και δεύτερου πολικού σωματίου, από τα οποία γίνεται διάγνωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών ή γενετικού νοσήματος, το μειονέκτημα όμως αυτής της προσέγγισης είναι ότι διαγιγνώσκεται μόνο η μητρική ανωμαλία. Εναλλακτικά, μπορεί να γίνει βιοψία βλαστοκύστης την πέμπτη μέρα της ανάπτυξης του εμβρύου. Επομένως, με την προεμφυτευτική γενετική διάγνωση μειώνεται η πιθανότητα σύλληψης παθολογικών εμβρύων σε εκείνες τις οικογένειες όπου ο κίνδυνος είναι υψηλός.

Οι εξελιγμένες τεχνολογίες της γενετικής δίνουν πλέον τη δυνατότητα σε εκατοντάδες ζευγάρια που λαχταρούν και αποζητούν να κρατήσουν στην αγκαλιά τους ένα υγιές παιδί, να το πετύχουν. Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση βελτιώνει σημαντικά τα ποσοστά επιτυχούς κύησης στα υπογόνιμα ζευγάρια και βοηθά τα ζευγάρια φορείς γενετικού νοσήματος να αποκτήσουν ένα υγιές παιδί. Στην Ελλάδα γίνεται προεμφυτευτική γενετική διάγνωση τα τελευταία 15 χρόνια με μεγάλη επιτυχία.

Abstract

Florentin L. Preimplantation genetic diagnosis. Iatrika Analekta 2012; 3: 674-677

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) has been stated to improve live birth rates compared to natural conception in couples who are at risk of passing on a known genetic disorder or chromosomal abnormality to their children. The process reduces the risk of a child inheriting a genetic disorder and minimizes the risk of late-term miscarriage and pregnancy termination by only implanting healthy and normal embryos into the mother's uterus. PGD uses a number of techniques to analyze genetic material from the embryos, such as, Fluorescence In Situ hybridization analysis (FISH), Polymerase Chain Reaction (PCR) and recently Comparative Genomic Hybridization Arrays (array CGH). Suitable candidates for PGD include couples with history of recurrent pregnancy loss due to chromosomal aneuploidies, repeated IVF failure, severe male infertility, couples carriers of a chromosomal rearrangement, couples with a family history of a genetic disorder such as thalassaemia, cystic fibrosis, hereditary colon cancer, or couples with an affected child that can be cured only with allogeneic bone marrow HLA matched cord blood or bone marrow from a healthy brother or sister; In conclusion, careful couple counseling along with constantly improving laboratory techniques applied in PGD, draw a very promising future.

Βιβλιογραφία

1. Li-Jung Chang, Shee-Uan Chen, Yi-Yi Tsai, et al. *An update of preimplantation genetic diagnosis in gene diseases, chromosomal translocation, and aneuploidy screening*. Clin Exp Reprod Med 2011; 38 (3):126-134.
2. Shamash J, Rienstein S, Wolf-Reznik H, et al. *Preimplantation genetic haplotyping a new application for diagnosis of translocation carrier's embryos- preliminary observations of two robertsonian translocation carrier families*. J Assist Reprod Genet. 2011; 28 (1): 77-83.
3. Harper JC, Harton G. *The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening*. Fertil Steril. 2010; 94 (4):1.173-1.177.
4. Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, et al. *PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic*

- hybridization*. Hum Reprod. 2011; 26 (7):1.925-1.935.
5. van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkema-Raddatz B, et al. *Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review*. Hum. Reprod. Update September-October 2011; 17 (5):620-627.
6. Fiorentino F. *Molecular genetic analysis of single cells*. Semin Reprod Med. 2012; 30 (4):267-282.
7. Scriven PN, Kirby TL, Ogilvie CM. *FISH for pre-implantation genetic diagnosis*. J Vis Exp. 2011; 23 (48): Pii: 2.570.
8. Fiorentino F, Biricik A, Karodayi H, et al. *Development and clinical application of a strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders combined with HLA matching*. Mol Hum Reprod 2004; 10 (6):445-460.
9. Sermon K, Van Steirteghem A, Liebaers I. *Preimplantation genetic diagnosis*. Lancet 2004; 363: 1.633-1.641.
10. Fiorentino F, Biricik A, Nuccitelli A, et al. *Strategies and clinical outcome of 250 cycles of Preimplantation Genetic Diagnosis for single gene disorders*. Hum Reprod 2006; 21 (3):670-684.

Προγεννητική διάγνωση χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου

Σταυρούλα Χριστοπούλου, Γεωργία Χριστοπούλου, Ζακλίν Ντόνοχιου, Μαργαρίτα Καρκαλέτση,
Ευαγγελία Μανίσσλη, Αναστασία Σπρινγκ, Θωμάς Τσεβά, Βούλα Βελισσαρίου
Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας ΜΗΤΕΡΑ
genetics@mitera.gr

Ο προγεννητικός έλεγχος είναι το σύνολο των εξετάσεων που πραγματοποιούνται πριν από τη γέννηση, με σκοπό να διαπιστωθούν πιθανές ανωμαλίες στο έμβρυο. Οι εξετάσεις προγεννητικού ελέγχου είναι οι μη επεμβατικές, όπως το υπερηχογράφημα, η μέτρηση της αυχενικής διαφάνειας, η μέτρηση βιοχημικών δεικτών στο αίμα της εγκύου, ή και οι επεμβατικές (λήψη χοριακών λαχνών, αμνιοπαρακέντηση, λήψη εμβρυϊκού αίματος). Με τα αποτελέσματα των μη επεμβατικών μεθόδων σε συνδυασμό με την ηλικία της μητέρας, μπορεί να εκτιμηθεί ο πιθανός κίνδυνος τον οποίο έχει το έμβρυο να πάσχει από κάποια χρωμοσωματική ανωμαλία. Η χρωμοσωματική σύσταση του εμβρύου όμως είναι δυνατόν να μελετηθεί και να υπάρξει ένα ασφαλές αποτέλεσμα μόνο με τις επεμβατικές μεθόδους.

Προγεννητικός καρυότυπος

Η προγεννητική διάγνωση ξεκίνησε το 1966, όταν οι Steel και Breg έδειξαν ότι η χρωμοσωματική σύσταση ενός εμβρύου είναι δυνατόν να προσδιοριστεί με ανάλυση του καρυότυπου των κυττάρων του αμνιακού του υγρού, τα οποία αναπτύσσονται σε καλλιέργεια. Το 1967 πραγματοποιήθηκε η πρώτη διάγνωση σε έμβρυο μετά από αμνιοπαρακέντηση. Ο καρυότυπος του εμβρύου αποτελεί μέχρι σήμερα πολύτιμο εργαλείο για τη διάγνωση των χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Η συχνότερη αριθμητική χρωμοσωματική ανωμαλία είναι η τρισωμία 21, κλινική εκδήλωση της οποίας αποτελεί το σύνδρομο Down, με συχνότητα 1/800 γεννήσεις. Υψηλή συχνότητα συναντάται και στις αριθμητικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων του φύλου. Οι συχνότητες των χρωμοσωματικών ανωμαλιών στα νεογμένα αναγράφονται στον πίνακα 1.

Αναγκαία προϋπόθεση για το γενετικό έλεγχο του εμβρύου αποτελεί η λήψη εμβρυϊκών ιστών με επεμβατικές μεθόδους, όπως με λήψη χοριακών λαχνών - τροφοβλάστης (11^η-14^η εβδομάδα της κύησης), με λήψη αμνιακού υγρού (αμνιοπαρακέντηση, 16^η-22^η εβδομάδα) ή με λήψη εμβρυϊκού αίματος μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης. Ο κίνδυνος αποβολής, τόσο για τη λήψη χοριακών λαχνών όσο και την αμνιοπαρακέντηση, κυμαίνεται από

0,5% έως 1,9%, ενώ η λήψη εμβρυϊκού αίματος ενέχει κίνδυνο αποβολής 3%-5%.

Με τις μεθόδους αυτές είναι δυνατόν να μελετηθούν τα χρωμοσώματα του εμβρύου, καθώς και να απομονωθεί DNA από τα εμβρυϊκά κύτταρα και να διαγνωστούν βλάβες σε συγκεκριμένα γονίδια που ευθύνονται για γνωστές γενετικές ασθένειες (μεσογειακή αναιμία, κυστική ίνωση, αχονδροπλασία κ.ά.).

Κύριες ενδείξεις προγεννητικής διάγνωσης

Η προγεννητική διάγνωση των χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου συνιστάται κυρίως στις κυήσεις με αυξημένο κίνδυνο, λόγω:

1. Προχωρημένης αναπαραγωγικής ηλικίας της μητέρας (άνω του 35ου έτους).
2. Ενδείξεων κατά τον βιοχημικό προγεννητικό έλεγχο 1ου και 2ου τριμήνου.
3. Υπερηχογραφικών ανωμαλιών του εμβρύου.
4. Χρωμοσωματικής αναδιάταξης σε έναν από τους γονείς.

Χρωμοσωματικές ανωμαλίες ανιχνεύσιμες με τον καρυότυπο και ταχεία προγεννητική διάγνωση

Με τον καρυότυπο ανιχνεύονται όλες οι αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες, καθώς και οι δομικές ανωμαλίες μεγέθους $\geq 3-5\text{Mb}$. Με τις τεχνικές σήμανσης και αναγνώρισης των χρωμοσωμάτων, το μέγεθος αυτό αντιστοιχεί περίπου σε μια ζώνη κατά μήκος ενός χρωμοσώματος (εικόνα 1). Για τη χρωμοσωματική κυτταρογενετική ανάλυση του εμβρύου με τον καρυότυπο απαιτείται η καλλιέργεια των εμβρυϊκών κυττάρων, η οποία απαιτεί συνήθως 10-15 ημέρες, γεγονός το οποίο παρατείνει την αγωνία των γονέων. Τα τελευταία έτη όμως έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι οι οποίες επιτρέπουν την ταχεία διεξαγωγή ενός αποτελέσματος όσον αφορά στις συχνότερες αριθμητικές ανωμαλίες του εμβρύου.

Ταχεία Προγεννητική Διάγνωση

Η πλέον διαδεδομένη μέθοδος ταχείας προγεννητικής διάγνωσης είναι η ποσοτική φθορίζουσα αντίδραση της πολυμεράσης (QF-PCR: quantitative fluorescent polymerase

chain reaction). Με τη μέθοδο αυτή εξάγεται ένα πρώτο αποτέλεσμα για την ανίχνευση των πιο συχνών ανευπλοειδιών, οι οποίες αφορούν στα χρωμοσώματα 13, 18, 21, X και Y. Το μεγάλο πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι δεν είναι απαραίτητη η καλλιέργεια των κυττάρων. Από μια μικρή ποσότητα χοριακών λαχνών, αμνιακού υγρού ή εμβρυϊκού αίματος, είναι δυνατόν να απομονωθεί αρκετό DNA για την εξαγωγή του αποτελέσματος σε λίγες ώρες.

Με τη μέθοδο αυτή, πολυμορφικές περιοχές (STRs-Short Tandem Repeats) ενισχύονται εκλεκτικά στα χρωμοσώματα 13, 18, 21, X και Y, ανευπλοειδίες των οποίων ευθύνονται για τα συχνότερα σύνδρομα στις κυήσεις (σύνδρομα Down, Edwards, Patau, Klinefelter, Turner). Έπειτα από λήψη χοριακών λαχνών, αμνιακού υγρού ή εμβρυϊκού αίματος, απομονώνεται εμβρυϊκό DNA, ακολουθεί QF-PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονται σε γενετικό αναλυτή. Η ανίχνευση προτύπου 3 αλληλομόρφων σε δύο τουλάχιστον δείκτες ενός χρωμοσώματος οδηγεί σε αποτέλεσμα συμβατό με την αντίστοιχη τρισωμία. Τα τρία αλ-

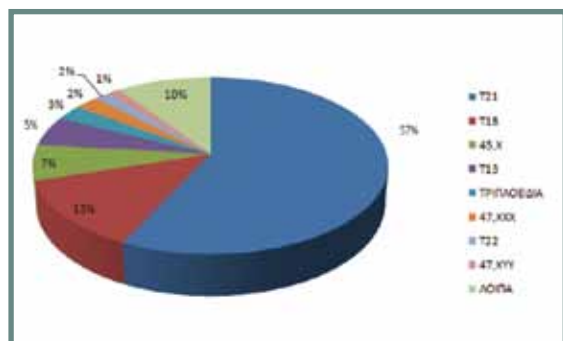


Εικ. 1. Καρυότυπος θήλεος εμβρύου φυσιολογικής όψεως με ζώνωση GTG (Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας, ΜΗΤΕΡΑ).

ληλόμορφα μπορεί να εμφανίζονται είτε ως τρεις κορυφές (τρिसωμικό-τριαλληλικό πρότυπο) είτε ως δύο με ποσοτική σχέση 2:1 μεταξύ τους (τρισωμικό-διαλληλικό πρότυπο). Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 99% για τα χρωμοσώματα τα οποία ελέγχονται.

Πίνακας 1	Συχνότητα χρωμοσωματικών ανωμαλιών σε νεογέννητα βρέφη*	
Χρωμοσωματική ανωμαλία	Συχνότητα	Σύνολο
Αριθμητικές		
Φυλετικά χρωμοσώματα, άρρενα		
47, XYY	1,2	
47, XXY (σ. Klinefelter)	1,2	
Άλλα	0,15	2,5
Φυλετικά χρωμοσώματα, θήλεα		
45, X και X/XX (σ. Turner)	0,3	
47, XXX	1,1	1,4
Αυτοσωμικά χρωμοσώματα		
Τρισωμίες		
Τρισωμία 21 (σ. Down)	1,2	
Τρισωμία 18 (σ. Edwards)	0,15	
Τρισωμία 13 (σ. Patau)	0,08	1,4
Τριπλοειδία	0,02	0,02
Δομικές		
Μη ισοζυγισμένες, 2n=46	0,3	0,3
Υπεράριθμα, 2n=47	0,4	0,4
Σύνολο μη ισοζυγισμένων αριθμητικών και δομικών (παθολογικός φαινότυπος)	4 (1/250)	
Σύνολο δομικών ισοζυγισμένων	4,3	
Σύνολο	8,3 (1/120)	8,3 (1/120)

*Gardner and Sutherland, Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling, Third Edition, Oxford Press, 2004.



Γράφημα. 1. Η συχνότητα των χρωμοσωματικών ανωμαλιών σε έμβρυα με παθολογικό καρυότυπο κατά την προγεννητική διάγνωση (Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας ΜΗΤΕΡΑ).

Εκτός από την ανίχνευση των συχνότερων ανευπλοειδιών του εμβρύου, η παραπάνω μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει την παρουσία DNA, μητρικής συνήθως προέλευσης, στο υπό εξέταση δείγμα. Σημαντική είναι, επίσης, η δυνατότητα ταυτοποίησης διδύμων σε δίδυμες κυήσεις.

Καρυότυπος του εμβρύου

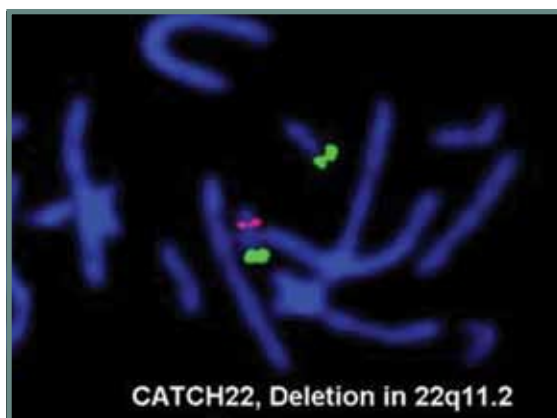
Ο χρωμοσωματικός έλεγχος του εμβρύου ολοκληρώνεται με τη μελέτη των χρωμοσωμάτων με τον καρυότυπο. Σε περίπτωση ευρήματος στον καρυότυπο, ενδέχεται να ζητηθεί κυτταρογενετικός έλεγχος των γονέων, προκειμένου να διαπιστωθεί αν το εύρημα είναι οικογενές ή de novo. Επίσης, σε ειδικές περιπτώσεις, μέθοδοι μοριακής κυτταρογενετικής, οι οποίες περιγράφονται παρακάτω, έρχονται να συμπληρώσουν τη συμβατική διάγνωση με τον καρυότυπο.

Αποτελέσματα του Τμήματος

Στο τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας του Νοσοκομείου ΜΗΤΕΡΑ, στα 13 περίπου χρόνια λειτουργίας του, έχουν πραγματοποιηθεί 27.345 προγεννητικές διαγνώσεις (7.676 διαγνώσεις σε δείγματα χοριακών λαχνών και 19.669 σε δείγματα αμνιακού υγρού). Στο σύνολο αυτό των δειγμάτων βρέθηκαν 683 δείγματα (ποσοστό 2,5%) με παθολογικό καρυότυπο (397 σε κυήσεις 1ου τριμήνου και 286 σε κυήσεις 2ου τριμήνου). Οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες που παρατηρήθηκαν παρουσιάζονται στο γράφημα 1. Η μεγαλύτερη συχνότητα συναντάται στην τρισωμία 21. Ακολουθεί η τρισωμία 18 και κάποιες αριθμητικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων του φύλου.

Χρωμοσωματικές ανωμαλίες μη ανιχνεύσιμες με τον καρυότυπο

Όπως προαναφέρθηκε, η διακριτική ικανότητα του καρυότυπου κυμαίνεται μεταξύ 3-5Mb. Μικρότερες χρωμοσω-

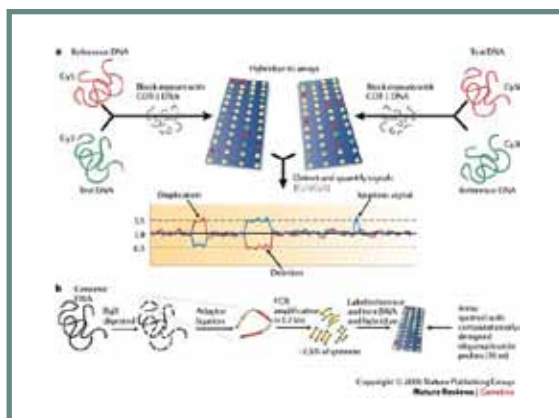


Εικ. 2. Διάγνωση του μικροελλείμματος 22q11 στο σύνδρομο DiGeorge με τη μέθοδο FISH. Ο ανιχνευτής με το πράσινο φθοριόχρωμα υβριδοποιείται στο κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος 22, όπου φαίνονται δύο σήματα, ενώ ο ανιχνευτής με το κόκκινο στην περιοχή 22q11, όπου φαίνεται ένα σήμα (έλλειμμα) (Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας, ΜΗΤΕΡΑ).

ματικές ανωμαλίες, όπως μικροδιπλασιασμοί και μικροελλείμματα, οι οποίες είναι δυνατόν να προκαλέσουν σοβαρά σύνδρομα, δεν ανιχνεύονται. Μοριακές μέθοδοι κυτταρογενετικής, όπως αυτές οι οποίες περιγράφονται στη συνέχεια, απαιτούνται για τη διάγνωση των υπομικροσκοπικών αυτών χρωμοσωματικών βλαβών.

FISH (Fluorescent In Situ Hybridization, φθορίζουσα υβριδοποίηση in situ): Η ανάπτυξη της μεθόδου έφερε μεγάλη πρόοδο στο χώρο της κυτταρογενετικής. Με τη FISH είναι δυνατόν να ανιχνευθούν στοχευμένα υπομικροσκοπικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες που δε φαίνονται στον καρυότυπο, όπως είναι π.χ. το μικροέλλειμμα 22q11, το οποίο προκαλεί το σύνδρομο DiGeorge, με σοβαρές καρδιακές ανωμαλίες και συχνότητα 1/4.000 γεννήσεις (εικόνα 2).

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, πολλαπλή ενίσχυση ανιχνευτών εξαρτώμενη από την αντίδραση λιγάσης): Για τη διάγνωση των μικροελλειμμάτων/μικροδιπλασιασμών που δεν είναι δυνατόν να παρατηρηθούν με το συμβατικό καρυότυπο, εφαρμόζεται σήμερα με επιτυχία η μέθοδος MLPA. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για τη διερεύνηση ενός μεγάλου αριθμού γνωστών συνδρόμων, τα οποία προκαλούνται από μικροελλείμματα ή/και μικροδιπλασιασμούς με συχνότητα 1/1.000 γεννήσεις, όπως DiGeorge, Williams, Prader-Willi κ.ά. (βλέπε σχετικό άρθρο στο παρόν τεύχος). Τα σύνδρομα αυτά συνδέονται με σοβαρές λειτουργικές ανωμαλίες και νοτική υστέρηση. Ταυτόχρονα με τα σύνδρομα αυτά



Εικ. 3. Τα βασικά στάδια της μεθόδου συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού με συστοιχίες (array CGH).

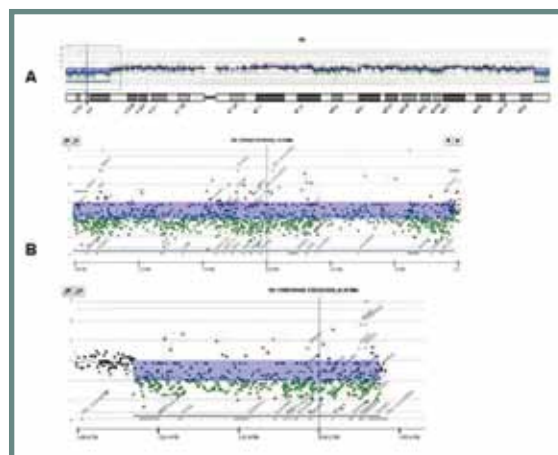
ανιχνεύονται και υποτελομεριδικές ανισοζυγίες όλων των χρωμοσωμάτων. Ο έλεγχος με MLPA συνιστάται σε περιπτώσεις όπου σε έμβρυα με φυσιολογικό καρυότυπο παρατηρούνται σοβαρά υπερηχογραφικά ευρήματα, όπως αυξημένη αυχενική διαφάνεια, καρδιακές ανωμαλίες, υπολειπομένη ανάπτυξη κ.ά.

Όλες οι παραπάνω μέθοδοι έχουν το μειονέκτημα ότι είναι σε θέση να ανιχνεύουν στοχευμένα τις συγκεκριμένες ανευλοειδίες για τις οποίες έχουν σχεδιαστεί. Η νέα μέθοδος με την οποία ανιχνεύονται όλες οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες σε ολόκληρο το γονιδίωμα είναι η τεχνική συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού με συστοιχίες (array CGH) ή πιο απλά ο μοριακός καρυότυπος.

Array CGH (array Comparative Genomic Hybridization, συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός με συστοιχίες)

- Μοριακός καρυότυπος: Η εισαγωγή της νέας αυτής μεθόδου επιτρέπει την ανάλυση όλου του γονιδιώματος για την ανίχνευση χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Εξάιρεση αποτελούν οι ισοζυγισμένες μεταθέσεις και αναστροφές, καθώς και οι πολυπλοειδίες, οι οποίες διαγιγνώσκονται μόνο με το συμβατικό καρυότυπο.

Η μέθοδος έχει αναπτυχθεί με διάφορες παραλλαγές. Βασική της αρχή αποτελεί η υβριδοποίηση DNA τόσο του εξεταζομένου όσο και του υγιούς ατόμου, σε ειδικά πλακίδια όπου έχουν καθλωθεί DNA αλληλουχίες όλου του ανθρώπινου γονιδιώματος. Τα DNA του εξεταζομένου δείγματος και του «φυσιολογικού» δείγματος αναφοράς, σημαίνονται με διαφορετικά φθοριοχρώματα. Ακολουθεί υβριδοποίηση στο πλακίδιο και στη συνέχεια συγκρίνεται η ένταση του φθορισμού των δύο δειγμάτων, προκειμένου να ανιχνευθούν οι ποσοτικές μεταβολές του γενετικού υ-



Εικ. 4. Συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός με συστοιχίες (array CGH) σε έμβρυο με δακτυλιοειδές χρωμόσωμα 10, όπου ανιχνεύτηκαν ελλείμματα στα τελομερίδια 10p και 10q. Α.) array CGH (244K) (agilent array) λόγος log2 για το χρωμόσωμα 10, όπου φαίνονται τα ελλείμματα αριστερά για το 10p και δεξιά για το 10q Β.) τα γονίδια τα οποία περιλαμβάνονται στα ελλείμματα και το μέγεθος των ελλειμμάτων σε Mb [10p15.3-p14 (12,59Mb) και 10q26.3 (4,22Mb), άνω και κάτω, αντίστοιχα]. Η εξέταση πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

λικού στις υπό εξέταση περιοχές. Η διακριτική ικανότητα της μεθόδου εξαρτάται από την πυκνότητα με την οποία αντιπροσωπεύεται το φυσιολογικό γονιδίωμα στις καθλωμένες αλληλουχίες του DNA στο πλακίδιο (εικόνα 3). Η μέθοδος, η οποία είναι ευρέως γνωστή και ως «μοριακός καρυότυπος», έχει αλλάξει δραστικά το τοπίο στη γενετική διάγνωση και επιτρέπει να αντληθούν πολύτιμες πληροφορίες για τη γενετική βλάβη σε επιλεγμένες περιπτώσεις υψηλού κινδύνου στο πλαίσιο του προγεννητικού ελέγχου (εικόνα 4).

Η αντικατάσταση του συμβατικού καρυότυπου με το μοριακό κατά την προγεννητική διάγνωση αποτελεί ακόμη θέμα συζήτησης στην επιστημονική κοινότητα, ενώ είναι ευρέως αποδεκτή για τη διερεύνηση μεταγεννητικά. Η μεγαλύτερη δυσκολία που υπάρχει αυτήν τη στιγμή, πέραν του κόστους, αφορά στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Υπάρχουν DNA αλληλουχίες διάσπαρτες στο ανθρώπινο γονιδίωμα, όπου ο αριθμός των επαναλήψεών τους διαφέρει από άτομο σε άτομο, χωρίς κλινικές επιπτώσεις στο φαινότυπο (CNVs, copy number variations). Έχουν αναφερθεί μεγάλες ελλείψεις ή διπλασιασμοί ακόμη και της τάξης των 10 Mb, χωρίς κλινικές επιπτώσεις. Επίσης, είναι δυνατόν η ίδια χρωμοσωματική ανωμαλία να μην προκαλεί κανένα πρόβλημα στο γονέα, αλλά να δημιουργήσει σοβαρά προβλήματα στο έμβρυο. Συνεπώς, πριν αρχίσει η εφαρμογή

του μοριακού καρυότυπου στην προγεννητική διάγνωση σε επίπεδο ρουτίνας, θα πρέπει να υπάρχει η δυνατότητα να ερμηνευθούν τα αποτελέσματα και να συσχετιστούν με το φαινότυπο. Αυτό θα είναι εφικτό μόνο όταν θα έχουν καταγραφεί όλες οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες και ο φαινότυπος ο οποίος προκύπτει από αυτές και εμπλουτισθούν οι διεθνείς βάσεις δεδομένων.

Συμπέρασμα

Η προγεννητική διάγνωση αποτελεί έναν τομέα της γενετικής του ανθρώπου συνεχώς αναπτυσσόμενο, λόγω του εμπλουτισμού των γνώσεών μας και της ανάπτυξης νέων μεθοδολογιών. Ο συμβατικός καρυότυπος αναμένεται να αντικατασταθεί σε αρκετές περιπτώσεις από το μοριακό, όταν ξεπεραστούν οι δυσκολίες ερμηνείας των αποτελεσμάτων και μειωθεί το κόστος του. Επίσης, οι νέες μέθοδοι

μη επεμβατικής προγεννητικής διάγνωσης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για τη διάγνωση των συχνότερων αριθμητικών ανωμαλιών του εμβρύου στο αίμα της εγκύου (βλέπε σχετικό άρθρο στο παρόν τεύχος). Μέχρι τότε όμως, στην καθημερινή πράξη, ο συμβατικός προγεννητικός καρυότυπος, σε συνδυασμό με τις τεχνικές της μοριακής κυτταρογενετικής FISH, QF-PCR και MLPA, θα συνεχίσει να αποτελεί το πλέον απαραίτητο εργαλείο για τη διάγνωση των συχνότερων χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου.

Επιθυμούμε να ευχαριστήσουμε τις τεχνολόγους του Τμήματος, Αικατερίνη Μπατσούλη και Παγώνα Σκλαπάνη, καθώς και τη γραμματέα, Δήμητρα Λυμπεροπούλου, για την πολύτιμη βοήθεια στη διεκπεραίωση του έργου και στην ομαλή λειτουργία του Τμήματος.

Abstract

Christopoulou S, Christopoulou G, Donohue J, Karkaletsi M, Manissali E, Spring A, Tseva T, Velissariou V. Prenatal diagnosis of fetal chromosomal abnormalities of the embryo. *Iatrika Analekta* 2012; 3: 678-682

At present, the prenatal diagnosis of fetal chromosomal abnormalities is routinely achieved with the molecular method of rapid detection QF-PCR and conventional karyotyping. In addition, molecular cytogenetics methodologies, such as FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), and MLPA (Multiple Ligation-dependent Probe Amplification) contribute to the targeted detection of microdeletions and microduplications, not detectable by karyotyping. Recently, array CGH (array Comparative Genomic Hybridization) has been introduced, a method which enables the genome wide identification of submicroscopic copy number variations (CNVs) which is expected to revolutionize the field of diagnostic clinical cytogenetics.

Βιβλιογραφία

1. Gardner RJM, Sutherland GR. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling (4th Edition)*. Oxford University Press 2004.
2. Tabor A, Vestergaard CH, Lidegaard O. *Fetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis: an 11-year national registry study*. *Ultrasound Obstetr Gynecol.* 2009; 34 (1): 19-24.
3. Mann K, Ogilvie CM. *QF-PCR: application, overview and review of the literature*. *Prenat Diagn.* 2012; 32 (4): 309-314.
4. Association for Clinical Genetics. *Professional Guidelines for Clinical Genetics. Prenatal Diagnosis Best Practice Guidelines*. 2009; V1.00.
5. Christopoulou S, Christopoulou G, Hatzaki A, et al. *The replacement of cytogenetic analysis of chorionic villi sampling direct preparation samples by quantitative fluorescence PCR*. *Gynecol Obstet Invest.* 2009; 68: 255-261.
6. Fan YS. *Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications (Methods in Molecular Biology)*. Humana Press, Totowa, New Jersey 2002.
7. Evangelidou P, Sismani C, Ioannides M, et al. *Clinical application of whole-genome array CGH during prenatal diagnosis: Study of 25 selected pregnancies with abnormal ultrasound findings or apparently balanced structural aberrations*. *Mol Cytogenet* 2010; 26: 3-24.
8. Christopoulou G, Tzetzis M, Konstantinidou AE, et al. *Clinical and molecular description of a fetus with a rare de novo ring 10 and deletions of 12.59 Mb in 10p15.3-p14 and 4.22 Mb in 10q26.3*. *Eur J Med Genet.* 2012; 55: 75-79.
9. Brady PD, Devriendt K, Deprest J, et al. *Array-based approaches in prenatal diagnosis*. *Methods Mol Biol* 2012; 838:151-171.
10. Fiorentino F, Caiazzo FF, Napolitano S, et al. *Introducing array CGH into routine prenatal diagnosis practice: a prospective study on over 1000 consecutive clinical cases*. *Prenat Diagn.* 2011; 31 (13): 1.270-1.282.

Διευρυμένος προγεννητικός έλεγχος χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου με τη μοριακή μέθοδο ανίχνευσης μικροελλειμμάτων και μικροδιπλασιασμών MLPA

Γεωργία Χριστοπούλου, Θωμαΐς Τσεβά, Αγγελική Χατζάκη, Βούλα Βελισσαρίου
Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας ΜΗΤΕΡΑ
genetics@mitera.gr

Η εφαρμογή της μεθοδολογίας MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) έχει περιγραφεί και έχει εφαρμοστεί ευρέως, τόσο στην προγεννητική, όσο και στη μεταγεννητική γενετική διάγνωση. Καθιστά δυνατή την ανίχνευση υπομικροσκοπικών ανωμαλιών των χρωσωμάτων του εμβρύου, όπως μικροελλείμματα και μικροδιπλασιασμούς, οι οποίες δε δύναται να διαπιστωθούν με το συμβατικό καρυότυπο. Τέτοιου είδους ανωμαλίες ευθύνονται

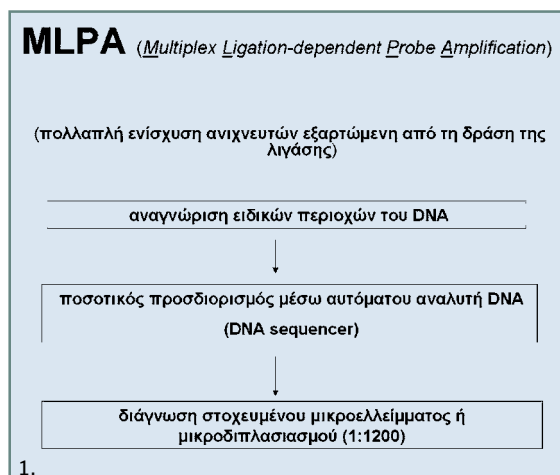
για ορισμένα καλά χαρακτηρισμένα σύνδρομα μικροελλειμμάτων/μικροδιπλασιασμών, καθώς και για σημαντικό ποσοστό περιπτώσεων με μετρίου έως μεγάλου βαθμού ιδιοπαθή νοτική υστέρηση. Η εφαρμογή της μεθόδου MLPA έχει διευρύνει σημαντικά τη διαγνωσιμότητα χρωμοσωματικών ανωμαλιών κατά την προγεννητική διάγνωση.

Οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες είναι τα συχνότερα γενετικά νοσήματα στον άνθρωπο και μία από τις βασικές αιτίες

Πίνακας 1 Συχνότητα συνδρόμων μικροελλειμμάτων και κλινικά χαρακτηριστικά		
Σύνδρομο	Συχνότητα στις γεννήσεις*	Κλινικά χαρακτηριστικά
DiGeorge	1/4.000	Καρδιακές ανωμαλίες, νεογνική υπασβεσταιμία, χαρακτηριστικό προσωπείο, μαθησιακές δυσκολίες, ψυχιατρικές διαταραχές (σχιζοφρένεια/βαριά κατάθλιψη).
1p3.6 deletion	1/5.000	Νοτική υστέρηση, κοντό ανάστημα, προεξέχον μέτωπο, πηγούνι, προγναθισμός, μικροφθαλμία / απώλεια ακοής, συγγενείς καρδιακές ανωμαλίες.
Williams	1/10.000	Νοτική υστέρηση, υπερβαλβιδική στένωση αορτής, περιφερικές στενώσεις πνευμονικής αρτηρίας, χαρακτηριστικό προσωπείο (elfin face), χαρακτηριστική, δύσμορφη οδοντοφυΐα, νεογνική υπερασβεσταιμία.
Cri du Chat	1/20.000 - 1/50.000	Έντονη ψυχοκινητική/νοτική υστέρηση, μικροκεφαλία, στρογγυλό πρόσωπο, υπερτηλορισμός, μικρογναθία, χαμηλή πρόσφυση αυτιών, υποτονία.
Prader-Willi /Angelman	1/25.000	Μέτρια έως βαριά νοτική υστέρηση, μυϊκή υποτονία (προβλήματα θρέψης), παχυσαρκία, κοντό ανάστημα, υπογοναδισμός.
Smith-Magenis	1/25.000	Βαριά-βαρύτατη νοτική υστέρηση, υποτονία, καθυστέρηση στην ομιλία, μικρά δυσπλαστικά αφτιά (απώλεια ακοής), μικροβραχυκεφαλία.
Sotos	1/12.000**	Νοτική υστέρηση, γρήγορη ανάπτυξη, ακρομεγαλία.
Langer-Giedion	1/50.000	Νοτική υστέρηση, πολλές δυσμορφίες προσώπου.
Miller-Dieker	1/50.000	Νοτική υστέρηση, λειογκεφαλία, μικροκεφαλία, χαρακτηριστικό προσωπείο, καρδιακές ανωμαλίες, υποπλαστικά/αμφίβολα έξω γεννητικά όργανα αρρένων.
WAGR	1/90.000	Νοτική υστέρηση, όγκοι Wilms, ανιριδία.
Wolf-Hirschhorn	1/95.000	Νοτική υστέρηση, βαριά καθυστέρηση ανάπτυξης, μικροκεφαλία, τυπικά χαρακτηριστικά περικεφαλαίας.

* Οι πληροφορίες για τις συχνότητες των συνδρόμων προέρχονται από τη βάση δεδομένων OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man).

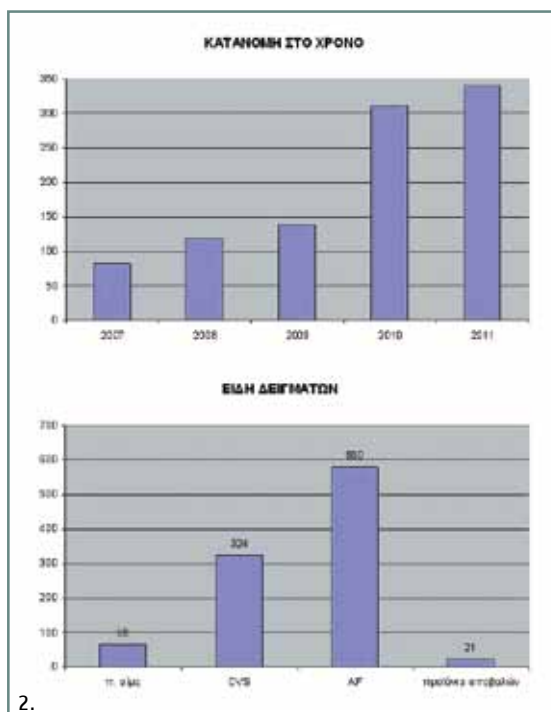
** 10%-45% μόνο των ασθενών εμφανίζει μικροελλείμματα.



Εικ. 1. Διαγραμματική απεικόνιση της μεθόδου MLPA.

νοτικής υστέρησης, καθυστέρησης της ενδομήτριας και μεταγεννητικής ανάπτυξης, καθώς επίσης και ανωμαλιών του κρανιοπροσωπικού, σκελετικού, καρδιακού και ουρογεννητικού συστήματος. Η συχνότερη χρωμοσωματική ανωμαλία είναι η τρισωμία 21, κλινική εκδήλωση της οποίας είναι το σύνδρομο Down, με συχνότητα 1 στις 800 γεννήσεις. Ο καρυότυπος του εμβρύου που προκύπτει από την κυτταρογενετική ανάλυση αποτελεί μέχρι σήμερα το χρυσό κανόνα για τη διάγνωση των χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Έχει όμως σοβαρούς περιορισμούς, κυρίως όσον αφορά στη διάγνωση υπομικροσκοπικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών μεγέθους <3 Mb, οι οποίες δε φαίνονται στον καρυότυπο. Υπολογίζεται ότι η αιτία νοσηρότητας για ποσοστό 10%-15% των ασθενών με νοτική υστέρηση, ή και δυσμορφίες και φυσιολογικό καρυότυπο, είναι κάποια υπομικροσκοπική βλάβη στα χρωμοσώματα διαγνώσιμη μόνο με μεθόδους μοριακής κυτταρογενετικής ή μοριακής βιολογίας.

Για τη διάγνωση των μικροελλειμμάτων/μικροδιπλασιασμών που δεν είναι δυνατόν να παρατηρηθούν με το συμβατικό καρυότυπο εφαρμόζεται σήμερα με επιτυχία μια μέθοδος της μοριακής βιολογίας η οποία είναι η πολλαπλή ενίσχυση ανιχνευτών εξαρτώμενη από την αντίδραση λιγάσης (MLPA: multiplex ligation-dependent probe amplification). Σε συνδυασμό με τη διεξαγωγή του συμβατικού καρυότυπου, αποτελεί αυτό που ονομάζουμε σήμερα «διευρυμένο προγεννητικό έλεγχο». Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για τη διερεύνηση μεγάλου αριθμού νοσημάτων των οποίων η αιτιολόγηση περιλαμβάνει μικροελλείμματα ή/και μικροδιπλασιασμούς. Τέτοια νοσήματα είναι σύνδρομα όπως τα DiGeorge, Williams,



Εικ. 2. Η κατανομή των δειγμάτων που παραπέμφθηκαν στο τμήμα μας. Στο επάνω ιστόγραμμα φαίνεται η κατανομή στο χρόνο και στο κάτω ιστόγραμμα η κατανομή με βάση το είδος του ιστού που επεξεργάστηκε.

Prader-Willi κ.ά. Τα συχνότερα από αυτά αναγράφονται στον πίνακα 1.

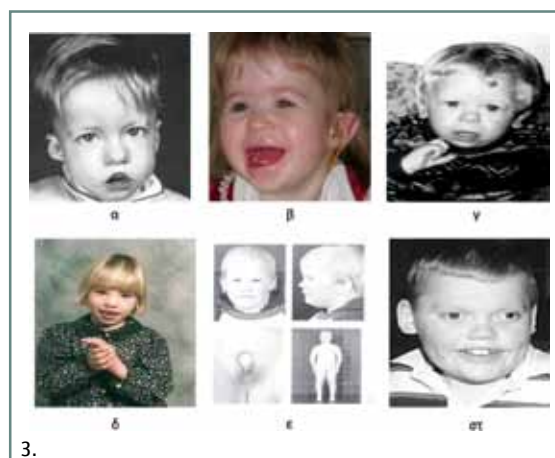
Επίσης, με την ίδια μέθοδο εξετάζονται μικροελλείμματα/μικροδιπλασιασμοί των υποτελομεριδίων όλων των χρωμοσωμάτων. Οι περιοχές αυτές είναι πλούσιες σε γονίδια και έχει βρεθεί ότι ποσοτικές μεταβολές του γενετικού υλικού στις περιοχές αυτές ευθύνονται για το 5%-10% των πασχόντων, με μετρίου έως σοβαρού βαθμού ιδιοπαθή νοτική υστέρηση.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην υβριδοποίηση δυο ειδικών ανιχνευτών ανά περιοχή-στόχο, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με την αντίδραση της λιγάσης μόνον εφόσον οι ανιχνευτές είναι ειδικά υβριδοποιημένοι (εικόνα 1). Στη συνέχεια ακολουθεί αντίδραση PCR με εκκινητές συνδεδεμένους με φθοριόχρωμα και διαχωρισμός των προϊόντων της αντίδρασης σε γενετικό αναλυτή όπως και στη QF-PCR (Quantitative Fluorescence-PCR, ποσοτική φθορίζουσα PCR). Η σύγκριση της έντασης φθορισμού του υπό εξέταση δείγματος με φυσιολογικό πρότυπο οδηγεί στην ανίχνευση μικροελλείμματος ή μικροδιπλασιασμού. Εφόσον δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική μεταβολή, το δείγμα είναι φυσιολογικό, ενώ αν ευρίσκεται μεταβολή της τάξης του 35%-50% διαγιγνώσκεται αντιστοίχως η ποσοτι-

κή αλλαγή στο γενετικό υλικό.

Εφαρμογή της μεθόδου MLPA

Ο διευρυμένος προγεννητικός έλεγχος με MLPA συνιστάται κυρίως σε περιπτώσεις κατά τις οποίες στο έμβρυο παρατηρούνται σοβαρά υπερηχογραφικά ευρήματα, όπως καρδιακές ανωμαλίες, αυξημένη αυχενική διαφάνεια, υπολειπομένη ανάπτυξη κ.ά., ενώ ο καρυότυπος του εμβρύου είναι φυσιολογικός. Ωστόσο, λόγω της αύξησης της διαγνωστικής ικανότητας, όταν συνδυάζεται με τον καρυότυπο του εμβρύου, τείνει να προτείνεται σε όλες πλέον τις επεμβατικές προγεννητικές διαγνώσεις, ως «διευρυμένος προγεννητικός έλεγχος». Επίσης, η εφαρμογή της μεθόδου MLPA έχει αποτελέσει επιπλέον χρήσιμο εργαλείο για την τελική διάγνωση χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου σε περιπτώσεις όπου απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση σε ευρήματα στον καρυότυπο, ώστε να γίνει καλύτερη ε-



Εικ. 3. Κλινική εικόνα παιδιών με τα σύνδρομα: α) DiGeorge, β) 1p36, γ) Williams, δ) Cri-du-chat (κλάματος γαλής), ε) Prader-Willi και στ) Smith-Magenis.

κτίμηση της κλινικής τους σημασίας, όπως αποτυπώνεται και από την πείρα του εργαστηρίου μας.

Τα τελευταία πέντε χρόνια η μέθοδος εφαρμόζεται στο εργαστήριο Γενετικής του ΜΗΤΕΡΑ με επιτυχία, έχοντας διερευνήσει συνολικά περίπου 1.000 περιπτώσεις, η πλειονότητα των οποίων είναι αναλύσεις που αφορούν προγεννητικές διαγνώσεις (εικόνα 2). Ευρήματα ανιχνεύθηκαν σε

Πίνακας 2	Περιπτώσεις του τμήματος Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας του ΜΗΤΕΡΑ όπου η μεθοδολογία MLPA συνέβαλε στην ορθή διαχείρισή τους.	
Τύπος MLPA	Χρωμοσωματικός τύπος	Διάγνωση
mlpa9p,9q(P036)x4	mos47,XY,i(9p)[18]/46,XY[2]	Υπεράριθμο ισοχρωμόσωμα 9p σε μωσαϊκό (παθολογικός φαινότυπος)
mlpaX/Yq(P036)x1(P245)x2	46,Xdel(Y)(qter)pat	Έλλειμμα Yq πατρικής προέλευσης (φυσιολογικός φαινότυπος)
mlpa12p(P036)x4	mos47,XY,+i(12p)[18]/46,XY[2]	Υπεράριθμο ισοχρωμόσωμα 12p σε μωσαϊκό (σύνδρομο Pallister-Killian, παθολογικός φαινότυπος)
mlpa5p(P069)x3,21q(P036,P069)x1	46,Xder(21)t(5;21)(p15.1;q22.1)mat	Μερική τρισωμία 5p και μερική μονοσωμία 12q ως αποτέλεσμα μετάθεσης στη μητέρα (παθολογικός φαινότυπος)
mlpaXp(P245)x0.8,X/Yq(P036,P069)x1	mos45,X[24]/46,X+mar[6]/47,XXY[2]/46,XY[4]	Πολλαπλές κυτταρικές σειρές των χρωμοσωμάτων του φύλου (γοναδική δυσγενεσία, παθολογικός φαινότυπος)
mlpa8p,8q(P036,P069)x3	47,XX+8[2]/46,XX[34]	Τρισωμία 8 σε χαμηλό μωσαϊκό (παθολογικός φαινότυπος)
mlpa22q11(P064,P245)x3	47,XX,+der(22)t(11;22)(q23;q11)mat	Τρισωμία 22q11 ως αποτέλεσμα μετάθεσης στη μητέρα (Emanuel syndrome, παθολογικός φαινότυπος)
mlpa18p(P036,P069)x1	46,XXdel(18)(p11.2)dn	Μερικό έλλειμμα 18p de novo (παθολογικός φαινότυπος)
mlpa4q(P036,P069)x1(P245)x2	46,XY,del(4)(q35.1)dn	Μερικό έλλειμμα 4q de novo (παθολογικός φαινότυπος)
mlpa3p(P036,P069)x1,10q(P036,P069)x3	446,XY,der(3)t(3;10)(p26.2;q24.3)mat	Μερική μονοσωμία 3p και μερική τρισωμία 10q ως αποτέλεσμα μετάθεσης στη μητέρα (παθολογικός φαινότυπος)

30/1.000 (3%) των περιπτώσεων και αφορούν μικροελλείμματα/μικροδιπλασιασμούς, τα οποία σχετίζονται με καλά χαρακτηρισμένα γενετικά σύνδρομα, χρωμοσωματικές ανωμαλίες και αναδιατάξεις ορατές στον καρυότυπο, και πολυμορφισμούς, κυρίως στις υποτελομεριδιακές περιοχές των χρωμοσωμάτων.

Στον πίνακα 2 φαίνονται μερικές από τις περιπτώσεις στις οποίες υπήρχαν κυτταρογενετικά ορατά ευρήματα και όπου η εφαρμογή του διευρυμένου προγεννητικού ελέγχου συνέβαλε ώστε να διερευνηθούν περαιτέρω, για να εκτιμηθεί στη συνέχεια η κλινική τους σημασία.

Σε ό,τι αφορά τα σύνδρομα μικροελλειμμάτων/μικροδιπλασιασμών, τα ευρήματα αφορούν κυρίως μεταγεννητικές περιπτώσεις με κλινική εικόνα χαρακτηριστική για σύνδρομα, όπως τα σύνδρομα DiGeorge και Williams (εικόνα 3α και 3γ). Στην προγεννητική διάγνωση, η εφαρμογή της μεθόδου αποκάλυψε ένα έμβρυο με μικροέλλειμμα στην περιοχή η οποία ευθύνεται για τα σύνδρομα Prader Willi/Angelman (εικόνα 3ε) και ένα έμβρυο με έλλειμμα στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 5, συμβατό με το σύνδρομο Cri-du-chat (σύνδρομο κλάματος γαλής, εικόνα 3δ).

Σημαντικό ποσοστό των ευρημάτων, ιδιαίτερα στις υποτελομεριδιακές περιοχές, αφορά κληρονομούμενους πολυμορφισμούς, οι οποίοι οφείλονται, είτε σε αληθή μικροελλείμματα/μικροδιπλασιασμούς χωρίς κλινική σημασία, είτε σε σημειακές μεταλλαγές σε περιοχές που επηρεάζουν τον υβριδισμό ή και τη σύνδεση των ανιχνευτών, οδηγώντας σε τεχνητή εμφάνιση εικόνας συμβατής με τα παραπάνω ευρήματα. Για τους λόγους αυτούς, όταν ανιχνεύονται ευρήματα είναι απαραίτητη η ανάλυση δειγμάτων DNA των γονέων, ώστε να διαπιστωθεί αν πρόκειται για γονεϊκής προέλευσης ή de novo εύρημα. Η διερεύνηση αυτή είναι απαραίτητη κυρίως σε ευρήματα τα οποία αφορούν στις υποτελομεριδιακές περιοχές. Στις περιπτώσεις όπου το εύρημα είναι de novo συνιστάται περαιτέρω διερεύνηση με άλλες μεθόδους. Στις περιπτώσεις κατά τις οποίες το εύρημα έχει κληρονομηθεί από υγιή γονέα, ο φαινότυπος του εμβρύου αναμένεται να είναι φυσιολογικός.

Υπάρχουν όμως περιπτώσεις στις οποίες είναι δυνατόν το ίδιο μικροέλλειμμα/μικροδιπλασιασμός να μην έχει καμία κλινική επίπτωση στο γονέα-φορέα, ενώ το έμβρυο να πάσχει. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το σύνδρομο DiGeorge, στο οποίο άτομα με το ίδιο μέγεθος μικροελλείμματος είναι δυνατόν να εμφανίζουν σημαντική ετερογένεια στην εκδήλωση της κλινικής εικόνας του συνδρόμου, ή

όταν το ακριβές μέγεθος του ελλείμματος δύναται να είναι διαφορετικό μεταξύ μελών της ίδιας οικογένειας. Πιθανή ερμηνεία για το γεγονός αυτό είναι ότι, εκτός από την παρουσία του μικροελλείμματος/μικροδιπλασιασμού, για να εκδηλωθεί το σύνδρομο το οποίο σχετίζεται με τη συγκεκριμένη γενετική περιοχή συμβάλλουν και άλλοι παράγοντες.

Συζήτηση και συμπεράσματα

Μέχρι σήμερα, ο συμβατικός καρυότυπος αποδεικνύεται μέθοδος επιλογής για τη διάγνωση των συχνότερων αριθμητικών και δομικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου. Οι γνωστοί όμως περιορισμοί σε ό,τι αφορά τη διακριτική ικανότητα, καθώς και το χρόνο απόδοσης των αποτελεσμάτων, κατέστησαν σταδιακά όλο και περισσότερο επιτακτική την ανάγκη εύρεσης και άλλων μεθόδων ώστε να υπάρχει η μέγιστη πληροφορία για τη χρωμοσωματική σύσταση του εμβρύου. Υπομικροσκοπικές μεταβολές του γενετικού υλικού είναι δυνατόν να οδηγήσουν στην εμφάνιση γενετικών συνδρόμων με βαρύτατη κλινική εικόνα, σε ό,τι αφορά τόσο τις σωματικές, όσο και τις νοητικές βλάβες. Η προγεννητική διάγνωση αυτών των συνδρόμων είναι δυνατόν, μετά από σωστή, διεξοδική πληροφόρηση και γενετική συμβουλευτική, να προλάβει τη γέννηση πασχόντων ατόμων, των οποίων το προσδόκιμο επιβίωσης είναι μειωμένο και η ποιότητα ζωής κακή. Ο διευρυμένος προγεννητικός έλεγχος συνιστάται κατά κύριο λόγο σε περιπτώσεις όπου κυτταρογενετικά ευρήματα χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης, ή σε περιπτώσεις όπου υπάρχουν υπερηχογραφικά ευρήματα κατά τη διάρκεια της κύησης και ο καρυότυπος του εμβρύου είναι φυσιολογικής μορφής. Ωστόσο, λόγω της υπολογισίμης συχνότητας των συνδρόμων που ανιχνεύει και του γεγονότος ότι πολλές φορές πάσχοντα έμβρυα μπορεί να μην εμφανίσουν ενδείξεις στα διάφορα στάδια των προγεννητικών ελέγχων, η ευαισθητοποίηση των μελλοντικών γονέων σε συνεργασία με το θεράποντα ιατρό οδηγεί στην επιλογή του διευρυμένου προγεννητικού ελέγχου. Αν υπολογίσει κανείς τις συνέπειες της γέννησης ενός πάσχοντος παιδιού, ενώ η επιστήμη έχει στη διάθεσή της τον τρόπο να φθάσει σε έγκαιρη διάγνωση, υπογραμμίζεται η ανάγκη πληροφόρησης των υποψηφίων γονέων για τις διαγνωστικές δυνατότητες του διευρυμένου προγεννητικού ελέγχου και της ένταξής του στους ελέγχους ρουτίνας της προγεννητικής διάγνωσης χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου.

Abstract

Christopoulou G, Tseva T, Hatzaki A, Velissariou V. Extensive Prenatal Diagnosis of Fetal Chromosomal Abnormalities with the MLPA method. *Iatrika Analekta* 2012; 3: 683-687

The application of MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) in prenatal diagnosis is described. This molecular method can facilitate the detection of submicroscopic aberrations of fetal chromosomes such as microdeletions and microduplications undetectable by conventional karyotype and which are responsible for well recognized microdeletion/microduplication syndromes, as well as a substantial portion of cases of moderate to severe unexplained mental retardation. The application of MLPA has significantly broadened the detection rate of chromosomal syndromes during prenatal diagnosis.

Βιβλιογραφία

1. Menten B, Maas N, Thienport B, et al. *Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports.* J Med Genet. 2006; 43 (8):625-633.
2. Kirchhoff M, Gerdes T, Brunebjerg S, et al. *Investigation of patients with mental retardation and dysmorphic features using comparative genomic hybridization and subtelomeric multiplex ligation dependent probe amplification.* Am J Med Genet A. 2005; 15:1.393 (3):231-233.
3. Kirchhoff M, Bisgaard AM, Gerdes T, et al. *MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams-Beuren syndrome regions.* Eur J Med Genet. 2007; 50 (1):33-42.
4. Kjaergaard S, Seindberg K, Jorgensen FS, et al. *Diagnostic yield by supplementing prenatal metaphase karyotyping with MLPA for microdeletion syndromes and subtelomere imbalances.* Prenat Diagn. 2010; 30 (10):995-999.
5. Stegmann AP, Jonker LM, Engelen JJ. *Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements.* Eur J Med Genet. 2008; 51 (2):93-105.
6. Lam AC, Lam ST, Lai KK, et al. *High rate of detection of subtelomeric aberration by using combined MLPA and subtelomeric FISH approach in patients with moderate to severe mental retardation.* Clin Biochem. 2006; 39 (3):196-202.
7. Northrop EL, Ren H, Bruno DL, et al. *Detection of cryptic subtelomeric chromosome abnormalities and identification of anonymous chromatin using a quantitative multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay.* Hum Mutat. 2005; 26 (5):477-486.
8. Rooms L, Reyniers E, van Luijk R, et al. *Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA).* Hum Mutat. 2004; 23 (1):17-21.
9. Konialis C, Hagnefect B, Sevastidou S, et al. *Uncovering recurrent microdeletion syndromes and subtelomeric deletions/duplications through non-selective application of a MLPA-based extended prenatal panel in routine prenatal diagnosis.* Prenat Diagn. 2011; 31 (6):571-577.
10. Christopoulou G, Tzetis M, Konstantinidou AE, et al. *Clinical and molecular description of a fetus in prenatal diagnosis with a rare de novo ring 10 and deletions of 12.59Mb in 10p15.3-p14 and 4.22Mb in 10q26.3.* Eur J Med Genet. 2012; 55 (1):75-79.
11. Kitsiou-Tzeli S, Sismani C, Karkaletsi M, et al. *Prenatal diagnosis of a de novo partial trisomy 10p12.1-12.2 pter originating from an unbalanced translocation onto 15qter and confirmed with array CGH.* Prenat Diagn. 2008; 28 (8):770-772.

Γενετική και μοριακή διάγνωση κρανιοσκελετικών δυσπλασιών

Δέσποινα Αποστολοπούλου, Αγγελική Χατζάκη

Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας, ΜΗΤΕΡΑ

deaapos@gmail.com, axatzaki@mitera.gr

Ολγα Καΐρα, Κανάρης Παναγόπουλος, Αλέξανδρος Στρατουδάκης

Ελληνικό Κρανιοπροσωπικό Κέντρο, ΜΗΤΕΡΑ

olgka@otenet.gr, kanpan@otenet.gr, astratou@otenet.gr

Σταύρος Σηφάκης

Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης, Ηράκλειο

stavros.sifakis@yahoo.com

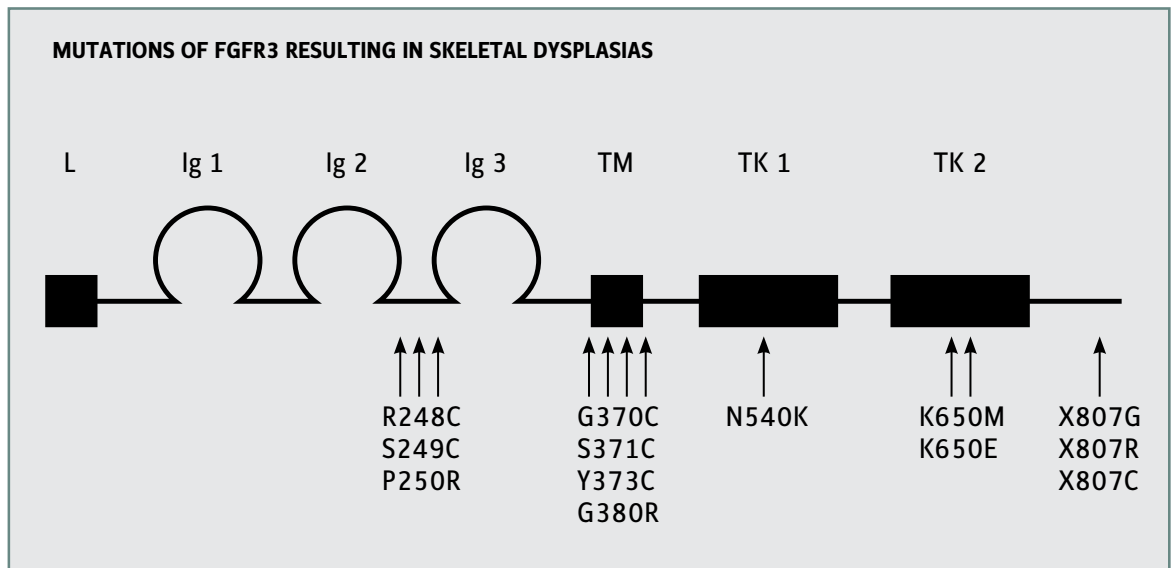
Οι κρανιοσκελετικές δυσπλασίες αποτελούν ετερογενή ομάδα δυσπλασιών που επηρεάζουν το μέγεθος, το σχήμα και την οστεοποίηση (υφή και μετάλλωση) του σκελετού και του κρανιακού θόλου. Ανάλογα με το πρωτεύον χαρακτηριστικό των δυσπλασιών αυτών, μπορούν να διακριθούν σε 2 μεγάλες κατηγορίες: τις σκελετικές δυσπλασίες (ΣΔ), που επηρεάζουν κυρίως το σκελετό, και τις κρανιοσυνοστεώσεις (ΚΡ), που επηρεάζουν τον κρανιακό θόλο. Στις κρανιοσκελετικές δυσπλασίες, ανάλογα με την κλινική ο-

ντότητα, επηρεάζονται:

- ▶ δύο είδη ιστών (οστό και χόνδρος),
- ▶ τρία είδη διαφοροποιημένων κυττάρων (οστεοβλάστες, οστεοκλάστες και χονδροκύτταρα),
- ▶ τα οργανικά συστατικά του οστού (π.χ. κολλαγόνο τύπου I),
- ▶ τα ανόργανα συστατικά του οστού (μετάλλωση) [π.χ. $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$].

Στις σκελετικές δυσπλασίες, τα επηρεαζόμενα μακρά

Πίνακας 1	Ταξινόμηση κρανιοσκελετικών δυσπλασιών ανάλογα με τη μοριακή βλάβη (παραδείγματα) (σύμφωνα με το International Nomenclature and Classification of Genetic Skeletal Disorders, 2006 revision)	
Βλάβη	Γονίδιο (α)/Χρωμοσωμ. Θέση Πρωτεΐνη	Φαινότυπος
Δομικές πρωτεΐνες χόνδρου	COL2A1/12q13.1-q13.3 Collagen type II	Kniest dysplasia, Stickler syndrome, achondrogenesis type 2, SED, SEM D. κ.ά.
Δομικές πρωτεΐνες χόνδρου	COL1A1, COL1A2 17q21 και 7q22.1 α(1) προκολλαγόνο α(2) προκολλαγόνο	Osteogenesis imperfecta I, II, III και IV.
Μεταβολικές οδοί χονδρογένεσης	DTDST / 5q32-q33 Diastrophic dysplasia sulfatetransporter	Diastrophic dysplasia, achondrogenesis IB, atelosteogenesis type 2, recessive multiple epiphyseal dysplasia.
Τοπική ρύθμιση πολλαπλασιασμού χονδροκυττάρων	FGFR3 / 4p16.3 Υποδοχέας 3 παράγοντα αύξησης ινοβλαστών Exostosin 1,2	Achondroplasia, thanatophoric dysplasia, hypochondroplasia, SADDAN.
Απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων	EXT1, EXT 2 / 8q23-q24.1 και 11p12-p12 Exostosin 1,2	Multiple cartilaginous exostoses.
Τοπική ρύθμιση πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης οστεοβλαστών	FGFR2 / 10q26.12 FGFR3 / 4p16.3 FGFR1 / 8p12 TWIST1 / 7p21.1	Apert, Crouzon, Pfeiffer SADDAN, Muenke syndromes, Pfeiffer syndrome, Saethre-Chotzen syndrome.
Ρύθμιση διαφοροποίησης προδρόμων κυττάρων προς οστεοβλάστες	RUNX2 / 6p21	Cleidocranial dysplasia



Σχήμα 1: Σχηματική δομή του γονιδίου FGFR3 και εντοπισμός μεταλλαγών που σχετίζονται με σκελετικές δυσπλασίες.

οστά έχουν μεσοδερμική και εξωδερμική προέλευση (πρόδρομα κύτταρα: οστεοβλάστες, χονδροβλάστες, ινοβλάστες), ενώ στις κρανιοσυνοστεώσεις, τα επηρεαζόμενα κρανιακά οστά έχουν κυρίως εξωδερμική προέλευση, σχεδόν αποκλειστικά από κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (neural crest cells). Ο τρόπος διαφοροποίησης και ανάπτυξης του σκελετού και του κρανιακού θόλου διαφέρει.

Σε γενικές γραμμές, στο σκελετό υπερτερεί το πρότυπο ενδοχονδρικής οστεοποίησης (endochondral ossification), ενώ στον κρανιακό θόλο αυτό της διαμεμβρανικής οστεοποίησης (intramembranous ossification), και ως εκ τούτου σε κάθε κατηγορία δυσπλασιών βλέπεται διαφορετικό αναπτυξιακό μονοπάτι και ενέχονται διαφορετικά αλλά και κοινά γονίδια (πίνακας 1).

FGFRs-σχετιζόμενες σκελετικές δυσπλασίες

Συνολικά οι σκελετικές δυσπλασίες εμφανίζονται με συχνότητα 1/4.000 γεννήσεις, ενώ το 25% από τα έμβρυα με σκελετική δυσπλασία πεθαίνει ενδομητρίως και το 30% σε πρώιμη βρεφική ηλικία. Σημαντικός γενετικός παράγοντας που σχετίζεται άμεσα με τις κρανιοσκελετικές δυσπλασίες είναι οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών (FGFRs). Η οικογένεια των FGFRs, η οποία ανήκει στην κατηγορία των υποδοχέων κίνησης τυροσίνης, αποτελείται από 4 μέλη: FGFR1-4. Κάθε υποδοχέας αποτελείται βασικά από 3 εξωκυττάρια περιοχές που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες (IgI-III), από μια διαμεμβρανική περιοχή (TM) και μια διαιρεμένη ενδοκυττάρια περιοχή κίνησης τυροσίνης (TK1/TK2) (σχήμα 1).

Η δημιουργία ενός τριμοριακού συμπλόκου, το οποίο περιλαμβάνει ένα μόριο αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF), που αποτελεί το μόριο-συνδέτη για τους FGFRs, ένα μόριο υποδοχέα (FGFR) και ένα μόριο πρωτεογλυκά-

νης (heparan sulfate proteoglycan) που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια, είναι απαραίτητη για το διμερισμό και την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα, με συνέπεια την ενεργοποίησή του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη μεταγωγής σήματος μέσω διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών, που ελέγχουν κατά περίπτωση διάφορες σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση και η απόπτωση. Οι αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (FGFs) αποτελούν οικογένεια 22 δομικά παρόμοιων, μιτογόνων πολυπεπτιδίων και η σηματοδότηση που προάγουν, μέσω των υποδοχέων τους, παίζει πολύ κρίσιμο ρόλο στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη και στην οργανογένεση. Μεταλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν για 3 από τους 4 υποδοχείς (FGFR1-3) έχουν καταγραφεί σε πληθώρα κρανιοσκελετικών ανωμαλιών.

Συγκεκριμένα, τρεις βασικές σκελετικές δυσπλασίες, η αχονδροπλασία (ACH), η υποχονδροπλασία (HCH) και η θανατηφόρος δυσπλασία τύπου 1 και 2 (TDI και TDII) συνδέονται με μεταλλαγές στο γονίδιο FGFR3.

Αχονδροπλασία

Η αχονδροπλασία (ACH) ή αχονδροπλασικός νανισμός (OMIM 100800) αντιπροσωπεύει περίπου το 15% του συνόλου των σκελετικών δυσπλασιών στη γέννηση και γι' αυτό θεωρείται η συχνότερη μη θανατηφόρος σκελετική δυσπλασία, με ποσοστό που εκτιμάται από 1/15.000-1/25.000 γεννήσεις. Χαρακτηρίζεται από μικρό ανάστημα (ενήλικοι: άνδρες 131cm±5.6, γυναίκες 124cm±5.9), ριζομελική βράχυνση των μακρών οστών, έντονη οσφυϊκή λόρδωση, ελάττωση μεσοσπονδυλίων διαστημάτων στην περιοχή του οσφυοϊερού, βλαιο- και ραιβο- παραμορφώσεις κάτω άκρων, μακροκεφαλία και προέχον μέτωπο, υποπλασία οστών προσώπου και χαρακτηριστι-

κό προσωπείο. Επιπλέον, συχνότατα εμφανίζονται περιορισμός της έκτασης και συστροφής του αγκώνα και σχήμα χεριών δίκην τρίαινας. Τα άτομα με ακονδροπλασία έχουν φυσιολογική νοτική ανάπτυξη και σπανιότατα εμφανίζουν ήπια νοτική υστέρηση και μαθησιακά προβλήματα.

Υποχονδροπλασία

Τα κλινικά χαρακτηριστικά της υποχονδροπλασίας (HCH) (OMIM 146000) είναι παρόμοια με αυτά της ακονδροπλασίας, αλλά ηπιότερα. Χαρακτηρίζεται από μικρό ανάστημα (128-165cm στους ενήλικες και 2-3 SD κάτω από το μέσο στα παιδιά), ριζομελική ή μεσομελική βράχυνση των μακρών οστών με ήπια πλάτυνση της μετάφυσης (μηνιαίο και κνήμη) και βραχύ, πεπλατυσμένο αυχένα του μηνιαίου. Επίσης, παρατηρούνται ελάττωση μεσοσπονδυλίων διαστημάτων στην κατώτερη οσφυϊκή μοίρα, γωνιώδη, βραχυμένα λαγόνια οστά και συχνά περιορισμός της έκτασης του αγκώνα, βραχυδακτυλία άνω και κάτω άκρων και γενικευμένη ήπια χαλαρότητα αρθρώσεων. Μακροκεφαλία συναντάται επίσης στα άτομα με υποχονδροπλασία, αλλά χωρίς υποπλασία οστών προσωπικού κρανίου και χαρακτηριστικό προσωπείο. Σπανιότερα, αλλά σημαντικά κλινικά χαρακτηριστικά είναι η σκολίωση, η οσφυϊκή λόρδωση, οι ήπιες βλαιο- και ραιβο- παραμορφώσεις κάτω άκρων, η οστεοαρθρίτιδα στους ενήλικες, η ήπια νοτική υστέρηση και τα μαθησιακά προβλήματα.

Και στις δύο προαναφερθείσες δυσπλασίες ισχύουν τα εξής:

- ▶ Αυτοσωμική επικρατούσα κληρονομικότητα.
- ▶ Άνω του 85% των παιδιών με ACH από γονείς με φυσιολογικό ύψος (de novo μεταλλαγές). Τα υπόλοιπα από 1 ή 2 γονείς με ACH. 70% των παιδιών με HCH από γονείς με φυσιολογικό ύψος (de novo μεταλλαγές). Τα υπόλοιπα από 1 ή 2 γονείς με HCH.
- ▶ Ομόζυγη ACH θνησιγόνος.
- ▶ Οι de novo μεταλλαγές σχετίζονται με αυξημένη ηλικία του πατέρα.
- ▶ Όλες οι de novo μεταλλαγές κληρονομούνται από τον πατέρα και συμβαίνουν κατά τη σπερματογένεση, και πολύ σπανιότερα από μωσαϊκισμό (μόνο στην ACH).
- ▶ Στην ACH το χαμηλό ποσοστό γοναδικού μωσαϊκισμού εξηγεί την ελαφρά αυξημένη πιθανότητα γέννησης και 2ου παιδιού με ACH από το ίδιο ζευγάρι. Στην HCH δεν έχει αναφερθεί μωσαϊκισμός, άρα η πιθανότητα γέννησης και 2ου παιδιού με HCH από το ίδιο ζευγάρι είναι <0,01%.

▶ Η διπλή ετεροζυγωτία για ACH και HCH είναι πολύ βαριά σκελετική δυσπλασία.

Θανατηφόρος δυσπλασία τύπου I και II

Η θανατηφόρος δυσπλασία (TDI: OMIM 187600, TDII: OMIM 187601) είναι η πιο συχνή σποραδική θνησιγόνος σκελετική δυσπλασία, με συχνότητα που κυμαίνεται μεταξύ 1/17.000-1/50.000 γεννήσεων. Τα κλινικά χαρακτηριστικά της περιλαμβάνουν μεγάλη βράχυνση των μακρών οστών, στενό θώρακα κωδωνοειδούς σχήματος αλλά φυσιολογικού μήκους, μακροκεφαλία με προέχον μέτωπο, χαμηλή πρόσφυση και επιπέδωση του ρινικού οστού, βραχυδακτυλία, υδροκέφαλο. Ειδικότερα, στον τύπο I παρατηρείται τοξοειδής κύρτωση του μηνιαίου, το οποίο περιγράφεται σαν ακουστικό τηλεφώνου και ήπιος φαινότυπος κρανιοσυνοστεώσεως, ενώ στον τύπο II το μηνιαίο είναι ευθύ, αλλά το κρανίο έχει το σχήμα τριφυλλίου λόγω πολυλαπλής κρανιοσυνοστεώσεως. Επίσης, μπορεί να βρεθούν υδρονέφρωση και καρδιακές ανωμαλίες. Τα πάσχοντα άτομα καταλήγουν λίγο μετά τη γέννηση λόγω αναπνευστικής ανεπάρκειας, η οποία οφείλεται σε υποπλασία των πνευμόνων. Κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα και οφείλεται κυρίως σε de novo μεταλλαγές. Έχει επίσης αναφερθεί χαμηλό ποσοστό γοναδικού μωσαϊκισμού, στο οποίο οφείλεται η πιθανότητα επανεμφάνισης της δυσπλασίας στο ίδιο ζευγάρι, σε σπάνιες περιπτώσεις.

Κρανιοσυνοστεώσεις

Οι κρανιοσυνοστεώσεις είναι χωριστή ομάδα κρανιοσκελετικών δυσπλασιών με ποικίλη αιτιολογία, στις οποίες μόνο το 21% των περιπτώσεων οφείλεται σε γενετικά αίτια. Από αυτές, περίπου το 85% οφείλεται σε μεταλλαγές σε γονίδια, όπου κυρίαρχο ρόλο παίζουν και πάλι οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών (FGFRs 1-3), και το 15% σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Άλλες αιτίες κρανιοσυνοστεώσεως είναι ο ενδομήτριος περιορισμός της ανάπτυξης του εμβρύου και η έκθεση της εγκύου σε τερατογόνα, όπως το βαλπροϊκό και η ισοτρετινοΐνη.

Ο όρος κρανιοσυνοστεώωση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά σε εγχειρίδιο παθολογικής ανατομίας το 1830 από τον Otto για να χαρακτηρίσει την πρόωρη σύντηξη των κρανιακών ραφών. Οι ραφές, οι στενές επιφάνειες επαφής των κρανιακών οστών, αποτελούνται από μη διαφοροποιημένο μεσέγχυμα και επιτρέπουν τη σύγχρονη με την ανάπτυξη του εγκεφάλου διαμόρφωση του κρανιακού θόλου.

Η κρανιοσυνοστέωση εμφανίζεται με συχνότητα περίπου 1/2.500 γεννήσεις και μπορεί να διακριθεί σε μη συνδρομική και συνδρομική.

Οι μη συνδρομικές κρανιοσυνοστεώσεις, στις οποίες η πρόωρη σύντηξη των ραφών εμφανίζεται ως μεμονωμένο χαρακτηριστικό, μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τη ραφή η οποία συνοστεώνεται: μετωπιαία, οβελιαία, στεφανιαία και λαμβδοειδή. Ο φαινότυπος των κρανιοσυνοστεώσεων ποικίλλει ανάλογα με το ποια ή ποιες από τις ραφές θα συνοστεωθούν (π.χ. συνοστέωση της οβελιαίας ραφής προκαλεί σκαφοκεφαλία, των δύο στεφανιαίων βραχυκεφαλία, της μιας μόνο στεφανιαίας μετωπιαία πλαγιοκεφαλία, της μετωπιαίας και της οβελιαίας ακροκεφαλία, της μετωπιαίας τριγωνοκεφαλία, της λαμβδοειδούς και της οβελιαίας ινιακή πλαγιοκεφαλία και, τέλος, όλων των ραφών μικροκεφαλία). Η συχνότητα συνοστέωσης της κάθε ραφής έχει υπολογιστεί σε: 40%-55% στην οβελιαία, 20%-25% στη στεφανιαία (μονόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη), 5%-15% στη μετωπιαία και 5% στη λαμβδοειδή. Στο 5%-15% των περιπτώσεων υπάρχει συνοστέωση σε περισσότερες από μία ραφές.

Στις συνδρομικές μορφές, η κρανιοσυνοστέωση μπορεί να αφορά μία ή περισσότερες ραφές και συνοδεύεται και από άλλα ευρήματα στα άκρα, στην καρδιά, στο κεντρικό νευρικό σύστημα κ.ά. Το 30% των συνδρόμων κρανιοσυνοστέωσης οφείλεται σε μεταλλαγές στα γονίδια FGFR1, FGFR2, FGFR3, TWIST1, EFN1, MSX2 (Muscle segment homeobox) και RAB23 (Ras-associated protein). Επιπλέον, το 16% των συνδρομικών περιπτώσεων έχει συσχετιστεί, μέσω συμβατικών κυτταρογενετικών μεθόδων, με χρωμοσωμικές ανωμαλίες, κυρίως ελλείμματα και διπλοσωμίες, ενώ το ποσοστό αυτό αυξάνεται με τη χρήση σύγχρονων τεχνικών ανάλυσης των χρωμοσωμάτων (PMSA: polymorphic microsatellite segregation analysis, υποτελομεριδιακή MLPA: multiplex ligation-dependent probe amplification και array CGH: array-based comparative genomic hybridization), οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν μικροελλείμματα και μικροδιπλοσωμίες.

Τα συχνότερα σύνδρομα κρανιοσυνοστέωσης είναι τα: Muenke, Crouzon, Apert, Pfeiffer, Saethre-Chotzen και το σύνδρομο CFN (Craniofrontonasal) (σχήμα 2). Με εξαίρεση, ίσως, το σύνδρομο Apert, τα υπόλοιπα σύνδρομα κρανιοσυνοστέωσης παρουσιάζουν ετερογένεια τόσο στα κλινικά τους χαρακτηριστικά, ακόμα και μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων, όσο και στις μεταλλαγές στις οποίες οφείλονται. Το



Σχήμα 2: Κλινική εικόνα των συχνότερων συνδρόμων κρανιοσυνοστέωσης: Apert (a), Crouzon (b), Pfeiffer (c), Saethre-Chotzen (d), Craniofrontonasal (e), Muenke (f).

γεγονός αυτό καθιστά πολλές φορές δύσκολη την ακριβή διάγνωση, καθώς επίσης και την ανίχνευση του γενετικού αίτιου του συνδρόμου (πίνακας 4).

Μεθοδολογία μοριακής διάγνωσης

Η δυνατότητα εντοπισμού της γενετικής βάσης ποικίλλει ανάλογα με την κλινική εικόνα των κρανιοσκελετικών δυσπλασιών. Για τις σκελετικές δυσπλασίες και για ορισμένα σύνδρομα κρανιοσυνοστέωσης, η συσχέτιση κλινικού φαινοτύπου-γενετικής αιτιολογίας είναι άμεση, καθιστώντας έτσι πιο εύκολη τη μοριακή διάγνωση. Αντίθετα, στις υπόλοιπες συνδρομικές μορφές, καθώς και σε όλες τις μη συνδρομικές μορφές κρανιοσυνοστέωσης, ο συσχετισμός αυτός είναι πιο πολύπλοκος και η μοριακή διάγνωση πιο δύσκολη και χρονοβόρα.

Συγκεκριμένα, με τη διερεύνηση μιας και μόνο μεταλλαγής, διαφορετικής ανά περίπτωση σκελετικής δυσπλασίας, επιτυγχάνεται μοριακή διάγνωση για την αχονδροπλασία σε ποσοστό >98%, για την υποχονδροπλασία σε >70%, για τη θανατηφόρο δυσπλασία τύπου II σε >99% και για το σύνδρομο Muenke στο 100%. Για τη διάγνωση του συνδρόμου Apert απαιτείται έλεγχος 2 μεταλλαγών που φθάνει σε ποσοστό 98%, ενώ για τη θανατηφόρο δυσπλασία τύπου I απαιτείται έλεγχος τριών διαφορετικών μεταλλαγών για να επιτευχθεί ποσοστό διάγνωσης 85%. Για τις υπόλοιπες περιπτώσεις, όπου η γενετική διάγνωση είναι πιο περίπλοκη, ακολουθείται ο αλγόριθμος που φαίνεται στους πίνακες 2 και 3.

Προγεννητική διάγνωση και γενετική συμβουλευτική

Η προγεννητική διάγνωση των σκελετικών δυσπλασιών βασίζεται αρχικά στην 2-D υπερηχογραφία 2ου τριμήνου κατά

ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ		
ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ	1ο στάδιο ελέγχου	2ο στάδιο ελέγχου
ΣΥΝΔΡΟΜΟ APERT	FGFR2-Ser252Trp/Phe, Pro253Arg	FGFR2-exon IIIc : ένθεση Alu ή έλλειμμα
ΣΥΝΔΡΟΜΟ PFEIFFER	FGFR2-exons IIIa, IIIc	FGFR2-exons 3, 5, 11, 14-17, FGFR1-Pro252Arg, FGFR3-Pro250Arg
ΣΥΝΔΡΟΜΟ CROUZON	FGFR2-exons IIIa, IIIc	FGFR2-exons 3, 5, 11, 14-17, FGFR3-Pro250Arg, Ala391Glu
ΣΥΝΔΡΟΜΟ SAETHRE-CHOTZEN	TWIST1-exon 1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΚΑΙ MLPA FGFR3-Pro250Arg	ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ, FGFR2-exons IIIa, IIIc
ΚΡΑΝΙΟΠΡΟΣΩΠΟΡΙΝΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ	EFNB1- ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΤΕΡΟΔΙΜΕΡΩΝ, ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΚΑΙ MLPA	
ΑΛΛΕΣ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΕΣ Ή ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΠΛΗΣ Ή ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗΣ	ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ, FGFR3-Pro250Arg	array CGH, FGFR2-exons IIIa, IIIc, TWIST1 exon1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΚΑΙ MLPA
ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ		
ΜΟΝΟΠΛΕΥΡΗ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ	FGFR3-Pro250Arg	FGFR2-exons IIIa, IIIc
ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΗ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ	FGFR3-Pro250Arg	ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ, FGFR2-exons IIIa, IIIc, TWIST1 EXON1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΚΑΙ MLPA
ΠΟΛΛΑΠΛΗ	ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ, FGFR3-Pro250Arg	array CGH, FGFR2-exons IIIa, IIIc, TWIST1 exon1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΚΑΙ MLPA
ΜΕΤΩΠΙΑΙΑ, ΟΒΕΛΙΑΙΑ, ΛΑΜΒΔΟΕΙΔΗΣ	ΚΑΜΙΑ ΥΠΟΧΡΕΩΤΙΚΗ	

Πίνακας 2: Προτεινόμενη μεθοδολογία ανίχνευσης γενετικής και μοριακής βάσης των κρανιοσυνοστεώσεων.

τη 18η-23η εβδομάδα της κύησης, όπου απεικονίζεται η ανατομία του εμβρύου και υπολογίζονται λεπτομερώς τα βιομετρικά χαρακτηριστικά του σκελετού, του κρανίου και του θώρακα. Παρ' όλα αυτά, ο εντοπισμός υπερηχογραφικών δεικτών, διαγνωστικών για κάθε σκελετική ή κρανιακή δυσπλασία, σε έμβρυα χωρίς οικογενειακό ιστορικό είναι πολύ δυσχερές προσέγγιση. Κατά τα τελευταία χρόνια, η μορια-

κή διάγνωση έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την επίτευξη οριστικής διάγνωσης in utero. Σε αυτό το πλαίσιο, έχει γίνει εφικτή η προγεννητική διάγνωση των σκελετικών δυσπλασιών που οφείλονται στο γονίδιο FGFR3, με συνδυασμό δεδομένων που προκύπτουν από τη στενή συνεργασία του υπερηχογραφικού ελέγχου, του εργαστηρίου μοριακής διαγνωστικής και σε περιπτώσεις διακοπής της κύησης και του

ΣΚΕΛΕΤΙΚΕΣ ΔΥΣΠΛΑΣΙΕΣ	1ο στάδιο ελέγχου	2ο στάδιο ελέγχου
ΑΧΟΝΔΡΟΠΛΑΣΙΑ	FGFR3-Gly380Arg	
ΥΠΟΧΟΝΔΡΟΠΛΑΣΙΑ	FGFR3-Asn540Lys	FGFR3-Lys650Met
ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΣ ΔΥΣΠΛΑΣΙΑ ΤΥΠΟΥ I	FGFR3-Arg248Cys	FGFR3-Ser249Cys, Tyr373C
ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΣ ΔΥΣΠΛΑΣΙΑ ΤΥΠΟΥ II	FGFR3-Lys650Glu	

Πίνακας 3: Προτεινόμενη μεθοδολογία ανίχνευσης μοριακής βάσης των FGFR3-σχετιζόμενων σκελετικών δυσπλασιών.

Πίνακας 4		
Συνδρομικές κρανιοσυνοστεώσεις: Εμπλεκόμενα γονίδια και κλινική εικόνα		
ΣΥΝΔΡΟΜΟ	ΓΟΝΙΔΙΟ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ
Muenke	FGFR3	Στεφανιαία κρανιοσυνοστεώση σοβαρής μορφής, ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη. Πρόγνωση δυσμενής, τείνει προς υποτροπή στον αρχικό φαινότυπο.
Crouzon	FGFR2 FGFR3	1/60.000 γεννήσεις. Πολλαπλές πρόωρες συνοστεώσεις των οστών του κρανίου και του προσώπου. Βραχυκεφαλία, υποπλασία προσώπου, σοβαρού βαθμού εξόφθαλμος, υπερτηλορισμός μέτριου βαθμού, αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση, μείωση ή απώλεια όρασης, αναπνευστική δυσκολία. Η κλινική εικόνα κυμαίνεται από ελαφρώς έως βαρύτατη, ασύμβατη με τη ζωή. Στις περισσότερες περιπτώσεις φυσιολογική νοητική ανάπτυξη.
Apert	FGFR2 FGFR3	1/65.000-1/88.000 γεννήσεις. Πρόωρες συνοστεώσεις μεταξύ των οστών του κρανίου αλλά και μεταξύ των οστών του κρανίου και του προσώπου. Βραχυκεφαλία, πρόσωπο αποπλατυσμένο, ρηχοί οφθαλμικοί κόγχοι (πλατυπροσώπια-υπερτηλορισμός), σοβαρή αναπνευστική απόφραξη (υπνική αποφρακτική άπνοια), μύτη αποστρογγυλεμένη στο ακρορίνιο, σοβαρές διαταραχές στην οδοντοφυΐα, θολωτή υπερώρα, αρκετά συχνά υπάρχει σχιστία, ελαττωματική ανάπτυξη πολλαπλών αρθρώσεων στα άκρα και σοβαρού βαθμού συνδακτυλίες χεριών και ποδιών. Αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση, νοητική υστέρηση της οποίας η σοβαρότητα ποικίλλει. Μεγαλεγκεφαλία (ενίοτε το βάρος του εγκεφάλου μπορεί να υπερβεί κατά 200-300 g το βάρος ενός φυσιολογικού εγκεφάλου).
Pfeiffer	FGFR2 FGFR1	1/100.000 γεννήσεις. Συνοστεώσεις κρανιακών ραφών, υποπλασία προσώπου, υπερτηλορισμός, ανατομικές ανωμαλίες του αναπνευστικού συστήματος, εξόφθαλμος, ευρείς αντίχειρες και μεγάλοι δάκτυλοι ποδιών, ποικίλου βαθμού συνδακτυλίες, δυσχέρεια στην αναπνοή, απώλεια όρασης από έκθεση του κερατοειδούς ή από παρατεταμένη αύξηση της ενδοκρανιακής πίεσης, νευρολογικά προβλήματα, απώλεια ή μείωση της ακοής. Η κλινική του εικόνα ποικίλλει, από σχετικά ήπια ως βαρύτατη. Με βάση την κλινική εικόνα, αλλά και τις γονιδιακές μεταλλαγές που ανιχνεύονται, οι περιπτώσεις κατατάσσονται σε τύπου 1, 2 ή 3. Στις περιπτώσεις τύπου 3 η θνητότητα φθάνει το 80%. Στις περιπτώσεις τύπου 2 ή 3 η ανάγκη να γίνει τραχειοστομία αγγίζει το 100%. Οι κυριότερες αιτίες θανάτου είναι αναπνευστική απόφραξη ή νευρολογικές επιπλοκές.
Saethre-Chotzen	TWIST1 FGFR2	Συχνό εύρημα η πρόωρη συνοστεώση της στεφανιαίας ραφής. Βραχυκεφαλία, πυργοκεφαλία (αυξημένο ύψος μετώπου και κρανιακού θόλου), συνήθως φυσιολογική νοητική ανάπτυξη, χαμηλή έκφυση τριχοφυΐας στο μέτωπο, παρέκκλιση ρινικού διαφράγματος και απόκλιση του άξονα της ρινός, πτώση άνω βλεφάρων, μικρού βαθμού συνδακτυλίες.
CFN	EFGN1	Κρανιομετωπορινικό σύνδρομο: διαμαρτία στη διάπλαση της μέσης γραμμής του προσώπου, σε σοβαρές μορφές η μύτη είναι δισχιδής (χωρισμένη στη μέση), υπερτηλορισμός, ευρύ, πλατύ ριζορίνιο, συχνά τριγωνική προβολή του τριχωτού της κεφαλής στην περιοχή του προβλήματος (hairline indicator). Η προβολή αυτή δείχνει την περιοχή της ανατομικής ανωμαλίας. Πιθανή συνοστεώση της στεφανιαίας ραφής, οπότε και η δυσμορφία καθίσταται ασύμμετρη. Συνήθως φυσιολογική νοημοσύνη.

παθολογοανατομικού εργαστηρίου. Με βάση τον υπέρηχο 2ου τριμήνου από υπερηχογραφιστές ειδικευμένους στην ιατρική εμβρύου ως πρώτη διαγνωστική γραμμή, επιτυγχάνεται διαγνωστική ακρίβεια που κυμαίνεται από 31%-65% ανάλογα με τον τύπο της δυσπλασίας, ακρίβεια που τείνει να αυξάνεται στις πιο πρόσφατες μελέτες (67,9%). Όσον αφορά τις θανατηφόρες δυσπλασίες επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ακρίβεια και πρωιμότερη διάγνωση, λόγω ειδικών υπερηχογραφικών δεικτών, ούτως ώστε να δίνεται η δυνατότητα έγκαιρης διακοπής της κύησης σε περίπτωση όπου επιλεγεί.

Άρα, ο ρόλος της υπερηχογραφίας εντοπίζεται στους παρακάτω στόχους:

► Να περιορίσει τη διαφορική διάγνωση σε συγκεκριμένα

πιθανά γονίδια, ώστε να μπορεί να παρασχεθεί επιβεβαίωση ή αποκλεισμός με μοριακή προσέγγιση.

► Να προβλέψει τη θνησιμότητα *in utero* ή στην πρώιμη βρεφική ηλικία.

► Να εντοπίσει αρκετά πρώιμα την κρανιοσκελετική δυσπλασία, ώστε να παρασχεθεί έγκαιρα και αποτελεσματικά η διάγνωση και η γενετική συμβουλή.

Σε περίπτωση βέβαια, όπου υπάρχει οικογενειακό ιστορικό και ακριβής περιγραφή του φαινοτύπου του πάσχοντος ατόμου, η προγεννητική διάγνωση είναι σαφώς ευκολότερη, αν και στην πλειονότητα των περιπτώσεων, δεδομένου ότι οι μεταλλάξεις εμφανίζονται *de novo*, τα ευρήματα πιθανόν να περιορίζονται στον τυχαίο εντοπισμό βράχυνσης των μακρών οστών ή σε ανώμαλο σχήμα του κρανιακού θόλου.

Abstract

Apostolopoulou D, Kaxira O, Panagopoulos K, Sifakis S, Hatzaki A, Stratoudakis A. Genetic and molecular diagnosis of cranioskeletal dysplasias. *Iatrika Analekta* 2012, 3: 688-694

Cranioskeletal dysplasias constitute a highly heterogeneous group of disorders affecting the skeleton and the cranial vault. Depending on the organ that is mainly affected we subdivide this large group to skeletal dysplasias presenting at a frequency of 1/4,000 births and craniosynostoses with a frequency of 1/2,500 births. The genetic aetiology underlying these disorders is extremely dispersed. In this paper we review mainly the genetic and molecular defects of the most frequent FGFRs-related skeletal dysplasias and the syndromic forms of craniosynostoses related to FGFR1, FGFR2, FGFR3, TWIST and EFNB-1 genes. We also present the molecular and cytogenetic methodology that is mainly performed in order to reach maximal diagnostic accuracy, the potential of offering an accurate prenatal diagnosis and genetic counseling and all the limitations of this approach.

Βιβλιογραφία

1. M.M. Cohen Jr. *The New Bone Biology: Pathologic, Molecular and Clinical Correlates*. *Amer J Med Genet A* 2006; 140A: 2.646-2.706.
2. Superti-Furga M, Unger S. *Nosology and Classification of Genetic Skeletal Disorders: 2006 revision*. *Amer J Med Genet A* 2007; 143A: 1-18.
3. Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, et al. *Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia*. *Cell* 1994; 78: 335-342.
4. Prinster C, Carrera P, Del Maschio M, et al. *Comparison of clinical-radiological and molecular findings in hypochondroplasia*. *Am J Med Genet* 1998; 6:75 (1):109-112.
5. Rousseau F, El Ghouzzi V, Delezoide AL, et al. *Missense FGFR3 mutations create cysteine residues in thanatophoric dwarfism type I (TD1)*. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 509-512.
6. Passos-Bueno MR, Serie AL, Jehee FS, et al. *Genetics of Craniosynostosis: Genes, Syndromes, Mutations and Genotype-Phenotype Correlations*. *Front Oral Biol* 2007; vol12: 107-143.
7. Johnson D, Wilkie AOM. *Practical Genetics: Craniosynostosis*. *Eur J Hum Genet* 2011; 1-8.
8. Krakow D, Lachman RS, Rimoin DL. *Guidelines for the prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasias*. *Genet Med* 2009; 11: 127-133.
9. Schramm T, Gloning KP, Minderer S, et al. *Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasias*. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 34: 160-170.
10. Hatzaki A, Sifakis S, Apostolopoulou D, et al. *FGFR3 related skeletal dysplasias diagnosed prenatally by ultrasonography and molecular analysis: presentation of 17 cases*. *Am J Med Genet A*. 2011; 155A (10): 2.426-2.435.

Γενετικά αίτια αυξημένης αυχενικής διαφάνειας κατά την κύηση

Αναστασία Σπρινγκ, Γεωργία Χριστοπούλου, Θωμάς Τσεβά, Σταυρούλα Χριστοπούλου, Ζακλίν Ντόνοχιου, Μαργαρίτα Καρκαλέτση, Ευαγγελία Μανιάλη, Βούλα Βελισσαρίου

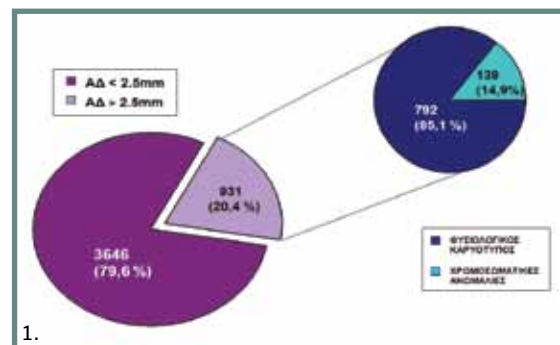
Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας ΜΗΤΕΡΑ
genetics@mitera.gr

Η υπερηχογραφική απεικόνιση της υποδόριας συσσώρευσης υγρού στον αυχένα του εμβρύου ορίζεται ως αυξημένη αυχενική διαφάνεια (ΑΔ). Η μέτρησή της κατά την 11n-14n εβδομάδα της κύησης αποτελεί εξαιρετικό δείκτη χρωμοσωματικών ανωμαλιών όπως τα σύνδρομα Down, Edwards, Patau και Turner, ενώ γενικότερα η αυξημένη τιμή της είναι δυνατόν να σχετίζεται με δυσμενή έκβαση της κύησης. Από το σύνολο των 4.577 δειγμάτων χοριακών λαχνών, τα οποία επεξεργάστηκε το Τμήμα μας στο διάστημα 2006-2012, τα 931 (20,4%) είχαν ως κυριότερη παραπομπή την αυξημένη ΑΔ. Στα 139 (14,9%) από αυτά ανιχνεύθηκε κάποια χρωμοσωματική ανωμαλία εμφανής στον καρυότυπο. Επί φυσιολογικού καρυότυπου παραμένει όμως κίνδυνος για την παρουσία μεμονωμένων ανωμαλιών, ενδομήτριου θανάτου και παρουσίας γενετικού συνδρόμου.

Υπάρχει ένας μακρύς κατάλογος συνδρόμων, που είναι δυνατόν να σχετίζονται με την αύξηση της ΑΔ. Για να αποκλειστούν τα περισσότερα από αυτά, είναι δυνατόν να εφαρμοστεί ο έλεγχος για την ανίχνευση συνδρόμων μικροελλειμμάτων/μικροδιπλασιασμών με τη μοριακή μέθοδο MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) ή, για μεγαλύτερη πληροφόρηση, ο μοριακός καρυότυπος (array CGH). Τέλος, με τη σωστή υπερηχογραφική παρακολούθηση και εφόσον το έμβρυο δεν παρουσιάζει κανένα εύρημα και η ΑΔ υποστρέψει, ο κίνδυνος επιπλοκών τόσο στην κύηση όσο και κατά την περιγεννητική περίοδο, δεν είναι μεγαλύτερος από εκείνον τον οποίον έχουν τα έμβρυα στο γενικό πληθυσμό.

Αυξημένη αυχενική διαφάνεια

Η αυξημένη ΑΔ του πρώτου τριμήνου της κύησης υποχωρεί ή εξελίσσεται σε αυχενικό οίδημα/κυστικό ύγρωμα, με την παρουσία ή όχι γενικευμένου ύδρωπα κατά το δεύτερο τρίμηνο. Η βέλτιστη ηλικία κύησης για τη μέτρηση της τιμής της ΑΔ είναι το διάστημα από την 11n έως τη 13n εβδομάδα της κύησης, όταν το κεφαλουραίο μήκος (CRL) του εμβρύου κυμαίνεται μεταξύ 45 και 84 mm. Η μέτρηση μέσα σ' αυτό το χρονικό διάστημα της κύησης είναι κατά 98%-100% ακριβής λόγω της θέσης που έχει το έμβρυο



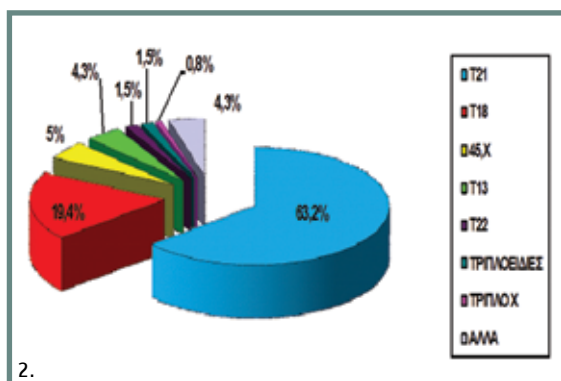
Σχήμα 1: Ποσοστό δειγμάτων χοριακών λαχνών με αυξημένη ΑΔ και χρωμοσωματική ανωμαλία (Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας, Νοσοκομείο ΜΗΤΕΡΑ).

(κάθετη).

Η ετερογένεια των καταστάσεων που σχετίζονται με την αυξημένη ΑΔ δείχνει ότι πιθανότατα η συσσώρευση υγρού στον αυχένα του εμβρύου δεν οφείλεται σε έναν μόνο μηχανισμό. Πιθανοί μηχανισμοί είναι η καρδιακή δυσλειτουργία, η συμφόρηση αγγείων στο κεφάλι και τον αυχένα, η διαταραχή της σύστασης του εξωκυττάριου υγρού, η ανώμαλη ή καθυστερημένη ανάπτυξη του λεμφικού συστήματος, η εμβρυϊκή αναιμία ή υποπρωτεϊναιμία και η διαταραχή στην κυκλοφορία της λέμφου λόγω μείωσης των κινήσεων του εμβρύου, όπως συμβαίνει σε περιπτώσεις νευρομυϊκών διαταραχών.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η τιμή της ΑΔ αναφέρεται ως αυξημένη όταν ξεπερνά την 95n εκατοστιαία θέση ή αλλιώς τα 2,5 χιλ. Η μέτρηση της ΑΔ αποτελεί εξαιρετικό δείκτη παρουσίας χρωμοσωματικών ανευλοειδιών στο έμβρυο, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με βιοχημικές διαταραχές και προχωρημένη αναπαραγωγική ηλικία της εγκύου (ΠΑΗ). Η συσχέτιση της αυξημένης ΑΔ με δυσμενή έκβαση της κύησης έχει ανασκοπηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία και μάλιστα ο κίνδυνος αυξάνεται εκθετικά όσο αυξάνεται η τιμή της.

Επί φυσιολογικού καρυότυπου παραμένει ο κίνδυνος ενδομήτριου θανάτου, μεμονωμένων ανωμαλιών και παρουσίας γενετικού συνδρόμου στο έμβρυο. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, από την πείρα των προηγούμενων ετών, με



Σχήμα 2: Είδος χρωμοσωματικής ανωμαλίας σε 139 παθολογικές περιπτώσεις με αυξημένη αυχενική διαφάνεια (Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας, Νοσοκομείο ΜΗΤΕΡΑ).

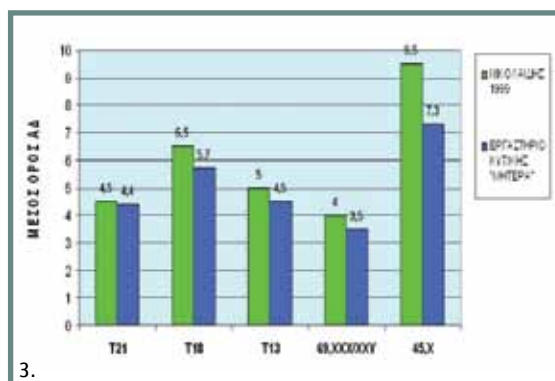
τη σωστή υπερηχογραφική παρακολούθηση, εφόσον το έμβρυο δεν παρουσιάσει κανένα εύρημα και η αυξημένη ΑΔ υποστρέψει, ο κίνδυνος επιπλοκών στην κύηση και την περιγεννητική περίοδο δε διαφέρει από εκείνον που έχουν τα έμβρυα που ανήκουν στο γενικό πληθυσμό.

Αυξημένη αυχενική διαφάνεια και χρωμοσωματικές ανευπλοειδίες του εμβρύου

Η αυξημένη ΑΔ αποτελεί σημαντικό δείκτη κυρίως για τα εξής χρωμοσωματικά σύνδρομα: το σύνδρομο Down (τρισωμία 21), το σύνδρομο Edwards (τρισωμία 18), το σύνδρομο Patau (τρισωμία 13) και το σύνδρομο Turner (μονοσωμία X), καθώς επίσης και για τριπλοειδίες.

Το Τμήμα μας τα τελευταία έξι έτη επεξεργάστηκε συνολικά 4.577 δείγματα χοριακών λαχνών (CV: chorionic villi). Όπως φαίνεται στο σχήμα 1, το ποσοστό των δειγμάτων με αυξημένη ΑΔ ανήλθε σε 931/4.577 (20,4%). Από αυτά, τα 792/931 (86,1%) είχαν φυσιολογικό καρυότυπο, ενώ τα 139/931 (14,9%) είχαν χρωμοσωματική ανωμαλία εμφανή στον καρυότυπο.

Το είδος της χρωμοσωματικής ανωμαλίας που διαγνώστηκε στα 139 δείγματα με αυξημένη ΑΔ φαίνεται στο σχήμα 2. Σε άνω των 60% των δειγμάτων (88/139) διαγνώστηκε τρισωμία 21, ενώ στο 20% περίπου (26/139)



Σχήμα 3: Μέσος όρος ΑΔ ανά χρωμοσωματική ανωμαλία σε δείγματα του ΜΗΤΕΡΑ σε σύγκριση με τις τιμές στη βιβλιογραφία.

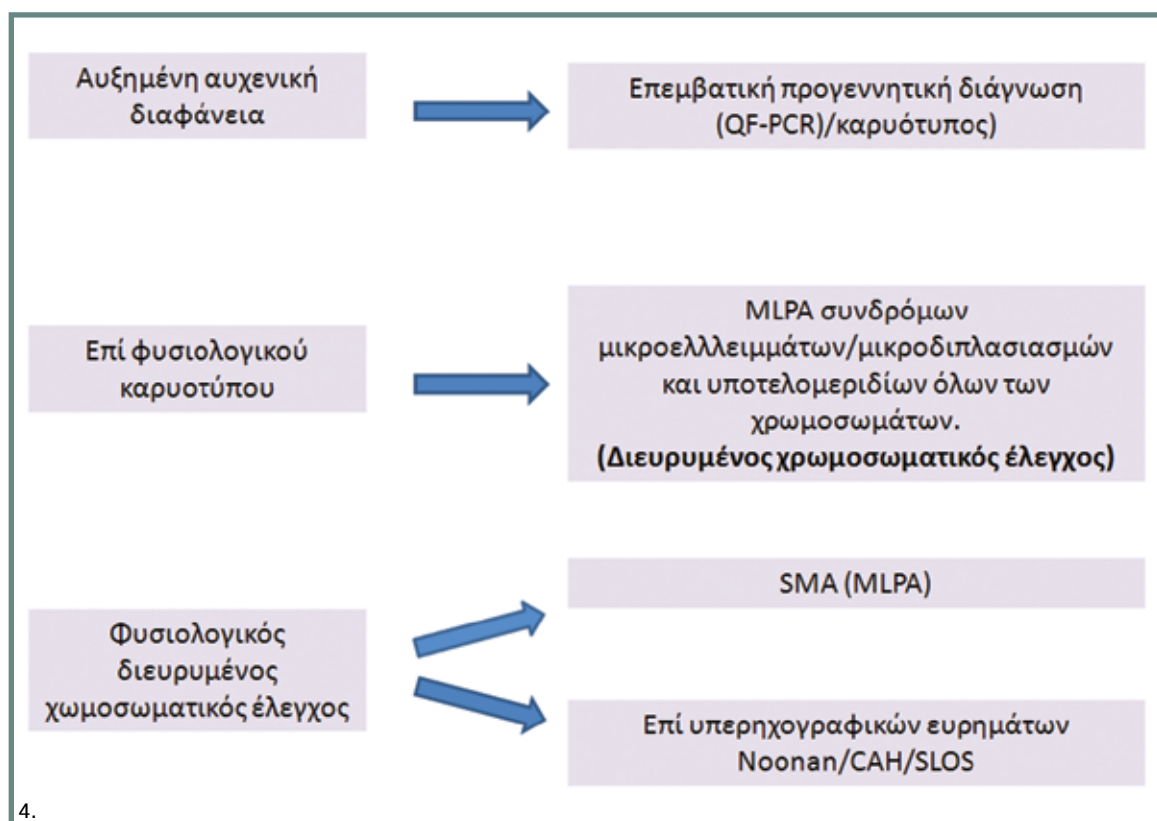
τρισωμία. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αυτά στη διεθνή βιβλιογραφία. Υπολογίζοντας το μέσο όρο της τιμής της ΑΔ για τις συχνότερες χρωμοσωματικές ανωμαλίες και συγκρίνοντας τις τιμές αυτές με τις αντίστοιχες κατά Νικολαΐδη (σχήμα 3), παρατηρούμε πως οι μέσοι όροι της ΑΔ για την τρισωμία 21 σχεδόν ταυτίζονται, ενώ οι διαφορές που παρατηρούνται στις υπόλοιπες χρωμοσωματικές ανευπλοειδίες είναι πιθανόν να οφείλονται στο σχετικά μικρό αριθμό των περιπτώσεων.

Αυξημένη αυχενική διαφάνεια σε έμβρυα με φυσιολογικό καρυότυπο

Έχει δημοσιευτεί ένας μακρύς κατάλογος γενετικών συνδρόμων στα οποία έχει παρατηρηθεί αυξημένη ΑΔ και τα οποία δεν ανιχνεύονται με το συμβατικό καρυότυπο. Ωστόσο, παραμένει αναπάντητο το ερώτημα κατά πόσον η αυξημένη ΑΔ έχει πραγματική σχέση με κάποια από τα σύνδρομα αυτά ή αν πρόκειται για τυχαίο εύρημα. Για να βρει κανείς την απάντηση θα πρέπει να ανατρέξει στους φυσιολογικούς μηχανισμούς συσσώρευσης λέμφου στον αυχένα, καθώς και στα παθοφυσιολογικά αίτια αύξησης της ΑΔ.

Επιχειρείται να συσχετιστούν ορισμένοι μηχανισμοί με κάποια από τα γενετικά σύνδρομα. Έτσι, η καρδιακή δυ-

Πίνακας 1		Τα συχνότερα γενετικά σύνδρομα που σχετίζονται με αυξημένη αυχενική διαφάνεια σε έμβρυα με φυσιολογικό καρυότυπο, η συχνότητά τους και η κληρονομικότητα	
Γενετικά Σύνδρομα	Συχνότητα	Κληρονομικότητα	
Σύνδρομο Noonan	1 στα 2.500	Αυτοσωμική επικρατής	
Σύνδρομο DiGeorge	1 στα 4.000	Αυτοσωμική επικρατής	
Νωτιαία μυϊκή ατροφία (SMA)	1 στα 7.000	Αυτοσωμική υπολειπόμενη	
Συγγενής υπερπλασία των επινεφριδίων (CAH)	1 στα 14.000	Αυτοσωμική υπολειπόμενη	
Σύνδρομο Smith- Lemli-Opitz (SLOS)	1 στα 20.000	Αυτοσωμική υπολειπόμενη	
Αχονδροπλασία	1 στα 26.000	Αυτοσωμική επικρατής	
Υποχονδροπλασία	1 στα 26.000	Αυτοσωμική επικρατής	
Θανατηφόρος δυσπλασία	1 στα 10.000	Σποραδική	



4.

Σχήμα 4. Διάγραμμα ροής που απεικονίζει τη συνήθη πρακτική που ακολουθείται στο Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας του Νοσοκομείου ΜΗΤΕΡΑ, για τη διερεύνηση περιπτώσεων εμβρύου με αυξημένη αυχενική διαφάνεια.

ολειτουργία ως αίτιο της αυξημένης ΑΔ συνδέεται με τα σύνδρομα που εμφανίζουν καρδιακές ανωμαλίες, όπως τα σύνδρομα Noonan και DiGeorge. Η τροποποίηση της σύνθεσης της εξωκυττάριας ουσίας εξηγεί το εύρημα σε γενετικά σύνδρομα που σχετίζονται με διαταραχές του κολλαγόνου (achondrogenesis type II, Nance-Sweeney syndrome, osteogenesis imperfecta type II κ.ά.) και των υποδοχών των αυχενικών παραγόντων των ινοβλαστών (FGFRs) (αχονδροπλασία, θανατηφόρος δυσπλασία κ.ά.). Η ανεπαρκής απομάκρυνση της λέμφου συνδέει το εύρημα με το σύνδρομο Noonan και, τέλος, οι μειωμένες εμβρυϊκές κινήσεις συσχετίζουν την αυξημένη ΑΔ με νευρομυϊκές διαταραχές, όπως τη νωτιαία μυϊκή ατροφία (SMA-Spinal Muscular Atrophy). Ωστόσο, η σπανιότητα των συνδρόμων αυτών δεν επιτρέπει τη διεξαγωγή μεγάλων μελετών που θα οδηγούσαν σε ασφαλέστερα συμπεράσματα.

Για τη διαχείριση των περιπτώσεων με αυξημένη ΑΔ και φυσιολογικό καρυότυπο είναι ιδιαίτερα σημαντική η στενή υπερηχογραφική παρακολούθηση της κύησης για τη διαπίστωση εμφάνισης ανατομικών ανωμαλιών, με έμφαση στον ενδεδειχμένο υπερηχογραφικό έλεγχο της καρδιάς και των μεγάλων αγγείων. Εξίσου σημαντική είναι η λήψη λεπτομερούς οικογενειακού ιστορικού, από το οποίο είναι δυνατόν να προκύψουν ενδείξεις διερεύνησης γενετικού συνδρόμου ιδιαίτερα σε περιπτώσεις υπολειπόμενου τύπου κληρονομικότητας.

Υπάρχουν γενετικά σύνδρομα ως καλά κλινικά χαρακτηρισμένες οντότητες, των οποίων η γενετική βάση δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η προγεννητική εργαστηριακή γενετική διάγνωση. Στον πίνακα 1 καταγράφονται ορισμένα από τα συχνότερα γενετικά σύνδρομα των οποίων το γενετικό αίτιο είναι γνωστό και σχετίζονται με αυξημένη ΑΔ σε ευηλοειδικά έμβρυα.

Διαχείριση περιπτώσεων με αυξημένη ΑΔ και φυσιολογικό καρυότυπο

Μετά το αποτέλεσμα φυσιολογικού καρυότυπου σε έμβρυα με αυξημένη ΑΔ στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στη μετέπειτα διαχείριση προκειμένου αφενός να αποφευχθεί η υπέρμετρη αγωνία από την πλευρά των γονέων, αφετέρου να γίνουν όλοι οι απαραίτητοι έλεγχοι ώστε να υπάρχει εγκαίρως αποτέλεσμα και χρόνος για τη λήψη αποφάσεων. Στο σχήμα 4 συνοψίζεται η συνήθης πρακτική που ακολουθείται σε περιπτώσεις που παραπέμπονται στο τμήμα μας.

Λόγω της συσχέτισης της αυξημένης ΑΔ με δυσμενή έκβαση της κύησης και της αυξημένης συχνότητας περιγεννητικής νοσηρότητας, η διαπίστωσή της αποτελεί εύρημα το οποίο οφείλει να διερευνάται ενδελεχώς. Συνήθως, ακολουθούνται διεθνώς αποδεκτά πρωτόκολλα αποκλεισμού μη γενετικών αιτιών, όπως μολύνσεις από κυτταρομεγαλοϊό ή B19 κ.ά. Για τη διερεύνηση των γενε-

τικών αιτιών αρχικά συνιστάται επεμβατική προγεννητική διάγνωση για τον αποκλεισμό εμφανών χρωμοσωματικών ανωμαλιών με τη διεξαγωγή του καρυότυπου του εμβρύου. Επί φυσιολογικού καρυότυπου συνιστάται διευρυμένος χρωμοσωματικός έλεγχος για την ανίχνευση συνδρόμων μικροελλειμμάτων/μικροδιπλασιασμών με MLPA που σχετίζονται με αυξημένη ΑΔ. Επί φυσιολογικού διευρυμένου χρωμοσωματικού ελέγχου και ανάλογα με τη συνύπαρξη άλλων υπερηχογραφικών ευρημάτων, συνεχίζεται η διερεύνηση επιπλέον συνδρόμων. Στη διερεύνηση συγκεκριμένων συνδρόμων είναι δυνατόν να οδηγήσει και η λήψη λεπτομερούς ατομικού και οικογενειακού ιατρικού ιστορικού. Από τις διαθέσιμες εργαστηριακές προσεγγίσεις αυτή που συγκεντρώνει το μεγαλύτερο διαγνωστικό δυναμικό

είναι η στοχευμένη μοριακή ανάλυση με συστοιχίες DNA (targeted array CGH). Ωστόσο, το κόστος της εξέτασης την καθιστά προς το παρόν δυσπρόσιτη στο ευρύ κοινό. Όσο μειώνεται το κόστος της εξέτασης αυτής και εμπλουτίζονται οι βάσεις δεδομένων, τόσο θα τείνει να είναι η μέθοδος επιλογής για τη διερεύνηση γενετικών αιτιών σε έμβρυα με αυξημένη ΑΔ.

Η αύξηση της ΑΔ είναι ένα φαινόμενο που δεν έχει πλήρως διερευνηθεί. Εξαιρετικά σημαντική θεωρείται η λεπτομερής υπερηχογραφική παρακολούθηση της κύησης, παράλληλα με τη διερεύνηση των αιτιών που την προκάλεσαν, έτσι ώστε να συνεκτιμώνται όλα τα δεδομένα που θα εξασφαλίσουν την υπεύθυνη και ασφαλή διαχείριση της υγείας του εμβρύου και της μέλλουσας μητέρας.

Abstract

Spring A, Christopoulou G, Tseva T, Christopoulou S, Donohue J, Karkaletsis M, Manissali E, Velissariou V. Genetics of increased fetal nuchal translucency. *Iatrika Analekta* 2012; 3: 695-698

The abnormal accumulation of fluid behind the fetal neck at 11-14 weeks of gestation visible via ultrasonography is known as increased nuchal translucency (NT). It is a common phenotypic expression of trisomy 21 and other chromosomal defects. Extensive studies have now established that, even in chromosomally normal fetuses, increased NT is also associated with a wide range of fetal defects and genetic syndromes. MLPA and array CGH can be applied to exclude most of them. From a total of 4577 chorionic villi samples analysed in our laboratory during the last six years, 931 (20.4%) presented increased NT and 139 (14.9%) of these presented a chromosomal abnormality visible by karyotype. Finally, if the fetus does not present any findings after a detailed sonographic follow-up and NT recedes, the chance of a healthy live birth is equal to that in the general population.

Βιβλιογραφία

1. Nicolaidis KH, Sebire NJ, Snijders JM. *The 11-14 week scan*. 1999; The Parthenon Publishing Group, New York.
2. Avgidou et al. *Prospective first-trimester screening for trisomy 21 in 30.564 pregnancies*. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192 (6): 1.761-1.767.
3. Senat MV, et al. *First-trimester screening for Down syndrome: recommendations for what purpose?* *Gynecol Obstet Fertil* 2007; 35 (10): 1.069-1.070.
4. Souka AP, Von Kaisenberg CS, Hyett JA, et al. *Increased nuchal translucency with normal karyotype*. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192 (4): 1.005-1.021.
5. Bilardo CM, Timmerman E, Pajkrt E, et al. *Increased nuchal translucency in euploid fetuses--what should we be telling the parents?* *Prenat Diagn*. 2010; 30 (2): 93-102.
6. Alamillo CM, Fiddler M, Pergament E. *Increased nuchal translucency in the presence of normal chromosomes: what's next?* *Curr Opin Obstet Gynecol* 2012; 24 (2): 102-108.
7. Allanson JE, Bohring A, Dorr HG, et al. *The face of Noonan syndrome: Does phenotype predict genotype*. *Am J Med Genet A*. 2010; 152A (8): 1.960-1.966.
8. Konialis C, Haghefelt B, Sevastidou S, et al. *Uncovering recurrent microdeletion syndromes and subtelomeric deletions/duplications through non-selective application of a MLPA-based extended prenatal panel in routine prenatal diagnosis*. *Prenat Diagn* 2011; 31 (6): 571-577.
9. Lin AE, Ardinger HH, Ardinger RH Jr, et al. *Cardiovascular malformations in Smith-Lemli-Opitz syndrome*. *Am J Med Genet* 1997; 68 (3):270-278.

Σύνδρομο εύθραυστου Χ και νοτική υστέρηση: μεθοδολογία προσέγγισης και μοριακή διάγνωση

Δήμητρα Μπουζαρέλου, Στέλλα Αμέντα

Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας ΜΗΤΕΡΑ

genetics@mitera.gr

Αγγελική Χατζάκη

Παιδιατρική Κλινική ΜΗΤΕΡΑ

axatzaki@mitera.gr

Το σύνδρομο του εύθραυστου Χ χρωμοσώματος (fragile X syndrome - FXS-OMIM 300624) είναι η συχνότερη μορφή μονογονιδιακής κληρονομούμενης νοτικής υστέρησης (1/3.600-1/4.000 αγόρια και 1/6.000-1/8.000 κορίτσια) και η δεύτερη συχνότερη αιτία νοτικής υστέρησης μετά το σύνδρομο Down, όπως επίσης και μία από τις σημαντικότερες αιτίες αυτισμού. Είναι μονογονιδιακό φυλοσύνδετο νόσημα και το υπεύθυνο γονίδιο (FMR-1) εδράζεται στο χρωμόσωμα Χ. Αποτελεί ένα από τα σύνδρομα επέκτασης τρινουκλεοτιδίων και οφείλεται στην επανάληψη μιας τριπλέτας νουκλεοτιδίων κυτοσίνης - γουανίνης - γουανίνης (CGG) που εντοπίζεται στην 5'-αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου FMR-1 που εδράζεται στην περιοχή q27.3 του χρωμοσώματος Χ (σχήμα 1).

Σε φυσιολογικά άτομα (normal alleles) ο αριθμός των

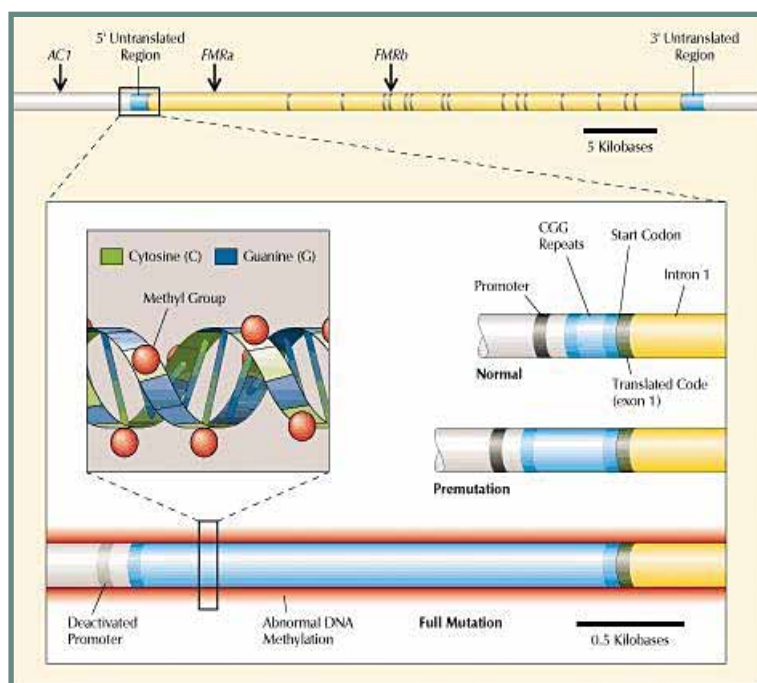
επανάληψεων CGG κυμαίνεται μεταξύ 5-50, σε φορείς προμετάλλαξης (premutation alleles) μεταξύ 55-200 και σε πάσχοντα άτομα (full mutation alleles) >200 φορές. Τα άτομα που φέρουν 50-54 επανάληψεις θεωρείται ότι ανήκουν στην γκρίζα ζώνη (intermediate alleles). Άρρενα (XY) και θήλεα (XX) άτομα είναι εξίσου πιθανό να είναι φορείς της προμετάλλαξης ή πάσχοντες. Οι πατέρες-φορείς προμετάλλαξης κληρονομούν υποχρεωτικά στις κόρες τους το παθολογικό Χ χρωμόσωμα και κατά συνέπεια όλες είναι φορείς προμετάλλαξης και έχουν πιθανότητα 50% να μεταβιβάσουν το παθολογικό χρωμόσωμα Χ στα άρρενα ή θήλεα τέκνα τους.

Όμως, αν και η νόσος κληρονομείται με τον επικρατή χαρακτήρα, εμφανίζει δύο χαρακτηριστικά που τροποποιούν τη μενδελική μεταβίβαση: μειωμένη διεισδυτικότητα και το φαινόμενο της επίσπευσης. Το παραπάνω σημαίνει ότι το παθολογικό FMR-1 γονίδιο μπορεί είτε να μεταβιβαστεί αμετάβλητο ως αλληλόμορφο προμετάλλαξης είτε να επεκταθεί σε αλληλόμορφο πλήρους μετάλλαξης, και η πιθανότητα να συμβεί αυτό αυξάνεται σε διαδοχικές γενιές (επίσπευση). Η επέκταση σε >200 τριπλέτες έχει ως αποτέλεσμα τη μεθυλίωση των κυτοσινών, άρα και απενεργοποίηση του γονιδίου FMR-1 και τη μειωμένη ή μηδενική παραγωγή της κωδικοποιούμενης FMR πρωτεΐνης (FMRP). Τα θήλεα άτομα με πλήρη μετάλλαξη στο γονίδιο FMR1 συνήθως εμφανίζουν ηπιότερη την εικόνα του συνδρόμου από τα άρρενα και αυτό οφείλεται κυρίως στο φαινόμενο της τυχαίας απενεργοποίησης του Χ χρωμοσώματος (μειωμένη διεισδυτικότητα).

Κατά συνέπεια, αν και όλες οι μητέρες πάσχόντων αρρένων είναι υποχρεωτικά φορείς της μετάλλαξης ή της προμετάλλαξης, περίπου το 70% δεν εμφανίζει καμιάς μορφής νοτική υστέρηση.

Η πρωτεΐνη FMRP

Η πρωτεΐνη FMRP είναι μία RNA-binding πρωτεΐνη που



Σχήμα 1: Σχηματική παράσταση της 5' αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου FMR-1. Στην ένθετη μεγέθυνση αναπαρίστανται 3 διαφορετικά αλληλόμορφα: φυσιολογικό, προμεταλλαγής και πλήρους μεταλλαγής (από την Abbott Molecular).

συμμετέχει στην αρνητική ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης και εκφράζεται κυρίως σε ιστούς του εγκεφάλου και των όρχεων. Μελέτες που διεξήχθησαν από το 1993 και μετά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η πρωτεΐνη FMRP λειτουργεί και ως μεταφραστικός καταστολέας συγκεκριμένων mRNAs που αποτελούν τους στόχους της και ως ρυθμιστής της μεταφοράς και εντοπισμού αυτών των mRNAs σε δενδριτικά κύτταρα και συνάψεις.

Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι η πρωτεΐνη FMRP παίζει σημαντικό ρόλο στην εγκεφαλική λειτουργία, που σχετίζεται με τη λειτουργία των συνάψεων, την ωρίμανση και την πλαστικότητα τους και ότι η απώλεια έκφρασης της FMRP πιθανόν να οδηγεί σε ανώμαλη δομή και λειτουργία των συνάψεων.

Επιπλέον, πειράματα που διεξήχθησαν από το 2002 και μετά ενισχύουν και μια δεύτερη υπόθεση για τη λειτουργία της FMRP. Η υπόθεση αυτή συνδέεται με τη λειτουργία των μεταβολοτροπικών υποδοχέων του νευροδιαβιβαστή γλουταμινικό οξύ (mGluR), από τη στιγμή όπου διαπιστώθηκε ότι μία από τις συνέπειες της ενεργοποίησης των υποδοχέων αυτών είναι η αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης στις συνάψεις. Σε *in vivo* πειράματα σε ποντίκια, στα οποία είχε απενεργοποιηθεί το γονίδιο FMR-1, η προσθήκη ενός ανταγωνιστή των mGluRs στα συναπτονευρωνικά κυστίδια οδήγησε σε σύνθεση της FMRP. Αυτό αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα και στη διαλεύκανση του υπεύθυνου μηχανισμού που ευθύνεται για το σύνδρομο εύθραυστου X, αλλά κυρίως έδωσε δύο σημαντικές πληροφορίες.

Η πρώτη ήταν ότι και άλλες συνέπειες της ενεργοποίησης των mGluRs μπορεί να τροποποιούνται όταν λείπει η FMRP πρωτεΐνη. Η δεύτερη και σημαντικότερη ήταν ότι η μείωση της δραστηριότητας των mGluRs μπορεί να αποκαταστήσει τη φυσιολογική πρωτεϊνοσύνθεση στις συνάψεις των ατόμων με απουσία της FMRP και έτσι να ανατρέψει εν μέρει τον παθολογικό φαινότυπο των ατόμων με σύνδρομο εύθραυστου X.

Έτσι, τίθεται ένας πρώτος «θεραπευτικός» στόχος στα πάσχοντα άτομα, που δεν βασίζεται σε αυτήν καθεαυτήν τη γονιδιακή θεραπεία, δηλαδή στην αποκατάσταση της φυσιολογικής FMRP.

Κλινική εικόνα

Κλινική υποψία τίθεται στα αγόρια με μέτρια έως σοβαρή νοτική υστέρηση. Στα κορίτσια ο φαινότυπος είναι ηπιό-

τερος λόγω του φαινομένου της τυχαίας απενεργοποίησης του X χρωμοσώματος και του κυτταρικού μωσαϊκισμού που προκύπτει, αν και έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία πάσχουσα γυναίκα στην οποία είχε απενεργοποιηθεί τελείως το φυσιολογικό X.

Τα αγόρια εμφανίζουν μακροκεφαλία, επιμκυσμένο πρόσωπο, μεγάλα αφτιά και προεξέχουσα γνάθο. Επίσης συνυπάρχει υπερεκτασιμότητα αρθρώσεων. Στον καρδιολογικό έλεγχο ευρίσκεται συχνά ανεπάρκεια μιτροειδούς. Στην προεμφυβία μπορεί να εμφανίζουν αυξημένο όγκο όρχεων. Καλό είναι να παρακολουθούνται οι πάσχοντες με υπερηχογράφημα κοιλίας, επειδή έχουν παρατηρηθεί κύστες, αλλά και κακοήθειες ήπατος. Ο βαθμός της νοτικής υστέρησης ποικίλλει και μπορεί να συνυπάρχει με αυτιστική συμπεριφορά και διάσπαση προσοχής, αλλά και με σπασμούς. Περίπου το 25%-35% των πασχόντων ατόμων πληροί τα διαγνωστικά κριτήρια αυτισμού. Δυσκολίες στην κοινωνική προσαρμοστικότητα και διαταραχές συμπεριφοράς παρατηρούνται κυρίως στα αγόρια, αλλά και συχνά στα κορίτσια, αν και σε αυτά δεν υπάρχει νευρολογική διαταραχή.

Σε ορισμένα γενεαλογικά δέντρα αξιολογείται η ύπαρξη θετικού οικογενειακού ιστορικού νοτικής υστέρησης, όπως και η παρουσία ανδρών υπερηλίκων στην οικογένεια που εμφανίζουν απώλεια πρόσφατης μνήμης, τρόμο τελικού σκοπού, παρεγκεφαλιδική αταξία, περιφερική νευροπάθεια και νόσο του Parkinson.

Πρόκειται για φορείς προμετάλλαξης στους οποίους η συμπτωματολογία εκδηλώνεται μετά την ηλικία των 50 χρόνων, ονομάζεται FXTAS (fragile X tremor-ataxia syndrome, OMIM 300623). Οι γυναίκες φορείς προμετάλλαξης είναι πιθανόν να εμφανίσουν πρόωμη ωοθηκική ανεπάρκεια (premature ovarian failure-POF) που οδηγεί σε εμμηνόπαυση πριν από την ηλικία των 40 ετών.

Η κλινική υποψία επιβεβαιώνεται με εργαστηριακή διάγνωση (μοριακός έλεγχος επέκτασης CGG στην 5'-UTR του FMR-1), η οποία θα ανιχνεύσει και τους φορείς της προμετάλλαξης. Με τη συνεργασία του συμβούλου γενετικής, μπορεί να προσφερθεί προγεννητική διάγνωση στη μητέρα του πάσχοντος, αλλά και στις πιθανές αδερφές της, καθώς και εντοπισμός των φορέων προμετάλλαξης σε όλο το οικογενειακό δέντρο και γενετική συμβουλή.

Να σημειωθεί ότι σε κανένα κράτος της Ευρώπης δεν έχει ακόμη καθιερωθεί ανιχνευτικό πρόγραμμα για FXS στο γενικό πληθυσμό.

Abstract

Bouzarelou D, Amenta S, Hatzaki A. Fragile X syndrome and mental retardation: diagnostic work-flow and molecular testing. Iatrika Analekta 2012; 3: 699-701

Fragile X syndrome (FXS) is the second most frequent genetic cause of inherited mental retardation after chromosomal aneuploidies, affecting approximately 1/3,600-1/4,000 males and 1/6,000-1/8,000 females. FXS is an X-linked dominantly inherited syndrome, modified by reduced penetrance and characterized by anticipation. The underlying genetic defect is the expansion of a CGG trinucleotide repeat >200 times, that disrupts FMR-1 gene and leads to reduced or null gene expression. FMRP is the protein encoded by FMR-1 gene and is mainly expressed in brain and testes. Recent experiments have indicated that FMRP negatively regulates protein synthesis and it may play an important role in local protein synthesis at synapses, affecting synapse maturation and plasticity.

Βιβλιογραφία

1. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, et al. *Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome.* Cell. 1991 May 31; 65 (5): 905-914.
2. Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, et al. *Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox.* Cell. 1991 Dec 20; 67 (6): 1.047-1.058.
3. Heitz D, Devys D, Imbert G, et al. *Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determinant of the transition to full mutation.* J Med Genet. 1992 Nov; 29 (11): 794-801.
4. Garber KB, Visootsak J, Warren ST. *Fragile X syndrome.* Eur J Hum Genet. 2008 Jun; 16 (6): 666-672.
5. Ashley CT Jr, Wilkinson KD, Reines D, et al. *FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding.* Science. 1993; 262 (5133): 563-566.
6. Tamanini F, Meijer N, Verheij C, et al. *FMRP is associated to the ribosomes via RNA.* Hum Mol Genet. 1996 Jun; 5 (6): 809-813.
7. Weiler LJ, Irwin SA, Klintsova AY, et al. *Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation.* Proc Natl Acad Sci USA. 1997 May 13; 94 (10): 5.395-5.400.
8. Huber KM, Gallagher SM, Warren ST, et al. *Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation.* Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 7.746-7.750.
9. Krueger DD, Bear MF. *Toward fulfilling the promise of molecular medicine in fragile X syndrome.* Annu Rev Med. 2011; 62: 411-429.
10. Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey M, et al. *Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates.* Am J Hum Genet. 2003 Apr; 72 (4): 869-878.
11. Rodriguez-Revenga L, Madrigal I, Pagonabarraga J, et al. *Penetrance of FMR1 premutation associated pathologies in fragile X syndrome families.* Eur J Hum Genet. 2009 Oct; 17 (10): 1.359-1.362.
12. Sherman SL. *Premature ovarian failure in the fragile X syndrome.* Am J Med Genet. 2000 Fall; 97 (3): 189-194.
13. Bailey DB Jr, Skinner D, Davis AM, et al. *Ethical, legal, and social concerns about expanded newborn screening: fragile X syndrome as a prototype for emerging issues.* Pediatrics. 2008 Mar; 121 (3): e693-704.

Η γενετική του τύπου 1 σακχαρώδη διαβήτη

Χρήστος Σπ. Μπαρτσόκας
Παιδίατρος ΜΗΤΕΡΑ
cbartsocas@nurs.uoa.gr

Ο σακχαρώδης διαβήτης προσβάλλει περίπου 366 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως προκαλώντας μικροαγγειακές και καρδιαγγειακές επιπλοκές. Το 10% περίπου των περιπτώσεων αφορά πάσχοντες από τύπου 1 διαβήτη και, με 3% αύξηση της συχνότητας ετησίως σε όλη την υφήλιο, ήδη το 2010 η συχνότητα είναι 40% υψηλότερη σε σχέση με το 1998.

Ο τύπου 1 διαβήτης είναι καθαρό παράδειγμα μιας πολύπλοκης πάθησης, η οποία προκύπτει από το συσχετισμό μεταξύ περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Ήδη διαπιστώνεται η ύπαρξη ισχυρού γενετικού παράγοντα στον τύπου 1 διαβήτη, κυρίως λόγω της σύμπτωσης της νόσου μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων και της εμφάνισης της νόσου και σε άλλα μέλη της οικογένειας, αλλά και του υψηλού κινδύνου εμφάνισης στους αδελφούς.

Παρά το γεγονός ότι υφίσταται ένα ευρύ γενετικό στοιχείο στον τύπου 1 διαβήτη, η αποκάλυψη των γονιδίων που συμβάλλουν στη νόσο αποτελεί ακόμη μία πρόκληση. Εντυπωσιακές, όμως, υπήρξαν οι εξελίξεις στον τομέα της γενετικής του διαβήτη κατά τα τρία τελευταία χρόνια.

Οι πρόοδοι στις τεχνικές ανίχνευσης γενετικών νόσων επέτρεψαν στους ερευνητές να διερευνήσουν το ανθρώπινο γονιδίωμα για γονιδιακές παραλλαγές που συμβάλλουν σε κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Τέτοιες μελέτες ευρείας γονιδιακής συσχέτισης αποκάλυψαν πολλές περιοχές του γονιδιώματος να συνδέονται ισχυρά και σταθερά με τον τύπου 1 διαβήτη.

Πολύ πρόσφατα ευρήματα είναι συνέπειες συνδυασμού σε μεταanalύσεις των αποτελεσμάτων πολλών μελετών από ανεξάρτητους ερευνητές, με τις οποίες αυξάνεται η ισχύς των πρόσθετων γενετικών παραλλαγών που συμβάλλουν στη γονιδιακή βλάβη.

Γονιδιακοί τόποι

Πριν από την περίοδο της ευρείας γονιδιακής ανάλυσης συσχέτισης, μόνο πέντε γονιδιακοί τόποι είχαν πλήρως διευκρινιστεί ως έχοντες σχέση με τον τύπου 1 διαβήτη. Αν και είχαν περιγραφεί πολλά άλλα ύποπτα γονίδια, πε-

ραιτέρω έρευνες σε άλλα κέντρα δεν επιβεβαίωναν τις αρχικές διαπιστώσεις.

Από καιρό είχε καθιερωθεί η αντίληψη ότι περίπου το 50% του γενετικού κινδύνου για την ανάπτυξη τύπου 1 διαβήτη παρέχεται από την περιοχή του γονιδιώματος στο χρωματόσωμα 6p21, που περιλαμβάνει τα γονίδια τάξης II του HLA, και κυρίως το HLA - DRB1 - DQA1 και - DQB1. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν τις λίαν πολυμορφικές πρωτεΐνες παρουσίασης αντιγόνου. Οι υπόλοιποι καθιερωμένοι γενετικοί τόποι, προ της εφαρμογής της ευρείας γονιδιακής ανάλυσης, ήταν τα γονίδια ινσουλίνης (INS), στο χρωματόσωμα 11p15, η κυτταροτοξική Τ-λεμφοκυτταρική πρωτεΐνη 4 (CTLA - 4), η πρωτεϊνική τυροσινική φωσφατάση, το χωρίς υποδοχέα γονίδιο 22 (PTPN22) στο χρωματόσωμα 1p13, ο υποδοχέας ιντερλευκίνης 2, και η πρωτεΐνη A, σχετιζόμενη με τη ubiquitin (χρωματόσωμα 21q2.23). Το συστατικό γενετικής προδιάθεσης για διαβήτη μη σχετιζόμενο με το HLA οφείλεται σε σωρευτική επίδραση άγνωστου αριθμού άλλων γονιδίων. Από τα 20 και πλέον αναφερόμενα γονίδια ως συνδεόμενα με τον τύπου 1 διαβήτη, μόνο ένα έχει σαφώς αποδειχθεί. Καθορίζεται ως IDDM2 και αφορά στο γονίδιο ινσουλίνης, ενώ εμφανίζεται στο 5%-10% των οικογενειακών συσσωρεύσεων.

Όσον αφορά στην περιοχή των ποικίλου αριθμού παράλληλων - επαναλήψεων (VNTR) του γονιδίου της ινσουλίνης, είναι γνωστό ότι αποτελούν το μεσολαβητή της έκφρασης στο θύμο αδένι και στο πάγκρεας, ενώ οι πολυμορφισμοί στις 5' και 3' ρυθμιστικές περιοχές του CTLA - 4 μεταβάλλουν τη γονιδιακή έκφραση, και μάλιστα ο πολυμορφισμός A49G επιδρά στη μεταμεταφραστική διαδικασία.

Ο γενετικός τόπος της τάξης II των HLA (IDDM1) είναι ο σημαντικότερος γονιδιακός τόπος για τον κίνδυνο ή την προστασία για τον τύπου 1 διαβήτη, επειδή αφορά στο 40%-50% οικογενειακής ομαδοποίησης. Η εφαρμογή της ευρείας γονιδιακής ανάλυσης αποκάλυψε δεκάδες γενετικών τόπων του HLA που συμβάλλουν στην εμφάνιση τύπου 1 διαβήτη. Πρόσφατη μεταανάλυση αναγνώρισε 40 γονιδιακούς τόπους, στους οποίους περιλαμβάνο-

νται νέες περιοχές. Η πλέον πρόσφατη και μεγάλη ευρεία γονιδιωματική ανάλυση για τον τύπου 1 διαβήτη ήταν του Bradfield και συν. (2011).

Γενικά η οικογενειακή συσσώρευση περιπτώσεων τύπου 1 σακχαρώδους διαβήτη και οι μελέτες διδύμων, σαφώς υποδεικνύουν την κατεύθυνση της γενετικής προδιάθεσης ως ενός σημαντικού παράγοντα για την εμφάνιση του τύπου 1 διαβήτη. Η σύμπτωση σε μονοζυγωτικά δίδυμα είναι μεγαλύτερη από 40% για την εμφάνιση του διαβήτη και περίπου 70% για νησιδιακή αυτοανοσία. Αντιθέτως, σε διζυγωτικούς διδύμους το ποσοστό αυτό είναι περίπου 5%, όσο δηλαδή και στους αδελφούς, ποσοστό μεγαλύτερο απ' όσο στο γενικό πληθυσμό. Είναι ενδιαφέρον ότι τα τέκνα των πασχόντων ανδρών με διαβήτη έχουν κίνδυνο εμφάνισης 6%-7%, περισσότερο από διπλάσιο από τα τέκνα πασχουσών μητέρων. Ως πιθανές εξηγήσεις θεωρούνται είτε πατρική αποτύπωση (σιώπηση είτε του μητρικού είτε του πατρικού αλληλίου) σε έναν ή περισσότερους γενετικούς τόπους ή επίδραση του μητρικού περιβάλλοντος ενδομητρίου.

Πρέπει να τονιστεί ότι ο τύπου 1 σακχαρώδης διαβήτης θεωρείται πολυπαραγοντική γενετική νόσος, διότι δεν ταιριάζει σε κάποια μορφή μενδελικής κληρονομικότητας. Αν και έχουν αναγνωριστεί διάφορα προδιαθεσικά γονίδια, η παρουσία τους θέτει σε κίνδυνο το άτομο για την εμφάνιση της νόσου σε σχέση με μη φορείς των γονιδίων αυτών, αλλά δε σημαίνει ότι αυτόματα το άτομο θα παρουσιάσει διαβήτη.

HLA - Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας

Τα περισσότερο σημαντικά γονίδια για εμφάνιση διαβήτη ευρίσκονται στην περιοχή των HLA που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6p21 στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας. Στην περιοχή αυτή χαρτογραφείται σχεδόν το ήμισυ του γενετικού κινδύνου για διαβήτη. Τα μέλη της οικογένειας των λίαν ομολόγων πρωτεϊνών, που αφορούν στην παρουσίαση αντιγόνων, είναι τα πλέον πολυμορφικά στο γονιδίωμα του ανθρώπου, και αυτό σημαίνει ότι υφίστανται πολλές ατομικές διαφορές για κάθε γονίδιο.

Όπως είναι γνωστό, το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας διαιρείται σε τρεις περιοχές (τάξεις I, II, και III), οι οποίες περιέχουν διάφορα γονίδια των HLA.

Ο τύπου 1 διαβήτη κυρίως σχετίζεται με την περιοχή της τάξης II των HLA, στην οποία κωδικοποιούνται τρεις πρωτεΐνες, η DR, η DQ και η DP. Καθεμία από τις πρω-

τεΐνες διαθέτει α και β αλυσίδες, που κωδικοποιούνται από γονίδια A και B, μόρια τα οποία εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων και παρουσιάζουν αντιγόνα στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα. Η προδιάθεση για διαβήτη χαρτογραφείται κυρίως στα γονίδια DR και DQ. Κρίσιμη σημασία έχει το αμινοξύ της θέσης 57 στη β αλυσίδα του DQ. Αλληλίες που κωδικοποιούν άλλο αμινοξύ πλην του ασπαργινικού οξέος στη θέση αυτή συμβάλλουν με υψηλό κίνδυνο για διαβήτη. Τα πλέον σημαντικά γονίδια είναι το DQB1*0302 και DQB1*0201, τα οποία αντιστοιχούν στο DR4 και στο DR3. Αλληλίες που κωδικοποιούν το ασπαργινικό γενικά είναι ουδέτερα ή προστατευτικά. Το ισχυρό προστατευτικό DQB1*0602 με το αντιγόνο DR2 ευρίσκεται στο 15%-20% των Ευρωπαίων, ενώ σε λιγότερους από 1% πάσχοντες από τύπου 1 διαβήτη.

Επιγενετικές τροποποιήσεις

Ως προς τους μη γενετικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση του τύπου 1 διαβήτη, έχουν ενοχοποιηθεί περιβαλλοντικές επιδράσεις, όπως ιώσεις, διατροφικοί παράγοντες, ακόμη και η έλλειψη βιταμίνης D. Μέχρι σήμερα, όμως, κανείς από τους ανωτέρω παράγοντες δεν έχει αποδειχθεί σημαντικός για την αιτιολογία του τύπου 1 διαβήτη και, σε σύγκριση με τις πρόσφατες προόδους στην αποκάλυψη γονιδιακών πολυμορφισμών, οι μη γενετικοί παράγοντες παραμένουν γενικά ανεξιχνίαστοι.

Το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί στην επιγενετική ποικιλομορφία και τη συμβολή της στην αιτιολογία του μη γενετικού διαβήτη. Είναι γνωστό ότι επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως μεθυλίωση του DNA και οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών, είναι απαραίτητες για ποικιλία γονιδιωματικών διαδικασιών, στις οποίες περιλαμβάνονται η μεταγραφική ρύθμιση και η διατήρηση της γονιδιωματικής ακεραιότητας. Προσφάτως, διαπιστώθηκε ότι επιγενετικές επιδράσεις σχετίζονται και με μη νεοπλασματικά νοσήματα, όπως τα αυτοάνοσα, προκαλώντας ακόμη και μονοζυγωτικά δίδυμα, να καθίστανται επιγενετικά διαφορετικά.

Ο Rakyan και συν. με ευρεία επιγονιδιωματική ανάλυση για μεθυλίωση μελέτησαν 15 μονοζυγωτικούς διδύμους, εκ των οποίων μόνο ο ένας έπασχε από διαβήτη. Η μελέτη τους ανακάλυψε 132 γονιδιακές θέσεις.

Η απεμπλοκή επιγενετικών επιδράσεων από τη σύμπτυξη γενετικής ή και περιβαλλοντικής ετερογένειας είναι σημαντικό εμπόδιο στην αποκάλυψη του αιτιολο-

γικού ρόλου της επιγενετικής ποικιλομορφίας στην ανθρώπινη σύμπλοκη νόσο. Ο Rakyar και συν. ανέφεραν το πρώτο παράδειγμα επιγενετικής ποικιλομορφίας, που προηγείται της κλινικής νόσου και δε δικαιολογείται ούτε από γενετική ετερογένεια, φαρμακολογική θεραπεία ούτε από κυτταρική δυσλειτουργία απότοκο της νόσου.

Ήδη, από πολλών ετών αναγνωρίστηκαν ενδείξεις που συνδέουν το χρόνιο κυτταρικό stress με νόσους όπως π.χ. οι καρκίνοι, η καρδιαγγειακή νόσος, ο διαβήτης και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Ασφαλώς, υφίστανται πολλές πιθανές αιτίες για τον τρόπο με τον οποίο το κυτταρικό stress προάγει νόσο, για παράδειγμα η κυτταροτοξικότητα, η μεταλλαξιογένεση, η διατάραξη του καταρράκτη της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης. Μία εξέλιξη χρόνιου stress δύναται να καθιερώσει ανώμαλες κυτταρικές καταστάσεις, που μπορούν να επιμένουν ακόμη και μετά την εξάλειψη ή τη μείωση του stress. Συνδυασμός γενετικών ή/και επιγενετικών μεταβολών που προκαλούνται κατά την περίοδο του stress, θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα μετατροπή της κυτταρικής μνήμης, που οδηγεί σε παθολογικές οντότητες. Οι επιγενετι-

κοί μηχανισμοί, ως γνωστόν, θεωρούνται σημαντικοί για τη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία, συμπίκνωση και οργάνωση της χρωματίνης, που επηρεάζεται από μεθυλίωση του DNA, την ποικιλία ιστονών και τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις της, που βοηθούν να καθοριστούν τα προφίλ της γονιδιακής έκφρασης, που διατηρούν και καθορίζουν την κυτταρική ταυτότητα. Όσον αφορά στην απώλεια των β νησιδιοκυττάρων ως το κύριο χαρακτηριστικό του τύπου 1 διαβήτη, είναι γνωστό ότι η νόσος θεωρείται αυτοάνοση, και αφορά σε καταστροφή με τη μεσολάβηση των T-λεμφοκυττάρων, σε περιβάλλον χρόνιας φλεγμονής των β κυττάρων.

Συντμήσεις
GWA (Genome-wide association). Ευρεία γονιδιωματική συσχέτιση.
SNP (Single nucleotide polymorphism). Πολυμορφισμός απλού νουκλεοτιδίου.
IFIH1 (interferon-induced helicase).
HNF (hepatonuclear factor).

Abstract

Bartsocas CS. Genetics of Type 1 Diabetes Mellitus. Ιατρικά Ανάλεκτα 2012; 3: 702-705.

Although the etiology of Type 1 diabetes mellitus is still unclear, recent advances reveal the significant genetic contribution of several HLA alleles (IDDM1) on chromosome 6p21. Secondary role is played by the insulin gene (IDDM2) on chromosome 11p15, as well as of CTLA-4, PTPN22, the receptor of interleukin 2 and the ubiquitin related protein A. Genome - wide association analysis revealed several other genetic loci, the contribution of which is under investigation, as well as the epigenetic involvement contributing to the development of Type 1 diabetes.

Βιβλιογραφία

1. Anjos S, Polychronakos C. *Mechanisms of genetic susceptibility to type 1 diabetes: beyond HLA*. Mol Genet Metab. 2004; 81: 187-195.
2. Barratt BJ, Payne F, Lowe CE, et al. *Remapping the insulin gene / IDDM2 locus in type 1 diabetes*. Diabetes 2004; 53: 1.884-1.889.
3. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, et al. *Genome - wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes*. Nat Genet. 2009; 41: 703-707.
4. Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, et al. *Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus*. Nat Genet. 1995; 9: 284-292.
5. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, et al. *A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes*. Nat Genet. 2004; 36: 337-338.
6. Bradfield JP, Qu H-Q, Wang K, et al. *A Genome - Wide Meta-Analysis of Six Type 1 Diabetes Cohorts Identifies Multiple Associated Loci*. PLOS Genet. 2011; 7 (9): e1002293.
7. Cooper JD, Smyth DJ, Smiles A, et al. *Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes loci*. Nat Genet. 2008; 40: 1.399-1.401.
8. Cooper JD, Howson JMM, Smyth D. *Confirmation of a novel type 1 diabetes risk loci in families*. Diabetologia 2012; 55: 996-1.000.
9. Johnstone SE, Baylin SB. *Stress and the epigenetic landscape: a link to the pathobiology of human diseases?* Nat Rev Genet. 2010; 11: 806-812.
10. Hermann R, Bartsocas CS, Soltisz G, et al. *Genetic screening for individuals at high risk for type 1 diabetes in the general population using HLA class II alleles as disease markers*. Diabetes Metab Res Rev. 2004; 20: 322-329.

11. Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. *CTLA-4 in autoimmune diseases - a general susceptibility gene to autoimmunity?* Genes Immun. 2000; 1: 170-184.
12. Mbanya JC. *Calling out Around the World*. Diabetes Voice 2011; 56: 4.
13. Noble JA, Erlich HA. *Genetics of Type 1 Diabetes*. (2012)
14. Cold Spring Harb Perspect Med 2 (1); a007732.doi: 10.110
15. Pociot F, Akolkar B, Concannon P, et al. *Genetics of Type 1 Diabetes: What's next?* Diabetes. 2010; 59: 1.561-1.571.
16. Qu HQ, Montpetit A, Ge B, et al. *Toward further mapping of the association between the IL2RA locus and type 1 diabetes*. Diabetes. 2007; 56: 1.174-1.176.
17. Rakyan VK, Beyan H, Down TA, et al. *Identification of Type 1 Diabetes Associated DNA Methylation Variable Positions that Precede Disease Diagnosis*. PLOS Genet. 2011; 7 (9):e1002300.doi: 1011371.
18. Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, et al. *A genome - wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a Type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region*. Nat Genet 2006; 38: 617-619.

Η γενετική του τύπου 2 σακχαρώδη διαβήτη: νεότερα στοιχεία

Χρήστος Σπ. Μπαρτσόκας
Παιδίατρος, ΜΗΤΕΡΑ
cbartsocas@nurs.uoa.gr

Η αυξανόμενη συχνότητα του τύπου 2 διαβήτη είναι ένδειξη μιας μεγάλης κρίσης στην παγκόσμια υγεία. Σήμερα υπάρχουν περισσότεροι από 400 εκατ. ενήλικες με δείκτη μάζας σώματος μεγαλύτερο των 30 kg/m² (παχύσαρκοι) και 220 εκατομμύρια με τύπου 2 διαβήτη. Σύμφωνα με τους υπολογισμούς του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας αναμένεται να αυξηθούν οι αριθμοί αυτοί σε 700 και 366 εκατομμύρια αντιστοίχως μέχρι το 2030!

Είναι γνωστό ότι και οι δύο παθήσεις αποτελούν σημαντικούς παράγοντες θνητότητας. Μόνο το 2004, περισσότεροι των 112.000 θανάτων στις ΗΠΑ αποδόθηκαν σε αυξημένη καρδιαγγειακή νόσο λόγω παχυσαρκίας. Κατά το ίδιο έτος υπολογίστηκε ότι το 5% περίπου της παγκόσμιας θνητότητας οφείλεται σε επιπλοκές του διαβήτη. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι επιπλοκές του συνδυασμού τύπου 2 διαβήτη και παχυσαρκίας ήταν υπεύθυνες για το 8% του συνολικού κόστους υγείας στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 2010.

Παρά τους εντυπωσιακούς αυτούς αριθμούς και την αυξανόμενη απειλή ατόμων, οικογενειών και συστημάτων υγείας, τα νεότερα στοιχεία της γενετικής, καθώς και της παθοφυσιολογίας του τύπου 2 διαβήτη, παραμένουν ανεπαρκή. Βεβαίως και η νόσος έχει και μονογονιδιακές και συνδρομικές μορφές, στις οποίες περιλαμβάνονται και ο MODY (maturity onset diabetes of the young), ο νεογενικός διαβήτης και το σύνδρομο Prader-Willi, για τις οποίες έχει επιτευχθεί ανάλυση των αιτιολογικών μηχανισμών, αλλά η πλειονότητα των περιπτώσεων τύπου 2 διαβήτη έχει περισσότερο πολύπλοκη αιτιολογική βάση. Σε κάθε περίπτωση φαίνεται ότι ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου αντανάκλα το συνδυασμό της κληρονομικής ποικιλομορφίας σε πολλούς γονιδιακούς τόπους και την έκθεση σε νεότερους περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες, στους οποίους περιλαμβάνονται η αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη και η μειωμένη σωματική άσκηση.

Είναι οφθαλμοφανές ότι η σύγχρονη έκρηξη στην εμφάνιση του τύπου 2 διαβήτη πρέπει να οφείλεται κυρίως σε περιβαλλοντικές μεταβολές. Υπολογίζεται, όμως, ότι η κληρονομική προδιάθεση του τύπου 2 διαβήτη είναι περίπου 25%. Οι υπολογισμοί κληρονομικότητας είναι δυνατό

να κυμαίνονται ανάλογα με το χρόνο και το χώρο, αντανάκλωντας μεταβολές της περιβαλλοντικής ποικιλότητας και τη γενική επίπτωση της νόσου.

Η αναζήτηση των γονιδίων του τύπου 2 διαβήτη

Λόγω της υψηλής διεισδυτικότητάς τους τα αλληλίου είναι υπεύθυνα για τις σπάνιες, μονογονιδιακές μορφές του μη αυτοάνοσου διαβήτη και της παχυσαρκίας, σχετικά εύκολα αναγνωρίστηκαν μέσω ανάλυσης σύνδεσης (linkage). Οι ανακαλύψεις αυτές οδήγησαν σε μοριακή κατάταξη της νόσου με σαφείς προγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές. Για παράδειγμα, τα άτομα που πάσχουν από MODY, λόγω μεταλλάξεων στο HNF1A, αποκρίνονται ιδιαίτερα καλά στη θεραπεία με σουλφονυλουρίες, ενώ αυτά με μεταλλάξεις στη γλυκοκινάση (GCK) μπορούν συχνά να απαλλαγούν από τη θεραπεία λόγω της καλοήθους προγνώσεως. Τα βρέφη με νεογενικό διαβήτη λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο KCNJ11, που συμβατικά θεραπεύονταν με ενέσεις ινσουλίνης, δείχνουν ουσιαστικές βελτιώσεις στη ρύθμιση του διαβήτη όταν αυτή αντικαθίσταται με σουλφονυλουρίες χορηγούμενες από το στόμα.

Ως συνέπεια για παρόμοιες προόδους στη γενετική κατανόηση και κατάταξη, η μοριακή διαγνωστική και η εξατομικευμένη θεραπεία είναι σήμερα τα καθιερωμένα στοιχεία της κλινικής φροντίδας των ασθενών με αυτές τις μονογονιδιακές μορφές της νόσου. Η φιλοδοξία πλέον στηρίζεται στη βελτίωση της κατανόησης της γενετικής βάσης των συνήθων μορφών του τύπου 2 διαβήτη για να εμπνέουν παρόμοια διεύθυνση στη βιολογία των νόσων και να υποσημειώνουν μελλοντικές προόδους στην κλινική φροντίδα.

Το πρώτο βήμα που οδηγεί στη γονιδιωματική ιατρική είναι η αναγνώριση γενετικών ποικιλιών που αποδεδειγμένα σχετίζονται με την υπό εξέταση νόσο. Έτσι, ο τύπου 2 διαβήτης, ως πολυπαραγοντική νόσος, υπήρξε το αρχικό στάδιο τεράστιας πρόκλησης.

Οικογενειακές μελέτες συνδέσεως, τόσο επιτυχείς σε μονογονιδιακά νοσήματα, έδωσαν φτωχά αποτελέσματα.

Στον τύπου 2 διαβήτη αναγνωρίστηκαν δύο ποικιλίες

γονιδίων που κωδικοποιούν τους στόχους δύο ευρέως χρησιμοποιημένων φαρμάκων (P12A στο PPARG για τις θειαζολιδινεδιόνες και E23K στο KCNJ11 για τις σουλφονουλιδίες). Από τα πρώτα γονίδια προδιάθεσης που ανακαλύφθηκαν για τον τύπου 2 διαβήτη ήταν το TCF7L2. Οι περισσότερες σχετιζόμενες ποικιλομορφίες στο γενετικό αυτό τόπο διαθέτουν τη μεγαλύτερη επίδραση στην προδιάθεση για τύπου 2 διαβήτη. Με την πρόοδο ελέγχου του γονιδιώματος το πεδίο μετεβλήθη τελείως. Έτσι, επιβεβαιώθηκαν τα γονίδια PPARG, KCNJ11 και TCF7L2 και προστέθηκαν άλλα 6 νέα (CDKAL1, HHEX, SLC30A8, IGF2BP2 και CDKN2A). Το έκτο γονίδιο, πλησίον του FTO, συνδυάζει τύπου 2 διαβήτη και παχυσαρκία, που είναι και το πρώτο κοινό γονίδιο για τις δύο νόσους. Εδώ θα πρέπει να αναφερθούν και τα γονίδια του β2 και του β3 - αδρενεργικού υποδοχέως που σχετίζονται με τη λιπόλυση, της δεσμευτικής πρωτεΐνης λιπαρών οξέων (FABP) με ινσουλινοαντίσταση, του TNFα επίσης με ινσουλινοαντίσταση, καθώς και το γονίδιο του υποδοχέως σεροτονίνης τύπος 2C, όλα σχετιζόμενα με παχυσαρκία και τύπου 2 διαβήτη.

Επακολούθησε ένας καταρράκτης αναγνώρισης γονιδίων υπεύθυνων για τύπου 2 διαβήτη από το 2009, κυρίως σε ευρωπαϊκής καταγωγής άτομα, αλλά και σε Ασιάτες, που απέδειξε ότι η γενετική προδιάθεση για τύπου 2 διαβήτη είναι κοινή σε πολλές εθνικές ομάδες (βλ. πίνακα).

Η δημοσίευση του πρώτου γονιδιακού τόπου, που ανακαλύφθηκε με ευρεία γονιδιωματική ανάλυση (GWA) το 2006 (IFIH1), άνοιξε ένα νέο πεδίο ανακαλύψεων στις συνήθεις αυτοάνοσες παθήσεις. Μέχρι στιγμής αναφέρονται περισσότεροι από 50 γενετικοί τόποι (www.t1dbase.org). Ο Barrett ανεγνώρισε δεκαοκτώ από αυτούς σε GWA μεταανάλυση 7.514 περιπτώσεων T2Δ και 9.045 υγιών μαρτύρων. Παράλληλα μελέτησε 2.319 οικογένειες με 4.342 γονείς - παιδιά πάσχοντες.

Παρά ταύτα, στα δείγματα ενδοοικογενειακής επαναλήψεως της νόσου 8 από τους επιβεβαιωμένους 18 γενετικούς τόπους απέτυχαν να φθάσουν σε βαθμό σημαντικότητας.

Οι περισσότεροι γονιδιακοί τόποι που σχετίζονται με τον τύπου 2 διαβήτη χαρτογραφούνται με ρυθμιστικές ακολουθίες σε άλλους τόπους, εκφράζοντας αντίγραφα, τα οποία μεσολαβούν στο αποτέλεσμα (HNF1A, GCK, IRS1, WFS1, PPARG, CAMK1D, JAZF1, KLF14 και άλλα), ως πρώτο βήμα στους βιολογικούς μηχανισμούς.

Διάφοροι τόποι φαίνονται να έχουν πρωταρχική δράση στη λειτουργία των β κυττάρων και λιγότερο στην ινσουλινοαντίσταση.

Συμπεράσματα

Τα τελευταία χρόνια η γενετική έρευνα του ανθρώπου έχει προοδεύσει στο χαρακτηρισμό της γενετικής βάσης των συνήθων μορφών διαβήτη. Σύντομα θα διατίθεται μία περισσότερο πλήρης και συστηματική άποψη γι' αυτήν τη νόσο. Εφαρμογή των ίδιων εργαλείων σε προοπτικές μελέτες και κλινικές δοκιμασίες θα παράσχει ισοδύναμες απόψεις στη γενετική βάση ατομικών διαφορών στην ταχύτητα εξέλιξης της νόσου και απόκριση σε θεραπευτικές ή προληπτικές παρεμβάσεις.

Ένας κατάλογος σχετικών γενετικών τόπων έχει μικρή σημασία εκτός αν καταστεί δυνατό να συντεθούν τα ευρήματα αυτά σ' ένα βελτιωμένο σχήμα νοσολογικής βιολογίας-παθοφυσιολογίας. Αυτό σημαίνει αναγνώριση των αιτιολογικών μεταλλάξεων και αποκάλυψη αμφοτέρων

Πίνακας υποψηφίων γονιδίων για T2Δ σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς με τις χρωμοσωμικές θέσεις τους (Barrett et al)

1q32.1/IL10 rs3024505 C T
4p15.2 rs10517086 G A
6q22.32/C6orf173 rs9388489 A G
7p12.1/COBL rs4948088 C A
7p15.2/SKAP2 rs7804356 T C
9p24.2/GLIS3 rs7020673 G C
10q23.31/RNLS rs10509540 T C
12p13.31/CD69 rs4763879 G A
14q24.1/ZFP36L1, C14orf181 rs1465788 G A
14q32.2/C14orf64 rs4900384 A G
16p11.2/IL27 rs4788084 G A
16q23.1/CTRB2 rs7202877 T G
17q12/GSDMB, ORMDL3 rs2290400 G A
17q21.2/CCR7 rs7221109 C T
19q13.32/PRKD2 rs425105 A G
20p13/SIRPG rs2281808 C T
22q12.2/HORMAD2 rs5753037 C T
Xq28/GAB3 rs2664170 A G

των εγγύς (δηλαδή των μοριακών) και των άπω (δηλαδή των κυτταρικών και των φυσιολογικών) μηχανισμών, με τους οποίους επιτελείται η επίδραση στην προδιάθεση της νόσου. Γνωρίζοντας το μεγάλο αριθμό γενετικών τόπων που ανακαλύπτονται, η λήψη των μηχανιστικών απόψεων θα απαιτήσει πολύ ευρύτερη και καλύτερη ενσωμάτωση των πληροφοριών σε πολλά επίπεδα.

Η δραστηριότητα αυτή πρέπει να παρακινηθεί από την ανάγκη για κλινική μετάφραση, ιδιαίτερα για πολυπαράγοντικές νόσους, ιδιαίτερα για το διαβήτη, που είναι σημαντική απειλητική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας, ενώ οι σήμερα διαθέσιμες θεραπευτικές και προληπτικές δυνατότητες παραμένουν ανεπαρκείς. Αναμένεται ότι ένα πληρέστερο υπόδειγμα της παθογένειας της νόσου, όπως εξάγεται από τις ανακαλύψεις της γενετικής, αλλά και των περιβαλλοντικών παραγόντων που συμβάλλουν στην εμφάνισή της, θα οδηγήσει σε πρωτοποριακές θεραπευτικές, διαγνωστικές και προληπτικές προσεγγίσεις με ευρύτατα οφέλη.

Εν κατακλείδι, βρισκόμαστε στην αρχή φάσης γενετι-

κών ανακαλύψεων, που έχουν την δυνατότητα να μετασχηματίσουν τους τρόπους με τους οποίους αντιμετωπίζονται νόσοι παγκόσμιας επίπτωσης, όπως ο διαβήτης. Είναι δύσκολο να προβλεφθούν οι ακριβείς τρόποι με τους οποίους ο μετασχηματισμός αυτός θα προχωρήσει, αλλά οι συνεχώς επιταχυνόμενες ανακαλύψεις της γενετικής του ανθρώπου (γονιδιωματική) θα αποκαλύψουν το χώρο στον οποίο θα επιτελεστούν οι αναπτύξεις αυτές.

Συντμήσεις
FTO (Fat mass and Obesity - associated protein).
GWA (Genome - wide association). Ευρεία γονιδιωματική συσχέτιση.
SNP (Single nucleotide polymorphism). Πολυμορφισμός απλού νουκλεοτιδίου.
IFIH1 (interferon - induced helicase).
HNF (hepatonuclear factor).
TNF (tumor necrosis factor).

Abstract

Bartsocas CS. Genetics of Type 2 Diabetes Mellitus. New data. Iatrika Analekta 2012; 3: 706-708.

A fast increasing incidence tendency of Type 2 diabetes mellitus all over the world proves to be a major threat to public health with catastrophic consequences. It is well established that T2DM is a multifactorial and hereditary disease. Attempts to elucidate the genetic component were not so far successful, but application of genome - wide association studies revealed several candidate genes. Nonetheless, the number of recognized significant genes, so far, is eight. Mapping loci and their regulatory - sequence expressing copies mediating results as the first step to biological mechanisms, seem to affect b cell function and much less insulin resistance.

Βιβλιογραφία

1. American Diabetes Association. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care 2004; 27 (Suppl 1): S5-S10.
2. Ashcroft FM, Rorsman P. *Diabetes mellitus and the B-cell: the last ten years*. Cell 2012; 148: 1.160-1.171.
3. Cho AH, Killea - Jones LA, et al. *Effect of genetic testing for risk of type 2 diabetes mellitus on health behaviors and outcomes: study rationale development and design*. BMC Health Serv. Res. 2012; 12: 1-14.
4. Mather KJ, Christophi CA, Jablonski KA, et al. *Common variants in genes encoding adiponectum (ADIPOQ) and its receptors (ADIPOR1/2) adiponectum concentrations and diabetes incidence in the Diabetes Prevention Program*. Diabet Med 2012; doi 10.1111/j. doi: 1.464-5.491, 2012.03662x.
5. Saxena R, Elbers CC, Guo Y, et al. *Large-scale gene-centric meta-analysis across 39 studies identifies Type 2 diabetes loci*. Amer J Hum Genet 2012; 90: 410-425.
6. Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, et al. *Five years of GWAS discovery*. Amer J Hum Genet 2012; 90: 7-24.

Γενετική της υπογονιμότητας

Μαργαρίτα Καρκαλέτση, Αγγελική Χατζάκη, Βούλα Βελισσαρίου
Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας ΜΗΤΕΡΑ
genetics@mitera.gr

Ένας σημαντικός αριθμός ζευγαριών, περίπου ένα στα έξι, αντιμετωπίζει προβλήματα σύλληψης και βιώνει τη δύσκολη εμπειρία μιας ή περισσοτέρων αποβολών. Γνωρίζουμε σήμερα ότι πολλοί παράγοντες συμβάλλουν στη δημιουργία προβλημάτων αναπαραγωγής. Μεταξύ αυτών, σημαντικοί είναι οι γενετικοί παράγοντες, κυρίως οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες και οι γονιδιακές βλάβες, οι οποίες δύνανται να συνδέονται με την ανδρική στειρότητα (ολιγοσπερμία, αζωοσπερμία, ασθενοσπερμία κ.ά.), με τη γυναικεία στειρότητα (πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής αμηνόρροια) και τις καθ' έξιν αποβολές. Σήμερα η διαγνωστική γενετική έχει τη δυνατότητα να διαγνώσει πολλές από τις γενετικές βλάβες που συνδέονται με προβλήματα της ανθρώπινης αναπαραγωγής.

1. Χρωμοσωματικές ανωμαλίες

Τόσο οι αριθμητικές, όσο και οι δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες έχουν επιπτώσεις στη γυναικεία και στην ανδρική γονιμότητα. Στις γυναίκες, η μονοσωμία του φυλετικού χρωμοσώματος X (45,X), κλινική εκδήλωση του οποίου αποτελεί το σύνδρομο Turner, καθώς και η παρουσία ενός επιπλέον χρωμοσώματος X (47,XXX) επηρεάζουν τη γονιμότητα. Στους άνδρες, η παρουσία ενός επιπλέον χρωμοσώματος X, γνωστού ως συνδρόμου Klinefelter (47,XXY), ευθύνεται για τη στειρότητα αυτών των ατόμων. Στο 12% των ανδρών με στειρότητα ή υπογονιμότητα παρατηρείται είτε αριθμητική ανωμαλία των χρωμοσωμάτων του φύλου είτε κάποια δομική αναδιάταξη των χρωμοσωμάτων. Προβλήματα υπογονιμότητας έχουν επίσης τα άτομα με τρισωμία 21.

Από τις δομικές αναδιατάξεις των χρωμοσωμάτων οι αμοιβαίες μεταθέσεις είναι εκείνες οι οποίες σχετίζονται συχνότερα τόσο με τη γυναικεία όσο και με την ανδρική υπογονιμότητα και τις καθ' έξιν αποβολές (εικόνα 1). Οι φορείς μεταθέσεων έχουν αυξημένο κίνδυνο σύλληψης εμβρύου με σοβαρή χρωμοσωματική ανωμαλία. Ο κίνδυνος κυμαίνεται μεταξύ 0,5%-50%, ανάλογα με τη μετάθεση. Οι επιπτώσεις στη γονιμότητα είναι σοβαρότερες στους άνδρες φορείς. Σε περιπτώσεις οικογενειών με μετάθεση, έχει παρατηρηθεί ότι, ενώ η μετάθεση στους άνδρες έχει ως αποτέλεσμα олиγοσπερμία ή олиγοασθενοσπερμία, στις

γυναίκες δεν έχει καμία επίπτωση στη γονιμότητα. Παρ' όλα αυτά, πρέπει να τονιστεί ότι δεν προκαλούν όλες οι μεταθέσεις προβλήματα στη σπερματογένεση. Στο σχήμα 1 απεικονίζονται οι τέσσερις συχνότεροι τύποι γαμετών που προκύπτουν κατά τη διαδικασία της μείωσης. Θεωρητικά 25% έχει ως αποτέλεσμα τη σύλληψη φυσιολογικού εμβρύου, 25% εμβρύου φορέα της γονεϊκής μετάθεσης και 50% παθολογικού εμβρύου με ανισοζυγισμένο χρωμοσωματικό υλικό. Τα ποσοστά αυτά, όμως, ποικίλλουν πολύ, ανάλογα με τη μετάθεση, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα του δικού μας εργαστηρίου.

Σε υπογόνιμους ή στειρούς άνδρες με φυσιολογικό καρυότυπο και ανωμαλίες στον αριθμό ή στη μορφολογία των σπερματοζωαρίων είναι αυξημένη η συχνότητα χρωμοσωματικών ανωμαλιών στα σπερματοζωάρια, κυρίως των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Στην олиγοσπερμία και στην олиγοασθενοσπερμία έχει παρατηρηθεί ότι 70% των σπερματοζωαρίων έχει ανευπλοειδίες, κυρίως των φυλετικών χρωμοσωμάτων X και Y. Αντιθέτως, η μειωμένη κινητικότητα δεν έχει συσχετιστεί με χρωμοσωματικές ανωμαλίες.

Σε υγιείς γόνιμους άνδρες, περίπου το 3%-4% των σπερματοζωαρίων έχει ανωμαλίες στον αριθμό και το 10% στη δομή των χρωμοσωμάτων. Όσον αφορά στα ωάρια, τα ποσοστά με ανωμαλίες κυμαίνονται από 1,5%-20%, ανάλογα με την ηλικία της γυναίκας.

1.1. Καθ' έξιν αποβολές

Το 15% των κύσεων χάνεται από μη συστηματικές αιτίες, επομένως ζευγάρια με μία ή δύο αποβολές δεν θεωρείται απαραίτητο να προχωρήσουν σε εξετάσεις. Όταν όμως ένα ζευγάρι έχει ιστορικό με τρεις αποβολές και πάνω απαιτείται εργαστηριακός έλεγχος. Μία από τις εξετάσεις που πρέπει να γίνει είναι ο χρωμοσωματικός έλεγχος (καρυότυπος) και στα δύο μέλη. Στο 7% περίπου αυτών των ζευγαριών, ένας γονιός φέρει κάποια συνήθως ισοζυγισμένη χρωμοσωματική αναδιάταξη, που να μην στον ίδιο μπορεί να μην έχει καμία κλινική επίπτωση, όμως σε μη ισοζυγισμένη μορφή στο έμβρυο προκαλεί παλινδρόμηση της κύησης. Αν η μη ισοζυγισμένη μορφή της αναδιάταξης στο έμβρυο είναι βιώσιμη έχει ως αποτέλεσμα τη γέννηση παιδιού με χρωμοσωματική ανωμαλία. Ο κίνδυνος παλινδρόμησης



Εικ. 1. Καρυότυπος θήλεος ατόμου με αμοιβαία μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων X και 6 σε γυναίκα με υπογονιμότητα.

του εμβρύου ή γέννησης παιδιού με χρωμοσωματική ανωμαλία εξαρτάται από τον τύπο της αναδιάταξης. Σήμερα είναι εφικτή και η προεμφυτευτική διάγνωση εμβρύων με χρωμοσωματική ανωμαλία σε κάποια ζευγάρια, τα οποία συμμετέχουν σε προγράμματα εξωσωματικής γονιμοποίησης, ανάλογα με το πρόβλημα. Σε αυτήν την περίπτωση εμφυτεύονται μόνον τα υγιή έμβρυα.

2. Γονιδιακές βλάβες

Η ανθρώπινη αναπαραγωγή είναι μια πολύ πολύπλοκη διαδικασία στην οποία λαμβάνουν μέρος χιλιάδες γονίδια, τα οποία ενεργοποιούνται και απενεργοποιούνται σε διάφορα στάδια ήδη από την εμβρυϊκή ζωή. Μερικά από αυτά μας είναι γνωστά, όμως πολλά μένουν ακόμη να διευκρινιστούν.

2.1 . Ανδρική υπογονιμότητα

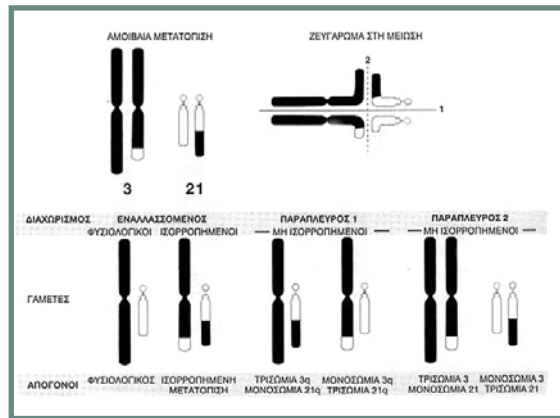
Φαίνεται να υπάρχουν 50 γονίδια τα οποία σχετίζονται με τη σπερματογένεση. Τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στις κυριότερες αιτίες της ανδρικής υπογονιμότητας οι οποίες είναι οι εξής:

2.1.1. Μικροελλείμματα στο χρωμόσωμα Y

Το 1996 ο Vogt και οι συνεργάτες του αναγνώρισαν τρεις περιοχές πάνω στο χρωμόσωμα Y, οι οποίες παρουσίαζαν συστηματικά ελλείψεις σε άνδρες με υπογονιμότητα. Ονόμασαν την ευρύτερη περιοχή παράγοντα αζωοσπερμίας ή αλλιώς AZF (azoospermia factor) και τη διαχώρισαν σε τρεις περιοχές, τις οποίες ονόμασαν AZFa, AZFb και AZFc αντίστοιχα (σχήμα 2).

Η περιοχή AZFa φέρει τα γονίδια USP9Y και DBY, ενώ η περιοχή AZFb τα γονίδια RBMY. Τα γονίδια αυτά εκφράζονται αποκλειστικά στους όρχεις και η έλλειψη της περιοχής αυτής προκαλεί διακοπή της σπερματογένεσης και αζωοσπερμία.

Τα μικροελλείμματα στην περιοχή AZFc είναι αυτά τα οποία απαντούν συχνότερα σε υπογόνιμους άντρες. Παρατηρούνται ολοκληρωτικές και μερικές ελλείψεις της περιοχής και προκαλούν ποικιλία φαινοτύπων (από олиγοσπερ-



Σχήμα 1. Απεικόνιση των τεσσάρων τύπων γαμετών που προκύπτουν κατά τη μειωτική διαίρεση στις γονάδες σε φορέα αμοιβαίας μετάθεσης μεταξύ δύο χρωμοσωμάτων.

μία έως αζωοσπερμία). Σύμφωνα με μελέτες το 13% των υπογόνιμων ανδρών φέρει μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή. Τα σημαντικότερα γονίδια που συναντώνται σε αυτήν είναι τα DAZ, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο ως ρυθμιστικοί παράγοντες στη μεταγραφή και στη μειωτική διαίρεση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων, καθώς και στην εξασφάλιση της σταθερότητας του αριθμού τους.

2.1.2. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της κυστικής ίνωσης (CFTR) και συγγενής αμφοτερόπλευρη απόφραξη του σπερματικού πόρου (CBAVD)

Πολύ σημαντικό ρόλο στην αποφρακτική ανδρική υπογονιμότητα διαδραματίζει το γονίδιο CFTR, το οποίο εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα εξωκρινών ιστών (πνεύμονες, πάγκρεας, ιδρωτοποιοί αδένες, σπερματικός πόρος) και είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης που λειτουργεί ως αυλός μεταφοράς ιόντων χλωρίου. Στο γονίδιο αυτό έχουν περιγραφεί πάνω από 1.500 μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί, με συχνότερη τη μετάλλαξη F508del. Οι ασθενείς με κυστική ίνωση είναι υπογόνιμοι στο 95% των περιπτώσεων εξαιτίας της συγγενούς αμφοτερόπλευρης απόφραξης του σπερματικού πόρου (CBAVD) την οποία παρουσιάζουν. Συγγενής αμφοτερόπλευρη απόφραξη του σπερματικού πόρου (CBAVD), όμως, παρουσιάζεται και στο 2%-6% των κατ'άλλα φυσιολογικών υπογόνιμων ανδρών. Το 60% αυτών των περιπτώσεων φέρουν ήπιες μεταλλαγές στο γονίδιο CFTR. Στους ασθενείς με CBAVD η σπερματογένεση ολοκληρώνεται κανονικά και είναι εφικτή η συλλογή σπερματοζωαρίων με βιοψία όρχεων.

2.1.3. Σύνδρομο μη απόκρισης στα ανδρογόνα (AIS: androgen insensitivity syndrome)

Πρόκειται για ένα φυλοσύνδετο νόσημα που χαρακτηρίζεται από ελαττωματική αρρενοποίηση σε άτομο με καρυότυπο 46,XY με ποικιλία φαινοτύπων. Διακρίνεται σε σύνδρομο ολικής μη απόκρισης στα ανδρογόνα (CAIS: Complete androgen insensitivity syndrome) με εξωτερικά

γεννητικά όργανα φυσιολογικού θήλεος ατόμου, σε σύνδρομο μερικής μη απόκρισης στα ανδρογόνα (PAIS: Partial androgen insensitivity syndrome) με εξωτερικά γεννητικά όργανα μερικώς αρρενοποιημένα και τέλος σε σύνδρομο ήπιος μη απόκρισης στα ανδρογόνα (MAIS: Mild androgen insensitivity syndrome) με εξωτερικά γεννητικά όργανα άρρενος ατόμου.

Το σύνδρομο αυτό οφείλεται σε ελαττωματική λειτουργία του γονιδίου του υποδοχέα ανδρογόνων (AR: Androgen Receptor). Το γονίδιο αυτό εκφράζεται σε διάφορους ιστούς από την όγδοη κιόλας εβδομάδα της κύησης και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετατροπή του αγωγού του Wolf σε επιδιδυμίδα, σπερματικό πόρο και σπερματοδόχους κύστες, καθώς και στη σπερματογένεση. Η μεγάλη ποικιλία των φαινοτύπων οφείλεται στη δυνατότητα επέκτασης του γονιδίου. Το 2% των κατά τα άλλα φυσιολογικών υπογόνιμων ανδρών παρουσιάζει μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό.

2.1.4. Υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός και σύνδρο-

μο Kallman

Ο υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός είναι ένα νόσημα που παρατηρείται σε 1:10.000 άρρενα άτομα. Η υπογονιμότητα σε αυτήν την περίπτωση οφείλεται σε ελαττώματα στο σύστημα υποθαλάμου-υπόφυσης και στην αδυναμία φυσιολογικής έκκρισης γοναδοτροπινών. Ο υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός συνοδευόμενος από ανοσμία αποτελεί το σύνδρομο Kallman. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά του συνδρόμου Kallman είναι η απουσία όσφρησης, ο υπογοναδισμός, η αναστολή της σπερματογένεσης, η ατροφία όρχεων, η κρυψορχία και η αμφίχειρη συνκληνσία. Υπάρχουν αρκετά γονίδια που σχετίζονται με το σύνδρομο αυτό με κυριότερα τα KAL1, KAL2 και GNRHR11.

2.1.5. Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA του σπέρματος

Η έκθεση των σπερματοζωαρίων σε χημικά ενεργοποιημένα μόρια (ROS), προκαλεί μεταλλάξεις στο ευάλωτο λόγω σχήματος μιτοχονδριακό DNA με αποτέλεσμα τη μειωμένη κινητικότητα και πιθανόν την απόπτωση των σπερματοζωαρίων.

2.1.6. Λάθη στο πακετάρισμα της χρωματίνης (sperm apoptosis - sperm DNA fragmentation)

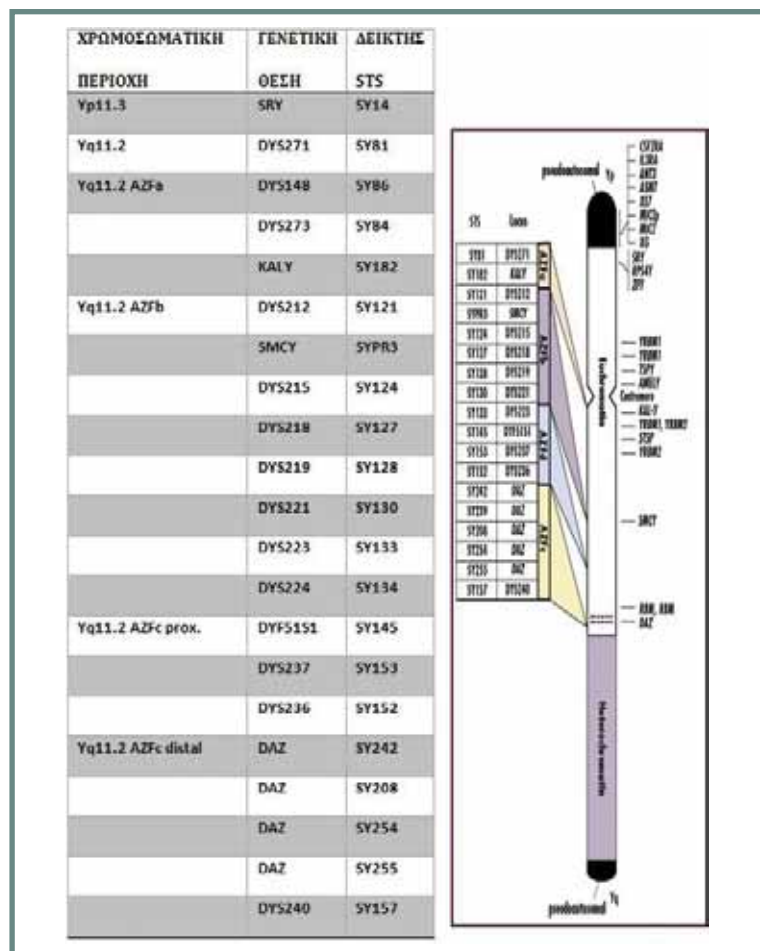
Το DNA στον πυρήνα των σπερματοζωαρίων είναι πολύ σφιχτά πακεταρισμένο γύρω από πρωτεΐνες που ονομάζονται πρωταμίνες. Μεταλλάξεις στα γονίδια που τις κωδικοποιούν έχουν ως αποτέλεσμα ανώμαλα πακεταρισμένες χρωματινικές δομές που οδηγούν σε χαμηλή ποιότητα σπέρματος, σε μειωμένη γονιμοποιητική ικανότητα, σε κατακερματισμό του DNA και τελικά σε απόπτωση.

2.2. Γυναικεία υπογονιμότητα

Οι κυριότερες αιτίες γυναικείας υπογονιμότητας είναι οι εξής:

2.2.1. Πρόωρη Ωοθηκική Ανεπάρκεια (POF: Premature Ovarian Failure)

Χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα γοναδοτροπινών. Οι κυριότερες γενετικές αιτίες είναι οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες, η γαλακτοζαιμία, οι μεταλλάξεις στον υποδοχέα της FSH και στον υποδοχέα της LH και τέλος η προμετάλλαξη ευθραύστου X (FMR1 premutation). Η τελευταία αποτελεί και τη συχνότερα συναντώμενη γνωστή αιτία της POF έπειτα από τις χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Η προμετάλλαξη οφείλεται σε επέκταση μιας τριπλέτας CGG σε 50-200 αντίγραφα στο 5' άκρο του γονιδίου FMR1, ενώ η επέκταση του γονιδίου σε περισσότερα από 200 αντίγραφα προκαλεί το σύνδρομο ευθραύστου X14. Η προμετάλλαξη αυτή θα



Σχήμα 2: Γενετικός χάρτης του χρωμοσώματος Y, στον οποίο φαίνονται οι δείκτες STS στο Yq.

προκαλέσει πρόωρη ωθηκική ανεπάρκεια στο 13%-20% των γυναικών που τη φέρουν.

2.2.2. Σύνδρομο πολυκυστικών ωθηκών (PCOS: polycystic ovarian syndrome)

Για την παρουσία του παραπάνω συνδρόμου έχουν ενοχοποιηθεί 50 γονίδια που αφορούν κυρίως στην ωογένεση, στην έκκριση και στην ενεργότητα της ινσουλίνης, καθώς και στη βιοσύνθεση των ανδρογόνων. Το πιο πιθανό γονίδιο, η μετάλλαξη του οποίου οδηγεί στην εμφάνιση του συνδρόμου, είναι το FBNN3, υπεύθυνο για την παραγωγή φιμπρίλίνης 3.

2.2.3. Υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός και σύνδρομο Kallman

Όπως στα άρρενα, έτσι και στα θήλεα άτομα ο υπογονα-

δοτροπικός υπογοναδισμός και το σύνδρομο Kallman (με μικρότερη συχνότητα 1:50.000 άτομα) είναι αιτίες υπογονιμότητας εξαιτίας της πρωτοπαθούς αμηνόρροιας που προκαλούν. Τα κυριότερα γονίδια, στα οποία οφείλεται είναι, όπως προαναφέρθηκε, τα KAL1, KAL2 και GNRHR gene.

Όπως προκύπτει από τα προαναφερθέντα, τόσο η ανδρική όσο και η γυναικεία υπογονιμότητα ενδεχομένως υποκρύπτουν χρωμοσωματικές ανωμαλίες και φορεία μεταλλάξεων σε γονίδια που σχετίζονται με σοβαρές γενετικές ασθένειες. Η διάγνωση της αιτίας υπογονιμότητας είναι σημαντική τόσο για την κατανόηση της αιτίας της όσο και για την καθοδήγηση του ασθενούς σχετικά με τις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής οι οποίες πρέπει να εφαρμοστούν.

Abstract

Karkaletsis M, Hatzaki A, Velissariou V. *Genetics of Infertility. Iatrika Analekta* 2012; 3: 709-712.

A substantial number of couples, approximately one in six, face subfertility or infertility and multiple miscarriage problems. We now know that several factors contribute to this. Amongst these factors, the most frequent are genetic, mainly chromosomal abnormalities and genetic mutations that lead to male infertility (oligospermia, azoospermia etc.), female infertility (primary or secondary amenorrhea) and multiple miscarriages. Today the major developments in diagnostic Genetics permits the identification of the genetic impairments that are associated with problems of human reproduction.

Βιβλιογραφία

1. A. Schinzel. *Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man (2nd Edition)*. Walter de Gruyter Berlin. New York 2001.
2. Gardner RJM, Sutherland GR. *Chromosomal abnormalities and genetic counseling. 4th Edition*. Oxford University Press 2004.
3. *The Investigation and Treatment of Couples with Recurrent First-trimester and Second-trimester Miscarriage*. Green-top Guideline No.17. 2011; Royal College of Obstetricians and Gynaecologists.
4. Hirshfeld-Cytron J, Sugiura-Ogasawara M, Stephenson MD. *Management of recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a reciprocal translocation: a systematic review*. Semin Reprod Med. 2011; 29 (6): 470-481.
5. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, et al., *Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11*. Hum Mol Genet 1996; 5: 933-943.
6. O'Flynn, O'Brien KL, Varghese AC, et al. *The genetic causes of male factor infertility: A review*. Fertility and Sterility 2010; 93: 1-12.
7. Sadeghi-Nejad H, Farrokhi F. *Genetics of Azoospermia: Current knowledge, clinical implications and future directions part II*. Urology 2007; 4: 192-206.
8. Radpour R, Gourabi H, Dizaj AV, et al. *Genetic Investigations of CFTR Mutations in Congenital Absence of Vas Deferens, Uterus and Vagina as a cause of infertility*. Journal of Andrology, 2008; 29: 506-513.
9. Brinkmann AO. *Molecular mechanisms of androgen action - a historical perspective*. Methods Mol Biol. 2011; 776: 3-24.
10. Sadeghi-Nejad H, Farrokhi F. *Genetics of Azoospermia: Current knowledge, clinical implications and future directions part I*. Urology 2006; 3: 193-203.
11. Achermann J, et al. *Genetic causes of human reproductive disease*. J Clin End & Metab 2002; 87 (6): 2.447-2.454.
12. Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. *Genetics of human male infertility*. Singapore Med J 2009; 50 (4): 336-347.
13. Beck-Peccoz P, Persani L. *Premature ovarian failure*. Orphanets Rare Dis 2006, 1-9.
14. Crosignani PG. *Genetic aspects of female reproduction*. Hum Reprod Update 2008; 14: 293-307.
15. Ferreira SI, Matoso E, Pinto M, et al. *X-chromosome terminal deletion in a female with premature ovarian failure: Haploinsufficiency of X-linked gene as a possible explanation*. Molecular Cytogenetics 2010; 3: 14.

Το μέλλον στην προγεννητική διάγνωση των γενετικών νόσων του εμβρύου: μη επεμβατική διάγνωση σε ελεύθερο DNA στο αίμα της εγκύου

Βούλα Βελισσαρίου

Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας ΜΗΤΕΡΑ

voulavel@mitera.gr

Φίλιππος Πατσάλης

Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου, Λευκωσία Κύπρος

patsalis@cing.ac.cy

Η μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση (ΜΕΠΔ, NIPD: Non-Invasive Prenatal Diagnosis) στο αίμα της εγκύου είναι ένα από τα πλέον συναρπαστικά ερευνητικά πεδία της μοριακής ιατρικής την τελευταία δεκαετία. Η σημασία της ανάπτυξης και δυνατότητας εφαρμογής της στην κλινική πράξη είναι τεράστια, διότι δυνητικά θα είναι δυνατόν να προσφερθεί σε κάθε έγκυο χωρίς κανέναν κίνδυνο αποβολής.

Την τελευταία δεκαετία στο πεδίο της ΜΕΠΔ γενετικών νοσημάτων στο αίμα της εγκύου έχουν υπάρξει αλματώδεις εξελίξεις. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μεθοδολογικές προσεγγίσεις, οι οποίες αποδεικνύουν ότι η ΜΕΠΔ των χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου είναι εφικτή. Οι δύο πλέον υποσχόμενες μέθοδοι είναι η ΜΕΠΔ με την αλληλούχιση του DNA με αναλυτές επόμενης γενιάς και η ΜΕΠΔ με την ανοσοκατακρήμνιση μεθυλιωμένου DNA (MEDIP: Methylated DNA Immunoprecipitation) σε συνδυασμό με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time qPCR), MeDIP-real time PCR. Αμφότερες οι μέθοδοι έχουν επαληθευθεί με τυφλές μελέτες και έχουν >99% ακρίβεια. Η ΜΕΠΔ με τη δεύτερη μέθοδο, η οποία έχει αναπτυχθεί από ομάδα της Κύπρου σε συνεργασία με το τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας του ΜΗΤΕΡΑ, βασίζεται στην ταυτοποίηση διαφορικά μεθυλιωμένων περιοχών στο DNA μεταξύ εμβρύου και εγκύου (DMRs: Differentially Methylated Regions), οι οποίες χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των φυσιολογικών από τα παθολογικά έμβρυα. Έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 10.000 τέτοιες περιοχές για τα χρωμοσώματα 13, 18, 21, X και Y με τη χρήση συστοιχιών ολιγονουκλεοτιδίων υψηλής διακριτικότητας (high resolution oligo-arrays), οι οποίες θα ήταν δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για τη ΜΕΠΔ ανευλοειδίων των χρωμοσωμάτων 13, 18, 21, X και Y. Θα περιγραφεί εδώ η νέα μέθοδος, καθώς και τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της σε σχέση με τη ΜΕΠΔ με τη μέθοδο της αλληλούχισης του DNA νέας γενιάς.

Θεωρείται ότι αμφότερες οι μέθοδοι θα έχουν πολύ σύντομα εφαρμογή στην κλινική πράξη για τη διάγνωση των συχνότερων τρισωμιών του εμβρύου και στα επόμενα δέκα έτη για την προγεννητική διάγνωση όλων των συχνών, καθώς και σπανιότερων γενετικών νοσημάτων.

Ελεύθερο εμβρυϊκό DNA στο αίμα της εγκύου

Η ταυτοποίηση και απομόνωση του εμβρυϊκού DNA με μη επεμβατικές μεθόδους, το οποίο αναλύεται στη συνέχεια με μοριακές μεθόδους, είναι το κλειδί για την επιτυχή ΜΕΠΔ. Οι πρώτες ενδείξεις ότι θα ήταν δυνατή η ΜΕΠΔ στο αίμα της εγκύου υπήρξαν όταν το 1997 απομονώθηκαν εμβρυϊκά κύτταρα, καθώς και πολύ μικρή ποσότητα ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (cffDNA) από το πλάσμα αίματος εγκύων. Αρχικά οι προσπάθειες ΜΕΠΔ για διάγνωση χρωμοσωματικών ανευλοειδίων έγιναν με τη χρήση της τεχνικής φθορίζουσας υβριδοποίησης in situ (FISH) σε εμβρυϊκά κύτταρα που απομονώθηκαν από το αίμα της εγκύου. Όμως, ο εξαιρετικά μικρός αριθμός των εμβρυϊκών κυττάρων (1 στα 350.000 μητρικά κύτταρα), καθώς και η δυσκολία απομόνωσής τους, κατέστησαν την προσέγγιση αυτή αναποτελεσματική.

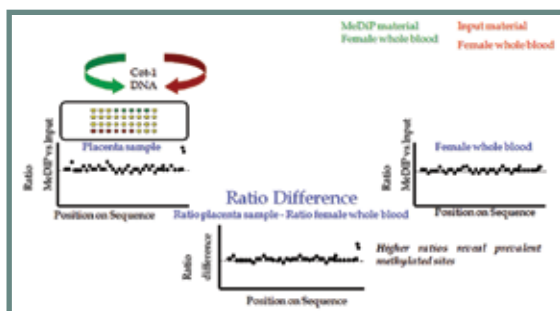
Αποτελεσματικότερη ήταν η χρήση του ελεύθερου εμβρυϊκού cffDNA στο αίμα της εγκύου για τη διάγνωση και μέτρηση DNA αλληλουχιών του εμβρύου, οι οποίες έχουν κληρονομηθεί αποκλειστικά από τον πατέρα και απουσιάζουν από το γονιδίωμα της εγκύου, όπως αυτές του χρωμοσώματος Y στα αρρενα έμβρυα. Η προσέγγιση αυτή επέτρεψε την ανάπτυξη διαγνωστικών εξετάσεων για τον παράγοντα Rhesus του εμβρύου, καθώς και τη διάγνωση του φύλου του εμβρύου στην περίπτωση φυλοσύνδετου νοσήματος. Όμως, η ανάπτυξη ΜΕΠΔ για τις χρωμοσωματικές ανευλοειδίες του εμβρύου, καθώς και για τα μονογονιδιακά νοσήματα, αποτελεί πολύ μεγαλύτερη πρόκληση, διότι το εμβρυϊκό DNA είναι μόλις το 3%-5% του συνολικού DNA στο πλάσμα του αίματος της εγκύου και είναι

κατά 50% πανομοιότυπο με αυτό της μητέρας.

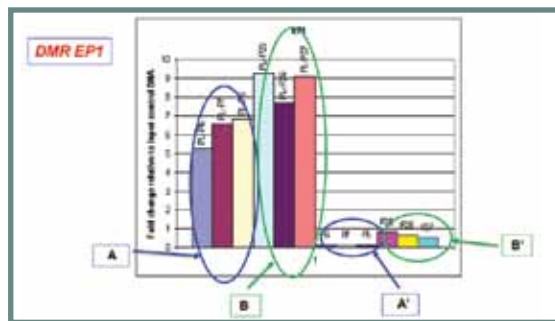
Η πρώτη διάγνωση χρωμοσωματικής ανευπλοειδίας εμβρύου σε DNA το οποίο απομονώθηκε από το πλάσμα αίματος εγκύου, αφορούσε στην τρισωμία 18. Επιτεύχθηκε το 2006 με τη χρήση μεθόδου που βασίζεται σε επιγενετικές τροποποιήσεις του DNA με τη μεθυλίωση, διαδικασία η οποία ως γνωστό καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων. Ειδικότερα, βασίζεται στη χρήση διαφορικά μεθυλιωμένων περιοχών (DMRs) στο εμβρυϊκό και μητρικό DNA. Έκτοτε έχουν περιγραφεί αρκετές εναλλακτικές προσεγγίσεις που βασίζονται στη διαφορά στη μεθυλίωση των ίδιων περιοχών μεταξύ εμβρυϊκού και μητρικού DNA, με τεχνικούς όμως περιορισμούς, οι οποίοι δεν επέτρεψαν την ανάπτυξη μιας ακριβούς και αξιόπιστης μεθόδου. Προκειμένου να ξεπεραστούν οι παραπάνω τεχνικές δυσκολίες, η ομάδα μας ανέπτυξε μια νέα επιγενετική μέθοδο ΜΕΠΔ των χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου, την ανοσοκατακρήμνιση μεθυλιωμένου DNA (MEDIP: Methylated DNA Immunoprecipitation) σε συνδυασμό με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time qPCR), τη MeDIP- qPCR πραγματικού χρόνου, με τη χρήση ειδικά επιλεγμένων DMRs, η οποία έχει μεγάλη ευαισθησία και αξιοπιστία.

ΜΕΠΔ του συνδρόμου Down με τη μέθοδο MEDIP- qPCR πραγματικού χρόνου

Η ταυτοποίηση νέων DMRs στα χρωμοσώματα 13, 18, 21, X και Y πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της ανοσοκατακρήμνισης μεθυλιωμένου DNA και της υψηλής διακριτικότητας συστοικιών ολιγονουκλεοτιδίων (MeDIP on a Chip) όπως φαίνεται στο σχήμα 1. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση DNA αίματος μη εγκύου γυναίκας και DNA πλακούντων πρώτου και δεύτερου τριμήνου σε δύο διαφορετικά πειράματα με τη χρήση ειδικού αντισώ-



Σχήμα 1. Ταυτοποίηση DMRs με τη χρήση της MeDIP και των υψηλής διακριτικότητας συστοικιών ολιγονουκλεοτιδίων.



Σχήμα 2. Για το δείκτη DMR EP1, αριστερά φαίνεται η αυξημένη μεθυλίωση σε τρία διαφορετικά δείγματα πλακούντων κύησης με σύνδρομο Down (B) σε σχέση με τρία δείγματα φυσιολογικών κύησης (A). Δεξιά, για τον ίδιο δείκτη, φαίνεται η αυξημένη μεθυλίωση σε τρία διαφορετικά δείγματα αίματος εγκύων με έμβρυα με σύνδρομο Down (B') σε σχέση με τρία δείγματα αιμάτων εγκύων με φυσιολογικά έμβρυα (A').

ματος για τις περιοχές CpG του DNA, οι οποίες μεθυλιώνονται. Οι εμπλουτισμένες (MeDIP DNA, σχήμα 1) και οι μη εμπλουτισμένες (input DNA, σχήμα 1) σε μεθυλίωση περιοχές του DNA στα δείγματα αίματος και πλακούντων απομονώθηκαν και στη συνέχεια υβριδοποιήθηκαν σε ειδικό πλακίδιο με υψηλής διακριτικότητας συστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων (high resolution oligo-array, σχήμα 1). Το πλακίδιο-πλατφόρμα είναι ειδικά σχεδιασμένο με DNA αλληλουχίες των χρωμοσωμάτων 13, 18, 21, X και Y. Η αναγνώριση των DMRs πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αλγορίθμου SW-ARRAY. Απομονώθηκαν συνολικά πάνω από 10.000 υποψήφια DMRs για τα χρωμοσώματα 13, 18, 21, X και Y. Περίπου 2.000 βρίσκονται στο χρωμόσωμα 21. Από αυτά επελέγησαν 12 με βάση τα εξής κριτήρια: η επιλεγμένη περιοχή πρέπει να είναι υπερμεθυλιωμένη στον πλακούντα και υπομεθυλιωμένη στο αίμα της εγκύου, η κατάσταση μεθυλίωσης πρέπει να είναι ίδια στον πλακούντα πρώτου και τρίτου τριμήνου και, τέλος, τα επίπεδα μεθυλίωσης πρέπει να είναι πάνω από ένα κατώτατο όριο, το οποίο καθορίζεται από την ανάλυση με τις υψηλής διακριτικότητας συστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων.

Προκειμένου να αποδειχθεί ότι τα παραπάνω επιλεγμένα DMRs είναι κατάλληλα για τη διάγνωση του συνδρόμου Down στο αίμα της εγκύου, εξετάστηκε μεγάλος αριθμός δειγμάτων. Στο σχήμα 2 φαίνεται η αυξημένη μεθυλίωση στον πλακούντα κύησης με σύνδρομο Down σε σχέση με εκείνη σε φυσιολογικές κύσεις και αντίστοιχα η αυξημένη μεθυλίωση στο αίμα εγκύων με παθολογικές κύσεις. Τα παραπάνω αποτελέσματα και η στατιστική ανάλυση των διαφορών επέτρεψαν την ανάπτυξη της νέας μεθόδου

ΜΕΠΔ του συνδρόμου Down στο αίμα της εγκύου. Στο εξεταζόμενο δείγμα αίματος της εγκύου γίνεται αρχικά εμπλουτισμός των υπερμεθυλιωμένων περιοχών του εμβρυϊκού DNA με ανοσοκατακρήμνιση και στη συνέχεια για καθένα από τα παραπάνω επιλεγμένα DMRs γίνεται μέτρηση της μεθυλίωσης. Στη συνέχεια για κάθε DMR εξάγεται ένας λόγος σε σχέση με το μέσο όρο των μετρήσεων της μεθυλίωσης σε φυσιολογικά δείγματα (XEP - σχήμα 3). Με τη χρήση του στατιστικού λογισμικού SPSS v16.0, σχεδιάστηκε η διαγνωστική εξίσωση: $D = -6.331 + 0.959 X_{EP4} + 1.188 X_{EP5} + 0.424 X_{EP6} + 0.621 X_{EP7} + 0.028 X_{EP8} + 0.387 X_{EP10} - 0.683 X_{EP11} + 0.897 X_{EP12}$, όπου X_{EP} είναι οι λόγοι για κάθε DMR. Όταν η τιμή D είναι >0, το δείγμα είναι παθολογικό, ενώ όταν είναι <0, είναι φυσιολογικό.

Εφαρμογή της ΜΕΠΔ για το σύνδρομο Down

Η νέα μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα περιφερικού αίματος εγκύων, οι οποίες προσήλθαν για λήψη χοριακών λαχνών μεταξύ της 11ης-13ης εβδομάδας της κύησης στο ΜΗΤΕΡΑ, λόγω αυξημένου κινδύνου κύησης με χρωματισωματική ανωμαλία. Κατόπιν ενημέρωσης και ενημέρωσης συγκατάθεσης της εγκύου, πραγματοποιήθηκε αιμοληψία πριν από τη λήψη των χοριακών λαχνών. Στη συνέχεια, αφού έγιναν γνωστά τα αποτελέσματα της επεμβατικής προγεννητικής διάγνωσης, η νέα μέθοδος εφαρμόστηκε σε 40 δείγματα συνολικά, εκ των οποίων 14 είχαν διαπιστωμένη τρισωμία 21, ενώ 26 ήταν φυσιολογικά. Η νέα μέθοδος διέγνωσε τόσο τα παθολογικά όσο και τα φυσιολογικά έμβρυα με 100% ευαισθησία και 100% ειδικότητα.

Η ΜΕΠΔ στην κλινική πράξη

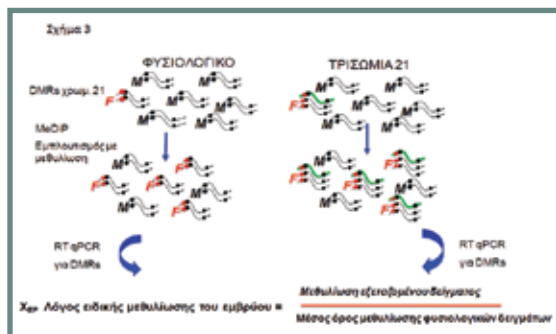
Στην παρούσα φάση δύο μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί και έχουν επαληθευθεί με 100% ακρίβεια. Η πρώτη βασίζεται

στην αλληλούχιση του DNA με αναλυτές επόμενης γενιάς και η δεύτερη στην ανοσοκατακρήμνιση μεθυλιωμένου DNA (MEDIP) σε συνδυασμό με qPCR πραγματικού χρόνου. Αμφότερες οι μέθοδοι έχουν επαληθευθεί σε κλινικές μελέτες. Η μέθοδος ΜΕΠΔ με αλληλούχιση του DNA έχει επαληθευθεί σε δύο ανεξάρτητες κλινικές μελέτες. Στην πρώτη, σε 753 δείγματα με 100% ευαισθησία και 97,9% ειδικότητα. Στη δεύτερη, σε 1.696 δείγματα, με 98,6% ευαισθησία και 99,8% ειδικότητα. Η «επιγενετική μέθοδος» με ανοσοκατακρήμνιση μεθυλιωμένου DNA (MEDIP) σε συνδυασμό με real time qPCR επαληθεύτηκε σε 175 δείγματα με 100% ευαισθησία και 99% ειδικότητα.

Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους παρατηρούνται τα εξής: Αμφότερες θεωρούνται ακριβείς με ευαισθησία και ειδικότητα άνω του 99%. Η μέθοδος ΜΕΠΔ με αλληλούχιση του DNA, εφόσον έχει επαληθευθεί σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων, αναμένεται να εφαρμοστεί πρώτη στην κλινική πράξη. Για τη δική μας «επιγενετική μέθοδο» ΜΕΠΔ βασισμένη στη διαφορική μεθυλίωση, προκειμένου να αρχίσει η εφαρμογή της στην κλινική πράξη, σχεδιάζεται να προηγηθεί κλινική μελέτη με 1.000 δείγματα, η οποία υπολογίζεται να έχει ολοκληρωθεί εντός ενός έτους. Αμφότερες οι μέθοδοι είναι δυνατόν να εφαρμοστούν από τη 10η εβδομάδα της κύησης, με χρόνο απάντησης 15-21 ημέρες για τη ΜΕΠΔ με αλληλούχιση του DNA και 6-7 ημέρες για τη ΜΕΠΔ με μεθυλίωση. Όσον αφορά στην πολυπλοκότητα και στο κόστος, η ΜΕΠΔ με αλληλούχιση του DNA είναι σημαντικά πολυπλοκότερη και ακριβότερη (περίπου 1.900 ευρώ), καθώς απαιτεί ειδικό και πιο δαπανηρό εργαστηριακό εξοπλισμό, ενώ η ΜΕΠΔ με μεθυλίωση θα κοστίζει περίπου 400 ευρώ, είναι απλούστερη στην εφαρμογή της και ο απαιτούμενος εξοπλισμός αποτελεί μέρος του βασικού εξοπλισμού ενός εργαστηρίου μοριακής βιολογίας.

Η ΜΕΠΔ γενετικών νοσημάτων στο μέλλον

Από τη δεκαετία του 1970, η προγεννητική διάγνωση παρέχεται μέσω των επεμβατικών μεθόδων της λήψης χοριακών λαχνών (τροφοβλάστης), της αμνιοπαρακέντησης και της ομφαλοκέντησης με χρωματοσωματική ανάλυση και μεθόδους ανάλυσης του DNA. Η αλματώδης πρόοδος της τεχνολογίας και των μεθόδων, ειδικά την τελευταία δεκαετία, επέτρεψε τη θεαματική βελτίωση της διακριτικής ικανότητας της ανάλυσης του γονιδιώματος, με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση βλαβών του DNA ακόμη και στο επίπεδο της μιας βάσης. Από τον καρυότυπο, ο οποίος ανιχνεύει



Σχήμα 3. Η μέθοδος ΜΕΠΔ με την ανοσοκατακρήμνιση μεθυλιωμένου DNA (MEDIP) σε συνδυασμό με real time PCR.

τις συχνότερες χρωμοσωματικές ανωμαλίες και αναδιατάξεις, προχωρήσαμε στη διάγνωση συνδρόμων, τα οποία οφείλονται σε μικροελλείμματα και μικροδιπλασιασμούς με τη μέθοδο FISH, στη διάγνωση ακόμη περισσότερων αλλαγών στο DNA με κλινική σημασία με τη μέθοδο των συστοικιών με CGH (array CGH) και, τέλος, στην αναγνώριση όλων των αλλαγών στο DNA ακόμη και στο επίπεδο της μιας βάσης με τους DNA αναλυτές επόμενης γενιάς.

Τα τελευταία 20 έτη, πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν προσπαθήσει να μετατρέψουν την προγεννητική διάγνωση των γενετικών νοσημάτων σε μια διαδικασία ασφαλή για την έγκυο και το έμβρυο με την παροχή της ΜΕΠΔ. Σήμερα, το 2012, προβλέπεται ότι αρχίζει μια νέα εποχή. Με τη βοήθεια των μεθόδων ΜΕΠΔ, οι οποίες περιγράφηκαν, και τη συνεχή αναβάθμιση που θα ακολουθήσει, προβλέπεται ότι τα επόμενα 10 έτη με μια απλή αιμοληψία στην

έγκυο θα είναι δυνατή η διάγνωση όλων των αλλαγών στο DNA, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την παθολογία του εμβρύου τόσο σε χρωμοσωματικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο γονιδίων.

Ευχαριστίες

Επιθυμούμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας σε όλες τις εγκύους κυρίες, οι οποίες συναίνεσαν και κατέστη δυνατή η πραγματοποίηση των κατάλληλων δοκιμών, προκειμένου να αναπτυχθεί η νέα αυτή μέθοδος. Επίσης, ευχαριστίες σε όλους τους συνεργάτες μας, οι οποίοι συνετέλεσαν στην επιτυχία του εγχειρήματος. Τέλος, στις διοικήσεις του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου, καθώς και του ΜΗΤΕΡΑ, οι οποίες εμπιστεύθηκαν τις επιστημονικές μας ομάδες, παρέχοντας τη δυνατότητα να πραγματοποιηθούν οι κατάλληλες δοκιμές.

Abstract

Velissariou V, Patsalis P. The Future of Prenatal Diagnosis of Genetic Diseases: Noninvasive Diagnosis in Cell Free DNA in Maternal Blood. *Iatrika Analekta* 2012; 3: 713-717.

The area of Non-Invasive Prenatal Diagnosis (NIPD) has rapidly evolved recently. Several methodological approaches have demonstrated a proof of concept for the NIPD of chromosomal aneuploidies. The two most promising methods are NIPD using next generation sequencing technologies and NIPD using Methylation DNA Immunoprecipitation (MeDIP) with real time qPCR. Both approaches have been validated with blind studies and have >99% accuracy. NIPD using next generation sequencing is achieved by high throughput shotgun sequencing of DNA from plasma of maternal blood followed by ratio comparisons of each chromosome sequence tag density over the median tag density of all autosomes (z-score analysis). The MeDIP real time qPCR method, which is described in this review in more detail, is based on the identification of Differentially Methylated Regions (DMRs) and their use in discriminating normal from abnormal cases. More than 10,000 DMRs were identified for chromosomes 13, 18, 21, X and Y using high resolution oligo-arrays that can be potentially used for the NIPD of aneuploidies for chromosomes 13, 18, 21, X and Y. Both NIPD methods have several advantages and limitations and it is believed that they will soon be implemented in clinical practice. With the continuous advancements of genetic methodologies and technologies, it is projected that within the next 10 years it will be possible to provide NIPD for all common and rare genetic disorders.

Βιβλιογραφία

1. Fan HC, Blumenfeld YS, Chitkara U, et al. *Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood*. Proc Natl Acad Sci USA, 2008; 105: 16.266-16.271.
2. Chiu RW, Chank C, Gao Y, et al. *Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma*. Proc Natl Acad Sci USA, 2008; 105: 20.458-20.463.
3. Papageorgiou EA, Karagrigoriou A, Tsaliki E, et al. *Fetal specific DNA methylation ratio permits non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21*. Nature Med, 2011; 17: 510-513.
4. Tong YK, Jin S, Chiu RW, et al. *Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach*. Clin Chem, 2010; 56: 90-98.
5. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. *Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study*. BMJ, 2011; 342: p.c7401
6. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. *DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international*

- clinical validation study*. Genet Med, 2011; 3: 913-920.
7. Tsaliki E, Papageorgiou EA, Spyrou C, et al. *MeDIP real time qPCR of maternal peripheral blood reliably identifies trisomy 21*. Prenat Diagn, 2012 (accepted for publication).
 8. Papageorgiou EA, Fiegler H, Rakyan V, et al. *Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies*. Am J Pathol, 2009; 174: 1.609-1.618.
 9. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. *Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum*. Lancet, 1997; 350 (9076): 485-487.
 10. Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, et al. *PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploidy pregnancies*. Am J Hum Genet, 1997; 61: 822-829.
 11. Samura O, Zhen DK, Falco V, et al., *Diagnosis of trisomy 21 in fetal nucleated erythrocytes from maternal blood by use of short tandem repeat sequences*. Clin Chem, 2001; 47: 1.622-1.626.
 12. Faas BH, Berling EA, Christiaens GL, et al. *Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma*. Lancet, 1998; 352(9135): 1.196.
 13. Chim SS, Tong YK, Chiu RW, et al. *Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma*. Proc Natl Acad Sci USA, 2005; 102 (41): 14.753-14.758.

Γενετική του καρκίνου

Λίνα Φλωρεντίν, B.Sc., PhD

Μοριακή Βιολόγος - Κυτταρογενετίστρια,

Διευθύντρια AlphaLab - Κέντρο Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής

lflorentin@leto.gr

Γεώργιος Δ. Λύπας

Παθολόγος Ογκολόγος,

Υπεύθυνος Μονάδας Γενετικής Ογκολογίας ΥΓΕΙΑ, Επιστημονικός Συνεργάτης Dana Farber / Harvard Cancer Center

glypas@hygeia.gr

Περίπου το 10% όλων των μορφών καρκίνου οφείλονται στη βλάβη ενός γονιδίου, η οποία έχει κληρονομηθεί. Από τις πιο συχνές μορφές καρκίνου που έχουν κληρονομική προδιάθεση είναι ο οικογενής καρκίνος του μαστού και των ωοθηκών, η οικογενής πολυποδίαση του παχέος εντέρου και ο οικογενής χωρίς πολυποδίαση καρκίνος του παχέος εντέρου ή σύνδρομο Lynch.

Και στα τρία αυτά νοσήματα η κληρονομία γίνεται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα, δηλαδή ο φορέας μιας μετάλλαξης έχει μεγάλη πιθανότητα να νοσήσει και 50% πιθανότητα να μεταφέρει τη βλάβη στην επόμενη γενιά. Κάθε άνθρωπος μπορεί να κληρονομήσει μια μετάλλαξη τόσο από τη μητέρα του όσο και από τον πατέρα του. Γι' αυτόν το λόγο πρέπει στο οικογενειακό ιστορικό του ατόμου που προσέρχεται για έλεγχο μεταλλάξεων να καταγράφονται πληροφορίες για τους συγγενείς μητρικής και πατρικής προέλευσης. Από τα παραπάνω σαφώς προκύπτει ότι, προκειμένου να επιλεγεί το κατάλληλο γονίδιο προς μελέτη και να γίνει σωστή ανάλυση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων, είναι απαραίτητη η καταγραφή όσο το δυνατόν πληρέστερου οικογενειακού ιστορικού πασχόντων και μη, σε τρεις ή τέσσερις γενεές, στο οποίο θα φαίνονται η ηλικία εμφάνισης της νόσου και όλες οι άλλες μορφές καρκίνου που μπορεί να έχουν διαγνωστεί στην οικογένεια. Σήμερα είναι γνωστό και πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι η εμφάνιση του καρκίνου είναι αποτέλεσμα πολλών γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Η σωστή αντιμετώπιση τέτοιων περιπτώσεων πρέπει να είναι το αποτέλεσμα στενής συνεργασίας του θεράποντος ογκολόγου, της μονάδας γενετικής ογκολογίας και του εργαστηρίου γενετικής.

Κληρονομικός καρκίνος του μαστού και των ωοθηκών

Το 5%-10% του συνόλου των καρκίνων του μαστού ή και των ωοθηκών έχουν κληρονομική προδιάθεση. Ο κληρονομικός καρκίνος του μαστού, αλλά και των ωοθηκών οφεί-

λεται κατά κύριο λόγο σε μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA1 και BRCA2. Συναντώνται, όμως, και γενετικά νοσήματα προδιάθεσης ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, τα οποία συνδέονται με άλλα γονίδια, όπως τα TP53, PTEN, ATM και CDH1. Παραδείγματα αυτών είναι η νόσος του Cowden, τα σύνδρομα Peutz-Jeghers και Li Fraumeni, η σταξία-ηλαγγειεκτασία κ.ά. Επίσης υφίστανται νοσήματα προδιάθεσης καρκίνου των ωοθηκών, όπως το σύνδρομο Gorlin, ο οικογενής χωρίς πολυποδίαση καρκίνος του παχέος εντέρου κ.ά. Αποκαλύφθηκαν επίσης γονίδια ενδιαμέσου διεισδυτικότητας, όπως το CHEK2, και πολυμορφισμοί (SNPs) που θεωρούνται γενετικοί προδιαθεσιακοί παράγοντες χαμηλής διεισδυτικότητας, οι οποίοι μπορούν να τροποποιήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε μια ή ένα φορέα όπως ο πολυμορφισμός SNP 135G>C RAD51.

Το γονίδιο BRCA1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 και αποτελείται από 24 εξώνια, ενώ το γονίδιο BRCA2 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13 και αποτελείται από 27 εξώνια. Περίπου το 40% των κληρονομικών περιπτώσεων καρκίνου μαστού οφείλεται σε αλλαγές στα παραπάνω γονίδια. Μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA1 εντοπίζονται στο 45% των οικογενειών με πολλές περιπτώσεις καρκίνου μαστού και στο 90% των οικογενειών με καρκίνο μαστού και ωοθηκών. Μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA2 εντοπίζονται στο 35% των οικογενειών με πολλές περιπτώσεις καρκίνου μαστού, καρκίνο μαστού σε άρρενα άτομα, καρκίνο ωοθηκών και προστάτη, παγκρέατος.

Τα κριτήρια επιλογής των δειγμάτων για ανάλυση των BRCA1 και BRCA2 γονιδίων είναι τα παρακάτω:

Για ασθενείς που έχουν νοσήσει με καρκίνο, όταν συντρέχουν ένα ή περισσότερα από τα εξής:

- ▶ Διάγνωση καρκίνου του μαστού σε σχετικά νέα ηλικία (πριν από τα 50).
- ▶ Τριπλά αρνητικός καρκίνος μαστού (ER-, PR-, HER2-).
- ▶ Δύο πρωτοπαθείς καρκίνοι μαστού σε ένα άτομο.
- ▶ Καρκίνος μαστού σε οποιαδήποτε ηλικία και επιπλέον:
 - Ένας ή περισσότεροι συγγενείς εξ αίματος με καρκί-

νο μαστού πριν τα 50,

- Ένας ή περισσότεροι συγγενείς ΕΞ αίματος με καρκίνο ωοθήκης ή σαλπίγγων ή πρωτοπαθή καρκίνο περιτοναίου, ανεξαρτήτως ηλικίας διάγνωσης,
- Δύο ή περισσότεροι συγγενείς ΕΞ αίματος με καρκίνο του μαστού ή/και καρκίνο παγκρέατος σε οποιαδήποτε ηλικία.

- Καρκίνος των ωοθηκών/σαλπίγγων/πρωτοπαθής καρκίνος περιτοναίου.
- Καρκίνος του μαστού σε άνδρα.

Για υγιή άτομα:

- Δύο ή περισσότερα άτομα με καρκίνο του μαστού στην ίδια πλευρά της οικογένειας.
- Ένα ή περισσότερα άτομα με καρκίνο της ωοθήκης.
- Συγγενής ΕΞ αίματος με γνωστή μετάλλαξη στα γονίδια BRCA1/2.
- Συγγενής ΕΞ αίματος, άνδρας, με καρκίνο μαστού.
- Καταγωγή από ομάδα υψηλού κινδύνου (Εβραίοι Ashkenazi).

Κληρονομική πολυποδίαση του παχέος εντέρου

Η οικογενής πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis - FAP) χαρακτηρίζεται από την παρουσία εκατοντάδων έως και χιλιάδων πολυπόδων στο παχύ έντερο, αλλά και στο ορθό, κατά τη δεύτερη δεκαετία της ζωής του ατόμου. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς θα αναπτύξουν καρκίνο του παχέος εντέρου αν δε διαγνωστούν εγκαίρως και δεν ακολουθήσουν την κατάλληλη θεραπεία σε πρώιμο στάδιο. Το 15% του συνόλου των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου είναι κληρονομούμενο, με την οικογενή πολυποδίαση του παχέος εντέρου να ευθύνεται για το 1% περίπου των περιπτώσεων.

Η ηπιότερη μορφή της πάθησης (attenuated FAP -

AFAP) χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολύ μικρότερου αριθμού πολυπόδων (10-100). Οι πολύποδες αναπτύσσονται κατά την τρίτη δεκαετία της ζωής του ατόμου, ενώ ο ασθενής εμφανίζει καρκίνο στην τέταρτη ή την πέμπτη δεκαετία της ζωής του. Η πλειονότητα των FAP ασθενών έχει βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό με πολύποδες και καρκίνο του παχέος εντέρου.

Η οικογενής πολυποδίαση οφείλεται συνήθως σε μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου APC, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5 και αποτελείται από 15 εξώνια. Τα άτομα που έχουν κληρονομήσει μια μετάλλαξη στο γονίδιο APC έχουν 100% πιθανότητα να εμφανίσουν κακοήθεια, όμως οι πιθανότητες αυτές μειώνονται σημαντικά αν υποβληθούν σε έγκαιρη αποκάλυψη της νόσου, γίνει δηλαδή προσυμπτωματικός έλεγχος και επιλεγεί θεραπευτική προσέγγιση (βλέπε συνέχεια).

Ένα 25% περίπου φέρει μεταλλάξεις στο γονίδιο MUTYH στο χρωμόσωμα 1 (15 εξώνια). Η νόσος κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα, δηλαδή χρειάζονται 2 αντίγραφα του μεταλλαγμένου γονιδίου για να νοσήσει ένα άτομο και οι γονείς του είναι ασυμπτωματικοί φορείς της νόσου. Οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο MUTYH έχουν κλινική εικόνα παρόμοια με την ηπιότερη μορφή της οικογενούς πολυποδίας.

Τα κριτήρια επιλογής των ατόμων για ανάλυση των APC και MUTYH γονιδίων είναι τα παρακάτω:

- Ιστορικό καρκίνου του παχέος εντέρου και ορθού, σε συγγενείς ΕΞ αίματος και σε ηλικία <50 ετών.
- Ιστορικό με πολύποδες στο έντερο σε ηλικία <50 ετών στην οικογένεια ή στο υπό εξέταση άτομο.
- Οικογενειακό ιστορικό με ελκώδη κολίτιδα.
- Εάν έχουν παρατηρηθεί στο υπό εξέταση άτομο συμπτώματα όπως εύκολη κόπωση, αδυναμία, αλλαγή στις συνήθειες του εντέρου, διάρροια ή δυσκοιλιότητα,

Πίνακας 1	Κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου στους φορείς μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA1 και BRCA2	
Τύπος καρκίνου	Πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου	
Μαστού	50%-85% (μέχρι ηλικία 85)	
Ωοθηκών / σαλπίγγων / πρωτοπαθής καρκίνος περιτοναίου	25%-50%	
Παχέος εντέρου	Ίσως ελαφρά αυξημένος	
Ενδομητρίου	Μέσος	
Νεφρού/Ουροφόρων οδών	Μέσος	
Παγκρέατος	Ελαφρά αυξημένος	
Λεπού Εντέρου	Μέσος	

ερυθρό ή σκούρο αίμα στα κόπρανα, απώλεια βάρους, κοιλιακά άλγη, κωλικοί, φούσκωμα.

► Εάν υπάρχει στην οικογένεια ιστορικό με καρκίνο του μαστού ή της μήτρας.

Κληρονομικός χωρίς πολυποδίαση καρκίνος του παχέος εντέρου (HNPCC) ή σύνδρομο Lynch

Στις οικογένειες με σύνδρομο Lynch εντοπίζονται πάσχοντες σε όλες τις γενιές, και σε νεαρή ηλικία. Ορισμένοι απ' αυτούς τους ασθενείς έχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν και άλλες μορφές καρκίνου (βλέπε πίνακα 2). Η συχνότητα εμφάνισης του συνδρόμου Lynch είναι 1%-2% των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου πριν από την ηλικία των 60 ετών.

Οι όγκοι που αναπτύσσονται σε άτομα οικογενειών με HNPCC προκαλούνται κατά κύριο λόγο από μεταλλάξεις στα γονίδια MLH1, MSH2, MSH6 υπεύθυνα για την επιδιόρθωση στο DNA (Mismatch Repair genes - MMR). Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια αναλογούν στο 90% περίπου των οικογενειών (60%, 30%, 7%-10% αντιστοίχως) που έχουν κλινικά διαγνωστεί με σύνδρομο Lynch. Σπανιότερα ανιχνεύονται μεταλλάξεις στα PSM2 και EPCAM γονίδια.

Οι μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια δίνουν χαρακτηρι-

στική εικόνα στα καρκινικά κύτταρα που ονομάζεται μικροδορυφορική αστάθεια (MicroSatellite Instability-MSI). Ο έλεγχος για MSI γίνεται σύμφωνα με τα κριτήρια της Bethesda και είναι σημαντικό κριτήριο βάσει του οποίου επιλέγεται ο έλεγχος μεταλλάξεων στα MMR γονίδια.

Για τη γενετική διερεύνηση ατόμων ύποπτων για σύνδρομο Lynch είναι τα γνωστά κριτήρια της Bethesda και τα κριτήρια του Amsterdam II. Τα μεν έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία, τα δε μεγαλύτερη ειδικότητα. Σύμφωνα με αυτά:

► Πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον τρεις ασθενείς στη ίδια οικογένεια με διαγνωσμένο καρκίνο των οποίων η ιστολογική εξέταση τους κατατάσσει στους καρκίνους που συνδέονται με το σύνδρομο Lynch.

► Πρέπει να υπάρχουν περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου ανάμεσα σε συγγενείς 1ου βαθμού σε δυο τουλάχιστον γενεές.

► Πρέπει σε τουλάχιστον μία από τις περιπτώσεις αυτές η διάγνωση να έχει γίνει πριν από την ηλικία των 50 ετών.

► Να έχει χαρακτηριστεί ο όγκος, έπειτα από βιοψία, με έλεγχο μικροδορυφορικής αστάθειας MSI.

Πρόσφατα αναπτύχθηκε το μαθηματικό μοντέλο IPREMM 1,2,6M για τον αριθμητικό υπολογισμό πιθανοτήτων ύπαρξης συνδρόμου Lynch, του οποίου η ευαισθη-

Πίνακας 2 Κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου στα σύνδρομο Lynch και οικογενούς πολυποδίασης του παχέος εντέρου				
Τύπος καρκίνου	Κίνδυνος γενικού πληθυσμού	Σύνδρομο Lynch		Σύνδρομο οικογενούς πολυποδίασης Κίνδυνος
		Κίνδυνος	Μέση ηλικία διάγνωσης	
Παχέος εντέρου	5,5%	52%-82%	44-61 ετών	~100% (μέση ηλικία: 39 ετών)
Ενδομητρίου	2,7%	25%-60%	48-62 ετών	Μέσος
Στομάχου	<1%	6%-13%	56 ετών	Μέσος
Ωοθήκης	1,6%	4%-12%	42,5 ετών	Μέσος
Ήπατος / χοληφόρων	<1%	1,4%-4%	Δεν αναφέρεται	Ηπατοβλάστωμα: 1,6%
Νεφρού/ ουροποιητικού	<1%	1%-4%	~55 ετών	Ελαφρά αυξημένος
Λεπού εντέρου	<1%	3%-6%	49 ετών	4 -12% (δωδεκαδάκτυλο, περιοχή φύματος Vater)
Κεντρικού νευρικού συστήματος	<1%	1%-3%	~50 ετών	<1% (συνήθως μυελοβλάστωμα)
Νεοπλασμάτα σμηγματογόνων αδένων	<1%	1%-9%	Δεν αναφέρεται	Δεν αναφέρεται

σία υπερέχει και των κριτηρίων της Bethesda, το οποίο τροφοδοτείται με δεδομένα οικογενειακού ιστορικού καρκίνου συγγενών 1ου και 2ου βαθμού (βλ. σύνδεσμο <http://dana-farber.prod.dfcidev.org/pat/cancer/gastrointestinal/crc-calculator/default.asp>). Τα άτομα των οποίων οι πιθανότητες είναι ίσες ή μεγαλύτερες του 5%, χρήζουν γενετικής αξιολόγησης. Εντούτοις, στα μεγάλα νοσοκομεία των ΗΠΑ κερδίζει διαρκώς έδαφος η τάση για την εφαρμογή διαγνωστικού αλγορίθμου σε όλους τους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και του ενδομητρίου. Συγκεκριμένα, καθιερώθηκε ως έλεγχος ρουτίνας η ανίχνευση δεικτών μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) και η ανοσοϊστοχημική μελέτη του όγκου για έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας MMR (MLH1, MSH2, MSH6 & PMS2). Η απουσία έκφρασης μιας εκ των πρωτεϊνών αυτών ή/και η μικροδορυφορική αστάθεια του όγκου, επιβάλλουν τη γενετική αξιολόγηση του ασθενούς. Εξ αυτών, 1 στους 3 θα αποδειχθεί ότι φέρει το σύνδρομο Lynch.

Με τον τρόπο αυτόν η ανίχνευση των φορέων του συνδρόμου Lynch αγγίζει το 100%. Επιπλέον, σχετικές μελέτες κόστους-αποτελεσματικότητας έχουν δείξει την υπεροχή αυτής της στρατηγικής σε επίπεδο πληθυσμού και ταυτόχρονα τη δυνατότητα μείωσης της νοσηρότητας από καρκίνο του παχέος εντέρου κατά 13,4% και του καρκίνου του ενδομητρίου κατά 8,5%.

Μεθοδολογίες ανίχνευσης μεταλλάξεων και ερμηνεία αποτελεσμάτων-Μοριακή ανάλυση μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI)

Το 70% -85% των βλαβών που εντοπίζονται στα γονίδια που προαναφέρθηκαν, είναι σημειακές μεταλλάξεις ενώ στο υπόλοιπο ποσοστό εντοπίζονται μεγάλες ελλείψεις ή διπλασιασμοί μέρους των γονιδίων. Μεταλλάξεις είναι δυνατό να ανιχνευθούν σε όλο το μήκος των γονιδίων και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητος ο έλεγχος όλων των εξονίων και όχι μόνο μέρους τους.

Υπάρχουν δύο ειδών τεχνικές για την ανίχνευση μεταλλάξεων και στις τρεις περιπτώσεις κληρονομικού καρκίνου που περιγράφονται παραπάνω:

- ▶ Καθορισμός της πρωτοταγούς δομής του DNA (Direct Sequencing) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων.
- ▶ Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μεγάλων ελλείψεων και μεγάλων διπλασιασμών.

Συνήθως γίνεται αρχικά ο καθορισμός της πρωτοταγούς δομής του DNA και, επί αρνητικού αποτελέσματος, γίνεται έλεγχος ελλείψεων και διπλασιασμών με MLPA.

Σημειώνεται ότι ο έλεγχος της μικροδορυφορικής αστάθειας MSI γίνεται με συγκριτική ανάλυση συγκεκριμένων πολυμορφικών δεικτών σύμφωνα με τα κριτήρια της Bethesda ανάμεσα στο DNA που απομονώνεται από τον όγκο και το DNA που απομονώνεται από το περιφερικό αίμα του ασθενούς.

Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης υπάρχει περίπτωση να ανιχνευθούν:

1. Γνωστές και καλά χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις, οι οποίες συνδέονται με τη νόσο ή νέες μεταλλάξεις που η θέση τους και το είδος τους με σαφήνεια οδηγούν σε δυσλειτουργία του γονιδίου και είναι η αιτία της νόσου (παθολογική μετάλλαξη).
2. Πολυμορφισμοί, οι οποίοι θεωρούνται φυσιολογικές παραλλαγές καθώς απαντούνταν και στο γενικό πληθυσμό και δεν έχουν καμία κλινική σημασία.
3. Ακατηγοριοποίητες παραλλαγές των οποίων η θέση και το είδος δεν είναι σαφές εάν προκαλούν δυσλειτουργία του γονιδίου και για το λόγο αυτό θεωρούνται παραλλαγές αγνώστου κλινικής σημασίας (mutations of clinical insignificance) και στην περίπτωση αυτήν η μελέτη άλλων υγιών και πασχόντων ατόμων της οικογένειας μπορεί να βοηθήσει στην αποσαφήνιση της κλινικής σημασίας της παραλλαγής αυτής.

Για την επιλογή της κατάλληλης εργαστηριακής διαγνωστικής προσέγγισης και της σωστής ερμηνείας των αποτελεσμάτων από τον εργαστηριακό γενετιστή είναι απαραίτητο να παρέχονται από τον κλινικό ιατρό ή από τον κλινικό γενετιστή όλες οι πληροφορίες του οικογενειακού ιστορικού του ασθενούς. Όπου αυτό είναι εφικτό, είναι προτιμότερο ο μοριακός έλεγχος για την ύπαρξη ή όχι κάποιας μετάλλαξης στα γονίδια αυτά να γίνεται αρχικά σε πάσχον μέλος της οικογένειας. Στη συνέχεια, εφόσον ανιχνευθεί βλάβη, μπορεί να γίνει μοριακός έλεγχος σε όποια από τα υγιή μέλη της οικογένειας το επιθυμούν (προσυμπτωματικός έλεγχος) ώστε να διαπιστωθεί εάν είναι φορείς της μετάλλαξης. Στην περίπτωση όπου δεν είναι εφικτός ο έλεγχος σε πάσχον μέλος της οικογένειας, η μη ανίχνευση μετάλλαξης σε κάποιο από τα γονίδια σε υγιές μέλος της οικογένειας δεν συνεπάγεται πάντα απουσία κληρονομούμενης μετάλλαξης στην οικογένεια.

Πρόσφατα άρχισε να εφαρμόζεται σε ειδικές περιπτώ-

σεις μια νέας γενιάς μέθοδος, η οποία ονομάζεται next generation sequencing και είναι μια μέθοδος ανίχνευσης μεταλλάξεων νέας γενιάς, με την οποία είναι δυνατή η ανίχνευση πολλών γονιδίων συγχρόνως. Αναπτύσσονται λοιπόν νέα πρωτόκολλα ανίχνευσης ομάδων γονιδίων όπως αυτά για τους γυναικολογικούς καρκίνους, όπου 18 γονίδια εκτός των BRCA1/2 μελετώνται (ATM, BARD1, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PMS2, PTEN, RAD50, RAD51C, STK11 και TP53) ή για τον καρκίνο του παχέος εντέρου με 14 γονίδια (APC, BMPR1A, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS2, PTEN, SMAD4, STK11 και TP53). Ο προγεννητικός έλεγχος, καθώς και η προεμφυτευτική διάγνωση (PGD) είναι εφικτά εάν είναι γνωστή η μετάλλαξη της οικογενείας, παρ' όλα αυτά, λόγω του ότι πρόκειται σε ορισμένες περιπτώσεις, για νόσηματα που εμφανίζονται σε μεγαλύτερη ηλικία (εφηβεία κ.λπ.) η οικογένεια σκόπιμο είναι να δεχθεί γενετική συμβουλή πριν ληφθούν σημαντικές αποφάσεις για την απόκτηση παιδιού που δεν θα πάσχει.

Στρατηγικές μείωσης κινδύνου/πρόληψης σε οικογένειες με κληρονομική προδιάθεση

Η διαδικασία της γενετικής αξιολόγησης και του γονιδιακού ελέγχου προσφέρει πολύ περισσότερα από την απάντηση του ερωτήματος που απασχολεί συχνά τους καρκινοπαθείς: γιατί σε μένα; Σήμερα είναι τεκμηριωμένη η αποτελεσματικότητα διαφόρων στρατηγικών μείωσης κινδύνου και πρόληψης των συχνότερων μορφών κληρονομικού καρκίνου. Ενδεικτικά αναφέρονται κάποιες κύριες επιλογές οι οποίες συνοψίζονται πιο κάτω με βάση τις σχετικές συστάσεις των διεθνών επιστημονικών εταιρειών (όπως National Comprehensive Cancer Network των ΗΠΑ, European Society of Medical Oncology κ.τ.λ.).

Φορείς παθογόνων μεταλλάξεων γονιδίου BRCA1/2:

- Έναρξη προσυμπτωματικού ελέγχου (screening) των μαστών, με μαστογραφία και μαγνητική μαστογραφία από τα 25 έτη (ή 10 χρόνια νωρίτερα από το πρωιμότερο κρούσμα στην οικογένεια).
- Χημειοπροφύλαξη, δηλαδή προφυλακτική λήψη ταμοξifen επί 5 έτη.
- Προφυλακτική αμφοτερόπλευρη μαστεκτομή (με ή χωρίς τη διατήρηση του δέρματος). Μείωση του κινδύνου για καρκίνο του μαστού κατά 90%-95%.

► Προφυλακτική αμφοτερόπλευρη σαλπινγγοοθηκεκτομή, για πρόληψη καρκίνου ωθηκών/σαλπίγγων (σε ηλικία 35-38 ετών και εφόσον έχει ολοκληρώσει η γυναίκα τα σχέδια τεκνοποίησης).

Προσυμπτωματικός έλεγχος για καρκίνο προστάτη, παγκρέατος ή/και κακόηθες μελάνωμα, βασίζονται στο λοιπό οικογενειακό ιστορικό.

Φορείς οικογενούς πολυποδιάσης του παχέος εντέρου:

- Για την κλασική μορφή του FAP (πολυποδιάση σε παιδική ηλικία) συνιστάται προφυλακτική κολεκτομή από την ηλικία περίπου των 12 ετών, καθώς ο κίνδυνος ΚΠΕ ως την ηλικία των 45 ετών αγγίζει το 100%.
- Επίσης, για την πρόληψη εξωεντερικών νεοπλασμάτων συνιστάται τακτικός έλεγχος του ανωτέρου πεπτικού (έλεγχος στομάχου και δωδεκαδακτύλου) από την ηλικία των 20 περίπου ετών και επανάληψη ανά 1-3 έτη, με βάση τα ευρήματα.
- Στην περίπτωση ήπιας μορφής του συνδρόμου (aFAP), συνιστάται ετήσιος ενδοσκοπικός έλεγχος του κατώτερου και ανωτέρου πεπτικού. Αν ευρίσκεται μεγάλος αριθμός πολυπόδων, είναι εύλογη και η συζήτηση για το ενδεχόμενο της προφυλακτικής κολεκτομής.

Φορείς συνδρόμου Lynch

- Για υγιείς φορείς: έναρξη προσυμπτωματικού ελέγχου με κολονοσκόπηση σε ηλικία 25 ετών ή 10 έτη πριν από το πρωιμότερο κρούσμα καρκίνου στην οικογένεια.
- Για νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με εξαιρέσιμο ΚΠΕ και δεδομένου ότι ο κίνδυνος για νέο πρωτοπαθή ΚΠΕ είναι υψηλός, πρέπει να εξετάζεται σοβαρά και η επιλογή της υφολικής κολεκτομής. Σε αυτούς τους ασθενείς και εντός δεκαετίας από την αρχική διάγνωση, μόλις το 3% αυτών που επιλέγουν υφολική κολεκτομή εμφανίζει νέο ΚΠΕ έναντι 16% των ασθενών που επιλέγουν εκτομή του πάσχοντος τμήματος.
- Ενδοσκοπικός έλεγχος ανώτερου πεπτικού κατά τη διάγνωση του συνδρόμου και εν συνεχεία επανάληψη με βάση τα ευρήματα.
- Έλεγχος του ουροποιητικού (με απεικόνιση και κυτταρολογική εξέταση ούρων).
- Απεικονιστικός έλεγχος παγκρέατος, εφόσον υπάρχει σχετικό ιστορικό.
- Οι γυναίκες θα πρέπει επιπροσθέτως να κάνουν ετήσιο γυναικολογικό έλεγχο.

Abstract

Florentin L, Lypas G. The genetics of cancer. Iatrika Analekta 2012; 3: 718-723

Approximately 5%-10% of all cancers are hereditary, which means that changes in specific genes are passed from one blood relative to another. Individuals who inherit these altered genes will have a higher possibility of developing cancer within their lifespan. Some of the most common types of inherited cancer is hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC), caused by mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes. Hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC) or Lynch Syndrome is also common and is characterized by early age onset colorectal cancer and endometrial cancer caused by mutations in DNA mismatch repair genes (MLH1, MSH2, MSH6 or PMS2) followed by familial adenomatous polyposis (FAP) which is a colon cancer predisposition syndrome in which hundreds to thousands of called adenomas develop in the gastrointestinal tract and are associated with mutations in the APC and MUTYH gene (in attenuated-FAP). Molecular techniques like MLPA, sequencing or lately next generation sequencing, help to diagnose, understand oncogene role and function in cancer and assess accurately patients' cancer risk and therapeutic intervention. Nowadays, careful multidisciplinary team approach including oncologists, clinical geneticists, laboratory geneticists, histopathologists, radiologists etc can help a lot of patients and their families to deal and eventually overcome cancer.

Βιβλιογραφία

1. Pistorius S, Gorgens H, Plaschke J, et al. *Genomic rearrangements in MSH2, MLH1 or MSH6 are rare in HNPCC patients carrying point mutations*. Cancer Lett. 2007 8; 248: 89-95.
2. Kurzawski G, Suchy J, Lener M, et al. *Germline MSH2 and MLH1 mutational spectrum including large rearrangements in HNPCC families from Poland (update study)*. Clin Genet. 2006; 69: 40-47.
3. Schneider R, Fürst A, Moslein G. *Lynch syndrome-epidemiology, clinical features, molecular genetics, screening, therapy*. Z Gastroenterol. 2012; 50: 217-225.
4. Nielsen M, Bik E, Hes FJ, et al. *Genotype-phenotype correlations in 19 Dutch cases with APC gene deletions and a literature review*. Eur J Hum Genet. 2007; 15: 1.034-1.042.
5. Auranen A, Joutsiniemi T. *A systematic review of gynecological cancer surveillance in women belonging to hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) families*. Acta Obstet Gynecol Scand. 2011; 90: 437-444.
6. Ewald IP, Ribeiro PL, Palmero EI, et al. *Genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2: A literature review*. Genet Mol Biol. 2009; 3: 437-446.
7. Venkatachalam R, T.P. Verwiell, et al. *Identification of candidate predisposing copy number variants in familial and early-onset colorectal cancer patients*. Intern J Cancer 2011; 129: 1.635-1.642.
8. Penegar S, Wood W, Lubbe S, et al. *National study of colorectal cancer genetics*. Br J Cancer. 2007; 97: 1.305-1.309.

Η κλινική γενετική στην καθημερινή ιατρική πράξη

Στέλλα Αμέντα-Κυριαζή, MD, PhD
Παιδιατρική Κλινική ΜΗΤΕΡΑ
amenta@hol.gr

Η κλινική γενετική αποτελεί έναν από τους πιο γοητευτικούς και πλέον εξελισσόμενους τομείς της ιατρικής και της βιολογίας του 20ού αιώνα. Ασχολείται με κληρονομούμενα νοσήματα και διαμαρτίες διάπλασης/συγγενείς ανωμαλίες. Στοχεύει στην προγεννητική διάγνωση και στην πρόληψη/αποφυγή εμφάνισης αυτών των νοσημάτων. Στοχεύει επίσης στη βελτίωση της ποιότητας ζωής και στην αποφυγή των μακροπρόθεσμων επιπλοκών στους ήδη πάσχοντες. Επίσης προσφέρει συμβουλευτική στα υγιή μέλη της οικογένειας του πάσχοντος που είναι σε κίνδυνο να εμφανίσουν τη νόσο.

Η συχνότητα εμφάνισης συγγενών ανωμαλιών υπολογίζεται στο 2%-4% των ζώντων εμβρύων και ευθύνεται για το 1/3 των εισαγωγών στα παιδιατρικά νοσοκομεία εξαιτίας των επιπλοκών που εμφανίζουν. Η προγεννητική διαπίστωση πάσχοντος εμβρύου αποτελεί βαρύ φορτίο τόσο για τους γονείς όσο και για το προσωπικό που θα εμπλακεί στη διάγνωση, αλλά και στη γενετική καθοδήγηση. Σε περίπτωση πάσχοντος εμβρύου είναι αναγκαία η χρήση των υπηρεσιών προγεννητικής διάγνωσης, ώστε να βοηθηθεί η οικογένεια να λάβει την καλύτερη δυνατή απόφαση με βάση το νόσημα, αλλά και τις ιδιαιτερότητες της (ηλικία μητέρας, ιστορικό αποβολών κ.λπ.). Επίσης, σε επόμενη κύηση πρέπει να υπάρχει επαρκής έλεγχος ώστε να αναπτυχθεί υγιές έμβρυο αν αυτό είναι εφικτό. Εφόσον η οικογένεια επιλέξει να διατηρήσει την εγκυμοσύνη, πρέπει να εξασφαλιστεί η καλύτερη δυνατή με βάση τα σημερινά δεδομένα παρακολούθηση (follow-up) με στόχο την αποφυγή απώτερων επιπλοκών για το πάσχον έμβρυο. Η αποδοχή του πάσχοντος παιδιού και η πρόωπη παρέμβαση επιτυγχάνουν την εκπαίδευση και την αξιοποίηση του όποιου δυναμικού του, με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Επιβάλλεται να βοηθηθούν οι οικογένειες να ξεπεράσουν τα συναισθήματα άρνησης, ενοχής, θυμού, απομόνωσης και λύπης, τα οποία εναλλάσσονται μετά τη διάγνωση ενός χρόνιου νοσήματος για το οποίο δεν προσφέρεται προς το παρόν θεραπεία. Μία από τις ιδιαιτερότητες της κλινικής γενετικής είναι ότι απευθύνεται τόσο στον πάσχοντα όσο και στην ευρύτερη οικογένειά του. Κάποιες φορές η διάγνωση επηρεάζει τον οικογενειακό προγραμματισμό

του πάσχοντος, αλλά και των αδελφών του, όπως την αδελφή άρρενος πάσχοντος από φιλοσύνδετο νόσημα. Η ολιστική προσέγγιση που απαιτείται προϋποθέτει τη συνεργασία κλινικών ιατρών, κυτταρογενετιστών, μοριακών βιολόγων, συμβούλων γενετικής, αλλά και ερευνητών που συνεργάζονται και λειτουργούν ως ομάδα. Η προσέγγιση οφείλει να είναι συστηματική και να γίνεται σε βήματα, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Οικογενειακό ιστορικό

Η προσεκτική και ενδελεχής λήψη του οικογενειακού ιστορικού ακολουθείται από τη δημιουργία ενός γενεαλογικού δέντρου, που θα βοηθήσει στην ανίχνευση του τρόπου μεταβίβασης του νοσήματος. Απαιτείται πείρα και τέχνη, ώστε να απομονώσει ο σύμβουλος γενετικής τα γεγονότα από τους μύθους που έχουν διατηρηθεί μέσα στην οικογένεια. Είναι φορές που θα αναζητήσει φωτογραφίες των γονέων για να εξασφαλίσει την αντικειμενική αλήθεια και να ξεκαθαρίσει ποια από αυτά που εντοπίζονται στο παιδί είναι οικογενή χαρακτηριστικά και ποια θα αξιολογηθούν. Πρέπει να αναζητήσει, διακριτικά, τυχόν συγγένεια μεταξύ των γονέων. Πρέπει να εκμαιεύσει πληροφορίες για αυτόματες αποβολές και θνησιγενή έμβρυα.

Γενεαλογικό δένδρο

Ο σχεδιασμός ενός γενεαλογικού δένδρου μπορεί να αποκαλύψει:

- ▶ Νόσο μεταβιβαζόμενη με αυτόσωμο επικρατούντα χαρακτήρα με πλήρη ή ατελή διεισδυτικότητα.
- ▶ Υπολειπόμενο χαρακτήρα μεταβίβασης.
- ▶ X-linked φυλοσύνδετη επικρατούσα ή υπολειπόμενη.
- ▶ Μιτοχονδριακή κληρονομικότητα.
- ▶ Πολυπαραγοντική κληρονομικότητα.
- ▶ Τυχαιο συμβάν μη γενετικής αιτιολογίας.

Ατομικό ιστορικό - Κλινική εξέταση

Θα ακολουθήσει λήψη του προγεννητικού, αλλά και περιγεννητικού ατομικού ιστορικού και, εφόσον πρόκειται για μεγαλύτερο παιδί, του αναπτυξιακού ιστορικού (πότε στήριξε το κεφάλι, πότε κάθισε, πότε βάδισε, πότε μίλησε

και αν μπορεί να παρακολουθήσει κανονικό σχολείο). Η αντικειμενική εξέταση θα συμπεριλάβει την «κατά συστήματα» εξέταση, σωματομετρικές μετρήσεις, καταγραφή της παρουσίας ή όχι δυσμορφικών χαρακτηριστικών (διακρίνονται σε μείζονα και ελάσσονα). Η παρουσία άνω των τριών ελασσόνων θα καταστήσει αναγκαίο τον περαιτέρω έλεγχο για εύρεση τυχόν μειζόνων συγγενών ανωμαλιών (π.χ. καρδιοπάθειας) και την επανεξέταση του παιδιού.

Προϋποθέτει συνήθως τη συνεργασία μεταξύ των κλινικών ιατρών διαφόρων ειδικοτήτων και επαρκή γνώση του τρόπου που προβάλλουν τα γενετικά νοσήματα σε κάθε ειδικότητα, ώστε να τεθεί έγκαιρα η υποψία και να παραπεμφθούν τα άτομα στον κλινικό γενετιστή ώστε να φθάσουμε από το σύμπτωμα στη διάγνωση. Σε ένα παιδί που εμφανίζει καρδιοπάθεια ο καρδιολόγος θα πρέπει να διευκρινίσει αν πρόκειται για συνδρομική ή μη μορφή και αν συνοδεύεται από άλλες συγγενείς ανωμαλίες. Συχνά απαιτούνται παραπομπές από τον κλινικό γενετιστή σε άλλες ειδικότητες. Σε ένα παιδί με υποτονία ή υπέρτονια, είναι απαραίτητη η νευρολογική εκτίμηση. Ένας νευρολόγος που υποψιάζεται γενετικό νόσημα (νόσος Huntington) θα παραπέμψει το παιδί στο γενετιστή. Σε ένα παιδί με σκελετική δυσπλασία η διάγνωση θα τεθεί μαζί με τον ορθοπαιδικό. Σε έναν οφθαλμολογικό έλεγχο που θα αποκαλύψει εκτοπία φακού θα πρέπει να αποκλειστεί το σύνδρομο Marfan. Σε ένα παιδί με διαταραχή ακοής ή δυσπλασία ώτων πρέπει να γίνει και έλεγχος ουροποιητικού. Σε κάθε περίπτωση που ο ενδοκρινολόγος υποψιάζεται πολυπαραγοντικό νόσημα, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, ή ο παιδίατρος συγγενή υπερχοληστερολαιμία, θα πρέπει να κάνει τις αναγκαίες εξετάσεις που θα επιβεβαιώσουν τη διάγνωση, να δώσει την κατάλληλη αγωγή, αλλά να συνεργαστεί και με τον κλινικό γενετιστή, ώστε να παρέχουν από κοινού προσυμπτωματικό έλεγχο στα μέλη της ευρύτερης οικογένειας που ενδιαφέρονται.

Επίσης οι κλινικοί ιατροί πρέπει να γνωρίζουν ότι ο φαινότυπος μιας γενετικής διαταραχής είναι εξελισσόμενος (evolving phenotype), άρα είναι ευκολότερη η διάγνωση και η εργαστηριακή επιβεβαίωση καθώς ολοκληρώνεται η κλινική εικόνα, γεγονός που καθιστά αναγκαία την επανεξέταση. Ο ίδιος φαινότυπος μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικές γενετικές βλάβες (διαφορετικούς γονότυπους), αλλά και η ίδια γενετική βλάβη (γονότυπος) να οδηγεί σε διαφορετικούς φαινότυπους, γεγονός που καθιστά τη

διάγνωση δύσκολη και απαιτεί την ομαδική προσέγγιση.

Διαγνωστικές εξετάσεις

Στη συνέχεια, με σκοπό την επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης, εφόσον υπάρχει και αφού ληφθεί ο ενδεδειγμένος κατά περίπτωση εργαστηριακός έλεγχος (βιοχημικός, ορολογικός, ενζυμικός, ακτινολογικός κ.λπ.) θα χρειαστεί εξειδικευμένος γενετικός (χρωμοσωματικός, μοριακός κ.λπ.) έλεγχος με σκοπό να διαγνωστεί:

- Χρωμοσωματική ανωμαλία.
- Σύνδρομο μικροελλείμματος.
- Σύνδρομο επέκτασης τρινουκλεοτιδίων.
- Μονογονιδιακό νόσημα.

Θα ληφθεί ένας καρυότυπος με σκοπό να αποκλειστούν χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Αν αυτός αποδειχθεί φυσιολογικός, θα γίνει στοχευμένος έλεγχος για σύνδρομα μικροελλειμμάτων, εφόσον βέβαια η κλινική εικόνα ή τα υπερηχογραφικά ευρήματα (αν πρόκειται για προγεννητικό έλεγχο) είναι συμβατά με μια τέτοια διάγνωση

Στα σύνδρομα μικροελλειμμάτων περιλαμβάνονται τα:

Wolf-Hirschhorn	4p16
Williams- Beuren	7q11.23
Angelman	15q11-q13
Prader-Willi	15q11-q13
Miller-Dieker	17p13
Smith Magenis	17p11.2
DiGeorge	22q11

Εφόσον υπάρχει κλινική υπόνοια νοσήματος που οφείλεται σε επέκταση τρινουκλεοτιδίων, αυτή επιβεβαιώνεται με συγκεκριμένη τεχνική. Η αναζήτηση μοριακής βλάβης διά της νέας τεχνικής του μοριακού καρυοτύπου, άνοιξε καινούρια μονοπάτια στον έλεγχο των γενετικών νοσημάτων. Η ερμηνεία των ευρημάτων είναι βέβαια ιδιαίτερα πολύπλοκη και προϋποθέτει γνώση, εξειδίκευση και πείρα. Η δυσκολία γίνεται ακόμα μεγαλύτερη όταν εφαρμόζεται στο πλαίσιο προγεννητικού ελέγχου. Οι διαθέσιμες βάσεις δεδομένων ενίοτε βοηθούν στην επεξήγηση των αποτελεσμάτων.

Εφόσον η κλινική εικόνα είναι χαρακτηριστική και έχει αναγνωρισθεί συγκεκριμένη οντότητα αναζητούνται στοχευμένα γνωστές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια, για τα οποία είναι γνωστό ότι ευθύνονται για την εμφάνιση μονογονιδιακών νοσημάτων. Οι εργαστηριακές εξετάσεις

καθώς περνούν τα χρόνια καθίστανται οικονομικότερες αλλά παραμένουν εξειδικευμένες και δαπανηρές και πρέπει να γίνονται με σύνεση.

Συζήτηση

Τα γενετικά νοσήματα μπορεί να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε ηλικία και να επηρεάσουν οποιοδήποτε σύστημα. Ο κατάλογος των νοσημάτων που γεφυρώνουν την κλινική γενετική με τις υπόλοιπες ειδικότητες είναι ατέλειωτος και όσο περνούν τα χρόνια θα επεκτείνεται, καθώς αναγνωρίζεται η γενετική βάση όλο και περισσότερων νοσημάτων. Στόχος όλων είναι η πρόληψη εμφάνισης αυτών των νοσημάτων και, αν αυτό δεν επιτευχθεί, η θεραπευτική αντιμετώπισή τους ή η βελτίωση της ποιότητας ζωής των πασχόντων και των οικογενειών τους.

Προϋπόθεση για τα παραπάνω είναι η έγκαιρη διάγνωση. Αυτή βοηθά στην καλύτερη αντιμετώπιση του πάσχοντος, τον προφυλάσσει από δαπανηρές και απρόσφορες εξετάσεις, προσφέρει προγεννητική διάγνωση σε επόμενη κύηση και συμβουλευτική στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας. Αφού τεθεί και επιβεβαιωθεί η διάγνωση

εργαστηριακά, πρέπει να δίνεται η ευκαιρία στην οικογένεια να επικοινωνεί με άλλες οικογένειες που έχουν το ίδιο νόσημα, με σκοπό να μοιράζονται εμπειρίες και να αναζητούν ψυχική υποστήριξη. Για το σκοπό αυτόν έχουν ιδρυθεί σύλλογοι πασχόντων. Πολλά υποσχόμενη και με απτά κλινικά αποτελέσματα είναι η φαρμακογονιδιοματική ή εξατομικευμένη-στοχευμένη θεραπεία, που στόχο έχει την καλύτερη δυνατή επιλογή φαρμάκου με βάση το γονότυπο του ατόμου (εφαρμόζεται ήδη σε αντιπηκτική αγωγή, άσθμα, θεραπεία κακοθειών).

Αποτελεί ευχή όλων να είναι δυνατή στο μέλλον η γονιδιακή θεραπεία ή έστω η βελτίωση της κλινικής εικόνας όπως συμβαίνει σήμερα σε ερευνητικό επίπεδο στην ινοκυστική νόσο (G551D μετάλλαξη) και τη μυϊκή δυστροφία Duchenne. Παρά τον αρχικό ενθουσιασμό και την ελπίδα που έδωσε στους πάσχοντες και τις οικογένειές τους, η γονιδιακή θεραπεία δεν έχει μέχρι στιγμής εφαρμογή στην κλινική πράξη. Η γονιδιακή θεραπεία θα αποτελέσει την πρόκληση για τους μελλοντικούς ερευνητές, αφού οι σημερινοί θα έχουν ολοκληρώσει την πλήρη ανάγνωση του γενετικού μας κώδικα.

Abstract

Amenta S. The role of clinical genetics in medicine. Iatrika Analekta 2012; 3: 724-726

Clinical genetics is one of the most exciting and dynamic areas in medicine. It requires the co-operation between all subspecialties involved in the field of Medical Genetics and the integration of the scientific knowledge that results from the rapid developments in technology. Genetic knowledge, and hopefully gene therapy, will underpin much of medical practice in the near future.

Βιβλιογραφία

1. Rimoin DC, Connor JM, Pyeritz RE, et al. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. 5th edn. 2006; Churchill Livingstone, Edinburgh.
2. Hennekam RCM, Krantz ID, Allanson JE. *Gorlin's Syndrome of the Head and Neck*. 5th edn. 2010; Oxford University Press, Oxford.
3. Cassidy SB and Allanson JE. *Management of Genetic Syndromes*, 3rd edn. 2010; Wiley-Blackwell, Oxford.
4. Hoffmann GF, Zschocke J, Nyhan WL. *Inherited Metabolic Diseases, a clinical approach*. 2010; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
5. Harper PS, Arnold H. *Practical Genetic Counselling*. 6th edn. 2004; Hodder Headline Group, London.
6. Read A. and Donnai D. *New Clinical Genetics*. 2nd edn. 2011; Scion Publishing Ltd, Banbury, UK.

Γενετική συμβουλευτική

Λουκία Κατσιχτη, MS, PhD
Σύμβουλος Γενετικής ΜΗΤΕΡΑ
katsihti@otenet.gr

Γενετική συμβουλευτική είναι η διαδικασία επικοινωνίας μέσα από την οποία παρέχεται ενημέρωση:

- α) σε θέματα διάγνωσης, πρόγνωσης και αντιμετώπισης της νόσου,
- β) στον τρόπο κληρονομικής μεταβίβασης της νόσου και της πιθανότητας επανεμφάνισής της, και
- γ) στις εναλλακτικές επιλογές για την αντιμετώπιση πιθανών προβλημάτων και στην παροχή συμβουλής για την επιλογή της προσφορότερης λύσης. Ο κλάδος που ασχολείται με αυτή ονομάζεται γενετική συμβουλευτική (genetic counseling).

Η γενετική συμβουλευτική είναι χρήσιμη σε κάθε ζευγάρι μελλοντικών γονέων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου κατά τη διάρκεια της κύησης αναφέρεται ιστορικό κληρονομικών νόσων ή προκύπτει οποιαδήποτε άλλη ένδειξη που συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για συγγενείς ανωμαλίες ή νοτική στέρηση (πίνακας 1). Επίσης η γενετική συμβουλευτική είναι απαραίτητη σε συνεργασία με τον

κλινικό γενετιστή στις οικογένειες πασχόντων και στους ίδιους τους πάσχοντες (πίνακας 2).

Διαδικασία γενετικής συμβουλευτικής

Η διαδικασία της γενετικής συμβουλής χωρίζεται κυρίως σε δύο στάδια, στο αρχικό και στο τελικό. Στο αρχικό στάδιο συμπεριλαμβάνονται η γενική εκτίμηση προσωπικότητας των ενδιαφερομένων, η λήψη οικογενειακού ιστορικού, η διάγνωση, η εκτίμηση κινδύνου επανεμφάνισης προβλήματος και η ενημέρωση των ενδιαφερομένων. Στο τελικό στάδιο συμπεριλαμβάνονται η ψυχική υποστήριξη και η παρακολούθηση.

Στην εκτίμηση κινδύνου σημαντικότερο ρόλο παίζει η λήψη του οικογενειακού ιστορικού. Η καταγραφή του οικογενειακού ιστορικού μπορεί να γίνει πολύ σύντομα με σύμβολα που χρησιμοποιούνται διεθνώς στη γενετική (πίνακας 3). Με αυτόν τον τρόπο πληροφορίες που αφορούν σε όλα τα μέλη της οικογένειας συνοψίζονται

Πίνακας 1	Ενδείξεις γενετικής συμβουλευτικής κατά τη διάρκεια της κύησης
	Προχωρημένη αναπαραγωγική ηλικία μητέρας (35 ετών και άνω)
	Ενδεικτικές ανιχνευτικές εξετάσεις (π.χ. αυχενική διαφάνεια, βιοχημικοί δείκτες ορού, υπερηχογραφικά ευρήματα)
	Ιστορικό κληρονομικών νόσων
	Ιστορικό νοτικής στέρησης
	Ιστορικό αποβολών
	Συγγένεια ανάμεσα στους γονείς
	Έκθεση σε τερατογόνους παράγοντες (φάρμακα, ακτινοβολία, λοιμώξεις)
	Εξωσωματική γονιμοποίηση

Πίνακας 2	Ενδείξεις γενετικής συμβουλευτικής μετά τη γέννηση πάσχοντος
	Συγγενείς ανατομικές ανωμαλίες
	Μεταβολικά νοσήματα
	Νοτική στέρηση
	Νευρολογικές/νευρομυϊκές παθήσεις
	Καρκίνοι, καρδιοπάθειες καρδιαγγειακές και ενδοκρινικές νόσοι

γραφικά. Παράδειγμα οικογενειακού δένδρου φαίνεται στο σχήμα 1.

Ψυχολογία και γενετική συμβουλευτική

► Προγεννητικός έλεγχος και ψυχικές επιπτώσεις

Η περίοδος της εγκυμοσύνης δημιουργεί στους μελλοντικούς γονείς, και ιδιαίτερα στη μελλοντική μητέρα, πολλά και ανάμικτα συναισθήματα. Η μητέρα προετοιμάζεται για να αποκτήσει ένα τέλειο παιδί, ενώ παράλληλα διακατέχεται από μεγάλη ανασφάλεια και φοβίες. Η μελλοντική μητέρα συχνά αισθάνεται μεγάλη ευθύνη. Ευθύνη απέναντι στο αναπτυσσόμενο έμβρυο, ευθύνη απέναντι στον κλειστό οικογενειακό κύκλο, αλλά και ευθύνη απέναντι στο ευρύ κοινωνικό σύνολο.

► Ψυχολογία σε φυσιολογικές κυήσεις

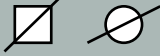
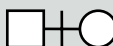
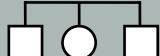
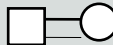
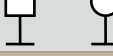
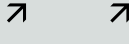
Θεωρητικά, οι ραγδαίες εξελίξεις στον προγεννητικό έλεγχο θα έπρεπε να «ελαφρύνουν» τη μελλοντική μητέρα από το βάρος της ευθύνης. Παρ' όλα αυτά, όμως, τις περισσότερες φορές φαίνεται ότι η επιλογή του προγεννητικού ελέγχου δημιουργεί επιπρόσθετο άγχος. Κύριοι παράγοντες γι' αυτό μπορεί να είναι: 1) η ελλιπής ενημέρωση και 2) τα μειονεκτήματα του προγεννητικού ελέγχου, δηλαδή το δίλημμα για την επιλογή ή όχι επεμβατικής διαγνωστικής εξέτασης, που όμως εμπεριέχει κίνδυνο επιπλοκών και κυρίως αποβολής, και επίσης το γεγονός ότι συχνά με τις υπάρχουσες μεθόδους η διάγνωση προβλήματος γίνεται στο δεύτερο τρίμηνο, όταν η απόφαση για τη συνέχιση ή όχι της εγκυμοσύνης γίνεται πολύ δύσκολη και οι ψυχικές συνέπειες είναι μεγάλες.

► Ψυχολογία σε διάγνωση ανωμαλιών

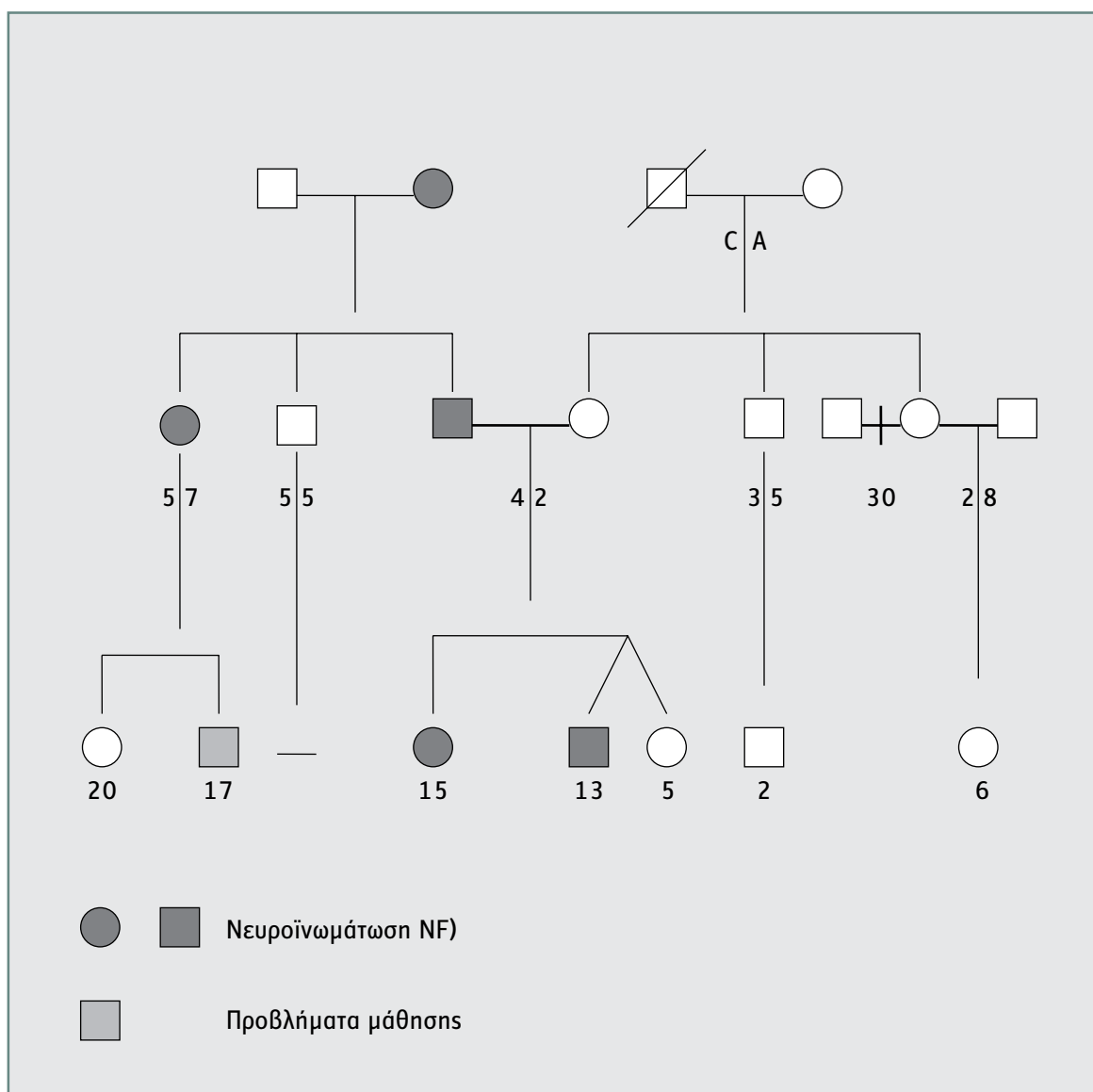
Η κατάσταση γίνεται ακόμα πιο δύσκολη όταν μέσω του προγεννητικού ελέγχου υπάρξει διάγνωση εμβρυϊκής ανωμαλίας. Σ' αυτές τις περιπτώσεις το όνειρο του τέλειου παιδιού χάνεται και οι μελλοντικοί γονείς καλούνται να πάρουν την απόφαση για διακοπή ή συνέχιση της εγκυμοσύνης.

► Διακοπή εγκυμοσύνης

Η απόφαση για διακοπή της εγκυμοσύνης λόγω εμβρυϊκής ανωμαλίας είναι τραυματική εμπειρία, που οδηγεί τους μελλοντικούς γονείς σε απόγνωση και απομόνωση. Απόγνωση γιατί το όνειρο της μητρότητας/πατρότητας, της οικογενειακής ζωής, που παρέχει αγάπη και φροντί-

Πίνακας 3	Διεθνή σύμβολα για την καταγραφή οικογενειακού ιστορικού
	Άρρεν
	Θήλυ
	Άγνωστο φύλο
	Υιοθεσία
	Κύηση
	Θανόντες
	Πάσχοντες
	Φορείς
	Φορέας φυλοσύνδετου γονιδίου
	Γάμος, Εξώγαμη σχέση
	Διαζύγιο
	Απόγονοι με ηλικίες
	Συγγένεια γονέων
	Διακοπή κύησης
	Αυτόματη αποβολή
	Δίδυμα (δίζυγωτικά)
	Δίδυμα (μονοζυγωτικά)
	Χωρίς απογόνους
	Ενδιαφερόμενος/η

δα, χάνεται. Απομόνωση γιατί στην κοινωνία μας δεν υπάρχει τυπική αναγνώριση ή αποδεκτή περίοδος θρήνου που να ακολουθεί τη διακοπή μιας εγκυμοσύνης.



Σχήμα 1: Παράδειγμα οικογενειακού ιστορικού.

► Συνέχιση κύησης

Μερικές φορές το ζευγάρι αποφασίζει να συνεχίσει την εγκυμοσύνη έπειτα από διάγνωση εμβρυϊκής ανωμαλίας. Οι λόγοι γι' αυτήν την απόφαση μπορεί να είναι:

1. Η καθυστερημένη διάγνωση (δεύτερο - τρίτο τρίμηνο).
2. Οι ηθικές και θρησκευτικές πεποιθήσεις του ζευγαριού.
3. Η σύνδεση της εμβρυϊκής ανωμαλίας με αισιόδοξη πρόγνωση.
4. Η αναποφασιστικότητα του ζευγαριού.
5. Η αβεβαιότητα σχετικά με τη διάγνωση και την πρόγνωση της εμβρυϊκής ανωμαλίας.
6. Η αδυναμία ή δυσχέρεια νέας κύησης, λόγω προχωρημένης αναπαραγωγικής ηλικίας.

Και σ' αυτές τις περιπτώσεις συνέχισης της εγκυμοσύνης η ψυχική πίεση είναι μεγάλη. Οι ελπίδες και τα όνειρα των μελλοντικών γονέων βρίσκονται κάτω από συνεχή απειλή. Το γεγονός της εμβρυϊκής ανωμαλίας

επιβραδύνει τη διαδικασία ταύτισης και συναισθηματικής σύνδεσης με το έμβρυο. Όλες οι αποφάσεις στην υπόλοιπη διάρκεια της εγκυμοσύνης λαμβάνονται κάτω από πίεση και έχουν τη δυνατότητα να αλλάξουν ριζικά τη ζωή αυτής της οικογένειας. Τα συναισθήματα και οι αγωνίες κορυφώνονται και η ώρα του τοκετού βρίσκει συχνά τους γονείς με μειωμένες δυνάμεις και σπάνια επαρκώς ψυχικά προετοιμασμένους.

► Ψυχολογία γονέων έπειτα από γέννηση παιδιού με ανωμαλία, χωρίς προϋπάρχουσα προγεννητική διάγνωση

Τα συναισθήματα είναι ανάλογα με αυτά των περιπτώσεων διάγνωσης εμβρυϊκής ανωμαλίας μέσω προγεννητικού ελέγχου, με τη διαφορά ότι εδώ οι γονείς δεν έχουν την επιλογή διακοπής ή συνέχισης της εγκυμοσύνης. Και σε αυτές τις περιπτώσεις χάνεται το όνειρο για το τέλειο παιδί. Υπάρχει επίσης το συναίσθημα της αποτυχίας με την έννοια του ότι οι γονείς αισθάνονται ότι απέτυχαν να

κατορθώσουν αυτό που με τόσο κόπο προσπαθούσαν να δημιουργήσουν. Η διαδικασία θρήνου για το χαμό ενός υγιούς παιδιού συνοδεύεται από την απαίτηση για επένδυση στο ανάπηρο παιδί ως αντικείμενο αγάπης.

Γενετική συμβουλευτική στην πράξη

Η γενετική είναι τομέας πρότυπο για ομαδική συνεργασία. Η ομάδα γενετικής παρέχει υπηρεσίες ανίχνευσης, προσδιορισμού προβλήματος και διάγνωσης, θεραπευτικής παρέμβασης, ψυχικής υποστήριξης και συμβουλευτικής σε σχέση με την πρόγνωση και τους παράγοντες κινδύνου. Τα τμήματα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας του ομίλου ΥΓΕΙΑ, ΜΗΤΕΡΑ και ALFALAB (ΛΗΤΩ), πρωτοπορούν στην παροχή υπηρεσιών, προσφέροντας γενετική συμβουλευτική στις περιπτώσεις όπου απαιτείται. Η γενε-

τική συμβουλευτική παρέχεται όταν υπάρχουν εργαστηριακά ευρήματα που χρήζουν συζήτησης. Επίσης, οι συνεργάτες ιατροί συχνά παραπέμπουν για συμβουλευτική, όταν κρίνουν ότι οι πιθανότητες για συγγενείς ανωμαλίες είναι αυξημένες στις κύσεις που παρακολουθούν. Οι παραπέμποντες ιατροί ενημερώνονται προφορικά, αλλά και γραπτά για κάθε περίπτωση.

Οι επιστημονικές εξελίξεις στη γενετική υπόσχονται πολλά. Ο τρόπος αξιολόγησης πολλών νοσημάτων αλλάζει και δημιουργούνται νέες προοπτικές στην αντιμετώπιση και τη θεραπεία. Ο ρόλος της γενετικής συμβουλευτικής γίνεται όλο και περισσότερο απαραίτητος με κύριο στόχο τη μετάφραση των επιστημονικών γνώσεων της γενετικής σε πρακτικές πληροφορίες για τους ενδιαφερόμενους με παράλληλη ψυχική υποστήριξη.

Abstract

Katsichti L, Genetic Counseling. Iatrika Analekta 2012; 3: 727-730

Genetics is the field of health sciences that has advanced rapidly during the recent years and has offered the tools for diagnosis through genetic testing. Genetic counseling is the communication process through which the patient or his family is informed about the diagnosis, prognosis and management of the disease, the mode of inheritance and the recurrence risk. Indications for genetic counseling may include indicative prenatal screening tests, positive family history of genetic disease and/or mental retardation, recurrent miscarriages, consanguinity, teratogen exposure, positive family history of cancer, or other hereditary disorders. Genetic counseling procedure includes the diagnosis evaluation, obtaining the family history, risk calculation, informing the patient, providing psychological support, making the appropriate referrals and offering follow-up. Genetic counseling is part of the genetics team approach, which also offers clinical genetics, cytogenetics and molecular genetics. The Department of Genetics and Molecular Genetics at MITERA is offering a full spectrum of genetic services to referred patients.

Βιβλιογραφία

1. Robinson A, Linden MG. *Clinical Genetics Handbook*. 2nd ed, Blackwell Scientific Publications, Boston, 1993.
2. Κατσιχτή Λ. *Γενικές αρχές γενετικής συμβουλευτικής*, Επιμέλεια Έκδοσης: Μπαρτσόκας Χ., Γενετική Συμβουλευτική: Ένας Τομέας για Νοσηλευτές, Εταιρεία Νοσηλευτικών Σπουδών και Τμήμα Νοσηλευτικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Ιανουάριος 1997; σελ. 7-10.
3. Harper PS. *Practical Genetic Counseling*. Edward Arnold Publishers Ltd., London, 2010.
4. Capron A. *Genetic counseling: facts, values and norms*. Birth Defects Orig Article Series 1979; 15: 5-17.
5. Rollnick B. *The NSGC: An historical perspective. Strategies in genetic counseling*. Birth Defects Orig Article Series 1984; 20: 3-8.
6. Riccardi V, Kurtz S. *Communication and Counseling in Health Care*. Ch 8, Charles Thomas 1983.
7. Kessler S. *Psychological aspects of genetic counseling. X. Advanced counseling techniques*. Journal of Genetic Counseling 1997; 6: 379-392.
8. Bartels DM, Caplan AL, Le Roy BS. *Genetic Counseling: Ethical Challenges and Consequences*. 2010.
9. Bartsocas CS. *Genetic Services in Greece*. Eur J Hum Genet 1997; 5(suppl 2): 89-92.
10. Bartsocas CS. *Genetic counseling and the paediatrician*. Paediatrician 1978; 7: 286-304.

Λεξιλόγιο γενετικών όρων

ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟ: Μία από τις εναλλακτικές μορφές ενός γονιδίου που καταλαμβάνει δεδομένο γενετικό τόπο.

AMNIO-PCR ή QF-PCR: Πρόκειται για μοριακή εξέταση στην υπηρεσία της κυτταρογενετικής. Παρέχει τη δυνατότητα ταχείας ανίχνευσης αριθμητικών ανωμαλιών των χρωμοσωμάτων που ευθύνονται για τα συχνότερα χρωμοσωματικά σύνδρομα κατά την κύηση (Down, Edwards, Patau, Klinefelter). Με την ίδια εξέταση ανιχνεύεται η συχνότερη μεταλλαγή του γονιδίου της κυστικής ίνωσης, ΔF508 (βλ. κυστική ίνωση). Εφαρμόζεται σε όλη τη διάρκεια της κύησης με λήψη του κατάλληλου υλικού (χοριακές λάχνες, αμνιακό υγρό, εμβρυϊκό αίμα) και είναι δυνατό το αποτέλεσμα να δοθεί σε 24-48 ώρες.

ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ Χ («Υπόθεση της Lyon»): Θεωρία που προσπαθεί να εξηγήσει το μηχανισμό εξισορρόπησης της δόσης των γονιδιακών προϊόντων του χρωμοσώματος Χ, η οποία προτάθηκε από την Dr Mary Lyon. Κατ' αυτήν, σύντομα μετά τη γονιμοποίηση ένα από τα δύο χρωμοσώματα Χ των θηλέων κυττάρων υφίσταται φυσικές και μοριακές αλλαγές ώστε να αδρανοποιείται σχεδόν εξ ολοκλήρου και δεν χρησιμοποιείται ως πηγή γενετικών πληροφοριών.

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ: Διαφορές στη γονιδιακή έκφραση και η διαφορετική κλινική εικόνα που οφείλεται στη γονεϊκή προέλευση συγκεκριμένης χρωμοσωματικής περιοχής. Διαφορές στη μεθυλίωση φαίνεται ότι αποτελούν σημαντικό μοριακό παράγοντα της διαφορετικής γονιδιακής έκφρασης (βλ. σχετικό λήμμα).

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ: Η γενετική καθοδήγηση (γενετική συμβουλή) είναι η διαδικασία κατά την οποία ειδικοί επιστήμονες δίνουν πληροφορίες σε μεμονωμένα άτομα, ζευγάρια ή οικογένειες που πάσχουν από κάποια γενετική ασθένεια ή έχουν αυξημένες πιθανότητες να την εμφανίσουν. Οι πληροφορίες αυτές είναι απαραίτητες για τους ενδιαφερόμενους, γιατί τους βοηθούν στη λήψη αποφάσεων, κυρίως σχετικά με την απόκτηση υγιών απογόνων.

ΓΟΝΙΔΙΟ: Μονάδα κληρονομικότητας. Αλληλουχία χρωμοσωματικού DNA απαραίτητη για την παραγωγή λειτουργικού προϊόντος.

ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ: Η πλήρης αλληλουχία του DNA, που περιέχει ολόκληρη τη γενετική πληροφορία ενός γαμέτη,

ενός ατόμου, ενός πληθυσμού ή ενός είδους.

ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ: 1. Το σύνολο των γονιδίων ενός οργανισμού καθορίζει το γονότυπό του. 2. Εναλλακτικά, τα αλληλόμορφα που υπάρχουν σε ένα γενετικό τόπο.

ΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΟΤΗΤΑ (απόλυτη ή ατελής): Φαινόμενο κατά το οποίο ο παθολογικός γονότυπος οδηγεί οπωσδήποτε στην εκδήλωση νοσήματος (απόλυτη διεισδυτικότητα) ή σε ποικίλου βαθμού εκδήλωση των συμπτωμάτων του (ατελής διεισδυτικότητα).

ΔΙΕΥΡΥΜΕΝΟΣ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ με MLPA: Πρόκειται για μοριακή ανίχνευση μικροελλειμμάτων/ μικροδιπλασιασμών που ευθύνονται για σοβαρά γενετικά σύνδρομα (π.χ. DiGeorge, Williams, Prader Willi/ Angelman κ.ά.). Οι ποσοτικές αυτές αλλαγές του DNA στα χρωμοσώματα δεν είναι εμφανείς στο συμβατικό καρυότυπο. Εκτός από τα 20 σύνδρομα που διερευνώνται στο εργαστήριο, ανιχνεύονται μικροελλείμματα/ μικροδιπλασιασμοί στα υποτελομερίδια όλων των χρωμοσωμάτων. Τόσο τα γενετικά σύνδρομα όσο και τα ευρήματα στα υποτελομερίδια εμπλέκονται σε ποικίλου βαθμού νοσητική υστέρηση. Η συνολική συχνότητα εύρεσης βλάβης στην προγεννητική διάγνωση υπολογίζεται σε 1/300-1.000.

DNA (δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ): Το μόριο που κωδικοποιεί τα υπεύθυνα γονίδια για τη δομή και τη λειτουργία των ζωντανών οργανισμών και επιτρέπει τη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας από γενιά σε γενιά

ΔΟΜΙΚΕΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΙΣ: Είναι αποτέλεσμα θραύσεων και ανακατατάξεων των χρωμοσωμάτων και χωρίζονται σε ισορροπημένες και μη ισορροπημένες. Στις ισορροπημένες υπάρχει ανακατάταξη χρωμοσωματικού υλικού, χωρίς περίσσεια ή απώλεια γενετικού υλικού. Ο φαινότυπος σ' αυτές τις περιπτώσεις είναι φυσιολογικός. Ισορροπημένες ανακατατάξεις είναι οι μεταθέσεις και οι αναστροφές. Προσδίδουν όμως αυξημένο κίνδυνο απόκτησης απογόνων με χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Για το λόγο αυτό συνιστάται προγεννητική διάγνωση του εμβρύου με λήψη χοριακών λαχνών ή αμνιακού υγρού στα ζευγάρια, όπου ο ένας είναι φορέας μιας τέτοιας ανακατάταξης. Στις μη ισορροπημένες δομικές ανωμαλίες υπάρχει περίσσεια ή απώλεια γενετικού υλικού, με αποτέλεσμα ο φαινότυπος να είναι συνήθως παθολογικός. Τέτοιες ανωμαλίες

είναι οι διπλάσιασμοί και τα ελλείμματα.

ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΑ ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ: Κληρονομήσιμες ή μη αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων, οι οποίες δεν οφείλονται σε αντίστοιχες αλλαγές στη γενετική πληροφορία.

ΕΠΙΚΡΑΤΗΣ: Χαρακτήρας ή γονίδιο που εκφράζεται φαινοτυπικά στους ετεροζυγώτες.

ΕΠΙΣΠΕΥΣΗ: Φαινόμενο κατά το οποίο σε κάθε γενιά τα συμπτώματα μιας νόσου εμφανίζονται νωρίτερα και οι εκδηλώσεις τους είναι βαρύτερες. Παρατηρείται σε νοσήματα των οποίων η γενετική βάση σχετίζεται με τρινουκλεοτιδική επέκταση (βλ. σχετικό λήμμα).

ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑ/ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΗΣ: Γονοτυπική κατάσταση/άτομο στην οποία/οποίο συνυπάρχουν διαφορετικά αλληλόμορφα σε δεδομένο γενετικό τόπο πάνω σε ένα ζεύγος ομολόγων χρωμοσωμάτων. Τυπικά, το ένα αλληλόμορφο είναι φυσιολογικό και το άλλο μεταλλαγμένο, αλλά ο όρος χρησιμοποιείται και για δύο διαφορετικά φυσιολογικά αλληλόμορφα.

ΗΜΙΖΥΓΩΤΙΑ/ΗΜΙΖΥΓΩΤΗΣ: Όρος που περιγράφει τον γονότυπο ενός ατόμου, με ένα μόνο ομόλογο χρωσώματος ή χρωμοσωματικού τμήματος αντί για δύο. Αναφέρεται κυρίως στα συνδεδεμένα με το Χ χρωμόσωμα γονίδια των ανδρών, αλλά χρησιμοποιείται επίσης για τα γονίδια που βρίσκονται σε οποιοδήποτε χρωμοσωματικό τμήμα απουσιάζει από το ομόλογο χρωμόσωμα.

ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ: Η ταξινόμηση των χρωμοσωμάτων ανά ζεύγη σύμφωνα με το μέγεθος και το σχήμα τους ονομάζεται καρυότυπος. Αποτελεί την απεικόνιση όλου του γενετικού υλικού ενός ατόμου και από αυτόν είναι δυνατό να εξαχθούν σημαντικά συμπεράσματα για τα συχνότερα γενετικά νοσήματα που είναι οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Διαγιγνώσκονται όλες οι αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες, καθώς και οι δομικές που είναι ορατές στο μικροσκόπιο.

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA: Η προσθήκη μεθυλομάδας στα νουκλεοτίδια του DNA. Η προσθήκη γίνεται συνήθως σε νουκλεοτίδια κυτοσίνης και ιδιαίτερα σε αλληλουχίες πλούσιες σε CpG. Ανήκει στην κατηγορία των επιγενετικών τροποποιήσεων του γενετικού υλικού και έχει σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση της έκφρασης γονιδίων.

ΜΕΤΑΛΛΑΓΗ (ή ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ): Οποιαδήποτε μόνιμη κληρονομήσιμη μεταβολή στην αλληλουχία του γονιδιωματικού DNA.

ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΜΜΑΤΑ και ΜΙΚΡΟΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΙ: Μικρές

χρωμοσωματικές ανωμαλίες που δεν είναι ορατές στο συμβατικό καρυότυπο <5-10Mb. Ευθύνονται για ένα μεγάλο αριθμό συνδρόμων με σοβαρές σωματικές ανωμαλίες ή/και νοτική υστέρηση. Ανιχνεύονται με μοριακές μεθόδους, όπως η πολλαπλή αντίδραση εξαρτώμενη από τη δράση της λιγάσης MLPA (multiplex ligation dependent probe amplification) και το συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό με συστοιχίες (array) CGH (comparative genomic hybridization).

ΜΟΝΟΓΟΝΕΪΚΗ ΔΙΣΩΜΙΑ: Η παρουσία ζεύγους ομολόγων χρωμοσωμάτων σε εμπύρνηνα σωματικά κύτταρα, στο οποίο και τα δύο χρωμοσώματα προέρχονται από τον ίδιο γονέα, ενώ φυσιολογικά καθένα θα έπρεπε να προέρχεται από διαφορετικό γονέα. Διακρίνεται σε ισοδισωμία και ετεροδισωμία, ανάλογα με το αν τα χρωμοσώματα είναι ίδια ή διαφορετικά αντίστοιχα.

ΜΟΝΟΓΟΝΙΔΙΑΚΟ ΝΟΣΗΜΑ / ΜΟΝΟΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ: Διαταραχή που οφείλεται σε ένα ή περισσότερα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα ενός και μόνο γενετικού τόπου.

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ [συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός με συστοιχίες (array) CGH: array comparative genomic hybridization]: Μοριακή εξέταση που έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει όλες τις χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Στην κλινική διάγνωση σχεδιάζεται για να ανιχνεύει μικροελλείμματα και μικροδιπλάσιασμούς που είναι γνωστό ότι έχουν ως αποτέλεσμα παθολογικό φαινότυπο. Προς το παρόν έχει ευρεία χρήση στη διάγνωση γεννημένων ατόμων με νοτική υστέρηση ή άλλες σοβαρές ανωμαλίες, αλλά στην προγεννητική διάγνωση δεν έχει καθιερωθεί ακόμη ως εξέταση ρουτίνας.

ΜΩΣΑΪΚΙΣΜΟΣ: Η παρουσία δύο ή περισσότερων πληθυσμών κυττάρων με διαφορετικούς γονότυπους. Στην προγεννητική διάγνωση ο συχνότερος τύπος μωσαϊκισμού αφορά στις τρισωμίες χρωμοσωμάτων. Στο γοναδικό μωσαϊκισμό είναι δυνατόν κάποιοι γαμέτες να έχουν μετάλλαξη ή χρωμοσωματική ανωμαλία.

ΟΜΟΖΥΓΩΤΙΑ/ΟΜΟΖΥΓΩΤΗΣ: Γονοτυπική κατάσταση/άτομο στην οποία/οποίο συνυπάρχουν πανομοιότυπα αλληλόμορφα σε δεδομένο γενετικό τόπο πάνω σε ένα ζεύγος ομολόγων χρωμοσωμάτων.

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ: Ταυτόχρονη εμφάνιση σε έναν πληθυσμό δύο ή περισσότερων εναλλακτικών γονότυπων, καθένας από τους οποίους έχει συχνότητα μεγαλύτερη

από εκείνη που θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις και μόνο.

ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΑΝΩ-

ΜΑΛΙΩΝ: Στόχος της προγεννητικής διάγνωσης είναι η εύρεση πιθανής χρωμοσωματικής ανωμαλίας στο έμβρυο. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μελέτη των χρωμοσωμάτων του εμβρύου σε δείγμα χοριακών λαχνών (τροφοβλάστη, πρώτο τρίμηνο), σε δείγμα αμνιακού υγρού (δεύτερο τρίμηνο) και σε δείγμα εμβρυϊκού αίματος (τρίτο τρίμηνο). Περιλαμβάνει δύο στάδια: τη μοριακή μέθοδο QF-PCR (ποσοτική φθορίζουσα PCR) με την οποία εξάγεται ένα πρώτο αποτέλεσμα σε 24-48 ώρες για τις συχνότερες αριθμητικές ανωμαλίες του εμβρύου και τον καρυότυπο έπειτα από καλλιέργεια με τον οποίο μελετώνται όλα τα χρωμοσώματα και ευρίσκονται οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες που είναι ορατές στο μικροσκόπιο.

RNA (ριβονουκλεϊκό οξύ): Νουκλεϊκό οξύ που σχηματίζεται με εκμαγείο DNA και το οποίο περιέχει ριβόζη αντί για δεοξυριβόζη. Επίσης, είναι υπεύθυνο για τη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας από γενιά σε γενιά σε ορισμένους ιούς (RNA ιοί).

ΤΡΙΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΕΣ ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ: Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες τρινουκλεοτιδίων, οι οποίες έχουν κλινική σημασία διότι σχετίζονται με γενετικά νοσήματα (π.χ. μυοτονική δυστροφία, σύνδρομο εύθραυστου Χ). Αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων εμφανίζει αστάθεια και μπορεί να οδηγήσει σε επέκταση της αλληλουχίας κατά την οποία, όταν ο αριθμός των τρινουκλεοτιδίων ξεπεράσει ένα κρίσιμο όριο, εμφανίζονται κλινικά προβλήματα.

ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟΣ: Χαρακτήρας ή γονίδιο που εκφράζεται μόνο σε ομοζυγώτες ή ημιζυγώτες.

ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ: Η έκφραση των γονιδίων στον οργανισμό δημιουργεί το φαινότυπο, δηλαδή τα παρατηρούμενα βιοχημικά, φυσιολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά ενός ατόμου. Ο φαινότυπος είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του γονότυπου με το περιβάλλον. Επίσης, κατά μια στενότερη έννοια, η έκφραση συγκεκριμένου γονιδίου ή γονιδίων. Αυτό γίνεται σαφές στην περίπτωση των μονοζυγωτικών διδύμων, που, ενώ έχουν την ίδια γενετική σύσταση, εμφανίζουν διαφορές που οφείλονται στο περιβάλλον, δηλαδή ενώ έχουν τον ίδιο γονότυπο, εμφανίζουν διαφορετικό φαινότυπο.

ΦΟΡΕΑΣ: Άτομο ετερόζυγο για συγκεκριμένο (συχνά μεταλλαγμένο) αλληλόμορφο. Ο όρος χαρακτηρίζει

ετεροζυγώτες για αυτοσωματικά υπολειπόμενα αλληλόμορφα, γυναίκες ετερόζυγες για συνδεδεμένα με το Χ αλληλόμορφα ή σπανιότερα κάποιο άτομο ετερόζυγο για ένα αυτοσωματικό επικρατές αλληλόμορφο που όμως δεν το εκφράζει.

ΦΥΛΟΣΥΝΔΕΤΟΣ/ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΟΣ ΜΕ ΤΟ Χ: Γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα Χ ή χαρακτήρας που καθορίζεται από γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα Χ.

ΦΥΛΟΣΥΝΔΕΤΟΣ/ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΟΣ ΜΕ ΤΟ Υ: Γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα Υ ή χαρακτήρας που καθορίζεται από γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα Υ.

ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ: Τα χρωμοσώματα παρατηρούνται και μελετώνται σε μικροσκόπιο. Ο άνθρωπος έχει 46 χρωμοσώματα σε 23 ζευγάρια στα σωματικά του κύτταρα. Μισά από αυτά τα έχει κληρονομήσει από τη μητέρα του και τα άλλα μισά από τον πατέρα του. Κατά τη δημιουργία των σπερματοζωαρίων και των ωαρίων ακολουθείται μια διαδικασία κατά την οποία το κάθε κύτταρο διασπάται και δημιουργεί δύο κύτταρα των 23 χρωμοσωμάτων, ούτως ώστε, όταν ενωθεί το σπερματοζωάριο με το ωάριο, να δημιουργείται και πάλι ένα κύτταρο με 46 χρωμοσώματα. Από τα 23 αυτά ζευγάρια χρωμοσωμάτων, τα 22 είναι μορφολογικά ίδια στα αρσενικά και στα θηλυκά άτομα και ονομάζονται αυτοσωματικά. Το 23ο ζευγάρι είναι τα φυλετικά χρωμοσώματα, που συμβολίζονται με Χ και Υ. Τα κύτταρα των θηλυκών ατόμων περιέχουν δύο χρωμοσώματα Χ, ενώ τα κύτταρα των αρσενικών ατόμων ένα Χ και ένα μικρότερο Υ χρωμόσωμα. Έτσι, λοιπόν, ο καρυότυπος ενός φυσιολογικού θήλεος ατόμου είναι 46,XX και ενός φυσιολογικού άρρενος ατόμου 46,XY.

ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ: Οφείλονται σε ανωμαλίες στον αριθμό ή στη δομή των χρωμοσωμάτων. Η τρισωμία 21, κλινική εκδήλωση της οποίας αποτελεί το σύνδρομο Down, αποτελεί τη συχνότερη χρωμοσωματική ανωμαλία, με συχνότητα 1 στα 700 νεογέννητα. Άλλες συχνές αριθμητικές ανωμαλίες είναι οι τρισωμίες 13 και 18, καθώς και αυτές που αφορούν στα φυλετικά χρωμοσώματα Χ και Υ. Η συχνότητα της τρισωμίας 21, καθώς και όλων των ανωμαλιών του αριθμού των χρωμοσωμάτων, αυξάνεται σημαντικά με την ηλικία της εγκύου. Ενώ, λοιπόν, στην ηλικία των 35 ετών ο κίνδυνος απόκτησης παιδιού με σύνδρομο Down είναι 0,26%, στην ηλικία των 45 ετών ο κίνδυνος είναι 5,26%, δηλαδή 20 φορές μεγαλύτερος.

γυναικολογική κλινική τράπεζα βλαστοκυττάρων
φαρμακευτικά είδη παροχή υπηρεσιών υγείας
Πρωτοβάθμια περίθαλψη
παιδιατρική κλινική μαιευτήρια



υγεία



ΜΗΤΕΡΑ



παιδών

ΜΗΤΕΡΑ

SPITALI HYGEIA TIRANË

Πάνω από όλα...
υγεία!



μαιευτήριο
ρητώ



Νοσοκομείο
Ευαγγελισμός



ΑΧΙΛΛΕΙΟΝ
ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ



Stem-Health



Ρήφα LAB



LOGIMED



ΟΜΙΛΟΣ ΥΓΕΙΑ