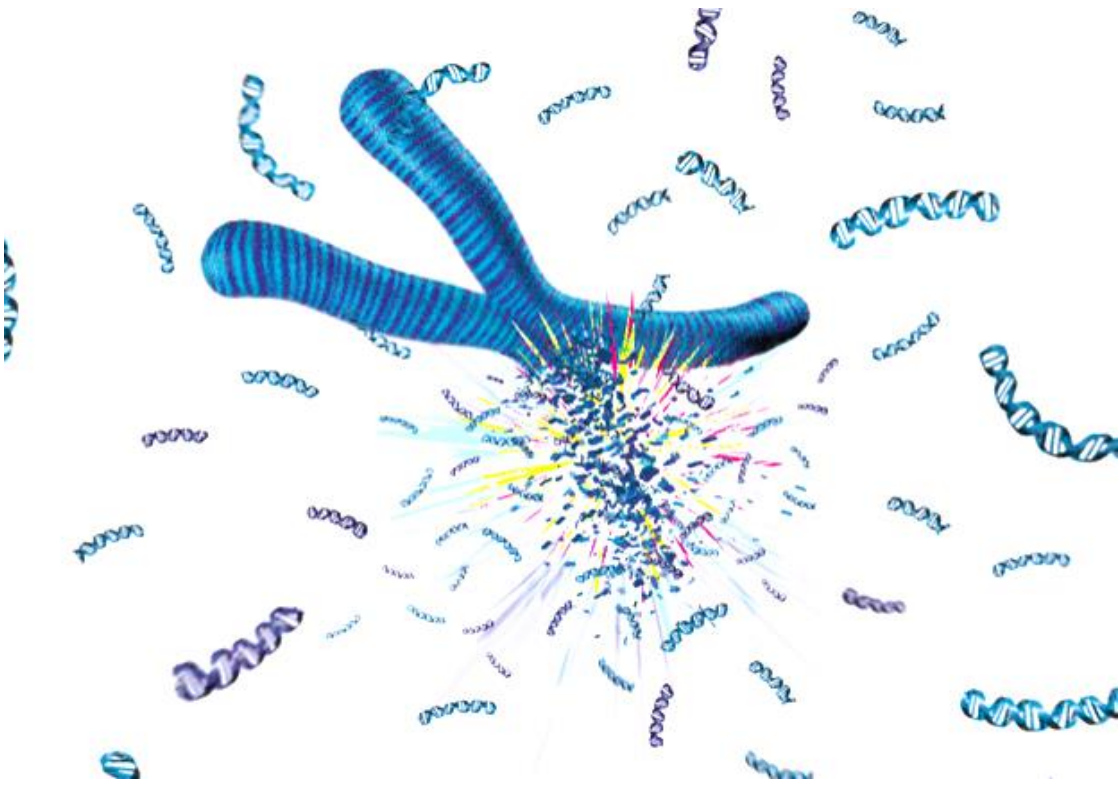




βιοGenetika

ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ



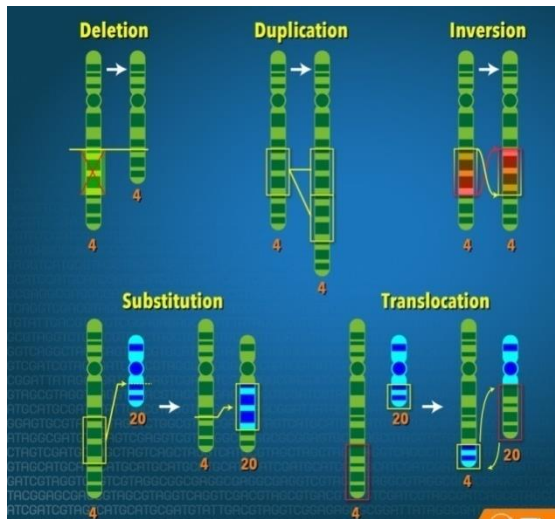
Καρυότυπος

Ο καρυότυπος είναι η απεικόνιση των ανθρωπίνων χρωμοσωμάτων, τα οποία φυσιολογικά είναι 46 σε αριθμό (23 ζεύγη, 22 αυτοσωμικά και 1 φυλετικό) και έχουν συγκεκριμένη μορφολογία. Οι συνηθέστερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες που μπορούν να ανιχνευθούν με τον κλασικό καρυότυπο εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Τρισωμία	Παρουσία ενός επιπλέον χρωμοσώματος(τρία αντί ζεύγους) <ul style="list-style-type: none">• σύνδρομο Down (Τρισωμία 21)• το σύνδρομο Patau (Τρισωμία 13)• σύνδρομο Edward (Τρισωμία 18)• σύνδρομο Klinefelter (αρσενικό άτομο με ένα επιπλέον X χρωμόσωμα - XXY αντί για XY)
Μονοσωμία	Απουσία ενός χρωμοσώματος. <ul style="list-style-type: none">• σύνδρομο Turner (θηλυκό άτομο με ένα μόνο χρωμόσωμα X - X αντί για XX).• Οι περισσότερες μονοσωμίες δεν είναι συμβατές με τη ζωή.
Ελλείψεις	Απουσία τμημάτων χρωμοσωμάτων. Μερικές είναι τόσο μικρές που είναι δύσκολο να εντοπιστούν. <ul style="list-style-type: none">• Σύνδρομο cri du chat (5p-)
Διπλασιασμοί	Επιπλέον γενετικό υλικό σε οποιοδήποτε χρωμόσωμα
Μετατοπίσεις	Τμήματα χρωμοσωμάτων αποσπώνται και επανασυνδέονται σε ένα άλλο χρωμόσωμα. Εάν η μετατόπιση είναι ένα προς



	ένα και όλο το γενετικό υλικό είναι παρόν (αλλά σε λάθος μέρος), λέγεται ότι είναι μια ισορροπημένη μετατόπιση. Εάν δεν είναι, τότε ονομάζεται μη ισορροπημένη μετατόπιση.
Γενετικός ανασυνδυασμός	Το γενετικό υλικό είναι παρόν στο χρωμόσωμα που θα έπρεπε να βρίσκεται αλλά όχι στη σωστή θέση.



Καρυότυπος περιφερικού αίματος

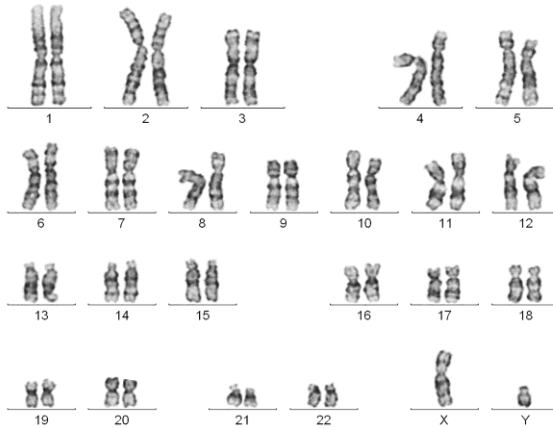
Ζευγάρια με πρόβλημα γονιμότητας παρουσιάζουν παθολογικό καρυότυπο (ένας από τους δύο) με πιθανότητα 4%. Η εξέταση καρυότυπου περιφερικού αίματος εμπεριέχει σημαντική πληροφορία για τη μελέτη τέτοιων περιστατικών και επιβάλλεται από τα κλινικά πρωτόκολλα αναφοράς. Μολονότι στις περισσότερες περιπτώσεις η υπογονιμότητα δεν σχετίζεται με



χρωμοσωμικές ανωμαλίες, υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις, στις οποίες ο παθολογικός καρυότυπος είναι το κύριο αίτιο της υπογονιμότητας:

- 45,X (σύνδρομο Turner) ή σύνδρομο Turner σε μωσαϊκισμό (mos 45,X/46,XX) στις γυναίκες
- 47,XXX (τρισωμία X) ή τρισωμία X σε μωσαϊκισμό (47,XXX/46,XX) στις γυναίκες
- 46,XXY (σύνδρομο Klinefelter) στους άνδρες
- Ο ένας από τους 2 γονείς φέρει μία ισοζυγισμένη χρωμοσωμική μετάθεση (ανταλλαγή τελικών τμημάτων μεταξύ δύο μη ομολόγων χρωμοσωμάτων χωρίς εμφανή απώλεια γενετικού υλικού). Οι φορείς χρωμοσωμικών μεταθέσεων συχνά παρουσιάζουν υπογονιμότητα ή/και αυξημένο αναπαραγωγικό κίνδυνο εξαιτίας του τρόπου συνδυασμού των ομολόγων χρωμοσωμάτων κατά το μηχανισμό της μείωσης.
- Ένας από τους γονείς φέρει μία μετάθεση τύπου Robertson (κεντρική σύντηξη δύο ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων (ζεύγη 13, 14, 15, 21 και 22). Η μετάθεση τύπου Robertson der(13;14) είναι η πιο γνωστή στον άνθρωπο. Οι άνδρες φορείς αυτών των μεταθέσεων έχουν 10 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης προβλημάτων γονιμότητας σε σχέση με τους μη φορείς.





Οι κύριες κλινικές ενδείξεις για κυτταρογενετικό έλεγχο περιφερικού αίματος είναι οι εξής:

Οικογενειακό ιστορικό:

- Χρωμοσωμικών ανωμαλιών.
- Νοητικής υστέρησης άγνωστης αιτίας.
- Πολλαπλών αποβολών, νεογνικού θανάτου.

Ασθενείς με:

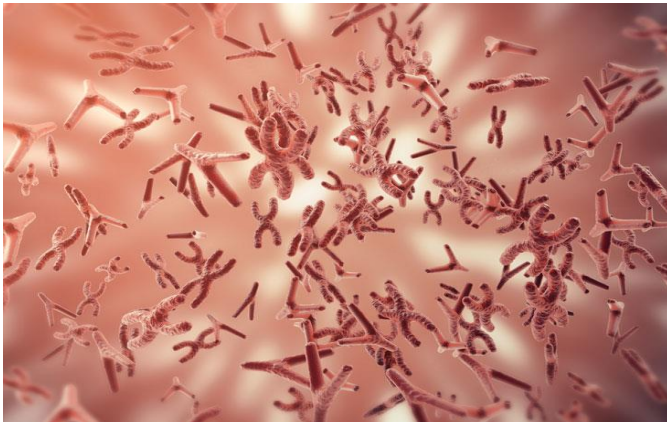
- Πρωτογενή ή δευτερογενή αμηνόρροια.
- Πρόωρη εμμηνόπαυση.
- Ανωμαλίες στο σπέρμα (αζωοσπερμία, ολιγοσπερμία).



- Μη-φυσιολογικό κλινικό φαινότυπο (καθυστερημένη ή υπερβολική σωματική ανάπτυξη, δυσμορφία, νοητική υστέρηση).

Ζευγάρια με:

- Υπογονιμότητα άγνωστης αιτίας (αδυναμία σύλληψης με φυσικό τρόπο ή κατόπιν διαδικασιών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής).
- Πολλαπλές αποβολές (>3) ή ιστορικό ανεξιχνίαστου νεογνικού θανάτου.
- Παιδί με διαγνωσμένη χρωμοσωμική ανωμαλία.
- Διαγνωσμένη χρωμοσωμική ανωμαλία δομικής φύσεως στον καρυότυπο αμνιακού υγρού του εμβρύου που κυοφορούν.



Καρυότυπος αμνιακού υγρού/χοριακών λαχνών

Χοριακές λάχνες: Η λήψη γίνεται από την 11η έως και την 14η εβδομάδα της κύησης. Κατά τη διάρκεια της λήψης χοριονικών λαχνών, τα δείγματα κυττάρων τροφοβλάστης και χοριακών λαχνών αποσύρονται διακοιλιακά ή διατραχηλικά. Ο κίνδυνος απώλειας της κύησης λόγω της λήψης χοριακών λαχνών υπολογίζεται σε λιγότερο από 1/500 (0,5%)

Αμνιακό υγρό: Η αμνιοπαρακέντηση συνήθως εκτελείται μετά την 16^η εβδομάδα μέχρι και το 3^ο τρίμηνο της κύησης. Ο κίνδυνος απώλειας της κύησης λόγω της λήψης αμνιακού υγρού υπολογίζεται σήμερα σε λιγότερο από 1/1000 (0,1%)

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. Χρωμοσωμικής αναδιάταξης σε έναν από τους γονείς.
5. Διάγνωση φύλου σε κληρονομούμενα φυλοσύνδετα νοσήματα
6. Προηγούμενο παιδί με χρωμοσωμιακή ανωμαλία



Με τον καρυότυπο ανιχνεύονται όλες οι αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες, καθώς και οι δομικές ανωμαλίες μεγέθους >5 Mb. Με τις τεχνικές σήμανσης και αναγνώρισης των χρωμοσωμάτων, το μέγεθος αυτό αντιστοιχεί περίπου σε μια ζώνη κατά μήκος ενός χρωμοσώματος. Για τη χρωμοσωμική κυτταρογενετική ανάλυση του εμβρύου με τον καρυότυπο απαιτείται η καλλιέργεια των εμβρυϊκών κυττάρων, η οποία απαιτεί συνήθως 10-15 ημέρες



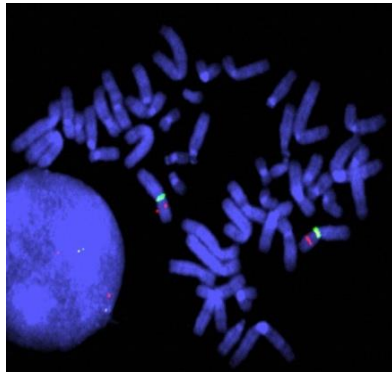
Η πιο διαδεδομένη μέθοδος **ταχείας προγεννητικής διάγνωσης** είναι η **QF-PCR** (quantitative fluorescent polymerase chain reaction). Με τη μέθοδο αυτή εξάγεται ένα πρώτο αποτέλεσμα για την ανίχνευση των πιο συχνών ανευπλοειδιών, οι οποίες αφορούν στα χρωμοσώματα 13, 18, 21, X και Y. Με τη μέθοδο αυτή, πολυμορφικές περιοχές (STRs-Short Tandem Repeats) ενισχύονται εκλεκτικά στα συγκεκριμένα χρωμοσώματα. 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. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 99% για τα χρωμοσώματα τα οποία ελέγχονται.



Ο συμβατικός καρυότυπος δεν μπορεί να ανιχνεύσει βλάβες στο χρωμόσωμα κάτω από 5 Mb. Για το λόγο αυτός για την ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών μικρότερης έκτασης χρησιμοποιούνται μοριακές μέθοδοι κυτταρογενετικής:

FISH (Fluorescent In Situ Hybridization): Με τη FISH είναι δυνατόν να ανιχνευθούν στοχευμένα υπομικροσκοπικές χρωμοσωμικές 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 1/4000 γεννήσεις.

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification): Για τη διάγνωση των μικροελλειμμάτων/μικροδιπλασιασμών που δεν είναι δυνατόν να παρατηρηθούν με το συμβατικό καρυότυπο, εφαρμόζεται η μέθοδος MLPA. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για τη διερεύνηση ενός μεγάλου αριθμού γνωστών συνδρόμων, τα οποία προκαλούνται από μικροελλείματα ή/και μικροδιπλασιασμούς με συχνότητα 1/1.000 γεννήσεις, όπως DiGeorge, Williams, Prader-Willi. Ταυτόχρονα με τα σύνδρομα αυτά ανιχνεύονται και υποτελομεριδιακές 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. Η αναλυτική ικανότητα και αυτής της εξέτασης περιορίζεται στις 3 Mb.

Καρυότυπος προϊόντος αποβολής

Αντίστοιχα, χρωμοσωμικές ανωμαλίες έχουν συσχετισθεί κλινικά με καθ' έξιν αποβολές (διαδοχική απώλεια 3 - 4 κυήσεων) όπου η πιθανότητα ένας από τους δύο γονείς να είναι φορέας χρωμοσωμικής ανακατάταξης είναι 4%. Σε περιπτώσεις με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών συνίσταται καρυότυπος περιφερικού αίματος και για τους δύο γονείς, καθώς και καρυότυπος των προϊόντων αποβολής. Κατά προσέγγιση 50-60% των αποβολών έχουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες και, δεδομένου ότι 10-15% των κλινικών κυήσεων οδηγούνται σε αποβολή, αυτό συνεπάγεται ότι 5-8% όλων των κλινικών κυήσεων έχουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Οι αυτοσωμικές τρισωμίες συνιστούν κατά προσέγγιση το 50% των κυτταρογενετικών αιτιών των αποβολών. Κατά κύριο λόγο αυτές είναι οι 16,22,21,15,13 και 14. Η πιο συχνή μορφή κυτταρογενετικής ανωμαλίας που παρατηρείται σε υλικά αποβολών είναι η τρισωμία 16, η οποία όμως δεν είναι συμβατή με τη ζωή και γι αυτό το λόγο παρατηρείται σπανιότατα σε ζώντα νεογνά.



Μοριακός καρυότυπος (aCGH)

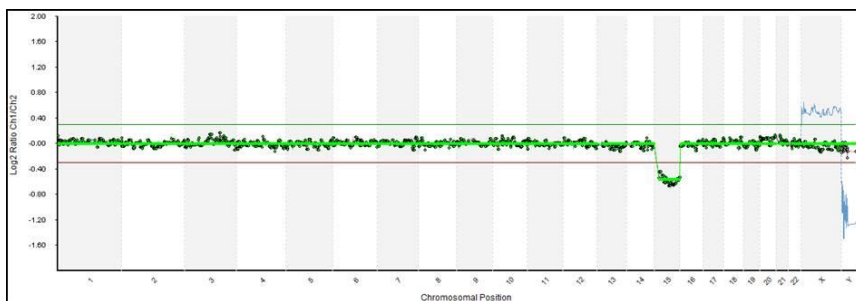
Η χρήση μοριακού καρυότυπου με την τεχνική του συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού με μικροσυστοιχίες (CGH arrays) προσφέρει τη δυνατότητα ανίχνευσης μικροελλείψεων ή μικροδιπλασιασμών σε όλο το μήκος των χρωμοσωμάτων με μεγαλύτερη αναλυτική ικανότητα σε σχέση με τις προηγούμενες μεθόδους. Ταυτόχρονα, ο ειδικός σχεδιασμός επιτρέπει τη στοχευμένη διερεύνηση συγκεκριμένων περιοχών του γενετικού υλικού που σχετίζονται με 120 γνωστά σοβαρά γενετικά σύνδρομα/νοσήματα. Η αναλυτική και ανιχνευτική ικανότητα του είναι 100 με 1000 φορές μεγαλύτερη από αυτή του κλασικού καρυότυπου. Σε κήσεις υψηλού κινδύνου ή σε περιπτώσεις υπερηχογραφικών ευρημάτων στο έμβρυο, ο μοριακός καρυότυπος ανιχνεύει σημαντικά νοσήματα σε ποσοστό περίπου 8-12% επιπλέον αυτών που θα ανιχνεύονταν με τον κλασικό καρυότυπο. Αντίστοιχα σε κήσεις χαμηλού κινδύνου το ποσοστό είναι περίπου 1,5-3%. Μεγάλη απήχηση βρίσκει σε όσο αναφορά τον έλεγχο πριν από εμφύτευση εμβρύου μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση (PGD-PGS).

Ο μοριακός καρυότυπος ανιχνεύει ουσιαστικά περισσότερο (διπλασιασμός) ή λιγότερο (έλλειψη) γενετικό υλικό σε σχέση με το φυσιολογικό. Δεν μπορεί να ανιχνεύσει ανακατάταξη του γενετικού υλικού χωρίς απώλεια ή αύξηση, όπως οι ισοζυγισμένες μεταθέσεις χρωμοσωμάτων. Επίσης, δεν μπορεί να ανιχνεύσει μωσαϊκισμό χαμηλού επιπέδου (μικρότερο από 10%) και τριπλοειδία.



Εργαστηριακός έλεγχος

Μπορεί να γίνει τόσο σε δείγμα τροφοβλάστης όσο και αμνιακού υγρού. Απαραίτητη είναι η λήψη αίματος από τους γονείς. Η μέθοδος βασίζεται στην ενίσχυση του γενομικού DNA από ένα ή περισσότερα κύτταρα (Whole Genome Amplification – WGA) και τον ανταγωνιστικό υβριδισμό δυο διαφορετικά σημασμένων γονιδιωμάτων πάνω σε χιλιάδες τμήματα DNA τα οποία βρίσκονται ακινητοποιημένα σε πλακίδια. Τα δεδομένα αναλύονται από κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα, το οποίο παράγει το γενετικό προφίλ του κάθε δείγματος.



Στο Κέντρο Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής **βιοGenetika**, παρέχονται οι παρακάτω Κυτταρογενετικές αναλύσεις:

- Καρυότυπος περιφερικού αίματος
- Καρυότυπος προϊόντων αποβολών
- Καρυότυπος αμνιακού υγρού/χοριακών λαχνών
- Μοριακός καρυότυπος (ΔF508,QF-PCR)
- Μοριακός καρυότυπος



Βιβλιογραφία

- Fan, Yao-Shan, ed. Molecular cytogenetics: protocols and applications. Springer Science & Business Media, (2002).
- Gouas, L., et al. "Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities." *Pathologie Biologie* 56.6 (2008): 345-353.
- Hahnemann, Johanne M., and Lars O. Vejerslev. "Accuracy of cytogenetic findings on Chorionic Villus Sampling (CVS)—diagnostic consequences of CVS Mosaicism and non-Mosaic Discrepancy in Centres contributing to EUCROMIC 1986–1992." *Prenatal diagnosis* 17.9 (1997): 801-820.
- Shaffer, Lisa G., and The-Hung Bui. "Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis." *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. Vol. 145. No. 1. Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2007.
- Turnpenny, P., and S. Ellard. "The history and impact of genetics in medicine." Turnpenny P, Ellard S. *Emery's Elements of Medical Genetics*. 12^a ed. Londres: Elsevier Ltd (2005): 3-11.
- Fan, Yao-Shan, ed. Molecular cytogenetics: protocols and applications. Springer Science & Business Media, (2002).



