طب و تزکیه
فصلنامه علمی ، پژوهشی
پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

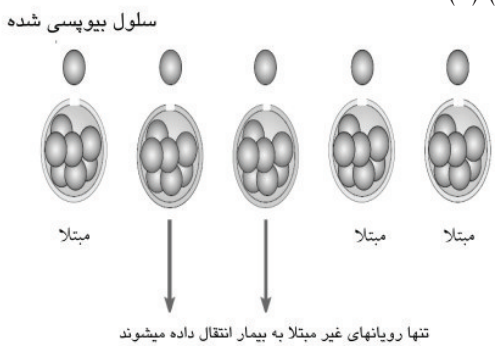
بر اساس تصویب اداره کل آموزش مداوم جامعه پزشکی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی به پاسخ دهندگان پرسشهای مطرح شده زیر در این مقاله (۲) امتیاز باز آموزی به پزشکان عمومی و متخصصین ژنتیک و متخصصین مولکولی تعلق می گیرد.

تشخیص ژنتیکی پیش کاشتی اهمیت ، کاربردها و چشم انداز

دکتر محمدرضا نوری دلویی[۱] ، علی رشیدی نژاد[۲]

مقدمه

تشخیص ژنتیکی پیش کاشتی (Preimplantation Genetic Diagnosis = PGD) یک روش تشخیص بالینی است که در آغاز به منظور کاهش انتقال بیماریهای ژنتیکی خطرناک برای زوجهای باروری که دارای بارداری‌های پر خطر از نظر ژنتیکی بودند به عنوان یک روش جایگزین برای تشخیص پیش از تولد (Prenatal Diagnosis = PND) ابداع شد. در این روش، چندین رویان بالقوه جهت یک شرایط ژنتیکی ویژه تحت آزمایش قرار می گیرند و تنها رویانهای غیرمبتلا انتخاب و به رحم مادر انتقال داده می شوند (شکل ۱) (۱).



شکل۱- تشخیص ژنتیکی پیش کاشتی. از هر بلاستومر یک سلول برداشته می شود و بر روی آن آزمونهای ژنتیکی انجام می گیرد و حداکثر سه رویان غیر مبتلا با انگیزه پایه گذاری یک بارداری به بیمار انتقال داده می شود.

نخستین کاربرد بالینی موفقیت آمیز روش PGD برای جلوگیری از بیماری ژنتیکی انسان در سال ۱۹۸۹ توسط هندی ساید و همکاران وی در انگلستان انجام شد. آنها از روش PCR (Polymerase Chain Reaction) برای تقویت و تکثیر یک توالی تکراری اختصاصی روی کروموزوم Y به منظور تعیین جنسیت رویانهای در خطر اختلالات ژنتیکی ALD (Adrenoleukodystrophy) و عقب ماندگی ذهنی وابسته به X استفاده کردند. به دنبال این موفقیت، در سال ۱۹۹۰ یک اختلال مغلوب اتوزومی توسط بیوپسی جسم قطبی (Polar body biossy = PBB) از یک تخمک بارور شده تشخیص داده شد و در سال ۱۹۹۲ اولین تولد زنده به دنبال PGD برای فیبروز کیستیک (Cystic Fibrosis = CF) گزارش گردید (۲،۱).

کاربردهای PGD

PGD برای سه گروه از اختلالات ژنتیکی به کار می‌رود:

گروه نخست- اختلالات تک ژنی: این اختلالات می‌توانند غالب یا مغلوب اتوزومی، مغلوب وابسته به X و یا متیوکندریایی باشند. این اختلالات در دو دسته جای دارند. دسته اول، اختلالاتی هستند که در آنها جهش ویژه‌ای که با بیماری مرتبط است از پیش شناخته شده است و با استفاده از PCR تک سلولی آن جهش را می‌توان تشخیص

۱. استاد گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲. دانشجوی دوره دکتری ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

Archive of SID
www.SID.ir

فصلنامه علمی - پژوهشی طب و تزکیه پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

داد. و دسته دوم اختلالاتی هستند که به دلیل همجواری یک نشانگر ژنتیکی مناسب با ژن بیماری می‌توان از تجزیه و تحلیل پیوستگی (Linkage analysis) برای تشخیص رویانهای غیر مبتلا استفاده کرد (۱).

گروه دوم- اختلالات وابسته به X : مانند دیستروفی ماهیچه‌ای دوشن (Duchenne Muscular Dystrophy = DMD) می‌باشند که به دلیل ناهمگونی ژنتیکی زیاد آزمایش PCR تک سلولی اختصاصی برای آنها موجود نباشد. برای جلوگیری از چنین اختلالاتی می‌توان از انتخاب جنسیت در PGD بهره جست. در خلال آزمایش انتخاب جنسیت در PGD، سلولها به منظور تعیین جنسیت آزمون می‌شوند و بسته به اختلال ژنتیکی، یکی از دو جنس که غیر مبتلا است (در اکثر موارد جنس مؤنث) به منظور ادامه بارداری در رحم مادر کاشته می‌شود (۱).

براساس آخرین اخبار منتشره از:

European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE)، ۸۵ ٪ موارد تعیین جنسیت با استفاده از فن دو رگه سازی فلئورسنت در جا (Fluorescent In Situ Hybridization) ، FISH و بقیه موارد با استفاده از PCR انجام پذیرفته است و بیشترین تعداد مراجعین این گروه مربوط به دیستروفی ماهیچه‌ای دوشن، هموفیلی A و نشانگان[۱] X شکننده (Fragile X Syndrom)،بوده است (۳).

گروه سوم- اختلالات کروموزومی: این اختلالات توسط روش FISH تشخیص داده می‌شوند. در بسیاری از مراکز PGD بازآرایی‌های کروموزومی مانند جابجایی‌های متعادل، جابجایی‌های روبرستونی (Robertsonian translocation) و وارونگی ها (Inversions)بخش قابل توجهی از حجم کاری را تشکیل می‌دهند (٤).

به طور تقریبی از هر ۵۰۰ نفر یک نفر حامل ظاهرا سالم واجد یک جابجایی دو طرفه است. بسیاری از این بازآیی‌ها برای آن فرد یا خانواده وی انحصاری بوده و تنها در آن خانواده دیده می‌شوند. جابجایی روبرستونی (ادغام سانترومری دو کروموزوم آکروسنتریک) فراوانی کمتری دارد و تنها در یک هزارم افراد ایجاد می‌شود. حاملین جابجایی‌های خانوادگی متعادل از نظر ظاهری تقریبا همیشه طبیعی هستند. این جابجایی‌ها معمولا زمانی تشخیص داده می‌شوند که یک عضو خانواده نابارور است و یا دارای از دست رفتن مکرر بارداری بوده و یا دارای فرزندی با ظاهر غیرطبیعی می‌باشد که از گامتهای نامتعادل ایجاد شده است (در گامتهای نامتعادل، به دلیل جابجایی کروموزومی، مقداری از ماده ژنتیکی از دست رفته و یا افزوده شده است) (٤ و ۱).

ضرورت انجام PGD

زوجهایی که تاکنون PGD را تجربه کرده‌اند به دلایل زیر مبادرت به انجام آن نموده‌اند:

الف) اجتناب از PND و ختم بارداری

تاکنون خانواده‌های زیادی یک فرزند و یا بارداری خود را به دلیل ابتلا به بیماریهای ژنتیکی از دست داده‌اند. برخی از این خانواده به منظور جلوگیری از چنین رخدادی در بارداری های بعدی خود از PND استفاده می‌کنند و درصورت مبتلا بودن جنین به ختم بارداری در سه ماهه اول یا دوم مبادرت می‌ورزند. این درحالی است که سایر خانواده‌ها به دلیل اعتقادات مذهبی، اجتماعی یا روانی تصمیمات باروری دیگری (مانند نداشتن فرزند دیگر، قبول فرزند خوانده، اهداء تخمک یا اسپرم و یا اقدام به بارداری بدون انجام آزمایش ژنتیکی تأییدی) را اتخاذ می‌کنند. در سالهای اخیر با ظهور PGD یک گزینه باروری دیگر نیز برای زوجین فراهم شده است. PGD یک فن بسیار تخصصی است که زوجین را قادر می‌سازد یک بارداری غیر مبتلا، که از نظر زیست شناختی مربوط به خود آنها می‌باشد، داشته باشند. از سوی دیگر چون در PGD تشخیص رویانها در ۳-۲ روز اول پس از بارورسازی و پیش از کاشته شدن آنها در رحم صورت می‌گیرد، زوجین

۱ syndrome

Archive of SID
www.SID.ir

فصلنامه علمی، پژوهشی
طب و تزکیه
پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

به لحاظ روانی اطمینان حاصل می‌کنند که از همان لحظه اول یک بارداری غیرمبتلا دارند و به ختم بارداری در سه ماهه اول یا دوم بارداری نیاز نخواهند داشت. در یک مطالعه که توسط Pergament و همکاران در سال ۱۹۹۱ انجام شد ۸۶ ٪ از زنان مزیت اصلی PGD را اجتناب از ختم بارداری بیان کردند (۶،۵).

ب) ناباروری به علل ژنتیکی

برخی زوجها به دلیل نقص تک ژنی و یا ناهنجاری کروموزومی که حمل می‌کنند مشکلات ناباروی دارند. برای نمونه برخی مردان که فقدان دو طرفه مجرای دفران دارند ممکن است حامل جهش‌های CF باشند. نیز امکان دارد که یک مرد با اولیگوسپرمی حامل یک جابجایی کروموزومی باشد. چنین زوجهایی برای آنکه مشکل باروری اولیه خود را مورد توجه قرار دهند ممکن است به فن آوری بارورسازی کمکی (Assisted Reproductive Technology = ART) نیاز پیدا کنند. باتوجه به اینکه PGD نیز از ART استفاده می‌کند و علاوه بر آن تنها یک مرحله اضافی بیوپسی رویانی دارد منطقی به نظر می‌رسد که این زوجها به منظور داشتن بیشترین احتمال بارداری غیر مبتلا از PGD استفاده کنند (۵).

ج) غربالگری آنوپلوئیدی (PGD-AS)

PGD-AS به منظور افزایش موفقیت بارورسازی آزمایشگاهی (Invitro Fertilization = IVF) صورت می گیرد. میزان بروز ناهنجاریهای کروموزومی در سقطهای خود به خودی حدود ۷۰-۵۰ ٪ است که ۹۵ ٪ از آنها را ناهنجاریهای تعدادی تشکیل می‌دهند. شایع ترین ناهنجاریهای تعدادی تشخیص داده شده در سقطهای زود هنگام، تری زومی‌های اتوزومی، منوزومی X و پلی پلوئیدی‌ها هستند که تری زومی کروموزومهای ۱۶، ۲۱ و ۲۲ شایع ترین تری زومی های اتوزومی در این گروه می‌باشند (۷).

پژوهش‌ها نشان داده‌اند که زوجهای نابارور با سن افزایش یافته مادر و شکست‌های مکرر IVF، مقادیر بیشتری از ناهنجاری‌های کروموزومی دارند. به منظور بهبود پیامدهای بارداری در این گروه و در زوجهای با سقط های مکرر، از PGD در روشهای بارورسازی کمکی استفاده شده است. غربالگری آنوپلوئیدی و انتقال متعاقب رویانهای یوپلوئید به زنان نابارور بالای ۳۷ سال که تحت درمان بارورسازی کمکی قرار گرفته‌اند میزان کاشته شدن و بارداری را به میزان قابل توجهی افزایش داده و میزان سقطهای پس از PGD را به میزان چشمگیری کاهش داده است (۷).

امروزه PGD-AS به دلیل سادگی نسبی فن و تعداد زیاد گروههای بیمار به رایج ترین کاربرد PGD تبدیل شده است. بر اساس نتایج منتشره از PGD-AS, ESHRE مسئول ۳۹٪ فعالیت‌های PGD در سال ۲۰۰۱ بوده است درحالی که این میزان برای اختلالات تک ژنی۲۳٪ و برای بازآرایی‌های کروموزومی ۲۱ ٪ بوده است (۹، ۸، ۳).

د) تعیینHLA (HLA Typing)برای پیوند مغز استخوان به خواهر - برادر بیمار

زمانی که یک خانواده یک فرزند بیمار نیازمند به پیوند اعضا (مانند پیوند مغز استخوان) دارد، به این خانواده توصیه می‌شود که برای نجات جان این فرزند، از PGD به منظور انتخاب یک رویان با HLA سازگار با فرزند قبلی استفاده کنند، زیرا در صورت تولد یک فرزند سالم با این روش، از سلولهای بنیادی بندناف ذخیره شده و به طور بالقوه مغز استخوان او می‌توان به عنوان یک منبع برای درمان خواهر - برادر بزرگتر او استفاده کرد. به کودکانی که بدین منظور و با استفاده از PGD متولد می‌شوند خواهران - برادران نجات دهنده (Saviour Sibling) می‌گویند (٤).

چرخه درمانی PGD

PGD از فناوریهای بارورسازی کمکی استاندارد استفاده

Archive of SID
www.SID.ir

فصلنامه علمی - پژوهشی
طب و تزکیه
پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

می‌کند. این روند شامل تحریک تخمدانی کنترل شده، برداشت تخمک (oocyte retrieval) بارورسازی و کشت رویان در آزمایشگاه، بیوپسی رویانی، انجام آزمونهای ژنتیکی و انتقال رویان می‌باشد (۱۰،٤).

الف) تحریک تخمدانی و برداشت تخمک

اولین مرحله برای انجام ICSI/IVF (Intracytoplasmic sperm injection) تحریک و برداشت تخمک می‌باشد. تحریک و برداشت تخمک یک فن آوری پیشرفته موجود در درمانگاههای بارورسازی کمکی است که به منظور تأمین تخمکها یا رویانهای لازم برای آزمایشهای ژنتیکی در روش PGD استفاده می‌شود. در خلال این روند تخمدان‌ها با گونادوتروپین‌های خارجی تحریک شده و این امر موجب تولید فولیکول‌های فراوان می‌شود که مراحل این کار به وسیله اولتراسونوگرافی لگنی کنترل می‌شود. زمانی که تعداد و اندازه فولیکول‌های در حال رشد، مناسب به نظر رسید، بلوغ تخمکها به صورت هورمونی تحریک می‌شود. پس از ٤٨-٣٤ ساعت تخمک‌ها به وسیله آسپره کردن مایع فولیکولی هدایت شده با اولتراسونوگرافی مهبلی جمع‌آوری می‌شوند (۱).

موفقیت PGD با تعداد تخمک‌های برداشت شده ارتباط دارد. در طی پژوهشی که توسط Vandervorst و همکاران صورت گرفت، نشان داده شد زمانی که تعداد تخمک‌های برداشت شده بیش از ۹ تخمک باشد، تعداد رویانهای مناسب برای انتقال به میزان چشمگیری بیشتر خواهد بود (۵).

ب) بارورسازی و کشت رویان در آزمایشگاه

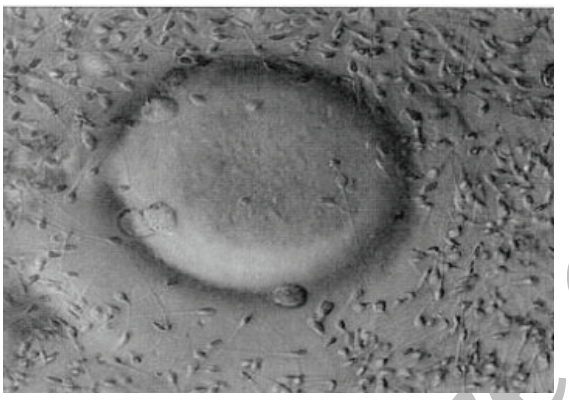
به محض اینکه اووسیت‌ها جمع‌آوری شدند برای انکوباسیون به محیط کشت منتقل می‌شوند.

نمونه مایع منی هم جمع‌آوری می‌شود و با محیط کشت رقیق شده و پس از جدا کردن اسپرم‌های متحرک و شستشو، در یک محیط دیگر قرار داده می‌شوند.

نوع آزمایش تشخیصی بکار گرفته شده در PGD روش بارورسازی را تعیین می‌نماید، به طوری که برای PGD اختلالات کروموزومی و در مواردی که از FISH برای تشخیص استفاده می‌شود از فناوری IVF به منظور بارورسازی استفاده می‌کنند (شکل ۲) اما زمانی که هدف

شکل۲- لقاح مصنوعی در آزمایشگاه (IVF)

تشخیص اختلالات تک ژنی است برای جلوگیری از آلودگی واکنش‌های PCR با DNA پدری از تزریق درون



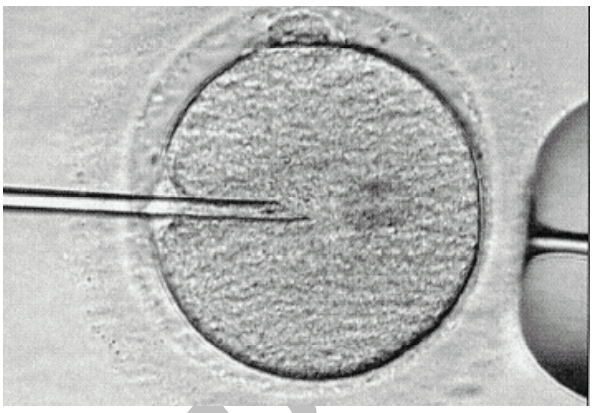
سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) استفاده می‌شود. دلیل این امر حضور اسپرم‌های مازادی است که پس از IVF در Zona pellucida به دام افتاده‌اند و ممکن است به آلودگی واکنش‌های PCR با DNA ی پدری و در نتیجه احتمال تشخیص اشتباه منجر شوند.

ICSI برای بیماران با کیفیت کاهش یافته اسپرم (تعداد کم، حرکت ضعیف یا اسپرم با ظاهر غیرطبیعی) و یا در جایی که IVF (به طور نمونه به دلیل موفقیت ضعیف قبلی در بارورسازی) با احتمال موفقیت کم انجام می‌شود نیز مورد نیاز است.

در خلال ICSI اسپرم‌های منفرد به صورت مستقیم به درون تخمک‌های بالغ تزریق می‌شوند (شکل ۳) (۵ ، ۱).

Archive of SID
www.SID.ir

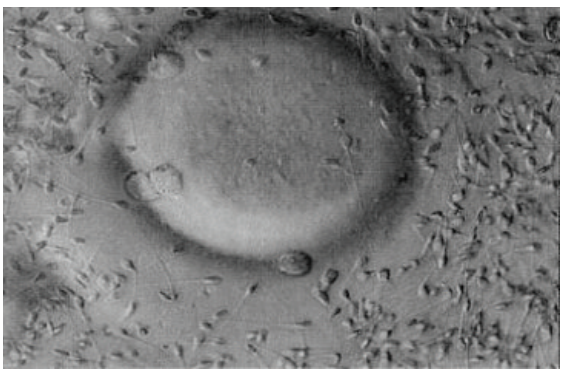
فصلنامه علمی، پژوهشی طب و تزکیه پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶



شکل۳- تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک (ICSI)

یک روز پس از برداشت تخمکها و به منظور حضور دو پیش هسته (Pronucei) که نشاندهنده بارورسازی طبیعی است، رویانها مورد بررسی قرار می‌گیرند و تخمکهایی که لقاح موفقی داشته‌اند از تخمکهای غیر طبیعی یا از بین رفته جدا شده و برای رشد بیشتر به گرمخانه بازگردانده می‌شوند و تا زمانی که به مرحله ۸ سلولی برسند در همانجا باقی می‌مانند. پس از این مرحله در یکی از مراحل مختلف رشد و نمو یک نمونه بیوپسی جهت انجام آزمونهای ژنتیکی تهیه می‌شود (۵، ۱).

شکل ٤ مراحل مختلف تکامل رویانی از تخمک لقاح یافته تا مراحل نهایی بلاستوسیست را نشان می‌دهند (٤).



شکل٤- مراحل مختلف نمو و تکوین رویان از تخمک بارور شده تا بلاستوسیست در حال شکافت. الف) تخمک بارور شده با دو پیش هسته قابل مشاهده (روز۰)، ب) مرحله دو سلولی (روز۱)، ج) مرحله چهار سلولی (روز۲)، د) مرحله هشت سلولی (اوایل روز۳)، هـ) مرحله شانزده سلولی (اواخر روز۳)، و) مرحله مورولا (روز٤)، ز) مرحله بلاستوسیست (روز۵)، توده سلولی داخلی با پیکان نمایش داده شده است. ح) بلاستوسیست در حال شکافته شدن.

ج) بیوپسی و انتقال رویان

بیوپسی رویانی فرآیندی دو مرحله‌ای است که مستلزم سوراخ کردن یا برداشتن بخشی از قشر شفاف محاصره کننده تخمک (یا رویان) و متعاقب آن برداشت یک یا چند سلول می‌باشد.

این عمل در هریک از مراحل تکاملی بین تخمک بالغ و بلاستوسیست قابل انجام است اما سه مرحله پیشنهاد شده است که هر مرحله دارای محاسن و معایبی می‌باشد (جدول ۱) (۱۱).

جدول۱- روشهای متفاوت بیوپسی رویانی به کار رفته در PGD (11).

مرحله انجام بیوپسی	مزایا	معایب
اووسیست (جسم قطبی اول)	۱- برداشت در این مرحله هیچ اثری بر روی نمو و تکوین رویان ندارد. ۲- پیش از انتقال رویان، زمان بیشتری برای تشخیص ژنتیکی با استفاده از PCR وجود دارد.	۱- تنها یک سلول برای بیوپسی وجود دارد ۲- احتمال تشخیص اشتباه بیشتر است. ۳- تنها اختلالات به ارث رسیده از مادر قابل تشخیص است. ۴- رویانهای کمتری برای انتقال وجود دارد.
سلول تخم (اجسام قطبی اول و دوم)	۱- دو سلول برای صحت و اطمینان بیشتر تشخیص وجود دارد. ۲- برداشت، هیچ اثری بر روی نمو و تکوین رویان ندارد. ۳- پیش از انتقال رویان، زمان بیشتری برای تشخیص ژنتیکی با استفاده از PCR وجود دارد.	۱- تنها اختلالات به ارث رسیده از مادر قابل تشخیص است. ۲- برای اتمام بیوپسی زمان محدودی وجود دارد.
مرحله تسهیم (بلاستومرها)	۱- اختلالات به ارث رسیده هم از پدر وهم از مادر قابل تشخیص می باشند. ۲- اطلاعات بالینی فراوانی در این رابطه وجود دارد. ۳- دو سلول برای صحت و اطمینان بیشتر تشخیص وجود دارد.	۱- احتمال موزائیسم کروموزومی وجود دارد. ۲- انتخاب بلاستومرهای هسته دار ضروری است.
بلاستوسیست (تروفواکتودرم)	۱- از سلولهای فراوانی نمونه گیری می شود. (شکست های PCR و ADO[1] حذف می گردند). ۲- از تروفواکتودرم و نه از توده سلولی داخلی، نمونه برداری می شود. ۳- کیفیت رویان ها پیش از تشخیص مورد توجه قرار می گردد. ۴- احتمال کاشته شدن در رحم بیشتر است. ۵- احتمال بارداری های چند تایی کمتر است.	۱- ممکن است زمان لازم برای انجام PCR محدود باشد. ۲- ممکن است سلولها نمایانگر وضعیت واقعی رویانها نباشند. ۳- رویانهای کمتری برای تشخیص وجود دارد. ۴- اطلاعات بالینی کمی وجود دارد.

۱- ADO = Allele dropout

Archive of SID
www.SID.ir

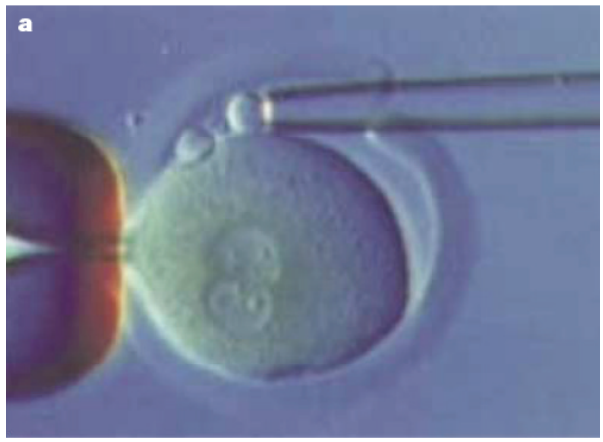
فصلنامه علمی - پژوهشی
طب و تزکیه
پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

۱-بیوپسی جسم قطبی
(Polar Body Biopsy = PBB)

باتوجه به اینکه جسم قطبی اول از نظر ژنتیکی مکمل اووسیت اولیه (و تخمک مشتق از آن) است، بیوپسی جسم قطبی اول یک روش غیر مستقیم برای بررسی وضعیت تخمک محسوب می‌شود. مزیتی که روش بیوپسی جسم قطبی دارد آن است که از مواد خارج رویانی نمونه‌گیری می‌شود بنابراین با احتمال کمتری بر رشد متعاقب رویان اثر زیان بخش بر جای می‌گذارد. این روش از نظر اخلاقی نیز توسط برخی از پژوهشگران ترجیح داده می‌شود. در هر صورت از آنجایی که این

روش تنها می‌تواند اطلاعاتی درباره ژنوتیپ مادری فراهم کند، در موارد اختلالات ایجاد شده از پدر و تعیین جنسیت کاربرد ندارد. به علاوه در جایی که پیش تقسیم کروماتیدها یا نوترکیبی تشخیص داده نشده میان نشانگرها رخ دهد ممکن است همواره یک تشخیص مطمئن امکان پذیر نباشد. تاکنون از PBB برای PGD ناهنجاری‌های کروموزومی، جابجایی، نقصهای تک ژنی و غربالگری آنوپلوئیدی استفاده شده است (۱، ۵).

شکل ۵ بیوپسی جسم قطبی دوم را نشان می دهد (۱).

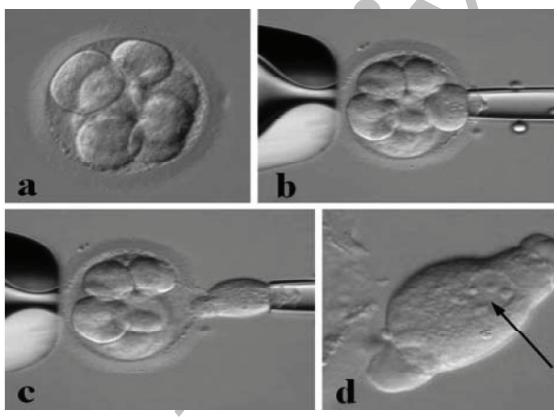


شکل۵- بیوپسی جسم قطبی دوم. حدود ۲۰-۱۴ ساعت پس از لقاح طبیعی، لایه zona pellucida سلول تخم با استفاده از یک ریز سوزن شکافته می شود و سپس یک لوله موئینه مکنده به زیر لایه zona pellucida وارد شده و اجسام قطبی اول و دوم به وسیله مکش ظریف برداشته می شوند.

۲- بیوپسی مرحله تسهیم
(Cleavage stage biopsy)

رایج ترین روش بیوپسی، نمونه برداری از رویانهای در مرحله ۱۰ تا ۱۵ سلولی است (۴،۱۲). بلاستومرها در این مرحله ویژگی بس توانی (Totipotency) دارند و به نظر می‌رسد که انجام بیوپسی در متابولیسم و حیات آنها بی تأثیر است (۱۱).

برای انجام بیوپسی ابتدا رویانها به یک محیط عاری از کلسیم منتقل می گردند و سپس توسط مکش ایجاد شده با یک پی پت نگهدارنده ثابت می‌شوند. Zona pellucida با استفاده از لیزر، محلول اسید تایرود یا به صورت مکانیکی شکسته شده و یک یا دو سلول با استفاده از پی پت بیوپسی به آرامی برداشته می‌شود (شکل ٦) (٥، ٤).



شکل٦- بیوپسی بلاستومر یک رویان انسانی در مرحله تسهیم. الف) رویان هشت سلولی (روز۳)، ب) رویانی که بر روی پی پت نگهدارنده قرار گرفته (چپ) و غشاء آن توسط پی پت بیوپسی در حال شکافته شدن است (راست)، ج) برداشت بلاستومر بوسیله مکش، د) بلاستومر بیوپسی شده با هسته منفرد قابل مشاهده (با پیکان نمایش داده شده است).

Archive of SID
www.SID.ir

طب و تزکیه
فصلنامه علمی - پژوهشی
پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

۳- بیوپسی مرحله بلاستوسیست

بلاستوسیست آخرین مرحله ای است که می‌توان از رویان بیوپسی تهیه کرد. برای انجام این روش ابتدا در Zona pellucida شکستگی ایجاد می‌شود که این شکستگی موجب بیرون زدگی تروفواکتودرم از بلاستوسیت شده و نمونه برداری از سلول‌های تروفواکتودرم را امکان پذیر می‌سازد.

از مزایای این روش آن است که برای انجام آزمونهای ژنتیکی سلولهای بیشتری در دسترس هستند. همچنین نمونه گیری از تروفواکتودرم هیچ آسیبی به توده سلولی داخل (Inner Cell Mass = ICM) و در نتیجه جنین، وارد نمی‌کند (۱۲،٤).

این روش دارای معایبی نیز می‌باشد که از آن جمله سختی کشت رویانها تا مرحله بلاستوسیت در آزمایشگاه است به طوری که تنها حدود ۳٦٪ رویانها تا این مرحله رشد می‌یابند. از معایب دیگر این روش آن است که چون رویانها باید پیش از روز پنجم یا ششم به رحم منتقل شوند، زمان موجود برای آزمونهای ژنتیکی بسیار اندک می‌باشد. به دلیل چنین مشکلاتی، بیوپسی مرحله بلاستوسیت تاکنون تنها توسط یک مرکز انجام شده است (٦).

انتقال رویان

در پی انجام بررسی های ژنتیکی، رویانهای غیر مبتلا پیش از روز ششم بارداری به رحم منتقل می‌شوند. با عنایت به مشاهدات میزان مرگ و میر جنینی مرتبط با بارداری و نیز بر اساس خط مشی مرجع رویان شناسی و بارورسازی انسان (Human Fertility and Embryolgy Authority = HFEA) ارجح آن است که حداکثر دو رویان به رحم منتقل شود (٥ ، ٤).

روش‌های متفاوت تشخیصی به‌کار رفته در PGD

آزمایش‌های PGD به میزان زیادی بر روی دو روش شناسی دورگه سازی در محل فلئورسنت(FISH) و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) متمرکز شده‌اند (۱۱).

الف) FISH

FISH رایج ترین روشی است که تاکنون برای بررسی مجموعه کروموزومی بلاستومرها استفاده شده است (۱۳). در این فن از سلول‌های به دست آمده لام تهیه و از شناساگرهای فلئورسنت به منظور شناسایی یک کروموزوم و یا بخشی از آن استفاده می‌شود. نوع و تعداد شناساگرهایی که برای انجام FISH به کار می‌روند برحسب دلیل انجام آزمایش متفاوت می‌باشند.

از FISH به منظور تشخیص جابجایی های کروموزومی و تعیین جنسیت در PGD نیز استفاده می‌شود:

۱- کاربرد FISH در تشخیص جابجایی کروموزومی

در روشهای اولیه ای که برای تشخیص جابجایی های کروموزومی انجام می‌شد، شناساگرهای ویژه هر بازآرایی به گونه‌ای که در بر گیرنده محل شکست و یا نواحی اطراف باشد ساخته شده و بر هسته اینترفازی سلولهای بیوپسی شده رویان اثر داده می‌شدند.

از مزایای این روش آن بود که رویانهای دارای مجموعه کروموزومی طبیعی از رویانهای حامل جابجایی متعادل قابل تشخیص بودند، با این وجود استفاده از این روش به دلیل زمان موردنیاز برای ساخت شناساگرهای اختصاصی برای هر جابجایی محدود شده است (۱).

روش تشخیصی‌دیگری که برای بازآرایی‌های کروموز ومی‌به‌کارمی‌رودبرپایه‌استفاده‌از شناساگرهای اختصاصی رنگ کننده تمام کروموزوم (whole chromosome painting probe) می‌باشد که در این روش از مواد سلولی بدست آمده از بیوپسی جسم قطبی استفاده می‌شود. از آنجایی که جسم قطبی اول کروموزوم‌های متافازی بسیار فشرده دارد از این شناساگرها برای نمایش موقعیت نسبی نواحی دخیل در جابجایی می‌توان استفاده کرد. البته، از آنجا که چون اکثر بلاستومرهای مرحله تسهیم در مرحله اینترفاز

Archive of SID
www.SID.ir

فصلنامه علمی - پژوهشی طب و تزکیه پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

به سر می‌برند. این روش را برای تشخیص جابجایی های کروموزومی بلاستومرها نمی‌توان به کار برد. علاوه بر این، عیب بزرگ دیگر این روش آن است که نمی توان از آن برای تشخیص جابجایی کروموزومی با منشاء پدری استفاده نمود. (۱)

در سال ۱۹۹۸ یک راهکار عمومی تر برای آزمایش سلول‌های بیوپسی شده مرحله تسهیم ایجاد شد. در این روش که از شناساگرهای ویژه نواحی زیر تلومری قطعات جابجایی شده استفاده می‌شود، دو شناساگر که ویژه بازوهای کروموزومهای شرکت کننده در جابجایی هستند و با رنگهای متفاوتی برچسب شده‌اند همراه با یک شناساگر سانترومری به کار می‌روند.

با این آزمون نمی توان رویانهای حامل جابجایی کروموزومی متعادل را از رویانهای سالم تشخیص داد، اما تشخیص رویانهای حامل جابجایی غیر متعادل از رویانهای حامل جابجایی متعادل و یا رویانهای سالم امکان پذیر است. استفاده از این روش نیاز به ساخت شناساگرهای هر بازآرایی را برطرف کرده است (٤ ، ١).

۲- کاربرد FISH برای تعیین جنسیت تک سلولی

FISH رایج ترین و مطمئن ترین روش برای تعیین جنسیت تک سلولی می‌باشد و در بسیاری از مراکز PGD دنیا به عنوان روش انتخابی تعیین جنسیت پذیرفته شده است (١٤). در این روش از شناساگرهای اختصاصی نواحی سانترومری کروموزومهای Y و X به منظور تعیین جنسیت، و معمولا از شناساگر ویژه سانترومر یکی از اتوزومها به عنوان کنترل داخلی استفاده می‌شود.

تحقیقات نشان داده‌اند که این روش برای تعیین جنسیت تک سلولی بسیار کارا می‌باشد زیرا علاوه بر احتمال آلودگی کمتر توان نشان دادن تعداد نسخه‌های هر کروموزوم مورد آزمایش و در نتیجه جلوگیری از انتقال رویانهای با اختلالات کروموزومی شایع مانند منوزومی یا تری زومی X را دارد (١١،٤).

اگرچه FISH یک فن قوی برای PGD می‌باشد اما معایبی نیز دارد از جمله اینکه یک فن وقت گیر است و نیاز به تجهیزات گران قیمت دارد و علاوه بر اینکه برای اختلالات تک ژنی نمی‌تواند به کار رود قادر به انگشت نگاری DNA و در نتیجه تعیین خطر آلودگی نیست (١٤).

ب) PCR

PCR یک واکنش شیمیایی ساده می‌باشد که موجب سنتز کمیت‌های نامحدود از یک توالی هدف اسیدنوکلئوتیک می‌شود. این واکنش بر اساس عملکرد DNA پلیمراز مقاوم به حرارت در حضور مخلوط dNTP ,KCL, MgCl۲ و بافر Tris-HCL می‌باشد.

یک چرخه PCR شامل سه مرحله می‌باشد. واسرشته شدن، اتصال و گسترش. در انتهای هر چرخه محصول PCR از نظر نظری دو برابر می‌شود. بنابراین بعد از n چرخه PCR توالی هدف می‌تواند به اندازه n۲ برابر تکثیر شود.

در وضعیت ایده آل توالی هدف بعد از ۲۰ چرخه یک میلیون برابر و بعد از ۳۰ چرخه یک میلیارد برابر می‌شود.

از آنجا که تشخیص وجود یک جهش ویژه در DNA به دست آمده از تک سلول به طور مستقیم ممکن نیست، تمام آزمایشهای تک ژنی PGD که تاکنون ایجاد شده‌اند بر مبنای PCR بوده‌اند. در این روشها نمونه به منظور آزادسازی DNA ی هسته‌ای آن لیز می‌شود. و سپس ناحیه موردنظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در ٦٠-٣٥ چرخه PCR تکثیر می‌گردد. در پی آن قطعه‌های تکثیر شده باتوجه به نیازهای آزمایش می‌توانند بررسی شوند (١).

کاربرد PCR برای تعیین جنسیت تک سلولی

چنانچه پیش تر توضیح داده شد اولین کاربرد عملی PGD با استفاده از PCR انجام شد. در آن زمان برای تعیین

Archive of SID
www.SID.ir

طب و تزکیه
فصلنامه علمی، پژوهشی
پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

جنسیت از توالی‌های تکراری اختصاصی روی کروموزوم Y استفاده شد. به طوری که وجود محصول PCR نشان دهنده یک رویان مذکر و عدم وجود محصول نشان دهنده رویان مؤنث بود(۱).

اگرچه این روش تعیین جنسیت در ابتدا با موفقیت‌هایی همراه بود اما گزارش یک تشخیص اشتباه که احتمالا به دلیل شکست تکثیر این ناحیه بود سبب ایجاد اصلاحاتی در این روش گردید. در نتیجه این اصلاحات امروزه به منظور تعیین جنسیت با PCR از مجموعه پرایمرهای استفاده می‌شود که هم توالی‌های روی کروموزوم X و هم توالی های روی کروموزوم Y را به صورت همزمان تکثیر می‌کنند. این توالی های مشترک روی کروموزوم‌های Y و X از نظر محل اتصال پرایمرها شبیه به هم بوده اما از نظر اندازه و یا وجود چند شکلی‌های جزئی با یکدیگر متفاوتند. از جمله این توالی‌های مشترک، ژن‌های تک نسخه مانند AMELX/AMELY/, ZFY/ZFX و توالی‌های تکراری مانند DYZ۱ و DXZ۱ هستند (۱۱،۱۵).

کاربرد PCR برای اختلالات تک ژنی

اگرچه استفاده از FISH به میزان زیادی استفاده از PCR برای تعیین جنسیت را تحت شعاع خود قرار داده است، تشخیص اختلالات تک ژنی کماکان وابسته به تقویت DNA توسط PCR است.

بر اساس پنجمین گزارش ESHRE درسال۲۰۰۶،PGD برای ۵۳ بیماری تک ژنی به کار برده شده است. جدول ۲ برخی بیماریهای تک ژنی که برای آنها PGD راه اندازی شده است را نشان می‌دهد (۱۹-۱۶، ۳)

مشکلات مربوط به PCR تک سلولی

تکثیر بوسیله PCR در سطح تک سلول مستعد به مشکلاتی مانند عدم موفقیت تکثیر، از دست رفتن آللی (Allele Dropout = ADO) و آلودگی با DNA ی خارجی می‌باشد (٤). امروزه برای کاستن این مشکلات تمهیداتی اندیشیده شده است برای نمونه برای جلوگیری از آلودگی با محصولات حاصل از PCR های قبلی (Carry-over contamination) و یا DNA های موجود در هوا و یا سطوح کار که مهمترین خطر آلودگی در PCR تک سلولی هستند، واکنش‌های PCR تک سلولی باید در یک اتاق استریل که برای این منظور طراحی شده (فضای پیش از PCR) و از نظر فیزیکی از فضایی که در آن محصولات PCR بررسی می‌شوند (فضای پس از PCR) مجزا است، راه اندازی شوند. بعلاوه به منظور جلوگیری از آلودگی با سلول‌های دیگر موجود در محیط مانند اسپرم‌های اضافی و یا سلول‌های Zona pellucida استفاده از روش ICSI برای تشخیص‌های PGD با استفاده از PCR ضروری است (۱۱).

مشکل دیگر ویژه PCR تک سلولی، از دست رفتن آللی است. ADO پدیده‌ای است که به موجب آن تنها یکی از دو آلل موجود به شکل موفقیت آمیز تکثیر می‌شود. ADO کماکان به عنوان بزرگترین مانع برای PGD صحیح و مؤثر اختلالات تک ژنی باقی مانده است و شدت عواقب آن به میزان زیادی

جدول ۲- برخی بیماریهای تک ژنی که برای آنهاPGD راه اندازی شده است

غالب اتوزومی	مغلوب اتوزومی	وابسته به X
دیستروفی میوتونیک	فیبروز کیستیک	دیستروفی عضلانی دوشن
بیماری هانتینگتن	بتا تالاسمی	دیستروفی عضلانی Becker
سندروم مارفان	آتروفی ماهیچه ای-نخاعی[1]	نشانگان X شکننده[2]
آکوندروپلازی	کم خونی داسی شکل	هموفیلی
نوروفیبروماتوز	بیماری گوشه	نشانگان هانتر[3]

1 - Spinal muscular atrophy ، 2- Fragile X syndrome ، 3- Hunter syndrome

Archive of SID
www.SID.ir

فصلنامه علمی - پژوهشی طب و تزکیه
پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

به شیوه وراثت اختلال در حال آزمایش شدن بستگی دارد. برای شرایط مغلوب اتوزومی زمانی که هر دو آلل به ارث رسیده از هر دو همسر جهش مشابهی را حمل می‌کنند، در غیاب آلودگی، ADO نباید به انتقال یک رویان مبتلا منجر شود. به هرحال هرچه میزان ADO افزایش یابد تعداد رویانهای در دسترس برای انتقال و در نتیجه احتمال بارداری کاهش می‌یابد. برخلاف این مورد، برای هتروزیگوت‌های مرکب و یا وضعیت غالب اتوزومی پیامد ADO می‌تواند فاجعه آمیز باشد، زیرا می‌تواند به تشخیص اشتباه و در پی آن انتقال رویان بیمار منجر گردد.

عامل اصلی ADO هنوز بطور کامل مشخص نشده است. فرضیه‌های اولیه پیشنهاد کرده‌اند که شرایط PCR نامطلوب یا لیز سلولی ناکافی می‌توانند مسئول باشند و در حمایت از این فرضیه شواهد عملی نیز وجود دارد.

در یک مطالعه افزایش دمای جداسازی از ۹۰C° به ۹۶C° در خلال PCR با کاهش چهار برابری ADO در فیبروز کیستیک و کاهش ۱۱ برابری در جایگاه (Locus) بتا گلوبین مرتبط بوده است. همچنین استفاده از بافر قلیایی یا بافر لیزی که حاوی پروتئاز و شوینده باشد مفید به نظر می‌رسد. سلول هایی که در حال تخریب شدن هستند نیز میزان ADO افزایش یافته را نشان می‌دهند که این مشاهده بیانگر آن است که در برخی موارد تخریب زنجیره DNA ممکن است مسئول باشد (۱۶).

اصلاحاتی که برای کاهش ADO می‌توان انجام داد متعدد است که استفاده از RT-PCR (Reverse transcriptase – PCR)، هضم بوسیله آنزیم برشگر محدود کننده پیش از انجام PCR، استفاده از مخلوط Taq/Pwo polymerase که واجد فعالیت غلط گیری (Proofreading) است، و استفاده از بیش از ۲ سلول در بیوپسی از آن جمله‌اند. همچنین استفاده از PCR فلئورسنت، رنگ آمیزی فلئورسنت بوسیلهSYBR سبز، تشخیص دو آلل طبیعی و استفاده از شناساگرهای متصل از جمله روشهایی هستند که می‌توان از آنها جهت تشخیص ADO استفاده کرد (۴).

در زیر به توضیح مواردی از روشهای مبتنی بر PCR و فوائد آنها می‌پردازیم.

الف) PCR آشیانه‌ای (Neted PCR)

در PCR تک سلولی برای به دست آوردن محصولات قابل تشخیص از توالی‌های منحصر به فرد با استفاده از یک سیستم تشخیصی بر مبنای اتیدیوم برماید، به حدود ۶۰-۵۰ چرخه PCR نیاز است. به دلیل اینکه آنزیم Taq پلیمراز تقریبا پس از ۴۰ چرخه اشتباهاتی را به درون محصول PCR وارد می‌کند، پس از چنین تعداد چرخه بالایی که برای PCR تک سلولی نیاز است، محصولات غیر اختصاصی ایجاد می‌شوند. این مشکل موجب ایجاد روش PCR آشیانه ای شد. در این روش به منظور ارتقاء ویژگی و حساسیت PCR تک سلولی از دو جفت پرایمر و دو مرحله PCR پشت سر هم استفاده می‌شود. مرحله اول PCR محصولاتی تولید می‌کند که در برگیرنده محل جهش هستند اما میزان آنها به اندازه ای که قابل رویت باشند نیست. محصولات PCR از واکنش اول به یک لوله جدید منتقل شده و با استفاده از یک سری جدید پرایمر به منظور رسیدن به یک میزان قابل تشخیص تکثیر می‌شوند.

پرایمرهای استفاده شده در مرحله دوم نسبت به پرایمرهای مرحله اول درونی تر هستند اما کماکان در بر گیرنده محل جهش می‌باشند. این راه حل علاوه بر اینکه اختصاصیت محصول PCR را افزایش می‌دهد، خطر آلودگی با (محصولات PCR قبلی) را نیز کاهش می‌دهد. از معایب این روش باقی ماندن خطر آلودگی در هر دو مرحله اول و دوم PCR است (۱۱).

PCR فلئورسنت

PCR فلئورسنت نوعی روش PCR است که در آن از پرایمرهایی که نوکلئوتید انتهای ۵ آنها با یک مولکول

Archive of SID
www.SID.ir

طب و تزکیه
فصلنامه علمی، پژوهشی
پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

فلئورسنت نشاندار شده استفاده می‌شود.

PCR فلئورسنت به چندین دلیل برای آزمایشگاه هایی که PCR تک سلولی انجام می‌دهند به سرعت روش انتخابی انجام آزمایش می‌شود. PCR فلئورسنت در مقایسه با PCR آشیانه ای، ترکیبی از افزایش حساسیت و دقت در اندازه گیری قطعات و کاهش زمان انجام کار است. استفاده از سیستم لیزری برای انجام خودکار بررسی قطعات موجب شده که محصولات PCR مختلف اما با اندازه یکسان که با رنگهای فلئورسنت متفاوتی برچسب شده‌اند به صورت همزمان قابل تشخیص باشند. به‌علاوه افزایش ۱۰۰۰ برابری حساسیت نسبت به‌روش آشکارسازی مرسوم با اتیدیوم برماید موجب شده که PCR فلئورسنت در یک مرحله انجام پذیر باشد و به طور بالقوه از آلودگی ناشی از چند بار باز شدن درب لوله‌ها جلوگیری به عمل آورد.PCR فلئورسنت با بسیاری از فن‌های متداول بررسی جهش مانند :

SSCP(Single stranded conformational polymorphism)

ARMS (Amplification refractory mutationsystem)

و هضم به وسیله آنزیم محدودگر نیز سازگاری دارد. تنها عیب مشخص PCR فلئورسنت گران بودن تجهیزات و دستگاههای آن است که می‌تواند بسیار بیشتر از قیمت محل کار FISH باشد (۱۶،۱۱).

PCR چندگانه (Multiplex PCR)

در فن PCR چندگانه دو یا تعداد بیشتری جفت پرایمر که برای تکثیر هدف های متفاوت طراحی شده‌اند، به طور همزمان در یک مخلوط واکنش استفاده می‌شود. در این روش مشروط بر اینکه هیچ میانکنشی بین پرایمرهای غیر مرتبط و یا محصولات PCR وجود نداشته باشد، جایگاههای مختلف می‌توانند به صورت همزمان در یک واکنش منفرد تقویت شوند.هر PCR چندگانه تنها به بهینه سازی مجموعه پرایمرهای دخیل نیاز دارد و تاکنون حداکثر تعداد توالی‌هایی که بصورت همزمان از یک تک سلول تقویت شده‌اند (چه بصورت تشخیص با روش اتیدیوم برماید مرسوم و چه با روش PCR فلئورسنت) تا ۷ جایگاه بوده است(۱۱).

PCR چندگانه ممکن است برای تشخیص ADO بوسیله تکثیر همزمان یک جهش ایجاد کننده بیماری و یک چند شکلی مرتبط اطلاع دهنده هم بکار رود. با وجود این که استفاده از این روش یک تدبیر مفید به ویژه برای تشخیص اختلالات غالب است، برای چندین اختلال مغلوب اتوزومی از جمله CF، تالاسمی β و کمبود Medium chain acyl coA dehydrogenase نیز گزارش شده است. در این روش آلل جهش یافته تقریبا همیشه تشخیص داده می‌شود زیرا احتمال اینکه ADO هم بر محل جهش و هم چند شکلی متصل با آن اثر بگذارد بسیار کم است (۱۱).

متأسفانه مشکل از دست رفتن آللی و تکثیر ترجیحی یک آلل در این روش و حتی در روش PCR فلئورسنت نیز وجود دارد.

تکثیر کل ژنوم
(Whole Genome Amplification = WGA)

یکی از پیشرفت‌های مهیج بررسی تک سلولی تکامل روشهای طراحی شده به منظور تکثیر تمامی ژنوم تک سلول است. بسته به روش ویژه WGA به کار رفته، یک DNAی الگوی آغازی pg ۷ ، تا ۱۰۰۰ برابر می‌تواند تقویت شود، رخدادی که به نحو معنی داری بر مشکلات تک سلول غلبه می‌کند.

با استفاده از WGA با مشکلات فنی مانند عدم تطابق دستجات پرایمری و مشکلات تشخیصی محصولات PCR مختلف که به ندرت در ارتباط با PCR چندتایی وجود دارد، مواجه نمی‌شویم. به علاوه WGA یک منبعی از نمونه DNA را که بار دیگر می‌تواند بررسی شود فراهم می‌کند این امر به ما اجازه می‌دهد که تشخیص را با استفاده از همان روش و یا روشهای دیگر قطعی سازیم و یا ژن‌های دیگری را بررسی کنیم (۱۱).

رایج ترین روش WGA استفاده شده در PGD روش

Archive of SID
www.SID.ir

فصلنامه علمی - پژوهشی طب و تزکیه پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

(Primer Extension Preamplification) PEP است که از پرایمرهای اولیگونو کلئوتیدی ۱۵ بازی با توالی های تصادفی برای آغاز سنتز DNA ی کل ژنوم استفاده می‌کند.

گزارشات برآورد کرده اند که با استفاده از این روش ۹۶-۷۰ ٪ از ژنوم ۱۰۰۰-۳۰ بار تکثیر می‌شود. PEP تاکنون برای بررسی تک سلولی بیماریهای CF، Tay-sachs، هموفیلی A ، DMD و نیز تعیین جنسیت به کار رفته است. PEP همچنین برای PGD نشانگان سرطانی غالب Familial Adenomatus Polyposis Coli) FAP) نیز به کار برده شده است. مدت زمان لازم برای انجام PEP، به انتقال رویان در روز چهارم پس از بارورسازی نیاز دارد. یک روش اصلاح شده نیز گزارش شده است که زمان مورد نیاز را از بیش از ۱۴ ساعت به پنج و نیم ساعت کاهش داده است(۱۱).

یک روش دیگر WGA که چندان برای آزمایشات تک سلولی به کار برده نشده است DOP-PCR (Degenerate oligonucleotide primed PCR) است. DOP-PCR به همان نسبت PEP اما به مقادیر بسیار قابل توجه تر ژنوم را تقویت می‌کند. یک تک سلول که تحت تأثیر DOP-PCR قرار می‌گیرد می‌تواند DNA ی کافی برای بیش از ۱۰۰ تکثیر PCR متوالی را فراهم نماید(۱۱).

به علاوه DNAی کافی برای روشهای تجربی دیگر مانند CGH (Comparative Genomic Hybridization)نیز تولید شود. یک ضعف مهم فنون WGA تکثیر توالی‌های DNA تکراری مانند STR ها است که زمانی که بر روی محصولات WGA انجام گیرد مستعد به خطا است. در برخی مطالعات گزارش شده است که بیش از ۵۰٪ قطعات تقویت شده در اندازه واقعی خود نبوده‌اند که احتمالا به دلیل دماهای پایین موردنیاز برای WGA بوده است که اجازه می‌دهد زنجیره DNA در خلال تولید محصول لغزش داشته باشد. امروزه چنین خطاهایی استفاده از WGA به منظور تشخیص بالینی اختلالات گسترش سه نوکلئوتیدی یا تشخیص بر پایه بررسی پیوستگی با STR ها را غیر محتمل ساخته است، اما به دلیل توان زیاد این روش برای اینکه با PCR چندتایی یا PCR ساده تکرار شده، CGH و ریزآرایه ترکیب شود، بی شک در آینده بر مشکلات جاری مربوط به روش WGA غلبه خواهد شد (۱۱).

روشهای مربوط به تشخیص جهش

زمانی که DNA از یک تک سلول به یک میزان قابل تشخیص تکثیر شد، بیشتر فنون تشخیصی جهش که امروزه در آزمایشگاههای تشخیصی در دسترس می‌باشند برای بررسی آن می‌توانند استفاده شوند. از جمله روشهای تشخیصی مورد استفاده در PGD می‌توان به Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)(DGGE, SSCP, ARMS، روش تعیین توالی (Sesquencing)، بررسی پیوستگی (Linkage Analysis) و روش لکه گذاری نقطه‌ای معکوس (Reverse Dot blot) اشاره نمود (۲۳-۲۰ ،۹).

میزان موفقیت :PGD

میزان موفقیت PGD براساس نوع روشهای بکار برده شده، زمینه ژنتیکی و دلیل مراجعه متقاضیان و دلایل دیگر، متفاوت است. براساس آخرین اخباره منتشره از ESHRE، در هر بار بازیافت تخمک حدود ۱۳ تخمک جمع‌آوری شده که در حدود۹۹٪ آنها بیوپسی و از این میان ۸۶ ٪ به صورت موفقیت آمیزی تشخیص داده شده‌اند. انتقال رویان در۸۰٪ چرخه‌های بازیافت تخمک صورت پذیرفته و از میان آنها۲۱-۱۶٪ موارد به ، بارداری‌های بالینی منجر شده‌اند. یک نکته قابل توجه آن است که این احتمال نسبتا کم PGD باید پیش از آغاز چرخه درمانی با جزئیات کامل برای زوجین توضیح داده شود. به علاوه برخی زوجین به دلیل پاسخ تخمدانی ضعیف، شکست بارورسازی، بیوپسی ناموفق، مبتلا بودن تمامی رویانها و یا نتایج غیرقابل تفسیر ممکن است هیچ رویان مناسبی برای انتقال نداشته باشند. پس توجه به این نکته ضروری است که هیچ تضمینی برای

Archive of SID
www.SID.ir

فصلنامه علمی، پژوهشی
طب و تزکیه
پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

موفقیت PGD وجود ندارد (۵،٦).

معایب :PGD

فن آوری تجزیه و تحلیل تک سلولی، پیچیده و درخور توجه است. یکی از مهمترین معضلات مربوط به PGD، تشخیص اشتباه رویانها می‌باشد. براساس گزارش منتشره از ESHREدر سال۲۰۰۵، تاکنون ٤ تشخیص اشتباه به دنبال استفاده از FISH (به ترتیب برای تعیین جنسیت، تری زومی۲۱، منوزومی X پس از PGS و برای یک جابجایی دو طرفه) و ۹ تشخیص اشتباه به وسیله PCR (به ترتیب دو مورد برای تعیین جنسیت، رتینیت پیگمنتوزا و DMD، یک مورد برای تالاسمی بتا و دیستروفی میوتونیک، چهار مورد برای CF و یک مورد برای(Amyloid Polyneuropathy)گزارش شده است. بنابراین احتمال تشخیص اشتباه برای FISH، ۱/٥٤٪ و برای PCR، ۸/٤۱٪ و در مجموع ۳/٥٥٪ می‌باشد.

چندین دلیل برای تشخیص اشتباه در PGD محتمل است که مهمترین آنها محدودیت‌های فنی و خطر آلودگی سلولی می‌باشند. یکی دیگر از معایب PGD، بدشکلی‌ها و بارداری‌های چندتایی می‌باشند. بارداری‌های چندتایی موجب مقادیر بالای نارسایی و نیز وزن تولدی پایین می‌شود. از دیگر مشکلات مربوط به PGD احتمال موفقیت نسبتا پایین روش، هزینه بالای آن و نشانگان OHSS (Ovarian hyperstimalation syndrom)) می‌باشد (۵،۹).

مسائل اخلاقی مربوط به PGD

PGD یک فن آوری با رشد سریع است اما اختلاف نظرهایی درمورد سودمندی وکاربردهای آن وجوددارد(۲٤).

توانایی انتخاب یک رویان پس از انجام آزمایش‌های ژنتیکی موجب برانگیختن اتهاماتی شده است از جمله اتهام انتخاب فرزند به عنوان یک کالا که به سادگی طراحی شده است تا نیازها و آرزوهای والدین را برآورده کند. اما این دیدگاه از این واقعیت که بیشتر زوجین به خاطر تنها آرزویشان برای داشتن یک بارداری زنده و یک فرزند سالم تحت PGD قرار می‌گیرند چشم پوشی می‌کند(۱).

حقیقت این است که مشکلات اخلاقی واقعی تنها در گروه کوچکی از موارد غیرمعمول به وجود می‌آید. برای نمونه یک زوج که هردوی آنها به بیماری غالب اتوزومی آکوندروپلازی مبتلا هستند ممکن است که PGD را نه تنها برای جلوگیری از رویانهای مبتلای هموزیگوت (که معمولا در رحم کشنده می‌باشد) درخواست کنند، بلکه تمایل دارند که به جای رویانهای سالم تنها رویانهای هتروزیگوت را (که به آکوندروپلازی مبتلا می‌شوند) انتخاب نمایند تا با نوع زندگی آنها تناسب بیشتری داشته باشد. با توجه به اهمیت شایان سلامت و سعادت فرزند این عمل همیشه هم آسان نیست زیرا علی رغم مشکلات فراوانی که با بیماری آکوندروپلازی مرتبط است، آیا یک فرزند غیر مبتلا در یک خانواده آکوندروپلازی بیشتر از یک فرزند بیمار در یک چنین محیطی رنج می‌برد. معضل اخلاقی مشابه در کری ارثی روی می‌دهد در حالتی که یک فرزند ناشنوا ممکن است بر یک فرزند سالم ترجیح داده شود (۱).

توانایی تعیین جنسیت رویان با استفاده از PGD زمینه دیگری است که اختلاف نظرات و مشاجرات اساسی را بر مسئله PGD دامن زده است. زمانی که در یک خانواده یک فرزند یا بیشتر از یک جنس وجود داشته باشد، ممکن است تمایل بیشتری برای داشتن فرزندی از جنس دیگر بوجود آید.این مسئله که به عنوان تعادل خانوادگی (Family Balancing) شناخته می‌شود توسط برخی در ایالات متحده با همدردی نگریسته شده است، اما کماکان به صورت مشاجره آمیز باقی مانده است و برخی بیان می‌کنند که این کاربرد یک استفاده صحیح از PGD نیست. نگرانی‌های ویژه از این موضوع زمانی بوجود می‌آید که در یک جمعیت به طور آشکار برای یک جنس انتخاب صورت می‌گیرد، به طور نمونه در جایی که به دلایل اقتصادی و فرهنگی فرزند

Archive of SID
www.SID.ir

فصلنامه علمی - پژوهشی
طب و تزکیه پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

پسر بر فرزند دختر ترجیح داده می‌شود. PGD برای انتخاب رویان مذکر در برخی کشورهای آسیایی و خاورمیانه به عنوان یک جایگزین برای تشخیص پیش از تولد و سقط جنین تنها به دلیل جنسیت آن تجربه شده است (۲۵). به هرحال افراد بسیاری احساس می‌کنند این موضوع که برای چنین هدفی یک زن را تحت تأثیر روشهای تهاجمی و بالقوه آسیب رسان PGD قرار دهیم چندان اخلاقی نمی‌باشد زیرا روشهای با خطر کمتر مانند تفکیک اسپرم (Sperm Sorting) ممکن است بدین منظور قابل قبول باشد. بنابر گزارشهای رسیده از ESHRE انتخاب جنسیت اجتماعی مسئول ۹ ٪ تمام فعالیت های گزارش شده به این سازمان می‌باشد (۱،۸).

از دیگر مواردی که بحث و اختلاف نظر درباره آن وجود دارد، کاربرد PGD در شرایط ژنتیکی است که یک زوج ممکن است درخواست کنند که رویانهای حامل جایگزین نشوند تا بیماری را از خانوادیشان ریشه کن کنند. برای نمونه در یک زوج که فرد مذکر مبتلا به بیماری هموفیلی است و به منظور جلوگیری از تولد یک نوزاد دختر حامل، درخواست انتخاب و انتقال تنها رویانهای مذکر را دارند، از جمله این موارد می‌باشند. در این موارد، خطر هیچ بیماری ژنتیکی در نسل بعد نیست بلکه این خطر تنها برای نوه آنها وجود دارد. برخی افراد ممکن است این موضوع را به عنوان انحراف از هدف PGD (جلوگیری از تولد یک بچه مبتلا) و به عنوان یک حرکت به سمت یوژنتیک مثبت (Positive eugenetics) بنگرند. نتایج یک بررسی تلفنی از بالغین در ایالات متحده نشان داده است که بیشتر افراد با استفاده از PGD برای بیماریهای ژنتیکی، تطابق HLA و استعداد ابتلا به سرطان موافق بوده اند، اما با انجام PGD برای تعیین جنسیت اجتماعی و «صفات مورد علاقه» (Desirable Characteristics) مخالف بوده‌اند (۱).

در انگلستان تعیین جنسیت رویان با استفاده از PGD برای دلایل غیر پزشکی به وسیله HFEA ممنوع شده است. اخیرا در هندوستان نیز دولت انتخاب جنسیت افراد مذکر توسط PGD را ممنوع کرده است و در آلمان تنها به روشهایی اجازه داده می‌شوند که برای رویان به صورت مستقیم مفید باشند. PGD در برخی کشورهای دیگر از جمله ایتالیا، سوئیس، آرژانتین و استرالیا ممنوع است و به تازگی در فرانسه به سه مرکز اجازه انجام PGD داده شده است (٤).

در حال حاضر PGD در ایران توسط چند مرکز انجام می‌شود اما متأسفانه، ظاهرا هیچ مرجع علمی و سازمان نظارتی برای کنترل و هماهنگی این مراکز وجود ندارد.

نتیجه گیری

PGD یک انتخاب باروری جایگزین برای زوجهایی است که در آرزوی داشتن فرزندی سالم هستند که اختلال ژنتیکی تهدید کننده موجود در خانواده آنها را ندارد. باوجود آنکه بیشتر زوجهایی که PGD را درخواست می‌کنند مشکلات باروری ندارند اما به منظور فراهم نمودن رویانهای موردنیاز برای انجام آزمایشهای ژنتیکی به فناوری بارورسازی کمکی نیاز است. برای نیل به این هدف بیشتر روشهای اولیه PGD از بیوپسی بلاستومرهای مرحله تسهیم استفاده می‌کردند اما امروزه بیوپسی اجسام قطبی اول و دوم به یک جایگزین معمولی برای این روش تبدیل شده است، هرچند که از بیوپسی بلاستوسیست هم در برخی مراکز استفاده می‌شود. بیشتر آزمونهای ژنتیکی به کار رفته در PGD بر روی دو روش شناسی PCR و FISH متمرکز شده‌اند که از FISH برای بررسی‌های کروموزومی و تعیین جنسیت و از PCR برای بررسی ژنها در اختلالات تک ژنی و نیز برای تعیین جنسیت استفاده می‌شود. PGD یک روش پیچیده و گران است و تنها برای تعداد کمی از اختلالات ژنتیکی موجود به کار می رود، اما با این وجود کاربردهای این روش در برخی زمینه‌های ژنتیکی رو به گسترش است به طوری که امروزه غربالگری

Archive of SID
www.SID.ir

طب و تزکیه
فصلنامه علمی، پژوهشی
پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

آنیوپلوئیدی (PGS) رایج ترین کاربرد PGD می‌باشد. در سالهای اخیر برخی کاربردهای PGD در زمینه‌هایی مانند تعیین نوع HLA و تعیین جنسیت اجتماعی موجب ایجاد اختلاف نظر و نگرانیهایی در جوامع شده است به طوری که در برخی کشورها تمام فعالیت‌های PGD به طور شدید کنترل شده و برای انجام هر آزمون ژنتیکی جدید به اجازه رسمی از مراجع قانونی مربوطه نیاز است و در برخی کشورهای دیگر تمامی فعالیتهای PGD غیرقانونی می‌باشند. اعتقاد ما بر این است که نیاز به وجود یک چنین مراجعی در ایران احساس می‌شود چرا که علاوه بر اینکه نظارت عالمانه، روزآمد و همه جانبه فعالیتهای PGD امری ضروری است چنین مباحثات و مشاجرات اخلاقی علمی، مستدل و جذابی PGD را به صورت مداوم و فعال در منظر جامعه قرار می‌دهد.

Archive of SID
www.SID.ir

فصلنامه علمی - پژوهشی
طب و تزکیه
پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

Referencess :

1. Braude P. Pickering S. Flinter F. et al., Preimplantation genetic diagnosis, Nature. Reviews. Genetics., 2002, 3: 941-953.

2. Ouhibi N. Olson S. Patton P. et al., Preimplantation genetic diagnosis, Current. women's. health. Reports., 2001, 1: 138-142.

3. Harper J.C. Boelaert K. Geraedts J. et al., ESHRE PGD Consortium data collection V: Cycles from January to December 2002 with pregnancy follow-up to October 2003, Human. Reproduction., 2006, 1: 3-21.

4. Ogilvie C.M. Braude P.R. Scriven P.N., Preimplantation genetic diagnosis-an overview, Journal. Of. Histochemistry. And. Cytochemistry., 2005, 53(3): 255-260.

5. Lashwood A., Preimplantation genetic diagnosis to prevent genetic disorders in children, British. Journal. Of. Nursing., 2005, 14(2): 64-70.

6. Sermon K. Steirteghem A.V. Liebares I., Preimplantation genetic diagnosis, The. Lancet., 2004 , 363: 1633-41.

7. Rubio C. Pehilvan T. Rodrigo L. et al., Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview, American. Journal. Of. Reproductive. Immunology., 2005, 53: 159-165.

8. Bjorndahl L. Barratt C.L.R. Fraser L.R. et al., ESHRE basic semen analysis courses 1995-1999: immediate beneficial effects of standardized training, Human. Reproduction., 2002, 17(5): 1299-1305.

9. Sermon K. Moutou C. Harper J. et al., ESHRE PGD consortium data collection IV: May-December 2001, Human. Reproduction., 2005, 20(1): 19-34.

10. Pickering S. Polidoropoulos N. Caller J. et al., Strategies and outcomes of the first 100 cycles of preimplantation genetic diagnosis at the Guy's and St. Thomas' center, Fertility. And. Sterility., 2003, 79(1): 81-90.

11. Thornhill A.R. Snow K., Molecular diagnostics in preimplantation genetic diagnosis, Journal. Of. Molecular. Diagnostics., 2002, 4(1): 11-29.

12. Simpson J.L. Carson S.A. Cisneros P., preimplantation genetic diagnosis for heritable neoplasia, Journal. of . the. National. Cancer. Institute. Monographs., 2005, 34: 87-90.

13. Wilton L., Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review, Prenatal. Diagnosis., 2002, 22: 312-318.

14. Findlay I. Corby N. Rutherford A. et al., Comparison of FIFH, PRINS, and conventional and fluorescent PCR for single-cell sexing: suitability for preimplantation genetic diagnosis, Journal. Of. Assisted. Reproduction. And. Genetics., 1998, 15(5): 258-265.

15. Staessen C. Assche E.V. Joris H. et al., Clinical expression of sex determination by fluorescent in situ hybridization for preimplantation genetic diagnosis, Molecular. Human. Reproduction., 1999, 5(4): 382-389.

16.Wells D. Sherlock J.K., Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification, Prenatal. Diagnosis., 1998, 18: 1389-1401.

17. Vandervost M. Staessen C. Sermon K. et al., The Brussels experience of more than 5 years of clinical preimplan genetic diagnosis, Human. Reproduction., 2000, 6(4): 364-373.

18. Ray P.F. Vekemons M. Munnich A., Single cell multiplex

Archive of SID
www.SID.ir

PCR amplification of five dystrophin gene exons combined with geneder determination, Molecular. Human. Reproduction., 2001, 7(5): 489-494.

19. Ray P.F. Ao A. Taylor D.M. et al., Assessment of the reliability of single blastomere analysis for preimplantation diagnosis of the ΔF508 deletion causing cystic fibrosis in clinical practice, Prenatal. Diagnosis., 1998, 18: 1402-1412.

20. Chamayou S. Alecci C. Ragolia C. et al., Successful application of preimplantation genetic diagnosis for β-thalassaemia and sickle cell anemia in Italy, Human. Reproduction., 2002, 17(5): 1158-1165.

21. Jiao Z. Zhou C. Li J. et al., Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of β-thalassemia by whole genome amplification, Prenatal. Diagnosis., 2003, 23: 646-651.

22. Spits C. De Rycke M. Van Ranst N. et al., Preimplantation genetic diagnosis for neurofibromatosis type 1, Molecular. Human. Reproduction., 2005, 11(5): 381-387.

23. De Rycke M. Georgiou I. Sermon K. et al., PGD for autosomal dominant polycystic kidney disease type 1, Molecular. Human. Reproduction., 2004, 11(1): 65-71.

24. Robertson J.A., Extending preimplantation genetic diagnosis: the ethical debate, Human. Reproduction., 2003, 18(3): 465-471.

25. Malpani A. Malpani A. Modi D., Preimplantation sex selection for family balancing in India, Human. Reproduction., 2002, 17(1): 11-12.

طب و تکنیک
فصلنامه علمی، پژوهشی
پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

Archive of SID
www.SID.ir

فصلنامه علمی - پژوهشی
طب و تزکیه
پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

سؤالات مقاله بازآموزی

۱-فن PGD نیاز به کدام یک از موارد زیر را برطرف کرده است؟

الف) ژن درمانی
ب) سقط جنین های مبتلا
ج) تشخیص های مولکولی
د)Art (Assisted Reproduction Technology)

۲-نخستین کاربرد بالینی PGD برای کدامیک از اختلالات زیر صورت گرفت ؟

الف) Cystic Fibrosis
ب) Phenyl ketonurea
ج) Adreno Leuko dystrophy
د) Thalassemia

۳-برای کدام یک از اختلالات زیر از PGD می توان استفاده نمود ؟

الف)Gaucher Disease
ب) Diabetes
ج) Rubella
د) Hepatitis B

۴-برای انجام تشخیصهای مولکولی در PGD کدامیک از روشهای باروری زیر استفاده می شود؟

الف) IUI
ب) IVF
ج) ICSI
د) Sperm Sorting

۵-رایج ترین روش تعیین جنسیت در PGD کدام است؟

الف)FISH
ب) Fluorescent PCR
ج) استفاده از STR کروموزومهای X و
د) RDB

۶-نخستین کاربرد بالینی موفق PGD در انسان برای جلوگیری از چه نوع اختلالی بوده است ؟

الف) آنیوپلوئیدی
ب) مغلوب اتوزومی
ج) غالب اتوزومی
د) وابسته به جنس

۷-کدام یک از موارد زیر درباره کاربردهای PGD صحیح است؟

الف) جهت جلوگیری از تولد نوزاد مبتلا به اختلالات چند عاملی به کار می رود .
ب) تنها در مورد اختلالات کروموزومی می تواند به کار گرفته شود .
ج) تنها در مورد اختلالات کروموزومی و بیماریهای تک ژنی که جهش های آنها مشخص است، می تواند به کار رود .
د) می تواند جهت افزایش میزان باروری در خانمهای باسقط های مکرر به کار رود .

Archive of SID
www.SID.ir

طب و تزکیه
فصلنامه علمی، پژوهشی
پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

۸-رایج ترین کاربرد امروزه PGD کدام است؟

الف) PGD- AS

ب) استفاده از PGD جهت تعیین HLA

ج) استفاده از PGD جهت کاهش فراوانی بیماریهای تک ژنی

د) تعیین جنسیت

۹-در PGD ، انتقال رویان حداکثر تا چندمین روز پس از لقاح صورت می گیرد؟

الف) سومین ب) چهارمین ج) ششمین د) هشتمین

۱۰- رایج ترین مرحله انجام بیوپسی جهت استفاده در PGD کدام است؟

الف) بیوپسی جسم قطبی اول ب) بیوپسی جسم قطبی دوم

ج) بیوپسی بلاستوسیست د) بیوپسی بلاستومر

۱۱-رایج ترین فن استفاده شده جاری در PGD کدام است ؟

الف) FISH ب) PCR ج) Microarray د) CGH

۱۲- کدام یک از روشهای زیر جهت تشخیص اختلالات کروموزومی در PGD استفاده می شود؟

الف)PCR آشیانه ای ب) RDB ج) Microarray د) FISH

۱۳- از کدامیک از روشهای زیر جهت تشخیص اختلالات تک ژنی در PGD استفاده می شود؟

الف) Fluorescent PCR ب) FISH ج) CGH د) PGD-AS

۱۴- بزرگترین مانع جهت انجام PGD صحیح و موثر اختلالات تک ژنی کدام است؟

الف) آلودگی با DNA خارجی ب) عدم موفقیت تکثیر

ج) هزینه بالا د) از دست رفتن اللی

۱۵- پیامد ADO در کدام یک از موارد زیر می تواند به انتقال رویانهای مبتلا منجر گردد؟

الف)در اختلالات مغلوب اتوزومی زمانی که هر دو آلل به ارث رسیده جهش مشابهی را حمل می کنند.

ب) اختلالات غالب اتوزومی

ج) اختلالات کروموزومی

د) اختلالات مغلوب وابسته به X

Archive of SID
www.SID.ir

فصلنامه علمی - پژوهشی
طب و تزکیه
پاییز و زمستان ۱۳۸۶ - شماره ۶۷ - ۶۶

۱۶- میزان موفقت PGD چند در صداست؟

الف) ۱۱-۶ ب) ۲۱-۱۶ ج) ۴۱-۳۶ د) ۵۱-۴۶

۱۷- کدام یک از گزینه های زیر صحیح است؟

الف) بیشترین تعداد مراجعین PGD برای اختلالات وابسته به X، مربوط به سندروم Rett می باشد.

ب) حاملین جابه جایی های خانوادگی متعادل از نظر ظاهری غیر طبیعی می باشند.

ج) حاملین جابه جایی های خانوادگی متعادل مشکلات باروری ندارند.

د) در میانگین از هر ۵۰۰ نفر یک نفر حامل یک جابه جایی متعادل می باشد.

۱۸- کدامیک از گزینه های زیر صحیح است؟

الف) با استفاده از بیوپسی اسپرم اختلالات به ارث رسیده از پدر قابل تشخیص می باشند.

ب) با استفاده از بیوپسی جسم قطبی اختلالات به ارث رسیده از پدر قابل تشخیص می باشد.

ج) رایج ترین روش انجام بیوپسی در PGD، بیوپسی بلاستومرها می باشد.

د) در بیوپسی بلاستوسیست از ICM نمونه برداری می شود.

۱۹- کدام یک از موارد زیر صحیح است؟

الف) در PGD حداکثر چهار رویان غیر مبتلا در رحم کاشته می شود.

ب) از جمله مشکلات PGD، سندروم OHSS می باشد.

ج) با استفاده از بیوپسی بلاستومر تنها اختلالات به ارث رسیده از مادر قابل تشخیص است.

د) از جمله مزایای PGD، میزان موفقیت بالای آن می باشد.

۲۰- انجام PGD در کدام یک از کشور های زیر ممنوع می باشد.

الف) ایران ب) انگلستان ج) هندوستان د) استرالیا

Archive of SID

www.SID.ir