

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دوره ۳۴ شماره ۴ مهر و آبان ۱۳۹۱ صفحات ۱۱۱-۱۰۷

## مطالعه سیتوزنتیک زوجین دارای مشکل سقط مکرر خودبخودی جنین مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی جهاد دانشگاهی تبریز طی سالهای ۱۳۸۵-۱۳۸۰

جعفر محسنی: مرکز ناباروی آذربایجان، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی جهاد دانشگاهی استان، تبریز، ایران

E-mail: jafarmohseni@yahoo.com

شهین زلالی مهد مهین: مرکز مشاوران سلامت تبریز، ایران  
هابده فرحمن‌آذر: مرکز ناباروی آذربایجان، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی جهاد دانشگاهی استان، تبریز، ایران  
آرزو لطفی وند: مرکز ناباروی آذربایجان، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی جهاد دانشگاهی استان، تبریز، ایران

دریافت: ۹۰/۱۲/۱۸ پذیرش: ۹۱/۶/۱۴

### چکیده

**زمینه و اهداف:** سقط خودبخودی جنین به از دست دادن آن تا هفته بیستم حاملگی اطلاق می شود. عدم موفقیت در بارداری و سقط مکرر خودبخودی جنین هزینه های اقتصادی و روانی برای خانواده و جامعه دارد. بخشی از این مشکل ناشی از اختلالات ژنتیکی و کروموزومی می باشد. هدف از این مطالعه، بررسی میزان اختلالات سیتوزنتیکی در زوجین دارای سقط مکرر خودبخودی بود.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه گذشته نگر از ۴۰۰ زوج که دارای بیش از دو بار سابقه سقط خود بخودی جنین بودند پس از بررسی سوابق پزشکی، آزمایش کشت کروموزومی و کاریوتایپ به روش استاندارد سیتوزنتیکی و GTG Banding به عمل آمد.

**یافته‌ها:** پس از انجام کاریوتایپ، ناهنجاری کروموزومی در ۴٪ (۳۲) افراد وجود داشت. که ۴۵٪ (۱۴ نفر) از آنها مرد و مابقی زن بودند. ۳٪ اختلالات مربوط به کروموزومهای جنسی و مابقی به علت ناهنجاری در کروموزومهای اتوزمال بود.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه سیتوزنتیکی زوجین دارای سابقه سقط مکرر خودبخودی جنین به منظور تشخیص هر گونه اختلال کروموزومی ضروری است. به منظور جلوگیری از تولد کودکان با ناهنجاریهای کروموزومی، انجام آزمایش تشخیص پیش از تولد در زوجین دارای ناهنجاری کروموزومی برای پیشگیری از تولد فرزند مبتلا به اختلالات کروموزومی از اهمیت بالائی برخوردار است.

**کلید واژه‌ها:** GTG banding، ناهنجاری کروموزومی، سقط مکرر خودبخودی جنین

### مقدمه

به سختی می توان چیزی را عامل ناکامی تولید مثل معرفی نمود چرا که این مشکلات ممکن است از علل ژنتیکی گرفته تا وقایع فیزیولوژیکی را شامل شود که در پدر، مادر و یا در جنین بروز می کنند و هر یک از آنها از مکانیسم های سلولی و یا ملکولی خاصی ناشی شود. لذا عوامل ژنتیکی، ایمونولوژی، هورمونی، اختلالات انعقادی، عفونی و آناتومیک در بروز آن موثر هستند (۵). طبق بررسی های به عمل آمده، نقش ناهنجاری های کروموزومی

تولید مثل انسان کفایت پائینی دارد بطوریکه ۳۰٪ از لقاح ها به تشکیل جنین منتهی نشده و سقط می شود (۱و۲). سقط خودبخودی به از دست رفتن جنین قبل از هفته بیستم حاملگی اطلاق می شود و بر اساس زمان سقط، به سقط غیر عمد پره کلینیکال و سقط های بالینی تقسیم می گردد و در کل حدود ۵٪ از زوجین با این مشکل دست به گریبان هستند (۴-۲).

خون محیطی به روش زیر به عمل آمد. افرادی که سابقه اختلالات آناتومیک در اندامهای زایشی، سابقه مثبت بیماریهای عفونی TORCH (توکسوپلازما، روبلا، لیستریا و هرپس)، بیماری های انعقادی و ایمونولوژیک و سابقه تماس با عوامل تراتوژن محیطی و دارویی داشتند از مطالعه حذف شدند.

به منظور رعایت اخلاق پزشکی، از مراجعین در زمان انجام مشاوره ژنتیکی رضایت نامه مبنی بر استفاده علمی از نتایج آزمایشات دریافت گردید. بعد از گرفتن خون محیطی از افراد در ونوجکتهای هپارینه، ۱ میلی لیتر آن در ۹ میلی لیتر محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ (GIBCO, USA) حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر محرک لنفوسیتی فیتو همآگلوتین (PHA)، ۱٪ حجمی آنتی-بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین و غنی شده با ۲۰٪ حجمی سرم جنین گاو (GIBCO, USA)، و ۲۰۰ میلی مول آل - گلوتامین منتقل گردید. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد، جهت توقف متافاز، ۳۰ دقیقه قبل از عمل هاروست مقدار ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر کالسمید (Bio Sera) به محیطها اضافه شد. پس از سانتریفوژ کردن سلول ها در مجاورت  $0.075KCl$  مولار قرار داده شده و ۱۵ دقیقه بعد سانتریفوژ و مایع روئی برداشته شد. بدنال آن با افزودن تدریجی محلول فیکساتیو (سه واحد متانل مرک با یک واحد اسید استیک مرک) به لوله ها اضافه نموده و لام تهیه شد و بعد لام ها در مجاورت تریپسین (GIBCO ۱/۲۵۰) و محلول رنگی گیمسا بندینگ رنگ آمیزی شدند. سپس تعداد ۲۵ گسترش متافازی از هر فرد بررسی و کاریوتایپ شد.

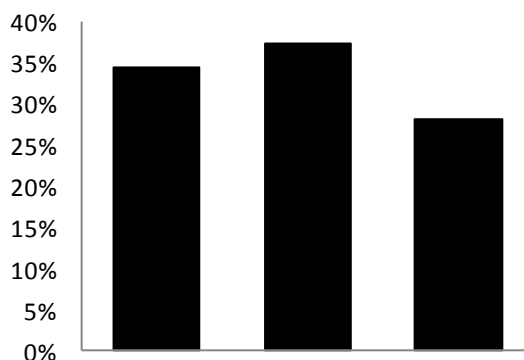
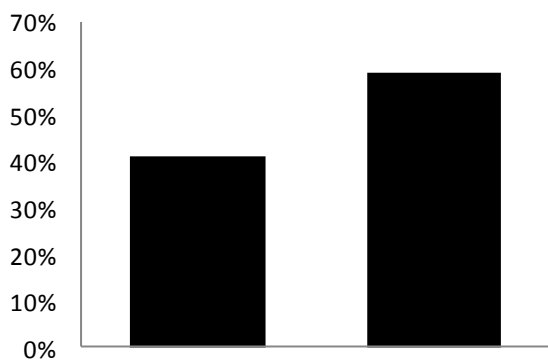
## نتایج

تعداد ۸۰۰ نفر با سابقه حداقل دو بار سقط مکرر خودبخودی یا بیشتر طی سالهای ۱۳۸۵-۱۳۸۰ با میانگین سنی ۳۲/۲ با  $SD=6/5$  (جوانترین فرد ۲۲ ساله و مسن ترین ۴۸ ساله) مورد بررسی قرار گرفتند. بیش از ۶۵٪ افراد ۳ یا بیش از سه بار سقط را تجربه کرده بودند (نمودار ۱). کاریوتایپ ۷۶۸ نفر طبیعی (XX، ۴۶، و یا XY، ۴۶) بود و کاریوتایپ ۳۲ نفر دارای ناهنجاریهای کروموزومی بودند و میزان ناهنجاری در زنان بیش از مردان بود (جدول ۱، نمودار ۲). در کل میزان اختلال کروموزومی ۴٪ محاسبه گردید که از این تعداد در ۱۰٪ افراد کروموزومهای جنسی دارای اختلال (تعدادی یا ساختمانی) و در ۹۰٪ مابقی کروموزومهای اتوزمال دارای ناهنجاری بودند. شایعترین ناهنجاری ساختمانی در درجه اول جابجائی رابرتسونی بین کروموزومهای ۱۳ و ۱۴ (۱۴g; ۱۳g) و بعد از آن شکستگی های کروموزومی و وارونگی در ناحیه ساترومر (پری ساتریک) کروموزوم ۹ ملاحظه گردید (نمودار ۳).

در بروز سقط جنین در سه ماهه اول کاملاً به اثبات رسیده است و حدود ۵٪ زوجین با سقط دو بار یا بیشتر حامل ناهنجاری ساختمانی کروموزومها بوده و یا ممکن است همزمان با چند مشکل دست به گریبان باشند. همچنین عوامل متعددی باعث افزایش خطر سقط خودبخودی می باشند که از ریسک فاکتورهای مهم، می توان به سن بارداری، سن مادر و سوابق پس از زایمان اشاره کرد (۴). بر اساس مطالعات انجام گرفته مصرف سیگار در دوران بارداری باعث افزایش ۱/۴ تا ۱/۸ برابر خطر سقط می شود. در صورت استنشاق غیر مستقیم دود سیگار، خطر سقط ۱/۵۲ تا ۲/۱۸ برابر افزایش می یابد. مصرف یکبار در روز الکل و یا بیش از ۳۷۵ میلی گرم کافئین در روز به ترتیب باعث افزایش ۴/۸۴ و ۲/۲۱ برابر خطر سقط جنین می شود (۴). صرف نظر از عوامل محیطی و تراتوژن، بیش از ۵۰٪ موارد بسته به سن مادر و سن بارداری، اختلالات کروموزومی در رویان و یا جنین باعث سقط می شوند (۶). تخمین زده می شود که آنیوپلوئیدی های جنین (اختلالات تعدادی کروموزومی) مسئول ۷۰٪ سقط های قبل از هفته ششم بارداری باشند. در ۱۵٪ از حاملگی های منتهی به سقط هفته های ۶-۱۰ بارداری، میزان ناهنجاریهای تعدادی و ساختمانی کروموزوم جنینی ۵۰٪ است (۷) و در این بین تریزومی ها از شایعترین عوامل می باشند که از Non-disjunction میوزی والدین ناشی می شوند و بدیهی است که کاریوتایپ والدین نرمال خواهد بود (۸). بیش از ۹۰٪ ناهنجاریهای کروموزومی مشاهده شده در جنین های سقط شده، اختلالات تعدادی کروموزومی گزارش شده است (۹). ناهنجاریهای ساختمانی، گروه مشخصی از اختلالات از جمله جابجائی های متعادل و نامتعادل، وارونگی، حذف و اضافه شدگی را دربر می گیرد (۸). تخمین زده می شود میزان شیوع ناهنجاریهای ساختمانی کروموزومی-جابجائی متعادل کروموزومی و ترانسلوکاسیون رابرتسونی- در یکی از زوجین با مشکل سقط مکرر ۳ تا ۵٪ باشد و ثابت شده است که این قبیل زوجین خطر کمتری به داشتن فرزند زنده با ناهنجاری کروموزومی نامتعادل دارند و علیرغم خطر بالای سقط جنین، شانس داشتن فرزند سالم در اینها برابر افراد بدون ترانسلوکاسیون است. در صورت ارزیابی و درمان دیگر ریسک فاکتورها، شانس تولد زنده سالم در کودکان زوجین حامل انومالی های ساختمانی کروموزومی ۷۱ تا ۸۳ درصد تخمین زده می شود (۱۱و ۱۰و ۱۲و ۱۳). هدف این مطالعه مشخص نمودن نوع و میزان اختلالات کروموزومی مشاهده شده در زوجین دارای سقط مکرر خودبخودی جنین مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی جهاد دانشگاهی استان آذربایجان شرقی طی سالهای ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۵ بود.

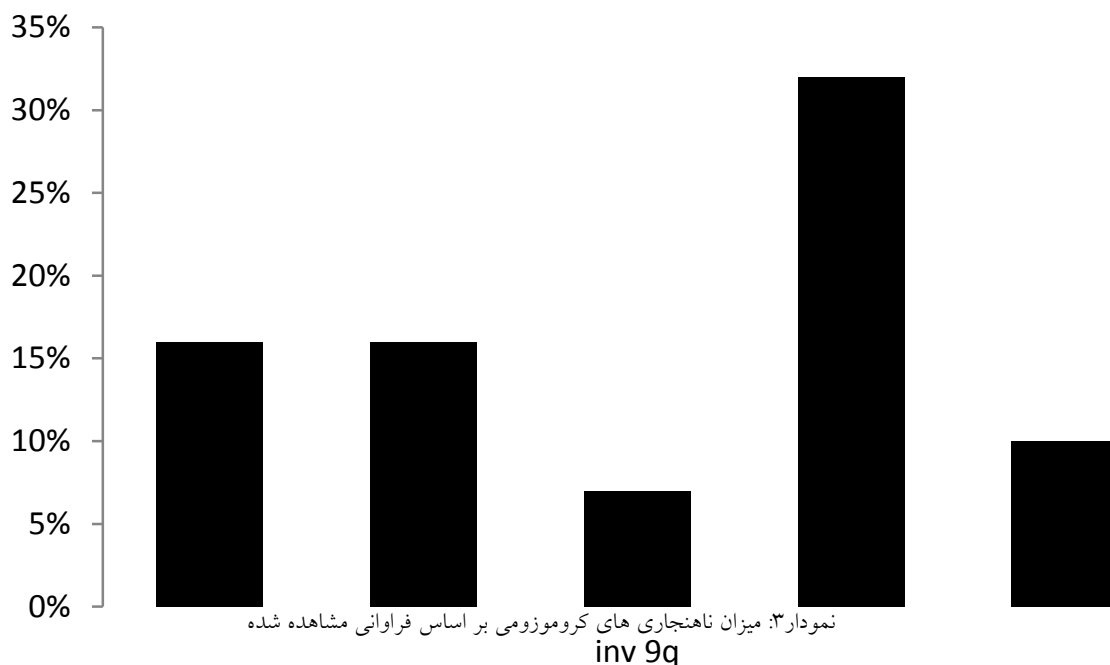
## مواد و روشها

جمعیت مورد مطالعه از ۴۰۰ زوج (۸۰۰ نفر) مراجعه کننده دارای سابقه سقط مکرر خودبخودی طی سالهای ۱۳۸۰ لغایت ۱۳۸۵، بعد از دریافت اطلاعات و سوابق پزشکی آزمایش کاریوتایپ از



نمودار ۲: فراوانی ناهنجاری های مشاهده شده بر اساس جنسیت زوجین

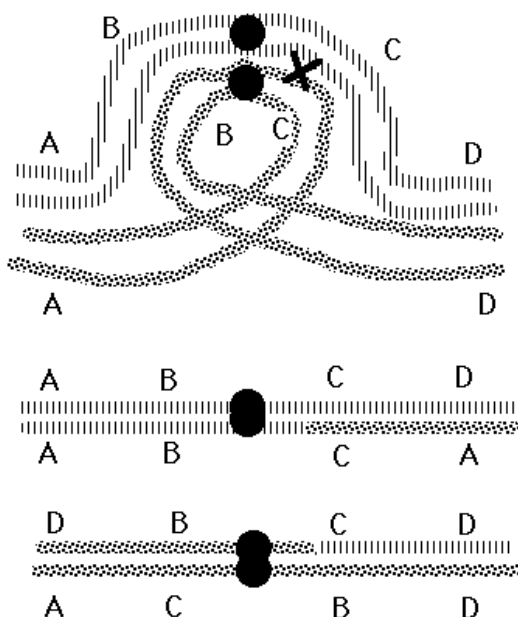
نمودار ۱: درصد تعداد سقط جنین در بیماران



نمودار ۳: میزان ناهنجاری های کروموزومی بر اساس فراوانی مشاهده شده

جدول ۱: نتایج افراد دارای کاریوتایپ غیر طبیعی

ردیف	کاریوتیپ	ردیف	کاریوتیپ
1	45,XY t(13q;14q)	22	45,XX t(21q;18q)
2	46,XY t(6q;12q)	23	45,XX t(13q;14q)
3	45,XXt(13q;14q)	24	46,XX fra3q
4	46,XX/47,XXX	25	46,XY dup 16q
5	46,XX del(9q22.1;22.3)	26	46,XY fra13q
6	45,Xy t(13q;14q)	27	46,XX t(2q;6q)
7	46,XY del(9q11-12)	28	46,XX del2q
8	46,XX t(2q;12q)	29	46,XX fra2q11
9	46,XYt(11q;13q)	30	46,XY inv(11p36.3;12q22)
10	46,XY delYq	31	46,XY inv9q
11	46,XY fra3q	32	45,XX t(5q;13q)
12	46,XX inv9q		
13	46,XX t(1q33;4q35)		
14	46,XX t(1p33;14q23)		
15	46,XY t(15q;22q)		
16	46,XY t(7q;14q)		
17	46,XY fra4q		
18	46,XX fra3q		
19	46,X Y(h+)		
20	46,XX fra5q		
21	46,XX t(4q;Xq)		



شکل ۴: شمای تاثیر اینورژن پری سانتریک در تقسیمات میوز برگرفته از سایت: <http://nitro.biosci.arizona.edu/courses>

## بحث و نتیجه گیری

سقط مکرر خودبخودی مشکل پزشکی حداقل ۵٪ از زوجین است (۱۲). لذا حمایت و کمک های پزشکی جهت تشخیص علل و ارائه راهکارهای مناسب در جهت رفع مشکل باید مد نظر باشد (۹).

اختلالات کروموزومی باعث کاهش قدرت باروری در زن و مرد می شود. حدود ۱۵-۲۰٪ بارداری ها به سقط جنین منتهی می شوند. اغلب سقط جنین در سه ماهه اول بارداری ناشی از ناهنجاریهای کروموزومی هستند. و در بیش از ۵۰٪ جنین های سقط شده این ناهنجاری مشاهده می شود (۴). بخش عمده این آنومالیهای کروموزومی (۹۵٪) از نوع آنیوپلوئیدی (اختلالات تعدادی) است. حدود ۶۰٪ موارد تریزومی، ۲۰٪ موارد مونوزومی کروموزوم X و ۱۵٪ موارد از نوع پلی پلوئیدی، خصوصا تریپلوئیدی است (۱۳). در مواقعی که جنین دارای آنیوپلوئیدی است معمولا والدین کاریوتایپ طبیعی دارند. ولی اختلالات ساختمانی کروموزوم والدین می تواند به سقط جنین و یا ناباروری منجر شود (۸). بر اساس مطالعات متعدد انجام شده، در ۵/۵٪ زوجین دارای مشکل RPL، یکی از آنها دارای نوعی جابجائی متعادل کروموزومی بوده اند و همچنین مشاهده شده است که جابجائی های متعادل کروموزومی در خانمها دو بار بیشتر آقایان دیده می شود. جابجائی ها در آقایان معمولا با ناباروری همراه است (۲). جابجائی ها از انواع بسیار شایع اختلالات کروموزومی هستند و در کل ۷۵٪ آنها مربوط به کروموزوم های اتوزوم می باشند. و در مطالعه حاضر ۴۸٪ از موارد را شامل شده است. Engels و همکاران که در سال ۲۰۰۸ تعداد ۱۰۱ فرد دارای سقط مورد بررسی قرار داده بودند و جابجائی رابرتسونی کروموزومهای

۱۳ و ۱۴ را شایعترین نوع ترانسلوکاسیون گزارش نموده اند که مطالعه حاضر نیز موید آن است (۱۴).

از جمله موارد مورد مناقشه در سقط جنین، نقش تغییرات جزئی یا مینور و یا چند شکلی های نرمال است. تغییراتی که در بیشتر از ۱٪ جمعیت مشاهده شود پلی مرفیسم نامیده می شود. ناقلین فاقد هرگونه پیامد ژنتیکی در خود هستند ولی در تقسیم میوز سلولی اینورژن هتروزیگوت کروموزومها باعث به وجود آمدن حلقه یا لوپ در ناحیه معکوس شده گشته و دو بل و یا حذف شدگی قطعات کروموزومی در ۵۰٪ سلول های جدید می شود (شکل ۴). بر اساس گزارشات متعدد طویل بودن بیش از اندازه بازوی بلند کروموزوم Y و یا حذف شدگی های ریز در این کروموزوم، در سقط مکرر مشاهده شده است (۷ و ۱۵). تغییرات پلی مورفیک در کروموزومهای ۱، ۱۶، Y و بویژه در کروموزوم ۹ به وفور مشاهده می شود لذا به منظور تعیین تاثیر معکوس شدگی در ناحیه سانترومر یا پری سانتریک اینورژن در کروموزوم ۹، Judit H Ford و همکارانشان مطالعه ای انجام دادند که نتیجه آن در افراد دارای سابقه سقط مکرر در مقایسه با گروه کنترل به شدت معنا دار بود (۱۶). شکستگی های کروموزومی از دیگر اشکال ناهنجاریها هستند که به شکل شکاف یا گپ و همچنین شکستگی دیده می شوند و مقالات متعددی تاثیر شکستگی ها در بروز سقط جنین گزارش نموده اند. و اهمیت اینها از آنجا ناشی می شود که این تغییرات کروموزوم را مستعد حذف و یا اضافه شدگی در تقسیمات میوز جنینی می نمایند (۱۷ و ۱۸).

در ایران، مطالعه سیتوژنتیکی زوجین دارای مشکل سقط مکرر توسط دهقانی فیروزآبادی و همکاران در سال ۲۰۰۶ میلادی روی ۸۸ زوج در یزد، ۱۲/۵٪ اختلال کروموزومی گزارش کرده است

کروموزومی مشاهده شده بیش از ۱۰٪ گزارش شده است. با عنایت به اینکه احتمال تولد کودکان مبتلا به عقب ماندگی ذهنی از این افراد وجود دارد، لذا انجام کاربوتایپ در افراد دارای سقط مکرر خودبخودی ضروری بوده و باید تشخیص پیش از تولد در بارداریهای افراد دارای اختلال کروموزومی انجام پذیرد. همچنین با توجه به اینکه تعداد کثیری از افراد دارای سقط مکرر دارای کاربوتایپ طبیعی هستند انجام بررسی‌های ملکولی و همچنین سیتوژنتیک ملکولی در این افراد کمک کننده خواهد بود.

### تشکر و قدردانی

از پرسنل زحمت‌کش آزمایشگاه جهاد دانشگاهی استان آذربایجان شرقی که در اجرای طرح ما را یاری نمودند کمال تشکر دارد.

(۱). همچنین در مطالعه دیگری که توسط دکتر حسن زاده نظر آبادی و همکاران در سال ۲۰۰۵ روی ۱۵۳ زوج مشهودی انجام داده بودند ۹/۸٪ جایجائی متعادل کروموزومی گزارش شده است (۱۳). بر اساس مطالعه مشابه انجام شده در پادشاهی عمان بین ۳۶۰ زوج (۷۸۰ نفر) میزان اختلالات کروموزومی مشاهده شده در زوجین ۴۲/۳٪ گزارش شده است که ۸/۲٪ اختلالات ساختمانی بوده است (۱۹).

هدف ما از این مطالعه بررسی میزان ناهنجاریهای شایع کروموزومی در سقط مکرر خودبخودی در افراد مراجعه کننده به مرکز ژنتیک پزشکی جهاد دانشگاهی آذربایجان شرقی بود که با توجه به مطالعات قبلی انجام شده در کشورها و استانهای دیگر، میزان ناهنجاری مشاهده شده در افراد ۴٪ بود که با مطالعات قبلی همخوانی دارد هر چند که در بعضی از آنها میزان اختلال

## References

- Dehghani Firoozabadi R, Seyed-Hasani SH, Ghasemi N, Asgharni M, Sheikhha MH. Cytogenetic analysis in couples with recurrent spontaneous abortion. *Iran J of Reprod Med* 2002; **4**(1): 203-208.
- Rubio CP, Rodrigo L, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview. *Am J Reprod Immunol* 2005; **53**(4): 159-165.
- Sierra S, Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006; **24**(1): 17-24.
- Hassanzadeh Nazarabadi A, Aboutorabi R. Balanced chromosomal translocation of parents in relation to spontaneous abortions. *J of sci Islamic Rep Iran* 2005; **16**(3): 203-208.
- Lebovic DI, Gordon JD, Taylor RN. Reproductive endocrinology and infertility: *Handbook for clinicians*. 1<sup>st</sup> ed. Arlington, Scrub Hill Press, 2005; PP: 466.
- Hogge WA. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 2003; **189**(2): 397-400.
- Blumberg BDS, Rotter JD, Mohandas JI, Kaback T. Minor chromosomal variants and major chromosomal anomalies in couples with recurrent abortion. *Am J Hum Genet* 1982; **34**(6): 948-960.
- Warburton D, Thangavelu M, Ross L, Levin B, Kline J. Trisomy recurrence: a reconsideration based on North American data. *Am J Hum Gene* 2004; **75**(3): 376-385.
- Malek asgar MA, Hashemi Tabar SMA. Cytogenetic study of patients with bad obstetric history. *J Sci Med J* 2006; **1**(3): 18-19.
- Stephenson MD, Sierra S. Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement. *Hum Reprod* 2006; **21**(4): 1076-1082.
- Venkateshwari A, Tella S, Nallari P, Akka J. A Robertsonian Translocation rob (14;15) (q10;q10) in a Patient with Recurrent Abortions: A Case Report. *J Reprod Infertil* 2010; **11**(3): 197-200.
- Sierra SS. Genetics of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006; **24**(1): 17-24.
- Stephanson MD, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case - control study. *Hum Repro* 2002; **17**: 446-451.
- Engels HE, Caliebe A, Jelska A, Schubert R. Genetic counseling in Robertsonian translocations der(13;14): frequencies of reproductive outcomes and infertility in 101 pedigrees. *Am J Med Genet A* 2008; **146**(20): 2611-2616.
- Dewan SP, Coulam E, Wilcox CB. Y-chromosome microdeletions and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2006; **85**(2): 441-445.
- Judith H, Ford DFC, Adrienne B. Within pair Differences of Human Chromosome 9 C-bandings associated with reproductive Loss. *Hum Genet* 1982; **61**: 360-363.
- Nadide N, Karadeniz YT, Imirzaliog N. New Heritable Fragile Site at 15q13 in Both Members of a Nonconsanguineous Couple. *American Journal of Medical Genetics* 2003; **118**: 3.
- Venkatraj VS, Verma RS. Chromosomal breakpoints in aborters. A relationship with heritable fragile sites. *Gynecol Obstet Invest* 1987; **24**(4): 241-249.
- Goud TM. Cytogenetic studies in couples with recurrent miscarriage in the Sultanate of Oman. *Reprod Biomed Online* 2009; **18**(3): 424-429.