منابع:

۱- محمدی. محمد حسن: بررسی چگونگی اجرای احکام شرع مقدس بر بالین بیماران اورژانس مختصر. مجموعه مقالات اولین کنگره اخلاق پرستاری، مرکز مطالعات وزارت بهداشت تهران ۱۳۷۳، ۴۵.

۲- بختیاری، فریده: لزوم آموزش احکام در موازین شرع در حرفه پرستاری، مجموعه مقالات اولین کنگره اخلاق پرستاری، مرکز مطالعات وزارت بهداشت تهران ۱۳۷۳، ۱۱۴-۱۱۵.

۳- توکلی بزاز، جواد: انطباق، ضرورت ها و موانع، طب و تزکیه، ۱۳۷۴، شماره ۱۸، ص ۱۳-۸.

۴- جمعی از اساتید حوزه و دانشگاه: اخلاق پزشکی، تهران: معاونت امور فرهنگی وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی، ۱۳۷۳.

۵- مرادی، آذر: ضوابط اخلاقی درپرستاری اطفال، خلاصه مقالات اولین کنگره سراسری اخلاق پرستاری، تهران: مرکز مطالعات و تحقیقات اخلاق پزشکی معاونت امور دانشجوئی فرهنگی و حقوق وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، ۱۳۷۳.

۶- حجه الاسلام محمد نصر: اخلاق اسلامی و حرفه پرستاری، خلاصه مقالات اولین کنگره اخلاق پرستاری مرکز مطالعات وزارت بهداشت، ۱۳۷۳، ۲۱-۲۰.

۷- ناجی سیدعلی، بررسی موانع اجرای احکام شرعی در خدمات پرستاری از دیدگاه پرستاران شاغل در بیمارستان های منتخب دولتی / اصفهان، مجموعه مقالات کنگره سراسری اخلاق پرستاری تهران ۱۳۷۳، ۴۵-۴۲.

۸- مرادی، آذر: رعایت ایمنی مددجویان براساس موازین شرعی، خلاصه مقالات اولین همایش سراسری ایمنی مددجو. تبریز، ۱۳۸۰.

طب و تزکیه: سال شانزدهم- بهارو تابستان ۱۳۸۶ - صفحه ۴۳ تا ۵۳ مقاله بازآموزی

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 دو امتیاز باز آموزی به پزشکان عمومی و متخصصین ژنتیک ومتخصصین داخلی تعلق میگیرد

تشخیص ژنتیکی پیش از لانه گزینی (PGD)

نویسندگان: اصغر کرزبر[1]، دکتر رضا بهجتی اردکانی[2]، دکتر محمد حسین مدرسی[3]

چکیده:
تشخیص پیش از لانه‌گزینی (PGD) روشی برای پیشگیری از ابتلا به بیماریهای ژنتیکی است که اصولاً از تشخیص پیش از تولد (PND) منشاء گرفته است و شامل مجموعه‌ای از تکنیک ها است که برای شناسایی انواع ناهنجاری‌های ژنتیکی بکار می‌رود. در این روش جنین به صورت لقاح آزمایشگاهی (IVF) شکل می‌گیرد و سپس در مرحله ۶ تا ۸ سلولی، یک یا دو سلول از آن بیوپسی می شود. در مرحله بعد سلول بیوپسی شده مورد آنالیز ژنتیکی قرار می گیرد و در صورت سالم بودن، جنین به رحم مادر منتقل می شود. اما در صورت ابتلا، انتقال صورت نمی‌گیرد. لذا حاملگی با جنین‌های سالم ایجاد می‌شود ونیازی به سقط نمی‌باشد. استفاده از PGD روز به روز شایع‌تر می شود و با بکارگیری تکنیک‌های جدید به مرور کارآیی آن افزایش می‌یابد.

کلید واژه‌ها: تشخیص ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی، تشخیص پیش از تولد، بیماری‌های وابسته به جنس، انتخاب جنسیت.

مقدمه

تشخیص ژنتیکی پیش از لانه گزینی یا PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis) روشی است که امکان بررسی ژنتیکی جنین ها را قبل ورود به رحم و شروع حاملگی فراهم می سازد. بدین منظور از جنین های بدست آمده به روش لقاح آزمایشگاهی (IVF) یک یا دو سلول بیوپسی می شود و از نظر بیماری ژنتیکی خاصی مورد بررسی قرار می گیرد. اگر سلول بیوپسی شده مبتلا نباشد، آنگاه می توان نتیجه گیری نمود که جنین مربوطه نیز عاری از بیماری ژنتیکی است. لذا جنین سالم به رحم مادر منتقل می گردد و حاملگی آغاز می شود. PGD همواره با IVF همراه است و برای زوجین بارور و نابارور به کار می رود (۱ و ۲).

تشخیص پیش از لانه گزینی امر جدیدی نیست در سال ۱۹۶۸، گاردنر و ادوارد با استفاده از الگوی خاص کروماتین X در بیوپسی بلاستوسیت های خرگوش، جنسیت جنین ها را قبل از انتقال به رحم مشخص نمودند. در انسان اصول کاربردهای بالینی PGD در سال ۱۹۸۰ پایه ریزی گردید و به تدریج به عنوان یک روش جایگزین برای تشخیص پیش از تولد یا PND (Prenatal Diagnosis) معرفی شده است (۳). در حال حاضر PGD تنها روش ممکن برای زوجینی است که در معرض داشتن بچه مبتلا به بیماری های ژنتیکی هستند و در ضمن نمی خواهند

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک دانشگاه تهران
۲-پزشک عمومی، عضو هیئت علمی پژوهشکده ابن سینا
۳-دکترای ژنتیک انسانی، استادیار و مدیر گروه ژنتیک

سقط جنین را در صورت مبتلا بودن جنین تجربه کنند. اولین مورد PGD که به تولد منجر شد، توسط Handyside در سال ۱۹۸۹ برای یک بیماری وابسته به X و پس از آن در سال ۱۹۹۲ برای CF (Cystic Fibrosis) گزارش گردید (۳). تا سال ۲۰۰۱ بیش از ۳۰۰۰ سیکل PGD گزارش شده که تقریباً به تولد ۷۰۰ کودک منجر گردیده است (۲). این آمار و ارقام بیانگر قابلیت اعتماد (Accuracy) و ایمن بودن (Safety) روش است. امروزه PGD برای هر بیماری که مترادف ژنی آن شناخته شده باشد امکان پذیر است و روز به روز به تعداد مراکزی که در آنها PGD انجام می شود افزوده می گردد.

PGD آخرین پیشرفت ها را در زمینه ژنتیک و پزشکی تولید مثلی تلفیق نموده است. به منظور انجام PGD ، ابتدا با استفاده از IVF جنین اولیه شکل می گیرد سپس از این جنین در مرحله ۶ تا ۸ سلولی یک یا دو سلول (بلاستومر) بیوپسی شده و به آزمایشگاه ژنتیک ارسال می گردد. در آزمایشگاه بسته به ماهیت بیماری PGD به دو روش اصلی یعنی PCR (Polymerase Chain Reaction) و FISH (Fluorescent in Situ Hybridization) انجام می شود. PCR روشی است که امکان تکثیر قطعات کوتاه DNA را فراهم می سازد و برای بیماری های تک ژنی به کار می رود در حالی که FISH امکان آشکارسازی نواحی کروموزومی را میسر ساخته و برای بیماری های کروموزومی به کار می رود (۴)(شکل ۱).

موارد استعمال PGD

● زوجینی که حداقل یکی از طرفین براساس مطالعات فامیلی حامل یا مبتلا به یک بیماری ژنتیکی قابل وراثت باشد.

● افرادی که سقط های مکرر داشته اند، خصوصاً در افرادی که سقط ها به خاطر ترانسلوکاسیون های کروموزومی می باشد.

● در زنان بالای ۳۵ سال به منظور غربالگری سندروم های آنیوپلوئیدی های وابسته به جنس یا PGD-AS ((satellite Associated

● در افراد مذکری که نیازمند به تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) هستند.

● در مواردیکه افراد برای سقط جنین با محدودیت های مذهبی و اخلاقی روبرو هستند.

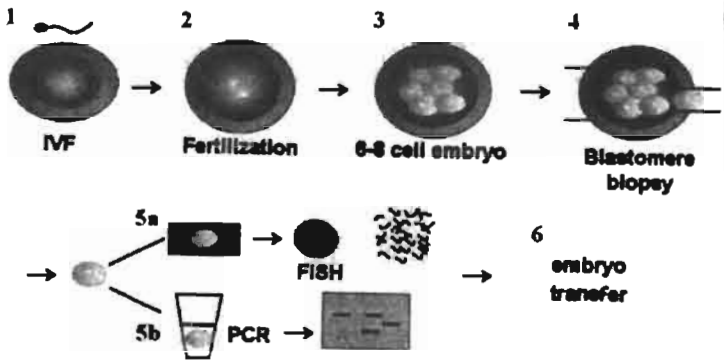
با استفاده از PGD می توان از بروز بسیاری از اختلالات ژنتیکی پیشگیری نمود. فهرست اختلالاتی که برای آنها PGD انجام می شود روز به روز در حال افزایش است این اختلالات را می توان به سه دسته کلی تقسیم نمود:

نقایص تک ژنی:

از آنجائی که شناسایی ژن معیوب با استفاده از DNA موجود در یک سلول امکان ندارد لذا به منظور انجام PGD برای اختلالات تک ژنی ابتدا لازم است DNA تک سلول به روش PCR تکثیر شده و در نتیجه در مقادیر بالا در دسترس قرار می گیرد. سپس قطعات تکثیر شده DNA متناسب با نوع اختلال ژنتیکی تجزیه و تحلیل می شوند. برخی از بیماری های تک ژنی که تاکنون برای آنها PGD انجام شده است شامل موارد زیر است: سیستیک فیبروزیس، آنمی سلول داسی شکل، سندرم مارفان، آتروفی ماهیچه ای نخاعی، بیماری شارکوت ماری توث تیپ یک A ، بتاتالاسمی، سرطان های ارثی، دیستروفی میوتونیک، هیپرپلازی مادرزادی آدرنال و بیماری هانتینگتون (۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱).

بیماری های وابسته به X :

تعیین جنسیت پیش از لانه گزینی (Sex Selection PGD) را می توان برای هر بیماری وابسته به X که تست اختصاصی با استفاده از PCR تک سلول برای آن وجود



شکل ۱: استفاده از RCR و FISH در تشخیص ژنتیکی پیش از لانه گزینی

نداشته باشد انجام داد. برای این قبیل بیماری ها می توان به بیماری های با اساس مولکولی ناشناخته، بیماری های کاملاً هتروژن (variable) و یا بیماری هایی که تشخیص آنها در سطح تک سلول امکان پذیر نباشد اشاره نمود. PGD Sex Selection را می توان به دو روش PCR یا FISH انجام داد. در هر دو روش با توجه به نحوهٔ انتقال بیماری های وابسته به X تنها جنین های مونث به رحم مادر منتقل می شوند. نقطه ضعف این روش در این است که نیمی از جنین های مذکر سالم دور ریخته می شوند (کنار گذاشته می شوند) و نیمی از جنین های مونث که منتقل می شوند حامل بیماری هستند. برخی از بیماری های وابسته به X عبارتند از: دیستروفی عضلانی دوشن، هموفیلی، سندرم X شکننده، عقب ماندگی ذهنی، آگاماگلوبولینمیا، سندرم ویسکوت آلدریچ و سندرم لش نیهان (۴ , ۱۲ و ۱۳).

ناهنجاری های کروموزومی:

اختلالات کروموزومی طیف وسیعی از بیماری های ژنتیکی را شامل می شوند. با استفاده از تکنیک FISH می توان بسیاری از این ناهنجاری ها را تشخیص داد. بسیاری از زوجین حامل این نوع ناهنجاری ها ممکن است بدون استفاده از PGD هرگز موفق به بچه دار شدن نشوند. ناهنجاری های کروموزومی به دو دسته اصلی ناهنجاری های عددی کروموزومی (آنیوپلوئیدی) و ناهنجاری های ساختمانی کروموزومی (ترانسلوکاسیون) تقسیم می شوند.

الف: ناهنجاری های عددی کروموزومی:

هدف از PGD ناهنجاری های عددی کروموزومی، غربالگری جنین ها از نظر این ناهنجاری های رایج است. این نوع PGD در زوجین ناباروری که سابقه IVF همراه با سقط های مکرر دارند، یا افرادی که چندین بار در اقدام به IVF با شکست روبرو شده اند یا در مواردی که سن مادر بالا باشد (زنان ۳۵ ساله یا مسن تر) صورت می گیرد. شواهد نشان می دهد که پایین بودن میزان موفقیت در IVF در زنان مسن با افزایش ناهنجاری های کروموزومی در تخمک و آن هم به نوبه خود در جنین های حاصله از آنها ارتباط دارد. با استفاده از تکنیک FISH می توان جنین ها را پیش از لانه گزینی برای ناهنجاری های کروموزومی خاص غربالگری نموده و تنها جنین های با کروموزوم های طبیعی را انتخاب نمود. به این ترتیب می توان میزان لانه گزینی را افزایش داد و از میزان سقط های خودبخودی کاست (۱۴ , ۱۵ و ۱۶).

ب: اختلالات ساختمانی کروموزومی:

تقریباً ۱ نفر از هر ۵۰۰ نفر در جامعه حامل نوآرایی های ساختمانی هستند. حاملین این نوع ناهنجاری ها از لحاظ بالینی طبیعی هستند، زیرا این افراد کمبود خالص مواد ژنتیکی را ندارند. اما این حاملین ممکن است بارها با سقط جنین مواجه شوند و یا حتی ممکن است دارای بچه های نابهنجار و یا مبتلا به عقب ماندگی ذهنی شوند زیرا مشکل اصلی این افراد، عدم جدا شدن مناسب و برابر کروموزوم ها در مرحله اسپرم سازی (اسپرماتوژنز) و یا تخمک سازی (اووژنز) می باشد. برخی از این زوجین ممکن است قبل از این که صاحب بچه ای طبیعی شوند چندین سقط در مراحل اولیه حاملگی را تجربه کنند. PGD در زوجین حامل این نوع اختلالات کروموزومی می تواند در انتخاب جنین های با مجموعه کروموزومی طبیعی بسیار کمک کننده باشد. هدف اصلی از PGD برای این جابجایی های کروموزومی، بهبود بخشیدن نرخ تولدهای زنده از طریق کاهش سقط های خودبخودی یا بهبود میزان حاملگی در زوجین نابارور است (مثلاً بعد از شکست های مکرر در IVF). با به کارگیری تکنیک FISH و استفاده از ترکیبی از پروب ها می توان نواحی کروموزومی درگیر در جابجایی های کروموزومی را شناسایی نمود (۱۷ و ۱۸).

مراحل انجام PGD با استفاده از بلاستومر

مشاوره ژنتیکی:

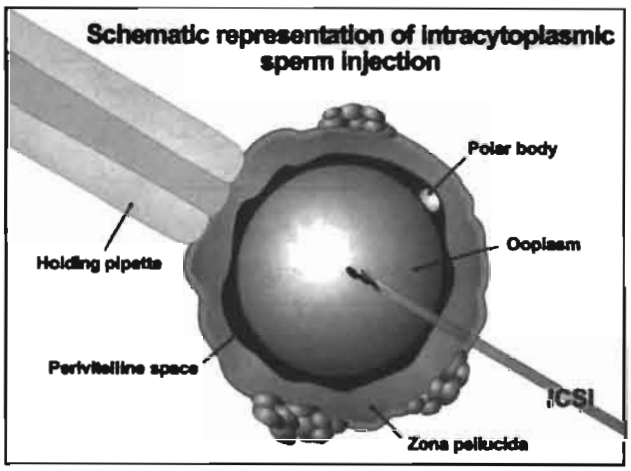
یکی از مهم ترین اقدامات در بررسی های اولیه، شناسایی موتاسیون یا اختلال مربوطه در والدین قبل از اقدام برای PGD می باشد. زوجین باید به منظور ارزیابی ریسک انتقال ناهنجاری ژنتیکی به فرزندانشان مورد مشاوره قرار گیرند، بخصوص اگر زوجین دارای ریسک بالایی برای انتقال ناهنجاری های ساختمانی یا بیماری های تک ژنی باشند. همچنین درباره معایب و مزایای روش PGD ، هزینه و احتمال موفقیت باید والدین را

آگاه ساخت و راه حل های احتمالی دیگری که ممکن است زوجین پیش رو داشته باشند را به آنها گوشزد نمود.

لقاح آزمایشگاهی (IVF):

همانطوری که قبلاً ذکر شد قبل از انجام PGD بایستی ابتدا تعداد مناسبی جنین را از طریق IVF ایجاد نمود. موفقیت در PGD تا حدود زیادی به تعداد جنین های با مورفولوژی خوب بستگی دارد که از طریق لقاح آزمایشگاهی بدست می آیند. یک سیکل IVF شامل مراحل زیر است:

ابتدا تحریک تخمدانی با تجویز هورمون صورت می گیرد.



شکل۲- تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم تخمک (ICSI)

در طی دوره تحریک با استفاده از اولتراسونوگرافی و تست های آزمایشگاهی رشد و تکامل فولیکول ها مورد پایش قرار می گیرد. در مرحله بعد فولیکول های بالغ را از تخمدان ها آسپیره نموده و محتوای آنها یعنی تخمک ها جمع آوری می شوند. تخمک های جمع آوری شده به مدت چند ساعت در محیط کشت قرار داده می شوند. سپس اسپرم از طریق روش ICSI به درون سیتوپلاسم تخمک تزریق می شود (شکل ۲). در صبح روز بعد از لقاح، تخمک ها از نظر علائم لقاح بررسی می شوند و سرانجام در روز سوم که جنین ها درحالت طبیعی دارای ۶ تا ۸ سلول هستند، بیوپسی صورت می گیرد (۱۹).

مواد ژنتیکی مورد استفاده در PGD

از سه منبع می توان DNA مورد نیاز برای PGD را فراهم نمود. این سه منبع شامل اجسام قطبی حاصل از اولین و دومین تقسیم میوزی، بلاستومرهای حاصله از جنین های مرحله کلیواژ و سلول های تروفواکتودرم حاصله از بلاستوسیت می باشد. هر روش بیوپسی حداقل دارای دو مرحلهٔ ایجاد رخنه در زونا پلوسیدا (Zona Pellucida) و برداشت سلول می باشد.

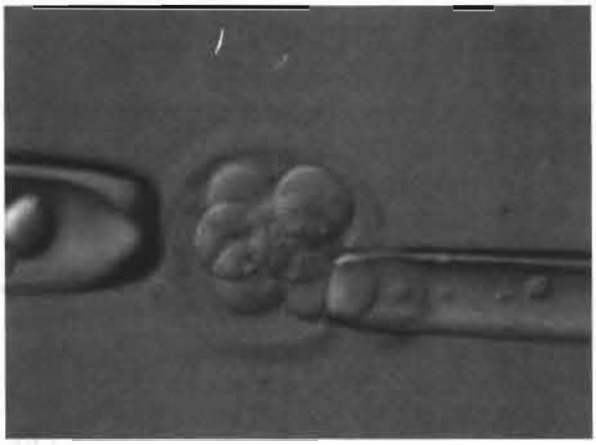
بیوپسی از اجسام قطبی:

این روش اولین بار توسط Verlinsky و همکارانش در سال ۱۹۹۰ به کار گرفته شد. با استفاده از این روش تنها می توان نقایص ژنتیکی مرتبط با مادر را تشخیص داد و در مورد اختلالات با منشاء پدر کارآیی ندارد. با توجه به این که اکثر اختلالات عددی کروموزومی منشاء مادری دارند، لذا با استفاده از آنالیز اجسام قطبی تنها می توان ناهنجاری های عددی کروموزومی به ارث رسیده از مادر را شناسایی نمود.

بیوپسی از بلاستومر:

بیوپسی از بلاستومر شایع ترین روش مورد استفاده برای PGD محسوب می گردد (۳). معمولاً بیوپسی جنین در صبح روز سوم تکامل جنین، یعنی زمانی که جنین ها از ۶ الی ۸ سلول تشکیل شده اند صورت می گیرد. در این روش جنین ها را مدت کوتاهی قبل از بیوپسی در محیط های کشت عاری از یون های Mg++ و Ca++ قرار می دهند تا اتصالات بین سلولی سست شده و انجام بیوپسی راحت تر گردد (۱). در این روش برای بیوپسی و برداشتن یک یا دو بلاستومر لازم است سوراخی در زوناپلوسیدا ایجاد گردد که ایجاد آن به سه روش مکانیکی (توسط میکرونیدل شیشه ای)، شیمیایی (توسط محلول اسیدی تایرود (Acid Tyrode solution) و لیزر صورت می گیرد. در روش اخیر برای ایجاد روزنه در زوناپلوسیدا از یک میکرودریل غیرتماسی استفاده می شود. در

این روش در حالی که جنین توسط پیپت نگهدارنده مهار شده است، پرتوهای لیزر ایجاد شده توسط دستگاه میکرودریل از



شکل ۳: بیوپسی بلاستومر در مرحله ۶ تا ۸ سلولی

طریق پیپت دیگری سوراخی را در زوناپلوسیدا ایجاد می کند. در مرحله بعد با استفاده از پیپت سوم یک یا دو بلاستومر آسپیره شده و سپس در محیط مناسب قرار داده می شود (شکل ۳). سلول های بیوپسی شده برای بررسی های ژنتیکی ارسال و با توجه به نوع بیماری ژنتیکی مورد بررسی، سلول های بیوپسی شده تحت آنالیز توسط FISH یا PCR قرار می گیرند.

اگر قرار باشد که از تکنیک FISH استفاده شود سلول بیوپسی شده در یک محلول هیپوتونیک قرار داده می شود تا متورم گردد. سپس سلول بر روی یک اسلاید شیشه ای قرار داده می شود در مرحله بعد با استفاده از محلول فیکساتیو (متانول و اسید استیک) محتوی سلولی شسته شده و از بین می رود و تنها مجموعه کروموزومی سلول برجا می ماند (۲).

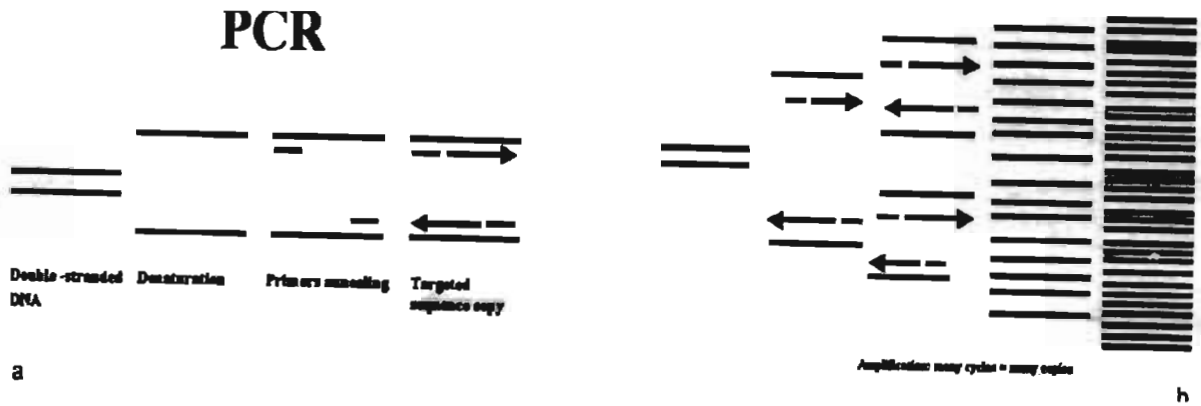
اما در صورت نیاز به تکنیک PCR سلول درون لوله مخصوص PCR گذاشته می شود. در داخل لوله مزبور بافری قرار دارد که امکان تکثیر قطعات DNA را به هنگام واکنش PCR فراهم می سازد (۲).

بیوپسی ازبلاستوسیست:

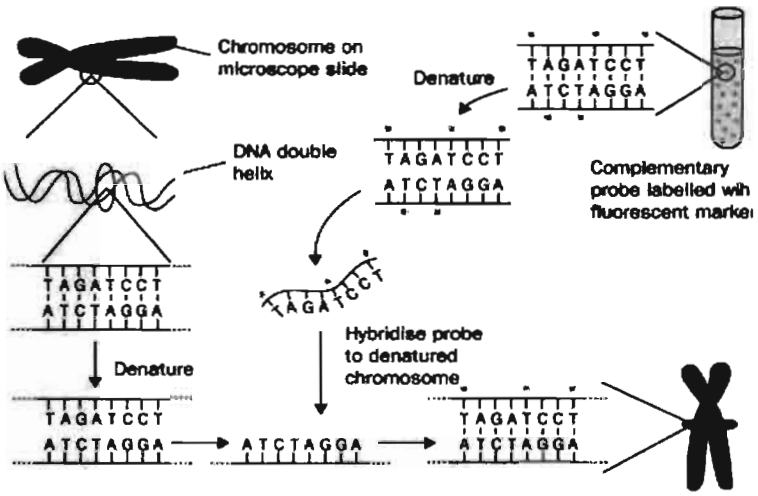
این روش تا کنون کمتر بکار گرفته شده است، زیرا انتقال دیرتر جنین به رحم مادر باعث کاهش احتمال حاملگی می گردد ولی ممکن است در آینده بیشتر مورد استفاده قرار گیرد.

آزمون های ژنتیکی PCR :

تمام آزمون های PGD برای اختلالات تک ژنی که تا کنون معرفی شده اند به واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) متکی هستند. PCR تکنیکی است که بوسیله آن توالی خاصی از DNA چندین بار تکثیر می شود تا امکان آنالیز DNA مورد نظر فراهم گردد. PCR



شکل ۴: مراحل مختلف واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) : a) در مرحله دناتوراسیون با استفاده از دمای ۹۴ درجه سانتیگراد دو رشته DNA از یکدیگر جدا می شوند. در مرحله اتصال پرایمرها، پرایمرهای Forward و Reverse در نقاط اختصاصی یعنی دو طرف قطعه ای که قرار است تکثیر شود، می چسبند. در مرحله بعدی پلیمریزاسیون رشته DNA جدید با کمک آنزیم Taq Polymerase انجام می شود. b) محصول PCR در هر مرحله به صورت تصاعدی افزایش می یابد و به حدی می رسد که قابل آشکارسازی باشد.



شکل ۵: مراحل مختلف هیبریداسیون در جای فلورسنت (FISH): پروبی که از قبل با مارکر فلورسنت نشان دار شده است، در مجاورت DNA دو رشته ای فرد بیمار قرار گرفته و بر اثر حرارت، هر دو دناتوره می شوند. سپس پروب به محل اختصاصی خود روی کروموزوم می چسبد و در زیر نور UV ، تابش فلورسانس در محل اتصال پروب مشاهده می گردد.

به سرعت یک ملکول DNA را به میلیاردها ملکول تبدیل می کند.

از لحاظ تکنیکی PCR شامل سه مرحله است که معمولاً این سه مرحله، بین ۲۰ تا ۴۰ بار تکرار می شود. اولین مرحله سیکل PCR شامل تک رشته ای نمودن DNA (Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد است که منجر به جدا شدن دو رشته DNA از یکدیگر می شود. این مرحله در ادامه به وسیله مرحله اتصال پرایمرها (Annealing) در دمای پایین تر دنبال می شود. در سومین مرحله یعنی مرحله طویل شدن (Extension)، آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت (Taq پلیمراز) نوکلئوتیدها را در فاصله بین محل اتصال دو پرایمر پلیمریزه می کند. در انتهای هر سیکل تعداد ملکول های DNA دو برابر شده و سیکل بعدی آغاز می گردد (۲۰) در شکل ۴ مراحل PCR به طور خلاصه نشان داده شده است.

محدود بودن مقدار DNA در یک سلول دیپلوئید (تقریباً ۷ پیکوگرم) منجر به بروز مشکلاتی می شود که بندرت در روش PCR معمولی (با مقدار DNA حداقل ۱۰ تا ۱۰۰ نانوگرم) با آن روبرو می شویم. آلودگی یکی از مشکلات مهم در PCR تک سلول است.

هنگامی که نمونه DNA آغازین تنها یک نسخه از ژنوم باشد، ریسک آلودگی با DNA خارجی فوق العاده افزایش می یابد. بنابراین برای اجتناب از آلودگی باید شرایط خاصی را رعایت نمود. تجهیزات و محلول های مورد استفاده باید کاملاً اختصاصی باشند و دائماً باید از تماس آنها با محصولات PCR جلوگیری نمود. محصولات PCR شایع ترین و اصلی ترین منبع آلودگی هستند (۲۱).

در PGD چون از سلول های جنینی بیوپسی شده بعد از IVF استفاده می شود، DNA با منشأ اسپرم یا سلول های کومولوس مادر منبع بالقوهٔ آلودگی دیگر هستند. به همین دلیل باید همهٔ سلول های کومولوس را در زیر میکروسکوپ به دقت از اطرف اووسیت جدا نمود. برای برطرف نمودن مشکل اسپرم های اضافی که به زوناپلوسیدا متصل می شوند می توان از تکنیک ICSI بهره جست.

مشکل دیگر در PCR تک سلول ADO (Drop out Allele) است. ADO پدیده ای است که بواسطه آن تنها یکی از دو آلل موجود در سلول تکثیر می شود و تنها در حالتی قابل تشخیص است که آلل ها هتروزیگوت باشند. ADO بزرگترین معضل در رسیدن به یک تشخیص درست و کارآمد برای اختلالات تک ژنی است و وخامت پیامدهای آن شدیداً به نحوهٔ وراثت اختلال مورد بررسی وابسته است. ADO به هنگام بررسی بیماری های اتوزومی غالب و همچنین بیماری های اتوزومی مغلوبی که دو جهش متفاوت وجود داشته باشد می تواند منجر به تشخیص اشتباه و انتقال جنین های مبتلا گردد (۲۱ و ۲۲).

FISH :

به منظور بررسی اختلالات ساختمانی کروموزومی، غربالگری اختلالات عددی کروموزومی و تعیین جنسیت از تکنیک FISH استفاده می شود. به طور خلاصه تکنیک FISH دارای مراحل زیر است. ابتدا بر روی یک اسلاید شیشه ای بلاستومر فیکس می شود. سپس پروب های نشاندار فلورسنت که توالی های خاصی از

کروموزوم‌ها را شناسایی می‌کنند، بر روی گسترهٔ سلولی اضافه می‌شوند و اجازه داده می‌شود تا کاملاً به کروموزوم‌های تک رشته‌ای شده بچسبند. بعد از یک مرحله شستشوی مختصر و برداشت پروب‌های اضافه، نتایج را می‌توان از طریق میکروسکوپ فلورسنت و با استفاده از فیلترهای رنگی مختلف آنالیز نمود (۲۰)(شکل ۵).

شایعترین منابع بروز خطا در هنگام استفاده از FISH برای تک سلول عبارتند از: از دست رفتن یا گم شدن میکرونوکلئوس‌ها، روی هم افتادن علامت‌ها (Signal Overlaping)، عدم هیبریداسیون یا هیبریداسیون ضعیف، وجود سیگنال‌های اضافی بخاطر شکسته شدن سیگنال‌های اصلی و موزائیسم (۱).

انتقال جنین

بعد از این که آزمایشگاه ژنتیک بررسی‌های لازم را در مورد وضعیت ژنتیکی جنین‌ها انجام داد، بر اساس اطلاعات به دست آمده، بین ۲ تا ۴ جنین به رحم مادر انتقال داده می‌شود. انتقال جنین از طریق کانال واژن و با استفاده از یک کاتتر پلاستیکی صورت می‌گیرد. اخیراً عمل انتقال با کمک اولتراسوند و به صورت هدایت شده انجام می‌گیرد. محل مناسب برای قرار دادن جنین‌ها قسمت بالای حفرهٔ رحم می‌باشد. پس از انتقال جنین‌ها لازم است که سطح هورمون‌ها در خون مادر بطور مرتب اندازه گیری شود و در صورت نیاز با تجویز هورمون سطح هورمونی مناسب ایجاد گردد (۲).

چشم اندازی به آیندهٔ PGD

از زمانی که PGD برای اولین بار مطرح شده تا کنون بیش از یک دهه سپری شده است. ظرف این مدت PGD برای بیماری‌های مختلفی به کار گرفته شده است و کارآیی آن نیز به اثبات رسیده است. امروزه PGD برای هر بیماری ژنتیکی که برای آن PND و سقط صورت می‌گیرد و همچنین برای آن دسته از بیماری‌هایی که معمولاً PND در مورد آنها انجام نمی‌شود، با حاملگی کنترل شده قابل انجام است. از این قبیل بیماری‌ها می‌توان بیماری‌های با سن شروع دیررس (هانتینگتون)، بیماری‌های با وراثت پیچیده، ناهنجاری‌های مادرزادی، ناسازگاری‌های گروه خونی و آزمون سازگاری HLA جنین با برادر یا خواهر مبتلا به اختلالات خونی به منظور پیوند سلول‌های بنیادی خون بند ناف را نام برد (۲۳ و ۲۴).

علاوه بر بعد کاربردی، جنبه‌های تکنیکی PGD نیز دائماً در حال پیشرفت است. تکنیک‌های جدید PGD کیفیت انجام PGD را بهبود خواهند بخشید. از این تکنیک‌ها می‌توان به بیوپسی با لیزرهای جدید، CGH (Comparative Genomic Hybridization)، PCR-DOP (Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR)، تبدیل متافازی (Nuclear Conversion)، Sky (Spectral Karyotyping) و تکنولوژی Chip اشاره نمود. ذکر این نکته ضروری به نظر می‌رسد که هر چند گزارشاتی از به کارگیری موفقیت آمیز این تکنیک‌ها در دسترس است اما داده‌های بیشتر باعث بهبود این روش‌ها به عنوان روش‌های بالینی استاندارد می‌گردد.

References:

1- Braude P, Pickering S, Flinter F, *et al.* Preimplantation genetic diagnosis. *Nat. Rev. Genet.* 2002, 3: 941-53.

2- Marik JJ. Preimplantation Genetic Diagnosis. *E. medicin. com.* 2005.

3- Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, *et al.* Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 1992, 327: 905-9.

4- Sermon K, Van Steirteghem A, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet.* 2004, 363(9421): 1633-41.

5- Xu K, Shi Z, Veeck L, *et al.* First unaffected pregnancy using preimplantation genetic diagnosis for sickle cell anemia. *JAMA,* 1999, 281: 1701-6.

6- Kuliev A, Rechistky S, Verlinsky O, *et al.* Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of thalassemias. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1999, 16: 207-11.

7- Dreesen J, Bras M, de Die-Smulders C, *et al.* Preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy. *Mol. Hum. Reprod.* 1998, 4: 881-5.
8- Piyamongkol W, Harper J, Sherlock J, *et al.* A successful strategy for preimplantation genetic diagnosis of myotonic dystrophy using multiplex fluorescent PCR. *Prenat. Diagn.* 2001, 21: 223-32.
9- Stern H, Harton G, Sisson M, *et al.* Non-disclosing preimplantation genetic diagnosis for Huntington disease. *Prenat. Diagn.* 2002, 22: 303-07.
10- Harton G, Tsipouras P, Sisson M, *et al.* Preimplantation genetic testing for Marfan syndrome. *Mol. Hum. Reprod.* 1996, 2: 713-5.
11- Rechitsky S, Verlinsky O, Chistokhina A, *et al.* Preimplantation genetic diagnosis for cancer predisposition. *Reprod. BioMed. Online.* 2002, 4:148-55.
12- Hussey N, Donggui H, Froiland D, *et al.* Analysis of five Duchenne muscular dystrophy exons and gender determination using conventional duplex polymerase chain reaction on single cells. *Mol. Hum. Reprod.* 1999, 5: 1089-94.
13- Sermon K, Seneca S, Vanderfaeillie A, *et al.* Preimplantation diagnosis for Fragile X syndrome based on the detection of the non-expanded paternal and maternal CGG. *Prenat. Diagn.* 1999, 19: 1223-30.
14- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, *et al.* Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil. Steril.* 1997, 68: 1128-31.
15- Kahraman S, Bahce M, Samli H, *et al.* Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. *Hum. Reprod.* 2000, 15: 2003-7.
16- Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos. *Prenat. Diagn.* 2002, 22: 312-8.
17- Munne´ S, Scott R, Sable D, *et al.* First pregnancies after preconception diagnosis of translocations of maternal origin. *Fertil. Steril.* 1998a, 69: 675-81.
18- Munne´ S, Sandalinas M, Escudero T, *et al.*Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations.*Fertil. Steril.* 2000, 73: 1209-18.
19- Liebaers I, Sermon K, Staessen C, *et al.* Clinical experience with preimplantation genetic diagnosis and intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 1998, 13: 186-95.
20- Sermon K. Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. *Hum. Reprod. Update.* 2002, 8: 11-20.
21- Thornhill AR, Snow K. Molecular diagnostics in preimplantation genetic diagnosis. *J. Mol. Diagn.* 2002, 4(1): 11-29.
22- Piyamongkol W, Bermudez MG, Harper JC, *et al.* Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol. Hum. Reprod.* 2003, 9: 411-20.
23- Kuliev A, Verlinsky Y. Place of preimplantation diagnosis in genetic practice. *Am. J. Med. Genet. A.* 2005, 134(1): 105-10.
24- Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, *et al.* Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. *JAMA* 2001, 285(24): 3130-3.
25- Wells D. Advances in preimplantation genetic diagnosis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2004 Jul 1, 115 Suppl 1:S97-101.

26- Willadsen S, Levron J, Munne´ S, *et al.* Rapid visualization of metaphase chromosomes in single human blastomeres after fusion with in-vitro matured bovine eggs. *Hum. Reprod.* 1999, 14: 470-5.

سوالات مقاله بازآموزی

۱- PGD یعنی:

الف) تشخیص نقایص ژنتیکی بعد از لانه گزینی
ب) تشخیص نقایص ژنتیکی قبل از لانه گزینی
ج) تشخیص نقایص ژنتیکی قبل از زایمان
د) تشخیص نقایص ژنتیکی بعد از تولد

۲- گزینه صحیح را انتخاب کنید:

الف) PGD بدون انجام IVF هم قابل انجام است.
ب) برای PGD انجام IVF ضروری است.
ج) PGD برای بیماری های تک ژنی کاربردی ندارد.
د) PGD برای بیماری های کروموزومی کاربردی ندارد.

۳- اصلی ترین مزیت PGD به PND :

الف) هزینه کمتر
ب) عدم نیاز به تجهیزات پیشرفته
ج) دقیق تر بودن تشخیص
د) عدم نیاز به سقط جنین در صورت ابتلای جنین

۴- مراحل انجام PGD به ترتیب عبارتند از:

الف) IVF، مشاوره، بیوپسی جنین، آنالیز ژنتیکی، انتقال جنین
ب) مشاوره، IVF، بیوپسی جنین، انتقال جنین، آنالیز ژنتیکی
ج) مشاوره، IVF، بیوپسی جنین، آنالیز ژنتیکی، انتقال جنین
د) مشاوره، آنالیز ژنتیکی، IVF، بیوپسی جنین، انتقال جنین

۵- کدام یک از موارد زیر از کاربردهای PGD محسوب نمی شود؟

الف) PGD به منظور به نژاد سازی (eugenic)
ب) در زنان بالای ۳۵ سال به منظور غربالگری سندروم های آنیوپلوئیدی های وابسته به جنس
ج) در زنان زیر ۳۵ سال و با سابقه سقط های مکرر
د) زوجین حامل بیماری ژنتیکی قابل وراثت

۶- در افرادی که برای سقط جنین با محدودیت های اخلاقی روبرو هستند، کدام مورد پیشنهاد می گردد؟

الف) IVF همراه PND
ب) PGD بدون انجام IVF
ج) PGD
د) عدم اقدام به بارداری

۷- PGD برای بیماری سیستیک فیبروزیس (CF) به چه روشی انجام می‌شود؟

الف) PGD با تکنیک PCR
ب) PGD با تکنیک FISH
ج) PGD با استفاده تعیین جنسیت
د) PGD با تکنیک کاریوتایپ

۸- PGD برای بیماری دیستروفی عضلانی دوشن به چه روشی انجام می‌شود؟

الف) PGD به روش تعیین جنسیت
ب) PGD به روش کاریوتایپ
ج) PGD به روش ساترن
د) PGD به روش RT-PCR

۹- PGD به روش تعیین جنسیت برای چه مواردی کاربرد کمتری دارد؟

الف) بیماری‌های وابسته به X که تست اختصاصی برای آنها وجود نداشته باشد.
ب) بیماری‌های وابسته به X که تست اختصاصی برای آنها وجود داشته باشد.
ج) بیماری‌های وابسته به X که اساس مولکولی شناخته شده‌ای ندارند.
د) بیماری‌های وابسته به X که کاملاً هتروژن (Variable) هستند.

۱۰- جهش در ژن کانکسین موجب کری می‌شود و سقط جنین‌های مبتلا به کری در کشور ما ممنوع است. در این صورت بهترین گزینه برای زوجین حامل این جهش که مایل به بچه‌دار شدن هستند، چیست؟

الف) PND
ب) بچه‌دار نشدن
ج) فرزندخواندگی
د) PGD

۱۱- مهم‌ترین منبع آلودگی در PGD با روش PCR کدام است؟

الف) آلودگی با سلول‌های کومولوس مادر
ب) آلودگی با اسپرم
ج) آلودگی با محصولات PCR
د) آلودگی با سلول‌های پوستی تکنسین

۱۲- ADO یعنی:

الف) عدم تکثیر یکی از آلل‌ها
ب) عدم تکثیر هر دو آلل
ج) تکثیر هر دو آلل
د عدم تکثیر ژن مورد نظر

۱۳- برای برطرف نمودن مشکل آلودگی اسپرم در PGD ، بهترین روش کدام است؟

الف) استفاده از nested PCR
ب) استفاده از مالتیپلکس PCR
ج) استفاده از ICSI
د) برداشتن اسپرم‌ها در زیر میکروسکوپ

۱۴- برای برطرف نمودن مشکل آلودگی با سلول‌های کومولوس مادری، بهترین روش کدام است؟

الف) استفاده از nested PCR
ب) استفاده از مالتیپلکس PCR

ج)استفاده از ICSI　　د)جدا نمودن سلول های کومولوس به دقت در زیر میکروسکوپ

۱۵- کدام منبع مواد ژنتیکی مورد استفاده در PGD نیست؟

الف) بیوپسی از بلاستومر　　ب)بیوپسی از اجسام قطبی

ج)بیوپسی از بلاستوسیت　　د)بیوپسی از زونا پلوسیدا

۱۶- کدام یک از تکنیک های زیر جهت تعیین جنسیت در PGD مورد استفاده قرار می گیرد؟

الف) PCR　　ب) FISH　　ج)کاریوتایپ　　د)الف و ب

۱۷- در مورد بیوپسی از اجسام قطبی کدام گزینه صحیح است؟

الف) بیوپسی اجسام قطبی ناهنجاری های ژنتیکی به ارث رسیده از هر دو والد را مشخص می نماید.

ب)بیوپسی اجسام قطبی فقط ناهنجاری های ژنتیکی به ارث رسیده از مادر را مشخص می نماید.

ج)بیوپسی اجسام قطبی فقط ناهنجاری های ژنتیکی به ارث رسیده از پدر را مشخص می نماید.

د)بیوپسی اجسام قطبی فقط برای تعیین جنسیت جنین به کار می رود.

۱۸- کدام یک از گزینه های زیر جزو مراحل PCR نمی باشد؟

الف) Denaturation　　ب) Annealing

ج) Extension　　د) Hybridization

۱۹- مناسب ترین زمان بیوپسی از بلاستومر در چه مرحله ای است؟

الف)تک سلولی　　ب)۲تا۴سلولی　　ج)۶تا۸سلولی　　د)۲۰تا۳۰سلولی

۲۰- کدام یک جزو بیماری های تک ژنی محسوب نمی گردد؟

الف)سیستیک فیبروزیس　　ب)سندروم داون

ج)سندرم مارفان　　د)آتروفی ماهیچه ای نخاعی