مقاله پژوهشی اصیل

# PGD در تک سلول های رویان در مورولا با استفاده از تکنیک FISH

فرخنده بهجتی[۱]، ایمان باقری زاده[۲]، معرفت غفاری[۳]، ابوطالب صارمی[۴]


## چکیده

**زمینه و هدف:** ناهنجاری های کروموزومی (انیوپلوییدی)، یکی از علت های شایع در بروز ناباروری و سقط های زودهنگام در دوران بارداری محسوب می شود. شایع‌ترین انیوپلوییدی در کروموزوم های ۱۳ و ۱۸ و ۲۱ و همچنین در کروموزوم های جنسی X و Y است که با انجام بررسی کروموزومی در قبل از مرحله لانه گزینی و انتخاب جنین های سالم، می توان سلامت جنین را ازلحاظ کروموزومی مشخص نمود. با انجام این آزمایش می توان جنسیت رویان را تعیین کرد و با انتقال جنین های سالم، میزان باروری را افزایش داد.

**مواد و روش ها:** زمانی که رویان در مرحله ۸-۱۶ سلولی است یک سلول از آن بیوپسی می شود و سپس آزمایش FISH جهت بررسی تعداد کروموزوم ها و تعیین جنسیت انجام می شود. سپس نتایج به آزمایشگاه IVF، جهت اطلاع ارسال می‌شود.

**یافته ها:** درمجموع ۳۲ رویان بررسی شدند، همگی آن ها ازلحاظ کروموزوم های جنسی و انوپلوییدی مورد آزمایش قرار گرفتند. قبل از انجام آزمایش FISH، در زمان لام گیری، کیفیت هسته نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. ۱۱ بلاستومر بدون هسته بودند که آزمایش کروموزومی بر روی آن ها انجام نشده است و همچنین ۶ بلاستومر دارای دو هسته بودند که بعد از انجام FISH مشخص شد هر هسته تتراپلویید است.

**نتیجه گیری:** با استفاده از روش FISH می توان جنسیت جنین را مشخص نمود و همین‌طور انیوپلوییدها که در ژنتیک بالینی اهمیت دارند را بررسی نمود تا میزان باروری را افزایش داد. از آنجایی در این روش تعداد هسته قابل‌مشاهده است، می توان تعداد آن را گزارش کرد تا سلول های مناسب با یک هسته را انتخاب و جهت باروری انتقال داده شوند.


**کلید واژه ها:** انیوپلوییدی، تعیین جنیست، PGD، تکنیک FISH


۱- PhD، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی صارم و دپارتمان ژنتیک، بیمارستان صارم، تهران، ایران، استاد دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران

۲- MSc، کارشناس ارشد ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی صارم و دپارتمان ژنتیک، بیمارستان صارم، تهران، ایران

۳- MD ، متخصص بیولوژی تولید مثل، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی صارم، بیمارستان صارم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران،

۴- MD، متخصص زنان و زایمان، فوق تخصصی نازایی، IVF و لاپراسکوپی، مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی و سلول های بنیادی صارم، بیمارستان صارم، تهران، ایران

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک:
fbehjati@gmail.com


تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۱ | تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۱۰

## مقدمه

در زمینه باروری، در انسان با افزایش سن مادر به دلیل افزایش احتمال آنومالی کروموزومی، میزان باروری کاهش می یابد و باعث افزایش سقط‌جنین می شود. رابطه سن با کاهش باروری همچنان پابرجا باقی مانده است. نتایج به‌دست‌آمده از تحقیقات گسترده ای که بر روی بررسی کروموزومی اووسیت ها و رویان اولیه انسان بعد از انجام IVF انجام شده، حاکی از این است که انوپلوئیدی در اووسیت ها بسیار بیشتر از آن چیزی است که قبلاً گزارش شده بود (۱۱-۱). در حال حاضر طبق مطالعاتی که با استفاده از تکنیک FISH و CGH بر روی رویان حاصل از IVF انجام شده است، مشخص نمود که ۵۰٪ این رویان‌ها دارای انوپلوئیدی (کاهش و افزایش در تعداد کروموزوم ها) هستند. طبق گزارشی که در آمریکای شمالی در خانم های بین ۳۵-۳۷ ساله منتشر شده است حدود ۷۰٪ خانم هایی که با استفاده از IVF باردار شده اند مشکلات کروموزومی داشته اند (۱۲-۲). این آمار در خانم های بالای ۴۰ سال به ۸۲٪ می رسد. این رقم در خانم های جوانی که دهنده تخمک بوده اند حدود ۵۰٪ بوده است. این درحالی است که در این خانم ها انوپلوئیدی های شایع کروموزومی یعنی فقط ۹ کروموزوم بررسی شدند (۱۱). اگرچه تحریک فولیکولی یکی از عواملی است که می تواند باعث ایجاد انوپلوئیدی شود بااین‌حال منشأهای پیچیده انوپلوئیدی در پرده ابهام قرار دارد. از آنجایی‌که میزان انوپلوئیدی در رویان شکل گرفته از IVF بسیار بیشتر از حد انتظار است. به همین دلیل متخصصین باروری در تلاش اند تا تکنیک هایی را که منجر به تشخیص انوپلوئیدی قبل از لانه گزینی می شود را جهت تشخیص و غربال‌گری کروموزومی توسعه دهند. با توجه به این موضوع که میزان انوپلوئیدی در رویان هایی که با استفاده از IVF به مرحله لانه گزینی می رسند بسیار بالا است و با توجه به این‌که انوپلوئیدی می تواند میزان حاملگی موفق را کاهش دهد، فرضیه ای مطرح می شود که رویان هایی که قبل از لانه گزینی با استفاده از تکنیک PGD مورد غربالگری انوپلوئیدی قرار می گیرند میزان موفقیت باروری یا حاملگی افزایش می یابد؛ چون با این روش رویان های سالم به رحم منتقل و رویان های دارای انوپلوئیدی از پروسه باروری حذف می‌شوند؛ بنابراین میزان حاملگی موفق افزایش یافته و میزان سقط های جنینی نیز کاهش می یابد.

اولین بار در سال ۱۹۹۰ مشخص شد که جدا کردن یک یا دو سلول در مرحله ۸ سلولی رویان آسیبی به رشد و نمو آن وارد نمی‌کند (۱۳). اولین بار تکنیک PGD در جهت تشخیص بیماری وابسته به جنس انجام شد و رویانی که ازنظر کروموزومی مؤنث تشخیص داده شد برای لانه گزینی انتخاب شد (۱۴). به دلیل عدم تکثیر توالی اختصاصی کروموزوم Y با استفاده از PCR در تکنیک PGD ، تشخیص جنسیت رویان با اشتباه مواجه می شد (۱۵). به همین خاطر استفاده از تکنیک FISH به‌عنوان یک روش استاندارد در جهت تعیین جنسیت رویان معرفی شد (۱۶).

## مواد و روش ها

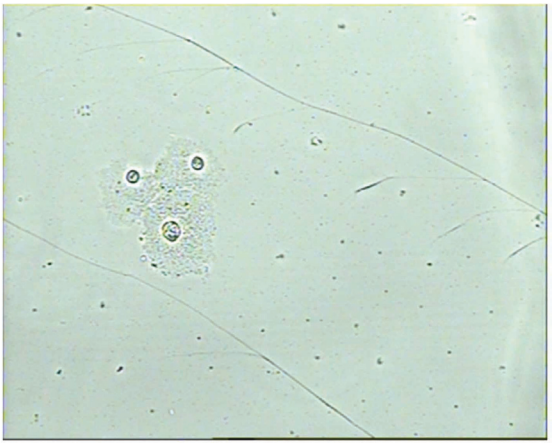
انجام بیوپسی و تهیه سلول های بلاستومر در آزمایشگاه IVF انجام شده است. ابتدا تخمک توسط اسپرم بارور شده و بعد از انجام تقسیمات سلولی در مرحله مورولا، زمانی که رویان ۸-۱۶ سلولی است، یک یا دو سلول بلاستومر از سلول تخم برداشته شده و به آزمایشگاه سیتوژنتیک ارسال می شود. سپس سلول بلاستومر با روش Tween/HCl بر روی لام فیکس شده (تصویر ۱) و با روش های استاندارد آزمایش FISH بر روی هسته سلول انجام می شود. آزمایش تعیین جنسیت بر روی همه سلول‌ها انجام و بررسی انوپلوییدی کروموزوم‌های ۱۳، ۱۸ و ۲۱ به‌طور انتخابی صورت گرفت.

## یافته ها

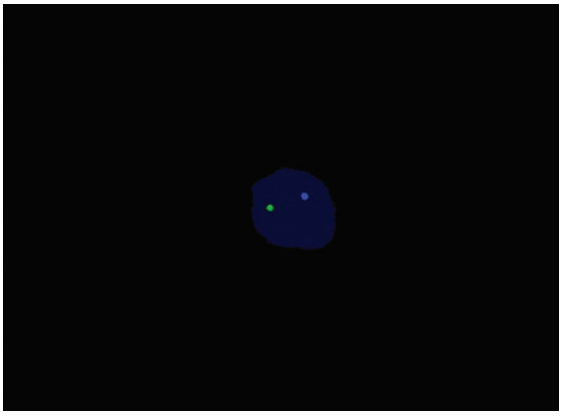
در مجموع ۳۲ رویان بررسی شد که تعداد سلول‌های مورد آزمایش یک یا دو عدد بوده است (جدول ۱). بررسی کروموزومی بر روی ۲۱ جنین صورت گرفت و سایر جنین‌ها مناسب این آزمایش نبودند زیرا فاقد هسته بوده‌اند. در تعیین جنسیت، ۱۶ رویان دختر و ۵ رویان پسر (تصویر ۲) مشخص شد. ۶ جنین که همگی مربوط به یک زوج بودند دارای دو هسته و همگی تتراپلویید (تصویر ۳) و ۲ جنین متفاوت مربوط به ۲ زوج مختلف نیز تتراپلوییدی اما تک هسته بودند.

جدول ۱: تعداد رویان، کیفیت، نوع پروب و نتیجه آزمایش FISH

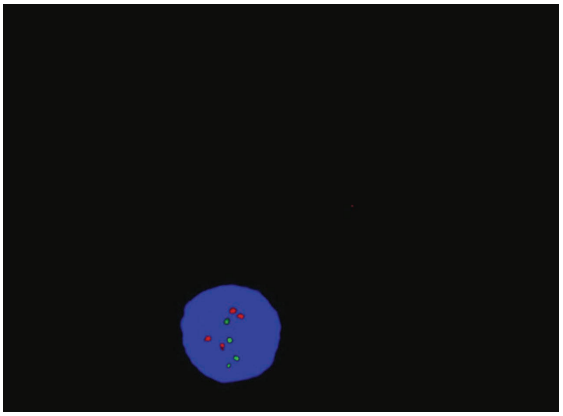
| شماره بلاستومر | نتیجه لام گیری | نوع پروب | نتیجه آزمایش |
|---|---|---|---|
| 1 | هسته دار | X, Y, 21 | Male, Normal |
| 2 | بدون هسته | | |
| 3 | هسته دار | X, Y, 21 | Female, Normal |
| 4 | هسته دار | X, Y, 21 | Female, Normal |
| 5 | بدون هسته | | |
| 6 | بدون هسته | | |
| 7 | بدون هسته | | |
| 8 | هسته دار | X, Y, 21 | Male, Normal |
| 9 | هسته دار | X, Y, 18 | Female, Normal |
| 10 | هسته دار | X, Y, 21 | Female, Normal |
| 11 | هسته دار | X, Y, 21 | Female, Normal |
| 12 | هسته دار | X, Y, 21 | Female, Normal |
| 13 | بدون هسته | | |
| 14 | بدون هسته | | |
| 15 | بدون هسته | | |
| 16 | دوهسته ای | X, Y, 21 | Male, Tetraploid |
| 17 | هسته دار | X, Y, 21 - 13, 18, 21 | Male, Normal |
| 18 | دوهسته ای | X, Y, 21 - 13, 18, 21 | Female,Tetraploid |
| 19 | دوهسته ای | X, Y, 21 - 13, 18, 21 | Female,Tetraploid |
| 20 | دوهسته ای | X, Y, 21 - 13, 18, 21 | Female, Tetraploi |
| 21 | دوهسته ای | X, Y, 21 - 13, 18, 21 | Female, Tetraploi |
| 22 | دوهسته ای | X, Y, 21 - 13, 18, 21 | Female, Tetraploi |
| 23 | بدون هسته | | |
| 24 | هسته دار | X, Y, 21 | Female, Normal |
| 25 | هسته دار | X, Y, 18 | Male, Normal |
| 26 | بدون هسته | | |
| 27 | بدون هسته | | |
| 28 | هسته دار | X, Y, 18 - 14/21 | Female, Normal |
| 29 | هسته دار | X, Y, 18 | Female,Tetraploid |
| 30 | هسته دار | X, Y, 21 | Female,Tetraploid |
| 31 | بدون هسته | | |
| 32 | هسته دار | X, Y, 21 | Female, Normal |



**تصویر ۱:** سه سلول بلاستومر به همراه هسته و هاله سیتوپلاسمی قبل از انجام ازمایش FISH ، بزرگنمایی 100



**تصویر ۲:** یک سلول از رویان پسر، سیگنال سبز، کروموزوم Y و سیگنال ابی کروموزوم، X را نشان می دهد، بزرگنمایی 1000



**تصویر ۳:** یک سلول از رویان تتراپلویید; سیگنال قرمز، کروموزوم ۱۲و سیگنال سبز کروموزوم X را نشان می دهد، بزرگنمایی 1000

## بحث و نتیجه گیری

هدف از این پژوهش راه اندازی تکنیک FISH در تشخیص قبل از لانه گزینی(PGD) جهت تعیین جنسیت و ناهنجاری‌های کروموزومی بود. این تحقیق به همراه راه اندازی FISH-PGD هفت ماه به طول انجامید. تمام روش های استاندارد جهت تعیین جنسیت و ناهنجاری های کروموزومی استفاده شد. درمجموع ۳۲ سلول بلاستومر جهت PGD به آزمایشگاه سیتوژنتیک داده شد. در آغاز همه سلول ها جهت وجود هسته بررسی شدند و آن هایی که بدون هسته بودند از آزمایش حذف و آزمون FISH فقط بر روی سلول های هسته‌دار انجام شد. نتایج این آزمون ها به‌صورت عکس از هسته و سیگنال‌های مرتبط با آن ثبت و بایگانی شد.

از آنجایی‌که ۸ سلول تتراپلویید بودند و ۱۱ سلول بدون هسته، در مجموع ۱۹ سلول (۵۹.۳ ٪) دارای هسته غیر معمول بودند؛ بنابراین انجام FISH-PGD جهت افزایش میزان باروری در زوج هایی که سابقه IVF ناموفق دارند توصیه می شود و بر طبق گزارش‌های قبلی اگر تست PGD-FISH با موفقیت انجام شود روش برتری در مقایسه با روش مولکولی برای تعیین جنسیت است (۱۷).

## References


1. Pellestor F. The cytogenetic analysis of human zygotes and preimplantation embryos. Hum Reprod Update 1995;1:581–5.
2. Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. Fertil Steril 1995;64:382–91.
3. Almeida PA, Bolton VN. The relationship between chromosomal abnormality

the human preimplantation embryo and development in vitro. Reprod Fertil Dev 1996;8:235– 41.

4. Márquez C, Sandalinas M, Bahçe M, Alikani M, Munné S. Chromosome

abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. Reprod Biomed Online 2000;1:17–27.

5. Magli MC, Gianaroli L, Ferrareti AP. Chromosomal abnormalities in embryos. Mol Cell Endocrinol 2001;22,183(suppl): S29–34.
6. Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munné S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. Hum Reprod 2001;16:1954–8.
7. Clouston HJ, Herbert M, Fenwick J, Murdoch AP, Wolstenholme J. Cytogenetic analysis of human blastocysts. Prenat Diagn 2002;22: 1143–52.
8. Bielanska M, Tan SL, Ao A. chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. Hum Reprod 2002;17:413–9.
9. Munné S, Sandalinas M, Alikani M, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, editors. Textbook of ART. 2nd ed. London: Martin Dunitz Ltd; 2004. p. 355–77.
10. Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. Hum Reprod Update 2005;11:33– 41.
11. Munné S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. Reprod Biomed Online 2006;12:234 –53.
12. Gutierrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sánchez-García JF, Bermúdez MG, Belil I, et al. Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. Hum Reprod 2004;19:2118 –25
13. Hardy, K., Martin, K. L., Leese, H. J.,Winston, R. M., and Handyside,A. H. (1990)

Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. Hum. Reprod. 5, 708–714.

14. Handyside, A. H., Kontogianni, E. H., Hardy, K., and Winston, R. M. (1990) Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA

amplification. Nature 344, 768–770.

15. Hardy, K. and Handyside, A. H.(1992) Biopsy of cleavage stage human embryos

and diagnosis of single gene defects by DNA amplification. Arch. Pathol. Lab. Med. 116, 388–392

16. Griffin, D. K., Handyside, A. H., Harper, J. C., et al. (1994) Clinical experience with preimplantation diagnosis of sex by dual fluorescent in situ hybridization. J. Assist. Reprod. Genet. 11, 132–143.
17. Karen Sermon, Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. Human Reproduction Update, Vol.8, No.1 pp. 11±20, 2002.