● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیستم، شمارهٔ ۶، ص ۵۴۵-۵۳۶، ۱۳۹۲

مقالهٔ پژوهشی

بررسی رابطه ناهنجاری‌های مادرزادی جنین با اختلال کروموزومی در جنین و والدین

محمدرضا بذرافشان[۱]، فاطمه میرزایی*[۲]، مریم درویش[۳]، سوده فلاحتی‌پور خنامانی[۴]

خلاصه

مقدمه: اختلالات کروموزومی یکی از علل نقص زمان تولد و مرگ و میر نوزادان به شمار می‌روند. این مطالعه با هدف بررسی همراهی نقایص زمان تولد با اختلالات کروموزومی در جنین و والدین انجام شده است.

روش: مطالعه به صورت مقطعی، بر روی مراجعه‌کنندگان به زایشگاه بیمارستان افضلی‌پور کرمان در یک دوره زمانی ۱۶ ماهه (از فروردین ۱۳۹۰ تا تیر ماه ۱۳۹۱) انجام شد. جمعیت مورد مطالعه شامل ۷۷ جنین بالای ۱۴ هفته با نقص زمان تولد و والدین آن‌ها بود. استخراج DNA از بافت جنین و بررسی اختلالات کروموزومی با تکنیک MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) انجام شد در ضمن کاریوتیپ والدین با روش نواربندی G (G-banding) تعیین گردید. در نهایت کلیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۷ و آزمون‌های آماری Student-t، χ^2 و Logistic regression تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: در بررسی کروموزومی جنین‌ها با روش MLPA ۲۷ مورد (۳۵/۹ درصد) ۴۶XX و ۲۵ مورد (۳۲/۱٪) ۴۶XY بودند. اختلال کروموزومی در ۲۵ جنین (۳۲/۵ درصد) وجود داشت. در بین این اختلالات، اختلال در کروموزومی‌های متعدد در ۴ مورد (۶/۵ درصد) و سندرم داون در ۳ مورد (۳/۹ درصد) جزء شایع‌ترین اختلالات بودند. بین اختلالات کروموزومی مختلف در جنین و آنومالی‌های اندام (P = ۰/۰۰۷)، الیگوهیدروآمینوس (P=۰/۰۰۵)، آسیت جنین (P<۰/۰۰۱)، ضخیم‌شدگی چین گردنی (P<۰/۰۰۱)، آترزی مری (P=۰/۰۰۷)، آترزی دوازدهه (P<۰/۰۰۱)، کلیه پلی‌کیستیک (P=۰/۰۰۷)، روده اکوژن (P<۰/۰۰۱)، پلورال افیوژن (P<۰/۰۰۱) و کاردیومگالی (P<۰/۰۰۱) تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده شد. بین اختلال کروموزومی در والدین و جنین ارتباطی معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۵).

نتیجه‌گیری: در مطالعه ما هم‌زمانی بین اختلال کروموزومی در جنین و والدین دیده نشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بسیاری از نقایص کروموزومی در هنگام تشکیل اسپرم یا تخمک به وجود می‌آیند و در والدین وجود ندارد. همچنین، تشخیص پره‌ناتال مالفورماسیون‌های مادرزادی عمده باید توجه را به احتمال وجود یک اختلال کروموزومی جلب کند.

واژه‌های کلیدی: اختلال کروموزومی، ناهنجاری‌های مادرزادی، والدین، MLPA، کاریوتیپ

۱- استادیار ژنتیک، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- دانشیار زنان و زایمان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۳- دستیار گروه زنان، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۴- دکترای ژنتیک ملکولی، پژوهشکده ملکولی مهندسی ژنتیکی و زیست فناوری تهران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: Mirzaie_fatemeh@yahoo. com

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۱/۱۸ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۲/۲/۲۹ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۳/۸

مقدمه

تولد کودکانی با ناهنجاری های مادرزادی علاوه بر فشار عاطفی که بر خانواده وارد می کند، برای فرد و سیستم بهداشتی نیز هزینه های زیادی در بر دارد. بر اساس تخمین مراکز کنترل و پیشگیری از بیماری ها در سال ۲۰۰۷، سالانه از هر ۳۳ کودکی که در ایالات متحده متولد شد یک کودک دارای ناهنجاری های مادرزادی بود (۱). در حال حاضر ناهنجاری های مادرزادی یکی از علل اصلی مرگ و میر در دوره نوزادی به شمار می‌روند و عامل ۲۰ درصد از کل مرگ و میرهای دوره نوزادی محسوب می‌شوند (۳، ۲). اکثر سقط‌ها و ناهنجاری‌های مادرزادی علت ژنتیکی دارند. اختلالات کروموزومی، یکی از اختلالات ژنتیکی مهم می‌باشند که عامل ۵ تا ۷ درصد موارد مرگ جنین، ۶ تا ۱۱ درصد موارد مرده‌زایی و مرگ نوزادان می‌باشند و در ۰/۹ درصد نوزادان با تولد زنده دیده می‌شود (۵، ۴). غربالگری روتین سونوگرافی در هفته‌های ۲۲-۱۸ بارداری یک روش استاندارد تشخیص پره‌ناتال در بسیاری از کشورها است. میزان تشخیص آنومالی قبل ازتولد بسته به جمعیت مورد مطالعه و وتجربه فرد انجام‌دهنده از ۲۱ تا ۸۴ درصد متغیر است. شیوع اختلال کروموزومی همراه با یافته‌های سونوگرافی غیر طبیعی از ۰/۳ تا ۶۵ درصد بر حسب نوع آنومالی متفاوت است. تشخیص یک نقص عمده یا دو نقص کوچک در سونوگرافی از موارد بررسی کروموزومی در جنین به شمار می‌رود. در یک مطالعه، در ۳۰/۵ درصد جنین‌های با نقص عمده و ۵/۴ درصد جنین‌های با نقص کوچک در سونوگرافی، اختلال کروموروموی مشاهده شد (۸-۶). یکی از روش‌های بررسی کروموزومی جنین قبل و بعد از تولد تکنیک (Multiplex ligation-dependent probe amplification) MLPA است. مطالعات سیتوژنتیکی مرسوم مانند کاریوتایپ و FISH (Fluorescence in situ hybridization) دارای مشکلاتی از قبیل دشوار بودن انجام تکنیک، از دست رفتن کشت، آلودگی نمونه جنینی با نمونه مادری، آلودگی خارجی و صرف زمان زیاد تا به دست آوردن نتایج، می‌باشند (۸-۶). همچنین، با توجه به این که روش های معمول سیتوژنتیک (G-banding) قادر به شناسایی تمام اختلالات و همچنین اختلالات نهفته (Cryptic) نمی‌باشند، باید روشی سریع، کارآمد و دقیق مد نظر قرار گیرد. MLPA تکنیکی پیشرفته است که در آن هر پروب حاوی دو قطعه الیگونوکلئوتیدی می‌باشد. این قطعات به سایت‌های مجاور توالی هدف در DNA متصل می گردند. سپس پروب‌ها به هم متصل می‌شوند و تکثیر محصولات با PCR (Polymerase chain reaction) و با استفاده از یک جفت پرایمر صورت می گیرد. این تکنیک قادر به مشخص نمودن تغییر در تعداد کپی یک ژن مانند حذف و مضاعف‌شدگی‌ها و همچنین تغییرات آنوپلوییدی در کروموزوم‌ها می‌باشد (۹-۸). در مطالعه‌ای که توسط Fiorentino و همکاران در ایتالیا انجام شد، در ۵/۸ درصد از جنین‌هایی که یافته‌های سونوگرافیک غیر طبیعی داشتند، اختلالات کروموزومی دیده شد. در این مطالعه مقایسه‌ای بین MLPA و کاریوتیپ معمولی انجام شد. نتایج نشان داد که MLPA منجر به تشخیص ناهنجاری‌های کروموزومی بیشتری حتی در حاملگی‌های با خطر پایین می‌شود و باید به عنوان خط اول روش‌های تشخیصی در بررسی‌های قبل از تولد قرار گیرد (۱۰). همچنین، در مطالعه Chitty و همکاران، MLPA از نظر اقتصادی نیز بر سایر روش‌های تشخیص قبل از تولد، برتری داشت (۱۱).

با توجه به توضیحات فوق، ضرورت تشخیص نوع ناهنجاری کروموزومی در جنین‌های مبتلا به نقایص زمان تولد مشهود است. بدیهی است که در مواردی که والد مبتلا به اختلال کروموزومی شناسایی شود، می‌توان از روش‌های تشخیصی مربوط به اوایل بارداری از جمله CVS (Chorionic villus sampling) یا آمنیوسنتز و حتی PGD (Preimplantation genetic diagnosis) بهره جست و زودتر در مورد ادامه یا ختم بارداری تصمیم گرفت. همچنین به

صورت ایده‌آل‌تر در این گونه موارد می‌توان با روش‌های لقاح آزمایشگاهی بررسی‌های لازم بر روی محصولات لقاح را قبل از لانه‌گزینی انجام داد و رویان فاقد ناهنجاری را انتخاب کرد.

با توجه به اهمیت تشخیص موضوع، این مطالعه با هدف بررسی همراهی ناهنجاری جنینی با اختلالات کروموزومی در جنین‌های با ناهنجاری ساختاری پس از تولد به روش MLPA و همچنین بررسی اختلالات کروموزومی والدین آن‌ها با تعیین کاریوتایپ به روش G-banding انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه به صورت مقطعی و در یک دوره ۱۶ ماهه (از فروردین ۱۳۹۰ تا تیر ماه ۱۳۹۱) در مراجعه‌کنندگان به زایشگاه بیمارستان افضلی‌پور شهر کرمان انجام شد. طرح در کمیته اخلاق دانشگاه بررسی و تصویب شد. جمعیت مورد مطالعه شامل ۷۷ جنین بالای ۱۴ هفته و والدین آن‌ها بودند که پس از سقط یا تولد، ناهنجاری ظاهری آشکار داشتند و یا در بررسی های سونوگرافیک هدفمند، نقصی در یکی از ارگان‌های حیاتی آن‌ها دیده شده بود. نمونه‌گیری به روش آسان انجام شد. از تمامی والدین برای ورود به مطالعه رضایت‌نامه آگاهانه اخذ شد. تمامی شرکت‌کنندگان در مطالعه برای ورود به مطالعه مختار بودند و همچنین برای آن‌ها توضیح داده شد که در هر قسمت از مطالعه می‌توانند از مطالعه خارج شوند. ناهنجاری‌ها شامل ناهنجاری‌های سیستم اعصاب مرکزی (هیدروسفالی، آژنزی کورپوس کالوزوم، ناهنجاری های دندی واکر، آرنولد کیاری و...)، ناهنجاری‌های صورت (شکاف کام و لب و...)، ناهنجاری‌های کلیه (پیلکتازی، هیدرونفروز، آژنزی کلیه، کلیه پلی‌کیستیک و...)، ناهنجاری‌های گوارشی (آترزی مری، انسداد روده، امفالوسل، گاستروشزی و...) و ناهنجاری‌های اسکلتی از جمله نقایص زمان تولد بودند که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه موارد جنین‌های با تشخیص تالاسمی، هموفیلی و فنیل‌کتونوری از مطالعه خارج شدند.

مراحل انجام کار

استخراج DNA از محصولات حاملگی برای انجام تکنیک MLPA: ۱۰۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم از محصولات حاملگی شامل پرزهای کوریونی جفت، بافت و یا بند ناف جنین، جهت هضم شیمیایی با پروتئیناز K در ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت قرار گرفت. سپس استخراج DNA با کیت Biorobot ENI (کیاژن، آلمان) و مطابق دستورالعمل کیت انجام گردید.

برای انجام تکنیک MLPA از کیت شرکت MRC هلند استفاده گردید. مراحل انجام کار به صورت خلاصه به شرح زیر بودند:

بعد از دناتوره کردن DNA در ۹۵ درجه سانتی گراد، عمل هیبریداسیون با استفاده از پروب‌های فلورسنت انجام شد و در نهایت جهت تکثیر قطعات DNA هدف، نمونه ها در ترموسایکلر قرار گرفتند. بعد از این که روند تکثیر پروب‌ها خاتمه یافت، نمونه‌های تکثیریافته توسط دستگاه (DNA Sequencer ABI 3130) الکتروفورز شدند و در نهایت داده‌های خام با استفاده از نرم‌افزار Gene Marker آنالیز شدند.

تعیین کاریوتایپ والدین: ۵ سی‌سی از خون والدین در لوله‌های هپارینه گرفته شد. سپس خون‌ها به مدت سه شبانه روز در محیط کشت RPMA1640 کشت داده شدند و بعد از برداشت گلبول‌های سفید از خون، عملیات لام‌گیری به روش Dropping انجام شد. لام‌های تهیه‌شده به روش G-banding با رنگ رایت رنگ‌آمیزی شدند و گستره‌های حاوی کروموزوم‌های متافازی مورد مطالعه قرار گرفتند.

در نهایت کلیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۷ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون‌های آماری Student-t، χ^2 و Logistic regression مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

در ۳۹ مورد از والدین (۵۰/۶ درصد) سابقه قبلی یک بار سقط و در ۹ مورد (۱۱/۶ درصد) سقط مکرر و در ۱۱ مورد (۱۴/۳ درصد) سابقه قبلی مرده‌زایی وجود داشت. همچنین در بررسی والدین، در چهار مورد (۵/۲ درصد) سابقه فرد مبتلا به عقب‌ماندگی ذهنی در خانواده مادر و در پنج مورد (۶/۵ درصد) سابقه فرد مبتلا به عقب ماندگی ذهنی در خانواده پدر وجود داشت. در بررسی والدین در ۴۴ مورد (۵۷/۱ درصد) ازدواج فامیلی بین والدین صورت گرفته بود. میانگین سنی مادران ۵/۶ ± ۲۹/۴ سال و میانگین سنی پدران ۶/۵ ± ۳۳/۶ سال بود.

پس از بررسی کروموزومی جنین‌ها با روش MLPA، ۲۶ مورد 46XX (۳۵/۹ درصد)، ۲۵ مورد 46XY (۳۲/۱ درصد) بودند و ۲۵ مورد (۳۲/۵ درصد) دارای اختلال کروموزومی بودند. در بین این اختلالات، حذف و مضاعف‌شدگیهای متعدد روی کروموزوم‌های مختلف در چهار جنین (۶/۵ درصد)، و سندرم داون در ۳ مورد (۳/۹ درصد) جزء شایع‌ترین اختلالات بودند (جدول ۱). در مواردی که نقص کروموزومی در جنین شناخته شد، میانگین سنی پدر۲/۵ ± ۳۱/۵ و میانگین سنی مادر ۶/۴ ± ۲۷/۵ سال بود.

در بررسی ناهنجاری ساختاری جنین‌ها، در ۱۱ مورد (۱۴/۳ درصد) هیدروپس فتالیس و در ۵ مورد (۶/۵ درصد) هیدروسفالی وجود داشت. همچنین آمبیگوس ژنیتالیا در ۷ مورد (۹/۱ درصد) مشاهده شد. ۱۸ جنین (۲۳/۴ درصد) نیز ظاهری طبیعی داشتند. ۴ مورد (۵/۲ درصد) آسیت، ۸ مورد (۱۰/۴ درصد) لب شکری، و ۶ مورد (۷/۸ درصد) شکاف کام داشتند. در ده مورد (۱۳ درصد) ناهنجاری‌های متعدد اندام گزارش شد. سه مورد (۳/۹ درصد) کوتاهی اندام، ۲ مورد (۲/۶ درصد) سین‌داکتیلی، ۲ مورد (۲/۶ درصد) پلی‌داکتیلی، ۲ مورد (۲/۶ درصد) براکی‌داکتیلی، دو مورد (۲/۶ درصد) فقدان انگشتان دست‌ها و پاها، ۱ مورد (۱/۳ درصد) کوتاهی انگشتان داشتند. ۸ مورد (۱۰/۴ درصد) هیگروم کیستیک داشتند. ۱ مورد ناهنجاری اندام تحتانی و ۴ مورد (۵/۲ درصد) پاچماقی گزارش شد. بین اختلالات کروموزومی مختلف از نظر بروز ناهنجاری‌های اندام (P = ۰/۰۰۷)، الیگوهیدرآمینوس (P = ۰/۰۰۵) و آسیت جنین (P < ۰/۰۰۱) تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده شد. از بین جنین‌هایی که دارای نقص سیستم اعصاب مرکزی بودند، ۴ مورد (۵/۲ درصد) مننگوسل، ۵ مورد (۶/۵ درصد) میلومننگوسل و ۸ مورد (۱۰/۴ درصد) هیدروسفالی داشتند. ۵ مورد (۶/۵ درصد) آننسفال بودند و در ۱ مورد (۱/۲ درصد) آتروفی مغز وجود داشت. در ۱ مورد (۱/۳ درصد) نیز کوچک بودن لوب فرونتال مشاهده شد. همچنین ۷ مورد (۹/۱ درصد) میکروسفال بودند. بین وجود اختلالات کروموزومی و بروز نقایص دستگاه عصبی تفاوت معنی‌داری یافت نشد (P = ۰/۸۱).

افزایش ضخامت چین گردنی، فاصله بین دو استخوان آهیانه سر، ادم شدید پوست سر، IUGR (Intrauterine growth restriction)، پلورال افیوژن، صورت نامشخص، آترزی مری، آترزی کورپوس کالوزوم، آترزی کولون، هایپوپلازی ریه‌ها، دیس‌ژنزی کلیه، کلیه‌های پلی‌کیستیک و خط کف دستی واحد، همگی در ۲ مورد (۲/۶ درصد) مشاهده شدند. بین اختلالات کروموزومی مختلف و بروز ضخیم‌شدگی چین گردنی (P<۰/۰۰۱)، آترزی مری (P = ۰/۰۰۷)، آترزی دوازدهه (P< ۰/۰۰۱)، کلیه پلی‌کیستیک (P = ۰/۰۰۷)، روده اکوژن (P<۰/۰۰۱) و پلورال افیوژن (P< ۰/۰۰۱) تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده شد.

۴۶ نفر از پدران (۵۹/۷ درصد) و ۴۳ نفر از مادران (۵۵/۸ درصد) کاریوتیپ طبیعی داشند و در هر دو گروه اختلال satellite شایع‌ترین اختلال بود (جدول ۱). اگر موارد اختلالات پلی‌مورفیسم کروموزوم‌ها را طبیعی در نظر بگیریم در ۳ مورد (۵/۸ درصد) از والدین اختلال

کروموزمی یافت شد. در این سه مورد هم کروموزوم‌های جنین‌های آن‌ها طبیعی بود. بین اختلال کروموزومی در والدین و جنین رابطه معنی‌داری وجود نداشت (P = ۰/۵۴). در مطالعه حاضر در ۹ مورد (۱۱/۶۸ درصد) سابقه سقط مکرر (بیش از ۳ سقط پشت سر هم) وجود داشت که در ۲ مورد از آن‌ها (۲۲/۲۲ درصد) اختلال کروموزومی دیده شد.

بر اساس یافته‌های Logistic regression، هیچ یک از عوامل سن پدر (P = ۰/۴۶) و مادر (P = ۰/۱۶)، سابقه عقب‌ماندگی ذهنی در خانواده پدر (P = ۰/۵۴) و خانواده مادر (P = ۰/۷۴)، سابقه سقط (P = ۰/۸۶)، مرده‌زایی (P = ۰/۳۲)، سابقه نقص جنین‌های قبلی (P = ۰/۷۷) و سابقه ازدواج فامیلی (P = ۰/۷۲) چه به صورت جداگانه و چه در مدل Regression به همراه یکدیگر با اختلال کروموزومی در جنین رابطه معنی‌داری نداشتند (جدول ۲).

جدول ۱. *فراوانی اختلالات کروموزومی در جنین‌های با نقص زمان تولد و والدین آن‌ها*

کاریوتیپ پدر	تعداد	درصد	کاریوتیپ جنین	تعداد	درصد	کاریوتیپ مادر	تعداد	درصد
46XY	۴۶	۵۹/۷	46XX	۲۷	۳۵/۱	46XX	۴۴	۵۵/۸
46XY,14 ps+	۱	۱/۳	46XY	۲۵	۳۲/۵	46XX,21 ps+	۳	۳/۸
46XY,9qh+	۱	۱/۳	47XY+21	۳	۳/۹	46XX,15 ps+	۹	۱۱/۵
46XY,14 ps+, 21ps+, 22 ps+	۱	۱/۳	45,X del Xq28	۱	۱/۳	46XX,15 ps+,22ps+	۲	۲/۶
46XY,14 ps+, 15ps+	۳	۳/۸	46XX del 8q24. 11	۱	۱/۳	45XX-rob (13,14) (q10,q10)	۱	۱/۳
46XY, 15ps+	۵	۶/۴	Del 15q21, 7q11, 22q11	۱	۱/۳	46XX,16qh+	۴	۵/۱
45XY, rob (13,14) (q10,q10)	۱	۱/۳	تریزمی ۱۸ و ۲۱	۱	۱/۳	46XX,16qh+,1qh+	۱	۱/۳
46XY, 13ps+	۲	۲/۶	46XX, del (15q12,17q21, 18q4)	۱	۱/۳	46XX,13 ps+,15ps+,22ps+	۱	۱/۳
46XY, 14ps+	۵	۶/۴	46XX Dup (8q24. 11, 8q24. 12)	۱	۱/۳	46XX,14 ps+,15ps+,22ps+	۱	۱/۳
46XY,13 ps+, 14ps+	۱	۱/۳	46XY (del17p11. 2) miller Dieker	۲	۲/۶	46XX, t (4,15) (q24,qter)	۱	۱/۳
46XY, 9qh+, yqh+	۲	۲/۶	46XY Del 18q21. 1	۲	۲/۶	46XX,15ps+21ps+	۲	۲/۶
46XY, yqh+	۱	۱/۳	46XY, Dup 18q22	۱	۱/۳	47XX+mar	۱	۱/۳
46XY, yqh-	۱	۱/۳	46XY Dup 13q14	۱	۱/۳	46XX,15pstk+,22pstk+	۱	۱/۳
46XY, 21ps+	۱	۱/۳	46XY Del 21q22	۲	۲/۶	46XX,13ps+,14ps+	۱	۱/۳
46XY, 16qh+	۱	۱/۳	ناهنجاری‌های متعدد کروموزومی	۴	۵/۱	46XX,1qh-	۱	۱/۳
46XY, 1qh+	۱	۱/۳	46XY Del 7q11	۱	۱/۳	46XX,14ps+,22ps+	۱	۱/۳
46XY, invy (p11. 2, q11. 2)	۱	۱/۳	46XX Dup 17q21, 21q21	۱	۱/۳	46XX,15ps+,16qh+	۱	۱/۳
46XY, t (11,22) (q25q13)	۱	۱/۳	46XX Dup 22q13	۱	۱/۳	46XX,14ps	۱	۱/۳
46XY, 13ps+, 15ps+	۲	۲/۶	46XX Del (18p11, 8q24)	۱	۱/۳	46XX,13ps+,22ps+	۱	۱/۳
مجموع	۷۷	۱۰۰	مجموع	۷۷	۱۰۰	مجموع	۷۷	۱۰۰

جدول ۲. *رابطه سابقه مامایی، سن و اختلال کروموزومی در والدین با اختلال کروموزومی در جنین‌های مورد مطالعه*

متغیر	جنین با اختلال کروموزومی	جنین بدون اختلال کروموزومی	P value
سن مادر (سال)*	۲۸/۱۲ ± ۵/٦۰	۳۰/۰۰ ± ۵/۵۰	۰/۱٦۹
سن پدر (سال)*	۳۲/۸۰ ± ۵/۵۰	۳٤/۰۰ ± ۷/۰٦	۰/٤٦٦
سابقه مرده‌زایی**	۵(٤۵/۵)	٦(۵٤/۵)	۰/۳۲۲
سابقه آنومالی قبلی**	۲(۳۳/۳)	٤(٦٦/۷)	۰/٤۳۵
اختلال کروموزومی در پدر**	۰(۰)	۳(۵/۸)	۰/۵٤۷
اختلال کروموزومی در مادر**	۰(۰)	۳(۵/۸)	۰/۵٤۷

*: انحراف معیار ± میانگین

**: (درصد) تعداد

بحث

بر اساس یافته‌های این مطالعه، هیچ یک از عوامل سن مادر، سن پدر، سابقه عقب ماندگی ذهنی در خانواده پدر و مادر، سابقه سقط، مرده‌زایی، ازدواج فامیلی با بروز اختلال کروموزومی در جنین رابطه معنی داری نداشت. در مطالعات مختلف همراهی بین افزایش سن پدر و افزایش خطر آنوپلوییدی در فرزندان آن‌ها دیده نشده است. بلکه مطالعات نشان دادند که افزایش سن پدر می‌تواند منجر به اختلالات ساختمانی گردد. همچنین، به طور مشخص در مطالعات مختلف بین افزایش سن مادر و تریزومی‌ها از جمله سندرم داون ارتباط وجود دارد. مطالعه Nicolaides و همکاران بر روی جنین‌های با نقص سونوگرافیک در انگلستان نشان داد که با افزایش سن مادر شیوع اختلالات کروموزومی بیشتر می‌گردد (۱۲). در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین سن پدر و مادر و نقایص تولد با اختلال کروموزومی (تعدادی و ساختاری) یافت نشد. اما باید به این نکته توجه کرد که در مطالعه ما میانگین سن پدر و مادر کمتر از ۳۵ سال بود و تعداد والدین با سن بالای ۳۵ سال کم بودند، بنابراین برای اثبات رابطه این موضوع به انجام مطالعه با حجم نمونه بیشتر و بررسی فاکتور سن در بروز اختلال کروموزومی در جنین نیاز است. اما در ۴ موردی که جنین‌ها مبتلا به سندروم داون بودند، میانگین سنی مادران ۳۷/۷۵ سال بود. رابطه بین این سندرم و سن مادر معنی‌دار بود و مطابق یافته‌های مطالعات دیگران بود. به طور مشخص خطر داشتن دو فرزند با یک اختلال کروموزومی بسیار کم است. طبق گزارش Rubio و همکاران، در والدینی که یک فرزند مبتلا به سندرم داون دارند در صورتی که سن مادر کمتر از ۳۵ سال باشد، احتمال داشتن فرزند دیگری مبتلا به این سندرم ۱ درصد خواهد بود (۱۳). در مطالعه ما در هیچ موردی ناهنجاری مشابه در بارداری‌های قبلی وجود نداشت.

در مطالعه حاضر در ۹ مورد (۱۱/۶۸ درصد) سابقه سقط مکرر (بیش از ۳ سقط پشت سر هم) وجود داشت که در ۲ مورد از آن‌ها (۲۲/۲۲ درصد) اختلال کروموزومی دیده شد. در مطالعه Rubio و همکاران، در مواردی که سابقه سقط مکرر وجود داشت، درصد جنین‌های با اختلال کروموزومی افزایش یافته بود. شایع‌ترین این اختلالات نقص در کروموزوم‌های ۱۶ و ۲۲ بود (۱۳). همچنین، در مطالعه Daniely و همکاران ناهنجاری‌های کروموزومی در محصولات سقط‌شده از مادران دارای حداقل ۲ سقط قبلی،

به میزان ۴۸ درصد در جنین‌ها بود. این ناهنجاری‌ها شامل تریزومی، مونوزومی، از دست دادن یا به دست آوردن قطعات کروموزومی بودند (۱۴). در مطالعه ما با تکنیک MLPA، در ۳۲/۵ درصد از جنین‌ها اختلال کروموزومی شناسایی شد. این نتیجه مشابه مطالعه yatsenko و همکاران بود که در ۳۰/۵ درصد از جنین‌های با یافته سونوگرافی غیر طبیعی، اختلال کروموزومی به روش کاریوتیپ و Array CGH شناسایی شده بود (۱۵). همچنین، در مطالعه Diego-Alvarez و همکاران، ۴۰/۲ درصد از جنین‌های با نقص ساختاری دارای ناهنجاری کروموزومی بودند (۸). شایع‌ترین اختلال ژنی و کروموزومی مشاهده‌شده در مطالعه حاضر شامل میزان زیاد ناهنجاری تعداد کپی (حذف و مضاعف‌شدگی‌های متعدد) در کروموزوم‌های مختلف بود (۴ مورد). تریزومی ۲۱ (۳ مورد) و ناهنجاری تعداد کپی از نوع حذف‌های کروموزوم‌های ۱۷، ۱۸ و ۲۱ نیز هر کدام با ۲ مورد در رده‌های بعدی قرار گرفتند.

شناسایی تغییرات تعداد کپی با تکنیک MLPA در بسیاری از بیماری‌های دیگر مورد بررسی قرار گرفته است و به عنوان روشی موثق برای پیدا نمودن علت بیماری ذکر شده است. در مطالعه Madrigal و همکاران MLPA به عنوان روشی برای شناسایی ناهنجاری‌های تعداد کپی در بیماران دارای عقب‌ماندگی ذهنی توصیه گردید و در مجموع ۴ ناهنجاری تعداد کپی شامل ۳ مضاعف‌شدگی و یک حذف در این بیماران مشاهده شد (۱۶). اگر چه وجود یک تریزومی شایع‌ترین ناهنجاری در سه ماهه اول در سقط‌های خود به خودی است اما وجود دو تریزومی در سقط‌های خود به خودی نیز به میزان ۲/۸-۰/۲۱ درصد در جنین‌های سقط‌شده مشاهده شده است (۲۰-۱۷). در مطالعه ما ۱/۳ درصد جنین‌های دارای دو تریزومی به صورت هم‌زمان بودند. به عبارت دیگر یک جنین، دو تریزومی ۱۸ و ۲۱ را با هم نشان داد. در این آزمایش، وجود تریزومی‌ها (۲۱ و ۱۸) و مونوزومی X با کاریوتایپ تأیید شد. این امر نشان‌دهنده دقیق بودن تکنیک MLPA و صرف مدت زمان بسیار کمتر نسبت به کاریوتایپ برای ارائه نتایج می‌باشد. همچنین، در مطالعات مولکولی، مقدار بالایی DNA از نمونه‌های تازه یا فریزشده از قطعات کوچکی از بافت که در فرمالین یا پارافین بوده‌اند به دست خواهد آمد (۲۱). سادگی نسبی، هزینه کم، سرعت انجام در طی ۲ روز، بررسی چندین توالی هدف به طور هم‌زمان به منظور دستیابی از مزایای MLPA است، در حالی که در روش‌های مرسوم سیتوژنتیک نیاز به سلول زنده برای کشت می‌باشد. میزان از دست رفتن نمونه‌ها در روش MlPA و سایر روش‌های مولکولی بسیار پایین‌تر از روش کاریوتایپینگ است. در مطالعه Diego-Alvarez و همکاران، ۳۶/۵ درصد از نمونه‌های بافت در محیط کشت به علت از بین رفتن کشت یا آلودگی از دست رفتند، در حالی که با روش QF-PCR تنها ۵/۶ درصد از نمونه‌های بافت محصول سقط‌شده برای تکثیر PCR مناسب نبودند که ممکن است به علت استخراج DNA از بافت‌های فیکس‌شده در فرمالین و یا خطا در روش استخراج باشد (۸). همچنین از دیگر مزایای روش MLPA می‌توان به نتایج مطمئن‌تر، دقت بالا در تخمین تعداد نسخه، نیاز به مقدار اندک DNA و نیاز به تنها یک جفت پرایمر اشاره نمود (۲۲-۲۱). در مطالعاتی همراهی اختلالات پلی‌مورفیسم کروموزوم‌ها مانند وجود ps^+ و $pstk^+$ و $qh^+ qh^-$ بر روی هر یک از کروموزوم‌ها در والدین (پدر، مادر و یا هر دو) با سقط و نازایی ذکر شده است، ولی ارتباط آن‌ها با ناهنجاری ساختاری جنین بررسی نشده است (۲۱). در مطالعه انجام شده ۲۸/۵۷ درصد از والدین لااقل دارای یک ناهنجاری از نوع ps^+ در کاریوتیپ خود بودند. وجود qh^+ و qh^- در کروموزوم‌های ۱، ۹، ۱۶ و Y والدین به میزان ۸/۴ درصد مشاهده شد. اگر اختلالات در پلی‌مورفیسم کروموزوم را به عنوان طبیعی در نظر بگیریم در ۳/۸ درصد از والدین اختلال کروموزومی یافت شد. بر این اساس در

مطالعه ما هم‌زمانی بین اختلال کروموزومی در جنین و والدین مشاهده نشد

نتیجه‌گیری

شناسایی عامل ایجاد ناهنجاری در جنین به صورت معنی‌داری، استرس و تألم روحی والدین را کاهش می‌دهد. از آن جایی که تعدادی از این اختلالات ژنتیکی است، بنابراین می‌توان با انجام مشاوره‌های تخصصی قبل از بارداری بعدی و تست‌های تهاجمی در حین بارداری به کاهش خطر انتقال ناهنجاری به فرزندان کمک نمود. در مطالعه ما هم‌زمانی بین اختلال کروموزومی در جنین و والدین دیده نشد. این مطلب بیانگر این نکته است که بسیاری از نقایص کروموزومی می‌توانند در هنگام تشکیل اسپرم یا تخمک در جنین به وجود می‌آید بدون این که پدر یا مادر دارای اختلال کروموزومی شناخته شده‌ای باشند.

با وجود این که +ps، +pstk، +qh و -qh بر روی کروموزوم‌های مختلف جزء تغییرات طبیعی کروموزومی محسوب می‌گردد، منتها در مطالعه ما کاریوتایپ تعدادی از والدین دارای ناهنجاری جنینی، این تغییرات مشاهده شد. بررسی این که وجود این تغییرات طبیعی باعث ایجاد ناهنجاری شده است یا خیر نیاز به مطالعات کنترل شده و شاهددار بیشتری دارد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان برای تأمین مالی این پروژه تحقیقات (به شماره ۹۰/۳۵/ک) قدردانی می‌شود.

References

1. Reddy UM, Page GP, Saade GR, Silver RM, Thorsten VR, Parker CB, et al. Karyotype versus microarray testing for genetic abnormalities after stillbirth. *N Engl J Med* 2012; 367(23): 2185-93.
2. Ferrari RA, Bertolozzi MR. Postnatal mortality in Brazilian territory: a literature review. *Rev Esc Enferm USP* 2012; 46(5): 1207-14. [In Portuguese].
3. Carp H, Toder V, Aviram A, Daniely M, Mashiach S, Barkai G. Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2001; 75(4): 678-82.
4. Cunningham F, Leveno K, Bloom S, Hauth J, Rouse D, Spong C. Williams obstetrics. 23th ed. Philadelphia, PA: Mcgraw-hill; 2009. p. 266-90.
5. Heron M. Deaths: leading causes for 2008. *Natl Vital Stat Rep* 2012; 60(6): 1-94.
6. Milunsky A, Milunsky JM. Genetic counseling: Preconception, prenatal, and perinatal. In: Milunsky A, editor. Genetic disorders and the fetus: Diagnosis, prevention and treatment. 5th ed. Baltimore, MD: JHU Press; 2004.
7. Ott WJ, Taysi K. Obstetric ultrasonographic findings and fetal chromosomal abnormalities: refining the association. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184(7): 1414-20.
8. Diego-Alvarez D, Ramos-Corrales C, Garcia-Hoyos M, Bustamante-Aragones A, Cantalapiedra D, Diaz-Recasens J, et al. Double trisomy in spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular

approach. *Hum Reprod* 2006; 21(4): 958-66.

9. Fernandez R, Mendez J, Pasaro E. Turner syndrome: a study of chromosomal mosaicism. *Hum Genet* 1996; 98(1): 29-35.
10. Fiorentino F, Napoletano S, Caiazzo F, Sessa M, Bono S, Spizzichino L, et al. Chromosomal microarray analysis as a first-line test in pregnancies with a priori low risk for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Eur J Hum Genet* 2013; 21(7): 725-30.
11. Chitty LS, Kistler J, Akolekar R, Liddle S, Nicolaides K, Levett L. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA): a reliable alternative for fetal chromosome analysis? *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25(8): 1383-6.
12. Nicolaides KH, Snijders RJ, Gosden CM, Berry C, Campbell S. Ultrasonographically detectable markers of fetal chromosomal abnormalities. *Lancet* 1992; 340(8821): 704-7.
13. Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J, et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003; 18(1): 182-8.
14. Daniely M, Aviram-Goldring A, Barkai G, Goldman B. Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 1998; 13(4): 805-9.
15. Yatsenko S, Davis S, Hendrix N, Surti U, Emery S, Canavan T, et al. Application of chromosomal microarray in the evaluation of abnormal prenatal findings. *Clin Genet* 2013; 84(1): 47-54.
16. Madrigal I, Rodriguez-Revenga L, Badenas C, Sanchez A, Martinez F, Fernandez I, et al. MLPA as first screening method for the detection of microduplications and microdeletions in patients with X-linked mental retardation. *Genet Med* 2007; 9(2): 117-22.
17. Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 1980; 44(Pt 2): 151-78.
18. Carrera M. Screening prenatal de aneuploidias: QF-PCR y FISH. *Prog Diag Prenat* 2001; 13: 262-6.
19. Nagaishi M, Yamamoto T, Iinuma K, Shimomura K, Berend SA, Knops J. Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan. *J Obstet Gynaecol Res* 2004; 30(3): 237-41.
20. Li QY, Tsukishiro S, Nakagawa C, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K, et al. Parental origin and cell stage of non-disjunction of double trisomy in spontaneous abortion. *Congenit Anom (Kyoto)* 2005; 45(1): 21-5.
21. Purandare H, Fernandes NV, Deshmukh SV, Chavan S. Heterochromatic variations and pregnancy losses in humans. *Int J Hum Genet* 2011; 11(3): 167-75.

Association of Fetal and Parental Chromosomal Abnormalities with Congenital Anomalies

Bazr Afshan M.R., Ph.D.[1], Mirzaie F., M.D.[*2], Darvish M., M.D.[3], Falahatipoor Khanamani S., Ph.D.[4]

1. Assistant Professor of Genetics, Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2. Associate Professor of Obstetrics and Gynecology, Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3. Resident of Obstertrics and Gynecology, Physiology Research Center, Kerman University of Me dical Sciences, Kerman, Iran
4. PhD in Molecular Genetics, Institute of Molecular Genetics Engineering and Biology, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: Mirzaie_fatemeh@yahoo. com

(Received: 7 Feb. 2013 Accepted: 29 May 2013)

Abstract

Background & Aims: Chromosome abnormalities are a major cause of miscarriage and neonatal mortality. The present study aimed to determine the association of fetal and parents chromosomal abnormalities with congenital anomalies.

Methods: A cross-sectional study was performed in a tertiary referral center (Afzalipour Hospital) over 16 months period (2011-2012). The study groups consisted of 77 fetuses over 14 weeks and their parents. Fetuses had apparent anomaly after abortion or birth, or showed a defect organs in targeted sonographic examination. DNA extractions were from fetus tissues for investigation of chromosome abnormalities using (multiplex ligation-dependent probe amplification) MLPA. Cytogenetic analysis for parents was performed with G-banding technique. Eventually data were analyzed by statistical software SPSS using t-test, chi-square and logistic regression.

Results: Karyotyping of fetus was 46*xx* in 27 (35.9%) and 46*xy* in 25 (32.1%) cases. Twenty-five fetuses had chromosomal abnormalities. The common chromosomal abnormalities were multiple deletion and duplication on different chromosomes in 4 (6.5%) and Down syndrome in 3 (3.9%) of them. This study showed a statistically significant association between the extremity anomalies (P=0.0070), oligohydroamnious (P=0.0050), ascitis (P=0.0001), increased nuchal translucency (P=0.0001), esophageal atresia (P=0.0070), duodenal atresia (P=0.0001), polycystic kidney (P=0.0070), echogenic bowel (P=0.0001), plural effusion (P=0.0001) and cardiomegaly (P=0.0010). There were no statistically significant association between the chromosomal abnormalities in fetus and parents (P=0.5700).

Conclusion: In our study, there was no association between the chromosomal abnormalities in fetus and parents. It can be concluded that many chromosomal defects occur during the formation of sperm or ovum. Detection of major congenital malformations should draw attention to the possibility of a chromosomal disorder in fetus. Therefore, MLPA is a low cost method for detecting a wide range of the most common chromosomal disorders in a short time.

Keywords: Chromosomal abnormalities, Congenital anomalies, Parents, Multiplex ligation-dependent probe amplification, Karyotyping

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2013; 20(6): 536-545