مجله تحقیقات ژنتیک پزشکی
سال : ۱۳۹۹ - شماره : ۱
مجله تحقیقات ژنتیک پزشکی
Medical Genetic Research
www.mgr.ir

تشخیص زودرس آنیوپلوئیدی کروموزومی در مرده زایی و جنین های سقط شده ارجاع داده شده به آزمایشگاه های ژنتیک پزشکی قانونی توسط آنالیز توالی های STR

فرزاد سید فروتن[۱،۲]، امیر شمس[۳،۴]، علیرضا صبوری[۱]، * آزاده حسن پور[۱،۵]

۱. مرکز تحقیقات پزشکی قانونی، سازمان پزشکی قانونی کشور، تهران، ایران.
۲. مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی ژنوم، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۳. گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه دولتی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
٤. گروه سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی، پژوهشکده زیست فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.
٥. گروه زیست شناسی، مرکز تحقیقات زیست فناوری پزشکی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران.
*پست الکترونیک مسئول مکاتبات: azadeh.hasanpour@gmail.com

چکیده

آنیوپلوئیدی‌های کروموزومی شایع شامل تریزومی ۲۱ (سندرم داون)، تریزومی۱۸ (سندرم ادوارد)، تریزومی ۱۳ (سندرم پاتو)، مونوزومی XO (سندرم ترنر) وXXY (سندرم کلاین فلتر) می باشند. از طرف دیگر سقط‌های خودبخودی در سه ماهه اول بارداری شایع بوده ودر ۵۰٪ موارد اساس آن‌ها اختلالات کروموزومی بوده و در ۵٪-۲ موارد تکرار خواهند شد. در حال حاضر روش‌های تشخیصی این آنیوپلوئیدی ها در دوران جنینی و یا بعد از تولد بر پایه کاریوتایپ سنتی استوار بوده که حداقل زمانی حدود ۱۵ روز به طول می انجامد. از فوائد استفاده از STR ها در مطالعات مولکولی و در جستجوی اختلالات کرموزومی، قابلیت تکثیر پذیری این توالی‌ها می باشد. برای مثال قابلیت تکثیرپذیری همزمان تعدادی، حساسیت و اختصاصیت و قابلیت آنالیز حجم بالایی از اطلاعات با حداقل هزینه و زمان از محاسن استفاده از STR می باشند.در این طرح قابلیت استفاده از توالی های کوتاه تکرار شونده در غربالگری آنیوپلوئیدی های کروموزومی شایع، براساس نتایج آزمایشات مبتلایان به سندرم داون اعتبار سنجی گردید. پس از اخذ رضایت نامه از ولی قانونی ۲۵ نفر از مراجعین به پزشکی قانونی مبتلابه سندرم داون، نمونه خون مبتلایان برروی کاغذ FTA ذخیره شد، سپس از نمونه های خون استخراج DNA گردید و پس از PCR با کیت Amp F STR Identifier و الکتروفورز موئینه پروفایل STR حاصله بررسی گردید. وجود سه آلل مختلف STR در لوکوس D21S11 در ۲۱ مورد از مبتلایان مشاهده گردید. استفاده از این تکنیک در غربالگری سریع آنیوپلوئیدی های کروموزومی در بارداری و همچنین در جنین های سقط شده نیز قابل تعمیم خواهد بود.

کلمات کلیدی

تشخیص آنیوپلوئیدی، سندرم داون، آنالیز سقط جنین، توالی های کوتاه تکرار شونده، واکنش زنجیره پلیمراز

مجله تحقیقات
ژنتیک پزشکی
سال : ۱۳۹۹ - شماره : ۱

مجله تحقیقات ژنتیک پزشکی
Medical Genetic Research

www.mgr.ir

Early detection of chromosomal aneuploidy in miscarriage and aborted embryos referred to forensic genetics' laboratories by STR sequence analysis

Farzad Seyed Forootan [1,2], Amir Shams [4,3], Alireza Sabouri [1], * Azadeh Hassanpour [1,5]

1. Legal Medicine Research Center, Legal Medicine Organization, Tehran, Iran.
2. Genome Medical Genetics Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
3. Department of Molecular Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord State University, Shahrekord, Iran.
4. Department of Stem Cells and Reconstructive Medicine, Medical Biotechnology Research Institute, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.
5. Department of Biology, Medical Biotechnology Research Center, Ashkdez Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.

* Correspondence email: azadeh.hasanpour@gmail.com

Abstract

The most common aneuploidies include chromosome 21 trisomy (Down syndrome), chromosome 18 trisomy (Edward syndrome), chromosome 13 trisomy (Down syndrome), chromosome 21 trisomy (Patau syndrome), chromosome X monosomy (Turner syndrome) and Klinefelter syndrome (XXY). On the other hand, spontaneous abortion is common in the first trimester which in the 50% of cases are based on chromosomal abnormalities and may repeated in 2-5% of next pregnancies. Nowadays, screening and diagnostic test for such aneuploidies in fatal period or neonatal phase are based on traditional karyotype which at least 15 days to develop. One of the benefits of applying short tandem repeats (STRs) in molecular studies and screening of chromosomal abnormalities, is the capability of reproducibility of this sequence. Synchronize reproducing capability in multiple loci, high sensitivity and specificity and capability of the analysis of huge data with less burden and time, are some of the impacts of STR application in the screening of chromosomal abnormalities. In this study, the validity of applying STRs for screening of common chromosomal aneuploidy (Down syndrome) have been assessed using data from affected people. After getting the letter of satisfaction from each case next of kin, blood samples from 25 Down syndrome clientele who have been admitted in Isfahan legal medicine department, have been saved on FTA cards. DNA has been extracted from blood samples which then amplified using Amp F STR Identifier kit with PCR. Resultant STR profiles have been visible using ABI capillary electrophoresis and have been analyzed by Gene-Mapper software. Presence of three different alleles in D21S11 locus has been reported in 21 cases out of 25. Application of this technique in rapid screening of chromosomal aneuploidies during pregnancy and also in aborted fetus can be extended.

Keywords

Diagnosis of aneuploidy, Down syndrome, Abortion analysis, STR, PCR

مقدمه

در سطح مولکولی و تحت میکروسکوپی DNA را می توان الگوی پایه ای در نظر گرفت که یک نمای کلی از تشکیل و حفظ یک موجود را فراهم می کند. DNA به شکل کروموزوم ها بسته بندی می شوند که آن‌ها را در یک سطح بسیار ساده می توان زنجیره های باند ژن در نظر گرفت که به محکمی پیچیده شده اند. و اطلاعات ژنتیکی را از نسلی به نسل دیگر انتقال می دهند. رفتار آن‌ها در تقسیم سلول سوماتیک در میتوز نشان می دهد که هر سلول دختر مجموعه ژنتیکی کامل خود را حفظ می کند. به طور مشابه، رفتار آن‌ها در طی تشکیل گامت در میوز، هر تخمک و اسپرم را قادر می سازد که یک مجموعه واحد منحصر بفرد از ژن های والد را داشته باشد. کروموزوم ها به بیان کاملاً تحت الفظی ناقلینی هستند که تکثیر و حفظ یک گونه را پیش می برند.. قبل از دهه ۱۹۵۰ به اشتباه تصور می کردند که هر سلول انسانی ۴۸ کروموزوم داشته و جنس انسان با تعداد کروموزوم های موجود در ماده لقاح یافته مشخص می شود. به دنبال پیشرفت تکنیک های قابل اعتمادتر برای مطالعه کروموزوم های انسانی در سال ۱۹۵۶، مشخص شد که تعداد صحیح کروموزوم های انسان ۴۶ بوده و مردانگی با حضور کروموزوم Y و بدون توجه به تعداد کروموزوم X موجود در هر سلول تعیین می گردد. همچنین مشخص شد که ناهنجاری در تعداد و ساختمان کروموزوم می تواند رشد و تکوین طبیعی را به طور جدی بر هم بزند[۱].

ناهنجاری های آنیوپلوئیدی

ناهنجاری تعدادی شامل افزایش یا کاهش یک یا تعدادی کروموزوم است که آنیوپلوئیدی نامیده می شود و یا افزایش یک یه تعدادی مجموعه کامل هاپلوئید که پلی پلوئیدی گفته می شود. کسب یک یا دو کروموزوم همولوگ، به ترتیب تری زومی و تترازومی نامیده می شود.حضور یک کروموزوم اضافی را تریزومی می گویند. بسیاری از موارد سندرم داون به جهت حضور یک کروموزوم شماره ۲۱ اضافی است، بنابراین سندرم داون، غالباً تریزومی ۲۱ نامیده می شود. دیگر تریزومی ها ی اتوزومی که با بقا سازگارند، سندرم پاتو (تریزومی ۱۳) و سندرم ادوارد (تریزومی ۱۸) هستند. بسیاری دیگر از تریزومی های اتوزومی باعث خاتمه اولیه حاملگی می شوند وتریزومی ۱۶ به ویژهشایع، در موارد سقط خودبخودی سه ماهه اول است. وجود یک کروموزوم جنسی(Y,X) اضافی فقط اثرات فنوتیپی خفیفی دارد. تریزومی ۲۱ معمولاً در اثر نارسایی جداسازی یکی از زوج کروموزوم همولوگ در طی آنافاز میوز I مادری است. این نارسایی در جداشدن بی والانت ، عدم تفکیک نامیده می شود. با شیوع کمتری تریزومی می تواند در اثر عدم تفکیک در طی میوز II به جهت عدم جداشدن یک جفت کروماتید خواهری اتفاق افتاد. در هر دو مورد مذکور، گامت ایجاد شده دو کروموزوم همولوگ (دی زومی) دریافت می‌کند و اگر متعاقباً لقاح اتفاق افتاد، رویان حاصل تری زومیک خواهد بود[۲].

منشاء و علت عدم تفکیک کروموزوم ها

عواقب عدم تفکیک در میوز I و II از نظر کروموزومهایی که در گامت یافت می شوند متفاوت هستند. خطا در میوزI منتهی به حضور هر دو همولوگ یک جفت کروموزوم در گامت می شود. در مقابل، عدم تفکیک در میوزII باعث می شود که گامت دو کپی از یکی از همولوگ های یک جفت کروموزوم را دریافت کند. مطالعات با استفاده از مارکرهای DNA نشان داده است که بسیاری از کودکان با تریزومی اتوزومی کروموزوم اضافی خود را در نتیجه عدم تفکیک در یکی از تقسیم های میوزی مادر به ارث برده اند. عدم تفکیک همچنین می تواند در طی یک تقسیم میتوزی اولیه در زیگوت در حال تکوین رخ می دهد. این پدیده منجر به حضور دو یا تعدادی رده سلولی متفاوت می شود که تحت عنوان موزاییسم شناخته می شود.

مطلوب ترین توضیح برای عدم تفکیک می تواند یک اثر پیری روی اووسیت اولیه باشد که در یک حالت تعلیق عدم فعالیت تا ۵۰ سال باقی می ماند. این توجیه براساس ارتباط ثابت شده بین افزایش سن مادر و افزایش بروز سندرم داون در فرزندان می باشد. اثر سن مادری همچنین برای تریزومی های ۱۳ و ۱۸ نیز ذکر شده است. مشخص نیست که افزایش سن مادر چرا و چگونه باعث استعداد به عدم تفکیک می شود. هر چند که تحقیقات نشان داده است که فقدان نوترکیبی در پروفاز میوز I عدم تفکیک متعاقب را القا می کند. این مساله تعجب برانگیز نیست، زیرا کیاسماهایی که بعد از نوترکیبی تشکیل می شود، مسئول نگهداری هر جفت کروموزوم همولوگ تا جداسازی متعاقب در دیاکینز می باشند، بنابراین نارسایی در تشکیل کیاسماها می تواند به جدا شدن زودرس هر جفت همولوگ و تفکیک تصادفی آن ها به سلول‌های دختری منجر شود. اما در زنان نوترکیبی قبل از تولد اتفاق می افتد، در حالی که وقایع عدم تفکیک در هر زمانی بین ۱۵ تا ۵۰ سال بعد روی می دهد. این امر پیشنهاد می‌کند که حداقل دو عامل می تواند در ایجاد عدم تفکیک موثر باشد؛ اول نبود نوترکیبی بین کروموزوم های همولوگ در تخمدان جنینی و دوم ناهنجاری در تشکیل دوک پس از سالیان بسیار.

توجیه دیگر برای ارتباط بین افزایش سن مادر با افزایش ریسک تریزومی اتوزومی، بقای رویان های تریزومیک به جهت کاهش وابسته به سن توانایی ایمونولوژیک است. مدارک قطعی این تئوری محدود است.

عوامل دیگری که در ایجاد عدم تفکیک دخیلند، شامل تشعشع و لقاح دیر هنگام پس از اوولاسیون می باشد. در حیوانات نشان داده شده است که یک افزایش بروز رویان های آنیوپلوئید می تواند از طولانی شدن فاصله بین اوولاسیون و لقاح، حاصل شود. پیشنهاد شده است که این مساله می تواند عامل رابط بین سن مادری و بروز سندرم داون باشد زیرا با افزایش سن دفعات مقاربت احتمالاً کاهش یافته و در نتیجه احتمال لقاح دیرهنگام بیشتر خواهد بود. این مطلب می تواند در مورد خانواده هایی که مستعد به عدم تفکیک مکرر هستند صدق نماید[۳].

همه گیر شناسی ناهنجاری های کروموزومی

ناهنجاری های کروموزومی حداقل در ۱۰٪ از کل اسپرم ها و ۲۵٪ از تخمک های بالغ دیده می شود. بین ٪۲۰-۱۵ از کل حاملگی‌های شناخته شده با سقط خودبخودی خاتمه می یابند، و تعداد بسیار بیشتری از زیگوت ها و رویان ها چنان ناهنجارند که بقای آن ها پس از چند روز یا چند هفته بعد از لقاح غیر ممکن است. ۵۰٪ از کل سقط های خودبخودی دارای یک ناهنجاری کروموزومی هستند و میزان بروز ناهنجاری های کروموزومی در رویان هایی که از نظر ریخت زایی طبیعی هستند ۲۰٪ است. این مشاهدات نشان می دهد که ناهنجاری کروموزومی عامل از دست رفتن نسبت بسیار بالایی از کل لقاح های انسانی است.از لقاح به بعد میزان بروز ناهنجاری کروموزومی به سرعت کاهش می یابد. تا هنگام تولد این میزان به سطح ۰/۵ یا ٪۱ می رسد، هر چند که میزان کلی آن در نوزادان مرده به دنیا آمده بسیار بیشتر (٪۵) است. شایان ذکر است که در بین سندرم های آنیوپلوئیدی معروف نیز درصد بالایی منجر به سقط می شوند(جدول ۱-۱).

این مساله با مقایسه میزان بروز بیماری‌هایی نظیر سندرم داون در زمان نمونه گیری پرزهایی کوریونی (هفته های ۱۱ تا ۱۲)، آمنیوسنتز (هفته ۱۶) و پایان حاملگی در (جدول ۲-۱) نشان داده شده است[۴].

جدول۱-۱-شیوع اختلالات کروموزومی در ده هزار تولد

نوع اختلال	تعداد موارد در ده هزار تولد
اتوزومی	
تریزومی ۱۳	۲
تریزومی ۱۸	۳
تریزومی ۲۱	۱۵
کروموزوهای جنسی	
تولدهای مونث	
۴۵، X	۲-۱
۴۷، XXX	۱۰
تولدهای مذکر	
۴۷،XXY	۱۰
۴۷،XYY	۱۰
سایر بازآرایی های نامتعادل	۱۰
بازآرایی های متعادل	۳۰
جمع	۹۰

تریزومی ۲۱ (سندرم داون)

یکی از مشهورترین اختلالات کروموزوم که قبلا" به آن منگولیسم می گفتند سندرم داون است. Langdon Downاولین شخصی بود که در سال ۱۸۶۶ علائم کلینیکی این بیماری را توضیح داد. مبتلایان به این بیماری دارای قد کوتاه ، چین خوردگی پرده گوشه چشم (epicanthus) شانه های کوتاه و پهن ، سوراخ بینی گشاد ، زبان بزرگ، همراه با شیار های مخصوص، دست های کوتاه هستند. عقب افتادگی ذهنی از خصوصیات این افراد است، ولی می توانند تا حدودی تعلیم داده شوند .این افراد یک کروموزوم ۲۱ اضافه دارند (تریزومی ۲۱). خطر ایجاد لوسمی در افراد مبتلا ۱۵ بار بیشتر از افراد معمولی است. حدود یک سوم

افراد بیمار دارای ناهنجاری های قلبی می باشند. متوسط عمر این افراد حدود ۴۰ سال است حدود یک ششم نوزادانی که مبتلا به این بیماری متولد می شوند در اولین سال زندگی خود از بین می روند. [۵]

تریزومی شماره ۱۸

اولین بار توسط ادواردز توضیح داده شد. فراوانی این بیماری ۱/۲۰۰۰۰است. مبتلایان به این بیماری اکثرا" در سه ماهگی بعد از تولد از بین می روند ولی بعضی از آن ها تا پنج سال هم زنده مانده اند علائم شامل : مغز کوچک ، عقب افتادگی ذهنی، کری، پایین بودن موضع گوش ها، گره شدن شست ها به صورت خاص می باشند، اکثرا" دارای ناهنجاری‌های قلبی می باشند. حدود ۸۰٪ افراد بیمار دختر هستند و لازم به ذکر است علت اکثر تریزومی ها سن مادر است[۵].

سندرم ترنر (XO ۴۴)

سندرم ترنر نوعی مونوزومی است که دارای ۴۴کروموزوم اتوزوم و یک کروموزوم جنسی x می باشند. فنوتیپ این ناهنجاری کروموزومی اولین بار توسط ترنر (H.H.Turner) کشف شد افراد مبتلا دختر های غیر طبیعی هستند که فراوانی آن ها ۱/۲۵۰۰ در بین متولدین دختر است .بیش از ۹۰٪ آن‌ها خود به خود سقط می گردند.

این گونه زن‌ها فاقد تخمدان هستند و صفات ثانویه جنسی آن‌ها محدود است. از دیگر عوارض این‌گونه افراد قد کوتاه، پایین بودن موضع گوش‌ها ، پایین بودن خط مو در پشت سر ، وجود پرده و چین در گردن ، و سینه های سپر مانند می باشند. افراد مبتلا با مقایسه با برادران وخواهران خود دارای هوش یکسان یا کمی کمتر هستند. مونوزومی x احتمالا" از تخمک یا اسپرم‌های استثنایی بدون کروموزم جنسی یا در اثر حذف کروموزوم جنسی xدر اولین تقسیم میتوز بعد از اینکه تخمxx یا xy ایجاد شده اند بوجود می آیند.

بعضی از افراد مبتلا دارای یک کروموزوم x و قطعه ای از کروموزوم x دوم می باشند. مطالعه ی این گونه افراد نشان داده است که هر دو بازوی کروموزوم x دوم جهت رشد طبیعی تخمدان لازم است.

افرادی که فقط بازوی بزرگ x دوم را دارا می باشند قدکوتاه بوده وبقیه عوارض سندرم ترنر را نشان می دهند .افرادی که دارای بازوی کوچک x دوم می باشند دارای قد طبیعی بوده وتمام عوارض را نشان نمی دهند، این موضوع نشان می دهد که فنوتیپ ترنر اکثرا" توسط ژن‌های واقع بر روی بازوی کوچک x کنترل می شود[۶].

سندرم کلاین فلتر(XXY 44)

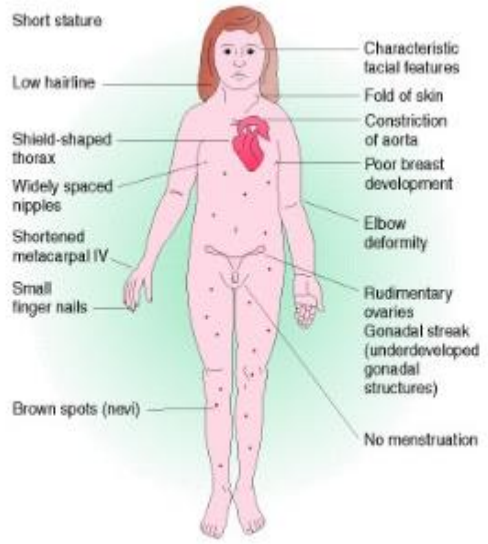
اضافه شدن یک کروموزومx به ترکیب کروموزومی مرد (xy) باعث ایجاد سندرم کلاین فلتر می گردد که اولین بار توسط کلاین فلتر توضیح داده شده است. این افراد مذکر بوده و فراوانی آن ها ۱/۱۰۰۰ در بین متولدین پسر می باشد. این افراد از نظر فنوتیپی نر ولی در بعضی خصوصیات به خصوص صفات ثانویه جنسی شبیه زن ها هستند. برای

مثال سینه ها رشد کرده ولی موی بدن رشد نمی کند ، بیضه ها کوچک و غده پروستات کوچک است.

علت ایجاد آن ها احتمالا" لقاح یک تخمک غیر طبیعی xxبا اسپرم y ، یک تخمک x با اسپرم غیر طبیعی xy است. حدود سه چهارم افراد بیمار دارای کاریوتیپ (44, xxy) می باشند . ولی در صورتیکه تعداد x ها ویا y ها اضافه شود همین فنوتیپ با اندکی تغیر مشاهده می گردد. برای مثال کاریوتیپ‌های , xxxxy ,xxxy, xxyy ، نیز سندرم کلاین فلتر نامیده می شود. یکی از عوارض این بیماری عقب افتادگی ذهنی است که بستگی به تعداد x ها دارد، به این صورت که هر چه تعداد x ها زیاد باشد عقب افتادگی نیز شدیدتر می گردد. پسر ها از حد معمول بلند تر بوده، نسبت قد به وزن آن‌ها طوری است که قد بلند و باریک به نظر می رسند، قطر سر آن ها به طور معنی داری از حد معمول کمتر است، حالت تعرضی و فعالیت آن ها کمتر و حساسیت آن ها نسبت به مسائل اجتماعی بیشتر است[7].

بیماری سندرم فریاد گربه

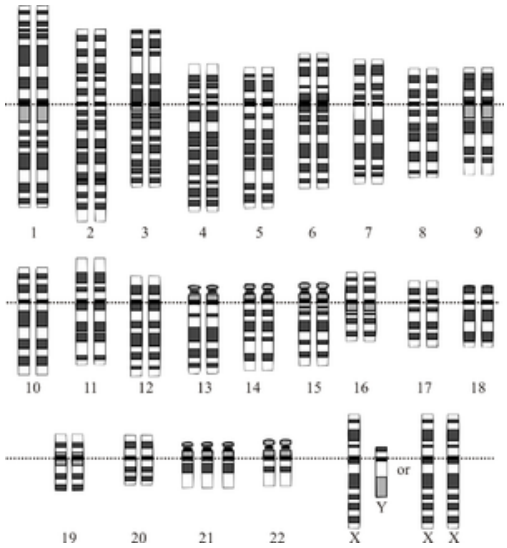
در انسان کمبودهای کروموزومی شناخته شده ، اثرات زیان باری به بار می‌آورند. یکی از این کمبود ها مربوط به بازوی کوچک کروموزوم شماره ۵ است که باعث سندر م فریاد گربه (cri-du- chat) می شود. علت نامگذاری نیز شباهت گریه نوزاد مبتلا به صدای گربه است .از علائم این بیماری می توان میکروسفالی ،افزایش فاصله چشم ها، پایین تر قرار گرفتن گوش ها ،مایل شدن چشم ها در جهت خلاف داون، کوچکی چانه (میکروگناسیا) را نام برد[8] .



شکل ۱: مشخصات سندرم ترنر: در نتیجه داشتن تک کروموزوم X (XO) [۹]

تشخیص آنیوپولوئیدی

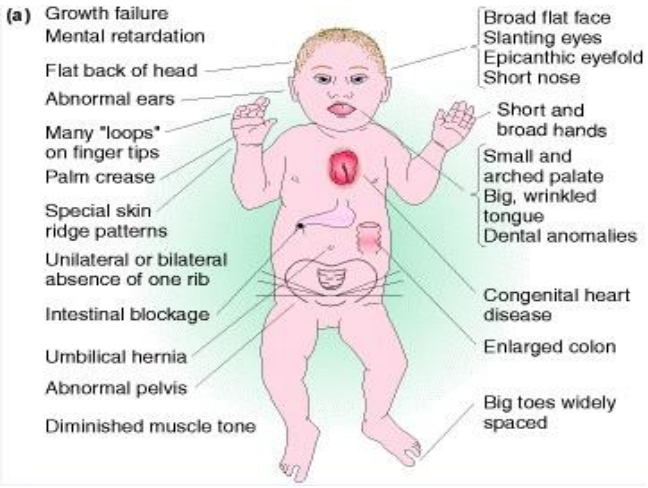
آنیوپولوئیدی معمولاً با استفاده از کاریوتایپ شناسایی می شود، که در آن یک نمونه از سلول ها ثابت و رنگ آمیزی شده است تا الگوی باند سبک کروموزومی معمولی و تاریک ایجاد شود و یک تصویر از کروموزوم ها تجزیه و تحلیل می شود. تکنیک های دیگر شامل Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)، PCR کمی از توالی کوتاه تکرارشونده Fluorescence PCR ، تجزیه و تحلیل مقدار کمی PCR، طیف سنجی کمی مولکول های تک مولکولی و ترکیب (Comparative Genomic Hybridization CGH) است.



شکل۲: نمای کاریوتایپ سندرم داون: شایعترین آنیوپلوئیدی انسانی، سه کپی از کروموزوم ۲۱ در سطر سوم مشهود است.

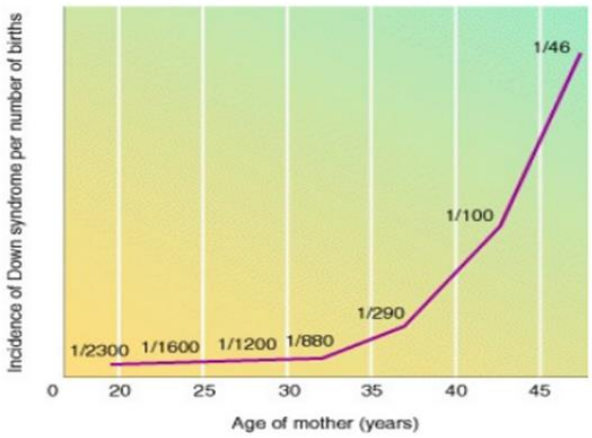
این آزمایش ها همچنین می توانند قبل از تشخیص آنیوپلوئیدی در حاملگی، از طریق آمنیوسنتز یا نمونه گیری CVS انجام شود. در زنان باردار ۳۵ سال و بالاتر تشخیص پیش از تولد را پیشنهاد می کنند، زیرا احتمال افزایش آنیوپلوئید کروموزومی با افزایش سن مادر افزایش می یابد. پیشرفت های اخیر باعث روی آوردن به روش های تهاجمی کمتری بر اساس حضور مواد ژنتیکی جنین در خون مادر شده است.

شایع‌ترین نوع آنیوپلوئید انسانی زنده، سندرم داون (شکل۳) است که در فرکانس حدود ٪۱۵/. از همه تولدهای زنده رخ می دهد. با وجود روش های موثری که در تشخیص پیش از تولد سندرم داون وجود دارد با این حال، شایع ترین نوع تریزومی، سندرم داون بوده است .



شکل ۳: مشخصات سندرم داون(تریزومی ۲۱)؛ علائم ظاهری سندرم در یک نوزاد [۱۰]

سندرم داون با سن مادر مرتبط است مادران مسن تر خطر ابتلا به بیماری سندرم داون را به شدت افزایش می دهند (شکل۴). به همین دلیل، تجزیه و تحلیل کروموزوم جنین (توسط آمنیوسنتز یا با استفاده از نمونه برداری CVS) برای مادران مسن تر توصیه می شود. اثرات نامطلوب سن پدر نیز ثابت شده است.



شکل۴: ارتباط سن مادر و شیوع سندرم داون [۱۱]

فنوتیپ های چندگانه که باعث ایجاد سندرم داون می شوند، شامل عقب ماندگی ذهنی با IQ در محدوده ۲۰ تا

۵۰ است. چهره وسیع و صاف؛ چشمانlow set ؛ قد کوتاه دست های کوتاه با چروک در وسط؛ و یک زبان بزرگ چین دار. زنان ممکن است بارور باشند و ممکن است گامت طبیعی یا تریزومیک تولید کنند، اما مردان عقیم می باشند. میانگین امید به زندگی حدود ۱۷ سال است و فقط ۸ درصد بعد از ۴۰ سالگی باقی مانده است[۱۱].

همه گیر شناسی سندرم داون

در سال ۲۰۱۰، سندرم داون در حدود ۱ در ۱۰۰۰ تولد اتفاق افتاده و در حدود ۱۷۰۰۰ مرگ و میر ناشی داشته است. بیشتر کودکان مبتلی سندرم داون در کشورهایی که سقط جنین مجاز نبوده و یا در کشورهایی که بارداری بیشتر در سنین بالا اتفاق می افتد، متولد می شوند. حدود ۱/۴ در ۱۰۰۰ تولد زنده در ایالات متحده و ۱/۱ در ۱۰۰۰ تولد زنده در نروژ مبتلا بوده اند. در دهه ۱۹۵۰ در ایالات متحده، این میزان به علت غربالگری قبل از زایمان و سقط جنین کاهش یافته است. میزان سقط های خودبخودی در حاملگی های مبتلا به سندرم داون دو برابر بیشتر از نرمال است که علت آن اختلالات مادرزادی در مبتلایان است. افزایش احتمال بارداری منجر به سنرم داون در ارتباط با سن بالای مادر گزارش شده است[۱۲].

جمعیت مورد مطالعه

در این تحقیق مجموعاً ۲۰ مراجعه کننده به پزشکی قانونی مرکز اصفهان، بخش روانپزشکی مورد بررسی قرار گرفتند که همگی این افراد دارای سندرم داون بوده اند. در تمامی موارد از ولی قانونی این افراد رضایت نامه اخذ گردید. لازم به‌ذکر است محققین این پایان نامه متعهد شدند در هیچ‌یک از بروندادها به هویت این افراد اشاره نگردد.

روش نمونه گیری

پس از کسب رضایت کتبی، نمونه خون ۲۰ بیمار جهت انجام استخراج DNA جمع آوری گردید. از هر بیمار ۳ میلی لیتر نمونه خون گرفته ودر لوله های ونوجکت حاوی EDTA ریخته شد.

استخراج DNA ژنومی ازخون

- جهت استخراج DNA از روش Boiling استفاده شد.
- برای هر نمونه ۰/۸ میلی لیتر از خون داخل میکروتیوب ریخته شد و به حجم ۱/۵ میلی لیتر بافر اضافه گردید. ۱۰-۵ ثانیه ورتکس و به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. فاز رویی به آرامی دور ریخته شد.
- شستشوی دوم: بار دیگر به میکروتیوب R بافر اضافه شد و ۳۰ ثانیه ورتکس گردید تا فازچسبیده در ته میکروتیوب کاملاً حل شود. به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید و محلول رویی به آرامی دور انداخته شد.
- شستشوی سوم: مجدداً به میکروتیوب فوق R بافر اضافه و مانند مرحله قبل، شستشو داده شد. (در صورت نیاز می توان یکبار دیگر شستشو را تکرار نمود).
- سپس ۱۰۰ میکرولیتر ۰/۰۵NaOH مولار به میکروتیوب اضافه و به آرامی تکان داده شد. ۳۰ ثانیه ورتکس و به مدت ۲۰ دقیقه در آب جوش قرارداده شد.
- در پایان ۲۰ میکرولیتر Tris–HCl 1مولار اضافه گردید، ۱دقیقه ورتکس و ۳۰ ثانیه با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ

شد، فاز بالایی که حاوی DNA بود جدا و به میکروتیوب دیگری منتقل گردید. در این مرحله محلول DNA آماده استفاده در آزمایشات مولکولی بود.

روش تهیه بافر مخصوص استخراج

- ۵۴/۷۶ گرم سوکروز، ۵ میلی لیتر Tris-HCl و ۲میلی لیتر از $MgCl_2$ در یک ارلن ریخته شد و با آب مقطر دو بار تقطیر به حجم ۴۰۰ میلی لیتر رسانیده شد. یک مگنت داخل آن انداخته وروی دستگاه همزن قرار گرفت تا مخلوط همگنی بدست آید. با پیپت ۵ میلی لیتراز محلول تریتون به آرامی اضافه گردید.محلول به بالن ژوژه ۵۰۰ میلی لیتر منتقل و با آب دو بار تقطیر به حجم رسانیده شد. محلول درون شیشه های کوچک جهت اتوکلاو منتقل گردید[۱۳].

ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده

ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ

در این مرحله جهت اندازه گیری میزان DNA استخراج شده ۵ میکرولیتر از نمونه را به داخل منفذ مربوط به دستگاه نانو دراپ ریخته و توسط دستگاه میزان جذب (Absorbance) محلول در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری گردید.

انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز(Polymerase Chain Reaction)

- مواد مصرفی: مواد این PCR با غلظت های ذکر شده در جدول(۱) با هم مخلوط شد و حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسید. سپس در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت تا واکنش PCR انجام گردید.

آغازگرهای (Primer) مورد استفاده

آغازگرهای شرکت Applied Bio-System که شامل تمامی مناطق ۱۵ گانه مورد نظر در سامانه نمایه گذاری ترکیبی DNA می باشد استفاده گردید. مقادیر مورد استفاده در واکنش PCR در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول(۱): مقادیر مورد استفاده در واکنش PCR

مقدار لازم (µl)	مشخصات	مواد مصرفی
۱۲	۲X	Master Mix
۱۲	۱۰pmol/µl	Primer Mix
۱	۲۰ng	Template DNA
مجموع	=۲۵ ML	

جدول(۲): چرخه حرارتPCR

مراحل	زمان	دما(C)
واسرشت سازی اولیه	۱۱دقیقه	۹۵
واسرشت سازی	۲۰ثانیه	۹۴

اتصال آغازگر به رشته الگو	۲ دقیقه	۵۹
بسط پلیمراز	۱ دقیقه	۷۲
بسط نهایی	۲۵دقیقه	۶۰
نگهداری	∞	۴

تعداد سیکل = ۲۷

در پایان، محصول به دست آمده به یخچال ۴ درجه سانتی گراد منتقل شد تا جهت انتقال بر روی ژل آگارز۲ ٪ برای سنجش وجود و کیفیت محصول PCR مورد بررسی قرار گیرد.

الکتروفورز موئینه

پس از اتمام روند PCR، محصولات به‌دست آمده به‌صورت مخلوطی از مولکول های DNA با اندازه های متفاوت بوده که تجزیه و تحلیل داده های نهفته در آن، منوط به جداسازی دقیق اجزای این مخلوط می باشد. یکی از این روش ها الکتروفورز موئینه بوده که در آن مراحل تزریق، جداسازی و شناسایی برای نمونه های متعدد به صورت خودکار صورت می گیرد. در این مطالعه الکتروفورز موئینه به وسیله دستگاه ABI-3130 Genetic Analyzer صورت گرفت. مواد مورد نیاز برای هر نمونه و یا لدر به شرح مندرج در جدول زیر می باشد; به منظور تک رشته ای شدن محصول PCR ، مخلوط حاصله به مدت سه دقیقه در درجه حرارت ۹۵ سانتیگراد حرارت داده شده و سپس به مدت ۳ دقیقه در درجه حرارت صفر فرایند فوق متوقف می گردد.

جدول(۳): جدول مواد لازم برای فرایند پیش الکتروفورز

مقدار لازم (µl)	مواد مصرفی
۱۲	Formamide
۰/۳۸	Lysis
۱	Template PCR product/ Ladder
۱۳/۳۸ µl	مجموع

تفسیر نتایج بدست آمده و گزارش دهی

نتایج حاصل از جداسازی قطعات DNA در مرحله الکتروفورز موئینه، در قالب ژنوتیپ فرد مورد بررسی مشخص می گردد. ژنوتیپ یک فرد در جایگاهی خاص عبارت است از دو آلل یکسان (هموزیگوت) یا نا همسان (هتروزیگوت). پروفایل یا نمایه ژنتیکی هر فرد، حاصل بررسی تعدادی از جایگاه های STR آن فرد است و در حقیقت اثرانگشت ژتتیکی محسوب می گردد.

پس از اتمام مراحل الکتروفورز، عمل شناسایی قطعات بر اساس اندازه و وزن ملکولی و میزان رنگ فلوروسنتی که با آن نشاندار شده است، صورت می گیرد. نتایج حاصله به صورت سیگنال های مخصوصی به رایانه همراه دستگاه ارسال شده و در نهایت به شکل نمودارهای قله ای، نمایش داده می شود. در این روش با الکتروفورز همزمان نردبان های آللی و اندازه ای، هر یک از قله ها که نمایانگر یک آلل می باشند را شناسایی کرده و ثبت کرد. نرم افزار Gene mapper IDX از جدید ترین نرم افزار های به کار رفته در

این زمینه بوده که با الگو قرار دادن نردبان های اندازه ای و آللی و با احتساب شرایط استاندارد الکتروفورز، داده های به‌دست آمده را به‌صورت خودکار مقایسه کرده و نتایج خام حاصل را جهت تایید نهایی و تفسیر کارشناس مربوطه ارائه می دهد.

نتایج جمع آوری نمونه

در این تحقیق مجموعاً ۲۰ مراجعه کننده به پزشکی قانونی مرکز اصفهان، بخش روانپزشکی مورد بررسی قرار گرفتند که همگی این افراد دارای سندرم داون بوده اند. در تمامی موارد از ولی قانونی این افراد رضایت نامه اخذ گردید. لازم به‌ذکر است محققین این پایان نامه متعهد شدند در هیچ یک از بروندادها به هویت این افراد اشاره نگردد.

نتایج بررسی DNA استخراج شده با دستگاه نانواسپکتوفتومتر

در این مرحله جهت اندازه گیری میزان DNA استخراج شده ۵ میکرولیتر از نمونه DNA های استخراج شده داخل منفذ مربوط به دستگاه نانودراپ ریخته شد و توسط دستگاه میزان جذب محلول در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری گردید. با توجه به ضریب جذب DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر مقدار DNA برحسب نانوگرم توسط نرم افزار دستگاه حساب شد. همچنین نسبت جذب ۲۶۰ نانومتر به جذب ۲۸۰ نانومتر(A260/A280) به منظور بررسی میزان آلودگی RNA یا پروتئین تعیین گردید. نسبت حاصله در صورتیکه بین ۱/۸ تا۲ باشد مطلوب است که در این تحقیق نمونه های DNA با نسبت ۱/۸ – ۱/۷ مورد استفاده قرارگرفت.

نتایج حاصل از واکنش (PCR)

پس از بررسی کیفیت DNA های استخراج شده، واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) برای نمونه ها انجام شد. محصول PCR جهت تعیین توالی در دستگاه ژن آنالایزر تحت الکتروفورز موئینه قرار گرفت.

نتایج بدست آمده ازالکتروفورز موئینه

در این مرحله قطعات تکثیر شده DNA با نرم افزار 3130 Data collection دسته بندی و تفکیک گردید. سپس نتایج تعیین توالی سکانس ها با برنامه Gene Mapper تجزیه و تحلیل گردید.

شکل۵: یک نمونه از نتایج توالی STR غیرجنسی در بیمار مبتلا به سندرم داون

نتایج حاصل از تحقیق

۱- سه آلل مجزا در جایگاه D21S11 در ۱۶نفر از ۲۰ فرد مورد مطالعه مشاهده شد.

۲- دو آلل مجزا در جایگاه D21S11 در چهار بیمار مشاهده گردید، به نظر می رسد این افراد دارای هموزیگوسیتی در یکی از دو آلل بیان شده در جایگاه D21S11 باشند.

۳- تغییرات حذف یا درج در جایگاه های دیگر مورد بررسی مشاهده نگردید.

٤- -توالی های STR در جایگاه D21S11 بیماران به تفکیک هر فرد در زیر آمده است:

۱) بیمار شماره۱: در جایگاه D21S11 دارای سه آلل در موقعیت ۳۰، ۳۰/۲ و ۳۲/۲ می باشد.

۲) بیمار شماره۲: در جایگاه D21S11 دارای سه آلل در موقعیت ۳۰، ۳۱/۲ و ۳۲/۲ می باشد.

۳) بیمار شماره۳: در جایگاه D21S11 دارای سه آلل در موقعیت ۲۸، ۲۹ و ۳۰ می باشد.

۴) بیمار شماره۴: در جایگاه D21S11 دارای دو آلل در موقعیت ۲۷ و۳۰ می باشد، که احتمالاً بیانگر هموزیگوسیتی در جایگاه ۳۰ می باشد.

۵) بیمار شماره۵: در جایگاه D21S11 دارای سه آلل در موقعیت ۲۸، ۲۹ و ۳۱/۲ می باشد.

۶) بیمار شماره۶: در جایگاه D21S11 دارای سه آلل در موقعیت ۲۸، ۲۹ و ۳۱/۲ می باشد.

۷) بیمار شماره۷: در جایگاه D21S11 دارای سه آلل در موقعیت ۳۰/۲، ۳۲ و ۳۳ می باشد

۸) بیمار شماره۸: در جایگاه D21S11 دارای دو آلل در موقعیت ۲۹ و۳۱/۲ می باشد، که احتمالاً بیانگر هموزیگوسیتی در جایگاه ۲۹ می باشد.

۹) بیمار شماره۹: در جایگاه D21S11 دارای سه آلل در موقعیت ۳۰، ۳۲/۲ و ۳۳/۲ می باشد.

۱۰) بیمار شماره۱۰: در جایگاه D21S11 دارای سه آلل در موقعیت ۲۸،۲۹و۳۰ می باشد

۱۱) بیمار شماره۱۱: در جایگاه D21S11 دارای سه آلل در موقعیت ۲۸/۲، ۲۹ و۳۰/۲ می باشد.

۱۲) بیمار شماره۱۲: در جایگاه D21S11 دارای سه آلل در موقعیت ۲۸، ۳۰و ۳۱/۲ می باشد.

۱۳) بیمار شماره۱۳: در جایگاه D21S11 دارای دو آلل در موقعیت ۲۷ و۳۰ می باشد، که احتمالاً بیانگر هموزیگوسیتی در جایگاه ۲۷ می باشد.

۱۴) بیمار شماره۱۴: در جایگاه D21S11 دارای سه آلل در موقعیت ۲۷، ۲۸ و ۳۰ می باشد

۱۵) بیمار شماره۱۵ : در جایگاه D21S11 دارای سه آلل در موقعیت ۳۰، ۳۱/۲ و۳۳/۲ می باشد.

۱۶) بیمار شماره۱۶: در جایگاه D21S11 دارای سه آلل در موقعیت ۲۸، ۳۰و ۳۲/۲ می باشد.

۱۷) بیمار شماره۱۷: در جایگاه D21S11 دارای سه آلل در موقعیت۲۷، ۲۸و ۲۹ می باشد.

۱۸) بیمار شماره۱۸: در جایگاه D21S11 دارای سه آلل در موقعیت ۲۷، ۲۹ و ۳۰ می باشد.

۱۹) بیمار شماره۱۹: در جایگاه D21S11 دارای دو آلل در موقعیت ۲۹ و۳۳/۲ می باشد، که احتمالاً بیانگر هموزیگوسیتی در جایگاه ۲۹ می باشد.

۲۰) بیمار شماره۲۰: در جایگاه D21S11 دارای سه آلل در موقعیت ۲۸، ۲۹ و ۳۵/۲ می باشد.

به طور کلی از داده های فوق می توان نتیجه گرفت در جمعیت محدود آماری مورد مطالعه، کیت (AMP F STR Identifier) در ۸۰٪ افراد قادر به شناسایی تریزومی ۲۱ بوده است. البته در ۲۰٪ دیگر نیز با تجزیه و تحلیل دقیق تر شواهدی دال بر تریزومی ۲۱ قابل مشاهده بود.

نتیجه گیری

آزمایشات ژنتیکی قبل از تولد به میزان قابل ملاحظه ای در طول دهه های گذشته متحول گشته بصورتیکه تست های جدید معرفی شده، در این عرصه به سرعت رو به افزایش می باشند. این معرفی گاهاً از مجاری غیر رسمی و در آزمایشگاه های غیر

آکادمیک رخ داده است. سه انجمن شاخص در این زمینه : انجمن طب مادر – جنین، انجمن متخصصین زنان و مامایی آمریکا و انجمن متخصصین ژنتیک آمریکا در کار گروهی در سه هدف نهایی به اجماع رسیدند: ۱- ایجاد قالب و الگویی جهت معرفی تست های ژنتیکی جدید جهت کاربرد بالینی ۲- معرفی قالب هایی جهت انجام مشاوره ژنتیک و تهیه دورنمای تست های ژنتیک ۳- تهیه دستورالعمل هایی شفاف و مستند جهت تست های ژنتیکی فعلی. کارگروه های متعدد دیگری با شرکت انجمن های بین المللی متعدد در این زمینه تشکیل شده و شرکت کنندگان در آن با درنظر گرفتن اهداف عمده ای در زمینه تست های ژنتیکی از جمله هزینه و مقرون به صرفه بودن ، مسائل اخلاقی – قانونی، امکانات آزمایشگاهی، پوشش بیمه، مشاوره قبل و بعد از تولد، یافته های اولیه و ثانویه و سلامت الکترونیک یا پزشکی از راه دور به تبادل نظر پرداخته اند. به موازات اقدامات صورت گرفته در راستای تست های غربالگری بیماری‌های تک ژنی ، تلاش‌های زیادی در راستای ارائه دستورالعمل های شفاف در غربالگری اختلالات (ناهنجاری های) کروموزومی صورت گرفته است.

در راستای دستیابی به هدف اول ایجاد راهکار جهت معرفی تست های ژنتیکی جدید از شرکت کنندگان کار گروه خواسته شد تا اهداف کلی در زمینه تست های ژنتیکی را توضیح داده و در نظر داشته باشند که آیا تداخلی در سلامت جنین در دوران قبل از تولد و یا در دوران نوزادی ایجاد می کند یا خیر؟

اهداف غربالگری نوزادی مجدداً مورد بازنگری قرار گرفت تا بتوان بررسی نمود که آیا از این خط مشی می توان به‌عنوان راهکار در تست های غربالگری قبل از تولد استفاده نمود؟

تست های تشخیصی قبل از تولد در ابتدا با استفاده از آمنیوسنتز جهت تعیین کاریوتایپ جنین و با تمرکز بر روی تشخیص سندرم داون پایه گذاری گردید. در ابتدا تنها تداخل جهت مادرانی که در فرزند آن ها تشخیص آنیوپلوئیدی داده شده بود، ختم حاملگی بود. در کل غربالگری ژنتیکی قبل از تولد (با در نظر گرفتن سن مادر

در بارداری) پیشرفت قابل ملاحظه ای با ابداع غربالگری های سرم خون مادر در سه ماهه اول و دوم، سونوگرافی های بیماری های ژنتیکی، غربالگری براساس Cell Free DNA و غربالگری حاملین بیماری های تک ژنی ایجاد شده است[۱۴].

متخصصین توافق دارند که آزمایشات ژنتیکی قبل از تولد، خواه تشخیصی و یا غربالگری، بایستی در جهت ارائه نتیجه بهتری در جهت سلامت نوزاد و رفاه خانواده باشد. اگر چه این هدف سلامت نوزادی، بسیار پیچیده و چند جانبه بوده و نیاز به سیستم های ارزش گذاری اجتماعی دارد. سوالی که اغلب خانواده ها در مواجهه با تست های غربالگری یا تشخیصی قبل از تولد دارند این است که آیا این اطلاعات به سلامت فرزند کمکی می کند و آیا این آزمایشات من را از سلامت کودکم مطمئن خواهد نمود؟ در بسیاری از بیماری های ژنتیکی، اطلاعات بیشتر تغییری مستقیم در روند پیشرفت بیماری نخواهد داشت.اگر چه فواید زیادی در تشخیص قبل از تولد بیماری های ژنتیکی وجود دارد و دانستن بیماری های ژنتیکی باعث می گردد که والدین از نظر روانی آماده پذیرش کودکی باشند که نیاز به مراقبت های پزشکی دارد. در مواردی که کودک نیاز به مراقبت های بعد از تولد دارد، اطلاع از این موضوع تاثیر مستقیم بر انتخاب محل انجام زایمان و تیم مراقبت نوزاد در روزهای اولیه دارد. اگر تشخیص بیماری کشنده ای باشد، توصیه انجام زایمان طبیعی و خودداری از سزارین صورت گرفته و تیم زایمانی با اطلاع از مشکلات جنین اقدام به عملکرد تشخیص درمانی اورژانسی در بدو تولد نخواهند نمود. به میزان فزاینده ای تشخیص ناهنجاری و اختلالات در حین بارداری منجر به افزایش بقا وکیفیت زندگی نوزاد خواهد گردید. در مورد بعضی بیماران، یک تشخیص دقیق قبل از تولد ممکن است به معنی ختم حاملگی باشد در حالی‌که در سایر موارد این تشخیص مستلزم تدارک مراقبت های پزشکی بعد از تولد می باشد. اگر تشخیصی دال بر بیماری خاص ژنتیکی گذاشته شود خانواده این فرصت را خواهند داشت که در مورد اهمیت آن بیماری و مراقبت های لازم بعد از تولد اطلاعات لازم را کسب نمایند. در مواردی که احتمال وجود بیماری ارثی ژنتیکی در خانواده وجود دارد علاوه بر وجود موثر بر سلامت نوزاد تشخیص زودرس قبل از تولد ناهنجاری در سلامت روحی خانواده، تصمیم جهت فرزند آوری های بعدی، روابط خانوادگی و برنامه ریزی اقتصادی خانواده تاثیر خواهد داشت. همراه با سیستم های آموزشی- حمایتی مناسب و ارائه دستورالعمل های مناسب فرد بیمار و خانواده قادر به انتخاب بهترین خط مشی جهت مواجهه با بیماری در هنگام تولد خواهد بود.

مثال های متعددی وجود دارد که در آن‌ها تشخیص قبل از تولد می تواند با ایجاد تداخل قبل از تولد موجب بهبود وضعیت بیماری گردد. از جمله این موارد می توان از درمان آنمی خود ایمنی، عفونت پاروویروس، جراحی ترمیمی نواقص ستون فقرات در دوران جنینی و یا بالن زدن فرد جهت درمان تنگی ائورت در دوران جنینی را نام برد. از جمله کاربرد های تشخیص های ژنتیکی قبل از تولد می توان به امکان انتقال خون به جنین و یا درمان با سلول های

بنیادی در تالاسمی آن ها و یا درمان آنزیمی در موارد شناخته شده اختلالات متابولیک اشاره کرد[۱۵].

متتخصصین بر این مسئله اتفاق نظر دارند که با توجه به روش های درمانی جدیدی که ابداع می گردد تشخیص های قبل از بارداری می تواند منجر به درمان های هدفمند قبل یا بلافاصله بعد از تولد نوزادگردد.پس غربالگری و تشخیص قبل از تولد علاوه بر ایجاد امکان ختم حاملگی در موارد اختلالات غیر قابل درمان، زمینه را جهت درمان موثر و به موقع موارد قابل درمان فراهم می نماید.

روش سنتی تشخیص آنیوپلوئیدی ها استفاده از karyotyping می باشد، که در آن یک نمونه از سلول ها ثابت و رنگ آمیزی شده اند تا الگوی باند سبک کروموزومی معمولی و تاریک ایجاد شود و یک تصویر از کروموزوم ها ، تجزیه و تحلیل می شود. این تکنیک متضمن صرف وقت نسبتاً طولانی می باشد. تکنیک های دیگر شامل Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)، PCR کمی از توالی کوتاه تکرارشونده، (Quantitative Fluorescence PCR)، تجزیه و تحلیل مقدار کمی PCR، طیف سنجی کمی مولکول های تک مولکولی و ترکیب CGH (Comparative Genomic Hybridization) است. این آزمایش ها همچنین می توانند قبل از تشخیص آنیوپلوئیدی در حاملگی، از طریق آمنیوسنتز یا نمونه گیری CVS انجام شود. در زنان باردار ۳۵ سال و بالاتر تشخیص پیش از تولد را پیشنهاد می کنند، زیرا احتمال افزایش آنیوپلوئید کروموزومی با افزایش سن مادر افزایش می یابد.

در تحقیق انجام شده امکان سنجی استفاده از کیت (AMP Identifier F STR) در غربالگری و یا تشخیص سریع تریزومی داون مورد بررسی قرار گرفت و نهایتا مشخص شد با حجم نمونه محدود بررسی شده، با حساسیت تقریبی ٪۸۰ می توان انتظار داشت این کیت قادر به تشخیص تریزومی ۲۱ باشد[۱۶].

متخصصین بر این مساله اتفاق نظر دارند که انجام فرایند تست های غربالگری- تشخیصی قبل یا ابتدای تولد علاوه بر تشخیص زودرس در بیماری شناخته شده، می تواند زمینه ای جهت انجام تحقیقات به وسیله تکنیک های High through put از جمله: WES (Whole Exome Sequencing) و NGS (Next Generation Sequencing) در جهت کشف و ریشه یابی بیماری های ناشناخته فراهم سازد که خود ممکن است در آینده به عنوان اولویت های تشخیصی- غربالگری در سیستم سلامت در نظر گرفته شود[۱۷].

منابع

١. Therman, E. and M. Susman, *Human chromosomes: structure, behavior, and effects*. 2012: Springer Science & Business Media.

٢. Miller, O.J. and E. Therman, *Human chromosomes*. 2011: Springer Science & Business Media.

٣. Nicolaidis, P. and M.B. Petersen, *Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies.* Human Reproduction, 1998. **13**(2): p. 313-319.

٤. Abruzzo, M.A. and T.J. Hassold, *Etiology of nondisjunction in humans.* Environmental and molecular mutagenesis, 1995. **25**(S2): p. 38-47.

٥. Hassold, T.J. and P.A. Jacobs, *Trisomy in man.* Annual review of genetics, 1984. **18**: p. 69.

٦. Lippe, B., *Turner syndrome.* Endocrinology and metabolism clinics of North America, 1991. **20**(1): p. 121-152.

٧. Smyth, C.M. and W.J. Bremner, *Klinefelter syndrome.* Archives of Internal Medicine, 1998. **158**(12): p. 1309-1314.

٨. Mainardi, P.C., *Cri du Chat syndrome.* Orphanet journal of rare diseases, 2006. **1**(1): p. 1-9.

٩. Vogel, F. and A.G. Motulsky, *Formal Genetics of Humans: Linkage Analysis Human Genetics. and Gene Clusters*, in 1997, Springer. p. 163-193.

١٠. Vogel, F. and A.G. Motulsky, *Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches*. 2013: Springer Science & Business Media.

١١. Penrose, L.S. and G.F. Smith, *Down's anomaly.* 1966.

١٢. Hsia, D.Y.-Y, et al., *Down's syndrome: A critical review of the biochemical and immunological data.* American Journal of Diseases of Children, 1971. **121**(2): p. 153-161.

١٣. Wang, T., et al., *A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR.* Genet Mol Res, 2011. **10**(1): p. 519-25.

١٤. Piasecka-Pazik, D. and Z. Szczerkowska, *Determination of polymorphic DNA sequences STR-PCR in decomposed human tissues.* Archiwum medycyny sadowej i kryminologii, 2003. **53**(3): p. 209-214.

١٥. Harper, J. and D. Wells, *Recent advances and future developments in PGD.* Prenatal diagnosis, 1999. **19**(13): p. 1193-1199.

١٦. Sheltzer, J.M. and A. Amon, *The aneuploidy paradox: costs and benefits of an incorrect karyotype.* Trends in Genetics, 2011. **27**(11): p. 446-453.

١٧. Cheung, S., et al., *Revisiting aneuploidy profile of surgically retrieved spermatozoa by whole exome sequencing molecular karyotype.* PloS one, 2019. **14**(1): p. e0210079.