Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics

بعض التغيرات الكروموسومية في حالات الاجهاضات المتكررة في الدم المحيطي لبعض الافراد العراقيين

اسماء عامر المختار

المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية

الخلاصة:

نظرا لمعاناة العديد من العراقيين في السنوات الاخيرة من مشكلة الاجهاض المتكرر والارتفاع الملحوظ في نسب هذه الاجهاضات تناولت العديد من البحوث هذه المشكلة من عدة اوجه وبحسب مسبباتها اما وراثية اوبكتيرية او طفيلية او فايروسية او هرمونية اوعمر الام او تشوه الحيامن عند الرجل .في هذا البحث تم تناول هذه المشكلة من الناحية الوراثية والبحث في مسبباتها .تم دراسة 120 حالة (60زوج) من الذين يعانون اجهاضات متكررة بعد ان تم تشخيصهم بشكل اولي لحاجتهم للفحص الوراثي حيث خضعوا لفحوصات المسببات الاخرى وكانت نتائجها سلبية.تم اخذ عينات من الدم المحيطي ثم اجري لها التحليل الكروموسومي بطريقة G-band بحسب طريقة(Yaseen,et al 1998).اوضحت النتائج ان اربعة حالات من اصل 120 تحمل تغيرات كروموسومية شملت حالة اقلاب في احد نسخ كروموسوم رقم 16 (inv16q),وحالة تبرقش شملت كروموسوم رقم18 [47XY,+18:90%46XY 10%].اضافة الى حالة تضاعف في كروموسوم رقم 1 (dup1q2).والحالة الاخيرة اعادة ترتيب شملت كرموسوم X معطية مشتقة(der X).تلك الحالات تميزت بتكرار حالات الاجهاض تراوحت مابين الاشهر الثلاث الاولى والاشهر الثلاث الثانية. ومن المحتمل ان تكون هذه المسببات المسوؤلة عن حالات الاجهاض لدى هؤلاء الاشخاص ,اما باقي الحالات لم يكن الخلل فيها واضح على المستوى الكروموسومي,اذ من الممكن ان تكون تغيراتها على المستوى الجيني.والذي يحتاج الى بحوث اخرى.

الكلمات الدلالية: التغيرات الكروموسومية، الاجهاضات المتكررة، الاقلاب، التضاعف، G-Banding .

المقدمة:

يعد الاجهاض من المشاكل المهمة التي تزايدت في العقود الاخيرة وان زيادة هذه النسبة في العراق رافقت عددا من التغيرات البيئية والسلوكية والغذائية . في السنوات الاخيرةسُجل ارتفاع في نسبة الازواج الذين يعانون الاجهاض المتكرر وصل3-5 % (1). وكتعريف للاجهاض هو حالة فقد تلقائي قبل أن يصل الجنين الى الحياة, وعندما يتعاقب فقد الحمل تلقائياً الى أكثر من ثلاث مرات تسمى بالاجهاض المتكرر(2) . تعود أسباب الاجهاض الى عوامل مختلفة منها عمر الام او تشوهات الحيامن عند الرجل اوأسباب هرمونية او أسباب وراثية او مناعة ذاتية او عوامل فايروسية 3)) . أضافة للعوامل الطفيلية (4) او البكتيرية (5) .

تعد المادة الوراثية العنصر الاهم من عناصر ديمومة الحياة لذا فسلامة هذه المادة والمحافظة عليها تضمن سلامة وبقاء الفرد لعمر اطول اذا تجنب المسببات الخارجية . في احد مراحل انقسام الخلاياوتكاثرها تاخذ المادة الوراثية شكل الكروموسومات لضمان انتقال المادة الوراثية من الخلية الام الى الخلية البنوية بشكل سليم ودقيق.وان تعرض المادة الوراثية الى الملوثات وبعض المسببات الاخرى بشكل كبير ومستمر يمكن ان يكون له تاثير سلبي اما ضيق (على مستوى جين) او واسع (على مستوى كروموسوم).بالمقابل يملك الفرد وسائل حماية تضمن سلامة المادة الوراثية مثل انظمة اصلاح 6 (DNA). يكون التاثير السلبي للملوثات على المادة الوراثية اما من خلال اسكات بعض الجينات او تطفيرها او احيانا الى حد تغيير الهيئة الكروموسومية الطبيعية.يكون تغير الهيئة الكروموسومية اما عدديا aneuploidy بشكل زيادة او فقد في عدد الكروموسومات .او وجود خلايا تحمل هيئات كروموسومية مختلفة ضمن نفس الشخص وتسمى تبرقشmosiaism او تغيرات تركيبية بشكل انتقالات متوازنة balanced translocation او انتقالات روبرتسونين robertsonian trans-location او حشر insertion او حذف deletion او تضاعف 7) dupli-cation).

تعود أكثر أسباب الاجهاضات المتكررة في الاشهر الثلاث الاولى الى أسباب وراثية وتغيرات في الهيئة الكروموسومية (7).

من هنا جاءت فكرة البحث كمحاولة لتحديد وتسجيل مدى الاختلالات الوراثية الحاصلة في الهيئة الكروموسومية لدى الاشخاص الذين يعانون من الاجهاض المتكرر, سيما وان هناك ارتفاع ملحوظ في نسبة هذه الحالات تزايدت مع زيادة التلوث البيئي في العراق والتي يُعتقد ان لها تأثير في ذلك اذ لابد من توثيق رسمي وعلمي لهذه الحالات لمعرفة مدى تاثر المادة الوراثية محلياً ومحاولة ايجاد الحلول لها بعد الوقوف على اسبابها.وقد تم تحويل عدد من هذه الحالات الى المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية والتي بلغت 120 حالة لعام 2010 فقط, تم استبعاد كونها من مسببات اخرى التي اشيرها انفاً وحصرت ضمن تشخيص الهيئة الكروموسومية.

المواد وطرائق العمل:

بدءًا تم استحصال الموافقات الرسمية من لجنة اخلاقيات البحث العلمي قبل البدء باخذ العينات بغرض اجراء البحث. حيث أُخذت عينات الدم المحيطي من الازواج الذين يعانون حالات الاجهاض المتكرر بمعدل 6-3 مرات على امتداد فترات 8-2 سنوات لكل زوج.كان الاشخاص باعمار مختلفة تراوحت مابين 18 -42 سنة للنساء و46-20 سنة للرجال .وكانت جميع هذه الحالات قد تم تحويلها بعد ان استوفت التحاليل الخاصة بالفحص الفايروسي والبكتيري والطفيلي اضافة

Corresponding Address:
Asmaa A. Almukhtar
General of Iraqi Center of Cancer & Medical Genetics Research/ University of Al-Mustansiriyah
Email: asmaalmukhtar.9@yahoo.com

الى التحاليل الهرمونية واُفترضت كاضطرابات وراثية من قبل الجهة المحولة .تمت خطوات العمل جميعها في مختبرات المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية وفق طريقة(Yaseen 1998,) (8).

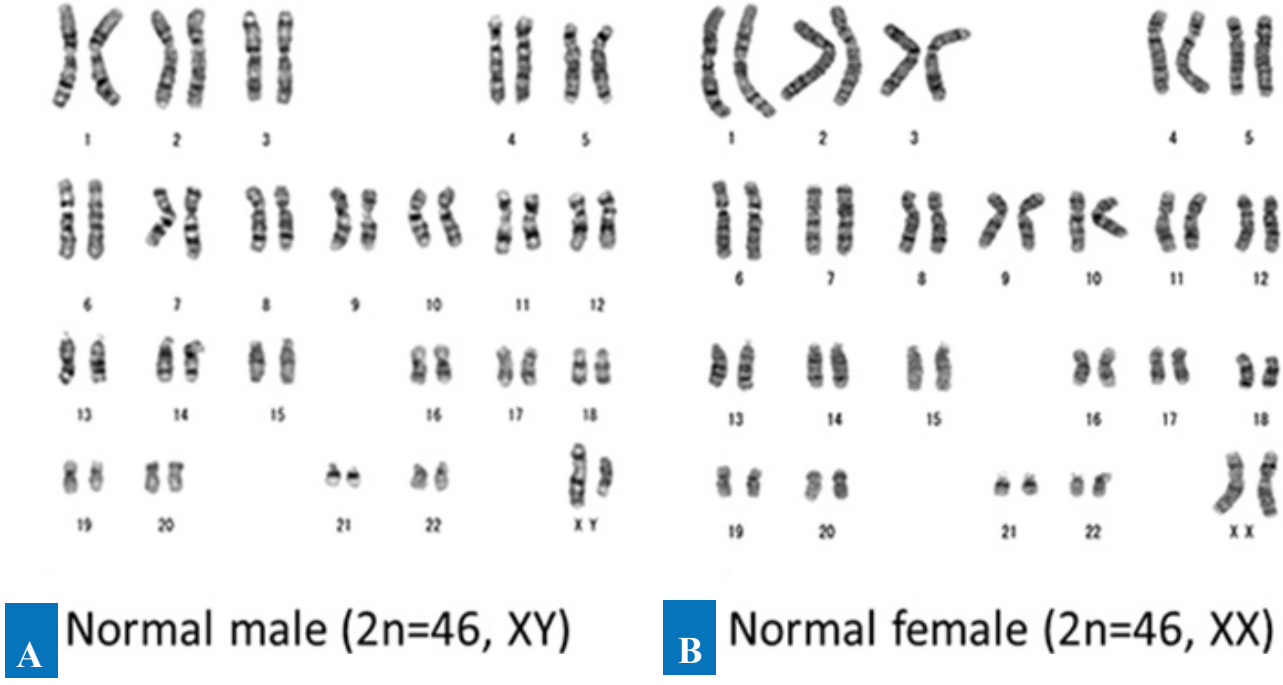
الزرع: تم اضافة عينة الدم المعاملة بالهيبارين الى وسط زرعي RPMI-1640 مع أضافة مادة pHA (phytoheamaglutenine) المحفزة لأنقسام الخلايا وحضنها بدرجة 37مئوي لمدة 71 ساعة .

حصاد الخلايا : تم حصاد الخلايا المنماة بعد مرور 71 ساعة، وذلك بأضافة الكولسيمايد وبمقدار 0.1 مليليتر لكل وعاء زرعي يحوي 5 مليلتر من الوسط الزرعي (أي بتركيز 12 مايكروغرام لكل مليلتر) ، وحضنت بدرجة 37 م° ،ونبذت مركزيا بسرعة 1500 دورة/ دقيقة، وأكملت طريقة تحضير الكروموسومات من الخلايا بأضافة محلول واطئ التوتر KCL الى راسب الخلايا وتركت في حمام مائي بدرجة م 37,ثم نبذت مركزيا بنفس السرعة السابقة ,بعدها تمت أضافة المثبت المتكون من حامض الخليك الثلجي والميثانول الى الراسب مع النبذ المركزي المتكرر لحين الحصول على عالق الخلايا الحاوي على الكروموسومات .

تحضير الشرائح الزجاجية: قُطرعالق الخلايا على شريحة زجاجية نظيفة وباردة وصبغ بصبغة كمزا بعد معاملتها بأنزيم التربسين وغسلها بمحلول دارئ الفوسفات PBS وتركت لتجف. تم فحص20-30 خلية في الطور الاستوائي لكل عينة وتم تشخيص الكروموسومات اعتماداً على نظام التسمية العالمي للكروموسومات9) ISCN1995).

النتائج:

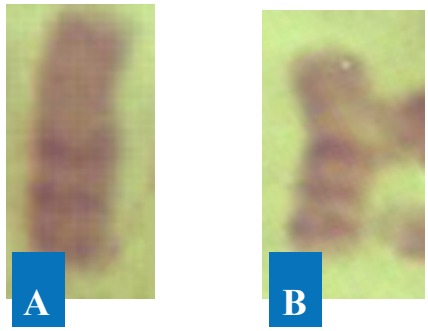
اظهرت النتائج 4 حالات من التغيرات الكروموسومية من اصل 120 حالة وتباينت التغايرات ما بين انحراف عن العدد الطبيعي aneuploidy وبين تغيرات تركيبية شملت اقلاب inversion و مضاعفة duplication واعادة ترتيب rearrangement .



الشكل رقم (1):
A- الهيئة الكروموسومية الطبيعية للذكر معاملة بتقنية تصبيغ G-banding ومعد من خلية بقوة تكبير 1000X.
B- الهيئة الكروموسومية الطبيعية للانثى معاملة بتقنية تصبيغ G-banding ومعد من خلية بقوة تكبير 1000X.

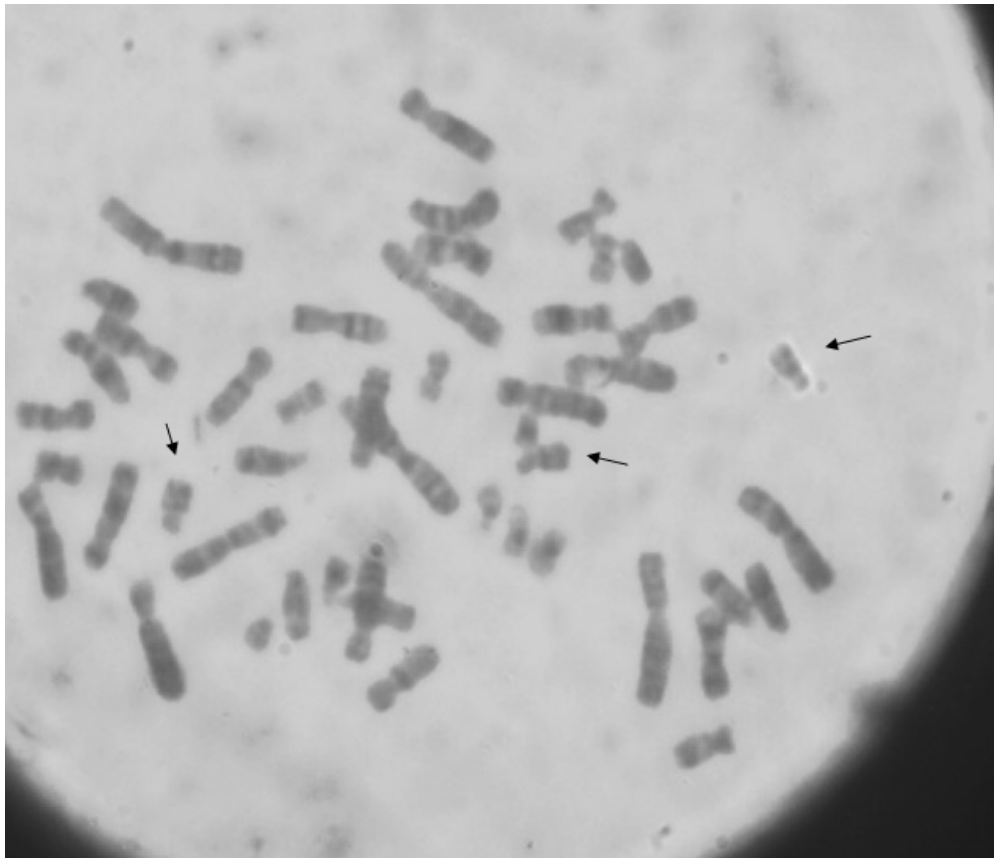
الحالة الاولى:

أول الاختلالات كانت في الرجل البالغ من العمر 41 والتي تكرر لديهم حالات الاجهاض 4 مرات والتي كانت في الاشهر الثلاث الاولى 1st triminster .حيث ظهرت لديه حالة اقـلاب في احد نسخ كروموسوم رقم 16 (شكل2) .[46XY-16,+inv16]



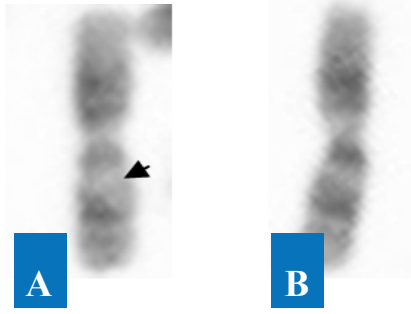
الشكل رقم 2 : الحالة رقم 1
A - كروموسوم رقم 16 يعاني من حالة اقلاب16q
B - كروموسوم رقم 16 بالحالة الطبيعية قوة التكبير X1000 والتصبيغ باستخدام G – banding

الحالة الثانية:
اظهرت الحالة الثانية تبرقشاً في خلايا الجسم لدى الذكر البالغ من العمر 29 عاماً حيث كانت خلايا جسمية تحوي90% خلايا طبيعة و10% خلايا ادوارد47XY,+18 ,10% 46,XY % 90] [Edward والتي ادت الى 3 اجهاضات متكررة.الشكل رقم (3).



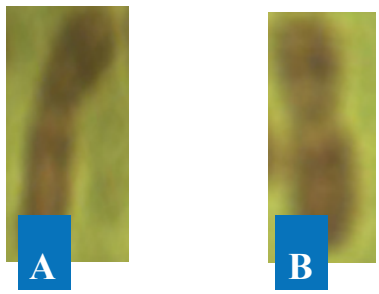
الشكل رقم (3):
الذي يبين خلية حاوية ثلاث نسخ من كروموسوم رقم 18 مصبغة بتقنية G-banding وبقوة تكبير 1000X. الهيئة الكروموسومية للخلية [47XY,+18]

الحالة الثالثة:
والتي كانت في الانثى البالغة من العمر 33 عاماً والتي عانت 6 اجهاضات متكررة تبايت ما بين الشهر الثالث للحمل والشهر الرابع وقد تبين انها تعاني حالة مضاعفة duplication في احد نسخ الكروموسوم رقم (1) الهيئة الكروموسومية تكون:[46XX,-1,+dup1q2] .



الشكل رقم (3) :
A- كروموسوم رقم 1 dup1q2
B- الكروموسوم رقم 1 طبيعي
قوة التكبير 1000X تقنية التصبيغ G-banding

الحالة الرابعة:
ظهرت عند الانثى البالغة 24 عاماً والتي عانت 4أجهاضات متكررة على مدى 4 سنوات تبين ان خلالاً في احد نسخ كروموسوم X قد عانت اعادة ترتيب [rearrangemant [derX والتي يمثلها الشكل رقم (4).



الشكل (4):
A - كروموسوم derivative X
B- كروموسوم X طبيعي
التصبيغ بتقنية G-band وقوة التكبير 1000X

رقم الحالة	العمر		عددالاجهاضات	فترة الاجهاض المتكرر		
	♀	♂		الاشهر الثلاثة الاولى	الاشهر الثلاثة الثانية	صيغة الهيئة الكروموسومية
1	29	41	4	الشهر الثاني	---------	(inv16(16q23+,16-,XY,46* XX,46*
2	23	29	3	الشهر الثالث	---------	90% 46,XY.;18+,XY,10%47* *46,XX
3	33	40	6	الشهر الثالث	الشهر الرابع	.XY,46* (2q1-3)(1) dup ,XX,46*
4	24	29	4	الشهر الثاني	الشهر الرابع	XY,46* derX+,X-,XX,46*

المناقشة:

سُجلت اربعة حالات متباينة من التغيرات الكروموسومية لدى 120حالة التي تم تحويلها للمركز والتي خضعت للتحليل الكروموسومي .اظهرت هذه الحالات اولاً حالة اقلاب في احد نسخ الكروموسوم رقم 16 (16q) لدى الزوج كتغير واحد فقط. نتيجة لهذا الخلل عانت الزوجة اربعة حالات اجهاض متكرر في الشهر الثاني من الحمل (اي ضمن الاشهر الثلاث الاولى (triminister 1st). حيث كانت جميع خلايا الرجل المفحوصة تحمل الهيئة الكروموسومية (46XY,+inv16). ان المنطقة المشمولة بالاقلاب تحوي منطقة 16q23 وهي احدى المناطق الهشة القابلة للكسر fragile site والتي يمكن ان تكون اسهمت في حصول هذا الاقلاب من خلال الكسر ثم اعادة الالتحام الخاطئ (10) حيث يمكن ان يتسبب هذا الخلل فى اعادة ترتيب الجينات الواقعة على الكروموسوم والذي يؤدي الى فقد عملها بالشكل الصحيح, علماً ان كروموسوم 16 له تاثيرات مسجلة في التسبب بالاجهاضات المتكررة والخصوبة عموماً وبشكل خاص تاثيرها في تطور الاجنة (12,11,10).ان الخلل الحاصل باعادة الترتيب يشمل المنطقة المحيطة بالسنترومير وهذا قد يؤثر على السلوك الانقسامي من جهة وتكوين التصالبات chaismata configuration بالشكل المفتوحopen configuration اي ان الاقلاب في الكروموسوم يؤدي الى جعل الكروموسوم يفقد الارتصاف الصحيح misalignment اثناء الانقسام الاختزالي والذي يؤدي الى رفع نسبة الانعزال الغير طبيعي للكروموسوم وهذا يزيد من احتمال تكون اجنة تحمل اعداد غير متوازنة من الكروموسومات والذي يتسبب باجهاضات للاجنة قبل الولادة (13و14).

اعطت الحالة الثانية تغيرات عددية للكروموسومات , اذ كانت خلايا الرجل البالغ 29 عاماً تحوي خطين من الخلايا.90% منهاخلايا طبيعية تحمل الهيئة الكروموسومية الطبيعية للرجل XY,46 اما 10%الباقية فقد كانت تحوي نسخة اضافية من كروموسوم رقم 18. ان وجود نسخة اضافية من كروموسوم 18 في بعض خلايا الجسم وليس جميعها تسمى تبرقش18 Mosaic trisomy . حيث كانت الهيئة الكروموسومية (XY /10%47,XY,+18,90%46)) .توجدحالة واحدة من trisomy 18 او المعروفة بـ(Edwards' syndrome) في كل 7500 ولادة .95% من هذه الحلات يجهضون تلقائياً والقليل منهم يعيش بعد الولادة او يصل الى بعض اشهر ويرافق الحالة اعتلالات قلبية وتشوهات في الكلى وعدة تشوهات اخرى(15).

ان التبرقش الحاصل لدى الزوج يفسر بقائه على قيد الحياة لعمر 29 عاماً اذ ان اغلب خلاياجسمه تحمل هيئة كروموسومية طبيعة و10% فقط التي تحمل الخلل لكن بالمقابل ادى هذا الخلل الى تكرار حالات الاجهاض لدى الزوجة ثلاث مرات خلال عامين وفي الشهر الثالث من الحمل, لقد سُجلت في دراسات سابقة دور Trisomy في حدوث الاجهاضات وبالاخص عند تكوين الحيامن اذ ينتج عنها diploid spermatozoa اثناء الانقسام الاختزالي والذي يؤدي الى انعزال غير متوازن والذي يؤدي بدوره عند التخصيب الى تكوين جنين يحوي هيئة مختلة الصيغة الكروموسومية (aneuploidy (14,13,11,10.

عانت الحالة الثالثة من ست مرات من الاجهاضات المتكررة متوالية تباينت ما بين الشهر الثالث و الرابع والتي تم تشخيص الخلل فيها بمنطقة تضاعف في الذراع السفلي من كروموسوم رقم 1 [3-2q1](1)(dup)].ان حالة التضاعف تؤدي في بعض الاحيان الى زيادة تعبير الجين over expression ولما كانت هذا المنطقة من الكروموسوم رقم 1قد عانت تضاعف فالاحتمال ان تكون الجينات الواقعة عليها قامت بزيادة التعبير للجينات.

علماً ان هذه المنطقة تحمل جينات مثل جينTMP3الواقع في منطقة1q21.2 الذي سُجل تاثيره في تكوين العضلات الهيكلية وبعض الاختلالات الخلقية لتناسب الالياف(16).وكذلك جين TNNT2الواقع في 1q32والذي سجلت له تاثيرات في اعتلال تضخم عضلة القلبfamilial hypertrophic cardiomyopathy 17)). وجين REN الواقع في 1q32والذي له تاثير في عمل الكلى وتكوين النبيبات الكلوية(18).

اما الحالة الرابعة التي كانت لامراءة في الرابعة والعشرين من عمرها والتي مرت باربعة اجهاضات متكررة على مدى اربعة سنوات .كانت الاجهاضات تحدث عندها مابين الشهر الثاني والثالث.تبين من التحليل الكروموسومي ان لديها خللاً في احد نسخ الكروموسوم X بحيث اُعيد ترتيب هذه النسخة rearrang-ment في الذراع الطويل Xq تحديدا والتي اخذت شكل مشتقة الكروموسوم X der X)).وهذايبدو واضح من خلال فرق الطول بين الكروموسوم الطبيعي والمشتق .ان اعادة الترتيب التركيبي لكروموسوم X بشكل خاص لها تاثير على تدني عمل المبايض دون المستوى الامثل من ناحيةوتتسبب في الموت في المراحل الجنينة اذ ان 9% من حالات التي تعاني خلل في احد نسخ كروموسوم X لاتستطيع ان تصل بالتفلج لمرحلة(19) blastocyst,كما ان الجينات التي تقع على كروموسوم X لها تاثيرات مسجلة على عمل وتكوين المبايض (21,20,19).

اما باقي الحالات المدروسة فلم يُسجل بها تغيرات على المستوى الكروموسومي اذ من المحتمل ان تكون الاختلالات على المستوى الجيني .هذا ان اخذنا بنظر الاعتبار انها مستبعدة من كون مسبباتها فايروسية او بكتيرية او هرمونية والمرجح انها وراثية.

واخيراً نستنتج من هذه الدراسة مايلي ,لما كانت الكروموسومات تحمل الجينات فمن المحتمل ان التغيرات الكروموسومية التي لاحظناها قد سببت تغيرات في الية عمل الجينات الواقعة عليها سيما وان هذه المناطق الكروموسومية تحمل عددا من الجينات المهمة في التخليق الحيوي ومعظمها مهم في اكتمال تطور الجنين مما تسبب في عدم اكتمالها وبالتالي حدوث اجهاضات.

المصادر:

1. Albayati, M.;Abid , A. A.;Abd-El-Kareem, H.F.(2012). Antithyroid Autoantibody in Unexplained Recurrent Abortion. Iraqi postgraduate Medical Journal. Volume: 11 Pages: 308-314.
2. Stirrat, GM. (1990). Recurrent miscarriage . Lancet 10, 336 Pages:1191-2
3. Danielsson, K. (2009). Recurrent Miscarriage Causes. Health's Disease and Condition content is reviewed by the Medical Review Board.
4. Nigro, G.; Mazzocco, M.; Mattia, E.; et al.(2011). Role of the infections in recurrent spontaneous abortion. Informa health care. Volume, 24 Pages: 983-989.
5. Hassani, H.H.; Khalaf, Z.SH.; Samarie E.J.(2011). AZF Microdeletions in Human Semen Infected with Bacteria. Online J Health Allied Scs.Volume:10, p:8.
6. Thompson&Thompson.(2007).Geneticsinmedicine.7thed. Elsevier,USA.
7. Philipp, T.; Philipp, K.; Reiner, A.(1999) Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. Human Reproduction. Volume 18, p: 1724-1732.
8. Yaseen,N.Y.;Humadi,A.A.;Tawfiq,M.S. and Estivan , A.G.(1998).Cytogenetic studies on patients with chronic Myelocytic leukemia. Med. J. Tikrit Univ.,4:5-9.
9. ISCN (1995).An international system for human cytogenetic nomenclature. Mitelman,F.& Karger, B. (ed).
10. Schlegelberger, B.; Gripp, K.; Werner Grote, W. (1989). Common fragile sites in couples with recurrent spontaneous abortions. American journal of medical genetics.

volume: 32 p:45-51.
11. Rubio, C.; Simon , C.; Vidal, F.(2003). Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. Human reproduction.vol:18 p: 182-188.
12. Bick RL; Madden J; Heller KB; Toofanian . A. (1998) . Medscape Women's Health Impact and Implications of Chromosomal Abnormalities. Volume 3:2.
13. Farcas.S.; Valerica Belengeanu .V.; Popa. C.(2007). Role of Chromosomal Translocations in Recurrent Spontaneous Abortion. Timisoara medical journal. volume: 57p 2-3.
14. Egozcue,S.g;Blanco,J.;Vendrell,J.M.(2000).Human male infertility: chromosomal anomalies ,meiotic disorders, abnormal spermazoa and recurrent abortion. Human reproduction.volume :6 p:93-105.
15. Farcas.S.; Valerica Belengeanu.V.;Stoian,M.(2007). Consedrations regarding the implication of polymorphic variants and chromosomal inversions in recurrent miscarriage. jurnalul pediattului volume: x p:39-40.
16. Clarke NF, Kolski H, Dye DE, et al .(2008). Mutations in TPM3 are common cause of congenital fiber type disproportion. Ann Neuro;63: 329-37.
17. Bashyam MD, Savithri GR ,Kumar MS, et al.(2003).Molecular genetic of familial hyper cardiomyopathy(FHC).J Hum Genet; 48:55-64.Review.
18. Gulber, MC. And Antiganac, C.(2010). Renin angiotensin system in kidney development renal tubular dysgenesis .Kidney Int;77:400-6.
19. Via,F.;Cocquet,J;Christin-Maitre,S.;Veita,R.;Fellous,M. (2002).The X chromosome and ovarian function. Cytogenet Genome Res.99:218-223.
20. Rubio,C.; Simón,C.; . Vidal, F.et al(2003). Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. Human Reprodction .Volume:18 p:182-188.
21. Kuo PL, Guo HR.(2004). Mechanism of recurrent spontaneous abortions in women with mosaicism of X-chromosome aneuploidies. Fertil Steril. 82:1594-601.

Some chromosomal abnormalities in cases of recurrent abortions in the peripheral blood of some Iraqis

Asamaa A. Almukhtar

General of Iraqi Center of Cancer & Medical Genetics Research/University of Al-Mustansiriyah

Abstract:

Due to the suffering of many Iraqis in recent years ,the problem of repeated abortions has markedly increased. The abortion has been studied in several researches according to bactarial, parasitic, Viro, hormonal causes , age of the mother, deformation sperm in men and genetic causes.

This study included 120 cases (60 pairs) of those who suffer miscarriages repeatedly, after they were diagnosed primarily for their need to examine genetic where they underwent tests other causes and results were negative. Samples were taken from peripheral blood and then conducted its analysis chromosomal G-band, according to the Yaseen,1998.

The results of chromosomal aberations ranged between inversion in chromosome16, duplication in chromosome 1, rearrangement in X chromosome and mosaism with trisomy 18.The duration of abortion were between 1st and 2nd minster. The rest cases maybe caused by gene aberations.