

کشف زودرس ناهنجاریهای کروموزومهای جنسی از طریق مطالعه یاخته‌های بند ناف  
گزارش نتیجه ۵۹۲ مورد آزمایش

دکتر محمد ابراهیم نیلی

دکتر محمد حسن کریمی نژاد

دکتر حسین پارسا

دکتر محمود امامی کوزئیپده

X وجود داشته باشد بهمان ترتیب، تعداد جسم بار بیشتر خواهد بود بطوریکه کروماتین جنسی مساوی است با تعداد کروموزوم X منهای یک یعنی Sex Chromation nX-1 برای بررسی کروماتین جنسی می‌توان هر یک از سلولهای بدن را مورد آزمایش قرار داد که معمولاً "بعلت راحتی تهیه نمونه از سلولهای پوششی مخاط دهان Buccal Smear یا ریشه مو استفاده می‌شود.

مطالعه کروماتین جنسی تا سال ۱۹۶۸ که کاسپرسن Casperson و همکاران خاصیت فلورسنت شدید بازوهای بلند کروموزوم را نشان دادند تنها وسیله بررسی کروموزومهای جنسی بود (۸ - ۶) این گروه محققین سوئدی و پیرسن Pearson (۹) در سال ۱۹۷۰ نشان دادند چنانچه سلولهای مرد را با ترکیبات کیناکرین رنگ نموده و، با نور فلورسنت مطالعه کنیم در داخل هسته سلولهای مرد در حالت انترفاز نقطه براق و درخشان کوچکی وجود دارد که معادل همان قسمتهای فلورسنت، بازوهای بلند کروموزوم Y در مرحله میتوز می‌باشد.

کشف زودرس ناهنجاری کروموزومهای جنسی از طریق مطالعه یاخته‌های بند ناف پس از کشف کروماتین جنسی وسیله دکتر بار و شاگردش برترام (۱) استفاده از آن برای تعیین تعداد کروموزوم X موجود در سلول و اختلالات آن مورد استعمال زیاد پیدا نمود منجمله برای تعیین تعداد X در دو جنسی‌ها، تعیین جنس جنین در داخل رحم، تعیین جنس مقتول در امور جنائی و همچنین تعیین جنس زن و مرد در ورزشهای المپیک بکار می‌رود (۲).

آقایان Ohne ، Kaplan ، Kinoshita (۳) در سال ۱۹۵۹ نشان دادند (۳) که کروماتین جنسی یکی از کروموزومهای X موجود در سلول می‌باشد که بحالت متراکم در کنار سلول قرار می‌گیرد.

بر اساس فرضیه خانم لیون (۵ - ۴) یکی از کروموزومهای X موجود در سلول زن طبیعی از نظر ژنتیک غیرفعال می‌باشد. این X غیرفعال ممکن است کروموزوم X پدری یا مادری باشد و این حالت در اوائل دوران جنینی اتفاق می‌افتد و در تمام طول زندگی باقی می‌ماند. هرگاه در سلولی بیش از دو کروموزوم

این مطالعه با استفاده از کمک مالی برنامه تحقیقاتی و پژوهشی دانشگاه تهران انجام یافته است.  
بیمارستان جهان‌شاه صالح دانشکده پزشکی رازی - دانشگاه تهران

خیلی کلفت مخصوصاً اگر حاوی خون باشد برای آزمایش مناسب نیست. و بلا درنگ لام‌ها را در محلول الکل ۹۶٪ می‌اندازیم از هر نوزاد لااقل دو لام بطریقه فوق‌تهیه می‌شود. مشخصات زانو و نوزاد و همچنین نشانی کامل بیمار در دو نسخه تهیه می‌شود در روی یکی از نسخه‌ها جنس نوزاد نیز تعیین می‌گردد.

نمونه‌های تهیه شده همراه با ورقه مشخصات نوزاد که فاقد جنس جنین می‌باشد به آزمایشگاه سیتوزنتیک بخش آسیب‌شناسی بیمارستان جهان‌شاه صالح ارسال می‌شود. در آزمایشگاه یکی از لام‌ها برای تعیین جنس جسم X با تیونین بطریقه Ludwing و Klinger (۱۶) رنگ نموده و از نظر کروماتین جنسی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

با این رنگ‌آمیزی که فقط DNA را رنگ می‌نماید چنانچه صحیح انجام گیرد سیتوپلاسم رنگ نمی‌گیرد و هسته به رنگ بنفش در می‌آید جسم بار بصورت برآمدگی مثلثی یا هلالی شکل در کنار هسته و چسبیده بروی پرده هسته دیده می‌شود گاهی کروماتین جنسی در وسط هسته قرار دارد و کاملاً قابل تمیز است ولی بمنظور جلوگیری از هرگونه اشتباه فقط آن عده از کروماتین جنسی که برروری پرده هسته قرار دارد و کلیه خواص کروماتین جنسی را داشته، باشد بعنوان جسم بار منظور می‌شود.

چنانچه نسبت کروماتین جنسی (جسم بار) کمتر از ده درصد باشد. لام دیگر را برای بررسی جسم Y با محلول نیم درصد الکل هیدروکلرید کنیاکری (نیم گرم پودر هیدروکلرید کنیاکری در ۱۰۰ سانتیمتر مکعب الکل متیلیک خالص بمدت ۱۲ دقیقه قرار می‌دهیم سپس لام را از داخل محلول درآورده و در داخل ظرف آب مقطر دو الی سه بار تکان می‌دهیم بعد لامل را در آب مقطر خیس کرده و بروی لام می‌گذاریم. آب اضافی سطح لام را با کاغذ خشک‌کن بدون فشار می‌گیریم. لام رنگ شده را حداقل مدت نیم ساعت در داخل محفظه یخ‌زن یخچال Freezer قرار می‌دهیم. تجربه نشان داد که سرد نمودن لام در، داخل یخ‌زن رابطه مستقیم در کیفیت کار و بروز جسم Y دارد و بعلاوه عملاً بدین نتیجه رسیدیم که

پیرسن و همکاران (۱۹۷۰) با استفاده از خاصیت فلورسنت کروموزوم Y توانستند، جسم Y را در سلولهای پوششی مخاط دهان (بوکال اسمیر) نشان دهند و به عنوان وسیله‌ای برای تعیین جنسیت بکار برند. (۹)  
گرین شر و همکاران (۱۰) Greensher نیز با تهیه نمونه از بندناف نوزاد - Touch Preparation ناهنجاریهای کروموزوم Y را مورد مطالعه قرار دادند. عده‌ای با استفاده از این خاصیت فلورسنت کروموزوم Y و تکنیک‌های دیگر درصد جداکردن اسپرمانتوزوئیدهای حاوی کروموزوم X و Y برآمده و امید دارند با انجام تلقیح مصنوعی از نمونه منی حاوی مقدار زیاد اسپرمانتوزوئید Y و یا X بتوان بدلخواه نوزاد پسر یا دختر داشت. (۱۱ - ۱۲) استفاده از خاصیت فلورسنت جسم Y و تعیین Y بادی در سلولها موارد استعمال متعدد منجمله برای تعیین جنس جنین قبل از تولد مورد توجه قرار گرفت (۱۳ - ۱۴) با توجه به اینکه اختلالات کروموزومهای جنسی X و Y زیادتر از سایر کروموزوم‌ها و معمولاً در بین هر ۲۵۰۰ نفر نوزاد یکی مبتلا بسندرم ترنر و در هر پانصد نفر نوزاد پسر یکی مبتلا به بیماری کلینفلتر می‌باشد و همچنین انواع اختلالات کروموزومهای جنسی دیگر از قبیل سندرم X ۳ به نسبت ۱/۲ در هزار نفر دیده می‌شود (۱۵) با اطلاع بر اینکه تشخیص زودرس و، درمان بموقع می‌تواند از بروز عوارض این بیماری جلوگیری کند.

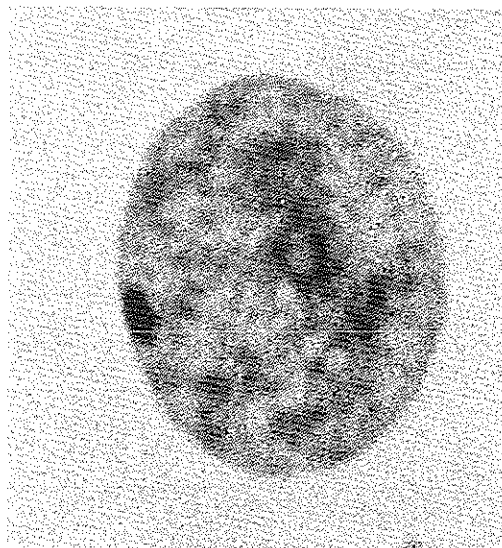
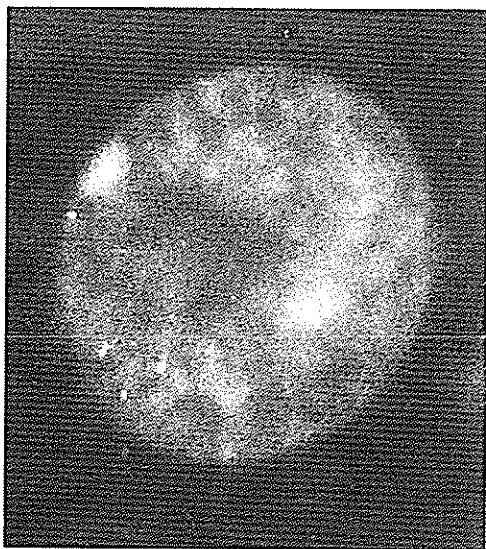
بر آن شدیم که نوزادان را از جسم X و Y مورد بررسی قرار دهیم و تا کنون ۵۹۲ نوزاد را از، بخش زایمان بیمارستان جهان‌شاه صالح و بیماران خصوصی تحت مطالعه قرار دادیم.

#### طریقه کار

۱ - تهیه نمونه بعد از تولد نوزاد و قطع بند ناف، تمیز کردن نوزاد و فراغت کامل از کارهای زایمانی بندناف را مجدداً در قسمتی که چسبیده بجفت می‌باشد قطع می‌کنیم؛ سطح مقطع را به آرامی در چهار نقطه بروی لام معمولی آزمایشگاهی مالش می‌دهیم، بطوری که لایه نازکی از سلولهای بند ناف بروی لام بچسبد، نمونه کم سلول و همچنین نمونه

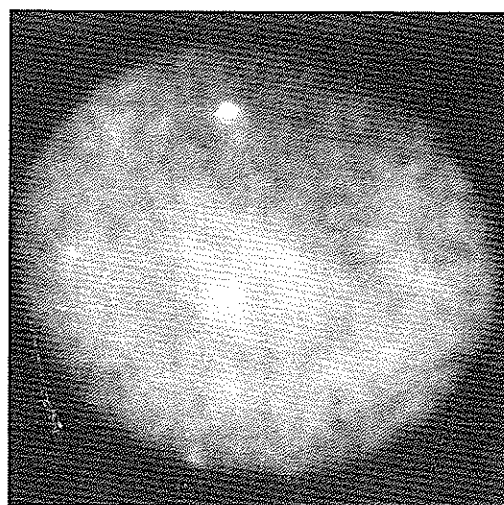
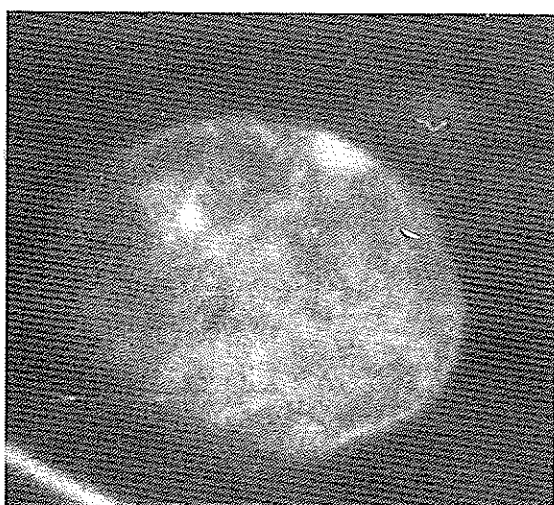
با اینتریکه قسمت‌های انتهائی بازوهای بلند کروموزوم بصورت نقطه شفاف و درخشان کوچکی در داخل هسته به چشم می‌خورد.  
گاهی اوقات جسم ایکس سالم یا کلیه خواص خود در کنار پرده هسته قابل رویت است.

هرگاه لام در معرض نور فلورسنت برای چند دقیقه و یا اینکه در هوای آزاد بمدت نسبتاً طولانی (بیش از نیمساعت) قرار گیرد بتدریج کمرنگ می‌شود و قابل، تشخیص نیست و چنانچه دوباره در داخل یخچال گذارده شود و مجدداً مورد آزمایش قرار گیرد رنگ فلورسنت سلولها و جسم Y مشخص می‌شود.



شکل شماره ۲ - جسم ایکس با نور فلورسنت (رنگ آمیزی هیدروکلرید کرین)

شکل شماره ۱ - جسم بار (کروماتین جنسی)، رنگ آمیزی تیونین آزمایشگاه سیتوزنتیک بیمارستان جهان‌شاه صالح



شکل شماره ۴ - جسم ایکس Y و ایگرگ Y هر دو با هم در داخل یک سلول دیده می‌شوند بیمار مبتلا به بیماری کلین فلتز.

شکل شماره ۳ - جسم ایگرگ Y شفاف تر و کوچکتر از جسم ایکس آزمایشگاه سیتوزنتیک بیمارستان جهان‌شاه صالح

امر توجه کامل داریم و معمولاً در زنان طبیعی بین ۲۰ - ۵۰٪ جسم بار در سلولها می بینیم و هرگاه کمتر از ۱۵٪ باشد بفکر موزائیسیم کروموزومی از قبیل XX/XX یا XX/OX هستیم که تا به حال هم همیشه صحیح قضاوت کرده ایم ولی در این مطالعه وجود جسم بار کمتر از ده درصد ۱۰٪ را به حساب اشتباه تکنیکی Art Fact گذارده و منفی تلقی نموده ایم، جدول زیر نسبت درصد جسم بار مثبت را در دخترها نشان می دهد.

نتیجه: تعداد ۶۷۳ مورد نمونه به آزمایشگاه فرستاده شده است که از این تعداد ۸۱ مورد آن بعلت نقص در تهیه لام قابل بررسی نبوده است. مابقی ۵۹۲ نمونه مورد بررسی قرار گرفته است که نتیجه آن در جدول زیر دیده می شود. با اینکه اعتقاد ما بر این است که در یک مرد طبیعی جسم بار باید صد در صد منفی باشد. و در آزمایشگاهی که برای تعیین جنسیت و پی بردن باختلالات کروموزومی از پوشش مخاطی دهان Buccal Smear انجام می دهیم بدین

دقت کار	جنس نوزاد		جنس تعیین شده نوزاد
	پسر	دختر	
۱۰۰٪	-	۳۲۹	دختر ۳۲۹
۱۰۰٪	۲۶۳	-	پسر ۲۶۳

$$۳۲۹ + ۲۶۳ = ۵۹۲$$

نسبت درصد جسم بار مثبت در دخترها (۱۸۲ مورد)

۴۱-۵۰	۳۱-۴۰	۲۱-۳۰	۱۱-۲۰	جسم بار مثبت درصد سلول
۲	۱۹	۵۶	۱۰۵	تعداد
۱٪	۱۰٪	۳۰٪	۵۷٪	نسبت درصد

و در جدول ۳ نسبت جسم بار مثبت در پسران نشان داده می‌شود.

جدول ۳ نسبت وفور جسم بار در ۲۶۳ پسر

جسم بار درصد سلول	منفی	۱-۵	۶-۹
تعداد	۱۵۱	۸۸	۲۴
نسبت درصد	%۵۷	%۳۳	%۹

در مواردی که جسم بار کاملاً منفی و یا کمتر از ۱۰% بوده است در تعدادی از آنها رنگ آمیزی فلورسنت انجام شده است که نتیجه آن در زیر دیده می‌شود:

نسبت جسم ۷ در پسران

وجود جسم درصد سلول	کمتر از ده	۱۰-۲۰	۲۰-۳۰	۳۱-۴۰	بیشتر از ۴۰	تعیین نشده
تعداد	۱	۲۵	۱۹	۸	۱۲	۱۹۸
نسبت درصد	%۱/۵	%۳۸	%۲۹	%۱۲	%۱۸	-

به آن نشانی کاملی که از زاعو در دست می‌باشد بسراغ او رفته و نوزاد را وسیله مددکار اجتماعی برای آزمایشات تکمیلی و معاینه کامل فیزیکی مخصوصاً "دستگاه تناسلی، تهیه بوکال اسمیر به بیمارستان می‌آوریم چنانچه در معاینه بالینی و آزمایش بوکال اسمیر اشکالی دیده‌شود از نوزاد کشت کروموزومی بعمل آمده و ناهنجاری او دقیقاً" تعیین خواهد شد.

اعتقاد ما بر این است با این آزمایش ساده براحتی می‌توان ناهنجاریهای کروموزومهای جنسی را در بدو تولد تشخیص داد و نوزاد را هرچه زودتر تحت درمان لازم قرار داد و مخصوصاً "مؤکدا" توصیه می‌کنیم که این آزمایشات در مواردی که دستگاه تناسلی خارجی ناهنجاری و اختلالاتی Ambiguity نشان می‌دهد و یا قیافه نوزاد کوچکترین علائم غیرطبیعی نشان می‌دهد این آزمایش انجام گیرد تا در صورت لازم نوزاد تحت مطالعه کافی قرار گیرد.

در مواردیکه نسبت درصد کروماتین جنسی بارنگ تیونین و تعیین اجسام X و Y با نورفلورسنت بعمل آمده است، وجود کروماتین جنسی در دخترها بین ۱۵ الی ۵۰ درصد و در پسرها بین صفر تا ۵ درصد و نسبت متوسط آن بترتیب ۲۰/۵ و ۱/۸ درصد بوده است با نور فلورسنت در دخترها جسم X بین صفر تا ۵۰ درصد متغییر بوده و نسبت متوسط آن ۲۵/۳ درصد و در، مردها ۶۳٪ بوده است و فور جسم Y در پسرها بین ده تا پنجاه درصد و نسبت متوسط آن ۳۲/۶ درصد و در دخترها وجود فقط براق شبیه جسم Y بین صفر تا نه درصد و نسبت متوسط آن ۱/۹ درصد بوده است. چنانچه ملاحظه می‌شود در ۵۹۲ مورد آزمایش بررسی کروموزومهای X و Y با جنس نوزاد تطبیق نموده و ناهنجاری نشان نداده است ولی چنانچه اختلافی در نمای کروموزومی دیده می‌شد

### Reference

1. Barr. K. L., Some notes on the discovery of the sex chromatin and its clinical application Am. J. Obstet. Gynecol. 122: 293, 1972.
2. Barr, M. L. and Bertram, E. G.: A morphological distinction between neurones of the male and female and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated, nucleoprotein synthesis. Nature 163: 676, 1949.
3. Caspersson T, Farber, S. Foley. G. E., et al: Cell Res. 49: 219, 1968.
4. Caspersson, T., et al Fluorescent staining of heteropycnotic chromosom regions in human interphase nuclei. Exp. Cell Res. 61: 472, 1970.
5. Caspersson. T. Zech L. and Lindsten: Identification of human chromosomes by Fluorescence Techniques Triangle 11: 73, 1972.
6. Ericsson R. J. Personal communication (MHK).
7. Ericsson R. J. Langeving C. N. and Nishinom, Isolation of fraction rich in Y, Spermatozoa from human ejaculates. Nature:
8. Greensher, et al: Screening of newborn infants for abnormalities of the Y, chromosome. J. Pediatrics 70: 305, 1971.

9. Klinger H. P, and Ludwig K. S., a universal stain for the sex chromatic body, stain technolo. 32: 235-244, 1957.
10. Khudr G. and Benirschke K., Fluorescence of the Y chromosome, A rapid test to determine fetal sex. Am. J. Obstet, Gynecol. 110: 1091, 1971.
11. Lyon, M. F. Sex chromatic and gene action in the mammalian X chromosome Am. J. Human Genet. 14: 135, 1962
12. Lyon, M. F. In advances in Teratology; Vol. 1 (D. H. M. Woollam) ed PP. 25-54 Logos Press London, 1966.
13. Maclean N. et al: sex chromosome abnormalities in newborn babies lancet, 1: 286, 1964.
14. Ohno, S: Kaplan W. D. and Kinoshita, R. Exp. Cell Res. 18: 415, 1959.
15. Pearson P. L., Bobrow M. and Vosa, C. G.: Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei, Nature 226: 78, 1970.
16. Valenti, C. et al: Prenatal sex determination. Am. J. Obstet. Gynecol. 112: 890, 1972.