بسم الله الرحمن الرحیم

روش‌های آزمایشگاهی سیتوژنتیک پزشکی

تألیف و نگارش: دکتر ملیحه خالقیان - دکتر سیروس عظیمی

ناشر: اطمینان

نوبت چاپ: اول - ۹۴

صفحه آرا: گیتی طهرانی

چاپ: ؟؟؟

شمارگان: ؟؟؟؟ نسخه

بها: ؟؟؟؟ ریال

شابک: ؟-؟؟-؟؟؟؟-؟؟؟-؟؟؟

کلیه حقوق مادی و معنوی اثر متعلق به ناشر است و هرگونه تکثیر، بازنویسی، خلاصه برداری و یا برداشت به هر نحوی بدون اجازه کتبی از ناشر مجاز نبوده و منجر به پیگرد قانونی می باشد.

روش‌های آزمایشگاهی سیتوژنتیک پزشکی

تألیف و نگارش:

دکتر ملیحه خالقیان
دکتر سیروس عظیمی

عضو هیأت علمی بخش ژنتیک پزشکی استاد و رئیس بخش ژنتیک پزشکی
انستیتو کانسر ایران مرکز تحقیقات سرطان و انستیتو کانسر ایران
دانشگاه علوم پزشکی تهران دانشگاه علوم پزشکی تهران

تقدیم به

روان پاک پسرم نیما عظیمی

که با سرطان خون از دست رفت

پیشگفتار

به نام خدا

تاریخچه سیر تحولات سیتوژنتیک پزشکی را می‌توان، از نظرپیشرفت در روش‌های مختلف آزمایشگاهی، به سه دوره تقسیم نمود: اوّل، دوره قبل از کشف روش نوار بندی (۱۹۷۰-۱۸۷۹). دوّم، دوره نواربندی (۱۹۸۶-۱۹۷۰)، وسّوم، دوره سیتوژنتیک مولکولی (از ۱۹۸۶ تاکنون). چهل سال قبل از شروع دوره اوّل، یعنی در سال ۱۸۳۹، Schleiden (گیاه شناس آلمانی) و Schwann (فیزیولوژیست آلمانی) کشف نمودند، که تمام حیوانات و گیاهان عالی، از سلول تشکیل شده‌اند. درسال ۱۸۴۰، Nageli (گیاه شناس سویسی) نیز اوّلین فردی بوده، که وجود اندامک هائی نخ مانند را، درهسته سلول‌های گیاهی ذکر نمود. اصول توارث توسط Gregor Mendel (راهب وژنتیسیست اطریشی) در سال ۱۸۶۵ کشف، وتحت عنوان قوانین مندل منتشر گردید، ولی برای سی و پنج سال کسی به آن توجهی نکرد. از آن تاریخ، سال‌ها پژوهش هائی توسط افرادی مثل Strasburger، گیاه شناس آلمانی (۱۸۸۰)، Flemming، بیولوژیست آلمانی (۱۸۸۲) و Hertwig، جانورشناس آلمانی (۱۸۸۴) درمورد ساختمان هسته سلول وتقسیم آن انجام گردید. اصطلاح کروموزوم، در سال ۱۸۸۸، توسط Heinrich Waldeyer (آناتومیست آلمانی) ابداع گردید، بعداز کار برد روش جدیدی از رنگ آمیزی، که باعث مشاهده بهترآنها شده بود. در سال ۱۹۰۰ یعنی شانزده سال بعد از فوت مندل، قوانین مندل توسط سه محقق به نامهای de Vries (گیاه شناس هلندی)، Correns (گیاه شناس آلمانی) و Tschermak (آگرونومیست اطریشی) به طور مستقل از یکدیگرتائید گردید. در سال ۱۹۰۲، Boveri (بیولوژیست آلمانی) و Sutton(جانورشناس آمریکایی) تئوری کروموزومی توارث (Boveri-Sutton theory) را پیشنهاد نمودند که پایه واساس انتقال مواد ژنتیکی، توسط کروموزوم‌ها می‌باشد. درسال ۱۹۰۶، William Bateson (ژنتیسیست انگلیسی) اصطلاح ژنتیک، ودر سال ۱۹۰۹، Wilhelm Johannsen (گیاه شناس دانمارکی) اصطلاح‌های ژن، ژنوتیپ و فنوتیپ را ابداع نمودند. درسال ۱۹۱۰، Morgan Thomas (بیولوژیست آمریکائی) با تحقیقات وسیع اش برروی جهش‌ها دردروزوفیلاملانوگاستر، مجدداً ثابت نمود که ژن‌ها، مبنای انتقال صفات بوده، وتوسط کروموزوم‌ها منتقل می‌شوند، وبرای همین کشف، درسال ۱۹۳۳، جایزه نوبل در پزشکی وفیزیولوژی رادریافت نمود. برای ده‌ها سال، پیشرفت‌های چندانی در رشته سیتوژنتیک انسانی انجام نشد. تا در دهه ۱۹۵۰، روش‌های بهتری برای بررسی کروموزوم‌ها توسط Makino & Nishimura (۱۹۵۲)، Hsu & Pomerat (۱۹۵۳)، و Ford & Hamer-ton (۱۹۵۶) پیشنهاد گردید. درسال ۱۹۵۳، Watson (بیوشیمیست آمریکائی) و Crick (بیولوژیست انگلیسی) مارپیچ دوتائی مولکول DNA را شناسائی نمودند. تاسال ۱۹۵۶، اطلاعات زیست شناسان، راجع به سیتوژنتیک انسانی مختصر بود، وعقیده بر این بود که تعداد کروموزوم‌های انسان ۴۸ عدد می‌باشد. درسال ۱۹۵۶، در سوئد، Tjio (ژنتیسیست چینی) و Levan (ژنتیسیست سوئدی) روش موثری را برای بررسی کروموزوم‌ها ابداع، وکشف نمودند که تعداد کروموزوم‌های انسان طبیعی ۴۶ عدد می‌باشد. در سال ۱۹۵۶ استفاده از مایع آمنیوتیک برای تشخیص جنسیت، از طریق وجود یا عدم وجود جسم بار، وهمچنین تشخیص احتمالی بیماری‌های ژنتیکی، برای اولین بار توسط Fuchs & Riis در دانمارک پیشنهاد گردید. ودر همین سال Edwards در انگلیس، پیشنهاد

بررسی مایع آمنیوتیک، جهت پیشگیری از بیماری‌های ژنتیکی، که مربوط به جنسیت می‌باشند، را نمود. بالاخره د رسال ۱۹۶۶، مناسب بودن کشت سلول‌های جنینی، برای کاریوتایپ توسط Steele & Breg پیشنهاد، واوّلین کاریوتایپ، باعمل آمنیوسنتز گزارش گردید. ازسال ۱۹۵۹، به سرعت ناهنجاری‌های متعدد کروموزومی کشف گردید. در سال ۱۹۵۹، چهار ناهنجاری کروموزومی شامل: تریزومی ۲۱ (که قبلاً علائم بالینی آن توسط پزشک انگلیسی بنام John Down درسال ۱۸۶۶ توصیف شده بود) هم زمان توسط Lejeune وهمکاران در فرانسه، و Jacobs وهمکاران در انگلیس; مونوزومی X (که قبلاً علائم بالینی آن توسط آندوکرینولوژیست آمریکایی بنام Henry Turner درسال ۱۹۳۸ توصیف شده بود) توسط Ford وهمکاران در انگلیس؛ نشانگان کلاین فلتر (که قبلاً علائم بالینی آن توسط پزشک آمریکائی بنام Harry Klinefelter درسال ۱۹۴۲ توصیف شده بود) توسط Jacobs & Strong در انگلیس; و بالاخره تریزومی X توسط Jacobs در انگلیس کشف گردیدند. درسال ۱۹۶۰، سه ناهنجاری کروموزومی شامل: تریزومی ۱۳ توسط Patau وهمکاران در آمریکا; تریزومی ۱۸ توسط Edwards وهمکاران در انگلیس; و همچنین فرم نشانگان داون در اثرجا بجائی کروموزومی، توسط Penrose وهمکاران درانگلیس کشف گردیدند. در سال ۱۹۶۸، Mohr (پزشک و ژنتیسیست نروژی) اولین فردی بود که بیوپسی کوریون راجهت تشخیص پیش از تولد پیشنهاد وانجام داد، ولی عمل اش با خونریزی، عفونت وعدم رشد سلول‌ها همراه بود. ولی در حقیقت اوّلین بیوپسی کوریون موفقیت آمیز در سال ۱۹۷۵ در چین انجام گردید. تا قبل از سال ۱۹۷۰ رنگ آمیزی یکدست، تنها روش رنگ آمیزی کروموزوم‌ها بود، تااینکه در سال ۱۹۷۰ رنگ آمیزی نواری (نوار بندی Q) توسط Caspersson وهمکاران در سوئد کشف گردید. بعداز آن به مرور در دهه ۱۹۷۰ چندین رنگ آمیزی نواری دیگرهمچون G، R،C وهمچنین تعدادی از ناهنجاری‌های کروموزومی جدید کشف گردید. با گذشت زمان وپیشرفت علم ژنتیک، و پررنگ تر شدن اهمیت وکاربرد علم ژنتیک در انکولوژی، آزمایش‌های جدیدی نیز در رشته‌های سیتوژنتیک پزشکی و ژنتیک سرطان کشف گردید. از جمله در سال ۱۹۶۹، Gall & Pardue و همچنین John وهمکاران، برای اوّلین بار، به طور همزمان In situ hybridization (ISH) را به کار بردند. در سال ۱۹۸۱، Fluorescence in situ hybridization (FISH) توسط Langer وهمکاران پیشنهاد، ودر سال ۱۹۸۶ توسط Pinkel وهمکاران تکمیل گردید. در سال ۱۹۸۳، توسط Yunis وهمکاران High resolution banding، و درسال ۱۹۹۲، توسط Kallioniemi وهمکاران Comparative genomic hybridization (CGH) کشف گردید. وبالاخره در اواخردهه ۱۹۹۰،array CGH، دراوایل دهه ۲۰۰۰MLPA, ودراواخر دهه ۲۰۰۰، CISH کشف گردید. اکنون نیز همچنان پژوهشگران ودانشمندان در پی کشف روش و تکنیک‌های جدیدی می‌باشند، تا از این راه بتوانند خدمات بیشتر وشایسته تری به علم ومبتلایان به بیماری‌های ژنتیکی وسرطان ها ارائه نمایند. متاسفانه، در ایران، در دوره تحصیل رشته‌های کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی و دکتری تخصّصی ژنتیک پزشکی، بجز در چند سال اخیر، آموزش عملی سیتوژنتیک پزشکی گنجانده نشده بود و اکثریت فارغ التحصیلان متخصّص ژنتیک پزشکی با مبانی عملی آزمایشات سیتوژنتیک کاملاً بیگانه بوده‌اند. جالب اینکه اغلب این افراد، آزمایشگاه تخصّصی ژنتیک پزشکی، تأسیس و بکار مشغول شده، و دائماً به دنبال دو سه نفر کارشناس قدیمی سیتوژنتیک هستند، تا آزمایشات آن‌ها را راه اندازی نمایند!! از این رو، آگاهی به آزمایشات مختلف سیتوژنتیک، تبدیل به یک رمز و راز شده و کسانی که آزمایشاتی را (اکثراً با تجارب خودآموزی) آموخته‌اند، تجربیات خود را از دیگران پنهان کرده و ترس فراوان، از زیاد شدن دست، در بازار وانفسای تجارت آزمایشات ژنتیک دارند. بنابراین مهّمترین قصد از نگارش این کتاب این بوده تا شاید کمکی به حل این مشکل و معضل بزرگ کشورگردیده و همگان به این آزمایشات سّری دست یابند و هر فردی که سابقه

کار آزمایشگاهی داشته باشد، بتواند با خواندن این کتاب، که کلیّه آزمایشات را به زبان ساده و روان شرح داده است، با مختصر تمرینات خود آموزی، آزمایشات مختلف سیتو ژنتیک پزشکی را انجام دهد. این کتاب که یک کتاب مرجع می‌باشد مشتمل بر نه فصل بوده و برای متخصّصین سیتوژنتیک و ژنتیک پزشکی، پاتولوژیست‌ها، متخصّصین علوم آزمایشگاهی، وهمچنین سایر متخصّصین و دانشجویان رشته‌های علوم پزشکی، وهمچنین کلیه دانشجویان و یا فارغ التحصیلان مقاطع کارشناسی، کارشناسی ارشد و دکتری کلیّه رشته‌های علوم آزمایشگاهی، سلولی- مولکولی، بیولوژی و سایر رشته‌های علوم پایه پزشکی وعلوم زیستی مفید وقابل استفاده خواهد بود. تجربه نشان داده است که اکثریت کتاب‌های چاپ شده (اعم از تألیف یا ترجمه)، درکلیه علوم، منجمله ژنتیک پزشکی، حاوی اشتباهات چاپی فراوان (به خصوص در کلمات انگلیسی) می‌باشند. بنا براین کتاب حاضر را اینجانب، شخصاً و با دقت فراوان، چندین بارتصحیح، و تلاش نموده‌ام تا در سراسر کتاب، اشتباهی رخ ندهد وامید وارم که در انجام این مهّم موفق شده باشم. چون خانواده اینجانب متجاوز از پانزده سال است که ساکن کانادا می‌باشند، بنابراین، وظیفه دارم از همسر فداکاروارجمندم خانم هما لطفی و پسرعزیزم آقای سینا عظیمی، تشکر و قدردانی ویژه ای بکنم که سال‌های متمادی دوری از اینجانب را، بدون هیچ اعتراض و گله، تحّمل کرده‌اند، تا من در ایران بتوانم به خدمات آموزشی، پژوهشی و درمانی خود در دانشگاه علوم پزشکی تهران ادامه دهم که نمونه آن انتشار کتاب حاضر می‌باشد که دهمین کتاب اینجانب است. در پایان از خانم دکتر ملیحه خالقیان که در تآلیف و نگارش این کتاب از هیچ کمکی دریغ ننمودند، صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایم. همچنین ازآقای محمد اطمینان (انتشارات اطمینان) که در چاپ این کتاب مساعدت فراوان نموده‌اند تشکر فراوان دارم.

دکتر سیروس عظیمی استاد و رئیس بخش ژنتیک پزشکی مرکز تحقیقات سرطان و انستیتو کانسر ایران
دانشگاه علوم پزشکی تهران بهمن ۱۳۹۳ (هشتمین سالگرد درگذشت نیما عظیمی)

مقدمه

به نام خدا

کتاب حاضر مجموعه ای از روش‌های مختلف کاربردی در سیتوژنتیک پزشکی بوده و در حقیقت نتیجه ۲۵ سال تجربه کاری در زمینه سیتوژنتیک پزشکی در ایران می‌باشد. در این کتاب سعی گردیده که مطالب برگرفته از منابع علمی جدید و معتبر دنیا و روش‌هایی که به طور روزمره در آزمایشگاه‌های ژنتیک در کشورهای پیشرفته استفاده می‌شوند، آورده شود. بنابراین امیدوارم که این کتاب بتواند برای دانشجویان و افرادی که علاقه مند هستند سیتوژنتیک را به صورت عملی برای پروژه‌های تحقیقاتی ویا خدماتی بیاموزندوهمچنین برای همکارانی که قصد راه اندازی آزمایشات سیتوژنتیک در آزمایشگاه‌های دولتی ویا خصوصی‌شان دارند، جالب ومفید باشد. خواندن این کتاب به کلیه متخصصین رشته ژنتیک (با گرایش‌های مختلف، بخصوص پزشکی وانسانی)، پاتولوژی، علوم آزمایشگاهی وهمچنین دانشجویان مقاطع کارشناسی ارشد ودکتری رشته‌های ژنتیک، سلولی مولکولی، علوم آزمایشگاهی، بیولوژی و سایر رشته‌های علوم زیستی و همچنین دانشجویان رشته‌های پزشکی و پیراپزشکی توصیه می‌شود. در ضمن از خوانندگان ارجمند این کتاب، که انتقادات سازنده خود را، به اینجانب تذکر دهند بسیار سپاسگزارم، و در چاپ‌های بعدی سعی در رفع آن‌ها خواهد شد. در خاتمه لازم است از زحمات جناب آقای دکتر سیروس عظیمی، استاد و رئیس محترم بخش ژنتیک پزشکی، انستیتو کانسر ایران، که در نگارش این کتاب با اینجانب همکاری صمیمانه داشته‌اند، قدردانی وکمال تشکر را بنمایم.

دکتر ملیحه خالقیان
عضو هیئت علمی و ناظمه فنی بخش ژنتیک پزشکی
انستیتو کانسر دانشگاه علوم پزشکی تهران

فهرست مطالب

فصل اول
اساس و روش‌های کشت بافت و تهیه کروموزوم
۱,۱- اساس کشت بافت
۱,۲- شرایط لازم واساسی برای رشد سلول‌ها در محیط کشت
۱,۲,۱- محیط کشت ومواد افزودنی
۱,۲,۲- ظروف کشت
۱,۲,۲,۱- دستورالعمل شستشوی ظروف
۱,۲,۳- محیط کار مناسب
۱,۲,٤- نوع بافتی که کشت داده می‌شود

فصل دوم
مراحل آماده سازی و کشت نمونه خون محیطی
۲,۱- پذیرش و آماده کردن نمونه
۲,۲- نوع و نحوه نگهداری نمونه‌های بیمار
۲,۲,۱- اساس کشت خون محیطی که با PHA تحریک شده
۲,۳ - دستورالعمل کشت خون محیطی
۲,۳,۱- آماده کردن محیط کشت
۲,۳,۲- روش کشت خون

فصل سوم
مراحل مختلف تهیه گستره‌های کروموزومی از نمونه‌های خون محیطی
۳,۱- برداشت (هاروست)
۳,۲- تهیه لام (لام گیری)
۳,۳- رفع مشکلات (troubleshooting)

فصل چهارم
انواع روش‌های رنگ آمیزی
٤,۱- رنگ آمیزی ساده (solid staining)
٤,۲- رنگ آمیزی بندینگ G
٤,۲,۱- پروتکل تریپسین

٤,٢,٢- پروتکل لیشمن
٤,٢,٣- پروتکل پانکراتین
٤,٣- رنگ آمیزی بندینگ C
٤,٤- رنگ آمیزی بندینگ Q
٤,٥- رنگ آمیزی بندینگ R
١. ٤,٥- رنگ آمیزی بندینگ R (روش ١)
٢. ٤,٥- رنگ آمیزی بندینگ R (روش ٢)
٣. ٤,٥- رنگ آمیزی بندینگ R (روش ٣)
٤,٦- رنگ آمیزی بندینگ NOR
٦,١. ٤- رنگ آمیزی بندینگ NOR (روش ١)
٦,٢. ٤- رنگ آمیزی بندینگ NOR (روش ٢)
٤,٧- رنگ آمیزی بندینگ با قدرت تفکیک بالا (HR)
٤,٧,١- هاروست به طریق HR
٤,٧,٢ - سینکرونه کردن کشت‌ها (همزمان کردن کشت‌ها)

فصل پنجم
سیتوژنتیک بدخیمی‌ها
٥,١ - مقدمه
٥,٢ – اطلاعات کلی راجع به نوع ومقدار نمونه، روش نمونه گیری، نحوه حمل نمونه
٥,٣ - روش رنگ آمیزی وشمارش سلولی با استفاده از لام نئوبار
٥,٤ - انواع محیط‌های مورداستفاده برای کشت مغز استخوان
٥,٥ - روش‌های کشت مغزاستخوان
٥,٦- روش کشت با قدرت تفکیک بالا (HR)
٥,٧ - کشت خون محیطی در بدخیمی‌ها
٥,٨- دستورالعمل کلی برای آنالیزکروموزومی نمونه‌های بدخیم

فصل ششم
سیتوژنتیک کم خونی فانکونی.
٦,١- روش‌های سیتوژنتیک برای تشخیص کم خونی فانکونی
٦,٢- پروتکل‌های فانکونی در آزمایشگاه
٦,٢,١- پروتکل ١
٦,٢,٢- پروتکل ٢
٦,٣ - نحوه بررسی کروموزومی ونحوه بررسی شکست‌ها
٦,٣,١- انواع شکست‌های کروموزومی در کم خونی فانکونی
٦,٣,٢- نحوه بررسی شکست‌ها

٦,٤- فرمول شمارش و روش گزارش فانکونی

فصل هفتم
روش‌های سیتوژنتیک برای تشخیص فراجایل X
۷,۱- روش‌های سیتوژنتیک برای تشخیص فراجایل X
۷,۲- پروتکل‌های فراجایل X
۷,۲,۱- پروتکل ۱
۷,۲,۲- پروتکل ۲
۷,۲,۳- پروتکل ۳ (پروتکل پیشنهادی برای شناسایی فراجایل X)
۷,۳- پروتکل برای شناسایی فراجایل X در سلول‌های کشت شده از مایع آمنیوتیک، فیبروبلاست‌ها و chorionic villi

فصل هشتم
کشت مایع آمنیوتیک.
۸,۱- جمع آوری وانتقال نمونه به آزمایشگاه
۸,۲- ترکیبات موجود در نمونه مایع آمنیوتیک
۸,۲,۱- ترکیبات سلولی
۸,۲,۳- شرایط نمونه گیری
۸,۳- کشت سلولی مایع آمنیوتیک
A- کشت‌های coverslip
B- کشت‌های با لوله یا فلاسک
۸,۳,۱- پایداری کشت
۸,۳,۱,۱- کشت‌های coverslip
۸,۳,۱,۲- کشت‌های درلوله و فلاسک
۸,۳,۱,۳- ساب کالچر با تریپسینه کردن
A- کشت‌های coverslip
۸,۳,۲- پروتکل‌های هاروست
۸,۳,۲,۱ هاروست در جا in situ
۸,۳,۲,۲ - پروتکل ۳ - کشت‌های coverslip هاروست در جا
A - هاروستینگ
B - تهیه گسترش کروموزومی
۸,۳,۲,۳ هاروست سوسپانسیون
۸,۳,۲,٤ روش پیپت
۸,۳,۳- آماده کردن کروموزوم
۸,۳,٤ - پروتکل کاربردی کشت AF

جدول ٥-١ تهیه محیط کشت مایع آمنیوتیک وکوریونیک ویلی

فصل نهم
کشت نمونه کوریونیک ویلی (CVS)

۹,۱- جمع آوری وانتقال نمونه
۹,۲- شرایط واندازه نمونه
۹,۲,۱- تست‌های اضافی
۹,۲,۲- محتویات سلولی
۹,۳- کشت CVS
۹,۳,۱- تمیز کردن نمونه
۹,۳,۲- کشت کوتاه مدت
۹,۳,۳- کشت دراز مدت
۹,۳,٤- ماندگاری کشت، هاروست وتهیه کروموزوم
۹,٤- پروتکل کشت بافت‌های جامد مثل C.V.S و P.O.C
A- ساب کالچر
B- هاروست

منابع.

پیوست‌ها.
محلول‌ها
ایدیوگرام کروموزوم‌ها همراه با رنگ آمیزی های G-banding و R-banding