Archive of SID

مجله علمی پزشکی، دوره ۷، شماره۲، تابستان ۱۳۸۷

تشخیص مولکولی پیش از تولد سیستیک فیبروزیس در یک خانواده از جنوب غربی ایران با یک فرزند مبتلا

حمید گله داری*[۱]، علی محمد فروغمند**، خدامراد زندیان***، محمد پدرام***
محمد رضا جعفری****، بهناز اندشتی+، احمد سلطانی++

چکیده

هدف: سیستیک فیبروزیس یک بیماری وراثتی است که به صورت نهفته اتوزومی به ارث می رسد و چندین ارگان را تحت تاثیر قرار می دهد. علت اصلی این بیماری نقص در کانال انتقال کلر از غشاء سلولی می باشد. .هدف از این مطالعه تشخیص مولکولی قبل از تولد جنینی می باشد که دارای والدین ناقل و برادر مبتلا می باشد.

روش بررسی: تهیه نمونه ها از مایع آمنیون و خون با استفاده از روش های روتین استخراج ژنوم و بررسی برای یافتن یکی از رایج ترین جهش ها در ژن CF با استفاده از روشRFLP [۱] انجام گرفت.

یافته ها: نتایج این بررسی نشان می دهد که والدین برای جهش ΔF508 هتروزیگوت می باشند. بچه مبتلا به بیماری برای جهش مشابه هموزیگوت بوده و جنین هتروزیگوت تشخیص داده شد. جنین مورد بررسی برای سیستیک فیبروزیس ناقل بوده ولی خطر این بیماری جنین را تهدید نمی کند.

نتیجه گیری: با توجه به اینکه والدین هیچگونه رابطه خویشاوندی با هم ندارند و از طرفی هر دو والد ناقل یک جهش یکسان می باشند، احتمالا این جهش خاص فراوانی نسبتا بالایی در استان خوزستان داشته باشد. بدین خاطر پیشنهاد می‌گردد که در یک طرح جامع استانی فراوانی جهش ها در ژن سیستیک فیبروزیس مورد بررسی قرار گیرد.

م ع پ ۱۳۸۷ ؛ ۷ (۲) : ۲۴۰ - ۲۳۴

کلید واژه گان: سیستیک فیبروزیس، تشخیص قبل از تولد، آمنیوسنتزیس

مقدمه

سیستیک فیبروزیس یک بیماری ژنتیکی است که چندین ارگان را تحت تاثیر قرار می دهد. علت اصلی این بیماری نقص در کانال انتقال کلر از غشاء سلولی می باشد که باعث غلظت شدید ترشحات می گردد. کم آبی و غلظت شدید موکوس منجر به چسبندگی آن در ریه ها، و پلاک برای موکوسی در لوزالمعده و افزایش مقدار قابل توجهی کلراید در عرق می باشد(۱ و ۲). در این افراد هوش و قوای ذهنی طبیعی می باشند. بیماری سیستیک فیبروزیس به طریق آتوزومی نهفته به ارث می رسد. ژن مسئول این بیماری یک تنظیم کننده هدایت غشائی کلراید می‌باشد(۱)

۱ -Restriction Fragment Length Polymorphism

*دانشیار بخش ژنتیک، دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز
**استادیاربخش ژنتیک، دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز
***استاد مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
**** استادیار مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
+کارشناس آزمایشگاه دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز
++دانشیار بخش رادیولوژی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
۱- نویسنده مسؤل : E mail: galehdari@scu.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۴/۳ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۶/۶/۲۸ اعلام قبولی: ۱۳۸۵/۹/۲۲

www.SID.ir

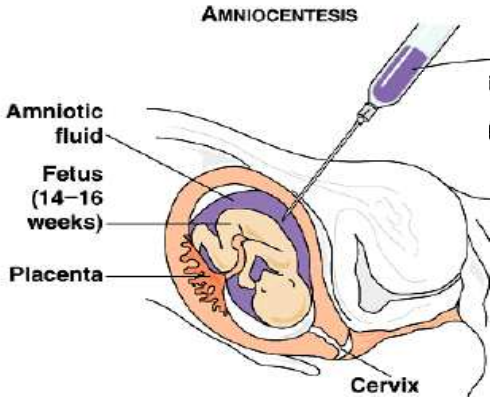
Archive of SID

که در سال ۱۹۸۹ میلادی بر روی کروموزوم ۷ تعیین نقشه گردید(۳). این بیماری دارای بیان و دوره متنوعی می باشد. متوسط سن در تشخیص این بیماری ۸-۶ ماهگی می باشد. حدود ۲/۳ افراد مبتلا تا قبل از یک سالگی تشخیص داده می شوند (۴). بعضی افراد دارای بیماری شدید ریوی و یا روده ای- معدی[1] می باشند در صورتی که بقیه ممکن است بیماری را به صورت خفیف در دوره نوجوانی و جوانی نشان دهند (۴). دامنه اثر این بیماری از مرگ زودرس در اثر ناراحتی های ریوی تا بیماری خفیف غیر تیپیک در دهه‌های دوم و سوم زندگی و در مواردی این افراد به صورت نادر دارای طول زندگی نرمال می باشند (۵). اگر چه متوسط طول زندگی این افراد از ۱۸ سال در ۱۹۷٦ به ۳۰ سال در ۱۹۹۵ رسید، اما در حقیقت مقدار کمی بر متوسط طول زندگی آنها بین سال های ۱۹۹۰ و ۱۹۹۵ افزوده شده است. مدیریت اختلالات و ضایعات ریوی و پانکراسی وضعیت قدرت حیات بیماران را بهبود داده است. البته علیرغم این پیشرفت ها در درمان سیستیک فیبروزیس دارو و درمان قطعی برای آن وجود ندارد (٦). شدت بیماری در نای کلید چکونگی و طول عمر (طول زندگی) می باشد. نود در صد افرادی که دارای سیستیک فیبروزیس می باشند از اختلالات ریوی می میرند. آزمایش‌های تشخیص اختلالات ریوی می‌توانند در تشخیص و پیش بینی مرگ مؤثر باشند (۷). پیش بینی (تشخیص اولیه) ضعیف به ناراحتی های ریوی قبل از سن یک سالگی، سوءتغذیه، و نادیده گرفتن شرائط بر می‌گردد. پیش بینی بهتر از علائم متوسط در تشخیص کارآئی پانکراسی و تابلو غیر تیپیک بیماری می تواند صورت گیرد (۸). در گزارشات منتشره تصور می شود که تشخیص اولیه و درمان ممکن است به بهبود رشد نوجوانان بیانجامد. به هر حال اطلاعات مربوط به درمان اولیه محدود به تست های عملکرد ریوی و نهایتا مراقبت های پزشکی می باشد (۹). ژن CF روی بازوی بلند کروموزوم ۷ قرار گرفته و دارای ۲۵۰۰۰۰ جفت باز است. در این لوکوس ژن کد کننده برای پروتئین CFTR دارای۲۷ اگزون می باشد که توسط اینترون‌ها از هم جدا شده اند. رونوشت[2] حاصل از این ژن دارای ۶۱۰۰ باز است که به پروتئینی با۱۴۸۰ اسید آمینه ترجمه می شود (۱۰). همراه با شناسائی نقش ژن CF در این بیماری مشخص گردید که یک حذف سه بازی (CTT) در آن منجر به نقص در تولید این ژن می گردد. این جهش به صورت ΔF508 نشان داده می شود. این حذف باعث می گردد تا یک اسید آمینه فنیل آلانین در موقعیت ۵۰۸ در پروتئین CFTR حذف گردد (۱۱). حدود ۷۰ در صد همه جهش های ژن *CF* در سفید پوستان امریکا و کانادا را این جهش تشکیل می دهد. به هر حال مطالعات بین المللی تنوع توزیع منطقه ای (جغرافیائی) و قومی توزیع این جهش را نشان می دهد. به طور کلی جهش ΔF508 در جمعیت های اروپای شمالی شیوع بیشتر و در اروپای جنوبی فراوانی کمتری را نشان می دهد. این جهش در کل و در سطح جهانی ۶۶درصد جهش های این ژن را شامل می شود. بیشتر جهش های دیگر در این ژن که باعث بیماری می شوند نادر می باشند. به طوری که فقط ۴ جهش دارای فراوانی بیشتر از ۱درصد می باشند. به هر حال بعضی از جهش‌ها به طور غیر معمولی در جمعیت های به خصوص، مثل جهش W1282X در میان یهودیان اشکنازی، رایج تر می باشند (۱۲،۱۳،۱۴،۱۵،۱۶).

1-Gastrointestinal
2-Transcript

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: روش نمونه برداری از مایع آمنیون از خانم باردار که بطور معمول بین هفته چهاردهم تا هیجدهم بارداری انجام می گیرد.

استخراج DNA از نمونه ها: استخراج DNA از خون طبق دستورالعمل کیت High pure از شرکت Roche انجام گرفت. در هر استخراج مقدار ۲۰۰ میکرولیتر خون استفاده شد.

واکنش زنجیره ای پلیمرازی (PCR): حدود ۵۰ نانوگرم از هر نمونه DNA استخراج شده در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. در برنامه PCR سه مرحله حرارتی در ۳۵ سیکل (۹۴ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه، ۵۰ درجه سانتیگراد ۲ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه) و در حجم ۲۵ میکرولیتر اعمال شد[1] . شرائط واکنش و همچنین غلظت پارامترهای استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: مقادیر استفاده شده از مواد در واکنش زنجیره ای پلیمرازی

مواد	غلظت
Taq. Polymerase	2 units
DNA Template	50 ng
each primer	25 pmol
dNTP	200 uM
10x PCR Buffer	2.5 ul
$MgCl_2$	1.5 mM

1 -Thermal Cycler from Corbett Research

www.SID.ir

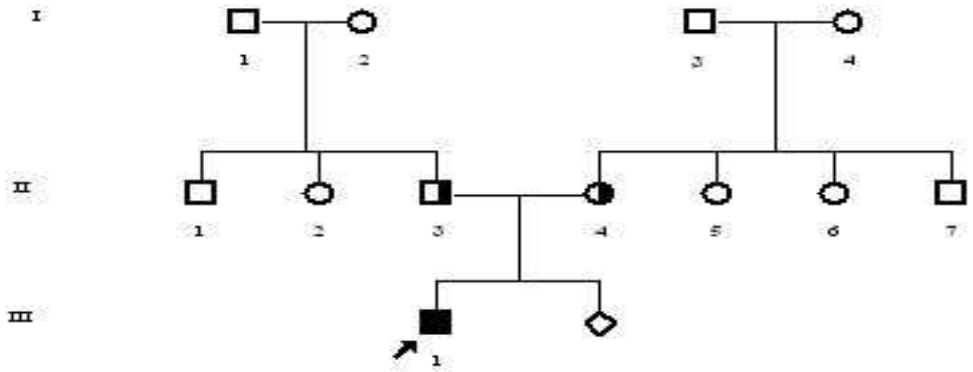
Archive of SID

در واکنش زنجیره ای پلیمرازی دو پرایمر استفاده شده بترتیب دارای ترادف‌های 5´- ACCATTAAAGAAAATATGAT -3´ و 5´- TGCAAGCTTCTTAAAGCATA -3´ بوده که محصولی با طول ۲۶۲ جفت باز را تکثیر می‌کردند. محصولات PCR جهت تایید بر روی ژل آگاروز۲ درصد الکتروفورز شدند (۵).

تعیین موتاسیون: برای تشخیص نوع موتاسیون در اگزون ۱۰ ژن مورد نظر در زوج مورد مطالعه محصولات بدست آمده از واکنش زنجیره ای پلیمرازی توسط یک آنزیم محدود کننده تخصصی (MboI) تیمار و سپس الگو های بدست آمده از هضم آنزیمی بر روی ژل آکریل آمید ۸درصد تفکیک شدند. جهت رویت باند ها در ژل از روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده گردید (۵).

یافته ها

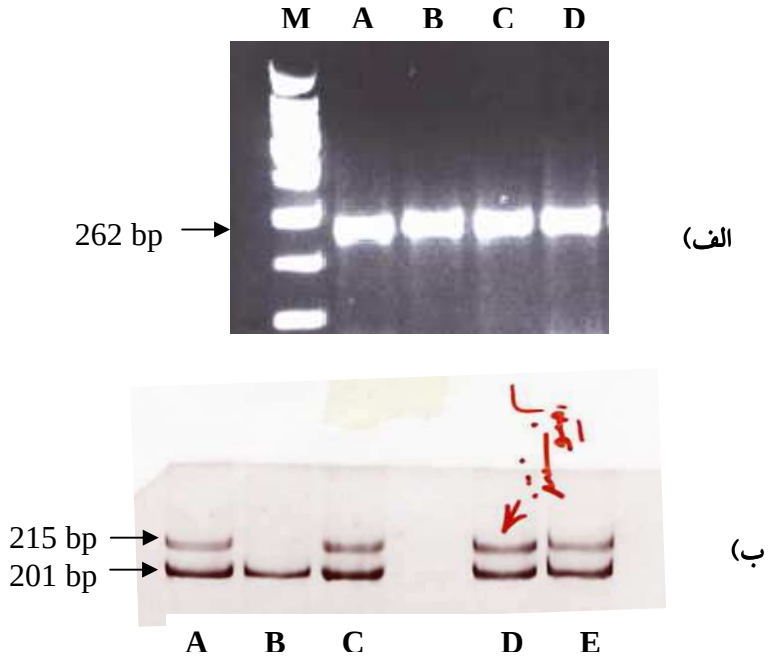
دست یابی به جهش دلتا ۵۰۸ : در این جهش حذف سه باز CTT در اگـزون شـماره ۱۰ ایـن ژن مشـاهده مـی گردد. برای دست یابی به این جهش ابتـدا واکـنش زنجیـره پلیمراز با استفاده از پرایمرهای ذکر شده انجام گردید. طول قطعه حاصل از واکنش برابر ۲۶۲ جفت باز می باشد کـه بـا حذف ۳ باز فوق طول قطعه به ۲۵۹ جفـت بـاز مـی رسـد (شکل ۳، الف). در آلل سالم با توجه به جایگاه برش طبیعی برای آنزیم MboI بخشی از محصول (یک قطعه ۴۷ جفت بازی) حذف می گردد و قطعـه جدیـد طـولی معـادل ۲۱۵ جفت باز دارد. در آلل جهش یافته همانطور که در شـکل ۳ دیده می شود یک جایگاه دیگر بـرای بـرش آنـزیم MboI بوجود می آید و طول قطعه به ۲۰۱ جفت باز می رسد. بنابر این در افراد هتروزیگوت هـر دو قطعـه ۲۱۵ و ۲۰۱ جفـت بازی و در افراد هموزیگوت فقـط یـک قطعـه ۲۰۱ جفـت بازی مشاهده می گردد (شکل ۳). نتایج بدست آمده حـاکی از آن است که والدین هر دو ناقل و دارای یک جهش مشابه می باشند. فرزند بیمار نیز طبعا جهش را در هر دو آلـل ژن CFTR دارد. جنین مورد بررسی همانند والدین فقط ناقـل می باشد.



شکل ۲: شجره خانواده مورد بررسی در تشخیص پیش از تولد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: الف) محصولات بدست آمده از واکنش PCR از ژنوم مادر (A) ، پدر (B) ، پسر بیمار (C) و جنین(D) به همراه مارکر (M) . ب) نتایج الگو های بدست آمده از روش RFLP : مادر ناقل (A)، پسر بیمار (B) ، پدر ناقل (C) ، جنین ناقل (D) و یک نمونه کنترل ناقل(E) .

بحث

سیستیک فیبروزیس یکی از رایجترین بیماری‌ها در قفقازی‌ها[1] با شیوع ۱ در ۳۳۰۰ می باشد. این بیماری همچنین با شیوعی برابر ۱ در ۹۵۰۰ در میان هیسپانیک ها[2] گزارش شده است (۱۴). سیستیک فیبروزیس در میان بومی های آفریقایی و آسیایی نادر و دارای فراوانی کمتر از ۱ در ۵۵۰۰۰ می باشد (۱۵). اما در میان امریکاییان افریقایی و آسیایی تبار[3] شیوع این بیماری بیشتر و به ترتیب برابر ۱ در ۱۵۳۰۰ و ۱ در ۳۲۰۰۰ در این جمعیت ها می باشد که در این رابطه اختلاط جمعیت های قفقازی تصور می شود (۱۶). مطالعات اخیر در بعضی از جمعیت های بومی امریکایی فراوانی بالایی، از جمله شیوعی برابر ۱ در ۳۷۹۰ در میان مردم پوئبلو[4] و ۱ در ۱۵۸۰ در میان جمعیت زونی[5] را نشان می دهد(جدول ۱). این شیوع نسبتا زیاد همراه با فراوانی بالا ناقلین ضرورت غربالگری جمعیتی را ایجاب می‌کند (۱۳).

1- Aucasians
2 - Hispanics
3-African Americans and Asian Americans
4- Pueblo
5- Zuni

www.SID.ir

Archive of SID

از زمان شناسائی این ژن و جهش اصلی مسئول برای سیستیک فیبروزیس، بیش از ۶۰۰ جهش و تنوعات متفاوت در سکانس ژن CF شناخته شده است. جهش ΔF508 تقریبا در همه جمعیت ها گزارش شده است اگر چه فراوانی نسبی آن در میان مناطق جغرافیائی متفاوت یکسان نیست. بیشترین فراوانی مشاهده شده در جمعیت های سفید پوستان می باشد به طوریکه حدود ۷۰درصد آلل های سیستیک فیبروزیس را در بر می گیرد(جدول ۲). جهش ΔF508 برای بخش بزرگی از آلل‌های جهش یافته در دیگر گروه‌های قومی – نژادی مشاهده گردیده است: ۴۸درصد در میان آمریکائیان آفریقائی تبار، ۴۶درصد در هیسپانیک‌ها و ۳۰درصد در امریکائیان آسیائی تبار و یهودیان اشکنازی (۱۷، ۱۸). ۲۰–۱۵درصد دیگر جهش های رایج برای ۱۵–۲درصد آلل های سیستیک فیبروزیس بسته به ترکیب قومی گروه بیمار مطالعه شده می باشد. بیشتر جهش های دیگر، نادر می باشند (۱۷).

نسبت جهش های قابل دست یابی یک شاخص مهم برای به کار گیری غربالگری جمعیتی می باشد. با دست یابی به ΔF508 و دیگر جهش های رایج در گروه های قومی بخصوص به نظر می رسد که با تکنولوژی رایج می توان با حساسیت ۹۵–۹۰ بررسی جمعیتی را برای از جمله یهودیان اشکنازی، برتون های سلتیک[1]، کانادائی های فرانسوی از کبک و امریکائیان بومی انجام داد (۲). میزان دست یابی در امریکائیان افریقائی تبار در حدود ۷۵درصد می باشد. علیرغم شیوع نسبتا زیاد در هیسپانیک‌ها، آلل‌های قابل دست‌یابی فقط برای ۵۷درصد جهش های CF در این گروه امکان پذیر است.

جدول ۲: میزان شیوع و فراوانی ناقلین در جمعیت های مختلف جهان

گروه	شیوع	فراوانی ناقلین	درصد Delta F508 in
سفید پوستان اروپایی	۱/۳۳۰۰	۱/۲۹	۷۰
هیسپانیک ها	۱/۸–۹۰۰۰	۱/۴۶	۴۶
یهودیان اشکنازی		۱/۲۹	۳۰
بومیان امریکایی	۱/۱۵۰۰–۱/۳۹۷۰		
آمریکائیان آفریقایی تبار	۱/۱۵۳۰۰	۱/۶۰–۶۵	۴۸
آمریکائیان آسیایی تبار	۱/۳۲۱۰۰	۱/۹۰	۳۰
ایران	–	–	۱۸

با توجه به کارایی و نتایج قابل اطمینان آزمایش های ژنتیکی با استفاده از روش‌های مولکولی در تشخیص بیماری های ژنتیکی و به ویژه در اینجا برای CF به بزرگسالان با سابقه مثبت در خانواده، به همسران افراد دارای CF، به زوجینی که قصد بچه دار شدن دارند و به زوج هائی که می‌خواهند آزمایش قبل از تولد انجام دهند این آزمایش‌ها توصیه می‌گردد.

1- Celtic Bretons

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1- Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell S.H, Gatzy J T, et al. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. Cell 1998; 95: 1005-15.

2-Slack J, Houlston RS, Marteau T. Identification of the cystic fibrosis gene. BMJ 1990; 300 (6727): 812.

3-Beaudet AL, Feldman GL; Fernbach SD, Buffone GJ, O'Brien WE. Linkage disequilibrium, cystic fibrosis, and genetic counseling. Am J Hum Genet 1989; 44: 319-26.

4-Borgo G, Mastella G, Gasparini P, Zorzanello A, Doro R, Pignatti PF. Pancreatic function and gene deletion F508 in cystic fibrosis. J Med Genet (11):665-9, 1990.

5-Denayer L, De Boeck K, Evers-Kiebooms G, Van den Berghe H. The transfer of information about genetic transmission to brothers and sisters of parents with a CF-child. Birth Defects 1992; 28 (1):149-58.

6-FitzSimmons SC; Burkhart GA, Borowitz D, Grand RJ, Hammerstrom T, et al. High-dose pancreatic-enzyme supplements and fibrosing colonopathy in children with cystic fibrosis. New Eng J Med 1997; 336: 1283-9.

7-Farrell, P. M.; Kosorok, M. R.; Rock, M. J.; Laxova, A.; Zeng, L.; Lai, H.-C.; Hoffman, G.; Laessig, R. H.; Splaingard, M. L.; Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group : Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves long-term growth. Pediatrics 107: 1-12, 2001.

8-Scotet, V.; Audrezet, M.-P.; Roussey, M.; Rault, G.; Blayau, M.; De Braekeleer, M.; Ferec, C. : Impact of public health strategies on the birth prevalence of cystic fibrosis in Brittany, France. Hum. Genet. 113: 280-285, 2003.

9-Arispe N, Rojas E, Hartman J, Sorscher EJ, Pollard HB. Intrinsic anion channel activity of the recombinant first nucleotide binding fold domain of the cystic fibrosis transmembrane regulator protein. Proc Natl Acad Sci U S A, Mar 1;89(5):1539-43, 1992.

10-Kerem, B.; Rommens, J. M.; Buchanan, J. A.; Markiewicz, D.; Cox, T. K.; Chakravarti, A.;Buchwald, M.; Tsui, L.-C. : Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 245: 1073-1080, 1989

11-Laroche, D.; Travert, G. : Abnormal frequency of delta-F(508) mutation in neonatal transitory hypertrypsinaemia. Lancet 337: 55 only, 1991.

12-Restrepo, C. M.; Pineda, L.; Rojas-Martinez, A.; Gutierrez, C. A.; Morales, A.; Gomez, Y.; Villalobos, M. C.; Borjas, L.; Delgado, W.; Myers, A.; Barrera-Saldana, H. A. : CFTR mutations in three Latin American countries. Am. J. Med. Genet. 91: 277-279, 2000.

13-Wang, J.; Bowman, M. C.; Hsu, E.; Wertz, K.; Wong, L.-J. C. : A novel mutation in the CFTR gene correlates with severe clinical phenotype in seven Hispanic patients. J. Med. Genet. 37: 215-218, 2000.

14-Nam, M. H.; Hijikata, M.; Tuan, L. A.; Lien, L. T.; Shojima, J.; Horie, T.; Nakata, K.; Matsushita, I.; Ohashi, J.; Tokunaga, K.; Keicho, N. :

15-Variations of the CFTR gene in the Hanoi-Vietnamese. Am. J. Med. Genet. 136A: 249-253, 2005.

16-Reza Alibakhshi and Mahdi Zamani1: Mutation Analysis of CFTR Gene in 70 Iranian Cystic Fibrosis Patients. Iran J Allergy Asthma Immunol ; March; 5(1): 3-8, 2006.

17-Brancolini V, Cremonesi L, Belloni E, Pappalardo E, Bordoni R, Seia M, Russo S, Padoan R, Giunta A, Ferrari M. Search for mutations in pancreatic sufficient cystic fibrosis Italian patients: detection of 90درصد of molecular defects and identification of three novel mutations. Hum Genet; Sep;96(3):312-8, 1995.

18-Thomas PJ, Shenbagamurthi P, Sondek J, Hullihen JM, Pedersen PL. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Effects of the most common cystic fibrosis-causing mutation on the secondary structure and stability of a synthetic peptide. J Bio l Chem; Mar 25;267(9):5727-30, 1992.

www.SID.ir