Original Article

Molecular Diagnosis of Duchenne/Becker Muscular Dystrophy: Analysis of Exons Deletion and Carrier Detection

Mohammad Taghi Akbari, Ph.D.[1,2]*, Shohreh Zare Karizi, Ph.D.[3], Shahryar Nafisi, M.D.[4], Gholamreza Zamani, M.D.[5]

1. Department of Medical Genetics, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Tehran Medical Genetics Laboratory, NO.297, Taleghani Street, Tehran, Iran
3. Department of Biology, Varamin Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin Pishva, Iran
4. Department of Neurology, Tehran University of Medical Sciences,TUMS, Tehran, Iran
5. Children's Medical Center, Tehran University of Medical Sciences, TUMS, Tehran, Iran

** Corresponding Address: P.O.BOX: 14115-331, Department of Medical Genetics, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: mtakbari@modares.ac.ir

Received: 15/Mar/2010, Accepted: 22/Aug/2010

Abstract

Objective: Duchenne and Becker Muscular Dystrophy (DMD and BMD) are X-linked conditions resulting from a defect in the dystrophin gene located at Xp21.2. DMD is the most frequent neuromuscular disease in humans (1/3500 male newborns). In approximately 65% of DMD and BMD patients, deletions in the dystrophin gene have been identified as the molecular determinant. The frequency and distribution of dystrophin gene deletions in DMD/BMD patients from different populations are different.

The aim of this study was to delineate various types of deleted exons and their frequency in affected male patients and identification of carrier females by linkage analysis.

Materials and Methods: In this study 100 unrelated patients with DMD/BMD were studied for intragenic deletions in 28 exons and the promoter region of the dystrophin gene using multiplex PCR. We also performed linkage analysis within the dystrophin gene utilizing 8 short tandem repeat markers.

Results: Fifty-two (52%) patients showed intragenic deletions. A total of 81% of the deletions were located at the distal hot spot region (44-55 exons) and 19% of the deletions were located at the proximal region (exon 2-19). The most frequent deleted exons were 47(16%), 48 and 46 (11%).

Most of the STR markers showed heterozygosity in the families studied. The linkage analysis was useful for detecting carrier status.

Conclusion: The present study suggests that intragenic dystrophin gene deletions occur with the same frequency in Iranian patients compared with other ethnic groups.

Keywords: Dystrophin, Multiplex PCR, Duchene Muscular Dystrophy, Becker Muscular Dystrophy

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 3, Autumn 2010, Pages: 421-428

Archive of SID

www.SID.ir

تشخیص ملکولی دیستروفی عضلانی دوشن و بکر: بررسی حذف‌ها و تعیین ناقلین

محمدتقی اکبری .Ph.D[۱،۲*]، شهره زارع کاریزی .Ph.D[۳]، شهریار نفیسی.M.D[۴]، غلامرضا زمانی .M.D[۵]

۱. دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، تهران، ایران
۲. آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران - دکتر اکبری، تهران، ایران
۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین پیشوا، گروه زیست‌شناسی، ورامین پیشوا، ایران
۴. دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه نورولوژی، تهران، ایران
۵. دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز طبی کودکان، بخش اعصاب، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی
پست الکترونیک: Email: mtakbari@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۸/۱۲/۲۴، پذیرش مقاله: ۸۹/۵/۳۱

چکیده

* **هدف:** مشخص کردن میزان و محل جهش‌های حذفی در بیماران ایرانی و شناسایی زنان ناقل از طریق آنالیز پیوستگی
* **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه ۱۰۰ بیمار غیرخویشاوند مبتلا به دیستروفی عضلانی برای ۲۸ اگزون و ناحیه پروموتر ژن دیستروفین با استفاده از PCR چندگانه بررسی شدند. نمونه‌گیری بیماران از طریق تصادفی آسان صورت گرفت. برای تشخیص زنان ناقل در خانواده‌های دارای بیمار مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن/بکر (Duchenne Muscular Dystrophy; DMD) از آنالیز پیوستگی با استفاده از ۸ مارکر STR در ژن دیستروفین استفاده شد.
* **یافته‌ها:** ۵۲ بیمار (۵۲ درصد) دارای حذف بودند. ۸۱ درصد حذف‌ها در انتها (اگزون‌های ۵۵-۴۴) و ۱۹ درصد حذف‌ها در اولین نقطه داغ ژن (اگزون‌های ۱۹-۲) قرار داشت. بیشترین حذف‌ها در اگزون ۴۷ (۱۶ درصد)، ۴۸ و ۴۶ (۱۱درصد) شناسایی شدند. مارکرهای STR مورد بررسی نیز در بسیاری از خانواده‌ها دارای هتروزیگوسیتی بودند. بنابراین آنالیز پیوستگی ابزار مفیدی برای تشخیص ناقلین می‌باشد.
* **نتیجه‌گیری:** در این مطالعه، فراوانی و الگوی پراکنش حذف‌های ژن دیستروفین در بیماران ایرانی مشابه سایر گزارش‌ها در دنیا می‌باشد.

* **کلیدواژگان:** دیستروفین، PCR چندگانه، دیستروفی عضلانی دوشن، دیستروفی عضلانی بکر

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۴۲۸-۴۲۱

مقدمه

دیستروفی عضلانی دوشن (Duchenne Muscular Dystrophy; DMD) و بکر (Becker Muscular Dystrophy; BMD) بیماری عصبی-عضلانی بوده که با ضعف عضلانی پیش‌رونده و تخریب ماهیچه‌های اسکلتی همراه است. DMD شایع‌ترین بیماری کشنده وابسته به X مغلوب بوده و شیوع آن ۱ در ۳۵۰۰ نفر مرد در هر تولد زنده می‌باشد. حدود یک سوم این موارد ناشی از جهش‌های جدید می‌باشد (۱). علایم بالینی این بیماری در سنین ۳-۲ سالگی مشاهده می‌شود. بیشتر پسران مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن تا ۱۸ ماهگی آغاز به راه رفتن نمی‌کنند در واقع دارای تاخیر در تکوین حرکتی می‌باشند. از دیگر علایم زودرس بیماری ناهنجاری در شیوه راه رفتن (راه رفتن اردک وار)، سختی در دویدن و پریدن می‌باشد. به طور معمول این کودکان در سن ده سالگی نیازمند به استفاده از ویلچر می‌باشند. ۹۰ درصد بیماران مبتلا به دوشن، ناهنجاری در الکتروکاردیوگرام‌های قلبی نشان می‌دهند. بیشتر بیماران در دهه دوم زندگی به علت پنومونی وابسته به مشکلات تنفسی مزمن می‌میرند (۲).

دیستروفی عضلانی بکر، فرم ملایم و خفیف بیماری می‌باشد. فراوانی آن ۱/۳ فراوانی بیماری DMD بوده، شروع علایم بیماری بین سنین ۱۵-۵ سالگی می‌باشد و بیشتر بیماران ۵۰-۴۰ سال عمر می‌کنند (۳).

علت بیماری دوشن و بکر نقص در ژن کد کننده پروتئین دیستروفین می باشد. ژن دیستروفین، بزرگترین ژن انسانی با ۷۹ اگزون و طول تقریبی ۲/۳ میلیون باز می‌باشد و رونوشتی به طول ۱۴ کیلوباز تولید می‌کند. این ژن در جایگاه کروموزومی Xp21.2 واقع شده است (۴، ۵). دیستروفین پروتئینی سیتواسکلتی با وزن ملکولی ۴۲۷ کیلو دالتون می‌باشد که تنظیم کننده جریان یون‌ها به درون سلول‌های ماهیچه‌ای می‌باشد. فقدان یا غیرفعال شدن این پروتیین منجر به آزاد شدن یون‌ها به درون سلول و تخریب شدید ماهیچه‌ای می‌شود. این پروتیین در عضلات صاف، اسکلتی، قلبی و مغز وجود دارد. ۶۰ تا ۶۵ درصد جهش‌های شناسایی شده در این ژن حذف‌های بزرگ می‌باشد. اندازه بزرگ ژن به ویژه اینترون‌های بزرگ که به طور میانگین ۳۵ کیلوباز طول دارند، ممکن است توجیه کننده بخشی از میزان حذف‌های زیاد این ژن باشد. پراکنش محل حذف‌ها غیرتصادفی بوده به طوری که قسمت عمده این حذف‌ها (۸۰ درصد) در مرکز و با فراوانی کمتر (۲۰ درصد) نزدیک به انتهای '۵ ژن گزارش شده است. قسمت عمده حذف‌ها در ناحیه‌ای حدود ۲۰۰ کیلو باز- اینترون ۴۴، اگزون ۴۵ و اینترون ۴۵- دیده شده است. طول توالی حذف شده در شدت و ضعف بیماری نقش چندانی ندارد، به طوری که طول اگزون‌های حذف شده در بیماران دوشن و بکر یکسان می‌باشد. این مساله از طریق تئوری قاب خواندن به این صورت توجیه شده است که اگر حذف باعث بر هم ریختن قاب خواندن شود، فنوتیپ حاصله کشنده خواهد بود. در حالی که، اگر قاب خواندن تغییر نکند، فنوتیپ حاصله شدت کمتری داشته و منجر به دیستروفی عضلانی بکر می‌شود (۳، ۶).

علاوه بر حذف، ۵ تا ۱۰ درصد بیماران دارای مضاعف‌شدگی جزیی می‌باشند. ۸۰ درصد مضاعف شدگی‌ها در انتهای '۵ ژن و ۲۰ درصد از آنها در بخش مرکزی اتفاق می‌افتد. پراکنش

Archive of SID
www.SID.ir

مضاعف‌شدگی‌ها مانند حذف‌ها در جوامع و گروه‌های نژادی مختلف متفاوت است. البته تغییرات نوکلئوتیدی کوچک اعم از حذف، دخول و موتاسیون‌های نقطه‌ای نیز در این ژن گزارش شده است که پراکنش آنها به طور کامل متفاوت می‌باشد. بیش از ۴۰ درصد جهش‌های نقطه‌ای در پایین دست اگزون ۵۵ و بیشتر در مناطق CpG دیده می‌شوند (۷).

در این مطالعه، ۱۰۰ بیمار ایرانی مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن/ بکر جهت غربال‌گری حذف‌های شایع ژن دیستروفین با استفاده از تکنیک PCR چندگانه مورد بررسی قرار گرفتند.

علاوه بر آن، تشخیص ناقلین با استفاده از توالی‌های تکراری کوتاه پشت سر هم (Short Tandem Repeats; STR) در خانواده‌هایی که دارای بیش از یک فرد مبتلا به DMD بودند، صورت گرفت. این روش بر توارث هم‌زمان ژن بیماری‌زا با ترادف‌های پلی‌مورفیک DNA که در ژن بیماری‌زا یا بسیار نزدیک به آن قرار دارند، استوار شده است، در نتیجه نیاز به دانستن نوع تغییر نمی‌باشد. آنالیز پیوستگی بر اساس مارکرهای STR ژن دیستروفین به ویژه مارکرهایی که در نقاط داغ قرار دارند، در تشخیص ناقلین و تشخیص قبل از تولد در خانواده‌های دارای بیماران مبتلا به دوشن و بکر که نوع جهش در آنها تعیین نشده، کاربرد گسترده‌ای دارد (۸). در سال‌های اخیر STRهای جدید در ژن دیستروفین شناسایی شده است.

(Leiden Muscular Dystrophy Page, www.dmd.nl).

مواد و روش‌ها

این مطالعه، گزارشی از بررسی حذف‌های ژن دیستروفین در ۱۰۰ بیمار مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران – دکتر اکبری در طی سال‌های ۱۳۸۹-۱۳۸۵ می‌باشد. بیماران از استان‌های مختلف ایران توسط پزشکان ارجاع داده شدند. انتخاب بیماران بر اساس معیارهای تشخیصی بالینی استاندارد از جمله علایم بالینی و میزان افزایش یافته کراتین کیناز بود. همه بیماران پسر و دامنه سن آنها بین ۳۳-۳ سال و میانگین آن ۱۲/۵ سال بود. پس از اخذ رضایت نامه۵ سی‌سی خون محیطی، از بیماران و والدین ایشان گرفته شد. استخراج DNA از گلبول‌های سفید خون محیطی بر اساس روش نمک اشباع صورت گرفت (۹).

بررسی حذف‌های ژن دیستروفین

جهت بررسی حذف‌های شایع ژن دیستروفین از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه (Multiplex Polymerase Chain Reaction) استفاده شد. ۲۸ اگزون و ناحیه پروموتردر چهار واکنش پرایمری جداگانه A-D مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

از قبل توالی پرایمرهای مورد استفاده گزارش گردیده است (۱۰، ۱۱). بیماران دارای حذف در PCR چندگانه به طور مجدد همراه با یک کنترل مثبت (بیمار دارای حذف در همان اگزون) و کنترل منفی (فرد سالم) جداگانه PCR و وجود حذف تایید شد.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲۰۰ نانوگرم DNA ژنومیک، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۰/۲۵ میلی‌مولار از هر dNTPs، ۲/۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۷ پیکومول از مخلوط پرایمرها و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (سیناژن، ایران) صورت گرفت. تکثیر در ۳۰ سیکل، دمای۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت۴ دقیقه انجام شد. دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و طویل‌سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد بارگذاری شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد آنالیز قرار گرفت.

جدول ۱: اگزون‌های مورد بررسی ژن دیستروفین در هر مخلوط پرایمری

شماره اگزون	واکنش
۴۵،۴۸،۱۹،۱۷،۵۱،۸،۱۲،۴۴،۴	A (Chamberlain) set
۵۲،۶۰،۴۷،۶،۱۳،۵۰،۴۳،۳، Pm	B (Beggs) set
۴۶،۴۲،۵۳،۴۱،۱۶	C set
۵۸،۵۷،۵۶،۵۵،۵۴	D set

تعیین ناقلیت

تعیین ناقلیت با استفاده از هشت STR-(CA)n – که در نواحی مختلف ژن پراکنده‌اند – انجام شد. این STRها بر اساس مطالعاتی که در جوامع مختلف انجام شده، بیشترین هتروزیگوسیتی را دارا هستند (۸). نام مارکرها و موقعیت آنها در جدول ۲ و توالی آنها در جدول ۳ لیست شده است. در این بررسی فقط خانواده‌هایی لحاظ شدند که بیش از یک فرد مبتلا در آن خانواده وجود داشت (توارث فامیلی).

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲۰۰ نانوگرم DNA ژنومیک، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۰/۲۵ میلی‌مولار از هر dNTPs، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۵ پیکومول از هر پرایمر و ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (سیناژن، ایران) صورت گرفت. تکثیر در ۲۶ سیکل، دمای۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت۱ دقیقه انجام شد. دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و طویل‌سازی نهایی به مدت ۸ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. محصولات PCR بر روی ژل اکریلامید ۱۲ درصد بارگذاری شده و پس از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره مورد آنالیز قرار گرفتند.

جدول ۲: جایگاه هشت STR-(CA)n در ژن دیستروفین

موقعیت مارکر	جایگاه مارکر	نام مارکر
بخش '۵ (ابتدایی)	پروموتر	5'-DYSI
	پروموتر	5'-DYSII
	اگزون ۱	5'-CA
بخش مرکزی	اینترون ٤٤	STR-44
	اینترون٤٥	STR-45
	اینترون ٤٩	STR-49
	اینترون ٥٠	STR-50
بخش '۳ (انتهایی)	اینترون ۷۹	3'-CA

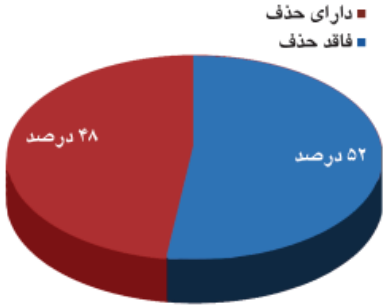
Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳: توالی مارکرهای STR مورد استفاده در تحقیق حاضر

STR مارکر	توالی پرایمر
DysI-F	ACT GTA AAT GAA ATT GTT TTC TAA GTG CC
DysI-R	GTT AAC AAA ATG TCC TTC AGT TCT ATC C
DysII-F	TCT TGA TAT ATA GGG ATT ATT TGT GTT TGT TAT AC
DysII-R	ATT ATG AAA CTA TAA GGA ATA ACT CAT TTA GC
5'-CA-F	TAG CTA AAA TGT ATG AGT A
5'-CA-R	AAT AGT GTT TTC CTA AGG G
STR44-F	TCC AAC ATT GGA AAT CAC ATT TCA
STR44-R	TCA TCA CAA ATA GAT GTT TCA CA
STR45-F	GAG GCT ATA ATT CTT TAA CTT TGG
STR45-R	CTC TTT CCC TCT TTA TTC ATG TTA
STR49-F	CGT TTA CCA GCT CAA AAT CTC AAC
STR49-R	CAT ATG ATA CGA TTC GTG TTT TGC
STR50-F	AAG GTT CCT CCA GTA ACA GAT TTG G
STR50-R	TAT GCT ACA TAG TAT GTC CTC AGA C
3'-CA-F	GAA AGA TTG TAA ACT AAA GTG TGC
3'-CA-R	GGA TGC AAA ACA ATG CGC TGC CTC

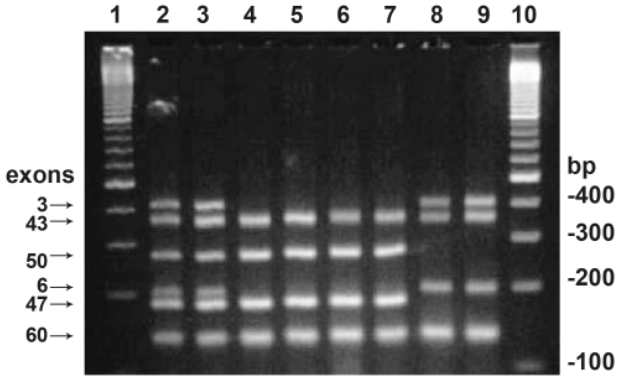
یافته ها

۱۰۰ بیمار غیر خویشاوند مبتلا به BMD/DMD جهت بررسی حذف‌های شایع در ژن دیستروفین با کمک تکنیک PCR چندگانه مورد آنالیز قرار گرفتند. شکل ۱ نمونه‌ای از ژل آگارز جهت بررسی حذف‌های ژن دیستروفین را نشان می‌دهد. ۵۲ نفر (۵۲ درصد) دارای حذف در یک یا چند اگزون از ۲۸ اگزون و ناحیه پروموتری مورد بررسی بودند (نمودار ۱).

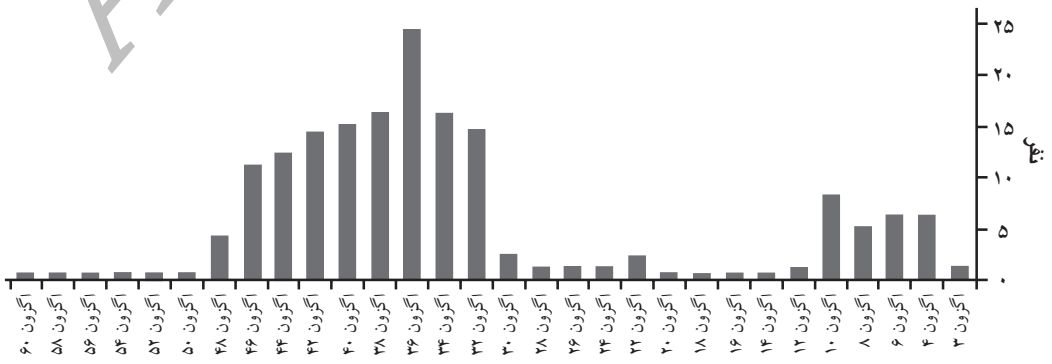


نمودار ۱: درصد فراوانی میزان حذف در ژن دیستروفین در بیماران مبتلا به DMD/BMD

۱۶ نفر (۳۱ درصد) حذف در یک اگزون و ۳۶ نفر (۶۹ درصد) دارای حذف در بیش از یک اگزون بودند. ۱۰ نفر (۱۹ درصد) دارای حذف در انتهای '۵ ژن، ۴۲ نفر (۸۱ درصد) حذف در قسمت مرکزی ژن و ۱ بیمار دارای حذف از انتهای '۵ (اگزون ۱۹) تا قسمت مرکزی ژن (اگزون ۴۳) بودند. بیشترین حذف‌ها به ترتیب در اگزون‌های ۴۷ (۱۶ درصد)، ۴۶ و ۴۸ با فراوانی ۱۱ درصد مشاهده شد. در ناحیه '۵ ژن نیز اگزون‌های ۳ و ۴ (۳/۹ درصد) جهش پذیرترین اگزون‌ها بودند (نمودار ۲).

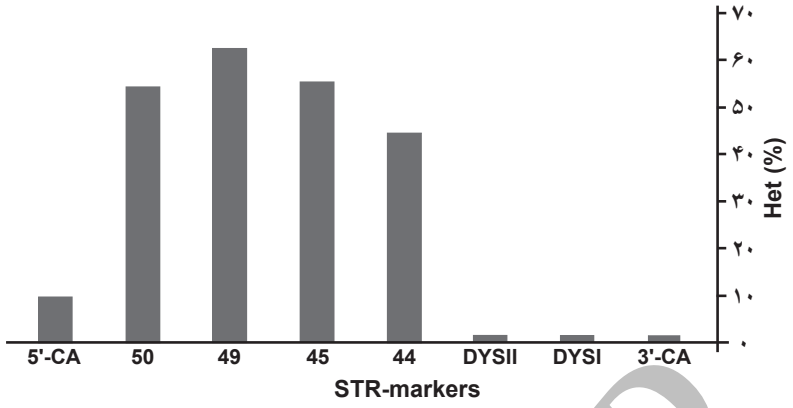


شکل ۱: بررسی حذف‌های شایع ژن دیستروفین با تکنیک PCR چندگانه. ردیف ۲ و ۳ کنترل نرمال، ردیف‌های ۴، ۵، ۶ و ۷ بیماران دارای حذف در اگزون‌های ۳ و ۶، ردیف‌های ۸ و ۹ بیماران دارای حذف در اگزون‌های ۴۷ و ۵۰ و ردیف‌های ۱ و ۱۰ سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی.



نمودار ۲: نحوه پراکنش حذف‌های ژن دیستروفین در بیماران مبتلا به DMD

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار۳. مقایسه هتروزیگوسیتی STRهای مورد مطالعه در تحقیق حاضر

در میان بیماران مورد مطالعه، بیماری در ۳۳ درصد به صورت خانوادگی (بیش از یک بیمار در یک خانواده) و در۶۷ درصد موارد نیز به صورت تک موردی مشاهده شد. در بین موارد تک موردی، ۶ خانواده (۱۸ درصد) دارای حذف در انتهای '۵ و ۲۸ خانواده (۸۲ درصد) دارای حذف در بخش مرکزی ژن بودند. در موارد خانوادگی، ۴ خانواده (۲۲ درصد) حذف در انتهای '۵ ژن و ۱۴ خانواده (۷۸ درصد) دارای حذف در بخش مرکزی ژن بودند.

در بین ۸ مارکر STR مورد بررسی، STRهای ۴۹ (۶۱/۲ درصد)، ۴۵ (۵۴ درصد)، ۵۰ (۵۳ درصد) و ۴۴ (۴۳/۲ درصد) بیشترین گویایی را در خانواده‌های دارای توارث فامیلی داشتند (نمودار ۳).

بحث

دیستروفی عضلانی دوشن و بکر یکی از شایع‌ترین بیماری‌های حرکتی با توارث وابسته به X مغلوب می‌باشد. علت عمده این بیماری، حذف‌های اگزونی در ژن دیستروفین می‌باشد. جهت بررسی حذف‌های ژن دیستروفین تکنیک‌های آزمایشگاهی متفاوتی وجود دارد. در برخی مطالعات جهت تعیین حذف از تکنیک ساترن‌بلات (Southern Blot) استفاده شده است. این تکنیک بسیار وقت‌گیر وسخت است، اما با این روش امکان شناسایی حذف‌ها و مضاعف‌شدگی در کل ژن، تعیین محل آغازین حذف‌ها و مضاعف‌شدگی‌ها - جهت تعیین اثر جهش بر روی قاب خواندن - و در نهایت تعیین محل اتصال اگزون‌ها کاربرد دارد. در برخی مطالعات از PCR چندگانه استفاده شده است. این تکنیک بر خلاف ساترن‌بلات سریع، ارزان‌تر و آسان می‌باشد. این تکنیک برای تشخیص قبل از تولد به علت سرعت بالا ایده‌آل می‌باشد. اما فقط شناسایی حذف‌ها امکان‌پذیر می‌باشد. به همین دلیل انجام هم‌زمان هر دو تست توصیه می‌شود. روش دیگر استفاده از PCR کمی و تعیین دوزاژ ژنی است. این روش اهمیت کاربردی جهت تعیین ناقلین دارد اما باید اگزون حذف یا مضاعف شده در آن خانواده مشخص شده باشد (۳، ۱۰، ۱۱). مطالعه‌ای نیز در این زمینه در ایران انجام شده است (۱۲).

امروزه با کمک تکنیک (Multiplex Ligation-de (MLPA-pendent Probe Amplification امکان بررسی کلیه حذف‌ها یا مضاعف‌شدگی‌های ژن دیستروفین میسر گردیده است (۳، ۱۳).

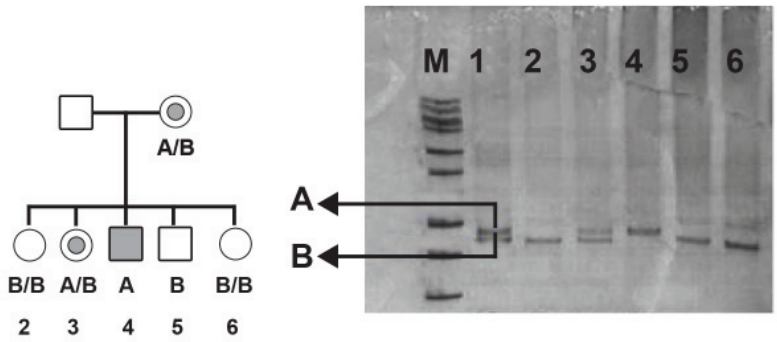
بر اساس این تحقیق با استفاده از تکنیک PCR چندگانه، در بیماران ایرانی مورد بررسی این مطالعه حذف‌های درون ژنی ۵۲ درصد از کل جهش‌های عامل بیماری در بیماران مبتلا به DMD و BMD را شامل می‌شود. گزارش‌های مختلفی در مورد فراوانی و الگوی حذف‌های درون ژنی در بسیاری از جوامع مختلف وجود دارد. بر اساس این گزارش‌ها، علاوه بر این که فراوانی حذف‌ها در جوامع مختلف متفاوت است، نحوه پراکنش حذف‌ها نیز در ژن دیستروفین فرق دارد.

میزان حذف در شمال آمریکا و اروپا از ۵۵ تا ۷۰ درصد متفاوت می‌باشد . در میان کشورهای اروپایی کمترین میزان حذف (۳۹ تا ۴۵ درصد) در کشورهای آلمان، مجارستان، چکسلواکی و اسپانیا دیده شده است (۱۴، ۱۵). در برخی از کشورهای آسیایی مانند چین، هند و کویت میزان حذف بین ۶۲ تا ۸۶ درصد متغییر است (۱۳، ۱۴). در حالی که در ویتنام، اسرائیل، ژاپن، سنگاپور و روسیه پایین تر و بین ۴۱-۳۱ درصد می‌باشد (۱۶، ۱۷، ۱۸). در جمعیت ترکیه میزان حذف شناسایی شده ۵۲-۵۹ درصد و در پاکستان ۴۱ درصد می‌باشد (۱۹، ۲۰).

در بیماران مورد بررسی در این مطالعه، ۸۱ درصد حذف‌ها در نواحی مرکزی (اگزون‌های ۵۲-۴۴) و ۱۹ درصد حذف‌ها در ابتدای ژن (اگزون‌های ۲۲-۱) قرار دارند. بیشترین میزان حذف در اگزون ۴۷ (۱۶ درصد)، سپس اگزون‌های ۴۶ و ۴۸ (۱۱ درصد) و ۴۵، ۴۹ و ۵۰ (۱۰ درصد) دیده شد. در واقع اگزون ۴۷ به عنوان جهش‌پذیرترین اگزون مطرح شده و به تدریج از دو طرف با فراوانی برابر، میزان جهش‌پذیری کاهش می‌یابد. این نحوه پراکنش حذف‌ها در جمعیت بیماران مورد مطالعه با الگوی حذف‌ها در بسیاری از جوامع مختلف مشابه است. ایران و ترکیه از لحاظ الگوی حذف‌ها و پراکنش شبیه می‌باشند (۱۹).

تحقیقات در جوامع اروپایی نشان داده است که ۶۰ درصد حذف‌ها در نواحی مرکزی ژن دیستروفین (اگزون ۵۲-۴۴) قرار دارد. در ایتالیا ۱۸ درصد حذف‌ها در ۲۰ اگزون اول، ۲ درصد در اگزون‌های ۴۰-۲۱ و ۸۰ درصد حذف‌ها در اگزون‌های ۶۰-۴۱ قرار دارد. در جمعیت بلغاری نیز عمده حذف‌ها در اگزون‌های ۴۴ تا ۵۲ مشاهده شده است که فراوانی حذف در اگزون ۵۰ بسیار بالا بوده است (۱۴، ۱۵).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲: بررسی ناقلیت در خانواده‌های دارای بیماری DMD از طریق آنالیز پیوستگی. ردیف ۱ مادر ناقل،ردیف‌های ۲ و ۶ دختران سالم، ردیف ۳ دختر ناقل، ردیف ۴ پسر بیمار و ردیف ۵ پسر سالم.

در اغلب کشورهای آسیایی نیز حذف‌ها در مرکز ژن قرار دارند. اما در فیلیپین و ژاپن بیشتر حذف‌ها در ناحیه ابتدایی ژن قرار دارد. جدول ۴ میزان حذف‌های شناسایی شده در ژن دیستروفین در مطالعات انجام شده در جوامع مختلف و تکنیک استفاده شده را نشان می‌دهد (۱۷).

مطالعه دیگری در ایران بر روی بیماران استان آذربایجان شرقی انجام گرفته است. در این بررسی، حذف‌های شایع ۲۶ اگزون (مخلوط پرایمری A-C) در ۴۶ بیمار پسر مطالعه شده است. ۲۱ نفر (۴۶ درصد) از بیماران دارای حذف بودند. عمده‌ترین حذف‌ها در اگزون‌های ۴۵، ۴۹ و ۵۰ با فراوانی ۱۴/۳ درصد مشاهده شده است و این اگزون‌ها به عنوان جهش‌پذیرترین اگزون‌ها در بیماران این استان معرفی شده‌اند (۲۱).

تفاوت‌های مشاهده شده در پراکنش حذف‌ها را می‌توان با این فرضیه توجیه کرد: به طور معمول محل حذف‌های اگزونی از یک اینترون شروع شده و به اینترون یا اینترون‌های بعدی ختم می‌شود و با توجه به تفاوت‌هایی که ممکن است در توالی‌های اینترونی در جوامع مختلف وجود داشته باشد، پراکنش حذف‌ها در هر جمعیت نیز ممکن است متفاوت باشد (۶).

جدول ۴: فراوانی، پراکنش و تکنیک مورد استفاده جهت شناسایی حذف‌ها در برخی از جوامع

کشور(منبع)	میزان حذف (درصد)	حذف در بخش ابتدایی	حذف در بخش مرکزی	تکنیک مورد استفاده
روسیه (۱٤)	٤۱	۲٦/۷۳+(۱۰) *	٦۳/٥	**Multiplex I,II**
کانادا(۲٤)	٦۸	۳۳	٦۳	**cDNA probes**
مکزیک (۲٥)	٥۲	۱۳	۸۷	**Multiplex I,II**
انگلستان (۱۰)	٥۰	۲٤	۷٦	**cDNA probes**
یونان (٦)	٦۳/٦	۲٤/۲	۷٥/۸	**cDNA probes, Multiplex I,II**
مراکش (۲٦)	٥۱/۳	۱۲	۸۱	**Multiplex I,II**
ترکیه (۲۷)	٥۲	۱۰/۸	۸۹/۲	**cDNA probes, Multiplex I,II**
ژاپن (۱۷)	٤۰	٥۲+(۸)*	٤۰	**Multiplex I**
چین (۲۰)	٤٥	٤٦	٥٤	**cDNA probes**
تایلند (۲۸)	٥٥	۲۰	۸۰	**Multiplex I**
سنگاپور (۱۸)	٤۰	۳۳/۳+(٥)*	٦۱/۹	**Multiplex I**
فیلیپین (۱۸)	۳۱	٦۳/٦	۳٦/٤	**Multiplex I,II**
اسرائیل (۱٦)	۳۷	۲۲	۷۸	**Multiplex I,II**
پاکستان (۲۰)	٤۱	٤۰/٦۹	٥۹/۳۰	**Multiplex I,II**
کویت (۱٤)	۸٦	۸+(٤۲) *	٥۰	**Multiplex I,II**
ایران (تبریز) (۲۱)	٤٦	۱٤	۸٦	**Multiplex I,II,III**
ایران (تحقیق حاضر)	٥۲	۱۹+(۱)	۸۰	**Multiplex I,II,III,IV**

* **حذف در فاصله اگزون‌های ۱۷ تا ۴۴ است.**

Archive of SID
www.SID.ir

در ۶۷ درصد بیماران مورد مطالعه، بیماری به صورت تک موردی دیده شد. موارد تکی، ناشی از جهش‌های جدید به صورت موزاییک در سلول‌های زایشی مادر هستند. در ضمن در تعدادی از خانواده‌ها نیز با وجود فامیلی بودن جهش (حضور چندین زن ناقل در خانواده) به طور تصادفی، بیماری از مادران ناقل به پسران منتقل نشده است و یا گاهی زنان ناقل فاقد فرزند پسر بودند. به منظور تعیین دقیق فامیلی بودن یا تک موردی بودن توارث بیماری نیاز به تعیین دوزاژ ژنی می‌باشد.

در برخی از مطالعات نشان داده شده است، احتمال به ارث رسیدن حذف‌های بخش ابتدایی ژن به صورت فامیلی بیشتر است، در حالی که اغلب جهش‌های ناحیه مرکزی به صورت انفرادی می‌باشند. در این مطالعه ۸۲ درصد حذف‌های انفرادی و ۷۸ درصد حذف‌های فامیلی در بخش مرکزی ژن بود (۳).

در این مطالعه جهت تشخیص ناقلین، از آنالیز پیوستگی مارکرهای STR استفاده شد (شکل ۲). در این تکنیک با استفاده از الگوی توارثی فرد بیمار، می‌توان توارث آلل بیماری‌زا را در سایر اعضای خانواده پیش‌بینی کرد. مارکرهای میکروساتلیت دارای طول‌های متفاوتی هستند و با استفاده از PCR به راحتی قابل بررسی‌اند. ولی دارای محدودیت‌هایی هم‌چون: احتمال وقوع نوترکیبی، وقوع جهش‌های جدید و در دسترس نبودن همه اعضای خانواده (۳). در این مطالعه STR-49 دارای بیشترین هتروزیگوسیتی بود. این هتروزیگوسیتی بالا در برخی جوامع دیگر نیز مشاهده شده است (۸، ۲۲).

نوترکیبی درون ژنی با فراوانی ۱۲-۱۰ درصد در ژن دیستروفین گزارش شده که ۴ برابر فراوانی مورد انتظار برای ژنی با این اندازه می‌باشد (۳، ۲۳). جهت غلبه بر این مساله، هشت STR در نقاط مختلف ژن یعنی ابتدا، بخش مرکزی و انتهای ژن انتخاب شده و برای خانواده‌های مورد مطالعه بررسی شد. جهت حذف محدودیت دوم (وقوع جهش‌های جدید) تشخیص ناقلین با استفاده از مارکرهای STR، در خانواده‌هایی انجام شد که دارای بیش از یک فرد بیمار بودند (توارث خانوادگی). البته بازهم نیاز به تعیین نوع جهش می‌باشد به خصوص در بیماران دیستروفی عضلانی بکر که دارای فنوتیپ ملایم هستند و ممکن است با برخی بیماری‌های دیگر از نظر علایم بالینی هم‌پوشانی داشته باشد. تشخیص دقیق بیماری مستلزم انجام ایمنوهیستوشیمی یا وسترن بلات پروتئین دیستروفین بر روی نمونه ماهیچه است (۳).

شناسایی حذف در بیماران مبتلا به DMD نه تنها تایید کننده تشخیص بیماری می‌باشد بلکه جهت شناسایی صحیح ناقلین در خانواده‌های دارای افراد بیمار کاربرد دارد. راه دیگرجهت تشخیص ناقلین تعیین دوزاژ ژنی می‌باشد. تعیین دوزاژ ژنی از طریق ساترن بلات یا PCR کمی امکان‌پذیر می‌باشد. تعیین دوزاژ ژنی مشکلات تشخیصی ناشی از عدم دسترسی به اعضای خانواده، موتاسیون‌های جدید و عدم گویایی مارکرهای STR را مرتفع می‌سازد زیرا زنان ناقل فاقد علامت بالینی بوده و میزان کراتین کیناز در آنها ۵۰ تا ۶۰ درصد افزایش می‌یابد. اگر در نتیجه تعیین دوزاژژنی مادری فاقد حذف باشد ولی دارای فرزند بیمار باشد، همچنان دارای ریسک ناقل بودن می‌باشد (به علت موزائیسم در سلول‌های ژرمینال). افرادی که دارای موزاییسم ژرمینال و فاقد جهش در سلول‌های سوماتیک هستند جهش در بیش از یک فرزند قابل انتقال است. تمام دختران زنانی که دارای موزاییسم در سلول‌های ژرمینال هستند نیاز به مشاوره و تشخیص ناقلین دارند. مادرانی که دارای فرزند مبتلا به DMD به صورت تک موردی هستند، اگر جهش در سلول‌های سوماتیک آنها نباشد ۲۰ درصد احتمال دارد که فرزند پسر بعدی آنها مبتلا باشد (۳).

نتیجه‌گیری

در نهایت شناسایی و تعیین طیف موتاسیون‌های ژن دیستروفین منجر به بهبود تست‌های تشخیصی بالینی BMD و DMD می‌شود. امروزه بهترین روش درمانی، مراقبت و جلوگیری از پیشرفت بیماری، پیشگیری از تولد نوزادان مبتلا به بیماری از طریق تشخیص قبل از تولد و شناسایی ناقلین می‌باشد.

تقدیر و تشکر

با تشکر از خانواده‌های بیماران مبتلا به دیستروفی، انجمن حمایت از بیماران دیستروفی و آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران که موجبات تحقق این پژوهش را فراهم نمودند.

References

1. Emery AE. Clinical and molecular studies in Duchenne muscular dystrophy. Prog Clin Biol Res. 1989; 306: 15-28.
2. Moser H. Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention.Hum Genet. 1984; 66(1): 17-40.
3. Prior TW, Bridgeman SJ. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. J Mol Diagn. 2005; 7: 317-326.
4. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein.Cell. 1988 ; 53: 219-228.
5. Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell. 1987; 51: 919-928.
6. Florentin L, Mavrou A, Kekou K, Metaxotou C. Deletion patterns of Duchenne and Becker muscular dystrophies in Greece. J Med Genet. 1995; 32: 48-51.
7. Buzin CH, Feng J, Yan J, Scaringe W, Liu Q, den Dunnen J, et al. Mutation rates in the dystrophin gene: a hotspot of mutation at a CpG dinucleotide. Hum Mutat. 2005; 25: 177-188.
8. Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, Gibbs RA, Andrade M, Chakraborty R, et al. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. Am J Hum Genet. 1991; 49: 951-960.
9. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988; 16: 12-15.
10. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Hum Genet. 1990; 86(1): 45-48.
11. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne

Archive of SID
www.SID.ir

muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Res. 1988; 16: 11141-11156.
12. Zeinali S , Karimipour M , Maryami F , Najmabadi H , Edalat R , Hayat No Saeed M. Carrier detection of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) in females using real time PCR. Yakhteh. 2007; 9: 45-50.
13. Wang X, Wang Z, Yan M, Huang S, Chen TJ, Zhong N. Similarity of DMD gene deletion and duplication in the Chinese patients compared to global populations. Behav Brain Funct. 2008; 4: 20.
14. Haider MZ, Bastaki L, Habib Y, Moosa A. Screening 25 dystrophin gene exons for deletions in Arab children with Duchenne muscular dystrophy. Hum Hered. 1998; 48: 61-66.
15. Herczegfalvi A, Tóth G, Gyürüs P, Morava E, Endreffy E, Fodor F, et al. Deletion patterns of dystrophin gene in Hungarian patients with Duchenne/Becker muscular dystrophies. Neuromuscul Disord. 1999; 9: 552-554.
16. Shomrat R, Gluck E, Legum C, Shiloh Y .Relatively low proportion of dystrophin gene deletions in Israeli Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Am J Med Genet. 1994; 49: 369-673.
17. Kitoh Y, Matsuo M, Nishio H, Takumi T, Nakajima T, Masumura T, et al. Amplification of ten deletion-rich exons of the dystrophin gene by polymerase chain reaction shows deletions in 36 of 90 Japanese families with Duchenne muscular dystrophy. Am J Med Genet. 1992; 42: 453-457.
18. Lai PS, Tay JS, Low PS, Lee WL, Koh GA, Gan GC. Deletion analysis of DMD/BMD children in Singapore using multiplex polymerase chain reaction (PCR) technique. J Trop Pediatr. 1992; 38: 224-227.
19. Dinçer P, Topaloğlu H, Ayter S, Ozgüç M, Taşdemir HA, Renda Y. Molecular deletion patterns in Turkish Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Brain Dev. 1996; 18: 91-94.
20. Hassan MJ, Mahmood S, Ali G, Bibi N, Waheed I, Rafiq MA, Ansar M, Ahmad W, et al. Intragenic deletions in the dystrophin gene in 211 Pakistani Duchenne muscular dystrophy patients. Pediatr Int. 2008; 50: 162-166.
21. Jabbarpour Bonyadi M, Barzgar M, Ayremlo H, Khandagi R, Esmaiili M. Screening and genetic diagnosis of Duchenne-Becker muscular dystrophy in East Azaribaijan by multiplex-PCR. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services. 2006; 28(1):33-39.
22. Shiroshita Y, Katayama S. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy in the Japanese population by fluorescent CA repeat polymorphisms analysis. J Obstet Gynaecol Res. 1997; 23(5): 453-461.
23. Abbs S, Roberts RG, Mathew CG, Bentley DR, Bobrow M. Accurate assessment of intragenic recombination frequency within the Duchenne muscular dystrophy gene. Genomics. 1990; 7: 602-606.
24. Simard LR, Gingras F, Delvoye N, Vanasse M, Melançon SB, Labuda D. Deletions in the dystrophin gene: analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophy patients in Quebec. Hum Genet. 1992; 89: 419-424.
25. Coral-Vazquez R, Arenas D, Cisneros B, Peñaloza L, Salamanca F, Kofman S, et al. Pattern of deletions of the dystrophin gene in Mexican Duchenne/Becker muscular dystrophy patients: the use of new designed primers for the analysis of the major deletion "hot spot" region. Am J Med Genet. 1997; 70: 240-246.
26. Sbiti A, El Kerch F, Sefiani A. Analysis of dystrophin gene deletions by multiplex PCR in moroccan patients. J Biomed Biotechnol. 2002;2:158-160.
27. Gökgöz N, Kuseyri F, Topaloğlu H, Yüksel-Apak M, Kirdar B. Screening of deletions and RFLP analysis in Turkish DMD/BMD families by PCR. Clin Genet. 1993;43:261-266.
28. Mutirangura A, Jongpiputvanich S, Norapucsunton T, Theamboonlers A, Srivuthana S, Promchainant C, Tumwasorn ,et al. Multiplex PCR to detect the dystrophin gene deletion in Thai patients. J Med Assoc Thai. 1995; 78: 460-465.

Archive of SID

www.SID.ir