مجلهی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دورهی ۱۵، شمارهی ۵۹ ، تابستان ۱۳۸۶، صفحات ٦٥ تا ٧٦

تشخیص مولکولی ناقلین بیماری دیستروفی عضلانی دوشن در خانوادههای مشکوک، با استفاده از نشانگرهای ریزماهوارهای

نرگس زینالزاده نیق*، دکتر مرتضی جبارپور بنیادی**، دکتر محمد برزگر***
نویسندهی مسئول: تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکدهی علومطبیعی، آزمایشگاه ژنتیک jabbarpour@tabrizu.ac.ir

دریافت: ۸۵/۱۱/۱۴ پذیرش: ۸۶/۷/۲

چکیده

زمینه و هدف: *بیماری دیستروفی عضلانی دوشن از اختلالات ماهیچهای- عصبی است که به ضعف و تحلیل پیشروندهی عضلات اسکلتی در مبتلایان منتهی میگردد. این بیماری ناشی از جهش در ژن دیستروفین بوده که جایگاه آن بر روی کروموزوم X است. الگوی توارث این بیماری به صورت مغلوب وابسته به جنس بوده و فراوانی آن یک در ۳۵۰۰ تولد زندهی پسر گزارش شده است. از آنجا که هنوز درمان مؤثری برای این بیماری شناخته نشده است، تعیین افراد مؤنث ناقل جهت انجام مشاورهی ژنتیکی و تشخیص پیش از تولد، ضروری میباشد.*

روش بررسی: *چهارده خانوادهی مبتلا توسط متخصصین مغز و اعصاب به آزمایشگاه ژنتیک تبریز معرفی و DNA آنها برای بررسیهای بعدی استخراج گردید. با استفاده از هفت ریزماهوارهی درون و اطراف ژن دیستروفین، تکتک اعضای این خانوادهها با تکنیک تعقیب ژنی مورد بررسی قرارگرفتند.*

یافتهها: *در مجموع ۳۷ فرد مؤنث با خطر ناقل بودن و ۷ فرد مؤنث ناقل اجباری مورد مطالعه قرارگرفتند و در نهایت وضعیت ۲۷ فرد مؤنث (۷۲/۹۷ درصد) از نظر ناقل بودن یا سالم بودن مشخص شد.*

نتیجهگیری: *در خانوادههایی که با استفاده از روشهای کلینیکی و پاراکلینیکی به عنوان دیستروفی عضلانی دوشن تشخیص داده شدهاند، تکنیک تعقیب ژنی یک تکنیک قابلاعتماد و کمهزینه برای تعیین وضعیت افراد مؤنث از نظر ناقل بودن با احتمال ۹۵ تا ۱۰۰درصد میباشد.*

واژگان کلیدی: دیستروفی عضلانی دوشن، تشخیص ناقلین، نشانگرهای ریزماهوارهای

مقدمه

دیستروفی عضلانی دوشن [Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)] با نرخ شیوع یک در ۳۵۰۰ تولد زندهی پسر یکی از شایعترین و پیشرونده‌ترین نقص‌های عصبی- عضلانی دوران کودکی است که موجب فوت بیمار تا سنین ۲۰ سالگی میگردد. این نوع دیستروفی عضلانی دارای الگوی وراثتی مغلوب وابسته به ایکس بوده و در اثر جهش در ژن دیستروفین که جایگاه آن بازوی کوتاه کروموزوم ایکس (Xp21.2)

*دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشکدهی علومطبیعی، دانشگاه تبریز
**دکترای تخصصی ژنتیک پزشکی ملکولی، دانشیار دانشگاه تبریز و مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
***فوق تخصص اعصاب کودکان، استاد دانشگاه علوم پزشکی تبریز

Archive of SID
www.SID.ir

می‌باشد، عارض می‌شود (۱). پروتئین دیستروفین که از این ژن کد می‌شود، جزو پروتئین‌های اسکلت سلولی در سلول‌های ماهیچه‌ای می‌باشد (۲).

در ۶۵ درصد از مبتلایان به دیستروفی عضلانی دوشن، حذف‌شدگی در یک یا چند اگزون از ژن دیستروفین مشاهده می‌شود، در ۳۰ درصد از مبتلایان، جهش نقطه‌ای و در ۵ درصد از آن‌ها دوبرابرشدگی، گزارش شده است (۳). تشخیص جهش‌های نقطه‌ای و دوبرابرشدگی‌های ژن دیستروفین بسیار پرهزینه و زمانبر است، اما با کاربرد یک روش مولکولی به نام PCR چندگانه (Multiplex PCR) می‌توان ۹۸ درصد از حذف‌شدگی‌های اگزونی این ژن را در مبتلایان تشخیص داد (۶-۴).

تقریبا یک سوم از کل مبتلایان به دیستروفی عضلانی دوشن در اثر جهش جدید (*de novo* mutation) عارض شده و سابقه‌ی فامیلی از بیماری مشاهده نمی‌گردد، در دوسوم بقیه، جهش از نوع ارثی با سابقه‌ی فامیلی می‌باشد (۷). با توجه به این که حتی در صورت تشخیص، هنوز درمان مؤثری برای این بیماری وجود ندارد، بهترین راهکاری که امروزه ژنتیک پزشکی ارایه می‌دهد، مشاوره‌ی ژنتیکی و تشخیص پیش از تولد جنین‌های مذکر و در صورت نیاز سقط‌درمانی است و برای رسیدن به این هدف بایستی وضعیت اعضای مؤنث خانواده‌های مبتلا از نظر ناقل بودن مشخص گردد (۸).

با توجه به این‌که اکثریت (۹۰ درصد) (۹) افراد مؤنث ناقل بیماری دیستروفی عضلانی دوشن فاقد علایم بالینی می‌باشند، برای تشخیص آن‌ها، در کنار روش‌های بیوشیمیایی نظیر تست کراتین‌کیناز سرمی و روش‌های هیستولوژیکی (۱۱-۱۰)، روش‌های مولکولی خاصی نیز ارایه شده است که هرکدام دارای مزایا و معایبی می‌باشند (۱۷-۱۲). تعقیب ژنی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای یکی از روش‌های مولکولی بوده که در این تکنیک، امکان تعقیب ژن بیماری‌زا در خانواده‌های مبتلا وجود دارد (۲۱-۱۸). در مطالعه‌ی حاضر هفت توالی کوتاه تکرارشونده (ریزماهواره) از درون و اطراف ژن دیستروفین (۲۲) جهت بررسی هاپلوتیپ (آلل‌های نشانگرهای موردنظر در روی کروموزوم هر فرد را که به ترتیب چیده شده‌اند، هاپلوتیپ آن فرد گویند) خویشاوندان فرد مبتلا و تعیین وضعیت اعضای مؤنث در خانواده‌هایی که مشکوک به بیماری دیستروفی عضلانی دوشن بودند، مورد استفاده قرار گرفته است.

روش بررسی

این مطالعه از نوع بنیادی کاربردی بوده و از تابستان ۸۳ تا بهار ۸۵ در آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه تبریز انجام پذیرفت.

بیماران و خانواده‌های مبتلا: با توجه به این که استفاده از روش مولکولی نمی‌تواند تمام جهش‌های ژن دیستروفین را در مبتلایان به دیستروفی عضلانی دوشن مشخص کند، از میان خانواده‌هایی که توسط متخصصین مغز و اعصاب برای انجام مطالعات مولکولی به مرکز ژنتیک معرفی شده بودند، در مبتلایان این چهارده خانواده حذف‌شدگی اگزونی در ژن دیستروفین مشخص نگردید. این خانواده‌ها با اعتماد به تشخیص کلینیکی متخصصان، برای مطالعه‌ی حاضر انتخاب شدند. سه خانواده از میان چهارده خانواده به دلیلی که در بحث به آن اشاره خواهد شد، از مطالعه کنار گذاشته شدند و از میان ۱۱ خانواده‌ی باقی‌مانده درکل ۸۶ نفر، شامل مبتلایان (۱۴ نفر)، افراد مؤنث ناقل اجباری (۷ نفر)، افراد مذکر سالم (۲۸ نفر) و افراد مؤنث با ریسک احتمالی ناقل بودن (۳۷ نفر) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای چندشکل مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA از خون: خون‌گیری از افراد ارجاع داده شده، بعد از کسب رضایت کتبی از تمامی اعضای خانواده، به منظور استخراج DNA انجام پذیرفت. برای استخراج DNA از روش فنل- کلروفرم اصلاح شده (۲۳) استفاده گردید.

تکثیر ریزماهواره‌ها و انجام الکتروفورز:

Archive of SID

www.SID.ir

تکثیر ریزماهواره‌ها با استفاده از تکنیک (Simple Sequence Repeat-PCR [SSR-PCR]) انجام شد. ریزماهواره‌ها از درون توالی بالادست و توالی پایین‌دست ژن دیستروفین انتخاب و توالی‌های آغازگر مناسب آن‌ها، جهت سنتز سفارش داده شدند (جدول ۱).

جدول ۱: نام ریزماهواره‌های مورد استفاده به همراه جایگاه ژنی و توالی آغازگرهای آن‌ها

نام نشان‌گر	توالی آغازگر (F 5'→3')	توالی آغازگر (R 5'→3')	مکان نشان‌گر
AFM338xa5	**GGGTGAAATTCCATCACAAA**	**ACAAATGCAGATGTACAAAAAATA**	**Xp21.1**
STR-44A	**TCCAACATTGGAAATCACATTTCAA**	**TCATCACAAATAGATGTTTCACAG**	**intron 44**
STR-45	**GAGGCTATAATTCTTTAACTTTGGC**	**CTCTTTCCCTCTTTATTCATGTTAC**	**intron 45**
AFM217xa5	**TGGCTTTATTTTAAGAGGAC**	**GTTTTCAGTTTCCTGGGT**	**Intron 48**
STR-49	**CGTTTACCAGCTCAAAATCTCAAC**	**CATATGATACGATTCGTGTTTTGC**	**Intron 49**
STR-50	**AAGGTTCCTCCAGTAACAGATTTGG**	**TATGCTACATAGTATGTCCTCAGAC**	**Intron 50**
AFM135xe7	**AGAAGATAGATATACCCACTCACC**	**ACATAAGAAATAAAATGGCTGC**	**Xp22**

F: forward
R: reverse

برای انجام PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ با غلظت نهایی ۱/۵ میلی‌مولار، بافر PCR (۱۰X : KCl ۵۰۰ میلی‌مولار، Tris-HCl ۲۰۰ میلی‌مولار، pH = ۸/۴) با غلظت نهایی ۱X، آنزیم Taq پلیمراز یک واحد (سیناژن) و dNTPs با غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌مولار استفاده گردید.

چرخه‌های PCR به این ترتیب بود: ۵ دقیقه ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای یک سیکل، ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه که این ۴ مرحله به تعداد ۳۵ سیکل تکرار گردید. مرحله‌ی آخر شامل ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصولات PCR به منظور بررسی چندشکلی بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید غیردناتوره‌کننده ۱۲ درصد به ابعاد ۲۰ ×۴۰ سانتی‌متر الکتروفورز و سپس با روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند (۲۴). در شرایطی که یکی از نشان‌گرها برای مادر خانواده‌ای قابل بررسی بود و در آن خانواده چندشکلی نشان می‌داد، بقیه‌ی اعضای خانواده نیز جهت مطالعه وضعیت ناقلین توسط آن نشان‌گر مورد بررسی قرارگرفتند.

برآورد احتمال ناقل بودن افراد مؤنث: مقایسه‌ی هاپلوتیپ افراد مؤنث خانواده‌های مبتلا با هاپلوتیپ اعضا یا عضو مبتلای خانواده، اساس تعیین ناقلین و نیز برآورد احتمال ناقل بودن آن‌هاست.

در خانواده‌های دارای بیش از یک فرد مبتلا (دارای سابقه‌ی فامیلی بیماری)، در صورت انتقال هاپلوتیپ پیوسته به ژن جهش‌یافته به یک فرد مؤنث، احتمال ناقل بودن آن فرد ۹۵ تا ۱۰۰ درصد خواهد بود و در صورت انتقال هاپلوتیپ غیرپیوسته به ژن جهش‌یافته، احتمال ناقل بودن افراد مؤنث کم‌تر و حدود ۵ درصد برآورد می‌شود. در خانواده‌هایی که سابقه‌ی پیشین بیماری در آن‌ها وجود ندارد، نتایج به دست آمده از بررسی نشان‌گرها تنها برای آن عده‌ای از افراد مؤنث که هاپلوتیپی متفاوت از هاپلوتیپ فرد مبتلا را نشان می‌دهند، قابل اعتماد خواهد بود. چنین افرادی با احتمال ۹۵ تا ۱۰۰ درصد فاقد آلل جهش‌یافته از ژن مذکور می‌باشند. در چنین خانواده‌هایی اگر هاپلوتیپ فرد مبتلا در خویشاوندان مؤنث نیز مشاهده گردد، امکان قضاوت در خصوص ناقل بودن آن‌ها وجود ندارد، چون در این خانواده‌ها ناقل بودن مادر مسجل نشده و این امکان وجود دارد که آلل جهش‌یافته در مادر سالم

Archive of SID

www.SID.ir

بوده و تنها هنگام انتقال بـه نـسل بعـدی، در گامـت مـادری، متحمل جهش گردیده یا مادر حالت موزاییکی برای جهش در ژن دیـستروفین داشـته باشـد. از آن‌جـا کـه احتمـال رخـداد نـوترکیبی بـین دو انتهـای ژن دیـستروفین حـدود ۱۰ درصـد برآورد شده است (۲۵) مقدار حداکثر نرخ نـوترکیبی مـا بـین محل یک نشان‌گر در اینتـرون‌هـای اواسـط ژن و یـک محـل فرضی جهش ژنی حدود ۵ درصد خواهد بود. بنـابراین بـا در نظرگـرفتن احتمـال نـوترکیبی، وقتـی نـشان‌گرهـای منطقـه‌ی مرکزی و نشان‌گرهای '۵ ژن دیستروفین برای تشخیص ناقلین مورد استفاده قرار می‌گیرند، احتمال درسـتی نـتایج بـه دسـت آمده، ۹۵ درصد برآورد می‌شود و اگر نشان‌گرهـای منطقـه '۳ ژن نیز به مجموع نشان‌گرهای مورد بررسی اضافه شوند، ایـن احتمال به بیش از ۹۵ درصد افزایش می‌یابد.

یافته‌ها

تعیین وضعیت افراد مؤنث دارای خطر ناقل بـودن: پـنج خانواده از یازده خانواده‌ی مورد مطالعه دارای سابقه‌ی فـامیلی و شـش خـانواده فاقـد سـابقه‌ی فـامیلی بیمـاری بودنـد. در مجموع، ۳۷ فرد مؤنث با خطر ناقل بودن و هفت فـرد مؤنـث ناقل اجباری، از این خانواده‌ها مورد مطالعه قرارگرفتند کـه در پایان وضعیت ۲۷ فرد مؤنث (۷۲/۹۷ درصـد) بـا خطـر ناقـل بودن مشخص گردید و وضـعیت ۱۰ فـرد مؤنـث نامـشخص باقی‌ماند. هر پنج مادر مربوط به خـانواده‌هـای دارای سـابقه‌ی فامیلی، ناقل اجباری محسوب می‌شدند و از آن‌جا کـه تعیـین وضعیت مادر در خانواده‌های بـدون سـابقه‌ی فـامیلی از نظـر ناقل بودن یا نبودن به تعیین وضعیت سایر افراد مؤنث خانواده کمک می‌کند، در ابتدا می‌بایست مـادران شـش خـانواده فاقـد سابقه‌ی فامیلی مورد بررسی قرار می‌گرفتند. در چهار مـادر از چهار خانواده‌ی بدون سابقه‌ی فامیلی، به دلیل ویژگـی جهـش جدید وضعیت ناقل بودن مادر مشخص نشد و دو مـادر از دو خانواده بدون سابقه‌ی فامیلی نیز به دلیـل داشـتن یـک فرزنـد سالم و یک فرزند مبتلا با هاپلوتیـپ مـشابه، سـالم تـشخیص داده شدند. البته با توجه به این که نرخ موزاییسم گزارش شده در خانواده‌های مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن حـدود ۱۵ درصد می‌باشد (۲۶) احتمال موزاییسم سلول‌های جنسی مادر را در این موارد نمی‌توان نادیده گرفت. از میان ۳۱ فرد مؤنـث باقی‌مانـده وضـعیت ۲۸ فـرد در جـدول ۲ آورده شـده اسـت (جدول ۲).

جدول ۲: تعیین وضعیت افراد مؤنث دارای خطر ناقل بودن در خانواده‌های مبتلا

وضعیت فرد	هاپلوتیپ فرد مؤنث	احتمال	تعداد و نوع خانواده‌ها	تعداد افراد مؤنث
سالم[۱]	هاپلوتیپ متفاوت از هاپلوتیپ مبتلا	۹۵ الی ۱۰۰ درصد	۳/S*	۳
سالم[۱]	هاپلوتیپ متفاوت از هاپلوتیپ مبتلا	۹۵ الی ۱۰۰ درصد	۳/F**	۱۲
ناقل[۲]	هاپلوتیپ مشابه هاپلوتیپ مبتلا	۹۵ الی ۱۰۰ درصد	۴/F	۸
نامشخص[۳]	هاپلوتیپ مشابه هاپلوتیپ مبتلا	–	۲/S	۴
نامشخص[۳]	ترکیبی از هر دو هاپلوتیپ	–	۱/F	۱

* خانواده‌های بدون سابقه‌ی فامیلی (Sporadic)

** خانواده‌های دارای سابقه‌ی فامیلی (Familial)

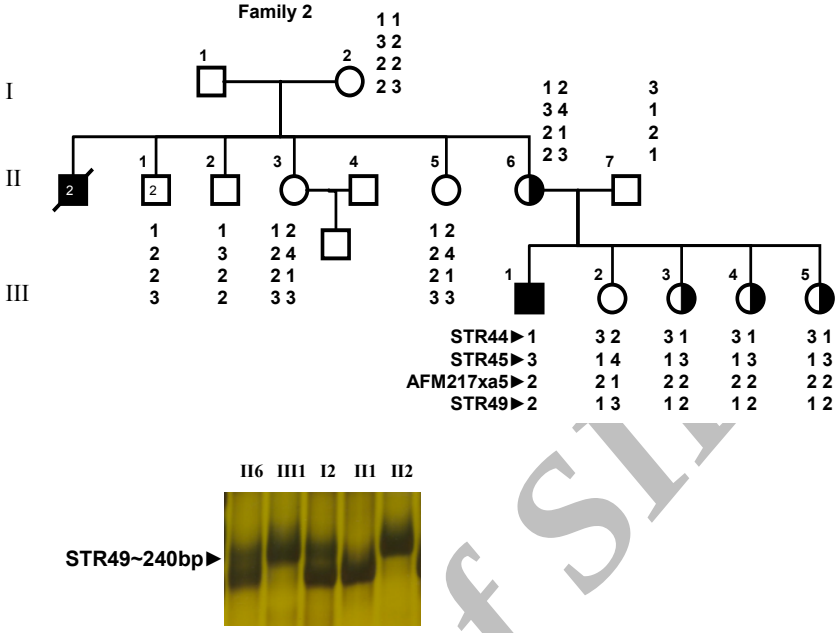
۱- چنین افراد مؤنثی به دلیل این که هاپلوتیپ منتقل شده به آن‌ها متفاوت از هاپلوتیپ فرد مبتلاست، با احتمال ۹۵ تا ۱۰۰ درصد سالم تشخیص داده شدند.

۲- مشاهده هاپلوتیپ مشابه در مقایسه با هاپلوتیپ اعضای مذکر مبتلا، در این افراد مؤنث، احتمال ناقل بودن آن‌ها را به بیش از ۹۵ درصد افزایش داد.

۳- وضعیت افراد مؤنث از خانواده‌های بدون سابقه‌ی فامیلی که هاپلوتیپی مشابه هاپلوتیپ فرد مبتلا داشتند و نیز افرادی که به دلیل وقوع نوترکیبی، ترکیبی از هر دو هاپلوتیپ مادری را دریافت کردند، نامشخص باقی‌ماند.

Archive of SID
www.SID.ir

وضعیت سه فرد مؤنث باقی‌مانده نیز به ترتیب زیر می‌باشد: در مورد مادربزرگ یکی از خانواده‌های دارای سابقه‌ی فامیلی احتمال وضعیت موزاییسم گنادی داده شد که در ادامه به آن اشاره می‌شود (شکل ۱).



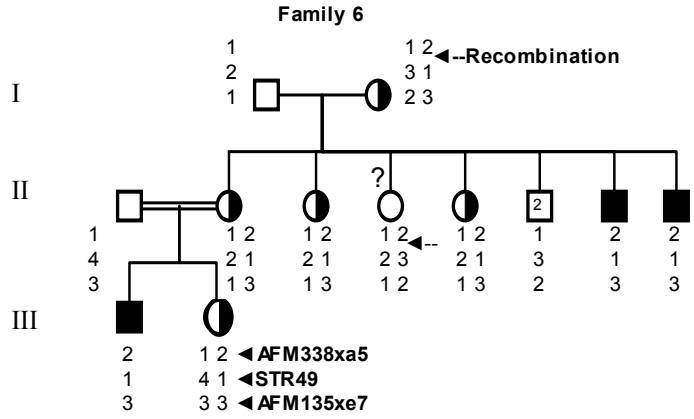
شکل ۱: شجره‌نامه و هاپلوتیپ‌های خانواده‌ی ۲ به همراه تصویر ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد از نشانگر STR49. مادر (II6) ناقل اجباری است. سه تن از خواهران (III3، III4 و III5) به دلیل دریافت هاپلوتیپ پیوسته به آلل بیماری‌زا ناقل تشخیص داده شدند و خواهر دیگر (III2) به دلیل دریافت هاپلوتیپی متفاوت از هاپلوتیپ فرد مبتلا سالم تشخیص داده شد. در مادربزرگ (I2) به دلیل انتقال هاپلوتیپ پیوسته به بیماری به دایی سالم (II2)، احتمال موزاییسم گنادی داده شد.

تعیین وضعیت خواهر یکی از مبتلایان که در اثر وقوع نوترکیبی، ترکیبی از هر دو هاپلوتیپ مادری را دریافت کرده بود، کاملا منوط به تعیین وضعیت مادر خانواده بود. مادر خانواده به دلیل انتقال هاپلوتیپ مشابه به هر دو فرزند سالم و مبتلا، سالم تشخیص داده شده بود اما احتمال موزاییسم جنسی مادر را نمی‌توان کاملا رد نمود. یکی از خانواده‌های بدون سابقه‌ی فامیلی دارای یک فرزند مذکر مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن و نیز یک فرزند مؤنث مبتلا به بیماری مشابه دیستروفی عضلانی دوشن بود. وضعیت این فرد مؤنث که ترکیبی از هر دو هاپلوتیپ مادری را دریافت کرده بود، نامشخص باقی‌ماند.

وقوع نوترکیبی: با بررسی ریزماهواره‌ها، وقوع چهار نوترکیبی در چهار خانواده از میان خانواده‌های مورد مطالعه مشخص گردید (شکل ۲).

یک مورد از این نوترکیبی‌ها در منطقه‌ی مرکزی ژن دیستروفین، دو مورد بین منطقه مرکزی و انتهای '۳ و یک مورد هم بین منطقه‌ی مرکزی و انتهای '۵ رخ داده بود (جدول ۳).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲: شجره‌نامه و هاپلوتیپ‌های خانواده‌ی ۶. مادر (II2) و مادربزرگ (I2) ناقل اجباری هستند. خواهر (III2) و دو تن از عمه‌ها (II3 و II5) به دلیل دریافت هاپلوتیپ پیوسته به آلل بیماری‌زا، ناقل تشخیص داده شدند. یکی از عمه‌ها (II4) ترکیبی از هر دو هاپلوتیپ مادری را دریافت کرده بود و به دلیل مشخص نبودن جایگاه جهش ژنی نسبت به جایگاه نوترکیبی وضعیت او نامشخص باقی‌ماند.

جدول ۳: اطلاعات مربوط به رخداد نوترکیبی درخانواده‌های مورد بررسی

شماره‌ی خانواده	نوترکیبی بین STR ها	نسبت فرد با مبتلا	تعیین وضعیت فرد حامل نوترکیبی
۴	STR44-STR49	خواهر	سالم
۵	STR50- AFM135xe7	*خواهر	نامشخص
۶	AFM338xa5-STR49	خواهر و عمه مبتلایان	نامشخص
۱۰	AFM135xe7-STR50	دختر خاله مبتلا	سالم

** این فرد مؤنث خود به بیماری مشابه دیستروفی عضلانی دوشن مبتلاست.*

احتمال وضعیت موزاییسم گنادی: بررسی و آنالیز ریزماهواره‌ها در دو خانواده نشان‌دهنده‌ی احتمال وضعیت موزاییسم گنادی بود. در هر دو خانواده سابقه‌ی فامیلی بیماری وجود داشت.

در خانواده‌ی اول (خانواده‌ی شماره‌ی۹) بررسی ریزماهواره‌ها نشان‌گر وضعیت موزاییسم گنادی در پدربزرگ بود. در این خانواده هاپلوتیپ مشابهی در هر دو نوه‌ی سالم و مبتلای آن پدربزرگ مشاهده گردید. در خانواده‌ی دوم (شکل۱) نیز بررسی ریزماهواره‌ها بیان‌گر وضعیت موزاییسم گنادی مادربزرگ بود. در این خانواده هاپلوتیپ یکسانی در یکی از فرزندان پسر سالم و نوه‌ی پسر مبتلا مشاهده گردید. البته با توجه به این‌که ریزماهواره‌های ابتدای '۵ و انتهای '۳ ژن، در این خانواده چندشکل نبودند و هاپلوتیپ این خانواده تنها از ریزماهواره‌های مرکزی ژن دیستروفین تشکیل شده بود، احتمال ناقل بودن مادربزرگ در صورت رخداد نوترکیبی در فرزند سالم، وجود داشت.

بحث

اهمیت روش تعقیب ژنی در تشخیص ناقلین: روش‌های متعددی برای تشخیص ناقلین وجود دارد (۱۷-۱۲)، اما نوع

Archive of SID
www.SID.ir

روشی که برای شناسایی افراد مؤنث ناقل بـه کـار مـی‌رود بـه وضعیت افراد مذکر مبتلای خانواده بستگی دارد. به این معنـی که اگر محل جهش ژنی در فرد یـا افـراد مبـتلای خـانواده‌ای شناسایی شده باشد، در مورد افراد مؤنث آن خانواده تنها کافی است ناقل بودن برای آن جهش خاص مورد بررسی قرار گیرد (۲۷). اما اگر جهش در فرد مبتلا یا مبتلایـان شناسـایی نـشده باشد یا فرد مبتلا در دسترس نبوده و فوت کرده باشد، بهترین و سریع‌ترین راهکار برای تعیین وضـعیت افـراد مؤنـث روش تعقیب ژنی خواهد بود.

کـاربرد ریزمـاهواره‌هـا در تأییـد پیوسـتگی بیمـاری بـه ژن دیستروفین: با توجه به این کـه بیمـاری دیـستروفی عـضلانی دوشن از نظر علایم کلینیکی با برخـی بیمـاری‌هـای عـصبی- عضلانی دیگر نظیر تیپ سه بیماری آتروفی عضلانی- نخاعی (Spinal Muscular Atrophy [SMA]) همپوشـانی نشان می‌دهد (۲۸)، به نظر می‌رسـد کـه روش مولکـولی تنهـا روشی است که امکـان افتـراق دقیـق بـین ایـن بیمـاری‌هـای همپوشـان را فـراهم مـی‌سـازد. در مطالعـه‌ی حاضـر در سـه خانواده از میان ۱۴ خانواده‌ای کـه توسـط متخصـصین مغـز و اعصاب به عنوان دیـستروفی عـضلانی دوشـن معرفـی شـده بودند، با بررسی ریزماهواره‌ها در بین اعـضای سـالم و مبـتلا، عدم وجود پیوستگی بیماری با ژن دیستروفین به اثبات رسید. با استفاده از مطالعات مولکولی نیز هـیچ جهـش ژنـی در ایـن مبتلایان شناسایی نشد. با بررسـی‌هـای بیـشتر در یـک مـورد از این خانواده‌ها، بیماری از نـوع آتروفـی عـضلانی- نخـاعی تیپ سه تشخیص داده شد. وجود چنین مواردی، بـر اهمیـت تأیید نتایج کلینیکی با مطالعات جهش ژنـی و پیوسـتگی ژنـی (از طریق ریزماهواره‌ها) تأکید می‌کند.

کاربرد ریزماهواره‌ها در تشخیص ناقلین خانواده‌های مشکوک به دیستروفی عضلانی دوشن: یکی از برتری‌های تکنیک مورد استفاده در این مطالعه، امکان ردیابی ژن معیـوب، در مـواردی است که محل جهش ژنی در مبتلایان مشخص نشده است. در این مطالعه با استفاده از نشان‌گرهـا وضـعیت ۲۷ فـرد مؤنـث (۷۲/۹۷ درصد) از بین ۳۷ فـرد مؤنـث بـا خطـر ناقـل بـودن، مشخص شد. باچرتی و همکاران با اسـتفاده از ۲ ریزمـاهواره (۲۹)، چاتورودی و همکاران با استفاده از ۶ ریزمـاهواره (۳۰) و فریرو و همکاران با کاربرد ۱۱ ریزماهواره (۱۸) که تعـدادی از آن‌ها با ریزماهواره‌های مورد استفاده در این مطالعه مطابقت دارند، عمل تشخیص ناقلین را در خانواده‌های مشکوک انجام داده و نتایجی مشابه نتایج این مطالعه گزارش کـرده‌انـد. البتـه بایـد افـزود کـه درصـد موفقیـت در ایـن روش بـه تعـداد ریزماهواره‌های مورد استفاده و نرخ چندشکلی آن‌هـا بـستگی دارد، به طـوری‌کـه بـا کـاربرد ریزمـاهواره‌هـای بیـشتر و نیـز چندشکلتر می‌توان وضعیت تعداد بیـشتری از افـراد مؤنـث را تعیین کرد.

در تعدادی از خانواده‌ها نیز وضعیت افراد مؤنث از نظـر ناقـل بودن یا نبودن، بنا به یکی از دلایل زیر نامشخص باقی‌ماند:

۱- وقوع نوترکیبی

۲- عدم توانایی در تعیین وضعیت مادر، در مواردی که جهش ژنی مشخص نشده و بیماری فاقد سـابقه‌ی فـامیلی مـی‌باشـد (خانواده‌های ۹ و ۸، ۵، ۱).

۳- عدم توانایی در تعیین وضعیت افراد مؤنـث خـانواده‌هـای مورد قبلی که هاپلوتیپ مشابهی در مقایسه با هاپلوتیپ فرد یا افراد مبتلا به ارث برده‌اند.

ریزماهواره‌ها و نوترکیبی: در میان خانواده‌های مورد مطالعه، ۴ میوز از ۶۶ میوز، همراه با وقوع نـوترکیبی بودنـد. بنـابراین در مطالعه‌ی حاضر نرخ نوترکیبی در ژن دیستروفین حـدود ۶/۰۶ درصد برآورد می‌شود. در نتایجی کـه توسـط دیگـر محققـین گزارش شده، نرخ نوترکیبی ۶/۶ درصد (۱۸)،۱۰ درصـد (۲۵) و ۱۲ درصد (۳۱) برآورد شده است.

با توجه به اندازه‌ی ژن دیـستروفین (۲/۳ میلیـون جفـت بـاز) نرخ مورد انتظار برای نوترکیبی حدود ۲/۳ درصـد اسـت کـه تمام نتایج به دست آمده، مؤید بالا بودن نرخ نـوترکیبی در ژن

Archive of SID

www.SID.ir

دیستروفین در مقایسه با عدد مورد انتظار می‌باشد. بزرگی بیش از حد ژن دیستروفین دلیل بالا بودن نرخ نوترکیبی عنوان شده است (۳۲).

رخداد نوترکیبی می‌تواند تأثیر قابل‌توجهی در تفسیر هاپلوتیپ‌ها، جهت تعیین وضعیت ناقلین داشته باشد و تفسیر ناصحیح منتهی به تشخیص نادرست در خصوص وضعیت افراد مؤنث با خطر ناقل بودن خواهد شد. در مطالعه‌ی حاضر وقوع نوترکیبی در خانواده‌هایی که جایگاه جهش ژنی در آن‌ها ناشناخته باقی‌مانده بود، منجر به عدم تشخیص وضعیت یک فرد مؤنث گردید (شکل۲، فرد II4).

نتیجه‌گیری

بررسی نشان‌گرهای چندشکلی که در سرتاسر ژن دیستروفین پراکنده هستند علاوه بر مشخص کردن افراد مؤنث ناقل در خانواده‌هایی که ابتلای آن‌ها به بیماری دوشن با روش‌های مولکولی تأیید نشده است (با سابقه‌ی فامیلی و نیز بدون سابقه‌ی فامیلی بیماری) می‌تواند برای مشخص‌کردن وضعیت موزاییسم جنسی در زنان ناقل و نیز مردان ناقل جهش ژنی، برای تشخیص نوترکیبی‌های ژن دیستروفین و نیز تشخیص پیش از تولد با استفاده از مایع آمونیوتیک به کار رود و بنابراین یک تکنیک مولکولی بسیار عالی برای مطالعه‌ی خانواده‌های مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن، انجام مشاوره ژنتیکی و تشخیص پیش از تولد می‌باشد.

تشکر و قدردانی

مؤلفین از کلیه‌ی همکاران در دانشگاه‌های تبریز و علوم پزشکی تبریز که در این پروژه همکاری نموده‌اند، کمال تشکر را دارند. هم‌چنین از خانواده‌های مبتلا که مشارکت‌های لازم را در این پروژه داشتند، سپاسگزاری می‌نمایند. این پروژه تحت حمایت قطب علمی بررسی سیتومولکولی تنوع زیستی دانشگاه تبریز بوده است.

منابع

1- Emery AEH. The muscular dystrophies. *BMJ.* 1998; 317: 991-5.

2- Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.* 2002; 82(2): 291-329.

3- Koenig M, Beggs AH, Moyer M, et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet.* 1989; 45(4): 498-506.

4- 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): 45-8.

5- Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, et al. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 1991; 49(5): 951-60.

۶) جبارپور بنیادی مرتضی، برزگر محمد، آیرملو هرمز، خندقی رضا، اسماعیلی محسن. تشخیص و غربالگری بیماری دیستروفی عضلانی دوشن و بکر با استفاده از تکنیک PCR چندگانه در آذربایجان شرقی. مجله‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز ۱۳۸۵؛ دوره‌ی ۲۸، شماره‌ی ۱: صفحات ۳۹ – ۳۳.

Archive of SID
www.SID.ir

7- Barbujani G, Russo A, Danielli GA, et al. Segregation analysis of 1885 DMD families: significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Hum Genet.* 1990; 84: 522-6.

8- Nowak KJ, Davies KE. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO reports.* 2004; 5(9): 872-6.

9- Emery AEH. Duchenne muscular dystrophy. Oxford and NewYork: Oxford University Press; 1993, 25-45.

10- Moser H. Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum Genet*. 1984; 66: 17-40.

11- Miranda AF, Francke U, Bonilla E, et al. Dystrophin immunocytochemistry in muscle culture: detection of a carrier of duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet*. 1989; 32(2): 268-273.

12- Roberts RG, Barby TEM, Manners E, Bobrow M, Bentley DR. Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. *Am J Hum Genet.* 1991; 49(2): 298-310.

13- Hiraishi Y, Kato S, Ishibara T, Takano T. Quantitative Southern blot analysis in the dystrophin gene of Japanese patients with Duchenne or Becker muscular dystrophy: a high frequency of duplications. *J Med Genet*. 1992; 29(12): 897-901.

14- Abbs S, Bobrow M. Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the dystrophin gene. *J Med Genet*. 1992; 29(3): 191-6.

15-Yau SC, Bobrow M, Mathew CG, Abbs SJ. Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis. *J Med Genet*. 1996; 33(7): 550–8.

16- Armour JA, Sismani C, Patsalis PC, Cross G. Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(2): 605–9.

17- Bennett RR, Den Dunnen J, O'Brien KF, Darras BT, Kunkel LM. Detection of mutations in the dystrophin gene via automated DHPLC screening and sequencing. *BMC Genet.* 2001; 2: 17.

18- Ferreiro V, Giliberto F, Francipane L, Szijan I. The role of polymorphic short tandem (CA)n repeat loci segregation analysis in the detection of Duchenne muscular dystrophy carriers and prenatal diagnosis. *Mol Diagn.* 2005; 9(2): 67-80.

19- Delgado-Luengo WN, Borjas-Fuentes L, Zabala-Fernandez W, et al. Carrier detection of Duchenne/ Becker muscular dystrophy by analysis of STRs loci linked to the gene of dystrophin in Venezuelan families. *Invest Clin.* 2002; 43(4): 239-54.

Archive of SID

www.SID.ir

20- Giliberto F, Ferreiro V, Dalamón V, et al. Direct deletion analysis in two Duchenne muscular dystrophy symptomatic females using polymorphic dinucleotide (CA)n loci within the dystrophin gene. *JBMB.* 2003; 36(2): 179-84.

21- Hai-Yan Z, Ling-Qian W, De-Sheng L, Qian P, Jia-Hui X. Identify female carriers and *de novo* mutations in deletional Duchenne/Becker muscular dystrophy families. *Acta Genetica Sinica.* 2006; 33 (3): 206-212.

22- Den Dunnen Jt. Center for Human and Clinical Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden muscular dystrophy, 2006. Available from: URL*: http://www.dmd.nl/ca_dmd.html*.

23- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extraction of DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3): 1215.

24- Bassam BJ, Anolles GC, Gresshoff PA. Fast and sensetive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1991; 196: 80-830.

25- Nobile C, Galvagni F, Marchi J, Roberts R, Vitiellol L. Genomic organization of the human dystrophin gene across the major deletion hot spot and 3' region. *Genomics.* 1995; 28(1): 97-100.

26- Essen AJ, Mulder IM, van der Vlies P, et al. Detection of point mutation in dystrophin gene reveals somatic and germline mosaicism in the mother of a patient with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet A*. 2003; 118(3): 296-8.

27- Joncourt F, Neuhaus B, Jostarndt-Foegen K, Kleinle S, Steiner B, Gallati S. Rapid identification of female carriers of DMD/BMD by quantitative real-time PCR. *Hum Mutat.* 2004; 23 (4): 385-91.

28- Panigrahi I, Kesari A, Phadke SR, Mittal B. Clinical and molecular diagnosis of spinal muscular atrophy. *Neurol India*. 2002; 50: 117-22.

29- Bachrati CZ, Somodi Z, Endreffy E, Kalmar T, Rasko I. Carrier detection by microsatellite analysis of Duchenne/Becker muscular dystrophy in Hungarian families. *Ann Hum Genet*. 1998; 62: 511-20.

30- Chaturvedi LS, Srivastava S, Mukherjee M, et al. Carrier detection in non-deletional Duchenne/Becker muscular dystrophy families using polymorphic dinucleotide (CA) repeat loci of dystrophin gene. *Indian J Med Res*. 2001; 113: 19-25.

31- 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(4): 602- 6.

32- Mukherjee M, Chaturvedi LS, Srivastava S, Mittal RD, Mittal B. De novo mutations in sporadic deletional Duchenne muscular dystrophy (DMD) cases. *Exp Mol Med.* 2003; 35: 113-7.

Archive of SID

www.SID.ir

Detection of Suspected Duchenne muscular dystrophy Carriers by Microsatellite Markers Application.

Zeinalzadeh Niagh N, Jabbarpour Bonyadi M, Barzgar M

Corresponding Author's Address: Department of Genetic, Faculty of Natural Science, Tabriz University, Iran.

***Email*:** bonyadim@tbzmed.ac.ir

Background and Objective: Duchenne Muscular Dystrophy(DMD) is a neuromuscular disorder with progressive muscle wasting and weakness. This disease is the consequence of mutations in dystrophin gene located on X chromosome. Inheritance pattern of the disease is gene-dependent recessive with an incidence of one in 3500 alive male newborns. Due to the absence of efficient treatment, detection of female carriers is essential for genetic counselling and prenatal diagnosis.

Materials and Methods: 14 DMD families were referred to the genetic laboratory by specialists. DNA was extracted from the whole peripheral blood and analyzed by gene tracking technique. All members of the families were studied through 7 microsatellites located in and around dystrophin gene.

Results: 37 females at the risk of being DMD carriers and 7 obligate carriers were studied and ultimately 27 females (72.97 %) were identified as carriers or non-carriers.

Conclusion: In the families who were diagnosed as DMD patients by clinical and preclinical procedure's gene tracking is a reliable and less expensive technique for female carrier-status identification with a 95-100% confidence.

Key words*: *Duchenne muscular dystrophy, Carrier identification, Microsatellite markers

Archive of SID

www.SID.ir