

## استفاده از مارکرهای ژنتیکی جهت بررسی خانواده های مبتلا به بیماری ویلسون در استان های آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی

نگین عظیمی<sup>۱</sup>، دکتر مرتضی جبارپور بنیادی<sup>۲</sup>، دکتر محمد حسین صومی<sup>۳</sup>، دکتر ماندانا رفیعی<sup>۴</sup>، دکتر فیروز صارمی<sup>۵</sup>، دکتر رضا محمدیان<sup>۶</sup>، دکتر مهدی فرهودی<sup>۷</sup>، دکتر محمد برزگر<sup>۸</sup>

تاریخ دریافت 85/5/25 – تاریخ پذیرش 85/8/17

### چکیده

**پیش زمینه و هدف:** بیماری ویلسون یکی از بیماری های نادر ژنتیکی است که اورگان های مختلف بدن را درگیر می سازد. در این بیماری ژن ATP7B بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۳ متحمل جهش گردیده و این منجر به رسوب مس در سلول های کبدی می شود. در این مبتلایان به دلیل اختلال در عملکرد محصول پروتئین کد شده (ATPase P type) توسط ژن مربوطه، سطح سرمی مس پایین بوده و دفع ادراری آن افزایش می یابد. بررسی ژنتیکی خانواده های مبتلای معرفی شده به مرکز ژنتیک با استفاده از ریز ماهواره های پلی مورفیک پیوسته به ژن بیماری زا، جهت تشخیص اعضای مبتلای پره سمیتوماتیک، ناقل و یا سالم این خانواده ها هدف اصلی این طرح می باشد.

**مواد و روش ها:** خانواده های مورد مطالعه با حداقل یک عضو مبتلا به بیماری ویلسون توسط پزشکان متخصص به مرکز ژنتیک معرفی شدند. والدین این خانواده ها با استفاده از ریز ماهواره های پیوسته به ژن ویلسون با استفاده از تکنیک SSR-PCR بررسی شدند. ریز ماهواره یا ریز ماهواره هایی که برای والدین خانواده ای چند شکلی بودند انتخاب و این مارکرها ابتدا در فرد مبتلا بررسی شده، سپس آلل پیوسته بیماری زا در دیگر اعضای آن خانواده مورد تعقیب ژنتیکی قرار گرفت.

**نتایج:** بر اساس امکان دسترسی به تمامی اعضاء خانواده ها از بین ۲۸ خانواده معرفی شده، ۲۴ خانواده انتخاب گردیدند. ریز ماهواره های استفاده شده در این بررسی عبارت از D13S228, D13S296, D13S297, D13S298, D13S133, D13S301, D13S314, D13S315, D13S316 بودند. در ۵ تا از این خانواده ها امکان تعقیب ژنی با این مارکرها وجود نداشت. در ۱۹ خانواده باقی مانده بیشترین حالت چند شکلی به ترتیب در ریز ماهواره های D13S314 و D13S301 مشاهده گردید. در دوازده خانواده با استفاده از این دو مارکر به تشخیص رسیده و در هفت خانواده باقی مانده از سایر ریز ماهواره ها جهت تشخیص استفاده گردید.

**بحث و نتیجه گیری:** دو ریز ماهواره D13S301 و D13S314 در خانواده های مبتلای معرفی شده از استان های مورد بررسی، بیشترین کاربرد را جهت تشخیص ناقلین و مبتلایان فاقد علائم بالینی دارند. در بررسی خانواده های مبتلای دیگر، توصیه می گردد که در ابتدا همین مارکرها با توجه به اولویت آنها مورد بررسی و در صورت چند شکلی نبودن، از سایر ریز ماهواره ها جهت تعقیب ژن بیماری زا استفاده گردد.

**کل واژگان:** ریز ماهواره ها، ژن ATP7B، بیماری ویلسون، چند شکلی

مجله پزشکی ارومیه، سال هجدهم، شماره دوم، ص ۴۶۸-۴۶۱، تابستان ۱۳۸۶

**آدرس مکاتبه:** تبریز- گروه ژنتیک - دانشکده علوم طبیعی - دانشگاه تبریز- دکتر مرتضی جبارپور بنیادی - تلفن: (داخلی ۲۵) ۰۴۱۱-۳۳۶۳۲۳۴ فاکس:

۰۹۱۴۳۱۳۹۸۲۵ همراه: ۰۴۱۱-۳۳۶۳۲۳۱

Email: bonyadim@tbzmed.ac.ir

<sup>۱</sup> دانشجوی پزشکی دانشگاه آزاد تبریز - مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (ازمایشگاه ژنتیک)

<sup>۲</sup> استادیار ژنتیک - بخش ژنتیک - دانشکده علوم طبیعی - دانشگاه تبریز (نویسنده مسئول)

<sup>۳</sup> استادیار- دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی تبریز - مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد

<sup>۴</sup> استادیار- دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی تبریز

<sup>۵</sup> استادیار - متخصص داخلی

<sup>۶</sup> استادیار- دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی تبریز

<sup>۷</sup> استادیار- دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی تبریز

<sup>۸</sup> دانشیار- دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی تبریز

## مقدمه

بیماری ویلسون یک بیماری تحلیلی است که در آن متابولیسم مس دچار اختلال می گردد. برای اولین بار در سال ۱۹۱۲ دکتر ویلسون این بیماری را به عنوان یک بیماری ارثی همراه با علائم نورولوژیکی و تحلیل سلول های کبدی (سیروز) تعریف کرد (۱). طی بررسی های اخیر فرکانس این بیماری در ژاپن یک در ۳۰ هزار و در استرالیا یک در صد هزار تولد زنده گزارش شده است در حالی که این فرکانس در مللی که درصد بالایی از ازدواج فامیلی را دارند، بالاتر می باشد. فرکانس ناقلین (افراد هتروزیگوت) این بیماری یک در نود بوده و فرکانس ژن جهش یافته ۰/۳ الی ۰/۷ درصد محاسبه شده است (۲). در این بیماری پروسه اتصال مس به سروپولپلاسمین و ترشح مس اضافی به روده متحمل اختلال گردیده و این منتهی به رسوب مس در بافت های مختلف بدن از جمله کبد، سیستم عصبی مرکزی، چشم و کلیه ها می شود (۳). علائم بالینی بیماری در کبد خود را به یکی از چند شکل هیپاتیت حاد، هیپاتیت مزمن، هیپاتیت برق آسا و سیروز کبدی نشان می دهد (۴). تظاهرات عصبی بیماری اغلب به سیستم حرکتی فرد محدود می شود (۵). مهمترین حالت گرفتاری چشمی به علت رسوب مس در لایه قرنیه چشم بوده که در اکثر مبتلایان به شکل هاله ای سبز- قهوه ای در اطراف قرنیه نمایان شده و حلقه کایزرفلشر<sup>۱</sup> نامیده می شود (۶).

بررسی های پیوستگی ژنی بر روی خانواده های مبتلا به بیماری ویلسون منتهی به کشف منطقه ای از بازوی بلند کروموزوم ۱۳ (13q14.3) گردید که با بیماری پیوستگی نشان می داد. این پیوستگی نشانگر حضور ژن بیماری زای ویلسون در آن منطقه بود (۷، ۸، ۹). بررسی های بیشتر ژنتیکی منجر به کشف ژن بیماری زا (ATP7B) مسئول بیماری ویلسون گردید (۱۰، ۱۱).

طول این ژن ۷/۵ کیلو جفت باز بوده و از ۲۱ اگزون بیان شده در کبد (۲۲ اگزون بیان شده در کلیه) تشکیل یافته است و کد کننده آنزیم ATPase نوع p حامل مس می باشد. بر اساس مطالعات ایمنوهِیستولوژیکی پروتئین حاصل از این ژن عمدتاً در کبد بیان شده و در شبکه گلژی متمرکز می شود (۱۲). بررسی های انجام گرفته نشانگر این است که در حالت طبیعی افزایش غلظت مس باعث انتقال این پروتئین از شبکه گلژی به وزیکول های سیتوپلاسمیک شده که این منجر به خروج مس از سلول های کبدی می گردد. لذا نقص در عملکرد این پروتئین منتهی به عدم دفع مس اضافی از سلول ها گردیده و علائم بیماری ویلسون به تدریج بروز پیدا می کند (۱۳، ۱۴). جهش های متفاوت یا جهش

در مناطق مختلف از ژن ATP7B (هتروژنی آلی) از علل اصلی بروز علائم مختلف کلینیکی و آزمایشگاهی در مبتلایان به بیماری ویلسون محسوب می گردد (۱۵). از سایر علل که باعث بروز طیف وسیعی از علائم بیماری در مبتلایان به ویلسون می شود، می توان به علل ژنتیکی دیگر نظیر آپولیپوپروتئین E و همچنین به فاکتورهای احتمالی ناشناخته محیطی اشاره نمود (۱۶).

با استفاده از روش های کلینیکی و پاراکلینیکی رایج در جهت تشخیص بیماری ویلسون، امکان تشخیص بیماری اکثراً بعد از بروز علائم مقدور بوده و همچنین امکان تشخیص ناقلین در خانواده های مبتلا با استفاده از این روش ها امکان پذیر نبوده و یا درصد اطمینان کمتری دارد. استفاده از روش های تشخیص ژنتیک مولکولی امکان تشخیص مبتلایان قبل از بروز علائم بالینی، تشخیص ناقلین و همچنین تشخیص قبل از تولد در خانواده های مبتلا را مقدور می سازد. از بین این روش ها، تکنیک تعقیب ژنی با استفاده از ریز ماهواره ها که قبلاً پیوستگی آنها با ژن بیماری زا به اثبات رسیده، روشی غیر تهاجمی و قابل اطمینان با درصد بالا می باشد (۱۹، ۱۸، ۱۷). درصد اطمینان این روش بستگی به جایگاه ریز ماهواره انتخاب شده دارد (۲۰). این روش در بیش از ۹۵%-۹۰% بیماران موثر بوده به طوری که با شناسایی مارکر موثر<sup>۲</sup> در هر خانواده می توان ژن بیماری زا در آن خانواده را تعقیب نمود (۲۱، ۲۲، ۲۳).

در بررسی حاضر، مارکرهای پیوسته با ژن بیماری زا، درصد چند شکلی بودن آن مارکرها در بین خانواده های مبتلا و همچنین کاربرد آنها در تشخیص مبتلایان و ناقلین در خانواده های مبتلای معرفی شده از استان های آذربایجان شرقی و غربی کشور مورد مطالعه ژنتیک مولکولی قرار گرفتند.

## مواد و روش

**معرفی افراد مبتلا:** ۳۴ نفر مبتلا به بیماری ویلسون که متعلق به ۲۸ خانواده مختلف (۱۸ خانواده از استان آذربایجان شرقی و ۱۰ خانواده از استان آذربایجان غربی) بودند، بر اساس علائم کلینیکی و پاراکلینیکی توسط پزشکان فوق تخصص گوارشی، متخصصین مغز و اعصاب به مرکز ژنتیک معرفی شدند. این مبتلایان بر اساس الگوریتم تشخیصی ویلسون (۲۴)، توسط پزشکان متخصص تشخیص داده شده بودند.

پس از تهیه شجره نامه خانواده های معرفی شده، از اکثر اعضاء این خانواده ها که مجموعاً ۱۳۵ نفر بودند، بعد از کسب رضایت کتبی

<sup>2</sup> Informative Marker<sup>1</sup> Kayser-Fleisher

شده و زیر اشعه التراویوله تست شده و بعد از اطمینان از کارکرد PCR، محصولات PCR جهت تست پلی مورفیک بودن، بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰ یا ۱۲ درصد الکتروفورز گردید. در شرایطی که یکی از ریز ماهواره ها برای والدین خانواده ای قابل بررسی بوده و در آن خانواده چند شکلی نشان می داد، تمام اعضا دیگر آن خانواده (مبتلا و سالم) توسط آن مارکر مورد بررسی قرار می گرفتند. از آنجائی که خانواده های مبتلا در این بررسی کوچک بودند، نیازی به آنالیز آماری نبود.

### یافته ها

در مجموع، ۲۸ خانواده که حداقل یک عضو مبتلا به بیماری ویلسون داشتند توسط فوق تخصصین گوارش و متخصصین مغز و اعصاب جهت بررسی ژنتیکی به مرکز ژنتیک معرفی شدند. این مبتلایان علائم عصبی، گوارشی، چشمی و آزمایشگاهی مختلف بروز داده بودند (جدول ۱).

در بین این افراد ۱۵ خانواده (۵۳/۵٪) محصول ازدواج غیر فامیلی و ۱۳ خانواده دیگر (۴۶/۵٪) محصول ازدواج فامیلی بودند. از مجموع ۲۸ خانواده معرفی شده، ۴ خانواده به علت ناقص بودن اعضا و عدم رضایت بعضی از اعضا آنها جهت خون گیری از بررسی کنار گذاشته شدند.

از ۲۴ خانواده باقی مانده که با ۹ جفت مارکر مورد بررسی قرار گرفتند، ریز ماهواره D13S314 در هفت خانواده (۲۹/۲٪) برای هر دو والد حالت چند شکلی نشان داد که جهت بررسی پیوستگی ژنی در آن خانواده ها مورد استفاده قرار گرفت. همین مارکر در هفت خانواده دیگر (۲۹/۲٪) تنها برای یکی از والدین (پدر یا مادر) حالت چند شکلی نشان داد (شکل ۱) و (جدول ۲).

مارکر D13S301 در پنج خانواده (۲۰/۸٪) از بیست و چهار خانواده برای هر دو والد هتروزیگوت بوده و در هشت خانواده دیگر (۳۳/۳٪) تنها یکی از والدین برای این مارکر حالت چند شکلی نشان داد (شکل ۲) و (جدول ۲).

همچنین در یکی از خانواده های بررسی شده (۴/۱٪) ریز ماهواره D13S316 حالت چند شکلی یا پلی مورفیزم برای هر دو والد نشان داده و در دو تا از خانواده ها (۸/۳٪) امکان تعقیب ژنی تنها در یکی از والدین (پدر یا مادر) مقدور بود (جدول ۲).

در دو تا از خانواده ها (۸/۳٪) والدین برای دو ریز ماهواره D13S301 و D13S314 به طور هم زمان حالت چند شکلی نشان دادند به طوری که در کل بازده خانواده (۴۵/۸٪) از بیست و چهار

افراد خون گیری به عمل آمده و DNA آنها متعاقباً استخراج گردید.

**خون گیری و استخراج DNA:** خون گیری توسط پرستار همکار از ۱۳۵ نفر از اعضا خانواده های مبتلای معرفی شده، با رضایت کامل افراد به عمل آمد. خون با مقداری ماده ضد انعقاد (EDTA) مخلوط شده و سریعاً به آزمایشگاه مرکز انتقال داده و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

برای استخراج DNA ژنومی از روش اصلاح شده فنل - کلروفرم استفاده گردید. به طور خلاصه پس از لیز سلول های گلبول های قرمز توسط بافر لیز کننده، گلبول های سفید رسوب داده شده در بافر SE، ۱۰ درصد SDS و پروتئیناز K (شرکت Fermentas فرانسه) حل گردیده و جهت لیز سلول های سفید خون، به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۶۰-۴۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از اضافه کردن فنل - کلروفرم به اندازه یکسان، محلول رویی که حاوی DNA است، جدا شده که با افزودن اتانول مطلق سرد، رشته DNA ظاهر می گردد. رشته DNA حاصل در مقدار مناسبی از آب استریل و یا TE بافر حل شد.

**روش PCR:** به منظور تکثیر ریز ماهواره های مورد نظر از تکنیک PCR-SSR استفاده شد. ریز ماهواره ها از منطقه کروموزومی مورد نظر که پیوستگی کامل با ژن مورد بررسی نشان می دادند، انتخاب و توالی های آغازگر مناسب این ریز ماهواره ها طراحی و جهت سنتز سفارش داده شدند. این ریز ماهواره ها بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۳ عبارت از D13S133, D13S228, D13S296, D13S297, D13S298, D13S301, D13S314, D13S315, D13S316 (۲۵، ۲۳، ۱۹) بودند. برای انجام PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر، از MgCl<sub>2</sub> (شرکت Roche آلمان) با غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار، بافر PCR (شرکت Roche آلمان) با غلظت نهایی یک برابر، یک واحد آنزیم Taq پلیمرز (شرکت Roche آلمان)، dNTP (شرکت Roche آلمان) با غلظت نهایی ۰/۲ میلی مولار استفاده گردید. برنامه ارائه شده برای انجام چرخه های PCR جهت تکثیر این ریز ماهواره ها به قرار ذیل بوده است:

چرخه اول با ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه جهت جدا کردن رشته های DNA از هم دیگر شروع شده و سپس چرخه های بعدی به صورت، ۹۴ درجه سانتی گراد برای یک دقیقه، ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد برای یک دقیقه تنظیم شده بود که این چرخه برای ۳۵ بار تکرار شده و بعد از تکمیل چرخه ها، آخرین چرخه با ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه به اتمام رسید.

**الکتروفورز محصولات PCR:** محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردیده و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی

<sup>1</sup> Informative

در پنج خانواده (۲۰/۸٪) جهت بررسی پیوستگی ژنی از ترکیب دو مارکر استفاده گردید (جدول ۲).

در نهایت در بین بیست و چهار خانواده انتخاب شده پنج تا از خانواده ها (۲۰/۸٪) برای هیچ کدام از ۹ مارکر مذکور چند شکلی نبوده یا قابل بررسی توسط این مارکر ها نبودند.

در خانواده های مبتلا با استفاده از مارکر های پلی مورفیسم ژن بیماری زا در شخص مبتلا و دیگر اعضای خانواده از جمله والدین مورد تعقیب ژنی قرار گرفت (شکل ۳).

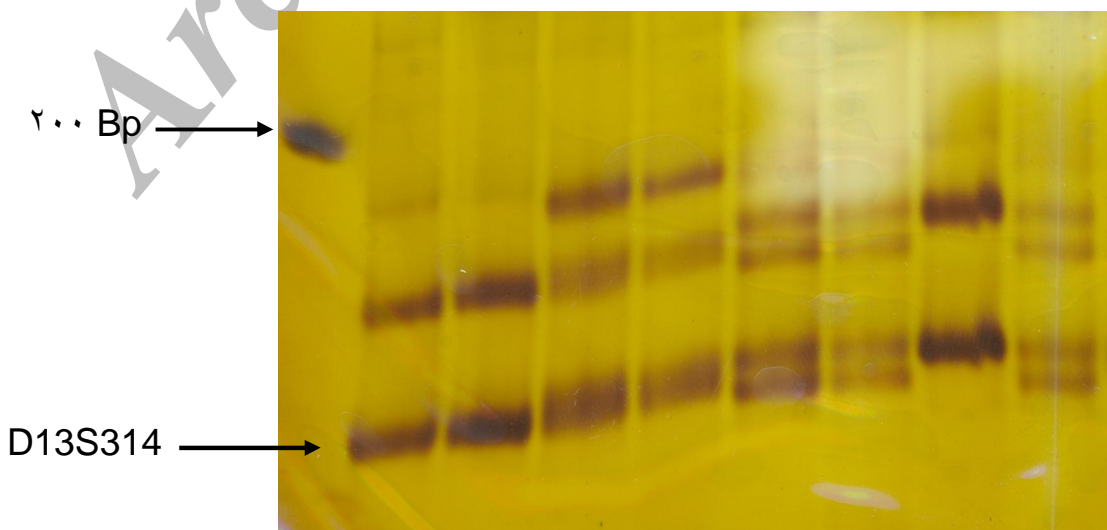
در بررسی های انجام شده روی نوزده خانواده ۲۵ نفر ناقل، ۶ نفر سالم و ۲ نفر مبتلا (که در بررسی های پاراکلینیک انجام شده هم تأیید شد) شناسائی گردیدند.

**جدول شماره ۱:** تعداد بیماران و علائم بالینی آنها که بر اساس الگوریتم تشخیصی بیماری ویلسون جهت بررسی ژنتیکی معرفی شده بودند.

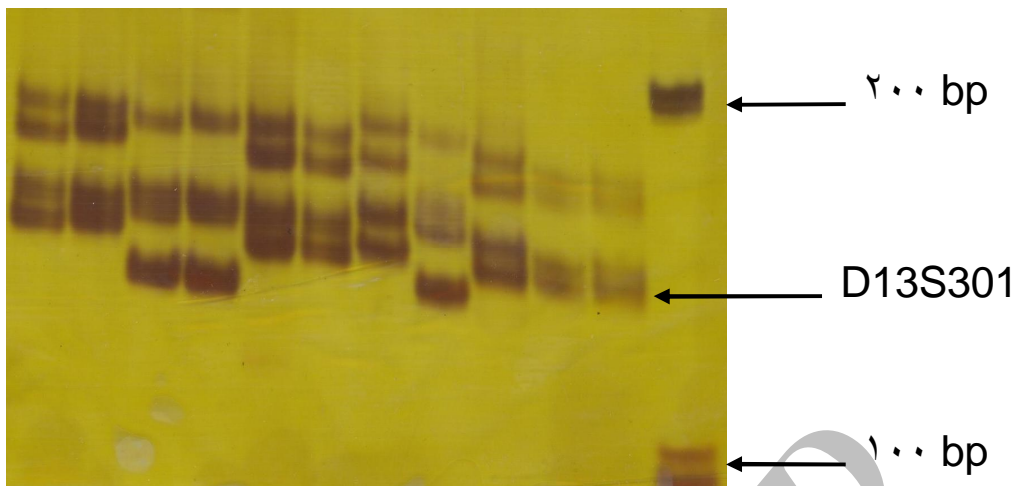
علائم بالینی	تعداد مبتلایان معرفی شده
گوارشی (هپاتیت حاد، هپاتیت مزمن، هپاتیت فولمینانت، سیروز)	۲۵ نفر
عصبی (علائم اکستراپیرامیدال، دیز آرتری، تشنج، روانی و ...)	۱۶ نفر
چشمی (حلقه کایزر فلشر)	۱۳ نفر
سایر علائم (کلیوی، خونی، قلبی، استخوانی و ...)	۱۳ نفر
آزمایشگاهی (مس و سرولوپلامین سرم، مس ادرار ۲۴ ساعته، مس کبدی و ...)	۳ نفر
تمام علائم (کبدی، عصبی، چشمی، سایر تظاهرات و آزمایشگاهی)	۶ نفر

**جدول شماره ۲:** درصد هتروزیگوت بودن والدین خانواده های بررسی شده برای مارکرهای ژنتیکی

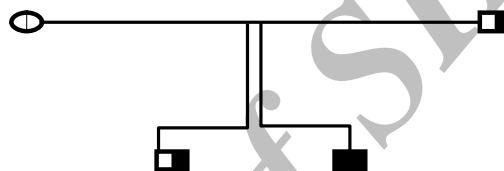
مارکر ژنتیکی	هتروزیگوت بودن هر دو والد	هتروزیگوت بودن یکی از والدین
D13S301	۵ خانواده (۲۰/۸٪)	۸ خانواده (۳۳/۳٪)
D13S314	۷ خانواده (۲۹/۱۶٪)	۷ خانواده (۲۹/۱۶٪)
D13S316	۱ خانواده (۴/۱٪)	۲ خانواده (۸/۳٪)
سایر مارکرها	۳ خانواده (۱۲/۵٪)	۳ خانواده (۱۲/۵٪)



**شکل ۱:** تنوع الی مشاهده شده در مارکر در D13S314 در خانواده های بررسی شده



شکل ۲: تنوع اللی مشاهده شده در مارکر در D13S301 در خانواده های بررسی شده



شکل ۳: یکی از خانواده ها که یک فرد مبتلا داشته و برادر این فرد نیز در این بررسی توسط میکروستلایت ها مشاهده گردید که ناقل به بیماری است.

### بحث

ویژه ای می باشد. از بین روش های تشخیص ژنتیکی، تشخیص نوع و محل موتاسیون رخ داده در ژن مذکور در هر خانواده روشی دقیق و با حساسیت بالا است که تشخیص بیماری را مسجل می کند ولی علی رغم این مزایا، کاربرد این روش مستلزم انجام آزمایشات وسیع، صرف زمان طولانی و هزینه های بیشتر است، همچنین با توجه به تنوع وسیع موتاسیون های ژن *ATP7B*، آنالیز ژنتیکی موتاسیون ها نیاز به یک نقشه مشابه برای جمعیت های خاص دارد که در فاز اول توصیه به انجام این آزمایشات نمی گردد، ولی استفاده از میکروستلایت ها روشی نسبتاً ساده و کم هزینه بوده که در زمان کوتاه قابل اجرا می باشد و جهت تشخیص ناقلین و سایر مبتلایان در خانواده هایی که یک عضو مبتلای شناخته شده دارند، کاربرد وسیعی دارد (۲۷).

بیماری ویلسون یک بیماری ژنتیکی با الگوی وراثتی اتوزوم مغلوب بوده که ژن مربوطه آن بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۳ قرار گرفته است. روش های مختلفی جهت تشخیص کلینیکی و پاراکلینیکی این بیماری وجود دارد. این روش ها عمدتاً بر مبنای افزایش مس ادرار بیست و چهار ساعته، کاهش مس و سرولوپلاسمین سرم، افزایش مس نسج خشک کبدی، مشاهده حلقه کایزر فلشر و بررسی های ژنتیکی می باشند (۲۶). تظاهر این علائم در مبتلایان معمولاً منتهی به بروز یک سری صدمات غیرقابل برگشت بافتی می گردد که بعد از تشخیص بیماری به روش های مذکور، امکان درمان کامل وجود نخواهد داشت. بنابراین، تشخیص قبل از بروز علائم بیماری در افراد مبتلا و همچنین تشخیص ناقلین در خانواده های مبتلا دارای اهمیت

ریز ماهواره ها قطعات گسترش یافته ای از DNA هستند که به صورت پشت سر هم تکرار شده و در نواحی غیر کد کننده ژنوم قرار گرفته اند و به دلیل فراوانی بالا و چند شکلی زیادی که دارند، نشانگرهای بسیار قوی در تهیه نقشه های ژنتیکی و نشانمند کردن ژن ها می باشند (۲۸، ۲۹). میکروستلایت ها دارای محدودیت هایی نیز هستند که در کاربرد عمومی آنها به عنوان نشانگرهای مولکولی موثر می باشند. از جمله این محدودیت ها می توان به عدم چند شکلی بودن بعضی از آنها در بین افراد مورد مطالعه اشاره نمود.

در کاربرد میکروستلایت ها یا ریز ماهواره ها به عنوان مارکر ژنتیکی جهت تعقیب ژن بیماری زای پیوسته به آن، مشکل احتمالی دیگر این است که بین این مارکر ژنتیکی و ژن بیماری زای مورد نظر، نوترکیبی ژنتیکی رخ بدهد. جهت کاهش اثر نوترکیبی در بررسی ژن های بیماری زا و تفسیر نتایج به دست آمده، بهترین روش، انتخاب مارکرهایی است که فاصله ژنتیکی خیلی کمی با ژن بیماری زای مورد نظر داشته و یا جایگاه آن در درون انترون ژن باشد. در این بررسی، همه مارکرهایی که انتخاب شده بودند، به استثنای یک مارکر، کمتر از یک سانتی مورگان با ژن ATP7B فاصله ژنتیکی داشتند (۲۰). میکروستلایت D13S301 در ابتدای ژن مذکور و در فاصله ۴۰ کیلوبازی آن قرار گرفته و نزدیک ترین مارکر از جهت پروکسیمال ژن است. جایگاه میکروستلایت D13S314 در قسمت انتهایی ژن و نزدیک ترین مارکر از جهت دیستال می باشد. تنها در یکی از مارکرهای استفاده شده (D13S316)، فاصله ژنتیکی گزارش شده بین ژن مذکور و مارکر استفاده شده، یک سانتی مورگان بود (۳۲، ۳۱، ۳۰) که دقت نتیجه به دست آمده در استفاده از این مارکر، ۹۹ درصد محاسبه می گردد. سایر مارکرهای انتخاب شده نیز در فاصله بین این مارکرها قرار گرفته بودند (۱۸، ۲۳).

بیشترین حالت پلی مورفیسم در گزارشات قبلی ارائه شده، به ترتیب در میکروستلایت های D13S316 و D13S314 و D13S301 بودند (۲۲، ۱۹). در این بررسی که بر روی خانواده هایی از استان های آذربایجان شرقی و غربی کشور صورت گرفت، درصد پلی مورفیسم این مارکرها به ترتیب مذکور نبوده و میکروستلایت D13S314 و D13S301 به ترتیب بیشترین حالت چند شکلی را در بین خانواده ها نشان داده و میکروستلایت D13S316 کمترین حالت پلی مورفیسم را نشان داد. چنین تفاوت در درصد پلی مورفیسم در بین جمعیت مورد مطالعه و

جمعیت های دیگر ناشی از تفاوت نژادی و اثر بنیان گذاری<sup>۱</sup> می باشد.

در این بررسی که با استفاده از میکروستلایت ها بر روی اعضاء خانواده های مبتلا صورت گرفت، ۲۵ نفر ناقل و دو نفر مبتلایی که علائم بالینی نشان نداده بود، تشخیص داده شدند. در این خانواده ها همچنین ۶ نفر که از نظر ژنتیکی کاملاً سالم بوده و ژن بیماری زا را به ارث نبرده بودند، تشخیص داده شدند. افرادی که توسط این روش مبتلا تشخیص داده شدند، با استفاده از روش های بیوشیمیایی و پاراکلینیک دیگر کاملاً به اثبات رسیده و تحت نظر پزشک متخصص قرار گرفتند. افراد ناقل نیز جهت مراعات رژیم غذایی و پیش آگهی به پزشک متخصص ارجاع داده شده و مشاوره های ژنتیکی لازم جهت پیشگیری از تولد فرزندان مبتلا در آینده در این خانواده ها ارائه گردید.

موضوع قابل توجه در این بررسی در خصوص ازدواج های فامیلی این است که درصد این نوع ازدواج در بین خانواده های مبتلا کمتر از ازدواج های غیر فامیلی بود. وجود چنین درصد بالا از ازدواج غیر فامیلی در بین خانواده های مبتلا به یک بیماری اتوزوم مغلوب نظیر بیماری ویلسون نشانگر فرکانس نسبتاً بالایی از وجود الل جهش یافته در جمعیت شمال غرب کشور می باشد که مستلزم توجه خاص مسئولین بهداشتی به این موضوع است. در خصوص ازدواج های فامیلی، بهترین روش جهت پیشگیری از تولد نوزادان مبتلا به بیماری های اتوزوم مغلوب نظیر بیماری ویلسون، افزایش آگاهی مردم در عدم ازدواج خویشاوندی است.

در راستای این بررسی، تکنیک های دیگر ژنتیک مولکولی جهت تشخیص نوع موتاسیون رخ داده در هر کدام از خانواده های مبتلا مطالعه خواهند شد تا ارتباط فنوتیپ بیماری با نوع جهش رخ داده و همچنین فرکانس هر کدام از موتاسیون ها در جمعیت بررسی شده مشخص گردد.

### تقدیر و تشکر

مولفین از روسای محترم مراکز تحقیقات گوارش و کبد تبریز، کاربردی دارویی، بیوتکنولوژی و همکاران محترم در این مراکز (دانشگاه علوم پزشکی تبریز) تشکر دارند. این پروژه مصوب مرکز تحقیقات گوارش و کبد بوده و بودجه آن توسط این مرکز تامین گردید.

<sup>1</sup> Founder Effect

## Reference:

01. Wilson SAK. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain* 1912; 34: 295-508.
02. Gollan JL, Gollan TJ. Wilson disease in 1998: genetic, diagnostic and therapeutic aspects. *Hepatology* 1998; 2: 8-36.
03. Hoogenraad, Tjaard U. Wilson disease. 2<sup>nd</sup> Ed. The Netherlands: Intermed Medical Publishers; 2001. P. 14-25.
04. Khan A, Khattak A, Sherin A, Khalil MA. Neurological manifestations of Wilson's disease. *Postgraduate Med Instit* 2003; 17 (1): 14-19.
05. Takeshita Y, Shimizu N, Yamaguchi Y, Nakazono H, Saitou M, Fujikawa Y, et al. Two families with Wilson disease in which siblings showed different phenotypes. *J Hum Genet* 2002; 47: 543-547.
06. Kuruville A. Postcremation diagnosis. *Lancet* 2001; 358: 1554.
07. Kalinsky H, Funes A, Zeldin A, Pel OY, Korostishevsky M, Gershoni BR, et al. Novel ATP7B mutations causing wilson disease in several Israeli ethnic groups. *Human Mutation* 1998; 11: 145-151.
08. Ferenci P. Diagnosis and current therapy of Wilson's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 157-165.
09. Wu ZY, Lin MT, Murong SX, Wang N. Molecular diagnosis and prophylactic therapy for presymptomatic Chinese patients with Wilson disease. *Arch Neurol* 2003; 60: 737-741.
10. Roberts EA, Schilsky ML. A Practice Guideline on Wilson Disease. *Hepatology* 2003; 37: 6.
11. Margarit E, Bach V, Gomez D, Bruguera M, Jara P, Queralt R, et al. Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene. *Clin Genet* 2005; 68: 61-68.
12. Terada K, Nakako T, Yang XL, Iida M, Aiba N, Minamiya Y, et al. Restoration of holoceruloplasmin synthesis in LEC rat after infusion of recombinant adenovirus bearing WND cDNA. *J Biol Chem* 1998; 273: 1815-1820.
13. Hung IH, Suzuki M, Yamaguchi Y, Yuan DS, Klausner RD, Gitlin JD. Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1997; 272: 21461-21466.
14. Nagano K, Nakamura K, Urakami KI, Umeyama K, Uchiyama H, Koiwai K, et al. Intracellular distribution of the Wilson's disease gene product (ATPase7B) after in vitro and in vivo exogenous expression in hepatocytes from the LEC rat, an animal model of Wilson's disease. *Hepatology* 1998; 27: 799-807.
15. Wu Z, Wang N, Murong S, Lin M. Identification and analysis of mutations of the Wilson disease gene in Chinese population. *Chin Med J* 2000; 113(1): 40-43.
16. Schiefermeier M, Kollegger H, Madl C, Polli C, Oder W, Kühn HJ, et al. The impact of apolipoprotein E genotypes on age at onset of symptoms and phenotypic expression in Wilson's disease. *Brain* 2000; 123(3): 585-590.
17. Bobba A, Marra E, Fathallah DM, Giannattasio S. Non-radioactive detection of five common microsatellite markers for ATP7B gene in Wilson disease patients. *Mol Cell Probes* 2003; 17(6): 271-4.
18. Gupta A, Neogi R, Mukherjee M, Mukhopadhyay A. DNA linkage based diagnosis of Wilson's disease in asymptomatic siblings. *Indian Med Res* 2003; 118: 208-14.
19. Curtis D, Durkie M, Balac MP, Sheard D, Goodeve A. A study of Wilson's Disease mutations in Britain. *Human Mutation* 1999; 14: 304-311.
20. Stewart EA, White A, Tomfohrde J, Osborne LS, Prestridge L, Bonne TB, et al. Polymorphic

- microsatellites and Wilson disease (WD). *Am J Hum Genet* 1993; 53(4): 864-73
21. Cossu P, Pirastu M, Nucaro A. Prenatal diagnosis of Wilson's disease by analysis of DNA polymorphisms. *N Engl J Med* 1992; 327: 57.
22. Caca K, Ferenci P, Kuhn HJ. High prevalence of the H1069Q mutation in East German patients with Wilson Disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype analysis. *Hepatology* 2001; 35: 575-581.
23. Loudianos G, Dessi YV, Lovicus M, Angius A, Kanavakis E, Tzetzis M, et al. Haplotype and mutation analysis in Greek patients with Wilson disease. *Eur Hum Genet* 1998; 6: 487-491.
24. Steindl P, Ferenci P, Dienes HP, Grimm G, Pabinger I, Madl C, et al. Wilson's diseases in patients presenting with liver disease; a diagnostic challenge. *Gastroenterol* 1997; 113(1): 212-8.
25. Wang L, Liang X, Liu Z, Shen F, Mong W, Xu P, et al. Detection of presymptomatic patients and heterozygotes with Wilson's disease by using haplotypes of microsatellites. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 1998; 15(4): 242-5.
26. Gow PJ, Smallwood RA, Angus PW, Smith AL, Wall AJ, Sewell RB. Diagnosis of Wilson's disease: an experience over three decades. *Gut* 2000; 46: 415-419.
27. Karunas AS, Mersiianova IV, Poliakov AV, Evgrafov OV, Khusnutdinova EK. Analysis of mutations and haplotypes of polymorphic markers in patients with Wilson-Konovalov disease from Bashkir. *Genetika* 2000; 36(7): 972-9.
28. Chambers GK, Makavoy ES. Microsatellites: Consensus and controversy. *Compar Biochem Physiology* 2000; 126: 455-476.
29. Litt M, Luxty JA. A hypervariable microsatellite reveal by in vitro amplification of a dinucleotide repeat with the cardiac muscle action gene. *Am J Hum Genet* 1989; 44(3): 287-401.
30. Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nat Genet* 1995; 9: 210-217.
31. Petrukhin K, Fischer SG, Pirastu M, Tanzi RE, Chernov I, Devoto M, et al. Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nat Genet* 1993; 5: 338-343.
32. Thomas GR, Bull PC, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. Haplotype studies in Wilson disease. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 71-78.