

## بررسی اختلالات کروموزومی ساب تلومریک در تعدادی از بیماران

### ایرانی مبتلا به عقب ماندگی ذهنی با علت نامشخص با استفاده از

#### روش هیبریداسیون در محل فلونورسنت (FISH)

جواد انصاری، فرخنده بهجتی\*، کیمیا کهریزی، ساغر قاسمی فیروزآبادی، مژگان عطائی

کچوئی، حسین نجم آبادی

به ترتیب کارشناسی ارشد، استادیار، دانشیار، کارشناسی ارشد، کارشناسی ارشد، استاد

مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، اوین، تهران، ایران

\*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: f\_behjati@uswr.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۶ - تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۵)

#### چکیده

اتیولوژی عقب ماندگی ذهنی هتروژن بوده و اکثراً علت ژنتیکی دارد. ناهنجاریهای کروموزومی علت ۴-۲۸ درصد کلیه عقب ماندگیهای ذهنی است. اکثر ناهنجاریهای کروموزوم نوع اتوزومی غیر متعادل باعث عقب ماندگی ذهنی می‌شوند. نواحی انتهایی کروموزومها غنی از ژن می‌باشند و مطالعات مختلف دال بر آن دارند که ناهنجاریهای این نواحی می‌توانند یکی از عوامل اصلی ایجاد عقب ماندگی ذهنی باشند. در این پژوهش با استفاده از روش هیبریداسیون در محل فلونورسنت ناهنجاریهای ساب تلومریک کروموزومی در ۱۳ نمونه واجد کاربوتایپ نرمال مورد بررسی قرار گرفتند. بیماران انتخاب شده دارای ضریب هوشی کمتر از ۷۰ ونیمی از بیماران فاقد دیسمورفسم سندرم ژنتیکی خاصی بودند. نتایج آزمایش برای ۱۱ نفر نرمال بود در حالیکه ۲ نفر (۱۵٪) ناهنجاری ساب تلومریک نشان دادند. در بیمار اول انتهای بازوی کوتاه هر دو همولوگ کروموزوم ۲۰ با پروب ویژه ساب تلومریک بازوی بلند ۱۹ سیگنال مثبت نشان داد. و بنابراین بیمار برای ناحیه ساب تلومریک بازوی بلند کروموزوم ۱۹ تترازومی می‌باشد. در بیمار دیگر انتهای بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ یا ۱۸ با پروب ویژه ساب تلومریک بازوی بلند کروموزوم ۹ سیگنال مثبت نشان داد. در نتیجه این بیمار برای ناحیه ساب تلومریک بازوی بلند کروموزوم ۹ تریزومی می‌باشد.

#### واژه های کلیدی

عقب ماندگی ذهنی با علت

نامشخص ،

ناهنجاریهای کروموزومی ،

ساب تلومریک ،

FISH

## مقدمه

حداقل ۶۰٪ علل عقب ماندگی ذهنی (MR) حاد منشا ژنتیکی داشته و علت آن نقص در ژن‌ها و کروموزوم هاست (۱) یکی از مشکلات مطرح در عقب ماندگی ذهنی این است که منشا دقیق آن در اکثر موارد هنوز ناشناخته است. نقص‌های کروموزومی در ۲۸-۴٪ و عوامل محیطی در ۳۰-۱۰٪ موارد به عنوان عامل مشخص شده است (۲). ناهنجاریهای کروموزومی مهمترین علت عقب ماندگی ذهنی در انسان شناخته شده است (۳). به دلیل آنکه معمولاً خطر تکرار برای فرزندان این افراد نسبت به افراد جامعه بالاتر است منطقی است که فاکتورهای ژنتیکی را در موارد عقب ماندگی ذهنی فاقد علت مشخص، دخیل بدانیم (۴، ۵).

نواحی ساب تلومریک نزدیک انتهای کروموزوم‌ها (تلومر) واقع می‌باشند. این نواحی دارای ژنهای گوناگون و متنوعی بوده و از نظر نسخه برداری فوق العاده فعال می‌باشند. به خاطر ساختار و عملکرد منحصر بفرد مناطق ساب تلومری، پیشنهاد گردیده عدم توازن که این نواحی را درگیر کند ممکن است از عوامل مهم در ایجاد عقب ماندگی‌های ذهنی باعث ناشناخته (IMR) باشد (۳). تحقیقات اخیر نشان از آن دارند که تقریباً در ۳۵-۴٪ بیماران با عقب ماندگی ذهنی بدون علت مشخص نواحی ساب تلومریک نوارائی یا فته‌اند (۳).

نوارائی‌های نواحی ساب تلومریک کروموزومی اغلب با استفاده از روش‌های کاریوتیپ استاندارد مشخص نمی‌گردد چراکه در این روش‌ها حساسیت کافی برای نشان دادن ناهنجاری‌های کمتر از 4Mb وجود ندارد (۶) و در این گونه موارد بایستی از تکنیک‌های سیتوژنتیک مولکولی از جمله روش هیبریداسیون در محل فلئورسنت (FISH) استفاده نمود (۷).

با استفاده از پروب‌های ساب تلومریک چندین سندرم جدید شناسایی شده‌اند. بعنوان مثال سندرم حذف 1p36 (۸)، سندرم حذف 22q13.3 (۹) و چندین ناهنجاری اوتیسم (۱۰) در ارتباط با ناهنجاریهای ساب تلومریک کروموزومی شناسایی شده‌اند. در این تحقیق ۱۳ نفر عقب مانده ذهنی واجد کاریوتایپ طبیعی و فاقد سندرم شناخته شده‌ای مثل سندرم Prader-Willi، Down

DiGeorge، Fragile X و غیره (که با عقب ماندگی ذهنی همراه می‌باشند)، و با استفاده از پروب‌های مخصوص ساب تلومریک ویکاریگری میکروسکوپ فلئورسانس، نواحی کروموزومی ساب تلومریک آنها مورد بررسی قرار گرفتند.

## مواد و روش‌ها

FISH یک روش سیتوژنتیک مولکولی برای ردیابی و تعیین جایگاه دقیق توالی‌های نوکلئوتیدی به کمک مواد نشاندار شده با ترکیبات فلئورسنت است. برای اجرای این روش مراحل زیر انجام گرفت.

## کشت و هاروست خون محیطی

تمامی مراحل کشت و هاروست مطابق استانداردهای بین المللی صورت گرفت (۱۱). سوسپانسیون حاصل از این مرحله جهت استفاده در فرایند دو رگه سازی، در ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند.

هیبریداسیون در محل فلئورسنت توسط تکنیک Chromoprobe Multiprobe- T System صورت گرفت.

کیت این پروب از شرکت CytoCell کشور انگلستان تهیه گردید. در این مرحله از سوسپانسیون آماده استفاده گردید. آماده سازی لام موسوم به Chromoprobe Multiprobe template slide مطابق بروشور شرکت CytoCell که به همراه کیت ارسال شده بود انجام گردید.

## بررسی میکروسکوپی لام

برای بررسی سیگنالها از میکروسکوپ فلئورسانس واجد فیلترهای FITC، DAPI و Texas Red و نرم افزار Applied Imaging برای سیستم FISH استفاده گردید.

## نتایج و بحث

در مجموع ۱۳ بیمار عقب مانده ذهنی مورد بررسی قرار گرفتند. والدین ۵ نفر از آنها، ازدواج غیرخویشاوندی و ۸ نفر ازدواج خویشاوندی داشتند.

## نتایج ساب تلومریک FISH

نتایج آزمایش برای ۱۱ بیمار نرمال بود در حالیکه ۲ نفر (۱۵٪) به شرح زیر ناهنجاری نشان دادند (جدول ۱):

دامنه سنی بیماران ۳۲-۱۵ سال بود و به غیر از یک نفر، بقیه پسر بودند. کلیه بیماران مبتلا به MR و ۵۰ درصد آنها بدون هیچ علامت دیسمورفیک بودند. کاریوتیپ همه طبیعی بود (اشکال ۱ و ۳).

جدول ۱: لیست بیمارانی که برای ساب تلومریک FISH غیرطبیعی بودند.

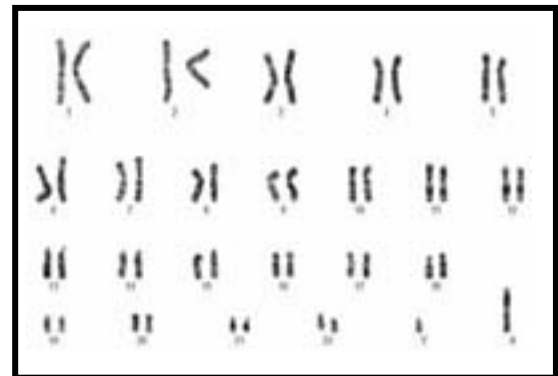
شماره	Family Code	Karyotype	وضعیت سیگنال برای ساب تلومریک FISH
۱	۸۶۰۰۰۶۸	46,XY,ish der(20)?t(19;20)(qter;pter)x2	19q with 20px2: dup(19qter)x2
۲	۸۶۰۰۰۷۳	46,XY,ish der(17or18)? t(9;17or18)(qter;pter)	9q with 17p or 18p: dup(9qter)

داد (شکل ۲). بنابراین این بیمار تترازومی برای ناحیه ساب تلومریک بازوی بلند کروموزوم ۱۹ می باشد. والدین این فرد ازدواج خویشاوندی داشتند.

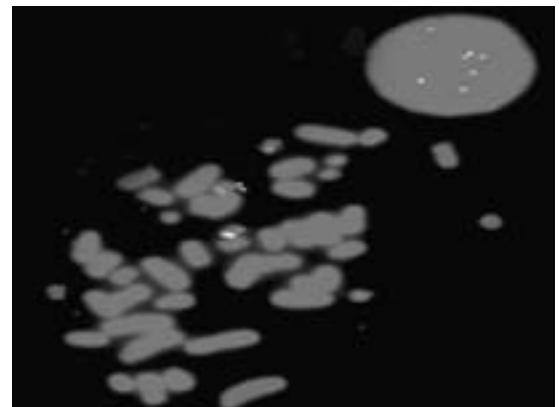
۱- بیمار ۸۶۰۰۰۶۸

در این بیمار انتهای بازوی کوتاه هر دو همولوگ کروموزوم ۲۰ با پروب ویژه ساب تلومریک بازوی بلند ۱۹ سیگنالی مثبت نشان

شکل ۱: کاریوتیپ طبیعی بیمار ۸۶۰۰۰۶۸  
توسط نرم افزار Cytovision



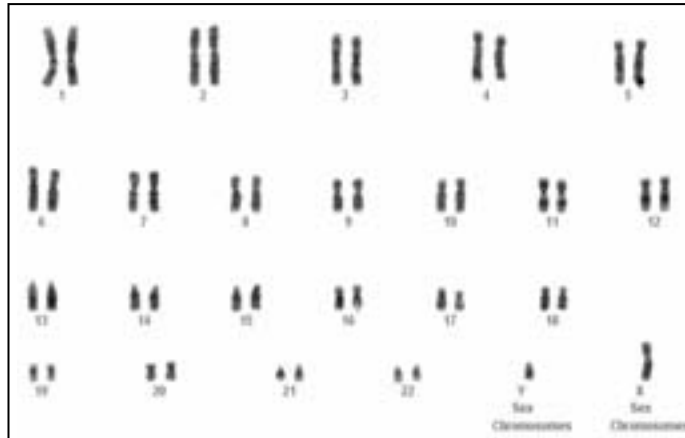
شکل ۲: تصویر ساب تلومریک FISH برای ۱۹q و ۱۹p از متافاز سلول در بیمار ۸۶۰۰۰۶۸: در شکل فوق ملاحظه می گردد علاوه بر سیگنالهای طبیعی مربوط به دو کروموزوم ۱۹، بر روی بازوی کوتاه هر دو کروموزوم ۲۰ هم سیگنال قرمز دیده می شود.



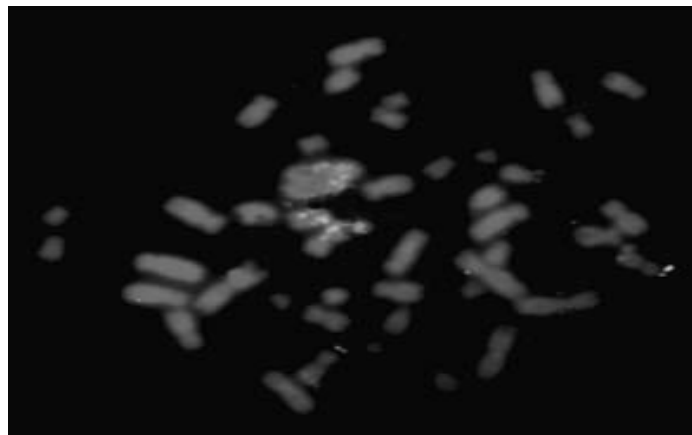
بیمار ۸۶۰۰۰۷۳

داد (شکل ۴). بنابراین این بیمار تریزومی برای ناحیه ساب تلومریک بازوی بلند کروموزوم ۹ می باشد. والدین این فرد ازدواج خویشاوندی داشتند.

در این بیمار انتهای بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ یا ۱۸ با پروب ویژه ساب تلومریک بازوی بلند کروموزوم ۹ سیگنال مثبت نشان



شکل ۳: کاریوتیپ طبیعی بیمار ۸۶۰۰۰۷۳



شکل ۴: تصویر ساب تلومریک FISH برای 9p و 9q از متافازسلول در بیمار ۸۶۰۰۰۷۳ مشاهده می گردد. علاوه بر سیگنالهای مربوط به کروموزومهای ۹ انتهای بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ یا ۱۸ با پروب ویژه ساب تلومریک بازوی بلند کروموزوم ۹ سیگنال مثبت دارد. داده است.

مشاهده شده در مطالعه ما از نوع دوپلیکاسیون بودند و هیچگونه حذفی وجود نداشت. در مورد بیمار ۸۶۰۰۰۷۳ مطالعات ساب تلومریک FISH نشان داد که یک کپی اضافی از ناحیه ساب تلومریک بازوی بلند کروموزوم ۹ به انتهای بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ یا ۱۸ اضافه گردیده است. به عبارت دیگر این بیمار

این دو بیمار از دو خانواده مختلف با ازدواج خویشاوندی و فاقد دیسمورفیسم بودند.

مطالعات متعددی ناهنجاریهای ساب تلومریک را در بیماران مبتلا به عقب ماندگی ذهنی با و یا بدون دیسمورفیسم نشان داده اند. جالب توجه است که هر دو مورد ناهنجاریهای ساب تلومریک

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی که با پشتیبانی و حمایت های مالی شان انجام این پژوهش را امکان پذیر نمودند. کمال تشکر و امتنان را داریم.

### منابع

- 1- Moser HG (1995), A role for gene therapy in mental retardation Mental retardation and Developmental Disabilities. Research Reviews: Gene Therapy, 1:4-6.
- 2- Phelan MC; Crawford EC, Bealer DM (1996), Mental retardation in south Carolina III Chromosome aberration. *proc Green genet Cancer*, 15:45-60.
- 3- Gopalrao V.N. Velagaleti, Salty S Robinson, Bobby M. Rouse, Vijay S. Tonk, and Lillian H. Lockhart (2005), Subtelomeric Rearrangements in idiopathic Mental Retardation, *Indian Journal of Pediatrics*, Volume 72: 679-685.
- 4- Markus Hengstschlager, Andrea Prusa, Christa Repa, Josef Deutinger, Arnold Pollak, and Gerhard Bernscek (2005), Subtelomeric Rearrangements as Neutral Genomic Polymorphisms, *American Journal of Medical Genetics* 133A:48-52 .
- 5- Marie Sogaard, Zeynep Tumer, Helle Hjalgrim, Johanne Hahnemann, Birgitte Friis, Paal Leddal, Vibeke Faurholt Pedersen, Peter Baekgaard, et al (2005), Subtelomeric study of 132 patients with mental retardation reveals 9 chromosomal anomalies and contributes to the delineation of submicroscopic deletions of 1pter, 2qter, 4pter, 5qter and 9qter, *BMC Medical Genetics*, 6:21 doi:10.1186/1471-2350-6-21.
- 6- Knight SJL, Flint T (2000). Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *JMG*, 37(6): 401-409.
- 7- Yao-shan Fan (2002). Molecular cytogenetics in Medicine From methods in molecular Biology. Vol 204 molecular cytogenetics: protocols and Applications. Human Press. Totowa, NJ.
- 8- Helistedt HA; Ballif BC; Howard LA, et al (2003). Population data suggest those deletions of 1p36 and a relatively common chromosome abnormality. *Clin Genet*; 64(4):310-6

دارای تریزومی جزئی برای انتهای بازوی بلند کروموزوم ۹ می باشد. در مطالعه ای که توسط Ravnan و همکاران صورت گرفت در ۵ بیمار دوپلیکاسیون ساب تلومریک 9q مشاهده گردید که همه این موارد همزمان حذف نواحی ساب تلومریک 13p,7q,8p,15q,17p را داشتند (۱۲). مورد دوپلیکاسیون ناحیه ساب تلومریک 9q حذف ناحیه ساب تلومریک 17p را داشت و واجد آنومالی های متعدد از جمله CHD,DGS/VCFS و هیپوتونیا بود. مادر پروباند واجد ترانسلوکاسیون متعادل بین کروموزوم های ۹ و ۱۷ بود. بیمار ۸۶۰۰۷۳ نیز دوپلیکاسیون ناحیه ساب تلومریک 9q را دارد ولیکن ناحیه 17p یا 18p حذف نشده است.

بیمار ۸۶۰۰۶۸ عقب ماندگی ذهنی متوسط داشت و دارای رفتار تهاجمی بدون علامت خاص دیسمورفیک بود.

مطالعات ساب تلومریک FISH نشان داد که یک کپی اضافی از ناحیه ساب تلومریک بازوی کوتاه کروموزوم ۱۹ به انتهای بازوی بلند هر دو همولوگ کروموزوم ۲۰ اضافه گردیده است. بنابراین این بیمار دارای تترازومی برای انتهای بازوی کوتاه کروموزوم ۱۹ می باشد. در مطالعه Ravnan و همکاران (۹) چهار بیمار دوپلیکاسیون ناحیه ساب تلومریک 19q را داشتند. این بیماران همچنین واجد حذف ناحیه ساب تلومریک برای 19p,15p,7p,12p بودند. در مطالعه دیگری توسط Ruiter و همکاران (13) در یک بررسی cohort ۶۲۴ بیمار عقب مانده ذهنی همراه یا بدون دیسمورفسم مورد بررسی قرار گرفتند. ۱۱ بیمار واجد دوپلیکاسیون و بدون هیچگونه حذفی بودند. از جمله یک مورد دوپلیکاسیون ناحیه ساب تلومریک 9q وجود داشت.

برای اینکه مشخص گردد که دو مورد ناهنجاری ساب تلومریک در این پژوهش پاتوژنتیک بوده و علت اصلی عقب ماندگی ذهنی در بیماران می باشند بایستی والدین آنها مورد بررسی قرار گیرند. در صورتیکه آنها فاقد این ناهنجاری باشند، این اختلال ساب تلومریک می تواند پاتوژن باشد.

9- luciani JJ, de Mas p, Depetris D, et al (2003) Telomeric 22q13 deletions resulting from rings, simple deletions, and translocations: cytogenetics, molecular and clinical analysis of new observations. *J. Med Genet*; 40(9):690-6.

10- Wolff DJ, Clifton K, Karr C, Charlesy (2002) Pilot assessment of the subtelomeric regions of children with autism: deletion of a 2q deletion. *Genet Med*; 4(1):10-4.

11- Rooney DE (2001). *Human Cytogenetics constitutional analysis*. Third edition, Oxford University press.

12- Ravan JB, Tapperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin. (2006). Subtelomere FISH analysis of 11688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet*, 43: 478-489.

13- Ruitter EM, Koolen DA, Kleefstra T, Nillesen WM, Pfundt R, de Leeuw N, Hamel BCJ, Brunner HG, Sijm EA, de Vries BBA. (2007). Pure subtelomeric microduplications as a cause of mental retardation. *Clin Genet*: 72: 362-368.