

تشخیص ناقلین بیماری دیستروفی عضلانی دوشن با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای

نرگس زینالزاده نیک: دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
دکتر مرتضی جبارپور بنیادی: استادیار ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم طبیعی، قطب علمی سیتومولکولی تنوع زیستی، دانشگاه تبریز: نویسنده رابط
E-mail: jabbapour@tabrizu.ac.ir

دکتر محمد برزگر: استاد بیماریهای کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
حسین نداف نیا: کارشناس ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات بیماریهای کبد و گوارش، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۵/۱۰/۲۸ پذیرش: ۸۶/۳/۱

چکیده

زمینه و اهداف: بیماری دیستروفی عضلانی دوشن از اختلالات ماهیچه‌ای - عصبی است که منتهی به ضعف و تحلیل پیشرونده عضلات اسکلتی در مبتلایان می‌گردد. این بیماری ناشی از جهش در ژن دیستروفین بوده که جایگاه کروموزومی آن بر روی کروموزوم ایکس است. الگوی توارث این بیماری بصورت مغلوب وابسته به جنس بوده و فراوانی آن یک در ۳۵۰۰ تولد زنده پسر گزارش شده است. از آنجا که هنوز درمان موثری برای این بیماری شناخته نشده، تعیین افراد مونث ناقل جهت انجام مشاوره ژنتیکی و تشخیص پیش از تولد، ضروری می‌باشد.

روش بررسی: شانزده خانواده مبتلا توسط متخصصین مغز و اعصاب به آزمایشگاه ژنتیک تبریز معرفی و DNA آنها برای بررسی‌های بعدی استخراج گردید. با استفاده از هفت ریزماهوره درون و اطراف ژن دیستروفین، تک تک اعضاء این خانواده‌ها با تکنیک تعقیب ژنی مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از شانزده خانواده مورد بررسی که محل حذف شدگی ژنی در مبتلایان آنها تشخیص داده شده بود در مجموع ۴۳ فرد مونث با ریسک ناقل بودن و ۳ فرد مونث ناقل اجباری مورد مطالعه قرار گرفته و در نهایت وضعیت ۲۹ فرد مونث (۶۸/۱۸ درصد) از نظر ناقل بودن یا سالم بودن مشخص شد.

نتیجه‌گیری: در خانواده‌هایی که مبتلا آنها به دیستروفی عضلانی دوشن با روش‌های مولکولی مسجل شده است، می‌توان با استفاده از تکنیک قابل اعتماد تعقیب ژنی وضعیت افراد مونث را از نظر ناقل بودن با احتمال ۱۰۰-۹۵ درصد مشخص نمود.

کلید واژه‌ها: دیستروفی عضلانی دوشن، تشخیص ناقلین، تکرارهای ریزماهورهای

مقدمه

می‌باشد، عارض می‌شود (۱و۲). پروتئین دیستروفین که از این ژن کد می‌شود، جزو پروتئینهای اسکلت سلولی در سلولهای ماهیچه-ای می‌باشد (۳).

در ۶۵ درصد از مبتلایان به دیستروفی عضلانی دوشن، حذف شدگی در یک یا چند آگزون از ژن دیستروفین مشاهده می‌شود و

دیستروفی عضلانی دوشن با نرخ شیوع یک در ۳۵۰۰ تولد زنده 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 کروموزومی آن بازوی کوتاه کروموزوم ایکس (Xp21.2)

جایگاه ژنی این آگزونها معمولاً در یکی از دو محل داغ جهشی می‌باشد (۴).

۹۸ درصد از حذف‌شدگی‌های آگزونی ژن دیستروفین در مبتلایان را می‌توان با استفاده از تکنیک PCR چندگانه^۱ تشخیص داد (۵-۷). تقریباً یک سوم از کل مبتلایان به دیستروفی عضلانی دوشن در اثر جهش جدید عارض شده و سابقه فامیلی از بیماری مشاهده نمی‌گردد. در دو سوم بقیه، جهش از نوع ارثی با سابقه فامیلی می‌باشد (۸).

با توجه به اینکه حتی در صورت تشخیص، هنوز درمان موثری برای این بیماری وجود ندارد، بهترین راهکاری که امروزه ژنتیک پزشکی ارائه می‌دهد، مشاوره ژنتیکی و تشخیص پیش از تولد جنینهای مذکر و در صورت نیاز سقط درمانی است و برای رسیدن به این هدف بایستی وضعیت اعضاء مونث خانواده‌های مبتلا از نظر ناقل بودن مشخص گردد (۹).

با توجه به اینکه اکثریت (۹۰ درصد) افراد مونث ناقل به بیماری دیستروفی عضلانی دوشن فاقد علائم بالینی می‌باشند (۱۰)، برای تشخیص آنها، در کنار روشهای بیوشیمیایی نظیر تست کراتین کیناز سرمی و روشهای هیستولوژیکی (۱۱ و ۱۲)، روشهای مولکولی خاصی نیز ارائه شده است که هر کدام دارای مزایا و محدودیتهایی می‌باشند (۱۸-۱۳). تعقیب ژنی با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای یکی از روشهای مولکولی بوده که در این تکنیک، امکان تعقیب ژن بیماریزا در خانواده‌های مبتلا وجود دارد (۲۲-۱۹). در مطالعه حاضر هفت توالی کوتاه تکرار شونده (ریزماهورها) از درون و اطراف ژن دیستروفین (۲۳) جهت بررسی هاپلوتیپ خویشاوندان فرد مبتلا و تعیین وضعیت اعضاء مونث در خانواده‌های مبتلا از منطقه شمال غرب کشور مورد استفاده قرار گرفته است.

مواد و روش ها

شانزده خانواده مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن توسط متخصصین مغز و اعصاب برای انجام مطالعات مولکولی به مرکز ژنتیک معرفی شدند که محل حذف شدگی ژنی در آنها با استفاده از روش مولکولی تشخیص داده شد (۷). از میان شانزده خانواده در ۲ خانواده (خانواده‌های ۱۴ و ۱۵) سابقه فامیلی بیماری وجود داشت و در چهارده خانواده نیز حالت غیر فامیلی مشاهده گردید. جمعاً ۹۲ نفر، شامل مبتلایان (۱۷ نفر)، افراد مونث ناقل اجباری (۳ نفر)، افراد مذکر سالم (۲۹ نفر) و افراد مونث با ریسک احتمالی ناقل بودن (۴۳ نفر) و یک جنین با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای چندشکل مورد بررسی قرار گرفتند.

خونگیری از افراد ارجاع داده شده، بعد از کسب رضایت کتبی از تمامی اعضاء خانواده، به منظور استخراج DNA انجام پذیرفت. برای استخراج DNA از روش فنل-کلروفرم اصلاح شده (۲۴) استفاده گردید. تکثیر ریزماهورها با استفاده از تکنیک PCR-SSR^۲ انجام شد. ریزماهورها از درون، توالی بالادست و توالی پائین-

دست ژن دیستروفین انتخاب و توالیهای آغازگر مناسب آنها، جهت سنتز سفارش داده شدند (جدول ۱). برای انجام PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از MgCl₂ با غلظت نهایی ۱/۵ میلی-مولار، بافر PCR (۱۰X) : KCl ۵۰۰ میلی-مولار، Tris-HCl ۲۰۰ میلی-مولار، با pH= ۸/۴) با غلظت نهایی ۱X، آنزیم Taq پلیمرز یک واحد (سینازن) و dNTP با غلظت نهایی ۰/۲ میلی-مولار استفاده گردید.

چرخه های PCR بدین ترتیب بود: ۵ دقیقه ۹۵ درجه سانتیگراد برای یک سیکل، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه که این ۴ مرحله به تعداد ۳۵ سیکل تکرار گردید. مرحله آخر شامل ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود.

محصولات PCR به منظور بررسی چندشکلی بروی ژل پلی آکریل آمید غیر دناتوره کننده ۱۲ درصد به ابعاد ۴۰×۲۰ سانتیمتر الکتروفورز گردید. در شرایطی که یکی از نشانگرها برای مادر خانواده‌ای قابل بررسی بود و در آن خانواده چند شکلی نشان می‌داد، بقیه اعضاء خانواده نیز جهت مطالعه وضعیت ناقلین توسط آن نشانگر مورد بررسی قرار گرفتند.

برآورد احتمال ناقل بودن افراد مونث

مقایسه هاپلوتیپ افراد مونث خانواده‌های مبتلا با هاپلوتیپ اعضاء یا عضو مبتلای خانواده، اساس تعیین ناقلین و نیز برآورد احتمال ناقل بودن آنها است.

در خانواده‌های دارای بیش از یک فرد مبتلا (دارای سابقه فامیلی بیماری)، در صورت انتقال هاپلوتیپ پیوسته به ژن جهش یافته به یک فرد مونث، احتمال ناقل بودن آن فرد ۱۰۰-۹۵ درصد خواهد بود و در صورت انتقال هاپلوتیپ غیر پیوسته به ژن جهش یافته، احتمال ناقل بودن افراد مونث کمتر و حدود ۵ درصد برآورد می‌شود. در خانواده‌هایی که سابقه پیشین بیماری در آنها وجود ندارد، در مواردی که حذف شدگی ژن دیستروفین علاوه بر توالی آگزونی، توالی‌های ایترونی را نیز شامل شود، نشانگر یا نشانگرهای قرار گرفته در آن ایترون نیز متحمل حذف شدگی گردیده و در نتیجه با بررسی این نشانگرها، می‌توان با احتمال نزدیک به ۱۰۰ درصد افراد ناقل را در آنها تشخیص داد. اما در مواردی که حذف شدگی نشانگرها مطرح نباشد، نتایج بدست آمده از بررسی نشانگرها تنها برای آن عده از افراد مونث که هاپلوتیپی متفاوت از هاپلوتیپ فرد مبتلا را نشان می‌دهند، قابل اعتماد خواهد بود. چنین افرادی با احتمال ۱۰۰-۹۵ درصد فاقد آلل جهش یافته از ژن مذکور می‌باشند. در چنین خانواده‌هایی اگر هاپلوتیپ فرد مبتلا (هاپلوتیپ پیوسته به بیماری) در خویشاوندان مونث مشاهده گردد، امکان قضاوت در خصوص ناقل بودن آنها وجود ندارد چون در این خانواده‌ها، ناقل بودن مادر مسجل نشده و امکان این هست که آلل جهش یافته در مادر سالم بوده و تنها هنگام انتقال به نسل بعدی، در گامت مادری، متحمل جهش

از ریزماهواریهای مورد مطالعه نمی‌توان مادران هموزیگوت را از مادران همی‌زیگوت تشخیص داد. در دو مورد از مادران نیز علیرغم حذف شدن ریزماهواری در فرد مبتلا و تک باندی بودن مادر نسبت به آن ریزماهواری، به دلیل انتقال هاپلو تیپ مشابه مادری به فرزندان سالم و مبتلا، مادر هموزیگوت و سالم تشخیص داده شدند (شکل ۱.ج).

با توجه به اینکه نرخ موزائیسیم گزارش شده در خانواده‌های مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن حدود ۱۵ درصد می‌باشد (۲۶) هر شش مادری که به این ترتیب سالم تشخیص داده شدند در صورت تصمیم به بارداری مجدد توصیه به تشخیص پیش از تولد گردیدند. به این ترتیب احتمال موزائیسیم گونادی برای هر کدام از مادر بزرگ‌های خانواده‌های شماره ۶ و ۱۱ نیز باید در نظر گرفته شود. در دو خانواده (خانواده‌های شماره ۱ و ۲) از چهارده خانواده بدون سابقه فامیلی، جایگاه حذف ژنی مجاور هیچکدام از ریزماهواریهای مورد بررسی نبود، در نتیجه حذف شدگی ریزماهواریها در مبتلایان آنها مشاهده نگردید. به همین دلیل امکان تعیین وضعیت مادران در این خانواده‌ها فراهم نشد. به این ترتیب از میان افراد مونث این دو خانواده تنها وضعیت آن عده‌ای مشخص شد که هاپلو تیپ فرد مبتلا را به ارث نبرده بودند (سالم) تشخیص داده شدند) و وضعیت بقیه آنها به دلیل نامشخص بودن وضعیت مادران خانواده تشخیص داده نشد. نتایج بررسی تمامی افراد مونث از چهارده خانواده بدون سابقه فامیلی (بغیر از مادران آنها که وضعیتشان در جدول ۲ آمده است و مادر بزرگ‌های دو خانواده ۶ و ۱۱) و دو خانواده با سابقه فامیلی در جدول ۳ آورده شده است. با بررسی ریزماهواریها، وقوع سه نوترکیبی در سه خانواده مشخص گردید (شکل ۱.ب). هر سه مورد از این نوترکیبی‌ها در منطقه مرکزی ژن دیستروفین رخ داده بودند. در یکی از خانواده‌هایی که محل حذف شدگی در آنها مشخص شده بود، مایع آمنیوتیک جنینی با جنسیت مذکر توسط ریزماهواریها مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱.ج). در عضو مبتلای این خانواده حذف شدگی اگزونی به همراه حذف شدگی یکی از ریزماهواریها مشخص گردیده بود. بررسی مایع آمنیوتیک نشانگر این بود که حذف شدگی آن ریزماهواری اتفاق نیفتاده است. به این ترتیب نتایج بررسی ریزماهواریها در کنار مطالعات اگزونی، سالم بودن جنین را به اثبات رسانید.

گردیده و یا مادر حالت موزائیکی برای جهش در ژن دیستروفین داشته باشد. از آنجا که احتمال رخداد نوترکیبی بین دو انتهای ژن دیستروفین حدود ۱۰ درصد برآورد شده است (۲۵) مقدار حداکثر نرخ نوترکیبی مابین محل یک نشانگر در ایترونیهای اواسط ژن و یک محل فرضی جهش ژنی حدود ۵ درصد خواهد بود. بنابراین با در نظر گرفتن احتمال نوترکیبی، وقتی نشانگرهای منطقه مرکزی و نشانگرهای ۵' ژن دیستروفین برای تشخیص ناقلین مورد استفاده قرار می‌گیرند، احتمال درستی نتایج بدست آمده، ۹۵ درصد برآورد می‌شود و اگر نشانگرهای منطقه ۳' ژن نیز به مجموع نشانگرهای مورد بررسی اضافه شوند، این احتمال به بیش از ۹۵ درصد افزایش می‌یابد. نهایتاً وقتی که منطقه حذف شده روی ژن دیستروفین شامل دو یا چند نشانگر پشت سر هم باشد، احتمال وقوع نوترکیبی در آن منطقه قابل اغماض و نتایج حاصله با احتمال ۱۰۰ درصد قابل استناد خواهند بود.

یافته‌ها

در مجموع ۴۳ فرد مونث دارای ریسک ناقل بودن و ۳ فرد مونث ناقل اجباری مورد مطالعه قرار گرفتند و در انتها وضعیت ۲۹ فرد مونث (۶/۱۸) از نظر ناقل بودن یا نبودن مشخص شده و وضعیت ۱۴ فرد مونث (۳۱/۸۱) نامشخص باقیماند. از آنجا که تعیین وضعیت مادر در خانواده‌های بدون سابقه فامیلی از نظر ناقل بودن یا نبودن به تعیین وضعیت سایر افراد مونث خانواده کمک می‌کند، در ابتدا می‌بایست مادران چهارده خانواده مورد بررسی قرار می‌گرفتند.

مطالعه‌ی چهارده فرد مبتلا از چهارده خانواده فاقد سابقه فامیلی نشان داد که در دوازده مبتلا از دوازده خانواده، حذف شدگی جایگاه ژنی با حذف برخی از ریزماهواریهای مجاور همراه می‌باشد. نتایج بررسی ریزماهواریهای حذف شده بر روی مادران دوازده خانواده در جدول ۲ آمده است. در خانواده شماره ۱۱ (شکل ۱.الف)، مادر نسبت به ریزماهواری STR49 همی‌زیگوسی نشان داد و بدین ترتیب ناقل بودن او تأیید گردید. در خانواده شماره ۶ هم که دارای دو فرزند مبتلا بودند، مادر نسبت به ریزماهواری STR49 همی‌زیگوسی نشان داد و به این ترتیب ناقل بودن او با رد احتمال موزائیسیم گونادی، تأیید گردید. (جدول ۲) در هر دو خانواده ۶ و ۱۱ آلل مادر بزرگی در هاپلو تیپ مادری متحمل حذف شدگی گردیده بود. البته هر دو مادر بزرگ نسبت به ریزماهواریهای حذف شده، هتروزیگوسی نشان دادند.

در چهار مادر از یازده مادر باقیمانده، علیرغم حذف شدن ریزماهواری یا ریزماهواریهای مربوطه در فرد مبتلا، مادر نسبت به حداقل یکی از آن ریزماهواریها هتروزیگوت بود که سه مورد از این هتروزیگوسی‌ها بوسیله ریزماهواری STR49 و یک مورد نیز توسط STR50 نشان داده شد. در پنج مورد از مادران علیرغم حذف شدن ریزماهواری مربوطه در فرد یا افراد مبتلا، مادر نسبت به این ریزماهواریها چند شکلی نشان نداد. در این موارد با استفاده

جدول ۱: نام ریزماهوره‌های مورد استفاده در این مطالعه به همراه جایگاه ژنی و توالی آغازگرهای آنها.

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

F: forward, R: reverse

جدول ۲: تعیین وضعیت مادران خانواده‌هایی که بیماری در آنها بدون سابقه فامیلی بوده و حذف آگرونی همراه با حذف برخی نشانگرهای مورد بررسی در مبتلا یا مبتلایان مشخص شده بود به همراه مادر خانواده ۶ که دارای دو فرزند مبتلا بودند.

شماره خانواده	نشانگر حذف شده در مبتلا یا مبتلایان	وضعیت مادر نسبت به نشانگر حذف شده	نشانگر کارا در تعیین وضعیت مادر
۳	STR49,STR45,AFM217xa5	Het:STR49 Hom:STR45,AFM217xa5	STR49
۴	STR45,AFM217xa5,STR49, STR50, AFM072zh3	Het:STR49 Hom: STR45,AFM217xa5, STR50, AFM072zh3	STR49
۵	AFM217xa5,STR49,STR50	Hom or Hem:AFM217xa5, STR49, STR50	-
۶	AFM217xa5, STR49	Hem:AFM217xa5,STR49	AFM217xa5, STR49
۷	STR49,STR50	Het:STR50 Hom:STR49	STR50
۸	STR49,STR50,AFM072zh3	Hom or Hem:STR49, STR50, AFM072zh3	-
۹	AFM072zh3	Hom or Hem:AFM072zh3	-
۱۰	AFM217xa5,STR49	Het:STR49 Hom:AFM217xa5	STR49
۱۱	STR49	Hem:STR49	STR49
۱۲	AFM072zh3	Hom:AFM072zh3	*
۱۳	STR44A	Hom:STR44A	*
۱۵	AFM072zh3	Hem or Hom:AFM072zh3	-
۱۶	STR49	Hem or Hom:STR49	-

Hom:Homozygosity, Hem:Hemizyosity, Het:Heterozygosity

مادران هتروزیگوت و یا هموزیگوت نسبت به نشانگرهایی که در مبتلا یا مبتلایان حذف شده است، سالم و مادرانی که نسبت به نشانگرهای مذکور همی‌زیگوت هستند، ناقل محسوب می‌شوند. در آن عده از مادرانی که وضعیت هموزیگوت یا هتروزیگوت بودنشان مشخص نمی‌باشد، تعیین وضعیت با استفاده از نشانگرهای به کار برده شده امکانپذیر نمی‌باشد.

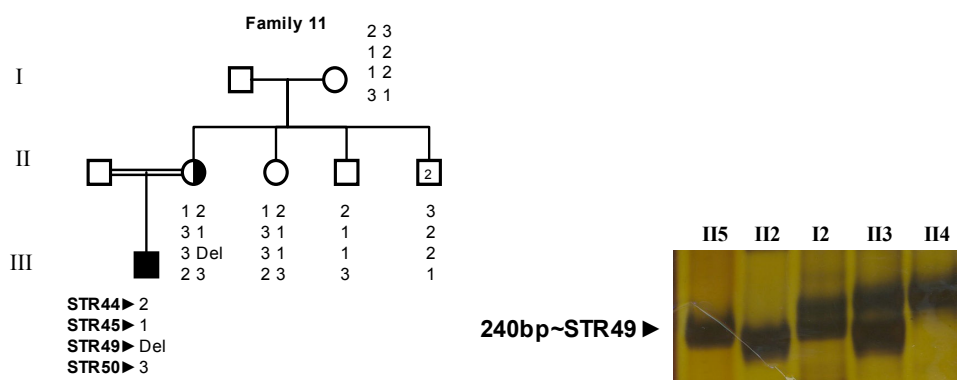
این مادران علیرغم تک باند بودن نسبت به نشانگر حذف شده در فرد مبتلا، به دلیل یکسان بودن هاپلوتیپ فرزندان مبتلا و سالم، هموزیگوت و سالم تشخیص داده شدند.

جدول ۳: تعیین وضعیت افراد مونث دارای ریسک ناقل بودن در خانواده‌های مبتلا.

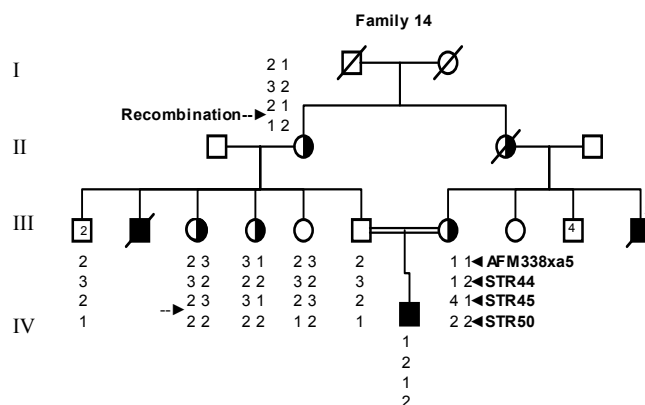
وضعیت فرد مونث	تعداد افراد مونث	هاپلوتیپ فرد مونث	احتمال	تعداد و نوع خانواده‌ها
سالم ^۱	۶	هاپلوتیپ متفاوت از هاپلوتیپ مبتلا	۹۵ الی ۱۰۰ درصد	۳/xS
سالم ^۱	۱	هاپلوتیپ متفاوت از هاپلوتیپ مبتلا	۹۵ الی ۱۰۰ درصد	۱/xxF
سالم ^۲	۷	هاپلوتیپ فاقد حذف‌شدگی	۱۰۰ درصد	۶/S
سالم ^۲	۴	هاپلوتیپ فاقد حذف‌شدگی	۱۰۰ درصد	۱/F
ناقل ^۳	۲	هاپلوتیپ مشابه هاپلوتیپ مبتلا	۹۵ الی ۱۰۰ درصد	۱/F
نامشخص ^۴	۷	-	-	۷/S

* خانواده‌های بدون سابقه فامیلی (Sporadic)، * خانواده‌های دارای سابقه فامیلی (Familial)

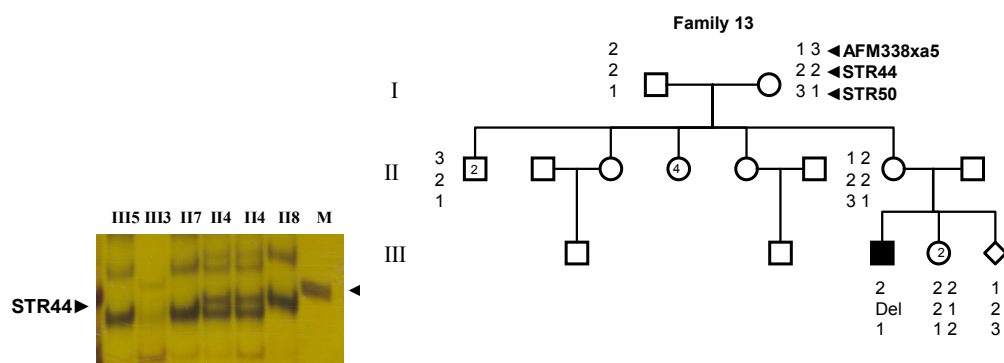
- چنین افراد مونثی به دلیل اینکه هاپلوتیپ متقل شده به آنها متفاوت از هاپلوتیپ فرد مبتلا است، با احتمال ۹۵ الی ۱۰۰ درصد سالم تشخیص داده شدند.
- در این افراد مونث حذف‌شدگی ریزماهوره/ها در الگوی هاپلوتیپ مشاهده نگردید. در اعضاء مذکر مبتلای خانواده‌های آنها، حذف‌شدگی همان ریزماهوره‌ها در هاپلوتیپشان تأیید شده بود و بر این اساس با احتمال نزدیک به ۱۰۰ درصد این افراد مونث سالم تشخیص داده شدند.
- مشاهده هاپلوتیپ مشابه در مقایسه با هاپلوتیپ اعضاء مذکر مبتلا، در این افراد مونث، احتمال ناقل بودن آنها را به بیش از ۹۵ درصد افزایش داد.
- وضعیت افراد مونثی که ریزماهوره‌های مورد مطالعه در آنها گویا نبوده‌اند، نامشخص باقی ماند.



شکل ۱. الف. شجره‌نامه و هاپلوتیپهای خانواده ۱۱ به همراه تصویر ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد از نشانگر STR49. ریزماهوره STR49 در هاپلوتیپ فرد مبتلا (III1) حذف شده است. مادر (II2) نیز نسبت به این ریزماهوره همی‌زیگوسی نشان داده و ناقل محسوب می‌شود.



شکل ۱. ب. شجره‌نامه و هاپلوتیپهای خانواده ۱۴. مادر (III7) و مادر بزرگ (II2) ناقل اجباری هستند. یکی از عمه‌ها (III5) به دلیل دریافت هاپلوتیپ پیوسته به آلل سالم ژن دیستروفین، سالم تشخیص داده شد. عمه دیگر (III4) به دلیل دریافت هاپلوتیپ پیوسته به آلل جهش یافته، ناقل تشخیص داده شد. عمه سوم (III3) ترکیبی از هر دو هاپلوتیپ مادری را دریافت کرده است که شامل جایگاه حذف شده‌ی ژنی نیز می‌باشد (جایگاه حذف ژنی در این خانواده، اگزون ۵۲ می‌باشد که بعد از نشانگر STR50 را شامل می‌شود) و به این ترتیب ناقل تشخیص داده شد.



شکل ۱. ج. شجره‌نامه و هاپلوتیپهای خانواده ۱۳ به همراه تصویر ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد از نشانگر STR-44A. هاپلوتیپ فرد مبتلا (III3) نسبت به ریزماهوره STR-44A حذف‌شدگی نشان می‌دهد. جنین (III5) که جنسیت آن پسر تشخیص داده شده بود، به دلیل انتقال هاپلوتیپ پیوسته به آلل سالم از مادر (II7)، سالم تشخیص داده شد. علیرغم تک باند بودن STR-44A در هاپلوتیپ مادری به دلیل انتقال هاپلوتیپ مشابه به فرزند مبتلا و دختران (III4) (که در فرزند مبتلا دارای حذف‌شدگی STR-44A و در دختران فاقد حذف‌شدگی می‌باشد)، مادر سالم تشخیص داده شد، البته احتمال موزائیسیم جنسی مادر را نباید از نظر دور داشت. (M: size marker)

بحث

از بین روش‌های مختلفی که برای تشخیص ناقلین وجود دارد، روش‌های هیستولوژیکی به شدت تهاجمی بوده و روش‌های کمی نظیر PCR کمی در عین حساس، پیچیده و پرهزینه بودن چندان قابل اعتماد نمی‌باشند، البته امروزه روش‌های پیشرفته‌ای نیز ارائه شده است که علی‌رغم دقت و میزان بالای موفقیت در تشخیص ناقلین، بسیار پرهزینه و زمانبر می‌باشند (۱۸ و ۱۷). روش تعقیب ژنی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت یک تکنیک مناسب و اقتصادی محسوب می‌شود و می‌توان با کاربرد تعداد بیشتری از ریزماهورها با درصد چندشکلی بالاتر، دقت و درصد موفقیت کار را در تشخیص ناقلین افزایش داد. با وجود پیشرفت‌های اخیر در تشخیص ناقلین از طریق روش‌های کمی (۲۷) استفاده از تکنیک تعقیب ژنی با کمک نشانگرهای ریزماهورهای، به دلیل هزینه پایین‌تر و نیز کارایی بالا هنوز جایگاه خود را، حتی برای خانواده‌های بدون سابقه بیماری دیستروفی عضلانی دوشن حفظ نموده است. در مواردی که حذف ژنی علاوه بر توالی‌های آگزونی، توالی‌های ایترونی را نیز در بر بگیرد حذف شدگی ریزماهورهای آن منطقه مشاهده خواهد شد (در این مطالعه در ۸۱/۲۵ درصد خانواده‌ها). حالتی که در آن یکی از آللهای پدربزرگی یا مادربزرگی در مادر متحمل حذف شدگی شده باشد، باعث ایجاد "از دست رفتن هتروزیگوسیتی" یا ایجاد حالت همی‌زیگوسی مادر در آن ریزماهور می‌شود که این مسأله بنوبه خود ناقل بودن مادر را به اثبات می‌رساند. هتروزیگوت بودن مادر برای ریزماهور یا ریزماهورهایی که حذف آنها در افراد مبتلا مشاهده گردیده است، دلیل بر سالم بودن مادر می‌باشد (۲۲-۱۹) که هر دو حالت به ترتیب در دو و چهار مورد از مادران مشاهده گردید.

به این ترتیب، از میان کل مادرانی که وضعیتشان مشخص شد، شش دهم (۶۰ درصد) سالم و چهار دهم (۴۰ درصد) ناقل تشخیص داده شدند. اکثر گزارشات (۲۸) درخصوص خانواده‌های مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن، یک سوم موارد را ناشی از جهش جدید و مادر را سالم و در دو سوم بقیه موارد، مادر را ناقل و بیماری را ارثی دانسته‌اند. البته Sinha (۲۹) و Alcantara (۳۰) نتایج متفاوتی را بدست آورده‌اند، بطوریکه در مطالعات اولی ۳۸/۷۰ درصد و در مطالعات دومی ۳۷/۸ درصد از مادرانی که وضعیتشان مشخص شده بود، ناقل تشخیص داده شدند. در این زمینه، نتایج مطالعه حاضر قابل مقایسه با دو گزارش اخیر است. البته با توجه به اینکه هدف مطالعه حاضر تنها کمک به شناسایی افراد مونث ناقل ژن جهش یافته دیستروفین بوده است، نمی‌توان نتایج آن را که حاصل بررسی تعداد محدودی از خانواده‌های مبتلا می‌باشد (که در آن تعداد خانواده‌های بدون سابقه فامیلی بیشتر بود)، برای کل جمعیت تعمیم داد و برای نیل به این هدف، بررسی‌های اپیدمیولوژیکی بیماری از ابعاد مختلف ضروری می‌باشد. در این بررسی (جدول ۲)، ریزماهوری STR49 به دلیل قرار گرفتن در کانون اولین منطقه داغ حذفی ژن دیستروفین و نیز به

دلیل درصد بالای چند شکلی، به عنوان بهترین ریزماهور در کمک به تعیین وضعیت مادران خانواده‌های بدون سابقه فامیلی و در نتیجه سایر افراد مونث دارای ریسک ناقل بودن این خانواده‌ها انتخاب شد که با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد (۱۹ و ۶).

ریزماهورها و نوترکیبی

در میان خانواده‌های مورد مطالعه، ۳ میوز از ۵۲ میوز، همراه با وقوع نوترکیبی بودند. بنابراین در مطالعه حاضر نرخ نوترکیبی در ژن دیستروفین حدود ۵/۷۶ درصد برآورد می‌شود. در نتایجی که توسط دیگر محققین گزارش شده، نرخ نوترکیبی ۶/۶ درصد (۱۹)، ۱۰ درصد (۲۵) و ۱۲ درصد (۳۱) برآورد شده است.

با توجه به اندازه ژن دیستروفین (۲/۳ مگا جفت باز) نرخ مورد انتظار برای نوترکیبی حدود ۲/۳ درصد است که تمام نتایج بدست آمده، موید بالا بودن نرخ نوترکیبی در ژن دیستروفین در مقایسه با عدد مورد انتظار می‌باشد. بزرگی بیش از حد ژن دیستروفین دلیل بالا بودن نرخ نوترکیبی عنوان شده است (۳۲). نکته قابل توجه دیگر انطباق مناطق داغ حذف ژنی و مناطق داغ نوترکیبی در ژن دیستروفین می‌باشد، که در این زمینه تفسیرهای مختلفی ارائه شده است (۱۹ و ۶).

رخداد نوترکیبی می‌تواند تأثیر قابل توجهی در تفسیر هاپلوتیپها، جهت تعیین وضعیت ناقلین داشته باشد و تفسیر ناصحیح منتهی به تشخیص نادرست در خصوص وضعیت افراد مونث با ریسک ناقل بودن خواهد شد. در مطالعه حاضر وقوع سه نوترکیبی در خانواده‌هایی که محل حذف شدگی ژنی در آنها شناسایی شده بود، مشکلی در تعیین وضعیت افراد مونث ایجاد نکرد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که بررسی نشانگرهای چندشکلی که در سراسر ژن دیستروفین پراکنده هستند علاوه بر مشخص کردن افراد مونث ناقل در خانواده‌های با سابقه فامیلی و خانواده‌های بدون سابقه بیماری دیستروفی عضلانی دوشن می‌تواند برای مشخص کردن حذف شدگی‌ها در افراد مذکر و مونث، تشخیص نوترکیبی‌های ژن دیستروفین و تشخیص پیش از تولد با بررسی مایع آمنیوتیک نیز مورد استفاده قرار گیرد و بنابراین یک تکنیک مولکولی اقتصادی و مناسب برای مطالعه خانواده‌های مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن، انجام مشاوره ژنتیکی و تشخیص پیش از تولد می‌باشد.

تشکر و قدردانی

مولفین از کلیه 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.

References

- Emery AEH. The muscular dystrophies. *BMJ* 1998; **317**: 991-995.
- Hoffman E P, Brown R H, Kunkel L M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; **51** (6): 919-928.
- Blake DJ, Weir A, Newey SE and Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 2002; **82** (2): 291-329.
- Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, 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.
- Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel L M. Detection of 98 % of DMD/ BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Human Genetics* 1990; **86** (1): 45-48.
- Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, Gibbs SRA, de 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** (5): 951-960.
- جبارپور بنیادی م، برزگر م، آیرملو، خندقی ر، اسماعیلی م. تشخیص و غربالگری بیماری دیستروفی عضلانی دوشن و بکر با استفاده از تکنیک PCR چندگانه در آذربایجان شرقی، مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز ۱۳۸۵، دوره ۲۸، شماره ۱، صص ۳۳ تا ۳۹.
- Davie AM, Emery AEH. Estimation of proportion of new mutations among cases of duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 1978; **15** (5): 339-345.
- Nowak KJ, Davies KE. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO reports* 2004; **5** (9): 872-876.
- Emery AEH. *Duchenne muscular dystrophy*. 2nd ed. Oxford and New York, Oxford University Press, 1993; PP: 25-45.
- Moser H. Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum Genet* 1984; **66**: 17-40.
- Miranda AF, Francke U, Bonilla E, Martucci G, Schmidt B, Salviati G, et al. Dystrophin immunocytochemistry in muscle culture: detection of a carrier of duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 1989; **32** (2): 268-273.
- 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.
- 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.
- 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): 191-196.
- 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): 550-558.
- Armour JA, Sismani C, Patsalis PC, Cross G. Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res* 2000; **28** (2): 605-609.
- 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.
- 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.
- Delgado-Luengo WN, Borjas-Fuentes L, Zabala-Fernandez W, Fernandez-Salgado E. 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.
- Giliberto F, Ferreiro V, Dalamón V, Surace E, Cotignola J. Direct deletion analysis in two Duchenne muscular dystrophy symptomatic females using polymorphic dinucleotide (CA)_n loci within the dystrophin gene. *JBMB* 2003; **36** (2): 179-184.
- 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.
- Center for Human and Clinical Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden muscular dystrophy, 2006. http://www.dmd.nl/ca_dmd.html (Accessed September 2006).
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple setting out procedure for extraction of DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1998; **16**(3): 1215.

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, van der Hout AH, Buys CH, Hofstra RM, 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* 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; **28** (4): 385-91.
28. Barbujani G, Russo A, Danielli GA, Spiegler AW, Borkowska J, Petruszewicz IH. Segregation analysis of 1885 DMD families: significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Hum Genet* 1990; **84** (6): 522-6.
29. Sinha S, Mishra S, Singh V, Mittal RD, Mittal B. High frequency of new mutations in North Indian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. *Clin Genet*. 1996; **50** (5): 327-31.
30. Alcántara, M.A., Villarreal, M.T., Del Castillo, V., Gutiérrez, G. et al. High frequency of *de novo* deletions in Mexican Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Implications for genetic counseling. *Clin Genet* 1999; **55**: 376-380.
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**: 602-606.
32. Mukherjee M, Chaturvedi LS, Srivastava S, Mittal RD, Mittal B. *De novo* mutations in sporadic deletional Duchenne muscular dystrophy (DMD) cases. *EMM* 2003; **35**: 113-117.