مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۵، شماره ۷، مهر ۱۳۹۷ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

بررسی جهش‌های اگزون ۱۱-۱۰ ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز در بیماران فنیل‌کتونوری در استان گلستان

حسین حایریان اردکانی: دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

***زینب خزائی کوهپر:** استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران (*نویسنده مسئول)
dz.khazaei@gmail.com

سکینه محمدیان: دانشیار، مرکز تحقیقات سلامت کودکان و نوزادان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: فنیل کتونوری (Phenylketonuria-PKU)، شایع‌ترین اختلال مادرزادی متابولیسم اسید آمینه، یک اختلال اتوزومال مغلوب است که به وسیله بیش از ۶۰۰ موتاسیون در ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز (*PAH*-*Phenylalanine Hydroxylase*) ایجاد می شود. الگوی توزیع موتاسیون‌ها در ژن *PAH*، خاص هر جمعیت است. هدف از این مطالعه شناسایی موتاسیون‌ها در اگزون های ۱۱و۱۰ ژن *PAH* در بیماران PKU از استان گلستان و مقایسه آن با مطالعات صورت گرفته در سایر بخش‌های ایران بود.

روش کار: مطالعه حاضر، یک مطالعه مقطعی و توصیفی می‌باشد. طی یک دوره یک ساله، تعداد ۲۶ بیمار PKU غیر مرتبط از نواحی مختلف استان گلستان شناسایی شد. DNA ژنومی از لوکوسیت‌ها با استفاده از کیت استخراج شد و روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز-تعیین توالی برای شناسایی موتاسیون‌ها استفاده گردید.

یافته‌ها: موتاسیون‌های شناسایی شده در این مطالعه عبارتند از: (۱۹/۲۳ درصد) IVS10-11G>A و (۷/۷ درصد) IVS11+1G>C. این بیماران فنوتیپ PKU کلاسیک داشتند.

نتیجه‌گیری: شیوع بالای موتاسیون IVS10-11G>A در استان گلستان احتمال دارد با رانش ژنتیکی، اثر موسس و ازدواج فامیلی مرتبط باشد. به علاوه بررسی موتاسیون‌ها در ژن *PAH*، می تواند ابزار مفیدی برای تشخیص مولکولی بیماری PKU و تعیین ناقلین در این جمعیت باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

کلیدواژه‌ها
استان گلستان،
فنیل کتونوری،
PAH،
IVS10-11G>A،
IVS11+1G>C

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۲۸
تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۲۰

شیوه استناد به این مقاله:
Haerian Ardakani H, Khazaei –Koohpar Z, Mohammadian S. Mutation analysis of exon 10-11 of phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria patients from Golestan province. Razi J Med Sci. 2018;25(7):38-46.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 1.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-12]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.7.8.3]

Razi Journal of Medical Sciences.2018;25(7):38-46. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Mutation analysis of exon 10-11 of phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria patients from Golestan province

Hossein Haerian Ardakani, MSc Student in Cellular and Molecular Biology, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran
***Zeinab Khazaei –Koohpar**, PhD, Assistant Professor of Cellular and Molecular Biology, Department of cellular and molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran (&Corresponding author) dz.khazaei@gmail.com
Sakineh Mohammadian, MD, Associate Professor of Pediatrics, Pediatrician, Neonatal and Childrens Health Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Abstract

Background: Phenylketonuria (PKU), the most common inborn error of aminoacid metabolism, is an autosomal recessive disorder caused by more than 600 mutations in Phenylalanine Hydroxylase gene (PAH). Distribution pattern of mutations in the PAH gene are specific to each population. The aim of this study was to identify mutations in exons 10 and 11 of the PAH gene in patients with PKU from Golestan Province and compare it with the studies in other parts of Iran.
Methods: This study is a cross-sectional descriptive study. During a one-year period, twenty- six unrelated PKU patients were identified from different regions of Golestan province. Genomic DNA was extracted from leukocytes using High Pure-Template PCR kit (Roche) and polymerase chain reaction – sequencing method was applied to detect mutations.
Results: The identified mutations in this study are: IVS10-11G>A (19.23%) and IVS11+1G>C (7.7%). These patients had classic PKU phenotype.
Conclusion: The high frequency of IVS10-11G>A mutation in Golestan province may be related to genetic drift, founder effect, and consanguinity. Moreover investigation of mutations in PAH gene can be a useful tool for molecular detection of PKU disease and carrier detection in this population.

Conflicts of interest: None
Funding: Islamic Azad University, Tonekabon Branch

Keywords
Golestan province,
Phenylketonuria,
PAH,
IVS10-11G>A,
IVS11+1G>C

Received: 05/18/2018
Accepted: 09/11/2018

Cite this article as:
Haerian Ardakani H, Khazaei –Koohpar Z, Mohammadian S. Mutation analysis of exon 10-11 of phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria patients from Golestan province. Razi J Med Sci. 2018;25(7):38-46.

*This work is published under CC BY-NC-SA 1.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-12]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.7.8.3]

مقدمه

فنیل‌کتونوری (Phenylketonuria-PKU) شایع‌ترین اختلال متابولیسم اسیدآمینه با دامنه وسیعی از تظاهرات بالینی و بیوشیمیایی است (۱). این اختلال اتوزومال مغلوب به دلیل نقص در آنزیم کبدی به نام فنیل آلانین هیدروکسیلاز ایجاد می‌شود (۲). نقص آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز باعث افزایش فنیل آلانین در خون شده که ممکن است موجب عقب‌ماندگی شدید و غیر قابل برگشت ذهنی در افراد مبتلا گردد، مگر در مواردی که کودک مبتلا تحت رژیم با فنیل آلانین کم قرار گرفته باشد (۱). شیوع ۱ در ۱۰۰۰۰ تولد در سفیدپوستان دارد اما در میان جمعیت‌های مختلف متفاوت است (۲). فراوانی بیماری PKU در جمعیت ایرانی ۱ در ۳۶۲۷ نفر در هر تولد زنده برآورد شده است که این فراوانی بالا به دلیل میزان بالای ازدواج فامیلی در این جمعیت است (۳).

بر اساس سطح فنیل آلانین خون قبل از درمان، Hyperphenylalaninemia از نظر بالینی به ۴ گروه تقسیم می‌شود: (HPA) هایپرفنیل آلانینمی (میلی‌گرم بر دسی لیتر ۱۰-۲)، خفیف PKU (میلی‌گرم بر دسی لیتر ۱۵-۱۰)، متوسط PKU (میلی‌گرم بر دسی لیتر ۲۰-۱۵) و کلاسیک PKU (میلی‌گرم بر دسی لیتر ۲۰<) (۴). بیماری PKU به وسیله انواع زیادی از موتاسیون‌ها که توالی کد کننده ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز (*Phenylalanine Hydroxylase-PAH*) یا فرآیند پیرایش (Splicing) mRNA را متأثر می‌سازند، ایجاد شده و موجب عمل ناقص یا حذف عمل آنزیم PAH می‌شود (۵). این آنزیم دارای ۳ دامین ساختاری شامل یک دامین تنظیمی در N ترمینال و یک دامین کاتالیتیک و یک دامین تترامریزه شدن در C ترمینال می‌باشد. پروفایل موتاسیونی ژن *PAH* در سرتاسر دامین‌های کامل ساختاری پراکنده بوده و تنوع زیادی را نشان می‌دهد (۶). ژن *PAH* با طول ۹۰ کیلوباز روی بازوی بلند کروموزوم ۱۲ در ناحیه q22-q24.1 واقع شده است (۱) که شامل ۱۳ اگزون و ۱۲ اینترون می‌باشد (۲).

تاکنون بیش از ۶۰۰ جهش مختلف در ژن *PAH* شناسایی و در پایگاه اطلاعاتی PAHdb ثبت شده‌اند (۷). IVS10-11G>A یکی از موتاسیون‌های شایع در مبتلایان به فنیل کتونوری کلاسیک در ایران (۲) و موتاسیون شایع ناحیه مدیترانه است (۸)؛ به‌طوری که زارع کریزی و همکاران در سال ۲۰۱۱ شیوع آن را در نمونه‌های جمع آوری شده از استان‌های خراسان، تهران، سمنان، مرکزی، همدان، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی (۱۲۴ نمونه) حدود ۲۵٪ گزارش کردند (۲). همچنین بنیادی و همکاران در سال ۲۰۱۰ نرخ این جهش را در بیماران آذری زبان ایرانی حدود ۱۹/۳٪ گزارش نمودند (۹). در حالی که شیوع کم این جهش در استان اصفهان و خوزستان به ترتیب حدود ۵/۷٪ (۱۰) و ۱۰٪ (۱۱) نشان‌دهنده تفاوت شیوع آن در مناطق مختلف ایران است. لازم به ذکر است که شیوع موتاسیون IVS11+1G>C در مطالعه زارع کریزی و همکاران ۸/۵٪ (۲)، در استان خراسان رضوی ۶/۴٪ (۸)، استان خوزستان ۲/۵٪ (۱۱) و در بیماران آذری زبان ایرانی ۱/۱٪ (۹) گزارش شده است.

با توجه به اینکه در هر جمعیتی ممکن است یک یا چند موتاسیون خاص شایع باشد، بررسی این موتاسیون‌های شایع در تشخیص مولکولی از نظر زمانی و اقتصادی مقرون به‌صرفه‌تر است، بنابراین شناسایی موتاسیون‌های شایع این آنزیم به‌طور بومی، عامل مفید و مؤثری در طراحی برنامه ژنتیکی مورد نیاز آزمایش تشخیصی مولکولی این بیماری می‌باشد (۱۲). هدف از این مطالعه شناسایی مولکولی موتاسیون‌های اگزون ۱۰-۱۱ ژن *PAH* به روش سکوئنسینگ در بیماران مبتلا به فنیل کتونوری از استان گلستان و مقایسه آن با مطالعات صورت گرفته در سایر بخش‌های ایران بود.

روش کار

این تحقیق در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گلستان دارای تأییدیه به

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-12]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.7.8.3]

شماره IR.GOUMS.REC.1394.204 است. مطالعه حاضر، یک مطالعه مقطعی و توصیفی می‌باشد. که طی یک دوره یک ساله تعداد ۲۶ بیمار PKU و غیر خویشاوند از نواحی مختلف استان گلستان شناسایی شد. شناسایی این بیماران بر اساس پرونده‌های موجود در بیمارستان طالقانی گرگان صورت گرفت. سپس از بیماران و خانواده‌های آن‌ها جهت شرکت در این مطالعه دعوت به عمل آمد. پس از توجیه شرکت‌کنندگان، فرم‌های رضایت نامه و پرسش نامه از سوی بیماران و یا خانواده‌های آنان تکمیل گردید (در مواردی که بیمار کودک یا دچار عقب‌ماندگی ذهنی بود). به منظور جمع آوری نمونه های خون از هر فرد بیمار به میزان ۵-۲ میلی لیتر خون گیری به عمل آمد و برای جلوگیری از انعقاد خون، از فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری حاوی ۳۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۵ مولار به عنوان ماده ضد انعقاد استفاده شد.

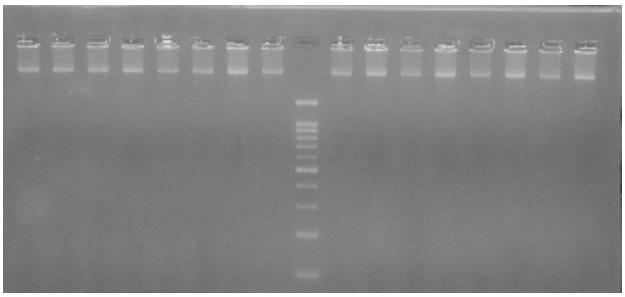
جهت استخراج DNA از کیت High Pure-Template PCR محصول شرکت Roche-آلمان استفاده شد. پس از استخراج DNA و قبل از انجام واکنش PCR جهت بررسی کمیت اسید نوکلئیک، DNA به‌دست آمده با نانواسپکتروفتومتر (USA, Thermo scientific, ,2000C,NanoDrop) بررسی شد. همچنین برای تایید کیفیت DNA استخراج شده، نمونه‌ها با روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۱).

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل ۴۰۰۰-TC محصول شرکت TECHNE–انگلستان انجام گرفت. توالی پرایمرهای رفت و برگشت مورد استفاده در این واکنش به صورت زیر بود (۱۱):

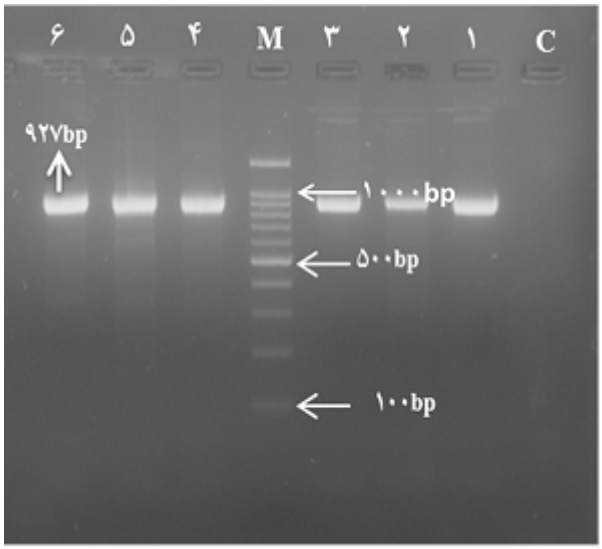
پرایمر رفت:

5′-AGGTATCCCTTCATCCAGTCAAGG-3′

پرایمر برگشت:



شکل ۱- الکتروفورز DNA استخراج شده از ۱۶ نمونه بیمار روی ژل آگارز ۱٪



شکل ۲- الکتروفورز محصولات PCR مربوط به قطعه شامل اگزون‌های ۱۱-۱۰ (۹۲۷جفت باز) بر روی ژل آگارز ۱٪
M (سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز)، شماره ۱ تا ۶ نمونه بیمار و C: کنترل منفی.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-12]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.7.8.3]

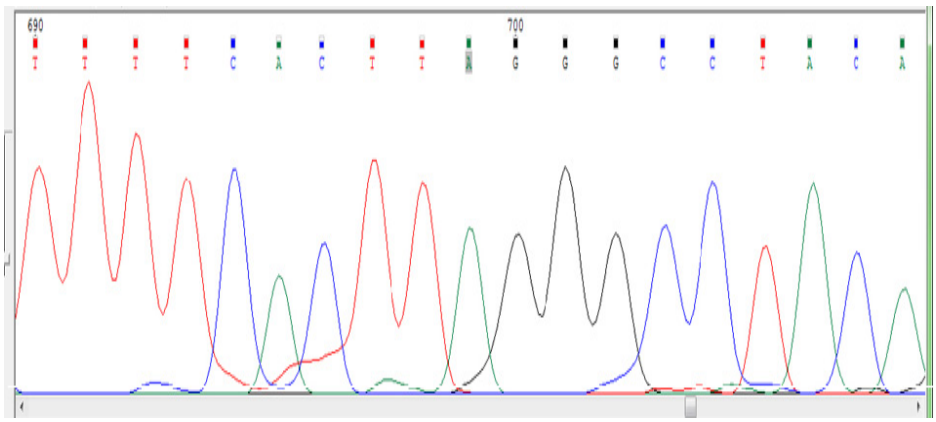
5'-GATGAGTGGCACCAGTCAGGAGG-3'

سنتز پرایمرها توسط شرکت Bioneer، کره جنوبی صورت گرفت.

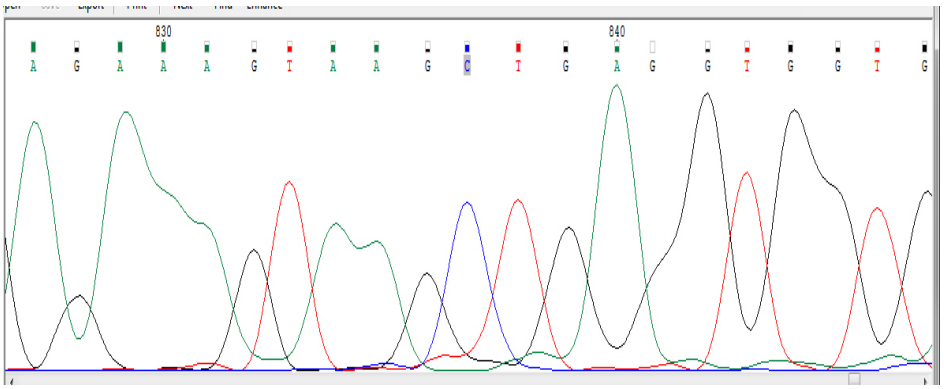
طول محصول نهایی واکنش PCR، ۹۲۷ bp و حجم نهایی مخلوط واکنش PCR، ۵۰ میکرولیتر بود که با استفاده از کیت AccuPower® PCR PreMix (شرکت Bioneer، کره جنوبی) و با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایمر (۲۰ میکرومول) و آب استریل به محلول PreMix تهیه شد. نتایج حاصل از تنظیم شرایط واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت تکثیر اگزون ۱۱-۱۰ و نواحی اینترونی اطراف آن به صورت زیر می‌باشد: دمای واسرشتگی اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، تعداد سیکل های واکنش، ۳۰ سیکل که هر سیکل شامل: دمای واسرشتگی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای چسبیدن پرایمر ها ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و دمای طویل سازی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای طویل سازی نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه.

برای اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر و کیفیت آن و عدم تکثیر محصولات غیراختصاصی،۳ میکرولیتر از محصولات واکنش (نمونه های بیماران) و مارکر bp ۱۰۰ بر (BR0800201, Ladder, 100bp DNA Germany Biotechrabbit, روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری و الکتروفورز گردید (شکل ۲).

محصولات PCR به منظور شناسایی موتاسیون‌های موجود در قطعات تکثیر شده موردتعیین توالی قرارگرفتند. تعیین توالی توسط دستگاه سکوئنسر ABI3730 (شرکت ماکروژن کره جنوبی) و با استفاده از روش ختم زنجیره صورت گرفت. همچنین از نرم افزارهای CLC main work bench 5 و chromas جهت خوانش توالی‌ها و مقایسه نتایج دستگاه سکوئنسر با پلات اصلی اگزون ۱۱-۱۰ ژن *PAH* و نواحی اینترونی آن استفاده شد (اشکال ۳ و ۴).



شکل ۳- الکتروفروگرام مربوط به جهش IVS10-11G>A(c.1066-11g->a) در بیمار شماره۷ (توالی رفت)



شکل ۴- الکتروفروگرام مربوط به جهش IVS11+1G>C (c.1199+1G>C) در بیمار شماره۳ (توالی رفت)

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-12]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.7.8.3]

یافته‌ها

در این مطالعه ۲۶ بیمار HPA که به بیمارستان طالقانی گرگان مراجعه نموده بودند توسط پزشک فوق تخصص غدد اطفال مورد بررسی قرار گرفت. بیماران براساس سطح Phe قبل از درمان، به ۵ گروه تقسیم شدند (جدول ۱). همچنین بیماران (۲۶ بیمار) درمحدوده سنی ۱ تا ۲۳ سال قرار داشته وترکیب قومیتی آن ها شامل فارس (۷۶٪/۹)، ترکمن (۱۹٪/۲) و لر (۳٪/۸) بود.

تاییدکیفیت DNA استخراج شده در شکل ۱ وتصویر الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد و باند اختصاصی با طول ۹۲۷ bp در شکل ۲ نشان داده شده است.

با بررسی توالی نوکلئوتیدی اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ و اینترون ۱۰ ژن *PAH* و نواحی اینترونی اطراف آن در ۲۶ بیمار PKU، ۲ موتاسیون پیرایشی IVS10-11G>A و IVS11+1G>C به ترتیب در اینترون های ۱۰ و ۱۱ شناسایی گردید. از ۲۶ نمونه، نمونه های شماره ۲،۷،۲۱،۲۲ و ۲۶ با فنوتیپ cPKU، در اینترون ۱۰ دارای موتاسیون IVS10-11G>A به صورت هموزایگوت بوده و نمونه های شماره ۳ و ۵ با فنوتیپ cPKU در اینترون ۱۱ دارای موتاسیون IVS11+1G>C به صورت هموزایگوت بودند. موتاسیون IVS10-11G>A در ۱۰ آلل (در ۵ بیماربه صورت هموزیگوت) با فراوانی ۱۹/۲۳ درصد و موتاسیون IVS11+1G>C در ۴ الل (در ۲ بیماربه صورت هموزیگوت) با فراوانی ۷/۷ درصد، از ۵۲ آلل مورد بررسی شناسایی شد. مشخصات بیماران واجد این دو موتاسیون به ترتیب در جداول ۲ و ۳ و الکتروفروگرام مربوط به دو موتاسیون فوق در اشکال ۳ و ۴ نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

بدون شک بیماری های ژنتیکی در جوامع بشری هم

جدول ۱- فراوانی بیماری در افرادمورد مطالعه بر اساس غلظت فنیل آلانین قبل از درمان

فنوتیپ متابولیک	بیماران٪
PKU کلاسیک	۵۷٪/۷
PKU متوسط	۱۱٪/۵
PKU خفیف	٪ ۷/۷
HPA	۱۵٪/۴
نامشخص	۷٪/۷ *

*بیمارانی که پرونده آنها نقص داشت.

جدول ۲- مشخصات بیماران واجد جهش IVS10-11G>A در مطالعه حاضر

بیمار	والدین	غلظت فنیل آلانین قبل از درمان (میلی گرم بر دسی لیتر)	فنوتیپ	جهش	IVS10-11G>A در هر دو آلل
۲	خویشاوند	۲۰>	*cPKU		+/+
۷	خویشاوند	۲۰>	cPKU		+/+
۲۱	خویشاوند	۲۰>	cPKU		+/+
۲۲	خویشاوند	۲۰>	cPKU		+/+
۲۶	غیرخویشاوند	۲۰>	cPKU		+/+

جدول ۳- مشخصات بیماران واجد جهش IVS11+1G>C در مطالعه حاضر

بیمار	والدین	غلظت فنیل آلانین قبل از درمان (mg/dl)	فنوتیپ	جهش	IVS11+1G>C در هر دو آلل
۳	غیرخویشاوند	۲۰>	*cPKU		+/+
۵	خویشاوند	۲۰>	cPKU		+/+

*کلاسیکPKU، +:واجد جهش

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-12]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.7.8.3]

از نظر عاطفی و هم از نظر مالی مسائل بزرگی را ایجاد می‌کنند. فنیل کتونوری اختلال اتوزومال مغلوب و شایع‌ترین اختلال وراثتی متابولیسم اسید آمینه است (۵ و ۱۳) که دارای دامنه وسیعی از تظاهرات بالینی و بیو شیمیایی است (۱۴). همچنین عقب‌ماندگی شدید ذهنی را دربیمارانی که درمان نشده اند، ایجاد می‌نماید (۱۵)، مگر مواردی که کودک مبتلا تحت رژیم با فنیل آلانین کم قرار گرفته باشد (۱۳). شیوع PKU موجب غربالگری نوزادان و درمان با رژیم غذایی محدود شده به صورت یک روش معمولی در بسیاری از کشورهای توسعه یافته شده است (۱۳). محدودیت‌های درمان، ضرورت انجام یک برنامه غربالگری نوزادان را افزایش می‌دهد به‌طوری که با اطمینان بتوان زوج‌هایی را که در معرض خطرهستند، شناسایی کرد. این امر مخصوصاً در کشورهایی مثل ترکیه که درمان، برای اکثریت جامعه در دسترس نیست مهم می‌باشد (۱۳)؛ بنابراین لازم است در هر منطقه جغرافیایی شیوع و طیف جهش‌های *PAH* عامل ایجاد این بیماری، در افراد مبتلا مورد بررسی قرار گرفته تا افراد در معرض خطر بیماری با غربالگری ژنتیکی شناسایی شده و مداخلات پزشکی به موقع اعمال گردد.

دراین تحقیق طیف موتاسیونی اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ و اینترون ۱۰ ژن *PAH* در ۲۶ فرد مبتلا به PKU از استان گلستان بررسی شدو دوجهشIVS11+1G>C و IVS10-11G>A به ترتیب بافراوانی حدود ۷/۷ درصد و ۱۹/۲۳ درصد مشاهده گردید.

جهش IVS11+1G>C(c.1199+1G>C) از نوع پیرایشی بوده ودر اینترون ۱۱ ژن *PAH* واقع شده است. بنیادی و همکاران در سال ۲۰۱۰ با مطالعه ۴۴ فرد مبتلا از نژاد ترک آذری فراوانی این جهش را ۱/۱ درصد (۹) و زارع کاریزی و همکاران در سال ۲۰۱۱ فراوانی آن را در مبتلایان به PKU در ایران ۸/۵ درصد (۲) گزارش نمودند. همچنین در شمال شرق کشور، مطالعه حمزه لویی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در ۳۱ فرد مبتلا به PKU از استان خراسان رضوی فرکانس این جهش را ۶/۴ درصد نشان داد (۸). شیوع این جهش در استان خوزستان حدود ۲/۵ درصد تعیین شد (۱۱). از سوی دیگر مطالعه بیگلری و همکاران در سال ۲۰۱۵، در دو استان قزوین و زنجان، برای این جهش فرکانس ۱/۲۸ در صد را نشان داد (۱۶). در مطالعه رضی پور و همکاران نیز فراوانی جهش IVS11+1G>C در بیماران PKU در ایران ۰/۶۲ درصد گزارش شد (۱۷). در مطالعه حاضر از استان گلستان در شمال ایران، این جهش فراوانی ۷/۷ در صد را نشان داده است که اولین گزارش از این جهش در جمعیتPKU از استان گلستان می‌باشد.

جهش IVS10-11G>A(c.1066-11G>A) با جایگزینی G با A در جایگاه ۵۴۶ در اینترون ۱۰ ژن *PAH* در محلی ۱۱ جفت باز بالادست مرز اینترون ۱۰ / اگزون ۱۱ قرار گرفته است. این جانشینی (جهش IVS10-11G>A) یک جایگاه پیرایش مخفی را فعال نموده و منجر به ورود یک قالب ۹ نوکلئوتیدی بین اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ در mRNA مربوط به ژن می‌شود (۱۱). در صورت ترجمه چنین mRNAیی، پروتئینی غیر فعال با سه اسید آمینه اضافی (Gly-Leu-Gln) حاصل می‌شود (۱۱). بنیادی و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی ۱۳ جهش مختلف *PAH* در بین ۴۴ فرد مبتلا از نژاد ترک آذری پرداختند. در مطالعه آنان که اولین مطالعه در این منطقه از کشور محسوب می‌شود جهش ذکر شده فراوانی ۱۹ درصد را نشان داد (۹). در شمال شرق کشور، حمزه لویی و همکاران در سال ۲۰۱۲ با مطالعه ۳۱ فرد مبتلا به PKU از استان خراسان رضوی این جهش را با فرکانس ۱۹ درصد شایع‌ترین جهش گروه مطالعه معرفی کردند (۸). حسینی مزینانی و همکاران در تهران شیوع این جهش را ۳۲ درصد گزارش نمودند (۱۸). همچنین در مطالعه زارع کاریزی و همکاران به عنوان شایع‌ترین جهش (۲۴/۶ درصد) در مبتلایان به PKU در ایران گزارش شد (۲). بر اساس مطالعه رضی پور و همکاران درسال ۲۰۱۷ این جهش در بیماران PKU در ایران با فراوانی ۲۰/۳۵٪ مشاهده گردید (۱۷). شیوع این جهش در استان خوزستان حدود ۱۰ درصد تعیین شد (۱۱). در حالی‌که این جهش در استان‌های اصفهان ۵/۷۷ درصد (۱۰) و کرمانشاه ۷/۴ درصد (۱۹) از فراوانی پایینی برخوردار است.

این جهش شایع‌ترین جهش عامل PKU در کشورهای حوزه مدیترانه است و با فراوانی‌های نسبتاً بالایی در جمعیت‌هایی مثل ایران، ترکیه ۳۲ درصد،

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-12]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.7.8.3]

یونان ۱۲/۵ درصد، سیسیل و جنوب ایتالیا ۱۵/۱ درصد، اسپانیا ۱۴/۷ درصد، پرتغال ۱۱/۱ درصد (۲)، مصر ۳۰/۸ درصد (۲۰) و عربستان سعودی ۱۷/۵ درصد (۱۸) گزارش شده است. به همین دلیل از این جهش با عنوان "جهش مدیترانه‌ای" نیز یاد می‌شود. با توجه به فراوانی بالای جهش IVS10-11G>A در جمعیت‌های فوق این فرضیه مطرح می‌شود که منشأ این جهش از شرق حوزه مدیترانه بوده و از طریق مهاجرت‌های جمعیتی و رانش ژنتیکی به دیگر نقاط گسترش یافته است (۱۸).

با توجه به مطالب فوق جهش IVS10-11G>A بالاترین فراوانی را در مطالعات صورت گرفته در بخش‌های مختلف ایران به استثنای اصفهان و کرمانشاه داشته است. به علاوه در مطالعه کاریزی و همکاران به شیوع بالای این جهش در بخش‌های شمالی ایران (شامل استان های خراسان، سمنان، تهران، مرکزی، همدان و آذربایجان) اشاره شده است (۷). علی‌رغم اینکه فراوانی‌های بالای به دست آمده در بیماران PKU آذربایجان، خراسان رضوی و تهران و بخش‌های شمالی ایران از فرضیه منشاء این جهش از شرق حوزه مدیترانه حمایت می کنند به نظر می رسد که فراوانی بالای این جهش در استان خوزستان در راستای این فرضیه نباشد.

در این تحقیق جهش IVS10-11G>A در استان گلستان ازشیوع بالایی برخوردار بود. به نظر می‌رسد این جهش نقش به سزایی در ایجاد PKU در افراد مبتلا داشته باشد و از این نظر لازم است جزء جهش‌های اصلی در شناسایی و غربالگری‌های ژنتیکی این استان برای افراد در معرض خطر بیماری در نظر گرفته شود. از طرفی شناسایی جهش‌های شایع در یک جمعیت خاص می تواند به میزان زیادی به برنامه‌های تشخیص پیش از تولد در خانواده‌های در معرض خطر تولد فرزند مبتلا به PKU در آن جمعیت کمک کننده باشد. همچنین با شناسایی این جهش‌های شایع می‌توان تا حدودی به قرابت یا عدم قرابت پیشینه‌ای جمعیت‌های مختلف با یکدیگر پی برد (۱۸). لذا، برای دستیابی به اهداف فوق شناسایی جهش‌های شایع ژن *PAH* در جمعیت مورد مطالعه می‌تواند کمک شایانی نماید.

محدودیت تحقیق شامل طول زیاد ژن *PAH* و عدم وجود بودجه کافی جهت بررسی موتاسیونی کل طول ژن بود. لذا، در این تحقیق تنهادو اگزون ۱۰ و ۱۱ و نواحی اینترونی اطراف آن جهت شناسایی جهش‌ها مورد مطالعه قرار گرفت.

با توجه به اینکه جهش IVS10-11G>A با فراوانی بالا در این مطالعه گزارش شده، لذا این جهش را می‌توان به عنوان یکی از مهم‌ترین علل ایجاد فنیل کتونوری در استان گلستان در نظر گرفت و به عنوان یک مارکر شناسایی در غربالگری‌های ژنتیکی در افراد در خطر از آن بهره برد. به علاوه موتاسیون‌هایی که در این مطالعه گزارش شده، تنها در ۲۶/۹ درصد کروموزوم‌ها یافت شدند و به دست آوردن طیف کامل موتاسیون‌های ژن *PAH* در بیماران PKU استان گلستان نیازمند بررسی ۱۱ اگزون دیگر می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی با کد ۱۵۹۳۰۵۵۴۹۴۱۰۰۸ و تاریخ تصویب ۹۴/۴/۱۵ از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن می‌باشد. نویسندگان مقاله از جناب آقای دکتر حسین زائری آق مشهدی و پرسنل محترم بیمارستان طالقانی گرگان که دست اندر کاران این پژوهش را یاری نمودن کمال تشکر و قدر دانی را دارند.

References

1. Fazeli Z, Vallian S. Phenylketonuria from genetics to clinics: An Iranian prospect. IJB; 2011. 9:163-72.
2. Zare-Karizi SH, Hosseini-Mazinani SM, Khazaei-Koohpar Z, Seifati SM, Shahsavan-Behboodi B, Akbari MT et al. Mutation spectrum of phenylketonuria in Iranian population. Mol Genet Metab; 2011. 102(1):29-32.
3. Koochmeshgi J, Bagheri A, Hosseini-Mazinani SM. Incidence of phenylketonuria in Iran estimated from consanguineous marriages. J Inherit Metab Dis; 2002. 25:80-81.
4. Gundorova P, Zinchenko RA, Makaov AKh, Polyakov AV. The spectrum of mutations in the *PAH* gene in patients with hyperphenylalaninemia

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-12]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.7.8.3]

from the Karachay-Cherkess Republic. Russ J Genet; 2017. 53(7):813-9.

5. Calì F, Dianzani I, Desviat LR, Perez B, Ugarte M, Ozguc M, et al. The STR252–IVS10nt546 – VNTR7 phenylalanine hydroxylase minihaplotype in five Mediterranean samples. Hum Genet; 1997. 100:350-5.

6. Moradi K, Alibakhshi R, Ghadiri K,Khatami SR,Galehdari H. Molecular analysis of exon 6 and 7 of phenylalanine hydroxylase gene mutations in phenylketonuria patients in western Iran. Indian J Hum Genet; 2012. 18(3):290-3.

7. Scriver CR, Prevost L, Hurtubise M Konecki D, Dobrowolski SF. PAHdb Phenylalanine hydroxylase locus knowledge base. URL:http://www.pahdb.mcgill.ca,update, 2009.08.31

8. Hamzehloei T, Hosseini SA, Vakili R, Mojarad M. Mutation spectrum of the PAH gene in the PKU patients from Khorasan Razavi province of Iran. Gene; 2012. 506:230-2.

9. Bonyadi M, Omrani O, Moghanjoghi SM, Shiva S. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in Iranian Azeri Turkish patients with phenylketonuria. Genet Test Mol Biomarkers; 2010. 14:233-5.

10. Vallian S, Barahimi E, Moeini H. Phenylketonuria in Iranian population: a study in institutions for mentally retarded in Isfahan. Mutat Res Fund Mol Mech Mut; 2003. 526:45-52.

11. Ajami N, Kazeminezhad SR, Foroughmand AM, Hasanpour M, Aminzadeh M. A preliminary mutation analysis of phenylketonuria in southwest Iran. Genet Mol Res; 2013. 12(4):4958-66.

12. Binaafar S, Mahdieh N. Genetics of Phenylketonuria in Iran: A Review Study. J Mazandaran Univ Med Sci; 2017. 27(147):446-55.

13. Dasovich M, Konecki D, Lichter- Konecki U, Eisensmith RC, Güttler F, Naughton E, et al. Molecular characterization of PKU allele prevalent in southern Europe and Ireland. Somat Cell Molec Gen; 1991. 17(3):303-09.

14. Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Kalogracou M, Soulpi K, Missiou-Tsangaraki S, Kattamis C. Preliminary mutation analysis in the phenylanaline hydroxylase gene in Greek PKU and HPA patients. Human Genet; 1994. 94:573-5.

15. O'Neill CA, Eisensmith RC, Croke T, Naughten ER, Cahalane SF, Woo SLC. Molecular analysis of PKU in Ireland. Acta Paediatr; 1994. 83(407):43-4.

16. Biglari A, Saffari F, Rashvand Z, Alizadeh S, Najafipour R, Sahmani M. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in Iranian patients with phenylketonuria. Springer Plus; 2015. 4:542.

17. Razipour M, Alavinejad E, Sajedi SZ, Talebi S, Entezam M, Mohajer N et al. Genetic study of the PAH locus in the Iranian population: familial gene mutations and minihaplotypes. Metabol Brain Dis; 2017. 32(5): 1685-91.

18. Moradi K, Alibakhshi R, Alimadadi K. The frequency of the most common Mediterranean mutation in phenylketonuria patients in Kermanshah Province. Sci J Kurdistan Univ Med Sci; 2014. 19(1):58-66.

19. Alibakhshi R, Moradi K, Mohebbi Z, Ghadiri K. Mutation analysis of PAH gene in patients with PKU in western Iran and its association with polymorphisms: identification of four novel mutations. Metab Brain Dis; 2014. 29:131-8.

20. Effat L, Kuzmin A, Kasem N, Abdel Meguid N, Kotb S, Eisensmith RC et al. Haplotypes and mutations of the PAHlocus in Egyptian families with PKU. Eur J Hum Genet; 1999. 7:259-62.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-12]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.7.8.3]