



## بررسی مولکولی جهش‌های اگزون ۶ ژن فنیل آلانین هیدروکسیلаз در بیماران فنیل کتونوری از استان گیلان

نسترن مددی: دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلوی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی سلوی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تکابن، ایران

زینب خزانی کوهپر: استادیار، گروه زیست‌شناسی سلوی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تکابن، ایران (\*نویسنده مسئول)

khazaei@toniau.ac.ir

نجمه رنجی: استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

چکیده

### کلیدواژه‌ها

فنیل آلانین هیدروکسیلاز،  
فنیل کتونوری،  
جهش،  
اگزون ۶

**زمینه و هدف:** فنیل کتونوری (PKU)، یک اختلال متابولیک است که بهوسیله جهش‌هایی در ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز (PAH) ایجاد می‌شود. پس از تالاسمی، PKU به عنوان شایع‌ترین بیماری اتوزومال مغلوب در جمعیت ایرانی محسوب می‌شود؛ بنابراین شناسایی موتاسیون‌های عامل بیماری در این جمعیت حائز اهمیت است. مطابق پایگاه داده PAH یکی از اگزون‌هایی که دارای بیشترین تعداد آلل‌های موتانت می‌باشد اگزون ۶ و ایترنون‌های اطراف است. بر این اساس، این مطالعه برای شناسایی جهش‌های اگزون ۶ ژن PAH در بیماران PKU استان گیلان و مقایسه آن با مطالعات انجام شده در سایر بخش‌های ایران طراحی شد.

**روش کار:** در این مطالعه توصیفی-مقطعي، طی یک دوره یک ساله، تعداد ۲۵ بیمار PKU و غیر خویشاوند (۱ تا ۲۱ سال) از نواحی مختلف استان گیلان شناسایی شد. پس از استخراج DNA ژنومی، شناسایی موتاسیون‌ها با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز-تیمین توالی صورت گرفت.

**یافته‌ها:** جهش‌ها و پلیمورفیسم‌های شناسایی شده در این مطالعه به ترتیب شامل (%۴۶) R176X و (%۴۶) Q232Q می‌باشد. جهش R176X در ۱ بیمار به صورت هموزیگوت مشاهده شد. این بیمار فنوتیپ cPKU داشته و والدین بیمار خویشاوند درجه سوم بودند.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به اینکه در این مطالعه جهش R176X تنها در ۴ درصد کروموزوم‌ها یافت شده است، بدست آوردن طیف کامل موتاسیون‌های ژن PAH در بیماران PKU استان گیلان نیازمند بررسی ۱۲ اگزون دیگر می‌باشد. به علاوه با در نظر گرفتن تقاضت طیف جهش‌های ژن PAH در بخش‌های مختلف ایران، می‌توان با انجام مطالعات جامع در مناطق مختلف ایران، جهش‌های خاص هر منطقه را شناسایی کرد و به منظور پیشبرد اهداف پیشگیرانه و درمانی آینده از آن‌ها بهره برد.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت کننده:** حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Madadi N, Khazaei Koohpar Z, Ranji N. Molecular analysis of exon 6 mutations of phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria patients from Guilan province. Razi J Med Sci. 2019;26(1):32-39.

\* منتشر این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 1.0](#) صورت گرفته است.



Original Article

## Molecular analysis of exon 6 mutations of phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria patients from Guilan province

**Nastaran Madadi**, 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**, Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran (\*Corresponding author) khazaei@toniau.ac.ir  
Najmeh Ranji, Assistant Professor, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

### Abstract

**Background:** Phenylketonuria (PKU) is a metabolic disorder caused by mutations in the phenylalanine hydroxylase (*PAH*) gene. After thalassemia, PKU is considered as the most common autosomal recessive disease in the Iranian population. Therefore, it is necessary to identify the disease-causing mutations in this population. According to the *PAH* database, one of the exons with the greatest number of mutant alleles is exon 6 and the surrounding introns. Accordingly, this study was designed to identify exon 6 mutations of *PAH* gene among PKU patients in Guilan province and compare them with studies conducted in other regions of Iran.

**Methods:** In this descriptive cross-sectional study, 25 PKU patients and non-relatives (1 to 21 years old) from different regions of Guilan province were identified during a one-year period. After genomic DNA extraction, mutation detection was performed by polymerase chain reaction-sequencing method.

**Results:** The mutations and polymorphisms identified in this study included R176X (4%) and Q232Q (46%), respectively. The patient had cPKU phenotype and her parents were 3th degree relatives.

**Conclusion:** Considering that the R176X mutation was only found in 4% of chromosomes in this study, achieving a complete spectrum of *PAH* gene mutations in PKU patients in Guilan province requires the analysis of 12 other exons. In addition, considering the difference of *PAH* mutation spectrum in different regions of Iran, comprehensive studies in different regions of Iran can identify specific mutations in each region and these studies can be used to advance the future preventive and therapeutic goals.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

### Keywords

Phenylalanine hydroxylase,  
Phenylketonuria,  
Mutation,  
Exon 6

Received: 04/12/2018

Accepted: 15/02/2019

### Cite this article as:

Madadi N, Khazaei Koohpar Z, Ranji N. Molecular analysis of exon 6 mutations of phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria patients from Guilan province. Razi J Med Sci. 2019;26(1):32-39.

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



اطلاعاتی PAHdb ثبت گردیده است (۱۱). شناسایی جهش‌های شایع در یک جمعیت خاص می‌تواند به میزان زیادی به برنامه‌های تشخیص پیش از تولد در خانواده‌های در معرض خطر تولد فرزند مبتلا به PKU در آن جمعیت کمک‌کننده باشد. همچنین با شناسایی این جهش‌های شایع می‌توان تا حدودی به قربات یا عدم قربات پیشینه‌ای جمعیت‌های مختلف با یکدیگر پی برد (۷).

هدف از مطالعه حاضر، بررسی مولکولی جهش‌های اگزون ۶ ژن *PAH* در بیماران مبتلا به فنیل کتونوری از استان گیلان و مقایسه آن با مطالعات صورت گرفته در سایر بخش‌های ایران می‌باشد.

### روش کار

بیماران: این مطالعه، یک مطالعه مقطعی-توصیفی می‌باشد. طی یک دوره یک ساله تعداد ۲۵ بیمار PKU و غیر خوبشاؤند از نواحی مختلف استان گیلان شناسایی شد. شناسایی این بیماران بر اساس پرونده‌های موجود در بیمارستان ۱۷ شهریور رشت صورت گرفت. سپس از بیماران و خانواده‌های آن‌ها جهت شرکت در این مطالعه دعوت به عمل آمد. پس از توجیه شرکت کنندگان، فرم‌های رضایت‌نامه و پرسشنامه از سوی بیماران و یا خانواده‌های آنان تکمیل گردید (در مواردی که بیمار کودک یا دچار عقب‌ماندگی ذهنی بود). نمونه‌گیری با مجوز کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت (REC.1397.138 IR.IAU.RASHT.) انجام شد. به منظور جمع‌آوری نمونه‌های خون از هر فرد بیمار به میزان ۲-۵ میلی‌لیتر 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.

استخراج DNA: جهت استخراج DNA از کیت Dynabio<sup>TM</sup> Blood/Tissue DNA Extraction Mini kit (Takapozist, Tehran, Iran) (Takapozist, Tehran, Iran) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. جهت بررسی

فنیل کتونوری (PKU; OMIM 261600) یکی از رایج‌ترین اختلالات ژنتیکی متابولیسم اسید‌آمینه می‌باشد که با نقص آنزیم کبدی فنیل آلانین هیدروکسیلаз (PAH; EC 1.14.16.1) و جهش در این ژن (PAH) مشخص می‌شود (۱ و ۲). این بیماری در صورت عدم تشخیص و درمان زود هنگام، آسیب برگشت‌ناپذیر به مغز را در پی خواهد داشت که تظاهر بالینی آن عقب‌ماندگی شدید ذهنی می‌باشد. نقص این آنزیم (فیل آلانین هیدروکسیلاز) یا کوفاکتور آن (تترا هیدروبیوپترین) موجب تجمع فنیل آلانین در مایعات بدن و آسیب به سیستم عصبی می‌شود که می‌تواند در ناتوانی رشد، میکروسفالی، کم‌هوشی و عدم رشد فکری تأثیرگذار باشد (۳).

شیوع PKU در کشورهای مختلف، متفاوت گزارش شده است. شیوع فنیل کتونوری در میان قفقازی‌ها (سفید پوستان) نزدیک ۱ در ۱۰۰۰۰ گزارش شده است (۴). همچنین شیوع آن در اروپا ۱:۱۰۰۰ در چین ۱:۱۲۰۰۰۰ در ۱:۴۱۰۰۰ در کره ۱:۱۱۰۰۰ در ۱:۴۱۰۰۰ در ژاپن ۱:۳۶۲۷ نشان می‌دهد (۶).

شیوع بالای ازدواج‌های خویشاوندی با شیوع بیماری در میان ایرانیان در ارتباط می‌باشد (۷). بیماران PKU را بر اساس میزان فنیل آلانین خون در سه گروه طبقه‌بندی می‌کنند: فنیل کتونوری کلاسیک PKU ( $\text{Phe } \mu\text{mol/l} > 1200$ ) فنیل کتونوری خفیف یا  $\text{Phe} > 600 \mu\text{mol/l}$  و هایپر فنیل آلانینی (Hypophenylalaninemia) ( $\text{Phe} < 600 \mu\text{mol/l}$ ) ۱ mPKU خفیف یا  $\text{Phe} < 600 \mu\text{mol/l}$  ۱ mHPA (۸ و ۹).

جهش در ژن کد کننده PAH علت عمدۀ بیماری PKU می‌باشد. ژن PAH تقریباً ۹۰ کیلو باز طول دارد و بر روی کروموزوم ۱۲ در ناحیه باندی q22-q24.1 قرار گرفته است این ژن واحد ۱۳ اگزون و ۱۲ اینtron می‌باشد (۱۰). تاکنون در جمعیت‌های مختلف بیش از ۵۰۰ جهش متفاوت در ژن PAH شناسایی و در پایگاه

پرایم‌ها ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و دمای طویل سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای طویل سازی نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه.

**الکتروفورز محصولات PCR:** برای اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر و کیفیت آن و عدم تکثیر محصولات غیراختصاصی،<sup>۳</sup> میکرولیتر از محصولات واکنش (نمونه های بیماران) و مارکر bp ۱۰۰ بر روی ژل آگارز ۱٪ باگذاری و الکتروفورز گردید (شکل ۱).

تعیین توالی: محصولات PCR به منظور شناسایی موتاسیون‌های موجود در قطعات تکثیر شده مورد تعیین توالی قرار گرفت. تعیین توالی توسط دستگاه سکوئنسر ABI3730 (شرکت ماکروژن کره جنوبی) و با استفاده از روش ختم زنجیره صورت گرفت. همچنین chromas، CLC main work bench ۵ و Gene runner و PAH نتایج خوانش توالی‌ها و مقایسه نتایج دستگاه سکوئنسر با پلات اصلی اگزون ۶ ژن PAH و نواحی اینترونی آن استفاده شد.

### یافته‌ها

فنوتیپ بیماران: در این مطالعه ۲۵ بیمار HPA که به بیمارستان هفده شهریور رشت مراجعه نموده بودند توسط پزشک متخصص اطفال مورد بررسی قرار گرفت. بیماران بر اساس سطح Phe قبل از درمان، به ۳ گروه PKU(m PKU) کلاسیک ۳۶٪، PKU(c PKU) خفیف ۳۲٪ و HPA(m HPA) خفیف ۳۲٪ تقسیم شدند. همچنین بیماران (۲۵ بیمار) در محدوده سنی ۱ تا ۲۱ سال قرار داشته و ترکیب قومیتی آن‌ها شامل گیلک (۷۶٪)، تالش (۱۲٪) و ترک (۱۲٪) بود.

نتایج تعیین توالی: بعد از الکتروفورز محصولات PCR و اطمینان از تشکیل باند اختصاصی با طول ۵۵۰ bp (شکل ۱)، محصولات تعیین توالی گردید. با بررسی توالی نوکلئوتیدی اگزون ۶ ژن PAH و نواحی اینترونی

چگالی نوری (OD) نمونه‌های استخراج شده، از یک دستگاه نانو دراپ (ND)-1000 spectrophotometer استفاده گردید. این دستگاه نمونه را در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ λ قرائت نموده و مقدار نمونه را بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر محاسبه می‌کند. بر اساس پروتکل شرکت سازنده نسبت ۲۶۰ / ۲۸۰ برای نمونه‌های دارای کیفیت مناسب DNA جهت استفاده در واکنش PCR بین ۰/۲ - ۱/۸ می‌باشد. برای نمونه‌های DNA مربوط به بیمارانی که خارج از این محدوده قرار داشتند استخراج مجدد انجام می‌گرفت و تا زمان حصول نمونه‌های با کیفیت بالا این عمل تکرار می‌شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): واکنش PCR در دستگاه ترموسایکل (Analytik jena) ساخت کشور آلمان انجام گرفت. توالی پرایم‌های رفت و برگشت مورد استفاده در این واکنش به صورت زیر بود (۱۲).

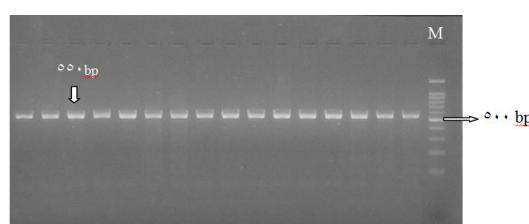
پرایم رفت:

5'GTGATGGCAGCTCACAGGTTCTGG- ۳'

پرایم برگشت:

5'-CAGGTACACGGCAAAATCCACAGC- ۳'

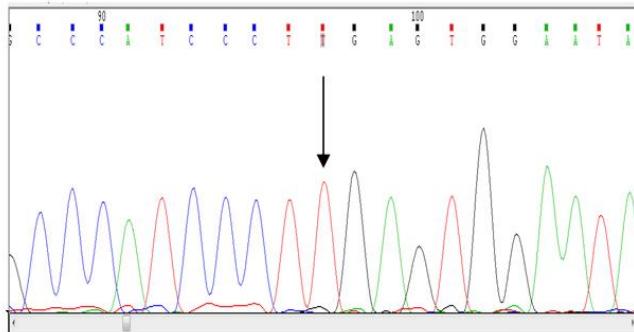
سنترز پرایم‌ها توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) صورت گرفت. طول محصول نهایی واکنش PCR ۵۵۰ و حجم نهایی مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتر بود؛ که با استفاده از کیت BIONEER (شرکت AccuPower®PCRPreMix کره جنوبی) و با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایم ۲۰ μM و آب استریل به محلول PreMix تهیه شد. نتایج حاصل از تنظیم شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر اگزون ۶ و نواحی اینترونی اطراف آن به صورت زیر می‌باشد: دمای واسرشتگی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، تعداد سیکل‌های واکنش، ۳۰ سیکل که هر سیکل شامل: دمای واسرشتگی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای چسبیدن



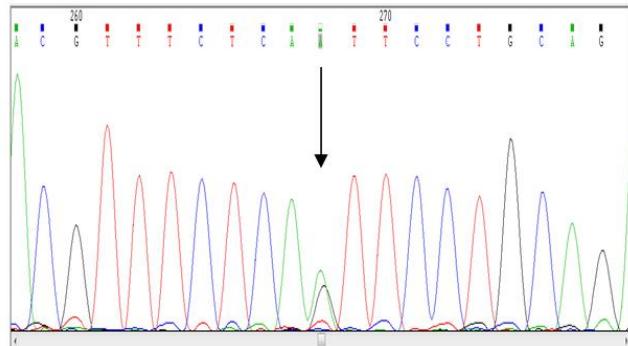
شکل ۱ - الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد از ۱۶ نمونه بیمار، M سایز مارکر ۱۰۰ bp، طول محصول PCR (۵۵۰ bp)

جدول ۱- مشخصات بیمار واحد جهش c.526 C&gt;T (R176X) در این مطالعه

جنس	محل	خویشاوندی والدین	سن شروع رژیم درمانی (سال)	سن فعلی درمانی (سال)	میزان phe قبل از درمان ( $\mu\text{m}/\text{L}$ )	فوتیپ	جهش شناسایی شده آلل مادری	آلل پدری	جهش شناسایی شده آلل مادری	آلل پدری
مونث	رشت	درجه سوم	۸	۴	۱۲۸۰	cPKU	R176X C>T	R176X C>T	R176X C>T	R176X C>T



شکل ۲- الکترو فروگرام جهش c.526C&gt;T (R176X) توالی رفت



شکل ۳- الکترو فروگرام پلی مورفیسم rs1126758(c.696A&gt;G) Q232Q در حالت هتروزایگوت (توالی رفت)

می کنند (۱۳). یک بیماری ژنتیکی اتوزوم مغلوب، فنیل کتونوری (PKU) در نتیجه نقص فنیل آلانین هیدروکسیلاز (PAH)، آنزیمی که در کبد آمینواسید فنیل آلانین را به تیروزین تبدیل می کند، ایجاد شده و منجر به افزایش فنیل آلانین در خون می گردد. این تجمع فنیل آلانین برای بافت مغز سمی بوده و در صورت عدم درمان بچه های با PKU دچار عقب ماندگی ذهنی می شوند (۱۴). این بیماری با غربالگری نوزادی و یا تشخیص پیش از تولد قابل شناسایی بوده و در صورت تشخیص سریع تر بیماری، می توان مانع بروز علائم بیماری (۷) یا کاهش شدت آن در افراد مبتلا شد؛ بنابراین لازم است در هر منطقه جغرافیایی شیوع و طیف جهش های PAH عامل ایجاد این بیماری، در افراد مبتلا مورد بررسی قرار گرفته تا افراد در معرض خطر

اطراف آن در ۲۵ بیمار PKU، جهش c.526C>T(R176X) در ۲ آلل (۴٪) (در یک بیمار به صورت هموزایگوت) از ۵۰ آلل مورد بررسی شناسایی شد. مشخصات بیمار واحد این جهش و الکتروفروگرام جهش R176X، توالی رفت، به ترتیب در جدول ۱ و شکل ۲ نشان داده شده است. همچنین پلی مورفیسم c.696A>G(Q232Q) در ۲۳ آلل (در ۸ بیمار به صورت هموزایگوت و ۷ بیمار هتروزایگوت) از ۵۰ آلل مورد مطالعه (۴۶٪) شناسایی گردید. الکتروفروگرام توالی رفت این پلی مورفیسم در شکل ۳ نشان داده شده است.

## بحث و نتیجه گیری

بدون شک بیماری های ژنتیکی در جوامع بشری هم از نظر عاطفی و هم از نظر مالی مسائل بزرگی را ایجاد

حمزه لویی و همکاران در سال ۲۰۱۲ با مطالعه ۳۱ فرد مبتلا به PKU از استان خراسان رضوی فرکانس این جهش را ۹/۷ درصد (۲۶) و مرادی و همکاران نیز فراوانی آن را در مبتلایان به PKU از استان کرمانشاه ۴ درصد گزارش نمودند (۱۴). شیوع این جهش در استان خوزستان حدود ۲/۵ درصد تعیین شد (۱۲). از سوی دیگر در سال ۲۰۱۴ علی بخشی و همکاران فراوانی جهش R176X را در استان کرمانشاه ۳/۷ درصد (۲۷) و بیگلری و همکاران در سال ۲۰۱۵، در دو استان قزوین و زنجان، فرکانس این جهش را ۱۰/۲۵ درصد گزارش نمودند (۳). در سال ۲۰۱۷ مطالعه رضی پور و همکاران در ۸۱ خانواده ایرانی با نقص PAH منجر به شناسایی ۳۳ جهش مختلف از جمله جهش R176X در اگزون ۶ ژن PAH با فراوانی ۱/۸۵٪ شد (۲۸). همچنین در سال ۲۰۱۸ شیخ السلام اصفهانی و ولیان با مطالعه طیف موتاسیونی PAH در بیماران PKU ایران، ۳۴ موتاسیون مختلف را شناسایی کردند. در این مطالعه جهش R176X با فراوانی ۰/۳۶ درصد گزارش شد (۲۹). شیرزاد و همکاران نیز در ۲۰۱۸ با بررسی ۶۳۵ بیمار PKU از ایران این جهش را در ۲۱ مورد گزارش نمودند (۳۰). در سایر مطالعاتی که تاکنون در جمعیت‌های مختلف PKU در ارتباط با طیف موتاسیونی PAH در ایران صورت گرفته به جهش R176X اشاره نشده است. از جمله می‌توان به مطالعه بنیادی و همکاران در ۲۰۱۰، در بیماران PKU با منشأ قومی ترکی آذربایجانی (۳۱) و مطالعه ولیان و همکاران در اصفهان (۳۲) اشاره نمود.

همچنین در مطالعه ما از استان گیلان در شمال ایران، پلیمورفیسم Q232Q فراوانی ۴۶ در صدرا نشان داده است؛ که اولین گزارش از این پلیمورفیسم در جمعیت PKU از استان گیلان می‌باشد. در سال ۲۰۱۱ زارع کاریزی و همکاران پلیمورفیسم Q232Q را در جمعیت PKU ایران گزارش کردند (۷). این پلیمورفیسم همچنین توسط علی بخشی و همکاران در بیماران PKU در غرب ایران (۲۷) و مرادی و همکاران در بیماران PKU از کرمانشاه (۰/۸٪) شناسایی گردید (۱۴). فراوانی پلیمورفیسم Q232Q در سال ۲۰۱۳ توسط عجمی و همکاران ۳۶/۲۵ درصد (۱۲) و بیگلری و همکاران ۵۱/۲۸ درصد (۳) گزارش شد و سرانجام در

بیماری با غربالگری ژنتیکی شناسایی شده و مداخلات پزشکی به موقع اعمال گردد (۱۵). مطابق با پایگاه داده PAH اگزون‌های ۶ و ۷ و نواحی اطراف آن‌ها دارای بیشترین تعداد آلل‌های موتانت می‌باشند (۱۴). بر این اساس در مطالعه فعلی اگزون ۶ ژن در ۲۵ فرد مبتلا به PKU از استان گیلان جهت شناسایی جهش‌ها مورد بررسی قرار گرفت. یکی از جهش‌هایی که در اگزون ۶ رخ می‌دهد، جهش R176X است. R176X (c.526C>T) یک جهش بی‌معنی است که در اگزون ۶ UGA رخ می‌دهد و با ایجاد کدون توقف PAH باعث پایان زودرس ترجمه در رونوشت می‌گردد. این جهش در دی‌نوکلئوتید CpG رخ می‌دهد. تغییر باز در کدون ۱۷۶ این ژن باعث تبدیل CGA>TGA و PKU Term Arg به شود (۱۴). از آنجایی که یک بیماری بسیار هتروژن بوده و در بسیاری از جمعیت‌های مطالعه شده در نقاط مختلف جهان، بیش از ۲۰ جهش مرتبط با این بیماری شناسایی شده که فراوانی و پراکنش این جهش‌ها در هر جمعیتی مشخص و متمایز از جمعیت دیگر می‌باشد. در جمعیت‌هایی که تاکنون مطالعه شده‌اند (در ایران و سایر نقاط جهان) تنها تعداد کمی از جهش‌ها بخش غالب جهش‌های عامل بیماری را در جمعیت به خود اختصاص داده‌اند و بقیه جهش‌ها، از فراوانی پایینی برخوردار بوده‌اند (۱۶). جهش R176X در این مطالعه با فراوانی ۴٪ مشاهده شد. در حالی که پیش‌تر به عنوان دومین موتاسیون مهم عامل PKU در جمعیت مراکش گزارش شده بود (۱۴). همچنین فراوانی جهش R176X در جمعیت‌های دیگر از جمله کره ۰/۱٪ (۱۷)، لیتوانی ۰/۰٪ (۱۸)، ایتالیا ۰/۰٪ (۱۹)، پرتغال ۰/۰٪ (۲۰)، مراکش ۰/۸٪ (۲۱)، مصر ۰/۷٪ (۲۲)، برباد ۰/۱٪ (۲۳)، کوبا ۰/۵٪ (۲۴) و شمال چین ۰/۰٪ (۲۵) گزارش شده است.

جهش R176X همکارانی که از جمعیت PKU در ایران از جهش R176X موجود است مربوط به مطالعاتی است که توسط پژوهشگران مختلف از سال ۲۰۱۱ تاکنون انجام شده است. از جمله زارع کاریزی و همکاران در سال ۲۰۱۱، طیف موتاسیونی ژن PAH را در ۱۲۴ خانواده ایرانی غیر وابسته با PKU کلاسیک مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه جهش‌های مختلف از جمله جهش R176X با فراوانی ۱/۶ درصد گزارش شد (۷). علاوه

## References

1. Fazeli Z, Vallian S. Phenylketonuria from genetics to clinics: An Iranian prospect. *Iran J Biotech*; 2011. 9(3): 163-172 .
2. Bik-Multanowski M, Kaluzny L, Mozrzymas R, Oltarzews M, Starostecka E, Lange A, et al. Molecular genetics of PKU in Poland and potential impact of mutations on BH4 responsiveness. *Acta Biochim Pol*; 2013. 60(4): 613-6.
3. Biglari A, Saffari F , Rashvand Z, Alizadeh S, Najafipour R, Sahmani M, et al. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in Iranian patients with phenylketonuria. *Springer Plus*; 2015. 4(1): 542.
4. Zhou Y, Ma YX, Zhang QB, Gao WH, Liu JP, Yang JP, et al . Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in patients with phenylketonuria in Shanxi, China. *Genet Mol Biol*; 2012. 35(4): 709-713
5. Silao CLT, Canson DM, Hernandez KN, Chiong MAD, Estrada SC, Padilla CD. Mutations of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in Filipino patients with phenylketonuria. *Acta Med Philip*; 2009. 43(2): 36-39
6. Bagheri M, Abdi Rad I, Hosseini-jazani N, Zarrin R, Ghazavi A. Association between PAH mutations and VNTR alleles in the West Azerbaijani PKU patients. *J Clin Med*; 2014. 9(3): 242-247
7. Zare-Karizi S, Hossini -Mazinani SM, Khazaei-koohpar Z, Seifati SM, Shahsavanh-behboodi B, Akbari MT, et al. Mutation spectrum of phenylketonuria in Iranian population. *Mol Genet Metab*; 2011. 102(1): 29-32.
8. Hanely W. Non-pku mild hyperphenylalaninemia ( MHP ) – the dilemma .*Molecular Genetics and Metabolism*; 2011.104:23-26.
9. Khemir S, Asmi ME, Sanhaji H, Feki M, Jemaa R, Tebib N, et al. Phenylketonuria is still a major cause of mental retardation in tunisia despite the possibility of treatment. *Clin Neurol Neurosurg*; 2011. 113:727-730
10. DiLella AG, Kwok SC, ledley FD, Marvit J, Woo SL. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry*; 1986. 25(4): 743-749.
11. Scriver CR, Waters P J, Sarkissian C, Ryan S, Prevost L, Côté D, et al. PAHdb: a locus-specific knowledgebase. *Hum Mutat*; 2000. 15,99-104
12. Ajami N, Kazeminezhad SR, Foroughmand AM, Hasanpour M, Aminzadeh MA. A preliminary mutation analysis of phenylketonuria in southwest Iran. *Genet Mol Res*; 2013. 12(4) 4958-66.
13. Haerian Ardakani H, Khazaei Koohpar Z, Mohammadian S. Mutations Analysis of exon 10 - 11 of phenylalanine Hydroxylase gene in phenylketonuria patients from Golestan province.

سال ۲۰۱۸ این پلیمورفیسم در دو مطالعه مجزا توسط شیرزاد و همکاران (۳۰) و نیز شیخ السلام اصفهانی و ولیان (۲/۸۶٪) شناسایی گردید (۲۹). از آنجایی که یکی از کاربردهای شناسایی جهش‌های عامل PKU شناسایی ناقلين و استفاده از آن به عنوان مارکر در مطالعات ژنتیک جمعیت ازلحاظ خویشاوندی جمعیت‌ها، پراکندگی و مهاجرت‌هایی که در طول تاریخ در بین جمعیت‌ها اتفاق افتاده، می‌باشد (۳۳) و با توجه به اینکه در مطالعه حاضر جهش R176X تنها در ۴ درصد کروموزوم‌ها یافت شده است، به نظر می‌رسد شناسایی جهش‌ها در سایر اگزون‌های زن در جمعیت مورد مطالعه در دستیابی به اهداف فوق کمک شایانی نماید.

محدودیت تحقیق شامل طول زیاد زن PAH و عدم وجود بودجه کافی جهت بررسی موتاسیونی کل طول زن بود. لذا در این تحقیق تنها اگزون ۶ و تواحی اینترونی اطراف آن جهت شناسایی جهش‌ها مورد مطالعه قرار گرفت.

با توجه به اینکه طیف جهش‌های زن در بخش‌های مختلف ایران دارای تفاوت‌های قبل توجهی می‌باشد. بر همین اساس، با انجام مطالعات جامع در مناطق مختلف ایران، می‌توان جهش‌های خاص هر منطقه را شناسایی کرد و به منظور پیشبرد اهداف پیشگیرانه و درمانی آینده از آن‌ها بهره برد. همچنین با در نظر گرفتن اینکه تنها یک اگزون زن PAH در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است برای بدست آوردن طیف کامل موتاسیون‌های این زن در بیماران PKU استان گیلان بررسی ۱۲ اگزون دیگر مورد نیاز می‌باشد.

## تقدیر و تشکر

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی با کد ۱۵۹۳۰۵۵۴۹۴۲۰۰۲ از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن می‌باشد. نویسنده‌گان مقاله از آقای دکتر افشن صفائی و پرسنل محترم بیمارستان ۱۷ شهریور رشت که دست‌اندرکاران این پژوهش را یاری نموده‌اند کمال تشکر و قدردانی را دارند.

- Razi J Med Sci; 2018. 25(172):39-46.
14. Moradi K, Alibakhshi R, Ghadiri K, Khatami SR, Galehdari H. Molecular analysis of exons 6 and 7 of phenylalanine hydroxylase gene mutations in Phenylketonuria patients in Western Iran. Ind J Hum Genet; 2012. 18(3): 290
15. Pourvatan N, Khazaei -Koopoor Z. Investigation of Exon 4 mutations in Phenylalanine Hydroxylase gene in Phenylketonuria patients from Guilan province using PCR-Sequencing. Feyz J Kashan Uni Med Sci; 2019. 22(6):595-601.
16. Moradi K, Alibakhshi R, Alimadadi K. The frequency of the most common Mediterranean mutation in phenylketonuria patients in Kermanshah Province. Sci J Kurdistan Uni Med Sci; 2014. 19 (1):58-66
17. Lee DH, Koo SK, Lee SK, Yeon YJ, Oh HJ, Kim SW, et al. The molecular basis of phenylketonuria in Korean. J Hum Genet; 2004. 49: 617-21.
18. Kasnauskiene J, Giannattasio S, Lattanzio P, Cimbalistiene L, Kucinskas V. The molecular basis of phenylketonuria in Lithuania. Hum Mutant; 2003. 21:398-402.
19. Guzzetta V, Bonapace G, Dianzani I, Parenti G, Lecora M, Giannattasio S, et al. phenylketonuria in Italy: Distinct distribution pattern of three mutations of the phenylalanine hydroxylase gene. J Inherit Metab Dis; 1997. 20:619-24.
20. Rivera I, Leandro P, Lichter-Konecki U, Tavares de Almeida I, Lechner MC. Population genetics of hyperphenylalaninemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. J Med Genet; 1998. 35:301-4.
21. Dahri S, Desviat LR, Perez B, Leal F, Ugarte M, Chabraoui L. Mutation analysis of phenylketonuria patients from Morocco: High prevalence of mutation G352fsdelG and detection of a novel mutation p.K85X. Clin Biochem; 2010. 43:76-81.
22. Effat L, Kuzmin A, Kasem N, Meguid NA, Kotb S, Eisensmith RC, et al. Haplotypes and mutations of the PAH locus in Egyptian families with PKU. Eur J Hum Genet; 1999. 7:259-62.
23. Acosta A, Silva W Jr, Carvallo T, Gomes M, Zago M. Mutations of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in Brazilian patients with phenylketonuria. Hum Mutant; 2001. 17:122-30.
24. Desviat LR, Perez B, Gutierrez E, Sanchez A, Barrios B, Ugarte M. Molecular basis of phenylketonuria in Cuba. Hum Mutat; 2001. 18(3): 252-252.
25. Song F, Qu YJ, Zhang T, Jin YW, Wang H, Zheng XY. Phenylketonuria mutations in northern China. Mol Genet Metab; 2005. 86: 107-118.
26. 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(1): 230-232.
27. Alibakhshi R, Moradi K, Mohebbi Z. 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(1): 131-138.
28. Razipour M, Alavinejad E, Sajedi S Z, Talebi S, Entezam M, Mohajer N, et al. Genetic study of the PAH locus in the Iranian population: familial gene mutations and minihaplotypes. Metab Brain Dis; 2017. 32(5): 1685-1691.
29. Shaykholeslam Esfahani M, Vallian S. A comprehensive study of phenylalanine hydroxylase gene mutations in the Iranian phenylketonuria patients. Eur J MedGenet; <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.10.011>
30. Shirzad T, Saeidian A H, Bagherian H, Salehpour S, Setoodeh A, Alaei M, et al. Molecular genetics of a cohort of 635 cases of phenylketonuria in a consanguineous population. J Inherit Metab Dis; 2018 – Springer, <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0228-6>.
31. Bonyadi M, Omrani O, Moghanjoghi SM, Shiva S. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in Iranian Azeri Turkish patients with phenylketonuria. Genet Test Mol Bioma; 2010. 14(2): 233-235.
32. 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(1): 45-52.
33. Effat LK, Essawi ML, Abd El Hamid MS, Hawari N, Gad YZ. Screening for six Mediterranean mutations in 90 Egyptian patients with phenylketonuria. Bratisl Lek Listy; 2008. 109(1):17-9.