مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۱، شماره ۳، پاییز ۹۰، صفحات ۱۹۶ تا ۲۰۰

Original Article

بررسی کارآیی مارکر VNTR ژن PAH برای شناسایی ناقلین فنیل کتونوری در جمعیت استان یزد

کاظم پریور[۱]، سید مرتضی سیفتی[۲]، جلال کوچمشگی[۳]، مهرداد هاشمی[۴]

[۱] استاد زیست شناسی تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات تهران
[۲] دکتری تخصصی زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اشکذر
[۳] پژوهشگر، موسسه زندگی پژوه یزد
[۴] استادیار ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: *تعدد جهش در ژن PAH (عامل PKU) باعث می‌شود که در بسیاری از موارد تشخیص جهش بیماری‌زا امکان‌پذیر نباشد. در این موارد برای شناسایی ناقلین از پلی‌مورفیسم‌های درون و نزدیک ژن PAH استفاده می‌شود. VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) یکی از مارکرهای چند آللی ژن PAH می‌باشد. در این مطالعه، فراوانی و توزیع آلل‌های VNTR ژن PAH در کلیه مبتلایان PKU شناخته شده استان یزد تا ابتدای سال ۱۳۸۷ مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *۲۴ نفر شامل ۹ فرد مبتلا به PKU و خواهران و برادران سالم و والدین آنها مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از استخراج DNA از خون افراد، قطعه حامل VNTR ژن PAH به کمک روش PCR تکثیر و با تکنیک الکتروفورز بررسی شد.*

یافته‌ها: *در مجموع ۶ نوع آلل VNTR در جمعیت PKU استان یزد دیده شد که تنها ۴ آلل آن در کروموزوم‌های جهش یافته وجود داشت. آلل‌های دارای ۳، ۷، ۸ و ۱۲ تکرار به ترتیب با فراوانی ۵/۵، ۱۱، ۷۸ و ۵/۵ در کروموزوم های جهش یافته و آلل های دارای ۳، ۷، ۸، ۹، ۱۱ و ۱۲ تکرار به ترتیب با فراوانی۲۰، ۲۰، ۳۳، ۱۳، ۷ و ۷ در کروموزوم های سالم مشاهده شدند. PIC برای جمعیت مورد بررسی ۶۳ درصد بدست آمد.*

نتیجه‌گیری: *PIC محاسبه شده برای جمعیت مورد بررسی نشان می‌دهد که در این منطقه در بیش از دو سوم موارد با بررسی مارکر VNTR امکان تشخیص ناقلین در بستگان بلافصل وجود دارد.*

واژگان کلیدی: *فنیل کتونوری، PKU، VNTR، PIC.*

مقدمه

فنیل‌کتونوری [Phenylketonuria (PKU); OMIM 261600] یکی از شایع‌ترین اختلالات در متابولیسم اسیدهای آمینه و یک بیماری مهم ژنتیکی است (۱). این بیماری در صورت عدم تشخیص و درمان زود هنگام، آسیب برگشت ناپذیر به مغز را در پی خواهد داشت که تظاهر بالینی آن عقب ماندگی شدید ذهنی می‌باشد (۲،۱). میزان بروز PKU در بین سفیدپوستان بطور کلی ۱ در ۱۰۰۰۰ تولد زنده است (۳،۲)، ولی بالاترین میزان بروز PKU در جهان از ایران و کشورهای همجوار گزارش شده است، به طوری که میزان بروز آن در ترکیه حدود ۱ در ۴۰۰۰ (۴) و در ایران ۱ در ۳۶۲۷ (۵) تولد زنده برآورد می‌شود. رواج گسترده ازدواج های فامیلی در منطقه، نقش مهمی در این امر دارد (۶،۴). PKU به دلیل نقص در یک آنزیم کبدی به نام فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز (PAH; EC1.14.16.1) به وجود می‌آید. این آنزیم در کبد بیان می‌شود و باعث تبدیل فنیل آلانین به تیروزین می‌گردد.

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دکتر کاظم پریور
(**email**: kazem_pariver@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۱۰/۲۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۰/۳/۵

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-17]

فقدان فعالیت آنزیمی PAH سبب هیپرفنیل‌آلانینمیای مزمن می‌شود (۱).

جهش در ژن کد کننده PAH علت عمده بیماری PKU می‌باشد. ژن PAH تقریبا ۹۰ کیلوباز طول دارد و بر روی کروموزوم ۱۲ در ناحیه باندی q22-q24.1 قرار گرفته است. این ژن واجد ۱۳ اگزون و ۱۲ اینترون می‌باشد (۷). تاکنون در جمعیت‌های مختلف بیش از ۵۰۰ جهش متفاوت در ژن PAH شناسایی شده است (۸). با توجه به تعدد جهش‌های بیماری‌زا در ژن PAH در بسیاری از موارد تشخیص جهش بیماری‌زا عملی نیست. بنابراین در این موارد برای شناسایی ناقلین از پلی‌مورفیسم‌های درون و نزدیک ژن PAH جهت ردیابی انتقال کروموزوم‌های سالم و جهش یافته از والدین به فرزندان استفاده می‌شود (۹).

چندین پلی‌مورفیسم در درون و در نزدیکی ژن PAH شناسایی شده است (۹). این پلی‌مورفیسم‌ها به دو دسته کلی مارکرهای دو آللی (RFLP ها و SNP ها) و مارکرهای چند آللی (VNTR و STR) تقسیم می‌شوند که بطور بالقوه در شناسایی ناقلین PKU قابل استفاده هستند، ولی میزان اطلاع رسانی مارکرهای چند آللی بسیار بیشتر از مارکرهای دو آللی است (۱۰،۹). VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) یکی از مارکرهای چند آللی موجود در ژن PAH می‌باشد که دارای واحد تکرار شونده غنی از AT به طول ۳۰ جفت باز بوده و تقریباً ۳ کیلوباز فرودست آخرین اگزون ژن واقع شده است (۹). تاکنون چندین آلل از این پلی‌مورفیسم در دنیا شناسایی و گزارش شده است(۱۲،۱۱). با توجه به اینکه مارکر مذکور به ژن مورد مطالعه نزدیک می‌باشد، احتمال نوترکیبی بین آنها کم بوده و پیوستگی بالایی دارند (۹). چنین مارکری برای شناسایی ناقلین اهمیت به سزایی دارد، زیرا بدون نیاز به بررسی جهش بیماری‌زا، با ردیابی مارکر در والدین و فرد بیمار، وضعیت آللی سایر فرزندان خانواده از لحاظ توارث آلل جهش یافته تعیین می‌شود (۱۱،۹). این پلی‌مورفیسم علاوه بر شناسایی ناقلین برای هاپلوتایپ کردن ژن PAH و ردیابی منشا جغرافیایی جهش‌ها نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱،۹، ۱۳).

میزان کارآیی مارکر VNTR در شناسایی ناقلین PKU در هر جمعیت به الگوی پراکندگی و فراوانی مارکر درخانواده‌های PKU آن جمعیت بستگی دارد (۱۱). یعنی هر چه انواع آلل‌ها بیشتر و توزیع آنها متوازن‌تر باشد این پلی‌مورفیسم در شناسایی ناقلین کاراتر است. بررسی میزان اطلاع‌رسانی (Polymorphism Information Content; PIC) مارکر VNTR در چندین جمعیت انجام شده است (۱۲،۱۱). PIC میزان اطلاع رسانی (کارآیی) مارکر ژنتیکی را مشخص می‌کند و برای یک مارکر مشخص، مقداری است که به ما نشان می‌دهد در جمعیت مورد مطالعه این مارکر تا چه حد می‌تواند وضعیت یک ژن خاص را در افراد یک خانواده نشان دهد (۱۴). میزان تنوع مارکر VNTR در جمعیت بیماران PKU سفید پوست اروپایی کارآیی لازم برای شناسایی ناقلین را دارا بوده و PIC آن در جمعیت مذکور ۷۰ درصد گزارش شده است (۱۱). برعکس، PIC مارکر VNTR در جمعیت بیماران PKU چین بسیار کمتر و در حدود ۳۲ درصد تخمین زده شده است که برای شناسایی ناقلین چندان کارآ نیست (۱۱). در جمعیت ایرانی نیز میزان PIC این مارکر حدود ۶۶ درصد محاسبه گردیده است که حاکی از اطلاع‌رسانی مناسب آن در تشخیص ناقلین PKU می‌باشد (۱۲). علاوه بر اینکه در جمعیت های مختلف، آلل‌های مارکر VNTR ممکن است متنوع باشند، در مناطق جغرافیایی متفاوت در درون یک جمعیت نیز چنین وضعیتی مشاهده می‌شود. به عنوان مثال، بررسی مارکر مذکور در مناطق جغرافیایی مختلف در جمعیت ایتالیا و انگلیس، حاکی از تفاوت آلل‌های VNTR در این مناطق می‌باشد (۱۶،۱۵).

با توجه به اینکه PKU بیماری اتوزومال مغلوب است، شناسایی ناقلین این بیماری در جوامعی که در آنها ازدواج فامیلی به گستردگی رواج دارد، مخصوصاً جوامعی مثل جمعیت ایرانی که غربالگری نوزادان برای PKU به صورت همگانی و گسترده انجام نمی‌شود، بسیار حائز اهمیت است. شناسایی ناقلین PKU با استفاده از روش‌های ژنتیک مولکولی امکان ارایه مشاوره ژنتیک دقیق و موثر را فراهم نموده و موجب کاهش تعداد موالید PKU خواهد شد. نظر به تنوع جمعیتی در ایران، بررسی فراوانی و پراکندگی آلل‌های مارکر VNTRدر نواحی مختلف کشور، جهت ارزیابی میزان کارآیی آن در شناسایی ناقلین هر ناحیه ضرورت دارد. در این مطالعه پس از شناسایی کلیه مبتلایان PKU استان یزد تا ابتدای سال ۱۳۸۷، فراوانی و توزیع آلل‌های مارکر پلی‌مورفیک VNTR ژن PAH در آنان مورد بررسی قرار گرفت و کارآیی این مارکر در شناسایی ناقلین PKU در این ناحیه ارزیابی شد.

مواد و روشها

در این مطالعه، ۹ فرد مبتلا به PKU که بیماری آنها با آزمایشات بیوشیمیایی تأیید شده بود و همچنین خواهران و

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-17]

برادران سالم (در صورت حضور) و والدین آنها مورد ارزیابی قرار گرفتند. خانواده بیماران از طریق هماهنگی با سازمان بهزیستی استان یزد مطلع شده و با آگاهی و اختیار در این مطالعه شرکت کردند. بررسی‌ها در بخش ژنتیک سازمان بهزیستی استان یزد انجام شد. بعد از توضیح در خصوص این تحقیق به شرکت کنندگان و پر کردن فرم رضایت‌نامه، مقدار ۳ تا ۵ میلی لیتر خون وریدی از هر فرد گرفته شد. پس از استخراج و تخلیص DNA از خون به کمک روش استاندارد نمک اشباع (salting out)، قطعه DNA در بردارنده ناحیه VNTR ژن PAH با روش PCR و به کمک پرایمرهای اختصاصی (۱۳) تکثیر شد. مقدار ۵ میکرولیتر از هر محصول PCR در چاهک‌های جداگانه در ژل آگارز ۲/۵ درصد در کنار مارکر اندازه‌گیری DNA الکتروفورز شدند. تمامی نمونه‌ها در ژل آکریل آمید ۱۲ درصد نیز مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۲۴ نفر شامل ۹ فرد مبتلا به PKU، والدین، خواهران و برادران آنها (در صورت حضور) از نظر آلل VNTR ژن PAH مورد مطالعه قرار گرفتند. به طور کلی، از ۴۸ کروموزوم مورد بررسی، در افراد مذکور ۱۵ کروموزوم سالم و ۳۳ کروموزوم واجد آلل جهش یافته ژن PAH بودند.

جدول ۱- فراوانی آلل‌های VNTR ژن PAH در کروموزوم‌های سالم و جهش یافته خانواده‌های PKU استان یزد در مقایسه با جمعیت کلی ایرانی

	سالم		جهش یافته	
آلل VNTR	یزد	ایرانی*	یزد	ایرانی*
۳	۲۰	۴۵	۵/۵	۷/۱
۶	۰	۲/۳	۰	۰
۷	۲۰	۱۲/۲	۱۱	۳۱/۳
۸	۳۳	۳۱/۳	۷۸	۴۸/۳
۹	۱۳	۹/۲	۰	۱۳/۳
۱۱	۷	۰	۰	۰
۱۲	۷	۰	۵/۵	۰
جمع	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

* منبع ۱۲

انواع و فراوانی آلل‌های VNTR ژن PAH در کروموزوم‌های مورد بررسی در جدول ۱ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود در مجموع ۶ نوع آلل VNTR دارای ۳، ۷، ۸، ۹، ۱۱ و ۱۲ به ترتیب با اندازه‌های ۳۲۵، ۴۴۵، ۴۷۵، ۵۰۵، ۵۶۵ و ۵۹۵ جفت باز در جمعیت PKU استان یزد وجود داشت که تنها ۴ آلل آن در کروموزوم‌های جهش یافته دیده می‌شود. آلل‌های ۳، ۷، ۸ و ۱۲ تکرار به ترتیب با فراوانی ۵/۵، ۱۱، ۷۸ و ۵/۵ در کروموزوم‌های جهش یافته و آلل‌های ۳، ۷، ۸، ۹، ۱۱ و ۱۲ تکرار به ترتیب با فراوانی ۲۰، ۲۰، ۳۳، ۷ و ۷ در کروموزوم‌های سالم وجود داشت. آلل ۸ تکرار بیشترین فراوانی را بین کروموزوم‌های سالم و جهش یافته داشت (جدول ۱). PIC مارکر VNTR برای جمعیت مورد بررسی ۶۳ درصد به دست آمد.

بحث

در درون و نزدیک ژن PAH علاوه بر مارکرهای دو آللی، دو مارکر چند آللی VNTR و STR نیز وجود دارد (۱۰،۹). با توجه به اینکه هر مارکر دو آللی دو آلل در جمعیت دارد، در بهترین حالت که فراوانی هرکدام از آلل‌ها ۵۰ درصد باشد، PIC حدوداً ۳۷/۵ درصد خواهد شد (۱۴). لذا این مارکرها برای شناسایی ناقلین و تشخیص قبل از تولد اطلاع‌رسانی مناسبی ندارند. اما مارکرهای VNTR و STR با توجه به تعدد آلل ها در صورتی که در جمعیت تنوع آللی داشته باشند، از اطلاع‌رسانی بسیار مناسبی برخوردار خواهند بود. میزان کارآیی این مارکرها در شناسایی ناقلین PKU در هر جمعیت به الگوی پراکندگی و فراوانی آنها درخانواده های PKU آن جمعیت بستگی دارد (۱۱،۹).

در این تحقیق، ۶ نوع آلل VNTR دارای ۳، ۷، ۸، ۹، ۱۱ و ۱۲ تکرار در جمعیت مورد مطالعه شناسایی گردید. آلل‌های دارای ۹ و ۱۱ تکرار فقط در کروموزوم‌های سالم وجود داشتند و در کروموزوم‌های جهش یافته مشاهده نشدند. آلل دارای ۸ تکرار بیشترین فراوانی را در بین کروموزوم‌های سالم و جهش یافته به خود اختصاص داده بود. فراوانی این آلل در کروموزوم‌های سالم و جهش یافته به ترتیب ۳۳ و ۷۸ درصد بود (جدول ۱). PIC محاسبه شده (۶۳ درصد) برای جمعیت این مطالعه نشان می‌دهد که تنوع آللی مارکر VNTR در جمعیت مناسب بوده و در بیش از دو سوم موارد امکان تشخیص وضعیت ناقل بودن بستگان بلافصل با بررسی این مارکر وجود دارد. لذا برای شناسایی ناقلین در گام اول نیاز به

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-17]

تشخیص مستقیم جهش عامل PKU نیست و در مشاوره ژنتیک خانواده‌ها می‌توان برای یافتن افراد ناقل، بررسی VNTR ژن PAH را توصیه نمود.

کارایی مارکر VNTR برای تشخیص ناقلین در جمعیت‌های مختلفی مورد ارزیابی قرار گرفته است (۱۲،۱۱). در جمعیت سفیدپوستان اروپایی با توجه به تنوع آلل‌های VNTR موجود در جمعیت، میزان کارایی این مارکر تقریبا ۷۰ درصد تخمین زده شده است (۱۱). مطالعه مشابهی نیز بر روی جمعیت چینی انجام شده است. به دلیل تنوع کم آلل‌های VNTR در جمعیت مذکور میزان اطلاع رسانی مارکر حدودا ۳۲ درصد تخمین زده شده که کارایی مناسبی برای تشخیص ناقلین نداشته است (۱۱).

در مطالعه‌ای که توسط کوچمشگی و همکاران به انجام رسیده، میزان کارایی مارکر VNTR برای شناسایی ناقلین در جمعیت ایرانی (به طور کلی) حدودا ۶۶ درصد محاسبه شده است. در این جمعیت، ۵ آلل متفاوت شناسایی و هماهنگی بعضی از جهش‌های بیماری‌زای ژن PAH با برخی از آلل‌های VNTR مشخص گردیده است (۱۲).

با وجود اینکه PIC به دست آمده در تحقیق حاضر تقریبا معادل میزان محاسبه شده در جمعیت ایرانی است ولی پراکندگی آلل‌ها تا حدودی متفاوت است. با این حال نکته جالب اینکه در هردو جمعیت مورد بررسی، کروموزوم‌های جهش یافته، بیشتر با آلل دارای ۸ تکرار همراه هستند (جدول ۱). آللی که بالاترین فراوانی را در کروموزوم‌های سالم به خود اختصاص می‌دهد در دو جمعیت متفاوت می‌باشد.

با توجه به تنوع جمعیتی در ایران ممکن است نوع و فراوانی آلل‌های VNTR ژن PAH در مناطق جغرافیایی مختلف، متفاوت باشد. بنابراین بررسی تفصیلی فراوانی و پراکندگی آلل‌های مارکر VNTR در نواحی مختلف کشور، میزان کارآیی آن را در شناسایی ناقلین هر ناحیه مشخص می‌نماید.

این مطالعه جزو اولین موارد بررسی منطقه‌ای مارکر VNTR ژن PAH در کشور بود. طی این تحقیق آلل های مارکر VNTR در مبتلایان و خانواده های آنها بررسی شد و در مجموع نشان داده شد که مارکر فوق جهت شناسایی ناقلین کارآیی مناسبی دارد. بنابراین با توجه به اینکه بررسی آلل VNTR به آسانی امکان‌پذیر است، این روش به عنوان روشی ساده، ارزان، اطلاع‌رسان و سریع در اولین گام برای شناسایی ناقلین PKU در این جمعیت توصیه می‌گردد. به علاوه نتایج حاصله از این تحقیق می‌تواند راهگشای پیگیری جهش‌ها در جمعیت تحت بررسی باشد. نکته آخر اینکه آنچه در قدم بعدی برای خانواده‌های PKU این منطقه از کشور ضرورت دارد، بررسی جهش‌های بیماری‌زای ژن PAH است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین سازمان بهزیستی استان یزد به دلیل مساعدت و در اختیار گذاشتن آزمایشگاه ژنتیک و همچنین از کارکنان آزمایشگاه ژنتیک قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, Woo SLC, Editors. The hyperphenylalaninemias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1995. p.1015-77.
2. Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. Clin Biochem 2008; 29: 31–41.
3. Bickel H, Bachmann C, Beckers R. Neonatal mass screening for metabolic disorders. Eur J Pediatr 1981; 137: 133-139.
4. Ozalp I, Coskun T, Tokol S, Demircin G, Mönch E. Inherited metabolic disorders in Turkey. J Inherit metab Dis 1990; 13: 732–38.
5. Koochmeshgi J, Bagheri A, Hosseini- Mazinani SM. Incidence of phenylketonuria in Iran estimated from consanguineous marriages. J Inherit Metab Dis 2002; 25: 80–81.
6. 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: 29-32.
7. DiLella AG, Kwok SC, Ledley FD, Marvit J, Woo SL. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. Biochemistry 1986; 25: 743-49.
8. PAHdb, Phenylalanine hydroxylase locus knowlegebase. Available from: http://www.pahdb.mcgill.ca.
9. Goltsov AA, Eisensmith RC, Konecki DS, Lichter-Konecki U, Woo SLC. Associations between mutations and a VNTR in the human phenylalanine hydroxylase gene. Am J Hum Genet 1992; 51: 627-36.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-17]

10. Goltsov AA, Eisensmith RC, Naughton ER, Jin L, Chakraborty R, Woo SLC. A single polymorphic STR system in the human phenylalanine hydroxylase gene permits rapid prenatal diagnosis and carrier screening for phenylketonuria. Hum Mol Genet 1993; 3: 577-81.

11. Eisensmith RC, Goltsov AA, Woo SL. A simple, rapid, and highly informative PCR-based procedure for prenatal diagnosis and carrier screening of phenylketonuria. Prenat Diagn 1994; 14: 1113-18.

12. Hosseini-Mazinani SM, Koochmeshgi J, Khazaee-Koohpar Z, Hosein-Pur-Nobari N, Seifati SM. Carrier detection of phenylketonuria in Iranian families by variable number tandem-repeat polymorphism analysis. East Mediterr Health J 2008; 14: 1445-51.

13. Zschocke J, Graham CA, Carson DJ, Nevin NC. Phenylketonuria mutation analysis in Northern Ireland: a rapid stepwise approach. Am J Hum Genet 1995; 57: 1311-17.

14. Shete S, Tiwari H, Elston RC. On estimating the heterozygosity and polymorphism information content value. Theor Popul Biol 2000; 57: 265-71.

15. Giannattasio S, Dianzani I, Lattanzio P, Spada M, Romano V, Calì F, et al. Genetic heterogeneity in five Italian regions: analysis of PAH mutations and minihaplotypes. Hum Hered 2001; 52: 154-59.

16. Tyfield LA, Stephenson A, Cockburn F, Harvie A, Bidwell JL, Wood NA, et al. Sequence variation at the phenylalanine hydroxylase gene in the British Isles. Am J Hum Genet 1997; 60: 388-96.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-17]