

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۲۸ شماره ۱ بهار ۱۳۸۵ صفحات ۳۹-۳۳

تشخیص و غربالگری بیماری دیستروفی عضلانی دوشن و بکر با استفاده از تکنیک PCR چندگانه در آذربایجانشرقی

دکتر مرتضی جبارپور بنیادی: استادیار گروه ژنتیک دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز، پژوهشگر مرکز تحقیقات کاربردی دارویی: نویسنده رابط
E-mail: bonyadim@tbzmed.ac.ir

دکتر محمد برزگر: دانشیار گروه کودکان مرکز آموزشی و درمانی کودکان تبریز، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر هرمز آیرملو: استادیار گروه مغز و اعصاب مرکز آموزشی و درمانی امام، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر رضا خندقی: استادیار گروه مغز و اعصاب مرکز آموزشی و درمانی امام، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
محسن اسماعیلی: پژوهشگر آزمایشگاه ژنتیک مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۴/۲/۲۵، پذیرش: ۸۴/۴/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: بیماری دیستروفی عضلانی دوشن از اختلالات ماهیچه ای - عصبی است که با تحلیل ماهیچه های عضلانی همراه است. این بیماری از جهش در ژن دیستروفین عارض شده و جایگاه کروموزومی این ژن بر روی کروموزوم ایکس بوده و الگوی توارث آن بصورت مغلوب است. فراوانی این بیماری یک در ۳۵۰۰ تولد زنده نوزاد پسر گزارش شده است. در ۳۵ درصد از خانواده های مبتلا، بیماری ناشی از جهش جدید است. علت رخداد جهش جدید با فرکانس بالا در این ژن بدلیل بزرگ بودن خیلی زیاد آن عنوان شده است. این ژن ۷۹ اگزون داشته و بزرگی آن در حدود ۲/۴ میلیون جفت باز است. در ۷۰ درصد از مبتلایان، ژن دیستروفین متحمل حذف شدگی و یا دو برابر شدگی در یکی از اگزونها گردیده و در بقیه موارد ناشی از جهشهای نقطه‌ای است. در این مطالعه، انواع حذف شدگی های اگزونی در مبتلایان به دیستروفی عضلانی دوشن و بکر در استان آذربایجانشرقی به روش مولکولی بررسی و فراوانی آنها در بین مبتلایان محاسبه گردید.

روش بررسی: افراد مشکوک به بیماری دیستروفی عضلانی دوشن و بکر بعد از تشخیص کلینیکی و آزمایشگاهی، جهت مطالعه مولکولی ارجاع داده شده و پس از استخراج DNA از خون مبتلایان، حذف شدگی در ۲۶ عدد از اگزونها ژن دیستروفین، با استفاده از تکنیک PCR چندگانه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: از ۴۶ بیمار پسر ارجاع داده شده با علائم کلینیکی دیستروفی عضلانی دوشن و بکر، در ۲۱ نفر (۴۶ درصد) حذف شدگی در یکی از اگزونها مورد مطالعه ژن دیستروفین اتفاق افتاده بود. از این تعداد در ۳ نفر (۱۴ درصد) حذف شدگی اگزونی در یکی از اگزونها شماره ۱ الی ۲۰ و در بقیه موارد (حدوداً ۸۶ درصد)، حذف شدگی در اگزونها شماره ۴۰ به بعد رخ داده بود. در ۱۵ خانواده (۳۲/۶ درصد) از خانواده های ارجاع داده شده، هیچ عضو مذکر دیگری در فامیل مبتلا نبوده و این با احتمال زیاد نشانگر رخداد جهش جدید بوده است.

نتیجه گیری: حذف شدگی اگزونی در ۴۶ درصد از موارد ارجاع داده شده از منطقه آذربایجانشرقی در یکی از اگزونها مورد مطالعه رخ داده که اکثر این جهشها در منطقه انتهایی یا دیستال ژن دیستروفین (بین اگزونها ۴۰ الی ۵۰) اتفاق افتاده است.

کلید واژه ها: دیستروفی عضلانی دوشن، دیستروفی عضلانی بکر، ژن دیستروفین، تکنیک PCR چندگانه

مقدمه

پروکسیمال بیشتر از عضلات دیستال بوده و در شروع بیماری اکثراً اعضای تحتانی درگیر می‌شوند (۳). خمیدگی ستون فقرات^۱ و بزرگ و ضعیف بودن ماهیچه‌های ساق پا (سودوهیپرتروفی) مشهود می‌باشد (۱ و ۳)، بطوریکه بچه مبتلا یکسری از مشخصه‌های مانوری به هنگام بلند شدن از حالت زانو زده را نشان می‌دهد (علائم گاورن) (۱). علاوه بر علائم بالینی فوق، آزمایشات بیوشیمی (تعیین کراتین کیناز)، هیستوپاتولوژی (بیوپسی ماهیچه)، الکتروفیزیولوژی و نیز آزمایشات ژنتیکی مولکولی می‌توانند در

دیستروفی عضلانی دوشن^۱ شایعترین و پیشرونده‌ترین دیستروفی از بین بیش از ۱۰ نوع دیستروفی عضلانی است که از نظر بالینی و ژنتیکی مجزا و مشخص از هم می‌باشند. سن شروع علائم بیماری معمولاً کمتر از سه سالگی بوده و در سن ۵-۴ سالگی کاملاً مشهود است (۱). بیماران مبتلا به دوشن تا سن ۱۲ سالگی مجبور به نشستن روی ویلچر بوده و معمولاً تا دهه سوم زندگی (تا ۲۰ سالگی) فوت میشوند (۱ و ۲). علائم بیماری شامل ضعف عضلانی پیشرونده متقارن می‌باشد که درگیری عضلات

حذف‌شدگی‌ها در تشخیص دیستروفی عضلانی دوشن و بکر بکار رود. پس از آن روشهای غربالگری دیگری نیز بر اساس PCR چندگانه جهت شناسایی حذف‌شدگی‌ها در سایر اگزونها توسعه یافتند (۱۱-۱۰)، بطوریکه با این روشها بیش از ۹۸-۹۹ درصد حذف‌شدگیهای ژن دیستروفین قابل ردیابی هستند.

مواد و روش‌ها

از افرادی که توسط متخصصین مغز و اعصاب بیمارستان کودکان بعنوان مشکوک به دیستروفی عضلانی دوشن و بکر به مرکز معرفی شده بودند، خونگیری توسط پرستار همکار بعمل آمد. جهت جلوگیری از انعقاد خون، مقداری EDTA (۲۰۰ تا ۴۰۰ میکرولیتر از EDTA نیم مولار به ازای ۱۰ سی سی خون) به خون اضافه و سریعاً به آزمایشگاه مرکز جهت استخراج DNA منتقل شده و یا در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید تا در زمان مناسب به آزمایشگاه منتقل گردد. جهت استخراج DNA از روش فنل - کلروفرم استفاده شد. جهت لیز کردن سلولهای گلبولهای قرمز و از بین بردن آنها، ابتدا ۳۰ میلی لیتر بافر لیز کننده (152mM NH₄Cl و 10mM NaHCO₃ و 0.1mM EDTA) به ۱۰ میلی لیتر خون اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت جدا کردن گلبولهای قرمز از گلبولهای سفید حاوی هسته، محلول حاصله برای مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی که فاقد گلبولهای قرمز بوده جدا و مایع تحتانی جهت آزمایشات بعدی نگهداری گردید. بعد از چند بار افزودن بافر لیز کننده و سانتریفیوژ کردن، رسوب حاصل که حاوی گلبولهای سفید بوده جدا و در بافر (75mM SE) حاصل گردید. سپس ۱۰ میلی لیتر محلول فنل - کلروفرم به آن اضافه و به شدت مخلوط گردید تا محلول شیری رنگی حاصل شود. محلول حاصل را به مدت ۳۰ دقیقه با ۵۰۰۰-۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده و مایع رویی به یک لوله استریل منتقل گردید. به این مایع به حجم ۱ به ۱۰ سدیم استات (3M) و دو برابر حجم خون اولیه اتانول مطلق سرد افزوده تا رشته DNA ظاهر گردد. رشته DNA حاصل در مقدار لازمی از آب استریل و یا TE بافر حل شد.

جهت تشخیص حذف‌شدگیهای شایع گزارش شده در مطالعات دیگر، از تکنیک PCR چندگانه به صورتیکه بگز و همکاران (۱۲) اشاره نموده بودند استفاده گردید. در این روش، ۲۶ اگزون از اگزونهای ژن دیستروفین در سه واکنش PCR مورد بررسی قرار گرفت. سه واکنش بکار گرفته شده بطور خلاصه توضیح داده میشوند.

تشخیص و تایید این بیماری سوئد واقع شونند (۳). پروتئین دیستروفین که بطور طبیعی در طول غشاء پلاسمایی (سارکولمای) سلولهای ماهیچه‌ای وجود دارد در بیوپسی ماهیچه این بیماران مشاهده نمیشود (۳۱). این پروتئین بخشی از کمپلکس پروتئینی است که اسکلت سلولی را به پروتئینهای غشاء که آنها نیز به نوبه خود با پروتئینهای موجود در ماتریکس خارج سلولی در ارتباطند، پیوند می‌دهد (۴). موتاسیونهایی که منجر به فقدان دیستروفین گردند منتهی به بیماری دیستروفی عضلانی دوشن و موتاسیونهایی که منجر به کیفیت یا کمیت غیرطبیعی دیستروفین گشته و امکان فعالیت باقیمانده آنرا میسر می‌سازند منتهی به اختلال آلی دیگری بنام دیستروفی عضلانی بکر می‌شوند که شدت بیماری در نوع اخیر ملایمتر است (۱). بنابراین این بیماری در اثر موتاسیون در ژن دیستروفین عارض شده و بواسطه موتاسیون جدید یا انتقال موتاسیون از مادر هتروزیگوت یا مادر دارای موزایسم سلولهای زایا ایجاد می‌شود (۱). الگوی وراثت این بیماری، مغلوب وابسته به جنس (یا وابسته به ایکس) بوده و فراوانی آن یک در ۳۵۰۰ تولد زنده نوزاد پسر می‌باشد (۱ و ۲). میزان رخداد موتاسیون جدید در این ژن بالا بوده که این امر احتمالاً بدلیل بزرگی غیرمعمول آن و رخداد نوترکیبی با میزان بیش از ۱۰ درصد در درون آن است (۱). ژن دیستروفین بعنوان بزرگترین ژن شناخته شده انسان (با طول ۴/۲ میلیون جفت باز) حدود ۰/۰۰۱ کل ژنوم انسان را دربرگرفته و حداقل هفت پروموتور و ۷۹ اگزون دارد (۵). این ژن بر روی کروموزوم X در موقعیت Xp21.2 قرار دارد (۲). آل‌های پاتوژن و بیماری‌ها بسیار متنوعند که شامل حذف‌شدگی‌های بزرگ در یک یا چند اگزون (۶۵-۵۵ درصد)، دو برابر شدگی‌ها (۵ درصد) و نیز موتاسیونهای کوچک (میکرودلسیون یا حذف‌شدگی کوچک، اینسرتن یا وارد شدگی، موتاسیون نقطه‌ای بی معنی و موتاسیون در محل قیچی شدن) (۴۰-۳۰ درصد) می‌باشند. با اینکه میزان موتاسیون در این ژن بالا هست لیکن رخداد موتاسیونهای نوع اشتباهی در این ژن بسیار غیرمعمول است (۱ و ۲). در هر دو تیپ دیستروفی عضلانی دوشن و بکر حذف‌شدگی‌ها و دوپلیکاسیونهای جزئی در دو نقطه داغ نوترکیبی جمع شده‌اند که یکی از این نقاط در پروکسیمال ژن بوده (در انتهای ۵) و شامل اگزونهای ۲۰-۲ (۳۰٪ موارد) میباشد. نقطه دیگر در دیستال ژن (انتهای ۳) بوده و در برگیرنده اگزونهای ۵۳-۴۴ (۷۰٪ موارد) است (۶). روش ساترن بلات که بعنوان اولین روش دقیق تشخیص دیستروفی عضلانی دوشن و بکر بکار می‌رفت (۷ و ۸)، بدلیل پرهزینه بودن، خسته‌کننده بودن، زمان‌بری بالا و نیز استفاده از مواد رادیوایزوتوپ نتوانست بعنوان روشی معمول جهت غربالگری این بیماری بکار رود. تکثیر همزمان ۹ اگزون از ژن دیستروفین جهت شناسایی و تعیین حذف‌شدگی‌ها با استفاده از PCR چندگانه انقلاب عظیمی در تشخیص دیستروفی عضلانی دوشن ایجاد کرد (۹). سادگی، سرعت، هزینه پایین و نیز عدم استفاده از مواد رادیوایزوتوپ موجب گردید که این تکنیک بعنوان روش غربالگری

قرار ذیل بوده است: ۶ دقیقه ۹۴ درجه سانتی گراد برای یک سیکل، ۹۴ درجه سانتی گراد برای سی ثانیه، ۶۴ درجه سانتیگراد برای دو دقیقه که این دو مرحله بتعداد ۲۵ سیکل تکرار گردید. در مرحله آخر، ۶۴ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه دیگر برای یک سیکل به اجرا گذاشته شد.

محصولات حاصل از PCR، بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ کم الکتروفورز گردید. در صورتیکه PCR کار کرده بود، این محصولات بر روی ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد الکتروفورز گردیده و توسط اولتراویوله و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید قابل مشاهده گردید. هر گونه حذف شدگی آگزونی بر روی ژل قابل مطالعه بود.

یافته ها

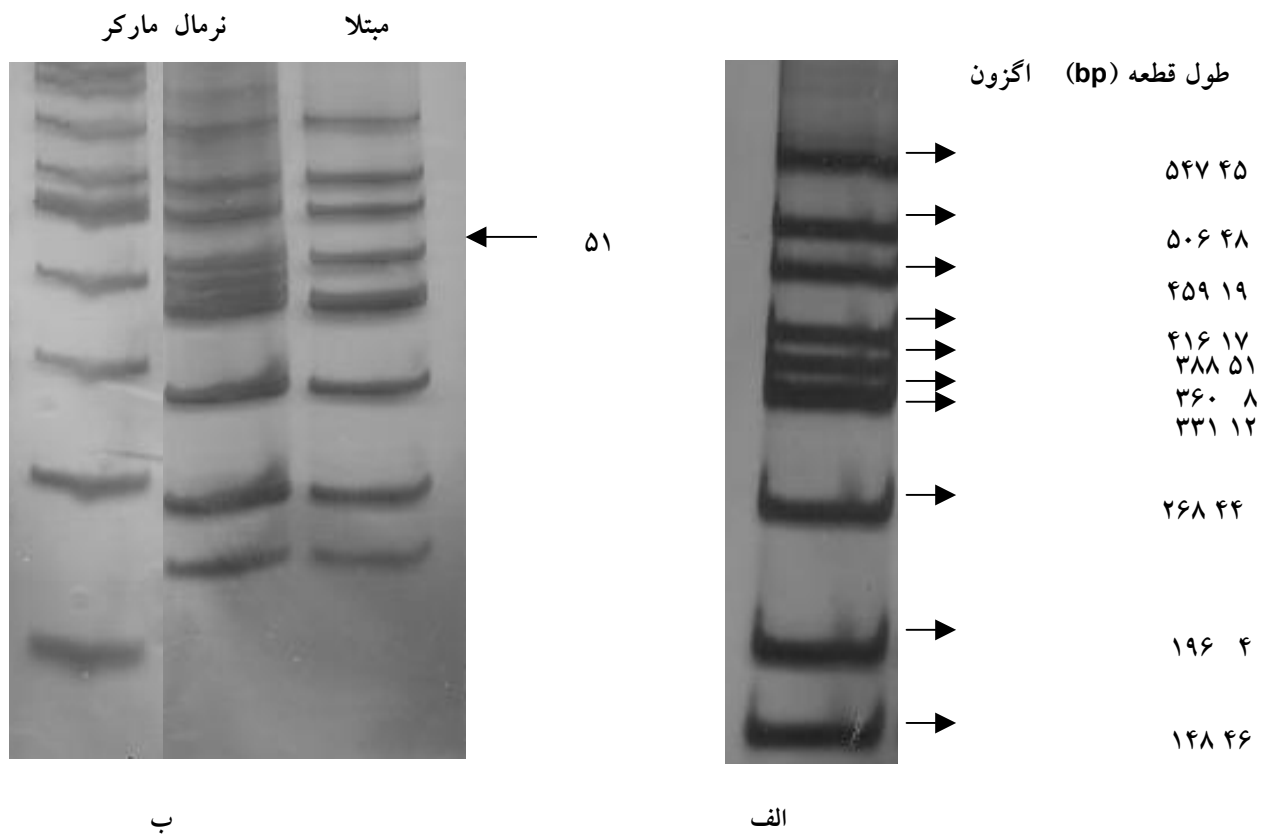
چهل و شش نفر پسر که از نظر بالینی مشکوک به دیستروفی عضلانی دوشن و یا بکر بودند با معرفی متخصصین مغز و اعصاب جهت خونگیری و مطالعات مولکولی و شجره نامه ای به این آزمایشگاه مراجعه نمودند. اطلاعات شجره نامه ای از این افراد تهیه شد و همچنین پس از خونگیری DNA آنها استخراج و جهت مطالعه مولکولی در فریزر نگهداری گردید.

بر اساس اطلاعات بدست آمده از شجره نامه این افراد در ۱۵ خانواده از خانواده های مبتلا، به جز شخص مبتلا و پروباند معرفی شده در دیگر اعضاء فامیل بیماری مشاهده نشده بود که این نشانگر این است که با احتمال زیاد جهش جدید در این پروباند صورت پذیرفته است. بنابراین در ۳۲/۶ درصد از مبتلایان منطقه مورد مطالعه، با احتمال زیاد جهش جدید رخ داده بود. مطالعات مولکولی با استفاده از PCR چندگانه، بر روی DNA استخراج شده از تمام پروباندها صورت گرفت. در این مطالعات طی سه واکنش PCR چندگانه، ۲۶ آگزون از ژن دیستروفین مورد بررسی قرار گرفت. در واکنش اول PCR، ۱۰ آگزون (شکل ۱)، در واکنش دوم PCR، ۹ آگزون و یک پروموتور (شکل ۲) و در واکنش سوم PCR، ۵ آگزون و یک پروموتور دیگر (شکل ۳) بررسی گردیدند. این بررسی ها نشان داد که با این روش تنها در ۲۱ نفر از افراد مبتلا امکان تشخیص حذف شدگی آگزونی وجود داشت که این نشان میدهد این تکنیک قادر به تشخیص ۴۵/۶ درصد از مبتلایان منطقه مورد مطالعه به دیستروفی عضلانی دوشن و یا بکر بوده است. در این مطالعه هیچگونه حذف کامل آگزونی در بیماران بکری مشاهده نگردید، فقط در یک مورد از این مبتلایان حذف شدگی کوچکی در آگزون شماره ۴۵ وجود داشت که این منجر به کوتاه شدن محصول PCR حاصله از تکثیر این آگزون شد (شکل ۴).

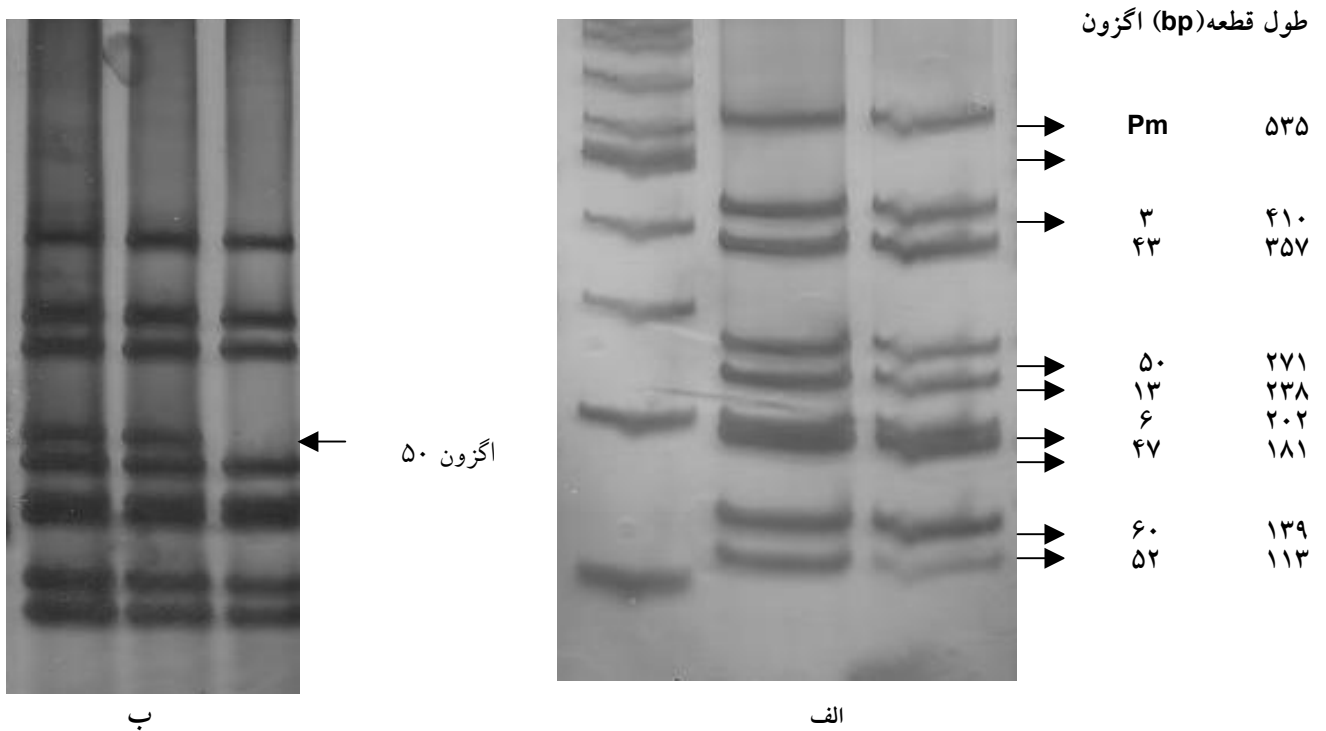
واکنش اول PCR: در این واکنش، با استفاده از ده جفت پرایمر آگزونهای شماره ۴، ۸، ۱۲، ۱۷، ۱۹، ۴۴، ۴۵، ۴۶، ۴۸ و ۵۱ بررسی گردیدند. طول محصولات PCR حاصل شده از این جفت پرایمرها به نحوی طراحی و انتخاب شده‌اند که به هنگام الکتروفورز کردن با همدیگر تداخل نداشته و قابل تشخیص باشند (شکل ۱-الف). در صورت رخداد حذف شدگی در هر کدام از این آگزونها در شخص مبتلا، امکان تشخیص آن بوده و بعد از تکرار مجدد و در صورت مشاهده مجدد همان حذف شدگی به نتیجه حاصله اطمینان پیدا میشود (شکل ۱-ب). جهت انجام این واکنش، از مواد ذیل با غلظتهای اشاره شده و با استفاده از برنامه PCR ذکر شده، استفاده گردید. برای انجام PCR در حجم نهایی به مقدار ۵۰ میکرو لیتر، از $MgCl_2$ با غلظت نهایی 1.5 mM، بافر PCR (10X: 500mM KCl and 200mM Tris-HCl (pH 8.4)) با غلظت نهایی 1X، آنزیم Taq پلیمرز دو واحد (سینازن)، dNTP با غلظت نهایی 0.2mM استفاده گردید. برنامه ارائه شده برای چرخه های PCR به قرار ذیل بوده است: ۶ دقیقه ۹۴ درجه سانتی گراد برای یک سیکل، ۹۴ درجه سانتی گراد برای سی ثانیه، ۵۴ درجه سانتیگراد برای سی ثانیه و ۶۵ درجه سانتی گراد برای یک دقیقه که این سه مرحله بتعداد ۲۵ سیکل تکرار گردید. در مرحله آخر، ۶۴ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه برای یک سیکل به اجرا گذاشته شد.

واکنش دوم PCR: در این واکنش، با استفاده از نه جفت پرایمر آگزونهای شماره ۳، ۶، ۱۳، ۴۳، ۴۷، ۵۰، ۵۲، ۶۰ و آگزون یک به همراه پروموتور این ژن (که مخصوص ماهیچه است) بررسی گردیدند. طول محصولات PCR حاصل شده از این جفت پرایمرها نیز نظیر PCR قبلی، به نحوی طراحی و انتخاب شده که به هنگام الکتروفورز کردن تداخلی در همدیگر نداشته و قابل تمییز از هم باشند (شکل ۲-الف). در این واکنش از مواد اشاره شده در واکنش اول با غلظتهای مخصوص خود استفاده گردید. برنامه ارائه شده برای چرخه های PCR به قرار ذیل بوده است: ۶ دقیقه ۹۴ درجه سانتی گراد برای یک سیکل، ۹۴ درجه سانتی گراد برای سی ثانیه، ۶۴ درجه سانتیگراد برای دو دقیقه که این دو مرحله بتعداد ۲۵ سیکل تکرار گردید. در مرحله آخر، ۶۴ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه دیگر برای یک سیکل به اجرا گذاشته شد.

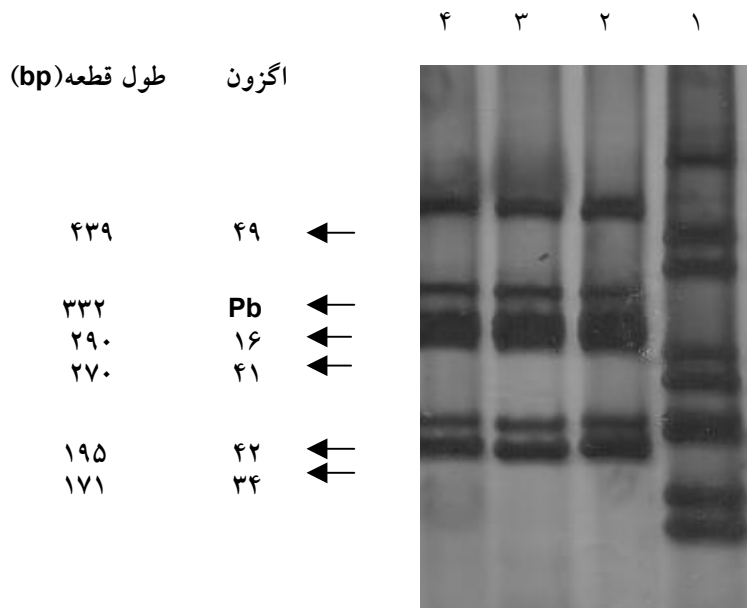
واکنش سوم PCR: در این واکنش، با استفاده از شش جفت پرایمر آگزونهای شماره ۱۶، ۳۴، ۴۱، ۴۲ و ۴۹ به همراه پروموتور دیستروفین مخصوص مغز بررسی گردیدند. طول محصولات PCR حاصل شده از این جفت پرایمرها نظیر PCR های قبلی، به نحوی طراحی و انتخاب شده که به هنگام الکتروفورز کردن تداخلی در همدیگر نداشته و قابل تمییز از همدیگر باشند (شکل ۳). در صورت رخداد حذف شدگی در هر کدام از این آگزونها و پروموتور در شخص مبتلا نیز، امکان تشخیص آن بوده است. جهت انجام این واکنش، از مواد اشاره شده در واکنشهای قبلی، استفاده گردید. برنامه ارائه شده برای چرخه های PCR به



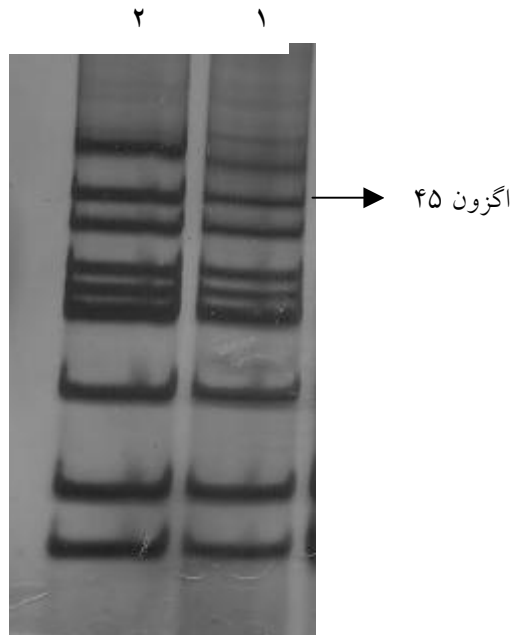
شکل ۱: الف) با استفاده از ۱۰ جفت پرایمر، اگزونهای شماره ۴، ۸، ۱۲، ۱۷، ۱۹، ۴۴، ۴۵، ۴۶، ۴۸ و ۵۱ تکثیر یافتند. ب) حذف شدگی اگزونی، در واکنش اول PCR در اگزون شماره ۵۱ که طول محصول PCR آن ۳۸۸ جفت باز است، در یکی از مبتلایان مشاهده میشود



شکل ۲: الف) با استفاده از ۹ جفت پرایمر، اگزونهای شماره ۳، ۶، ۱۳، ۴۳، ۴۷، ۵۰، ۵۲، ۶۰ و اگزون شماره یک به همراه پروموتور این ژن (که مخصوص ماهیچه است) بررسی گردیدند. ب) حذف شدگی اگزونی، در واکنش دوم PCR در اگزون شماره ۵۰ که طول محصول PCR آن ۲۷۱ جفت باز است، در یکی از مبتلایان مشاهده میشود.



شکل ۳: با استفاده از ۶ جفت پرایمر، اگزونهای شماره ۱۶، ۳۴، ۴۱، ۴۲ و ۴۹ به همراه پرموتور دیستروفین مخصوص مغز بررسی گردیدند. لاین یک مربوط به محصول واکنش PCR دوم بوده ولی لاینهای ۲، ۳ و ۴ مربوط به محصول واکنش PCR سوم هستند.



شکل ۴: محصول PCR از واکنش نوع اول در شخصی که مبتلا به بیماری دیستروفی عضلانی بکر است (لاین یک). در اگزون شماره ۴۵ حذف شدگی کوچکی در درون اگزون صورت گرفته که منجر به کوتاه شدگی مختصر محصول PCR این اگزون گردیده است.

بحث

با توجه به عدم وجود درمان برای بیماران مبتلا به دوشن و بکر، مشاوره ژنتیک و تشخیص بیماری نقش قابل توجهی در جلوگیری از گسترش آن در جامعه دارد. همانگونه که قبلاً ذکر شد روشهای مختلفی برای آنالیز حذف شدگیهای ژن دیستروفین بکار گرفته شده است که از این بین روش PCR چندگانه بدلیل سادگی جایگاه ویژه‌ای در بین روشهای تشخیصی به خود

اختصاص داده است و به مرور زمان با بسط این روش به اگزونهای بیشتر، حساسیت تشخیصی حذف شدگیها جهت غربالگری بیماران مبتلا به دوشن بالا رفته است. آنالیز ۲۶ عدد اگزون در ۴۶ نفر مبتلا (۴۳ نفر دوشن، ۳ نفر بکر) نشان داد که حدود ۴۵/۶ درصد از کل بیماران دارای حذف شدگی در یک یا چند اگزون می‌باشند که تقریباً با نتایج جهانی مطابقت دارد. میزان

شده، به ترتیب آگزونهای ۴۸، ۵۱ و ۵۲ هرکدام با فراوانی ۲/۸ درصد، آگزونهای ۴۱، ۴۲، ۴۴ و ۶۰ هرکدام با فراوانی ۱/۴ درصد است. از آنجایی که از بین ۲۶ آگزون بررسی شده فقط در ۱۵ آگزون حذف شدگی مشاهده گردیده است، هدف اولیه غربالگری بایستی بر روی منطقه دیستال و آنهم بر روی آگزونهای ۴۵، ۴۹ و ۵۰ (شایعترین جهشهای یافت شده) متمرکز شده و در مراحل بعدی آگزونهای ۴۶ و ۴۷ بررسی شده و سپس در نهایت در منطقه پروکسیمال و دیستال حذف شدگیهای دیگر بررسی شوند.

با توجه به یکسان بودن تقریبی علائم بالینی بیماری در بین تمامی بیماران دوشن و نیز عدم وجود رابطه بین میزان و نوع آگزونهای حذف شده با علائم بیماری در بین این بیماران، رابطه قابل مشاهدهای بین فنوتیپ و ژنوتیپ در بیماران دیستروفی عضلانی دوشن وجود نداشت. البته کم بودن شدت بیماری و نیز بروز بیماری در سنین بالا در بیماران بکر بدلیل بروز موتاسیونهایی است که امکان فعالیت باقیمانده پروتئین دیستروفین را ممکن می‌سازند. در این مطالعه نیز هیچگونه حذف کامل آگزونی در این بیماران مشاهده نگردید چرا که اینگونه حذفها باعث فقدان پروتئین دیستروفین می‌شوند. در یک مورد از مبتلایان به دیستروفی عضلانی بکر، حذف شدگی کوچکی در آگزون ۴۵ ژن دیستروفین مشاهده گردید که این متهمی به بروز بیماری با علائم خفیف بکر گردیده بود.

نتیجه گیری

تشخیص ژنتیکی مبتلایان به دیستروفی عضلانی دوشن در منطقه آذربایجان شرقی با استفاده از روش PCR چندگانه در ۴۵/۶ درصد موارد امکان پذیر بوده که در اکثر این موارد (۸۶ درصد) حذف شدگی آگزونی در منطقه دیستال ژن دیستروفین رخ داده است. همچنین در حدود یک سوم از مبتلایان به دیستروفی عضلانی دوشن از منطقه مورد مطالعه جهش جدید در ژن دیستروفین عارض شده بود.

تقدیر و تشکر

مؤلفین از ریاست محترم مرکز تحقیقات کاربردی دارویی و دیگر همکاران در این مرکز کمال تشکر را دارند. بودجه تحقیقاتی این پژوهش توسط مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تامین شده است.

حذف شدگی گزارش شده از آمریکای شمالی و اروپا حدود ۶۵-۴۵ درصد می‌باشد (۱۰ و ۱۵-۱۳). پایین‌ترین میزان حذف گزارش شده مربوط به انگلستان بوده (۴۳ درصد) (۱۳) و بالاترین میزان مربوط به ایالات متحده آمریکا (۶۵ درصد) (۱۰) می‌باشد. این میزان برای آسیا کمی پایین‌تر گزارش شده است، بطوریکه این میزان برای فلسطین اشغالی ۳۷ درصد (۱۶)، ژاپن ۴۰ درصد (۱۷)، چین ۴۶ درصد (۱۸)، تایلند ۵۵ درصد (۱۹)، ترکیه ۵۹ درصد (۲۰) و برای سنگاپور ۶۱ درصد (۲۱) می‌باشد. این میزان در منطقه دیگری از ایران در حدود ۵۷ درصد گزارش شده بود (۲۲). برای قاره آفریقا نیز این میزان حدود ۵۱ درصد گزارش شده است (۲۳). اختلاف مشاهده شده در فرکانس حذف شدگی در بین مناطق مختلف و همچنین بین این مطالعه و مطالعات دیگر (در مناطق دیگر ایران و کشورهای همجوار)، ناشی از تاثیر اساس بنیانگذاری است.

نقاط داغ نوترکیبی که برای ژن دیستروفین گزارش شده‌اند (۶) کاملاً در این مطالعه نیز مشهود می‌باشد. ۱۴ درصد از کل موارد حذف شدگی‌های آگزونی در نقطه داغ پروکسیمال (شامل آگزونهای ۲۰-۲) رخ داده و ۸۶ درصد مابقی در نقطه داغ دیستال (شامل آگزونهای ۶۰-۴) متمرکز شده است. از بین حذف شدگی‌های آگزونی در منطقه پروکسیمالی ژن، ۲۵ درصد مربوط به آگزون ۶، ۵۰ درصد مربوط به آگزون ۸ و ۲۵ درصد مربوط به آگزون ۱۳ می‌باشد. در بین ۴۶ نفر مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن و بکر مورد مطالعه، ۳/۲ درصد (۰/۴۵۶x۰/۱۴x۰/۵x۱۰۰) آنها حذف شدگی آگزونی در آگزون ۸ از منطقه پروکسیمال را نشان داده بودند. آگزونهای ۶ و ۱۳ هر کدام با فراوانی حذف شدگی ۱/۶ درصد در بین کل مبتلایان بررسی شده در جایگاههای بعدی آگزونهای حذف شده منطقه پروکسیمال قرار دارند. همچنین از بین ۸۶ درصد کل حذفهای دیستال، حذف آگزونهای ۴۱، ۴۲، ۴۴، ۴۵، ۴۶، ۴۷، ۴۸، ۴۹، ۵۰، ۵۱، ۵۲ و ۶۰ بترتیب دارای فراوانیهای ۳/۶، ۳/۶، ۱۴/۳، ۱۰/۷، ۱۰/۷، ۷/۱، ۱۴/۳، ۷/۱، ۷/۱ و ۳/۶ درصد بوده است. همانگونه که ملاحظه می‌شود بیشترین حذف شدگی آگزونی در آگزونهای ۴۵، ۴۹ و ۵۰ بوده و کلاً مجموع حذف شدگی آگزونی آگزونهای ۴۵، ۴۹ و ۵۰ در بین کل مبتلایان بررسی شده در این مطالعه ۱۶/۸ درصد (۰/۱۴۳x۰/۸۶x۰/۴۵۶x۰/۳x۰/۱۰) می‌باشد، که این نشانگر بالا بودن احتمال جهش‌پذیری این آگزونها است. در ۸/۴ درصد از کل مبتلایان، حذف شدگی آگزونی در آگزونهای ۴۶ و ۴۷ مشاهده گردید. حذف شدگی آگزونی در آگزونهای دیگر این منطقه (منطقه دیستال ژن) کم بوده است. بطوریکه فراوانی حذف شدگی این آگزونها در کل مبتلایان بررسی

References

1. Passarge E. *Color Atlas of Genetics*. 2nd ed. Stuttgart, Thieme, 2001; pp: 378-79.
2. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. 2nd ed. Oxford, Bios Scientific Publishers, 1999; pp. 362,414,534.

3. Bakker E, Jennekens FGI, de Visser M, Wintzen AR. Duchenne and Becker muscular dystrophies. In: Emery AEH. *Diagnostic criteria for Neuromuscular Disorders*. 2nd ed. London, Royal Society of Medicine Press. 1997; pp: 1-4
4. Ehmsen J, Poon E, Davies K. The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci*. 2002; **115**(14): 2801-3.
5. Howard PL, Dally GY, Wong MH, Ho A, Weleber RG, Pillers DA, et al. Localization of dystrophin isoform Dp71 to the inner limiting membrane of the retina suggests a unique functional contribution of Dp71 in the retina. *Hum Mol Genet*. 1998; **7**(9): 1385-91.
6. Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, Blonden LA, Ginjaar HB, Wapenaar MC, et al. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet* 1989; **45**(6): 835-47
7. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; **50**(3): 509-17
8. Darras BT, Francke U. Myopathy in complex glycerol kinase deficiency patients is due to 3' deletions of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 1988; **43**(2): 126-30
9. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**(23): 11141-6
10. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletion by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990; **86**(1): 45-8
11. Multicenter Study Group. Diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by polymerase chain reaction. *JAMA* 1992; **267**(19): 2609-15
12. Beggs AH. Multiplex PCR for identifying dystrophin gene deletions. In: Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Moir DT, Morton CC, Seidman CE, et al. *Current protocols in human genetics*. 1st ed., New York, John Wiley & Sons, 2000, unit 9.3
13. Hodgson S, Hart K, Abbs S, Heckmatt J, Rodillo E, Bobrow M, Dubowitz V. Correlation of clinical and deletion data in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *J Med Genet* 1989; **26**(11): 682-693.
14. Florentin L, Mavrou A, Kekou K, Metaxotou C. Deletion patterns of Duchenne and Becker muscular dystrophies in Greece. *J Med Genet* 1995; **32**(1): 48-51
15. Coral-Vazquez R, Arenas D, Cisneros B, Penaloza L, Kofman S, Salamanca F, et al. Analysis of dystrophin gene deletions in patients from Mexican population with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Arch Med Res* 1993; **24**(1): 1-6.
16. Shomrat R, Gluck E, Legum C, Shiloh Y. Relatively low proportion of dystrophin gene deletions in Israeli Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Am J Med Genet* 1994; **49**(4): 369-373
17. Kitoh Y, Matsuo M, Nishio H, Takumi T, Nakajima T, Masumura T, et al. Amplification of ten deletion rich exons of the dystrophin gene by polymerase chain reaction shows deletions in 36 of 90 Japanese families with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 1992; **42**(4): 453-457.
18. Soong BW, Tsai TF, Su CH, Kao KP, Hsiao KJ, Su TS. DNA polymorphisms and deletion analysis of the Duchenne muscular dystrophy gene in the Chinese. *Am J Med Genet* 1991; **38**(4): 593-600
19. Mutirangura A, Jongpipitvanich S, Norapucsunton T, Theamboonlers A, Srivuthana S, Promchainant C, et al. Multiplex PCR to detect the dystrophin gene deletion in Thai patients. *J Med Assoc Thai* 1995; **78**(9): 460-465.
20. Battaloglu E, Telatar M, Deymeer F, Serdaroglu P, Kuseyri F, Ozdemir C, et al. DNA analysis in Turkish Duchenne/Becker muscular dystrophy families. *Hum Genet* 1992; **89**(6): 635-639.
21. Lai PS, Tay JSH, Low PS, Lee WL, Koh GAS, Gan GC. Deletion analysis of DMD/BMD children in Singapore using multiplex PCR techniques. *J Trop Pediatr* 1992; **38**(5): 224-227.
22. Kheradmand Kia S, Farhud DD, Zeinali S, Mowjoodi AR, Najmabadi H, Pourfarzad F, et al. Molecular analysis of Iranian patients with Duchenne/Becker muscular dystrophies. *Iranian J Publ Health* 2003; **32**(3): 47-53
23. Sbiti A, El Kerch F, Sefiani A. Analysis of dystrophin gene deletions by multiplex PCR in Moroccan patients. *J Biomed Biotech* 2002; **2**(3): 158-160