

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۰ شماره ۱ بهار ۱۳۸۷ صفحات ۱۳-۷

بررسی ژن *cfr* در مبتلایان به فیبروز کیستیک از شمال غرب کشور

سمیه آزمون: دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
امید عمرانی: مربی ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

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

دکتر ماندانا رفیعی: دانشیار بیماریهای کودکان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماریهای کبد و گوارش، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر نعمت بیلان: استاد بیماریهای کودکان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سل و ریه دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر خلیل انصارین: دانشیار بیماریهای ریه، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سل و ریه دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۵/۱۱/۱۶، پذیرش: ۸۶/۸/۵

چکیده

زمینه و اهداف: فیبروز کیستیک شایع‌ترین اختلال کشنده ژنتیکی اتوزوم مغلوب در جمعیت‌های سفیدپوست می‌باشد که در اثر انتقال غیرطبیعی الکترولیت‌ها از غشاهای رأسی سلول‌های اپی‌تلیال به صورت افزایش سطح یون سدیم و کلرید عرق و اختلال در ریه، پانکراس، روده، دستگاه کبدی - صفراوی و دستگاه تناسلی تظاهر می‌کند. میزان شیوع این بیماری در بین جمعیت‌های سفیدپوست ۱ در ۲۵۰۰ تولد زنده گزارش شده است. در این بیماری، ژن *cfr* بر روی بازوی بلند کروموزوم ۷ (۲، ۷q۳۱)، متحمل جهش می‌شود. این ژن دارای ۲۷ آگزون است. پس از مطالعه آگزون ۱۰ و نامشخص بودن ژنوتیپ در بسیاری از خانواده‌های مبتلا، نیاز به بررسی آگزون‌های دیگر در این منطقه احساس می‌شد. بررسی مولکولی این بیماری، تعیین فرکانس جهش‌های شایع در منطقه، برآوردی از میزان بروز جهش در آگزون‌های مورد بررسی، امکان تشخیص ناقلین و تشخیص پیش از تولد را به‌خصوص در خانواده‌های با ریسک بالا فراهم می‌سازد.

روش بررسی: از ۴۸ خانواده مشکوک به بیماری فیبروز کیستیک که بر اساس علائم بالینی و پاراکلینیکی توسط پزشکان متخصص به آزمایشگاه ژنتیک معرفی شده بودند، با کسب رضایت کتبی، خونگیری به‌عمل آمد و پس از استخراج DNA و انجام PCR، ژن مذکور برای آگزون‌های ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۷b، ۱۹ و ۲۱ با روش SSCP/Hd بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در آگزون ۷ متعلق به یکی از خانواده‌ها، تفاوت در الگوی (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) مشاهده گردید. در ۹ تا از خانواده‌ها الگوی SSCP قطعه تکثیری شامل آگزون ۱۱ تفاوت نشان داد. تفاوت در الگوی SSCP در آگزون‌های ۱۳، ۱۹ و ۲۱ به ترتیب در ۲، ۲ و ۱ خانواده مشاهده گردید. آگزون ۱۷b در هیچ‌کدام از خانواده‌های مبتلا تفاوت در الگوی SSCP نشان نداد.

نتیجه‌گیری: در جمعیت مورد مطالعه هتروژنتیسی بالایی برای جهش‌های ژن (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, *cfr*) مشاهده شد و با توجه به نتایج موجود، آگزون ۱۱ بیشترین میزان تغییر الگوی بانندی را در بین آگزون‌های مورد بررسی نشان داده است.

کلید واژه‌ها: فیبروز کیستیک، ژن تنظیم کننده هدایت بین غشایی فیبروز کیستیک، اختلال ژنتیکی

مقدمه

۲۰۰۰ تا ۳۰۰۰ تولد زنده می‌باشد. فرکانس ناقلین در این جمعیت -
ها حدود ۱ در ۲۵ برآورد شده است (۱). شیوع بالای فیروز-
کیستیک در گروه‌های جمعیتی خاصی نظیر سیلت‌هایی (Celts) که
در بریتانیا و فرانسه زندگی می‌کنند (۱) در ۳۷۷ تولد زنده،

فیبروز کیستیک به‌عنوان یکی از معمول‌ترین اختلالات توارثی
تهدیدکننده جمعیت‌های سفیدپوست شناخته شده است. مطالعات
اپیدمیولوژیک نشان داده که فرکانس این بیماری در بیشتر
جمعیت‌های اروپایی و جمعیت‌های منشاء گرفته از آنها بین ۱ در

اگزون ۱۹ بخشی از دمین دوم طی کننده غشایی و بخشی از دمین دوم اتصال نوکلئوتیدی را در پروتئین CFTR کد می کند. از جهش های آن می توان R1162X، R1158X را نام برد. اگزون ۲۱ بخشی از دمین دوم اتصال نوکلئوتیدی را در پروتئین CFTR کد می کند. جهش N1303K از مهمترین جهش های این اگزون می باشد. N1303H، 4040delA، Q1313X، W1316X از جمله جهش ها و 4029A/G، 4050C/T (P1306P)، 42T/C + 4095 و 283T/C - 4096 از جمله پلی مورفیسم های این اگزون هستند (۱۱). در این مطالعه اگزون های ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۷b، ۱۹ و ۲۱ و به طور خاص جهش N1303K در این اگزون مورد بررسی قرار گرفتند. این اگزون ها بعد از اگزون ۱۰ جهش های شایع بیشتری را به خود اختصاص می دهند و مانند آن در بخش های حساس پروتئین کد می شوند. با توجه به اینکه در مطالعه انجام گرفته توسط جلالی راد و همکاران (۱۲) در منطقه ای از کشور ایران و بررسی های مشابه در کشورهای مجاور نظیر ترکیه بعد از اگزون ۱۰، اگزون های مذکور فرکانس جهشی بالایی نشان داده اند (۱۳)، بررسی این اگزون ها در این مطالعه مد نظر قرار گرفتند.

مواد و روش ها

افراد مطالعه شده در این تحقیق، مبتلایان مراجعه کننده به متخصصین ریه و گوارش بودند. پس از مراجعه خانواده های مبتلای مشکوک به فیروزکیستیک، مشاوره ژنتیک و رسم شجره نامه صورت گرفته و پروباند مشخص شد. پس از تکمیل فرم رضایت، از کودک و والدین توسط پرستار همکار خونگیری به عمل آمد. از هر فرد مقدار ۵ سی سی خون اخذ و در فالتکون های حاوی اتیلن دی آمین تتراسیتیک اسید، به عنوان ماده ضد انعقادی ریخته و سپس فالتکون ها به آرامی تکان داده می شد تا مخلوط شوند و از تشکیل لخته های خونی جلوگیری شود. نهایتاً نمونه ها در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری می شدند.

استخراج DNA از نمونه های خونی با روش نمک اشباع صورت پذیرفت (۱۴). بطور خلاصه در این روش، بر روی ۲ سی سی خون، ۶ سی سی بافر لیزکننده (NH₄Cl+NaHCO₃+EDTA) افزوده و پس از لیز شدن گلبول های قرمز، محلول حاصله سانتریفوژ شده و این مراحل تا زمانی تکرار گردید که رسوب سفیدرنگ مایل به صورتی حاصل گردد. بر روی رسوب حاصله، مقدار ۲ سی سی بافر SE و ۲۰۰ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد و ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه و جهت هضم پروتئینی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز قرار داده شد. جهت به دست آوردن کلاف DNA، از محلول نمک اشباع به همراه کلروفرم و اتانول مطلق سرد استفاده شد.

جهت تکثیر اگزون های ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۷b، ۱۹ و ۲۱ از روش PCR استفاده گردید. یک جفت پرایمر مستقیم و معکوس که قبلاً در مقالات دیگر گزارش شده بود برای تکثیر قطعات مربوطه به

افریقایی های ساکن در افریقای جنوب غربی (۱ در ۶۲۲) و کانادایی های فرانسوی تبار منطقه ای از کانادا (۱ در ۸۹۵) گزارش شده است. احتمالاً فاکتورهای نظیر رانش ژنتیکی و یا اثر بنیانگذار برای این شیوع بالا مطرح می باشند (۴-۲).

از جمله علائم کلینیکی این بیماری می توان به ناراحتی های دستگاه تنفسی مانند سرفه و عفونت های حاد آن، دستگاه گوارشی مثل ناکارآمدی پانکراس، دستگاه تناسلی مانند عقیم بودن ناشی از غیاب دوطرفه مجاری وابران ارثی^۱ در مردان و از علائم پاراکلینیکی آن می توان به افزایش غلظت کلرید عرق به بیش از ۶۰ mEq/l، جذب های ناقص مانند جذب ناقص چربی مدفوع و ناهنجاری های اختلاط پتانسیل الکتریکی بین غشایی بینی اشاره کرد (۵ و ۶).

در دسترس بودن تعداد زیادی از خانواده ها با دو یا تعداد اعضای مبتلای بیشتر امکان استفاده از آنالیز پیوستگی ژنی را برای تعیین موقعیت ژن فراهم ساخت (۱). ژن *cftr* (تنظیم کننده هدایت بین غشایی فیروزکیستیک) بر روی بازوی بلند کروموزوم ۷ (۷q۳۱.۲) قرار گرفته و ۲۵۰ کیلوباز از طول DNA را در بر می گیرد. این ژن ۲۷ اگزون داشته و به یک RNA بالغ به طول ۶/۵ کیلوباز رونویسی می شود. پروتئین کد شده شامل ۱۴۸۰ آمینو اسید و وزن مولکولی ۱۶۸ کیلو دالتون می باشد. این پروتئین به صورت یک کانال کلریدی تنظیم شونده cAMP در غشاء سلول های پوششی عمل می کند (۷ و ۸). جهش های مختلف در ژن *cftr* می تواند منجر به اختلال در تنظیم ستر پروتئین، عدم ایجاد پروتئین، تولید پروتئین فاقد عملکرد، و یا کاهش پایداری پروتئین شوند. تاکنون حدود ۱۲۰۰ نوع جهش مختلف در ژن *cftr* شناسایی و گزارش شده است (۹). شیوع فیروزکیستیک یک تنوع قومی و جغرافیایی بالایی را در سراسر جهان نشان می دهد (۱۰).

اگزون ۷ بخشی از دمین اول طی کننده غشاء را در پروتئین CFTR کد می کند. از جهش های این اگزون می توان R347H، G330X را نام برد (۱۱).

اگزون ۱۱ به همراه اگزون ۱۰ دمین اول اتصال نوکلئوتیدی را در پروتئین CFTR کد می کند، این اگزون نیز از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده و جهش های شایعی نظیر G551D، R553X، R560T را در بین جمعیت های مختلف نشان داده است. از پلی مورفیسم های اگزون و ایترون ۱۱ می توان به 1773A/T، 1764 T/G، در منطقه اگزونی و >A+1650-1811، 59T/G-1812، 136 T/C-1812، 108 T/C-1812 در ایترون آن اشاره کرد.

اگزون ۱۳ نیز جزء مهمی از ژن *cftr* بوده و به تنهایی دمین تنظیمی پروتئین CFTR را کد می کند، از جمله جهش های آن 2183+5G>A+2184insA، E822X، 2043delG می باشند.

اگزون ۱۷b بخشی از دمین دوم طی کننده غشایی را کد می کند. از جهش های آن می توان به W1098X، R1066L و از پلی مورفیسم های آن می توان به L1059L، C/T 3332، 3499+45T/C اشاره نمود.

۰۱ نیز الگوی متفاوت از فرد نرمال را به صورت هموزیگوت نشان داد(شکل ۱-ج). نمونه ۸۲۷ هم الگوی متفاوت از نرمال و به صورت هموزیگوت نشان داد(شکل ۱-ح).

برای آگزون ۱۳ دو نوع الگوی بانندی SSCP متفاوت از الگوی بانندی SSCP فرد نرمال مشاهده شد، در یک خانواده برادر و خواهری دارای الگوی نوع I به صورت هموزیگوت بودند. در خانواده دیگر کودک الگوی نوع II را به صورت هموزیگوت و در خانواده سوم کودک این الگو را به صورت هتروزیگوت نشان داد(شکل ۲).

در آگزون ۱۷b در هیچ یک از خانواده‌های مورد بررسی تغییر قابل ملاحظه‌ای در الگوی SSCP مشاهده نشد. در آگزون ۱۹ نیز دو الگوی متفاوت از الگوی نرمال مشاهده شد، در یک خانواده کودک و پدر الگوی هتروزیگوت نوع I و در خانواده دیگر کودک و پدر الگوی نوع II را به صورت هتروزیگوت نشان دادند(شکل ۳).

برای آگزون ۲۱ نیز در این مطالعه نمونه‌های DNA استخراج شده از خون بیمار و والدین مورد بررسی قرار گرفت که هیچ‌یک از نمونه‌ها تغییر الگوی بانندی را نشان ندادند. جهت بررسی دقیق‌تر این آگزون به‌خصوص برای جهش N1303K پرایمر جدیدی برای تکثیر قطعه‌ای کوچک‌تر به طول ۲۸۶ جفت باز که شامل این نقطه می‌شود، استفاده گردید. یک نمونه تغییر الگو را به صورت هموزیگوت نشان داد(شکل ۴). ازدواج والدین نمونه موردنظر فامیلی بوده، و علائمی از قبیل تست عرق مثبت، مشکل ریوی و کاهش رشد داشته است.

بحث

بیماری فیبروزکیستیک یک بیماری اتوزوم مغلوب شایع در جمعیت‌های سفیدپوست می‌باشد. فراوانی این بیماری و پراکنش جهش‌های مختلف آن در قسمت‌های مختلف جهان متفاوت می‌باشد. در ایران به علت عدم وجود داده‌های ثبت شده در مورد نوزادان زنده متولد شده و همچنین فقدان تست‌های تشخیصی برای بیماری فیبروزکیستیک در بدو تولد تخمین فراوانی این بیماری هم‌اکنون امکان پذیر نمی‌باشد. همچنین در مناطقی از کشور به علت مطلوب نبودن شرایط اقتصادی و اجتماعی بیماری فیبروزکیستیک در بیماران تشخیص داده نمی‌شود.

تاکنون حدود ۱۲۰۰ نوع جهش مختلف در ژن *cftfr* گزارش شده است(۹). جهش‌ها و چندشکلی‌های ژن *cftfr* در سراسر این ژن از قبیل آگزون‌ها، ایترون‌ها و ناحیه پرموتری آن وجود دارند. مطالعه ۳۰ جهش شایع در سراسر جهان نشان داده است که فراوانی این جهش‌ها در قوم‌ها و مناطق مختلف جهان بسیار متفاوت است(۱۳).

کار برده شد(۱۵). از قطعات ایترونی قبل و بعد از آگزون مربوطه برای طراحی پرایمرها استفاده شده و قطعات تکثیر شده نواحی ایترونی را نیز در بر می‌گرفتند. برای بررسی جهش N1303K در آگزون ۲۱ از یک جفت پرایمر که قطعه کوچکتیری را تکثیر می‌نمود، استفاده شد. برای انجام PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از کلرید منیزیم ($MgCl_2$) با غلظت نهایی ۱/۵ میلی‌مولار، بافر PCR با غلظت نهایی ۱ برابر (IX)، آنزیم تک پلیمراز ۱ واحد، دزوکسی‌نوکلئوتید تری فسفات (dNTP) با غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌مولار و آب دو بار تقطیر استفاده شد. تکثیر همه قطعات با یک برنامه مشابه و با دمای اتصال متفاوت مطابق گزارشات قبلی انجام گرفت(۱۵). و جهت مشاهده نتیجه واکنش PCR، محصولات PCR برای هر شش آگزون، بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردیده و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. پس از تکثیر اختصاصی، قطعات فاقد باندهای اضافی بر روی ژل آکریل‌امید با روش SSCP بررسی شد (۱۵). برای مشاهده الگوی بانندی حاصل، از روش رنگ‌آمیزی نیترا تفرقه استفاده شد(۱۶).

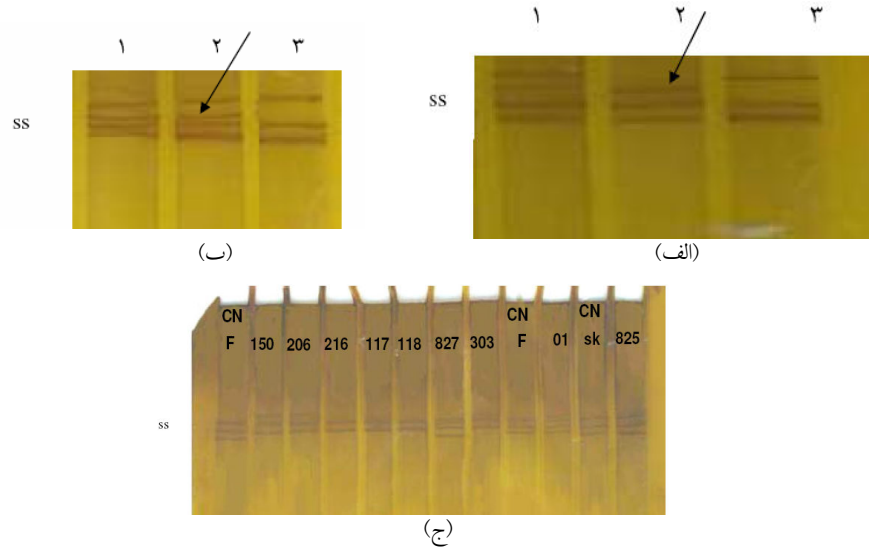
یافته‌ها

در این بررسی شش آگزون ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۷b، ۱۹ و ۲۱ ژن *cftfr* در ۹۶ کروموزوم مربوط به ۴۸ خانواده مشکوک به بیماری فیبروزکیستیک با استفاده از روش SSCP مورد بررسی قرار گرفت. در صورت مشاهده تفاوت در الگوی هر یک از نمونه‌ها، نمونه موردنظر بر روی ژل پلی‌اکریل‌امید با محصول PCR جدید مورد بررسی مجدد قرار گرفت تا وجود تفاوت در الگو به طور قطعی اثبات شود. یکی از نمونه‌ها در آگزون ۷ تغییر الگوی بانندی را به صورت هتروزیگوت نشان داد. در ۹ خانواده تغییرات شاخصی در الگوی SSCP مربوط به آگزون ۱۱ مشاهده شد، که این تغییرات بیانگر جهش یا پلی مورفیسم در قطعه تکثیرشده حاوی آگزون ۱۱ آنها می‌باشد(شکل ۱).

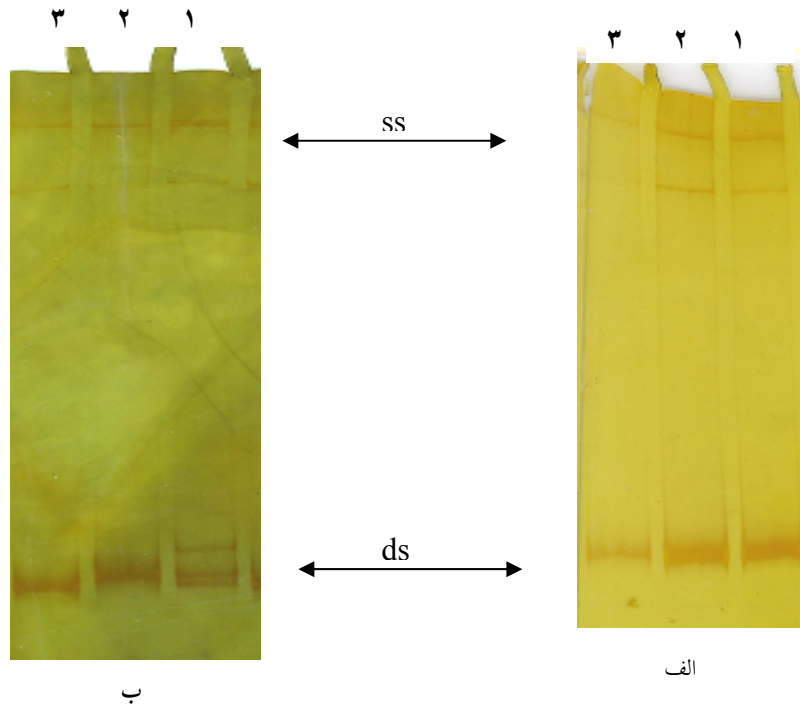
در یکی از این خانواده‌ها الگوی خاصی از SSCP مشاهده شد که بر اساس گزارشات قبلی، این الگو متعلق به جهش G542X به صورت هموزیگوت می‌باشد(شکل ۱-الف). ازدواج والدین در این خانواده فامیلی بوده است و کودک علائمی از قبیل تست عرق مثبت و عفونت ریه و وجود چربی در مدفوع را نشان داده بود.

در یک خانواده دیگر تغییر مشخصی به صورت هتروزیگوت در الگوی SSCP مشاهده گردید که بیانگر وجود جهش یا پلی-مورفیسم در این آگزون می‌باشد(شکل ۱-ب). ازدواج والدین در این خانواده، غیرفامیلی بوده علائمی از قبیل رشد کم و مشکلات ریوی در بیمار مورد نظر مشاهده شده بود.

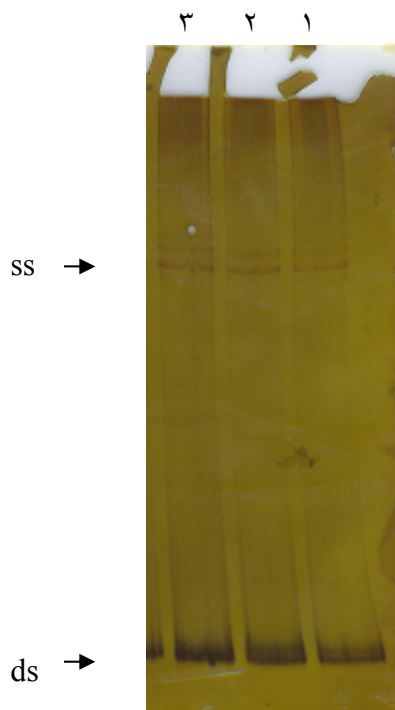
سه تا از نمونه‌های متعلق به خانواده‌های بررسی شده با شماره‌های ۱۵۰، ۲۰۶ و ۳۰۳ الگوی SSCP مشابه را به صورت هموزیگوت نشان دادند(شکل ۱-ج)، و دو نمونه دیگر با شماره‌های ۱۱۷ (همچنین ۱۱۸ که مادر فرد مبتلاست) و ۲۱۶ نیز الگوی SSCP مشابه به صورت هتروزیگوت نشان دادند. همچنین نمونه



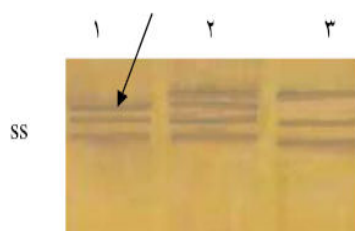
شکل شماره ۱: الف) الگوی SSCP جهش G542X. Line 1 مادر، Line 2 بیمار، Line 3 فرد نرمال را نشان می‌دهد. ب) الگوی SSCP اگزون ۱۱ در یک خانواده با تغییر مشخص الگوی باندی. Line 1 بیمار، Line 2 مادرو Line 3 فرد نرمال را نشان می‌دهد. ج) الگوی SSCP اگزون ۱۱ در چند خانواده. Lines 1, 9, 11 کنترل‌های نرمال، Lines 2, 3, 8 نمونه‌های بیمار با الگوی SSCP مشابه، Lines 4-6 نمونه‌هایی با الگوی مشابه (۱۱۷ فرزند، ۱۱۸ مادر)، Line 7، Line 10 نمونه‌ای بیمار، Line 12 بیمار بدون تغییر در این اگزون. ss: DNA تک رشته‌ای.



شکل شماره ۲: الگوی باندی مربوط به اگزون ۱۳: الف) الگوی نوع I؛ لاین ۱ و ۲: خواهر و برادر مبتلا که الگوی باندی را بصورت هموزیگوت نشان داده‌اند، لاین شماره ۳ مربوط به فرد سالم می‌باشد. ب) الگوی نوع II؛ لاین ۱ مربوط به مخلوط PCR فرد بیمار و سالم می‌باشد، لاین ۲ الگوی فرد بیمار و لاین ۳ الگوی فرد سالم را نشان می‌دهند. ds: DNA دو رشته‌ای، ss: DNA تک رشته‌ای.



شکل شماره ۳: الگوی باندهای مربوط به آگرون ۱۹؛ الگوی نوع II؛ لاین ۱ و ۲: به ترتیب کودک مبتلا و پدر می‌باشد، لاین شماره ۳ مربوط به فرد سالم است. ds: DNA دو رشته‌ای، ss: DNA تک‌رشته‌ای.



شکل شماره ۴: الگوی SSCP در نمونه‌ای که در بررسی جهش N1303K تفاوت نشان داده است. Line1 فرد بیمار، Line2 مخلوط فرد نرمال با بیمار، Line3 فرد نرمال را نشان می‌دهد. ss: DNA تک‌رشته‌ای.

شناخته شده و خاصی به کار برده می‌شوند اما روش‌هایی مثل تعیین توالی،^۵ CCM و SSCP وجود دارند که برای بررسی ژن از نظر وجود جهش‌ها یا پلی‌مورفیسم‌های ژنی ناشناخته درون یک جمعیت به کار می‌روند. در این بین تکنیک SSCP روشی دقیق، ارزان، با حساسیت بالا و بدون نیاز به مواد رادیواکتیو است که قادر به شناسایی حدود ۹۷ درصد از تغییرات (جهش و پلی‌مورفیسم) موجود در ژن *cfr* می‌باشد (۱۷). این روش بر این اساس استوار است که حرکت الکتروفوریتیک DNA تک رشته‌ای بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید، نه فقط به اندازه آنها بلکه به شکل سه بعدی و ساختار پیچ خورده وابسته به توالی آنها هم بستگی دارد. یک تغییر تک بازی می‌تواند این ساختار ثانویه را تغییر داده و باعث تغییر الگوی باندهای ایجاد شده بر روی ژل شود (۱۸).

با توجه به وجود تعداد قابل توجهی از خانواده‌های مبتلا در منطقه شمال غرب کشور، نیاز به بررسی جهش‌ها و اقدامات در جهت غربال‌گری این بیماری احساس شده و لذا این مطالعه برای اولین بار در این منطقه با استفاده از تکنیک حساس SSCP که روش بهتری جهت غربال‌گری اولیه جمعیت برای پیدا کردن موتاسیون‌ها و پلی‌مورفیسم‌های ژنی می‌باشد، صورت گرفت. روش‌های مولکولی متفاوتی برای شناسایی جهش‌های ناشناخته و شناخته شده در ژن *cfr* وجود دارند. تست‌های ژنتیکی می‌توانند بر روی DNA نمونه‌های مختلف از قبیل نمونه‌های خون محیطی و سلول‌های موکوسی دهان انجام بگیرند. از تست‌های مولکولی برای بررسی ژنتیکی فیروزکیستیک می‌توان به ARMS^۱، ASO^۲، OLA^۳، RFLP^۴ اشاره کرد که به منظور بررسی جهش‌های

1. Amplification Refractory Mutation System, ARMS
2. Allele Specific Oligonucleotide Hybridization, ASO
3. Oligonucleotide Ligation Assay, OLA

4. Restriction Fragments Length Polymorphism, RFLP
5. Chemical Cleavage Mismatch, CCM

در آگزون ۲۱ می‌شود. این جهش را از یک منشأ منفرد و مرتبط با جمعیت‌های مدیترانه‌ای باستان دانسته‌اند. میانگین ۱/۲۵ درصد در آمریکا و ۱/۶۴ درصد در اروپا دارد (۱). در لبنان در فرکانس نسبتاً بالای ۱۰ درصد گزارش شده است (۱۳). آگزون ۲۱، ۲/۰۸ درصد از تغییرات را در این مطالعه نشان داده است.

به طور کلی در این مطالعه آگزون ۱۱ در بین آگزون‌های مورد بررسی، تغییرات الگوی بانندی بیشتری را به خود اختصاص داده است. با این وجود نسبت بیشتری از آلل‌های CF به صورت ناشناخته باقی ماندند و این امر مطالعات وسیعتر را می‌طلبد. بنابراین به نظر می‌رسد که جمعیت شمال غرب کشور مانند جمعیت ترکیه از نظر تعداد و فراوانی جهش‌های CF ناهمگن می‌باشد. به این معنی که جهش‌های مؤثر متنوعی در بروز بیماری نقش دارند.

نتیجه‌گیری

در جمعیت مورد مطالعه ناهمگنی بالایی برای جهش‌های ژن *cftr* مشاهده شد و با توجه به نتایج موجود آگزون ۱۱ بعد از آگزون ۱۰ بیشترین سهم را در بین تغییرات الگوی بانندی ژن *cftr* دارد. بنابراین بنظر می‌رسد، بررسی آگزون ۱۱ در بین خانواده‌های مبتلا می‌تواند در جهت تشخیص بیماری و تشخیص پیش از تولد در خانواده‌های با ریسک بالا کمک شایانی نماید.

تقدیر و تشکر

مؤلفین از همکاران دانشکده علوم طبیعی دانشکده تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و مرکز تحقیقات سل و ریه کمال تشکر را دارند. این پروژه مصوب مرکز تحقیقاتی سل و ریه می‌باشد. همچنین از کلیه خانواده‌های مبتلا که کمال همکاری را در طول این پروژه داشته و از پرستار همکار، سرکار خانم رقیه ابراهیمی سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. Welsh M, Ramsey B, Accurso F, Cutting G. *Cystic Fibrosis*. Scriver. Beaudet. Valle. Sly. Childs. Kinzler. Vogelstein. *The Metabolic and Molecular bases of inherited disease*. Vol.3. McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2001; pp: 5121-5188.
2. Bois E, Feingold J, Demenais F, Runavot y, Jehanne M, Toudic, L. cluster of cystic fibrosis cases in a limited area of Brittany(France). *Clin Genet* 1978; **14**: 73.
3. Rozen R, Schwartz R, Hilman B, Stanislovitis B, Horn G, Klinger K, et al. cystic fibrosis mutations in North American populations of French ancestry: Analysis of Quebec French-canadian and Louisiana Acadian families. *Am J Hum Genet* 1990; **47**: 606.
4. Super, M. cystic fibrosis in the South west African Afrikaner. *S Afr Med J* 1975; **49**: 818.
5. Lissens W, Zaki Mahmoud K, El-Gindi E, Abdel-Sattar A, Seneca S, Van Steirteghem A, and Liebaers I. Molecular analysis of the cystic fibrosis gene reveals a high frequency of the intron 8 splice variant 5T in Egyptian males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol Hum Rep* 1999; **5**(1): pp:10-13.
6. Hodson M, Geddes D. *Cystic Fibrosis*. 1st Edition, London Chapman & Hall Medical. 1997; p: 192.
7. Riordan J, Rommens J, Kerem B. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterisation of complementary DNA. *Science* 1989; **245**:1066-1073.

با توجه به اینکه در مطالعه‌ای که بر روی آگزون ۱۰ در این منطقه صورت گرفته، بسیاری از آلل‌های CF ناشناخته مانده و همچنین اهمیت آگزون‌های مورد بررسی و اینکه جهش‌های شایعی را در نقاط مختلف شامل می‌شدند نیاز به بررسی بیشتر ژن *cftr* به‌خصوص در این آگزون‌ها احساس می‌شد.

جهش‌های آگزون ۷، ۱۳ درصد از جهش‌های مطالعه جلالی - راد و همکاران، ۶ درصد از جهش‌های جمعیت ترکیه را تشکیل می‌دهند (۱۲ و ۱۳) که در مطالعه ما ۱/۰۴ درصد از تغییرات را شامل می‌شوند.

جهش‌های آگزون ۱۱، ۴/۱ درصد از جهش‌های جمعیت ترکیه (۱۳)، ۲/۷ درصد از بیماران مورد مطالعه جلالی راد و همکاران در تهران، را تشکیل می‌دهند. در مطالعه ما ۱۴/۵ درصد از تغییرات مربوط به این آگزون بوده، که می‌تواند شامل جهش‌ها و چندشکلی‌ها باشد. *G542X* یک جهش نقطه‌ای بی‌معنی در آگزون ۱۱ و در ناحیه کدکننده دوم اتصال نوکلئوتیدی است که باعث می‌شود اسید آمینه گلیسین در جایگاه ۵۴۲ به کدون خاتمه تبدیل شود و یک *mRNA* نامطلوب CFTR ایجاد کند. میانگین این جهش در آمریکا ۲/۴۳ درصد، در اروپا ۲/۶۴ درصد و در ترکیه ۲/۶ درصد می‌باشد (۱۳). در کشور ما در مطالعه‌ای که توسط جلالی راد و همکاران صورت گرفته ۲/۷ درصد از بیماران، این جهش را نشان داده‌اند (۱۲). فراوانی جهش مذکور در این مطالعه ۲/۱ درصد است.

جهش‌های آگزون ۱۳، ۵/۳ درصد و جهش‌های آگزون ۱۷b، ۱/۲ درصد از جهش‌های جمعیت ترکیه را تشکیل می‌دهند در مطالعه جلالی راد و همکاران هیچ نوع جهشی در آگزون‌های ۱۳، ۱۷b و ۱۹ گزارش نشده است. در مطالعه حاضر ۵/۲ درصد از تغییرات را آگزون ۱۳ و ۲/۰۸ درصد را آگزون ۱۹ تشکیل می‌دهند. جهش‌های آگزون ۲۱، ۱/۸ درصد از جهش‌های جمعیت ترکیه را تشکیل می‌دهند (۱۳)، جهش N1303K باعث تبدیل اسید آمینه اسپاراژین (ASN) به لیزین (LYS) در موقعیت ۱۳۰۳

8. Rommens J, Iannuzzi M, Kerem B, Drumm M, Melmer G, Dean M, et al. Identification of cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 1989, **245**:1059.
9. Eshaque B, Dixon B. Technology platforms for molecular diagnosis of cystic fibrosis. *Biotechnology advances*. 2006; **24**(1): pp: 86-93.
10. Schwartz M, Sørensen N, Brandt N, Høgdall E, Holm T. High incidence of cystic fibrosis on the Faroe Islands: a molecular and genealogical study. *Hum Genet* 1995; **95**: 703-706.
11. Cystic Fibrosis mutation atabase, 2006. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>.
12. Jalalirad M., Houshmand M, Mirfakhraie R, Goharbari M, Mirzajani F. First study of CF mutations in the CFTR gene of Iranian Patients: detection of $\Delta F508$, G542X, W1282X, A120T, R117H, and R347H Mutations. *J Trop pediatr* 2005; **50**(6): 359-361.
13. Bobadilla JL, Macek MJ, Fine JP, Farrel PM. Cystic Fibrosis: A worldwide Analysis of CFTR mutations-correlation with incidence data and Application to screening. *Hum Mut*, 2002; **19**: 575-606.
14. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1998; **16**:1215
15. Sanz J, Steiner B, and Gallati S. Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis of DNA and RNA: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis. *Division of Human Genetics* 2003; pp: 1-9.
16. Bassam B, Anolles G, Gresshoff P. fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 1991; **196**: 800-830.
17. Liechti-Gallati S, Schneider V, Neeser D and Kraemer R. Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis and any other human genetic disease. *Eur. J. Hum. Genet* 1999; **7**: 590-598.
18. Cooper DN, Czak M. *Human Gene mutation*. Bios scientific publishers 1993; pp: 73-75.