جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله پژوهشی

بررسی مولکولی و ژنتیکی فردریش آتاکسیا در بیماران ایرانی

سارا سنجریان [۱]، زهرا نور محمدی[۱]، مریم ناصرالاسلامی[۱]، امید آریانی[۲]، مسعود هوشمند[۳*]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران ۲- آزمایشگاه ژنتیک پزشکی - مرکز پزشکی خاص،تهران
۳- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری

چکیده

فردریش آتاکسیا یک بیماری اتوزومال مغلوب است که به علت گسترش تکرار GAA در اولین اینترون ژن fxn ایجاد می‌شود. از جمله مشخصات کلینیکی این بیماری می‌توان عدم تعادل پیشرونده، از بین رفتن رفلکس در اعضا، اختلال در تکلم، بد شکلی اسکلتی، کاردیومیوپاتی، ضعف عضلانی و دیابت شیرین را نام برد. یکی از بارزترین علایمی که در بیماران FA دیده می‌شود کاردیومیوپاتی است. کاردیومیوپاتی یکی از علل اصلی مرگ و میر در این بیماران است. در این مطالعه به بررسی تعداد تکرارهای گسترش یافته و رابطه میان تعداد تکرارها با سن شروع بیماری و بروز کاردیومیوپاتی پرداخته شد. به وسیله تکنیک Long PCR در ۲٤ بیمار که خصوصیات کلینیکی FA را نشان داده بودند، از طریق آنالیز مولکولی نیز ابتلا به FA را در ۱۲ مورد آنها تثبیت شد و با تعیین تعداد تکرارها رابطه معکوس میان تعداد تکرارها و سن بروز FA و بروز کاردیومیوپاتی دیده شد.

کلمات کلیدی: فردریش آتاکسیا، سن بروز، کاردیومیوپاتی

مقدمه:

گسترش تکرارهای سه نوکلئوتیدی باعث ایجاد چندین بیماری ژنتیکی از جمله X شکننده[۱]، آتاکسی اسپانیوسربلار[۲]، هانتیگتون[۳] و آتاکسی فردریش[۴] در انسان شده است (۲،۱). در میان بیماری‌های نورودژنراتیو، فردریش آتاکسیا شایع‌ترین نوع آتاکسی است. گسترش تکرارهای سه نوکلئوتیدی GAA در ژن fxn موجب کاهش بیان پروتئین فراتاکسین می‌شود و در نهایت باعث عملکرد بد میتوکندری دربافت‌های عصبی و ماهیچه قلب می‌شود (۳). این پروتئین درمیتوکندری وجود دارد و در هموستاز آهن نقش ایفا می‌کند (۴). افراد مبتلا به FA به دلیل تجمع آهن در میتوکندری سلولها نسبت به استرس‌های اکسیداتیو میتوکندریایی حساسیت بالایی دارند. از جمله سلول‌هایی که در مبتلایان به FA تجمع آهن را نشان می‌دهند کاردیومیوسیت‌ها می‌باشند.

1. Fragil X
2. Spinocerebellar ataxia
3. Huntington
4. Friedreich Ataxia

* مسعود هوشمند، Ph.D ژنتیک پزشکی مولکولی
استادیار ژنتیک پزشکی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری E.mail: housh62@yahoo.com
تاریخ دریافت:۸۹/۷/۱۹ تاریخ پذیرش:۸۹/۸/۱۵

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بر اساس تحقیقات روتینگ[5] و همکارانش، در کاردیومیوسیت‌ها افزایش آهن در میتوکندری باعث نقص در کمپلکس‌های I وII وIII و آنزیم آکونیتاز[6] می‌شود که این نقص به دلیل کمبود آنزیم آهن–سولفور ایجاد می‌شود (۵،۶). کاردیومیوپاتی به مرور زمان در مبتلایان به FA ظهور می‌کند و در نهایت یکی از دلایل اصلی مرگ در این افراد است.

در اکثریت افراد بیمار (۹۶٪) گسترش تکرار سه نوکلئوتیدی GAA در هردو آلل دیده شده است ولی در حدود ۴٪ بیماران نیز در اثر گسترش تکرارها در یک آلل و جهش نقطه‌ای در آلل دیگر ایجاد می‌شوند (۳).

محدوده تکرارها در افراد نرمال از ۷ تا ۲۲ است، آلل‌هایی با تعداد تکرار ۲۲ تا ۱۹۹، آلل‌های لب مرز نامیده می‌شوند که در نسل‌های بعد مستعد به موتاسیون هستند. در افراد بیمار محدوده تکرارها از ۱۹۹ تا ۹۰۰ تکرار به بالا است (۱). از آنجا که FA یک بیماری چند سیستمیک است و با دیگر بیماری‌های تکرارهای سه نوکلئوتیدی شباهت‌های کلینیکی دارد، تشخیص این بیماری تنها بر پایه تظاهرات کلینیکی کافی نیست و استفاده از آنالیز مولکولی جهت تشخیص قطعی بیماری ضروری است (۷و۸).

در این مطالعه به بررسی روشی مناسب جهت تشخیص مولکولی FA برای استفاده در آزمایشگاه‌های تشخیص مولکولی و نیز رابطه میان ژنوتیپ– سن شروع بیماری و بروز کاردیومیوپاتی در مبتلایان به FA پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

از ۲۴ فردی که از سال ۸۶ به مرکز پزشکی خاص مراجعه کرده بودند و یا نمونه خون آن‌ها به این مرکز فرستاده شده بود، از طریق روش نمک اشباع (۹) DNA استخراج گردید و جهت اطمینان از کیفیت DNA و مشاهده قطعات DNAی استخراج شده از ژل آگاروز ۱٪ و دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. به منظور تشخیص مولکولی این بیماری Long PCR با کیت expand high fidelity enzyme و آغازگرهای زیر استفاده شد:

Bam (5′ -GGAGGGATCCGTCTGGGCAAAGG-3′)
۲۵۰۰F (5′ -CAATCCAGGACAGTCAGGGCTTT-3′)

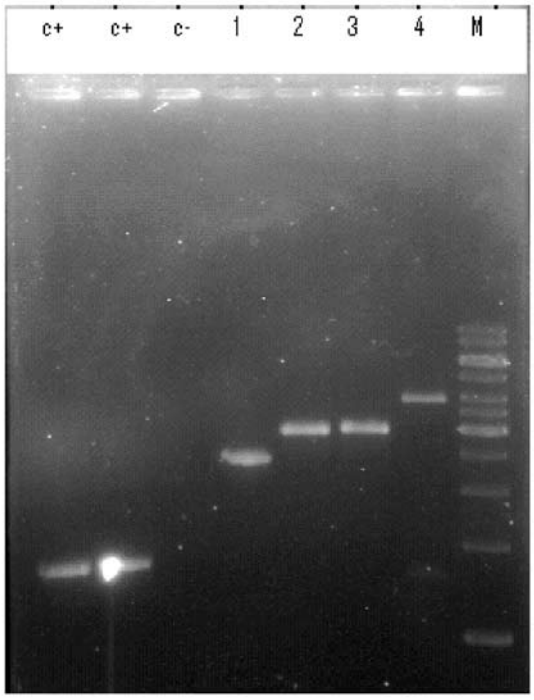
برای انجام Long PCR حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر بوده که شامل ۲۵ نانوگرم DNAی ژنومیک، ۲/۵ میکرولیتر ۱۰X میکرولیتر بافر PCR، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۱/۶ میلی مولار $Mgcl_2$، ۸ پیکو مول از هر آغازگر و ۰/۴ واحد Expand High Fidelity Enzyme بود که در دستگاه ترمال سیکلر MWG با برنامه زیر اجرا شد.

برنامه حرارتی مورد استفاده شامل: ۹۴ درجه سانتی گراد، ۲دقیقه سپس ۲۰ سیکل به ترتیب شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲/۵ دقیقه و در ۱۷ سیکل ادامه به صورت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۶۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲/۵ دقیقه که در هر سیکل ۱۵ ثانیه به آن اضافه می‌شود و طویل سازی نهایی در ۶۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود.

محصولات حاصل بر روی ژل ۱٪ آگارز برده شد. پس از ظهور باندها بر روی ژل، با اندازه‌گیری فاصله طی شده بر روی ژل توسط نمونه و منظور کردن این فاصله در نمودار رسم شده طول باند مربوط به آن باند به دست آمد و سپس تعداد تکرارها محاسبه شد.

نتایج

از میان ۲۴ فرد مشکوک به FA که تنها از لحاظ کلینیکی به این بیماری مبتلا بودند، ۱۲ نفر از آنان به لحاظ مولکولی نیز به FA مبتلا بودند و گسترش GAA را در هر دو آلل خود نشان دادند. طول باند افراد نرمال حدود ۱/۳ kb بود و محدوده طول باندها در افراد مبتلا ۴٫۵–۲ kb به دست آمد (شکل۱). علائم کلینیکی بررسی شده در بیماران در جدول ۱ آورده شده است.



شکل۱: تشخیص مولکولی بیماران مبتلا به فردریش آتاکسیا. ۱–۴: افراد بیمار (4 : 4000bp، 2,3:3000b ،1:2500bp)
C^+: کنترل مثبت (1300bp)، C^-: کنترل منفی، M: مارکر مولکولی 1Kb (Fermentas)

5. Roting
6. Echonitese

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جدول ۱: بررسی علائم و جنسیت بیماران

جنسیت	سن	ضعف عضلانی	عدم تعادل	اختلال در تکلم	بیماران
زن	۲۹	_	+	+	۱
مرد	۲۶	+	+	+	۲
زن	۲۱	+	+	+	۳
مرد	۱۴	+	+	+	۴
زن	۲۱	+	+	_	۵
مرد	۲۰	+	+	_	۶
زن	۲۱	+	+	+	۷
زن	۱۷	+	+	+	۸
مرد	۱۹	+	+	_	۹
زن	۲۳	+	+	+	۱۰
مرد	۲۸	+	+	NA	۱۱
مرد	۳۴	+	+	NA	۱۲

NA: Not available

با توجه به میزان گسترش تکرارها در افراد بیمار و بررسی رابطه با سن شروع بیماری چون ضریب همبستگی (r=-0.07) و کمتر از صفر است نتایج بیانگر وجود رابطه منفی میان میزان گسترش تکرارها و سن بروز بیماری بود و هر چه گسترش تکرارها بیشتر شود، سن بروز نیز کاهش می‌یابد (شکل۲) (۱۶-۱۴).

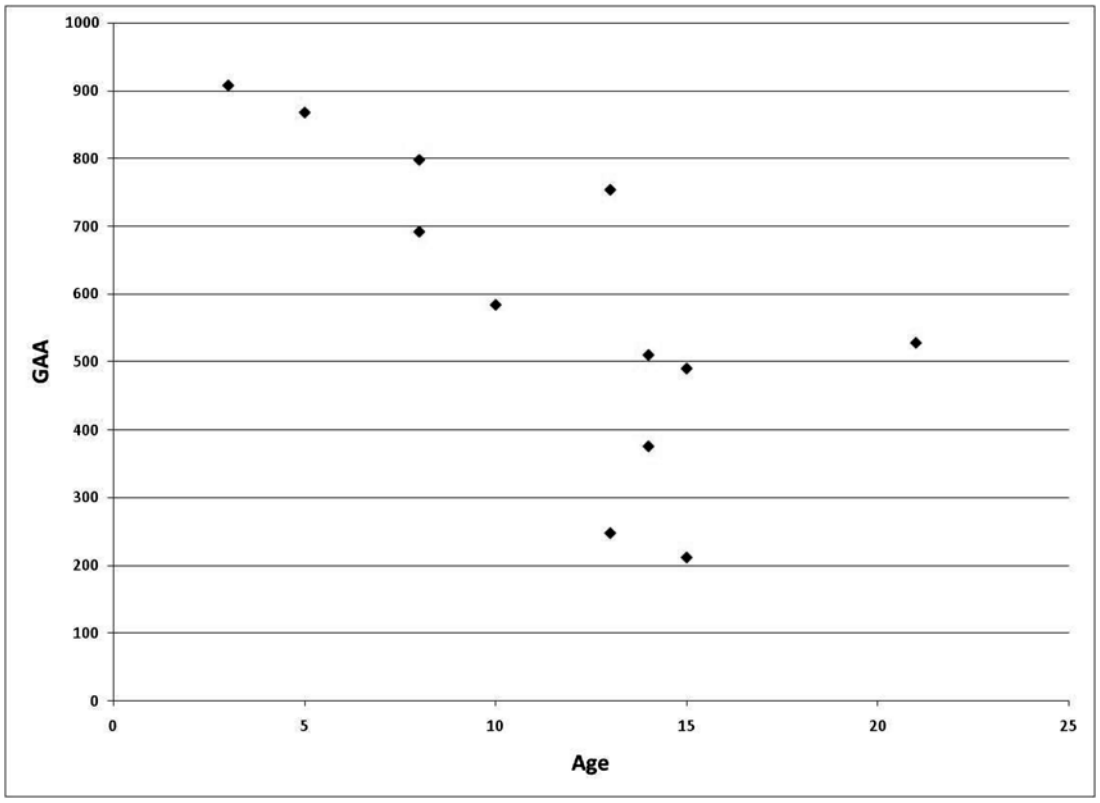
بررسی‌ها نشان می‌داد که ۱۶/۶٪ از بیماران FA در مراحل ابتدایی به کاردیومیوپاتی مبتلا هستند و میان تعداد تکرارها و سن بروز کاردیومیوپاتی نیز رابطه‌ای معکوس دیده شد، (در ۲ بیمار مبتلا به FA که گسترش تکرار در آن ها بالا و مطابق n=۹۰۸ وn=۸۰۸ بود، کاردیومیوپاتی دیده شد و در دیگر بیماران که تکرارهای کمتری داشتند این فنوتیپ بروز نیافته بود).

بحث

لامونت[7] و همکارانش در سال ۱۹۹۷ بر روی ۵۶ بیمار که خصوصیات کلینیکی FA را نشان می‌دادند و با استفاده از تکنیک Long PCR ، رابطه معکوس میان طول تکرارها و سن بروز بیماری نشان دادند (۱۰).

کوچوا[8] و همکاران (۲۰۰۸) ، در مقدونیه به بررسی مولکولی بیماری فردریش آتاکسیا در ۴۰ بیمار پرداخت و از تکنیک PCR جهت تشخیص بیماری استفاده کرد، پرایمرها و پروتوکل استفاده شده در این تحقیق مشابه با تحقیقات ما در بررسی مولکولی این بیماری در ۲۴ بیمار ایرانی بود. نتایج به دست آمده در تحقیق وی تائید کننده نتایج ما در ایران بود. در این تحقیق استفاده از Long PCR برای تشخیص بیماری و همچنین تشخیص

7. Lamont
8. Kocheva



شکل۲: رابطه سن شروع بیماری با تعداد تکرارهای GAA در بیماران فردریش آتاکسیا

ناقلین پیشنهاد شده است (۱۱).

لیلیان[9] و همکاران (۲۰۰۱) در ۲۵ بیمار برزیلی را بررسی کردند. ۶۸٪ از بیماران که فنوتیپ FA را داشتند، به لحاظ مولکولی نیز گسترش GAA را در ژن fxn نشان داند و ۳۲٪ از بیماران بر خلاف داشتن فنوتیپ، گسترش GAA را نداشتند بنابراین ثابت شد که این افراد به فردریش آتاکسی مبتلا نیستند. در این تحقیق پیشنهاد شده بود افرادی که تنها فنوتیپ مشابه به FA را دارند اما گسترش تکرار GAA در آن ها مشاهده نشده است، برای بررسی کمبود ویتامین E وراثتی که فنوتیپ مشابه به FA را دارد، اقدام نمایند (۱۲).

از آنجا که فردریش آتاکسیا یک بیماری اتوزومال مغلوب است و پیشرفتی تدریجی دارد لذا می‌توان با استفاده از آنالیز مولکولی فرد قبل از بروز بیماری، از فنوتیپ احتمالی از جمله کاردیومیوپاتی که از دلایل اصلی مرگ در این بیماران است آگاهی پیدا کرد (۳) و با استفاده از درمان‌های مناسب سن بروز را به تعویق انداخت و فنوتیپ بیماری را کاهش داد.

با توجه به نتایج حاصله متوسط سن بروز بیماری حدود ۱۲/۲ سال و متوسط سن تشخیص بیماری حدود ۲۲/۵ سالگی است و اختلافی در حدود ۹/۷ سال را نشان می‌دهد که این مسئله بیانگر تشخیص دیر هنگام بیماری و اهمیت تشخیص مولکولی و تشخیص به موقع بیماری در مبتلایان است.لذا می‌توان با استفاده از تکنیک Long PCR در تشخیص سریع‌تر بیماری و استفاده از درمان‌های مناسب جهت به تعویق انداختن علایم بیماری بهره جست. با استفاده از این تکنیک افراد ناقل قابل شناسایی هستند لذا با توجه به نحوه وراثت این بیماری، چنانچه فردی بیمار در شجره نامه مشاهده شود می توان از طریق آنالیز مولکولی برای مشاوره ازدواج به زوجها کمک کرد و در صورت ناقل بودن، آنها را از خطر داشتن فرزند مبتلا در آینده آگاه کرد. چنانچه با وجود توصیه‌های ذکر شده، افراد ناقل بچه دار شوند، می‌توان جهت آگاهی از سلامت جنین، آنالیز مولکولی انجام داد (۱۲).

9. Lillian

References

1. Montermini L, Andermann E, Labuda M, et al. The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: permutations and normal alleles. Human molecular genetics 1997; 6:1261-66.

2. Cossee M, Schmitt M, Campuzano V, et al. Evolution of the Friedreich ataxia trinucleotide repeat expansion: Founder effect and permutations. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:7452-57.

3. Panas M, Gialafos E, Spengo K, et al. Pervalence of interartial block in patients with Friedreich′s atatxia. IJCA 2010; 12538:1-2.

4. Pook MA, Al-Mahdawi SA, Thomas NH, et al. Identification of three novel frameshift mutations in patients with Friedreich′s ataxia. J Med Genet 2000; 37;E38.

5. Chakravarty A. Friedreich′s ataxia – yesterday, today and tomorrow. Neurol India 2003;51:176-82.

6. Jauslin ML, Meier Th, Smith AJ, et al. Mitochondria-targeted antioxidants protect Friedreich Ataxia fibroblasts from endogenous oxidative stress more effectively than untargeted antioxidants. FASEB J 2003; 17(13)1972-4.

7. Ciotti P, Di Maria E, Bellone E, et al. Triplet repeat primed PCR (TP PCR) in molecular diagnostic testing for Friedreich ataxia. J Mol Diagn 2004;6(4):285-9.

8. Bercanio J, Mateo I, Polo JM, et al. Friedreich ataxia With minimal GAA expansion presenting as adult-spastic ataxia. Journal of the Neurological Sciences 2002;194:75-82.

9. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells Nucl Acids Res 1988;16:1215.

10. Lamont PJ, Davis MB Wood W. Identification and sizing of the GAA trinucleotide repeat expansion of Friedreich′s ataxia in 56 patients. Brain 1997; 120:673-80.

11. Kocheva S, Trivodalieva S, Valski-Jekic S, et al. Molecular analysis of Friedreich′s ataxia in Macedonian patients. BJMG 2008; 11:61-4.

12. Lilian M, Albono J, Zatz M, et al. Friedreich ataxia: clinical and molecular study of 25 Brazilian cases. Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo 2001;56:143-8.