

بررسی مولکولی جهش مدیترانه ای در مبتلایان به کمبود آنزیم G₆PD

شهر تهران سال ۸۰-۱۳۸۱

دکتر یوسف مرتضوی*، مجید ترماحی اردستانی**، دکتر علی اکبر پورفتح الله***

خلاصه

سابقه و هدف: کمبود آنزیم گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز (G₆PD) از شایعترین نقص های آنزیمی شناخته شده در انسان می باشد. با استفاده از روشهای بیوشیمیایی انواع مختلف آنزیم از سراسر دنیا گزارش گردیده است. از آنجا که تکنیک واریته های مختلف با روشهای بیوشیمیایی امکان پذیر نیست، این مطالعه به منظور تعیین جهش مدیترانه ای به روش مولکولی بر روی مبتلایان به کمبود آنزیم G₆PD مراجعه کننده به مراکز درمانی شهر تهران صورت پذیرفت. مواد و روش ها: تحقیق به روش توصیفی و بر روی ۶۴ نفر انجام گرفت. کمبود آنزیم G₆PD توسط آزمون فلورسانس نقطه ای مشخص شد. DNA از نمونه خون محیطی استخراج و تخلیص گردید و سپس نمونه های DNA توسط PCR (Polymerase Chain Reaction) تکثیر شدند. محصولات PCR به وسیله آنزیم هضم گردیده و مبتلایان به جهش مدیترانه ای شناسایی شدند.

یافته ها: ۶۴ نفر شامل ۵۸ فرد مذکر و ۶ فرد مؤنث در سنین کمتر از ۱۶ سال مورد بررسی قرار گرفتند. شیوع نقص مدیترانه ای در ۴۷ نفر (۷۳/۴ درصد) وجود داشت که در مردان به میزان ۷۴/۱ درصد و در زنان ۶۶/۷ درصد بود. ۱۷ نفر (۲۶/۶ درصد) دارای جهش های دیگری غیر از نوع مدیترانه ای بودند. نتیجه گیری و توصیه ها: شیوع نقص آنزیمی مدیترانه ای مشابه کشورهای همجوار بوده و انجام تحقیق برای مشخص نمودن نوع جهش سایر واریته ها را توصیه می نماید.

واژگان کلیدی: جهش مدیترانه ای، آنزیم G₆PD، Polymerase Chain Reaction

مقدمه

عارضه مبتلا هستند (۲). کمبود آنزیم G₆PD از لحاظ نوع و پراکندگی بسیار متغیر است. تقریباً ۷/۵ درصد مردم دنیا حامل یک یا دو ژن ناقص G₆PD می باشند. بالاترین میزان شیوع آن در گروههای یهودی به حدود ۷۰ درصد می رسد و کمترین مقدار آن در حدود ۱ درصد در ژاپنی ها گزارش شده است. براساس آمار سازمان بهداشت جهانی نقص آنزیم مذکور در کشور ایران بین ۱۰ تا ۱۴/۹ درصد پیش بینی گردیده است (۳،۴)، هر چند طبق

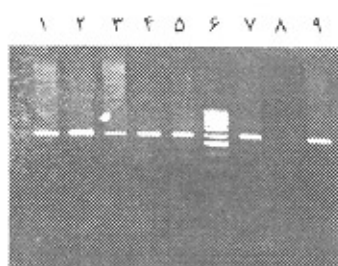
آنزیم G₆PD (Glucose-6-phosphate dehydrogenase) از مهمترین آنزیم های موجود در بدن انسان می باشد که سلولهای مختلف بدن از جمله گلبولهای قرمز مقادیر متفاوتی از این آنزیم را دارا هستند (۱). کمبود آنزیم G₆PD از شایع ترین نقص های آنزیمی شناخته شده در انسان می باشد. براساس آمارهای موجود تخمین زده شده است که حدود ۴۰۰ میلیون نفر در سراسر جهان به این

* استادیار هماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی زنجان

** کارشناس ارشد هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس

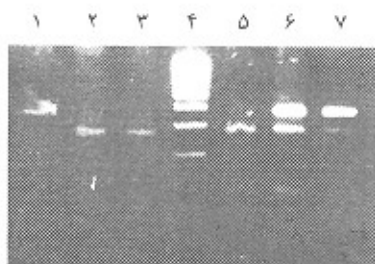
*** دانشیار ایمونوهماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس

مربوط و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم MboII (شرکت Biolabs، انگلستان) را در یک لوله مخلوط نموده و برای مدت ۱۴-۱۲ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دادیم. محصولات هضم شده را بر روی ژل آگارز ۲ تا ۳ درصد الکتروفورز نموده و از چگونگی برش DNA توسط آنزیم MboII عکس تهیه گردید (شکل ۲).



شکل ۱ - تکثیر آگزونهای ۶ و ۷ با استفاده از پرایمرهای ۹۱ و ۹۲ توسط PCR

(ستونهای ۱ الی ۵ و ۷-۹ قطعه ۵۸۳ نوکلئوتیدی را نشان می دهد. ستون ۶ سایزمارکر ۱۰۰ bp می باشد. ستون ۸ نشان دهنده شاهد منفی (نمونه بدون DNA) و ستون ۹ شاهد مثبت است.)



شکل ۲ - محصولات PCR هضم شده توسط آنزیم

MboII

(ستون ۱: DNA فرد مذکر که فاقد جهش مدیترانه ای می باشد و باند ۳۷۹ bp برش نخورده است. ستونهای ۲، ۳ و ۵ مربوط به افراد مذکر دارای جهش مدیترانه ای می باشد که باند ۳۷۹ bp مربوط به قطعات ۲۷۶ و ۱۰۳ برش نخورده است. ستونهای ۶ و ۷ مربوط به نمونه های DNA افراد مؤنث می باشد. به علت هتروزیگوت بودن نمونه های مذکور، قطعات ۳۷۹ و ۲۷۶ به همراه قطعات کوچکتر ۱۲۰ و ۱۰۳ نوکلئوتیدی دیده می شوند. ستون ۸: سایز مارکر ۱۰۰ bp را نشان می دهد.)

یافته ها

تحقیق بر روی ۶۴ نفر انجام گرفت که سن آنها از یک ماه تا ۱۶ سال متغیر بود. از این تعداد، ۵۸ نفر مذکر و ۶

با استفاده از آنزیم پروتیناز K و یک دترجنت، سلولها را لیز نموده و سپس، پروتئینهای سلولی با فنل و کلروفرم از DNA جدا گردیدند. در نهایت، DNA با اتانول مطلق رسوب داده شد. غلظت و خلوص DNA در این روش بالا می باشد. برای انجام PCR (Polymerase Chain Reaction) بر روی نمونه های DNA آگزون های ۶ و ۷ از ژن G₆PD توسط پرایمرهای (5'-CCCCGAAGAGGAATTCAAGGGGGT - 3') و (5'-GAAGAGTAGCCCTCGAGGGTGACT-3') تکثیر گردیدند.

برای هر نمونه بیمار، ۲ میکرو لیتر از هر یک از پرایمرهای مذکور، ۱/۵ میکرو لیتر، از MgCl₂ (50 mM)، ۰/۵ میکرو لیتر از هر یک از dNTPs (10 mM) و واحد Taq DNA Polymerase (سینا ژن، ایران) به لوله PCR اضافه گردید. سپس مقدار ۵ میکرو لیتر از DNA به لوله افزوده و تا حجم نهایی ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. شرایط PCR عبارت بود از: دناتور نمودن اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۳ سیکل که هر سیکل عبارت بود از ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و بالاخره تکثیر نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و برای یک سیکل انجام گردید.

برای الکتروفورز نمونه های PCR ژن G₆PD، ۱۲ میکرو لیتر از محصولات PCR را با ۲ میکرو لیتر از بافر نمونه گذاری (Loading Buffer) مخلوط نموده و درون چاهکهای ژل آگاروز ۱/۵ درصد قرار دادیم. نمونه ها برای مدت ۱/۵ ساعت در ۷۰ ولت الکتروفورز گردیده و ژل توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید. باندهای DNA توسط دستگاه UV ترانس ایلومیناتور قابل رؤیت گردیده و از ژل عکس تهیه گردید. (شکل ۱)

برای هضم محصولات PCR مقدار ۳۱ میکرو لیتر از محصولات PCR با ۳/۵ میکرو لیتر از بافر ۱۰ بار غلیظ شده

تا به امروز مطالعات بسیاری در اکثر نقاط جهان بر روی شیوع و اساس ژنتیکی کمبود آنزیم G₆PD در میان نژادهای مختلف صورت گرفته است. پس از هضم آنزیمی مشخص گردید، ۷۳/۴ درصد از افرادی که توسط آزمون کیفی فلورسنت نقطه ای کمبود آنزیم G₆PD در آنها محرز گردیده بود، دارای جهش نوع مدیترانه (nt 563 C/T) می باشند. سن افراد مورد مطالعه از کمتر از یک ماه تا ۱۶ سال متغیر بوده است. تمام کسانی که در گروه سنی کمتر از ۱ ماه قرار داشتند، دارای میانگین هموگلوبین ۱۶-۱۴ گرم در دسی لیتر و هماتوکریت ۴۸-۴۰ درصد بوده اند. افراد در محدوده سنی ۹-۳ سال دارای میانگین هموگلوبین و هماتوکریت به ترتیب ۷ و ۲۳ گرم در دسی لیتر درصد بوده و هیپرپلی روینمی و رتیکولوسیتوز داشتند. بقیه افراد دارای شاخص های خونی طبیعی بوده و علائمی از یرقان نداشتند. آگروزهای ۶ و ۷ از ژن G₆PD افراد فوق توسط پرایمرهای ۹۱ و ۹۲ تکثیر گردیدند که محصول PCR یک بانده ۵۸۳ نوکلئوتیدی می باشد. این قطعه PCR شده پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز قابل مشاهده می باشد (شکل ۱). جهت اطمینان از عدم آلودگی محصولات PCR از کنترل های مناسب استفاده گردید. در بانده DNA فوق در حالت طبیعی برای آنزیم MboII، ۴ محل برش وجود دارد و قطعات ایجاد شده دارای اندازه های ۳۷۹، ۱۲۰، ۶۰، ۲۴ نوکلئوتید می باشند. در صورتی که جهش نوع مدیترانه اتفاق افتاده باشد، یک محل برش جدید برای آنزیم Mbo II در موقعیت نوکلئوتید ۵۸۳ ایجاد می گردد و بانده ۳۷۹ به باندهای کوچکتر ۱۰۳ و ۲۷۶ تقسیم می شود. بانده ۲۴ نوکلئوتیدی بر روی ژل آگارز معمولی قابل مشاهده نیست و بانده ۶۰ نوکلئوتیدی نیز به صورت منتشر و محو دیده می شود (شکل ۲).

پس از هضم محصولات PCR توسط آنزیم MboII مشخص گردید که ۴۷ نفر (۷۳/۴ درصد) دچار نقص آنزیمی نوع مدیترانه ای می باشند که ۸/۵ درصد از افراد دارای جهش مدیترانه ای را افراد مؤنث و ۴۳/۴۷

نفر مؤنث بودند. ۴۷ نفر کمبود آنزیم G₆PD از نوع مدیترانه ای داشتند که شیوع ۷۳/۴ درصد را نشان می دهد. ۱۷ نفر (۲۶/۶ درصد) نیز مبتلا به جهش ایجادی از نوع مدیترانه ای نبوده اند. شیوع نقص مدیترانه ای در مردان به میزان ۷۴/۱ درصد و در زنان ۶۶/۷ درصد بود. در بیماران کمتر از ۱ ماه، میانگین هموگلوبین ۱۴ تا ۱۶ گرم در دسی لیتر و هماتوکریت ۴۰ تا ۴۸ درصد بود و در افراد با گروه سنی ۳ تا ۹ سال میانگین هموگلوبین و هماتوکریت به ترتیب ۷ گرم در دسی لیتر و ۲۳ درصد بود.

بحث

این مطالعه نشان داد که نقص آنزیمی نوع مدیترانه ای در ۷۳/۴ درصد مبتلایان به کمبود G₆PD وجود دارد. شیوع کمبود آنزیم G₆PD به طور قابل ملاحظه ای در جمعیت های مختلف متغیر است. از موتاسیونهای متعدد شناخته شده آنزیم G₆PD، تعداد کمی شایع هستند. معمولاً مطالعات جمعیتی برای شناسایی کمبود آنزیم G₆PD با به کار بردن یک آزمون غربالی امکان پذیر است که با استفاده از روش رنگ زدایی یا آزمون فلورسنت نقطه ای انجام می گیرد و سپس با آنالیز موتاسیون در افرادی که دارای کمبود آنزیم هستند، دنبال می گردد. این روش نمی تواند در نشان دادن زنان هتروزیگوت قابل اعتماد باشد و از این رو، همه گزارشات فراهم آمده در مورد شیوع ژنی G₆PD تنها در ارتباط با جنس مذکر بوده است. روش دیگر در مطالعات جمعیتی برپایه ارزیابی مستقیم جهش های شایع آنزیم G₆PD می باشد. چنین روشی نه تنها به ما قدرت شناسایی افراد همی زیگوت و هموزیگوت را می دهد بلکه شناسایی زنان هتروزیگوت را نیز ممکن می سازد. در این صورت می توان ارزیابی دقیق تری از شیوع یک جهش شایع ژن G₆PD در یک جمعیت داشت. روش دوم احتمالاً در جمعیت هایی که شیوع کمبود آنزیم G₆PD شایع است عملی تر می باشد (۱۲).

کودک فاویسمی ساکن شهرستانهای استان مازندران صورت پذیرفت و مشخص شد که ۴۹ نفر (۶۶/۲ درصد) از افراد دارای جهش مدیترانه ای می باشند، ۳۳/۸ درصد نیز جهش های غیر مدیترانه ای داشتند (۲۵).

یافته ما با نتایجی که از شمال کشور به دست آمده و نیز با نتایج برخی کشورهای همجوار همخوانی دارد. علت این همخوانی می تواند قدیمی بودن جهش نوع مدیترانه ای نسبت به سایر جهش ها باشد. یعنی این جهش هزاران سال قبل اتفاق افتاده است و زن جهش یافته توسط مهاجرت ها و یا جابه جایی جمعیت ها به علت جنگ و غیره به سایر سرزمین ها جریان یافته است. ۱۷ نفر (۲۶/۶ درصد) افراد مورد مطالعه فاقد این جهش بودند که مشخص کردن نوع جهش در این افراد به مطالعات مولکولی بیشتر نیاز دارد و با استفاده از روشهای هترو دوپلکس و در نهایت، توسط تعیین توالی زن G₆PD قابل انجام می باشد.

تشکر و قدردانی

از مسئولان محترم آزمایشگاههای مرکز طبی کودکان، بیمارستان مفید و آزمایشگاه پاتوبیولوژی نور به خاطر در اختیار قرار دادن نمونه های خون و از مسئولان و کارکنان بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران به خصوص آقای دکتر زینلی به خاطر اجازه استفاده از وسایل و امکانات بخش تشکر و قدردانی می گردد.

(۹۱/۵ درصد) را افراد مذکر تشکیل می دهند. از آنجا که نمونه گیری در این مطالعه به صورت تصادفی انجام نگرفته است از این رو، نمی توان شیوع آن را براساس تعداد کروموزوم (شیوع زنی) بیان نمود و چون جمعیت تهران از مجموعه نژادهای مختلف تشکیل گردیده بنابراین ردیابی ژنتیک و نژاد آنها امکان پذیر نمی باشد. در ۲۶/۶ درصد از نمونه های مورد مطالعه، جهش ایجاد شده از نوع مدیترانه ای نبوده است که این درصد در مقایسه با جهش های گزارش شده از کشورهای همسایه و برخی کشورهای حاشیه منطقه مدیترانه همخوانی دارد. از نظر شیوع جهش مدیترانه ای در کشورهای مختلف جهان مطالعات زیادی صورت پذیرفته است. فراوانی این جهش در کشورهای حاشیه مدیترانه بسیار بالا می باشد. مطالعاتی که در کشورهای ایتالیا (۱۳)، پرتغال (۱۴)، اسپانیا (۱۵)، یونان (۱۶)، مصر (۱۷) و الجزایر (۱۸) به عمل آمده، حاکی از شیوع بالای جهش مدیترانه می باشد. شیوع جهش نوع مدیترانه ای در کشور های همسایه نظیر عربستان (۱۹)، ترکیه (۲۰)، عمان (۲۱)، امارات متحده عربی (۲۲)، پاکستان (۲۳) و کویت (۲۴) نیز به ترتیب ۸۰٪، ۷۸/۲٪، ۵۵٪، ۷۸٪، ۸۸/۸٪ می باشد. تنها مطالعه گزارش شده مولکولی که در کشور ما صورت گرفته است مربوط به تحقیقی می باشد که در یکی از استانهای ساحلی دریای خزر (مازندران) انجام شد. این مطالعه توسط مصباح نمین و همکاران بر روی ۷۴

منابع

- 1- Vulliamy T, Mason P, Luzzatto L. The molecular basis of G₆PD deficiency. *Hematologica* 1992; 8(4):138.
- 2-Beutler E. G₆PD deficiency. *Blood* 1994; 84(11):3613 - 17
- 3-Cocco P, Todde P, Forenza S, Manca M. Mortality in a cohort of men expressing the G₆PD deficiency. *Blood* 1998; 91: 706-9.
- 4-WHO Working group. G₆PD deficiency. *Bulletin of the world health organization*. 1989; 67: 601-11.
- ۵- حسن زاده الق بولاغی قاسم. تعیین میزان شیوع کمبود آنزیم G₆PD در گلبولهای قرمز دانش آموزان پسر شهرستان ماکو. پایان نامه کارشناسی ارشد، تهران: دانشگاه علوم پزشکی ایران، ۱۳۷۰، صفحات ۴۷-۳۸.
- ۶- میری مقدم ابراهیم، پور فتح الله علی اکبر، معتبر منصور، کمبود آنزیم گلوکز - ۶ - فسفات دهیدروژناز و ارتباط آن با مالاریا. پرونده ۱۳۷۸، شماره ۱۳: صفحات ۴۳-۳۹.

- 7 - Beutler E. The genetic of G₆PD deficiency. *Semin Hematol* 1990; 27:137.
- 8 - Kirkman HN, Hendrikson EM. Sex-linked electrophoretic difference in G₆PD. *Am J Hum Genet* 1963; 15:241.
- 9 - Betke K, Beutler E, Brewer G. Standardization of procedures for the study of G₆PD, Report of a WHO scientific group. *WHO Tech Rep Ser* 1967; 366: 1-53.
- 10 - Luzzatto L. Studies of polymorphic traits for the characterization of populations, African populations south of the sahara. *J Med Sci* 1973; 9:1181-84.
- 11 - Oppenheim A, Jurycl R, Rund D. G₆PD mediterranean accounts for the high prevalence of G₆PD deficiency in kurdish jews. *Hum Genet* 1930; 91:203-6.
- 12 - Elena S, Brendan D. Population study of common G₆PD mutations in Kuwait. *Hum Hered* 1999; 19: 41-44.
- 13 - Martibez DF, Dottic TD, Fiorelli G, Capellini MD. Molecular heterogeneity of G₆PD variants in Italy. *Hematologica* 1997; 82: 440-44
- 14 - Mason P, Vulliamy T. *Genetic variation of human erythrocyte G₆PD in human blood cells, consequences of genetic polymorphism and variations*. London: Imperial College Press; 2000; 251-7.
- 15 - Vives- Corrons JL. Molecular analysis of G₆PD deficiency in Spain. *Sangre* 1997; 42(5): 391-8.
- 16 - Xu W, Westood B, Bartsocas CS. G₆PD mutations and haplotypes in various ethnic groups. *Blood* 1995; 85:257-63.
- 17 - Rizk SH, Aziz MA. Frequency of the G₆PD mediterranean mutation among a group of Egyptian Pediatric Patients. *Lab hematol* 2000; 6:127-131.
- 18 - Nafa K, Reghis A, Osmani N. At least five polymorphic mutants accounts for the prevalence of G₆PD deficiency in Algeria. *Am J Hum Genet* 1994; 94:513-7.
- 19 - Niazi G, Adey O, Kunnu A. Neonatal jaundic in Saudi newborns with G₆PD Aures. *Am Trop Pediatr* 1996; 16(1): 33-7.
- 20 - Oner R, Gumruk F, Acar C. Molecular characterization of G₆PD deficiency in Turkey. *Hematologica* 2000; 85:3-7.
- 21 - Daar S, Vulliamy T. Molecular characterization of G₆PD deficiency in Oman. *Hum Hered* 1996; 49:172-4.
- 22 - Bayoumi RA, Anur-Komals E. Molecular characterization of erythrocyte G₆PD deficiency in Al-ain district, United Arab Emirats. *Hum Hered* 1996; 46:136-40.
- 23 - Saha N, Ramzan M. Molecular characterization of red cell G₆PD deficiency in north west Pakistan. *Hum Hered* 1994; 44:85-9.
- 24 - Samilcuk E, Brendan D, Al-Aeadi S. Population study of common G₆PD multations in Kuwait. *Hum Hered* 1999; 19:41-45.
- 25 - Mesbah S, Sanati MH, Mowjoodi A. Spread of the G₆PD variant (G₆PD Mediterranean) in one of the coastal provinences of caspian sea in Iran. *J Sci IR Iran* 2000; 11(4): 285- 8.