بسم الله
الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان

همخوانی ژنوتیپ- فنوتیپ در موکوپلی ساکاریدوز تیپ I و نقش پلی مورفیسم های ژن IDUA در درمان با داروی لارونیداز (آلدورازیم)

نگارش

محمد عبدی

اساتید راهنما

دکتر محمد تقی‌خانی

دکتر شهره خاتمی

استاد مشاور

دکتر محمد سعید هخامنشی

خرداد ۱۳۹۳

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای **محمد عبدی** رشته **بیوشیمی بالینی** رساله **دکتری** خود را با عنوان « **همخوانی ژنوتیپ – فنوتیپ در موکوپلی ساکاریدوز تیپ I و نقش پلی مورفیسم های ژن IDUA در درمان با داروی لارونیداز (آلدورازیم)** » در تاریخ **۱۳۹۳/۳/۳۱** ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنمای اصلی	دکتر محمد تقی خانی	
استاد راهنمای دوم	دکتر شهره خاتمی	
استاد مشاور	دکتر محمد سعید هخامنشی	
استاد ناظر	دکتر محمد تقی اکبری	
استاد ناظر	دکتر فاطمه صغری کرمی	
استاد ناظر	دکتر پروین پاسالار	
استاد ناظر	دکتر مریم رزاقی آذر	
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر سید علیرضا مصباح نمین	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **محمد عبدی** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۹** مقطع **دکترای تخصصی (PhD)** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ ۹۳/۴/۱

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **بیوشیمی بالینی** است که در سال **۱۳۹۳** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **جناب آقای دکتر تقی‌خانی و سرکار خانم دکتر شهره خاتمی** ، مشاوره **جناب آقای دکتر محمد سعید هخامنشی** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **محمد عبدی** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** مقطع **دکترای تخصصی (PhD)** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی محمد عبدی

تاریخ و امضا

۹۴/۳/۱

چکیده

موکوپلی‌ساکاریدوزها گروهی از بیماری‌های نادر ژنتیکی و متابولیکی هستند که بدلیل وفور ازدواج‌های خویشاوندی در جوامعی مانند ایران نسبتاً شایع‌اند. یکی از اشکال شایع موکوپلی‌ساکاریدوز، نوع 1 این بیماری بوده که از لحاظ شدت بیماری بسیار هتروژن می‌باشد. علت ایجاد موکوپلی‌ساکاریدوز نوع 1 جهش در ژن IDUA و در نتیجه نقص در فعالیت محصول پروتئینی این ژن یعنی آنزیم α-L-ایدورونیداز می‌باشد. برای پیشگیری و درمان ضروری است تا نوع موکوپلی‌ساکاریدوز با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم معلوم شود. با توجه به محدود بودن مطالعات غربالگری و انجام آزمایش‌های تشخیصی این دسته از بیماری‌ها، مطالعه حاضر به منظور طراحی و اجرای روش‌های سنجش آنزیمی α-L-ایدورونیداز و روش‌های غربالگری بیوشیمیایی این بیماری در کشور و نیز تعیین ارتباط بین میزان تغییرات ژنتیکی با فنوتیپ بیوشیمیایی در بیماران مبتلا، انجام گردید. نتایج حاصل از مطالعه گروه حاضر نشان‌دهنده میزان بالای حساسیت و ویژگی سنجش GAGهای ادراری بر اساس روش رنگ سنجی DMB است. بعلاوه، راه‌اندازی روش آنزیمی بخوبی انجام پذیرفت و با توجه به نتایج این روش را می‌توان برای تشخیص MPS I بکار برد. در این مطالعه برای اولین بار از تکنیک HRM برای آنالیز جهش‌های رایج در ژن IDUA مورد استفاده قرار گرفت. تعداد 2 جهش که قبلاً گزارش شده بودند و 5 جهش جدید در بیماران حاضر شناسایی گردید. آنالیز موتاسیون ژن IDUA نشان از فراوانی جهش‌ها بترتیب در اگزون‌های 1 و 7 و کدون‌های 33 و 257 می‌باشد که تاکنون چنین فراوانی گزارش نشده است. در این مطالعه جهش‌های رایج گزارش شده در سایر مطالعات دیده نشد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر حاکی از بالا بودن میزان دفع گلیکوزآمینوگلیکان‌های ادراری در بیماران مبتلا به MPS I، علی‌رغم درمان با لارونیداز نسبت به گروه کنترل است.

کلمات کلیدی: موکوپلی ساکاریدوز نوع 1، α-L-ایدورونیداز، ارتباط ژنوتیپ-فنوتیپ، ایران

اختصارات

4-MU	4-Methylumbelliferone
BST	Berry spot test
CCM	Chemical Cleavage Mismatched
CPC	Cetylpyridinium chloride
Cr	Creatinine
CS	Chondroitin sulfate
DBS	Dried Blood Spot
DDF	Di Deoxy Fingerprinting
Del	Deletion
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DHPLC	Denaturing high pressure liquid chromatography
DMB	1,9-Dimethyl-Methylene Blue
DS	Dermatan sulfate
ERT	Enzyme Replacement Therapy
GAG	Glycosaminoglycans
HPF	High Power Field
HRM	High Resolution Melting
HS	Heparan sulfate
IDUA	Alpha-L-iduronidase
Ins	Insertion
LR+	Positive likelihood Ratio
LR-	Negative likelihood Ratio
LSD	Lysosomal storage diseases
MPS	Mucopolysaccharidoses
NPV	Negative Prognostic Value
NTD	Non Template DNA
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylene glycol
PPV	Positive Prognostic Value
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SNP	Single-nucleotide polymorphism
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis

فهرست مطالب

فصل اول- مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. موکوپلی‌ساکاریدوز ۲

۱-۲. تاریخچه موکوپلی‌ساکاریدوز ۲

۱-۳. بیوشیمی موکوپلی‌ساکاریدوز ۷

۱-۳-۱. تجزیه هپاران سولفات ۱۰

۱-۳-۲. تجزیه درماتان سولفات ۱۱

۱-۴. موکوپلی‌ساکاریدوز نوع اول ۱۴

۱-۴-۱. ژنتیک MPS I ۱۵

۱-۴-۱-۱. جهش‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا در ژن IDUA ۱۷

۱-۴-۱-۱-۱. جهش‌های بی‌معنی ۱۸

۱-۴-۱-۱-۲. جهش‌های بدمعنی ۲۰

۱-۴-۱-۱-۳. جهش‌های تغییر جایگاه پیرایش ۲۰

۱-۴-۱-۱-۴. جهش‌های حذفی و الحاقی ۲۱

۱-۴-۱-۱-۵. پلی‌مورفیسم‌ها و توالی‌های غیر بیماری‌زا ۲۱

۱-۴-۱-۱-۶. جهش‌های رایج و فراوانی جهش‌ها در گروه‌های مختلف بیماران ۲۲

۱-۴-۲. علائم بالینی MPS I ۲۲

۱-۴-۲-۱. تغییرات پاتولوژیک ۲۵

۱-۴-۳. تشخیص MPS I ۲۷

۱-۴-۳-۱. سنجش کیفی GAGهای ادراری ۲۸

۱-۴-۳-۲. روش سنجش کمی میزان GAGها ۲۹

۱-۴-۳-۳. روش‌های سنجش نوع GAG دفع شده ۲۹

۱-۴-۳-۴. سنجش آنزیمی ۳۰
۱-۴-۳-۵. تشخیص پیش از تولد ۳۱
۱-۴-۳-۶. تشخیص مولکولی MPS I ۳۱
۱-۵. درمان موکوپلی‌ساکاریدوز نوع I ۳۱
۱-۵-۱. درمان‌های علتی ۳۲
۱-۵-۲. پیوند مغز استخوان ۳۲
۱-۵-۳. جایگزینی آنزیم ۳۳
۱-۵-۴. ژن درمانی ۳۳
۱-۵-۵. پیوند سلول‌های بنیادی ۳۴
۱-۵. اهداف پژوهش ۳۴
فصل دوم : مواد و روش‌ها ۳۷
۲-۱. مواد، وسایل و نمونه‌های مورد نیاز ۳۸
۲-۱-۱. مواد شیمیایی ۳۸
۲-۱-۲. وسایل لازم جهت انجام کار ۳۹
۲- ۲. آماده سازی محلول‌ها جهت انجام آزمایش ۳۹
۲-۲-۱. محلول‌های لازم جهت اندازه‌گیری GAGهای ادراری ۳۹
۲-۲-۲. تخلیص GAGهای ادراری ۴۰
۲-۲-۳. الکتروفورز GAGهای ادراری ۴۱
۲-۲-۴. تخلیص لکوسیت از خون کامل ۴۱
۲-۲-۵. مواد لازم برای سنجش فعالیت آنزیمی ۴۱
۲-۳. روش کار ۴۳
۲-۳-۱. فلوچارت مراحل تحقیق ۴۳
۲-۳-۲. خصوصیات افراد مورد مطالعه در گروه‌های بیمار و کنترل ۴۴

۲-۳-۳. نوع مطالعه ۴۴
۲-۳-۴. محاسبه حجم نمونه ۴۵
۲-۳-۵. روش‌های جمع آوری اطلاعات ۴۵
۲-۳-۶. آنالیز ادرار از لحاظ میزان دفع گلیکوزآمینوگلیکان‌ها ۴۷
۲-۳-۶-۱. نحوه نمونه‌برداری ۴۷
۲-۳-۶-۲. تعیین حضور GAG در ادرار با استفاده از روش تست لکه‌ای بری (BST) ۴۷
۲-۳-۶-۳. اندازه‌گیری غلظت GAGهای ادراری با استفاده از روش فتومتریDMB ۴۷
۲-۳-۶-۴. تعیین نوع GAG دفع شده با استفاده از الکتروفورز استات سلولز ۴۹
۲-۳-۶-۴-۱. تخلیص GAGهای ادراری ۴۹
۲-۳-۶-۴-۲. الکتروفورز GAGهای تخلیص شده از نمونه‌های ادراری ۴۹
۲-۳-۷. محاسبه فعالیت آنزیمی ۵۰
۲-۳-۷-۱. جدا کردن و تخلیص لکوسیت‌ها ۵۰
۲-۳-۷-۲. سنجش فعالیت آنزیمی IDUA ۵۱
۲-۳-۷-۲-۱. روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی α–L- ایدورونیداز (EC 3.2.1.76) در نمونه DBS ۵۲
۲-۳-۷-۲-۲. روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی IDUA در نمونه لکوسیت ۵۳
۲-۳-۸. سنجش مولکولار ۵۳
۲-۳-۸-۱. استخراج DNA از نمونه خون کامل ۵۳
۲-۳-۸-۱-۱. ارزیابی DNA استخراج شده از لحاظ کمی و کیفی ۵۴
۲-۳-۸-۲. طراحی پرایمر ۵۵
۲-۳-۸-۲-۱. طراحی پرایمر برای تکثیر اگزون‌های ۱ تا ۱۴ ژن IDUA ۵۷
۲-۳-۸-۲-۲. طراحی پرایمر برای آنالیز موتاسیون اگزون‌های ۱، ۲، ۹ و ۱۱ ۵۷
۲-۳-۸-۳. تکثیر اگزون‌های ۱ تا ۱۴ توسط PCR ۵۸
۲-۳-۸-۳-۱. روش انجام PCR ۶۰

۲-۳-۸-۳-۲. سیکل‌های PCR ۶۲
۲-۳-۸-۳-۳. الکتروفورز محصولا PCR روی ژل آگارز ۶۳
۲-۳-۸-۴. تعیین توالی ۶۴
۲-۳-۸-۵. آنالیز موتاسیون با استفاده از High Resolution Melting Curve PCR ۶۵
۲-۳-۸-۵-۱. اساس HRM ۶۵
۲-۳-۸-۵-۲. جریان کار در HRM ۶۸
۲-۳-۸-۵-۳. آنالیز موتاسیون اگزون‌های ۱، ۲، ۹ و ۱۱ با استفاده از HRM ۷۰
۲-۳-۸-۵-۴. روش انجام HRM ۷۲
۲-۴. آنالیز آماری ۷۳
فصل سوم : نتایج و یافته‌ها ۷۶
۳-۱. یافته‌های حاصل از آنالیز GAGهای ادراری ۷۷
۳-۱-۱. نتایج حاصل از بررسی کیفی GAGهای ادراری با روش تست لکه‌ای بری (BST) ۷۷
۳-۱-۲. نتایج حاصل از بررسی کمی ادرار برای گلیکوزآمینوگلیکان‌ها توسط روش DMB ۷۸
۳-۱-۳. نتایج حاصل از تعیین نوع GAGهای دفع شده با استفاده از الکتروفورز روی کاغذ استات سلولز ۸۴
۳-۲. نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیمی IDUA با روش فلوریمتری ۸۵
۳-۳. نتایج آزمایش‌های مولکولار ۸۹
۳-۳-۱. نتایج حاصل از ارزیابی کیفی DNA استخراجی از خون کامل نمونه های مورد بررسی و کارآیی پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر قطعات ژنی آنزیم IDUA ۸۹
۳-۳-۲. نتایج حاصل از بهینه سازی دمای Annealing ۹۰
۳-۳-۲-۱. نتیجه بهینه سازی دمای Annealing برای اگزون ۱ ..... ۹۰
۳-۳-۲-۲. نتیجه بهینه سازی دمای Annealing برای اگزون ۲ ..... ۹۱
۳-۳-۲-۳. نتیجه بهینه سازی دمای Annealing برای اگزون ۳-۴ ..... ۹۲
۳-۳-۲-۴. نتیجه بهینه سازی دمای Annealing برای اگزون ۵-۶ ..... ۹۲

۳-۳-۲-۵. نتیجه بهینه سازی دمای Annealing برای اگزون ۷..... ۹۳
۳-۳-۲-۶. نتیجه بهینه سازی دمای Annealing برای اگزون ۸..... ۹۳
۳-۳-۲-۷. نتیجه بهینه سازی دمای Annealing برای اگزون ۹..... ۹۴
۳-۳-۲-۸. نتیجه بهینه سازی دمای Annealing برای اگزون ۱۰..... ۹۵
۳-۳-۲-۹. نتیجه بهینه سازی دمای Annealing برای اگزون ۱۱-۱۲..... ۹۶
۳-۳-۲-۱۰. نتیجه بهینه سازی دمای Annealing برای اگزون ۱۳-۱۴..... ۹۷
۳-۳-۳. نتایج انجام PCR برای تکثیر قطعات اگزونی ژن IDUA بیماران مبتلا به MPS I..... ۹۸
۳-۳-۴. آنالیز قطعات تعیین توالی شده توسط نرم افزار CLC Main workbench-5 جهت یافتن تغییرات ژنتیکی..... ۹۹
۳-۳-۵. نتایج حاصل از آنالیز موتاسیون‌های احتمالی در ژن IDUA با روش HRM..... ۱۰۳
۳-۳-۶. نتایج حاصل از ارتباط ژنوتیپ بیماران با میزان فعالیت آنزیمی..... ۱۱۱
۳-۳-۷. ارتباط نوع جهش با میزان فعالیت آنزیمی در بیماران تحت درمان با لارونیداز..... ۱۱۱
فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها..... ۱۱۳
۴-۱. گلیکوزآمینوگلیکان‌های ادراری و سنجش آنها..... ۱۱۵
۴-۲. سنجش فلورومتریک IDUA در نمونه‌های DBS..... ۱۱۸
۴-۳. آنالیز موتاسیون جهش‌های شایع ژن IDUA به کمک روش HRM..... ۱۲۰
۴-۴. بررسی جهش‌های شناسایی شده در بیماران..... ۱۲۴
۴-۵. ارتباط ژنوتیپ با فنوتیپ..... ۱۲۵
۴-۶. پاسخ‌دهی به درمان با لارونیداز..... ۱۲۶
فهرست منابع و ماخذ..... ۱۲۸
چکیده انگلیسی..... ۱۴۲

فهرست جداول

جدول ۱-۱. انواع موکوپلی‌ساکاریدها (MPS)..... ۳

جدول ۲-۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای انجام PCR..... ۵۶

جدول ۲-۲. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای انجام HRM-PCR..... ۵۸

جدول ۲-۳. شرایط انجام PCR جهت تکثیر قطعات اگزونی ۱ تا ۱۴ ژن IDUA..... ۶۲

جدول ۲-۴. قدرت جداسازی مولکولهای DNA توسط غلظتهای مختلف آگارز..... ۶۴

جدول ۲-۵. غلظت DNA الگو در آنالیز HRM..... ۶۹

جدول ۲-۶. شرایط انجام PCR جهت آنالیز موتاسیون اگزون‌های ۱، ۲، ۹ و ۱۱ با استفاده از روش HRM با استفاده از Rotor-Gene 6000..... ۷۳

جدول ۲-۷. جدول ۲×۲ برای بررسی ارزش تشخیصی تست‌های مورد بررسی..... ۷۵

جدول ۳-۱. نتایج بررسی GAGهای ادراری در بیماران مبتلا به MPS I با دو روش BST و DMB..... ۷۷

جدول ۳-۲. نتایج حاصل از بررسی GAGهای ادراری در گروه‌های بیمار و کنترل..... ۷۸

جدول ۳-۳. غلظت GAGهای ادراری بر اساس سن نمونه‌ها، تعداد WBC و تعداد سلول‌های اپیتلیال جدول ادراری..... ۸۳

جدول ۳-۴. بررسی ارزش تشخیصی تست‌های BST و DMB در تشخیص بیماران مبتلا به MPS I..... ۸۴

جدول ۳-۵. نتایج بررسی فعالیت آنزیم IDUA در نمونه‌های DBS بیماران مبتلا به MPS I با روش جدول فلوریمتری..... ۸۶

جدول ۳-۶. فعالیت IDUA در نمونه‌های DBS بر اساس وجود بیماری، سن و جنسیت در افراد مطالعه ..۸۷

جدول ۳-۷. بررسی ارزش تشخیصی تست فلورومتری سنجش IDUA در نمونه‌های DBS در تشخیص بیماران مبتلا به MPS I..... ۸۹

جدول ۳-۸. جهش‌های ژن IDUA در بیماران مورد بررسی..... ۱۰۲

جدول ۳-۹. ارتباط ژنوتیپ با فنوتیپ بیوشیمیایی بیماران..... ۱۱۲

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. انواع GAGها ۷

شکل ۱-۲. ساختار GAGها ۸

شکل ۱-۳. تجزیه GAGها ۱۱

شکل ۱-۴. محل قرارگیری ژن IDUA روی کروموزوم ۴ ۱۵

شکل ۱-۵. توالی اسید آمینه‌ای (الف) و ساختار سه بعدی (ب) آنزیم IDUA ۱۷

شکل ۱-۶. جهش‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا در ژن IDUA ۱۹

شکل ۱-۷. تظاهرات بالینی در MPS I ۲۳

شکل ۱-۸. دیس‌استوزمولتی‌پلکس در بیماران مبتلا به MPS I ۲۴

شکل ۱-۹. Zebra Bodies ۲۵

شکل ۲-۱. اساس یک نمودار HRM ۶۵

شکل ۲-۲. رنگ‌های تداخلی با dsDNA موسوم به غیر اشباع، اشباع و release-on-demand ۶۸

شکل ۲-۳. اثر افزایش MgCl2 بر منحنی دمایی ۶۹

شکل ۲-۴. آنالیز نتایج HRM مربوط به یک SNP فرضی (A/T) ۷۱

شکل ۲-۵. نحوه برنامه‌دهی به دستگاه با استفاده از نرم افزار Rotor-Gene 6000 ۷۴

شکل ۳-۱. نتایج حاصل از تست BST ۷۹

شکل ۳-۲. غلظت GAGهای ادراری در نمونه‌های افراد مذکر و مونث ۸۰

شکل ۳-۳. غلظت GAGهای ادراری در کنترل‌های سالم بر اساس سن نمونه‌ها ۸۱

شکل ۳-۴. غلظت GAGهای ادراری در کنترل‌های سالم بر اساس تعداد WBC (Cell/HPF) نمونه‌ها ۸۲

شکل ۳-۵. غلظت GAGهای ادراری در کنترل‌های سالم بر اساس تعداد Epithelial cells (Cell/HPF) نمونه‌ها ۸۲

شکل ۳-۶. نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه‌های ادراری ۸۵

شکل ۳-۷. بررسی فعالیت آنزیمی IDUA بر اساس گروه بندی سنی..... ۸۸
شکل ۳-۸. ارزیابی DNA استخراج شده از نمونه‌های خون افراد مورد مطالعه..... ۸۹
شکل ۳-۹. انجام PCR بصورت تک دما از ۵۵ تا ۵۸ درجه سانتیگراد برای اگزون ۱..... ۹۱
شکل ۳-۱۰. انجام PCR بصورت تک دما از ۵۵ تا ۵۸ درجه سانتیگراد برای اگزون ۲..... ۹۲
شکل ۳-۱۱. انجام PCR بصورت تک دما از ۵۴ تا ۵۸ درجه سانتیگراد برای اگزون‌های ۴-۳ و ۶-۵..... ۹۳
شکل ۳-۱۲. انجام PCR بصورت تک دما از ۵۲ تا ۵۸ درجه سانتیگراد برای اگزون‌های ۷ و ۸..... ۹۳
شکل ۳-۱۳. انجام PCR بصورت تک دما از ۵۳ تا ۵۸ درجه سانتیگراد برای اگزون ۹..... ۹۵
شکل ۳-۱۴. انجام PCR بصورت تک دما از ۵۳ تا ۵۸ درجه سانتیگراد برای اگزون ۱۰..... ۹۶
شکل ۳-۱۵. انجام PCR بصورت تک دما از ۵۴ تا ۵۹ درجه سانتیگراد برای اگزون ۱۲-۱۱..... ۹۷
شکل ۳-۱۶. انجام PCR بصورت تک دما از ۵۳ تا ۵۸ درجه سانتیگراد برای اگزون ۱۴-۱۳..... ۹۸
شکل ۳-۱۷. انجام PCR بر اساس شرایط بهینه شده برای تکثیر اگزون ۲ نمونه‌های بیماران..... ۹۹
شکل ۳-۱۸. Alignment نمونه‌های تعیین توالی شده نسبت به ژن رفرانس..... ۱۰۰
شکل ۳-۱۹. تعیین تغییرات نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار CLC..... ۱۰۱
شکل ۳-۲۰. نتایج HRM-PCR ژن IDUA استفاده از آنالیز توسط نرم افزار Rotor-Gene 600..... ۱۰۴
شکل ۳-۲۱. نتایج HRM-PCR ژن IDUA آنالیز توسط نرم افزار Rotor-Gene 6000 (ادامه)..... ۱۰۵
شکل ۳-۲۲. نتایج HRM-PCR ژن IDUA آنالیز توسط نرم افزار Rotor-Gene 6000 (ادامه)..... ۱۰۶
شکل ۳-۲۳. آنالیز HRM به کمک نرم افزار Rotor Gene 6000..... ۱۰۸
شکل ۳-۲۴. آنالیز HRM به کمک نرم افزار Rotor Gene 6000 (ادامه)..... ۱۰۹
شکل ۳-۲۵. آنالیز HRM به کمک نرم افزار Rotor Gene 6000 (ادامه)..... ۱۱۰

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. موکوپلی‌ساکاریدوز

موکوپلی‌ساکاریدوزها (MPS[1]) گروهی از بیمارهای ارثی ذخیره‌ای لیزوزومی می‌باشند که با نقص در یک یا چند آنزیم لیزوزومی موردنیاز برای تجزیه گلیکوزآمینوگلیکان‌ها مشخص می‌شوند (جدول ۱-۱) [۱, ۲]. در تمامی زیرگونه‌هایMPS، گلیکوزآمینوگلیکان‌های نسبتاً تجزیه‌شده در لیزوزوم‌های سلول‌های آسیب‌دیده تجمع یافته یا اینکه پس از تخریب سلول‌های مذکور به داخل جریان خون واردشده و سپس از طریق ادرار از بدن خارج می‌شوند. فروانی MPS حدود یک در هر ۵۰۰۰۰ تولد بوده [۲] و به‌طور کلی نوزادان مبتلابهMPS تا زمانی که تجمع بیش از حد GAGها منجر به بروز علائم پاتولوژیک نگردد بدون علامت هستند [۳].

۱-۲. تاریخچه موکوپلی‌ساکاریدوز

زمانی که در سال ۱۹۱۹ گرترود هورلر در حال یادگیری بیماری‌های اطفال بود، علائمی را شامل تاری قرنیه، دیسپلازی و کوتاهی اسکلتی، عدم قرارگیری ستون فقرات در یک راستا و عقب‌ماندگی ذهنی توصیف کرد که بعدها به نام لیپوکندرودیستروفی و در نهایت به نام سندرم هورلر[2] شناخته شد [۴]. بدلیل عدم درک اساس پاتولوژیک بیماری در ابتدا و با توجه به چهره خشن و پرمو و نیز بدشکلی‌های اسکلتی بیماران مبتلا، افراد مذکور را گارگویلیسم[3] می‌نامیدند [۴]. دو سال پیش از گزارش هورلر، دکتر هانتر نیز جزئیاتی از دو بیمار با تظاهرات بالینی مشابه گزارش کرده بود، اما

[1]Mucopolysaccharidosis
[2]Hurler Syndrome
[3]Gargoylism

بدلیل وقوع جنگ جهانی اول تا مدت‌ها نام هورلر به‌عنوان یک نام عمومی برای این نوع نشانگان بکار برده می‌شد. پس‌ازآنکه در سال ۱۹۵۲ اساس بیوشیمیایی اختلال تشخیص داده شد، این بیماری به نام موکوپلی‌ساکاریدوز مشهور گردید [۴].

جدول ۱-۱: انواع موکوپلی‌ساکاریدوزها (MPS) [۵]

MPS type	Eponym	McKusick No.	Enzyme	Incidence [a]
I	Hurler/Scheie	607014	α-l-Iduronidase	1:76,000–144,000
II	Hunter	309900	Iduronate-2-sulfatase	1:34,000–132,000
III	Sanfilippo			1:280,000[b]
IIIA	Sanfilippo A	252900	Heparan-N-sulfatase	
IIIB	Sanfilippo B	252920	α-N-acetylglucosaminidase	
IIIC	Sanfilippo C	252930	Acetyltransferase[c]	
IIID	Sanfilippo D	252940	N-acetylglucosamine-6-sulfate	
IV	Morquio			
IVa	Morquio A	253000	N-acetylgalactosamine-6-sulfate	1:76,000–216,000 1:40,000–50,000[d]
IVB	Morquio B	253010	β-d-galactosidas[e]	
V	Maroteaux-Lamy	253200	Arylsulfatase B[e]	1:840,000–1,300,000 1:248,000[f]
VI	Sly	253220	β-d-glucuronidas[e]	1:840,000–1,300,000

a Estimated incidence according to Neufeld [6] unless otherwise noted
b For Sanfilippo A and B in Northern Ireland (see a)
c Acetyl CoA:α-glucosaminide-N-acetyltransferase
d Northover [7]
e N-acetyl-galactosamine-4-sulfatase
f Hein [8]

با توجه به اساس ناهمگون ژنتیکی، بیوشیمیایی و بالینی بیماری سندرم هورلر یا MPS I و سندرم هانتر یا MPS II برای نامیدن این نشانگان رایج گردید. در ابتدای امر تصور بر این بود که این اختلالات حاصل نقص در متابولیسم چربی‌ها می‌باشد؛ اما در سال ۱۹۷۵ مشخص شد که ادرار بیماران مذکور حاوی میزان بالایی از دو موکوپلی‌ساکارید به نام درماتان سولفات و هپاران سولفات است [۴]. در سال ۱۹۶۴ مشخص شد که اساس پاتولوژیک این دو نوع سندرم نقص فعالیت آنزیمی می‌باشد. بعدها و در سال ۱۹۷۲ فقدان فعالیت آنزیمی آلفا-L-ایدورونیداز[1] در سندرم هورلر و نوع خفیف‌تر این بیماری سندرم شای[2] ثابت گردید [۴]. شای در سال ۱۹۶۲ همراه دو تن از همکارانش گونه جدیدی از موکوپلی‌ساکاریدوز را معرفی کرد. این‌گونه ابتداً MPS V نام داشت، ولی با مطرح‌شدن احتمال آللیک بودن آن با سندرم هورلر در سال ۱۹۷۰ آن را MPS I-S نامیدند. هانتر در ۱۹۱۷ گزارشی از یک بیماری نادر در دو برادر کانادایی ۸ و ۱۰ ساله، همراه با یافته‌های بالینی و پرتوشناستی آنان ارائه کرد. مک‌کیوسیک چندین دهه خانواده این بیماران را پیگیری کرده و تائید کرد که این بیماران مبتلابه گونه‌ای خاص از موکوپلی‌ساکاریدوز به نام MPS II هستند [۴]. مقاله هانتر در زمان خود توجه کمی را جلب کرد و تا مدت‌ها این بیماری را مانند سایر بیماران مشابه، با عنوان مبتلایان به گارگویلیسم می‌شناختند. سرانجام این بیماری با عنوان غیراختصاصی استئوکندرودیستروفی معرفی شد و پس از شناسایی یافته‌های بیوشیمیایی غیرطبیعی ادرار عنوان موکوپلی‌ساکاریدوز برای آنان بکار رفت. بیب و فورنل در سال ۱۹۵۴ با گزارش خانواده‌ای با ۹ عضو مذکر مبتلا، احتمال توارث وابسته به X را مطرح کردند [۴]. بعدها مشخص شد که ژن عامل بیماری یعنی آنزیم ایدورونات سولفاتاز بر روی بازوی بلند کروموزوم X (Xq28) قرار دارد. در سال ۱۹۶۱، دختر ۶ ساله‌ای که دچار هپاتواسپلنومگالی خفیف و اسکلت طبیعی به همراه ترشح مقادیر بالای هپاران سولفات در ادرار بود، معرفی گردید. در سال‌های ۱۹۶۲ و ۱۹۶۳، سیلوستر سان‌فیلیپو و همکارانش ۸ کودک دیگر را با طیف وسیعی از عقب‌ماندگی ذهنی و ترشح مقادیر بالای هپاران سولفات در ادرار معرفی کردند که بعدها بانام سندرم سان‌فیلیپو یا MPS III شناخته شد. این سندرم

[1] α-L-Iduronidase
[2] Scheie Syndrome

بعدها به چهار زیرگروهA، B، C و D تقسیم‌بندی شد. جایگاه ژنیآنزیم دخیل در نوع A روی کروموزوم ۱۷ (17q25.3) بوده و N-هپاران سولفاتاز نامیده می‌شود. آنزیم دخیل در نوع B، آلفا-N- استیل گلوکزآمینیداز است که بعدها جایگاه آن روی کروموزوم ۱۷ (17q21) نشان داده شد. سندرم سان‌فیلیپو C در سال ۱۹۷۶ توسط کرسه و همکارانش در دو بیمار خویشاوند یونانی تبار گزارش شد. کرسه و همکاران در سال ۱۹۸۰ نیز اولین مورد سندرم سان‌فیلیپو D را در یک پسر ۷ ساله هندی که ساکن انگلستان بود معرفی کرد. در همین سال آنزیم‌های دخیل در این دو بیماری به ترتیب به نام‌های آلفا- گلوکز آمین-N-استیل ترانسفراز و N-استیل گلوکز آمین-۶-سولفات سولفاتاز که ژن آن‌هابه ترتیب روی کروموزوم‌های ۸ (8p11-q13) و ۱۲ (12q14) قرار دارد، معرفی شدند [۴, ۹].

در سال ۱۹۲۹ لوییس موروکیو مقاله‌ای با عنوان شکلی از دیستروفی اسکلتی خانوادگی در یک خانواده سوئدی منتشر کرد [۴]. این زوج خویشاوند دارای ۵ فرزند بودند که از بین آن‌ها تنها یک نفر سالم بود. تا پیش از گزارش موروکیو افتراق این بیماری از دیسپلازی‌های اسکلتی همراه با کوتاهی قد مقدور نبود. اسامی متعددی نظیر آکندروپلازی، دیسپلازی اسپوندیلواپی‌فیزیال و دیسپلازی‌های متعدد اپیفیز بر روی این بیماری قرار گرفت. طی سال‌ها عنوان موروکیو- بریلز فورد بدون هیچ تعریف واحد و مقبولی برای هر نشانگانی از کوتاهی قد و نا هم‌راستایی ستون فقرات بکار می‌رفت. مدتی نیز نام غیراختصاصی گارگویلیسم رواج یافته بود. این سردرگمی در سال ۱۹۶۲ با شناسایی ترشح بالای موکوپلی‌سکاریدها در ادرار این بیماران رفع شد و عنوان سندرم موروکیو جهت توصیف گونه چهارم موکوپلی‌ساکاریدوز (MPS IV) پذیرفته شد. در سال ۱۹۷۷ آربیسر و همکارانش گونه دومی از نشانگان موروکیو را نشان دادند. در همان سال آنزیم دخیل در MPS IV-B تحت عنوان بتا گالاکتوزیداز شناسایی شد. آنزیم مسئول در MPS IV-A در سال ۱۹۷۸ بنام N-استیل گالاکتوز آمین-۶-سولفات سولفاتاز معرفی شد. ژن دخیل در موروکیو A روی کروموزوم ۱۶ (16q24.3) و موروکیو B روی کروموزوم ۳ (3p21.33) قرار دارد [۴].

موکوپلی‌ساکاریدوز بعدی توسط پیر ماروتو و موریس لامی در سال ۱۹۶۳ تعریف‌شده وبه نام MPS VI خوانده شد. در سال ۱۹۶۵ آنزیم درگیر در ایجاد این بیماری به نام آریل سولفاتاز B (N-