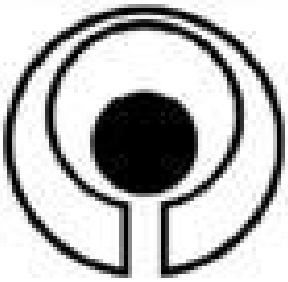
PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

گروه ژنتیک

پایان نامه کارشناسی ارشد ژنتیک

بررسی علل عقب ماندگی ذهنی ژنتیکی (کروموزومی اتوزومی و وابسته به جنس) در استان گلستان از مهر 1385 تا آخر شهریور 1386

نگارنده:

حسین درویش

استاد راهنما:

دکتر حسین نجم آبادی

اساتید مشاور:

دکتر کیمیا کهریزی

دکتر فرخنده بهجتی

زمستان 1387

شماره ثبت: 133-1000

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

چکیده:

هدف: سهم عوامل ژنتیکی در بروز اختلال عقب ماندگی ذهنی حدود 70 درصد است. هدف از این مطالعه بررسی علل ژنتیکی عقب ماندگی ذهنی در استان گلستان است تا بدین وسیله همگام با تحقیق در راستای یافتن ژن های جدید درگیر در بروز عقب ماندگی ذهنی، پزشکان و مشاورین ژنتیک در این استان قادر به انجام مشاوره صحیح در جهت پیشگیری و کنترل این عارضه باشند.

روش بررسی: در این مطالعه 42 خانواده از نقاط مختلف استان گلستان که دارای 2 و بیشتر فرزند عقب ماندگی ذهنی بودند مورد بررسی قرار گرفت. خانواده ها با همکاری بهزیستی کل استان گلستان شناسایی شدند. عقب ماندگی ذهنی افراد مبتلا قبلاً با انجام مشاوره ژنتیک و معاینه بالینی توسط پزشک تایید شده بود. تکمیل پرسشنامه ، رسم شجره نامه و نمونه گیری از افراد مبتلا و سالم در خانواده انجام گرفت. در مورد بیماران بررسی دیسمورفی و سنجش میکزوسفالی نیز انجام شد. سپس افراد مبتلا تحت بررسی کروموزومی (سیتونتیک)، بررسی شکنندگی کروموزوم X (سندرم X شکننده) و آنالیز پیوستگی قرار گرفتند.

یافته ها: ناهنجاری کروموزومی در هیچ یک از خانواده های مورد مطالعه دیده نشد. از میان 42 خانواده مورد بررسی، یک خانواده شکنندگی کروموزوم X و6 خانواده مبتلا به عقب ماندگی ذهنی همراه با میکروسفالی بودند. از میان 6 خانواده میکروسفال 4 خانواده به لکوس های MCPHپیوستگی نشان دادند و در یکی از آنها یک جهش جدید شناسایی گردید.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

چکیده انگلیسی:

Investigation of six mental retardation loci (MCPH1, MCPH2, MCPH3, MCPH4, MCPH5, and MCPH6) associated with microcephaly north of Iran

Introduction: Primary autosomal recessive microcephaly is defined as a reduction in head circumference. So far six out of ten Non-Syndromic Autosomal Recessive Mental Retardation (NS-ARMR) loci associated with microcephaly (MCPH1-MCPH6) which belongs to the family of MCPH (autosomal recessive primary microcephaly). So far four genes have been identified: *MCPH1*, encoding Microcephalin; *MCPH3*, encoding CDK5RAP2; *MCPH5*, encoding ASPM; *MCPH6*, encoding CENPJ. Based on MCPH heterogeneity studies in Pakistani and Indian population MCPH5 and MCPH1 are more common than other loci.

Aim: The objective of this study was to investigate prevalence of ARMR associated with microcephaly in Iranian families from north of Iran.

Materials and methods: Total of 6 consanguineous families with two or more affected individuals with ARMR inheritance pattern have been collected after obtaining consent form. Clinical examination and excluding chromosomal abnormalities of the families was completed and they were subjected to homozygosity mapping using STR (Short Tandem Repeats) markers for six mentioned MCPH loci. The sequencing was performed for the linked families.

Results: four out of six families linked to three of these loci. Two were linked to MCPH5, and each locus (MCPH1, and MCPH6) showed one linked family. We have been able to identify a stop codon mutation in on of the MCPH families.

Conclusion: According to our finding MCPH5, it seems to be the must prevalent. In our northern population. Sequencing for causative gene is on the way.

Key words: Mental Retardation, ARMR, microcephaly, MCPH, Iran

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

فهرست

عنوان ..... **صفحه**

فصل اول: کلیات تحقیق 1

1-1 بیان مساله 1

1-2 اهمیت و ضرورت تحقیق 4

1-3 هدف از اجرای تحقیق 5

1-3-1 اهداف کلی 5

1-3-2 اهداف اختصاصی 5

1-3-3 اهداف کاربردی 5

1-4 سوال ها و فرضیه ها 5

1-5 روش شناسی تحقیق 6

1-5-1 نوع مطالعه 6

1-5-2 جامعه و نمونه آماری و روش نمونه گیری 6

1-5-3 روش جمع آوری داده ها 6

1-5-4 متغیرها 6

1-5-4-1 متغیرهای مستقل 6

1-5-4-2 متغیرها ی وابسته 7

1-5-5 روش اجرا 7

1-5-6 روش تجزیه و تحلیل داده ها 8

1-5-7 ملاحظات اخلاقی 8

فصل دوم: پیشینه تحقیق 9

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

1-1 ناهنجاری های کروموزومی 9
1-1-1 آنیوپلوئیدی 10
1-1-2 ناهنجاری کروموزومی در ناحیه تلومر 10
1-1-3 ناهنجاریهای ساختاری کروموزومها 11
1-1-3-1 نواراییهای نامتعادل 11
1-1-3-1-1 حذف 11
1-1-3-1-2 دوپلیکاسیون 12
1-1-3-1-3 کروموزوم های حلقوی 13
1-1-3-1-4 ایزو کروموزوم ها 14
1-1-3-1-5 کروموزومهای دو سانترومری 14
1-1-3-2 نوآراییهای متعادل 15
1-1-3-2-1 واژگونی ها 15
1-1-3-2-2 جابجاییها 16
1-1-3-2-2-1 جابجایی متقابل 16
1-1-3-2-2-2 جابجایی روبرتسونی 17
1-1-3-2-3 دخولها 18
1-1-3-2-4 کروموزوم های نشانگر 19
1-2 بیماری های تک ژنی 23
1-2-1 عقب ماندگی ذهنی وابسته به جنس 23
1-2-1-1 بررسی جمعیتی سندرم X شکننده 28
1-2-1-2 بررسی پروتئین حاصل از ژن FMR1 (FMRP) 28
1-2-2 عقب ماندگی ذهنی اتوزومال مغلوب 30
1-2-2-1 عقب ماندگی اتوزومی مغلوب سندرومی 31
1-2-2-2 عقب ماندگی اتوزومی مغلوب غیرسندرومی 31
1-2-2-2-1 نوروتریپسین 32
1-2-2-3 عقب ماندگی اتوزومی مغلوب همراه با میکروسفالی 36
1-2-2-3-1 عقب ماندگی ذهنی اتوزومال مغلوب همراه با میکروسفالی اولیه 38

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

1-1-4-2-2-1پروتئین میکروسفالین 44
1-3 نقشه‌یابی براساس هموزیگوسیتی 64 1-3-1
استفاده از روش نقشه‌یابی براساس هموزیگوسیتی در بررسی لکوس های 64
1-3-1-1 مارکرهای DNA برای آنالیز پیوستگی 65
1-1-1-3-1 پلی‌مورفیسم‌های‌تکرارهای کوتاه‌پشت‌سرهم 67
فصل سوم: روش شناسی تحقیق 70
3-1 روش انتخاب جامعه 70
3-1-1 شرایط انتخاب جمعیت هدف 70
3-1-2 حجم نمونه 70
3-1-3 چگونگی اندازگیری دورسر و تعیین میکروسفالی افراد 71
3-2 روش جمع آوری نمونه 73
3-3 مواد آزمایشگاهی و روش ها 73
3-3-1 مواد مورد نیاز و روش های بکارگرفته شده جهت بررسی آنالیز کروموزومی 73
3-3-1-1 تهیه محیط کشت 73
3-3-1-1-1 روش انجام کار 73
3-3-1-3 هاروست 75
3-3-1-4-1 3 روش کار 75
3-3-1-4 لام گیری 76
3-3-1-5 رنگ آمیزی 76
3-3-1-5-2 روش انجام کار 76
3-3-1-6 لام مناسب برای انالیز 77
3-3-2 مواد مورد نیاز و روش های بکارگرفته شده جهت آنالیز مولکولی 80
3-3-2-1-4 نحوه خالص سازی نمونه های آلوده به پروتئین 85
3-3-2-1-4-1 روش کار 85
3-3-2-3 آنالیز ساترن بلات 90
3-4 آنالیز پیوستگی جهت بررسی جایگاه های شناخته شده میکروسفالی 101
3-4-1 نقشه یابی بر اساس هموزیگوسیتی 101
3-4-1-1 روش انتخاب مارکرها 101
3-4-1-1-1 تعیین هتروزیگوسیتی مارکرهای STRs به طور تقریبی در جمعیت ایران 105

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

3-4-2 روش PCR 105
1-3-4-2 مواد اولیه واکنش PCR 106
3-4-2-2 الکتروفورز محصول PCR روی ژل پلی اکریل امید 108
3-4-2-2 مواد لازم جهت الکتروفورز ژل پلی اکریل امید 108
3-4-2-2-1 طرز تهیه ژل اکریل امید 8 درصد 110
3-4-2-2-2 رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره 111
3-4-2-2-1 مواد لازم جهت رنگ آمیزی نقره 111
3-4-2-2-2 روش رنگ آمیزی نیترات نقره 112
3-4-3 Homozygosity mapping در خانواده های میکروسفال 112
3-4-4 پیدا کردن موتاسیون به روش مستقیم در ژن ASPM (لکوس MCPH 5) 113
3-4-4-1 الکترو فورز محصول PCR بر روی ژل آگارز 119
3-4-4-1-1 مواد لازم جهت انجام الکتروفورز DNA برروی ژل آگارز 1/2% 120
3-4-4-1-1-1 روش کار 120
3-4-4-2 روش آنالیز نتایج حاصل از Sequencing 121

فصل چهارم: توصیف و تحلیل داده ها 122
4-1 نتایج حاصل از مطالعات کروموزومی 123
4-2 نتایج حاصل از تست های PCR و ساترن بلات برای Fragile X 124
4-3 نتایج حاصل از مطالعات آنالیز پیوستگی 127
4-3-1 مارکر های دارای فرکانس اللی بالا تر 127
4-3-2 نتایج نقشه یابی براساس هموزیگوسیتی در خانوادهای میکروسفال استان گلستان 128

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری و پیشنهادات 152
5-1 بحث 152
5-2 نتیجه گیری 162
5-3 پیشنهادات 163

فهرست منابع مآخذ 164

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

فصل اول

کلیات تحقیق

1-1 بیان مسأله

مسأله تعریف عقب ماندگی ذهنی از جمله دشواری هایی بود که تا سال های پیش تعریف کامل و جامعی که مورد قبول همه باشد، ارائه نشده بود. چنانچه اگر یک مروری بر تعاریف گذشته داشته باشیم، مشاهده می شود که گروهی عقب ماندگی ذهنی را زاییده تغییرات بیوشیمیایی در مغز می دانستند و عده ای هم معتقد بودند که عقب ماندگی ذهنی بیشتر از وضعیت اجتماعی و مقایسه فرد با معیارهای اجتماعی سرچشمه می گیرد. تلاقی همین دیدگاه های متفاوت موجب می شد که عقب ماندگی ذهنی از نظرمکاتب مختلف مفهوم واحدی نداشته باشد.

اما تعریفی که امروزه مورد قبول همگان می باشد، توسط انجمن عقب ماندگی ذهنی آمریکا[1] در سال 1992 ارائه گردید؛ بنابراین تعریف، به فردی عقب مانده ذهنی گفته می شود که دارای 3 ویژگی زیر باشد(1) :

1. سطح ضریب هوشی (IQ)[2] پایین تر از 70 تا 75
2. محدودیت در یک یا چندین مهارت تطابقی[3]
3. بروز هر یک از علایم ذکر شده در سن زیر 18 سالگی

انجمن عقب ماندگی ذهنی آمریکا در سال 1992، این بیماری را به چهار گروه تقسیم کرد که امروزه این تقسیم بندی مورد پذیرش همگان می باشد (1).

چنانچه در جدول1-1 مشاهده می کنید، طبقه بندی عقب ماندگی ذهنی و شیوع آنها به طور متوسط در جمعیت جهان نشان داده شده است (2).

1- (AAMR) American Association of Mental Retardation
2- Intelligence quotient
3- منظور از این مهارت ها، همان کارهایی است که هر فرد برای زندگی و کار در اجتماع به آن نیاز دارد.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول1-1| طبقه بندی عقب ماندگی ذهنی و شیوع آنها را نشان می دهد (2)

تقسیم بندی	IQ	سطح تحصیل	شدت نیاز به حمایت	شیوع در جمعیت
خفیف	55 تا 70	تحصیل پذیر	متناوب	%0/9 تا 2/7 %
متوسط	40 تا 54	آموزش پذیر	محدود	%0/3 تا %0/4
شدید	25 تا 39	غیرقابل آموزش	وسیع	
بسیار شدید	<25	غیرقابل آموزش	مداوم، گسترده	

بر اساس آمار WHO در سال 1994 تقریباً 156 میلیون نفر یعنی 3% از جمعیت جهان مبتلا به عقب ماندگی ذهنی بودند که میزان فراوانی آنها در جدول2-1 نشان داده شده است (3):

جدول2-1| فراوانی افراد مبتلا به عقب ماندگی ذهنی براساس آمار WHO

آفریقا	20/310/000
استرالیا	5/250/000
آسیا	97/710/000
اروپا	15/390/000
آمریکای لاتین	13/800/000
آمریکای شمالی	8/610/000

بطور کلی نسبت عقب ماندگی ذهنی در هر کشوری بین2-4 درصد متغیر می باشد (2).

عقب ماندگی ذهنی می تواند در هر دوره و شرایطی از جمله در زمان تکامل مغزی قبل از تولد، دوران جنینی، بعد از تولد و ...ایجاد گردد. لوکاسون و همکارانش درسال 1992 بیش از350 عامل درگیر در ایجاد عقب ماندگی ذهنی را شناسایی کردند (1) .

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

علل عقب ماندگی ذهنی را می توان به دو دسته عوامل غیر ژنتیکی و عوامل ژنتیکی تقسیم کرد: عوامل غیر ژنتیکی شامل عــوامل دوران بارداری مانند عوامل عفونت زا و ضربه (تروما) ، بیماری ها و آسیب های دوران کودکی و درآخر فاکتورهای محیطی مانند تشعشعات رادیویی، بدی تغذیه و سایر فاکتورهای بیولوژیکی می‌توانند منجر به بروز عقب ماندگی ذهنی شوند. با کمرنگ شدن نقش عوامل غیر ژنتیکی و پیشرفت در زمینه تحقیقات ژنتیک، در سالهای اخیر مشخص شده است که بخش عمده ای از عقب ماندگی ذهنی ناشی از اختلالات ژنتیکی می باشد. عوامل ژنتیکی تقریباً 70 درصد از علل عقب ماندگی ذهنی را تشکیل می دهند(5). عوامل ژنتیکی عقب ماندگی ذهنی عبارتند از: بیماریهای چند عاملی، ناهنجاری های کروموزومی و بیماری های تک ژنی. ازاین میان علت 4 تا 28 درصد از عقب ماندگی های ذهنی ناهنجاری های کروموزومی میباشد(6). ناهنجاری های کروموزومی به دو شکل شمارشی و ساختمانی بروز می کنند.در نوع شمارشی تغییر در تعداد کرومزومها باعث اختلال میگردد و در نوع ساختمانی تغییر در شکل کروموزومها به صورت جابجایی های کروموزومی حذف و مضاعف شدن و وارونگی های کروموزومی باعث ایجاد عقب ماندگی ذهنی میشوند.اختلالات تک ژنی که عامل تقریباً 40 تا 50 درصد عقب ماندگی های ذهنی است و به دو شکل وابسته به جنس و اتوزومال بروز می کنند(7). عقب افتادگی های ذهنی وابسته به جنس به گروهی ازعقب ماندگی ذهنی اشاره دارد که در نتیجه نقص در ژن هایی که روی کروموزوم X قرار دارند ایجاد می شوند و عقب افتادگی های ذهنی اتوزومال به گروهی ازعقب ماندگی ذهنی اشاره دارد که در نتیجه نقص در ژن هایی که روی کروموزومهای اتوزومال قرار دارند ایجاد می شوند (8).

در مطالعات گذشته جایگاه های ژنی عقب ماندگی ذهنی اتوزومی و وابسته به جنس مورد بررسی قرار گرفت و نتایج این مطالعات به کل جامعه ایران تعمیم داده شد(9).با توجه به نمونه های محدود مورد بررسی در این مطالعات و تمرکز نداشتن بر روی منطقه جغرافیایی خاص در این تحقیق برانیم تا با متمرکز شدن بر روی منطقه جغرافیایی خاص و با انتخاب نمونه های بیشتر علل عقب ماندگی ذهنی ژنتیکی را در استان گلستان مورد بررسی قرار دهیم.

1-2 اهمیت و ضرورت تحقیق

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

عقب ماندگی ذهنی 10 برابر شایع تر از فلج مغزی ، 28 برابر شایع تر از نقایص لوله عصبی و 25 برابر شایع تر از نابینایی و 50 برابر شایع تر از ناشنوایی است (10).طی تحقیقی که در سال 2003 در ایالات متحده صورت گرفت تخمین زده شد هزینه ای را که دولت برای افراد عقب مانده ذهنی متولد شده در سال 2000 تا پایان عمرشان باید بپردازد حدود 51/2 بیلیون دلار است. شیوع عقب ماندگی ذهنی و پرداخت این هزینه های کلان محققین را بر آن داشت که در سالهای اخیر مطالعات بیشتری بر روی علل عقب ماندگی ذهنی انجام دهند تا با شناسایی این عوامل، راه کارهایی را برای پیشگیری از بروز این مشکل ارایه دهند. با توجه به نتایج مطالعات صورت گرفته مشخص شد که یکی از علل مهم عقب ماندگی ذهنی ژنتیکی ازدواج های خویشاوندی است (11). انجام این ازدواج ها در ایران شایع می باشد، بنابراین تولد کودکان مبتلا به عقب ماندگی ذهنی از شیوع بالایی برخوردار است. در طی سالهای گذشته محققین ایرانی نیز مطالعاتی در مورد عوامل ایجاد کننده عقب ماندگی ذهنی انجام داده اند، اما در این تحقیقات تمرکز کمتری بر روی استانی خاص بوده است.در این تحقیق برآنیم تا با تمرکز بر روی یکی از استانهای شمالی کشور به نام استان گلستان که دارای تنوع نژادی بالایی نیز می باشدجامعه مورد تحقیق خود را انتخاب کنیم. تا با شناسایی علل عقب ماندگی ذهنی ژنتیکی (کرموزومی، اتوزومال و وابسته به جنس) این استان، پزشکان و مشاورین ژنتیک بتوانند با انجام مشاوره ژنتیک صحیح نسبت به درمان، پیشگیری و کنترل این عارضه اقدامات منطقی تری انجام دهند.

1-3 هدف از اجرای تحقیق

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

1-3-1 اهداف کلی

شناسایی علل عقب ماندگی ذهنی ژنتیکی (کروموزومی، اتوزومال و وابسته به جنس) در استان گلستان از مهر 85 تا شهریور 86

1-3-2 اهداف اختصاصی

1. شناسایی علل عقب ماندگی ذهنی کروموزومی در استان گلستان
2. شناسایی علل عقب ماندگی ذهنی اتوزومی در استان گلستان
3. شناسایی علل عقب ماندگی ذهنی وابسته به جنس در استان گلستان

1-3-3 اهداف کاربردی

1. با شناسایی علل عقب ماندگی ذهنی ژنتیکی (کروموزومی، اتوزومال و وابسته به جنس) در استان گلستان می توان از طریق آگاه‌سازی خانواده های در گیر با ارائه خدمات مشاوره ژنتیک از طریق توضیح ریسک خطر، از ابتلای فرزندان دیگر به عقب ماندگی ذهنی پیشگیری کرد.
2. تشخیص پیش از تولد در موارد قابل اجرا شامل اختلالات کروموزومی، سندرم X شکننده و ... انجام شود.

1-4 سوال ها و فرضیه ها

سوال ها

1. چه سهمی از عقب ماندگی ذهنی ژنتیکی استان گلستان ناشی از عقب ماندگی ذهنی با اختلالات کروموزومی است.
2. چه سهمی از عقب ماندگی ذهنی ژنتیکی استان گلستان ناشی از عقب ماندگی ذهنی اتوزومی است.
3. چه سهمی از عقب ماندگی ذهنی ژنتیکی استان گلستان ناشی از عقب ماندگی ذهنی وابسته به جنس است.

1-5 روش شناسی تحقیق

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

1-5-1 نوع مطالعه

بنیادی – کاربردی

1-5-2 جامعه و نمونه آماری و روش نمونه گیری

جامعه و نمونه مورد تحقیق بیماران عقب مانده ذهنی استان گلستان بودند که از طریق شناسایی خانواده ها و مراکز نگهداری کودکان عقب مانده ذهنی زیر نظر بهزیستی کل استان گلستان، پرسشنامه و رسم شجره نامه نمونه گیری انجام شد.

1-5-3 روش جمع آوری داده ها

1. جمع آوری و بررسی پرسشنامه ها
2. جمع آوری و بررسی نتایج آزمایشات و تجزیه و تحلیل آنها

1-5-4 متغیرها

1-5-4-1 متغیرهای مستقل

1. علل ژنتیکی: عوامل ژنتیکی ایجادکننده عقب ماندگی ذهنی با تغییر در ساختمان کروموزمها و ژنها باعث ایجاد عقب ماندگی می شوند.
2. جنسیت افراد مبتلا: این که فرد مبتلا مرد یا زن باشد.
3. تعداد افراد مبتلا در خانواده: در هر خانواده چند فرد مبتلا به عقب ماندگی ذهنی وجود دارد.
4. ازدواج خویشاوندی

1-5-4-2 متغیرها ی وابسته

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

1. عقب ماندگی ذهنی کروموزومی: ناهنجاری های کروموزومی به دو شکل شمارشی و ساختمانی بروز می کنند.در نوع شمارشی تغییر در تعداد کرومزومها باعث اختلال میگردد و در نوع ساختمانی تغییر در شکل کروموزومها به صورت جابجایی های کروموزومی حذف و مضاعف شدن و وارونگی های کروموزومی باعث ایجاد عقب ماندگی ذهنی میشوند.
2. عقب ماندگی ذهنی اتوزومی: عقب افتادگی های ذهنی اتوزومی به گروهی ازعقب ماندگی ذهنی اشاره دارد که در نتیجه نقص در ژن هایی که روی کروموزومهای اتوزومال قرار دارند ایجاد می شوند.
3. عقب ماندگی ذهنی وابسته به جنس: عقب افتادگی های ذهنی وابسته به جنس به گروهی ازعقب ماندگی ذهنی اشاره دارد که در نتیجه نقص در ژن هایی که روی کروموزوم X قرار دارند ایجاد می شوند.

1-5-5 روش اجرا

1. برقراری ارتباط با مراکز مشاوره و مراکزی که با کودکان عقب مانده ذهنی در ارتباط باشند مانند مراکز نگهداری کودکان عقب مانده ذهنی که زیر نظر بهزیستی کل استان گلستان هستند.
2. بررسی پرونده های بالینی موجود و شناسایی خانواده هایی که دو و بیشتر فرزند عقب مانده ذهنی دارند(برای بررسی علل عقب ماندگی ذهنی ژنتیکی، موارد تک موردی عقب ماندگی ذهنی ممکن است به علت عوامل غیر ژنتیکی ایجاد شوند).
3. گرفتن فرم رضایت نامه مطابق با مصوبات کمیته اخلاق دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی.
4. نمونه گیری و تشکیل پرونده.
5. استخراج DNA از نمونه های گرفته شده.
6. انجام تست مولکولی سندروم X شکننده که شامل تست مولکولی PCR وساترن بلات می باشد.
7. انجام کاریوتایپ.
8. چنانچه جواب تست مولکولی سندرم X شکننده در مورد افراد مبتلا منفی بود و کاهش دراندازه دورسر بیماران مشاهده شد، جایگاه های شایع بیماری میکروسفالی با روش linkage بررسی میشود.
9. جمع آوری داده ها و تجزیه و تحلیل آنها.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

1-5-6 روش تجزیه و تحلیل داده ها

از آنجاییکه هدف از این پا یان نامه شناسایی علل مختلف عقب ماندگی ذهنی شامل کروموزومی، اتوزومی و وابسته به جنس می باشد و تنوع این موارد رابطه ای با نوع استان مورد بررسی ندارد و هدف صرفا شناسایی این علل می باشد، لذا با توجه به حجم پایین هر گروه از این بیماری ها در این تحقیق، روش آماری خاصی مورد استفاده قرار نمی گیرد، و هدف تعیین سهم این بیماری ها در بروز عقب ماندگی ذهنی ژنتیکی در استان مربوطه است.

1-5-7 ملاحظات اخلاقی

با توجه به اینکه کلیه طرحهای مرکز تحقیقات ژنتیک در کمیته اخلاقی پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده است این پروژه بر اساس گرفتن فرم رضایت نامه و رعایت کلیه موازین اخلاقی اجرا می گردد.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

فصل دوم

پیشینه تحقیق

عوامل ژنتیکی عقب ماندگی ذهنی را می توان به دو گروه اصلی تقسیم کرد: ناهنجاری های کروموزومی و بیماری های تک ژنی که خود به دو دسته وابسته به جنس و اتوزومال تقسیم می شوند.

1-1 ناهنجاری های کروموزومی

در سال 1956[1] لوان و همکارش در مقاله خود تعداد کروموزوم های انسان را 46 عدد ذکر کردند، که این پروژه آنها بر روی سلول های جنین انسان انجام شده بود. تا سال 1959 تحقیقات بیشتری بر روی کروموزوم های انسان انجام شد و نظریه و طبقه بندی های گوناگونی ارائه شد. در سال 1966 در شیکاگو در سومین کنگره بین المللی ژنتیک انسانی در حالی که 37 محقق کارهای خود را در زمینه کروموزوم های انسانی ارائه دادند، یک دایره المعارف استاندارد برا ی کروموزوم های انسان پیشنهاد شد و نقش آنها در بیماری ها و ناهنجاری های کروموزومی مشخص گردید (12).

در سال 1968 کاسپرسون[2] روش رنگ امیزی کروموزوم ها را با روش کویناکرین[3] معرفی کرد. در سال 1971 کاسپرسون مقاله خود در مورد این نوع رنگ امیزی منتشر کرد، مبنی بر اینکه 24 نوع کروموزوم با الگوی بندینگ کویناکرین مطابقت دارد.

در همان سال سامنر و همکارانش[4]، روش رنگ امیزی گیمسا را برای رنگ آمیزی کروموزوم های متافازی را منتشر کرد، که این نوع رنگ امیزی هم گامی بزرگ برای پیشرفت سیتوژنتیک بود. روش رنگ امیزی G banding در سال های بعد کامل تر شد تا اینکه امروزه هم به عنوان روشی استاندارد در باند کردن آنالیز کروموزوم های متافازی استفاده می شود.

1- Tjio and Levan
2- Caspersson et al
3- Quinacrine Mustard
4- Sumner et al

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

یک گروه 50 نفری شامل محققان ژنتیک در چهارمین کنگره بین المللی ژنتیک انسانی درپاریس گرد هم آمدند، و روشی استاندارد در شناسایی تمام کروموزوم های انسانی با استفاده از الگوی بندینگ ارائه دادند.

در پنجمین کنگره بین المللی ژنتیک انسانی که در مکزیکوسیتی برگزار شد، یک دایره المعارف جامع که شامل سیستم های نام گذاری روش ها، ناهنجاری های کروموزومی پیشنهاد شد، و این پیشنهاد توسط کمیته ژنتیک در استوکهلم در سال 1977 دنبال شد تا اینکه اولین کتابچه بین المللی در زمینه سیتوژنیک انسانی تحت عنوان ISCN1 در سال 1978 به محققان عرضه شد (12).

بسیاری از سندروم های مشهور و مهم که در عقب ماندگی ذهنی به چشم می خورند دارای ناهنجاریهای کروموزومی هستند و انواع مختلف ناهنجاریهای کروموزومی اعم از ناهنجاریهای ساختاری مثل حذف2 و یا ناهنجاریها در شمارش کروموزومی، نقش مهمی در 4 تا 28 درصد اتیولوژی عقب ماندگی ذهنی بر عهده دارند.

1-1-1 آنیوپلوئیدی

در میان این سندروم ها می توان به سندروم داون اشاره نمود که شایع ترین فرم ایجادکنندهٔ عقب ماندگی ذهنی می باشد. همچنین این سندروم شایع ترین اختلال کروموزومی است که تاکنون گزارش شده است (12). از دیگر اختلالات می توان به تریزومی 18 اشاره نمود که موجب بروز عقب ماندگی ذهنی به همراه اختلالات شدید قلبی می شود. سندروم دیگر فریاد گربه (**Cri du Chat**) نام دارد که حدود 1% بیماران عقب مانده ذهنی به آن مبتلا می باشند. این سندروم در اثر حذف بخشی از بازوی کوچک کروموزوم 5 اتفاق می افتد و جزو ناهنجاریهای ساختاری است(13).

1-1-2 ناهنجاری کروموزومی در ناحیه تلومر

حذف های کوچک در نزدیکی تلومر عامل 5 تا 10 درصد از اتیولوژی عقب ماندگی ذهنی می باشند . همچنین ممکن است که این حذف ها عامل مهم عقب ماندگی های ذهنی فامیلی به شمار آیند. حذف هایی نیز در ناحیه تلومر دیده شده که هیچگونه ارتباطی با عقب ماندگی های ذهنی نداشته اند ولی در هر صورت، بیمارانی که فنوتیپ عقب ماندگی ذهنی دارند، ناحیه تلومرکروموزوم مورد بررسی قرار می گیرد (13و14و15و16 17و18و19و20و21).

An International System for Human Cytogenetic Nomenclature -1
Deletion-2

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

3- 1-1 ناهنجاریهای ساختاری کروموزومها

نوآراییهای ساختاری[1] از شکست کروموزومها و سپس بازسازی آنها در یک ترکیب غیر طبیعی نتیجه می شود. نوآرایی از راههای متعددی می تواند رخ دهد که تمامشان از انیوپلوئیدی نادرترند ; معمولترین نمونه نوارائی جابجائی[2] متوازن رابرتسونی[3] است که 1در هر 1500 نوزاد دیده می شود.

نوارایی های ساختاری را تحت عنوان متعادل[4] یا غیر متعادل[5] تعریف می کنند. برخی از نوآرایی ها پایدارند، یعنی می توانند بدون تغییر طی تقسیم سلولی منتقل می شوند، در حالیکه بقیه ناپایدارند. برای پایدار بودن، یک نوآرایی کروموزومی باید عناصر ساختاری طبیعی، شامل یک سانترومر و دو تلومر، داشته باشیم.

1- 3- 1-1 نوارایی‌های نامتعادل

در نوارایی‌های کروموزومی به خاطر بروز دوپلیکاسیون[6]، حذف و یا هر دو فنوتیپ احتمالا غیر طبیعی است. تکرار بخشی از یک کروموزوم، با تریزومی جزئی قابل مقایسه است؛ حذف منجر به مونوزومی جزئی می شود. هر تغییری که توازن عادی ژنهای فعال را برهم زند می تواند به نمو غیر طبیعی بیانجامد.

1-1 - 3- 1-1 حذف

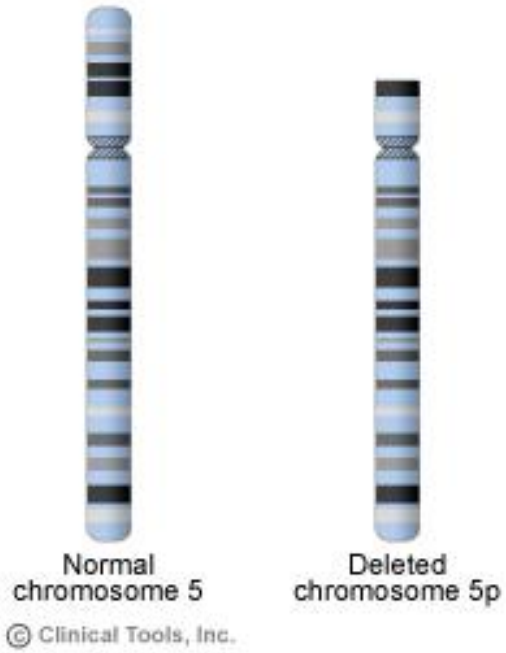
حذف[7] فقدان قطعه ای از یک کروموزوم است که به عدم تعادل کروموزومی منجر می شود. فرد حامل یک کروموزوم دارای حذف (یک کروموزوم طبیعی و یک کروموزوم دچار حذف) در اطلاعات ژنتیکی قطعه مطابق بر روی کروموزوم طبیعی همی زیگوت است. پیامد های بالینی این رویداد به اندازه قطعه حذف شده، یا تعداد و عملکرد ژنهای این قطعه بستگی دارد.

حذف ممکن است انتهایی یا بینابینی باشد. حذفها میتوانند بسادگی از شکستن و فقدان قطعه بدون سانترومر ناشی شوند. از طرف دیگر کراسینگ اور نابرابر بین کروموزومهای همساخت یا کروماتیدهای خواهری، که قرار گیری آنها در مقابل هم درست نباشد، در برخی موارد به عنوان علت حذف ذکر شده است. حذفهای کوچکتر از حد قابل مشاهده در گستره کروموزومهای متافازی را توسط تکنیکهای بندینگ با قدرت

1- Structural rearrengment
2- Traslocation
3- Robertsonian
4- Balanced
5- Unbalanced
6- Duplication
7- Deletion

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

زیاد می توان نشان داد. برای انکه یک حذف از راه سیتوژنتیکی توسط بندینگ با قدرت تفکیک زیاد، قابل تشخیص باشد حداقل باید5000 کیلو باز را فرا گیرد؛ اما حذف های با پیامد های فنوتیپی که از راه تهیه کاریوتیپ قابل مشاهده نیستند توسط تکنیکهای سیتوژنتیک مولکولی تشخیص داده می شوند. حذف های کوچکتر درون ژنی یا حذفهایی که چندژن مجاور را فرا می گیرند از مکانیسم های شناخته شده جهش به شمار می روند.



شکل1-2 شماتیکی از یک حذف در کروموزوم. (13)

در بررسی بیماران دچار بدشکلی و در تشخیص پیش از تولد، حذفهای بسیاری شناسایی شده اند، ولی دانش مربوط به ژنهای از دست رفته در قطعات حذف شده و رابطه آنها با پیامد های بالینی در حال حاضر بسیار محدود است.

2-1 - 3- 1-1 دوپلیکاسیون

دوپلیکاسیون نیز مانند حذف می تواند از کراسینگ اور نا برابر و یا تفکیک غیر عادی در تقسیم میوزی فرد حامل جابجایی یا وارونگی ناشی شود. در کل به نظر میرسد که دوپلیکاسیون کمتر از حذف زیانبخش است. اما چون دوپلیکاسیون در سلولهای جنسی موجب عدم توازن کروموزومی می شود و چون شکستگی

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com