بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه علوم بهزیستی و توان بخشی
گروه ژنتیک

پایا ن نامه کارشناسی ارشد ژنتیک

بررسی اختلالات کروموزومی ساب تلومریک در ۲۰ بیمارعقب مانده ذهنی باعلت نامشخص بااستفاده ازروش هیریداسیون فلورسانس درجا (FISH)

نگارش : جواد انصاری
استاد راهنما : دکتر فرخنده بهجتی
استاد مشاور: دکتر کیمیا کهریزی

تابستان ۱۳۸۷
شماره ثبت: 132-1000

حمد سپاس خداوند بلند مرتبه ای را که پیوسته از لطف و کرمش بهره مند بوده ام امید آنکه به دیده منت از کوتاهیها و لغزشهایم بگذرد.

تقدیم به:

پدر، مادر و همسر عزیزم

که صبوریشان در وصف نگنجد و توان

بی پایان گامهایم از سحر نفسهایشان

است.

با تقدیر و تشکر از راهنمایی ها و زحمات دلسوزانه و بی دریغ اساتید گرامی

دکتر بهجتی

دکتر کهریزی

دکتر نجم آبادی

و

سرکارخانم قاسمی

و از اساتید محترمی که افتخار بهره گیری از محضر شان را داشتم، همچنین از سرکار خانم جلالوند مسئول آزمایشگاه و همه فعالان در مرکز تحقیقات ژنتیک که صمیمانه با من همکاری نمودند.

مقام فرزانگی زیبنده روزگارشان باد

چکیده:

اتیولوژی عقب ماندگی ذهنی هتروژن و اکثرا علت ژنتیکی دارد. باهنجاریهای کروموزومی علت ۴-۲۸ در صد کلیه عقب ماندگی های ذهنی و ۲۰-۴۰ در صد نوع شدید و ۱۰ در صد نوع ملایم عقب ماندگی ذهنی می باشد. اکثر ناهنجاریهای کروموزومی غیر متعادل از نوع اتوزومی در ارتباط با عقب ماندگی ذهنی می باشند. با روش های روتین سیتوژنتیک با قدرت تفکیک بالای باندینگ GTG می توان ناهنجاریهای کروموزومی تا 4Mbp را تشخیص داد ولیکن برای ناهنجاریهای کوچکتر کروموزومی بایستی از تکنیک های سیتوژنتیک مولکولی از جمله هیبریداسیون فلورسانس درجا FISH استفاده نمود .

نواحی انتهایی کروموزوم ها غنی در ژن می باشند ومطالعات مختلف دال برآن دارند که ناهنجاریهای این نواحی می توانند یکی از عوامل اصلی ایجاد عقب ماندگی ذهنی باشند. امروزه با استفاده از پروب های ساب تلومریک ویژه هر یک از کروموزوم های چندین سندرم جدید شناسایی شده اند. بعنوان مثال سندرم حذف 1P36 (انتهای بازوی کوتاه کروموزم ۱) و سندرم حذف 13.3 2q (انتهای بازوی بلند کروموزوم ۲۲) و چندین ناهنجاری در ارتباط با ناهنجاریهای ساب تلومریک کروموزوم شناسایی شده اند.

گزارش های مختلف نشان داده که با استفاده از روش های FISH می توان ناهنجاری ساب تلومریک های کروموزومی را در ۴ الی ۳۵ درصد موارد عقب مانده ذهنی با علت نامشخص تشخیص داد و 50 70% این موارد از نوع ارثی گزارش شده است. این در حالی است که روش های روتین سیتوژنتیک کاریوتایپ این موارد را نرمال گزارش داده اند.

در مرکز تحقیقات ژنتیک طبق یک طرح پژوهشی برای بررسی ناهنجارهای کروموزومی در ۱۴۷ بیمار عقب ماندهذهنی با استفاده از روشهای روتین سیتوژنتیک میزان ناهنجاریهای کروموزومی ۷درصد گزارش شد. متعاقباً بمنظور دقیق تر نمودن میزان ناهنجاریهای کروموزومی در بیماران عقب مانده ذهنی ارجاعی به این مرکز طرح پژوهشی کنونی پیشنهاد گردید. در این طرح با استفاده از روش هیبریداسیون فلورسانس در جا ناهنجاری های ساب تلومریک کروموزومی در۲۰ نمونه واجد کاریوتایپ نرمال مورد بررسی قرار گرفتند. بیماران انتخاب شده دارای و ضریب هوشی کمتر از ۷۰و اکثر بیماران فاقد دیسمورفیسم بودند و هیچکدام سندرم ژنتیکی خاصی نداشتند.

جواب آزمایش برای ۱۳ بیمار موفقیت آمیز بود که برای ۱۱ نفر آنها نتایج نرمال بود در حالیکه ۲ نفر (۱۵٪) ناهنجاری ساب تلومریک نشان دادند. هر دو بیمار از دو خانواده مختلف با ازدواج خویشاوندی و وجود افراد مبتلای دیگر در خانواده و بدون دیسموفیسم خاصی بودند. در بیماراول انتهای بازوی کوتاه هر

دو همولوگ کروموزوم ۲۰ با پروب ویژه ساب تلومریک بازوی بلند ۱۹ سیگنال مثبت نشان داد. و بنابراین بیمار تترازومی برای ناحیه ساب تلومریک بازوی بلند کروموزوم ۱۹ می باشد. در بیمار دیگر انتهای بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ / ۱۸ با پروب ویژه ساب تلومریک بازوی بلند کروموزوم ۹ سیگنال مثبت نشان داد . در نتیجه این بیمار تریزومی برای ناحیه ساب تلومریک بازوی بلند کروموزوم ۹ می باشد.

برای اینکه مشخص گردد که این ناهنجاری های ساب تلومریک علت بیماری هستند و یا اینکه پلی مورفیسم می باشند، لازم است که والدین مورد بررسی ساب تلومریک FISH برای کروموزوم های درگیر قرار بگیرند. در مواردی که ارثی بودن ناهنجاری تشخیص داده شود تشخیص قبل از تولد به والدین توصیه می گردد.

ضروری است که در آینده تعداد بیماران بیشتری با عقب‌ماندگی ذهنی با علت نامشخص مورد بررسی قرار گیرند تا آمار دقیق تری از فراوانی این ناهنجاری در میان بیماران ایرانی بدست بیاید. لازم به ذکر است که انجام چنین پروژه ای باعث راه اندازی تکنیک FISH برای اولین بار در مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی گردید.

لغات کلیدی: عقب ماندگی ذهنی با علت نامشخص، ناهنجاریهای کروموزومی، ، ساب تلومریک FISH

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: کلیات تحقیق ۱

۱-۱-بیان مسئله ۲

۱-۲-اهمیت و ضرورت ۳

۱-۳-تعریف واژه ها ۵

۱-۳-۱ - پلی مورفیسم ۵

۱-۳-۲-عقب ماندگی ذهنی با علت نامشخص ۵

۱-۴ - هدف از اجرای تحقیق ۶

۱-۴-۱ – اهداف کلی ۶

۱-۴-۲- اهداف فرعی ۶

۱-۴-۳- اهداف کاربردی ۶

۱-۵- سؤال ۶

۱-۶- فرضیه ۶

فصل دوم : مروری بر مطالعات گذشته ۷

تاریخچه ۸

۲-۱- تعریف عقب ماندگی ذهنی (Mental Retardation) ۹

۲-۲- سطوح عقب ماندگی ذهنی ۱۰

۲-۳-انواع عقب ماندگی ذهنی ۱۰

۲-۴- علل عقب ماندگی ذهنی ۱۱

۲-۴-۱- عوامل وراثتی ۱۳

۲-۵- شیوع اختلالات ژنتیکی ۱۳

۲-۶- انواع اختلالات ژنتیکی در اتیولوژی عقب ماندگی ذهنی ۱۴

۲-۷- ناهنجاریهای ساختاری کروموزومها ۱۴

۲-۷-۱- نواراییهای نا متعادل ۱۵

۲-۷-۱-۱- حذف ۱۵

۲-۷-۱-۲- مضاعف شدن ۱۵

۲-۷-۱-۳- کروموزوم های حلقوی ۱۶

۲-۷-۱-۴- ایزو کروموزوم ها ۱۶

۲-۷-۱-۵- کروموزومهای دوسانترومری ۱۶

۲-۷-۲- نواراییهای متعادل ۱۷

۲-۷-۲-۱-واژگونی ها ۱۷

۲-۷-۲-۲- جابجایی ۱۸

۲-۷-۲-۲-۱- جابجایی متقابل ۱۸
۲-۷-۲-۲-۲- جابجایی روبرتسونی ۱۸
۲-۷-۲-۳- دخول ۱۹
۲-۷-۲-۴-کروموزوم های نشانگر ۱۹
۲-۸-نقش اختلالات کروموزومی در عقب ماندگی ذهنی ۲۰
۲-۸-۱- آنیوپلوئیدی ۲۰
۲-۸-۲- ناهنجاری کروموزومی در ناحیه ساب تلومر ۲۰
۲-۹- ناحیه ساب تلومریک کروموزوم ۲۱
۲-۱۰- مطالعه نوارایی ساب تلومرهادر بیماران عقب مانده ذهنی ۲۳
۲-۱۰-۱- مطالعه نوارایی ساب تلومرها در ۱۳۲ بیمار عقب مانده ذهنی با علت نامشخص در دانمارک ۲۳
۲-۱۰-۲- بررسی نوارایی ساب تلومریک در بیماران عقب مانده ذهنی در آلمان ۲۴
۲-۱۰-۳- بررسی ناهنجاریهای ساب تلومریکی در ۳۹ بیمار عقب مانده ذهنی در چین ۲۶
۲-۱۰-۴- بررسی میزان نوآرائی ساب تلومریک در ۲۱۹ بیمار عقب مانده ذهنی با علت نامشخص و کاری و تیپ نرمال در ایتالیا ۲۶
۲-۱۰-۵- تخمین و ارزیابی فراوانی نوآرائی های ساب تلومریک در ۱۸ بیمار عقب مانده ذهنی بدون علت مشخص تک گیر (sporadic) و غیرسندرمی (non-syndromic) در آمریکا ۲۶
۲-۱۰-۶- ناهنجاری های کروموزومی ساب تلومریک در ۱۰ بیمار عقب مانده ذهنی با علت نامشخص و خصوصیات دیمورفیک در کشور ترکیه ۲۷
۲-۱۰-۷- بررسی نوارایی ساب تلومریکی در ۲۵۰۰ بیمار عقب مانده ذهنی در وین ۲۷
۲-۱۰-۸- بررسی نواحی ساب تلومری ۱۱۶۸۸ مورد با استفاده از تکنیک FISH:بررسی الگو و فراوانی نوآرایی های ساب تلومریک در افرادی با ناهنجاریهای رشدی در آمریکا ۲۸
۲-۱۰-۹- فراوانی بالای نوارایی های ساب تلومریک در ۹۲ بیمار با عقب ماندگی ذهنی شدید و دیسمورفیسم در ایتالیا ۲۸
۲-۱۰-۱۰- بررسی مضاعف شدگی های ریزدر ناحیه ساب تلومریک به عنوان یکی ازعوامل عقب ماندگی ذهنی درهلند ۲۹
فصل سوم:مواد و روش تحقیق ۳۰
۳-۱- روش شناسی تحقیق ۳۱
۳-۱-۱- نوع مطالعه ۳۱
۳-۱-۲- جامعه آماری ۳۱
۳-۱-۳- نمونه برداری و روش نمونه گیری (sampeling) ۳۱
۳-۱-۴- معیارهای انتخاب بیماران ۳۲
۳-۱-۵- روش جمع آوری داده ها ۳۲
۳-۱-۶-ملاحظات اخلاقی ۳۲
۳-۱-۷- نمونه برداری جهت بررسی سیتوژنتیکی ۳۲
۳-۲- دستورالعمل کشت و هاروست خون محیطی ۳۲

۳-۲-۱- تهیه محیط کشت ۳۲
۳-۲-۱-۱- مقدار خون برای کشت در 5cc محیط کشت کامل ۳۳
۳-۲-۳- کشت با قدرت تفکیک بالا ۳۴
۳-۲-۳-۱- موارد مورد نیاز ۳۴
۳-۲-۳-۲-روش انجام کار ۳۴
۳-۲-۴- هاروست ۳۵
۳-۲-۴-۱- موارد مورد نیاز ۳۵
۳-۲-۴-۲-روش انجان کار ۳۶
۳-۳- لام گیری ۳۷
۳-۳-۱- آماده سازی لام ها ۳۷
۳-۳-۲- مرحله لام گیری ۳۷
۳-۳-۳- مرحله aging ۳۸
۳-۴- نوار بندی G(G-Banding) ۳۸
۳-۴-۱- مواد مورد نیاز ۳۸
۳-۴-۲- طرز تهیه رنگ گیمسا ۳۸
۳-۴-۳- طرز تهیه محلول PBS ۳۸
۳-۴-۴- روش انجام کار ۳۹
۳-۴-۵- آنالیز کروموزومی ۳۹
۳-۴-۶- لام مناسب برای آنالیز ۴۰
۳-۴-۷- استفاده از نرم افزار cytovision در آنالیزکروموزم های رنگ آمیزی شده ۴۲
۳-۵- ویژگی ها و توانائی های نرم افزار Cytovision ۴۲
۳-۵-۱-قابلیت نرم افزاربرای کاریوتیپ ۴۲
۳-۵-۲-قابلیت نرم افزاربرای FISH ۴۲
۳-۶- تکنیک FISH ۴۳
۳-۶-۱- انواع برچسب های (LABEL) مورد استفاده در روش هیبریداسیون درجا ۴۴
۳-۶-۲- برچسب رادیواکتیو ۴۴
۳-۶-۳- برچسب غیررادیواکتیو ۴۵
۳-۶-۳-۱- برچسب غیر رادیواکتیو نوع مستقیم ۴۵
۳-۶-۳-۲- برچسب غیر رادیواکتیو نوع غیرمستقیم ۴۵
۳-۶-۳-۲ -۱ سیستم بیوتن – استرپتواویدین ۴۵
۳-۶-۳-۲-۲- سیستم دیگوکسی ژنین ۴۵
۳-۶-۳-۲-۳ -سیستم برچسب زنی فلورسانس ۴۶
۳-۶-۳-۲-۴- سیستم های شناسایی برچسب های فلورسانت ۴۶
۳-۶-۴-انواع روش های تولید برچسب ۴۷

۳-۶-۴-۱- برچسب زدن زنجیره جدید DNA یا RNA در هنگام سنتز به صورت in vivo ۴۸
۳-۶-۴-۲- برچسب زدن به روش برچسب انتهایی ۴۸
۳-۶-۴-۳-برچسب زدن DNA با استفاده از ترجمه شکاف ۴۸
۳-۶-۴-۴- برچسب زدن DNA با استفاده از آغاز اتفاقی ۴۹
۳-۶-۴-۵- روش برچسب زنی با استفاده از PCR(PRINS) ۴۹
۳-۶-۵- انواع پروب های (کاوشگران) مورد استفاده در روش هیبریداسیون فلورسانس ۴۹
۳-۶-۵-۱- پروب های رنگ آمیزی کروموزومی ۴۹
۳-۶-۵-۲- پروب های ترادف های تکراری ۵۰
۳-۶-۵-۳- پروب های تک لوکوسی ۵۰
۳-۶-۶- انواع حامل های مورد استفاده برای پروب هایFISH ۵۱
۳-۶-۷- پروب ها و حامل ها ۵۱
۳-۶-۷-۱- کاسمید ۵۲
۳-۶-۷-۲- کروموزوم های مصنوعی P1 و مشتق شده از P1 ..... ۵۲
۳-۶-۷-۳- کروموزوم های مصنوعی باکتری (BAC) ۵۳
۳-۶-۷-۴- کروموزوم مصنوعی مخمر YAC ۵۳
۳-۶-۷-۵- پروب های اولیگونوکلئوتید ۵۳
۳-۷- انواع مختلف روش های FISH ۵۴
۳-۷-۱- کاریوتایپ Spectral (SKY) ۵۴
۳-۷-۲- FISH چند رنگی (M-FISH) ۵۴
۳-۷-۳- FISH با استفاده از ریزش (Micro FISH) ۵۴
۳-۷-۴- هیبریداسیون ژنومی مقایسه (CGH) ۵۵
۳-۷-۵- روش هیبریداسیون در جای جلودار(PRINS) ۵۵
۳-۷-۶- روش باندینگ رنگی ۵۵
۳-۷-۷- FISH فیبری ۵۶
۳-۷-۸- ایمونوفنوتیپ مرکب و FISH ۵۶
۳-۷-۹- Microarrays ، ژنوتیپ نمودن با فروسانس تکنیک های مولکولی ۵۶
۳-۷-۱۰- FISH با استفاده از پروب های چندگانه ساب تلومریک (Multi-Telomer FISH) ۵۷
۳-۸- تکنیک هیبریداسیون فلورسانس درجا (FISH) و شیوه انجام پژوهش ۵۸
۳-۸-۱- تکنیک Chromoprobe Multiprobe- T System ۵۸
۳-۸-۲- مواد داخل هر کیت (شرکت Cyto Cell) ۵۸
۳-۸-۳- دستگاههای مورد نیاز ۵۸
۳-۸-۴- محلول های مورد نیاز ۵۹
۳-۸-۵- سیستم Chromoprobe Multiprobe- T System ۶۰
۳-۹- تهیه و آماده نمودن لام ها برای انجام FISH ۶۰

۳-۹-۱- سوسپانسیون خون محیطی ۶۰
۳-۹-۲- لام گیری ۶۱
۳-۹-۳- آماده سازی Multiprobe device and template slide ۶۲
۳-۹-۴- قرار دادن اسلاید Template روی Multiprobe Device ۶۳
۳-۹-۵- دناتوره کردن پروب و DNA هدف ۶۴
۳-۹-۵-۱ عوامل موثر در دناتوره کردن ۶۴
۳-۹-۶- هیبریداسیون ۶۵
۳-۹-۶-۱- عوامل مؤثر در هیبریداسیون ۶۵
۳-۹-۷- مراحل شستشوی بعد از هیبریداسیون ۶۷
۳-۹-۸- رنگ آمیزی کروموزوم ها و بررسی میکروسکوپی لام ۶۷
۳-۹-۹-ثبات سیگنال های لام های تمام شده ۶۸
۳-۹-۱۰ – بررسی میکروسکوپی ۶۸
۳-۹-۱۰-۱- آنالیز داده های FISH ۶۹
۳-۹-۱۰-۲- میکروسکوپ مورد استفاده ۶۹
فصل چهارم : نتایج تحقیق ۷۲
٤-۱- نتایج ۷۳
۴-۲- اطلاعات عمومی بیماران عقب مانده ذهنی این پژوهش ۷۳
۴-۳- نتایج ساب تلومریک FISH ۷۵
۴-۴- نمونه هایی از تصاویر گرفته شده توسط Cytovision ۸۲
فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری ۸۴
۵-۱- بحث ۸۵
۵-۲- نتیجه گیری ۸۶
منابع ۸۷

فهرست جداول

جدول ..... صفحه

جدول ۱-۱- فراوانی افراد مبتلا به عقب ماندگی ذهنی بر اساس آمار WHO ۴

جدول ۱-۲- سطوح مختلف عقب ماندگی ذهنی و درصد شروع هر کدام به جمعیت کل عقب مانده ها ۱۱

جدول ۱-۳- لیست مواد استفاده شده برای مراحل مختلف کشت، هاروست، لام گیری و باندینگ ۳۳

جدول ۲-۳- مشخصات نوارهای کروموزومی ۴۱

جدول ۳-۳- انواع برچسب های مورد استفاده در روش هیبریداسیون درجا ۴۴

جدول ۳-۴- انواع برچسب های غیر رادیواکتیو مورد استفاده برای پروب های DNA و RNA ۴۷

جدول ۵-۳- انواع حامل های مورد استفاده برای پروب های FISH ۵۱

جدول ۱-۴- وضعیت بیماران بررسی شده از لحاظ بالینی، کاریوتایپ و ساب تلومریک FISH ۷۴

جدول ۲-۴- بیمارانی که برای ساب تلومریک FISH غیر طبیعی بودند ۷۵

فهرست نمودارها

نمودار ..... صفحه

نمودار ۱-۲- فراوانی نوارایی ساب تلومریک در ۱۳۲ بیمار..... ۲۴

نمودار ۲-۲- میزان نوارایی ساب تلومریک در ۵۰ بیمار عقب مانده ذهنی در المان ۲۵

نمودار۳-۲: انواع نوارایی ساب تلومریک در ۵۰ بیمار عقب مانده ذهنی در المان ۲۵

فهرست تصاویر

شکل ..... صفحه

شکل ۱-۲- شماتیکی ازناحیه ساب تلومریک ۲۲

شکل ۱-۳- مراحل مختلف تهیه کاریوتیپ از خون محیطی: کشت و هاروست خون محیطی ۳۵

شکل ۲-۳- لام کروموزوم با پراکندگی کم ۴۰

شکل ۳-۳- لام کروموزوم با پراکندگی زیاد ۴۰

شکل ۴-۳- لام کروموزوم با یکنواختی مناسب ۴۰

شکل ۵-۳- سیستم شناسایی برچسب های فلورسانت با میکروسکوپ فلورسانس ۴۷

شکل ۶-۳- تصویر شماتیک مراحل مختلف آزمایش FISH ۵۷

شکل ۷-۳- شکل اسلاید Chromoprobe Multiprobe-T device ۶۲

شکل ۸-۳- شمایی از device و جایگاه پروب های ساب تلومریک ۶۳

شکل ۹-۳- اسلاید Chromoprobe Multiprobe-T device ۶۳

شکل ۱۰-۳- فرم مخصوص برای شمارش سیگنال های FISH ۷۰

شکل 1-4 : شجره و تصویر بیمار ۸۶۰۰۰۶۸ ..... ۷۶

شکل ۲-۴- گسترده کروموزومی و کاریوتایپ نرمال بیمار ۸۶۰۰۰۶۸ ..... ۷۷

شکل 3-4 تصا ویر ساب تلومریک FISH برای 19q و ۱۹p از متافاز سلول در بیمار ۸۶۰۰۰۶۸ ..... ۷۸

شکل 4-۴-شجره وتصویر بیمار ۸۶۰۰۰۷۳ ..... ۷۹

شکل ۵-۴- گسترده کروموزومی و کاریوتایپ نرمال بیمار ۸۶۰۰۰۷۳ ..... ۸۰

شکل ۶-۴- تصاویر ساب تلومریک FISH برای q ۹ و p ۹ از متافاز سلول بیمار ۸۶۰۰۰۷۳ ..... ۸۱

شکل ۷-۴- تصویر ساب تلومریک برای q ۸ و p ۸ از اینترفاز و متافاز یک سلول در بیمار ۸۶۰۰۰۸۳ ..... ۸۲

شکل ۸-۴- تصویر ساب تلومریک FISH برای q ۱۴ از اینترفاز و متافاز یک سلول در بیمار ۸۶۰۰۱۶۰ ..... ۸۲

شکل ۹-۴- تصویر ساب تلومریک FISH برای q ۵ و p ۵ از اینترفاز و متافاز یک سلول در بیمار ۸۶۰۰۲۱۶ ..... ۸۳

شکل ۱۰-۴- تصویر ساب تلومریک FISH برای q ۱۱ و p ۱۱ از هسته اینترفازی یک سلول در بیمار ۸۶۰۰۰۰۴۸ ..... ۸۳

فصل اول:

کلیات تحقیق

۱-۱ بیان مسئله

حداقل ۶۰٪ علل عقب ماندگی ذهنی [۱]شدید منشا ژنتیکی داشته و علت آن نقص در ژنها وکروموزوم هاست (۱). بیش از ۸۰۰ بیماری ژنتیکی در ارتباط با عقب ماندگی ذهنی (MR) می باشند. نقص های کروموزومی در ۲۸-۴ ٪ و عوامل محیطی در ۳۰-۱۰٪ موارد به عنوان عامل مشخص شده است (۲). ناهنجاریهای کروموزومی مهمترین علت عقب ماندگی ذهنی در انسان شناخته شده است و تقریبا ۴۰٪ موارد با عقب ماندگی ذهنی شدید واجد ناهنجاریهای کروموزومی می باشند(۳). دربیش از ۵۰ ٪ موارد، در افراد مبتلا به عقب مانده ذهنی، علت نامعلوم می باشد (۴). منطقی است که فاکتورهای ژنتیکی را در مواردMR فاقد علت مشخص، دخیل بدانیم چرا که مشخص شده است که خطر تکرار برای فرزندان این افرادنسبت به افراد جامعه بالاتر است (۵).

نواحی ساب تلومریک [۲]مناطق فعال از نظر نسخه برداری می باشند که نزدیک انتهای کروموزومها ، مابین توالی های منحصر به هر کروموزوم وتوالی های بازهای نوکلئوتیدی ویژه تلومری که انتهای کروموزومها را می پوشانند قرار دارند وغنی از ژن می باشند . به خاطر ساختار وعملکرد منحصر بفرد مناطق ساب تلومری از جمله غنی بودنشان برای ژنهای کاذب وتوالیهایی که منجر به جفت شدن نادرست [۳]درمیوزمی گردند و می توانند متعاقبا میزان نوترکیبی درنواحی تلومری را افزایش دهند، این امر باعث ایجاد عدم تعادل ژنی در این نواحی میگردد ومی تواند ازعوامل مهم در ایجاد عقب ماندگی های ذهنی با علت ناشناخته [۴]باشد.(۳) تحقیقات اخیر نشان از آن دارند که تقریبا در ۳۵-۴٪ بیماران با عقب ماندگی ذهنی بدون علت مشخص نواحی ساب تلومریک نوارائی [۵]یا فته اند(۳).

در اکثر ناهنجاریهای کروموزومی غیرمتعادل از نوع اتوزومی در ارتباط با عقب ماندگی ذهنی، تا Mbp ۴ را می توان با روش های روتین سیتوژنتیک با قدرت تفکیک بالای باندینگ GTG (۵۵۰-۴۰۰ bph[۶]) تشخیص داد و لیکن برای ناهنجاریهای کوچکتر کروموزومی بایستی از تکنیک های سیتوژنتیک مولکولی ازجمله هیبریداسیون فلورسانس درجا[۷](FISH) استفاده نمود (۶). نوآرائی های ساب میکروسکوبیک اغلب با استفاده ازروش های کاریوتیپ استاندارد مشخص نمی گردد چراکه در این روش ها حساسیت کافی برای نشان دادن

---

[۱] Mental Retardation
[۲] Subtelomeric Region
[۳] Mispairing
[۴] idiopathic mental retardation
[۵] Subtelomeric Rearrangment
[۶] Band per haploid
[۷] Fluorescent *in situ* Hybridization

ناهنجاریهای های کمتر از۴Mb وجود ندارد وگاهی اوقات در تعیین نوآرائی های های بزرگتر نیز بسته به جایگاه نوآرائی ونحوه تحقیقات ناکار آمد می باشند(۷). امروزه تکنولوژی مورد استفاده برای تعیین ناهنجاریهای ساب تلومریک FISH می باشد در حال حاضر ابزار لازم برای انجام تکنیک FISH توسط کمپانی های متعددی ارائه می گردد.در این روش ساب تلومر همه کروموزومها بر روی یک گستره متافازی و یا سلولهای اینترفازی به صورت همزمان موردبررسی قرارمی گیرد.

یکی ازروش های فلورسانس هیبریداسیون درجا، سیستم Chromoprobe Multiprobe-T می باشد. این سیستم متشکل از۲۴ ناحیه جدا از هم و برجسته روی یک لام است که روی هرکدام یک پروب ساب تلومریک، ویژه هر یک از کروموزومهای جداگانه قرار گرفته است. پروب های ساب تلومری بسته به اینکه برای بازوی بلند(q) یا کوتاه (p) کروموزومی طراحی شده باشند متمایزمی گردند. پروب ساب تلومری ویژه بازوی بلند با برچسب ماده فلورسنس قرمز وپروب ساب تلومری ویژه بازوی کوتاه با برچسب ماده فلورسنس سبز نشان دار می شوند. با استفاده ازپروبهای ساب تلومریک چندین سندرم جدید شناسایی شده اند:بعنوان مثال سندرم حذف ۱p۳۶ انتهای بازوی کوتاه کروموزوم ۱ (۸) سندرم حذف ۲۲q۱۳,۳ انتهای بازوی بلند کروموزوم ۲۲(۹) و چندین ناهنجاری اوتیسم(۱۰) در ارتباط با ناهنجاریهای ساب تلومریک کروموزوم شناسایی شده اند. در این تحقیق از ۲۰ نفر عقب مانده ذهنی ،که طی سال ۱۳۸۶ به مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی ارجاع داده شده انداستفاده شد که دارای کاریوتیپ نرمال بودند و هیچ سندرم شناخته شده ای مثل سندرم Down ،Prader-Willi ، DiGeorge ، Fragile X وغیره (که با عقب ماندگی ذهنی همراه می باشند) نداشتند، در این بیماران با استفاد از پروبهای مخصوص ساب تلومریک و بکارگیری میکروسکوپ فلوئورسانس، نوا حی ساب تلومریک مورد بررسی قرار گرفتند.

لازم به یادآوری است در انجام این پژوهش برای اولین بار در مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی ازتکنیک FISH و نرم افزا رCyto Vision استفاده گردید.

۱-۲ اهمیت و ضرورت

شیوع اختلال عقب ماندگی ذهنی بیشتر از شیوع فلج مغزی، ۲۸ برابر بیشتر از شیوع نقایص لوله عصبی مثل اسپاندا بیفیدا، ۲۵ برابر شایع تر از نابینایی مطلق و ۵۰ برابر شایع تر از ناشنوایی است (۱۱). برای عقب ماندگی ذهنی مرزی وجود ندارد (شکل ۱-۱) و این بیماری تمام مرزهای جغرافیایی، اجتماعی، اقتصادی، اخلاقی و فرهنگی را درمی نوردد و امکان بروز این بیماری در هر خانواده ای وجود دارد، بطوریکه بر اساس آمارهای منتشر شده، از هر ۱۰ خانوادهٔ آمریکایی، یک خانواده بطور مستقیم با این بیماری دست و پنجه نرم می کند. فقر فرهنگی و اقتصادی و سوء تغذیه در کشور های فقیر آمار چشمگیرتری از این عارضه را نشان میدهد. در شکل (۱-۱) آمار این شیوع در کشورهای جهان سوم و آفریقا به خوبی نمایانگر این مسئله است. این بیماری هنوز هم

به عنوان یکی از مشکلات حل نشده برای بشر باقی مانده است و در حقیقت به عنوان یک چالش و یک منبع استرس برای خانواده هایی است که با آن دست به گریبان هستند(۱۲). بیمارانی که از عقب ماندگی ذهنی رنج می برند، زندگی اسف باری را سپری می کنند، زیرا بسیاری از آنها، از خانواده های خود طرد شده و در مؤسسات نگهداری افراد عقب مانده ذهنی زندگی می کنند و بسته به میزان شدت بیماری ، جمع کثیری از این افراد، به دلیل عدم برخورداری از قابلیت تعلیم و تربیت ، بدون دیدن آموزش، صرفاً زنده نگه داشته می شوند تا هنگامیکه اختلالات آنها اجازه زنده ماندن را از ایشان سلب نموده و بمیرند. کاملاً روشن است که در مورد این ناهنجاری، صرف نظر از صدمات فرهنگی و اجتماعی، مسائل اقتصادی و عاطفی نیز لطمات بزرگی به بشریت وارد می آورد(۱۳). از این رو شناسایی علل ایجادکننده این بیماری به منظور پیشگیری از ابتلاء و درصورت ممکن درمان مبتلایان به یکی از اهداف بزرگ محققین مرتبط با علوم پایه پزشکی تبدیل شده است.

بر اساس آمار WHO[5] (World Health on Organization) در سال ۱۹۹۴ تقریباً ۱۵۶ میلیون نفر یعنی ۳٪ از جمعیت جهان مبتلا به عقب ماندگی ذهنی بودند که میزان فراوانی آنها در جدول۱-۱ نشان داده شده است (۱۱).

جدول۱-۱- فراوانی افراد مبتلا به عقب ماندگی ذهنی براساس آمار WHO (۱۱)

آسیا	اروپا	آفریقا	آمریکای شمالی	آمریکای لاتین	استرالیا
۹۷/۷۱۰/۰۰۰	۱۵/۳۹۰/۰۰۰	۲۰/۳۱۰/۰۰۰	۸/۶۱۰/۰۰۰	۱۳/۸۰۰/۰۰۰	۵/۲۵۰/۰۰۰

بطور کلی نسبت عقب ماندگی ذهنی در هر کشوری بین ۴-۲ درصد متغیر می باشد (۱۵).

بر اساس شواهد مختلف ایران یکی ازکشورهائی است که به علت سنن و فرهنگ حاکم بر آن و بالا بودن ازدواج های خویشاوندی و قومی دارای در صد بالائی از افراد مبتلا به عقب ماندگی ذهنی می باشد که در بسیاری ازموارد علت نامعلوم می باشد. بررسی و شناخت ناحیه ساب تلومریک احتمالا می تواند در تشخیص عقب ماندگی ذهنی که در جامعه ایران شایع است بکار آید.

درضمن با توجه به علل اختلافات ژنتیکی جمعیت ایران با جمعیت هائی که قبلا بررسی شده اند، امکان شناسائی واریاسیونهای جدید و پلی مورفیسم در ناحیه ساب تلومریک مطرح می باشد.

۱-۳ - تعریف واژه ها

۱-۳-۱ - پلی مورفیسم [۱](چند شکلی های ژنتیکی)

اگرتوالی ناحیه دقیقا یکسانی ازDNA واقع در محل خاصی روی یک کروموزوم را درتعداد زیادی از کروموزوم های بسیاری ازافراد گوشه و کنار جهان تعیین کنیم ،تشابه نسبتا زیادی بین آنها مشاهده می شود. در واقع هر قطعه ای از DNA انسان به طول حدود ۱۰۰۰ جفت باز، به طور متوسط حاوی فقط یک جفت باز متفاوت بین دو فرد متفاوت می باشد.حالت های مختلف یک توالی خاص DNA در یک مکان کروموزومی خاص (جایگاه ژنی) را آلل می نامند. وقتی آللهابه حدی فراوان باشندکه فراوانی آللی دربیش از ۱ درصدکروموزوم ها در جمعیت عمومی یافت شوند، آنچه را که چند شکلی کروموزومی نامیده می شود به وجود می آورند. در مقابل آللهائی با فراوانی کمتر از ۱ در صد را طبق قرارداد انواع نادر می نامند. برخی اللها که نمایانگر تغییراتی در توالی DNA واقع بین ژنها یا در داخل اینترون می باشند، تاثیری برعملکرد هیچ زنی ندارند و صرفا با آنالیز مستقیم DNA قابل شناسائی هستند. تغییرات دیگر در توالی رمزدار خود ژنها قراردارند و ممکن است به ایجاد انواع مختلفی ازپروتئینها بینجامد که به نوبه خود امکان دارد موجب فنوتیپ های کاملا متمایز شود.

در ساختار کروموزوم ها نیز ما با پلی مورفیسم های متعددی روبرو می باشیم.به عنوان مثال:

۱- هتروکروماتین ناحیه ۱q، ۹q ، ۱۶q و Yq

۲- اندازه و تعداد ستلایت ها در کروموزوم های آکروسانتریک

۳- اندازه NOR در آکروسانتریک ها

۴- واژگونی پری سانتریک کروموزوم ۹

۱-۳-۲ عقب ماندگی ذهنی با علت نامشخص:

عقب ماندگی ذهنی مشکل گریبانگیر جوامع بوده و باعث مشکلات فراوان روانی،مالی و روحی برای خانواده و اجتماع می گردد .این بیماری بسیار پیچیده بوده و عوامل متعددی میتواند عامل آن می باشد، که شامل عوامل پیش و بعد از تولد می گردد.با رشد و پیشرفت در علم علت آن در بعضی موارد مشخص شده است. به عنوان مثال در سندرم داون، فرد مبتلا دارای یک کروموزوم ۲۱ اضافی می باشد و در این افراد عوارض و علائم موجود در فرد را می توان به آن کروموزوم اضافی نسبت داد. در این افراد که عقب ماندگی ذهنی هم دارند علت عقب مانگی مشخص است و آن اضافه بودن کروموزوم ۲۱ می باشد.

اما در بسیاری موارد مشاهده می گردد که فرد با معیارهای شناخته شده عقب ماندگی ذهنی دارد اما هیچیک از عواملی که تابحال شناخته شده علت آن نمی باشد در این موارد گفته می شود فرد دارای عقب ماندگی ذهنی با علت نامشخص می باشد.

---

[۱] Polymorphism

۱-۴ هدف از اجرای تحقیق

۱-۴-۱ اهداف کلی

تعیین میزان ناهنجاریهای کروموزومی ساب تلومریک در تعدادی از بیماران عقب مانده ذهنی با علت نامشخص که در سال ۱۳۸۶ به مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی مراجعه کرده اند

۱-۴-۲ اهداف فرعی

۱- تعیین سهم ناهنجاریهای کروموزومی ساب تلومریک در ایجاد عقب ماندگی ذهنی درتعدادی ازبیماران ایرانی

۲- تعیین ارتباط بین ناهنجاریهای کروموزومی ساب تلومریک و عقب ماندگی ذهنی در تعدادی ازبیماران ایرانی

۱-۴-۳ اهداف کاربردی

۱- بررسی وضعیت ارثی بودن ناهنجاریهای ساب تلومریک در بیماران درگیر در مطالعات تکمیلی بعدی

۲- مشاوره ژنتیک و آزمایش های تشخیص قبل از تولد در مواردی که ناهنجاریهای ساب تلومریک ارثی باشند.

۳- راه اندازی روش هیبریداسیون فلورسانس درجا (FISH) در مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

۱-۵ سئوال

آیاناهنجاریهای ساب تلومریک باعقب ماندگی ذهنی ارتباط دارند؟

۱-۶ فرضیه

فرضیه تحقیق پیشنهادی فوق این است که با توجه به غنی بودن ناحیه ساب تلومریک از ژن ها نوآرایی های موجود در این نواحی می تواند باعث ایجاد ایجاد عقب ماندگی ذهنی گردد.