

## Investigation of exon 4 mutations of phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria patients in Guilan Province using PCR-sequencing

Pourvatan N, Khazaei-Koohpar Z\*

Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, I. R. Iran.

Received: 2018/08/15 | Accepted: 2018/12/2

### Abstract:

**Background:** Phenylketonuria (PKU) is a heterogeneous and autosomal recessive metabolic disorder that is mainly caused by mutations in the hepatic phenylalanine hydroxylase (*PAH*) gene. Distribution pattern of mutations in the *PAH* gene are specific to each population. To date, no reports of phenylketonuria molecular analysis have been found in this population. The aim of this study was to identify *PAH* mutations within exon 4 in PKU patients in Guilan Province and compare it with the studies in other parts of Iran.

**Materials and Methods:** In this cross-sectional and descriptive study, 25 unrelated PKU patients (age range, 1-21 years) were identified from different regions of Guilan Province during a one-year period. After collecting blood samples and DNA extraction, the DNA fragments containing the exon 4 of the *PAH* gene and its flanking intronic sequences were amplified and sequenced.

**Results:** In this study, IVS4+5G>T mutation (10%) was identified. This mutation was found in two homozygous PKU patients and one heterozygous patient; they had mPKU and cPKU phenotypes, respectively and their parents were third degree relatives. In addition, IVS4+47C>T (28%) and IVS3-22C>T (8%) polymorphisms were also detected.

**Conclusion:** Investigation of mutations in the *PAH* gene can be a useful tool for molecular detection of the PKU disease and carrier detection in this population. Moreover, the other 12 remaining exons need to be analyzed to obtain the full spectrum of mutations of this gene among the PKU patients in Guilan Province.

**Keywords:** Mutation, *PAH*, PKU, Exon 4, PCR-sequencing

\* Corresponding Author.

**Email:** khazaei@toniau.ac.ir

**Tel:** 0098 115 427 1105

**Fax:** 0098 1142 744 09

Conflict of Interests: **No**

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2019; Vol. 22, No 6, Pages 595-601*

Please cite this article as: Pourvatan N, Khazaei-Koohpar Z. Investigation of exon 4 mutations of phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria patients in Guilan Province using PCR-sequencing. *Feyz* 2019; 22(6): 595-601.

# بررسی جهش‌های اگزون ۴ ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز در بیماران مبتلا به فنیل‌کتونوری در استان گیلان با استفاده از PCR-Sequencing

ندا پوروطن<sup>۱</sup>، زینب خزائی کوهر<sup>۲\*</sup>

## خلاصه:

سابقه و هدف: فنیل‌کتونوری (PKU) یک اختلال متابولیک اتوزومال مغلوب و هتروژن است که به‌طور عمده ناشی از موتاسیون‌هایی در ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز (PAH) کبدی می‌باشد. الگوی توزیع موتاسیون‌ها در ژن PAH خاص هر جمعیت است. تاکنون هیچ گزارشی از تحلیل مولکولی فنیل‌کتونوری در این جمعیت یافت نشده است. هدف از این مطالعه شناسایی موتاسیون‌های ژن PAH در اگزون ۴، در بیماران PKU در استان گیلان و مقایسه آن با مطالعات صورت گرفته در سایر بخش‌های ایران بود. مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی طی یک دوره یک‌ساله، تعداد ۲۵ بیمار PKU و غیرخویشاوند (۱ تا ۲۱ سال) از نواحی مختلف استان گیلان شناسایی شدند. پس از اخذ نمونه خون از افراد و جداسازی DNA، قطعات DNA شامل اگزون ۴ ژن PAH و نواحی ایترونی اطراف آن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر یافته و تعیین توالی شد. نتایج: در این مطالعه جهش IVS4+5G>T (۱۰ درصد) شناسایی شد. این جهش در دو بیمار PKU به‌صورت هموزیگوت و در یک بیمار به‌صورت هتروزیگوت مشاهده شد. این بیماران به‌ترتیب فنوتیپ‌های mPKU و cPKU داشته و والدین آنها خویشاوندان درجه سوم بودند. به‌علاوه پلی‌مورفیسم‌های IVS4+47C>T (۲۸ درصد) و IVS3-22C>T (۸ درصد) نیز مشخص گردید. نتیجه‌گیری: بررسی موتاسیون‌ها ابزار مفیدی برای تشخیص مولکولی بیماری PKU و تعیین ناقلین در این جمعیت است. به‌علاوه، برای دست‌یابی به طیف کامل موتاسیون‌های این ژن در بیماران PKU استان گیلان نیاز به بررسی ۱۲ اگزون دیگر می‌باشد.

واژگان کلیدی: جهش، فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز، فنیل‌کتونوری، اگزون ۴، PCR-Sequencing

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۹۷، صفحات ۶۰۱-۵۹۵

## مقدمه

ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز (PAH) روی بازوی بلند کروموزوم ۱۲ در ناحیه q22-q24 واقع شده است [۵]. این ژن واجد ۱۳ اگزون و ۱۲ اینترون می‌باشد [۶]. فنیل‌کتونوری به‌طور عمده از طریق موتاسیون‌هایی در ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز ایجاد می‌شود. پایگاه داده لوکوس PAH تاکنون لیست بیش از ۸۰۰ جهش مختلف از جمله موتاسیون‌های بدمعنی و بی‌معنی، حذف‌های بزرگ و کوچک، درج‌های کوچک و نقص‌های پیرایشی را ثبت کرده است [۷]. مطالعات متعدد نشان داده که طیف موتاسیون‌های عامل PKU در میان جمعیت‌های مختلف، متفاوت است [۴]. PKU یک بیماری بسیار هتروژن است. در بسیاری از جمعیت‌های مطالعه شده بیش از ۲۰ موتاسیون مرتبط با بیماری PKU شناسایی شده که فراوانی و پراکنش این جهش‌ها در هر جمعیت مشخص و متمایز از جمعیت دیگر است [۸]. جهش IVS4+5G>T از نوع پیرایشی می‌باشد که در اینترون ۴ ژن PAH رخ می‌دهد. در سال ۲۰۱۱ فراوانی جهش مذکور در جمعیت PKU ایران توسط زارع کاریزی و همکاران ۰/۴ درصد گزارش گردیده است [۴]. همچنین، در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۷ توسط رضی پور و همکاران صورت گرفت، این جهش با فراوانی ۱/۲۳ درصد از بیماران گزارش شده است [۹]. شیرزاد و همکاران نیز با مطالعه ۶۳۵ مورد PKU از مناطق مختلف ایران در سال ۲۰۱۸ این جهش را در ۲۹ مورد

فنیل‌کتونوری (PKU) یک اختلال اتوزومال مغلوب با شیوع ۱ در ۱۰۰۰۰ در سفیدپوستان و فراوانی متغیر در دیگر جمعیت‌ها می‌باشد [۱]. شیوع این اختلال در جمعیت ایرانی ۱ در ۳۶۲۷ تولد زنده برآورد شده است [۲]. و این شیوع بالا به‌دلیل میزان بالای ازدواج‌های فامیلی در جمعیت ایرانی است [۳]. بارز-ترین تظاهر بالینی PKU عقب‌ماندگی شدید ذهنی در افراد درمان‌نشده است. تشخیص اولیه این اختلال و اتخاذ رژیم درمانی مناسب برای کنترل سطح فنیل‌آلانین سرمی یکی از دستاوردهای بزرگ در مهار عقب‌ماندگی ذهنی است [۴].

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

<sup>۲</sup> استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

## \*نشانی نویسنده مسئول:

گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

دوره‌نویس: ۰۱۱۴۲۷۴۴۰۹

تلفن: ۰۱۱۵۴۲۷۱۱۰۵

پست الکترونیک: khazaei@toniau.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۹/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲۴

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Analytik jena, Germany) انجام گرفت. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این واکنش در جدول شماره ۱ آمده است. توالی این آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 طراحی شد. همچنین، اختصاصی بودن پرایمرها برای توالی‌های مورد نظر با استفاده از برنامه NCBI Blast بررسی گردید. سنتز پرایمرها توسط شرکت Bioneer کره جنوبی صورت گرفت. طول محصول نهایی واکنش PCR، ۶۷۸ bp و حجم نهایی مخلوط واکنش PCR، ۲۵ میکرو-لیتر بود که با استفاده از کیت PCR PreMix AccuPower® (شرکت Bioneer، کره جنوبی) و با افزودن ۴ میکرولیتر DNA ژنومی (۱۰۰-۱۱۰ نانوگرم)، ۲ میکرولیتر جفت پرایمر (۲۰ پیکومول) و ۱۴ میکرولیتر آب استریل به ۵ میکرولیتر محلول PreMix (حاوی dNTP، MgCl<sub>2</sub>، آنزیم و بافر واکنش) تهیه شد. نتایج حاصل از تنظیم شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تکثیر آگزون ۴ و نواحی ایترونی اطراف آن به صورت زیر می‌باشد: دمای واسرشتگی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، تعداد سیکل‌های واکنش، ۳۰ سیکل که هر سیکل شامل: دمای واسر-شتگی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای چسبیدن پرایمر-ها ۶۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای طولی سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و دمای طولی سازی نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود.

#### الکتروفورز محصولات PCR

برای اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر و کیفیت آن و عدم تکثیر محصولات غیراختصاصی، ۳ میکرولیتر از محصولات واکنش (نمونه‌های بیماران) و مارکر bp ۱۰۰ روی ژل آگاروز ۱ درصد بارگذاری و الکتروفورز گردید (شکل شماره ۲).

#### تعیین توالی

محصولات PCR به منظور شناسایی موتاسیون‌های موجود در قطعات تکثیر شده تعیین توالی شدند. تعیین توالی توسط دستگاه سکونسر ABI3730 (شرکت ماکروژن کره جنوبی) و با استفاده از روش ختم زنجیره صورت گرفت. همچنین، از نرم‌افزارهای 5 CLC main work bench و chromas و Gene runner جهت خوانش توالی‌ها و مقایسه نتایج دستگاه سکونسر با پلات اصلی آگزون ۴ ژن PAH و نواحی ایترونی آن استفاده شد (شکل‌های شماره ۳، ۴ و ۵).

(۴/۶ درصد) مشاهده کردند [۱۰]. با توجه به اینکه در هر جمعیت ممکن است یک یا چند موتاسیون خاص شایع باشد، بررسی موتاسیون‌های شایع در تشخیص مولکولی از نظر زمانی و اقتصادی به صرفه‌تر است. بنابراین شناسایی موتاسیون‌های شایع این آنزیم به طور بومی، عامل مفید و موثری در طراحی برنامه ژنتیکی مورد نیاز آزمایش تشخیصی مولکولی این بیماری می‌باشد [۱۱]. هدف از مطالعه حاضر بررسی مولکولی جهش‌های آگزون ۴ ژن PAH به روش سکونسینگ در بیماران مبتلا به فنیل‌کتونوری از استان گیلان و مقایسه آن با مطالعات صورت گرفته در سایر بخش‌های ایران می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه مقطعی-توصیفی می‌باشد. طی یک دوره یک‌ساله تعداد ۲۵ بیمار PKU و غیرخویشاوند از نواحی مختلف استان گیلان شناسایی شدند. شناسایی این بیماران براساس پرونده‌های موجود در بیمارستان ۱۷ شهریور رشت صورت گرفت. سپس، از بیماران و خانواده‌های آنها جهت شرکت در مطالعه دعوت به عمل آمد. پس از توجیه شرکت کنندگان، فرم-های رضایت‌نامه و پرسشنامه از سوی بیماران و یا خانواده‌های آنان (در مواردی که بیمار کودک یا دچار عقب‌ماندگی ذهنی بود) تکمیل گردید. در این مطالعه بیماران بر اساس سطح Phe قبل از درمان در سه گروه PKU کلاسیک، PKU خفیف و HPA خفیف قرار گرفتند. نمونه‌گیری با مجوز کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت (IR.IAU.RASHT.REC.-) 1397.138 انجام شد. از هر فرد بیمار به میزان ۲-۵ میلی‌لیتر خون‌گیری به عمل آمد و برای جلوگیری از انعقاد خون، از فالتکون-های ۱۵ میلی‌لیتری حاوی ۳۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۵ مولار به-عنوان ماده ضد انعقاد استفاده شد.

#### استخراج DNA

جهت استخراج DNA از کیت Dynabio™ Takapozist, Blood/Tissue DNA Extraction Mini kit (Tehran, Iran) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. پس از استخراج DNA و قبل از انجام واکنش PCR جهت بررسی کمیت اسید نوکلئیک، DNA به دست آمده با نانواسپکترو-فومتر (NanoDrop, 2000C, Thermo scientific, USA) بررسی شد. همچنین، برای تایید کیفیت DNA استخراج شده، نمونه‌ها با روش الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ درصد مورد مطالعه قرار گرفت (شکل شماره ۱).

## آنالیز آماری

یک جهش پیرایشی  $IVS4+5G>T$  (c.441+5G>T) در اینترون ۴ و دو پلی مورفیسم  $IVS3-22C>T$  (rs2037639) و  $IVS4+47C>T$  (rs1718301) به ترتیب در اینترون های ۳ و ۴ شناسایی گردید. از ۲۵ نمونه، نمونه شماره ۲ با فنوتیپ cPKU و نمونه های شماره ۱۲ و ۲۰ با فنوتیپ mPKU در اینترون ۴ دارای جهش پیرایشی  $IVS4+5G>T$  بودند که در نمونه ۲ به صورت هتروزایگوت و در دو نمونه ۱۲ و ۲۰ به صورت هموزایگوت مشاهده شد؛ تغییر باز در اینترون ۴ این ژن باعث ایجاد جایگاه پیرایشی در ژن PAH شده بود. همچنین، پلی مورفیسم های  $IVS3-22C>T$  (rs2037639) و  $IVS4+47C>T$  (rs1718301) (۹ به ترتیب در ۱۴ (۲۸ درصد) و ۴ آلل (۸ درصد) مشاهده گردید. در ۲۷ آلل از ۵۰ آلل، اگزون ۴ جهشی یافت نشد. جهش  $IVS4+5G>T$  (c.441+5G>T) در ۵ آلل (۱۰ درصد) شناسایی شد. مشخصات بیماران واجد این جهش و الکتروفورگرام جهش  $IVS4+5G>T$  در جدول شماره ۳ و شکل شماره ۳ نشان داده شده است. همچنین، پلی مورفیسم  $IVS4+47C>T$  در ۱۴ آلل (در ۸ بیمار به صورت هتروزایگوت و ۳ بیمار به صورت هموزایگوت) و پلی مورفیسم  $IVS3-22C>T$  در ۴ آلل (در ۲ بیمار به صورت هتروزایگوت و ۱ بیمار هموزایگوت) از ۵۰ آلل مورد مطالعه شناسایی شد. الکتروفورگرام توالی رفت این دو پلی-مورفیسم به ترتیب در شکل های شماره ۴ و ۵ نشان داده شده است.

فراوانی نسبی آلل ها، تعداد آلل های شناسایی شده برای یک جهش یا پلی مورفیسم خاص بر تعداد کل آلل های مورد مطالعه برابر با فراوانی نسبی آن جهش یا پلی مورفیسم می باشد که در این مطالعه به صورت درصد بیان شده است.

## نتایج

## فنوتیپ بیماران

در این مطالعه ۲۵ بیمار PKU که به بیمارستان ۱۷ شهریور رشت مراجعه نموده بودند، توسط پزشک متخصص اطفال مورد بررسی قرار گرفتند. بیماران براساس سطح Phe قبل از درمان به ۳ گروه تقسیم شدند (جدول شماره ۲). بیماران در محدوده سنی ۱ تا ۲۱ سال قرار داشته و ترکیب قومیتی آنها شامل گیلک (۷۶ درصد)، تالش (۱۲ درصد) و ترک (۱۲ درصد) بود. مشخصات بیماران واجد جهش از جمله سن تشخیص بیماری، میزان فنیل آلانین قبل از درمان، خویشاوندی والدین و قومیت در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

## نتایج تعیین توالی

بعد از الکتروفورز محصولات PCR و اطمینان از تشکیل باند اختصاصی با طول ۶۷۸ bp (شکل شماره ۲)، محصولات تعیین توالی گردید. با بررسی توالی نوکلئوتیدی اگزون ۴ ژن PAH و نواحی اینترونی اطراف آن در ۲۵ بیمار PKU (۵۰ آلل)،

جدول شماره ۱- مشخصات پرایمر مورد استفاده در این مطالعه

نام ژن	توالی پرایمر	طول محصول PCR
(PAH-E4) Forward	5'-GACGGGTGGGAGGGAGATGAG-3'	۶۷۸ bp
(PAH-E4) Reverse	5'-AGCACTTGACTTAAACCTCCATAGATG-3'	

جدول شماره ۲- فراوانی بیماری در افراد مورد مطالعه بر اساس غلظت فنیل آلانین قبل از درمان

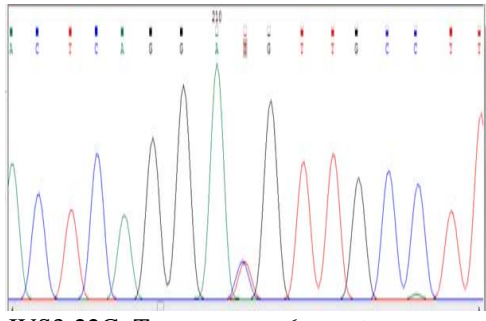
بیماران# (درصد)	فنوتیپ متابولیک
۳۶	PKU کلاسیک (cPKU)
۳۲	PKU خفیف (mPKU)
۳۲	HPA خفیف (mHPA)

جدول شماره ۳- مشخصات بیماران واجد جهش  $IVS4+5G>T$  در مطالعه حاضر

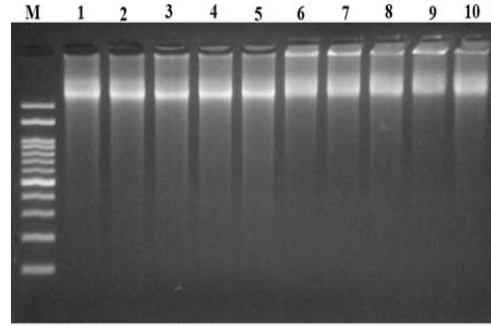
بیمار	والدین	سن تشخیص بیماری	غلظت فنیل آلانین قبل از درمان ( $\mu\text{mol/L}$ )	فنوتیپ	قومیت	جهش $IVS4+5G>T$ در هر دو آلل
۲	خویشاوند	۲ سالگی	۱۸۰۰	*cPKU	ترک	-/+
۱۲	خویشاوند	۱ سالگی	۱۱۹۹	**mPKU	گیلک	+/+
۲۰	خویشاوند	۶ سالگی	۱۰۶۰	mPKU	گیلک	+/+

\* PKU کلاسیک، \*\* PKU خفیف، +/+ هموزایگوت، -/+ هتروزایگوت

بررسی جهش‌های اگزون ۴ در ژن فنیل آلانین، ...



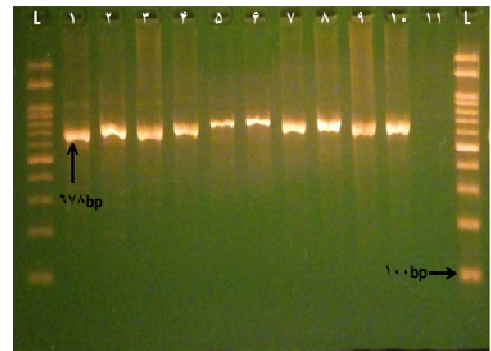
شکل شماره ۵- الکتروفورگرام پلی مورفیسم IVS3-22C>T در حالت هتروزیگوت (توالی رفت)



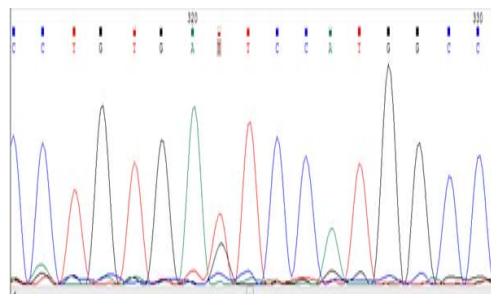
شکل شماره ۱- الکتروفورز DNA استخراج شده از ۱۰ نمونه بیمار روی ژل آگاروز ۱ درصد، M: مارکر وزنی ۱۰۰ جفت بازی

### بحث

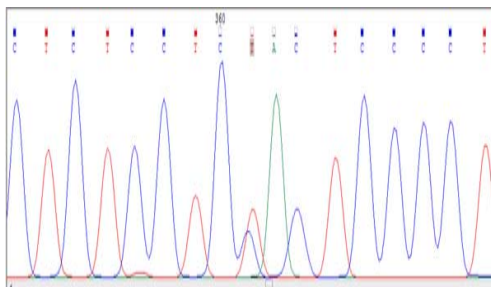
شیوع PKU موجب غربالگری نوزادان و درمان با رژیم غذایی محدود شده، به صورت یک روش معمولی در بسیاری از کشورهای توسعه یافته شده است. محدودیت‌های درمان، ضرورت انجام یک برنامه غربالگری نوزادان را افزایش می‌دهد؛ به طوری که با اطمینان بتوان زوج‌هایی را که در معرض خطر هستند، شناسایی کرد [۱۲]. بنابراین لازم است در هر منطقه جغرافیایی شیوع و طیف جهش‌های PAH عامل ایجاد این بیماری در افراد مبتلا مورد بررسی قرار گرفته تا افراد در معرض خطر بیماری با غربالگری ژنتیکی شناسایی شده و مداخلات پزشکی به موقع اعمال گردد. در مطالعه حاضر با استفاده از توالی‌یابی مستقیم محصولات PCR اگزون ۴ و نواحی اینترونی اطراف در بیماران PKU از استان گیلان، یک جهش پیرایشی IVS4+5G>T (c.441+5G>T) با فراوانی ۱۰ درصد و دو پلی مورفیسم IVS4+47C>T (۲۸ درصد) و IVS3-22C>T (۸ درصد) شناسایی گردید که اولین گزارش از این دو پلی مورفیسم در جمعیت PKU از استان گیلان می‌باشد. در سال ۲۰۱۱ زارع کاریزی و همکاران پلی مورفیسم IVS4+47C>T را در جمعیت PKU ایران گزارش کردند [۴]. در سال ۲۰۱۴ علی‌بخشی و همکاران دو پلی مورفیسم IVS3-22C>T و IVS4+47C>T را در بیماران PKU از استان کرمانشاه (غرب ایران) شناسایی کردند [۱۳]. متعاقب آن در سال ۲۰۱۵ پلی مورفیسم IVS3-22C>T توسط بیگلری و همکاران از استان‌های قزوین و زنجان با فرکانس ۲/۵۶ [۱۴] و در سال ۲۰۱۷ نیز توسط علوی نژاد و همکاران با فرکانس ۷۰ درصد گزارش شد [۱۵]. جهش‌های ژن PAH در بسیاری از جمعیت‌ها مطالعه شده است. جهش IVS4+5G>T از نوع پیرایشی می‌باشد که در اینترون ۴ ژن PAH رخ می‌دهد. در مطالعه حاضر این جهش با فراوانی ۱۰ درصد در یک بیمار به صورت هتروزیگوت و در دو بیمار به صورت هموزیگوت مشاهده شد که تغییر باز در اینترون ۴ باعث ایجاد جایگاه پیرایشی در ژن PAH شده



شکل شماره ۲- نتایج الکتروفورز محصولات PCR (شماره ۱-۱۰) مربوط به اگزون ۴ (۶۷۸ bp) روی ژل آگاروز ۱ درصد، شماره ۱۱ (نمونه کنترل منفی)، L (سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز)



شکل شماره ۳- الکتروفورگرام جهش IVS4+5G>T (c.441+5G>T) در حالت هتروزیگوت (توالی رفت)



شکل شماره ۴- الکتروفورگرام پلی مورفیسم IVS4+47C>T در حالت هتروزیگوت (توالی رفت)

جهش IVS4+5G>T در بیماران PKU استان گیلان در مقایسه با سایر مطالعاتی که تاکنون در ایران صورت گرفته شیوع بالایی را نشان داده است. اما در مطالعه حاضر جهش فوق تنها در ۱۰ درصد کروموزومها یافت شده و به دست آوردن طیف کامل موتاسیونهای ژن PAH در بیماران PKU استان گیلان نیازمند بررسی ۱۲ اگزون دیگر می‌باشد. با توجه به اینکه طیف جهشهای ژن PAH در بخشهای مختلف ایران دارای تفاوت‌های قابل توجه می‌باشد، لذا با انجام مطالعات جامع در مناطق مختلف ایران می‌توان جهشهای خاص هر منطقه را شناسایی کرد و به منظور پیش‌برد اهداف پیش‌گیرانه و درمانی آینده از آنها بهره برد. محدودیت تحقیق شامل طول زیاد ژن PAH و عدم وجود بودجه کافی جهت بررسی موتاسیونی کل طول ژن بود.

#### نتیجه‌گیری

شناسایی جهشهای ژن PAH به‌ویژه جهشهای بومی هر خطه کشور با توجه به رواج ازدواج خویشاوندی در آن برای طراحی برنامه غربالگری ضرورت ویژه‌ای دارد. با در نظر گرفتن اینکه تنها یک اگزون ژن PAH در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است برای به دست آوردن طیف کامل موتاسیونهای این ژن در بیماران PKU استان گیلان بررسی ۱۲ اگزون دیگر مورد نیاز می‌باشد.

#### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد می‌باشد. نویسندگان از آقای دکتر افشین صفائی و پرسنل محترم بیمارستان ۱۷ شهریور رشت که دست‌اندرکاران این پژوهش را یاری نموده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

#### References:

[1] Hamzehloei T, Hosseini SA, Vakili R, Mojarad M. Mutation spectrum of the PAH gene in the PKU patients from Khorasan Razavi province of Iran. *Gene* 2012; 506(1): 230-2.  
 [2] Koochmeshgi J, Bagheri A, Hosseini-Mazinani SM. Incidence of phenylketonuria in Iran estimated from consanguineous marriages. *Inherit Metab Dis* 2002; 25(1): 80-1.  
 [3] Hosseini-Mazinani SM, Koochmeshgi J, Khazaei-Koohpar Z, Hosein-Pur-Nobari N, Seifati SM, Carrier detection of phenylketonuria in Iranian families by variable number tandem-repeat polymorphism analysis. *East Mediterr Health J* 2008; 14(6): 1445-51.

است. گزارش‌هایی که از جمعیت PKU در ایران از جهش IVS4+5G>T موجود است به ترتیب زیر است: زارع کاریزی و همکاران در سال ۲۰۱۱ طیف موتاسیونی ژن PAH را در ۱۲۴ خانواده ایرانی غیروابسته با PKU کلاسیک مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه جهش‌های مختلف از جمله جهش IVS4+5G>T با فراوانی ۰/۸ درصد در ایترون ۴ گزارش شد [۴]. به علاوه، در مطالعه‌ای که در ۲۰۱۷ توسط رضی‌پور و همکاران در ۸۱ خانواده ایرانی با نقص PAH صورت گرفت، هر ۱۳ اگزون و نواحی ایترونی اطراف با روش PCR-Sequencing بررسی شد که منجر به شناسایی ۳۳ جهش مختلف از جمله جهش IVS4+5G>T در ایترون ۴ ژن PAH با فراوانی ۱/۲۳ درصد شد [۹]. همچنین، شیرزاد و همکاران در سال ۲۰۱۸ با بررسی ۶۳۵ بیمار PKU از ایران این جهش را در ۲۹ مورد گزارش نمودند [۱۰]. در سایر مطالعاتی که تاکنون در جمعیت‌های مختلف PKU در ارتباط با طیف موتاسیونی PAH در ایران صورت گرفته، به جهش IVS4+5G>T اشاره نشده است. از جمله می‌توان به مطالعه بنیادی و همکاران روی بیماران PKU با منشاء قومی ترکی آذری [۱۶]، علی‌بخشی و همکاران از استان کرمانشاه [۱۳]، بیگلری و همکاران در دو استان زنجان و قزوین [۱۴] و مطالعه علی‌بخشی و همکاران در سال ۲۰۱۸ در دو استان همدان و لرستان [۷] اشاره نمود. فراوانی جهش IVS4+5G>T در سایر بخش‌ها مثل جنوب آلمان ۰/۸ درصد [۸]، غرب آلمان ۱/۱ درصد [۸]، جنوب ایتالیا ۲/۴ درصد [۱۷]، ایالات متحده در دو آل از ۱۹۰ آل [۱۸]، اسرائیل ۵/۲۷ درصد [۱۹]، ونزوئلا ۱۱/۶ درصد [۲۰]، ترکیه ۳ درصد [۲۱] و در دو ناحیه Kemero و Novosibirsk از سبیری غربی به ترتیب ۱/۴ و ۱/۸۵ درصد [۲۲] گزارش شده است. بررسی جهش IVS4+5G>T در ونزوئلا موجب بهبود نرخ شناسایی جهش از ۸۶ به ۹۷/۷ درصد شده است [۲۰].

[4] Zare-Karizi S, Hossini-Mazinani SM, Khazaei-Koohpar Z, Seifati SM, Shahsavan-behboodi B, Akbari MT et al. Mutation spectrum of phenylketonuria in Iranian population. *Mol Genet Metab* 2011; 102(1): 29-32.  
 [5] Fazeli Z, Vallian S. Phenylketonuria from genetics to clinics: An Iranian prospect. *Iran J Biotech* 2011; 9(3): 163-72.  
 [6] Moradi K, Alibakhshi R, Ghadiri K, Khatami SR, Galehdari H. Molecular analysis of exons 6 and 7 of phenylalanine hydroxylase gene mutations in Phenylketonuria patients in Western Iran. *Indian J Hum Genet* 2012; 18(3): 290.  
 [7] Alibakhshi R, Moradi K, Biglari M, Shafieenia S. Spectrum of phenylalanine hydroxylase gene

mutations in Hamadan and Lorestan provinces of Iran and their associations with variable number of tandem repeat alleles. *Iran J Med Sci* 2018; 43(3): 318-23.

[8] Aulehla-Scholz C, Heilbronner H. Mutational spectrum in German patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutation Mutation Brief* 2003; 21(4): 1-6.

[9] Razipour M, Alavinejad E, Sajedi SZ, Talebi S, Entezam M, Mohajer N, et al. Genetic study of the PAH locus in the Iranian population: familial gene mutations and minihaplotypes. *Metabolic Brain Dis* 2017; 32(5): 1685-91.

[10] Shirzad T, Saeidian AH, Bagherian H, Salehpour S, Setoodeh A, Alaei M, et al. Molecular genetics of a cohort of 635 cases of phenylketonuria in a consanguineous population. *J Inherit Metab Dis* 2018; 1-9.

[11] Binaafar S, Mahdieh N. Genetics of Phenylketonuria in Iran: A Review Study. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2017; 27(147): 446-55. [in Persian]

[12] Haerian Ardakani H, Khazaei Kooohpar Z, Mohammadian S. Mutations Analysis of exon 10 - 11 of phenylalanine Hydroxylase gene in phenylketonuria patients from Golestan province. *Razi J Med Sci* 2018; 25(172): 38-46.

[13] Alibakhshi R., Moradi K, Mohebbi Z, Ghadiri K. Mutation analysis of PAH gene in patients with PKU in western Iran and its association with polymorphisms: identification of four novel mutations. *Metab Brain Dis* 2014; 29(1): 131-8.

[14] Biglari A, Saffari F, Rashvand Z, Alizadeh S, Najafipour R, Sahmani M, et al. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in Iranian patients with phenylketonuria. *Springerplus* 2015; 4(1): 542.

[15] Alavinejad E, Sajedi SZ, Razipour M, Entezam M, Mohajer N, Setoodeh A et al. A novel variant in the PAH gene causing phenylketonuria in an Iranian pedigree. *Avicenna J Med Biotechnol* 2017; 9(3):

146-9.

[16] Bonyadi M, Omrani O, Mohamadi Moghanjoghi S, Shiva S. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in Iranian Azeri Turkish patients with phenylketonuria. *Genet Test Mol Biomarkers* 2010; 14(2): 233-5.

[17] Daniele A, Cardillo G, Pennino C, Carbone MT, Scognamiglio D, Correria A, et al. Molecular epidemiology of phenylalanine hydroxylase deficiency in southern Italy: a 96% detection rate with ten novel mutations. *Ann Hum Genet* 2006; 71(2): 185-93.

[18] Dobrowolski SF, Ellingson C, Coyne T, Grey J, Martin R, Naylor EW, et al. Mutations in the phenylalanine hydroxylase gene identified in 95 patients with phenylketonuria using novel systems of mutation scanning and specific genotyping based upon thermal melt profiles. *Mol Genet Metab* 2007; 91: 218-27.

[19] Bercovich D, Elimelech A, Zlotogora J, Korem S, Yardeni T, Gal N, et al. Genotype-phenotype correlations analysis of mutations in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene. *J Hum Genet* 2008; 53(5): 407-18.

[20] De Lucca M, Arias I, Casique L, Araujo K, Merzon RM. Improving phenylketonuria genotyping by screening for the IVS4+5g>t mutation in the PAH gene. *Clin Chim Acta* 2009; 402(1-2): 206-8.

[21] Dobrowolski SF, Heintz C, Miller T, Ellingson C, Ellingson C, Özer I, et al. Molecular genetics and impact of residual in vitro phenylalanine hydroxylase activity on tetrahydrobiopterin responsiveness in Turkish PKU population. *Mol Genet Metab* 2011; 10: 116-21.

[22] Baturina OA, Morozov IV. Comparative analysis of phenylalanine hydroxylase mutations spectrum in Novosibirsk and Kemerovo regions of Western Siberia, Russia. *Eur J Med* 2016; 11(1): 4-11.