Original Article

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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]

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

ندا پوروطن [۱]، زینب خزائی کوهپر [۲*]

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 فنیل کتونوری 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 اینترونی اطراف آن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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

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 درمان-نشده 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].

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 می-شود. 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 ایران 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

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و ملکولی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

[۲] استادیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

* **نشانی نویسنده مسئول:**
گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

تلفن: ۰۱۱۵۴۲۷۱۱۰۵ **دورنویس:** ۰۱۱۴۲۷۴۴۰۹

پست الکترونیک: khazaei@toniau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲۴ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۷/۹/۱۱

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]

(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 به‌صرفه‌تر است. بنابراین شناسایی موتاسیون‌های شایع این آنزیم به‌طور 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 اگزون ۴ ژن *PAH* به‌روش سکوئنسینگ 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 خانواده های آنها جهت شرکت در مطالعه دعوت به‌عمل 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 ۵-۲ میلی‌لیتر خون‌گیری به‌عمل آمد و برای جلوگیری از انعقاد خون، از فالکون-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^{TM} Blood/Tissue DNA Extraction Mini kit (Takapozist, 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 به‌دست آمده با نانواسپکترو-فتومتر (NanoDrop, 2000C, Thermo scientific, USA) بررسی شد. همچنین، برای تایید کیفیت DNA استخراج شده، نمونه‌ها با روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد مورد مطالعه قرار گرفت (شکل شماره ۱).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (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 AccuPower® PCR PreMix (شرکت Bioneer، کره جنوبی) و با افزودن ۴ میکرولیتر DNA ژنومی (۱۰۰-۱نانوگرم)، ۲ میکرولیتر جفت پرایمر (۲۰ پیکومول) و ۱۴ میکرولیتر آب استریل به ۵ میکرولیتر محلول PreMix (حاوی $dNTP$،$Mgcl_2$، آنزیم و بافر واکنش) تهیه شد. نتایج حاصل از تنظیم شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر اگزون ۴ و نواحی اینترونی اطراف آن به‌صورت زیر می‌باشد: دمای واسرشتگی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، تعداد سیکل‌های واکنش، ۳۰ سیکل که هر سیکل شامل: دمای واسر-شتگی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، دمای چسبیدن پرایمر-ها ۶۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و دمای طویل سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه و دمای طویل سازی نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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 به‌منظور شناسایی موتاسیون‌های موجود در قطعات تکثیر شده تعیین توالی شدند. تعیین توالی توسط دستگاه سکوئنسر ABI3730 (شرکت ماکروژن کره جنوبی) و با استفاده از روش ختم زنجیره صورت گرفت. همچنین، از نرم‌افزارهای CLC main work bench 5، chromas و Gene runner جهت خوانش توالی‌ها و مقایسه نتایج دستگاه سکوئنسر با پلات اصلی اگزون ۴ ژن *PAH* و نواحی اینترونی آن استفاده شد (شکل‌های شماره ۳، ۴ و ۵).

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]

آنالیز آماری

فراوانی نسبی آلل‌ها، تعداد آلل‌های شناسایی شده برای یک جهش یا پلی‌مورفیسم خاص بر تعداد کل آلل‌های مورد مطالعه برابر با فراوانی نسبی آن جهش یا پلی‌مورفیسم می‌باشد که در این مطالعه به‌صورت 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 فنیل‌آلانین 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)، یک جهش پیرایشی IVS4+5G>T(c.441+5G>T) در اینترون ۴ و دو پلی‌مورفیسم IVS3-22C>T(rs2037639) و IVS4+47C>T(rs1718301) به‌ترتیب در اینترون‌های ۳ و ۴ شناسایی گردید. از ۲۵ نمونه، نمونه شماره ۲ با فنوتیپ cPKU و نمونه‌های شماره ۱۲ و ۲۰ با فنوتیپ mPKU در اینترون ۴ دارای جهش پیرایشی IVS4+5G>T بودند که در نمونه ۲ به‌صورت هتروزایگوت و در دو نمونه ۱۲ و ۲۰ به‌صورت هموزایگوت مشاهده شد؛ تغییر باز در اینترون ۴ این ژن باعث ایجاد جایگاه پیرایشی در ژن *PAH* شده بود. همچنین، پلی‌مورفیسم‌های IVS4+47C>T(rs1718301) و IVS3-22C>T(rs203763-9) به‌ترتیب 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 الکتروفروگرام جهش IVS4+5G>T در جدول شماره ۳ و شکل شماره ۳ نشان داده شده است. همچنین، پلی‌مورفیسم IVS4+47C>T در ۱۴ آلل (در ۸ بیمار به‌صورت هتروزیگوت و ۳ بیمار به‌صورت هموزیگوت) و پلی‌مورفیسم IVS3-22C>T در ۴ آلل (در ۲ بیمار به‌صورت هتروزیگوت و ۱ بیمار هموزیگوت) از ۵۰ آلل مورد مطالعه شناسایی شد. الکتروفروگرام توالی رفت این دو پلی-مورفیسم به‌ترتیب در شکل‌های شماره ۴ و ۵ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱- مشخصات پرایمر مورد استفاده در این مطالعه

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

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

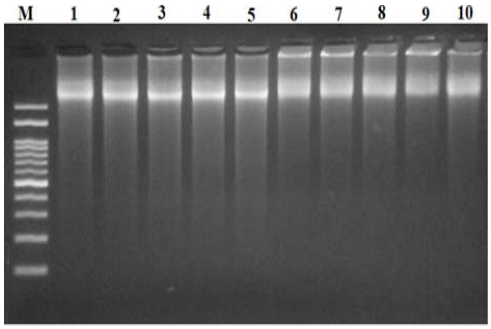
فنوتیپ متابولیک	بیماران#(درصد)
PKU کلاسیک (cPKU)	۳۶
PKU خفیف (mPKU)	۳۲
HPA خفیف (mHPA)	۳۲

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

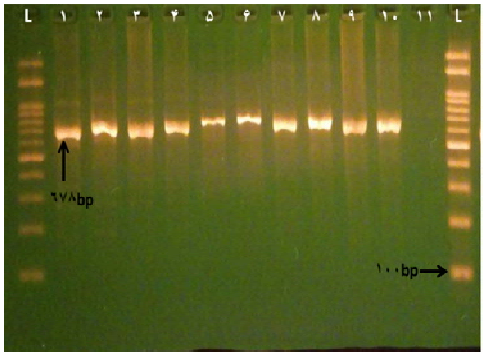
بیمار	والدین	سن تشخیص بیماری	غلظت فنیل‌آلانین قبل از درمان (µmol/L)	فنوتیپ	قومیت	جهش IVS4+5G>T در هر دو آلل
۲	خویشاوند	۲سالگی	۱۸۰۰	*cPKU	ترک	+/-
۱۲	خویشاوند	۱سالگی	۱۱۹۹	**mPKU	گیلک	+/+
۲۰	خویشاوند	۶سالگی	۱۰۶۰	mPKU	گیلک	+/+

* PKU کلاسیک ،** PKU خفیف، +/+:هموزیگوت، +/-: هتروزیگوت

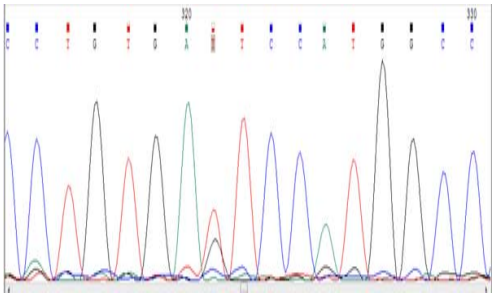
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]



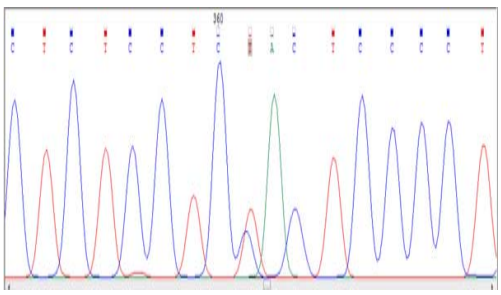
شکل شماره ۱- الکتروفورز DNA استخراج شده از ۱۰ نمونه بیمار روی ژل آگاروز ۱ درصد، M: مارکر وزنی ۱۰۰جفت بازی



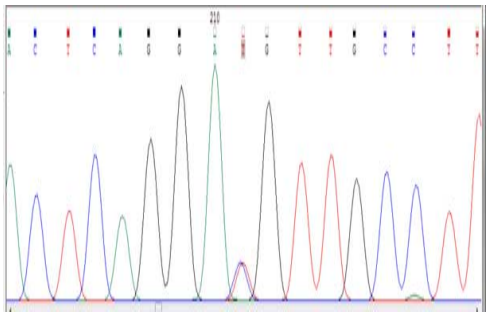
شکل شماره ۲- نتایج الکتروفورز محصولات PCR (شماره ۱۰-۱) مربوط به اگزون ۴ (۶۷۸ bp) روی ژل آگاروز ۱ درصد، شماره ۱۱ (نمونه کنترل منفی)، L (سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز)



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



شکل شماره ۴- الکتروفروگرام پلی‌مورفیسم IVS4+47C>T در حالت هتروزیگوت (توالی رفت)



شکل شماره ۵- الکتروفروگرام پلی‌مورفیسم IVS3-22C>T در حالت هتروزیگوت (توالی رفت)

بحث

شیوع PKU موجب غربال‌گری نوزادان و درمان با رژیم غذایی محدود شده، به‌صورت یک روش معمولی در بسیاری از کشورهای توسعه یافته شده است. محدودیت‌های درمان، ضرورت انجام یک برنامه غربال‌گری نوزادان را افزایش می‌دهد؛ به‌طوری‌که 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 به‌موقع 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 پلی‌مورفیسم 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 پلی‌مورفیسم IVS4+47C>T را در جمعیت PKU ایران گزارش کردند [۴]. در سال ۲۰۱۴ علی‌بخشی و همکاران دو پلی‌مورفیسم IVS4+47C>T و IVS3-22C>T را در بیماران PKU از استان کرمانشاه (غرب ایران) شناسایی کردند [۱۳]. متعاقب آن در سال ۲۰۱۵ پلی‌مورفیسم 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 به‌صورت هتروزیگوت و در دو بیمار به‌صورت هموزیگوت مشاهده شد که تغییر باز در اینترون ۴ این ژن باعث ایجاد جایگاه پیرایشی در ژن *PAH* شده

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]

است. گزارش‌هایی که از جمعیت PKU در ایران از جهش IVS4+5G>T موجود است به‌ترتیب 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 اینترون ۴ گزارش شد [۴]. به‌علاوه، در مطالعه‌ای که در ۲۰۱۷ توسط رضی‌پور و همکاران در ۸۱ خانواده ایرانی با نقص PAH صورت گرفت، هر ۱۳ اگزون و نواحی اینترونی اطراف با روش PCR-Sequencing بررسی شدکه منجر به شناسایی ۳۳ جهش مختلف از جمله جهش c.441+5G>T در اینترون 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. ازجمله 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 علی بخشی 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 آلل از ۱۹۰ آلل [۱۸]، اسرائیل ۵/۲۷ درصد [۱۹]، ونزوئلا ۱۱/۶ درصد [۲۰]، ترکیه ۳ درصد [۲۱] و در دو ناحیه Kemero و Novos-ibirsk در سیبری غربی به‌ترتیب 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].

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 به‌دست 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 به‌منظور 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 درنظر گرفتن اینکه تنها یک اگزون ژن PAH در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است برای به‌دست 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, Khazaee- 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.

[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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]

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 Koohpar 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, Correra 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 hydroxylasegene 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 residualin vitrophenylalanine 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-05]