Internal Medicine Today
Gonabad University of Medical Sciences
October 2022. Vol 28. Issue 4

Research Paper

First Report of Variable Number of Tandem Repeat Alleles in Phenylalanine Hydroxylase Gene in Patients With Phenylketonuria From Guilan Province, Iran

Maryam Vakilpour[1], ***Zeinab Khazaei-Koohpar**[2]

1. Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
2. Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Vakilpour M, Khazaei-Koohpar Z. [First Report of Variable Number of Tandem Repeat Alleles in Phenylalanine Hydroxylase Gene in Patients With Phenylketonuria From Guilan Province, Iran (Persian)]. Internal Medicine Today. 2022; 28(4):464-477. https://doi.org/10.32598/hms.28.4.3841.1

https://doi.org/10.32598/hms.28.4.3841.1

CC BY NC

Received: 27 Jun 2022
Accepted: 04 Aug 2022
Available Online: 01 Oct 2022

Key words:
Polymorphic markers, Phenylketonuria, Guilan Province, Iran

ABSTRACT

Aims Mutations in the phenylalanine hydroxylase (*PAH*) gene are the main reason for phenylketonuria (PKU). The multiplicity of mutations in the *PAH* gene, which leads to PKU, makes the diagnosis of pathogenic mutations impossible in many cases. In these cases, polymorphic markers in the *PAH* gene, such as the variable number of tandem repeats (*VNTR*) are used to determine the carriers in PKU families. This study aims to investigate the allele frequency of this marker in the PKU population of Guilan Province, Iran.

Methods & Materials During one year, 25 unrelated PKU patients were identified from different areas of Guilan Province. After extracting DNA from patients' blood, VNTR containing fragments of the *PAH* gene were assessed using the polymerase chain reaction (PCR)-sequencing method.

Findings PCR products related to *PAH VNTR* alleles produced 380, 500, and 530 base pairs fragments. They were related to 3, 7, and 8 copies of the repeat units, respectively. In addition, these repetitions had a frequency of 6(12%), 6(12%), and 33(66%), respectively. Also, this study demonstrated that PKU patients in Guilan Province, Iran had *VNTR3/VNTR3*, *VNTR3/VNTR8*, *ND/VNTR8*, *VNTR7/VNTR7, VNTR8/VNTR8*, and *ND/ND* genotypes in the *PAH* gene.

Conclusion This study is the first report on the genetic structure of the PKU population using *PAH VNTR* alleles in Guilan Province, Iran. Given the population diversity in Iran, it is necessary to study the frequency and distribution of *VNTR* alleles in different parts of the country.

*** *Corresponding Author:***
Zeinab Khazaei-Koohpar, Asistant Professor.
Address: Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
Tel: +98 (11) 54271105
E-mail: dz.khazaei@gmail.com, ze.khazaei@iau.ac.ir

English Version

Introduction

Phenylketonuria (PKU) and hyperphenylalaninemia (HPA) are the result of the deficiency of hepatic phenylalanine hydroxylase (*PAH*). *PAH* deficiency leads to an abnormal increase in serum phenylalanine (Phe), that is, more than 120 µmol/L, which leads to irreversible mental retardation in untreated patients [1]. PKU is an autosomal recessive disease and the most common disorder of amino acid metabolism with a wide range of clinical and biochemical manifestations, comprising different geographical prevalences [2]. The prevalence of PKU in Caucasians is 1 in 10000 births; however, it is significantly higher in the East Mediterranean region. The highest prevalence of PKU has been reported in this region of the world, 1 in 4000 in Turkey and 1 in 3627 in Iran. This high prevalence can be considered primarily due to the high rate of family marriage in the region [3]. In another study, the highest prevalence was reported in Turkey and the lowest prevalence was reported in the UAE [4]. Hyperphenylalaninemia is the result of any increase in the level of phenylalanine in the blood. This level in healthy children is less than 120 µmol/L [5]. In mild hyperphenylalaninemia (MHP), this number is 120 to 600 µmol/L, in mild PKU (mPKU) it is 600 to 1200 µmol/L, and in classic PKU (cPKU) it is more than 1200 µmol/L [6]. The *PAH* gene with a length of 90 kilobases is located on chromosome 12 in the q22-q24.1 region, which includes 13 exons and 12 introns [7]. PAH protein has a tetrameric structure with several subunits, each of which consists of 3 domains, namely a regulatory domain at the N terminal, a catalytic domain, and a tetramerization domain at the C terminal [7]. The main cause of PKU is a wide range of mutations in the *PAH* gene [8]. About 1180 biallelic variants have been identified in the *PAH* gene [6]. In addition, the *PAH* gene has different polymorphic markers, such as intergenic short tandem repeats (STRs) located in intron 3, a variable number of tandem repeats located in the 3′ untranslated region (3′-UTR), and several restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) that are strongly associated with the PAH region [9]. *VNTR* polymorphism has an AT-rich repeat unit and 30 base pairs, and several alleles of this polymorphism have been identified and reported worldwide [3]. Polymorphic markers that are strongly associated with the *PAH* gene facilitate prenatal diagnosis and identification of carriers [10]. So far, many studies have been conducted on *PAH VNTR* tandem repeat sequences. In these studies, the polymorphism of this sequence, its relationship with the types of *PAH* gene mutations, the ability of this sequence to identify PKU carriers, and the use of *VNTR* sequences along with STR repetitive sequences in forensic medicine have also been considered [10]. Among the conducted research, the study of Hosseini Mezinani et al. in 2008 reports 4 alleles of *VNTR3*, *VNTR7*, *VNTR8*, and *VNTR9* repetitions in PKU chromosomes [3]. In another study conducted in 2017 by Razipour et al., 5 alleles of *VNTR3*, *VNTR7*, *VNTR8*, *VNTR9*, and *VNTR12* repetitions were reported in Iranian PKU patients [9]. Also, in the study of Abedini and Khazaei in 2020, 5 alleles of *VNTR3*, *VNTR7*, *VNTR8*, *VNTR9*, and *VNTR12* repetitions were identified in PKU patients in Northern Iran [10]. Polymorphic systems have a high degree of heterogeneity and are very informative for prenatal diagnosis and carrier screening in most populations [10]. According to the studies conducted in Iran, *VNTR* alleles in the Iranian population were 66% informative [3]. Considering the high prevalence of PKU and consanguineous marriages in the Iranian population, the current study was conducted to identify *PAH VNTR* alleles in PKU patients in Guilan Province, Iran.

Materials and Methods

Patients

This was descriptive cross-sectional research. The study population were 25 people with PKU, non-relatives from different areas of Guilan Province, who were referred to 17 Shahrivar Hospital in Rasht City, within a one-year period, and their disease was diagnosed by a pediatrician. The identification of these patients was based on the files available in 17 Shahrivar Hospital in Rasht City, Iran. Only one patient from each family was included in the study. The levels of phenylalanine pretreatment in 25 patients werre determined at 320-2453 µmol/L. Then, the patients and their families were invited to participate in this study. After explaining the aim of the study to the participants, the consent forms and questionnaires were completed by the subjects or their families (in cases where the patient was a child or mentally challenged). The study was approved by the ethics committee of Islamic Azad University, Rasht Branch. To collect blood samples from each patient, 2-5 mL of blood was collected, and to prevent blood coagulation, 15 mL falcons containing 300 µL of 0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid were used as an anticoagulant.

DNA extraction

Dynabio™ Blood/Tissue DNA Extraction Mini kit (Takapozist, Tehran, Iran) was used for DNA extraction. Fast extraction, yield, and a high degree of purity are the

features of this kit. After extracting the DNA and before performing the PCR reaction to check the quantity and purity of the nucleic acid, the obtained DNA was checked with a nano-spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop, 2000C, USA).

Polymerase chain reaction (PCR)

The PCR reaction was performed in Analytik Jena thermocycler (Germany). The sequence of of the forward and reverse primers used in this reaction was as follows [3]:

Forward primer: 5′-GCTTGAAACTTGAAAGTTGC-3′;

Reverse primer: 5'-GGAAACTTAAGAATCCCCATC-3'.

Primers were synthesized by Bioneer Company, South Korea. The final volume of the PCR reaction mixture was 25 µL which was prepared using the AccuPower® PCR PreMix kit (Bioneer, South Korea) and adding genomic DNA, primer pair (20 pmol), and sterile water to the PreMix solution. The results of setting the PCR conditions for the amplification of the *PAH VNTR* fragment were as follows: Initial denaturation temperature of 94˚C for 10 min, 30 reaction cycles, each cycle including denaturation temperature of 94˚C for 1 min, primers binding temperature of 65˚C for 1 min, extension temperature 72˚C for 1 min and final extension temperature 72˚C for 5 min.

Electrophoresis of PCR Products

To ensure the amplification of the desired fragment and its quality and not amplifying the non-specific products, 3 µL of reaction products (patient samples) and 100 base pairs marker (100 bp DNA Ladder, BR0800201, Biotechrabbit, Germany) on agarose gel 2% was loaded and electrophoresed (Figure 1 and Figure 2).

Sequencing

After observing the clear band of amplified fragments (PCR products) on 2% agarose gel, to ensure the presence of VNTR repeats, the PCR products were sequenced. Also, CLC main workbench software, version 3.5 was used to read the sequences and compare the sequencer device.

The statistical method used in the present study was descriptive; accordingly, the mean was used for the age variable of the patients, and the frequency distribution (percentage) was used for the *VNTR* alleles.

Results

Patients phenotype

In this study, out of 25 patients, 9(36%) were classified in the cPKU group, 8(32%) in the mPKU group, and 8(32%) in the mild HPA group. The pre-treatment Phe levels of 25 patients were determined at 320–2453 µmol/L. The rate of family marriage among patients' parents was 52%. The mean age of the patients was 8.4 years (in the age range of 1 to 21 years) and their ethnic composition included 19 Gilak (76%), 3 Talesh (12%), and 3 Turks (12%).

The results of the nano-spectrophotometer

The spectrophotometer showed the amount of extracted DNA in the range of 100-500 ng/µL and the absorption ratio of 260/280 in the range of 1.8-2, that the extracted DNA with the mentioned quantity and purity was suitable for PCR.

Results of gel electrophoresis of PCR products

The electrophoresis image of PCR products on 2% agarose gel and the bands related to *PAH VNTR* fragments are shown in Figure 1A and Figure 1B. PCR products related to *PAH VNTR* alleles produced 380, 500, and 530 base pairs fragments, which corresponded to the presence of alleles of 3, 7, and 8 repetitions, respectively. Among the 50 investigated alleles, the alleles related to repetitions 3, 7, and 8 had frequencies of 6(12%), 6(12%), and 33(66%), respectively. Also, 5 alleles (10%) were indeterminate (ND). Table 1 shows the number and relative frequency of *PAH VNTR* alleles related to the studied patients. Also, *VNTR8/VNTR8*, *VNTR7/VNTR7*, *VNTR3/VNTR3*, *VNTR3/VNTR8*, *ND/VNTR8*, and *ND/ND* genotypes were observed in the examined subjects, which have frequencies of 15(60%), 3(12%), 2(8%), 2(8%), 1(4%), and 2(8%), respectively.

Sequencing results After the PCR reaction, the PCR products were sequenced to confirm the number of *VNTR* repeats. The base sequence of *PAH VNTR* alleles was determined with CLC main workbench oftware, version 3.5. In this way, the number of *VNTR* repetitions was determined (Table 1). For example, sequencing the PCR product of patient number 11 confirmed that the *VNTR* allele of this patient has 7 repeats with a length of 30 nucleotides:

Table 1. Relative frequency of alleles *PAH VNTR* observed in the studied patients(n=50)

%	Total	The Number of Chromosomes in the Studied Positions			*VNTR* Alleles	PCR Product Length (bp)
		Turk	Talesh	Gilak		
12	6	-	1	5	3	380
12	6	-	-	6	7	500
66	33	4	5	24	8	530
10	5	2	-	3	ND	ND

ND: Not determined.

1- TGCACATATATGTATATGCATATGTACGTA

2- TGCACATATATGTATATGCATATGTACGTA

3- TGCACATATATGTATATGCATATGTACGTA

4- TGCACATATATGTATATGCATATGTACGTA

5- TGCACATATATGTATATGCATATGTACGTA

6- TGCACATATATGTATGTGCATATGTACGTA

7- TGCACATATATGTATGTGCATATGTATGTA

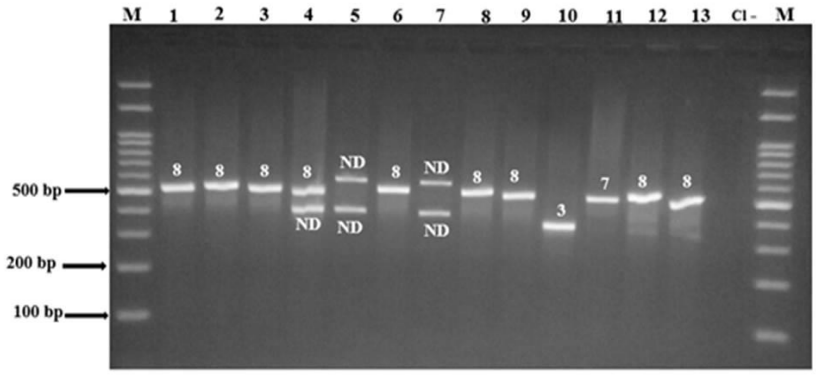
Discussion

The *VNTR* alleles in the *PAH* gene were previously described by Eisensmith et al. [11] In this study, the *VNTR* alleles in the *PAH* gene were examined for the first time in 25 PKU patients in Guilan Province, Iran, and 3 *VNTR* alleles with 3, 7, and 8 repeats were identified with a frequency of 12%, 12%, and 66%. The highest frequency was related to *VNTR8*. Meanwhile, *VNTR8* was observed in all 3 ethnic groups, namely Gilak, Talesh, and Turk, and the highest frequency was related to the Gilak ethnic group. Several studies have been conducted on *VNTR* alleles in the *PAH* gene in Iranian PKU families. In Valian Borojeni and Ebrahimi's study, *PAH VNTR* alleles 3, 7, 8, and 9 repetitions were reported in PKU patients in Isfahan City, Iran [12].

In the study by Hosseini-Mazinani et al., five *VNTR* alleles 3, 6, 7, 8, and 9 repetitions were identified in Iranian PKU families. The distribution of alleles in PKU chromosomes was as follows: *VNTR3* (7.1%), *VNTR6* (0%), *VNTR7* (31.3%), *VNTR8* (48.3%), and *VNTR9* (13.3%). In this study, the highest frequency belonged to *VNTR8* [3]. In the study of Parivar et al. in Yazd Province, Iran, 4 *VNTR* alleles with 3, 7, 8, and 12 repetitions were observed in PKU chromosomes with frequencies of 5.5%, 11%, 78%, and 5.5%, respectively. In their study, the highest frequency was related to the *VNTR8* allele [13].

In the study of Bagheri et al. in West Azerbaijan Province, Iran, *VNTR8* (95%) and *VNTR3* (5%) alleles were reported in 20 PKU patients [1]. In line with the above studies, in the present study, the highest frequency was related to *VNTR8*. In another study conducted by Bagheri et al. on Iranian Turkish-Azeri patients with PKU, 5 *VNTR* alleles, including *VNTR3* (15.1%), *VNTR7* (3.49%), *VNTR8* (74.4%), *VNTR9* (5.81%), and *VNTR11* (1.16%) were identified, in which the 8-repeat allele was the most frequent [14]. In addition, in the study of Razipour et al., mutations and mini-haplotypes related to the *PAH* gene were investigated in 81 Iranian PKU patients. In their study, *VNTR3*, *VNTR7*, *VNTR8*, *VNTR9*, and *VNTR12* alleles were observed [9]. Subsequently, in the study of Alibakshi et al., 18 unrelated PKU patients from 3 provinces of Kermanshah, Hamedan, and Lorestan in Iran were examined in terms of mutations and their relationship with *VNTR* alleles in the *PAH* gene. This study led to the identification of 11 specific mutations and 4 alleles of *VNTR3*, *VNTR7*, *VNTR8*, and *VNTR9* [15].

In another study conducted by Alibakshi et al. on PKU patients of Kurdish ethnicity in Kermanshah Province, Iran, *VNTR* alleles 3, 7, 8, and 9 were identified, and the most frequent allele was 8 [16]. Finally, in a study conducted in 2020 by Abedini and Khazaei for the first time on PKU patients from Golestan Province in Northern Iran, 26 unrelated PKU patients were examined in terms of *PAH VNTR* alleles, which led to the identification of 5 *VNTR* alleles: *VNTR3* (28.85%), *VNTR7* (28.85%), VNTR8 (17.3%), *VNTR9* (19.23%), and *VNTR12* (5.77%). In their study, in contrast to other studies conducted on the PKU population in different regions of Iran,

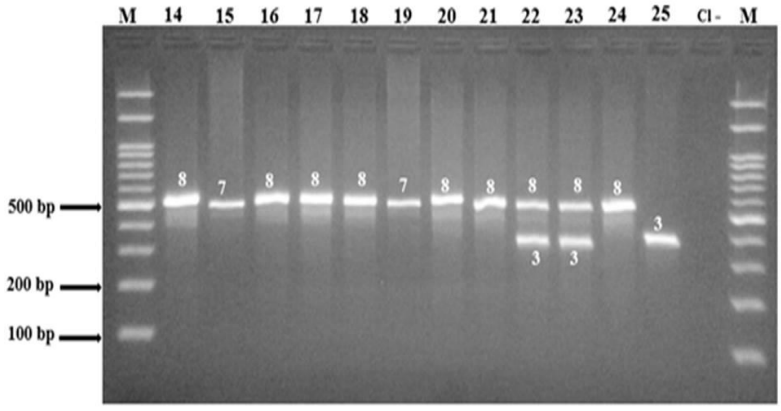


Internal Medicine Today

Figure 1. Electrophoresis image of polymerase chain reaction products (PAH VNTR fragment) in 2% agarose gel related to samples 1-13

Notes:Sample 1: 8/8; Sample 2: 8/8; Sample 3: 8/8; Sample 4: ND/8; Sample 5: ND/ND; Sample 6: 8/8; Sample 7: ND/ND; Sample 8: 8/8; Sample 9: 8/8; Sample 10: 3/3; Sample 11: 7/7; Sample 12: 8/8; Sample 13: 8/8.

Abbreviations: Cl: Negative control; M: Molecular marker 100 base pairs; ND:Not determined.



Internal Medicine Today

Figure 2. Electrophoresis image of polymerase chain reaction products (PAH VNTR fragment) in 2% agarose gel related to samples 14-25

Notes: Sample 14: 8/8; Sample 15: 7/7; Sample 16: 8/8; Sample 17: 8/8; Sample 18: 8/8; Sample 19: 7/7; Sample 20: 8/8; Sample 21: 8/8; Sample 22: 3/8; Sample 23: 3/8; Sample 24: 8/8; Sample 25: 3/3.

Abbreviations: Cl: Negative control; M: Molecular marker 100 base pairs.

2 alleles of *VNTR3* and *VNTR7* had the highest frequency [10]. While in the present study, the highest frequency was assigned to *VNTR8* from Guilan Province (another province located in the North of Iran).. This can be related to the different mutation spectrums in these populations. For example, the IVS10-11G>A mutation is the most common mutation causing PKU in Golestan Province [18, 17].

It is associated with *VNTR7* (data not published), while the above mutation has shown a low frequency in PKU patients from Guilan Province, Iran [2]. In addition, based on the studies, it has been determined that the frequency of multiallelic *VNTR* in the *PAH* gene is significantly different among ethnic groups. Accordingly, different ethnic compositions in these two northern provinces of the country can be another reason for the difference in the frequency of *VNTR* alleles in these two populations. On the other hand, the frequency of the *VNTR3* allele in PKU chromosomes in Guilan Province, Iran, was significantly different from the reports obtained from the European population. *VNTR3* shows a lower frequency and *VNTR8* shows a higher frequency compared to the European population [11] and this is partly related to different mutational spectrums in these populations. The *R408W* mutation is the

most common mutation causing PKU in European populations, which is associated with the *VNTR3* allele, especially in the eastern regions of this continent [3, 19]. This mutation is very rare in the Iranian population. According to the studies conducted in Iran regarding *PAH VNTR* alleles, in the current study in Guilan Province, Iran, *VNTR* alleles in the *PAH* gene have little variation, it is clear that markers with more alleles have a higher information rate. This study is the first reportregarding the genetic structure of PKU population using *VNTR* alleles in the *PAH* gene in Guilan Province. The limitations of the current research included the small sample size and the lack of sufficient funds to investigate another polymorphic marker called STR related to the *PAH* gene in PKU patients.

Conclusion

Due to population diversity in Iran, the type of *VNTR* alleles in the *PAH* gene may be different in different regions. Therefore, it is necessary to investigate the frequency and distribution of *VNTR* marker alleles in different regions of the country. Overall, this study was a preliminary work for the future practical use of this sequence (VNTR) for various purposes, including the identification of heterozygous individuals for phenylketonuria in the community and the analysis of gene flow in the population.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This research has been approved by Islamic Azad University Rasht Branch (Code: REC.1397.138 IR.IAU.RASHT).

Funding

This research paper is taken from the master's thesis of Maryam Vakilpour, approved by Department of Genetics, Islamic Azad University-Tonekabon Branch (Code: 15930553962008|).

Authors' contributions

Writing and editing of the manuscript: Zeinab Khazaei Koohpar; Data collection and statistical analysis: Maryam Vakilpour.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors of the article are grateful to Afshin Safai and the respected staff of 17 Shahrivar Hospital in Rasht, who helped the participants of this research.

This Page Intentionally Left Blank

مقاله پژوهشی

اولین گزارش از تعداد تکرارهای پشت سر هم متغیر در ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز در بیماران فنیل کتونوری از استان گیلان، ایران

مریم وکیل‌پور[۱]، *زینب خزائی کوهپر[۲]

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.
۲. گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Vakilpour M, Khazaei-Koohpar Z. [First Report of Variable Number of Tandem Repeat Alleles in Phenylalanine Hydroxylase Gene in Patients With Phenylketonuria From Guilan Province, Iran (Persian)]. Internal Medicine Today. 2022; 28(4):464-477. https://doi.org/10.32598/hms.28.4.3841.1

https://doi.org/10.32598/hms.28.4.3841.1

تاریخ دریافت: ۰۶ تیر ۱۴۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳ مرداد ۱۴۰۱
تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۴۰۱

چکیده

اهداف جهش‌ها در ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز علت اصلی فنیل کتونوری هستند. تعدد جهش در ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز عامل فنیل کتونوری باعث می‌شود در بسیاری از موارد، تشخیص جهش بیماری‌زا امکان‌پذیر نباشد. در این موارد از مارکرهای چند شکلی درون ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز مثل تعداد تکرارهای پشت سر هم متغیر (VNTR) برای تعیین ناقلین در خانواده‌های فنیل کتونوری استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی آللی این مارکر در جمعیت فنیل کتونوری استان گیلان بود.

مواد و روش‌ها در این مطالعه توصیفی‌مقطعی طی یک دوره ۱ ساله، تعداد ۲۵ بیمار فنیل کتونوری و غیر مرتبط از نواحی مختلف استان گیلان شناسایی شدند. پس از استخراج DNA از خون بیماران قطعه حامل VNTR ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز-تعیین توالی بررسی شد.

یافته‌ها محصولات PCR مربوط به آلل‌های PAH VNTR قطعات ۳۸۰، ۵۰۰ و ۵۳۰ جفت‌باز تولید کرد. آن‌ها به‌ترتیب مربوط به تکرارهای ۳، ۷ و ۸ تایی هستند. به‌علاوه این تکرارها به‌ترتیب دارای فراوانی ۶ (۱۲ درصد)، ۶ (۱۲ درصد) و ۳۳ (۶۶ درصد) بودند. همچنین این مطالعه نشان داد بیماران فنیل کتونوری در استان گیلان دارای ژنوتیپ‌های VNTR3/VNTR3، VNTR3/ VNTR8/VNTR8، VNTR7/VNTR7، ND/VNTR8 ، VNTR8 و ND/ND در ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز بودند.

نتیجه‌گیری این مطالعه اولین گزارش در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت فنیل کتونوری با استفاده از آلل‌های PAH VNTR در استان گیلان است. باتوجه‌به تنوع جمعیتی در ایران، بررسی فراوانی و پراکندگی آلل‌های VNTR در نقاط مختلف کشور ضروری است.

کلیدواژه‌ها:
مارکر چند شکلی، فنیل کتونوری، استان گیلان، ایران

* **نویسنده مسئول:**
دکتر زینب خزائی کوهپر
نشانی: تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی،واحد تنکابن، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی.
تلفن: ۵۴۲۷۱۱۰۵ (۱۱) ۹۸+
پست الکترونیکی: dz.khazaei@gmail.com, ze.khazaei@iau.ac.ir

مقدمه

فنیل‌کتونوری[1] و هیپرفنیل‌آلانینمی[2] حاصل نقص فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز کبدی[3] است که منجر به افزایش غیرطبیعی فنیل‌آلانین سرمی یعنی بیش از ۱۲۰ میکرومول بر لیتر می‌شود که منجر به عقب‌ماندگی غیرقابل برگشت ذهنی در بیماران درمان‌نشده می‌شود [۱]. فنیل‌کتونوری بیماری اتوزومال مغلوب و شایع‌ترین اختلال متابولیسم اسیدآمینه با دامنه وسیعی از تظاهرات بالینی و بیوشیمیایی است که ازنظر جغرافیایی شیوع متفاوتی دارد [۲]. شیوع فنیل‌کتونوری در سفیدپوستان، ۱ در ۱۰۰۰۰ تولد است، اما به‌طور قابل توجهی در منطقه مدیترانه شرقی بیشتر است. درواقع بیشترین شیوع فنیل‌کتونوری در این دو منطقه از جهان گزارش شده است، ۱ در ۴۰۰۰ در ترکیه و ۱ در ۳۶۲۷ در ایران. این شیوع بالا را می‌توان در درجه اول ناشی از نرخ بالای ازدواج فامیلی در منطقه دانست [۳].

در مطالعه دیگری بیشترین شیوع در ترکیه و کمترین شیوع در امارات گزارش شده است [۴]. هیپرفنیل‌آلانینمی حاصل هر گونه افزایش سطح فنیل‌آلانین خون می‌باشد. این سطح در کودکان سالم کمتر از ۱۲۰ میکرومول بر لیتر است [۵]. در هیپرفنیل‌آلانینمی خفیف[4] ۱۲۰-۶۰۰ میکرومول بر لیتر، در فنیل‌کتونوری خفیف[5] ۶۰۰-۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر و در فنیل‌کتونوری کلاسیک[6] بیش از ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر است [۶]. ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز با طول ۹۰ کیلوباز روی کروموزوم ۱۲ در ناحیه q۲۲-q۲۴٫۱ واقع شده است که شامل ۱۳ اگزون و ۱۲ اینترون می‌باشد [۷]. پروتئین فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز کبدی ساختار تترامری با چندین زیر واحد دارد که هریک از ۳ دامین، دامین تنظیمی در N ترمینال و ۱ دامین کاتالیتیک و ۱ دامین تترامریزه شدن در C ترمینال تشکیل می‌شوند [۷].

عامل اصلی فنیل‌کتونوری محدوده وسیعی از موتاسیون‌ها در ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز است [۸]. در ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز حدود ۱۱۸۰ واریانت دو آللی شناسایی شده است [۶]. به‌علاوه ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز دارای نشانگرهای چند شکلی مختلف مانند تکرارهای پشت سر هم کوتاه درون ژنی (STRs) واقع در اینترون ۳، تعداد تکرارهای پشت سر هم متغیر درون ژنی[7] واقع در ناحیه ترجمه نشدنی ′3 (3′-UTR) و چندین پلی مورفیسم قطعات حاصل از عمل آنزیم‌های محدودکننده (RFLPs) است که به‌شدت با ناحیه فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز مرتبط هستند [۹]. پلی مورفیسم چند آللی VNTR یک واحد تکراری غنی از AT، ۳۰ جفت‌بازی دارد و چندین آلل این پلی مورفیسم در دنیا شناسایی و گزارش شده است [۳]. نشانگرهای چند شکلی که به‌شدت با ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز مرتبط هستند، تشخیص قبل از تولد و شناسایی ناقلین را تسهیل می‌کنند [۱۰]. تاکنون مطالعات زیادی در مورد توالی‌های تکراری پشت سر هم PAH VNTR انجام شده است. در این مطالعات پلی مورفیسم این توالی، ارتباط آن با انواع جهش‌های ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز، توانایی این توالی در شناسایی ناقلین فنیل‌کتونوری و استفاده از توالی VNTR در کنار توالی‌های تکراری STR در پزشکی قانونی نیز مورد توجه قرار گرفته است [۱۰].

از جمله مطالعات انجام‌شده شامل مطالعه حسینی مزینانی و همکاران در سال ۲۰۰۸ بود که در آن ۴ نوع آلل VNTR با ۳، ۷، ۸ و ۹ تکرار در کروموزوم‌های فنیل‌کتونوری شناسایی شد [۳]. در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۷ رضی‌پور و همکاران در بیماران فنیل‌کتونوری ایرانی انجام دادند ۵ آلل VNTR با ۳، ۷، ۸، ۹ و ۱۲ تکرار گزارش شد [۹]. همچنین در مطالعه عابدینی و خزائی در سال ۲۰۲۰، ۵ آلل VNTR با ۳، ۷، ۸، ۹ و ۱۲ تکرار در بیماران فنیل‌کتونوری در شمال ایران شناسایی شد [۱۰]. به‌طورکلی سیستم‌های چند شکلی درجه بالایی از ناهمگنی دارند و برای تشخیص قبل از تولد و غربالگری ناقلین در اکثر جمعیت‌ها بسیار اطلاع‌رسان هستند [۱۰]. براساس مطالعات انجام‌شده در ایران، آلل‌های VNTR در جمعیت ایران ۶۶ درصد اطلاع‌رسان بوده است [۳]. باتوجه‌به شیوع بالای فنیل‌کتونوری و ازدواج‌های فامیلی در جمعیت ایرانی مطالعه فعلی به منظور شناسایی آلل‌های PAH VNTR در بیماران فنیل‌کتونوری در استان گیلان انجام شد.

مواد و روش‌ها

بیماران

این مطالعه از نوع توصیفی‌مقطعی می‌باشد. جامعه مورد بررسی در این مطالعه، ۲۵ فرد مبتلا به بیماری فنیل‌کتونوری، غیر خویشاوند و از نواحی مختلف استان گیلان می‌باشند که جهت درمان به بیمارستان ۱۷ شهریور رشت مراجعه کرده‌اند (طی یک دوره ۱ ساله) و بیماری آن‌ها توسط پزشک متخصص کودکان تأیید شده است. شناسایی این بیماران براساس پرونده‌های موجود در بیمارستان ۱۷ شهریور رشت صورت گرفت. فقط ۱ بیمار از هر خانواده وارد مطالعه شد. سطح فنیل‌آلانین قبل از درمان در ۲۵ بیمار ۳۲۰ تا ۲۴۵۳ میکرومول بر لیتر تعیین شد. سپس از بیماران و خانواده‌های آن‌ها جهت شرکت در این مطالعه دعوت به عمل آمد. پس از توجیه شرکت‌کنندگان، فرم‌های رضایت‌نامه و پرسش‌نامه از سوی بیماران و یا خانواده‌های آنان تکمیل شد (در مواردی که بیمار کودک یا دچار عقب‌ماندگی ذهنی بود). نمونه‌گیری با مجوز کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه

1. Phenylketonuria (PKU)
2. Hyperphenylalaninemia (HPA)
3. Phenylalanine hydroxylase(PAH)
4. Mild hyperphenylalaninemia (MHP)
5. Mild PKU(mPKU)
6. Classic PKU(cPKU)
7. Variable number of tandem repeat

آزاد اسلامی واحد رشت انجام شد. به منظور جمع‌آوری نمونه‌های خون از هر فرد بیمار به میزان ۲-۵ میلی‌لیتر خون‌گیری به عمل آمد و برای جلوگیری از انعقاد خون، از فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری حاوی ۳۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۵ مولار به‌عنوان ماده ضدانعقاد استفاده شد.

استخراج DNA

برای استخراج DNA از کیت Dynabio™، کیت استخراج دنا از خون و بافت (تکاپوزیست، تهران، ایران) استفاده شد که استخراج سریع، بازده و درجه خلوص بالا از ویژگی‌های این کیت می‌باشد. پس از استخراج DNA و قبل از انجام واکنش PCR جهت بررسی کمیت و خلوص اسید نوکلئیک، DNA به‌دست‌آمده با نانواسپکتروفتومتر (Thermo Scientific NanoDrop,2000C,USA) بررسی شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[8]

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر[9] ساخت کشور آلمان انجام شد. توالی پرایمرهای رفت و برگشت مورد استفاده در این واکنش به‌صورت زیر بود [۳]:

پرایمر رفت: 5′-GCTTGAAACTTGAAAGTTGC-3′

پرایمر برگشت: 5′-GGAAACTTAAGAATCCCATC-3′

سنتز پرایمرها توسط شرکت Bioneer، کره‌جنوبی صورت گرفت. حجم نهایی مخلوط واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر بود که با استفاده از کیت AccuPower® PCR PreMix (شرکت Bioneer، کره‌جنوبی) و با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایمر (20 pmol) و آب استریل به محلول PreMix تهیه شد. نتایج حاصل از تنظیم شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر قطعه PAH VNTR به‌صورت زیر می‌باشد:

دمای واسرشتگی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه،

تعداد سیکل‌های واکنش، ۳۰ سیکل که هر سیکل شامل:

-دمای واسرشتگی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه؛

-دمای اتصال پرایمرها ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه؛

-دمای طویل‌سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه؛

-دمای طویل‌سازی نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه.

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[10] بر روی ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری و الکتروفورز شد (تصاویر شماره ۱-الف و ۱-ب).

تعیین توالی

پس از مشاهده باند واضح قطعات تکثیرشده (محصولات PCR) بر روی ژل آگارز ۲ درصد، برای اطمینان از حضور تکرارهای VNTR، محصولات PCR تعیین توالی شدند. تعیین توالی توسط دستگاه سکوئنسر ABI3730 (شرکت Macro-gen کره جنوبی) صورت گرفت. همچنین از نرم‌افزار CLC main work bench v3.5 جهت خوانش توالی‌ها و مقایسه دستگاه سکوئنسر استفاده شد. روش آماری مورد استفاده در مطالعه حاضر توصیفی می‌باشد که برای متغیر سن بیماران از شاخص میانگین و برای آلل‌های VNTR از توزیع فراوانی (درصد) استفاده شده است.

8. Polymerase Chain Reaction (PCR)
9. Analytik jena
10. 100bp DNA Ladder, BR0800201, Biotechrabbit, Germany

جدول ۱. فراوانی نسبی (درصد) آلل‌های **PAH VNTR** مشاهده‌شده در بیماران مورد مطالعه(n=۵۰)

طول محصول PCR(bp)	آلل‌های VNTR	تعداد کروموزوم‌ها در موقعیت‌های موردمطالعه			کل	درصد
		گیلک	تالش	ترک		
۳۸۰	۳	۵	۱	–	۶	۱۲
۵۰۰	۷	۶	–	–	۶	۱۲
۵۳۰	۸	۲۴	۵	۴	۳۳	۶۶
نامشخص	نامشخص	۳	–	۲	۵	۱۰

جدول ۲. فراوانی نسبی (درصد) ژنوتیپ‌های مشاهده‌شده در بیماران مورد مطالعه

ژنوتیپ	تعداد (درصد)
VNTR8/VNTR8	۱۵(۶۰)
VNTR7/VNTR7	۳(۱۲)
VNTR3/VNTR3	۲(۸)
VNTR3/VNTR8	۲(۸)
ND/VNTR8	۱(۴)
ND/ND	۲(۸)

طب داخلی روز

یافته‌ها

فنوتیپ بیماران

در این مطالعه از ۲۵ بیمار، ۹ نفر (۳۶ درصد) در گروه فنیل‌کتونوری کلاسیک، ۸ نفر (۳۲ درصد) در گروه فنیل‌کتونوری خفیف و ۸ نفر (۳۲ درصد) در گروه هیپرفنیل‌آلانینمی خفیف طبقه‌بندی شدند. سطح فنیل‌آلانین سرمی قبل از درمان ۲۵ بیمار ۳۲۰ تا ۲۴۵۳ میکرومول بر لیتر تعیین شد. میزان ازدواج فامیلی در بین والدین بیماران ۵۲ درصد بود. میانگین سن بیماران ۸/۴ سال (محدوده ۱-۲۱ سال) بود و ترکیب قومیتی آن‌ها شامل گیلک ۱۹ (۷۶ درصد)، تالش ۳ (۱۲ درصد) و ترک ۳ (۱۲ درصد) بود.

نتایج نانواسپکتروفتومتر

اسپکتروفتومتر به‌ترتیب کمیت DNA استخراج‌شده را در محدوده ۵۰۰-۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر و نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ را در محدوده ۱/۸-۲ نشان داد که DNA استخراج‌شده با کمیت و خلوص مذکور برای انجام PCR مناسب بود.

نتیجه الکتروفورز محصولات PCR

تصویر الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد و باندهای مربوط به قطعات PAH VNTR در تصاویر شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است. محصولات PCR مربوط به آلل‌های PAH VNTR، قطعات ۳۸۰، ۵۰۰ و ۵۳۰ جفت‌بازی را تولید کردند که آن‌ها به‌ترتیب با حضور آلل‌های ۳، ۷ و ۸ تکرار مطابقت داشتند. از میان ۵۰ آلل مورد بررسی، آلل‌های مربوط به تکرارهای ۳، ۷ و ۸ به‌ترتیب دارای فراوانی ۶ (۱۲ درصد)، ۶ (۱۲ درصد) و ۳۳ (۶۶ درصد) بودند. همچنین ۵ آلل (۱۰ درصد) به‌صورت نامشخص[11] بود. جدول شماره ۱ تعداد و فراوانی نسبی آلل‌های PAH VNTR مربوط به بیماران مورد مطالعه را نشان می‌دهد. همچنین ژنوتیپ‌های مشاهده‌شده در افراد مورد بررسی در جدول شماره ۲ ارائه شده است

نتایج تعیین توالی

پس از واکنش PCR، برای تأیید تعداد تکرارهای VNTR، محصولات PCR تعیین توالی شدند. توالی بازی آلل‌های PAH VNTR با نرم‌افزار CLC main work bench v 3.5 تعیین شد. به این ترتیب تعداد تکرارهای VNTRمشخص شد (جدول شماره ۱). برای مثال، تعیین توالی محصول PCR مربوط به بیمار شماره ۱۱ تأیید کرد که آلل VNTR این بیمار دارای ۷ تکرار با طول ۳۰ نوکلئوتیدمی‌باشد:

1- TGCACATATATGTATATGCATATGTACGTA

2- TGCACATATATGTATATGCATATGTACGTA

3- TGCACATATATGTATATGCATATGTACGTA

4- TGCACATATATGTATATGCATATGTACGTA

5- TGCACATATATGTATATGCATATGTACGTA

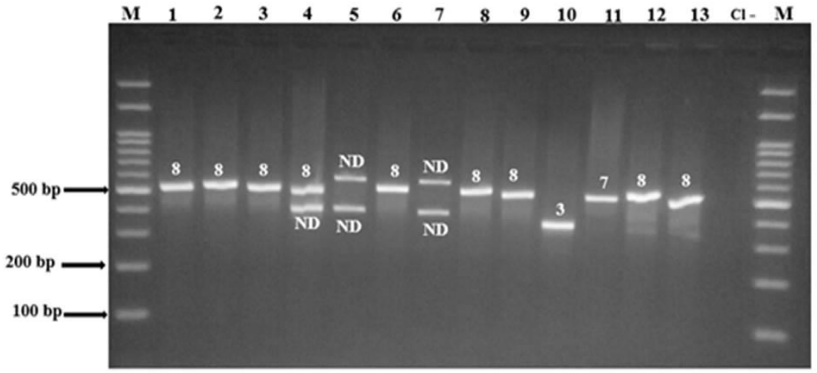
6- TGCACATATATGTATGTGCATATGTACGTA

7- TGCACATATATGTATGTGCATATGTATGTA

بحث

آلل‌های VNTR در ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز قبلاً توسط آیزنسمیت و همکاران شرح داده شد [۱۱] در این مطالعه، آلل‌های VNTR در ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز، در ۲۵ بیمار فنیل‌کتونوری در استان گیلان برای اولین بار مورد بررسی قرارگرفت و ۳ آلل VNTR با تکرارهای ۳، ۷ و ۸ به‌ترتیب با فراوانی ۱۲، ۱۲ و ۶۶ درصد شناسایی شد که بالاترین فراوانی مربوط به VNTR8 بود. قابل توجه است که VNTR8 در هر ۳ گروه قومی گیلک، تالش و ترک مشاهده شد و بالاترین فراوانی مربوط به

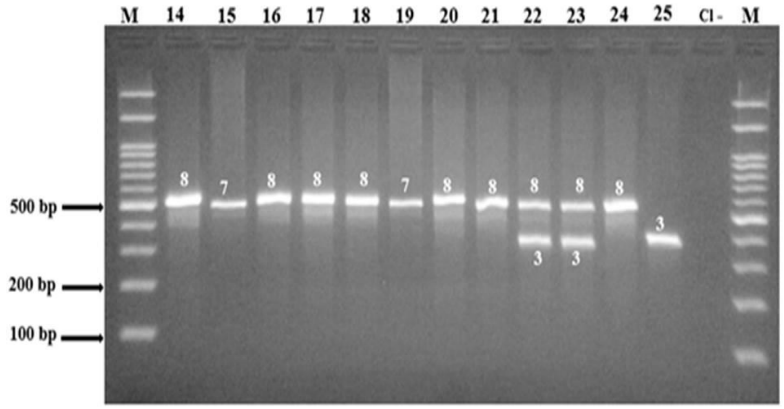
11. Not Determined (ND)



طب داخلی روز

تصویر ۱. تصویر الکتروفورز محصولات PCR (قطعه PAH VNTR) در ژل آگاروز ۲ درصد مربوط به نمونه‌های ۱-۱۳، نمونه ۱: ۸/۸؛ نمونه ۲: ۸/۸؛ نمونه ۳: ۸/۸؛ نمونه ۴: ۸/ND؛ نمونه ۵: ND/ND؛ نمونه ۶: ۸/۸؛ نمونه ۷: ND/ND؛ نمونه ۸: ۸/۸؛ نمونه ۹: ۸/۸؛ نمونه ۱۰: ۳/۳؛ نمونه ۱۱: ۷/۷؛ نمونه ۱۲: ۸/۸؛ نمونه ۱۳: ۸/۸؛ Cl :- کنترل منفی؛ M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی؛ ND: Not Determined.

گروه قومی گیلک بود. مطالعات متعددی در مورد آلل‌های VNTR در ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز در خانواده‌های فنیل‌کتونوری ایرانی انجام شده است. در مطالعه ولیان و ابراهیمی آلل‌های مارکر PAH VNTR، با ۳، ۷، ۸ و ۹ تکرار در بیماران فنیل‌کتونوری در اصفهان گزارش شد [۱۲]. در مطالعه حسینی مزینانی و همکاران ۵ آلل VNTR با تکرارهای ۳، ۶، ۷، ۸ و ۹ تایی در خانواده‌های فنیل‌کتونوری ایرانی شناسایی شد، به‌طوری‌که توزیع آلل‌ها در کروموزوم‌های فنیل‌کتونوری بدین شرح بود: VNTR3 (۷/۱ درصد)، VNTR (صفر درصد)، VNTR7 (۳۱/۳ درصد)، VNTR8 (۴۸/۳ درصد) و VNTR9 (۱۳/۳ درصد). در این مطالعه بالاترین فراوانی متعلق به VNTR8 بود [۳]. در مطالعه پریور و همکاران در استان یزد، ۴ آلل VNTR دارای ۳، ۷، ۸ و ۱۲ تکرار به‌ترتیب با فراوانی ۵/۵، ۷۸، ۱۱ و ۵/۵ درصد در کروموزوم‌های فنیل‌کتونوری مشاهده شد. در مطالعه آن‌ها نیز بیشترین فراوانی مربوط به آلل VNTR8 بود [۱۳]. در مطالعه باقری و همکاران در استان آذربایجان‌غربی در ۲۰ بیمار فنیل‌کتونوری، آلل‌های VNTR8 (۹۵ درصد) و VNTR3 (۵ درصد) گزارش شد [۱]. در توافق با موارد فوق، در مطالعه حاضر نیز بالاترین فراوانی مربوط به VNTR8 بود. در مطالعه دیگری که توسط باقری و همکاران در بیماران ترکی-آذری ایرانی مبتلا به فنیل‌کتونوری انجام شد، ۵ آلل VNTR شامل آلل‌های VNTR3 (۱۵/۱ درصد)، VNTR7 (۳/۴۹ درصد)، VNTR8 (۷۴/۴ درصد)، VNTR9 (۵/۸۱ درصد) و VNTR11 (۱/۱۶ درصد) شناسایی شد که در آن آلل با ۸ تکرار بیشترین فراوانی را داشت [۱۴]. به‌علاوه در مطالعه رضی‌پور و همکاران موتاسیون‌ها و مینی هاپلوتایپ مرتبط با ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز در ۸۱ بیمار فنیل‌کتونوری ایرانی مورد بررسی قرار گرفت که در مطالعه آن‌ها، آلل‌های VNTR3، VNTR12 و VNTR9، VNTR8، VNTR7 مشاهده شد [۹]. متعاقباً در مطالعه علی بخشی و همکاران ۱۸ بیمار فنیل‌کتونوری غیر خویشاوند از ۳ استان کرمانشاه، همدان و لرستان ازنظر موتاسیون‌ها و ارتباط آن‌ها با آلل‌های VNTR در ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز



طب داخلی روز

تصویر ۲. تصویر الکتروفورز محصولات PCR (قطعه PAH VNTR) در ژل آگاروز۲ درصد مربوط به نمونه‌های ۱۴-۲۵، نمونه ۱۴: ۸/۸؛ نمونه ۱۵: ۷/۷؛ نمونه ۱۶: ۸/۸؛ نمونه ۱۷: ۸/۸؛ نمونه ۱۸: ۸/۸؛ نمونه ۱۹: ۷/۷؛ نمونه ۲۰: ۸/۸؛ نمونه ۲۱: ۸/۸؛ نمونه ۲۲: ۸/۳؛ نمونه ۲۳: ۸/۳؛ نمونه ۲۴: ۸/۸؛ نمونه ۲۵: ۳/۳؛ Cl :- کنترل منفی؛ M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی.

مورد بررسی قرار گرفتند. مطالعه آن‌ها منجر به شناسایی ۱۱ موتاسیون اختصاصی و ۴ آلل VNTR8، VNTR7، VNTR3 و VNTR9 شد [۱۵].

در مطالعه دیگری که علی بخشی و همکاران در بیماران فنیل‌کتونوری با قومیت کرد در استان کرمانشاه انجام دادند نیز آلل‌های VNTR با ۳، ۷، ۸ و ۹ تکرار شناسایی شد که بیشترین فراوانی متعلق به آلل ۸ تکرار بود [۱۶]. درنهایت مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۰ عابدینی و خزائی برای اولین بار در بیماران فنیل‌کتونوری از استان گلستان در شمال ایران انجام دادند، ۲۶ بیمار فنیل‌کتونوری غیر خویشاوند ازنظر آلل‌های PAH VNTR مورد بررسی قرار گرفتند که منجر به شناسایی ۵ آلل VNTR3 (۲۸/۸۵ درصد)، VNTR7 (۲۸/۸۵ درصد)، VNTR8 (۱۷/۳ درصد)، VNTR9 (۱۹/۲۳ درصد) و VNTR12 (۵/۷۷ درصد) شد. در مطالعه آن‌ها برخلاف سایر مطالعات انجام‌شده در جمعیت فنیل‌کتونوری در مناطق مختلف ایران دو آلل VNTR3 و VNTR7 بیشترین فراوانی را دارا بودند [۱۰]، درحالی‌که در مطالعه حاضر از استان گیلان (یکی دیگر از استان‌های واقع در شمال ایران) بیش‌ترین فراوانی به VNTR8 اختصاص داشت. این تاحدی با طیف موتاسیونی مختلف در این جمعیت‌ها می‌تواند مرتبط باشد. مثلاً جهش IVS10-11G>A شایع‌ترین جهش عامل فنیل‌کتونوری در استان گلستان [۱۷، ۱۸] با VNTR7 مرتبط است (داده‌ها منتشرنشده)، درحالی‌که جهش فوق در بیماران فنیل‌کتونوری از استان گیلان فراوانی کمی را نشان داده است [۲].

به‌علاوه براساس مطالعات انجام‌شده، مشخص شده است فراوانی VNTR چندآللی در ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز به‌طور معناداری در میان گروه‌های قومیتی متفاوت است. بنابراین ترکیب قومیتی متفاوت در این دو استان شمالی کشور می‌تواند دلیل دیگر تفاوت در فراوانی آلل‌های VNTR در این دو جمعیت باشد. از سوی دیگر فراوانی آلل VNTR3 در کروموزوم‌های فنیل‌کتونوری در استان گیلان تفاوت معناداری با گزارشات حاصله از جمعیت اروپایی داشت، به‌طوری‌که VNTR3 فراوانی کمتر و VNTR8 فراوانی بیشتری را نسبت به جمعیت اروپایی نشان می‌دهد [۱۱] و این نیز تا حدی با طیف‌های موتاسیونی مختلف در این جمعیت‌ها مرتبط است. موتاسیون R408W شایع‌ترین موتاسیون عامل فنیل‌کتونوری در جمعیت‌های اروپایی است که با آلل VNTR3 به‌ویژه در نواحی شرقی این قاره مرتبط است [۳، ۱۹]. این موتاسیون در جمعیت ایرانی بسیار نادر است. باتوجه‌به مطالعات انجام‌شده در ایران درارتباط‌با آلل‌های PAH VNTR، در مطالعه حاضر در استان گیلان آلل‌های VNTR در ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز تنوع کمی دارند. واضح است که نشانگرهایی با تعداد آلل بیشتر، میزان اطلاع‌رسانی بالاتری دارند. این مطالعه اولین گزارش از ساختار ژنتیک جمعیت فنیل کتونوری با استفاده از آلل‌های VNTR در ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز در استان گیلان است. محدودیت‌های تحقیق حاضر شامل حجم کم نمونه و عدم وجود بودجه کافی جهت بررسی نشان‌گر پلی‌مورفیک دیگر به نام STR مرتبط با ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز در بیماران فنیل‌کتونوری بود.

نتیجه‌گیری

باتوجه‌به تنوع جمعیتی در ایران، نوع آلل‌های VNTR در ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز ممکن است در مناطق مختلف متفاوت باشد. بنابراین بررسی فراوانی و پراکندگی آلل‌های نشانگر VNTR در مناطق مختلف کشور ضروری است، به‌طورکلی این مطالعه یک کار مقدماتی برای استفاده عملی آینده از این توالی (VNTR) برای اهداف مختلف ازجمله شناسایی افراد هتروزیگوت در مورد فنیل کتونوری در جامعه و تجزیه‌وتحلیل جریان ژن در جمعیت بود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این تحقیق در دانشگاه آزاد اسلامی رشت با کد (REC.1397.138 IR.IAU.RASHT) تأیید شده است.

حامی مالی

این مقاله پژوهشی برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد مریم وکیل‌پور، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن است (کد: ۱۵۹۳۰۵۵۳۹۶۲۰۰۸). این تحقیق هیچ‌گونه کمک مالی از سازمان های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیر انتفاعی دریافت نکرد.

مشارکت نویسندگان

نگارش و ویرایش متن: زینب خزائی کوهپر، جمع‌آوری داده‌ها و تحلیل آماری: مریم وکیل‌پور.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از آقای دکتر افشین صفائی و پرسنل محترم بیمارستان ۱۷ شهریور رشت که دست اندر کاران این پژوهش را یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

[1] Bagheri M, Abdi Rad I, Hosseini Jazani N, Zarrin R, Ghazavi A. Association Between PAH Mutations and VNTR Alleles in the West Azerbaijani PKU Patients . MAEDICA: A Journal of Clinical Medicine. 2014; 9(3):242-7. [Link]

[2] Nemati H, Karimi Yousefi SS, Pourvatan N, Aparviz R, Farzaneh P, Khazaei Koohpar Z, et al. Mutation analysis of phenylketonuria in the north of Iran. Gene Reports. 2021; 24:101196. [DOI:10.1016/j.genrep.2021.101196]

[3] Hosseini-Mazinani SM, Koochmeshgi J, Khazaee-Koohpar Z, HoseinPur-Nobari N, Seifati SM. Carrier detection of phenylketonuria in Iranian families by variable number tandem-repeat polymorphism analysis. EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal. 2008; 14(6):1445-51. [Link]

[4] Jafarzadeh-Esfehani R, Vojdani S, Hashemian S, Mirinezhad M, Pourafshar M, Forouzanfar N, et al. Genetic variants of the phenylalanine hydroxylase gene in patients with phenylketonuria in the northeast of Iran. Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism. 2020; 33(3):355-9. [DOI:10.1515/jpem-2019-0351] [PMID]

[5] Gundorova P, Zinchenko RA, Makaov AK, Polyakov AV. The spectrum of mutations in the PAH gene in patients with hyperphenylalaninemia from the Karachay-Cherkess Republic. Russian Journal of Genetics. 2017; 53(7):813-9. [Link]

[6] Hillert A, Anikster Y, Belanger-Quintana A, Burlina A, Burton BK, Carducci C, et al. The genetic landscape and epidemiology of Phenylketonuria. American Journal of Human Genetics. 2020; 107(2):234-250. [DOI:10.1016/j.ajhg.2020.06.006] [PMID] [PMCID]

[7] Zarinkoob M, Khazaei Koohpar Z. Mutation analysis of exon 5 of PAH gene in phenylketonuria patients from Golestan Province, Iran. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences. 2022; 24(1):15-9. [DOI:10.34172/jsums.2022.03]

[8] Rastegar Moghadam M, Shojaei A, Babaei V, Rohani F, Ghazi F. Mutation analysis of Phenylalanine hydroxylase gene in Iranian patients with Phenylketonuria. Medical Journal of The Islamic Republic of Iran. 2018; 32:21. [DOI:10.14196/mjiri.32.21] [PMID] [PMCID]

[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 Disease. 2017; 32(5):1685-91. [DOI:10.1007/s11011-017-0048-7] [PMID]

[10] Abedini G, Khazaei Koohpar Z. Identifying variable number of tandem repeat alleles in phenylalanine hydroxylase gene in patients with phenylketonuria in Golestan Province, Iran. Journal of Advances in Medical and Biomedical Research. 2020; 28(129):198-203. [Link]

[11] Eisensmith RC, Goltsov AA, Woo SL.A simple, rapid, and highly informative PCR-based procedure for prenatal diagnosis and carrier screening of phenylketonuria. Prenatal Diagnosis. 1994; 14 (12):1113-8. [DOI:10.1002/pd.1970141204]] [PMID]

[12] Valian Borojeni S, Ebrahimi E. Investigating the importance of PAH VNTR marker in the diagnosis of phenylketonuria disease carriers in Isfahan population. Genetics in the Third Millennium. 2009; 6(4):1477. [Link]

[13] Parivar K, Seifati SM, Koochmeshgi J. [Studying the level of informativity of VNTR marker on PAH gene for carrier detection of the patients with phenylketonuria in Yazd province, Iran (Persian)]. Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch. 2011; 21(3): 196-200. [Link]

[14] Bagheri M, Abdi Rad I, Hosseini Jazani N, Zarrin R, Ghazavi A. Frequency of the VNTR- Polymorphisms at the PAH gene in the Iranian Azeri Turkish Patients with phenylketonuria. MAEDICA - A Journal of Clinical Medicine.2015; 10(4):310-4. [Link]

[15] 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. Iranian Journal of Medical Sciences. 2018; 43(3):318-23. [Link]

[16] Alibakhshi R, Moradi K, Ghadiri K. The status of PAH gene-VNTR alleles and mini-haplotypes associations with PAH gene mutations in Iranian Kurdish PKU patients. Medical Journal of The Islamic Republic of Iran. 2019; 33:88 [DOI:10.47176/mjiri.33.88] [PMID] [PMCID]

[17] Zamanfar D, Jalali H, Mahdavi MR, Maadanisani M, Zaeri H, Asadpoor E. Investigation of five common mutations on phenylalanine hydroxylase gene of phenylketonuria patients from two provinces in North of Iran. International Journal of Preventive Medicine. 2017; 8:89. [PMID]

[18] Khazaei Koohpar Z, Qasemiyan Y, Haerian Ardakani H, Hashemi M, Kimiajou M, Mohammadian S, et al. Mutation spectrum of the phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria patients in Golestan Province, Iran. Biology Bulletin. 2020; 47(6):569-75. [Link]

[19] Pronina N, Lugoveska R. Association between minihaplotypes and mutations at the phenylalanine hydroxylase locus in Latvian phenylketonuria patients PKU. Proceedings of The Latvian Academy of Sciences. 2011; 65(3-4):73-9. [DOI:10.2478/v10046-011-0021-5]