

بررسی ژنتیکی یک مورد بیماری تب مدیترانه‌ای حاد با شروع در دوره‌ی نوزادی

سینا میرزا احمدی*، دکتر صفر فرج‌نیا**، دکتر ماندانا رفیعی***، دکتر محمدحسین صومی****

آیلار نخلبند****، هانیه رضایی****، لیلا محمدنژاد*****

نویسنده‌ی مسئول: تبریز، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی farajnia@tbzmed.ac.ir

دریافت: ۸۵/۱۲/۲۴ پذیرش: ۸۶/۶/۲۰

چکیده

سابقه و هدف: تب مدیترانه‌ای فامیلی (FMF) یک بیماری ژنتیکی اتوزومی مغلوب است که با حملات دوره‌ای تب‌دار که با دردهای شدید شکمی، التهاب ریه، آرتریت و راش‌های پوستی همراه می‌گردد، مشخص می‌شود. شدت علائم بالینی این بیماری در بیماران مختلف بسیار متغیر بوده اما اطلاعات کمی در مورد علت اصلی این تفاوت‌ها وجود دارد. این مطالعه به بررسی ژنتیکی یک بیمار آذری مبتلا به FMF شدید و والدین او می‌پردازد.

روش بررسی: بیمار مورد بررسی یک پسر ۵ ماهه می‌باشد که دچار تب‌های عودکننده به همراه درد شدید شکمی و راش‌های پوستی می‌باشد. جهت شناسایی نوع جهش یا جهش‌های ژنتیکی مسبب بیماری، آزمایش‌های مولکولی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و تعیین توالی اگزون ۱۰ ژن MEFV انجام گرفت.

یافته‌ها: بررسی‌ها توسط روش‌های ARMS-PCR و تعیین توالی اگزون ۱۰ وجود جهش هتروزیگوت مرکب M694 V/ M680 I را در اگزون ۱۰ ژن مربوطه در فرد بیمار نشان داد. پدر و مادر بیمار به ترتیب دارای جهش هتروزیگوت از نوع M694 V و M680 I بوده و هیچ‌گونه سابقه‌ای از حملات بیماری FMF نداشته‌اند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد همراهی دو جهش M694 V و M680 I حتی در شکل هتروزیگوت مرکب می‌تواند به بیماری FMF با فنوتیپ شدید منجر شود. این مورد اولین گزارش شروع زودهنگام و فنوتیپ شدید FMF ناشی از جهش هتروزیگوت مرکب 694V/680I در یک بیمار ایرانی می‌باشد.

واژگان کلیدی: FMF، جهش هتروزیگوت مرکب، شروع زودهنگام

مقدمه

التهاب صفاق، التهاب ریه، آرتریت و راش‌های پوستی
مشخص می‌گردد. وخیم‌ترین عوارض این بیماری توسعه‌ی

تب مدیترانه‌ای فامیلی (Familial Mediterranean Fever [FMF])

یک بیماری اتوزومی مغلوب است که با تب‌های عودکننده و

*دانشجوی دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی، مربی دانشگاه آزاد اسلامی زنجان

**دکتری تخصصی بیوتکنولوژی، استادیار مرکز تحقیقات کاربردی دارویی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

***فوق تخصص گوارش کودکان، دانشیار مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

****فوق تخصص گوارش، دانشیار مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

*****کارشناس بیولوژی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

*****کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

*****کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

نشان داده شده است که بعضی از جهش‌های ژن Mediterranean Fever [MEFV]) نظیر جهش‌های E148Q و P396S نفوذپذیری کمی داشته (۱۰) و برخی نظیر V726A منجر به بیماری خفیف‌تری می‌شوند (۱۱). جهش M694V شایع‌ترین جهش بوده و اغلب به بیماری شدید FMF منجر می‌گردد. این جهش به طور معمول در بیماران مبتلا به آمیلویدوزیس به صورت هموزیگوت دیده می‌شود (۱۲، ۱۳). در گزارش حاضر نتایج بررسی ژنتیکی یک بیمار ایرانی با شروع زود هنگام و فنوتیپ شدید بیماری FMF ارائه می‌گردد.

روش بررسی

بیمار مورد نظر پسر بچه‌ای شش ماهه‌ای بود که با علائم تب‌های متناوب، درد شکمی و اریتمای شبه‌باد سرخ به بیمارستان کودکان دانشگاه علوم پزشکی تبریز ارجاع داده شد. طبق اظهار والدین حملات متناوب کودک برای نخستین بار از ۴ ماهگی شروع گردید و با تب ۴۰ درجه‌ای سانتی‌گراد حدود یک بار در هفته که به مدت ۱ تا ۲ روز ادامه داشته و در تمام موارد با دردهای شکمی همراه بوده است. والدین بیمار خود هیچ سابقه‌ای از حملات متناوب تب یا دردهای شکمی نداشته و فاقد هر نوع نسبت فامیلی بودند. عکسبرداری‌های قفسه‌سینه و شکم هیچ نقصی یا ضایعه‌ای را نشان نداده و نتایج تست‌های آزمایشگاهی در دوره‌های تبادار به شرح زیر بوده است:

هموگلوبین ۱۲/۸ گرم در دسی‌لیتر، شمارش گلبول‌های سفید ۱۵۳۰۰ عدد در لیتر (۶۸ درصد گرانولوسیت، ۲۶ درصد لنفوسیت، ۴ درصد باند، ۲ درصد مونوسیت)، شمارش پلاکت ۳۲۰۰۰۰ عدد در لیتر، سرعت رسوب گلوبولی ۵۴ میلی‌متر در ساعت، سطح فیبرینوژن سرمی ۲۲۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر (نرمال ۲۰۰ تا ۴۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) و C-reactive protein 3+ آزمایشات بیوشیمی خون و

آمیلویدوزیس سیستمیک می‌باشد که در نهایت منجر به نارسایی کلیوی می‌شود (۱). علائم بالینی بیماری معمولاً در دهه‌ی اول زندگی بروز می‌کند و بیش از ۸۰ درصد بیماران در دوران کودکی و بلوغ بیماری را تجربه می‌کنند. شدت و فراوانی حملات در بین بیماران مختلف متفاوت بوده و در فواصل بین حملات بیمار معمولاً هیچ علامت بالینی نشان نمی‌دهد. بیماری در جنس مذکر بیشتر از جنس مؤنث بوده و نسبت شیوع بیماری در پسران نسبت به دختران ۱/۲ - ۱/۵ به ۱ می‌باشد (۲). FMF به طور غالب در جمعیت‌های اطراف دریای مدیترانه بروز می‌کند (۳، ۴). این بیماری به طور ویژه‌ای در بین نژادهای ترک، عرب، ارمنی و یهودیان شایع می‌باشد. هرچند موارد رو به افزایشی از گزارشات بیماری از سایر گروه‌های نژادی در نقاط مختلف دنیا دیده می‌شود. فراوانی FMF در جمعیت‌های ایرانی دقیقاً برآورد نشده ولی در بین جمعیت یهودی‌های ایرانی حدود ۶ درصد گزارش شده است (۵). تا چندی پیش تشخیص FMF بر پایه‌ی ظهور علائم بالینی، زمینه‌ی نژادی، شجره‌نامه‌ی خانوادگی و پاسخ به درمان با کلشی‌سین انجام می‌گرفت. در سال ۱۹۹۲، جایگاه ژن مربوط به FMF روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۶ شناسایی شد (۶) و در سال ۱۹۹۷ دو گروه مستقل ژن مسؤؤل FMF را کلون کردند (۷، ۸). این ژن پروتئینی به نام pyrin یا marenostin را رمزگذاری کرده، به گروه ژن‌های معروف به RoRet gene family متعلق بوده و بیشتر در گرانولوسیت‌ها بیان می‌شود. بر اساس فنوتیپ FMF، به نظر می‌رسد پیرین یک تنظیم‌کننده‌ی منفی در التهاب با واسطه‌ی گرانولوسیت‌ها می‌باشد (۹). تا کنون بیش از ۵۰ نوع جهش در ژن پیرین شناخته شده است که بیشتر این جهش‌ها در اگزون ۱۰ واقع شده‌اند و ۴ مورد از این جهش‌های missense شامل جهش‌های M694V، M680 I، M694I و V726A عامل بیش از ۷۰ تا ۸۶ درصد موارد بیماری FMF را تشکیل می‌دهند.

ادار نیز نرمال بود. تست‌های مربوط به اتوانتی‌بادی‌ها شامل آنآ (Antinuclear Antibody [ANA]) و فاکتور روماتیسمی (Rheumatoid Factor [RF]) منفی بودند. درمان با داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی فاقد تأثیر بالینی قابل توجه بود. درمان با ۰/۵ میلی گرم در روز کلشی‌سین قادر به کنترل کامل حملات بیماری نبوده ولی یک میلی گرم کلشی‌سین در روز پاسخ درمانی خوبی به دنبال داشت. **بررسی ژنتیکی:** جهت آزمایشات ژنتیکی، ابتدا DNA ژنومیک از گلبول‌های سفید خون محیطی بیمار و والدینش با روش استاندارد استخراج گردید (۱۴). چهار جهش شایع که در اغلب جمعیت‌ها مسئول

بیش از ۸۰ درصد موارد بیماری هستند شامل جهش‌های M694V، M680I، M694I و V726A توسط پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر آلل‌های نرمال و تغییر یافته و با روش ARMS-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. هر سری پرایمر شامل سه اولیگونوکلوئوتید بود که توالی آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردیده و برای آشکارسازی قطعات تکثیر شده با اتیدیوم برمایند رنگ‌آمیزی شدند. جهت تعیین توالی ناحیه‌ی کدکننده‌ی اگزون ۱۰، قطعه‌ی مربوطه با روش PCR تکثیر گردیده و برای تعیین توالی به شرکت پرایم ایتالیا ارسال شد.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR برای تشخیص FMF

نوع جهش		پرایمر
M694 V	Common	5'-TATCATTTGTTCTGGGCTC-3'
	Mutant	5'-TGGTACTCATTTTCCTTCAC-3'
	Normal	5'-TGGTACTCATTTTCCTTCAT-3'
M694I	Common	5'-TATCATTTGTTCTGGGCTC-3'
	Mutant	5'-CTGGTACTCATTTTCCTTT-3'
	Normal	5'-CTGGTACTCATTTTCCTTC-3'
M680 I	Common	5'- GGAAACAAGTGGGAGAGGCTGC-3'
	Mutant	5'- GTAGCCATTCTCTAGCGACAGTGCC -3'
	Normal	5'- GTAGCCATTCTCTAGCGACAGTGCG -3'
V726A	Common	5'- TTGGAGACAAGACAGCATGGATCC-3'
	Mutant	5'- GTCACATTGTAAAAGGAGATGCTTGCTG-3'
	Normal	5'-CTGTCACATTGTAAAAGGAGATGCTTGCTA-3'
Exon 10 primers	Forward	5'-CCCATGGACCCCTACCTAGG- 3'
	Reverse	5'-AAGAGAGATGCAGTGTTGGGC-3'

یافته‌ها

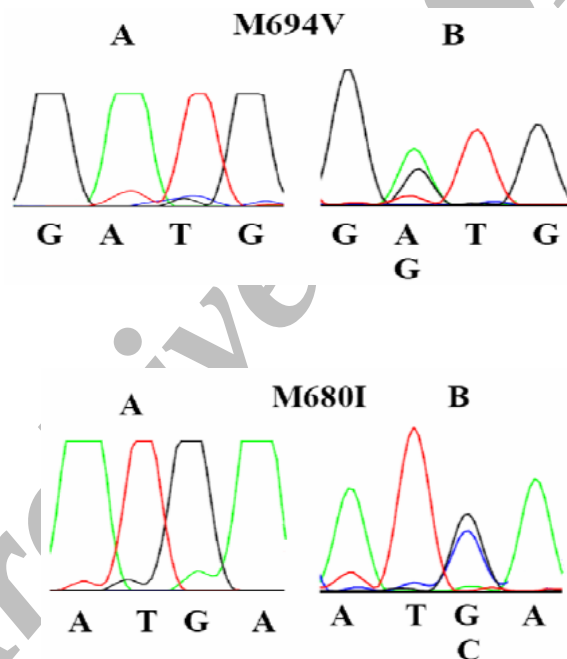
نتایج آزمایش ژنتیک در جدول ۲ و شکل ۱ نشان داده جدول ۲: نتایج بررسی ژنتیکی جهت شناسایی موتاسیون‌های شایع در ژن

MEFV (Normal = N و Mutant = M)

	694V	694I	680I	726A
Child	M/N	N/N	M/N	N/N
Father	M/N	N/N	N/N	N/N
Mother	N/N	N/N	M/N	N/N

شده است. بررسی ژنتیکی با ARMS-PCR مشخص کرد که بیمار دارای دو جهش M680I و M694V به صورت هتروزیگوت مرکب می‌باشد. آزمایش والدین بیمار برای یافتن موتاسیون‌ها نشان داد که پدر بیمار دارای جهش M694V و مادر بیمار دارای جهش M680I به صورت هتروزیگوت می‌باشند. توالی‌یابی ناحیه‌ی کدکنده‌ی اگزون ۱۰ نتایج ARMS-PCR را تأیید کرده و هیچ جهش دیگری غیر از جهش‌های مشاهده شده با ARMS-PCR را نشان نداد.

شکل ۱: کروماتوگرام توالی کدون‌های ۶۸۰ و ۶۹۴ اگزون ۱۰ ژن *MEFV* اشکال A نمایش‌گر توالی کدون نرمال و اشکال B نمایش‌گر توالی کدون جهش‌یافته به صورت هتروزیگوت می‌باشند.



بحث

تب مدیترانه‌ای فAMILIAL یک بیماری ژنتیکی است که الگوی توارث آن به صورت اتوزومی بوده و جهش‌های ژن *MEFV* واقع بر روی کروموزوم ۱۶ علت اصلی این بیماری می‌باشند (۷). علائم بالینی بیماری شامل تب، التهاب صفرا، التهاب ریه و راش‌های جلدی از نظر شدت و سن شروع

تفاوت‌های قابل توجهی در بیماران مختلف نشان می‌دهند. مطالعات فراوانی برای یافتن علت این تنوع علائم انجام گرفته و نوع موتاسیون، زمینه‌ی نژادی، اثر متقابل دیگر ژن‌ها و عوامل محیطی از دلایل احتمالی چنین تفاوتی گزارش شده است. مطالعات اولیه برای تعیین رابطه‌ی فنوتیپ - ژنوتیپ،

ارتباطی را بین برخی موتاسیون‌ها و شدت بیماری نشان داده‌اند (۱۶، ۱۵). نشان داده شده است بیمارانی که برای جهش M694V هموزیگوت هستند بیماری شدیدتری داشته و احتمالاً گرایش بیشتری برای آمیلویدوز دارند (۱۶، ۱۳، ۱۰). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که در افراد مبتلا به آمیلویدوز جهش M694V شایع‌ترین تغییر ژنتیکی بوده و این جهش می‌تواند به عنوان شاخصی برای پیش‌بینی توسعه‌ی آمیلویدوز باشد (۱۷). تظاهر بیماری FMF در افرادی که جهش در ژن MEFV فقط در یک آلل رخ داده موضوع گزارشات بسیار متغیری است. گرچه گزارشاتی در مورد بروز بیماری در افراد هتروزیگوت وجود دارد (۱۸)، وقوع جهش‌های هتروزیگوت بدون علائم فنوتیپی مربوطه رویداد شایعی بوده و به عنوان فنوتیپ III بیماری FMF شناخته می‌شود (۱۹). موتاسیون M 680I یکی دیگر از موتاسیون‌های شایعی است که غالباً بین آمریکایی‌ها دیده می‌شود و با بروز بیماری خفیف‌تر همراه می‌باشد (۹).

جمعیت ساکن ایران هر چند از نقطه‌نظر منطقه‌ی جغرافیایی جزو مناطق پرخطر برای بیماری تب مدیترانه‌ای است اما غیر از جمعیت‌های عرب، یهودی و ارمنی، دیگر ساکنین ایران از نظر نژادی جزو نژادهای مستعد به بیماری FMF محسوب نمی‌شوند. میزان وقوع این بیماری در کشور به درستی مشخص نبوده و ممکن است به علت همسایگی یا وجود جمعیت‌های مستعد در کشور شیوع بیماری در دیگر جمعیت‌های نژادی کشور نیز بیش از حد انتظار باشد. بیماری که در این مطالعه گزارش می‌شود متعلق به نژاد آذری بوده و نسبت به بیماری FMF زمینه‌ی نژادی نامساعدی داشته و علائم بالینی به ویژه سن شروع بیماری غیرمعمول می‌باشد. آزمایش‌های انجام شده برای شناسایی موتاسیون‌های شایع FMF نشان دادند که این بیمار برای موتاسیون M694V و M680I هتروزیگوت مرکب می‌باشد. پدر و مادر این بیمار به ترتیب برای موتاسیون‌های 680I و 694V

هتروزیگوت بوده و هیچ‌یک از علائم بالینی FMF را نداشته‌اند. این نتایج با گزارشات متعددی مبنی بر عدم ظهور علائم بالینی در مبتلایان به اشکال هتروزیگوت جهش‌های M694V و M680I سازگاری داشته و مؤید الگوی توارث اتوزومی مغلوب بیماری می‌باشد. از طرفی گزارشات نشان داده‌اند که جهش M680I حتی در شکل هموزیگوت با تظاهرات بالینی خفیف‌تری همراه است. نتایج به دست آمده از تست‌های ژنتیکی در مورد بیمار مورد بررسی نشان می‌دهند که همراهی دو جهش M694V و M680I حتی به شکل هتروزیگوت مرکب می‌تواند بیماری شدید FMF را ایجاد کند که با شروع زود هنگام بیماری و فراوانی بالای حملات شدید مشخص می‌گردد. با وجود این که یکسری معیارهای کلینیکی برای تشخیص بیماری FMF پیشنهاد شده است (۲۰)، اما بسیاری از بیماران مبتلا به FMF به دلیل علائم بالینی غیراختصاصی به درستی و به موقع تشخیص داده نمی‌شوند. بنابراین تست‌های تشخیص ژنتیکی می‌تواند تشخیص سریع و صحیح بیماری FMF را فراهم کرده و با درمان به موقع با کلسی‌سین می‌توان از توسعه‌ی عوارض وخیم بیماری شامل آمیلویدوز و نارسایی کلیه جلوگیری کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر مؤید وجود نوعی همراهی بین ژنوتیپ و فنوتیپ در بیماری FMF بوده و نشان می‌دهد که موتاسیون‌های خاصی با علائم زودرس و شدیدتری همراه است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در مرکز تحقیقات کاربردی دارویی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز با حمایت مالی این مراکز و معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد زنجان انجام

گردیده است که به این وسیله نهایت سپاسگزاری را در خصوص این همکاری داریم.

منابع

- 1- Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, et al. Familial Mediterranean fever at the millennium: clinical spectrum, ancient mutations, and a survey of 100 American referrals to the national institutes of health. *Medicine*. 1998; 77: 268-97.
- 2- Tunca M, Akar S, Onen F, et al. Turkish FMF study group. familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)*. 2005; 84: 1-11.
- 3- Ben-Chetrit E, Levy M. Familial Mediterranean fever. *Lancet*. 1998; 351: 659-64.
- 4- Bakkaloglu A. Familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol*. 2003; 18: 853-9.
- 5- Stoffman N, Magal N, Shohat T, et al. Higher than expected carrier rates for familial Mediterranean fever in various Jewish ethnic groups. *Eur J Hum Genet*. 2000; 8: 307-10.
- 6- Pras E, Aksentijevich I, Balow JE, et al. Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. *N Eng J Med*. 1992; 326: 1509-13.
- 7- The French FMF Consortium. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat Genet*. 1997; 17: 25-31.
- 8- The International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the Ro-Ret gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell*. 1997; 90: 797-807.
- 9- Pars M. Familial Mediterranean fever: From the clinical syndrome to the cloning of the pyrin gene. *Scand J Rheumatol*. 1998; 27: 92-7.
- 10- Cazeneuve C, Sarkisian T, Pecheux C, et al. MEFV-gene analysis in Armenian patients with familial Mediterranean fever: diagnostic value and unfavorable renal prognosis of the M694V homozygous genotype-genetic and therapeutic implications. *Am J Hum Genet*. 1999; 65: 88-97.
- 11- Aksentijevich I, Torosyan Y, Samuels J, et al. Mutation and haplotype studies of familial Mediterranean fever reveal new ancestral relationship and evidence for a high carrier frequency with reduced penetrance in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet*. 1999; 64: 946-62.
- 12- Livneh A, Langevitz P, Shinar Y, Zaks N, Kastner DL, Pras M, Pras E. MEFV mutation analysis in patients suffering from amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Amyloid*. 1999; 6: 1-6.
- 13- Shohat M, Magal N, Shohat T, et al. Phenotype-genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. *Eur J Hum Genet*. 1999; 7: 287-92.
- 14- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2001; 1: 6.8-6.9.

- 15- Pras E, Langevitz P, Livneh A, et al. **Genotype-phenotype correlation in familial Mediterranean fever (a preliminary report)**. In: Sohar E, Gafni J, Pras M, editors. *Familial Mediterranean fever*. TelAviv: Freund Publishing House; 1997; 260-4.
- 16- Dewalle M, Domingo C, Rozenbaum M, et al. Phenotype-genotype correlation in Jewish patients suffering from familial Mediterranean fever (FMF). *Eur J Hum Genet*. 1998; 6: 95-7.
- 17- Balci B, Tinaztepe K, Yilmaz E, et al. MEFV gene mutations in familial Mediterranean fever phenotype II patients with renal amyloidosis in childhood: a retrospective clinicopathological and molecular study. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17: 1921-3.
- 18- Yuval Y, Hemo-Zisser M, Zemer D, Sohar E, Pras M. Dominant inheritance in two families with familial Mediterranean fever (FMF). *Am J Med Genet*. 1995; 57: 455-7.
- 19- Kogan A, Shinar Y, Lidar M, et al. Common MEFV mutations among Jewish ethnic groups in Israel: high frequency of carrier and phenotype III states and absence of a perceptible biological advantage for the carrier state. *Am J Med Genet*. 2001; 102: 272-26.
- 20- Livneh A, Langevitz P, Zemer D, et al. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*. 1997; 40: 1879-85.