Pajouhan Scientific Journal Volume 17, Issue 2, Winter 2019, Pages: 37-44

Original Article

doi: 10.29252/psj.17.2.37

Next Generation Sequencing a Method for Identifying Genetic Mutations Associated with Spina Bifida Disorder

Hanieh Naddaf (MSc)[1,*], Arash Sattari (PhD)[2], Sina Mirzaahmadi (PhD)[3]

[1] *Master of Genetic, College of Basic Science, Islamic Azad University, Zanjan Unit, Zanjan, Iran*
[2] *Post Doc of Medical Genetic, Assistant Professor, College of Basic Science, Islamic Azad University, Gorgan Unit, Gorgan, Iran*
[3] *PhD of Molecular Genetic, Assistant Professor, College of Basic Science, Islamic Azad University, Zanjan unit, Zanjan, Iran*

**** Corresponding Author:*** *Hanieh Naddaf, College of Basic Science, Islamic Azad University, Zanjan Unit, Zanjan, Iran. Email: haniehnaddaf@gmail.com*

Received: 16/10/2018
Accepted: 15/12/2018

How to Cite this Article:
Naddaf H, Sattari A, Mirzaahmadi S. Next Generation Sequencing a Method for Identifying Genetic Mutations Associated with Spina Bifida Disorder. *Pajouhan Scientific Journal*. 2019; 17(2): 37-44. DOI: 10.29252/psj.17.2.37

Abstract

Background and Objective: Spina Bifida (SB) is a congenital malformation and is a result of the failure of the closure and failure of the neural tube. The causes and mechanisms of genetic involvement involved in the onset of SB are still ambiguous. The present study addresses the genetic variation in SB disease using Next Generation Sequencing (NGS) as a powerful molecular tool for comprehensive genetic disorders studies.

Materials and Methods: Three complete blood samples from people with spina bifida were investigated after DNA extraction using NGS-whole exome sequencing (NGS-WES) method and after comparing the obtained data with the control sample. The results were analyzed using Alignment software (bwa), variant calling (gatk4) and Annotation (wannovar) with the version of the Hg19 genome.

Results: Out of 559087 mutations, there are 1205 mutations of the type INDELs and 557882 mutations associated with SNPs. This number of mutations was compared with control samples and patients with SB. Further studies ultimately identified the genes of PAX3, CUBN, MTHFR and PDGFRA as more effective genes in the disease.

Conclusion: The NGS is a powerful method for the genetic evaluation of patients with SB that can help detect genetic disorders in these patients. Gene mutations found have all occurred in genes that are associated with evolution in the nervous system during the fetal period. These mutations should be confirmed by valid molecular methods.

Keywords: NGS; Nervous System; Spina Bifida

Copyright © 2019 Pajouhan Scientific Journal. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (*http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/*) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite.

مقاله پژوهشی

doi: 10.29252/psj.17.2.37

توالی یابی نسل جدید (NGS) روشی برای شناسایی جهش‌های ژنتیکی مرتبط با اختلال اسپینابیفیدا

هانیه نداف[۱،*]، آرش ستاری[۲]، سینا میرزااحمدی[۳]

[۱] کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران

[۲] پست دکترا ژنتیک پزشکی، استادیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران

[۳] دکترا ژنتیک مولکولی، استادیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران

* **نویسنده مسئول:** هانیه نداف، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران. ایمیل: haniehnaddaf@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۷/۲۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۹/۲۴

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

چکیده

سابقه و هدف: اسپینابیفیدا (Spina Bifida, SB) از ناهنجاری های مادرزادی می‌باشد و به عنوان نتیجه ای از عدم بسته شدن و شکست لوله عصبی است. علل و مکانیسم های ژنتیکی که در بروز SB دخیل هستند، مبهم می باشند. مطالعه حاضر به بررسی تغییرات ژنتیکی در بیماری SB با استفاده از روش تعیین توالی نسل بعدی (Next Generation Sequencing, NGS) به عنوان ابزار قدرتمند مولکولی بررسی های جامع اختلالات ژنتیکی می پردازد.

مواد و روش‌ها: سه نمونه خون کامل از نوزادان مبتلا به SB پس از استخراج DNA با استفاده از روش NGS-Whole Exome Sequencing (NGS-WES) مورد بررسی قرار گرفته و پس از مقایسه اطلاعات به دست آمده با توالی شاهد آنالیز نتایج با استفاده از نرم افزارهای Alignment (bwa)، Variant calling(gatk4) و Annotation(wannovar) با ورژن ژنوم Hg19 اجرا شد.

یافته‌ها: در مجموع ۵۵۹۰۸۷ جهش در سه نمونه مشاهده شد که این تعداد جهش در مقایسه و بررسی نمونه کنترل و بیماران مبتلا به SB بدست آمد. بررسی های بیشتر در نهایت ژن‌های PAX3، CUBN، MTHFR و PDGFRA را به عنوان ژن های موثرتر در بروز بیماری شناسایی نمود.

نتیجه‌گیری: NGS، روشی قدرتمند برای بررسی ژنتیکی بیماران مبتلا به SB می باشد که می تواند به شناسایی اختلالات ژنتیکی در این بیماران کمک شایانی نماید. جهش ها ی ژنتیکی یافت شده همگی در ژن هایی رخ داده اند که با تکامل در سیستم عصبی در دوران جنینی مرتبط می باشند.

واژگان کلیدی: اسپینابیفیدا؛ سیستم عصبی؛ NGS

مقدمه

نقص لوله عصبی (Neural Tube Defect, NTDs) از شایع ترین ناهنجاری های مادرزادی نوزادان است که با اختلال در عملکرد سیستم عصبی مرکزی (Central Nervous System, CNS) همراه می‌باشد. هنگامی که لوله عصبی در مراحل اولیه تکامل جنین موفق به انسداد کامل نمی‌شود، نقص عملکردی شدید در مغز و نخاع و به تبع آن اختلالات عصبی زیادی ایجاد می‌گردد. میزان شیوع NTDs بین ۱- ۱۰ در هر ۱۰۰۰ تولد در سراسر جهان تخمین زده شده است، با این حال لازم به ذکر است که میزان شیوع در جمعیت‌های مختلف متفاوت می‌باشد [۲, ۱]. یکی از اختلالات مربوط به نقص لوله عصبی ناهنجاری مادرزادی SB است که در این اختلال ستون فقرات تقسیم و دو شاخه شده (Spine به معنای مهره و Bifida به معنای دو شاخه شدن) و به عنوان نتیجه ای از عدم بسته شدن و شکست لوله عصبی در طول هفته سوم و چهارم جنینی است. SB به طور کلی به دو گروه اختلال Spina Bifida Occulta (SBO) و Spina Bifida Cystica (SBC) تقسیم می‌شود که SBC شامل سه گروه، Myelomeningocele (MMC)، Meningocele (MC) و Lipomeningocele می‌باشد [۶-۳]. MMC شایعترین و شدیدترین فرم SB است[۶] که نوزادان مبتلا بسته به اندازه و محل نقص، یا هیچ نقص جسمی ندارند و یا به طور مادام العمر از معلولیت شدید حرکتی همراه با آبشاری از اختلالات در اندام های مختلف بدن

به ویژه هیدروسفالی رنج می‌برند [۵, ۴].

محققین بر این باورند که مجموع عواملی مانند تغذیه، محیط و ژنتیک در بروز NTDs تاثیر گذارند که عوامل ژنتیکی به احتمال زیاد شامل تغییرات نابجا در ژن‌های کلیدی موثر در بسته شدن طبیعی لوله عصبی می‌باشد [۶, ۴, ۲]. چاقی و سن باروری مادران نیز به عنوان عوامل خطر در NTDs شناخته شده که بر اساس این برآیند احتمال خطر در مادران با سن بالاتر از ۴۰ و جوان تر از ۱۹ سال افزایش می‌یابد [۸, ۷, ۵].

مطالعات سبب شناسی بیانگر ارتباط میزان فولات، ویتامین B12 و تعداد دیگری از مواد مغذی و عوامل مربوط به تغذیه با بروز NTDs و عدم بسته شدن صحیح لوله عصبی در زمان جنینی بوده، مطالعات پیشرفته‌تر به بررسی کاهش فزاینده بروز نقص لوله عصبی و عود آن با افزایش سطح فولات در بدن مادر پرداخته است [۱۲-۹]. فولات به عنوان کوفاکتور آنزیم های درگیر در بیوسنتز DNA و RNA عمل می کند و تامین کننده گروه متیل در چرخه متیلاسیون است [۱۳].

بر اساس مطالعات انجام گرفته بر روی حیوانات ثابت شده است که خطر ابتلا به SB در بستگان درجه اول به میزان ۳ تا ۸ درصد و در بستگان درجه دوم و سوم به میزان ۱ تا ۲ درصد افزایش می یابد[۴, ۱]. متاسفانه، استراتژی جستجوی ژن (به عنوان مثال، کلونینگ موضعی و نقشه برداری پیوستگی ژنتیکی) در جهت شناسایی ژن مسبب NTDs ممکن نیست، چرا که در اکثر موارد تنها یک فرد مبتلا در یک خانواده وجود دارد [۱].

NTDs با تعدادی از سندرم‌های ژنتیکی با ویژگی‌های فنوتیپی مشترک مانند سندرم مکل، میلومننگوسل خاجی قدامی و سندرم مُهر، همچنین ناهنجاری های کروموزومی از جمله تریزومی ۱۳ و ۱۸ و به طور خاص آنیوپلوییدی که در ۱۷-۵ درصد از موارد با NTDs همراه است مرتبط می باشد، اما بدون سایر سندرم‌ها و به تنهایی نیز رخ می‌دهد [۱۶, ۱۵, ۴].

تشخیص نقایص لوله عصبی پیش از تولد از طریق غربالگری AFP (Alpha-FetoProtein)، سونوگرافی، MRI و اکوکاردیوگرافی صورت می پذیرد [۱۷, ۶]. یکی از راه های درمان بیماری، جراحی پیش از تولد (فتوسکوپی) است که اگر چه بازده بالایی دارد اما به علت خطرات پیش روی مادر، بیشتر جراحی پس از تولد که شامل جراحی نقص نخاعی توسط شکاف در قشر می‌باشد، صورت می پذیرد [۱۸].

به دلیل شیوع بالای بیماری و همچنین از آنجایی که تاکنون عوامل اصلی ژنتیکی در بروز بیماری در کشورمان به طور دقیق مورد مطالعه قرار نگرفته، لذا هدف از این مطالعه شناسایی ژن های دخیل در SB با بهره گیری از تکنیک NGS در نژاد ایرانی و معرفی مکانیسم های مرتبط با آن می باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش توصیفی بوده و از دی ماه ۱۳۹۵ لغایت بهمن ماه ۱۳۹۶ پس از کسب تائیدیه کمیته اخلاق و اخذ رضایت از والدین نوزادان صورت پذیرفت.

سه نمونه خون (دو نوزاد دختر و یک نوزاد پسر) با تشخیص مثبت SB نوع MMC از طریق کیست حاوی نخاع و مننژ موجود در انتهای لوله عصبی توسط جراح مغز و اعصاب از نوزادان بستری در بخش NICU بیمارستان بعثت همدان تهیه و مورد مقایسه و بررسی قرار گرفتند، این نوزدان در روز چهارم پس از تولد تحت عمل جراحی قرار گرفتند.

جهت استخراج DNA از خون تام حاوی ماده ضد انعقاد خون (EDTA)، از روش نمکی میلر با مقداری دستکاری و تغییرات استفاده گردید. در این روش از دو بافر لیز کننده سلول (A) و لیز کننده سلول (B) استفاده شد(جدول ۱ و ۲).

جدول ۱: ترکیب بافر A

مواد	غلظت	میزان مورد نیاز در ۱۰۰ml	غلظت نهایی
Tris- HCl (pH=8)	۵/۰ M	۲ ml	۱۰ mM
MgCl2	۱ M	۵/۰ ml	۵ mM
Triton-X-100	-	۱ ml	٪۱
Sucrose	-	۱۱ g	٪۱۱
آب یک بار تقطیر	-	به میزان مورد نیاز تا ۱۰۰ ml	-

جدول ۲: ترکیب بافر B

ماده	غلظت موجود	میزان مورد نیاز در ۱۰۰ml	غلظت نهایی
Tris- HCl (pH=8)	۰/۵ M	۲ ml	۱۰ mM
EDTA	۰/۲۵ M	۴ ml	۱۰ mM
سیترات سدیم	۱ M	۱ ml	٪۱
SDS	٪۱۰	۱۰ ml	٪۱
آب یک بار تقطیر	-	به میزان مورد نیاز تا ۱۰۰ ml	-

روش استخراج DNA را می‌توان به سه مرحله تقسیم نمود:

مرحله اول: تجزیه نمودن غشای سیتوپلاسمی سلول‌های خونی با استفاده از بافر A (شوینده غیر یونی Triton X-100) و همچنین تجزیه غشای هسته گلبول‌های سفید با استفاده از بافر B (شوینده یونی SDS).

مرحله دوم: خالص سازی DNA از عصاره سلولی (پروتئین و DNA) با استفاده از نمک‌های اشباع (NaCl) و محلول کلروفرم.

مرحله سوم: تغلیظ DNA با استفاده از اتانول مطلق در حضور نمک و درجه برودت ۲۰- درجه سانتی گراد یا کمتر.

DNA های استخراج شده جهت توالی یابی به شرکت Novo gene در کشور چین ارسال و با بهره گیری از روش NGS توالی یابی انجام پذیرفت. این توالی یابی در سه مرحله صورت می پذیرد، مرحله اول نمونه ژنومی به کتابخانه ای از قطعات کوچک تقسیم می شود و در ادامه آداپتورها (الیگو نوکلئوتیدهای مصنوعی با توالی شناخته) بر انتهای قطعات متصل می‌شوند. سپس این کتابخانه ها تکثیر شده تا برای توالی یابی آماده شوند. در مرحله دوم تعیین توالی و تصویربرداری صورت می پذیرد که بر مبنای ساختن و تولید قطعات بوده، طی آن هر کدام از قطعات کتابخانه به عنوان یک واحد ژنومی الگو عمل می کند. طی یک چرخه شستشو و مجاورت با نوکلئوتیدهای شناخته شده توالی یابی انجام می شود، در مرحله سوم تجزیه و تحلیل صورت گرفته که شامل حذف توالی آداپتور کم کیفیت و نقشه برداری از داده ها با استفاده از ژنوم مرجع و یا در غیاب ژن مرجع می باشد و در نهایت ارزیابی بیوانفورماتیکی و مقایسه با توالی الگو انجام می‌پذیرد [۲۱-۱۹].

پس از مقایسه (از طریق BLAS) با توالی DNA الگو (از توالی FASTA موجود در سایت های National (NCBI) Center for Biotechnology Information و (UCSC) University of California Santa Cruz به عنوان توالی شاهد) ارزیابی بیوانفورماتیکی توسط نرم افزارهای Alignment (bwa)، Variant calling (gatk4) و Annotation (wannovar) با ورژن ژنوم Hg19 صورت پذیرفت.

یافته‌ها

با توجه به اطلاعات بدست آمده حاصل از NGS-WES می توان بیان کرد که در بررسی پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) نمونه‌های مورد مطالعه بطور کلی به ترتیب ۳۰۲۰۴۸، ۲۲۲۱۳۳ و ۲۶۱۵۴۰ SNP مشاهده شد (جدول ۳).

جایگاه اثر SNP ها در ژن نیز به شرح (جدول ۴) می باشد:

در بررسی جهش های INDEL (Deletion and Duplication) سه نمونه به ترتیب و به طور کلی ۵۲۹۰۶، ۳۸۴۲۵ و ۴۵۴۹۸ جهش مشاهده شده است (جدول ۵).

جایگاه اثر INDEL ها در ژن نیز به شرح (جدول ۶) می باشد:

با توجه به بررسی تمامی ژن های گزارش شده در پایگاه های omim، Gene cards، Array express و Human protein atlas، UCSC می توان بیان کرد که از ۶۰۳ ژن مشترک در INDEL تعداد ۱۱۲ ژن مرتبط با NTD وجود دارد و همچنین در SNP ها ۱۹۰ ژن و نیز ۳۰۷ SNP مرتبط با NTDs است.

جدول ۳: داده های مربوط به خصوصیات SNP ها در سه نمونه

نمونه	شماره یک	شماره دو	شماره سه
Total SNP	۳۰۲۰۴۸	۲۲۲۱۳۳	۲۶۱۵۴۰
Heterozygotes	۹۹۷۸۵	۹۰۲۲۳	۹۷۰۸۷
Homozygotes	۲۰۲۲۶۳	۱۳۱۹۱۰	۱۶۴۴۵۳
Transition	۲۰۸۹۸۴	۱۵۴۶۲۰	۱۸۱۴۱۹
Transvertion	۹۳۰۶۴	۶۷۵۱۳	۸۰۱۲۱
ts / tv	۲,۲۵	۲,۲۹	۲,۲۶
dbSNP%	۲۹۵۵۴۵ (٪۹۷/۸۵)	۲۱۷۵۶۰ (٪۹۷/۹۴)	۲۵۵۹۴۸ (٪۹۷/۸۶)
Novel SNP	۶۵۰۳	۴۵۷۳	۵۵۹۲
Novel ts	۳۹۸۵	۲۷۸۵	۳۳۴۱
Novel tv	۲۵۱۸	۱۷۸۸	۲۲۵۱
Novel ts/tv	۱/۵۸	۱/۴۸	۱/۵۶

(ts) مخفف Transition و (tv) مخفف Transvertion می باشد. (dbSNP %) تعداد SNP های گزارش شده در پایگاه داده dbSNP تقسیم بر تعداد SNP مشاهده شده است.

جدول ۴: داده های مربوط به عملکرد SNP ها در سه نمونه

نمونه	شماره یک	شماره دو	شماره سه
CDS	۲۲۱۴۹	۲۲۶۲۱	۲۲۷۹۷
synonymous_SNP	۱۱۲۹۲	۱۱۵۹۹	۱۱۶۶۳
missense_SNP	۱۰۲۷۹	۱۰۴۴۲	۱۰۵۵۲
stopgain	۷۱	۸۴	۸۹
stoploss	۱۳	۸	۹
unknown	۵۰۲	۴۹۸	۴۹۲
intronic	۱۳۸۳۶۲	۱۰۹۷۳۲	۱۲۳۸۰۴
UTR3	۵۳۹۱	۴۸۲۵	۵۱۹۶
UTR5	۲۹۹۳	۲۸۱۷	۲۹۴۱
Splicing	۶۶	۷۵	۵۹
ncRNA_exonic	۳۱۸۵	۲۸۹۴	۳۱۵۵
ncRNA_intronic	۱۳۸۶۰	۹۷۲۱	۱۱۷۶۰
ncRNA_splicing	۱۵	۱۰	۱۶
upstream	۳۹۹۶	۳۲۷۶	۳۵۸۳
downstream	۲۳۳۲	۱۶۶۳	۲۰۸۵
intergenic	۱۰۹۴۴۹	۶۴۳۰۰	۸۵۹۲۳
Total SNP	۳۰۲۰۴۸	۲۲۲۱۳۳	۲۶۱۵۴۰

(CDS) تعداد SNP ها در ناحیه اگزون می باشد. (Stopgain) جهشی که منجر به حضور کدون توقف شود. (Stoploss) جهشی که منجر به حذف کدون توقف می شود. (ncRNA) تعداد SNP ها در ناحیه غیر کد کننده RNA. (Upstream) تعداد SNP ها در 1kb ناحیه بالادست جایگاه شروع رونویسی. (downstream) تعداد SNP ها در 1kb ناحیه پایین دست جایگاه خاتمه رونویسی

جدول ۵: داده های مربوط به خصوصیات INDEL ها در سه نمونه

نمونه	شماره یک	شماره دو	شماره سه
Total INDEL	۵۲۹۰۶	۳۸۴۲۵	۴۵۴۹۸
Heterozygotes	۱۴۶۱۱	۱۳۴۳۸	۱۴۰۴۶
Homozygotes	۳۸۲۹۵	۲۴۹۸۷	۳۱۴۵۲
%dbSNP	۴۷۶۴۵ (٪۹۰/۰۶)	۳۴۴۰۴ (٪۸۹/۵۴)	۴۰۸۱۳ (٪۸۹/۷۰)
Novel INDEL	۵۲۶۱	۴۰۲۱	۴۶۸۵

(dbSNP %) تعداد INDEL های گزارش شده در پایگاه داده dbSNP تقسیم بر تعداد کل INDEL های مشاهده شده است.

جدول ۶: داده های مربوط به عملکرد INDEL ها در سه نمونه

نمونه	شماره یک	شماره دو	شماره سه
CDS	۷۰۷	۶۹۹	۷۰۹
frameshift_deletion	۱۱۰	۱۱۹	۱۳۶
frameshift_insertion	۸۵	۹۶	۹۴
nonframeshift_deletion	۲۰۷	۱۷۸	۱۸۶
nonframeshift_insertion	۱۹۱	۱۹۶	۱۹۲
stopgain	۸	۶	۴
stoploss	۰	۱	۰
unknown	۱۱۰	۱۰۸	۱۰۱
Intronic	۲۶۴۲۸	۲۰۷۰۹	۲۳۲۱۲
UTR3	۱۰۰۷	۹۲۶	۸۸۸
UTR5	۵۰۱	۵۰۰	۵۴۰
Splicing	۸۴	۸۱	۸۳

ادامه جدول ۶.			
ncRNA_exonic	۴۰۰	۳۴۷	۳۹۹
ncRNA_intronic	۲۵۷۹	۱۸۶۲	۲۲۷۵
ncRNA_splicing	۲	۵	۱
Upstream	۷۲۹	۶۲۸	۷۰۵
Downstream	۴۴۶	۲۹۱	۳۶۷
Intergenic	۱۹۹۷۵	۱۲۳۲۷	۱۶۲۷۸
Total INDEL	۵۲۹۰۶	۳۸۴۲۵	۴۵۴۹۸

بحث

با استفاده از آنالیز های بیوانفورماتیکی در مطالعه حاضر ژن‌های PAX3، CUBN، MTHFR، PDGFRA تاثیرگذارتر از سایر ژن ها مشاهده شدند. ژن (2q36.1) PAX3 به عنوان یک فاکتور رونویسی عمل می کند. از جمله عملکردهای مولکولی آن شامل اتصال به DNA و پروتئین، حضور در فرآیندهای بیولوژیکی همچون تنظیم مثبت رونویسی، توسعه اندام‌ها و سیستم عصبی مرکزی، فرآیند آپوپتوز و تنظیم بیان ژن‌های موثر در فرآیندهای تکثیر، بقا و تمایز می‌باشد. جهش در این ژن موجب بروز سندرم واردنبرگ می شود [۲۴-۲۲]. ژن CUBN (10p13) به طور کلی در جذب ویتامین B12 و در فرآیندهای بیولوژیکی از جمله انتقال کوبالامین، انتقال پروتئین و سوخت و ساز ویتامین D نقش دارد. این ژن به عنوان عامل تشخیص بروز سرطان کلیه شناخته شده است [۲۵, ۲۶]. ژن MTHFR (1p36.22) در پردازش اسیدهای آمینه به ویژه تبدیل هموسیستئین به متیونین موثر است، تغییرات ژنتیکی در این ژن موجب اختلال در عملکرد یا غیرفعال شدن این آنزیم شده و منجر به کاهش سطح هموسیستئین در افراد با سطح پایین فولات می شود. به عنوان اصلی ترین ژن در مسیر متابولیسم فولات عمل می کند و در فعالیت های کاتالیتیکی، اکسیداسیون و احیا و گردش خون نقش دارد. برخی از جهش های این ژن در بروز اختلالاتی از جمله نقص لوله عصبی و آلزایمر نیز اثرگذارند [۲۹-۲۷]. سطح بیان PDGFRA در توسعه جنین نقش مهمی دارد و موجب ایجاد اختلال در ساختارهای مشتق از اندودرم و مزودرم می شود. بطور کلی در شکل گیری لوله عصبی انسان و موش، بروز انواع تومورهای بدخیم از جمله گلیوبلاستوما و ملانوما موثر است [۳۲-۳۰]. به همین دلیل می توان گفت که احتمال اثرگذاری این ژن ها در بروز SB وجود دارد.

در مطالعه ای Wei Lu و همکارانش در سال ۲۰۰۶ به بررسی SNP های ژن PAX3 در مبتلایان به SB پرداختند. در نهایت rs16863657 به عنوان عامل خطر در بروز بیماری گزارش شد [۳۳] و در سال ۲۰۱۳ Agopian به بررسی تاثیر ژن های PAX3 و T در بروز SB پرداخت. این مطالعه با استفاده از ۱۱۴ نمونه بیمار و به روش سنگر صورت پذیرفت، در نهایت گزارش شد که این ژن‌ها در بروز SB موثرند [۳۴] که با توجه به دو پژوهش فوق می توان گفت احتمال ارتباط ژن PAX3 با اختلال SB وجود دارد زیرا که در مطالعه حاضر نیز این ارتباط مشاهده شده است. در سال ۲۰۰۸ گری و همکارانش به بررسی SNP۱۱۸ در مبتلایان به SB پرداختند. مشاهدات آنان حاکی از آن بود که بروز بیماری به فولات و ژن های دخیل در متابولیسم فولات وابسته نیست. Grey معتقد بود که شواهد آماری حاکی از ارتباط غیر تصادفی بیماری با ژن های MTHFR،TYMS، BHMT و MTR می باشد [۳۵]. در توافق با مطالعه مذکور نتایج حاصل از این پژوهش نیز جهش در ژن MTHFR مشاهده شد.

تاکنون بیش از ۲۰۰ ژن غالبا متعلق به مسیرهای متابولیسم folate/1-methyl carbon، انتقال و متابولیسم گلوکز، ترمیم DNA و ژن های غیر مرتبط با فولات مانند *PAX3*، *ApoE* در مدل‌های موشی در ارتباط با SB بررسی شده که به ندرت در بیان ریسک اختصاصی NTD موفق شده اند. با این حال مکانیزم های ژنتیکی اساسی NTDs در انسان به طور دقیق و کامل هنوز مشخص نشده است [۳۷, ۳۶].

نتیجه‌گیری

با توجه به این نتایج می توان بیان کرد که ارتباط این بیماری با سندرم واردنبرگ قابل اثبات است و همچنین ژن دخیل در متابولیسم فولات و انتقال دهنده فولات نیز در این نمونه ها مشاهده شده است اما به طور حتم نمی توان گفت کدامیک از این ژن ها عامل بروز بیماری می باشند. به طوری که این جهش ها می بایست با روش های معتبر مولکولی تایید گردند.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک می باشد. بدین وسیله از زحمات اساتید گرامی سرکار خانم دکتر فرزانه مشیری و جناب آقای دکتر علی عبدلی که

در این مسیر بدون هیچگونه چشم‌داشتی راهنمایی و همکاری خود را از اینجانب دریغ نکرده اند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

تضاد منافع

این مطالعه برای نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی نداشته است.

REFERENCES

1. Au KS, Ashley-Koch A, Northrup H. Epidemiologic and genetic aspects of spina bifida and other neural tube defects. Dev Disabil Res Rev. 2010; 16(1): 6-15. DOI:10.1002/ddrr.93.
2. Lei Y, Finnell RH. New Techniques for the Study of Neural Tube Defects. Adv Tech Biol Med. 2016; 4(1).
3. DeJong PM, Adams NS, Mann RJ, Polley JW, Girotto JA. Management of Lumbosacral Myelomeningocele. Eplasty. 2016; 16: ic51.
4. Detrait ER, George TM, Etchevers HC, Gilbert JR, Vekemans M, Speer MC. Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics. Neurotoxicol Teratol. 2005; 27(3): 515-524. DOI:10.1016/j.ntt.2004.12.007.
5. Copp AJ, Adzick NS, Chitty LS, Fletcher JM, Holmbeck GN, Shaw GM. Spina bifida. Nat Rev Dis Primers. 2015;1: 15007.
6. Fletcher JM, Brei TJ. Introduction: Spina bifida--a multidisciplinary perspective. Dev Disabil Res Rev. 2010; 16(1):1-5. DOI: 10.1002/ddrr.101.
7. Waller DK, Shaw GM, Rasmussen SA, Hobbs CA, Canfield MA, Siega-Riz AM, Gallaway MS, Correa A. Prepregnancy obesity as a risk factor for structural birth defects. Arch Pediatr Adolesc Med. 2007; 161(8): 745-750.
8. Vieira AR, Castillo Taucher S. Maternal age and neural tube defects: evidence for a greater effect in spina bifida than in anencephaly. Rev Med Chil. 2005; 133(1): 62-70.
9. Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. Q J Med. 1993; 86(11): 703-708.
10. Molloy AM, Kirke PN, Troendle JF, Burke H, Sutton M, Brody LC, Scott JM, Mills JL. Maternal vitamin B12 status and risk of neural tube defects in a population with high neural tube defect prevalence and no folic Acid fortification. Pediatrics. 2009; 123(3):917-923. DOI:10.1542/peds.2008-1173.
11. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong LY. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. JAMA. 2001; 285(23):2981-2986.
12. Lumley J, Watson L, Watson M, Bower C. Withdrawn: Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. Cochrane Database Syst Rev. 2011(4): CD001056.
13. Scott JM, Weir DG, Molloy A, McPartlin J, Daly L, Kirke P. Folic acid metabolism and mechanisms of neural tube defects. Ciba Found Symp. 1994; 181: 180-187; discussion 187-191.
14. Harris MJ, Juriloff DM. An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2010; 88(8):653-669. DOI:10.1002/bdra.20676.
15. Kennedy D, Chitayat D, Winsor EJ, Silver M, Toi A. Prenatally diagnosed neural tube defects: ultrasound, chromosome, and autopsy or postnatal findings in 212 cases. Am J Med Genet. 1998; 77(4): 317-321.
16. Goetzinger KR, Stamilio DM, Dicke JM, Macones GA, Odibo AO. Evaluating the incidence and likelihood ratios for chromosomal abnormalities in fetuses with common central nervous system malformations. Am J Obstet Gynecol. 2008; 199(3):285 e1-6. DOI:10.1016/j.ajog.2008.06.100.
17. Adzick NS. Prenatal diagnosis and treatment of spina bifida. Preface. Fetal Diagn Ther. 2015; 37(3):165. DOI: org/10.1159/000375329.
18. Bevilacqua NS, Pedreira DA. Fetoscopy for meningo-myelocele repair: past, present and future. Einstein (Sao Paulo). 2015; 13(2):283-9. DOI: 10.1590/s1679-45082015RW3032.
19. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, Huff CD, Shannon PT, Jabs EW, Nickerson DA, Shendure J, Bamshad MJ. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. Nat Genet. 2010; 42(1):30-35. DOI: 10.1038/ng.499.
20. Warr A, Robert C, Hume D, Archibald A, Deeb N, Watson M. Exome Sequencing: Current and Future Perspectives. G3 (Bethesda). 2015; 5(8):1543-1550. DOI: 10.1534/g3.115.018564.
21. Lohmann K, Klein C. Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. Neurotherapeutics. 2014; 11(4):699-707. DOI: 10.1007/s13311-014-0288-8.
22. Boudjadi S, Chatterjee B, Sun W, Vemu P, Barr FG. The expression and function of PAX3 in development and disease. Gene. 2018; 666:145-157. DOI: 10.1016/j.gene.2018.04.087.
23. Stuart ET, Kioussi C, Gruss P. Mammalian Pax genes. Annu Rev Genet. 1994; 28:219-236.
24. Scholl FA, Kamarashev J, Murmann OV, Geertsen R, Dummer R, Schafer BW.PAX3 is expressed in human melanomas and contributes to tumor cell survival. Cancer Res. 2001; 61(3):823-6.
25. Christensen EI, Nielsen R, Birn H. From bowel to kidneys: the role of cubilin in physiology and disease. Nephrol Dial Transplant. 2013; 28(2):274-281. DOI: 10.1093/ndt/gfs565.
26. Nykjaer A, Fyfe JC, Kozyraki R, Leheste JR, Jacobsen C, Nielsen MS, Verroust PJ, Aminoff M, de la Chapelle A, Moestrup SK, Ray R, Gliemann J, Willnow TE, Christensen EI. Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH) vitamin D(3). Proc Natl Acad Sci U S A. 200;. 98(24):13895-13900.
27. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. J Nephrol. 2000; 13(1):20-33.
28. Trimmer EE. Methylenetetrahydrofolate reductase: biochemical characterization and medical significance. Curr Pharm Des. 2013; 19(14):2574-2593.
29. Dean L. Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency, in Medical Genetics Summarie. Pratt V, McLeod H, Rubinstein W, Dean L, Kattman B, Malheiro A ,Editors. 2012; Bethesda (MD).
30. Toepoel M, Steegers-Theunissen RP, Ouborg NJ, Franke B, Gonzalez-Zuloeta Ladd AM, Joosten PH, van Zoelen EJ. Interaction of PDGFRA promoter haplotypes and maternal environmental exposures in the risk of spina bifida. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2009; 85(7):629-236.
31. Qian C, Wong CWY, Wu Z, He Q, Xia H, Tam PKH, Wong KKY, Lui VCH. Stage specific requirement of platelet-derived growth factor receptor-alpha in embryonic development. PLoS One. 2017; 12(9):e0184473. DOI: 10.1371/journal.pone.0184473.
32. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. Science. 2003; 299(5607):708-710.
33. Lu W, Zhu H, Wen S, Laurent C, Shaw GM, Lammer EJ, Finnell RH. Screening for novel PAX3 polymorphisms and risks of spina bifida. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2007; 79(1):45-49.
34. Agopian AJ, Bhalla AD, Boerwinkle E, Finnell RH, Grove ML, Hixson JE, Shimmin LC, Sewda A, Stuart C, Zhong Y, Zhu H ,Mitchell LE. Exon sequencing of PAX3 and T (brachyury) in cases with spina bifida. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2013; 97(9):597-601. DOI: 10.1002/bdra.23163.
35. Shaw GM, Lu W, Zhu H, Yang W, Briggs FB, Carmichael

SL, Barcellos LF, Lammer EJ, Finnell RH. 118 SNPs of folate-related genes and risks of spina bifida and conotruncal heart defects. BMC Med Genet. 2009; 10: 49. DOI:10.1186/1471-2350-10-49.
36. Greene ND, Stanier P, Copp AJ. Genetics of human neural tube defects. Hum Mol Genet. 2009; 18(R2):R113-29. DOI:10.1093/hmg/ddp347.
37. Bassuk AG, Muthuswamy LB, Boland R, Smith TL, Hulstrand AM, Northrup H, Hakeman M, Dierdorff JM, Yung CK, Long A, Brouillette RB, Au KS, Gurnett C, Houston DW, Cornell RA, Manak JR. Copy number variation analysis implicates the cell polarity gene glypican 5 as a human spina bifida candidate gene. Hum Mol Genet. 2013; 22(6):1097-1111. DOI:10.1093/hmg/dds515.