مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی یازدهم، شماره‌ی ۵، صفحه‌های ۵۵۲ ـ ۵۴۳ (دی ۱۳۸۸)

مقاله‌ی پژوهشی

جهش‌های احتمالی ژن تیروئید پراکسیداز در کودکان مبتلا به کم‌کاری مادرزادی دایمی تیروئید در استان اصفهان

سکینه کریمی زارع[۱]، دکتر فهیمه سهیلی‌پور[۲]، دکتر مر تضی کریمی‌پور[۳]، دکتر حسین خان احمد شهرضا[۳]، دکتر پریچهر یغمایی[۱]، لیلا کوکبی[۳]، سپیده امین‌زاده[۳]، دکتر مهین هاشمی‌پور[۲]، دکتر مسعود امینی[۲]، دکتر رضوانه هادیان[۲]

۱) دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ۲) مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۳) انستیتو پاستور ایران، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول**: اصفهان، خیابان خرم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم اصفهان، دکتر مهین هاشمی‌پور؛ e-mail:hashemipour@med.mui.ac.ir

چکیده

مقدمه: کم‌کاری مادرزادی تیروئید، شایع‌ترین بیماری متابولیک و درون‌ریز، و یکی از علل بروز عقب‌افتادگی ذهنی در کودکان است. این بیماری ممکن است در اثر جهش ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های دخیل در سنتز هورمون‌های تیروئید رخ دهد که دیس هورمونوژنزتیروئیدی نام دارد. نقص در ژن تیروئید پراکسیداز به عنوان متداول‌ترین عامل در بروز دیس هورمونوژنزتیروئید مطرح است. هدف در این مطالعه بررسی شیوع جهش‌های ژن تیروئید پراکسیداز در کودکان مبتلا به دیس‌هورمونوژنز تیروئید در استان اصفهان بود. مواد و روش‌ها: این مطالعه به صورت مقطعی در روی ۴۰ نوزاد مبتلا به کم‌کاری دایمی مادرزادی تیروئید به دلیل دیس هورمونوژنز تیروئید انجام شد. استخراج DNA ژنومیک از نمونه‌ی خون این بیماران به روش استاندارد اشباع نمک انجام شد. ۱۷ ناحیه‌ی اگزونی ژن تیروئیدپراکسیداز تکثیر شدند و محصولات PCR با روش غربالگری SSCP و تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفتند. یافته‌ها: یک جهش بدمعنی در موقعیت (G2669A) در اگزون ۱۵ در یک بیمار، و۷ پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی مختلف واقع در اگزون‌های ۱، ۷، ۸، ۱۱ و ۱۵ ژن تیروئید پراکسیداز یافت شد. نتیجه‌گیری: شیوع جهش در ژن تیروئیدپراکسیداز در این مطالعه در مقایسه با سایر مطالعه‌های مشابه، کمتر بود. این احتمال وجود دارد که جهش مربوط به این ژن در بیماران مورد بررسی مربوط به نواحی اینترونی و تنظیمی باشد. علاوه بر این، استفاده از روش‌های دیگر در کنار SSCP و بررسی ژن‌های دیگر دخیل در دیس‌هورمونوژنز تیروئید در مطالعه‌های بعدی لازم به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: کم‌کاری مادرزادی تیروئید، دیس هورمونوژنز تیروئید، ژن تیروئید پراکسیداز، جهش، SSCP

دریافت مقاله: ۸۸/۲/۲۹ ـ دریافت اصلاحیه: ۸۸/۴/۷ ـ پذیرش مقاله: ۸۸/۵/۳

مقدمه

کم‌کاری مادرزادی تیروئید (OMIM No:# 274500) یا (CH)[i]، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غدد درون‌ریز کودکان است که در صورت تشخیص و درمان زودرس از متداول‌ترین علل قابل پیشگیری عقب‌ماندگی ذهنی محسوب می‌شود. شیوع این بیماری در اروپا و آمریکای شمالی به طور متوسط ۱ در ۳۰۰۰ تا ۴۰۰۰ نوزاد گزارش شده است.[۱،۲] در ایران، برای اولین بار مطالعه‌های غربالگری کم‌کاری مادرزادی تیروئید در سال ۱۳۶۶، قبل از رفع کمبود ید انجام شد که طرح به دلیل میزان فراخوان بالا متوقف شد.[۳] بعد از

i- Congenital Hypothyroidism

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-10-27]

طرح یدرسانی عمومی (سال ۱۳۶۸)، غربالگری کم‌کاری مادرزادی تیروئید دوباره در سال ۱۳۷۶ در تهران و در سال‌های بعد در چند استان دیگر اجرا شد. یافته‌های این بررسی‌ها شیوع بالای این بیماری را در کشور نسبت به آمار جهانی نشان دادند. فراوانی کم‌کاری مادرزادی تیروئید در استان‌های تهران، فارس و اصفهان به ترتیب ۱ در ۹۱۴، ۱ در ۱۴۲۳ و ۱ در ۳۱۷ نوزاد تازه تولد یافته تخمین زده شده است.[۴،۵] در بین مبتلایان، حدود ۱۰٪ موارد به صورت گذرا است و به طور خود به خود و کامل در عرض هفته‌ها یا ماهها از بین می‌رود. سایر موارد به صورت دایمی باقی می‌ماند.[۶] دیس‌ژنزتیروئید نوع متداول کم‌کاری دایمی مادرزادی تیروئید و شامل ۸۵٪ موارد آن است و اغلب به صورت اسپورادیک (تک‌گیر) بروز می‌کند که به دلیل اشکال در تکامل غده‌ی تیروئید در دوران جنینی ایجاد و به دو نوع آژنزی (فاقد غده‌ی تیروئید) و هیپوپلازی (غده‌ی تیروئید کوچک) تقسیم می‌شود. در نوع هیپوپلازی، غده یا در محل طبیعی خود یا جایگاهی غیر از آن در گردن دیده می‌شود. ۱۵٪ باقی مانده‌ی کم‌کاری مادرزادی تیروئید دایمی با عنوان دیس‌هورمونوژنز تیروئید شناخته شده است و در آن مبتلایان با وجود داشتن غده‌ی تیروئید طبیعی قادر به سنتزهورمون نیستند. علت دیس‌هورمونوژنز تیروئید، نقص در فرایند سنتز هورمون تیروئید است. این نوع بیشتر به صورت ارثی با توارث اتوزوم مغلوب گزارش شده است.[۷] در بین ژن‌های مختلف مؤثر در نوع دیس‌هورمونوژنز، اختلال در ژن تیروئیدپراکسیداز (TPO[i])، واقع در کروموزوم 2p25 به عنوان شایع‌ترین و مهم‌ترین عامل شناخته شده است.[۸] این ژن دارای ۱۷ اگزون و با اندازه‌ی تقریبی ۱۵۰ Kbp است و گلیکوپروتئین آهن داری را کد می‌کند که با یک دومین کوچک درون غشایی به غشای داخلی سلول‌های فولیکولی غده‌ی تیروئید متصل می‌شود و نقش اصلی را در سنتز هورمون‌های تیروئیدی ایفا می‌نماید.[۹] تاکنون در مطالعه‌های انجام شده در چند کشور اروپایی و آسیایی، بیش از ۴۰ نوع جهش در ژن TPO شناسایی شده که بسیاری از آنها روی اگزون‌های ۸، ۹، ۱۰ و۱۴ این ژن واقع شده‌اند. بیشتر جهش‌ها از نوع جهش نقطه‌ای[ii] است و تعداد کمی از آن‌ها از نوع جهش‌های حذف و اضافه هستند. دوپلیکاسیون ۴ نوکلئوتیدی GGCC در اگزون ۸ که منجر به کدون خاتمه زودرس در اگزون ۹ می‌شود، شایع‌ترین جهش در بیشتر مطالعه‌ها معرفی شده است.[۲۸-۱۰]

در استان اصفهان، همزمان با اجرای طرح غربالگری کم‌کاری مادرزادی تیروئید، مطالعه‌های مختلفی در زمینه‌ی یافتن علت شیوع بالای این بیماری در مرکز غدد درون‌ریز و متابولیسم اصفهان در حال انجام است. از آنجا که کمبود ید به عنوان شایع‌ترین علت کم‌کاری مادرزادی تیروئید در جهان معرفی شده،[۲۹] بعد از انجام طرح یدرسانی عمومی در کشور، مطالعه‌ای در اصفهان در نوزادان و مادران آن‌ها انجام شد که میزان ید در نمونه‌های مورد بررسی در آن مطالعه، در محدوده‌ی طبیعی قرار داشت.[۳۰] در مطالعه‌ای دیگر، فراوانی نوع کم‌کاری دایمی مادرزادی تیروئید در استان اصفهان بسیار بالاتر از فراوانی این نوع نسبت به آمار جهانی گزارش شد و این نشان می‌دهد که کم کاری مادرزادی تیروئید به علت موارد دایمی در استان اصفهان شایع‌تر است.[۳۱] یافته‌های مطالعه‌های دیگر در این زمینه در استان اصفهان بیان‌گر این است که دیس‌هورمونوژنز تیروئیدی، علت ابتلای میزان بالاتری از بیماران در مقایسه با آمار جهانی است. از طرف دیگر، شیوع کم‌کاری مادرزادی تیروئید در خانواده‌های دارای ازدواج‌های خویشاوندی، بیشتر است.[۳۲،۳۳]

بنابراین، به نظر می‌رسد ازدواج فامیلی و جمع شدن ژن‌های جهش‌یافته‌ی اتوزوم مغلوب و بروز دیس هورمونوژنز تیروئیدی تاحدی توجیه‌کننده‌ی شیوع بالای کم‌کاری مادرزادی تیروئید در این استان باشد. این مطالعه به بررسی شیوع جهش‌های احتمالی ژن تیروئید پراکسیداز در کودکان مبتلا به کم‌کاری مادرزادی تیروئید دایمی استان اصفهان با اندازه‌ی غده‌ی تیروئید طبیعی پرداخته است و هدف آن کمک به شناسایی علل بالا بودن شیوع این بیماری در استان اصفهان، استفاده از یافته‌ها در مشاوره‌ی ژنتیک و شناسایی ناقلان در جهت بهتر نمودن برنامه‌ی غربالگری در استان اصفهان است.

مواد و روش‌ها

از ابتدای خرداد ماه ۱۳۸۱، همه‌ی نوزادن متولد شده در استان اصفهان پس از غربالگری اولیه در صورتی که بعد از هفته‌ی دوم تولد TSH ≥ ۱۰ میلی‌واحد بر لیتر و ۷ میکروگرم بر دسی‌لیتر T4 داشتند، به عنوان کودکان مبتلا به کم‌کاری مادرزادی تیروئید تلقی و توسط پزشک، با قرص لووتیروکسین درمان شدند. این کودکان از نظر سلامت کلی،

i - Thyroid Peroxidase
ii - Point mutation

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-10-27]

کفایت درمان و سایر موارد به صورت دوره‌ای در مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم پیگیری شدند. در مرحله‌ی بعدی برای تشخیص دایمی یا گذار بودن مشکل کم‌کاری تیروئید در این بیماران، شیرخواران به دو گروه تقسیم شدند.

گروه اول، کودکانی بودند که از زمان شروع مطالعه به سن سه سالگی رسیده بودند. در این افراد قرص لووتیروکسین قطع شد و آن‌ها یک ماه بعد از قطع دارو از نظر ابتلا به کم‌کاری تیروئید دایمی معاینه و آزمایش شدند (با بررسی T4 و TSH) و در صورت اثبات بیماری، به عنوان کودکان مبتلا به کم‌کاری مادرزادی تیروئید دایمی تلقی و دوباره درمان و پیگیری دوره‌ای شدند. علت بیماری در این مقطع، می‌تواند دیس‌ژنزی تیروئید و یا یک اختلال آنزیمی در سنتز هورمون‌های تیروئید (دیس هورمونوژنز تیروئید) باشد. قبل از درمان مجدد، سونوگرافی یا اسکن رادیوایزتوپ تیروئید انجام شد. سونوگرافی توسط یک رادیولوژیست مجرب در مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم با دستگاه هوندا الکتریک مدل ۲۰۰۰ و با پروب Linear شماره‌ی ۷/۵ مگاهرتز، و اسکن تیروئید از طریق تصاویر planar در نمای قدامی از ناحیه‌ی گردن در وضعیت extension گردن و با تکنسیم پرتکنتات انجام شد. دستگاه مربوط Gamma camera ESPECT 75 PMT ساخت کشور آلمان بود. تنها کودکانی که در بدو تولد در زمان تشخیص اولیه‌ی کم‌کاری مادرزادی تیروئیدی و قبل از شروع دارو اسکن تیروئید شده‌اند و اسکن تیروئید را نسج تیروئید در محل طبیعی نشان داده بود، از انجام سونوگرافی معاف شدند. کودکانی که در بدو تولد در اسکن آژنزی داشتند برای تأیید یا رد تشخیص دوباره سونوگرافی شدند. در صورتی که نوزاد سونوگرافی یا اسکن طبیعی داشت، دیس‌هورمونوژنز تیروئیدی برای او مطرح شد.

گروه دوم از مبتلایان به کم کاری مادرزادی تیروئید دایمی کسانی بودند که پس از سن یک سالگی باوجود درمان همچنان TSH مهار نشده (≥ ۱۰ میلی‌واحد بر لیتر) و مشابه گروه اول سونوگرافی یا اسکن طبیعی داشتند. در مجموع، معیار ورود به این مطالعه، ابتلای کودکان به کم‌کاری مادر زادی تیروئید دایمی و داشتن آناتومی طبیعی تیروئید در سونوگرافی یا اسکن بود. قبل از خون‌گیری رضایت کتبی از والدین بیماران برای ورود به مطالعه گرفته شد.

از هر کدام از کودکان مورد بررسی مقدار ۵ سی‌سی وریدی گرفته و نمونه‌ی خون در لوله‌های فالکون درپوش‌دار، دارای ماده‌ی ضد انعقاد EDTA (۵ میلی‌مول) ریخته شد و در دمای ۷۰°c- نگهداری گردید. نمونه‌های خون برای انجام مراحل بعدی طرح همراه یخ به بخش پزشکی مولکولی انستیتوپاستور تهران انتقال یافت. مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاق مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم اصفهان بررسی و تأیید شد.

DNA ژنومیک از خون محیطی بیماران به روش اشباع نمکی[i] استخراج شد[۳۴] و بعد از ارزیابی خلوص و غلظت توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر، در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری شد.

ابتدا با کمک نرم‌افزار GeneRunner ۱۷جفت آغازگر (primer) برای مناطق اگزونی و مجاور اگزونی ژن تیروئید پراکسیداز طراحی شد (جدول ۱). پس از ساخت آغازگرها، این نواحی به وسیله‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بعد از بهینه‌سازی به طور جداگانه تکثیر شدند.

مواد مورد نیاز این واکنش شامل ۱۰ پیکومول از هر آغازگر پایین دست و بالا دست برای هر اگزون، ۵۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، مخلوط dNTP (شرکت سیناژن ـ ایران) با غلظت ۲۰۰ میکرومول، MgCl2 با غلظت ۲ میلی‌مول، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X و ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA پلی‌مراز (شرکت سیناژن ـ ایران) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. برای تکثیر اگزون ۸ به دلیل درصد بالای CG آن علاوه بر مواد فوق به میزان ۱ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO)[ii] به ترکیب واکنش اضافه شد. PCR در دستگاه ترموسایکر (اپندورف ـ آلمان) با دمای واسرشت اولیه‌ی ۹۵ به مدت ۴ دقیقه آغاز و سپس ۳۰ سیکل تحت برنامه‌ای با دماهای واسرشت ۹۵ و اتصال، ۵۵-۶۲ (دمای اتصال بهینه شده برای اگزون‌های مختلف) و پلی‌مریزاسیون ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به ترتیب به مدت ۴۵، ۳۰ و ۴۰ ثانیه ادامه پیدا کرد و در نهایت با دمای پلی‌مریزاسیون نهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه خاتمه یافت. بعد از اتمام واکنش به منظور بررسی، محصول PCR با در نظرگرفتن طول قطعه‌ی تکثیر شده روی ژل آگاروز ۱/۵ تا ۲٪ دارای ۱ میکرولیتر اتیدیم برماید ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت‌الکتروفورز و سپس با تابش نور ماورای بنفش مشاهده و اندازه‌ی آن‌ها با اندازه‌ی مارکر 100 bp مقایسه و تأیید شد.

i- Salting out
ii - Dimethyl Sulfoxide

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-10-27]

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای به کار رفته برای تکثیر ژن تیروئیدپراکسیداز

ناحیه	آغازگر پایین‌دست		آغازگر بالادست			دمای آنیلینگ
	توالی (5´→3´)	موقعیت سر 5' تا انتهای اگزون	توالی (5´→3´)	موقعیت سر 5' تا انتهای اگزون	طول قطعه (bp)	
اگزون ۱	CACTTTACAAGTTCCAATGATG	+۶۷	GACTTCCTAGCATCTTGACG	-۷۰	۲۲۰	۵۸ °c
اگزون۲	CATGGCCTTGTCAGTGCTTG	+۹۵	AGACAAGGACACAGCGGTTC	-۷۴	۲۲۵	۶۰ °c
اگزون۳	TTAACAATGGCAAGCTTCAG	+۱۲۳	AAGCAACACTGTCAGTGAATC	-۶۷	۲۷۵	۶۰ °c
اگزون۴	CACAAAGTCAAGGTGTCCTC	+۶۵	TT AGTACCAAAGATACCATAGAC	-۶۰	۲۹۵	۶۰ °c
اگزون۵	TCCTTCATGATGGCATCTAGTC	+۷۳	CAAATTCAGATGCTGGAGTCAC	-۱۰۱	۳۰۸	۶۱ °c
اگزون۶	AGCATCACAGGACCCAATC	+۵۲	CTGAGAATGGTGTCTTATATCTG	-۸۶	۳۱۳	۶۱ °c
اگزون۷	TTGACGTTTTAAATAGCACTTAG	+۶۰	GTCATCTTTCTGCTACCACG	-۶۱	۳۲۷	۵۵ °c
اگزون۸	AAGTACCTGGGAGAGAGA AGC	+۱۶۳	AGAGTCTTACAA AGG GTG CAC	-۶۰	۶۷۸	۶۰ °c
اگزون۹	AAGAGTTCATGGGGACCAG	+۴۵	TCA CTGAGATGCTTTTCCTAT C	-۲۹	۳۲۷	۶۰ °c
اگزون۱۰	AGTCTCTCTAGCAGCAGGTTG	+۷۹	GTTTCTCTAGAACTGAGCCAAG	-۵۵	۳۰۶	۶۱ °c
اگزون۱۱	TGTGCAGAACGTGAAGGAAG	+۴۴	AACAAAAGTTCAGTTCTGTGAGAG	-۵۱	۳۳۰	۶۱ °c
اگزون۱۲	CTTTGTTTGATGAGATGCACG	+۵۷	CTC CAT GCA CTG TGA CCT TAC	-۴۲	۳۰۸	۶۱ °c
اگزون۱۳	CTTATATCGGAAACATTCAGATG	+۵۴	CTTTTCTCGTAGTTTGACTACATG	-۴۶	۲۷۱	۶۰ °c
اگزون۱۴	TACAAAAACTCGCAAATGGAC	+۶۹	AGAGAAGCACCTCCCAGAAC	-۶۹	۲۷۰	۶۱ °c
اگزون۱۵	ATTGCAGCCATGTCCAGAG	+۶۹	CAGACTCAGGCAGGACAACC	-۷۵	۲۴۴	۶۱ °c
اگزون۱۶	CCAGATCCTGTCCAACCACT	+۵۹	CTACCCTCCACAGTCACGGT	-۶۱	۲۵۰	۶۲°c
اگزون۱۷	GTGATTTTGGGAACATGAAG	+۴۹	TGTGAAAAGAGCTCCTGTC	-۱۰۸	۲۱۱	۶۲°c

برای بررسی جهش‌های احتمالی ژن تیروئیدپراکسیداز، ازآزمایش غربالگری SSCP[i] استفاده شد. به این صورت که ۵ میکرولیتر از محصول PCR حاصل از تمام نواحی تکثیر شده (به غیر از ناحیه‌ی مربوط به اگزون ۸) به طور جداگانه و به همراه کنترل طبیعی (کنترل منفی) با ۷ میکرولیتر از SSCP loading buffer که شامل فرمامید (۹۵٪)، برومومفنل بلو (۰/۰۵٪) و زایلن سیانل (۰/۰۵٪) است، مخلوط شد و ترکیب حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای تک‌رشته‌ای شدن DNA انکوبه و به سرعت در یخ منتقل شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از سرنگ هامیلتون به درون چاهک‌های تعبیه شده روی ژل پلی آکریل آمید ۲۹ به ۱، ۸٪ غیرتقلیب‌کننده[ii] شامل ۱۰ درصد گلیسرول منتقل و به مدت ۱۶-۱۰ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با ولتاژ ۳۰۰ ولت الکتروفورز شدند. برای ظهور باندها از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد. به این ترتیب که، ابتدا ژل به مدت ۵ دقیقه با محلول شامل ۵٪ اسید استیک و ۴۰٪ اتانول تثبیت، و در ادامه ۱۰ دقیقه با نیترات نقره‌ی ۱٪ رنگ‌آمیزی شد. پس از شستشو با آب مقطر باندها با محلول NaOH ۱/۵٪ و فرمالدئید ۳۷٪ قابل رویت شدند و در نهایت با اضافه کردن اسید استیک ۱٪ واکنش متوقف شد. سپس، باندهای حاصل با کنترل طبیعی (کنترل منفی) از نظر حرکتی و محل قرار گرفتن، مقایسه شدند و هر نمونه‌ای که

i - Single Conformational Pdymorphism

ii- Nondenaturing

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-10-27]

در آن تغییر الگوی حرکت نسبت به فرد طبیعی دیده شد، پس از PCR مجدد در حجم کلی ۵۰ میکرو لیتر و خالص‌سازی محصول PCR توسط کیت تخلیص DNA از ژل (کیاژن ـ آلمان)، و با آغازگرهای پایین دست یا بالادست به روش ختم زنجیره به صورت تجاری (شرکت ماکروژن ـ کره) تعیین توالی شد.

در اینجا کنترل طبیعی یا کنترل منفی به عنوان فردی در نظر گرفته شد که فاقد هر گونه تغییر نوکلئوتیدی در توالی ژن تیروئیدپراکسیداز باشد. برای انتخاب این مورد از فرد سالم که از نظر بالینی فاقد بیماری دیس‌هورمونوژنز تیروئید بود، استفاده شد. فرد طبیعی انتخاب شده دارای میزان TSH و T4 طبیعی در سن ۲۰ سالگی بود و اسکن و سونوگرافی تیروئید طبیعی داشت. در این فرد همه‌ی نواحی اگزونی ژن تیروئیدپراکسیداز تعیین توالی شد و نبود تغییر نوکلئوتیدی در توالی ژن تیروئید پراکسیداز تأیید شد.

در شروع آزمایش به علت عدم وجود نمونه‌های دارای تغییر نوکلئوتیدی در ژن TPO در جمعیت مورد، نمونه‌ی کنترل مثبت (نمونه‌ای که در آن وجود تغییر نوکلئوتیدی در ناحیه‌ای از ژن تیروئیدپراکسیداز تأیید شده باشد) وجود نداشت. در هنگام انجام کار، هنگامی که در یک ناحیه‌ی اگزونی ژن تیروئیدپراکسیداز، تفاوت حرکتی در نمونه یک بیمار با کنترل طبیعی (کنترل منفی) مشاهده شد، نمونه‌ی فرد مذکور تعیین توالی شد و نوع تغییر نوکلئوتیدی در آن ناحیه‌ی ژنی تأیید شد. در مراحل بعدی، از این نمونه به عنوان نمونه‌ی کنترل مثبت برای آن ناحیه‌ی ژنی استفاده شد و در کنار نمونه‌ی سایر بیماران و کنترل منفی روی ژل پلی‌آکریل‌آمید الکتروفورز شد.

از آن‌جا که یکی از متغیرهای مهم که بر حساسیت تکنیک غربالگری SSCP اثر می‌گذارد، اندازه‌ی قطعه‌های تکثیر شده توسط PCR است و کاهش تدریجی در حساسیت تکنیک با افزایش طول قطعه‌ی DNA از bp ۲۵۰ به بالا وجود دارد، در این تکنیک معمولاً حد بالای طول قطعه حدود ۳۵۰ باز در نظر گرفته می‌شود. فقط اگزون ۸ به علت بزرگ بودن و نداشتن شرایط مناسب برای بررسی به وسیله‌ی تکنیک SSCP، در همه‌ی نمونه‌ها به طور مستقیم تکثیر و تعیین توالی شد. علاوه بر این، در بین بیماران ۴ فرد که شدیدتر از بقیه بیمار بودند، انتخاب، و علاوه بر بررسی تمام قطعات مربوط به ژن TPO توسط SSCP، کل اگزون‌ها در آن‌ها تعیین توالی شد. این کار برای مقایسه‌ی یافته‌های SSCP با یافته‌های حاصل از تعیین توالی کلی و بررسی میزان خطاهای احتمالی در تکنیک SSCP انجام شد.

تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصل از تعیین توالی با نرم افزار کروماز انجام شد و سپس با توالی اصلی ژن تیروئید پر اکسیداز (Gen Bank Accession Number : DQ011222) به وسیله‌ی برنامه‌ی Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ Blast) تطبیق داده شد و به این ترتیب اختلاف باز مربوط با توالی اصلی مشخص شد. پس از انجام آنالیزهای لازم درباره‌ی توالی‌ها و ترجمه‌ی آنها، تغییر به دست آمده با بانک اطلاعاتی موتاسیون، Human Gene Mutation Database (http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html) و بانک اطلاعاتی SNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) و مطالعه‌های مرتبط با این موضوع مقا یسه شدند.

یافته‌ها

از بین کودکان فراخوانده شده، ۴۰ بیمار با TSH > ۱۰ میلی‌واحد بر لیتر و T4 < ۷ میکروگرم بر دسی‌لیتر در روز ۳ تا ۷ تولد و ۱ ماه پس از قطع دارو در سن ۳ تا ۴ سالگی، و با اسکن و سونوگرافی طبیعی انتخاب و به عنوان بیماران مبتلا به کم‌کاری مادرزادی تیروئید دایمی از نوع دیس‌هورمونوژنز وارد این مطالعه شدند. والدین ۱۱ کودک دارای ازدواج خویشاوندی بودند.

همه‌ی DNAهای استخراج شده دارایOD مناسب (۱/۷ تا ۲) بودند و از نظر کمّی و کیفی برای PCR مناسب تشخیص داده شدند. در همه‌ی بیماران اگزون‌ها و نواحی حد فاصل اگزون‌ها و اینترون‌های ژن تیروئیدپراکسیداز تکثیر شدند.

یافته‌های حاصل از SSCP و تعیین توالی در مجموع ۷ نوع پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی (SNP) در ژن TPO، و یک جهش را در اگزون ۱۵ نشان دادند. پلی‌مورفیسم‌ها در اگزون یک و ناحیه‌ی مجاور بالادست آن (پروموتر) به صورت هموزیگوت و اگزون‌های ۱۱،۸،۷ و ۱۵ در هر دو حالت هموزیگوت و هتروزیگوت در بیماران مشاهده شدند. الگوهای حرکتی SSCPمربوط به نمونه‌های دارای SNP در هر دو حالت هموزیگوت و هتروزیگوت از یکدیگر، و از نمونه‌های فاقد SNP، متفاوت و قابل تشخیص بودند. همه‌ی پلی‌مورفیسم‌های یافت شده در این مطالعه در گذشته گزارش شده و در بانک اطلاعاتی SNP موجود است. در جدول ۲ جایگاه پلی‌مورفیسم‌ها و فراوانی آن در بیماران مورد مطالعه، درج شده است.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-10-27]

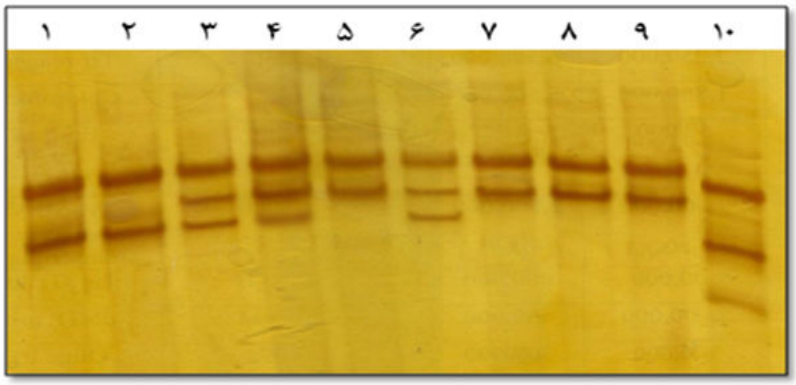
جدول ۲-SNP*های به دست آمده‌ی ژن تیروئیدپراکسیداز در بیماران مورد بررسی

	ناحیه	تعداد بیماران با SNP مربوطه					نوع تغییر	شماره‌ی ارجاع	شماره‌ی ثبت SNP
		تغییر و موقعیت نوکلئوتید†	تغییر و موقعیت اسید امینه	هموزیگوت	هتروزیگوت	فاقد SNP			
۱	پروموتر	A-35G	-	۱۲	-	۲۸	–		–
۲	اگزون۱	G11A	**	۱۲	-	۲۸	–	۱۳	–
۳	اگزون۷	G859T	A257S	۶	۱۵	۱۹	Missense‡	۱۳	rs4927611
۴	اگزون۸	G1207T	A373S	۹	۱۴	۱۷	Missense	۱۱	rs2280132
۵	اگزون۸	G1283C	T398S	۷	۱۴	۱۹	Missense	۱۱	rs2175977
۶	اگزون۱۱	C2088T	D666D	۶	۱۵	۱۹	Synonymous§	۱۳	rs10189135
۷	اگزون۱۵	T2630C	A847V	۹	۱۹	۱۲	Missense	۱۶	rs1126799

* SNP= شماره‌گذاری بازها بر اساس Kimura 1989 et al. می باشد (۱۲)، **اگزون ۱ ژن تیروئیدپراکسیداز به پروتئین کد نمی‌شود، †Missense: جهشی که سبب تغییر اسید آمینه می‌شود، § Synonymousجهشی که سبب تغییر اسید آمینه نمی‌شود، A :آلانین، S: سرین، T:ترئونین، D :اسیدآسپارتیک،V: والین

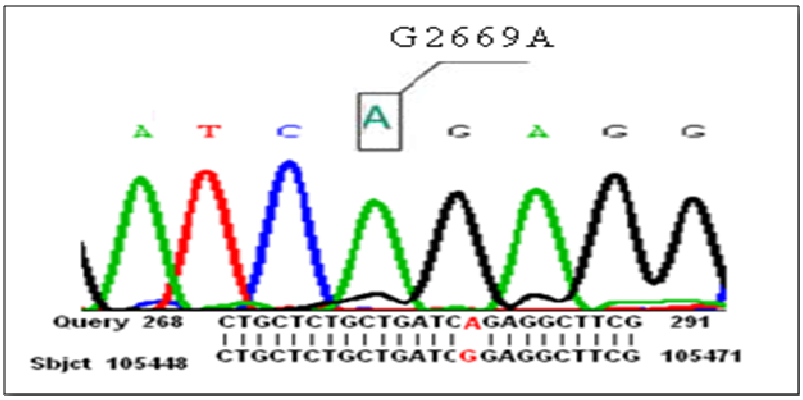
یافته‌های SSCP مربوط به اگزون ۱۵، تنها یک الگوی حرکتی متفاوت از کنترل طبیعی و نمونه‌های دارای SNP را در یک بیمار نشان داد (شکل ۱). آنالیز تعیین توالی در فرد مذکور، جابه‌جایی نوکلئوتید گوانین (G) در جایگاه ۲۶۶۹ ژن TPO به آدنین (A) (G2669A) که سبب تغییر اسیدآمینه‌ی گلایسین (G) به آرژینین (A) را در موقعیت ۸۶۰ پروتئین تیروئیدپراکسیداز می‌شود تأیید نمود، که این تغییر به صورت هموزیگوت مشاهده شد. البته جهش مشاهده شده با انجام تعیین توالی با هر دو آغازگر پایین‌دست و بالا دست تأیید شد (شکل ۲).

در چهار بیماری که تمام اگزون‌های ژن TPO در آن‌ها تعیین توالی شد، جهشی گزارش نشد که این یافته مشابه یافته‌های حاصل از SSCP در این بیماران بود.



شکل ۱- نتایج ژل SSCP مربوط به اگزون ۱۵. ردیف ۱ : فرد طبیعی. ردیف ۲ : فرد فاقد SNP در جایگاه T2630C. ردیف‌های ۳،۴ و ۶ : افراد دارای SNP به صورت هتروزیگوت. ردیف ۸،۷،۵ و ۹ : افراد دارای SNP به صورت هموزیگوت. ردیف ۱۰ : فرد دارای جهش هموزیگوت در موقعیت G2669A.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-10-27]



شکل ۲- نتایج تعیین توالی اگزون ۱۵ مربوط به فرد دارای جهش هموزیگوت در جایگاه G2669A

بحث

آنزیم تیروئیدپراکسیداز (TPO) به دلیل داشتن ۳ نقش کلیدی در فرایند سنتز هورمون‌های تیروئید (اکسیده کردن ید، انتقال ید به اسیدامینه‌ی تیروزین در پروتئین تیروگلوبین و اتصال تیروزین‌های یددار شده‌ی مجاور به منظور شکل‌گیری هورمون‌های تیروئید)، مهمترین آنزیم در این فرایند است.[۹] جهش در ژن TPO به عنوان تأ ثیرگذارترین عامل ژنتیکی دیس هورمونوژنز تیروئید معرفی شده است.[۲۸-۱۰]

در این مطالعه، میزان شیوع جهش ژن تیروئیدپراکسیداز در۴۰ کودک مبتلا به دیس هورمونوژنز تیروئید استان اصفهان بررسی شد. از بین ۴۰ بیمار تنها یک مورد یافت شد که دارای جهش در توالی کدکننده‌ی ژن TPO بود. بنابراین، شیوع جهش ژن TPO در بیماران مورد مطالعه پایین است.

جهش گزارش شده، در اگزون ۱۵ ژن TPO در موقعیت G2669A قرار دارد که نتیجه‌ی آن تبدیل اسیدآمینه‌ی غیریونی گلایسین (G) به اسیدآمینه‌ی یونی با بار مثبت آرژینین (A) در موقعیت ۸۶۰ پروتئین تیروئیدپراکسیداز است. از آن جا که اگزون ۱۵ ژن TPO پلی‌پپتید مربوط به دومین (Domain) درون غشایی پروتئین تیروئیدپراکسیداز را کد می‌کند، تغییر حاصل در شیوه‌ی برهمکنش این دومین با غشای داخلی سلول‌های فولیکولی غده‌ی تیروئید تأثیر می‌گذارد و در اتصال صحیح پروتئین با غشای اختلال ایجاد می‌کند. عدم اتصال صحیح که برای عملکرد درست پروتئین TPO ضروری است، منجر به کاهش فعالیت پروتئین و در نتیجه کاهش میزان تولید هورمون تیروئید در فرد می‌شود.[۲۱]

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ توسط Avbelj در کشور بوسنی و هرزه‌گوین در ۴۶ بیمار انجام شد، جهش در ژن TPO عامل ۴۵٪ موارد دیس‌هورمونوژنز تیروئید معرفی شد.[۲۱] در همین سال مطالعه‌ی توسط راکوور و همکاران در کشور فلسطین اشغالی در ۲۲ بیمار انجام شد. نتیجه‌ی آن بررسی نیز شیوع بالای جهش ژن TPO در بیماران مبتلا به دیس‌هورمونوژنز تیروئیدی را نشان داد. در آن مطالعه دو نوع جهش در ۹۰٪ بیماران مشاهده شد.[۲۸] مطالعه‌ی دیگر در سال ۲۰۰۵ توسط رودریگوئز و همکاران در کشور پرتقال در ۵۵ بیمار انجام شد. در آن بررسی ۸ نوع جهش در ۱۳ بیمار گزارش شد.[۲۳] در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ در کشور تایوان توسط نیو انجام شد، در ۱۶ بیمار مبتلا به دیس‌هورمونوژنز ۷ بیمار (۴۴٪ بیماران) دارای جهش در ژن TPO بودند. در آن مطالعه بیان شد که احتمال وجود جهش در نواحی اینترونی و تنظیمی ژن TPO و یا جهش در سایر ژن‌های دخیل در دیس‌هورمونوژنز تیروئید در سایر بیماران وجود دارد.[۱۹]

ارتباط به دست آمده بین شیوع جهش در ژن TPO و بیماری دیس‌هورمونوژنز تیروئیدی در این مطالعه با سایر مطالعه‌ها[۱۹،۲۱،۲۳،۲۸] که ارتباط به نسبت زیادی بین جهش‌های این ژن و بیماری دیس‌هورمونوژنز تیروئیدی یافته بودند، همخوانی نداشت و بسیار پایین‌تر از مطالعه‌های مشابه بود. در مطالعه‌ی ما تعداد بیماران کمتر از مطالعه‌ی بوسنی و پرتقال بیشتر از مطالعه‌ی فلسطین اشغالی و تایوان بود. بنابراین، تعداد بیماران در محدوده‌ی مطالعه‌های مشابه بود و تعداد کم بیماران نمی‌تواند از دلایل شیوع کم جهش در ژن

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-10-27]

تیروئیدپراکسیداز باشد. به علاوه، در آن بررسی کم‌کاری تیروئید در کودکان ۱ تا ۳ ساله بررسی شد. روش تعیین نوع دایمی کم‌کاری تیروئید مانند مطالعه‌ی بوسنی و هرزه‌گوین و پرتقال بود و وجود بیماری در افراد مورد مطالعه نمی‌تواند به علت موارد گذرا باشد. تفسیر ما در مورد تغییر میزان جهش در مطالعه‌ی ما شامل موارد زیر است: در مطالعه‌ی حاضر جهش در نواحی اگزونی ژن TPO بررسی گرفت. تاکنون مطالعه‌ای درباره‌ی ارتباط بین جهش در ناحیه‌ی اینترونی و تنظیمی این ژن و بیماری دیس‌هورمونوژنز تیروئید گزارش نشده است. همان‌طور که در مطالعه تایوان ذکر شد، احتمال وجود جهش در ناحیه‌ی اینترونی و تنظیمی ژن تیروئیدپراکسیداز در بیمارانی که فاقد جهش در ناحیه‌ی اگزونی بودند، وجود دارد. ممکن است در جمعیت استان اصفهان جهش نواحی اینترونی و تنظیمی ژن تیروئیدپراکسیداز عامل درصد بالاتری از بیماری دیس‌هورمونوژنز تیروئید باشد. مسأله‌ی دیگر که باید در مطالعه‌ی ما مد نظر قرار گیرد این است با توجه به این‌که جمعیت اصفهان گنجینه‌ی ژنتیکی مربوط به خود را دارا است، ممکن است برخلاف سایر مطالعه‌ها، در جمعیت اصفهان جهش ژن‌هایی دیگر دخیل در بیماری دیس‌هورمونوژنز تیروئید شامل ژن‌های کانال غشایی سدیم ـ ید، تیروگلوبولین، تیروئیداکسیداز و پندرین شیوع بالاتری از جهش در ژن تیروئیدپراکسیداز داشته و بروز بیماری در بیماران مورد بررسی ما به دلیل جهش در ژن‌های دیگر دخیل در این بیماری باشد. نکته‌ی دیگر مورد بحث، حساسیت تکنیک مورد استفاده در مطالعه است. تکنیک SSCP یکی از روش‌های ارزان و مناسب، با حساسیت بالا برای تشخیص اختلاف‌های ژنتیک است.[۳۵] اختلاف‌های بسیار جزیی در حد جابه‌جایی تک نوکلئوتیدی و حذف و اضافه‌های کوچک در توالی ژنوم با این روش قابل شناسایی است.[۳۷،۳۸] شیوع بالای جهش نقطه‌ای در ژن TPO و کاربرد بالای تکنیک SSCP در تشخیص جهش‌های نقطه‌ای در کنار سایر مزایای این روش که به آن اشاره شد، از دلایل انتخاب آن در این مطالعه است. در مطالعه‌ی مربوط به کشورهای بوسنی و هرزه‌گوین و پرتقال نیز از تکنیک SSCP برای غربالگری جهش در ژن تیروئیدپراکسیداز استفاده شده است. در هر دو مطالعه‌ی گذشته، SSCP روش مؤثری برای تشخیص جهش‌های ژن TPO معرفی شده است، که این می‌تواند تأییدی برای انتخاب این روش در مطالعه‌ی حاضر باشد.

اساس SSCP، تشکیل ساختارهای متفاوت ثانویه است که زنجیره‌های تک‌رشته‌ای DNA در شرایط ویژه مثل تغییر در ترکیب بافرها و یا توالی اسیدهای نوکلئیک به خود می‌گیرند و این مسأله سبب تفاوت الگوی حرکتی قطعات در ژل در نتیجه‌ی الکتروفورز می‌گردد، بنابراین، DNAهای تک‌رشته‌ای که دارای یک جهش ژنتیکی باشند نسبت به رشته‌های طبیعی روی ژل پلی‌آکریل‌آمید الگوی حرکتی متفاوتی از خود نشان می‌دهند.[۳۷] برای تأیید تغییر و مشخص شدن نوع آن، نمونه‌های دارای الگوی حرکتی متفاوت تعیین توالی می‌شوند. حد بالای توانایی این روش برای تعیین جهش‌ها حدود ۹۰٪ است.[۳۸] در مطالعه‌ی ما، قابل تشخیص بودن چند پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی (SNP) در تعدادی از اگزون‌های ژن TPO با روش SSCP و از طرفی مشابه بودن یافته‌های حاصل از تعیین توالی مستقیم در چهار بیمار با یافته‌های مربوط به SSCP، نشان می‌دهد که حساسیت تکنیک به کار گرفته شده به حد بالای تعیین جهش با این تکنیک نزدیک است. ولی در عین حال تکنیک SSCP نیز مانند سایر تکنیک‌های غربالگری دارای درصدی از خطا است. از معایب SSCP می‌توان وابسته بودن شدید به شرایط آزمایشگاه و عدم تشخیص جهش‌هایی که تأثیر کم در تغییر شکل‌گیری ساختار فضایی تک‌رشته می‌گذارند، نام برد. در مواردی نیز تغییرات مربوط به نواحی کناری قطعه‌های مورد بررسی با این تکنیک‌قابل بررسی نیست.[۳۸] بنابراین، در مطالعه‌ی حاضر، احتمال وجود جهش‌هایی که با روش SSCP قابل تشخیص نیست، وجود دارد.

شایان ذکر است در بعضی موارد، علت بیماری‌های ژنتیک با توارث اتوزوم مغلوب، حذف‌های بزرگ هموزیگوت در ژن است که در این بیماران، نواحی حذف شده با روش PCR تکثیر نمی‌شوند و از این راه قابل تشخیص هستند ولی در صورت داشتن حذف‌های بزرگ هتروزیگوت، به دلیل داشتن یک نسخه‌ی طبیعی ژن، همه‌ی نواحی مورد بررسی با PCR تکثیر یافته که این گونه حذف‌ها با تکنیک SSCP و تعیین توالی قابل تشخیص نیستند. همان طور که اشاره شد، در همه‌ی بیماران تمام اگزون‌های ژن TPO با PCR تکثیر شده و در هیچ بیماری ناحیه‌ای یافت نشد که قابل تکثیر نباشد و احتمال وجود حذف بزرگ هموزیگوت رد شد ولی امکان وجود حذف‌های بزرگ هتروزیگوت در بیماران مورد بررسی را باید در نظر گرفت. اگرچه تاکنون حذف‌های بزرگ

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-10-27]

در ارتباط با ژن TPO گزارش نشده است، باید احتمال وجود این مورد را در بیماران مورد بررسی در نظر گرفت.

به طور کلی، فراوانی جهش مربوط به ژن TPO در بیماران مبتلا به دیس‌هورمونوژنز تیروئید در استان اصفهان کمتر از مطالعه‌های مشابه است. در مجموع، مطالعه‌های بیشتر در این زمینه مانند بررسی جهش‌های اینترون‌ها و نواحی تنظیمی ژن TPO که در این مطالعه پوشش داده نشدند، و استفاده از روش‌های دیگر غربالگری در کنار روش SSCP و همین‌طور بررسی جهش در سایر ژن‌های دخیل در دیس هورمونوژنز تیروئیدی در مطالعه‌های آتی پیشنهاد می‌شود. هم‌چنین، مطالعه‌های گسترده با تعداد نمونه‌ی بیشتر در زمینه‌ی بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های گزارش شده در این مطالعه با بیماری در مقایسه با نمونه‌های طبیعی نیز می‌تواند کمک‌کننده باشد.

سپاسگزاری: این طرح با حمایت مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران انجام شد. از همکاران گروه ژنتیک بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران، به خصوص سرکار خانم سمیه جمالی و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، خانم‌ها نغمه قانع و اکبری، هم‌چنین از همه‌ی بیماران و خانواده‌های محترم آن‌ها که در این طرح ما را یاری رساندند، نهایت سپاس و امتنان را داریم.

References

1. Delange F. Neonatal screening for congenital hypothyroiddism in Europe. Report of the Newborn Committee of the European Thyroid Association. Acta Endocrinol suppl (Copenh) 1979; 223: 3-29.
2. Fisher DA, Dussault JH, Foley TP, Klein AH, LaFranchi S, Larsen PR, et al. Screening for congenital hypothyroidism, results of screening one million North American infants. J Pediatr 1979; 94: 700-5.
3. Azizi F, Oladi B, Nafar abadi M, Hajipour R. Screening for identification congenital hypothyroidism in Tehran: effects of iodid deficiency in increasing inborn transient TSH. Journal Shaheed Beheshti University of Medical Sciences 1994;1: 34-8.[farsi]
4. Ordookhani A, Mirmiran P, Hajipour R, Hedayati M, Azizi F. Screening for congenital hypothyroidism in the Islamic Republic of Iran: strategies, obstacles and future perspectives. East Mediterr Health J 2002; 8: 480-9.
5. Hashemipour M, Amini M, Iranpour R, Sadri GH, Javaheri N, Haghighi S, et al. Prevalence of Congenital Hypothyroidism in Isfahan, Iran: Results of a Survey on 20,000 Neonates. Horm Res 2004; 62: 79-83.
6. Radetti G, Zavallone A, Gentili L, Beck-Peccoz P, Bona G. Foetal and neonatal thyroid disorders. Minerva Pediatr 2002; 54: 383-400.
7. Park SM, Chatterjee VK. Genetics of congenital hypothyroidism. J Medi Genet 2005; 42: 379-89.
8. Nascimento AC, Guedes DR, Santos CS, Knobel M, Rubio IG, Medeiros-Neto G. Thyroperoxidase gene mutations in congenital goitrous hypothyroidism with total and partial iodide organification defect. Thyroid 2003; 13: 1145-51.
9. Kimura S, Hong YS, Kotani T, Ohtaki S, Kikkawa F. Structure of the human thyroid peroxidase gene: comparison and relationship to the human myeloperoxidase gene. Biochemistry 1989; 28: 4481- 9.
10. Abramowicz MJ, Targovnik HM, Varela V, Cochaux P, Krawiec L, Pisarev MA , et al. Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter. J Cl in Invest 1992; 90: 1200-4.
11. Bikker H, Den Hartog MT, Baas F, Gons MH, Vulsma T, De Vi jlder JJM. A 20-basepairduplication in the human thyroid peroxidase gene results in a total iodide organification defect and congenital hypothyroidism. J Clin Endocrinol Metab 1994; 79:248–52.
12. Bikker H, Vulsma T, Baas F, De Vijlder JJ. Identification of five novel inactivating mutationsin the human thyroid peroxidase gene by denaturing gradient gel electrophoresis. Hum Mutat1995; 6: 9–16.
13. Kotani T, Umeki K, Yamamoto I, Maesaka H, Tachibana K, Ohtaki S. A novel mutation in the human thyroid peroxidase gene resulting in a total iodide organification defect. J Endocrinol 1999; 160:267–73.
14. Kotani T, Umeki K, Yamamoto I, Ohtaki S, Adachi M, Tachibana K. Iodide organification defect resulting from co segregation of mutated and null thyroid peroxidase alleles. Mol Cellul Endocrinol 2001; 182: 61–8.
15. Pannain S, Weiss RE, Jackson CE, Dian D, Beck JC, Sheffield VC, et al. Two different mutations in the thyroid peroxidase gene of large inbred Amish kindred: power and limits of homozygosity mapping. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84:1061–71.
16. Bakker B, Bikker H, Vulsma T, De Randamie JS, Wiedijk BM, et al. Two decades of screening for congenital hypothyroidism in the Netherlands: TPO gene mutations in total iodide organification defects (an update). J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 3708–12.
17. Bakker B, Bikker H, Hennekam RC, Lommen EJ, Schipper MG, Vulsma T, et al. Maternal isodisomy for chromosome 2p causing severe congenital hypothyroidism. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:1164–8.
18. Umeki K, Kotani T, Kawano J, Suganuma T,Yamamoto I, Aratake Y, et al. Two novel missense mutations in the thyroid peroxidase gene, R665Wand G771R, result in a localization defect and cause congenital hypothyroidism. Eur JEndocrinol 2002; 146:491–8.
19. Niu DM, Hwang B, Chu YK, Liao CJ, Wang PL, Lin CY. High Prevalence of a Novel Mutation (2268 insT) of theThyroid Peroxidase Gene in Taiwanese Patients with Total Iodide Organification Defect, and Evidence

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-10-27]

for a Founder Effect. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 4208-12.
20. Wu JY, Shu SG, Yang CF, Lee CC, Tsai FJ. Mutation analysis of thyroid peroxidase gene in Chinese patients with total iodide organification defect: identification of five novel mutations. J Endocrinol 2002; 172: 627–35.
21. Avbelj M, Tahirovic H, Debeljak M, Kusekova M, Toromanovic A, Krzisnik C, et al. High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dyshormonogenesis. Eur J Endocrinol 2007; 156: 511–9.
22. Rivolta CM, Esperante SA, Gruñeiro-Papendieck L, Chiesa A, Moya CM, Domené S, et al. Five novel inactivating mutations in the thyroid peroxidase gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect. Hum Mutat 2003; 22: 259.
23. Rodrigues C, Jorge P, Soares JP, Santos I, Salomão R, Madeira M, et al. Mutation screening of the thyroid peroxidase gene in a cohort of 55 Portuguese patients with congenital hypothyroidism. Eur J Endocrinol 2005; 152: 193–8.
24. Ambrugger P, Stoeva I, Biebermann H, Torresani T, Leitner C, Grüters. A Novel mutation of the thyroid peroxidase gene in patients with permanent congenital hypothyroidism. Eur J Endocrinol 2001; 145: 19-24.
25. Tajima T, Tsubaki J, Fujieda K. Two novel mutations in the thyroid peroxidase gene with goitrous hypothyroidism. Endocr J 1995; 52: 643–5.
26. Pfarr N, Musholt TJ, Musholt PB, Brzezinska R, Pohlenz, J. Congenital primary hypothyroidism with subsequent adenomatous goiter in a Turkish patient caused by a homozygous 10-bpdeletion in the thyroid peroxidase (TPO) gene. Clin Endocrinol (Oxf) 2006; 64: 514–18.
27. Pfarr N, Borck G, Turk A, Napiontek U, Keilmann A, Muller-Forell W, et al. Goitrous congenital hypothyroidism and hearing impairment associated with mutationsin the TPO and SLC26A4/PDS genes. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 2678–81.
28. Tenenbaum-Rakover Y, Mamanasiri S, Ris-Stalpers C, German A, Sack J, Allon-Shalev S, et al. Clinical and genetic characteristics of congenital hypothyroidism due to mutations in the thyroid peroxidase(TPO) gene in Israelis. Clin Endocrino (Oxf) 2007; 66: 695–702
29. Delang F. Screening for congenital hypothyroidism used as an indicator of the degree of iodine deficiency and of its control. Thyroid 1998; 8: 1185–92.
30. Hashemipoor M, Amini M, Gheisari A, Sharifei S, Iranpour R, Aminorroay A.Comparison of urinary iodine excretion in neonatesand their mothers in Isfahan, Iran. Endocr Pract 2002; 8: 347–50.
31. Hashemipour M, Hovsepian S, Kelishadi R, Iranpour R, Hadian R, Haghighi S, et al. Permanent and Transient Congenital Hypothyroidism in Isfahan-Iran. J Med Screen 2009; 16: 11–16.
32. Hashemipour M, Amini M, Talaie M, Kelishadi R, Hovespian S, Iranpour R, et al. Parental consanguinity among parents of neonates with congenital hypothyroidism in Isfahan. East Mediterr Health J 2007; 13(3): 567-574.
33. Iranpour R, Hashemipour M, Amini M, Talaei SM, Kelishadi R, Hovsepian S, et al. [Tc]-99m Thyroid Scintigraphy in Congenital Hypothyroidism Screening Program. J Trop Pediatr 2006; 52: 411-5.
34. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16:1215.
35. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekyia T. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 2766-70.
36. Sunnucks P,Wilson AC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC. SSCP Is Not So Difficult: The Application and Utility of Single-Stranded Conformation Polymorphism in Evolutionary Biology and Molecular Ecology. Mol Ecol 2000; 9: 1699-710.
37. Hayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of Mutations in the genomic DNA. PCR Methods Appl1991; 1: 34-8.
38. Nollau P, Wagener C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques. Clin Chem 1997; 43: 1114-28.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-10-27]

Original Article

Potential Mutations of Thyroid Peroxidase Gene in Children with Congenital Hypothyroidism in Isfahan Province

Karimizare S[1], Soheilipour F[2], Karimipour M[3], Khanahmad[3], Yaghmayee P[1], Kokabee L[3], Aminzadeh S[3], Hashemipour M[2], Amini M[2], Hadyan R[2]

[1]Sciences and Research Branch, Islamic Azad university,Tehran, [2]Endocrine & Metabolism Research Center, Isfahan University of Medical Sciences & Health Services, Isfahan; [3]Pasteur Institute of Iran, Molecular Medicine Department, Tehran, I.R.Iran

e-mail: hashemipour@med.mui.ac.ir

Received: 19/04/2009 **Accepted**: 25/07/2009

Abstract

Introduction: Congenital hypothyroidism (CH), the most common congenital endocrine disorder in childhood and one of the causes of mental retardation, may be caused by defects in the enzymatic cascade of thyroid hormone synthesis, called thyroid dyshormonogenesis, of which thyroid peroxidase gene (TPO) mutations are one of the most common causes. The aim of this study was to assess frequency of TPO gene defects in patients with thyroid dyshormonogenesis in Isfahan province. Materials and Methods: This was a cross sectional study conducted on 40 patients with permanent congenital hypothyroidism, due to thyroid dyshormonogenesis. Genomic DNA was extracted from the peripheral blood of these patients, using the salting out method. The 17 exonic region of the TPO gene was amplified and mutation screening was performed by single-strand conformational analysis (SSCP) and sequencing. Results: Results demonstrated one missense mutation in the (G2669A) location of exon 15 in one patient and seven different single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exons 1, 7, 8, 11 and 15 of the TPO gene. Conclusion: Frequency of TPO gene mutation in this study was lower in comparison to other similar studies. It remains possible that in these patients, the disorder was caused by a TPO gene defect in regulatory or intronic regions. In addition, methods besides SSCP analysis and detection of other gene defects in thyroid dyshormonogenesis need to be further investigated in this field.

Keywords: Congenital Hypothyroidism, Thyroid dyshormonogenesis, Thyroid peroxidase gene, Mutation, SSCP

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-10-27]