

## تشخیص پیش از تولد بتا تالاسمی از طریق cffDNA با تکنیک NGS و

### آنالیز RHDO

#### Prenatal diagnosis of $\beta$ -thalassemia through cffDNA by NGS technique and RHDO analysis

نادیا میرزایی گیسومی<sup>۱</sup>، غلامرضا جوادی<sup>۱</sup>، شهره زارع کاریزی<sup>۱</sup>، محمد میریونسی<sup>۲</sup>، پروانه کشاورز<sup>۳\*</sup>

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، گروه زیست‌شناسی واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی،

تهران، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی واحد پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۳- دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

Mirzaei Gisomi N<sup>1</sup>, Javadi Gh<sup>1</sup>, Zare Karizi Sh<sup>2</sup>, Miryounesi M<sup>3</sup>, Keshavarz P<sup>3\*4</sup>

1- PhD Student, Associate Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Pishva Branch, Varamin, Iran

3- Associate Professor, Department of Medical Genetics, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Cellular and Molecular research center, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: keshavarz@gums.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۹/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۱۸)

### چکیده

بتا تالاسمی یک گروه از اختلال‌های خونی ارثی با وراثت اتوزومی مغلوب است. مؤثرترین روش برای کاهش این بیماری ارثی، تشخیص پیش از تولد است. نمونه‌برداری تهاجمی جهت بررسی جنین با خطر سقط تقریبی یک درصد برای جنین همراه است. DNA آزاد جنینی در پلاسما مادر، منبع بسیار خوبی از مواد ژنتیکی برای تشخیص‌های مولکولی پیش از تولد جنین است. Relative Haplotype Dosage Analysis (RHDO) که بر اساس هاپلو تیپ است، به عنوان یک کاربرد در تشخیص پیش از تولد امیدبخش است. هدف از این مطالعه، بررسی بیماری بتا تالاسمی از طریق تکنیک Next-Generation Sequencing (NGS) با آنالیز (RHDO) است. در این مطالعه پنج زوج ناقل بتا تالاسمی (مینور) با روش Amplification Refractory Mutation System- Polymerase chain reaction (ARMS-PCR) نسبت به موتاسیون IVSII-1 G>A تعیین ژنوتیپ شدند. طی حاملگی ۱۰ سی‌سی خون از هر خانم باردار و همچنین نمونه‌ی بزاق از همسرانشان گرفته شد. نمونه‌ها به مرکز Genoma ایتالیا جهت بررسی با تکنیک NGS ارسال شد. در نهایت نتایج به دست آمده با روش تهاجمی مقایسه شد. نتایج به دست آمده از تکنیک NGS با آنالیز RHDO بدون نیاز به آنالیز فرد مبتلا با بررسی بلوک‌های هاپلو تیپی دارای دقت و صحت ۱۰۰ درصد است. نتایج حاصل از Cell-free fetal DNA (cffDNA) طبق پروتکل کشوری برای بیماری بتا تالاسمی تایید شدند. از پنج نمونه‌ی جنینی به دست آمده از زوج‌های بالا که نسبت به موتاسیون IVSII-1 G>A بررسی شدند، یک جنین مبتلا، دو جنین نرمال و دو جنین مینور بودند. حساسیت و ویژگی تست NGS ۱۰۰ درصد بود و هم‌چنین ارزش پیش‌بینی‌کننده مثبت و منفی ۱۰۰ درصد بود. تعیین توالی هدفمند پلاسما‌ی مادری برای NIPD در بتا تالاسمی با استفاده از نرم‌افزار SHAPEIT برای آنالیز RHDO میسر است. بنابراین می‌توان با استفاده از نرم‌افزارهای جدید در این زمینه بدون نیاز به اطلاعات سایر اعضای خانواده هاپلو تیپ والدین را تهیه کرد.

### واژه‌های کلیدی

بتا تالاسمی

تشخیص پیش از تولد (PND)

cffDNA

NGS

RHDO

تالاسمی نوعی بیماری ژنتیکی است که در اثر آن هموگلوبین ساختار طبیعی خود را از دست داده یا در ساخت آن اختلال ایجاد می‌شود، در نتیجه اکسیژن‌رسانی به اعضا بدن به‌طور مطلوب صورت نمی‌پذیرد. هموگلوبین جزئی از یک انتقال‌دهنده اکسیژن در سلول‌های قرمز خونی است و شامل دو زنجیره پلی‌پپتید مختلف به نام آلفا و بتا است. بتا تالاسمی، که در اثر جهش در ژن HBB<sup>1</sup> واقع در کروموزوم ۱۱ ایجاد می‌شود، یکی از رایج‌ترین بیماری‌های تک‌ژنی در جهان است (Higgs et al. 2012). بیش از ۲۰۰ موتاسیون مختلف بتا تالاسمی تاکنون شناسایی شده است که اکثراً جهش نقطه‌ای است (Giardine et al. 2014). موتاسیون IVSII-1 G>A شایع‌ترین موتاسیون در ایران است (Bazi et al. 2016). اگر والدین هر دو ناقل این بیماری باشند، برای آن‌ها ۲۵ درصد خطر تولد فرزند مبتلا وجود دارد. افراد درگیر بیماری بتا تالاسمی به انتقال مکرر خون و کپسول آهن نیاز دارند و همچنین درمان نهایی در بیماران، نیاز به پیوند سلول‌های بنیادی و ژن درمانی دارد (Higgs et al. 2012). پیشگیری از این بیماری در نوزادان، موضوع مهمی برای والدین و دولت است، زیرا این روش درمانی برای بیماران دردناک است و بار سنگینی را بر دوش جامعه می‌گذارد. بنابراین، مؤثرترین راهکار در کاهش شیوع این بیماری ژنتیکی، تشخیص مناسب پیش از تولد (PND)<sup>۲</sup> است. با این حال، تشخیص سنتی قبل از تولد، که شامل روش‌های تهاجمی مانند آمنیوسنتز و نمونه‌گیری از پرزهای کوریونی (CVS)<sup>۳</sup> است، خطر سقط جنین را افزایش می‌دهد (Akolekar et al. 2014; Han et al. 2015). تشخیص پیش از تولد تالاسمی در ایران از سال ۱۹۹۲ آغاز و به‌عنوان یک برنامه پیشگیری و درمان ملی تالاسمی در سال ۱۹۹۷ اجرا شد (Abolghasemi et al. 2007). کشف DNA جنین (cffDNA) در پلاسماي مادری در تشخیص غیر تهاجمی قبل از تولد (NIPD)<sup>۴</sup> نقش بسیار مهمی دارد (Lo et al. 1997). این قطعات حدود ۱۰ درصد از کل DNA سلول (cfDNA) را در خون مادر تشکیل می‌دهند (Barrett et al.

2011). تست‌های غیرتهاجمی پیش از تولد (NIPT)<sup>۵</sup> جهت غربالگری آنیوپلوئیدی‌ها، در حال حاضر یک خدمت معتبر در بسیاری از کشورها در سراسر جهان است. NIPD به والدین با حاملگی‌های پر خطر اجازه می‌دهد تا گزینه‌ای با روش ایمن با نمونه خون مادر به‌جای تشخیص تهاجمی داشته باشند که خطر ابتلا به سقط جنین را کاهش می‌دهد (Verhoef et al. 2016). NIPD کاربردهای بالینی مختلفی از جمله تعیین جنسیت جنین برای بیماری‌های وابسته به جنس، وضعیت تعیین آنتی‌ژن گروه خونی Rh و تشخیص برخی بیماری‌های تک‌ژنی را دارد (Bustamante-Aragonés et al. 2012) با این حال، NIPD مبتنی بر cffDNA برای بیماری‌های تک‌ژنی بسیار چالش برانگیز است، اما اغلب محدود به تشخیص جهش‌های پدری در وراثت اتوزومی مغلوب، زمانی که زوجین جهش‌های متفاوتی دارند (Hill et al. 2015) و یا جهش‌های جدید در وراثت اتوزومی غالب مثل بیماری هانتینگتون (Gonzalez-Gonzalez et al. 2008) و آکندروپلازی (Chitty et al. 2011) می‌باشد. اگرچه NIPD برای بیماری‌های تک‌ژنی مغلوب، آینده‌ای درخشان در کاربردهای بالینی نشان می‌دهد، اما هنوز با چالش‌های فنی فراوانی روبرو است. آلودگی cffDNA توسط پلاسما مادر یکی از مهم‌ترین موانع، غلبه بر شناسایی نادرست ژنوتیپ مربوط به بیماری جنین است، خصوصاً هنگامی که جهش در هر دو والد یکسان باشد. در دهه گذشته، استفاده از massively parallel sequencing برای تعیین ژنوتیپ به‌صورت genome-wide برای ژن مسبب مسئول بیماری یا پلی‌مورفیسیم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP)<sup>۶</sup> اطراف آن امکان جدیدی را برای استنباط آلل‌های SNP جنین فراهم کرده است. Lo et al. (2010) برای اولین بار یک روش مبتنی بر هاپلوتیپ<sup>۷</sup> که آنالیز دوز نسبی هاپلوتیپ relative haplotype dosage (RHDO) نامیده می‌شود، جهت بررسی بیماری بتا تالاسمی، از طریق NIPD معرفی کرد (Lo et al. 2010). با همین رویکرد، دانشمندان پژوهش‌های دیگری را جهت بررسی سایر بیماری‌های تک‌ژنی همانند بیماری DMD<sup>۸</sup> (Xu et al. 2015) یا

<sup>5</sup> Non-invasive prenatal test

<sup>6</sup> Single nucleotide polymorphisms

<sup>7</sup> Haplotype based

<sup>8</sup> Duchenne muscular dystrophy

<sup>1</sup> Hemoglobin

<sup>2</sup> Prenatal diagnosis

<sup>3</sup> Chorionic villus sampling

<sup>4</sup> Non-invasive prenatal diagnosis

نمونه‌ها با رعایت استانداردهای لازم جهت بررسی با تکنیک NGS به آزمایشگاه Genoma در ایتالیا ارسال شد. جهت بررسی برای نمونه‌ها هم‌زمان پنج ژن در یک پنل به صورت توالی‌یابی هدفمند با خوانش بالای 500X انجام گرفت. این پنل شامل ژن‌های CFTR، HBB، CX26 (GJB2)، CX30 (GJB6) است. دی‌گرام ترسیم‌شده نشان‌دهنده کل پروسه‌ی این بررسی است (شکل ۱).

استخراج DNA ژنومی از خون مادر و بزاق پدر انجام شد، جهت استخراج cfDNA ابتدا پلاسما از خون مادر طی دو مرحله سانتریفیوژ (Kubota 4000) جدا شد. مرحله‌ی اول با ۲۵۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد سپس دو میلی‌لیتر از پلاسما جدا شد و در ویال ۲ ریخته شد. مرحله دوم با ۱۶۰۰۰g به مدت ۱۲ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد و در نهایت ۴۰۰ میکرولیتر از مایع رویی را جدا نموده و به ویال ۱/۵ انتقال داده شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد و سپس از پلاسما استخراج cfDNA انجام شد. ابتدا کتابخانه‌ی ژنومی و سپس تکثیر قطعات و بعد توالی‌یابی و در نهایت آنالیز اطلاعات انجام می‌شود. جهت تهیه کتابخانه ژنومی برای gDNA، DNA ژنومی ابتدا با مکانیسم سونیکیت کردن قطعه قطعه شد و سپس End repairing جهت فسفریله کردن انتهای 5' و اضافه کردن نوکلئوتید A در انتهای 3' و ایجاد انتهای صاف در DNA صورت گرفت. در مرحله‌ی بعد، از آداپتورها جهت تکثیر قطعات استفاده شد. جهت تهیه کتابخانه ژنومی برای cfDNA، با توجه به قطعات کوتاه آن، مرحله قطعه‌قطعه کردن حذف شد، پس از End repairing، سپس size selection انجام شده قطعات بین ۱۸۰ جفت‌باز تا ۲۰۰ جفت‌باز انتخاب شدند. طراحی پروب برای تکثیر ژن‌های مورد نظر و نواحی بالادست و پایین دست ژن انجام شد.

جهت تکثیر قطعات انجام شد و در نهایت توالی‌یابی با دستگاه HiSeqTM 2000 (Illumina) با پروتکل paired- 150bp end صورت گرفت.

بیماری SMA<sup>۱</sup> (Parks et al. 2017) و همچنین بیماری هایپرپلازی مادرزادی آدرنال (CAH) (New et al. 2014) با کارایی تشخیص بالا اجرا کردند. با این حال، در این مطالعات فرایند ساخت هاپلوتیپ نیاز به استفاده از سایر اعضای خانواده مثل پروباند و یا تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک پیچیده دارد، که باعث ایجاد مشکلاتی در بررسی‌های تشخیصی می‌شود. پیچیدگی فنی و پرهزینه بودن این تکنیک، دو محدودیت در NIPD برای اختلالات تک ژنی است. آخرین مطالعه در این زمینه در سال ۲۰۱۹ با هدف مشخص نمودن هاپلوتیپ جنین بدون نیاز به اطلاعات مربوط به پروباند، انجام شد که می‌تواند هزینه تست را کاهش دهد و انجام این تست را کاربردی‌تر کند (Li et al. 2019). هدف از این مطالعه تشخیص پیش از تولد بیماری بتا تالاسمی از طریق DNA آزاد جنینی با تکنیک NGS و آنالیز RHDO است، که برای اولین بار در ایران انجام می‌شود.

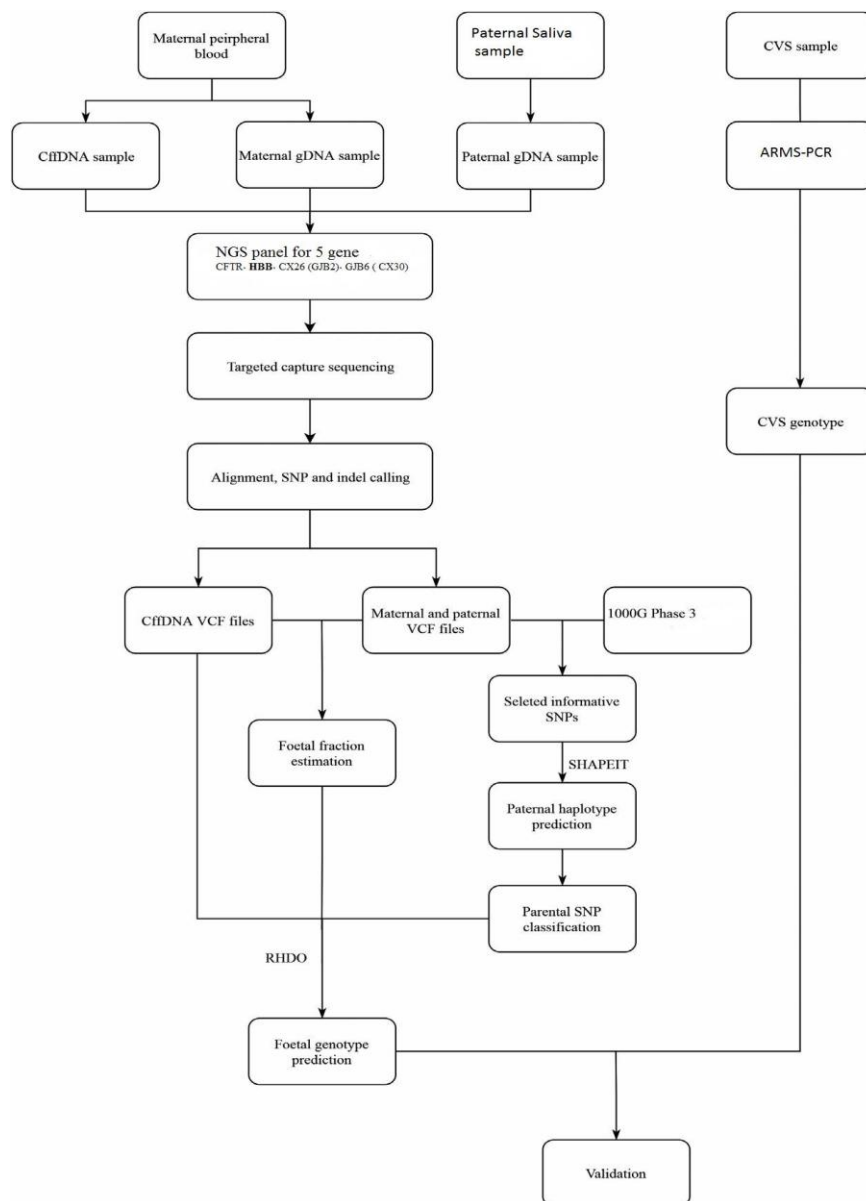
#### مواد و روش‌ها

در این مطالعه زوج‌های ناقل بتا تالاسمی که به آزمایشگاه ژنتیک دکتر کشاورز رشت در سال‌های ۹۸ و ۹۹ مراجعه داشتند و نتایج آزمایشات خون‌شناسی آنها ( $MCV < 80$ ,  $MCH < 27$  Hb,  $A2 > 3$ ) نشان‌دهنده حامل بودن آنها از نظر بتا تالاسمی بود، مورد بررسی قرار گرفتند. از ۳۰ زوج ناقل بتا تالاسمی نمونه خون گرفته شد و تعیین ژنوتیپ برای این افراد انجام شد، پنج زوجی که دارای جهش IVSII-1 در ژن HBB بودند، وارد مطالعه شدند. سپس از خانم‌های باردار که جهت تشخیص قبل از تولد مراجعه کردند ۱۰ میلی‌لیتر خون در لوله‌های مخصوص نگهدارنده DNA آزاد پلاسمایی (استرک) و همچنین نمونه‌ی جنینی (CVS یا مایع آمنیوتیک) گرفته شد و از همسرانشان نیز نمونه‌ی بزاق تهیه شد. هفته‌ی بارداری خانم‌هایی که از آنها نمونه گرفته شد از هفته‌ی دهم به بالا بود. تمام خانم‌های باردار رضایت‌نامه کتبی دادند و از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی گیلان تاییدیه دریافت شد (IR.GUMS.REC.1398.152). کل پروسه‌ی بررسی به صورت یک الگوریتم در (شکل ۱) قابل رویت است.

<sup>1</sup> Spinal muscular atrophy

<sup>2</sup> Mean corpuscular volume

<sup>3</sup> mean corpuscular hemoglobin



شکل ۱- تشخیص قبل از تولد بیماری بتا تالاسمی با دو روش تهاجمی و غیر تهاجمی (Lo et al. 2019).

gDNA, genomic DNA; cffDNA cell-free fetal DNA; CVS, chorionic villus sampling; RHDO, relative haplotype dosage

توزیع هر باز باید نزدیک به ۲۵ درصد باشد که تغییر در این توزیع می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که خوانش دستگاه همراه با خطا بوده است و باید آن ناحیه از تمامی توالی‌ها حذف شود.

در مرحله Trimming خوانش‌های کم کیفیت با نرم‌افزار Trimmomatic حذف شد. پس از حذف بازها و خوانش‌های با کیفیت پایین فایل‌های به‌دست آمده برای قسمت بعد مورد استفاده قرار می‌گیرد.

ابتدا بعد از دریافت فایل خام (Row data)، برای کنترل کیفی فایل FASTQ از نرم‌افزار FastQC استفاده شد. که خروجی این مرحله HTML است. این نرم‌افزار خوانش‌های توالی را از چندین منظر مورد بررسی قرار می‌دهد. با نرم‌افزار فوق خوانش‌ها از نظر کیفیت توالی‌یابی هر باز و توزیع ۴ باز در طول خوانش مورد بررسی قرار داده شد. کیفیت خوانش بازها می‌بایست بالاتر از عدد ۳۰ باشد. این کیفیت نشان‌دهنده این است که به ازای هر باز احتمال خوانش خطا ۱ در ۱۰۰۰ است. علاوه بر این موضوع

برای آنالیز RHDO، SNP‌هایی که قبلاً انتخاب شدند به دو گروه طبق گزارش قبلی طبقه‌بندی شدند (Lo et al. 2010). برای مشخص کردن ال به ارث رسیده‌ی مادری، ابتدا SNP‌هایی که در مادر هتروزیگوت بوده و در پدر هموزیگوت بوده انتخاب می‌شوند. سپس این SNP‌ها به دو گروه تقسیم می‌شوند (HapI, HapII). SNP‌هایی که در هاپلوتیپ I مادری قرار دارند و با ال پدری یکسان هستند به نام SNP‌های گروه آلفا طبقه‌بندی می‌شوند. در مقابل SNP‌هایی که در هاپلوتیپ II مادری قرار دارند و با ال پدری یکسان هستند، به نام SNP‌های گروه بتا طبقه‌بندی می‌شوند. اگر جنین HapI را به ارث ببرد SNP‌های آلفا زیاد ارائه می‌شوند (overrepresentation). اگر جنین HapII را به ارث ببرد، ال‌های بر روی HapI, II به‌طور مساوی ارائه می‌شوند (represented). به همین ترتیب، اگر جنین HapII را به ارث ببرد، SNP‌های گروه بتا بیشتر ارائه می‌شوند. در حالی که اگر HapI به جنین انتقال پیدا کند، ال‌های بر روی HapI, II به‌طور مساوی ارائه می‌شوند. هاپلوتیپ‌های به ارث رسیده به جنین را می‌توان با اندازه‌گیری allelic imbalance به وسیله‌ی Sequential Probability (SPRT) Ratio Test محاسبه کرد (Karoui et al. 2006; Lo et al. 2010). بعد از شناسایی هاپلوتیپ به ارث رسیده به جنین (HapI یا HapII) چک می‌شود که در آن هاپلوتیپ به ارث رسیده موتاسیون قرار دارد یا خیر. از این طریق می‌توان ژنوتیپ جنین را تعیین کرد. جهت بررسی جهش پدری در زوجینی که جهش متفاوت دارند، جهش پدری در جنینی مستقیماً با بررسی خوانش‌ها خوانده شده بررسی می‌شود و موتاسیون مادری از طریق هاپلوتیپ‌ها با استراتژی RHDO بررسی می‌شود. جهت بررسی موتاسیون پدری در زوج‌هایی که جهش یکسان دارند همانند بررسی جهش مادری از استراتژی RHDO استفاده می‌شود. SNP‌هایی که در پدر هتروزیگوت و در مادر هموزیگوت هستند انتخاب می‌شوند و طبق توضیحات بالا آنالیز می‌شود.

از تمامی خانم‌های باردار نمونه جنینی، ترجیحاً CVS گرفته شد و چنانچه نمونه‌برداری CVS برای خانم باردار تهدیدی جدی به واسطه موقعیت جنین و جفت محسوب می‌شد، نمونه‌برداری از مایع آمنیون جنین صورت گرفت. از پنج نمونه‌ی جنینی، چهار

در این مرحله خوانش‌های خوانده شده به ژنوم مرجع هم‌تراز می‌شوند و هر خوانش به ژنوم متصل می‌شود که ژنوم نسخه‌های مختلفی دارد، جدیدترین نسخه آن hg38 و دو نسخه دیگر hg18 و hg19 است. در این مطالعه از ژنوم مرجع (hg19, NCBI37) و طبق دستورالعمل از نرم‌افزار Burrows- BWA (version 0.7) Wheeler Aligner استفاده شد، خروجی این مرحله فایل SAM است. از نرم‌افزار SAMtools (version 1.2) جهت مرتب سازی و تبدیل فایل SAM به فایل BAM استفاده شد، فایل BAM فرم فشرده‌ی فایل SAM بوده و بر اساس خوانش‌ها مرتب شده است. داده‌ی خوانش‌ها معمولاً شامل درصدی از خوانش‌های تکراری است که در روند کشف جهش‌های ژنتیکی اختلال ایجاد می‌کند. به‌منظور از بین بردن این خطا از نرم‌افزار (version 1.93) PICARD به‌منظور حذف خوانش‌های تکراری استفاده می‌شود. در این مرحله از نرم‌افزارهای مختلفی استفاده می‌شود که در اینجا از نرم‌افزار GATK<sup>1</sup> استفاده شد، در این مرحله فایل خروجی از نرم‌افزار BAM و ژنوم انسان و dbSNP وارد شده و فایل BAM با ژنوم انسان جهت بررسی SNP و indel مقایسه شده و در نهایت خروجی یک فایل VCF است. با برنامه Integrative Genomics Viewer (IGV) تصویر موتاسیون رویت شد.

برای اندازه‌گیری Fetal Fraction، SNP‌هایی که در والدین برای ال‌های مختلف هموزیگوت (واقع در کروموزوم ۱۱) بودند، انتخاب شدند که با فرمول  $f = \frac{\sum 2p}{\sum (p+q)}$  محاسبه شده، P نشان‌دهنده‌ی تعداد خوانش‌های مربوط به ال جنینی خاص (fetal-specific allele) و q مربوط به عمق خوانش سایر ال‌ها است.

برای ایجاد هاپلوتیپ‌های والدین بدون نیاز به اطلاعات سایر اعضای خانواده (پروبانده) ابتدا SNP‌های گویا در ناحیه‌ی هدف انتخاب شده، سپس هاپلوتیپ والدین با نرم‌افزار SHAPEIT استفاده از اطلاعات 1000 Genome phase 3 ایجاد شدند.

دسته‌بندی SNP‌های گویا و نتیجه‌گیری هاپلوتیپ جنینی

<sup>1</sup> Genome Analysis Toolkit

همزمان در نمونه‌های CVS و پلاسمای خون مادری با استفاده از cffDNA با تکنیک NGS و آنالیز RHDO انجام شد. DNA ژنومی والدین و cffDNA استخراج شده و هاپلوتیپ‌ها مشخص شدند و توالی‌یابی صورت گرفت و در نهایت بررسی با روش تهاجمی نیز انجام شد و نتایج دو روش با هم مقایسه شدند (شکل ۱). پنج زوجی که انتخاب شدند همگی دارای جهش یکسان IVSII-1 بودند، بررسی بعد از توالی‌یابی نشان‌دهنده این است که جنین زوج ۱ و ۲ ناقل موتاسیون بوده و جنین زوج ۳ مبتلا بوده و جنین زوج ۴ و ۵ سالم بوده است و ۴ نمونه‌ی جنینی اول CVS بوده و نمونه‌ی پنجم آمیون است. سه جنین اول پسر و دو جنین آخر دختر است (جدول ۱). نتایج بدست آمده با بررسی به روش ARMS-PCR تایید شدند. در روش تهاجمی بررسی از سه گروه کنترل نرمال و ناقل و مبتلا استفاده شده است و در نهایت کنترل منفی گذاشته شده است و نمونه‌ی والدین به‌همراه نمونه‌ی جنین (که دو بار تکرار شده با دو روش تخلیص جداگانه Boiling و Salting out) بررسی شدند (شکل ۲).

### بحث

مطالعه حاضر یک تحقیق با هدف تشخیص پیش از تولد بیماری بتا تالاسمی از طریق DNA آزاد جنینی با تکنیک NGS و آنالیز RHDO است. بیماری تالاسمی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تک‌ژنی در کشور و هم‌چنین در منطقه شمال کشور است موتاسیون IVSII-1 G>A در این تحقیق به‌عنوان شایع‌ترین موتاسیون در ایران و شمال کشور جهت بررسی انتخاب شد. فراوانی کلی این موتاسیون ۲۳ درصد در ایران است. با این حال، شیوع آن در همه مناطق مشابه نیست بالاترین فراوانی در مناطق شمال کشور با فراوانی ۶۶ درصد مشاهده شده است (Bazi et al. 2016). انجام آزمایش پیش از تولد غیرتهاجمی برای بررسی ناهنجاری‌های کروموزومی در طی یک دهه گذشته با تکنیک NGS در آزمایشگاه‌های دنیا در حال انجام است. اما بررسی اختلالات تک‌ژنی با این روش یک چالش بزرگ در اجرای کلینیکی است. تشخیص قطعی آکوندروپلازی و بدشکلی تاناتفوریک با تکنیک NIPD از سال ۲۰۰۷ در دست تحقیقات بوده و در سال ۲۰۱۲ برای استفاده در روش‌های معمول بالینی در

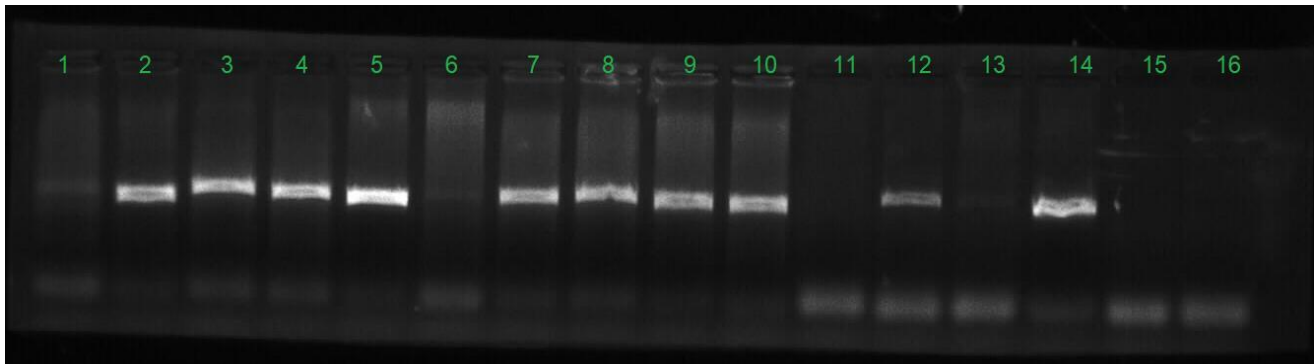
نمونه CVS و یک نمونه آمیون بوده است. نمونه‌های CVS بعد از دریافت، طبق رعایت استانداردهای لازم در زیر لوپ به‌منظور جداسازی از نمونه‌ی مادری تمیز شدند. استخراج DNA به روش Salting-out انجام شد. طبق پروتکل کشوری برای بتا تالاسمی، نمونه‌ها با دو روش مستقیم (بررسی مستقیم موتاسیون) و بررسی غیر مستقیم (بررسی با الگوهای RFLP) با تکنیک ARMS-PCR دو ویاله انجام شد. توالی 5'- AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAT 3' برای پرایمر Forward جهش‌یافته و توالی 5'- AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAC 3' برای پرایمر Forward نرمال و توالی 5'- ACCTCACCTGTGGAGCCAC 3' برای پرایمر Reverse مشترک (جهت بررسی موتاسیون IVSII-1) طراحی شد. مواد تشکیل دهنده جهت واکنش PCR در هر ویال با حجم کلی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۵۰ نانوگرم DNA، ۲ میکرولیتر 10X PCR، یک میلی‌مولار dNTP (KBC, cat No. 1100005)، ۱/۱۵ میلی‌مولار MgCl<sub>2</sub>، پنج پیکومول از هر پرایمر، و یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase (KBC, cat No. K1111-500) بوده است. تکثیر در ۳۲ سیکل با برنامه زیر انجام شد: دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در دستگاه Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler انجام شد. و طویل سازی نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. الگوهای مورد بررسی شامل 3'Ψβ، AvaIIβ، HinfI/β می‌باشند. جهت به‌دست آوردن الگوی همراه موتاسیون در هر فرد (Phasing)، در صورتی که زوج فرزند داشته باشند و یا جنینی که قبلاً مورد بررسی قرار گرفته باشد و در غیر این صورت از والدین زوج، و در صورتی که هیچ‌کدام در دسترس نباشد از آماری که در این زمینه وجود دارد استفاده می‌شود.

### نتایج

مطالعه حاضر جهت تشخیص قبل از تولد بیماری بتا تالاسمی در جنین‌هایی که والدین آن‌ها ناقل جهش IVSII-1 بودند، به‌طور

در بررسی به صورت غیرمستقیم که از طریق بررسی SNPها بوده، در این روش نیز به ارث رسیدن الل پدری در زوجینی که موتاسیون متفاوت یا یکسان دارند، انجام می شود. در مطالعاتی که با روش NGS برای بررسی بیماری های تک ژنی و وابسته به X انجام شده، آنالیز اطلاعات با دو روش سنجش نسبی موتاسیون relative mutation dosage (RMD) (بررسی مستقیم) و سنجش نسبی میزان هاپلوتیپ (RHDO) relative haplotype dosage (بررسی غیرمستقیم) انجام می شود. هر دو روش بر اساس این که جنین کدام الل مادری را دریافت کرده و به حضور بیشتر آن الل در پلاسمای مادری بستگی دارد.

انگلستان تأیید شده است (Everett et al. 2015). تاکنون بسیاری از مطالعات در جهت بررسی اختلالات تک ژنی با تکنیک های مختلف انجام شده است. مطالعات در این زمینه به دو دسته تقسیم می شود: مطالعاتی که با تکنیک NGS انجام شدند و مطالعاتی که با تکنیک های غیر از NGS بررسی شدند. تمام مطالعات بر اساس تکنیک های به غیر از NGS، به دو صورت مستقیم و غیر مستقیم است در مطالعات مستقیم، جهش ها مستقیماً مورد بررسی قرار می گیرند که اکثراً فقط موتاسیون پدری بررسی می شود.



شکل ۲- تصویر مربوط به ژل خانواده چهارم: چاهک ۱ و ۲ نشان دهنده کنترل نرمال، چاهک ۳ و ۴ نشان دهنده کنترل هتروزیگوت (مینور)، چاهک ۵ و ۶ کنترل هموزیگوت مبتلا، چاهک ۷ و ۸ نشان دهنده نمونه پدر (هتروزیگوت- ناقل)، چاهک ۹ و ۱۰ نشان دهنده نمونه مادر (هتروزیگوت- ناقل)، چاهک ۱۱ و ۱۲ نشان دهنده نمونه جنینی (هموزیگوت- نرمال)، و چاهک ۱۳ و ۱۴ تکرار نمونه جنینی است. چاهک ۱۵ و ۱۶ کنترل منفی است.

جدول ۱- مقایسه نتایج دو روش نهاجمی و غیرتهاجمی

No	Paternal genotype with cffDNA	Maternal genotype	Gestational age	Fetal genotype Prediction	Fetal genotype	sex	Fetal Fraction
1	IVSII-I/N	IVSII-I/N	13W+3D	Carrier	IVSII-I/N (CVS)	Male	14%
2	IVSII-I/N	IVSII-I/N	14W+2D	Carrier	IVSII-I/N (CVS)	Male	16%
3	IVSII-I/N	IVSII-I/N	13W+5D	Affected	IVSII-I/ IVSII-I (CVS)	Male	10%
4	IVSII-I/N	IVSII-I/N	14W	Normal	N/N (CVS)	Female	17%
5	IVSII-I/N	IVSII-I/N	16W+3D	Normal	N/N (AF)	Female	19%

RMD که به نسبت الل نرمال و الل دارای موتاسیون در پلاسماهای مادر بستگی دارد یعنی زمانی که مادر برای یک بیماری با وراثت اتوزومی مغلوب ناقل است دارای هر دو الل نرمال و موتانت به یک نسبت هست، در صورتی که پدر نیز ناقل جهش باشد، ژنوتیپ جنین نرمال، ناقل یا مبتلا خواهد شد که به ترتیب جنین در وضعیت نرمال دارای الل نرمال است که در این صورت در پلاسماهای مادر نسبت الل نرمال به موتانت بیشتر خواهد شد، در وضعیت ناقل نسبت یک به یک خواهد بود و در وضعیت مبتلا نسبت الل موتانت به الل نرمال بیشتر خواهد بود. با اینکه این روش حساسیت بالایی دارد اما از آنجایی که برای هر موتاسیون نیاز به طراحی پروب جداگانه است، زمان بر و هزینه بر می باشد. از طرف دیگر روش RHDO به بررسی نسبت هاپلوتیپ والدین در پلاسماهای مادر می پردازد. برای انجام این روش به اطلاعات هاپلوتیپ والدین نیاز است. RHDO می تواند برای بررسی کل ژنوم جنین استفاده شود و یا در توالی یابی هدفمند در تشخیص بیماری ها کاربرد داشته باشد که توالی یابی هدفمند از لحاظ هزینه مقرون به صرفه بوده و یک روش مناسب برای کاربرد کلینیکی است و میزان ارزان بودن این روش به اندازه پل های ژن هدف و طول خوانش و تعداد توالی های خوانده شده (که می توانند پلی مورفیسیم های گویا را پوشش دهند) و قیمت پروب های capture بستگی دارد (Chio et al. 2018). از لحاظ تکنیکی، پیشرفت آنالیز RHDO که از طریق اطلاعات هاپلوتیپ والدین است، دقت تشخیص اختلالات تک ژنی را بهبود بخشید. در بسیاری از مطالعات قبلی جهت تعیین هاپلوتیپ والدین با این روش به آنالیز پروباند نیز نیاز بود که این تکنیک برای خانواده هایی که فرزند نداشتند کاربردی نیست، در این مطالعه به نمونه ی پروباند نیاز نیست و از طریق نرم افزار SHAPEIT2 و پایگاه اطلاعاتی 1000 ژنوم مستقیماً هاپلوتیپ والدین در اطراف ژن HBB تشخیص داده شد، این کار یک گام مهمی در جهت دست یابی به ابزار بالینی در مورد بیماری های تک ژنی مبتنی بر cffDNA ساخته است، و همچنین این روش جهت تشخیص الل موتانت مادری نیز کاربردی می باشد (Li et al. 2019). با این حال، در بیشتر موارد، به دلیل حضور مقدار زیادی از DNAی مادر در

مقایسه با مقدار cffDNA، شناسایی جهش مادری در جنین با پلاسما نسبتاً دشوار است. با روش RHDO، که ما در این تحقیق از آن استفاده کردیم، می توان آلل  $\beta$ -تالاسمی منشا مادری را تشخیص داد (Lam et al. 2012). در این مطالعه همچنین بررسی با آنالیز RHDO به بررسی غیرمستقیم موتاسیون هایی که تشخیص آن ها چالش برانگیز است، مانند حذف ژنی و واژگونی و موتاسیون های توالی تکراری سه گانه کمک کننده است (Hui et al. 2017)، که این مورد می تواند انقلاب بزرگی در ژنتیک ایجاد کند که با یک تکنیک به توان حذف ها را در بیماری های شایع مهمی مثل دیستروفی عضلانی دوشن و یا SMA و آلفا تالاسمی یا بررسی واژگونی در بیماری هموفیلی و یا بررسی موتاسیون های دینامیک در بیماری های مثل Fragile X و هانتینگتون و یا SCA و غیره بررسی کرد. همچنین فرایند نوترکیبی می تواند بر صحت و کارایی تست تأثیرگذار باشد، که می توان با شناسایی جایگاه های نوترکیبی این مشکل را برطرف کرد. ولی در توالی های بسیار تکراری این امکان وجود ندارد، انتخاب محل بلوک هاپلوتیپ در پایین دست یا بالادست از منطقه هدف یک راه حل مناسب است (Parks et al. 2017; Lo et al. 2019) در یک مطالعه دانشمندان به بررسی بتا تالاسمی با genome-wide genotyping بر اساس آنالیز RHDO پرداختند، ۹۰۰ هزار SNP در نمونه ی پدری و مادری و نمونه CVS با Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 system تعیین ژنوتیپ شد. SNP ها در ۵ گروه دسته بندی شدند، گروه اول SNP هایی که در والدین برای الل های مختلف هموزیگوت بودند، گروه دوم SNP هایی که در والدین برای الل های یکسان هموزیگوت بودند، گروه سوم SNP هایی که در پدر هتروزیگوت و در مادر هموزیگوت بودند انتخاب شدند، گروه چهارم SNP هایی که در پدر هموزیگوت و در مادر هتروزیگوت بودند، گروه پنجم SNP هایی که در هر دو نفر هتروزیگوت بودند. سپس توالی یابی DNAی پلاسما با روش 50 bp PE sequencing انجام شد. برای تعیین Fetal Fraction از SNP های گروه اول استفاده شد. جهت بررسی SNP های پدری در جنین، SNP های گروه سوم و جهت بررسی الل مادری به ارث رسیده به جنین از SNP های گروه چهارم استفاده شد و با آنالیز

منفی و دقت تست، ۱۰۰ درصد اعلام شد (Lo et al. 2019). بررسی با NGS در مطالعه‌ی حاضر نیز بر همین اساس است و نتایج به‌دست آمده با نتایج روش تهاجمی مطابقت داشت.

محدودیت تشخیص قبل از تولد با cffDNA، در تشخیص اشتباه در ناپدید شدن یک قل در بارداری دو قلوبی است و یا عدم امکان به‌دست آوردن نتیجه تشخیصی مناسب در صورت وجود موزایسم سوماتیکی در مادر یا در صورت دریافت خون مادر و همچنین اگر بیمار تحت عمل جراحی پیوند قرار گرفته باشد (Parks et al. 2017). محدودیت مطالعه‌ی حاضر کم بودن تعداد نمونه‌ها به‌دلیل هزینه‌ی بالای تکنیک NGS و مشکلات موجود در رابطه با ارسال نمونه‌ها به خارج از کشور به‌علت نداشتن این تکنولوژی در ایران و محدودیت در دریافت فایل‌های خام مربوط به اطلاعات NGS، می‌باشد. با توجه به اینکه دستگاه‌های NGS در ایران هر چند محدود جهت بررسی ناهنجاری‌های کروموزومی با cffDNA و جهت بررسی بیمارهای تک‌زنی به صورت پنل و یا تست WES برای بررسی تعیین ناقلی و یا افراد بیمار، موجود است، پیشنهاد می‌شود تلاش در جهت بررسی بیشتر تعداد نمونه‌ها با تکنیک NGS (به‌عنوان روش گلد استاندارد) و آنالیز بر اساس RHDO در جهت ستاپ این تکنیک برای بررسی بیمارهای با وراثت تک‌زنی و وابسته به X با cffDNA در ایران انجام پذیرد.

در نتیجه بررسی بتا تالاسمی از طریق خون مادر با مارکرهای پلی‌مورفیسم در قالب هاپلوتیپ با تکنیک NGS به روش آنالیز RHDO امکان‌پذیر است. بنابراین می‌توان امیدوار بود که در آینده، در بسیاری موارد در تشخیص‌های قبل از تولد، یک آزمایش خون ساده می‌تواند در دوران بارداری آسایش مطلوب را برای خانواده به‌همراه داشته باشد و جایگزین آزمایش‌های تهاجمی سنگین و خطرناک مانند CVS و آمنیوسنتز باشد.

RHDO (گروه HAPI,II و SNP‌های گروه آلفا و بتا) بررسی شد. گروه سوم و پنجم قابل آنالیز نبودند. در این مطالعه به بررسی نمونه‌ی جنینی (CVS) نیاز بود که در بررسی کیلینیکی این امکان وجود ندارد، و با این روش الل به ارث رسیده از مادر به جنین تشخیص داده شد و جهش پدری که متفاوت از جهش مادری بود با بررسی مستقیم جهش مشخص شد (Lo et al. 2010). در مطالعه‌ی حاضر جهت تشخیص هاپلوتیپ‌ها نیاز به نمونه‌ی جنینی نمی‌باشد.

در یک مطالعه‌ی دیگر، بررسی در دو خانواده جهت تشخیص قبل از تولد بیماری بتا تالاسمی از طریق cffDNA به‌صورت Targeted Massively Parallel Sequencing انجام شد، سه مزیت نسبت به مطالعه‌ی قبلی داشت؛ مورد اول، فرایند RHDO را به‌صورت هدفمند (بخشی از ژنوم، نه کل ژنوم) genome wide ایجاد کردند، مورد دوم، توسعه دادن الگوریتم فرایند RHDO برای SNP‌هایی که در هر دو والد به‌صورت هتروزیگوت می‌باشد. چون ساختار هاپلوتیپ انتظار می‌رود در والدین، در نواحی ژنوم مرتبط با بیماری برای بیمارهای تک‌زنی با یک اثر مؤسس (founder effect) قوی و یا در ازدواج‌های خویشاوندی، خیلی شبیه به هم باشد. مورد سوم، ایجاد هاپلوتیپ والدین مستقیماً از DNA ژنومی آن‌ها با digital PCR است (که این روش هزینه‌بر است) (Lam et al. 2012). در مطالعه‌ی حاضر با استفاده از نرم‌افزار SHAPEIT2 مستقیماً هاپلوتیپ‌ها ایجاد شدند که نیازی به هزینه‌ی بالا نمی‌باشد.

در سال ۲۰۱۹ گروهی از دانشمندان به بررسی تشخیص قبل از تولد بیماری بتا تالاسمی از طریق RHDO بدون نیاز به آنالیز پروباند پرداختند. در این مطالعه هاپلوتیپ‌های والدین با استفاده از نرم‌افزار SHAPEIT و پروژه 3 1000 genomes، ایجاد شد. الل‌های به ارث رسیده به جنین با آنالیز RHDO بررسی شد. برای این بررسی، حساسیت و ویژگی و ارزش پیش‌بینی مثبت و

#### منابع

Abolghasemi H, Amid A, Zeinali S, Radfar MH, Eshghi P, Rahiminejad MS, Akhavan-Niaki, H (2007) Thalassaemia in Iran: epidemiology, prevention, and management. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 29: 233-238.

Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio, F (2015) Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 45: 16-26.

- Barrett AN, Zimmermann BG, Wang D, Holloway A, Chitty LS (2011). Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: accurate identification of factors affecting fetal DNA yield. *PLoS one* 6: e25202.
- Bazi A, and Miri-Moghaddam, E (2016) Spectrum of  $\beta$ -thalassemia Mutations in Iran, an Update. *Iranian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 6: 190-202.
- Bustamante-Aragón A, de Alba, MR, Perlado S, Trujillo-Tiebas MJ, Arranz JP, Díaz-Recasens J, Ramos, C (2012) Non-invasive prenatal diagnosis of single-gene disorders from maternal blood. *Gene* 504: 144-149.
- Chitty LS, Griffin DR, Meaney C, Barrett A, Khalil A, Pajkrt E, and Cole TJ (2011) New aids for the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia: dysmorphic features, charts of fetal size and molecular confirmation using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 37: 283-289.
- Chiu EKL, Hui WWI, and Chiu RWK (2018) cfDNA screening and diagnosis of monogenic disorders—where are we heading?. *Prenatal diagnosis* 38: 52-58.
- Everett TR, Chitty LS (2015) Cell-free fetal DNA: the new tool in fetal medicine. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 45: 499.
- Giardine B, Borg J, Viennas E, Pavlidis C, Moradkhani K, Joly P, Wajcman H (2013) Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic acids research* 42: D1063-D1069.
- González-González MC, García-Hoyos M, Trujillo-Tiebas MJ, Aragón AB, De Alba MR, Alvarez DD, Ramos C (2008) Improvement in strategies for the non-invasive prenatal diagnosis of Huntington disease. *Journal of assisted reproduction and genetics* 25: 477-481.
- Han J, Pan M, Zhen L, Yang X, Ou YM, Liao C, and Li DZ (2014) Chorionic villus sampling for early prenatal diagnosis: Experience at a mainland Chinese hospital. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 34: 669-672.
- Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G (2012) Thalassemia. *The Lancet* 379: 373-383.
- Hill M, Twiss P, Verhoef TI, Drury S, McKay F, Mason S, Jenkins L, Morris S and Chitty LS, (2015) Non-invasive prenatal diagnosis for cystic fibrosis: detection of paternal mutations, exploration of patient preferences and cost analysis. *Prenatal diagnosis* 35: 950-958.
- Hui WW, Jiang P, Tong YK, Lee WS, Cheng YK, New MI, Kadir RA, Chan KA, Leung TY, Lo YD and Chiu RW (2017). Universal haplotype-based noninvasive prenatal testing for single gene diseases. *Clinical chemistry* 63: 513-524.
- Karoui NE, Zhou W, and Whittemore AS (2006) Getting more from digital SNP data. *Statistics in medicine* 25: 3124-3133.
- Lam KWG, Jiang P, Liao GJ, Chan KA, Leung TY, Chiu RW, Lo YD (2012) Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by targeted massively parallel sequencing of maternal plasma: application to  $\beta$ -thalassemia. *Clinical chemistry* 58: 1467-1475.
- Lo YD, Chan KA, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, Chiu RW (2010) Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Science translational medicine* 2: 61ra91-61ra91.
- Lo YD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, and Wainscoat JS (1997) Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet* 350: 485-487.
- Li H, Du B, Jiang F, Guo Y, Wang Y, Zhang C, Zeng X, Xie Y, Ouyang S, Xian Y and Chen M (2019). Noninvasive prenatal diagnosis of  $\beta$  thalassemia by relative haplotype dosage without analyzing proband. *Molecular genetics and genomic medicine* 7: p.e963.
- New MI, Tong YK, Yuen T, Jiang P, Pina C, Chan KA, Khattab A, Liao GJ, Yau M, Kim SM and Chiu RW (2014) Noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99: E1022-E1030.
- Parks M, Court S, Bowns B, Cleary S, Clokie S, Hewitt J, Allen S (2017) Non-invasive prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy by relative haplotype dosage. *European Journal of Human Genetics* 25: 416.
- Verhoef TI, Hill M, Drury S, Mason S, Jenkins L, Morris S, Chitty LS (2016) Non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) for single gene disorders: cost analysis of NIPD and invasive testing pathways. *Prenatal diagnosis* 36: 636-642.
- Xu Y, Li X, Ge HJ, Xiao B, Zhang YY, Ying XM, Pan XY, Wang L, Xie WW, Ni L and Chen SP, (2015) Haplotype-based approach for noninvasive prenatal tests of Duchenne muscular dystrophy using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Genetics in Medicine* 17: 889.