ژنتیک نوین
دوره پانزدهم ، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۹
صفحه ۲۸٦ - ۲۷۷

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

Prenatal diagnosis of β-thalassemia through cffDNA by NGS technique and RHDO analysis

نادیا میرزایی گیسمی[۱]، غلامرضا جوادی[۱]، شهره زارع کاریزی[۲]، محمد میریونسی[۳]، پروانه کشاورز[*٤]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، گروه زیست‌شناسی واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه زیست شناسی واحد پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
۳- دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
٤- دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

Mirzaei Gisomi N[1], Javadi Gh[1], Zare Karizi Sh[2], Miryounesi M[3], Keshavarz P[*4]

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: ۹۸/۰۹/۲٤ - 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. DNAی 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 هاپلوتیپ است، به‌عنوان 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-I 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 به‌دست آمده با روش تهاجمی مقایسه شد. نتایج به‌دست آمده از تکنیک NGS با آنالیز RHDO بدون نیاز به آنالیز فرد مبتلا با بررسی بلوک‌های هاپلوتیپی 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 به‌دست آمده از زوج های 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 هاپلوتیپ والدین را تهیه کرد.

واژه‌های کلیدی

بتا تالاسمی
تشخیص پیش از تولد (PND)
cffDNA
NGS
RHDO

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.8.5]

مقدمه

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[1] 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 اکثرا 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)[2] است. با این حال، تشخیص سنتی قبل از تولد، که شامل روش‌های تهاجمی مانند آمنیوسنتز و نمونه‌گیری از پرزهای کوریونی (CVS)[3] است، خطر سقط جنین را افزایش می‌دهد (Akolekar et al. 2015; Han et al. 2014). 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 پلاسمای مادری در تشخیص غیر تهاجمی قبل از تولد (NIPD)[4] 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)[5] 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، زمانی‌که زوجین جهش‌های متفاوتی دارند (Hill et al. 2015) و یا جهش‌های جدید در وراثت اتوزومی غالب مثل بیماری هانتیگتون (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 پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP)[6] 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[7] 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[8] (Xu et al. 2015) یا

[1] Hemoglobin
[2] Prenatal diagnosis
[3] Chorionic villus sampling
[4] Non-invasive prenatal diagnosis
[5] Non-invasive prenatal test
[6] Single nucleotide polymorphisms
[7] Haplotype based
[8] Duchenne muscular dystrophy

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.8.5]

بیماری SMA[1] (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 DNAی آزاد جنینی با تکنیک NGS و آنالیز RHDO است، که برای اولین‌بار 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,[2] MCH<27Hb, A2>3[3] A2>3) نشان‌دهنده حامل بودن آن‌ها از نظر بتاتالاسمی 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 DNAی 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 به‌صورت یک الگوریتم در (شکل ۱) قابل رویت است.

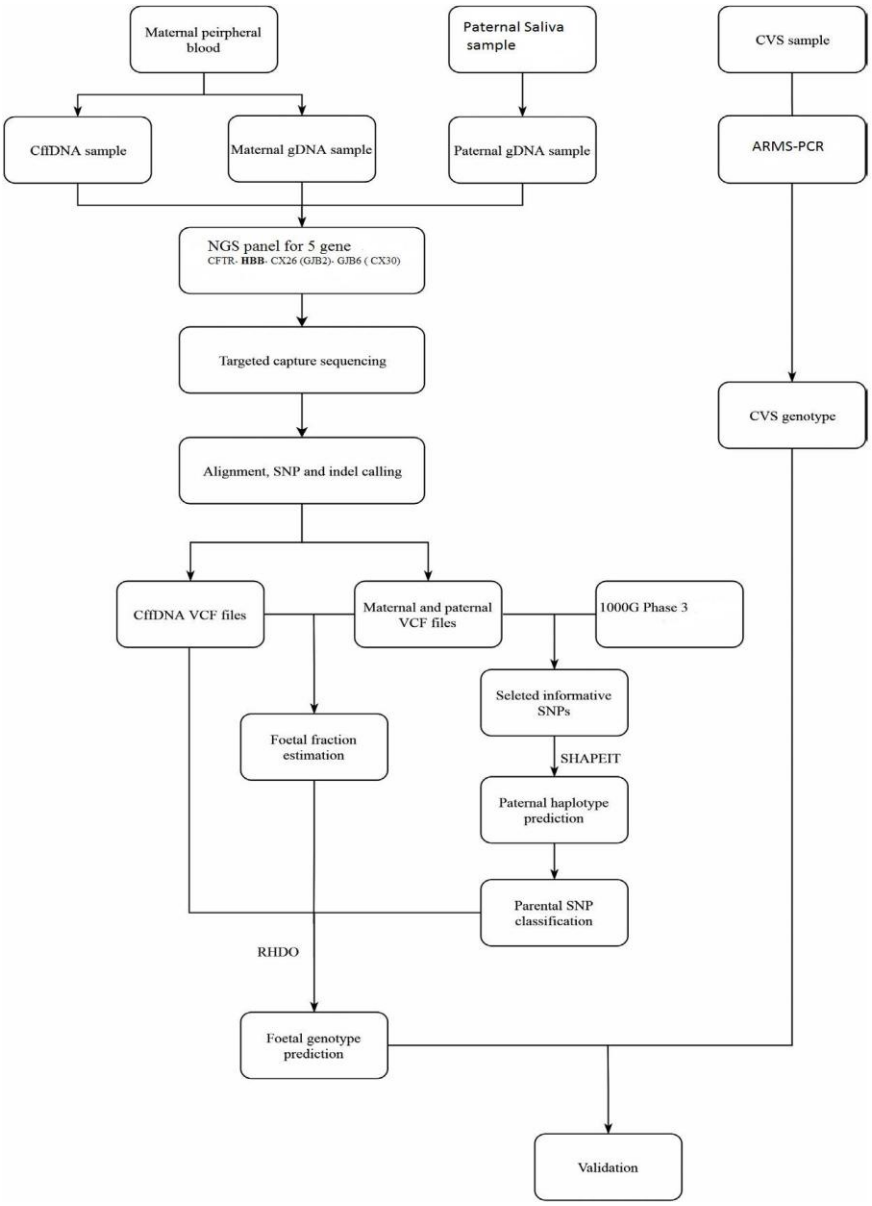
نمونه‌ها با رعایت استانداردهای لازم جهت بررسی با تکنیک NGS به آزمایشگاه Genoma در ایتالیا ارسال شد. جهت بررسی برای نمونه‌ها هم‌زمان پنج ژن در یک پنل به‌صورت توالی‌یابی هدفمند با خوانش بالای 500X انجام گرفت. این پنل شامل ژن‌های CFTR، HBB، CX26 (GJB2)، CX30 (GJB6) است. دیاگرام ترسیم‌شده نشان‌دهنده کل پروسه‌ی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

استخراج DNA ژنومی از خون مادر و بزاق پدر انجام شد، جهت استخراج cffDNA ابتدا پلاسما از خون مادر طی دو مرحله سانتریفیوژ (Kubota 4000) جدا شد. مرحله‌ی اول با g ۲۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انجام شد سپس دو میلی‌لیتر از پلاسما جدا شد و در ویال ۲ ریخته شد. مرحله دوم با g۱٦۰۰۰ به مدت ۱۲ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انجام شد و در نهایت ٤۰۰ میکرولیتر از مایع رویی را جدا نموده و به‌ویال ۱/۵ انتقال داده شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد و سپس از پلاسما استخراج cffDNA 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، DNAی 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 cffDNA، با توجه به قطعات کوتاه آن، مرحله قطعه قطعه 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.

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

[1] Spinal muscular atrophy
[2] Mean corpuscular volume
[3] mean corpuscular hemoglobin

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.8.5]



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

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 ٤ 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 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.8.5]

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 BWA (version 0.7) Burrows- 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 معمولا 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[1] 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 الل‌های 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 الل جنینی خاص(fetal-specific allele) و q مربوط به عمق خوانش سایر الل‌ها است.

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

دسته‌بندی SNPهای گویا و نتیجه‌گیری هاپلوتیپ جنینی

برای آنالیز RHDO، SNPهایی که قبلا انتخاب شدند به دوگروه طبق گزارش قبلی طبقه‌بندی شدند (Lo et al. 2010). برای مشخص کردن الل 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 الل پدری یکسان هستند به‌نام SNPهای گروه آلفا طبقه‌بندی می‌شوند. در مقابل SNPهایی که در هاپلوتیپ II مادری قرار دارند و با الل پدری یکسان هستند، به‌نام 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، الل‌های 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 حالی‌که اگر HapI به جنین انتقال پیدا کند، الل‌های بر روی HapI,II به‌طور مساوی ارائه می‌شوند. هاپلوتیپ‌های به ارث رسیده به جنین را می‌توان با اندازه‌گیری allelic imbalance به‌وسیله‌ی 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 به‌واسطه موقعیت جنین و جفت محسوب می‌شد، نمونه‌برداری از مایع آمنیون جنین صورت گرفت. از پنج نمونه‌ی جنینی، چهار

[1] Genome Analysis Toolkit

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.8.5]

نمونه CVS و یک نمونه آمنیون 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′- ACCTCACCCTGTGGAGCCAC 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 $Mgcl_2$، پنج پیکومول از هر پرایمر، و یک واحد آنزیم Taq DNApolymerase (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، Hinf/β می‌باشند. جهت به‌دست آوردن الگوی همراه موتاسیون در هر فرد (Phasing)، در صورتی‌که زوج فرزند داشته باشند و یا جنینی که قبلا 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 هم‌زمان در نمونه‌های CVS و پلاسمای خون مادری با استفاده از cffDNA با تکنیک NGS و آنالیز RHDO انجام شد.

DNAی 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 ٤ و ٥ سالم بوده است و ٤ نمونه‌ی جنینی اول CVS بوده و نمونه‌ی پنجم آمنیون 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 DNAی 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 ٦٦ 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 تاناتوفوریک با تکنیک NIPD از سال ۲۰۰۷ در دست تحقیقات بوده و در سال ۲۰۱۲ برای استفاده در روش‌های معمول بالینی در

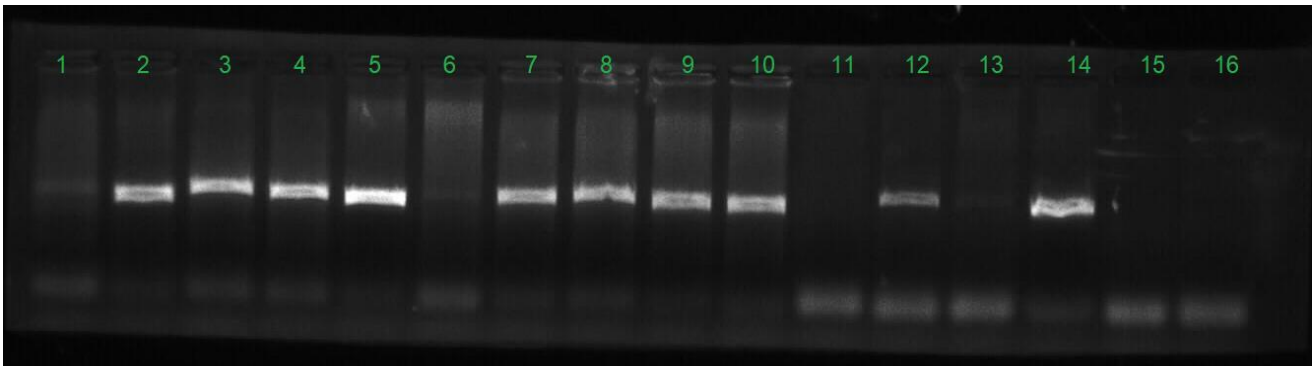
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.8.5]

انگلستان تأیید شده است (Everett et al. 2015). تاکنون بسیاری از مطالعات در جهت بررسی اختلالات تک‌ژنی با تکنیک‌های مختلف انجام شده است.

مطالعات در این زمینه به دو دسته تقسیم می‌شود: مطالعاتی که با تکنیک NGS انجام شدند و مطالعاتی که با تکنیک‌های غیر از NGS بررسی شدند. تمام مطالعات بر اساس تکنیک‌های به‌غیر از NGS، به دو صورت مستقیم و غیر مستقیم است در مطالعات مستقیم، جهش‌ها مستقیماً مورد بررسی قرار می‌گیرند که اکثراً فقط موتاسیون پدری بررسی می‌شود.

در بررسی به‌صورت 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 می‌شود. در مطالعاتی که با روش NGS برای بررسی بیماری‌های تک‌ژنی 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 relative haplotype dosage (RHDO) (بررسی غیرمستقیم) انجام می‌شود. هر دو روش بر اساس این‌که جنین کدام الل مادری را دریافت کرده و به حضور بیشتر آن الل در پلاسمای مادری بستگی دارد.



شکل ۲- تصویر مربوط به ژل خانواده چهارم: چاهک ۱ و ۲ نشان‌دهنده کنترل نرمال، چاهک ۳ و ٤ نشان‌دهنده کنترل هتروزیگوت (مینور)، چاهک ۵ و ٦ کنترل هموزیگوت مبتلا، چاهک ۷ و ۸ نشان‌دهنده‌ی نمونه‌ی پدر(هتروزیگوت- ناقل)، چاهک ۹ و ۱۰ نشاندهنده‌ی نمونه‌ی مادر (هتروزیگوت- ناقل)، چاهک ۱۱ و ۱۲ نشان‌دهنده‌ی نمونه‌ی جنینی (هموزیگوت- نرمال)، و چاهک ۱۳ و ١٤ تکرار نمونه‌ی جنینی است. چاهک ۱۵ و ١٦ کنترل منفی است.

جدول ۱- مقایسه نتایج دو روش تهاجمی و غیرتهاجمی

No	Paternal genotype	Maternal genotype with cffDNA	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%

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.8.5]

RMD که به نسبت الل نرمال و الل دارای موتاسیون در پلاسمای مادر بستگی دارد یعنی زمانی‌که مادر برای یک بیماری با وراثت اتوزومی مغلوب ناقل است دارای هر دو الل نرمال و موتانت به یک نسبت هست، در صورتی‌که پدر نیز ناقل جهش باشد، ژنوتیپ جنین نرمال، ناقل یا مبتلا خواهد شد که به‌ترتیب جنین در وضعیت نرمال دارای الل نرمال است که در این صورت در پلاسمای 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 آنجایی‌که برای هر موتاسیون نیاز به طراحی پروب جداگانه است، زمان‌بر و هزینه‌بر می‌باشد. از طرف دیگر روش RHDO به بررسی نسبت هاپلوتیپ والدین در پلاسمای مادر می‌پردازد. برای انجام این روش به اطلاعات هاپلوتیپ والدین نیاز است. RHDO می‌تواند برای بررسی کل ژنوم جنین استفاده شود و یا در توالی‌یابی هدفمند در تشخیص بیماری‌ها کاربرد داشته باشد که توالی‌یابی هدفمند از لحاظ هزینه مقرون به‌صرفه بوده و یک روش مناسب برای کاربرد کلینیکی است و میزان ارزان بودن این روش به اندازه پنل‌های ژن هدف و طول خوانش و تعداد توالی‌های خوانده شده (که می‌توانند پلی‌مورفیسم‌های گویا را پوشش دهند) و قیمت پروب‌های capture بستگی دارد (Chio et al. 2018). از لحاظ تکنیکی، پیشرفت آنالیز RHDO که از طریق اطلاعات هاپلوتیپ والدین است، دقت تشخیص اختلالات تک‌ژنی 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 خانواده‌هایی که فرزند نداشتند کاربردی نیست، در این مطالعه به نمونه‌ی پروباند نیاز نیست و از طریق نرم‌افزار SHAPEIT2 و پایگاه اطلاعاتی 1000 ژنوم مستقیماً هاپلوتیپ والدین در اطراف ژن HBB تشخیص داده شد، این کار یک گام مهمی در جهت دست‌یابی به ابزار بالینی در مورد بیماری‌های تک ژنی مبتنی بر cffDNA ساخته است، و همچنین این روش جهت تشخیص الل موتانت مادری نیز کاربردی می‌باشد (Li et al. 2019). با این حال، در بیشتر موارد، به‌دلیل حضور مقدار زیادی از DNAی مادر در مقایسه با مقدارcffDNA، شناسایی جهش مادری در جنین با پلاسما نسبتاً دشوار است. با روش RHDO، که ما در این تحقیق از آن استفاده کردیم، می‌توان آلل β-تالاسمی منشا مادری را تشخیص داد (Lam et al. 2012). در این مطالعه همچنین بررسی با آنالیز RHDO به بررسی غیرمستقیم موتاسیون‌هایی که تشخیص آن‌ها چالش‌برانگیز است، مانند حذف ژنی و واژگونی و موتاسیون‌های توالی تکراری سه‌گانه کمک کننده است (Hui et al. 2017)، که این مورد می‌تواند انقلاب بزرگی در ژنتیک ایجاد کند که با یک تکنیک به‌توان حذف‌ها را در بیماری‌های شایع مهمی مثل دیستروفی عضلانی دوشن و یا SMA و آلفا تالاسمی یا بررسی واژگونی در بیماری هموفیلی و یا بررسی موتاسیون‌های دینامیک در بیماری‌هایی مثل Fragile X و هانتیگتون و یا SCA و غیره بررسی کرد. همچنین فرایند نوترکیبی می‌تواند بر صحت و کارآیی تست تأثیرگزار باشد، که می‌توان با شناسایی جایگاه‌های نوترکیبی این مشکل را برطرف کرد. ولی در توالی‌های 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 نمونه‌ی پدری و مادری و نمونه CVS با Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 system تعیین ژنوتیپ شد. SNPها در ۵ گروه دسته‌بندی شدند، گروه اول SNPهایی که در والدین برای الل‌های مختلف هموزیگوت بودند، گروه دوم SNPهایی که در والدین برای الل‌های یکسان هموزیگوت بودند، گروه سوم SNPهایی که در پدر هتروزیگوت و در مادر هموزیگوت بودند انتخاب شدند، گروه چهارم SNPهایی که در پدر هموزیگوت و در مادر هتروزیگوت بودند، گروه پنجم SNPهایی که در هر دو نفر هتروزیگوت بودند. سپس توالی‌یابی DNAی پلاسما با روش 50 bp PE sequencing انجام شد. برای تعیین Fetal Fraction از SNPهای گروه اول استفاده شد. جهت بررسی SNPهای پدری در جنین، SNPهای گروه سوم و جهت بررسی الل مادری به ارث رسیده به جنین از SNPهای گروه چهارم استفاده شد و با آنالیز

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.8.5]

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 بیماری‌های تک‌ژنی با یک اثر مؤسس (founder effect) قوی و یا در ازدواج‌های خویشاوندی، خیلی شبیه به‌هم باشد. مورد سوم، ایجاد هاپلوتیپ والدین مستقیما از DNAی 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 1000 genomes phase 3، ایجاد شد. الل‌های به ارث رسیده به جنین با آنالیز RHDO بررسی شد. برای این بررسی، حساسیت و ویژگی و ارزش پیش‌بینی مثبت و 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 قلویی است و یا عدم امکان به‌دست آوردن نتیجه تشخیصی مناسب در صورت وجود موزاییسم 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 تک‌ژنی 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 بیماری‌های با وراثت تک‌ژنی 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.

منابع

Abolghasemi H, Amid A, Zeinali S, Radfar MH, Eshghi P, Rahiminejad MS, Akhavan-Niaki, H (2007) Thalassemia 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.8.5]

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 β-thalassemia Mutations in Iran, an Update. Iranian Journal of Pediatric Hematology and Oncology 6: 190-202.

Bustamante-Aragonés 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, Garcia-Hoyos M, Trujillo-Tiebas MJ, Aragonés 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) Thalassaemia. 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 β-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 β 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.8.5]