بررسي جهش هاي ژن شايع بتا گلوبين در بيماران مبتلا به تالاسمي ماژور در استان خوزستان به روش RDB

جواد محمدی اصل[*1] ، علیرضا سمرباف زاده[**] ، منوچهر مکوندی[***]
خدامرادزندیان[****] ، محمد پدرام[****]

چکیده
هدف: بتا تالاسمی از شایع ترین بیماریهای ارثی تک ژنی ایران است. ایران روی نقشه کمربند تالاسمی جهانی قراردارد و حدود ۵ تا ۱۰ درصد جمعیت آن ناقل بتا تالاسمی هستند استان خوزستان دارای جمعیتی از اقوام مختلف است هدف این تحقیق تعیین فراوانی الگوهای جهش های ژنی بتا تالاسمی در استان خوزستان جهت پیشگیری قبل از تولد به شکل مقطعی آینده نگر در میان مراجعین به مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی ارجاع شده اند انجام گردید.
روش بررسی: برای این مقصود ما ۱۱۶ بیمار مبتلا به بتا تالاسمی ماژور را که در نواحی مختلف استان خوزستان زندگی می‌کردند با نمونه گیری ساده در بیماران مراجعه کننده مورد مطالعه قرار گرفت.
این تحقیق استفاده شده است RDB [1] بوده است از هر بیمار ۵ میلی لیتر خون حاوی EDTA[2] برای تجزیه DNA[3] گرفته شده است. آزمایش با استفاده از کیت شرکت (Vinea – Lab) انجام گردید.
یافته ها: شایع ترین جهش های مشا هده شده در این گزارش عبارتند از : کدون۳۶/۳۷ (۱٤/۷ درصد) و جهش - IVSI 110 (۱۴/۲ درصد) وجهش IVS11-1 (۶/۹درصد)، کدون ۸ (۶/۵درصد) کدون ۵ (۵/۲درصد)، سایر موارد (۳۱درصد) ، ناشناخته ها (۲۱/۶ درصد) بودند.
نتیجه‌گیری : شایع ترین جهش های شناسایی شده در این مطالعه در خوزستان کدون ۳۶ /۳۷ با ۱۴/۷ درصد است.

کلید واژه‌گان: بتا تالاسمی ماژور، RDB ،جهش یابی

1-Revers Dot Blot Hybridization
2-Etylendiamin Tetra Acetic Acid
3-Deoxy Ribonucleic Acid

*کارشناس ارشد ژنتیک ، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
**استادیارگروه میکروب شناسی ویروس، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
*** استاد یارگروه میکروب شناسی ویروس، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
****استاد گروه کودکان خون وسرطان، مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
۱- نویسنده مسؤل

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۱۱/۷ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۶/۲/۲۳ اعلام قبولی: ۱۳۸۶/۳/۲۹

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

تالاسمی بتا بعلت کمبود نسبی سنتز زنجیره بتا گلوبین بوجود می آید. در در سال ۱۳۷۸ تعداد مبتلایان به تالاسمی ماژور درایران۲۰ هزار نفر که تعداد افراد ناقل ۲ تا ۳ میلیون نفر گزارش شده است(۸). یکی از راه های پیشگیری از تولد بیماران مبتلا به تالاسمی بتا تشخیص قبل از تولد و انجام سقط درمانی می باشد و یکی از گامهای اولیه و ضروری برای این امر شناسایی جهش های شایع در هر قومیت است. چون مطالعه ای جامع که بتواند تمام جمعیت استان خوزستان را در برگیرد تاکنون انجام نگرفته است تصمیم به انجام این تحقیق پیلوت گرفته شد این تحقیق با استفاده ازروش Reveres Dot Blot انجام گرفت.

روش بررسی

بیماران از تمام استان خوزستان بصورت نمونه گیری خوشه ای انتخاب شدند.(جدول ۱). از هر بیمار ۵ میلی لیتر خوندر لوله های حاوی EDTA تهیه و برای آنالیز DNA مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش ها با استفاده از کیت شرکت Vienna Lab ساخت اتریش انجام گردید این کیت دارای تمام مواد مورد نیاز برای انجام آزمایش می باشد. مواد تکمیلی کیت از حمله آنزیم Taq به آن اضافه گردید. هر کیت برای ۲۰ تست طراحی شده بود و هر تست ۲۲ جهش بتا گلوبین را شناسایی می نماید. عمل PCR [1] با شرایط زیر انجام شد.

Pre-PCR: 94˚C/2 min
PCR: [94˚C/10 sec. – 54˚C/15 sec. – 72˚C/45 sec.] – 35 cycles
Final extension: 72˚C/3 min

بعد از انجام PCR محصول آن بر روی ژل آگارز ۱درصد الکتروفورز گردید و مشاهده سه باند با اندازه‌های ۷۳۸ و ۵۹٦ و ۲۵۱ جفت بازی دلالت بر موفقیت آمیز بودن مرحله PCR داشت. در مرحله بعدی عمل هیبرید بین محصول PCR و نوار مخصوص کیت انجام می‌گرفت. این عمل باید در دمای دقیق 45˚C در بن ماری انجام شود. در این مرحله که با کمک محلولهای با کیت انجام می گرفت بر روی نوار مخصوص کیت نوارهای بنفش تیره ظاهر می شدند که با قرار دادن نوار در جدول مخصوص و بررسی نوارهای ظاهر شده نوع جهش بیماران مشخص می گردید.

یافته ها

در این تحقیق ۱۱٦ بیمار مبتلا به تالاسمی ماژور مورد آنالیز قرار گرفتند. ۵۱درصد آنها دختر و ٤۹درصد پسر بودند. معدل سنی دختران ۱٤/۵۱سال و پسران ۱۵/۲۸ سال بود.٤۲/۷درصد بیماران والدین غیر خویشاوند و ۵۷/۳درصد آنها والدین خویشاوند داشتند. چون هر فرد دو کروموزوم حاوی ژن بتاگلوبین دارد بنابرین در مجموع ۲۳۲ کروموزوم مورد بررسی قرار گرفت و انواع جهش‌های این بیماران در جدول زیر گرد آوری شده است

جدول ۱ : تعداد بیماران انتخاب شده از مناطق مختلف استان خوزستان

منطقه در استان خوزستان	تعداد	درصد
۱- اهواز (مرکز خوزستان)	۷۰	۳۵درصد
۲-شوشتر - دزفول – اندیمشک - مسجد سلیمان - رامهرمز (شمال خوزستان)	٦۱	۳۰/۵درصد
۳- خرمشهر - آبادان (جنوب غرب خوزستان)	۳٦	۱۸درصد
٤- شادگان (جنوب خوزستان)	۱۸	۹درصد
۵- دشت آزادگان (غرب خوزستان)	۱۵	۷/۵درصد
جمع	۲۰۰	۱۰۰درصد

1-Polymerization Chain Reation

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲ : فراوانی و درصد انواع جهش های بتا تالاسمی در استان خوزستان

نام جهش	فراوانی	درصد
Condon 36/37	۳٤	۱٤/۷درصد
IVS-I -110	۳۳	۱٤/۲درصد
IVS – II -1	۱٦	٦/۹
Condon 8	۱۵	٦/۵
Codon 5	۱۲	۵/۲
IVS-I – 25	۱۲	۵/۲
Codon 44	۱۰	٤/۳
Codon 8/9	۹	۳/۹
IVS-I -5	۸	۳/٤
Hemo S	۷	۳/۰
IVS-I -745	۵	۲/۲
IVS-I -6	۵	۲/۲
Codon 22	۵	۲/۲
IVS-I -2	٤	۱/۷
- 30	۲	۰/۹
IVS-I -116	۲	۰/۹
Codon 39	۲	۰/۹
Codon 30	۱	۰/٤
ناشناخته	۵۰	۲۱/٦درصد
جمع	۲۳۲	۱۰۰

جدول ۳ : فراوانی جهش های ژن گلوبین بتا تالاسمی بیماران در جمعیت غیر عرب و عرب زبان

نام جهش	جمعیت غیر عرب زبان	جمعیت عرب زبان	جمع
Codon 36/37	(درصد۳ /۱۷) ۱۴	(درصد ۸/۲) ۸	(درصد ۱۲/۳) ۲۲
IVS-I-110	(درصد۸/٦) ۷	(درصد ۲۵/۲) ۲۵	(درصد ۱۷/۹) ۳۲
IVS-II-1	(درصد٤/۹) ٤	(درصد ۱٤/۳) ۱٤	(درصد ۱۰/۱) ۱۸
Codon 8	(درصد۷/٤) ٦	(درصد ٤/۱) ٤	(درصد ۵/٦) ۱۰
Codon 5	(درصد۸/٦)۷	(درصد ۳/۱) ۳	(درصد ۵/٦) ۱۰
IVS-I- 25	(درصد ۷/٤) ٦	(درصد ۵/۱) ۵	(درصد ٦/۱) ۱۱
Codon 44	(درصد۰/۰)۰	(درصد ٤/۱) ٤	(درصد ۲/۲) ٤
Codon 8/9	(درصد ٤/۹)٤	(درصد ۳/۱) ۳	(درصد ۳/۹) ۷
IVS-I- 5	(درصد ۳/۵) ۳	(درصد ۲/۰) ۲	(درصد ۲/۸) ۵
Hemo S	(درصد ۱/۲) ۱	(درصد ٤/۱) ٤	(درصد ۲/۸) ۵
IVS 2/745	(درصد ۱/۲) ۱	(درصد ۰/۰) ۰	(درصد ۰/٦) ۱
IVS-I -6	(درصد۳/۷) ۳	(درصد ۲/۰) ۲	(درصد ۲/۸) ۵
Codon 22	(درصد۳/۷) ۳	(درصد ۱/۰) ۱	(درصد ۲/۲) ٤
IVS-I-2	(درصد ۰/۰)۰	(درصد ۰/۰) ۰	(درصد ۰/۰) ۰
-۳۰	(درصد ۲/۵) ۲	(درصد ۰/۰) ۰	(درصد ۱/۱) ۲
IVS-I-116	(درصد ۱/۲) ۱	(درصد ۱/۰) ۱	(درصد ۱/۱) ۲
Codon 39	(درصد ۱/۲) ۱	(درصد ۱/۰) ۱	(درصد ۱/۱) ۲
Codon 30	(درصد ۰/۰) ۰	(درصد ۰/۰) ۰	(درصد ۰/۰) ۰
ناشناخته	(درصد۲۲/۲) ۱۸	(درصد ۲۱/٤)۲۱	(درصد ۲۱/۸) ۳۹
جمع	(درصد۱۰۰)۸۱	(درصد ۱۰۰)۸۱	(درصد ۱۰۰) ۱۷۹

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

انواعی از جهش ها در ژن زنجیره بتا گلوبین منجر به بیمار تالاسمی میگردند. اگرچه شیوع آ ن ها در مناطق مختلف متفاوت می باشند و توزیع جغرافیایی آنهادر بعضی نقا ط بیشتر است مثلا جهش 619 bp deletion بیشتر در شمال هندوستان و جهش های IVS-I-110 و IVS-II-1 بیشتر در اقوام عرب یافت می شود(۱۲و۶). از طرفی در طول تاریخ جنگهای بین ممالک اتفاق افتاده و نیز روابط تجاری بین آنان مبادله ژنها را بین اقوام مختلف سبب شده است. موقعیت جغرافیایی ایران بگونه ای است که از دیر باز مورد حمله اقوام مختلف قرار گرفته است. در تاریخ باستان بارها جنگ هایی بین ایران و یونان و نیز ابران و روم رخ داده است. بعدها اعراب و پس از آن مغولها به ایران وارد شده و به همراه خود ژنهای خود را وارد جامعه ساخته اند. مرزهای شرقی و جنوب شرقی ایران و نیز راههای آبی جنوب کشور محل تردد بازرگانان بوده است. از اینرو شگفت آور نیست اگر جهش هایی از بتا تالاسمی با وفور جغرافیایی ویژه نظیر جهش های مدیترانه ای و یا عرب و یا مغول در ایران یافت شوند. مهم ترین یافته این تحقیق این بود که شایعترین جهش بتا تالاسمی کدون 36/37 است این چهش در ۱٤/۷ درصد کروموزومهای بررسی شده مشاهده گردید . در رتبه های بعدی جهش IVS-I-110 در ۱٤/۲ درصد و IVS-II-1 در ٦/۹ درصد موارد مشاهده شده است (جدول ۲)

بر طبق گزارش (۱۰) بررسی ۸۷ بیمار مبتلا به بتاتالاسمی انترمدیت به روش ARMS نشان داد که جهش های IVS-II-1 و IVS-I-110 و IVS-I-1 و Fr8/9 شایعترین جهش ها در استان فارس هستند و جهش IVS-II-1 شایعترین جهش (۲٤درصد) برای استان فارس معرفی شده بود. بر طبق نتایج ما شایعترین جهش در استان خوزستان کدون 36/37 میباشد و جهش‌های IVS-II-1 در مرتبه دوم و سوم قرار دارد. شایعترین جهش در بوشهر IVSI-3end(-25bp de) با ۲۹/٤۱ درصد در بررسی است که با کشور امارات هم خوانی دارد و جهش IVS11-1 GA در مرحله دوم است و دلیل احتمالی این تفاوت ناشی ازارتباط قدیم بوشهر با امارات درطول تاریخ می باشد*.

همچنین در مطالعه دیگری که توسط نجم آبادی روی ۱۲۱۷ نفر بیمار مبتلا به بتا تالاسمی انجام شده بود مشخص کرد که در شمال ایران IVS-II-1 با فراوانی ۳٤درصد شایعترین جهش است و در جنوب ایران از فراوانی این جهش کم شده و فراوانی جهش IVS-I-5 بیشتر میشود. به طوری که شایعترین جهش جنوب ایران IVS-I-5 گزارش شده بودنجم آبادی ۲۰۰۱.

مقایسه نتایج این تحقیق با گزارشات منتشر شده قبلی تفاوتی آشکار را برای شایعترین جهش جنوب ایران نشان می دهد. بدین صورت که در تحقیق کریمی شایعترین جهش برای جنوب ایران IVS-II-1 گزارش شده بود ولی در گزارش نجم آبادی شایعترین جهش جنوب ایران IVS-I-5

*استان لارستان تا زمان زندیه به جای(استان های فارس بوشهر هرمزگان کنونی به اضا فه کل مساحت امارات عربی بوده) است مرجع(نقشه ایراندرزمان نادر شاه افشاردر آرامگاه نادرشاه در شهر مشهد) بنا بر این ارتباط شما ل خلیج فارس با جنوب آن یک امر بدیهی بوده است

Archive of SID
www.SID.ir

معرفی شده بود و در تحقیق حاضر جهش Codon36/37 و IVSI-II 0 شایعترین شناخته شد و در گزارش فدائی از استان بوشهرجهش IVS1-3 end (25 bp del).شایع ترینجهش می باشد البته ممکن است این تفاوت ها ناشی از این باشد که در تحقیقات قبلی محل انجام تحقیق در تهران و شیراز بوده است و نمونه گیری از جنوب ایران شامل تمام استانهای جنوبی از خوزستان تا بوشهر و هرمزگان و غیره نبوده است و با نتایج تحقیق ما که نمونه ها صرفا از استان خوزستان انتخاب شده اند تفاوت نشان دهد. بنابراین نتایج این تحقیق بدلیل نمونه گیری صرف از استان خوزستان به واقعیت نزدیکتر است.

همچنین تحقیقاتی مشابه در استان هرمزگان در جنوب ایران توسط یاوریان برای تعیین الگوی جهش ها انجام شده است. فراوانترین جهش IVS-I-5 با فراوانی ٦٩درصد و در مرتبه بعدی IVS-II-1 با فراوانی ٩/٦درصد گزارش شده است که با گزارش نجم آبادی تطابق بیشتری دارد یاوریان ۲۰۰۱.

با وجود قرار گرفتن هر دو استان هرمزگان و خوزستان در جنوب ایران تفاوت زیادی بین الگوی جهش ها در آنها مشاهده میشود و این تفاوت احتمالا بدلیل مجاورت خوزستان با کشورهای عرب و انتقال احتمالی ژن از آن کشور ها به ایران است.

البته مطالعه ای که در ۸ کشور عربی برای تعیین الگوی جهش ها انجام گرفته است نشان میدهد که جهش IVS-I-110 و IVS-II-1 شایعترین جهش ها در این کشورها هستند و جهش IVS-I-5 و Codon 39 و Codon6 و Del 25bp در مرتبه های بعدی قرار دارند(۶).

در مطالعه ای در کشور کویت شایعترین جهش ها که در ٦٤ درصد موارد مشاهده شده بود بترتیب شامل جهش‌های IVS-II-1 و IVS-I-6 و CD39 و IVS-I-110 و CD8 و IVS-I-1 بود و دو جهش ایرانی-کردی CD44 و Codon36-37 در ۱۰ درصد افراد وجود داشت. جهش Codon36-37 که در کویت مشاهده شده است همان جهشی است که در خوزستان شایعترین جهش شناخته شد(۱).

نکته دیگر اینکه بر خلاف دیگر نقاط دنیا که تعداد اندکی جهش در درصد زیادی ازجهش های بیماران تالاسمیک دیده می شود در این استان پراکندگی انواع جهش ها بالا است و ٤ جهش شایع یعنی Codon36/37 و IVS-I-110 و Codon8 و IVS-II-1 تنها در ٤٢ درصد بیماران مشاهده میشود. این مسئله پراکندگی انواع جهش‌ها را در استان خوزستان نشان میدهد که دامنه وسیع نیاز به تحقیقات را در آینده نشان می دهد.

نتایج این تحقیق می تواند بعنوان راهنمایی برای شناسایی جهش ها و تشخیص قبل از تولد تالاسمی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

۱-بدینوسیله نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز که هزینه انجام این طرح را تقبل نمودند تشکر و قدردانی می نمایند.

۲-از خانم صالحه شانه مدیریت بخش تالاسمی، خانم پور عطیه منشی بخش تالاسمی جهت جمع آوری تهیه ۷۰ نمونه تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1- Adekile AD, Gu LH, Bayasal E, Hiader MZ, al-Fuzae L, Aboobacker KC, al-Rashied A, Huisman TH. Molecular characterization of alpha- thalassemia determinants, beta- thalassemia alleles , and beta S haplotypes among Kuwaiti Arabs. Acta Haematol 1994;92(4):176-81.

Archive of SID
www.SID.ir

2-Akhavan – Niakia H, Hashemi AB, Mohammad –Jafari N, Asgari B. Rapid and accurate prenatal diagnosis of thalassemia in Iran. HGM 2002; poster abstract 7, Medical Genomics.

3- Angastinotis M, Modell B, Global epidemiology of hemoglobin disorders . Ann NY Acod Sci 1998;850:251-69.

4- Chehab F, et al . Detection of multiple cystic fibrosis mutations by reverse dot blot hybridization : technology for carrier screening . Human Genet 1992;89:163-8.

5-Curuk MA, Yuregir GT, Asadow CD, Dasasova T, Gu LH, Bayasal E, Gu YC, Riberio ML, Huisman TH. Molecular charactrization of beta- thalassemia in Azerbaijan. Hum Geet.1992;90(4):417-9.

6-El-Hazmi MA, Warsy AS, Al-wailem AR. The frequency of 14 beta thalassemia mutations in the Arab populations. Hemoglobin 1996;19(6):353-60.

7-Gulesken S, Oren H, Vergin C, Anli N, Gulen H, Ucar C, Irken G. Mutational analysis of beta – thalassemia cases from the Aegean region of Turkey using an allele-specific oligonucleotide hybridization technique. Acta Haematol 2000;104(4):181-4.

8-Habibzadeh F, Yadollahie M, Meart A, Haghshenas M, Thalassemia in Iran; an overview. Archive of Iranian Medicine 1998;1(1):1-9.

9- Huisam TH, Carver M, Baysal E A syllabus of Thlassemia Mutations. Sickle Cell Anemia USA: Foundation in Augusta; 1997.

10- Karimi M , Yarmohammadi H, Farjadian S, Zeinali S, Mofhaddan Z, Cappellini MD, Giordano PC. Beta-Thalassemia intermediate from southern Iran : IVS-II-1(G A) is the prevalent thalassemia intermediate allele . Hemoglobin 2002; 26(2)147-54.

11- Khan SN , Riazuddin S. Molecular charactization of beta-thalassemia in Pakistan. Hemoglobin 1998; 22(4):333-45.

12- Madan N , Sharma S, Rusia U, Sen S, Sook SK. Beta- Thalassemia Mutations in northen India (Dehli). Indian J Med Res 1998;107:134-41.

13- Maggio A, Giambonu A, Cais P, Wall J, Kan YW, Chehab FF. Rapid and simulateous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven Mediterranean B- Thalassemia mutations by by covalent reverse dot blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily. BL 1993;239-242.

14- Najmabadi H, Karimi- Nejad R, Sahebjam S, Pourfarzad F, Teimourian S, Sahebjam F, Amirizadeh N, Karimi-Nejad MH. The beta – Thalassemia mutation spectrum in the Iranian population . Hemoglobin 2001;25(3):285-96.

15- Papapanagiotou E, Doumas D, Balasopoulous A, Patrinson GP, Papadakis MN, IN:16 the Panhelenic congress or the Greek Society of Biological Sciences. 1994;7-10.

16- Rosatelli MC, Tuveri T, Sealas MT, et al. Molecular screening and fetal diagnosis of beta- thalassemia in the Italian population. Hum Gen 1992;89:585-9.

17- Saiki RK, Walash PS, Levenson CH, Erlich HA, Genetic analysis of amplified DNA with immobilized equence specific oligonucleotide probs.proc Natl Acad Sci 1989;86:6230-4.

18- Tadmouri GO, Tuzmen S, Ozcelik, et al. Molecular and population genetics analysis of beta – thalassemia in Turkey . Am J Hematol 1998;57:215-220.

19- Weatheral DJ. ABC of clinical hematology . The hereditary anemia's. BMJ 1997;314:492-6.

20- Weatheral DJ. The Thalassemia in : stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW,Varmus H, eds. The molecular Basis of blood diseases , Philadelphia: WB .Sanders; 1994. P.157-205.

21- Winichagoon P, Saechan V, Sirpanich R, Napparptana C, Kanikpongsakdi S, Maggio A, Fucharoen S. Prenatal diagnosis of beta- thalassemia by reverse dot –blot hybridization. Prenatal Diagnosis 1999;19(5):428-35.

22- Wood WG. The complexities of b-globin in gene mutation regulation. Trends Genetic 1996;12:204-6.

Archive of SID

www.SID.ir