(مقاله پژوهشی)

بررسی نقش مارکر های پلی مورفیک *BCL11A* و *HBS1L-MYB* در افزایش هموگلوبین جنینی افراد ناقل و مبتلا به تالاسمی بتا در جنوب ایران– خوزستان

محمد حمید [۱]، نیلوفر برخورداری بافقی [۲]، غلامرضا شریعتی [۳*]،
حمید گله داری [۴]، علی حسین صابری [۵]، علیرضا صداقت [۶]

۱-استادیار بخش پزشکی مولکولی
۲-کارشناس ارشد بخش پزشکی مولکولی.
۳-استادیار گروه ژنتیک.
٤-استاد گروه ژنتیک.
٥-دانشیار گروه ژنتیک.
٦-استادیار گروه غدد.

۱و۲-انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش پزشکی مولکولی، تهران، ایران.
۳و٦-آزمایشگاه ژنتیک پزشکی و تشخیص پیش از تولد نرگس، اهواز، ایران.
٤و٥-گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

*نویسندهٔ مسؤول:
غلامرضا شریعتی؛ آزمایشگاه ژنتیک پزشکی و تشخیص پیش از تولد نرگس، اهواز، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸٦۱۳۳۳٦۹۰٤۳
Email: Shariatig@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: افزایش بیان هموگلوبین جنینی در برخی بیماران تالاسمی بتا و داسی شکل منجر به بهبود علائم بیماری می‌گردد. شناخت عواملی که موجب افزایش مجدد هموگلوبین جنینی می‌شوند بسیار مهم است. توجیه مولکولی افزایش هموگلوبین جنینی را می‌توان به ژن‌هایی نسبت داد که نقش تنظیمی در بیان ژن‌های خوشه ی ژنی بتاگلوبین دارند. هدف از این تحقیق بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم شایع مرتبط با افزایش هموگلوبین جنینی ژن BCL11A و ناحیه ی بین ژنی HBS1L-MYB در بیماران و ناقلین بتا تالاسمی خوزستان می باشد.

روش بررسی: دراین مطالعه ۵۰ بیمار تالاسمی با هموگلوبین جنینی بالا و۵۰ مورد به عنوان کنترل نرمال از جمعیت خوزستان انتخاب شد. با بهره‌گیری از روش‌های PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی فراوانی پلی‌مورفیسم‌های rs28384513, rs766432, rs11886868 و rs4895441 بررسی شد.

یافته‌ها: فراوانی پلی‌مورفیسم‌های (A/C) s766432 آلل C و (C/T) rs11886868 آلل C و (A/C) rs28384513 آلل A در افراد با هموگلوبین جنینی افزایش یافته بالا بوده، ارتباط معنی‌دار قوی با افزایش هموگلوبینی جنینی داشتند. در حالی که در رابطه با پلی مورفیسم (A/G) rs4895441 تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه می توان گفت که پلی مورفیسم های (A/C) rs766432 آلل C و (C/T) rs1188 6868 آلل C و (A/C) rs28384513 آلل A در ارتباط با افزایش هموگلوبین جنینی بوده، در پیش‌بینی وضعیت بالینی جنین به صورت تالاسمی ماژور یا اینترمدیا می توانند نقش داشته باشند. اگرچه برای تایید این موضوع بررسی این مارکرها در جمعیت بزرگتر ضروری است.

واژه‌های کلیدی: تالاسمی بتا، هموگلوبین جنینی، پلی مورفیسم.

دریافت مقاله: ۱۳۹٦/٤/۲۰ **دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده:** ۱۳۹٦/۹/۱ **اعلام قبولی:** ۱۳۹٦/۹/٤

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

تالاسمی بتا، کم خونی هتروژن اتوزوم مغلوب بوده که به وسیله ی کاهش یا عدم سنتز زنجیره‌های گلوبین، بواسطه بیش از ۲۰۰ جهش رخ می دهد (۱). در طی رشد جنینی زنجیره گاما گلوبین جایگزین اپسیلون شده و اصلی ترین نوع هموگلوبین دوران جنینی و بدو تولد یا همان هموگلوبین جنینی تولید می‌گردد. هموگلوبین جنینی (HbF؛α2γ2) از دو زنجیرهٔ گلوبین آلفا و گاما (γ2α۲) تشکیل شده است و در اوایل دوره رویانی یعنی در حدود هفتهٔ ششم که خون‌سازی در کبد وطحال انجام می گردد قابل مشاهده است و سنتز آن به طور سریع افزایش می‌یابد. به طوری که در هفته هشتم حاملگی، حداقل ۹۰ درصد هموگلوبین از این نوع می باشد و درطی دوران جنینی و نوزادی به شکل غالب باقی می ماند. تغییر هموگلوبین جنینی به هموگلوبین بزرگسالی (HbA؛α2β2)، در هفته های اول زندگی اتفاق می افتد بطوری که مقدار هموگلوبین جنینی تا ماه ششم پس از تولد شروع به افت سریع کرده به حدود ۳ درصد کل هموگلوبین می رسد و پس از یک سالگی میزان آن به کمتر از ۲ درصد کاهش می یابد (۲).

افزایش مجدد بیان هموگلوبین جنینی معمولا در بیماران مبتلا به حذفهای بزرگ در ناحیه ژنی بتاگلوبین نظیر بیمارانی که همواره سطح بیان بالایی از هموگلوبین جنینی (Hereditary Persistence of Fetal Haemoglobin; HPFH) دارند و نیز بیماران مبتلا به تالاسمی دلتا- بتا دیده شده است. در برخی از بیماران که در ناحیه تنظیمی ژن گاماگلوبین آنها تغییرات تک نوکلئوتیدی اتفاق افتاده است نیزگزارش شده است (۳). فاکتورهایی چندگانه که با مقادیر هموگلوبین جنینی در جمعیت مرتبط اند شامل سن، جنسیت (۲ درصد) و فاکتورهای محیطی(۱درصد) می‌شود؛ اما نقش فاکتورهای ژنتیکی در این ارتباط چشمگیر است(۹۱ درصد). چندشکلی *Xmn1-Gγ* در لوکوس بتا گلوبین، مسئول ۱۳ درصد از تنوع سلول جنینی در جمعیت است(٤).اگرچه بیش از 35 درصد تنوع سلول جنینی توسط دو لوکوس *HBSIL-MYB* (۱۹درصد) و *BCL11A* (۱۵ درصد) کنترل می شود، که با لوکوس بتا گلوبین بی ارتباط اند(۵).

سه لوکوس مرتبط باافزایش هموگلوبین جنینی شامل *Xmn1-Gγ polymorphism* در خوشه ی ژن بتا گلوبین، ناحیه ی بین ژنی *HBSIL-MYB* بر روی کروموزوم 6q23 و *BCL11A* به روی کروموزوم 2p16مورد بررسی ویژه ای قرارگرفته اند (۵).

BCL11A یک فاکتور رونویسی درگیر در رشد هماتوپویتیک نرمال و بدخیم می باشد. محصول ژن *BCL11A* یک فاکتور رونویسیMulti-zinc finger است که با اتصال به Hypersensitive site 3 مربوط به جایگاه locus Control Region در تنظیم بیان هموگلوبین جنینی نقش دارد. کاهش بیان *BCL11A* در سلول‌های اولیه‌ی اریتروئید بالغ منجر به بیان قوی هموگلوبین جنینی می شود. ناحیه ی *HBS1L-MYB* یک ناحیه ی اینترژنیک است که برخی پلی مورفیسم های آن در ارتباط با افزایش هموگلوبین جنینی می باشند (٦و۷). *HBS1L* که عملکرد آن تاکنون به خوبی شناخته نشده است خصوصیات ساختمانی آن با خانواده ی فاکتور طویل سازی*eEF-1* و فاکتور آزاد سازی *eERF-3* شباهت دارد (۸). ژن *MYB* به شدت در طول تکامل حفظ شده است و محصول اصلی آن در انسان، پروتئینی هسته ای است که در اغلب بافت های خون ساز بیان می شود و میزان بیان آن در سلول های نابالغ خون ساز بسیار بالاست. این ژن کلید تنظیم خون سازی است و بیان بالای آن با مهار گاماگلوبین همراه است و در تکثیر و تمایز سلول‌ها نقش دارد، مقادیر پایین *MYB* منجر به تسریع در بلوغ سلول های اریتروئیدی می‌شود (۹). با توجه به اینکه بحث مکانیسم های افزایش هموگلوبین

Archive of SID

www.SID.ir

جنینی در بیماران مبتلا به بتا تالاسمی چندین سال است که مورد توجه محققین قرار گرفته است بدین منظور در این مطالعه مارکر های پلی مورفیک *BCL11A* و *HBS1L-MYB* مورد بررسی قرار گرفته تا نقش آنها در افزایش هموگلوبین جنینی در جمعیت جنوب ایران–خوزستان تعیین گردد. بررسی این مارکرها برای اولین بار در بیماران تالاسمی جمعیت خوزستان انجام شده است.

روش بررسی

در مطالعه ی حاضر، که به صورت مورد – شاهدی انجام گرفته است. پس از اخذ رضایت نامه از افراد نرمال و بیماران تالاسمی مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک نرگس در این مطالعه ۵۰ بیمار شامل ۱۵ بیمار تالاسمی ماژور و ۳۵ تالاسمی مینور همراه با هموگلوبین جنینی بالا (بین ۳/۲ الی ۹۸/۵ درصد) و ۵۰ فرد سالم به عنوان افراد کنترل انتخاب شدند و نسبت زن و مرد تقریباً برابر بود.نمونه گیری بر اساس داده های خونشناسی و الکتروفورز هموگلوبین ازبین بیماران تالاسمی مینور یا ماژور انجام شد.

نمونه خون در حدود ۲ میلی لیتر در لوله‌های حاوی ضدانعقاد EDTA جمع آوری گردید و استخراج DNA به روش Salting Out انجام گرفت. از دستگاه نانودراپ برای خواندن غلظت DNA بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر (µg/ml) استفاده گردید. همچنین درجه‌ی خلوص با استفاده از تقسیم جذب نوری DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر بر جذب نوری پروتئین در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری و محاسبه شد.

برای تکثیر نواحی پلی مورفیسم‌های شایع rs28384513، rs4895441، rs766432 و rs11886868 آغازگرهای رفت و برگشت با استفاده از نرم افزار Gene Runner version 4.0.9.2 طراحی شد. در مرحله ی بعد برای اطمینان از اینکه پرایمرهای طراحی شده قادر به شناسایی دیگر توالی های DNA به غیراز ژن هدف نیست، در سایت اینترنتی http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi، پرایمر بلاست صورت گرفت. توالی آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر نواحی پلی مورفیسم در جدول ۱ آمده است. برای تکثیر ویژه ی قطعات اطراف پلی مورفیسم های مورد نظر، واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) در حجم ۳۰ میکرولیتر شامل ۲۰۰ نانوگرم DNA ، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۵/. میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۱/۲ میکرولیتر MgCl2 ۵۰ میلی مولار، ۱میکرولیتر ازآغازگرهای رفت و برگشت، ۳/. میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز Taq (سیناژن) انجام گردید. برنامه ی زمانی – دمایی بهینه برای PCR به صورت زیر بدست آمد: مرحله ی ذوب آغازین شامل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ تکرار دمایی با دناتوراسیون در دمای ۹٤ به مدت ۱ دقیقه، ۵۰ ثانیه در دمای ٦۲/۵ درجه برای اتصال آغازگرها، دمای تکثیر ۷۲ ^{o}C به مدت ۱ دقیقه و در نهایت ٤ دقیقه در دمای ۷۲ درجه جهت تکثیر نهایی انتخاب شد.سپس محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ با ولتاژ ۸۲ ولت، الکتروفورز شدند و در نهایت باندهای تفکیک شده توسط دستگاه UV Gel Documentation مشاهده و مورد آنالیز قرارگرفتند .

برای هضم آنزیمی محصولات PCR حاوی پلی مورفیسم rs4895441 از آنزیم محدودگر *Rsa*I (Thermo، 500 u، 10u /µl) استفاده شد. انکوباسیون محصولات PCR به مدت شش ساعت در دمـای ۳۷□ صورت گرفت. بعد از این مدت، محصولات برش آنزیمی، در ژل آگارز ۲/۵ درصد در کنار محصول برش نیافته ی PCR و نشانگر، الکتروفورز شدند.

برای هضم آنزیمی محصولات PCR حاوی چندشکلی rs28384513 از آنزیم محدودگر *Bstx*I (Thermo، ۵۰۰u، ۱۰ u /µl) استفاده شد. انکوباسیون محصولات PCR، در دمـای ۵۵□ در طول یک شبانه روز صورت گرفت. بعد از این مدت، محصولات برش آنزیمی، در ژل آگارز ۲/۵ درصد در کنار محصول برش نیافته ی

Archive of SID
www.SID.ir

PCR و نشانگر الکتروفورز شدند. برای بررسی دو پلی مورفیسم دیگر rs766432, rs11886868 ابتدا محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد و با ولتاژ ۸۰-۸۵ الکتروفورز شد. پس از اتمام الکتروفورز و اطمینان از عدم وجود باند غیر اختصاصی ، نمونه در حجم ۲۰ µl جهت انجام تعیین توالی به صورت تجاری (Bioneer co., Korea) آماده شد که با استفاده از روش ختم زنجیره صورت گرفت. آغازگرهایی که با آن تعیین توالی صورت گرفت همان آغازگرهایی بودند که در تکثیر قطعات به کار رفته بودند.

به منظور تفسیر نمودارهای تعیین توالی از برنامه Chromas استفاده شد و جهت بررسی اختلاف فراوانی توزیع آللی موجود در گروههای مجزای مورد مطالعه، تست کای دو (x^2) بکار رفت نتایج بدست آمده با سطح معنی‌داری $\alpha=0.05$ مقایسه شد. بدین صورت که اگر $p < 0.05$ باشد، فرضیه معنی‌دار تلقی می‌گردد. سپس معنی‌دار بودن فراوانی آلل‌های مورد مطالعه براساس آزمون کای دو در دو گروه شاهد و نمونه بررسی گردید. در ادامه جهت بررسی اثر هر پلی‌مورفیسم بر افزایش هموگلوبین جنینی Odds Ratio با درصد اطمینان ۹۵٪ (CI:%95) محاسبه شد که شانس وقوع خطر را نشان می‌دهد. برای آنالیز آماری نتایج از نرم افزارSPSS نسخه ۱۶ استفاده گردید.

یافته ها

از مجموع افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک نرگس در سال های ۹۰،۹۱ و ۹۲، در حدود ۵ هزار فرد دارای موتاسیون در ژن بتا گلوبین بودند که از این تعداد حدود ۵۰ نفر که دارای هموگلوبین جنینی بالا (در رنج ۳,۲ الی ۹۸ درصد) و ۵۰ فرد سالم با هموگلوبین جنینی نرمال انتخاب شد که نسبت زن و مرد تقریباً برابر داشتند. پلی-مورفیسم‌های شایع rs28384513، rs4895441، rs766432 و rs11886868 با استفاده از دو روش هضم آنزیمی و تعیین توالی بررسی شدند.

پلی مورفیسم rs28384513 (A/C)

محصولات PCR حاصل از تکثیر ناحیه‌ی چندشکلی rs28384513 که اندازه ۴۳۵ جفت بازی دارند با آنزیم محدودگر *BstxI* مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. این آنزیم توالی CCANNNNN/NTGG را شناسایی و برش می‌دهد. در صورتی که در جایگاه چندشکلی، نوکلئوتید A وجود داشته باشد، جایگاه برش آنزیم مربوطه وجود دارد، بنابر آنزیم آن را برش داده و دو قطعه با طول‌های ۳۱۶ و ۱۱۹ جفت بازی ایجاد می کند. اما در صورتی که در جایگاه چندشکلی، نوکلئوتید C وجود داشته باشد در محصول PCR، جایگاه برش آنزیم مربوطه وجود ندارد و محصول بدون برش به طول ۴۳۵ جفت باز باقی می‌ماند. نتایج ذکرشده در شکل ۱ آمده است.

پلی مورفیسم rs4895441 (A/G)

طول قطعه ی تکثیر شده مربوط به پلی مورفیسم rs4895441، ۷۳۷ جفت باز است که با آنزیم محدودگر *RsaI* مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. این آنزیم توالی GT/AC را شناسایی و برش می‌دهد. در صورتی که در جایگاه چندشکلی، نوکلئوتید A وجود داشته باشد در محصول PCR، یک جایگاه برش آنزیم مربوطه وجود دارد، بنابراین آنزیم آن را برش داده و دو قطعه با طول های متفاوت ۵۳۲ و ۲۰۵ جفت بازی ایجاد می‌کند.اما در صورتی که در جایگاه پلی مورفیسم ، نوکلئوتید G وجود داشته باشد در محصول PCR، ۲ جایگاه برش آنزیم وجود دارد بنابراین آنزیم آن را برش داده و سه قطعه با طول‌های متفاوت ۴۳۰، ۲۰۵ و ۱۰۲ جفت بازی ایجاد می-کند.

در صورتی که هر دو نسخه (پدری و مادری) مورد هضم آنزیمی قرار گیرند (ژنوتیپ هموزیگوت AA)، دو قطعه به طول‌های ۵۳۲ و ۲۰۵ جفت باز وجود خواهد داشت. اما اگر تغییر G وجود داشته باشد به دلیل وجود دو جایگاه برش سه قطعه به طول های ۴۳۰، ۲۰۵ و ۱۰۲ جفت بازی خواهیم داشت (ژنوتیپ هموزیگوت GG).

Archive of SID

www.SID.ir

در صورتی که یک نسخه برش بخورد و نسخه‌ی دیگر بدون برش و دست نخورده باقی بماند (ژنوتیپ هتروزیگوت AG) چهار قطعه با اندازه‌های ۵۳۲، ٤۳۰، ۲۰۵، ۱۰۲ جفت باز بر روی ژل مشاهده می‌شود. نتایج مذکور در شکل ۲ آمده است. قابل ذکر است که قطعه ۱۰۲ جفت بازی به دلیل اندازه کوچک در ژل آگارز قابل مشاهده نبود.

پلی‌مورفیسم‌های rs766432 (A/C) و(C/T) rs11886868

در رابطه با دو پلی مورفیسم فوق محصول PCR ، تعیین توالی گردیده نتایج بدست آمده در شرایط هتروزیگوت و هموزیگوت در شکل‌های ۳ و ٤ نشان داده شده است.

فراوانی آللی

از میان پلی مورفیسم مورد مطالعه در افراد با هموگلوبین جنینی بالا و جمعیت نرمال، فراوانی پلی مورفیسم های rs766432 (A/C) آلل C و 6868 rs1188 (C/T) آلل C و rs28384513 (A/C) آلل A در افراد با هموگلوبین جنینی افزایش یافته بالا بوده، تفاوت معنی داری را بین دو گروه نشان داد که به منزله ارتباط معنی داری با افزایش هموگلوبینی جنینی است. در حالیکه در رابطه با پلی مورفیسم rs4895441 (A/G) تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نگردید جدول ۲.

جدول ۱: توالی آغازگرهای رفت وبرگشت برای تکثیر پلی مورفیسم ها ژن های*HBS1L-MYB* و*BCL11A*

ژن	پلی مورفیسم	آغازگر رفت	آغازگر برگشت	طول محصول (جفت باز)
HBS1L-MYB	rs28384513	5'-GAATGCCCACTGTGTGCTTAATG-3'	5'-ATACTGATAAGGCGCCAACTG-3'	٤۳۵
HBS1L-MYB	rs4895441	5'-TTGGCCAGAGCACACTTGAATG-3'	5'-GGATGGGTGATCATGTGTTTGC-3'	۷۳۷
BCL11A	rs766432, rs11886868	5'-GCATTCTCATTTCCCTGAAATGT-3'	5'-ATCTACACAGTGTCCATTGTAGCACT-3'	٦۰۹

جدول ۲: فراوانی آللی پلی مورفیسم های مورد مطالعه در نمونه های با افزایش هموگلوبین جنینی و گروه شاهد

نمونه ها	فرکانس آللی rs766432 (A/C)		سطح معنی دار	فرکانس آللی rs11886868 (C/T)		سطح معنی دار	فرکانس آللی rs28384513 (A/C)		سطح معنی دار	فرکانس آللی rs4895441 (A/G)		سطح معنی دار
	C	A		C	T		C	A		G	A	
هموگلوبین جنینی بالا(میانگین ۲۷/٦ و انحراف معیار (۳۲/۱)	٤۲(٪٤۲)	۵۸(٪۵۸)	./۰۰	٦۰(٪٦۰)	٤۰(٪٤۰)	./۰۰۱	۲۳(٪۲۳)	۷۷(٪۷۷)	./۰۰	۲۲(٪۲۲)	۷۸(٪۷۸)	./۲
کنترل	۱۰(٪۱۰)	۹۰(٪۹۰)		۳۷(٪۳۷)	٦۳(٪٦۳)		٦۰(٪٦۰)	٤۰(٪٤۰)		۱۵(٪۱۵)	۸۵(٪۸۵)	

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

القا و مکانیسم های افزایش هموگلوبین جنینی در بیماران مبتلا به بتا تالاسمی چندین سال است که مورد توجه محققین قرار گرفته تا بدین روش بتوانند آن ها را به تالاسمی اینترمدیا تبدیل کرده و درمان نمایند. به این صورت که افزایش جبرانی زنجیره های گاما در همراهی با ژن معیوب بتا موجب افزایش بیشتر هموگلوبین جنینی و در نتیجه تعادل بهتر زنجیره ها و کاهش تجمع زنجیره های آلفا می شود. توجیه مولکولی افزایش هموگلوبین جنینی را می توان به ژن هایی نسبت داد که نقش تنظیمی در بیان ژن های خوشه ی بتاگلوبین دارند.

بنابراین بررسی دو مارکر BCL11A و HBS1L-MYB و تعیین نقش این مارکرها در افزایش هموگلوبین جنینی به شناخت مکانسیم افزایش هموگلوبین جنینی کمک می‌کند همچنین این مارکرها در پیش بینی وضعیت بالینی جنین در تشخیص های پیش از تولد به صورت تالاسمی ماژور یا اینترمدیا ارزشمند می باشند.

مطالعه‌ی حاضر بر روی ۵۰ بیمار تالاسمی ماژور و تالاسمی مینور همراه با هموگلوبین جنینی بالا و ۵۰ فرد سالم به عنوان افراد کنترل انجام گرفت. در این تحقیق ٤ پلی مورفیسم رایج در دو ناحیه‌ی مرتبط با افزایش هموگلوبین جنینی در ژن BCL11A و ناحیه‌ی بین ژنی HBS1L-MYB مورد بررسی قرار گرفتند.

پلی مورفیسم های rs766432 (A/C) آلل C و rs1188 6868 (C/T) آللC و rs28384513 (A/C) آلل A در افراد با هموگلوبین افزایش یافته در مقایسه با افراد نرمال بالا بوده، ارتباط معنی داری نشان دادند. در حالیکه در پلی مورفیسم rs4895441 (A/G) تفاوت معنی داری بین دو گروه مشاهده نگردید. لذا این مارکر اخیر در افزایش هموگلوبین جنینی موثر نمی باشد.در مقایسه نتایج بدست آمده در این مطالعه با نتایج بدست آمده در جمعیت های دیگر می توان بطور خلاصه به موارد زیر اشاره کرد.

مطالعه‌ای که ارتباط پلی مورفیسم‌های rs28384513، rs766432 و rs11886868 با افزایش هموگلوبین جنینی را بررسی کرده می توان به مطالعه ای که در جمعیت های تانزانیایی و انگلیسی مبتلا به سیکل سل اشاره کرد که پلی مورفیسم rs11886868 در هردو جمعیت ارتباط معنی داری قوی را نشان می داد در حالی که پلی مرفیسم rs28384513 در جمعیت انگلیسی برعکس جمعیت تانزانیایی معنی دار نبود (۱۰).

تحقیقی که در سال ۲۰۰۷ توسط Thein و همکاران به روی ناحیه‌ی بین ژنی HBS1L-MYB در لندن انجام شد، به وجود رابطه‌ی مستقیم میان میزان افزایش هموگلوبین جنینی و rs4895441 اشاره دارد. همچنین وی در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۰۹ منتشر کرد، وجود این رابطه را نیز در پلی‌مورفیسم rs11886868 تأیید نمود (۹ و۱۱).

در سال ۲۰۰۸، Sedgewick و همکارانش، ارتباط میان پلی مورفیسم های ژن BCL11A به ویژه rs766432 با تعداد سلول‌های جنینی در نمونه‌های مربوط به گروه جمعیتی شمال تایلند و همچنین ارتباط آن با میزان هموگلوبین جنینی در جمعیت‌های آمریکایی آفریقایی مشخص کردند (۱۲).

در سال ۲۰۱۰، Nguyen و همکارانش در فرانسه با بررسی ۵۷ بیمار تالاسمی اینترمدیا با ژنوتیپ‌های بسیار متفاوت مشخص کردند که rs11886868, rs4671393 بر خلاف نتایج تحقیقات قبلی هیچ‌گونه ارتباط میان آنها و میزان هموگلوبین جنینی وجود ندارد (۱۳).

در سال ۲۰۱۱ در تحقیقی که در جمعیت ایرانی صورت گرفت در بررسی ۵۰ بیمار مبتلا به تالاسمی بتا با هموگلوبین جنینی بالا و ٤۷ فرد سالم با هموگلوبین جنینی نرمال، ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم های rs11886868،rs4895441 و rs28384513 و افزایش میزان هموگلوبین جنینی مشاهده نشد(١٤). این مطالعه مجددا توسط گروه دیگری در سال ۲۰۱۳ برروی

Archive of SID

www.SID.ir

پلی‌مورفیسم‌های rs11886868 و rs766432 در جمعیت ایرانی انجام شد که نتایج بدست آمده عدم ارتباط را نشان می داد(۱۵).

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۳ بر روی جمعیت عرب در کشور عربستان انجام شده بود پلی مورفیسم-های rs766432، rs886868 و rs4895441 مورد بررسی قرار گرفته و نتایج بدست آمده با مطالعه ما مشابه بود (۱۶).

روشن است که نتایج بدست آمده در این مطالعه، در راستای تحقیقات صورت گرفته در جمعیت‌های مختلف دنیا می‌باشد و تنها در سه مورد (۱۳-۱۵) متفاوت است. که دلایل تفاوت نتایج بدست آمده در این تحقیق با دو مطالعه انجام شده قبلی برروی جمعیت ایرانی، می توان به مواردی اشاره کرد: از جمله افراد انتخاب شده در مطالعات قبلی بصورت هتروژن بودند در حالی که در مطالعه حاضر در حدود ۸۰ درصد افراد مورد بررسی عرب و بقیه از قومیت لر بودند و به این دلیل نتایج این مطالعه با مطالعه ای که در عربستان صورت گرفته مشابه بود. دلیل دیگر این تفاوت فراوانی بالای ازدواج های خویشاوندی در خوزستان است. لذا جمعیت مورد بررسی در این تحقیق خالص‌تر از مطالعات قبلی است. همچنین در دو مطالعه قبلی حذف‌های بتاگلوبین در نمونه‌های HPFH با عامل موتاسیون حذفی بتاگلوبین، مورد بررسی قرار نگرفته که چه بسا برخی از نمونه های مورد بررسی آنها، افزایش هموگلوبین جنینی در آنها به دلیل موتاسیون حذفی بتاگلوبین بوده است. ولی در این مطالعه مواردی که دارای موتاسیون حذفی ژن بتاگلوبین بودند از جمعیت مورد مطالعه حذف شده بودند.

نتیجه گیری

شناخت عواملی که موجب فعالیت مجدد هموگلوبین جنینی می‌شوند بسیار مهم است، زیرا می توانی از آن به عنوان یک استراتژی درمانی برای تالاسمی و کم‌خونی داسی شکل استفاده کرد. همچنین در تشخیص‌های قبل از تولد برای پیشبینی وضعیت بالینی جنین حائز اهمیت می-باشد. لذا با توجه نتایج بدست آمده در این مطالعه که بر روی جمعیت خالص تری صورت گرفت می‌توان گفت که پلی مورفیسم های rs766432 (A/C) آلل C و rs1188 6868 (C/T) آلل C و rs28384513 (A/C) آلل A در ارتباط با افزایش هموگلوبین جنینی بوده، می‌توانند در پیش بینی وضعیت بالینی جنین به صورت تالاسمی ماژور یا اینترمدیا نقش داشته باشند. اگرچه برای تایید این موضوع بررسی این مارکرها در جمعیت بزرگتر ضروری است.

قدردانی

از کلیه افراد شرکت کننده در این تحقیق، پرسنل آزمایشگاه ژنتیک نرگس و همکاران بخش پزشکی مولکولی انستیتوپاستور ایران تشکر و تقدیر بعمل می آید. همچنین این تحقیق با گرنت شماره ۶۸۷ انستیتوپاستور ایران حمایت مالی شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1-Fabrice Danjou, Franco Anni, Renzo Galanello. Beta-thalassemia: from genotype to phenotype Haematologica 2011;96(11):1573-5.

2-Thein, S. L. and Menzel, S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. British Journal of Haematology 2009;145(4): 455-67.

3-Hamid M, Mahjoubi F, Akbari MT, Arab A, Zeinali S, Karimipoor M. Molecular analysis of gamma-globin promoters, HS-111 and 3'HS1, in beta-thalassemia intermedia patients associated with high levels of Hb F. Hemoglobin 2009;33(6):428-38.

4-Thein S L. 'Beta-thalassaemia prototype of a single gene disorder with multiple phenotypes. International Journal of Hematology *2002;*76: 96-104.

5-Menzel S, Garner C, Gut I, Matsuda F, Yamaguchi M, Heath S, et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zincfinger protein on chromosome 2p15. Nature Genetics 2007; 39(10):1197-9.

6-Farrell JJ, Sherva RM, Chen ZY, Luo HY, Chu BF, Ha SY, et al. A 3-bp deletion in the hbs1l-myb intergenic region on chromosome 6q23 is associated with hbf expression. Blood 2011;117:4935-4945.

7-Wahlberg K, Jiang J, Rooks H, Jawaid K, Matsuda F, Yamaguchi M, et al. The hbs1l-myb intergenic interval associated with elevated hbf levels shows characteristics of a distal regulatory region in erythroid cells. Blood 2009;114:1254-1262.

8-Wallrapp C, Verrier SB, Zhouravleva G, Philippe H, Philippe M, Gress TM, et al. The product of the mammalian orthologue of the Saccharomyces cerevisiae HBS1 gene is phylogenetically related to eukaryotic release factor 3 (eRF3) but does not carry eRF3-like activity. *FEBS Letters* 1998; 440: 387-392.

9-Westin EH, Gallo RC, Arya SK, Eva A, Souza LM, Baluda MA, et al. Differential expression of the amv gene in human hematopoietic cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1982;79 (7): 2194-8.

10-Makani J, Menzel S, Nkya S, Cox SE, Drasar E, Soka D, et al. Genetics of fetal hemoglobin in Tanzanian and British patients with sickle cell anemia. Blood 2011;117(4):1390-2.

11-Thein SL, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2007;104 (27), 11346-51.

12-Sedgewick AE, Timofeev N, Sebastiani P, So JC, Ma ES, Chan LC, et al.BCL11A is a major HbF quantitative trait locus in three different populations with betahemoglobinopathies. Blood Cells Molecules and Disease 2008;41(3):255-8.

13-Thi Khanh Tien Nguyen, Philippe Joly, Claire Bardel, Mustapha Moulsma, Nathalie Bonello-Palot, Alain Francina. The XmnI (G)gamma polymorphism influences hemoglobin F synthesis contrary to BCL11A and HBS1L-MYB SNPs in a cohort of 57 beta-thalassemia intermedia patients. Blood Cells Molecules and Diseases 2010 45(2):124-7.

14-Hashemi Gorji F, Hamid M, Arab A,, Amirian A, Zeinali S, Karimipoor M. Relationship between DNA polymorphisms at the BCL11A and HBS1L-MYB loci in 9-Thalassemia patients with increased fetal hemoglobin levels. Scientific Journal of Iran Blood Transfus Organ 2011;8(3):149-157.

15-Neishabury M, Zamani F, Keyhani E, Azarkeivan A, Abedini SS, Eslami MS, et al. The influence of the BCL11A polymorphism on the phenotype of patients with beta thalassemia could be affected by the beta globin locus control region and/or the Xmn1-HBG2 genotypic background. Blood Cells Molecules and Diseases 2013;51(2):80-4.

16-Ngo D, Bae H, Steinberg MH, Sebastiani P, Solovieff N, Baldwin CT, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genetic studies of the Arab-Indian haplotype. Blood Cells, Molecules and Diseases 2013;51(1):22-6.

Archive of SID

www.SID.ir

The Impact of *BCL11A* and *HBS1L-MYB* Polymorphic Markers in Affected and Carriers of Beta Thalassemia with High Level of Fetal Hemoglobin in South of Iran, Khuzestan

Mohammad Hamid[1], Nilofar Barkhordari Bafghi[2], Gholamreza Shariati[3*], Hamid Galehdari [4], Ali Hossein Saberi[5], Ali Reza Sedaghat[6]

1-Assistant Professor of Molecular Medicine.
2-Master of Science in Molecular Medicine.
3-Assistant Professor of Medical Genetic.
4-Professor of Genetic.
5-Associate Professor of Genetic.
6-Associate Professor of Endocrinology.

1,2-Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3,6-Laboratory of Genetic Medicine and Prenatal Diagnosis, Narges, Ahvaz, Iran.
4,5-Department of Medical Genetic, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

⁎Corresponding author:
Gholamreza Shariati; Laboratory of Genetic Medicine and Prenatal Diagnosis, Narges, Ahvaz, Iran.
Tel: +98 6133369043
Email: Shariatig@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: The increase of HbF in some beta-thalassemia and sickle cell patients ameliorates the disease severity. Therefore, understanding the reasons behind the increasing of fetal hemoglobin is needful. The molecular explanation of fetal hemoglobin increment might be correlated with the genes which play a regulatory role in expression of beta-globin cluster genes. In this study, the likelihood of polymorphisms of BCL11A and HBS1L-MYB regions to cause HbFelevation was studied.

Subjects and Methods: In this investigation, 50 thalassemia patients with high level of fetal hemoglobin and 50 healthy individuals as control group were selected from Khuzestan. The allele frequency of rs28384513, rs766432, rs11886868 and rs4895441 polymorphisms were assessed by using PCR-RFLP and PCR- sequencing methods.

Results: The frequency of C allele in rs766432 (A/C), C allele in rs11886868 (C/T) and A allele in rs28384513 (A/C) were significantly high among the patients with increased level of HbF. Whereas, the frequency of rs4895441 (A/G) polymorphism had no significant differences compared with the patients with high level of HbF and control group.

Conclusion: Based on this study, rs766432 (A/C), rs11886868 (C/T) and rs28384513 (A/C) polymorphisms are correlated with HbF increased and they can be used to predict the clinical features of fetus in case of bearing the major or intermediate forms of thalassemia. However, to confirm these results these markers need to be studied by applying a larger number of samples.

Keywords: Beta-thalassemia, Fetal hemoglobin, Polymorphism.

►*Please cite this paper as:*
Hamid M, Barkhordari Bafghi N, GhR Shariati, Galehdari H, Saberi AH, Sedaghat AR. The Impact of BCL11A and HBS1L-MYB Polymorphic Markers in Affected and Carriers of Beta Thalassemia with High Level of Fetal Hemoglobin in South of Iran, Khuzestan.Jundishapur Sci Med J 2017; 16(6):611-619.

Received: July 11, 2017 **Revised: Nov 22, 2017** **Accepted: Nov 11, 2017**

Archive of SID
www.SID.ir