

## تعیین جهش‌های شایع ژن بتا گلوبین در بیماران تالاسمی ماژور استان لرستان

علی اصغر کیانی <sup>۱</sup> M.Sc.، یوسف مرتضوی <sup>۲</sup> Ph.D.، سیروس زینلی <sup>۳</sup> Ph.D.، یعقوب شیرخانی <sup>۴</sup> Ph.D.، بهرام دلفان <sup>۵</sup> Ph.D.، معصومه کاشی <sup>۵</sup> M.Sc.

۱. دانشگاه علوم پزشکی لرستان، گروه هاتولوژی
۲. دانشگاه تربیت مدرس، گروه هاتولوژی
۳. انیستیتو پاستور ایران، گروه بیوتکنولوژی
۴. دانشگاه علوم پزشکی لرستان، گروه فارماکولوژی
۵. دانشگاه علوم پزشکی لرستان، آموزشکده پیراپزشکی

✉ آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، صندوق پستی: ۴۴۱، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه هاتولوژی

پست الکترونیک: [Email: aliasghr.kiani@gmail.com](mailto:aliasghr.kiani@gmail.com)

### چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۱۰/۲۵، پذیرش مقاله: ۸۵/۵/۱۸

**هدف:** تعیین شیوع جهش‌های ژن بتا گلوبین در بیماران تالاسمی ماژور استان لرستان و استفاده از این نتایج در مطالعات اپیدمیولوژیک و کمک به تشخیص قبل از تولد بتا تالاسمی ماژور

**مواد و روش‌ها:** توسط روش ARMS PCR، ۱۳۰ کروموزوم به دست آمده از ۶۵ بیمار بتا تالاسمی ماژور غیر خویشاوند ساکن در استان لرستان مورد بررسی و شایع‌ترین جهش‌های منطقه مدیترانه‌ای (بیش از ۳۰ نوع جهش) مورد جستجو قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد جهش (-T) codons 36/37 با شیوع ۳۳/۸۴ درصد، شایع‌ترین جهش منطقه است و به دنبال آن چهار جهش (G-->A) IVS-II-1، (G-->A) IVS-I-110 (+G) 8/9 (Fr) frameshift codons (Fr) 8/9 و (G-->C) IVS-I-5 به ترتیب با شیوع ۲۷/۶۴، ۱۱/۵۳، ۱۰/۷۶ و ۴/۴۷ درصد در رتبه‌های بعدی قرار دارد.

آلل‌های (C-->G) IVS-II-745، (-CT0) Codon 5، IVS-I (25bp deletion) و (-C) Frameshift CD44 دارای کمترین میزان شیوع در میان جهش‌های مورد مطالعه بودند و در مجموع فقط ۳/۸۷ درصد از کل جهش‌های کشف شده را شامل می‌شدند. ۷/۶۳ درصد از جهش‌ها را نیز، جهش‌های ناشناخته تشکیل دادند.

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه یافته‌های متفاوتی نسبت به نتایج به دست آمده توسط سایر محققان در ایران و حتی جهان به دست آمد.

**کلیدواژگان:** بتا تالاسمی، جهش، ایران، لرستان

فصلنامه پزشکی باخه، سال هشتم، شماره ۲، تابستان ۸۵، صفحات ۹۱-۸۸

### مقدمه

تالاسمی از شایع‌ترین بیماری‌های تک‌ژنی اتوزومال مغلوب در ایران و جهان است (۱). این بیماری در بیش از ۶۰ کشور جهان (به طور عمده کشورهای خاورمیانه و حوزه مدیترانه) شیوع دارد و بیش از ۱۵۰ میلیون نفر در جهان به این بیماری مبتلا هستند (۲). تالاسمی بیشتر در استان‌های شمالی و جنوبی کشور شیوع دارد و برآورد شده است در حدود ۳ درصد جمعیت ایران حامل ژن این بیماری باشند (۳). بر اساس آمارهای موجود بین ۱۵ هزار (بنیاد بیماری‌های خاص) تا ۲۰ هزار (انجمن تالاسمی) بیمار مبتلا به بتا-تالاسمی ماژور در ایران زندگی می‌کنند (تماس‌های خاص).

در برخی مناطق کشور (به خصوص در شمال و جنوب) حدود ۱۰ درصد افراد ناقل تالاسمی هستند (۴). مطالعات نشان می‌دهد که بسیاری از جهش‌های مسئول ایجاد تالاسمی در ایران را جهش‌های

مدیترانه‌ای تشکیل می‌دهند (۲). مطالعات محدودی در رابطه با تعیین نوع جهش‌های مناطق مختلف ایران انجام شده است (۱، ۲، ۵، ۶، ۷). این مطالعه نیز تلاشی در جهت تسهیل در تشخیص قبل از تولد بیماران تالاسمی است. تحقیق حاضر همچنین دارای ارزش اپیدمیولوژیک و آماری بسیار مفیدی است که می‌توان با مقایسه جهش‌های شایع منطقه با جهش‌های شایع سایر مناطق کشور و جهان، اختلاف جهش‌های شایع منطقه لرستان را با سایر مناطق کشور و جهان مشخص کرد که این امر در مطالعات وسیع و کلان اپیدمیولوژیک کشوری و جهانی بسیار مؤثر خواهد بود.

استان لرستان در غرب کشور واقع شده و دارای شرایط جغرافیایی کوهستانی با آب و هوای معتدل کوهستانی است و با توجه به اینکه لرستان نیز از تنوع اقوام لر برخوردار است در این تحقیق سعی بر آن شد

که از اقوام مختلف ساکن در لرستان که همگی لر بودند نمونه گیری صورت گیرد و نتایج با دیگر مطالعات مقایسه شود.

## مواد و روش‌ها

پرونده بیماران تالاسمی ماژور آزمایشگاه بیمارستان شهید مدنی خرم‌آباد مورد مطالعه قرار گرفت و بیمارانی که واجد شرایط نمونه گیری بودند انتخاب شدند و پس از کسب رضایت از بیماران و والدینشان و اخذ رضایت‌نامه از ایشان، نمونه گیری به عمل آمد. شرط اصلی نمونه گیری، غیرخوشاوند بودن بیماران بود. ۷ تا ۱۰ میلی لیتر خون به همراه ماده ضد انعقاد (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid: EDTA) از هر بیمار دریافت می‌شد. نمونه‌ها بلافاصله منجمد و به آزمایشگاه جهت تخلیص DNA ارسال می‌شدند.

### تخلیص DNA (DNA Extraction)

در تحقیق حاضر از روش پروتییناز K(۸) جهت تخلیص DNA استفاده شد. ابتدا ۵ میلی لیتر خون بیمار سانتریفیوژ و گلبول‌های رسوب با آب مقطر شستشو شدند. سپس به گلبول‌ها بافر Tris یک مولار (pH=۷/۵) و SDS ده درصد و پروتییناز K (۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه و پس از انکوباسیون، کلرید سدیم ۶ مولار اضافه و سانتریفیوژ می‌شد. به مایع رویی ایزوپروپانول صددرصد اضافه می‌شد بعد از آن مجدداً سانتریفیوژ و بعد اتانول ۷۰درصد اضافه می‌شد و پس از سانتریفیوژ، آب مقطر اضافه می‌شد. با استفاده از جذب نوری (OD=260, 280) از به دست آمدن مقدار مناسب DNA اطمینان حاصل می‌گردید.

### تعیین جهش

در این پژوهش، از روش ARMS PCR (Polymerase Chain Reaction: PCR) (Amplification Refractory Mutation System: ARMS)

جهت تعیین جهش‌ها استفاده شد. مبنای این روش تفاوت نوکلئوتید انتهایی ۳ پرایمر برای آلل‌های مختلف است. در این روش دو واکنش PCR با استفاده از یک DNA الگو انجام می‌شود که در هر واکنش پرایمر مشترک به همراه یکی از دو پرایمر اختصاصی آلل مورد استفاده قرار می‌گیرد. در واکنش اول، پرایمری استفاده می‌شود که تکثیر را از روی آلل اول انجام می‌دهد و در واکنش دوم پرایمر دوم استفاده می‌شود که آلل دوم را تکثیر کند. حالت اختصاصی این پرایمرها برای هر یک از آلل‌ها ناشی از نوکلئوتید انتهایی ۳ آنها است که با هم متفاوتند. لازم به ذکر است که دو پرایمر اختصاصی آلل‌ها به نحوی طراحی می‌شوند که انتهایی ۳ آنها فقط به ناحیه متفاوت بین دو آلل متصل شود. این پرایمرهای اختصاصی آلل به همراه یک پرایمر مشترک تنها در صورت حضور آلل اختصاصی آنها محصول مورد نظر را تکثیر می‌کنند.

با استفاده از روش ARMS PCR، شصت و پنج بیمار از نظر بود یا نبود جهش‌های شایع ایجادکننده بتا-تالاسمی مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی نمونه‌ها از نظر وجود ۳۰ جهش (جهش‌های یافت شده در ایران) مورد بررسی قرار گرفتند. فهرست تعدادی از مهمترین جهش‌های ایجادکننده تالاسمی که عمدتاً جهش‌های مدیترانه‌ای می‌باشند در اینجا ذکر می‌گردد:

codon 5 (-CT); frameshift codons (FSC) 8/9 (+G); codon 30 (G->C); IVS-I-1 (G->A); IVS-I-5 (G->C); IVS-I-6 (T->C); IVS-I-110 (G->A); codons 36/37 (-T); codon 44 (-C); IVS-II-1 (G->A); IVS-II-745 (C->G); IVS-I (25 bp deletion); IVS-I-130 (G->C) and codon 39 (C->T)

پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش محصول شرکت Prime Italy کشور ایتالیا بوده و از شرکت فزا پژوه خریداری شدند. DNAهای تخلیص شده، به روش ARMS PCR (مطابق روش شرح داده شده در منبع شماره ۹) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر جهش، تکثیر شدند. سپس قطعات تکثیر یافته، الکتروفورز و رنگ آمیزی و در نهایت از نظر وجود جهش‌های مختلف ارزیابی شدند.

## یافته‌ها

### تعیین فراوانی بر اساس انواع جهش

نمونه‌های بیماران از نظر ۳۰ جهش ایجادکننده تالاسمی با روش آمار توصیفی مورد بررسی قرار گرفت که مجموعاً ۹ نوع جهش شناسایی شد و پنج بیمار نیز به طور هموزایگوت و یا هتروزایگوت دارای جهش‌های ناشناخته بودند. جهش‌های کشف شده در نمونه‌های بیماران تالاسمی ماژور استان و درصد شیوع آنها (۶۵ بیمار و ۱۳۰ کروموزوم) به شرح زیر است:

جدول ۱: فهرست جهش‌های کشف شده در استان لرستان همراه با ترتیب شیوع آنها

Allele	No. Chromosome (among of 130)	درصد
Codons 36/37 (-T)	۲۴	۲۳/۸۴ درصد
IVS-II-1, G->A	۲۶	۲۷/۶۹ درصد
IVS-I-110, G->A	۱۵	۱۱/۵۳ درصد
Fr 8/9, +G	۱۴	۱۰/۷۶ درصد
IVS-I-5, G->C	۶	۴/۶۷ درصد
IVS-II-745, G->C	۲	۱/۵۹ درصد
Codon 44, -C	۱	۰/۷۶ درصد
25 bp deletion	۱	۰/۷۶ درصد
Codon 5, -CT	۱	۰/۷۶ درصد
Unknown; others	۱۰	۷/۶۳ درصد

## بحث

جهش‌های فراوان شناخته شده در تالاسمی بتا و تحقیقات صورت گرفته نشان‌دهنده وجود جهش‌های متفاوت در سطح کشورهای مختلف جهان است. همچنین وجود اقوام و تیره‌های متنوع در کشورها، این فرضیه که در اقوام مختلف، جهش‌های متفاوت وجود دارد

HVS I-I (۱۳ درصد)، IVSI-6 (۲۱/۶ درصد)، IVSI-II (۳۵/۹ درصد) گزارش شده است (۱۳). جهش های شایع پاکستان در شمال این کشور Fr 8-9 (۴۱/۳ درصد) و در جنوب این کشور IVSI-5 (۵۲/۲ درصد) گزارش شده است (۱۴).

جهش G->A، IVS-I-110، بیشتر در مناطق مدیترانه ای و به خصوص در جزیره قبرس (Cyprus) گزارش شده است (۱۸-۱۵، ۹). همچنین جهش های شایع کشورهای عربی G->A، IVS-I-110، G->A، IVS-II-1 (۱۹، ۲۰، ۲۱) و کشور هندوستان نیز G->C، IVS-I-5 (۲۲) گزارش شده اند. Codons 36/37 (-T) که شایع ترین جهش یافت شده در مطالعه ما می باشد در هیچ جای دنیا جهش شایع گزارش نشده و فقط مناطق معدودی چون فلسطین و ترکیه این جهش را (نه به عنوان جهش شایع) گزارش کرده اند (۱۰، ۱۱). با توجه به این گزارش ها مشخص می شود که جهش های شایع ژن بتا گلوبین در بیماران تالاسمی ماژور مناطق مختلف جهان و حتی استان های مختلف کشور متفاوت است.

نکته مورد توجه این که پنج موتاسیون (-T) Codons 36/37، IVS- Frameshift Codons 8/9، -AA، IVS-I-110، G->A، II-1، G->A و G->C، IVS-I-5، بالغ بر ۸۹/۷۶ درصد از کل جهش های مورد مطالعه و ۸۸/۴۶ درصد از کل کروموزوم های بررسی شده را شامل می شوند.

### نتیجه گیری

به این ترتیب می توان با به کار بردن پرایمرهای اختصاصی این پنج جهش، ۸۸/۴۶ درصد از کروموزوم های جهش یافته منطقه لرستان را کشف کرد که این امر کمک بسیار شایانی در تشخیص قبل از تولد (Prenatal Diagnosis: PND) تالاسمی ماژور محسوب و موجب کاهش چشمگیر پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص قبل از تولد و در نتیجه کاهش قابل توجه زمان و هزینه آزمایشات می شود و زمینه انجام سریع و ارزان PND را فراهم می کند.

### تقدیر و تشکر

بدینوسیله از زحمات معاونت محترم آموزشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان، ریاست محترم سازمان مدیریت و برنامه ریزی استان لرستان جناب آقای رستمی و معاونت پژوهشی آن سازمان جناب آقای جزیری به جهت تامین اعتبار مالی پروژه و همچنین جناب آقای دکتر گلشن ناظر فنی طرح، آقای محمد جواد طراح (مشاور آماری)، پرسنل محترم آزمایشگاه ژنتیک، دکتر زینلی، و کلیه عزیزانی که ما را در انجام این طرح یاری کرده اند، قدردانی می کنیم.

### References

- Lee GR, Forester J, Lukens J, Paraskovas F, Greer JP, Rodgers GM. The Wintrobe's Clinic Hematology. Vol 1, 10th ed. Baltimore, Lippincott, Williams and

را قوت می بخشد. مطالعات انجام شده در کشور موید این مطلب است (۱، ۲، ۳، ۴).

در مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعات مشابهی که در سایر مناطق ایران و جهان حاصل شده است نتایج جالبی به دست آمد: همان طور که ذکر شد بیشترین شیوع جهش در استان لرستان متعلق به جهش های C36-37 (۳۳/۸۴ درصد) و IVSII-I (۲۷/۶۹ درصد) است. جالب آن که جهش C36-37 شیوع بسیار کمی در سایر مناطق مطالعه شده ایران (به خصوص در استان های غرب و جنوب غرب کشور) و جهان دارد. این جهش با شیوع ۱۱ درصدی در فلسطین (۱۰) و با میزان بسیار کم (Rare) در ترکیه (۱۱) گزارش شده است.

G->A، IVS-II-1، شایع ترین جهش بتا تالاسمی در ایران است، اما شیوع آن در شمال کشور بیش از سایر مناطق است. در حالی که G->C، IVS-I-5، بیشترین موتاسیون جنوب و جنوب شرقی ایران را تشکیل می دهد. نکته جالب این که IVS-25 bp deletion شایع ترین موتاسیون استان بوشهر است و این استان از نظر شیوع این جهش، منحصر به فرد است. این در حالی است که جهش های شایع استان تهران G->A، IVS-II-1؛ استان فارس (G% C) IVS-I-5 (۳)، استان های سیستان و بلوچستان (G% C) IVS-I-5، بوشهر 25 bp deletion، خوزستان G->A، IVS-I-1 (ارایه شده در کنگره بین المللی تالاسمی و هموگلوبینوپاتی Malat, ۱۹۹۷) و استان هرمزگان (IVS-I-5) (۱۲) است.

جدول ۲: انواع جهش های کشف شده در استان های مختلف ایران (ارایه شده در کنگره بین المللی تالاسمی و هموگلوبینوپاتی، Malat, ۱۹۹۷)

Allele	خوزستان	بوشهر	سیستان و بلوچستان	تهران
Codon 5, -CT		۵		۹
Codons 8/9, -AA	۳۶	۱۸	۱۳	۶۸
Codon 30, G->C		۷		۱۰
IVS-I-1, G->C	۴۸	۱۸	۱۴	۴۸
IVS-I-5, G->C	۱۸	۱۶	۱۱۰	۵۳
IVS-I-6, T->C	۲۲	۳	۶	۱۳
IVS-I-110, G->A	۳۵	۱۲	۱۹	۵۰
Codon 39, C->T		۷		
Codon 44, -C				۱
IVS-II-1, G->A	۲۵	۲۸		۲۷۱
IVS-II-745, G-C		۷		۵
25 bp deletion		۴۹		
Unknown; others	۲۴	۳۴	۷	۱۱۰
جمع	۲۰۸	۲۰۴	۱۶۹	۶۳۸

به علاوه جهش های شایع کشورهای همسایه نیز نمایی متفاوت با جهش های شایع لرستان دارند. جهش های شایع ترکیه (۱۳۹) کروموزوم

Wilkins; 1999

- Najmabadi H, Karimi-Nejad R, Sahebjam S, Pourfarzad F, Teimourian S, Sahebjam F, Amirzadeh N, Karimi-Nejad MH. The beta-thalassemia mutation

- spectrum in the Iranian population, *Hemoglobin* 2001; 25(3): 285-296
3. Mahboudi F, Zeinali S, Merat A, Delmaghani S, Mostafavipour K, Moghaddam Z, Haghshenas M. The molecular basis of  $\beta$ thalassemia mutation in Fars province, Iran, *Iran J Med Sci* 1996; 21(3&4): 104
  4. Samavat A, Modell B. Iranian national thalassaemia screening programme *BMJ*, *Hemoglobin*. 2002; 26(2): 147-154
  5. Merat A, Haghshenas M, Pour Z.  $\beta$ thalassemia in southwestern Iran, *Hemoglobin* 1993; 17(5): 427-437
  6. Noori-Dalooi M, Moazami N, Farhangi S.  $\beta$  thalassaemia in Iran: a high incidence of the nonsense codon 39 mutation on the island of Queshm, *Hemoglobin* 1994; 18(6): 449-453
  7. Karimi M, Yarmohammadi H, Farjadian S, Zeinali S, Moghaddam Z, Cappellini MD, Giordano PC. Beta-thalassaemia intermedia from southern Iran: IVS-II-1 (G $\rightarrow$ A) is the prevalent thalassaemia intermedia allele, *Hemoglobin*, 2002; 26(2): 147-154
  8. Goossens M, Kan YW. DNA analysis in the diagnosis of hemoglobin disorders, *Methods Enzymol* 1998; 76: 805-817
  9. Old J, Varawalla N, Weatherall D. Rapid detection and prenatal diagnosis of beta thalassaemia: studies in Indian and Cypriot populations in the U.K. *Lancet* 1990; 336: 834-837
  10. El-Latif MA, Filon D, Rund D, Oppenheim A, Kanaan M. The beta $^{+}$ -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) mutation accounts for half of the thalassaemia chromosomes in the Palestinian populations of the mountain regions, *Hemoglobin*. 2002; 26(1): 33-40
  11. Tadmouri GO, Tuzmen S, Basak AN. Rare beta-thalassaemia mutation in a Turkish patient, FSC-36/37 (-T). *Hum Biol*. 1997; 69(2): 263-267
  12. Yavarian M, Hartevelde CL, Batelaan D, Bernini LF, Giordano PC. Molecular spectrum of beta-thalassaemia in the Iranian Province of Hormozgan, *Hemoglobin*. 2001; 25(1): 35-43
  13. EO Atalay, B.Cirakoglu, G Dincolc, A Atalaty. Regional distribution of beta thalassaemia mutation in Turkey, *International journal of hematology*, 1993; 57: 207-211
  14. Khan SN, Riazuddin S. Molecular characterization of beta-thalassaemia in Pakistan, *Hemoglobin*. 1998; 22(4): 333-345
  15. Stefanis L, Kanavakis E, Traeger-Synodinos J. hematologic phenotype of the mutations IOVS-1-n6(T-C) in carriers of  $\beta$  thalassaemia in Greece, *Pediatr Hematol Oncol* 1994; 11(5): 509-517
  16. Kattamis C, Hu H, Cheng G, Reese AL, Gonzalez-Redondo JM, Kutlar A, Kutlar F, Huisman TH. Molecular characterization of beta-thalassaemia in 174 Greek patients with thalassaemia major, *Br J Haematol*. 1990 Mar; 74(3): 342-346
  17. Sozuoz A, Berkalp A, Figus A, Loi A, Pirastu M, Cao A. Beta thalassaemia mutations in Turkish Cypriots, *J Med Genet*. 1988; 25(11): 766-768
  18. Hussein I, Temtamy S, el-beshlawy A. Molecular Characterization of Beta thalassaemia in Egyptians, *Hum-Mutat* 1993; 2(1): 48-52
  19. Sadiq M, Huisma T. Molecular characterization of Beta thalassaemia in north Jordan, *Hemoglobin* 1994; 18: 325-332
  20. el-Hazmi MA, Warsy AS, al-Swailem AR. The frequency of 14 beta-thalassaemia mutations in the Arab populations, *Hemoglobin*. 1995; 19(6): 353-360
  21. Adekile AD, Gu LH, Baysal E, Haider MZ, al-Fuzae L, Aboobacker KC, al-Rashied A, Huisman TH. Molecular characterization of alpha-thalassaemia determinants, beta-thalassaemia alleles, and beta S haplotypes among Kuwaiti Arabs, *Acta Haematol*. 1994; 92(4): 176-181
  22. Colah R, Nadkarni A, Gorakshakar A, Phanasaonkar S, Surve R, Subramaniam PG. Impact of beta globin gene mutations on the clinical phenotype of beta thalassaemia in India, *Blood Cells Mol Dis*. 2004; 33(2): 153-157