مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۰ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۷ صفحات ۳۶-۳۳

بررسی پراکندگی جهش های بتاتالاسمی شمالغرب کشور

دکتر محمدعلی حسینپورفیضی: گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز: نویسنده رابط
E-mail: pourfeizi@eastp
دکتر عباسعلی حسینپورفیضی: گروه هماتولوژی انکولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
ناصر پولادی: گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم آذربایجان
مهدی حقی: گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز
پروین آذرفام: گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز

دریافت: ۸۶/۷/۱۸، **پذیرش**: ۸۷/۱/۳۱

چکیده

زمینه واهداف: بتا تالاسمی، اختلال توارثی همراه با کاهش یا عدم تولید زنجیره بتاگلوبین میباشد. هدف از این مطالعه شناسایی جهش های شایع ونادر بتاتالاسمی در شمالغرب کشورمان می باشد. این امر در تشخیص قبل از تولد این بیماری مفید خواهد بود.

روش بررسی: یکصد بیمار غیر فامیل از استانهای آذربایجان شرقی و اردبیل که با روشهای بالینی به عنوان بیماران بتاتالاسمی شناخته شده بودند،انتخاب شدند که شامل ۲۰۰ کروموزوم می باشند.جهش این کروموزومها توسط روشهای PCR-ARMS وتعیین توالی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: هفده نوع جهش مختلف در این منطقه شناسایی گردید که جمعا" ٪۹۵ کل کروموزومهای مورد مطالعه را شامل می شوند. جهش (IVS-II-1 (G→A با ۲۱٪ ، بیشترین فراوانی را دارا بود. سایر جهش هاعبارتند از :
IVS-I-110 (G→A) 18%, FSC-8/9 (+G) 14.5%, FSC-8 (-AA) 8%, IVS-I-1 (G→A) 7.5%, IVS-I-5 (G→C), FSC 44 (–C), Codon 15 (TG*G*→TG*A*), FSC 5 (–CT), IVS-I-6 (TC), IVS-II-848 (C→A), FSC 36/37 (–T), –28 (A→C), FSC 25/26 (+T), IVS-II-745 (C→G), FSC 16 (–C) و IVS-I-25 (–25 bp del).
جهش در ۵٪ کروموزومها ناشناخته باقی ماند.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که شباهت ها و تفاوت هایی بین این منطقه با سایر مناطق ایران و کشورهای همسایه وجود دارد. این مطالعه جامعترین مطالعه در زمینه جهش های بتاتالاسی شمالغرب کشور می باشد و می توا ند در تشخیص قبل از تولد بیماری بتاتالاسمی در شمالغرب کشور بسیار سودمند باشد .

کلید واژه ها: بتاتالاسمی، جهش، اتوزومی

مقدمه

بتاتالاسمی، اختلالی رایج با توارث اتوزومی مغلوب می باشد که در ا ثر بیش از ۲۰۰ نوع جهش مختلف در ژن بتاگلوبین ایجاد می شود و منجر به کاهش تولید زنجیره بتاگلوبین (β^+–تالاسمی) یا عدم تولید آن (β^o– تالاسمی) می شود. بیش از ۹۵٪ کل جهش های بتاتالاسمی در جهان ا ز نوع جهش های نقطه ای و در صد کمی نیز از نوع حذف ژنی می باشند (۱) .

پراکندگی اللهای بتاتالاسمی در جهان تصادفی نیست وهر جمیعت وقومی الل ها و پراکندگی جهش های ویژه خود را دارد که شامل تعداد کمی از جهش های شایع که درصد زیادی را شامل می شوند وتعداد زیادی جهش نادر که درصد کمتری از کل جهش های هر جمعیت را شامل می شوند(۲). ایران، یکی از کشورهای بزرگ خاورمیانه است ومانند سایر کشورهای منطقه دارای تعداد زیادی بیمار مبتلا به بتاتالاسمی است. اقوام مختلفی درایران زندگی می کنند و مقایسه برخی استانهای مختلف در ایران نشان دهنده تنوع واختلاف در طیف جهش های بتاتالاسمی می باشد(۵–۳). منطقه آذربایجان دارای سابقه تاریخی طولانی می باشد که مهاجرت و لشکرکشی های زیادی به این منطقه شده است. همچنین درمسیر جاده باستانی ابریشم قرار گرفته است که منطقه گزیان چین تا شبه قاره هند وایران به ترکیه را شامل می شود. با وجود مطالعات مختلف در مناطق مختلف ایران (۵–۳)، اطلاعات

Archive of SID
www.SID.ir

جامعی از جهش های منطقه‌ی شما لغرب کشور در دسترس نمی باشد. بنابراین بررسی جهش ها ی شایع و نادر در منطقه ی شما لغرب کشور می تواند کمک موثری در شناسایی این جهش ها و استفاده آن در تشخیص های قبل از تولد بیما ری بتاتالاسمی داشته باشد.

موارد و روش ها

یکصد بیمار غیر فامیل مبتلا به تالاسمی ماژور از استا نهای آذربا یجان شرقی و ارد بیل انتخاب شده ، نمونه خون محیطی آنها در ظروف حاوی ماده ضد انعقادEDTA جمع آوری شده، DNA با روش نمک اشباع، از گلبولهای سفید استخراج گردید.

جهش هایی که قبلا در جمعیت ایران (۵-۳)، ترکیه (۷)، و جمهوری آذر بایجان(۸) بصورت شایع مشاهده شده بودند بوسیله روش PCR-ARMS مطالعه گردیدند این جهش ها عبارتند از :

IVS-II-1 (G→A), IVS-I-110 (G→A), FSC 8 (–AA), IVS-I-6 (T→C), IVS-II-745 (C→G), IVS-I-1 (G→A), IVS-I-5 (G→C), FSC 8/9 (+G).

نمونه هایی که با روش PCR- ARMS جهشی را نشان ندادند، برای تعین توالی انتخاب شدند. دو ناحیه از ژن بتاگلوبین تکثیر داده شد. اولین ناحیه با طول ۷۱۹ جفت باز، که از نوکلئوتید ۱۵۸- پروموتر تا نوکلئوتید ۶۵ از ایترون II ژن بتاگلوبین را شامل می شد که توسط پرایمر رفت ('CTGAGGGTTTGAAAGTCCAACTCC-3-'۵) و پرایمر برگشت (CTGTACCCTGTTACTTCTCCCCTCC-3-'۵) تکثیر داده شد. دومین ناحیه با طول ۵۳۶ جفت باز، از نوکلئوتید ۶۱۷ از ایترون II تا نوکلئوتید ۱۷۶ از منطقه UTR- '۳ ژن بتاگلوبین را شامل می شد که توسط پرایمر رفت ('ATGTATCATGCCTCTTTGCCACC-3-'۵) و پرایمر برگشت ('GCACTGACCTCCCACATTCC-3-'۵) تکثیر داده شد .

قطعات تکثیر داده شده جهت تعیین توالی با دستگاه مدل ABI3730XL به شرکت فزا بیوتک فرستاده شد.
(http://www.fazabiotech.com).

یا فته ها

از ۱۶۴ بیمار مربوط به ۱۴۱ خانواده ی مبتلا به بتاتالاسمی، ۲۳ نفر بدلیل خواهر و برادر بودن کنار گذاشته شدند (۱۹نفر از ۱۹ خانواده که دارای دو برادر یا خواهر مبتلا بودند و۴ نفر از دو خانواده که دارای سه برادر یا خواهر مبتلا بودند) بنابراین ۱۴۱ بیمار از ۱۴۱ خانواده ی غیر فامیل انتخاب گردیدند (۸۶ بیمار از استان آذربایجان شرقی و ۵۵ بیمار از استان اردبیل) که از این گروه ۲۹ بیمار به دلیل عدم رضایت و ۱۲ بیمار به دلیل عدم استخراج DNA از نمونه بیماران کنار گذاشته شدند. در نهایت ۱۰۰ بیمار غیر فامیل (شامل ۲۰۰ کروموزوم) در این مطالعه شرکت کردند که اطلاعات پرسشنامه‌ای بیماران جدول۱ آورده شده است. هفده نوع جهش مختلف که پنج نوع جهش اول به عنوان جهش های شایع منطقه (۶۹٪) و دوازده نوع جهش نادر(۲۶٪) شناسایی گردید. هفت نوع جهش از نوع β^o (۶۶/۵٪) و شش نوع جهش از نوع β^+ (۲۸/۵٪) بودند(جدول۲). ۵ درصدجهش ها که شامل ۱۰کروموزوم از ۵ بیمار بود با روش PCR-ARMS جهشی را نشان نداده بودند، به دلیل نا کافی بودن نمونه DNA ، تعیین توالی نگردیده و نا شناخته باقی ماندند.

جدول ۱: اطلاعات پرسشنامه‌ای بیماران

مشخصات پرسشنامه‌ای بیماران	درصد
داشتن والدین فامیل	٪۷۳
داشتن والدین غیر فامیل	٪۲۷
بیماران مذکر	٪۵۲
بیماران مونث	٪۴۸
بیماران بالای ۱۵سال	٪۱۱
بیماران زیر ۱۵ سال	٪۸۹

بحث

در دهه های اخیر جهش های بتاتالاسمی در مناطق مختلف کشور گزارش شده است (۵-۳) که این مطالعه جامعتر ین آنها در منطقه شمال غرب کشور می باشد. در این پژوهش که ۱۷ نوع جهش مختلف گزارش شده است که تفاوتهایی را با فراوانی جهش های کل ایران وکشورهای همسایه نشان می دهد (جدول۲)

جهش IVS-II-1(G→A) در ایران (۳۳/۹٪)(۵)و جمهوری آذربایجان (۲۱٪) (۸) شایع است . این جهش مدیترانه ای در ایران نسبت به ترکیه فراوانی بیشتری دارد و یک کاهش در فراوانی از سمت شرق به غرب، میتواند نشان دهنده این موضوع باشد که ایران منشاء این جهش است (۵ و ۷ و ۸ و ۱۰ و ۱۱) .

جهش IVS-I-110(G→A) که موجب β^+ تالاسمی شدید می شود یکی از شایعترین آلل های بتاتالاسمی در کشورهای مدیترانه ای، بویژه قبرس می باشد (۷و۱۲و۱۳) ودر هندوستان (۱۴) و پاکستان (۱۵) نادر است. این جهش در جنوب ایران گزارش نشده است (۴) و در سایر مناطق ایران با فراوانی پایین (۴/۸٪) گزارش شده است (۵) و به نظر می رسد در منطقه مورد مطالعه بیشترین فراوانی را دارد (۱۸٪).

جهش FSC8/9(+G) که یک نوع جهش β^o هندی – آسیایی است، در هندوستان (۱۴) و پاکستان(۱۵) و شرق ایران (۵) شایع بوده، ولی در مناطق مدیترانه ای(۱۲)، ترکیه(۷) و جمهوری آذربایجان(۸) نادر است. وجود این جهش در منطقه مورد مطالعه ما ممکن است به دلیل ارتباط تجاری با شرق به واسطه جاده ابریشم ویا حمله مغول یا تاتارها باشد. مراغه که در این منطقه قرار دارد، پایتخت سلسله ایلخانیان مغول بوده است. از طرف دیگر ممکن است این جهش دارای منشاء آذری – کردی باشد (۱۶) که به سایر مناطق در زمانی که بین قرون ۱۰ تا ۱۸ میلادی شبه قاره هند تحت نفوذ ایرانیان بوده است، گسترش یافته باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: فراوانی جهش های مطالعه شده درمنطقه مورد مطالعه و مناطق اطراف آن

انواع جهش‌ها	نوع بتاتالاسمی	دراین مطالعه	جمهوری آذربایجان(۸)	ایران (۵)	ترکیه(۷)
IVS-II-1 (G→A)	β^0	۲۱	۲/۲۱	۹/۳۳	۷/۴
IVS-I-110 (G→A)	β^+	۱۸	۲/۲۰	۸/۴	۳/۳۹
FSC 8/9 (+G)	β^0	۵/۱۴	۲	۸/۴	۳/۱
FSC 8 (–AA)	β^0	۸	۲/۲۱	۵/۴	۵/۵
IVS-I-1 (G→A)	β^0	۵/۷	۲	۹/۲	۵
IVS-I-5 (G→C)	β^+	۵/۴	۱	۶/۷	۱/۱
FSC 44 (–C)	β^0	۴	۱/۳	۶/۲	۳/۱
Codon 15 (TG*G*→TG*A*)	β^0	۵/۳	–	–	۱/۰
FSC 5 (–CT)	β^0	۵/۳	–	۷/۰	۲/۲
IVS-I-6 (T→C)	β^+	۲	۱/۷	۱/۱	۱/۱۰
IVS-II-848 (C→A)	β^+	۲	–	–	۴/۰
FSC 36/37 (–T)	β^0	۲	۲	۹/۲	۱/۰
–28 (A→C)	β^+	۱	–	–	۱/۰
FSC 25/26 (+T)	β^0	۱	–	–	–
IVS-II-745 (C→G)	β^+	۱	۱/۳	۱/۲	۵
FSC 16 (–C)	β^0	۱	۲	۴/۰	–
IVS-I-25 (25 bp deletion)	β^0	۵/۰	–	۷/۲	–
سایر جهش ها	–		۱/۱۵	۹/۹	۷/۱۴
ناشناخته		۵	–	۱/۱۹	۱/۹
کل (٪)		۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

حذف دو جفت بازی در کدون ۸ به نام جهش (FSC8(-AA، اولین بار در یک بیمار ترکیه ای گزارش شده بود (۱۷) که در منطقه مورد مطالعه ما نیز شایع است (۸٪) این جهش همچنین در کشورهای همسایه شمالی یعنی جمهوری آذربایجان (۲۱٪)(۸) و روسیه(۱۲) شایع است.در ایران نیز به طور متوسط ۴/۵٪ گزارش شده است(۵).

جهش (IVS-I-1(G→A، در بیشتر مناطق مدیترانه ای، خاورمیانه وآسیا وجود دارد(۱۲) ولی بیشترین فراوانی با ۵۵٪ در جنوب اسپانیا گزارش شده است (۱۸). نتایج این پژوهش نشان داده است که در شمال غرب ایران، این جهش با فراوانی ۷/۵٪ شایع می باشد. جهش Codon 15 (TG*G*→TG*A*) اولین بار در شمال لیسبون گزارش شده است ودر پرتغال نیز شایع است (۱۹).

جهش نادر (FSC25/26(+T، برای اولین باردرتونس گزارش شده است که به صورت هتروزیگوت ترکیبی با HbS بود(۲۰). در این طرح، جهش ذکرشده بصورت هموزیگوت دریک خانواده مشاهده و گزارش شده است.

جهش IVS-I-25 (25 bp deletion) درخاور میانه فراوان دیده شده است. بویژه در بحرین (۲۱)که جزیره ای درجنوب خلیج فارس است و همچنین دراستان بوشهر(۲۲)که در شمال خلیج فارس قرار گرفته است.

از ۱۷ جهش گزارش شده هفت جهش:
IVS-I-110 (G→A), FSC-8 (-AA), IVS-I-1 (G→A) Cd15 (TGG→TGA), IVS-I-6 (T→C), FSC-25/26 (+T), IVS-II-745 (C→G),
در مجموع با فراوانی ۴۱٪از نوع مدیترانه ای هستند.

شش جهش شامل:
IVS-II-1(G→A), FSC-44(-C), FSC-5(-CT), IVS-II-848(C→A), FSC-36/37(-T), -28 (A→C)
در مجموع با فراوانی ۳۳/۵٪ از نوع ایرانی – کردی می باشند .

چهار نوع جهش :
FSC-8/9 (+G), IVS-I-5 (G→C), FSC-16 (-C), IVS-I-25 (-25bp del) در مجموع با ۲۰/۵٪ از نوع هندی – آسیایی است.

در ۵ بیمار (۱۰ کروموزوم) که با روش PCR –ARMS جهشی را نشان نداده بودند به دلیل فقدان نمونه DNA کافی در مرحله تعیین توالی، جهش آنها نا شناخته باقی ماند.

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان دهنده فراوانی جهش های این منطقه با طیف متنوعی می باشد که میتواند به دلیل تاثیر مهاجرت باشد. نتایج نیز تفاوت هایی را با سایر مناطق ایران و حتی کشور های همسایه نشان می دهد (جدول۲).

این نتایج می تواند برای تشخیص جهش های بتا تالاسمی، که در مشاوره و تشخیص قبل از تولد در این منطقه بسیار سودمند و لازم است، مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

ما از تمام بیماران و خانواده های ایشان جهت همکاری در این پژوهش سپاسگزاریم، از خانم فاطمه خدایی، جهت تایپ این مقاله تشکر می نماییم. این پژوهش از نظر مالی توسط دانشگاه تبریز مورد حمایت واقع شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG. *The hemoglobinopathies*. In: Scriver CR. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. New York, McGraw-Hill. 2001; 4571-4636.
2. Kazazian HH, Boehm CD. Molecular basis and prenatal diagnosis of β-thalassemia. *Blood* 1988; **72** (4): 1107-1116.
3. Merat A, Haghshenas M, Mostafavi Pour Z, Plonczynski MW, Harrell AN, Coleman MB, et al. β – thalassemia in southwestern Iran. *Hemoglobin* 1993; **17** (5): 427-437.
4. Yavarian M, Harteveld CL, Batelaan D, Bernini LF, Giordano PC. Molecular spectrum of beta-thalassemhan in the Iranian Province of Hormozgan. *Hemoglobin* 2001; **25** (1): 35-34.
5. Najmabadi H, Karimi-Nejad R, Sahebjam S, Pourfarzad F, Teimourian S, Sahebjam F, et al. The β – thalassemia mutation spectrum in the Iranian population. *Hemoglobin* 2005; **25** (3): 285 – 296.
6. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acids Res* 1988; **16** (3): 1215-1216.
7. Tadmouri GO, Tuzmen S, Ozcelik H, Ozer A, Baig SM, Senga EB,et al. Molecular and population genetic analyses of β–thalassemia in Turkey. *A. J. Hematol* 1998; 57 (3): 215-220.
8. Curuk MA, Yuregir GT, Asadov CD, Dadassova T, Gu L, Baysal E, et al. Molecular characterization of β-thalassemia in Azerbaijan, *Hum. Genet* 1992; **90** (4): 417-419.
9. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N,et al. Analysis of any point mutation in DNA. *Nucleic Acids Res* 1989; **17** (7): 2503-2516.
10. Al-Allawi NAS, Jubrael JMS, Hughson M. Molecular Characterization of β Thalassemia in the Dohuk Region of Iraq. *Hemoglobin* 2006; **30** (4): 479-486.
11. Zahed L. The spectrum of β-thalassemia mutations in the Arab populations, *J Biomed. Biotechnol* 2001; **1** (3): 129-132.
12. Globin Gene Server. Pennsylvania State University. http://www.globin.cse.psu.edu/
13. Baysal E, Indrak K, Bozkurt G, Ariktan A, Old JM, Ioan-nou P, et al. The β-thalassemia mutationsin the population of Cyprus. *Br. J. Haematol* 1992; **81** (4): 607-609
14. Chakrabarti P, Gurpta R, Mishra A, Rai M, Singh VP, Dash D. Spectrum of β - thalassemia mutation in North Indian State. A β - thalassemia trait with two mutations in cis. *Clinical Biochemistry* 2005; **38** (6): 576-578.
15. Suhaib A, Petrou M, Saleem M. Molecular genetics of β - thalassemia in Pakistan: a basis for prenatal diagnoses. *Br. J. Haematol* 1996; **94** (3): 476-482.
16. Kazazian HH. The thalassemia syndrome: Molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Seminars in Hematology* 1990; 27 (3): 209-228.
17. Orkin SH, Goff SC. Nonsense and frameshift mutations in beta 0-thalassemia detected in cloned beta-globin genes. *J. Biol. Chem* 1981; **256** (19): 9782-9784.
18. Benito A, Villegas A, Perez-Cano R, Bernal R. Beta-thalassaemia in south-western Spain: high frequency of G→A (IVS I-1) mutation, *Br. J. Haematol* 1996**; 92** (2): 336-338.
19. Tamagnini GP, Goncalves P, Ribeiro ML, Kaeda J, Kutlar F, Baysal E, et al. Beta-thalassemia mutations in the Portuguese; high frequencies of two alleles in restricted populations. *Hemoglobin* 1993; **17** (1): 31-40.
20. Fattoum S, Guemira F, Oner C, Oner R, Li HW, Kutlar F, et al. Beta-thalassemia, HB S-beta-thalassemia and sickle cell anemia among Tunisians. *Hemoglobin* 1991; **15** (1&2): 11-21.
21. Jassim N, Merghoub T, Pascaud O, al Mukharraq H, Ducrocq R, Labie D, et al. Molecular basis of beta-thalassemia in Bahrain: an epicenter for a Middle East specific mutation. *Ann N Y Acad Sci* 1998; **850** (1): 407-409.
22. Khodaie H, Zeinali S, Dilmaghani S, Moghaddam ZK, Sarhadi M, Golbari R, et al. β -Globin gene mutations among β -thalassemic patients from Boushehr Province in south of Iran. In: Felice AE, ed. Book of Abstracts, Abstract 30. *Proceedings of the 6th International Conference on Thalassaemia and Haemoglobinopathies*, University of Malta, 1997; 5-10.

Archive of SID

www.SID.ir