Archive of SID

مقدمه

بتاتالاسمی یکی از شایعترین بیماریهای ژنتیکی در سطح جهان است. حدود ۳۵٪ مردم جهان یعنی ۱۵۰ میلیون نفر حامل موتاسیون ژن هستند (۱) و تاکنون بیش از ۱۹۰ نوع موتاسیون مختلف ایجادکننده بتاتالاسمی در دنیا شناسایی شده است. بتاتالاسمی از مشکلات مهم در سطح ایران بوده و پیش‌بینی می‌شود که حدود دو میلیون حامل ژن این بیماری در ایران زندگی کنند (۳). جدا کردن زوجهایی که حامل ژن باشند، درحال حاضر توسط مرکز مشاورهٔ تالاسمی در کشور انجام می‌شود، ولی با توجه به فرهنگ خاص مردم در مورد ازدواج این روش به تنهایی نمی‌تواند در پیشگیری بیماری کاملاً مؤثر باشد. به نظر می‌رسد که تشخیص قبل از تولد بیماری در جنین این زوجها می‌تواند در کنترل این مسألهٔ مهم بهداشتی و اجتماعی به ما کمک بیشتری کند که لازمهٔ آن در ابتدا تعیین موتاسیونهای شایع و غیرشایع هر منطقهٔ خاص نژادی یا قومی است.

نحوهٔ گسترش و انواع موتاسیونهای تالاسمی در میان مردم جهان و نژادهای مختلف آن مدتهاست که تقریباً انجام شده و یا در حال انجام است. در ایران نیز با توجه به این که گروههای نژادی و قومی متفاوتی زندگی می‌کنند و در نقاط مختلف پراکنده شده‌اند، حتماً گوناگونی موتاسیونهای ژن تالاسمی، هم زیاد و هم پراکنده‌تر است؛ لذا تعیین شیوع و پراکندگی این موتاسیونها در نقاط مختلف کشور امری الزامی می‌نماید و البته در بیشتر استانهای کشور نیز به انجام رسیده است.

در این پژوهش که بر روی بیماران تالاسمی ماژور مراجعه‌کننده به مرکز تالاسمی انجام شد، هدف ما تعیین موتاسیونهای شایع در استان کردستان بود؛ بدین منظورکه بتوانیم تشخیص قبل از تولد را در جنینهای در معرض خطر با هزینهٔ کمتر و در زمان سریعتری انجام دهیم تا علاوه بر جلوگیری از افزایش بیماران تالاسمی، از نظر اقتصادی و فرهنگی و مهمتر از همهٔ این موارد از نظر انسانی بتوان در این زمینه برنامه ریزی نمود.

مواد و روشها

پس از تکمیل مشاورهٔ ژنتیک و ثبت اطلاعات هماتولوژیک از بیماران، نمونهٔ خون آنها جمع‌آوری شد و آنالیز ملکولی جهت تعیین موتاسیونهای شایع منطقه در مرکز ژنتیک دانشکده علوم بهزیستی و توانبخشی طبق مراحل زیر روی آنها به انجام رسید.

- استخراج DNA: نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی EDTA بعنوان ضدانقعاد جمع‌آوری، و ژنوم DNA از ۵ـ۱۰cc خون بیمار با روش پروتئیناز k با افزودن محلولهای SDS, TES و پروتئیناز k و ایزوپروپانل الکل، خالص و بعد جدا شد. پس از خشک کردن DNA با الکل اتانل سرد ۷۰٪، نمونه‌ها با محلول نگهدارنده بافر TE جهت مرحلهٔ PCR آماده شدند.
- In Vitro Amplification (PCR): در این مرحله رشته‌های DNA استخراج شده از هم باز شدند و از هر رشته دو رشته مشابه ساخته می‌شد؛ یعنی ژن بتاگلوبین کاملاً تکثیر یافت. جهت تعیین ژنوتیپ β گلوبین نمونه انجام شده بایستی پاترن رنگ گرفته Test strip را با استفاده از Decoder Table یا حالت مشابه آن تطابق داده و موتاسیون را معلوم نمود. اگر فقط Wilde Type باشد ژنوتیپ نرمال، اگر wilde و Mutant باشد هتروزیگوت حامل و چنانچه فقط موتانت باشد، هموزیگوت موتانت بوده و شخص گرفتار است.

بیماران ما در گروه سوم بودند و با استفاده از این روش موتاسیون آنها مشخص گردید که در زیر خلاصه‌وار ارائه می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

یافته‌ها

موتاسیونهای بتاتالاسمی در کشور ایران بیش از انواع جهشهای منطقه و مشابه کشورهایی چون ترکیه، عراق، هند، پاکستان، حاشیهٔ جنوب خلیج فارس و سایر کشورهای مدیترانه‌ای و حتی خاور دور است. تاکنون در ایران حدود ۲۰ نوع جهش شایع شناسایی شده که در مطالعهٔ ما نیز این دستهٔ شایع مورد بررسی قرار گرفتند.

در این تحقیق ابتدا ۳۵ بیمار مبتلا به تالاسمی ماژور که تحت پوشش مرکز تالاسمی شهر سنندج بودند، انتخاب شدند. با توجه با این‌که بعداً از مطالعه خارج شدند، ٦٦ کروموزوم از بیماران باقیمانده مورد مطالعه قرار گرفت. از این تعداد ۷۸/۷۹٪ موتاسیونهای به‌دست آمده از این کروموزومها جزو جهش‌های شایع در ایران بودند؛ اما ۲۱/۲۱٪ از آنها چون جزو موتاسیونهای شایع نبودند، شناسایی نشدند و بعنوان ناشناخته باقی ماندند.

از موتاسیونهای شناسایی شده، جهش IVSII-I با فراوانی ۳۱/۸۱٪ شایعترین موتاسیون در مطالعه ما بود (جدول ۱). Codon 8/9 با فراوانی ۱۳/٦٪ دومین جهش شایع و سایر جهش‌ها با درصدهای کمتر در رده‌های بعد قرار گرفتند.

در این بررسی سطح Hb و Hct و MCV نیز در رابطه با موتاسیونهای به‌دست آمده مورد مطالعه قرار گرفت و درنهایت رابطهٔ معنی‌داری میان آنها و جهش‌های مختلف دیده نشد؛ در حالی‌که در مطالعهٔ دکتر نجم آبادی و همکارانش موتاسیون Codon 37/36 نسبت به بقیه، Hb و Hct بالاتری داشته‌اند و MCV در Codon 22 پایین‌ترین مقدار را نسبت به بقیه دارا بوده‌اند.

جدول ۱) توزیع فراوانی جهشهای یافت شده در بیماران مبتلا به تالاسمی سنندج

موتاسیون	فراوانی	درصد
IvsII-I	۲۱	۳۱/۸۱
Codon 8/9	۹	۱۳/۶۲
IVSI-I	۸	۱۲/۱۰
Codon 8	۴	۶/۰۶
Codon 39	۳	۴/۵۵
Codon 44	۳	۴/۵۵
Codon 36/37	۱	۱/۵۲
Ivs 1-110	۱	۱/۵۲
Ivs 1-6	۱	۱/۵۲
Ivs 1-5	۱	۱/۵۲
Unknown	۱۴	۲۱/۱۲
Total	۶۶	۱۰۰

بحث

هدف این مطالعه بررسی جهش‌های شایع ژن بتاتالاسمی در کردستان و مقایسه آن با سایر مناطق ایران و جهان بود که تاکنون مورد شناسائی قرار نگرفته بودند.

در این مطالعه موتاسیون IVSII-I که در ترجمه mRNA دخالت داشته و آلل °B ایجاد می‌کند، با شیوع ۳۱/۸۱٪ شایعترین جهش ژنی به‌دست آمده بود. در تحقیقات دکتر نجم‌آبادی این موتاسیون در اغلب استانها با حدود ۳۰٪ شیوع، جزو شایعترین جهش‌ها بودند. البته این موتاسیون در شمال کشور نیز مانند کردستان شایعترین موتاسیون بود (۳۰٪) و در مطالعهٔ Curuk در جمهوری آذربایجان و مطالعات الجزایر هم جزو ژنهای شایع بوده است (٦). Codon 8/9 با ۱۳/٦۳٪ دومین ژن شایع در این تحقیق محسوب می‌شد و در کشور الجزایر با میزان شیوع ۲٦٪ شایعترین موتاسیون بوده است (٦).

موتاسیون IVSI-I نیز که آلل °B ایجاد می‌کند، در این مطالعه با ۱۲/۱٪ در میان جهش‌های شایع در مقام سوم قرار گرفت. این موتاسیون در مصر با شیوع ۱۳٪ از جهش‌های شایع بوده و در الجزایر ۱٤٪ و در عربستان ۵٪ شیوع داشته است. همچنین در خوزستان شایعترین موتاسیون بوده و در استان چهار محال و بختیاری نیز جزو شایعترین موتاسیونها بوده است (۵).

www.SID.ir

Archive of SID

Codon 44 در این مرکز شیوع ٤/٥٥ درصد داشته ولی در مطالعه Rund و همکاران در سال ۱۹۹۰ بر روی بیماران تالاسمی که از یهودیان کرد بوده‌اند شایعترین جهش میباشد که معادل ۲۱ نفر از ۷۱ نفر مورد مطالعه بوده است (۱۳).

Codon 39 در بررسی Bonhass و همکاران در الجزایر شیوع بسیار بالائی داشته در ساردینا با شیوع ۹۷/۵ درصد شایعترین جهش بوده است. در جزیره قشم طی بررسی نوری ـ دلوئی با ٦۱٪ شایعترین ژن بوده و در عربستان درصدی معادل ٦/۷ داشته است (۷) در خوزستان ۱۷/۳ شیوع داشته و در اسپانیا با ٦٤٪ شایعترین موتاسیون بوده است (۱۲) اما در مطالعه ما در کردستان با شیوع ٤/٥٥٪ در رده پنجم قرار می‌گیرد.

جهش IVSI-110 در این مطالعه ۱/۵۲ درصد شیوع داشته ولی در یوگسلاوی با ۵۳ درصد شایعترین موتاسیون (۸) و در مصر با ۱٤٪ از ژنهای شایع بوده (۱۳) در نواحی مدیترانه ۳۹٪ شیوع داشته (۵) در الجزایر شایع بوده (٦) در عربستان ۳۸/۷٪ (۷) در یهودیان کردستان ۹٪ شیوع داشته است (۲) و در لبنان با ٦۲٪ شایعترین موتاسیون بوده است. در خراسان در بررسی دکتر آقاخان ۹/۹ درصد شیوع داشته و در سیستان و بلوچستان طی بررسی دکتر سرمدی و همکاران با فراوانی ٦٦٪ شایعترین موتاسیون بوده است (۱۰).

ژن Codon 37/36 منحصراً مربوط به کشور ایران است. در مطالعه Rund در یهودیان کرد دو نفر از ۷۱ نفر این جهش را داشته‌اند، در استان چهار محال و بختیاری با شیوع ۲۳/۳ درصد شایعترین موتاسیون اعلام شده (۱۱) در حالیکه در مطالعه ما با شیوع ۱/۵۲ درصد از جهش‌های کمیاب می‌باشد. موتاسیون IVSI-6 در یوگسلاوی با شیوع ۲۹/۵ درصد از جهش‌های شایع بوده (۸) در مصر حدود ۱۳٪ فراوانی داشته (۱۱) در کشور عربستان شیوعی معادل ۸/٦ درصد داشته است (۷) در استان فارس طی بررسی دکتر مرآت این جهش معادل ۱۰٪ گزارش شده و جزو موتاسیونهای شایع بوده است (۱۱) در جزیره قشم درصدی معادل ٤/۸ را داشته و در مطالعه ما ازجهش‌های کمتر شایع و معادل ۱/۵۲ درصد بوده است.

موتاسیون IVSI-5 در مطالعه ما با شیوع کم ۱/۵۲ درصد بوده، در استان یزد با ٤۲٪ و در اطراف مدیترانه با ۳۷٪ از جهش‌های شایع بوده است. در بوشهر ۹/٤ درصد و در کرمان شایعترین موتاسیون با شیوع ٥٤/٤ درصد بوده است (۱۲). در استان خراسان در بررسی دکتر آقاخان با شیوع ۵۸/٤ درصد شایعترین ژن بوده و در عربستان ٤/۲ درصد شیوع داشته است (۷).

بطور کلی در مطالعه ما در منطقه کردستان ۱۰ موتاسیون شایعتر از بقیه جهش‌ها بوده است. طبق جدول از میان موتاسیونهای مشخص شده IVSII-I با شیوع ۳۱/۸۱ درصد شایعترین بوده که با بررسی‌های قبلی منطقه غرب کشور مطابقت کامل داشته و نیز با توجه به اینکه این جهش در شمال ایران شایعترین ژن بوده است به نظر می‌رسد نشاندهنده نزدیکی ژنی بین این دو ناحیه از کشور باشد.

نتایج بررسی‌ها در کردستان که جزو منطقه مدیترانه‌ای است با نتایج حاصل از این منطقه تقریباً مطابقت داشته غیر از موتاسیون IVSI-110 که جزو ژنهای شایع شرق مدیترانه بوده که در مطالعه ما کمترین شیوع یعنی ۱/۵ درصد را داشته است (٤).

سپاسگزاری

در پایان از آقای دکتر نجم‌آبادی و همکاران مرکز ژنتیک دانشکدهٔ علوم بهزیستی و توانبخشی تهران سپاسگزاری می‌کنیم.

www.SID.ir

Archive of SID

References:

1. Liv J.Z. et: Sutdies of - β- Thalassemia mutation in families living in three provinces in southern China. Hemogolobin. 1989, 13(6): 585-95.
2. Lu Kenes J.N. Thalassemia and related disorders in: Vintrobes clinical hematology. Eds: Lee G.R, Bithel T.C, Foerster J. 9 th ed, Vol 1, Pennesylvania: Lee and Febiger, 1993.
3. Stamatoyanno poulous G, Nienhuis A.W, Majerus Ph. Wand Varmush Molecular basis of blood disease. Philadelphia: WB saunders company, 1994.
4. Elles, R. Molecular diagnosis of genenetic disease. Total Newgersay: Humamna Press inc, 1996.
5. Amselem, S. Determination of the spectrum of β thalassemia genes in Spain by use of dot blood analysis of amplified β-globin DNA. Am J Hum Genet. 1988, 43(1): 95-100.
6. Labie, D. β- Thalassemia in Algeria. Ann. NY Acad Sci 1990, 6(12): 43-54.
7. Cao, A. Antenatal diagnosis of β- Thalassemia in sordnia. Ann N Y Acad Sci. 1990, 6(12): 115-222.
8. Dimorski A. Thalassemia in Yogouslavia. Hemogolobin 1990, 14(1): 15-24.
9. Deborah, R. Evaluation of genetic disease in an ethnic isolate: B- thalassemia in the Jews of Kurdistan. Proc Nathl Acad Sci 1991, 88: 310-314. 1991.

۱۰. آقاخان. مانلی. بررسی موتاسیونهای شایع ژن بتا ـ گلوبین در بیماران مبتلا به بتا ـ تالاسمی ماژور در استان کرمان. پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، ۱۳۷۵.

۱۱. سرحدی م. تعیین موتاسیونهای ژن بتا گلوبین در بیماران بتا تالاسمی زاهدان. مجموعه مقالات دومین کنگره خون و بیماریهای مرتبط، تهران، انستیتو پاستور ایران، ۱۳۷۵.

12. Mahboudi. F. The molecular basis of thalassemia mutations in Fars province. Iran Med Sci 1996, 21: 99-104.

۱۳. نجم‌آبادی ح . جهش‌های نادر و جدا نشده بتا تالاسمی در ایران، پایان نامه دکترای ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی تهران ۱۳۸۰.

www.SID.ir

Archive of SID

Common Beta-Thalassemia Mutations in The City of Sanandaj

Fathollah-pour, A., M.D.,[1] Naghshi-Zadeian, R., M.D.[2]

ABSTRACT

Introduction: Thalassemia with more than two million carriers is the most common hereditary disorder in Iran. Since Iran is a multi ethnic country, it is necessary to determine the frequency and distribution of beta thalassemia mutations in the different parts of the country.

Materials & Methods: 35 sample from Beta-thalassemia patients obtained. DNA extraction was performed using protienase K method and genetic formulation was determined by reverse dot blot/PCR.

Results: Ten mutations were detected among 66 chromosomes that were studied. 14 chromosomes which had uncommon mutation was named unknown. Among remaining 52 chromosomes IVSII was the predominant mutation (31.8%), followed by codon 8/9 (31.8%), IVSI-I (%12.1), codon 8 (6%), codon 39(%45). IVSI-5(%1.5), IVSI-6(%1.5), IVSI-110(%1.5) and codon 36/37 (%1.5) were the other mutations.

Conclusion: IVSII-I was the most common mutation in this study. The result of this study is compatible with the results obtained in other areas in the west of Iran. Data obtained in this study can be used as a base for prenatal diagnosis of Beta-thalassemia in Kurdistan Province.

Key words: Beta-Thalassemia, Mutation, Prevalence, Gene

1. Assistant Professor of Pediatric Disease, Kurdistan University of Medical Sciences, Behsat Hospital, Sanandaj, Corresponding Author.
2. Specialist in Pediatric Disease, Kurdistan University of Medical Sciences.

www.SID.ir