خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۷ شماره ۲ تابستان ۸۹ (۷۷-۷۰)

مقاله پژوهشی

بررسی مولکولی آلفا تالاسمی از نظر جهش‌های حذفی و غیر حذفی در حاملین مشکوک ایرانی

بهناز زربخش[۱]، الهام فرشادی[۲]، آرین آریانی کاشانی[۳]، مرتضی کریمی‌پور[۴]، آزیتا آذرکیوان[۵]، راضیه حبیبی پورفتیده[۶]، محمد صادق فلاح[۷]، فرشته مریمی[۸]، علیرضا کردافشاری[۳]، زهرا کائینی مقدم[۲]، حمیده باقریان[۹]، سیروس زینلی[۱۰]

چکیده

سابقه و هدف

زوج‌های بسیاری در وضعیت نامشخص از نظر داشتن نقص در ژن‌های تالاسمی وجود دارند که تعیین قطعی این نواقص برای برنامه غربالگری قبل از ازدواج و نیز برای کمک به مشاوره ژنتیک ضروری می‌باشد. در این بررسی افراد مشکوک به آلفا تالاسمی، از نظر جهش‌های مختلف حذفی و غیر حذفی مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی، نمونه‌های مشکوک به آلفا تالاسمی با MCV< ۸۰ fL ، MCH< ۲۷ pg ، به همراه سطح آهن و HbA_2 طبیعی از بین مراجعین به انستیتو پاستور ایران به طور تصادفی جدا و مورد بررسی قرار گرفتند. جهش‌های حذفی با روش Multiplex gap-PCR و جهش‌های غیر حذفی با روش ARMS-PCR و تعیین توالی(Sequencing) بررسی شدند.

یافته‌ها

از میان ۱۴۰ نمونه، در ۱۲۶ نفر(۹۰٪) جهش در خوشه ژن آلفا گلوبین تعیین شد. در بررسی جهش‌های حذفی، وجود حداقل یک حذف در ۹۹ نفر(۷۰/۷۱٪) از افراد نشان داده شد. در بررسی جهش‌های غیر حذفی، حداقل یک جهش نقطه‌ای در ۲۷ نفر(۱۹/۲۸٪) از نمونه‌های فاقد جهش حذفی دیده شد. در مجموع ۹ جهش مختلف در این افراد تعیین شد. شایع‌ترین جهش، حذف $\alpha^{3/7}$ – در ۱۰۰ آلل(۳۵/۷۱٪) در مجموع ۲۸۰ کروموزوم مورد بررسی و به دنبال آن جهش غیر حذفی α^{5nt}– در ۲۵ آلل(۸/۹۳٪) بود.

نتیجه گیری

در این مطالعه به دلیل استفاده از روش تعیین توالی، جهش‌های نقطه‌ای در خوشه ژنی آلفا گلوبین فراوانی بیشتری را نسبت به سایر تحقیقات انجام شده توسط دیگر محققین کشور نشان می‌دهد. یافته‌های این مطالعه می‌تواند در برنامه کشوری مهار تالاسمی بسیار مفید باشد.

کلمات کلیدی: آلفا تالاسمی، جهش، PCR ، ایران

تاریخ دریافت : ۸۸/۵/۷
تاریخ پذیرش : ۸۹/۲/۶

۱ـ دکترای دامپزشکی ـ انستیتو پاستور ایران
۲ـ کارشناس زیست‌شناسی عمومی ـ انستیتو پاستور ایران
۳- کارشناس زیست‌شناسی سلولی مولکولی ـ انستیتو پاستور ایران
۴- PhD فرآورده‌های بیولوژیک ـ استادیار انستیتو پاستور ایران
۵ـ فوق تخصص خون و انکولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۶ـ کارشناس ارشد هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و پایگاه منطقه‌ای انتقال خون گیلان
۷ـ PhD ژنتیک پزشکی ـ مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر
۸ـ پزشک عمومی ـ انستیتو پاستور ایران
۹ـ پزشک عمومی ـ مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر
۱۰ـ مؤلف مسؤول: PhD ژنتیک انسانی ـ دانشیار انستیتو پاستور ایران و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر- صندوق پستی: ۱۶۶۷-۱۳۱۸۵

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

تالاسمی یکی از مشکلات اساسی بهداشتی، اقتصادی، روانی و اجتماعی به حساب می‌آید. غربالگری ناقلین پیش از ازدواج برای بتاتالاسمی، تقریباً از سال ۱۳۷۶ در کشور اجباری گردید(۲، ۱). از زمانی که در کشور غربالگری زوجین داوطلب ازدواج به عنوان راه‌کاری اجباری برای جلوگیری از تولد افراد تالاسمی مطرح شده، پیشرفت‌های نسبتاً خوبی در عرصه شناخت نواقص ژنتیکی در ژن‌های بتا و آلفا گلوبین حاصل شده است. تا پیش ازسال ۱۳۷۵، تقریباً ۱۵ موتاسیون روی ژن بتا گلوبین شناخته شده بود و بر روی ژن آلفا گلوبین شناختی بر مبنای تحقیقات داخلی وجود نداشت. به کمک تحقیقات گسترده‌ای که محققین کشورمان در مراکز مختلف چه در ارتباط با مراکز خارجی و یا بدون ارتباط با آن‌ها انجام داده‌اند، اطلاعات ارزشمندی در خصوص درک بهتری از نواقص مولکولی این ژن‌ها به دست آمده است(۱۱-۲).

خوشه ژنی آلفا گلوبین در انسان بر روی کروموزوم ۱۶ واقع شده و شامل ۷ ژن می‌باشد که دو ژن مهم و اصلی آن یعنی α_1 و α_2 گلوبین از نظر ترتیب توالی ژنی بسیار مشابهند. نقص مولکولی در این ژن‌ها، سندرم‌هایی با شدت متفاوت ایجاد می‌کنند. به این معنا که در نتیجه درگیری یک یا دو ژن، تغییرات خفیف(۷۵ < MCV < ۸۰ و ۲۵ < MCH < ۲۷) تا شدید(MCV < ۷۵ و MCH <۲۵) در پارامترهای هماتولوژیک و تظاهرات بالینی از کم خونی نامحسوس تا جزیی رخ می‌دهد. با درگیری ۳ ژن، بیماری هموگلوبین H (HbH تترامر زنجیره بتا می‌باشد) ایجاد می‌گردد. اکثر بیماران H نیازی به تزریق خون ندارند و کم خونی آن‌ها ملایم است، اما بعضی از موارد این بیماری به خصوص در موارد همراهی یک جهش نقطه‌ای با یک جهش حذفی دو ژنی، نیازمند دریافت خون هستند. با درگیری هر ۴ ژن، امکان تولید زنجیره آلفا وجود ندارد، زندگی پس از تولد بدون تزریق خون قبل و بعد از تولد امکان‌پذیر نیست و هیدروپس فتالیس نتیجه بارداری خواهد بود. در چنین حالتی هموگلوبین جنین یک تترامر از زنجیره گاما است که به آن "هموگلوبین بارث Bart's" می‌گویند(۱۳، ۱۲).

از مشکلات دیگری که در مشاوره ژنتیک زوج‌های مشکوک به ناقل تالاسمی با آن مواجه هستیم، همراهی ناقل آلفا تالاسمی با بتا تالاسمی است. در این مورد نیز تشخیص دقیق ژن‌های درگیر بسیار لازم و ضروری می‌باشد.

در این مطالعه بررسی مولکولی خوشه ژنی آلفا گلوبین در داوطلبینی با اندکس‌های خونی کاهش یافته(MCH<۲۷، MCV< ۸۰) و سطح آهن و HbA_2 طبیعی که مشکوک به آلفا تالاسمی بودند و از مراکز بهداشت شهر تهران به انستیتو پاستور ایران ارجاع شده بودند، انجام گرفت.

مواد و روش ها

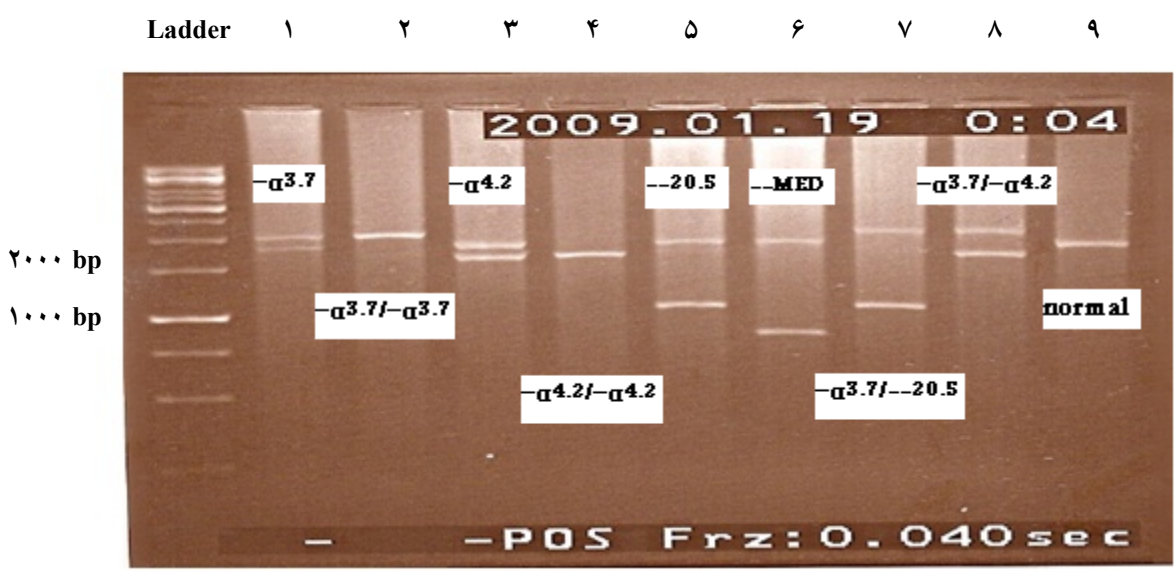
مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. ۱۴۰ نمونه از میان داوطلبان ازدواج که به دنبال طرح غربالگری تالاسمی به مراکز بهداشت سطح شهر تهران مراجعه کرده بودند و مشکوک به حمل نقص در ژن‌های آلفا گلوبین بودند(MCV و MCH کاهش یافته به همراه سطح آهن و HbA_2 طبیعی) به صورت تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از دریافت رضایت‌نامه، نمونه خون از افراد مراجعه کننده جهت استخراج DNA و بررسی مولکولی برای تعیین وضعیت نقص احتمالی در ژن آلفا گلوبین گرفته شد. تخلیص DNA ازخون، با روش salting out و طبق دستورالعمل استاندارد صورت پذیرفت(۱۴).

نمونه‌ها ابتدا از نظر وجود چهار جهش حذفی متداول در کشور شامل حذف‌های تک ژنی $-\alpha^{3/7}$ و $-\alpha^{4/2}$ و حذف‌های دو ژنی $--^{20/5}$ و $--^{MED}$ با روش Multiplex gap-PCR بررسی شدند(۱۵، ۷). در شکل نتایج حاصل از یک Multiplex Gap PCR با تعداد چهار جهش حذفی مختلف درحالت‌های هتروزیگوت، هموزیگوت و هتروزیگوت مرکب(نه حالت مختلف) نمایش داده شده است(۷)(شکل ۱).

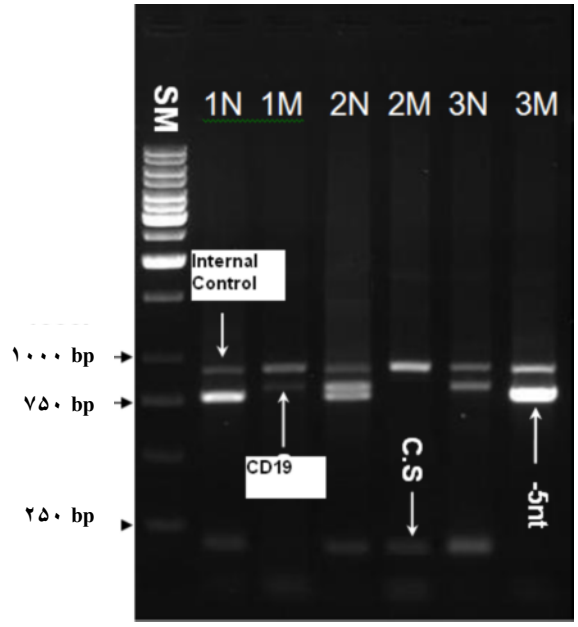
افراد فاقد جهش در بررسی با روش Multiplex gap-PCR ابتدا با روش ARMS-PCR جهت یافتن جهش‌های $-\alpha^{5nt}$ ، $-\alpha^{CS}$ و $-\alpha^{CD19}$ مورد بررسی قرار گرفتند(شکل ۲). ژن‌های آلفا ۱ و ۲ در سایر نمونه‌هایی که با این روش‌ها، جهش موجود در آن‌ها مشخص نشد،برای بررسی

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: الکتروفورز محصولات Multiplex gap-PCR برروی ژل یک درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید.
باند نرمال برای ژن آلفا با سایز ۱۸۰۰ جفت باز، باند حذف تک ژنی $-\alpha^{3/7}$ با سایز ۲۰۲۲ جفت باز، باند حذف تک ژنی $-\alpha^{4/2}$ با سایز ۱۶۲۸ جفت باز، باند حذف ۲ ژنی $--^{20/5}$ با سایز ۱۰۰۷ جفت باز و باند حذف ۲ ژنی $--^{Med}$ با سایز ۸۰۷ جفت باز دیده می‌شود. لازم به ذکر است، از آن جایی که کنترل داخلی در این آزمایش از منطقه ژن α_2 انتخاب گردیده است، بدیهی است که در ستون‌هایی که حاوی دو جهش حذفی هستند دیده نمی‌شود.



شکل۲: Multiplex ARMS-PCR مربوط به جهش‌های CD19, -5nt، Constant Spring. جهش CD19 با سایز 816bp ، جهش Constant Spring با سایز 189bp (هتروزیگوت)، جهش 5nt- با سایز 768bp و کنترل داخلی با سایز 932bp دیده می‌شود.

از نظر سایر جهش‌های نقطه‌ای، تعیین توالی شدند. برای این کار محصول PCR به شرکت Prim در کره جنوبی فرستاده شد و پاسخ آن‌ها به کمک نرم‌افزار DNA سیس مکس، تجزیه و تحلیل گردید.

یافته ها

۱۴۰ نمونه مشکوک به آلفا تالاسمی با MCV<۸۰ fL ، MCH< ۲۷ pg ، به همراه سطح آهن و HbA_2 طبیعی انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی ۴ جهش حذفی شایع درخوشه ژن آلفا گلوبین با روش Multiplex gap-PCR ، وجود حداقل یک حذف را در ۹۹ نفر (۷۰/۷۱٪) از افراد نشان داد. در بررسی جهش‌های غیر حذفی با روش ARMS-PCR ، یک جهش نقطه‌ای در ۱۹ نفر(۴۶/۳۴٪) از نمونه‌های فاقد جهش دیده شد. بررسی بقیه نمونه‌ها به روش تعیین توالی، وجود جهش نقطه‌ای در ۸ نفر را نشان داد. در ۱۳ نفر از افراد واجد یک جهش حذفی که جهش یافته شده به تنهایی توجیه‌گر اندکس‌های هماتولوژی آن‌ها نبود، در بررسی بیشتر، وجود یک جهش نقطه‌ای نیز در آن‌ها مشاهده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: توزیع فراوانی جهش‌های شناخته شده در این مطالعه و اندکس‌های هماتولوژی هر ژنوتیپ

ژنوتایپ	تعداد	درصد	MCV (mean ± SD)	MCH (mean ± SD)
αα/αα	۱۴	۱۰/۰	۷۵/۳ ± ۲/۱	۲۴/۸ ± ۱/۳
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	۳۳	۲۳/۵	۷۵ ± ۲/۹	۲۴ ± ۱/۶
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	۲۵	۱۷/۸	۷۰ ± ۳/۱	۲۲/۱ ± ۱/۴
$\alpha^{-5nt}\alpha/\alpha\alpha$	۱۵	۱۰/۷	۷۴/۸ ± ۳/۷	۲۳/۸ ± ۱/۹
$--^{MED}/\alpha\alpha$	۱۴	۱۰/۰	۶۷/۱ ± ۴/۹	۲۰/۳ ± ۰/۶۷
$-\alpha^{3.7}/\alpha^{-5nt}\alpha$	۸	۵/۷	۶۴/۶ ± ۲/۵	۲۰/۳ ± ۰/۱۴
$--^{20.5}/\alpha\alpha$	۵	۳/۶	۶۹/۵ ± ۰/۷	۲۲/۰ ± ۰/۷
$\alpha^{C.S}\alpha/\alpha\alpha$	۴	۲/۸	۷۱/۱ ± ۲/۹	۲۲/۸ ± ۱/۱
$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	۳	۱/۲	۷۱ ± ۰/۹	۱۹/۸ ± ۱/۱
$-\alpha^{3.7}/--^{20.5}$	۳	۱/۲	۶۵ ± ۱/۸	۱۷/۷ ± ۰/۹
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$	۳	۱/۲	۷۲/۹ ± ۰/۱۴	۲۳/۷ ± ۰/۹
$-\alpha^{3.7}/\alpha^{C.S}\alpha$	۲	۱/۴	۷۷/۹ ± ۱/۵	۲۳/۵ ± ۰/۹۱
$\alpha^{cd19}\alpha/\ \alpha\alpha$	۲	۱/۴	۷۴ ± ۰	۲۳/۵ ± ۰/۷
$\alpha^{PA2\ (4A>G)}\alpha/\alpha\alpha$	۲	۱/۴	۶۳/۳ ± ۳/۵	۱۹ ± ۲/۸
$\alpha^{PA2\ (4A>G)}\alpha/\alpha^{PA2(4A>G)}\alpha$	۲	۱/۴	۶۱/۴ ± ۶/۲	۱۸/۲ ± ۳
$--^{20.5}/\alpha^{-5nt}\alpha$	۲	۱/۴	۶۰/۵ ± ۲	۱۸/۰ ± ۱/۸
$\alpha^{cd19}\alpha/\ -\alpha^{3.7}$	۱	۰/۷	۷۰	۲۲
$\alpha\alpha/\alpha^{PA2\ (6A>G)}\alpha$	۱	۰/۷	۷۱	۲۴
$-\alpha^{4.2}/\alpha^{PA2\ (4A>G)}\alpha$	۱	۰/۷	۶۴/۹	۱۹/۸
جمع	۱۴۰	۱۰۰		

در کل نتیجه بررسی‌های مولکولی در ۱۲۶ نفر(۹۰٪) از افراد مورد بررسی نشانگر وجود جهش در خوشه ژنی آلفا بود(جدول ۱).

در مجموع ۹ جهش مختلف در این افراد تعیین شد. شایع‌ترین جهش، حذف $-\alpha^{3.7}$ در ۱۰۰ آلل(۳۵/۷۱٪) در مجموع ۲۸۰ کروموزوم مورد بررسی و به دنبال آن جهش غیر حذفی α^{5nt} در ۲۵ آلل(۸/۹۳٪) بود(جدول ۲).

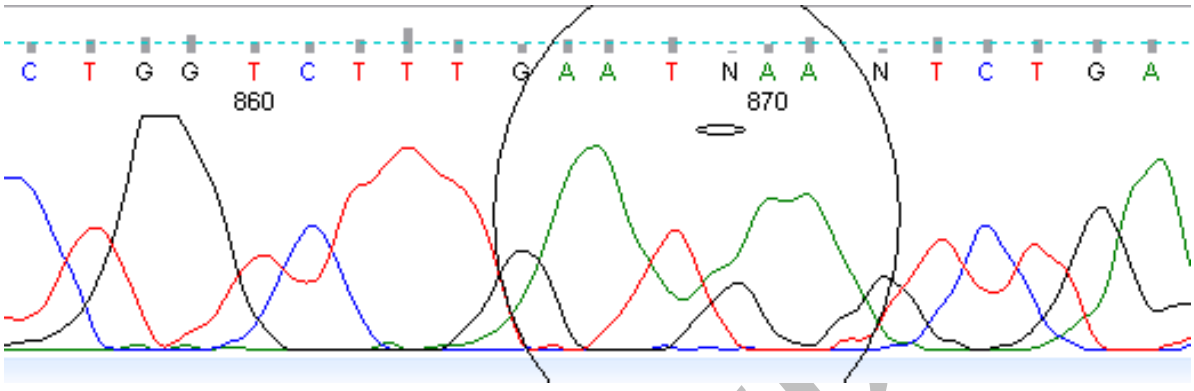
در مورد نمونه‌هایی که با روش‌های Multiplex Gap-PCR و ARMS-PCR ، تعیین ژنوتیپ نشدند، با روش تعیین توالی هر دو حالت هتروزیگوت و هموزیگوت جهش درسیگنال پلیA به صورت AATAAA>AATGAA تعیین شد(شکل ۳).

جدول ۲: فرکانس آللی جهش‌های یافته شده در مجموعه ژنی آلفا

ژنوتایپ	تعداد	درصد
$-\alpha^{3.7}$	۱۰۰	۳۵/۷۱
$\alpha\alpha^{-5nt}$	۲۵	۸/۹۳
$--^{MED}$	۱۴	۵/۰۰
$--^{20.5}$	۱۰	۳/۵۷
$\alpha^{PA2\ (4A>G)}\alpha$	۸	۲/۸۶
$-\alpha^{4.2}$	۷	۲/۵۰
$\alpha\alpha^{CS}$	۶	۲/۱۴
$\alpha^{cd19}\alpha$	۳	۱/۰۷
آلل طبیعی	۲۸ + ۷۹	۱۰ + ۲۸/۲۱
جمع	۲۸۰	۱۰۰

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳: جهش در سیگنال پلی A به صورت AATAAA → AATGAA : جهش آدنین به گوانین به صورت هتروزیگوت در نوکلئوتید ۸۶۹ مشاهده می‌گردد.

بحث

بیوسنتز طبیعی هموگلوبین نیاز به ژن سالم، تقویت کننده‌ها، خاموش کننده‌ها، آغازگرها و منطقه کنترل (LCR = Locus control region) دارد. جهش‌های متعددی موجب بروز تالاسمی می‌شوند که تعداد بسیاری از آن‌ها شرح داده شده است. این جهش‌ها ممکن است در هر مرحله از بیان ژن گلوبین، نسخه‌برداری، Pre-mRNA splicing، translation mRNA و یا پایداری mRNA و assembly بعد از ترجمه و نهایتاً پایداری پلی‌پپتیدگلوبین تاثیرگذار باشند(۱۶).

با وجودی که بیش از پنجاه سال از تحقیقات در سطح جهانی برای سندرم تالاسمی می‌گذرد و با وجود پیشرفت‌های غیر قابل انکاری که در شناخت مکانیسم اثر جهش‌های ژنی در بروز علایم بالینی حاصل شده است، هنوز تالاسمی یکی از مشکلات گسترده بهداشتی در جهان به شمار می‌رود.

پزشکان گاهی آلفا تالاسمی خفیف را با کم خونی فقر آهن اشتباه کرده و آهن تجویز می‌نمایند که البته تاثیری روی این کم خونی ندارد. در فردی که ناقل آلفا تالاسمی خفیف و یا شدید می‌باشد، معمولاً RBC بیش از حد طبیعی و Hb طبیعی و یا مرزی(آقایان ۱۴/۵ > و خانم‌ها ۱۲/۵≥)، MCV کمتر از ۸۰ و MCH کمتر از ۲۷ است. شباهت آزمایشگاهی در پارامترهای خونی والدین می‌تواند نقش مهمی در تشخیص افراد ناقل مشکوک به آلفاتالاسمی ایفا نماید.

آزمایش تعیین توالی برای ژن‌های آلفا، می‌تواند وجود موتاسیون‌های نقطه‌ای و حذف‌های کوچک را در نمونه‌های فاقد جهش‌های حذفی بزرگ و یا در نمونه‌های واجد یک حذف کوچک یا یک آلل غیر حذفی همراه با اندکس‌های هماتولوژیک بسیار پایین‌تراز حد مورد انتظار، مشخص کند. اکثر منابع از وجود چند جهش مهم در ژن α_2 (که سه برابر بیشتر از α_1 محصول دارد) نام برده‌اند که در برخی از تحقیقات محققان ایرانی داخل کشور نیز گزارش شده است(۲۰-۱۷، ۱۱، ۱۰، ۸).

در این مطالعه جهش $-\alpha^{3.7}$ در ۱۰۰ (۳۵/۷۱٪) آلل از آلل‌های بررسی شده، تشخیص داده شد. فراوانی جهش $-\alpha^{3.7}$ در مطالعه‌های سایر محققین کشور به میزان ۳۲/۸٪ ، ۴۲/۵٪ و ۴۴/۹٪ در بین افراد واجد جهش گزارش شده است(۱۰، ۵، ۳). در صورت محاسبه فراوانی آللی جهش $-\alpha^{3.7}$ در کل جمعیت مورد مطالعه، این میزان در ۲ مقاله اخیر ۲۲/۳۰٪ و ۲۴/۱۱٪ خواهد بود(۵، ۳).

جهش در سیگنال پلی A به صورت AATAAA> AATAAG ، از جهش‌هایی است که به ارث بردن فرم هموزیگوت آن، ایجاد فنوتیپ بیماری H می‌کند که شدیدتر از فرم حذفی این بیماری است(۲۱). در مطالعه حاضر این جهش بالاترین فراوانی آللی در میان جهش‌های غیر حذفی را نشان داد. یاوریان جهش در کدون ۱۹ ژن α_2 را برای اولین بار در سال ۲۰۰۳ گزارش کرد که در جمعیت هموژن استان هرمزگان، ۱۲/۲٪ از آلل‌های معیوب

Archive of SID
www.SID.ir

مرتبط با آلفا تالاسمی را تشکیل می‌داد(۱۱). در حالی که در مطالعه ما فراوانی این جهش بسیار کمتر می‌باشد. این تفاوت می‌تواند احتمالاً ناشی از شیوع بالاتر جهش CD19 در منطقه جنوب کشور باشد. در این مطالعه، جهش فوق در دو فرد از شمال ایران(گیلان) و یک فرد از منطقه مرکزی کشور تشخیص داده شد.

فراوانی آللی جهش cd142 (TAA>CAA) یا هموگلوبین Constant Spring در مطالعه حاضر ۲/۱۴٪ بود. گرشاسبی فراوانی این جهش غیر حذفی را در جمعیت مورد مطالعه خود ۲/۲٪ اعلام کرده بود. این فراوانی در مطالعه هادوی ۱۰/۶٪ و تمدنی ۳/۳٪ گزارش گردید که در صورت محاسبه فراوانی آللی جهش در کل جمعیت مورد مطالعه، این میزان در ۲ مقاله اخیر ۵/۸۲٪ و ۱/۷۶٪ خواهد بود(۵، ۳).

حذف ۵ نوکلئوتید از ابتدای اینترون ۱ ژن α_2 (IVS1;5-bp del) از جهش‌های مهم دیگر این ژن است که در ایران نیز گزارش شده است(۲۲).

اساساً، در جمعیت‌هایی با فراوانی بالای اختلالات هموگلوبین، نوع و فراوانی جهش‌ها می‌تواند بسیار متغیر باشد. افزایش برخی از این جهش‌ها در مناطق به خصوص، به دلیل انتخاب طبیعی آن‌ها در مقاومت نسبت به انگل مالاریا(مناطق مالاریا خیز)، اتفاق افتاده است. مثال آن مناطقی هستند که ترکیب متفاوتی از چند جهش محدود را که مخصوص آن جمعیت گردیده، بروز می‌دهند. بنابراین، داشتن اطلاعات اولیه از ریشه نژادی یک فرد ناقل، می‌تواند به پیشگویی حضور جهش‌های احتمالی در فرد، کمک فراوان نماید(استراتژی غربالگری اولیه ناقلین). اما در کشورهایی که از تنوع نژادی برخوردارند، این حربه خیلی نمی‌تواند کارآمد باشد.

اگرچه نقص در ژن آلفا گلوبین اغلب به صورت حذف‌های تکی(-α/αα) و یا دو تایی(--/αα) می‌باشد، ولی جهش‌های غیر حذفی شامل جابجایی تک نوکلئوتیدی و حذف، یا دخول یک یا چند نوکلئوتید کوچک نیز با فراوانی کمتر گزارش شده است(۲۳، ۲۱). این مطالعه و نیز تحقیقات مشابه نشان می‌دهد که نوع نقص مولکولی، در شدت تظاهر بیماری نقش دارد. بیماران مبتلا به HbH متأثر از جهش‌های غیر حذفی($\alpha^T\alpha$/--) درمقایسه با فرم حذفی آن(-α/--) دارای عوارض شدیدتر بوده و بیشتر به تزریق خون وابسته می‌شوند. مواردی نیزکه به واسطه فرم هموزیگوت برخی از این جهش‌ها($\alpha^T\alpha$ / $\alpha^T\alpha$) به تنهایی به وجود آمده باشد، وجود دارد(Personal Observation) (۲۳، ۲۱، ۱۷). لذا مشخص کردن وضعیت نقص در ژن‌های آلفا گلوبین جهت تعیین ناقل بودن فرد از نظر آلفا یا بتا تالاسمی و نیاز به تشخیص پیش از تولد حایز اهمیت است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتیجه این مطالعه به نظر می‌رسد به دلیل اهمیت تعیین وضعیت ناقل بودن زوج‌ها از نظر آلفا تالاسمی به خصوص در مواردی که طرف دیگر ناقل قطعی بتا تالاسمی می‌باشد، تعیین توالی ژن آلفا ۱ و ۲ گلوبین برای بررسی جهش‌های غیر حذفی ضروری می‌باشد.

با افزودن روش تعیین توالی مستقیم برای بررسی جهش‌های منطقه‌ای و نیز با استفاده از روش‌های بررسی کمی دوزاژ ژن، تعداد نسخه ژنی یا gene dosage study ، شامل Real Time PCR و Multiple Ligation dependent probe Amplification در بررسی بیشتر مواردی که هم چنان ناشناخته می‌مانند، شناخت جهش‌های خونی غیر شایع موارد آلفا تالاسمی تسهیل می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بخشی از این تحقیق توسط صندوق حمایت از پژوهشگران، حمایت مالی شده است. بدین‌وسیله تقدیر خود را از همکارانمان در مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر و بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران اعلام می‌داریم. هم چنین از همکاران خود در مراکز بهداشت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی به دلیل معرفی خانواده‌ها تقدیر و تشکر می‌نماییم.

Archive of SID

www.SID.ir

References :

1- Comprehensive instruction and educational materials of prevention programme on Major Beta-Thalassaemia (2004); Genetic Office, Ministry of Health and Medical Education of I.R.Iran, Health Deputy Cener for Disease Control.
2- Abolghasemi H, Amid A, Zeinali S, Radfar MH, Eshghi P, Rahiminejad MS, *et al*. Thalassemia in Iran: epidemiology, prevention, and management. J Pediatr Hematol Oncol 2007; 29(4): 233-8
3- Hadavi V, Jafroodi M, Hafezi-Nejad N, Moghadam S D, Eskandari F, Tarashohi S, *et al*. Alpha-thalassemia mutations in Gilan Province, North Iran. Hemoglobin 2009; 33(3): 235-41.
4- Hadavi V, Taromchi AH, Malekpour M, Gholami B, Law HY, Almadani N, *et al*. Elucidating the Spectrum of α-thalassemia Mutations in Iran. Haematologica 2007; 92(7): 992-3.
5- Tamaddoni A, Hadavi V, Hafezi Nejad N, Khosh-Ain A, Siami R, Aghai-Meibodi Jl, *et al.* alph-Thalassemia mutation analyses in Mazandaran province, North Iran. Hemoglobin 2009; 33 (2) : 115-23.
6- Zandian Kh, Nateghi Jl, Keikhaie B, Pedram M, Hafezi-Nejad N, Hadavi V, *et al*. alpha-thalassemia mutations in Khuzestan Province, Southwest Iran. Hemoglobin 2008; 32(6): 546-52.
7- Kiani-Shirazi R, Zainali S, Karimipoor M, Zarbakhsh B, Alibakhshi R. PCR Application In Recognition Of Prevelant Deletion of α Globin Gene In Alpha Thalasemia Carriers. Tehran University Medical Journal 2006; 64(2): 95-9. [Article in Farsi].
8- Neishabury M, Oberkanins C, Moheb LA, Pourfathollah AA, Kahrizi K, Keyhani E, *et al*. High prevalence of the -alpha3.7 deletion among thalassemia patients in Iran. Hemoglobin 2003; 27(1): 53-5.
9- Gohari LH, Petrou M, Felekis X, Christopoulos G, Kleanthous M. Identification of alpha-thalassemia mutations in Iranian individuals with abnormal hematological indices and normal Hb A2. Hemoglobin 2003; 27(2): 129-32.
10- Garshasbi M, Oberkanins C, Law HY, Neishabury M, Kariminejad R, Najmabadi H. alpha-globin gene deletion and point mutation analysis among in Iranian patients with microcytic hypochromic anemia. Haematologica 2003; 88(10): 1196-7.
11- Harteveld CL, Yavarian M, Zorai A, Quakkelaar ED, Van Delft P, Giordano PC. Molecular spectrum of alpha-thalassemia in the Iranian population of Hormozgan: three novel point mutation defects. Am J Hematol 2003; 74(2): 99-103.
12- Higgs DR, Vickers AOM, Wilkie IM, Pretorious AP, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. Blood 1989; 73(5): 1081-104.
13- Chui DH, Waye JS. Hydrops fetalis caused by α-thalassemia: an emerging health care problem. Blood 1998; 91(7): 2213-22.
14- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16(3): 1215.
15- Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. Blood 2000; 95(1): 360-62.
16- Bleible SA, Leonard RJ, Jones-Crawford JL, Kutler A, Hendricks LK. Thalassemia Alpha. Wayne State University, St. John's Hospital and Medical Centers. Article last updated: Sep17, 2007 " Http://emedicine.medscape.com/article/206397-overview"
17- Chui DH, Fucharoen S, Chan V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. Blood 2003; 101(3): 791-800.
18- Wang W, Kham SKY, Yeo GH, Quah TC, Chong SS. Multiplex minisequencing screen for common Southeast Asian and Indian beta-thalassemia mutations. Clin Chem 2003; 49(2): 209-18.
19- Jia SQ, Li J, Mo QH, Liao C, Li LY, Xu XM. Alpha0 thalassaemia as a result of a novel 11.1 kb deletion eliminating both of the duplicated alpha globin genes. J Clin Pathol 2004; 57(2): 164-7.
20- Angastiniotis MA, Hadjiminas MG. Prevention of thalassaemia in Cyprus. Lancet 1981; 1(8216): 369-71.
21- Fei YJ, Oner R, Bozkurt G, Gu LH, Altay C, Gurgey A, *et al*. Hb H disease caused by homozygosity for the AATAAA->AATAAG mutation in the polyadenylation site of the alpha 2-globin gene: hematological observations. Acta Haematol 1992; 88(2): 82-5.
22- Puehringer H, Najmabadi H, Law HY, Krugluger W, Viprakasit V, Pissard S, *et al*. Validation of a reverse-hybridization StripAssay for the simultaneous analysis of common alpha-thalassemia point mutations and deletions. Clin Chem Lab Med 2007; 45(5): 605-10.
23- Orkin SH, Goff SC, Hechtman RL. Mutation in an intervening sequence splice junction in man. Proc Natl Acad Sci U S A 1981; 78(8): 5041-5.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

Molecular study of alpha-thalassemia mutations in Iranian potential carriers

Zarbakhsh B.[1] , Farshadi E. [1], Ariani Kashani A. [1], Karimipoor M. [1], Azarkeivan A. [2], Habibi Pourfatideh R. [2,3], Fallah M.S.[4], Maryami F.[1], Kordafshari A.R.[1], Kaeini Moghadam Z.[1], Bagherian H.[4], Zeinali S.[1,4]

[1]*Pasteur Institute, Tehran, Iran*
[2]*Research Center of Iranian Blood Transfusion Organization, Tehran, Iran*
[3]*Gilan Regional Blood Transfusion Center, Rasht, Iran*
[4]*Kawsar Human Genetic Research Center,Tehran, Iran*

Archive of SID

Abstract

Background and Objectives

There is a large number of couples who are considered potential carriers of alpha or beta-thalassemia. The exact determination of gene defect for thalassemia carriers is essential for premarital screening genetic counseling. In this study, we conducted a molecular study of those suspected of carrying alpha-thalassemia mutated genes in order to detect potential deletional and non-deletional mutations in the alpha globin gene cluster.

Materials and Methods

In this study, those suspected of having mutation in alpha-globin gene cluster with MCV < 80 fl, MCH < 27 pg, normal serum iron, and HbA_2 were selected from those referred to Pasteur Institute of Iran. Four common deletional mutations and non-deletional mutations were studied using multiplex gap-PCR, ARMS-PCR, and direct sequencing.

Results

One hundred and forty samples with above criteria entered the study with 126 (90%) cases showing at least one mutation. Study of 4 common deletional mutations using multiplex gap-PCR revealed at least one deletion in 99 (70.71%) cases. Non-deletional mutations were found using ARMS-PCR or direct sequencing in 27 (19.28%) cases. Nine different mutations were found in the samples with $-\alpha^{3.7}$ being the most common deletion in 100 (35.71%) alleles out of 280 studied chromosomes followed by $-\alpha5^{nt}$ in 25 (8.93%) alleles as the next most common.

Conclusions

We used direct sequencing to characterize more suspected carriers of alpha thalassemia. However, using other methods like real-time PCR and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for gene dosage study of alpha-globin gene cluster could help find other non-common deletions.

Key words: alpha-Thalassemia, mutation, PCR, Iran
Sci J Iran Blood Transfus Org 2010; 7(2): 70-77

Received: 29 July 2009
Accepted: 26 Apr 2010

Correspondence: Zeinali S., PhD of Human Genetics. Associate Professor of Pasteur Institute and Kawsar Human Genetic Research Center.
P.O.Box: 13185-1667, Tehran, Iran. Tel: (+9821)66480780; Fax : (+9821)66480780
E-mail: *zeinali@kawsar.ir*

www.SID.ir