

تحقیقی

تعیین جهش‌های هموگلوبین D به روش مولکولی در مازندران

دکتر محمدرضا مهدوی امیری^۱، پیام روشن*^۲، نسیم یوسفیان^۳، محمداطهر جعتی^۴، دکتر محمدباقر هاشمی سوتنه^۵

۱- استادیار گروه علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات تالاسمی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۲- کارشناس ارشد ایمنی‌شناسی. ۳- کارشناس علوم آزمایشگاهی.

۴- کارشناس ارشد خون‌شناسی. ۵- دکتری ژنتیک انسانی، دانشیار مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی - مولکولی و دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران.

چکیده

زمینه و هدف: هموگلوبینوپاتی‌ها از بیماری‌های ارثی شایع در سراسر دنیا است که به‌واسطه جهش در ژن سازنده زنجیره‌های هموگلوبین به وجود می‌آیند. تاکنون بیشتر از ۱۰۰۰ نوع نقص در ژن گلوبین شناخته شده است و هموگلوبین D یکی از انواع هموگلوبینوپاتی است که در آن جهش در موقعیت ۱۲۱ بر روی زنجیره بتا رخ می‌دهد. این اختلال هموگلوبینی در غرب هندوستان، پاکستان و ایران شایع است. این مطالعه به منظور تعیین جهش‌های هموگلوبین D به روش مولکولی در استان مازندران انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی روی ۵۱ بیمار دارای باند هموگلوبین D مراجعه کننده به مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و مرکز آزمایشگاهی تشخیص پزشکی فجر ساری طی سال‌های ۹۰-۱۳۸۹ انجام شد. در ابتدا دارا بودن باند در ناحیه S در بیماران توسط الکتروفورز به روش قلیایی و سپس دارا بودن باند هموگلوبین D تایید شد. سپس با آزمایشات مولکولی نوع هموگلوبین D به روش PCR-RFLP تعیین گردید.

یافته‌ها: جهش $\beta 121(GH4)Glu>Gln$ هموگلوبین D پنجاب در همه ۵۱ بیمار مورد مطالعه مشاهده گردید. همچنین ژن معيوب دو نفر از نوع هموزیگوت بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که همه بیماران با هموگلوبین D دارای هموگلوبین D پنجاب بودند.

کلید واژه‌ها: هموگلوبین D پنجاب، PCR-RFLP، هموگلوبینوپاتی، جهش ژنی

* نویسنده مسؤل: پیام روشن، پست الکترونیکی info@fajrlaboratory.com

نشانی: ساری، بلوار کشاورز، ساختمان پزشکان دکتر دادخواه، گروه آزمایشگاهی فجر، تلفن: ۳۴۱۱۱۰۳-۰۱۷۱، نامبر ۳۲۹۲۹۲۹

وصول مقاله: ۹۰/۱۲/۲۱، اصلاح نهایی: ۹۱/۵/۱۴، پذیرش مقاله: ۹۱/۵/۱۸

مقدمه

در ایران هموگلوبینوپاتی‌های مختلفی گزارش شده است و در حدود پنج درصد از جمعیت کشور حامل ژن بتا تالاسمی و ۱-۵/۰ درصد دیگر حاملین انواع دیگر هموگلوبینوپاتی هستند (۳). هموگلوبین D نوعی از هموگلوبینوپاتی است که در مناطق غربی هندوستان، پاکستان و ایران شایع است (۴). Itano در سال ۱۹۵۱ این اختلال هموگلوبین را در موقعیت ۱۲۱ بر روی زنجیره بتا شناسایی کرد که در الکتروفورز قلیایی همراه با هموگلوبین S حرکت می‌کند و برای تمایز آنها از یکدیگر بایستی تست‌های تاییدی انجام شود (۵).

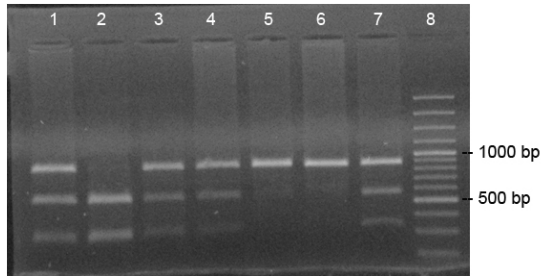
هموگلوبین D پنجاب ($\beta 121(GH4)Glu>Gln$) که با نام‌های D لس آنجلس، D شیکاگو، D نورث کارولینا، D پرتغال و D اوک ریج (Oak Ridge) نیز شناخته می‌شود؛ دارای شیوع ۲درصدی در مناطقی از هند و پاکستان (۶) و شیوع یک درصدی در کشورهای غربی است (۱). مواردی از آن در اقوام اروپایی و در نژاد سیاه نیز گزارش شده است. این افراد رابطه نزدیکی با اقوام هندی که در گذشته مهاجرت کردند؛ داشته است (۷).

هموگلوبینوپاتی‌ها از بیماری‌های وراثتی شایع در دنیا است که خاورمیانه نیز از آن مستثنی نیست و در برخی نقاط خاورمیانه بیش از ده درصد از جمعیت، حامل یکی از این ژن‌های غیرطبیعی هموگلوبین هستند. در حالت طبیعی بعد از تولد، هموگلوبین A1 دارای عملکرد طبیعی و از نظر مقدار، هموگلوبین غالب در بدن است و هموگلوبین‌هایی مثل A2 و F با مقادیر بسیار کمتر در کنار آن وجود دارند. مجموعه این هموگلوبین‌ها، میزان هموگلوبین تام فرد را تعیین می‌کنند. در حالتی که به‌واسطه جهش، تغییری در توالی اسید آمینه‌های هموگلوبین رخ دهد؛ این ساختار دیگر قادر به انجام عملکرد مطلوب خود نبوده و اصطلاحاً هموگلوبینوپاتی به‌وجود می‌آید. بسیاری از این هموگلوبین‌های غیرطبیعی دارای میل ترکیبی بالا با اکسیژن هستند که در حاملین خود پلی‌سیتمی ایجاد می‌کنند (۱). تاکنون ۱۵۳۶ نقص در ژن گلوبین شناخته شده است که بسیاری از آنها با بررسی حرکت الکتروفور تیک بر روی استات سلولز (pH: 8.6) و سیترات آگار (pH: 6.2) شناسایی می‌شوند (۲).

۸۰ درجه سانتی‌گراد لکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد صورت گرفت. در افراد طبیعی که جایگاه تاثیر آنزیم بر روی زنجیره بتا تغییری نکرده بود؛ برش آنزیمی منجر به تشکیل دو قطعه ۳۰۹ و ۵۲۰ نوکلئوتیدی شد. در حالی که در افراد حامل ژن معیوب، قطعه تکثیر شده بدون تغییر باقی ماند.

یافته‌ها

جهش beta121(GH4)Glu>Gln هموگلوبین D پنجاب در همه ۵۱ بیمار مورد مطالعه مشاهده گردید. از این میان، دو نفر از نظر ژن معیوب، هموزیگوت بودند (شکل یک).



شکل ۱: نتایج آزمایشات مولکولی بیماران دارای هموگلوبین D ستون ۳: کنترل مثبت، ستون‌های ۱، ۴ و ۷: هتروزیگوت ستون ۲: نمونه طبیعی و ستون‌های ۵ و ۶: هموزیگوت ستون ۸: ladder 100 bp (محصول سیناژن، ایران)

جدول ۱: یافته‌های هماتولوژیک بیماران با باند هموگلوبین D مراجعه کننده به مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و مرکز آزمایشگاهی تشخیص پزشکی فجر ساری در سال‌های ۹۰-۱۳۸۹

ایندکس	میانگین و انحراف معیار	حداقل	حداکثر
RBC (۱۰ ^۶ میلی‌لیتر)	۴/۹۴±۰/۵۴	۴/۲۶	۶/۰۶
Hb (گرم در دسی‌لیتر)	۱۳/۲۷±۱/۲۴	۱۱/۳	۱۵/۸
Hct (درصد)	۴۰±۳/۸	۳۳/۷	۴۸
MCV (fl)	۸۰/۲±۴/۵	۶۸	۸۶
MCH (پیکوگرم)	۲۶/۹±۱/۳	۲۳	۲۸/۶
MCHC (گرم در دسی‌لیتر)	۳۲/۸±۲/۱	۲۳	۳۵
Hb A1 (درصد)	۵۹/۳±۴/۱	۵۲	۶۶
Hb A2 (درصد)	۲/۲±۰/۷	۰/۵	۳/۲
Hb F (درصد)	۰/۸۴±۰/۳	۰/۲	۵/۹
Hb D (درصد)	۳۷/۷±۳/۸	۳۲	۴۵

یافته‌های هماتولوژیک بیماران در جدول یک آمده است. میزان هموگلوبین D به طور متوسط ۳۷/۷±۳/۸ درصد و در افراد هموزیگوت ۸۹/۱±۱/۱ درصد بود. میزان MCV در بیماران حامل ژن هموگلوبین D ۸۰/۲±۴/۵ درصد و در افراد هموزیگوت ۷۹±۲/۲ درصد بود. تغییرات صورت گرفته در درصد سایر هموگلوبین‌ها نیز در حد دامنه طبیعی تعریف شده (۹) برای هر کدام بود.

بحث

در این مطالعه جهش مولکولی هموگلوبین D همه بیماران از نوع

الگوی وراثتی هموگلوبین D می‌تواند به یکی از چهار شکل هتروزیگوت، هموزیگوت، هموگلوبین D - تالاسمی و هموگلوبین D - هموگلوبین S باشد (۸). این مطالعه به منظور تعیین جهش‌های هموگلوبین D به روش مولکولی در استان مازندران انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی روی ۵۱ بیمار دارای باند هموگلوبین D مراجعه کننده به مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و مرکز آزمایشگاهی تشخیص پزشکی فجر ساری طی سال‌های ۹۰-۱۳۸۹ انجام شد.

در ابتدا ۷۱ بیمار در الکتروفورز هموگلوبین به روش pH قلیایی دارای باند هموگلوبین در ناحیه S بودند که مجدداً به روش الکتروفورز کاپیلاری (Sebia، فرانسه) بررسی شدند تا موارد هموگلوبین D مشخص گردد. از این میان ۵۱ بیمار به عنوان حامل هموگلوبین D شناسایی شدند.

این مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران قرار گرفت. از افراد شرکت کننده در مطالعه رضایت‌نامه کتبی آگاهانه اخذ شد.

افراد مورد مطالعه از خانواده‌های کاملاً غیرمرتبط انتخاب شدند و هیچ کدام رابطه خویشاوندی نداشتند.

برای انجام آزمایشات مولکولی، ۵ میلی‌لیتر خون کامل از بیماران تهیه و DNA به روش salting out استخراج شد (۹). برای تکثیر ژن بتای زنجیره گلوبین، از پرایمرهای با تسوالی (5'-CAATGTATCATGCCTCTTTGCACC-3' و 5'-GAGTCAAGGCTGAGAGATGCAGGA-3') استفاده شد.

واکنش PCR در حجم ۲۴ میکرولیتر و با استفاده از تریس ۱۰ میلی‌مولار (pH=8.3)، کلرید پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار، کلرید منیزیم ۱/۵ میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرولیتر از هر dNTP، ۰/۲۵ نانوگرم در میکرولیتر از هر پرایمر، یک واحد از آنزیم DNA پلیمراز و ۱/۵ میکرولیتر از DNA ژنومی انجام شد.

تکثیر در شرایط واسرشت اولیه (hot start) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه در شرایط ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه توسط ترمال سایکلر (Techne، انگلستان) انجام پذیرفت. در پایان این واکنش بخشی از زنجیره بتا گلوبین به طول ۸۶۱ نوکلئوتید تکثیر شد. پس از پایان تکثیر، نمونه‌ها برای restriction fragment length polymorphism (RFLP) در معرض آنزیم EcoR1 (Fermentas، لتونی) قرار گرفتند. یک میکرولیتر آنزیم به یک میکروگرم DNA محصول PCR اضافه گردید و به مدت ۱۲ ساعت در شرایط انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای توقف واکنش دما به

پنجاب بود. تاکنون واریانت‌های متعددی از هموگلوبین D شناسایی شده‌اند که از نظر نقص مولکولی با یکدیگر متفاوتند (۸). این موارد براساس محل پیدایش و گزارش اولیه به انواع پنجاب (Punjab)، ایران (Iran)، آگری (Agri)، ایبادان (Ibadan)، بوشمن (Bushman)، Ouled Rabah، گرانادا (Granada) و نیث (Neath) تفکیک شده‌اند (۸). وجود واریانت‌های فوق در وضعیت هتروزیگوت با تظاهرات بالینی خاصی همراه نیست. بیمار با هموگلوبین D در وضعیت هموزیگوت، ممکن است بدون علائم بوده یا نشانه‌هایی نظیر کم‌خونی همولیتیک خفیف و بزرگی خفیف تا متوسط طحال مواجه شوند. نوزادان دارای هموگلوبین D هتروزیگوت / بتاتالاسمی می‌توانند بدون علائم بوده یا کم‌خونی همولیتیک خفیف تا متوسط داشته باشند. این علائم معمولاً در نخستین ماه‌های پس از تولد بروز می‌کند. زیرا میزان هموگلوبین F در این زمان کاهش یافته و هموگلوبین D افزایش می‌یابد. در بیماران هموگلوبین D / بتا⁰ تالاسمی، کم‌خونی خفیف تا متوسط مشاهده می‌شود و تغییری در طحال ایجاد نمی‌گردد. کودکان دارای هموگلوبین D / بتا⁰ تالاسمی که فاقد هموگلوبین A هستند؛ کم‌خونی با علائم و بزرگی طحال را به نمایش می‌گذارند و ممکن است اختلالات بالینی نسبتاً شدیدی داشته باشند. از آنجایی که اندیکس‌های خونی در هموگلوبین D / بتاتالاسمی غیرطبیعی است؛ فقر آهن نیز ممکن است بروز نماید. توارث همزمان هموگلوبین D به همراه هموگلوبین S به کم‌خونی داسی شکل منتهی می‌شود. این حالت مشابه توارث هموگلوبین E، هموگلوبین C و هموگلوبین O-Arab همراه با هموگلوبین S است (۱۰).

پنجاب بود. تاکنون واریانت‌های متعددی از هموگلوبین D شناسایی شده‌اند که از نظر نقص مولکولی با یکدیگر متفاوتند (۸). این موارد براساس محل پیدایش و گزارش اولیه به انواع پنجاب (Punjab)، ایران (Iran)، آگری (Agri)، ایبادان (Ibadan)، بوشمن (Bushman)، Ouled Rabah، گرانادا (Granada) و نیث (Neath) تفکیک شده‌اند (۸). وجود واریانت‌های فوق در وضعیت هتروزیگوت با تظاهرات بالینی خاصی همراه نیست. بیمار با هموگلوبین D در وضعیت هموزیگوت، ممکن است بدون علائم بوده یا نشانه‌هایی نظیر کم‌خونی همولیتیک خفیف و بزرگی خفیف تا متوسط طحال مواجه شوند. نوزادان دارای هموگلوبین D هتروزیگوت / بتاتالاسمی می‌توانند بدون علائم بوده یا کم‌خونی همولیتیک خفیف تا متوسط داشته باشند. این علائم معمولاً در نخستین ماه‌های پس از تولد بروز می‌کند. زیرا میزان هموگلوبین F در این زمان کاهش یافته و هموگلوبین D افزایش می‌یابد. در بیماران هموگلوبین D / بتا⁰ تالاسمی، کم‌خونی خفیف تا متوسط مشاهده می‌شود و تغییری در طحال ایجاد نمی‌گردد. کودکان دارای هموگلوبین D / بتا⁰ تالاسمی که فاقد هموگلوبین A هستند؛ کم‌خونی با علائم و بزرگی طحال را به نمایش می‌گذارند و ممکن است اختلالات بالینی نسبتاً شدیدی داشته باشند. از آنجایی که اندیکس‌های خونی در هموگلوبین D / بتاتالاسمی غیرطبیعی است؛ فقر آهن نیز ممکن است بروز نماید. توارث همزمان هموگلوبین D به همراه هموگلوبین S به کم‌خونی داسی شکل منتهی می‌شود. این حالت مشابه توارث هموگلوبین E، هموگلوبین C و هموگلوبین O-Arab همراه با هموگلوبین S است (۱۰).

از آنجایی که وجود این اختلال در کنار هموگلوبینوپاتی‌های دیگر ممکن است به تظاهرات بالینی منجر گردد؛ لذا شناسایی و بررسی آن از اهمیت خاصی برخوردار بوده و مراکز مشاوره ژنتیکی بایستی آن را مدنظر قرار دهند.

هموگلوبین D پنجاب یک هموگلوبین غیرطبیعی است که از جایگزینی گلیسین با گلوتامیک اسید در کدون ۱۲۱ ژن بتاگلوبین به وجود می‌آید. نتایج مطالعه حاضر بیانگر وجود هموگلوبین D پنجاب در همه بیماران تحت بررسی بود. با توجه به مطالعه ذاکری‌نیا و همکاران (۱۱) این واریانت هموگلوبین D بیشترین شیوع را در مناطق مختلف ایران دارا است.

در مطالعه ذاکری‌نیا و همکاران با هدف شناسایی توارث همزمان آلفا و بتاتالاسمی با هموگلوبین D در منطقه جنوب ایران بین سال‌های ۲۰۱۰-۲۰۰۲، در جمعیت مورد مطالعه ۱۸۰ نفر دارای جهش هموگلوبین D پنجاب در وضعیت هتروزیگوت، ۸۸ نفر هموگلوبین D ایران، ۳ نفر هموگلوبین D هموزیگوت، ۱۷ نفر دارای توارث همزمان بتاتالاسمی و هموگلوبین D، ۱۲ نفر دارای توارث همزمان آلفاتالاسمی و هموگلوبین D، یک مورد

مطالعه رحیمی و همکاران ۳۲ فرد از ۱۱ خانواده غیرمرتبط در غرب ایران بررسی شدند و وجود هموگلوبین D پنجاب در تمامی این افراد به واسطه PCR به همراه هضم آنزیمی توسط EcoRI تایید شد و مشخص گردید که الگوی بتاتالاسمی - هموگلوبین D پنجاب، در غرب ایران شایع است (۱۳).

مطالعه Funcharnoen و همکاران روی ۹ بیمار تایلندی مشکوک به وجود هموگلوبینوپاتی از ۵ خانواده که رابطه فامیلی نداشتند؛ نشان داد که ۴ فرد از این بیماران حامل هموگلوبین D پنجاب، ۲ نفر هتروزیگوت ترکیبی هموگلوبین D پنجاب به همراه دیگر هموگلوبینوپاتی‌ها، ۲ بیمار دیگر دارای ژن هموگلوبین D پنجاب و تالاسمی و یک نفر هم دارای نقص توامان هموگلوبین D پنجاب و هموگلوبین E به صورت هتروزیگوت بودند. آنان با بررسی توالی DNA در بیماران ناقل ژن هموگلوبین D دریافتند که همه موارد دارای جهش مشابه در کدون ۱۲۱ هستند (۱۴).

در مطالعه یاوریان و همکاران نقش وراثت و قومیت در بروز واریانت‌های متفاوت یک بیماری خاص، با بررسی هاپلوتیپ‌های هموگلوبین D پنجاب در جنوب ایران بررسی شد و نتایج با دو کشور اروپایی هلند و بلژیک مقایسه و مشخص گردید که در ایران سه هاپلوتیپ مختلف از این اختلال شایع است. این در حالی است که در کشورهای اروپایی فقط یک نوع هاپلوتیپ دیده می‌شود (۱۰).

مقایسه مطالعه حاضر با مطالعه ذاکری‌نیا و همکاران در غرب و جنوب ایران (۱۱) نشان می‌دهد که الگوی پراکندگی این اختلال در شمال ایران مشابهت بیشتری با موارد گزارش شده از غرب ایران دارد. بررسی‌های هاپلوتایپینگ که در حال انجام است؛ می‌تواند توضیحات بیشتری در مورد الگوی توارث این ناهنجاری ارائه دهد. منشاء پیدایی و گسترش هموگلوبین D پنجاب تا امروز ناشناخته مانده است. این موضوع ناشی از آن است که اطلاعات جامعی از جوامع مختلف دارای شیوع این ناهنجاری ژنتیکی در دست نیست و جهش هموگلوبین D پنجاب عمدتاً با هاپلوتایپ مدیترانه‌ای در ارتباط است (۱۳). بررسی هاپلوتایپینگ بیماران مورد مطالعه در مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، کمک

تالاسمی، کم‌خونی داسی شکل و هموگلوبین D در آن از شیوع بالایی برخوردار است. لذا شناسایی حاملان ژن‌های این اختلالات و تمایز موارد مشابه و غیرقابل تفکیک در روش‌های مرسوم به وسیله روش‌های پیشرفته مولکولی، به منظور کنترل نمودن جمعیت ناقلین و نیز تمایز بین واریانت‌های مختلف یک اختلال، ضروری به نظر می‌رسد. همچنین بررسی اختصاصی نمونه‌های غیرطبیعی در موارد مشابه از نظر الگوی الکتروفورز و شناسایی زیر گروه‌های هریک از هموگلوبینوپاتی‌ها در کاهش اثرات نامطلوب آنها و نیز انجام درمان‌های حمایتی در جهت بهبود بیماران مبتلا در مناطق مختلف ضروری به نظر می‌رسد. این یافته‌ها به ارائه مشاوره ژنتیکی کامل‌تر به جوانان در مرحله ازدواج و بررسی‌های ژنتیکی دقیق‌تر پیش از بارداری کمک شایانی نموده و به محدود نمودن و در نهایت ریشه‌کنی اختلالات ژنتیکی خاصی که کیفیت زندگی فرد مبتلا تحت تاثیر قرار می‌دهد؛ کمک می‌نماید.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که همه بیماران با هموگلوبین D دارای هموگلوبین D پنجاب بودند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران بود. بدین وسیله از همکاران محترم مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و کارکنان گروه آزمایشگاهی فجر ساری که در اجرای این مطالعه همکاری نمودند؛ سپاسگزاری می‌گردد.

References

- Marengo-Rowe AJ. Structure-function relations of human hemoglobins. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2006;19(3):239-45.
- Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. Scand J Clin Lab Invest. 2007;67(1):71-86.
- Arjmandi K, Faranoush M, Bahoush G, Vossough P, Hedayatian AA, Ansari S. Study of D/G Hemoglobin incidence in a sample population (single institution). IJHOBMT. 2005; 2(4): 23.
- Mukherjee MB, Surve RR, Gangakhedkar RR, Mohanty D, Colah RB. Case Reports: Hemoglobin sickle D Punjab-a case report. Indian J Hum Genet. 2005; 11(3):154-5.
- Itano HA. A Third Abnormal Hemoglobin Associated with Hereditary Hemolytic Anemia. Proc Natl Acad Sci U S A 1951;37:775-84.
- Bird GWG, Lehmann H. Hemoglobin D in India. Br Med J 1956;1:514.
- Leoneli Guilherme G, Melo Silma MA, Zago Marco A, Silva Jr Wilson A, Bonini-Domingos Cláudia R. HB D Los Angeles in a Brazilian family. Rev Bras Hematol Hemoter. 2001; 23(3): 142-5.
- Lukens JN. The Abnormal Hemoglobins: General Principles. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, editors. Wintrobe's Clinical Hematology. 10th. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins; 1998; pp:1329-45.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic

Acids Res. 1988 Feb;16(3):1215.

خواهد کرد تا مشخص شود که آیا هاپلو تیپ ژن بتا گلوبین در همه این بیماران از الگوی ژنتیکی مشابهی پیروی می‌کنند یا این الگوها متفاوت هستند. این موضوع به درک دقیق‌تر منشاء پیدایی این اختلال ژنتیکی و تک مرکزی یا چند مرکزی بودن آن کمک شایانی خواهد نمود.

در مواردی آزمون‌های اختصاصی تشخیص هموگلوبینوپاتی خاص هم قادر به تفکیک هموگلوبینوپاتی‌های مختلف از یکدیگر نیستند. چنین جهش‌هایی بایستی به کمک روش‌های مولکولی از یکدیگر افتراق داده شوند. به عنوان نمونه هموگلوبین Q ایران (alpha 75 (EF4) Asp-His) نوع نادری از این نوع هموگلوبینوپاتی است که زنجیره آلفا را تحت تاثیر قرار داده و برای اولین بار در یک خانواده ایرانی گزارش شد و از نظر الگوی الکتروفورز مشابه با هموگلوبین S و هموگلوبین D است (۱۵). در مطالعه Ozdag و همکاران بیماری که دارای الگوی الکتروفورز شبیه هموگلوبین S ولی دارای تست sickling منفی بود؛ بررسی شد. پس از انجام PCR به روش مرسوم بر روی زنجیره بتا گلوبین آن بیمار؛ هیچ الگویی از هموگلوبین D دیده نشد. این گروه تحقیقاتی پس از انجام PCR روی زنجیره آلفا، هموگلوبین Q ایران را شناسایی نمودند (۱۵). چنین مطالعاتی بر لزوم پیگیری نتایج اولیه بیماران دارای باندهای غیرطبیعی در الکتروفورز هموگلوبین برای افتراق نمونه‌های با الگوی الکتروفورز مشابه تاکید دارد.

نظراً به این که ایران روی کمربند تالاسمی قرار دارد و مازندران یکی از مناطقی است که بیماری‌های مرتبط با هموگلوبین مانند

Acids Res. 1988 Feb;16(3):1215.

10. Yavarian M, Karimi M, Paran F, Neven C, Harteveld CL, Giordano PC. Multi centric origin of Hb D-Punjab [beta 121(GH4)Glu->Gln, GAA>CAA]. Hemoglobin. 2009;33(6):399-405.

11. Zakerinia M, Ayatollahi M, Rastegar M, Amanat Sh, Askarnejad AR, Amirghofran S, Haghshenas M. Hemoglobin D (Hb D Punjab/ Los Angeles and Hb D Iran) and Co-Inheritance with Alpha- and Beta- Thalassemia in southern Iran. Iran Red Crescent Med J. 2011;13(7):493-98.

12. Rahimi Z, Akramipour R, Vaisi-Raygani A, Nagel RL, Muniz A. An Iranian child with HbQ-Iran [alpha75 (EF4) Asp->His]/-alpha3.7 kb/IVSII.1 G->A: first report. J Pediatr Hematol Oncol. 2007;29(9):649-51.

13. Rahimi Z, Akramipour R, Nagel RL, Ahmadi AS, Merat A, Bahrehmand F. The beta-globin gene haplotypes associated with Hb D-Los Angeles [beta121(GH4)Glu -> Gln] in Western Iran. Hemoglobin. 2006;30(1):39-44.

14. Fucharoen S, Changtrakun Y, Surapot S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K. Molecular characterization of Hb D-Punjab [beta121(GH4)Glu->Gln] in Thailand. Hemoglobin. 2002 Aug; 26(3):261-9.

15. Ozdag H, Yildiz I, Akar N. First observation of homozygote Hb Q-Iran (alpha 75 (EF4) Asp-His). Turk J Hematol. 2008;25:48-50.

Original Paper

Molecular evaluation of hemoglobin D mutations in Mazandaran province, Iran

Mahdavi MR (PhD)¹, Roshan P (MSc)*², Yousefian N (BSc)³
Hojjati MT (MSc)⁴, Hashemi-Soteh MB (PhD)⁵

¹Assistant Professor, Department of Laboratory Medicine, Thalassemia Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. ²MSc in Immunology. ³BSc in Laboratory Medicine. ⁴MSc in Hematology.

⁵Associate Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

Abstract

Background and Objective: Hemoglobinopathies are among the most prevalent genetic disorders worldwide, and occur as a result of mutations in the gene involved in synthesizing hemoglobin chains. By now more than 1000 defects in hemoglobin chains are discovered. Hemoglobin D (Hb D) is one of these disorders, identified by a single nucleotide mutation on codon 121 of beta globin chain. This study was carried out to evaluate Hb D mutations through molecular methods in Mazandaran province of Iran.

Materials and Methods: This descriptive laboratory study was done on 70 patients with an electrophoresis band in hemoglobin-S zone in Mazandaran province of Iran during 2010-11. Capillary zone electrophoresis was done to find out Hb D in 51 patients. Subsequently, PCR-RFLP was performed to evaluate the samples at molecular level.

Results: Molecular investigation revealed all cases are carriers of hemoglobin D-Punjab. Two patients were shown to be homozygote carriers of the abnormal gene.

Conclusion: This study showed all Hb D affected patients were carriers of Hb D Punjab.

Keywords: Hemoglobin D Punjab, PCR-RFLP, Hemoglobinopathy, Genetic mutation

* **Corresponding Author:** Roshan P (MSc), E-mail: info@fajrlaboratory.com

Received 11 March 2012

Revised 4 August 2012

Accepted 8 August 2012