

## نقش پلی مورفیسم های rs10421768 ، rs8101606 و rs66868858 ژن هپسیدین در سرباری آهن بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور مراجعه کننده به درمانگاه ظفر تهران

معصومه یزدی<sup>۱</sup>، آریتا آذرکیوان<sup>۲</sup>، فهیمه رنجبر کرمانی<sup>۳</sup>، مجید شهابی<sup>۴</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

بیماران تالاسمی ماژور، دچار آنمی شدید بوده و برای بقا وابسته به تزریق خون منظم می باشند اما تزریق خون باعث ایجاد مشکلاتی از قبیل سرباری آهن در این بیماران می شود. هپسیدین پلی پپتیدی است که تنظیم کننده اصلی هومئوستاز آهن می باشد. اخیراً پلی مورفیسم هایی در ژن کدکننده هپسیدین شناسایی شده است که در سرباری آهن در بافت ها دخیل هستند. هدف از مطالعه، بررسی ارتباط واریانت های rs10421768 ، rs8101606 و rs66868858 در ژن هپسیدین و سرباری آهن در بیماران بتا تالاسمی ماژور بود.

#### مواد و روش ها

در این پژوهش مقطعی، ۱۰۰ نمونه خون بیماران تالاسمی ماژور مربوط به درمانگاه تالاسمی ظفر در سال ۱۴۰۰ جمع آوری شد. پس از استخراج DNA ژنومی، ژنوتیپ پلی مورفیسم ها با روش High resolution melt curve analysis تعیین شد. نتایج ژنوتیپ با تعیین توالی تعدادی از نمونه ها معتبرسازی شد. برای ارتباط بین ژنوتیپ های مختلف و شاخص های سرباری آهن از آزمون کای دو استفاده شد. مقدار  $p < 0.05$  نشان دهنده ارتباط معنادار در نظر گرفته شد.

#### یافته ها

برمبنای مقدار فریتین سرم  $\geq 1000 \text{ ng/mL}$ ، تعداد ۷۲ نفر (۷۲٪) از بیماران دارای سرباری آهن بودند. به علاوه مطابق معیارهای فدراسیون بین المللی تالاسمی، تعداد ۳۳ نفر (۳۳٪) از بیماران مبتلا به سرباری آهن قلبی و ۶۳ نفر (۶۳٪) دچار سرباری آهن کبدی بودند. هیچ ارتباط معناداری بین ژنوتیپ های مختلف و میزان فریتین، آهن قلب و آهن کبد یافت نشد.

#### نتیجه گیری

هر چند در این مطالعه ارتباطی بین هر کدام از پلی مورفیسم های مورد بررسی و سرباری آهن یافت نشد، ممکن است این پلی مورفیسم ها به صورت یک هاپلوتیپ واحد در سرباری آهن دخالت داشته باشند که نیازمند مطالعه های بیشتر است.

**کلمات کلیدی:** تالاسمی بتا، هپسیدین، سرباری آهن، پلی مورفیسم

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۲۸

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- فوق تخصص خون و هماتولوژی کودکان - استاد مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۳- PhD طب انتقال خون - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۴- مؤلف مسئول: PhD فرآورده های بیولوژیک - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق

پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

## مقدمه

بتانالاسمی یکی از رایج‌ترین بیماری‌های اتوزومال مغلوب در جهان است. ایران با میانگین شیوع ۴٪، بالاتر از میانگین جهانی (۱٪) قرار دارد (۱). شدت تالاسمی بستگی به تعداد ژن‌های حذف یا غیرفعال شده دارد که دارای انواع مینور، ایترمدیا و ماژور می‌باشد. نوع ماژور این بیماری به صورت آنمی شدید وابسته به تزریق خون است (۲، ۱). شخص دارای تالاسمی ماژور معمولاً برای زنده ماندن نیازمند تزریق خون منظم می‌باشد و در معرض خطرات ناشی از تزریقات مکرر خون مانند سرباری آهن قرار می‌گیرد. آهن اضافی به صورت آزاد در پلاسما یا به صورت رسوب در کبد سمی می‌باشد و دارای اثر سوء بر دیگر ارگان‌های بدن مانند قلب و کلیه است (۳). تجویز داروهای شلاته‌کننده آهن تا حدی به کاهش سرباری آهن کمک می‌کند اما دارای عوارض جانبی مخصوص به خود نیز می‌باشند (۴).

هموستاز آهن توسط عوامل مختلفی کنترل می‌شود. هپسیدین یک هورمون پلی‌پپتیدی است و توسط ژن *HAMP* که بر روی کروموزوم ۱۹ قرار دارد کد شده و در کبد ساخته می‌شود. هپسیدین تنظیم‌کننده اصلی هموستاز آهن می‌باشد (۵، ۴). میزان هپسیدین در بیماران تالاسمی ماژور بسیار پایین است زیرا ساخت این هورمون سرکوب شده که در نهایت باعث تجمع آهن می‌شود (۷-۵). هپسیدین از سه طریق آهن خون را تنظیم می‌کند: (۱) ممانعت جذب آهن از روده (۲) توقف آزاد شدن آهن از ماکروفاژها (۳) کنترل آهن ذخیره شده در هیپاتوسیت‌ها (۸). مطالعه‌های زیادی نشان داده است که بیان هپسیدین متاثر از وجود پلی‌مورفیسم‌هایی بر روی ژن *HAMP* می‌باشد. پاراجز و همکارانش نشان دادند که وجود پلی‌مورفیسم *c.-582A>G* باعث کاهش بیان ژن هپسیدین می‌شود (۹). مطالعه‌های آندریانی و همکارانش نیز تأییدکننده نقش این پلی‌مورفیسم در افزایش آهن کبدی و افزایش سطح سرمی آهن می‌باشد (۱۰).

با توجه به نقش محوری هپسیدین در هموستاز آهن و نیز تاثیر کمی و کیفی پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در بیان ژن، هدف از این مطالعه بررسی ارتباط

پلی‌مورفیسم‌های rs8101606، rs10421768 و rs66868858 ژن هپسیدین و سرباری آهن در بیماران تالاسمی ماژور تحت درمان منظم با شلاته‌کننده‌های آهن بود. اگر چه نتایج این تحقیق تاثیری در درمان سرباری آهن در بیماران تالاسمی نداشت ولی می‌تواند در شناسایی مکانیسم‌های تاثیرگذار بر سرباری آهن مؤثر باشد.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مقطعی غیر مداخله‌ای (مشاهده‌ای) و بر روی ۱۰۰ بیمار تالاسمی ماژور که به طور منظم برای دریافت خون به درمانگاه تالاسمی ظفر تهران مراجعه کرده بودند در سال ۱۴۰۰-۱۳۹۹ انجام شد. همگی تحت تزریق منظم خون (با فاصله ۲ تا ۴ هفته)، تحت درمان منظم با داروهای شلاته‌کننده (دسفرال، Exjade، دسفرال/L1، دسفرال/Exjade) بوده و سن بالای ۱۴ سال داشتند. براساس راهنمای فدراسیون بین‌المللی تالاسمی (TIF) فریتین بالای ۱۰۰۰ ng/mL سرم به عنوان سرباری آهن در نظر گرفته شد. آهن قلب و کبد توسط  $T2^*MRI$  اندازه‌گیری شد. طبقه‌بندی شدت سرباری آهن قلب و کبد مطابق جداول بود (جداول ۱ و ۲). این پژوهش توسط کمیته اخلاق مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون با کد IR.TMI.REC.1399.019 تصویب شد و از همه بیماران رضایت‌نامه کتبی اخذ شد.

## آنالیز مولکولی:

۳ میلی‌لیتر از خون گرفته شده با EDTA، با ۱۲ میلی‌لیتر از بافر لیزکننده (۱۵۰ mM EDTA، ۱۰ mM NaHCO<sub>3</sub>، ۱ mM NH<sub>4</sub>Cl) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ ×g سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب گلبول‌های سفید دو مرتبه با محلول طبیعی سالین شسته شدند. DNA ژنومی از ۰/۲ mL گلبول سفید با کیت GeneAll (تایوان) طبق دستورالعمل کیت استخراج شد. برای پلی‌مورفیسم‌های rs8101606، rs10421768 و rs66868858 آغازگرهای اختصاصی طراحی شد و توسط شرکت سینا کلون ساخته شد (جدول ۳). برای هر پلی‌مورفیسم تعداد ۱۰ نمونه با واکنش‌های

جدول ۱: تقسیم‌بندی بیماران بر اساس میزان آهن کبدی

| طبیعی<br>>۶/۳ ms* | خفیف<br>۲/۶-۸/۳ ms | متوسط<br>۱/۲-۴/۷ ms | شدید<br><۱/۴ ms | خیلی شدید<br><۱/۱۰ ms |                 |
|-------------------|--------------------|---------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| ۳۷                | ۲۳                 | ۳۲                  | ۸               | ۰                     | فراوانی (تعداد) |
| ۳۶/۳              | ۲۲/۵               | ۳۱/۴                | ۷/۸             | ۰/۰                   | درصد            |

\* در T2 MRI میزان ms (millisecond) با مقدار آهن یافت نسبت معکوس دارد.

جدول ۲: تقسیم‌بندی بیماران بر اساس میزان آهن قلبی

| طبیعی<br>>۲۰ ms* | خفیف<br>۱۴-۲۰ ms | متوسط<br>۱۰-۱۴ ms | شدید<br><۱۰ ms | خیلی شدید<br><۵/۱۰ ms |                 |
|------------------|------------------|-------------------|----------------|-----------------------|-----------------|
| ۶۷               | ۱۷               | ۱۰                | ۶              | -                     | فراوانی (تعداد) |
| ۶۵/۷             | ۱۶/۷             | ۹/۸               | ۵/۹            | -                     | درصد            |

\* در T2 MRI میزان ms (millisecond) با مقدار آهن یافت نسبت معکوس دارد.

جدول ۳: خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های PCR برای تعیین توالی و نیز HRM

| آغازگر | سکانس<br>(5'-3')       | درجه حرارت<br>(°C) | درصد بازهای<br>GC (%) | طول<br>(nt) |
|--------|------------------------|--------------------|-----------------------|-------------|
| 668-F  | AAGAGGCAAAATGTGCAAGGG  | ۵۹                 | ۴۸                    | ۱۱۰         |
| 668-R  | GACTGCAGTGCCTTCATTCCT  |                    | ۵۲                    |             |
| 810-F  | CTTCGTCTTGAGGGTGAGAGAT | ۶۱                 | ۵۲                    | ۱۰۰         |
| 810-R  | AGTCCCACCATCTCCTCTTGTT |                    | ۵۰                    |             |
| 104-F  | TTCCAGTTACCAGAGCCACAT  | ۶۱                 | ۴۸                    | ۱۰۴         |
| 104-R  | GAACACTAGATAGCCCTGAGCA |                    | ۵۰                    |             |

PCR تکثیر و جهت تعیین توالی به شرکت کدون ژنتیک ارسال شد (Sanger method). تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها با روش High resolution melt curve analysis (HRM) انجام گردید. ابتدا واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۰ µL و با استفاده از ۱۰ µL میکس HRM (Type-it HRM، کیاژن)، غلظت ۰/۷ µM هر کدام از آغازگرها و نیز ۲۰ ng از DNA ژنومی انجام شد. چرخه دمایی متشکل از ۱۰ دقیقه در ۹۶ درجه سانتی‌گراد و سپس ۴۰ چرخه شامل ۱۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود. واکنش‌های HRM نیز به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۰ ثانیه، ۴۰ درجه سانتی‌گراد ۵ ثانیه و ۷۰ درجه سانتی‌گراد

۶۰ ثانیه بود و پس از آن دما تا ۹۷ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته و در هر درجه شدت فلوروسنت ۲۵ بار قرائت شد. واکنش‌های PCR و HRM با دستگاه Roche Lightcycler 96 انجام گرفت. نتایج ژنوتیپ هر نمونه از روی منحنی ذوب قرائت شد. نمونه‌های تعیین توالی شده به عنوان تأیید نتایج HRM استفاده شدند.

#### آنالیز آماری:

نتایج حاصله برای متغیرهایی که توزیع طبیعی داشته‌اند به صورت میانگین و انحراف استاندارد (mean ± SD) و برای متغیرهایی که توزیع طبیعی نداشته‌اند به صورت

شاخص پراکندگی IQR (Interquartile Range) بیان شد. برای مقایسه متغیرهای کیفی از chi-square test استفاده شد. مقدار  $p < 0/05$  به عنوان اختلاف معناداری در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (version ۲۳) استفاده شد.

### یافته‌ها

در مجموع ۱۰۰ نفر از بیماران تالاسمی ماژور وارد مطالعه شدند. مطابق راهنمای TIF و بر اساس فریتین سرم، ۷۲٪ از بیماران دارای سرباری آهن بودند. نتایج MRI آهن قلب نشان‌دهنده سرباری آهن در ۳۳٪ بیماران بود که شدت سرباری عبارت بود از: ۵/۹٪ بیماران شدید، ۹/۸٪

بیماران متوسط و ۱۶/۷٪ بیماران خفیف. طبق نتایج MRI کبدی در مجموع ۶۳٪ بیماران سرباری آهن داشتند که ۷/۸٪ بیماران شدید، ۳۱/۴٪ بیماران متوسط و ۲۲/۵٪ بیماران سرباری خفیف داشتند. نتایج تعیین ژنوتیپ پلی مورفسم‌ها در جدول آمده است (جدول ۴). هیچ‌گونه ارتباطی بین پلی مورفسم‌های مورد بررسی و سرباری آهن قلب و کبد و نیز مقدار فریتین سرم مشاهده نشد. برای هر محاسبه تعداد آلل اصلی در مقابل مجموع تعداد آلل مینور به اضافه تعداد هتروزیگوت قرار داده شد. مقادیر p-value برای هر کدام از این پارامترها در جدول نمایش داده شده است (جدول ۵). منحنی ذوب واکنش‌های HRM در شکل نمایش داده شده است (اشکال ۱ و ۲).

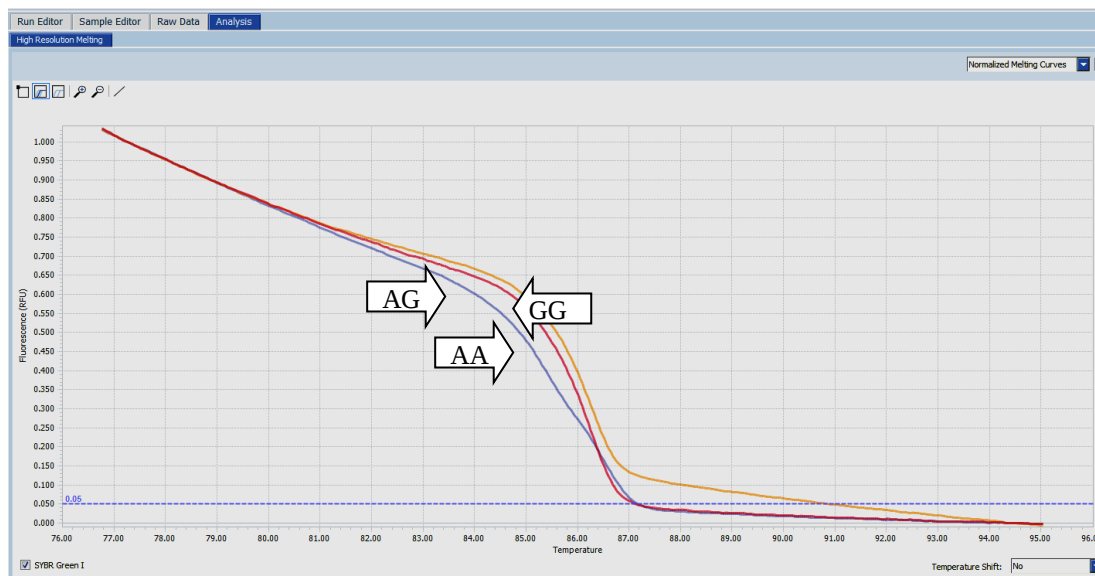
جدول ۴: فراوانی ژنوتیپ‌ها برای پلی مورفسم‌های مورد بررسی

| ژنوتیپ | فراوانی | درصد |            |
|--------|---------|------|------------|
| AA     | ۳۸      | ۳۸   | rs10421768 |
| AG     | ۵۶      | ۵۶   |            |
| GG     | ۶       | ۶    |            |
| CC     | ۴۲      | ۴۲   | rs66868858 |
| CG     | ۵۳      | ۵۳   |            |
| GG     | ۵       | ۵    |            |
| AA     | ۳۳      | ۳۳   | rs8101606  |
| AC     | ۶۳      | ۶۳   |            |
| CC     | ۴       | ۴    |            |

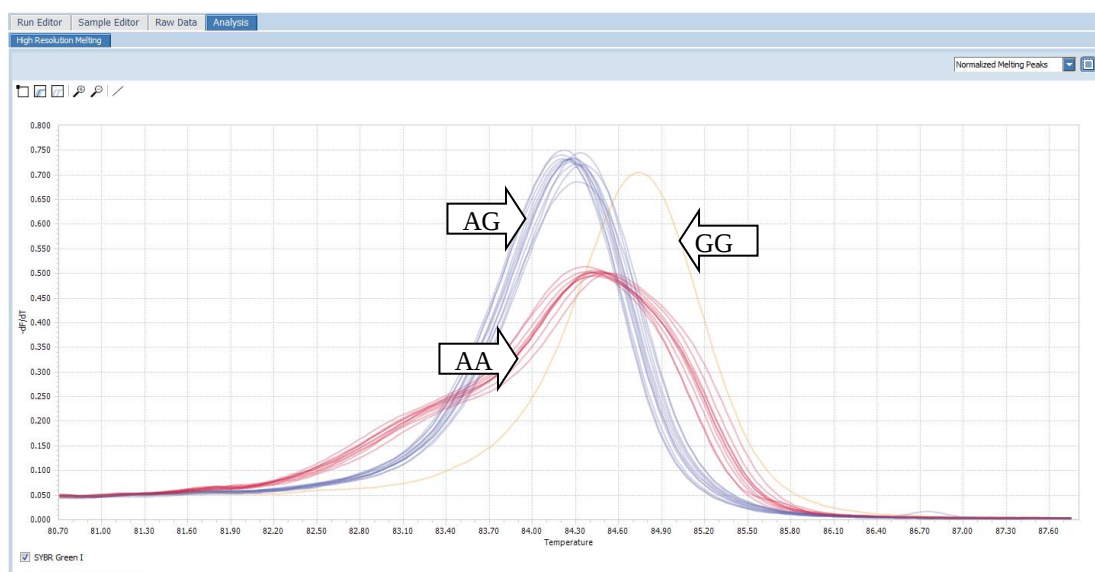
جدول ۵: نتایج آزمون chi-squared جهت تعیین ارتباط بین پلی مورفسم‌ها و شاخص‌های سرباری آهن

| پلی مورفسم                      | فریتین سرم | آهن کبدی | آهن قلبی |
|---------------------------------|------------|----------|----------|
| rs10421768<br>AA در مقابل AG+GG | p= ۰/۲     | p= ۰/۱   | p= ۰/۰۶  |
| rs66868858<br>CC در مقابل CG+GG | p= ۰/۵۲    | p= ۰/۴۵  | p= ۰/۷۸  |
| rs8101606<br>AA در مقابل AC+CC  | p= ۰/۳۶    | p= ۰/۴۷  | p= ۰/۶۲  |

مقدار p-value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنادار در نظر گرفته شد.



شکل ۱: منحنی normalized melting curve مربوط به rs10421768. رنگ آبی نشان‌دهنده ژنوتیپ AG، رنگ قرمز بیانگر ژنوتیپ AA و رنگ زرد معرف ژنوتیپ GG می‌باشد.



شکل ۲: منحنی normalized melting peak برای مارکر rs10421768. رنگ آبی نمایشگر نمونه‌های هتروزیگوس AG، قرمز هموزیگوس AA و زرد برای نمونه‌های هموزیگوس GG به کار رفته است.

## بحث

فرد خواهد شد اما اضافه بار آهن عارضه‌ای است که در صورت عدم استفاده از درمان‌های شلاته‌کننده، موجب اختلالات جدی در سال‌های بعد خواهد شد (۳، ۴).  
هپسیدین پروتئینی است که در تنظیم هموستاز آهن بدن نقش مهمی را ایفا می‌کند. به طور کلی، این هورمون با

بتا تالاسمی مازور شدیدترین فرم تالاسمی است که جهش در هر دو ژن سازنده زنجیره بتا وجود دارد و میزان تولید این زنجیره‌ها در حدود صفر است. اگر چه تزریق مکرر خون در سال‌های اول زندگی موجب رشد طبیعی

کاهش جذب آهن از انتروسیته‌های دئودنوم و همچنین ممانعت از آزادسازی آن از ماکروفاژها، سطح آهن را کاهش می‌دهد (۴، ۶). در سال‌های اخیر مطالعه‌های زیادی بر روی پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژن‌ها انجام شده است این واریانت‌ها ممکن است پاتوژن نباشند اما می‌توانند تغییراتی را بر روی ساختمان پروتئین و میزان بیان آن اعمال کنند.

در این تحقیق ارتباط میان واریانت‌های rs8101606، rs10421768، rs66868858 که از فراوانی نسبتاً زیادی در جمعیت سفید برخوردار هستند، با سرباری آهن با روش HRM مورد مطالعه قرار گرفت. پورن‌پرازرت و همکاران نیز برای تشخیص بیماری آلفا تالاسمی و حذف ژن بتا تالاسمی از این روش استفاده کردند. از مزیت‌های این روش می‌توان به ساده بودن، قدرت تشخیص و دقت بالا حتی در مقادیر کم DNA اشاره کرد. نیاز نداشتن به مراحل بعد از PCR نیز باعث افزایش سرعت و کاهش احتمال آلودگی می‌شود (۱۱).

#### واریانت rs10421768:

نتایج مطالعه‌های قبلی تاثیر آلل G این واریانت را در کاهش بیان ژن هپسیدین نشان می‌دهد، که این کاهش در نهایت منجر به افزایش آهن پلاسما خواهد شد. پاراجز و همکاران تاثیر پلی مورفیسم A>G در E-BOX این ژن را مورد بررسی قرار داد که باعث کاهش اتصال فاکتورهای رونویسی و در نتیجه کاهش بیان هپسیدین می‌شود (۱۳، ۱۲، ۸). نتایج به دست آمده در مطالعه ما ارتباطی بین ژنوتیپ‌های این پلی مورفیسم و سرباری آهن کبدی و نیز میزان فریتین سرم را نشان نمی‌دهد.

#### واریانت rs8101606 و rs66868858:

تاکنون مطالعه‌ای بر روی این واریانت‌ها در سطح دنیا صورت نگرفته است ولی با توجه به فراوانی نسبتاً بالای آن در جمعیت، حائز اهمیت و قابل بررسی هستند. در مطالعه مشابهی که توسط آندریانی و همکاران بر روی یکی از

پلی مورفیسم‌های ژن HAMP در بیماران تالاسمی ماژور انجام شد، وجود این پلی مورفیسم با سرباری آهن کبدی و افزایش سطح سرمی فریتین در بیمارانی که به طور منظم درمان آهن‌زدایی ندارند، ارتباط داشت (۱۰). در حالی که در مطالعه ما تمامی بیماران درمان منظم داشتند. نمودارها افزایش آهن سرمی و کبدی در حضور موتانت این واریانت‌ها را نشان می‌دهند اما در مطالعه ما ارتباط معناداری میان آن‌ها پیدا نشد.

در مطالعه‌ای که آلتس و همکاران بر روی جهش‌های ژن HAMP در بیماری هموکروماتوزیس انجام داد، مشاهده کرد که حضور هم‌زمان جهش در این ژن و ژن هموجوولین در به وجود آمدن این بیماری مؤثر هستند (۱۴).

#### نتیجه‌گیری

هپسیدین در هموستاز آهن و متابولیسم آن نقش مهمی را ایفا می‌کند هر چند پروتئین‌های دیگری مانند فروپورتین، اریتروفرین و هموجوولین نیز در آن دخیل هستند. وجود واریانت‌های مختلف در هر کدام از این ژن‌ها می‌تواند بر هموستاز آهن تاثیرگذار باشد. اگر چه ارتباطی برای پلی مورفیسم‌های مورد مطالعه در این پژوهش یافت نشد لکن ممکن است نقش آن‌ها به صورت تجمیعی با سایر پلی مورفیسم‌های این ناحیه و به صورت هاپلوتیپ باشد که درک آن نیازمند مطالعه‌های جامع‌تر می‌باشد.

#### تشکر و قدردانی

این تحقیق موضوع پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد زیست‌فناوری پزشکی است و هزینه آن توسط مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین شده است.

نویسندگان از کارکنان درمانگاه تالاسمی جهت همکاری صمیمانه در جمع‌آوری اطلاعات و نمونه بیماران کمال تشکر را دارند.

## References:

- 1- Karimi M, Bagheri MH, Tahmtan M, Shakibafard A, Rashid M. Prevalence of hepatosplenomegaly in beta thalassemia minor subjects in Iran. *Eur J Radiol* 2009; 69(1): 120-2
- 2- Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet* 2001; 2(4): 245-55.
- 3- Rechavi G, Rivella S. Regulation of iron absorption in hemoglobinopathies. *Curr Mol Med* 2008; 8(7): 646-62.
- 4- Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823(9): 1434-43.
- 5- Sripichai O, Fucharoen S. Fetal hemoglobin regulation in  $\beta$ -thalassemia: heterogeneity, modifiers and therapeutic approaches. *Expert Rev Hematol* 2016; 9(12): 1129-37.
- 6- Camaschella C, Nai A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica* 2020; 105(2): 260-72.
- 7- Smesam HNK, Albuthabhak HAQ, Arjmand S, Al-Hakeim HK, R Siadat SO. Evaluation of Erythroferrone, Hepcidin, and Iron Overload Status in Iraqi Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia Major Patients. *Hemoglobin* 2020; 44(4): 272-7.
- 8- Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol* 2009; 122(2-3): 78-86.
- 9- Parajes S, González-Quintela A, Campos J, Quinteiro C, Domínguez F, Loidi L. Genetic study of the hepcidin gene (HAMP) promoter and functional analysis of the c.-582A> G variant. *BMC Genet* 2010; 11(1): 110
- 10- Andreani M, Radio FC, Testi M, De Bernardo C, Troiano M, Majore S, *et al.* Association of hepcidin promoter c.-582 A>G variant and iron overload in thalassemia major. *Haematologica* 2009; 94(9): 1293-6.
- 11- Pornprasert S, Wiengkum T, Srithep S, Chainoi I, Singboottra P, Wongwiwatthanakit S. Detection of  $\alpha$ -thalassemia-1 Southeast Asian and Thai type deletions and  $\beta$ -thalassemia 3.5-kb deletion by single-tube multiplex real-time PCR with SYBR Green1 and high-resolution melting analysis. *Korean J Lab Med* 2011; 31(3): 138-42.
- 12- Zarghamian P, Azarkeivan A, Arabkhazaeli A, Mardani A, Shahabi M. Hepcidin gene polymorphisms and iron overload in  $\beta$ -thalassemia major patients refractory to iron chelating therapy. *BMC Med Genet* 2020; 21(1): 75.
- 13- Ayatollahi H, Mousavi Nezhad SF, Talebpour A, Badii Z, Nezami H. Relation of hepcidin gene expression in blood mononuclear cells with iron overload severity among  $\beta$ -thalassemia major patients. *Mol Biol Rep* 2020; 47(12): 9353-9.
- 14- Altès A, Bach V, Ruiz A, Esteve A, Felez J, Remacha AF, *et al.* Mutations in HAMP and HJV genes and their impact on expression of clinical hemochromatosis in a cohort of 100 Spanish patients homozygous for the C282Y mutation of HFE gene. *Ann Hematol* 2009; 88(10): 951-5.

**Original Article**

## **The role of rs10421768, rs66868858 and 8101606 polymorphisms in hepcidin gene and iron overload in $\beta$ -thalassemia patients**

**Yazdi M.<sup>1</sup>, Azarkeivan A.<sup>1</sup>, Ranjbar Kermani F.<sup>1</sup>, Shahabi M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

### **Abstract**

#### **Background and Objectives**

Patients with  $\beta$ -thalassemia major are dependent on regular blood transfusion. Iron overload is the main complication of transfusion which damages vital organs. Hepcidin, a peptide hormone, is the key element of body iron hemostasis. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the hepcidin gene alter its function and thereby iron status. The aim of this study was to determine the association of three SNPs of rs10421768, rs8101606 and rs66868858 with iron overload in thalassemia patients.

#### **Materials and Methods**

In this cross-sectional study, one hundred thalassemia patients were recruited. Patient clinical and laboratory data including serum ferritin, liver and heart iron deposition were collected from their files. SNPs genotypes were determined by high resolution melt curve analysis. Association between genotypes and iron overload markers was estimated by chi-square test considering  $p < 0.05$  as statistically significant.

#### **Results**

Based on serum ferritin  $> 1000$  ng/mL, 72% of patients were iron overloaded and 33% and 63% had abnormal heart and liver iron, respectively. Statistical analysis revealed no relation between SNPs genotype and iron overload.

#### **Conclusions**

Although we could not find any significant relation, it is probable that the effect of these polymorphisms on iron overload applied through a specific haplotype consisting of several SNPs.

**Key words:** beta-Thalassemia, Hepcidin, Iron Overload, Polymorphism

Received: 28 Dec 2021

Accepted: 19 Jul 2022

Correspondence: Shahabi M., PhD of Biological Products. Assistant professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.  
P.O.Box: 14665 -1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601558; Fax: (+9821) 88601542  
E-mail: m.shahabi@tmi.ac.ir