

## جهش‌های ژن گلوپین بتا و پلی‌مورفیسم $XmnI$ در بیماران تالاسمی اینترمدیا مراجعه‌کننده به بیمارستان علی‌اصغر (ع) تهران

علی رجبی<sup>۱</sup>، آیدا عرب<sup>۲</sup>، مرتضی کریمی‌پور<sup>۳</sup>، سعید کاویانی<sup>۴</sup>، خدیجه ارجمندی<sup>۵</sup>، سیروس زینلی<sup>۶</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

تالاسمی اینترمدیا (TI)، گروهی از تالاسمی‌های بتا هستند که از نظر شدت بیماری، بین تالاسمی ماژور و مینور می‌باشند. در بیشتر کشورهای درگیر، اساس مولکولی TI مشخص شده ولی در کشور ما هنوز بررسی دقیقی در این باره انجام نشده است. در این تحقیق، نتایج فاز نخست یک طرح پژوهشی جامع با هدف بررسی مولکولی TI ارایه شده که دو عامل مهم در ایجاد فنوتیپ TI یعنی جهش‌های ژن بتا، پلی‌مورفیسم  $XmnI$  و ارتباط ژنوتیپ/فنوتیپ آن در بیماران TI بررسی شده است.

#### مواد و روش‌ها

در یک بررسی تجربی و پایلوت، نمونه‌های ۴۲ فرد مبتلا به TI مراجعه‌کننده به بیمارستان علی‌اصغر (ع) تهران پس از استخراج DNA به روش Salting-out، برای یافتن شایع‌ترین جهش تالاسمی بتا در ایران (IVSII-1(G>A)) توسط ARMS-PCR بررسی شدند. در صورت نبودن جهش در هر دو آلل ژن بتا، این ژن تعیین توالی می‌شد. هم‌زمان پلی‌مورفیسم  $XmnI$  با استفاده از RFLP و سپس ارتباط بین این پلی‌مورفیسم و ایجاد TI در بیماران بررسی گردید.

#### یافته‌ها

از ۷۶ کروموزوم مورد بررسی (۳۸ بیمار)، IVSII-1 شایع‌ترین جهش با تعداد ۴۲ کروموزوم (۵۵/۲۶٪) بود. به طور کلی آلل‌های  $\beta^0$  در ۶۶ کروموزوم (۸۶/۸۴٪) و آلل‌های  $\beta^+$  در ۷ کروموزوم (۹/۲۱٪) یافت گردید. ۶۱ کروموزوم (۸۰/۲۶٪) نیز دارای پلی‌مورفیسم  $XmnI$  بودند. این پلی‌مورفیسم دارای پیوستگی بالایی با جهش‌های  $\beta^0$  به ویژه IVSII-1 بود. در هیچ موردی از IVSII-1، پلی‌مورفیسم  $XmnI$  منفی (-/-) مشاهده نشد.

#### نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که وجود پلی‌مورفیسم  $XmnI$  مهم‌ترین عامل کاهش شدت بالینی بیماران تالاسمی دارای جهش‌های شدید  $\beta^0$  و به ویژه IVSII-1 و ایجاد TI در ایران است.

**کلمات کلیدی:** تالاسمی اینترمدیا، گلوپین، جهش، Rflp

تاریخ دریافت: ۱۹/۵/۹۶

تاریخ پذیرش: ۱۹/۸/۹۶

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون - دانشگاه علوم پزشکی تربیت مدرس

۲- کارشناس ارشد ژنتیک - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران

۳- مؤلف مسئول: PhD زیست فن‌آوری پزشکی - استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران - تهران - خیابان پاستور - پلاک ۶۹ - کد پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

۴- PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار دانشگاه علوم پزشکی تربیت مدرس

۵- فوق تخصص خون و انکولوژی کودکان - استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران - بیمارستان کودکان علی‌اصغر (ع)

۶- PhD ژنتیک انسانی - دانشیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر

## مقدمه

تالاسمی‌ها شایع‌ترین اختلالات تک‌ژنی در دنیا محسوب می‌شوند (۱). در تالاسمی بتا، تولید زنجیره گلوبین بتا کاهش داشته ( $\beta^+$ ) و یا وجود ندارد ( $\beta^0$ ) (۱). در مواقعی که ژن بتا گلوبین به صورت  $\beta^{++}$  باشد، بیماری تالاسمی بتا به صورت بسیار خفیف‌تری ایجاد می‌گردد که در این‌جا تولید مقدار متوسط گلوبین بتا وجود دارد (۲). بیش از ۲۰۰ جهش گوناگون در ژن گلوبین بتا، سبب ایجاد تالاسمی بتا می‌شوند (۱). با این حال هر جمعیتی دارای تعداد کمی از جهش‌های معمول به همراه تعداد متفاوتی از انواع نادر هستند و تنها ۲۰ آلل تالاسمی بتا، مسئول بیش از ۸۰٪ جهش‌های تالاسمی بتا در تمام دنیا می‌باشند (۳). در کشور ما شش جهش در ژن گلوبین بتا، سبب ایجاد حدود ۸۰٪ موارد تالاسمی بتا می‌شود (۴).

تالاسمی اینترمدیا (TI)، یک تعریف بالینی است و برای بیمارانی به کار می‌رود که نشانه‌های بالینی آن‌ها شدیدتر از تالاسمی مینور و خفیف‌تر از تالاسمی ماژور است و دوره بالینی غیروابسته به انتقال خون دارند (۱).

میزان هموگلوبین در بیماران TI، بین ۷ تا ۱۰ گرم در دسی‌لیتر است (۵، ۱). الکتروفورز هموگلوبین به طور معمول حدود ۷۵٪-۳۰٪ باند F را نشان می‌دهد، اما انواع خفیف‌تر بیماری ممکن است دارای هموگلوبین F در حدود ۱۲٪-۱/۵٪ باشند (۶).

سه دسته از عوامل ژنتیکی در ایجاد فنوتیپ TI تاثیر بیشتری دارند (۵، ۷، ۸):

۱- آلل‌های تالاسمی بتا: مهم‌ترین عامل مؤثر بر ایجاد فنوتیپ بالینی TI محسوب می‌شود، مانند وجود آلل‌های خفیف تالاسمی بتا.

۲- شاخص‌هایی که دارای اثر مستقیم بر روی تعدیل زنجیره‌های اضافی آلفا هستند، مانند به ارث رسیدن ژن‌های غیرطبیعی آلفا، یا گاما و یا پلی‌مورفیسم‌های خوشه ژنی گلوبین بتا، به ویژه پلی‌مورفیسم  $\gamma$  XmnI.

۳- عواملی که سبب افزایش و فعال شدن مجدد هموگلوبین جنینی (HbF) می‌شوند.

در ۹۰٪ - ۶۰٪ موارد، بیماران TI دارای دو آلل تالاسمی بتا هستند (۹، ۱۰). مواردی که در آن‌ها تنها یک جایگاه ژنی

بتا درگیر و جایگاه دیگر به طور کامل طبیعی است، بسیار نادرند (۵). حالت‌های هموزیگوت یا هتروزیگوت ترکیبی برای آلل تالاسمی بتا به همراه به ارث رسیدن هم‌زمان تالاسمی آلفا و یا افزایش میزان هموگلوبین F؛ و حالت‌های هتروزیگوت تالاسمی بتا به همراه به ارث رسیدن هم‌زمان ژن‌های اضافی گلوبین آلفا و یا گونه‌های ژنتیکی کم‌یاب تالاسمی، بر هم کنش‌های معمول ژنتیکی هستند که سبب ایجاد فنوتیپ بالینی TI می‌شوند (۲).

وجود جایگاه اثر برای آنزیم محدودالتر  $\gamma$  XmnI (توالی موجود در جایگاه ۱۵۸-ژن گاما-گلیسین) که به پلی‌مورفیسم XmnI معروف است، با احتمال بیشتری با افزایش میزان هموگلوبین F همراه است (۲). افزایش میزان هموگلوبین F در بیماران دارای جهش‌های هموزیگوت یا هتروزیگوت ترکیبی در ژن بتا، می‌تواند شدت تالاسمی را کاهش دهد و سبب ایجاد TI شود (۱۱، ۱). (۱).

در کشور ما آمار دقیقی از تعداد بیماران TI وجود ندارد، چرا که بسیاری از این بیماران به خاطر عدم نیاز به انتقال خون و نداشتن درگیری‌های بالینی، به پزشک مراجعه نمی‌کنند و ناشناخته باقی می‌مانند. برخی هم در سنین بالا به طور اتفاقی طی یک آزمایش معمولی خون شناسایی می‌شوند.

در سطح جهانی مطالعه‌های متنوع و جامعی بر روی TI انجام شده است و اساس مولکولی این بیماری در بسیاری از کشورهای درگیر با این بیماری مشخص شده است (۲۳-۱۲، ۱۰، ۹). در کشور ما نیز مطالعه‌های پراکنده‌ای انجام شده است، اما تاکنون اساس مولکولی TI در ایران به ویژه با دارا بودن جمعیت ناهمگون، به طور دقیق مشخص نشده است (۲۷-۲۴).

در این مطالعه، در نظر داریم که اساس مولکولی TI را در کشور به طور دقیق بررسی کنیم. برای این منظور طی یک طرح جامع پژوهشی، تعیین جهش‌های ژن گلوبین بتا، بررسی هم‌زمان حضور تالاسمی آلفا مانند حذف‌ها و افزودگی‌های ژن آلفا، بررسی پلی‌مورفیسم‌های خوشه ژنی بتا به ویژه پلی‌مورفیسم XmnI و تعیین هاپلوتیپ‌های این خوشه، بررسی عوامل تنظیمی در بالادست و پایین دست خوشه ژنی بتا به ویژه عوامل مؤثر بر روی افزایش بیان

جدول ۱: آغازگرهای به کار رفته در واکنش ARMS برای بررسی جهش IVSII-1 (G&gt;A)

| نام آغازگر                              | توالی الیگونوکلئوتیدی (۳' > ۵') | اندازه محصول |
|-----------------------------------------|---------------------------------|--------------|
| RA (آغازگر رفت توالی طبیعی)             | AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAC  | ۶۳۴ جفت باز  |
| RB (آغازگر رفت توالی جهش یافته IVSII-1) | AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAT  | ۶۳۴ جفت باز  |
| ComC (آغازگر برگشت برای هردو توالی)     | ACCTCACCTGTGGAGCCAC             | ۶۳۴ جفت باز  |
| RD (آغازگر رفت کنترل داخلی)             | GAGTCAAGGCTGAGAGATGCAGGA        | ۸۰۰ جفت باز  |
| RE (آغازگر برگشت کنترل داخلی)           | CAATGTATCATGCCTCTTTGCACC        | ۸۰۰ جفت باز  |

هموگلوبین F را در دستور کار قرار داده ایم. نوشتار حاضر، حاصل فاز نخست این پژوهش به منظور بررسی جهش های ژن بتا، پلی مورفیسم  $XmnI$  و بررسی ارتباط این دو عامل بر روی فنوتیپ بالینی TI (ارتباط ژنوتیپ/فنوتیپ) می باشد.

### مواد و روش ها

نمونه های مورد آزمایش در این پژوهش پایلوت و تجربی، از ۴۲ بیمار TI غیرخویشاوند با شدت متوسط تا شدید (بر اساس تشخیص پزشک معالج هماتولوژیست و بر پایه معیارهایی مانند تظاهر بیماری پس از سن ۲ سالگی، عدم نیاز یا نیاز اتفاقی و گهگاهی به انتقال خون و متوسط سطح هموگلوبین بین ۷-۱۰ گرم در دسی لیتر) که به مدت یک سال به بیمارستان علی اصغر (ع) تهران مراجعه کرده بودند، به روش نمونه گیری آسان و تصادفی و با هماهنگی مسوولین مربوطه و گرفتن رضایت نامه به دست آمدند (۵). حجم نمونه های خون بین ۲ تا ۱۰ میلی لیتر بودند و در لوله های حاوی ضد انعقاد EDTA جمع آوری گردیدند. استخراج DNA به روش مرسوم Salting Out با استفاده از SDS (سدیم دودسیل سولفات) و پروتئیناز K انجام شد (۲۸).

برای بررسی جهش های ژن گلوبین بتا، نخست با استفاده از مطالعه های قبلی انجام شده در ایران در ارتباط

با تعیین جهش های شایع ژن بتا در بیماران تالاسمی ایترمدیا و ماژور ایرانی، تغییر نوکلئوتیدی آدنین با گوانین (G>A) در نخستین باز ایترون دوم ژن بتا (IVSII-1) به عنوان شایع ترین جهش ژن بتا در اغلب جمعیت های ایرانی مبتلا به تالاسمی بتا انتخاب شد (۲۵، ۴). مطلوب ترین روش تعیین جهش های نقطه ای شناخته شده، روش تکثیر متزلزل جهش ها (ARMS-PCR) می باشد (۲۹). بنابراین این روش به عنوان روش غربالگری برای بررسی جهش IVSII-1 (G>A) در همه بیماران مورد مطالعه انتخاب و به کار گرفته شد.

برای انجام ARMS-PCR، در هر واکنش ۵۰۰-۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، مخلوط dNTP با غلظت ۲۰۰ میکرومولار، کلرید منیزیم ۲ میلی مولار، اسپرمیدین، آب، به همراه ۷ پیکومول از هر آغازگر Com C و RA یا RB، ۵ پیکومول از هر آغازگر RD و RE به عنوان کنترل داخلی و سپس یک واحد آنزیم پلی مرز Taq (شرکت سیناژن، ایران) در حجم پایانی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه PCR (ترموسایکلر مدل اپندورف، آلمان) با شرایط دمایی ۹۴ °C (دمای تقلیب)، ۶۷ °C (دمای آنیلینگ) و ۷۲ °C (دمای تکثیر) به تعداد ۲۷ چرخه تکثیر شدند (جدول ۱). پس از پایان چرخه های تکثیر، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ و ولتاژ حدود ۸۰ ولت، الکتروفورز شدند (براساس دستورالعمل بخش ژنتیک انستیتو پاستور ایران).

جدول ۲: آغازگرهای به کار رفته در تعیین توالی قطعات نخست ( $\beta 1$ ) و دوم ( $\beta 2$ ) ژن بتا (۱)

| نام آغازگر                           | توالی الیگونوکلئوتیدی ( $3' > 5'$ ) | اندازه محصول |
|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------|
| $\beta 1F$ (آغازگر رفت $\beta 1$ )   | CTGAGGGTTTGAAGTCCAACCTCC            | ۷۵۰ جفت باز  |
| $\beta 1R$ (آغازگر برگشت $\beta 1$ ) | CTGTACCCTGTTACTTCTCCCCCTT           | ۷۵۰ جفت باز  |
| $\beta 2F$ (آغازگر رفت $\beta 2$ )   | ATGTATCATGCCTCTTTGCACC              | ۵۵۰ جفت باز  |
| $\beta 2R$ (آغازگر برگشت $\beta 2$ ) | GCACTGACCTCCCACATTCC                | ۵۵۰ جفت باز  |

جدول ۳: آغازگرهای به کار رفته در تکثیر پلای مورفیم  $XmnI$  (۱).

| نام آغازگر | توالی الیگونوکلئوتیدی ( $3' > 5'$ ) | اندازه محصول |
|------------|-------------------------------------|--------------|
| $XmnI F$   | AACTGTTGCTTTATAGGATTTT              | ۶۵۷ جفت باز  |
| $XmnI R$   | AGGAGCTTATTGATAACCTCAGAC            | ۶۵۷ جفت باز  |

#### یافته‌ها

کل بیماران در ابتدای پژوهش ۴۲ مورد بودند که پس از بررسی جهش‌های ژن گلوبین بتا، به دلیل این که در ۲ بیمار ژن بتا با آغازگرهای مرسوم تکثیر نشدند و ۲ بیمار نیز هر دو آلل ژن بتای طبیعی داشتند و بنابراین هیچ توجیهی برای ایجاد تالاسمی اینترمدیا در این ۴ بیمار وجود نداشت، این بیماران در این مرحله از پژوهش حذف شدند و بررسی آن‌ها به مراحل بعدی تحقیق موکول شد. بررسی‌ها بر روی ۳۸ بیمار دیگر ادامه یافت. لازم به ذکر است که در جمعیت بیماران مورد مطالعه، بیمارانی از نقاط گوناگون کشور نیز حضور داشتند.

از ۳۸ بیمار مورد مطالعه، ۱۴ بیمار (۳۶/۸٪) مذکر و ۲۴ بیمار (۶۳/۲٪) مؤنث بودند. دامنه سنی بیماران از ۴ تا ۲۶ سال و با میانگین ۱۰/۵ سال بود. فنوتیپ بالینی در بیماران، بین TI با شدت متوسط تا TI شدید بود. ۱۶ بیمار (۴۲/۱٪) در طی بیماری خود یک یا چند واحد گویچه سرخ فشرده (Packed Red Cell) به صورت گهگاهی و یا

بر اساس مطالعه‌های پیشین، جهش‌های دیگر ژن بتا در جمعیت تهران شیوع زیادی نداشتند و بنابراین پس از غربال جهش  $G > A$  IVSII-1، در صورت حضور دست کم یک آلل طبیعی برای این جهش، ژن بتا به روش ختم زنجیره تعیین توالی شد (از طریق ارسال به شرکت ماکروژن، کره جنوبی) (۳۰، ۴). توالی آغازگرهای مورد استفاده در تعیین توالی ژن بتا گلوبین به صورت جدول ۲ بود (۱):

برای تفسیر نمودارهای تعیین توالی از برنامه‌های کروماس (Chromas) و بلاست (Blast) استفاده شد.

روش چند شکلی در طول قطعات محدود (RFLP) که شامل یک مرحله PCR و یک مرحله هضم آنزیمی (توسط آنزیم محدودالثر  $XmnI$ ) می‌باشد، روش مناسبی برای بررسی پلای مورفیم  $XmnI$  5' است (۱).

برای انجام RFLP، نخست نمونه‌های DNA با استفاده از PCR با دمای آنیلینگ  $55^{\circ}C$  و تعداد ۳۰ چرخه تکثیر شدند. برای تکثیر از توالی آغازگرهای رفت ( $XmnI F$ ) و برگشت ( $XmnI R$ ) طبق جدول استفاده شد (۱) (جدول ۳):

پس از انجام PCR، به میزان ۱۰ میکرولیتر محصول PCR (حدود ۱ میکروگرم DNA خالص)، ۱۰ واحد آنزیم  $XmnI$  (۱ میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر بافر  $X$  ۱۰ و ۷ میکرولیتر آب مقطر (حجم کلی ۲۰ میکرولیتر) با هم مخلوط شده و پس از یک شب انکوباسیون در  $37^{\circ}C$ ، بر روی ژل ۲٪-۱/۵٪ آگارز و با ولتاژ ۶۵ ولت الکتروفورز شد. محصول PCR دارای طولی برابر ۶۵۷ جفت باز و قطعات حاصل از هضم آنزیمی دارای طول ۴۵۵ و ۲۰۲ جفت باز بودند.

جدول ۴: نتایج نهایی حاصل از بررسی جهش‌های ژن گلوبین بتا و پلی مورفیسم  $XmnI$  به همراه دیگر یافته‌های بالینی و آزمایشگاهی در ۳۸ بیمار تالاسمی اینترمدیا. N نشانه آلل طبیعی (Normal) می‌باشد.

| سن تشخیص<br>(Mean $\pm$ SD) | سن<br>(Mean $\pm$ SD) | HbF<br>(درصد)    | Hb (g/dl)       | درصد  | تعداد | نوع جهش            | جهش‌های<br>ژن بتا                          | پلی مورفیسم<br>$XmnI$ |
|-----------------------------|-----------------------|------------------|-----------------|-------|-------|--------------------|--------------------------------------------|-----------------------|
| ۵/۸ $\pm$ ۵/۶               | ۱۰/۵۸ $\pm$ ۵/۱       | ۶۴/۵۱ $\pm$ ۹/۵۶ | ۸/۵۲ $\pm$ ۱/۸۷ | ۳۹/۴۷ | ۱۵    | $\beta^0/\beta^0$  | IVSII-1(G>A)/<br>IVSII-1(G>A)              | +/+                   |
| ۵                           | ۱۶                    | ۴۷/۵             | ۸/۳             | ۲/۶۳  | ۱     | $\beta^0/\beta^0$  | IVSII-1(G>A)/<br>IVSII-1(G>A)              | -/+                   |
| ۲/۸ $\pm$ ۱/۷               | ۷ $\pm$ ۱/۴           | ۵۶/۱ $\pm$ ۱۰    | ۸/۹۵ $\pm$ ۰/۱  | ۷/۸۹  | ۳     | $\beta^0/\beta^0$  | IVSII-1(G>A)/<br>Codons 36/37(-T)          | -/+                   |
| ۵                           | ۶                     | ۶۴/۱             | ۸/۸             | ۲/۶۳  | ۱     | $\beta^+/ \beta^0$ | IVSII-1(G>A)/<br>IVSI-110(G>A)             | +/+                   |
| ۶                           | ۷                     | ۵۵               | ۸/۱             | ۲/۶۳  | ۱     | $\beta^+/ \beta^0$ | IVSII-1(G>A)/<br>IVSI-5(G>C)               | -/+                   |
| ۶                           | ۹                     | ۵۱               | ۶/۶             | ۲/۶۳  | ۱     | $\beta^0/\beta^0$  | IVSII-1(G>A)/<br>Codon 30(G>A)             | -/+                   |
| ۱                           | ۹                     | ۷۵               | ۱۰/۴            | ۲/۶۳  | ۱     | $\beta^0/\beta^0$  | IVSII-1(G>A)/<br>Codon 5 (-CT)             | +/+                   |
| ۶                           | ۲۶                    | ۵۷               | ۸/۳             | ۲/۶۳  | ۱     | $\beta^0/\beta^0$  | IVSII-1(G>A)/<br>Codons 22/23/24(-AAGTTGG) | +/+                   |
| ۲                           | ۵                     | ۵۹/۵             | ۸/۴۵            | ۲/۶۳  | ۱     | $\beta^+/ \beta^0$ | IVSII-1(G>A)/<br>Codons 8/9(+G)            | +/+                   |
| ۲                           | ۲۶                    | ؟                | ۱۱/۴            | ۲/۶۳  | ۱     | $\beta^+/ \beta^0$ | IVSII-1(G>A)/ N                            | -/+                   |
| ۷ $\pm$ ۶/۵۶                | ۷ $\pm$ ۶/۵۶          | ۶۵ $\pm$ ۶/۷۶    | ۹/۶۷ $\pm$ ۰/۷۵ | ۱۰/۵۲ | ۴     | $\beta^0/\beta^0$  | Codon 8(-AA)/ Codon 8(-AA)                 | +/+                   |
| ۲                           | ۵                     | ۵۴               | ۸/۵             | ۲/۶۳  | ۱     | $\beta^+/ \beta^+$ | IVSI-6(T>C)/<br>IVSI-6(T>C)                | -/-                   |
| ۴                           | ۶                     | ۷۵/۱             | ۹/۵             | ۲/۶۳  | ۱     | $\beta^+/ \beta^+$ | IVSI-5(G>C)/<br>IVSI-5(G>C)                | -/-                   |
| ۱                           | ۴                     | ۵۹/۷             | ۸/۴             | ۲/۶۳  | ۱     | $\beta^0/\beta^0$  | Codon 15(G>A)/<br>Codon 15(G>A)            | -/-                   |
| ۳                           | ۷                     | ۸۰/۵             | ۹/۷             | ۲/۶۳  | ۱     | $\beta^0/\beta^0$  | Codon 30(G>A)/<br>Codon 30(G>A)            | +/+                   |
| ۱                           | ۴                     | ۶۳/۳۸            | ۸/۶             | ۲/۶۳  | ۱     | $\beta^0/\beta^0$  | Codon 30(G>A)/<br>Codons 82/83(-G)         | +/+                   |

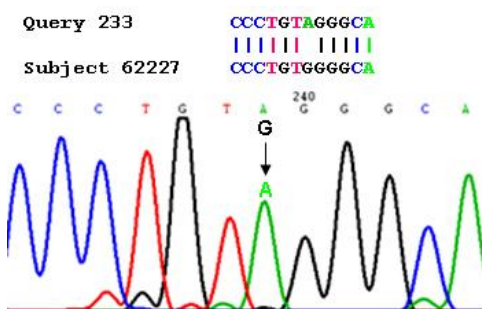
|     |                                  |                   |   |      |     |      |   |   |
|-----|----------------------------------|-------------------|---|------|-----|------|---|---|
| -/+ | -88(C>A)/<br>Codons<br>36/37(-T) | $\beta^0/\beta^+$ | ۱ | ۲/۶۳ | ۹/۱ | ۵۸/۱ | ۸ | ۱ |
| -/+ | Codons<br>8/9(+G)/ N             | $\beta^0/\beta^0$ | ۱ | ۲/۶۳ | ۸/۴ | ۱۰/۳ | ۵ | ؟ |
| +/+ | IVSII-25bp<br>Del/ N             | $\beta^0/\beta^0$ | ۱ | ۲/۶۳ | ؟   | ؟    |   | ۵ |

جدول ۵: وضعیت پلی مورفیسم XmnI در بیماران TI مورد بررسی

| پلی مورفیسم XmnI | تعداد بیماران | درصد بیماران |
|------------------|---------------|--------------|
| +/+              | ۲۶            | ۶۸/۴۲        |
| -/+              | ۹             | ۲۳/۶۸        |
| -/-              | ۳             | ۷/۸۹         |



شکل ۱: الکتروفورز محصول ARMS-PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ برای جهش IVSII-1 در ۵ بیمار تالاسمی ایترمدیا. شماره‌های ۱۰-۱ مربوط به نمونه‌های بیماران، ۱۲ و ۱۳ کنترل هتروزیگوت، و ۱۴ کنترل طبیعی، ۱۶ و ۱۷ کنترل منفی بدون DNA و ۱۱ و ۱۸ مربوط به نشانگر اندازه (size marker) ۱۰۰ جفت‌بازی (100 bp) می‌باشند. باند کنترل داخلی ۸۰۰ جفت‌باز و باند طبیعی و جهش یافته ۶۳۴ جفت‌باز طول دارند.



نمودار ۱: کروماتوگرام ژن گلوبین بتا برای جهش (G>A) Codon 15 به صورت هموزیگوت در یک بیمار تالاسمی ایترمدیا. نتیجه تعیین توالی با Accession No: U01317 در بانک ژن (Gene Bank) مقایسه شده است.

در زمان‌هایی مانند بارداری دریافت کرده بودند. ۲۲ بیمار دیگر (۵۷/۹٪) اظهار می‌داشتند که تاکنون دریافت خون نداشته‌اند. ۱۵ بیمار (۳۹/۵٪) در هنگام نمونه‌گیری مورد طحال‌برداری قرار گرفته بودند. ۱۳ بیمار (۳۴/۲٪) به طور مرتب و یا در طی دوره‌ای از بیماری خود کپسول هیدروکسی‌اوره مصرف کرده بودند. سطح هموگلوبین کل بین ۶/۶-۱۱/۴ و با میانگین ۹/۰۵ گرم در دسی‌لیتر و میزان هموگلوبین جنینی (F) بین ۸۰/۵-۱۰/۳ و با میانگین ۶۲/۰۸ بود (جدول ۴).

یافته‌های به‌دست‌آمده از بررسی جهش‌های ژن بتا:

ابتدا با استفاده از روش ARMS-PCR، نمونه‌های همه بیماران برای جهش IVSII-1(G>A) بررسی شدند (شکل ۱). سپس در صورت وجود دست‌کم یک آلل (کروموزوم) طبیعی ژن بتا در این بیماران، نمونه‌های DNA تعیین توالی شدند تا جهش در آلل دیگر ژن هم مشخص شود (نمودار ۱). از میان ۳۸ بیمار مبتلا به TI، ۲۴ بیمار (۶۳/۱۶٪) دارای جهش‌های هموزیگوت، ۱۱ بیمار (۲۸/۹۵٪) جهش‌های هتروزیگوت ترکیبی و ۳ بیمار (۷/۸۹٪) دارای جهش‌های تالاسمی بتا به صورت هتروزیگوت ساده بودند. هم‌چنین از ۷۶ آلل (۳۸ بیمار)، جهش‌های شدید ( $\beta^0$ ) شامل ۶۶ آلل (۸۶/۸۴٪)، جهش‌های خفیف ( $\beta^+$ ) تنها ۷ آلل (۹/۲۱٪) و کروموزوم سالم نیز تنها ۳ آلل (۳/۹۵٪) را دربر می‌گرفتند (نمودار ۲).

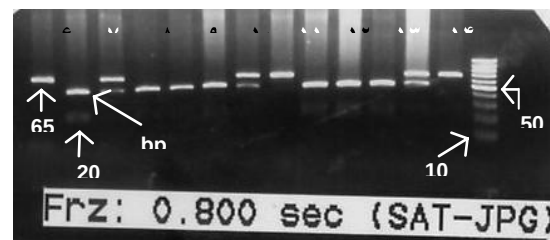
یافته‌های RFLP:

با استفاده از روش RFLP، پلی مورفیسم XmnI طی دو مرحله PCR و هضم آنزیمی توسط آنزیم محدودالایر XmnI بررسی شد (شکل ۲).

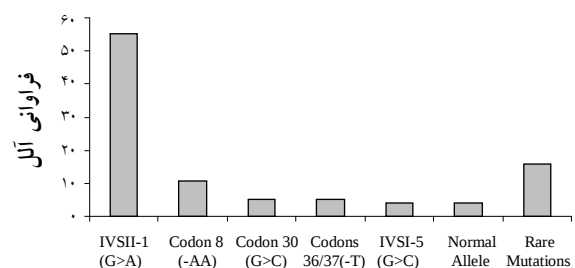
به طور کلی از ۷۶ آلل مورد بررسی، ۶۱ آلل (۸۰/۲۶٪) برای جایگاه برش آنزیم XmnI مثبت، و تنها ۱۵ آلل (۱۹/۷۴٪) منفی بودند (جدول ۵).

نتایج نهایی به دست آمده از جهش های ژن بتا و پلی مورفیسم *XmnI*:

نتایج کامل جهش های یافت شده در ژن بتا به همراه پلی مورفیسم *XmnI* و دیگر یافته های آزمایشگاهی و بالینی بیماران TI در جدول ۴ ارایه شده است.



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR برای پلی مورفیسم *XmnI* پس از هضم آنزیمی. شماره های ۱-۱۰ مربوط به بیماران، ۱۱ کنترل ++، ۱۲ کنترل +/-، ۱۳ کنترل -/- و ۱۴ نشانگر اندازه (size marker) ۱۰۰ جفت بازی است. طول محصول PCR هضم نشده (undigested) ۶۵۷ جفت باز و طول محصولات هضم شده ۴۵۵ و ۲۰۲ جفت باز است.



نمودار ۲: فراوانی جهش های یافت شده در ژن بتا بیماران تالاسمی اینترمدیا با استفاده از ARMS-PCR و تعیین توالی ژن گلوبین بتا

## بحث

ارتباط ژنوتیپ/فنوتیپ در TI به خاطر شمار زیادی از برهم کنش های ژنتیکی و به علاوه عوامل غیرژنتیکی که می توانند فنوتیپ بالینی را تحت تاثیر قرار دهند، بسیار پیچیده و مشکل است (۱، ۲، ۵، ۹). بنابراین عجیب نیست که این بیماری بسیار ناهمگون باشد. افزون بر این، نمی توان ثابت کرد که تا چه میزان از ناهمگونی بالینی مربوط به ناهنجاری ژنتیکی است و چه میزان مربوط به عوامل غیرژنتیکی. با این حال مهم ترین عامل موثر بر ایجاد

فنوتیپ بالینی TI، نوع جهش ژن گلوبین بتا است (۳۱، ۸). (۱)

در کشور ایران تاکنون چهار مطالعه بر روی سازوکارهای مولکولی مسبب TI انجام شده است که مطالعه حاضر پنجمین مورد می باشد.

در مطالعه اکبری و همکاران در سال ۱۳۷۹ بر روی ۵۰ بیمار TI ایرانی، وجود جهش IVSII-1 (G>A) و پلی مورفیسم *XmnI* بررسی شدند که جهش IVSII-1، شیوع ۶۰٪ و پلی مورفیسم *XmnI* شیوع ۷۶٪ را در این بیماران دارا بودند (۲۴). نتایج مطالعه حاضر که شیوع IVSII-1 را ۵۵/۲۶٪ و شیوع پلی مورفیسم *XmnI* را ۸۰/۲۶٪ به دست آورده است، یافته های مطالعه اکبری و همکاران را تایید می کند. هر چند در مطالعه یاد شده، اصلیت بیماران مورد مطالعه ذکر نشده بود.

در سال ۲۰۰۲، کریمی و همکاران، ۸۷ بیمار شیرازی مبتلا به TI را به منظور یافتن جهش های مسبب TI و نیز پلی مورفیسم *XmnI* مورد بررسی قرار دادند (۲۵). در این مطالعه با استفاده از روش ARMS-PCR تنها ۴ جهش IVSII-1 (G>A) (۲۴٪)، Codons 8/9 (+G) (۳/۵٪)، IVSI-110 (G>A) (۱/۲٪) و IVSI-1 (G>A) (۰/۶٪) و به طور کلی تنها جهش های ۲۹٪ آلل های ژن بتا گلوبین یافت گردید. پلی مورفیسم *XmnI* نیز تنها در ۴۸ بیمار به همراه ۵۰ داوطلب سالم بررسی شد که در گروه بیمار، ۴۰/۶٪ و در گروه سالم ۱۴٪ دارای این جایگاه بودند. هم چنین ۸۷/۵٪ بیماران هموزیگوت جهش IVSII-1 دارای پلی مورفیسم *XmnI* بودند. بر خلاف مطالعه یاد شده، پژوهش حاضر ۱۴ جهش را در ژن بتای بیماران TI به دست آورده است، با این حال مطالعه حاضر، شایع ترین جهش گزارش شده در مطالعه کریمی و همکاران یعنی IVSII-1 (G>A) را تایید می کند، هرچند در پژوهش حاضر شیوع IVSII-1 (۵۵/۲۶٪) بیشتر از مطالعه مذکور به دست آمده است. شیوع جهش های Codons 8/9 (+G) و IVSI-110 (G>A) در پژوهش حاضر به ترتیب ۲/۶۳٪ و ۱/۳۲٪ بودند که با مطالعه پیشین تفاوت زیادی ندارد. شیوع پلی مورفیسم *XmnI* نیز در مطالعه پیشین (۴۰/۶٪) بسیار کمتر از پژوهش حاضر (۸۰/۲۶٪) گزارش شده است.

(G>C)، IVSI-6 (T>C)، IVSI-110 (G>A) و (C>A) 88- بودند که در مجموع تنها ۹٪ جهش‌های ژن بتا را تشکیل می‌دادند. جهش‌های شدید (+T) Codons 25/26، IVSI-1 (G>A)، Codon39 (C>T) و Codon44 (-C) و هم‌چنین جهش‌های خفیف IVSI-128 (T>G) که در مطالعه نیشابوری و همکاران گزارش شده‌اند، در مطالعه حاضر یافت نشدند. از سوی دیگر، جهش‌های شدید IVSI-25bp deletion و Codon15 (G>A) در پژوهش حاضر، در مطالعه نیشابوری و همکاران گزارش نشدند. در مطالعه حاضر، ۹۳/۷۵٪ بیماران هموزیگوت برای جهش IVSII-1 دارای پلی‌مورفیسم XmnI به صورت ++ و ۶/۲۵٪ آن‌ها به صورت +/- بودند. هم‌چنین به جز پیوستگی بالای جهش IVSII-1 و پلی‌مورفیسم XmnI در مطالعه ما، این پلی‌مورفیسم با جهش شدید Codon 8 (-AA) نیز پیوستگی بسیار بالایی (۱۰۰٪) داشت که در مطالعه نیشابوری و همکاران گزارش نشده بود. اصلیت بیماران نیز در مطالعه نیشابوری و همکاران ذکر نشده بود. هم‌چنین در پژوهش حاضر، حذف‌های تالاسمی دلتا - بتا (δβ) بررسی نشدند و بررسی بر روی حذف‌های ژن آلفا نیز به فازهای بعدی پژوهش موکول شد.

حقی و همکاران در سال ۲۰۰۹ یک مورد از جهش نادر Codons 25/26 (+T) (یک آلل β<sup>0</sup>) را برای نخستین بار در یک خانواده آذربایجانی در ایران گزارش کردند که به همراه پلی‌مورفیسم XmnI سبب ایجاد TI شده بود. این جهش در مطالعه حاضر یافت نگردید (۲۷).

جهش‌های خفیف علت ایجاد بسیاری از موارد TI در دنیا و به ویژه مناطق مدیترانه‌ای هستند، اما در مطالعه حاضر این جهش‌ها نقش بسیار کمی در ایجاد بیماری داشتند و تنها ۹/۲۱٪ آلل‌های بیماران TI این پژوهش را تشکیل می‌دادند (۳۲-۳۴). جهش IVSI-5 (G>C)، شایع‌ترین آلل تالاسمی بتا در جنوب، شرق و جنوب شرقی ایران (استان‌های خراسان، کرمان، سیستان و بلوچستان و هرمزگان) است (۳۵، ۴). هم‌چنین این جهش دومین جهش شایع در کل کشور پس از IVSII-1 می‌باشد که شیوع آن از شمال به طرف جنوب بیشتر می‌شود و در واقع یک جهش هندی - آسیایی است (۴). تغییر

هم‌چنین بر خلاف مطالعه مذکور، در پژوهش حاضر پلی‌مورفیسم XmnI در افراد سالم به منظور کنترل، مورد استفاده قرار نگرفت. این پژوهش هم‌چنین پیوستگی بالای جهش هموزیگوت IVSII-1 و پلی‌مورفیسم XmnI را در مطالعه پیشین تایید می‌کند (۹۳/۷۵٪ در مطالعه حاضر در مقایسه با ۸۷/۵٪ در مطالعه کریمی و همکاران).

در پژوهشی توسط نیشابوری و همکاران در سال ۲۰۰۸، پلی‌مورفیسم XmnI<sup>6</sup>، توارث آلل‌های خفیف و خاموش تالاسمی، حذف‌های دلتا - بتا تالاسمی و توارث هم زمان آلفا و بتا تالاسمی در ۵۲ بیمار مشکوک به TI بررسی شد (۲۶). جهش‌های ژن بتا با روش هیبریدیژاسیون معکوس (reverse hybridization assay) و بررسی XmnI توسط RFLP انجام شد. در این بررسی، توارث XmnI به همراه آلل‌های شدید تالاسمی بتا به صورت هموزیگوت و یا هتروزیگوت ترکیبی، سازوکار غالب ایجاد TI بود که در ۵۵/۳٪ بیماران یافت شد.

IVSII-1 (G>A) شایع‌ترین جهش با فراوانی ۴۵/۵٪ بود. جهش‌های شدید (β<sup>0</sup>) (-G) IVSII-850 و Codons 22/23/24 (7bp deletion) هر کدام با شیوع ۴/۳٪ در جایگاه بعدی بودند. هم‌چنین در این مطالعه ۱۴/۸٪ آلل‌های تالاسمی بتا، جهش‌های خفیف مانند IVSI-6 (T>C) و (C>A) 88- بودند که دومین علت ایجاد TI محسوب می‌شدند. افزون بر این، ۵۹/۱٪ هموزیگوت‌ها و ۴۰/۹٪ هتروزیگوت‌های جهش‌های شدید ژن بتا، شاخص XmnI مثبت داشتند. در پژوهش مذکور، همراهی تالاسمی آلفا نیز در ۸/۵٪ موارد گزارش شد. در توافق با مطالعه یاد شده، در پژوهش حاضر نیز توارث هم‌زمان آلل‌های شدید ژن بتا (β<sup>0</sup>) به همراه پلی‌مورفیسم XmnI، اصلی‌ترین یافته مولکولی بیماران TI به دست آمد، اما در این مطالعه سازوکار یاد شده در بیش از ۸۰٪ بیماران یافت گردید. آلل‌های شدید تالاسمی بتا نیز در ۸۶/۸۴٪ موارد در پژوهش حاضر دیده شد که IVSII-1 با ۵۵/۲۶٪ فراوانی آلی، شایع‌ترین جهش بود. Codon8 (-AA) دومین جهش شایع با شیوع ۱۰/۵۳٪ در تحقیق حاضر بود که در مطالعه نیشابوری و همکاران گزارش نشده بود (۲۶). هم‌چنین آلل‌های خفیف در این پژوهش شامل جهش‌های IVSI-5

نوکلئوتیدی  $G>C$  در پنجمین نوکلئوتید اینترون نخست ژن بتا، بر پیرایش طبیعی به میزان زیادی تاثیر گذاشته و در نتیجه تنها میزان بسیار کمی از محصول گلوبین بتا حاصل خواهد شد (تالاسمی  $\beta^+$  شدید) ( $\beta^+$  Severe) (۳۶). شیوع این جهش در مطالعه حاضر ۳/۹۵٪ بود.

جهش  $IVSI-6$  ( $T>C$ ) یک جهش جایگاه پیرایش است که گاه گونه پرتغالی (Portuguese variant) نیز خوانده می شود، چون نخستین بار در پرتغال گزارش شد (۱). این جهش یکی از شایع ترین اشکال تالاسمی بتا خفیف ( $\beta^+$ ) است و در جمعیت های مدیترانه ای شیوع گسترده ای دارد. حالت هموزیگوت آن سبب ایجاد  $TI$  خفیف تا متوسط می شود، اما به نظر می رسد که برهم کنش آن با آلل های  $\beta^0$  شدت بیشتری دارد و یک  $TI$  شدید را در انتهای گستره بالینی این بیماری ایجاد می کند (۱). بیشترین شیوع این جهش در ایران، در استان های جنوبی (خوزستان و شیراز) گزارش شده است (۴). فراوانی این جهش در بیماران  $TI$  در پژوهش حاضر، تنها ۲/۶۳٪ بود.

جهش  $IVSI-110$  ( $G>A$ ) شایع ترین جهش تالاسمی خفیف ( $\beta^+$ ) مدیترانه ای است (۳۷، ۲۹). هم چنین این جهش در غرب و جنوب ایران شایع است (۴). جایگزینی  $G>A$  در جایگاه ۱۱۰ مربوط به اینترون نخست ژن گلوبین بتا، سبب ایجاد یک جایگاه پیرایشی فرعی در اینترون می شود و کارایی ترجمه mRNA را کمی کاهش می دهد (تالاسمی  $\beta^+$  خفیف) (۳۸، ۳۶). در مطالعه حاضر، این جهش تنها ۱/۳۲٪ فراوانی را دارا بود.

جایگزینی آدنین به جای سیتوزین در جایگاه ۸۸- جعبه CACCC آغازگر ژن گلوبین بتا، سبب کاهش کارایی ترجمه mRNA گلوبین بتا به میزان اندکی می شود و یک تالاسمی  $\beta^+$  ایجاد می کند (۳۸). احتمال دارد که جهش  $88(C>A)$ - ویژه جمعیت ایرانی باشد، اما شیوع کمی دارد (۳۹). فراوانی این جهش نیز در بیماران  $TI$  در مطالعه حاضر ۱/۳۲٪ بود.

از سوی دیگر بیشتر بیماران مورد پژوهش (حدود ۸۷٪) دارای جهش های شدید  $\beta^0$  بودند که سهم  $IVSI-1$  از این بین، بیش از ۵۵٪ بود. این یافته با مطالعه های پیشین درباره بیماران  $TI$  ایرانی هم خوانی دارد (۲۴-۲۶). هرچند هنوز

مطالعه جامع جمعیتی در نژادهای مختلف ایرانی در مورد  $TI$  و پراکندگی جهش های آن در کشور ما انجام نشده است، اما این پژوهش به همراه دیگر پژوهش های پراکنده نشان می دهد که جهش های  $\beta^0$  و به ویژه  $IVSI-1$ ، دارای اصلی ترین نقش در ایجاد  $TI$  در ایران هستند.

بیشتر بیماران مورد مطالعه (۸۰/۲۶٪) دارای کروموزوم با جایگاه برش آنزیم  $XmnI$  و تنها کمتر از ۲۰٪ بیماران بدون این جایگاه بودند. یافته دیگر، توارث هم زمان برخی جهش های ژن بتا با پلی مورفیسم  $XmnI$  بود. از ۱۶ بیمار دارای جهش  $IVSI-1$  به صورت هموزیگوت، ۱۵ بیمار (۹۳/۷۵٪) دارای نشانگر  $XmnI^{+/-}$  و تنها یک بیمار (۶/۲۵٪) دارای  $XmnI^{+/-}$  بودند. این امر بیانگر پیوستگی بالای جهش  $IVSI-1$  و پلی مورفیسم  $XmnI$  است. هم چنین همه بیماران دارای جهش Codon 8 به صورت هموزیگوت (۱۰۰٪)، دارای نشانگر  $XmnI^{+/-}$  بودند. پیوستگی ژنتیکی جهش های  $IVSI-1$  ( $G>A$ ) و  $8(-AA)$  Codon با حالت مثبت پلی مورفیسم  $XmnI$  اثبات شده است (۳۱، ۷، ۱). بنابراین یافته های این پژوهش به طور کامل بر این اصول منطبق است. افزون بر این دو، به طور کلی، ۲۴ بیمار از ۳۰ بیمار دارای ژنوتیپ  $\beta^0/\beta^0$  (۸۰٪) دارای نشانگر  $XmnI^{+/-}$  (۱۶، ۶۷٪) بیمار  $XmnI^{+/-}$  و تنها یک بیمار (۳/۳۳٪)  $XmnI^{-/-}$  بودند. هم چنین هر دو مورد بیمار دارای ژنوتیپ  $\beta^+/ \beta^+$  (۱۰۰٪)  $XmnI^{-/-}$  بودند.

یافته جالب دیگر در بیماران مورد بررسی، میزان بالای هموگلوبین F (میانگین بیش از ۶۲٪) بود، به طوری که سطح هموگلوبین F تنها در یک بیمار برابر با ۱۰/۳٪ و در بقیه بیش از ۴۰٪ بود. به نظر می رسد این سطح بسیار بالای هموگلوبین F، بیانگر نقش بسیار زیاد این هموگلوبین در پاتوفیزیولوژی بیماران  $TI$  در جمعیت مورد مطالعه باشد. با توجه به این که بیش از ۸۰٪ بیماران برای نشانگر  $XmnI$  مثبت، و از طرفی ۸۷٪ بیماران  $TI$  دارای جهش های شدید ( $\beta^0$ ) بودند، می توان گفت که پلی مورفیسم  $XmnI$  نقش زیادی در افزایش میزان هموگلوبین F بیماران دارای جهش های شدید و کاهش فتوتیپ بالینی این بیماران و ایجاد  $TI$  داشته است. با توجه به این که جمعیت مورد مطالعه تا حدودی ناهمگون بود و بیماران از مناطق دیگر

هستند، اما به خودی خود قادر به ایجاد تالاسمی اینترمدیا نیستند، چراکه بسیاری از بیماران این پژوهش دارای ژنوتیپ  $\beta^0/\beta^0$  بودند و در این صورت می‌بایست به طور معمول مبتلا به تالاسمی شدید وابسته به انتقال خون (ماژور) می‌شدند. مهم‌ترین عامل تخفیف شدت بالینی بیماران TI در بیماران مورد پژوهش، میزان بالای هموگلوبین F به دلیل به ارث رسیدن هم‌زمان پلی‌مورفیسم  $XmnI$  در یک زمینه جهش‌های شدید ژن گلوبین بتا بود. این یافته به همراه یافته‌های دیگر پژوهشگران، می‌تواند در مشاوره ژنتیک بیماران و خانواده‌های آنان به ویژه در مواردی مانند ازدواج بیمار و یا اعضای خانواده وی، هم‌چنین بهبود و کنترل وضعیت بالینی بیماران تالاسمی به ویژه TI در کشور مورد استفاده قرار گیرد.

#### تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی و در بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور انجام شده است. بدین‌وسیله از همه همکاران محترم این بخش و نیز همکاران محترم بیمارستان علی‌اصغر (ع) تهران به خاطر مساعدت در تهیه نمونه‌های بیماران TI و تاریخچه بالینی آن‌ها تشکر و قدردانی می‌گردد.

ایران هم در این پژوهش حضور داشتند، می‌توان گفت که دست‌کم یکی از مهم‌ترین سازوکارهای مولکولی ایجاد TI در کشور ما، بودن پلی‌مورفیسم  $XmnI$  در یک زمینه جهش‌های شدید  $\beta^0$  به ویژه IVSII-1 می‌باشد. این یافته هرچند با دیگر منابع معتبر هم‌خوانی دارد، اما پلی‌مورفیسم  $XmnI$  در دیگر جمعیت‌ها نقشی به این آشکاری و یا به تنهایی در افزایش میزان هموگلوبین F و در نتیجه ایجاد فنوتیپ بالینی TI نداشته است (۴۰، ۳۶، ۹، ۵، ۲، ۱).

سه بیمار از ۳۸ بیمار مورد پژوهش (حدود ۸٪) دارای یک جهش  $\beta^0$  و یک آلل طبیعی ژن بتا بودند. هرچند که در گستره ژنتیکی TI، درگیری یک آلل تکی ژن بتا نیز به ندرت می‌تواند سبب ایجاد این بیماری شود، با این حال برای توجیه علت ایجاد TI در این بیماران و موارد مشابه، لازم است همراهی ژن‌های آلفا به صورت سه‌تایی ( $\alpha\alpha\alpha$ ) و یا حتی چهارتایی ( $\alpha\alpha\alpha\alpha$ )، و نیز احتمال دخالت عوامل ژنتیکی دیگر در داخل و یا خارج از خوشه ژنی گلوبین بتا ارزیابی شود (۵، ۱).

هم‌چنین در یک بیمار دارای ژنوتیپ  $\beta^0/\beta^0$  (Codon15/Codon 15) که فاقد جایگاه برش آنزیم  $XmnI$  بود ( $XmnI/-$ )، فنوتیپ TI قابل توجیه نبود، که احتمال دارد این بیمار دارای توارث هم‌زمان تالاسمی آلفا باشد.

#### نتیجه‌گیری

جهش‌های ژن بتا اگرچه مهم‌ترین عامل مسبب TI

#### References :

- 1- Weatherall DJ, Clegg JB, Gibbons R, Higgs DR, Old JM, Olivieri NF, *et al*, editors. The Thalassemia Syndromes. 4<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Science; 2001.
- 2- Thein SL. Pathophysiology of  $\beta$ -thalassaemia- a guide to molecular therapies. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2005; 31-7.
- 3- Kumar Das S, Talukder G. Beta globin genes and related diseases: A review. Int J Hum Genet 2002; 2(3): 139-52.
- 4- Najmabadi H, Karimi-Nejad R, Sahebjam S, Pourfarzad F, Teimourian S, Sahebjam F, *et al*. The  $\beta$ -thalassaemia mutation spectrum in the Iranian population. Hemoglobin 2001; 25(3): 285-96.
- 5- Taher A, Isma'eel H, Cappellini MD. Thalassemia intermedia: Revisited. Blood Cell Mol Dis 2006; 37(1): 12-20.
- 6- Randolph TR. Thalassemia. In: McKenzie SB. Clinical Laboratory Hematology. New Jersey: Pearson Education; 2004. p. 239-62.
- 7- Thein SL. Genetic modifiers of  $\beta$ -thalassaemia. Haematologica 2005; 90(5): 649-60.
- 8- Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic diseases: Lessons from the thalassemias. Nat Rev Genet 2001; 2(4): 245-55.
- 9- Ho PJ, Hall GW, Luo LY, Weatherall DJ, Thein SL. Beta thalassaemia intermedia: Is it possible consistently to predict phenotype from genotype? Br J Haematol 1998; 100(1): 70-8.
- 10- Camaschella C, Maza U, Roetto A, Gottardi E, Parziale A, Travi M, *et al*. Genetic interactions in thalassemia intermedia: analysis of beta-mutations, alpha-genotype, gamma-promoters, and beta-LCR hypersensitive sites 2 and 4 in Italian patients. Am J Hematol 1995; 48: 82-7.
- 11- Garner C, Tatu T, Game L, Cardon LR, Spector TD,

- Farrall M, *et al.* A candidate gene study of F cell levels in sibling pairs using a joint linkage and association analysis. *GeneScreen* 2000; 1: 9-14.
- 12- Wainscoat JS, Kanavakis E, Wood WG, Latsky EA, Huehns ER, Marsh GW, *et al.* Thalassaemia intermedia in Cyprus: the interaction of alpha and beta thalassaemia. *Br J Haematol* 1983; 53(3): 411-6.
  - 13- Kulozik AE, Kohne E, Kleihauer E. Thalassaemia intermedia: Compound heterozygous beta zero/beta(+)-thalassaemia and co-inherited heterozygous  $\alpha$ +thalassaemia. *Ann Hematol* 1993; 66(1): 51-4.
  - 14- Camaschella C, Capellini MD. Thalassaemia intermedia. *Haematologica* 1995; 80(1): 58-68.
  - 15- Badens C, Mattei MG, Imbert AM, Lapoum roulie C, Martini N, Michel G, *et al.* A novel mechanism for thalassaemia intermedia. *Lancet* 2002; 359(9301): 132-3.
  - 16- Phadke SR, Agarwal S. Phenotype score to grade the severity of thalassaemia intermedia. *Indian J Pediatr* 2003; 70(6): 477-81.
  - 17- Tyagi S, Kabra M, Tandon N, Saxena R, Pati HP, Choudhry VP. Clinico-haematological profile of thalassaemia intermedia patients. *Int J Hum Genet* 2003; 3(4): 251-8.
  - 18- Galanello R, Perseu L, Perra C, Maccioni L, Barella S, Longinotti M, *et al.* Somatic deletion of the normal beta-globin gene leading to thalassaemia intermedia in heterozygous beta-thalassaemic patients. *Br J Haematol* 2004; 127(5): 604-6.
  - 19- Premawardhena A, Fisher CA, Olivieri NF, de Silva S, Sloane-Stanley J, Wood WG, *et al.* A novel molecular basis for  $\beta$ -thalassaemia intermedia poses new questions about its pathophysiology. *Blood* 2005; 106(9): 3251-5.
  - 20- Panigrahi I, Agarwal S, Pradhan M, Choudhry DR, Choudhry VP, Saxena R. Molecular characterization of thalassaemia intermedia in Indians. *Haematologica* 2006; 91(9): 1279-80.
  - 21- Verma IC, Kleanthous M, Saxena R, Fucharoen S, Winichagoon P, Raizuddin S, *et al.* Multicenter study of the molecular basis of thalassaemia intermedia in different ethnic populations. *Hemoglobin* 2007; 31(4): 439-52.
  - 22- Sollaino MC, Paglietti ME, Perseu L, Giagu N, Loi D, Galanello R. Association of alpha globin gene quadruplication and heterozygous beta thalassaemia in patients with thalassaemia intermedia. *haematologica* 2009; 94(10): 1445-8.
  - 23- Chen W, Zhang X, Shang X, Cai R, Li L, Zhou T, *et al.* The molecular basis of beta-thalassaemia intermedia in southern China: Genotypic heterogeneity and phenotypic diversity. *BMC Med Genet* 2010; 11: 31.
  - 24- Akbari MT, Izadyar M, Izadi P, Vardasbi S. Study of molecular basis of thalassaemia intermedia and it's relation to hematological indices and clinical findings. *Hakim* 2001; 3(4): 298-307. [Article in Farsi]
  - 25- Karimi M, Yarmohammadi H, Farjadian S, Zeinali S, Moghaddam Z, Cappellini MD, *et al.*  $\beta$ -thalassaemia intermedia from Southern Iran: IVSII-1(G>A) is the prevalent thalassaemia intermedia allele. *Hemoglobin* 2002; 26(2): 147-54.
  - 26- Neishabury M, Azarkeivan A, Oberkanins C, Esteghamat F, Amirizadeh N, Najmabadi H. Molecular mechanisms underlying thalassaemia intermedia in Iran. *Genet Test* 2008; 12(4): 549-56.
  - 27- Haghi M, Hosseinpour Feizi AA, Harteveld CL, Pouladi N, Hosseinpour Feizi MA. Homozygosity for a rare  $\beta$ 0-thalassaemia mutation [frameshift codons 25/26 (+T)] causes  $\beta$ -thalassaemia intermedia in an Iranian family. *Hemoglobin* 2009; 33(1): 75-80.
  - 28- 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.
  - 29- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, *et al.* Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989; 17(7): 2503-16.
  - 30- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74(12): 5463-7.
  - 31- Cao A, Galanello R, Rosatelli MC. Genotype-phenotype correlations in  $\beta$ -thalassaemias. *Blood Rev* 1994; 8: 1-12.
  - 32- Maragoudaki E, Kanavakis E, Trager-Synodinos J, Vrettou C, Tzetis M, Metaxotou-Mavrommati A, *et al.* Molecular, haematological and clinical studies of the -110 C>T substitution in the  $\beta$ -globin gene promoter in 25  $\beta$ -thalassaemia intermedia patients and 45 heterozygotes. *Br J Haematol* 1999; 107(4): 699-706.
  - 33- Qatanani M, Taher A, Koussa S, Naaman R, Fisher C, Rugless M, *et al.* Beta-thalassaemia intermedia in Lebanon. *Eur J Haematol* 2000; 64(4): 237-44.
  - 34- Tamagnini GP, Lopes MC, Castanheira ME, Wainscoat JS, Wood WG. Beta+ thalassaemia- Portuguese type: Clinical, haematological and molecular studies of a newly defined form of beta thalassaemia. *Br J Haematol* 1983; 54(2): 189-200.
  - 35- Yavarian M, Harteveld CL, Batlaan D, Bernini LF, Giordano PC. Molecular spectrum of beta-thalassaemia in the Iranian province of Hormozgan. *Hemoglobin* 2001; 25(1): 35-43.
  - 36- Forget BG, Olivieri NF. Hemoglobin synthesis and the thalassaemias. In: Handin RI, Lux SE, Stossel TP. *Blood: Principles and practice of hematology*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2003. p. 1503-96.
  - 37- Cao A, Rosatelli MC, Leoni GB, Tuveri T, Scalas MT, Monni G, *et al.* Antenatal diagnosis of beta-thalassaemia in Sardinia. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 612: 215-25.
  - 38- Huisman THJ, Carver MFH, Baysal E. A Syllabus of Thalassaemia Mutations: The Scikle Cell Anemia Foundation; 1997. p. 1-309.
  - 39- Nozari G, Rahbar S, Golshaiyzan A, Rahmanzadeh S. Molecular analysis of beta-thalassaemia in Iran. *Hemoglobin* 1995; 19(6): 425-31.
  - 40- Thein SL. Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia. *Br J Haematol* 2004; 124(3): 264-74.

Original Article

## Analysis of $\beta$ globin gene mutations and $G\gamma$ *Xmn*I polymorphism in thalassemia intermedia patients referred to Ali-Asghar Hospital, Tehran

Rajabi A.<sup>1</sup>, Arab A.<sup>2</sup>, Karimipoor M.<sup>2</sup>, Kaviani S.<sup>1</sup>, Arjmandi Kh.<sup>3</sup>, Zeinali S.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Tarbiat Modares Medical University, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Tehran Medical University, Ali-Asghar Children Hospital, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Kowsar Human Genetic Research Center, Tehran, Iran

### Abstract

#### Background and Objectives

The molecular basis for thalassemia intermedia (TI) is determined in most thalassemia affected countries, but in Iran there has been no perfect investigation so far. This report is the results of the first step of a comprehensive analysis on molecular basis of TI in Iran. Two most important factors influencing the phenotype of TI, i.e. beta globin gene mutations,  $G\gamma$  *Xmn*I polymorphism, and genotype/phenotype correlation in these patients were analysed.

#### Materials and Methods

In an experimental pilot study, 42 TI patients who referred to Ali-Asghar Hospital were selected and genomic DNA was extracted by salting out method. The ARMS-PCR technique was performed to detect the most prevalent  $\beta$  thalassemia mutations in Iran: IVSII-1 (G>A). Direct DNA sequencing was performed on the samples which had at least one unidentified allele. Simultaneously,  $G\gamma$  *Xmn*I polymorphism was determined using PCR-RFLP procedure. Afterwards, the association of this polymorphism with TI was analyzed.

#### Results

Among 76 chromosomes, IVSII-1 was the most frequent mutation detected with 42 alleles (55.26%). Totally, 66  $\beta$  globin alleles (86.84%) were  $\beta^0$  and 7 (9.21%)  $\beta^+$ . In addition, 61 chromosomes (80.26%) were positive for *Xmn*I polymorphism. This polymorphism was in strong linkage to  $\beta^0$  mutations, mainly IVSII-1. No cases with IVSII-1 mutation were *Xmn*I-/-.

#### Conclusions

It seems that the presence of *Xmn*I polymorphism may play an important role in reducing the clinical severity of thalassemia in patients with severe  $\beta^0$  alleles. However, other genetic factors should be also investigated.

**Key words:** Thalassemia intermedia, Globin, Mutation, Rflp  
*Sci J Iran Blood Transfus Org* 2011; 8(1): 20-31

Received: 28 Jul 2010

Accepted: 30 Oct 2010

Correspondence: Karimipoor M., PhD of Medical Biotechnology. Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran. Pasteur St., No. 69.  
Posta code: 1316943551, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 66480780; Fax : (+9821) 66480780  
E-mail: mortezakarimi@yahoo.com