خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۸ شماره ۱ بهار ۹۰ (۳۱-۲۰)

مقاله پژوهشی

جهش‌های ژن گلوبین بتا و پلی‌مورفیسم $^{G}\gamma$ *Xmn*I در بیماران تالاسمی اینترمدیا مراجعه‌کننده به بیمارستان علی‌اصغر(ع) تهران

علی رجبی[۱]، آیدا عرب[۲]، مرتضی کریمی‌پور[۳]، سعید کاویانی[۴]، خدیجه ارجمندی[۵]، سیروس زینلی[۶]

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 $^{G}\gamma$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 β^0 در ۶۶ کروموزوم(۸۶/۸۴٪) و آلل‌های β^+ در ۷ کروموزوم(۹/۲۱٪) یافت گردید. ۶۱ کروموزوم(۸۰/۲۶٪) نیز دارای پلی‌مورفیسم XmnI بودند. این پلی‌مورفیسم دارای پیوستگی بالایی با جهش‌های β^o به ویژه IVSII-1 بود. در هیچ موردی از IVSII-1 ، پلی‌مورفیسم *Xmn*I منفی(-/-) مشاهده نشد.

نتیجه گیری

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

کلمات کلیدی: تالاسمی اینترمدیا، گلوبین، جهش، Rflp

تاریخ دریافت : ۸۹/۵/۶
تاریخ پذیرش : ۸۹/۸/۸

۱ـ کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون ـ دانشگاه علوم پزشکی تربیت مدرس
۲ـ کارشناس ارشد ژنتیک ـ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران
۳- مؤلف مسؤول: PhD زیست فن‌آوری پزشکی ـ استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران ـ تهران ـ خیابان پاستور ـ پلاک ۶۹ ـ کد پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱
۴- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ استادیار دانشگاه علوم پزشکی تربیت مدرس
۵ـ فوق تخصص خون و انکولوژی کودکان ـ استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ بیمارستان کودکان علی اصغر(ع)
۶ـ PhD ژنتیک انسانی ـ دانشیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-06-02]

مقدمه

تالاسمی‌ها شایع‌ترین اختلالات تک‌ژنی در دنیا محسوب می‌شوند(۱). در تالاسمی بتا، تولید زنجیره گلوبین بتا کاهش داشته(β^+) و یا وجود ندارد (β^0)(۱). در مواقعی‌که ژن بتا گلوبین به صورت β^{++} 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، مسؤول 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(۸، ۷، ۵):

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 $^{G}_{\gamma}$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(۱۰، ۹). 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 محدودالاثر $^{G}_{\gamma}$ *Xmn*I (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).

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 *Xmn*I و تعیین هاپلوتیپ‌های این خوشه، بررسی عوامل تنظیمی در بالادست و پایین‌دست خوشه ژنی بتا به ویژه عوامل موثر بر روی افزایش بیان

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-06-02]

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

نام آغازگر	توالی الیگونوکلئوتیدی(۳' > ' ۵)	اندازه محصول
RA (آغازگر رفت توالی طبیعی)	AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAC	۶۳۴ جفت باز
RB (آغازگر رفت توالی جهش‌یافته IVSII-1)	AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAT	۶۳۴ جفت باز
ComC (آغازگر برگشت برای هردو توالی)	ACCTCACCCTGTGGAGCCAC	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 داده‌ایم. نوشتار حاضر، حاصل فاز نخست این پژوهش به منظور بررسی جهش‌های ژن بتا، پلی‌مورفیسم XmnI و بررسی ارتباط این دو عامل بر روی فنوتیپ بالینی TI (ارتباط ژنوتیپ/فنوتیپ) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های مورد آزمایش در این پژوهش پایلوت و تجربی، از ۴۲ بیمار TI غیرخویشاوند با شدت متوسط تا شدید(بر اساس تشخیص پزشک معالج هماتوانکولوژیست 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 ۱۰-۷ گرم در دسی‌لیتر) که به مدت یک سال به بیمارستان علی‌اصغر(ع) تهران مراجعه کرده بودند، به روش نمونه‌گیری آسان و تصادفی و با هماهنگی مسوولین مربوطه و گرفتن رضایت‌نامه به دست آمدند(۵). حجم نمونه‌های خون بین ۲ تا ۱۰ میلی‌لیتر بودند و در لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری گردیدند. استخراج DNA به روش مرسوم Salting Out با استفاده از SDS (سدیم دودسیل سولفات) و پروتئیناز K انجام شد(۲۸).

برای بررسی جهش‌های ژن گلوبین بتا، نخست با استفاده از مطالعه‌های قبلی انجام شده در ایران در ارتباط با تعیین جهش‌های شایع ژن بتا در بیماران تالاسمی اینترمدیا و ماژور ایرانی، تغییر نوکلئوتیدی آدنین با گوانین (G>A) در نخستین باز اینترون دوم ژن بتا(IVSII-1) به عنوان شایع‌ترین جهش ژن بتا در اغلب جمعیت‌های ایرانی مبتلا به تالاسمی بتا انتخاب شد(۲۵، ۴). مطلوب‌ترین روش تعیین جهش‌های نقطه‌ای شناخته شده، روش تکثیر متزلزل جهش‌ها(ARMS-PCR) می‌باشد(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 میلی‌مولار، 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 پلی‌مراز Taq (شرکت سیناژن، ایران) در حجم پایانی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه PCR (ترموسایکلر مدل اپندورف، آلمان) با شرایط دمایی ۹۴ ºC (دمای تقلیب)، ۶۷ ºC (دمای آنیلینگ) و ۷۲ ºC (دمای تکثیر) به تعداد ۲۷ چرخه تکثیر شدند(جدول ۱). پس از پایان چرخه‌های تکثیر، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ و ولتاژ حدود ۸۰ ولت، الکتروفورز شدند(براساس دستورالعمل بخش ژنتیک انستیتو پاستور ایران).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-06-02]

جدول ۲: آغازگرهای به کار رفته در تعیین توالی قطعات نخست(β1) و دوم (β2) ژن بتا(۱)

نام آغازگر	توالی الیگونوکلئوتیدی('۳ < '۵)	اندازه محصول
β1F (آغازگر رفت β1)	CTGAGGGTTTGAAGTCCAACTCC	۷۵۰ جفت‌باز
β1R (آغازگر برگشت β1)	CTGTACCCTGTTACTTCTCCCCTT	۷۵۰ جفت‌باز
β2F (آغازگر رفت β2)	ATGTATCATGCCTCTTTGCACC	۵۵۰ جفت‌باز
β2R (آغازگر برگشت β2)	GCACTGACCTCCCACATTCC	۵۵۰ جفت‌باز

بر اساس مطالعه‌های پیشین، جهش‌های دیگر ژن بتا در جمعیت تهران شیوع زیادی نداشتند و بنابراین پس از غربال جهش IVSII-1 G>A، 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 محدودالاثر XmnI) می‌باشد، روش مناسبی برای بررسی پلی‌مورفیسم $^{G}\gamma$XmnI 5' است(۱).

برای انجام RFLP ، نخست نمونه‌های DNA با استفاده از PCR با دمای آنیلینگ ۵۵ ºC 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 ۱۰X و ۷ میکرولیتر آب مقطر (حجم کلی ۲۰ میکرولیتر) با هم مخلوط شده و پس از یک شب انکوباسیون در ۳۷ ºC، بر روی ژل ۲٪– ۱/۵٪ آگارز و با ولتاژ ۶۵ ولت الکتروفورز شد. محصول PCR دارای طولی برابر ۶۵۷ جفت‌باز و قطعات حاصل از هضم آنزیمی دارای طول ۴۵۵ و ۲۰۲ جفت‌باز بودند.

جدول ۳: آغازگرهای به کار رفته در تکثیر پلی‌مورفیسم XmnI (۱).

نام آغازگر	توالی الیگونوکلئوتیدی('۳ < ' ۵)	اندازه محصول
*Xmn*I F	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	۶۵۷ جفت باز
*Xmn*I 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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-06-02]

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

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-06-02]

۱	۸	۵۸/۱	۹/۱	۲/۶۳	۱	β°/β^{+}	-88(C>A)/ Codons 36/37(-T)	−/+
؟	۵	۱۰/۳	۸/۴	۲/۶۳	۱	$\beta^{\circ}/\beta^{\circ}$	Codons 8/9(+G)/ N	−/+
۵		؟	؟	۲/۶۳	۱	$\beta^{\circ}/\beta^{\circ}$	IVSI-25bp Del/ N	+/+

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 ۱۱/۴-۶/۶ و با میانگین ۹/۰۵ گرم در دسی‌لیتر و میزان هموگلوبین جنینی(F) بین ۸۰/۵-۱۰/۳ و با میانگین۶۲/۰۸ 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 شدندتا 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 (β^{0}) شامل ۶۶ آلل (۸۶/۸۴٪)، جهش‌های خفیف(β^{+}) تنها ۷ آلل(۹/۲۱٪) و کروموزوم سالم نیز تنها ۳ آلل(۳/۹۵٪) را دربر می‌گرفتند(نمودار ۲).

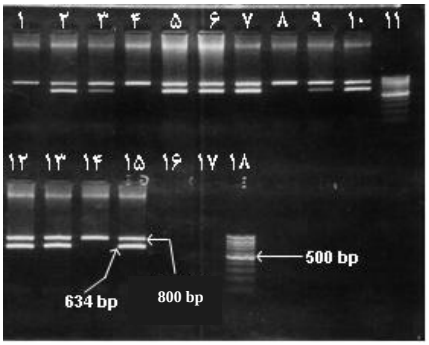
یافته‌های RFLP:

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

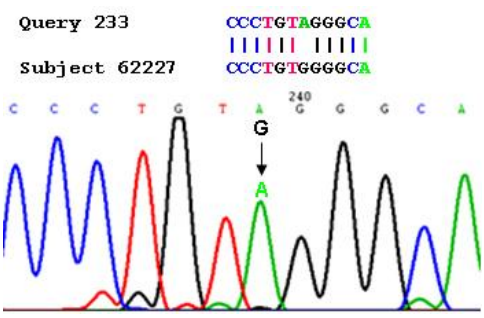
به طور کلی از ۷۶ آلل مورد بررسی، ۶۱ آلل(۸۰/۲۶٪) برای جایگاه برش آنزیم XmnI مثبت، و تنها ۱۵ آلل (۱۹/۷۴٪) منفی بودند(جدول ۵).

جدول ۵: وضعیت پلی‌مورفیسم XmnI در بیماران TI مورد بررسی

درصد بیماران	تعداد بیماران	پلی‌مورفیسم XmnI
۶۸/۴۲	۲۶	+/+
۲۳/۶۸	۹	−/+
۷/۸۹	۳	−/−



شکل ۱: الکتروفورز محصول ARMS-PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ برای جهش IVSII-1 در ۵ بیمار تالاسمی اینترمدیا. شماره‌های ۱۰-۱ مربوط به نمونه‌های بیماران، ۱۲ و ۱۳ کنترل هتروزیگوت، ۱۴ و ۱۵ 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 جهش‌یافته ۶۳۴ جفت‌باز طول دارند.

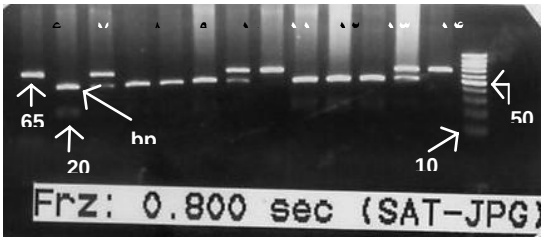


نمودار ۱: کروماتوگرام ژن گلوبین بتا برای جهش(G>A) Codon 15 به صورت هموزیگوت در یک بیمار تالاسمی اینترمدیا. نتیجه تعیین توالی با Accession No: U01317 در بانک ژن(Gene Bank) مقایسه شده است.

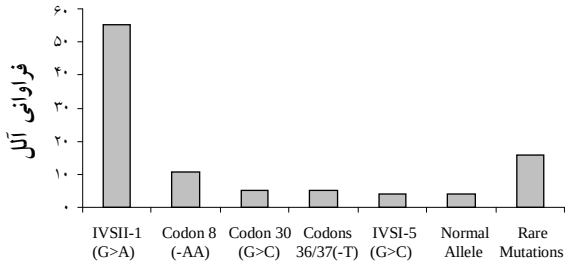
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-06-02]

*نتایج نهایی به‌دست‌آمده از جهش‌های ژن بتا و پلی‌مورفیسم Xmn*I *:*

نتایج کامل جهش‌های یافت‌شده در ژن بتا به همراه پلی‌مورفیسم *Xmn*I و دیگر یافته‌های آزمایشگاهی و بالینی بیماران TI در جدول ۴ ارایه شده است.



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR برای پلی‌مورفیسم XmnI پس از هضم آنزیمی. شماره‌های ۱۰-۱ مربوط به بیماران، ۱۱ کنترل +/+، ۱۲ کنترل -/+، ۱۳ کنترل -/- و ۱۴ نشان‌گر اندازه(size marker) ۱۰۰ جفت‌بازی است. طول محصول PCR هضم‌نشده (undigested) ۶۵۷ جفت‌باز و طول محصولات هضم‌شده ۴۵۵ و ۲۰۲ جفت‌باز است.



نمودار ۲: فراوانی جهش‌های 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 برهم‌کنش‌های ژنتیکی و به علاوه عوامل غیرژنتیکی که می‌توانند فنوتیپ بالینی را تحت تاثیر قرار دهند، بسیار پیچیده و مشکل است(۹، ۵، ۲، ۱). بنابراین عجیب نیست که این بیماری بسیار ناهمگون باشد. افزون بر این، نمی‌توان ثابت کرد که تا چه میزان از ناهمگونی بالینی مربوط به ناهنجاری ژنتیکی است و چه میزان مربوط به عوامل غیرژنتیکی. با این حال مهم‌ترین 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 می‌باشد.

در مطالعه اکبری و همکاران در سال ۱۳۷۹ بر روی ۵۰ بیمار TI ایرانی، وجود جهش IVSII – 1 (G>A) و پلی‌مورفیسم XmnI بررسی شدند که جهش IVSII-1 ، شیوع ۶۰٪ و پلی‌مورفیسم XmnI شیوع ۷۶٪ را در این بیماران دارا بودند(۲۴). نتایج مطالعه حاضر که شیوع IVSII-1 را ۵۵/۲۶٪ و شیوع پلی‌مورفیسم XmnI را ۸۰/۲۶٪ به دست آورده است، یافته‌های مطالعه اکبری و همکاران را تایید می‌کند. 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 جهش‌های مسبب TI و نیز پلی‌مورفیسم 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 جهش‌های ۲۹٪ آلل‌های ژن بتاگلوبین یافت گردید. پلی‌مورفیسم 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. هم‌چنین ۸۷/۵٪ بیماران هموزیگوت جهش IVSII-1 دارای پلی‌مورفیسم XmnI بودند. بر خلاف مطالعه یادشده، پژوهش حاضر ۱۴ جهش را در ژن بتای بیماران TI به دست آورده است، با این حال مطالعه حاضر، شایع‌ترین جهش گزارش شده در مطالعه کریمی و همکاران یعنی IVSII-1(G>A) را تایید می‌کند، هرچند در پژوهش حاضر شیوع IVSII-1 (۵۵/۲۶٪) بیشتر از مطالعه مذکور به دست آمده است. شیوع جهش‌های 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 پلی‌مورفیسم XmnI نیز در مطالعه پیشین(۴۰/۶٪) بسیار کمتر از پژوهش حاضر(۸۰/۲۶٪) گزارش شده است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-06-02]

هم‌چنین بـر خـلاف مطالعـه مـذکور، در پـژوهش حاضـر پلی‌مورفیسم XmnI در افراد سالم به منظـور کنتـرل، مـورد استفاده قرار نگرفت. این پژوهش هم‌چنین پیوستگی بـالای جهش هموزیگـوت IVSII-1 و پلـی‌مورفیسـم XmnI را در مطالعه پیشین تایید می‌کنـد(۹۳/۷۵٪ در مطالعـه حاضـر در مقایسه با ۸۷/۵٪ در مطالعه کریمی و همکاران).

در پژوهشـی توسـط نیشـابوری و همکـاران در سـال ۲۰۰۸، پلی‌مورفیسم $^{G}\gamma$XmnI ، توارث آلـل‌هـای خفیـف و خاموش تالاسمی، حذف‌های دلتا ـ بتا تالاسـمی و تـوارث هم زمان آلفا و بتا تالاسـمی در ۵۲ بیمـار مشـکوک بـه TI بررسی شد(۲۶). جهش‌های ژن بتا با روش هیبریدیزاسیون معکـوس(reverse hybridization assay) و بررسـی XmnI توسط RFLP انجام شد. در این بررسی، تـوارث XmnI بـه همراه آلل‌های شدید تالاسمی بتا به صورت هموزیگوت و یا هتروزیگوت ترکیبی، سازوکار غالب ایجاد TI بود کـه در ۵۵/۳٪ بیماران یافت شد.

IVSII-1(G>A) شایع‌ترین جهش با فراوانی ۴۵/۵٪ بود. جهـش‌هـای شـدید (β^0) (-G) IVSII-850 و Codons 22/23/24 (7bp delition) هر کدام با شیوع ۴/۳٪ در جایگاه بعدی بودند. هـم چنـین در ایـن مطالعـه ۱۴/۸٪ آلـل‌هـای تالاسمـی بتـا، جهـش‌های خفیـف ماننـد IVSI-6(T>C) و 88-(C>A) بودنـد کـه دومـین علـت ایجـاد TI محسـوب می‌شدند. افزون بـر ایـن، ۵۹/۱٪ هموزیگـوت‌هـا و ۴۰/۹٪ هتروزیگوت‌های جهش‌های شدید ژن بتا، شـاخص 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 آلل‌هـای شـدید ژن بتـا (β^0) بـه همـراه پلـی‌مورفیسـم XmnI ، اصـلی‌تـرین یافتـه مولکولی بیمـاران TI بـه دسـت آمـد، امـا در ایـن مطالعـه سازوکار یادشـده در بـیش از ۸۰٪ بیمـاران یافـت گردیـد. آلـل‌هـای شـدید تالاسـمی بتـا نیـز در ۸۶/۸۴٪ مـوارد در پژوهش حاضر دیده شد کـه IVSII-1 بـا ۵۵/۲۶٪ فراوانـی آللی، شایع‌ترین جهش بود. Codon8(-AA) دومـین جهـش شایع با شیوع ۱۰/۵۳٪ در تحقیق حاضر بود که در مطالعـه نیشابوری و همکاران گـزارش نشـده بـود(۲۶). هـم‌چنـین آلل‌های خفیف در این پژوهش شامل جهش‌هـای IVSI-5 (G>C) ، IVSI-6 (T>C) ، IVSI-110 (G>A) و IVSI-88 (C>A) بودند که در مجموع تنها ۹٪ جهش‌های ژن بتـا را تشـکیل می‌دادند. جهـش‌هـای شـدید Codons 25/26 (+T)، IVSI-1(G>A) ، Codon39(C>T) و Codon44(-C) و هـم‌چنـین جهـش‌هـای خفیـف IVSI-128(T>G) کـه در مطالعـه نیشابوری و همکاران گزارش شده‌انـد، در مطالعـه حاضـر یافت نشدند. از سوی دیگر، جهش‌های شدید IVSI-25bp deletion و Codon15 (G>A) در پژوهش حاضر، در مطالعه نیشابوری و همکاران گزارش نشـدند. در مطالعـه حاضـر، ۹۳/۷۵٪ بیماران هموزیگوت بـرای جهـش IVSII-1 دارای پلـی‌مورفیسـم XmnI بـه صـورت +/+ و ۶/۲۵٪ آن‌هـا بـه صورت -/+ بودند. هم‌چنین به جز پیوستگی بالای جهـش IVSII-1 و پلـی‌مورفیسـم XmnI در مطالعـه مـا، ایـن پلی‌مورفیسم با جهش شدید Codon 8(-AA) نیز پیوسـتگی بسـیار بـالایی(۱۰۰٪) داشـت کـه در مطالعـه نیشـابوری و همکاران گزارش نشده بود. اصلیت بیماران نیـز در مطالعـه نیشابوری و همکاران ذکر نشده بود. هم‌چنـین در پـژوهش حاضر، حذف‌های تالاسمی دلتا ـ بتا(δβ) بررسی نشـدند و بررسی بر روی حذف‌های ژن آلفا نیـز بـه فازهـای بعـدی پژوهش موکول شد.

حقی و همکاران در سال ۲۰۰۹ یک مورد از جهش نادر Codons 25/26 (+T) (یک آلل β^0) را برای نخستین بـار در یک خانواده آذربایجـانی در ایـران گـزارش کردنـد کـه بـه همراه پلی‌مورفیسم XmnI سبب ایجـاد TI شـده بـود. ایـن جهش در مطالعه حاضر یافت نگردید(۲۷).

جهش‌های خفیف علت ایجاد بسـیاری از مـوارد TI در دنیا و به ویـژه منـاطق مدیترانـه‌ای هسـتند، امـا در مطالعـه حاضر این جهش‌ها نقـش بسـیار کمـی در ایجـاد بیمـاری داشتند و تنها ۹/۲۱٪ آلل‌های بیمـاران TI ایـن پـژوهش را تشـکیل مـی‌دادنـد(۳۴-۳۲). جهـش IVSI-5 (G>C) ، شایع‌ترین آلـل تالاسـمی بتـا در جنـوب، شـرق و جنـوب شـرقی ایـران (اسـتان‌هـای خراسـان، کرمـان، سیسـتان و بلوچستان و هرمزگان) است (۳۵، ۴). هم‌چنین این جهـش دومین جهش شایع در کل کشور پس از IVSII-1 مـی‌باشـد که شیوع آن از شمال به طرف جنوب بیشتر مـی‌شـود و در واقـع یـک جهـش هنـدی - آسـیایی اسـت(۴). تغییـر

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-06-02]

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 β^+ شدید) (Severe β^+) (۳۶). شیوع این جهش در مطالعه حاضر ۳/۹۵٪ بود.

جهش IVSI-6 (T>C) یک جهش جایگاه پیرایش است که گاه گونه پرتغالی(Portuguse variant) نیز خوانده می‌شود، چون نخستین بار در پرتغال گزارش شد(۱). این جهش یکی از شایع‌ترین اشکال تالاسمی بتا خفیف(+β) است و در جمعیت‌های مدیترانه‌ای شیوع گسترده‌ای دارد. حالت هموزیگوت آن سبب ایجاد TI خفیف تا متوسط می‌شود، اما به نظر می‌رسد که برهم‌کنش آن با آلل‌های β^0، شدت بیشتری دارد و یک TI شدید را در انتهای گستره بالینی این بیماری ایجاد می‌کند(۱). بیشترین شیوع این جهش در ایران، در استان‌های 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) شایع‌ترین جهش تالاسمی خفیف (β^+) مدیترانه‌ای است(۳۷، ۲۹). هم‌چنین 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 می‌شود و کارایی ترجمه mRNA را کمی کاهش می‌دهد(تالاسمی β^+ خفیف)(۳۸، ۳۶). در مطالعه حاضر، این جهش تنها ۱/۳۲٪ فراوانی را دارا بود.

جایگزینی آدنین به جای سیتوزین در جایگاه ۸۸- در جعبه CACCC آغازگر ژن گلوبین بتا، سبب کاهش کارایی ترجمه mRNA گلوبین بتا به میزان اندکی می‌شود و یک تالاسمی β^+ ایجاد می‌کند(۳۸). احتمال دارد که جهش ۸۸(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 جهش‌های شدید β^0 بودند که سهم IVSII-1 از این بین، بیش از ۵۵٪ بود. این یافته با مطالعه‌های پیشین درباره بیماران TI ایرانی هم‌خوانی دارد (۲۶-۲۴). هرچند هنوز مطالعه جامع جمعیتی در نژادهای مختلف ایرانی در مورد TI و پراکندگی جهش‌های آن در کشور ما انجام نشده است، اما این پژوهش به همراه دیگر پژوهش‌های پراکنده نشان می‌دهد که جهش‌های β^0 و به ویژه IVSII-1 ، دارای اصلی‌ترین نقش در ایجاد TI در ایران هستند.

بیشتر بیماران مورد مطالعه(۸۰/۲۶٪) دارای کروموزوم با جایگاه برش آنزیم *Xmn*I و تنها کمتر از ۲۰٪ بیماران بدون این جایگاه بودند. یافته دیگر، توارث هم‌زمان برخی جهش‌های ژن بتا با پلی‌مورفیسم *Xmn*I بود. از ۱۶ بیمار دارای جهش IVSII-1 به صورت هموزیگوت، ۱۵ بیمار(۹۳/۷۵٪) دارای نشانگر *Xmn*I+/+ و تنها یک بیمار(۶/۲۵ ٪) دارای *Xmn*I+/- بودند. این امر بیانگر پیوستگی بالای جهش IVSII-1 و پلی‌مورفیسم *Xmn*I است. هم‌چنین همه بیماران دارای جهش Codon 8 به صورت هموزیگوت(۱۰۰٪)، دارای نشانگر *Xmn*I+/+ بودند. پیوستگی ژنتیکی جهش‌های IVSII-1 (G>A) و Codon 8 (-AA) با حالت مثبت پلی‌مورفیسم *Xmn*I اثبات شده است(۳۱، ۷، ۱). بنابراین یافته‌های این پژوهش به طور کامل بر این اصول منطبق است. افزون بر این دو، به طور کلی، ۲۴ بیمار از ۳۰ بیمار دارای ژنوتیپ β^0/β^0 (۸۰٪) دارای نشانگر *Xmn*I+/+ ، ۵ بیمار(۱۶/۶۷٪) *Xmn*I+/- و تنها یک بیمار(۳/۳۳٪) *Xmn*I-/- بودند. هم‌چنین هر دو مورد بیمار دارای ژنوتیپ β^+/β^+ (۱۰۰٪) *Xmn*I-/- 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 می‌رسد این سطح بسیار بالای هموگلوبین F ، بیانگر نقش بسیار زیاد این هموگلوبین در پاتوفیزیولوژی بیماران TI در جمعیت مورد مطالعه باشد. با توجه به این‌که بیش از ۸۰٪ بیماران برای نشانگر *Xmn*I مثبت، و از طرفی ۸۷٪ بیماران TI دارای جهش‌های شدید(β^0) بودند، می‌توان گفت که پلی‌مورفیسم *Xmn*I نقش زیادی در افزایش میزان هموگلوبین F بیماران دارای جهش‌های شدید و کاهش فنوتیپ بالینی این بیماران و ایجاد TI داشته است. با توجه به این‌که جمعیت مورد مطالعه تا حدودی ناهمگون بود و بیماران از مناطق دیگر

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-06-02]

ایران هم در این پژوهش حضور داشتند، می‌توان گفت که دست‌کم یکی از مهم‌ترین سازوکارهای مولکولی ایجاد TI در کشور ما، بودن پلی‌مورفیسم *Xmn*I در یک زمینه جهش‌های شدید β^0 به ویژه IVSII-1 می‌باشد. این یافته هرچند با دیگر منابع معتبر هم‌خوانی دارد، اما پلی‌مورفیسم *Xmn*I 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 β^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 (ααα) و یا حتی چهارتایی (αααα)، 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 β^0/β^0 (Codon15/Codon 15) که فاقد جایگاه برش آنزیم *Xmn*I بود (*Xmn*I-/-)، 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 هستند، اما به خودی خود قادر به ایجاد تالاسمی اینترمدیا نیستند، چراکه بسیاری از بیماران این پژوهش دارای ژنوتیپ β^0/β^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 *Xmn*I 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.

References :

1- Weatherall DJ, Clegg JB, Gibbons R, Higgs DR, Old JM, Olivieri NF, *et al*, editors. The Thalassaemia Syndromes. 4th ed. Oxford: Blackwell Science; 2001.
2- Thein SL. Pathophisiology of β-thalassemia- 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 β-thalassemia 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 β-thalassaemia. Haematologica 2005; 90(5): 649-60.
8- Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic diseases: Lessons from the thalassaemias. 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,

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-06-02]

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. Thalassemia intermedia: Compound heterozygous beta zero/beta(+)-thalassemia and co-inherited heterozygous α+-thalassemia. Ann Hematol 1993; 66(1): 51-4.
14- Camaschella C, Capellini MD. Thalassemia intermedia. Haematologica 1995; 80(1): 58-68.
15- Badens C, Mattei MG, Imbert AM, Lapouméroulie C, Martini N, Michel G, *et al*. A novel mechanism for thalassemia intermedia. Lancet 2002; 359(9301): 132-3.
16- Phadke SR, Agarwal S. Phenotype score to grade the severity of thalassemia 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 thalassemia 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 β-thalassemia intermedia poses new questions about its pathophisiology. Blood 2005; 106(9): 3251-5.
20- Panigrahi I, Agarwal S, Pradhan M, Choudhry DR, Choudhry VP, Saxena R. Molecular characterization of thalassemia 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 thalassemia 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 thalassemia in patients with thalassemia 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-thalassemia 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 thalassemia 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*. β-thalassemia intermedia from Southern Iran: IVSII-1(G>A) is the prevalent thalassemia intermedia allele. Hemoglobin 2002; 26(2): 147-54.
26- Neishabury M , Azarkeivan A , Oberkanins C , Esteghamat F, Amirizadeh N, Najmabadi H. Molecular mechanisms underlying thalassemia 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 β0-thalassemia mutation [frameshift codons 25/26 (+T)] causes β-thalassemia 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 β-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 substitusion in the β-globin gene promoter in 25 β-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+ thalassemia- 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, Batelaan D, Bernini LF, Giordano PC. Molecular spectrum of beta-thalassemia in the Iranian province of Hormozgan. Hemoglobin 2001; 25(1): 35-43.
36- Forget BG, Olivieri NF. Hemoglobin synthesis and the thalassemias. In: Handin RI, Lux SE, Stossel TP. Blood: Principles and practice of hematology. 2nd 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-thalassemia in Sardinia. Ann N Y Acad Sci 1990; 612: 215-25.
38- Huisman THJ, Carver MFH, Baysal E. A Syllabus of Thalassemia Mutations: The Scikle Cell Anemia Foundation; 1997. p. 1-309.
39- Nozari G, Rahbar S, Golshaiyzan A, Rahmanzadeh S. Molecular analysis of beta-thalassemia 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-06-02]

Original Article

Analysis of β globin gene mutations and *Gγ Xmn*I polymorphism in thalassemia intermedia patients referred to Ali-Asghar Hospital, Tehran

Rajabi A.[1], Arab A.[2], Karimipoor M.[2], Kaviani S.[1], Arjmandi Kh.[3], Zeinali S.[2,4]

[1]*Tarbiat Modares Medical University, Tehran, Iran*
[2]*Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*
[3]*Tehran Medical University, Ali-Asghar Children Hospital, Tehran, Iran*
[4]*Kowsar Human Genetic Research Center, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

The molecular basis for thalassemia intermedia (TI) is determined in most thalasemia 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, *Gγ 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 β thalassemia mutations in Iran: IVSII-1 (G>A). Direct DNA sequencing was performed on the samples which had at least one unidentified allele. Simultaneously, *Gγ 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 β globin alleles (86.84%) were β^0 and 7 (9.21%) β^+. In addition, 61 chromosomes (80.26%) were positive for XmnI polymorphism. This polymorphism was in strong linkage to β^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 β^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*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-06-02]