

## تعیین فرکانس ناقلین آلفا تالاسمی در جمعیت داوطلب ازدواج استان تهران با روش‌های مولکولی

بهناز زربخش<sup>۱</sup>، فرناز اقبال‌پور<sup>۲</sup>، الهام فرشادی<sup>۳</sup>، محمد صادق فلاح<sup>۳</sup>، مرتضی کریمی‌پور<sup>۴</sup>،  
زهرا کائینی مقدم<sup>۵</sup>، سیروس زینلی<sup>۶</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

توزیع آلفا تالاسمی در جمعیت‌های متفاوت بسیار متغیر است. بسته به نوع ژنوتیپ، فنوتیپ‌های مختلفی قابل انتظار است. هدف از تحقیق حاضر، بررسی فراوانی ناقلین آلفا تالاسمی در داوطلبین ازدواج بود.

#### مواد و روش‌ها

در یک مطالعه کاربردی، در مدت یک ماه از هشت مرکز بهداشت واقع در شمال، جنوب، شرق و غرب شهر تهران بدون هیچ محدودیتی صرفاً بر اساس مراجعه افراد، ۶۲۶ نمونه خون به آزمایشگاه ارسال شد. DNA تخلیص و آزمایش‌های مولکولی انجام شد. به طور عمده از آزمایش‌های مولکولی Multiplex Gap PCR، ARMS PCR و Sequencing استفاده گردید.

#### یافته‌ها

حداقل یک نوع حذف در ژن آلفا گلوبین در ۹۵ نفر تشخیص داده شد. بر این اساس فراوانی جهش‌های حذفی شایع در افراد مورد بررسی ۱۹/۸۳٪ بود (۲۷/۸۵-۱۱/۸۱ = CI /۹۵). تریپلیکیشن در هیچ یک از نمونه‌ها یافت نشد. بر اساس بررسی‌های قبلی و با توجه به این که با روش Multiplex Gap PCR، حدود ۶۵٪ موارد دارای جهش در ژن آلفا گلوبین در افراد دارای  $MCH < ۲۷$  یا  $MCV < ۸۰$  قابل تشخیص می‌باشد، به نظر می‌رسد تعداد واقعی موارد دارای جهش در ژن آلفا گلوبین بیشتر از موارد یافته شده با روش فوق باشد.

#### نتیجه‌گیری

بر اساس این تحقیق، در صورت تعمیم نتیجه به دست آمده در این مطالعه به جامعه و بر اساس مطالعه قبلی، به نظر می‌رسد تعداد افراد دارای جهش در ژن آلفا گلوبین در افراد دارای  $MCH < ۲۷$  یا  $MCV < ۸۰$  حداقل ۱۴۳ نفر و با فراوانی ۲۹/۹۰٪ باشد (۳۷/۴۰-۲۲/۴۰ = CI /۹۵).

**کلمات کلیدی:** فراوانی، آلفا - گلوبین، آلفا - تالاسمی، ایران

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۹

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۲۲

- ۱- دکترای دامپزشکی - بخش پزشکی مولکولی - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران
- ۲- کارشناس آزمایشگاه - بخش پزشکی مولکولی - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران
- ۳- PhD ژنتیک مولکولی پزشکی - مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر - تهران - ایران
- ۴- PhD زیست فن‌آوری پزشکی - بخش پزشکی مولکولی - استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران
- ۵- کارشناس ارشد آزمایشگاه - بخش پزشکی مولکولی - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران
- ۶- مؤلف مسئول: PhD ژنتیک انسانی - دانشیار بخش پزشکی مولکولی - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۳۱۸۵-۱۶۶۷

### مقدمه

ژن‌هایی که ساخت گلوبین‌های مختلف را در بدن انسان تنظیم می‌کنند، در دو خوشه ژنی متفاوت قرار دارند. ژن‌های آلفا گلوبین روی کروموزم ۱۶ و گاما، دلتا و بتا گلوبین روی کروموزم ۱۱ قرار دارند. هر فرد به طور طبیعی حامل ۴ ژن عملیاتی آلفا گلوبین است که دو تا از مادر و دو تا از پدر به ارث می‌رسند و به صورت  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$  نوشته می‌شود. فنوتیپ آلفا تالاسمی زمانی بروز می‌کند که بیان یک تا ۴ ژن آلفا، درگیر اختلال شود. این اختلال می‌تواند جهش‌های نقطه‌ای، جابه‌جایی و حذف‌های کوچک و بزرگ را شامل شود که شدت و حدت بروز بیماری، بستگی به هر چه کمتر تولید شدن زنجیره گلوبین آلفا دارد. داشتن مراکز مشاوره ژنتیک و تشخیص قبل از تولد کارآمد، مستلزم داشتن آگاهی از میزان شیوع و نوع جهش‌های انواع تالاسمی موجود در منطقه است. لزوم تقویت تحقیقات در زمینه تشخیص آلفا تالاسمی آن‌جا بارز می‌شود که مراجعه‌های مکرر زوج‌های داوطلب برای مشاوره به دلیل عدم امکان تعیین قطعی وضعیت زوجین از نظر تالاسمی، زمان پاسخگویی به خانواده‌ها را طولانی می‌کند. با پی بردن به فراوانی ناقلین آلفا تالاسمی در جمعیت کشورمان (که در این تحقیق از میان انبوه مراجعین داوطلب ازدواج به مراکز بهداشتی کشور به عنوان نمونه‌ای از جمعیت استفاده شده است)، می‌توان به الگوی دقیق‌تری برای ارزیابی مراجعین مشکوک در مراکز بهداشتی کشور دست یافت.

تعیین دقیق وضعیت فرد از نظر جهش‌های احتمالی بر روی ژن آلفا تالاسمی می‌تواند سردرگمی موجود برای اظهار نظر بر روی جنین زوج‌های مشکوک را به حداقل برساند. اطلاع از فراوانی ناقلین آلفا تالاسمی در جمعیت و مقایسه نتایج پارامترهای خونی این گروه می‌تواند ارزیابی مراجعین مشکوک در مراکز بهداشتی را تسهیل بخشد.

با دریافت نتایج حاصل از آزمایش‌های خون افراد داوطلب ازدواج که به مراکز بهداشت سطح شهر تهران مراجعه می‌نمایند، اولاً نسبت افراد سالم که برای ازدواج از نظر تالاسمی، مشکلی ندارند و افراد ناقل مشکوک به

دست می‌آید و از طرف دیگر با کنار گذاردن نمونه‌هایی که قطعاً نقص بر روی ژن بتا گلوبین دارند، می‌توان فراوانی آلفا تالاسمی را در جمعیت مورد مطالعه تعیین کرد.

### مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع کاربردی بود. در یک محدوده زمانی مشخص یک ماهه از ۸ مرکز بهداشت در مناطق مختلف شهر تهران نمونه‌گیری انجام شد که عمدتاً داوطلبان مذکر بودند. از مراکز وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران (مرکز بهداشت فرمانفرمائیان، مرکز بهداشت نیک‌نژاد واقع در شهر ری و مرکز بهداشت نور سعادت که مربوط به مناطق مرکزی و جنوب شرق تهران بودند)، ۲۱۴ نمونه خون تهیه و به آزمایشگاه بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران ارسال گردید. از مراکز بهداشتی هاشمی‌نژاد، ولیعصر و فاضل که مربوط به مناطق مرکزی، جنوب و جنوب غربی تهران بودند، جمعاً ۱۹۲ نمونه خون تازه از داوطلبان ازدواج جمع‌آوری و به بخش پزشکی مولکولی در انستیتو پاستور ایران تحویل داده شد. هم‌چنین از مراکز وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مانند مرکز بهداشت دکمه‌چی و مرکز بهداشت نامجو که بیشترین مراجعه را داشتند و مربوط به مناطق شرق و شمال شرق تهران بودند، جمعاً ۲۲۰ نمونه خون جمع‌آوری گردید. از هر داوطلب ۱۰ میلی‌لیتر خون در ماده ضد انعقاد EDTA که در انجام آزمایش‌های PCR هیچ‌گونه منعی ایجاد نمی‌کند و هم‌زمان با آن رضایت‌نامه گرفته شد. به این ترتیب ۶۲۶ نمونه خون از داوطلبان ازدواج شهر تهران به بخش پزشکی مولکولی در انستیتو پاستور ایران منتقل شد. قبل از شروع آزمایش‌های مولکولی، ابتدا جعبه‌های نگهداری خون در فریزر با کدگذاری مربوطه آماده گشت و به کمک برنامه رایانه‌ای ACCESS، کلیه اطلاعات ثبت گردید، هم‌چنین به کمک نرم‌افزار «cold sample manager» از ابتدای ورود هر نمونه در فریزر مدیریت و کنترل شد.

سپس آزمایش‌های مربوطه جهت تخلیص DNA از خون، شروع گردید. تخلیص DNA به کمک روش

نتایج آزمایش تعیین توالی به کمک نرم‌افزار سیس مکس DNA ارزیابی شد. برای تعیین چهار جهش حذفی متداول در ژن آلفا گلوبین ( $\alpha^{3/7}$ ،  $-\alpha^{4/2}$ ،  $-\alpha^{20/5}$ ، MED<sup>-</sup>) از روش Multiplex Gap PCR که در بخش پزشکی مولکولی با تغییر در میزان بافرها، نوع آنزیم و تغییر برنامه PCR بهینه گردیده بود، استفاده شد (۴، ۲).

#### یافته‌ها

تعداد ۶۲۶ نمونه خون از ۸ مرکز بهداشتی وابسته به یکی از سه دانشگاه علوم پزشکی در شهر تهران دریافت شد. برای همه داوطلبان آزمایش CBC انجام شد. تعداد ۱۴۷ نمونه با در نظر گرفتن پارامترهای خونی‌شان برای آلفا تالاسمی طبیعی تلقی گردیدند. طبق جدول پارامترهای خونی، داوطلبانی که در این تحقیق شرکت کردند و دارای میزان MCV بالای ۸۸ و MCH بالای ۲۸/۵ و یا هموگلوبین بالای ۱۵/۴ بودند، برای انجام آزمایش‌های مولکولی انتخاب نگردیدند و طبیعی تلقی شدند (۵). بررسی مولکولی در بقیه افراد (۴۷۹ نمونه) به روش Multiplex Gap PCR برای بررسی حذف‌های شایع انجام شد. حداقل ۱ نوع حذف در ژن آلفا گلوبین در ۹۵ نفر تشخیص داده شد. بر این اساس، فراوانی جهش‌های حذفی شایع در افراد مورد بررسی ۱۹/۸۳٪ بود (۲۷/۸۵ - CI = ۱۱/۸۱٪).

۵۰ نمونه از نمونه‌های فاقد جهش‌های حذفی که دارای پارامترهای  $MCV > ۸۰$  و  $MCH > ۲۷$  بودند، به طور تصادفی انتخاب و از نظر وجود تریپلیکیشن در ژن آلفا گلوبین مورد بررسی قرار گرفتند ولی تریپلیکیشن در هیچ نمونه‌ای یافت نشد.

بر اساس بررسی‌های قبلی و با توجه به این که با روش Multiplex Gap PCR حدود ۶۵٪ موارد دارای جهش در ژن آلفا گلوبین در افراد دارای  $MCH < ۲۷$  یا  $MCV < ۸۰$  قابل تشخیص می‌باشد، به نظر می‌رسد تعداد واقعی موارد دارای جهش در ژن آلفا گلوبین بیشتر از موارد یافته شده با روش فوق باشد (۶). بر این اساس در صورت تعمیم نتیجه به دست آمده در این مطالعه به جامعه بر اساس مطالعه قبلی، به نظر می‌رسد تعداد افراد

میلر (۱) صورت پذیرفت و متعاقب آن آزمایش‌های مولکولی Multiplex Gap PCR و ARMS PCR و در مواردی که میزان پارامترهای خونی افراد با پاسخ آزمایش‌های مولکولی قابل توجه نبود برای بررسی بیشتر جهت تعیین توالی (Sequencing) ارسال گردید (۴-۲). در این میان نمونه‌هایی بودند که با توجه به پارامترهای خونی انتظار جهش‌های تاثیرگذار در وضعیت فنوتیپی آنها می‌رفت ولی فقط یک جهش شایع حذفی که حداکثر می‌تواند منجر به میکروسیتوز و هیپوکروم خفیف شود، برای آنها تعیین می‌شد که این نمونه‌ها از نظر ناقل بتا تالاسمی بودن و یا ناقل سایر جهش‌های ژن آلفا تالاسمی، مورد ارزیابی مجدد مولکولی قرار گرفتند و در اغلب موارد جهش‌های هتروزیگوت مرکب برای آنها تعیین گردید.

با توجه به جدول پارامترهای خونی از کتاب دکتر ودرال، از میان ۶۲۶ نمونه خون، ۱۴۷ نمونه طبیعی تلقی شده و از انجام آزمایش‌های مولکولی روی آنها صرف نظر گردید (۵). ضمن این که چون افتراق بتا از آلفا در افراد هیپوکرومیک و میکروسیتوز با A2 طبیعی مهم بود، افراد نرموکروم و نرموسیتوز با پارامترهای خونی طبیعی حذف شدند (جدول ۱).

جدول ۱: میزان پارامترهای خونی در افراد با ژنوتیپ سالم

(aa/aa) و آلفا تالاسمی خفیف (-a/aa) (۵)

ژنوتیپ	MCV (fL)	MCH (pg)	Hb (g/dL)
aa/aa	90	30	15/5
	Min ± SD* 0/5	SD 0/2	SD 0/1
-a/aa	81/2	26/2	14/3
	Min ± SD 6/9	SD 2/3	SD 1/4

\* میانگین و انحراف معیار (mean ± SD)

از آزمایش‌های مولکولی مختلفی مانند Multiplex Gap PCR، ARMS PCR و در بعضی موارد از روش تعیین توالی جهت تعیین نواقص مولکولی استفاده گردید. کلیه نتایج به کمک نرم‌افزار ACCESS و نتایج آماری به کمک برنامه SPSS ۱۶ تجزیه و تحلیل، ثبت و مستند گردید و

Compound Heterozygote ۲۰،۵/۳،۷

Compound Heterozygote ۳،۷/۴،۲

بودند که هر سه به صورت ترانس هر دو جهش، هر کدام بر یک کروموزوم خواهری رخ داده‌اند.

جدول ۳: فراوانی ژنوتیپی در جمعیت مورد مطالعه

ژنوتیپ	فراوانی	درصد
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	۳۸۴	۸۰/۱۷
$-a/\alpha\alpha$	۸۰	۱۶/۷۰
$--/\alpha\alpha$	۵	۱/۰۵
$\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$	۴	۰/۸۴
$-a/-\alpha$	۴	۰/۸۴
$--/-\alpha$	۲	۰/۴۲
	۴۷۹	۱۰۰

جدول ۴: فراوانی آلی در آلفاگلوبین

آلی	فراوانی	درصد
$-\alpha\alpha^{3'V}$	۸۸	۹/۱۹
$--MED$	۴	۰/۴۲
$\alpha\alpha^{5nt}$	۳	۰/۳۱
$--^{20/5}$	۳	۰/۳۱
$-\alpha^{4/2}$	۲	۰/۲۱
$\alpha\alpha^{PolyA}$	۱	۰/۱۰
تعداد کروموزوم بررسی شده	۹۵۸	

### بحث

در جمعیت‌هایی که تالاسمی (آلفا و بتا) شیوع بالایی داشته و برنامه‌های مدون غربالگری ناقلین پیش از ازدواج و تشخیص قبل از تولد برای ناقلین تالاسمی بتا، به اجرا در می‌آید (ایران از جمله این کشورهاست)، توانایی تعیین ژنوتیپ سریع و کامل ناقلین مشکوک به  $\alpha$ -تالاسمی به عنوان رد یکی از دلایل عمده آنمی‌های میکروسیتیک و هیپوکرومیک مزمن و هم چنین یک معضل مشاوره‌ای و تشخیصی، خصوصاً در موارد وقوع هم زمان  $\alpha$  و  $\beta$  تالاسمی در فرد مورد مطالعه، بسیار ضروری به نظر می‌رسد. بیش از بیست نوع مختلف جهش‌های طبیعی

دارای جهش در ژن آلفا گلوبین در افراد دارای ۲۷  $MCH < 80$  یا  $MCV < 143$  نفر و با فراوانی ۲۹/۹۰٪ باشد ( $CI = 22/40 - 37/40$ ).

حذف ۳/۷ کیلو بازی در ژن آلفا گلوبین به صورت هتروزیگوت ( $\alpha^{3'V}/\alpha$ ) در ۷۹ نفر از افراد مورد بررسی (۱۶/۴۹٪) یافت شد. فراوانی آلی حذف ۳/۷ کیلو بازی - به صورت هترو و هموزیگوت - در ۸۸ کروموزوم مورد بررسی (۹/۱۹٪) دیده شد.

جدول ۲: فراوانی جهش‌های مختلف ژن آلفا گلوبین در جمعیت مورد مطالعه

ژنوتیپ	فراوانی	درصد
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	۳۸۴	۸۰/۱۷
$-a^{3'V}/\alpha\alpha$	۷۹	۱۶/۴۹
$-a^{3'V}/-\alpha^{3'V}$	۳	۰/۶۳
$--MED/\alpha\alpha$	۳	۰/۶۳
$\alpha\alpha^{5nt}/\alpha\alpha$	۳	۰/۶۳
$--^{20/5}/\alpha\alpha$	۲	۰/۴۲
$--MED/-\alpha^{3'V}$	۱	۰/۲۱
$--^{20/5}/-\alpha^{3'V}$	۱	۰/۲۱
$-\alpha^{3'V}/-\alpha^{4/2}$	۱	۰/۲۱
$\alpha\alpha/-\alpha^{4/2}$	۱	۰/۲۱
$\alpha\alpha^{PolyA}/\alpha\alpha$	۱	۰/۲۱

حالت هموزیگوت این جهش در سه نمونه دیده شد که در واقع ۰/۶ درصد جمعیت مورد مطالعه بود. جهش حذفی مدیترانه‌ای در سه نمونه و حذف  $^{20/5}$  در دو نمونه به صورت هتروزیگوت (فقط در یک کروموزوم) و در یک نمونه نیز به صورت ترانس همراه با موتاسیون  $\alpha^{3'V}$  تعیین شد. جهش حذفی  $\alpha^{4/2}$  فقط در یک نمونه دیده شد و یک نمونه هم جهش پلی A تعیین گردید (جدول ۲ تا ۴).

همان گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، جهش غیر حذفی ۵ nt- در این مطالعه در سه نمونه تعیین گردید در سه نمونه نیز دو جهش هم زمان در ژن آلفا گلوبین دیده شد. این موتاسیون‌ها شامل:

Compound Heterozygote MED/۳،۷

طرح برای این همکاران، از نظر تبادل اطلاعات علمی بین مراکز علمی بسیار مفید است. در تحقیق حاضر از میان ۶۲۶ نمونه خون، ۸۰ نفر میزان MCV و MCH زیر حد طبیعی داشتند. از این ۸۰ نفر، ۱۰ نفر ناقل بتا تالاسمی و ۳ نفر فقر آهن شدید داشتند و ۶۷ نفر باقی‌مانده حامل آلفا تالاسمی بودند. در این تحقیق ۹۵ نفر حامل آلفا تالاسمی گزارش شده که تفاوت آن از ۶۷ نفر، یعنی ۲۸ نفر، کسانی بودند که میزان MCV و MCH بالای حد طبیعی داشتند (از نظر برنامه غربالگری کشوری). بدین ترتیب از نظر پارامترهای خونی می‌توان اعلام نمود در صورتی که میزان MCV و MCH در حد لب مرز (border line) و هموگلوبین A و A2 طبیعی باشد ولی RBC بالا باشد، دلالت بر ناقل آلفا تالاسمی دارد. اگر RBC پایین همراه با هموگلوبین پایین گزارش شود، نشانه فقر آهن است. RBC بالا همراه با هموگلوبین پایین نشانه تالاسمی است. در صورتی که فرد ناقل آلفا تالاسمی باشد و همراه با آن فقر آهن شدید داشته باشد، کاهش نسبی RBC و کاهش هموگلوبین را شاهد خواهیم بود.

در مناطقی که تالاسمی شایع است، فراوانی ناقلین آلفا تالاسمی بسیار متغیر است (برای مثال از ۱٪ در جنوب اسپانیا تا ۹۰٪ در مناطق قبیله‌ای در هندوستان) (۱۶، ۱۷). در سطح جهانی؛ ۲۷۰ میلیون ناقل آلفا‌های جهش یافته گلوبین وجود دارد که به طور بالقوه، باعث ایجاد فرم‌های شدید تالاسمی و هموگلوبینوپاتی‌ها می‌شوند. سالانه ۳۰۰ تا ۴۰۰ هزار تولد با نقص گلوبینی به دنیا می‌آیند (۱۷). بیش از ۹۵٪ این تولدها در آسیا، هند و خاورمیانه رخ می‌دهد. هر چند در دهه‌های اخیر به دلیل مهاجرت‌ها در جمعیت جهانی، اکنون در استرالیا و اروپا و شمال آمریکا نیز (به طور اخص در جمعیت مهاجرانی که با منشاء کشورهای با شیوع بالای تالاسمی هستند) این فراوانی وجود دارد.

از آن جایی که در ۵۰ سال اخیر به دلیل بهبود شرایط بهداشتی و تغذیه‌ای، میزان تولدهایی با نقص زنجیره‌های گلوبین عمر طولانی‌تری می‌کنند، عملاً در سطح جهانی می‌توان گفت که هنوز تالاسمی یکی از بزرگترین مشکلات رو به افزایش هماتولوژیکی هم در کشورهای

شناخته شده است که هر دو ژن آلفا گلوبین را از روی یک کروموزوم حذف می‌کنند (به صورت cis) و یا خوشه کامل ژن‌های  $\alpha$  -  $\beta$  گلوبین را حذف می‌کنند و به عنوان جهش‌های  $\alpha^0$  تالاسمی معروفند (۷). در سال‌های اخیر روش Gap PCR برای تعیین بسیاری از جهش‌های حذفی معرفی شده (۸، ۹) و سپس روش مولتیپلکس Gap PCR که در یک واکنش می‌توان چندین حذف را تشخیص داد، برای سهولت و صرفه‌جویی در زمان معرفی گردیده است (۲).

بر خلاف بتا تالاسمی، جهش‌های غیر حذفی در آلفا تالاسمی شایع نیستند. به دلیل توالی نوکلئوتیدی ژن‌های آلفا گلوبین که حاوی توالی‌های بسیار زیاد گوانین - سیتوزین است (GC rich)، تعیین این جهش‌ها سختی خاص خود را دارد. اخیراً بیش از سی نوع مختلف جهش غیر حذفی در ژن آلفا گلوبین انسانی در پایگاه اطلاعات ژنتیک انسانی فهرست شده است: (<http://globin.cse.psu.edu>). به طور طبیعی ژن  $\alpha 2$  گلوبین، دو تا سه مرتبه بیشتر mRNA آلفا گلوبین را نسبت به ژن  $\alpha 1$  بیان می‌کند (۱۰). به همین دلیل جهش‌های نقطه‌ای که در  $\alpha 2$  گلوبین رخ می‌دهند، نسبت به جهش‌های نقطه‌ای در ژن  $\alpha 1$ ، ایجاد آنتی‌شیدتری می‌کنند (۱۱). برای جهش غیر حذفی و یا جهش‌های حذف و یا دخول چند نوکلئوتیدی کوچک، تشخیص اغلب بر پایه تعیین توالی محصول PCR و یا هر دو ژن‌های آلفا یک و آلفا دو استوار است (۱۲، ۱۳). هم چنین روش‌های Reverse dot-blot و ARMS PCR برای تشخیص جهش‌های نقطه‌ای  $\alpha^+$  تالاسمی استفاده می‌گردد (۱۴، ۱۵).

در بازدیدی که در سال ۱۳۸۵ از مرکز تشخیص قبل از تولد در بیمارستان دولتی کشور امارات، هم زمان با کنفرانس TIF ۲۰۰۶ به عمل آمد، در گزارشی که دکتر بیزل ارائه نمود، حدود ۵۰ درصد جمعیت این کشور ناقل آلفا تالاسمی می‌باشند. اگر چه دارای پارامترهای خونی نزدیک به مرز طبیعی هستند و در هم‌زمانی با بتا تالاسمی خاموش، یک معضل تشخیصی در کلینیک‌های مشاوره تالاسمی می‌باشند. دکتر بیزل تصور می‌کند در ایران بایستی میزان ناقلین بیشتر باشد و بنابراین ارائه نتایج این

افراد دارای  $MCH < 27$  یا  $MCV < 80$  حداقل ۱۴۳ نفر و با فراوانی ۲۹/۹۰٪ باشد ( $37/40 - 22/40 = 95\% CI$ ).

### نتیجه گیری

بر اساس این تحقیق، در صورت تعمیم نتیجه به دست آمده در این مطالعه به جامعه و بر اساس مطالعه قبلی، به نظر می‌رسد تعداد افراد دارای جهش در ژن آلفا گلوبین در افراد دارای  $MCH < 27$  یا  $MCV < 80$  حداقل ۱۴۳ نفر و با فراوانی ۲۹/۹۰٪ باشد ( $37/40 - 22/40 = 95\% CI$ ).

### تشکر و تقدیر

این تحقیق با حمایت مالی «صندوق حمایت از پژوهشگران کشور» انجام شده است. بدین وسیله از مسؤولین و همکاران محترم شاغل در مراکز بهداشتی نامبرده در این تحقیق و نیز همکاران محترم در مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر و بخش پزشکی مولکولی در انستیتو پاستور تقدیر و تشکر می‌نمایم.

پیشرفته و هم در کشورهای در حال پیشرفت محسوب می‌شود (۱۸). در تحقیقی که وایت و همکاران در شبه جزیره عمان انجام دادند، فراوانی آلفا تالاسمی را ۳۸/۹٪ اعلام کرده‌اند (۱۹). در همان سال این فراوانی در امارات متحده عربی ۱۶/۵٪ ذکر شده که بعدها در تحقیق دکتر بیزل و همکارانش، این میزان ۴۹٪ ذکر گردیده است (۲۱). (۲۰)

در مناطق آفریقایی برای مثال در شمال گینه‌نو، فراوانی آلفا تالاسمی بسیار بالا گزارش می‌شود (۶۸٪) (۲۲). در مقاله نجم‌آبادی و همکاران (۲۰۰۷)، از میان ۶۵۳ نمونه مورد بررسی که دارای شاخص هماتولوژیکی  $MCV < 85$  و  $MCH < 27$  و نیز هموگلوبین A2 طبیعی بودند به کمک روش‌های مختلف مولکولی، ۵۰/۲٪ جمعیت مورد بررسی را دارای انواع موتاسیون‌های حذفی و غیر حذفی شایع و غیر شایع گزارش نمودند (۲۳). در این تحقیق به نظر می‌رسد تعداد افراد دارای جهش در ژن آلفا گلوبین در

### References :

- 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.
- Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. *Blood* 2000 95(1): 360-2.
- Zarbaksh B, Farshadi E, Ariani Kashani A, Karimipoor M, Azarkeivan A, Habibi Pourfatideh R, et al. Molecular study of alpha-thalassemia mutations in Iranian potential carriers. *Sci J Iran Blood Transfus Org* 2010; 7(2): 70-7. [Article in Farsi]
- Kiani-Shirazi R, Zainali S, Karimipoor M, Zarbaksh B, Alibakhshi R. PCR Application in recognition of prevalent deletion of 5 globin gene in Alpha Thalassemia carriers. *Tehran University Medical Journal* 2006; 64(2): 95-9. [Article in Farsi]
- Gibbons R, Higgs DR, Olivieri Nancy F, Wood WG. Clinical features of the thalassemia. In: Weatherall DJ, Clegg JB. *The Thalassemia Syndromes*. 4<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Science Ltd; 2001. p. 497.
- Fallah MS. Molecular analysis of alpha globin gene cluster in suspected carriers of alpha thalassemia with unknown mutation [dissertation]. Tehran: National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology; 2010.
- Higgs DR. Molecular mechanisms of thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. *Disorders of Hemoglobin; Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management*. United Kingdom: Cambridge University Press; 2001. p. 405-30.
- Baysal E, Huisman THJ. Detection of common deletional  $\alpha$ -thalassemia-2 determinants by PCR. *Am J Hematol* 1994; 46(3): 208-13.
- Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood* 2001; 98(1): 250-1.
- Liebhaber SA, Cash FE, Ballas SK. Human alpha-globin expression . The dominant role of the alpha 2-locus in mRNA and protein synthesis. *J Biol Chem* 1986; 261(32): 15327-33.
- Chui DHK, Fucharoen S, and Chan V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. *Blood* 2003; 101(3): 791-800.
- Lorey F, Charoenkwan P, Witkowska HE, Lafferty J, Patterson M, Eng B, et al. Hb H hydrops foetalis syndrome: a case report and review of literature. *Br J Haematol* 2001; 115(1): 72-8.
- Viprakasit V, Green S, Height S, Ayyub H, Higgs DR. Hb H hydrops fetalis syndrome associated with the interaction of two common determinants of alpha thalassaemia (--MED/(alpha) TSaudi(alpha)). *Br J Haematol* 2002; 117(3): 759-62.
- Chan V, Yam I, Chen FE, Chan TK. A reverse dot-blot method for rapid detection of non-deletion alpha thalassaemia. *Br J Haematol* 1999; 104(3): 513-5.
- Eng B, Patterson M, Walker L, Chui DH, Wayne JS. Detection of severe nondeletion alpha-thalassemia

- mutations using a single-tube multiplex ARMS assay. *Genet Test* 2001; 5(4): 327-9.
- 16- Angastiniotis M, Modell B. Global epidemiology of hemoglobin disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 850: 251-69. Baysal E. Hemoglobinopathies in the United Arab Emirates. *Hemoglobin* 2001; 25(2): 247-53
- 17- Higgs DR. Gene regulation in hematopoiesis: new lessons from thalassemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004: 1-13.
- 18- Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ* 2001; 79(8): 704-12.
- 19- White JM, Byrne M, Richards R, Buchanan T, Katsoulis E, Weerasingh K. Red cell genetic abnormalities in Peninsular Arabs: sickle hemoglobin, G6PD deficiency and alpha and beta thalassaemia. *J Med Genet* 1986; 23(3): 245-51.
- 20- Baysal E. Hemoglobinopathies in the United Arab Emirates. *Hemoglobin* 2001; 25(2): 247-53.
- 21- El-Kalla S, Baysal E. Alpha-thalassemia in the United Arab Emirates. *Acta Haematol* 1998; 100(1): 49-53.
- 22- Fowkes FJ, Allen SJ, Allen A, Alpers MP, Weatherall DJ, Day KP. Increased microerythrocyte count in homozygous alpha(+)-thalassaemia contributes to protection against severe malarial anaemia. *PLoS Med* 2008; 5(3): e56.
- 23- Hadavi V, Taronchi AH, Malekpour M, Gholami B, Law HY, Almadani N, et al. Elucidating the spectrum of alpha-thalassemia mutations in Iran. *Haematologica* 2007; 92(7): 992-3.

*Original Article*

## Frequency of alpha thalassemia carriers detected in Tehran premarriage screening using molecular techniques

Zarbakhsh B.<sup>1</sup>, Eghbalpour F.<sup>1</sup>, Farshadi E.<sup>1</sup>, Fallah M.S.<sup>2</sup>, Karimipour M.<sup>1</sup>, Kaeini Moghadam Z.<sup>1</sup>, Zeinali S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Pasteur Institute, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Kawsar Human Genetics Research Center, Tehran, Iran

### Abstract

#### *Background and Objectives*

Based on the previous researches performed in Iran and worldwide, there is a significant number of subjects carrying alpha-thalassemia gene defect. Therefore, we aimed to assess its frequency amongst a random population selected from premarriage couples who entered the national prevention program of  $\beta$ -thalassemia major at Tehran.

#### *Materials and Methods*

Blood samples were collected from 625 randomly selected individuals following obtaining written informed consent through eight cooperating primary health care centers (PHC) in Tehran. Primarily, CBC testing was performed. Subsequently, blood samples underwent DNA extraction and gene-specific amplification using ARMS PCR and Multiplex Gap PCR followed by DNA sequencing of negative samples to identify potentially missed alpha-globin gene mutations.

#### *Results*

According to CBC results, 147 individuals were considered normal; 479 remaining blood samples underwent molecular assessment which revealed that 95 samples possessed a minimum of one deletional mutation in the alpha-globin genes, resulting in a frequency of 19.83% in the tested population (CI 95%; 11.81-27.85). Furthermore, 50 samples with normal hematological indices (MCH>27, MCV>80) were tested for triplication mutation and revealed to be negative.

#### *Conclusions*

It has previously been established that Multiplex Gap PCR is capable of detecting 65% of alpha globin gene defects in blood samples with abnormally low hematological indices (MCH<27, MCV<80). Hence, using bio-informatic techniques with generalization of our results to the entire population of Tehran showed the true frequency of alpha-globin gene defect to be actually 29.90% (CI 95%; 22.40-37.40) at the population level.

**Key words:** frequency, alpha-Globins, alpha-Thalassemia, Iran

Received: 16 Dec 2009

Accepted: 28 Sep 2010

Correspondence: Zeinali S., PhD of Human Genetics. Associate Professor of Pasteur Institute and Kawsar Human Genetics Research Center.

P.O.Box: 13185-1667, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 66480780; Fax: (+9821) 66480780

E-mail: zeinali@kawsar.ir