

تنوع ژنتیکی پلی مورفیسم HindIII در اینترون دوم IVSII-I ژن Gy و ارتباط آن با میزان HbF در بیماران بتا تالاسمی ماژور و اینترمدیا در استان اصفهان

مجید متولی باشی^۱، زهرا سجادی پور^۲، طیبه قاسمی^۲

چکیده

سابقه و هدف

تالاسمی بتا، یک بیماری اتوزومی مغلوب است. طی مطالعه‌های صورت گرفته، گزارش شده است که آلل A پلی مورفیسم HindIII با بیماری تالاسمی اینترمدیا پیوستگی دارد. هدف این پژوهش، بررسی پلی مورفیسم HindIII در اینترون دوم ژن Gy و ارتباط آن با میزان HbF در بیماران تالاسمی بتا و اینترمدیا بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه مورد - شاهده‌ای، تعداد ۱۵۰ بیمار بتا تالاسمی ماژور، ۳۴ بیمار بتا تالاسمی اینترمدیا و ۵۰ فرد سالم مورد مطالعه قرار گرفتند. پلی مورفیسم HindIII در اینترون دوم ژن Gy به روش RFLP-PCR تعیین گردید. میزان HbF به روش الکتروفورز با استفاده از پرونده‌های بیماران مشخص شد. سپس پیوستگی این پلی مورفیسم، با پلی مورفیسم XmnI در ناحیه ۵' ژن Gy با اندازه‌گیری مقدار D' توسط نرم افزار Power Marker بررسی شد.

یافته‌ها

آنالیز داده‌ها نشان داد که بین آلل A و بیماری تالاسمی اینترمدیا، ارتباط وجود دارد به طوری که اگر آلل A غالب در نظر گرفته شود، ژنوتیپ‌های AA+AC با تالاسمی اینترمدیا ارتباط دارند ($p=0/014$) اما ارتباطی با تالاسمی ماژور مشاهده نشد. میانگین HbF در بیماران بتا تالاسمی ماژور و اینترمدیا به ترتیب برابر $94/3 \text{ g/dL}$ و $84/4 \text{ g/dL}$ بود. پیوستگی نامتعادل بالایی بین دو پلی مورفیسم HindIII و XmnI دیده شد.

نتیجه‌گیری

حضور آلل A پلی مورفیسم HindIII به عنوان یک آلل غالب، اثر مثبتی بر میزان HbF و کاهش شدت علائم بالینی بیماران بتا تالاسمی اینترمدیا دارد. پیوستگی بالای آلل A پلی مورفیسم HindIII با آلل T پلی مورفیسم XmnI در بیماران تالاسمی اینترمدیا و آلل C پلی مورفیسم HindIII با آلل C پلی مورفیسم XmnI در بیماران تالاسمی ماژور مشاهده شد.

کلمات کلیدی: تالاسمی بتا، پلی مورفیسم ژنتیک، HbF، تالاسمی اینترمدیا

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۲۹

۱- مؤلف مسئول: PhD ژنتیک مولکولی - دانشیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان - اصفهان - ایران - صندوق پستی: ۸۱۷۴۶-۷۳۴۴۱

۲- کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی - گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان - اصفهان - ایران

مقدمه

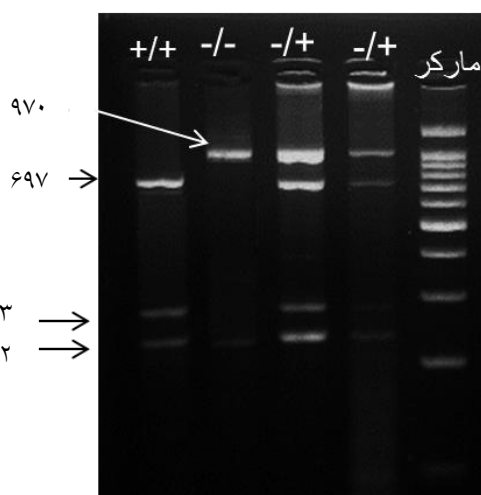
تالاسمی، نوعی کم خونی ارثی و ژنتیکی است (۱، ۲). عدم توازن در تولید زنجیره‌های آلفاگلوبین و بتاگلوبین در بیماران تالاسمی، منجر به تجمع زنجیره‌های آزاد گلوبین در پیش‌سازهای سلول خونی می‌شود. بر اساس فنوتیپ، سه گروه از بیماران مبتلا دیده می‌شوند: ۱- تالاسمی ماژور ۲- تالاسمی مینور ۳- تالاسمی ایترمدیا. تالاسمی ماژور فرم شدید بیماری است که بیماران نیاز به تزریق خون مداوم برای زنده ماندن دارند، با این حال بعضی از بیماران بتا تالاسمی ماژور، نیاز به تزریق خون ندارند که به عنوان تالاسمی ایترمدیا شناخته می‌شوند (۳). بیماران تالاسمی ایترمدیا از نظر علائم فنوتیپی، گروه حد واسط بوده و بسته به عوامل مختلف، بیماری در آن‌ها به گونه‌ای تعدیل شده است (۱). با توجه به مشابه بودن نوع جهش‌های بتا تالاسمی در افراد مبتلا به تالاسمی ایترمدیا و ماژور، می‌توان گفت به جز ژنوتیپ ژن بتا گلوبین، عوامل دیگری نیز در تعیین فنوتیپ فرد بیمار و شدت یا تعدیل علایم بیماری اثرگذار است. بروز فنوتیپی و علائم بالینی در افراد ایترمدیا بسیار متنوع و گسترده می‌باشد که خود گویای پیچیدگی مکانیسم‌های ژنتیکی دخیل در این امر است. به طور کلی هر عاملی که بتواند به گونه‌ای عدم تعادل ایجاد شده بین مقدار زنجیره‌های آلفا و بتا را در گلوبول‌های قرمز جبران کند، می‌تواند موجب تعدیل شدت بیماری بتا تالاسمی شود. بر این اساس عوامل مؤثر در تعدیل شدت بیماری عبارتند از: ۱. وجود آل‌های خفیف بتا تالاسمی ۲. به ارث رسیدن ژن‌های غیر طبیعی آلفا، یا گاما و یا پلی مورفیسم‌های خوشه ژنی بتا گلوبین ۳. عواملی که سبب افزایش و فعال شدن مجدد هموگلوبین جنینی می‌شوند. در ۶۰٪ تا ۹۰٪ موارد، بیماران تالاسمی ایترمدیا دارای دو آل بتا تالاسمی هستند (۴، ۵)، دو نوع زنجیره گاما HbF، G γ و A γ در خوشه ژنی بتا گلوبین وجود دارد که در موقعیت ۱۳۶ (گلايسين به جای آلانين) با یکدیگر متفاوت هستند (۶). در سطح جهانی، مطالعه‌های متنوع و جامعی در مورد بیماری تالاسمی ایترمدیا صورت گرفته است. در این مطالعه‌ها نشان داده شده که حضور آل A پلی مورفیسم HindIII با وضعیت کلینیکی خفیف بیماری همراه است

(۸، ۷). اما علت خاص یا مکانیسم مولکولی مشخصی برای این ارتباطات شناخته نشده است. پلی مورفیسم HindIII بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۱ (Chr.11p15.4) و در داخل خوشه ژنی بتاگلوبین، در ایترون دوم ژن G γ واقع شده است. در طی مطالعه‌های متعددی که بر روی پلی مورفیسم XmnI صورت گرفته، مشخص گردید که این پلی مورفیسم منجر به افزایش بیان ژن G γ و تغییر در میزان HbF می‌گردد و سبب بروز فنوتیپ معتدل‌تری در افراد مبتلا به سیکل سل و بتا تالاسمی می‌شود (۹). مطالعه‌های مختلف نشان داده است که احتمالاً این جابه‌جایی نوکلئوتیدی در پلی مورفیسم XmnI، سبب کاهش اتصال فاکتورهای مهار کننده بر روی پروموتور ژن G γ شده است. بنابراین قرارگیری کمپلکس ACH (Active Chromatin Hub) در بالادست ژن بتا گلوبین و انجام پدیده کلید کردن مختل می‌شود (۱۰-۱۲). در این حالت LCR در بالادست ژن G γ قرار گرفته و همین امر موجب فعال شدن مجدد ژن G γ می‌گردد (۱۳). در کشور ایران طبق مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ توسط عرب و همکاران در جمعیت تهران صورت گرفت، پلی مورفیسم HindIII در هاپلوتیپ گزارش شده به صورت هموزیگوس (A/A) با بیماری تالاسمی ایترمدیا، HbF بالا و پلی مورفیسم XmnI ارتباط نشان داد (۱۴). در مطالعه حاضر ارتباط پلی مورفیسم HindIII در ایترون دوم ژن G γ با بیماری تالاسمی ایترمدیا، مقدار HbF پیوستگی این مارکر با پلی مورفیسم XmnI در ۵' ژن G γ در جمعیت اصفهان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع مورد - شاهدهی و وابسته به گذشته بود. جامعه مورد مطالعه، بیماران بتا تالاسمی ایترمدیا و بتا تالاسمی ماژور مراجعه‌کننده به بیمارستان سیدالشهدای اصفهان بودند. در این مطالعه ۳۴ بیمار بتا تالاسمی ایترمدیا، ۱۵۰ بیمار بتا تالاسمی ماژور و ۵۰ فرد سالم به عنوان کنترل بررسی شدند. نمونه خون افراد کنترل از افراد مراجعه‌کننده به آزمایشگاه امید اصفهان جمع‌آوری شد. این افراد بیماری‌های خونی مانند سرطان خون و

تالاسمی ایترمدیا و میزان HbF، به کمک آزمون کای دو محاسبه گردید، سطح معنادار کوچک‌تر از $0/05$ ($\leq 0/05$) (p) از لحاظ آماری قابل قبول فرض شد. سپس پیوستگی دو مارکر توسط نرم‌افزار Power Marker انجام شد.



شکل ۱: هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم HindIII برای مارکر HindIII γ . الکتروفورز محصول هضم مارکر HindIII γ بر روی ژل آگارز ۲٪ به مدت نیم ساعت در ولتاژ ۷۰ انجام شده است. علامت + (آل A) نشان‌دهنده وجود جایگاه برش و علامت - (آل C) نشان‌دهنده عدم وجود جایگاه برش است. افراد هموزیگوت CC دو باند ۹۷۰ و ۲۳۲ جفت بازی، افراد هموزیگوت AA سه باند ۲۷۳، ۶۹۷ و ۲۳۲ جفت بازی و افراد هتروزیگوت AC باندهای ۲۷۳، ۶۹۷، ۲۳۲ و ۹۷۰ جفت بازی را نشان می‌دهند.

یافته‌ها

در این مطالعه با بررسی ۳۴ بیمار بتا تالاسمی ایترمدیا، ۱۵۰ بیمار بتا تالاسمی ماژور و ۵۰ فرد سالم که به بیمارستان سیدالشهدای اصفهان مراجعه کرده بودند، با استفاده از روش RFLP-PCR، درصد فراوانی آلی و ژنوتیپی پلی مورفیسم HindIII γ در بیماران بتا تالاسمی ماژور و ایترمدیا مشخص شد (جدول ۱ و ۲). فراوانی آل A در تالاسمی ایترمدیا $89/70\%$ و در افراد سالم 39% مشاهده شد که این اختلاف از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد ($OR = 13/63$ ، $CI (95\%) = 5/65-32/8$)، $p = 0/001$ (جدول ۳).

تالاسمی نداشتند و از لحاظ جنس، دخانیات و سن سعی شد با افراد بیمار همسان‌سازی صورت گیرد. بیماران بتا تالاسمی ماژور ماهیانه خون دریافت می‌کردند اما بیماران بتا تالاسمی ایترمدیا خون دریافت نمی‌کردند یا به صورت هر سه ماه یک بار خون می‌گرفتند. هموگلوبین بیماران بتا تالاسمی ایترمدیا بین $8-10$ g/dL بود که توسط پزشک متخصص خون تأیید شده بود. با کسب رضایت از بیماران، مقدار ۵ mL خون جمع‌آوری و در لوله‌های حاوی EDTA ریخته شد. متغیرهای هماتولوژیک شامل Hb، HbF، RBC، MCV و MCH از پرونده‌های بیماران استخراج شد. محل پلی مورفیک HindIII γ در ایترون دوم ژن γ در خوشه ژنی بتا گلوبین قرار گرفته که حاصل تغییر باز A به C می‌باشد که با این تغییر، مکان برش آنزیم از بین می‌رود. DNA خون بیماران به روش فنل کلروفرم استخراج شد (۱۵). جایگاه پلی مورفیک با استفاده از آغازگرهای طراحی شده توسط یانگ و همکاران با روش PCR تکثیر و قطعه‌ای ۱۲۰۲ جفت بازی به دست آمد (۱۶). واکنش PCR بهینه شده در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. پس از انجام PCR، برای تعیین حضور یا عدم حضور جایگاه پلی مورفیسم، قطعه تکثیر یافته واجد مارکر HindIII γ تحت هضم آنزیمی توسط آنزیم HindIII قرار گرفت. هضم آنزیمی محصول PCR بر اساس دستورالعمل آنزیم انجام گرفت. ویال حاوی مخلوط واکنش هضم آنزیمی به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا هضم آنزیمی کامل گردد. سپس ژنوتیپ محصولات هضم شده با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز دو درصد در ولتاژ ۷۰ ولت به مدت نیم ساعت تشخیص داده شد. در افراد هموزیگوت C/C، این قطعه به دو قطعه ۲۳۲ و ۹۷۰ جفت بازی شکسته شده (محصول PCR به طور طبیعی واجد یک منطقه شناسایی آنزیم می‌باشد) در حالی که در افراد هموزیگوت A/A، سه قطعه ۲۳۲، ۶۹۷ و ۲۷۳ جفت بازی ایجاد و در افراد هتروزیگوت قطعات ۲۷۳، ۲۳۲، ۶۹۷ و ۹۷۰ جفت بازی پس از انجام RFLP بر روی ژل آگارز ایجاد می‌شود (شکل ۱). تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SISA انجام شد. در ابتدا فراوانی آلی و ژنوتیپی نمونه‌ها مشخص و سپس ارتباط آن با بیماری بتا

جدول ۱: توزیع فراوانی پلی مورفیسم HindIII در بیماران بتا تالاسمی اینترمدیا و افراد کنترل در استان اصفهان

Hind III	تعداد افراد تالاسمی ماژور (درصد)	تعداد افراد سالم (درصد)	p	OR	فاصله اطمینان (٪۹۵)
ژنوتیپ C/C A/C + A/A	۱ (۲/۹۴) ۳۳ (۹۷/۰۶)	۱۱ (۲۲/۷۹) ۳۹ (۷۷/۲۱)	۰/۰۱۴	۹/۳۰	۱/۱۴-۷۵/۹
آلل C A	۷ (۱۰/۲۹) ۶۱ (۸۹/۷۰)	۶۱ (۶۱) ۳۹ (۳۹)	۰/۰۰۱	۱۳/۶۳	۵/۶۵-۳۲/۸

جدول ۲: توزیع فراوانی پلی مورفیسم HindIII در بیماران بتا تالاسمی ماژور و افراد کنترل در استان اصفهان

Hind III	تعداد افراد تالاسمی ماژور (درصد)	تعداد افراد سالم (درصد)	p	OR	فاصله اطمینان (٪۹۵)
ژنوتیپ C/C A/C + A/A	۵۶ (۳۷/۲۶) ۹۴ (۶۲/۷۴)	۱۱ (۲۲/۷۹) ۳۹ (۷۷/۲۱)	۰/۱	۱	۰/۴۱-۱/۱۹
آلل C A	۱۶۸ (۵۶/۰۱) ۱۳۲ (۴۳/۹۹)	۶۱ (۶۱) ۳۹ (۳۹)	۰/۶	۰/۹۲	۰/۶۳-۱/۳۲

جدول ۳: توزیع فراوانی پلی مورفیسم HindIII در بیماران تالاسمی اینترمدیا و تالاسمی ماژور به عنوان گروه کنترل در جمعیت اصفهان

Hind III	تعداد افراد ماژور (درصد)	تعداد افراد اینترمدیا (درصد)	p	OR (CI ٪۹۵)
ژنوتیپ C/C(-/-) A/A(+/-)(-/+)A/C+	۵۶ (۳۷/۲۶) ۹۴ (۶۲/۷۳)	۱ (۲/۹۴) ۳۳ (۹۷/۰۵)	۰/۰۰۰۹	۱۹/۶۵ (۲/۷-۱۴۷/۷)
آلل C(-) A(+)	۱۶۸ (۵۶/۰۱) ۱۳۲ (۴۳/۹۹)	۷ (۱۰/۲۹) ۶۱ (۸۹/۷۰)	۰/۰۰۱	۱۱/۰۹ (۴/۹-۲۵)

هم چنین افرادی که دارای حداقل یک آلل A می باشند افزایش چشمگیری در کاهش علائم بالینی نسبت به افراد دارای آلل C دارند (۱/۱۴-۷۵/۹) (٪۹۵) CI = ۹/۳۰ ، OR = ۰/۰۱۴ (p=). فراوانی آلل A در تالاسمی ماژور ۴۳/۹۹٪ مشاهده شد اما ارتباطی بین آلل A و بیماری تالاسمی ماژور دیده نشد (جدول ۴).

بر اساس جدول ۳، مقایسه فراوانی پلی مورفیسم HindIII در بیماران تالاسمی اینترمدیا و تالاسمی ماژور به عنوان گروه کنترل، ارتباط معنادار این آلل با بیماری تالاسمی اینترمدیا تایید گردید.

میزان HbF با استخراج از پرونده بیماران (به روش

الکتروفورز) و میانگین HbF بر حسب پلی مورفیسم HindIII طبق جدول ۴ مشخص شد. همان طور که در این جدول مشخص است، بیشترین مقدار HbF در بیماران بتا تالاسمی ماژور و در بیماران بتا تالاسمی اینترمدیا در حالتی است که مکان پلی مورفیک HindIII به صورت هموزیگوت AA وجود داشته باشد.

با بررسی پلی مورفیسم HindIII در مطالعه حاضر، پیوستگی این پلی مورفیسم با پلی مورفیسم XmnI مورد بررسی قرار گرفت. پیوستگی نامتعادل بالایی بین دو مارکر ذکر شده در تالاسمی اینترمدیا مشاهده شد (D'=1). در بیماران تالاسمی اینترمدیا، ۷۷٪ افراد دارای آلل A

پلی مورفیسیم HindIIIIG، هم چنین واجد پلی مورفیسیم XmnI(T) بودند. در بیماران بتا تالاسمی ماژور، ۲/۷۰٪ افراد دارای آلل A پلی مورفیسیم HindIIIIG و هم چنین واجد پلی مورفیسیم XmnI(T) بودند. در بیماران بتا تالاسمی ماژور، ۵۸/۸٪ افراد دارای آلل C پلی مورفیسیم HindIIIIG و فاقد پلی مورفیسیم XmnI(T) بودند و در بیماران تالاسمی ایترمدیا، ۸٪ افراد دارای آلل C پلی مورفیسیم HindIIIIG و فاقد پلی مورفیسیم XmnI(T) بودند.

جدول ۴: میانگین درصد HbF بر حسب پلی مورفیسیم HindIIIIG در بیماران بتا تالاسمی ماژور و ایترمدیا در اصفهان (± نشان دهنده انحراف معیار است)

پلی مورفیسیم HindIIIIG	میانگین درصد HbF	
	ماژور	ایترمدیا
A/A	۹۶/۲ ± ۲	۸۹/۱ ± ۱۰
A/C	۹۳/۳ ± ۱۴	۸۶ ± ۱۰
C/C	۹۳/۱ ± ۹	۷۸ ± ۱۱

بحث

در مطالعه حاضر به بررسی پلی مورفیسیم HindIIIIG در ایترون دوم ژن $G\gamma$ در خوشه ژنی بتا گلوبین و ارتباط آن با میزان HbF و پیوستگی آن با پلی مورفیسیم XmnI ناحیه ۵' ژن $G\gamma$ در بیماران بتا تالاسمی ماژور و ایترمدیا در اصفهان پرداخته شد. پس از بررسی بر روی ۱۵۰ بیمار بتا تالاسمی ماژور، ۳۴ بیمار بتا تالاسمی ایترمدیا و ۵۰ فرد سالم، مشخص شد که ارتباط معناداری بین حضور آلل A پلی مورفیسیم HindIIIIG و بیماری تالاسمی ایترمدیا وجود دارد ($p=0/001$). همان طور که در جداول ۱-۳ مشاهده می شود، فراوانی آلل A در تالاسمی ایترمدیا ۸۹/۷۰٪ و در تالاسمی ماژور ۴۳/۹۹٪ مشاهده شد، این اختلاف از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد. نتایج، گویای ارتباط چشمگیر آلل A پلی مورفیسیم HindIIIIG با بهبود علائم کلینیکی در تالاسمی ایترمدیا نسبت به تالاسمی ماژور بود. در بررسی ارتباط حضور آلل A این پلی مورفیسیم و میانگین HbF ارتباط معناداری مشاهده نشد، ولی از نظر

توصیفی، میانگین درصد HbF در بیماران بتا تالاسمی ماژور و ایترمدیا در حضور آلل A پلی مورفیسیم HindIIIIG، افزایش نشان داد. در بررسی پیوستگی بین پلی مورفیسیم های HindIIIIG و XmnI، پیوستگی نامتعادل بالایی بین دو مارکر HindIIIIG و XmnI مشاهده شد. وجود پلی مورفیسیم XmnI در ۳۴ بیمار تالاسمی ایترمدیا مورد بررسی در این مطالعه، از پیش طی مطالعه متولی باشی و قاسمی تعیین شده بود (۱۷). بین آلل A پلی مورفیسیم HindIIIIG و آلل T پلی مورفیسیم XmnI در بیماران بتا تالاسمی ایترمدیا، پیوستگی بالایی مشاهده شد، علاوه بر این بین آلل های C این دو پلی مورفیسیم در بیماران تالاسمی ماژور پیوستگی بالایی مشاهده شد. نتایج مطالعه حاضر با نتایج همه مطالعه های صورت گرفته هم خوانی دارد. البته به دلیل مراجعه پایین بیماران تالاسمی ایترمدیا به بیمارستان برای تزریق خون و فراوانی کم این بیماران در میان بیماران تالاسمی بتا، جمع آوری نمونه خون و مطالعه بر روی این افراد کار بسیار سختی است. به همین دلیل مطالعه های اندکی بر روی افراد تالاسمی ایترمدیا وجود دارد.

در مطالعه های اندکی که تاکنون بر روی تالاسمی ایترمدیا انجام شده، نتایج مختلفی در رابطه با پلی مورفیسیم HindIIIIG حاصل شده است به صورتی که بین حضور آلل A این پلی مورفیسیم و میزان HbF و تالاسمی ایترمدیا ارتباط مشاهده شده است. در مطالعه تین و همکاران بر روی جمعیت بیماران تالاسمی ایترمدیا و ماژور آسیایی، آلل A پلی مورفیسیم HindIIIIG در ۵۰٪ کروموزوم های بیماران تالاسمی ایترمدیا و تنها در ۱۱/۴٪ بیماران تالاسمی ماژور گزارش شد و ۶ نفر از ۱۴ بیمار تالاسمی ایترمدیا برای این آلل به صورت هموزیگوت بودند در حالی که تنها یک بیمار از ۴۲ بیمار تالاسمی ماژور برای این آلل هموزیگوت بود و این تفاوت ها از نظر آماری با اهمیت بود ($p=0/001$). سطح HbF برای بیماران هموزیگوت AA و هتروزیگوت AC و هموزیگوت CC به ترتیب ۹/۸ g/dL، ۹/۲ g/dL و ۶/۸ g/dL گزارش شد. در مطالعه تین و همکاران بر روی جمعیت بیماران بتا تالاسمی ماژور و ایترمدیا ایتالیایی، ۱۲ بیمار از ۴۵ بیمار

گزارش شد (۱۴).

نتیجه گیری

مطالعه حاضر حضور یا عدم حضور محل پلی مورفیک HindIII در بیماران بتا تالاسمی ماژور و ایترمیدیا در اصفهان و هم چنین ارتباط آن را با HbF مورد بررسی قرار داد. به طور کلی نتایج مطالعه کنونی نشان داد که آلل A پلی مورفیک HindIII در ایترون دوم ژن $G\gamma$ در خوشه ژنی بتا گلوبین، با افزایش سطح HbF در بیماران بتا تالاسمی ماژور و ایترمیدیا در اصفهان به علت ناشناخته‌ای در ارتباط است. یکی از علت‌های این امر می‌تواند پیوستگی اش با پلی مورفیک XmnI در پروموتور ژن $G\gamma$ باشد. به هر صورت، در افراد با حضور آلل A پلی مورفیک HindIII، زمان نیاز به تزریق خون به تأخیر افتاده و از شدت علائم بالینی در این بیماران کاسته می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از مدیریت تحصیلات تکمیلی و پژوهشی دانشگاه اصفهان به خاطر حمایت‌های مالی و سهولت در اجرای این تحقیق و هم چنین از بیمارستان سیدالشهداء اصفهان بالانحص آقای دکتر حمید هورفر به خاطر در اختیار قرار دادن نمونه خون بیماران و اطلاعات پزشکی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

تالاسمی ایترمیدیا برای حضور آلل A این پلی مورفیک به صورت هموزیگوت بودند در حالی که ۳ بیمار از ۳۶ بیمار تالاسمی ماژور به صورت هموزیگوت AA بودند که این تفاوت از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد ($p=0/005$). در بررسی پیوستگی بین پلی مورفیک XmnI(T) و پلی مورفیک HindIII مشاهده گردید که در همه کروموزوم‌هایی که آلل A پلی مورفیک HindIII را دارند، پلی مورفیک XmnI(T) حضور می‌یابد (۱۸). وجود HindIII(A) در بسیاری از جمعیت‌ها در ارتباط با جهش آنمی داسی شکل و جهش‌های متفاوت بتا تالاسمی ایترمیدیا می‌باشد و با HbF افزایش یافته در ارتباط است (۱۹، ۲۰). در مطالعه کریستینا و همکاران بر روی تالاسمی ایترمیدیا، بین HindIII(A) و وضعیت کلینیکی خفیف بیماری ارتباط مشاهده شد (۹).

گیلمن و هویسمن در مطالعه خود نشان دادند که تولید بالای زنجیره $G\gamma$ با حضور آلل HindIII(A) در ارتباط می‌باشد (۷). در مطالعه هارانو و همکاران، همه کروموزوم‌هایی که دارای HindIII(A) بودند، با سطح افزایش یافته زنجیره $G\gamma$ همراه بودند (۲۱). در مطالعه گالانلو و همکاران نتایج مشابهی گزارش شد (۲۲). در طی مطالعه‌ای که توسط عرب و همکاران در تهران بر روی بررسی مولکولی تالاسمی ایترمیدیا صورت گرفت، در شایع‌ترین هاپلوتیپی که با بیماری تالاسمی ایترمیدیا و سطح بالایی از HbF ارتباط داشت، پلی مورفیک HindIII در این هاپلوتیپ به صورت هموزیگوت AA

References :

- Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. Orphanet J Rare Dis 2010; 5: 11.
- Rahim F, Abromand M. Spectrum of β -Thalassemia mutations in various Ethnic Regions of Iran. Pakistan Journal of Medical Sciences 2008; 24(3): 410-5.
- Weatherall D, Clegg J. Thalassemia--a global public health problem. Nat Med 1996; 2(8): 847-9.
- Taher A, Isma'eel H, Cappellini MD. Thalassemia intermedia: revisited. Blood Cells Mol Dis 2006; 37(1): 12-20.
- Randolph TR. Pathophysiology of compound heterozygotes involving hemoglobinopathies and thalassemias. Clin Lab Sci 2008; 21(4): 240-8.
- Gilman JG, Huisman TH. DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production. Blood 1985; 66(4): 783-7.
- Papachatzopoulou A, Kourakli A, Makropoulou P, Kakagianne T, Sgourou A, Papadakis M, et al. Genotypic heterogeneity and correlation to intergenic haplotype within high HbF beta-thalassemia intermedia. Eur J Haematol 2006; 76(4): 322-30.
- Rosatelli MC, Oggiano L, Leoni GB, Tuveri T, Di Tucci A, Scalas MT, et al. Thalassemia intermedia resulting from a mild beta-thalassemia mutation. Blood 1989; 73(2): 601-5.
- Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. Hum Mol Genet 2009; 18(R2): R216-23.
- Bank A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. Blood 2006; 107(2): 435-43.

- 11- Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 2008; 112(10): 3927-38.
- 12- Palstra RJ, Tolhuis B, Splinter E, Nijmeijer R, Grosveld F, de Laat W. The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nat Genet* 2003; 35(2): 190-4.
- 13- Liu LR, Du ZW, Zhao HL, Liu XL, Huang XD, Shen J, *et al.* T to C substitution at -175 or -173 of the gamma-globin promoter affects GATA-1 and Oct-1 binding *in vitro* differently but can independently reproduce the hereditary persistence of fetal hemoglobin phenotype in transgenic mice. *J Biol Chem* 2005; 280(9): 7452-9.
- 14- Arab A, Karimipoor M, Rajabi A, Hamid M, Arjmandi S, Zeinali S. Molecular characterization of β -thalassemia intermedia: a report from Iran. *Mol Biol Rep* 2011; 38(7): 4321-6.
- 15- 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.
- 16- Lee YJ, Park SS, Kim JY, Cho HI. RFLP haplotypes of beta-globin gene complex of beta-thalassemic chromosomes in Koreans. *J Korean Med Sci* 2002; 17(4): 475-8.
- 17- Motovali-Bashi M, Ghasemi T. Role of XmnI/G Polymorphism in Hydroxyurea Treatment and Fetal Hemoglobin Level at Isfahanian Intermediate β -Thalassemia Patients. *Iran Biomed J* 2015; 19(3): 177-82.
- 18- Thein S, Wainscoat J, Sampietro M, Old J, Cappellini D, Fiorelli G, *et al.* Association of thalassaemia intermedia with a beta-globin gene haplotype. *Br J Haematol* 1987; 65(3): 367-73.
- 19- Labie D, Pagnier J, Lapoumeroulie C, Rouabhi F, Dunda-Belkhodja O, Chardin P, *et al.* Common haplotype dependency of high G gamma-globin gene expression and high Hb F levels in beta-thalassemia and sickle cell anemia patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(7): 2111-4.
- 20- Miller BA, Salameh M, Ahmed M, Wainscoat J, Antognetti G, Orkin S, *et al.* High fetal hemoglobin production in sickle cell anemia in the eastern province of Saudi Arabia is genetically determined. *Blood* 1986; 67(5): 1404-10.
- 21- Harano T, Reese A, Ryan R, Abraham B, Huisman T. Five haplotypes in Black beta-thalassaemia heterozygotes: three are associated with high and two with low G γ values in fetal haemoglobin. *Br J haematol* 1985; 59(2): 333-42.
- 22- Galanello R, Dessi E, Melis M, Addis M, Sanna M, Rosatelli C, *et al.* Molecular analysis of beta zero-thalassemia intermedia in Sardinia. *Blood* 1989; 74(2): 823-7.

Original Article

Genetic diversity of HindIII G polymorphism in second intron IVSII-I $G\gamma$ gene and its association with HbF level in β -thalassemia and intermedia thalassemia in Isfahan province

Motovali-Bashi M.¹, Sajadpour Z.¹, Ghasemi T.¹

¹Biology Department, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Abstract

Background and Objectives

Beta thalassemia is an autosomal recessive disease. The synthesis of HbF in patients with β -thalassemia seems to ameliorate the severity of symptoms.

Materials and Methods

In this case control study, 150 β -thalassemia major patients, 34 thalassemia intermedia patients, and 50 healthy individuals as the control were studied. HindIII G polymorphism in IVSII-I $G\gamma$ gene was determined using RFLP-PCR method. HbF levels with electrophoresis method were taken from clinical files. Then, the linkage disequilibrium of this polymorphism with XmnI polymorphism in 5' $G\gamma$ gene was determined by D' Power Marker software.

Results

After data analysis, an association was observed between the A allele and thalassemia intermedia. In the dominant effect of the A allele (comparison between AA+AC vs. CC), AA+AC genotypes associates with intermedia thalassemia ($p = 0.014$, OR = 9.30, CI(95%) = 1.14-75.9) but there is no association with major thalassemia ($p = 0.1$, OR = 1, CI(95%) = 0.41-1.19). The means of HbF levels in β -thalassemia major and thalassemia intermedia patients were 94.3 g/dl and 84.4 g/dl, respectively. High linkage disequilibrium was seen between the two polymorphisms.

Conclusions

It is concluded that A allele may act as a dominant allele and increase disease amelioration. It showed that A allele of HindIII G polymorphism has a positive effect on HbF level. Furthermore, the A allele of HindIII G polymorphism is strongly correlated with T allele of XmnI polymorphism in thalassemia intermedia patients and C allele of HindIII G polymorphism is strongly correlated with C allele of XmnI polymorphism in β -thalassemia major.

Key words: beta-Thalassemia, Genetic Polymorphism, HbF, Thalassemia Intermedia

Received: 1 Feb 2015

Accepted: 20 Dec 2015

Correspondence: Motovali-Bashi M., PhD of Genetics. Associate Professor of Biology Department, Faculty of Sciences, University of Isfahan.
P.O.Box: 81746-73441, Isfahan, Iran. Tel: (+9831) 37932474; Fax: (+9831) 37932456
E-mail: mbashi@sci.ui.ac.ir