

# خون

فصلنامه علمی پژوهشی  
دوره ۱۳ شماره ۲ تابستان ۹۵ (۱۴۲-۱۴۳)

مقاله پژوهشی

## تنوع ژنتیکی پلیمورفیسم *HindIIIIG* در اینترون دوم IVSII-I ژن *Gy* و ارتباط آن با میزان *HbF* در بیماران بتا تالاسمی مژوز و ایترمیدیا در استان اصفهان

مجید متولی باشی<sup>۱</sup>، زهرا سجادپور<sup>۱</sup>، طبیه قاسمی<sup>۱</sup>

### چکیده ساقه و هدف

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

### مواد و روش‌ها

در یک مطالعه مورد - شاهدی، تعداد ۱۵۰ بیمار بتا تالاسمی مژوز، ۳۴ بیمار بتا تالاسمی ایترمیدیا و ۵۰ فرد سالم مورد مطالعه قرار گرفتند. پلیمورفیسم *HindIIIIG* 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 پلیمورفیسم، با پلیمورفیسم *XmnI* در ناحیه<sup>۱</sup> ژن *Gy* با اندازه‌گیری مقدار<sup>۲</sup> D توسط نرم‌افزار Power Marker بررسی شد.

### پافته‌ها

آنالیز داده‌ها نشان داد که بین آلل A و بیماری تالاسمی ایترمیدیا، ارتباط وجود دارد به طوری که اگر آلل A غالب در نظر گرفته شود، ژنتیپ‌های AA+AC با تالاسمی ایترمیدیا ارتباط دارند ( $p=0.014$ ) اما ارتباطی با تالاسمی مژوز مشاهده نشد. میانگین *HbF* در بیماران بتا تالاسمی مژوز و ایترمیدیا به ترتیب برابر  $94/3$  g/dL و  $84/4$  g/dL بود. پیوستگی نامتعادل بالایی بین دو پلیمورفیسم *XmnI* و *HindIIIIG* دیده شد.

### نتیجه‌گیری

حضور آلل A پلیمورفیسم *HindIIIIG* به عنوان یک آلل غالب، اثر مثبتی بر میزان *HbF* و کاهش شدت علایم بالینی بیماران بتا تالاسمی ایترمیدیا دارد. پیوستگی بالای آلل A پلیمورفیسم *HindIIIIG* با آلل T پلیمورفیسم *XmnI* در بیماران تالاسمی ایترمیدیا و آلل C پلیمورفیسم *HindIIIIG* با آلل C پلیمورفیسم *XmnI* در بیماران تالاسمی مژوز مشاهده شد.

**کلمات کلیدی:** تالاسمی بتا، پلیمورفیسم ژنتیک، HBF، تالاسمی ایترمیدیا

تاریخ دریافت: ۱۲/۱۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۲۹/۹/۹۶

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

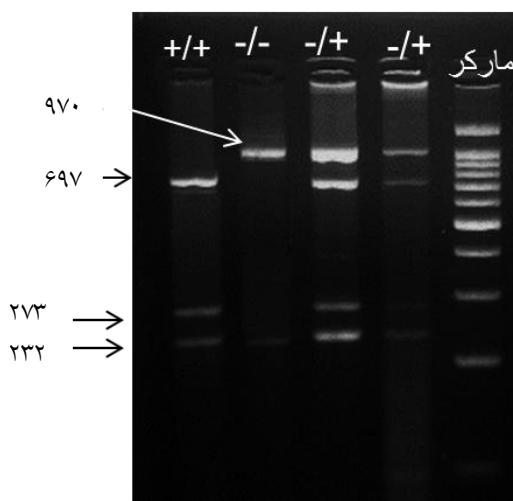
(۷). اما علت خاص یا مکانیسم مولکولی مشخصی برای این ارتباطات شناخته نشده است. پلی مورفیسم HindIII G بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۱ (Chr.11p15.4) و در داخل خوشه ژنی بتاگلوبین، در ایترون دوم ژن  $G\gamma$  واقع شده است. در طی مطالعه های متعددی که بر روی پلی مورفیسم XmnI صورت گرفته، مشخص گردید که این پلی مورفیسم منجر به افزایش بیان ژن  $G\gamma$  و تغییر در میزان HbF می گردد و سبب بروز فنوتیپ معتدل تری در افراد مبتلا به سیکل سل و بتا تالاسمی می شود<sup>(۹)</sup>. مطالعه های مختلف نشان داده است که احتمالاً این جایه جایی نوکلئوتیدی در پلی مورفیسم XmnI، سبب کاهش اتصال فاکتورهای مهار کننده بر روی پرموتر ژن  $G\gamma$  شده است. بنابراین قرار گیری کمپلکس ACH (Active Chromatin Hub) در بالادست ژن بتا گلوبین و انجام پدیده کلید کردن مختلط می شود<sup>(۱۰-۱۲)</sup>. در این حالت LCR در بالادست ژن  $G\gamma$  قرار گرفته و همین امر موجب فعال شدن مجدد ژن  $G\gamma$  می گردد<sup>(۱۳)</sup>. در کشور ایران طبق مطالعه ای که در سال ۲۰۱۱ توسط عرب و همکاران در جمعیت تهران صورت گرفت، پلی مورفیسم HindIII G در هاپلوتیپ گزارش شده به صورت هموزیگوس (A/A) با بیماری تالاسمی ایترمیدیا، HbF بالا و پلی مورفیسم XmnI ارتباط نشان داد<sup>(۱۴)</sup>. در مطالعه حاضر ارتباط پلی مورفیسم HindIII G در ایترون دوم ژن  $G\gamma$  با بیماری تالاسمی ایترمیدیا، مقدار HbF و پیوستگی این مارکر با پلی مورفیسم XmnI در  $5' \text{ ژن } G\gamma$  در جمعیت اصفهان مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش ها

مطالعه حاضر از نوع مورد - شاهدی و وابسته به گذشته بود. جامعه مورد مطالعه، بیماران بتا تالاسمی ایترمیدیا و بتا تالاسمی مازور مراجعه کننده به بیمارستان سیدالشهدا اصفهان بودند. در این مطالعه ۳۴ بیمار بتا تالاسمی ایترمیدیا، ۱۵۰ بیمار بتا تالاسمی مازور و ۵۰ فرد سالم به عنوان کنترل بررسی شدند. نمونه خون افراد کنترل از افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه امید اصفهان جمع آوری شد. این افراد بیماری های خونی مانند سرطان خون و

تالاسمی، نوعی کم خونی ارشی و ژنتیکی است<sup>(۱، ۲)</sup>. عدم توازن در تولید زنجیره های آلفاگلوبین و بتاگلوبین در بیماران تالاسمی، منجر به تجمع زنجیره های آزاد گلوبین در پیش سازه ای سلول خونی می شود. بر اساس فنوتیپ، سه گروه از بیماران مبتلا دیده می شوند: ۱- تالاسمی مازور ۲- تالاسمی مینور ۳- تالاسمی ایترمیدیا. تالاسمی مازور فرم شدید بیماری است که بیماران نیاز به تزریق خون مداوم برای زنده ماندن دارند، با این حال بعضی از بیماران بتا تالاسمی مازور، نیاز به تزریق خون ندارند که به عنوان تالاسمی ایترمیدیا شناخته می شوند<sup>(۳)</sup>. بیماران تالاسمی ایترمیدیا از نظر علائم فنوتیپی، گروه حد وسط بوده و بسته به عوامل مختلف، بیماری در آنها به گونه ای تعديل شده است<sup>(۱)</sup>. با توجه به مشابه بودن نوع جهش های بتا تالاسمی در افراد مبتلا به تالاسمی ایترمیدیا و مازور، می توان گفت به جز ژنوتیپ ژن بتا گلوبین، عوامل دیگری نیز در تعیین فنوتیپ فرد بیمار و شدت یا تعديل عالیم بیماری اثرگذار است. بروز فنوتیپی و علائم بالینی در افراد ایترمیدیا بسیار متنوع و گسترده می باشد که خود گویای پیچیدگی مکانیسم های ژنتیکی دخیل در این امر است. به طور کلی هر عاملی که بتواند به گونه ای عدم تعادل ایجاد شده بین مقدار زنجیره های آلفا و بتا را در گلبول های قرمز جبران کند، می تواند موجب تعديل شدت بیماری بتا تالاسمی شود. بر این اساس عوامل مؤثر در تعديل شدت بیماری عبارتند از: ۱. وجود آلل های خفیف بتاتالاسمی<sup>(۲)</sup>. به ارت رسیدن ژن های غیر طبیعی آلفا، یا گاما و یا پلی مورفیسم های خوشه ژنی بتا گلوبین<sup>(۳)</sup>. عواملی که سبب افزایش و فعال شدن مجدد هموگلوبین جنینی می شوند. در ۶۰٪ تا ۹۰٪ موارد، بیماران تالاسمی ایترمیدیا دارای دو آلل بتا تالاسمی هستند<sup>(۴)</sup>، دو نوع زنجیره گاما HbF و  $G\gamma$  در خوشه ژنی بتا گلوبین وجود دارد که در موقعیت ۳۶ (گلایسین به جای آلانین) با یکدیگر متفاوت هستند<sup>(۶)</sup>. در سطح جهانی، مطالعه های متنوع و جامعی در مورد بیماری تالاسمی ایترمیدیا صورت گرفته است. در این مطالعه ها نشان داده شده که حضور آلل A پلی مورفیسم HindIII G با وضعیت کلینیکی خفیف بیماری همراه است

تالاسمی ایترمیدیا و میزان HbF، به کمک آزمون کای دو محاسبه گردید، سطح معنادار کوچکتر از  $0.05 \pm 0.05$  (p) از لحاظ آماری قابل قبول فرض شد. سپس پیوستگی دو مارکر توسط نرم افزار Power Marker انجام شد.



شکل ۱: هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم HindIII برای مارکر HindIIIγ. الکتروفورز محصول هضم مارکر HindIIIγ بر روی ژل آکارز 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 هموژیگوت CC دو باند ۹۷۰ و ۲۳۲ جفت بازی افراد هموژیگوت AA سه باند ۲۷۳، ۶۹۷ و ۲۳۲ و جفت بازی افراد هتروژیگوت AC باندهای ۲۷۳، ۶۹۷ و ۹۷۰ جفت بازی را نشان می‌دهند.

#### یافته‌ها

در این مطالعه با بررسی ۳۴ بیمار بتا تالاسمی ایترمیدیا، ۱۵۰ بیمار بتا تالاسمی مازور و ۵۰ فرد سالم که به بیمارستان سیدالشهداي اصفهان مراجعه کرده بودند، با استفاده از روش RFLP-PCR، درصد فراوانی آلی و ژنتیکی پلیمورفیسم HindIII در بیماران بتا تالاسمی مازور و ایترمیدیا مشخص شد (جدول ۱ و ۲). فراوانی آل A در تالاسمی ایترمیدیا  $0.89 \pm 0.07$ ٪ و در افراد سالم  $0.39 \pm 0.01$ ٪ مشاهده شد که این اختلاف از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد ( $p = 0.001$ ) (جدول ۳).

تالاسمی نداشتند و از لحاظ جنس، دخانیات و سن سعی شد با افراد بیمار همسان‌سازی صورت گیرد. بیماران بتا تالاسمی مازور ماهیانه خون دریافت می‌کردند اما بیماران بتا تالاسمی ایترمیدیا خون دریافت نمی‌کردند یا به صورت هر سه ماه یک بار خون می‌گرفتند. هموگلوبین بیماران بتا تالاسمی ایترمیدیا بین  $8-10 \text{ g/dL}$  بود که توسط پرشک متخصص خون تأیید شده بود. با کسب رضایت از بیماران، مقدار  $5 \text{ mL}$  خون جمع‌آوری و در لوله‌های حاوی EDTA، Hb، HbF، MCV و RBC از پرونده‌های بیماران شامل  $G\gamma$  در محل پلیمورفیک HindIII در ایتررون دوم ژن  $\gamma$  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 پلیمورفیک 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  $25 \text{ }\mu\text{l}$  انجام شد. پس از انجام PCR، برای تعیین حضور یا عدم حضور جایگاه HindIII در پلیمورفیسم، قطعه تکثیر یافته واجد مارکر HindIII تحت هضم آنزیمی توسط آنزیم  $\gamma$ -HindIII قرار گرفت. هضم آنزیمی PCR بر اساس دستورالعمل آنزیم انجام گرفت. ویال حاوی مخلوط واکنش هضم آنزیمی به مدت ۱۶ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا هضم آنزیمی کامل گردد. سپس ژنوتیپ محصولات هضم شده با انجام الکتروفورز بر روی ژل آکارز دو درصد در ولتاژ ۷۰ ولت به مدت نیم ساعت تشخیص داده شد. در افراد هموژیگوت 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 هموژیگوت A/A، سه قطعه ۲۳۲، ۶۹۷ و ۲۷۳، جفت بازی ایجاد و در افراد هتروژیگوت قطعات ۲۷۳، ۶۹۷، ۲۳۲ و ۹۷۰ جفت بازی پس از انجام RFLP بر روی ژل آکارز ایجاد می‌شود (شکل ۱). تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SISA انجام شد. در ابتدا فراوانی آلی و ژنتیکی نمونه‌ها مشخص و سپس ارتباط آن با بیماری بتا

جدول ۱: توزیع فراوانی پلیمورفیسم HindIIIIG در بیماران بتا تالاسمی ایترمیدیا و افراد کنترل در استان اصفهان

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

جدول ۲: توزیع فراوانی پلیمورفیسم HindIIIIG در بیماران بتا تالاسمی ماژور و افراد کنترل در استان اصفهان

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

جدول ۳: توزیع فراوانی پلیمورفیسم HindIIIIG در بیماران بتا تالاسمی ایترمیدیا و تالاسمی ماژور به عنوان گروه کنترل در جمعیت اصفهان

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

الکتروفوروز) و میانگین HbF بر حسب پلیمورفیسم HindIIIIG 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 ایترمیدیا در حالتی است که مکان پلیمورفیک HindIIIIG به صورت هموزیگوت AA وجود داشته باشد.

با بررسی پلیمورفیسم HindIIIIG در مطالعه حاضر، پیوستگی این پلیمورفیسم با پلیمورفیسم XmnI مورد بررسی قرار گرفت. پیوستگی نامتعادل بالایی بین دو مارکر ذکر شده در تالاسمی ایترمیدیا مشاهده شد ( $D=1$ ). در بیماران بتا تالاسمی ایترمیدیا، ۷۷٪ افراد دارای آلل A

هم چنین افرادی که دارای حداقل یک آلل A می‌باشند افزایش چشمگیری در کاهش علائم بالینی نسبت به افراد دارای آلل C دارند ( $D=1/۱۴-۷۵/۹$ )،  $OR=9/30$ ،  $CI(٪۹۵)=0/۰۱۴$  (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 پلیمورفیسم HindIIIIG در بیماران بتا تالاسمی ایترمیدیا و تالاسمی ماژور به عنوان گروه کنترل، ارتباط معنادار این آلل با بیماری تالاسمی ایترمیدیا تایید گردید.

میزان HbF با استخراج از پرونده بیماران (به روش

توصیفی، میانگین درصد HbF در بیماران بتا تالاسمی مژور و ایترمیدیا در حضور آلل A پلیمورفیسم HindIIIG افزایش نشان داد. در بررسی پیوستگی بین پلیمورفیسم های HindIIIG و XmniI، پیوستگی نامتعادل بالایی بین دو مارکر HindIIIG و XmniI مشاهده شد. وجود پلیمورفیسم XmniI در ۳۴ بیمار تالاسمی ایترمیدیا مورد بررسی در این مطالعه، از پیش طی مطالعه متولی باشی و قاسمی تعیین شده بود(۱۷). بین آلل A پلیمورفیسم HindIIIG و آلل T پلیمورفیسم XmniI در بیماران بتا تالاسمی ایترمیدیا، پیوستگی بالایی مشاهده شد، علاوه بر این بین آلل های C این دو پلیمورفیسم در بیماران تالاسمی مژور پیوستگی بالایی مشاهده شد. نتایج مطالعه حاضر با نتایج همه مطالعه های صورت گرفته هم خوانی دارد. البته به دلیل مراجعه پایین بیماران تالاسمی ایترمیدیا 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 ایترمیدیا وجود دارد.

در مطالعه های اندکی که تاکنون بر روی تالاسمی ایترمیدیا انجام شده، نتایج مختلفی در رابطه با پلیمورفیسم HindIIIG حاصل شده است به صورتی که بین حضور آلل A این پلیمورفیسم و میزان HbF و تالاسمی ایترمیدیا ارتباط مشاهده شده است. در مطالعه تین و همکاران بر روی جمعیت بیماران تالاسمی ایترمیدیا و مژور آسیایی، آلل A پلیمورفیسم HindIIIG در ۵۰٪ کروموزوم های بیماران تالاسمی ایترمیدیا و تنها در ۱۱٪ بیماران تالاسمی مژور گزارش شد و ۶ نفر از ۱۴ بیمار تالاسمی ایترمیدیا برای این آلل به صورت هموزیگوت بودند در حالی که تنها یک بیمار از ۴۲ بیمار تالاسمی مژور 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  $9.8 \text{ g/dL}$ ,  $9.2 \text{ g/dL}$  و  $6.8 \text{ g/dL}$  گزارش شد. در مطالعه تین و همکاران بر روی جمعیت بیماران بتا تالاسمی مژور و ایترمیدیا ایتالیایی، ۱۲ بیمار از ۴۵ بیمار

پلیمورفیسم HindIIIG، هم چنین واجد پلیمورفیسم XmniI(T) بودند. در بیماران بتا تالاسمی مژور، ۲۷٪ افراد دارای آلل A پلیمورفیسم HindIIIG هم چنین واجد پلیمورفیسم XmniI(T) بودند. در بیماران بتا تالاسمی مژور، ۵۸٪ افراد دارای آلل C پلیمورفیسم HindIIIG و فاقد پلیمورفیسم XmniI(T) بودند و در بیماران تالاسمی ایترمیدیا، ۸٪ افراد دارای آلل C پلیمورفیسم HindIIIG و فاقد پلیمورفیسم XmniI(T) بودند.

جدول ۴: میانگین درصد HbF بر حسب پلیمورفیسم HindIIIG در بیماران بتا تالاسمی مژور و ایترمیدیا در اصفهان (± نشان دهنده انحراف معیار است)

پلیمورفیسم HindIIIG	میانگین درصد HbF	ایترمیدیا	ماژور
A/A	$96.2 \pm 2$	$89.1 \pm 10$	
A/C	$93.3 \pm 14$	$86 \pm 10$	
C/C	$93.1 \pm 9$	$78 \pm 11$	

## بحث

در مطالعه حاضر به بررسی پلیمورفیسم HindIIIG در ایترون دوم زن  $G\gamma$  در خوشة زنی بتا گلووین و ارتباط آن با میزان HbF و پیوستگی آن با پلیمورفیسم XmniI در ناحیه  $G\gamma$  در بیماران بتا تالاسمی مژور و ایترمیدیا در اصفهان پرداخته شد. پس از بررسی بر روی ۱۵۰ بیمار بتا تالاسمی مژور، ۳۴ بیمار بتا تالاسمی ایترمیدیا و ۵۰ فرد سالم، مشخص شد که ارتباط معناداری بین حضور آلل A پلیمورفیسم HindIIIG و بیماری تالاسمی ایترمیدیا وجود دارد( $p=0.001$ ). همان طور که در جداول ۱-۳ مشاهده می شود، فراوانی آلل A در تالاسمی ایترمیدیا  $89.70\%$  و در تالاسمی مژور  $43.99\%$  مشاهده شد، این اختلاف از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد. نتایج، گویای ارتباط چشمگیر آلل A پلیمورفیسم HindIIIG با بهبود علائم کلینیکی در تالاسمی ایترمیدیا نسبت به تالاسمی مژور بود. در بررسی ارتباط حضور آلل A این پلیمورفیسم و میانگین HbF ارتباط معناداری مشاهده نشد، ولی از نظر

گزارش شد (۱۴).

### نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر حضور یا عدم حضور محل پلی‌مورفیک HindIIIIG در بیماران بتا تالاسمی مژوزر 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 پلی‌مورفیسم HindIIIIG در ایتررون دوم ژن Gγ در خوشة ژنی بتا گلووبین، با افزایش سطح HbF در بیماران بتا تالاسمی مژوزر و ایترمیدیا در اصفهان به علت ناشناخته‌ای در ارتباط است. یکی از علت‌های این امر می‌تواند Gγ پیوستگی اش با پلی‌مورفیسم XmniI در پروموتور ژن Gγ باشد. به هر صورت، در افراد با حضور آلل A پلی‌مورفیسم HindIIIIG، زمان نیاز به تزریق خون به تأخیر افتاده و از شدت علائم بالینی در این بیماران کاسته می‌شود.

### تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان 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 بالاخص آقای دکتر حمید هورفر به خاطر در اختیار قرار دادن نمونه خون بیماران و اطلاعات پزشکی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

### References :

- 1- Galanello R, Origlia R. Beta-thalassemia. Orphanet J Rare Dis 2010; 5: 11.
- 2- 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.
- 3- Weatherall D, Clegg J. Thalassemia—a global public health problem. Nat Med 1996; 2(8): 847-9.
- 4- Taher A, Isma'el H, Cappellini MD. Thalassemia intermedia: revisited. Blood Cells Mol Dis 2006; 37(1): 12-20.
- 5- Randolph TR. Pathophysiology of compound heterozygotes involving hemoglobinopathies and thalassemias. Clin Lab Sci 2008; 21(4): 240-8.
- 6- Gilman JG, Huisman TH. DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production. Blood 1985; 66(4): 783-7.
- 7- Papachatzopoulou A, Kourakli A, Makropoulou P, Kakagianni 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.
- 8- 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.
- 9- 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.
- 10- 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  $\beta$ -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- Motovalli-Bashi M, Ghasemi T. Role of XmnI IgG Polymorphism in Hydroxyurea Treatment and Fetal Hemoglobin Level at Isfahanian Intermediate  $\beta$ -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-thalassaeia heterozygotes: three are associated with high and two with low  $G\gamma$  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 HindIIIG polymorphism in second intron IVSII-I $G\gamma$ gene and its association with HbF level in $\beta$ -thalassemia and intermedia thalassemia in Isfahan province

Motovali-Bashi M.<sup>1</sup>, Sajadpour Z.<sup>1</sup>, Ghasemi T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biology 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  $\beta$ -thalassemia seems to ameliorate the severity of symptoms.

#### Materials and Methods

In this case control study, 150  $\beta$ -thalassemia major patients, 34 thalassemia intermedia patients, and 50 healthy individuals as the control were studied. HindIIIG 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  $\beta$ -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 HindIIIG polymorphism has a positive effect on HbF level. Furthermore, the A allele of HindIIIG polymorphism is strongly correlated with T allele of XmnI polymorphism in thalassemia intermedia patients and C allele of HindIIIG polymorphism is strongly correlated with C allele of XmnI polymorphism in  $\beta$ -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