تعیین جهش‌های شایع ژن بتا گلوبین در بیماران تالاسمی ماژور استان لرستان

علی اصغر کیانی M.Sc.[1*]، یوسف مرتضوی Ph.D.[2]، سیروس زینلی Ph.D.[3]، یعقوب شیرخانی Ph.D.[1]، بهرام دلفان Ph.D.[4]، معصومه کاشی M.Sc.[5]

۱. دانشگاه علوم پزشکی لرستان، گروه هماتولوژی
۲. دانشگاه تربیت مدرس، گروه هماتولوژی
۳. انیستیتو پاستور ایران، گروه بیوتکنولوژی
۴. دانشگاه علوم پزشکی لرستان، گروه فارماکولوژی
۵. دانشگاه علوم پزشکی لرستان، آموزشکده پیراپزشکی

* آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، صندوق‌پستی: ۴۴۱، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه هماتولوژی
پست الکترونیک: Email: aliasghr.kiani@gmail.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۱۰/۲۵، پذیرش مقاله: ۸۵/۵/۱۸

هدف: تعیین شیوع جهش‌های ژن بتاگلوبین در بیماران تالاسمی ماژور استان لرستان و استفاده از این نتایج در مطالعات اپیدمیولوژیک و کمک به تشخیص قبل از تولد بتا تالاسمی ماژور

مواد و روش‌ها: توسط روش ARMS PCR، ۱۳۰ کروموزوم به دست آمده از ۶۵ بیمار بتا تالاسمی ماژور غیر خویشاوند ساکن در استان لرستان مورد بررسی و شایع‌ترین جهش‌های منطقه مدیترانه‌ای (بیش از ۳۰ نوع جهش) مورد جستجو قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد جهش codons 36/37 (-T) با شیوع ۳۳/۸۴درصد، شایع‌ترین جهش منطقه است و به دنبال آن چهار جهش IVS-II-1 (G-->A)، IVS-I-110 (G-->A) (+G) frameshift codons (Fr) 8/9 و IVS-I-5 (G-->C به ترتیب با شیوع ۲۷/۶۴، ۱۱/۵۳، ۱۰/۷۶ و ۴/۴۷ درصد در رتبه‌های بعدی قرار دارد.
آلل‌های IVS-II-745 (C-->G)، Codon 5 (-CT0)، IVS-I (25bp deletion) و Frameshift CD44 (-C) دارای کمترین میزان شیوع در میان جهش‌های مورد مطالعه بودند و در مجموع فقط ۳/۸۷ درصد از کل جهش‌های کشف شده را شامل می‌شدند. ۷/۶۳ درصد از جهش‌ها را نیز، جهش‌های ناشناخته تشکیل دادند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه یافته‌های متفاوتی نسبت به نتایج به دست آمده توسط سایر محققان در ایران و حتی جهان به دست آمد.

کلیدواژگان: بتا تالاسمی، جهش، ایران، لرستان

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۲، تابستان ۸۵، صفحات ۹۱-۸۸

مقدمه

تالاسمی از شایع‌ترین بیماری‌های تک‌ژنی اتوزومال مغلوب در ایران و جهان است (۱). این بیماری در بیش از ۶۰ کشور جهان (به طور عمده کشورهای خاورمیانه و حوزه مدیترانه) شیوع دارد و بیش از ۱۵۰ میلیون نفر در جهان به این بیماری مبتلا هستند (۲). تالاسمی بیشتر در استان‌های شمالی و جنوبی کشور شیوع دارد و برآورد شده است در حدود ۳ درصد جمعیت ایران حامل ژن این بیماری باشند (۳). بر اساس آمارهای موجود بین ۱۵ هزار (بنیاد بیماری‌های خاص) تا ۲۰ هزار (انجمن تالاسمی) بیمار مبتلا به بتا- تالاسمی ماژور در ایران زندگی می‌کنند (تماس‌های خاص).

در برخی مناطق کشور (به خصوص در شمال و جنوب) حدود ۱۰ درصد افراد ناقل تالاسمی هستند (۴). مطالعات نشان می‌دهد که بسیاری از جهش‌های مسئول ایجاد تالاسمی در ایران را جهش‌های مدیترانه‌ای تشکیل می‌دهند (۲).

مطالعات محدودی در رابطه با تعیین نوع جهش‌های مناطق مختلف ایران انجام شده است (۱، ۲، ۵، ۶، ۷).

این مطالعه نیز تلاشی در جهت تسهیل در تشخیص قبل از تولد بیماران تالاسمی است. تحقیق حاضر همچنین دارای ارزش اپیدمیولوژیک و آماری بسیار مفیدی است که می‌توان با مقایسه جهش‌های شایع منطقه با جهش‌های شایع سایر مناطق کشور و جهان، اختلاف جهش‌های شایع منطقه لرستان را با سایر مناطق کشور و جهان مشخص کرد که این امر در مطالعات وسیع و کلان اپیدمیولوژیک کشوری و جهانی بسیار مؤثر خواهد بود.

استان لرستان در غرب کشور واقع شده و دارای شرایط جغرافیایی کوهستانی با آب و هوای معتدل کوهستانی است و با توجه به اینکه لرستان نیز از تنوع اقوام لر برخوردار است در این تحقیق سعی بر آن شد

که از اقوام مختلف ساکن در لرستان که همگی لر بودند نمونه‌گیری صورت گیرد و نتایج با دیگر مطالعات مقایسه شود.

مواد و روش‌ها

پرونده بیماران تالاسمی ماژور آزمایشگاه بیمارستان شهید مدنی خرم‌آباد مورد مطالعه قرار گرفت و بیمارانی که واجد شرایط نمونه گیری بودند انتخاب شدند و پس از کسب رضایت از بیماران و والدینشان و اخذ رضایت‌نامه از ایشان، نمونه‌گیری به عمل آمد. شرط اصلی نمونه‌گیری، غیرخویشاوند بودن بیماران بود. ۷ تا ۱۰ میلی‌لیتر خون به همراه ماده ضد انعقاد (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid: EDTA) از هر بیمار دریافت می‌شد. نمونه‌ها بلافاصله منجمد و به آزمایشگاه جهت تخلیص DNA ارسال می‌شدند.

تخلیص DNA (DNA Extraction)

در تحقیق حاضر از روش پروتیناز K(۸) جهت تخلیص DNA استفاده شد. ابتدا ۵ میلی‌لیتر خون بیمار سانتریفیوژ و گلبول‌های رسوب با آب مقطر شستشو شدند. سپس به گلبول‌ها بافر Tris یک مولار (pH=۷/۵) و SDS ده درصد و پروتیناز K (۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه و پس از انکوباسیون، کلرید سدیم ۶ مولار اضافه و سانتریفیوژ می‌شد. به مایع رویی ایزوپروپانول صددرصد اضافه می‌شد. بعد از آن مجدد سانتریفیوژ و بعد اتانول ۷۰درصد اضافه می‌شد و پس از سانتریفیوژ، آب مقطر اضافه می‌شد. با استفاده از جذب نوری (OD=260, 280) از به دست آمدن مقدار مناسب DNA اطمینان حاصل می‌گردید.

تعیین جهش

در این پژوهش، از روش ARMS PCR (Polymerase Chain Reaction: PCR) (Amplification Refractory Mutation System: ARMS) جهت تعیین جهش‌ها استفاده شد. مبنای این روش تفاوت نوکلئوتید انتهای ۳′ پرایمر برای آلل‌های مختلف است. در این روش دو واکنش PCR با استفاده از یک DNA الگو انجام می‌شود که در هر واکنش پرایمر مشترک به همراه یکی از دو پرایمر اختصاصی آلل مورد استفاده قرار می‌گیرد. در واکنش اول، پرایمری استفاده می‌شود که تکثیر را از روی آلل اول انجام می‌دهد و در واکنش دوم پرایمر دوم استفاده می‌شود که آلل دوم را تکثیر کند. حالت اختصاصی این پرایمرها برای هر یک از آلل‌ها ناشی از نوکلئوتید انتهای ۳′ آنها است که با هم متفاوتند. لازم به ذکر است که دو پرایمر اختصاصی آلل‌ها به نحوی طراحی می‌شوند که انتهای ۳′ آنها فقط به ناحیه متفاوت بین دو آلل متصل شود. این پرایمرهای اختصاصی آلل به همراه یک پرایمر مشترک تنها در صورت حضور آلل اختصاصی آنها محصول مورد نظر را تکثیر می‌کنند.

با استفاده از روش ARMS PCR، شصت و پنج بیمار از نظر بود یا نبود جهش‌های شایع ایجادکننده بتا-تالاسمی مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی نمونه‌ها از نظر وجود ۳۰ جهش (جهش‌های یافت شده در ایران) مورد بررسی قرار گرفتند. فهرست تعدادی از مهمترین جهش‌های ایجاد کننده تالاسمی که عمدتا جهش‌های مدیترانه‌ای می‌باشند در اینجا ذکر می‌گردد:

codon 5 (-CT); frameshift codons (FSC) 8/9 (+G); codon 30 (G-->C); IVS-I-1 (G-->A); IVS-I-5 (G-->C); IVS-I-6 (T-->C); IVS-I-110 (G-->A); codons 36/37 (-T); codon 44 (-C); IVS-II-1 (G-->A); IVS-II-745 (C-->G); IVS-I (25 bp deletion); IVS-I-130 (G-->C) and codon 39 (C-->T)

پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش محصول شرکت Prime Italy کشور ایتالیا بوده و از شرکت فزا پژوه خریداری شدند. DNAهای تخلیص شده، به روش ARMS PCR (مطابق روش شرح داده شده در منبع شماره ۹) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر جهش، تکثیر شدند. سپس قطعات تکثیر یافته، الکتروفورز و رنگ‌آمیزی و در نهایت از نظر وجود جهش‌های مختلف ارزیابی شدند.

یافته‌ها

تعیین فراوانی بر اساس انواع جهش

نمونه‌های بیماران از نظر ۳۰ جهش ایجادکننده تالاسمی با روش آمار توصیفی مورد بررسی قرار گرفت که مجموعا ۹ نوع جهش شناسایی شد و پنج بیمار نیز به طور هموزایگوت و یا هتروزایگوت دارای جهش‌های ناشناخته بودند. جهش‌های کشف شده در نمونه‌های بیماران تالاسمی ماژور استان و درصد شیوع آنها (۶۵ بیمار و ۱۳۰ کروموزوم) به شرح زیر است:

جدول ۱: فهرست جهش‌های کشف شده در استان لرستان همراه با ترتیب شیوع آن‌ها

Allele	No. Chromosome (among of 130)	درصد
Codons 36/37 (-T)	۴۴	۳۳/۸۴ درصد
IVS-II-1, G->A	۳۶	۲۷/۶۹ درصد
IVS-I-110, G->A	۱۵	۱۱/۵۳ درصد
Fr 8/9, +G	۱۴	۱۰/۷۶ درصد
IVS-I-5, G->C	۶	۴/۶۷ درصد
IVS-II-745, G->C	۲	۱/۵۹ درصد
Codon 44, -C	۱	۰/۷۶ درصد
25 bp deletion	۱	۰/۷۶ درصد
Codon 5, -CT	۱	۰/۷۶ درصد
Unknown; others	۱۰	۷/۶۳ درصد

بحث

جهش‌های فراوان شناخته شده در تالاسمی بتا و تحقیقات صورت گرفته نشان‌دهنده وجود جهش‌های متفاوت در سطح کشورهای مختلف جهان است. همچنین وجود اقوام و تیره‌های متنوع در کشورها، این فرضیه که در اقوام مختلف، جهش‌های متفاوت وجود دارد

را قوت می‌بخشد. مطالعات انجام شده در کشور موید این مطلب است (۱، ۲، ۳، ۴).

در مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعات مشابهی که در سایر مناطق ایران و جهان حاصل شده است نتایج جالبی به دست آمد:

همان طور که ذکر شد بیشترین شیوع جهش در استان لرستان متعلق به جهش‌های C36-37 (۳۳/۸۴درصد) و IVSII-I (۲۷/۶۹درصد) است. جالب آن‌که جهش C36-37 شیوع بسیار کمی در سایر مناطق مطالعه شده ایران (به خصوص در استان‌های غرب و جنوب غرب کشور) و جهان دارد. این جهش با شیوع ۱۱ درصدی در فلسطین (۱۰) و با میزان بسیار کم (Rare) در ترکیه (۱۱) گزارش شده است.

G->A، IVS-II-1 شایع‌ترین جهش بتاتالاسمی در ایران است، اما شیوع آن در شمال کشور بیش از سایر مناطق است. درحالی که G->C، IVS-I-5 بیشترین موتاسیون جنوب و جنوب‌شرقی ایران را تشکیل می‌دهد. نکته جالب این‌که IVS-25 bp deletion شایع‌ترین موتاسیون استان بوشهر است و این استان از نظر شیوع این جهش، منحصر به فرد است. این در حالی است که جهش‌های شایع استان تهران G->A، IVS-II-1؛ استان فارس IVS-I-5 (G%C) (۳)، استان‌های سیستان و بلوچستان IVS-I-5 (G%C)، بوشهر 25 bp deletion، خوزستان G->A، IVS-I-1 (ارایه شده در کنگره بین‌المللی تالاسمی و هموگلوبینوپاتی Malat, ۱۹۹۷) و استان هرمزگان IVS-I-5 (۱۲) است.

جدول ۲: انواع جهش‌های کشف شده در استان‌های مختلف ایران (ارایه شده در کنگره بین‌المللی تالاسمی و هموگلوبینوپاتی، ۱۹۹۷، Malat)

Allele	خوزستان	بوشهر	سیستان و بلوچستان	تهران
Codon 5, -CT		۵		۹
Codons 8/9, -AA	۳۶	۱۸	۱۳	۶۸
Codon 30, G->C		۷		۱۰
IVS-I-1, G->C	۴۸	۱۸	۱۴	۴۸
IVS-I-5, G->C	۱۸	۱۶	۱۱۰	۵۳
IVS-I-6, T->C	۲۲	۳	۶	۱۳
IVS-I-110, G->A	۳۵	۱۲	۱۹	۵۰
Codon 39, C->T		۷		
Codon 44, -C				۱
IVS-II-1, G->A	۲۵	۲۸		۲۷۱
IVS-II-745, G-C		۷		۵
25 bp deletion		۴۹		
Unknown; others	۲۴	۳۴	۷	۱۱۰
جمع	۲۰۸	۲۰۴	۱۶۹	۶۳۸

به علاوه جهش‌های شایع کشورهای همسایه نیز نمایی متفاوت با جهش‌های شایع لرستان دارند. جهش‌های شایع ترکیه (۱۳۹ کروموزوم) HVS I-I (۱۳درصد)، IVSI-6 (۲۱/۶درصد)، IVSI-II0 (۳۵/۹درصد) گزارش شده است (۱۳). جهش‌های شایع پاکستان در شمال این کشور Fr 8-9 (۴۱/۳درصد) و در جنوب این کشور IVSI_5 (۵۲/۲درصد) گزارش شده است (۱۴).

جهش G->A، IVS-I-110 بیشتر در مناطق مدیترانه‌ای و به خصوص در جزیره قبرس (Cyprus) گزارش شده است (۱۸–۱۵، ۹). همچنین جهش‌های شایع کشورهای عربی G->A، IVS-I-110، G->A، IVS-II-1 (۱۹، ۲۰، ۲۱) و کشور هندوستان نیز G->C، IVS-I-5 (۲۲) گزارش شده‌اند. Codons 36/37 (-T) که شایع‌ترین جهش یافت شده در مطالعه ما می‌باشد در هیچ جای دنیا جهش شایع گزارش نشده و فقط مناطق معدودی چون فلسطین و ترکیه این جهش را (نه به عنوان جهش شایع) گزارش کرده‌اند (۱۰، ۱۱). با توجه به این گزارش‌ها مشخص می‌شود که جهش‌های شایع ژن بتاگلوبین در بیماران تالاسمی ماژور مناطق مختلف جهان و حتی استان‌های مختلف کشور متفاوت است.

نکته مورد توجه این که پنج موتاسیون Codons 36/37 (-T)، IVS-II-1, G->A، IVS-I-110, G->A، Frameshift Codons 8/9, -AA و IVS-I-5, G->C بالغ بر ۸۹/۷۶ درصد از کل جهش‌های مورد مطالعه و ۸۸/۴۶ درصد از کل کروموزوم‌های بررسی شده را شامل می‌شوند.

نتیجه‌گیری

به این ترتیب می‌توان با به کار بردن پرایمرهای اختصاصی این پنج جهش، ۸۸/۴۶ درصد از کروموزوم‌های جهش یافته منطقه لرستان را کشف کرد که این امر کمک بسیار شایانی در تشخیص قبل از تولد (Prenatal Diagnosis: PND) تالاسمی ماژور محسوب و موجب کاهش چشمگیر پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص قبل از تولد و در نتیجه کاهش قابل توجه زمان و هزینه آزمایشات می‌شود و زمینه انجام سریع و ارزان PND را فراهم می‌کند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از زحمات معاونت محترم آموزشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان، ریاست محترم سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی استان لرستان جناب آقای رستمی و معاونت پژوهشی آن سازمان جناب آقای جزایری به جهت تامین اعتبار مالی پروژه و همچنین جناب آقای دکتر گلشن ناظر فنی طرح، آقای محمد جواد طراحی (مشاور آماری)، پرسنل محترم آزمایشگاه ژنتیک، دکتر زینلی، و کلیه عزیزانی که ما را در انجام این طرح یاری کرده‌اند، قدردانی می‌کنیم.

References

1. Lee GR, Forester J, Lukens J, Paraskovas F, Greer JP, Rodgers GM. The Wintrobe's Clinic Hematology. Vol 1, 10th ed. Baltimore, Lippincott, Williams and Wilkins; 1999

2. Najmabadi H, Karimi-Nejad R, Sahebjam S, Pourfarzad F, Teimourian S, Sahebjam F, Amirizadeh N, Karimi-Nejad MH. The beta-thalassemia mutation

spectrum in the Iranian population, Hemoglobin 2001; 25(3): 285-296
3. Mahboudi F, Zeinali S, Merat A, Delmaghani S, Mostafavipour K, Moghaddam Z, Haghshenas M. The molecular basis of βthalassemia mutation in Fars province, Iran, Irn J Med Sci 1996; 21(3&4): 104
4. Samavat A, Modell B. Iranian national thalassaemia screening programme BMJ, Hemoglobin. 2002; 26(2): 147-154
5. Merat A, Haghshenas M, Pour Z. βthalassemia in southwestern Iran, Hemoglobin 1993; 17(5): 427-437
6. Noori-Daloii M, Moazami N, Farhangi S. β thalassemia in Iran: a high incidence of the nonsense codon 39 mutation on the island of Queshm, Hemoglobin 1994; 18(6): 449-453
7. Karimi M, Yarmohammadi H, Farjadian S, Zeinali S, Moghaddam Z, Cappellini MD, Giordano PC. Beta-thalassemia intermedia from southern Iran: IVS-II-1 (G-->A) is the prevalent thalassemia intermedia allele, Hemoglobin, 2002; 26(2): 147-154
8. Goossens M, Kan YW. DNA analysis in the diagnosis of hemoglobin disorders, Methods Enzymol 19981; 76: 805-817
9. Old J, Varawalla N, Weatherall D. Rapid detection and prenatal diagnosis of beta thalassaemia: studies in Indian and Cypriot populations in the U.K. Lancet 1990; 336: 834-837
10. El-Latif MA, Filon D, Rund D, Oppenheim A, Kanaan M. The beta+-IVS-I-6 (T-->C) mutation accounts for half of the thalassemia chromosomes in the Palestinian populations of the mountain regions, Hemoglobin. 2002; 26(1): 33-40
11. Tadmouri GO, Tuzmen S, Basak AN. Rare beta-thalassemia mutation in a Turkish patient, FSC-36/37 (-T). Hum Biol. 1997; 69(2): 263-267
12. 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
13. EO Atalay, B.Cirakoglu, G Dincolc, A Atalaty. Regional distribution of beta thalassemia mutation in Turkey, International journal of hematology, 1993; 57: 207-211
14. Khan SN, Riazuddin S. Molecular characterization of beta-thalassemia in Pakistan, Hemoglobin. 1998; 22(4): 333-345
15. Stefanis L, Kanavakis E, Traeger-Synodinos J. hematologic phenotype of the mutations IOVS-1-n6(T-C) in carriers of β thalassemia in Greece, Pediatr Hematol Oncol 1994; 11(5): 509-517
16. Kattamis C, Hu H, Cheng G, Reese AL, Gonzalez-Redondo JM, Kutlar A, Kutlar F, Huisman TH. Molecular characterization of beta-thalassaemia in 174 Greek patients withthalassaemia major, Br J Haematol. 1990 Mar; 74(3): 342-346
17. Sozuoz A, Berkalp A, Figus A, Loi A, Pirastu M, Cao A. Beta thalassaemia mutations in Turkish Cypriots, J Med Genet. 1988; 25(11): 766-768
18. Hussein I, Temtamy S, el-beshlawy A. Molecular Characteriziation of Beta thalassemia in Egyptians, Hum-Mutat 1993; 2(1): 48-52
19. Sadiq M, Huisma T. Molecular characteizaitions of Beta thalassemia in north Jordan, Hemoglobin 1994; 18: 325-332
20. el-Hazmi MA, Warsy AS, al-Swailem AR. The frequency of 14 beta-thalassemia mutations in the Arab populations, Hemoglobin. 1995; 19(6): 353-360
21. Adekile AD, Gu LH, Baysal E, Haider MZ, al-Fuzae L, Aboobacker KC, al-Rashied A, Huisman TH. Molecular characterization of alpha-thalassemia determinants, beta-thalassemia alleles, and beta S haplotypes among Kuwaiti Arabs, Acta Haematol. 1994; 92(4): 176-181
22. Colah R, Nadkarni A, Gorakshakar A, Phanasgaonkar S, Surve R, Subramaniam PG. Impact of beta globin gene mutations on the clinical phenotype of beta thalassemia in India, Blood Cells Mol Dis. 2004; 33(2): 153-157