

## گزارش تولد یک مورد نوزاد مبتلا به تالاسمی بتا با جهش نادر +22 UTR(G>A) پس از انجام مراحل پیشگیری و تشخیص قبل از تولد

محمدرضا مهدوی: استادیار دانشگاه علوم پزشکی مازندران. mahdavi899@gmail.com

مهرونوش کوثریان: متخصص اطفال و استاد دانشگاه علوم پزشکی مازندران. mekowsarian@gmail.com

\*پیام روشن: کارشناس ارشد ایمنی شناسی (\*نویسنده مسئول). info@fajrlaboratory.com

حسین جلالی: کارشناس ارشد ژنتیک. hossein.jalaliakerdi@gmail.com

عاطفه خوش آئین: متخصص ژنتیک. atefeh.khoshaien@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۷

### چکیده

**زمینه و هدف:** تالاسمی بتا یکی از شایع‌ترین بیماری‌های وراثتی در جهان می‌باشد که در ایران نیز در استان‌های شمالی و جنوبی از فراوانی بالایی برخوردار است. در کشور ما به منظور جلوگیری از تولد نوزاد مبتلا، غربالگری و تشخیص قبل از تولد صورت می‌گیرد. با این وجود در مواردی برنامه‌های تشخیص قبل از تولد قادر به شناسایی تمامی افراد تالاسمی نیستند.

**معرفی مورد:** زوجی پس از انجام مراحل پیش‌گیری و تشخیص قبل از تولد صاحب فرزندی شدند که مبتلا به تالاسمی ماژور بوده، پس از انجام مطالعات مولکولی متعدد مشخص شد این فرد دارای یک جهش نادر ایجادکننده بیماری به نام +22 5UTR (G>A) به صورت هتروزایگوت مرکب به همراه جهش شایع codon 8 (-AA) می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** مورد یافت شده نشان می‌دهد که انجام آزمایش‌های مولکولی کامل‌تر به منظور شناسایی جهش‌های نادر در روش‌های پیشگیری و تشخیص قبل از تولد ضروری به نظر می‌رسد.

**کلیدواژه‌ها:** تالاسمی بتا، جهش نادر، ژن بتاگلوبین، غربالگری پیش از تولد.

### مقدمه

بیماری بتا تالاسمی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تک ژنی در جهان می‌باشد که در بیش از ۶۰ کشور دنیا یافت شده است و در حدود ۱۵۰ الی ۲۰۰ میلیون نفر در سرتاسر جهان ناقل این بیماری می‌باشند. در ایران نیز بیش از ۱۸۰۰۰ بیمار تالاسمی ماژور زندگی می‌کنند و تعداد افراد ناقل نیز به بیش از دو میلیون نفر می‌رسد که فراوانی این بیماری در استان‌های شمالی و جنوبی کشور بسیار بالا می‌باشد. بهترین راه جهت کنترل این بیماری در جمعیت یک کشور شناسایی جهش‌ها و شناسایی افراد ناقل در آن جمعیت، مشاوره ژنتیکی و ارائه خدمات تشخیص قبل از تولد می‌باشد که همه این موارد در ایران نیز صورت می‌پذیرد (۱-۴).

دانشمندان بیش از ۲۰۰ نوع جهش مختلف را در ژن بتا گلوبین شناسایی کرده‌اند که به پیدایش بیماری تالاسمی منجر می‌گردند. در بررسی بر روی بیماران تالاسمی در استان‌های مختلف ایران، نزدیک

به ۴۳ نوع جهش در ژن بتاگلوبین شناسایی شده است و در هر استان نیز فراوانی انواع جهش‌ها متفاوت است به طوری که چند جهش به عنوان جهش شایع و چند جهش به عنوان جهش نادر شناخته شده‌اند. در ایران ۱۳ جهش هستند که ۷۰٪ تا ۹۰٪ از جهش‌های شناسایی شده در بیماران را پوشش می‌دهند. این جهش‌ها به عنوان جهش‌های شایع شناخته شده و سایر جهش‌ها در گروه جهش‌های نادر قرار می‌گیرند. در استان مازندران نیز جهش IVS-II-1 (G>A) با فراوانی ۶۱٪ شایع‌ترین جهش بوده و سایر جهش‌های شایع به ترتیب codon 30 (۷/۵٪)، codon 22 (۶/۲٪) و (8 codon AA-) (۵/۴٪) می‌باشند (۳، ۵ و ۶).

جهش +22 5UTR(G>A) که در گروه جهش‌های نادر ایجادکننده بتا تالاسمی قرار می‌گیرد برای اولین بار در سال ۱۹۸۹ در کشور ترکیه شناسایی شد (۷ و ۸). در مقایسه با سایر جهش‌هایی که منجر به بروز تالاسمی بتا می‌گردند در برخی از

جدول ۱- ایندکس خونی بیمار مورد و والدین بیمار.

جنسیت	سن (سال)	RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Hb-A (%)	Hb-A2 (%)	Hb-F (%)
مورد	M	۴/۰۹	۷/۳	۲۳/۱	۵۶/۵	۱۷/۸	۳۱/۶	۳۵/۲	۳/۲	۶۱/۶
پدر	M	۵/۷۸	۱۲/۴	۴۲/۸	۶۷/۷	۲۱/۵	۳۱/۷	۹۶/۸	۲/۶	۰/۶
مادر	F	۵/۳	۹/۸	۳۲/۹	۶۲/۱	۱۸/۵	۲۹/۸	۹۳/۸	۵/۷	۰/۵

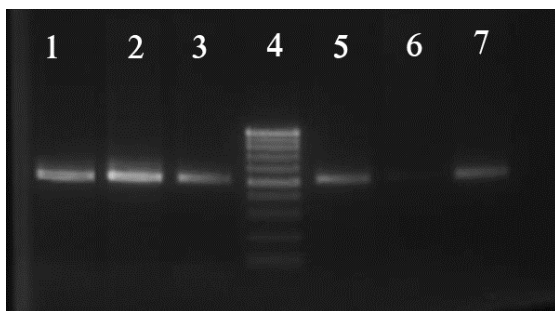
(CBC) Count انجام گردید. الکتروفورز هموگلوبین به روش کاپیلاری با دستگاه Minicap (Sebia) از کشور فرانسه انجام شد (جدول ۱). پس از بررسی اندکس‌های خونی و نتایج الکتروفورز، این فرد به عنوان مبتلا به تالاسمی تشخیص داده شد. این در حالی است که پدر و مادر فرد مبتلا از طریق برنامه پیشگیری و تشخیص قبل از تولد مورد بررسی قرار گرفته و بارداری مادر بلامانع تشخیص داده شده بود. به منظور تشخیص جهش‌های موجود در ژن بتا گلوبین ابتدا پنج جهش شایع ژن بتا گلوبین در استان مازندران با استفاده از تکنیک Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR مورد بررسی قرار گرفتند که نتیجه حاصل نشان داد فرد مورد نظر حامل جهش شایع (codon 8 -AA) در وضعیت هتروزیگوت می باشد (تصویر ۱). سپس به منظور شناسایی جهش دیگر، بیست و دو جهش شایع و نادر در استان مازندران با استفاده از روش‌های PCR و reverse hybridization بررسی

مواردی که این جهش به صورت هتروزیگوت در بیمار تالاسمی بتای مینور وجود دارد تغییرات کمتری در ایندکس‌های خونی به وجود می آورد و در نتیجه تشخیص افراد مینور حامل این جهش از طریق این ایندکس‌ها مشکل تر خواهد بود. امکان دارد این جهش از اتصال mRNA به ریبوزوم جلوگیری به عمل آورد و در نتیجه عمل ترجمه با مشکل روبرو گردد (۹). در ایران در چندین استان وجود این جهش در بیماران تالاسمی گزارش شده است. در جمعیت کرد‌های ایران در یک فرد این جهش به صورت هتروزیگوت مرکب به همراه جهش IVS-II-1 (G>A) شناسایی شده (۱۰)، در استان قزوین نیز این جهش به صورت هتروزیگوت مرکب به همراه جهش IVS 1/5 گزارش شده است (۱۱). در استان مازندران تا کنون بیمار تالاسمی ماژوری که دارای جهش +22 5UTR(G>A) باشد گزارش نشده است.

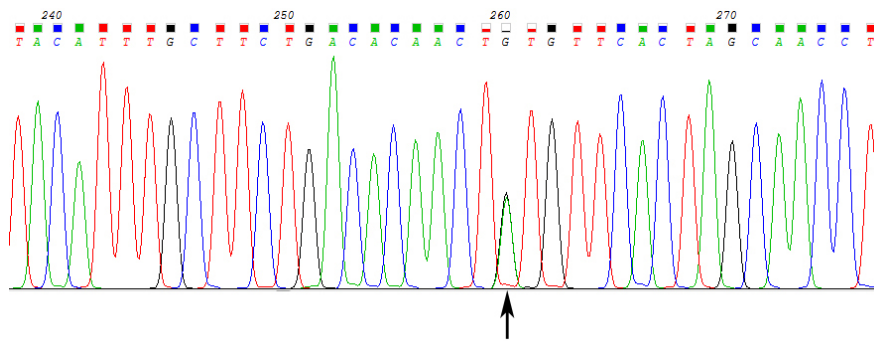
کنترل بیماری در بیماران تالاسمی طی فرآیند خاصی صورت می گیرد. بیمار تالاسمی نیاز دارد تا به طور مکرر خون تازه دریافت نماید. در این بیماران برای کنترل سطح آهن خون و جلوگیری از افزایش غیر طبیعی آن (Iron overload)، باید میزان آهن خون با انجام آزمایش‌هایی مانند بررسی سطح سرمی فریتین یا گیرنده ترانسفرین بررسی گردد و متعاقباً با استفاده از داروهای Iron chelating آهن اضافی از خون خارج شده و دفع گردد. معاینات متعارف و بررسی دوره ای وضعیت فعالیت قلب، کبد و طحال در این بیماران ضروری است.

### معرفی مورد

بیمار مذکر هجده ماهه با اهلیت مازندرانی به منظور بررسی و شناسایی اختلالات هموگلوبینی به مرکز آزمایشگاهی فجر در شهرستان ساری ارجاع داده شد. در ابتدا آزمایش Complete Blood



تصویر ۱- نتایج الکتروفورز ژل آگارز بخشی از DNA ژن بتا گلوبین به طول ۵۲۲ نوکلئوتید برای شناسایی جهش (codon 8 -AA). نمونه‌های فرد مورد (۱ و ۵)، فرد طبیعی (۲ و ۶) و شاهد مثبت (۳ و ۷) برای وجود جهش (codon 8 -AA) بررسی شدند. با به کارگیری پرایمرهای اختصاصی و استفاده از تکنیک ARMS-PCR، در ستون‌های ۱، ۲ و ۳ وضعیت طبیعی wild type و در ستون‌های ۴، ۵، ۶ و ۷ وجود جهش (codon 8 -AA) مورد بررسی قرار گرفته است. ستون چهارم به ladder اختصاص دارد.



تصویر ۲- نتایج تعیین توالی ژن بتاگلوبین وجود جهش نقطه ای  $+22\text{UTR}(G>A)$  را در موقعیت نوکلئوتید ۲۲ (نشانه پیکان) از ژن بتاگلوبین را به نمایش می‌گذارد.

جهش‌های نقطه ای و یا حذف و اضافه شدن های چند نوکلئوتیدی می باشند. در این بیماری بر خلاف آلفا تالاسمی حذف های عمده ژنی فراوانی کمی دارند. در هر گروه قومی و نژادی تعداد محدودی از جهش ها فراوانی بالاتری دارند به عنوان مثال در منطقه ساردینیا در ایتالیا جهش  $C>T$  codon 39 به تنهایی در ۹۵/۷٪ از بیماران وجود دارد (۱۲). با این وجود همواره در درصدی از مبتلایان جهش های نادری وجود دارد که شناسایی تمامی جهش‌های نادر موجود در هر منطقه می‌تواند کمک شایانی در برنامه‌های پیشگیری و تشخیص قبل از تولد نماید.

در سال ۲۰۰۷، درخشنده پیکر و همکاران جهش‌های موجود را در ۳۹۴ ناقل تالاسمی بتا در استان‌های شمالی ایران بررسی نمودند. مطالعه بر روی جهش‌های شایع به روش ARMS-PCR و سایر جهش ها با استفاده از روش تعیین توالی ژنی انجام شد. از ۱۹ جهش شناسایی شده،  $G>A$  شایع ترین (۵۱/۶٪) جهش بوده و هیچ موردی با جهش  $+22\text{UTR}(G>A)$  یافت نشد (۳).

در مطالعه‌ای دیگر، اخوان نیاکی و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی جهش های موجود در ۱۶۳۵ نفر از افراد تالاسمی بتای مینور پرداختند که از این تعداد ۹۹۸ نفر (۶۱٪) دارای جهش  $IVS-II-1 (G>A)$  بودند. در بررسی این گروه دو مورد (۰/۱٪) نیز جهش  $+22\text{UTR}(G>A)$  یافت شد (۶). در گزارش مطالعه حاضر چنان که ذکر شد، این جهش به صورت هتروزیگوت مرکب با جهش شایع دیگری شناسایی شده اند که به بروز

شدند. نتایج حاصل تایید وجود جهش ( $-8\text{codon AA}$ ) بوده ولی جهش دیگر شناسایی نشد. متعاقباً به منظور شناسایی دومین جهش که نامشخص و موثر در بروز بیماری بوده است، از روش توالی یابی sequencing استفاده شد. توالی یابی با استفاده از دستگاه سکانسر (ABI 377, Applied Biosystems, Foster City, California, USA) روی نمونه DNA تکثیر شده از توالی ژنی بتاگلوبین انجام گردید. نتایج این بررسی وجود یک جهش حذفی و یک جهش نقطه‌ای در موقعیت های کدون هشت و نوکلئوتید بیست و دو از ژن بتا گلوبین را به نمایش گذاشت که به ترتیب متناظر با جهش‌های  $+22\text{UTR}(G>A)$  و  $codon 8 (-AA)$  در این فرد می باشند (تصویر ۲). بیمار از نظر وجود جهش های ژن آلفاگلوبین نیز مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، بیست و دو جهش شایع و ناشایع ژن آلفاگلوبین، به روش PCR و متعاقباً reverse hybridization بررسی گردیدند که هیچ کدام از این جهش‌ها یافت نشدند. درمان بیمار که اندکی پیش از تشخیص دقیق نوع جهش های تالاسمی شروع شده بود، پس از دستیابی به اطلاعات فوق به دقت دنبال گردید و همچنان ادامه دارد.

### بحث و نتیجه گیری

برای شناسایی جهش‌های موجود در ژن بتاگلوبین، مطالعات متعددی از سال ۱۹۸۰ صورت گرفته است و با ابداع روش PCR سرعت شناسایی این جهش‌ها افزایش چشم گیری پیدا کرده است به طوری که تا کنون بیش از ۲۰۰ جهش متفاوت در این ژن شناسایی شده است که اکثر آن ها

data and sample resource for worldwide collaborative genetics research. *Hum Mutat.* 2003; 21(2):146-50.

5. Roudkanar MH, Najmabadi H, Derakhshandeh P, Farhud DD. Detection of rare and unknown mutations in  $\beta$ -thalassemia traits in Iran. *Iran J Public Health.* 2003; 32(1): 11-14.

6. Akhavan-Niaki H, Derakhshandeh-Peykar P, Banihashemi A, Mostafazadeh A, Asghari B, Ahmadifard MR, et al. comprehensive molecular characterization of beta thalassaemia in a highly heterogeneous population. *Blood Cells Mol Dis.* 2011; 47(1):29-32.

7. Wong C, Antonarakis SE, Goff SC, Orkin SH, Forget BG, Nathan DG, et al. Beta-thalassaemia due to two novel nucleotide substitutions in consensus acceptor splice sequences of the beta-globin gene. *Blood.* 1989; 73:914-918.

8. Oner R, Oner C, Birben E, Sözen M, Gümrük F, Gürgey A, et al. Beta-thalassaemia intermedia in a Turkish girl: homozygosity for G>A substitution at +22 relative to the beta-globin cap site. *Br J Haematol.* 2001; 115(1):90-4.

9. Oner R, Agarwal S, Dimovski AJ, Efremov GD, Petkov GH, Altay C, et al. The G----A mutation at position +22 3' to the Cap site of the beta-globin gene as a possible cause for a beta-thalassaemia. *Hemoglobin.* 1991; 15(1-2):67-76.

10. Hagi M, Khorshidi S, Hosseinpour Feizi MA, Pouladi N, Hosseinpour Feizi AA. Beta-Thalassaemia mutations in the Iranian Kurdish population of Kurdistan and West Azerbaijan provinces. *Hemoglobin.* 2009; 33(2):109-14.

11. Sarookhani MR, Ahmadi MH. Rare and unexpected beta thalassaemic mutations in Qazvin province of Iran. *African J Biotechnol.* 2010; 9(1):95-101.

12. Cao A, Rosatelli MC, Leoni GB, Tuveri T, Scalas MT, Monni G, et al. Antenatal diagnosis of beta-thalassaemia in Sardinia. *Ann N Y Acad Sci.* 1990; 612:215-25.

بیماری منجر گردیده است.

جهش  $+22$  5UTR(G>A) که در ناحیه غیر کد کننده ۵ ابتدایی ژن بتاگلوبین رخ می‌دهد در گروه جهش‌های نادر ایجاد کننده بتا تالاسمی قرار دارد که تا کنون در استان مازندران و در بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور گزارش نشده است. گزارش‌های پیشین از وجود این جهش در استان کردستان این جهش را به صورت هتروزیگوت به همراه جهش IVS-II-1(G>A) و در استان قزوین به صورت هتروزیگوت با جهش IVS-1/6 شناسایی کرده‌اند (۱۰ و ۱۱).

مطالعه حاضر اولین گزارش از وجود جهش فوق در یک بیمار تالاسمی بتای ماژور در استان مازندران می‌باشد. مشاهده این مورد نشان می‌دهد که برنامه‌های پیشگیری و تشخیص قبل از تولد در مواردی که جهش‌های نادر وجود دارند می‌تواند دچار اشتباه شود. با در نظر گرفتن وجود چنین نمونه‌هایی، توصیه می‌گردد تا جهش‌های نادر ایجاد کننده بیماری نیز در برنامه‌های فوق مورد بررسی قرار گیرند. شناسایی جهش فوق در استان مازندران می‌تواند در برنامه‌های پیشگیری و تشخیص قبل از تولد بیماران تالاسمی بتا مورد استفاده قرار گیرد (۱۰ و ۱۱).

## منابع

1. Old JM, Varawalla NY, Weatherall DJ. Rapid detection and prenatal diagnosis of beta-thalassaemia: studies in Indian and Cypriot populations in the UK. *Lancet.* 1990; 336(8719):834-7.
2. Kawthalkar SM (2006). In: Anemia due to red cell destruction. *Essentials of haematology.* 1st ed. India. Jaypee brothers medical publishers Co; p. 140-7.
3. Derakhshandeh-Peykar P, Akhavan-Niaki H, Tamaddoni A, Ghawidel-Parsa S, Naieni KH, Rahmani M, et al. Distribution of beta-thalassaemia mutations in the northern provinces of Iran. *Hemoglobin.* 2007; 31(3):351-6.
4. Najmabadi H, Neishabury M, Sahebjam F, Kahrizi K, Shafaghati Y, Nikzat N, et al. The Iranian human mutation gene bank: a

## Detection of rare beta globin gene mutation [+22 5UTR (G>A)] in an infant despite prenatal screening

**Mohammadreza Mahdavi**, Assistant Professor, Mazandaran University of Medical Sciences. mahdavi899@gmail.com

**Mehrnoosh Kowsarian**, Professor of pediatrics, Mazandaran University of Medical Sciences. mekowsarian@gmail.com

\***Payam Roshan**, MSc in Immunology (\*Corresponding author). info@fajrlaboratory.com

**Hossein Jalili**, MSc in Genetics. hossein.jalialiakerdi@gmail.com

**Atefeh Khosh Aein**, MD. atefeh.khoshaien@gmail.com

### Abstract

**Background:** Beta thalassemia is one of the most common hereditary disorders worldwide. In Iran, it is frequently reported from northern and southern provinces. In order to prevent child birth affected by this complication, prenatal screening and diagnosis is carried out nationwide. However in some instances, this program is unable to identify rare mutations leading to thalassemia.

**Case presentation:** A married couple, who took part in prenatal screening and diagnosis, gave birth to a child who is affected by thalassemia major. After several molecular examination, a rare mutation [+22 5UTR (G>A)] in compound heterozygote state with a common mutation [codon 8 (-AA)] was found.

**Conclusions:** This case study suggests that more advanced molecular evaluations must be integrated in prenatal screening programs to identify rare mutations and antenatal diagnosis of thalassemia cases.

**Keywords:** Beta thalassemia, Rare mutation, Beta globin gene, Prenatal screening.