

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

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

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

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

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

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

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۲۰

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 پیش گیری و تشخیص قبل از تولد صاحب فرزندی شدنده که مبتلا به تالاسمی مژوور بوده، پس از انجام مطالعات مولکولی متعدد مشخص شد این فرد دارای یک جهش نادر ایجاد کننده بیماری به نام +22 5UTR (G>A) codon 8 (-AA) می‌باشد.

نتیجه‌گیری: مورد یافته 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

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 جهش‌ها شایع 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 (G>A) IVS-II-1 با فراوانی ٪ ۶۱ شایع‌ترین جهش بوده و سایر جهش‌های شایع به ترتیب codon 30 (٪ ۷/۵)، codon 22 (٪ ۶/۲) و codon 8 (٪ ۵/۴) می‌باشند (۳، ۵ و ۶).

جهش +22 5UTR(G>A) که در گروه جهش‌های نادر ایجاد کننده 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

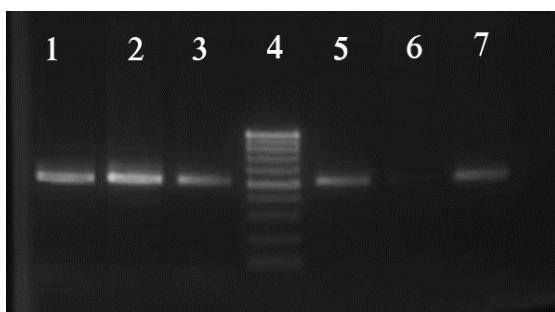
بیماری بتا تالاسمی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تک ژنی در جهان می‌باشد که در بیش از ۶۰ کشور دنیا یافت شده است و در حدود ۱۵۰ الی ۲۰۰ میلیون نفر در سرتاسر جهان ناقل این بیماری می‌باشند. در ایران نیز بیش از ۱۸۰۰۰ بیمار تالاسمی مژوور زندگی می‌کنند و تعداد افراد ناقل نیز به بیش از دو میلیون نفر می‌رسد که فراوانی این بیماری در استان‌های شمالی و جنوبی کشور بسیار بالا می‌باشد. بهترین راه جهت کنترل این بیماری در جمیعت یک کشور شناسایی جهش‌ها و شناسایی افراد ناقل در آن جمیعت، 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 بتاگلوبین شناسایی کرده‌اند که به پیدایش بیماری تالاسمی منجر می‌گردند. در بررسی بر روی بیماران تالاسمی در استان‌های مختلف ایران، نزدیک

جدول ۱- ایندکس خونی بیمار مورد و والدین بیمار.

	جنسیت	سن (سال)	RBC (x 10 ⁶ /µl)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Hb-A (%)	Hb-A2 (%)	Hb-F (%)
مورد	M	۱/۵	۴/۰۹	۷/۳	۲۳/۱	۵۶/۵	۱۷/۸	۳۱/۶	۲۵/۲	۳/۲	۶۱/۶
پدر	M	۳۰	۵/۷۸	۱۲/۴	۴۲/۸	۶۷/۷	۲۱/۵	۳۱/۷	۹۶/۸	۲/۶	۰/۶
مادر	F	۲۶	۵/۳	۹/۸	۳۲/۹	۶۲/۱	۱۸/۵	۲۹/۸	۹۳/۸	۵/۷	۰/۵

مواردی که این جهش به صورت هتروزیگوت در بیمار تالاسمی بتای مینور وجود دارد تغییرات کمتری در ایندکس های خونی به وجود می آورد و در نتیجه تشخیص افراد مینور حامل این جهش از طریق این ایندکس ها مشکل تر خواهد بود. امکان دارد این جهش از اتصال mRNA به ریبوزوم پیشگیری و تشخیص قبل از تولد مورد بررسی قرار گرفته و بارداری مادر بلامانع تشخیص داده شده بود. به منظور تشخیص جهش های 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 روش های PCR و reverse hybridization بررسی شده است.



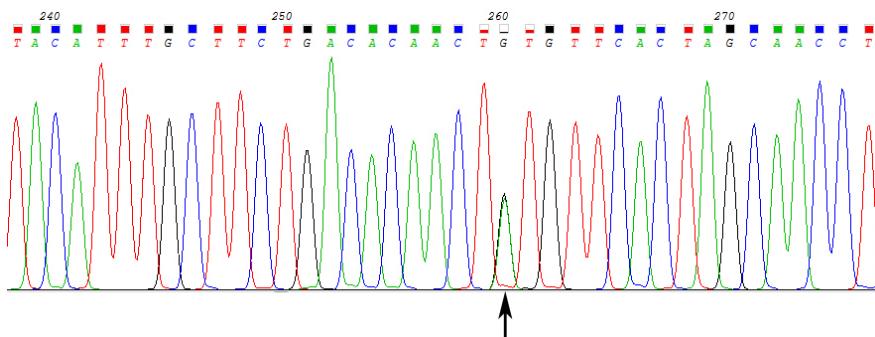
تصویر ۱- نتایج الکتروفورز ژل آگارز بخشی از DNA ژن بتا گلوبین به طول ۵۲۲ نوکلئوتید برای شناسایی جهش (AA) codon 8. نمونه های فرد مورد (۱ و ۵)، فرد طبیعی (۲ و ۶) و شاهد مثبت (۳ و ۷) برای وجود جهش (AA) codon 8 بررسی شدند. با به کارگیری پرایمرهای اختصاصی و استفاده از تکنیک ARMS-PCR، در ستون های ۲، ۱، ۳ و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

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 آزمایش هایی مانند بررسی سطح سرمی فربتین یا گیرنده ترانسفرین بررسی گردد و متعاقباً با استفاده از داروهای Iron chelating 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.

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 آزمایش هایی مانند بررسی سطح سرمی فربتین یا گیرنده ترانسفرین بررسی گردد و متعاقباً با استفاده از داروهای Iron chelating 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 مذکور 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 ۲- نتایج تعیین توالی ژن بتاگلوبین وجود جهش نقطه ای (G>A)+22UTR در موقعیت نوکلئوتید ۲۲ (نشانه پیکان) از ژن بتاگلوبین را به نمایش می گذارد.

جهش های نقطه ای و یا حذف و اضافه شدن های چند نوکلئوتیدی می باشند. در این بیماری برخلاف آلفا تالاسمی حذف های عمدۀ ژنی فراوانی کمی دارند. در هر گروه قومی و نژادی تعداد معدودی از جهش ها فروانی بالاتری دارند به عنوان مثال در منطقه سارдинیا در ایتالیا جهش codon 39 C>T به تنها یی در ۹۵/۷٪ از بیماران وجود دارد (۱۲). با این وجود همواره در درصدی از مبتلایان جهش های نادری وجود دارد که شناسایی تمامی جهش های نادر موجود در هر منطقه می تواند کمک شایانی در برنامه های پیشگیری و تشخیص قبل از تولد نماید.

در سال ۲۰۰۷، درخششده پیکر و همکاران جهش های موجود را در ۳۹۴ ناقل تالاسمی بتا در استان های شمالی ایران بررسی نمودند. مطالعه بر روی جهش های شایع به روش ARMS-PCR و سایر جهش ها با استفاده از روش تعیین توالی ژنی IVS-II-1 (G>A) شایع ترین (۵۱/۶٪) جهش بوده و هیچ موردي با جهش (G>A)+22 5UTR(G>A)+22 یافت نشد (۳).

در مطالعه ای 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 (G>A) IVS-II-1 بودند. در بررسی این گروه دو مورد (۰/۱٪) نیز جهش (G>A)+22UTR(G>A)+22 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

شدن. نتایج حاصل تایید وجود جهش (codon 8-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 (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 نقطه ای در موقعیت های کدون هشت و نوکلئوتید بیست و دو از ژن بتا گلوبین را به نمایش گذاشت که به ترتیب متناظر با جهش های (-AA) codon 8 و +22UTR(G>A) 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 جهش ها یافت نشدن. 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 جهش های موجود در ژن بتاگلوبین، مطالعات متعددی از سال ۱۹۸۰ صورت گرفته است و با ابداع روش PCR سرعت شناسایی این جهش ها 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 β -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 thalassemia 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-thalassemia 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-thalassemia. *Hemoglobin.* 1991; 15(1-2):67-76.

10. Hagh M, Khorshidi S, Hosseinpour Feizi MA, Pouladi N, Hosseinpour Feizi AA. Beta-Thalassemia 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 thalassemic 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-thalassemia in Sardinia. *Ann N Y Acad Sci.* 1990; 612:215-25.

بیماری منجر گردیده است.

جهش (G>A) 5UTR(+22) 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 مژوور 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 مژوور 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

- 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.
- Kawthalklar SM (2006). In: Anemia due to red cell destruction. Essentials of haematology. 1st ed. India. Jaypee brothers medical publishers Co; p. 140-7.
- Derakhshandeh-Peykar P, Akhavan-Niaki H, Tamaddoni A, Ghawidel-Parsa S, Naieni KH, Rahmani M, , et al. Distribution of beta-thalassemia mutations in the northern provinces of Iran. *Hemoglobin.* 2007; 31(3):351-6.
- 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.jalaliakerdi@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.