بررسی مولکولی جهش های غیر حذفی ژن های آلفاگلوبین بیماران آلفا تالاسمی دراستان کرمانشاه

* **دکتر رضا علی بخشی:** استاد یار و متخصص ژنتیک پزشکی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی و مرکزتحقیقاتی دارو رسانی نانو، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران (* نویسنده مسئول). ralibakhshi@kums.ac.ir

سمیه خالقی: کارشناسی ارشد زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور مرکز تهران شرق، تهران، ایران. s_kh_61@yahoo.com

دکتر رضا اکرمی پور: دانشیار و فوق تخصص خون و انکولوژی، گروه کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. akramipour20@kums.ac.ir

دکتر سید کاظم بیدکی: استادیار و متخصص ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور مرکز تهران شرق، تهران، ایران. drbidoki@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: آلفاتالاسمی یک بیماری تک ژنی با توارث اتوزومی مغلوب بوده و در جمعیت هایی با منشاء مدیترانه ای و آسیای جنوب شرقی شایع می باشد. بررسی شیوع جهش های غیر حذفی این بیماری می تواند راهنمای مفید و سریعی جهت پیش گیری، کنترل و تشخیص قبل از تولد این بیماری باشد.

روش کار: دراین مطالعه توصیفی – تحلیلی از ۴۰ فرد ارجاعی به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه با اصلیت کرمانشاهی، با MCV (< ۸۰ fl) و MCH (<۲۷) پایین تر از حد طبیعی و سطوح Hb F و Hb A2 طبیعی یا کاهش یافته، نمونه گیری به عمل آمد. این افراد فاقد حذف های شایع ژن آلفا گلوبین بوده اند. DNA ژنومی این افراد به روش Salting Out تخلیص و با تکنیک ARMS PCR جهش های نقطه ای شایع آلفاتالاسمی بررسی شد. نمونه هایی که فاقد جهش های حذفی و جهش های نقطه ای مورد بررسی بودند ژن های α1 و α2 آن ها تعیین توالی شدند.

یافته‌ها: در ۳۹ مورد از ۴۰ فرد مورد بررسی، ۶ نوع جهش مشخص گشت. شایع ترین جهش در بین نمونه مورد مطالعه جهش αpolyA4 با فراوانی ۳۷/۵٪، پس از آن جهش α-5nt با فراوانی ۳۵٪ وجهش αpolyA6 با فراوانی ۱۷/۵٪ می باشد. جهش های Hb Adana، α1+1mRNA و α2+832 G>A از طریق تعیین توالی شناسایی گردیدند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه، جامع ترین مطالعه انجام شده در منطقه بوده و از نتایج این بررسی می توان جهت مشاوره ژنتیک، غربال گری جمعیتی و تشخیص قبل از تولد استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: آلفا تالاسمی، تعیین توالی، جهش های غیرحذفی، کرمانشاه

مقدمه

تالاسمی یکی از شایع‌ترین بیماری های تک ژنی در جهان محسوب می شود (۱). این اختلال در اثر فقدان یا کاهش سنتز زنجیره های گلوبین به وجود می آید (۲). آلفاتالاسمی اشاره بر نقص در تولید زنجیره های آلفا گلوبین دارد (۳). ژن های آلفاگلوبین به صورت مضاعف (1α و 2α) در خوشه ژن α (θ_1، α_1، α_2، $\Psi\alpha_1$، $\Psi\alpha_2$، $\Psi\zeta$، ζ_2) و در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۶ واقع شده اند (۴). اگر چه نقص در ژن آلفاگلوبین اغلب به صورت حذف‌های تکی (/αα -) و یا دوتایی (/αα--) می‌باشد، ولی جهش های غیر حذفی شامل جابه جایی تک نوکلئوتیدی و حذف یا اضافه شدن یک یا چند نوکلئوتیدی کوچک نیز (۷-۵) در نواحی خاصی از ژن های 2α (Tα α) یا 1α (α Tα) می‌تواند مسئول ایجاد بیماری آلفاتالاسمی باشد. موتاسیون ها ممکن است به طور کامل تولید زنجیره آلفا رامتوقف (α°-تالاسمی) و یا به طور نسبی میزان سنتز آن را کاهش دهند (α+-تالاسمی) (۸).

چهار سندرم آلفا تالاسمی شامل حامل خاموش، صفت آلفا تالاسمی، بیماری هوگلوبین H وهیدروپس فتالیس می باشند که به ترتیب نمایانگر نقایص مولکولی اثرگذار بر روی یک، دو، سه یا چهار ژن آلفاگلوبین می باشند. در چهار رده کلی آلفا تالاسمی، ناهمگونی ژنتیکی و بالینی مشخص وجود دارد و دو فرم آلفا تالاسمی که از نظر بالینی اهمیت دارند، بیماری هموگلوبین H (Hb H) و سندرم هیدروپس فتالیس (Hb Bart) می‌باشند (۹ و ۱۰).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-12-14]

اختلالات آلفا تالاسمی عمدتاً در جمعیت هایی با منشأ مدیترانه ای و آسیای جنوب شرقی و سیاهان شایع می باشد (۸ و ۱۱). تالاسمی در سطح مولکولی از هتروژنی بالایی برخوردار است ولی علی رغم این هتروژنی، هر جمعیتی الگوی جهش خاصی را دارا می باشد، به طوری‌که ۵ تا ۱۰ جهش، شایع ترین جهش های هر منطقه را تشکیل می دهد (۱). تشخیص ژنتیکی آلفا تالاسمی می تواند در توصیف پاتولوژی مولکولی بیماری، کشف حاملین، تشخیص قبل از تولد در خانواده های در معرض خطر سندرم هموگلوبین هیدروپس فتالیس و بیماری Hb H، جلوگیری از موارد خاص هم توارثی با بتاتالاسمی (۱۲) و همچنین تشخیص علت میکروسیتوز و اجتناب از بررسی های مکرر پرهزینه ودرمان آهن طولانی مدت کمک نماید (۲)، بنابراین یافتن جهش های آلفای موجود در کشور برای مشخص کردن وضعیت افراد بیمار ضروری است و از آن می‌توان در شناسایی سریع ناقلین و تشخیص قبل از تولد استفاده کرد.

در ایران مطالعات مختلفی در این زمینه انجام شده، اما در استان کرمانشاه که یکی از استان های کردنشین کشورمی باشد، بررسی اختصاصی بر روی نمونه های استان صورت نگرفته است. جهت بررسی مولکولی نمونه بتدا با استفاده از تکنیک ARMS PCR موتاسیون‌های های نقطه ای شایع آلفاتالاسمی (α^{polyA4}, α^{-5nt}, HbCS and Cd19 (-G) α^{polyA6}) مورد بررسی قرار گرفت، وسپس برای مواردی که جهش از طریق روش ARMS PCR شناسایی نگردید، تعیین توالی انجام گردید.

روش کار

تعداد ۴۰ فرد از بین بیماران ارجاعی از طرف پزشک متخصص به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه با اصل نژادی استان کرمانشاه، که شرایط ورود به مطالعه را داشتند، انتخاب شدند. پس ازکسب رضایت و تکمیل فرم رضایت نامه وپرسش نامه اختصاصی، افراد وارد مطالعه شدند. ازاین تعداد ۱۸ نفر مذکر و ۲۲ نفر مونث بودند. این افراد دارای کم‌خونی هیپوکرومیک و میکروسیتیک همراه با MCH و MCV پایین، HbA2 نرمال یا کاهش یافته وHb F نرمال هستند که به درمان آهن پاسخ نداده بودند. همچنین این افراد فاقد حذف های شایع ژن های آلفا گلوبین ($^{3.7}\alpha$-، $^{4.2}\alpha$-، $^{20.5}(\alpha)$- و ^{MED}--) می‌باشند. محدوده سنی بیماران مورد بررسی بین ۱۵ و ۳۹ سال بود. مقادیر شاخصه های خونی تمامی نمونه ها به وسیله سیستم اتوماتیک (SYSMEX KX-2, Japan) در آزمایشگاه رفرانس اندازه گیری شدند. همچنین الکتروفورز هموگلوبین A2 نیز در این آزمایشگاه انجام گرفت.

برای نمونه گیری ۱۰-۵ میلی لیتر از خون محیطی هر فرد در داخل لوله ای که حاوی ۳۰۰-۱۰۰ میکرولیتر EDTA نیم مولار (PH=8) می‌باشد ریخته شد. نمونه های خونی قبل از استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

DNA از سلول های سفید خون بیماران با روش نمک اشباع (Salting out) استخراج گردید (۱۳). به طور خلاصه در این روش با دو بارشستشوی خون کامل توسط بافر سرد لیز کننده گلبول قرمز (Red cell lyses buffer) گلبول های قرمز شسته شده دور ریخته می شوند. سپس گلبول های سفید باقیمانده در حضور پروتئیناز K و محلول SDS به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد داخل بن ماری قرار خواهند گرفت. در ادامه افزودن NaCl غلیظ باعث جداسازی اجزای ناخواسته می شود. سانتریفیوژ فاز بالایی در طی دو مرحله و به ترتیب با کمک ایزوپروپانول واتانول ۷۰ ٪ در دستگاه میکروسانتریفیوژ، ته نشین سازی DNA ژنومی را در بر خواهد داشت. در این مرحله حدود ۱۵۰-۱۰۰ میکرولیتر محلول TE جهت انحلال DNA افزوده خواهد شد.

در آخر غلظت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر (NanoDrop ® ND - 1000) در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شده و نمونه هایی که نسبت A 260/A280 در آن ها بین ۲/۲- ۱/۸ بودند، جهت واکنش PCR انتخاب شدند. DNA استخراج شده تا زمان انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز در دمای

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-12-14]

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمر های مورد استفاده در واکنش ARMS-PCR و Sequencing واندازه قطعات حاصل از واکنش PCR.

آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه تکثیری	مورد استفاده
α2 cs-N	۵′-GCA CCG TGC TGA CCT CCA AAT ACA GTT -3′	189bp	ARMS PCR
α2 cs-M	۵′- GCACCGTGCTGACCTCCAAATACAGTC-3′	189bp	ARMS PCR
a2cd19-N	۵′-CAAGGCCTCCTGGGGTAAGGTCGGCTCG -3′	815bp	ARMS PCR
a2cd19-M	۵′-CAAGGCCTCCTGGGGTAAGGTCGGCTCC-3′	815bp	ARMS PCR
_ 5nt N	۵′- GGAGGCCCTGGAGAGGTGAGGCT-3′	767bp	ARMS PCR
_5ntM	۵′-GGTGCGGAGGCCCTGGAGAGGCT-3′	767bp	ARMS PCR
a2Com R	۵′-CTCCATTGTTGGCACATTCCGGG-3′		ARMS PCR
PolyA6 N	۵′-CACCGGCCCTTCCTGGTCTTTGAACAAA -3′	334bp	ARMS PCR
PolyA6 M	۵′-CACCGGCCCTTCCTGGTCTTTGAACAAG-3′	334pb	ARMS PCR
PolyA4 N	۵′-GGCCCTTCCTGGTCTTTGTATA -3′	330bp	ARMS PCR
polyA4M	۵′-CGGCCCTTCCTGGTCTTTGTATG -3′	Pb330	ARMS PCR
PAScom-R	۵′-CAGGGAGATTTCAAAGGAGGGTG-3′		ARMS PCR
ALPHA1-2-F-SEQ	۵′-CGCGCCAGCCAATGAGCG -3′		Sequencing PCR
ALPHA1-R-SEQ	۵′-CATGTGTGTCCCAGCTGCTGT-3′		Sequencing PCR
Alpha-2- R-SEQ	۵′-GAGAGGTCCTTGGTCTGAGACAG-3′		Sequencing PCR

N پرایمر طبیعی، M پرایمر جهش یافته، R پرایمر برگشتی، F پرایمر رفت، COM پرایمر مشترک، SEQ پرایمر مربوط به تعیین توالی، ALPHA 1 ژن آلفا ۱، ALPHA 2 ژن آلفا ۲

۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

ARMS PCR: روش مستقیم ARMS PCR (Newton, et al, 1989) برای شناسایی موتاسیون‌های نقطه ای شناخته شده با استفاده از آغازگرهای ویژه (جدول ۱) جهت نمونه های بیماران به همراه کنترل موتانت وکنترل نرمال انجام پذیرفت.

PA2 (α^{polyA4}) (HBA2:c.*+92A>G) α^{-5nt} , PA1(α^{polyA6}) (HBA2:c.*+94A>G), (HBA2:c.95+2_95+6delTGAGG), Codon 19 (-G)(HBA2:c.56delG), Hb Constant Spring (HBA2:c.427T>C).

پس از بهینه سازی شرایط انجام واکنش مخلوط واکنشی به حجم ۵۰ میکرولیتر شامل DNA ژنومی، مخلوط آغازگرها (پرایمرهای جهش یافته یا طبیعی و پرایمر مشترک)، آنزیم Taq پلیمراز، dNTP و مخلوط بافر با غلظت $MgCl_2$ 1.5 میلی مولار در یک تیوب۰/۲ سی سی تهیه گردید. در ادامه با تغییرات در زمان، دما و تعداد چرخه، واکنش PCR در دستگاه ترمال سایکلر (Biometra, Germany) انجام شد؛ واسرشتگی اولیه DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه صورت پذیرفت، سپس برنامه تکثیر زیر برای ۳۰ چرخه انجام یافت: ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه. همچنین واکنش برای مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد ادامه یافت.

در نهایت محصولات PCR روی ژل آگارز ٪۱/۵٪ (Invitrogen) و در بافر TBE به مدت ۴۵ دقیقه و با ولتاژ ۸۵ ولت، الکتروفورز (Power supply, IRAN) گردید. نمونه های ران شده بر روی ژل با استفاده اتیدیوم برماید (Ethidium bromide) رنگ آمیزی شد. همراه نمونه ها شاخص مولکولی (Ladder) وکنترل منفی و مثبت استفاده شده است. از محصول PCR مشاهده شده زیر UV ترانس ایلومیناتور، عکس برداری به عمل آمد (اشکال۱ تا ۳).

جهت بررسی موتاسیون های نقطه ای DNA ژنومی افرادی که طبق نتایج ARMS PCR، فاقد جهش‌های یاد شده بودند، ژن های α_1 و α_2-گلوبین با استفاده از آغازگرهای خاص (جدول ۱)، تکثیر شدند. فرآیند در مخلوط واکنشی با حجم نهایی ۵۰ میکرو لیتر شامل DNA ژنومی، مخلوط آغازگرها، آنزیم Tag پلیمراز، بافر PCR (با غلظت نهایی) MgCl2 ۲ میلی مولار و dNTPs و

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-12-14]

جدول ۲- درصد جهش های شناسایی شده در مطالعه و میانگین ایندکس های خونی

ژنوتیپ	تعداد	٪	MCV (mean ±SD)	MCH (mean ±SD)
ناشناس	۱	۲/۵	۷۷/۸±۳/۳۶	۲۵/۷±۱/۱۵
α^{polyA4} α /αα	۱۴	۳۵	۷۶/۹±۱/۷	۲۵/۳±۰/۹۷
α^{polyA4} α/ α^{polyA4} α	۱	۲/۵	۷۰/۸	۲۱/۹
α^{-5nt} α/αα	۱۴	۳۵	۷۶/۹±۲/۱۲	۲۵/۳۲±۱/۴۳
α^{polyA6}α/αα	۷	۱۷/۵	۷۳/۷±۳/۳۵	۲۴/۴±۱/۹۸
Hb Adana / αااا	۱	۲/۵	۷۲/۷	۲۴/۲
α_2 +832 G>A α/ α_2 +832 G>A α	۱	۲/۵	۷۵/۵	۲۵/۵
α_1 +1mRNA α/αα	۱	۲/۵	۷۷/۲	۲۶
مجموع	۴۰	۱۰۰		

در مجموع ۶ جهش مختلف در این افراد تعیین شد. همچنین در هیچ یک ازنمونه ها، جهش های نقطه ای Codon 19 (-G) (HBA2:c.56delG) و Hb Constant Spring (HBA2:c.427T>C) یافت نشد.

DMSO، در دستگاه ترمال سایکلر (ABI Applied Biosystems, USA) انجام شد. برنامه دستگاه به شکل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه تنظیم گردید، در پایان واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد ادامه یافت.

در ادامه پس از مشاهده نتیجه محصول PCR1 و تایید درستی انجام PCR، خالص سازی محصول PCR1 توسط کیت خالص سازی PCR انجام گردید. برای به دست آوردن DNA تک رشته ای و تکثیر یافته جهت انجام تعیین توالی، واکنش PCR2 انجام شد. در این مرحله، مخلوط واکنشی به حجم ۱۰ میکرو لیتر تهیه گردید. این مخلوط شامل: 1 میکرو لیتر محصول واکنش PCR تلخیص شده، 2 میکرو لیتر آنزیم Bigdye Terminator v3.1، ۲ میکرو لیتر بافر PCR5X، 0.5 میکرو لیتر آغازگر Forward یا Reverse (جدول ۱) و ۴/۵ میکرو لیتر آب مقطر (RNase-free water) آماده گردید و در دستگاه ترمال سایکلر (Applied Biosystems, USA) طبق شرایط زیر تکثیر یافت:

۹۶ درجه سانتی گراد مدت ۱ دقیقه، ۲۵ چرخه به صورت ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ثانیه ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه. DNA تک رشته ای تکثیر یافته پس از مراحل رسوب گذاری (Percipitation) در ۱۵ میکرو لیتر فرمامایید مخلوط شد. پلیت ۹۶ تایی حاوی نمونه ها در دستگاه ABI Genetic Analyzer مدل ۳۱۳۰ قرار داده شد. با توجه به برنامه داده شده به دستگاه خوانش نمونه ها انجام و ترادف نوکلئوتیدی نمونه ها انجام می گیرد. نتایج به دست آمده از دستگاه را با کمک نرم افزار های اختصاصی Sequencing Analysis 5.2 و Gene Runner آنالیز و نتیجه ترادف نوکلئوتیدی مشخص گشت.

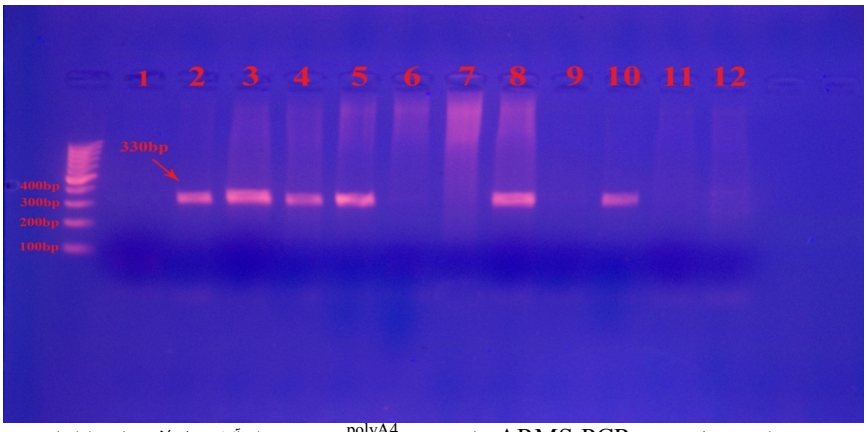
یافته‌ها

دراین مطالعه در بررسی جهش های غیرحذفی با روش ARMS PCR، ۳ نوع جهش نقطه ای در ۳۶ نفر (۹۰٪) از نمونه ها دیده شد. بررسی بقیه نمونه ها به روش تعیین توالی، وجود جهش نقطه ای در ۳ نفر را نشان داد. در کل نتیجه بررسی های مولکولی در ۳۹ نفر (۹۷/۵ ٪) از افراد مورد بررسی نشانگر وجود جهش در خوشه ژنی آلفا بود (جدول۲).

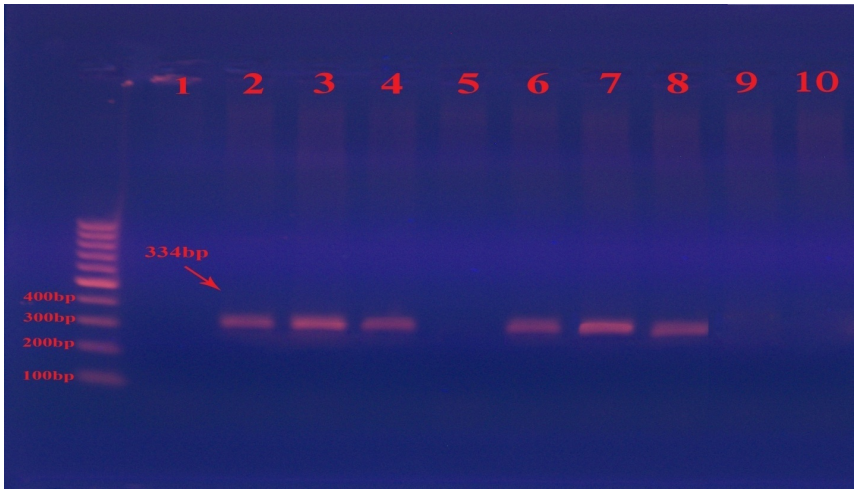
در مجموع ۶ جهش مختلف در این افراد تعیین شد. همچنین در هیچ یک ازنمونه ها، جهش های نقطه ای Codon 19 (-G) (HBA2:c.56delG) و Hb Constant Spring (HBA2:c.427T>C) یافت نشد.

انواع جهش هایی که به کمک روش تعیین توالی در ژن α-گلوبین مشخص شد جهش هموگلوبین

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-12-14]



شکل ۱- الکتروفورز محصولات در یک سری ARMS PCR برای جهش α^{polyA4} بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ دو لان اول از سمت چپ مربوط به کنترل نرمال، لان۳ و ۴ مربوط به جهش به صورت هتروزیگوت (کنترل هترو) و لان ۵ و ۶مربوط به همین جهش به صورت هموزیگوت است و لان ها ی ۷ تا ۱۰مربوط به نمونه های نرمال می باشند. لان های ۱۱ و ۱۲ مربوط به نمونه کنترل منفی می باشد. با کم کردن مقدار مصرف پرایمرها از۱/۵به ۱ میکرولیتر از تشکیل پرایمر دایمر جلوگیری شده است.



شکل ۲- الکتروفورز محصولات در یک سری ARMS PCR برای جهش αpolyA6 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ دو لان اول از سمت چپ مربوط به کنترل نرمال، لان ۳ و ۴ مربوط به کنترل هتروزیگوت و لان ۵ و ۶ مربوط به نمونه نرمال ولان ۷ و ۸ مربوط به همین جهش به صورت هتروزیگوت است. لان های ۹ و ۱۰ مربوط به نمونه کنترل منفی می باشد.

آدانا Hb Adana (HBA1:c.179G>A) به صورت هتروزیگوت در یک فرد و فراوانی ۲/۵ درصد، جهش α1+mRNA1 به صورت هتروزیگوت در یک فرد و فراوانی ۲/۵ درصد و جهش α_2 +832 G>A (HBA2:c.*+107A>G) به صورت هموزیگوت در یک فرد می باشد (شکل ۴).

بحث و نتیجه گیری

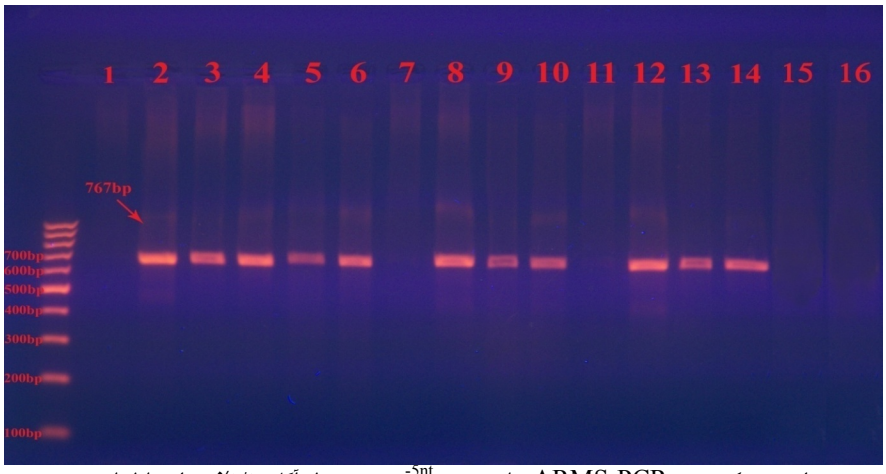
در تحقیق حاضر، جهش در سیگنال پلی A به صورت PA2 (αpolyA4) (HBA2:c.*+92A>G)، بالاترین فراوانی را (۳۷/۵٪) دارد. این جهش در بین آلل های واجد موتاسیون غیر حذفی آلفا تالاسمی، فراوان ترین آلل جهش یافته در مناطق شمال ایران، جنوب غرب ایران، غرب ایران و شمال شرق ایران را به خود اختصاص داده است (۱۶-۱۴). در جنوب ایران موردی از این نوع جهش گزارش نشده است (۱۴).

دومین جهش شایع در تحقیق حاضر، حذف پنج نوکلئوتید از ابتدای اینترون یک ژن α_2 با فراوانی ۳۵٪ می باشد α^{-5nt} (HBA2:c.95+2_95+6delTGAGG).

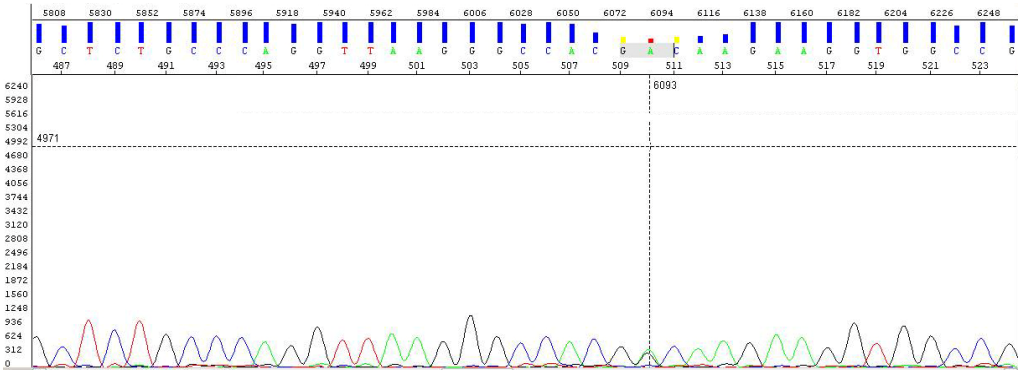
مطالعاتی که جهت تجزیه و تحلیل جهش های آلفا تالاسمی انجام گرفته است نشان می دهد که این جهش به همراه

α_2 ATG→ ACG(HBA2:c.1A>G),
PA1(α^{polyA6}) (HBA2:c.*+94A>G)

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-12-14]



شکل ۳- الکتروفورز محصولات در یک سری ARMS PCR برای جهش α^{-5nt} بر روی ژل آگارز ۱/۵٪، دو لان اول از سمت چپ مربوط به کنترل نرمال، لان ۳ و ۴ مربوط به کنترل هتروزیگوت ولان ۵ و ۶، ۹ و ۱۰، ۱۳ و ۱۴ مربوط به نمونه های هتروزیگوت و لان ۷ و ۸، ۱۱ و ۱۲ مربوط به نمونه های نرمال است. لان های ۱۵ و ۱۶ مربوط به نمونه کنترل منفی می باشد.



شکل ۴- جهش αHb Adana (HBA1:c.179G>A) که به صورت هتروزیگوت دیده می شود (دراین مطالعه درکلیه اشکال مربوط به نتیجه تعیین توالی تصویر باز آدنین به رنگ سبز، گوانین به رنگ مشکی، سیتوزین به رنگ آبی و تیمین به رنگ قرمز نشان داده شده است).

فراوانی آللی جهش در مطالعه سایر محققین کشور در میان جهش های غیر حذفی در شمال غرب و جنوب شرق به طور مشابه با فراوانی (۳۳/۳۳٪)، در مرکز ایران با فراوانی ۳۱٪، در جنوب غربی و شمال ایران به ترتیب با فراوانی ۱۵٪ و ۱۳/۶۷٪ گزارش شده است (۱۴). همچنین این نوع جهش دومین نوع آلل جهش یافته شایع (۳۳/۶۶٪در کشور اردن (۱۸) بوده و در کشور های کویت وامارات متحده عربی (۱۹) و ترکیه (۱۰) از جهش های شایع می باشد.

فراوانی جهش (HBA2:c.*+94A>G) (α^{polyA6}) PA1 در مطالعه حاضر (۱۷/۵٪) می باشد. به ارث بردن فرم هموزیگوت این جهش فنوتیپ بیماری H را به صورت شدیدتر از فرم حذفی این بیماری ایجاد می‌کند (۶). این مورد شایع ترین جهش غیر حذفی در امارات متحده عربی، اردن و بحرین می‌باشد (۱۸و۱۹).

جهش Codon 19 (-G) (HBA2:c.56delG) در جنوب وجنوب شرق ایران از فراوانی قابل توجهی برخوردار بوده در حالی که در مطالعه حاضر موردی از آن یافت نشد. این جهش با فراوانی کمتری در شمال، مرکز و جنوب غرب کشورمان نیز گزارش شده است (۱۴).

فراوانی آللی جهش (HBA2:c.427T>C) یا هموگلوبین Constant spring در مطالعه حاضر صفر بود. این جهش در مطالعه هادوی و همکارانش ۵۰٪ فراوانی را از میان آلل های جهش یافته غیر حذفی در شمال شرق کشورمان به خود اختصاص داده است و با فراوانی کمتر در مرکز، جنوب غرب و شمال کشور نیز یافت شده است

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-12-14]

(۱۴).

جهش Hb Adanaα(HBA1:c.179G>A) یا همان هموگلوبین Adana نسبت به جهش های دیگر شناسایی شده از فراوانی کمتری برخورداراست (۱۴)، همراهی این جهش با حذف دوتایی فنوتیپ بیماری H را ایجاد می کند (۲۰).

با مقایسه نتایج تحقیق حاضر و سایرتحقیقات مشخص گشت که شیوع جهش در مناطق مختلف کشور تطابق و اختلافاتی دارد به صورتی که برخی جهش ها در بعضی مناطق از فراوانی بیشتری برخوردار بوده و برخی فقط در مناطق خاصی یافت می شود.

شیوع بالاتر آلفا تالاسمی و برخی از این جهش‌ها در مناطق خاصی، به دلیل انتخاب طبیعی آن‌ها در مقاومت نسبت به انگل مالاریا، اتفاق افتاده است (۲).

در کشور های آسیای جنوب شرقی، شایع ترین جهش غیر حذفی در افراد آلفا تالاسمی جهش نقطه ای Hb Constant (HBA2:c.427T>C) Spring می باشد. در خاور میانه جهش‌های شایع غیر حذفی عمدتاً جهش‌های

PA2(α^{polyA4}) (HBA2:c.*+92A>G),

PA1(α^{polyA6}) (HBA2:c.*+94A>G),

α^{-5nt} (HBA2:c.95+2_95+6delTGAGG)

می‌باشند که با جهش های یافت شده در این مطالعه هم خوانی دارد (۸).

موتاسیون PA2 (α^{polyA4}) (HBA2:c.*+92A>G) شایع ترین جهش ژن آلفاگلوبین در نمونه های مورد مطالعه می باشد. این مطالعه، جامع ترین مطالعه انجام شده در منطقه بوده واز آن می توان برای اهداف غربال گری ملکولی آلفا تالاسمی وتشخیص قبل از تولد در استان کرمانشاه بهره برداری کرد. از نتایج عملی این طرح می توان در راستای انجام بهتر مشاوره ژنتیک جهت بیماران آلفا تالاسمی استان، غربال گری جمعیتی و تشخیص قبل از تولد استفاده نمود. افزودن روش تعیین توالی مستقیم در بررسی جهش های منطقه ای برای شناخت جهش های خونی غیر شایع آلفاتالاسمی ضروری به نظر می رسد.

تقدیر و تشکر

ازهمه بیماران و خانواده محترم آن ها و همچنین همکاران آزمایشگاهی در آزمایشگاه رفرانس و ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، جهت همکاری در انجام این طرح تشکر و قدر دانی به عمل می آید.

شایان ذکر است انجام این طرح با تصویب و کمک مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شده است.

منابع

1. Cao A, Saba L, Galanello R, Rosatelli MC. Molecular diagnosis and carrier screening for beta thalassemia. JAMA. 1997; 278(15):1273-7.
2. Weatherall DJ, Clegg JB, Gibbons R. Thethalassaemia syndromes. 4th ed. Oxford, Malden, MA: Blackwell Science; 2001. P.484-525.
3. Greenberg PL, Gordeuk V, Issaragrisil S, Siritanaratkul N, Fucharoen S, Ribeiro RC. Major hematologic diseases in the developing world- new aspects of diagnosis and management of thalassemia, malarial anemia, and acute leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2001:479-98.
4. Shaji RV, Eunice SE, Baidya S, Srivastava A, Chandy M. Determination of the breakpoint and molecular diagnosis of a common alpha-thalassaemia-1deletion in the Indian population. Br J Haematol. 2003;123(5):942-7.
5. ClarkBE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. Clin Lab Haem. 2004; 26:159-76.
6. Fei YJ, Oner R, Bozkurt G, Gu LH, Altay C, Gurgey A, et al. Hb H disease caused by a homozygosity for the AATAAA-->AATAAG mutation in the polyadenylation site of the alpha 2-globin gene: hematological observations. Acta Haematol. 1992; 88(2-3):82-5.
7. Orkin SH, Goff SC, Hechtman RL. Mutation in an intervening sequence splice junction in man. Proc Natl Acad Sci. 1981;

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-12-14]

78(8):5041-5.
8. Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. Orphanet J Rare Dis. 2010; 5(13):1-22.
9. Phillips JA 3rd, Scott AF, Smith KD, Young KE, Lightbody KL, Jiji RM, et al. A molecular basis for hemoglobin-H disease in American blacks. Blood. 1979; 54(6):1439-45.
10. Oner C, Gürgey A, Oner R, Balkan H, Gümrük F, Baysal E, et al. The molecular basis of Hb H disease in Turkey. Hemoglobin. 1997; 21(1):41-51.
11. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. Blood. 1989; 73(5):1081-104.
12. Lam YH, Ghosh A, tang MH, Lee CP, sin SY. Second trimester hydrops fetalis in pregnancies affected by homozygous alpha-thalassemia-1. Prenat Diagn. 1997; 17:267-9.
13. Miller SA, Dg Kes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988; 16(3):1215.
14. .Hadavi V, Taromchi A, Malekpour M, Gholami B, Law H, Almadani N, et al. Elucidating the spectrum of α-thalassemia mutations in Iran. Haematologica. 2007; 92(7):992-3.
15. Hadavi V, Jafroodi M, Hafezi-Nejad N, Moghadam SD, Eskandari F, Tarashohi S, et al. Alpha-thalassemia mutations in Gilan Province, North Iran. Hemoglobin. 2009; 33(3):235-41.
16. Tamaddoni A, Hadavi V, Nejad NH, Khosh-Ain A, Siami R, Aghai-Meibodi J, et al. alpha-Thalassemia mutation analyses in Mazandaran province, North Iran. Hemoglobin. 2009; 33(2):115-23.
17. Lacerra G, Musollino G, Di Noce F, Prezioso R,Carestia C.Genotyping for known Mediterranean alpha-thalassemia point mutations using a multiplex amplification refractory mutation system. Haematologica. 2007; 92:254-5.
18. Abu-Ghoush Mw. Subtypes of alpha thalassemia diagnosed at a medical center in Jordan. TAF Prev Med Bull. 2008;7(5):373-6.
19. Hamamy HA, Al-Allawi NA. Epidemiological profile of common haemoglobinopathies in Arab countries. J Community Genet. 2013;4:147-67.
20. Durmaz AA, Akin H, Ekmekci AY, Onay H, Durmaz B, Cogulu O, et al. A severe alpha thalassemia case compound heterozygous for Hb Adana in alpha1 gene and 20.5 kb double gene deletion. J Pediatr Hematol Oncol. 2009; 31(8):592-4.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-12-14]

Molecular analysis of alpha globin genes non deletional mutations in alpha thalassemia patients in Kermanshah province

* **Reza Alibakhshi,** Assistant Professor of Medical Genetics, Dept of Biochemistry, School of Medicine and Nano Drug Delivery Research Centre, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran (*Corresponding author). ralibakhshi@kums.ac.ir
Somayeh Khalegi, MSc. Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran. s_kh_61@yahoo.com
Reza Akramipour, Associate Profesor of pediatric hematology and oncology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. akramipour20@ kums.ac.ir
Seyed Kazem Bidoki, Assistant Professor of Genetics, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran. drbidoki@yahoo.com

Abstract

Background: Alpha thalassemia is a single gene disorder, inherited in an autosomal recessive manner. The thalassemia occurs mostly in peoples from the Mediterranean to Southeast Asia. The present study was aimed to identify the prevalence of nondeletional Alpha thalassemia mutations in our samples in the Kermanshah province.

Methods: This study included Alpha thalassemia individuals who had referred to Medical Genetics Laboratory, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran, between March 2009 and February 2011. Subjects were from different geographic areas of Kermanshah province in the west of Iran.

Forty patients were selected upon having red cell indices suggestive of non deletional alpha thalassemia carrier status (MCV<80 fl and MCH<27pg, normal or slightly reduced HbA2 and HbF) after ß- thalassemia, iron deficiency and deletional Alpha thalassemia were excluded. Blood samples were collected, and genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes by salting out procedure. DNA analyses were performed using Amplification Refractory Mutation System (ARMS). Sequence analysis was applied for DNA samples when no mutation was detected with ARMS.

Results: Six different types of mutations were determined in 39 subjects of 40 individuals.

The most common Alpha-thalassemia mutation is α^{polyA4} which comprises 37.5% of the total mutations, followed by α^{-5nt} (35%) and α^{polyA6} (17.5%).

DNA sequencing of the amplified a-globin genes revealed Hb Adana, Alpha1+1mRNA and alpha2+832 (G>A) point mutations.

Conclusions: This is the first comprehensive study in this region. The results of the study can be also applied for the genetic counseling, population screening and prenatal diagnosis.

Keywords: Iran, Nondeletional alpha thalassemia, Sequencing, Kermanshah

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-12-14]