# موتاسیون‌های نادر و کم‌شیوع بتاتالاسمی در استان قزوین-ایران

*دکتر محمدرضا ساروخانی[I]
محمدحسین احمدی[II]
دکتر ناصر امیری‌زاده[III]

## چکیده

**زمینه و هدف:** حدود ۱۳ موتاسیون بتاگلوبین، ۹۰-۷۰٪ طیف ملکولی تالاسمی‌ها را در ایران تشکیل می‌دهند که به نام موتاسیون‌های شایع بتاگلوبین خوانده می‌شوند. مابقی موتاسیون‌ها به نام نادر یا ناشناخته معروف هستند. هدف از این مطالعه شناسایی و توصیف موتاسیون‌های نادر و کم شیوع بتاگلوبین در استان قزوین می‌باشد.

**روش بررسی:** در یک مطالعه توصیفی- تحلیلی از ۱۰۰ بیمار تالاسمی ماژور وابسته به انتقال خون مراجعه‌کننده به بیمارستان قدس قزوین، نمونه خون وریدی روی ضدانعقاد EDTA جمع‌آوری شد. سن، جنس، نژاد، تاریخچه بیماری و وجود خویشاوندی بین والدین از پرونده بیماران اقتباس شد. غربالگری موتاسیون‌های متداول روی DNA استخراج شده از گلبول‌های سفید بیماران با استفاده از تکنیک ARMS صورت گرفت، ولی برای تعیین سایر موتاسیون‌های ژن بتاگلوبین روی نمونه‌های DNA که با روش ARMS موتاسیونی نداشتند از روش تعیین ترادف مستقیم استفاده شد. میانگین آماری آلل ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS V.13.5 محاسبه گردید.

**یافته‌ها:** ۸۵/۹٪ آلل‌ها با روش ARMS تعیین گردیدند، اما ۱۴/۹٪ مابقی آلل‌ها در روش تعیین ترادف مستقیم تعیین گردیدند. ۲۰ نوع موتاسیون مختلف در این مطالعه دو مرحله‌ای شناسایی شدند (۱۱ نوع موتاسیون با روش ARMS و ۹ نوع با روش تعیین ترادف). سه نوع آلل فراوان (IVS-II-I، IVS-I-110 و FSC8/9)، ۵۹/۳٪ موتاسیون‌ها را تشکیل می‌دهند. IVS-II-1 با فراوانی ۳۱/۳٪ فراوان‌ترین آلل بود، در حالی که موتاسیون‌های nt-30، IVS-I-6، Cd5، IVS-II-745، 5'UTR، Cd15، Cd39، IVSI-130، Cd24، HbS،Cd74/75 و Hb Monroe، هر یک با فراوانی حدود ۱ درصد و یا کمتر، کمترین نوع آلل‌ها بودند.

**نتیجه‌گیری:** آنالیز ملکولی ژن‌های بتاگلوبین در قزوین مؤید وجود تعداد زیادی موتاسیون‌های نادر مسؤول بیماری، علاوه بر موتاسیون‌های متداول در این منطقه می‌باشند. در این مطالعه وجود ۸ نوع آلل موتاسیون نادر نشان داده شد که دو موردآن‌ها برای اولین بار در ایران گزارش می‌گردند (Hb Monroe ،Cd 74/75).

**کلیدواژه‌ها:** ۱- موتاسیون‌های نادر تالاسمی ۲- ژن بتاگلوبین ۳- تعیین ترادف

**تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۱۶، تاریخ پذیرش: ۸۷/۹/۱۲**

## مقدمه

بتاتالاسمی، شایع‌ترین بیماری تک‌ژنی اتوزومی در جهان محسوب می‌شود که در بیش از ٦٠ کشور دنیا وجود دارد. جمعیت حاملین ژن (کریرها) حدوداً ۲۰۰-۱۵۰ میلیون نفر و یا ٤/٥ درصد جمعیت جهان را تشکیل می‌دهد و حداقل ۳۰۰ هزار نفر افراد درگیر هموزیگوت سالانه متولد می‌شوند.[۱و۲]

کشور ایران با داشتن بیش از ۱۸۰۰۰ بیمار تالاسمی ماژور، یکی از نواحی با شیوع بالای غیرمتداول تالاسمی در جهان محسوب می‌شود. استان‌های حاشیه خلیج فارس و دریای خزر با فراوانی ژنی بیش از ۱۰ درصد، از اصلی‌ترین نواحی تالاسمی خیز کشور محسوب می‌شوند.[۳و٤]

بیماری تالاسمی ناشی از بروز یک یا چند موتاسیون از حدود ۲۰۰ نوع اختلالی است که می‌توانند در ژن زنجیره بتاگلوبین (HBB) رخ دهند. لذا، بر خلاف تصور موتاسیون‌های فراوانی در ایجاد بیماری مداخله دارند که در کشور ایران حداقل ٤٣ نوع مختلف ازآن‌ها شناسایی شده‌اند؛اما در هر استانی تعداد ویژه و یا به عبارتی طیف مشخصی از این موتاسیون‌ها وجود دارند که تعدادی از این موتاسیون‌ها شایع و تعداد زیادی نادرند.[۳-۵] بررسی و شناسایی موتاسیون‌های نادر و یا جدید در فرایندهای غربالگری جمعیتی، مشاوره ژنتیکی و تشخیص قبل از تولد تالاسمی‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است.

این مطالعه تحت حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین به انجام رسیده است.

I) دانشیار و متخصص بیوتکنولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی قزوین، قزوین، ایران (*مؤلف مسؤول)
II) فوق لیسانس هماتولوژی، مربی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی قزوین، قزوین، ایران
III) استادیار و متخصص هماتولوژی، سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران

در ایران ۱۳ نوع موتاسیون بتا گلوبین، حدود ۹۰-۷۰ درصد طیف ملکولی تالاسمی‌ها را تشکیل می‌دهند که موتاسیون‌های شایع بتاگلوبین محسوب می‌شوند.[۵] مابقی موتاسیون‌ها به نام نادر یا ناشناخته خوانده می‌شوند. قزوین استان کوچکی با جمعیت حدود ۱/۲ میلیون نفر در شمال ایران در حد فاصل استان‌های تهران، گیلان، مازندران، زنجان و همدان قرار دارد. این مطالعه با هدف آنالیز موتاسیون‌های نادر و یا غیرمتداول ژن بتاگلوبین در این استان طراحی گردیده است.

## روش بررسی

در این مطالعه که به روش توصیفی –تحلیلی انجام شد ، از ۱۰۰ بیمار تالاسمی ماژور وابسته به انتقال خون مراجعه کننده به مرکز طبی کودکان قدس قزوین، نمونه خون وریدی روی ضد انعقاد EDTA و درست قبل از تزریق خون گرفته شد.

۹ نفر از این بیماران دارای برادر یا خواهر مبتلا بودند. از پرونده بیماران اطلاعاتی مانند سن، جنس، دوره و شروع انتقال خون و وجود هم‌خونی (ازدواج فامیلی والدین)، پس از کسب اجازه از شرکت کنندگان (و یا والدین آن‌ها)، به دست آمد.

DNA گلبول‌های سفید خون اخذ شده با روش استاندارد استخراج[۶] و تا زمان آنالیز در فریزر منهای ۷۰ درجه نگهداری شد.در مرحله اول مطالعه، نمونه ها از نظر ۱۳ موتاسیون شایع بتاگلوبین در منطقه خاورمیانه با استفاده از تکنیک سیستم تعیین موتاسیون مقاوم به تکثیر (ARMS) مورد بررسی قرار گرفتند.[۷] در مرحله دوم مطالعه، تعداد ۱۳ نمونه که با استفاده از این روش منفی بودند، مورد تعیین ترادف ژن بتاگلوبین قرار گرفتند.

جهت شناسایی این آلل‌های غیرشایع تالاسمی، دو ناحیه از ژن بتاگلوبین نمونه‌های مربوطه، با استفاده از دو سری پرایمر (به نام‌های پرایمرهای سنس و آنتی‌سنس و F و نیز پرایمر R به ترتیب برای قطعات ۱ و ۲) مورد تکثیر قرار گرفتند (توالی پرایمرها در جدول شماره ۱ آمده است).

این دو قطعه قسمت‌های ابتدایی، اگزون I، اینترون I اگزون II و اینترون II ژن بتاگلوبین را شامل می‌شوند.[۸] پرایمرهای مربوطه در کمپانی ATG کپنهاگ دانمارک سنتز گردیدند. دو قطعه حاصل از تکثیر توسط پرایمرهای مذکور (به ترتیب با طول ۸۵۰ bP و ۵۰۰ bP)، اکثریت نواحی موتاسیون یافته ویژه جمعیت مدیترانه‌ای را شامل می‌شوند.

پس از تکثیر، محصولات PCR با استفاده از کیت خالص سازی شرکت ABI مورد تخلیص قرار گرفتند. نمونه‌های خالص شده با استفاده از روش ختم زنجیره سانگر مورد تعیین سکانس قرار گرفتند[۹] که این فرایند با استفاده از دستگاه اتومات تعیین ترادف ABI 3730 XL کمپانی Applied Biosystem آمریکا و مطابق دستور شرکت سازنده انجام شد.

مقایسه نتایج ترادف با سکانس‌های ژن طبیعی بتاگلوبین، با استفاده از نرم‌افزار Gene runner صورت پذیرفت. محاسبه اطلاعات دموگرافیک و فراوانی آلل‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش 13.5 صورت پذیرفت.

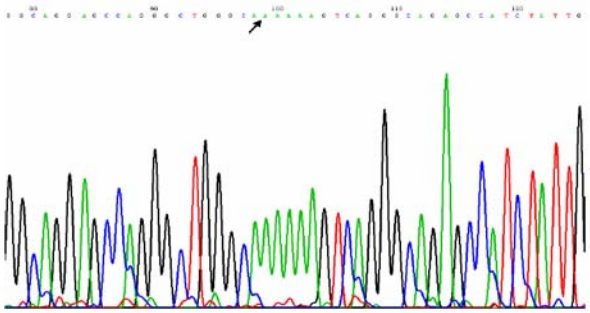
**جدول شماره ۱**- پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی مورد استفاده در تعیین ترادف موتاسیون‌ها

| | |
|---|---|
| Sequencing primer Sense | 5′-TTGAGGATTCGGTCACGGTCTTCT-3′ |
| Sequencing primer Anti sense | 5′-TTTTCCCTTACACCCTCCAGTCAC -3′ |
| Sequencing primer F | 5′-CTTAGGCTGCTGGTGGTCTACC-3′ |
| Sequencing primer R | 5′-AGCACTTTCTTGCCATGAGCC-3′ |

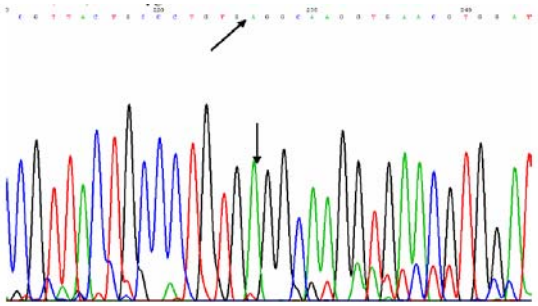
## یافته‌ها

۸۷ مورد از بیماران غیرخویشاوند با روش ARMS شناسایی شدند، اما ۱۳ مورد دیگر از بیماران غیرخویشاوند با روش تعیین ترادف مستقیم احراز هویت گردیدند (کروماتوگرام برخی از موتاسیون‌های نادر مربوطه در شکل شماره ۱ آورده شده‌اند). ۲۰ نوع موتاسیون مختلف

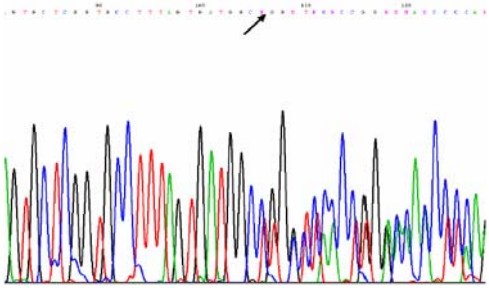
در دو مرحله مطالعه کشف گردیدند و ۳۷ ترکیب مختلف از آلل‌ها (ژنوتیپ‌های متفاوت) شناسایی گردیدند.



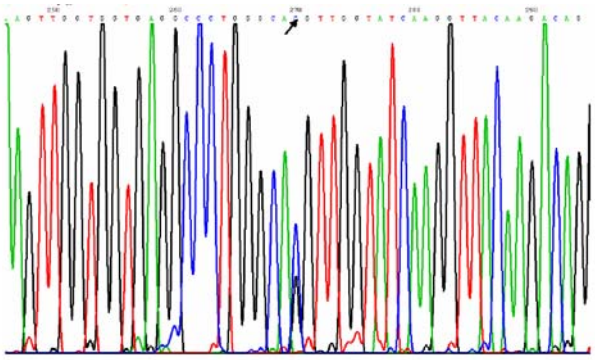
موتاسیون nt-30: تغییر T به A در ناحیه پروموتر (اشکال در نسخه‌برداری) در بیمار هموزیگوت



موتاسیون Cd15: جایگزینی G به A درکدون ۱۵و تبدیل کدون تریپتوفان به Stop در بیمار هموزیگوت



موتاسیون کدون۷۴/۷۵: حذف C در نوکلئوتید آخر کدون ۷٤ که ایجاد تغییر قاب در کدون‌های بعدی می‌کند (بیمار هتروزیگوت)



موتاسیون هموگلوبین مونرو:جابه جایی G با C در آخرین نوکلئوتید اگزون یک بتاگلوبین که آخرین نوکلئوتیدپپتید بتاگلوبین نیز هست (بیمارهتروزیگوت)

**شکل شماره ۱**- ترادف‌های به دست آمده از دستگاه اتومات تعیین سکانس برخی از نمونه‌هایی که با روش ARMS شناسایی نشده‌اند.

انواع موتاسیون‌های مختلف بیماران غیرخویشاوند تالاسمی وابسته به خون استان قزوین (۹۱ بیمار) برحسب میزان شیوع آن‌ها در جدول شماره ۲، آورده شده‌اند.

بر مبنای این نتایج، سه آلل اصلی (IVS-II-1، IVS-I-110 و FSC8/9)، مسؤول ۵۹/۳٪ از موتاسیون‌ها می‌باشند. IVS-II-1 فراوان‌ترین آلل با فرکانس ۳۱/۳٪ بوده و IVS-I-110 (با فراوانی ۱۹/۲٪) و FSC 8/9 (با فراوانی ۸/۸٪) در رده‌های بعدی قرار دارند. این در حالی است که موتاسیون‌های nt-30، IVS-I-6، Cd5، IVS-II-745، 5'UTR، Cd15، Cd39، IVS-I-130، Cd24، Cd74/75، HbS و Hb Monroe با کمترین میزان (حدود ۱ درصد و یا کمتر) در این منطقه وجود دارند. در مجموع انواع موتاسیون‌های کم‌شیوع و نادر، ۱٤/۸۵٪ موتاسیون‌ها را شامل می‌شوند (جدول شماره ۲). در یک بیمار (۲ آلل) موتاسیونی به دست نیامد.

**جدول شماره ۲**- فراوانی انواع موتاسیون‌های تالاسمی در بیماران تالاسمی ماژور استان قزوین

| میزان شیوع | نوع موتاسیون | تعداد | درصد |
|---|---|---|---|
| شیوع بالا | Ivs 2/1 | ۵۷ | ٪۵۹/۳ |
| | Ivs 1/110 | ۳۵ | |
| | Fsc 8/9 | ۱٦ | |
| شیوع متوسط | Codon 30 | ۹ | ٪۲۵/۸۵ |
| | Codon 44 | ۱۱ | |
| | Ivs 1/5 | ۱۰ | |
| | Fsc 36/37 | ۹ | |
| | Ivs 1/1 | ۸ | |
| | nt -30 | ٤ | |
| شیوع کم | Ivs 1/6 | ۳ | ٪۱۲ |
| | Codon 5 | ۳ | |
| | Ivs 2/745 | ۲ | |
| | 5 UTR | ۲ | |
| | Codon 15 | ۲ | |
| | Codon 39 | ۲ | |
| | Ivs 1/130 | ۲ | |
| | No mutation in beta globin | ۲ | |
| نادر | Codon 24 | ۱ | ٪۲/۷۵ |
| | Codon 74/75 | ۱ | |
| | Sickle-thalassemia | ۱ | |
| | Hb Monroe | ۲ | |
| جمع | ۲۰ | ۱۸۲ | ٪۱۰۰ |

## بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که به علت اختلاط شدید قومیتی (ژنتیکی)، و وجود گنجینه غنی ژنتیکی در استان کوچک و با مساحت کم نظیر قزوین که در بخش مقدمه به آن اشاره شد، توزیع موتاسیون‌های با وفور کم و یا نادر تالاسمی گستردگی زیادی دارد. دو نوع از این موتاسیون‌ها منحصر به فرد در استان قزوین بوده و در هیچ یک از استان‌های دیگر کشور مشاهده نمی‌شود.

بررسی انواع مختلف موتاسیون‌های نادر در این مطالعه نکات ویژه‌ای را نشان می‌دهند که در ادامه به آن‌ها پرداخته می‌شود:

موتاسیون نوکلئوتید منهای ۳۰ (nt-30) (تغییر A به T) به عنوان یک موتاسیون منطقه نسخه‌برداری، اصولاً یک جهش نادر و با فراوانی ۰/۱۵٪ در ایران قلمداد می‌شود.[۱۰] جالب این که این جهش دارای منشاء ترکی- ایرانی بوده[۱۱] و با فنوتیپ $\beta^+$ و تظاهرات بالینی تالاسمی اینترمدیا و یا حتی بدون تظاهرات می‌باشد.[۱۲و۱۳] در مطالعه حاضر نیز هر دو بیمار با این موتاسیون دارای ژنوتیپ هموزیگوت و قومیت ترک بوده و تظاهرات بالینی تالاسمی اینترمدیا را بروز می‌دهند.

موتاسیون ناحیه کلاهک 5'UTR (+22) (با تغییر G به A) در ایران بسیار نادر (۰/۰۴٪) بوده[۱۰و۱۱] و در قومیت‌های ترک مشاهده می‌شود. در فرم هموزیگوت، بیماری با تظاهرات تالاسمی اینترمدیا جلوه‌گر می‌شود. اما در مطالعه حاضر هر دو آلل این جهش در تلفیق با دو موتاسیون دیگر (ژنوتیپ‌های 5'UTR/IVS-I-5 و 5'UTR/FSC8/9) به توارث رسیده که در هر دو مورد تظاهرات تالاسمی ماژور مشاهده می‌شوند.

موتاسیون کدون ۱۵ (تبدیل کدون TGG به کدون TGA که یک کدون بی‌معنی و یا کدون ختم می‌باشد) در سه مورد توسط نجم آبادی و همکاران در ایران گزارش شده است (نوع پرتغالی آن و البته محقق فوق یک آلل آسیایی- هندی این موتاسیون را هم گزارش نموده است).[۱۱] شیوع کلی این موتاسیون در ایران ۰/۱۱٪ می‌باشد.[۱۰] در مطالعه جاری فرم پرتغالی این موتاسیون در حالت هموزیگوت در یک بیمار با قومیت ترک تعیین گردیده است.

جهش IVS-I-130 (تغییر G به C) با منشاء ترکی- ایرانی به عنوان فراوان‌ترین نوع موتاسیون‌های نادر توسط محققین مختلف شامل نجم‌آبادی و همکاران (۱۱ آلل)، رحیم و همکاران (۱ آلل) و رودکنار و همکاران (٤ آلل) در ایران گزارش شده است[۱۱،۵و۱٤] و یاوریان شیوع آن را در ایران برابر ۰/٤۱٪ می‌داند.[۱۰] در مطالعه حاضر این جهش در دو بیمار و هر دو با قومیت ترک و به صورت هتروزیگوت تلفیقی (ژنوتیپ‌های IVS-I-1 / IVS-I-130 و IVS-I-130 / FSC8/9) ملاحظه شد.

جهش حذفی کدون ۲٤ (تغییر کدون GGT به GT-) با شیوع بسیار نادر (۰/۰٤٪) در ایران گزارش می‌گردد.[۱۰و۱۱] در این بررسی نیز تنها یک آلل از این جهش و در ترکیب با موتاسیون کدون ۳۰ (ژنوتیپ Cd24 / Cd30) به دست آمد. HbS (تغییر GAG به GTG) که منجر به جابه جایی اسید گلوتامیک با والین می‌شود، هموگلوبینوپاتی شایعی در جنوب ایران است.[۱۵] این اختلال با انواع مختلف موتاسیون‌های تالاسمی می‌تواند توأم شود و لذا در گروه سندروم‌های تالاسمی طبقه‌بندی می‌گردد (حالات هتروزیگوت دوگانه و یا سیکل سل تالاسمی). طبق اطلاعات موجود این حالات در شمال ایران در بررسی پژوهش های مختلف گزارش نشده است.

در مطالعه حاضر وضعیت فوق به شکل ژنوتیپ HbS / FSC8/9 مشاهده شد که فنوتیپ شدید تالاسمی ماژور را در بیمار موجب شده است (جهت احتراز از اشتباه با موتاسیون‌های تالاسمی در جدول شماره ۲ به صورت Sickle-thalassemia آورده شد). مشابه چنین حالتی توسط رحیمی در جنوب ایران گزارش شده است.[۱۵]

Hb Monroe یا beta30 IVSI (-1) (تغییر G به C) از موتاسیون ناحیه چسبیدن در آخرین نوکلئوتید اگزون I

بتاگلوبین، که خود نیز آخرین نوکلئوتید کدون ۳۰ پپتید بتاگلوبین می‌باشد (تبدیل AGG به ACG که با تغییر Arg به Thr توام است)، حاصل می‌شود. به دنبال اولین گزارش Hb Monroe در سال ۱۹۸۹، میزان گزارش شیوع آن کم بوده و بیشتر گزارش‌ها به صورت هتروزیگوت ترکیبی با دیگر موتاسیون‌های بتاگلوبین بوده است.[۱۶] در این مطالعه، این اختلال با موتاسیون IVS-II-1 به توارث رسیده است (کروماتوگرام مربوط به Hb Monroe در آخرین کروماتوگرام شکل شماره ۱ آورده شده است). بررسی منابع مختلف از وجود چنین موتاسیون و یا ژنوتیپی در ایران خبر نداده‌اند.[۱۱،۱۰،۵و۱۷]

جهش کدون 74/75 (GGC CTG to GG - CTG) نوعی موتاسیون تغییر قاب خواندن با وفور بسیار کم در دنیااست و با فنوتیپ $\beta^{\circ}$ می‌باشد که در گروه‌های با نژاد ترک دیده شده است.[۱۲]

یک مورد از این جهش به صورت ترکیب با موتاسیون کدون ۵ (Cd74/75 / Cd5) در این بررسی کشف گردید که مطابق اطلاعات به دست آمده، اولین گزارش آن در ایران بوده و هیچ محققی در گزارش‌های مروری تالاسمی در ایران آن را گزارش ننموده است.

از محدودیت‌های این مطالعه اینکه جهت بررسی یافته‌های فنوتیپی با ژنوتیپی توصیف شده در فوق لازم بود پلی‌مورفیسم Xmn I روی نمونه‌های این پژوهش صورت بگیرد که مقدور نگردید. در ضمن در یک بیمار علی‌رغم داشتن تظاهرات تالاسمی ماژور هیچ گونه موتاسیونی در هر دو آلل ژن بتاگلوبین به دست نیامد (no mutation in beta globin gene) ، که لازم است این مورد تحت بررسی‌های بیشتری به ویژه در نواحی کنترل لوکوس (LCR_Locus Control Region) ژن بتاگلوبین قرار گیرد.

به طور اجمال باید متذکر شد که تنوع فوق العاده موتاسیون‌های بتاتالاسمی در منطقه کوچکی نظیر استان قزوین رد پای بسیاری از مهاجرت‌های جمعیتی را نشان می‌دهد.

## نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان داد که فراوانی موتاسیون‌های تالاسمی در استان قزوین با آنچه در کل کشور مشاهده می‌شود، تفاوت دارد. در این بررسی ترکیبات متعددی از آلل‌های تالاسمی به دست آمد که می‌توانند در تفهیم مکانیسم‌های ملکولی موجد بیماری حائز اهمیت باشند. در نهایت در این مطالعه چندین موتاسیون نادر در منطقه کشف گردید که دو تا از آن‌ها برای اولین بار در کشور ارائه می‌شوند.

## تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین به انجام رسیده است و بدین وسیله نویسندگان مقاله از مسؤولین محترم کمال سپاسگزاری را دارند (قرارداد شماره ۲۸/۲۰/۲۵۹۰). همچنین از مساعدت‌های تکنیکی جناب آقای فرشاد فروغی قدردانی می‌گردد.

## فهرست منابع

1-Kawthalklar SM. Anemia due to red cell destruction.In:Kawthalkar SM. Essentials of haematology. 1st ed. India: Jaypee Brothers Medical Publishers Co; 2006.p.140-147.

2- Old JM, Vorawalla NY, Weatherall DJ.Rapid detection and prenatal diagnosis of β-thalassemia. Lancet 1990; 6(336): 834-7.

3- Najmabadi H, Neishabury M, Sahebjam F, Kharazi K, Shafaghati Y, Nikzat N, et al. IHMGB. Human Mutat 2003; 21 (2):146-150.

4- Derakhshandeh Peyker P, Akhavan Niaki H, Tamaddoni A, Ghavidel-Parsa S, Holakouei Naeini K, Rahmani M, et al. Distribution of β-thalassemia mutations in the northern provinces of Iran. Hemoglobin, 2007; 31(3): 351-356.

5- Roudkanar MH, Najmabadi H, Derakhshandeh P, Farhud DD. Detection of rare and unknown mutations in

β-thalassemia traits in Iran. IJPH 2003; 32(1): 11-14.

6- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Res 1998; 16(3): 1215-1216.

7- Najmabadi H, Teimourian S, Khatibi T, Neishabouri M, Pour Farzad F, Jalil-nejad S, et al. Amplification refractory mutation system (ARMS) and reverse hybridization, in the detection of β-thalassemia mutations. Arch Iran Med 2001; 4(4): 165-170.

8- Mirasena S, Shimbhu D, Sanguansermsri M, Sanguansermsri T. The spectrum of β-thalassemia mutations in Phitsanulok province: Development of multiplex ARMS for mutation Detection. Naresuan Univ. J 2007; 15(1): 43-53.

9-Sanger F. DNA sequencing with chain termination inhibitors. Proc Natl Acad Sci 1997; 74(12): 5463-67.

10- Yavarian (M). Leiden university library (Netherlands); 26 Jan 2005-[cited 2005] Hemoglobinopathies in Iran; Molecular spectrum, Prevention and Treatment. Available from: http://hdl.handle.net/1887/3728. html files updated monthly. Accessed Feb 2, 2007.

11- Najmabadi H, Pour Fathallah AA, Neishbury M, Sahebjam F, Krugluger W, Oberkanins C. Rare and unexpected mutations among Iranian β-thalassemia patients and prenatal samples discovered by reverse-hybridization and DNA sequencing. Hematologica 2002; 87(10): 1113-4.

12- Altay C. The frequency and distribution pattern of β-thalassemia mutations in Turkey. Turk J Haematol 2002; 19(2): 309-315.

13 - Oner AF, Ozer R, Uner A, Arslan S, Gumruk F. Beta thalassemia mutations in the East of Turkey. Turk J Haematol 2001; 18(4): 239-242.

14- Rahim F, Keikhaei B, Abrumeud M. Prenatal diagnosis (PND) of β-thalassemia in the Khuzestan province, Iran. JCDR . 2007; 1( 6): 454-9.

15- Rahimi Z, Vaisi Raygani A, Merat M, Haghshenass N, Gerard RL, Nagel R.. Thalassemia mutations in southern Iran. Iran J Med Sci 2006; 31(2): 70-73.

16-Agarwal N, Kutlar F, Mojica-Henshaw MP, Ou CN, Gaikwad A, Scott Reading N, et al. Missence mutation of the last nucleotide of exon 1 (G to C) of beta-globin gene not only leads to undetectable mutant peptide and transcript but also interferes with the expression of wild allele. Haematologica 2007; 92(12): 1715-6.

17- Najmabadi H, Karimi Nejad R, Saheb Jam S, Poufarzad F, Teimourian S ,Sahebjam F, et al. The β-thalassemia mutation spectrum in the Iranian population. Hemoglobin 2001; 25(3): 285-96.

# Rare and Unexpected Beta Thalassemic Mutations in Qazvin Province of Iran

***M.R. Sarookhani, PhD[I] M.H. Ahmadi, MSc[II]**
**N. Amirizadeh, PhD[III]**

## Abstract

**Background and Aim:** About 13 beta-globin mutations encompass 70-90% of the mutation spectrum in Iran. These mutations are called common beta-globin mutations. The rest are rare or unknown mutations. The objective of this study was to identify the rare or unknown beta-globin mutations in Qazvin province.

**Materials and Methods:** In this descriptive-analytic study, EDTA-containing venous blood samples were collected from 100 patients with transfusion-dependent beta-thalassemia referring to Qods hospital of Qazvin. Age, sex, ethnicity, history and consanguinity between parents were recorded by reviewing the patients files. Screening for causal mutations was carried out on DNA isolated from WBCs of the patients by using ARMS technique. To explore the other mutations in the beta globin gene, direct sequencing analysis was applied for DNA samples when no mutation was detected with ARMS. For data analysis SPSS V. 13.5 was used.

**Results:** Based on the results, 85.9% of alleles were identified by ARMS technique, while direct sequencing uncovered the remaining alleles (14.1%). Total 20 different mutations discovered by this two-step approach (11 mutations with ARMS and 9 mutations with sequencing). Abundant alleles (IVS-II-1, IVS-I-110, FSC8/9) accounted for 59.3 % of the mutations. IVS-II-1 with a frequency of 31.3% was the most common, while nt-30, IVS-I-6, Cd5, IVS-II-745, 5´ UTR, Cd15, Cd39, IVS-I-130, Cd24, Cd74/75, HbS and Hb Monroe mutations were observed with the least frequency (each about 1% or less).

**Conclusion:** Molecular analysis of beta thalassemia has shown that in addition to the common mutations, many rare beta-globin mutations responsible for the disease are present in the Qazvin population.We have revealed the existence of 8 rare mutations from Qazvin, two of which (Cd74/75 and Hb Monroe) are the first reported in Iran.

**Key Words: 1) Rare thalassemia mutations 2) Beta globin gene 3) Direct sequencing**

*This study has been conducted under the financial support of the Deputy of Research of Qazvin University of Medical Sciences and Health Services.*

***I)*** *Associate Professor of Biotechnology, Faculty of Public Health, Qazvin University of Medical Sciences and Health Services, Qazvin, Iran(* Corresponding Author)*
***II)*** *MSc in Hematology, Instructor, Qazvin University of Medical Sciences and Health Services, Qazvin, Iran*
***III)*** *Assistant Professor of Hematology, Iranian Blood Transfusion Organization, Tehran, Iran*