Original Paper

Prevalence of common point mutations of alpha globin gene in Babol, Iran (2005-09)

**Akhavan-Niaki H (PhD)*[1], Pourtaghi M (MD)[2], Firouzjahi AR (MD)[3]
Banihashemi A (BSc)[4], Sedaghat S (MD)[5]**

[1]Associate Professor, Department of Genetics, Cellular and Molecular Biology Research Center and Genetic Laboratory of Amirkola Children Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran. [2]Pathologist, Department of Pathology, Shahid Beheshti Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran. [3]Assistant Professor, Department of Pathology, Shahid Beheshti Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran. [4]BSc in Laboratory Sciences, Amirkola Genetic Laboratory, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran. [5]Assistant Professor, Department of Hematology, Ayatollah Roohani Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

Abstract

Background and Objective: Alpha thalassemia is one of the most common hemoglobin disorders. Some combination of alpha globin gene mutations may cause HbH disease with severe anemia or intermediate thalassemia. genotype common deletions are routinely tested for suspicious alpha thalassemia couples but because of lack of information about the nature and frequency of point mutations and higher expenosor of sequencing, less attention was paid to them. This study was done to determine the prevalence of common point mutations of alpha globin gene in Babol, Iran.

Materials and Methods: This descriptive study was carried out on DNA of 153 adult suspected to α-thalasemia with deleted α- golobolin gene referred to genetic laboratory in Babol, Iran during 2005-09. α1 and α2 genes were amplified by using specific biotinilated primers by PCR method. PCR products were assayed using 11 specific probs corresponding to common point mutations in alpha gene (C19, IVSI (-5nt), C59, Hb constant spring, Hb Icaria, Hb seal Rock, IVSI (148), C14, poly A (-2bp), poly A2, Poly A1) and fixed on byodine C membrabe. Hybridization between the probes and PCR products was visualized after a colorimetric reaction using of conjugated streptavidin peroxidase and TMB (tetra methyle Benzidine) and H^2O^2.

Results: The prevalence of point mutations in poly A2, 5nt, Hb constant spring and poly A1 were 28.75%, 14.38%, 7.84% and 2.61%, respectively.

Conclusion: Point mutation in alpha globin genes was detected in %53.60 out of 153 adults suspected with alpha thalassemia without common deletion mutations.

Keywords: Alpha Thalassemia, Point mutation, Reverse Dot Blot

*** Corresponding Author: Akhavan Niaki H (PhD), E-mail: halehakhavan@yahoo.com**

Received 12 May 2010 **Revised** 2 August 2010 **Accepted** 7 August 2010

This paper should be cited as: Akhavan-Niaki H, Pourtaghi M, Firouzjahi AR, Banihashemi A, Sedaghat S. [Prevalence of common point mutations of alpha globin gene in Babol, Iran (2005-09)]. J Gorgan Uni Med Sci. 2012; 14(1): 75-82. [Article in Persian]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان / بهار ۱۳۹۱ / دوره ۱۴ / شماره ۱ (پی در پی ۴۱) / صفحات ۷۵ تا ۸۲

تحقیقی

فراوانی جهش‌های نقطه‌ای شایع ژن آلفاگلوبین در مراجعین به بیمارستان کودکان امیرکلا بابل (۸۸-۱۳۸۴)

دکتر هاله اخوان نیاکی*[۱]، دکتر مهناز پورتقی[۲]، دکتر علیرضا فیروزجاهی[۳]، علی بنی هاشمی[۴]، دکتر صادق صداقت[۵]

۱- دانشیار گروه ژنتیک ، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بابل ، آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان کودکان امیرکلا دانشگاه علوم پزشکی بابل.

۲- متخصص آسیب شناسی ، دانشگاه علوم پزشکی بابل ، بخش آسیب‌شناسی بیمارستان شهید بهشتی بابل. ۳- استادیار آسیب شناسی ، آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان کودکان امیرکلا، دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۴- کارشناس علوم آزمایشگاهی ، بخش هماتولوژی بیمارستان آیت اله روحانی ، دانشگاه علوم پزشکی بابل.

۵- استادیار هماتولوژی انکولوژی ، بخش هماتولوژی بیمارستان آیت اله روحانی ، دانشگاه علوم پزشکی بابل.

چکیده

زمینه و هدف : *آلفاتالاسمی یکی از اختلالات شایع هموگلوبین می‌باشد. با توجه به ناهمگونی جهش‌ها و پیچیدگی فنوتیپ در آلفاتالاسمی، تعیین دقیق نوع جهش زوجین، تنها روش برای تعیین وضعیت جنین در رابطه با تالاسمی است. حذف‌های شایع در این ژن برای زوجین مشکوک به طور روتین مورد بررسی قرار می‌گیرد؛ اما جهش‌های نقطه‌ای به‌دلیل نداشتن اطلاعات کافی در مورد فراوانی آنها کمتر مورد توجه قرار می‌گیرد. این مطالعه به منظور تعیین فراوانی جهش‌های نقطه‌ای ژن آلفاگلوبین در مراجعین به آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان کودکان امیرکلا بابل انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی روی DNA ۱۵۳ فرد بالغ مشکوک به آلفاتالاسمی مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان امیرکلا بابل که فاقد حذف ژن آلفاگلوبین بودند؛ طی سال‌های ۸۸-۱۳۸٤ انجام شد. بررسی ژنتیکی برای ۱۱ جهش نقطه‌ای ژن آلفاگلوبین C19، IVSI (-5nt)، C59، Hb Constant Spring و Hb Icaria، Hb Seal Rock، Poly A1، Poly A2 و Poly A(-2bp)، C14 و IVSI-148 با استفاده از روش Reverse Dot Blot صورت گرفت.*

یافته‌ها : *فراوانی جهش‌های نقطه‌ای در Poly A2 ۲۸/۷۵درصد، 5nt- ۱۴/۳۸ درصد، CS ۷/۸۴ درصد و Poly A1 ۲/۶۱ درصد مشاهده گردید.*

نتیجه‌گیری : *از ۱۵۳ فرد مشکوک به آلفاتالاسمی که فاقد جهش‌های حذفی شایع بودند؛ برای ۵۳/٦۰درصد آنها جهش نقطه‌ای ژن آلفاگلوبین مشخص شد. با توجه به فراوانی جهش‌های نقطه‌ای ژن آلفاگلوبین در شمال ایران و امکان ایجاد بیماری HbH ، غربالگری این جهش‌ها در زوج‌های مشکوک ضروری است.*

کلید واژه‌ها : *آلفاتالاسمی ، جهش نقطه ای ، Reverse Dot Blot ، ژن آلفاگلوبین*

---

* نویسنده مسؤول : دکتر هاله اخوان نیاکی ، پست الکترونیکی halehakhavan@yahoo.com

نشانی : بابل ، خیابان گنج افروز ، دانشگاه علوم پزشکی بابل ، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی ، تلفن و نمابر ۲۲۳۴۶۵۰ - ۰۱۱۱

وصول مقاله : ۸۹/۲/۲۲ ، اصلاح نهایی : ۸۹/۵/۱۱ ، پذیرش مقاله : ۸۹/۵/۱۶

مقدمه

آلفاتالاسمی یکی از اختلالات شایع هموگلوبین در جهان است و اغلب در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری آسیا، افریقا و مدیترانه مشاهده می‌شود. این اختلال در ایران نیز گزارش شده است (۱و۲). دو ژن آلفاگلوبین بر روی هر کروموزوم ۱۶ قرار دارند. آلفاتالاسمی‌ها عموماً ناشی از حذف ژن بوده و براساس میزان بیان دو ژن آلفاگلوبین طبقه‌بندی می‌شوند. در تلاسمی α0، هر دو ژن آلفاگلوبین یک کروموزوم غیرفعال هستند (/ - -) و در تالاسمی +α، تنها یک ژن معیوب وجود دارد که ناشی از حذف یک ژن آلفاگلوبین (/ α -) و یا به میزان کمتر، در اثر جهش نقطه‌ای یک ژن آلفاگلوبین (/ αT) می‌باشد. اشکال غیرحذفی معمولاً منجر به فنوتیپ‌های شدیدتری می‌شوند (۱۰-۳و۱).

در آلفاتالاسمی، زنجیره‌های β و γ اضافی می‌توانند؛ ترامرهای پایدار هموگلوبین Hb Bart's (γ4) در دوران جنینی و هموگلوبین H (β4) بعد از تولد تشکیل دهند. این هموگلوبین‌ها در گلبول‌های قرمز پیر رسوب می‌کند و باعث همولیز می‌شوند (۱و۳و۸و۱۳-۱۱). Hb Bart's (γ4) که در صورت فقدان کامل زنجیره های آلفاگلوبین (--/--) با هیدروپس فتالیس همراه است؛ با حیات سازگار نمی‌باشد. جنین با ادم شدید، کم‌خونی قابل توجه، هپاتواسپلنومگالی چشمگیر و مرده به دنیا می‌آید. زیرا هموگلوبین Bart's از نظر عملکردی در نقل و انتقال اکسیژن بی‌فایده است و منجر به هیپوکسی شدید جنین می‌شود. بیماری HbH ناشی از حذف سه ژن آلفا و یا حذف دو ژن و جهش نقطه‌ای ژن دیگر آلفاگلوبین می‌باشد (α-/-- یا α Tα / -- یا αTα/--) (۱و۳و۱۴و۱۵).

در اکثر موارد کم‌خونی همولیتیک مزمن همراه با تصویر بالینی تالاسمی اینترمدیا وجود دارد. شدت بیماری HbH در افراد مختلف، متفاوت است و می‌تواند بدون علامت یا دارای علائم آنمی و سرباری آهن و یا اختلال عملکرد چند اندام شود که اختلال عملکرد اعضاء بیشتر با برخی جهش‌های غیرحذفی ژن آلفاگلوبین همراه است (۱و۱۰-۳و۱۶-۱۴).

جهش‌های نقطه‌ای که در صورت هموزیگوتی یا همراهی با جهش‌های حذفی بزرگ ژن آلفاگلوبین می‌توانند منجر به بیماری HbH شوند؛ شامل Hb Constant Spring، IVSI (-5nt)، Poly A1 و Poly A2 می‌باشد (۱۵و۱۹-۱۷) که هر چهار جهش نقطه‌ای در مطالعه جنوب غربی ایران گزارش شده است (۱۷). جهش‌های نقطه‌ای دیگر مانند C19، C59، Hb Icaria، Hb Seal Rock، C14 و IVSI -148 اگرچه در ایران گزارش شده‌اند؛ اما منجر به بروز بیماری HbH نمی‌شوند (۱۷و۲۰و۲۱).

تالاسمی Trait ناشی از تالاسمی α0 هتروزیگوت (αα/--) یا تالاسمی +α هموزیگوت (α-/α-) می‌باشد. در صورت استفاده از روش‌های معمول آزمایشگاهی هیچ نشانه‌ای از عدم تعادل هموگلوبینی، قابل کشف نخواهد بود (۱و۳) و بالاخره در تالاسمی silent (تالاسمی +α هتروزیگوت αα/-α) MCH و / یا MCV ممکن است اندکی کاهش یابند؛ با این وجود در بسیاری مواقع اندکس‌های RBC کاملاً طبیعی هستند (۱و۳و۲۰).

از مطالعات زیادی که یافته‌های خون‌شناسی ژنوتیپ‌های مختلف را مقایسه می‌کند؛ مشخص شده است که با هیچ تست بیوشیمیایی ساده‌ای نمی‌توان آلفاتالاسمی را تشخیص داد (۲۰). براساس نوع جهش آلفاگلوبین، ممکن است کم‌خونی میکروسیتیک وجود داشته باشد و یا فقط درجاتی از میکروسیتوز بدون آنمی ایجاد شود. معمولاً افزایش نسبی در تعداد گلبول‌های قرمز خون نسبت به افراد طبیعی وجود دارد؛ اما هیچ مارکر هماتولوژیک نمی‌تواند به‌طور قطعی آلفاتالاسمی را تشخیص دهد (۱و۳و۱۵و۲۰و۲۱).

با توجه به میزان بالای تالاسمی در ایران و احتمال همزمان به ارث رسیدن آلفا و بتا تالاسمی که می‌تواند گوناگونی زیادی از نظر فنوتیپ ایجاد کند؛ نیاز به تعیین شیوع و توزیع جهش‌های آلفاتالاسمی در نواحی گوناگون کشور احساس می‌شود. دراین مطالعه ۸ جهش نقطه‌ای در ژن α2 و ۳ جهش نقطه‌ای در ژن α1 برای بیماران مشکوک به آلفاتالاسمی که به آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان کودکان امیرکلا وابسته به دانشگاه علوم پزشکی بابل ارجاع شده بودند؛ به روش Reverse Dot Blot (RDB) بررسی شدند. این افراد قبلاً برای حذف‌های شایع ژن آلفاگلوبین به روش GAP-PCR در همین مرکز آزمایش شده بودند.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی ۱۵۳ فرد بالغ شامل ۹۷مرد با میانگین سنی ۵±۲۸ و ۵۶زن با میانگین سنی ۴±۲۳ و انـدکس‌هـای هماتولوژیـک MCV<80fl، MCH<27pg، HbA2 طبیعی و فاقد فقرآهن و غیرباردار (برای زنان) که برای تشخیص نوع جهش ژن آلفاگلوبین از استان‌های مازندران، گیلان، گلستان و خراسان شمالی به آزمایشگاه ژنتیک امیرکلا بابل ارجاع شده و فاقد جهش حذفی ژن آلفاگلوبین بودند؛ طی سال‌های ۸۸-۱۳۸۴ مورد بررسی قرار گرفتند.

تکثیر DNA ژن آلفاگلوبین به روش PCR

پس از استخراج DNA به روش salting out از ۵ml خون محیطی، DNA با استفاده از یک پرایمر بیوتینیله forward مشترک و پرایمرهای بیوتینیله Reverse R1 و R2 به ترتیب برای ژن‌های α1 و α2 به روش PCR تکثیر شد. جهش‌های نقطه‌ای ژن آلفاگلوبین مورد مطالعه در این بررسی و توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های آلفا۱و آلفا۲ گلوبین در جداول ۱ و ۲ آمده است.

جدول ۱ : جهش‌های نقطه‌ای ژن آلفاگلوبین

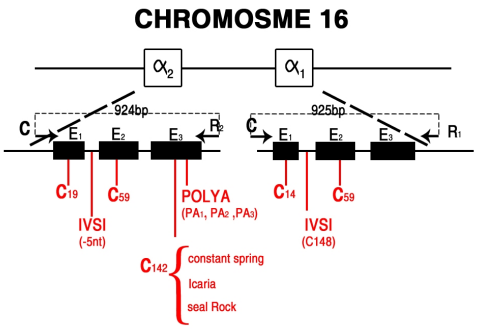
جهش‌های نقطه‌ای ژن α1	*Hb Adana cd 59 GGC→GAC* *IVSI-148 A→G* *Cd 14 T→G*
جهش‌های نقطه‌ای ژن α2	*Hb Icaria cd 142 TAA→AAA* *Hb constant spring cd 142 TAA→CAA* *Hb seal Rock cd 142 TAA→GAA* *Poly A1 AAT AAA→AATAAG* *Poly A2 AATAAA→AATGAA* *Poly A-2bp (AAT AAA→AATA)* *Cd 19 GCG→GC* *IVSI-5nt (del TGAGG)*

جدول ۲ : توالی پرایمرهای forward مشترک و Reverse R1 و R2

پرایمر	توالی
F	*CCAAGC ATAAACCCT GGC GCG CT*
R1	*CCATGC CTG GCA CGT TTG CTG AG*
R2	*AAC ACC TCC ATT GTT GGC ACA TTCC*

هر واکنش PCR در حجم ۵۰µl با حضور ۰/۲µM از هر پرایمـــر، dNTP ۰/۲۵mM و MgCl2 ۱۵/۵mM و ۵µL از x (2) Buffer و DMSO ۲/۵درصـد و ۲/۵units Expand Taq DNA pol از کمپانی Roche و DNA ng ۸۰۰-۲۰۰ ژنومی انجام گرفت.

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Creacon مدل TCY ساخت هلند به صورت زیر تنظیم شد. اولین Denaturation ۹۷درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، سپس ۵ سیکل به صورت ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ثانیه، ۲۵ سیکل به صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه گذاشته شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک درصد با حضور مارکر شماره VIII از کمپانی Roche الکتروفورز شد (شکل یک).



شکل ۱ : شماتیک محل پرایمرهای به کار برده شده در PCR و جهش‌های نقطه‌ای بررسی شده

تعیین جهش به روش Reverse Dot Blot

روش Reverse dot blot روشی سریع و کم‌هزینه و دقیق است که امکان بررسی چندین جهش نقطه‌ای و جهش‌های حذفی شناخته شده را به طور همزمان می‌دهد (۲۴-۲۲). سایر روش‌ها مانند ARMS و RFLP معمولاً یک جایگاه جهش را در هر آزمایش بررسی می‌کنند (۱۴و۲۲و۲۴). روش RDB مطابق Fogliatta و همکاران انجام شد.

به منظور انجام RDB، محصولات PCR بیوتینیله برای دورگه گیری (hybridization) با پروب‌های مخصوص توالی نرمال و یا جهش‌یافته جایگاه‌های ژن α که بر روی نوارهای biodyne C قرار داده شده بودند؛ مورد استفاده قرار گرفتند. پس از افزون پراکسیداز کنژوگه با استرپتاویدین، واکنش شیمیایی رنگ‌زا در حضور تترامتیل بنزیدین و آب اکسیژنه، اجازه رویت لکه‌های آبی‌رنگ و در نتیجه تشخیص دو رگه‌گیری محصول PCR با هر یک از پروب‌ها را داد. توالی

پروب‌های طبیعی و جهش‌یافته مورد استفاده برای تعیین نوع جهش در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳ : توالی پروب‌های طبیعی و جهش‌یافته

پروب	توالی '3→'5
5nt (N)	NH2-GAG GTG AGG CTC CCT C
5nt (M)	NH2-CTG GAG AGG CTC CCTC
C142 (N)	NH2-TCC AGC TTA ACG GTA TTT
CS(M)	NH2-TCC AGG TTG ACG GTA TT
IVSI-148 (N)	NH2-CTG CAC AGC TCC TAA GC
IVSI-148 (M)	NH2-CTT AGG AGG CGT GCA G
C19(N)	NH2- TCG GCG CGC ACG CTG
C19(M)	NH2-TCG GCG CCA CGC TGG
Icaria (M)	NH2- TCC AGC TTT ACG GTA TTT
Seal Rock (M)	NH2- TCC AGC TTC ACG GTA TT
PA(N)	NH2- TCA GAC TTT ATT CAA AG AC
PA1(M)	NH2-CAC TCA GAC CTT ATT CAA A
PA2(M)	NH2-CTC AGA CTT CAT TCA AA GA
PA(-2bp)	NH2-CTT TGA ATA GTC TGA GTG
C14 (N)	NH2-CGC CTG GGG TAA GG TC
C14 (M)	NH2-CGC CTA GGG TAA GGT C
C59(N)	NH2- GGC CAC GGC AAG AAG G
C59(M)	NH2- GGC CAC GAC AAG AAG G

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-17 و آزمون‌های آماری ANOVA و t-test تجزیه و تحلیل شدند. ضریب اطمینان ۹۵ درصد و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

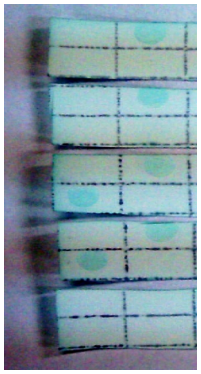
۱۱ جهش نقطه‌ای در ۱۵۳ فرد بالغ مشکوک به آلفاتالاسمی شامل ۵۶ زن و ۹۷ مرد با MCV پایین (۷۵/۳۸±۴/۱)، MCH پایین (۲۴/۴۴±۱/۶۱)، RBC بالا ($۱۰^{۶}$ (۵/۶۱±۰/۵۶) هموگلوبین (۱۳/۶۶±۱/۳۵)، HbA2 طبیعی (۲/۵۱±۰/۴۴) و فاقد فقرآهن و بدون جهش حذفی ۳/۷Kb، ۴/۲Kb، MED، ۲۰/۵Kb، غیربردار (در مورد زنان)، مورد مطالعه قرار گرفت. جهش‌ها عبارت PA2، Hb Icaria،-5nt ،PA1 ، Poly A (-2bp)، Hb Constant Spring (CS)، Hb Seal Rock، C19، C59، IVSI-148 و C14 بود. براساس نتایج RDB تنها جهش‌های PA2، -5nt ، CS و PA1 به ترتیب با فراوانی ۲۸/۷۵درصد، ۱۴/۳۸درصد، ۷/۸۴درصد و ۲/۶۱درصد مشاهده شدند (شکل۲).

ژن‌های α1 و α2 با استفاده از روش PCR تکثیر شدند (شکل ۳). نمونه نتایج آزمایش PCR برای تکثیر، فراوانی و اندکس‌های هماتولوژیک برای هر یک از جهش‌های نقطه‌ای شناسایی شده در جدول ۴ آمده است. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین اندکس‌های هماتولوژیک در افراد مورد مطالعه بدون در نظر گرفتن جنس وجود ندارد.

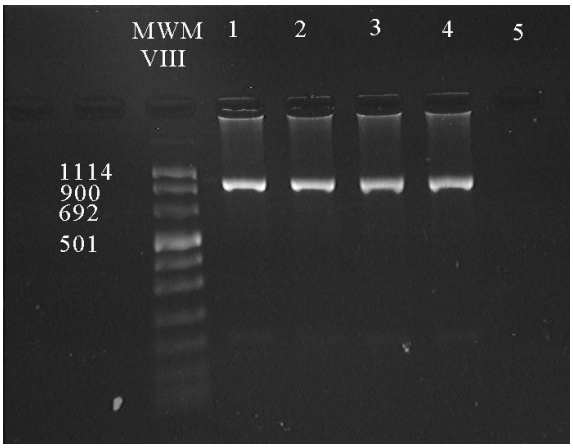
همچنین تفاوت آماری معنی‌داری بین فراوانی جهش‌های نقطه‌ای ژن آلفاگلوبین در دو گروه جنسی مورد مطالعه وجود نداشت. تفاوت آماری معنی‌داری بین اختلاف اندکس‌های هماتولوژیک RBC و Hb و HCT در بین دو جنس یافت شد (P<۰/۰۰۱) و میانگین RBC و Hb و HCT در جنس مذکر بالاتر بود (P<۰/۰۰۱).

ترتیب پروب‌های فیکس شده

PA-2bp	PA (N)
PA2	PA1



شکل ۲ : نمونه نتایج به دست آمده پس از آزمایش RDB
۱ فرد طبیعی ، ۲ فرد طبیعی ، ۳و٤ فرد ناقل جهش PolyA2
٥ تهی (کنترل بدون محصول PCR)



شکل ۳ : تکثیر ژن‌های α1 و α2 با استفاده از روش PCR به ترتیب از چپ به راست شامل سایز مارکر شماره VIII، محصولات PCR:٤-۱ و ٥: تهی (بدون DNA)

جدول ٤ : فراوانی جهش‌های نقطه‌ای ژن آلفاگلوبین و اندکس‌های هماتولوژیک مربوط به ۱۵۳ بیمار

جهش نقطه‌ای	تعداد (درصد)	میانگین وانحراف معیار MCV(fl)	MCH (pg)	تعداد $RBC\times10^6$	Hb gr/dl	Hct	MCHC
PA2	٤٤ (۲۸/۷۵)	۷٦/۷۹±۳/۳۹	۲٤/۹۷±۱/٤۲	۵/٦۱±۰/۵۷	۱۳/۹۷±۱/۲۲	٤۲/۹٦±۳/۷۸	۳۲/۵۱±۰/۸۳
-5nt	۲۲ (۱٤/۳۸)	۷٤/٦۲±۳/٦۰	۲٤/۹۷±۱/٤۲	۵/٦۵±۰/٦۰	۱۳/۹۷±۱/۲۳	٤۲/۹٦±۳/۷۸	۳۲/۳۹±۱/۰۹
CS	۱۲ (۷/۸٤)	۷٤/٤۸±٤/۸٤	۲۳/٦۸±۱/۸۵	۵/٤۵±۰/۵۷	۱۲/۸٦±۱/۰۸	٤۰/٤۸±۳/۲۰	۳۱/۷۸±۱/٦۱
PA1	٤ (۲/٦۱)	۷۳/۰۷±۳/۳۱	۲۳/۸۰±۰/۷۹	۵/۸۲±۰/۱۹	۱٤/۲۲±۰/۰۹	٤۳/۷٤±۱/٤۵	۳۲/۵۷±۰/۹
ناشناخته	۷۱ (٤۱/٤٦)	۷۵/۱۲±٤/٤۸	۲٤/٤٤±۱/۷۳	۵/٦۱±۰/۵٦	۱۳/٦۸±۱/٤۰	٤۲/۱۰±۳/۹۲	۳۲/۵۳±۱/۲۰

بحث

در این مطالعه از ۱۵۳ فرد مشکوک به آلفاتالاسمی که فاقد جهش‌های حذفی ۳/۷Kb و ۴/۲Kb و MED و ۲۰/۵Kb بودند؛ برای ۵۳/۶۰درصد آنان جهش نقطه‌ای ژن آلفاگلوبین مشخص شد. از ۱۱ جهش نقطه‌ای بررسی شده PA2 شایع‌ترین جهش نقطه‌ای ژن آلفاگلوبین (۲۸/۷۵ درصد) بود. سایر جهش‌های مشاهده شده به ترتیب فراوانی عبارت از 5nt--، Hb Constant Spring و PA1 بودند. جهش‌های C19، C14، C59، IVSI-148، Hb Icaria، Hb Seal Rock و Poly A (-2bp) در جمعیت بررسی شده یافت نشد. افرادی که هیچ‌یک از جهش‌های نقطه‌ای مورد مطالعه را نداشتند؛ ممکن است که دارای حذف یا جهش نقطه‌ای ناشایعی باشند و در این مطالعه بررسی نشده است.

فراوانی جهش‌های نقطه‌ای ژن آلفاگلوبین در مطالعاتی که در سایر نواحی ایران انجام شده است؛ در جدول ۵ آورده شده است. فراوانی جهش‌های نقطه‌ای PA2، 5nt- ، CS و PA1 در مطالعه حاضر مشابه استان‌های شمال کشور است. جهش C19 که در این مطالعه و اکثر مناطق ایران یافت نشد؛ در هرمزگان شایع‌ترین جهش نقطه‌ای (۱۲/۲درصد) بود. جهش 5nt- در استان‌های شمال کشور از بیشترین فراوانی (۷/۱-۶/۵درصد) برخوردار است و در میان کشورهای همسایه ایران، در بحرین بیشترین فراوانی (۱۲درصد) دیده می‌شود (۲۵). در حالی که در کویت PA2 جهش شایع می‌باشد. به طوری که در یک مطالعه روی ۱۵ بیمار HbH ۸۶/۷درصد این جهش دیده شد (۲۹). به‌طور کلی PA2 در استان‌های شمالی ایران با فراوانی ۱۸/۲-۱۰ درصد بسیار شایع‌تر از استان‌های جنوبی است (۲۰و۲۶و۲۷). تنها در منطقه شمال کشور Hb Constant Spring گزارش شده است. این جهش در استان گیلان از بیشترین فراوانی (۱۰/۶درصد) برخوردار است و در جنوب ایران یا کشورهای حاشیه خلیج فارس یافت نشده است (۲و۲۰و۲۷و۲۸). مطالعه حاضر و مطالعات انجام شده در سایر مناطق ایران یا کشورهای همسایه حاکی از ناهمگونی جهش‌های نقطه‌ای در مناطق مختلف است.

هرچند آمار فراوانی آلفاتالاسمی در ایران یا استان مازندران به درستی شناخته شده نیست؛ اما تعداد افراد مشکوک آلفاتالاسمی در آزمایشات غربالگری پیش از ازدواج حاکی از شیوع نسبتاً بالای آلفاتالاسمی در شمال ایران است. لذا غربالگری زوجین مشکوک به آلفاتالاسمی برای جهش‌های نقطه‌ای شایع یا حذف‌های منجر به بروز HbH در نسل آینده ضروری است (۱۹و۲۳).

روش RDB روشی کم‌هزینه، سریع و دقیق برای این‌کار می‌باشد. مطالعه حاضر نشان می‌دهد که سه جهش PA2 ، 5nt- و Hb Constant Spring از فراوانی قابل توجهی در جمعیت شمال کشور برخوردارند. فراوانی این جهش‌ها در افراد

جدول ۵ : فراوانی جهش‌های نقطه‌ای گزارش شده در مناطق مختلف ایران

شهر	تعداد	PA2 درصد	-5nt درصد	CS درصد	PA1 درصد	C59 درصد	C19 درصد	C14 درصد	IVSI-148 درصد	Hb Icaria درصد
ایران (۲)	٦۵٦	۵/۱	۲/۵	۱/۷	۰/۸	۰/٦	۱/۱	–	–	۰/۳
مازندران (۲٦)	۲۷٤	۱۸/۲	٦/۵	–	–	–	–	–	–	–
گیلان (۲۷)	۱۰۳	۱۲/٤	۷/۱	۱۰/٦	۳/۵	–	–	–	–	–
جنوب ایران (۲۰)	۸۸	۱/۱	۳/٤	–	–	–	–	–	–	–
هرمزگان (۲۸)	۱۱٤	–	٤/۳	–	–	–	۱۲/۲	۰/۹	۰/۹	–
* مطالعه حاضر	۳٤۸	۱۲/٦٤	٦/۳۱	۳/٤٤۸	۱/۱٤۹	–	–	–	–	–

* فراوانی جهش‌های نقطه‌ای با در نظر گرفتن مجموع جهش‌ها (حذف‌ها و جهش‌های نقطه‌ای) محاسبه شد.

کم‌خون فاقد حذف شایع ژن آلفاگلوبین عبارت از Poly A2 ۲۸/۷۵درصد، 5nt- ۱۴/۳۸ درصد، CS ۷/۸۴ درصد و Poly A1 ۲/۶۱ درصد بود.

با توجه به این که همراهی PA2 یا 5nt- یا Hb Constant Spring با حذف‌های بزرگ مانند MED یا حالت هموزیگوت برای PA2 منجر به بیماری HbH می‌شود و نیز با وجود فراوانی قابل توجه جهش‌های PA2 و 5nt- و Hb Constant Spring و جهش حذفی MED براساس مطالعات انجام شده در این جمعیت، بررسی جهش نقطه‌ای PA2، همراه سایر جهش‌ها برای افراد مشکوک به آلفاتالاسمی در منطقه شمال کشور اکیداً توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

از ۱۵۳ فرد مشکوک به آلفاتالاسمی که فاقد جهش‌های حذفی شایع بودند؛ برای ۵۳/۶۰درصد آنها جهش نقطه‌ای ژن آلفاگلوبین مشخص شد. با توجه به فراوانی جهش‌های نقطه‌ای ژن آلفاگلوبین در شمال ایران و امکان ایجاد بیماری HbH ، غربالگری این جهش‌ها در زوج‌های مشکوک ضروری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دکتر مهناز پورتقی برای اخذ درجه تخصص در رشته پاتولوژی از دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بابل (شماره ۲۸۰) بود. بدین‌وسیله از همه اهداء کنندگان خون که بدون رضایت آنها این پژوهش میسر نبود و نیز از سرکار خانم زینب عابدیان که در پیگیری امور مربوط به چاپ مقاله ما را یاری نمودند؛ صمیمانه سپاسگزاریم.

References

1. McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 21st. Philadelphia: Saunders Company. 2007; pp:528-32.

2. Hadavi V, Taromchi AH, Malekpour M, Gholami B, Law HY, Almadani N, et al. Elucidating the spectrum of alpha-thalassemia mutations in Iran. Haematologica. 2007; 92(7):992-3.

3. Borgna-Pignatti C, Galanello R. Thalassemias and related disorders: Quantitative disorders of hemoglobin synthesis. In: Greer JP (eds). Wintrobe's Clinical Hematology. Vol 1. 12th. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2009; pp: 1083-31.

4. Charoenkwan P, Sirichotiyakul S, Chanprapaph P, Tongprasert F, Taweephol R, Sae-Tung R, et al. Anemia and hydrops in a fetus with homozygous hemoglobin constant spring. J Pediatr Hematol Oncol. 2006 Dec;28(12):827-30.

5. Origa R, Sollaino MC, Giagu N, Barella S, Campus S, Mandas C, et al. Clinical and molecular analysis of haemoglobin H disease in Sardinia: haematological, obstetric and cardiac aspects in patients with different genotypes. Br J Haematol. 2007 Jan; 136(2):326-32.

6. Charoenkwan P, Taweephon R, Sae-Tung R, Thanarattanakorn P, Sanguansermsri T. Molecular and clinical features of Hb H disease in northern Thailand. Hemoglobin. 2005;29(2):133-40.

7. Zhou YQ, Xiao QZ, Huang LJ, Xiao GF, Li WD, Zhu LF, et al. [Clinical phenotype genotype correlation in children with hemoglobin H disease in Zhuhai area of China]. Zhonghua Er Ke Za Zhi. 2004 Sep;42(9):693-6. [Article in Chinese]

8. Galanello R, Pirastu M, Melis MA, Paglietti E, Moi P, Cao A. Phenotype-genotype correlation in haemoglobin H disease in childhood. J Med Genet. 1983 Dec;20(6):425-9.

9. Kattamis C, Tzotzos S, Kanavakis E, Synodinos J, Metaxotou-Mavrommati A. Correlation of clinical phenotype to genotype in haemoglobin H disease. Lancet. 1988 Feb 27;1(8583):442-4.

10. Ne-Win, Harano K, Harano T, Kyaw-Shwe, Aye-Aye-Myint, Khin-Thander-Aye, et al. Hb Constant Spring [alpha 142, Term-->Gln (TAA>CAA in alpha2)] in the alpha-thalassemia of anemic patients in Myanmar. Hemoglobin. 2008;32(5):454-61.

11. Cürük MA, Dimovski AJ, Baysal E, Gu LH, Kutlar F, Molchanova TP, et al. Hb Adana or alpha 2(59)(E8)Gly-->Asp beta 2, a severely unstable alpha 1-globin variant, observed in combination with the -(alpha)20.5 Kb alpha-thal-1 deletion in two Turkish patients. Am J Hematol. 1993 Dec;44(4):270-5.

12. Pembrey ME, Weatherall DJ, Clegg JB, Bunch C, Perrine RP. Haemoglobin Bart's in Saudi Arabia. Br J Haematol. 1975 Feb; 29(2):221-34.

13. Wajcman H, Traeger-Synodinos J, Papassotiriou I, Giordano PC, Harteveld CL, Baudin-Creuza V, et al. Unstable and thalassemic alpha chain hemoglobin variants: a cause of Hb H disease and thalassemia intermedia. Hemoglobin. 2008;32(4): 327-49.

14. Chan AY, So CC, Ma ES, Chan LC. A laboratory strategy for genotyping haemoglobin H disease in the Chinese. J Clin Pathol. 2007 Aug;60(8):931-4.

15. Huisman THJ, Carver MFH, Baysal E. A syllabus of thalassemia mutations. In: Augusta GA. The Sickle Cell Anemia Foundation. 1997. Available from: http://globin.cse.psu.edu [accessed on 6 February 2008].

16. 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 Jan;21(1):41-51.

17. Yavarian M, Karimi M, Zorai A, Harteveld CL, Giordano PC. Molecular basis of Hb H disease in southwest Iran. Hemoglobin. 2005; 29(1):43-50.

18. Adekile AD, Gu LH, Baysal E, Haider MZ, al-Fuzae L, Aboobacker KC, et al. Molecular characterization of alpha-

thalassemia determinants, beta-thalassemia alleles, and beta S haplotypes among Kuwaiti Arabs. Acta Haematol. 1994;92(4): 176-81.

19. El-Kalla S, Baysal E. alpha-thalassemia in the United Arab Emirates. Acta Haematol. 1998;100(1):49-53.

20. Fakhar R. Genotyping of Thalassemia in microcytic hypochromic anemia patients from southwest region of Iran. Pak J Med Sci. 2008 Jan-Mar;24(1):23-8.

21. Garshasbi M, Oberkanins C, Law HY, Neishabury M, Kariminejad R, Najmabadi H. alpha-globin gene deletion and point mutation analysis among in Iranian patients with microcytic hypochromic anemia. Haematologica. 2003 Oct;88(10):1196-7.

22. Foglietta E, Bianco I, Maggio A, Giambona A. Rapid detection of six common Mediterranean and three non-Mediterranean alpha-thalassemia point mutations by reverse dot blot analysis. Am J Hematol. 2003 Nov;74(3):191-5.

23. Chan V, Yam I, Chen FE, Chan TK. A reverse dot-blot method for rapid detection of non-deletion alpha thalassaemia. Br J Haematol. 1999 Mar;104(3):513-5.

24. Puehringer H, Najmabadi H, Law HY, Krugluger W, Viprakasit V, Pissard S, et al. Validation of a reverse-hybridization StripAssay for the simultaneous analysis of common alpha-thalassemia point mutations and deletions. Clin Chem Lab Med. 2007; 45(5):605-10.

25. Jassim N, Al-Arrayed S, Gerard N, Al-Mukharraq H, Al-Ajami A, Ducrocoq R, et al. Molecular basis of alpha-thalassemia in Bahrain. Bahrain Med Bull. 2001; 23(1):3-7.

26. 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.

27. 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.

28. Harteveld CL, Yavarian M, Zorai A, Quakkelaar ED, van Delft P, Giordano PC. Molecular spectrum of alpha-thalassemia in the Iranian population of Hormozgan: three novel point mutation defects. Am J Hematol. 2003 Oct;74(2):99-103.