

بررسی ملکولی جهش های حذفی ژن آلفا گلوبین در بیماران با کم خونی هیپوکرومی میکروسیتی در کرمانشاه*

رضا علی بخشی^{1*}؛ مجید آرش²؛ رضا اکرمی پور³؛ حمید نعمانی¹؛ محمدرضا فرشچی⁴؛ سهیلا فتح الهی⁴؛ منصور رضایی⁵

چکیده

زمینه: اکثر جهش های آلفا تالاسمی شامل حذف یک یا هر دو ژن آلفا گلوبین هستند. از آنجا که جمعیت ایران ترکیبی از گروه های قومی مختلف است، توزیع و فراوانی جهش های ژن آلفا گلوبین در نواحی متفاوت نیاز به بررسی دارد. این مطالعه به منظور شناسایی حذف های شایع ژن آلفا گلوبین در میان افراد با کم خونی هیپوکرومی میکروسیتی در استان کرمانشاه انجام شده است.

روش ها: پس از ارزیابی اولیه، 92 بیمار شامل 47 زن و 45 مرد با کم خونی هیپوکرومی میکروسیتی (MCV < 80 fl & MCH < 27 pg) جهت انجام این مطالعه انتخاب شدند. تمامی نمونه ها برای تشخیص چهار حذف ژن آلفا گلوبین شامل $\alpha^{3.7}$ ، $\alpha^{4.2}$ ، $\alpha^{20.5}$ و α^{MED} با استفاده از تکنیک GAP-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از تکثیر، 10 میکرولیتر از محصول بر روی ژل آگارز 1/2 درصد الکتروفورز شد. باندها در محلول اتیدیوم بروماید نمایان و در زیر دستگاه ترانس ایلومیناتور عکس برداری به عمل آمد.

یافته ها: 45 بیمار واجد حذف $\alpha^{3.7}$ بودند. در بیماران دارای حذف $\alpha^{3.7}$ هم در حالت هتروزیگوت و هم در حالت هموزیگوت، مقدار MCH کم تر از محدوده طبیعی و میزان هموگلوبین A2 در محدوده طبیعی بود. سایر جهش های حذفی شایع شامل $\alpha^{20.5}$ ، $\alpha^{4.2}$ و α^{MED} مشاهده نشدند.

نتیجه گیری: فراوانی حذف $\alpha^{3.7}$ (تنها جهش یافت شده حذفی) در بیماران با کم خونی هیپوکرومی میکروسیتی در کرمانشاه 48/9 درصد بود.

کلیدواژه ها: آلفا تالاسمی، جهش های حذفی، تکنیک GAP PCR، کم خونی هیپوکرومی میکروسیتی

«دریافت: 1388/10/19 پذیرش: 1389/3/18»

1. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

2. کمیته تحقیقات دانشجویان، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

3. گروه کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

4. آزمایشگاه ژنتیک پزشکی، آزمایشگاه مرکزی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

5. گروه آمار زیستی، دانشکده پزشکی و عضو مرکز تحقیقات سلامت دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

*عهددار مکاتبات: کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، تلفن: 0831-7213330

Email: ralibakhshi@kums.ac.ir

* این مقاله برگرفته از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد آقای مجید آرش در دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می باشد.

آلفاگلوبین به صورت زیر واحدهای هموگلوبین جنینی (HbF: $\alpha 2\gamma 2$) و هموگلوبین بزرگسالان (HbA: $\alpha 2\beta 2$) عمل می کنند. برعکس بتا تالاسمی که در ایجاد آن جهش های غیرحذفی غالب هستند، اکثر انواع آلفا تالاسمی

مقدمه
آلفا تالاسمی نوعی بیماری ژنتیکی با توارث اتوزومی مغلوب، همراه با کاهش یا عدم ساخت زنجیره های پلی پپتیدی آلفاگلوبین هموگلوبین است. زنجیره های

شناخته شده دارای حذف یک یا دو ژن آلفاگلوبین بر روی کروموزوم 16p13.3 هستند (1 و 2). آلفاتالاسمی به عنوان یکی از شایع ترین نقص های ژنتیکی در سرتاسر دنیا شناخته می شود. این بیماری با فراوانی بالایی در منطقه وسیعی که از حوزه مدیترانه تا سرتاسر خاور میانه، شبه قاره هند، برمه و آسیای جنوب شرقی کشیده شده است، دیده می شود. بالاترین شیوع بیماری آلفا تالاسمی، در آسیای جنوبی و در میان جوامعی که منشأ آن ها از سواحل غرب آفریقا است مشاهده می شود. این بیماری در تایلند با شیوع 10-4/8 درصد گزارش شده است (3). همچنین این بیماری در آسیای جنوب شرقی (4 و 5)، چین (6 و 7) و به طور پراکنده در هند (8 و 9)، کویت (10)، یونان، ایتالیا (11-13) و اروپای شمالی (14) دیده می شود. جهش های حذفی و غیرحذفی موجب ایجاد آلفاتالاسمی می شوند. بسیاری از جهش های غیرحذفی ژن آلفاگلوبین حاصل جایگزینی های نوکلئوتیدی هستند. شایع ترین جهش های حذفی، حذف های تک ژنی $\alpha^{3.7}$ - و $\alpha^{4.2}$ - در آسیا، حذف های دوژنی α^{SEA} -- و α^{FIL} -- در آسیای جنوب شرقی و حذف های دوژنی $\alpha^{20.5}$ (α)- و α^{MED} -- در نواحی مدیترانه ای است. حذف α^{THAI} - در تایوان شیوع بالایی دارد (15 و 16). حذف تکی (α -) یا دوتایی ($\alpha\alpha$ --) از ژن های α -گلوبین در حالت سیس از رایج ترین علل α تالاسمی است. در حدود 25 نوع حذف دوژنی سیس مختلف ($\alpha\alpha$ --) و هشت حذف تک ژنی (α -) در جمعیت های مختلف گزارش شده است (17). مطالعه حاضر با هدف بررسی ملکولی جهش های حذفی ژن آلفاگلوبین در بیماران با کم خونی هیپوکرومی میکروسیتی در کرمانشاه در سال 88-1387 انجام شد.

مواد و روش ها

نمونه گیری از بین بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکزی کرمانشاه (ارجاعی از طرف پزشک متخصص) صورت گرفت. این افراد دارای آنمی هیپوکروم میکروسیتیک همراه با MCV و MCH پائین

تکنیک Gap PCR برای تشخیص جهش های حذفی مورد استفاده قرار می گیرد و پرایمرهای مورد استفاده در این تکنیک، طوری طراحی شده که دو طرف محل حذف شده را در بر گیرد (18). بر اساس غلظت DNA، مقدار مناسب نمونه در تیوب های واکنش ریخته شد. برای تعیین هر یک از جهش های حذفی، ابتدا به ازای هر نمونه، 50 میکرولیتر PCR MIX، شامل 2mM MgCl₂، 0/2mM dNTP و GC-Rich solution(5X) و آب مقطر دیونیزه استریل، در یک تیوب بزرگ ریخته شد. مقادیر مختلف پرایمرهای Forward و Reverse $\alpha^{3.7}$ - و $\alpha^{20.5}$ (α)-، پرایمرهای Forward و Reverse $\alpha^{4.2}$ - و پرایمرهای Forward و Reverse α^{MED} -- بسته به نوع حذف مورد بررسی در تیوب ریخته شدند. سپس به ازای هر نمونه، 2/5Unit آنزیم به تیوب افزوده شد. پس از مخلوط کردن محتویات تیوب بزرگ، به هر تیوب واکنش حاوی DNA، 50 میکرولیتر از مخلوط مذکور اضافه گردید. به دنبال بهینه سازی شرایط Gap PCR برای مقادیر پرایمرها، دما، غلظت کلراید منیزیم و مقدار آنزیم، تیوب های واکنش در

بزرگی اندازه قطعات، محصولات تکثیرشده بر روی ژل آگارز 1/2 حرکت داده شدند.

جهش حذفی $\alpha^{3.7}$ - بر روی خوشه آلفاگلوبین، این حذف در 45 بیمار مشاهده شد. باندهای مربوط به حذف $\alpha^{3.7}$ - دارای طول 2029 جفت باز و باندهای مربوط به قطعه $\alpha 2$ دارای طول 1800 جفت بازی هستند (تصویر 1). در بررسی جهش حذفی $\alpha^{4.2}$ - بر روی خوشه آلفاگلوبین، هیچ موردی با این حذف در میان نمونه‌های مورد بررسی مشاهده نشد. باندهای مربوط به حذف $\alpha^{4.2}$ - دارای طول 1628 جفت باز بوده و باندهای مربوط به قطعه $\alpha 2$ دارای طول 1800 جفت باز هستند (تصویر 2). همچنین جهش حذفی $\alpha^{20.5}$ - بر روی خوشه آلفاگلوبین در نمونه‌های مورد بررسی یافت نشد. باندهای مربوط به حذف $\alpha^{20.5}$ - دارای طول 1007 bp بوده و باندهای مربوط به قطعه $\alpha 2$ دارای طول 1800 bp هستند



تصویر 1- lane3 مربوط به حذف $\alpha^{3.7}$ - به صورت هموزیگوت و lane 2 مربوط به همین حذف به صورت هتروزیگوت است، lane1 نیز مربوط به نمونه فاقد این حذف می‌باشد. باند با طول 2029bp مربوط به باند $\alpha^{3.7}$ - و باندهای با طول 1800 bp مربوط به باند $\alpha 2$ هستند.

ترموسایکلر (Biometra, Germany) قرار داده شد و بهترین شرایط برای انجام مراحل مختلف Gap PCR به صورت ذیل به دست آمد، چرخه اول به مدت 5 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن 35 چرخه به صورت دمای دناتوره شدن در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه، دمای اتصال 61 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه و دمای گسترش 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 دقیقه و 30 ثانیه تعیین گردید. در پایان این مراحل به مدت 5 دقیقه دمای 72 درجه سانتی‌گراد به دستگاه داده شد. پس از تکثیر قطعات مورد نظر، محصولات PCR بر روی ژل آگارز 1/2 درصد با ولتاژ 85 ولت و به مدت 1 ساعت Run شدند. پس از گذشت این زمان، ژل در دستگاه ترانس لومیناتور قرار داده شد و باندهای تکثیرشده مشاهده شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه چهار جهش حذفی شایع شامل جهش‌های حذفی $\alpha^{4.2}$ ، $\alpha^{20.5}$ ، MED -- و $\alpha^{3.7}$ - بر روی بیماران مبتلا به کم‌خونی هیپوکروم میکروسیتیک در استان کرمانشاه مورد بررسی قرار گرفتند. از میان 92 بیمار تحت مطالعه، 45 بیمار (48/9%) دارای حذف از نوع تک‌ژنی $\alpha^{3.7}$ - بودند. از میان 45 بیماری که حذف $\alpha^{3.7}$ - در آنها مشاهده شد، 40 بیمار (88/9%) دارای حذف به صورت هتروزیگوت (α/α -) و 5 بیمار (11/1%) دارای حذف به صورت هموزیگوت (α/α -) بودند. در تعدادی از نمونه‌ها که حذف $\alpha^{3.7}$ - به صورت هتروزیگوت بود، مقادیر MCV و MCH در محدوده نزدیک به طبیعی قرار داشتند. همچنین در هیچ‌یک از نمونه‌های مورد مطالعه، جهش‌های حذفی $\alpha^{4.2}$ ، $\alpha^{20.5}$ - و MED -- یافت نشد.

برای تکثیر نمونه‌های مورد بررسی، در هر بار که PCR انجام شد، نمونه کنترل مثبت مربوط به آن حذف هم مورد استفاده قرار گرفته و تکثیر انجام شده است. این کار برای حصول اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر انجام گردید. پس از انجام Gap PCR بر روی نمونه‌ها به دلیل

(تصویر 3). هیچ بیماری با جهش حذفی α -MED بر روی خوشه آلفاگلوبین یافت نشد. باندهای مربوط به حذف α 2 دارای طول 1800 bp هستند (تصویر 4). α -MED دارای طول 807 bp بوده و باندهای مربوط به قطعه



تصویر 2- lane 2 و 3 مربوط به حذف α 4.2- به صورت هموزیگوت و lane 1، 4، 5، 6، 7 و 8 مربوط به نمونه‌های فاقد این حذف بوده که دارای باند با طول 1800 bp مربوط به α 2 هستند



تصویر 3- lane 5 و 6 مربوط به حذف α 20.5- به صورت هتروزیگوت هستند که دارای باندهای با طول 1007bp بوده و lane 1، 2، 3 و 4 مربوط به نمونه‌های فاقد این حذف می‌باشند که دارای باندهای با طول 1800 bp مربوط به α 2 هستند.



تصویر 4- باندهای مشاهده شده در lane 1، 4، 5، 6، 7 و 8 باند α 2 با طول 1800bp هستند. در lane 2 و 3 باند α -MED با طول 807bp مشاهده می‌شوند که مربوط به نمونه‌های هتروزیگوت برای این حذف می‌باشند.

بحث

نتایج بررسی چهار حذف شایع بر روی خوشه آلفاگلوبین نشان دادند که در بین افراد مورد مطالعه در استان کرمانشاه، تنها حذف تکی $\alpha^{3.7}$ - شناسایی گردید. در صورتی که نمونه‌های بیشتری مورد بررسی قرار گیرند، ممکن است جهش‌های حذفی دیگری وجود داشته باشد و در این حالت، درصد جزئی از جهش‌های حذفی را به خود اختصاص دهند. بنابراین نتایج این تحقیق، دلیلی بر رد سایر جهش‌های حذفی در استان کرمانشاه نیست. شایان ذکر است در صورت بررسی جهش‌های نقطه‌ای و سایر جهش‌ها، درصد جهش‌های یافت‌شده در افراد مورد مطالعه و استان افزایش خواهد یافت. از 92 فرد مورد مطالعه، 45 فرد (48/9%) دارای این نوع جهش حذفی بودند؛ 40 مورد (43/5%) به صورت هتروزیگوت ($\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) برای حذف $\alpha^{3.7}$ و 5 نفر (5/4%) به صورت هموزیگوت ($\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$) برای این حذف بودند.

نیشابوری و همکاران در سال 2001 تعداد 57 فرد ایرانی با آنمی هیپوکروم میکروسیتیک را مورد بررسی قرار دادند و در جهش‌های حذفی ژن آلفاگلوبین مورد مطالعه تنها جهش حذفی $\alpha^{3.7}$ - (31/6%) را شناسایی نمودند (19).

کیانی شیرازی و همکاران، در سال 2006 تعداد هفت جهش ژنی از نوع حذف را بر روی 114 بیمار مشکوک به آلفاتالاسمی مورد بررسی قرار دادند (نمونه‌ها مربوط به استان‌های مختلف کشور بوده است). از این تعداد 29 مورد برای $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ هتروزیگوت و 18 مورد هموزیگوت $\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$ بودند. همچنین 2 مورد، هر دو حذف 3/7 و 4/2 را داشتند ($\alpha^{4.2}/\alpha^{3.7}$) و 12 مورد هتروزیگوت $\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ ، 5 مورد هتروزیگوت $\alpha^{4.2}/\alpha$ MED و 8 مورد هتروزیگوت $\alpha^{20.5}/\alpha\alpha$ بودند و 40 مورد هم شاخصه‌های هماتولوژیکی پائینی داشته ولی هیچ حذفی را نشان ندادند (20).

EL-kalla و Baysal در سال 1998 ژن‌های آلفاگلوبین را در 418 نمونه خون بند ناف نوزادان اماراتی آنالیز

کرده و دو نوع جهش حذفی را در افراد مورد مطالعه گزارش نمودند. فراوان‌ترین جهش در بین نمونه‌های مورد مطالعه، جهش حذفی $\alpha^{3.7}$ - بوده (68%) و فقط در یک مورد هم جهش‌های حذفی $\alpha^{3.7}$ - و $\alpha^{4.2}$ - به صورت هتروزیگوت مرکب $\alpha^{3.7}/\alpha^{4.2}$ - بودند (21).

Borges و همکاران در سال 2001 توزیع انواع حذف‌های آلفاتالاسمی را در 339 فرد بالغ برزیلی (98 نفر سیاه پوست و 241 نفر سفید پوست) که MCH و MCV کاهش یافته و هموگلوبین طبیعی داشتند، مورد بررسی قرار دادند. از این تعداد، 169 نفر آلفاتالاسمی بودند. در بین آن‌ها 145 نفر (42/8%) برای حذف $\alpha^{3.7}$ - به صورت هتروزیگوت و 18 نفر (5/3%) به صورت هموزیگوت بودند. همچنین 5 نفر (1/5%) به صورت هتروزیگوت برای فرم غیرحذفی و یک نفر (3%) حامل حذف مدیترانه‌ای بود (22).

Adekile و همکارانش در سال 1994، بیماری آلفاتالاسمی را در بین عرب‌های کویتی مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی ژن‌های آلفاگلوبین در 64 کروموزوم با استفاده از تکنیک‌های ژنتیک ملکولی آنالیز شدند. در این پژوهش، 3 نوع جهش در 30 کروموزوم در بین افراد با بیماری HbH شناسایی شدند. در بین آن‌ها جهش حذفی $\alpha^{3.7}$ -، 10 درصد موارد را به خود اختصاص داد (23).

Win و همکارانش در سال 2006 سه حذف شایع $\alpha^{3.7}$ -، $\alpha^{4.2}$ - و MED-- منطقه جنوب شرق آسیا را در 170 بیمار تالاسمی میانماری بررسی کرده و در 27 بیمار، جهش حذفی را شناسایی کردند (24).

مقایسه نتایج حاصل از بررسی حاضر با سایر تحقیق‌هایی که در بسیاری از نقاط دیگر انجام شده نشان می‌دهد که میان نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج سایر تحقیق‌ها تطابق خطی وجود دارد.

نتیجه گیری

نتایج نشان دادند که حذف $\alpha^{3.7}$ -، شایع‌ترین حذف در بیماران مبتلا به آنمی هیپوکروم میکروسیتیک در استان

کرمانشاه است. پیشنهاد می‌شود که برای شناسایی انواع جهش‌های غیرحذفی (جهش‌های نقطه‌ای و...) در بیماران مختلف آلفاتالاسمی، علاوه بر جهش‌های حذفی، ارزیابی مشکوک به آلفاتالاسمی صورت پذیرد.

References

- Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jaman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. *Blood*. 1989; 73(5): 1081-104.
- Kazazian HH Jr. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol* 1990; 27(3): 209-28.
- Flatz G. Hemoglobinopathies in Thailand. *Br J Hematol* 1965; 11: 216-27.
- Lopez CG, Lei-Injo LE. Alpha and beta thalassemia in newborns in west Malaysia. *Hum Hered* 1971; 21:185-91.
- Pet Al. Alpha and beta thalassemia in Thailand. *Ann NY Acad Sci* 1969; 165: 60-82.
- Chen FE, Ooi C, Ha SY, Cheung BM, Todd D, Liang R, et al. Genetic and clinical features of hemoglobin H disease in Chinese patients. *N Engl J Med* 2000; 343(8): 544-50.
- Chang JG, Lee LS, Lin CP, Chen PH, Chen CP. Rapid diagnosis of alpha-thalassemia-I of Southeast Asia type and hydrops fetalis by polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 78(3): 853-4.
- Rudra T, Chakrabarti S, Sengupta B. Alpha thalassaemia: experience of referral cases in Kolkata, India. *Int J Hum Genet* 2008; 8(4): 357-60.
- Kulozik AE, Kar BC, Serjeant GR, Serjeant BE, Weatherall DJ. The molecular basis of alpha thalassemia in India. Its interaction with the sickle cell gene. *Blood* 1988; 71(2): 467-72.
- 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.
- Nicholas RD. Thalassemia due to recombination between the alpha 1 globin gene and an alu I repeat. *Blood* 1985; 65: 1434-8.
- Di Rienzo A, Novelletto A, Aliqu? MC, Bianco I, Tagarelli A, Brancati C. Molecular basis for HbH disease in Italy: geographical distribution of deletional and nondeletional alpha-thalassemia haplotypes. *Am J Hum Genet* 1986; 39(5): 631-9.
- Dittman WA, Haut A, Wintrobe MM, Cartwright GE. Hemoglobin associated with an uncommon variant of thalassemia trait. *Blood* 1960; 15: 975-83.
- Hedenberg F, Muller-Eberhard U, Sjolín S, Wranne L. Hemoglobin H and inclusion body anemia in a Swedish family. *Acta Paediatr* 1958; 47(6): 652-65.
- Ko TM, Chen TA, Hsieh MI, Tseng LH, Hsieh FJ, Chuang SM, et al. Alpha-thalassemia in the four major aboriginal groups in Taiwan. *Hum Genet* 1993; 92(1): 79-80.
- Ko TM, Tseng LH, Kao CH, Lin YW, Hwa HL, Hsu PM, et al. Molecular characterization and PCR diagnosis of Thailand deletion of alpha-globin gene cluster. *Am J Hematol* 1998; 57(2): 124-30.
- Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia; *Blood* 2000; 95(1): 360-4.
- Pearson HA, O'Brien RT, McIntosh S. Screening for thalassemia trait by electronic measurement of mean corpuscular volume. *N Engl J Med* 1973; 288(7): 351-3.
- Neishabury ML, Abbasi-Moheb L, Najmabadi H. Alpha-thalassemia deletion analysis in Iran. *Arch Iran Med* 2001; 4(4): 160-4.
- Kiani-Shirazi R, Zeinali S, Karimipoor M, Zarbakhsh B, Alibakhshi R. [PCR application in recognition of prevalent deletion of alpha globin gene in alpha thalassemia carriers (Persian)]. *Tehran University Medical Journal* 2006; 64(2): 95-9.
- El-Kalla S, Baysal E. Alpha-thalassemia in the United Arab Emirates. *Acta Haematol* 1998; 100(1): 49-53.
- Borges E, Wenning MR, Kimura EM, Gervasio SA, Sonati MF, Costa FF. High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34(6):759-62.
- 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.
- Ne-Win, Harano K, Harano T, Thein-Thein-Myint, Rai-Mra, Aye-Aye-Myint, et al. Common alpha-thalassemia deletions in transfusion-dependent thalassemia patients in the Southeast Asia region of Myanmar. *Lab Hematol*. 2006; 12(3): 139-42.