

پلی مورفیسم XmnI در ناحیه 5' ژن G γ و ارتباط آن با میزان HbF و نسبت G γ به A γ در بیماران بتاتالاسمی ماژور و اینترمدیا در کرمانشاه

هوشنگ نعمتی*؛ دکتر زهره رحیمی**؛ دکتر غلامرضا بهرامی***؛ دکتر حمید نعمانی**؛ دکتر منصور رضایی****

چکیده

مقدمه: بتاتالاسمی رایج‌ترین اختلال خونی - ارثی است که در روی سنتز زنجیره بتاگلوبین تأثیر می‌گذارد. نوع جهش در ژن بتاگلوبین تعیین‌کننده میزان سنتز زنجیره بتاگلوبین می‌باشد که به صورت β^+ ، β^0 و β^{++} تالاسمی بروز می‌کند. وجود محل پلی مورفیک XmnI در ناحیه 5' به ژن G γ در روی میزان سنتز زنجیره G γ و در برخی موارد در روی میزان HbF تولیدشده تأثیر می‌گذارد که از نظر تأثیر در بروز علائم بالینی در بیماران بتاتالاسمی اهمیت دارد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه کنونی تعداد 197 بیمار بتاتالاسمی ماژور و تعداد 9 بیمار بتاتالاسمی اینترمدیا در مراجعه به بیمارستان شهید فهمیده کرمانشاه مورد مطالعه قرار گرفتند. پلی مورفیسم XmnI در ناحیه 5' ژن G γ به وسیله روش PCR-RFLP تعیین گردید. درصد زنجیره‌های G γ و A γ در HbF با استفاده از روش HPLC مشخص شدند. درصد HbF به روش الکتروفورز (استخراج از پرونده بیماران) مشخص گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون واریانس و کای اسکویر استفاده شد.

یافته‌ها: با بررسی پلی مورفیسم XmnI در هر دو گروه مشخص شد که در بیماران بتاتالاسمی ماژور تعداد 32 نفر (16/3%) هموزیگوت XmnI(+/+) و تعداد 44 نفر (22/3%) هتروزیگوت XmnI(+/-) بودند. در بیماران بتاتالاسمی اینترمدیا تعداد 5 نفر (55/6%) هموزیگوت XmnI(+/+) و تعداد 2 نفر (22/3%) هتروزیگوت XmnI(+/-) بودند. میانگین HbF در بیماران بتاتالاسمی ماژور و اینترمدیا به ترتیب برابر 95/3 g/dl و 85/4 g/dl بود. میانگین G γ به A γ در بیماران بتاتالاسمی ماژور و اینترمدیا به ترتیب برابر 2/5 و 2/3 درصد بود. در این مطالعه با استفاده از آزمون ANOVA مشخص گردید (P= 0/001) که در بیماران بتاتالاسمی در حضور سایت پلی مورفیک XmnI مقدار HbF و درصد زنجیره G γ و نسبت G γ / A γ افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر، پلی مورفیسم XmnI را در بیماران بتاتالاسمی ماژور و اینترمدیا کرمانشاه تعیین نموده و نشان داده‌است که حضور این محل پلی مورفیک اثر مثبتی بر روی میزان HbF و درصد G γ دارد.

کلیدواژه‌ها: تالاسمی، HbF، درصد زنجیره G γ ، پلی مورفیسم XmnI

« دریافت: 85/12/9 پذیرش: 86/8/29 »

* کارشناس ارشد بیوشیمی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

** استادیار بیوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

*** دانشیار فارماکولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

**** استادیار آمار دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

* عهده‌دار مکاتبات: کرمانشاه، سرخه لیزه، دانشکده داروسازی - تلفن: 09188362982

مقدمه

هموگلوبینوپاتی‌ها اختلالات ساختمانی هموگلوبین هستند و مهم‌ترین آن‌ها سندرم‌های تالاسمی می‌باشند که به علت نقص در سنتز زنجیره‌های گلوبین ایجاد می‌شوند، بسته به این که سنتز کدام زنجیره گلوبین نقص داشته باشد به انواع α -تالاسمی، β -تالاسمی، δ -تالاسمی، $\beta\delta$ -تالاسمی و $\gamma\epsilon\beta\delta$ -تالاسمی تقسیم‌بندی می‌شوند (۱).

بیماری کم‌خونی تالاسمی نخستین بار توسط دانشمندی بنام کولی در سال ۱۹۲۵ کشف شد و بدین منظور آن را آمی‌کولی نامیدند (۲). اگرچه امروزه به علت مهاجرت، این بیماری به صورت پراکنده مشاهده می‌شود و تقریباً در تمام مناطق دنیا گزارش شده است، با این حال بیشتر در کشورهای حاشیه دریای مدیترانه و خط استوا و نواحی نزدیک به خط استوا در آفریقا دیده می‌شود، یا به عبارت دیگر کمربند تالاسمی در منطقه‌ای از کرانه‌های دریای مدیترانه و سرتاسر شبه جزیره عربستان، ترکیه، ایران، هند و آسیای جنوب شرقی به‌ویژه تایلند، کامبوج و چین جنوبی گسترش دارد. شیوع ژنی در این نواحی بین ۱۵-۲۰ درصد می‌باشد. بتاتالاسمی شایع‌ترین بیماری تک‌ژنی در ایران است و بیش از ۲۵۰۰۰ فرد مبتلا در جمعیت ایران گزارش شده است. در استان‌های شمالی و جنوبی شیوع بتاتالاسمی حدود ۱۰ درصد و در نقاط دیگر حدود ۸-۴ درصد ارزیابی شده است (۳).

علائم بالینی بیماران بتاتالاسمی متغیر بوده و تحت تأثیر عوامل ژنتیکی می‌باشد. یکی از این عوامل ژنتیکی پلی‌مورفیسم محل XmnI است. سایت پلی‌مورفیک

XmnI در ناحیه ۵' ژن γ قرار دارد و حضور این محل پلی‌مورفیک در ناحیه ۵' به ژن γ به‌طور معمول منجر به افزایش تولید زنجیره γ می‌شود. این زنجیره‌های γ تولیدشده از طرفی با باندشدن با زنجیره‌های α آزاد، باعث جلوگیری از تجمع و رسوب آن‌ها در سلول‌های قرمز شده و بقای RBCها را افزایش می‌دهند و از طرف دیگر با افزایش میزان HbF باعث کاهش کم‌خونی و در نتیجه کاهش شدت علائم بالینی در بیماران می‌گردد (۴ و ۵).

در کشور ایران طی مطالعاتی که در سال ۱۳۸۱ در کرمانشاه در روی بیماران بتاتالاسمی اینترمدیا انجام شد فراوانی پلی‌مورفیسم XmnI را ۸۷ درصد گزارش کردند (۶). از طرفی در مطالعات دیگری که در جنوب کشور در سال ۱۳۸۱ در روی بیماران بتاتالاسمی اینترمدیا انجام گرفت، فراوانی پلی‌مورفیسم XmnI را ۴۱ درصد گزارش کردند (۷). در کشور هند در سال ۱۹۹۹ میلادی با مطالعه ۲۵ بیمار HbE/Beta thalassaemia فراوانی پلی‌مورفیسم XmnI را ۸۳ درصد گزارش کردند (۸). در این مطالعات ارتباط بین حضور سایت پلی‌مورفیک XmnI و افزایش HbF نشان داده شد.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه بیماران بتاتالاسمی ماژور و اینترمدیا مراجعه‌کننده به بخش تالاسمی مرکز آموزشی درمانی شهید فهمیده بودند. در این مطالعه ۱۹۷ بیمار بتاتالاسمی ماژور و ۹ بیمار بتاتالاسمی اینترمدیا بررسی شدند. بیماران بتاتالاسمی ماژور به‌طور منظم، ماهیانه خون دریافت می‌کنند، اما بیماران بتاتالاسمی اینترمدیا یا این که خون

به روش PCR-RFLP تعیین شد. مقدار ۳ml خون تام حاوی EDTA هر فرد درون یک لوله فالتون ریخته و DNA خون بیماران به روش فنل کلروفرم استخراج شد (۱۰). برای بررسی سایت پلی مورفیک XmnI با استفاده از تکنیک PCR قطعه ۶۵۷bp تکثیرشده با تکنیک RFLP تحت تأثیر آنزیم اندونوکلاز XmnI قرار داده شد. در افراد هموزیگوت XmnI(+/+) این قطعه به دو قطعه ۴۵۵bp و ۲۰۲bp شکسته شده در حالی که در افراد هتروزیگوت XmnI(+/-) فقط یک کروموزوم شکسته شده و در نتیجه علاوه بر دو قطعه مذکور یک قطعه ۶۵۷bp هم مشاهده شد، در حالی که در افراد فاقد این پلی مورفیسم فقط یک قطعه ۶۵۷ bp پس از انجام RFLP بر روی ژل آگارز مشاهده می گردد و در نهایت نتیجه به صورت هموزیگوت XmnI(+/+) و هتروزیگوت XmnI(+/-) و فاقد محل پلی مورفیک XmnI(-/-) مشخص شدند.

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد و با استفاده از آزمون های آنالیز واریانس و کای اسکویر مقایسه ها انجام شد.

یافته ها

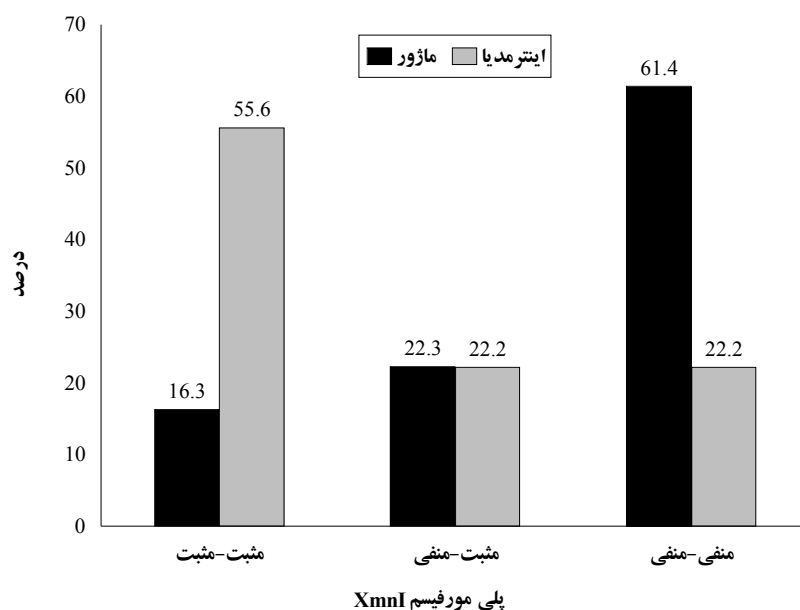
در این مطالعه با بررسی ۲۰۶ بیمار شامل ۱۹۷ بتاتالاسمی ماژور و ۹ بتاتالاسمی ایترمدیا که به بیمارستان شهید فهمیده کرمانشاه مراجعه نمودند با استفاده از روش PCR-RFLP، درصد فراوانی پلی مورفیسم XmnI در بیماران بتاتالاسمی ماژور و ایترمدیا طبق نمودار ۱ مشخص شد، که در بیماران بتاتالاسمی ماژور و ایترمدیا به ترتیب در ۳۲ و ۵ مورد سایت پلی مورفیک XmnI

دریافت نمی کنند و یا به صورت هر ۳-۲ ماه یک بار خون دریافت می کنند. هموگلوبین بیماران بتاتالاسمی ایترمدیا به طور معمول بین ۷-۱۰ g/dl می باشد که به وسیله پزشک فوق تخصص خون تأیید و معرفی شدند. در جمع آوری نمونه ها با کسب رضایت از بیماران والدینشان قبل از ترانسفوزیون خون جدید، از هر فرد مقدار ۵ml خون تام حاوی EDTA گرفته شد که در سه لوله جداگانه به مقدار ۱، ۲ و ۳ml جمع آوری شدند.

متغیرهای هماتولوژیک شامل Hb، Hct، MCV، MCH و MCHC با استفاده از دستگاه سل کانتر دیاترون تعیین شدند. کالیبر بودن دستگاه با مقایسه نتایج حاصل از این دستگاه با کولتر H₁ تأیید گردید.

درصد زنجیره های گلوبین (α, β, γ^G, γ^A) با استفاده از دستگاه HPLC مدل Shimadzo اندازه گیری شدند. مقدار ۱ml خون تام حاوی EDTA سه بار با سرم فیزیولوژی شسته شده و به نسبت ۱/۱۰ با آب دیونیزه رقیق شد. زنجیره های گلوبین به روش استاندارد استخراج شدند (۹). سپس زنجیره های گلوبین استخراج شده را به نسبت ۱۶ mg/ml در آب دیونیزه حل کرده و پس از حل شدن کامل، مقدار ۲۰ μl به دستگاه HPLC تزریق شد و درصد زنجیره های α, β, γ^G و γ^A گلوبین اندازه گیری و محاسبه شدند. قبل از انجام آزمایش دستگاه HPLC با استفاده از زنجیره های گلوبین استاندارد کالیبر شد. میزان HbF با استخراج از پرونده بیماران به روش الکتروفورز اندازه گیری شد.

محل پلی مورفیک XmnI در ناحیه 5' ژن γ^G از خوشه ژنی بتاگلوبین قرار دارد که حاصل تغییر C→T در موقعیت ۱۵۸ ژن γ^G است. پلی مورفیسم XmnI



نمودار ۱- توزیع فراوانی پلی مورفیسم XmnI در بیماران بتاتالاسمی ماژور و ایترمدیا در کرمانشاه (n=۲۰۶)

میانگین درصد زنجیره‌های $G\gamma$ و $A\gamma$ با استفاده از دستگاه HPLC اندازه‌گیری و سپس نسبت $G\gamma$ به $A\gamma$ محاسبه شد. ذکر این نکته ضروری است که درصد $G\gamma$ و $A\gamma$ و نسبت $G\gamma$ به $A\gamma$ تحت تأثیر رقت حاصله از ترانسفوزیون خون قرار نمی‌گیرد. میانگین درصد $G\gamma$ و $A\gamma$ و نسبت $G\gamma$ به $A\gamma$ برحسب پلی مورفیسم XmnI مشخص

جدول ۱- میانگین درصد HbF به روش الکتروفورز برحسب پلی مورفیسم XmnI در بیماران بتاتالاسمی ماژور و ایترمدیا در کرمانشاه (n=۲۰۶).

پلی مورفیسم XmnI	میانگین درصد HbF	
	ماژور	ایترمدیا
(+/+)	۹۷/۱±۲	۸۷±۱۱
(+/-)	۹۴/۶±۱۵	۹۰/۲±۱۱
(-/-)	۹۴/۴±۱۰	۷۹/۱±۱۲

روی هر دو کروموزوم وجود داشت و در ۴۴ و ۲ مورد این سایت پلی مورفیک تنها در روی یک کروموزوم وجود داشت و از طرفی در ۱۲۱ و ۲ مورد باقیمانده سایت پلی مورفیک XmnI وجود نداشت.

میزان HbF با استخراج از پرونده بیماران به روش الکتروفورز اندازه‌گیری شده و میانگین HbF برحسب پلی مورفیسم XmnI طبق جدول ۱ مشخص شد. همچنان‌که مشاهده می‌شود در حضور سایت پلی مورفیک XmnI مقدار HbF افزایش دارد، نکته حایز اهمیت این است که در بیماران بتاتالاسمی ماژور بیشترین مقدار HbF درحالتی است که سایت پلی مورفیک XmnI به صورت هموزیگوت وجود دارد درحالی‌که در بیماران بتاتالاسمی ایترمدیا بیشترین مقدار HbF درحالتی است که سایت پلی مورفیک XmnI به صورت هتروزیگوت وجود دارد.

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار درصد $G\gamma$ و $A\gamma$ و نسبت $G\gamma$ به $A\gamma$ بر حسب پلی مورفیسم XmnI در بیماران بتاتالاسمی ماژور و اینترمدیا در کرمانشاه (n=۲۰۶).

پلی مورفیسم XmnI				β -تالاسمی ماژور (n=۱۹۷)				β -تالاسمی اینترمدیا (n=۹)			
P.V	$G\gamma/A\gamma$	% $A\gamma$	% $G\gamma$	P.V	$G\gamma/A\gamma$	% $A\gamma$	% $G\gamma$	P.V	$G\gamma/A\gamma$	% $A\gamma$	% $G\gamma$
	۲/۹±۰/۷	۲۶/۳±۴	۷۳/۶±۴		۳±۰/۵	۲۵/۱±۲	۷۴/۸±۲				
۰/۰۰۱	۲/۵±۰/۱	۲۸/۴±۰/۶	۷۱/۵±۰/۶	۰/۰۰۱	۲/۵±۰/۴	۲۸/۵±۳	۷۱/۴±۳				
	۱/۷±۰/۱	۳۶/۶±۰/۴	۶۳/۴±۰/۴		۲±۰/۳	۳۳/۲±۴	۶۶/۷±۴				

جدول ۳- توزیع پارامترهای خونی در بیماران بتاتالاسمی ماژور و اینترمدیا در کرمانشاه

بتاتالاسمی	ماژور (n=۱۹۷)	اینترمدیا (n=۹)
RBC $\times 10^{12}/L$	۳/۳±۰/۵	۳/۶±۰/۷
Hb (g/dL)	۸/۹±۱/۱	۹/۳±۱/۳
Hct (%)	۲۶/۷±۳/۶	۲۷/۸±۴/۵
MCV (fL)	۸۱/۳±۷/۱	۸۰/۳±۳/۴
MCH (pg)	۲۷/۶±۲/۲	۲۷/۶±۱/۲
MCHC (g/dL)	۳۳/۶±۱/۷	۳۳/۶±۰/۸

در ۲۷/۴ درصد و در بیماران بتاتالاسمی اینترمدیا در ۲۲/۲ درصد عمل طحال برداری انجام شده بود.

بحث

عوارض بالینی بارز و مشکلات جسمی، روانی و اقتصادی که افراد مبتلا به بتاتالاسمی ماژور و اینترمدیا با آن دست به گریبان هستند و از طرف دیگر، هزینه‌هایی که در درمان و نگهداری این بیماران بر دولت تحمیل می‌شود، ما را بر آن واداشت تا مطالعات بیشتری در زمینه

شد (جدول ۲). همچنان که مشاهده می‌شود در حضور سایت پلی مورفیک XmnI سنتز زنجیره $G\gamma$ و در نتیجه نسبت $G\gamma$ به $A\gamma$ افزایش یافته است و بیشترین افزایش درحالتی است که سایت پلی مورفیک XmnI به صورت هموزیگوت وجود دارد.

میانگین پارامترهای خونی شامل سلول‌های قرمز خون (RBC)، هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (Hct)، حجم متوسط سلولی (MCV)، هموگلوبین متوسط سلولی (MCH) و غلظت میانگین هموگلوبین سلولی (MCHC) که با استفاده از دستگاه سل کانترومتری اندازگی شدند که در جدول ۳ نشان داده شده است. البته باید در نظر داشت که این بیماران ماهیانه خون دریافت می‌کنند ولی نمونه‌گیری برای کلیه آزمایش‌ها قبل از هرگونه دریافت خون جدید انجام شده است.

علائم بالینی شامل تغییر چهره و طحال برداری تحت نظر پزشک متخصص از روی پرونده بیماران ثبت شد که در بررسی ۱۹۷ بیمار بتاتالاسمی ماژور ۵۷/۴ درصد و در بررسی ۹ بیمار بتاتالاسمی اینترمدیا ۳۳/۳ درصد تغییر چهره داشتند. در بیماران بتاتالاسمی ماژور تحت بررسی

XmnI(-/-) پلی مورفیسم با بیماران در ۶۰/۶±۵/۷ درصد و در بیماران با پلی مورفیسم XmnI(-/-) برابر با ۳۹/۶±۴ درصد بود (۴).

در مطالعه انجام گرفته توسط لابی و همکارانش، نشان داده شده است که پلی مورفیسم C→T در ناحیه Cap در ژن $G\gamma$ در موقعیت ۱۵۸ که به وسیله آنزیم محدود الاثر XmnI تشخیص داده می شود در ارتباط با بیان بالای $G\gamma$ در بالغین و افزایش میزان HbF و تأخیر در تبدیل هموگلوبین جنینی به بالغین است (۵).

در مطالعه دیگری که در ژاپن انجام شده است مشخص شده که حضور محل پلی مورفیک XmnI در افراد سالم بالغ در ژاپن و کره جنوبی با افزایش زنجیره $G\gamma$ همراه بوده است (۱۲).

میلر و همکاران پلی مورفیسم XmnI را در افراد نرمال و بیماران سیکل سل بررسی کردند که در ۱۰۰ درصد بیماران سیکل سل و ۲۲ درصد افراد نرمال سایت پلی مورفیک XmnI وجود داشت. سپس تأثیر سایت پلی مورفیک XmnI را در افزایش سطح HbF در افراد نرمال و بیماران سیکل سل بررسی کردند و مشخص شد که در افراد نرمال حضور سایت پلی مورفیک XmnI تأثیر قابل ملاحظه ای در افزایش سطح HbF نداشت، ولی در بیماران سیکل سل حضور سایت پلی مورفیک XmnI سطح HbF افزایش داشت و نتیجه گرفتند که حضور این محل پلی مورفیک به طور واحد در افزایش سطح HbF تأثیری ندارد، ولی ممکن است وجود سایت پلی مورفیک XmnI در حضور عوامل دیگری مانند استرس اریتروپوئیتیک و آنمی، در افزایش سطح HbF مؤثر باشد (۱۳).

شناخت ژنتیک ملکولی این بیماری انجام دهیم. هدف مطالعه حاضر، تعیین پلی مورفیسم XmnI در ناحیه $G\gamma$ ژن $G\gamma$ در خوشه ژنی بتاگلوبین و ارتباط آن با میزان HbF و نسبت زنجیره $G\gamma$ به $A\gamma$ هموگلوبین F در بیماران بتاتالاسمی ماژور و ایترمدیا در کرمانشاه می باشد.

هر عاملی که قادر به کاهش عدم تعادل زنجیره های گلوبین گردد منجر به بروز شکل خفیف تر تالاسمی می شود. یکی از این عوامل، شاخص های ژنتیکی است که منجر به تولید زنجیره γ و افزایش سطح HbF می گردد. جهش های ناحیه پروموتور ژن $G\gamma$ و جایگزینی نوکلئوتید C → T در ناحیه ۱۵۸- پروموتور ژن $G\gamma$ که به وسیله آنزیم XmnI تشخیص داده می شود منجر به افزایش تولید $G\gamma$ در شرایط استرس اریتروپوئیتیک می شود و به طور نسبی عدم سنتز زنجیره β تالاسمی را جبران می کند (۱۱).

در مطالعات مختلفی که تاکنون انجام شده است نتایج مختلفی در رابطه با پلی مورفیسم XmnI حاصل شده است که در بعضی موارد بین حضور سایت پلی مورفیک XmnI و میزان HbF و درصد زنجیره $G\gamma$ ارتباط معناداری وجود نداشته است اما در بیشتر موارد این ارتباط اثبات شده است.

گیلمن و همکارانش در سال ۱۹۸۵ ارتباط بین حضور پلی مورفیسم XmnI و درصد زنجیره $G\gamma$ را در بیماران سیکل سل و بتاتالاسمی ایترمدیا بررسی کردند، که در بیماران با پلی مورفیسم XmnI(+/+) درصد زنجیره $G\gamma$ برابر ۶۹/۷±۴/۶ درصد بود در حالی که در بیماران با پلی مورفیسم XmnI (+/-) درصد زنجیره $G\gamma$ برابر

در یونان در سال ۲۰۰۵ با بررسی‌های انجام شده در مورد دو خواهر بتاتالاسمی در یک خانواده، مشخص شد که در اولی با XmnI(+/-) مقدار HbF برابر ۶ درصد و نسبت $G\gamma$ به $A\gamma$ برابر $70/30$ بود، یعنی این نسبت در حد جنینی باقی مانده بود، ولی در دومی با XmnI(-/-) مقدار HbF برابر $1/5$ درصد و نسبت $G\gamma$ به $A\gamma$ برابر $50/50$ بود و نتیجه گرفتند که عوامل مختلفی روی بیان ژن $G\gamma$ تأثیر می‌گذارند که یکی از این عوامل، وجود پلی مورفیسم XmnI بوده و سبب افزایش سنتز $G\gamma$ و در نتیجه افزایش نسبت $G\gamma$ به $A\gamma$ و افزایش HbF می‌شود (۱۷).

در مطالعه حاضر پس از بررسی ۱۹۷ بیمار بتاتالاسمی ماژور، در ۳۲ نفر سایت XmnI بر روی هر دو کروموزوم آنها وجود داشت ($3/16$ ٪) و در ۴۴ مورد سایت پلی مورفیک XmnI تنها در روی یک کروموزوم آنها وجود داشت ($3/22$ ٪) و در ۱۲۱ مورد دیگر سایت پلی مورفیک XmnI وجود نداشت ($4/61$ ٪).

در بررسی ۹ بیمار بتاتالاسمی ایترمدیا در ۵ مورد ($6/55$ ٪) به صورت XmnI(++), ۲ مورد ($2/22$ ٪) به صورت XmnI(+/-) و در ۲ مورد دیگر ($2/22$ ٪) از نظر حضور سایت پلی مورفیک XmnI منفی بودند.

میانگین $G\gamma$ و $A\gamma$ در بیماران بتاتالاسمی ماژور به ترتیب برابر $69/1$ درصد و $30/9$ درصد بود در حالی که میانگین $G\gamma$ و $A\gamma$ در بیماران بتاتالاسمی ایترمدیا به ترتیب برابر $70/9$ درصد و $29/1$ درصد بود. نسبت $G\gamma$ به $A\gamma$ در بیماران بتاتالاسمی ماژور و ایترمدیا به ترتیب برابر $2/3$ و $2/5$ مشخص شد.

در بررسی ارتباط حضور سایت پلی مورفیک XmnI و میانگین HbF با استفاده از آزمون ANOVA، ارتباط

دکتر احسانی و همکارانش تعداد ۱۶ بیمار بتاتالاسمی ایترمدیا در کرمانشاه را به منظور درمان با هیدروکسی اوره بررسی کردند. پس از تعیین پلی مورفیسم XmnI در بیماران درصد فراوانی به شرح زیر بود:

تعداد ۲ نفر XmnI(-/-)، ۶ نفر XmnI(+/-) و تعداد ۸ نفر XmnI(+++) مشخص شد و نشان دادند که بیشترین افزایش در میزان HbF و هموگلوبین توتال در افراد دارای پلی مورفیسم XmnI وجود دارد (۶).

در مطالعه‌ای که به وسیله دکتر کریمی و همکارانش در جنوب کشور انجام شد درصد فراوانی پلی مورفیسم XmnI را ۴۱ درصد گزارش کردند و نشان دادند که ارتباط معناداری بین حضور سایت پلی مورفیک XmnI و افزایش HbF در بیماران بتاتالاسمی ایترمدیا وجود دارد (۷). در مطالعه دیگری که توسط دکتر رحیمی و همکارانش در شیراز در روی بیماران سیکل سل و سیکل - تالاسمی انجام شد مشخص شد که در حضور سایت پلی مورفیک XmnI مقدار HbF و نسبت زنجیره $G\gamma$ به $A\gamma$ افزایش دارد (۱۴).

در یک مطالعه در لبنان که در روی بیماران بتاتالاسمی ایترمدیا انجام شده است، ارتباط میان وجود XmnI و سطح HbF دیده نشده است. بدین منظور برخی مطالعات شاخص‌های دیگر ژنتیکی به غیر از XmnI را در این موضوع دخیل می‌دانند (۱۵).

تین و همکارانش در سال ۲۰۰۵ طی بررسی‌هایی نشان دادند که حضور پلی مورفیسم XmnI سبب افزایش HbF در بیماران بتاتالاسمی می‌شود. آنها معتقد بودند که پلی مورفیسم XmnI در روی عوامل رونویسی تأثیر گذاشته و بیان HbF را افزایش می‌دهد (۱۶).

نتایج متفاوت در مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از تأثیر عوامل مختلف ژنتیکی دیگر به غیر از پلی مورفیسم XmnI در روی سنتز زنجیره $G\gamma$ و میزان HbF باشد.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر از یک طرف حضور یا عدم حضور محل پلی مورفیک XmnI در تمام بیماران بتاتالاسمی ماژور و اینترمدیا در کرمانشاه را بررسی و از طرف دیگر ارتباط آن را با HbF و درصد زنجیره $G\gamma$ سنجیده است. به طور کلی نتایج مطالعه کنونی نشان داده است که حضور پلی مورفیسم XmnI در موقعیت ۱۵۸ ژن $G\gamma$ سبب افزایش سنتز $G\gamma$ و افزایش سطح HbF در بیماران بتاتالاسمی ماژور و اینترمدیا در کرمانشاه می‌شود، در نتیجه در افراد با حضور پلی مورفیسم XmnI زمان نیاز به ترانسفوزیون به تأخیر افتاده و از شدت علائم بالینی در این بیماران کاسته می‌شود.

معناداری وجود نداشت ولی از نظر توصیفی، میانگین درصد HbF در بیماران بتاتالاسمی ماژور و اینترمدیا در حضور سایت پلی مورفیک XmnI افزایش داشت (جدول ۱).

در مقایسه نسبت زنجیره $G\gamma$ به $A\gamma$ با حضور سایت پلی مورفیک XmnI به وسیله آزمون ANOVA ارتباط معناداری بین این دو وجود داشت ($p=0/001$). حضور سایت پلی مورفیک XmnI سبب افزایش بیان ژن $G\gamma$ و سنتز زنجیره $G\gamma$ و در نتیجه افزایش نسبت زنجیره $G\gamma$ به $A\gamma$ در بیماران بتاتالاسمی ماژور و اینترمدیا می‌شود (جدول ۲).

اما آزمون ANOVA ارتباط معناداری بین حضور سایت پلی مورفیک XmnI و میانگین پارامترهای خونی در بیماران نشان نداد، شاید دلیل عمده این باشد که این بیماران به طور ماهیانه خون دریافت کرده‌اند.

نتایج مطالعه حاضر با مطالعاتی که در لبنان (۴۴) انجام شده متفاوت و مشابه مطالعات دیگر می‌باشد. این

Abstract:

The XmnI Polymorphic Site at 5' to G γ Gene and its Correlation to the HbF Level and G γ : A γ Ratio in β -Thalassemia the Major and the Intermediate Patients from Kermanshah

Nemati,H.¹;Rahimi,Z.²;Bahrami,GH.³;Nomani,H.²;Rezaei,M.⁴

1. MS in Biochemistry, Kermanshah University of Medical sciences.
2. Assistant Professor in Biochemistry, Kermanshah University of Medical sciences.
3. Associate Professor in Pharmacology, Kermanshah University of Medical sciences.
4. Assistant Professor in Biostatistics, Kermanshah University of Medical sciences.

Introduction: Beta Thalassemia is the most common inherited bloody disorder, affecting synthesis of the beta globin chain of hemoglobin. The type of β -Thalassemia mutation affects on the β -globin chain synthesis that appears as β^0 , β^+ and β^{++} -Thalassemia. The presence of XmnI polymorphic site at the 5' region of the G γ -globin gene affects on the rate of G γ chain synthesis and in some conditions influences on the production of HbF. These effects are important in the view of presentation of clinical symptoms in β -Thalassemia patients.

Materials and Methods: In this researches one hundred ninety seven beta Thalassemia the Major and nine beta Thalassemia the Intermediate patients who had been registered in shahid fahmideh hospital in Kermanshah were studied. The XmnI polymorphisms in the region of 5' to G γ gene was determined by PCR-RFLP procedure. The percent of G γ and A γ chains in HbF were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The HbF levels were determined by electrophoresis (according to patients' files). Data were subjected to the chi square & analysis of variance (ANOVA).

Results: Analysis of XMN1 polymorphism from both groups showed that there were 32(16.3%) XmnI homozygote (+/+) and 44(22.3%) XMN1 heterozygote (+/-) in β -Thalassemia the Major group. In patients with β -Thalassemia the Intermediate 5 (55.6%) XmnI homozygote (+/+) and 2 (22.3%) XmnI heterozygote (+/-) were found. The mean level of HbF in β -Thalassemia the Major and the Intermediate patients was 95.3g/dl, 85.4g, respectively. Mean G γ / A γ ratio in β -Thalassemia the Major and the Intermediate patients was 2.5% and 2.3% respectively. In the present study while using ANOVA test we found that, in beta Thalassemia patients, the presence of XmnI polymorphic site increases HbF levels, G γ percent and G γ / A γ ratio ($p=0.001$).

Conclusion: The present study has determined XmnI polymorphic site in β -Thalassemia the Major and the Intermediate patients from Kermanshah and has shown that the presence of this polymorphic site has had a positive influence on HbF production and G γ chain percent.

Keywords: Thalassemia, HbF, G γ chain percent, XmnI polymorphism.

منابع

1. Adamson JW. Oncology & hematology: In: Kasper DL, editor. Harrison's principles of internal medicine. 16th ed. New York: McGraw Hill; 2005, PP. 185-216
2. Cooley TB, Lee P. A series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. *Trans American Pediatric Society* 1925; 37:29-40
۳. حق شناس م. زمانی ج. تالاسمی. چاپ اول. شیراز: دانشگاه علوم پزشکی شیراز، سال ۱۳۷۶، صفحات: ۲۸-۳۳
4. Gilman JG, Huisman THJ. DNA sequence variation associated with elevated fetal γ globin production. *Blood* 1985; 66:783-87
5. Labie D, Dunda BO, Roubahi F, Pagnier J, Ragusa A, Nagel RL. The -158 site 5' to the γ gene and γ expression. *Blood* 1985; 66(6):1463-65
۶. احسانی م، هدایتی ع، باقری ع. اثر درمانی هیدروکسی اوره در بیماران بتاتالاسمی ایترمدیا. بهبود، فصلنامه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه. پائیز ۱۳۸۱؛ سال ششم، شماره سوم، صفحات ۲۴-۱۷
7. Karimi M, Yarmohammadi H, Farjadian S, Mighaddam Z, Cappeliini MD, Giordano PC. Beta thalassemia intermedia from Southern Iran: IVSII.1(G:A) is the prevalent thalassemia intermedia allele. *Hemoglobin* 2002; 26(2):147-54
8. Nadkarni A, Ghosh K, Gorakshaker A, Colah R, Mohanty D. Variable clinical severity of Hb E β -thalassemia among Indians. *JAPI* 1999; 47:966-68
9. Clegg JB, Naughton MA, Weatherall DJ. An improved method for the characterization of human hemoglobin mutants: identification of $\alpha 2\beta 2(95\text{GLU})$ hemoglobin N(Baltimore). *Nature* 1965; 207:945-47
10. Old JM. Hemoglobinopathies: In: Elles R, editor. *Methods in molecular medicine: molecular diagnosis of genetic disease*. Totowa, NJ: Humana Press; 1996, PP. 169-83
11. Galanello R, Cao A. Relationship between genotype and phenotype (thalassemia intermedia). *Ann New York Acad Sci* 1995; 850:325-33
12. Shimizu K, Park KS, Enoki Y. The XmnI site 5' to the G gamma globin gene polymorphism and its relationship to %HbF and %G-gamma in normal Japanese and Korean adults. *Hum Hered* 1992; 42(4):253-8
13. Miller BA, Olivieri N, Salameh M, Ahmed M, Antogentti G, Huisman THJ, et al. Molecular analysis of the high-hemoglobin-F phenotype in Saudi Arabian sickle cell anemia N. *Engl J Med* 1987; 316(5):244-50

14. Rahimi Z, Karimi M, Haghshenass M, Merat A. Beta globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Southwest Iran. *Am J Hematol* 2003; 74(3):156-60
15. Qatanani M, Taher A, Koussa S, Naaman R, Fisher C, Rugless M, et al. Beta thalassemia intermedia in Lebanon. *Euro J Haematol* 2000; 64:237-44
16. Thein SL. Genetic modifiers of β thalassemia. *Haematologica* 2005; 90:649-60
17. George VZ, Dedoussis MC, Kyrtsolis MG, Kleio S, Panayiotis T, Aphroditi L. Genetic modifiers of β thalassemia. *Haematologica* 2005; 8(1):70-74