

Prevalence of Co-Inheritance of Alpha-Thalassemia with Beta-Thalassemia and Beta-Hemoglobinopathy in Ahvaz City

Saki N¹, Dorgalaleh A², Kashani Khatib Z², Alizadeh Sh^{2*}, Rahim F³, Galehdari H⁴,
Kaikhaei B¹, Pedram M¹, Dehghani Fard A⁵

¹ Research Center of Thalassemia and Hemoglobinopathies, Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

² Department of Hematology and Transfusion Medicine, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Toxicology Research Center, Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

⁴ Departments of Genetics, Faculty of Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

⁵ Department of Hematology and Blood Bank, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding author: Tel: +982186704715 Fax: +982188622533 E-mail: alizadehs@sina.tums.ac.ir

Received: 16 Nov 2012 Accepted: 19 Feb 2013

ABSTRACT

Background: Co-inheritance of hemoglobin gene defects is a rare important status that can lead to double heterozygote or homozygote with significant clinical manifestations. Such conditions can be observed in co-inheritance of alpha-thalassemia with beta-thalassemia or hemoglobinopathy. The aim of this study was to evaluate the prevalence of alpha-thalassemia with beta-thalassemia and hemoglobinopathy co-inheritance in a considerable number of Iranian.

Methods: This descriptive study was performed on patients with abnormal hematological findings in favor of alpha-thalassemia, beta-thalassemia or beta-hemoglobinopathies. Patients with low MCV and MCH levels and high HbA2 (>3.5) and those with low MCV and MCH and normal or low HbA2 were candidate for molecular analysis for beta and alpha thalassemia respectively. Abnormal Hb electrophoresis was diagnostic criteria for molecular analysis of beta-hemoglobinopathies.

Results: Study revealed that more than half of the patients with alpha-thalassemia affected simultaneously by beta-thalassemia and about thirty percent inherited beta-hemoglobinopathies. Among patients with beta-thalassemia, HbSCd6 (A-T) was the most common mutation and in alpha-thalassemic patients $\alpha^{3.7}$ was the commonest mutation.

Conclusion: Relatively high prevalence of co-inheritance of alfa-thalassemia with beta-thalassemia and hemoglobinopathies reflect the necessity of genetic consulting and molecular analysis in diagnosis of such conditions.

Keywords: Alfa-Thalassemia; Beta-Thalassemia; Hemoglobinopathy; Co-Inheritance

بررسی شیوع توارث همزمان آلفا تالاسمی با بتا تالاسمی و هموگلوبینوپاتی در شهرستان اهواز

نجم‌الدین ساکی^۱، اکبر درگل‌لله^۲، زهرا کاشانی خطیب^۲، شعبان علیزاده^{۳*}، فاخر رحیم^۳، حمید گله داری^۴،
بیژن کیخایی^۱، محمد پدram^۱، علی دهقانی فرد^۵

^۱ مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران
^۲ گروه هماتولوژی و علوم انتقال خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۳ مرکز تحقیقات سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران
^۴ گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
^۵ گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱۸۶۷۰۷۴۱۵ فاکس: ۰۲۱۸۸۶۲۲۵۳۳ پست الکترونیک: alizadehs@sina.tums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: به ندرت ممکن است توارث همزمان بتا تالاسمی با آلفا تالاسمی و هموگلوبینوپاتی مشاهده شود که در برخی موارد این حالت می‌تواند باعث ایجاد هتروزیگوت‌های دوگانه یا هموزیگوت‌هایی با علائم بالینی شدید در فرزندان گردد. هدف مطالعه حاضر تعیین شیوع توارث همزمان آلفا تالاسمی با بتا تالاسمی یا بتاهموگلوبینوپاتی می‌باشد.

روش کار: مطالعه توصیفی حاضر بر روی جمعیت بزرگی از افراد که حدود ۶۰۰۰ نفر می‌باشند در شهرستان اهواز صورت گرفته است. شمارش کامل سلول‌های خونی، اندازه‌گیری HbA2 و الکتروفورز هموگلوبین برای شناسایی ناقلین تالاسمی و هموگلوبینوپاتی مورد استفاده قرار گرفته و همچنین HbA2 بالا ($>3/5$) به عنوان معیار تشخیصی استاندارد برای بتا تالاسمی و MCV و MCH پایین همراه با HbA2 نرمال یا کاهش یافته به عنوان معیار تشخیصی آلفا تالاسمی در نظر گرفته شد. در ادامه بیماران مشکوک به آلفا و یا بتا تالاسمی جهت تعیین نقص ملکولی عامل بیماری مورد بررسی ملکولی قرار گرفتند. همچنین افراد دارای الگوی الکتروفورزی هموگلوبین غیر طبیعی کاندید بررسی ملکولی برای بتاهموگلوبینوپاتی بودند.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاکی از این است که از بین ۶۰۰۰ نفر جمعیت مورد بررسی، ۱۴۱ بیمار به طور همزمان به آلفا تالاسمی یا بتا تالاسمی و یا آلفا تالاسمی با بتاهموگلوبینوپاتی مبتلا بودند. این تعداد شامل ۱۳ ($1/11$) جنین، ۵۵ ($2/38$) مرد و ۷۳ ($7/50$) نفر زن بود. از بین ۱۴۱ بیمار مبتلا به آلفا تالاسمی، ۹۲ نفر ($24/65$) ناقل بتا تالاسمی، ۳ نفر بتا تالاسمی مازور ($2/12$)، ۴۳ ($30/49$) مورد بتاهموگلوبینوپاتی داشتند و ۳ ($2/12$) نفر مبتلا به هتروزیگوت دوگانه بتا تالاسمی و واریانت هموگلوبینوپاتی بودند. نتایج حاکی از وجود ۲۲ جهش شایع ژن بتا گلوبین بود که در این میان (HbS Cd6(A-T)) شایع‌ترین جهش شناخته شده بود. در مورد آلفا تالاسمی $\alpha^{3.7}$ شایع‌ترین اختلال ژنی بود و سپس POLYA-1 در بین مردان و CD19 در میان زنان اختلالات شایع بعدی بودند.

نتیجه‌گیری: از آنجا که نتایج مطالعه حاضر، حاکی از این حقیقت است که $30/49$ افراد مورد مطالعه دارای توارث همزمان آلفا تالاسمی و بتاهموگلوبینوپاتی که می‌تواند علائم بالینی مهمی را در پی داشته باشد بودند و همچنین تعداد قابل ملاحظه‌ای از بیماران ناقل بتا تالاسمی بوده که می‌تواند در صورت توارث همزمان با هموگلوبینوپاتی‌ها (به خصوص هموگلوبینوپاتی‌های S و E) علایم بالینی شدیدی را در پی داشته باشد، آزمایش‌های غربالگری و بررسی‌های ملکولی در هنگام مشاوره ژنتیکی برای افراد مشکوک به این اختلالات باید مدنظر قرار گیرد. علاوه بر این، شناسایی افراد ناقل آلفا و بتا تالاسمی جهت ممانعت از صرف وقت و هزینه گزاف جهت شناسایی اتیولوژی آنمی‌ها و استفاده نا بجا از مکمل‌های آهن ضروری به نظر می‌رسد.

کلمات کلیدی: آلفا تالاسمی، بتا تالاسمی، هموگلوبینوپاتی، توارث همزمان

دریافت: ۹۱/۸/۲۵ پذیرش: ۹۱/۱۱/۳۰

مقدمه

تالاسمی گروهی از اختلالات ارثی با توارث اتوزوم مغلوب بوده که با کاهش (+) یا عدم تولید (-) یک یا چند زنجیره گلوبین همراه می باشند. بسته به نوع زنجیره درگیر، تالاسمی به انواع α ، β ، $\epsilon\beta$ و غیره تقسیم می شود [۱].

اختلالات تالاسمی شایع ترین بیماری های ارثی تک ژنی در سراسر جهان می باشند به طوریکه حدود ۳٪ از کل جمعیت دنیا (۱۵۰ میلیون نفر)، تنها حامل ژن بتا تالاسمی می باشند. هر چند تالاسمی از بیش از ۶۰ کشور دنیا گزارش شده است اما بیشترین شیوع این اختلال در کمربند مالاریا خیز دنیا، شامل کشورهای حوزه مدیترانه، بخش هایی از غرب و شمال آفریقا، خاورمیانه، شبه قاره هند و جنوب شرق آسیا مشاهده شده است. ایران نیز جزء کشورهای می باشد که بر روی کمربند مالاریا خیز واقع شده و با شیوع به نسبت بالای تالاسمی روبرو است [۵-۲].

تاکنون بیش از ۲۰۰ جهش نقطه ای مختلف و نیز موارد نادری از حذف ژنی در مورد ژن بتا و بیش از ۲۳ نقص ژنی متفاوت که مسئول ایجاد تالاسمی آلفا می باشند در سراسر جهان گزارش شده است. معمولاً هر جمعیتی، دارای تعدادی جهش شایع تالاسمیک و نیز تعدادی جهش نادر خاص مربوط به جمعیت خود می باشد [۶،۷].

هر چند ژن بتا تالاسمی در جمعیت ایرانی شیوع بالایی دارد اما فراوانی آن در نواحی مختلف ایران کاملاً متفاوت می باشد به طوریکه بالاترین شیوع آن در امتداد خطوط ساحلی شمال (دریای خزر) و جنوب (خلیج فارس) با میزان بیش از ۱۰٪ دیده می شود. این در حالی است که شیوع این اختلال در دیگر نواحی ایران بین ۴ تا ۸ درصد می باشد [۸،۹].

تاکنون بیش از ۵۰ جهش متفاوت مربوط به ژن بتا

در سراسر ایران یافته شده است که این موضوع نشان دهنده ناهمگونی جمعیت ایران می باشد [۸-۱۰]. جهش های مختلف عامل بتا تالاسمی در ایران، دارای منشأ های متفاوتی همچون ایرانی، مدیترانه ای، کردی، ترکی، مصری، تونسی، هندی و چینی می باشند [۱۱].

آلفا تالاسمی که برخلاف نوع بتا در ایران بسیار نادر می باشد حاصل کاهش تولید زنجیره آلفا هموگلوبین می باشد. تولید زنجیره آلفای هموگلوبین توسط دو ژن موجود بر روی هرکدام از کروموزوم های شماره ۱۶ کنترل می شود [۱۲].

تولید ناقص زنجیره آلفا معمولاً حاصل حذف یک $(\alpha\alpha/\alpha\alpha)$ و یا هر دو $(\alpha\alpha/--)$ ژن آلفا می باشد. هر چند در موارد نادری جهش های نقطه ای در مناطق حساس ژن $1(\alpha\alpha^T)$ یا $2(\alpha^T\alpha)$ نیز می تواند آلفا تالاسمی (نوع غیر حذفی) را به همراه داشته باشد. شایع ترین حذف های ژنی شناخته شده مربوط به ژن آلفا شامل $\alpha^{3.7}$ ، $\alpha^{4.2}$ ، α^{Med} و $\alpha^{20.5}$ می باشند. علاوه بر این در موارد بسیار نادری، آلفا تالاسمی می تواند در نتیجه حذف عناصر تنظیمی ژن آلفا که MCS-R¹ نامیده می شوند ایجاد گردد [۱۲].

هموگلوبینوپاتی ها اختلالات کیفی ناهمگونی هستند که می توانند در اثر جهش هایی در هر یک از ژن های آلفا یا بتای هموگلوبین ایجاد شوند. این اختلالات عموماً حاصل جهش های نقطه ای می باشند که موجب جایگزینی اسید آمینه ای جدید به جای اسید آمینه اصلی، و در نتیجه تغییر بار الکتریکی هموگلوبین و نیز تغییر حرکت الکتروفوریتیک و ظهور علائم بالینی احتمالی آن می گردد. اغلب این اختلالات، در حالت هتروزیگوت فاقد علائم بالینی می باشند، در حالیکه اشکال هموزیگوت برخی از این هموگلوبین ها (مانند هموگلوبین S و E) علائم بالینی قابل ملاحظه ای را به همراه دارند [۱۳].

به صورت نادر ممکن است توارث همزمان آلفا تالاسمی با بتا تالاسمی یا هموگلوبینوپاتی ها مشاهده

¹Multi-Species Conserved Sequences

شود. یافتن این هتروزیگوت های دوگانه به خصوص برای مشاوره ژنتیکی پیش از ازدواج و تشخیص پیش از تولد (PND)^۱ از اهمیت بسزایی برخوردار است چرا که ازدواج این هتروزیگوت های دوگانه می تواند منجر به تولد هموزیگوت های کشنده تالاسمی گردد. علاوه بر این، برخی هتروزیگوت های آلفا تالاسمی با هموگلوبینوپاتی، می تواند علائم بالینی مهمی را به همراه داشته باشد [۱۳].

همراهی بتا تالاسمی با HbS نیز موجب ایجاد نوعی سندرم داسی شونده با علائم بالینی متغیر می گردد و توارث جهش مربوط به HbE از یکی از والدین و جهش بتا تالاسمی از والد دیگر (HbE/ β -thalassemia) می تواند حالت بالینی شبیه به بتا تالاسمی اینترمدیا یا ماژور ایجاد کند، همچنین این هتروزیگوت های دوگانه یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده تالاسمی با علائم بالینی شدید در سراسر جهان می باشد. توارث همزمان HbC و بتا تالاسمی نیز می تواند ایجاد سندرمی با علائم بالینی متغیر نماید [۱۳، ۱].

هدف مطالعه حاضر تعیین شیوع توارث همزمان آلفا و بتا تالاسمی یا هموگلوبینوپاتی در شهر اهواز به وسیله بررسی جهش های شایع بتا تالاسمی، آلفا تالاسمی و بتا هموگلوبینوپاتی ها می باشد.

روش کار

مطالعه حاضر به عنوان بخشی از برنامه ملی پیشگیری از تالاسمی بر روی ۶۰۰۰ بیمار و نیز تعدادی جنین که به منظور تشخیص ناقلین تالاسمی یا تشخیص پیش از تولد (PND) به مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی شهر اهواز مراجعه کرده بودند صورت گرفت. ابتدا تمامی مراجعه کنندگان فرم رضایت نامه را تکمیل کرده و سپس ۸ میلی لیتر خون

در دو لوله جداگانه حاوی ضدانعقاد EDTA جمع آوری شد. یکی از نمونه ها جهت تعیین میزان هموگلوبین، شمارش گلبول قرمز، حجم متوسط سلولی (MCV) و متوسط هموگلوبین سلولی (MCH) توسط آنالیزور هماتولوژی (Sysmex KX21; Sysmex, Kobe, Japan) مورد استفاده قرار گرفت و نمونه دیگر جهت انجام الکتروفورز هموگلوبین به روش استات سلولز و اندازه گیری HbA2 با روش کروماتوگرافی ستونی در بیماران با $MCV \leq 80 \text{ fl}$ و $MCH < 27 \text{ pg}$ مورد استفاده قرار گرفت. هموگلوبین F نیز با کیت ها شرکت bio-Rad اندازه گیری شد.

کاهش MCV و MCH همراه با افزایش HbA2 ($> 5/3$) شاخص تشخیصی استاندارد برای بتا تالاسمی مینور در نظر گرفته شد. در حالیکه بیماران با MCV و MCH کاهش یافته، همراه با HbA2 نرمال ناقل آلفا تالاسمی در نظر گرفته شدند. همچنین رنگ آمیزی حیاتی برای بررسی وجود اجسام هموگلوبین H به عنوان بخشی از آزمایشهای غربالگری بر روی بیماران مشکوک به آلفا تالاسمی انجام شد. افراد با $MCV < 80$ و $MCH < 27 \text{ pg}$ و $Hb < 15/3 \text{ g/dl}$ برای مردان و $Hb < 14 \text{ g/dl}$ برای زنان، کاندید بررسی مولکولی برای حضور جهش های تالاسمی بوده و افراد با الگوی الکتروفورزی غیر طبیعی (حضور واریانت های غیر طبیعی هموگلوبین) کاندید بررسی مولکولی برای هموگلوبینوپاتی ها بودند.

بررسی مولکولی ژن بتا گلوبین

ابتدا DNA بیماران با استفاده از کیت accuprep (BIONEER, S. Korea) از نمونه خون وریدی حاوی ضد انعقاد EDTA استخراج گردید.

بررسی با روش PCR-Reverse Dot- (RDB) Blot

واکنش زنجیره پلی مرز (PCR) روش RDB به عنوان یک روش غربالگری برای تعیین ناقلین بتا تالاسمی، براساس دستورالعمل سازنده کیت Vienna

¹ Pre Natal Diagnosis

3'UTR صورت می گرفت. مخلوط واکنش PCR شامل ۱۰۰ ng DNA بیمار، ۲/۵ μL بافر PCR با غلظت ۱۰X، ۱/۵ mM MgCl₂، ۰/۲ mM از هر داکسی نوکلئوتید، ۰/۴ pmol/L از هر پرایمر بوده و حجم نهائی به وسیله آب فاقد RNase و DNase به ۲۵ μL رسانده شد. برنامه PCR به وسیله سایکلر حرارتی (PCR express thermal cycler; Hybaid Ltd, Ashford, Middlesex, UK) برنامه شامل ۳ دقیقه حرارت ۹۵ درجه، ۳۰ سیکل دمایی که شامل ۳۰ ثانیه ۹۵ درجه، ۳۰ ثانیه ۵۹ درجه، ۳۰ ثانیه ۷۲ درجه، و در نهایت نیز ۵ دقیقه انکوباسیون در ۷۲ درجه بود و سرانجام محصول PCR در دو واکنش مجزا با استفاده از پرایمرهای بالا و با استفاده از ABI PRISMTM Big Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Fairlands, South Africa) بر اساس دستورالعمل سازنده کیت پروسس گردید و بر روی ABI PRISMTM 3700 sequencer (Applied Biosystems). بررسی صورت گرفت. تمام جهش‌های ژن بتا مانند Hb S، Hb C و... با این روش ردیابی گردیدند. پس از تعیین توالی جهت تایید نتایج از RFLP^۴ (هاپلوتایپینگ و ARMS استفاده شد که در اینجا شرایط PCR همان شرایط یاد شده فوق بود و پرایمرهای مربوطه نیز در جدولهای ۲ و ۳ آمده‌اند [۱].

هموگلوبینوپاتی‌ها

جهت تایید نتایج تعیین توالی، PCR-RFLP برای واریانت‌های شایع هموگلوبین مانند HbS، HbD و HbO^{Arab} مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر این در برخی موارد از کیت (Vienna lab. Austria) RDB^۵ بهره گرفته شد.

(Lab GmbH, Vienna, Austria) مورد استفاده قرار گرفت. این کیت می‌تواند به طور همزمان ۲۲ جهش شایع ژن بتا گلوبین را با استفاده از Oligonucleotide Arrays Immobilized بر روی نوار آزمایش آشکار سازد. در RDB که به عنوان یک روش مستقیم برای شناسایی جهش‌های (determinant) تالاسمی استفاده می‌شود، توالی نرمال و جهش یافته با استفاده از پرایمر بیوتینیته شده^۱ در واکنش زنجیره پلی‌مرز (PCR) تکثیر یافته و تگ شده، سپس هیبرید شده^۲ تا نوار نیتروسولوز فیکس شود و در نهایت با استفاده از یک واکنش آنزیماتیک با بهره‌گیری از میل ترکیبی بیوتین-آویدین قابل رؤیت می‌گردد.

جهت تایید نتایج RDB از بررسی جهش مقاوم به تکثیر (ARMS)^۳ بهره گرفته شد و برای جهش‌های ناشناخته از تعیین توالی ژن بتا گلوبین استفاده شد.

بررسی مستقیم توالی DNA

کام اصلی جهت بررسی وجود مارکرهای بتا تالاسمی و بتاهموگلوبینوپاتی، تعیین توالی ژن β گلوبین به صورت دو قطعه مجزا بود.

قطعه نخست که از نوکلئوتید ۱۱۰- بالا دست ژن تا بخش اول اینترون ۲ را در بر می‌گرفت با استفاده از پرایمرهای forward₁ 5'AACCTCCTAAGCCAGTGCCAGAAGA3' و reverse₂ 5'CCCCTTCCTATGACATGAACCTTAA3' تکثیر و تعیین توالی گردید. قطعه دوم ژن، شامل بخش انتهائی اینترون دوم تا قسمتی از پائین دست ژن بود با استفاده از جفت پرایمر forward₂ 5'CAATGTATCATGCCTCTTTGCACC3' و reverse₂ 5'CACTGACCTCCACATTCCTTTT3' تکثیر و تعیین توالی گردید. به طور کلی تکثیر و تعیین توالی ژن از نوکلئوتید ۱۱۰- (ناحیه ترجمه نشده 5' UTR) تا

¹ Biotinylated

² Hybridized

³ Amplification Refractory Mutation System

⁴ Restriction Fragment Length Polymorphism

⁵ Reverse Dot Blot

بررسی مولکولی ژن آلفا گلوبین

در موارد کاندیدای بررسی آلفا تالاسمی، اولین گام استفاده از کیت RDB (Vienna lab. Austria) بود. برای تشخیص جهش های نقطه‌ای هر دو ژن آلفا گلوبین ($HBA1$ و $HBA2$) تکثیر و تعیین توالی شدند. علاوه براین، gap-PCR به صورت مولتیپلکس^۱ برای تشخیص چهار حذف شایع یعنی $\alpha^{3.7}$ ، $\alpha^{4.2}$ ، α^{Med} و $\alpha^{20.5}$ مورد استفاده قرار گرفت. همچنین RFLP به عنوان یک روش جهت بررسی دو گانه^۲ هموگلوبین Constant Spring استفاده می‌شد.

بررسی DNA جنینی

برای تشخیص پیش از تولد، نمونه‌گیری ویلوس کوریون و مایع آمنیوتیک در سه ماهه نخست بارداری (هفته ۱۰-۱۲) (توسط متخصص زنان و یا رادیولوژی) انجام شد. سپس برای حذف هرگونه آلودگی Deciduas microscopic Maternal Dissection انجام گرفت و DNA از نمونه به

پیش از تایید نتیجه تشخیص پیش از تولد، باید نتایج هماتولوژیک، فنوتیپ و ژنوتیپ والدین در دسترس باشد. نمونه والدین و کنترل های مثبت و منفی باید همواره در بررسی ها مورد استفاده قرار گیرند. روش اصلی مورد استفاده جهت تعیین جهش های مربوط به بتا تالاسمی برای هر یک از جنین ها، تعیین توالی ژن بتا گلوبین بود. روش β - Reverse Assay kit, Vienna lab. Austria) Globin Strip dot blotting به عنوان یک روش پشتیبان^۳ استفاده شد. برای تایید بیشتر نتایج از تکنیک هایی همچون ARMS و مطالعات linkage بهره گرفته شد.

یافته ها

در این مطالعه از بین ۶۰۰۰ نفر، ۳۵۶ زن، ۳۶۵ مرد و ۳۰۶ جنین از لحاظ وجود آلفا تالاسمی، بتا تالاسمی و بتا هموگلوبینوپاتی مورد بررسی قرار گرفتند. شاخص های خونی و نتایج الکتروفورز بدست آمده در جدول ۱ خلاصه شده اند (جدول ۱).

جدول ۱. یافته های مربوط به سن و شاخص های هماتولوژیک در بین زنان و مردان جامعه مورد مطالعه

تعداد (میانگین $\pm$ انحراف معیار)		
مرد	زن	
سن		
۵۴ (۲۹/۴۳ $\pm$ ۵/۳۴)	۷۱ (۲۴ $\pm$ ۵/۵۲)	
شمارش RBC (در یک میکرولیتر)		
۵۵ (۶/۰۱ $\pm$ ۰/۸۲)	۷۱ (۵/۲۸ $\pm$ ۰/۷۳)	
MCV (فمتو لیتر)		
۵۵ (۷۰/۴۷ $\pm$ ۷/۵۹)	۷۰ (۶۷/۴۸ $\pm$ ۸/۴۴)	
MCH (پیکو گرم)		
۵۵ (۲۱/۹۷ $\pm$ ۴/۱۴)	۷۱ (۲۱/۹۷ $\pm$ ۷/۵۴)	
HbA1 (درصد)		
۵۴ (۸۴/۲۹ $\pm$ ۱۷/۵۸)	۶۹ (۸۰/۳۳ $\pm$ ۲۶/۳۵)	
HbA2 (درصد)		
۵۵ (۴/۱۳ $\pm$ ۱/۴۷)	۷۰ (۴/۹۵ $\pm$ ۶/۶۸)	
HbF (درصد)		
۵۴ (۰/۹ $\pm$ ۱/۴۶)	۶۹ (۱/۹۹ $\pm$ ۵/۲۹)	
سایر هموگلوبین ها (درصد)		
۱۶ (۳۷/۶۵ $\pm$ ۱۱/۸۲)	۱۸ (۴۸/۷۲ $\pm$ ۲۷/۴۱)	

وسيله Accuprep Genomic DNA Extraction (BIONEER, S. Korea) استخراج شد. در ابتدا نمونه جهت حصول اطمینان از فقدان آلودگی خون مادری بررسی شد.

در ابتدا افرادی که بر اساس یافته های دستگاه شمارشگر سلولی، الکتروفورز هموگلوبین و مقادیر HbA2، مشکوک به بتا تالاسمی مینور بودند به وسیله هیبریدیزاسیون معکوس^۴ برای وجود ۲۲

³ Backup

⁴ Reverse Hybridization

¹ Multiplex

² Double Check

بین پراکندگی جهش های ژن آلفا و جنسیت افراد مورد مطالعه اختلاف معنی داری وجود نداشت ($CI=0/95$, $p=0/287$).

از بین ۶۰۰۰ نفر جمعیت مورد مطالعه، ۱۴۱ نفر به طور همزمان به آلفا و بتا تالاسمی و یا آلفا تالاسمی و بتاهموگلوبینوپاتی مبتلا بودند. این موارد شامل ۱۳ جنین ($11/1\%$)، ۵۵ نفر مرد ($38/2\%$) و ۷۳ نفر زن ($50/7\%$) بودند. از بین ۱۴۱ نفر بیمار مبتلا به آلفا تالاسمی، ۹۲ نفر ($62/24\%$) به طور همزمان ناقل بتا تالاسمی بودند، ۳ مورد ($2/12\%$) مبتلا به بتا تالاسمی مازور بوده و ۴۳ نفر ($30/49\%$) دچار بتاهموگلوبینوپاتی (Hb S, G, D, E) نیز بودند (جدول ۴).

جدول ۴. پراکندگی موتاسیون های بتا هموگلوبینوپاتی ها در بین جمعیت زن و مرد تحت مطالعه

جنسیت		
مرد	زن	
۱۳(۳۳/۳)	۱۵(۳۸/۵)	HbS CARR
۲(۵/۱)	۱(۲/۶)	HbS AFFE
۴(۱۰/۳)	۲(۵/۱)	HbD CARR
۱(۲/۶)	-	HbE CARR
۱(۲/۶)	-	HbG CARR
۲۱(۵۳/۸)	۱۸(۴۶/۲)	تعداد کل

همچنین ۳ فرد مبتلا به آلفا تالاسمی ($2/12\%$) علاوه بر بتا تالاسمی دارای یک واریانت هموگلوبین نیز بودند (جدول ۵).

شایع ترین جهش مشاهده شده ژن بتا در کل جمعیت تحت مطالعه مربوط به HbS بود. بررسی آماری اختلاف معنی داری را بین پراکندگی دیگر جهش های ژن بتا و جنسیت جمعیت مورد بررسی نشان نداد ($CI=0/95$, $P=0/737$).

از ۹۹ فرد با جهش ۳/۷، به عنوان شایع ترین نقص ژنی آلفا گلوبین، ۸۴/۶۰٪ موارد دارای الگوی فنوتیپ silent و ۱۵/۲٪ دارای الگوی فنوتیپ carrier بودند. الگوی فنوتیپی مشابهی در مورد جهش ۱-POLYA مشاهده شد. در مورد جهش ۴/۲، تمام ۶ بیمار

جهش شایع بتا گلوبین، تعیین توالی^۱ کردن کامل ژن بتا گلوبین، ARMS-PCR و بررسی linkage مورد بررسی کامل قرار گرفتند. نتیجه بررسی های فوق، دستیابی به ۳۱ جهش شایع ژن بتا گلوبین بود. از بین افراد مورد بررسی ۷۴۱ نفر ناقل بتا تالاسمی و ۱۲۶ نفر مبتلا به بتا تالاسمی مازور تشخیص داده شدند.

شایع ترین جهش ژن بتا گلوبین در بین زن و مرد HbS Cd6(A-T) بود و پس از این جهش در بین مردان جهش IVSII-1(G>A) و در میان زنان جهش CD36/37 (-T) از شیوع بیشتری برخوردار بود. این سه جهش که مجموعاً در برگیرنده ۴۶٪ جهش های ژن بتا گلوبین بودند به ترتیب شیوعی برابر با ۲۴٪، ۱۱٪ و ۱۰/۹٪ داشتند. شایع ترین فنوتیپ مشاهده شده بین زن و مرد فنوتیپ ناقل بود (جدول ۲). بین پراکندگی جهش های ژن بتا گلوبین و جنسیت جامعه مورد مطالعه اختلاف معنی داری وجود نداشت ($CI=0/95$, $P=0/737$).

جدول ۲. فراوانی فنوتیپ های مربوط به ژن بتا مشاهده شده در بین جمعیت زن و مرد

جنسیت		فنوتیپ های ژن بتا
مرد	زن	
۵۲(۵۷/۱)	۳۶(۳۹/۶)	SILENT
۱(۱/۱)	-	CARRIER
۱(۱/۱)	۱(۱/۱)	ICARIA SILENT
۵۴(۵۹/۳)	۳۷(۴۰/۷)	تعداد کل

در مورد ژن آلفا گلوبین شایع ترین جهش یافت شده ابتدا ۳/۷ و سپس در بین زنان POLY-A و برای مردان CD19 بود (جدول ۳).

جدول ۳. فراوانی فنوتیپ های مربوط به ژن آلفا مشاهده شده در بین جمعیت زن و مرد

جنسیت		فنوتیپ های ژن آلفا
مرد	زن	
۵۷(۴۴/۵)	۴۶(۳۵/۹)	SILENT
۱۴(۱۰/۹)	۸(۶/۲)	CARRIER
-	۱(۰/۸)	ICARIA SILENT
۲(۱/۶)	-	CS SILENT
۷۳(۵۷/۰)	۵۵(۴۳/۰)	تعداد کل

¹ DNA Sequencing

بحث

تالاسمی اختلالی شایع بوده که دارای الگوی توارث مختلف می باشند. این اختلالات ژن هموگلوبین را درگیر کرده منجر به کاهش تولید زنجیره گلوبین

دارای الگوی فنوتیپی Silent بودند. اغلب جهش های آلفا گلوبین، همراه با الگوی جهش های حامل HbS (Carrier) بودند. توارث همزمان جهش های ژن آلفا و بتا گلوبین در جدول ۶ آمده است.

جدول ۵. ژنوتیپ و یافته های هماتولوژیک سه فرد آلفا تالاسمی با هتروزیگوت دو گانه برای بتا تالاسمی و بتا هموگلوبینوپاتی

ژنوتیپ بتا	ژنوتیپ آلفا	HbA2 (%)	HbA1 (%)	HbF (%)	MCH (pg)	MCV (ft)	سن (سال)	جنس	مورد
$\beta^{IVS1-110}/\beta^{CD121}$	$-\alpha^{anti3.7}/\alpha\alpha$	-	-	-	-	-	-	جنین	۱
$\beta^{CD36-37}/\beta^{CD26}$	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	-	۰	۸/۴	۱۲/۸	۴۳/۲	۳۸	F	۲
$\beta^{IVSII-1}/\beta^{CD121}$	$-\alpha^{CD19}/\alpha\alpha$	۲/۸	۰	۰	۱۹/۴	۶۰/۴	۲۲	F	۳

جدول ۶. توارث همزمان برخی از موتاسیون های آلفا تالاسمی و بتا تالاسمی

جهش های ژن آلفا														
3.7	POLYA-1	4.2	CD19	3.7, ANTI 3.7	3.7, 4.2	IVSI-5nt	MED	ANTI 3.7	CD 142	3.7, MED	CD59	3.7, C D1	POLY A(A)	
CD36-37	۹(۶/۴)		۳(۲/۱)				۱(۰/۷)	۱(۰/۷)			۱(۰/۷)			
CD-6 HbS	۲۲(۱۵/۶)	۵(۳/۵)	۱(۰/۷)	۱(۰/۷)	۲(۱/۴)	۱(۰/۷)	۲(۱/۴)		۱(۰/۷)	۱(۰/۷)				
IVSII-1	۱۳(۹/۲)	۱(۰/۷)		۱(۰/۷)										
bata-88	۵(۳/۵)													۱(۰/۷)
IVSI-110	۷(۵/۰)	۱(۰/۷)							۲(۱/۴)					
IVSI-5	۴(۲/۸)			۱(۰/۷)										
5UTR+47	۱(۰/۷)	۱(۰/۷)												
IVSI-1	۲(۱/۴)			۱(۰/۷)										
CD-121 H	۱(۰/۷)			۱(۰/۷)				۲(۱/۴)						
CD5	۱(۰/۷)	۱(۰/۷)												
IVSI-24D	۳(۲/۱)		۲(۱/۴)	۱(۰/۷)					۱(۰/۷)					
IVSII-84	۱(۰/۷)													۱(۰/۷)

جهش های ژن بتا

می شوند بر حسب نوع زنجیره این گروه از اختلالات به انواع متعددی شامل آلفا، بتا و غیره تقسیم بندی می شوند [۱]. اکثر موارد بتا تالاسمی در اثر جهش های نقطه ای ایجاد می شود به طوری که تا کنون بیش از ۲۰۰ جهش نقطه ای در مورد بتا تالاسمی و بیش از ۲۳ نقص مولکولی متفاوت مسئول ایجاد آلفا تالاسمی گزارش شده است.

هموگلوبینوپاتی ها نیز اختلالات مربوط به ژن های گلوبین می باشند که می توانند در اثر جهش هایی در هر یک از ژن های آلفا و بتا گلوبین ایجاد شوند [۷، ۶]. در برخی افراد ممکن است نقایص ژنی مربوط به تالاسمی و هموگلوبینوپاتی به طور همزمان به ارث برسند که در بسیاری موارد همراه با فنوتیپ شدید همراه بوده و لذا در مشاوره ژنتیکی و برنامه های

هر چند افزایش HbA2 مارکر تشخیصی اصلی برای بتا تالاسمی بود اما برخی بیماران مبتلا به بتا تالاسمی با وجود MCV و MCH کاهش یافته، دارای میزان طبیعی و یا کاهش یافته HbA2 بودند. توارث هتروزیگوت دوگانه بتا و دلتا تالاسمی، بتا تالاسمی حذفی^۱ و یا توارث همزمان آلفا و بتا تالاسمی می تواند منجر به سطوح کاهش یافته یا طبیعی HbA2 گردد. در این مطالعه ۹ نفر با توارث همزمان آلفا و بتا تالاسمی و مقادیر طبیعی یا کاهش یافته HbA2، ۳۲ نفر دارای توارث همزمان آلفا و بتا تالاسمی و یک بیمار دارای توارث همزمان آلفا تالاسمی، بتا تالاسمی و هموگلوبینوپاتی بودند.

¹ Deletional

تشخیص پیش از تولد از اهمیت بسزایی برخوردار است [۱۳].

همانند بسیاری دیگر از کشورهای حوزه مدیترانه، ایران نیز دارای شیوع بالای تالاسمی و هموگلوبینوپاتی می باشد. هر چند آلفا تالاسمی شایع ترین نقص ژنتیکی می باشد اما اکثر مطالعات بر روی بتا تالاسمی متمرکز شده است. هر چند فراوانی تالاسمی و هموگلوبینوپاتی و طیف جهش های مربوطه در بخش های مختلف ایران گزارش شده است مطالعه حاضر در نظر دارد توارث همزمان این اختلالات را مورد بررسی قرار دهد. علاوه بر این در این مطالعه ماطیف وسیعی از جهش ها را در جمعیتی قابل ملاحظه طی ۱۶ ماه مورد بررسی قرار دادیم.

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد از ۶۰۰۰ فرد مورد مطالعه، ۱۴۱ نفر به طور همزمان به آلفا تالاسمی و بتا تالاسمی و یا آلفا تالاسمی و بتا هموگلوبینوپاتی مبتلا بودند ۶۵/۲۴٪ افراد مبتلا به آلفا تالاسمی به بتا تالاسمی و ۳۰/۴۹٪ به بتا هموگلوبینوپاتی مبتلا بودند. از بین جهش های مربوط به آلفا تالاسمی جهش ۳/۷ شایع ترین جهش یافت شده می باشد که این موضوع با بسیاری از مطالعات دیگر انجام شده در سطح منطقه یا کشور تطابق دارد [۱۶-۱۴].

در مورد ژن بتا گلوبین شایع ترین جهش یافت شده جهش HbS یا Cd6(A-T) بود هر چند دیگر مطالعات، جهش CD36/37 (-T) را به عنوان شایع ترین جهش منطقه معرفی کرده اند که بر اساس مطالعه ما این جهش دومین جهش شایع در میان جمعیت زنان مورد مطالعه تشخیص داده شد و IVSII-1(G>A) دومین جهش شایع در بین مردان بود. مشابه دیگر مطالعات، نتایج بررسی حاضر حاکی

از این است که HbS شایع ترین جهش این بخش جنوبی از کشور می باشد [۱۷].

مطالعات پیشین نیز حاکی از ضرورت استفاده از روش های ملکولی برای تشخیص دقیق هتروزیگوت های دوگانه در زوجینی می باشد که آزمایشات هماتولوژیک آنان شک به وجود توارث همزمان آلفا و بتا تالاسمی را برمی انگیزد [۱۵]. مطالعه ای مشابه که به بررسی ارتباط بین بتا تالاسمی و آلفا تالاسمی پرداخته است پیشنهاد به استفاده از مشاوره ژنتیکی و تشخیص پیش از تولد برای تشخیص بیماران با توارث همزمان کرده است و آگاهی از الگوی جهش های منطقه را نه تنها عاملی برای کاهش هزینه های غربالگری دانسته بلکه آن را موجب پیشگیری از تولد نوزادان مبتلا به تالاسمی دانسته است [۱۶].

نتیجه گیری

از آنجا که نتایج مطالعه حاضر، حاکی از این حقیقت است که ۳۰/۴۹٪ افراد مورد مطالعه دارای توارث همزمان آلفا تالاسمی و بتا هموگلوبینوپاتی که می تواند علائم بالینی مهمی را در پی داشته باشد بودند و همچنین تعداد قابل ملاحظه ای از بیماران ناقل بتا تالاسمی بوده که می تواند در صورت توارث همزمان با هموگلوبینوپاتی ها (به خصوص هموگلوبینوپاتی های S و E) علایم بالینی شدیدی را در پی داشته باشد، آزمایش های غربالگری و بررسی های ملکولی در هنگام مشاوره ژنتیکی برای افراد مشکوک به این اختلالات باید مدنظر قرار گیرد. علاوه بر این، شناسایی افراد ناقل آلفا و بتا تالاسمی جهت ممانعت از صرف وقت و هزینه گزاف جهت شناسایی اتیولوژی آنمی ها و استفاده نا بجا از مکمل های آهن ضروری به نظر می رسد.

References

- 1- Langlois S, Ford JC, Chitayat D, Desilets VA, Farrell SA, Geraghty M, et al. Carrier screening for thalassemia and hemoglobinopathies in Canada. J Obstet Gynaecol Can. 2008 Jun; 30(10): 950.

- 2- da Luz JA, Sans M, Kimura EM, Albuquerque DM, Sonati MDF, Costa FF. α -thalassemia, HbS, and β -globin gene cluster haplotypes in two Afro-Uruguayan sub-populations from northern and southern Uruguay. *Genetics and Molecular Biology*. 2006 Jan; 29(4): 595-600.
- 3- Rachmilewitz EA, Giardina PJ. How I treat thalassemia. *Blood*. 2011 Sep;118(13):3479-88.
- 4- Habibzadeh F, Yadollahie M, Merat A, Haghshenas M. Thalassemia in Iran; an overview. *Arch Iran Med*. 1998 Sep; 1(1): 27-33.
- 5- Naderi M, Shamshiri H, Alizadeh S, Dorgalaleh A, Manafi R, Tabibian S. Cutaneous and mucosal manifestations in patients with beta major thalassemia. *Dermatology and Cosmetic*. 2013 Dec; 4(1): 27-33.
- 6- Jahantigh M, Naderi M, Dorgalaleh A, Tabibian S. Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance test in thalassemia major patients. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. 2013 May: 29-31.
- 7- Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Deutsches Arzteblatt International*. 2011 Oct; 108(31-32): 532.
- 8- Rahim F, Aberumand M. Spectrum of β -thalassemia mutations in various Ethnic Regions of Iran. *Pakistan journal of medical sciences*. 2008 May; 24(3):410.
- 9- Akhavan-Niaki H, Derakhshandeh-Peykar P, Banihashemi A, Mostafazadeh A, Asghari B, Ahmadifard M-R, et al. A comprehensive molecular characterization of beta thalassemia in a highly heterogeneous population. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2011 Sep;47 (1): 29-32.
- 10- Yavarian M, Harteveld CL, Batelaan D, Bernini LF, Giordano PC. Molecular spectrum of beta-thalassemia in the Iranian. Province of Hormozgan. *Hemoglobin*. 2001 Feb;25(1):35-43.
- 11- Haghshenas M ZJ. Thalassemia. (1st ed). Shiraz: Shiraz University of Medical Sciences Publishing Center. [Book in Persian]. 1997 Oct.
- 12- Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010 Apr; 5: 13.
- 13- Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clinical Chemistry*. 2000 Aug; 46(8): 1284-90.
- 14- Harteveld C, Yavarian M, Zorai A, Quakkelaar E, Van Delft P, Giordano P. Molecular spectrum of α -thalassemia in the Iranian population of Hormozgan: Three novel point mutation defects. *American journal of hematology*. 2003 Dec; 74(2): 99-103.
- 15- Zandian K, Nateghi J, Keikhaie B, Pedram M, Hafezi-Nejad N, Hadavi V, et al. α -Thalassemia mutations in khuzestan province, southwest Iran. *Hemoglobin*. 2008 Aug; 32(6): 546-52.
- 16- Sarookhani MR, Asiabanha M. Spectrum of α -thalassemia mutations in Qazvin province, Iran. *African Journal of Biotechnology*. 2011 Oct; 10(77): 17690-4.
- 17- Rahim F, Keikhani B, Aberumand M. Prenatal Diagnosis (PND) of β -thalassemia in the Khuzestan province, Iran. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2007 Jan; 1(6): 454-9.