

## بررسی ارتباط موتاسیون های ژن بتا-گلوبین در بیماران بتا-تالاسمی با پاسخ های درمانی متفاوت به داروی هیدروکسی اوره

محمد باقر هاشمی سوته\* (Ph.D.)  
آیلی علی اصغریان\* (B.Sc.)  
علی بنی هاشمی\* (B.Sc.)

هاله اخوان نیایکی\*\* (Ph.D.)  
فریدون مجتهد زاده\*\*\*\* (M.D.)  
سیروس زینلی\*\*\*\*\* (Ph.D.)

مهرنوش کوثریان\*\*\* (M.D.)  
حسین کرمی\*\*\*\*\* (M.D.)

### چکیده

**سابقه و هدف:** بتا تالاسمی، شایع ترین بیماری ارثی در جهان و به ویژه در ایران و استان مازندران می باشد. بیماری به دلیل ایجاد جهش در ژن بتا-گلوبین بر روی کروموزوم ۱۱ ایجاد می شود و تاکنون بیش از ۱۵۰ نوع مختلف جهش در این ژن شناسایی شده است. یکی از داروهایی که در درمان بیماران تالاسمی مورد استفاده قرار می گیرد هیدروکسی اوره است که البته در تمام بیماران موثر نیست. مکانیسم اثر هیدروکسی اوره کاملاً روشن نیست، این مطالعه به مقایسه انواع جهش های ژن بتا در افراد بتا-تالاسمی مراجعه کننده به مرکز تحقیقات تالاسمی ساری در دو گروه پاسخ دهنده به دارو و بیمارانی که به این درمان پاسخ نمی دهند، پرداخته است.

**مواد و روش ها:** مطالعه به روش مورد-شاهدی، با مقایسه دو گروه ۳۰ تایی بیماران تالاسمی که داروی هیدروکسی اوره را دریافت نموده اند، انجام گرفته است. مطالعه بین دو گروه، شامل افراد خوب پاسخ دهنده (شاهد) و گروهی که به درمان پاسخ نداده اند (مورد) صورت گرفته است. ابتدا DNA افراد با استفاده از خون محیطی استخراج گردید. سپس از دو روش مختلف برای تعیین جهش استفاده شد. تعیین جهش ژن بیماران فوق در مرکز تحقیقات تالاسمی ساری با روش ARMS-PCR، انجام گردید. همچنین یافته ها مجدداً در مرکز تالاسمی امیر کلا و با استفاده از دو روش (Reverse Dot Blot) و ARMS-PCR مورد مطالعه و تایید قرار گرفت.

**یافته ها:** در گروه پاسخ دهنده (شاهد)، میانگین سن افراد  $28/1 \pm 7/78$  سال و میانگین سن شروع انتقال خون  $8/5 \pm 8/56$  سال بوده است. همچنین میانگین مدت مصرف داروی هیدروکسی اوره در این گروه  $9/6 \pm 2/34$  گزارش شده است. در این گروه، مقایسه میانگین میزان هموگلوبین و اندازه گلبول قرمز (MCV) در قبل و بعد از مصرف دارو از نظر آماری معنی دار بوده است. در گروه بدون پاسخ (مورد)، میانگین سن افراد گروه  $21/3 \pm 6/43$  سال و سن شروع انتقال خون  $3/3 \pm 3/75$  سال و میانگین مدت مصرف داروی هیدروکسی اوره  $2/3 \pm 0/8$  ماه گزارش شده است. از جهش های به دست آمده،  $IVSII-IG>A$  بیشترین شیوع را در دو گروه شاهد و مورد داشته است؛ به گونه ای که در ۳۰ بیمار شاهد، ۲۲ نفر برای این جهش، هموزیگوت بوده و ۷ نفر این جهش را به شکل هتروزیگوت نشان داده اند (فراوانی ۴۲/۵ درصد) اما در ۳۰ بیمار مورد، تعداد هموزیگوت ها ۱۱ نفر و تعداد هتروزیگوت ها ۱۱ نفر به دست آمده است (فراوانی ۲۷/۵ درصد). مقایسه آماری بین دو گروه مورد و شاهد از نظر جهش  $IVSII-1$  بیانگر تفاوت معنی داری در این دو گروه بوده است ( $P < 0/008$ ). در مورد جهش های دیگر به دلیل فراوانی پایین جهش های یافت شده در بین دو گروه، مقادیر از نظر آماری قابل مقایسه نبوده است.

**استنتاج:** ارتباط معنی دار جهش  $IVSII-1$  در بیماران پاسخ دهنده به هیدروکسی اوره نسبت به گروه بدون پاسخ، مشابه یافته های گذشته و معنی دار می باشد همچنین یافته های قبلی حاکی از ارتباط تغییرات دیگری در بخش های تنظیمی ژن گاما مانند پلی مورفیسم در نقطه ۱۵۸ - (T یا C) در پروموتور ژن گاما ( $XmnI$ ) با اثر داروی هیدروکسی اوره می باشد. برای روشن شدن نقش دقیق مولکولی هیدروکسی اوره در فعال سازی ژن گاما-گلوبین در بعضی و عدم توانایی آن در بعضی دیگر از بیماران نیاز به بررسی فاکتورهای مولکولی بیش تری می باشد.

### واژه های کلیدی: بتا-تالاسمی، موتاسیون، هیدروکسی اوره

E-mail: Hashemisoteh@gmail.com

\* مؤلف مسئول: دکتر محمد باقر هاشمی سوته- ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد، دانشکده پزشکی

\*\* دکترای ژنتیک، استادیار مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران \*\*\* دکترای بیولوژی سلولی، استادیار مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بابل

\*\*\*\* فوق تخصص بیماریهای غدد اطفال، استاد مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

\*\*\*\*\* فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی اطفال، استادیار مرکز تحقیقات تالاسمی و دانشگاه علوم پزشکی مازندران

\*\*\*\*\* کارشناس آزمایشگاه، آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان کودکان امیر کلا، دانشگاه علوم پزشکی بابل

\*\*\*\*\* دکترای ژنتیک، دانشیار دپارتمان بیوتکنولوژی و شبکه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور تهران

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۲۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۷/۲/۷ تاریخ تصویب: ۸۷/۳/۲۲

## مقدمه

بتا تالاسمی، شایع‌ترین بیماری ارثی در جهان و به ویژه در ایران و استان مازندران می‌باشد. و به طور گسترده‌ای در منطقه خاورمیانه و کشورهای آسیایی شیوع دارد. این بیماری خود را به شکل کم‌خونی شدید از بدو تولد نشان داده و بدون دریافت خون در سال‌های اول زندگی به مرگ کودک منجر خواهد شد (۲،۱). بیماری بتا-تالاسمی به دلیل ایجاد جهش در ژن بتا-گلوبین بر روی کروموزوم ۱۱ در انسان ایجاد می‌شود که به صورت اتوزومال مغلوب از والدین به فرزندان به ارث می‌رسد. تاکنون بیش از ۱۵۰ نوع مختلف جهش در این ژن شناسایی شده است. اکثر این جهش‌ها نقطه‌ای بوده، و هم نواحی ایجادکننده رمز اسید آمینه در زنجیره بتا، و هم نواحی فاقد رمز و داخل اینترون را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۲،۱). میزان شیوع این جهش‌ها در جمعیت‌های مختلف، متفاوت است مطالعات مختلف در گذشته در ایران هم نشان داده است که پراکندگی و شیوع این جهش‌ها در مناطق مختلف، کاملاً یکسان نبوده و تفاوت‌هایی با هم دارند (۳ تا ۵).

مطالعات گذشته نشان داده است که بعضی از مواد شیمیایی یا داروها مانند گونادوتروپین جفتی، پروژسترون، ۵-آزاسیتیدین، اریثروپوئیتین، مشتقات بوتیرات، کلرید فریکک هم (هیمین / Haemin) و هیدروکسی اوره باعث افزایش هموگلوبین در بیماران می‌گردند (۶). مصرف درمانی هیدروکسی اوره در تالاسمی از سال ۱۹۹۴ آغاز شده (۷) و تا به حال مطالعات مختلفی در ارتباط با مصرف آن در بیماران تالاسمی صورت گرفته است (۸ تا ۱۱). مکانیسم اثر هیدروکسی اوره کاملاً روشن نیست، آنچه واضح است افزایش ساخت زنجیره گاما-گلوبین و در نتیجه ساخت هموگلوبین جنینی است. در نتیجه از عوارض بیماری مانند عدم تعادل زنجیره‌ها و زیاد بودن زنجیره آلفا-گلوبین که عامل تخریب سلول و خون‌سازی غیر موثر در بیماران است،

کاسته شده و گلبول‌های سرخ بیش‌تری، بالغ و وارد خون محیطی می‌شوند (۶، ۱۲). در نتیجه بیمار به خون‌گیری کم‌تری نیاز پیدا می‌کند و یا بی‌نیاز می‌شود.

بیماران دچار تالاسمی از نظر نوع پاسخ به داروی هیدروکسی اوره به دو گروه عمده خوب پاسخ دهنده (Good Responder) و گروه بدون پاسخ (Non-responder) به دارو تقسیم می‌شوند، گروه اول بیمارانی هستند که بعد از مصرف ۳ ماه کپسول هیدروکسی اوره (۱۸-۲۰ میلی‌گرم / کیلوگرم / روز) سطح هموگلوبین و دیگر شاخص‌های خونی آن‌ها افزایش می‌یابد؛ به گونه‌ای که نیازشان به دریافت منظم خون بر طرف می‌گردد. گروه دوم بیمارانی هستند که به درمان پاسخ نداده و بعد از مصرف ۳ ماه تا یک سال از کپسول هیدروکسی اوره (۱۸-۲۰ میلی‌گرم / کیلوگرم / روز) سطح هموگلوبین آن‌ها همچنان کم‌تر از ۷/۵ گرم / دسی لیتر و وابسته به دریافت خون باقی می‌مانند. مطالعات گذشته نشان داده است که حذف ژن آلفا، تعدد شکل در نقطه ۱۵۸- (C یا T) در پروموتور ژن گاما (XmnI) (۱۳) و افراد با وضعیت ترکیبی HbE / بتا تالاسمی (۱۴) ممکن است شاخص‌های خوبی برای پاسخ مناسب به درمان هیدروکسی اوره باشند.

این دارو از سال ۱۳۷۷ در ساری مصرف می‌شود و به تجربه ما در حدود ۷۰ درصد موارد، نیاز به انتقال خون را کاملاً مرتفع می‌سازد (۱۵). برای ما این سوال مطرح است که آیا نوع جهش ژن بتا رابطه‌ای با جواب به درمان دارد یا خیر؟ لذا در این مطالعه اختصاصاً به مقایسه ژنوتیپ یا نوع جهش ژن بتا و ارتباط احتمالی آن با نوع پاسخ به درمان هیدروکسی اوره در دو گروه "خوب پاسخ دهنده" و "بدون پاسخ" بیماران بتا-تالاسمی مراجعه کننده به بیمارستان بوعلی سینای ساری پرداخته شده است.

## مواد و روش ها

مطالعه به روش مورد-شاهدی، با مقایسه دو گروه ۳۰ تایی بیماران بتا تالاسمی (ماژور و ایترمدیای غیر خویشاوند) که داروی هیدروکسی اوره را دریافت نموده‌اند، صورت گرفته است. این تحقیق بعد از گرفتن رضایت نامه از بیماران یا والدین آنها بر روی بیماران انجام پذیرفته است.

## بیماران مورد مطالعه:

۶۰ بیمار ثبت نام شده در بیمارستان بوعلی سینای ساری تحت عنوان دو گروه ۳۰ تایی خوب پاسخ دهنده (شاهد) و بدون پاسخ به دارو (مورد) مورد مطالعه قرار گرفتند. گروه اول (Good Responder)، بیمارانی بودند که بعد از مصرف حداقل ۳ ماه از کپسول هیدروکسی اوره (۲۰-۱۸ میلی گرم/کیلوگرم/روز)، سطح هموگلوبین و دیگر شاخص‌های خونی آنها افزایش یافته بود؛ به گونه‌ای که نیاز به دریافت خون نداشتند. همچنین ۳۰ نفر که به درمان پاسخ نداده بودند (non-responder) یعنی بیمارانی که بعد از مصرف حداقل ۳ ماه تا یک سال از مصرف هیدروکسی اوره (۲۰-۱۸ میلی گرم/کیلوگرم/روز)، سطح هموگلوبین آنها همچنان تغییر نکرده بود (کمتر از ۷/۵ گرم/دسی‌لیتر) و وابسته به دریافت خون باقی ماندند.

## استخراج DNA:

۱۰ سی‌سی خون وریدی در لوله حاوی ۳۰۰ میکرولیتر ضد انعقاد EDTA (۰/۵ مولار) از بیماران تهیه و تا زمان تخلیص DNA در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. سپس DNA با استفاده از روش "Nucleon BACCII" از خون محیطی استخراج گردید و با استفاده از دستگاه طیف سنج در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر از نظر میزان خلوص و غلظت (کمیت و کیفیت) مورد ارزیابی قرار گرفت. از نمونه‌های DNA مورد استفاده رقت ۲۵۰

میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شده و برای مطالعات بعدی در حالت انجماد نگهداری شد.

## تعیین جهش:

از دو روش مختلف برای تعیین جهش استفاده شد. در مرکز تحقیقات تالاسمی ساری با استفاده از روش مستقیم ARMS-PCR جهت تعیین جهش‌های مختلف (نقطه‌ای، حذف و اضافه شدن چند نوکلئوتید و...) برای ۶۰ بیمار تعیین جهش گردید. بدین منظور ۲۰ نوع از انواع جهش‌های شایع در کشور مورد بررسی قرار گرفت. در این روش با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (۱۶) و به کمک ترموسایکلر (MasterCycler gradient) از کمپانی اپندروف آلمان تکثیر شدند. DNA ژنومی نمونه‌ها به وسیله آنزیم DNA پلیمراز Taq (شرکت سیناژن) تکثیر یافت. ۲۴ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR (شرکت سیناژن، ایران) در هر میکروتیوب شامل تریس ۱۰ میلی‌مولار (PH=۸/۳)، کلرید پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار، کلرید متیزیم (شرکت سیناژن) ۱/۵ میلی‌مولار و ۲۰۰ میکرومول از هر یک از dNTP (شرکت سیناژن) و ۰/۲۵ نانوگرم در میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای جهش یافته یا طبیعی و پرایمر مشترک (شرکت پریم، ایتالیا)، ۱ واحد از آنزیم پلی‌مراز Taq (شرکت سیناژن) و یک و نیم میکرولیتر از DNA ژنومیک فرد بیمار ریخته شد. تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر با شرایط زیر انجام گردید: ۹۵ درجه سانتیگراد ۵ دقیقه، سپس نمونه‌ها به ترتیب ۹۵ درجه سانتیگراد ۶۰ ثانیه، ۶۴ یا ۶۶ درجه سانتیگراد ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد ۶۰ ثانیه برای ۳۵ بار تکثیر گردید و نهایتاً نمونه‌ها در ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه قرار گرفتند. همچنین یافته‌ها مجدداً در مرکز تالاسمی امیرکلا و با استفاده از دو روش (Reverse Dot Blot) و ARMS-PCR مورد مطالعه و تایید قرار گرفتند (۱۷).

## انجام الکتروفورز:

پس از انجام PCR، ۱۰ میکرولیتر از محصول تکثیر یافته بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی ۱۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید در ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد.

برای ساختن ژل آگارز، ۱/۵ درصد، میزان یک و نیم گرم از آگارز در ۱۰۰ سی‌سی بافر IX TBE (تریس، بوریک اسید و EDTA) حل شده و سپس به ظرف‌های مخصوص الکتروفورز منتقل شد. به هر ۵۰ سی‌سی ژل، میزان ۸-۱۰ میکرولیتر اتیدیوم بروماید ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر اضافه شد و پس از اضافه کردن نمونه‌های PCR با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز انجام شد در نهایت برای بررسی نتایج PCR، از ژل با استفاده از دستگاه عکس‌برداری تصویر تهیه و مورد بررسی قرار گرفت.

## آنالیز آماری:

آنالیز آماری یافته‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱ صورت گرفته است.

## یافته‌ها

از دو گروه شرکت‌کننده در مطالعه، گروه اول شامل ۳۰ نفر که به داروی هیدروکسی‌اوره پاسخ مناسب داده بودند، مشخصات فردی و پارامترهای خونی قبل و بعد از درمان هیدروکسی‌اوره از پرونده بیماران استخراج و مورد بررسی قرار گرفت. در گروه اول، ۱۰ پسر/مرد و ۲۰ دختر/زن در طرح شرکت کرده بودند. میانگین سن افراد  $28.1 \pm 7.78$  و میانگین سن شروع انتقال خون  $8.5 \pm 8.56$  سال بوده است. همچنین میانگین مدت مصرف داروی هیدروکسی‌اوره در این گروه  $9.6 \pm 2.34$  سال گزارش شده است. همچنین در این گروه، میانگین میزان هموگلوبین قبل از مصرف هیدروکسی‌اوره  $8.7 \pm 1$  و بعد از مصرف  $9.4 \pm 0.67$  گرم/دسی‌لیتر بوده است که تفاوت آنها از نظر آماری معنی‌دار بوده

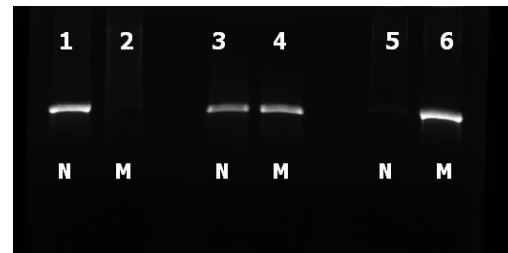
است ( $P < 0.01$ ). همچنین بیمارانی که به درمان هیدروکسی‌اوره پاسخ مناسب داده‌اند میانگین اندازه گلبول قرمز (MCV) از  $73.2$  به  $87.4$  بعد از مصرف دارو تغییر یافته بود ( $P < 0.0001$ ) که از نظر آماری کاملاً معنی‌دار بوده است. از گروه دوم ۱۴ پسر/مرد و ۱۶ دختر/زن در طرح شرکت کردند. میانگین سن افراد این گروه  $21.3 \pm 6.43$  سال و سن شروع انتقال خون  $3.75 \pm 3.3$  سال در پرونده درج گردیده بود. همچنین میانگین مدت مصرف داروی هیدروکسی‌اوره  $0.8 \pm 2.3$  ماه گزارش شده است. مصرف دارو در این گروه به دلیل عدم پاسخ به درمان و یا به دلیل ایجاد عوارض جانبی دارو متوقف گردیده است. میانگین میزان هموگلوبین در این گروه قبل از مصرف هیدروکسی‌اوره  $7.7 \pm 0.9$  و بعد از مصرف  $9.2 \pm 0.8$  گرم/دسی‌لیتر بوده است که البته این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بوده است ( $P < 0.0001$ ). تغییرات MCV در این گروه بعد از مصرف هیدروکسی‌اوره نسبت به قبل از آن در مدت متوسط ۳ ماه تغییرات معنی‌داری را نشان نداده است ( $P < 0.1156$ ). همچنین بیماران این گروه از بی‌حالی و ضعف و دردهای استخوانی شکایت داشتند.

جهش‌های یافته شده در دو گروه پاسخ‌دهنده و بدون پاسخ به مصرف هیدروکسی‌اوره در بین دو گروه ۳۰ نفره در جدول شماره ۱ خلاصه شده است. در هر دو گروه مورد مطالعه جهش  $IVSII-1G > A$  بیش‌ترین شیوع را داشته است. در ۳۰ بیماری که به درمان پاسخ مناسب داده‌اند (گروه شاهد) ۲۲ نفر برای این جهش، یک تخمی و ۷ نفر هم این جهش را به شکل چند تخمی نشان داده‌اند (فراوانی ۴۲/۵ درصد). اما در ۳۰ بیمار گروه (گروه مورد) که به دارو پاسخ نداده‌اند، تعداد افراد یک تخمی ۱۱ نفر و تعداد چند تخمی‌ها هم ۱۱ نفر یعنی ترکیبی از این جهش و جهش‌های دیگر بوده است (فراوانی ۲۷/۵ درصد) (جدول شماره ۱). جهش‌های دیگر به دست آمده در هر دو گروه به صورت پراکنده و با فراوانی‌های پایین دیده شده است.

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی جهش‌های دو گروه پاسخ‌دهنده (شاهد) و بدون پاسخ (مورد) به داروی هیدروکسی اوره. در هر گروه ۳۰ نفر مورد بررسی قرار گرفته اند (n=60).

ژنوتیپ یا نوع موتاسیونهای ژن بتا	پاسخ به دارو (تعداد نفر)	عدم پاسخ به دارو (تعداد نفر)
IVSII-1(G>A)/ IVSII-1(G>A)	۲۲ *	۱۱
IVSII-1(G>A)/ C22 (G>T)	۲	۰
IVSII-1(G>A)/ C8(-AA)	۱	۲
IVSII-1(G>A)/ C30(G>C)	۱	۰
IVSII-1(G>A)/ Fr8/9(+G)	۰	۲
IVSII-1(G>A)/ C5(-CT)	۰	۱
IVSII-1(G>A)/ C36/37(-T)	۰	۱
IVSII-1(G>A)/ IVSII-110(G>A)	۰	۱
IVSII-1(G>A)/ IVSII-1(G>A)	۰	۳
IVSII-1(G>A)/ IVSII-25base del	۲	۰
C22(G>T)/ C30(G>C)	۰	۱
C8(-AA)/ Fr8/9(+G)	۰	۱
C22(G>T)/ C39(C>T)	۰	۱
C30(G>C)/ IVSII-25base del	۰	۱
C22(G>T)/ C22(G>T)	۰	۱
IVSII-1(G>A) / ?	۱	۱
C30(G>C) / ?	۰	۱
C8(-AA) / ?	۰	۱
Unknown	۰	۱

\* برای ژنوتیپ IVSII-1(G>A)/ IVSII-1(G>A) در مقایسه بین گروه شاهد و مورد تفاوت معنی دار بدست آمده است (P < ۰/۰۰۱)



تصویر شماره ۱: نمونه‌ای از نتیجه ARMS-PCR در تشخیص جهش IVSII-1G>A. در این روش برای هر فرد دو لوله PCR، یکی برای حالت نرمال (N) و دیگری برای حالت جهش یافته (M) به کار می‌رود. ردیف‌های یک و دو برای فردی است که به عنوان شاهد طبیعی استفاده شده است و تنها ردیف اول (لوله N) جواب داده است. ردیف‌های سه و چهار مربوط به کنترل مثبت است (فرد مینور حاوی یک ژن سالم و یک ژن جهش یافته با جهش IVSII-1G>A). ردیف‌های ۳ و ۴ گویای این است که هر دو لوله طبیعی و جهش یافته جواب داده است که نشان‌دهنده درست بودن مراحل آزمایش است. ردیف‌های ۵ و ۶ مربوط به نمونه فرد بیمار مورد مطالعه است. چون لوله مربوط به جهش (ردیف ۶) جواب داده است اما ردیف ۵ که مربوط به حالت طبیعی (N) است جواب نداده است بیانگر وجود این جهش به صورت یک تخمی در این فرد بیمار می‌باشد.

## بحث

فاز S شناخته می‌شود، قادر است که ساخت HbF را القاء کرده و این خصوصیت عمدتاً به واسطه خاصیت سمیت سلولی آن است. در حقیقت هیدروکسی اوره به صورت اختیاری سلول‌های در حال تقسیم را کشته و سبب می‌شود که سلول‌های پیش‌ساز اریترئوئید اولیه (primary erythroid progenitor)، هموگلوبین جنینی بیش‌تری بسازند. همچنین ممکن است نقش عمومی بیش‌تری در افزایش ساخت گلوبین داشته باشد (۲۰-۲۲).

اگر چه استفاده از هیدروکسی اوره در درمان تالاسمی هنوز کاملاً تأیید نشده است، مجموعه بزرگی از بیماران تالاسمی اینترمدیا که با هیدروکسی اوره درمان شده‌اند از کشورهای مختلف از جمله از ایران و

اثر بخشی و مفید بودن داروی هیدروکسی اوره که همچنین به نام هیدروکسی کربامید هم شناخته می‌شود به منظور افزایش هموگلوبین جنینی (HbF) در بیماران دچار کم خونی داسی شکل از قبل اثبات شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷، ۱۸). در بیماران دچار کم خونی داسی شکل، نشان داده شد که تعداد حملات درد ناک، سندرم‌های قفسه‌سینه و انتقال خون بعد از مصرف دارو کاهش پیدا کرده و سطح HbF از سطح پایه، ۵ تا ۹ درصد افزایش یافته بود. همچنین در آن بیماران هیدروکسی اوره دارای اثرات دیگری مانند افزایش اندازه گلبول قرمز هم بوده است (۱۹). هیدروکسی اوره که به عنوان ماده شیمی درمانی هیپومتیله کننده غیر DNA و مختص

درمان پاسخ مناسب داده‌اند و نشان دادند که از ۴۶ کروموزومی که نوع جهش آنها تعیین گردید، در ۱۵ بیمار حالت یک تخمی  $IVSII-1G>A$  و در ۹ مورد دیگر حالت چند تخمی  $IVSII-1G>A$  همراه با یکی از انواع جهش‌های  $IVS 1-5, Fr 8-9, IVS1-110, IVS1-25del$  وجود داشته است (۱۵).

مطالعه دیگری توسط آل بویه و همکاران در سال ۱۳۸۳ در ایران بر روی ۴۵ بیمار دچار تالاسمی ماژور، نشان داد که جهش  $IVSII-1G>A$  (یک تخمی و/یا چند تخمی) در بیماران خوب پاسخ‌دهنده با درمان هیدروکسی اوره مرتبط است (۲۴). همچنین یاوریان و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه دیگری بر روی شاخص‌های مولکولی در دسته ژنی بتا-گلوبین و ارتباط آن‌ها به پاسخ بیماران به هیدروکسی اوره نشان دادند که جهش  $IVSII-1G>A$  جزء جهش‌های خوب پاسخ‌دهنده و جهش  $IVS1-5G>C$  از جهش‌هایی است که در افراد با پاسخ ضعیف به درمان هیدروکسی اوره بیش‌تر دیده شده است (۲۵). در این مطالعه در ۳ مورد از کسانی که به درمان هیدروکسی اوره پاسخ نداده‌اند ژنوتیپ چند تخمی  $VSII-1G>A/IVS1-1G>A$  مشاهده گردید که در هیچ‌یک از گروه پاسخ‌دهنده دیده نشد. اما به دلیل کم بودن تعداد نمونه از نظر آماری قابل مقایسه نبوده است. همچنین سایر جهش‌ها به میزان کم در دو گروه دیده شده‌اند؛ به گونه‌ای که امکان مقایسه در این مطالعه وجود نداشته و نیاز به بررسی حجم بزرگ‌تری از نمونه‌ها می‌باشد.

مکانیسم افزایش گاما-گلوبین توسط هیدروکسی اوره هنوز به درستی روشن نشده است. اما در این میان به مواردی مانند تغییر ساختمان کروماتین در جهت افزایش دسترسی به فاکتور رونویسی به پروموتور ژن گاما-گلوبین، همانند ممانعت از فعالیت هیستون داستیلاز ( $Histone\ deacetylase = HDAC$ )؛ هیپومتیلاسیون

هند گزارش شده است. در این بیماران نتایج خوبی به دست آمده است؛ به گونه‌ای که اکثر بیماران وابستگی شان به انتقال خون از بین رفته است (۲۳، ۱۱، ۱۰). همچنین این دارو برای بیماران تالاسمی ماژور هم مورد استفاده قرار گرفته است که پاسخ‌های متفاوتی را در بیماران به همراه داشته است. در مواردی که بیماران به دارو پاسخ داده‌اند وابستگی به تزریق خون کاهش یافته است اما در مواردی هم بیماران به دارو پاسخ مناسب نشان نداده‌اند (۲۵، ۲۴، ۱۰، ۸).

بتا-تالاسمی در سطح مولکولی، بسیار غیریکنواخت است و جهش‌های متعددی برای آن گزارش شده است. علی‌رغم این غیریکنواختی، در هر جمعیت به‌طور معمول بین ۵ تا ۱۰ جهش شایع‌تر می‌باشند. در ایران به میزان زیادی غیریکنواخت بودن جهش‌های ژن بتا در مناطق مختلف، گزارش شده است ولی جهش غالب ایران  $IVSII-1(G>A)$  بوده و فراوانی آن در شمال کشور بیش از جنوب گزارش شده است (۵، ۳). بررسی‌های اولیه ما حاکی از فراوانی بیش از ۶۰ درصدی این جهش در مازندران است (۲۶).

از بررسی جهش‌های به‌دست آمده از ۶۰ بیمار دچار تالاسمی، در هر دو گروه پاسخ‌دهنده و بدون پاسخ به داروی هیدروکسی اوره، جهش  $IVSII-1$  بیش‌ترین شیوع را داشته است مقایسه آماری (مربع‌کای دو، آزمون دقیق فیشر) بین دو گروه از نظر جهش  $IVSII-1 (G->A)$  بیانگر تفاوت معنی‌دار بوده است ( $P < 0/001$ ).

$IVSII-1 (G>A)$  از نوع جهش‌های مدیترانه‌ای می‌باشد و شیوع آن در کشورهای همسایه نیز با درجات متفاوت گزارش شده است در این نوع جهش در اولین نوکلئوتید اینترون دوم ژن بتا یک جهش نقطه‌ای اتفاق می‌افتد و به‌جای گوانین باز آدنین قرار می‌گیرد. کوثریان و همکاران (۱۹۹۹) در یک مطالعه بر روی ۳۰ بیمار دچار تالاسمی ماژور گزارش کردند که سه چهارم بیماران به

در بین افراد مختلف می‌تواند عامل تفاوت در پاسخ به یک دارو باشد. به عنوان مثال وانگ و همکاران (۲۰۰۲) در یک بررسی بر روی سلول‌های اریترئید در محیط کشت آزمایشگاهی نشان دادند که هیدروکسی اوره سبب فعال‌تر شدن ژن‌های گیرنده DR-5 (Death Receptor 5) و ۳ Caspase و ۲-GATA شده و در عوض قادر است فعالیت ژن ۱-GATA که سازنده یک پروتئین تنظیمی رونویسی است را کاهش دهد (۲۹). همچنین مطالعات جداگانه گارنر و همکاران (۱۹۹۸) و (۲۰۰۴) بیانگر دخالت ژن‌هایی بر روی کروموزوم‌های ۶ و ۸ در تولید سلول‌های خونی F و هموگلوبین F و یا جابه‌جا شدن (سوئیچ) فعالیت ژن از هموگلوبین F به نوع بالغین A در بعد از تولد هستند (۳۰، ۳۱). مطالعات پیش‌تری در این رابطه در آینده مورد نیاز است تا بتواند مکانیسم دقیق اثر گذاری داروی هیدروکسی اوره را روشن نماید.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونین محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و علوم پزشکی بابل، برای تصویب این طرح تحقیقاتی مشترک و اختصاص بودجه، همچنین از بیماران تالاسمی شرکت‌کننده در طرح و کارکنان زحمت‌کش درمانگاه تالاسمی بیمارستان بوعلی سینای ساری به دلیل همکاری در طرح کمال تقدیر و تشکر خود را ابراز می‌داریم.

پروموت‌های ژن‌های گاما-گلوبین و فعال‌سازی رونویسی در آن‌ها و یا تسریع در تمایز سلول‌های اریترئید نام برد (۲۷). موارد نام‌برده شده و احیانا مکانیسم‌های ناشناخته مشابه تماما حکایت از دلایل ژنتیکی و مولکولی در پاسخ یا عدم پاسخ به داروی هیدروکسی اوره دارد. گرچه مطالعات مولکولی گذشته بیانگر ارتباط بعضی از جهش‌ها با پاسخ به درمان و عدم پاسخ جهش‌های دیگری به درمان با هیدروکسی اوره می‌باشد، مطالعات دقیق‌تر مولکولی در آینده مورد نیاز است تا نقش مولکولی هیدروکسی اوره را در فعال‌سازی گلوبین گاما در بعضی و عدم توانایی آن در بعضی دیگر از بیماران به صورت دقیق‌تری بیان نماید. از دیدگاه مولکولی آنچه که بیش‌تر محتمل می‌باشد وجود تغییرات (تعدد شکل یا جهش) در بخش‌های تنظیمی ژن گاما در بالا دست ژن بتا و یا در قسمت تنظیمی (Locus Control Region) مربوط به خانواده ژنی بتا بر روی کروموزوم ۱۱ می‌تواند باشد. وجود این ارتباط با تغییر در تعدد شکل در نقطه ۱۵۸- (C یا T) در پروموت‌ژن گاما (XmnI) از قبل تا حدودی روشن شده است (۲۸، ۲۴، ۱۳).

به دلیل پیچیده بودن مکانیسم‌های تنظیم ژنی و نقش پروتئین‌های تنظیمی مختلف در اثرگذاری بر فعالیت یک ژن، می‌توان پیش‌بینی کرد که تغییرات در سطح DNA (اعم از تغییرات طبیعی مانند Single nucleotide polymorphism=SNP یا جهش)

### References

1. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ* 2001; 79(8): 704-712.
2. Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers G M, Paraskevas F, Glader B E. *The Wintrobe's Clinic Hematology*. (Lippincott, Williams and Wilkins). 2003.

3. Merat A, Haghshenas M, Pour ZM, Plonczynski MW, Harrell AN, Coleman MB, et al. Beta-thalassemia in southwestern Iran. *Hemoglobin* 1993; 17(5): 427-437.
4. Najmabadi H, Karimi-Nejad R, Sahebjam S, Pourfarzad F, Teimourian S, Sahebjam F, et al. The beta-thalassemia mutation spectrum in the Iranian population. *Hemoglobin* 2001; 25(3): 285-296.
5. Abolghasemi H, Amid A, Zeinali S, Radfar MH, Eshghi P, Rahiminejad MS, et al. Thalassemia in Iran: epidemiology, prevention, and management. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007; 29(4): 233-238.
6. Borgna-Pignatti C. Modern treatment of thalassaemia intermedia. *Br J Haematol* 2007; 138(3): 291-304.
7. Hajjar FM, Pearson HA. Pharmacologic treatment of thalassemia intermedia with hydroxyurea. *J Pediatr* 1994; 125(3): 490-492.
8. Arruda VR, Lima CS, Saad ST, Costa FF. Successful use of hydroxyurea in beta-thalassemia major. *N Engl J Med* 1997; 336(13): 964.
9. Hoppe C, Vichinsky E, Lewis B, Foote D, Styles L. Hydroxyurea and sodium phenylbutyrate therapy in thalassemia intermedia. *Am J Hematol* 1999; 62(4): 221-227.
10. Bradai M, Abad MT, Pissard S, Lamraoui F, Skopinski L, de Montalembert M. Hydroxyurea can eliminate transfusion requirements in children with severe beta-thalassemia. *Blood* 2003; 102(4): 1529-1530.
11. Dixit A, Chatterjee TC, Mishra P, Choudhry DR, Mahapatra M, Tyagi S, et al. Hydroxyurea in thalassemia intermedia--a promising therapy. *Ann Hematol* 2005; 84(7): 441-446.
12. Olivieri NF, Weatherall DJ. The therapeutic reactivation of fetal haemoglobin. *Hum Mol Genet* 1998; 7(10): 1655-1658.
13. Panigrahi I, Dixit A, Arora S, Kabra M, Mahapatra M, Choudhry VP, et al. Do alpha deletions influence hydroxyurea response in thalassemia intermedia? *Hematology* 2005; 10(1): 61-63.
14. Singer ST, Kuypers FA, Olivieri NF, Weatherall DJ, Mignacca R, Coates TD, et al. Fetal haemoglobin augmentation in E/beta(0) thalassaemia: clinical and haematological outcome. *Br J Haematol* 2005; 131(3): 378-388.
15. Kosarian M, Yousefi Gh, Mahdavi MR, Farzeen D, Arab S, Zeinvali S, et al. Therapeutic effect of Hydroxy Urea in Thalassemia intermedia. *J Mazand Univ Med Sci* 1999; 9(25): 30-38(Persian).
16. Goulden NJ, Steward CG. *Pediatric Hematology: Methods and Protocols*. Pediatric and Developmental Pathology. 2004; 7(4): 420.
17. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, McMahon RP, Barton FB, et



- al. Design of the multicenter study of hydroxyurea in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea. *Control Clin Trials* 1995; 16(6): 432-446.
18. Rodgers GP, Dover GJ, Noguchi CT, Schechter AN, Nienhuis AW. Hematologic responses of patients with sickle cell disease to treatment with hydroxyurea. *N Engl J Med* 1990; 322(15): 1037-1045.
19. Charache S. Mechanism of action of hydroxyurea in the management of sickle cell anemia in adults. *Semin Hematol* 1997; 34(3 Suppl 3): 15-21.
20. Zeng YT, Huang SZ, Ren ZR, Lu ZH, Zeng FY, Schechter AN, et al. Hydroxyurea therapy in beta-thalassaemia intermedia: improvement in haematological parameters due to enhanced beta-globin synthesis. *Br J Haematol* 1995; 90(3): 557-563.
21. Loukopoulos D, Voskaridou E, Stamoulakatou A, Papassotiriou Y, Kalotychou V, Loutradi A, et al. Hydroxyurea therapy in thalassemia. *Ann NY Acad Sci* 1998; 850: 120-128.
22. Atweh GF, Loukopoulos D. Pharmacological induction of fetal hemoglobin in sickle cell disease and beta-thalassemia. *Semin Hematol* 2001; 38(4): 367-373.
23. Karimi M, Darzi H, Yavarian M. Hematologic and clinical responses of thalassemia intermedia patients to hydroxyurea during 6 years of therapy in Iran. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005; 27(7): 380-385.
24. Alebouyeh M, Moussavi F, Haddad-Deylami H, Vossough P. Hydroxyurea in the treatment of major beta-thalassemia and importance of genetic screening. *Ann Hematol* 2004; 83(7): 430-433.
25. Yavarian M, Karimi M, Bakker E, Hartevelde CL, Giordano PC. Response to hydroxyurea treatment in Iranian transfusion-dependent beta-thalassemia patients. *Haematologica* 2004; 89(10): 1172-1178.
26. Derakhshandeh-Peykar P, Akhavan-Niaki H, Tamaddoni A, Ghawidel-Parsa S, Naieni KH, Rahmani M, et al. Distribution of beta-thalassemia mutations in the northern provinces of Iran. *Hemoglobin* 2007; 31(3): 351-356.
27. Quek L, Thein SL. Molecular therapies in beta-thalassaemia. *Br J Haematol* 2007; 136(3): 353-365.
28. Dedoussis GV, Mandilara GD, Boussiu M, Loutradis A. HbF production in beta thalassaemia heterozygotes for the IVS-II-1 G-->A beta(0)- globin mutation. Implication of the haplotype and the (G) gamma-158 C-->T mutation on the HbF level. *Am J Hematol* 2000; 64(3): 151-155.
29. Wang M, Tang DC, Liu W, Chin K, Zhu JG, Fibach E, et al. Hydroxyurea exerts bi-modal dose-dependent effects on erythropoiesis in human cultured erythroid cells via distinct pathways. *Br J Haematol* 2002; 119(4): 1098-1105.

30. Garner C, Mitchell J, Hatzis T, Reittie J, Farrall M, Thein SL. Haplotype mapping of a major quantitative-trait locus for fetal hemoglobin production, on chromosome 6q23. *Am J Hum Genet* 1998; 62(6): 1468-1474.
31. Garner C, Silver N, Best S, Menzel S, Martin C, Spector TD, et al. Quantitative trait locus on chromosome 8q influences the switch from fetal to adult hemoglobin. *Blood* 2004; 104(7): 2184-2186.

Archive of SID