انواع موتاسیون های بتاتالاسمی در بیماران مراجعه کننده به بیمارستان بوعلی سینا ساری در سال ۱۳۷۳

فریدون مجتهدزاده (M.D.) *

چکیده

سابقه و هدف : با توجه به شیوع بیماری بتاتالاسمی در مازندران، به منظور تعیین انواع موتاسیون های این بیماری این تحقیق در بیماران و خانواده های مراجعه کننده به درمانگاه تالاسمی بیمارستان بوعلی سینای ساری در سال ۱۳۷۳ انجام گرفت.

مواد و روش ها : تحقیق به روش توصیفی روی ۴۴ خانواده تالاسمیک انجام گرفت (در این تحقیق، هر خانواده تالاسمیک عبارت است ازیک فرزند بیمار به اضافه والدین آنها که حاملین ژن بیماری می باشند). از هر خانواده تالاسمیک مقدار ۱۰cc خون در لوله هپارین دار دریافت گردید و برای تشخیص موتاسیون بیماری به آزمایشگاه تشخیص های قبل از تولد دانشگاه لندن ارسال شد. D.N.A. گلبول های سفید نمونه های مورد آزمایش استخراج شده و سپس به کمک روش P.C.R(Polymerase chaine reaction) و سیستم ARMS(Amplification refractory mulation system) موتاسیون آنها مشخص گردید.

نتایج : از ۴۴ بیمار مورد بررسی ۲۳ نفر (۵۲/۳ درصد) پس و ۲۱ نفر (۴۷/۷ درصد) دختر بودند. میانگین سن بیماران ۹ سال بود در ۸ مورد از بیماران تعیین موتاسیون دریکی ازکروموزوم ها ممکن نشد (۱۸/۲ درصد). ۲۴ مورد (۵۴/۵درصد) دارای ژنوتیپ هموزیگوت و ۱۲ مورد (۲۷/۳ درصد) بصورت Compound heterozygote بودند. فقط در ۱۸٪ خانواده ها بین زن و شوهر نسبت خویشاوندی وجود داشت.

تعداد ۱۰ نوع موتاسیون ازبیماران و حاملین ژن بدست آمد. شایعترین آنها موتاسیون IVSII-1 (G → A) بود که از ۶۸/۷٪ کروموزوم ها بدست آمد.

استنتاج : دانستن نوع موتاسیون های بتاتالاسمی یک منطقه برای تأمین خدمات تخصصی قبل از تولد در آن منطقه ضروری و مقدی می باشد.

واژه های کلیدی : بتاتالاسمی، موتاسیون، PCR ، ARMS ، مازندران، ایران

مقدمه

بتاتالاسمی ازبیماریهائی است که به علت موتاسیون در ژنهائی که تولید زنجیره بتا و Beta-like را در ساختمان هموگلوبین انسانی به عهده دارند به وجود می آید(۱). این ژنها بصوتر خوشه (Cluster) بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۱ قرار دارند و حدود ۷۰kb (هر kb مساوی۱۰۰۰bp و bp مخفف Pase pair است) از D.N.A.

این تحقیق طی شماره۷- ۷۴ در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت گردیده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.

* متخصص کودکان و فوق تخصص ژنتیک، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران ✉ ساری- بلوار پاسداران- مرکز آموزشی درمانی بو علی سینا

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

این ناحیه را اشغال نموده اند(۱). ساختمان کلی این ژنها، شبیه هم بوده و همگی دارای ۳ منطقه exon (مناطق از ژن که حاوی Codon یا اطلاعات ژنتیکی هستند) و دو منطقه Intervening sequence (این مناطق بین نواحی exons قرار دارند وحاوی اطلاعات ژنتیکی نیستند و بطور اختصار بصورت.I.V.S نوشته می شوند) می باشند. تا کنون بیش از ۱۴۰ نوع موتاسیون برای بتاتالاسمی شناخته شده اند(۳) و هنوز در بسیاری از نقاط دنیا، بخصوص در مناطقی مانند بعضی از ممالک عربی و آفریقائی، بررسی ژنتیکی کامل و وسیعی انجام نگرفته است و شک نیست که با بررسی های همه جانبه انجام شده در آینده، تعداد موتاسیون های شناخته شده فعلی، افزایش خواهد یافت. در حال حاضر در مازندران ۱۸۰۰ بیمار مبتلا به بتاتالاسمی شناخته شده اند که اکثراً از نوع Major می باشند. تعداد بیماران تالاسمی از نوع Intermediate بطور دقیق معین نشده ولی با مطالعه پرونده های موجود حدس زده می شود که حدود ۱۰ درصد از بیماران فوق دچار این نوع تالاسمی در مازندران معلوم نیست ولی بنظر می رسد که تعداد آنها بسیار کم باشد. شاید با تعیین موتاسیون های تالاسمی از نوع Intermediate در این استان، بتوان انواعی از آلفا بتاتالاسمی را بین اینگونه بیماران بدست آورد.

هدف ازاین آزمایشات،تعیین موتاسیون‌های بیماران وحاملین ژن بتاتالاسمی مربوط به شمال ایران (مازندران) که در سال ۱۳۷۳ تحت پوشش درمانگاه تالاسمی شهرستان ساری قرار داشتند، بود. این نوع مطالعات ژنتیکی، بخصوص از نظر تشخیص های قبل از تولد (Prenatal diagnosis) در بیماران تالاسمی اهمیت زیادی دارند، زیرا با داشتن اطلاعات بیشتر در مورد شیوع موتاسیون ها در جوامعی که این بیماری شایع می باشد، تشخیص های قبل از تولد سهل تر شده و با هزینه کمتری صورت خواهند گرفت. انجام مطالعات ژنتیکی، همچنین می تواند روابط بین ژنوتیپ بیماران را روشن تر سازد و در نتیجه، پیش آگهی بسیاری از افراد مورد آزمایش را تعیین نماید و چنانچه این مطالعات بطور وسیع انجام پذیرد، ممکن است باعث شناخت موتاسیون های جدیدی گردد.

مواد و روش ها

این تحقیق، به روش توصیفی انجام شده و بیماران مورد بررسی و والدین آنها (حاملین ژن بیماری) افرادی بودند که قبلاً آزمایشات خونی لازم(CBC و Hb-electrophoresis) در مورد آنها انجام شده بود و بیماران مورد مطالعه هم، تحت درمان و نیز تزریق خون بودند. از ۶۰۰ بیماری که در درمانگاه تالاسمی بیمارستان بوعلی سینای ساری دارای پرونده بودند وتحت پوشش درمانی این درمانگاه قرار داشتند، تعداد ۴۴ بیمار بطور تصادفی (Random) انتخاب شدند. خصوصیاتی مانند سن، جنس، نسبت فامیلی والدین تعیین و در فرم اطلاعاتی ثبت شدند. از هر کودک بیمار و والدین آنها مقدار ۱۰cc خون در لوله هپارین دار دریافت گردید. لوله ها در جعبه های مخصوصی جاسازی و با پست هوائی روز بعد به آزمایشگاه تشخیص های قبل از تولد دانشگاه لندن فرستاده شدند.

ابتدا در هر نمونه خونی، .D.N.A گلبولهای سفید استخراج گردید. سپس با کمک روش PCR (Polymerase chain reaction) و سیستم ARMS (Amplification refractory mulation system) بطور مستقیم، تعیین موتاسیون انجام گرفت.

در روش ARMS ، تعیین موتاسیون بطور مستقیم صورت می گیرد وبجای دو پرایمر(Primer) (که معمولاً در روش غیر مستقیم R.F.L.P بکار می روند) از چهار پرایمر استفاده می شود. پرایمر عبارت است از طول کوچکی ازR.N.A که بازهای موجود در آن (که مکمل

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

بازهای موجود در DNA مورد نظر هستند) می توانند با کمک آنزیم پلیمر از (Polymerase) با بازهای DNA پیوند یافته وزنجیره جدیدD.N.A رابسازند.دراین روش، ازچهار پرایمر مورد استفاده، دو عدد آنها، پرایمرهائی هستند که برای کنترل این روش بکار می روند و در حقیقت P.C.R دوبار انجام می گیرد(۵). این روش برای سرعت عمل و در مواردی که از قبل وجود موتاسیون (از نظر علائم بالینی و آزمایشات پاراکلینیک و هماتولوژیکی) مورد تأیید می باشد، بکار می رود.

نتایج

بیماران از شهرهای ساری، نکا، جویبار، پل سفید، زیراب و قائمشهر بودند. از ۴۴ بیمار مورد بررسی تعداد ۲۳ مورد (۵۲/۳ درصد) پسر و ۲۱ مورد (۴۷/۷ درصد) دختر بودند. میانگین سن این بیماران ۹ سال، حداقل سن ۹ ماه و حداکثر سن ۲۵ سال بود. در ۳۶ خانواده از خانواده های مورد بررسی (۸۲ درصد) بین زن و شوهر نسبت فامیلی وجود نداشت و در ۸ مورد (۱۸/۲ درصد) زن و شوهر نسبت خویشاوندی داشتند.

از۴۴بیماردچارتالاسمی ماژور۲۴مورد(۵۴/۵درصد) از نظر ژنتیکی بصورت هموزیگوت بودند و ۱۲مورد (۲۷/۳ درصد) ژنوتیپ Compound heterozygote داشتند.

در ۸ بیمار (۱۸/۲ درصد) تعیین یکی از موتاسیون ها بر روی کروموزوم جفت مسیر نشد.

از نظر شیوع موتاسیون های هموزیگوت، از ۲۴ موردبیمارانی که دراین دسته قرار داشتند،۲۰مورد دارای موتاسیون IVSII-1 (G → A) بصورت هموزیگوت بودند.

جدول شماره(۱) توزیع موتاسیون های هموزیگوت را نشان می دهد.

جدول شماره ۱: توزیع انواع موتاسیون های هموزیگوت در بیماران بتاتالاسمی مراجعه کننده به درمانگاه تالاسمی شهرستان ساری در سال ۱۳۷۳

فراوانی / انواع موتاسیون های هموزیگوت	تعداد	درصد
IVSII-1 (G → A)	۲۰	۸۳/۳۳
IVSII-5 (G → C)	۱	۴/۱۶
IVSII-745 (G → G)	۱	۴/۱۶
Codon 30 (G → A)	۱	۴/۱۶
IVSII-3 (025bp)	۱	۴/۱۶
جمع	۲۴	#۱۰۰

۱۲ مورد از بیماران دارای ژنوتیپ Compound heterozygote بوده اند که $\frac{1}{4}$ آنها از نوع IVSII-1 (G (+G) Fr (8-9) / (A → بودند. در جدول شماره (۲) توزیع موتاسیون های بدست آمده از نوع Compound heterozygote ارائه گردیده است.

تعداد بیمارانی که یکی از موتاسیون های آنها قابل تشخیص نبود ۸ نفر بود و اینها مواردی بودند که در یکی از والدین نیز تعیین موتاسیون با روش ARMS امکان پذیر نشد. ۶ نفر از این بیماران دارای موتاسیون یک طرفه IVSII-1 (G → A) بودند و در یک بیمار یک موتاسیون IVSI-1 و در دیگری موتاسیون IVAI-5 بر روی یک کروموزوم شناخته شد.

بنابراین جمعاً ۱۰ نوع موتاسیون از بیماران و حاملین ژن بدست آمده که انواع آنها به ترتیب شیوع در جدول شماره (۳) ارائه شده اند. این جدول نشان می هده که بیش از $\frac{2}{3}$ موتاسیون های مزبور از نوع IVSII-1 (G → A) می باشند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

جدول شماره ۲ : توزیع انواع موتاسیون ها از نوع Compound heterozygote در بیماران بتاتالاسمی مراجعه کننده به درمانگاه تالاسمی ساری در سال ۱۳۷۳

فراوانی / انواع موتاسیون	تعداد	درصد
IVSII-1 (G → A) / Fr (8-9) (+G)	۳	۲۵
Fr (8-9) (+G) / codon 8(-AA)	۲	۱۶/۶۷
IVSII-1 (G → A) / IVSII-5 (G → C)	۲	۱۶/۶۷
IVSII-1 (G → A) / IVS1-3 (-25bp)	۱	۸/۳۳
IVSII-1 (G → A) / Codon 5 (-CT)	۱	۸/۳۳
IVSII-1 (G → A) / Codon 30 (G → C)	۱	۸/۳۳
IVSII-1 (G → A) / Codon 39 (G → C)	۱	۸/۳۳
IVSII-5 (G → C) / C5 (-CT)	۱	۸/۳۳
جمع	۱۲	#۱۰۰

جدول شماره ۳ : توزیع انواع موتاسیون و خصوصیات آنها در بیماران بتاتالاسمی مراجعه کننده به درمانگاه تالاسمی شهرستان ساری در سال ۱۳۷۳

No	Mutation	Phenotype	Type	تعداد	درصد
1	IVSII-1 (G → A)	β°	Mediterranean	۵۵ نفر	۶۸/۷
2	IVSII-5 (G → C)	β^{+}	Asian	۶ ″	۷/۵
3	Fr 8-9 (+G)	β°	Asian	۵ ″	۶/۳
4	Codon 30 (G → C)	β^{+}	Asian	۳ ″	۳/۸
5	IVS1-3 (-25bp)	β°	Asian	۳ ″	۳/۸
6	Codon 5 (-CT)	β^{+}	Mediterranean	۲ ″	۲/۵
7	IVSII-745 (G → G)	β°	Mediterranean	۲ ″	۲/۵
8	codon 8(-AA)	β°	Mediterranean	۲ ″	۲/۵
9	IVSII-1 (G → A)	β°	Mediterranean	۱ ″	۱/۲
19	Codon 39 (C → T)	β°	Mediterranean	۱ ″	۱/۲
جمع				۸۰ ″	۱۰۰

بحث

ازبررسی ده‌نوع موتاسیون بدست آمده از۴۴خانواده ایرانی مقیم مازندران، موتاسیون IVSII-1(G → A) بیشترین شیووع را داشته است،بطوریکه از ۸۰ مورد حاملین ژن شناخته شده، ۵۵ نفر (۶۸/۷۵ درصد) حامل این نوع موتاسیون بوده اند. این نوع موتاسیون از نوع موتاسیون های مدیترانه ای می باشد که فنوتیپ β دارد

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

و شیوع آن در کشورهای همسایه نیز دیده شده است اما درجه شیوع آن در کشروهای مختلف همسایه متفاوت است، مثلاً در جمهوری آذربایجان، در تحقیقی که روی صدوبیست بیمار مبتلا به بتاتالاسمی بعمل آمده، این موتاسیون در ردیف دوم قرار داشته است(۶). در این نوع موتاسیون، در اولین نوکلئوتید اینترون دوم ژن بتایک Point mutation اتفاق می افتد و بجای بازآدنین (A) باز دیگری که گوآنین می باشد (G) قرار می گیرد. موتاسیون IVSII-5 (G → C) در ردیف بعدی شیوع قرار دارد که یک نوع موتاسیون آسیائی است. این نوع موتاسیون، اخیراً در امارات متحده عربی فراوانی بیشتری را نشان داده است(۷). در این موتاسیون، در پنجمین نوکلئوتید اینترون اول ژن بتا به علت موتاسیونی از نوع Point mutation بجای باز سیتوزین (C) بازگوآنین (G) قرار می گیرد.

موتسایون Fr 8-9 در ردیف سوم فراوانی است، که یک نوع موتاسیون از نوع Frame shift می باشد و نییز یک موتاسیون آسیائی است که در کشورهای آسیائی بخصوص هند و پاکستان زیاد دیده شده است(۱۰) بقیه موتاسیون ها، یا از نوع آسیائی و یا از نوع مدیترانه ای می باشند و از نظر فراوانی در ردیف های بعدی جدول قرار دارند.

مطالعات قبلی درایران، که توسط دکترکریمی نژائ و همکاران انجام شده و در سال ۱۹۹۳ میلادی منتشر گردید نیز نشان داده که موتاسیون IVSII-1 (G → A) بیشترین شیوع را در ایران داشته است(۴) و تحقیق حاظر نیز این موضوع را نشان می دهد. در سال ۱۹۹۴ تحقیقی در مورد موتاسیون بتاتالاسمی در جزیره قشم ایران انجام شد که شیوع موتاسیون کدون ۳۹ را نشان داد(۱۱).

در مطالعات حاظر ۸۱/۸ درصد از والدین (حامل ژن) نسبت خویشاوندی با یکدیگر نداشته اند. این موضوع می تواند تعداد زیاد بیمارانی را که از نظر ژنوتیپی، بصورت Compound heterozygote هستند را توجیه کند.

تقدیر و تشکر

از همکاری خانواده های بیماران و پرسنل بخش و درمانگان تالاسمی بیمارسااان بوعلی سینا ساری تشکر می نمایم و نیز همکاریهای آقای موسی عظیمی ریاست وقت مرکز انتقال خون مازندران و همکار گرامی سرکار خانم دکتر وجیهه غفاری برای اینجانب بسیار مغتنم بوده است.

فهرست منابع

1. Weatherall DJ, Clegg JB, eds. "The thalassaemia syndromes". Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1981; P: 120.
2. Weatherall DJ. Thalassaemia in: Stamatoyannopulos G, Nienhuis AW, Majerus PW. Varmus H. eds. "The molecular basis of boold diseases."2nd ed. New York: WB Saunders. 1993;157-206.
3. Kazazian HH. The thalassaemia syndromes: Molecular basis and prenatal diagnisis in: Semin Hematol 1990, 27: 209-228.
4. Varnavides. L, OldJ, Mitchell. Metal. Proceedings of the 5th international conference on thalassaemias and the haemoglobino pathies, Nicosia; 1993.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

5. Newton C.R., Graham A, Heptinstall.L.E, et al. “Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system(ARMS). “nucleic Acids Ressearch 1989; 17(7): P: 20-51.
6. Kuliev AM, Rasulov IMR, Dadasheva T, et al. “Thalaassaemia in Azerbaijan” Med Genet 1994; 31: 209-212.
7. Quaife R,AL. Gazali S, Abbes S, et al. “The spectrum of β thalassaemia mutation in the UAE national population,” Med Genet 1994; 59-61.
8. Huisman THJ. “The structure and function of normal and abnormal haemoglobins.” In: Higgs DR, Watherall DJ eds.: Balliere’s Clinical Haematology (the Haemoglobinopathies) Vol. 6, No.1; London, Bailliere Tindall 1993; PP:1-31.
9. Thein SL. “β-Thalassaemia”. In: Higgs DR,Weatherall DJ eds: Bailiere’s clinical Haematology (the haemoglobinopathies). Vol.6, No.1; London, Bailliere Tindall 1993; PP: 151-177.
10. Varnavides NY, Old JM, Sarkar R, et al. “The Spectrum of β thalassaemia mutations on the Indian subcontinent: the basis for prenatal diagnosis. “Br J Haematol 1991; 78: 242-7.
11. Noori-Daloii. M.R., Moazami. N., Farhangi,s ., et al., “β Thalassaemia in IRAN: A high island of Queshm,” Hemoglobin. 1994; 18(6): 449-453.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]