جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۶، شماره ٤، تابستان ۱۳۸٤

بررسی جهش‌های بتاگلوبین در مبتلایان تالاسمی بتا در استان قزوین

معصومه تفضلی* (Ph.D)، عیسی نورمحمدی (Ph.D)، فرهاد ذاکر (Ph.D)، سیما خردمندکیا (M.Sc)
دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

سابقه و هدف: تالاسمی از مهم‌ترین ناهنجاری‌های ارثی خونی بوده و جهش‌های ژن گلوبین بتا از شیوع بیش‌تری در جهان برخوردار است. شناخت این جهش‌ها از نظر تشخیص و درمان در مناطق گوناگون با ارزش است. این پژوهش جهت بررسی شیوع جهش‌های بتاگلوبین در مبتلایان تالاسمی بتا در استان قزوین انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۳۰ بیمار از بیمارستان قدس قزوین نمونه خون جمع‌آوری و پس از استخراج DNA به روش سدیم کلراید اشباعی، آزمایش ARMS با استفاده از PCR با پرایمرهای معین جهت شناسایی ۱۳ جهش انجام شد.

یافته‌ها: بیش‌ترین جهش در ژن بتا گلوبین در این بیماران به ترتیب IVSII-1 (۵۰٪)، IVSI-110 (۱۵٪) و Fr8-9 (۵٪) شناسایی شد و درصد کمی از آن‌ها هم ناشناخته باقی ماندند.

نتیجه‌گیری: غربال‌گری جهش‌ها در جمعیت کوچک بیماران در منطقه قزوین نشان داد که فراوانی جهش‌های مورد بررسی با منطقه حوزه خاورمیانه متفاوت بوده که احتمالاً عوامل نژادی و جغرافیایی دخیل هستند. پیشنهاد می‌شود که با سایر پرایمرها، جهش‌های ناشناخته در این ناحیه مورد بررسی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بتا تالاسمی، جهش، واکنش زنجیری پلی‌مراز

مقدمه

تالاسمی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ارثی و یکی از علل کم‌خونی‌های ارثی با وراثت اتوزوم بوده و بتا تالاسمی از انواع شایع آن می‌باشد. جهش‌های متعددی با تغییرات کم در نقطه‌ای از DNA که سازنده زنجیره بتا است باعث بروز بیماری می‌گردد [۶]. کاهش سنتز در تولید زنجیره بتا موجب عدم تعادل نسبت زنجیره‌های آلفا و بتا شده که رسوب زنجیره‌های اضافی آن‌ها باعث تغییرات پاتوفیزیولوژیک در بیمار می‌شود [۱۳]. مطالعات انجام گرفته نشان می‌دهد که این بیماری در بعضی از مناطق کشور ایران تا ۱۰٪ ناقل دارد و در شمال و جنوب کشور از شیوع بیش‌تری برخوردار است [۱۴]. گسترش این بیماری در نقاط مختلف دنیا متفاوت است؛ چنان‌چه در حوزه مدیترانه و خاورمیانه و هند شایع‌تر و در نواحی آسیای دور و اروپای شرقی شیوع کم‌تری دارند [۱۲]. با توجه به انواع جهش‌ها و اهمیت آن‌ها در جمعیت‌های مختلف، پراکندگی جهش‌های این بیماری در ایران حائز اهمیت است. در ضمن موفقیت در تشخیص قبل از تولد در صورت اطلاعات کافی از جهش‌های شایع این بیماری با هزینه کم‌تر و سرعت بیش‌تر امکان‌پذیر است. جلوگیری از بیماری تالاسمی بتا نیازمند بررسی همه جانبه جهش‌های مختلف مولکولی در جمعیت‌های مختلف به‌خصوص با احتمال شیوع بالا می‌باشد. در ایران در این زمینه مطالعات مختلفی صورت گرفته است اما در استان قزوین چنین بررسی انجام نشده است که هدف این مقاله می‌باشد. از این رو یک جمعیت

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱-۸۸۰۵۴۳۶۵، نمابر: ۰۲۱-۸۸۰۵۴۳۵۵، E-mail: cmrc.iums@yahoo.com

تاریخ دریافت:۸۳/۸/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۳/۱۲/۱۶

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

نسبتاً کوچک با توجه به امکانات موجود از بیماران استان قزوین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش از بیماران بیمارستان کودکان قدس قزوین (بخش تالاسمی) هماهنگی انجام گرفت. از ۳۰ بیمار خون‌گیری وریدی انجام شد که ۱۰میلی‌لیتر خون در EDTA تهیه و نمونه‌ها در شرایط مناسب به مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران منتقل گردید.

بیماران مورد نظر همگی مبتلا به تالاسمی ماژور بودند و خون‌گیری از آن‌ها قبل از تعویض خون صورت گرفت.

تعداد ۱۵ نمونه خون که جهش IVSII-I داشتند به آزمایشگاه ژنتیک رفرانس تحویل و از DNA آن‌ها به عنوان کنترل استفاده شد و هم‌چنین از ۹ فرد سالم به عنوان شاهد استفاده گردید. برای استخراج DNA از روش استاندارد سدیم کلراید اشباعی (Saturated NaCl) استفاده گردید [۷]. بدین ترتیب که گلبول‌های قرمز خون توسط بافر، لیز شده (Lysis) و سپس DNA از سلول هسته‌دار جدا شد.

جدول۱. ترتیب توالی بازهای آلی پرایمرهای مورد استفاده در تسخیر موتاسیون‌های تالاسمی

نوع پرایمر	ترتیب توالی بازهای آلی (5→3)
Codon 8N	ACA CCA TGG TGC ACC TGA CTC CTG AGC AGA
Codon 8M	ACA CCA TGG TGA ACC TGA CTC CTG AGC ACG
Codon 30N	TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTG ATA CCT ACC
Codon 30M	TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTG ATA CCT ACG
IVSI-1N	TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAC
IVSI-1M	TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAT
IVSI-5N	CTC CTT AAA CCT GTC TTG TAA CCT TGT TAC
IVSI-5M	CTC CTT AAA CCT GTC TTG TAA CCT TGT TAG
IVSI-6N	TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATA
IVSI-6M	TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATG
IVSI-110N	ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC ACC
IVSI-110M	ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC ACT
IVSI-25 N	TGT AAC CTT GAT ACC AAC CTG CCC A
IVSI-25 M	TGCCCA GTT TCT ATT GGT CTC CTT AAA CCT GTC
Fr:36/37N	GGT AAG GAC TCA AAG AAC CTC TGG GTC CAA
Fr :36/37M	GGT AAG GAC TCA AAG AAC CTC TGG GTC CAG
Codon39N	CAG ATC CCC AAA GGA CTC AAA GAA CCT GTG
Codon39M	CAG ATC CCC AAA GGA CTC AAA GAA CCT GTA
Codon44N	AGC ATC AGG AGT GGA CAG ATC CCC AAT GG
Codon44M	CAG CAT CAG GAG TGG ACA GAT CCC CAA TGA
IVSII-1N	AAG AAA ACA TCA AGG GTC CCA TAG ACT GAC
IVSII-1M	AAG AAA ACA TCA AGG GTC CCA TAG ACT GAT
IVSII-745N	GGT TTC ATA TTG CTA ATA GCA GCT ACA ATC GAG C
IVSII-745M	GGT TTC ATA TTG CTA ATA GCA GCT ACA ATC GAG G
Fr8,9N	CCT TGC CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAC ACT
Fr8,9M	CCT TGC CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAC ACC
CommonC (internal control)	ACC TCA CCC TGT GGA GCC AC
CommonD (internal control)	CCC CTT CCT ATG ACA TGA ACT TAA

منظور از N، نرمال و M، موتانت است.

نمونه خون با بافر لیز (سوکروز ۰/۳۲ میلی‌مول، تریس ۱۰ میلی‌مول، کلرور منیزیوم ۵ میلی‌مول و تریتون- x-۱۰۰ یک درصد) مخلوط و مدت یک دقیقه سانتریفوژ شد و به روی رسوب حاصله، سود ۵۰ میلی‌مول اضافه و مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری جوش قرار داده شد و سپس مدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ شد و محلول رویی حاوی DNA به‌دست آمد.

تعیین جهش ژن بتاگلوبین بتا با روش PCR-ARMS انجام شد [۱۰]. ابتدا شرایط مطلوب آزمایش برای ۱۳ جهشی که پرایمرهای آن‌ها از شرکت زیست پژوه خریداری شده بود، انجام شد. بهینه کردن شرایط PCR شامل اختصاصی بودن باند، اختصاصی کار کردن پرایمرهای موتانت و نرمال می‌باشد. از دستگاه ترموسیکلر (Eppendorf, Germany) استفاده

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

شد. پس از بهینه کردن شرایط PCR نمونه‌های بیماران همراه کنترل موتانت و کنترل نرمال برای جهش‌های شایع ایران بررسی شدند.

انواع پرایمرهای مورد استفاده، جهش‌های فوق را بررسی کردند (جدول ۱). به‌طور خلاصه در سیکل اول دما تا ۹۴°c برای یک دقیقه می‌رسد و متناسب با جهش‌های موجود پرایمرها در هر لوله وجود دارد که با کاهش حرارت تا ۶۶°c مدت ۱ دقیقه اتصال پرایمرها به ناحیه جهش‌یافته صورت می‌گیرد. سپس حرارت مجدداً تا ۷۲°c برای ۱/۵ دقیقه بالا می‌رود و پرایمرها درحضور dNTPs و بافر موجود، رشته مکمل DNA را می‌سازند. در سیکل‌های بعدی تعداد زیادی محصول DNA مورد نظر به‌دست می‌آید.

پس از پایان فرآیند تکثیری انجام سیکل‌ها در دستگاه ترموسیکلر، محصولات به‌دست آمده روی ژل آگار ۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید، الکتروفورز (GNA-100, Pharmacia) شده که باند درخشان آن‌ها در صورت وجود داشتن توسط دستگاه Transiluminator (UV-20, Pharmacia) مشاهده شد [۱۰].

نتایج

از بین ۳۰ نمونه غیرخویشاوند که رابطه خواهر و برادری نداشتند، RT-PCR انجام شد. نتایج به‌دست آمده در جدول ۲ اشاره گردیده است. نتایج نشان می‌دهد که ۸۰٪ موارد پرایمرهای به‌کار برده شده جهش‌ها را شناسایی نمودند و باقی‌مانده یعنی ۲۰٪ ناشی از جهش‌هایی هستند که شیوع کم‌تری دارند و الل‌هایی هستند که در مطالعه، ناشناخته باقی مانده‌اند یا این‌که پرایمرهای آن‌ها در این مطالعه بررسی نشده است.

جدول ۲. الل‌های جهش‌یافته و ناشناخته در ۳۰ بیمار غیرخویشاوند تالاسمیک

	تعداد	درصد
الل‌های بررسی شده	۶۰	۱۰۰
الل‌های جهش یافته	۴۸	۸۰
الل‌های ناشناخته	۱۲	۲۰

بررسی در تمامی نمونه‌های بیماران نشان می‌دهد، که ۵۰٪ بیماران دارای جهش IVSII-1 و ۱۵٪ دارای جهش IVSI-110 و ۵٪ دارای جهش Fr8-9 می‌باشند. بعضی از جهش‌ها از وفور کم‌تری برخوردار هستند. ۶ مورد از جهش‌ها به‌طور کامل در بیماران یافت نگردید که شامل IVSI-1، Fr36-37، IVSI-25، C44، C39، IVSII-745 بود (جدول ۳).

جدول ۳. درصد انواع جهش‌های شناسایی شده در بیماران تالاسمیک

انواع جهش‌ها	تعداد	درصد نسبت به کل الل‌ها	درصد نسبت به الل‌های جهش‌یافته	انواع جهش‌ها	تعداد	درصد نسبت به کل الل‌ها	درصد نسبت به الل‌های جهش‌یافته
IVSII-1	۳۰	۵۰	۶۲/۵	IVSI-1	۰	۰	۰
IVSI-5	۱	۱/۶۶	۲/۰۸	Fr36-37	۰	۰	۰
C30	۲	۳/۳	۴/۱۶	IVSI-25	۰	۰	۰
IVSI-6	۲	۳/۳	۴/۱۶	C44	۰	۰	۰
IVSI-110	۹	۱۵	۱۸/۷۵	C39	۰	۰	۰
Fr8-9	۳	۵	۶/۲۵	IVSII-745	۰	۰	۰
C8	۱	۱/۶۶	۲/۰۸				

بحث و نتیجه‌گیری

تحقیقات نشان داده است که شیوع جهش‌های تالاسمی بتا در نقاط مختلف دنیا متفاوت است.[۸،۴،۱۳]. در حوزه مدیترانه جهش IVSI-110 با فراوانی ۳۲٪ و Non sense

CD39 با فراوانی ۲۶٪ و در هندوهای آسیایی جهش‌های IVSI-5، Fr8/9 و IVSI-I به ترتیب با فراوانی‌های ۲۲٪، ۱۹٪ و ۱۳٪ و در آفریقا جهش ۲۹- با فراوانی ۵۵٪ بیش‌تر از انواع دیگر در بیماران دیده می‌شود [۸،۱۱].

در این مطالعه فراوانی جهش‌های IVSII-1، IVSI-110 و Fr8/9 بتا تالاسمی در استان قزوین به ترتیب ۵۰٪، ۱۵٪ و ۵٪ به‌دست آمد که با مناطق دیگر از جمله مدیترانه تفاوت دارد که احتمالاً عوامل نژادی و جغرافیایی در ایجاد آن دخیل است و تظاهرات بیماری را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۵]. جالب این‌که نتایج به‌دست آمده حاضر با بعضی از نتایج داخل کشور تطابق و اختلاف دارد؛ از جمله در مطالعه‌ای در اصفهان جهش IVSII-1 بیش‌ترین شیوع را داشته و IVSI-1 در موارد کمی مشاهده گردید، ولی در این مطالعه جهش مورد دوم دیده نشد [۲]. لازم به ذکر است که جهش IVSII-I در شمال کشور نیز شایع است [۱]. با توجه به پرونده بیماران در استان قزوین که تعداد زیادی از بیماران غیربومی و مهاجر از شمال هستند، وفور جهش IVSII-1 قابل توجیه می‌باشد. در گزارشی که در جمعیت‌های متفاوتی از ایرانیان صورت گرفته است جهش در IVSII-1 از شایع‌ترین جهش‌ها در شمال کشور بوده است که با مطالعه حاضر انطباق دارد [۹]. نکته قابل توجه این‌که، جهش IVSII-1 در مردم جزایر کومورو که در اقیانوس هند زندگی می‌کنند نیز به وفور دیده شده است [۳]. در مطالعه‌ای در هرمزگان، بیش‌ترین جهش IVSI-5 و سپس IVSII-1 بود و جهش IVSI-110 مشاهده نشد، که برخلاف مطالعه حاضر می‌باشد [۱۴].

با نتایج به‌دست آمده، شیوع جهش‌های مولکولی حاضر در استان قزوین می‌تواند راهنمای مفیدی جهت پیش‌گیری از تالاسمی و برنامه‌ریزی در کنترل و تشخیص قبل از تولد این بیماری باشد.

در خاتمه جهت مطالعات تکمیلی پیشنهاد می‌شود که پرایمرهای دیگر تهیه و بر روی جهش‌های ناشناخته مورد بررسی قرار گیرند و هم‌چنین ژن بتاگلوبین در این افراد بررسی توالی ژنتیکی شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه همکاران در دانشگاه علوم پزشکی قزوین، به ویژه مسئولین بیمارستان قدس و هم‌چنین از معاونت پژوهشی و مدیر امور پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران که در تأمین مالی و اجرای این پژوهش در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

[۱] اخوان نیاکی هاله، فتحی معصومه، لطفی مریم، زینلی سیروس، دونامور اریک، الیون ژاک. بررسی مولکولی ژن‌های بتاگلوبین در افراد تالاسمیک استان مازندران. دومین کنگره خون و بیماریهای مرتبط. تهران، ۳-۱ دی ۱۳۷۵. صفحات ۱۲۹-۱۲۸.

[۲] پور نقشبند زهرا، قانعی مصطفی، زینلی سیروس، ذولفقاری بهزاد. بررسی موتاسیون‌های شایع بتا تالاسمی در استان اصفهان. اولین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران؛ تهران، ۵ اسفند ۱۳۷۸. صفحات ۱۳۴۵-۱۳۴۱.

[3] Badens C, Martinez di, Montemuros F, Michel GF, Thuret I. Molecular basis of hemoglobinopathies and G6PD deficiency in the Comorian. Hematol J, 2002; 1(4): 264-8.

[4] Benito A, Villegas A, Perez–Cano R, Bernal R. β-thalassemia in south west spain. Br J Haematol, 1996; 92(2): 336-8.

[5] Cao A, Moi P. Genetic modifying factor in beta-thalassemia. Clin Chem Lab Med, 2000; 38(2): 123-32.

[6] Mazza JJ. Manual of clinical hematology. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2002. p.149-53.

[7] McPherson MJ, Qurike P, Tailor GR. PCR a practical approach. 1st ed. Oxford: Oxford University press; 1993. p.33-58.

[8] Moren I, Bolufer P, Luzparez M. Rapid detection of Major Mediterranean β-thalassemia mutations. Br J Haematol, 2002; 119(2): 554-7.

[9] Najmabadi H, Kariminejad R, Sahebjam S, Pourfarzad F, Teimourian S, Sahebjam F. The beta thalassemia mutation spectrum in the Iranian population. Hemoglobin, 2001; 25(3): 285-96.

[10] Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powel SJ, Summers C, Kalsheker N. Analysis of any point mutation in DNA. Nucleic Acid Res, 1989; 17(7): 2503-16.

[11] Old JM. Antenatal diagnosis. Baillieres Clin Haematol, 1991; 4(2): 391-428.

[12] Thein SL. Beta-thalassemia prototype of a single gene disorder with multiple phenotypes. Int J Hematol, 2000; 76(supp2): 96-104.

[13] Thein SL. Beta thalassemia. Baillieres Clin Haematol, 1998; 11(1): 91-126.

[14] Yavarian M, Harteveld CL, Batelan D, Bernini LF, Giordano PC. Molecular spectrum of Beta-thalassemia in the Iranian province of Hormozgan. Hemoglobin, 2001; 25(1): 35-43.