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

مجلهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
شمارهٔ ۶۲ (تابستان ۱۳۸۳)، صفحات ۷۲-۶۷

جهش های شایع ژن بتا ـ گلوبین در بخش مرکزی استان آذربایجان شرقی

دکتر سید مجتبی محدث اردبیلی: استادیار ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
سیامک جبارزاده تبریزی: کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی ، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر علیرضا نیکانفر: استادیار گروه هماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر محمد رهبانی نوبر: استاد بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

چکیده

زمینه و اهداف: بتا- تالاسمی یکی از شایع ترین ناهنجاری های وراثتی هموگلوبین درمنطقه و یکی از مشکلات عمده موجود بر سر راه بهداشت و سلامت جمعیت ایران محسوب می شود. حدود ۱۰ الی ۱۵ هزار بیمار مبتلا به بتا- تالاسمی و بیش از ۲ الی ۲/۵ میلیون نفر به عنوان ناقل بیماری شناخته شده اند. احتمال تولد نوزاد مبتلا در هر زایمان مادران ایرانی به طور متوسط ۰/۳۳ در صد محاسبه شده است. هدف از این مطالعه شناسایی انواع جهش های شایع در استان آذربایجان شرقی و فراهم آوردن امکان تشخیص مولکولی بیماری برای افراد در معرض خطر دراین منطقه بود.

روش بررسی: این مطالعه بر روی بیش از ۸۰ ناقل یا مبتلا (بیش از ۱۵۰ کروموزوم) و در میان ۳۷ خانواده مجزا انجام شد. از میان ۱۲ نوع آلل موتانت رایج در منطقه مدیترانه، ٦ نوع که محتمل تر می رسید، انتخاب شدند و در DNA های استخراج شده از افراد مورد نظر با به کار گیری دو روش مختلف واکنش زنجیره ای پلیمراز چند گانه[1] با الکتروفورز روی ژل آگارز و لکه گذاری نقطه ای معکوس[2] مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته ها: مطالعه حاضر نشان داد که جهش IVS II-۱ با فراوانی ۳۲٪ بیشترین میزان شیوع را به خود اختصاص می دهد. فراوانی ۵ آلل دیگر به شرح زیر است: IVSI- ۱ (G→A) ۲۲/٦۷ درصد،(+G)۸/۹ frame shift ۱۸/٦۷ درصد، IVSI- ۱۱۰(G→A) ۱٦ درصد، (G→C) کدون ۳۰ ، ۵/۳٤ درصد و(G→C) IVS I- ۵ ۲/٦ درصد.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده نشان می دهد که الگوی پراکنش آلل های موتانت تبریز و حومه آن با سایر نواحی کشور تا حدودی متفاوت است. در عین حال، با فراوانی های گزارش شده برای جمعیت ایرانی مقیم آمریکا مطابقت دارد. همچنین این مطالعه نشان داد که روش لکه گذاری نقطه ای معکوس در مقایسه با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز چند گانه معمول سریع تر و دقیق تر است.

کلید واژه ها: بتا - تالاسمی، واکنش زنجیره ای پلیمراز چندگانه، لکه گذاری نقطه ای معکوس، الگوی پراکندگی جهش ها

مقدمه

بیماری تالاسمی گروهی ناهمگون از اختلالات ارثی را شامل می شود که وجه مشترک آنها فقدان یا کاهش سنتز یک یا چند زنجیره پلی پپتیدی تشکیل دهنده هموگلوبین است. تالاسمی ساختار ژنتیکی غیر یکنواختی دارد، به طوری که در مورد بتا- تالاسمی که زنجیره β دچار نقص می شود، بیش از ۹۰ نوع جهش شناخته شده است (۱).

بتا- تالاسمی یکی از شایع‌ترین ناهنجاری های وراثتی هموگلوبین از مدیترانه وخاورمیانه تا هند و خاور دور است و مشکل عمده بهداشت و سلامت ایرانیان محسوب می‌شود. بتا- تالاسمی بیماری وراثتی مزمن و کشنده است. نوزادان مبتلا بعد از تولد در بستر خانواده رشد می‌یابند و گاه به سنین بلوغ می‌رسند، ولی به تدریج با ظهور عوارض متعدد و وخیم‌تر شدن بیماری متأسفانه فوت می‌شوند. احتمال تولد نوزاد مبتلا به بتا- تالاسمی در ایران، به طور متوسط، یک مورد در ۳۰۰ زایمان تخمین زده می شود که تقریباً ۳ برابر بیشتر از بالاترین فراوانی در بیماری‌های وراثتی، یعنی سندرم داون، با شیوع حداکثر ۱/۱۰۰۰ در هر تولد است (۲). اجباری شدن غربالگری این بیماری قبل از ازدواج درکشور خصوصاً در کم‌خونی‌های مزمن مشکوک گامی بسیار مهم تلقی می شود، ولی از آن جا که این افراد علی رغم آگاهی از ناقل بودن خود دست به ازدواج می زنند و حتی بچه دار هم می‌شوند، چنین به نظر می‌رسد که صرفاً اجباری شدن مشاوره ژنتیکی قبل از ازدواج نمی تواند در پیشگیری از بروز موارد جدید بیماری کارساز باشد. تعیین الگوی پراکندگی آلل‌ها کمک ارزنده‌ای برای تشخیص سریع و تعیین نوع جهش احتمالی درجنین می‌کند.

روشهای مطالعه DNA جهت تشخیص پیش از تولد اولین بار بر روی DNA سلولهای مایع آمنیوتیک انجام شد. آلفا تالاسمی، کم خونی داسی شکل و بتا- تالاسمی در ۱۹۷۶ با استفاده از آمنیوسیت های کشت شده تشخیص داده شدند. در ۱۹۸۲ ملاحظه شد که نمونه پرزهای جنینی[3] منابع مناسب‌تری برای تهیه DNA لازم جهت مطالعه مولکولی هستند. این روش مورد اقبال بیشتری قرار گرفت، زیرا انجام آن در هفته‌های ۱۱-۹ حاملگی میسر بود و قطع حاملگی با ایمنی بیشتر و فشار روحی کمتری انجام می‌پذیرفت(۳).

1. Multiplex PCR
2. Reverse dot blotting
3. chorionic villus

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

به طور کلی، مبتلایان تالاسمی با شیوع بالا در کمربند مدیترانه‌ای از خاورمیانه گرفته تا هند و برمه و آسیای جنوب شرقی پراکنده شده‌اند. بالاترین تراکم ژن آلفا- تالاسمی در جنوب‌شرقی آسیا و سواحل غرب آفریقا گزارش شده است. ۵۰٪ جمعیت در عربستان سعودی یکی از اشکال خاموش آلفا ـ تالاسمی را دارا هستند. در سیاه پوستان آمریکا آلفا- تالاسمی نسبتاً شایع است ولی تظاهر بالینی ندارد. (۱ و٤). در مورد بتا- تالاسمی، بیشترین شیوع در ساکنین ایتالیا و یونان ملاحظه شده است. بتا- تالاسمی، با شیوع کمتر، در نواحی غربی و شمال آفریقا، ترکیه، ایران، سوریه، عربستان سعودی، هند وپاکستان دیده می شود.بتا ـ تالاسمی، به طور تک‌گیر و آندمیک در کلیه نژادهای موجود در چین دیده می‌شود ولی جمعیتی مشخص با فراوانی بالا شناسایی نشده است(٤ و ۵). در مطالعه‌ای که «احمد صاحب» و همکارانش (٤) با همکاری کالج دانشگاه لندن درپاکستان انجام دادند، از روش PCR چندگانه مشابه روش به کار رفته در این تحقیق استفاده شده است. مطالعه فوق برروی ۱۳ جفت از ۱۹ جفت آلل شایع در پاکستان با استفاده از آغازگرهای موتانت نشان داد که توزیع فراوانی انواع جهش ها در استانهای مختلف پاکستان الگوی متفاوتی دارد: در شمال پاکستان frame shift ۸/۹ با فراوانی ٤۱/۳ درصد شایع‌ترین جهش است، ولی در جنوب این کشور IVSI-۵ با فراوانی ۵۲/۲٪ شیوع بیشتری دارد. درصد فراوانی در کل پاکستان به صورت زیر محاسبه شده بود:

IVSI - ۵ (G→C) ٪۳۱/۳ , frame shift ۸/۹ (+G) : ٪۲۵/۹
٤۱/٤۲ (-TTC) :٪٦/۷ , IVSI - ۱ (G→T) : ٪۵/٤

تالاسمی به ویژه بتا- تالاسمی در ایران نیز شیوع بالایی دارد و بیشترین میزان شیوع این بیماری در استانهای شمالی کشور، فارس و سیستان و بلوچستان گزارش شده است. ۱۵-۱۰ هزار بیمار تالاسمی ماژور و ۲/۵-۲ میلیون نفر ناقل تالاسمی، که بالقوه می‌توانند والدین‌بیماران ماژور در آینده باشند، رسماً به ثبت رسیده است (۱). گزارشی که در ۱۳۷۵ از نتایج مطالعه برروی انواع جهش های مربوط به ژن بتا- گلوبین در استان فارس منتشر شد (۵) (G →A) IVSI-۱ با فراوانی ۲۷٪ شایع‌ترین نوع جهش در استان مذکور بود. پس از آن IVSI- ۱۱۰ با فراوانی ۱۷/۸٪، IVSII-۱ با فراوانی ۱۳/۷٪، IVSI-٦ و ۸/۹ frame shift. با فراوانی‌های ۹/٦٪، کدون ۵ با فراوانی ٦/۸٪ و کدون ٤٤ و IVSII-۷٤۵ هر یک با فراوانی ۱/٤، انواع دیگر جهش های مربوط به ژن بتا ـ گلوبین را تشکیل می دهند. فراوانی جهش کدون ۳۰ در این مطالعه صفر درصد گزارش شده است.

در مطالعه مشابه دیگری که در بیماران مربوط به هشت ناحیه مختلف ایران انجام شده است به ترتیب IVS-II-۱ و IVS-I- ۵ به عنوان شایع ترین انواع جهش ها معرفی شده اند (٦).

با توجه به غیر یکنواخت بودن بیماری و این که تعیین انواع جهش های شایع ژن مربوطه در یک منطقه جغرافیایی خاص می تواند نقش مهمی در اتخاذ روش مناسب برای تشخیص افراد ناقل و مبتلا داشته باشد، در این مطالعه با استفاده از روشهای واکنش زنجیره ای پلیمراز چندگانه، واکنش زنجیره ای پلیمراز چندگانه ARMS و لکه گذاری نقطه ای معکوس، نوع جهش افراد ناقل و مبتلادر منطقه شمال غرب کشور (آذربایجان شرقی و استان همجوار) تعیین شد. نتایج به دست آمده نشان می دهد که الگوی پراکنش آلل های موتانت در این منطقه با فراوانی آن در سایر مناطق کشور متفاوت است. در عین حال، با فراوانی های گزارش شده برای جمعیت ایرانی مقیم آمریکا مطابقت دارد. همچنین این مطالعه نشان داد که روش لکه گذاری نقطه‌ای معکوس در مقایسه با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز معمول روش سریع‌تر و دقیق تری است.

مواد و روش ها

نمونه‌گیری از بیمارانی که در سنین ۸ هفتگی تا ۱٤ سالگی قرار داشتند، انجام گرفت. توزیع جغرافیایی نمونه ها محدود به مرکز استان آذربایجان شرقی، روستاها و شهرهای همجوار و برخی از استانهای اطراف بود.

حدود ۱۰ میلی لیتر نمونه خون محیطی از هر یک از۸۰ فرد ناقل یا مبتلا به بیماری بتا- تالاسمی که از ۳۷ خانواده مختلف بودند ، تهیه و در لوله‌های سرپیچ‌دار حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محلول EDTA (Merck) نیم مولار جمع آوری شد. نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA از گلبول‌های سفید در یخچال نگهداری شدند.

استخراج وتخلیص DNA ژنومی از نمونه‌های خون به روش فنل، کلروفرم و پروتیناز K (Boehringer Manheim GmbH) انجام شد. پس از رساندن دمای نمونه ها به ۳۷ درجه سانتیگراد، با ۳۰ میلی لیتر بافر لیز[1] مخلوط و سانتریفوژ گردید. بعد ازتکرارمجدد مرحله فوق، رسوب حاصل در ۱۰ میلی لیتر بافر SE به همراه SDS ۱۰ درصد (Merck) و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر پروتئیناز K به حالت محلول در آمد و به مدت ۳-۱ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس ۱۰ میلی لیتر فنل - کلروفرم به مخلوط فوق اضافه و فاز آبی جدا شد و با ۱/۱۰ حجم استات سدیم ۳ مولار و دو برابر حجم اتانول مطلق سرد شده مخلوط گردید. کلاف DNA حاصل از محلول جدا شد و در حجم مناسبی از بافر TE یا آب مقطر حل گردید.

توالی های مورد نظر در هر یک از نمونه های DNA استخراج شد. ابتدا با استفاده از روش PCR چندگانه وبه‌کارگیری پرایمرهای طبیعی و موتانت برای هر یک از انواع جهش های مورد مطالعه طی واکنش های مجزا تکثیر شدند. توالی هایی از ژن بتا ـ گلوبین که به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفتند عبارتند از:

IVS II -۱: (G→A); ۱:(G→A); frameshift ۸/۹: (+ G); IVS - ۱۱۰: (G→A); IVS1 - ۵: (G →C); Codon۳۰: (G→C)

توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای طبیعی و موتانت مورد استفاده در این مطالعه با نتایج قبلی سایر محققین مطابقت دارد(۷و۸).

مخلوط هر یک از واکنش های PCR به شرح ذیل تهیه شد: ۵ پیکو مول از هر یک از پرایمرها، ۰/۳ واحد آنزیم Taq DNA، ۳۰ میکرومول از هر یک از dNTPها (Boehringer Manheim,GmBH) TrisHCL با غلظت ۱۰ میلی مول و PH = ۸/۳ ، KCL با غلظت ۵۰ میلی مول، MgCl ۲ باغلظت ۱/۵ میلی مولارو نهایتاً ۰/۵- ۰/۳ میکروگرم از DNA ژنومی به عنوان الگو. حجم نهایی واکنش با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر، به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. بعد از قرار دادن مخلوط واکنش در دمای ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه (دمای دناتوره شدن DNA الگو) و ۲۵ دور واکنش PCR طی

1. Lysis buffer

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

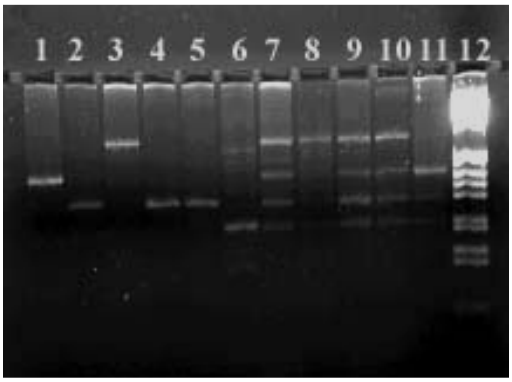
برنامه زیر انجام شد: ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ٦٥ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱/٥ دقیقه. محصول نهایی در انتها به مدت یک دقیقه در دمای ٦٧ درجه سانتیگراد و به مدت ۳ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد قرار گرفت. محصول واکنش در دمای یخچال نگهداری شد.

همچنین نمونه‌ها به‌روش ARMS-PCR موردمطالعه قرار گرفتند. در این روش برای هر نمونه ٦ واکنش مستقل PCR و هر واکنش با استفاده از یک پرایمر طبیعی یا موتانت به همراه یک پرایمر مشترک انجام شد و وجود یا عدم وجود یک آلل در هر واکنش مورد مطالعه قرار گرفت. از هر یک از پرایمرها به مقدار ٥ پیکو مول مورد استفاده قرار گرفت. غلظت سایر مواد مورد استفاده در هر واکنش و سایر شرایط همانند روش PCR چندگانه بود. محصول حاصل از دو نوع PCR مذکور از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۳٪ و با استفاده از سیستم مستند سازی UVP مجهز به نرم افزارUVP-Labworks مورد مطالعه قرار گرفت.

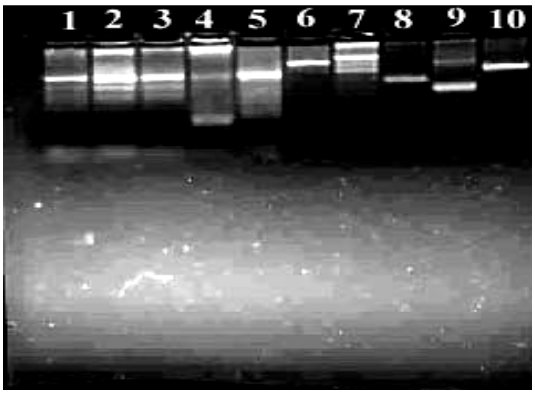
در مطالعه نمونه ها به روش لکه گذاری نقطه ای معکوس، قطعات مورد نظر در DNA ژنومی ابتدا با استفاده از آغازگرهای عرضه شده در کیت مخصوص[1] و مطابق با برنامه زیر تکثیر شد: ٩٤ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و متعاقب آن ۳۰ دور PCR تحت شرایط: دناتوره کردن در دمای ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ ثانیه، جفت شدن پرایمرها در دمای ٥٤ درجه سانتیگراد به مدت ۱٥ ثانیه، و پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ٤٥ ثانیه و در دور آخر(سیکل ۳۰) مرحله نهایی پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه انجام و محصول در دمای یخچال نگهداری شد. جهت حصول اطمینان از تکثیر مطلوب قطعات مورد نظر از DNA الگو، قطعات حاصل برروی ژل آگارز ۳٪ مورد مطالعه قرار گرفتند. در مرحله بعد، محصول PCR که توسط آغازگرهای بیوتین دار در انتهای ٥َ خود نشاندار شده بود، با پروب های اختصاصی آلل های موتانت و طبیعی موجود بر روی نوارهای آماده هیبرید شد و محل هیبریداسیون با استفاده از آنزیم آلکالن فسفاتاز متصل به زنجیره استرپتوآویدین[2] قابل رؤیت شد. با اضافه کردن سوبسترای آنزیم واکنش رنگی به صورت خط ارغوانی رنگ بر روی نوار ظاهر می شود. با قرار دادن نوارهای خشک شده فوق در کنار نوار راهنما، وضعیت آللی نمونه ها، از نظر طبیعی و ماژور و یا مینور بودن برای بیش از ۱٥ نوع جهش مشخص شد.

یافته ها

در PCR چندگانه شش جفت پرایمرطبیعی در هر واکنش مورد استفاده قرار می‌گیرد و اصولاً باید ٦ نوار مجزا مشاهده شود. ولی از آنجا که قدرت تفکیک ژل آگارز حداکثر تا ۱۰۰bp است، آمپلیکان‌های مربوط به کدون ۳۰، ۱ -IVSI و ٥ - IVSI که به‌ترتیب به طول ۲۸۴ جفت باز، ۲۸۰ جفت باز، ۲۷۳ جفت باز هستند، نمی‌توانند از هم تفکیک شوند و این ۳ آمپلیکان‌جایگاه یکسانی را در ژل اشغال کرده و بر روی هم می‌افتند. به همین دلیل، در کل، چهار نوار قابل مشاهده خواهدبود که به ترتیب عبارتنداز: frameshift ۸/۹ به طول۲۱۳جفت باز، آمپلیکان های مربوط به کدون ۳۰، ۱ -IVSI و ٥ -IVS1 به ترتیب به طول های ۲۷۳، ۲۸۰ و ۲۸٤ جفت باز که به صورت یک نوار ظاهر می شوند، سومین نوار مربوط به ۱۱۰-IVSI به طول ۳۸۹ جفت باز وسنگین‌ترین زنجیره تکثیر شده به طول ٦۳۳ جفت باز مربوط به ۱-IVSII. در هر یک از افراد مبتلا به بیماری بتا- تالاسمی حذف حداقل یک نوار را انتظار داریم که درمقایسه با اندازه مارکر، نوار حذف شده و نهایتاً جهش یا جهش‌های مربوطه تشخیص داده می‌شوند. در حالتی که فرد مبتلا ٤ نوار مجزا را نشان بدهد، بدین معنی است که‌جهش حداقل در یکی از ۳ آلل موتانت ذکر شده که طول تقریباً یکسانی دارند، اتفاق افتاده‌است. بنابراین، جهت تشخیص این نوع جهش باید تک تک ۳ پرایمر فوق را به طور مجزا با روش PCR- ARMS دوباره آزمایش کرد (*تصویر ۱*). در طی واکنش PCR چندگانه با به کارگیری آغازگرهای موتانت درفرد طبیعی نبایدهیچ نواری مشاهده شود (تصویر۲).



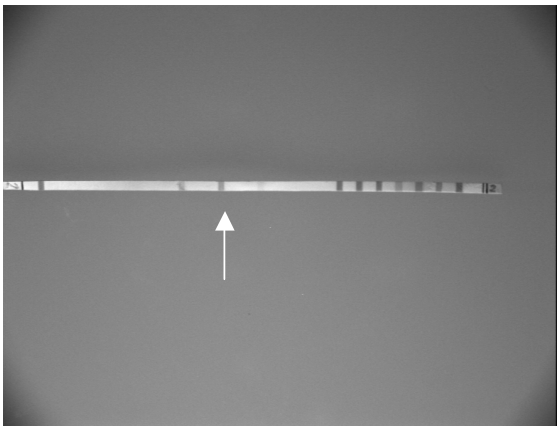
تصویر ۱: *الکتروفورز محصولات ARMS-PCR و PCR چندگانه:* ازپایین به بالا چاهک (۱) DNA Ladder ، چاهک‌های ۲ الی ٦ آمپلیکان‌های تکثیر شده با پرایمرهای طبیعی طی واکنش PCR چندگانه، در ردیف چاهک‌های ۳ و ٤ و ٥ و ٦ چهار نوار مشاهده می‌شود. نوار اول نظیر نوار ۲۱۳ bp ، نوار دوم نظیر نوارهای ۲۷۹ bp و ۲۸۰bp و ۲۸٤bp، نوار سوم نظیر نوار ۳۸۹ bp و نوار چهارم، که سنگین‌ترین قطعه است، نظیر نوار ٦۳۳ bp از DNA Ladder است که به ترتیب بیانگر جایگاه آللی نظیر frame shift ۸/۹ ، سپس ٥ - IVSI و ۱ - IVSI و بعد از آن ۱۱۰ - IVSI و در آخر ۱ -IVSII هستند. چاهک های ۷-۱۲ مربوط به PCR-ARMS همان آلل ها هستند .



تصویر ۲: انجام PCR چندگانه در مجاورت ARMS PCR با آلل های موتانت و طبیعی: نمونه شماره ۸ مطالعه کور از یک بیمار ماژور بوده است که ٥ -IVSI شناسایی می شود.

1. β strip assay kit Vinenna Lab, Labora diagnostika
2. Strepto Avidine

عدم رؤیت نوار در مورد PCR-ARMS با پرایمرهای موتانت بیانگر عدم تکثیرتوالی مورد نظر، یعنی عدم‌حضور ترادف جهش یافته مورد انتظار در نمونه است. بالعکس وجود نوار جهش در آن جایگاه را برای آن‌آلل اثبات می‌کند.



تصویر۳: *نوار آماده شده با روش لکه گذاری نقطه ای معکوس.* تصویر مربوط به یکی از نمونه‌های مورد مطالعه به صورت مطالعه کور نمایش داده شده است. نوع جهش در این نمونه ۵ - IVS1 و فرد مورد آزمایش هتروزیگوت تشخیص داده شد.

تفسیر و خواندن نوارها: جهت مشخص کردن ژنوتیپ نمونه مورد نظربر روی نوار باید الگوی نوار راهنما با الگوی مربوط به نوار هر آزمایش مقایسه و با مقابل هم قرار دادن جایگاه‌ها امکان خواندن نوارها فراهم شود. در بالا و پایین هر نوار به ترتیب ۱و ۲ خط چاپ شده تیره رنگ جهت مشخص کردن سر و ته نوار وجود دارد که می باید بر روی‌همان خطوط در الگوی راهنما قرار گیرد. اولین نوار از بالا کنترل (+) است که در تمامی نمونه‌ها باید رنگی شده باشد که حاکی از صحت انجام کار است. وجود یا عدم وجود نوار رنگی در مقابل جایگاه هر آلل به ترتیب بیانگر وجود یا عدم وجود آن نوع آلل در بیمار خواهدبود.

از آنجا که دو رشته پروب (یک رشته برای آمپلیکان‌های طبیعی و سری دیگر برای آمپلیکان‌های موتانت) برروی نوار تعبیه شده است، برای هر واکنش PCR و هر نمونه DNA مورد آزمایش، سه حالت زیربرای هر جایگاه آللی امکان‌پذیر است: ۱) فقط پروب‌های طبیعی رنگ‌زایی داشته باشند.۲) هم جایگاه پروب‌های طبیعی و هم جایگاه پروب‌های موتانت رنگ زایی داشته باشند. ۳) در محل یک یا چند آلل فقط پروب موتانت رنگ زایی داشته و جای آلل طبیعی آن خالی (بدون رنگ زایی) باشد. حالت اول نشان دهنده ژنوتیپ طبیعی (وحشی[1]) و حالت دوم نشان دهنده ژنوتیپ هتروزیگوت برای آن آلل و یا آلل‌ها (مینور) و حالت سوم نشان دهنده ژنوتیپ هموزیگوت موتانت برای آن آلل است (فرد ماژور و مبتلا)(*تصویر۳*).

در این مطالعه بیش از ۸۰ نفر از ۳۷ خانواده غیر همخون انتخاب شدند ، به این معنی که از هر خانواده ۳- ۱ نفر مبتلا یا ناقل که در مجموع ۱۵۰ کروموزم را تشکیل‌می‌دادند، مورد مطالعه قرار گرفتند. *جدول ۱* نتایج حاصل از غربالگری انجام‌شده را نشان می‌دهد. همان گونه در جدول ملاحظه می شود، ۱ -IVSII و ۱ -IVSI به ترتیب با فراوانی ۳۲٪ و ۲۲/۶٪ بیشترین‌شیوع را دارند. در کل، از بیش از ۱۰۰ نفر جهت استخراج DNA خونگیری به عمل آمد. از تعداد ۲۵ نمونه اخذ شده به علل مختلف امکان استفاده فراهم نشد و مجموعاً ۷۵ نمونه به روش های ذکر شده مورد مطالعه قرار گرفتند.

نوع جهش	تعداد کروموزوم ها	فراوانی جهش
IVS II-۱	٤٨	٪ ٣٢
IVS I-۱	٣٤	٪ ٢٢/٦٧
SHIFT FRAME-۸/۹	٢٨	٪١٨/٦٧
IVS I-۱۱۰	٢٤	٪ ١٦
CODONE-۳۰	٨	٪ ٥/٣٤
IVS I-٥	٤	٪ ٢/٦

جدول ۱: بررسی نتایج بر اساس نوع جهش ها و فراوانی آنها

بحث و نتیجه‌گیری

روش PCR چندگانه، که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، با استفاده از حدود ۰/۵-۰/۳ میلی گرم از DNA ژنوم انسانی قابل انجام است. این میزان از DNA الگو را به سادگی می توان از هر بیمار به دست آورد. استفاده از مقادیر کمتر DNA الگو احتمال جواب منفی کاذب را بیشتر می کند. مطالعه نتایج حاصل از تکثیر قطعات مورد نظر DNA استخراج شده از نمونه ها به طریق الکتروفورز محصول PCR برروی ژل آگارز و مشاهده نوارهای DNA حاصل برروی ژل به وسیله نور فرابنفش صورت می گیرد. با توجه به قدرت تمایز این روش از الکتروفورز قطعاتی از DNA که طول شان در حدود ۱۰۰ جفت باز از هم متفاوت است، قابل تمایز خواهند بود. استفاده از ژل پلی اکریل آمید و رنگ آمیزی توسط نیترات نقره قدرت تمایز را می تواند تا حدودی افزایش دهد. ولی در مطالعه حاضر تفاوت طول قطعات DNA نزدیک به هم (آمپلیکان‌های کدون ۳۰، ۱ - IVSI و ۵ – IVSI) در حدود ۱۰ جفت باز کمتر بود. به کارگیری روش فوق تفاوتی در دقت مطالعات به وجود نمی آورد. به کارگیری کنترل مثبت و منفی تفسیر نتایج کاذب راساده‌تر می‌کند. ولی دقت روش را تغییر نمی دهد.

روش لکه گذاری نقطه‌ای معکوس استفاده شده در این مطالعه اساساً تفاوت چندانی با روش PCR چند گانه ندارد، ولی دقت و تکرار پذیری روش لکه گذاری نقطه ای معکوس بیشتر است. زیرا برروی هر نوار پروب های اختصاصی آلل های طبیعی و موتانت، هر دو، وجود دارد و طبیعی یا موتانت بودن هر آلل به دو طریق اثبات می شود.

هرنوار دارای پروب کنترل مثبت داخلی است که از طریق آن می‌توان از صحت هیبریداسیون اطمینان حاصل کرد. همچنین محصولات PCR قبل از هیبرید شدن با نوار، روی ژل آگارز الکتروفورز می‌شوند و در صورت وجود نوارهای DNA مورد نظر، روند ادامه می یابد. این روند موجب می‌شود که جواب‌های منفی کاذب به حداقل ممکن برسد. در مقابل، قیمت بالای تمام شده برای هر آزمایش، مراحل متعدد و نسبتاً پیچیده کار و نیز تنوع آلل های موتانت بر حسب جمعیت و منطقه جغرافیایی مواردی هستند که استفاده از این روش را محدود می سازند(۳، ۹ و ۱۰).

اگرچه حالت هتروزیگوتی بتا- تالاسمی بیماری مینور ایجاد می‌کند، ولی تظاهرات علامتدار در تعدادی از افراد دارای ژنوتیپ β۰/β+ ملاحظه می شود که در این مطالعه نیز چنین است. به نظر می رسد که این گونه افراد برای ژن β^{+} و بتای خاموش حالت هتروزیگوت دوگانه داشته باشند. به این معنی که والدین دچار بتا-تالاسمی مینور و بتا- تالاسمی خاموش توأم با شاخص های هماتولوژیک طبیعی باشند(٤).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که الگوی پراکندگی جهش‌ها در بخش مرکزی استان آذربایجان شرقی شباهت بیشتری با توزیع انواع این جهش ها در نوار مدیترانه‌ای دریای سیاه و تفاوتی روشن با جهش‌های مربوط به آسیای جنوب شرقی، چین و سیاهپوستان دارد (۱۸-۹).

تفاوت بارزی از نظر الگوی آللی جهش ها بین نتایج حاصل از این تحقیق با برخی از گزارش ها نظیر تحقیقات انجام شده در استانهای فارس و خراسان دیده می‌شود. تفاوت عمده در الگوی آلل‌ها ست تا درصد فراوانی‌ها؛ به عنوان مثال، درتحقیق انجام شده در منطقه جنوب غرب کشور، IVSII - ۱ با فراوانی ۳۱٪ گزارش شده است که با فراوانی ۳۲٪ در این منطقه همخوانی دارد. ولی سایر جهش‌های رایج شناخته شده در آن منطقه متفاوت از جهش‌های شناخته شده در این تحقیق بودند که می تواند بیانگر این مطلب باشد که تنوع آللی جهش ها شاخص مهم تری نسبت به پراکنش فراوانی‌ها در بررسی جهش‌های بتا-تالاسمی در ایران است(۱ ، ۷ و ۸).

همچنین نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعه دیگری که برروی بیماران برخی نواحی دیگر کشور انجام شده است، مطابقت دارد. بر اساس نتایج گزارش شده از این مطالعه (۱۰)، جهش IVSII- ۱ شایع ترین جهش به خصوص در استانهای شمالی کشور شناخته شده است. جهش در IVSI- ۵ و frame shift ۸/۹ در مراتب بعدی قرار دارند.

تحقیق انجام شده در این مرکز همپوشانی خوبی را با گزارش منتشر شده درباره تعدادی از مهاجران ایرانی به آمریکا نشان می دهد. در این گزارش که درباره بیماران بتا- تالاسمی وابسته به انتقال خون با قومیت ایرانی و مهاجر در ایالات متحده انجام شده است، در تنوع جهش‌ها و فاصله بین جهش های شایع تشابه واضحی وجود دارد (۱). به نظر می‌رسد که آذربایجان در سالیان گذشته از آنجا که پل ارتباطی بین دو قاره عمده جهان و مسیر تجاری مهم از آسیای میانه به اروپا و ترکیه و عربستان بوده(۱۲-۸)، تعیین الگوی فراوانی دقیق تری از جهش های متنوع پراکنده در آذربایجان مستلزم انجام تحقیقات جامع تری است که حجم نمونه بالاتر و روشهای متنوع تری را در برگیرد. شناسایی آلل‌های شایع منطقه ای گامی بسیار ضروری در پیشگیری از بیماری بتا- تالاسمی است. در این مطالعه شایع ترین آلل های قابل شناسایی در افراد مبتلا به بیماری فوق مد نظر قرار گرفتند، لیکن بررسی فراگیرتر با استفاده از تعداد نمونه های بیشتر در جهت تکمیل نتایج و مطالعه سایر انواع جهش های مربوط به ژن بتا ـ گلوبین ضروری به نظر می رسد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه از محل اعتبارات دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به انجام رسیده است. بخشی از مواد مورد استفاده در این تحقیق از سوی «آزمایشگاه ژنتیک جهاد دانشگاهی تبریز» تأمین شده است که بدین وسیله مراتب سپاس و تقدیر خود را اعلام می داریم.

References

1. Incerm I, Cochin C. Sequence Polymorphisms of Potential Functional Relevance in the β- Globin Gene Locus. Hemoglobin, 1996; 20(92): 85-101.
2. New South Wales Health Department [Editorial]: Mothers and Babies 1998, NSW Pub Health Bullet Supplement 2000, February; 1:19-20.
3. Cheung MC, Goldberg JD, Waikany. Prenatal diagnosis of sickle cell anaemia and thalassaemia by analysis of fetal cells in maternal blood. Nature genetics, 1996; 14 : 264 – 68
4. Ballas SK, Cai Sh, Gabuzda T, Farid F. Molecular Basis of Asymptomic β- Thalassemia Major in an African- American Individual. Am. J. Med. Genet., 1997 ;69: 196 – 199.
5. Mahmoudi F, Zeinali S, Merat A,Delmaghani S, Mostafavipour K, ghaddam Z et al. The Molecular Basis of β- Thalassemia mutation in Fars province IRAN. Iran, J. Med. Sciences, 1996; 21 (384): 99 – 103.
6. Suhaib A, Mary p, Mohammad S. Molecular genetics of β- Thalassaemia in Pakistan. A basis for prenatal diagnosis. B.J. hemat., 1996; 94: 476-482.
7. Xu X, liao C, Liu Z, Huang Y, Zhang J, Li J et al. Antenatal Screening and fetal diagnosis of β – thalassemia in a Chinese population: Prevalence of the trait in the Guangzhou area of China. Hum. Genet., 1996;98: 199-202.
8. Sutcharichan P, Saki R, Fucharoen S, Winchagoon P, Erlich H et al. Reverse Dot-blot Detection of Thai β- thalassaemia mutations. B J of haematology, 1995; 95 : 809-16.

9. Sutcharichan P, Saki R, Huisman THJ, Kutler A, Mckie V, Erlich H etal. Reverse Dot Blot detection of African –American β-thalassemia mutations. Blood, 1995; 86 (4): 1580-85.
10. Najmabadi H, Karimi-Nejad R, Sahebjam S, Pourfarzad F, Teimourian S, Sahebjam F, Amirizadeh N, Karimi-Nejad MH. The beta-thalassaemia mutation spectrum in the Iranian population. Hemoglobin; 2001, 26(3):285-96.
11. Old JM, Varawalla NY, Wetherall DJ. Rapid detection and prenatal diagnosis of β-thalassaemia; studies In indian and Cyriot population in UK. Lancet 1990, 336: 834-37.
12. Growth J, lu, JM, Huang JM, Chen JT, liu HJ, Chang CP. Rapid diagnosis Of β-thalassaemia by Mutagenically Seperated Polymerase Chain Reaction (MS-PCR) and Its Application to Prenatal Diagnosis. B J of Haematology, 1995; 91 602-7.
13. Varawalla Ny, Old JM, Sakar R, Venkatesan R, Weatherall DJ. The spectrum of β- thalassemia mutations on the Indian subcontinent: the basis for prenatal diagnosis. B J of Hematology, 1991; 78: 242 – 247
14. Tadmouri GO, Bilenoglu O, Kantarci S, Kayserili H, Perrin P Basak AN. A rare mutation (IVS I-130 G→A) in a Turkish β-thalassemia major Patient. Am. J of Hematology, 2000; 63 223-225.
15. Varawalla Ny, Old JM, Weatherall DJ. Rare β-thalassaemia Mutation in Asian Indians. B J of Haematology, 1991; 79; 640-44.
16. Nozari G, Rahbar S, Golshaiyzan A, Rahmanzadeh S. Molecular Analysies of β- Thalassemia in Iran. Hemoglobin, 1995; 19 (6) : 425-430.
17. Rolan A, Gutierrez M,Cygler A, Bonduel M, Sciuccati G et al. Molecular characterization of β-thalassaemia genes in an Argentine population. Am. J. of hematology, 1997; 54:179 – 182.
18. Schu rern C, Chih-ping C. Prenatal and molecular diagnosis of beta- thalassemia major in Taiwan . Int. J. of Gyn. & Obes. (2000); 69:103-6.