ارزیابی موارد شایع هموگلوبینوپاتی در ایران از دیدگاه مولکولی

حکیم میاحی[۱]، دکتر سیده زینب پیغمبر زاده[۲]، دکتر منصور بهمنی[۳]

(تاریخ دریافت ۹/۵/۶؛ تاریخ پذیرش ۹۲/۶/۱۲)

چکیده:

زمینه و هدف: ژن عامل وراثتی و تعیین کننده یک عمل بیولوژیک، یک واحد توارث است که در یک قسمت ثابت کروموزوم واقع گردیده است. هموگلوبین (Hb)پروتئین آهن داری است که از دو جفت زنجیره پلی پپتیدی (αوβگلوبین) و چهار گروه پروستتیک هم، تشکیل شده است که هر کدام حاوی یک اتم آهن۲ ظرفیتی (ferrous) می‌باشند. دو گروه ژن αوβ به ترتیب روی کروموزوم های شماره ۱۶ و ۱۱ قرار دارند. در هموگلوبینوپاتی ها، ساختار یکی از چهار نوع زنجیره پلی پپتیدی تشکیل شده غیر طبیعی است؛ این ناهنجاری معمولا ناشی از جایگزینی یک اسید آمینه منفرد و یا اختلال در سنتز زنجیره گلوبین می‌باشد. هموگلوبینوپاتی ها جز اختلالات تک ژنی طبقه بندی می‌شوند و در این مطالعه ناهنجاری های شایع هموگلوبین از نقطه نظر مولکولی(متاسیون ها) مورد توجه قرار گرفته است.

روش کار: در ابتدای بررسی MCV و MCH تمامی بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت و در صورت مشکوک بودن افراد، آزمایش PCR انجام شد.

یافته‌ها: از ۱۴۰ مورد مشکوک، در مرکز بهداشت شهر تهران، در مجموع ۹ جهش مختلف شناسایی شد که شایع‌ترین جهش $-\alpha^{3.7}$ در ۱۰۰آلل و به دنبال آن جهش غیر حذفی $-\alpha^{-5nt}$ در ۲۵ آلل بود. در مطالعه‌ای دیگر بر روی ۱۰۴ ناقل α تالاسمی از استان خوزستان و خراسان، جهش α^{0}(MED) در ۳ ناقل از خوزستان گزارش گردید. در استان لرستان از ۶۵ بیمار تالاسمی ماژور والدین دو تن از بیماران دارای HbS بودند. بیمارستان امیرکلا از ۳۰ مورد، حذف های سیسیلی، آسیایی و هندی و هموگلوبین لپور هرکدام به ترتیب در ۶ نفر، ۶ نفر و یک نفر گزارش گردید و در ۱۷ مورد جهش ناشناخته ماند. مرکز پاتولوژی و ژنتیک کریمی نژاد- نجم آبادی از ۱۱۴ بیمار شایع‌ترین حذف تک ژنی $-\alpha^{3.7}$ و بعد از آن حذف دوتایی MED- جهش αرا گزارش نمود.

بحث و نتیجه گیری: در مرکز بهداشت شهر تهران به دلیل استفاده از روش تعیین توالی جهش های نقطه‌ای در خوشه ژنی αگلوبین فراوانی ژنی بیشتری نشان داد. در ارتباط بین شاخص‌های خونی ناقلان αتالاسمی با نوع جهش ژنی ارتباط مستقیمی بین MCV و MCH با شدت جهش(α^{+} و α^{0}) دیده شد. پیشنهاد می‌شود در زمینه ژنتیک، هتروزیگوسیتی دوگانه تالاسمی β و HbS در بیماران تالاسمی ماژور، مجددا مطالعه ای صورت گیرد. مطالعه در بیمارستان امیرکلا انواع حذف در خوشه ژنی β گلوبین در این منطقه را گزارش کرد و جهت توسعه و بهبود تشخیص مولکولی α تالاسمی مرکز پاتولوژی و ژنتیک کریمی نژاد- نجم آبادی، بررسی جهش های بدست آمده در این مرکز را مجدداً پیشنهاد می‌کند.

واژگان کلیدی: هموگلوبینوپاتی، PCR، DNAپلی مراز، ایران

---

[۱] دانش آموخته کارشناسی علوم آزمایشگاهی دامپزشکی

[۲] عضو هیأت علمی و استادیار گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر

[۳] دکتری تخصصی پاتولوژی تشریحی

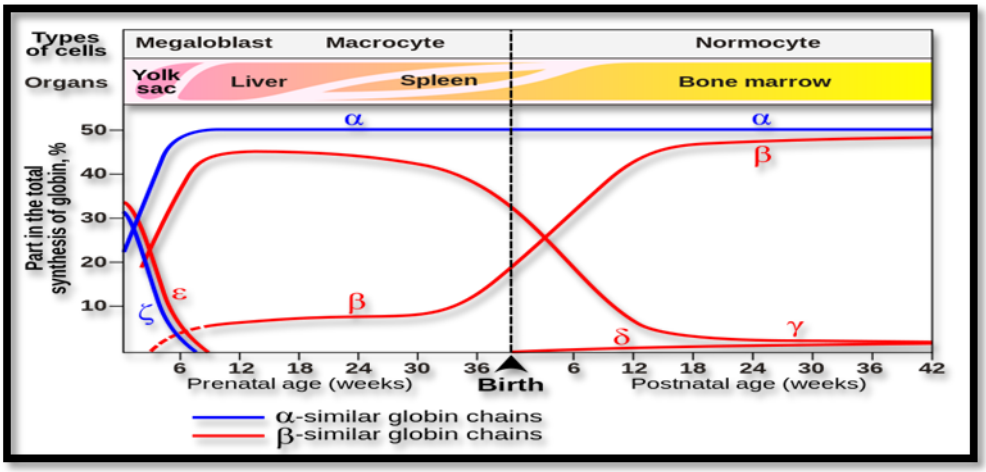
مقدمه

واژه هموگلوبین به انواع زیادی از پروتئین ها اشاره دارد که ساختار ذاتا متنوعی دارند، اما به احتمال بسیار زیاد، اصل و نسب تکاملی مشترک دارند. ژن عامل وراثتی و تعیین کننده یک عمل بیولوژیک، یک واحد توارث (DNA) که در یک قسمت ثابت کروموزوم واقع شده است (۱۱،۱). از نظر ژنتیکی، ژنهای گلوبین انسان در دو دسته قرار می‌گیرند: ژن‌های شبه α که در حدود ۳۰kb از DNA را به خود اختصاص می‌دهد و روی بازوی کوچک کروموزوم ۱۶بین باند۱۳,۲ و در انتها واقع است و ژن‌های شبه β در حدود ۵۰kb از DNA و روی قسمت انتهایی بازوی کوچک کروموزوم ۱۱ (P15) قرار دارد (۲). دسته ژن‌های α شامل دو ژن α و یک ژن ξ می‌باشند. گلوبین ξ در دوران رویانی (چند ماه اول) و گلوبین α در دوران جنینی و بعد از تولد بیان می‌گردد. دسته ژن‌های β شامل یک ژن برای هر کدام از گلوبین‌های β، ε، δ، و دو ژن گلوبینγ (یکی $A\gamma$ با آلانین در موقعیت ۱۳۶ و دیگری $G\gamma$ با گلایسین در این موقعیت). گلوبین ε در دوران رویانی، گلوبین γ در دوران جنینی و گلوبین β و δ در دوران بعد از تولد بیان می‌شود. حاصل ترکیب این زنجیرهای گلوبینی، تولید هموگلوبین‌های مختلف می‌باشد که در جدول انواع مولکول‌های هموگلوبین و در شکل تغییرات هموگلوبین بر اساس سن نشان داده شده اند (۳).

مولکول هموگلوبین از دو گروه زنجیره گلوبینی(زنجیره پلی پپتیدی) تشکیل شده است: دو زنجیره α و زنجیره β و چهار گروه پروستتیک (prosthetic group) هم که هر کدام حاوی یک اتم آهن ۲ ظرفیتی (ferrous) می‌باشند، تشکیل شده است. (۵). هموگلوبینوپاتی‌ها گروهی از اختلالات هستند که به واسطه اشکالات ارثی در هموگلوبین ایجاد می شوند.

جدول ۱. انواع مولکول های هموگلوبین

نوع هموگلوبین	فرمول	ملاحضات
هموگلوبین بالغین(Hb A)	$\alpha 2\beta 2$	هموگلوبین غالب بالغین(بیش از ۹۵٪)
هموگلوبین A2 (Hb A2)	α2δ2	هموگلوبین ناچیز بالغین(کمتر از ۳٪)، افزایش در موارد β- تالاسمی ها
هموگلوبین جنینی (Hb F)	α2γ2	هموگلوبین جنینی اصلی، افزایش در برخی β - تالاسمی ها
هموگلوبین پورتلند	ξ2γ2	هموگلوبین رویانی(تولید در طی ماه های دوم و سوم بارداری)
هموگلوبین گاور I	ξ2ε2	هموگلوبین رویانی(تولید در طی ماه های دوم و سوم بارداری)
هموگلوبین گاورΠ	α2ε2	هموگلوبین رویانی(تولید در طی ماه های دوم و سوم بارداری)



شکل ۱. تکامل ساخت گویچه‌های قرمز در جنین انسان و شیرخوار. انواع سلول‌های مسئول ساخت هموگلوبین، عضوهای دخیل و انواع زنجیره های گلوبین ساخته شده در مراحل متوالی نشان داده شده است.

اختلالات Hb انسان به سه گروه عمده تقسیم می‌شوند: ۱- واریانت های ساختاری زنجیره گلوبین نظیر بیماری سلول داسی شکل که در این نوع تغییر اثری بر سرعت سنتز پلی پپتید گلوبین ندارد ۲- اختلالات سنتز زنجیره های گلوبینی که تالاسمی‌ها می‌باشند که کاهش سنتز (یا به ندرت، بی ثباتی شدید) یکی یا بیش از یکی از زنجیره های گلوبین وجود دارد که منجربه بروز یک عدم تعادل در مقدار نسبی زنجیره های α و β می شوند ۳- بقای ارثی هموگلوبین جنین، یک گروه از وضعیت های خوش خیم بالینی هستند که به علت اینکه Switch شدن پیش از تولد را از سنتز δ گلوبین به β گلوبین مختل می‌کنند مورد توجه می‌باشند (۷،۶،۴). هموگلوبین سلول داسی (HbS) اولین هموگلوبین غیرطبیعی بود (علت ناهنجاری آن اختلال واریانت های ساختاری است) که کشف شد. بیماری سلول داسی شکل (SC) که از الگوی وراثت اتوزومی مغلوب پیروی می‌کند، کم خونی همولیتیک مزمن جدی ایجاد میکند و در اوائل کودکی تظاهر یافته و اغلب قبل از سن ۳۰ سالگی کشنده است. از نظر پاتولوژی مولکولی اختلال موجود در HbS به دلیل جایگزینی منفرد نوکلئوتیدی است. کدون اسید آمینه ششم گلوبین β را از گلوتامیک اسید به والین (GAG ← GTG :

Glu 6 Val) تغییر می کند. در مورد صفت سلول داسی شکل[1] در افراد هتروزیگوت وجود دارد و فقط زمانی ایجاد می‌شود که فشار اکسیژن خیلی پایین باشد (۶،۴،۱۲). درافراد هتروزیگوت، در حدود ۴۰٪ هموگلوبین، HbS است؛ بقیه آن از نوع HbA می باشد (صفت سلول داسی شکل) برعکس، تمامی هموگلوبین در افراد هموزیگوت به صورت HbS است، لذا این افراد دارای کم خونی سلول داسی شکل تمام عیار[2] هستند(۹).

تالاسمی ها شایعترین گروه اختلالات ارثی انسان هستند که در افراد منطقه مدیترانه، خاورمیانه، شبه قاره هند و آسیای جنوب شرقی شایع هستند و یک گروه ناهمگن از اختلالات ژنتیکی ساخت هموگلوبین هستند که با فقدان یا کاهش ساخت زنجیرهای هموگلوبین (اختلال در سنتز هموگلوبین) مشخص می‌گردند (۴). از نظر آسیب‌شناسی مولکولی β تالاسمی شامل سه گروه اصلی است: تالاسمی ماژور (که بنام آنمی کولی وآنمی مدیترانه ای نیز شناخته می شود و حالت هموزیگوت یا β^0 است)، تالاسمی اینترمدیا و تالاسمی مینور (که همچنان به عنوان β

[1] Sickle cell trait
[2] Full-blown
[3] Cloned

تالاسمی حامل، صفت β تالاسمی یا β تالاسمی هتروزیگوت (β^+) نامیده می شود). تعیین توالی ژن-های دودمان بندی شده گلوبین β که از بیماران تالاسمی بدست آمده نشانگر بیش از ۱۰۰ مورد ژنهای جهش یافته متفاوت مسبب تالاسمی β^0 یا β^+ است (۱۶،۹).

ژن β گلوبین (HBB) رمز کننده پروتئین گلوبین β می‌باشد. ژن مزبور بر روی کروموزوم ۱۱ واقع شده است (۱۷). چند جهش پروموترژن β گلوبین شناسایی شده‌اند، اما اکثر جهش‌های β تالاسمی به واسطه تولید یک mRNA یا یک پروتئین ناپایدار عمل می‌کنند تا اینکه مستقیماً رونویسی را مهار کنند (۸). در β تالاسمی ماژور در دوران کودکی بزرگی کبد و طحال و کم خونی شدید و همچنین افزایش میزن HbF و HbA ، یافت می‌شود. در β تالاسمی مینور (یعنی صفت تالاسمی) معمولاً میکروسیتوز و هیپوکرومی شدید (MCV↓وMCH↓) به همراه کم خونی خفیف یا جزئی تظاهر می‌کند. در الکتروفورز همگلوبین به شکل کلاسیک، افزایش HbA2(۳/۵ تا ۷/۵ درصد) مشاهده می‌شود، اما در بعضی انواع آن، سطح طبیعی HbA2 و یا سطح بالای HbF وجود دارد (۱۳). α- تالاسمی، احتمالاً شایع‌ترین اختلال تک ژنی در انسانهاست. اساس مولکولی تالاسمی α از تالاسمی β کاملاً متفاوت است. با این حال عکس α گلوبین، زنجیره β فقط در دوره پس از تولد مهم است. اغلب تالاسمی α به خاطر حذف شدگی مقعر[1]ژن α گلوبین بارز می‌شوند. اختلالات ژنتیکی محصول α گلوبین بر تشکیل هموگلوبین‌های جنینی و بزرگسالی اثر می-کند. و لذا موجب بروز بیماری‌های داخل رحمی و پس از تولد می‌شود. بر روی هر کروموزوم ۱۶، دو ژن α گلوبین وجود دارد که نه تنها این ژنها مشابه هم هستند بلکه توالی های اینترونی اطراف دو ژن α نیز مشابه هستند (۱۰،۹،۶).این دو ژن به وسیله دو واحد نسخه برداری بسیار همگون احاطه می‌شوند و هر ژن سه قطعه همگون دارد (α -گلوبین سه نسخه ای حاصل کراسینگ اور نامتقارن بین همولوگهای قطعات X ، Y، Z خوشه ژنی در طی میوز است). به طور کلی ممکن است دو نوع آلل سه نسخه‌ای از یک کراس اور نامتقارن حاصل شود که عبارتند از $\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$ و $\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}$. در صورتی که کراس اور بین همولوگ Z1 و Z2 رخ دهد که اصطلاحاً کراس اور راست[2] نام دارد، دو نوع آلل ایجاد می‌شود که یکی حاوی جهش تک ژنی $-\alpha^{3.7}$ و دیگری آلل معکوس سه نسخه ای $\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$ است. اما در حالتی که کراس اور بین boxهای X1 و X2 رخ دهد (کراس اور چپ)[3] ، حاصل آن آللی با جهش تک ژنی $-\alpha^{4.2}$ و آلل معکوس سه نسخه ای ای $\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}$ خواهد بود. همچنان که مطالعات پیشتر نشان داده شده است، حذف تک ژنی $-\alpha^{3.7}$ شیوع بیشتری دارد در حالی که در میان حذف های دوتایی، جهشMED– شیوع بیشتری دارد (۱۴،۱۰).از علائم اصلی ناقلان αتالاسمی کاهش شاخص‌های خونی گلبول های قرمز و بعضاً الگوی هموگلوبین شان است. این شاخص ها بصورت میکروستیوز یا پایین بودن MCV↓ و هیپوکرومیا یا پایین بودن MCH↓ بدون یا با تغییر محسوس در میزان HbF، HbA و HbA_2 می باشد (۱۵). برخی از حذفهای موجود در مجموعه β گلوبین موجب تالاسمی نمی‌شوند بلکه موجب یک فنوتیپی بنام بقای ارثی هموگلوبین جنینی[4] می گردند (یعنی باقی ماندن و ادامه تظاهر ژن δ گلوبین در تمامی طول دوران زندگی). HPFH جزء تالاسمی‌ها محسوب می‌گردد. آن اغلب نوعی تالاسمی βδ است که در آن سنتز زنجیره γ برای جبران کمبود تولید زنجیره های گلوبینی β و δ ادامه می‌یابد. شایع-ترین HPFH هتروسلولار، نوع سوئیسی است. شناسایی این حالت به خاطر همپوشانی با حالت

[1] Locus

[2] Rrightward
[3] Leftward
[4] Hereditary persistence of fetal Hb

طبیعی، مشکل است. هنگامی که این اختلال همراه با یک ژن βتالاسمی به ارث برسد، نتیجه آن بالاتر بودن HbF نسبت به مقداری است که فقط در تالاسمی β هتروزیگوت یافت می‌شود (۱۲،۶،۴). ویژگی HPFH تداوم تولید HbF به میزان زیاد در دوره پس از تولد می‌باشد (۱۳). در این مطالعه ناهنجاری‌های شایع هموگلوبین از نقطه نظر مولکولی(متاسیون ها) مورد توجه قرار گرفته است.

روش کار

در بررسی های انجام شده، در مرکز بهداشت شهر تهران، α- تالاسمی جهش های حذفی و غیر حذفی در حاملین ایرانی از دید مولکولی، مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه ۱۴۰زوج داوطلب که مشکوک به حمل نقص αگلوبین بودند (MCV↓ و MCH↓ به همراه سطح آهن و HbA2طبیعی) به شکل تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از تخلیص DNAاز خون با دستور العمل استاندارد و با روش salting outنمونه ها از نظر جهش های حذفی تک ژنی $-\alpha^{3/7}$ و $-\alpha^{4/2}$ و حذف‌های دو ژنی $--^{20/5}$ و $--^{MED}$ با روش Multiplex Gap PCR بررسی گردیدند. افراد فاقد جهش در بررسی با روش Multiplex Gap PCRابتدا با روش ARMS-PCR جهت یافتن جهش های $-\alpha^{5nt}$، $-\alpha^{cs}$، $-\alpha^{CD19}$ مورد بررسی قرار گرفتند. ژنهای α_1وα_2 در سایر نمونه هایی که با این روش ها، جهش موجود در آنها مشخص نشد، برای بررسی از نظر سایر جهش های نقطه ای، تعیین توالی شدند. برای این کار محصول PCR به شرکت Prim در کره جنوبی فرستاده شد و نتایج آنها به وسیله نرم افزار DNA سیس مکس تجزیه و تحلیل گردید (۱۸). همچنین در بررسی دیگر روی ۱۰۴ ناقل α تالاسمی به منظور بررسی ارتباط بین شاخص‌های خونی ناقلان α تالاسمی با نوع جهش‌های ژنی، انجام شد. این تحقیق بر روی ۷۱ نفر از استان خراسان و ۳۳ نفر از استان خوزستان انجام گردید. پس از تایید میزان کم MCV و MCH و HbF طبیعی تا کمی افزایش یافته مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از استخراج DNA به روش استاندارد از ۵CC خون EDTA دار از افراد، نمونه های DNA توسط روش Multiplex Gap PCR جهت دست یافتن به جهش‌های حذفی شایع در ایران تکثیر یافت. جهش-های نقطه ای، پس از PCR و تخلیص، توسط روش تعیین سکانس مشخص شدند (۱۵) و در استان لرستان در بررسی به عمل آمده از ۶۵ بیمار تالاسمی ماژور، که به بیمارستان شهید مدنی خرم آباد مراجعه نموده بودند، هتروزیگوسیتی دوگانه تالاسمی β تالاسمی و هموگلوبین S در بیماران تالاسمی ماژور این استان مورد مطالعه قرار گرفت. پس از الکتروفورز هموگلوبین به روش استات سلولز، مقادیر هموگلوبین‌های (هموگلوبینوپاتی) مختلف بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین روش‌های شیمیایی و کروماتوگرافی ستونی جهت تأیید درصد انواع هموگلوبین ها انجام شد. در مواردی که والدین دارای هموگلوبینوپاتی بودند، جهت تأیید حضور توام ژن β تالاسمی با هموگلوبینوپاتی‌های مربوطه، نمونه های بیماران به وسیله روش PCR، جهش‌های ژن βتالاسمی مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که ۱۰میلی لیتر خون حاوی EDTA از بیماران تهیه شده و DNA نمونه ها توسط روش پروتئین کیناز K تخلیص شده و پس از تکثیر DNA بیماران به منظور وجود یا عدم وجود جهش، مورد مطالعه قرار گرفت (۱۹). در مطالعه دیگر در شمال کشور، که هدف بررسی حذف های خوشه ژنی β گلوبین در افراد کم خون بود، بر روی ۳۰ بیمار مشکوک که به آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان امیرکلا مراجعه نموده بودند، صورت گرفت. اندکس‌های هماتولوژیک انجام گردید (MCV< 80 fl، MCH< 27 pg، HbA_2 متغیر و HbF نرمال و یا افزایش یافته). ۵CC خون حاوی EDTA به منظور استخراج DNA به روش Alkalin lysis مورد

استفاده قرار گرفت. بررسی مولکولی با استفاده از روش Gap-PCR که برای مشخص کردن حذف‌های شناخته شده می باشد، انجام گردید. در این روش برای هر جهش دو آغازگر اولیگونوکلئوتیدی که دو طرف ناحیه حذف شده را در بر می‌گیرند، مورد استفاده قرار گرفت. در صورت وجود حذف، دو آغازگر به هم نزدیک شده و تکثیر DNA صورت می‌گیرد و اگر حذفی صورت نگرفته باشد دو آغازگر به علت فاصله زیاد قادر به تکثیر DNA نمی‌باشند و محصولی تولید نمی‌شود. طول قطعات تکثیر شده مورد انتظار برای هر حذف بر اساس موقعیت آغازگرهای به کار گرفته شده، مشخص است. برای مشاهده محصولات از ژل آگارز ۱٪ در حضور سایز مارکر ۲۵۰ جفت بازی استفاده شد(۲۰). همچنین طی بررسی بر روی ۱۱۴ بیمار از استان خوزستان از میان افراد مراجعه کننده به مرکز پاتولوژی و ژنتیک کریمی نژاد- نجم آبادی، میان سال های ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۵، انتخاب شدند. در این بررسی توزیع فراوانی جهش های αتالاسمی در استان خوزستان مورد مطالعه قرار گرفت. جهت تشخیص نوع بیماری تالاسمی و رد کردن احتمال فقر آهن، اندکس های هماتولوژی انجام شد. در موارد مشکوک، بیماران جهت بررسی زنجیره‌های βوα تالاسمی به انستیتو پاستور ایران ارجاع داده شدند. پس از انجام مشاوره ژنتیک، ۱۰ ml خون EDTA از هر بیمار گرفته شد و DNA ژنومی براساس پروتکل های استاندارد استخراج شد. روش PCR جهت تکثیر نمونه‌ها برای دو جهش تکی شایع($\alpha^{3.7}$ - و$\alpha^{4.2}$-) و یک حذف دوتایی شایع (MED--) استفاده شد. در مواردی که هیچ جهشی یافت نشد، بررسی بیشتر با PCR Multiplex و هیبریدیزاسیون معکوس با استفاده از بررسی نوار α- گلوبین که شامل حذف های دوتایی ژن های -20.5kb , anti-3.7gene --FIL triplication , --THAT, SEA و دو جهش نقطه ای در ژن α-۱و ۱۱ جهش ژن α-۲ بود، انجام شد. در افرادی که با هیچ یک از دو روش بالا، جهش αتالاسمی مشخص نشد، بررسی بیشتر توسط تعیین ژن های α-1 و α-2، در بیمارستان زنان و کودکان سنگاپور[1] در سال های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶ انجام شد(۱۴).

یافته ها

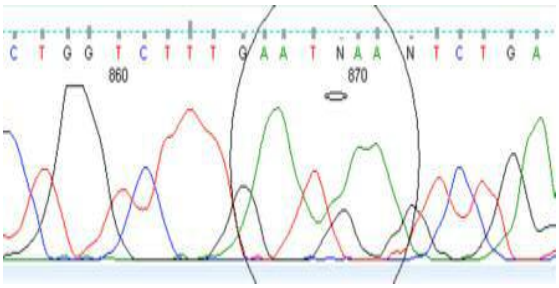
از ۱۴۰ نمونه مشکوک، در مرکز بهداشت شهر تهران بررسی ۴جهش حذفی شایع در خوشه ژن α گلوبین به روش Multiplex Gap PCR، وجود حداقل یک حذف را در ۹۹ نفر(۷۰/۷۱٪) از افراد نشان داد. در بررسی جهش‌های غیر حذفی با روش ARMS-PCR، یک جهش نقطه ای در ۱۹نفر(۴۶/۳۴٪) از نمونه‌های فاقد جهش دیده شد. بررسی بقیه نمونه‌ها به روش تعیین توالی، وجود جهش نقطه‌ای در ۸ نفر را نشان داد. در ۱۳ نفر از افراد واجد یک جهش حذفی که جهش یافته شده به تنهایی توجیه گر اندکس‌های هماتولوژی آنها نبود، در بررسی بیشتر، وجود یک جهش نقطه ای نیز در آنها مشاهده شد. در مجموع ۹جهش مختلف در این افراد تعیین شد. شایع ترین جهش، $-\alpha^{3.7}$ در ۱۰۰ آلل(۳۵/۷۱٪) در مجموع ۲۸۰ کروموزوم مورد بررسی و به دنبال آن جهش غیر حذفی $-\alpha^{5nt}$ در ۲۵ آلل(۸/۹۳٪) بود (جدول۲). در مورد نمونه‌هایی که با روش Multiplex Gap PCR و ARMS-PCR، تعیین ژنوتیپ نشدند، با روش تعیین توالی هر دو حالت هتروزیگوت و هموزیگوت جهش در سیگنال پلی A به صورت AATAAA>AATGAA تعیین شد (شکل۲).

[1] KK Women's and Children

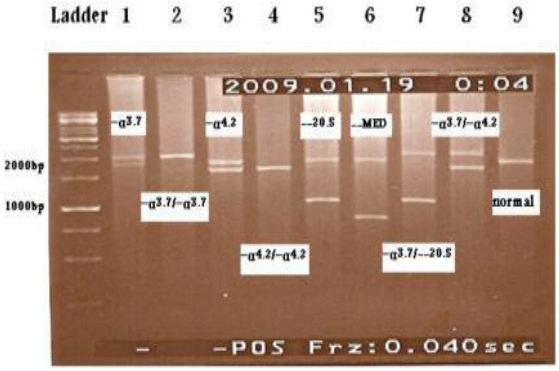
جدول۲. فرکانس آللی جهش های یافته شده در مجموعه ژنی α

ژنوتیپ	تعداد	درصد
$-\alpha^{3.7}$	۱۰۰	۳۵/۷۱
$\alpha\alpha^{-5nt}$	۲۵	۸/۹۳
$--^{MED}$	۱۴	۵/۰۰
$--^{20.5}$	۱۰	۳/۵۷
$\alpha^{PA2(44>G)}\alpha$	۸	۲/۸۶
$-\alpha^{4.2}$	۷	۲/۵۰
$\alpha\alpha^{CS}$	۶	۲/۱۴
$\alpha^{cd19}\alpha$	۳	۱/۰۷
آلل طبیعی	۲۸ +۷۹	۱۰+۲۸/۲۱
جمع	۲۸۰	۱۰۰

در شکل نتایج حاصل از یک *Multiplex Gap PCR* با تعداد چهار جهش حذفی شایع در حالت‌های هتروزیگوت، هموزیگوت و هتروزیگوت مرکب(نه حالت مختلف) نمایش داده شده است (۱۸)(شکل۳).



شکل۲. جهش در سیگنال پلی A به صورت AATAAA→ AATGAA : جهش آدنین به گوانین به صورت هتروزیگوت در نوکلئوتید ۸۶۹ مشاهده می گردد.



شکل۳: الکتروفورز محصولات Multiplex Gap PCR بر روی ژل ۱٪ با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید. باند نرمال برای ژن α با سایز ۱۸۰۰ جفت باز، باند حذف تک‌ژنی $-\alpha^{3.7}$ با سایز ۲۰۲۲ جفت باز، باند حذف تک ژنی $-\alpha^{4.2}$ با سایز ۱۶۲۸ جفت باز، و باند حذف ۲ژنی $--^{MED}$ با سایز ۸۰۷ جفت باز دیده می‌شود. لازم به ذکر است، از آن جایی که کنترل داخلی در این آزمایش از منطقه ژن α_2 انتخاب گردیده است، بدیهی است که در ستون‌هایی که حاوی دو جهش حذفی هستند دیده نمی‌شود.

در مطالعه ای که بر روی ۱۰۴ ناقل αتالاسمی از استان خوزستان و خراسان انجام گرفت، تنها جهش α^0 بدست آمده (MED)، در ۳ ناقل از استان خوزستان مشاهده شد و فراوانی آن در جمعیت مورد مطالعه ۲/۹٪ گزارش گردید. ناقلان این جهش از متوسط MCV معادل ۶۳/۹۰ برخوردار بودند. این در حالی بود که ناقلان α تالاسمی با سایر هشت جهش یافته شده α^+ (در مجموع ده ژنوتیپ)، دارای متوسط MCV بالاتری نسبت به گروه قبلی بودند (۶۸/۴<MCV<۷۷/۲). ارزش متوسط MCV برای جهش α^0 و سایر جهش های α^+ با فراوانی بیش از ۳ نفر در جدول آمده است (جدول۳). آیا این فرضیه که جهش α^0 می‌تواند در مقابل α^+ به منظور پیشگویی میزان ارزش MCV مورد استفاده قرار بگیرد از نظر آماری قابل تایید است؟ جواب بصورت مشروط و در رابطه با ارزش متوسط MCV مثبت است. ناقلان α تالاسمی با جهش α^0 نسبت به α^+ از متوسط MCV پایین تری برخوردار بودند. اما در صورتی که فقط به حداقل و حداکثر MCV افرادی که دارای جهش‌های متفاوت α^+ بودند اکتفا بشود این فرضیه از نظر آماری دارای اهمیت معنی‌دار نمی‌باشند و نهایتا رد می‌شود. ارزش متوسط MCH برای جهش α^0 (MED) معادل ۲۱/۲۶ و ۱/۰۷= SD می‌باشد این در حالی است که ارزش متوسط MCH برای سایر جهش‌های α^+ که شامل بیش از ۳ نفر بودند، همگی بالاتر از این مقدار بود (جدول۳). در راستای فرضیه قبلی، این فرضیه که آیا جهش α^0 می‌تواند در مقایسه با α^+ به پیشگویی ارزش MCH بپردازد؟ مجددا پاسخ بصورت مشروط و در رابطه با ارزش متوسط MCH مثبت است. ناقلان αتالاسمی با جهش α^0 نسبت به α^+ از متوسط MCH پایین‌تری برخوردار بودند. این در حالی است که اگر تنها به حداقل و حداکثر MCV افرادی که دارای جهش های متفاوت α^+ بودند اکتفا بشود، این فرضیه از نظر آماری دارای اهمیت معنی‌داری نمی‌باشد و مانند نظریه بالا رد می‌شود. با دو مقایسه قبلی، شاخص متوسط MCH نسبت به MCV، جهت افتراق نوع جهش α^0 از α^+ از حساسیت کمتری برخوردار است (۱۵). در مطالعه ای که در استان لرستان در رابطه با هتروزیگوسیتی دوگانه تالاسمی β و هموگلوبین S در بیماران تالاسمی ماژور انجام شد، نتایج زیر حاصل شد:

از والدین بیماران تالاسمی ماژور نتایج یر بدست آمد: در ۹۵٪ موارد شمارش گلبول‌های قرمز بیماران بیش از $5/5 \times 10^{22}$ در لیتر[1]، در ۹۰٪ موارد حجم متوسط گلبول های قرمز کمتر از ۷۰ فمتولیتر[2] و در ۹۸٪ موارد میزان هموگلوبین A_2 بیشتر از ۳/۵٪ بود[3]. از آنجایی که بیماران مورد مطالعه، همگی فرزندان تالاسمی ماژور داشتند، مسلما ژن جهش یافته β را دارا بودند. بنابراین مقادیر RBC، MCV و HbA_2 آنان از اهمیت تشخیص بالایی در این تحقیق برخوردار نبود. آنچه که در درجه اول در این بررسی اهمیت داشت، وجود هموگلوبین‌های غیر طبیعی (هموگلوبینوپاتی) در والدین بیماران بود. در والدین دو تن از بیماران تالاسمی ماژور نتایج زیر حاصل شد:

[1] RBC >5.5 × / liter
[2] MCV < 70 femtoliter
[3] Hb >3.5%

جدول۴. مقایسه نتایج بدست آمده از والدین دو بیمار مورد مطالعه

	پدر	مادر	
RBC ($\times 10^{12}$/Liter)	۵/۵۲	۴/۹۵	
MCV(femtolitre)	۷۸/۹	۸۳	
$Hb A_2$ %	۷/۵	۳/۵	Patient 1
HbS %	۴۲	۳۲/۵	
$Hb A_1$%	۶۳/۵	۵۴	
RBC($\times 10^{12}$/Litre)	۵/۵۰	۴/۹۰	
MCV(femtolitre	۷۸/۴	۸۰	
$Hb A_2$%	۷/۲	۳/۵	Patien 2
HbS%	۴۰	۳۱/۹	
$Hb A_1$%	۶۵/۵	۵۶	

جدول۳. متوسط ارزش MCV/MCH در مقابل شدت و نوع جهش های α^+ و α^0 (p<۰/۰۰۱)

ارزش متوسط	MED	Cd14(G> A)	3.7/4.2	4.2	3.7/3.7	3.7
	(α^0)	(α^+)	(α^+)	(α^+)	(α^+)	
MCV	۲/۸۸±۶۳/۹۰	۶/۱۱±۷۳/۹۵	۳/۶۳±۷۰/۶۶	۲/۸۸±۷۱/۲۰	۴/۵±۷۴/۲۹	۴/۴۹±۷۵/۹۰
MCH	۰/۰۵±۲۱/۲۶	۲/۸۹±۲۴/۵۲	۰/۵۵±۲۲/۹۶	۰/۷۵±۲۳/۴۶	۰/۷۵±۲۴/۷۸	۰/۵۹±۲۴/۹۵

(اطلاعات مربوط به سایر جهش های با تعداد کمتر از ۳۰ ناقل حذف شده است)

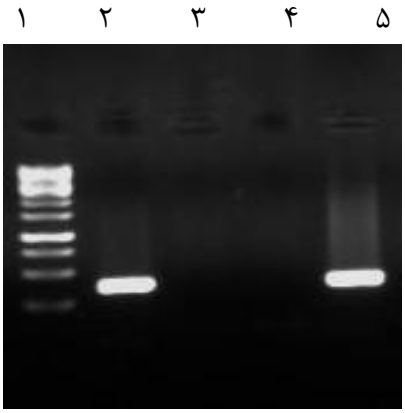
با توجه به نتایج جدول شماره ۴ ملاحضه می‌گردد که والدین دو تن از بیماران دارای هموگلوبین S می‌باشند. وجود هموگلوبین A_1 نشان دهنده این است که بیماران از نظر ژن S هتروزیگوت می‌باشند. از دو بیمار تالاسمی ماژوری که والدین آنان دارای هموگلوبین S بود، جهت بررسی وجود جهش ژن β آزمایش PCR صورت گرفت؛ اما جهش شناخته‌ای در هر دو کروموزوم آنان وجود نداشت و ژنوتیپ بیماران به صورت ناشناخته/ناشناخته[1] به دست آمده است (۱۹). در بیمارستان امیر کلاً ۳۰ بیمار کم خون مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از تکثیر DNA به روش

[1] Unknown/Unknown

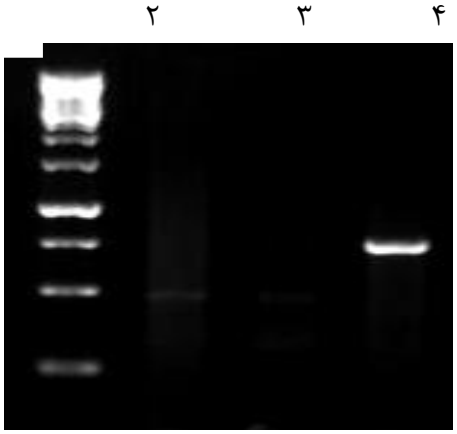
Gap-PCR در بیماران دارای βδ تالاسمی سیسیلی، βδ تالاسمی هندی- آسیایی و هموگلوبین لپور به ترتیب یک قطعه به طول ۱۱۵۰، ۳۷۱ و ۷۷۷ جفت باز مشاهده گردید. این آزمایشات نشان داد که ۶ بیمار ناقل βδ تالاسمی سیسیلی، ۶ بیمار ناقل βδ تالاسمی هندی- آسیایی و یک بیمار ناقل هموگلوبین لپور بودند و در ۱۷ مورد هیچ یک از انواع جهش‌های بررسی شده، وجود نداشت. نتایج تکثیر DNA در بیماران βδتالاسمی آسیایی- هندی، هموگلوبین لپور و βδ تالاسمی سیسیلی متفاوت بود (۲۰) (شکل۴). در نگاهی دیگر نتایج حاصل از بررسی‌های به عمل آمده در مرکز پاتولوژی و ژنتیک کریمی نژاد- نجم آبادی[۱] به قرار زیر است:

از بین ۱۱۴ بیمار بررسی شده، در ۹۶ نفر (۸۴/۲٪) جهش بیمار تشخیص داده شد و در ۱۸ نفر (۱۵/۸٪) هیچ گونه جهش α تالاسمی یافت نشد. در بین افرادی که جهش α گلوبین برای آنان تعیین شد، ۷۶ نفر(۷۹/۲٪) حامل جهش به صورت سیس و ۱۳ نفر (۱۳/۵٪) حامل جهش به صورت ترانس و ۷ نفر (۷/۳٪) نیز حامل دو جهش به صورت سیس بودند. به عبارت دیگر، ۷۰ نفر (۷۲/۹٪) ناقل خاموش، ۱۹ نفر(۱۹/۸٪) دچار صفت α تالاسمی و ۷ نفر (۷/۳٪) مبتلا به α تالاسمی ماژور بودند. شایع‌ترین جهش، $-\alpha^{3.7}$- با فراوانی ۵۵/۲٪ در میان تمام آلل‌های جهش یافته در این بررسی بود. جهش دوتایی --MED دومین جهش شایع بود که در ۱۴/۴٪ از آلل های جهش یافته شناسایی شد که دارای یک حذف در هر دو ژن α گلوبین است. بعد از این دو جهش، جهش-های $\alpha^{PA2(GAA)}$ و $-\alpha^{4.2}$- (حذف 4.2 کیلوبازی ژن α_2)، α^{cd19} و α^{-5nt} از سایر جهش‌ها فراوان‌تر بودند و به ترتیب ۷/۲٪، ۶/۴٪، ۴/۰٪ (هر یک از α^{cd19} و α^{-5nt}) آلل‌های جهش یافته را تشکیل می‌دادند. هفت جهش دیگر، هر کدام با فراوانی نسبی کمتر از ۲/۵٪ کل آلل‌های جهش یافته، نیز شناسایی شد. در ۲۱ مورد برای یافتن جهش الزاماً از روش توالی یابی استفاده شد و حدودا ۱۵/۸٪ از بیماران هیچ جهشی یافت نشد. از میان جهش‌های نادر α تالاسمی، جهش $\alpha^{cd21(CCT)}$ در یک بیمار تعیین شد(۱۴).

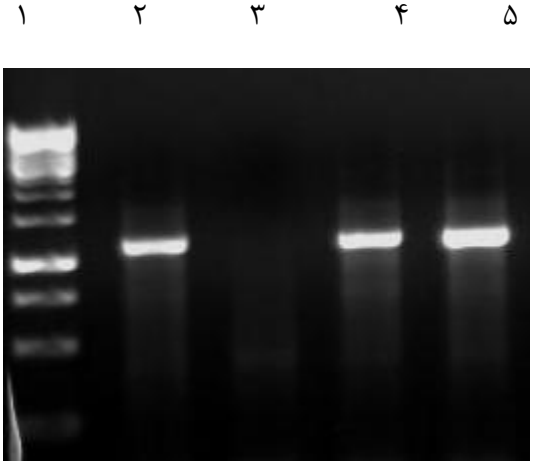
[۱] خدامرادزندیان، جمال ناطقی، بیژن کیخاهی و همکاران



شکل۴. نتیجه PCR تالاسمی βεتالاسمی آسیایی-هندی. ستون ۱ نشانگر طول قطعات (250 bp DNA Ladder) ، ستون ۲و۵ محصول تکثیر DNA مربوط به فرد ناقل βεتالاسمی آسیایی- هندی را نشان می دهد. ستون ۳و۴ مربوط به فرد فاقد این نوع جهش می‌باشد.



شکل۵. نتیجه PCR برای هموگلوبین لپور. ستون ۱ نشانگر طول قطعات (250 bp DNA Ladder) و ستون ۴ محصول تکثیر DNA مربوط به فرد ناقل هموگلوبین لپور را نشان می دهد. ستون های ۲و۳ مربوط به فرد ناقل این نوع جهش می باشند.



شکل۶. نتیجه PCR مربوط به βδتالاسمی سیسیلی. ستون ۱ نشاگر طول قطعات (250 bp DNA Ladder)، ستون های ۲و۴و۵ محصول تکثیر DNA مربوط به فرد نافل βδتالاسمی سیسیلی را نشان می دهد. ستون ۳ مربوط به فرد ناقل این نوع جهش می باشد.

بحث

جهش‌های متعددی موجب بروز تالاسمی می شوند که تعداد بسیاری از آنها شرح داده شد. با وجودی که بیش از پنجاه سال از تحقیقات در سطح جهانی برای سندرم تالاسمی می‌گذرد و با وجود پیشرفت غیر قابل انکاری که در شناخت مکانیسم اثر جهش‌های ژنی در بروز علائم بالینی حاصل شده است، هنوز تالاسمی یکی از مشکلات گسترده بهداشت جهانی به شمار می‌رود. در فردی که ناقل α تالاسمی خفیف و شدید می باشد، معمولاً RBC بیش از حد طبیعی و Hb طبیعی یا مرزی (آقایان ≤۱۴/۵ و خانم ها ≤۱۲/۵)، MCV کمتر از ۸۰ و MCH کمتر از ۲۷ است. آزمایش تعیین توالی برای ژنهای α، می‌تواند وجود متاسیون‌های نقطه ای و حذف‌های کوچک را در نمونه های فاقد جهش‌های حذفی بزرگ و یا در نمونه‌های واجد یک حذف کوچک یا یک آلل غیر حذفی همراه با اندکس‌های هماتولوژیک بسیار پایین‌تر از حد مورد انتظار، مشخص کند. اکثر منابع از وجود چند جهش مهم در ژنα_2 (که سه برابر بیش از α_1 محصول دارد) نام برده‌اند که در برخی از تحقیقات محققان ایرانی داخل کشور نیز گزارش شده است. در این مطالعه جهش $-\alpha^{3.7}$ در ۱۰۰(۳۵/۷۱٪) آلل از آلل‌های برسی شده، تشخیص داده شد. فراوانی جهش $-\alpha^{3/7}$ در مطالعه‌های سایر محققین کشور به میزان ۳۲/۸٪، ۴۲/۵٪، ۴۴/۹٪ در بین افراد واجد جهش گزارش شده است.

جهش در سیگنال پلی A به صورت AATAAA> AATAAG، از جهش هایی است که به ارث بردن فرم هموزیگوت آن، ایجاد فنوتیپ بیماری H می‌کند که شدید تر از فرم حذفی این بیماری است. یاوریان جهش در کدون ۱۹ ژن α_2 را برای اولین بار در سال ۲۰۰۳ گزارش کرد که در جمعیت هموژن استان هرمزگان، ۱۲/۲٪ از آلل‌های معیوب مرتبط با αتالاسمی را تشکیل می‌داد. در حالی که در مطالعه‌ای که زربخش و همکاران انجام داده‌اند فراوانی این جهش بسیار کمتر می‌باشد. این تفاوت می‌تواند احتمالاً ناشی از شیوع بالاتر جهش CD19 در منطقه جنوب کشور باشد. در این مطالعه(زربخش و همکاران)، جهش فوق در دو فرد از شمال ایران(گیلان) و یک فرد از منطقه مرکزی کشور تشخیص داده شد. فراوانی آلل جهش cd142 (TAA>CAA)یا هموگلوبین Constant Spring در مطالعه حاضر ۲/۱۴٪ بود. گرشاسبی فراوانی این جهش غیر حذفی را در جمعیت مورد مطالعه خود ۲/۲٪ اعلام کرده بود. این فراوانی در مطالعه هادوی ۱۰/۶٪ و تمدنی ۳/۳٪ گزارش گردید. حذف ۵ نوکلئوتید از ابتدای اینترون ۱ ژن α_2 (IVS1;5-bp del) از جهش‌های مهم دیگر این ژن است که در ایران گزارش شده است. داشت اطلاعات اولیه از ریشه نژادی یک فرد ناقل، می‌تواند به پیشگویی حضور جهش‌های احتمالی در فرد، کمک فراوان نماید (استراتژی غربالگری اولیه ناقلین). اما در کشورهایی که از تنوع نژادی برخوردارند، این حربه خیلی نمی‌تواند کارآمد باشد. بیماران مبتلا به HbH متأثر از جهش های غیر حذفی ($\alpha^{T}\alpha$/--) در مقایسه با فرم حذفی آن (α-/--) دارای عوارض شدیدتر بوده و بیشتر به تزریق خون وابسته می‌شوند. لذا مشخص کردن وضعیت نقص در ژن های αگلوبین جهت تعیین ناقل بودن فرد از نظر α یا β تالاسمی و نیاز به تشخیص پیش از تولد حایز اهمیت است (۱۸). در زمینه ارتباط بین شاخص‌های خونی ناقلان α تالاسمی با نوع جهش‌های ژنی، ابراهیم زاده وصال و همکاران، همانند مطالعه Rund و همکارانش در سال ۱۹۹۲ (در رابطه با جهش‌های β و β^0 و ارتباط آنها با کاهش MCV)، مطالعه‌ای انجام دادند، آنها نیز به هتروژن بودن جهش‌های α^+ برخورد نموده اند و تا حدودی توانستند اثبات کنند که این طیف پراکنده از جهش‌های α^+، با قدرت تفکیک پذیری قابل قبولی از نظر آماری در رابطه مستقیم با میزان متوسط MCV و MCH می‌باشد ($p<۰/۰۰۱$). در مجموع یک نقطه قطعی بین میزان ارزش‌های MCV و MCH و جهش‌های α^+ و α^0 که بیش از

دو نفر از ناقلان را درگیر کرده بود بدست آمد. جای تعجب نمی‌باشد چرا که هر فرد ناقل αتالاسمی می‌تواند دارای یک تا دو جهش باشد. در این صورت دارای اندکس خونی با مشخصات α تالاسمی معرفی می‌گردد، در حالی که از نظر ژنتیکی می‌تواند یکی از دو حالت خاموش ($\alpha/\alpha\alpha$) یا مینور ($\alpha\alpha$/--و-α/-α) را دارا باشد. ارزش تفکیکی متوسط MCH تا حدودی نسبت به ارزش متوسط MCV در رابطه با تشخیص نوع موتاسیون α^{+} و α^{0} کمک کننده به نظر می‌آید. اما وقتی که α^{+} های مختلف با هم و به صورت دو به دو مقایسه می‌شوند MCH دارای ارزش افتراقی کمتری می‌شود ($p>۰/۰۰۱$)(۱۵). در ارتباط با هتروزیگوسیتی دوگانه که اصغرکیانی و همکاران مطالعه ای انجام داده بودند؛ مشخص شد که والدین دو تن از بیماران تالاسمی ماژور استان لرستان، دارای هموگلوبین S می‌باشند. مطالعات مشابه از جمله در ترکیه شیوع نسبتاً بالای هتروزیگوسیتی دوگانه تالاسمی β و هموگلوبین S را نشان می‌دهند. با توجه به نتایج بدست آمده که هر دو والد دارای هموگلوبین A1 نیز بودند، بنابراین واضح بود که والدین از نظر ژن S در حالت هتروزیگوت قرار داشته و فقط یکی از کروموزوم‌های آنان حاوی ژن S می‌باشد. با توجه به این مسئله دو احتمال وجود دارد: اول اینکه والدین ممکن است فقط دارای ژن S بوده و فاقد ژن جهش یافته β تالاسمی باشند که در این صورت فرزندان آنان فقط مبتلا به بیماری هموگلوبین S بوده و اشتباهاً تالاسمی ماژور تشخیص داده شده بودند. احتمال دوم اینکه والدین، هر دو ژن S و ژن β تالاسمی را دارا بودند که در این صورت ممکن است برای فرزندان آنان دو حالت بوجود آید. حال سوال اینجاست که آیا این بیماران دارای ژن β سالم هستند یا اینکه ژن β آنها دارای جهش تالاسمی است(بیماران هتروزیگوت S هستند یا هتروزیگوت βتالاسمی سلول داسی شکل هستند؟). به منظور پاسخ به این سوال بیماران از نظر وجود جهش ژن β مورد آزمایش PCR قرار گرفتند اما جهش شناخته شده‌ای در هردو کروموزوم حاصل نشد و باز هم دو احتمال وجود دارد: ۱- ژن β تالاسمی وجود دارد اما توالی آن ناشناخته است ۲- ژن βتالاسمی اصلا وجود ندارد و بیماران مبتلا به تالاسمی نمی‌باشند. پاسخ این سوال را تا حدود زیادی می‌توان از روی شدت کم خونی و علائم بالینی مشخص نمود (۱۹). در ارتباط با تشخیص مولکولی افراد کم خون دارای حذف خوشه ژنی β گلوبین احمدی فرد و همکاران مطالعه-ای انجام دادند. براساس این مطالعه که در بیمارستان کودکان امیر کلاً انجام شد، جهش βδ تالاسمی در ۱۳ مورد شناسایی گردید. ۶ مورد(۲۰٪) βδتالاسمی سیسیلی و ۶ مورد(۲۰٪) حذف- وارونگی هندی- آسیایی از شایع ترین جهش‌ها بودند و هموگلوبین لپور تنها در یک مورد(۳/۳٪) مشاهده شد. در یک مطالعه دیگر در ایران که توسط Babashah و همکاران بر روی ۲۶ بیمار از کل استانهای ایران صورت گرفت به ترتیب شایع‌ترین جهش‌ها، هموگلوبین لپور، βδ تالاسمی سیسیلی، βδ تالاسمی هندی- آسیایی و βδ تالاسمی ترکی گزارش شد. اما در این مطالعه هموگلوبین لپور کمترین فراوانی را داشت، این تفاوت مشاهده شده در توزیع جهش‌ها بار دیگر تأکیدی بر لازمه تعیین طیف و فراوانی جهش‌های هر منطقه می‌باشد (۲۰). همچنین به منظور بررسی شیوع انواع جهش‌های α تالاسمی در استان خوزستان خدامراد زندیان، جمال ناطقی، بیژن کیخاهی و همکاران مطالعه‌ای انجام دادند. بر طبق این مطالعه شایع‌ترین جهش $-\alpha^{3.7}$ در αتالاسمی جمعیت خوزستانی و بعد از آن، MED-- شایع‌ترین حذف دوتایی بود. آلل شایع دیگری که در ۵ آلل بررسی شده یافت شد، کدون۱۹:α^{cd19} است[۱]. Hb Adana که بر اثر جهش کدون ۵۹ ژن αگلوبین (G>A) ایجاد می‌شود، در یک مورد یافت شد

[۱] این جهش که در آن حذف G باعث تغییر در ناحیه C- ترمینال می شود، اولین بار در سال ۲۰۰۳ توسط یاوریان در استان هرمزگان یافت شد.

همچنین در این بررسی تعداد و انواع زیادی از جهش‌های غیر حذفی مشاهده شد(۱۴).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج و بحث‌های به عمل آمده می‌توان اذعان داشت که مشکلات ناشی از هتروژن بودن جمعیت ایرانی همراه با جهش‌های نادر و یا نامشخص که در ژن αگلوبین قرار دارد امکان تعیین جهش و تشخیص پیش از تولد را برای متخصصان ژنتیک مبتلا به تالاسمی ماژور یکی از اولویت‌های بهداشتی در ایران است. مطالعات نشان می‌دهد که جمعیت ایران از نظر پراکندگی جهش‌ها بسیار همگون می-باشد و طیف جهش‌ها در هر منطقه متفاوت است. لذا شناسایی طیف جهش‌های شایع در هر منطقه موجب سهولت و سرعت بخشیدن شناسایی افراد ناقل در آزمایشات مولکولی و تشخیص پیش از تولد می شود (۲۰). تحقیق حاضر انتخاب MCV و MCH را بر سایر شاخص‌های خونی کاهش یافته در ناقلان α تالاسمی، در جهت انتخاب نوع جهش پیشنهاد می-کند (۱۵). همچنین از آنجا که اکثر افراد مبتلا به βδ تالاسمی و پایداری ارثی هموگلوبین جنینی(HPFH) و سایر حذف‌های ژن β گلوبین، دارای هموگلوبین جنینی (HbF) افزایش یافته هستند، مشکل می‌کند (۱۵). همچنین تعدادی از بیماران تالاسمی ماژور کشور ممکن است علاوه بر تالاسمی دارای ناهنجاری‌های مختلف دیگری نیز در ژنهای سازنده گلوبین خود باشند (۱۹). با توجه به خطر ۲۵ درصدی تولد فرزند تالاسمی ماژور در هر بارداری برای زوجین ناقل این بیماری، توصیه می‌شود که در آزمایشات غربالگری قبل از ازدواج علاوه بر سایر تست‌های هماتولوژیک میزان هموگلوبین جنینی(HbF) نیز بررسی شود (۲۰). با افزودن روش تعیین توالی مستقیم برای بررسی جهش‌های منطقه ای و نیز با استفاده از روش‌های بررسی کمی دوزاژ ژن، تعداد نسخه ژنی یا gene dosage study، شامل Real time PCR و Multiple Ligation dependent probe Amplification، در بررسی بیشتر مواردی که هم چنان ناشناخته می‌مانند، شناخت جهش‌های خونی غیر شایع موارد α تالاسمی تسهیل می‌گردد (۱۸). این مطالعه به منظور بررسی موارد شایع هموگلوبینوپاتی‌ها، می تواند اطلاعات سودمندی برای محققین در اختیار بگذارد.

منابع

۱- هاینز دیکر و کنسال ای، ون هولد؛ اکسیژن و تکامل حیات؛ ترجمه: سادات عطری م، صبوری ع م. چاپ اول. مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران؛ ۱۳۹۰.

2-Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H. *Hematology : basic principles and practice*,First edition, Churchill Livingstone, United State of America(1991).

۳- محمدی ر. ضروریات بیوشیمی، چاپ سوم. انتشارات آییژ تهران؛ ۱۳۹۰.

۴- پیتر ترن پنی، سین الارد ؛ اصول ژنتیک پزشکی امری؛ ترجمه: خلج کندری م، آهنی ع، اکبری م ت. چاپ اول. انتشارات اندیشه رفیع ؛۱۳۹۰.

۵- لوبرت استرایر ،جرمی ام برگ، جان ال تمیشکو؛ بیوشیمی استرایر(۱)؛ ترجمه: امین زاده س، بازرگان ل، پویان م، ساجدی ر ح، حسینخانی س، خواجه خ، زینلی م، طالب زاده فاروجی م، کاووسی غ، معروفی ب، مقرب ن، مهدیونی ح، میر حبیبی ب. چاپ اول. انتشارات تابش اندیشه(وابسته به خانه زیست شناسی)؛ ۱۳۸۳.

۶- رابرت نوس بام، ردریک مک اینز، هانتینگتون ویلیارد؛ ژنتیک پزشکی؛ ترجمه: علیزاده م. چاپ اول. انتشارات سماط؛ ۱۳۸۲.

۷- هیوفلچر، آیور هیکی، پل پل وینتر؛ درسنامه ژنتیک؛ ترجمه: حسینی ب، اولیا زاده ن. چاپ سوم.انتشارات برای فردا؛۱۳۹۰.

۸- تی. استرون، اندرو پی. رید؛ ژنتیک مولکولی انسانی استراخان(۲)؛ ترجمه: اکبری م ت، شیرزاد ه، اقدم ح، عسگری م، مجیدی س. چاپ اول. انتشارات برای فردا؛ ۱۳۹۰.

۹- استانلی رابینز، وینه کومار، رامزی کوتران؛ آسیب شناسی پایه(اختصاصی)؛ ترجمه: فتح اللهی ع. چاپ دوم.انتشارات ارجمند؛ .۱۳۷۹.

۱۰- ریچارد ا. مک فرسون، متیو آر. پینکوس؛ روش های تشخیص آزمایشگاهی هنری: خون شناسی و انعقاد؛ ترجمه: رزاقیان ه، عاملی رضایی م، قربانی م ح، شرکا ع، شهریوری م. چاپ اول. انتشارات ارجمند؛ ۱۳۸۹.

۱۱- آساد م ت. مبانی ژنتیک. چاپ اول. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد؛ ۱۳۹۰.

۱۲- فردریک آر. دیوی، جان برنارد هنری؛ تشخیص و پیگیری بالینی بیماری ها به کمک روش های آزمایشگاهی هنری(دیویدسون): خون شناسی انعقاد و طب انتقال خون؛ ترجمه: رخشان م، احمدی ک، مجتهد زاده ر. انتشارات مؤسسه فرهنگی انتشاراتی تبمور زاده، نشر طبیب؛ ۱۳۷۵.

۱۳- یوجین براون والد...[و دیگران]؛ اصول طب داخلی هاریسون: بیماری های هماتولوژی؛ ترجمه: صمدانی فرد ح، ستوده نیا ع، رضا سهرابی م. چاپ اول. انتشارات ارجمند؛ ۱۳۸۱.

۱۴- خدا مراد زندیان، جمال ناطقی، بیژن کیخواهی و همکاران. توزیع فراوانی جهش های αتالاسمی در خوزستان. ژنتیک در هزاره سوم۱۳۸۶: سال ۵؛ شماره۳: صفحه ۱۱۲۰ تا ۱۱۲۵.

۱۵- براهیم زاده وصال و همکاران. ارتباط بین شاخص های خونی ناقلان αتالاسمی با نوع جهش ژنی. مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی۱۳۸۸: دوره۷؛ شماره۲: صفحه ۱۵ تا ۲۳.

۱۶- ساکی نجم الدین، دهقانی فرد علی، کاویانی سعید و همکاران. βتلاسمی: اپیدمیولوژی و راه کارهای تشخیصی و درمانی در ایران. ژنتیک در هزاره سوم۱۳۹۱: سال۱۰؛ شماره۱: صفحه ۲۶۷۴ تا ۲۶۸۳.

۱۷- ولیان بروجنی ص، نصیری ای، خزاعی م. مبانی مولکولی ژنتیک انسانی. چاپ اول. انتشارات دانشگاه اصفهان؛۱۳۸۷.

۱۸- زربخش بهناز و همکاران. بررسی مولکولی αتالاسمی از نظر جهش های حذفی و غیر حذفی در حاملین مشکوک ایرانی. فصلنامه پژوهشی خون۱۳۸۹: دوره۷؛ شماره۲: صفحه ۷۰ تا ۷۷.

۱۹- کیانی ع الف، شیرخانی ی، مرتضوی ی، زینلی س. هتروزیگوسیتی دوگانه تالاسمی β و هموگلوبین S در بیماران تالاسمی ماژور استان لرستان. فصلنامه علمی- پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان۱۳۸۵: دوره۸؛ شماره۱؛ مسلسل۲۷: صفحات ۹۱ تا ۹۵.

۲۰- احمدی فرد م و همکاران. بررسی مولکولی حذف های خوشه ژنیβگلوبین در افراد کم خون مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان کودکان امیرکلا. مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل۱۳۹۱: دوره۱۴؛ شماره ۳: صفحه ۱۳ تا ۱۸.