بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی گرایش ژنتیک

عنوان پایان نامه

بررسی فراوانی چند شکلی های RDB,RSa, Hinc و Xmn و هاپلوتایپ های HBBS۱۱D در مبتلایان به بیماری بتا تالاسمی مینور در استان اردبیل

استاد راهنما:

دکتر سید سعید حسینی اصل

استاد مشاور:

-

نگارش:

سیده شبنم ایرانخواه

پاییز۱۳۹۹

دانشگاه آزاد اسلامی

سازمان مرکزی

تاریخ: .....

شماره : .....

پیوست: .....

تعهد نامه اصالت رساله یا پایان نامه

اینجانب ..... دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد ناپیوسته / دکترای حرفه ای / دکترای تخصصی در رشته

..... که در تاریخ ..... از پایان نامه / رساله خود تحت عنوان "

.....

....."

با کسب نمره ..... و درجه ..... دفاع نموده‌ام بدینوسیله متعهد می شوم:

۱) این پایان نامه / رساله حاصل تحقیق و پژوهش انجام شده توسط اینجانب بوده و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران (اعم از پایان نامه، کتاب، مقاله و ...) استفاده نموده‌ام ، مطابق ضوابط و رویه موجود، نام منبع مورد استفاده و سایر مشخصات آن را در فهرست مربوطه ذکر و درج کرده‌ام.

۲) این پایان نامه / رساله قبلاً برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی(هم سطح،پایین تر یا بالاتر) در سایر دانشگاه‌ها و موسسات آموزش عالی ارائه نشده است.

۳) چنانچه بعد از فراغت از تحصیل ، قصد استفاده و هرگونه بهره برداری اعم از چاپ کتاب، ثبت اختراع و ... از این پایان نامه داشته باشم، از حوزه معاونت پژوهشی واحد مجوزهای مربوطه را اخذ نمایم.

۴) چنانچه در هر مقطع زمانی خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن را می پذیرم و واحد دانشگاهی مجاز است با اینجانب مطابق ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت ابطال مدرک تحصیلی‌ام هیچگونه ادعایی نخواهم داشت.

نام و نام خانوادگی:

تاریخ و امضاء:

پدر عزیزم از تو هرچه می گویم باز هم کم می آورم

خورشیدی شدی و از روشنایی ات جان گرفتم ودر ناامیدی ها نازم را

کشیدی و لبریزم کردی از شوق

اکنون حاصل دستان خسته ات رمز موفقیتم شد

به خودم تبریک میگویم که تورا دارم و دنیا با همه بزرگیش مثل تو ندارد

مادر مهربانم ای شوق زیبای نفس کشیدن

ای روح مهربان هستی ام

تو رنگ شادی هایم شدی و لحظه هارا باتمام وجود از من دور کردی و

عمری خستگی هارا به جان خریدی تا اکنون توانستی

طعم خوش پیروزی را به من بچشانی

تشکر و قدردانی :

نخستین سپاس و ستایش ازآن خداوندی است که بنده کوچکش را در دریای بی کران اندیشه قطره ای ساخت تا وسعت آن را از دریچه اندیشه های ناب اساتیدی بزرگ

به تماشا نشیند.

از استاد گرامیم جناب اقای دکتر سید سعید حسینی اصل بسیار سپاس گذارم چرا که بدون راهنمایی هایشان تامین این پایان نامه بسیار مشکل می نمود.

از استاد محترم جناب اقای فیروز امانی بدلیل یاری ها و راهنمایی های بی چشمداشت ایشان که بسیاری از سختی هارا برایم اسان نمودند.

ونیزبا تشکراز

ازداواران محترم جلسه دفاع آقای دکترمهبودجعفری وآقای دکتر ابولفضل قربانی

کلیه اساتید و همکاران محترم درآزمایشگاه ژنتیک بیمارستان امام خمینی اردبیل و آزمایشگاه ژنتیک هما تشکر و قدردانی میشود.

چکیده

مقدمه و هدف: بتا تالاسمی از بیماری های شایع ژنتیکی با الگوی وراثتی اتوزومی مغلوب در جهان است ودر کشور ایران نیز جز شایع ترین بیماریها میباشد که درتمام گروههای سنی و جنسی وجود داشته و تعیین جهش های ژنی موجود در این بیماری میتوانددر کنترل و درمان بیماری موثر باشد.هدف از مطالعه حاضرتعیین فراوانی چند شکلی ها ی HINC,RSAI,RDB,XMN, در مبتلایان به بتا تلاسمی مینور در استان اردبیل میباشد.

روش کار : دراین مطالعه ی توصیفی_مقطعی تعداد ۵۳ نفر از بیماران بتاتالاسمی مراجعه کننده به بخش ژنتیک بیمارستان امام خمینی و آزمایشگاه ژنتیکی هما در استان اردبیل مورد مطالعه قرار گرفتنداز کل بیماران مربوطه برای تعیین نوع جهش ژنی نمونه خون گرفته شد ودر لابراتوار تخصصی نمونه ها مورد آزمایش قرار گرفته در مرحله اول استخراج DNA انجام شدو در مرحله بعد PCRنمونه ها جهت تعیین جهش های ژنتیکی با استفاده از روش های RDB-Sequence-RFLP-Haplotype مورد ارزیابی ژنتیکی قرار گرفتند.

نتایج: تعداد ۵۳ نمونه مورد بررسی قرار گرفتندکه از این تعداد۵۶/۶٪ مرد و بقیه زن بودند بیشترین موارد مثبت در رتبه های اول و دوم به ترتیب مربوط به آنزیمهای XmnIوAvaII با ۷۳٪/۵ و ۶۰/۳ ٪ بوده است. شایعترین موتاسیون استخراج شده در نمونه های مورد مطالعه با ۱۴ مورد(۲۶/۴ ٪) IVS۲/۱ بوده است.ازبین موتاسیون شایع استخراج شده به روش RDB مربوط به IVS ۲/۱ با ۲۶/۴ ٪ بوده است.

نتیجه گیری : نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پراکندگی جهش های ژنتیکی در نمونه های مورد مطالعه میتواند متفاوت از جاهای دیگر باشد و برای شناسایی بهتر این جهش ها براساس تکنیک های موجود میتوان مطالعاتی را درآینده روی نمونه هایی با تعداد بیشتر و انجام آزمایش های دقیق و همچنین انجام مشاوره های ژنتیکی هدفمند در نسبت به کنترل و پشگیری از بیماری در آینده اقدام نمود.

کلید واژگان :بتا تالاسمی , RDB . موتاسیون , اردبیل , HINC .

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول:اهداف و کلیات تحقیق	۱
۱-۱- تعریف	۲
۱-۲-دسته بندی علائِم بالینی و هماتولوژیکی بیماری	۲
۱-۳- اپیدومیولوژی تالاسمی	۴
۱-۲-۱-شیوع تالاسمی در ایران	۴
۱-۴-انواع تالاسمی	۵
۱-۴-۱- تالاسمی آلفا	۵
۲-۴-۱-تالاسمی بتا	۹
۱-۵- ژن های گلوبین	۱۱
۱-۵-۱- ژن بتاگلوبین	۱۶
۱-۶- جهش های ژل بتاگلوبین	۱۷
۱-۷-چند شکلی های Hinc , Xmn , Rsa , RDB	۲۲
۱-۸- اهمیت بررسی جهش ها در ژنوم	۲۵
۱-۸-۱- انواع پلی مورفیسم های نوکلئوتیدی	۲۵
۲-۸-۱-توزیع پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی	۲۶
۱-۹-ویژگی SNP مناسب برای همبستگی	۲۶
۱-۹-۱-هاپلوتایپ	۲۸
۱-۱۰-هدف	۳۰
فصل دوم:مبانی نظری و پیشینه تحقیق	۳۲

۲-۱-مروری بر مطالعات خارجی و داخلی	۳۳
فصل سوم: مواد و روش ها	۳۶
۳-۱-فهرست مواد مصرفی مورد استفاده در ازمایشگاه	۳۷
۳-۲-فهرست تجهیزات مورد نیاز در ازمایشگاه	۳۸
۳-۳-جامع اماری	۳۹
۳-۴-استخراج DNA از خون	۳۹
۳-۵-بررسی خلوص و غلظت DNA ژنومی استخراج شده	۴۰
۳-۵-۱-تهیه بافر TBE و ژل اگاروز	۴۰
۳-۵-۲-تعیین اندازه قطعه تکثیر شده در PCR	۴۱
۳-۵-۳-ارزیابی کمی DNA استخراج شده	۴۱
۳-۶-انتخاب پرایمر ها	۴۲
۳-۷-انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز	۴۳
۳-۸- بررسی بیماری تالاسمی بر اساس روش هاپلوتایپ	۴۴
۳-۱۲-روش سکانس	۴۷
۳-۱۴-روش RDB	۴۸
۳-۱۴-۳- مراحل انجام RDB	۴۹
فصل چهار : نتایج	۵۱
۴-۱-فراوانی بیماران بتاتالاسمی بر حسب جنسیت	۵۲
فصل پنجم:بحث و نتیجه گیری	۶۹
۵-۱- بحث	۷۰

۵-۲-نتیجه گیری ۷۵
۵-۳- پیشنهادات ۷۵
منابع ۷۶

فهرست جدول ها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱-ساختار های مختلف هموگلوبین در دوران مختلف تکوین	۱۵
جدول ۳-۱-فهرست مواد ازمایشگاهی مورد نیاز	۳۸
جدول ۳-۲- فهرست وسایل و تجهیزات موردنیاز	۳۸
جدول ۳-۳-مواد مورد نیاز جهت تهیه TBX5	۴۱
جدول ۴-۳-توالی و مشخصات اغازگرهای مورد استفاده برای انجام واکنش PCR	۴۲
جدول ۳-۵- برنامه دمایی PCR ویژه پرایمر های مورد بررسی	۴۳
جدول۳-۹-مشخصات مارکرهای STR که در کیت هاپلوتایپ استفاده شده	۴۵
جدول ۳-۱۰- جدول مواد استفاده شده در کیت هاپلوتایپ	۴۶
جدول ۳-۱۱- جدول برنامه PCR در هاپلوتایپ	۴۶
جدول ۳-۱۲-توالی و مشخصات اغازگرهای مورد استفاده برای انجام واکنش PCR	۴۷
جدول ۳-۱۳برنامه دمایی PCR ویژه پرایمر های مورد بررسی در روش سکانس	۴۸
جدول ۳-۱۴-۲-برنامه دمایی PCR ویژه کیت RDB	۴۹
جدول ۴-۱-فراوانی موارد مثبت PCR از نمونه های خونی افراد مبتلا به بتاتالاسمی	۵۲

جدول ۴-۲- توزیع فراوانی موارد مثبت برش داده شده در انزیم RFLP ۵۳

جدول ۴-۳-توزیع فراوانی موتاسیون های ژنی استخراج شده در نمونه ها ۵۴

جدول ۴-۴- نتایج بدست امده بااستفاده ای روش RDB ۵۵

فهرست شکل ها

عنوان صفحه

شکل ۱-۱- انواع تالاسمی آلفا ۷

شکل۱-۲-خوشه های ژنی آلفا و بتاگلوبین ساختار هموگلوبین ۱۳

شکل۱-۳-هموگلوبین های ساخته شده در مراحل مختلف در تکامل اولیه انسان ۱۴

شکل۱-۴- ناحیه خوشه ژنی بتاو نواحی اطراف ان روی کروموزم ۱۱P ۱۷

شکل ۱-۵- ساختار کلی ژن بتاگلوبین ۱۸

شکل ۱-۶- پراکندگی جهش های ژن بتاگلوبین در مناطق مختلف ایران ۲۲

شکل ۱-۷-مارکر های مورد بررسی ۲۳

شکل ۳-۱-نشانگر صدجفت بازی شرکت یکتاتجهیز ۴۱

شکل ۴-۵-عکس های مربوط به ژل ران شده توسط روش های PCR و RFLP ۵۶

شکل۴-۶- اشکال مربوط به انالیز هاپلوتایپ ۶۷

شکل ۴-۷- انالیز اشکال داده های روش سکانس ۶۸

فصل اول

اهداف و کلیات تحقیق

۱-۱- تعریف:

تالاسمی از بیماری‌های ژنتیکی است که در اثر آن هموگلوبین ساختار طبیعی خود را از دست می‌دهد و بنابراین پدیده ی تولید هموگلوبین غیر مؤثر در بدن ایجاد می‌شود، در نتیجه هموگلوبین معیوب قادر به اکسیژن رسانی مطلوب به اعضا بدن نیست. پس در واقع کمبود کلی هموگلوبین وجود ندارد، بلکه هموگلوبین غیرطبیعی افزایش یافته‌است(۱). هموگلوبین جزء انتقال دهنده اکسیژن در سلول های قرمز خونی است. هموگلوبین شامل دو پروتئین مختلف به نام آلفا و بتا است(۲). اگر بدن توانایی تولید کافی از هر نوع پروتئین را نداشته باشد، سلول های خونی به طور کامل شکل نمی‌گیرند و توانایی انتقال اکسیژن کافی را ندارند و نتیجه یک نوع کم خونی است که در طفولیت آغاز می‌شود و تا پایان عمر به طول می‌انجامد. هر چند تالاسمی یک اختلال منفرد نیست، اما یک گروه اختلالات از طرق مشابه بدن انسان را درگیر می‌کند. درک تفاوت بین گونه‌های مختلف تالاسمی مهم است(۳).

۱-۲- دسته بندی، علائم بالینی و هماتولوژیک بیماری

نخستین بار آقای کولی در سال ۱۹۲۵، بچه هایی از ایتالیا با تظاهرات آنمی شدید، بزرگ شدن طحال و تغییرات استخوانی گزارش کرد. علت اصلی بروز آنمی در تالاسمی رسوب زنجیره های اضافی در گلبول قرمز (اجسام آنکلوزیونی) است که توسط فاگوسیت کننده های طحال شناسایی شده و باعث همولیز گلبولهای قرمز زودتر از موعد طبیعی می شود. به طور کلی، ناهنجاری های مربوط به هموگلوبین به دو دسته تقسیم می شوند: ۱-تولید هموگلوبین های غیر طبیعی (هموگلوبینوپاتی)؛ به علت جایگزینی نادرست اسید های آمینه در زنجیره های گلوبین و تولید زنجیره های گلوبین غیر طبیعی، یک هموگلوبین ناهنجار به وجود می آید که بسته به نوع آمینواسید تغییر یافته و جایگاه آن می تواند به بیماری هایی مثل هموگلوبین S,D و C منجر شود(۴). در واقع، این دسته از ناهنجاری ها شامل

اختلالات کیفی هموگلوبین می باشد. بسیاری از این هموگلوبین های ناهنجار دارای تمایل بالایی در اتصال به اکسیژن بوده و لذا معمولا در حاملین خود با پلی سیتمی همراه می باشند(۵).

۲-کاهش در تولید زنجیره های گلوبین شامل اختلال کمی در تولید زنجیره های گلوبین است که مهمترین نوع بیماری در این ناهنجاری، انواع تالاسمی هاست. دو نوع رایج از تالاسمی آلفا و بتا وجود دارد، البته، اشکال کمیاب تالاسمی نیز گزارش شده است(۶).

در تالاسمی بسته به این که تولید زنجیره آلفا کاهش یافته باشد یا زنجیره بتا، به ترتیب به دو دسته کلی تالاسمی آلفا و تالاسمی بتا تقسیم می شوند. هر کدام از این تالاسمی ها نیز براساس شدت بروز به زیرمجموعه هایی تقسیم می گردند. در شرایط طبیعی نسبت میزان تولید زنجیره های آلفا و بتا مساوی است ولی در بیماری تالاسمی براساس نوع زنجیره درگیر، این نسبت به هم می خورد. در بتالاسمی زنجیره های اضافه آلفا و در تالاسمی آلفا زنجیره های زیادی بتا به عنوان زنجیره های غیر موثر رسوب می کنند که با همولیز خارج عروقی گلبول های قرمز همراه می گردد(۷, ۸). در موارد شدید تالاسمی، همولیز با تحمیل افزایش خون سازی در مغز استخوان و در نتیجه، تغییر شکل استخوانی در بیمار رخ می دهد(۹). همین طور، خون سازی خارج مدولاری در این بیماران باعث بزرگی طحال و کبد و بزرگی غدد لنفاوی می شود(۱۰). تالاسمی در موارد شدید یک بیماری وابسته به تزریق خون است به طور که بدون دریافت خون به دلیل آنمی شدید تا ۵ سالگی می میرند(۷). به هر حال، دریافت مکرر خون سبب تجمع آهن در بافت های مختلف از جمله کبد و قلب و در نتیجه نارسایی کارکردی آن ها و سرانجام مرگ بیمار می شود. هر چند به کمک شلاتور کننده های آهن تا حدی می توان از عوارض ناشی از رسوب آهن در بافت های مختلف بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور کم کرد(۱۱). از آنجا که تولید HbA و بیان کامل زنجیره بتا پس از تولد اتفاق می افتد، تالاسمی بتا ۶-۴ ماه پس از تولد تظاهر پیدا می کند ولی با توجه به حضور و بیان زنجیره های آلفا در هموگلوبین های دوران جنینی، تالاسمی آلفا در صورت بیماری از دوران جنینی خود را نشان می دهد(۲, ۱۰).

۳-۱- اپیدمیولوژی تالاسمی:

این بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۲۵ به طور مستقل از ایالات متحده و ایتالیا گزارش شده است. تالاسمی از واژه ی یونانی thalassa به معنی دریا و Heama یعنی خون گرفته شده است(۴). این بیماری در تمام نژاد ها گزارش شده است، اما بیشتر در کشورهای حوزه مدیترانه، نواحی استوایی و مناطق نزدیک به آن در آسیا و آفریقا شیوع دارد به طوری که از نظر جغرافیایی قسمت هایی از آفریقا، ترکیه، ایران ، هلند و آسیای جنوب شرقی، کمربند تالاسمی جهانی نام گرفته اند. بالاترین بروز بتا تالاسمی در قبرس (۱۴٪)، ساردینیا (۱۲٪) و جنوب شرقی آسیا گزارش شده است(۱۲). با توجه به اینکه فرم هتروزیگوت تالاسمی نسبت به بیماری مالاریا خیز مثل خاورمیانه، نوار مدیترانه، مناطق گرمسیری آفریقا و جنوب شرقی آسیا بالاست. با وجود این تالاسمی به صورت یک بیماری تک گیر در هر جمعیت و قومی با هر موقعیت جغرافیایی دیده شده است(۱۳).

۱-۲-۱- شیوع تالاسمی در ایران

ایران، نیز مانند دیگر کشورهای منطقه، بیماران تالاسمی ماژور بسیاری دارد. بیش از دو میلیون حامل در ایران زندگی می کنند و فراوانی بتا تالاسمی بطور قابل ملاحظه ای از یک منطقه تا منطقه ی دیگر متفاوت است ، بیشترین فراو انی (۱۰درصد) در حاشیه های دریای خزر و خلیج فارس می باشد. شیوع بیماری در مناطق دیگر بین ۸-۴ درصد می باشد. در جنوب ایران، در استان فارس، فراوانی ژن بالا بوده و حدود ۱۰-۸ درصد است. به دلیل نسبت بالای ازدواج های فامیلی و پیامد آن در خزانه ی ژنی ، نرخ اشکال شدید این بیماری افزایش یافته است. نسبت ازدواج های فامیلی در ایران ۳۸ درصد است که ۲۹ درصد آنها بین عموزاده ها، عمه زاده ها و (زاده های نخست) می باشد. به همین علت حتی غربالگری و آشنایی با جهش های نادر نیز در جمعیت ما از اهمیت بالایی برخوردار است(۲, ۱۴).

همچنین براساس نتایج مقالات متعدد، گزارش شده است که تالاسمی در ایران در حاشیه خلیج فارس و دریای خزر، کهکیلویه و بویراحمد، فارس، کرمان، اصفهان و سیستان و بلوچستان شایع است. در واقع، آمار مبتلایان به این بیماری در این استان ها از میزان جهانی و کشوری بالاتر است؛ به عنوان نمونه در یک بررسی در سال ۱۳۹۵ از ۱۴۸۹۶ بیمار تالاسمی ثبت شده در کشور، استان های مازندران و گیلان به ترتیب با ۷۳/۲۹ و ۷۵/۶۱ در هر۱۰۰ هزار نفر جمعیت در شمال کشور به ترتیب و استان های هرمزگان و خوزستان به ترتیب با ۵۰/۲ و ۴۸/۷۹ در هر ۱۰۰ هزار نفر جمعیت در جنوب کشور دارای بیشترین فراوانی بیماری بودند(۱۵, ۱۶).

۱-٤- انواع تالاسمی

۱-۴-۱- تالاسمی آلفا

تالاسمی آلفا یکی از شایع ترین اختلالات هموگلوبینی در دنیا می باشد که بیشتر در مناطق درآفریقایی، آسیای جنوب شرقی و خاورمیانه شیوع دارد(۲). مجموعه ژنی آلفا گلوبین با طولی در حدود ۳۰ کیلوباز بر روی کروموزوم ۱۶ قرار دارد و به واسطه ۴ لوکوس ژنی به ارث می رسد. بررسی تالاسمی آلفا در سطح مولکولی نشان می دهد که این بیماری عمدتا از حذف قطعات متغیری از یک یا دو ژن آلفا در مجموعه ژنی آلفا می باشد(۲, ۷, ۱۳). دو قطعه ژنی آلفا گلوبین (α۱ و α۲) روی یک کروموزوم در دو جایگاه ژنی بسیار همسان به اندازه ۲ واحد ۴ کیلوبازی جای دارند که توالی آنها در حین تکامل حفظ شده است. این توالی های همسان به وسیله عناصری غیر همسان از هم جدا شده اند. نوترکیبی های بین اللی می تواند موجب حذف ژن ها شده که یکی از مکانیسم های مسئول کاهش سنتز زنجیره آلفا در تالاسمی آلفا می باشد(۹). شدت بیماری حاصله به تعداد ژن های درگیر بستگی دارد. به افراد فاقد یک ژن آلفا، α+ thal به افرادی که دو ژن آلفای خود را از یک کروموزوم (وضعیت سیس) از دست داده اند، α۰۰ thal، و به افرادی که دو ژن آلفای خود را به صورت یک ژن از هر کروموزوم (وضعیت ترانس)

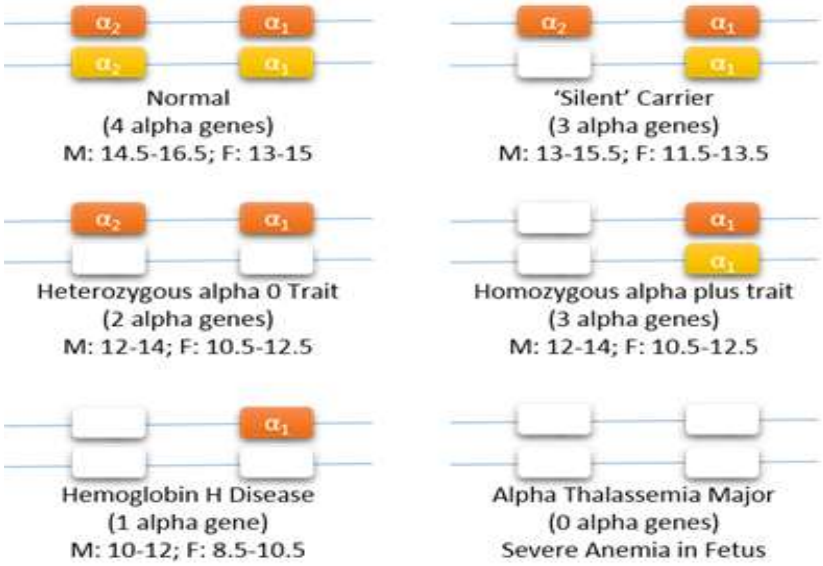
از دست داده اند، α+ thal+ homozygote اطلاق می گردد که در این حالات افراد مبتلا غالباً بدون علامت یا دارای کم خونی حد واسط بوده اما بیش تر آن ها دارای گلبول های قرمز میکروسیتیک (MCV<۸۰fL) می باشند .در صورتی که سه ژن آلفا حذف شده باشد (بیماری Hb-H) فرد مبتلا نمایی از تالاسمی اینترمدیا را که با کم خونی متوسطی همراه می باشد، نشان می دهد(۱۷).

حذف کامل هر چهار ژن آلفا موجب ایجاد بیماری هیدروپس فتالیس شده که با مرگ داخل رحمی جنین همراه می باشد . بیش از ۹۵درصد از موارد تالاسمی آلفا از نوع حذفی است .از شایع ترین حذف های آلفا می توان از انواع آسیای جنوب شرقی (^{SEA} - -)، مدیترانه ای (^{MED} - -)، ($^{-(\alpha)^{20.5}}$ -)۲۰.۵ و فیلیپینی (^{FIL} - -) نام برد که حذف های دو ژنی می باشند . از شایع ترین انواع حذف های تک ژنی نیز می توان به ($^{-\alpha^{3.7}}$) و ($^{-\alpha^{4.2}}$) اشاره کرد .در این میان برخی از جهش های نقطه ای نیز می توانند عامل ایجاد این ناهنجاری شوند(۲, ۱۸). چهار جهش نقطه ای شایع در این ژن به ترتیب عبارتند از:

PolyA-۱ [αPA-۱(AATAAA→AATAAG)]
PolyA-۲ [αPA-۲ (AATAAA→AATGAA)],
Hb Constant Spring [HbCS (αCSα/αCSα)TAA→CAA]
Pentanucleotide deletion [α-۵nt del(GAGGTGAGG → GAGG)]

نوع PolyA-۲ شایع ترین جهش نقطه ای در ایران(۱۱) و جهش های ($^{-\alpha^{3.7}}$) ،($^{-\alpha^{4.2}}$) و (- MED) در نوع حذفی، به ترتیب دارای بیش ترین شیوع در کشور ما می باشند(۸, ۹, ۱۹).

افرادی که در آن‌ها هموگلوبین به میزان کافی پروتئین آلفا تولید نمی‌کند به تالاسمی آلفا مبتلا می‌شوند. چهارگونه تالاسمی آلفا وجود دارد که با توجه به آثار آن‌ها بر بدن از خفیف تا شدید تقسیم‌بندی می‌شود(۲۰).



شکل ۱-۱- انواع تالاسمی آلفا

Two alpha genes (α۲ and α۱) are located on each chromosome ۱۶ (red and yellow chromosomes are inherited from different parents). White boxes indicate nonfunctioning alpha genes. The usual hemoglobin range in adults (males and females) is shown for each genotype

- مرحله حامل خاموش:

در این مرحله عموماً فرد سالم است، زیرا کمبود بسیار کم پروتئین آلفا بر عملکرد هموگلوبین تأثیر نمی‌گذارد. به علت تشخیص مشکل، این مرحله حامل خاموش نامیده می‌شود. هنگامی‌که فرد به ظاهر طبیعی صاحب یک فرزند با هموگلوبین H یا صفت تالاسمی آلفا می‌شود، مرحله حامل خاموش تشخیص داده می‌شود(۲۱).

- هموگلوبین کنستانت اسپرینگ[۱]

[۱] Hemoglobin Constant Spring

یک فرم غیرمعمول از مرحله حامل خاموش که به واسطه جهش در هموگلوبین آلفا رخ می‌دهد. علت این نامگذاری آن است که این موضوع در منطقه‌ای در جامائیکا به نام کنستانت اسپرینگ کشف شده‌است. بیمار، همانند مرحله خاموش، هیچ گونه مشکلی را تجربه نمی‌کند(۲۲).

- صفت تالاسمی آلفا یا تالاسمی آلفا خفیف

در این مرحله کمبود پروتئین آلفا بیشتر است. بیماران در این مرحله سلول‌های قرمز خونی کمتر و کوچک‌تری دارند، اگر چه بسیار از بیماران علائمی‌از بیماری را تجربه نمی‌کنند. پزشکان اغلب تالاسمی آلفا خفیف را با کم خونی فقر آهن اشتباه می‌گیرند و برای بیماران آهن تجویز می‌کنند. آهن هیچ تأثیری بر درمان کم خونی تالاسمی آلفا ندارد(۲۳).

- بیماری هموگلوبین H

در این مرحله، کمبود پروتئین آلفا به حدی است که منجر به کم خونی شدید و بروز مشکلاتی نظیر طحال بزرگ، تغییرات استخوانی و خستگی می‌شود. نامگذاری به علت هموگلوبین H غیرطبیعی است که سلول‌های قرمز خون را تخریب می‌کند(۲۳).

- هموگلوبین H- کنستانت اسپرینگ[۱]

این حالت بسیار شدیدتر از بیماری هموگلوبینH است. بیماران در این مرحله، از کم خونی شدید، بزرگی طحال و عفونت‌های ویروسی رنج می‌برند(۲۲).

- هموزیگوس H- کنستانت اسپرینگ[۲]

Hemoglobin H- Constant Spring[۱]
Hemozygous H- Constant Spring[۲]

این حالت یک نوع از Hemoglobin H- Constant Spring است. هنگامی‌که دو فرد حامل Constant Spring ژن‌ها را به فرزند منتقل می‌کنند، این نوع بیماری بروز می‌یابد. این حالت عموماً خفیف تر از Hemoglobin H- Constant Spring و تقریباً مشابه بیماری هموگلوبین H است(۲۲).

- هیدروپس جنینی یا تالاسمی آلفای ماژورتالاسمی آلفای بزرگ

در این حالت، در بررسی DNA فرد ژن‌های آلفا مشاهده نمی‌شود. این اختلال باعث می‌شود گلوبین گامای تولیدی در جنین هموگلوبین غیرطبیعی بارت (Barts) ایجاد کند. بسیاری از این بیماران قبل یا در فاصله کوتاهی بعد از تولد می‌میرند. در موارد بسیار نادری که بیماری قبل از تولد تشخیص داده می‌شود، تزریق خون داخل رحمی منجر به تولد کودکی با هیدروپس جنینی می‌شود. این نوزاد در سراسر زندگی خود به تزریق خون و مراقبت‌های پزشکی نیازمند است(۲۴).

۲-۴-۱- تالاسمی بتا

تالاسمی بتا نوعی اختلال هموگلوبین می باشد که مانند تالاسمی آلفا موجب کاهش یا عدم تولید هموگلوبین می شود . ژن کد کننده این زنجیره روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۱ بوده و در حدود ۵۰ کیلوبازی می باشد .این ژن شامل سه اگزون می باشد که به وسیله دو اینترون از هم جدا شده‌اند.(۲۵) تاکنون بیش از ۷۰۰ جهش در ژن بتا گزارش شده است و تخمین زده می شود که ۱/۵ درصد از جمعیت جهان یعنی در حدود ۲۰۰ میلیون نفر حامل ژن تالاسمی بتا باشند(۲۵). این بیماری به واسطه ایجاد جهش های نقطه ای و به میزان کمتر حذف ژن زنجیره بتاگلوبین ایجاد شده، به صورت اتوزومی مغلوب منتقل می شود . تالاسمی بتا براساس تظاهرات بالینی به سه گروه مینور، اینتر مدیا و ماژور تقسیم می شود که مورد اخیر که شدیدترین نوع کم خونی در این گروه از بیماران می باشد از به ارث رسیدن دو الل معیوب به وجود می آید (β^{0}/β^{0} یا β^{+}/β^{0})(۲).

تالاسمی اینترمدیا نوعی از تالاسمی بتا است که دامنه ای از حاملان بدون علامت تا بیماران وابسته به تزریق را شامل می شود. بیماران این گروه، در بیش تر موارد به تزریق خون منظم و همیشگی نیاز ندارند. بیش تر جهش های ژنی شناسائی شده مرتبط با تالاسمی اینترمدیا به صورت نقطه ای، حذف یا وارد شدن نوکلئوتید یا الیگونوکلئوتید و در نتیجه تغییر در ساختار ژن می باشند(۲۶). در مطالعات صورت گرفته در ایران تاکنون در حدود ۶۰ نوع جهش در ژن بتا تالاسمی در این منطقه شناسایی شده است که از این تعداد ۲۶ جهش در اگزون ۱ و مناطق بالادست آن می باشند(۲). شایع ترین جهش تالاسمی بتا در ایران (A<IVSII-۱(G))است(۲۷).

در افرادی که هموگلوبین پروتئین بتا کافی تولید نمی‌کند ایجاد می‌شود. این بیماری در مردم نواحی مدیترانه نظیر یونان و ایتالیا، ایران، شبه جزیره عربستان، آفریقا، جنوب آسیا و جنوب چین یافت می‌شود. سه گونه تالاسمی بتا وجود دارد که با توجه به آثار آن‌ها بدن از خفیف تا شدید تقسیم‌بندی می‌شوند(۴).

- تالاسمی مینور یا صفت تالاسمی

در این حالت کمبود پروتئین به حدی نیست که باعث اختلال در عملکرد هموگلوبین شود. یک فرد با این بیماری حامل صفت ژنتیکی تالاسمی است. این فرد به جز یک‌کم خونی خفیف در برخی موارد، مشکل دیگری را تجربه نخواهد کرد. همانند تالاسمی آلفای خفیف، گاهی ممکن است پزشک بخواهد فرد مبتلا به تالاسمی بتای مینور را به عنوان علامتی از کم خونی فقر آهن با تجویز نادرست مکمل آهن درمان کند(۲۸).

- تالاسمی بینابینی

در این حالت کمبود پروتئین بتا در هموگلوبین به اندازه‌ای است که منجر به کم خونی نسبتاً شدید و اختلالات قابل ملاحظه‌ای در سلامت فرد نظیر بدفرمی‌های استخوانی و بزرگی طحال می‌شود. در این

مرحله طیف وسیعی از علائم وجود دارد. تفاوت کم بین علائم تالاسمی بینابینی و فرم شدیدتر (تالاسمی ماژور) یا تالاسمی بزرگ می‌تواند گیج‌کننده باشد. به دلیل وابستگی بیمار به تزریق خون، فرد را در گروه تالاسمی ماژور قرار می‌دهند. بیماران مبتلا به تالاسمی بینابینی برای بهبود کیفیت زندگی و نه برای نجات یافتن، به تزریق خون نیازمندند(۲۶).

- تالاسمی ماژور یا کم خونی Cooley's Anemia تالاسمی بزرگ

این مرحله شدیدترین فرم تالاسمی بتا می‌باشد که کمبود شدید پروتئین بتا در هموگلوبین منجر به یک‌کم خونی تهدیدکننده حیات می‌شود و فرد به انتقال خون منظم و مراقبت‌های طبی فراوانی نیازمند می‌شود. انتقال خون مکرر در طول عمر منجر به تجمع بیش از حد آهن می‌شود که باید توسط تجویز عوامل Chelator کمک‌کننده در دفع جهت جلوگیری از مرگ و نارسایی ارگان‌ها درمان شوند(۲۹).

۵-۱- ژن های گلوبین

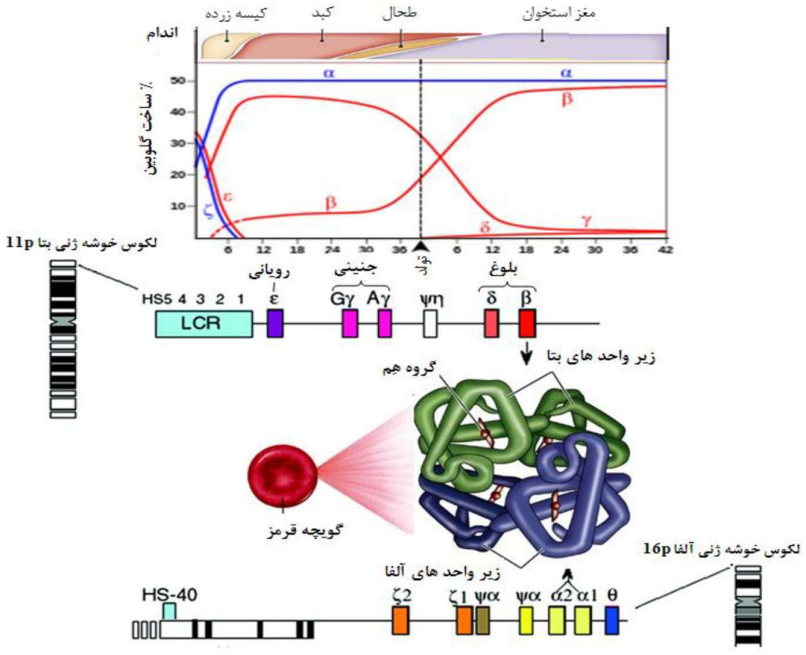
گلبول های قرمز خون حاوی مولکول هموگلوبین هستند. هموگلوبین از یک قسمت پروتئینی به نام گلوبین و یک رنگ دانه آهن دار به نام هم تشکیل شده است (شکل ۱-۲)(۴). سنتز مولکول هموگلوبین در گلبول های قرمز اولیه شروع می شود و تا زمانی که گلبول قرمز، مغز استخوان را ترک می کند و وارد خون می شود، برای حدود یک روز به تشکیل مقادیر ناچیزی هموگلوبین ادامه می دهند. هر مولکول هم پس از تشکیل شدن، با یک زنجیره هموگلوبین را پدید می آورد(۸). هموگلوبین به علت داشتن آهن که در حالت احیا شده می باشد، می تواند با اکسیژن و دی اکسید کربن ترکیب شده و به ترکیب اکسی هموگلوبین[۱] و کربآمینوهموگلوبین[۲] تشکیل دهد. با توجه به بالا بودن فشار اکسیژن در ریه ها، اکسی هموگلوبین در یه ها تشکیل شده و پس از رسیدن به بافت ها، اکسیژن جدا شده و دی

---

۱ Oxyhemoglobin

۲ Carbaminohemoglobin

اکسید کربن (CO^2) به آن متصل می گردد. به این ترتیب، امکان حمل اکسیژن از ریه ها به بافت ها و دی اکسید کربن از بافت ها به ریه ها امکان پذیر می گردد. از طرف دیگر، سطح بسیار زیاد گلبول های قرمز نسبت به حجم آن (به علت داشتن شکل مقعرالطرفین) سبب تسریع و تسهیل اشباع هموگلوبین با اکسیژن در ریه ها می شود. افزودن بر انتقال اکسیژن، مولکول هموگلوبین عمل تثبیت فشار اکسیژن در بافت ها را نیز انجام می دهد. هموگلوبین مرکب از ۴ زنجیره پلی پپتیدی که به هر زنجیره یک پور فیرین آهن دار (هِم) متصل شده است. بر اساس نوع زنجیره های پلی پپتیدی سه نوع هموگلوبین (Hb) قابل تشخیص در انسان شامل HbA۲ ,HbA۱ وHbF می باشد؛ HbA۱ مرکب از دو زنجیره آلفا و دو زنجیره بتا، در حدود ۹۷ درصد هموگلوبین افراد بالغ را تشکیل می دهد. HbA۲ متشکل از دو زنجیره آلفا و دو زنجیره دلتا، در حدود ۲ درصد هموگلوبین افراد بالغ را اختصاص می دهد و HbF نیز متشکل از دو زنجیره آلفا و دو زنجیره گاما، در حدود یک درصد هموگلوبین بالغین را می سازد(۳۰, ۳۱).



شکل ۱-۲: خوشه های ژنی آلفا و بتا گلوبین، ساختار هموگلوبین و بیان گلوبین های مختلف در طول دوران زندگی.

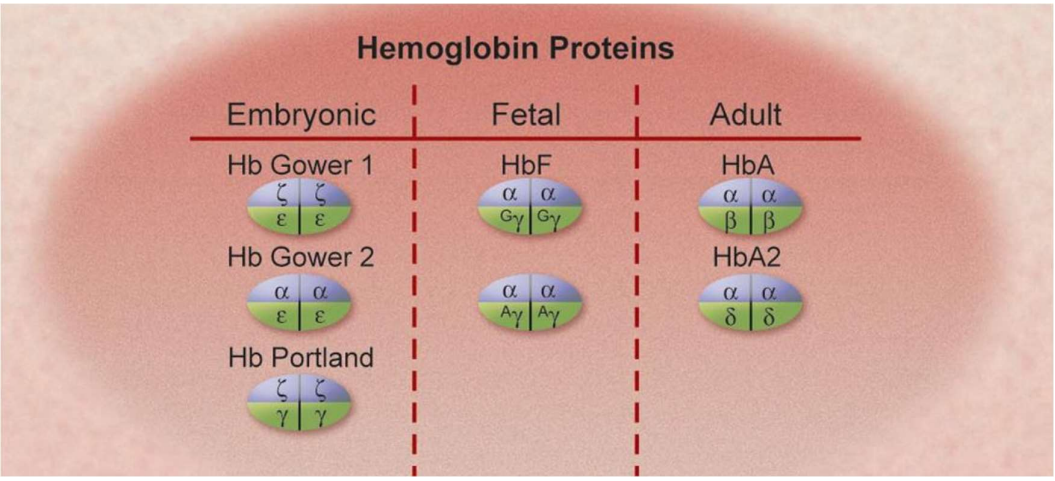
Hs : ناحیه حساس به هضم آنزیمی، LCR[1]: ناحیه کنترل لکوسی

ژن های کد کننده زنجیره های پروتئینی گلوبین دو دسته اند: گروه اول شامل ژن های اپسیلون، دلتا، گاما و بتا بر روی کروموزوم شماره۱۱ قرار گرفته و گروه دوم شامل ژن های زتا و آلفا بوده که بر روی کروموزوم شماره ۱۶ قرار دارد (شکل۱-۲). زنجیره آلفا دارای ۴ نسخه ژنی و زنجیره بتا تنها دو نسخه ژنی است. در تالاسمی آلفا، جهش های ژنی معمولا از نوع حذف ژنی و در تالاسمی بتا معمولا از نوع جهش های نقطه ای (مثلا تغییر یک نوکلئوتید) هستند(۲۵). آلفا تالاسمی براساس تعداد ژن های حذف شده می تواند ۴ زیر مجموعه داشته باشد که شامل هیدروپس فتالیس (حذف چهار نسخه ژن آلفا گلوبین)، بیماری H (حذف سه نسخه از ژن های آلفا)، آلفا تالاسمی مینور (حذف دو نسخه ژنی) و ناقل خاموش (حذف تنها یک نسخه از ژن) است(۳۲).

در تالاسمی بتا نیز افرادی که هر دو الل ژن گلوبین بتا در آن جهش پیدا کرده باشد یعنی افراد هموزیگوت و یا هتروزیگوت مرکب (که دو الل جهش یافته متفاوت دارند) به شکل شدید یا ماژور بتالاسمی مبتلا می شوند. اگر در این کودکان انتقال خون منظم انجام نگیرد معمولا ظرف چند ماه می میرند. بیماران هتروزیگوت تالاسمی بتا، خواه +B و یا B۰ تالاسمی باشند، از نظر بالینی سالم هستند ولی از نظر آزمایشگاهی MCV، MCH و هموگلوبین کاهش یافته و گلبول های قرمز و HbA۲ افزایش یافته اند. در حالت هموزیگوت غیر از علایم آزمایشگاهی، علایم بالینی نیز به صورت آنمی خود را نشان می دهند. در هموگلوبینوپاتی های کیفی هموگلوبین نیز بسته به هتروزیگوت و یا هموزیگوت بودن جهش علایم از حالت خفیف تا شدید متغیر است. افزون بر این دو نوع اصلی تالاسمی، جهش های سایر

[1] Locus Control Region

ژن های مجموعه های ژنی گلوبین نیز ممکن است سبب بروز انواع دیگر تالاسمی از جمله تالاسمی دلتا بتا گردد(۲).



شکل ۱-۳: هموگلوبین های مختلف ساخته شده در مراحل مختلف تکامل اولیه انسان

نوع و ساختار هموگلوبین غالب در دوران مختلف رویانی، جنینی و بلوغ در زندگی انسان با توجه به شرایط خاص هر دوره متفاوت بوده، به طوری که در دوران زندگی رویانی، زنجیره های گلوبینی آلفا، گاما، اپسیلون و زتا زنجیره های غالب هموگلوبین بوده و لذا هموگلوبین های گاور۱، گاور۲ و پورتلند از ترکیب این زنجیره ها پدید می آیند. در اواخر دوران رویانی از زندگی انسان، تولید زنجیره های گلوبینی اپسیلون و زتا متوقف شده در حالی که زنجیره های گلوبینی آلفا، گاما هم چنان بیش از پیش به تولید خود ادامه می دهند(۳۳). در نتیجه، هموگلوبین F یا هموگلوبین جنینی را پدید می آورند. پس از تولد، تولید زنجیره آلفا هم چنان به قوت خود باقی است در حالی که زنجیره گاما تدریجا در طول مدت ۶ ماه بعد از تولد کاهش یافته و جای خود را به نولید زنجیره بتا می دهد (شکل ۱-۲). به این ترتیب در حدود ۶ ماهگی دووران زندگی بعد از تولد تا پایان زندگی هموگلوبین A به عنوان هموگلوبین غالب خون است. به این ترتیب، هموگلوبین اصلی در زندگی رویانی گاور۱، گاور۲ و پورتلند، در دوران جنینی F و در دوران بلوغ هموگلوبین A است(۲). بنابراین، ساخت زنجیره های گلوبین بسته