بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم ژن *BCL11A* با میزان بیان ژن گاما گلوبین و مقدار هموگلوبین F در افراد مبتلا به بیماری بتا تالاسمی اینترمدیا در جمعیت اصفهان

* **مجید متولی باشی**: دانشیار ژنتیک مولکولی، بخش ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران (*نویسنده مسئول).mbashi@sci.ui.ac.ir
سروش کرد: دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، بخش ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران. biosoroush@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: تالاسمی اینترمدیا یک بیماری اتوزوم مغلوب بوده که از نظر بالینی طیفی بسیار گسترده از اختلالات وابسته به هموگلوبین را شامل می‌شود و از نظر شدت بیماری بین تالاسمی ماژور و مینور قرار می‌گیرد. سطح بالای هموگلوبین جنینی تاثیر عمده‌ای بر وخامت کلینیکی (بالینی) این بیماری دارد، به طوری‌که افزایش تولید HbF شدت بیماری را کاهش می‌دهد. عوامل مختلفی درون لوکوس بتا گلوبین می‌توانند در کاهش شدت علائم بالینی بیماران بتا تالاسمی اینترمدیا تاثیرگذار باشند. همچنین برخی پلی‌مورفیسم‌ها در ژن *BCL11A* می‌توانند سبب افزایش تولید هموگلوبین جنینی و تعدیل فنوتیپ بالینی این بیماران شوند. هدف مطالعه حاضر بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs11886868 با تالاسمی اینترمدیا است.

روش کار: مطالعه‌ی انجام شده از نوع گذشته‌نگر می‌باشد. در این مطالعه پلی‌مورفیسم شایع rs11886868 در اینترون ۲ ژن *BCL11A* با استفاده از روش Tetra-primer ARMS PCR در میان ۵۰ بیمار مبتلا به بتا تالاسمی اینترمدیا تعیین ژنوتیپ شد. میزان هموگلوبین جنینی و هموگلوبین کل، با مطالعه‌ی داده‌های حاصل از الکتروفورز برای هر بیمار مشخص گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SPSS16 انجام گرفت.

یافته‌ها: میانگین میزان هموگلوبین جنینی در بیماران ۳۲/۰۴g/dl±۷۵/۲ و میانگین میزان هموگلوبین کل در آنها ۱/۳۳g/dl±۸/۹ بود. افرادی که از نظر جایگاه پلی‌مورفیک هتروزیگوت (CT) بودند، میانگین هموگلوبین جنینی و هموگلوبین کل بالاتری نسبت به افراد فاقد این جایگاه داشتند، هرچند که این افزایش‌ها از لحاظ آماری معنادار نبودند (مقدار P به ترتیب ۰/۹۳ و ۰/۵۱).

نتیجه گیری: در این مطالعه ارتباطی بین الل بهبودی بخش C و افزایش بیان ژن گاما گلوبین و میزان هموگلوبین جنینی در بیماران مورد مطالعه مشاهده نشد. به علاوه مشاهده گردید که با حضور الل T در جایگاه پلی مورفیسم، مقدار HbF و Hb افزایش می‌یابد، هرچند این افزایش‌ها از لحاظ آماری معنادار نبودند.

کلید واژه‌ها: بتا تالاسمی اینترمدیا، پلی‌مورفیسم *BCL11A*، HbF، Tetra-primer ARMS PCR

مقدمه

اختلالات هموگلوبین (Hemoglobinopathies) رایج‌ترین دسته از ناهنجاری‌های وراثتی‌اند که اثر شدیدی بر مرگ و میر جهانی دارند (۱). با داشتن حدود ۷٪ جمعیت ناقل در جهان، هموگلوبینوپاتی‌ها شایع‌ترین بیماری‌های تک‌ژنی و از مشکلات عمده‌ی سلامت جهانی هستند (۲). تالاسمی‌ها شایع‌ترین هموگلوبینوپاتی‌های ارثی جهان‌اند (۳). تالاسمی بتا یکی از بیماری‌های اتوزوم مغلوب بوده که در سطح مولکولی بسیار ناهمگون است. بیش از ۲۰۰ جهش ایجاد کننده‌ی این بیماری تاکنون شناسایی شده است (۴ و ۵). تالاسمی‌های بتا توسط جهش‌های نقطه‌ای یا به صورت نادرتر توسط حذف‌هایی که در ژن بتا گلوبین بر روی کروموزوم ۱۱ صورت می‌گیرد، ایجاد می‌شوند که این امر منجر به کاهش سنتز ($beta^+$) یا غیاب ($beta^0$) زنجیره‌های بتا گلوبین می‌شود (۶). تالاسمی بتا در بیش از ۶۰ کشور جهان، از جمله در نواحیمدیترانه، آسیای مرکزی، هند، جنوب چین و خاورِ دور، کشورهای در امتداد سواحل شمال آفریقا و آمریکای جنوبی، خاورمیانه و به خصوص ایران که بر روی کمربند تالاسمی قرار گرفته، شایع‌تر است (۷). تالاسمی‌های بتا به طور کلی به سه دسته تقسیم می‌شوند: ۱) ماژور: افراد مبتلا به تالاسمی ماژور زنجیره‌ی بتا گلوبین را تولید نمی‌کنند، کم‌خونی شدید داشته و نیاز به انتقال خون منظم دارند (۸). جدا از فرم‌های غالب نادر، بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور برای ژنهای

β^{o} و β^{+}، هوموزیگوس یا هتروزیگوس مرکب هستند (۶). ۲) مینور: افراد مبتلا به این نوع تالاسمی با کاهش تولید زنجیره‌ی بتا مواجه‌اند (β^{+})، عمدتاً هتروزیگوس و معمولاً فاقد علائم کلینیکی‌اند (۸). ۳) اینترمدیا: این نوع از تالاسمی بتا به هوموزیگوس ملایم (Mild homozygous) یا هتروزیگوس مرکب (Mixed heterozygous) معروف است (۲). تالاسمی اینترمدیا (TI) از نظر شدت، حدواسط تالاسمی ماژور و مینور بوده و دارای تنوع بسیار بالایی از حالت ناقل بدون علامت تا نوع شدیداً وابسته به انتقال خون می‌باشد (۹). بیماران با وجود جهش‌های مشخص دارای علائم کلینیکی و شدت بروز متفاوتی می‌باشند (۶). بیماران مبتلا به TI معمولاً در اواخر کودکی یا حتی بزرگسالی جهت مراقبت‌های پزشکی معرفی می‌شوند. این بیماران کمخونی خفیف تا متوسطی نشان می‌دهند و سطح هموگلوبین خون‌شان بین ۷-۱۰g/dl است که عموماً بدون نیاز به درمان انتقال خون منظم قابل تحمل است (۱۰). به طور کلی دلایل ایجاد تالاسمی اینترمدیا را می‌توان به سه دسته تقسیم بندی نمود: ۱) الل‌های تالاسمی بتا؛ مهمترین عامل موثر بر ایجاد فنوتیپ بالینی تالاسمی اینترمدیا می‌باشد، مانند وجود الل‌های خفیف تالاسمی بتا. ۲) شاخص‌هایی که دارای اثر مستقیم بر روی زنجیره‌های اضافی آلفا هستند، مانند به ارث رسیدن ژن‌های غیرطبیعی آلفا یا گاما و یا پلی‌مورفیسم‌های خوشه‌ی ژنی بتا گلوبین، به ویژه پلی‌مورفیسم $^{G}\gamma XmnI$. ۳) عواملی که سبب افزایش و فعال‌شدن مجدد هموگلوبین جنینی (HbF) می‌شوند (۱۱) مانند الل مینور C متعلق به SNP rs11886868 در ژن *BCL11A* (۱۲).

خوشه‌ی ژنی بتا گلوبین انسان دارای ۵ ژن عملکردی است، (´۵-ε-Gγ-Aγ-δ-β-´۳) که در دوران تکوین به ترتیب بیان می‌شوند. از مهم‌ترین عوامل کنترل این خوشه‌ی ژنی، ناحیه کنترل لوکوس (LCR, Locus Control Region) است که در حدود ۶-۲۰kb بالادست ژن اپسیلون خوشه‌ی ژنی بتا قرار گرفته و دارای پنج جایگاه حساس به آنزیم DNaseI (HS1-5) می‌باشد. همچنین نواحی دیگر DNaseI تحت عنوان HS111 و HS1 که به ترتیب در بالادست و پائین‌دست خوشه‌ی ژنی بتا گلوبین قرار گرفته‌اند، در بیان ژنهای خوشه‌ی ژنی بتا گلوبین تاثیر دارند. بر اساس مطالعات انجام شده بر روی وضعیت کروموزومی خوشه‌ی ژنی بتا گلوبین در انسان و موش نشان داده شده که این نواحی در هم‌کنش با ناحیه HS5 در LCR و ژنهای خوشه‌ی ژنی بتا گلوبین، فرم فعال کروماتین را تشکیل داده و باعث بیان مناسب ژنهای خوشه‌ی ژنی بتا گلوبین در زمان و مکان مناسب می‌شوند (۱۳). سوئیچ از تولید هموگلوبین جنینی به هموگلوبین بالغ، عموماً در انتهای سال اول زندگیِ پس از تولد کامل می‌شود. این ترنسفورماسیون به دلیل بینش‌هایی که تعویض هموگلوبین می‌تواند در تنظیم بیان ژن پستانداران پیشنهاد کند، از نظر علمی جالب است. از منظر بالینی نیز فهم جزئیات این سوئیچ مهم است، چون سطوح بالای هموگلوبین جنینی (HbF) با یک دوره‌ی بالینی خفیف‌تر در بیماران تالاسمی بتا همراه است (۱۴). این سوئیچ توسط چندین عمل‌کننده‌ی سیس (Cis-acting) و تعداد زیادی فاکتور رونویسی که به عنوان کمپلکس‌های مالتی‌پروتئینی عمل می‌کنند، تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۱۵). درمان‌هایی که بیان γ-گلوبین خاموش‌شده را دوباره فعال کنند، می‌توانند از یک سری مشکلات ویرانگرِ همراه بیماری در بیماران تالاسمی بتا جلوگیری نمایند (۱۴). پس از دو سالگی، HbF بخش کوچکی از هموگلوبین کل (Hb) را تشکیل داده و فقط در درصد کمی از گلبول‌های بالغ در افراد سالم حضور دارد (۱۵). اکثر افراد بالغ نرمال معمولاً سطح HbF شان کمتر از ۶٪ درصد مجموع هموگلوبین است؛ هرچند ۱۰- ۱۵ درصد افراد سطوح بالاتری از آن را نشان می‌دهند (۴). افرادی که بیش از ۵ درصد افزایش سلول‌های F (اریتروسیت‌های حاوی HbF) را دارند، تحت عنوان پایداری وراثتی هموگلوبین جنینی مورد بررسی قرار می‌گیرند (۱). مطالعات پیوستگی ژنتیکی سه لوکوس عمده را که مسئول ۵۰- ۲۰ درصد گوناگونیِ شایع در سطوح HbF در بیماران

تالاسمی بتا و بالغ سالم می‌باشند، شناسایی کردند (۱۶). یکی از مهمترین آنها پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) در اینترون ۲ ژن *BCL11A* می‌باشد. *BCL11A* به عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی خاموشی بیان ژن گاما گلوبین عمل می‌کند. *BCL11A* در لوکوس بتا گلوبین در سلول‌های اریتروئیدی تکامل‌یافته ساکن می‌شود و با عناصر تنظیمی انتهایی با اتصال متمرکز در LCR (Hypersensitive site 3) و ناحیه بین ژنی، بین ژنهای Aγ-globin و δ-globin، برای پیکربندی مجدد خوشه‌ی بتا گلوبین همراه می‌شود (۱۵). محصول ژن *BCL11A* بر روی لوکوس p21601، یک فاکتور رونویسی Multi-zinc finger بوده که یک تنظیم‌کننده‌ی اختصاصی مرحله‌ی بیان HbF را کد می‌کند (۱۷). مطالعه‌های بسیاری در مورد پلی‌مورفیسم‌های مرتبط با ژن *BCL11A* که در تنظیم میزان سلول‌های F نقش دارند، در جمعیت‌های مختلف انجام شده است. برخی مطالعات نشان داده‌اند که یک پلی‌مورفیسم در اینترون ۲ این ژن (بر روی کروموزوم ۲) با بیان گاما گلوبین مرتبط است (۱۴). هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی و ارتباط پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی *BCL11A* با میزان بیان ژن گاما گلوبین و مقدار هموگلوبین F در افراد مبتلا به بیماری بتا تالاسمی اینترمدیا در جمعیت اصفهان می‌باشد.

روش کار

در مطالعه‌ی حاضر ۵۰ نمونه‌ی خونی از بیماران مراجعه کننده به بخش تالاسمی کلینیک فوق تخصصی امام رضا (ع) شهر اصفهان در بین سال های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ مورد آزمایش قرار گرفت. این افراد بر اساس تشخیص پزشک معالج و بر پایه معیارهایی مانند عدم نیاز یا نیاز پراکنده به تزریق خون و میانگین سطح هموگلوبین خون بین ۷-۱۰g/dl شناسایی و مورد بررسی قرار گرفتند. میزان HbF و Hb با مطالعه‌ی داده‌های حاصل از الکتروفورز (درج شده در پرونده‌ی هر بیمار) مشخص گردید. پس از اخذ رضایت‌نامه از بیماران و رعایت موارد اخلاقی، مقدار ۵ میلی‌لیتر نمونه‌ی خون از هر بیمار گرفته و به داخل لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA ریخته شد. DNA ژنومی نمونه‌های خون با استفاده از روش استاندارد نمکی میلر (۱۸) استخراج و پس از تعیین غلظت و برای انجام مراحل بعدی، در دمای ۲۰°C- نگهداری شد. برای طراحی آغازگرهای مورد نیاز برای انجام واکنش PCR، توالی نواحی مجاور SNP هدف با مراجعه به بانک اطلاعاتی dbSNP واقع در پایگاه اینترنتی http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP، استخراج و آغازگرهای مناسب با استفاده از نرم‌افزار طراحی گردید. تجزیه و تحلیل آغازگرها توسط نرم افزار Oligo 7 برای مواردی مثل تشکیل دوپلکس و سنجاق سر، Tm و سایر موارد انجام گرفت. همچنین آغازگرهای طراحی شده توسط سرویس BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) موجود در سایت NCBI، برای یافتن نواحی دارای همولوژی در ژنوم انسان ارزیابی شدند. SNP مورد نظر توسط پرایمرهای اختصاصی الل با توجه به آخرین نوکلئوتید در انتهای ´۳ پرایمر و مکمل محل SNP، با استفاده از روش Tetra-primer ARMS PCR تعیین ژنوتیپ شد. در این تکنیک به چهار پرایمر برای تکثیر ژنی یک قطعه‌ی بزرگ از DNA الگو حاوی SNP (قطعه‌ی کنترل) و ۲ قطعه‌ی کوچکتر نمایانگر هر یک از دو محصول الل‌ها نیاز است (جدول ۱). پرایمرها به نحوی طراحی شدند که قطعات تکثیر شده‌ی اللی در اندازه‌های متفاوت حاصل گردند و بتوانند توسط آگاروز ژل الکتروفورز متمایز شوند. برای افزایش اختصاصیت واکنش، علاوه بر اولین عدم جفت شدگی در انتهای ´۳ پرایمرهای اختصاصی داخلی، یک عدم جفت شدگی اضافی نیز عمداً در موقعیت سوم از انتهای ´۳ هر یک از دو پرایمر اختصاصی داخلی ایجاد شد (۱۹). برای تکثیر ویژه‌ی قطعات اطراف پلی‌مورفیسم مورد نظر، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۰۰ نانوگرم DNA، ۳ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۱/۵ میکرولیتر dNTP۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار، ۱/۵ پیکومول از پرایمرهای برگشت خارجی و رفت داخلی (OR و IF)، ۱

جدول ۱- توالی آغازگرهای طراحی شده به انضمام دمای واسرشت و اندازه‌ی محصول PCR در تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم rs11886868

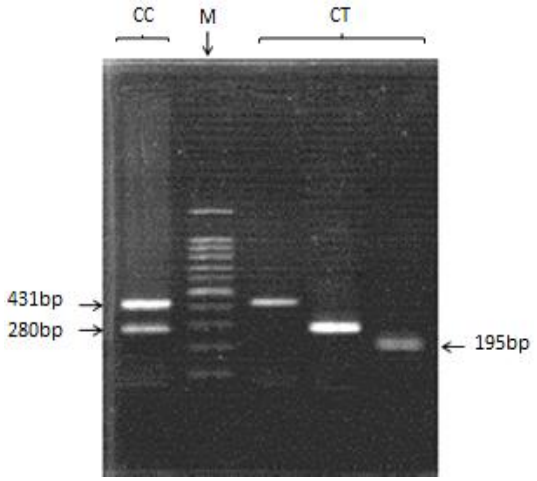
آغازگر	توالی نوکلئوتیدی (′۳ → ′۵)	Tm	اندازه محصول PCR
FO (آغازگر رفت الل G)	CAAAACCTTTTCTGTGTTCTCG	۵۶/۵	۲۸۰bp
RI (آغازگر برگشت الل G)	ATCGTCTTTTGTGTTTAATTTCGTC	۵۶/۵	
RO (آغازگر برگشت الل A)	ACGTCCACCAGTCTAGAAAG	۵۷/۳	۱۹۵bp
FI (آغازگر رفت الل A)	AGAATCATTCTGCTCTGGGA	۵۵/۳	

(باند کنترل مثبت شامل ۴۳۱ جفت باز و حاصل همکاری پرایمرهای FO و RO می‌باشد). محل ایجاد عدم جفت‌شدگی با زیرخط مشخص شده است.

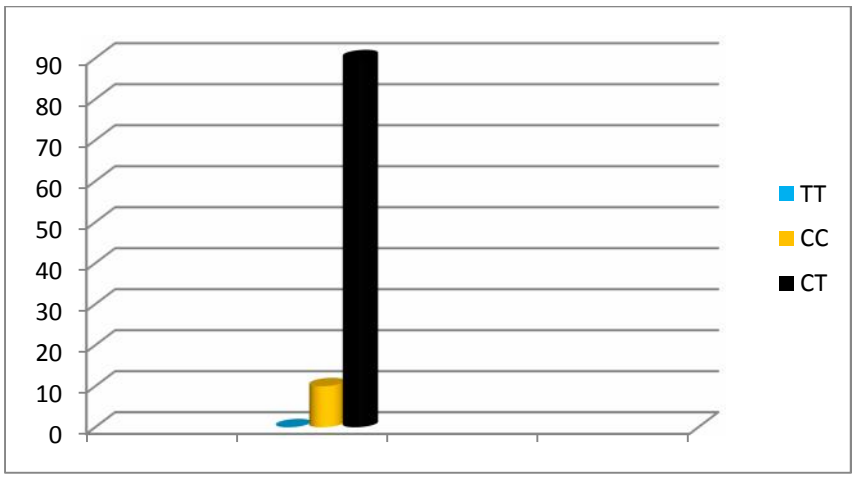
پیکومول از پرایمر برگشت داخلی (IR)، ۰/۵ پیکومول از پرایمر رفت خارجی (OF)، ۰/۴ میکرولیتر (۲ واحد) آنزیم DNA پلیمراز Taq (سیناژن) توسط دستگاه PCR (ترموسایکلر مدل اپندورف، آلمان) انجام شد. برنامه‌ی زمانی- دمایی بهینه برای PCR به صورت زیر بدست آمد: مرحله‌ی ذوب آغازین شامل ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۰ تکرار دمایی با دناتوراسیون در دمای ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۷°C برای اتصال آغازگرها، دمای تکثیر ۷۲°C به مدت ۵۵ ثانیه و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C جهت تکثیر نهایی انتخاب شد. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت، الکتروفورز شدند و در نهایت باندهای تفکیک شده توسط دستگاه UV Gel Documentation مشاهده و مورد آنالیز قرار گرفتند. در افراد هموزیگوت CC برای پلی‌مورفیسم *BCL11A*، همانطور که انتظار می‌رفت باندهایی با طول ۲۸۰bp و ۴۳۱bp مشاهده گردید. در افراد هموزیگوت TT، باندهایی به اندازه‌ی ۱۹۵bp و ۴۳۱bp مشاهده می‌گردد و در افراد هتروزیگوت CT، علاوه بر باند کنترل ۴۳۱bp، هر دو باند ۲۸۰bp و ۱۹۵bp قابل مشاهده است. پس از تعیین ژنوتیپ افراد بیمار، همراهی بین بیماری و ژنوتیپ با نسبت احتمال فزاینده (OR یا Odd Ratio) محاسبه گردید. به منظور بررسی اختلاف فراوانی توزیع ژنوتیپی موجود در گروه های مجزای مورد مطالعه، از آزمون کای دو استفاده شد. در تمامی محاسبات سطح احتمال $p< ۰/۰۵$ از نظر آماری معنا دار در نظر گرفته شد. برای آنالیز آماری نتایج از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد.

یافته‌ها

در مطالعه‌ی حاضر، پلی‌مورفیسم شایع rs11886868 در ژن *BCL11A* برای ارتباط با میزان بیان ژن گاما گلوبین و مقدار هموگلوبین F، در میان ۵۰ فرد مبتلا به بیماری بتا تالاسمی اینترمدیا با استفاده از روش Tetra-primer ARMS PCR تعیین ژنوتیپ شد (شکل ۱). بیماران شامل ۲۵ مرد (۵۰٪) و ۲۵ زن (۵۰٪) بودند. دامنه‌ی سنی بیماران از ۵ تا ۵۵ سال و با میانگین سنی ۱۲/۰۲±۲۶/۶ سال بود. ۲۲ بیمار در هنگام نمونه‌گیری مورد طحال برداری قرار گرفته بودند که ۱۴ نفر مذکر و ۸ نفر مونث بودند. سه بیمار اظهار داشتند که تاکنون خون دریافت نکرده‌اند. میانگین میزان HbF در افراد مذکر



شکل ۱- نمایش الکتروفورز محصولات Tetra-primer ARMS PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ برای پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs11886868 ژن *BCL11A* در ۲ بیمار بتا تالاسمی اینترمدیا. اولین ستون از سمت چپ یک فرد هموزیگوت CC (Mix PCR)، دومین ستون مارکر (M) ۱۰۰ جفت‌بازی و ستون‌های ۳، ۴ و ۵ یک فرد هتروزیگوت CT (PCR معمولی) را نشان می‌دهند. نمونه‌ها بطور تصادفی از بین نمونه‌های بیمار انتخاب شده‌اند



شکل ۲- نمایش درصد فراوانی ژنوتیپ پلی‌مورفیسم C/T ژن *BCL11A* در گروه بیماران بتا تالاسمی اینترمدیا

۷۲/۲±۳۲/۷۱g/dl و در افراد مونث ۸۶g/dl ۷۷/۸±۳۲/ و میانگین سطح هموگلوبین کل در افراد مذکر ۹/۰±۱/۴۰g/dl و در افراد مونث ۸/۷±۱/۲۶g/dl بود. پس از ژنوتایپینگ مشخص شد که از ۵۰ بیمار مورد مطالعه، ۴۵ نفر دارای ژنوتیپ هتروزیگوت CT و ۵ نفر دارای ژنوتیپ هوموزیگوت CC بودند. شکل ۲ نمودار درصد فراوانی این توزیع ژنوتیپی را نشان می‌دهد. فراوانی الل C در بیماران مورد مطالعه ٪۵۵ و فراوانی الل T، ٪۴۵ محاسبه گردید (جدول ۲).

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود توزیع ژنوتیپی پلی‌مورفیسم rs11886868 در گروه مردان و زنان بیمار تفاوت معناداری ندارد (p=./۶۳) که این موضوع نشان‌دهنده‌ی عدم ارتباط توزیع ژنوتیپی پلی‌مورفیسم با جنسیت در بیماران مبتلا به تالاسمی اینترمدیا می‌باشد.

میانگین درصد Hb و HbF برحسب پلی‌مورفیسم *BCL11A* محاسبه شد. افرادی که از نظر جایگاه پلی‌مورفیک هتروزیگوت (CT) بودند، میانگین Hb و HbF بالاتری نسبت به افراد فاقد این جایگاه داشتند، هر چند این افزایش‌ها از لحاظ آماری معنادار نبودند (جدول ۴، ارزش P بالاتر از ۰،۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

فراهم آوردن درمان مناسب برای بیماران بتا

جدول ۲- فراوانی ژنوتیپی و اللی پلی‌مورفیسم *BCL11A* در بیماران تالاسمی اینترمدیای مورد بررسی

پلی‌مورفیسم *BCL11A*	تعداد بیماران	درصد بیماران
CC	۵	٪۱۰
CT	۴۵	٪۹۰
TT	۰	ـــــ
اللها	فراوانی در افراد بیمار	
C	۵۵	
T	۴۵	

جدول ۳- فراوانی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم rs11886868 در مردان و زنان بیمار مبتلا به بتا تالاسمی اینترمدیا

ژنوتیپ‌ها	مردان بیمار		زنان بیمار		p	OR
	تعداد	درصد	تعداد	درصد		
CC	۳	۱۲	۲	۸		
CT	۲۲	۸۸	۲۳	۹۲	./۶۳	۱/۵۶
TT	۰	ـــــ	۰	ـــــ		
مجموع	۲۵		۲۵			

در محاسبات مربوط به OR ژنوتیپ CC مرجع در نظر گرفته شده است

جدول ۴- میانگین و انحراف معیار درصد Hb وHbF برحسب پلی‌مورفیسم *BCL11A*

متغیر	CT	CC	p
Hb(g/dl)	۸/۹±۱/۳۸	۸/۴±./۴۹	./۵۱
HbF(g/dl)	۷۵/۴±۳۰/۷۱	۷۳/۹±۴۸/۸۹	./۹۳

تالاسمی اینترمدیا به دلیل گوناگونی فنوتیپی و ناهمگونی ژنتیکی این بیماران هنوز یک چالش بزرگ بوده و بنابراین پیش‌بینی وخامت کلینیکی را از روی اطلاعات ژنوتیپی دشوار می‌کند. تالاسمی‌های بتا تنوع قابل توجهی را در شدت بیماری نشان می‌دهند و یکی از فاکتورهای بهبود بخش در این مورد، توانایی ذاتی تولید هموگلوبین جنینی است. با افزایش بیان هموگلوبین جنینی حاصل از بیان گاماگلوبین، می‌توان زنجیره‌های غیر متصل آلفا و عدم تعادل ایجاد شده را که منجر به رسوب هموگلوبین‌های غیرطبیعی و اریتروپویزیس (Erythropoiesis) غیر موثر می‌شود، خنثی نمود؛ بنابراین مقدار زیاد HbF، وخامت تالاسمی بتا را توسط افزایش سطح هموگلوبین و کاهش عدم تعادل زنجیره‌های α/β و سمیت متعاقبش کاهش می‌دهد. تعیین مارکرهایی برای افتراق بیماران تالاسمی اینترمدیا β^o همراه با افزایش هموگلوبین جنینی از بیماران تالاسمی ماژور در زمان تشخیص بسیار حائز اهمیت است؛ زیرا با انتخاب روش درمانی مناسب می‌توان از عوارض افزایش میزان آهن در نتیجه‌ی تزریق زودرس و مستمر خون در بیماران تالاسمی اینترمدیا و یا عوارض ناشی از عدم دریافت به موقع و مستمر خون در بیماران تالاسمی ماژور جلوگیری کرد (۱۳). در سالیان اخیر مشخص شده که متغیرهای خونی توسط ساختار ژنتیکی بیماران تحت تاثیر قرار می‌گیرند. مطالعه‌های همبستگی ژنتیکی چندین SNP را که با تنوع در بیان هموگلوبین جنینی در خارج از لوکوس بتا گلوبین مرتبط می‌باشند، شناسایی نموده که برای کاهش بروز شدت کلینیکی بیماری تالاسمی معنادار شناخته شده‌اند. از این موارد می‌توان به rs11886868 در ناحیه اینترونی ژن *BCL11A* اشاره کرد که در افزایش بیان هموگلوبین جنینی نقش دارد (۱). بررسی‌ها مشخص کردند که ژنوتیپی از *BCL11A* که با افزایش سطوح HbF در ارتباط می‌باشد، با کاهش بیان *BCL11A* همراه است (۱۶). مطالعات انجام گرفته بر روی ژن *BCL11A* گویای این است که پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (به خصوص rs11886868) در ناحیه‌ای ۱۴ کیلوبازی در اینترون ۲ این ژن، قویاً با سطوح HbF در ارتباط می‌باشند (۲۰). بر اساس مطالعاتی که تاکنون انجام شده، انتظار می‌رود که میان الل C پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs11886868 و افزایش HbF در بیماران تالاسمی اینترمدیا ارتباط وجود داشته باشد. الل مینور C این SNP به طور مشخص در افراد ساردینین با سطوح HbF افزایش یافته در ارتباط بود. همچنین الل C واریانت *BCL11A* به موجب افزایش سطوح HbF در بیماران کمخونی داسی شکل نیز گزارش شده است (۹). در مطالعه‌ی یودا و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش گردید که rs11886868 در جمعیت ساردینین مبتلا به تالاسمی با افزایش HbF ($P<10^{-35}$) در ارتباط می‌باشد (۲۱). همچنین در بررسی‌های تین و همکاران و همینطور لتره و همکاران، پلی‌مورفیسم rs11886868 در ارتباط معناداری با کاهش بروز شدت کلینیکی بیماری تالاسمی از طریق افزایش HbF گزارش گردید (۱)؛ اما در مطالعه‌ی نیشابوری و همکاران که در سال ۲۰۱۳ بر روی ۱۰۰ بیمار مبتلا به تالاسمی در ایران صورت گرفت، فراوانی الل بهبودی‌بخش C برای پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs11886868 C/T) ژن *BCL11A*، مشخصاً در بیماران با فنوتیپ ملایم‌تر یا در افراد نرمال با سطوح HbF بالا مرتبط نبود. فراوانی الل C برای پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs11886868 ژن *BCL11A* در بیماران تالاسمی مورد مطالعه‌ی آنها ٪۵۵/۵ و فراوانی الل T٪۴۵/۵ بود (۲۲). در مطالعات Sankaran و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص شد

که ناک‌دان *BCL11A* توسط si-RNA و sh-RNA سبب القای زیاد mRNA گلوبین جنینی می‌شود (۱۸). در بیماران تالاسمی اینترمدیا اروپایی نیز نشان داده شد که این پلی مورفیسم با افزایش سطح HbF در ارتباط است (۲۳)؛ اما در مطالعه‌ی هاشمی گرجی و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی ۵۰ بیمار تالاسمی ماژور در ایران، ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم مذکور و افزایش هموگلوبین جنینی مشاهده نشد (۱). این نتایج متفاوت در مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از تاثیر متقابل چندین فاکتور ژنتیکی و غیر ژنتیکی بر روی سنتز زنجیره‌ی گاما گلوبین و میزان HbF باشد. در مطالعه‌ی Galanello و همکاران در سال ۲۰۰۹، گزارش شد که *BCL11A* در تنظیم HbF نقش داشته و الل C پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی در اینترون ۲ این ژن به طور انتخابی در بیماران تالاسمی اینترمدیا بروز و به طور چشمگیری با افزایش تولید هموگلوبین جنینی همراه است ($p=۲/۰۵ \times ۱۰^{-۵}$) (۱۲). در مطالعه‌ی حاضر فراوانی الل C در بیماران مورد مطالعه ٪۵۵ بود و بین این الل در جایگاه پلی مورفیسم *BCL11A* و افزایش HbF ارتباط معناداری مشاهده نشد. چنین نتیجه‌ای می‌تواند به دلیل تفاوت در زمینه‌ی ژنتیک جمعیت ایران با سایر جمعیت‌ها در مطالعات باشد. یکی دیگر از دلایل می تواند عدم وجود نتایج الکتروفورز HbF قبل یا بعد از درمان در کلیه‌ی بیماران و در نتیجه امکان محاسبه‌ی این متغیر در تعداد اندکی از بیماران باشد.

این مطالعه برای اولین بار در ایران، ارتباط پلی‌مورفیسمِ ژن *BCL11A* را با افزایش هموگلوبین جنینی و هموگلوبین کل در بیماران بتا تالاسمی اینترمدیا مورد بررسی قرار داده است. در این مطالعه افزایش هموگلوبین جنینی و هموگلوبین کل در افرادی که دارای الل T در جایگاه پلی‌مورفیسم بودند، بیشتر از افرادی که دارای الل C بودند مشاهده شد هر چند این افزایش از نظر آماری معنادار نبود. شناخت عواملی که موجب فعالیت مجدد هموگلوبین جنینی می‌شوند، مهم بوده و از آن می‌توان به عنوان یک استراتژی درمانی برای بیماری تالاسمی بتا استفاده نمود. پیشنهاد می‌گردد جهت کاهش خطای نمونه‌گیری و افزایش اعتبار آماری نتایج، ارتباط این پلی‌مورفیسم با بتا تالاسمی اینترمدیا در جمعیتی بزرگتر شامل نمونه هایی از تمام مردم ایران بررسی شود. همچنین سایر پلی مورفیسم‌های دخیل در تعدیل فنوتیپ بیماری نیز بررسی گردند.

تقدیر و تشکر

از معاونت‌های پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به خاطر کمک‌های مالی و تجهیزات و همچنین از همکاری پرسنل محترم بخش تالاسمی کلینیک فوق تخصصی امام رضا (ع) اصفهان برای جمع آوری نمونه‌ها و فراهم کردن اطلاعات پزشکی صمیمانه تشکر می‌شود.

منابع

1. Hashemi Gorji F, Hamid M, Arab A, Amirian A, Zeinali S, Karimipoor M. Relationship between DNA polymorphisms at the *BCL11A* and *HBS1L-MYB* loci in β-Thalassemia patients with increased fetal hemoglobin levels. Sci J IranBlood Transfus Organ. 2011;8(3):149-157.
2. Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. Dtsch Arztebl Int. 2011; 108(31–32): 532–40.
3. Kutlar F. Diagnostic approach to hemoglobinopathies. Hemoglobin. 2007; 31: 243-250.
4. Cao A, Moi P, Galanello R. Recent advances in β-thalassemias. Pediatric Reports. 2011; 3(2): e17.
5. Rahim F, Abromand M. Spectrum of β-Thalassemia mutations in various Ethnic Regions of Iran. Pak. J. Me. Sc. 2008; 24: 410-415.
6. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. Orphanet Journal of Rare Diseases 2010;5:11.
7. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited hemoglobin disorders: an increasing global health problem. Bull World Health Organ. 2001; 79(8): 704-12.
8. Tadmouri GO, Basak AN. β-Thalassemia in Turkey: a review of the clinical, epidemiological, molecular, and evolutionary aspects. Hemoglobin. 2001; 25: 227-239.
9. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. Genetics in Medicine. 2010; 12(2): 61-76.
10. Musallam, KM, Taher AT, Rachmilewitz EA. β-thalassemia intermedia: A clinical perspective. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012; 2: a013482.

11. Rajabi A, Arab A, Karimipoor M, Kaviani S, ArjmandiKh, Zeinali S. Analysis of β globin gene mutations and *GγXmnI* polymorphism in thalassemia intermedia patients referred to Ali-Asghar Hospital, Tehran. Sci J IranBlood Transfus Org. 2011; 8(1): 20-31.

12. Galanello R, Sanna S, Perseu L, Carla Sollaino M, Satta S, Eliana Lai M, et al. Amelioration of Sardinian beta-zero thalassemia by genetic modifiers. Blood 2009; 114(18):3935-7.

13. Hamid M, Karimipoor M, Zeinali S, Akbari M, Kokabi L, Mahjoubi F. Molecular analysis of HS-111 and 3′HS1 variations in β-thalassemia intermedia patients with high levels of HbF. Yakhteh Medical Journal. 2010; 11(4 (44)): 418-423.

14. Steensma DP. BCL11A: Master Switch for Fetal Hemoglobin Regulation. Amer. Soc. of Hem. 2010.

15. Wliber A, Nienhuis AW, Persons DA. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. Blood. 2011; 117(15):3945-53.

16. Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner Ch. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. Human Molecular Genetics. 2009; 18: 216-223.

17. Miller SA, Dybes DD, Polesky HF. A single salting out procedure extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1998; 16: 1215-25.

18. Sankaran VG, Menne TF, Xu J, Akie TE, Lettre G, Van Handel B, et al. Human Fetal Hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. SCIENCE. 2008; 322(5909): 1839-1842.

19. You FM, Huo N, Gu YQ, Luo MCh, Ma Y, Hane D, et al. BatchPrimer3: A high throughput web application for PCR andsequencing primer design. Bio Med Central. 2008;9:253.

20. Jawaid K, Wahlberg K, Thein SL, Best S. Binding patterns of BCL11A in the globin and GATA1 loci and characterization of the BCL11A fetal hemoglobin locus. Blood Cells, Molecules, and Diseases. 2010; 45: 140-146.

21. Uda M, Galanello R, Sanna S, Lettre G, Sankaran VG, Chen W, et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105(5): 1620-5.

22. Neishabury M, Zamani F, Keyhani E, Azarkeivan A, Abedini SS, Eslami MS, et al. The influence of the BCL11A polymorphism on the phenotype of patients with beta thalassemia could be affected by the beta globin locus control region and/or the Xmn1-HBG2 genotypic background. Blood Cells, Molecules and Diseases. 2013; 51(2):80-4.

23. Chen W, Zhang X, Shang X, Cai R, Li L, Zhou T, Sun M, Xiong F, Xu X, et al. The molecular basis of beta-thalassemia intermedia in southern China: genotypic heterogeneity and phenotypic diversity. Bio Med Central. 2010; 11: 31.

Study of association between BCL11A gene polymorphism and amount of gamma globin gene expression and hemoglobin F level in patients with beta thalassemia intermedia disease in Isfahan population

***Majid Motovali-bashi**, PhD, Associate Professor of Molecular Genetics, Genetics division, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran (* Corresponding author). mbashi@sci.ui.ac.ir
Soroush Kord, MSc. in molecular Genetics, Genetics division, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran. biosoroush@yahoo.com

Abstract

Background: A Thalassemia intermedium is an autosomal recessive disease that from clinical and also genotypic view contains a very heterogeneous group of hemoglobinopathies and severity of disease is placed between thalassemia major and minor. High levels of fetal hemoglobin have a major impact on the severity of this disease, so that increased production of HbF, reduces these verities of disease. Many factors both within and outside of the beta-globin locus, including some polymorphisms in BCL11A gene, can increase the production of fetal hemoglobin and modify the clinical symptoms of beta-thalassemia intermedia patients.

Methods: This research is a retrospective study. In this study, common polymorphism rs11886868 in intron 2 of BCL11A gene using Tetra-primer ARMS PCR method was genotyped among 50 patients with beta thalassemia intermedia disease. The values of fetal and total hemoglobin were determined by study of electrophoresis data for each patient. Data were analyzed using independent-samples t test, paired-samples t-test and Chi-square statistical method through SPSS v.16.

Results: Genotyping study of BCL11A polymorphism showed that a total of 45 patients were heterozygous (CT) and 5 were homozygous (CC) in polymorphic site. Average levels of fetal and total hemoglobin in patients were 75.2±32.04g/dl and 8.9±1.33g/dl, respectively. People who were heterozygote (CT) in polymorphic site, had a higher average of fetal and total hemoglobin in comparison with patients without this status, however, this increase was not statistically significant (p-values were 0.93 and 0.51, respectively).

Conclusion: Our data showed that in the presence of T allele in polymorphic site, the values of HbF and Hb would be increased. However, that increase was not statistically significant.

Keywords: Beta thalassemia intermedia, BCL11A polymorphism, HbF, Tetra-primer ARMS PCR