

# Investigation of BamHI and AvaII polymorphisms at beta globin cluster gene and its association with beta thalassemia disease in Esfahan population

Majid Motovali-Bashi\*, Zahra Sajadpoor, Samaneh Hajihouseini

Genetic Division, Biology Department, Faculty of Sciences, University of Esfahan

(Received 6 Dec, 2014 Accepted 14 Apr, 2015)

## Abstract

**Background:** Beta thalassemia is one of the autosomal recessive diseases that related to synthesis disorder of beta globin chain. It is caused by any of the more than 200 mutations in the  $\beta$ -globin gene. DNA sequencing and genotyping of numerous mutations at beta globin gene is timely and expensive. Therefore, the best method for screening is linkage using polymorph markers at beta globin region and it is usually applied at carrier screening and pre-diagnosis. Aim of the present study is frequency determination of *AvaII* marker at second Intron and *BamHI* marker at 3' region of *beta globin* gene and its association with beta thalassemia disease in Esfahan population.

**Materials and methods:** In the present study, 150 beta-thalassemia patients including 50 individuals without disease as a control group were investigated. After genomic DNA extraction from blood cells, polymorphism genotype of *AvaII* and *BamHI* were determined using RFLP-PCR technique. Obtained results were statistically analyzed using Power Marker software package and SISA.

**Results:** G allele frequency of *AvaII* polymorphism was observed 65.32% at patient groups and 70.59% at control groups; this difference was not statistically significant ( $p=0.29$ ). Genotype distribution of this polymorphism was not statistically significant ( $p=0.1$ ). T allele frequency of *BamHI* polymorphism was observed 40.57% at patient groups and 35.63% at control groups, but this difference was not statistically significant ( $p=0.40$ ). Genotype frequency of this polymorphism was not statistically significant ( $p=0.6$ ). Linkage disequilibrium results between two markers showed  $D'$  ( $p=0.064$ ). The best state for two markers ++ and its frequency is 54.33% at control groups and 42.33% at patient groups.

**Conclusion:** No statistically association between *AvaII* in second Intron and *BamHI* at 3' region of beta globin with beta thalassemia disease is expressed that mutant alleles could not to be a risk factor for the disease. However, simultaneous investigation of two markers could be useful.

**Keywords:** Beta thalassemia, *AvaII* polymorphism, *BamHI* polymorphism, RFLP-PCR.

## بررسی پلی مورفیسم‌های *BamHI* و *AvaII* در خوشه ژنی بتا گلوبین و ارتباط آن با بیماری تالاسمی بتا در جمعیت اصفهان

دکتر مجید متولی باشی\*، زهرا سجادیپور، دکتر سمانه حاجی حسینی

بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

### چکیده

**سابقه و هدف:** بتا تالاسمی یکی از بیماری‌های اتوزومی مغلوب با اختلال در سنتز زنجیره‌های بتا هموگلوبین است و به علت بیش از ۲۰۰ جهش مختلف در ژن بتا گلوبین ایجاد می‌گردد. هدف این مطالعه تعیین فراوانی مارکرهای *AvaII* در اینترون دوم ژن بتا گلوبین و *BamHI* در ۳ ژن بتا گلوبین و ارتباط آن با بیماری تالاسمی بتا در جمعیت استان اصفهان بود.

**روش بررسی:** در این پژوهش، نمونه خون ۱۵۰ فرد مبتلا به تالاسمی بتا و ۵۰ فرد سالم جمع‌آوری و بررسی شد. پس از استخراج DNA ژنومی از خون محیطی، ژنوتیپ‌های حاصل از پلی مورفیسم‌های *AvaII* و *BamHI* با روش RFLP-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله با نرم افزار Power Marker و سرور اینترنتی SISA از نظر آماری بررسی شدند.

**یافته‌ها:** فراوانی آلل G پلی مورفیسم *AvaII* در افراد بیمار ۶۵/۳۲٪ و در افراد سالم ۷۰/۵۹٪ مشاهده شد این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $P=0/29$ ). بررسی چگونگی توزیع ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی مورفیسم از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $P=0/1$ ). فراوانی آلل موتانت T پلی مورفیسم *BamHI* در افراد بیمار ۴۰/۵۷٪ و در افراد سالم ۳۵/۶۳٪ مشاهده شد ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $P=0/4$ ). فراوانی ژنوتیپ‌های این پلی مورفیسم از نظر آماری قابل توجه نبود ( $P=0/6$ ). نتایج پیوستگی نامتعادل بین دو مارکر نشان داد که  $D'$  بین مارکرهای *BamHI* و *AvaII* است ( $P=0/64$ ). رایج‌ترین حالت برای دو مارکر ++ با فراوانی ۵۴/۳۳٪ در افراد سالم و ۴۲/۳۳٪ در افراد بیمار مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** عدم وجود ارتباط معنی‌دار بین پلی مورفیسم‌های *AvaII* و *BamHI* و بیماری تالاسمی بتا بیان می‌کند که آلل‌های موتانت در دو پلی مورفیسم هر کدام به تنهایی نمی‌توانند به عنوان فاکتورهای خطر ژنتیکی در ابتلاء به این بیماری نقش داشته باشند. بررسی این دو مارکر به صورت همزمان می‌تواند اطلاعات مفیدی نسبت به بررسی تک تک مارکرها در اختیار قرار دهد.

**واژگان کلیدی:** تالاسمی بتا، پلی مورفیسم *AvaII*، پلی مورفیسم *BamHI*، RFLP-PCR

### مقدمه

تالاسمی نوعی کم خونی ارثی و ژنتیکی است که به علت اختلال در ساخت زنجیره‌های پروتئینی هموگلوبین به وجود می‌آید (۱). تالاسمی اشکال مختلفی مثل تالاسمی  $\alpha$ ،  $\beta$  و  $\delta\beta$  دارد. عدم توازن در تولید زنجیره گلوبین منجر به تجمع

زنجیره‌های آزاد گلوبین در پیش‌سازهای سلول خونی می‌شود. زنجیره‌های مذکور غیرقابل حل بوده و ته‌نشین شدن آن‌ها به همولیز سلول‌های خونی یعنی کم‌خونی همولیتیک منجر می‌شود (۲). بیماران تالاسمی حدود ۵ درصد از جمعیت جهان را به خود اختصاص می‌دهند. ایران کشوری است که فراوانی ژن بتا تالاسمی در آن بالا بوده و به طور قابل ملاحظه‌ای از ناحیه‌ای به ناحیه دیگر این فراوانی متفاوت است. در شهر اصفهان که در اطراف زاینده رود ساخته شده، فراوانی آن به حدود ۸ درصد افزایش می‌یابد

آدرس نویسنده مسئول: اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، بخش ژنتیک،

دکتر مجید متولی باشی (e-mail: mbashi@sci.ui.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۹/۱۵

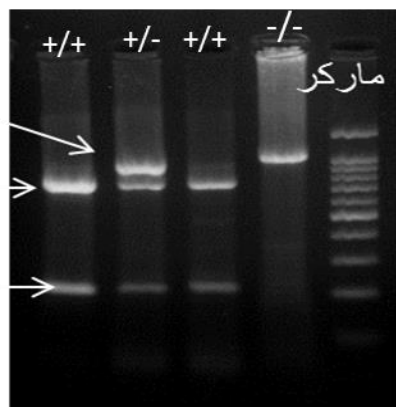
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱/۲۵

شناسایی شده است. اکثر این جایگاه‌ها در جمعیت ایرانی از پلی مورفیسیم کمی برخوردارند و هم از ژن بتا گلوبین فاصله دارند (۷). به علت وجود یک نقطه داغ نوترکیبی در نزدیکی انتهای ۵' ژن بتا گلوبین احتمال نوترکیبی و اشتباه در تشخیص آلل جهش یافته با بررسی پیوستگی ژنی وجود دارد (۸). بنابراین احتمال خطا با استفاده از پلی مورفیسیم‌های داخل ژن بتا گلوبین کمتر خواهد بود. در مطالعه آیت اللهی و همکاران در سال ۲۰۰۱ در جمعیت شیراز بر روی افراد مبتلا به آنمی داسی شکل، ارتباط معناداری بین پلی مورفیسیم و بیماری مشاهده شد (۹). در ایران و جهان مطالعات صورت گرفته بر روی مارکرهای AvaII در اینترون دوم ژن بتا گلوبین و BamHI در ناحیه ۳' ژن بتا گلوبین به صورت هاپلوتیپ (همراه پنج مارکر دیگر) بررسی شده و در این بررسی‌های هاپلوتیپی، پیوستگی بالای این دو مارکر به ژن بتا گلوبین و جهش‌های این ژن تأیید شده است (۱۰-۱۲). تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با بررسی تنوع ژنتیکی این دو مارکر و ارتباط آن با بیماری تالاسمی بتا انجام نگرفته است. بنابراین مطالعه حاضر به بررسی ویژگی‌های مارکرهای مذکور در جمعیت اصفهان پرداخت.

### مواد و روشها

در مطالعه حاضر، ۱۵۰ فرد مبتلا به تالاسمی بتا و ۵۰ فرد سالم بررسی شدند. ۱۰ میلی لیتر خون محیطی افراد مورد مطالعه در لوله حاوی یک میلی لیتر EDTA ریخته شد و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگه داری شد. استخراج DNA از خون محیطی با استفاده از روش رسوب دهی نمکی صورت گرفت (۱۳). ارزیابی کمی میزان DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. ناحیه ژنی مورد نظر توسط پرایمرهای طراحی شده توسط یانگ و همکاران تکثیر گردید (۱۴). در نهایت، واکنش PCR بهینه شده در حجم ۲۵ میکرولیتر طبق جدول ۱ انجام گرفت. برای اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ لود شد. در مرحله بعد قطعه تکثیر یافته مارکر AvaII به طول ۹۶۳ جفت باز تحت هضم آنزیمی توسط آنزیم AvaII (با توجه به دستور العمل پروتکل آنزیم) قرار گرفت. سپس با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز دو درصد در ولتاژ ۷۰ ولت به مدت نیم ساعت ژنوتیپ محصولات هضم شده تشخیص داده شد. در صورتی که مکان پلی مورفیسیم واجد نوکلئوتید G باشد، توسط این آنزیم برش خواهد خورد

(۳). عوارض بالینی و مشکلات روحی و روانی که در بسیاری از افراد مبتلا به تالاسمی وجود دارد و هزینه‌های انجام گرفته برای درمان این بیماران و همچنین بالا بودن فراوانی ژن بتا تالاسمی در شهر اصفهان، اهمیت انجام بررسی‌ها و مطالعات را پررنگ‌تر می‌کند. استفاده از مارکرهای ژنتیکی در مواردی که جهش شناسایی نشده است، می‌تواند راه‌گشا باشد. تعیین توالی و شناسایی مستقیم جهش‌ها با توجه به شمار زیاد جهش‌های شناخته شده در ژن بتا گلوبین و احتمال وجود جهش‌های جدید در این ژن یک فرایند پر هزینه و زمان‌بر خواهد بود. روش جایگزین بر اساس بررسی پیوستگی با استفاده از مارکرهای چندشکلی پیوسته به ناحیه ژنی بتا گلوبین معمولاً در شناسایی حاملان و تشخیص پیش از تولد استفاده می‌شوند. بیش از ۹۵ درصد کل جهش‌های بتا تالاسمی در جهان از نوع جهش‌های نقطه‌ای در ژن بتا گلوبین و درصد کمی نیز از نوع حذف ژنی می‌باشند. جهش‌های نقطه‌ای شامل جابه‌جایی تک نوکلئوتیدی، حذف یا نفوذ یک یا چند باز می‌باشند. تاکنون بیش از ۲۰۰ نوع جهش موثر بر ژن بتا گلوبین شناسایی شده که موجب بروز فنوتیپ بتا تالاسمی می‌شوند (۱). هر یک از این جهش‌ها می‌توانند موجب توقف کامل ( $\beta 0$ ) و یا کاهش ( $\beta +$ ) سنتز زنجیره بتا گلوبین در فرد بیمار گردند. در حال حاضر میلیون‌ها SNP در سرتاسر ژنوم انسان شناسایی شده است و تخمین زده می‌شود که فراوانی آن‌ها یک در هر هزار جفت باز باشد. اما نتایج حاصل از بررسی‌های نواحی کوتاه ژنومی نشان می‌دهد که فراوانی آن‌ها ممکن است به یک در هر ۲۰۰ جفت باز نزدیک باشد (۴). اگرچه SNPها در سرتاسر ژنوم پراکنده‌اند، با این حال تصور می‌شود که شمار آن‌ها در نواحی غیر کدکننده بیشتر باشد. فراوانی بالای SNPها در نواحی غیر کدکننده و همچنین پیوستگی شدید آن‌ها با لوکوس‌های بیماری‌زا، SNPها را به عنوان مارکرهای ژنتیکی با ارزش برای شناسایی آلل‌های جهش یافته ژن‌ها از طریق بررسی‌های پیوستگی مطرح ساخته است. SNPها علاوه بر فراوانی بالا و پیوستگی شدید، دارای مزایای دیگری نیز هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به پایداری و همچنین قابل استفاده بودن در تحقیقات جامع اشاره کرد (۵). چند شکلی در طول قطعات محدود کننده (RFLP) در اثر تغییرات کوچک که معمولاً جانشینی نوکلئوتیدی است ایجاد می‌شود. این تغییرات کوچک باعث ایجاد یا حذف جایگاه شکست آنزیم اندونوکلاز محدودکننده در توالی ژن می‌شود (۶). بیش از ۲۰ مارکر RFLP در خوشه‌ی ژنی بتا گلوبین



شکل ۱. هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم *AvaII*. الکتروفورز محصول هضم مارکر *AvaII* بر روی ژل آگارز ۲٪ به مدت نیم ساعت در ولتاژ ۷۰ انجام شده است. علامت + نشان دهنده وجود جایگاه برش و علامت - نشان دهنده عدم وجود جایگاه برش است. افراد هموزیگوت -/- یک باند ۹۶۳ جفت بازی، افراد هموزیگوت +/+ دو باند ۷۷۲ و ۱۹۱ جفت بازی و افراد هتروزیگوت +/- باندهای ۹۶۳، ۷۷۲ و ۱۹۱ جفت بازی را نشان می‌دهند.

بررسی پلی مورفیسم *BamHI* با استفاده از جفت پرایمرهای طراحی شده توسط یانگ و همکاران انجام گرفت (۱۴). پس از تکثیر ناحیه پلی مورفیسم قطعه‌ای به طول حدود ۱۵۲۰ جفت باز به دست آمد که تحت تاثیر هضم آنزیمی با *BamHI* (مطابق دستورالعمل پروتکل آنزیم انجام گرفت) و انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز دو درصد در ولتاژ ۷۰ ولت به مدت نیم ساعت ژنوتیپ محصولات هضم شده تشخیص داده شد. در صورتی که مکان پلی مورفیسم واجد نوکلئوتید موتانت T باشد توسط آنزیم برش نخواهد خورد (-)، اما اگر در این ناحیه نوکلئوتید G مستقر باشد آنزیم آنرا خواهد برید (+). یعنی با حضور این پلی مورفیسم مکان برش از بین می‌رود. افراد هموزیگوت -/- یک باند ۱۵۲۰ جفت بازی، افراد هموزیگوت +/+ دو باند ۱۲۲۸ و ۲۹۲ جفت بازی و افراد هتروزیگوت +/- باندهای ۱۵۲۰، ۱۲۲۸ و ۲۹۲ جفت بازی را نشان دادند. در شکل ۲ نمونه‌ای از این هضم آنزیمی مشاهده می‌شود.

در نهایت فراوانی آلی و ژنوتیپی مارکرهای ذکر شده توسط نرم افزار Power Marker به دست آمد. سپس اطلاعات آماری با سرور اینترنتی SISA انجام شد. پس از به دست آوردن فراوانی آلی و ژنوتیپی، ارتباط این پلی مورفیسم‌ها با بیماری تالاسمی بتا به کمک آزمون  $2\chi$  و Odd ratio محاسبه شد. سطح معنی دار کوچکتر از ۰/۰۵ ( $P \leq 0.05$ ) از لحاظ آماری مقبول فرض شد.

(+)، اما اگر در این ناحیه نوکلئوتید C مستقر باشد برش صورت نخواهد گرفت (-). افراد هموزیگوت -/- یک باند ۹۶۳ جفت بازی، افراد هموزیگوت +/+ دو باند ۷۷۲ و ۱۹۱ جفت بازی و افراد هتروزیگوت +/- باندهای ۷۷۲، ۹۶۳ و ۱۹۱ جفت بازی را نشان می‌دهند (شکل ۱).

جدول ۱. مواد و مقدار مورد نیاز برای انجام PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برای مارکرهای *BamHI* و *AvaII*

| ماده                        | غلظت      | حجم مورد استفاده در PCR |
|-----------------------------|-----------|-------------------------|
| PCR Buffer                  | ۱۰X       | ۲/۵μl                   |
| MgCl <sub>2</sub>           | ۵۰mM      | ۱/۵μl                   |
| dNTP mix                    | ۱۰mM      | ۰/۵μl                   |
| Primer F                    | ۱۰pmol/μl | ۱μl                     |
| Primer R                    | ۱۰pmol/μl | ۱μl                     |
| Taq DNA Polymerase          | ۵u/μl     | ۰/۲۵μl                  |
| Genomic DNA                 | ۰/۶nM     | ۲μl                     |
| Deionised dH <sub>2</sub> O | ...       | تا ۲۵μl                 |

تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر (مدل Ependorf آلمان) طبق جدول ۲ و ۳ انجام گرفت.

جدول ۲. برنامه بهینه شده PCR برای مارکر *AvaII*

| سیکل | زمان  | دما (°C) | Stage                |
|------|-------|----------|----------------------|
| ۳۰   | ۳Min  | ۹۵       | Primary Denaturation |
|      | ۴۵Sec | ۹۵       | Denaturation         |
|      | ۶۰Sec | ۶۵       | Annealing            |
|      | ۶۰Sec | ۷۲       | Extension            |
|      | ۱۰Min | ۷۲       | Final Extension      |

جدول ۳. برنامه بهینه شده PCR برای مارکر *BamHI*

| سیکل | زمان  | دما (°C) | Stage                |
|------|-------|----------|----------------------|
| ۳۰   | ۳Min  | ۹۵       | Primary Denaturation |
|      | ۴۵sec | ۹۵       | Denaturation         |
|      | ۶۰Sec | ۵۹       | Annealing            |
|      | ۶۰Sec | ۷۲       | Extension            |
|      | ۱۰Min | ۷۲       | Final Extension      |

همان طور که در جدول ۵ مشاهده شود، فراوانی آلل موتانت T مارکر BamHI در افراد بیمار ۴۰/۶ درصد و در افراد سالم ۳۵/۶ درصد و فراوانی آلل G در افراد بیمار ۵۹/۴ درصد و در افراد سالم ۶۴/۴ درصد بود، ولی این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود ( $P=0/4$ ). توزیع ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی مورفیسم نشان داد که ژنوتیپ‌های هموزیگوت موتانت TT و هتروزیگوت TG در بیماران مبتلا به تالاسمی بتا در ۵۹/۸ درصد و در افراد سالم ۶۳/۸ درصد بود و این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود ( $P=0/6$ ). ژنوتیپ هتروزیگوت TG با فراوانی ۴۳/۴ درصد در افراد بیمار و با فراوانی ۵۱/۱ درصد در افراد سالم مشاهده شد ( $P=0/6$ ).

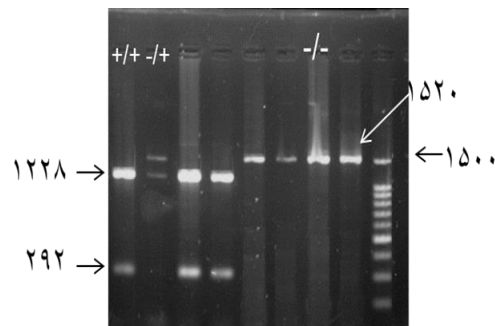
**جدول ۵.** توزیع افراد مورد بررسی بر ابتلا به تالاسمی بتا و به

تفکیک مارکرهای موتانت T مارکر BaamHI

| BaamHI    | بیماران    | سالم        | P   | OR   |
|-----------|------------|-------------|-----|------|
| ژنوتیپ    |            |             |     |      |
| T/G + T/T | ۹۰ (۵۹/۸)* | ۳۲ (۶۳/۸) * | ۰/۶ | ۰/۸۴ |
| G/G       | ۶۰ (۴۰/۲)  | ۱۸ (۳۶/۲)   |     |      |
| آلل       |            |             |     |      |
| T         | ۱۲۲ (۴۰/۶) | ۳۶ (۳۵/۶)   | ۰/۴ | ۱/۲۱ |
| G         | ۱۷۸ (۵۹/۴) | ۶۴ (۶۴/۴)   |     |      |

\* تعداد (درصد)

پس از تعیین ژنوتیپ مارکرهای چندشکلی در جمعیت مورد مطالعه پیوستگی نامتعادل بین مارکرها با استفاده از نرم‌افزار Power Marker مورد ارزیابی قرار گرفت. این نرم‌افزار بر اساس معیار اندازه‌گیری  $D'$  به بررسی پیوستگی نامتعادل بین مارکرها می‌پردازد. این معیار رایج‌ترین معیار اندازه‌گیری LD (Linkage Disequilibrium) می‌باشد، به علت حضور آلل‌های موتانت در نمونه مورد بررسی این احتمال می‌رفت که این آلل‌ها به طور کاذب باعث بالا رفتن میزان LD تعیین شده بین مارکرها شود. برای رفع این مشکل  $D'$  و P برای کروموزوم‌های ۵۰ فرد سالم محاسبه گردید. نتایج پیوستگی نامتعادل بین دو مارکر نشان داد که  $D'$  بین مارکرهای BamHI و AvaII ۰/۶۴ است ( $P=0$ ). سپس به بررسی وجود همزمان این دو مارکر با بیماری تالاسمی بتا پرداخته شد. همان طور که در جدول ۶ مشاهده می‌شود، رایج‌ترین حالت، ++ با فراوانی ۵۴/۳ درصد در کروموزوم‌های افراد سالم و با فراوانی ۴۲/۳ درصد در کروموزوم‌های بیماران تالاسمی بتا به دست آمد.



**شکل ۲.** هضم انزیمی محصولات PCR با آنزیم BamHI. الکتروفورز محصول هضم مارکر BamHI بر روی ژل آگارز ۲٪ به مدت نیم ساعت در ولتاژ ۷۰ انجام شده است. علامت + نشان دهنده وجود جایگاه برش و علامت - نشان دهنده عدم وجود جایگاه برش است. افراد هموزیگوت -/- یک باند ۱۵۲۰ جفت بازی، افراد هموزیگوت +/+ دو باند ۱۲۲۸ و ۲۹۲ جفت بازی و افراد هتروزیگوت +/- باندهای ۱۵۲۰، ۱۲۲۸ و ۲۹۲ جفت بازی را نشان می‌دهد.

## یافته‌ها

فراوانی آلل G مارکر AvaII در افراد بیمار ۶۵/۳ درصد و در افراد سالم ۷۰/۶ درصد و فراوانی آلل C در افراد بیمار ۳۴/۷ درصد و در افراد سالم ۲۹/۴ درصد به دست آمد ( $P=0/29$ ). بررسی چگونگی توزیع ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی مورفیسم نشان داد که ژنوتیپ‌های هموزیگوت موتانت GG و هتروزیگوت CG در بیماران مبتلا به تالاسمی بتا با فراوانی ۸۸/۸ درصد و در افراد سالم با فراوانی ۹۶/۱ درصد بود ( $P=0/1$ ) (جدول ۴). ژنوتیپ هتروزیگوت GC با فراوانی ۴۱/۳ درصد در افراد بیمار و با فراوانی ۵۱ درصد در افراد سالم مشاهده شد و این اختلاف نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $P=0/4$ ).

**جدول ۴.** توزیع افراد مورد بررسی بر حسب وضعیت آلل G و C

مارکر AvaII و به تفکیک گروه‌ها

| AvaII     | بیمار      | سالم      | P    | OR   |
|-----------|------------|-----------|------|------|
| ژنوتیپ    |            |           |      |      |
| G/G + C/G | ۱۳۲ (۸۸)*  | ۴۸ (۹۷) * | ۰/۱۰ | ۰/۳۰ |
| C/C       | ۱۸ (۱۲)    | ۳ (۳)     |      |      |
| آلل       |            |           |      |      |
| C         | ۱۰۴ (۳۴/۷) | ۲۹ (۲۹/۴) | ۰/۲۹ | ۰/۷۶ |
| G         | ۱۹۶ (۶۵/۳) | ۷۱ (۷۰/۶) |      |      |

\* تعداد (درصد)

جدول ۶. توزیع مبتلایان به تالاسمی بتا و گروه شاهد آنها بر حسب وجود همزمان دو مارکر

| AvaII-BamHI | سالم | بیمار |
|-------------|------|-------|
| ++          | ۵۴/۳ | ۴۲/۳  |
| +-          | ۲۶   | ۳۲/۷  |
| -+          | ۱۸/۷ | ۲۳/۳  |
| --          | ۰    | ۱/۷   |

## بحث

بر اساس اطلاعات نویسندگان، این مطالعه اولین گزارش از بررسی فراوانی چند شکلی جایگاه‌های *AvaII* در اینترون دوم و *BamHI* در ۳ ژن بتا گلوبین و ارتباط آن با بیماری تالاسمی بتا در جمعیت ایرانی و به طور خاص در استان اصفهان می باشد. اکثر مطالعات صورت گرفته بر روی این دو مارکر در جمعیت‌های ایرانی و غیر ایرانی به صورت هاپلوتیپ (همراه پنج مارکر دیگر) است. تحقیق نشان داد که آلل G با فراوانی ۶۵/۳ درصد در افراد بیمار و با فراوانی ۷۰/۶ درصد در افراد سالم بیشترین و آلل C با فراوانی ۳۴/۷ درصد در افراد بیمار و ۲۹/۴ درصد در افراد سالم کمترین فراوانی را در جمعیت اصفهان دارد. در مطالعه آیت‌اللهی و همکاران در سال ۲۰۰۱ در جمعیت شیراز، فراوانی آلل موتان G در افراد سالم ۷۸٪ گزارش شد (۹). در مطالعه ولیان و گیوی در سال ۲۰۱۴ در جمعیت اصفهان، فراوانی این آلل در افراد سالم ۶۳٪ گزارش شد (۱۲). نتایج این مطالعات با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مطالعه Antonarakis و همکارانش در سال ۱۹۸۲ فراوانی آلل G در جمعیت‌های یونان، ایتالیا و هند در کروموزوم‌های بتا تالاسمی به ترتیب ۷٪، ۲۲٪ و ۳۸٪ و در کروموزوم‌های سالم به ترتیب ۱۶٪، ۲۰٪ و ۲۳٪ گزارش شد (۱۵). در مطالعه رحیمی و همکاران در سال ۲۰۰۸ در جمعیت کرمانشاه فراوانی آلل موتان در کروموزوم‌های سالم ۹۴/۲۸٪ و در کروموزوم‌های بتا تالاسمی ۸۵/۳۳٪ گزارش شد (۳). در مطالعه رحیمی و همکاران در سال ۲۰۰۵ در جمعیت شیراز فراوانی آلل موتان در کروموزوم‌های سالم ۸۵/۵۷٪ و در کروموزوم‌های بتا تالاسمی ۱۰۰٪ گزارش شد (۱۶). در مطالعه Kazzian و همکاران در سال ۱۹۸۲ فراوانی آلل G در کروموزوم‌های سالم ۶۶/۶۶٪ و در کروموزوم‌های بتا تالاسمی ۳۱/۸۱٪ گزارش شد (۱۷). در مطالعه Orkin و همکاران در سال ۱۹۸۲ فراوانی آلل G در کروموزوم‌های بتا تالاسمی ۸۹٪ گزارش شد (۱۰). در مطالعه Maishnam و همکاران در سال

۲۰۱۱ در شمال غرب هند فراوانی آلل موتانت در کروموزوم‌های سالم ۵۵/۲٪ گزارش شد (۱۸). بر اساس گزارشات پایگاه‌های داده ALFRED و International HapMap Project بیشترین فراوانی آلل موتانت G در نیجریه دیده می‌شود و کمترین فراوانی مربوط به جمعیت آمریکای جنوبی می‌باشد. فراوانی این آلل در آسیا ۴۶۹/۰، در آمریکا جنوبی ۰/۶، در شمال و غرب اروپا ۸۴۱۷/۰، در چین ۵۴۴۴/۰ و در ژاپن ۵۲۲۲/۰ مشاهده شده است. مقایسه نتایج به دست آمده از این مطالعه با اطلاعات موجود در پایگاه داده ALFRED نشان می‌دهد که فراوانی آللی این مارکر در جمعیت ایران از سایر جمعیت‌ها بیشتر بوده اما از جمعیت‌های اروپا و نیجریه کمتر است.

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر بر روی مارکر *BamHI* نشان داد که آلل T با فراوانی ۴۰/۵۷٪ در افراد بیمار و با فراوانی ۳۵/۶۳٪ در افراد سالم بیشترین و آلل C با فراوانی ۵۹/۴۳٪ در افراد بیمار و ۶۳/۳۷٪ در افراد سالم کمترین فراوانی را در جمعیت اصفهان دارد. در مطالعه رحیمی و همکاران در سال ۲۰۰۸ در جمعیت کرمانشاه فراوانی آلل موتانت در کروموزوم‌های سالم ۲۸/۵۷٪ و در کروموزوم‌های بتا تالاسمی ۳۵٪ گزارش شد (۱۱). در مطالعه رحیمی و همکاران در سال ۲۰۰۵ در جمعیت شیراز فراوانی آلل موتانت در کروموزوم‌های سالم ۲۱/۱۵٪ و در کروموزوم‌های بتا تالاسمی ۲۶/۹۲٪ گزارش شد (۱۶). در مطالعه Kazazian و همکاران در سال ۱۹۸۲ فراوانی آلل موتانت در کروموزوم‌های سالم ۱۸/۱۸٪ و در کروموزوم‌های بتا تالاسمی ۱۳/۶۳٪ گزارش شد (۱۷). در مطالعه Orkin و همکاران در سال ۱۹۸۲ فراوانی آلل موتانت در کروموزوم‌های بتا تالاسمی ۱۸/۶۸٪ گزارش شد (۱۰). در مطالعه Kan و همکاران در سال ۱۹۸۰ در جمعیت Sardinia فراوانی آلل موتانت در کروموزوم‌های بتا تالاسمی صفر و فراوانی آلل C ۱۰۰٪ و در کروموزوم‌های سالم فراوانی آلل موتانت ۳۳٪ گزارش شد (۱۹). در مطالعه Vivian و همکاران در چین در سال ۱۹۸۴ فراوانی آلل موتانت در افراد سالم ۲۸/۹٪ و در افراد هتروزیگوس بتا تالاسمی ۱۲/۵٪ و در افراد هموزیگوس بتا تالاسمی صفر درصد گزارش شد (۲۰). بر اساس گزارشات پایگاه داده ALFRED، بیشترین فراوانی آلل موتانت T در Ewenki آسیا (۰/۲۷۶) دیده می‌شود و کمترین فراوانی مربوط به جمعیت Cakamsa آمریکای جنوبی (۰/۰۳) می‌باشد. فراوانی این آلل در Ingano آمریکای جنوبی ۰/۰۷، و در Oroqen آسیا ۰/۱۹۱ گزارش شده است. مقایسه نتایج به



- با فراوانی صفر در افراد سالم و با فراوانی ۱/۶ درصد در بیماران شناخته شد. حالت ++ رایج‌ترین حالت در بیمار و سالم است، که این موضوع نشان دهنده این امر است که جهش‌های بتا تالاسمی ممکن است از زمینه‌های کروموزومی رایج در جمعیت ناشی شده باشند. البته این امر نسبتاً وابسته به فشار انتخابی یا جریان ژنی (مهاجرت) می‌تواند باشد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از مدیریت تحصیلات تکمیلی و پژوهشی دانشگاه اصفهان به خاطر حمایت‌های مالی و سهولت در اجرای این تحقیق، و همچنین از بیمارستان سیدالشهداء اصفهان، به خصوص جناب آقای دکتر حمید هورفر، به خاطر در اختیار قرار دادن نمونه خون بیماران و اطلاعات پزشکی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

دست آمده از این مطالعه با اطلاعات موجود در پایگاه داده ALFRED نشان می‌دهد که فراوانی آللی این مارکر در جمعیت ایران از سایر جمعیت‌ها بیشتر است و در حدود ۷ درصد از جمعیت آسیا بیشتر است. بررسی چگونگی توزیع ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی مورفیسم در جمعیت اصفهان نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین حضور این پلی مورفیسم و بیماری تالاسمی بتا وجود ندارد. میزان D' بالا بین مارکرهای BamHI و AvaII (۰/۶۴) مشاهده شد که نشان دهنده وجود پیوستگی نامتعادل بین مارکرهای ذکر شده است. در مطالعه حاضر وجود حالت ++ برای دو مارکر، با فراوانی ۵۴/۳ درصد در کروموزوم‌های سالم و ۴۲/۳ درصد در کروموزوم‌های بتا تالاسمی رایج‌ترین حالت در بیمار و سالم بود. بعد از آن حالت - + با فراوانی ۲۶ درصد در افراد سالم و با فراوانی ۳۲/۷ درصد در بیماران، حالت - + با فراوانی ۱۸/۳ درصد در افراد سالم و با فراوانی ۲۳/۳ درصد در بیماران بتا تالاسمی، و حالت

### REFERENCES

- Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. Orphanet Journal of Rare Diseases 2010;5: 1-15.
- Bank A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. Blood 2006;107: 435-43.
- Derakhshandeh-Peykar P, Hourfar H, Heidari M, Kheirollahi M, Miryounesi M. The spectrum of  $\beta$ -thalassemia mutations in Isfahan province of Iran. Iranian Journal of Public Health 2008;37: 106-11.
- Patil N, Berno AJ, Hinds DA, Barrett WA, Doshi JM, Hacker CR, et al. Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. Science 2001;294: 1719-23.
- Elahi E, Kumm J, Ronaghi M. Global genetic analysis. J Biochemistr Mol Biol 2004;37: 11-27.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Nature 1985;314: 67-73.
- Akhavan-Niaki H, Shafiezadeh S, Asghari B, Banihashemi S, Azizi M. The Frequency of SspI polymorphism in intron II of beta globin gene in Mazandaran province. J Mazandaran Univ Med Sci 2007; 17:57-64. [In Persian]
- Chakravarti A, Buetow KH, Antonarakis SE, Waber PG, Boehm CD, Kazazian HH. Nonuniform recombination within the human beta-globin gene cluster. Am J Human Genet 1984;36: 1239.
- Ayatollahi M, Merat A, Haghshenas M. Ava II site as a marker of  $\beta$ -globin gene polymorphism, among normal and sickle cell patients in Iran. Iranian Biomedical Journal 2001;5: 117-19.
- Orkin SH, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, et al. Linkage of beta-thalassaemia mutations and beta-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster. Nature 1982;296: 627-31.
- Rahimi Z, Muniz A, Akramipour R, Tofieghzadeh F, Mozafari H, Vaisi-Raygani A, et al. Haplotype analysis of beta thalassemia patients in Western Iran. Blood Cells Mol Dis 2009;42:140-43.
- Givi S, Vallian S. Ava II-Taq I-Hind III represents a novel informative haplotype at the  $\beta$ -globin gene cluster: application in carrier detection and prenatal diagnosis of beta Thalassemia in the Iranian population. Ann Exp Biol 2014;2:53-57.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988;16: 1215.
- Lee YJ, Park SS, Kim JY, Cho HI. RFLP haplotypes of beta-globin gene complex of beta-thalassemic chromosomes in Koreans. J Korean Med Sci 2002;17: 475.
- Antonarakis SE, Boehm CD, Giardina PJ, Kazazian HH. Nonrandom association of polymorphic restriction sites in the  $\beta$ -globin gene cluster. Proc Natl Acad Sci U S A 1982;79: 137-41.

16. Rahimi Z, Karimi M, Haghshenas M, Merat A. Beta globin gene cluster haplotype in cycle cell patient from Southwest Iran. *Am J Hematol* 2003;74: 156-60.
17. Kazazian HH, Orkin SH, Markham AF, Chapman CR, Youssoufian H, Waber PG. Quantification of the close association between DNA haplotypes and specific  $\beta$ -thalassaemia mutations in Mediterraneans. *Nature* 1984;310:152-54.
18. Singh MR, Choudhury B, Singh TS, Rao VR. Beta-Globin Gene Haplotypes in Manipur, North-east India. *Int J Human Genet* 2011;11: 45-49.
19. Kan YW, Lee KY, Furbetta M, Angius A, Cao A. Polymorphism of DNA sequence in the  $\beta$ -globin gene region: application to prenatal diagnosis of  $\beta^0$  thalassemia in Sardinia. *New Engl J Med* 1980;302: 185-88.
20. Chan V, Chan TK, Chebab FF, Todd D. Distribution of beta-thalassemia mutations in south China and their association with haplotypes. *Am J Hum Genet* 1987;41:678-85.