٨٤٠٦٠١٥٥
رحیمی
١٠ ایرانی

١١٤٥٨٥

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکدهٔ علوم پزشکی

پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد

رشتهٔ ***هماتولوژی و بانک خون***

عنوان:

بررسی جهش‌های ژن آلفا و بتا گلوبین و پلی‌مورفیسم‌های خوشهٔ ژنی بتا در بیماران بتا تالاسمی اینترمدیا

نگارش:

علی رجبی

استاد راهنما:

دکتر مرتضی کریمی‌پور

استاد مشاور:

دکتر سعید کاویانی

۱۳۸۸/۴/۱

مرکز اطلاعات و مدارک علمی
تهیه ملک

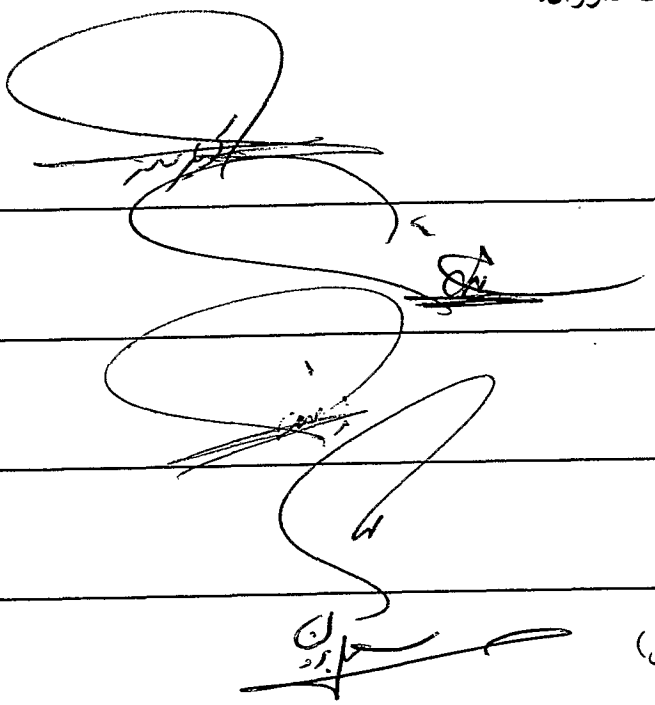
تابستان ۱۳۸۷

۱۱۴۵۸۵

فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای علی رجبی رشته: هماتولوژی گرایش:
تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:



دکتر مرتضی کریمی پور (استاد راهنما)

دکتر سعید کاویانی (استاد مشاور)

دکتر سیروس زینعلی (استاد ناظر)

دکتر مهرداد نوروزی نیا (استاد ناظر)

دکتر سعید آبرون (نماینده تحصیلات تکمیلی)

آئین نامه پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس مبین بخشی از فعالیتهای علمی ــ پژوهشی دانشگاه است .بنابراین به منظورآگاهی و رعایت حقوق دانشگاه ، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود ،مراتب را قبلا به طور کتبی به دفتر " دفتر نشر آثار علمی " دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند :

" کتاب حاضر ، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد / رساله دکتری نگارنده دررشته ...ژئوفیزیک... است که در سال ...۱۳۸۷... دردانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی ...دکتر مرتضی کریمی نیا... ، مشاوره ...دکتر سید کاوه کاوه... از آن دفاع شده است."

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه ،تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قراردهد .

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳ ، ۵۰ ٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس ،تادیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداختهای بهای خسارت ،دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه ووصول کند ،به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود ، ازطریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ۴ رااز محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش ،تامین نماید .

ماده ۶: اینجانب ...علی رحیمی... دانشجوی رشته ...ژئوفیزیک... مقطع ...کارشناسی ارشد... تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده ، به آن ملتزم می شوم.

نام ونام خانوادگی علی رحیمی

تاریخ و امضا

۸۷/۳/۲۶

دستورالعمل حق مالکیت مادي و معنوي در مورد نتایج پژوهشهاي علمي
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان ، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها/ رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند.
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی حاصل از نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

نام و نام خانوادگي . علی رحیمی
تاریخ و امضاء
۸۷/۳/۲۴

تقدیم به

پدر و مادر عزیز و بزرگوارم؛

و همسر خوب و مهربانم؛

و خواهران و برادران ارجمندم؛

و استاد فرزانه‌ام

دکتر حبیب‌اله گل افشان

به پاس آنچه از ایشان آموخته‌ام *

تقدیر و تشکر از

۱- جناب آقای دکتر مرتضی کریمی‌پور استاد محترم راهنما به خاطر کمک‌های فراوانی که در طی مدت تحقیق به بنده نمودند

۲- جناب آقای دکتر سعید کاویانی استاد محترم مشاور

۳- جناب آقای دکتر سیروس زینلی استاد محترم ناظر

۴- جناب آقای دکتر مهرداد نوروزی‌نیا استاد محترم ناظر

۵- جناب آقای دکتر سعید آبرون نمایندهٔ محترم تحصیلات تکمیلی

۶- جناب آقای دکتر علی‌اکبر پورفتح‌اله مدیر محترم سابق گروه هماتولوژی به خاطر موافقت ایشان با گذراندن پایان‌نامه اینجانب در انستیتو پاستور

۷- دوست بزرگوار جناب آقای حمزه رحیمی

۸- پرسنل محترم گروه ژنتیک انستیتو پاستور ایران

۹- همکلاسی‌های محترم آقایان نادر وظیفه شیرانی، محمود حریریان، محمد قربانی، مهدی آزاد، خانم‌ها هاجر میرمنگره و مرجان حاج‌هاشمی

چکیده

تالاسمی‌ها اختلالات ارثی هستند که به وسیلهٔ تولید غیر طبیعی هموگلوبین ایجاد می‌شوند [۱۲].

تالاسمی‌های بتا از مهمترین مشکلات بهداشت عمومی در جهان محسوب می‌شوند [۱۲]. بیش از ۲۰۰ جهش در ژن گلوبین بتا منجر به تالاسمی بتا می‌شود [۱۳].

تالاسمی اینترمدیا گسترهٔ وسیعی از فنوتیپ‌های بالینی تالاسمی بتا را دربرمی‌گیرد. بیشتر بیماران تالاسمی اینترمدیا هوموزیگوت یا هتروزیگوت ترکیبی برای تالاسمی بتا هستند، بدین معنی که هر دو جایگاه ژنی گلوبین بتا درگیر هستند. با شیوع کمتری، تنها یک جایگاه منفرد گلوبین بتا درگیر بوده و جایگاه دیگر به طور کامل طبیعی است [۸]. عوامل زیادی وجود دارند که شدت بالینی تالاسمی اینترمدیا را تحت تأثیر قرار می‌دهند، مثل به ارث رسیدن همزمان تالاسمی آلفا و پلی‌مورفیسم‌های خوشهٔ ژنی گلوبین بتا [۳۲].

متأسفانه مطالعهٔ جامعی در ایران بر روی اساس ملکولی تالاسمی اینترمدیا انجام نشده است. مطالعهٔ حاضر اولین مطالعهٔ چند جانبه در این زمینه محسوب می‌شود.

در این پژوهش، ۴۹ بیمار تالاسمی اینترمدیا انتخاب و DNA ژنومی بر اساس روش مرسوم salting out [۹۵] استخراج شد.

روش‌های ARMS و تعیین توالی مستقیم DNA برای یافتن جهش‌های ژن بتا مورد استفاده قرار گرفت. به منظور بررسی حذف‌های معمول تالاسمی آلفا در ایران ($-\alpha^{3.7}$، $-\alpha^{4.2}$، $-\alpha^{20.5}$ و $--^{MED}$) از روش Multiplex Gap-PCR استفاده شد. هاپلوتیپ‌های خوشهٔ ژنی گلوبین بتا (نُه هاپلوتیپ مرسوم) نیز با استفاده از روش RFLP برای هشت جایگاه پلی‌مورفیسم بررسی شد.

در این مطالعه، ۹۳/۷۵٪ جهش‌های ژن بتا و به طور کلی ۱۵ جهش در ژن بتا یافت شد. IVSII-1(G>A) شایع‌ترین جهش با ۴۸/۹۵٪ فراوانی آللی بود. پس از آن، جهش‌های FSC8 (۸/۳۳٪)، IVSI-6 (۵/۲۱٪)، CD30 (۴/۱۷٪)، IVSI-5 (۳/۱۲٪)، FSC36/37 (۳/۱۲٪)، IVSI-25 bp deletion (۳/۱۲٪)، CD15 (۲/۱٪) و FSC8/9 (۲/۱٪) در جایگاه بعدی قرار داشتند. جهش‌های دیگر با شیوع کم عبارت بودند از: 88-، FSC5، IVSI-110، حذف کدون‌های ۲۲/۲۳/۲۴، FSC82/83 و CD90. این جهش‌ها دارای شیوع ۱٪ بودند. این اولین گزارش جهش CD90 ((GAG(Glu)>GAC(Asp)) در ایران است. شیوع آلل‌های تالاسمی آلفا کم و تنها ۳/۶۵٪ بود. بررسی هاپلوتیپ‌های خوشهٔ ژنی بتا نشان داد که هاپلوتیپ شمارهٔ ۳ (III) شایع‌ترین هاپلوتیپ با فراوانی ۶۰/۴٪ است. این هاپلوتیپ با جهش IVSII-1 پیوستگی فیزیکی داشت. همچنین بررسی پلی‌مورفیسم *Xmn*I نشان داد که ۷۳/۹۶٪ آلل‌ها برای این جایگاه مثبت هستند. این پلی‌مورفیسم نیز دارای پیوستگی بالایی با جهش IVSII-1 بود. هیچ‌کدام از مواردِ دارای جهش IVSII-1، شاخص XmnI منفی (-/-) نداشتند.

کلمات کلیدی: تالاسمی اینترمدیا، ARMS-PCR، Multiplex Gap-PCR، RFLP، *Xmn*I polymorphism

فهرست عناوین ..... صفحه

فصل اول: کلیات ۱

۱-۱ مقدمه ۲

۱-۲ گویچهٔ قرمز ۳

۱-۳ هموگلوبین ۳

۱-۳-۱ تولید گویچهٔ قرمز و انواع هموگلوبین طبیعی ۴

۱-۳-۲ تاریخچهٔ مطالعهٔ ژن گلوبین بتا ۵

۱-۳-۳ خوشهٔ ژنی گلوبین و بیان آن ۶

۱-۳-۴ تبدیل هموگلوبین ۱۳

۱-۴ سندروم‌های تالاسمی ۱۴

۱-۴-۱ پراکندگی جغرافیایی تالاسمی و ارتباط آن با مالاریا ۱۵

۱-۴-۱-۱ همه‌گیر شناسی بیماری تالاسمی در ایران ۱۸

۱-۴-۲ انواع تالاسمی بر اساس نوع زنجیرهٔ درگیر ۱۹

۱-۴-۲-۱ تالاسمی آلفا ۱۹

۱-۴-۲-۱-۱ تالاسمی آلفا ماژور ۱۹

۱-۴-۲-۱-۲ بیماری هموگلوبین H ۲۰

۱-۴-۲-۱-۳ تالاسمی مینور آلفا ۲۰

۱-۴-۲-۱-۴ ناقل خاموش تالاسمی آلفا ۲۱

۱-۴-۲-۱-۵ هموگلوبین کانستانت اسپرینگ ۲۱

۱-۴-۲-۱-۶ اساس ملکولی حذف‌های معمول تالاسمی آلفا ۲۲

۱-۴-۲-۲ تالاسمی بتا ۲۳

۱-۴-۲-۲-۱ تالاسمی بتا ماژور ۲۳

۱-۴-۲-۲-۲ تالاسمی بتا اینترمدیا ۲۴
۱-۴-۲-۲-۳ تالاسمی بتا مینور ۲۵
۱-۴-۲-۲-۴ تالاسمی بتا ناقل خاموش ۲۵
۱-۴-۲-۲-۵ اساس ملکولی تالاسمی بتا و اثرات جهش‌ها ۲۵
۱-۴-۲-۲-۶ پاتوفیزیولوژی تالاسمی بتا ۲۹
۱-۴-۲-۳ دیگر انواع تالاسمی ۳۱
۱-۴-۲-۳-۱ تالاسمی دلتا/بتا ۳۱
۱-۴-۲-۳-۲ تالاسمی گاما/دلتا/بتا ۳۲
۱-۴-۲-۳-۳ پایداری ارثی هموگلوبین جنینی ۳۲
۱-۴-۲-۳-۴ هموگلوبین لپور ۳۳
۱-۴-۳ تالاسمی اینترمدیا ۳۴
۱-۴-۳-۱ تعریف تالاسمی اینترمدیا ۳۴
۱-۴-۳-۲ اساس ملکولی تالاسمی اینترمدیا ۳۵
۱-۴-۳-۳ عوامل مؤثر بر فنوتیپ تالاسمی اینترمدیا و ارتباط ژنوتیپ/فنوتیپ ۳۸
۱-۴-۳-۳-۱ عوامل ژنتیکی ۳۸
۱-۴-۳-۳-۱-۱ شاخص‌های تعدیل کنندهٔ نوع اول ۳۸
۱-۴-۳-۳-۱-۱-۱ تالاسمی غالب بتا ۳۹
۱-۴-۳-۳-۱-۲ شاخص‌های تعدیل کنندهٔ نوع دوم ۴۰
۱-۴-۳-۳-۱-۲-۱ شاخص‌های مؤثر بر افزایش تولید هموگلوبین F ۴۰
۱-۴-۳-۳-۱-۲-۱-۱ هاپلوتیپ‌های خوشهٔ ژنی گلوبین بتا ۴۰
۱-۴-۳-۳-۱-۲-۱-۲ عوامل کنترلی عمل کننده از راه دور ۴۲
۱-۴-۳-۳-۱-۲-۲ تعدیل کننده‌های زنجیره‌های اضافی آلفا ۴۲
۱-۴-۳-۳-۱-۲-۱پروتئین پایدارکنندهٔ هموگلوبین آلفا (AHSP) ۴۲

۱-۴-۳-۳-۱-۲-۲-۱ HRI ۴۳
۱-۴-۳-۳-۱-۲-۲-۳ توانایی پروتئولیتیک پیش‌سازهای گویچهٔ قرمز در کاتابولیزه کردن مقادیر اضافی گلوبین آلفا ۴۳
۱-۴-۳-۳-۱-۳ شاخص‌های تعدیل کنندهٔ نوع سوم ۴۳
۱-۴-۳-۳-۲ عوامل محیطی ۴۳
۱-۴-۳-۳-۴ مشکلات تشخیصی بیماری ۴۴
۱-۴-۳-۳-۵ علائم بالینی تالاسمی اینترمدیا ۴۶
۱-۴-۳-۳-۶ درمان تالاسمی اینترمدیا ۴۹
۱-۴-۳-۳-۶-۱ درمان با انتقال خون ۴۹
۱-۴-۳-۳-۶-۲ درمان با افزایش دهنده‌های هموگلوبین F ۵۱
۱-۴-۳-۳-۶-۳ درمان‌های جدیدتر ۵۱
۱-۴-۳-۳-۶-۳-۱ پیوند مغزاستخوان ۵۱
۱-۴-۳-۳-۶-۳-۲ ژن‌درمانی ۵۱
۱-۴-۳-۳-۶-۳-۳ استفاده از RNA کوچک تداخلی ۵۲
۱-۴-۳-۳-۶-۳-۴ فناوری آنتی‌سنس ۵۲
۱-۴-۳-۳-۶-۳-۵ درمان‌های تجربی برای مهار جذب اضافی آهن ۵۲
۱-۴-۳-۳-۶-۳-۶ کاهش تولید درون‌زاد گلوبین آلفا ۵۳
۱-۴-۴ تشخیص آزمایشگاهی سندروم‌های تالاسمی ۵۳
۱-۴-۴-۱ تشخیص ملکولی سندروم‌های تالاسمی ۵۳
۱-۴-۴-۱-۱ روش‌های شناسایی جهش‌های شناخته شده ۵۴
۱-۴-۴-۱-۱-۱ Gap-PCR ۵۴
۱-۴-۴-۱-۱-۲ سامانهٔ تکثیر متزلزل جهش‌ها (ARMS) ۵۵
۱-۴-۴-۱-۱-۳ چندشکلی طول قطعات حاصل از اثر آنزیم اندونوکلئاز (RFLP) ۵۶

۱-۴-۴-۱-۲ روش‌های شناسایی جهش‌های ناشناخته ۵۸
۱-۴-۴-۱-۲-۱ DGGE ۵۸
۱-۴-۴-۱-۲-۲ بررسی تغییرات ساختاری تک‌رشته‌ای (SSCP) ۵۸
۱-۴-۴-۱-۲-۳ بررسی هترودوپلکس (HA) ۶۰
۱-۴-۴-۱-۳ تعیین توالی مستقیم DNA ۶۰
فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام شده ۶۳
۲-۱ مطالعات انجام شده در جهان ۶۴
۲-۲ مطالعات انجام شده در ایران ۷۰
فصل سوم: مواد و روش‌ها ۷۲
۳-۱ هدف ۷۳
۳-۱-۱ شناسایی جهش‌های ژن بتا و نحوهٔ انتخاب روش بررسی ۷۳
۳-۱-۲ بررسی حذف‌های معمول ژن آلفا و نحوهٔ انتخاب روش بررسی ۷۳
۳-۱-۳ بررسی هاپلوتیپ‌های خوشهٔ ژنی بتا و نحوهٔ انتخاب روش بررسی ۷۴
۳-۲ نمونه‌گیری و جامعهٔ آماری ۷۴
۳-۳ استخراج DNA ۷۴
۳-۳-۱ مواد و دستگاه‌های مورد نیاز ۷۵
۳-۳-۲ اصول و روش کار ۷۶
۳-۳-۳ تعیین غلظت و درجهٔ خلوص DNA ۷۸
۳-۴ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۷۹
۳-۴-۱ مواد و وسایل مورد نیاز ۷۹
۳-۴-۲ تهیهٔ محلول کاری (مخلوط واکنش) ۸۱
۳-۴-۳ الکتروفورز محصولات PCR ۸۲

۳-۴-۳-۱ مواد و وسایل مورد نیاز برای الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز..... ۸۲
۳-۴-۳-۲ بافر الکتروفورز ۸۳
۳-۴-۳-۳ بافر بارگذاری ۸۳
۳-۴-۳-۴ رنگ آمیزی ژل آگارز ۸۴
۳-۴-۳-۴-۱ تهیهٔ محلول اتیدیوم بروماید..... ۸۴
۳-۴-۳-۵ منبع تغذیهٔ جریان..... ۸۵
۳-۵ واکنش ARMS ۸۵
۳-۵-۱ تهیهٔ ژل الکتروفورز ۸۶
۳-۶ تعیین توالی مستقیم DNA..... ۸۷
۳-۶-۱ انجام PCR و خالص‌سازی محصولات PCR برای تعیین توالی ۸۷
۳-۶-۲ تفسیر نمودارهای تعیین توالی ۸۸
۳-۷ واکنش RFLP..... ۸۸
۳-۸ روش Multiplex Gap-PCR..... ۹۰
فصل چهارم: نتایج، بحث و پیشنهادات ۹۳
۴-۱ نتایج..... ۹۴
۴-۱-۱ نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۹۴
۴-۱-۱-۱ الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده ۹۴
۴-۱-۱-۲ الکتروفورز محصول ARMS-PCR برای جهش IVSII-1 ..... ۹۴
۴-۱-۱-۳ الکتروفورز محصول PCR برای تعیین توالی قطعهٔ اوّل ژن بتا ۹۵
۴-۱-۱-۴ الکتروفورز محصول Multiplex Gap-PCR برای حذف‌های معمول ژن آلفا ۹۶
۴-۱-۱-۵ الکتروفورز محصول PCR و هضم آنزیمی برای پلی‌مورفیسم HincII 3'ψβ.... ۹۷
۴-۱-۱-۶ الکتروفورز محصول PCR و هضم آنزیمی برای پلی‌مورفیسم HincII 5'ψβ.... ۹۷
۴-۱-۱-۷ الکتروفورز محصول PCR و هضم آنزیمی برای پلی‌مورفیسم XmnI $5'^{G}_{\gamma}$..... ۹۸

۴-۱-۲ نتایج حاصل از تعیین توالی ژن بتا ۹۹
۴-۱-۳ نتایج جهش‌های به دست آمده در ژن بتا ۱۰۱
۴-۱-۴ نتایج به دست آمده از حذف‌های ژن آلفا ۱۰۴
۴--۱-۵ نتایج حاصل از بررسی هاپلوتیپ‌های خوشهٔ ژنی بتا ۱۰۵
۴-۱-۶ نتایج کلّی ۱۰۹
۴-۲ بحث و پیشنهادات ۱۱۱
۴-۲-۱ بحث ۱۱۱
۴-۲-۲ پیشنهادات ۱۲۲
منابع و مآخذ ۱۲۴
الف- منابع فارسی ۱۲۵
ب- منابع لاتین ۱۲۵
ج- منابع اینترنت ۱۳۲
پیوست ۱۳۳
فرم رضایت‌نامه ۱۳۴

فهرست اَشکال .....صفحه

شکل ۱-۱ ترتیب فعال شدن گلوبین‌های مربوط به دوران رویانی، جنینی و بلوغ ۵

شکل ۱-۲ ژن‌های گلوبین شبه آلفا و شبه بتا بر روی کروموزوم‌های ۱۶ و ۱۱.....۷

شکل ۱-۳ کنترل ژنتیکی تولید زنجیرهٔ گلوبین ۹

شکل ۱-۴ انتشار جهانی تالاسمی‌های بتا.....۱۶

شکل ۱-۵ انتشار جهانی تالاسمی‌های α^0 و α^+ ۱۷

شکل ۱-۶ ژنوتیپ طبیعی ژن‌های آلفا و انواع حذفی تالاسمی آلفا بر روی کروموزوم ۱۶....۲۱

شکل ۱-۷ سازوکار ایجاد حذف‌های معمول تالاسمی آلفا ۲۳

شکل ۱-۸ جایگاه اثر جهش‌های مسئول ایجاد تالاسمی بتا ۲۹

شکل ۱-۹ پاتوفیزیولوژی تالاسمی بتا ۳۱

شکل۱-۱۰ سازوکار ایجاد هموگلوبین لپور ۳۴

شکل ۱-۱۱ خوشهٔ ژنی گلوبین بتا و برخی از پلی‌مورفیسم‌های آن.....۴۲

شکل ۱-۱۲ شاخص‌های مؤثر بر فنوتیپ بالینی تالاسمی اینترمدیا ۴۴

شکل ۱-۱۳ مقایسهٔ تغییرات استخوانی در تالاسمی ماژور و اینترمدیا ۴۸

شکل ۱-۱۴ مقایسهٔ تصویر گسترهٔ خون محیطی در دو بیمار تالاسمی ماژور و اینترمدیا ...۴۹

شکل ۱-۱۵ تعیین توالی مستقیم DNA به روش خاتمهٔ زنجیره با دی‌داکسی ۶۲

شکل۳-۱ جایگاه پلی‌مورفیسم‌های معمول بر روی خوشهٔ ژنی بتا ۸۸

شکل ۴-۱ الکتروفورز شش نمونهٔ DNA ژنومی بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ و جذب نوری چهار نمونه در طول موج ۲۸۰ نانومتر.....۹۴

شکل۴-۲ الکتروفورز محصول ARMS-PCR برای جهش IVSII-1 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ برای شش نمونهٔ مختلف.....۹۵

شکل ۴-۳ الکتروفورز محصول PCR قطعهٔ اوّل ژن بتا برای ۱۰ نمونهٔ مختلف بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ۹۶

شکل ۴-۴ الکتروفورز محصول Multiplex Gap-PCR برای حذف‌های معمول ژن آلفا
بر روی ژل آگارز ۱٪ ۹۶
شکل ۴-۵ الکتروفورز محصول PCR برای پلی‌مورفیسم 3'ψβ HincII ۹۷
شکل ۴-۶ الکتروفورز محصول PCR برای پلی‌مورفیسم 5'ψβ HincII ۹۸
شکل ۴-۷ الکتروفورز محصول PCR برای پلی‌مورفیسم $5'^{G}{}_{\gamma}$ XmnI ۹۹
شکل ۴-۸ نمودار تعیین توالی ژن بتا برای چند جهش به عنوان نمونه ۱۰۰

فهرست جداول .....صفحه

جدول ۱-۱ جهش‌های معمول ژن بتا در مناطق مختلف جغرافیایی ۲۶

جدول ۱-۲ برخی از کاربردهای انتقال خون و طحال‌برداری در تالاسمی اینترمدیا..... ۵۰

جدول ۳-۱ غلظت و نوع محلول‌های به کار رفته در یک واکنش معمول PCR..... ۸۱

جدول ۳-۲ برنامهٔ یک PCR پایه ۸۱

جدول ۳-۳ میزان و اجزاءِ مواد به کار رفته در تهیهٔ محلول کاری برای تکثیر ژن آلفا ۸۱

جدول ۳-۴ میزان و اجزاءِ مواد به کار رفته در تهیهٔ محلول کاری برای تکثیر ژن بتا..... ۸۱

جدول ۳-۵ شرایط و محیط واکنش ARMS ۸۵

جدول ۳-۶ اجزاءِ به کار رفته در واکنش ARMS برای لولهٔ حاوی واکنش طبیعی ۸۵

جدول ۳-۷ اجزاءِ به کار رفته در واکنش ARMS برای لولهٔ حاوی واکنش جهش یافته ۸۶

جدول۳-۸ شرایط دمایی، زمان و تعداد چرخه‌های واکنش ARMS برای بررسی
جهش IVSII-1 .....۸۶

جدول ۳-۹ لیست آغازگرهای به‌کار رفته در واکنش ARMS برای بررسی جهش IVSII-1 ۸۷

جدول۳-۱۰: اجزاء و میزان مواد به کار رفته در واکنش PCR برای تکثیر قطعهٔ اول ژن بتا ۸۷

جدول۳-۱۱: شرایط دمایی، زمان و تعداد چرخه‌های واکنش PCR برای تکثیر قطعهٔ اول ژن بتا
..... ۸۷

جدول ۳-۱۲ توالی و سایر مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش RFLP برای
بررسی نُه هاپلوتیپ خوشهٔ ژنی بتا ۸۹

جدول ۳-۱۳ اجزاء و میزان مواد به کار رفته در واکنش PCR به منظور بررسی RFLP ... ۹۰

جدول ۳-۱۴ شرایط عمومی واکنش PCR برای هشت RFLP معمول خوشهٔ ژنی بتا..... ۹۰

جدول ۳-۱۵ اجزاءِ مخلوط آغازگرها برای واکنش Multiplex Gap-PCR.....۹۱

جدول ۳-۱۶ اجزاء و میزان مواد به کار رفته در واکنش Multiplex Gap-PCR.....۹۱

جدول ۳-۱۷ شراط دمایی، زمان و تعداد چرخه‌ها در واکنش Multiplex Gap-PCR ۹۱

جدول ۳-۱۸ لیست و توالی آغازگرهای مورد استفاده و اندازهٔ قطعات حاصل از تکثیر DNA استفاده شده در واکنش Multiplex Gap-PCR ۹۲
جدول ۴-۱ جهش‌های یافت شده در ژن بتا، میزان و درصد آن‌ها نسبت به کل کروموزوم‌ها (آلل‌ها)، تغییر نوکلئوتیدی و فنوتیپ آن‌ها ۱۰۱
جدول ۴-۲ تعداد و درصد بیماران دارای جهش‌های هوموزیگوت در ژن گلوبین بتا ۱۰۳
جدول ۴-۳ تعداد و درصد بیماران دارای جهش‌های هتروزیگوت ترکیبی در ژن گلوبین بتا ۱۰۳
جدول ۴-۴ تعداد و درصد بیماران دارای جهش‌های هتروزیگوت در ژن گلوبین بتا ۱۰۳
جدول ۴-۵ فراوانی جهش IVSII-1 به صورت هوموزیگوت یا هتروزیگوت ترکیبی ۱۰۴
جدول ۴-۶ نسبت جهش‌های شدید و خفیف بر روی هر دو آلل ژن گلوبین بتا ۱۰۴
جدول ۴-۷ حذف‌های یافت شده در ژن آلفا در بیماران تالاسمی اینترمدیا ۱۰۵
جدول ۴-۸ هاپلوتیپ‌های شناسایی شده در خوشهٔ ژنی بتا و فراوانی آن‌ها ۱۰۵
جدول ۴-۹ هاپلوتیپ‌های خوشهٔ ژنی بتا و همراهی آن‌ها با جهش‌های ژن بتا و نیز فراوانی این همراهی ۱۰۷
جدول ۴-۱۰ فراوانی پلی‌مورفیسم XmnI در بیماران تالاسمی اینترمدیا ۱۰۷
جدول ۴-۱۱ همراهی پلی‌مورفیسم XmnI با جهش هوموزیگوت و هتروزیگوت IVSII-1 ۱۰۸
جدول ۴-۱۲ متوسط میزان هموگلوبین F و نیز هموگلوبین کلّ در هاپلوتیپ‌های مختلف خوشهٔ ژنی بتا ۱۰۸
جدول ۴-۱۳ متوسط میزان هموگلوبین F در موارد پلی‌مورفیسم XmnI ۱۰۹
جدول ۴-۱۴ نتایج نهایی حاصل از بررسی جهش‌های ژن بتا، حذف-های ژن آلفا و پلی‌مورفیسم‌های خوشهٔ ژنی بتا در بیماران تالاسمی بتا اینترمدیا ۱۰۹

فهرست نمودارها .....صفحه

نمودار ۴-۱ فراوانی جهش‌های مختلف ژن گلوبین بتا ۱۰۲

نمودار ۴-۲ فراوانی هاپلوتیپ‌های مختلف خوشهٔ ژنی گلوبین بتا ۱۰۶

فصل اوّل

کلیّات