بسم الله الرحمن الرحيم

پردیس دانشگاهی
زیست شناسی
سلولی و مولکولی

تشخیص پیش از تولد تالاسمی بتا با استفاده از DNA آزاد جنین موجود در خون مادر

از:
سهیلا استاد محمدی

استاد راهنما:
دکتر محمد تقی اکبری

استادان مشاور:
دکتر شهره زارع کاریزی
دکتر حمیدرضا وزیری

اسفند ۱۳۹۲

تقدیم به:

همه کسانی که خالصانه در راه علم قدم برمی دارند .

تقدیر و تشکر:

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزی مان ساخت. اکنون که با یاری خداوند متعال به انجام این پایان نامه نائل آمدم. بر خود لازم می دانم از زحمات بی دریغ و دلسوزانه **استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمد تقی اکبری** که مسئولیت راهنمایی اینجانب را بر عهده داشتند و در کلیه مراحل این تحقیق، اینجانب را مورد عنایات و لطف خویش قرار داده و از هر گونه راهنمایی دریغ نورزیدند.

همچنین از **سرکار خانم دکتر شهره زارع و جناب آقای دکتر حمیدرضا وزیری** اساتید مشاور که از مشاوره و نظرات سازنده ایشان نیز بهره مند شدم تشکر و قدردانی نمایم.

ضمناً مراتب امتنان و قدردانی خود را نسبت به کلیه عزیزانی که در **آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران (دکتر اکبری)** مرا در امر تهیه این پایان نامه یاری نمودند ابراز می دارم و سعادت و بهروزی آنان را از خداوند منان مسئلت می نمایم.

چکیده

تشخیص پیش از تولد تالاسمی بتا با استفاده از DNA آزاد جنین موجود در خون مادر

سهیلا استادمحمدی

بتا تالاسمی ها یک گروه از اختلال های خونی ارثی هستند که از طریق سنتز غیر معمول زنجیره های بتا هموگلوبین به وجود می ایند. نتیجه ان فنوتیپ هایی است که از انمی تا افرادی بدون علامت کلینیکی را شامل می شوند. بار ژنتیکی این بیماری به دلیل هزینه بالا و درگیری سیستم بهداشتی پزشکی در ارائه خدمات درمانی ترانسفوزیون منظم خون و کیلاتور آهن به بیماران بسیار بالاست و تشخیص پیش از تولد به عنوان روش مناسب پیشگیری در کشورهای پر شیوع از جایگاه ویژه ای برخوردار است. در ایران که یکی از کشورهای پر شیوع برنامه ملی پیشگیری تالاسمی بتا سالهاست که اجرا می شود و محور اصلی آن شناسایی زوجین ناقل و انجام تشخیص پیش از تولد برای جنین آنهاست.

نمونه برداری از پرزهای کوریونی و یا امینو سنتز که به منظور تهیه DNA جنینی برای تعیین ژنوتیپ جنین استفاده می شود یک روش تهاجمی است که احتمال سقط ناشی از به کارگیری ان،در صورتیکه شخص تجربه و ماهر باشد،یک درصد بیش از احتمال سقط خودبه خودی است و اغلب زنان باردار از این روش بیم و هراس دارند،پس نیاز به استفاده از یک روش جایگزین غیر تهاجمی مقبولیت بالائی دارد. امروزه مشخص شده است که DNA ازاد جنینی در پلاسما مادر وجود دارد و منبع بسیار خوبی از مواد ژنتیکی برای تشخیص های مولکولی پیش از تولد جنین می باشد.هدف از این مطالعه ارائه یک روش غیر تهاجمی برای تشخیص پیش از تولد بتا-تالاسمی بر اساس بر رسی نحوه انتقال پلی مورفیسم های به ارث رسیده از پدر به جنین می باشد . زوج هاییکه جنین انها در معرض ابتلا به بتا-تالاسمی قرار دارند مورد بررسی قرار می گیرند. مقرهای پلی مورفیک پیوسته به ژن بتا-گلوبین برای هر خانواده با استفاده ازRFLPبررسی می شوند ومقرهای گویا شناسایی می شوند.الل به ارث رسیده از پدر به جنین در DNA ازاد پلاسما مادر که مخلوطی از DNA ازاد جنینی و DNA ازاد مادری می باشد شناسایی می شودو در مورد زوج هاییکه امکان تعیین فاز کروموزومی پدر وجود داشته باشد وضعیت جنین از نظر ابتلا به بتا-تالاسمی تعیین خواهد شد. در اینجا مطالعه تعدادی خانواده با ریسک جنین تالاسمی که الگوی RFLP آنها را از قبل مشخص نموده بودیم امکان بررسی انتقال ژن تالاسمی پدری برای آنها وجود داشت . از مادر باردار در سن حاملگی ۱۰ تا ۱۲ هفته ۱۰ سی سی خون وریدی گرفته و پلاسمای آن را جدا نموده و DNA آزاد (غیر سلولی) آن را که حاوی DNA مادری و جنینی بود برای مقرهای گویای RFLP ژن گلوبین بتا مورد بررسی قرار دادیم. با آنکه DNA جنینی نسبت به DNA مادری از مقدار بسیار کمتری برخوردار است توانستیم الگوی ویژه RFLP جنین را شناسایی نموده و نوع آلل انتقال پدر به جنین را مشخص کنیم.

کلید واژگان: بتا تالاسمی، تشخیص پیش از تولد، DNA ازاد جنینی

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

۱-۱تالاسمی ۲

۱-۲تاریخچه تالاسمی: ۲

۱-۳هموگلوبین ۳

۱-۳-۱ انواع هموگلوبین ۳

۱-۴ بتا تالاسمی: ٤

۱-۴-۱ ساختمان و بروز ژن بتا- گلوبین ٥

۱-۴-۲ الگوی توارث بیماری بتا تالاسمی: ٦

۱-۴-۳اپیدمیولوژی ٦

۱-۴-۴علائم بالینی: ۷

۱-۴-۴-۱تالاسمی برحسب شدت علائم تقسیم می شود: ۷

۱-۴-۴-۲ بتا تالاسمی ماژور (آنمی کولی): ۸

۱-۴-۵ تظاهرات پاتوفیزیولوژیک تالاسمی: ۸

۱-۴-۶ تظاهرات بالینی تالاسمی: ۹

۱-۴-۷ تشخیص و درمان در بیماران تالاسمی ماژور: ۱۰

۱-۴-۸ روش های درمانی: ۱۰

۱-۴-۸-۱ تزریق مر تب خون: ۱۰

۱-۴-۸-۲ طحال برداری (اسپنگتومی): ۱۱

۱-۴-۸-۳ آهن زدایی: ۱۱

۱-۴-۸-۴ پیوند مغز استخوان: ۱۱

۱-۴-۹ سبک زندگی و رژیم غذایی در β تالاسمی: ۱۱

۱-۴-۱۰ درمان‌های تحت بررسی: ۱۲

۱-۴-۱۱ پیش آگهی تالاسمی ماژور: ۱۲

۱-۵اثرات مولکولی جهش ها ۱۲

۱-۵-۱جهش های نقطه ای و حذف و اضافه شدن های کوچک ۱۳

۱-۵-۱-۱ موتاسیون های مؤثر در سطح رونویسی ۱۳

۱-۵-۱-۲ موتاسیون های مؤثر در سطح پردازش mRNA ۱٤

۱-۵-۱-۲-۱ جهش های ساختمانی: ۱٤
۱-۵-۱-۲-۲ جهش های اتصالی: ۱٤
۱-۵-۱-۲-۲-۱ جهش های نواحی اتصالی ۱٤
۱-۵-۱-۲-۲-۲ جهش های نواحی مجاور نواحی اتصالی ۱٤
۱-۵-۱-۲-۲-۳ جهش های نواحی مخفی ۱٥
۱-۵-۱-۳ جهش هایی که باعث تولید زنجیره گلوبین فاقد عمل می گردند ۱٥
۱-۵-۱-۳-۴ حذف های بزرگ ژنی ۱٦
۱-۶ مطالعه پیوستگی در تشخیص تالاسمی ۱۷
۱-۷ مشاوره ژنتیک و تشخیص پیش از تولد: ۱۸
۱-۸ لزوم استفاده از روش های غیرتهاجمی تشخیص پیش از تولد ۲۰
۱-۹ DNA جنینی آزاد سلولی در پلاسما و سرم مادر ۲۰
۱-۹-۱ زیست شناسی cffDNA: ۲۱
۱-۹-۱-۱ منشأ بافت: ۲۱
۱-۹-۱-۲ مکانیزم هایی که باعث آزاد شدن cffDNA به درون گردش خون مادر شوند: ۲۲
۱-۹-۱-۳ جداسازی سلول ها و DNA آزاد جنین از خون مادر ۲۳
۱-۹-۱-۴ تغییرات میزان cffDNA در طی بارداری: ۲٤
۱-۹-۱-۴-۱ فاکتورهایی که DNA جنینی را تحت تأثیر قرار می دهند ۲٤
۱-۹-۱-۴-۲ روش هایی به قصد غنی کردن DNA جنینی: ۲٥
۱-۹-۱-۴-۲-۱ استفاده از فرم آلدهید: ۲٥
۱-۹-۱-۴-۲-۲ جدا کردن بر پایه سایز به وسیله ژل الکتروفورز: ۲٥
۱-۹-۱-۴-۲-۳ Cold PCR : ۲٥
۱-۹-۲روش های تشخیص CffDNA: ۲٦
۱-۹-۲-۱جدا کردن پلاسما و استخراج CffDNA: ۲۹
۱-۹-۲-۲جدایی بر پایه سایز به قصد جدا کردن Fetal DNA: ۲۹
۱-۹-۲-۳استفاده از Nested PCR جهت تشخیص جهش های جنینی که باعث هموگلوبینو پاتی می شوند: ۳۰
۱-۱۰ اهداف تحقیق ۳۴

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱ جمع اوری نمونه ۳٥

۲-۲ استخراج DNA از خون محیطی با استفاده از روش نمک اشباع ۳۵
۲-۳:جدا کردن پلاسما ۳۷
۲-۴استخراج DNA از پلاسما مادر: ۳۷
۲-۴-۱استخراج DNA از پلاسمای مادربا استفاده ازMaxi Kit: ۳۸
۲-۵ DNA typing : ۳۹
۲-۶ واکنش زنجیره ی پلی مراز(PCR) ۴۰
۲-۶-۱ شرایط، مواد و محلول های مورد نیاز برایRFLP ۴۰
۲-۷ الکتروفورز در ژل آگارز ۴۲
۲-۷-۱ مواد و محلول های مورد نیاز جهت الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۴۳
۲-۷-۲ طریقه بارگذاری(Running Procedure) ۴۳
۲-۸ روش انجامRFLP ۴۴
۲-۹ الکتروفورز با ژل پلی آکریل امید ۴۴
۲-۹-۱ محلولهای لازم در الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ۴۴
۲-۹-۲ وسایل لازم برای الکتروفورز ۴۴
۲-۹-۳ طرز تهیه ژل ۴۵
۲-۹-۴ ررنگ آمیزی نیترات نقره ۴۵
۲-۹-۴-۱ محلولهای مورد نیاز جهت رنگ آمیزی نیترات نقره ۴۵

فصل سوم: نتایج

۳-۱ PCR-RFLP : ۴۷
۳-۲ DNA typing : ۴۸
۳-۳ نتایج PCR-RFLP بر روی CffDNA: ۴۹
۳-۴ نتایج PCR-RFLP با پرایمرهای جدید: ۵۰
۳-۵ مشخص شدن وضعیت جنین از نظر ابتلا به بتا تالاسمی: ۵۵

فصل چهارم: بحث و پیشنهاد

۴-۱ بحث ۵۹
۴-۲ پیشنهادات ٦٤

فهرست جداول

جدول ۱-۱ تکنولوژی های آزمایش تشخیص قبل تولد(روش های تهاجمی): کابردهای بالینی مرتبط و ریسک ها و منافع...۱۹
جدول۲-۱ترکیبات محلول I استخراج(DNA محلول لیز کننده ی گلبول قرمز) ۳۶
جدول۲-۲: ترکیبات محلول II استخراج(DNA محلول لیز کننده ی گلبول سفید ۳۶
جدول۲-۳: غلظت و ترکیبات تشکیل دهنده يTE ۳۷
جدول۲-۴ : توالی پرایمرهای RFLP: ۴۰
جدول۲-۵ : آنزیم های محدود کننده و بافرم های مربوط به هر کدام ۴۱
جدول۲-۶: مواد تشکیل دهنده PCR برای هر مقر RFLP ۴۱
جدول ۲-۷ شرایط مراحل PCR برای پلاسما ۴۱
جدول۲-۸ :اندازه قطعات مقرهای RFLP قبل و بعد از برش ۴۲
جدول ۳-۱ نتایج حاصل از بررسی RFLP روی ۲ خانواده مورد بررسی ۴۸
جدول ۳-۲ نتیجه PCR-RFLP در مقر ε در مورد خانواده شماره ۱ .....۵۶

فهرست اشکال

شکل(۱-۱) : تولید انواع هموگلوبین در دوران جنینی و بلوغ ۳

شکل (۱-۲) : جایگاه وزمان تولید هموگلوبین در طی دوران جنینی و پس از تولد ٤

شکل(۱-۳) مجموعه ژنی β روی بازوی کوتاه کروموزم ۱۱ قرار گرفته است. ٤

شکل(۱-۴) ساختمان و بروز ژن بتا- گلوبین ٦

شکل(۱-۵) الگوی توارث بیماری بتا تالاسمی ٦

شکل(۱-۶) : فرم صورت بیماران تالاسمی ۷

شکل(۱-۷) موتاسیون های نقطه ای در پروموتر ژنی بتا- گلوبین سه ناحیه حفاظت شده پروموتری به همراه فاصله آنها از محل شروع رونویسی نشان داده شده است ۱۳

شکل(۱-۸) موتاسیون های نقطه ای در نواحی اتصالی که منجر به ایجاد آلل β۰ می شود و در نواحی مجاور اتصالی که منجر به ایجاد آلل +β می گردد، نشان داده شده است. ۱۵

شکل(۱-۹) موتاسیون های ایجاد شده در محل مخفی ناحیه اتصالی که منجر به ایجاد محل های جدید قطع و وصل در mRNAو تولید انواع غیرطبیعی هموگلوبین می شود. ۱۵

شکل(۱-۱۰) تعدادی از حذف های گزارش شده در دسته ژنی بتا- گلوبین.. ..... ۱۷

شکل(۱-۱۱).انالیز PCR -RFLP برای ۷ ژن بتا گلوبین که هاپلوتیپ ژن بتا گلوبین را می سازد. ۱۸

شکل(۳-۱) DNA typing بر روی DNAی استخراج شده از پلاسمای مادری در مقر آمیلوژنین ٤۸

شکل (۳-۲) DNA typing در مقر D8S1179 ،A: ٤۹

شکل(۳-۳): نتایج PCR-RFLP با پرایمرهای روتین آزمایشگاهی ۵۰

شکل۳-۴ : نتایج PCR برای 3'ωβ ۵۱

شکل(۳-۵) : نتایج PCR برای Rsa I ۵۲

شکل(۳-۶) : نتایج PCR برای Hinf I ۵۲

شکل(۳-۷) . شجره نامه مربوط به خانواده شماره ۲ و الگوی برش آنزیم Hinf I در افراد آن ۵۳

شکل(۳-۸) . نتیجه PCR-RFLP در مقر Hinf I در خانواده شماره ۲. ..... ۵٤

شکل(۳-۹) . شجره نامه مربوط به خانواده شماره ۱ که در مقر ε گویایی دارد. ۵٦

شکل(۳-۱۰) . نتیجه PCR-RFLP در مقر ε در خانواده شماره ۱. ..... ۵۷

شکل ۴-۱ : شجره نامه خانواده A ٦۲

شکل ۴-۲: شجره نامه خانواده B ٦۳

شکل ۴-۳ : شجره نامه خانواده C ٦٤

فصل اول:

مقدمه

۱-۱تالاسمی

تالاسمی قسمتی از یک گروه بزرگ اختلالات خونی به نام ناهنجاری هموگلوبینی[1] است. این گروه از اختلالات خونی به دو دسته اختلالات ساختمانی زنجیره گلوبین مانند کم خونی داسی شکل [2] و اختلالات مربوط به میزان سنتز یک یا چند زنجیره از گلوبین تقسیم می شود ، بهترین مثال برای دسته دوم، تالاسمی است [۱]..تالاسمی یکی از شایع ترین بیماری های ژنتیکی در جهان است که تقریباً ۲۰۰ میلیون نفر از مردم سراسر جهان به آن مبتلا می باشند [۲].

هموگلوبین یک فرد بالغ به طور طبیعی شامل دو زنجیره پلی پپتیدی الفا (α گلوبین) و دو زنجیره پلی پپتید بتا (β گلوبین) می باشد. در تالاسمی ساخت یک یا تعداد بیشتری از زنجیره های هموگلوبین به علت جهش در ژن تولید کننده آنها دچار نقص می گردد و بر این اساس به آلفا تالاسمی و بتا تالاسمی تقسیم می شود [۱].در α- تالاسمی، اختلال در سنتز زنجیره α گلوبین و در β- تالاسمی، اختلال در سنتز زنجیره β گلوبین وجود دارد [۳].

۱-۲تاریخچه تالاسمی:

تالاسمی برای اولین بار توسط توماس کولی[3] و لی[4] در سال ۱۹۲۵ در چند کودک ایتالیایی با کم خونی شدید، بزرگی طحال و کبد، تغییر رنگ پوست و تغییرات استخوانی شرح داده شد [۳].

لغت تالاسمی (به معنی کم خونی دریا) برای جلب توجه به ارتباط بیماری با منطقه مدیترانه مورد استفاده قرار گرفت. در آن زمان اکثر موارد تشخیص داده شده بیماری در خانوادهایی بود که اصلیت آنها از کشورهای اطراف دریای مدیترانه، خصوصاً یونان و ایتالیا بود . ولی امروزه، ثابت شده علاوه بر کشورهای مجاور دریای مدیترانه این بیماری در کشورهای غرب خاورمیانه، هند، اندونزی، ایران، تایلند، چین- ترکیه، ایتالیا و اسپانیا نیز شایع است [۴-۵] .

پس از سال ۱۹۴۰ مشخص شد که شکل ژنتیکی بیماری به صورت هموزیگوت بوده و به صورت اتوزومال مغلوب به ارث می رسد و نوع هتروزیگوت آن به نسبت خفیف تر است [۶].

[1] Hemoglobinopathies
[2] Sickle cell anemia
[3] Thomas Cooly
[4] Lee

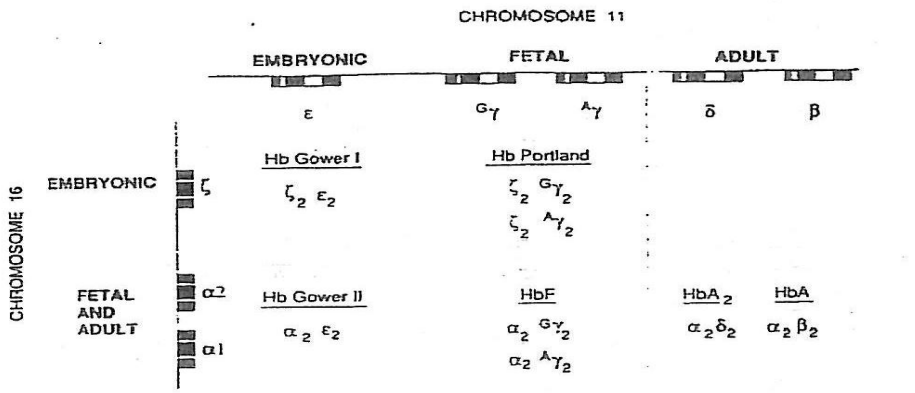
۱-۳هموگلوبین

گلبول های قرمز در مغز استخوان تولید می گردند و به دنبال از دست دادن هسته خود وارد خون گردیده و به مدت ۱۲۰ روز در آنجا باقی می مانند. وظیفه اصلی گلبول های قرمز انتقال اکسیژن از ریه ها به اندام ها و سلول های بدن می باشد. عامل اصلی این انتقال پروتئینی به نام هموگلوبین (Hb) است که محتوای اصلی گلبول های قرمز می باشد [۷].

هموگلوبین از چهار زنجیره که دو به دو با هم یکسان هستند و هر یک به یک مولکول هم[1] متصل شده اند تشکیل شده است. زنجیره های هموگلوبین عبارتند از دو زنجیره α و دو زنجیره β هرگونه نقص در تولید این زنجیره ها باعث ایجاد بیماری می گردد [۸].

۱-۳-۱ انواع هموگلوبین

اولین سلول های دارای هموگلوبین در جنین انسانی در چهارمین هفته بارداری مشاهده می شوند. قبل از هفته هشتم داخل رحمی، هموگلوبین های رویانی ($\zeta_2\varepsilon_2$) GowerI، ($\alpha_2\zeta_2$) GowerII و ($\varepsilon_2\gamma_2$) Portland غالب هستند [۹]. طبق شکل(۱-۱) هموگلوبین جنینی ($\alpha_2\gamma_2$) از اوایل دوران رویانی ساخته می شود و تولید آن بطور سریع افزایش می یابد به طوری که در هفته هشتم حاملگی، حداقل ۹۰٪ هموگلوبین از این نوع می باشد و در طول دوره جنینی و نوزادی به شکل غالب باقی می ماند. پس از ماه سوم بارداری هموگلوبین ($\alpha_2\beta_2$) تولید می گردد و پس از تولد در هفته های اول، میزان هموگلوبین F کاهش می یابد. هموگلوبین A بخش عمده ای از هموگلوبین گلبول قرمز را تشکیل می دهد.

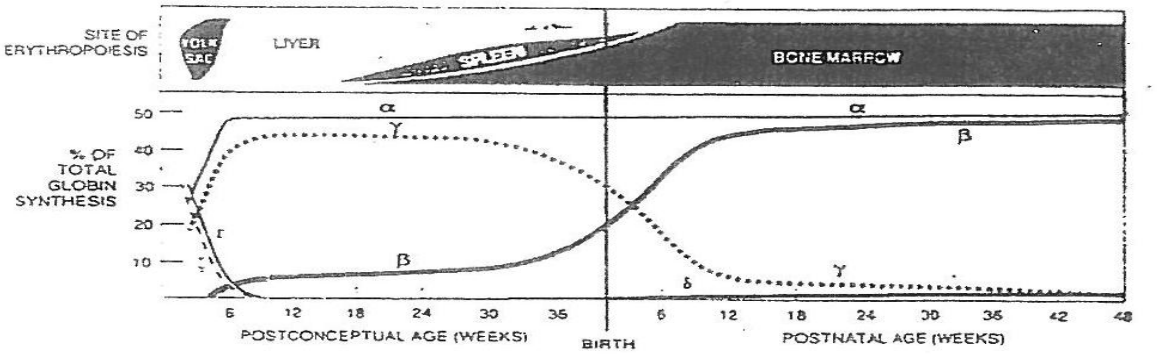


شکل(۱-۱) : تولید انواع هموگلوبین در دوران جنینی و بلوغ

مقدار HbF تا ششمین ماه تولد به حدود ۳٪ کل هموگلوبین کاهش می یابد و پس از یک سالگی به کمتر از ۲٪ می رسد. حدود ۲ تا ۳ درصد هموگلوبین بالغین را هموگلوبین A_2 تشکیل می دهد که از دو زنجیره α و دو زنجیره γ تشکیل شده است

[1] Heme

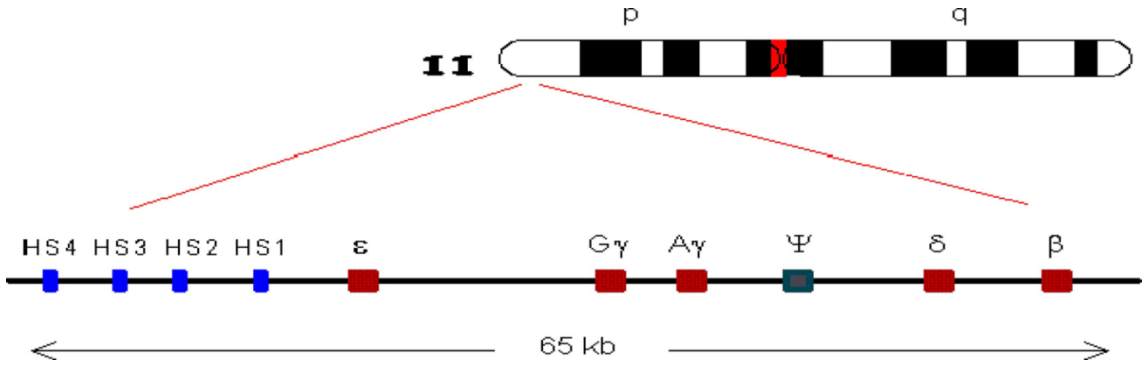
[۱۰]. شکل(۱-۲) جایگاه تولید گلبول های قرمز در طی دوران جنینی و پس از تولد را نشان می دهد. همان گونه که مشاهده می شود در دوران جنینی تولید گلبول های قرمز به ترتیب توسط کیسه زرده، کبد و طحال صورت می گیرد و پس از تولد مغزاستخوان این وظیفه را عهده دارد.



شکل (۱-۲) : جایگاه وزمان تولید هموگلوبین در طی دوران جنینی و پس از تولد[۱۰]

۱-۴ بتا تالاسمی:

سندروم های β- تالاسمی، گروهی از اختلالات ارثی هستند که به دلیل اختلالل در تولید زنجیره های β گلوبین ایجاد می شوند.ژن β گلوبین قسمتی از مجموعه ژنی است. مجموعه ژنی β روی بازوی کوتاه کروموزم ۱۱ قرار گرفته است.در مجموعه ژنی β بترتیب ژن های زیر قرار گرفته اند: ε- Gγ -Aγ -1βψ- δ- β که در زمان های مختلف بلوغ بروز پیدا می کنند[۷] شکل(۱-۳).



شکل(۱-۳) مجموعه ژنی β روی بازوی کوتاه کروموزم ۱۱ قرار گرفته است.

۱-۴-۱ ساختمان و بروز ژن بتا- گلوبین

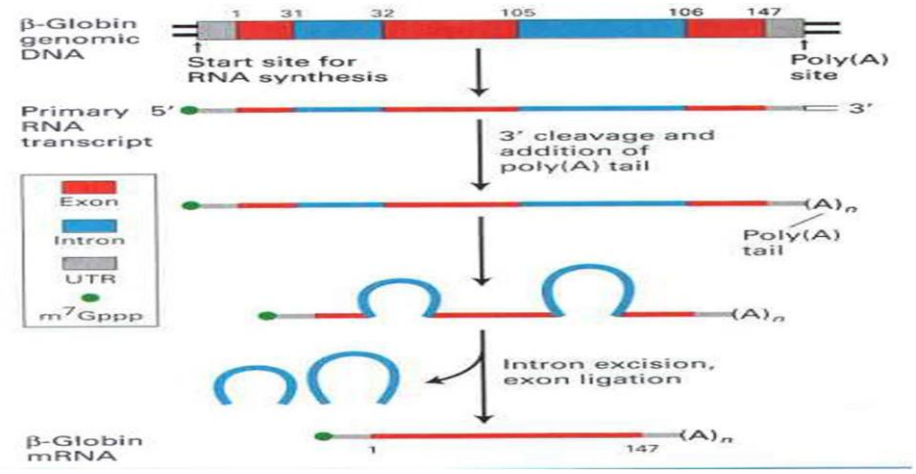
در ناحیه پروموتر ژن بتا- گلوبین جعبه TATA وجود دارد که شامل ردیف ATA می باشد. همچنین جعبه CCAAT و کمی بالاتر به طرف انتهای '۵ ردیف CACCC که یک بار تکرار شده است و در ژن های گلوبین های دیگر نیز یافت می شود، وجود دارد. ژن بتا- گلوبین ویژگی بافتی زیادی دارد و تنها در گلبولهای قرمز و پیش سازهای آنها بروز می یابد [۹].

ردیف هایی از پروموتر ژن، محل اتصال فاکتورهای نسخه برداری می باشد. یکی از این فاکتورها GATA-1 است. ژن های GATA خانوده ای از فاکتورهای نسخه برداری را کد می کنند که در DNA به ردیف های (A/G) GATA(T/A) متصل می شوند. چندین نسخه از ردیف هایی که GATA-1 به آن متصل می شود در پروموتر ژن بتا- گلوبین وجود دارد [۱۰].فاکتور نسخه برداری EKLE[1] به ردیف CACCC باعث عدم اتصال EKLF به این ناحیه شده و بتا- تالاسمی ایجاد می گردد. واکنش های پیچیده دیگری بین چندین فاکتور نسخه برداری دیگر و ناحیه پروموتر در کنترل بروز ژن نقش دارند. یک تنظیم کننده مهم دیگر شناسایی شده است که کاملاً دور از ژن بتا- گلوبین قرار دارد. این محل، ناحیه کنترل جایگاه LCR[2] نامیده می شود، این ناحیه برای بروز همه ژن های مجموعه ژنی بتا- گلوبین ضروری می باشد. LCR حاوی ردیف هایی است که محل اتصال GATA-1 و NF-E2[3] می باشد [۹] در نتیجه واکنش های پیچیده صورت گرفته بین LCR و پروموتر، تنظیم دقیقی در تغییر هموگلوبین رویانی به جنینی و سپس به بزرگسالی در طی دوران بلوغ و رشد جنین صورت می گیرد[۱۰].

ژن بتا- گلوبین دارای سه اگزون و ۲ اینترون می باشد. که اینترون دوم به طور قابل ملاحظه ای از اینترون اول بزرگتر است. همانطور که در شکل(۱-۴) مشاهده می شود نواحی غیرترجمه ای[4] کوتاهی د ردو انتهای '۵ و '۳، ناحیه کلاهک گذاری، ناحیه اتصال پلی آدنیل و نواحی برش و اتصال مجدد[5] همگی به ترتیب و مطابق معمول قرار گرفته اند. mRNA حاصل از ژن به سیتوپلاسم انتقال می یابد.

در ناحیه کلاهک، ۷- متیل گوانوزین قرار دارد که بعد از آن ناحیه غیرترجمه ای قرار گرفته است. کدون آغازین AUG است، که ترجمه از آنجا صورت می گیرد. این کدون رمز متیونین است و در آخر از رشته پلی پپتیدی جدا می گردد، بطوری که اولین اسید آمینه در رشته پروتئین بالغ والدین است، که با رمز GUG کار گذارده می شود. پلی پپتید بالغ حاصل از ترجمه، ۱۴۶ اسید آمینه دارد. با ظاهر شدن کدون UAA سنتز رشته متوقف می گردد [۹] باقی مانده انتهای mRNA,۳' غیرقابل ترجمه است [۱۱].

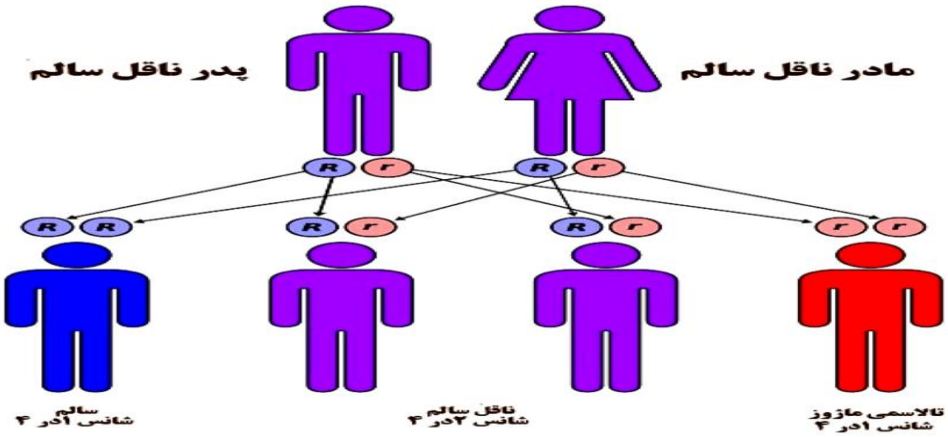
[1] Erythroid- krulppel like factor
[2] Lucos Control Region
[3] Nuclear factor Erythroid2
[4] Untranslated regions
[5] Splicing



شکل(۱-۴) ساختمان و بروز ژن بتا- گلوبین

۱-۴-۲ الگوی توارث بیماری بتا تالاسمی:

در اثر ازدواج زن و مردی که هر ۲ ناقل ژن تالاسمی باشند (فرم هتروزیگوت)، $\frac{1}{4}$ فرزندان به بیماری بتا تالاسمی ماژور مبتلا خواهند شد (شکل۱- ۵) و ۵۰٪ صرفاً ناقل ژن شده و ۲۵ ٪ ناقل ژن نیستند [۱۲-۱۳] .

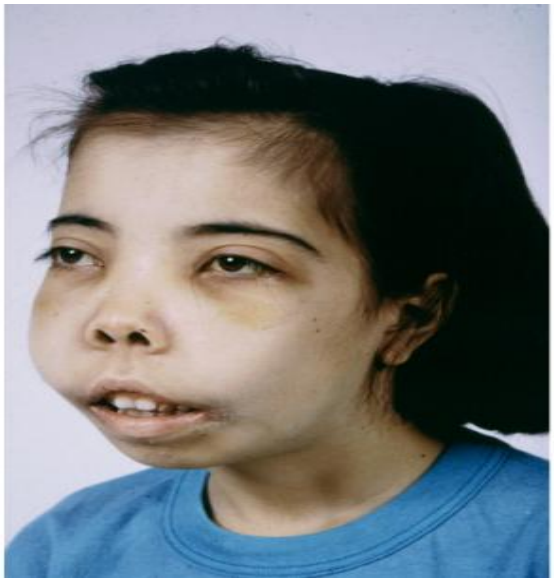


شکل(۱-۵) الگوی توارث بیماری بتا تالاسمی

۱-۴-۳اپیدمیولوژی

بتا تالاسمی در کشورهای وابسته به دریای مدیترانه ، خاورمیانه ، اسیای مرکزی ، هند ، جنوب چین وخاوردور وکشورهایی که در امتداد ساحل شمال افریقا و درجنوب امریکا هستند رایج است.بیشترین فراوانی ناقلین درمصر، ساردینیا واسیای جنوبی گزارش شده است[۱۴].

فراوانی ناقلین بتا تالاسمی ۱/۵ ٪ در جهان تخمین زده شده و حدود ۶۰۰۰۰ فرد علامت‌دار سالانه متولد می شوند و اکثریت در کشورهای در حال توسعه هستند . با توجه به آمارهای رسمی موجود، در ایران بیش از بیست هزار بیمار مبتلا به بتا-تالاسمی وجود دارد که سالیانه حدود ۲۵۰۰ تا ۳۵۰۰ نفر به آنها اضافه می شود[۱۵].



شکل(۱-۶) : فرم صورت بیماران تالاسمی

۱-۴-۴علائم بالینی:

فرم صورت بیماران تالاسمی حالتی شبیه صورت جوندگان[1] دارد. استخوان پیشانی ، آهیانه و گونه در این افراد برجسته می شود. پلی بینی کوتاه شده و چشم ها حالتی شبیه افراد مبتلا به سندرم داون پیدا می کنند(شکل۱-۶). در پرتو نگاری پوکی استخوان ناشی از افزایش حجم مغز استخوان، افزایش ترابکول ها و نازک شدن استخوان کورتیکال[2]، همچنین افزایش ضخامت کاسه سر و بروز نمای سیخ شدگی مو یا برس مویی مشهود است. از جمله تظاهرات دهانی در این بیماران می توان به جلو زدگی دندان های دو فک ، فاصله بین دندان ها، برجستگی لب بالا به علت بیرون زدگی فک بالا اشاره کرد [۱-۱۶].

۱-۴-۴-۱تالاسمی برحسب شدت علائم تقسیم می شود:

۱) تالاسمی مینور: به شکل هتروزیگوت و خفیف بیماری اطلاق می شود که در ان کم خونی، مختصر و خفیف است .از نظر ریخت شناسی با کم خونی فقر آهن اشتباه می شود. هموگلوبین A_2 افزایش یافته(۷-۳/۵ درصد) و گاهی افزایش

[1] Rodent face
[2] Cortical

مختصری در هموگلوبین F (۱۰-۲ درصد) دیده می شود. در این حالت درمانی لازم نیست و بیشتر افراد مبتلا هرگز تشخیص داده نمی شوند [۱۳].

۲) تالاسمی حد واسط[1]: علائمی خفیف تری نسبت به تالاسمی ماژور و شدیدتر از تالاسمی مینور داشته و در مقایسه با تالاسمی ماژور در سنین بالاتری مشاهده می شوند. در حالت شدید طیف بالینی، بیماران ۲ تا ۶ ساله هستند و بدون انتقال خون قادر به بقا بوده و رشد و تکامل توقف یافته است. در سوی دیگر طیف بیماران کاملاً بی علامت هستند با آنمی خفیف تا بلوغ می باشند[۱۷].

۳) تالاسمی ماژور:

۱-۴-۴-۲ بتا تالاسمی ماژور (آنمی کولی):

کم خونی کولی به حالت شدید و هموزیگوت بتا تالاسمی اطلاق می شود و شدیدترین حالت آنمی همولیتیک به حساب می آید. ادامه حیات این افراد وابسته به انتقال مکرر و مزمن خون می باشد. از نظر ژنوتیپ یا با دو ژن معیوب، $\beta^{o}-\beta^{o}$ (فقدان زنجیره β) یا $\beta^{+}-\beta^{+}$ (کاهش شدید زنجیره β) مشخص می شود [۱-۱۸].

۱- $\beta^{0}\beta^{0}$ - تالاسمی: در این حالت الل جهش یافته یا بیان نمی شود و یا برخی اوقات ژن حذف می شود. درحالت ($\beta^{o}-\beta^{o}$)، بطور کامل کاهش تولید زنجیره β اتفاق می افتد و یک نقصان کلی در تولید هموگلوبین A ایجاد می شود.

۲- β^{+}- تلاسمی: در این حالت یک کاهش در بیان ژن β گلوبین داریم نه حذف کامل آن . بنابراین در حالت هموزیگوت مقداری هموگلوبین A تولید می شود [۱۹] .

۱-۴-۵ تظاهرات پاتوفیزیولوژیک تالاسمی:

ژن تولید کننده زنجیره β گلوبین در تالاسمی ماژور به شدت کاهش یافته یا غایب است. کاهش زنجیره β باعث افزایش تولید زنجیره های δ و σ که در حالت طبیعی به میزان کم و ناچیز در بالغین وجود دارد، می شود و مقادیر هموگلوبین F و $A_{۲}$ افزایش می یابد. یکی دیگر از نتایج کاهش تولید زنجیره β گلوبین، تولید اضافی زنجیره α گلوبین می باشد که بصورت تترامر و اجسام انکلوزیونی غیرمحلول در می آیند و رسوب می کنند. این مواد عامل بسیاری از نواقص بالینی در تالاسمی می باشند [۲۰]. اریتروبلاست های در حال تکامل در مغز استخوان از بین می روند و تعداد معدودی از گلبول های قرمز هم که زنده می مانند محتوی انبوهی از اجسام انکلوزیونی هستند که در طحال شناسایی شده و دستخوش فاگوسیتوز و تخریب می شوند. این امر طول عمر گلبول های قرمز را کوتاه و آنمی همولیتیک شدیدی ایجاد می کند. از طرفی کاهش مقادیر تترامر هموگلوبین طبیعی ایجاد آنمی هیپوکروم و میکروستیک می کند.در نتیجه فرد دچار کاهش اکسیژن رسانی می شود

[1] Intermedia

این مسئله باعث آزاد شدن محرک ساخت گلبول های قرمز به نام اریتروپوئتین[1] می شود و مغز استخوان شروع به خون سازی می کند که البته به علت اثرات سمی زنجیره اضافی آلفا غیرمؤثر است و باعث افزایش حجم مغز استخوان می شود [۲].

از آنجا که خون سازی مغز استخوان بی فایده است کم خونی ادامه می یابد تا این که بافت های خون ساز خارج از مغز استخوان در کبد و طحال ایجاد می شوند، به نوبه خود باعث بزرگ شدن کبد و طحال می شود. بزرگی طحال باعث پرکاری آن و تخریب بیشتر گلبول های قرمز می شود [۲-۱۹].

افزایش حجم خون به دنبال اتساع مغز استخوان می تواند باعث فشار اضافی بر قلب، نارسایی قلبی، برون ده بالا و در نهایت بزرگی قلب شود. همچنین اتساع مغز استخوان باعث افزایش جذب آهن و رسوب آهن در بافت های بدن می شود [۲].

از طرفی با شروع درمان تزریق خون اضافه بار آهن ایجاد شده و رسوب پیشرونده آهن در بافت های بدن باعث ایجاد عوارض قلبی، کبدی و غدد درون ریز است که این مورد آخر باعث کوتاهی قد و تأخیر بلوغ می شود [۲۱-۲۲].

۱-۴-۶ تظاهرات بالینی تالاسمی:

علائم بالینی در ماه اول زندگی به علت اثر محافظتی هموگلوبین F بارز نبوده و با کاهش تدریجی آن در ۶-۴ ماهگی، زمانی که هموگلوبین جنینی با زنجیره δ (گاما) به هموگلوبین بالغین با زنجیره β تبدیل می شود، علائم نیز تشدید می گردد. در این زمان میزان هماتوکریت به کمتر از ۲۰ درصد و میزان هموگلوبین به $3g/dL$ می رسد [۱-۱۸]. در نتیجه فرد به آنمی شدید در اوایل دوران کودکی دچار می گردد و پرکاری طحال و در نتیجه افزایش کاتابولیسم هموگلوبین باعث افزایش میزان بیلی روبین[2] می شود [۲۳].

یکی از عوارض بسیار مهم این بیماری، بد شکلی های ناشی از افزایش حجم مغز استخوان است . اولین استخوان هایی که در این روند دچار مشکل می شوند. عبارتنداز: استخوان های کف پا، کف دست و استخوان های انگشتان که حالتی زاویه دار مستطیل شکل پیدا می کنند. اتصال زود هنگام اپی فیز استخوان های بلند باعث کوتاه ماندن این استخوان ها می شود و در نتیجه بیشتر بیماران تالاسمی، کوتاه قد هستند [۲۳]. نارسایی قلبی ناشی از هموکروماتوز[3] که بطور شایع عارض می شوداز مهمترین علل مرگ و میر در این بیماران است [۲۴].

[1] Erythropoietin
[2] Bilrubin
[3] Hemochoromatosis

۱-۴-۷ تشخیص و درمان در بیماران تالاسمی ماژور:

تشخیص بتا تالاسمی ماژور در طی دوران کودکی براساس کم خونی شدید همراه با بزرگی کبد ، طحال و گلبول های قرمز هیپوکروم و میکروستیک که در شکل و اندازه متفاوت اند به راحتی صورت می گیرد. الکتروفورز هموگلوبین افزایش مقدار Hbf , HbA_2 و مقادیر متغیر HbA را نشان می دهد. تشخیص قبل از تولد به وسیله آنالیز DNA در مایع آمنیوتیک امکانپذیر است و نقش مهمی در مشاوره ژنتیک دارد [۱-۲].

۱-۴-۸ روش های درمانی:

در حال حاضر دو روش متفاوت درمانی وجود دارد: یکی درمان سنتی بیماری و دیگری پیوند مغز استخوان. روش سنتی شامل سه جزء می باشد:

۱- ترزیق مر تب خون ۲- طحال برداری (اسپنکتومی) ۳- آهن زدایی[1]

۱-۴-۸-۱ تزریق مر تب خون:

حیات بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور وابسته به انتقال خون مکرر می باشد. ترزیق خون جهت نگهداری هموگلوبین در حدی که برای تأمین اکسیژن بافت ها کفایت نماید و نیز تولید گلبول های قرمز معیوب را مهار کند ضروری است [۲۵-۲۱] . ثابت شده اگر برای کودکان مبتلا به طور و تب انتقال خون انجام گیرد تا سطح هموگلوبین بین g/dL ۱۴-۱۰ حفظ شود، از کمبود مزمن اکسیژن خون جلوگیری می شود، بیمار فعالیت بدنی و رشد طبیعی دارد و افزایش حجم جبرانی مغز استخوان کاهش می یابد [۲۶-۱]

رژیم درمانی (سوپوترانسفوزیون یا میزان بالای تزریق) که بین سال های ۱۹۷۹ و ۱۹۸۲ مطرح گردید هدف درمان را از اصطلاح کم خونی به طرف حفظ حداقل هموگلوبین در حد g/dL ۱۲ تغییر داد. این رژیم درمانی ضمن برطرف نمودن کم خونی بیمار، موجب افزایش بار آهن و عوارض ناشی از آن می گردد.

[1] Iron chelation therapy