٥٩٩٣

بسم الله الرحمن الرحيم

١١٤٦٨٦

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده پزشکی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی بالینی

تشخیص غیر تهاجمی پیش از تولد بتا-تالاسمی با استفاده از DNA آزاد جنینی موجود در خون مادران باردار

نگارش :
امید توسلی

استاد راهنما :
دکتر سید علیرضا مصباح نمین

استاد مشاور :
دکتر محمد تقی اکبری

۱۳۸۸/۴/ ۱
مرکز اطلاعات مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

زمستان ۸۷

۱۱۴۶۸۶

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای امید توسلی رشته: بیوشیمی بالینی 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 سیدعلیرضا مصباح نمین (استاد راهنما)

دکتر محمدتقی اکبری (استاد مشاور)

دکتر محمد تقی‌خانی (استاد ناظر)

دکتر سیروس زینلی (استاد ناظر)

دکتر زهرا بطحائی (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 ـ 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 بیوشیمی بالینی است که در سال ۱۳۸۷ دردانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر سید علیرضا صباغ ، مشاوره دکتر محمدتقی کبری 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 امید نوسلی ..... دانشجوی رشته بیوشیمی بالینی ..... مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده ، به آن ملتزم می شوم.

نام ونام خانوادگی امید نوسلی
تاریخ و امضا ۱۳۸۷/۱۲/۱۹

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 . امید موسلی
تاریخ و امضاء ۱۳۸۷/۱۲/۱۹

تقدیم به پزشکان و پژوهشگرانی که در زمینه
پیش گیری و درمان بتا- تالاسمی تلاش می کنند.

حال که این پژوهش با موفقیت به انجام رسیده است، لازم است از کلیه عزیزانی که در کلیه مراحل انجام این کار مرا یاری رسانده و مورد لطف قرار داده اند تشکر کنم :

استاد محترم جناب آقای دکتر سید علیرضا مصباح نمین که با راهنمایی های ارزنده هدایت این پایان نامه را بر عهده داشتند.

استاد محترم جناب آقای دکتر محمد تقی اکبری که علاوه بر راهنمایی های ارزنده با در اختیار گذاشتن مواد، دستگاه ها و نمونه ها شرایط مناسبی برای انجام این تحقیق فراهم آوردند.

کلیه پرسنل آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران (دکتر اکبری)، (به ویژه خانم ها بهمنی، زارع، شعبانی، متقی و جنگجو) که مرا در پیشبرد این پژو.هش یاری کردند.

چکیده :

تالاسمی شایعترین اختلال تک ژنی در دنیا می باشدبه طوری که حدود ۷ درصدجمعیت جهان و در ایران به طور متوسط۵ درصد(حدود ۳ میلیون نفر) ناقل این بیماری هستند. با توجه به اینکه در حال حاضر در ایران و سایر کشورها از نمونه برداری از پرز های کوریونی (CVS) برای تعیین ژنوتیپ جنین استفاده می شود و با توجه به اینکه این روش یک روش تهاجمی است که شانس سقط ناشی از به کارگیری آن، در صورتی که شخص با تجربه و ماهر باشد، یک درصد بیش از احتمال سقط خودبه خودی در همان زمان است و اغلب زنان باردار از این روش بیم و هراس دارند؛ نیاز به استفاده از یک روش غیر تهاجمی احساس می شود.
امروزه مشخص شده است که DNA آزاد جنینی در سرم 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 پلی مورفیسم های به ارث رسیده از پدر به جنین بوده است. ۲۰ زوج که نوزاد آن ها در معرض ابتلا به بتا-تالاسمی قرار داشتند مورد بررسی قرار گرفتند. هشت مقر پلی مورفیک پیوسته به ژن بتا-گلوبین با استفاده از RFLP بررسی شدند و مقرهای گویا شناسایی شدند. آلل پدری به ارث رسیده از پدر به جنین در زمینه ژنتیکی سرم مادر شناسایی شد و در مورد زوج هایی که امکان تعیین فاز کروموزومی پدر وجود داشت وضعیت جنین از نظر ابتلا به بتا-تالاسمی تعیین شد. در مورد همه ۲۰ خانواده مورد بررسی در این تحقیق همه هشت مقر RFLP بررسی شدند و در هر خانواده حداقل یک مقر گویا وجود داشت. نتایج بدست آمده از بررسی ۲۸ مقر گویا بدست آمده در مورد سرم مادر با نمونه CVS مطابقت داشت. از ۲۰ خانواده مورد بررسی در این تحقیق اطلاعات خانوادگی کامل ۱۲ خانواده بدست آمد و با استفاده از آنالیز ژن بتا-گلوبین به کمک RFLP، در همه ۱۲ مورد، وضعیت جنین از نظر ابتلا به بتا-تالاسمی تعیین شد که با نتایج بدست آمده از بررسی نمونه CVS منطبق بود. تشخیص غیر تهاجمی پیش از تولد بتا-تالاسمی با آنالیز RFLP ژن بتا-گلوبین در مورد سرم مادر را می توان پیش از نمونه برداری CVS انجام داد.
این روش تعیین می کند که جنین کدام آلل پدر (آلل نرمال یا جهش یافته) دریافت کرده است. در صورتی که جنین آلل نرمال پدر را گرفته باشد، پس مبتلا به تالاسمی ماژور نیست و نمونه برداری CVS منتفی می شود. ولی در صورتی که مشخص شود جنین آلل جهش یافته پدر را دریافت کرده، در این حالت، جنین نرمال نیست و ممکن است مبتلا به بتا-تالاسمی مینور یا ماژور باشد. پس با آنالیز CVS و تعیین عدم حضور جهش مادری، احتمال ابتلا جنین به بتا-تالاسمی ماژور به ۰٪ خواهد رسید.

کلمات کلیدی : بتا-تالاسمی، سرم مادر، تشخیص پیش از تولد، RFLP

فهرست عناوین

عنوان صفحه

فصل اول : مقدمه
۱-۱- تاریخچه ای در مورد بتا- تالاسمی ۲
۱-۲- شیوع تالاسمی ۳
۱-۳- هموگلوبین ۵
۱-۳-۱- انواع هموگلوبین ۶
۱-۳-۲- ساختار ژنتیکی هموگلوبین ۶
۱-۳-۳- ساختمان و بروز ژن بتا – گلوبین ۷
۱-۴- سندرم تالاسمی ۹
۱-۴-۱- پاتوژنز تالاسمی ۹
۱-۴-۲- بتا-تالاسمی ۱۰
۱-۴-۲-۱-علائم بالینی ۱۱
۱-۴-۲-۲- اساس مولکول بتا تالاسمی ۱۲
۱-۴-۲-۱-۱- اثرات مو لکولی جهش ها ۱۵
۱-۴-۲-۱-۱-۱- حذفهای بزرگ ژن ۱۵
۱-۴-۲-۱-۲- جهش های نقطه ای و حذف و اضافه شدنهای کوچک ۱۶
۱-۴-۲-۱-۲-۱- موتاسیون ها ی مؤثر درسطح رونویسی ۱۷
۱-۴-۲-۱-۲-۲-موتاسیون های موثر در سطح پردازش mRNA ۱۸
۱-۴-۲-۱-۲-۱- جهش های ساختمانی ۱۸
۱-۴-۲-۱-۲-۱-۱- جهش جایگاه کلاهک گذاری ۱۸
۱-۴-۲-۱-۲-۱-۲- جهش جایگاه پلی آدنیلاسیون ۱۹
۱-۴-۲-۱-۲-۲- جهش های اتصالی ۱۹
۱-۴-۲-۱-۲-۲-۱- جهشهای نواحی اتصالی ۱۹
۱-۴-۲-۱-۲-۲-۲- جهش های نواحی مجاور نواحی اتصالی ۲۱
۱-۴-۲-۱-۲-۲-۳- جهش های نواحی مخفی ۲۱
۱-۴-۲-۱-۲-۲-۳-۱- جهش درجایگاه های مخفی پیرایش دراگزون ها ۲۲
۱-۴-۲-۱-۲-۲-۳-۲- جهش در جایگاه های مخفی پیر ایش در اینترون ها ۲۳
۱-۴-۲-۱-۲-۳- جهش هایی که باعث تولید زنجیره گلوبین فاقد عمل می گردند ۲۳
۱-۴-۲-۱-۲-۳- ۱-جهش های بی معنی ۲۴
۱-۴-۲-۱-۲-۳- ۲- موتاسیون های تغییرقالب ۲۴

۱-۴-۲-۲-۱-۲-۳- ۳- موتاسیون در کدون آغازین ۲۴
۱-۵- تشخیص پیش از تولد ۲۵
۱-۵-۱- انواع تکنیک های تشخیص قبل از تولد ۲۶
۱-۵-۱-۱- آمنیوسنتز ۲۶
۱-۵-۱-۲- نمونه برداری از پرزهای کوریونی (CVS) ۲۶
۱-۵-۱-۳- نمونه برداری از خون جنین ۲۸
۱-۵-۱-۴- اولترا سونوگرافی ۲۹
۱-۵-۱-۵ - جدا سازی سلول ها و DNA آزاد جنین از خون مادر ۲۹
۱-۵-۲- لزوم استفاده از روش های غیر تهاجمی تشخیص پیش از تولد ۳۰
۱-۶- **DNA** جنینی آزاد سلولی در پلاسما و سرم مادر ۳۰
۱-۶-۱- تاریخچه ۳۰
۱-۶-۲- توصیف DNA در حال گردش ۳۱
۱-۶-۳- DNA با منشأ جنینی در زنان باردار ۳۲
۱-۶-۴-زیست شناسی cffDNA ۳۲
۱-۶-۴-۱- بافت منشأ ۳۲
۱-۶-۴-۲- مکانیزم هایی که باعث آزاد شدن cffDNA به درون گردش خون مادر می شوند ۳۳
۱-۶-۴-۳- تغییرات میزان cffDNA در طی بارداری ۳۴
۱-۶-۴-۳-۱- فاکتورهایی که DNA جنینی را تحت تأثیر قرار می دهند ۳۵
۱-۶-۵- مقایسه سرم و پلاسما به عنوان منبع cffDNA ۳۶
۱-۷- تشخیص مولکولی بتا-تالاسمی ۳۶
۱-۷-۱- دستورالعمل تشخیص قبل از تولد بتا-تالاسمی (در ایران) ۳۶
۱-۷-۱-۱- تشخیص قبل از تولد بتا تالاسمی ـ مرحله دوم ۳۶
۱-۷-۲- تشخیص پیش از تولد بتا- تالاسمی ۳۶
۱-۸- فرضیه تحقیق ۳۷
۱-۹- اهداف تحقیق ۳۷

فصل دوم : مروری بر مطالعات گذشته
۲-۱- مقدمه ۳۹
۲-۲- تشخیص پیش از تولد بتا-تالاسمی با استفاده از cffDNA ۳۹

فصل سوم : مواد و روش ها
۳-۱- جمع آوری نمونه خون ۴۵

۳-۲- استخراج **DNA** ژنومی ۴۵
۳-۲-۱ وسائل مورد نیاز ۴۵
۳-۲-۲ مواد مورد نیاز ۴۵
۳-۲-۳ روش کار ۴۶
۳-۳- جمع آوری نمونه سرم و **CVS** مادران باردار ۴۷
۳-۴- استخراج **DNA** از سرم مادر ۴۷
۳-۴-۱ مواد مورد نیاز ۴۷
۳-۴-۲ وسائل مورد نیاز ۴۷
۳-۴-۳ روش کار ۴۷
۳-۵- استخراج **DNA** از **CVS** ۴۹
۳-۵-۱ مواد و وسایل لازم برای استخراج ۵۰
۳-۵-۲- روش کار ۵۰
۳-۶- بررسی میزان خلوص **DNA** های استخراج شده ۵۰
۳-۶-۱مواد و وسائل لازم ۵۰
۳-۶-۲ روش کار ۵۱
۳-۷- تعیین نوع جهش پدر، مادر و **CVS** با استفاده از تکنیک **ARMS-PCR** ۵۱
۳-۷-۱- روش ARMS / PCR ۵۱
۳-۷-۲- طراحی آغازگر ۵۲
۳-۷-۲-۱- عوامل مؤثر بر ویژگی آغازگرهای ARMS ۵۴
۳-۷-۳- مواد و وسائل لازم ۵۴
۳-۷-۴-روش کار ۵۶
۳-۸- الکتروفورز محصول**PCR** بر روی ژل آگارز ۵۹
۳-۸-۱- مواد لازم ۵۹
۳-۸-۲- روش کار ۵۹
۳-۹- بررسی **RFLP** ۶۰
۳-۹-۱- مواد و وسائل لازم ۶۰
۳-۹-۲- واکنش زنجیره ای پلیمرازی (PCR) ۶۲
۳-۹-۳- روش کار ۶۵
۳-۱۰- الکتروفورز محصول **PCR** بر روی ژل پلی آکریل آمید ۶۵
۳-۱۰-۱- تهیه ژل ۶۵
۳-۱۰-۱-۱ مواد لازم ۶۵
۳-۱۰-۱-۲- طرز تهیه ژل پلی آکریل آمید ۶۶

۳-۱۰-۲- رنگ آمبزی ژل پلی آکریل آمید ۶۷
۳-۱۰-۲-۱ مواد لازم جهت رنگ آمیزی نیترات نقره ۶۷
۳-۱۰-۲-۲- روش کار ۶۷

فصل چهارم : نتایج
۴-۱- نتایج حاصل از تعیین نوع جهش پدر، مادر و CVS با استفاده از تکنیک ARMS-PCR ۷۰
۴-۲- نتایج حاصل از بررسی RFLP ۷۳
۴-۳- نتایج تعیین وضعیت جنین از نظر ابتلا به بتا-تالاسمی ۷۵
فصل پنجم : بحث و پیشنهادات ۸۵
فهرست منابع ۹۱
ضمیمه ۹۹
ضمیمه الف-۱- نمونه ای از پرسشنامه (حاوی اطلاعات خانوادگی بیمار)
که برای هر خانواده تکمیل شده است ۱۰۰
چکیده به انگلیسی ۱۰۱
صفحه عنوان انگلیسی ۱۰۲

فهرست تصاویر

عنوان — صفحه

شکل ۱-۱- توزیع جغرافیایی مالاریا و بتا- تالاسمی ۴
شکل ۱- ۲ تغییرات نسبت تولد بچه های مبتلا به بتا- تالاسمی
در چهار کشور بعد از اجرای برنامه پیشگیری ۵
شکل ۱-۳- تولید انواع هموگلوبین در دوران جنینی و بلوغ ۶
شکل ۱-۴- جایگاه تولید گلبولهای قرمز در طی دوران جنینی و پس از تولد ۷
شکل ۱-۵ : نقشه مجموعه ژنی بتا و آلفا ۷
شکل ۱-۶ : نقشه ژن بتا - گلوبین و چگونکی نسخه برداری و تبدیل آن به mRNA بالغ ۹
شکل ۱-۷ پاتوژنز تالاسمی ۱۰
شکل ۱-۸- الگوی وراثت ژنی در بیماری بتا-تالاسمی ۱۱
شکل ۱-۹: ژنوتیپ های که منجر به فنوتیپ های مختلف بتا- تالاسمی می گردند ۱۲
شکل ۱-۱۰ : چهره ظاهری یک بیمار مبتلا به بتا - تالاسمی ماژور ۱۳
شکل ۱ -۱۱:موتاسیون های مختلف درژن بتا گلوبین ۱۴
شکل ۱-۱۲:توزیع جهانی موتاسیون های مختلف بتا- تالاسمی ۱۵

شکل ۱-۱۳- تعدادی از حذفهای گزارش شده در دسته ژنی بتا- گلوبین ۱۶
شکل ۱- ۱۴ : موتاسیونهای نقطه ای در پروموتر ژنی بتا- گلوبین ۱۸
شکل ۱-۱۵- برش و آدنیل گذاری ۲۰
شکل ۱-۱۶: موتاسیون های نقطه ای در نواحی اتصالی ۲۰
شکل ۱-۱۷ : موتاسیون های ایجاد شده در محل مخفی ناحیه اتصالی ۲۲
شکل۱-۱۸- فعال شدن جایگاه مخفی پیرایش در اولین اگزون ژن بتا - گلو بین ۲۲
شکل۱-۱۹- فعال شدن جایگاه مخفی پیرایش در اولین اینترون ژن بتا-گلوبین ۲۳
شکل ۱-۲۰ نمونه برداری از مایع آمنیوتیک ۲۷
شکل ۱-۲۱- نمونه برداری از پرزهای کوریونی ۲۷
شکل۱-۲۲- نمونه گیری از خون جنین ۲۸
شکل۳-۱- مراحل استخراج DNA به روش column based ۴۸
شکل۳-۲- مقایسه تراد ف های دو نوع آغازگر طبیعی و جهش یافته، طراحی شده، برای
بررسی جهش (G → A) 1- IVSI در ژن بتا – گلوبین ۵۲
شکل ۳-۳- نمایی از مراحل مختلف واکنش PCR ۶۳
شکل۴-۱- الکتروفورز محصولات مربوط به واکنش PCR، Mix A روی ژل آگارز ۲٪ ۷۱
شکل۴-۲- الکتروفورز محصولات مربوط به واکنش PCR، Mix B روی ژل آگارز ۲٪ ۷۲
شکل۴-۳- الکتروفورز محصولات PCR بررسی شده از نظر جهش مادر (IVS I-I) ۷۲
شکل۴-۴- الکتروفورز محصولات PCR بررسی شده از نظر جهش پدر (IVS II-I) ۷۳
شکل۴-۵- الکتروفورز محصول PCR مقر Hinc II/β3'ψ هضم شده با آنزیم
محدودکننده Hinc II بر روی ژل آکریل آمید ۱۲٪ ۷۶
شکل۴-۶- الکتروفورز محصول PCR مقر Hind II/ε هضم شده با آنزیم
محدودکننده Hind II بر روی ژل آکریل آمید ۱۲٪ ۷۷
شکل۴-۷- الکتروفورز محصول PCR مقر Hind II/ε هضم شده با آنزیم
محدودکننده Hind II بر روی ژل آکریل آمید ۱۲٪ ۷۸
شکل۴-۸- الکتروفورز محصول PCR مقر Ava II/β هضم شده با آنزیم
محدودکننده AvaII بر روی ژل آکریل آمید ۱۲٪ ۸۰
شکل۴-۹- الکتروفورز محصول PCR مقر Rsa I/β هضم شده با آنزیم
محدودکننده Rsa I بر روی ژل آکریل آمید ۱۲٪ ۸۲
شکل۴-۱۰- الکتروفورز محصول PCR مقر Hinf I/β هضم شده با آنزیم
محدودکننده Hinf I بر روی ژل آکریل آمید ۱۲٪ ۸۴

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول ۱-۱- هزینه های سالیانه یک بیمار تالاسمی ۴
جدول۱-۲- انواع جهش های گزارش شده برای لکوس ژنی بتاگلوبین در دنیا ۱۴
جدول ۱-۳ : انواع تالاسمی با توجه به ژنوتیپ جهش یافته ۲۵
جدول۱-۴- روش های تشخیص پیش از تولد ۲۶
جدول۳-۱- تاثیر ناجور جفت شدگی ها بر تکثیر ویژه آللی ۵۳
جدول۳-۲- برنامه ARMS-PCR مورد استفاده ۵۵
جدول۳-۳- جدول ترادف آغازگرهای کنترل داخلی و مشترک ۵۶
جدول ۳-۴- ترادف آغازگرهایی که آغازگر مشترک 31#، آغازگر reverse آن ها است ۵۶
جدول ۳-۵- ترادف آغازگر جهش هایی که آغازگر مشترک 30#، آغازگر forward آن ها است ۵۷
جدول۳-۶- مواد تشکیل دهنده میکس PCR در واکنش Mix A ۵۷
جدول۳-۷- مواد تشکیل دهنده میکس PCR در واکنش Mix B ۵۸
جدول۳-۸- مواد تشکیل دهنده میکس PCR برای واکنش های
منفردی که پرایمر مشترک آن ها ۳۰# است ۵۸
جدول۳-۹- مواد تشکیل دهنده میکس PCR برای واکنش های
منفردی که پرایمر مشترک آن ها #۳۱ است ۵۸
جدول۳-۱۰- مواد تشکیل دهنده واکنش PCR در مورد DNA بدست آمده از سرم مادر ۵۹
جدول ۳-۱۱- توالی پرایمرهای RFLP ۶۱
جدول ۳-۱۲- آنزیم های محدودکننده و بافرهای مربوط به هر کدام ۶۱
جدول ۳-۱۳- مواد تشکیل دهنده PCR برای هر مقر RFLP به همراه شرایط PCR ۶۲
جدول۳-۱۴- اندازه قطعات مقر های RFLP قبل و بعد از برش ۶۴
جدول۴-۱- جهش های تعیین شده پدر، مادر و نمونه CVS در مورد ۲۰
خانواده مورد بررسی در این تحقیق ۷۱
جدول۴-۲- نتایج بدست آمده از بررسی RFLP، ۲۰ خانواده مورد بررسی ۷۴
جدول۴-۳- اطلاعات خانوادگی کامل ۱۲ خانواده از ۲۰ خانواده مورد بررسی در این تحقیق ۷۹

فصل اول:

مقدمه و کلیات

۱-۱- تاریخچه ای در مورد بتا- تالاسمی:

بیماری های هموگلوبین (هموگلوبینوپاتیها)[۱] عمومی ترین بیماری تک ژنی در جهان می باشند [۱] که شامل وار یته های مختلف ساختمانی هموگلوبین و انواع تالاسمی می باشند [۲]. در سال دو هزار میلادی تقریباً ۷٪ جمعیت جهان حامل ژنهای بیما ری های مهم هموگلوبین بودند [۱].

از نظر بالینی، مهمترین انواع اختلالات هموگلوبین عبارتند از: بتا-تالاسمی، آلفا - تالاسمی ، کم خونی داسی شکل[۲] و ترکیبات حالات هتروزیگوت بتا- تالاسمی/ هموگلوبین S و بتا- تالاسمی/ هموگلوبین E [۲].

بتا - تالاسمی یکی از مهم ترین و شایع ترین اختلالات هموگلوبین می باشد. اولین گزارش از آنچه که امروزهٔ بتا _ تالاسمی هموزیگوت نامیده می شود ، به وسیله توماس کولی[۳] و همکارش پیر لی[۴] در سال ۱۹۲۵ ارائه شد، آنها چهار کودک را مشاهده کردند که دارای کم خونی و بزرگی طحال بوده و در اثر تغییر شکل استخوان های صورت و جمجمه، شکل ظاهری چهره آنها غیرطبیعی شده بود و به آن کم خونی کولی می گفتند [۳].

نام تالاسمی برای این بیماری اولین بار در سال ۱۹۳۲به وسیله جرج ویپل[۵] و برادفورد[۶] با استفاده از کلمه یونانی تالاسا (θαλασσα) به معنی دریا انتخاب شد؛ چون اولین افراد شناسایی شده مبتلا به این بیماری از ساکنان منطقه مدیترانه بودند [٤] . در سال ۱۹۳۷ آنجلینی[۷] ایتالیایی و در سال ۱۹۳۸کامینوپتروس[۸] یونانی مشاهده کردند که والدین و خویشاوندان بیماران مبتلا به کم خونی کولی نیز علائم بیماری را نشان می دهند، از اینرو آنها پیشنهاد کردند که این بیماری دارای اساس ژنتیکی است[۳]. در نیمه اول دهه ۱۹۴۰چندین گروه تحقیقاتی ازجمله وینتروب[۹] و همکاران و دامشک[۱۰] و همکاران و در سال ۱۹۴۱ استراوس[۱۱] شکل ملایم تالاسمی را در خانواده های دارای کم خونی کولی گزارش کردند.

درسال ۱۹۴۴ والنتین[۱۲] و نیل[۱۳] نشان دادند که تالاسمی مینور، حالت هتروزیگوت تالاسمی، و تالاسمی ماژور و یا کم خونی کولی، شکل هموزیگوت آن است. در سال ۱۹۵۱ لیکوری[۱٤] و در سال ۱۹۵۲ ریچ[۱۵] نشان دادند که در افراد مبتلا به کم خونی کولی، هموگلوبین جنینی (HbF) افزایش می یابد [۳]. در سال ۱۹۶۵ ودرال[۱٦] و همکاران نشان دادند که در آلفا - تالاسمی سنتز زنجیره آلفا و در افراد مبتلا به بتا - تالاسمی ، سنتز زنجیره بتا- گلوبین در سلولهای اریتروئیدی کاهش می یابد [۳].

1-Hemoglobinopathies
2-Sickle cell anemia
3-Thomas B.Cooley
4-Pear Lee
5-George Wipple
6-Brad For
7-Angelini
8-Camino
9-Wintrobe
10-Dameshek
11-Strauss
12-Vaslentine
13-Neel
14-Liquori
15-Rich
16-Weatheral

درسال ۱۹۷۹ دیزروت[1] وهمکاران با ایجاد ملکول های هیبریدوما (با استفاده از فیبروبلاست انسانی و موش) نشان دادند که ژن آلفا- گلوبین بر روی کروموزوم ۱۶ و ژن بتا – گلوبین بر روی کروموزوم ۱۱قرار دارد [۳]. در همین سال گوسلا[2] و همکاران نشان دادند که جایگاه ژن بتا - گلوبین بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۱ قرار دارد. درسال ۱۹۸۰ فریتش[3] و همکاران ترتیب قرار گرفتن ژن ها را در دسته ژنی بتا- گلوبین[4] تعیین کردند. در همین سال لایر[5] و همکاران و همچنین لیب هابر[6] و همکارانش نشان دادند که ژن بتا - گلوبین دارای سه اگزون و دو اینترون می باشد [۳].

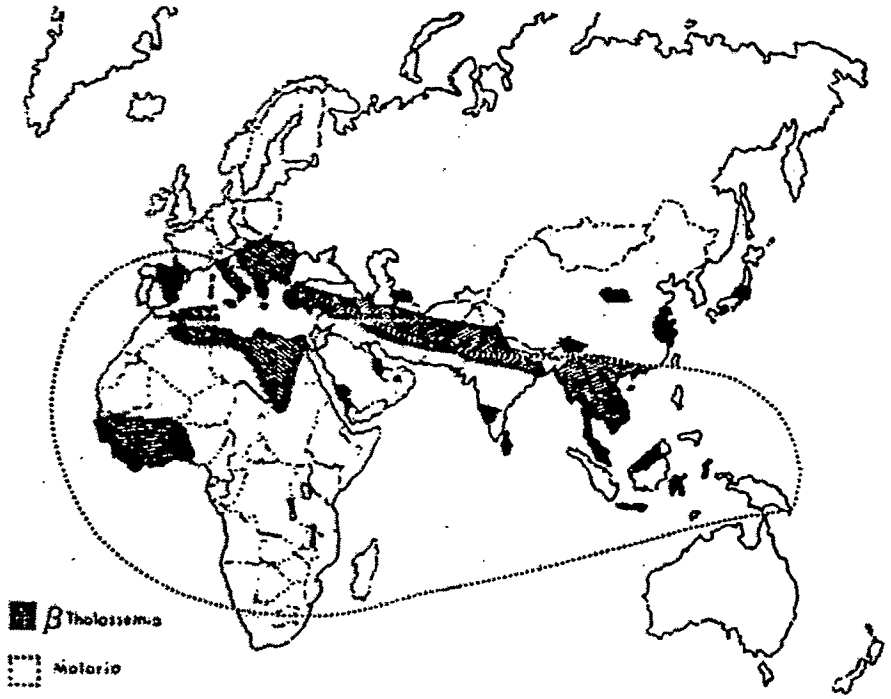
۱-۲- شیوع تالاسمی

بیماری های مربوط به هموگلوبین بیشترین بیماری تک ژنی درجهان هستند که یک مشکل عمده زیستی در بسیاری از کشورهای جهان به حساب می آیند. بطوریکه در سال ۲۰۰۰حدود ۷٪جمعیت جهان حامل ژنهای این بیماری بودند [۱]. از ابن دسته بیماری ها، سندرم های تالاسمی بطور گسترده در منطقه مدیترانه و خاورمیانه وکشورهای آسیایی مشاهده می شوند و شیوع قابل توجهی در بین جمعیت هایی که از این مناطق منشأ گرفته اند وجود دارد [۵]. با توجه به اینکه افراد حامل ژن تالاسمی (حالت هتروزیگوت) تا حدی نسبت به مالاریا مقاوم هستند بنابر این مالاریا یک فشار انتخابی بر انتشار ژن های تالاسمی اعمال می کند [۶]. همانطور که درشکل ۱-۱ مشاهده می شود، اکثرمناطقی که تالاسمی شیوع دارد در نواحی مالاریا خیز جهان قراردارند [۱]. در منطقه مدیترانه و خلیج فارس بیش از دویست هزار بیمار مبتلا به بتا- تالاسمی هموزیگوت وجود دارد.

در برخی از نواحی مانند یونان، سواحل مدیترانه ای ایتالیا، ایران، جنوب روسیه، هند و جنوب شرقی آسیا ده تا پانزده درصد ازمردم حامل ژن بتا- تالاسمی هستند و تخمین زده می شود که در هر ۱۵۰ تا ۲۰۰ تولد یک مورد مبتلا به بتا- تالاسمی هموزیگوت متولد می شود [۵]. تخمین زده شده است که درآسیا بالغ بر یکصد وهفده میلیون حامل بتا- تالاسمی وجود داشته باشند و سالانه بیش از یکصد و پنج هزار فرد مبتلا به بتا- تالاسمی ماژور در این منطقه متولد می شوند [۱]. 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 [۷].

با توجه به شیوع بالای بتا- تالاسمی در ایران و هزینه های سنگین درمان نگهدارنده این افراد (جدول ۱-۱) و اینکه تا این زمان ، تنها راه درمان بیماری، پیوند مغز استخوان می باشد (که آن هم درصورت وجود دهنده با HLAیکسان با آنها می باشد)، تنها راه پیشگیری، شناساثی حاملین و انجام مشاوره های لازم با آنها و تشخیص پیش از تولد می باشد [۷].

1-Deisseroth 2- Gusella 3- Fritsh
4-β-Globin gene cluster 5-Lauer 6-Lieb Haber



شکل ۱-۱- توزیع جغرافیایی مالاریا و بتا- تالاسمی[۵].

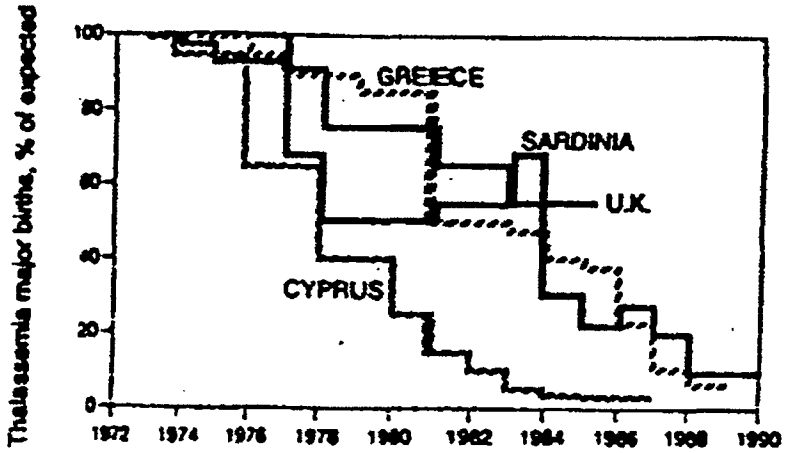
جدول ۱-۱- هزینه های سالیانه یک بیمار تالاسمی بدون احتساب هزینه های پرسنلی، تجهیزات آزمایشگاهی و درمان آهن]۷[

هزینه درمانی	۴۴۳۴۷۵
هزینه تزریق خون	۵۴۷۲۰۰
هزینه خرید فیلتر برای هر بار تزریق	۶۳۰۰۰۰
مراقبتهای ویژه	۱۸۷۸۲۰
جمع کل به ریال	۵۷۹۰۶۷۰

شکل ۱- ۲ برنامه های تشخیص قبل از تولد در کشورهایی که به طور جدی آن را پیگیری کرده اند را نشان می دهد. همان گونه که مشاهده می شود در قبرس از تولد بیش از ۹۶٪ موارد تالاسمی و در یونان و ایتالیا از تولد حدود ۹۵٪جنین های مبتلا به بتا- تالاسمی جلوگیری شده است [۸].

۱-۳- هموگلوبین

گلبولهای قرمز در مغز استخوان تولید می گردند و به دنبال از دست دادن هسته خود وارد خون گردیده و بمدت ۱۲۰ روز در آنجا باقی می مانند. گلبولهای پیر و فرسوده توسط سیستم بیگانه خواری تک هسته ای در طحال از خون، پاکسازی می گردند. وظیفه اصلی گلبول های قرمز انتقال اکسیژن از ریه ها به اندام ها وسلول های بدن می باشد. عامل اصلی این انتقال پروتئینی است به نام هموگلوبین(Hb) که محتوای اصلی گلبولهای قرمز می باشد[۹].



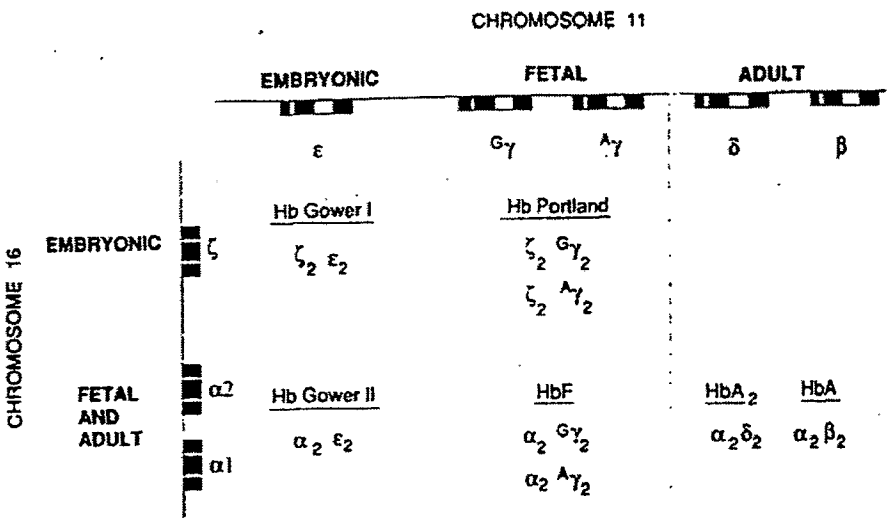
شکل ۱-۲ : تغییرات نسبت تولد بچه های مبتلا به بتا- تالاسمی در چهار کشور بعد از اجرای برنامه پیشگیری [۸].

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 که به طور متعادل ویکسان درگلبولهای قرمز نارس و رتیلکوسیت ها تولید می گردند و هرگونه نقص در تولید این زنجیره ها باعث ایجاد بیماری می گردد. در هموگلوبینوپاتی هایی مثل بیماری سلول داسی، هموگلوبین D و غیره یک نقص کیفی در زنجیرهای هموگلوبین وجود دارد که منجر به عدم عملکرد طبیعی و بیماری گشته است . اما هرگونه کاهش در میزان سنتز یکی از زنجیره ها باعث عدم تعادل بین رشته های α و β گردیده و رشته های اضافی به صورت پلیمر درآمده و درگلبول رسوب می کند که منجر به نابودی زودرس گلبول های قرمز می شود و سندرم تالاسمی را ایجاد می کند [۱۰]. گاهی اوقات تغییرات در رشته های هموگلوبین هم کیفی و هم کمی است (مانند هموگلوبین E) که در این حالت هم از میزان ساخت زنجیر β کاسته شده است و هم هموگلوبین ساخته شده فاقد عملکرد طبیعی است [۱۰].

1-Heme

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 Portland ($\varepsilon_2 \gamma_2$)و GowerII ($\alpha_2\xi_2$), GowerI ($\xi_2\varepsilon_2$) غالب هستند[۶]. همان گونه که در شکل ۱-۳ مشاهده می شود هموگلوبین جنینی($\alpha_2\gamma_2$-HbF) 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 ازاین نوع می باشد و در طول دوره جنینی و نوزادی به شکل غالب باقی می ماند. پس از ماه سوم بارداری هموگلوبین A($\alpha_2\beta_2$)تولید می گردد و پس از تولد در هفته های اول، میزان هموگلوبینF کاهش می یابد. هموگلوبین A اکثریت هموگلوبین گلبول قرمز را تشکیل می دهد.



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

بطوری که 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. تمایل هموگلوبینF به اکسیژن بیشتر از هموگلوبینA می باشد و با این مکانیسم در دوران جنینی اکسیژن از هموگلوبین مادر به گلبولهای قرمز جنین که دارای هموگلوبینF می باشند انتقال می یابد. حدود ۲ تا ۳درصد هموگلوبین بالغین را هموگلوبین A_2 تشکیل می دهد که از دو زنجیره α و دو زنجیره γ تشکیل شده است [۱۱].

شکل ۱-۴ 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 مغز استخوان این وظیفه را به عهده می گیرد.

۱-۳-۲- ساختار ژنتیکی هموگلوبین

هر دو ژن α و β گلوبین قسمتی از مجموعه های ژنی هستند. مجموعه ژنی β روی بازوی کوتاه کروموزم ۱۱ و مجموعه ژنی α روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۶قرار گرفته است. این مجموعه های ژنی علاوه بر ژن های