مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره چهاردهم، شمارهٔ ۳، اردیبهشت۱۳۹۱، صفحه ۱۸-۱۳

بررسی مولکولی حذف های خوشه ژنی بتا- گلوبین در افراد کم خون مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان کودکان امیرکلا

محمدرضا احمدی فرد(MSc) [۱]، هاله اخوان نیاکی(PhD) *[۲و۴]، حسن محمودی نشلی(MD) [۳]، علی بنی هاشمی(BSc) [۴]،
ماندانا عزیزی(BSc) [۴]، نرگس موسوی(MSc) [۱]، رقیه پورباقر(MSc) [۱]، رضا یوسفی کمانگری(BSc) [۴]

۱- دانشگاه علوم پزشکی بابل
۲- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
۳- مرکز تحقیقات بیماریهای غیرواگیر کودکان امیرکلا، دانشگاه علوم پزشکی بابل
۴- آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان کودکان امیرکلا، دانشگاه علوم پزشکی بابل

دریافت: ۹۰/۵/۱۲، اصلاح: ۹۰/۸/۱۸، پذیرش: ۹۰/۹/۱۰

خلاصه

سابقه و هدف: دلتا بتا تالاسمی و پایداری ارثی هموگلوبین جنینی (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin, HPFH) حالتهای هتروژنی هستند که با افزایش هموگلوبین جنینی (Hemoglobin Fetal, Hb F) همراه می باشند. جهش های مربوطه از نوع حذف ژنی می باشند که با روش های معمول هماتولوژیک قابل تشخیص نمی باشند. این مطالعه به منظور تشخیص مولکولی افراد کم خون دارای حذف خوشه ژنی بتا گلوبین مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان کودکان امیرکلا انجام شد.

مواد و روشها: این مطالعه مقطعی بر روی ۳۰ بیمار کم خون (۱۴ زن و ۱۶ مرد) با اندکس های هماتولوژیک (MCV<80 fl، MCH<27 pg، Hb A_2 متغیر و Hb F افزایش یافته) که فاقد جهش های شایع ژن بتا گلوبین بودند، انجام شد. نمونه ها با روش مولکولی Gap-PCR برای ۳ حذف شایع ژن بتا گلوبین شامل دلتا و بتا تالاسمی سیسیلی، وارونگی- حذف شدگی آسیایی هندی و هموگلوبین لپور بررسی شدند.

یافته ها: حذف های سیسیلی، آسیایی- هندی و هموگلوبین لپور هر کدام به ترتیب در ۶ نفر (۲۰٪)، ۶ نفر (۲۰٪) و ۱ نفر (۳/۳۳٪) بیماران وجود داشت و در ۱۷ مورد جهش ناشناخته باقی ماند.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که انواع حذف در خوشه ژنی بتا گلوبین در این منطقه وجود دارد. بنابراین با غربالگری قبل از ازدواج و تشخیص پیش از تولد می توان موجب افزایش کارایی برنامه پیشگیری تالاسمی ماژور شد.

واژه های کلیدی: دلتا- بتا تالاسمی، هموگلوبین لپور، واکنش زنجیره ای پلیمراز.

مقدمه

بتا تالاسمی یکی از شایع ترین بیماری های تک ژنی در جهان می باشد که با کاهش و یا عدم سنتز زنجیره بتا گلوبین همراه می باشد که در نتیجه آن ساخت هموگلوبین کاهش یافته و باعث کم خونی می شود. این بیماری در کشورهای منطقه مدیترانه، خاورمیانه، آسیای مرکزی، هندوستان، جنوب چین، شرق دور، شمال آفریقا و آمریکای جنوبی شیوع بیشتری دارد (۱). حدود ۲۷۰ میلیون نفر در جهان دارای یک نقص در سنتز هموگلوبین می باشند که از این میان حدود ۸۰ میلیون نفر ناقل بتا تالاسمی بوده و سالانه حدود ۵۶ هزار نوزاد مبتلا به بتا تالاسمی ماژور در دنیا متولد می شوند (۳و۲). تالاسمی مهمترین اختلال ژنتیکی در ایران می باشد. بیش از ۲ میلیون ناقل بتا تالاسمی و حدود ۱۵ هزار فرد مبتلا به بتا تالاسمی ماژور در ایران وجود دارند (۴). تاکنون بیش از ۲۰۰ نوع موتاسیون در ژن بتا گلوبین شناسایی شده است که شایع ترین آنها شامل جابجایی تک نوکلئوتیدی، حذف و یا اضافه شدن یک قطعه الیگونوکلئوتیدی می باشد (۶و۵).

▣ این مقاله حاصل پایان نامه محمدرضا احمدی فرد دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و طرح تحقیقاتی به شماره ۸۹۲۸۵۲۵ دانشگاه علوم پزشکی بابل می باشد.

* مسئول مقاله:
آدرس: بابل، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، تلفن: ۰۱۱۱-۲۲۳۴۶۵۰
e-mail:halehakhavan@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.3.2.2]

جهش هایی که موجب حذف قطعات بزرگ از ژن بتا گلوبین شوند ناشایع می باشند و ممکن است علاوه بر ژن بتا، سایر ژنها را نیز در بر گیرند و حالت ناهمگنی از تالاسمی تحت عنوان دلتا- بتا تالاسمی یا پایداری ارثی هموگلوبین جنینی (HPFH) را ایجاد کنند (۸-۵). افراد هتروزیگوت برای این حالت دارای کم خونی میکروسیتیک هایپوکرومیک خفیفی می باشند و هموگلوبین A2 آنها نرمال یا کاهش یافته و هموگلوبین F آنها معمولا افزایش نشان می دهد (۸و۷). با توجه به ناحیه حذف شده در خانواده ژنی بتاگلوبین طول قطعات متفاوت می باشند و بر این اساس انواع مختلف دلتا بتا تالاسمی وجود دارد که شایع ترین آنها شامل حذفهای سیلیسی، چینی، اسپانیایی، هموگلوبین لپور و حذف و وارونگی ترکی و آسیایی هندی می باشند (۸).

بررسی های انجام شده در جمعیتهای مختلف جهان و نیز مطالعات محدود در ایران نشان میدهد که هر جمعیت یا منطقه طیف جهشهای مختص خود را دارد (۱۷-۸). لذا با توجه به هتروژن بودن جمعیت ایران و متفاوت بودن جهش ها در هر منطقه و نیز گزارش موارد دلتا بتا تالاسمی در اکثر جمعیت های با شیوع قابل توجه بتا تالاسمی، شناسایی حذف های احتمالی دلتا بتا تالاسمی در جمعیت شمال کشور که ۸ تا ۱۰ درصد آنها ناقل بتا تالاسمی می باشند (۱۸) و تاکنون نیز هیچ گزارش از انواع جهشهای دلتا- بتا تالاسمی در این منطقه ارائه نشده است، از اهمیت خاصی برخوردار است. از آنجا که موارد خاص دلتا- بتا تالاسمی با آزمایشات معمول هماتولوژیک و توالی یابی قابل تشخیص نمی باشند، شناسایی این جهش ها با روش سریع، ساده و ارزان Gap-PCR جهت تشخیص ناقلین و پیشگیری از تولد نوزادان مبتلا به تالاسمی ماژور در زوجین مستعد حائز اهمیت می باشد.

هدف از این مطالعه تعیین طیف انواع جهش های شایع دلتا- بتا تالاسمی در افراد کم خون مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک امیرکلا و در نتیجه تسهیل مشاوره و ارتقای کیفیت غربالگری و تشخیص مولکولی جهت پیشگیری از تولد نوزادان تالاسمی ماژور می باشد.

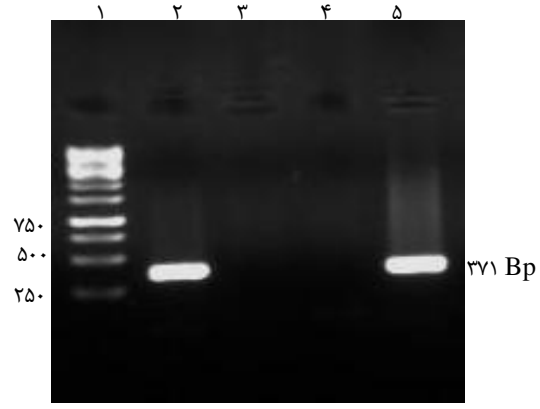
مواد و روشها

این مطالعه مقطعی بر روی ۳۰ بیمار مشکوک به حذف در خوشه ژنی بتا گلوبین مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان کودکان امیرکلا با اندکس های هماتولوژیک (MCV<80 fl، MCH<27 pg، $Hb\ A_2$ متغیر و Hb F نرمال و یا افزایش یافته) که براساس بررسی های مولکولی انجام شده فاقد جهش های شایع ژنهای آلفا و بتا گلوبین و دارای هاپلوتیپهای یکسان (هوموزیگوت) و در نتیجه احتمال حذف در خوشه ژنی بتا گلوبین بودند، انجام شد. جهش در ژنهای آلفا و بتا گلوبین با استفاده از روش Gap PCR یا RFLP یا Reverse Dot Blot مورد بررسی قرار گرفت (۱۹). از کلیه بیماران رضایت نامه کتبی جهت انجام مطالعه اخذ شد.

بررسی مولکولی دلتا بتا تالاسمی: برای هر بیمار ۰/۵ سی سی نمونه خون حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جهت استخراج DNA به روش Alkalin lysis مورد استفاده قرار گرفت. بررسی مولکولی با استفاده از روش Gap-PCR که برای مشخص کردن حذف های شناخته شده می باشد، انجام شد. در این روش برای هر جهش دو آغازگر اولیگونوکلئوتیدی که دو طرف ناحیه حذف شده را در بر می گیرند، مورد استفاده قرار گرفت. در صورت وجود حذف، دو آغازگر به هم نزدیک شده و تکثیر DNA صورت می گیرد و اگر حذفی صورت نگرفته باشد دو آغازگر به علت فاصله زیاد قادر به تکثیر DNA نمی باشند و محصولی تولید نمی شود (۸). طول قطعات تکثیر شده مورد انتظار برای هر حذف بر اساس موقعیت آغازگرهای به کار گرفته شده، مشخص است. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر که شامل ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، آنزیم DNA پلیمراز (1Unit)Taq، (10mM Tris-HCl, 1.25mM MgCl2, 50mM KCl, PH 8.3) PCR buffer، dNTP Mix(200 nMol) که همگی از شرکت Roche آلمان خریداری شدند، انجام شد. توالی پرایمرها بر اساس تحقیق Graig و همکاران (۸) که توسط شرکت Bioneer ساخته شده، مشخص می باشد (جدول ۱). این پرایمرها اجازه بررسی حذف های سیسیلی، وارونگی- حذف شدگی آسیایی هندی و هموگلوبین لپور را می دهند. واکنش PCR نیز همین تحقیق انجام شد. برای مشاهده محصولات از ژل آگارز ۱٪ در حضور سایز مارکر ۲۵۰ جفت بازی استفاده شد.

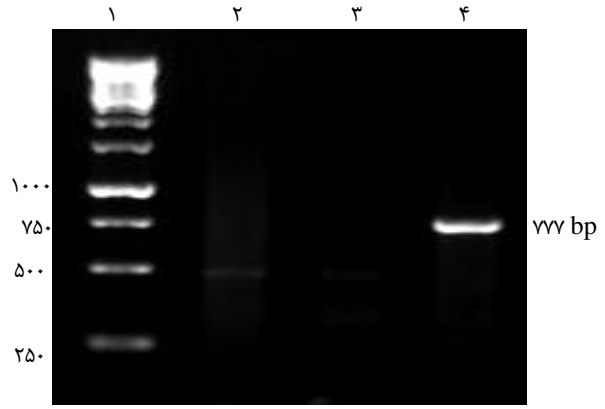
یافته ها

۳۰ بیمارکم خون مشکوک به دلتا-بتا تالاسمی با اندکسهای هماتولوژیک MCV= ۶۸/۶±۵/۴ (fl) RBC= ۵/۶±۰/۷ ($x10^6$/µl) و (pg) MCH= ۲۱/۸±۲/۲ و HbA2= ۳/۹۶±۱/۷٪ و HbF= ۵/۵±۶/۲٪ مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند. پس از تکثیر DNA به روش Gap-PCR در بیماران دارای دلتا- بتا تالاسمی سیسیلی، دلتا-بتا تالاسمی هندی- آسیایی و هموگلوبین لپور به ترتیب یک قطعه به طول۱۱۵۰، ۳۷۱ و ۷۷۷ جفت باز مشاهده گردید. این آزمایشات نشان داد که ۶ بیمار ناقل دلتا- بتا تالاسمی سیسیلی، ۶ بیمار ناقل دلتا- بتا تالاسمی هندی- آسیایی و یک بیمار ناقل هموگلوبین لپور بودند و در ۱۷ مورد هیچیک از انواع جهشهای بررسی شده، وجود نداشت. نتایج تکثیر DNA در بیماران دلتا- بتا تالاسمی آسیایی- هندی، هموگلوبین لپور و دلتا - بتا تالاسمی سیسیلی متفاوت بود (تصاویر ۳-۱). شاخص های هماتولوژیک این بیماران نیز بر اساس نوع جهش با هم متفاوت بود (جدول ۲).

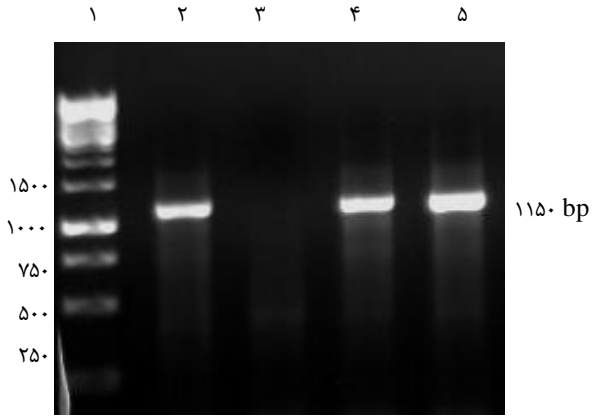


شکل ۱. نتیجه PCR دلتا بتا تالاسمی آسیایی- هندی. ستون ۱ نشانگر طول قطعات (250 bp DNA ladder)، ستون ۲و۵ محصول تکثیر DNA مربوط به فرد ناقل دلتا بتا تالاسمی آسیایی- هندی را نشان میدهد. ستون ۳و۴ مربوط به فرد فاقد این نوع جهش می باشد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.3.2.2]



شکل ۲. نتیجه PCR برای هموگلوبین لپور. ستون ۱ نشانگر طول قطعات (250 bp DNA Ladder) و ستون ۴ محصول تکثیر DNA مربوط به فرد ناقل هموگلوبین لپور را نشان می دهد. ستون های ۲و۳ مربوط به فرد فاقد این نوع جهش می باشد.



شکل ۳. نتیجه PCR مربوط به دلتا بتا تالاسمی سیسیلی. ستون ۱ نشانگر طول قطعات (250 bp DNA Ladder)، ستون های ۲و۴و۵ محصول تکثیر DNA مربوط به فرد ناقل دلتا بتا تالاسمی سیسیلی را نشان میدهد. ستون ۳ مربوط به فرد فاقد این نوع جهش می باشد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای استفاده شده و طول قطعات تکثیر یافته برای جهش های مختلف

طول قطعه تکثیر یافته	موقعیت آغازگر بر روی ژن	توالی آغازگر		حذف
۱۱۵۰جفت باز	۵۴۹۷۲-۵۴۹۹۲	5′ TTGGGTTTCTGATAGGCACTG 3′	چپ	سیسیلی
	۶۹۵۰۰-۶۹۴۸۱	5′ TAGATCCCTTTGCCATTATG 3′	راست	
۳۷۱ جفت باز	۴۱۰۲۲-۴۱۰۰۰	5′ GAGCTGAAGAAAATCATGTGTGA 3′	چپ	آسیایی-هندی
	۶۳۹۰۷-۶۳۸۸۶	5′ GCAGCCTCACCTTCTTTCATGG 3′	راست	
۷۷۷ جفت باز	۵۴۵۸۶-۵۴۶۱۰	5′ GACACACATGACAGAACAGCCAAT 3′	چپ	هموگلوبین
	۶۲۷۶۳-۶۲۷۴۲	5′ CATTCGTCTGTTTCCCATTCTA 3′	راست	لپور

جدول ۲. شاخص های خون شناسی در ۳۰ فرد کم خون بررسی شده

حذف	تعداد	RBC(x106/µl)	MCV(fl)	MCH(pg)	Hb(g/dl)	HbA2(%)	HbF(%)
سیسیلی	۶	۵/۱± ۰/۶	۷۲± ۴/۵	۲۳/ ۱± ۲	۱۲± ۰/۹	۳/ ۲± ۱/۳	۸/۴± ۷/۴
آسیایی-هندی	۶	۵/۶± ۰/۷	۷۲/۸±۳/۵	۲۳/۸±۰/۹	۱۳/۶±۱/۳	۲/۵±۱/۱	۱۴/۶±۱
هموگلوبین لپور	۱	۶/۵	۶۴	۲۰	۱۳/۶	۳/۷	۱
حذف ناشناخته	۱۷	۵/۷±۰/۷	۶۶/۵±۵/۳	۲۱±۲/۱	۱۱/۷±۱/۷	۴/۶±۱/۳	۱/۶±۳/۶

MCV: میانگین حجم گویچه ای، MCH:میانگین هموگلوبین گویچه ای، HbF: هموگلوبین جنینی ($\alpha_2\gamma_2$)، HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$). مقادیر ذکر شده در جدول نمایانگر میانگین ± انحراف از معیار (mean ± SD) است.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه جهش دلتا بتا تالاسمی در ۱۳ مورد شناسایی شد. ۶ مورد (۲۰٪) دلتا بتا تالاسمی سیسیلی و ۶ مورد (۲۰٪) حذف- وارونگی هندی- آسیایی از شایع ترین جهش ها بودند و هموگلوبین لپور تنها در یک مورد (۳/۳٪) مشاهده شد. نتایج این مطالعه با فراوانی های گزارش شده توسط Esteghamat و همکاران در ایران همخوانی دارد (۱۰). در یک مطالعه دیگر در ایران که توسط Babashah و همکاران بر روی۲۶ بیمار از کل استانهای ایران صورت گرفت به ترتیب شایع ترین جهش ها، هموگلوبین لپور، دلتا- بتا تالاسمی سیسیلی، دلتا- بتا تالاسمی هندی- آسیایی و دلتا- بتا تالاسمی ترکی گزارش شد (۱۱). اما در این مطالعه هموگلوبین لپور کمترین فراوانی را داشت، این تفاوت مشاهده شده در توزیع جهش ها بار دیگر تاکیدی بر لازمه تعیین طیف و فراوانی جهشهای هر منطقه می باشد. مطالعاتی که پیرامون حذف های خانواده ژنی بتا گلوبین در کشورهای اطراف ایران انجام شده نیز نشان می دهد که انواع حذفهای موجود در خوشه ژنی بتا گلوبین درکشورهای تالاسمی خیز متفاوت است.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.3.2.2]

بتا تالاسمی شایع ترین بیماری ژنتیکی در ایران می باشد و بسیار ناهمگون است. با توجه به خطر ۲۵ درصدی تولد فرزند تالاسمی ماژور در هر بارداری برای زوجین ناقل این بیماری، آزمایشات غربالگری قبل از ازدواج برای جلوگیری از تولد فرزندان مبتلا به بتا تالاسمی ماژور یکی از اولویت های بهداشتی در ایران می باشد. برای این منظور ابتدا زوجین را بر اساس آزمایشات هماتولوژیک و اندازه گیری MCV، MCH و $Hb\ A_2$ غربالگری و پس از آن افراد مشکوک به تالاسمی را برای تشخیص نوع جهش با آزمایشات مولکولی بررسی می کنند. در این میان افرادی وجود دارند که کم خونی خفیفی دارند ولی $Hb\ A_2$ آنها نرمال است و ممکن است گاها در روند غربالگری شناسایی نشوند یا علی رغم شناسایی در غربالگری اولیه و انجام بررسی های مولکولی معمول و حتی تعیین توالی DNA، جهش آنها ناشناخته باقی می ماند و در نتیجه ممکن است این افراد در صورت داشتن حذف در خوشه ژنی بتا گلوبین و ازدواج با یک فرد ناقل تالاسمی، صاحب نوزاد مبتلا به تالاسمی ماژور شوند.

در هندوستان HPFH-3 بیشترین شیوع را دارد و پس از آن حذف- وارونگی هندی- آسیایی و دلتا- بتا تالاسمی ویتنامی قرار دارند (۱۲). در مطالعاتی که در ترکیه صورت گرفت حذف- وارونگی ترکیه ای که شامل وارونگی یک قطعه ۷/۶Kb و حذف دو قطعه ۱۱/۵ Kb از انتهای '۵ و ۱/۶Kb از انتهای '۳ زنجیره بتا می باشد، دیده شده است (۱۳). علاوه بر آن یک حذف ۳۰Kb نیز در نوع دیگری از دلتا- بتا تالاسمی در ترکیه گزارش شده است (۱۴). در یک مطالعه که در یونان انجام شد حذفی به طول ۷.۲Kb در زنجیره بتاگلوبین اتفاق افتاد که این ناحیه حذف شده نقش مهمی در تکامل ژن بتا گلوبین دارد (۱۵). نتایج دیگر مطالعات نشان می دهد که جمعیت ایران از نظر پراکندگی جهش ها بسیار نا همگون می باشد و طیف جهش ها در هر منطقه متفاوت است. لذا شناسایی طیف جهش های شایع در هر منطقه موجب سهولت و سرعت بخشیدن شناسایی افراد ناقل در آزمایشات مولکولی و تشخیص پیش از تولد می شود (۱۷و۴). بررسی مولکولی سایر جهشهای حذفی گزارش شده در ایران یا کشورهای همسایه بر روی نمونه های نا شناخته میتواند در تعیین دقیقتر اپیدمیولوژی مولکولی این بیماری و افرایش دقت و تسریع شناسایی مولکولی تالاسمی کمک کننده باشد (۲۰و۱۹).

همچنین از آنجا که اکثر افراد مبتلا به دلتا- بتا تالاسمی و پایداری ارثی هموگلوبین جنینی (HPFH) و سایر حذف های ژن بتا گلوبین، دارای هموگلوبین جنینی (Hb F) افزایش یافته هستند، توصیه می شود که در آزمایشات غربالگری قبل از ازدواج علاوه بر سایر تست های هماتولوژیک میزان هموگلوبین جنینی (Hb F) نیز بررسی شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بابل و همچنین از مساعدت و همکاری کلیه بیماران و خانواده های محترم آنها تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.3.2.2]

Molecular Investigation of Beta Globin Gene Cluster Deletions in Anemic Patients Referred to the Genetic Laboratory of Amirkola Children Hospital (Iran)

M.R. Ahmadi Fard (MSc)[1], H. Akhavan Niaki (PhD) [2,4 *], H. Mahmoodi Nesheli (MD)[3], A. Banihashemi (BSc)[4], M. Azizi (BSc) [4], N. Mousavi (MSc) [1], R. Pourbagher (MSc) [1], R. Yousefi Kamangari (BSc)[4]

1. Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
2. Cellular and Molecular Biology Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
3. Non Communicable Pediatric Diseases Research Center, Amirkola Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
4. Genetic laboratory of Amirkola Children Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

J Babol Univ Med Sci; 14(3); May 2012; pp: 13-18.

Received: Aug 3rd 2011, Revised: Nov 9th 2011, Accepted: Dec 1st 2011.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) and δβ-thalassemia are heterogeneous disorders characterized by elevated levels of fetal hemoglobin (Hb F). Deletional mutations are responsible for the disease and are not recognized by routine hematological tests. The aim of this study was to perform a molecular characterization of beta globin gene cluster deletions in anemic patients referred to the genetic laboratory of Amirkola children hospital.

METHODS: In this cross sectional study, thirty patients (14 females and 16 males) with mild microcytic hypochromic anemia with hematologic index (MCV<80 fl, MCH<27 pg, variable HbA_2 and high level of Hb F) were tested for the 3 common delta beta deletional mutations: Sicilian δβ-thalassemia, Asian-Indian inversion-deletion γδβ-thalssemia and hemoglobin Lepore using Gap-PCR technique.

FINDINGS: Sicilian, Asian-Indian γδβ-thalssemia deletions as well as the Hb Lepore were found respectively in 6 (20%), 6 (20%) and 1 (3.33%) patients and 17 cases remained uncharacterized.

CONCLUSION: Regarding the presence of different forms of deletion in beta globin gene cluster in this region, molecular characterization of these mutations is important in at risk couples presenting microcytic anemia and should be considered in premarital screening and prenatal diagnosis centers for a more efficient thalassemia major prevention program.

KEY WORDS: *Delta beta thalassemia, PCR, Hemoglobin Lepore.*

* **Corresponding Author;**
Address: Cellular and Molecular Biology Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
Tel: +98 111 2234650
E-mail: halehakhavan@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.3.2.2]

References

1.Weatherall DJ, Clegg JB, Gibbons R. The thalassaemia syndromes. 4th ed. Oxford/Malden, MA: Blackwell Science 2001; pp: 192-247, 846.

2.Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. Bull World Health Organ 2008;86(6):480-7.

3.Vichinsky EP. Changing patterns of thalassemia worldwide. Ann N Y Acad Sci 2005;1054:18-24.

4.Abolghasemi H, Amid A, Zeinali S, et al. Thalassemia in Iran: epidemiology, prevention, and management. J Pediatr Hematol Oncol 2007;29(4):233-8.

5.Giardine B, van Baal S, Kaimakis P, et al. Hb Var database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations: 2007 update. Hum Mutat 2007;28(2):206.

6.Chui DH, Hardison R, Riemer C, et al. An electronic database of human hemoglobin variants on the World Wide Web. Blood 1998;91(8):2643-4.

7.Panyasai S, Fucharoen S, Surapot S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K. Molecular basis and hematologic characterization of δβ-thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin in Thailand. Haematologica 2004; 89(7):777-81.

8.Craig JE, Barnetson RA, Prior J, Raven JL, Thein SL. Rapid detection of deletions causing delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. Blood 1994;83(6):1673-82.

9.Joly P, Lacan P, Garcia C, Couprie N, Francina A. Identification and molecular characterization of four new large deletions in the β-globin gene cluster. Blood Cells Mol Dis 2009;43(1):53-7.

10.Esteghamat F, Imanian H, Azarkeivan A, Pourfarzad F, Almadani N, Najmabadi H. Screening of Iranian thalassemic families for the most common deletions of the beta-globin gene cluster. Hemoglobin 2007;31(4):463-9.

11.Babashah S, Jamali S, Mahdian R, et al. Detection of unknown deletions in beta-globin gene cluster using relative quantitative PCR methods. Eur J Haematol 2009;83(3):261-9.

12.Nadkarni A, Wadia M, Gorakshakar A, Kiyama R, Colah RB, Mohanty D. Molecular characterization of delta beta-thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin in the Indian population. Hemoglobin 2008;32(5):425-33.

13.Oner C, Oner R, Balkan H, et al. Molecular analysis of the Turkish form of deletion-inversion (delta beta)(0) thalassaemia. Br J Haematol 1997;96(2):229-34.

14.Oner R, Oner C, Erdem G, et al. A novel (delta beta) (0)-thalassemia due to a approximately 30-kb deletion observed in a Turkish family. Acta Haematol 1996;96(4):232-6.

15.Chakalova L, Osborne CS, Dai YF, et al. The Corfu δβ-thalassemia deletion disrupts γ-globin gene silencing and reveals post-transcriptional regulation of HbF expression. Blood 2005;105(5):2154-60.

16.Guzmán LF, Perea FJ, Morales-González KR, et al. Characterization of the 5' and 3' breakpoints of the Spanish (δβ)0-thalassemia deletion in Mexican patients. Hemoglobin 2011;35(1):80-3.

17.Phylipsen M, Gallivan MV, Arkesteijn SG, Harteveld CL, Giordano PC. Occurrence of common and rare δ-globin gene defects in two multiethnic populations: thirteen new mutations and the significance of δ-globin gene defects in β-thalassemia diagnostics. Int J Lab Hematol 2011;33(1):85-91.

18.Habibzadeh F, Yadollahie M, Merat A, Haghshenas M. Thalassemia in Iran: an overview. Arch Iran Med 1998;1(1): 27-34.

19.Akhavan-Niaki H, Derakhshandeh-Peykar P, Banihashemi A, et al. A comprehensive molecular characterization of beta thalassemia in a highly heterogeneous population. Blood Cells Mol Dis 2011;47(1):29-32.

20.Rahim F, Saki N, Jalalaifar MA. The role of gene mutations detection in defining the spectrum of ß– thalassemia in various ethnic regions. In: Plaseska-Karanfilska D. Human genetic diseases. 1st ed. Croatia: In Tech Company 2011; pp: 109-20.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.3.2.2]