

جهش های ژن آلفا گلوبین در تعدادی از بیماران کرد ایرانی مبتلا به تالاسمی آلفا

لطیفه محمدپور^۱، محمد صادق فلاح^۲، فاطمه کشاورزی^۳، سیروس زینلی^۴، بایزید قادری^۵، آزاد فتحی راد^۶، رضا اکرمی پور^۷، سارا آزاد مهر^۸

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران

۲. استادیار ژنتیک، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران.

۳. مرکز تحقیقات سلولی مولکولی غدد درون ریز، پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران ایران.

۴. استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران (نویسنده مسئول) تلفن ثابت ۰۰۸۷-۳۳۲۸۷۶۵۲ gol.keshavarzi@gmail.com

۵. استاد ژنتیک، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۶. استادیار هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۷. پزشک عمومی، بیمارستان توحید، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۸. دانشیار هماتولوژی و انکولوژی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۹. کارشناس ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: آلفا تالاسمی یک بیماری ژنتیکی با وراثت اتوزومی مغلوب، همراه با کاهش یا عدم ساخت زنجیره های پلی پپتیدی آلفا گلوبین است. فرم شدید بیماری آلفا تالاسمی، بیماری H disease می باشد که حاصل غیر فعال شدن ۳ ژن آلفا در بیمار است. این مطالعه به منظور شناسایی ژنوتیپ مبتلا یان به H بر روی تعدادی از بیماران وابسته به خون مراجعه کننده به مراکز درمانی استان های کردستان و کرمانشاه انجام شد.

روش بررسی: در یک مطالعه توصیفی ۱۱۰ بیمار مبتلا به آنمی میکروستیک و هیپوکرومیک مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج شمارش سلول های قرمز خون و الکتروفورز هموگلوبین فرد بیمار قبل از تزریق خون و یا والدین فرد بیمار، افراد با تشخیص آلفا تالاسمی انتخاب و مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند DNA به روش salting out استخراج گردید. جهش های حذفی شایع با روش multiplex PCR و جهش های نقطه ای با تعیین توالی مستقیم به روش Sanger بررسی گردید.

یافته ها: در ۱۲ بیمار با تشخیص تالاسمی آلفا ۵ مورد حذف دو ژنی Med (۲۰/۸ درصد)، ۴ مورد حذف تک ژنی $\alpha 3.7$ (۶/۶ درصد)، ۳ مورد حذف دو ژنی 20.5 (۱۲/۵ درصد)، ۳ مورد جهش نقطه ای polyA1 (۱۲/۵ درصد)، ۲ مورد جهش نقطه ای Cd59 (۸/۳ درصد) و ۲ مورد جهش نقطه ای IVSI(-5nt) (۸/۳ درصد) بدست آمد. ۴ نفر از بیماران واجد بیماری H از نوع حذفی ($\alpha\alpha$ - / -)، ۳ مورد بیماری H از نوع غیرحذفی ($\alpha\alpha^T$ - / -) و ۲ مورد هم واجد دو جهش نقطه ای ($\alpha\alpha^T / \alpha\alpha^T$) بودند. ۲ نفر از بیماران وابسته به تزریق خون بودند و ژنوتیپ فردی که به صورت منظم خون تزریق می نمود، $\alpha\alpha^{MED / CD59}$ - - تشخیص داده شد. فردی که به صورت نامنظم و بر حسب نیاز چند بار تزریق خون انجام داده بود دارای ژنوتیپ $\alpha^{3.7} / - \alpha^{20.5}$ - - بود. در ۷ مورد از بیماران بزرگی طحال مشاهده شد و در ۳ نفر دیگر قبلا، عمل طحال برداری انجام شده بود.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده نشان از تنوع جهش های آلفا گلوبین در گروه مورد مطالعه و اهمیت جهش های نقطه ای در بیماری H داشت. هرچند تعیین رابطه فنوتیپ و ژنوتیپ دقیق تر و تشخیص موارد بیماری H که نیاز به تشخیص قبل از تولد دارند ضرورت انجام مطالعه ای وسیع تر در سطح ملی را می طلبد.

واژه های کلیدی: آلفا تالاسمی، بیماری H، کردستان، کرمانشاه.

وصول مقاله: ۹۳/۴/۲۵ اصلاحیه نهایی: ۹۳/۹/۲۴ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۸

مقدمه

تالاسمی شایعترین اختلال ژنتیک تک ژنی در سراسر دنیاست که در نتیجه کاهش سنتز یک یا چند زنجیره گلوبین (۱) و عدم تعادل میان مقدار زنجیره آلفا و بتا گلوبین بوجود می آید (۲). شدت بالینی بیماری، دارای رابطه مستقیم با شدت عدم تعادل در مقدار زنجیره آلفا و بتا می باشد (۳). آلفا تالاسمی نوعی بیماری ژنتیکی با توارث اتوزومی مغلوب، همراه با کاهش یا عدم ساخت زنجیره های پل پتیدی آلفا گلوبین هموگلوبین است. زنجیره های آلفا گلوبین به صورت زیرواحدهای هموگلوبین جنین (HbF: $\alpha 2\gamma 2$) و هموگلوبین بزرگسالان (HbA: $\alpha 2\beta 2$) عمل می کنند. برعکس بتا تالاسمی که در ایجاد آن جهش های غیر حذفی غالب هستند، اکثر انواع آلفا تالاسمی های شناخته شده دارای حذف یک و یا دو ژن آلفا گلوبین بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۶ می باشند (۴).

آلفا تالاسمی شامل طیفی از اختلالات بی خطر تا کشنده است و از ترکیب آلل های جهش یافته آلفا گلوبین امکان تولد نوزاد مبتلا به بیماری H و هیدروپس فتالیس وجود دارد، بعلاوه مادر هم در معرض خطر است. افراد وابسته به خون تالاسمی آلفا دارای جهش در سه ژن آلفا گلوبین و مبتلا به بیماری H هستند و با توجه به نوع و تعداد جهش علائم بیماری در افراد مختلف متفاوت می باشند. جهش های نقطه ای در صورت هموزیگوت بودن و یا همراهی با جهش های حذفی بزرگ آلفا گلوبین می توانند منجر به بیماری H شدید گردند. اهمیت تشخیص جهش های ژن آلفا گلوبین افتراق آنها از انواع تالاسمی بتا با میزان هموگلوبین A2 نرمال و نیز جلوگیری از تولد فرد مبتلا به بیماری H وابسته به خون می باشد. به همین دلیل تشخیص درست تالاسمی آلفا و یا رد آن با اطمینان کافی در برنامه پیشگیری از بروز تالاسمی بتا نیز از اهمیت فراوانی برخوردار است.

تشخیص قطعی آلفا تالاسمی بر اساس تعیین جهش بیماریزا در ژن آلفا گلوبین و با استفاده از تکنیک های ملکولی

است. به دلیل فراوانی ناقلین جهش در آلفا گلوبین در ایران و اهمیت شناسایی انواع جهش ها و فراوانی آن ها در مناطق جغرافیایی و قومی مختلف کشور، در این مطالعه بررسی جهش های ژن آلفا گلوبین در افراد مراجعه کننده به بیمارستانهای شهرهای سندج و کرمانشاه انجام شد تا متعاقباً نتایج آن در آزمایش های شناسایی ناقلین در آزمایشگاه های ژنتیک و همچنین در تشخیص های پیش از تولد بکار رود.

روش بررسی

این یک مطالعه ی توصیفی بود. با توجه به آزمایشات، والدین با مقادیر MCV پایینتر از ۸۰ fl و MCH پایینتر از ۲۷ pg و HbA2 و HbF نرمال به عنوان ناقل تالاسمی آلفا شناخته شدند. بر روی نمونه های گرفته شده از والدین، جهت تعیین ناقلین آلفا تالاسمی CBC و الکتروفورز هموگلوبین به روش استات سلولز انجام شد. در چند مورد از بیماران به دلیل گذشت مدت زمان زیادی از تزریق خون، CBC و الکتروفورز خود بیمار مورد استفاده قرار گرفت.

این تحقیق در فاصله بین مهر ماه ۱۳۹۲ تا اردیبهشت ۱۳۹۳ در سندج انجام شد. بیماران وابسته به تزریق خون مراجعه کننده برای دریافت خون به مراکز درمانی سطح استان کردستان و کرمانشاه، بیمارستان، مطب متخصصین انکولوژی و هماتولوژی وارد مطالعه شدند. باتوجه به اینکه اغلب بیماران وابسته به تزریق خون بودند و به دلیل عدم دسترسی به آزمایشات CBC شامل MCV, Hb, MCH و هموگلوبین الکتروفورز قبل از تزریق خون از والدین بیماران یک نمونه خون وریدی گرفته شد. با توجه به آزمایشات، والدین با مقادیر MCV پایینتر از ۸۰ fl و MCH پایینتر از ۲۷ pg و HbA2 و HbF نرمال به عنوان ناقل تالاسمی آلفا شناخته شدند. بر روی نمونه های گرفته شده از والدین، جهت تعیین ناقلین آلفا تالاسمی CBC و الکتروفورز هموگلوبین به روش استات سلولز انجام شد. در

استفاده از روش استاندارد و آغازگرهای مقاله Samuel S Chong، با اندکی تغییرات (جدول ۱)، انجام پذیرفت (۶). بعد از انجام PCR، جداسازی محصول PCR الکتروفورز بوسیله آگارز ۲/۵ درصد انجام شد. در نمونه های فاقد جهش حذفی، تعیین توالی مستقیم به روش sanger انجام گردید. جهت تفسیر نتایج حاصل از توالی یابی ابتدا از نرم افزار chromas جهت بررسی توالی ها استفاده شد و سپس با استفاده از نرم افزار DNA STAR نتایج آنالیز شدند.

چند مورد از بیماران به دلیل گذشت مدت زمان زیادی از تزریق خون، CBC و الکتروفورز خود بیمار مورد استفاده قرار گرفت. بر این اساس ۱۱۰ بیمار مبتلا به تالاسمی آلفا بر اساس نتایج CBC و الکتروفورز هموگلوبین فرد بیمار قبل از تزریق خون و یا والدین بیمار شناسایی شدند. از هر بیمار یک نمونه خون وریدی گرفته شد. DNA با روش استاندارد salting out (۵) استخراج شد. تعیین جهش با روش مولتی پلکس PCR برای حذف های شناخته شده آلفا تالاسمی شامل $\alpha^{3.7}$ ، $\alpha^{20.5}$ ، MED و $\alpha^{4.2}$ با

جدول ۱- سکانس پرایمرهای مورد استفاده

Primers of multiplex -pcr analysis of ommon thalassemia deletions		
Name	5' → 3' sequence	Tm
3.7/20.5R	AAAGCACTCTAGGGGTCCAGCG	53.1
$\alpha 2/3.7F$	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	54.6
MED F	TACCCTTTGCAAAGCACACACGTAC	49.7
MED R	TCAATCTCCGACAGCTCCGAC	51.2
20.5 F	GCCCAACATCCGGAGTACATG	51.2
4.2 F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	51.2
4.2 R	CCGTTGGATCTTCTACTTTCCC	51.9

یافته ها

در این مطالعه ابتدا ۱۱۰ نفر از بیماران تالاسمی مراجعه کننده به بیمارستان های شهرستان های بانه، سقز، بیجار، قروه، مریوان و سنندج و بیماران مراجعه کننده به پزشکان متخصص هماتولوژی و انکولوژی در کرمانشاه وارد مطالعه شدند. همه بیماران دارای قومیت کرد بودند. از بین بیمارانی که دارای نسبت فامیلی بودند از هر خانواده فقط یک نمونه مورد بررسی قرار گرفت. بعد از بررسی CBC و الکتروفورز والدین ۱۲ نفر از این افراد به عنوان بیماران مبتلا به تالاسمی آلفا شناخته شده و وارد مطالعه شدند.

میانگین سنی این افراد $15 \pm 8/46$ سال و به تعداد ۷ نفر $(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ مرد و ۵ نفر زن $(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ بودند. ۲ نفر مریوان $(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ ، ۱ نفر قروه $(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ ، ۱ نفر جوانرود $(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ ، ۱ نفر اسلام آباد $(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ ، ۱ نفر پاوه $(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ ، ۲ نفر هرسین $(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ ، ۴ نفر کرمانشاه $(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ بودند. والدین ۳ نفر

$(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ از بیماران با یکدیگر نسبت فامیلی درجه ۳ داشتند و ۸ نفر از بیماران $(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ دارای سابقه فامیلی بیماری تالاسمی بودند. میانگین سن تشخیص در بیماری از ۴ ماهگی تا ۲۰ سالگی متغیر بود.

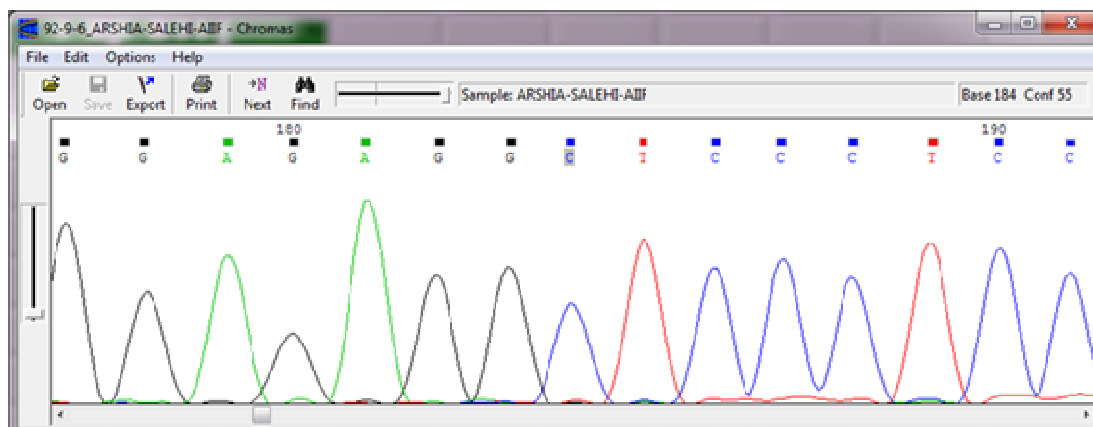
در بررسی ملکولی ۱۲ بیمار مورد مطالعه جهش دو حذفی Med شایعترین آلل شناخته شده در ۵ کروموزوم $(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ بود. به دنبال آن جهش یک حذفی $\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5}$ در ۴ کروموزوم $(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ ، جهش دو حذفی $\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5}$ در ۳ کروموزوم $(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ ، جهش PolyA1 در ۳ کروموزوم $(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ ، جهش 5nt در ۲ کروموزوم $(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ و جهش CD59 در ۲ کروموزوم $(\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5})$ مشاهده شد. ۶ آلل نیز فاقد جهش های حذفی شایع و جهش نقطه ای در ژن آلفا گلوبین بودند. ۲ نفر از بیماران هیچ یک از جهش های مورد بررسی در این مطالعه را نداشتند، این در حالی بود که CBC و هموگلوبین الکتروفورز والدین یکی از این بیماران، حاکی از ابتلا

نتایج توالی یابی و جهش های شناسایی شده را نشان می دهند.

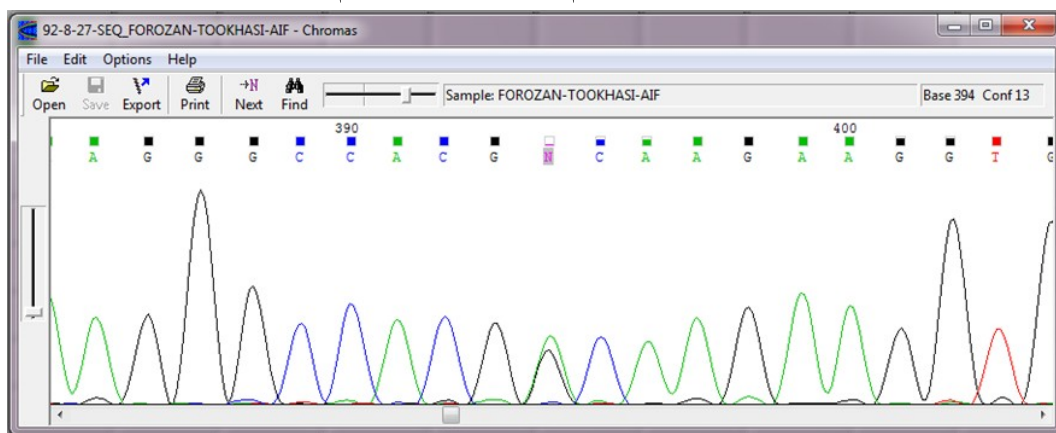
۲ نفر از بیماران وابسته به تزریق خون بودند و ژنوتیپ فردی که به صورت منظم خون تزریق می نمود، $\alpha\alpha^{MED}/CD59$ - تشخیص داده شد. فردی که به صورت نامنظم و بر حسب نیاز چند بار تزریق خون انجام داده بود دارای ژنوتیپ $\alpha^{3.7} - \alpha^{20.5}/$ بود.

فرزندشان به آلفا تالاسمی بود و در بیمار دیگر CBC و هموگلوبین الکتروفورز خود بیمار نشان دهنده وجود آلفا تالاسمی در این بیمار بود.

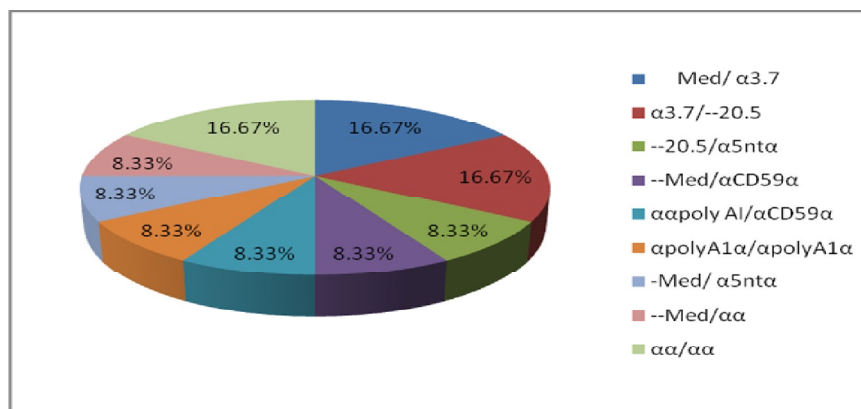
بیماری H از نوع حذفی (α^-/α^-) در ۴ نفر از بیماران دیده شد. ۳ نفر واجد بیماری H از نوع غیرحذفی (α^T/α^T) و ۲ نفر واجد دو جهش نقطه ای ($\alpha\alpha^T/\alpha\alpha^T$) هم زمان بودند. فراوانی ژنوتیپی جهش های شناخته شده در بیماران مبتلا به تالاسمی آلفا در نمودار ۱ نشان داده شده است. شکل ۱ و ۲



شکل ۱- جهش نقطه ای ($\alpha 5nt$): در محل مشخص شده توالی TGAGG حذف شده - - GAG GTG AGG>GAG G- (شکل ۱- - - که با توجه به وجود یک حذف بزرگ در کروموزوم دیگر، در الکتروفوروگرام به صورت هموزیگوت مشاهده می شود).



شکل ۲- جهش نقطه ای $Cd59$: در این جهش نوکلئوتید A جایگزین نوکلئوتید G شده و آمینو اسید گلیسین به اسپارتیک اسید تغییر یافته است.



نمودار ۱- فراوانی ژنوتیپی جهش های شناخته شده در بیماران مبتلا به تالاسمی آلفا وابسته به خون

بحث

بیماری تالاسمی در کشور ایران از فراوانی بالایی برخوردار است و هرچند بتا تالاسمی دارای شدت بیشتری می باشد ولی فراوانی ناقلین تالاسمی آلفا بیشتر بوده که به دلیل تداخل در تشخیص ناقلین تالاسمی بتا و نیز اهمیت موارد شدید آن، حایز اهمیت می باشد.

در این مطالعه همچون مطالعات پیشین در استانهای کرمانشاه (۷)، خوزستان (۸)، مازندران (۹)، کرمان (۱۰)، گیلان (۱۱) و مطالعه گرشاسبی و همکاران (۱۲) جهش های حذفی شامل $3/7$ MED، و $20/5$ حایز بیشترین فراوانی بودند. جهش های نقطه ای مانند $CD19$ ، $CD59$ ، $polyA1$ ، $5nt$ و CS نیز در تعدادی از مطالعات (۱۳) و (۱۰) گزارش گردیده اند.

با توجه به نتایج به دست آمده تنوع جهش های شناخته شده در بیماران شامل حذفهای دو ژنی Med و $20/5$ ، حذف تک ژنی $3/7$ و نیز جهش های نقطه ای $CD59$ ، $polyA1$ و $IVSI(-5nt)$ می باشند و در میان افراد واجد بیماری H هر سه نوع بیماری H حذفی ($--/\alpha$)، غیرحذفی ($--/\alpha\alpha^T$) و موارد واجد ۲ جهش نقطه ای همزمان ($\alpha\alpha^T/\alpha\alpha^T$) تشخیص داده شد که مورد اخیر نشان دهنده اهمیت جهش های نقطه ای در بروز بیماری H و نیز تنوع جهش در افرادی با قومیت کرد می باشد. با توجه به این که اهمیت

بیماری H بیشتر در مواردی است که کم خونی شدید بوده و در درمان بیماری نیاز به تزریق مداوم خون می باشد، اهمیت جهش های نقطه ای و حذف و اضافه شدن های کوچک که می تواند به بروز بیماری H غیر حذفی و موارد شدید و وابسته به خون گردد، بیش از پیش مشخص می گردد.

با توجه به اینکه اکثر افراد این مطالعه از ساکنین استان کرمانشاه بودند تنوع جهش های آلفا گلوبین بیش از یافته های گزارش شده مطالعه قبلی در این استان (۷) بود. از طرف دیگر عدم وجود جهش حذفی $\alpha^{4.2}$ در هر دو مطالعه قابل توجه است و با توجه به اینکه ساکنین هر دو استان کرد می باشند، به نظر می رسد فراوانی این جهش در میان قوم کرد، که در این منطقه ساکن هستند پایین باشد.

مطالعه ای که در بابل توسط اخوان و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی جهش های نقطه ای آلفا گلوبین انجام شد (۱۳)، نشان از فراوانی جهش $polyA2$ و به دنبال آن CS و $5nt$ در شمال کشور داشت که به جز جهش CS که می تواند در ایجاد بیماری H غیر حذفی دخیل باشد، سایر جهش ها در این مطالعه نیز با فراوانی کمتری در جمعیت غرب کشور مشاهد شده بود.

جهت افتراق موارد زوج مشکوک و زوج ناقل قطعی بتا تالاسمی در برنامه ملی پیشگیری از بروز بتا تالاسمی ماژور ضروری میباشد. همچنین بررسی ژنوتیپ افرادی که با تشخیص تالاسمی آلفا و بیماری H در کشور تحت درمان با فرآورده های خونی می باشند و تعیین فراوانی موارد شدید و وابسته به خون بیماری و ارتباط آن با ژنوتیپ بیماری از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده، می تواند راهگشای تصمیم گیری در خصوص موارد نیاز به تشخیص قبل از تولد و ختم بارداری و تولید داده های لازم جهت تصمیم گیری سیاست گزاران در خصوص ضرورت و اولویت انجام برنامه ملی پیشگیری از موارد شدید تالاسمی آلفا باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر انجام گردید. از پرسنل آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی بابت کمک در اجرای پژوهش و آقای روشنی و خانم بوجار پرسنل بیمارستان محمد کرمانشاهی و دانشگاه علوم پزشکی کردستان، بابت همکاری در نمونه گیری سپاسگزاری می شود.

تزریق خون ماهیانه در بیماری با ژنوتیپ $\alpha\alpha^{CD59}/MED$ قابل انتظار است، اما در بیماری با ژنوتیپ $\alpha^{3.7}/\alpha^{20.5}$ شدت بیماری معمولاً خفیف تر می باشد (۱۴) و موارد مشابه در مطالعه دیگری که از افراد مبتلا به بیماری H از ایران گزارش گردیده است نیاز به تزریق خون نداشته اند (۱۵). در مطالعه صورت گرفته توسط VichaiLaosombat و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی ۱۴۷ بیمار مبتلا به بیماری H در جنوب تایلند، نشان دادند که افرادی با ژنوتیپ α^{cd59}/MED نیاز به تزریق منظم خون و افرادی با ژنوتیپ $\alpha^{3.7}/MED$ به صورت نامنظم نیاز به تزریق خون دارند (۱۶). در مطالعه ابراهیم خانی و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی ۴۰ فرد مبتلا به بیماری H، بیماران با ژنوتیپ های $\alpha\alpha^{CS}/\alpha\alpha^{CS}$ ، $\alpha\alpha^{MED}/\alpha\alpha^{CS}$ و $\alpha\alpha^{poly A2}/\alpha\alpha^{MED}$ نیازمند به تزریق خون بودند (۱۷) که این نکته نیز موید اهمیت جهش های نقطه ای، حذف و اضافه شدن های کوچک در بروز موارد شدید و وابسته به خون بیماری H می باشد.

نتیجه گیری

با توجه به فراوانی ناقلین جهش در ژن آلفا گلوبین در کشور، شناسایی صحیح افراد ناقل جهش در ژن آلفا گلوبین

References

1. Galanello R and Cao A. Alpha-thalassemia. J Genetics in Medicine 2011;13: 83-88.
2. Weatherall DJ and Clegg JB. The thalassaemia syndromes. 2008: John Wiley & Sons.
3. Kimura, E. Thalassaemia intermedia as a result of heterozygosis for β^0 -thalassaemia and anti-3.7/aa genotype in a Brazilian patient. Brazilian journal of medical and biological research 2003;36: 699-701.
4. Butler E. Williams Text book of Hematology 2001; McGraw hill, New York..
5. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. J Nucleic Acids Res 1988; 16: 1215.
6. Chong SS. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α -thalassaemia. J Blood 2000; 95: 360-362.
7. Alibakhshi R. Molecular analysis of alpha globin gene deletions among patients with microcytic hypochromic anemia in Kermanshah-Iran. Journal of Kermanshah University of Medical Sciences 2011; 14: 60-69.

8. Zandian K. alpha-thalassemia mutations in Khuzestan Province, Southwest Iran. *J Hemoglobin* 2008; 32: 546-52.
9. Tamaddon A. alpha-Thalassemia mutation analyses in Mazandaran province, North Iran. *J Hemoglobin* 2009; 33: 115-23.
10. Saleh-Gohari N and Khosravi-Mashizi A. Spectrum of alpha-globin gene mutations in the Kerman Province of Iran. *J Hemoglobin* 2010;34: 451-60.
11. Hadavi V. Alpha-thalassemia mutations in Gilan Province, North Iran. *J Hemoglobin* 2009; 33: 235-41.
12. Garshasbi M. alpha-globin gene deletion and point mutation analysis among in Iranian patients with microcytic hypochromic anemia. *J Haematologica* 2003; 88: 1196-7.
13. Akhavan-Niaki H. Hematologic features of alpha thalassemia carriers. *Int J Mol Cell Med* 2012; 1: 162-7.
14. Chui DH, Fucharoen S and Chan V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. *J Blood* 2003; 101: 791-800.
15. Zeinali S, Fallah MS and Bagherian H. Heterogeneity of hemoglobin h disease in childhood. *N Engl J Med* 2011; 364: 2070-1.
16. Laosombat V. Clinical features and molecular analysis in Thai patients with HbH disease. *J Annals of hematology* 2009;88: 1185-1192.
17. Ebrahimkhani S. Genotype-phenotype correlation in Iranian patients with Hb H disease. *J Hemoglobin* 2011;35: 40-46.