مقاله پژوهشی، صفحات DOR: XX.XXXX.XX.XXXX.XX.XXXXX

# بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم های rs2111833 و rs2235324 در ژن *TMPRSS6* با کم خونی فقر آهن در جمعیت ایرانی

**مریم زارع[1*] ، فائزه سید مومنی[2] و مسعود هوشمند[3]**

[1] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

[2] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور مرکز شهر ری، شهر ری، ایران

[3] استاد، گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۹

## چکیده

کم خونی که با کاهش هموگلوبین و گلبول های قرمز خون مشخص می شود، یکی از مشکلات رایج بهداشت عمومی در جهان است. کمبود آهن شدید و یا طولانی باعث کم خونی فقر آهن می شود که دلیل اصلی کم خونی می باشد. بجز کمبودهای تغذیه ای و بیمارهای عفونی و التهابی، فاکتورهای ژنتیکی نیز در بروز آن نقش دارد. جهش و پلی مورفیسم در ژن *TMPRSS6* می تواند با افزایش هپسیدین بعنوان هورمون تنظیم کننده آهن، باعث ایجاد آنمی فقر آهن شود. هدف این مطالعه بررسی پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی rs2111833 و rs2235324 در ژن *TMPRSS6* برای اولین بار در جمعیت بیماران ایرانی دارای کم خونی فقر آهن می باشد. به این منظور ۲۰۰ نمونه خون از بیماران دارای کم خونی فقر آهن و افراد سالم بدست آمد. سپس استخراج DNA و Tetra-ARMS PCR با پرایمرهای اختصاصی برای هر واریانت انجام گردید. محصولات بدست آمده الکتروفورز و تعیین توالی شده و نتایج مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، جایگاه rs2111833 دارای سه نوع ژنوتیپ هتروزیگوت (GA)، هموزیگوت طبیعی (GG) و هموزیگوت جهش یافته (AA) است و این پلی مورفیسم بطور معنی داری با کم خونی فقر آهن مرتبط است. برای جایگاه rs2235324 فقط یک ژنوتیپ هموزیگوت طبیعی (TT) مشاهده شد. این یافته ها نشان می دهد که پلی مورفیسم rs2111833 ارتباط معنی داری با کم خونی فقر آهن داشته و بنظر می رسد که نقش مهمی در بروز این بیماری در جمعیت ایرانی داشته باشد اما پلی مورفیسم rs2135324 رابطه معنی داری با کم خونی فقر آهن ندارد.

**واژه های کلیدی:** کم خونی فقر آهن، پلی مورفیسم، ژن *TMPRSS6*، rs2111833، rs2235324

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۹۱۲۲۷۸۷۹۵۱ ایمیل: m_zare@pnu.ac.ir

## مقدمه

آنمی(Anemia) یا کم خونی با کاهش هموگلوبین و گلبول های قرمز خون شناخته می شود. در اثر کاهش هموگلوبین ظرفیت حمل اکسیژن پایین می آید. در این بیماری میزان و حجم گلبول ها قرمز خون کاهش پیدا می کند. کم خونی انواع مختلفی دارد که هرکدام به دلایل مختلفی بروز می کند. کمبود آهن شدید یا طولانی مدت می‌تواند به کم خونی فقر آهن (Iron deficiency anemia) منجر شود که بعنوان یک مشکل رایج بهداشت جهانی شناخته شده و بیش از ۱/۲ میلیارد نفر در سراسر جهان را تحت تاثیر قرار داده است (۲۶ و ۳۱). عواملی مانند مصرف یا جذب ناکافی آهن و یا افزایش نیازهای آهن

با توجه به رشد و از دست دادن آهن ناشی از خونریزی، باعث فقر آهن می‌شود و می‌تواند به تولید هموگلوبین ناکافی و کم خونی فقر آهن منجر شود (۱۱ و ۲۶). شیوع کم خونی فقر آهن با سن، جنس، نژاد، رژیم غذایی و عوامل اقتصادی و اجتماعی در ارتباط است. کمبود ریزمغذی‌ها یک مشکل بهداشت عمومی است که کودکان و زنان باردار به ویژه در کشورهای در حال توسعه در معرض خطر آن هستند و تخمین زده می شود که ۴۱٪ زنان و ۲۷٪ کودکان قبل از سن مدرسه از کم خونی فقر آهن رنج می‌برند (۱۱ و ۱۸ و ۲۶ و ۳۱).

کم خونی فقر آهن در حالت پیشرفته با کاهش آهن سرم، افزایش ظرفیت تام اتصال آهن (TIBC) و کاهش فریتین سرم، جلوه می‌کند (۱۰). تجویز آهن بصورت خوراکی و یا تزریقی یک روش موثر و ارزان برای درمان کم خونی فقر آهن بوده و افزایش شمارش رتیکولوسیت بعد از ۵ روز از شروع درمان مشاهده می‌شود (۳۲).

هپسیدین (Hepcidin) که یک پپتید کاتیونی کوچک ( ۲۵ آمینواسیدی) است و توسط ژن *HAMP* کد می شود، نقش مهمی در حفظ تعادل آهن در بدن دارد. این پپتید اساسا در کبد تولید می شود (۱۴ و۲۰). وقتی سطح آهن خون زیاد باشد آهن وارد سلولهای کبدی شده و باعث افزایش تولید هپسیدین می شود. هپسیدین سپس در خون گردش نموده و زمانی که آهن بدن زیاد باشد، جذب آهن در روده کوچک را متوقف می کند تا تعادل و هموستاز آهن در بدن حفظ شود. در واقع هپسیدین با پیوند به کانال‌های فروپورتین (Fpn-1)، سبب تجزیه و تخریب آن‌ها شده و از این رو از ورود آهن توسط سلول‌های گوارشی به گردش خون و خروج آهن از ماکروفاژها جلوگیری می‌کند (۳۳ و ۳۷). از سوی دیگر هورمون اریتروفرون از گلبول‌های قرمز هسته دار و در پاسخ به هورمون اریتروپویتین ترشح می‌گردد. این هورمون قادر است که به سرعت بیان ژن هپسیدین را خاموش نموده و لذا با تنظیم منفی ژن هپسیدین و در نتیجه کاهش سنتز آن، موجب افزایش جذب آهن از دستگاه گوارش و خروج آهن از ماکروفاژها از طریق کانال فروپورتین می‌گردد که نتیجه‌ی آن فراهم شدن آهن کافی برای بافت خون ساز است (۱۴).

در این راستا پروتئین ماتریپتاز-۲ (Matriptase-2) که بطور عمده در کبد تولید می شود، تولید هپسیدین (هورمورن تنظیم کننده آهن سیستمیک) را بطور منفی تنظیم می کند. ماتریپتاز-۲ که توسط ژن *TMPRSS6* کد می شود، متعلق به خانواده سرین پروتئازهای تراغشایی نوع II بوده و به صورت یک پروآنزیم غیرفعال تک زنجیره ای سنتز شده و متعاقبا با برش یک اسید آمینه آرژینین در ناحیه بین پرودومین و دومین کاتالیتیکی فعال می شود و به غشا متصل می ماند (۴۱). یکی از سوبسترهای ماتریپتاز-۲ فاکتور هموژولین (HJV) متصل به غشا است. در واقع متریپتاز-۲ در حالت طبیعی با شکستن پروتئین هموژوولین، ارتباط آن را با گیرنده‌ی BMP-6 که نقش مهمی در افزایش بیان هپسیدین دارد، قطع می‌کند و موجب کاهش بیان ژن هپسیدین می‌گردد. کاهش بیان ژن هپسیدین نیز متعاقبا با افزایش جذب آهن از گوارش همراه است (۱۳ و ۲۵). لذا جهش در ژن *TMPRSS6* و عدم عملکرد آن، موجب افزایش بیان هپسیدین و تخریب کانال‌های فروپورتین می‌گردد که در این حالت جذب آهن خوراکی صورت نمی‌گیرد و باعث ایجاد کم خونی فقر آهن مقاوم به درمان می شود. براساس مطالعات انجام شده وقوع جهش ها و نیز پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی در ژن *TPMRSS6* با کم خونی فقر آهن مرتبط می باشد (۵ و ۱۰ و ۱۶ و ۲۴ و ۳۱).

امروزه مطالعه‌ی پلی‌مورفیسم‌ها به منظور یافتن مارکرهای ژنتیکی موثر برای تشخیص و درمان بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است (۱ و ۲ و ۳ و ۲۳). پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) جایگزینی یک نوکلوتید منفرد است که در یک موقعیت خاص در ژنوم رخ می دهد بطوریکه این تغییر در سطح بیش از ۱٪ جمعیت وجود داشته باشد. به عنوان مثال در یک

موقعیت پایه خاص در ژنوم انسان نوکلئوتید C ممکن است در بیشتر افراد ظاهر شود اما در افراد کمی این موقعیت توسط یک A اشغال می شود. این بدان معنی است که SNP در این موقعیت خاص وجود دارد و گفته می شود که دو آلل برای این موقعیت وجود دارد. SNP ها باعث تفاوت در حساسیت افراد به طیف گسترده ای از بیماری ها می شوند. همچنین شدت بیماری و نحوه واکنش به درمان ها نیز بر اساس واریانت های ژنتیکی متفاوت می باشد (۱۲ و ۱۵ و ۲۲ و ۳۶).

با توجه اهمیت پلی مورفیسم ها به عنوان مارکرهای ژنتیکی مفید و ارتباط SNP های شناخته شده ژن *TMPRSS6* با کم خونی فقر آهن و نیز اهمیت و شیوع این بیماری، در این مطالعه پلی‌مورفیسم های rs2111833 و rs2135324 در ژن *TMPRSS6* برای اولین بار در ایران و به روش Tetra-ARMS PCR در افراد مبتلا به کم خونی فقر آهن مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روشها

**جمع آوری نمونه:** در این مطالعه مورد–شاهدی ۲۰۰ نمونه شامل ۱۰۰ نمونه بیمار مبتلا به کم خونی فقر آهن و ۱۰۰ نمونه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های بیمار از بیمارستان شهید رجایی کرج و نمونه های کنترل از آزمایشگاه تابان و طی یک دوره سه ماهه در تابستان ۱۳۹۸ جمع آوری شدند. اهداف پژوهش برای همه افراد شرکت کننده توضیح داده شد و خونگیری از همه افراد با کسب رضایت از آنها و تکمیل و امضای فرم رضایت آگاهانه انجام شد. ابتلا بیماران به کم خونی فقر آهن براساس معیارهای تشخیصی WHO و براساس نتایج تست CBC (شمارش کامل گلبولهای قرمز) شامل سطح هموگلوبین کمتر از ۱۲g /dl و فریتین کمتر از ۱۵ ng/ml مورد تایید قرار گرفت. از هر فرد به میزان ۵ سی سی خون در لوله ای حاوی EDTA جمع آوری شد.

**استخراج DNA ژنومی:** استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج NIGEB (پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، ایران) و طبق پروتکل مربوطه انجام شد. DNA استخراج شده در دمای ۴ ºC و یا برای استفاده طولانی مدت در ۲۰ºC- درجه نگهداری گردید. پس از استخراج DNA تعیین غلظت و میزان خلوص آن ضروری است و این ارزیابی ها با دستگاه نانودراپ (Nano Drop ND-1000, Thermo Scientific, USA) و نیز الکتروفورز DNA روی ژل ۱٪ انجام شد.

**طراحی پرایمر:** برای انجام تکنیک Tetra-ARMS PCR تعداد ۴ پرایمر شامل ۲ پرایمر بیرونی و ۲ پرایمر دورنی مورد نیاز است که عبارتند از: (پیشرو بیرونی Forward Outer) FO ، (معکوس بیرونی Reverse Outer) RO، (پیشرو درونی Forward Inner) FI و (معکوس درونی Reverse Inner) RI. برای طراحی پرایمر ابتدا با استفاده از پایگاه SNP متعلق به NCBI توالی پلی مورفیسم مورد نظر بدست آمد. نواحی بالادست و پایین دست نقطه پلی مورفیسم جهت طراحی دو پرایمر FO و RO در نظر گرفته شد و انتخاب توالی به صورت دستی انجام شد. طراحی پرایمرهای FI و RI هم با در نظر گرفتن این نکته که انتهای هر دو پرایمر نقطه پلی مورفیسم قرار گیرد به صورت دستی و با کمک سایت NEB(New England Biolabs; https://international.neb.com/) انجام شد. پس از طراحی برای اطمینان از عملکرد اختصاصی پرایمرها، میزان همپوشانی پرایمرها با برنامه Blast و با استفاده از پایگاه داده NCBI انجام شد. نهایتا پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت سینا کلون (ایران) سنتز شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ مشاهده می گردد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژن *TMPRSS6* در جایگاه های rs2111833 و rs2235324

| rs2235324 | rs2111833 | |
|---|---|---|
| GAGGTCTCCCTCTGTGGGTCACAG | CCACTCTACTACCCTATGAGGTG | **FO** |
| AGATTGGGGACTTGGGCTTCCAATGAG | GCATAGGCATCAAACCAGAGG | **RO** |
| CTATGCACTGAGGAGGCAGAAGGAG | TTCCTGGCACTGCTCTTCG | **FI** |
| CTGGGTGCACGGCAAACCA | ATTGTCTCAACGGCAGCGAT | **RI** |

**انجام Tetra-ARMS PCR**: برای تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم های مورد نظر در ژن *TMPRSS6* از تکنیک Tetra-ARMS PCR استفاده شد. این تکنیک یک روش مبتنی بر PCR برای تشخیص SNP در ژنوم می باشد. در این روش طراحی پرایمرها ( پیشرو و معکوس بیرونی (FO و RO) و پیشرو و معکوس درونی (FI و RI) به گونه ای صورت می گیرد که بتوان دو واکنش PCR با پرایمر مختص آلل طبیعی و پرایمر مختص آلل جهش یافته را همزمان در یک مخلوط واکنش بررسی نمود. در واقع پرایمرهای FO و RO برای هر دو آلل طبیعی و جهش یافته مشترک و به عنوان یک کنترل برای صحت واکنش PCR بکار می روند. و پرایمرهای FI و RI بصورت اختصاصی و برای تشخیص نوع آلل طبیعی و یا جهش یافته موجود در جایگاه مورد نظر بکار می ورد. در روش Tetra-ARMS PCR از هر چهار پرایمر در یک واکنش PCR استفاده می شود.

انجام واکنش Tetra-ARMS PCR منجر به تشکیل سه نوع محصول می شود: اول محصول حاصل از تکثیر قطعه بین پرایمرهای FO و RO که این قطعه تکثیرشده در هر دو توالی جهش یافته و طبیعی مشاهده می گردد و دارای بیشترین طول باند است. این محصول به عنوان کنترلی برای صحت PCR بکار می رود. دوم محصول حاصل از تکثیر قطعه بین پرایمرهای FI و RO و سوم محصول حاصل از تکثیر قطعه بین پرایمرهای FO و RI. براساس نتایج این تکنیک، ژنوم دیپلوئید انسان می تواند در هر جایگاه موردنظر دارای دو آلل طبیعی، یا دو آلل جهش یافته، و یا یک آلل طبیعی و یک آلل جهش یافته باشد.

برای هر جایگاه، مخلوط واکنش PCR در یک میکروتیوپ و در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل پنج میکرولیتر از مخلوط آماده (Master mix 2X) (سیناکلون، ایران)، یک میکرولیتر از DNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها به همراه دو میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز (سیناکلون، ایران) آماده سازی شد. متعاقبا مخلوط واکنش در دستگاه ترموسایکلر (BioRad, USA) قرار گرفته و واکنش PCR تحت شرایط اختصاصی انجام شد. شرایط و پروفایل دمایی به این صورت بوده است: یک سیکل برای واسرشتگی اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ $^{o}C$ ، سپس ۳۲ سیکل تکثیر شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ $^{o}C$، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ $^{o}C$ و ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ $^{o}C$، و یک سیکل نهایی در دمای ۷۲ $^{o}C$ به مدت ۱۰ دقیقه. سپس برای بررسی نتایج، الکتروفورز محصولات بدست آمده بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ انجام شده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، با استفاده از دستگاه ژل داک و زیر نور ماورا بنفش مشاهده گردید.

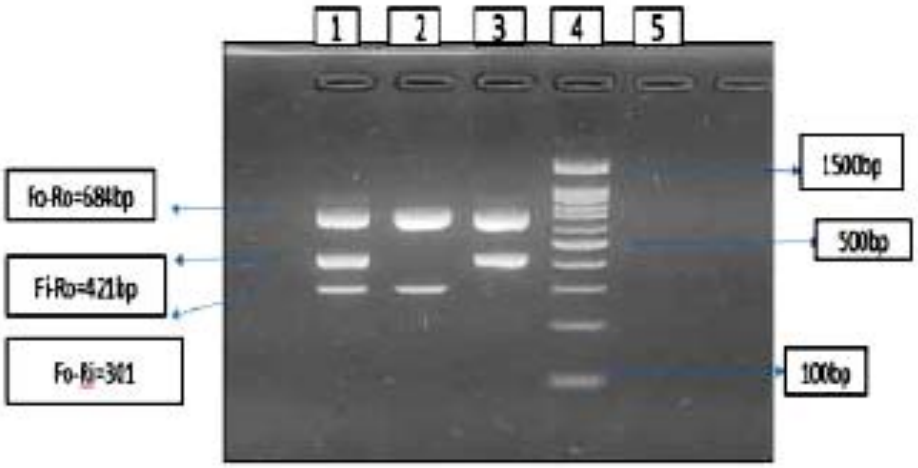
**توالی یابی محصولات PCR**: برای اطمینان از اختصاصی بودن پرایمرها و نتایج بدست آمده، تعیین توالی محصولات PCR برای یک نمونه هتروزیگوت و یک نمونه هموزیگوت از گروه های کنترل و بیمار انجام شد (شرکت تکاپو زیست، ایران) و توالی های بدست آمده، مورد بررسی قرار گرفتند. در نتایج بدست آمده، توالی DNA به صورت پیک هایی با ۴ رنگ متفاوت برای ۴ نوکلئوتید نشان داده

می شوند. تشخیص حالت هموزیگوت و یا هتروزیگوت، براساس وجود یک پیک و یا دو پیک همپوشان در جایگاه مورد نظر صورت می گیرد.

**آنالیز آماری:** تحلیل آماری نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. در این مطالعه فراوانی هر یک از پلی مورفیسم ها و ژنوتیپ آنها محاسبه شد. چگونگی وقوع دو پلی مورفیسم در سه حالت نرمال ، هتروزیگوت و هموزیگوت در دو گروه بیمار و کنترل با استفاده از آزمون خی دو Chi Square ($x^2$) مورد بررسی قرار گرفته و با سطح معنی‌داری مقایسه شد. نسبت شانس (OR) با ضریب اطمینان ۹۵٪ به عنوان شاخص ارتباط پلی مورفیسم های ژن موردنظر با استعداد ابتلا به کم خونی فقر آهن تخمین زده شد. برای قبول یا رد این ارتباط ارزش P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف آماری معنادار در نظر گرفته شد ( $P < ۰/۰۵$).

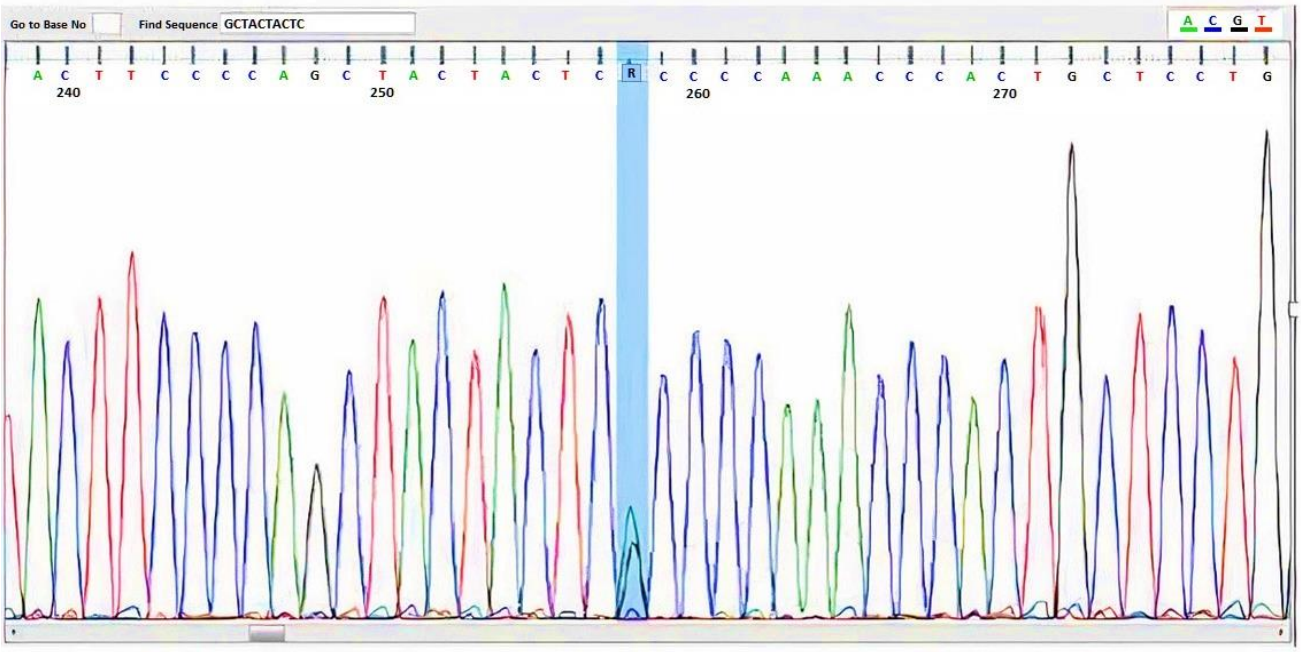
## نتایج

الکتروفورز محصولات بدست آمده در روش Tetra-ARMS PCR برای پلی مورفیسم جایگاه (rs2111833) *TMPRSS6* نشان داده است که افراد در سه دسته هتروزیگوت (GA)، هموزیگوت طبیعی (GG) و هموزیگوت جهش یافته (AA) قرار می گیرند (شکل ۱). افراد هتروزیگوت دارای سه محصول می باشند شامل یک باند bp ۶۸۴ ( با پرایمرهای FO و RO)، یک باند bp ۴۲۱ ( با پرایمر های FI و RO) که نشاندهنده وجود آلل جهش یافته A می باشد و یک باند bp ۳۰۱ ( با پرایمرهای FO و RI) که نشاندهنده وجود آلل طبیعی G می باشد. همچنین افراد هموزیگوت طبیعی (GG) دارای یک باند bp ۶۸۴ ( با پرایمرهای FO و RO)، و یک باند bp ۳۰۱ ( با پرایمرهای FO و RI) مربوط به آلل طبیعی G می باشند. در افراد هموزیگوت جهش یافته (AA) نیز علاوه بر وجود باند bp ۶۸۴ ( با پرایمرهای FO و RO)، فقط یک باند bp ۴۲۱ ( با پرایمر های FI و RO) مربوط به آلل جهش یافته A وجود دارد.




شکل ۱- نتایج الکتروفورز محصول PCR در روش Tetra-ARMS PCR برای پلی مورفیسم جایگاه (rs2111833) TMPRSS6. چاهک ۱ نمونه هتروزیگوت، چاهک ۲ فرد هوزیگوت طبیعی، چاهک ۳ فرد هموزیگوت جهش یافته و چاهک ۵ نمونه کنترل منفی.

نتایج تعیین توالی محصولات PCR نشان داده است که فرد هتروزیگوت در جایگاه rs2111833 دارای دو پیک نوکلئوتیدی است که نشاندهنده وجود هر دو آلل A و G می باشد (شکل ۲).

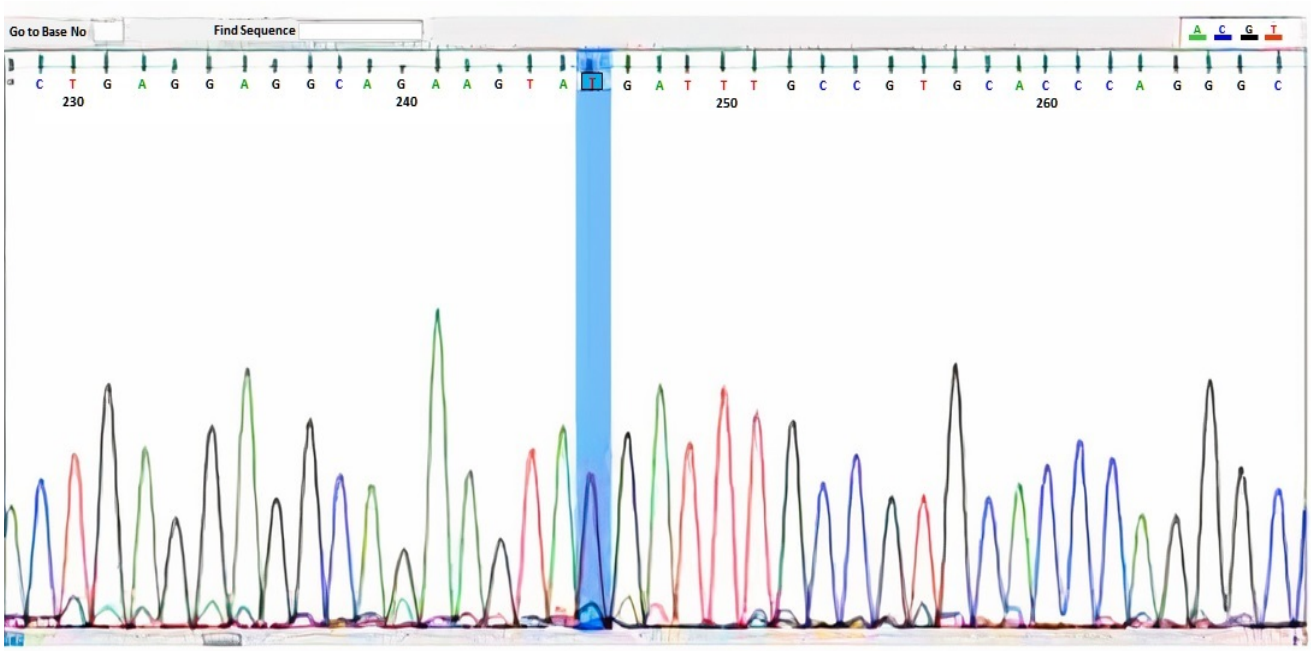



شکل ۲- نتایج تعیین توالی پلی مورفیسم (rs2111833) *TMPRSS6* در حالت هتروزیگوت (AG). رنگ سبز نشاندهنده نوکلئوتید A، رنگ آبی نوکلئوتید C، رنگ سیاه نوکلئوتید G و رنگ قرمز نوکلئوتید T است. در جایگاه مورد نظر دو پیک سبز (مربوط به نوکلئوتید A) و پیک سیاه (مربوط به نوکلئوتید G) مشاهده می شود.

در مورد پلی مورفیسم جایگاه (rs2235324) *TMPRSS6* نیز الکتروفورز محصولات بدست آمده نشان داده است که همه افراد بیمار و نیز کنترل در این جایگاه دارای ژنوتیپ هموزیگوت طبیعی (TT) می باشند. در افراد هموزیگوت طبیعی (TT) یک باند ۳۷۶ bp ( با پرایمرهای FO و RO) و یک باند ۲۴۸ bp ( با پرایمرهای FO و RI) مربوط به آلل طبیعی T مشاهده شد و محصول پرایمرهای FI و RO نیز مشاهده نشد (شکل ۳).

شکل ۳- نتایج الکتروفورز محصولات Tetra-ARMS PCR برای پلی مورفیسم TMPRSS6 (rs2235324). چاهک ۱ و ۲ نمونه فرد بیمار هموزیگوت طبیعی، چاهک ۳ تا ۵ نمونه فرد کنترل سالم با ژنوتیپ هموزیگوت طبیعی، چاهک ۷ کنترل منفی

در مورد جایگاه rs2235324 نیز تعیین توالی محصولات PCR نشان داده است که جایگاه موردنظر دارای یک پیک نوکلئوتیدی مربوط به نوکلئوتید T است که نشاندهنده ژنوتیپ هموزیگوت طبیعی (TT) در جایگاه rs2235324 می باشد (شکل ۴).




شکل ۴- نتایج تعیین توالی پلی مورفیسم (rs2235324) *TMPRSS6*. رنگ سبز نشاندهنده نوکلئوتید A، رنگ آبی نوکلئوتید C، رنگ سیاه نوکلئوتید G و رنگ قرمز نوکلئوتید T است. در جایگاه مورد نظر یک پیک قرمز مربوط به نوکلئوتید T مشاهده می شود که نشاندهنده ژنوتیپ هموزیگوت طبیعی TT است.

آنالیز آللی در رابطه با پلی مورفیسم جایگاه rs2111833، نشان داده است که فراوانی آلل طبیعی G در جمعیت مورد مطالعه ۹۵٪ بوده که ۴۹/۵٪ مربوط به گروه کنترل و ۴۵/۵٪ مربوط به گروه بیمار بوده است. نسبت شانس (Odds Ratio) داشتن آلل G در جمعیت مورد مطالعه برابر ۹/۷۹۱ با ضریب اطمینان ۹۵٪ (از ۱/۲۱۷ تا ۷۸/۸۰۶) و خطر نسبی (Relative Risk ) بروز کم خونی فقر آهن در جمعیت بیمار ۱/۸۷۹ با ضریب اطمینان ۹۵٪ (از ۱/۴۵۷ تا ۲/۴۲۳) و در جمعیت سالم ۰/۱۹۲ با ضریب اطمینان (از ۰/۳۰ تا ۱/۲۳۸) می باشد که نشان می دهد افراد سالم داری آلل G در معرض خطر کمتری برای ابتلا به کم خونی فقر آهن قرار دارند. براساس آزمون پیرسون کای دو، آلل G بطور معنی داری با عدم بروز کم خونی فقر آهن ارتباط دارد ( p=۰/۰۰۹) (جدول ۲).

فراوانی آلل جهش یافته A برای این پلی مورفیسم در جمعیت مورد مطالعه ۴۰٪ بوده که ۸٪ مربوط به گروه کنترل و ۳۲٪ مربوط به گروه بیمار بوده است. نسبت شانس داشتن آلل A در جمعیت برابر با ۰/۱۰۷ با ضریب اطمینان ۹۵٪ ( کمتر از آلل G) بوده و خطر نسبی بروز کم خونی فقر آهن در جمعیت بیمار ۰/۳۷۵ و در جمعیت سالم ۳/۵۰ با ضریب اطمینان ۹۵٪ می باشد که نشان می دهد افراد سالم دارای آلل A ریسک بالاتری برای ابتلا به کم خونی فقر آهن دارند. همچنین نتایج نشان داده اند که رابطه معنی داری بین آلل A و بروز کم خونی فقر آهن وجود دارد ($p\leq0.001$) (جدول ۲).

جدول ۲- فراوانی آللی در جایگاه *TMPRSS6* (rs2111833) و ارتباط آن با خطر بروز بیماری در دو گروه بیمار و کنترل

| آلل | نمونه | تعداد (درصد) | خطر نسبی (Relative Risk) | نسبت شانس آلل (Odd Ratio) | p-Value |
|---|---|---|---|---|---|
| G | بیمار | ۹۱ (٪ ۴۵/۵) | ۱/۸۷۹ | ۹/۷۹۱ | ۰/۰۰۹ |
| | کنترل | ۹۹ (٪ ۴۹/۵) | ۰/۱۹۲ | | |
| | کل | ۱۹۰ (٪ ۹۵) | | | |
| A | بیمار | ۶۴ (٪ ۳۲) | ۰/۳۷۵ | ۰/۱۰۷ | ۰/۰۰۰ |
| | کنترل | ۱۶ (٪ ۸) | ۳/۵ | | |
| | کل | ۸۰ (٪ ۴۰) | | | |

نتایج آنالیز ژنوتیپی جایگاه rs2111833 نشان داده است فراوانی ژنوتیپ GG در جمعیت مورد مطالعه ۶۰٪ بوده که ۴۲٪ مربوط به گروه کنترل و ۱۸٪ مربوط به گروه بیمار می باشد. براساس نتایج، رابطه معنی داری بین ژنوتیپ GG و عدم بروز کم خونی فقر آهن وجود دارد ($p\leq0.001$). همچنین فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت GA در جمعیت ۳۵٪ بوده که شامل ۷/۵٪ گروه کنترل و ۲۷/۵٪ گروه بیمار بوده است. نتایج بدست آمده نشان داده اند که ژنوتیپ GA بطور معنی داری با بروز کم خونی فقر آهن مرتبط است ($p\leq0.001$). ژنوتیپ AA نیز دارای فراوانی ۵٪ بوده که ۰/۵٪ مربوط به گروه کنترل و ۴/۵٪ گروه بیمار می باشد و براساس آنالیزهای آماری، ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ AA و بیماری کم خونی فقر آهن وجود دارد ( p=۰/۰۰۹) (جدول ۳).

**جدول ۳- فراوانی پلی مورفیسم *TMPRSS6* (rs2111833) و رابطه آن با خطر بروز بیماری در دو گروه بیمار و کنترل**

| | | *TMPRSS6* (rs2111833) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ژنوتیپ ها | | بیمار | کنترل | کل | P-Value |
| ژنوتیپ GG | **تعداد (درصد)** | **۳۶ (٪ ۱۸)** | **۸۴ (٪ ۴۲)** | **۱۲۰ (٪ ۶۰)** | ۰/۰۰۰ |
| ژنوتیپ GA | **تعداد (درصد)** | **۵۵ (٪ ۲۷/۵)** | **۱۵ (٪ ۷/۵)** | **۷۰ (٪ ۳۵)** | ۰/۰۰۰ |
| ژنوتیپ AA | **تعداد (درصد)** | **۹ (٪ ۴/۵)** | **۱ (٪ ۰/۵)** | **۱۰ (٪ ۵)** | ۰/۰۰۹ |
| **کل** | **تعداد (درصد)** | **۱۰۰ (٪ ۱۰۰)** | **۱۰۰ (٪ ۱۰۰)** | **۲۰۰ (٪ ۱۰۰)** | |

در مورد جایگاه rs2235324 نیز با توجه به اینکه در هر دو گروه بیمار و کنترل فقط آلل T مشاهده شده است و همه افراد مورد مطالعه دارای ژنوتیپ AA بوده اند، آنالیزهای آماری و تعیین سطح معنی داری قابل انجام نبوده است. بررسی آماری افراد مورد مطالعه از نظر جنسیت نشان داده است، گروه کنترل شامل ۵۶ زن و ۴۴ مرد بوده که بترتیب ۵۶٪ و ۴۴٪ افراد گروه را تشکیل داده اند. گروه بیمار نیز شامل (۴۷٪) ۴۷ زن و(۵۳٪) ۵۳ مرد بوده است. براساس نتایج رابطه معنی داری بین جنسیت افراد و بروز بیماری وجود ندارد. ( p=۰/۲۰۳).

## بحث

کمبود آهن وضعیتی است که در آن میزان آهن جریان خون بسیار کم می شود و اگر بمدت طولانی ادامه یابد می تواند کم خونی فقر آهن را ایجاد نماید که یکی از مشکلات رایج بهداشت جهانی در همه جوامع است (۲۶). کمبود آهن به عنوان مهمترین عامل کم خونی در سراسر جهان شناخته می شود و کم خونی ناشی از آن اثر قابل توجهی در زندگی افراد مبتلا دارد. کم خونی فقر آهن مزمن و غالبا بدون علامت است و بنابراین ممکن است اغلب تشخیص داده نشود. ضعف، خستگی، دشواری در تمرکز و بهره وری ضعیف از علائم غیراختصاصی است که به دلیل کاهش اکسیژن رسانی به بافتهای بدن و کاهش فعالیت آنزیمهای حاوی آهن رخ می دهد. همچنین کمبود آهن باعث کاهش عملکرد شناختی و تاخیر در رشد ذهنی و حرکتی کودکان می شود (۱۱ و ۲۶). کمبود آهن بطور معمول ناشی از رژیم غذایی ناکافی، از دست دادن خون بدلیل کرم های روده ای، برخی عادات غذایی مانند رژیم گیاهخواری و عدم مصرف گوشت و شرایط پاتولوژیک ( از دست دادن خون مزمن و یا سوء جذب) می باشد (۱۷).

آهن برای عملکردهای بیولوژیکی از جمله تنفس، تولید انرژی، سنتز DNA و تکثیر سلولی بسیار مهم است. بدن انسان برای ذخیره آهن از چندین طریق تکامل یافته است ازجمله می توان به بازیافت آهن پس از تجزیه گلبول قرمز و نگه داشتن آهن درصورت عدم وجود مکانیسم دفع آن اشاره کرد. اما از آنجا که مقادیر بیش از حد آهن می تواند سمی باشد جذب آن

بصورت ۱ تا ۲ میلی گرم در روز محدود می شود و بیشتر آهن مورد نیاز روزانه (۲۵ میلی گرم در روز) از طریق بازیافت توسط ماکروفاژها که فاگوسیتوز گلبولهای قرمز پیر را انجام می دهند، تامین می شود. دو مکانیسم آخر توسط هورمون هپسیدین کنترل می شود که آهن بدن را در محدوده طبیعی حفظ می کند و از کمبود آهن و مقدار اضافی آن جلوگیری می کند (۱۱ و ۱۴). تحقیقات نشان داده اند که ژن *TMPRSS6* برای هموستاز نرمال آهن سیستمیک در انسان ضروری است. جهش در این ژن که موجب اختلال در سنتز ماتریپتاز-۲ می شود از مهمترین علل ژنتیکی این بیماری است. ماتریپتاز-۲ در حالت طبیعی باعث کاهش بیان ژن هپسیدین شده و در نتیجه جذب آهن خوراکی انجام می شود. لذا وقوع جهش و عدم عملکرد محصول این ژن می تواند باعث عدم جذب آهن گوارشی و کمبود آهن گردد. با توجه به اهمیت این بیماری بویژه در دوران کودکی، تشخیص و درمان سریع آن ضروری است (۳۱).

مطالعات همبستگی نشان داده اند که افرادی که در جایگاه های دارای پلی مورفیسم، یک سری آلل های خاص دارند، دارای ریسک بالاتری برای ابتلا به یک فنوتیپ هستند (۱۵ و ۲۲ و ۲۳ و ۳۶). یافتن این پلی مورفیسم ها و تعیین سطح خطر افراد دارای آن، موضوع بسیار مهمی است که باید بیشتر به آن پرداخته شود و امروزه نیز تحقیقات زیادی در زمینه ارتباط بین پلی مورفیسم های ژنی با خطر بروز بیماری های مختلف در حال انجام است (۱ و ۲). تکنیک‌های مولکولی متفاوتی برای بررسی پلی‌مورفیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. تکنیک Tetra-ARMS PCR یک روش مبتنی بر PCR برای تشخیص وجود پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژنوم می‌باشد که مزایایی از قبیل تکرار پذیری بالا، هزینه پایین، عدم نیاز به تکنولوژی بالا و آنالیز آسان نتایج دارد. این تکنیک نیازی به تعیین توالی نداشته و تنها با استفاده از الکتروفورز محصولات، انواع ژنوتیپ افراد قابل تشخیص است (۲۳ و ۳۰).

در این مطالعه پلی مورفیسم های rs2111833 و rs2235324 در ژن *TMPRSS6* و ارتباط آن با کم خونی فقر آهن با استفاده از تکنیک Tetra-ARMS PCR در جمعیت ایرانی مورد بررسی قرارگرفته است. براساس نتایج این مطالعه، در جایگاه rs2111833 وجود آلل طبیعی G و آلل جهش یافته A و نیز ژنوتیپ های هموزیگوت طبیعی(GG)، هتروزیگوت (GA) و هموزیگوت جهش یافته شناسایی شده است. در جایگاه rs2235324 نیز فقط آلل طبیعی T و ژنوتیپ هموزیگوت طبیعی (TT) مشاهده شد. Batar و همکاران نیز در سال ۲۰۱۸ در رابطه با جایگاه rs2111833 وجود ژنوتیپ های هموزیگوت طبیعی، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش یافته را شناسایی نمودند (۸). همچنین Piao و همکاران با مطالعه روی زنان باردار چینی نشان دادند که ژنوتیپ های GG، GA و AA در این جایگاه وجود دارد و نیز پلی مورفیسم این جایگاه با کاهش سطح فریتین سرم و بروز کم خونی فقر آهن مرتبط است (۳۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان داده است که وجود آلل A در جایگاه rs2111833 ارتباط معنی داری با بروز کم خونی فقر آهن دارد. در این رابطه، مطالعه انجام شده توسط Batar و همکاران در جمعیتی از کشور ترکیه نشان داده است که پلی مورفیسم این جایگاه و وجود واریانت های مختلف آن رابطه معنی داری با بیماری کم خونی فقر آهن ندارد (۸). در حالیکه نتایج مطالعه piao و همکاران هم راستا با نتایج مطالعه حاضر بوده و نشان داده است که پلی مورفیسم rs2111833 با بروز کم خونی مرتبط است (۳۵). تفاوت در نتایج گزارش شده احتمالا به دلیل تنوع ژنتیکی در جمعیت های مختلف می باشد. بطوریکه Gichohi-Wainaina و همکاران بر اساس مشاهدات مربوط به شیوع بالاتر آنمی در جمعیتهای آسیایی و آفریقایی و یا میزان کمتر غلظت هموگلوبین در جمعیت آمریکایی های آفریقایی تبار در مقایسه با قفقازی ها، در یک مطالعه مروری نشان دادند که تفاوتهای بین نژادی در واریانت های *TMPRSS6* از جمله جایگاه rs2111833 با شاخص های وضعیت آهن

و کم خونی مرتبط است بطوریکه در جایگاه rs2111833 کمترین میزان فراوانی آلل Tبه عنوان آلل حداقلی در جمعیت آمریکای لاتین کمتر بوده و برابر ۰/۲ (۲۰٪) است ولی فراوانی آن در جمعیتهای قفقازی، آسیایی و آمریکایی های آفریقایی تبار بالاتر بوده و بویژه در جمعیت قفقازی ۰/۴۷(۴۷٪) است (۱۹).

همچنین McLaren و همکاران با بررسی SNP های این ژن در جمعیت های مختلف مشاهده نمودند پلی مورفیسم این جایگاه در جمعیت آسیایی بشدت با سطوح سرمی آهن و ظرفیت اتصال به آهن ترانسفرین مرتبط است (۲۹). همچنین مطالعه ای که در جمعیت دختران ۲۵-۱۸ ساله عربستان سعودی انجام شده، نشان داده است که پلی مورفیسم rs2111833 با پارامترهای خونی، میزان آهن و نیز کم خونی فقر آهن ارتباط معنی داری ندارد (۴). برخی مطالعات نیز نشان داده اند که پلی مورفیسم این جایگاه با خطر بروز سرطان پستان مرتبط است (۲۱).

در مورد جایگاه rs2235324 نیز Lee و همکاران با مطالعه بر روی زنان غیرباردار مبتلا به کم خونی نشان دادند که پلی مورفیسم این جایگاه ارتباط معنی داری با فاکتورهای خونی (میزان هموگلوبین، سطح ترانسفرین اشباع و میزان MCV) و بیماری کم خونی فقر آهن ندارد (۲۷). Sato و همکاران نیز وجود این پلی مورفیسم و ارتباط آن را با کم خونی در زنان ژاپنی مبتلا به کم خونی فقر آهن مقاوم به درمان گزارش نمودند (۳۸). مطالعه انجام شده توسط Tanaka و همکاران نشان داد که پلی مورفیسم این جایگاه با کاهش سطح آهن سرمی مرتبط است (۳۹). همچنین Beutler و همکاران نیز با تعیین توالی ژن *TMPRSS6* برای بررسی پلی مورفیسم های آن در جمعیت افراد اروپایی، نشان دادند که پلی مورفیسم جایگاه rs2235324 با کم خونی فقر آهن مرتبط است (۹). Jallow و همکاران نیز ضمن مطالعه روی پلی مورفیسم های شایع ژن *TMPRSS6*، نشان دادند که پلی مورفیسم rs2235324 با پارامترهای وضعیت آهن در جمعیت افراد سالم گامبیا رابطه معنی داری ندارد (۲۴). از سوی دیگر ارتباط بین پلی مورفیسم جایگاه rs2235324 با سرطان پستان و کاهش بقای بیماران توسط محققین نشان داده شده است (۴۰).

در ایران تنها یک مطالعه بر روی پلی مورفیسم جایگاه های rs4820268 و rs855791 ژن *TMPRSS6* در جمعیت استان کردستان انجام شد. نتایج این مطالعه که با استفاده از روش RFLP انجام گردید، نشان داده است که وجود ژنوتیپ GG در جایگاه rs4820268 و ژنوتیپ TT در جایگاه rs855791 ارتباط معنی داری با کم خونی فقر آهن دارد (۷ و ۲۸). لازم به ذکر است که پلی مورفیسم جایگاه های rs4820268 و rs855791 به عنوان شایع ترین پلی مورفیسم های *TMPRSS6* می باشند که ارتباط معنی داری با کم خونی فقر آهن دارند (۶ و ۲۴ و ۳۱ و ۳۴).

## نتیجه گیری

در این مطالعه برای اولین بار پلی مورفیسم جایگاه های rs2111833 و rs2235324 ژن *TMPRSS6* در جمعیت ایرانی افراد مبتلا به کم خونی فقر آهن مورد بررسی قرار گرفت و نتایج بدست آمده نشان داده است که پلی مورفیسم جایگاه rs2111833 ارتباط معنی داری با ابتلا به کم خونی فقر آهن دارد، درحالیکه در جایگاه rs2235324 تنوع آللی در جمعیت مورد مطالعه مشاهده نشده است.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور، کارکنان بیمارستان شهید رجایی و آزمایشگاه تابان تشکر و قدردانی می نمایند.

## تضاد منافع

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافعی ندارند.

## منابع

۱- تیز مغز، سیده رقیه.، قربانی، ابوالفضل. (۱۳۹۸). بررسی ارتباط چند شکلی کدون ۶۵۵ ژن her2 با ابتلا به سرطان تخمدان در استان آذربایجان شرقی. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۳۲ (۳) ۳۱۱-۳۱۹.

۲- ناطق، فاطمه.، یعقوبی، هاشم. و رجبعلیزاده، کیوان. (۱۳۹۶). بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم C825T در ژن GNB3با چاقی در جمعیت استان اردبیل. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۳۰ (۴) ۴۲۲-۴۲۹.

3- Agha Heydar Ali Naghash, H. R., Hoshmand, M., Salehzadeh, A., Ansari Nejad, N. (2022). The rs4415084 and rs10941679 Might be Risk Conferring Factors for Breast Cancer among Iranian Women, J Genet Resour, 8(1):1-6.

4- Al-amer, O., Hawasawi, Y., Abdulwahab, A., *et al*. (2020). Study the association of transmembrane serine protease 6 gene polymorphisms with iron deficiency status in Saudi Arabia. Gene, 751:144767.

5- Al-Jamea, L. H., Woodman, A. M., Heiba, N., Elshazly, S. A., Ben Khalaf, N., Al-Yami, F. S., *et al*. (2023). TMPRSS6 gene mutations in six Saudi families with iron refractory iron deficiency anemia. Gene, 2023 Jan 30;851:146977.

6- An, P., Wu, Q., Wang, H., Guan, Y., Mu, M., Liao, Y., *et al*. (2012). *TMPRSS6*, but not *TF*, *TFR2* or *BMP2* variants are associated with increased risk of iron-deficiency anemia. Human Molecular Genetics, 21(9); 2124-2132.

7- Baban, A., Keshavarzi, F., Nikkhoo, B. (2021). Association of rs855791TMPRSS6 polymorphism with iron deficiency anemia. Sci J Iran Blood Transfus Organ, 18(3): 205-214.

8- Batar, B., Bavunoglu, I., Hacioglu, Y., Cengiz, M., Mutlu, T., Yavuzer, S., *et al*. (2018). The role of TMPRSS6 gene variants in iron-related hematological parameters in Turkish patients with iron deficiency anemia. Gene, 673: 201-205.

9- Beutler, E., Van Geet, C., Loo, D. M., Gelbart, T., Crain, K., Truksa, J., *et al*. (2010). Polymorphisms and mutations of human TMPRSS6 in iron deficiency anemia. Blood Cells Mol Dis, 44(1): 16-21.

10- Buerkli, S., Pei, S. N., Hsiao, S. C., Lee, C. T., Zeder, C., Zimmermann, M. B., *et al*. (2021). The *TMPRSS6* variant (SNP rs855791) affects iron metabolism and oral iron absorption - a stable iron isotope study in Taiwanese women. Haematologica, 106(11): 2897-2905.

11- Camaschella, C. (2015). Iron-deficiency anemia. New England Journal of Medicine, 327(19): 1832-1843.

12- Consortium, G. P. A. (2015). Global reference for human genetic variation. Nature, 526(7571),68.

13- Enns, C. A., Jue, S., Zhang, A. S. (2020). The ectodomain of matriptase-2 plays an important nonproteolytic role in suppressing hepcidin expression in mice. Blood, 136(8): 989-1001.
14- Fathi, Z. H., Mohammad, J. A., Younus, Z. M., Mahmood, S. M. (2022). Hepcidin as a Potential Biomarker for the Diagnosis of Anemia. Turk J Pharm Sci, 19(5): 603-609.
15- Fedorova, L., Khrunin, A., Khvorykh, G., Lim, J., Thornton, N., Mulyar, O. A., *et al*. (2022). Analysis of Common SNPs across Continents Reveals Major Genomic Differences between Human Populations. Genes (Basel), 13(8): 1472.
16- Finberg, K. E., Heeney, M. M., Campagna, D. R., Aydınok, Y., Pearson, H. A., Hartman, K. R., *et al*. (2008). Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA) Nat. Genet, 40(5): 569–571.
17- Gardner, W., Kassebaum, N. (2020). Global, regional, and national prevalence of anemia and its causes in 204 countries and territories, 1990–2019. Curr Dev Nutr, 4(Suppl 2):830.
18- Gedfie, S., Getawa, S., Melku, M. (2022). Prevalence and Associated Factors of Iron Deficiency and Iron Deficiency Anemia Among Under-5 Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. Glob Pediatr Health, 9:2333794X221110860.
19- Gichohi-Wainaina, W. N., Towers, G. W., Swinkels, D. W., Zimmermann, M. B., Feskens, E. J., Melse-Boonstra, A. (2015). Inter-ethnic differences in genetic variants within the transmembrane protease, serine 6 (TMPRSS6) gene associated with iron status indicators: a systematic review with meta-analyses. Genes & nutrition, 10(1), 442.
20- Girelli, D., Nemeth, E., Swinkels, D. W. (2016). Hepcidin in the diagnosis of iron disorders. Blood, 127: 2809-2813.
21- Guven, M., Mete, M., Trabulus, D. C., Ozoran, E., Erhan, D. (2021). Association of TMPRSS6 polymorphisms with hematologic parameters, histopathological data and breast cancer risk in Turkish population, Meta Gene, 29(2021), 100941.
22- Hedayati, M., Vaziri, H., Darbandi, B., Baghersalimi, A., Jafarzadeh, M., Salehzadeh, A. (2020). Association of TPMT (rs1800460) Gene Polymorphism with Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in a Population from Guilan, Iran. J Genet Resour, 6(2):142-147.
23- Heydari, M., Colagar, A. H., & Moudi, E. (2022). Mutant Allele of CD44 (rs8193C> T) and Pum2 Regulatory Element as A Prognosis Factor of Prostate Neoplasms: A Case-Control and In Silico Studies. Cell Journal (Yakhteh), 24(12): 723.
24- Jallow, M. W., Campino, S., Prentice, A. M., Cerami, C. (2021). Association of common TMPRSS6 and TF gene variants with hepcidin and iron status in healthy rural Gambians. Sci Rep, 11(1):8075.
25- Krijt, J., Frýdlová, J., Gurieva, I., Přikryl, P., Báječný, M., Steinbicker, A. U., *et al*. (2021) Matriptase-2 and Hemojuvelin in Hepcidin Regulation: In Vivo Immunoblot Studies in *Mask* Mice. Int J Mol Sci, 22(5):2650.
26- Kumar, S. B., Arnipalli, S. R., Mehta, P., Carrau, S., Ziouzenkova, O. (2022). Iron Deficiency Anemia: Efficacy and Limitations of Nutritional and Comprehensive Mitigation Strategies. Nutrients, 14(14):2976.
27- Lee, P. L., Barton, J. C., Khaw, P. L., Bhattacharjee, S. Y., Barton, J. C. (2012). Common TMPRSS6 mutations and iron, erythrocyte, and pica phenotypes in 48 women with iron deficiency or epletion. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 48(2), 124-127.

28- Maleki, A., Nikkhoo, B., Keshavarzi, F. (2022). The Association of *TMPRSS6 rs4820268* Polymorphism with Iron Deficiency Anemia among the Population of Kurdistan: A Case Control Study. J Isfahan Med Sch, 40(659): 55-61.
29- McLaren, C. E., McLachlan, S., Garner, C. P., Vulpe, C. D., Gordeuk, V. R., Eckfeldt, J. H., *et al*. (2012). Associations between single nucleotide polymorphisms in iron-related genes and iron status in multiethnic populations. PLoS One, 7(6): e38339.
30- Medrano, R. F. V., & De Oliveira, C. A. (2014). Guidelines for the tetra-primer ARMS–PCR technique development. Molecular biotechnology, 56(7), 599-608.
31- Mohd Atan, F. N. E., Wan Mohd Saman, W. A., Kamsani, Y. S., *et al*. (2022). TMPRSS6 gene polymorphisms associated with iron deficiency anemia among global population. Egypt J Med Hum Genet, 23,147
32- Ning, S., Zeller, M. P. (2019). Management of iron deficiency. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2019(1):315-322.
33- Pagani, A., Nai, A., Silvestri, L., Camaschella, C. (2019). Hepcidin and anemia: a tight relationship. Front Physiol, 10:1294.
34- Pei, S. N., Ma, M. C., You, H. L., Fu, H. C., Kuo, C. Y., Rau, K. M., *et al*. (2014). TMPRSS6 rs855791 polymorphism influences the susceptibility to iron deficiency anemia in women at reproductive age. International journal of medical sciences, 11(6), 614.
35- Piao, W., Bao, Y., Zhang, T., Wang, Z., Huang, J., Huo, J., *et al*. (2018). Association between the polymorphisms of TMPRSS6 and the levels of serum ferritin and soluble transferrin receptor in pregnant women in Lüliang Area of Shanxi Province. Wei Sheng Yan Jiu, Journal of hygiene research, 47(6), 883-889.
36- Rabiee, N., Nakhaei Sistani, R., Ahadi, A. M. (2022). Screening rs2241766 Polymorphism as a Susceptibility Index Parameter in Obese Patients with a High Level of Cholestrol. J Genet Resour, 8(2):198-206.
37- Robson, K. J. (2004). Hepcidin and its role in iron absorption. Gut, 53:617-619.
38- Sato, T., Iyama, S., Murase, K., Kamihara, Y., Ono, K., Kikuchi, S., Takada, K., Miyanishi, K., Sato, Y., Takimoto, R., Kobune, M., Kato, J. (2011). Novel missense mutation in the TMPRSS6 gene in a Japanese female with iron-refractory iron deficiency anemia. (International journal of hematology) Int J Hematol, 94(1):101-103.
39- Tanaka, T., Roy, C. N., Yao, W., *et al*. (2010). A genome-wide association analysis of serum iron concentrations. Blood, 115: 94– 6.
40- Tuhkanen, H., Hartikainen, J. M., Soini, Y., Velasco, G., Sironen, R., Nykopp, T. K., *et al*. (2013). Matriptase-2 gene (TMPRSS6) variants associate with breast cancer survival, and reduced expression is related to triple-negative breast cancer. Int J Cancer, 133(10):2334-40.
41- Wang, C. Y., Meynard, D., Lin, H. Y. (2014). The role of TMPRSS6/matriptase-2 in iron regulation and anemia. Front Pharmacol, 5:114.

DOR: XX.XXXX.XX.XXXX.XX.XXXXX مقاله پژوهشی، صفحات

# Assessing the Association between the rs2111833 and rs2235324 Polymorphisms Of the *TMPRSS6* Gene with Iron Deficiency Anemia in the Iranian Population

Maryam Zare [1*], Faezeh Seyed Momeni [2], Massoud Houshmand [3]

[1] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

[2] MSc student, Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Shahre Rey, Iran

[3] Professor, Department of Medical Genetics, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

Address for correspondence: Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, P. O. BOX. 19395-4697, Nakhl St, Artesh Blv, Tehran, Iran

Email: m_zare@pnu.ac.ir

## Abstract

The anemia which is recognized by a decrease in hemoglobin and red blood cells is a common global health problem. Severe or prolonged iron deficiency can lead to iron deficiency anemia (IDA), the main cause of Iron deficiency. Apart from the lack of nutrients, infections and inflammatory diseases genetic factors can also be involved in IDA. *TMPRSS6* gene mutations and polymorphism can result in iron deficiency anemia (IDA) and cause an increased iron-regulatory hormone, and hepcidin. This study aimed to investigate single nucleotide polymorphisms rs2111833 and rs2235324 in the *TMPRSS6* gene for the first time in Iranian patients with IDA and healthy individuals. To do this study, 200 blood samples were collected from IDA patients. Then DNA was extracted, and Tetra-Arms PCR was performed using specific primers for each variant. The PCR products were electrophoresed and sequenced, and the results were analyzed. According to the results, there were three heterozygous (GA), wild homozygous (GG) and mutated homozygous (AA) genotypes for rs2111833 and this polymorphism was significantly associated with iron deficiency anemia. Only the wild-type homozygous (TT) genotype was observed for rs2235324. These results show that rs2111833 polymorphism is significantly correlated with iron deficiency anemia and seems to play a major role in iron deficiency anemia risk in Iranian patients. However, the rs2235324 variant was not significantly associated with this disease.

**Keywords:** Iron deficiency anemia, Polymorphism, *TMPRSS6* gene, rs2111833, rs223532