Downloaded from labdiagnosis.ir at 20:07 +0330 on Saturday February 23rd 2019

پیش بینی خطر کم خونی در فرزندان ناقلین تالاسمی و هموگلوبینوپاتی ها

● دکتر حبیب اله گل افشان
دکترای علوم آزمایشگاهی، هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
golafshanh@sums.ac.ir

● دکتر ناهید نصیری
دکترای تخصصی هماتولوژی

سندرم‌های تالاسمی و هموگلوبینوپاتی ها از شایع‌ترین اختلالات تک ژنی در دنیا بوده که موجب کم خونی همولیتیک و زندگی وابسته به تزریق خون و مرگ و میر می‌گردند. شناسایی ناقلین در پیشگیری از تولد فرزندان پرخطر نقش مهمی در جامعه دارد. وضعیت فرزندان از نظر شدت کم خونی در ازدواج ناقلین در یک جدول رنگی با رنگ‌های سفید، قرمز، بنفش و زرد پیش بینی گردیده است. رنگ قرمز به مفهوم خطر جدی، رنگ بنفش با ریسک خطر کمتر، رنگ زرد به مفهوم خطر نهفته و رنگ سفید به مفهوم بدون خطر شناخته شده در فرزندان می‌باشد. در هر مورد توضیح تفصیلی ارائه می‌گردد.

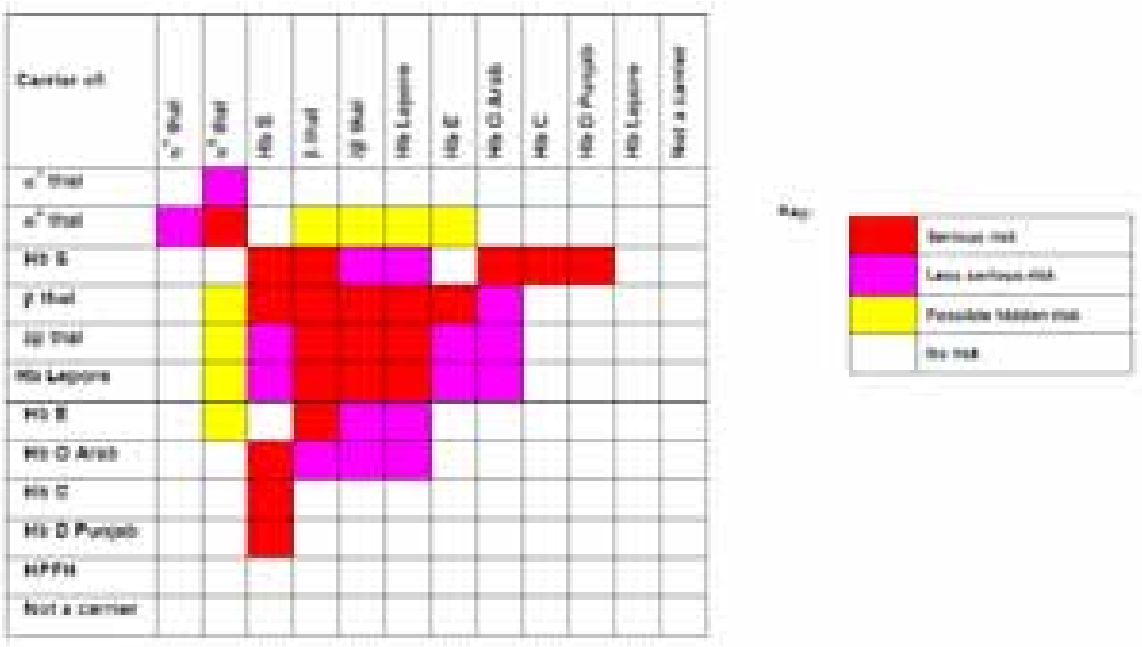
کلمات کلیدی: تالاسمی، هموگلوبینوپاتی، ازدواج ناقلین، جدول رنگی

خطر درجات مختلف کم خونی در فرزندان ناقلین تالاسمی و هموگلوبینوپاتی

سندرم‌های تالاسمی و هموگلوبینوپاتی ها گروهی گسترده از اختلالات ارثی در سنتز کمی و کیفی هموگلوبین می‌باشند. این گروه از بیماری‌ها شایع‌ترین اختلالات تک‌ژنی در دنیا بوده که مشکلات جدی سلامت را به بار می‌آورند. در حال حاضر پیوند سلول‌های مادر خون ساز تنها راه درمان کم خونی‌های شدید است و قبل از پیوند از درمان‌های حمایتی استفاده می‌شود. زندگی وابسته به تزریق خون نه تنها مشکلات فراوان برای بیمار در بر داشته، بلکه زندگی خانواده را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد. بهترین راه جلوگیری از تولد فرزند مبتلا به کم خونی شدید، شناسایی ناقلین در برهه زمانی سن بلوغ یا قبل از ازدواج و یا در حین بارداری و آموزش صحیح به ناقلین پرخطر کم خونی می‌باشد.

جدول زیر نامطلوب‌ترین حالت در فرزندان ناقلین پرخطر را نشان می‌دهد و این به مفهوم آن نیست که تمام فرزندان مبتلا خواهند شد بلکه در اکثر موارد بدترین حالتی که احتمالاً در ۲۵٪ فرزندان رخ می‌دهد را نشان می‌دهد. در جدول ناحیه سفید به مفهوم بدون خطر شناخته شده، رنگ قرمز بیانگر خطر جدی و کم خونی شدید، رنگ بنفش با خطر جدی کمتر یا کم خونی ملایم تر و رنگ زرد احتمال خطر نهفته را بیان می‌کند.

Downloaded from labdiagnosis.ir at 20:07 +0330 on Saturday February 23rd 2019



رنگ سفید علامت بدون ریسک خطر شناخته شده (Not known risk)
رنگ قرمز با ریسک خطر جدی و کم خونی شدید (Possible serious risk)
رنگ بنفش با ریسک خطر جدی کمتر (Less serious risk)
رنگ زرد با احتمال ریسک خطر نهفته (Possible hidden risk)

چند مثال

مثال اول: چنانچه یکی از والدین ناقل تالاسمی α^{o} (αα/--) و دیگری هم ناقل تالاسمی α^{o} (αα/--) باشد، در منطقه قرمز جدول تلاقی می‌کنند زیرا در این حالت احتمال تولد نوزاد مرده مبتلا به هیدروپس فتالیس با هموگلوبین بارت یا سقط در اوایل حاملگی به علت فقدان هر چهار ژن آلفا را به دنبال دارد.

مثال دوم: چنانچه یکی از والدین هتروزیگوت داسی و دیگری هتروزیگوت برای هموگلوبین D پنجاب یا لس آنجلس باشد باز هم در منطقه قرمز تلاقی می‌کنند زیرا هتروزیگوت ترکیبی داسی و D پنجاب شبیه آنمی داسی شکل است ولی منطقه تلاقی آن با D ایران در نقطه سفید یا بی خطر است.

مثال سوم: چنانچه هر دو والدین ناقل هموگلوبین D باشند نقطه تلاقی در منطقه سفید رنگ است زیرا هموزیگوت D ایران و پنجاب کم خونی نمی‌دهند.

مثال چهارم: چنانچه یکی از والدین ناقل تالاسمی α^{o} (αα/--) ودیگری ناقل تالاسمی β^{o} باشد، نقطه تلاقی ناحیه زرد با ریسک خطر نهفته است زیرا در این حالت امکان بیماری هموگلوبین اچ به علت حذف یک ژن آلفا در ناقل تالاسمی بتا وجود دارد. از طرف دیگر حذف سیس آلفا ممکن است در همراهی با ناقل β^{o} با آنمی خفیف همراه باشد در حالی که حذف ترانس آلفا (α/-α) با ناقل β^{o} در ناحیه سفید قرار می‌گیرد. حذف سیس آلفا با ناقل β^{+} نیز در ناحیه سفید قرار دارد.

از سال‌ها پیش تا کنون فرمول‌هایی جهت افتراق آنمی فقر آهن از سندرم‌های تالاسمی ماینور آلفا و بتا ابداع شده است که در جدول زیر مشاهده می‌نمایید (۱). تمام این فرمول‌ها جنبه آکادمیک داشته و بایستی با روش‌های الکتروفورز تأیید گردند.

Downloaded from labdiagnosis.ir at 20:07 +0330 on Saturday February 23rd 2019

افتراق سندرم‌های تالاسمی ماینور آلفا و بتا از آنمی فقر آهن

Indices	Year	IDA	Thalassemia
Mentzer = MCV/RBC	1973	>13	<13
Srivastava = MCH/RBC	1973	>3.8	<3.8
England & Fraser = MCV- RBC- 5 × Hb - 3.4	1976	>0	<0
Ricerca = RDW/RBC	1987	>4.4	<4.4
Green & King = MCV^2 × RDW/100 × Hb	1989	>65	<65
MH ratio(Technicon) = %micro / %hypo	1992	<1	>1
Sirdah = MCV- RBC - 3 × Hb	2008	>27	<27
MH ratio (Siemens)	2008	<3.4	>3.4
Ehsani = MCV- (10 × RBC)	2009	>15	<15
%MicroR - %Hypo He	2010	<11.5	>11.5
%MicroR - %Hypo He - RDW	2011	< -7.6	> -7.6

چنانچه روش‌های الکتروفورز قانع کننده نباشد بایستی از روش‌های مولکولی مانند محاسبه نسبت سنتز زنجیره آلفا به بتا و یا از روش‌های مولکولی دیگر مانند Gap–PCR, MLPA, ARMS, ASO, RE–PCR و Sequencing برای تشخیص صحیح بهره گرفت.

PCR: Polymerase Chain Reaction

MLPA: Multiplex Ligation dependent Probe Amplification

RE: Restriction Enzyme

ASO: Allele Specific Oligonucleotide

ARMS: Amplification Refractory Mutation System

جهش‌های تالاسمی بتا ممکن است با فقدان فرآورده زنجیره بتا (β°) یا موجب کاهش تولید زنجیره بتا (β+) گردند. از مثال‌های β° می‌توان به جهش در رمز اسید آمینه شماره β°39 و IVS 1-1, IVS 2-1 اشاره کرد. جهش‌های β+ ممکن است مانند جهش IVS 1-110 بسیار شدید و یا مانند IVS 2-844, IVS 2-745, IVS 1-6 متوسط و یا خفیف (88-, 87-) و یا خاموش (101-) باشند. در حامل خاموش اندکس ها و هموگلوبین A2 طبیعی است.

بنابراین وراثت β+β+ ممکن است با تالاسمی اینترمدیای خفیف یا شدید جلوه کند. موارد شدید جهش β+ شبیه β° بوده و حدود ۵ در صد ژن سالم فرآورده دارد. مواردی از β°β+ خفیف ممکن است به صورت اینترمدیا درآید و مواردی از β+β+ ممکن است به صورت تالاسمی ماینور بتا جلوه کند. بنابراین جلوه بالینی بستگی به نوع جهش β دارد که با روش‌های مولکولی قابل تشخیص است.

نکته‌های مهم

۱- تالاسمی ماینور آلفا با ژنوتایپ های ترانس (-α/-α) و سیس (--/αα) با آزمایش‌های CBC و اندازه گیری Hb A2 قابل افتراق نمی‌باشند و نیازمند آزمایش‌های مولکولی مانند Gap PCR برای تشخیص است. حذف سیس آلفا در همراهی با تالاسمی‌های آلفا عوارضی مانند بیماری هموگلوبین اچ و هیدروپس فتالیس با هموگلوبین‌بارت را به دنبال دارد.

۲- افزایش هموگلوبین A2 (بیشتر از ۳/۵٪) بدون توجه به اندکس های خون بیانگر تالاسمی ماینور بتاست. گرچه مواردی از قبیل پرکاری تیروئید، کم خونی مگالوبلاستیک، درمان HIV و هموگلوبین‌های ناپایدار ممکن است

Hb A2 را اندکی افزایش دهند ولی همیشه افزایش Hb A2 جدی است.

۳- کاهش اندکس های گلبول قرمز در تالاسمی ماینورآلفا، ماینور بتا و بیماری هموگلوبین E همراه با افزایش شمارش گلبول قرمز دیده می‌شود. در مناطقی که شیوع تالاسمی آلفا کم است از کاهش اندکس ها همراه با اریتروسیتوز می‌توان برای اسکرین تالاسمی ماینور بتا استفاده کرد.

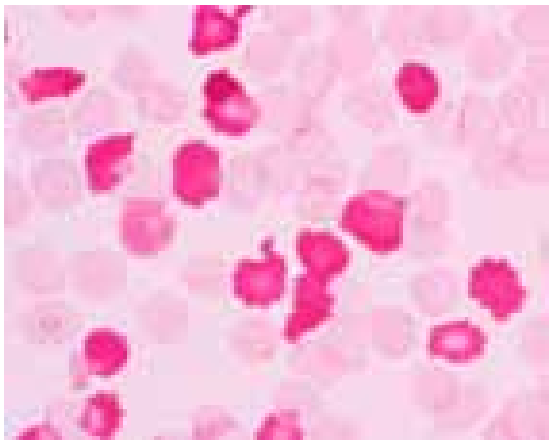
٤- همراهی وراثت تالاسمی ماینور بتا با تالاسمی آلفا (-α/αα) و یا بندرت (-α/-α) ممکن است به علت بالانس بهتر زنجیره‌ها اندکس ها را نرمال کند و تشخیص تالاسمی ماینور بتا را مشکل نماید ولی افزایش هموگلوبین A2 این وراثت همزمانی را همراهی می‌کند.

۵- یکی از مشکلات تشخیصی تالاسمی ماینور بتا مقدار نرمال یا لب مرز هموگلوبین A2 و حتی گاهی با اندکس‌های طبیعی است (حامل خاموش). گرچه اکثر این موارد تشخیص داده نمی‌شوند و در همراهی با تالاسمی ماینور بتا ممکن است تالاسمی اینترمدیا را به دنبال داشته باشد. برخی از جهش‌ها از قبیل (C>T) -101, (C>T) -92 به صورت حامل خاموش ماینور بتا خود را نشان می‌دهند.

٦- گاهی با وجود اندکس های تالاسمیک مقدار Hb A2 نرمال یا حتی کمتر از نرمال است. برای مثال همراه شدن تالاسمی ماینور بتا با جهش‌های ژن دلتا به صورت سیس و ترانس می‌تواند موجب کاهش ۵۰ درصدی هموگلوبین A2 یا حتی مقدار A2در حد صفر گردد. در این موارد آزمایش‌های مولکولی جهت افتراق از تالاسمی آلفا لازم است.

۷- دو گونه تالاسمی ماینور بتا با افزایش ٤ تا ۱۸ درصدی هموگلوبین F و سطح نرمال A2 همراه است. تالاسمی دلتا- بتا با حذف یا جهش ناکارآمد در دو ژن دلتا و بتا و بیان بیشتر ژن گاما که به آن تالاسمی F هم گفته می‌شود و دیگری HPFH حذفی است که به مفهوم تداوم سنتز هموگلوبین F است که هموگلوبین F بین ۳ تا ۳۰ درصد قرار می‌گیرد.

حذفی به مفهوم حذف شدن ژن‌های بتا و دلتا و فعال شدن بیشتر ژن گاما است. در تالاسمی دلتا-بتا اندکس ها تالاسمیک، ولی در HPFH نرمال یا در مرز نرمال است. با آزمایش بتکه که شیوه پخش هموگلوبین F را درگلبول ها نشان می‌دهد می‌توان این دو حالت را از هم افتراق داد. در تالاسمی دلتا بتا پخش غیر یکنواخت و در HPFH پخش یکنواخت مشاهده می‌شود.



پخش غیر یکنواخت هموگلوبین F در تالاسمی دلتا بتا

حذف ژن‌های خوشه بتا

۱- حذف تمام یا قسمتی از ژن بتا منجر به تالاسمی β° می‌گردد. برای مثال یک حذف 619 bp (جفت باز) در انتهای '3 ژن بتا شایع‌ترین آلل در جمعیت آسیایی هندی است. حذف‌های بزرگ که ناحیه پروموتر ژن بتا را در بر می‌گیرد با افزایش غیرمعمول Hb A2 حتی در سطح ۹-٦ درصد در حالت هتروزیگوت مشاهده می‌گردد.

۲- تالاسمی $(\delta\beta)^{\circ}$ که با افزایش ۵ تا ۲۵ درصدی هموگلوبین F در حالت هتروزیگوت و ۱۰۰ درصدی هموگلوبین F در حالت هموزیگوت همراه است.

۳- تالاسمی‌های حذفی (γδβ) و (εγδβ) که حتی در حالت هتروزیگوت با کم خونی شدید میکروسیت و هایپوکروم وابسته به تزریق خون در نوزادی همراه بوده و پس از ۳ تا ٦ ماه شبیه تالاسمی ماینور بتا در بزرگسالان و فاقد علایم بالینی می‌گردد.

٤- سندرم HPFH حذفی یا سندرم پا بر جایی سنتز هموگلوبین F که در حالت هتروزیگوت میزان هموگلوبین F بین ۳ تا ۳۵٪ متغیر است.

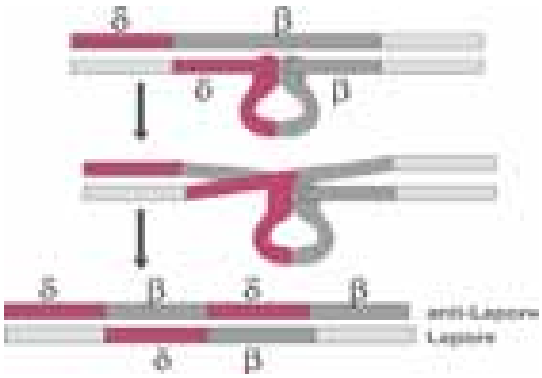
۵- حذف قسمتی از ژن‌های دلتا و بتا و ادغام آن‌ها در

Downloaded from labdiagnosis.ir at 20:07 +0330 on Saturday February 23rd 2019

Downloaded from labdiagnosis.ir at 20:07 +0330 on Saturday February 23rd 2019

نتیجه تقاطع نابرابر که نتیجه آن سرعت کند سنتز زنجیره دلتا بتا بوده و هموگلوبین لپور $(\alpha_2(\delta\beta)_2)$ نام دارد و در گروه سندرم‌های تالاسمی قرار می‌گیرد.

با توجه به جایگاه ادغام چهار نوع هموگلوبین لپور به نام‌های هلندیا، بوستون/ واشنگتن، بالتیمور و لیدن شناخته شده است. هموگلوبین لپور در حالت هتروزیگوت ۵ تا ۱۵٪ کل هموگلوبین بوده و در جایگاه S روی استات سلولز قرار می‌گیرد. با روش الکتروفورز IFE قابل افتراق بوده و در جایگاه ویژه بین هموگلوبین‌های A و S قرار می‌گیرد.



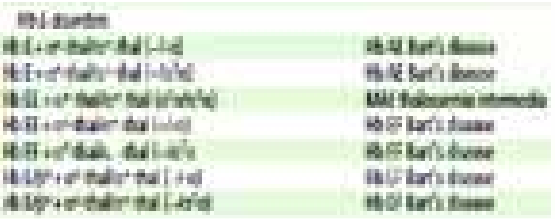
شکل گیری هموگلوبین لپور در نتیجه تقاطع نابرابر (Crossing Over) هاپلوتایپ های کروموزوم ۱۱

۶- حذف ژنتیکی و ادغام قسمتی از ژن‌های γβ، هموگلوبین کنیا را تشکیل داده که مانند HPFH عمل می‌کند.

	Hematologic Features		
Disorders	Heterozygotes	Homozygous State	DNA Analysis By PCR Methods
γ^+-Thalassemia			
Deletion (-α)	8–2% Hb Bart's at birth, minimal hematologic changes	5–10% Hb Bart's at birth, low MCH and MCV	Gap PCR: -α3.7, -α4.2 alleles
Nondeletion ($\alpha^T\alpha$)	Similar to above, but hematological changes may be more severe	Hb H disease in some cases	Selective PCR of αT or αα, then ASO, RS-PCR or sequencing
Nondeletion ($\alpha^{CS}\alpha$)	8–2% Hb Bart's at birth, 0.5–1% Hb Constant Spring	Slightly more severe than heterozygous α^+-Thalassemia	Selective PCR of αCS or αα, then ASO, RS-PCR or sequencing
α^0-Thalassemia (--)	5–10% Hb Bart's at birth, low MCH and MCV, minimal Hb A_2	Hb Bart's hydrops fetalis; 80% Hb Bart's, 20% Hb Portland at birth	Gap PCR: –SEA, –FIL, –MED, –THAI, –FIL alleles; MLPA for all alleles
α^+-Thalassemia/ α^0-Thalassemia		Hb H disease 20–80% Hb Bart's at birth, Hb H hydrops fetalis with a low severity of αα alleles	As above
β^0-Thalassemia	Low MCH and MCV, Hb A_2 3.5–7.0%	Thalassemia major; Hb F 98%, Hb A_2 2%	Nondeletion alleles as for β^+-thal Deletion alleles: Gap PCR, MLPA
β^+-Thalassemia			
Severe	Low MCH and MCV, Hb A_2 4.5–7.0%	Thalassemia major; Hb F 70–90%	ASO, ARMS, sequencing
Mild	Low MCH and MCV, Hb A_2 3.5–7.0%	Thalassemia intermedia; Hb F 20–40%	ASO, ARMS, sequencing
Silent	Normal MCH and MCV, Hb A_2 2.8–3.8%		ASO, ARMS, sequencing
Hb Lepore	Low MCH and MCV, Hb Lepore 8–20%, low Hb A_2	Thalassemia major/intermedia; Hb F 80%, Hb Lepore 20%	Gap PCR, MLPA
$\delta\beta^0$-Thalassemia	Low MCH and MCV, normal Hb A_2, Hb F 4–18% (heterocellular)	Thalassemia intermedia; 100% Hb F	Gap PCR, MLPA
HPFH			
Deletion	Normal indices; Hb F 15–25% (pancellular)	Normal; 100% Hb F	Gap PCR, MLPA
Nondeletion	Normal indices; Hb F 1–20%	Not described	Sequencing, Xmn I Bsa –158 $^G\gamma$ C→T

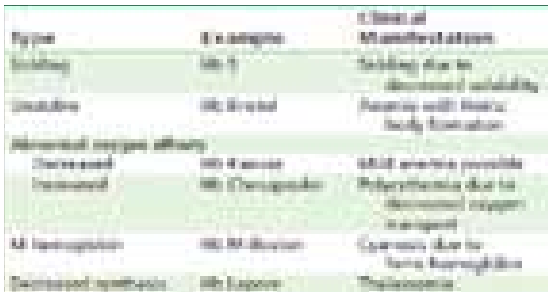
در جدول فوق الگوی الکتروفورز در حالت‌های هتروزیگوت و هموزیگوت سندرم‌های تالاسمی و هموگلوبینوپاتی‌ها و نیز روش‌های مولکولی در تشخیص آن‌ها آورده شده است. سندرم‌های تالاسمی آلفا در دوران جنینی و بدو تولد با هموگلوبین بارت و پس از تولد با هموگلوبین اچ همراه می‌باشند. مقدار هموگلوبین بارت در بدو تولد بستگی به تعداد حذف‌های ژن آلفا دارد. برای مثال در فقدان سه ژن آلفا به ۲۰ تا ۴۰ در صد می‌رسد. هموگلوبین بارت پس از ۶ ماهگی ناپدید می‌شود (۲).

Downloaded from labdiagnosis.ir at 20:07 +0330 on Saturday February 23rd 2019



همراهی هتروزیگوت و هموزیگوت و هتروزیگوت دوبل تالاسمی و هموگلوبین E با ژنوتایپ های مختلف تالاسمی آلفا با بیماری‌های EF Bart disease و AE Bart disease همراه بوده که از نظر بالینی به صورت هموگلوبین H و یا سندرم‌های تالاسمی اینترمدیا بروز می‌کند (۲).

گاهی همراهی تالاسمی آلفا با هتروزیگوت E(AE) یا هموزیگوت E (EE) و یا β° /E علامت دار می‌شود که تحت عناوین بیماری AE Bart و Hb EF Bart از آن یاد می‌شود. بیماری AE bart disease بارت نتیجه وراثت هم زمانی ژنوتایپ اچ (α-/--) با هتروزیگوت E است که با Hb A، Hb E(15-13%) و هموگلوبین‌بارت همراه است.



وراثت هموگلوبین‌های مختلف منجر به علائم بالینی گوناگونی از قبیل کم خونی همولیتیک، آنمی با ایجاد اجسام هاینز، پرخونی و سیانوز می‌گردد

هموگلوبین‌های ناپایدار

ابتلای پدر یا مادر به هموگلوبین ناپایدار موجب انتقال آن به فرزندان می‌شود. تاکنون ۳۰۰ نوع هموگلوبین ناپایدار شناخته شده است. جهش موجب دناتوره شدن و به هم خوردن ساختمان آلفا هلیکس زنجیره گلوبین می‌گردد. برخی جهش‌ها موجب جدا شدن دایمرهای گلوبین و جدا شدن ساختار هیم و یا تولید پاکت هیدروفیل در اطراف حلقه هیم می‌گردد. جهش‌های ناپایدار بتا بیشتر از آلفا علایم دار می‌گردد. گلوبین های دناتوره شده ایجاد هاینزبادی و کم خونی همولیتیک با ژاندیس و بزرگی طحال و گاهی سیانوز می‌کنند. دفع ادراری قهوه ای رنگ حاکی از مشتقات دایپرول در بیماران است. همراهی ژن بتای ناپایدار با تالاسمی β° و β^{+} ایجاد کم خونی شدید می‌کند. هموگلوبین‌های ناپایدار در حالت هتروزیگوت هم علایم‌دار هستند.

برخی از واریانت‌های ناپایدار β چنان ناپایدار هستند که به سرعت از بین رفته و تنها مطالعه DNA قادر به تشخیص آن‌ها می‌باشد. آزمایش‌های رسوب هموگلوبین در ایزوپروپانول ۱۷٪ و تست حرارتی از آزمایش‌های اسکرین تشخیص هموگلوبین‌های ناپایدار هستند. هموگلوبین‌های ناپایدار دارای میل ترکیبی کم یا زیاد یا نرمال برای اکسیژن هستند (۵). جهش ناپایدار در یک ژن آلفا با تولید ۵ تا ۲۰٪ هموگلوبین ناپایدار همراه است که علایم بالینی ندارد ولی جهش ناپایدار بتا با تولید ۲۰ تا ۴۰ درصد هموگلوبین ناپایدار علایم دار می‌شود.

مشاهده رسوب هموگلوبین در ایزوپروپانول ۱۷ درصد از آزمایش‌های تشخیصی برای هموگلوبین‌های ناپایدار می‌باشد

Downloaded from labdiagnosis.ir at 20:07 +0330 on Saturday February 23rd 2019

References

1- Angela N.Barrett: Thalassemia screening and confirmation of carriers in parent, form best practice and research: clinical obstetric and gynecology 39 (2017) 27-40 Elsevier Ltd.

2- John old; Hemoglobinopathies and thalassemia, National hemoglobinopathy reference laboratory, molecular hematology chapter17 form Emery and Rimoin's principle and practice of medical genetics: 2013, page 1-44 Elsevier.

3- Hemoglobinopathies: current practice for screening confirmation and follow-up, CDC December, 2015.

4- Debbie Man; Hemoglobinopathy genetics user hand book, university college London hospitals, 2016.

5-Henry; Clinical diagnosis by laboratory method, 2017, Elsevier.