

## گزارش دو مورد هتروزیگوسیتی دو گانه تالاسمی بتا و هموگلوبین S در بیماران تالاسمی ماژور استان لرستان

علی اصغر کیانی<sup>۱</sup>، یعقوب شیرخانی<sup>۲</sup>، یوسف مرتضوی<sup>۳</sup>، سیروس زینلی<sup>۴</sup>، معصومه کاشی<sup>۵</sup>، محمد رضا فیضیان<sup>۶</sup>

- 1- کارشناس ارشد هماتولوژی - مربی - عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی لرستان
- 2- دکتری علوم آزمایشگاهی - مربی - عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی لرستان
- 3- PhD هماتولوژی - عضو هیئت علمی دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه علوم پزشکی زنجان
- 4- PhD ژنتیک مولکولی - عضو هیئت علمی انستیتو پاستور ایران
- 5- مسول امور آزمایشگاه های دانشکده بهداشت
- 6- کارشناس مدیریت - معاونت آموزشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان

یافته / دوره هشتم / شماره 1 / بهار 85 / مسلسل 27

### چکیده

دریافت مقاله: 84/6/24، پذیرش مقاله: 84/9/19

Ø مقدمه: وجود همزمان دو ناهنجاری مختلف در یک ژن، هتروزیگوسیتی دو گانه نام دارد. یکی از معمول ترین انواع این هتروزیگوسیتی، همراهی تالاسمی و بیماری سلول داسی شکل است که تالاسمی سلول داسی شکل نامیده می شود. هدف از انجام این طرح جستجوی انواع هموگلوبینوپاتیها در بیماران تالاسمی ماژور استان لرستان بوده است.

Ø مواد و روش ها: در این مطالعه سرشماری ۶۵ بیمار تالاسمی ماژور استان لرستان دارای پرونده و مراجعه کننده به بیمارستان شهید مدنی خرم آباد به همراه والدینشان تحت آزمایشات CBC و الکتروفورز هموگلوبین قرار گرفتند. نمونه DNA بیماران که والدینشان دارای هموگلوبینوپاتی بودند، جهت پی گیری امکان ابتلا به هتروزیگوسیتی دو گانه با استفاده از پرایمرهای مخصوص جهش های ژنی، توسط روش PCR مورد آزمایش قرار گرفت.

Ø یافته ها: از میان ۶۵ بیمار تالاسمی ماژور، والدین دو تن از آنان دارای هموگلوبین S بودند. بنابراین احتمال ابتلای فرزندان آنان به هتروزیگوسیتی دو گانه تالاسمی بتا و هموگلوبین S وجود داشت. در بررسیهای ژنتیک، جهش های شناخته شده این ژن در هر دو کروموزوم شماره ۱۱ حامل ژن بتا گلوبین بیماران وجود نداشت.

Ø نتیجه گیری: از مجموع ۶۵ بیمار تالاسمی ماژور استان لرستان، دو بیمار مبتلا به هتروزیگوسیتی دو گانه تالاسمی بتا و هموگلوبین S بودند. با توجه به این موضوع انجام مطالعات بیشتر به خصوص در زمینه های ژنتیک برای بیماران تالاسمی و والدین آنان ضروری است.

واژه های کلیدی: بتا تالاسمی ماژور، هتروزیگوسیتی دو گانه، هموگلوبین S-PCR، الکتروفورز هموگلوبین

آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه هماتولوژی

پست الکترونیک: [kiani\\_ali54@yahoo.com](mailto:kiani_ali54@yahoo.com)

## مقدمه

داشتن همزمان دو ناهنجاری مختلف بر روی یک ژن، هتروزیگوسیتی دو گانه نام دارد. یکی از معمولترین انواع این هتروزیگوسیتی، همراهی تالاسمی و بیماری سلول داسی شکل است که تالاسمی سلول داسی شکل<sup>۱</sup> نامیده می شود. به عبارت دیگر بیمار به طور همزمان مبتلا به تالاسمی و بیماری سلول داسی شکل می باشد. تالاسمی ها شامل گروهی ناهمگون از اختلالات ارثی سنتز هموگلوبین می باشند که عمدتاً در افرادی از تبار مدیترانه ای، آفریقایی و آسیایی رخ می دهند (۱).

ویژگی معمول این اختلالات، مختل شدن تولید زنجیره های پلی پپتیدی هموگلوبین است. در تالاسمی بتا، به علت جهش های ژن بتا، تولید این زنجیره دچار اختلال می شود (۲).

بیش از ۱۸۰ جهش مختلف بعنوان عامل تالاسمی بتا شناسایی شده اند و تقریباً ۲۰ جهش علت ۸۰٪ از کل آلل های تالاسمی بتا در مردم دنیا محسوب می شوند (۳).

بیماری سلول داسی شکل معروف ترین هموگلوبینوپاتی<sup>۲</sup> است که در اثر ایجاد هموگلوبین S<sup>۳</sup> به وجود می آید. جایگزینی تیمیدین به جای آدنین در کدون مربوط به اسید گلوتامیک و استخلاف والین به جای اسید گلوتامیک در اسید آمینه شماره ۶ زنجیره بتا (که به صورت  $\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu} \rightarrow \text{val}}$  نمایش داده می شود) علت بروز این هموگلوبین ناهنجار است (۴). لازم به ذکر است که هموگلوبینوپاتی ها در اثر جهشهای نقطه ای در ژن گلوبین و در نتیجه تعویض یک اسید آمینه در ساختار گلوبین، ایجاد می شوند (۵).

در بیماری هموگلوبین S هموزیگوت، هموگلوبین A1 وجود ندارد و مقادیر هموگلوبینهای مختلف در این افراد به این شرح است: HbA<sub>2</sub> = ۲-۴٪، HbS > ۸۰٪، HbF = ۱-۲٪، HbA<sub>1</sub> = ۵۰-۶۰٪. در بیماری هموگلوبین S هتروزیگوت HbA<sub>1</sub> = ۵۰-۶۰٪، HbA<sub>2</sub> = ۱۵-۴۵٪ و HbF = ۱۵-۴۵٪ طبیعی یا کمی افزایش دارند (۷).

در هتروزیگوسیتی دو گانه تالاسمی بتا و هموگلوبین S میزان Hbs، بیش از هموگلوبین A1 است و کم خونی و یافته های بالینی از خفیف تا شدید متغیرند و همراه با تظاهراتی شبیه کم خونی سلول داسی شکل (Hbss) هستند. اما بر خلاف Hbss، طحال در این بیماران بزرگ باقی می ماند (۸). به علت مقادیر بالای Hbs، این بیماران می بایست از قرار گرفتن در شرایط هیپوکسی پرهیز نمایند، لذا از این بابت با بیماری تالاسمی هموزیگوت تفاوت دارند و در نتیجه تشخیص اینگونه اختلالات حائز اهمیت می باشد (۹). هدف از انجام این طرح جستجوی انواع هموگلوبینوپاتیها در بیماران تالاسمی ماژور استان لرستان بوده است.

## مواد و روش ها

۶۵ بیمار تالاسمی ماژور استان لرستان که از شهرهای مختلف استان جهت تزریق خون به بیمارستان شهید مدنی خرم آباد مراجعه نموده و دارای پرونده بودند به همراه والدینشان، به روش سرشماری مورد مطالعه قرار گرفتند. برای والدین بیماران تالاسمی ماژور پس از نمونه گیری و تهیه خون حاوی ضد انعقاد EDTA<sup>۴</sup>، آزمایشات CBC<sup>۵</sup> و الکتروفورز هموگلوبین به روش استات سلولز انجام شد (۱۰). جهت شمارش سلول و تعیین اندیکسهای RBC، دستگاه سل کانتر Sysmex مدل ۱۰۰۰ K ساخت کشور ژاپن مورد استفاده قرار گرفت.

در الکتروفورز هموگلوبین، وجود یا عدم وجود هموگلوبینهای غیر طبیعی (هموگلوبینوپاتی) و همچنین مقادیر (درصد) هموگلوبینهای مختلف بیماران مورد ارزیابی

- 1  $\beta$ thalassemia / Hbs
2. Hemoglobinopathy
3. HBS
4. Fetal hemoglobin
5. S hemoglobin
6. Adult 2 hemoglobin
7. Adult 1 hemoglobin
8. Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
9. Complete Blood Count

در والدین دو تن از بیماران تالاسمی ماژور نتایج زیر حاصل شد:

جدول شماره ۱- مقایسه نتایج به دست آمده از والدین دو بیمار

| مورد مطالعه |      |                               |
|-------------|------|-------------------------------|
| مادر        | پدر  |                               |
| ۴/۹۵        | ۵/۵۲ | RBC( $\times 10^{12}$ /Liter) |
| ۸۳          | ۷۸/۹ | MCV(femtolitre)               |
| ۳/۵         | ۷/۵  | HbA2%                         |
| ۳۲/۵        | ۴۲   | %HbS                          |
| ۵۴          | ۶۳/۵ | HbA1%                         |
|             |      |                               |
| ۴/۹۰        | ۵/۵۰ | RBC( $\times 10^{12}$ /Liter) |
| ۸۰          | ۷۸/۴ | MCV(femtolitre)               |
| ۳/۵         | ۷/۲  | HbA2%                         |
| ۳۱/۹        | ۴۰   | HbS%                          |
| ۵۶          | ۶۵/۵ | HbA1%                         |

با توجه به نتیجه جدول شماره یک ملاحظه می گردد که والدین دو تن از بیماران دارای هموگلوبین S می باشند. وجود هموگلوبین A1 نشان دهنده این است که بیماران از نظر ژن S هتروزینگوت می باشند.

از دو بیمار تالاسمی ماژوری که والدین آنان دارای هموگلوبین S بود، جهت بررسی وجود جهش ژن بتا آزمایش PCR صورت گرفت؛ اما جهش شناخته شده ای در هر دو کروموزوم آنان وجود نداشت و ژنوتیپ بیماران به صورت ناشناخته/ناشناخته<sup>۵</sup> به دست آمد.

### بحث

پس از انجام آزمایشات و بررسی نتایج، مشخص شد که والدین دو تن از بیماران تالاسمی ماژور استان، دارای

قرار گرفت. علاوه بر الکتروفورز، درصد انواع هموگلوبینهای مختلف به دست آمده نیز توسط روش های شیمیایی و کروماتوگرافی ستونی تأیید شد (۱۱).

در مواردی که والدین بیماران دارای هموگلوبینوپاتی بودند، جهت تأیید حضور توام ژن بتا تالاسمی با هموگلوبینوپاتی مربوطه، نمونه های بیماران توسط روش PCR<sup>۱</sup> و با استفاده از پرایمرهای مخصوص جهش های ژن بتا تالاسمی (۱۲) مورد بررسی قرار گرفتند. ده میلی لیتر نمونه خون حاوی EDTA از بیماران تهیه شده و DNA نمونه ها توسط روش پروتیناز K تخلیص شد (۱۳)؛ سپس جهت بررسی وجود جهش های ژن بتا، DNA بیماران، تکثیر شده و از نظر وجود یا عدم وجود جهش مورد مطالعه قرار می گرفت. از روشهای آمار توصیفی جهت مقیاس و توصیف اطلاعات استفاده شد.

### یافته ها

پس از انجام آزمایش CBC و الکتروفورز هموگلوبین والدین بیماران تالاسمی ماژور نتایج زیر بدست آمد:

در ۹۵٪ موارد شمارش گلبولهای قرمز بیماران بیش از  $5/5 \times 10^{12}$  در لیتر<sup>۲</sup>، در ۹۰٪ موارد حجم متوسط گلبولهای قرمز کمتر از ۷۰ فمتولیترا<sup>۳</sup> و در ۹۸٪ موارد میزان هموگلوبین A2 بیشتر از ۳/۵٪ بود<sup>۴</sup>.

لازم به ذکر است از آنجائیکه بیماران مورد مطالعه، همگی فرزندان تالاسمی ماژور داشتند، مسلماً ژن جهش یافته بتا را دارا بودند. بنابراین مقادیر RBC، MCV و HbA2 آنان از اهمیت تشخیص بالایی در این تحقیق برخوردار نبود. از این رو در مواردی که HbA2 کمتر از ۳/۵٪ و یا RBC کمتر از  $5/5 \times 10^{12}$  در لیتر بود، ضرورتی بر تأیید قطعی و بررسی مواردی چون میزان ذخیره آهن که اثر قابل توجهی بر این اندیکسها دارد، وجود نداشت. آنچه که در درجه اول اهمیت قرار داشت و ما نیز در پی آن بودیم، وجود هموگلوبین های غیر طبیعی یا هموگلوبینوپاتی در والدین بیماران بود.

1. Polymerase Chain Reaction
2. RBC  $> 5.5 \times 10^{12}$  /liter
3. MCV  $< 70$  femtoliter
4. HbA2  $> 3.5$  %
5. unknown/unknown

هموگلوبین S می باشند. مطالعات مشابه از جمله در ترکیه شیوع نسبتاً بالای هتروزیگوسیتی دو گانه تالاسمی بتا و هموگلوبین S را نشان می‌دهند (۱۴). با توجه به نتایج به دست آمده که هر دو والد دارای هموگلوبین A1 نیز بودند، بنا براین واضح بود که والدین از نظر وجود ژن S در حالت هتروزیگوت قرار داشته و فقط یکی از کروموزومهای آنان حاوی ژن S است.

با توجه به این مسئله دو احتمال وجود داشت. اول اینکه والدین ممکن است فقط دارای ژن S بوده و فاقد ژن جهش یافته بتا تالاسمی باشند که در این صورت فرزندان آنان فقط مبتلا به بیماری هموگلوبین S بوده و به اشتباه تالاسمی ماژور تشخیص داده شده بودند. احتمال دوم اینکه والدین، هر دو ژن S و ژن بتا تالاسمی را دارا بودند که در این صورت برای فرزندان آنان دو حالت ممکن است به وجود آید.

با توجه به ژنوتیپ والدین (S/ $\beta$ thalassemia) فرزندان آنان ممکن است دارای ژنوتیپ به احتمال ۲۵ درصد  $\beta$ thalassemia / $\beta$ thalassemia (بتا تالاسمی ماژور) و یا به احتمال ۵۰ درصد S/ $\beta$ thalassemia (تالاسمی به همراه سلول داسی شکل) و به احتمال ۲۵ درصد S/S (بیماری هموگلوبین S هموزیگوت) باشند.

حال سوال مطرح شده این است که آیا این بیماران دارای ژن بتا سالم هستند یا اینکه ژن بتای آنان دارای جهش تالاسمی است. به عبارتی آیا بیماران، بیماران هتروزیگوت S هستند یا به بیماری هتروزیگوت بتا تالاسمی سلول داسی شکل مبتلا می باشند. به منظور پاسخ به این سوال بیماران از نظر

وجود جهش ژن بتا مورد آزمایش ژنتیک توسط روش PCR قرار گرفتند اما جهش شناخته شده ای در هر دو کروموزوم حاصل نشد. باز هم دو احتمال مطرح است. ۱- ژن بتا تالاسمی وجود دارد اما توالی آن ناشناخته است ۲- ژن بتا تالاسمی اصلاً وجود ندارد و بیماران مبتلا به تالاسمی نمی باشند. پاسخ به این سوال را تا حدود زیادی می توان از روی شدت کم خونی و علائم بالینی مشخص نمود.

اگر بیمار فاقد ژن بتا تالاسمی باشد و فقط بیماری هتروزیگوس هموگلوبین S داشته باشد، میزان هموگلوبین A1 به حدی است (۶۰ - ۵۰٪) که بیمار معمولاً نیازی به تزریق خون نخواهد داشت (۱۵). اما بیماران مورد مطالعه ما نیازمند تزریق خون بودند بنابراین به احتمال قوی، این بیماران دارای ژن جهش یافته بتا نیز بودند و در واقع مبتلا به بیماری هتروزیگوت بتا تالاسمی سلول داسی شکل بوده و می بایست از قرار گرفتن در معرض شرایطی که استرس همپوکسی را به دنبال دارد، بپرهیزند.

### نتیجه گیری

تعدادی از بیماران تالاسمی ماژور کشور ممکن است علاوه بر تالاسمی دارای ناهنجاریهای مختلف دیگری نیز در ژنهای سازنده گلوبین خود باشند. لذا انجام مطالعات بیشتر به خصوص در زمینه های ژنتیک برای این بیماران و والدین آنان اجتناب ناپذیر می باشد.

## References

1. Anonymous. The Management of Sickle Cell Disease. Bethesda, MD: *National Institutes of Health*. National Heart, Lung, and Blood Institute. Division of Blood Diseases and Resource, 2002
2. Mahboudi F, Zeinali S, Merat A, Delmaghani S, Mostafavipour K, Moghaddam CZ, Haghshenas M. The molecular basis of  $\beta$ thalassemia mutation in Fars province, Iran. *Irn J Med Sci* 1996; 21(3&4):104
3. Lee GR, Forester J, Lukens J, Paraskovas F, Greer JP, Rodgers GM. *The Wintrobe's Clinic Hematology*. Vol 1. 10th ed. Baltimore: Lippincott, Williams and Wilkins, 1999
4. Fucharoen S, Winichagoon P, Piankijagum A. Standardization on laboratory diagnosis of thalassemia and abnormal hemoglobin. *Southeast Asian. J Trop Med Public Health* 1999;30 Suppl 3: 90-98
5. Guvenc B, Unsal C, Hanta I, Unsal A, Guvenc H. Sickle cell anemia patient with sarcoidosis-associated inguinal lymph node and lung infiltration. *J Natl Med Assoc* 2005 Jun;97(6):820-822
6. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V and et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA*, 2005 Jul 6; 294(1):81-90
7. Fanny A, Coulibaly F, Gbe K, Meite M, Adjorlolo C, Konan-Toure ML and et al. Sickle cell beta-thalassemia leading to serious ischemic retinopathy: A study of 18 patients in Abidjan. *J Fr Ophthalmol*. 2005 Apr; 28(4):391-5
8. Kutlar F, Mirmow D, Glendenning M, Holley L, Kutlar A. Postmortem molecular diagnosis of sickle beta thalassaemia. *J Clin Pathol* 2005 May;58(5):548-9
9. Aslam AF, Aslam AK, Dipillo F. Fatal splenic sequestration crisis with multiorgan failure in an adult woman with sickle cell-beta+ thalassemia. *Am J Med Sci*. 2005 Mar;329(3):141-3
10. Marouf R, D'souza TM, Adekile AD. Hemoglobin electrophoresis and hemoglobinopathies in Kuwait. *Med Princ Pract* 2002 Jan-Mar;11(1):38-41
11. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: Review and update. *Clin Chem* 2000 Aug;46(8 Pt 2):1284-90
12. Colah R, Nadkarni A, Gorakshakar A, Phanasaonkar S, Surve R, Subramaniam PG. Impact of beta globin gene mutations on the clinical phenotype of beta thalassemia in India. *Blood Cells Mol Dis*. 2004 Sep-Oct;33(2):153-7.
13. Najmabadi H, Karimi-Nejad R, Sahebjam S, Pourfarzad F, Teimourian S, Sahebjam F and et al. The beta-thalassemia mutation. Spectrum in the Iranian population. *Hemoglobin* 2001 Aug;25(3):285-96
14. Deepak K Associated with high levels of hemoglobins A2 and F in a Turkish family. Westminster Publications, Inc. 708 Glen Cove Avenue, Glen Head, NY 11545, U.S.A. 2003
15. Jaja SI, Gbadamosi TA, Kehinde MO, Gbenebitse S. The effect of warmth or/and vitamin E supplementation on forearm blood flow and forearm vascular resistance in sickle cell and non sickle cell anaemia subjects. *Niger Postgrad Med J* 2003 Mar;10(1):6-12