خون
دوره ۴ شماره ۴ زمستان ۸۶ (۲۴۶-۲۳۹)

سنتز زنجیره‌های گلوبین جهت تشخیص افتراقی حاملین بتا تالاسمی از آلفا تالاسمی

دکتر شهره خاتمی[۱]، دکتر صغری روحی دهبنه[۲]، دکتر صدیقه صادقی[۲]، پریناز سعیدی[۳]، رقیه میرزازاده[۴]، پرستو بیات[۵]، دکتر عارف امیرخانی[۶]، دکتر اشرف سماوات[۷]، دکتر سیروس زینلی[۸]، دکتر محمد تقی اکبری[۹]، دکتر حسین نجم‌آبادی[۱۰]

چکیده

سابقه و هدف

سنتز زنجیره‌های گلوبین و آنالیز DNA ، آزمایش‌های تکمیلی در زمینه تشخیص تالاسمی می‌باشند. در حال حاضر آنالیز DNA به عنوان معتبرترین آزمایش تشخیص بیماری‌های ژنتیکی از جمله تالاسمی محسوب می‌شود. اما با توجه به پیچیدگی این بیماری هتروژن، که می‌تواند مربوط به وجود موتاسیون‌های ناشناخته و یا وجود موتاسیون در نقاط تنظیمی دوردست ژن باشد، سنتز زنجیره‌های گلوبین جایگاه خاصی در زمینه تشخیص افتراقی انواع تالاسمی حفظ کرده است. از این جهت بر آن شدیم که علاوه بر راه‌اندازی این روش به صورت روتین، محدوده نسبت آلفا به بتا را نیز در گروه‌های مختلف تالاسمی و گروه کنترل تعیین نماییم.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این تحقیق جمعاً ۲۱۴ فرد شامل گروه کنترل(۵۱ نفر)، گروه بتاتالاسمی مینور(۲۴ نفر)، گروه آلفاتالاسمی ملایم(α Thal-2)(۶۸ نفر)، گروه آلفا تالاسمی شدید(۴۴ نفر)، گروه بیماری هموگلوبین H (۶ نفر)، گروه بتاتالاسمی نهفته(تیپ II)(۱۴ نفر)، گروه دلتابتا تالاسمی(۵ نفر) و گروه آلفادلتابتا تالاسمی(۲ نفر) شرکت نمودند. برای گروه‌های فوق آزمایش‌های زیر انجام شد: CBC ، الکتروفورز هموگلوبین بر روی کاغذ استات سلولز در pH قلیایی و اندازه‌گیری هموگلوبین A_2 با استفاده از کروماتوگرافی ستونی، شمارش درصد رتیکولوسیت‌ها، بررسی انکلوزیون‌های هموگلوبین H ، بررسی مورفولوژی سلول‌های قرمز خون و سنتز زنجیره‌های گلوبین.

یافته‌ها

یافته‌های مطالعه نشان‌دهنده این نتایج هستند: ۱- تغییرات معنی‌دار در مورد متغیرهای زیر نسبت به گروه کنترل در جهت افزایش میانگین گلبول‌های قرمز، کاهش میانگین هموگلوبین، کاهش میانگین هماتوکریت، کاهش میانگین MCV ، کاهش میانگین MCH و کاهش میانگین MCHC ، هم چنین کاهش میانگین نسبت آلفا به بتا در موارد آلفا تالاسمی و بر عکس افزایش آن در موارد بتاتالاسمی. ۲- شیوع بیشتر آلفا تالاسمی نسبت به فرم‌های آتیپیک بتاتالاسمی در جمعیت مشکوک به تالاسمی(۵۵/۲٪ موارد مختلف آلفا تالاسمی در مقابل ۹/۸٪ موارد مختلف بتا تالاسمی آتیپیک).

نتیجه گیری

نتایج نشان می‌دهند که میانگین نسبت آلفا به بتا در این مطالعه منطبق با نتایج ارایه شده در سایر مقالات و کتاب‌های معتبر است با این تفاوت که انحراف معیار بزرگ‌تر می‌باشد. در نتیجه این انحراف معیار، محدوده بازتری برای نسبت آلفا به بتا به دست آمده است. وجود این محدوده باز سبب هم‌پوشانی محدوده‌ها در گروه‌های مختلف و مجاور می‌گردد. به همین دلیل از این عدد به تنهایی نمی‌توان برای تشخیص قطعی نوع تالاسمی استفاده کرد. لذا برای تعیین وضعیت نهایی بیمار، ضمن در نظر گرفتن قومیت بیمار و وضعیت بالینی وی، لازم است که نتایج آزمایش‌های CBC ، مورفولوژی سلول‌های قرمز، الکتروفورز هموگلوبین، سنتز زنجیره‌های گلوبین و هم چنین نتایج آزمایش‌های پدر و مادر بیمار و در صورت لزوم آنالیز DNA آن‌ها، در کنار هم گذاشته شود.

کلمات کلیدی: تالاسمی بتا، تالاسمی آلفا، گلوبین

تاریخ دریافت : ۸۶/ ۴/۱۱ *تاریخ پذیرش : ۱ /۸۶/۱۰*

۱ـ مؤلف مسؤول: PhD بیوشیمی ـ استادیار انستیتو پاستور ایران ـ خیابان پاستور ـ پلاک ۶۹ ـ کدپستی: ۱۳۱۶۴
۲ـ دکترای علوم آزمایشگاهی ـ انستیتو پاستور ایران
۳ـ کارشناس علوم آزمایشگاهی ـ انستیتو پاستور ایران
۴- دانشجوی PhD شیمی ـ انستیتو پاستور ایران
۵- کارشناس شیمی ـ انستیتو پاستور ایران
۶- PhD اپیدمیولوژی ـ دانشیار انستیتو پاستور ایران
۷- متخصص اطفال ـ رئیس اداره ژنتیک مرکز مدیریت و پیشگیری از بیماری‌ها
۸- PhD ژنتیک انسانی ـ استادیار انستیتو پاستور ایران
۹- PhD ژنتیک انسانی ـ استادیار دانشگاه تربیت مدرس
۱۰- PhD ژنتیک انسانی ـ استادیار دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

تالاسمی یک نوع کم خونی ارثی است که در آن سنتز یک یا چند زیر واحد از زنجیره‌های شرکت کننده در ساختمان هموگلوبین از نظر کمی کاهش می‌یابد. این بیماری که شایع‌ترین اختلال تک ژنی در جمعیت جهان می‌باشد، بسیار هتروژن بوده و انواع مختلفی دارد. عنوان بتا تالاسمی به مواردی اطلاق می‌شود که در آن‌ها سنتز زنجیره‌های بتا کاهش یافته است و آلفا تالاسمی به مواردی گفته می‌شود که در آن تولید زنجیره آلفا کاهش پیدا کرده است. تظاهر کلینیکی بیماری، کم خونی است که شدت آن با میزان زنجیره‌های تولید شده و پایداری زنجیره‌های اضافی تولید شده ارتباط دارد(۱). در کم خونی ایجاد شده، کوچک و کم رنگ شدن سلول‌های قرمز مرتبط با کاهش تولید زنجیره‌های گلوبین است در حالی که کم خونی همولیتیک و خون‌سازی غیر مؤثر مرتبط با ناپایداری زنجیره‌های اضافی تولید شده می‌باشد.

تاکنون بیش از ۱۰۰۰ نوع موتاسیون یا حذف ژنی پیدا شده است که از نظر کمی و یا کیفی بر روی تولید زنجیره‌های گلوبین تاثیر می‌گذارد. در این بین ۲۰۰ نوع از موتاسیون‌های فوق‌الذکر بر روی ژن بتا تاثیر می‌کنند(۲). این موتاسیون‌ها می‌توانند در هر یک از مراحل رونویسی، پردازش، ترجمه و پایداری زنجیره پس از ترجمه، بر روی بیان ژن اثر گذاشته و عملکرد ژن را مختل کنند.

در بین تالاسمی‌ها، تشخیص انواع مختلف بتا تالاسمی از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد، زیرا عدم تشخیص موارد بتا تالاسمی(خصوصاً موارد آتیپیک و یا نهفته آن) و یا اشتباه با موارد آلفا تالاسمی می‌تواند خطر به دنیا آمدن بچه‌های بتا تالاسمی ماژور یا اینترمدیا را افزایش دهد.

جهت دست‌یابی به تشخیص صحیح، نمودارهای مختلفی وجود دارد که استفاده از آن ها می‌تواند بسیار کمک کننده باشد(۶-۳). آزمایش‌های مورد استفاده در این نمودارها شامل CBC ، بررسی الگوی الکتروفورز هموگلوبین و مطالعه وضعیت آهن بدن است که در بسیاری از موارد می‌تواند منجر به تشخیص قطعی گردد. ولی امر تشخیص برخی موارد پیچیده شامل بتا تالاسمی نهفته تیپ I (بتا تالاسمی با MCV ، MCH و هموگلوبین A_2 طبیعی)، آلفا بتا تالاسمی(توارث هم زمان آلفا و بتا تالاسمی)، بتا تالاسمی نهفته تیپ II (بتا + دلتا تالاسمی یا توارث هم زمان دلتا و بتا تالاسمی یا بتا تالاسمی با MCV و MCH پایین و هموگلوبین A_2 و F طبیعی)، دلتا بتا تالاسمی(بتا تالاسمی با هموگلوبین A2 طبیعی و F بالا)، گاما دلتا بتا تالاسمی، HPFH و تریپلیکاسیون ژن آلفا نیاز به انجام آزمایش‌های تکمیلی مثل سنتز زنجیره‌های گلوبین و آنالیز DNA دارد.

در حال حاضر با وجود این که آنالیز DNA معتبرترین آزمایش تشخیصی بیماری‌های ژنتیکی از جمله تالاسمی محسوب می‌شود، اما به دلیل وجود موتاسیون‌های ناشناخته و یا وجود موتاسیون در مناطق تنظیمی دوردست ژن، نمی‌توان از آن به تنهایی برای تشخیص قطعی استفاده کرد. لذا نیاز به آزمایش‌های دیگر از جمله سنتز زنجیره‌ها می‌باشد. آزمایش سنتز زنجیره‌های گلوبین از سال ۱۳۷۵ به صورت پایلوت و از سال ۱۳۷۹ به صورت روتین در بخش بیوشیمی انستیتو پاستور ایران جهت پاسخگویی به افراد مشکوک به تالاسمی راه‌اندازی گردیده است. نتیجه حاصل از این آزمایش به صورت نسبت آلفا به بتا گزارش می‌گردد. این نسبت در افراد سالم در حدود ۱، در افراد بتا تالاسمی بالاتر از ۱ و در افراد آلفا تالاسمی پایین‌تر از ۱ می‌باشد. تعیین محدوده نسبت آلفا به بتا در گروه‌های مختلف تالاسمی و هم چنین گروه سالم با در نظر گرفتن روش آنالیز، در ایران از ضروریات می‌باشد. لذا جهت دست‌یابی به اهداف زیر، این مطالعه انجام پذیرفت: ۱- تشخیص افتراقی بتا تالاسمی نهفته از سایر انواع تالاسمی به دلیل اهمیت موضوع در برنامه پیشگیری از تولد کودک مبتلا به بتا تالاسمی ماژور ۲- تعیین و مقایسه نسبت آلفا به بتا در گروه‌های مورد مطالعه ۳- تعیین و مقایسه سایر پارامترهای هماتولوژیک با اهمیت در گروه‌های مورد مطالعه.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع کاربردی بود. در این تحقیق زیر گروه‌های مورد مطالعه در گروه تالاسمی در کنار ۵۱ فرد سالم عبارت بودند از: گروه آلفا تالاسمی ملایم

www.SID.ir
Archive of SID

(Thal-2 آلفا)(۶۸ نفر)، گروه آلفا تالاسمی شدید(Thal-1 آلفا)(۴۴ نفر)، گروه بیماری هموگلوبین H(۶ نفر)، گروه بتا تالاسمی مینور(۲۴ نفر)، گروه بتا تالاسمی نهفته تیپ II(۱۴ نفر)، گروه دلتا بتا تالاسمی(۵ نفر) و گروه آلفا دلتا بتا تالاسمی(۲ نفر).

مواد لازم جهت تهیه بافرها و محلول‌ها و محیط کشت از شرکت‌های مرک و سیگما تهیه گردید.

برای گروه‌های مورد مطالعه آزمایش‌های زیر انجام پذیرفت:

الف- CBC یا شمارش سلول‌های خونی با استفاده از دستگاه شمارشگر الکترونیکی سیس مکس مدل ۱۰۰۰ K و KX ۲۱ .

ب- الکتروفورز هموگلوبین با استفاده از کاغذ استات سلولز در pH قلیایی و اندازه‌گیری هموگلوبین A_2 با استفاده از کروماتوگرافی ستونی(۷).

ج- شمارش درصد رتیکولوسیت‌ها و بررسی هموگلوبین H با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی برلیانت کرزول بلو و بررسی مورفولوژی سلول‌های قرمز خون(۷).

د- آزمایش‌های آهن، TIBC و فریتین برای افراد مشکوک به تالاسمی جهت رد وجود فقر آهن.

ه- سنتز زنجیره‌های گلوبین جهت تعیین نسبت آلفا به بتا، طبق روش کلگ و ودرال و آنالیز آن با استفاده از دستگاه HPLC طبق روش دکتر رهبر با تغییر در میزان گرادیانت برقرار شده(۱۰-۸). این آزمایش به طور خلاصه شامل مراحل زیر است:

۱- غنی‌سازی نمونه خون هپارینه از رتیکولوسیت‌ها و عاری نمودن آن از سلول‌های سفید(۱۱، ۸).

۲- بیوسنتز زنجیره‌های جدید نشاندار با کشت سلول‌های قرمز آماده شده از مرحله یک در محیط کشت مخصوص در حضور ترانسفرین انسانی و لوسین نشاندار(ال- ۴، ۵ ^3H لوسین، شرکت آمرشام، TRK 170)(۸). با توجه به استفاده از ترانسفرین انسانی، از پلاسمای دیالیز شده در تهیه محیط کشت استفاده نگردید(۱۲).

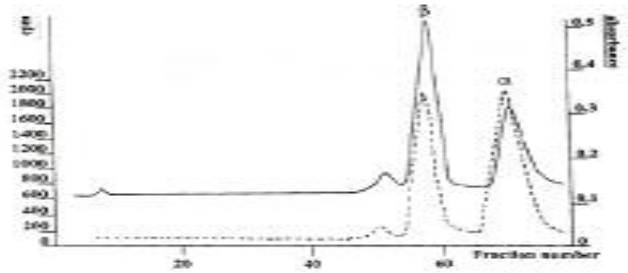
۳- تهیه پودر گلوبین با استفاده از استن سرد و اتر خالص (۱۳، ۱۰، ۸).

۴- جداسازی زنجیره‌ها به وسیله دستگاه HPLC شرکت واترز و ستون تعویض یونی Mono-S شرکت فارماسیا (۱۳، ۱۰).

۵- اضافه کردن مایع سنتیلاسیون به فراکشن‌های به دست آمده به نسبت ده به یک و شمارش رادیو اکتیویته لوله‌ها با دستگاه بتا کانتر شرکت والاک(۱۰، ۸).

۶- محاسبه نسبت آلفا به بتا از تقسیم مجموع شمارش‌های سطح زیر منحنی آلفا به مجموع شمارش‌های سطح زیر منحنی بتا(شکل ۱).

تحلیل آماری نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار EPI_5 انجام پذیرفت. برای هر آغازگر میانگین($\overline{X}$)، انحراف معیار(SD)، حد ماکزیمم و حد می‌نیمم و محدوده(میانگین ± ۲SD) محاسبه گردید. مقایسه نتایج به دست آمده بین گروه‌های مختلف با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه کروسکال والیس انجام پذیرفت.



شکل ۱: پروفایل رادیواکتیویتی و جذب نوری در یک فرد سالم (α/β=۱/۰۴) (۱۰)

یافته ها

نتایج مربوط به متغیرهای عمومی نشان داد که ۹۹/۱ درصد جمعیت مورد مطالعه در گروه سنی بیشتر از ۱۵ سال، ۴۶/۳ درصد از این افراد مونث و ۵۳/۷ درصد آن‌ها مذکر بودند. ۲۳/۸ درصد جمعیت مورد مطالعه در گروه افراد سالم و ۷۶/۲ درصد آن‌ها در گروه‌های مختلف تالاسمی قرار داشتند.

گروه‌های قومی ۱۸۹ نفر(۸۸/۳ درصد) از کل جمعیت مورد مطالعه مشخص بودند که به ترتیب در گروه‌های قومی فارس(۶۲ نفر)، طبری(۴۷ نفر)، آذری(۲۸ نفر)، گیلک(۲۶ نفر)، لر(۱۱ نفر)، کرد(۹ نفر)، عرب(۴ نفر)، لک(۱ نفر) و روس(۱ نفر) قرار گرفتند. در این مطالعه نیز مشخص گردید که اکثریت افراد مراجعه کننده حامل ژن

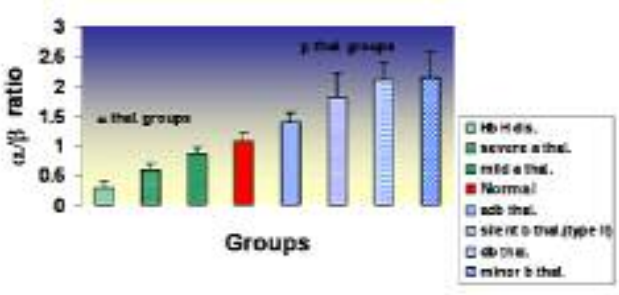
Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: نتایج هماتولوژیک

شاخص‌ها	جنس	بیماری هموگلوبین H M ± 2SD	آلفا تالاسمی شدید M ± 2SD	آلفا تالاسمی ملایم M ± 2SD	کنترل M ± 2SD	بتا تالاسمی نهفته M ± 2SD	آلفا دلتا بتا تالاسمی M ± 2SD	دلتا بتا تالاسمی M ± 2SD	بتا تالاسمی خفیف M ± 2SD	P Value
RBC (x 10^{12}/ L)	مرد	۶/۴۹ ± ۱/۳۳	۶/۲۲ ± ۰/۹۲	۵/۸۶ ± ۰/۷۸	۵/۳۵ ± ۰/۹۱	۶/۶۳ ± ۱/۲۹	۵/۹۵ ± ۰/۰	۶/۳۱ ± ۰/۸۱	۶/۵۶ ± ۱/۳۱	p< ۰/۰۰۰۰۱
	زن	۴/۵۳ ± ۰/۳۵	۵/۴۱ ± ۱/۰۶	۵/۰۹ ± ۰/۸۹	۴/۷۶ ± ۰/۵۸	۵/۲۹ ± ۰/۸۸	۵/۶۰ ± ۰/۰	–	۵/۴۹ ± ۰/۷۳	
Hb (g/dl)	مرد	۱۱/۰ ± ۱/۸	۱۴/۲ ± ۲/۲	۱۴/۸ ± ۲/۱	۱۵/۶ ± ۲/۴	۱۴/۱ ± ۲/۱	۱۲/۵ ± ۰/۰	۱۳/۷ ± ۲/۳	۱۳/۲ ± ۲/۶	p< ۰/۰۰۰۰۰۱
	زن	۷/۹ ± ۰/۱	۱۱/۸ ± ۲/۱	۱۲/۷ ± ۲/۷	۱۳/۸ ± ۱/۶	۱۲/۴ ± ۲/۲	۱۳/۱ ± ۰/۰	–	۱۱/۱ ± ۱/۸	
Hct (%)	مرد	۳۸/۰ ± ۱۱/۳	۴۴/۶ ± ۴/۹	۴۵/۵ ± ۶/۳	۴۶/۴ ± ۶/۹	۴۵/۱ ± ۶/۷	۴۰/۲ ± ۰/۰	۴۲/۹ ± ۴/۴	۴۲/۷ ± ۹/۳	p< ۰/۰۰۱
	زن	۲۷/۳ ± ۲/۸	۳۷/۷ ± ۶/۳	۳۹/۲ ± ۷/۷	۴۲/۱ ± ۵/۶	۳۹/۳ ± ۶/۲	۴۱/۲ ± ۰/۰	–	۳۵/۳ ± ۴/۷	
MCV (fl)	مرد	۵۸/۲ ± ۸/۱	۷۱/۹ ± ۸/۳	۷۷/۶ ± ۵/۱	۸۶/۸ ± ۷/۰	۶۸/۳ ± ۹/۴	۶۷/۵ ± ۰/۰	۶۸/۳ ± ۱۲/۳	۶۴/۷ ± ۹/۸	p< ۰/۰۰۰۰۱
	زن	۶۰/۲ ± ۱/۷	۶۹/۹ ± ۸/۱	۷۷/۱ ± ۵/۷	۸۸/۲ ± ۷/۵	۷۴/۴ ± ۹/۴	۷۳/۴ ± ۰/۰	–	۶۴/۴ ± ۶/۲	
MCH (pg)	مرد	۱۷/۰ ± ۲/۳	۲۲/۹ ± ۳/۶	۲۵/۴ ± ۲/۲	۲۹/۲ ± ۲/۶	۲۱/۴ ± ۴/۳	۲۱/۰ ± ۰/۰	۲۱/۹ ± ۵/۵	۲۰/۲ ± ۲/۴	p< ۰/۰۰۰۰۱
	زن	۱۷/۴ ± ۰/۹	۲۱/۹ ± ۳/۴	۲۴/۹ ± ۲/۲	۲۹/۰ ± ۲/۵	۲۳/۶ ± ۳/۵	۲۳/۴ ± ۰/۰	–	۲۰/۰ ± ۳/۱	
MCHC (g/dl)	مرد	۲۹/۲ ± ۵/۰	۳۱/۸ ± ۲/۱	۳۲/۷ ± ۱/۴	۳۳/۷ ± ۱/۵	۳۱/۳ ± ۲/۵	۳۱/۱ ± ۰/۰	۳۲/۰ ± ۲/۵	۳۱/۰ ± ۲/۸	p< ۰/۰۰۰۰۰۱
	زن	۲۸/۹ ± ۲/۳	۳۱/۳ ± ۱/۸	۳۲/۳ ± ۱/۴	۳۲/۹ ± ۲/۲	۳۱/۰۷ ± ۱/۸	۳۱/۹ ± ۰/۰	–	۳۱/۳ ± ۲/۰	
Reticulocytes (%)	مرد	۲/۵ ± ۲/۴	۰/۸ ± ۰/۵	۰/۸ ± ۰/۵	۰/۸ ± ۰/۶	۰/۸ ± ۰/۲	۱/۲ ± ۰/۰	۱/۳ ± ۰/۸	۱/۰ ± ۰/۸	–
	زن	۵/۳ ± ۲/۱	۰/۹ ± ۰/۸	۰/۹ ± ۰/۶	۰/۷ ± ۰/۴	۱/۰ ± ۰/۶	۱/۰ ± ۰/۰	–	۱/۴ ± ۰/۷	
HbA_2 (%)	مرد	۱/۶ ± ۱/۳	۲/۵ ± ۰/۹	۲/۶ ± ۰/۹	۲/۲ ± ۰/۷	۳/۰ ± ۱/۱	۲/۵ ± ۰/۰	۲/۹ ± ۱/۰	۵/۳ ± ۱/۷	p< ۰/۰۰۰۱
	زن	۲/۲ ± ۲/۰	۲/۵ ± ۱/۰	۲/۶ ± ۱/۲	۱/۹ ± ۰/۶	۲/۶ ± ۱/۲	۲/۲ ± ۰/۰	–	۵/۴ ± ۲/۶	
α/β ratio	بالغین	۰/۲۹ ± ۰/۲	۰/۵۹ ± ۰/۲۲	۰/۸۵ ± ۰/۲۴	۱/۰۶ ± ۰/۳۰	۱/۸۰ ± ۰/۸۴	۱/۳۹ ± ۰/۳۲	۲/۰۹ ± ۰/۶۰	۲/۱۵ ± ۰/۸۰	p< ۰/۰۰۰۰۰۱
No. of cases	مرد	۴	۱۸	۴۲	۲۴	۷	۱	۵	۱۴	
	زن	۲	۲۶	۲۶	۲۷	۷	۱	۰	۱۰	

بیماری، از شمال و جنوب کشور بوده‌اند که این خود می‌تواند موید شیوع بیشتر موتاسیون‌ها یا حذف‌های ایجاد کننده انواع مختلف تالاسمی در دو منطقه بالا باشد.

نتایج میانگین متغیرهای آلفا به بتا، WBC، RBC ، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV ، MCH ، MCHC ، پلاکت، درصد Hb A ، درصد $Hb\ A_2$ ، درصد Hb F ، آهن، TIBC ، فریتین بیماران و گروه کنترل مورد مطالعه آماری قرار گرفت. در مجموع با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه کروسکال والیس معلوم گردید که میانگین کمی فاکتورهای مورد نظر بر حسب جنس و ادغام شده در تعدادی از گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل در نوسان بوده است.



شکل ۲: مقایسه میانگین نسبت α/β بین گروه‌های مختلف

شکل ۲ مقایسه میانگین نسبت آلفا به بتا در گروه‌های مختلف مورد مطالعه و جدول ۱ مقادیر عددی متغیرهای مورد مطالعه را نشان می‌دهد. مقدار قابل قبول تکرارپذیری داخل آزمایشگاهی جهت آزمایش سنتز زنجیره‌ها کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد که در این مطالعه این پارامتر ۰/۰۴ محاسبه گردید(۱۴).

از طرفی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ۵۵/۲٪ جمعیت مورد مطالعه انواع مختلف آلفا تالاسمی، ۲۱٪ موارد انواع مختلف بتا تالاسمی و ۲۳/۸٪ موارد سالم و جزو گروه کنترل بوده‌اند. از ۵۵/۲٪ جمعیت آلفا تالاسمی در مطالعه فوق، ۳۱/۸٪ آلفا تالاسمی ملایم، ۲۰/۶٪ آلفا تالاسمی شدید و ۲/۸٪ بیماری هموگلوبین H داشته‌اند. در بین جمعیت بتا تالاسمی، ۰/۹٪ آلفا دلتا بتا تالاسمی، ۲/۳٪ دلتا بتا تالاسمی، ۶/۶٪ بتا تالاسمی نهفته(تیپ II) و ۱۱/۲٪ بتا تالاسمی مینور داشته‌اند.

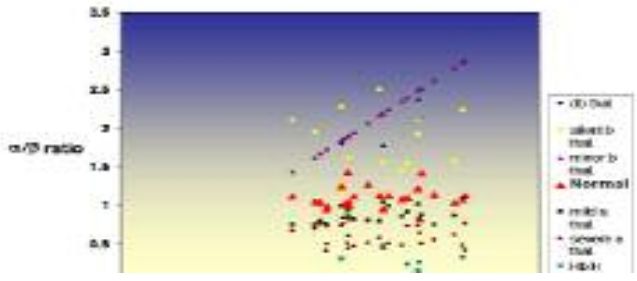
در مطالعه نوع ژنوتیپ عامل ایجاد بیماری، مشخص گردید که در بین جمعیت آلفا تالاسمی ملایم ۱۶/۸٪ موارد ژنوتیپ آلفا آلفا/$^{3/7}$ آلفا، ۳/۳٪ ژنوتیپ آلفاآلفا/$^{4/2}$ آلفا، ۳/۳٪ ژنوتیپ آلفاآلفا/$^{(-5nt)}$آلفاآلفا، ۱/۹٪ ژنوتیپ

Archive of SID
www.SID.ir

آلفاآلفا/$^{(PA)}$آلفاآلفا، ۰/۹٪ ژنوتیپ آلفاآلفا/$^{(+14)}$آلفاآلفا، ۰/۹٪ ژنوتیپ آلفاآلفا/$^{(cd19)}$آلفاآلفا، ۰/۵٪ ژنوتیپ آلفاآلفا/$^{(-22)}$آلفاآلفا، ۰/۵٪ ژنوتیپ آلفاآلفا/$^{(CS)}$آلفاآلفا، ۰/۵٪ ژنوتیپ آلفاآلفا/$^{(cd\ 103)}$آلفاآلفا و ۰/۵٪ ژنوتیپ آلفاآلفا/$^{(cd\ 59)}$آلفاآلفا داشته‌اند. برای ۲/۸٪ از این جمعیت، موتاسیون عامل ایجاد بیماری ناشناخته باقی ماند.

از طرفی در بین جمعیت آلفا تالاسمی شدید ۸/۹٪ ژنوتیپ $^{3/7}$آلفا/$^{3/7}$آلفا، ۲/۸٪ ژنوتیپ آلفاآلفا/$^{(med)}$__ ، ۱/۹٪ ژنوتیپ $^{4/2}$آلفا/$^{3/7}$آلفا، ۰/۹٪ ژنوتیپ آلفاآلفا/$^{(20/5)}$آلفا، ۰/۵٪ ژنوتیپ $^{(+14)}$آلفاآلفا/$^{(nt\ -5)}$آلفاآلفا، ۰/۵٪ ژنوتیپ$^{(PA)}$آلفاآلفا/$^{(PA)}$آلفاآلفا را داشته‌اند. ژنوتیپ عامل ایجاد بیماری جهت ۵/۱٪ این گروه نیز مشخص نگردید.

این نتایج حاکی از آن است که در بین جمعیت مشکوک به تالاسمی، آلفا تالاسمی شیوع بیشتری نسبت به انواع مختلف بتا تالاسمی دارد. در ضمن در بین جمعیت آلفا تالاسمی مورد مطالعه، حذف ۳/۷ کیلو باز، شایع‌ترین عامل ایجاد آلفا تالاسمی بوده است. این یافته‌ها منطبق با نتایج به دست آمده از سایر مطالعات می‌باشد که اولاً بیماری آلفا تالاسمی را شایع‌ترین بیماری تک ژنی در جهان ذکر کرده و از طرفی حذف ۳/۷ کیلو باز را شایع‌ترین عامل ایجاد آلفا تالاسمی در ایران و جهان معرفی نموده است(۱۵). علی‌رغم توانمندی روش سنتز زنجیره‌های گلوبین در تشخیص بعضی از شکل‌های تالاسمی، هم‌پوشانی محدوده‌های نسبت آلفا به بتا در گروه‌های مختلف و مجاور، مانع از آن می‌شود که عدد به دست آمده برای نسبت آلفا به بتا به تنهایی سبب تشخیص قطعی گردد(شکل ۳).



شکل ۳: توزیع نسبت α/β در گروه های مختلف

بحث

سندرم‌های تالاسمی گروه هتروژنی از آنمی‌های ارثی هستند که با اختلال در سنتز یک یا چند زنجیره گلوبینی در تترامر هموگلوبین همراه می‌باشند. در واقع مشخصه سندرم‌های تالاسمی تغییرات کمی در تولید زنجیره های گلوبین است. انواع خفیف سندرم‌های تالاسمی از شایع‌ترین نقایص ژنتیکی می‌باشند و انواع شدید این بیماری سبب مرگ و میر قابل توجه می‌شوند. این اختلالات از حذف کامل یا جا به جایی در ژن‌ها تا موتاسیون نقطه‌ای که سبب اختلال در ترجمه mRNA گلوبین می‌شوند، متغیر می‌باشند.

نتایج به دست آمده از این مطالعه حاکی از آن بوده است که:

۱- در همه گروه‌های تالاسمی افزایش میانگین گلبول‌های قرمز، کاهش میانگین هموگلوبین، کاهش میانگین هماتوکریت، کاهش میانگین MCV ،کاهش میانگین MCH و کاهش میانگین MCHC نسبت به متغیرهای مشابه در گروه کنترل وجود داشته است. این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار بوده است($p< ۰/۰۰۱$).

۲- میانگین نسبت آلفا به بتا در بیماران آلفا تالاسمی نسبت به گروه کنترل کاهش و برعکس، در بیماران بتا تالاسمی نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. این تغییرات نیز از نظر آماری معنی‌دار بوده است($p< ۰/۰۰۱$). نتایج به دست آمده برای نسبت آلفا به بتا در این مطالعه منطبق با نتایج ارایه شده در مقالات و کتاب‌های معتبر می‌باشد، با این تفاوت که انحراف معیار بزرگ‌تر و در نتیجه محدوده بازتر شده است(۱۶، ۱۴). نتایج به دست آمده در زمینه هم‌پوشانی محدوده‌ها، با نتایج به دست آمده از مطالعه جیوردانو و همکارانش نیز هم‌خوانی دارد(۱۷). در این مقاله به این مساله اشاره شده است که این هم پوشانی می‌تواند مربوط به تغییرات بیولوژیک و یا متدولوژیک باشد. هم چنین در این مقاله به این نکته اشاره شده است که ارایه مرزهای معین و کاملاً مشخص که در بعضی از رفرانس‌ها اعلام شده است، واقعی نمی‌باشند.

۳- میانگین تعداد گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها در گروه‌های تالاسمی تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشته

Archive of SID
www.SID.ir

است.

۴- در جمعیت مشکوک به تالاسمی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته‌اند، شیوع آلفا تالاسمی بیشتر از فرم‌های آتیپیک بتا تالاسمی بوده است(جمعاً ۵۵/۲٪ موارد مختلف آلفا تالاسمی در مقابل ۹/۸٪ موارد مختلف بتا تالاسمی آتیپیک). البته با وجود این شیوع نسبتاً پایین، پزشکان متخصص خون و ژنتیک باید نسبت به تشخیص این عده حساس باشند زیرا وجود این دسته از افراد می‌تواند خطر بالقوه برای تولد کودک مبتلا به بتا تالاسمی ماژور یا اینترمدیا باشد.

نتیجه‌گیری

در نمودار تشخیصی حاملین ژن بیماری تالاسمی، ابتدا افراد مشکوک به تالاسمی به آزمایشگاه‌های ژنتیک ارجاع داده می‌شوند. در صورت عدم دست‌یابی به موتاسیون‌های شایع آلفا تالاسمی، این افراد جهت آزمایش سنتز زنجیره‌های گلوبین معرفی می‌گردند.

این آزمایش می‌تواند در موارد پیچیده که موتاسیون‌های ناشناخته و یا حذف‌های بزرگ عامل ایجاد بیماری تالاسمی است و یا در مواردی که توارث هم زمان دو نوع تالاسمی وجود دارد، به امر تشخیص کمک نماید(۱۳). هم چنین انجام این آزمایش در افتراق بین بتا تالاسمی نهفته و آلفا تالاسمی ارزشمند می‌باشد(۱۶). در واقع با در کنار هم گذاشتن نتایج آزمایش‌های CBC و الکتروفورز هموگلوبین و سنتز زنجیره‌های گلوبین و هم چنین مطالعه نتایج آزمایش‌های پدر و مادر بیمار و در صورت لزوم تحلیل DNA ، وضعیت نهایی بیمار مشخص می‌گردد(۱۳).

با توجه به نتایج به دست آمده، می‌توان اذعان داشت که آزمایش سنتز زنجیره‌ها یکی از آزمایش‌های کمک کننده در جهت تشخیص بیماران مشکوک به تالاسمی می‌باشد. به طوری که با کمک این آزمایش بعضی از موتاسیون‌های کمیاب در ایران شناسایی گردیده است(۱۸).

تشکر و قدردانی

نویسندگان بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مرکز مدیریت و پیشگیری از بیماری‌ها که در واقع مجری برنامه کشوری پیشگیری از تولد نوزادان مبتلا به بتا تالاسمی ماژور می‌باشد اعلام می‌دارند. لازم به ذکر است که افراد ارجاع شده، توسط آن مرکز، به انستیتو پاستور ایران جهت انجام آزمایش سنتز زنجیره‌های گلوبین در قالب برنامه فوق معرفی گردیده‌اند.

هم چنین نویسندگان از همکاری صمیمانه خانم‌ها زهرا خاتمی محقق بیمارستان کینگ جورج لندن، دکتر بهناز زربخش، دکتر ملیح‌السادات محمدی، الهام شفیعیه و زهرا مقدم کائینی در بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران، مرضیه غلام تمیمی و فاطمه میرخانی در بخش بیوشیمی انستیتو پاستور ایران و سایه جلیل نژاد در مرکز ژنتیک دکتر کریمی نژاد ـ دکتر نجم‌آبادی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

References:

۱۲- دکتر ده‌بزرگیان جواد، دکتر کلوبندی اعظم، دکتر شرفی فریدون. تعیین نسبت زنجیره α به β در افراد بتا تالاسمی با هموگلوبین A2 و F نرمال به روش سنتز زنجیره‌های گلوبین. پایان‌نامه. ۱۳۷۷- ۱۳۷۶.

1- Clarke WM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. Clinical Chemistry 2000;46:1284-90.

2- Yaish Hassan M. Thalassemia 2005. http://www.emedicine.com/ped/topic2229.htm .

3- Old JM. Screening and genetic diagnosis of hemoglobin disorders. Blood 2003;17:43-53.

4- Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes. 4th ed. London: Blackwell Scientific Publications, Oxford;2001.

5- Antonio C, Renzo G, Cristina RM. Prenatal diagnosis and screening of the haemoglobinopathies. The Electronic Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 1999;3.

6- British Society for Heamatology. The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies. British Journal of Haematology 1998:101;783-92.

7- Dacie JV, Levis SM. Practical Hematology. 6th ed. London: Churchill Livingstone;1984.

8- Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes. 3rd ed. London: Blackwell Scientific Publications, Oxford;1981.

9- Rahbar S, Asmerom Y. Rapid HPLC techniques for globin chain synthesis studies. Hemoglobin 1989;13 (5): 475-87.

10- Mirzazadeh R, Khatami Sh, Bayat P, Zamani Z, Sadeghi S, Roohi S, *et al*. Removing peroxide impurities from ether improves the quality of globin chains for biosynthetic studies. Hemoglobin 2005; 29(2):161-4.

11- Beutler E, West D, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88(2):328-33.

13- Khatami Sh, Rouhi Dehboneh S, Sadeghi S, Mirzazadeh R, Saeedi P, Bayat P, *et al*. Globin chain synthesis is a useful complementary tool in the differential diagnosis of thalassemias. Hemoglobin 2007;31(3):1-9.

14- Clegg JB. Hemoglobin synthesis. In: Chanarin I, editor. Laboratory Hematology (an account of laboratory techniques). Edinburg:Churchill Livingston; 1989;44-48.

15- Garshasbi M , Oberkanins C, Law HY, Neishabury M, Kariminejad R, Najmabadi H. α globin gene deletion and point mutation analysis among Iranian patients with microcytic hypochromic anemia. Hematologica 2003;88:1196-7.

16- Villegas A, Porres A, Sanchez J, Gonzalez F, Perez-Clausell C, *et al*. Red blood cell phenotypes in α thalassemias in the Spanish population. Hematologica 1998;83:99-103

17- Giordano PC, Van delft P, Batelaan D, Harteveld CL, Bernini LF. Haemoglobinopathy analysis in the Netherlands: a report of an in vitro globin chain biosynthesis survey using a rapid, modified method. Clinical Laboratory Haematology 1999;21:247-55.

18- Moghimi B, Yavariyan M, Oberkanins Ch, Hosseini Amini SS, Khatami Sh, Rouhi S, *et al*. Hb Dhonburi (Neapolis) [B 126(H4) Val---Gly] Identified in a family from Northern Iran. Hemoglobin 2004; 28(4):353-6.

Archive of SID

www.SID.ir

Globin chain synthesis for differential diagnosis of β thalassemia from α thalassemia carriers

Khatami Sh.[1](PhD), Rouhi Dehboneh S.[1](DMT), Sadeghi S.[1](DMT), Saeidi P.[1](BS), Mirzazadeh R.[1](MS), Bayat P.[1](BS), Amirkhani A.[1](PhD), Samavat A.[2](MD), Zeinali S.[1](PhD), Akbari M.T.[3](PhD), Najmabadi H.[4,5](PhD)

[1]*Pasteur Institute of Iran*
[2]*Head of Genetics office, Center of Management and Prevention of Diseases*
[3]*Tarbiat Modarres University of Medical Sciences*
[4] *University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Genetic Research Center*
[5]*Genetic Laboratory of Kariminejad/Najmabadi*

Abstract

Background and Objectives

Globin chain synthesis and DNA analysis are among complementary tests for thalassemia diagnosis. Nowadays, DNA analysis is the only definitive method for diagnosis of suspected carriers. Despite the complexity of this heterogenic disease which is attributed to mutations in gene regulation sites or unknown mutations, globin chain synthesis has maintained its significant role in identifying different kinds of thalassemia. As a result, besides the routine application of this method , we decided to determine the ranges of α/β ratio values in different kinds of thalassemia.

Materials and Methods

In this experimental study 214 cases were divided into the control (51 cases), minor β thalassemia (24 cases), mild α (α thal. 2) thalassemia (68 cases), severe α (α thal. 1) thalassemia (44 cases), Hemoglobin H disease (6 cases), silent β (type II) thalassemia (14 cases), δβ thalassemia (5 cases), and αδβ thalassemia (2 cases) groups. CBC, hemoglobin electrophoresis using acetate cellulose paper in alkaline pH, hemoglobin A2 measurement by column chromatography, reticulocytes percentage, hemoglobin H, RBC morphology, and globin chain synthesis were performed on each group.

Results

Significant differences were observed in mean values of RBC, hemoglobin, hematocrite, MCV, MCH, MCHC, α/β ratio in α and β thalassemia cases as compared with the control group. High prevalence of α thalassemia was observed among suspected individuals (55.2% of different kinds of α thalassemia vs. 9.8% of different kinds of atypic β thalassemia) as compared with atypic β thalassemia.

Conclusions

The mean value of α/β ratio achieved in this study was similar to the others, but with a greater standard deviation. Because of this, there exists a wider range of α/β ratio. This width of range made overlaps in different and adjacent groups. Therefore, α/β ratio cannot be used by itself to firmly diagnose the type of thalassemia. As a result, for accurate diagnosis to be made, besides considering patient's ethnicity and clinical features, it is necessary to assess the results of CBC, hemoglobin electrophoresis pattern analysis, globin chain synthesis, familial tests, and DNA analysis.

Key words: β Thalassemia, α thalassemia, Globin
SJIBTO 2008; 4(4): 239-246
Received: 2 July 2007
Accepted: 22 Dec 2007

Correspondence: Khatami Sh., PhD of Biochemistry. Pasteur Institute of Iran. Pasteur St, No. 69. Postal code:13164,Tehran, Iran. Tel: (+9821)66402770; Fax : (+9821)66402770
E-mail: *sh-khatami@pasteur.ac.ir*

Archive of SID
www.SID.ir