

خون

فصلنامه علمی پژوهشی
دوره ۱۱ شماره ۳ پاییز ۹۳ (۲۵۶-۲۵۲)

گزارش یک مورد بیمار Hb-Hamadan در استان هرمزگان

هانیه سلیمانی^۱، کیانوش ملکزاده^۱، محمد شکاری^۲، فریده پران^۲، مریم بزمجو^۲، الهام نامجو^۲، معصومه جعفری^۷

چکیده

سابقه و هدف

بنا تالاسمی شایع ترین اختلال تک ژنی اتوزومال مغلوب در سرتاسر جهان است. با شناخت افراد ناقل و با آزمایش‌های پرهاستال، می‌توان از تولد بیمار جدید پیشگیری نمود.

مورد

زوج جوانی ساکن بندرعباس همراه پسرشان با آزمایش‌های هماتولوژی که نشانگر تالاسمی مینور بود و به هموگلوبین ناشناخته‌ای برای پدر اشاره داشت به آزمایشگاه ژنتیک مراجعه نمودند. بر اساس بررسی‌های ژنتیکی، هموگلوبین ناشناخته در اثر جهش نادر CD56(GGC>CGC) بود که منجر به تولید Hb-Hamdan می‌گردید.

نتیجه گیری

با توجه به مورد بررسی شده و نیز محدود گزارش‌هایی که از این هموگلوبین در سرتاسر جهان وجود دارد، به نظر نمی‌رسد که یک هموگلوبین پاتولوژیک باشد. این امر در تصمیم‌گیری درخصوص غربالگری پیش از تولد در برنامه پیشگیری از بروز موارد جدید تالاسمی حائز اهمیت است.

کلمات کلیدی: بنا تالاسمی، هموگلوبین، تشخیص قبل از تولد

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۲۰

۱- کارشناس ارشد فیزیولوژی مولکولی - آزمایشگاه ژنتیک و تشخیص پیش از تولد دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان - بندرعباس - ایران
۲- مؤلف مسؤول: دکترای بیوتکنولوژی پزشکی - استادیار مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان - بندرعباس - ایران - صندوق پستی: ۷۹۱۹۷-۸۶۸۴۸

۳- دکترای ژنتیک مولکولی انسانی - استادیار مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان - بندرعباس - ایران
۴- کارشناس علوم آزمایشگاهی - آزمایشگاه ژنتیک و تشخیص پیش از تولد دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان - بندرعباس - ایران
۵- کارشناس بیولوژی سلولی مولکولی - آزمایشگاه ژنتیک و تشخیص پیش از تولد دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان - بندرعباس - ایران
۶- کارشناس ژنتیک - آزمایشگاه ژنتیک و تشخیص پیش از تولد دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان - بندرعباس - ایران
۷- دیپلم - آزمایشگاه ژنتیک و تشخیص پیش از تولد دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان - بندرعباس - ایران

مادر خانم متولد شیراز و پدر ایشان نیز، متولد رشت بودند. بررسی های هماتولوژیک در جدول ۱ و الکتروفوروز هموگلوبین کودک و والدین در جدول ۲ آمده است. در این مطالعه سعی در یافتن جهشی در زنجیره بتای این خانواده بودیم که باعث ایجاد کم خونی در فرزندشان گردیده بود.

جدول ۱: اطلاعات هماتولوژیک کودک و والدین

کودک	پدر	مادر	
۱۰/۷	۱۱/۳	۸	گلبول سفید (WBC) $10^3/\mu\text{L}$
۵/۵۳	۵/۴۵	۵/۵۷	گلبول قرمز (RBC) $10^6/\mu\text{L}$
۱۱	۱۵/۸	۱۱/۵	هموگلوبین (Hb) gr/dL
۶۴	۷۹/۴	۶۶/۸	حجم متوسط گوچه (MCV) fL
۱۹/۹	۲۹	۲۰/۶	حجم متوسط هموگلوبین (MCH) pg
۳۱/۱	۳۶/۵	۳۰/۹	متوجه غلظت هموگلوبین هر گلبول (MCHC) g/dL
۵۳۵	۲۲۸	۳۲۰	پلاکت (PLt) $10^3/\mu\text{L}$

جدول ۲: اطلاعات الکتروفوروز کودک و والدین در زمان مراجعته به آزمایشگاه

کودک	پدر	مادر	
۸۲/۷	۵۰/۵	۹۳/۸	درصد هموگلوبین A
۵/۱	۲/۸	۵/۸	درصد هموگلوبین A2
۱۲/۲	-	۰/۴	درصد هموگلوبین F
-	۴۶/۷	-	Hb unknown

بعد از استخراج DNA توسط روش Salting-out، ابتدا آزمایش هایی برای جهش های شایع بتا تالاسمی برای پدر و مادر با روش ARMS-PCR (آغازگرهای ۳ الی ۷ در جدول ۳) و توالی یابی (sequencing) انجام شد (آغازگرهای ۱ الی ۳ در جدول ۳) و مشخص گردید که مادر و کودک هر دو حامل جهش IVSII-I(G:C) به صورت هتروزیگوت می باشند^(۴) (شکل ۱). با فرض امکان گزارش اشتباه CBC (که از اشتباهات رایج است)

مقدمه
بنا تالاسمی، شایع ترین اختلال تک ژنی اتوزومال مغلوب در سرتاسر جهان محسوب می شود و ناشی از موتاسیون در ژن بتاگلوبین می باشد. بنا تالاسمی در سطح مولکولی بسیار هتروژن است به طوری که تاکنون بیش از ۲۰۰ جهش از آن شناسایی شده است^(۱). پراکندگی آلل های بنا تالاسمی در جهان تصادفی نیست و هر جمعیت و قومی، آلل ها و پراکندگی جهش های ویژه خود را دارند که تعداد کمی از جهش های شایع با درصد زیاد و تعداد زیادی جهش نادر با درصد کمتری از کل جهش های هر جمعیت را شامل می شوند^(۲). ایران با داشتن حدود ۲۵۰۰ بیمار تالاسمی و سه میلیون ناقل از جمله مناطقی است که بنا تالاسمی به طور غیر معمول در آن شایع است. فراوانی جهش در ژن بنا تالاسمی در مناطق مختلف ایران متفاوت گزارش شده است به طوری که در استان های مجاور خلیج فارس و دریای مازندران، فراوانی آن از ۱۰٪ نیز بیشتر است^(۳).

مورد

زوج جوانی به هماتولوژیست مراجعه نموده، با انجام آزمایش های قبل از ازدواج، متوجه شدن که خانم مشکوک به تالاسمی مینور است اما گزارش شد که آقا سالم بوده و این زوج برای ازدواج و بچه دار شدن از نظر خونی هیچ مشکلی نخواهد داشت. پس از این که این زوج صاحب فرزندی شدند، به طور کاملاً اتفاقی متوجه شدند که آزمایش های پسر ۳ ساله آن ها نرمال نیست از این رو بررسی های هماتولوژیک و آزمایش الکتروفوروز برای پدر و مادر ضروری دانسته شد و نتایج آن نشان دهنده کم خونی و تالاسمی مینور بود که مشاوره با هماتولوژیست، بررسی های ژنتیکی را برای این خانواده ضروری دانست. کودک که فرزند اول بود، به همراه پدر و مادر خود به آزمایشگاه ژنتیک و تشخیص پیش از تولد بندرعباس ارجاع گردید. در شرح حال کودک، فرزند اول یک مادر ۳۰ ساله و پدر ۳۴ ساله است، در کودک هیچ گونه علایم بالینی و کم خونی شدید مشاهده نشد، مادر؛ ۳۰ ساله، متولد اصفهان و پدر؛ ۳۴ ساله، متولد تهران بود و نسبت آنها دختر دایی و پسر عمه بود. والدین پدر متولد رشت،

ولیکن جواب منفی مشاهده گردید که دال بر عدم وجود حذف یا اضافه بود. هم زمان نتیجه توالی یابی ژن بتاگلوبین CD56 پدر و کودک نیز آنالیز گردید، وجود جهش GGC>CGC) که سبب ایجاد نوعی هموگلوبین کمیاب معروف به Hb-Hamadan، فقط در پدر شناسایی گردید(جدول ۴). گزارش‌های فوق حاکی از آن است که این نوع جهش نادر دارای هیچ گونه علایم بالینی از قبیل فقر آهن نبوده و تا قبل از مراجعته بیمار به آزمایشگاه ژنتیک و انجام آزمایش‌های مربوط به حذف در خوشة ژنی بتا، این جهش ناشناخته باقی می‌ماند.

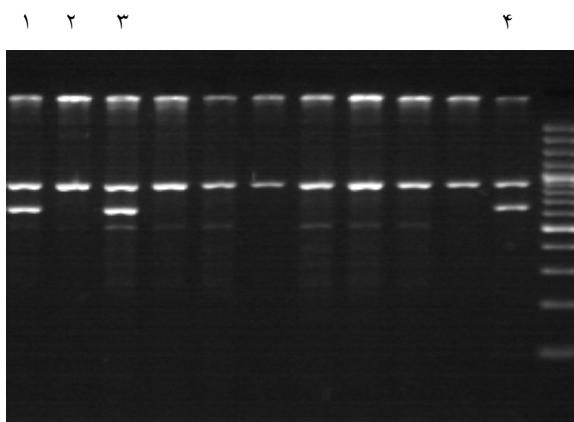
بحث

با توجه به شیوع بیماری تالاسمی در کشور، برنامه کشوری پیشگیری از بروز موارد جدید تالاسمی از طریق غربالگری در حال انجام است. در این برنامه زوجین با اندازه‌های خونی غیر متعارف MCV<80fl; MCH<27 (MCV<80fl; MCH<27) HbA2>3.4 (۳) که مشکوک به تالاسمی مینور باشند مورد مشاوره ژنتیک قرار می‌گیرند. راه عملی جهت کترول بیماری تالاسمی و جلوگیری از افزایش تعداد موارد آن در جمعیت کشور، شناسایی جهش‌ها و افراد ناقل، مشاوره ژنتیکی و ارایه خدمات تشخیص پیش از تولد به آن‌ها می‌باشد(۵-۷). در آزمایش Hb الکتروفوروز نمونه مورد مطالعه ما، درصد هموگلوبین A از حالت طبیعی بسیار پایین‌تر بوده و هم چنین به میزان بالایی، Hb unknown گزارش شده بود که بررسی‌های ژنتیکی صورت گرفته وجود نوعی موتاسیون نادر به نام Hb Hamadan را در این شخص به اثبات رساند. هموگلوبین همدان که تا به حال تعداد بسیار محدودی در دنیا گزارش شده است، نخستین بار در سال ۱۹۷۵ در خانواده‌ای ایرانی گزارش شد(۸). علاوه بر آن در فرانسوی‌های نژاد قفقاز و در چندین خانواده ژاپنی نیز گزارش شده است(۸-۱۰). به نظر می‌رسد این جهش در فهرست هموگلوبینوپاتی‌هایی قرار می‌گیرد که HPLC و مقدار HbA1 را تحت تاثیر خود قرار می‌دهد. همه گزارش‌ها از افراد هتروزیگوت بوده است. تنها یک نمونه از فرم هموزیگوت هموگلوبین همدان در ترکیه یافت شده است که طبق مطالعه‌های انجام شده

جدول ۳: آغازگرهای استفاده شده در PCR

۵' → ۳'	آغازگرهای توالی آغازگرها	
	توالی	آغازگرها
AACTCCTAACGCCAGTGCAGAAGA	Seq-F	۱
CACTGACCTCCACATTCCCTTT	Seq-R	۲
ARMS توالی برای		
GAGTCAAGGCTGAGAGATGCAGGA	ARMS IC-F	۳
CAATGTATCATGCCTTTGCACC	ARMS IC-R	۴
ACCTCACCTGTGGAGCCAC	ARMS-General	۵
AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAT	ARMS-M	۶
AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAC	ARMS-N	۷

IC: Internal Control; F: forward R: reverse; Seq: Sequencing M:mutation N:Normal ComD: Common -D which is used as internal primer for sequencing



شکل ۱: محصول آزمایش PCR روی ژل ۱/۵٪ آگاروز. باند ۱ نمونه مادر، باند ۲ نمونه پدر، باند ۳ کودک، باند ۴ کترول مثبت

جدول ۴: نتیجه آنالیز ژن بتاگلوبین

آنالیز ژنتیکی	باند	مادر	پدر	کودک
آنالیز مستقیم ^۱	-	IVSII-1 (G:C)	IVSII-1 (G:C)	IVSII-1 (G:C)
توالی یابی ^۲	-	CD56 (GGC>CGC)	IVSII-1 (G:C)	IVSII-1 (G:C)

Sequencing-۲ ، Direct analysis by ARMS-PCR ۱

و نیز به علت بالا بودن HbF کودک حذف‌های متداول برای تالاسمی $\delta\beta 0$ ، لپور، HPFH حذفی توسط multiplex GAP-PCR و نیز انجام MLPA در کل خوشه ژنی بنا گلوبین (کیت MRC، هلند) برای کودک نیز انجام گرفت

باشد و تغییراتی چون هموگلوبین HbD را در CBC و Hb-electrophoresis موجب می‌گردد. این امر در تصمیم‌گیری درخصوص غربالگری پیش از تولد در برنامه پیشگیری از بروز موارد جدید تالاسمی حائز اهمیت است.

از سوی دیگر همکاران پژوهش کردند که تعیین نوع Hb-unknown برای تصمیم‌گیری نهایی درخصوص انجام تشخیص پیش از تولد الزامی است. البته بایستی در نظر گرفت بعضی از انواع هموگلوبین‌ها و یا جهش‌ها توسط روش‌ها و امکانات آزمایشگاهی قابل افتراق نبوده و در اندکس‌های خونی نیز آنچنان تاثیر نمی‌گذارند ولی ممکن است در ترکیب با جهش‌های دیگر، کم خونی‌هایی از ملایم تا ایترمیدیا را موجب گردد. لذا توصیه می‌گردد که بررسی زنجیره بنا شخصی که زوج ایشان مینور باشد و تعیین نوع هموگلوبین و میزان پاتولوژیک آن در برنامه غربالگری الزامی بوده و نمی‌توان فقط به اندکس‌های خونی گزارش شده در CBC و Hb-electrophoresis اکتفا نمود.

توسط آکار و همکاران، اولین گزارش از حالت هتروزیگوت این جهش نادر در ترکیه متعلق به مردی بود که هیچ گونه علایم بالینی نداشت. نکته قابل ملاحظه این است که پدر ایشان ترکیبی از جهش‌های Hb Hamadan و G>A 29- را داشت که فقط منجر به نوعی کم خونی ضعیف شده بود، به علاوه در این مطالعه ذکر گردیده است که نه حالت هموزیگوت این جهش و نه با ترکیب با موتاسیون‌های خوش‌ژنی بنا دارای هیچ گونه علایم بالینی از قبیل کم خونی نبوده که این نکته به خصوص در تشخیص پیش از تولد حائز اهمیت است(۱۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به برنامه پیشگیری از بروز موارد جدید تالاسمی از طریق غربالگری پیش از تولد، معرفی مورد فوق بر لزوم گرفتن نمونه CVS در مشاوره ژنتیک حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به مورد بررسی شده فوق و نیز معدد گزارشاتی که از این هموگلوبین در سرتاسر جهان وجود دارد، به نظر نمی‌رسد که یک هموگلوبین پاتولوژیک

References:

- Olivieri NF. The beta-thalassemia. N Engl J Med 1999; 331(2): 99- 109.
- Kazazian HH Jr, Boehm CD. Molecular basis and prenatal diagnosis of beta-thalassemia. Blood 1988; 72 (4): 1107-16.
- Najmabadi H, Teimourian Sh, Khatibi T, Neishabury M, Pourfarzad F, Jalil-Nejad S, et al. Amplification Refractory Mutation System(ARMS) and Reverse Hybridization in the detection of thalassemia in mutation. Arch Iran Med 2001; 4(4): 165-70.
- Gaaib JN, Nassief AF, Al-Assi AH. Simple salting-out method for genomic DNA extraction from whole Blood. Tikrit Journal of Pure Science 2011; 16(2): 9- 11.
- Najmabadi H, Karimi-Nejad R, Sahebjam S, Pourfarzad F, Teimourian S, Sahebjam F, et al. The beta-thalassemia mutation spectrum in the Iranian population. Hemoglobin 2001; 25(3): 285-96.
- Kumar Das S, Talukder G. Beta globin gene and related disease: A review. Int J Hum Genet 2002; 2(1): 139-52.
- Kiani AA, Mortazavi Y, Zeinali S, Shirkhani Y. The molecular analysis of beta-thalassemia mutation in Lorestan Province, Iran. Hemoglobin 2007; 31(3): 343- 9.
- Rahbar S, Nowzari G, Haydari H, Daneshmand P: Haemoglobin hamadan: alpha-2A beta-2 56(D7) glycine yields arginine. Biochim Biophys Acta 1975; 379(2): 645-8.
- Dinçol G, Aksoy M, Dinçol K, Kutlar A, Wilson JB, Huisman TH.. Hemoglobin Hamadan or alpha 2 beta-2 56(D7)Gly-Arg in a Turkish family. Hemoglobin 1984; 8(4): 423-5.
- Harano T, Harano K, Ueda S. Hemoglobin Hamadan [beta 56(D 7) glycine---arginine] found in a Japanese male. Hemoglobin 1986; 10(1): 91-2.
- Akar E, Ozdemir S, Hakki Timur I, Akar N. First observation of homozygous hemoglobin hamadan (B 56 (D7) GLY-ARG) and beta thalassemia (-29 G>A)-hemoglobin Hamadan combination in a Turkish family. Am J Hematol 2003; 74(4): 280-2.

Case Report

A case report of Hemoglobin Hamadan in Hormozgan province

**Soleimani H.¹, Malekzadeh K.², Shekari M.², Paran F.¹, Baznjou M.¹,
Namjou E.¹, Jafari M.¹**

¹Laboratory of Genetics and Prenatal Diagnosis, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

²Molecular Medicine Research Center of Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

Abstract

Background and Objectives

β -thalassemia is the most common monogenic autosomal recessive all over the world. Therefore, identifying carriers and performing prenatal testing can prevent the birth of a new patient.

Case

The young couple resident in Bandar Abbas with their son were referred to the Genetic Laboratory with hematological parameters that indicated minor thalassemia and implicated a symptom of an unknown hemoglobin in the father. Based on the genetic study, the father carried a rare mutation in CD56 (GGC > CGC) leading to Hb-Hamadan.

Conclusions

In this study seems that Hb-Hamdan has no pathological effect and . This point is very important particularly in prenatal diagnosis (PND).

Key words: beta-Thalassemia, Hemoglobin, Prenatal Diagnosis

Received: 8 Dec 2013

Accepted: 11 Mar 2014

Correspondence: Malekzadeh K. PhD of Medical Biotechnology. Assistant Professor of Molecular Medicine Research Center, Hormozgan University of Medical Sciences.
P.O.Box: 79197-86848, Bandar Abbas, Iran. Tel: (+98761) 3354459; Fax: (+98761) 3354459
E-mail: keyanoosh@gmail.com