

گزارش یک مورد بیمار Hb-Hamadan در استان هرمزگان

هانیه سلیمانی^۱، کیانوش ملک‌زاده^۲، محمد شکاری^۳، فریده پیران^۴، مریم بزمجو^۵، الهام نامجو^۶، معصومه جعفری^۷

چکیده

سابقه و هدف

بتا تالاسمی شایع‌ترین اختلال تک ژنی اتوزومال مغلوب در سرتاسر جهان است. با شناخت افراد ناقل و با آزمایش‌های پره‌ناتال، 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 (GGC>CGC) CD56 بود که منجر به تولید Hb-Hamdan می‌گردید.

نتیجه‌گیری

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 در خصوص غربالگری پیش از تولد در برنامه پیشگیری از بروز موارد جدید تالاسمی حائز اهمیت است.

کلمات کلیدی: بتا 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 مسؤل: 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

مقدمه

مادر خانم متولد شیراز و پدرایشان نیز، متولد رشت بودند. بررسی‌های هماتولوژیک در جدول ۱ و الکتروفورز 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) / μL 10^3 |
| ۵/۵۳ | ۵/۴۵ | ۵/۵۷ | گلبول قرمز (RBC) / μL 10^6 |
| ۱۱ | ۱۵/۸ | ۱۱/۵ | هموگلوبین (Hb) gr/dL |
| ۶۴ | ۷۹/۴ | ۶۶/۸ | حجم متوسط گویچه (MCV) fL |
| ۱۹/۹ | ۲۹ | ۲۰/۶ | حجم متوسط هموگلوبین (MCH) pg |
| ۳۱/۱ | ۳۶/۵ | ۳۰/۹ | متوسط غلظت هموگلوبین هر گلبول (MCHC) g/dL |
| ۵۳۵ | ۲۲۸ | ۳۲۰ | پلاکت (PLt) / μL 10^3 |

جدول ۲: اطلاعات الکتروفورز کودک و والدین در زمان مراجعه 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 آزمایش‌هایی برای جهش‌های شایع بتا تالاسمی برای پدر و مادر با روش ARMS-PCR (آغازگرهای ۳ الی ۷ در جدول ۳) و توالی‌یابی (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 می‌باشند (۴) (شکل ۱). با فرض امکان گزارش اشتباه CBC Hb - electrophoresis & (که از اشتباهات رایج است)

بتا تالاسمی، شایع‌ترین اختلال تک ژنی اتوزومال مغلوب در سرتاسر جهان محسوب می‌شود و ناشی از موتاسیون در ژن بتاگلوبین می‌باشد. بتا تالاسمی در سطح مولکولی بسیار هتروژن است به طوری که تاکنون بیش از ۲۰۰ جهش از آن شناسایی شده است (۱). پراکندگی آل‌های بتا تالاسمی در جهان تصادفی نیست و هر جمعیت و قومی، آل‌ها و پراکندگی جهش‌های ویژه خود را دارند که تعداد کمی از جهش‌های شایع با درصد زیاد و تعداد زیادی جهش نادر با درصد کمتری از کل جهش‌های هر جمعیت را شامل می‌شوند (۲). ایران با داشتن حدود ۲۵۰۰۰ بیمار تالاسمی و سه میلیون ناقل از جمله مناطقی است که بتا تالاسمی به طور غیر معمول در آن شایع است. فراوانی جهش در ژن بتا تالاسمی در مناطق مختلف ایران متفاوت گزارش شده است به طوری که در استان‌های مجاور خلیج فارس و دریای مازندران، فراوانی آن از ۱۰٪ نیز بیشتر است (۳).

مورد

زوج جوانی به هماتولوژیست مراجعه نموده، با انجام آزمایش‌های قبل از ازدواج، متوجه شدند که خانم مشکوک به تالاسمی مینور است اما گزارش شد که آقا سالم بوده و این زوج برای ازدواج و بچه‌دار شدن از نظر خونی هیچ مشکلی نخواهند داشت. پس از این که این زوج صاحب فرزندی شدند، به طور کاملاً اتفاقی متوجه شدند که آزمایش‌های پسر ۳ ساله آن‌ها نرمال نیست از این رو بررسی‌های هماتولوژیک و آزمایش الکتروفورز برای پدر و مادر ضروری دانسته شد و نتایج آن نشان‌دهنده کم خونی و تالاسمی مینور بود که مشاوره با هماتولوژیست، بررسی‌های 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 هیچ‌گونه علائم 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 توالی‌یابی ژن بتاگلوبین پدر و کودک نیز آنالیز گردید، وجود جهش CD56 (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 علائم بالینی از قبیل فقر آهن نبوده و تا قبل از مراجعه بیمار به آزمایشگاه ژنتیک و انجام آزمایش‌های مربوط به حذف در خوشه ژنی بتا، این جهش ناشناخته باقی می‌ماند.

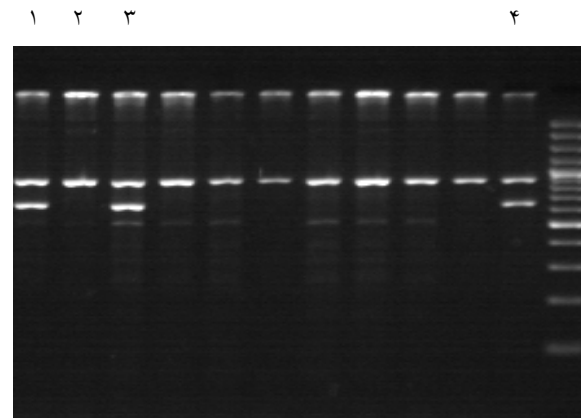
بحث

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 اندکس‌های خونی غیر متعارف (MCV<80fl; MCH<27) (HbA₂>3.4) که مشکوک به تالاسمی مینور باشند مورد مشاوره ژنتیک قرار می‌گیرند (۳). راه عملی جهت کنترل بیماری تالاسمی و جلوگیری از افزایش تعداد موارد آن در جمعیت کشور، شناسایی جهش‌ها و افراد ناقل، مشاوره ژنتیکی و ارائه خدمات تشخیص پیش از تولد به آن‌ها می‌باشد (۷-۵). در آزمایش Hb الکتروفورز 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 معدودی 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 (۱۰-۸). به نظر می‌رسد این جهش در فهرست هموگلوبینوپاتی‌هایی قرار می‌گیرد که HPLC و مقدار HbA₁ 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

| آغازگرها | | 5' → 3' |
|-------------------------------|--------------|---------|
| توالی آغازگرها | | |
| AACTCCTAAGCCAGTGCCAGAAGA | Seq-F | ۱ |
| CACTGACCTCCCACATCCCTTTT | Seq-R | ۲ |
| توالی برای ARMS | | |
| GAGTCAAGGCTGAGAGATGCAGGA | ARMS IC-F | ۳ |
| CAATGTATCATGCCTCTTTGCACC | ARMS IC-R | ۴ |
| ACCTCACCTGTGGAGCCAC | ARMS-General | ۵ |
| AAGAAAACATCAAGGGTCCATAGACTGAT | ARMS-M | ۶ |
| AAGAAAACATCAAGGGTCCATAGACTGAC | 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 کنترل مثبت

جدول ۴: نتیجه آنالیز ژن بتاگلوبین

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

۱- Direct analysis by ARMS-PCR، ۲- Sequencing

و نیز به علت بالا بودن HbF کودک حذف‌های متداول برای تالاسمی $\delta\beta 0$ ، لپور، HPLC حذفی توسط multiplex GAP-PCR و نیز انجام MLPA در کل خوشه ژنی بتا 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 پزشک توجه داشته باشند 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، کم‌خونی‌هایی از ملایم تا ایترومدیا را موجب گردد. لذا توصیه می‌گردد که بررسی زنجیره بتا 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 هیچ‌گونه علائم 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 کم‌خونی ضعیف شده بود، به علاوه در این مطالعه ذکر گردیده است که نه حالت هموزیگوت این جهش و نه با ترکیب با موتاسیون‌های خوشه ژنی بتا دارای هیچ‌گونه علائم بالینی از قبیل کم‌خونی نبوده که این نکته به خصوص در تشخیص پیش از تولد حایز 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 معدود گزارشات که از این هموگلوبین در سرتاسر جهان وجود دارد، به نظر نمی‌رسد که یک هموگلوبین پاتولوژیک

References:

- 1- Olivieri NF. The beta-thalassemia. N Engl J Med 1999; 341(2): 99- 109.
- 2- Kazazian HH Jr, Boehm CD. Molecular basis and prenatal diagnosis of beta-thalassemia. Blood 1988; 72 (4): 1107-16.
- 3- 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.
- 4- 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.
- 5- 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.
- 6- Kumar Das S, Talukder G. Beta globin gene and related disease: A review. Int J Hum Genet 2002; 2(1): 139-52.
- 7- 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.
- 8- 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.
- 9- 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.
- 10- 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.
- 11- 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, Bazmjou 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