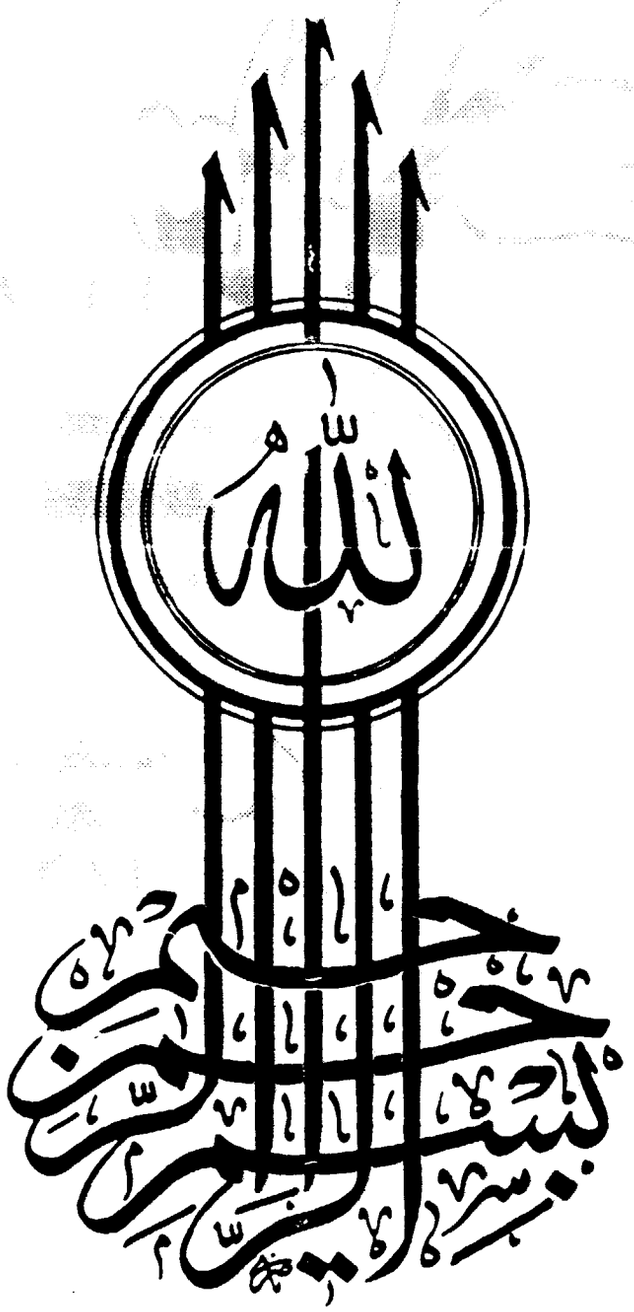

٣٢١٤١

مرکز اطلاعات علمی ایران
تقدیم به مرکز

۱۳۷۹/۹/۲۰

دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
دانشکده پزشکی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه دکترای تخصصی بیماریهای کودکان

موضوع

مقایسه اعتبار شاخص MCV در مقابل MCH در غربالگری بتاتالاسمی

استاد راهنما

دکتر سیّد محمّد تقی حسینی طباطبائی

نگارش

دکتر محمودرضا خزاعی

9045

زمستان ۷۷
شماره پایان‌نامه: ۸۱/ت

۳۲۱۴۱

تقدیر و تشکر

از الطـــاف و راهـــنمائی‌های اســـتاد ارجـــمند جناب آقای دکتر سیّد محمّد تـقی حسـینی طـباطبائی که به حق معلمی گرانقدر در عرصه علم و دانش بوده و بدون ارشاد و راهنمائی ایشان انجام این تـحقیق مـیسر نبود؛

و با تقدیر از جناب آقای دکتر محمود صانعی و جناب آقای دکتر صارم ماکـوئی کـه از مسـاعدت و هـمکاری بی‌شائبهٔ این عزیزان برخوردار بودم؛

و با امتنان فراوان از Prof. Bernadette Modell که مشوق اینجانب در انجام این تحقیق بـوده و از راهـنمائی‌های ایشان بهره‌مند بودم؛

و با تشکر فراوان از سرکار خانم شـهرکی‌پور و سـرکار خانم دکتر رخشانی که در انجام محاسبات آماری ایـن حقیر را مساعدت نمودند.

ROYAL FREE HOSPITAL SCHOOL OF MEDICINE
UNIVERSITY COLLEGE LONDON MEDICAL SCHOOL
THE UNIVERSITY OF LONDON

UCL MEDICAL SCHOOL

Department of Primary Care and Population Sciences
Archway Resource Centre, 2nd Floor Archway Wing
Whittington Hospital, Highgate Hill, London N19 5NF

Tel: +44 (0)171 288 3474
Fax: +44 (0)171 281 8004
Email: pcps@ucl.ac.uk
Tel: +44 (0)171 288 5733 (direct line)
+44 (0)171 288 3597 (PA)
email: b.modell@ucl.ac.uk

8 May, 1998

Mahmood Reza Khazaei M.D.
Ali-Asghar Pediatric Hospital
Azadi av.
Iran-Zahedan P.C. 98136

Dear Dr Mahmood Reza Khazaei

It was a great pleasure to receive your letter of 21 March. It took a very long time to reach me, but I suppose that is to be expected.

I remember with pleasure meeting you at the Thalassaemia Workshop in October last year, and I am delighted that you are doing research on this population. I think your study could be very valuable in several ways. The very first requirement for screening for thalassaemia is to establish a good base-line of adequate data on the usual range of haematological indices of males and females in the study population. Then you can describe the characteristics of patients found to carry thalassaemia against this background data.

A major problem in this country, and probably also in yours, is what to do when people have microcytic indices with a normal haemoglobin A2 and electrophoresis - I think we discussed this at the conference. The differential diagnosis is iron deficiency or alpha or beta thalassaemia. Of course only beta thalassaemia matters. I imagine you already plan to treat such people with iron and study them again in three months or so. The results of such a study would be extremely useful.

I suspect that you will find some people who still have microcytosis and a normal haemoglobin A2 after iron deficiency has been corrected. These people will carry alpha + thalassaemia. They are quite common in the Pakistani population here in the UK, so I am pretty sure you will find them in Baluchistan. I am really interested in this area because we are presently trying to collect mutation-specific information on red cell indices. By the time you contact me again I may have more information.

I look forward to hearing from you in the future, and wish you good luck with your studies. Thank you for the Nowrooz card. I had the pleasure once of being in Azerbaijan (former USSR) at Nowrooz, and I am aware of some of the celebrations.

With very best wishes.

pp Bernadette Modell

فصل اول ۱

۱-۱) مقدمه ۱

۱-۲) اهداف ۲

فصل دوم ۴

۲-۱) ساختمان هموگلوبین ۴

۲-۲) ژنهای کنترل کننده بیوسنتز هموگلوبین ۵

۲-۳) بیوسنتز زنجیره گلوبین ۸

فصل سوم ۱۰

۳-۱) روند خونسازی در جریان رشد و تکامل ۱۰

۳-۲) مکانیسم سوئیچ هموگلوبین ۱۲

فصل چهارم ۱۴

۴-۱) RBC - اندکسها - مورفولوژی گلبول قرمز ۱۴

۴-۲) آنمی‌های هیپوکروم میکروسیتر ۱۵

۴-۲-۱) آنمی فقر آهن ۱۶

۴-۲-۲) آنمی در بیماری مزمن ۱۸

۳-۲-۴) آنمی در بیماریهای مزمن ۱۹

۴-۲-۴) مسمومیت با سرب ۲۰

فصل پنجم ۲۲

۵-۱) تاریخچهٔ تالاسمی ۲۲

۵-۲) شیوع و انتشار جغرافیائی ۲۳

۵-۳) تعریف کلی ۲۳

۵-۴) پاتوفیزیولوژی ۲۴

۵-۴-۱) α تالاسمی ۲۸

۵-۴-۲) β تالاسمی ۲۹

۵-۵) سندرومهای تالاسمی ۳۱

۵-۵-۱) سندرومهای α تالاسمی ۳۲

۵-۱-۵-۱) هیدروپس فتالیس با هموگلوبین بارت ۳۲

۵-۱-۵-۲) بیماری HbH ۳۲

۵-۱-۵-۳) آلفاتالاسمی مینور ۳۳

۵-۱-۵-۴) ناقل خاموش (Silent carrier) ۳۳

۲-۵-۵) سندرومهای βتالاسمی ۳۴

۱-۲-۵-۵) تالاسمی ماژور ۳۴

۲-۲-۵-۵) تالاسمی انترمدیا ۳۶

۳-۲-۵-۵) بتاتالاسمی هتروزیگوت یا بتاتالاسمی تریت ۳۶

۴-۲-۵-۵) بتاتالاسمی همراه با واریانت‌های ساختمانی بتا ۳۸

۵-۲-۵-۵) انواع ساختمانی βتالاسمی دارای زنجیرهٔ بلند ۳۸

۶-۲-۵-۵) تالاسمی هموگلوبین لپور ۳۸

فصل ششم ۳۹

۱-۶) غربالگری تالاسمی ۳۹

۱-۱-۶) تعریف غربالگری ۳۹

۲-۱-۶) غربالگری تالاسمی ۳۹

۲-۶) تشخیص آزمایشگاهی ۴۰

۱-۲-۶) شاخصهای گلبول قرمز ۴۲

۲-۲-۶) شمارش گلبول قرمز ۴۳

۳-۲-۶) مورفولوژی غیرطبیعی گلبول قرمز ۴۴

۴-۲-۶) آزمایش شکنندگی گلبول قرمز ۴۴

۵-۲-۶) سنجش HbA_2 ..... ۴۵

۶-۲-۶) الکتروفورز هموگلوبین ۴۷

۷-۲-۶) روشهای تکمیلی جهت تشخیص نهائی ۴۸

۸-۲-۶) سنتز زنجیرهٔ گلوبین ۵۰

فصل هفتم ۵۱

۱-۷) فرمولهای افتراق جهت تشخیص تالاسمی هتروزیگوت از فقر آهن ۵۱

فصل هشتم ۵۴

۱-۸) متدولوژی و روش بررسی و مواد لازم ۵۴

۲-۸) نتایج ۵۵

۳-۸) بحث ۶۲

۴-۸)خلاصه ۶۵

فصل نهم ۶۷

۱-۹) شناسائی منطقهٔ مورد بررسی ۶۷

فصل اول

۱-۱) مقدمه:

تالاسمی شایعترین اختلال ژنتیکی هموگلوبین است که در حال حاضر در کشور ایران بیش از بیست هزار بیمار مبتلا به بتاتالاسمی ماژور بسر می‌برند و سالانه نیز بیش از هزار نفر بر این تعداد افزوده می‌شوند. هرچند با فراهم‌نمودن امکانات درمانی مناسب می‌توان برطول عمر این بیماران افزود و موجب بهبود کیفیت حیات آنان شد ولی این افزایش روزافزون بتدریج باعث محدود شدن امکانات درمانی موجود می‌شود؛ و با تمام تلاش و کوششی که در این زمینه انجام می‌گیرد نتیجهٔ مطلوب حاصل نخواهد شد. بنابراین کنترل و پیشگیری از این بیماری مزمن باید یکی از اولویتهای بهداشتی کشور محسوب شود. یک برنامهٔ پیشگیری صحیح در واقع غربال و شناسائی ناقلین بیماری است. درکنار آن و حتّی قبل از آن لازم است تا آموزشهای همگانی موردنیاز پیرامون بیماری و دلایل لزوم اجرای برنامهٔ پیشگیری در اختیار مردم قرارگیرد؛ زیرا اجرای یک برنامهٔ پیشگیری موفق در سطح ملّی بدون همکاری و همیاری داوطلبانهٔ مردم ممکن نخواهد بود. برنامه‌های پیشگیری در یونان، قبرس و ساردینیا ثابت کرده‌اند که کنترل تالاسمی ماژور توسط غربالگری هتروزیگوتها و تشخیص قبل از تولد امکانپذیر است. جهت آزمایش قبل از تولد باید ژنوتیپهای احتمالی تعیین شود و اینکار جز با تعیین انواع ناقل ممکن نیست.

۲-۱) اهداف:

با توجه به اینکه استان سیستان و بلوچستان یکی از استانهائی است که شیوع بتاتالاسمی در این منطقه زیاد است و تاکنون هیچگونه تحقیقی در زمینهٔ کشف ناقلین بتاتالاسمی صورت نگرفته بود بر آن شدیم تا در جهت پیشگیری و کنترل بیماری، غربالگری بتاتالاسمی را در این منطقه با استفاده ازکشف ناقلین بتاتالاسمی آغازکنیم.

بطورکلی در این استان ۱۰۷۴ بیمار مبتلا به تالاسمی ماژور وجود داردکه تعداد آنان به تفکیک شهر بشرح زیر می‌باشد:

زاهدان	۴۱۵ نفر
زابل	۱۴۳ نفر
ایرانشهر	۲۴۳ نفر
سراوان	۵۸ نفر
چابهار	۸۷ نفر
خاش	۷۵ نفر
نیکشهر	۵۳ نفر

که از این تعداد ۵۶٪ پسر و ۴۴٪ دختر می‌باشند و حدود ۵۰/۵٪ آنها در سن کمتر از ۵ سال و ۴۰/۳٪ بین ۵ تا ۱۰ سال و ۹/۲٪ آنان در سن بالاتر از ۱۰ سال هستند.

در ۴۳٪ بیماران این منطقه گرفتاری فامیلی وجود دارد که در ۳۴٪ موارد کمتر از ۳ بیمار در فامیل و در ۸/۶٪ بیشتر از ۳ نفر در فامیل وجود دارد. در بین افراد مبتلا ۶۱/۷٪ بلوچ و۳۴/۴٪ فارس و ۳/۹٪ دورگه می‌باشند.

گروه انتخابی برای غربالگری بتاتالاسمی از بین پسران جوان سال آخر دبیرستان انتخاب شدند که چند علت داشت:

اولاً مسئلهٔ تداخل فقر آهن تا حدامکان کمتر انجام می‌گیرد،

ثانیاً خون‌گیری از پسران با مشکل زیادی روبرو نمی‌شود،

ثالثاً اطلاع از ناقل بودن آنها مشکل اجتماعی زیادی در زندگی آنان ایجاد نخواهد کرد،

و از طرفی درگروه سنی درست قبل از ازدواج قرار دارند و دانش و آگاهی از بیماری در انتخاب همسر آینده به آنان کمک خواهد کرد.

هرچند منطقی نخواهد بود که دو نفر به علت ناقل بودن الزاماً نتوانند با هم ازدواج کنند و در عمل نیز شاید با مشکل روبرو باشیم، لذا این مسئله لزوم تشخیص قبل از تولد در ایران را مطرح می‌سازد. غربالگری بتاتالاسمی با استفاده از انجام اندکسهای گلبولی و اندازه‌گیری هموگلوبین A_2 و بررسی آهن و TIBC صورت می‌گیرد. روش کار در این طرح بعداً مفصلاً توضیح داده خواهد شد. امید است که این طرح بتواند گامی در جهت ریشه‌کنی تالاسمی در این منطقه باشد.

فصل دوم

۱-۲) ساختمان هموگلوبین:

هموگلوبین کروموپروتئین آهن‌داری است که ناقل اکسیژن در بدن انسان می‌باشد. این پروتئین در بالغین از چهار زنجیره که دوبه دو شبیه به هم هستند با فرمول $\alpha_2\beta_2$ تشکیل شده است. هر یک از زنجیره‌ها دارای گروه پروستیکی بنام هِم است که در وسط آن یک یون دو ظرفیتی آهن قرار گرفته است. هِم توسط اتصالات قوی و ضعیف با زنجیرهٔ گلوبین ارتباط دارد. هر زنجیره قادر است با یک مولکول اکسیژن اتصال برگشت‌پذیر برقرار کند. بنابراین یک مولکول هموگلوبین در هنگام اشباع کامل دارای چهار ملکول اکسیژن است. میل ترکیبی اکسیژن با هر یک از زنجیره‌ها برابر نیست. اتصال اولین اکسیژن به هموگلوبین مشکل است ولی بتدریج در نتیجهٔ همین اتصال، اتصال اکسیژنهای بعدی آسان و آسانتر می‌شود. رها شدن اکسیژن نیز به همین ترتیب است. یعنی اولین اکسیژن به سختی جدا می‌شود ولی جداشدن اکسیژنهای بعدی آسانتر انجام می‌شود. علّت تفاوتهای فوق ایجاد و قطع تعدادی پل نمکی است. بطورکلی هرچه تعداد پل نمکی در ملکول هموگلوبین بیشتر باشد، میل ترکیبی آن به اکسیژن کمتر بوده و رهاسازی آن آسانتر صورت می‌گیرد و بالعکس.[۱]

۹۵٪ هموگلوبین بدن بالغین از نوع A_1 است ولی هموگلوبینهای دیگری نیز وجود

دارند که ساختمان کلی آنها مشابه هموگلوبین A_1 است ولی نوع زنجیره‌های بتای آن متفاوت است. این هموگلوبینها شامل A_2 $(\alpha_2\delta_2)$ و F $(\alpha_2\gamma_2)$ و متهموگلوبین (که آهن زنجیرهٔ بتای آن تبدیل به نوع سه ظرفیتی یا فریّک شده است) می‌باشند. مقدار ناچیزی نیز هموگلوبین گلیکوزیلیت (HbA_1C) وجود دارد که زنجیرهٔ β به یک قند متصل شده است.

هموگلوبین مانند هر ملکول دیگری در بدن انسان ممکن است دچار اختلال گردد. این اختلال ممکن است کمّی یا کیفی باشد. در اختلالات کیفی که بطور کلی هموگلوبینوپاتیها خوانده می‌شوند، ساختار هموگلوبین طبیعی نیست؛ مانند کم‌خونی داسی شکل و متهموگلوبینمی. ولی در بیماریهائی که هموگلوبینوز خوانده می‌شوند و اختلال کمّی وجود دارد یک یا دو زنجیره کم ساخته می‌شوند یا اصلا" ساخته نمی‌شوند که این بیماریها در مجموع سندرمهای تالاسمی را تشکیل می‌دهند.

۲-۲) ژنهای کنترل کننده بیوسنتز هموگلوبین:

ساختمان لوکوس ژن گلوبین: علاوه بر ژن‌های کنترل کنندهٔ زنجیره‌های آلفا و غیر آلفایی، دسته‌های شبه ژنی اضافی با همولوژی ساختمانی مشابه ژنهای گلوبینی حقیقی وجود دارد که بین دستجات ژنی بتا و یا آلفا قرار دارند و این ساختمانها بنام ژنهای کاذب (Pseudogenes) خوانده می‌شوند. جایگاه ژن زنجیره‌های گلوبین آلفا و زتا روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۶ در داخل باند P13.3 قرار دارند و شامل دو ژن آلفا(α_2 و α_1)، یک ژن

شبه آلفای جنینی (ξ_2)، سه ژن کاذب ($\varepsilon\alpha_1$ و $\varepsilon\alpha_2$ و $\varepsilon\xi_1$) و یک ژن با عمل نامعین (θ_1) که به ترتیب قرار گرفته‌اند می‌باشند(شکل ۱-۲)

ژن θ_1 عضو جدید خانوادهٔ آلفاگلوبین است. هرچند هیچ گلوبینی در ارتباط با آن هنوز مشخص نشده است. این ژن فونکسیونل است ولی غیر ممکن است که سازندهٔ هموگلوبین باشد.[۱۶] یک ژن کاذب برای خانوادهٔ رو "RO" ($\varepsilon\tau$) در RNAهای سیتوپلاسمی کوچک معین شده که پایین‌تر از ژن α_1 قرار دارد. یک کپی پروسه شدهٔ ناقص از خانوادهٔ ژن ($\varepsilon_2\theta$) θ_1 روی کروموزوم ۲۲ پیدا شده است.[۳]

این ناحیهٔ کروموزوم محتوی سگمانهای تکرار شوندهٔ مشترک متعدد از DNA تحت عنوان نواحی خیلی متغیر (HVRs) است که بترتیب در انتهای سه کمپلکس (α-globulin 3'HVR) قرار دارند. در حالت حذف هتروزیگوت یا هموزیگوت ژن θ_1 رشد غیر طبیعی اصلا" وجود ندارد و این ژن از نظر رونویسی در سلولهای اریتروئیدی فعالیت دارد. احتمالاً ژن تتا-۱ حدود ۲۸۰-۲۶۰ میلیون سال قبل از ژنهای آلفاگلوبین شروع به جداسازی کرده است.[۴]

حذف لوکوس ژن زتا با زندگی جنینی منافات دارد و منجر به سقط خودبخودی جنینی سریع می‌شود. حذف یک لوکوس α یا بیشتر از یکی منجر به انواع مختلف α تالاسمی می‌شود.[۵]

ژنهای زنجیره‌های بتا، گاما، دلتا، اپسیلون (مجموعهٔ زنجیره‌های غیرآلفائی) بـر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۱ قرار دارند. همانطورکه در شکل ۱-۲ نشان داده شـده بـطور طبیعی ۲ لوکوس ژن جهت تعیین ساختمان زنجیرهٔ گاما بنام A_γ و G_γ، یک لوکوس برای زنجیرهٔ γ و یک لوکوس برای زنجیره βوجود دارد. در این ناحیه مابین ژنهای γگلوبین و A_γ یک ژن کاذب بنام $\varepsilon\beta_1$ و یکی دیگر بنام $\varepsilon\beta_2$ در وضعیت '5 نسبت به ε قرار دارد.[۵]

زنجیرهٔ A_γ در وضعیت ۱۳۶ محتوی اسیدآمینهٔ آلانین است و زنجیرهٔ G_γ در وضعیت ۱۳۶ محتوی اسیدآمینهٔ گلیسین است. در جایگاه ۷۵ زنجیرهٔ A_γ در موارد کـمی (۱۸٪) اسـیدآمینهٔ تـره‌اونـین قـرار دارد و لذا زیـر واحـد را $A_\gamma T$ مـی‌نامند. قـبلا" بـه ایـن نـوع HbF-Sardinia مـی‌گفتند. در بـقیهٔ مـوارد در جـایگاه ۷۵ زنـجیرهٔ A_γ و G_γ اسـیدآمینهٔ ایزولوسین قرار دارد.[۶] HbF-Sardinia می‌تواند توسط ایـزوالکـتریک فـوکوسینگ روی slab پلی‌اکریلامید جدا و سنجیده شود و توسط HPLC نیز از G_γ و A_γ جدا شود.[۶]

مطالعات توسط روش DNA ری‌کامبیننت و انـزیم‌انـدونوکلئاز دانش مـا را راجـع بـه ساختمان لوکوس ژن گلوبین به مقدار زیادی توسعه داده است.

لوکوس ژن بتا حاوی ۱۹۰۰ نوکلئوتید در طـول خـود مـی‌باشد. در سـمت '5 نـاحیهٔ کدکننده یک ناحیهٔ طویل کناری (flanking) وجود دارد. ناحیهٔ کدکننده توسط ۲ سگمان فاصله‌انداز طویل یا Intron جدا می‌شوند که یکسری ردیفهای نوکلئوتیدی هسـتند کـه