Downloaded from g3m.ir at 19:46 +0330 on Thursday October 19th 2017

ABSTRACT

Beta Thalassemia: Epidemiology and Diagnostic and Treatment Approaches in Iran

Najmaldin Saki, Ali dehghani Fard, Saeid Kaviani, Mohammad Ali Jalali Far, Seyed Hadi Mousavi, Kheirollah Al –Ali, Fakher Rahim *

Beta thalassemia is the most common monogenic disorders with an autosomal recessive inheritance worldwide. In this article, we reviewed fifty articles on the epidemiology and diagnostic and treatment procedures of beta thalassemia during 1982- 2011 and highlighted different diagnostic and treatment procedures in Iran. Beta thalassemia is more prevalent in coastal areas, especially the Mediterranean Sea. In Iran, many cases of beta thalassemia are found in the Caspian Sea and Persian Gulf regions. Also, other regions including Isfahan, Fars and Bushehr have a significant number of thalassemic patients. The IVS II-1 mutation is most prevalent variant in different regions of Iran. The diagnostic tests based on PCR play a great role in identification of new mutations, heterozygote patients and pre-natal diagnosis.

The molecular methods are selected depending on the mutation. Given the importance of early treatment of thalassemic patients, screening and identification of affected people is very important. At present, the common therapeutic approaches of beta thalassemia are transfusion and ferrochellator drugs. The definitive treatment of patients, in case of finding HLA matched donors, is bone marrow transplantation.

Key words: beta-Thalassemia; Mutation; Therapeutics; Molecular Diagnostic Techniques; Bone marrow transplantation.

* **Fakher Rahim, PhD Student of Epidemiology**
Endocrine and Metabolism Research Center,
Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Tel: 021-88220037. Email: fakherraheem@yahoo.com
Submission Date: 7. Mar. 2012 • Acceptance Date: 14. May. 2012

Downloaded from g3m.ir at 19:46 +0330 on Thursday October 19th 2017

مقاله مروری

بتا تالاسمی: اپیدمیولوژی و راه کارهای تشخیصی و درمانی در ایران

نجم الدین ساکی[1]، علی دهقانی‌فرد[2]، سعید کاویانی[2]، محمد علی جلالی‌فر[1]، سید هادی موسوی[2]، خیراله آل علی[3]، فاخر رحیم[4]*

۱. مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور، اهواز ۲. گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران ۳. دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور، اهواز ۴. مرکز تحقیقات اندوکرین و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران.

چکیده/ بتا تالاسمی از جمله مهمترین اختلالات تک ژنی با وراثت اتوزومی مغلوب در سراسر جهان به شمار می‌رود. در این مقاله با مرور حدود ۵۰ مقاله چاپ شده طی سال‌های ۱۹۸۲ تا ۲۰۱۱ در زمینه اپیدمیولوژی و روش‌های تشخیصی و درمانی بتا تالاسمی، به بررسی اهمیت توجه به روش‌های مختلف تشخیصی و درمانی در ایران پرداخته شده است.

بتا تالاسمی دارای شیوع بالایی در نواحی حاشیه دریاها بویژه دریای مدیترانه می‌باشد. در ایران نیز در نواحی ساحلی دریای خزر و خلیج فارس موارد شایعی از این بیماری یافت می‌شود. بتا تالاسمی همچنین در سایر مناطق ایران از جمله اصفهان، فارس و بوشهر شیوع قابل توجهی دارد. در بین جهش‌های مختلف در ژن بتا گلوبین، جهش IVS II-1 (G>A) به عنوان شایع‌ترین واریان در مناطق مختلف ایران مطرح می‌باشد. در بحث شناسایی جهش‌های جدید و همچنین شناسایی افراد هتروزیگوت و تشخیص پیش از تولد، استفاده از آزمون‌های تشخیصی بر پایه PCR دارای اهمیت زیادی است. نوع آزمون تشخیصی مولکولی مورد استفاده با توجه به نوع جهش مورد بررسی انتخاب می‌گردد. با توجه به اهمیت درمان زود هنگام بیماران بتا تالاسمی، شناسایی و غربالگری افراد بیمار بسیار اهمیت دارد. در حال حاضر استفاده از تزریق خون و داروهای شلاته‌کننده آهن به عنوان راه کار درمانی معمول بتا تالاسمی مطرح می‌باشد. البته درمان قطعی بیماران از طریق پیوند مغز استخوان در صورت وجود اهدا کننده مناسب، میسر می‌باشد.

واژگان کلیدی: بتا تالاسمی؛ جهش؛ درمان؛ تشخیص مولکولی؛ پیوند مغز استخوان.

مقدمه

تالاسمی گروهی از اختلالات ارثی خونی هستند که بعلت نقص در ساخت یک یا چندین زنجیره هموگلوبین ایجاد می‌شوند. علت ایجاد بتا تالاسمی کاهش یا عدم ساخت زنجیره بتا ـ گلوبین است که منجر به کاهش هموگلوبین (Hb) و تعداد گلبول قرمز (RBC) و به دنبال آن آنمی ایجاد می‌شود (۱،۲).

این بیماری یکی از گسترده‌ترین بیماری‌های ژنتیکی در دنیا می‌باشد و حدود ۵٪ از جمعیت دنیا را تحت تأثیر قرار می‌دهد(۱). بتا تالاسمی شامل ۳ گروه اصلی است: تالاسمی ماژور (که به نام آنمی کولی و آنمی مدیترانه‌ای نیز شناخته می‌شود)، تالاسمی اینترمدیا و تالاسمی مینور (که همچنین به عنوان بتا تالاسمی حامل، صفت بتا تالاسمی یا بتا تالاسمی هتروزیگوت نامیده می‌شود). جدول۱ به بررسی و مقایسه ویژگی‌های بیماری بتا

* فاخر رحیم، دانشجوی دکترای اپیدمیولوژی
مرکز تحقیقات اندوکرین و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
تلفن: ۰۲۱-۸۸۲۲۰۰۳۷
پست الکترونیک: fakherraheem@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۷ • تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۲۵

Downloaded from g3m.ir at 19:46 +0330 on Thursday October 19th 2017

نوع بتـا تالاسمی	شروع عـلائم	عـلائم بارز قـبل از تزریق خون	علائم بارز ناشی از تزریق خون	مشخصه‌مهم
مـــاژور	۶ تا ۲۴ ماهگی	مشکلات تغذیه‌ای، اسهـال، بزرگ شـدن بیش از اندازه شـکم بعلت بزرگی طحال و کـبد، اختلال رشد، ناهنجاری‌هـای اسکلتی عمدتاً به صورت بدشـکلی استخوان‌هـای بلند پا و تغیـیرات‌شـکل‌جمجـمه	عوارض مرتبط با افـزایش بار آهن در قلب، کبد و غـدد اندوکرینی بصورت دیابت ملیتوس و هیپوگنـادیسم، هپاتیت هـای مزمن (هپاتیت B یا C)، عفونت HIV، ترومبوز وریدی	مرگ به علت موسیدروز بافت قلب
اینترمدیا	۲ تا ۶ سالگی	طیفـی از عـلائم از آنمـی خفیف تا علائم شدید شامل عقب ماندگی رشد و تکامل	بـه دلیل عدم نیـاز به اسـتفاده از برنامه منظـم تزریق خـون معمولاً ایـن عـلائم یافت نمی‌شوند	ترومبوز، مشکلات ناشی از آنمی همولیتیک خـود ایمن به دنبـال تـزریق خـون
مینور	معمولاً بطور تصادفی طی آزمایش خون	بدون علامت، گاهی آنمی خفیف وجود دارد	بدون نیاز به تزریق خون	اهمیـت تشـخیص در غربالگری قبل از ازدواج

جـدول۱: مقایسه مشخصات بالینی بتا تالاسمی ماژور، اینترمدیا و مینور، نوع بتا تالاسمی، شروع علائم، علائم بارز قبل از تزریق خون، علائم بارز ناشی از تزریق خون، مشخصه مهم.

تالاسـمی ماژور، اینترمدیا و مینور می‌پردازد (۲-۷). مـاژور ۶ تا ۲۴ مـاهگی مشکلات تغذیه‌ای، اسهـال، بزرگ شدن بیش از اندازه شکم بعلت بزرگی طحال و کبد، اختلال رشـد، ناهنجاری‌هـای اسـکلتی عمـدتاً به صورت بدشـکلی استخوان‌هـای بلند پا و تغییرات شکل جمجمه عـوارض مرتبط با افـزایش بـار آهن در قلب، کبـد و غدد اندوکرینی بصورت دیابت ملیتوس و هیپـوگنادیسم، هپاتیت‌هـای مزمن (هپاتیت B یا C)، عفونت HIV، ترومبـوز وریدی مرگ به علت هموسیدروز بافـت قلب اینـترمدیا ۲ تا ۶ سـالگی طیفی از عـلائم از آنمی خفیف تا علائم شـدید شـامل عقب ماندگی رشد و تکامل به دلیل عـدم نیاز به استـفاده از برنامه منظم تزریق خون معـمولاً این علائم یافت نمی‌شوندترومبوز، مشکلات ناشی از آنمی همـولیتیک خـود ایمن به دنبال تزریق خون مینور معمولاً بطـور تصادفی طی آزمـایش خون بدون علامـت، گاهی آنمی خفیف وجود دارد بدون نیـاز به تزریق خون‌اهمیت تشـخیص درغـربالگری قبل از ازدواج بـا توجـه به اهمیت تشـخیص زودهنگام بیمـاری به بررسـی راه کارهـای مختلف تشـخیصی بویژه راه کارهای تشخیص مولکـولی و اسـتـفاده از آزمون‌های بر پایه PCR بررسـی و پس از آن شیوع جهش‌هـای ژن بتـا ـ گلوبیـن در مـناطـق مختلف ایران و سـایر کشـورهـای جهان مقایسه می‌شـود. در پایان نیز بدلیل اهمیت انتخاب راه کار درمانی مؤثر و مناسـب برای بیمـاران، به بررسـی روش‌هـای درمـانی معمول و نوین که طی سـال‌هـای اخیر مورد توجه قـرار گرفته‌اند پرداخـته شده است.

اپیدمیولوژی

بتا تالاسـمی در کشـورهای اطـراف دریای مدیترانه مـانند، یونان، ایتالیا، ترکیه و کشورهای آفریقای شمالی شایع می‌باشد. این بیمـاری همچنین در عربسـتان سعـودی، پاکستان، ایران، افغانستان، هند و کشورهـای آسیای شرقی مانند تایلند و اندونزی شیوع قـابل توجهی دارد(۷). بیشـترین فـراوانـی حاملین ژن بتا تالاسـمی در قـبرس، سـاردینیا و آسـیای جنوب شرقی گـزارش شده است. مهاجرت‌هـا و ازدواج بین اقـوام مختلف باعث شده است که تالاسمی در اکـثر کشـورهـا دیده شود. میزان بروز سـالانه افـراد علامت دار حدود یک به صـد هزار در سراسر جهان تخمین زده می‌شـود(۲).

کشـورما دارای تعداد زیـادی از موارد ابتلا به بیمـاری تالاسـمی ماژور می‌باشد که شیوع آن در مـناطق جغرافیـایی مختلف متغیر می‌باشد. بیشترین میزان شیوع بتا تالاسمـی در اطراف دریای خزر و خلیج فـارس به میزان بیش از ۱۰٪ گـزارش شده است. شیوع این اختـلال در دیگر منـاطق بین ۸-۴٪ اسـت. در اصفهان فـراوانی به

Downloaded from g3m.ir at 19:46 +0330 on Thursday October 19th 2017

حدود ۸٪ افزایش می‌یابد. همچنین در استان فارس فراوانی ژن بتا تالاسمی به حدود ۱۰-۸٪ می‌رسد(۸).

جهش‌ها و واریان‌های آللی مختلف

بتا تالاسمی یک بیماری معمول اتوزومال مغلوب است که عمدتاً بعلت جهش‌های نقطه‌ای در ژن بتا ـ گلوبین که در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۱ قرار دارد، بوجود می‌آید(۳). تاکنون بیش از ۲۰۰ جهش مختلف تأثیر گذار بر بیان ژن‌های بتا ـ گلوبین شناسایی شده‌اند(۱۱,۱۰). جهش حذفی در ژن بتا ـ گلوبین نادر می‌باشد. بتا تالاسمی شایع‌ترین بیماری تک ژنی در جهان می‌باشند؛ و در سطح مولکولی بصورت هتروژن هستند.

تاکنون بیش از ۲۳ نوع نقص مختلف مولکولی در ژن بتا ـ گلوبین شناسایی شده است(۴). کاهش (β+) یا عدم وجود (β0) زنجیرهای بتا ـ گلوبین منجر به افزایش زنجیره‌های آلفا گلوبین آزاد می‌شوند که در پیش سازهای رده اریتروئیدی در مغزاستخوان رسوب می‌کنند و منجر به تخریب پیش از بلوغ گلبول‌های قرمز و اریتروپوئز غیر مؤثر می‌شوند. درجه کاهش زنجیره گلوبین توسط طبیعت جهش در ژن گلوبین بتا در کروموزوم ۱۱ تعیین می شود(۱۲,۲). استراتژی‌های مختلف طبقه بندی ژنوتیپی افراد توسط دسته بندی ژن بتا ـ گلوبین و کلونینگ توالی‌های نوکلئوتیدی منجر به شناسایی چندین جهش جدید در مناطق مدیترانه‌ای، هند، چین و در جمعیت سیاه پوستان آمریکا شده است(۱۳-۱۷).

تشابه و نزدیکی جهش‌ها در ایران با کشورهای هم جوار

تحقیقات انجام شده در ۸ کشور عربی نشان می‌دهند که شایع‌ترین جهش‌ها از نوع IVS I -110 و IVS II -1 بوده و پس از آن جهش‌های IVS I - 5, CD39, CD6. حذف 25bp - IVS I (انتهای ´۳) در درجه بعدی اهمیت می‌باشند. یافته‌های بدست آمده در ایران مشابه کارهای انجام شده در کویت می‌باشد، که ۶ جهش غالب شامل IVS II-1, IVS 1-6, CD39, IVS I-110, CD8, IVS I-1 (۶۴٪ همه موارد) را نشان می‌دهد و پس از آن دو جهش دیگر شامل CD44, CD36/37 (کردها، طایفه ایرانی) که۱۰٪ از جمعیت می‌باشند، حائز اهمیت می‌باشند. در مطالعه انجام شده، جهش دیگری از بتا تالاسمی در مطالعه کروموزوم‌ها بدست آمد و ۵ ناحیه مختلف از ایران جهش(IVS II-1 (G>A را نشان دادند، که جهش غالب یافت شده در همه اقوام این نواحی بود. شایع‌ترین جهش‌ها در ایران به ترتیب(IVS II-1 (G>A (۳۴٪) درخوزستان، حذف bp25 از IVS I (انتهای ´۳)(۲۸/۷٪) در بوشهر، (IVS II-1 (G>A (۴۱/۵٪) در فارس، (IVS II-1 (G>A (۳۱/۸٪) در اصفهان، IVS I-5 (G>C)) (۴۴/۸٪) در سیستان و بلوچستان بودند (۳). طی مطالعه دیگری که توسط کریمی‌پور و همکاران او انجام شد مشخص شد که شایع‌ترین جهش در جنوب ایران (IVS II-1 (G>A می‌باشد (۱۲).

روش‌های تشخیصی

با توجه به اهمیت تشخیص زودهنگام بیماری بتا تالاسمی و همچنین شناسایی و غربالگری افراد هتروزیگوت از افراد سالم، استفاده از روش‌های مختلف تشخیصی اعم از روش‌های روتین و ژنتیک مولکولی حائز اهمیت می‌باشد. جدول ۲ به بررسی روش‌های معمول تشخیصی بتا تالاسمی می‌پردازد (۲۴-۱۹,۲).

تشخیص بالینی‌علائم مربوط به آنمی میکروسیتیک شدید، زردی خفیف و هپاتواسپلنومگالی در بتا تالاسمی ماژور، یافته‌های مشابه با تالاسمی ماژور اما خفیف تر در بتا تالاسمی اینترمدیا، حالت بدون علامت یا آنمی خفیف در بتا تالاسمی مینور تشخیص خون شناسی g/dl 7> Hb, 70 fL>MCV > 50 fL ، و MCH<20Pgr Pgr> 12در بتا تالاسمی ماژور 7 fL <MCV 50 fL <80 fL,<Hb<10 g/dL g/dL و<Pgr MCH 16 Pgr 24>در بتا تالاسمی اینترمدیا کاهش خفیف MCV و MCH در بتا تالاسمی مینور.

اسمیر خون محیطی

تغییراتی در RBC (میکروسیت، هیپوکروم، آنیزوسیتوز، پوئی کیلوسیتوز) و حضور NRBC در خون محیطی، تعداد NRBC در خون محیطی مرتبط با درجه آنمی می‌باشد و بعد از برداشتن طحال به شدت افزایش می‌یابد.

آنالیز کمی و کیفی هموگلوبین

HbF: ۹۵-۹۲٪ و عدم وجود HbA2 در بتا تالاسمی ماژور

HbF:۷۰- ۹۰٪ و: 30% - 10 HbA2 در بتا تالاسمی اینترمدیا

افزایش قابل توجه HbA2 در بتا تالاسمی مینور

آنالیز ژنتیک مولکولی

با توجه به شیوع پایین تعدادی از جهش‌ها در هر جمعیت،

Downloaded from g3m.ir at 19:46 +0330 on Thursday October 19th 2017

را ه کار تشخیصی	کلید تشخیص
تشخیص بالینی	علائم مربوط به آنمی میکروسیتیک شدید، زردی خفیـف و هپاتواسـپلنومگالی در بتا تالاسـمی ماژور، یافته های مشـابه با تالاسـمی ماژور اما خفیف تر در بتا تالاسمی اینترمدیا، حالت بدون علامت یا آنمی خفیف در بتا تالاسمی مینور.
تشخیص خون‌شناسی	MCH<20Pgr > و ،Hb, 70 fL>MCV > 50 fL <7 g/dL<Hb<10 7 Pgr 12 در بتا تالاسـمی ماژور و g/dL,<80 fL <MCV 50 fL Pgr MCH 16 24> Pgr>در بتا تالاسـمی اینترمدیا T کاهش خفیف MCV و MCH در بتا تالاسمی مینور.
اسمیر خون محیطی	تغییراتـی در RBC (میکروسـیت، هیپوکـروم، آنیزوسیتوز، پوئی کیلوسـیتوز) و حضور NRBC در خـون محیطـی، تعـداد NRBC در خـون محیطی مرتبط با درجه آنمی می‌باشـد و بعد از برداشتن طحال به شدت افـزایش می‌یابد.
آنالیز کمـی و کیفی هموگلوبین	HbF : 95-92% و عـدم وجـود HbA2 در بتـا تالاسـمی ماژور، HbF :70- 90% و : HbA2 10 30% - در بتـا تالاسـمی اینترمدیا، افزایش قابل توجه HbA2 در بتا تالاسمی مینور.

جـدول ۲: روش های معمول تشخیص بتا تالاسمی

آزمایـش ژنتیک مولکولـی می‌تواند کمک زیادی به تشـخیص و شناسـایی جهش نماید. جهش‌های معمولی کـه در ژن بتا ـ گلوبین رخ می‌دهند توسـط تکنیک‌هایی که بر پایه PCR هستند شناسایی شوند(۲۰). از این روش جهت تشخیص قطعی بتا تالاسمی می‌توان اسـتفاده نمود. از آنجایی کـه در هر جمعیتی تعـداد محدودی از جهش‌ها شـایع هسـتند، این مسئله سبب آسـان‌تر شدن انجام آزمون‌های ژنتیک مولکولی می‌شود. با این وجود روش های ژنتیک مولکولی نمی‌توانند جایگزین آزمون‌هـای تشخیصی بیوشیمیایی و هماتولوژیک گـردند.

به اسـتثنای موارد نـادر، اغلب هموگلوبینوپاتی‌هـا دارای وراثت اتوزومـال مغلوب بـوده و افـراد هتروزیگوت عمومـاً وضعیت بالینی مناسـبی دارند. شناسـایی افراد هتروزیگوت یا ناقل بوسیله آزمون‌هـای تشـخیصی هماتولوژیک قابـل اعتمـاد امـکان پذیر می‌باشـد. همچنین انجام آزمون‌هـای تشـخیصی بیوشـیمیایی و هماتولوژیک جهت شناسـایی تداخـلات ژنتیکی مختلف ضروری می‌باشد. بررسـی پارامترهای هماتولوژیک در افراد فامیل بویژه در پدر و مادر، فرزندان و سـایر اعضای خانواده کمک فراوانی به تشـخیص جهش‌هـای ژنی مختلف می‌کند. شناسـایی افراد ناقل و تشـخیص نوع جهش به عنوان هـدف اصلی آزمون‌های تشخیصی ژنتیکی در تشخیص هموگلوبینوپاتی‌هـا محسوب می‌شـود.

آزمون‌هـای پایه‌ای تشـخیصی هماتولوژیک شـامل شـمارش کامل سـلولی(CBC)، آنالیز Hb توسـط الکتروفورز و ایزوالکتریک فوکوسـینگ (IEF) و یا کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) جهـت ارزیابی کمی سـطح HbF و HbA2 می‌باشـد. آزمون‌های بیوشـیمیایی شـامل بررسـی وضعیـت آهن با بررسـی سـطح پروتوپورفیریـن سرمـی متصل بـه روی (ZPP)، فریتیـن و TIBC می‌تواننـد به تشـخیص کمـک کنند. نهایتـاً نتایـج آزمون‌هـای هماتولوژیک و بیوشیمیایی راه را برای انتخاب آزمون ژنتیکی مناسب و رسیدن به تشخیص قطعی هموار می‌کند(۲).

بررسی اجمالی تکنیک‌های تشخیصی بر پایه DNA

امـروزه تقریبـاً تمـام روش‌هـای آنالیـز DNA بـرای تشـخیص هموگلوبینوپاتی‌ها بر اسـاس PCR می‌باشد. بنابراین تشخیص نوع جهـش (نقطه‌ای، حذفی و یا بازآرایی) با اسـتفاده از تکنیک‌های مشـابهی انجام می‌گیرد و تنها نوع پرایمرهـا است که کمـک به تشـخیص اختصاصی نوع جهش می‌کـند. در حقیقت حساسیت و اختصاصیت بالای PCR و نیاز به مقـدار کم DNA سبب ایجاد تحول نوینی در بحث تشـخیص مولکولی شده اسـت. امـروزه با وجود PCR، آزمون‌های تشخیصی بر مبنـای ایزوتایپ‌هـای رادیواکتیو نیز کاملاً منسوخ شده است.

آزمون‌هـای تشـخیصی بـر پایـه PCR جهـت تشـخیص همـوگلوبینوپاتی‌هـا شـامل آزمون هیـبریدیزاسیونASO[1] یا dot-blot analysis، Reverse dot-blot analysis، آزمـون[2] ARMS یـا allele-specific priming، restriction enzyme analysis، amplification creat-mutagenically seperated PCR و ed restriction analysis، Gap-PCR می‌باشـند. این تکنیک‌ها جهت شناسایی جهش‌های شناخته شده

1. Allele-Specific Oligonucleotide
2. Amplification Refractory Mutation System

Downloaded from g3m.ir at 19:46 +0330 on Thursday October 19th 2017

در هموگلوبینوپاتی‌ها کاربرد دارند. در صورتی که تکنیک‌های بر پایه PCR جهت شناسایی جهش‌های ناشناخته بر مبنای DNA تک رشته‌ای تغییر ساختار یافته طراحی می‌شود و شامل تکنیک‌هایی نظیر DGGE [3] ، SSCP [4] و آنالیز DNA دو رشته‌ای[5] می‌باشند. در اینجا تشخیص محل جهش بر اساس الگوی تغییر یافته حرکت مولکول DNA می‌باشد.

بدین ترتیب ناحیه هدف، شناسایی شده و در ادامه تشخیص جهش مورد نظر انجام می‌گیرد. روش نهایی جهت تشخیص جهش، تکنیک آنالیز مستقیم تعیین توالی[6] می‌باشد، که در آن توالی مورد نظر بطور اختصاصی PCR شده است. در واقع در یک دهه اخیر تعیین توالی با استفاده از sequencerهای اتوماتیک بدلیل سرعت و دقت بالا و عدم استفاده از مواد رادیواکتیو به عنوان ابزار تشخیصی معمول مورد استفاده قرار می‌گیرد.

نکته قابل توجه اینکه تکنیک تعیین توالی جهت شناسایی جهش‌ها در ژن‌های نزدیک به هم و با توالی‌های کوتاه مثل ژن‌های گلوبینی و با طول 1/6–1/2 kb بسیار کاربردی می‌باشد.

به کمک تعیین توالی می‌توان اغلب جهش‌های نقطه‌ای در ساختار ژن‌های گلوبینی و یا درتوالی‌های مجاور را شناسایی نمود.تکنیک ساترن بلات هم می‌توان گفت که جزء معدود تکنیک‌هایی است که بر پایه PCR نبوده ولی همچنان به عنوان یک تکنیک مولکولی با ارزش جهت تشخیص هموگلوبینوپاتی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

این تکنیک جهت شناسایی جهش‌های حذفی بزرگ، بازآرایی‌ها و شناسایی جهش‌های جدید بسیار کاربردی می‌باشد. همچنین از تکنیک Gap-PCR جهت شناسایی جهش‌های حذفی شایع در ژن‌های گلوبینی با استفاده از طراحی پرایمرهای اختصاصی جهت اتصال به نواحی کناری ناحیه حذف شده می‌توان استفاده نمود. با این وجود هرکدام از تکنیک‌های نام برده شده دارای محدودیت‌هایی می‌باشند. انتخاب تکنیک تشخیصی مناسب با توجه به نوع جهش‌های شایع در هر منطقه و مهارت تکنسین‌ها روی تکنیک مورد نظر اهمیت ویژه‌ای دارد. توصیه می‌شود هر آزمایشگاه تشخیصی ژنتیک دارای حداقل دو تکنیک جایگزین برای تشخیص جهش‌ها باشد(۲).

تشخیص پیش از تولد

مهمترین منبع استخراج DNA از لکوسیت‌های جدا شده از خون محیطی EDTA دار و یا خون بند ناف می‌باشد. برای انجام PND [7] نیز استخراج DNA از پرزهای کوریونی به دنبال آسپیراسیون سرویکال یا شکمی در هفته ۱۱ جنینی و همچنین از سلول‌های مایع آمنیوتیک معمولاً حدود هفته‌های ۱۸-۱۵ جنینی انجام می‌گیرد. در روش‌های غیر تهاجمی می‌توان استخراج DNA را از سلول‌های جنینی یا DNA جنینی موجود در گردش خون مادر انجام داد. اما روش اخیر به عنوان یک روش معمول برای تشخیص هموگلوبینوپاتی‌ها استفاده نمی‌گردد (۲۵,۲۶). سازمان بهداشت جهانی (WHO) برنامه کنترلی شامل افزایش آگاهی عمومی در مورد بیماری، غربالگری ناقلین بیماری، تشخیص پیش از تولد و مشاوره ژنتیکی را پیشنهاد می‌کند که منجر به جلوگیری از تولد نوزاد بیمار می‌شود (۲۷).

مدیریت درمانی بیماری تالاسمی

تالاسمی ماژور

انتقال خون: هدف از انتقال خون در بیماران بتا تالاسمی بهبود وضعیت آنمی، سرکوب اریتروپوئز غیر موثر و مهار جذب آهن در دستگاه گوارش می‌باشد. زمان شروع انتقال خون در بیماران با تشخیص بتا تالاسمی با توجه به شدت آنمی تعیین می‌گردد. در مواردی که هموگلوبین به مدت دو هفته کمتر از ۷ گرم بر دسی لیتر باشد، انتقال خون در برنامه درمانی بیمار قرار می‌گیرد. در بیمارانی با هموگلوبین بیشتر از ۷ گرم بر دسی لیتر، عوامل دیگر شامل تغییرات صورت، اختلال رشد، مدارکی دال بر گسترش فضای خونسازی و بزرگی طحال در استفاده از تزریق خون جهت درمان بیماران مورد توجه قرار می‌گیرند.

افزایش بارآهن، شایع‌ترین عارضه تزریق خون است. دیگر عوارض ناشی از انتقال خون شامل، عفونت‌ها (ویروسی، باکتریایی و انگلی)، واکنش‌های همولیتیک و غیر همولیتیک می‌باشند(۵).

3. Denaturation Gradient Gel Electrophoresis
4. Single-Strand Conformation Polymorphism
5. Heteroduplex analysis
6. Sequencing
7. Pre Natal Diagnosis

Downloaded from g3m.ir at 19:46 +0330 on Thursday October 19th 2017

درمان افزایش بار آهن

دفروکسامین (DFO)

در۳۰ سال گذشته، درمان مرسوم بتا تالاسمی ماژور بر پایه تزریق منظم خون و داروهای شلاته کننده آهن مثل دفروکسامین (DFO) بوده است که بطور چشمگیری عوارض بیماری را بهبود می‌بخشید. تزریق مناسب DFO، باعث کاهش یا جلوگیری از تجمع آهن و آسیب بافتی بواسطه رسوب آهن و در نتیجه کاهش مرگ و میر می‌شود(۲۹). بهر حال به چندین دلیل شلاته درمانی با DFO ممکن است نامناسب باشد. در دسترس نبودن DFO برای اکثر بیماران بتا تالاسمی و عوارض ناشی از مصرف دارو در بیماران منجر به توجه به استفاده از سایر داروهای شلاته کننده آهن شد. از جمله خصوصیات مهم برای شلاته کننده‌های آهن، افینیتی بالا و ویژگی برای Fe^{3+}، افینیتی بالای شلاته کنندگی، سرعت پایین متابولیسم، نفوذ پذیری سلولی و بافتی، عدم توزیع مجدد آهن، غیر سمی، ارزان و دردسترس بودن می‌باشد(۳۰).

در مدیریت درمانی بیماری بتا تالاسمی ماژور استفاده از روش‌های جدید برای اندازه گیری تجمع بافتی آهن و داروهای جدید برای برداشت بار آهن اضافی حائز اهمیت می‌باشند. از جمله داروهای جدید شلاته کننده آهن می‌توان به دفریپرون (DFP) و ICL670 که بصورت خوراکی و همچنین هیدروکسی بنزن ـ اتیلن دی آمین ـ دی استیک اسید[8] و دفروکسامین نشاسته‌ای که بصورت تزریقی استفاده می‌شوند اشاره داشت. راه کار شلاته درمانی با بکارگیری همزمان دو داروی شلاته کننده آهن، احتمال برداشت آهن با اثر بیشتر و کمترین عوارض بالینی را فراهم می‌کند. رویکرد استفاده از شلاته درمانی در آینده با هدف استفاده از داروهایی با توانایی برداشت و حذف بار آهن از بافت‌های خاص مانند قلب و کبد می‌باشد(۳۱).

دفریپرون (DFP):

در حال حاضر دفریپرون یا L1 (DFP)، تنها داروی شلاته کننده خوراکی مورد استفاده بالینی می‌باشد. مطالعات نشاندهنده تأثیر مناسب دفریپرون در کاهش سطح فریتین سرم و غلظت آهن کبد در اکثر بیماران وابسته به تزریق خون می‌باشد(۳۲). مهمترین عارضه جانبی استفاده از دفریپرون، آگرانولوسیتوز می‌باشد(۳۳). البته عوارض جانبی شایعتر و با شدت کمتر شامل اختلالات دستگاه گوارش، درد مفاصل و فقر روی در بیماران می‌تواند مشاهده گردد. مطالعات نشان می‌دهند که درمان بیماران با DFO، باعث کاهش مناسب رسوب آهن در بافت قلب و بهبود عملکرد قلب در مقایسه با سایر بیماران می‌شود(۳۴, ۳۵). دسفریتیوسین (DFT) دیگر داروی خوراکی شلاته کننده آهن بوده که دارای قدرت بالایی در برداشت آهن Fe^{3+} از بافت‌ها می‌باشد(۳۶). دیگر شلاته کننده‌های آهن از جمله GT56، ICL670، 252، 40SD02، HBED و PIH در دست بررسی می‌باشند.در مجموع می‌توان گفت که استفاده از راه کار شلاته درمانی ترکیبی می‌تواند در برنامه درمانی بیماران بتا تالاسمی مورد توجه قرار گیرد. این ترکیب باید دارای مزایایی از جمله دسترسی به تمام ذخائر آهن، جلوگیری از تجمع آهن غیر ترانسفرینی متصل شده و در مجموع بهبود کیفیت زندگی بیماران باشد.

پیوند مغزاستخوان و خون بندناف

پیوند مغزاستخوان[9]، تنها راه کار درمانی قطعی موجود برای درمان بیماران بتا تالاسمی می‌باشد. موفقیت در انجام BMT با شرایط بالینی بیمار پیش از انجام پیوند بخصوص در مورد بزرگی کبد، فیبرز کبد، شلاته درمانی منظم در گذشته و شدت تجمع آهن مرتبط می‌باشد(۳۷).

بزرگترین محدودیت انجامBMT آلوژنیک، کمبود دهنده پیوند با HLA مشابه در اکثر موارد می‌باشد. البته حدود ۳۰-۲۵٪ بیماران می‌توانند دهنده خواهر یا برادر سازگار از نظرHLA داشته باشند. انجامBMT با استفاده از دهندگان غیرخویشاوند بیماران بتا تالاسمی کاربرد کمی دارد(۳۸). اگر BMT موفقیت آمیز باشد، افزایش بار آهن می‌تواند توسط فلبوتومی مکرر کاهش یابد، بدون آنکه نیازی به استفاده از داروهای شلاته کننده‌های آهن باشد. از عوارض شایع BMT می‌توان به بیماری مزمن پیوند علیه میزبان[10] با در ۸-۵٪ از بیماران اشاره داشت.

استفاده از پیوند سلول‌های بنیادی خون بند ناف در بیماران بتا تالاسمی با درصد موفقیت بالا وکاهش احتمال ایجاد GVHD همراه می‌باشد (۳۹,۴۰). در شرایطی که والدینی دارای فرزندی

8. HBED
9. BMT
10. GVHD

Downloaded from g3m.ir at 19:46 +0330 on Thursday October 19th 2017

بتا تالاسمی و جنینی سالم (با تشخیص پیش از تولد) در بارداری بعدی می‌باشند، شناسایی پیش از تولد HLA سازگار بین فرزند بیمار و جنین سالم، جمع آوری خون جفت در هنگام زایمان و انتخاب پیوند خون بند ناف برای درمان فرزند بیمار را میسر می‌سازد (۴۱).

تالاسمی اینترمدیا

توجه به درمان تنها در افراد با بتا تالاسمی اینترمدیا در صورت وجود علائم بالینی اهمیت می‌یابد(۴۱). برداشت طحال از جمله راه کارهای درمان مورد استفاده برای این بیماران می‌باشد. در واقع بزرگی طحال در بیماران بتا تالاسمی اینترمدیا عامل ایجاد آنمی شدید، تأخیر در رشد و اختلال عملکرد طحال می‌باشد. البته خطرات ناشی از برداشتن طحال شامل، افزایش استعداد ابتلا به عفونت‌ها و ترومبوآمبولی وریدی باید مورد توجه قرار گیرند. برای جلوگیری از عفونت‌های بعد از برداشتن طحال از آنتی بیوتیک یا واکسن‌هایی علیه عفونت خاص استفاده می‌شود(۴۲). برای جلوگیری از ترومبوز نیز از ضد انعقادها پیش از انجام جراحی استفاده می‌شود(۴۳).

برای درمان خونسازی خارج از مغزاستخوان در بیماران نیز از انتقال خون یا هیدروکسی کربامید استفاده می‌شود. زمانی که افزایش بار آهن وجود داشته باشد، استفاده از شلاته کننده‌های آهن مدنظر قرار می‌گیرد (۴۳-۴۵). در این بیماران برای درمان زخم‌های پا نیز از مکمل روی و پنتوکسیفیلین استفاده می‌شود (۴۵). در سال‌های اخیر نیز استفاده از داروهای القا کننده اپی ژنتیکی بیان هموگلوبین جنینی به عنوان یک راه کار نوین درمانی مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از ترکیب دو داروی تالیدومایدو سدیم بوتیرات می‌تواند سبب القای مؤثر سطح هموگلوبین جنینی گردد(۴۶, ۴۷).

نتیجه‌گیری

با توجه به مشکلات زیادی که افراد با بتا تالاسمی ماژور با آن مواجه هستند، به نظر می‌رسد مهمترین راه کار مقابله با آن بالا بردن آگاهی عمومی افراد جامعه می‌باشد تا از تولد چنین افرادی جلوگیری شود. در صورت بارداری زوجین با تالاسمی مینور به هر دلیلی، تشخیص قبل از تولد دیگر راه کار می‌باشد که البته باید در زمان مناسب انجام گیرد تا در صورت مشاهده جنین مبتلا اقدامات بعدی صورت گیرد. با توجه به اهمیت استفاده از تکنیک‌های مولکولی بر پایه PCR در شناسایی واریان‌های مختلف و شناسایی پیش از تولد در این مقاله سعی شده است که علاوه برتعریف، توصیف و طبقه بندی بالینی بتاتالاسمی راه کارهای تشخیصی معمول و مولکولی مورد بررسی قرار گرفته و به بررسی اپیدمیولوژی و مقایسه شیوع واریان‌های آللی مختلف در مناطق مختلف ایران و سایر مناطق جهان پرداخته شود. در ادامه به بررسی راه کارهای درمانی رایج و نوین پرداخته شده است. مشکل اصلی افراد با تالاسمی بتا ماژور رسوب آهن در بافت‌های مختلف در نتیجه انتقال خون مکرر می‌باشد. جهت جلوگیری از چنین وضعیتی داروهای شلاته کننده آهن مورد استفاده قرار می‌گیرند. مشکل استفاده از اینچنین داروهایی این است که نمی‌توانند تمام آهن تزریق شده را دفع کنند و در نتیجه موجب رسوب آهن در بافت‌ها می‌شوند و همچنین باید بطور دائم مورد استفاده قرار گیرند. بنابر این به نظر می‌رسد با توجه به پیشرفت‌های حاصله در زمینه پیوند سلول‌های بنیادی می‌توان از چنین سلول‌هایی استفاده کرد تا مشکلات مربوط به انتقال خون مکرر و عوارض جانبی آن مرتفع گردد. در حال حاضر استفاده از پیوند سلول‌های بنیادی خون بندناف و مغزاستخوان به عنوان تنها راه کار درمانی قطعی و مؤثر برای بتا تالاسمی مطرح می‌باشد. در صورت وجود اهدا کننده سازگار از نظر HLA، پیوند مغز استخوان می‌تواند به درمان قطعی بیمار منجر شود.■

Downloaded from g3m.ir at 19:46 +0330 on Thursday October 19th 2017

Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update. Clinical Chemistry 2000;46: 1284–1290.

25. Mavrou A, Kouvidi E, Antsaklis A, et al. Identification of nucleated red blood cells in maternal circulation: a second step in screening for fetal aneuploidies and pregnancy complications. Prenat Diagn 2007;27: 150-153.
26. Lo YM. Recent advances in fetal nucleic acids in maternal plasma. J Histochem Cytochem 2005;53: 293-296.
27. Rahim F, Kaeikhaei B, Aberumand M. Prenatal Diagnosis (PND) of β-Thalassemia in the Khuzestan Province, Iran. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2007;1: 454-459.
28. Alan RC, Renzo G, Dudley JP, et al. Thalassemia. American Society of Hematology 2004: 14-34.
29. Lorey F, Charoenkwan P, Witkowska HE, et al. Hb H hydrops foetalis syndrome: a case report and review of literature. Br J Haematol 2001; 115(1): 72-8.
30. Cappellini MD. Iron-chelating therapy with the new oral agent ICL670. Best Practice and Research Clinical Hematology. 2005;18: 289-298.
31. Hoffbrand AV, Cohen A, Hershko C. Role of deferiprone in chelation therapy for transfusional iron overload. Blood 2003;102: 17-22.
32. Cohen AR, Galanello R, Piga A, et al. Safety profile of the oral iron chelator deferiprone: a multicenter study. Br J Haematol. 2000;108: 305-312.
33. Piga A, Caglioti C, Fogliacco E and Tricta F. Comparative effects of deferiprone and deferoxamine on survival and cardiac disease in patients with thalassemia major: a retrospective analysis. Haematologica, 2003;88: 489-496.
34. Anderson LJ, Wonke B, Prescott E, et al. Comparison of effects of oral deferiprone and subcutaneous desferrioxamine on myocardial iron concentrations and ventricular function in beta-thalassemia. Lancet 2002;360: 516-520.
35. Nick H, Acklin P, Lattmann R, et al. Development of tridentate iron chelators: from desferrithiocin to ICL670. Curr Med Chem 2003;10: 1065-1076.
36. Gaziev J, Lucarelli G. Stem cell transplantation for hemoglobinopathies. Curr Opin Pediatr 2003;15: 24-31.
37. La Nasa G, Argiolu F, Giardini C, et al. Unrelated bone marrow transplantation for beta-thalassemia patients: The experience of the Italian Bone Marrow Transplant Group. Ann N Y Acad Sci 2005;1054: 186-195.
38. Pinto FO, Roberts I. Cord blood stem cell transplantation for haemoglobinopathies. Br J Haematol 2008;141: 309-324.
39. Locatelli F, Rocha V, Reed W, et al. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. Blood 2003;101: 2137-2143.
40. Orofino MG, Argiolu F, Sanna MA, et al. Fetal HLA typing in beta thalassemia: implications for haemopoietic stem-cell transplantation. Lancet 2003;362: 41-42.
41. Ali T, Hussain I, Maria DC. Thalassemia intermedia: Revisited. Blood Cells, Molecules, and Diseases 2006;37: 12–20.
42. Taher A, Isma'eel H, Mehio G, et al. Prevalence of thromboembolic events among 8860 patients with thalassemia major and intermedia in the Mediterranean area and Iran. Thromb Haemost 2006:96(4): 488-91.
43. Karimi M, Darzi H, Yavarian M. Hematologic and clinical responses of thalassemia intermedia patients to hydroxyurea during 6 years of therapy in Iran. J Pediatr Hematol Oncol 2005;27: 380-385
44. Cario H, Wegener M, Debatin KM and Kohne E. Treatment with hydroxyurea in thalassemia intermedia with paravertebral pseudotumors of extramedullary hematopoiesis. Ann Hematol 2002;81: 478–482.
45. Dettelbach HR, Aviado DM. Clinical pharmacology of pentoxifylline with special reference to its hemorrheologic effect for the treatment of intermittent claudication. J. Clin. Pharmacol 1985;25: 8-26.
46. Ahmadvand M, Noruzinia M, Soleimani M, et al. In vitro induction of gamma globin gene in erythroid cells derived from CD133+ by thalidomide and sodium butyrate (In Persian). Genetics in the third millennium 2011;9(2): 2373-78.
47. Dehghani-Fard A, Kaviani S, Noruzinia M , et al. Evaluation of synergistic effect of sodium butyrate and thalidomide on HbF induction in erythroid progenitors of cord blood CD133+ cells. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences (In Persian) (In Press).

References /منابع

1. Muncie HL Jr, Campbell J. Alpha and beta thalassemia. Am Fam Physician 2009;15;80(4): 339-44.
2. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. Orphanet J Rare Dis 2010;21;5:11.
3. Thalassemia International Federation: Guidelines for the clinical management of thalassemia 2nd edition. 2008. (http://www.thalassemia.org.cy).
4. Borgna-Pignatti C, Vergine G, Lombardo T, et al. Hepatocellular carcinoma in the thalassemia syndromes. Br J Haematol 2004;124: 114-117.
5. Borgna-Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, et al, Survival and complications in thalassemia. Ann N Y Acad Sci 2005;1054: 40-47.
6. Galanello R, Piras S, Barella S, et al. Cholelithiasis and Gilbert's syndrome in homozygous betathalassemia. Br J Haematol 2001;115: 926-928.
7. Taher AT, Otrock ZK, Uthman I and Cappellini MD. Thalassemia and hypercoagulability. Blood Rev 2008;22: 283-292.
8. Rahim F and Abromand M. spectrum OF β –Thalassemia mutations in various ethnic regions of IRAN. Pak J Med Sci 2008;24: 410-415.
9. Rahim F, Kaeikhaei B, Akbari MT. Application of diagnostic methods and molecular diagnosis of hemoglobin disorders in khuzestan province of Iran. Indian Journal of Human Genetics 2007;13: 5-15.
10. Giardine B, van Baal S, Kaimakis P, et al. HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations: 2007 update. Hum Mutat 2007;208: 206.
11. Huisman THJ, Carver MFH, Baysal E. A Syllabus of Thalassemia Mutations. The Sickle Cell Anemia Foundation, 1997.
12. Arab A, Karimipoor M, Rajabi A, et al. Molecular characterization of β-thalassemia intermedia: a report from Iran. Mol Biol Rep 2011;38(7):4321-6.
13. Orkin SH, Kazazian HH, Jr Antonarakis SE, et al. Linkage of beta - thalassemia mutations and beta-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human betaglobin gene cluster. Nature 1982;296: 627-631.
14. Kazazian HH, Orkin SH, Antonarakis SE, et al. Molecular characterization of seven beta - Thalassemia mutations in Asian Indians. EMBO J 1984;3: 593-596
15. Ohba Y, Hattori Y, Harano K, et al. β-thalassemia mutations in Japanese and Koreans. Hemoglobin 1997;21: 191-200.
16. Antonarakis SE, Irkin SH, Cheng TC, et al. beta - Thalassemia in American Blacks: novel mutations in the "TATA" box and an acceptor splice site. Proc Natl Acad Sci USA 1984;81: 1154-1158.
17. Cheng TC, Orkin SH, Antonarakis SE, et al. beta- Thalassemia in Chinese: use of in vivo RNA analysis and oligonucleotide hybridization in systematic characterization of molecular defects. Proc Natl Acad Sci USA 1984;81: 2821-2825.
18. Rahim F. Microcytic hypochromic anemia patients with thalassemia: genotyping approach. Indian Journal of Medical Sciences 2009;63: 101-108.
19. Rahim F, Kaeikhaei B. Better differential diagnosis of iron deficiency anemia from beta-thalassemia trait. Turk J Hematol 2009;26: 138-145.
20. Rahim F, Kaeikhaei B, Zandian K and Hoseini A. Co-inheritance of a-and b-thalassemia in Khuzestan Province, Iran. Hematology 2008;13: 1-7.
21. Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Tzetis M, et al. Rapid screening of multiple betaglobin gene mutations by real-time PCR on the LightCycler: application to carrier screening and prenatal diagnosis of thalassemia syndromes. Clin Chem 2003;49: 769-776.
22. Galanello R, Melis MA, Ruggeri R, et al. Beta0 thalassemia trait in Sardinia. Hemoglobin 1979;3: 33-46.
23. Rahim F. Correlation of beta-thalassemia mutations with alpha-thalassemia: an experience of the southwestern region of Iran. hematology 2010;15(6):430-3.
24. Gwendolyn MC, Trefor NH. Laboratory Investigation of

Downloaded from g3m.ir at 19:46 +0330 on Thursday October 19th 2017