

هموگلوبینوپاتی‌های نادر زنجیره‌ی آلفا در آزمایشگاه رفرانس کرمانشاه؛ گزارش چند مورد همراه با نکات تشخیصی

امین سلوکی^۱، فرزانه کرانی^۲، محمد قربانی^۳، محمدرضا فرشچی^۴، طاهره منوچهرآبادی^۵

گزارش مورد

چکیده

مقدمه: هموگلوبینوپاتی‌ها، گروهی از اختلالات کیفی هموگلوبین هستند که در ایران بسیار شایع است. برخی از این موارد، علائم بالینی شدیدی داشته و برخی دیگر ندارند. هموگلوبینوپاتی‌های خاص در قومیت‌های مخصوصی دیده می‌شوند و می‌توانند منجر به تشخیص و یا تفسیر اشتباه به خاطر الگوی مشابه حرکت الکتروفورزی آن‌ها با دیگر واریان‌های هموگلوبین شوند.

گزارش مورد: در این مقاله، سه بیمار با هموگلوبینوپاتی‌های نادر آریا، هموگلوبین Q-Iran و Setif همراه با دو بیمار مبتلا به هموگلوبینوپاتی (Constant Spring) Cs که به آزمایشگاه رفرانس کرمانشاه مراجعه کرده‌اند، بررسی و بحث شده است. این هموگلوبینوپاتی‌ها ناشی از موتاسیون در زنجیره‌ی آلفا هموگلوبین می‌باشند و به علاوه هموگلوبینوپاتی آریا و Q-Iran، می‌توانند موجب تداخل در تفسیر سایر هموگلوبینوپاتی‌های حائز اهمیت بالینی گردند. هموگلوبین ستیف می‌تواند در الکتروفورز مشابه هموگلوبین S حرکت کرده و تست داسی شدن آن به صورت کاذب مثبت می‌باشد. در آخر هموگلوبین Cs با قرار گرفتن در کنار یک آلفا تالاسمی حذفی می‌تواند موجب بیماری شدیدتری نسبت به بیماری هموگلوبین H گردد.

نتیجه‌گیری: با توجه به این موارد گفته شده، ارزیابی دقیق این هموگلوبینوپاتی‌ها می‌تواند از مشکلات بعدی جلوگیری نماید.

واژگان کلیدی: هموگلوبینوپاتی‌ها؛ هموگلوبین آریا؛ هموگلوبین Q-Iran؛ هموگلوبین Setif؛ هموگلوبین Constant Spring

ارجاع: سلوکی امین، کرانی فرزانه، قربانی محمد، فرشچی محمدرضا، منوچهرآبادی طاهره. هموگلوبینوپاتی‌های نادر زنجیره‌ی آلفا در آزمایشگاه رفرانس کرمانشاه؛ گزارش چند مورد همراه با نکات تشخیصی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۴۰: ۶۹۸-۶۹۳ (۶۸۶): ۴۰: ۱۴۰۱

مقدمه

هموگلوبینوپاتی‌ها، دسته‌ی هتروژنی از اختلالات کیفی هستند که می‌توانند توسط موتاسیون‌ها در هر ژنی از ژن‌های زنجیره‌ی گلوبین آلفا و یا بتا ایجاد شوند. این اختلالات معمولاً ناشی از موتاسیون نقطه‌ای هستند که آمینو اسید اصلی را با آمینو اسید جدیدی جایگزین می‌کند و در نتیجه بار الکتریکی و حرکت الکتروفورزی نیز تغییر کرده و علائم بالینی احتمالی ظاهر می‌گردد. بسیاری از این موارد در حالت هتروزیگوت بدون علامت بوده در حالی که در فرم هموزیگوت بعضی از آن‌ها، مثل هموگلوبین S، علائم بالینی قابل توجهی وجود دارد (۱).

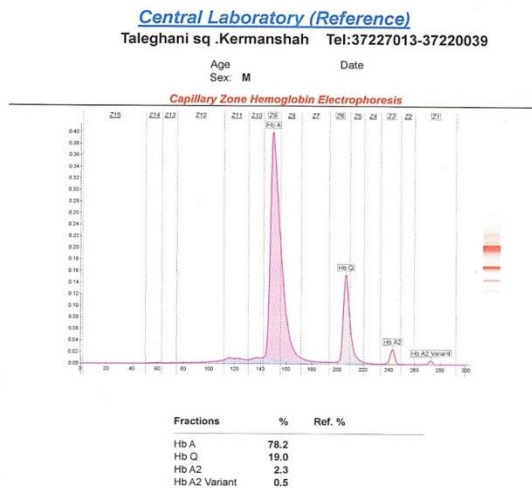
در این مطالعه چندین مورد از هموگلوبینوپاتی‌های آلفا شامل: هموگلوبین آریا، Q-Iran، Setif و Cs (Constant Spring) مورد بررسی قرار گرفته‌اند. این بیماران بر اساس پرونده‌ی آزمایشگاهی در آزمایشگاه رفرانس کرمانشاه انتخاب شده‌اند.

گزارش مورد

در این مطالعه، ۴ هموگلوبینوپاتی آلفای نادر به صورت جداگانه شرح داده شده است. این مطالعه دارای تأییدیه‌ی اخلاق با کد IR.GMU.REC.1401.012 می‌باشد. برای همگی بیماران، تست

- ۱- دکتری تخصصی، گروه خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۲- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران
- ۳- دکتری تخصصی، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران
- ۴- کارشناس آزمایشگاه، بخش خون‌شناسی و الکتروفورز، آزمایشگاه رفرانس کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
- ۵- دکتری تخصصی، گروه طب بازسازی و مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: طاهره منوچهرآبادی؛ دکتری تخصصی، گروه طب بازسازی و مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
Email: manoochehrabadit68@gmail.com



Reference: (Hb A= 96.5 - 98.5) (Hb A2= 1.6 - 3.5) (Hb F= 0 - 2)
Comments
Hb F less than 0.1% detected.

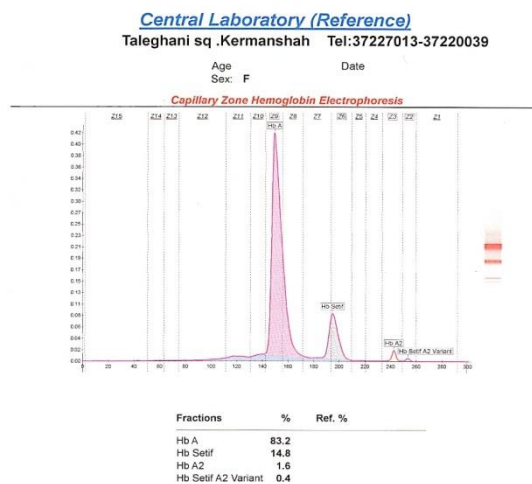
sebia

Signature.....

شکل ۲. نتایج الکتروفورز بیمار با Hb Q

Hb A:78.2, Hb Q: 19.0, Hb A2:2.3, Hb A2 variant:0.5

الکتروفورز، دال بر حضور هموگلوبین Setif به میزان ۱۴/۸ درصد بود. نتایج کامل این بیمار در شکل ۳ نشان داده شده است.



Reference: (Hb A= 96.5 - 98.5) (Hb A2= 1.6 - 3.5) (Hb F= 0 - 2)
Comments
Hb F less than 0.1% detected.

sebia

Signature.....

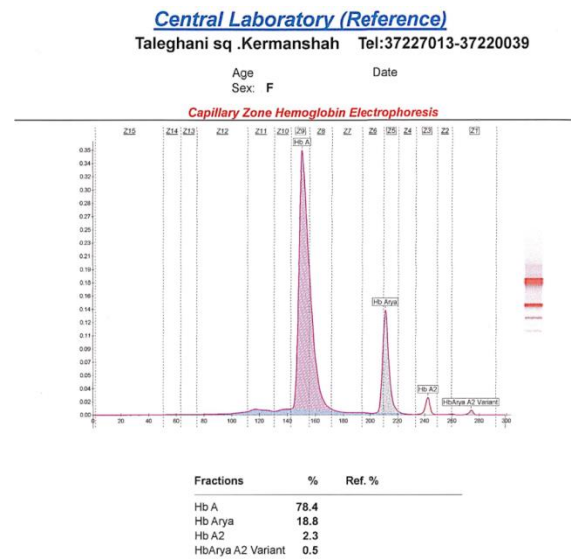
شکل ۳. نتایج الکتروفورز بیمار با هموگلوبین Setif

Hb A: 83.2%, Hb Setif: 14.8%, Hb A2: 1.6%, Hb Setif A2 variant: 0.4%

CBC توسط دستگاه Sysmex Kx21 و الکتروفورز با Capillary Zone Electrophoresis با دستگاه Sebia انجام شد. این بیماران برای آزمایش‌های غربالگری قبل از ازدواج و مطالعات فامیلی به آزمایشگاه ارجاع داده شدند.

الف) بیمار با هموگلوبین آریا: بیمار خانمی ۳۶ است که نتایج CBC و الکتروفورز وی به شرح زیر می‌باشد. شکل ۱ نتیجه الکتروفورز را نشان می‌دهد.

RBC: $4.49 \times 10^{12}/L$, HB:126 g/L, HCT:33.2%,
MCV: 83×10^{-15} L, MCH: 28.1×10^{-12} g, MCHC:339 g/L
Hb A:78.4, Hb A2:2.3, Hb Arya: 18.8, Hb Arya variant:0.5.



Reference: (Hb A= 96.5 - 98.5) (Hb A2= 1.6 - 3.5) (Hb F= 0 - 2)
Comments
Hb F less than 0.1% detected.

شکل ۱. نتایج الکتروفورز بیمار با هموگلوبین آریا و اندیس‌های RBC نرمال
Hb A:78.4, Hb A2:2.3, Hb Arya: 18.8, Hb Arya variant:0.5

ب) بیمار با هموگلوبین Q-Iran: بیمار آقای ۲۸ ساله است. نتایج CBC وی نرمال بوده و به شرح زیر می‌باشد:

RBC: $5.97 \times 10^{12}/L$, HB:161 g/L, HCT:49.2%,
MCV: 82×10^{-15} L, MCH: 26.7×10^{-12} g, MCHC:326 g/L.

برای بیمار، الکتروفورز انجام شد که هموگلوبین Q-Iran او ۱۹/۲ درصد بود. شکل ۲، نتیجه الکتروفورز این بیمار را نشان می‌دهد.

ج) بیمار با هموگلوبین Setif: بیمار خانمی ۳۳ ساله است که اندیس‌ها بیانگر آنمی میکروسیت هاپوکروم هستند. نتایج CBC وی به شرح زیر است:

RBC: $4.44 \times 10^{12}/L$, HB:101 g/L, HCT:31.6%,
MCV: 71×10^{-15} L, MCH: 22.7×10^{-12} g, MCHC:319 g/L

هموگلوبینوپاتی‌ها تأیید شده است (۲، ۳).

در این روش، جداسازی بر اساس pH الکترولیت و جریان الکترواسموتیک اتفاق می‌افتد و نسبت به کروماتوگرافی، جریان ثابتی داشته که موجب قله‌های باریک‌تر و رزولوشن بهتر می‌شود (۴). هموگلوبین واریانت A2 می‌تواند موجب پیک ضعیفی در S.Window در تکنیک کروماتوگرافی شود که همین موضوع نیز در مورد واریانت‌های آلفا صادق است که باید با تکنیک دیگر و یا روش‌های مولکولی تأیید شوند (۵).

یکی از سرخ‌های بسیار مهم افتراق حالت هتروزیگوت HbS از واریت‌های آلفای با حرکت مشابه، درصد Hb واریانت است. در صورت عدم همراهی تالاسمی مینور Hbs حدود نیمی از کل هموگلوبین ولی واریت آلفا اغلب ۱۵ تا ۳۰ درصد از Hb نام را تشکیل می‌دهد (با توجه به درگیری آلفا یا ۱ یا ۲) (۲، ۳، ۶).

تمام هموگلوبینوپاتی‌های فوق، به خاطر تفسیر بالینی‌شان و همچنین احتمال تفسیر اشتباه به دیگر هموگلوبینوپاتی‌ها، حائز اهمیت هستند و به صورت جداگانه شرح داده می‌شوند.

هموگلوبین آریا که در اثر جایگزینی در کدون ۴۷ زنجیره‌ی آلفا ۲ (جایگزینی اسپاریتک اسید (Asp) با اسپارژین (Asn)) ایجاد می‌شود برای اولین بار در یک خانم ایرانی تشخیص و توسط Rahbar و همکاران گزارش شد (۷).

د) بیمار با هموگلوبین Cs: برای این اختلال دو بیمار معرفی شده است:

۱- بیمار اول با هموگلوبین Cs

خانمی ۵۳ ساله است که پارامترهای RBC وی به شرح زیر است:

RBC: $4.76 \times 10^{12}/L$, HB: 121 g/L, HCT: 37.3%,
MCV: $78 \times 10^{-15} L$, MCH: $25.5 \times 10^{-12} g$, MCHC: 326 g/L

۲- بیمار دوم با هموگلوبین Cs

بیمار خانمی ۲۶ ساله که برای غربالگری ازدواج مراجعه کرده

است. نتایج CBC وی به شرح زیر می‌باشد:

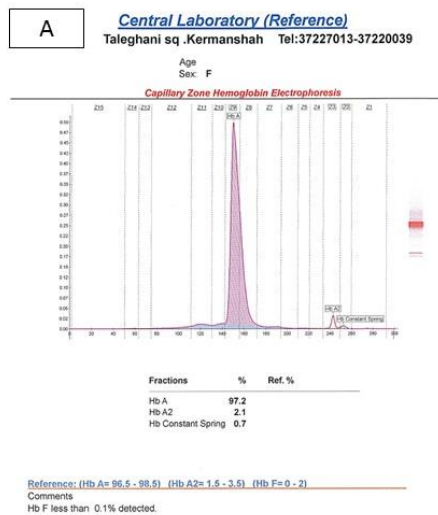
RBC: $5.96 \times 10^{12}/L$, HB: 132 g/L, HCT: 42.8%,
MCV: $72 \times 10^{-15} L$, MCH: $21.9 \times 10^{-12} g$, MCHC: 306 g/L

نتایج الکتروفورز بیمار اول در شکل A و بیمار دوم در شکل

B نمایش داده شده است.

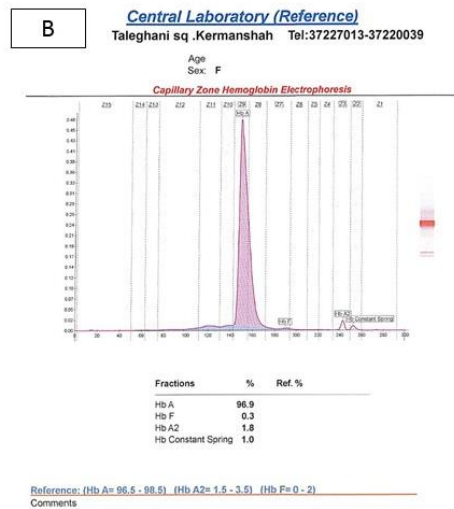
بحث

روش جداسازی واریانت‌های مختلف هموگلوبین، روش‌های الکتروفورز (قلیایی و اسیدی)، کروماتوگرافی (HPLC)، روش الکتروفورز کاپیلاری و روش‌های مولکولی می‌باشد. در این بین روش، الکتروفورز کاپیلاری از روش‌های بسیار دقیقی است که توسط FDA (Food and Drug Administration) برای تشخیص




sebia

Signature.....




sebia

Signature.....

شکل ۴. A: بیمار اول با هموگلوبین Cs

Hb A: 97.2%, Hb A2: 2.1%, Hb Cs: 0.7%.

B: بیمار دوم با هموگلوبین Cs

Hb A: 96.9%, Hb A2: 1.8%, Hb F: 0.3%, Hb Cs: 1.0

هموگلوبینوپاتی‌های هموزیگوت (مثل هموگلوبین S) ندارند و فنوتیپ آن‌ها شبیه افراد هتروزیگوت است (۱۳). در بیماران فوق، به خاطر هتروزیگوت بودن بیمار، دلیل آنمی وی احتمالاً فقر آهن و یا ترکیب با آلفا تالاسمی بوده است.

هموگلوبین Cs، یک اختلال غیر حذفی است که موتاسیون نقطه‌ای در کدون خاتمه‌ی ژن گلوبین آلفا ۲ رخ داده و منجر به یک زنجیره‌ی آلفای طولیل با ۳۱ آمینواسید اضافی شده است (۱۴). به خاطر کاهش چشمگیر پایداری mRNA، فنوتیپ بالینی مشابه تالاسمی است. افراد هتروزیگوت، فنوتیپ ناقل خاموش همراه با اندیس‌های نرمال و در حدود ۱ درصد Hb Cs دارند. در بیماران هموزیگوت نیز آنمی وجود دارد اما کاهش چشمگیری در میانگین حجم سلولی (MCV) دیده نمی‌شود. هموگلوبین Cs، بین باند کربونیک انهدراز و HbA2 حرکت می‌کند. این هموگلوبین، بسیار مستعد پروتولیز است و به صورت ۱ تا ۴ نوار ضعیف ظاهر می‌شود که کمی کندتر یا کمی سریع‌تر از HbA2 مهاجرت و در نتیجه به راحتی نادیده گرفته می‌شود (۱۴). این موضوع دلیل مهمی برای بیماری هموگلوبین H می‌باشد که هتروزیگوتی از Hb Cs همراه با حذف دوتایی ژن آلفا ($\alpha\alpha$) می‌باشد و ممکن است بیماری شدیدتری را نسبت به هموگلوبین H (حذف سه ژن آلفا) ایجاد کند. به خاطر مقادیر کم HbCs، تشخیص آن در حالت هتروزیگوت در وضعیت هتروزیگوت مشکل است (۶).

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعه‌ی حاضر، شیوع هموگلوبینوپاتی‌های آلفا و بتا به خاطر اجرای برنامه‌ی غربالگری پیش از ازدواج رو به کاهش است. بنابراین توصیه می‌شود که موفقیت این برنامه با مطالعات گسترده‌ی آماری ارزیابی شود و دلایل احتمالی عدم موفقیت آن مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه بابت همکاری در دسترسی به پرونده بیماران و دانشگاه علوم پزشکی گناباد جهت بررسی موارد تشکر و قدردانی می‌گردد.

این واریانت ساختاری، با علائم بالینی خاصی همراه نیست و علائم و نشانه‌های احتمالی، بخاطر مشکلات دیگر هستند (۸). این هموگلوبین دقیقاً مشابه هموگلوبین S در الکتروفورز در pH قلیایی حرکت می‌کند و بنابراین باید به دقت پایش شود تا از تفسیر اشتباه اجتناب گردد (۹). پایداری آن در دمای 50°C نرمال است اما در دمای 55°C ناپایدار می‌گردد (۷، ۸).

هموگلوبین Q-Iran واریانتی نادر است که در نتیجه‌ی جایگزینی Asp → His در کدون ۷۵ ژن آلفا ایجاد می‌شود (۱۰، ۱۱). اولین گزارش هموگلوبین Q-Iran در سال ۲۰۱۱ منتشر گردید که در یک آقای ۲۲ ساله‌ی مازندرانی و مادرش تشخیص داده شد. در این گزارش، هموگلوبین Q-Iran، ۱۹/۲ درصد بود (۱۰، ۱۱). این اختلالات شامل Hb Q-India و Hb Q-thailand، Hb Q-Iran می‌باشند که هر سه، واریانت‌هایی با سرعت حرکت آهسته هستند و در جایگاه هموگلوبین S در pH قلیایی قرار می‌گیرند و حلالیت آن‌ها نرمال است. جایگزینی Asp با هیستیدین تعاملات پروتئینی را تغییر داده و موجب تغییر در پارامترهای هماتولوژیک نمی‌شود (۱۲).

هموگلوبین Setif که با جایگزینی Asp → Tyr در کدون ۹۴ رخ می‌دهد منجر به اختلال در اندیس‌های هماتولوژیک در افراد ناقل نمی‌شود. حرکت الکتروستاتیک در pH قلیایی مشابه هموگلوبین S می‌باشد (۶). همچنین حلالیت کمتری از هموگلوبین A دارد و در نتیجه موجب سیکل شدن اریتروسیت‌های به صورت کاذب در محیط برون تن می‌گردد (۱۳).

در یک مطالعه که اهمیت موارد هموزیگوت هموگلوبین Setif را بررسی کرده است، Asp کدون ۹۴ زنجیره‌ی آلفا در تشکیل دنوکسی هموگلوبین و اکسی هموگلوبین دخالت دارد. در این ساختار یک باند هیدروژنی با Asp (G4) β 102 ساختار اکسی هموگلوبین را پایدار می‌سازد. تغییر در این، منجر به کاهش افینیتی به اکسیژن می‌گردد (۱۳). اکثر موارد هموگلوبین Setif هتروژن هستند و مقادیر MCV (Mean corpuscular volume) و MCH (Mean corpuscular hemoglobin) نرمالی دارند (۱).

در یک مطالعه در سال ۲۰۱۶، هموزیگوت بودن بررسی و نشان داده شد که افراد هموزیگوت، هموگلوبین Setif مبتلا به آنمی دائمی میکروسیت هاپوکروم هستند اما علائم بالینی شدیدتری از سایر

References

- Nasiri A, Rahimi Z, Vaisi-Raygani A. Hemoglobinopathies in Iran: an updated review. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2020; 14(2): 140-50.
- Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, Ou CN, Bak R. Comparison of Sebia Capillary capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *Am J Clin Pathol* 2008; 130(5): 824-31.
- Rasouli Ghahfarokhi SM, Asadi F, Obeidi N. Use of capillary electrophoresis for detection of hemoglobinopathies in individuals referred to health

- centers in Masjed-Soleiman. *IJBC* 2017; 9(3): 89-92.
4. Barrett AN, Saminathan R, Choolani M. Thalassaemia screening and confirmation of carriers in parents. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2017; 39: 27-40.
 5. Nusrat M, Moiz B, Nasir A, Rasool Hashmi M. An insight into the suspected HbA2 cases detected by high performance liquid chromatography in Pakistan. *BMC Res Notes* 2011; 4(1): 103.
 6. Rahimi Z. Genetic epidemiology, hematological and clinical features of hemoglobinopathies in Iran. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 803487.
 7. Rahbar S, Mahdavi N, Nowzari G, Mostafavi I. Haemoglobin Arya: alpha 2-47 (CD5), aspartic acid yields asparagine. *Biochim Biophys Acta* 1975; 386(2): 525-9.
 8. Rahimi Z, Najafi S, Moghohchie L, Amiri E, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z. The prevalence of hemoglobinopathies in reference laboratory of Kermanshah, Western Iran. *Iran J Public Health* 2019; 48(2): 359-61.
 9. Mohd Sahid ENMS, Esa EE, Yasin NY, Su Yee KSY, Zakaria Z. A rare hemoglobin variant, Hb Arya in a Malay woman. *Asian J Med Biomed* 2018; (Suppl 2).
 10. Özdağ H, Yıldız I, Akar N. First observation of homozygote Hb Q-Iran (alpha 75 (EF4) Asp-His). *Turk J Haematol* 2008; 25(1): 48-50.
 11. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ* 2001; 79(8): 704-12.
 12. Rahimi Z, Akramipour R, Vaisi-Raygani A, Nagel RL, Muniz A. An Iranian child with HbQ-Iran [alpha75 (EF4) Asp-->His]/-alpha3.7 kb/IVSII.1 G-->A: first report. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007; 29(9): 649-51.
 13. Farashi S, Garous NF, Vakili S, Ashki M, Imanian H, Azarkeivan A, et al. Characterization of homozygous Hb Setif (HBA2: c. 283G> T) in the Iranian population. *Hemoglobin* 2016; 40(1): 53-5.
 14. Harteveld CL, Traeger-Synodinos J, Ragusa A, Fichera M, Kanavakis E, Kattamis C, et al. Different geographic origins of Hb Constant Spring [alpha (2) codon 142 TAA-->CAA]. *Haematologica* 2001; 86(1): 36-8.

Rare Alpha hemoglobinopathies in Kermanshah Reference Laboratory; Report of Cases Along with Diagnostic Tips

Amin Solouki¹, Farzaneh Korani², Mohammad Ghorbani³,
Mohammadreza Farshchi⁴, Tahereh Manoochehrabadi⁵

Case Report

Abstract

Background: Hemoglobinopathies are a group of qualitative hemoglobin disorders which also happen to be very common in Iran. Some of these cases have severe clinical symptoms and others have none. Specific hemoglobinopathies are seen in certain ethnicities and can also lead to misdiagnosis and misinterpretation by similar electrophoretic motion to other hemoglobin variants.

Case Report: In this article, three patients with rare hemoglobinopathies named Hb Arya, Hb Q-Iran, Setif and two cases of Hb Constant Spring who were referred to Kermanshah Reference Laboratory have been studied and discussed. These hemoglobinopathies are caused by mutations in the alpha chain of hemoglobin, and in addition, Arya and Q-Iran hemoglobinopathies can interfere with the interpretation of other clinically significant hemoglobinopathies. Hemoglobin Setif can move on electrophoresis similar to hemoglobin S, and its sickling test is a false positive. Finally, hemoglobin Cs could cause more severe hemoglobin H disease if it combines with deletional alpha thalassemia.

Conclusion: Therefore, accurate evaluation of these hemoglobinopathies can prevent further problems.

Keywords: Hemoglobinopathies; Hemoglobin Arya; Hemoglobin Q Iran; Hemoglobin Setif; Hemoglobin Constant Spring

Citation: Solouki A, Korani F, Ghorbani M, Farshchi M, Manoochehrabadi T. **Rare Alpha hemoglobinopathies in Kermanshah Reference Laboratory; Report of Cases Along with Diagnostic Tips.** J Isfahan Med Sch 2022; 40(686): 693-8.

1- PhD, Department of Hematology and Blood Bank, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- MSc, Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

3- PhD, Department of Pathology, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

4- BSc, Department of Hematology and Electrophoresis, Kermanshah Reference Laboratory, Kermanshah, Iran

5- PhD, Department of Tissue Engineering, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Tahereh Manoochehrabadi, PhD, Department of Tissue Engineering, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran; Email: manoochehrabadit68@gmail.com