

هموگلوبینوپاتی ها و روشهای تشخیص ازمایشگاهی انها

نام مدرس: دکتر مهین بهزادی فرد
دکتری خونشناسی ازمایشگاهی و بانک خون
بهمن 1401

هموگلوبینوپاتی ها

تعریف

انواع

- کمی: کاهش ساخت زنجیره های گلوبین (تالاسمی ها)

- کیفی: اختلالات عملکردی، ساختاری (ناپایداری و رسوب در

سلولهای قرمز و تخریب آنها، تغییر مرفولوژی سلولهای

قرمز) علایم و عوارض بالینی از جمله بزرگی کبد و

طحال، ترمبوز، چسبندگی به جدار عروق، رتینوپاتی، نفروپاتیو....

C ، S ، D ، لیپور ، ستیف ، J ، Q ، CS

اختلالات هموگلوبین

طبق آمار های سازمان بهداشت

جهانی حداقل 5/2% جمعیت جهان ناقل بیماری Hb هستند

فراوانی هموگلوبینوپاتی ها با منطقه جغرافیایی و گروه های

نژادی متفاوت است

در ایران نیز با توجه به تنوع وسیع نژادی و موقعیت های جغرافیایی شمال و جنوب، دارای انواع مختلفی از هموگلوبین ها است.

نزدیک 5% جمعیت ایران ناقل ژن تالاسمی و 0/5 تا 1% ناقل ژن های غیر طبیعی دیگری از جمله G، S، D و E هستند



تالاسمی

شایعترین بیماری ژنتیک میباشد

این بیماری از حالت کاملاً بدون علامت تا وضعیتی بسیار شدید بروز می کند.

ژن معیوب به صورت مغلوب و غیروابسته به جنس از نسلی به نسل دیگر منتقل میشود..

تالاسمی از دو واژه **Thalassa** به معنی دریا و **hemia** به معنی خون است

ارتباط تالاسمی و مالاریا؟؟؟؟



کمر بند تالاسمی در جهان

✓ تالاسمی در تمام جهان و در میان همه نژادها وجود دارد.
✓ شیوع تالاسمی ، در مناطق زیر از جهان بیشتر است:

اطراف مدیترانه (یونان، قبرس و ایتالیا)
خاور میانه (ایران ، ترکیه و سوریه)
آسیا (هندوستان ، پاکستان و ناحیه جنوب شرقی)

پراکندگی تالاسمی در ایران

پراکندگی ژن بیماری در مناطق مختلف کشور یکسان نیست ، در حاشیه دریای خزر (شمال کشور) و سواحل خلیج فارس و دریای عمان (جنوب کشور) شایع تر است.

میزان شیوع تالاسمی مینور در استان های گیلان ، مازندران ، خوزستان ، بوشهر ، هرمزگان ، سیستان بلوچستان و کرمان حدود 10%

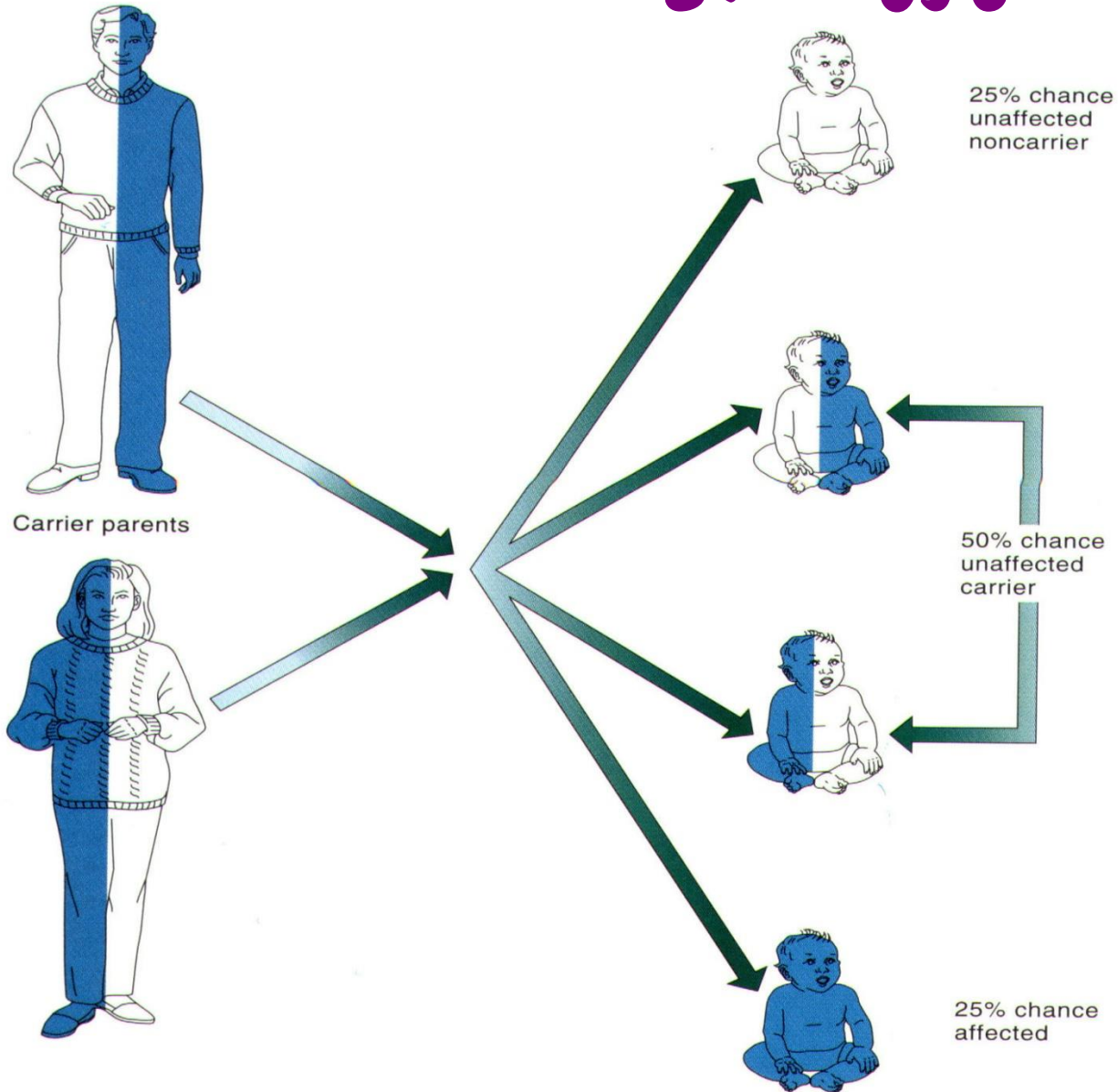
مازندران خوزستان و هرمزگان مقام های اول تا 3 را دارند

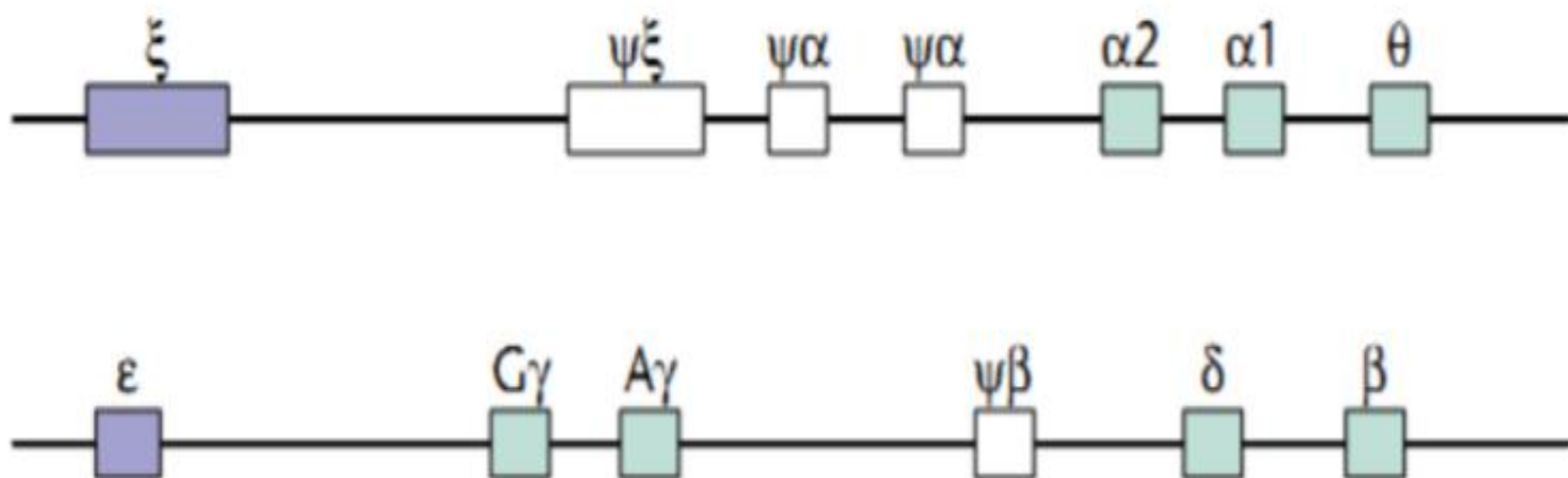
شیوع در بقیه نقاط کشور 4 - 8 %

همدان کمترین امار را دارد

دلیل شیوع بالایی بیماری در ایران در بعضی از اقوام ازدواج های درون گروهی و فامیلی است.

الگوی انتقال ژن تالاسمی





شکل ۱. نمایی از ژن های α گلوبین و β گلوبین

جدول ۱. انواع مولکول های هموگلوبین

نوع هموگلوبین	فرمول	ملاحظات
هموگلوبین بالغین (Hb A)	$\alpha_2\beta_2$	هموگلوبین غالب بالغین (بیش از ۹۵٪)
هموگلوبین A2 (Hb A2)	$\alpha_2\delta_2$	هموگلوبین ناچیز بالغین (کمتر از ۳٪)، افزایش در موارد β -تالاسمی ها
هموگلوبین جنینی (Hb F)	$\alpha_2\gamma_2$	هموگلوبین جنینی اصلی، افزایش در برخی β -تالاسمی ها
هموگلوبین پورتلند (بارداری)	$\xi_2\gamma_2$	هموگلوبین رویانی (تولید در طی ماه های دوم و سوم بارداری)
هموگلوبین گاور I (بارداری)	$\xi_2\varepsilon_2$	هموگلوبین رویانی (تولید در طی ماه های دوم و سوم بارداری)
هموگلوبین گاور II (بارداری)	$\alpha_2\varepsilon_2$	هموگلوبین رویانی (تولید در طی ماه های دوم و سوم بارداری)

ژنتیک تالاسمی

- فرم هتروزیگوت یا صفت تالاسمی یا تالاسمی مینور یا ناقل تالاسمی گفته می شود
- الفا تالاسمی ناقل تالاسمی به علت حذف بخش های از ژن الفارخ میدهد
- بتا تالاسمی به علت جهش نقطه ای در ژنهای بتا است BO یهنی ژن بتا بدون محصول بتا مثبت یعنی 5-30% ژن نرمال تولید دارد
- BO/BO یا $B+/B+$ ، بیمار تالاسمی ماژور
- فرم هتروزیگوت بتا تالاسمی یا صفت تالاسمی یا ناقل صفت تالاسمی (تالاسمی مینور) BO/B یا $B+/B$ خوانده می شود.

اشکال بالینی تالاسمی B

1- تالاسمی ماژور

✓ شدیدترین فرم تالاسمی بتا بوده و با کم خونی شدید و تغییرات استخوانی وسیع بویژه در صورت همراه می باشد.

✓ Fesus body (تترامرهای زنجیره الفا)

✓ در صورت عدم درمان ، به دلیل رسوب آهن در اعضای حیاتی بدن ، نارسایی قلبی و کبدی زودرس ، اختلالات غدد داخلی بویژه دیابت و .. سبب مرگ زود هنگام بیماران خواهد شد.

✓ تزریق مستمر و دائمی خون (هر 20 روز یکبار) و مصرف داروهای دافع آهن ، مهمترین درمان این بیماری است.

✓ در برخی موارد ، پیوند مغز استخوان به درمان دائم این بیماری منجر گردیده است.

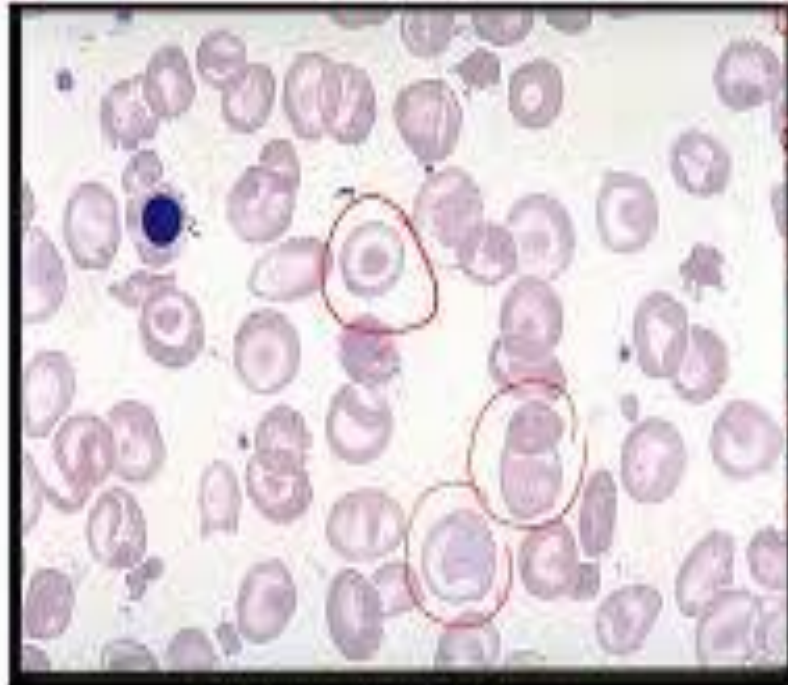
2- تالاسمی بتا اینترمدیا

✓ فرم خفیف بیماری بتا تالاسمی بوده و با کم خونی خفیف تا متوسط و تغییرات استخوانی خفیف همراه است.

✓ تزریق خون گاه گاه (حداکثر چند بار در سال) و مصرف داروهای دافع آهن مهمترین درمان این بیماران است.

بتا تالاسمی ماژور

β -THALASSAEMIAS MAJOR PBS



- 1) Hypochromia
- 2) Target
- 3) Anisocytosis
- 4) Poikilocytes
- 5) Eosinophils
- 6) Lymphocytes

اشکال الفا تالاسمی

نکته: 1 در یک فرد نرمال زئوتیپ الفا $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ است یعنی فرد 4 زن الفا دارد که دوتا را از یک والد و دو تا دیگر را از والد دیگر می گیرد

1- هموگلوبین بارت ($Hb\ \gamma_4$) (Bart Hb) زئوتیپ --/--

✓ شدید ترین شکل بالینی الفا تالاسمی بوده و در آن فقدان کامل زنجیره α وجود دارد.

✓ هیدروپس فتالیس (ادم و آسیت شدید جنین همراه با هیدروسفالی) و متعاقب آن مرگ در اواخر دوره جنینی یا بدو تولد ، مهمترین علائم بالینی این بیماری است.

2- هموگلوبین H

✓ به علت فقدان سه آل از چهار آل کد کننده زنجیره α رخ می دهد. $\alpha\alpha\gamma\gamma$ --/

✓ کم خونی خفیف تا متوسط همراه با تغییرات استخوانی خفیف از علائم مهم این بیماری است.

✓ تزریق گاه گاه خون در حملات شدید آنمی و مصرف داروهای دافع آهن ، مهمترین درمان این بیماری است.

✓ رنگ امیزی با نیومتیلن بلو و مشاهده گلف بادی

3- الفا تالاسمی مینور یا صفت تالاسمی مینور یا هتروزیگوت الفا $\alpha\alpha$ or $\alpha\alpha$ --/

4- الفا تالاسمی مینیمال $\alpha\alpha$ -/ α

نکات مهم

صرفاً با یک تست آزمایشگاهی نمیتوان ادعای هموگلوبینوپاتی کرد و باید از یک روش تاییدی بهره برد و اطلاعات بالینی-نژاد بیمار-والدین بیمار cbc بررسی مرفولوژی خون محیطی و سابقه فامیلی بیمار مهم است

نمونه خون خون وریدی EDTA و یا خون مویرگی نوزاد خون بند ناف

نمونه ها در یخچال و ظرف 1 هفته بررسی شوند

نگهداری طولانی تغییر ماهیت هموگلوبین خطا در الکتروفورزباند ها کمرنگ و از وضوح انها کم می شود

ولی همولیزات را در ازت برای سالها می توان نگه داشت

-تست های شمارش رتیک هموگلوبین ناپایدار و HbH (گلف بادی) انکوباسیون ۳۰-۴۵ نمونه خون با نیومتیلن بلو و مشاهده گلفت بادی

بررسی لام خون محیطی و پلی کرومازیا ، نتیجه Rpi

تست‌های اصلی تشخیصی هموگلوبینوپاتی‌ها

الکتروفورزیس قلیایی روی استات سلولز 8.6

-الکتروفورزیس اسیدی روی سیترات اگار 6-6.2

-کروماتوگرافی میکروستون با دی اتیل امینواتیل سلولز

DEAE جهت HbA2

-تست ترسیب شیمیایی کلایهاور بتکه و تست جونگیس برای

HbF

IEF

-الکتروفورز زنجیره گلوبین

انالیز میزان ساخت زنجیره های گلوبین نسبت الفا به بتا

اسپکتروفتومتری جرمی

انالیز توالی DNA با **PCR, ARMS, GAP-PCR, PCR-RFLP**

تست های فرعی

-تست داسی

تست ناپایداری هموگلوبین،OFT،IDAT،DAT

رنگ حیاتی برای گلف بادی هاینز بادی و میزات رتیک

تست CBC (HB,HCT,MCV,MCH,MCHC,CHCM,RDW-cv,sd

بررسی مرفولوژی مانند تارگت،بایت،کریستالهای HB،
انیزوپویکیلو،هاول ژولی،کابوت رینگ

تست ABG,P50

تست های SIRON,T-SAT

مجموعه فرمولهای محاسباتی برای تفکیک تالاسمی از IDAمانند
کرمین،گرینگ-کینگ،منتزرن،شین-لال،سریواستا،DF،MCHDو....

نکات مهم در تست الکتروفورز HB

-شستشوی خون سه بار و تهیه غلظت 10 گرم از پکسل

بعد تهیه همولیزانت و اضافه کردن حلالهایی مانند تتراکلرورکربن و تولوین موجب حل شدن غشاها شده سپس سانتریفیوژ کردن نمونه و رسوب لاشه های سلولی رخ می دهد

-برای تهیه همولیزات اگر از خون کامل استفاده می شود پاراپروتیین ها و ایمنوگلوبولین ها می تواند باعث تولید باند اضافه و تداخل در تفسیر شود

IEF دقیق تر از الکتروفورز استات سلولز باند ها را جدا می کند برخی از واریانتهای D,G مانند G فیلادلفیا و D پنجاب یا لسانجلس را از S جدا می کند که روی استات سلولز جدا نمی شود در این روش A1C M-HB نیز جدا می شوند

اندازه گیری باندها روی استات سلولز یا با دانسیتومتری یا برش باند و تعیین مقدار هموگلوبین با روش سیان متهموگلوبین قابل انجام است

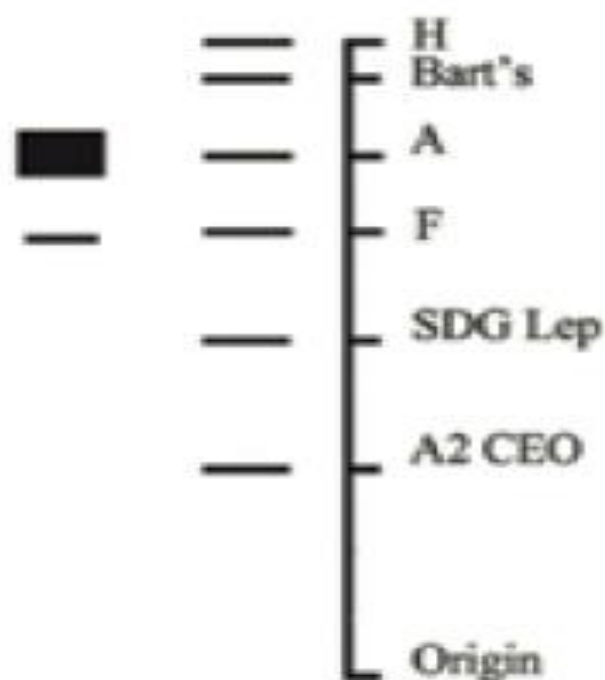
نکات مهم در تست الکتروفورز HB

گرفتن باندهای شارپ و بدون همپوشانی به قدرت یونی و پ اچ بافر، ولتاژ و امپر برق، غلظت هموگلوبین (بهترین حالت ست هموگلوبین روی 10 است) برای جلوگیری از تولید باندهای ضعیف و مقدار بالای آن موجب همپوشانی باندها می شود خالص بودن HB اندازه شکل و بار الکتریکی نوع هموگلوبین میزان تخلخل ژل یا بستر الکتروفورز نوع الکتروفورز (افقی یا عمودی) سرعت الکتروفورز بستگی دارد

اندازه شکل و بار PH ایزوالکتریک و MW هموگلوبین نیز به نوع هموگلوبین میزان گلیکوزیلاسیون و استیلاسیون آن و مقدار اسید آمینه های قطبی و باردار موجود در آن میزان مت هموگلوبینو واریانت های مختلف بستگی دارد

Alkaline electrophoresis (pH 8.4)

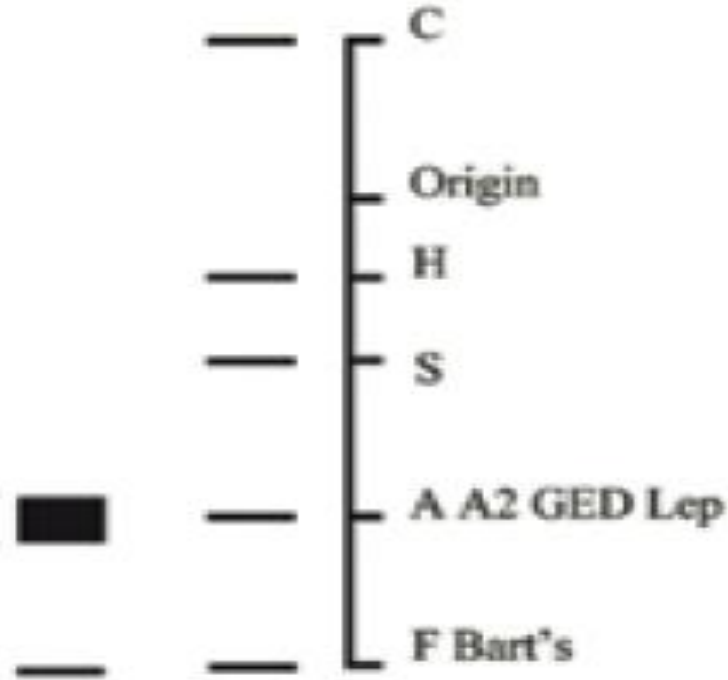
+



Normal Abnormal

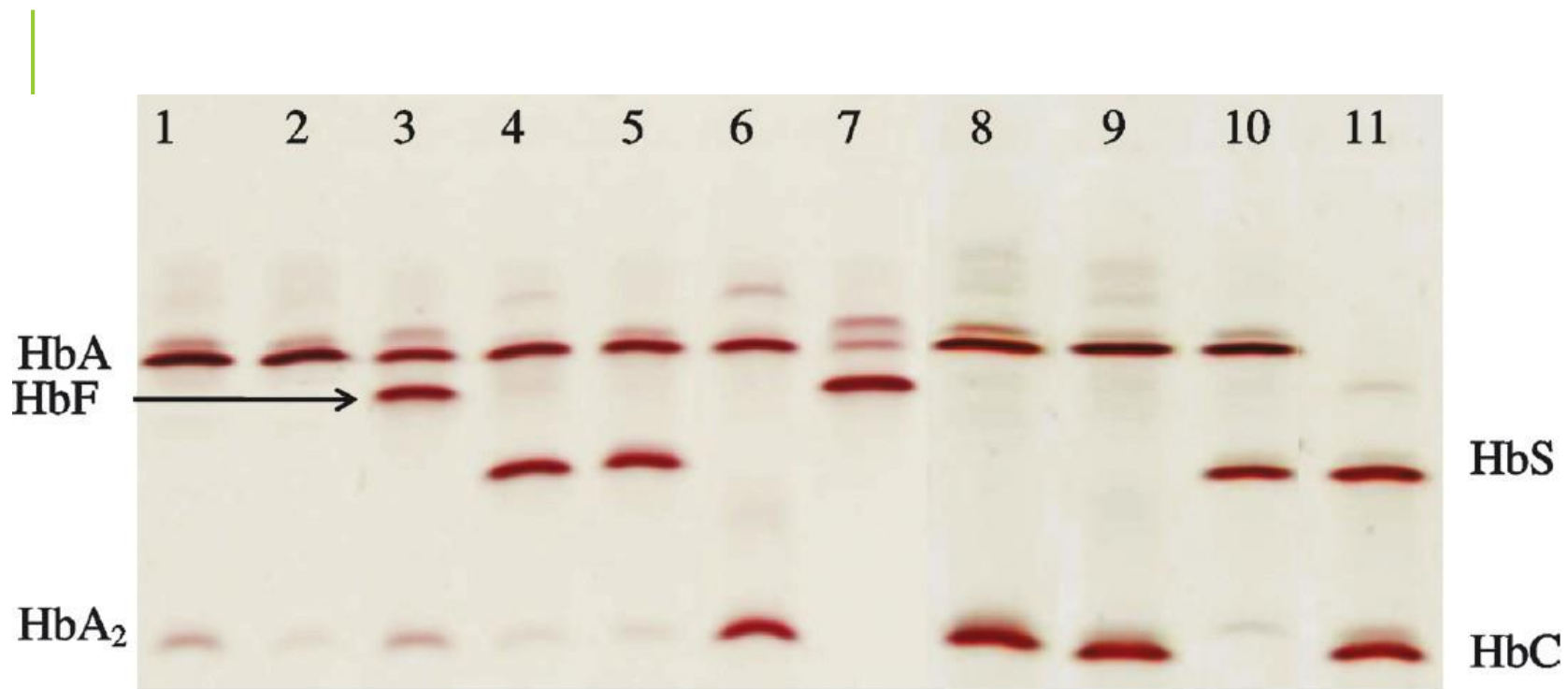
Acid electrophoresis (pH 6.2)

+



Normal Abnormal

جایگاه‌های قرار هموگلوبین‌های مختلف در PH
قلیایی و اسیدی



تست‌های تکمیلی تالاسمی ها

سنتز زنجیره های گلوبین و آنالیز DNA، آزمایش های تکمیلی در زمینه تشخیص تالاسمی می باشند. در حال حاضر آنالیز DNA به عنوان معتبرترین آزمایش تشخیص بیماری های ژنتیکی از جمله تالاسمی محسوب می شود.

اما با توجه به پیچیدگی این بیماری هتروژن، که می تواند مربوط به وجود موتاسیون های ناشناخته و یا وجود موتاسیون در نقاط تنظیمی دوردست ژن باشد، سنتز زنجیره های گلوبین جایگاه خاصی در زمینه تشخیص افتراقی انواع تالاسمی حفظ کرده است.

نرمال الفا به بتا 1 به 1 است در الفا تالاسمی کاهش و در بتا تالاسمی افزایش دارد

✓ هر گونه میکروسیت و هایپوکروم مقاوم به درمان آهن را بایستی جهت سندرم‌های تالاسمی مینور و یا هموگلوبینوپاتی‌های دیگر مورد آزمایش قرار داد. کمبود

آهن مقدار HbA_2 آن دسته از تالاسمی‌های مینور بتا را که با افزایش ملایم HbA_2 همراه بوده است در طیف طبیعی قرار می‌دهد. گستره خون محیطی در سندرم‌های تالاسمی مینور زمینه شلوغ گلبول‌های قرمز میکروسیتیک هایپوکروم همراه با مقداری تارگت سل و انکلوزیون بازوفیلیک استیپلینگ را نشان می‌دهد (۲).

تمایز فقر آهن و تالاسمی مینور

$$MCV < 80 \text{ fl}, MCH < 27 \text{ pg}$$

مرز MCV در فقر آهن و تالاسمی

-بیشتر مطالعات < 72 را برای تالاسمی ارزشمند می دانند

سندروم های تالاسمی

✓-بعضی موارد بتا مینور با پارامترهای هماتولوژیک نرمال و افزایش A2 همراهند (مانند الفا تالاسمی مینور و بتا تالاسمی مینور)

افزایش A2 در صورت عدم تالاسمی

✓-در پرکاری تیروئید،هموگلوبین های ناپایدار،کم خونی های دیس اریتروپوئیتیک، کم خونی مگالوبلاستیک، بیماری ویلسون،مصرف داروهای ضدویروسی

همراهی تالاسمی و انمی مگالوبلاستیک یا بیماری کبدی با نرمال شدن پارامترهای هماتولوژیک همراه است

یک نکته مهم

نرمال بودن A2 رد کننده بتا تالاسمی مینور نیست

-همراهی با دلتا تالاسمی (دلتا+ یا دلتا صفر)

-در دلتا بتا، گاما دلتا بتا تالاسمی ها و هتروزیگوت لیپور و الفا تالاسمی های A2 کاهش می یابد

-A2 کمتر از 2% به شرط عدم فقر آهن مطرح کننده الفا مینور است

تست H بادی در بیماری HBH مثبت و در الفا مینور ممکن است مثبت شود

نکته مهم

به علت وارانتهای الفا و دلتا می تواند هموگلوبین A2 دو قسمتی ایجاد کند

-مثال هموگلوبین G و اریا (وارانتهای الفا) با دلتا نرمال
HbB2(HbA2'-(یک ژن دلتا سالم و یک دلتا جهش یافته) دو
نوع A2

A2 در بتا مینور بین 3.5% تا 7% است

A2 بیش از 8 تا 9 درصد در حذف پروموتورهای
بتا دیده می شود که با افزایش F همراه است

افزایش بیش از 7% A2 ممکن است مطرح کننده
دیگر هموگلوبینوپاتی ها مانند S یا هموگلوبینهای
همشارژ A2 باشد

اندکسهای تالاسمی و باند ناحیه S
کمتر از 15% با ازمون حلالیت
منفی و HbF بین 1-3% مطرح
کننده هموگلوبین لیور است

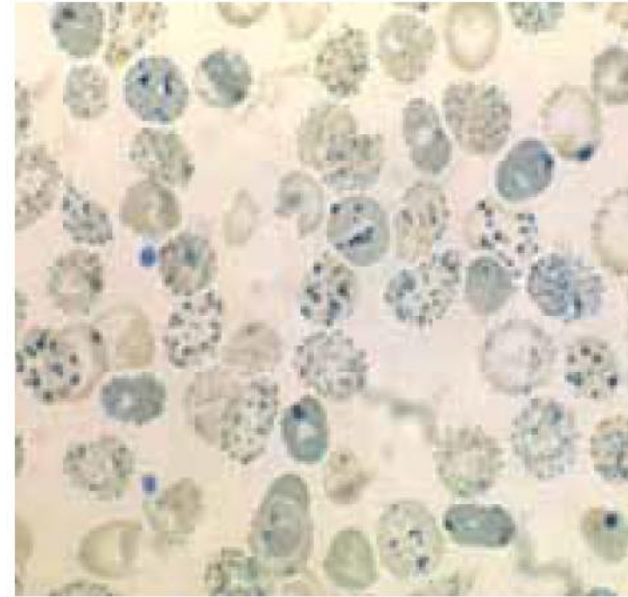
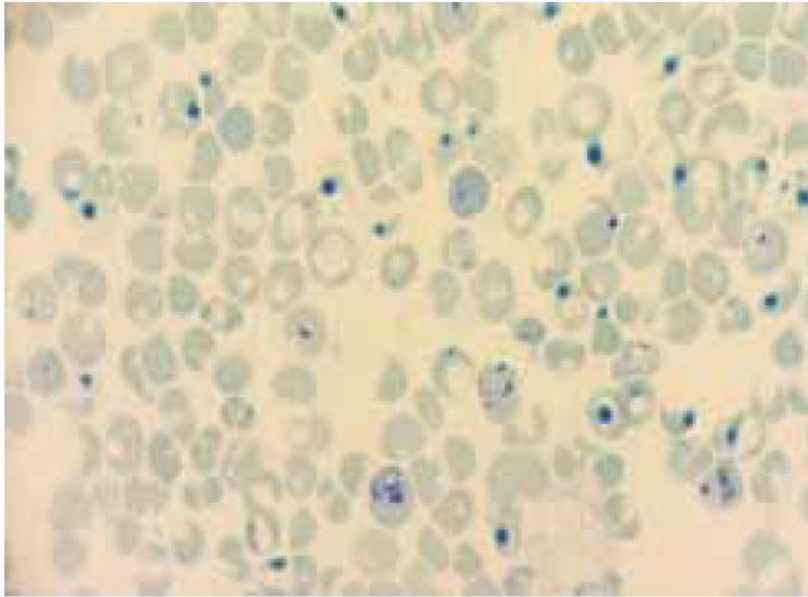
اندکسهای تالاسمی و 20%-5 F با
مقدار نرمال یا کاهش یافته
A2 مطرح کننده دلتا بتا تالاسمی
است

A2 کمتر از 2% با پارامترهای تالاسمی میتواند مطرح کننده
HBH باشد (رنگ امزی نیومتیلن بلو) - همولیزات تازه
باشد؟؟؟؟؟

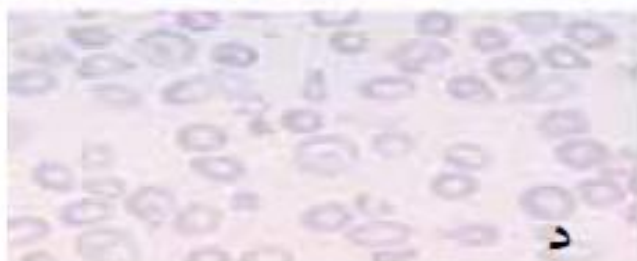
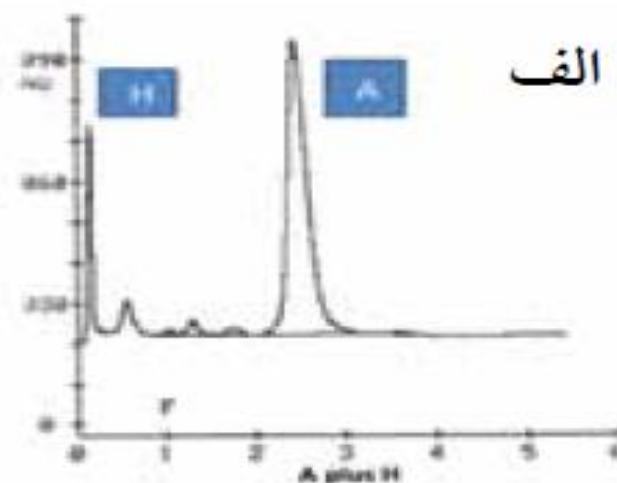
سانتریفیوژ نمونه برداشت از لایه رتیک و رنگ امیزی
زنجیره های بتا 4 در رتیک هنوز هضم نشده و شناسایی می
شوند

تترامر بتا 4 (HbH) با زنجیره های نرمال تولید می شود BS
نمیتواند بتا 4 تولید کند

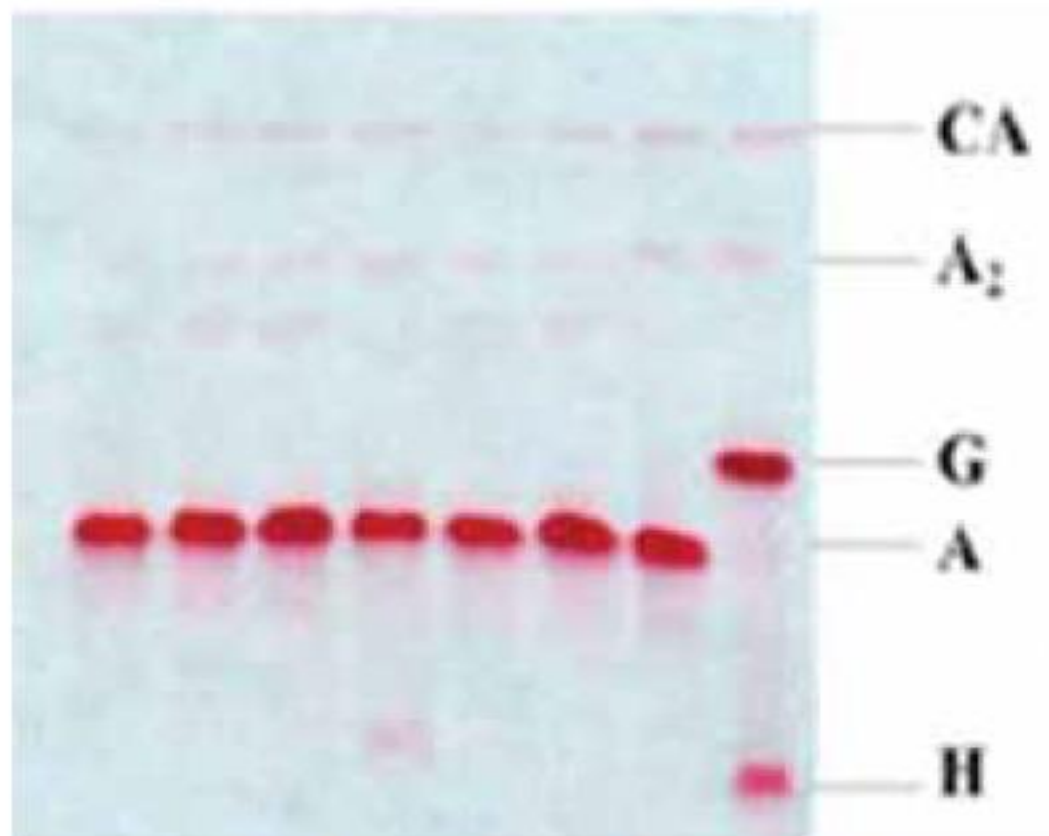
همراهی هموگلوبین H و بتا تالاسمی مینور به علت محدود
شدن زنجیره های بتا ممکن است H دیده نشود الگوی
الکتروفورز AA2 است و کم خونی شدید



در رنگ آمیزی حیاتی به صورت نقطه H اجسام
نقطه ای قبل از برداشتن طحال (سمت راست) و به
صورت جسم هاینز بزرگ (سمت چپ) بعد از بیرون
آوردن طحال



شاخص‌های مختلف هموگلوبین H در الکتروفورز با HPLC (الف)، استات سلولز (ب) و مرفولوژی اجسام H (ج) و نیز نمای گستره محیطی (د)



الگوی هموگلوبین های G/H

هموگلوبین بارت (Hb Bart)

الفا تالاسمی تا 6 ماهگی

در بزرگسالان در بیماری هموگلوبین H
هموزیگوت کانستنت اسپرینگ و
همراهی HbH و HPFH دیده می شود

سوار شدن سیکل روی بتا مینور
(B+) هموگلوبین S10% و افزایش A2
می دهد که باید از لیور تشخیص داده
شود؟؟؟؟

بیماری کبدی، کم خونی مگالوبلاستیک میتواند
اندکسهای تالاسمی را نرمال کند

قند بالای 400 هیپرناترمی اورمی

بیماری HBH به پلاکت ممکن است در حد میلیون
گزارش شود؟؟؟؟

همراهی حالت‌های سه تایی یا 4 تایی
الفا با بتا مینور

حالتی شبیه تالاسمی اینترمدیا ایجاد می کند
در این حالت ظرفیت انزیمی سلولها برای
هضم الفاهای اضافی کافی نیست

تالاسمی با وجود ژنهای گلوبین سالم

GATA1

ATXR

نکات دیگر

در بارداری فرد سالم بدون کم خونی MCV تا 4 و در مینور تا 2 FL افزایش دارد نگهداری خون در RT بعد MCV H24 را 6 واحد بالا می برد

در صورت ازدواج فرد مینور الفاسیس با فرد سالم امکان تولد فرزند HBH وجود دارد؟؟؟

تالاسمی اینترمدیا یا HBH معمولاً بعد متولد شدن نوزاد گویای تالاسمی خاموش در والدین است

فرمولهای محاسبه ای افتراق فقر آهن

و تالاسمی
RBC بیش از 5.5 و RDW نرمال در تالاسمی

سه فرمول معروف تمایز فقر آهن و تالاسمی

DF=MCV-RBC-5×3.4 (کمتر صفر مینور بالای صفر فقر آهن

GREEN AND KING=MCV² × RDW: 100 × HB

کمتر از 65 تالاسمی و بیش از آن فقر آهن

MENTZNER INDEX=MCV:RBC

کمتر از 12 تالاسمی بیش از 12 فقر آهن

در صورتی که طرف ازدواج مینور و طرف دوم سالم است باید الکتروفورز HB انجام شود زیرا ناقل تالاسمی پارامترهای نرمال دارد

الفاسه تایی و 4 تایی ممکن است مشکل ساز باشد--/aaa ممکن است اندکسها کاملاً نرمال باشد و در ازدواج با ناقل سالم aa/-a میتواند باعث تولد نوزاد HbH و در ازدواج با مینور سیس--/aa نوزاد هیدروپس فتالیس میدهد

الفای زیادی با مینور بتا مشکل ساز است؟؟؟؟

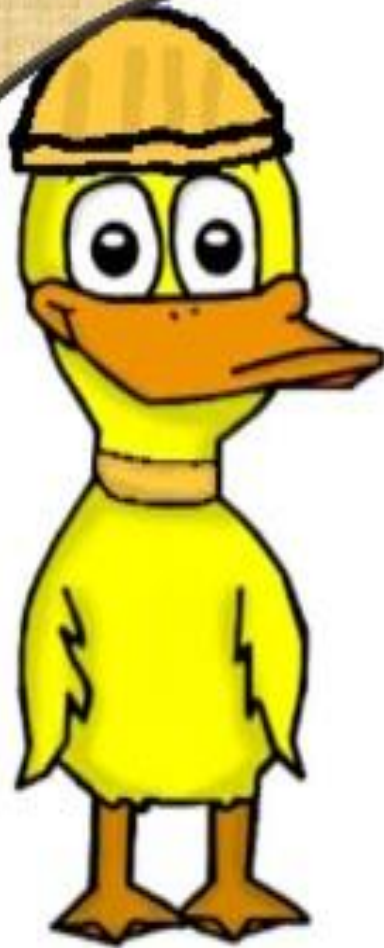
در S هتروزیگوت (HBS) 40% پارامترها نرمال است؟؟؟
بتا S با حذف ژن های الفای: یک (35%) دو (28%) یا سه ژن الفای (20%) با افت هموگلوبین و کاهش اندکسها همراه است

نکته مهم

در کنار CBC و اندازه گیری HbA2

نسبت سنتز زنجیره ها در صورت عدم مشاهده افزایش HbA2 برای تشخیص لازم است

-در صورت نرمال بودن یک طرف ازدواج الکتروفورز هموگلوبین برای تشخیص هموگلوبینوپاتی ها لازم است تا از تولد هتروزیگوت های تالاسمی هموگلوبینوپاتی جلوگیری شود



Thank
You
For
Waiting!