Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:44 IRDT on Tuesday May 21st 2019

نامهٔ دانشکدهٔ پزشکی
«تهران»

شمارهٔ هفتم ازسال بیست وچهارم — فروردین ماه ۱۳۴۶

جستجوها و گردآوریهای علمی

دکتر رهبر* — دبیل، ایزاک و لهمن**

هموگلوبین‌های غیرطبیعی ایران***

مشاهده یك نوع جدید هموگلوبین J ایران

$\alpha_2 \beta_2$ 77 His → Asp

خلاصه این مقاله دریازدهمین کنگره خون‌شناسی دراسترالیاارائه شده‌است

اخیراً برای تجسس هموگلوبین‌های غیرطبیعی درایران سه بررسی جداگانه انجام داده‌ایم. دوبررسی درسالهای ۱۹۶۴ و ۱۹۶۵ درشیراز انجام شدکه ۱۰۰ نمونه خون اشخاص عادی مورد آزمایش قرارگرفت که مبتلا به کم‌خونی همولیتیکی نبودند. دربین این صدمورد فقط دومورد هموگلوبین A-D دیده شد (D پنجاب).

بررسی سوم درتهران برروی ۴۰۰ مورد بیماران مبتلا به کم‌خونی انجام شدکه ازاین

* گروه ایمونولوژی عمومی دانشکده پزشکی تهران

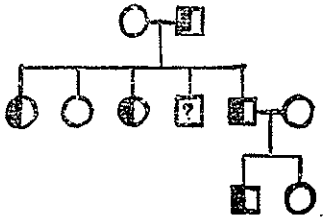
** - مرکزتحقیقات هموگلوبین‌های غیرطبیعی دانشگاه کمبریج انگلستان

*** - ترجمه ازمجله بریتیش مدیکال جورنال صفحه ۶۷۴ تا ۶۷۷ - ۱۸ مارس ۱۹۶۷

عده ۷ مورد مبتلا به تالاسمی، سه مورد بیماری سیکل سل همراه با تالاسمی و ۱۷ مورد هموگلوبین A-S، یک مورد سیکل سل توام با هموگلوبین D و یک مورد بیماری هموگلوبین C دیده شد دریک بیمار دیگر یک هموگلوبین با حرکت الکتروفورزی سریع دیده شد . اکثر بیماران مبتلا به سیکل سل از اهالی شمال ایران وجنوب دریای خزر بوده‌اند ولی هموگلوبین با حرکت الکتروفورزی سریع دریک خانواده ساکن مرکز ایران دیده‌شد .

هموگلوبین J ایران

این هموگلوبین درالکتروفورز روی کاغذ PH =8/9 دارای حرکت الکتروفورزی J بود کمی سریع تراز هموگلوبین K و کندتراز هموگلوبین N دربررسی خانوادگی این هموگلوبین درسه نسل متوالی فامیل دیده شد که بصورت صفت کودومینان منتقل شده است . (شکل ۱)



شکل ۱
شجره‌نامه هموگلوبین J

آزمایش هموگلوبین پدر بیمار نیز هموگلوبین غیرطبیعی را نشان داد سایر آزمایشات خونی درحدود طبیعی بوده‌اند مقدارهموگلوبین ۱۴/۲ گرم درصد سانتی‌متر مکعب گلوبولهای سرخ ۴۹۰۰۰۰۰ هماتوکریت ۴۱٪ و M.C.H.C ۳۵٪ سلولهای صدفی وسایر گلوبولهای سرخ غیرطبیعی درخون محیطی دیده نشد بنابراین وجود این هموگلوبین بخودی خودایجاد کم‌خونی‌را نکرده است وکم‌خونی طفل علت دیگری داشته‌است .

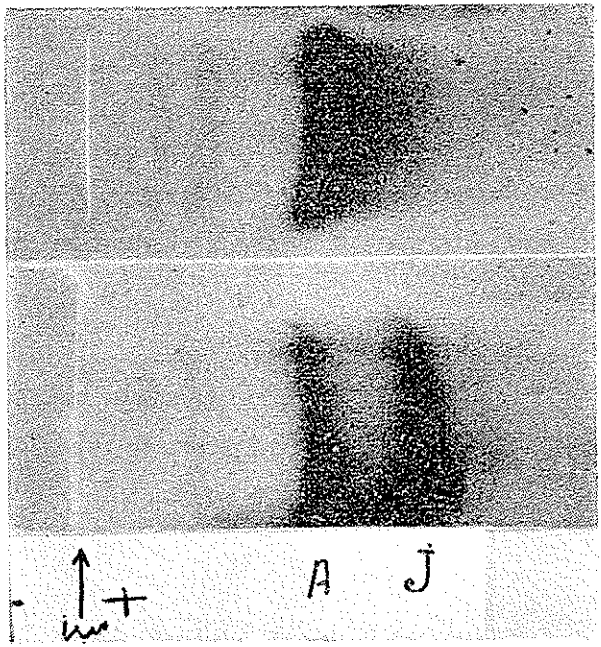
آزمایشات شیمیائی هموگلوبین ایران

محلول هموگلوبین بطورمعمول تهیه والکتروفورز درمحیط های کاغذ ـ استات سلولز ـ استارچ ژل واستارچ بلاك انجام شد درتمام آزمایشات دیده شد که هموگلوبین طبیعی A و هموگلوبین J تقریباً بمقدارمساوی وجود دارد . (شکل ۲)

هموگلوبین A تشکیل شده‌است ازدوزنجیره پولی‌پپتیدی آلفا ودو زنجیره بتا وفورمول آن عبارتست از $\alpha_2\beta_2$ ـ هموگلوبین J درالکتروفورز PH قلیائی ازهموگلوبین A سریع تر به ـ طرف قطب مثبت حرکت میکند واین خاصیت نشان میدهد که دارای بارمنفی بیشتری میباشد .

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:44 IRDT on Tuesday May 21st 2019

برای تعیین اینکه اختلاف بار الکتریکی هموگلوبین J مربوط به زنجیره پلی پپتیدی آلفا ویا بتا میباشد قبلا هموگلوبین غیرطبیعی را بوسیله استارچ بلاك خالص کرده وعامل Heme را جدا کرده وگلوبین غیرطبیعی را با گلوبین هموگلوبین طبیعی A مقایسه میکنیم برای اینکار از روش چرنف وهمکاران ۱۹۶۰ استفاده میشود :



شکل ۲ـ الکتروفورز در استارچ ژل

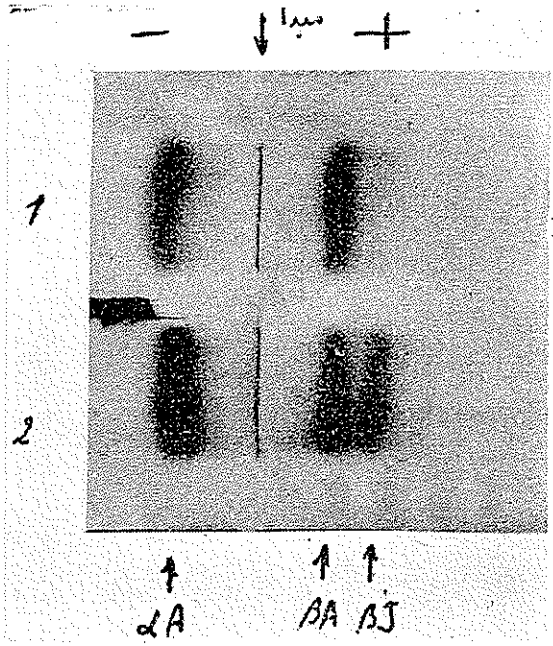
بالا طبیعی

پائین هموگلوبین بیمار

این روش عبارتست ازالکتروفورز گلوبین دراستارچ ژل PH=8 باافزایش 6M اوره . وجود اوره با غلظت زیاد باعث جدا شدن زنجیره های پلی پپتیدی آلفا و بتا شده ودر الکترو فورز زنجیره آلفا بطرف کاتد و زنجیره بتا بطرف آند حرکت میکند چنانکه در شکل شماره ۳ دیده میشود زنجیره آلفای هموگلوبین J درست شبیه به زنجیره آلفای هموگلوبین A حرکت کرده است ولی زنجیره بتای هموگلوبین J سریع تر از زنجیره بتای هموگلوبین A حرکت کرده است واین نشان میدهد که ازدیاد بارالکتریکی منفی هموگلوبین J مربوط به زنجیره بتای هموگلوبین J میباشد بنابراین فرمول آن عبارتست از $\alpha_2^A \beta_2^J$. هیبرید کردن هموگلوبین J باهموگلوبین Canine این نتیجه را تأئید کرد که زنجیره بتای هموگلوبین J غیرطبیعی است هیبرید کردن هموگلوبین A باهموگلوبین سگ نیزبموازات آزمایش بالا بعنوان شاهد انجام شد (ایتانورو روبینسون ۱۹۵۳ هیونزوشوتروبیون ۱۹۶۲) بعد از مجزا کردن زنجیره‌های پلی پپتیدی واتصال مجدد هموگلوبین های هیبرید جدید بدست میآید هیبریدهای حاصل از زنجیره آلفای هموگلوبین J وهموگلوبین سگ باهم اختلافی نشان نمیدهند ولی

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:44 IRDT on Tuesday May 21st 2019

هیبریدهای زنجیره بتای هموگلوبین J وزنجیره آلفای هموگلوبین سگ باهیبرید مشابه خود



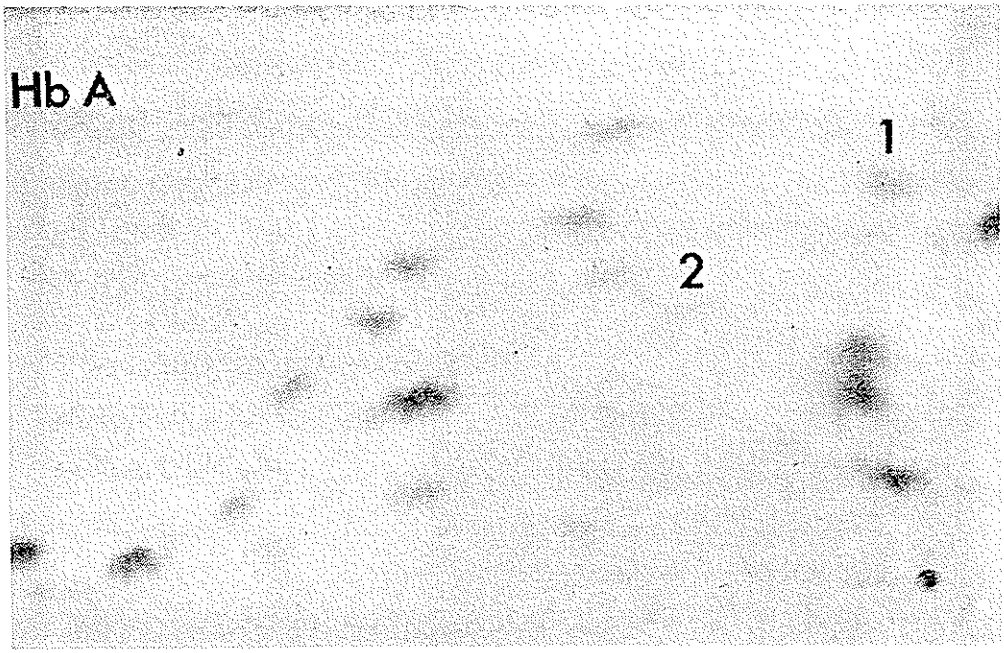
شکل۳- جدا کردن زنجیره‌ها در استارچ ژل PH=8
۱- هموگلوبین A
۲- هموگلوبین ایران A+J زنجیره بتای دوم که بیشتر حرکت کرده مربوط به هموگلوبین J ایران میباشد

درهموگلوبین طبیعی متفاوت است هیبرید $\alpha_2^{Canine}\beta_2^{J}$ سریع تر از هیبرید $\alpha_2^{Canine}\beta_2^{A}$ درالکتروفورز استارچ ژل ۸/۶ حرکت میکند بنابراین دارای شارژ منفی بیشتری است .

برای کشف اینکه آیا این هموگلوبین J یکنوع جدید میباشد ویا شبیه به هموگلوبین J بالیتمور میباشد (با گلیونی و ودرال ۱۹۶۳) گلوبین هموگلوبین را بوسیله تریپسین دیژمیون کرده وپپتیدهای محلول حاصل را باالکتروفورز در PH=۶/۰ در یکجهت و کروماتوگرافی صعودی درجهت دیگراز هم جدا میکنیم تایک فینگرپرینت و یانقشه پپتیدی پپتیدهای محلول هموگلوبین J بدست آید بموازات آن فینگرپرینت هموگلوبین طبیعی A نیز تهیه میشود . روش های بکار رفته شبیه بروش اینگرام ۱۹۵۸ وبا گلیونی ۱۹۶۱ میباشد . شرح کامل تکنیک های فینگرپرینت اخیراً بوسیله واتسون ویلیامز - بیل - ایروین ولهمن (۱۹۶۵) خلاصه شده است.

درمقایسه درفینگرپرینت (شکل ٤ و٥) دیده میشود که دوپپتید هموگلوبین طبیعی یعنی شماره‌های ۱ و۲ درهموگلوبین J وجود ندارد درعوض دوپپتید جدید (۳ و٤) دیده میشود (شکل ٥) در زیرپپتید نمره٤ یک پپتید اضافی دیده میشود که باعلامت ستاره مشخص شده است این پپتید دارای فعل وانفعال مثبت باسعرف‌های تیروزین است ودراغلب فینگر

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:44 IRDT on Tuesday May 21st 2019



شکل ٤ـ فینگرپرینت هموگلوبین طبیعی A

نمره۱ پپتید βTp IX (آسیدهای آمینه شماره۶۷ تا ۸۲زنجیره بتا)

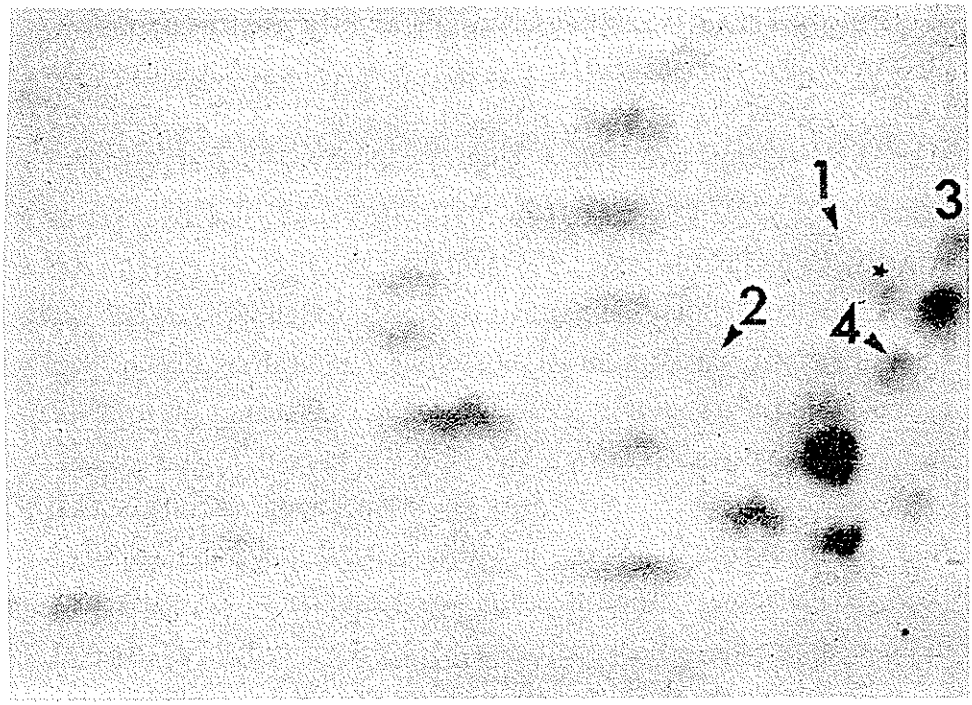
نمره۲ـ پپتید βVIII - IX (آسیدهای آمینه شماره ۶۶تا۸۲ زنجیره بتا)

پرینت‌ها دیده میشود ودرنتیجه اثر کیموتریپسین روی اسیدهای آمینه شماره ۱۲۱ تا ۱۳۲ زنجیره بتا میباشد (βTP-XIII). پپتید کیموتریپتیک شامل آسید های آمینه ۱۲۱ تا ۱۳۰ زنجیره بتاست ازاین پپتید باعلامت ستاره‌میتوان‌صرفنظر کرد وپپتیدهای نمره۳ و٤ فینگرپرینت هموگلوبین A نشان دهنده اختلاف هموگلوبین طبیعی وهموگلوبین J ایران میباشد.

پپتیدهای نمره۱ و۲ درهموگلوبین A مربوط‌به‌پپتید βTp IX وپپتید βTp VIII-IX زنجیره بتاست پپتید βTp VIII یک‌پپتیدحقیقی نیست بلکه یک‌اسید آمینه‌لیزین آزادمیباشد ومحل آن وضعیت شماره۶۶ زنجیره بتاست که خود شامل ۱۴۶ آسیدآمینه میباشد . تریپسین بطورکامل اتصال بین این لیزین و۱۶ آسیدآمینه بعدی (شماره ۶۷ تا ۸۲) را قطع نمیکند بنابراین‌لیزین‌آزاد βTp VIII وپپتید βTp IX وهمینطورپپتیدβTp VIII - βTp IX هرسه درفینگرپرینت هموگلوبین A دیده میشود .

پپتید βTp IX هموگلوبین طبیعی دارای هیستیدین‌میباشد واین هیستیدین بارنگ -

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:44 IRDT on Tuesday May 21st 2019



شکل ۵ـ فینگرپرینت همو گلوبین J ایران

نمره ۱ و ۲ محل پپتیدهای βTpVIII - IX که وجود ندارد

نمره‌های ۳ و ۴ پپتیدهای جدیدرا نشان میدهد بهشرح مقاله رجوع شود

آمیزی مخصوص هیستیدین ظاهرمیشود وپپتیدهای ۱ و ۲ زنجیره بتای همو گلوبین طبیعی آزمایش مثبت با معرف هیستیدین نشان میدهند اما در فینگرپرینت همو گلوبین J ایران پپتیدهای نمره ۳ و ۴ هیستیدین‌را نشان نمیدهند وچون همو گلوبین J یک همو گلوبین سریع است ودارای شارژ منفی‌بیشتری است دراین مرحله‌میتوان حدس زد که هیستیدین دروضعیت ۷۷ زنجیره بتا درهمو گلوبین طبیعی بوسیله یک آسیدآمینه باشارژ منفی عوض شده است که یاآسید گلوتامیک Glu ویاآسید اسپارتیک Asp میباشد.

مطالعات نیرنبرگ وهمکاران ۱۹۶۵ برروی سیستم‌های میکروبی عمل کدژنتیک که ترتیب قرارگرفتن بازهای پوریک وپیریمیدیک نوکلئوتیدهای Messenger R.N.A میباشد وکنترل قرارگرفتن آسیدآمینه‌را درساختمان پروتئین در دست دارد روشن ساخته است. وچون انواع آللیک همو گلوبین‌های غیرطبیعی درنتیجه‌یکنوع موتاسیون واحد ایجاد میگردد(تغییر فقط یکی ازبازهای پوریک ویا پیریمیدیک) ثابت‌شده است که هرنوع تغییری‌تابع کدژنتیک میباشد(بیل ولهمن ۱۹۶۵).

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:44 IRDT on Tuesday May 21st 2019

کدژنتیک بازهای نوکلئوتید برای هیستیدین عبارتست از C.A.C سیتوزین - آدنین- سیتوزین ویا C.A.U سیتوزین - آدنین - اوراسیل وکدژنتیک برای آسید گلوتامیک GAA یا GAG گوانین - آدنین - گوانین میباشد وتغییرفقط یکی ازبازهای کدژنتیک هیستیدین باعث ایجاد کدژنتیک آسید گلوتامیک نمیشود بنابراین این موتاسیون غیر ممکن میگردد اما Triplet Code آسپارتیک‌آسیدعبارتست‌از GAC یا GAU واگراولین‌بازکدژنتیک‌هیستیدین CAC یا CAU به G گوانین تغییریابد تبدیل به کدژنتیک آسپارتیک آسید میشود GAC واین تغییرواحد دربازهای کدژنتیک‌ممکن‌است وباتغییر فقط یکی ازبازها کدژنتیک‌هیستیدین تبدیل به‌کدژنتیک آسپارتیک اسید میگردد بنابراین فقط بارنگ آمیزی فینگرپرینت‌های هموگلوبین‌های J وA باسعرف هیستیدین میتوان حدس زد که این هموگلوبین درنتیجه‌تغییر هیستیدین شماره ۷۷ زنجیره بتا به آسپارتیک آسید بوجود آمده است و این هیستیدین تنها هیستیدینی است که درپپتید βTpIX وجود دارد.

پپتید شماره۳ را ازفینگرپرینت هموگلوبین J بریده ودرآسید کلریدریک 6N حل کرده (سانگروتوپی ۱۹۵۱ وکلگ ونفتون ۱۹۶۰) وپس از هیدرولیز این پپتید آسید های آمینه آنرا در دستگاه آمینوآسید آنالایزر برطبق روش اسپاکمن واشتاین ومور۱۹۵۸ تعیین میکند ونتایج آنرا باآنالیز پپتید βTp IX هموگلوبین طبیعی مقایسه‌میکنیم.

نسبت مولکول های آسیدهای آمینه

آسید آمینه	پپتیدβTp IX هموگلوبین A	پپتیدβTp IH هموگلوبین J ایران
Asp	۲/۷	۳/۷
Ser	۱/	۱/۵
Gly	۲	۲/۱
Ala	۲/٤	۲/۱
Val	۱/۱	۱/۱
Leu	۷/۷	۳/٦
Phe	۱	۱
Lys	۰/۹	۱
His	۱/۱	۰

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:44 IRDT on Tuesday May 21st 2019

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:44 IRDT on Tuesday May 21st 2019

تابلوی یک نشان میدهد که پپتید شماره۳ که βTpIX هموگلوبین J میباشد اختلاف آن باβTP IX هموگلوبین A فقط دریک آسیدآسپارتیک میباشد که جایگزین هیستیدین در هموگلوبین A شده‌است.

تابلوی اول : آنالیزاسیدهای آمینه پپتید βTp IX (آسیدهای‌آمینه شماره ۶۷ تا ۸۲ زنجیره بتا برای‌هموگلوبین A وهموگلوبین J ایران .

آسید آمینه آسپاراژین در وضعیت ۸۰ درهیدرولیز تبدیل به‌اسپارتیک آسید شده است ودرهردو پپتید βTp IX هموگلوبین A و J دیده میشود.

بادرنظرگرفتن اینکه هیچ نوع تغییردیگری درآسیدهای آمینه هموگلوبین J ایران دیده نمی‌شود میتوان فورمول این هموگلوبین را اینطور نوشت .

$$\alpha_2 \beta_2 \; 77 \; His \rightarrow Asp$$

تابلوی دوم : ترتیب آسیدهای آمینه پپتید βTp IX هموگلوبین A و هموگلوبین J ایران (آسیدآمینه ۶۷ تا ۸۲) .

	۶۷	۶۸	۶۹	۷۰	۷۱	۷۲	۷۳	۷۴	۷۵	۷۶	۷۷	۷۸	۷۹	۸۰	۸۱	۸۲
هموگلوبینA	Val	Leu	Gly	Ala	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	His	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys
هموگلوبین J ایران	Val	Leu	Gly	Ala	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Asp	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys

حرکت الکتروفورزی PH=۸/۶ و PH=۶/۵

دوپپتید جدید یعنی شماره۳ و۴ درفینگرپرینت هموگلوبین J خیلی به کاتد نزدیک هستند تاپپتیدهای βIpVIII - IX و βTp IX هموگلوبین‌طبیعی (شکل شماره۴ و۵)چون آنها دارای بارمنفی بیشتری هستند هموگلوبین J بتا ایران در PH = ۸/۶ دارای حرکت الکتروفورزی مشخصی است که نماینده اضافه شدن شارژ منفی در زنجیره بتا میباشد.

اختلاف حرکت الکتروفورزی پپتیدهای۳ و ۴ هموگلوبین J با حرکت الکتروفورزی پپتیدهای۱ و۲ هموگلوبین طبیعی در PH=۶/۵ بیش‌از موقعی است که فقط یک واحد شارژ درمولکول تغییرکرده باشد مثلاآسیدآمینه خنثی تبدیل به‌یک آسیدآمینه بابار منفی(آسیدی) بشود . اختلاف حرکت الکتروفورزی نشان میدهد که یک آسید آمینه بابار نیمه مثبت (هیستیدین) تبدیل به‌یک آسیدآمینه بابارمنفی (آسیدی) شده است.

هیستیدین درPH=۸/۶ دارای شارژ نمیباشد ومثل یک آسیدآمینه خنثی است و در PH=۸/۶ تبدیل هیستیدین به یک آسیدآمینه بابار منفی‌مثل هموگلوبین J ایران تفاوت‌یک شارژ منفی‌است درصورتیکه درPH=۶/۵ که الکتروفورزفینگرپرینت دراین PH انجام‌میشود هیستیدین تقریباً شارژه ودارای بار مثبت میباشد جایگزینی یک آسیدآمینه با بارمنفی بجای

عامل هیستیدین با بارمثبت باعث ایجاد اختلاف شارژ بیشتری بین βTp IX هموگلوبین J وهموگلوبین A میشود وبه‌این علت در PH=۶/۵ اختلاف حرکت الکتروفورزی پپتیدها بیش از PH=۸/۶ میباشد .

اگر فینگرپرینت هموگلوبین J ایران را بافینگرپرینت هموگلوبین سیاتل (هیونزوشوتر ۱۹۶۵) مقایسه کنیم درهموگلوبین سیاتل آلانین که یک آسیدآمینه خنثی میباشددروضعیت ۷۰یا۷۶ زنجیره بتا جایگزین آسیدآگلوتامیک Glu شده است و پپتید βTp IX هموگلوبین سیاتل دارای حرکت الکتروفورزی کمتری به‌طرف قطب‌مثبت میباشدتاپپتید βTp V (پپتید βTp V در زیرپپتید βTp IX دیده‌میشود وبخوبی رنگ‌میگردد) ولی پپتید βTp IX(پپتید شماره۳ هموگلوبین ایران‌بیشتراز پپتید βTp V بطرف آند حرکت میکند علت آنست که در PH=۶/۵ پپتید βTp IX هموگلوبین J ایران‌دارای شارژ منفی بیشتری ازهمان پپتیددر هموگلوبین سیاتل میباشد (Ala→Glu 76 یا 70) .

قبلا نتایج متفاوتی برای الکتروفورز وکروماتوگراقی هموگلوبین J در PH آسیدی بدست آمده است بعضی ازمصنفین مثلا (آژرو لهمن۱۹۸۸) گزارشی داده‌اندکه هموگلوبین A - J درالکتروفورز PH = ۶/۵ ازهم جدا نمی شوند و یا در کروماتوگرافی Irc - 50 در PH=۶ جدا نمی‌شوند. سایرمصنفین بخوبی‌دراین شرائط این‌دوهموگلوبین‌راجدا کرده‌اندمثلا (ویرژینیاسینیش) ومی‌توان‌تصورکردکه علت تجربه روی هموگلوبین‌های J مختلف‌میباشد وچون هموگلوبین J ایران بخوبی در PH = ۶/۵ از هموگلوبین A جدا میشود ازبین رفتن هیستیدین دراین PH باعث اختلاف شارژ زیادی بین هموگلوبین A و J ایران می‌شود.

خلاصه :در دوبررسی‌روی ۱۰۰ هموگلوبین اشخاص‌عادی درشیراز ایران‌نقطه‌ونمونه هموگلوبین D پنجاب دیده شد دربررسی سومی که درتهران روی چهارصد بیمارداراى‌علائم کم‌خونی‌انجام‌شدتالاسمی - هموگلوبین S وهموگلوبین D وهموگلوبین C ویک‌هموگلوبین جدید بنام J ایران بفورمول $\alpha_2\ \beta_2 77$ His → Asp کشف گردید.

قدردانی : یکی ازمصنفین (دکتررهبر) ازآقای‌دکترسیردامادی وآقای‌دکترسفیدی وآقای دکتر رابرت برای راهنمائیها وکمک‌های ذیقیمت آنها کمال امتنان دارد ما همینطور ازآقای ایروین که فینگرپرینت هموگلوبین D شیراز را انجام داده‌اند تشکر میکنیم همینطور ازآقای پروفسور دوتزو کارکنان بخش ایشان در دانشگاه پهلوی برای ارسال و جمع آوری نمونه‌های خون تشکر میکنیم .

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:44 IRDT on Tuesday May 21st 2019

REFERENCES :

—Ager, J.A.M., and Lehmann, H. (1958). Brit. Med. J., 1, 929

—Baglioni, C. (1961). Biochim. Biophys. Acta, 48, 392.

—Baglioni, C., and Weatherall, D.J. (1963). Biochim, Biophys. Acta, 78, 636.

—Beale, D., and Lehmann, H. (1965). Nature, 207, 259.

—Chernoff, A.I , and Pettit, N.M. (1964). Blood, 24. 750.

—Clegg, J.B., Naughton, M.A., and Weatherail, D. J. (1965). Nature, 207, 945.

—Huehns, E.R., and Shooter, E.M. (1965). J. Med. Genet., 2, 1.

—Huehns, E.R., Shooter, E.M.. and Beaven. G.H. (1962). J. Mol. Biol., 4, 323.

—Ingram, V.M. (1958). Biochim. Biophys. Acta, 28, 539.

—Itano, H.A., and Robinson, E. (1953). Nature, 184, 1468.

—Nirenberg, M., Leder, P., Bermfield. M., Brimacombe, R., Trupin, J.'

—Rottman, F., and O'Neal, C. (1965). Proc. U.S. Nat. Acad. Sci.. 53, 1161.

—Sanger, F., and Tuppy. H. (1951). Biochem. J. 49, 463.

—Spackman, D. H., Stein, W. H., and Moore, S. (1958) Anal. Chem., 40, 1190.

—Watson - Williams, E. J., Beale, D., Irvine, D., and Lehmann, H. (1965), Nature, 205, 1273,

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:44 IRDT on Tuesday May 21st 2019