مجله دانشکده پزشکی تهران
شماره هفتم ــ آذر ماه ۱۳۵۹ ــ صفحــه ۲۰۹

بیوسنتزهموگلوبین درخارج ازبدن (in Vitro) و اهمیت بررسی کمی زنجیره هــای آن در تشخیص انواع الفاتالاسمی بوسیله مواد رادیواکتیـــو در ایـــــران

دکتر گیتی نوذری با همکاری فنی ایران مصطفوی

معرفی: تالاسمی یاکم خونی مدیترانه ای بیمـــاری ژنتیکی وشایع دربعضی نقاط دنیا مثل اطراف دریای‌مدیترانه و جنوب شرقی و جنوب آسیاست (۱)و (۲)و (۳) کشور ایران نیزکه‌از نظر جغرافیائی بین ایندو منطقه قرار گرفته و طبیعتا" یک گذرگاه بوده همچنین از نظر تاریخی صحنه تاخـــت و تازهائی‌چون حمله اسکندر و عرب و فتنه مغول گشته است نیز منطقا" نمی‌تواند خالی از این نقص ژنتیکی باشد تالاسمـــی برعکس هموگلوبین های غیر طبیعی یک نقص کیفی مولکـــول هموگلوبین نیست بلکه زنجیره های الفا وبتای هموگلوبین از نظر کیفی بدون اشکال بوده منتهی یکی از زنجیره ها (و در بعضی موارد هر دو) باندازه کافی ساخته نمیشوند.

این کم ساخته شدن و یا اصلا" ساخته نشدن یکی از زنجیره ها شدت و ضعف داشته در نتیجه تولید کم خونـی‌ـ بیماری و عوارض خفیف تا شدید و مرگ مینمایند. از طرفـی زنجیره دیگر که باندازه کافی و نرمال سنتز میگردد چون‌جفت غیر همجنس خود را باندازه کافی نمی‌یابد تا مولکول باثبات هموگلوبین A را تشکیل دهد ــ مولکولهای هم جنس ۴ به ۴ بهم پیوسته‌و تولید تترامر بی ثبات و غیر طبیعی هموگلوبین H (β_4) در بالغین و هموگلوبین Bart's (γ_4) در نوزادان مینمایداین هموگلوبین ها از نظر تنفسی بـــــدون ارزش بوده‌و بعلت بی‌ثباتی‌و رسوب درگلبولهاموجب همولیز میگردند و یا بوسیله طحال جمع آوری و خرد گشته ازجریان خون خارج میشوند و بهمین دلایل بیماری و کم خونی را شدت میدهند.

کم‌ساخته شدن زنجیره بتا تولیدبتاتالاسمی‌مینماید که در فرم خفیف یا مینور minor و شدید یا ماژورmajor (آنمی کولی Cooley Anaemia)دیده شده است ــ در فرم ماژور که هر دو ژن سازنده زنجیره بتا مبتلا هستنـد یا زنجیره بطور مطلق ساخته نمی‌شودβ^0 thalassaemia و یا کمی ساخته میشود β^+ thalassaemia بهر حـال علائم کلینیکی (از قبیل تغییر شکل استخوان ها و عقـب افتاده گی رشد)و آزمایشگاهی (بالا بودن‌هموگلوبین جنینی و A_2 و زیاد شدن مقاومت گلبولی) مشخص داشته (چنانکه با آنمی فقرآهن و یا الفاتالاسمی توام نباشد) و اکثرا "قابل تشخیص اند ــ اما متاءسفانه در موارد الفاتالاسمی که نقـص ژنتیکی در سنتز زنجیره های الفاست تشخیص چندان ساده نبوده و علائم کلینیکی و آزمایشگاهی مشخصی ممکن اسـت نداشته‌باشدبخصوص‌درفرم‌خفیف‌آن‌که$\alpha_2$thalassaemia

---

استادیار گروه بیولوژی کاربردی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]

نامیده شده است در این نوع یکی از چهار ژن مسوول زنجیره الفا مبتلا میباشد ــ در نوزادیکه باین نقص دچار اســـــت هموگلوبین بارت درحدود ۱ــ ۲% است و تغییر شکل‌گلبولهای سرخ در کار نیست مقاومت گلبولی و هموگلوبین های F و A_2 میتواند نرمال باشد .

در فرم شدیدتر که α_1 thalassaemia نامیده شده تغییرات شکل گلبول قرمز ممکن است در کار بـــــوده و هموگلوبین های A_2 و F نیز میتوانند کمتر از نرمال باشند .

در بیماری هموگلوبین H الفاتالاسمی بشکـــــــل اینکلوژن های غربالی درگلبول قرمز خود را نشان داده واین وقتی است که سه ژن مبتلا به تالاسمـــی وجـــود دارد . وبالاخره تالاسمیک بودن هرچهار ژن آلفا مغایر باحیات‌بوده و باعث سقط‌جنین و Hydrops Foetalis میگردد .این سندرم درحقیقت‌الفاتالاسمی‌هموزیگوت $\alpha\ thal_1/\alpha thal_2$ میباشد .

در بخش هموگلوبین های غیرطبیعی دانشکده‌پزشکی دانشگاه تهران که سالیان متمادی روی هموگلوبین های غیـر طبیعی در ایران کار میکرده است و تعداد قابل ملاحظه ای هموگلبوین غیر طبیعی در ایران برای اولین بار در جهـان کشف و بدنیای علم‌عرضه نموده است (۴) بررسی تالاسمی‌ها نیز ازنظر دور نبوده و مواردی ازبتاتالاسمی‌را بوسیله‌تستهای مربوطه مشخص نموده است (۵) .

هدف از نوشتن این مقاله پیشرفتی است که اخیرا" بامتد تازه و دقیقتر بیوسنتز هموگلوبین در خارج از بدن ومار که نمودن زنجیره هابا مواد رادیواکتیو و مقایسه دیواکتیویته زنجیره ها نسبت بهم ــ حتی α_2 thalassaemia را تشخیص‌داده وآنرا با مواردنرمال وشدیدتالاسمی (هموگلوبین H) که در حقیقت دوبل هتروزیگوت $\alpha\ thal_1/\alpha thal_2$ است مقایسه نموده ام . این موارد خفیف گرچه در مبتلایـان ظاهرا" میتواندآزار چندانی نداشته باشد لیکن نتیجه ازدواج این افراد با افراد مشابه خود که دارای چنین نقص ژنتیکـی باشند احتمال فاجعه بوجود آمدن نوزادی با نقص شدیـــد و هموزیگوت را داشته و تشخیص آن باعث میشود که بتوان از این فاجعه قبل از وقوع جلوگیری بعمل آورد .

متـــــد: رتیکولوسیت های خون تازه بیمار را طبق روشهای معمول جدا نموده با سرم فیزیولژی در سرما شسته ــ املاح‌لازم بغلظت های معین همراه با سرم دیالیز شده‌انسانی و آهن و کلیه اسید آمینه های حیوانی باستثنای یک اسیـد آمینه (لوسین) به‌رتیکولوسیتها علاوه‌نموده‌دربن‌ماری۳۷درجه باگردش ملایم دورانی قرارداده شد بطرزیکه اکسیژن براحتی دردسترس‌گلبولیها اشد .مقدار ۵۰۰μCi ازلوسین ^3H (0/014 μmol) بعنوان‌ماده‌رادیواکتیو (New England Nuclear) بجـای تنها اسیدآمینه‌ایکه‌اضافه‌نشده‌بود به‌رتیکولوسیتها علاوه و مدت‌لازم دربن‌ماری قرار گرفت (۶) .

سپس‌رتیکولوسیتهارا ازبن ماری خارج ساخته زیادی ایزوتوپ باشستن متوالی بوسیله سرم فیزیولژی در سرمـــا ازمحیط خارج گشت ــ رتیکولوسیتها را همولیز نموده گلوبین آن‌درمحلول۱/۵%اسیداستن‌رسوب‌داده وتهیه شد .

زنجیره‌های‌هموگلوبین‌رادرمجاورت‌اوره۸مولارو (0,05M) مرکاپتوانانول‌باگرادیانتی‌ازمحلول فسفات‌سدیم PH=6.7-6.8 بوسیله‌روش‌کروماتوگرافی‌باتعویض‌یون (CM_{23} سلولز) جـدا نموده (۷) رادیواکتیویته‌زنجیره‌هارادرسنتی‌لیتور LS233 Beckman تعیین‌کرده‌منحنی رادیواکتیویته‌رانسبت به منحنی optical density (LKB Recorder) ویااسپکتروفتومتر زایس) ترسیم‌ونسبت‌بیکدیگرسنجیده‌و Activity specific هریک‌اززنجیره‌ها تعیین گشت (۸) و (۹) .

نتیجـــه: ۱ــ تعداد ۴ نمونه خون نرمال مـــورد آزمایش قرارگرفت ومنحنی مربوطه ترسیم‌گردید (شکل شماره ۱) معدل نسبت ساخته شدن زنجیره‌های الفا و بتای آنهـا نسبت بهم ۱/۱ ــ ۰/۹۷ = α/β ratio و Activity Specific زنجیره الفا نسبت به بتا ۱/۰۳ــ ۰/۹۰ = $S.A^{\alpha}/S.A_{\beta}$ بود .

۲ــ درمورد بیمار۲۱ ساله ای اهل آبادان که سابقه کم خونی سردرد و سرگیجه داشته ــ هموگلوبین اش حدود ۸ گرم و رتیکولوسیت ۱۵% و دارای طحال بزرگ بوده اسـت این آزمایش بعمل آمده آزمایشهای‌خون شناسی و بیوشیمـی بیمار بقرار زیر است :

میکرون مکعب ۵ ± ۸۶ = M C V

۷۷　　M C H = ۲۹ ± ۲

M C H C = ۳۴ ± ۲

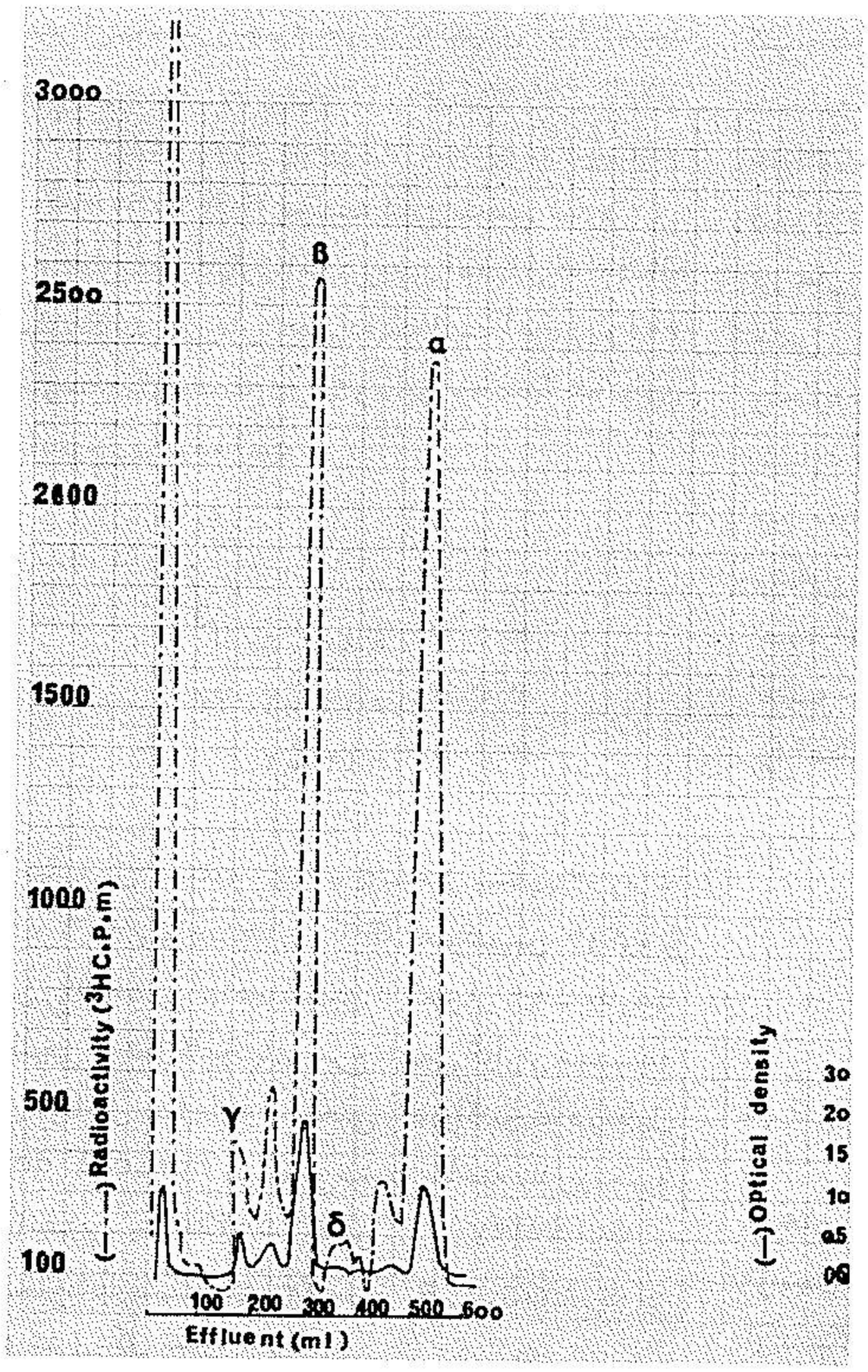
بیلروبین مستقیم = ۰/۷ و غیر مستقیم ۳ میلـــی گرم در صد بوده است ضمنا" خون بیمار با آب نمک ۳/۳

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]

دزهزار ۲۷% همولیز گشته و بنابراین مقاومت گلبولی آن زیادتر از نرمال بوده است همچنین اینکلوژن های غربالـی هموگلوبین H در گلبولهای سرخ با رنگ آمیزی BCB دیـده

(Brilliant Cresyl Blue)

در الکتروفورز همولیز بیمار در PH قلیائی (۸/۶) باندسریع هموگلوبین وجود داشت در لام خونی گلبولهای



منحنی شماره ۱ــ جدا کردن زنجیره های هموگلوبین ساخته شده در خارج از بدن(in vitro) فرد طبیعی که قبلا" با اسید آمینه لوسین (^{3}H) نشان دار شده بود.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]

سرخ آنیزوسیتوز Anisocytosis و پوئی کیلوسیتـــوز Schistocytosis,Hypochromia,Poikiloctosis Ovalocytosis و Target Cell نشان دادند ــ در فینگرپرنیت زنجیره هاهموگلوبین طبیعی بود.

هموگلوبین A_2 کمتر ازنرمال و HbF کمتراز ۲% بود.

پس ازبیوسنتز زنجیره هاو مارکه نمودن آنها نسبت رادیواکتیویته زنجیره الفا به بتا ۰/۲۴= α/β ratio و Spevific Activity زنجیره ها نسبـــت بهـــم S.A α/S.A.β =۰/۲۹ محاسبه شد (منحنی شماره ۲).

۳ــ در بیمار دیگری اهل بروجن اصفهان که ۲۲ساله بوده واسپلنومگالی از زمان بچگی‌داشته است آهن سرم ۳۴۶ میکروگرم درصدرتیکولوسیت ۰/۵% و سایر آزمایشها هماتولژی و بیوشمی بشرح زیر بوده است:

M C V = ۸۶ ± ۵ μ^3

M C H = ۲۹ ± ۲ γγ

M C H C= ۳۴ ± ۲

بیلروبین مستقیم ۰/۰۵ % ــ غیر مستقیم ۰/۶% + واحد ۱۸= SGOT و واحد ۲۲= GPT هموگلوبین ۱۳ گرم ــ هموگلوبین A_2 طبیعی ــ هموگلوبین F کمتر از ۲% ــ مقاومت گلبولی طبیعی و شکل‌گلبولهای سرخ طبیعی گزارش شـــده است. این آزمایش بعمل آمد و منحنی رادیواکتیویته درمقابل optical dencity ترسیم و نسبت ساخته شدن‌زنجیره الفا به بتا ۰/۸۹ = α/β ratio و Activity

زنجیره ها نسبت بهم S.Aα/S.A.β = ۰/۸۳ محاسبه شد (شکل شماره ۳).

بحـــث.

در اولین مورد معرفی شده گرچه بانـد سریع الحرکتی در الکتروفورز دیده شد اما فینگرپرنیت نشان داد که این باند سریع الحرکت هموگلوبین بتای طبیعی بوده است وجود دانه های غربالی اینکلوژن‌در گلبولهای سرخ‌بیمار همراه با فینگرپرنیت طبیعی وجود هموگلوبینH را نشـــان میدهد.

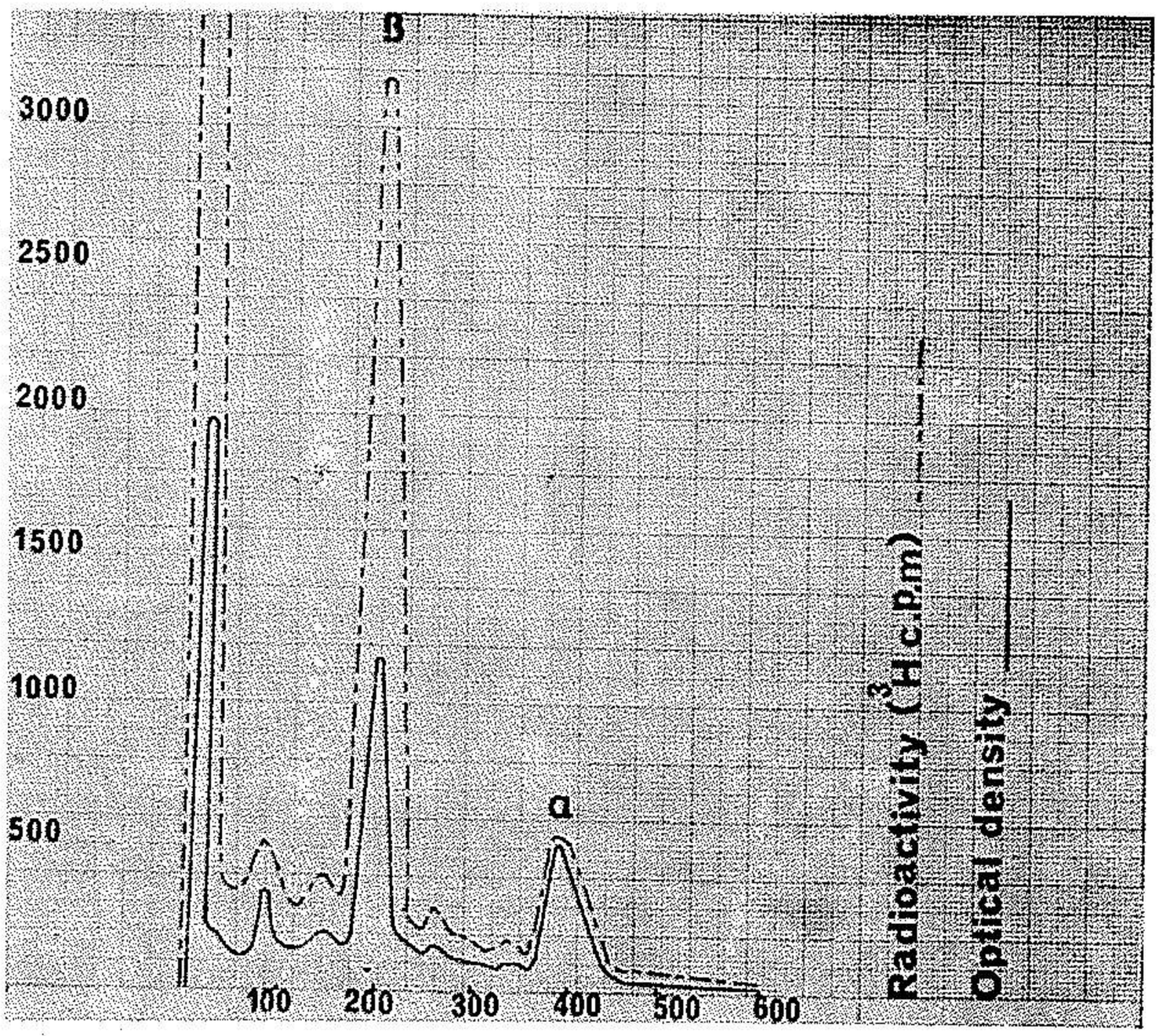
شکل غیر طبیعی اریتروسیت ها همراه رتیکولوسیت زیاد بیمار تائید کننده این بیماری اند در منحنی سنتـــز زنجیره هادر مقایسه با منحنی نرمال فقدان فاحشی درساخته شدن زنجیره آلفا مشاهده میشود.

اما درموردبیمار دیگر تنها علامت کلینیکی‌راهنمائی کننده طحال بزرگ بیماراست که میتواند علل مختلف داشته باشدآزمایشهای هماتولژی وبیوشیمی بیمارحتی مقدارطبیعی هموگلوبین های A_2 و F و مقاومت گلبولی بیمار بهیچوجـه کمک به تشخیص نمینمایند در صورتیکه سنتز هموگلوبین‌بیمار در خارج از بدن و بررسی مقدار ساخته شدن‌زنجیره هابطور قطعی و کامل نقص و کمبود سنتز زنجیره الفا را در مقابـــل زنجیره بتا بخصوص در مقایسه با منحنی طبیعی مشخـــص میسازد که مرهون RNA پیامبری است که دستورات DNAیـــا ژن سازنده هموگلوبین را از هسته بداخل سیتوپلاســـم رتیکولوسیت آورده و با وجودیکه گلبول قرمز سلول بـــدون هسته است‌این RNA پیامبر در رتیکولوسیت جوان که‌بتازه‌گی هسته خود را از دست داده است فعال بوده و این نقص ژنی را آشکار ساخته است.

قدردانـــی و تشکـــر

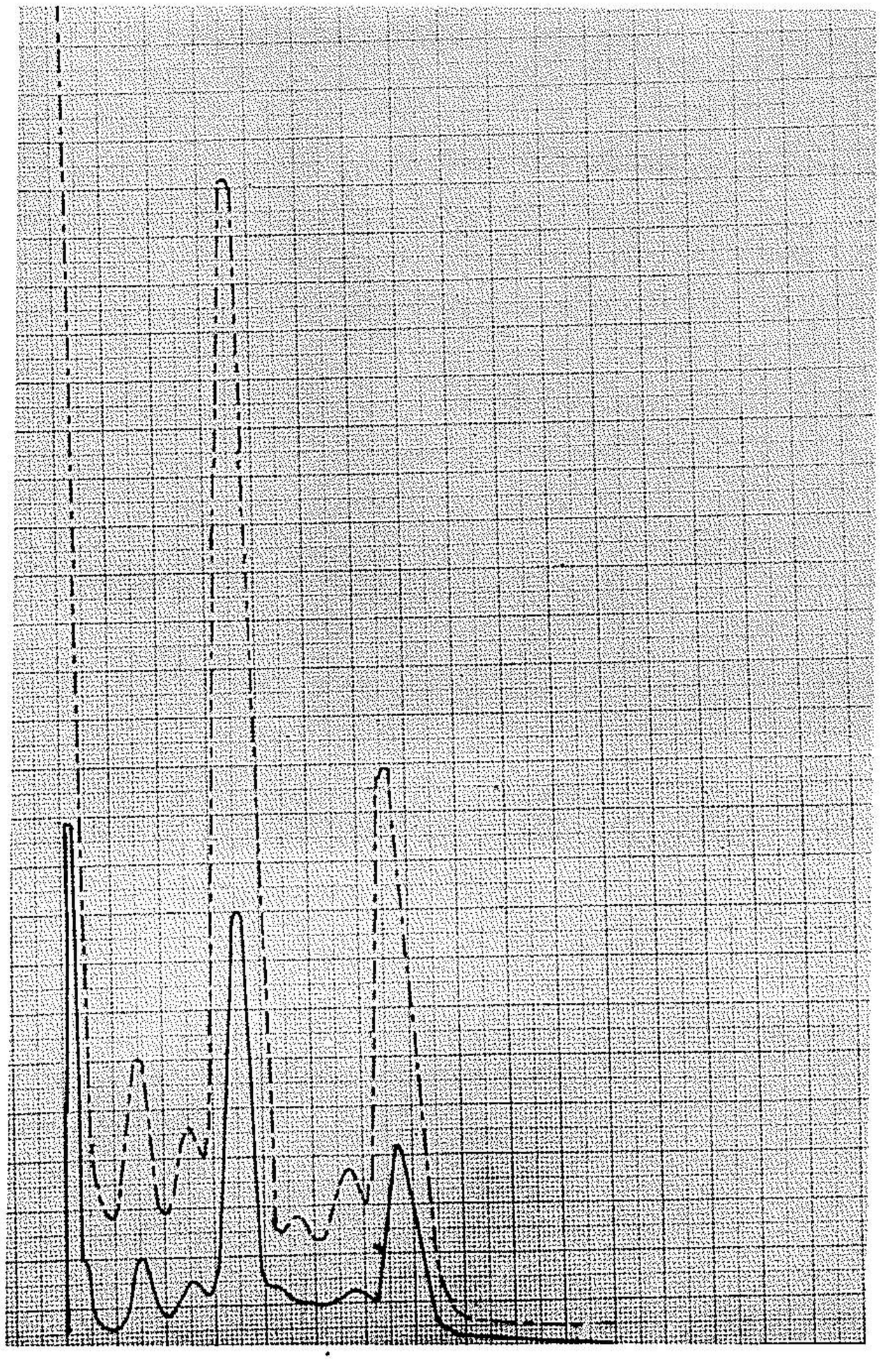
این تحقیقات در دانشکده پزشکی دانشگاه تهران (بخش هموگلوبین های غیر طبیعی گروه بیولوژی کاربردی) از محل طرح نیمه کاره تحقیقاتی وزارت علوم با استفـــاده از دستگاه سنتی لیتور دانشکده داروسازی انجام گرفته کـــه امیدواریم این همکاری ادامه داشته باشد ــ از وزارت علوم‌و دانشگاه تهران با تشکر فراوان قدردانی مینمائیم.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]



منحنی شماره ۲ـ جدا کردن زنجیره های هموگلوبین ساخته شده در خارج از بدن(in vitro) فرد دوبل هتروزیگوت $\alpha\ thal_1/\alpha\ thal_2$ (بیماری هموگلوبین H) .

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]



منحنی شماره ۳ـ جدا کردن زنجیره های هموگلوبین ساخته شده در خارج از بدن (in vitro) در مـــورد فرد بدون علائم کلینیکی و آزمایشگاهی مشخص. از مقایسه این منحنی با منحنی نرمال (شماره ۱) کم ساخته شدن زنجیره الفا بخوبی مشاهده میگردد .

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]

References

1- Wasi,P., The α^{a} thalassaemia genes. Med Ass. Thailand, 53,677-686,1970.

2- Fessas,Ph.,Lie-Injo,L.E.,Na-Nakorn,S.,Todd,D.,Clegg,J.B., and Weatherall,D,J., Lancet 1, 1308-1310,1972.

3- Weatherall,D.J., and Clegg J.B., The Thalassaemia Syndromes(Blackwell Scientific Publications Oxford) 1972.

4- Rahbar,S., Haemoglobinopathies in Iran; International Haematology Congress in to Japan, 1976.

5- Rahbar,S., Haemoglobinopathies and β-thalassaemia in Iran: International Haematolog Congress in Paris, 1978.

6- Lingrel,J.B., and Borsook, H., Biochemistry,Vol 2,No 2,309-314, 1962.

7- Clegg, J.B., Naughton,M.A., and Weatherall,D.J., J.Mol.Biol,19,91-108,1966.

8- Casey,R., Kynoch,P.A.M.,Lang,A.,Lehmann,H.,Nozari,G.,and Shinton,N.K.,Brit.J. Haematol.38,195-209,1978.

9- Nozari,G., Rahbar,S., and Lehmann,H., FEBS Letters 95, 88-90,1978.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]