نامهٔ دانشکدهٔ پزشکی
تهران

شمارهٔ هفتم ازسال بیست وچهارم　　فروردین ماه ۱۳۴۶

جستجوها و گردآوریهای علمی

دکتر رهبر*　　دبیل، ایزاك 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 هموگلوبین های 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

** - مرکز تحقیقات هموگلوبین‌های غیرطبیعی دانشگاه کمبریج انگلستان

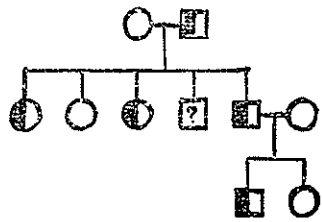
*** - ترجمه ازمجله بریتیش مدیکال جورنال صفحه ۶۷۴ تا ۶۷۷ - ۱۸ مارس ۱۹۶۷

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-01-31]

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

همو گلوبین J ایران

این همو گلوبین در الکتروفورز روی کاغذ PH =8/9 دارای حرکت الکتروفورزی J بود کمی سریع تر از همو گلوبین K و کندتر از همو گلوبین N در بررسی خانوادگی این همو گلوبین در سه نسل متوالی فامیل دیده شد که بصورت صفت کودومینان منتقل شده است . (شکل ۱)



شکل ۱
شجره‌نامه همو گلوبین J

آزمایش همو گلوبین پدر بیمار نیز همو گلوبین غیرطبیعی را نشان داد سایر آزمایشات خونی درحدود طبیعی بوده‌اند مقدار همو گلوبین 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 همو گلوبین بخودی خود ایجاد کم‌خونی را نکرده است و کم‌خونی طفل علت دیگری داشته‌است .

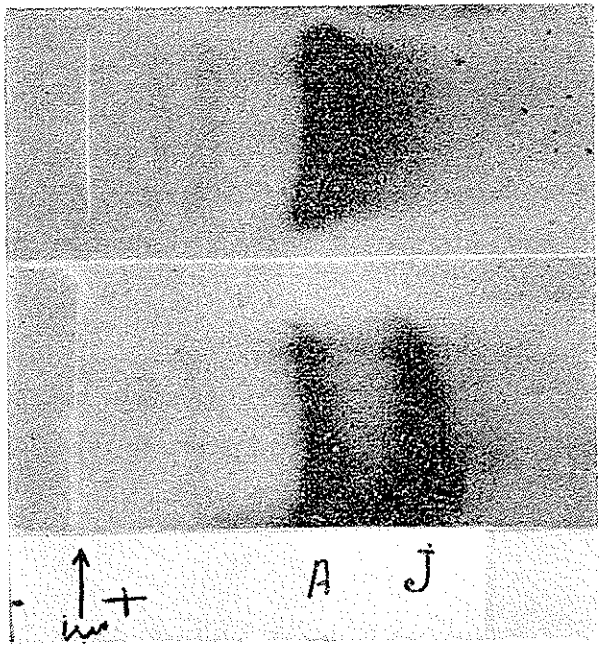
آزمایشات شیمیائی همو گلوبین ایران

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

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

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-01-31]

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 :



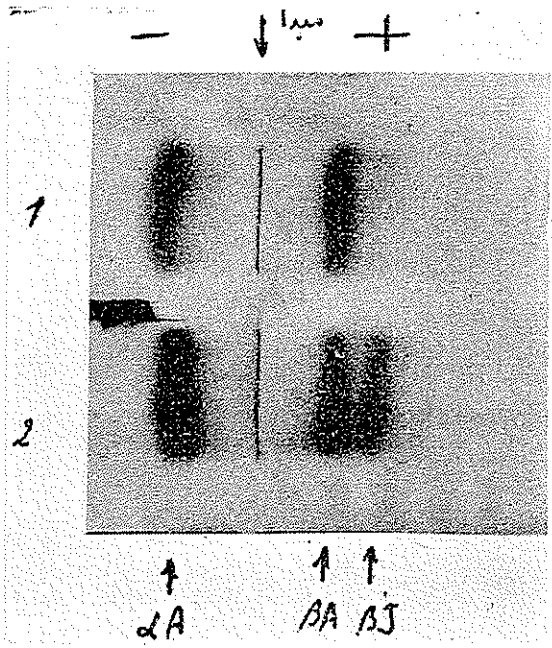
شکل ۲ـ الکتروفورز در استارچ ژل بالا طبیعی

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 نیز بموازات آزمایش بالا بعنوان شاهد انجام شد (ایتانورو روبینسون ۱۹۵۳ هیونزوشوتروبیون ۱۹۶۲) بعد از مجزا کردن زنجیره های 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 on 2025-01-31]

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



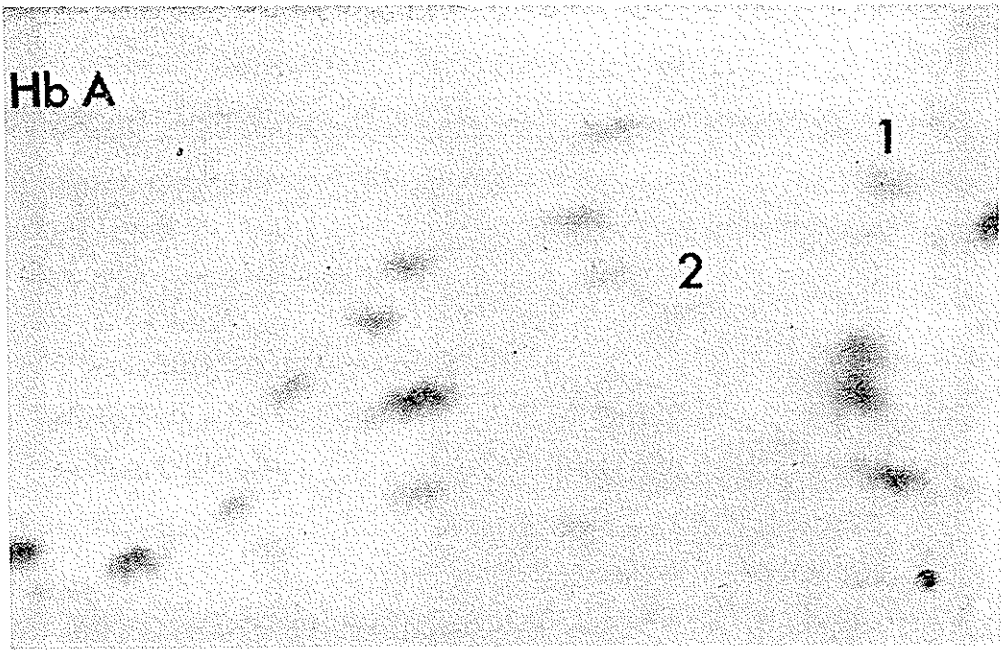
شکل۳- جدا کردن زنجیره‌ها در استارچ ژل PH=8
۱- هموگلوبین A
۲- هموگلوبین ایران A+J زنجیره بتای دوم که بیشتر حرکت کرده مربوط به هموگلوبین J ایران میباشد

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 به‌هموگلوبین J بالتیمور میباشد (باگلیونی‌و ودرال۱۹۶۳) گلوبین هموگلوبین‌را بوسیله تریپسین دیژسیون کرده وپپتیدهای محلول حاصل‌را باالکتروفورز در PH=۶/۵ در یکجهت و کروماتوگرافی صعودی درجهت دیگراز هم جدا میکنیم تایک‌فینگرپرینت و یانقشه پپتیدی پپتیدهای‌محلول هموگلوبین J بدست آید بموازات آن فینگرپرینت هموگلوبین طبیعی A نیز تهیه میشود . روش‌های بکار رفته شبیه بروش اینگرام ۱۹۵۸ وبا گلیونی ۱۹۶۱ میباشد . شرح کامل تکنیک‌های 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 (شکل٥) در زیرپپتید نمره٤ یک پپتید اضافی دیده میشود که باعلامت ستاره‌مشخص شده است این پپتید دارای فعل وانفعال مثبت بامعرف‌های تیروزین است ودراغلب فینگر

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-01-31]



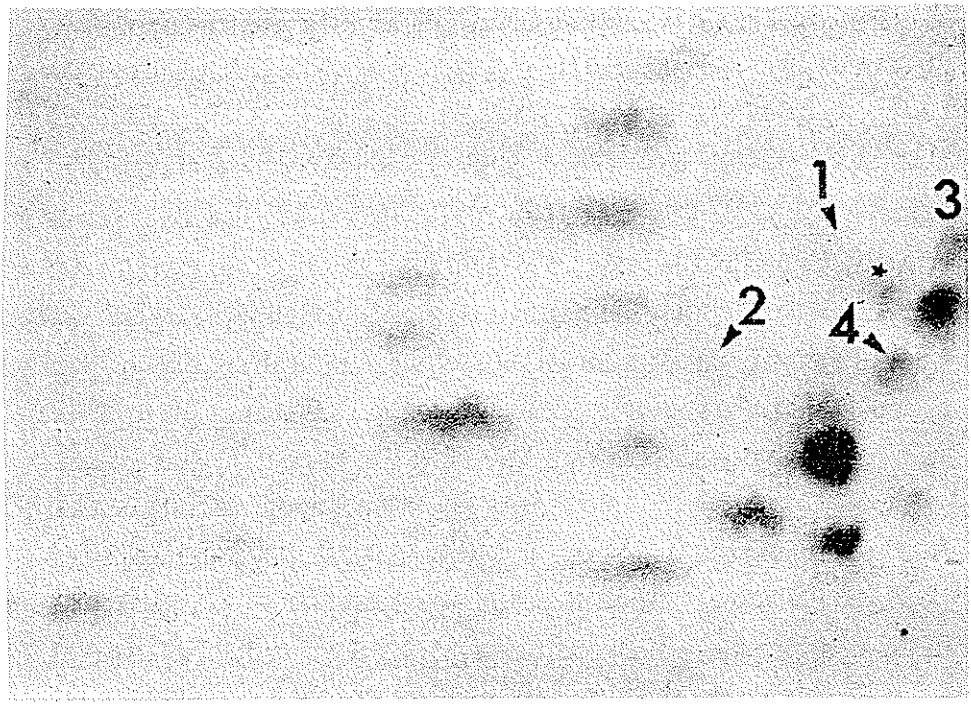
شکل٤- فینگرپرینت هموگلوبین طبیعی A
نمره۱ پپتید βTp IX (آسیدهای آمینه شماره٦٧ تا ٨٢زنجیره بتا)
نمره۲- پپتید βVIII - IX (آسیدهای آمینه شماره ٦٦تا٨٢ زنجیره بتا)

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

پپتیدهای نمره۱ و۲درهموگلوبین A مربوطبه‌پپتید βTp IX وپپتید βTp VIII-IX زنجیره بتاست پپتید βTp VIII یک‌پپتیدحقیقی نیست بلکه یک‌اسید آمینه‌لیزین آزادمیباشد ومحل آن وضعیت شماره٦٦ زنجیره بتاست‌که خود شامل ١٤٦ آسیدآمینه میباشد. ترپسین بطورکامل اتصال بین این لیزین و٦١آسیدآمینه بعدی (شماره ٦٧ تا ٨٢) 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 on 2025-01-31]



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 بشرح مقاله رجوع شود

آمیزی مخصوص هیستیدین ظاهرمیشود وپپتیدهای ۱ و۲ زنجیره بتای همو گلوبین طبیعی آزمایش مثبت با معرف هیستیدین نشان میدهند اما در فینگرپرینت همو گلوبین J ایران پپتیدهای نمره۳ و۴ هیستیدین‌را نشان نمیدهند وچون همو گلوبین J یک همو گلوبین سریع است ودارای شارژ منفی‌بیشتری است دراین مرحله‌میتوان حدس زد که هیستیدین دروضعیت ۷۷زنجیره بتا درهمو گلوبن 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 گلوبین های 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 on 2025-01-31]

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 بامعرف 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 ودرآسیدکلریدریک 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 میکنند 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 on 2025-01-31]

تابلوی یک نشان میدهد که پپتید شماره۳ که βTpIX هموگلوبین J میباشد اختلاف آن با βTP IX هموگلوبین A فقط دریک آسیدآمپارتیک 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	
Val	Leu	Gly	Ala	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	His	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys	هموگلوبین A
Val	Leu	Gly	Ala	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Asp	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys	هموگلوبین J ایران

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 بابارمنفی(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 بابارمنفی‌مثل هموگلوبین J ایران تفاوت‌یک شارژ منفی‌است درصورتیکه درPH=۶/۵ که الکتروفورزفینگرپرینت دراین PH انجام‌میشود هیستیدین تقریباً شارژه ودارای بارمثبت میباشد جایگزینی یک آسیدآمینه با بارمنفی بجای

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-01-31]

عامل هیستیدین‌با بارمثبت باعث ایجاد اختلاف شارژ بیشتری بین βTp IX هموگلوبین J وهموگلوبین A میشود وبه‌این علت در PH=۶/۵ اختلاف حرکت الکتروفورزی پپتیدها بیش‌از 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 دره PH=۶/۵ پپتید βTp IX هموگلوبین J ایران‌دارای شارژ منفی بیشتری ازهمان پپتیددر هموگلوبین سیاتل میباشد (Glu→Ala 76 یا 70).

قبلا نتایج متفاوتی برای الکتروفورز وکروماتوگرافی هموگلوبین J در PH آسیدی بدست آمده است بعضی ازمصنفین مثلا (آژرو لهمن۱۹۸۸) گزارشی داده‌اندکه هموگلوبین J - A درالکتروفورز PH = ۶/۵ ازهم جدا نمی شوند و یا در کروماتوگرافی Irc - 50 در PH=۶ جدا نمی‌شوند. سایرمصنفین بخوبی دراین شرائط این‌دوهموگلوبین راجدا کرده‌اندمثلا (ویرژینیاسینیش) ومی‌توان‌تصورکرد که علت تجربه روی هموگلوبین‌های J مختلف‌میباشد وچون هموگلوبین J ایران بخوبی دره 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 ایران‌فقط‌دونمونه هموگلوبین D پنجاب دیده شد دربررسی سومی که درتهران روی چهارصد بیمارداری‌علائم کم‌خونی‌انجام‌شدتالاسمی - هموگلوبین S وهموگلوبین D وهموگلوبین C ویک‌هموگلوبین جدید بنام J ایران بفورسول $\alpha_2 \beta_2 77$ His → Asp کشف گردید.

قدردانی: یکی ازمصنفین (دکتررهبر) ازآقای‌دکترمیرداسادی 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 on 2025-01-31]

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 on 2025-01-31]