

شش مورد هموگلوبین اندونزی در بیماران ایرانی

دکتر شموئیل رهبر - دکتر محمود کبیری - دکتر پرویز بهادری

دکتر غلامرضا ولی زاده - دکتر محمد پوستی

(۵) علاوه بر هموگلوبین های شناخته شده قبلی تا کنون ۹ مورد هموگلوبین غیرطبیعی که برای اولین بار در جهان شناخته میشود در ایران کشف شده است (۷۶)

در این مقاله گزارش شش مورد HbO اندونزی که در شش فامیل ایرانی طی سه سال اخیر مشاهده شده است ذکر میشود.

در بعضی از حاملین این هموگلوبین غیرطبیعی کم خونی دیده شده است که باید بعلمت دیگری بجز وجود هموگلوبین غیرطبیعی باشد زیرا وجود این هموگلوبین معمولاً همراه کم خونی یا عوارض دیگری نمیباشد.

تاکنون نزدیک به ۲۰۰ نوع هموگلوبین غیرطبیعی در جهان کشف شده است که از لحاظ ساختمان مولکولی با هموگلوبین طبیعی فرق دارند و یک تغییر در قسمت معینی از زنجیره های الفا و بتای هموگلوبین سبب ایجاد این هموگلوبین غیرطبیعی شده است.

در بسیاری از آنها وجود یک هموگلوبین غیرطبیعی همراه با علائم کلینیکی مانند کم خونی و یا بزرگی طحال و علائم همولیتیک نمیباشد زیرا محل موتاسیون یافته در مولکول از لحاظ کار هموگلوبین و ثابت نگه داشتن آن در گلبول رل مهمی ندارد.

دلایل زیادی برای وفور هموگلوبین های غیرطبیعی در بین ایرانیان وجود دارد که مهمترین آنها وجود گروه های نژادی و قومی در نقاط مختلف کشور میباشد. تجربه ۱۰ ساله آزمایشگاه تحقیق هموگلوبین های غیرطبیعی در دانشگاه تهران که نتیجه آزمایش روی حدود چهار هزار نمونه خون نشان میدهد که مثلاً هموگلوبین پنجاب به نسبت یک نفر در ۱۵۰ نفر و در مناطق شمالی کشور از هر صد نفر ۳-۴ نفر مثلاً به بتا تالاسمی مبتلا هستند و بهمین دلیل فرمهای دابل هتروزایگوت مانند بتا تالاسمی و سیکل سل و بتا تالاسمی و هموگلوبین D به وفور دیده میشود (۱) بتا دلتا تالاسمی نیز در سه مورد دیده شده است. علاوه بر هموگلوبین های غیرطبیعی و شایع قبلی که در بیماران ایرانی اغلب دیده میشود مانند HbD پنجاب، HbE، HbS هموگلوبین های نادری که در سایر نقاط جهان قبلاً دیده شده در بین ایرانیان وجود دارد مانند Hb J. Paris (x 12 Ala-ASP) در ده خانواده (۲) Hb O Indonesia Hb Setif در چهار خانواده (۳) (ASP - Tyr. x 34) (x116 Glu-Lys) در شش خانواده دیده شده است که در پنج مورد بصورت هتروزایگوت که یک مورد آن قبلاً گزارش شده است (۴) در یک مورد بصورت دابل هتروزایگوت با هموگلوبین D^D بوده است.

بتا وجود ندارد (۱۱) و یا در هموگلوبین لیدن LEIDEN اسید آمینه ۶ یا ۷ زنجیره بتا وجود ندارد (۱۲)، در هموگلوبین گان هیل ۵ اسید آمینه زنجیره بتا از شماره ۹۱ تا شماره ۹۵ از زنجیره بتا جا افتاده است (۱۳) نوع جدید از هموگلوبین‌های غیر طبیعی که از لحاظ دانش بیولوژی مولکولی توجه زیادی به آنها معطوف گشته است هموگلوبین‌های غیر طبیعی با زنجیره‌های طولانی تر از طبیعی است Elong-Constant ated Chain مانند هموگلوبین Spring (۱۴) و هموگلوبین TAK (۱۵).

باید دانست که تعداد و ترتیب اسیدهای آمینه در هموگلوبین طبیعی اشخاص بالغ ثابت است، مثلاً زنجیره آلفا دارای ۱۴۱ اسید آمینه با ترکیب معین و خاصی و زنجیره بتا دارای ۱۴۶ اسید آمینه با ترکیب معین و خاصی میباشد.

تغییر کدهای خاتمه دهنده سبب میشود که این کدها عمل نکنند و زنجیره پولی پپتیدی مثلاً زنجیره هموگلوبین در محل معین پایان نیابد و اسیدهای آمینه زیادتر از طبیعی داشته باشند تا بیک کدها خاتمه دهنده دیگر برسد و قطع شود بالنتیجه زنجیره آلفا یا بتای هموگلوبین طولانی تر از طبیعی و دارای اسیدهای آمینه بیشتر خواهد شد، این نوع هموگلوبین ها که خود مدرک و دلیل روشنی بر وجود کدهای خاتمه دهنده هستند تاکنون سه نوع دیده شده است.

اول هموگلوبین Constant Spring که مبتلایان به الفا تالاسمی و بیماری هموگلوبین دیده شده است و زنجیره آلفای آن دارای ۱۷۲ اسید آمینه یعنی ۳۱ اسید آمینه بیشتر از زنجیره‌های آلفای طبیعی دارد این هموگلوبین از نوع هموگلوبین‌های بی ثبات و ایجاد علائم همولیتیک می نماید.

دوم در هموگلوبین TAK زنجیره‌های بتا طولانی تر از طبیعی و دارای ۱۵۳ اسید آمینه یعنی ۶ اسید آمینه اضافی دارد.

در ایران یک مورد هموگلوبین Constant Spring داشته ایم.

از نوع دیگر موتاسیون هموگلوبین غیر طبیعی بنام هموگلوبین‌های لیپور و آنتی لیپور میباشد که در نتیجه تقاطع

Unequal Crossing Over

زنی نامساوی

در بسیاری از هموگلوبین‌های غیر طبیعی موتاسیون در قسمتی از زنجیره‌های هموگلوبین بوجود آمده است که آن قسمت در نگهداری استحکام و ثبات مولکول اهمیت دارد و محل پیوندهای فرعی با سایر قسمت‌های زنجیره ها میباشد بالنتیجه تغییر در این قسمت سبب بوجود آمدن یک هموگلوبین بی ثبات میباشد که بر راحتی در گلبول رسوب میکند و رسوب خراب شده هموگلوبین توسط طحال جدا شده سبب بزرگی طحال و علائم همولیتیکی میگردد مانند هموگلوبین زوریخ (۸) هموگلوبین ها مرآسیت (۹) و در تمام این موارد باید بفکر یک هموگلوبین بی ثبات بود در بعضی از هموگلوبین‌های غیر طبیعی علت ایجاد موتاسیون در قسمتی از زنجیره هموگلوبین که مسئول تنظیم اکسیژن گیری است جاذبه هموگلوبین به اکسیژن زیاد میشود و در انساج اکسیژن کمتری از مولکول هموگلوبین جدا میشود و بدن برای جبران این نقص تعداد گلبولهای سرخ را زیاد میکند و مقدار هموگلوبین خون نیز بیشتر از طبیعی میگردد و بهمین دلیل علت بسیاری از پولی سیتی ها میتواند وجود یک هموگلوبین غیر طبیعی باشد از جمله این نوع هموگلوبین‌هایی که همراه با اریتروسیتوز هستند هموگلوبین سیرا کیوس (۱۰) را میتوان نام برد.

در چند نوع هموگلوبین غیر طبیعی تغییر در ساختمان یک زنجیره گلوبین سبب شده است که اتم آهن که در وضع طبیعی به حالت فرو میباشد Fe^{++} یک الکترون از دست داده و به صورت فریک Fe^{+++} در میاید که این شکل هموگلوبین نمی تواند عمل فیزیولوژیک انتقال اکسیژن را انجام دهد یعنی تبدیل به اکسی هموگلوبین گردد و بالنتیجه در بیمار ایجاد مت هموگلوبین امی میشود که با عوارض شناخته شده آن مانند سیانور و غیره همراه است این نوع هموگلوبین‌های غیر طبیعی را که ایجاد مت هموگلوبین امی میکند هموگلوبین M مینامند و در مورد سیانورهای فامیلی باید بفکر وجود یک هموگلوبین غیر طبیعی نیز بود.

انواع موتاسیون‌ها در هموگلوبین دیده شده است البته در اکثر موارد نوع موتاسیون از نوع جایگزینی یک اسید آمینه بجای اسید آمینه دیگر میباشد ولی در چند نمونه هموگلوبین غیر طبیعی از جا افتادگی یک یا چند اسید آمینه دیده می شود مثلاً در هموگلوبین فرایبورگ اسید آمینه شماره ۲۳ زنجیره

علائم کلینیکی حامل و کاملاً "شبه به بیماری کولی مازور می باشد (۱۶-۱۷)

شرح حال یک مورد از شش مورد را در زیر ذکر میشود

شهناز - ن ۱۳ ساله که بعلت بی اشتهائی و درد ران از چند هفته قبل از بستری شدن شکایت داشت بستری گردید ، پدر و مادر همخون نیستند ، یک برادر و خواهر دارد که سالمند ،

یافته بالینی

بیمار از نظر رشد جسمی عقب افتاده است قد ۱۲۲ سانتی متر (طبیعی برای سن ۱۴۲ سانتیمتر) و وزنش ۲۴/۵ کیلوگرم (طبیعی برای سن ۲۴ کیلوگرم) بود ،

پوست و مخاطها رنگ پریده بوده دستگاهها ، بخصوص اندامها ، قلب ، کبد و طحال در معاینه بالینی تغییرات پاتولوژیک نشان نمیدادند ، در رادیوگرافی ران راست جمجمه و مچ دستها ضایعه استخوانی دیده نشد سن استخوانی با ۱۱ سال مطابقت داشت ،

یافته های آزمایشگاهی

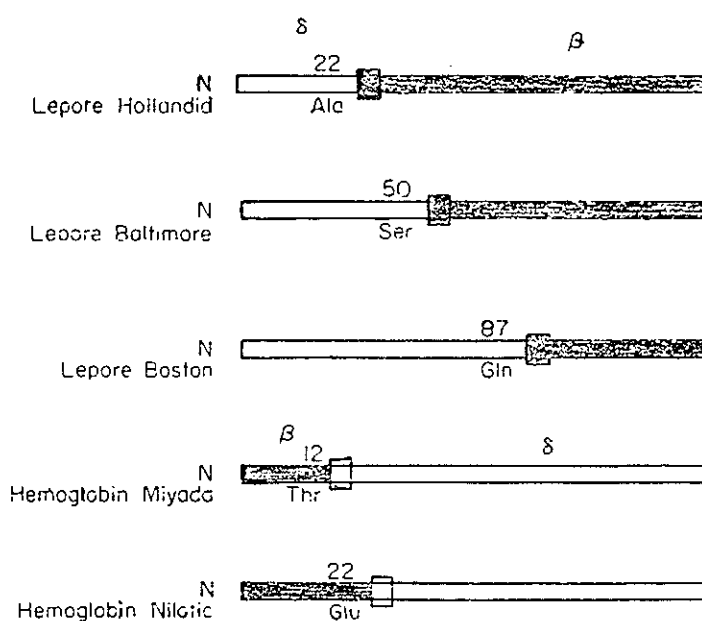
خون محیطی ۶۶۰۰ لکوسیت با فرمول طبیعی (سگمانته ۶۶٪ ، مونوسیت ۲٪ ، لنفوسیت ۳۲٪) داشت مقدار هموگلوبین ۸ گرم در صد و هماتوکریت ۲۷٪ (MCHC = ۲۹٪) بود مقدار آهن سرم ۲۲ میکروگرم در صد بود ،

روش ها و نتایج

آزمایشات خون شناسی معمولی طبق روش استاندارد (۱۸) انجام شد و قسمتی از آن در شرح حال یکی از بیماران ذکر شد - در یک بیمار که مبتلا به دو بل هتروزیگوت (هتروزیگوت دوگانه) هموگلوبین O اندونزی و D پنجاب بود و همین طور بیمار مبتلا به هیدرو نفروز بود آنمی فقر آهن وجود داشت که میتوان این آنمی را وابسته به هیدرو نفروز دانست ، در گلبولهای سرخ بیمار دانه های رسوبی انکلو زیون وجود نداشت و آزمایش جستجوی سیکلینک منفی بود نسبت هموگلوبین جنین کمتر از یک در صد و آزمایش دناتو راسیون با حرارت مطابق روش (۱۹) Dacie منفی بود در الکترو فورز

بین ژنهای سازنده زنجیره بتا و دلتا تولید میشود و ژن مخلوط و هیپریدی که حاصل میشود باعث ساخته شدن هموگلوبین میشود که زنجیره های بتای آن طبیعی نیست و در قسمتی زنجیره ساختمان دلتا و قسمتی زنجیره ساختمان بتا را دارد ،

در انواع هموگلوبین های لیپور مثل لیپور Myada لیپور هلانده و لیپور بوستون و لیپور بالتیمور محل اتصال دو زنجیره بتا و آلفا و نسبت زنجیره های بتا و دلتا که در ساختمان زنجیره شرکت میکند فرق میکند شکل زیر که از مقاله یکی از نویسندگان تهیه شده است این فرق را نشان میدهد (۱۶) .

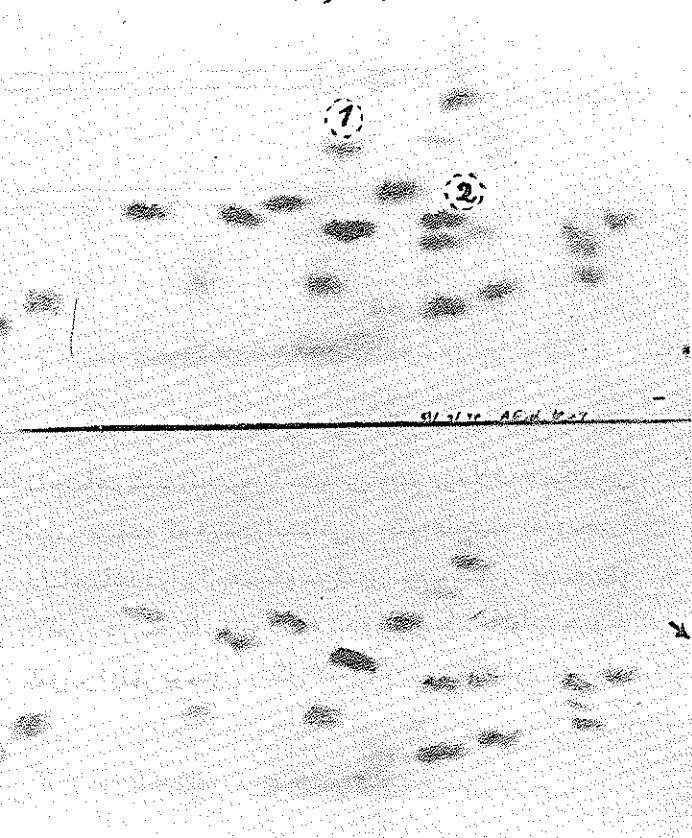


در مورد هموگلوبین های آنمی لیپور قسمت شروع زنجیره ساختمانش شبه زنجیره بتا است و این وضع برخلاف هموگلوبین لیپور میباشد که قسمت ابتدائی زنجیره ها شبه به زنجیره دلتا میباشد در ایران هموگلوبین لیپور نوع بوستون (Boston) تاکنون در سه خانواده دیده شده و در یک خانواده هموگلوبین لیپور بوستون بشکل هموزیگوت وجود دارد که دارای

استون در سرمای ۲۰ درجه جدا نموده پس از سانتریفوژ رسوب حاصله را با استون شسته و لیوفیلیزه نمودیم برای تشخیص اینکه عیب این هموگلوبین در کدام زنجیره آن می باشد به آن مرکاپتواتانول اضافه شده (۲۱) آزمایش نموده و معلوم شد که زنجیره آلفا غیر طبیعی می باشد زیرا با مقایسه با هموگلوبین طبیعی زنجیره آلفا دارای حرکت الکتروفورزی کمتری است.

زنجیره آلفای هموگلوبین غیر طبیعی را بروش کروماتو-گرافی ستونی روی CMC سلولز (کاربوکسی متیل سلولز) جدا کرده و خالص نموده (۲۲) و زنجیره جدا شده را با اتیلین ایمین آمینواتیل نمودیم (یعنی عامل سولفیدریل سیستمین را آمینواتیل کرده ایم) گلوبین آمینواتیل را با تریپسین بر طبق روش ذکر شده هضم نموده و پپتیدهای حاصله را با روش فینگرپرینت یا تهیه نقشه پپتیدی جدا نمودیم (در این روش مخلوط پپتیدی را در یک جهت با الکتروفورز با ولتاژ زیاد و در جهت دیگر با کروماتوگرافی صعودی جدا میکنند و با مقایسه با فینگرپرینت یک هموگلوبین طبیعی میتوان پپتید تغییر یافته را پیدا کرد)

شکل شماره ۲



هموگلوبین بیماران همیشه علاوه بر باند طبیعی هموگلوبین A و هموگلوبین A2 یک باند هموگلوبین کمی سریعتر از هموگلوبین A2 تقریباً در محل هموگلوبین S دیده میشود در مورد بیماری که دارای دو نوع هموگلوبین O و D بود بعلاوه تشکیل هیبرید بین زنجیره های آلفا و بتای مختلف چهار نوع باند الکتروفورزی وجود داشت نسبت این هموگلوبین به کل هموگلوبین در حدود ۲۰٪ اندازه گیری شد و این کار به وسیله حل کردن باندهای مختلف هموگلوبین از کاغذ استات سلولز و اندازه گیری بوسیله اسپکتروفتومتر انجام شد. در الکتروفورز در ژل نشاسته هموگلوبین غیر طبیعی بیمار در محل هموگلوبین A2 قرار میگیرد و این موردی است که در دو محیط استات سلولز و استات ژل حرکت الکتروفورزی فرق میکند.

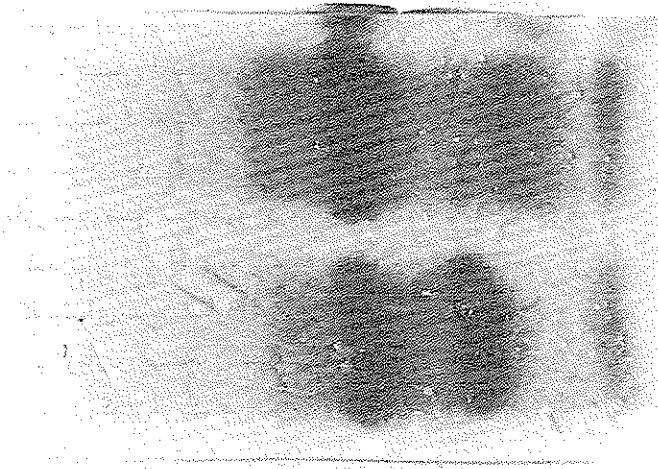
در الکتروفورز در آگار ژل $PH = 6$ (۲۰) هموگلوبین O از هموگلوبین A جدا میشود و در مبدأ قرار میگیرد.

برای تعیین ساختمان هموگلوبین غیر طبیعی اول آنرا به وسیله کروماتوگرافی ستونی روی Deae سلولز (دی اتیل آمینو اتیل سلولز) با بکار بردن تامپون تریس $PH = 8$ خالص کرده و بوسیله اولترافیلتراسیون تغلیظ نموده و گلوبین هموگلوبین خالص شده را با بکار بردن محلول ۲٪ اسید کلریدریک در

(الکتروفورز O اندونزی شکل شماره یک)

مبدأ

A2 O DA



۱۱۶ زنجیره آلفا وجود ندارد و بجای آن یک مولکول لیزین وجود دارد و ترکیب اسیدهای آمینه پپتید شماره ۲ عیناً مطابق ردیف ۱۱۷ تا ۱۲۷ زنجیره آلفا است یعنی در این هموگلوبین اسید آمینه شماره ۱۱۶ زنجیره آلفا که در حال طبیعی گلو-تامیک اسید میباشد تبدیل به لیزین شده است و در موقع هضم این زنجیره با تریپسین، تریپسین روی لیزین اثر کرده و در آن نقطه پپتید را قطع و بدو پپتید تبدیل کرده است که ما در فینگر پرنیت می بینیم.

بنابراین هموگلوبین غیر طبیعی فرمول آن عبارت است از $X_{2116} Glu \rightarrow Lys$ یعنی هموگلوبین O اندونزی است این هموگلوبین برای اولین بار بوسیله Lie و Injo و Sodono (۲۳) در اندونزی کشف و پس از آن در بعضی از نقاط جهان دیده شد ولی وفور آن در - اندونزی است و پیدا کردن این هموگلوبین در سایر نقاط جهان دلیل بر حرکت جمعیت ها در زمانهای گذشته باین مناطق میباشد آنچه که در چند مورد هموگلوبین O اندونزی یافته ایم بعلت اینکه این هموگلوبین همراه با عوارضی نظیر کم خونی و یا برفان و طحال بزرگ نمیشد این هموگلوبین بیماری زائی زیادی ندارد و آنچه در مورد کم خونی یکی از بیماران ذکر شده است احتمالاً مربوط به هیدرونفروز بوده است.

از فینگر پرنیت زنجیره آلفای هموگلوبین طبیعی و هموگلوبین گاما تهیه شده چنانچه دیده میشود پپتید شماره B ۱۲ که با فلش نشان داده شده در هموگلوبین غیر طبیعی وجود ندارد و در پپتید اضافی بشماره های ۱ و ۲ در شکل دیده می شود وجود دارد که هر دو با رنگ آمیزی هیستیدین رنگ مثبت میگیرد.

پپتیدهای اضافی و غیر طبیعی شماره های ۱ و ۲ را از چند فینگر پرنیت هموگلوبین غیر طبیعی بریده و پس از حل کردن پپتیدها را بطور خالص بدست می آوریم برای تعیین اسیدهای آمینه تشکیل دهنده هر پپتید، پپتیدها را بطور جداگانه در محلول $6 NC1H$ حل کرده و مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۱۱۰ درجه هیدرولیز نموده و اسیدهای حاصله را از هیدرو لیزهر پپتید در دستگاه تجزیه کننده اسیدهای آمینه (آمینواسید آنالایزر) تعیین مینمائیم.

چنانچه دیده میشود پپتید شماره یک دارای اسید آمینه هائی است که از ردیف اسید آمینه های ۱۰۴ تا ۱۱۶ زنجیره آلفا میباشد و یا اختلاف آن این است که گلو تامیک اسید شماره

تابلوی شماره ۳ ترکیب اسیدهای آمینه پپتید شماره ۱ و ۲ را نشان میدهد.

Antino acid	Peptide 1	Peptide 2
Lysine	1	2
Histidine	1	1
Aspartic acid	—	1
Threonine	1	1
Serine	—	1
Proline	1	1
Alanine	3	2
Valine	1	1
Leucine	4	1
Phenylalanine	—	1

References

- 1- Rahbar, S.: Hemoglobinopathies in Iran. 14th International Congress of Hematology, Sao-Poulo, Brazil, July 1972.
- 2- Rahbar, S., Sauodi, H. and Daneshmand, P.: Acta Hematologica 47:43, 1972.
- 3- Rahbar, S., Nowzari, G.: Hb Setif in 3 Iranien family, in press.
- 4- Rahbar, S. Berelian, F. Nowzari, G. and Daneshmand, P.: Hb. O. Indonesia in an Iranian family: Acta Hematologica, 50:30, 1973.
- 5- Rahbar, S. Nowzari, G. and Poosti, M.: Am. J. Clin. of Pathology 64: 416, 1975.
- 6- Rahbar, S. Nowzari, G. and Daneshmand, P.: Hemoglobin Daneshgah Tehran, Nature New Biology, 245-268, 1973.
- 7- Rahbar, S. Mahdavi, N. Nowzari, G. and Mostafavi, I: Hb Aria B.B.I. Acta 386-525, 1975.
- 8- Frack, P.G., Hitzig, W.H. and Bettec, K: Blood 20: 261, 1962.
- 9- Dacie, J.V., Shinton, N.K. Gaffnay P.J.Jr., Casreil, R.W. and Lehrman, H.: Nature 216, 633, 1967.
- 10- Jensen, M. Osici, F.A.: Nathan D.G. and Bunn. F.H.: J.Clin. Invest. 55, 469, 1975.
- 11- Jones, R.T. Brimhall, B. Huisman, T.H.J. et al.: Science 154, 1024, 1966.
- 12- De Jong W.W., Wend, L.N. and Bernini L.F.: Nature 220, 788, 1968.
- 13- Bradly T.B. Jr., Wohl, R.C. and Ruches, R.F.: Science 157, 1581, 1967.
- 14- Clegg, J.B. and Weathesall D.J.: Nature 234, 337, 1971.
- 15- Lehmann, H.: Third International Conf. of Hematology. European and African association London, August, 1975.
- 16- Rahbar, S. Golban-Moghadam, N. and Saoodi, H.: Blood 43, 79, 1974.
- 17- Rahbar, S. Azizi, M. and Nowzari, G.: Acta Hematology, 53, 60, 1975.
- 18- Wintrobe, M.M.: Clinical Hematologie 6th Ed. Lea & Feb. 1974.
- 19- Grimes A.S. Mershi, A. and Dacie, J.V.: Brit. J. Moemat. 10, 28, 1964.
- 20- Robinson, A.R. Robenson, M. Harrison, K. and Zuelzer, W.W.J.: Lab. Clin. Med. 50, 745, 1967.
- 21- Cherneff, A.T. and Pettit, N.M.: Blood 24, 750, 1965.
- 22- Clegg, J.B., Naughton, M.A. and Weathesall, D.J.J.: Molec, Biol, 19, 9, 1966.
- 23- Lie Ingo. L.E. and Sodorno: Brit. Med. J. I. 1461, 1958.