

نامه دانشکده پزشکی تهران

شماره هفتم از سال بیست و چهارم فروردین ماه ۱۳۴۶

جستجوها و گروهای علمی

دیل، ایزاک و لهن

دکتر رهبر

هموگلوبین‌های غیر طبیعی ایران*** مشاهده یک نوع جدید هموگلوبین β_2 در ایران

$\alpha_2 \beta_2 77 \text{ His} \rightarrow \text{Asp}$

خلاصه این مقاله در بازدهمین کنگره خون‌شناسی در استرالیا ارائه شده است

اخیراً برای تجسس هموگلوبین‌های غیر طبیعی در ایران سه بررسی جداگانه انجام داده‌ایم. دوبررسی در سالهای ۱۹۶۵ و ۱۹۶۶ در شیراز انجام شد که ۱۰۰ نمونه خون اشخاص عادی مورد آزمایش قرار گرفت که مبتلا به کم‌خونی همولیتیکی نبودند. در بین این صدمورد فقط دومورد هموگلوبین Λ -D دیده شد (D پنجاب).

بررسی سوم در تهران بر روی ۱۰۰ مورد بیماران مبتلا به کم‌خونی انجام شد که از این

* گروه ایمونولوژی عمومی دانشکده پزشکی تهران

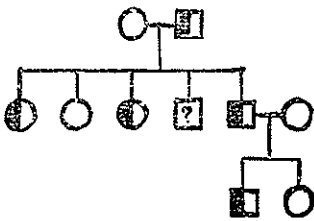
** مرکز تحقیقات هموگلوبین‌های غیر طبیعی دانشگاه کمبریج انگلستان

*** ترجمه از مجله 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 در یک بیمار دیگر یک هموگلوبین با حرکت الکتروفورزی سریع دیده شد. اکثر بیماران مبتلا به سیکل سل از اهالی شمال ایران و جنوب دریای خزر بوده اند ولی هموگلوبین با حرکت الکتروفورزی سریع در یک خانواده ساکن مرکز ایران دیده شد.

هموگلوبین J ایران

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



شکل ۱

شجره زاده هموگلوبین J

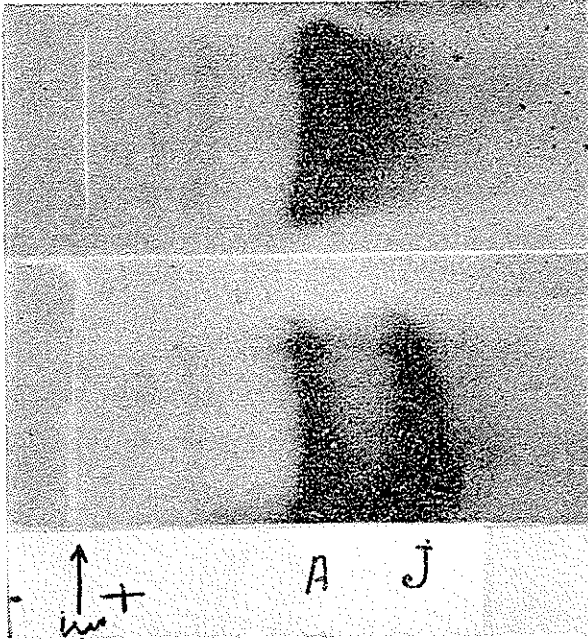
آزمایش هموگلوبین پدر بیمار نیز هموگلوبین غیرطبیعی را نشان داد سایر آزمایشات خونی در حدود طبیعی بوده اند مقدار هموگلوبین $14/2$ گرم درصد سانتی متر مکعب گلوبولهای سرخ 49.0000 هماتوکریت 41% و $M.C.H.C = 35$ سلولهای صدفی و سایر گلوبولهای سرخ غیرطبیعی در خون محیطی دیده نشد بنابراین وجود این هموگلوبین بخودی خود ایجاد کم خونی را نکرده است و کم خونی طفل علت دیگری داشته است.

آزمایشات شیمیائی هموگلوبین ایران

محلول هموگلوبین بطور معمول تهیه و الکتروفورز در محیط های کاغذ - اسنات سلولز - استارچ ژل و استارچ بلاک انجام شد در تمام آزمایشات دیده شد که هموگلوبین طبیعی A و هموگلوبین J تقریباً به مقدار مساوی وجود دارد. (شکل ۲)

هموگلوبین A تشکیل شده است از دوزنجیره پولی پپتیدی آلفا و دو زنجیره بتا و فورسول آن عبارتست از $\alpha_2\beta_2$ - هموگلوبین J در الکتروفورز PH قلیائی از هموگلوبین A سریع تر به - طرف قطب مثبت حرکت میکند و این خاصیت نشان میدهد که دارای بار منفی بیشتری میباشد.

برای تعیین اینکه اختلاف بار الکتریکی هموگلوبین J مربوط به زنجیره پلی پپتیدی آلفا و یا بتا میباشد قبلاً هموگلوبین غیرطبیعی را بوسیله استارچ بلاک خالص کرده و عامل Heme را جدا کرده و گلوبین غیرطبیعی را با گلوبین هموگلوبین طبیعی A بنمایشه میکنیم برای اینکه از روش چرنف و همکاران ۱۹۶۵ استفاده میشود :

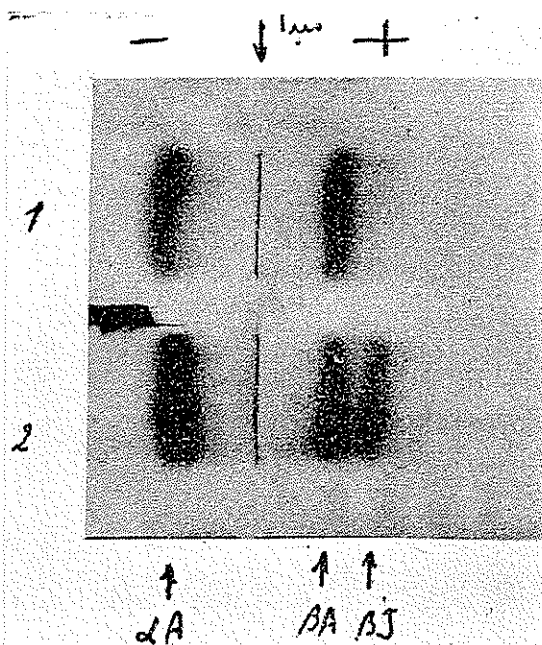


شکل ۲- الکتروفورز در
استارچ ژل
بالا طبیعی

پائین هموگلوبین بیمار

این روش عبارتست از الکتروفورز گلوبین در استارچ ژل PH=8 با افزایش 6M اوره . وجود اوره با غلظت زیاد باعث جدا شدن زنجیره های پلی پپتیدی آلفا و بتا شده و در الکتروفورز زنجیره آلفا بطرف کاتد و زنجیره بتا بطرف آنود حرکت میکند چنانکه در شکل شماره ۳ دیده میشود زنجیره آلفای هموگلوبین J درست شبیه به زنجیره آلفای همو- گلوبین A حرکت کرده است ولی زنجیره بتای هموگلوبین J سریع تر از زنجیره بتای هموگلوبین A حرکت کرده است و این نشان میدهد که ازدیاد بار الکتریکی منفی هموگلوبین J مربوط به زنجیره بتای هموگلوبین J میباشد بنابراین فرمول آن عبارتست از $\alpha_2^A \beta_2^J$. هیپرید کردن هموگلوبین J با هموگلوبین Canine این نتیجه را تأیید کرد که زنجیره بتای هموگلوبین J غیرطبیعی است هیپرید کردن هموگلوبین A با هموگلوبین سگ نیز بموازات آزمایش بالا بعنوان شاهد انجام شد (ایتانورو روبینسون ۱۹۵۳ میونر و شوتروبیون ۱۹۶۳) بعد از جدا کردن زنجیره های پلی پپتیدی و اتصال مجدد هموگلوبین های هیپرید جدید بدست سیاید هیپریدهای حاصل از زنجیره آلفای هموگلوبین J و هموگلوبین سگ با هم اختلافی نشان نمیدهند ولی

هیپریدهای زنجیره بتای هموگلوبین J و زنجیره آلفای هموگلوبین سگ با هیپرید مشابه خود



شکل ۳- جدا کردن زنجیره عا در استارچ ژل PH=8

۱- هموگلوبین A

۲- هموگلوبین ایران J+ A زنجیره

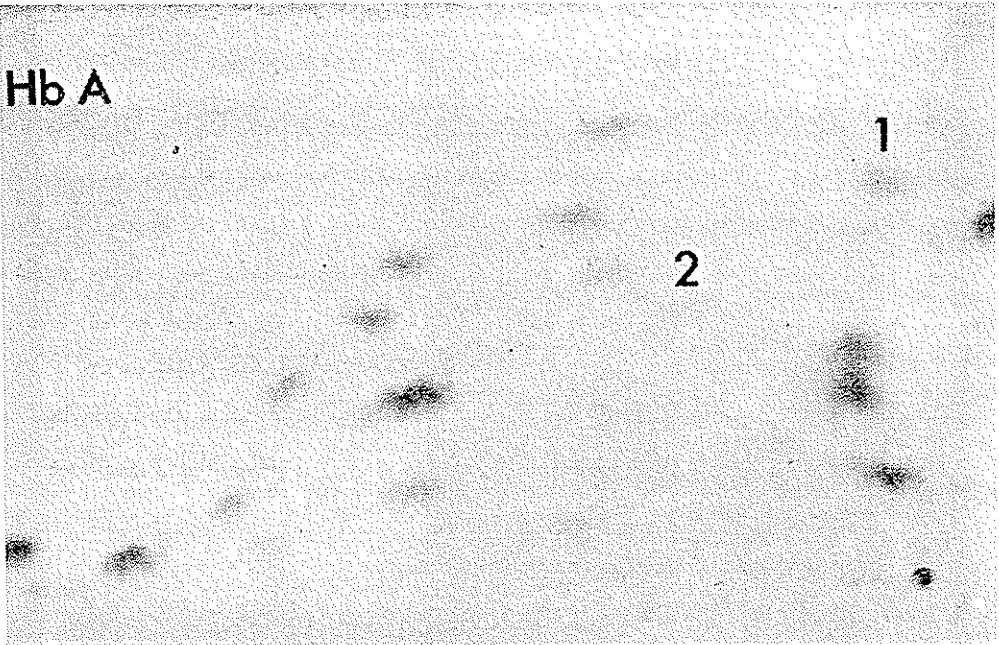
بتای دوم که بیشتر حرکت کرده مربوط به

هموگلوبین J ایران میباشد

در هموگلوبین طبیعی متفاوت است هیپرید α_2 Canine β_2^A سریع تر از هیپرید α_2 Canine β_2^A در الکتروفورز استارچ ژل ۸/۶ حرکت میکند بنابراین دارای شارژ منفی بیشتری است .

برای کشف اینکه آیا این هموگلوبین J یک نوع جدید میباشد و یا شبیه به هموگلوبین J بالیتور میباشد (با گلیونی و ودرال ۱۹۶۳) گلوبین هموگلوبین را بوسیله تریپسین دیسایون کرده و پپتیدهای محلول حاصل را با الکتروفورز در PH=۶/۵ در یک جهت و کروماتوگرافی صعودی در جهت دیگر از هم جدا میکنیم تا یکک فینگرپرینت و یا نقشه پپتیدی پپتیدهای محلول هموگلوبین J بدست آید بموازات آن فینگرپرینت هموگلوبین طبیعی A نیز تهیه میشود . روش های بکار رفته شبیه بروش اینگرام ۱۹۵۸ و با گلیونی ۱۹۶۱ میباشد . شرح کامل تکنیک های فینگرپرینت اخیراً بوسیله واتسون و بلیاسز - بیل - ایروین و لهمن (۱۹۶۵) خلاصه شده است .

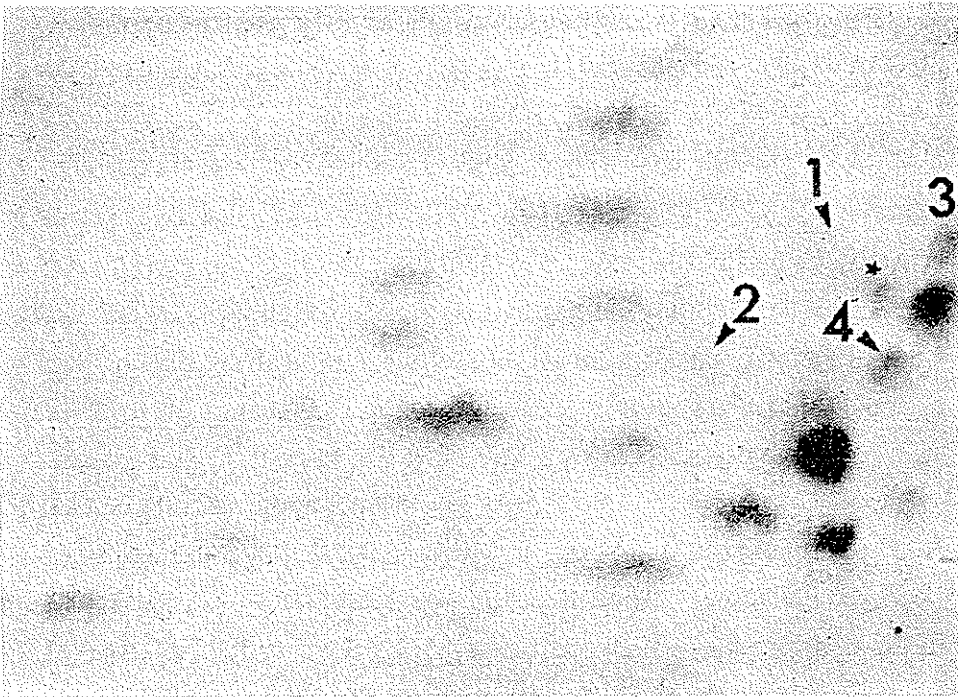
در مقایسه در فینگرپرینت (شکل ۴ و ۵) دیده میشود که دو پپتید هموگلوبین طبیعی یعنی شماره های ۱ و ۲ در هموگلوبین J وجود ندارد در عوض دو پپتید جدید (۳ و ۴) دیده میشود (شکل ۵) در زیر پپتید نمره ۴ یک پپتید اضافی دیده میشود که با علامت ستاره مشخص شده است این پپتید دارای فعل و انفعال مثبت با معرف های تیروزین است و در اغلب فینگر



شکل ۴- فینگرپرینت هموگلوبین طبیعی A
 نمره ۱- پپتید IX β TP (آسیدهای آمینه شماره ۶۷ تا ۸۲ زنجیره بتا)
 نمره ۲- پپتید IX - VIII β (آسیدهای آمینه شماره ۶۶ تا ۸۲ زنجیره بتا)

پرینت‌ها دیده می‌شود و در نتیجه اثر کیموتروپسین روی اسیدهای آمینه شماره ۱۲۱ تا ۱۳۲ زنجیره بتا می‌باشد (XIII- β TP). پپتید کیموتروپتیک شامل اسیدهای آمینه ۱۲۱ تا ۱۳۰ زنجیره بتاست از این پپتید با علامت ستاره می‌توان صرف‌نظر کرد و پپتیدهای نمره ۳ و ۴ فینگرپرینت هموگلوبین A نشان دهنده اختلاف هموگلوبین طبیعی و هموگلوبین J ایران می‌باشد. پپتیدهای نمره ۱ و ۲ در هموگلوبین A مربوط به پپتید IX β TP و پپتید VIII-IX β TP زنجیره بتاست پپتید VIII β TP یک پپتید حقیقی نیست بلکه یک اسید آمینه لیزین آزاد می‌باشد و محل آن وضعیت شماره ۶۶ زنجیره بتاست که خود شامل ۶۶ تا ۱۴۱ اسید آمینه می‌باشد. تریپسین بطور کامل اتصال بین این لیزین و ۶۶ اسید آمینه بعدی (شماره ۶۷ تا ۸۲) را قطع نمی‌کند بنابراین لیزین آزاد VIII β TP و پپتید IX β TP و همین‌طور پپتید VIII β TP - IX β TP هر سه در فینگرپرینت هموگلوبین A دیده می‌شود.

پپتید IX β TP هموگلوبین طبیعی دارای هیستیدین می‌باشد و این هیستیدین با رنگ -



شکل ۵- فینگرپرینت هموگلوبین J ایران

نمره ۱ و ۲ محل پپتیدهای IX - β TPVIII که وجود ندارد
نمره های ۳ و ۴ پپتیدهای جدید را نشان می دهد به شرح مقاله رجوع شود

آسیزی مخصوص هیستیدین ظاهر می شود و پپتیدهای ۱ و ۲ زنجیره بتای هموگلوبین طبیعی آزمایش مثبت با معرف هیستیدین نشان می دهند اما در فینگرپرینت هموگلوبین J ایران پپتیدهای نمره ۳ و ۴ هیستیدین را نشان نمی دهند و چون هموگلوبین J یک هموگلوبین سریع است و دارای شارژ منفی بیشتری است در این مرحله می توان حدس زد که هیستیدین در وضعیت ۷۷ زنجیره بتا در هموگلوبین طبیعی بوسیله یک آسید آمینه با شارژ منفی عوض شده است که ویا آسید گلوتامیک Glu و یا آسید اسپارتیک Asp می باشد.

مطالعات نیرنبرگ و همکاران ۱۹۶۵ بر روی سیستم های میکروبی عمل کدژنتیک که ترتیب قرار گرفتن بازهای پوریک و پیریمیدیک نوکلئوتیدهای Messenger R.N.A می باشد و کنترل قرار گرفتن آسید آمین در ساختمان پروتئین در دست دارد روشن ساخته است. و چون انواع آللیک هموگلوبین های غیر طبیعی در نتیجه یک نوع موتاسیون واحد ایجاد می گردد (تغییر فقط یکی از بازهای پوریک و یا پیریمیدیک) ثابت شده است که هر نوع تغییری تابع کدژنتیک می باشد (بیل ولهن ۱۹۶۵).

کدژنتیک بازهای نوکلئوتید برای هیستیدین عبارتست از C.A.C سیروزین - آدنین - سیروزین و یا C.A.U سیروزین - آدنین - اوراسیل و کدژنتیک برای آسید گلوتامیک GAA یا GAG گوانین - آدنین - گوانین میباشد و تغییر فقط یکی از بازهای کدژنتیک هیستیدین باعث ایجاد کدژنتیک آسید گلوتامیک نمیشود بنابراین این سوتاسیون غیر ممکن میگردد اما Triplet Code اسپارتریک آسید عبارتست از GAC یا GAU و گراولین باز کدژنتیک هیستیدین CAC یا CAU به G گوانین تغییر یابد تبدیل به کدژنتیک اسپارتریک آسید میشود GAC و این تغییر واحد در بازهای کدژنتیک ممکن است و با تغییر فقط یکی از بازها کدژنتیک هیستیدین تبدیل به کدژنتیک اسپارتریک آسید میگردد بنابراین فقط بارنگ آمیزی فینگر پرنیت های هموگلوبین های J و A با معرف هیستیدین میتوان حدس زد که این هموگلوبین در نتیجه تغییر هیستیدین شماره ۷۷ زنجیره بتا به اسپارتریک آسید بوجود آمده است و این هیستیدین تنها هیستیدینی است که در پپتید β TpIX وجود دارد.

پپتید شماره ۳ را از فینگر پرنیت هموگلوبین J بریده و در آسید کلریدریک 6N حل کرده (سانگروتوبی ۱۹۵۱ و کلگ و نفتون ۱۹۶۵) و پس از هیدرولیز این پپتید آسید های آمینه آنرا در دستگاه آمینوآسید آنالایزر بر طبق روش اسپاکمن واشتاین و مورس ۱۹۵۸ تعیین میکنند و نتایج آنرا با آنالیز پپتید β Tp IX هموگلوبین طبیعی مقایسه میکنیم.

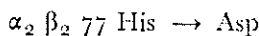
نسبت مولکول های آسیدهای آمینه

آسید آمینه	پپتید β Tp IX هموگلوبین A	پپتید β Tp III هموگلوبین J ایران
Asp	۲/۷	۳/۷
Ser	۱/	۱/۵
Gly	۲	۲/۱
Ala	۲/۴	۲/۱
Val	۱/۱	۱/۱
Leu	۷/۷	۳/۶
Phe]	۱	۱
Lys	۰/۹	۱
His	۱/۱	۰

تا بلوی یک نشان میدهد که پپتید شماره ۳ که βTpIX هموگلوبین J میباشد اختلاف آن با βTpIX هموگلوبین A فقط در یک آمیدآسپارتیکک میباشد که جایگزین هیستیدین در هموگلوبین A شده است.

تا بلوی اول : آنالیز اسیدهای آمینه پپتید $\beta\text{Tp IX}$ (آسیدهای آمینه شماره ۶۷ تا ۸۲ زنجیره بتا برای هموگلوبین A و هموگلوبین J ایران .
 آسید آمینه اسپارازین در وضعیت ۸. در هیدرولیز تبدیل به اسپارتیکک آسید شده است و در هر دو پپتید $\beta\text{Tp IX}$ هموگلوبین A و J دیده میشود .

با در نظر گرفتن اینکه هیچ نوع تغییر دیگری در اسیدهای آمینه هموگلوبین J ایران دیده نمی شود میتوان فورمول این هموگلوبین را اینطور نوشت .



تا بلوی دوم : ترتیب اسیدهای آمینه پپتید $\beta\text{Tp IX}$ هموگلوبین A و هموگلوبین J ایران (آسید آمینه 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
Val	Leu	Gly	Ala	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Asp	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys

حرکت الکتروفورزی $\text{PH} = ۸/۶$ و $\text{PH} = ۶/۵$

دو پپتید جدید یعنی شماره ۳ و ۴ در فرینگرپرینت هموگلوبین J خیلی به کاتد نزدیک هستند تا پپتیدهای $\beta\text{IpVIII} - \text{IX}$ و $\beta\text{Tp IX}$ هموگلوبین طبیعی (شکل شماره ۴ و ۵) چون آنها دارای بار منفی بیشتری هستند هموگلوبین J بتا ایران در $\text{PH} = ۸/۶$ دارای حرکت الکتروفورزی مشخصی است که نماینده اضافه شدن شارژ منفی در زنجیره بتا میباشد. اختلاف حرکت الکتروفورزی پپتیدهای ۳ و ۴ هموگلوبین J با حرکت الکتروفورزی پپتیدهای ۱ و ۲ هموگلوبین طبیعی در $\text{PH} = ۶/۵$ بیش از موقعی است که فقط یک واحد شارژ در سولکول تغییر کرده باشد مثلاً آسید آمینه خنثی تبدیل به یک آسید آمینه با بار منفی (آسیدی) بشود . اختلاف حرکت الکتروفورزی نشان میدهد که یک آسید آمینه با بار نیمه مثبت (هیستیدین) تبدیل به یک آسید آمینه با بار منفی (آسیدی) شده است .

هیستیدین در $\text{PH} = ۸/۶$ دارای شارژ نمیشود و مثل یک آسید آمینه خنثی است و در $\text{PH} = ۸/۶$ تبدیل هیستیدین به یک آسید آمینه با بار منفی مثل هموگلوبین J ایران تفاوت یک شارژ منفی است در صورتیکه در $\text{PH} = ۶/۵$ که الکتروفورزی فرینت در این PH انجام میشود هیستیدین تقریباً شارژ و دارای بار مثبت میباشد جایگزینی یک آسید آمینه با بار منفی بجای

عامل هیستیدین با بار مثبت باعث ایجاد اختلاف شارژ بیشتری بین $\beta\text{Tp IX}$ هموگلوبین J و هموگلوبین A میشود و به این علت در $\text{pH} = 6/5$ اختلاف حرکت الکتروفورزی پپتیدها بیش از $8/6$ می باشد .

اگر فینگرپرینت هموگلوبین J ایران را با فینگرپرینت هموگلوبین سیاتل (هیونزوشوتر ۱۹۶۵) مقایسه کنیم در هموگلوبین سیاتل آلانین که یک اسید آمینه خنثی میباشد در وضعیت ۷ یا ۷ زنجیره بتا جایگزین اسید آگلوتامیک Glu شده است و پپتید $\beta\text{Tp IX}$ هموگلوبین سیاتل دارای حرکت الکتروفورزی کمتری به طرف قطب مثبت میباشد تا پپتید $\beta\text{Tp V}$ (پپتید $\beta\text{Tp V}$ در زیر پپتید $\beta\text{Tp IX}$ دیده میشود و بخوبی رنگ سیگردد) ولی پپتید $\beta\text{Tp IX}$ (پپتید شماره ۳ هموگلوبین ایران بیشتر از پپتید $\beta\text{Tp V}$ بطرف آند حرکت میکند علت آنست که در $\text{pH} = 6/5$ پپتید $\beta\text{Tp IX}$ هموگلوبین J ایران دارای شارژ منفی بیشتری از همان پپتید در هموگلوبین سیاتل میباشد ($\text{Ala} \rightarrow \text{Glu}$ 76 یا 75).

قبلا نتایج متفاوتی برای الکتروفورز و کروماتوگرافی هموگلوبین J در pH اسیدی بدست آمده است بعضی از مصنفین مثلاً (آزرو لهمن ۱۹۸۸) گزارشی داده اند که هموگلوبین J - A در الکتروفورز $\text{pH} = 6/5$ از هم جدا نمی شوند و یا در کروماتوگرافی $\text{Irc} - 50$ در $\text{pH} = 6$ جدا نمی شوند. سایر مصنفین بخوبی در این شرایط این دو هموگلوبین را جدا کرده اند مثلاً (ویرژینیا سینیس) و می توان تصور کرد که علت تجربه روی هموگلوبین های J مختلف میباشد و چون هموگلوبین J ایران بخوبی در $\text{pH} = 6/5$ از هموگلوبین A جدا میشود از این رقتن هیستیدین در این pH باعث اختلاف شارژ زیادی بین هموگلوبین A و J ایران می شود.

خلاصه: در دوبررسی روی ۱۰۰ هموگلوبین اشخاص عادی در شیراز ایران نقطه نمونه هموگلوبین D پنجاب دیده شد در بررسی سومی که در تهران روی چهارصد بیمار دارای علائم کم خونی انجام شد تا لاسمی - هموگلوبین S و هموگلوبین D و هموگلوبین C و یک هموگلوبین جدید بنام J ایران بفرسول $\text{Asp} \rightarrow \text{His} \beta_{277} \alpha_2$ کشف گردید.

قدردانی: یکی از مصنفین (دکتر رهبر) از آقای دکتر میرداسادی و آقای دکتر مغنیدی و آقای دکتر رابرت برای راهنماییها و کمکهای ذقیمت آنها کمال امتنان دارد ما همینطور از آقای ایروین که فینگرپرینت هموگلوبین D شیراز را انجام داده اند تشکر میکنیم همینطور از آقای پروفیسور دوتزو کارکنان بخش ایشان در دانشگاه پهلوی برای ارسال و جمع آوری نمونه های خون تشکر میکنیم.

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 Weatherall, 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,