

بیوسنتز هموگلوبین در خارج از بدن (in Vitro) و اهمیت بررسی کمی زنجیره های آن در تشخیص انواع الفاتالاسمی بوسیله مواد رادیواکتیو در ایران

دکتر گیتی نوذری با همکاری فنی ایران مصطفوی

نوزادان مینماید این هموگلوبین ها از نظر تنفسی بدون ارزش بوده و بعلت بی ثباتی و رسوب در گلبولها موجب همولیز میگرددند و یا بوسیله طحال جمع آوری و خرد گشته از جریان خون خارج میشوند و بهمین دلایل بیماری و کم خونی را شدت میدهند.

کم ساخته شدن زنجیره بتا تولید بتا تالاسمی مینماید که در فرم خفیف یا مینور minor و شدید یا مازور major (آنمی کولی Cooley Anaemia) دیده شده است - در فرم مازور که هر دو ژن سازنده زنجیره بتا مبتلا هستند یا زنجیره بطور مطلق ساخته نمی شود  $\beta^0$  thalassaemia و یا کمی ساخته میشود  $\beta^+$  thalassaemia بهر حال علائم کلینیکی (از قبیل تغییر شکل استخوان ها و عقب افتاده گی رشد) و آزمایشگاهی (بالا بودن هموگلوبین جنینی و  $A_2$  و زیاد شدن مقاومت گلبولی) مشخص داشته (چنانکه با آنمی فقر آهن و یا الفاتالاسمی توام نباشد) و اکثرا "قابل تشخیص اند - اما متأسفانه در موارد الفاتالاسمی که نقص ژنتیکی در سنتز زنجیره های الفاست تشخیص چندان ساده نبوده و علائم کلینیکی و آزمایشگاهی مشخصی ممکن است نداشته باشد بخصوص در فرم خفیف آن که  $\alpha_2$  thalassaemia

معرفی: تالاسمی یا کم خونی مدیترانه ای بیماری ژنتیکی و شایع در بعضی نقاط دنیا مثل اطراف دریای مدیترانه و جنوب شرقی و جنوب آسیاست (۱) و (۲) و (۳) کشور ایران نیز که از نظر جغرافیائی بین ایندو منطقه قرار گرفته و طبیعتاً یک گذرگاه بوده همچنین از نظر تاریخی صحنه تاخست و تازهای چون حمله اسکندر و عرب و فتنه مغول گشته است نیز منطقاً " نمی تواند خالی از این نقص ژنتیکی باشد تالاسمی برعکس هموگلوبین های غیر طبیعی یک نقص کیفی مولکول هموگلوبین نیست بلکه زنجیره های الفا و بتای 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 اصلاً " ساخته نشدن یکی از زنجیره ها شدت و ضعف داشته در نتیجه تولید کم خونی - بیماری و عوارض خفیف تا شدید و مرگ مینمایند. از طرفی زنجیره دیگر که باندازه کافی و نرمال سنتز میگردد چون جفت غیر همجنس خود را باندازه کافی نمی یابد تا مولکول باثبات هموگلوبین A را تشکیل دهد - مولکولهای هم جنس ۴ به ۴ بهم پیوسته و تولید تترامر بی ثبات و غیر طبیعی هموگلوبین  $H(\beta_4)$  در بالغین و هموگلوبین Bart's  $(\gamma_4)$  در

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

در فرم شدیدتر که  $\alpha_1$  thalassaemia نامیده شده تغییرات شکل گلبول قرمز ممکن است در کار بوده و هموگلوبین های  $F$  و  $A_2$  نیز میتوانند کمتر از نرمال باشند . در بیماری هموگلوبین H الفاتالاسمی بشکلی اینکلوزن های غربالی در گلبول قرمز خود را نشان داده و این وقتی است که سه ژن مبتلا به تالاسمی وجود دارد . وبالاخره تالاسمیک بودن هر چهار ژن آلفا مغایر باحیات بوده و باعث سقط جنین و Hydrops Foetalis میگردد . این سندرم در حقیقت الفاتالاسمی هموزیگوت  $\alpha$  thal<sub>1</sub>/αthal<sub>2</sub> میباشد .

در بخش هموگلوبین های غیرطبیعی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران که سالیان متمادی روی هموگلوبین های غیر طبیعی در ایران کار میکرده است و تعداد قابل ملاحظه ای هموگلوبین غیر طبیعی در ایران برای اولین بار در جهان کشف و بدنیای علم عرضه نموده است (۴) بررسی تالاسمی ها نیز از نظر دور نبوده و مواردی از بتا تالاسمی را بوسیله تستهای مربوطه مشخص نموده است (۵) .

هدف از نوشتن این مقاله پیشرفتی است که اخیراً با مدت تازه و دقیقتر بیوسنتز هموگلوبین در خارج از بدن و مار که نمودن زنجیره ها با مواد رادیواکتیو و مقایسه دیواکتیویته زنجیره ها نسبت بهم - حتی  $\alpha_2$  thalassaemia را تشخیص داده و آنرا با موارد نرمال و شدید تالاسمی (هموگلوبین H) که در حقیقت دو بل هتروزیگوت  $\alpha$  thal<sub>1</sub>/αthal<sub>2</sub> است مقایسه نموده ام . این موارد خفیف گرچه در مبتلایان ظاهراً "میتواند آزار چندانی نداشته باشد لیکن نتیجه ازدواج این افراد با افراد مشابه خود که دارای چنین نقص ژنتیکی باشند احتمال فاجعه بوجود آمدن نوزادی با نقص شدید و هموزیگوت را داشته و تشخیص آن باعث میشود که بتوان از این فاجعه قبل از وقوع جلوگیری بعمل آورد .

متد: رتیولو سیت های خون تازه بیمار را طبق روشهای معمول جدا نموده با سرم فیزیولوژی در سرما شسته -

املاح لازم بغلظت های معین همراه با سرم دیالیز شده انسانی و آهن و کلیه اسید آمینه های حیوانی با استثنای یک اسید آمینه (لوسین) به رتیولو سیتها علاوه نموده درین ماری ۳۷ درجه با گردش ملایم دورانی قرار داده شد بطرزیکه اکسیژن براحتی در دسترس گلبولها اشد . مقدار  $500 \mu Ci$  از لوسین  $^3H$  ( $0/014 \mu mol$ ) بعنوان ماده رادیواکتیو (New England Nuclear) بجای تنها اسید آمینه ای که اضافه نشده بود به رتیولو سیتها علاوه و مدت لازم درین ماری قرار گرفت (۶) .

سپس رتیولو سیتها را ازین ماری خارج ساخته زیادی ایزوتوپ با شستن متوالی بوسیله سرم فیزیولوژی در سرما از محیط خارج گشت - رتیولو سیتها را همولیز نموده گلوبین آن در محلول ۱/۵% اسید استن رسوب داده و تهیه شد .

زنجیره های هموگلوبین را در مجاورت اوره ۸ مولارو (۰,۰۵M) مرکاپتوانانول با گرادیا نتی از محلول فسفات سدیم  $PH=6.7-6.8$  بوسیله روش کروماتوگرافی با تعویض یون ( $CM_{23}$  سلولز) جدا نموده (۷) رادیواکتیویته زنجیره ها را در سنتی لیتور LS233 Beckman تعیین کرده منحنی رادیواکتیویته را نسبت به منحنی optical density (LKB Recorder) و یا اسپکتروفتومتر زایس) ترسیم و نسبت بیکدیگر سنجیده و Activity specific هر یک از زنجیره ها تعیین گشت (۸) و (۹) .

نتیجه: ۱- تعداد ۴ نمونه خون نرمال مورد آزمایش قرار گرفت و منحنی مربوطه ترسیم گردید (شکل شماره ۱) معدل نسبت ساخته شدن زنجیره های الفا و بتای آنها نسبت بهم  $\alpha/\beta$  ratio = ۰/۹۷ - ۱/۱ Activity و Specific زنجیره الفا نسبت به بتا  $0/90 - 1/02 = S.A^\alpha / S.A^\beta$  بود .

۲- در مورد بیمار ۲۱ ساله ای اهل آبادان که سابقه کم خونی سردرد و سرگیجه داشته - هموگلوبین اش حدود ۸ گرم و رتیولو سیت ۱۵% و دارای طحال بزرگ بوده است این آزمایش بعمل آمده آزمایشهای خون شناسی و بیوشیمی بیمار بقرار زیر است :

$$M C V = 86 \pm 5 \text{ میکرون مکعب}$$

$$M C H = 29 \pm 2 \quad \gamma\gamma$$

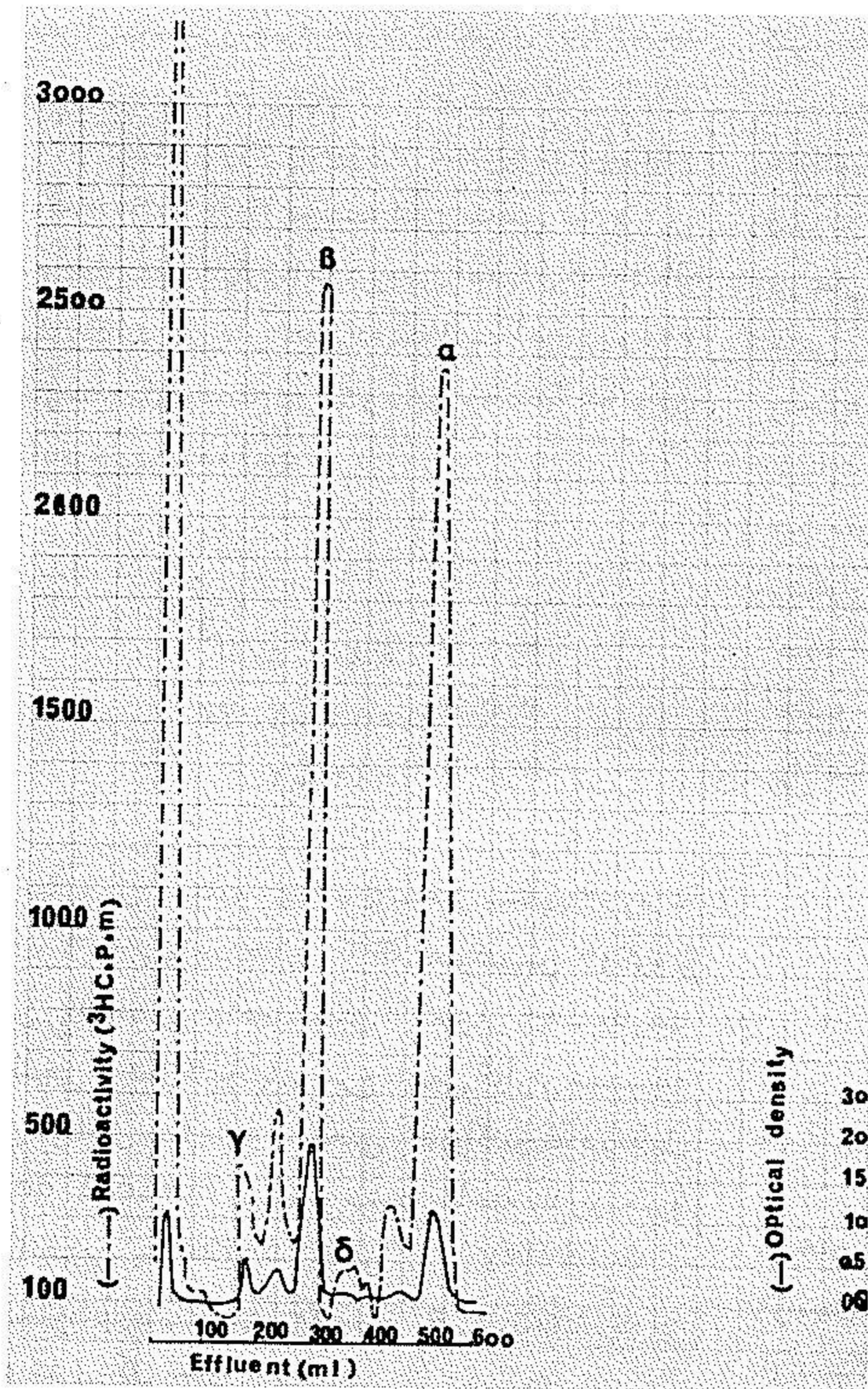
$$M C H C = 34 \pm 2$$

بیلروبین مستقیم = ۰/۷ و غیر مستقیم ۳ میلیسی

گرم در صد بوده است ضمناً "خون بیمار با آب نمک ۳/۳

(Brilliant Cresyl Blue)  
 در الکتروفورز همولیز بیمار در PH قلیائی (۸/۶)  
 باندرسریر هموگلوبین وجود داشت در لام خونی گلبولهای

دز هزار ۲۷% همولیز گشته و بنابراین مقاومت گلبولی آن  
 زیادتر از نرمال بوده است همچنین اینکلوزن های غربالی  
 هموگلوبین H در گلبولهای سرخ با رنگ آمیزی BCB دیده



منحنی شماره ۱- جدا کردن زنجیره های هموگلوبین ساخته شده در خارج از بدن (in vitro) فرد طبیعی که قبلاً " با اسید آمینه لوسین (<sup>3</sup>H) نشان دار شده بود .

شکل غیر طبیعی اریتروسیت ها همراه رتیکیلوسیت زیاد بیمار تأیید کننده این بیماری اند در منحنی سنتز زنجیره هادر مقایسه با منحنی نرمال فقدان فاحشی در ساخته شدن زنجیره آلفا مشاهده میشود.

اما در مورد بیمار دیگر تنها علامت کلینیکی راهنمائی کننده طحال بزرگ بیمار است که میتواند علل مختلف داشته باشد آزمایشهای هماتولوژی و بیوشیمی بیمار حتی مقدار طبیعی هموگلوبین های  $A_2$  و F و مقاومت گلبولی بیمار بهیچوجه کمک به تشخیص نمینمایند در صورتیکه سنتز هموگلوبین بیمار در خارج از بدن و بررسی مقدار ساخته شدن زنجیره ها بطور قطعی و کامل نقص و کمبود سنتز زنجیره آلفا را در مقابل زنجیره بتا بخصوص در مقایسه با منحنی طبیعی مشخص میسازد که مرهون RNA پیامبری است که دستورات DNA یا ژن سازنده هموگلوبین را از هسته بداخل سیتوپلاسم رتیکیلوسیت آورده و با وجودیکه گلبول قرمز سلول بدون هسته است این RNA پیامبر در رتیکیلوسیت جوان که بتازگی هسته خود را از دست داده است فعال بوده و این نقص ژنی را آشکار ساخته است.

سرخ آنیزوسیتوز Anisocytosis و پوئی کیلوسیتوز Schistocytosis, Hypochromia, Poikilocytosis و Ovalocytosis و Target Cell نشان دادند. فینگرپریت زنجیره ها هموگلوبین طبیعی بود. هموگلوبین  $A_2$  کمتر از نرمال و HbF کمتر از ۲% بود. پس از بیوسنتز زنجیره ها و مارکه نمودن آنها نسبت رادیواکتیویته زنجیره آلفا به بتا  $\alpha/\beta$  ratio = ۰/۲۴ و Specific Activity زنجیره ها نسبت بهم  $S.A. \alpha/S.A. \beta = ۰/۲۹$  محاسبه شد (منحنی شماره ۲).  
۳- در بیمار دیگری اهل بروجن اصفهان که ۲۲ ساله بوده و اسپلنومگالی از زمان بچگی داشته است آهن سرم ۳۴۶ میکروگرم در صد رتیکیلوسیت ۵/۰% و سایر آزمایشها هماتولوژی و بیوشیمی بشرح زیر بوده است:

$$M C V = ۸۶ \pm ۵ \mu^3$$

$$M C H = ۲۹ \pm ۲ \gamma\gamma$$

$$M C H C = ۳۴ \pm ۲$$

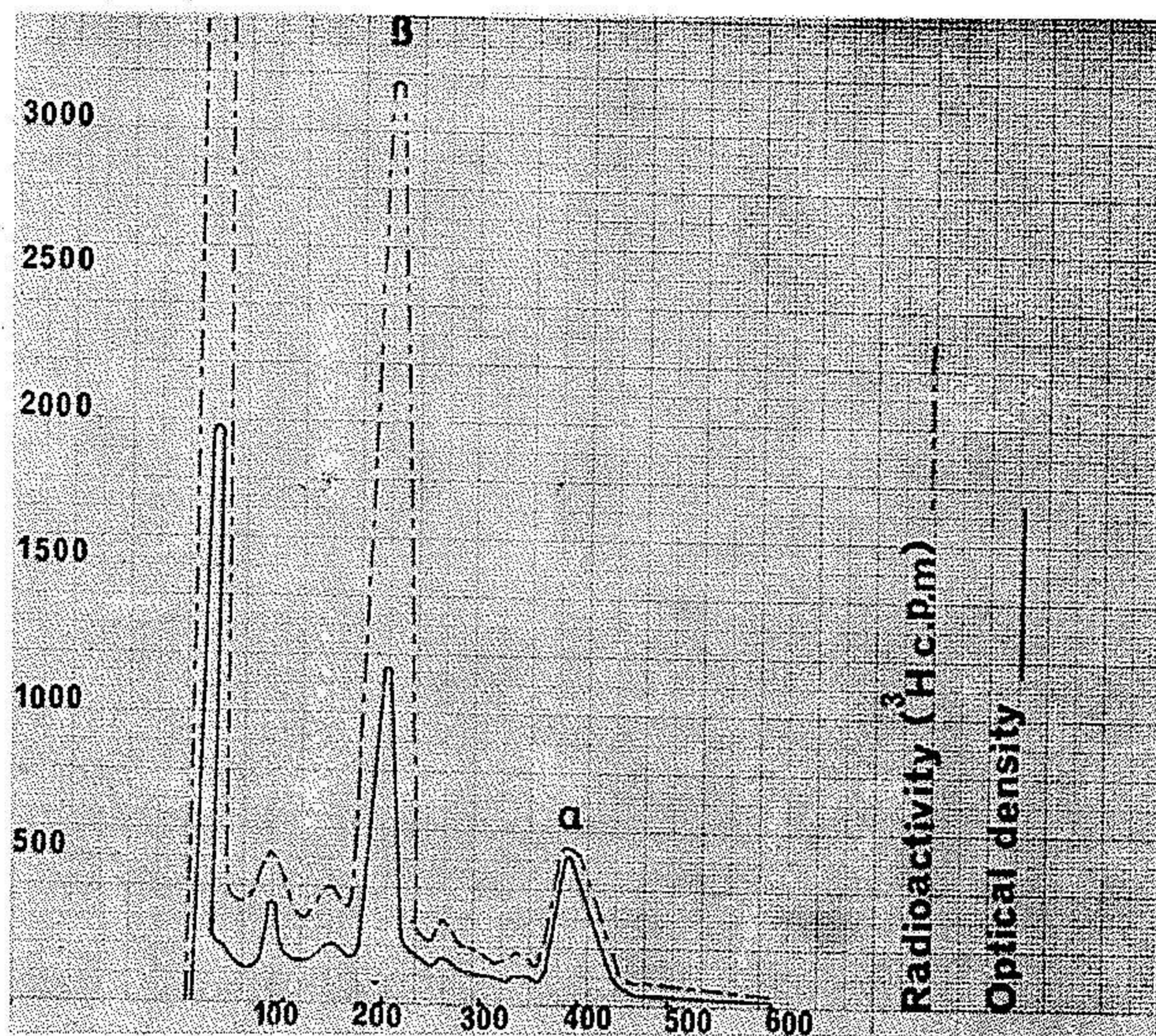
بیلروبین مستقیم ۵/۰۵% - غیر مستقیم ۰/۶% +  
واحد  $SGOT = ۱۸$  و واحد  $GPT = ۲۲$  هموگلوبین ۱۳ گرم -  
هموگلوبین  $A_2$  طبیعی - هموگلوبین F کمتر از ۲% - مقاومت گلبولی طبیعی و شکل گلبولهای سرخ طبیعی گزارش شده است. این آزمایش بعمل آمد و منحنی رادیواکتیویته در مقابل optical density ترسیم و نسبت ساخته شدن زنجیره آلفا به بتا  $\alpha/\beta$  ratio = ۰/۸۹ و Activity زنجیره ها نسبت بهم  $S.A. \alpha/S.A. \beta = ۰/۸۳$  محاسبه شد (شکل شماره ۳).

### بحث

در اولین مورد معرفی شده گرچه باند سریع حرکتی در الکتروفورز دیده شد اما فینگرپریت نشان داد که این باند سریع حرکت هموگلوبین بتای طبیعی بوده است وجود دانه های غربالی اینکلوزن در گلبولهای سرخ بیمار همراه با فینگرپریت طبیعی وجود هموگلوبین H را نشان میدهد.

### قدردانی و تشکر

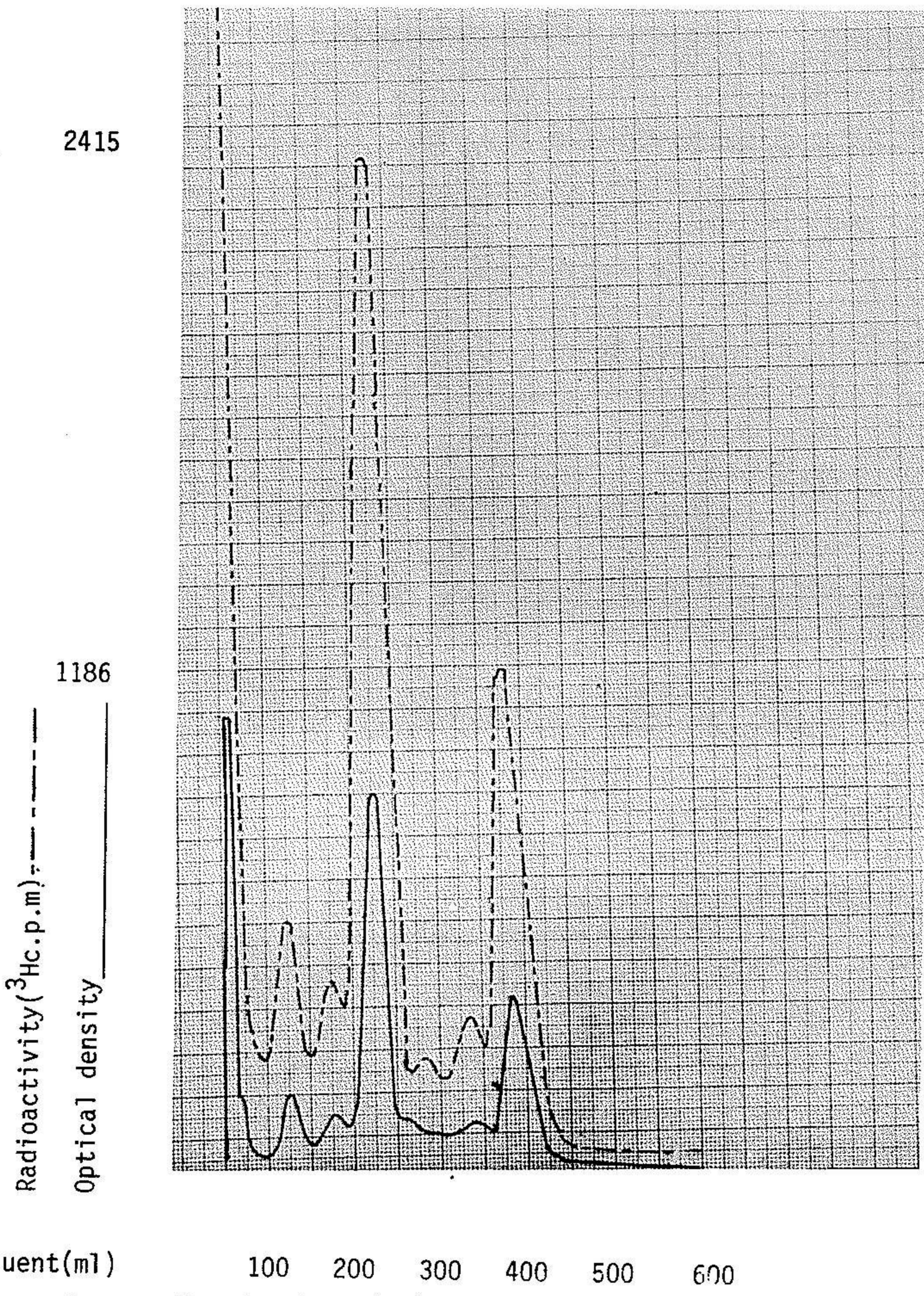
این تحقیقات در دانشکده پزشکی دانشگاه تهران (بخش هموگلوبین های غیر طبیعی گروه بیولوژی کاربردی) از محل طرح نیمه کاره تحقیقاتی وزارت علوم با استفاده از دستگاه سنتی لیتور دانشکده داروسازی انجام گرفته که امیدواریم این همکاری ادامه داشته باشد - از وزارت علوم و دانشگاه تهران با تشکر فراوان قدردانی مینمائیم.



منحنی شماره ۲- جدا کردن زنجیره های هموگلوبین ساخته شده در خارج از بدن (in vitro) فرد دابل هتروزیگوت  $\alpha\text{thal}_1/\alpha\text{thal}_2$  (بیماری هموگلوبین H).

انتهای سال ۱۳۵۷  
 بهتاسیست دانشگاه تهران  
 در چیتگان کتابخانه پزشکی

β α



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

References

- 1- Wasi, P., The  $\alpha^0$  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  $\beta$ -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.