جداسازی زنجیره‌های گلوبین به روش کروماتوگرافی تعویض یونی در تشخیص هموگلوبینوپاتی‌ها

فاطمه معینی علیشاه I

***دکتر لادن حسینی گوهری** II

دکتر بی‌بی شهین شمسیان III

لیلا مستعان IV

چکیده

زمینه و هدف: هموگلوبینوپاتی‌ها در اثر نقص در ژن سنتز کننده زنجیره‌های هموگلوبین بوجود می‌آیند. در مواقعی که موتاسیون در ژن زنجیره‌های آلفا یا بتا بصورتی باشد که تغییر بار الکتریکی هموگلوبین محسوس نباشد، برای تفکیک می‌توان از کروماتوگرافی تعویض یونی بهره جست. هدف از انجام این مطالعه، تشخیص واریان‌های زنجیره گلوبین به روش کروماتوگرافی تعویض یونی بود و از این لحاظ نمونه برای تعیین توالی ژنی مربوط به زنجیره خاص آماده شد.

روش بررسی: مطالعه از نوع توصیفی بود. در این مطالعه، ۲۰ مورد که دارای حداقل یک هموگلوبین غیرطبیعی بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. بر روی نمونه‌ها آزمایشات شمارش کامل سلولهای خونی(Cell blood count=CBC)، اندازه‌گیری هموگلوبین A2 وF، الکتروفورز بر روی استات سلولز و سیترات آگار و تست حلالیت برای تایید هموگلوبینS، انجام گردید و در مرحله پایانی روی نمونه‌ها، کروماتوگرافی تعویض یونی صورت گرفت. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS(version 14) استفاده گردید.

یافته‌ها: طبق روشهای الکتروفورزی، هر ۲۰ مورد دارای الگوی الکتروفورزی غیرطبیعی بودند که در زمره هیچ یک از انواع هموگلوبین‌های غیرطبیعی C، S، D و G طبقه‌بندی نمی‌شوند. بعد از انجام کروماتوگرافی کربوکسی متیل سلولز، مشخص گردید که ۱۵ مورد، در زنجیره آلفا، ۳ مورد، در زنجیره بتا و ۲ مورد، هم در زنجیره آلفا و هم در زنجیر بتا دچار اختلال بوده‌اند.

نتیجه‌گیری: بر طبق نتایج بدست آمده، روش مورد استفاده قادر به تفکیک زنجیره‌های جهش یافته آلفا و بتا است و می‌تواند در تشخیص قطعی عارضه بوسیله تعیین ردیف بازهای DNA مؤثر باشد. در ضمن جهت پیشگیری از بروز موارد جدید بتا تالاسمی توأم با هموگلوبینوپاتی‌ها که در بعضی مواقع می‌تواند موجب بروز علایم شدید بالینی گردد، می‌توانیم با استفاده از این روش، افراد را از نظر هموگلوبینوپاتی‌ها، غربالگری نمائیم.

کلیدواژه‌ها: ۱ – **هموگلوبینوپاتی** ۲ – **کروماتوگرافی تعویض یونی** ۳ – **واریان‌های زنجیره گلوبین**

مقدمه

هر نوع جهش در ژن سنتز کننده زنجیره‌های هموگلوبین که منجر به جابجایی یک یا چند اسیدآمینه در زنجیره گلوبین می‌شود، عامل ایجاد هموگلوبینوپاتی‌هاست. هموگلوبینوپاتی‌ها از لحاظ عملکرد هموگلوبین به گروه‌های مختلف تقسیم می‌شوند:

- گروهی از آنها دارای عملکرد طبیعی بوده و فاقد علائم بالینی هستند.
- گروهی ایجاد پلیمر نموده(مانند هموگلوبین S) و گروهی با تشکیل کریستال(مانند هموگلوبین C)، عامل ایجاد کم‌خونی‌های وسیع همولیتیک می‌باشند.[۱و ۲]

این مقاله خلاصه‌ای از پایان نامه خانم فاطمه معینی علیشاه در مقطع کارشناسی ارشد به راهنمایی خانم دکتر لادن حسینی گوهری و مشاوره خانم دکتر بی‌بی‌شهین شمسیان می باشد.

I) دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران.

II) استاد و PhD بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پیراپزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران(*مؤلف مسؤول).

III) استادیار و فوق‌تخصص بیماری‌های خون کودکان، بیمارستان مفید، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران.

IV) کارشناس علوم آزمایشگاهی، آزمایشگاه تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی‌ها، پایگاه انتقال خون، تهران، ایران.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

تشخیص صحیح و تعیین کمی گونه‌های طبیعی و غیرطبیعی هموگلوبین‌ها، از نظر بالینی اهمیت زیادی دارد. نظر به اینکه میزان هموگلوبین‌های طبیعی A2 و F اغلب در بیماران مبتلا به تالاسمی و هموگلوبینوپاتی تغییر می‌کند، تعیین مقدار این هموگلوبین‌ها می‌تواند جهت تشخیص این بیماران مفید واقع شود.[۳]

مطالعات انجام گرفته توسط ودرال(Weatherall)، هانیگ(Honnig)، باین(Bain) و کانکنی(Conconi) نشان داده است که در مواقعی که موتاسیون در ژن زنجیره‌های آلفا یا بتا، بصورتی انجام گیرد که تغییر بار الکتریکی هموگلوبین محسوس نباشد (نتوان واریان‌های مختلف هموگلوبین را با این ویژگی به روشهای الکتروفورزی تفکیک نمود)، می‌توان از کروماتوگرافی تعویض یونی بهره جست.[۴-۷] به این ترتیب محل اختلال، از نظر اینکه روی زنجیره آلفا یا بتا باشد، مشخص می‌گردد، سپس نمونه برای تعیین توالی ژن مربوط به زنجیره خاص آماده می‌شود.[۴]

اگر چه نمی‌توان ژن معیوب را اصلاح کرد ولی می‌توان ناقلین سالم این هموگلوبینوپاتی‌ها را غربالگری نمود و این موضوع از لحاظ پیشگیری از تولد کودکان مبتلا به هموگلوبینوپاتی با عوارض شدید، حائز اهمیت است.[۳و ۴] هدف از انجام این مطالعه جداسازی واریان‌های زنجیره گلوبین به روش کروماتوگرافی تعویض یونی و تعیین زنجیره دچار اختلال بود.

روش بررسی

در این مطالعه که از نوع تجربی بود، ۱۱۲ بیمار که حداقل دارای یک هموگلوبین غیرطبیعی بودند، بدون توجه به سن و جنس مورد بررسی قرار گرفتند.

ابتدا بر روی تمامی نمونه‌ها آزمایش CBC(Cell blood count) انجام گردید. سپس درصد هموگلوبین A2 آنها، به روش کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از ژل دی اتیل آمینو اتیل سلولز با شماره ۵۲(DE-52) و درصد هموگلوبین F، به روش مقاومت نسبت به قلیائی اندازه‌گیری شد. الکتروفورز بر روی استات سلولز و سیترات آگار و تست حلالیت برای تأیید هموگلوبین S، انجام گردید.[۸] با توجه به الگوی الکتروفورزی استات سلولز و سیترات آگار، ۲۰ مورد از ۱۱۲ نمونه اولیه، در زمره هیچ کدام از هموگلوبین‌های غیرطبیعی S، C، D و G قرار نگرفتند، که بر روی این ۲۰ مورد، کروماتوگرافی کربوکسی متیل سلولز (Carboxy methyl cellulose=CMC) انجام شد. این روش بی‌نهایت معتبر است و قابلیت تکرارپذیری دارد؛ با این وجود، روش پرزحمتی است و زمان زیادی لازم دارد،(در حدود ۲ روز کامل برای آنالیز وقت لازم است).[۹و ۱۰]

مواد و وسایل لازم عبارتند از:

- آلفاسلولز(Sigma-8002)
- سلولز میکروکریستالین(Sigma S-550)
- مخلوط اسید و استن
- اتر
- کربوکسی متیل سلولز ۲۳ (CMC۲۳)
- بافر فسفات با قدرت یونی پائین(Strong Buffer)
- بافر فسفات با قدرت یونی بالا(Weak Buffer)
- دستگاه فراکشن کولکتور

مراحل آزمایش به شرح زیر است:

- تهیه نمونه خون تام (هپارینه)
- سانتریفوژ نمونه‌ها در دور ۲۵۰۰ در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد و جداسازی پلاسما
- حذف گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها بوسیله فیلتراسیون از ستون حاوی مخلوط آلفاسلولز(Sigma-8002) و سلولز میکروکریستالین(Sigma S-550)
- شستشوی گلبول‌های قرمز خارج شده از ستون در سه نوبت با سرم فیزیولوژی و محلول کربس رینگرفسفات (Krebs Ringer phosphate=KRP)
- رسوب زنجیره‌های گلوبین به وسیله اسید، استن و اتر
- جداسازی زنجیره‌ها به روش کروماتوگرافی تعویض کاتیونی و شیب قدرت یونی

جهت جداسازی زنجیره‌ها، ستون کروماتوگرافی به ابعاد۳۰×۱، از رزین CMC۲۳ (۲ گرم در ۳۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ضعیف: ۷ میلی‌مول در اوره ۸ مولار و دی‌تیوتریتول)، پر و آماده شد. پس از نمونه‌گذاری زنجیره(۲۰ میلی‌گرم در بافر ضعیف) و جذب آن توسط ستون، عمل الوشن(Elution) بصورت شیب قدرت یونی با ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر با قدرت یونی پایین با pH=6.35 و ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر با قدرت یونی بالا با pH=6.45(۳۶/۴ میلی مول بافر فسفات در اوره ۸ مولارودی تیوتریتول) و با استفاده از

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

دستگاه فراکشن کولکتور متصل به رکوردر انجام گردید(زمان تقریبی۱۷ ساعت).[۸]

ضریب تغییرات (coefficient variation = CV) این روش برابر ۳/۸٪ می‌باشد[۸] و از نظر حساسیت، حداقل مقداری از پودر زنجیره که جهت کروماتوگرافی تعویض یونی می‌توان استفاده کرد، ۱۰-۵ میلی‌گرم می‌باشد. لازم به ذکر است که این روش به نام روش Clegg-Weatherall معروف است و این روش برای جداسازی زنجیره‌های گلوبین، Gold standard محسوب می‌شود؛ در نتیجه از ویژگی خاصی جهت جداسازی زنجیره‌ها برخوردار است.[۹] ضمناً بر روی یک نمونه سالم ۱۰ بار آزمایش انجام گردید و ترتیب خروج زنجیره‌های آلفا و بتا از ستون، مشابه هم بود. همچنین ۴ بار ترتیب خروج زنجیره‌های βA و βS یک بیمار سیکل سل هتروزیگوت(HbAS) با افراد سالم و بیماران مقایسه گردید و نتایج از نظر درستی مورد قبول بود.

برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار(SPSS(Version 14 استفاده گردید.

یافته‌ها

برای بررسی بیماران مبتلا به هموگلوبینوپاتی و نیز یافتن هموگلوبین و یا هموگلوبین‌های غیر طبیعی در آنها و نهایتاً دستیابی به تشخیص قطعی، بر روی بیماران مشکوک و ارسالی(متعاقب معاینه پزشک) به آزمایشگاه‌ها، آزمایش CBC صورت گرفت. اولین بررسی بر روی این بیماران، شمارش گلبول‌های قرمز و بررسی اندکس‌های خونی بود که توسط دستگاه‌های خودکار شمارنده سلولی انجام گرفت. میانگین هموگلوبین توتال برابر ۱۲/۹۶±۱/۷۹ گرم دردسی‌لیتر، هماتوکریت برابر ۳۸/۷±۴/۶۵٪، RBC (Red blood cell) برابر ۵/۱۲x۱۰^{۱۲}/L±۰/۵۵، MCV(Mean corpuscular volume) برابر ۷۶/۴۲±۸/۴۷ فمتو لیتر، MCH (Mean corpuscullar hemoglobin) برابر ۲۵/۴۷±۳/۷۷ پیکوگرم بود. لازم به ذکر است که ۹ مورد دارای MCV <۸۰ و MCH<۲۷ بودند(جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱- اندکس‌های خونی و درصد HbA2 و F و درصد باند غیرطبیعی در استات سلولز و نوع واریان زنجیره گلوبین

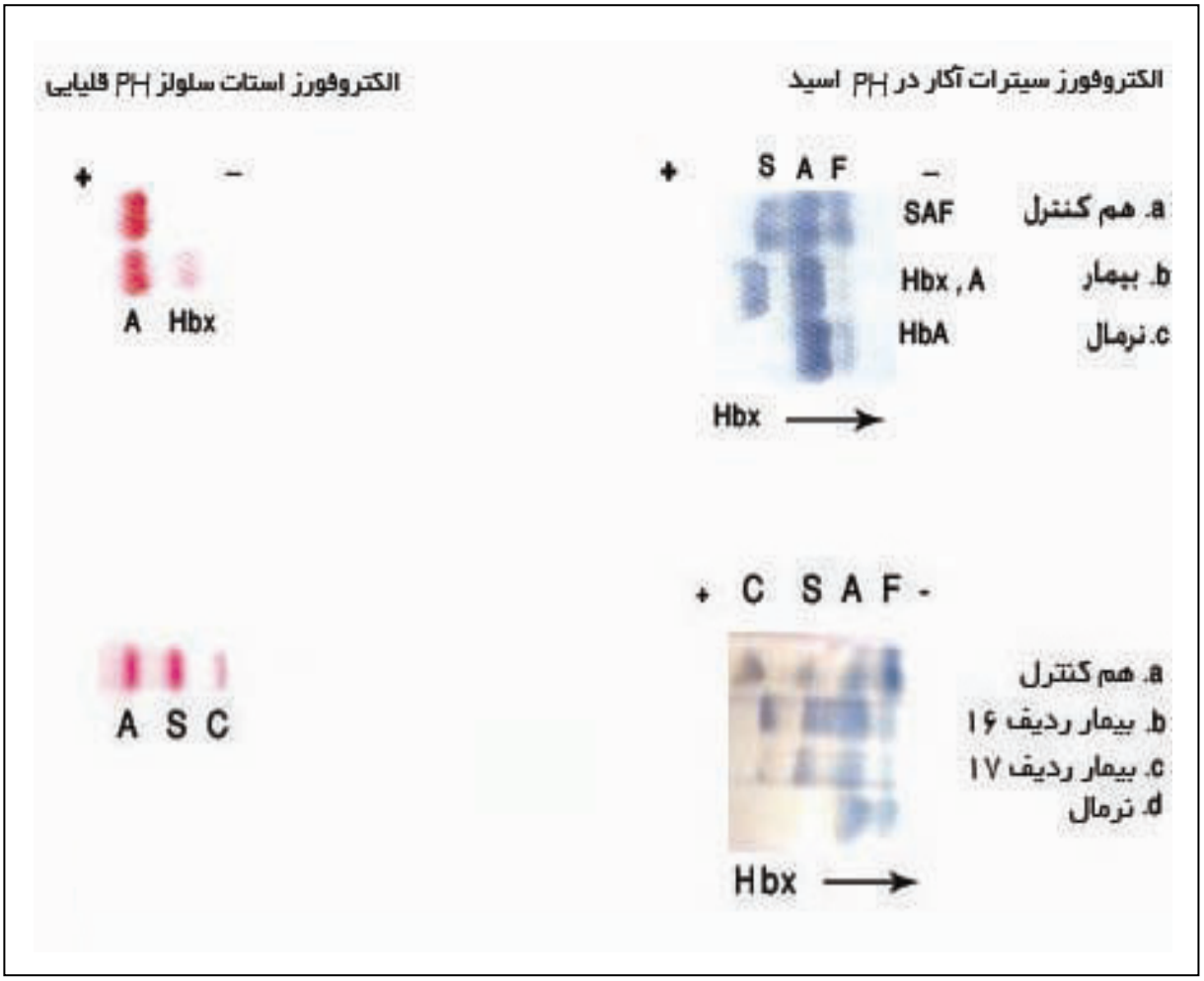
ردیف	Hb(g/dl)	Hct(٪)	RBC(۱۰^{۱۲}/l)*	MCV(fl)	MCH(pg)	HbA2(٪)	HbF(٪)	باند غیرطبیعی(٪)	واریان زنجیره
۱	۱۲/۳	۳۷/۴	۴/۷	۷۹/۶	۲۶/۲	۰/۵	-	۲۰/۹	α
۲	۱۶	۴۶/۷	۵/۵۲	۸۴/۶	۲۹	*۱۲	-	۱۶/۵	"
۳	۱۵/۶	۴۵/۷	۵/۳۶	۸۴/۹	۲۹	۲/۸	-	۲۴/۳	"
۴	۱۰/۶	۳۴/۹	۵/۹	۵۹/۲	۱۸	*۳/۸	۱/۸	۸۰/۴	"
۵	۱۴	۴۰/۱	۴/۷۵	۸۴/۴	۲۹/۵	۱/۵	۰/۷	۲۰/۳	"
۶	۱۴/۶	۴۲/۸	۵/۲	۸۲/۳	۲۸/۱	۲/۲	-	۲۱/۶	"
۷	۱۱/۴	۳۵/۶	۴/۳۹	۸۱/۸	۲۶	۲/۲۵	-	۳۰	"
۸	۱۳/۴	۳۸/۸	۴/۵	۸۶/۲	۲۹/۸	۲/۵	-	۴۴/۹	"
۹	۱۴/۶	۴۴/۵	۵/۸۹	۷۵/۶	۲۴/۸	۲	۱/۳	۳۰/۵	"
۱۰	۱۳/۴	۳۷/۴	۴/۹۶	۷۵/۴	۲۷	۲/۷	۱/۱	۴۴/۹	"
۱۱	۱۴/۱	۴۵/۲	۵/۷۹	۷۸/۱	۲۴/۴	۲/۱	-	۲۳/۳	"
۱۲	۱۱/۴	۳۵/۸	۵/۳۲	۶۷/۳	۲۱/۴	۱/۶	۰/۹	۱۹/۵	"
۱۳	۱۲/۷	۳۷/۷	۵/۷	۶۶/۱	۲۲/۳	۲	۰/۸	۱۸/۳	"
۱۴	۱۰/۴	۳۴/۹	۵/۵۵	۶۲/۹	۱۸/۷	*۵	۱/۱	۱۰/۳	"
۱۵	۱۳/۴	۳۸/۸	۴/۵	۸۶/۲	۲۹/۸	۲/۳	-	۲۸	α و β
۱۶	۱۵/۲	۴۳/۷	۵/۹۴	۷۳/۶	۲۵/۶	*۱۳/۸	-	۴۴/۱	"
۱۷	۱۲/۳	۳۰/۸	۴/۴۷	۸۰/۱	۲۷/۵	*۱۰	۰/۹	۴۴/۱	β
۱۸	۱۲/۶	۳۶/۹	۴/۳۹	۸۴/۲	۲۸/۸	۳/۲	۰/۷	۲۴/۳	"
۱۹	۹/۵	۳۲/۶	۴/۸۴	۶۷/۴	۱۹/۶	*۴	۱/۱	۱۱/۴	"
۲۰	۱۱/۸	۳۳/۷	۴/۹۱	۶۸/۶	۲۴	*۷	-	۴۴/۲	

* به علت نزدیک بودن جمع جبری بار این هموگلوبین‌ها با هموگلوبین A2 ممکن است در اندازه‌گیری هموگلوبین A2 به روش کروماتوگرافی تعویض یونی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

طبق روشهای الکتروفورزی، هر ۲۰ مورد، الگوی الکتروفورزی غیرطبیعی داشتند که در زمره هیچ یک از انواع هموگلوبین‌های غیرطبیعی C، S، D و G طبقه‌بندی نمی‌شوند. در الکتروفورز استات سلولز، همه نمونه‌ها دارای باند غیرطبیعی در حدود منطقه S، D و G و در روی سیترات آگار، دارای باند غیرطبیعی بین منطقه S و C بودند. موردهای ۱۶و ۱۷ در الگوی الکتروفورزی سیترات آگار دارای یک باند در منطقه S و یک باند بین S و C بودند(شکل شماره ۱ و جدول شماره ۲).

در مرحله پایانی، کروماتوگرافی کربوکسی متیل سلولز انجام گرفت، در این روش زنجیره‌های پلی‌پپتیدی بر اساس بار مثبت آنها جدا می‌شوند به این ترتیب که در نمونه‌های سالم، زنجیره آلفا چون نسبت به زنجیره بتا دارای بار مثبت بیش‌تری است، با این روش دیرتر از ستون خارج می‌گردد. چنانکه موتاسیونی در ژن زنجیره آلفا یا بتا رخ داده باشد، احتمال دارد دو پیک در محل منحنی مربوط به زنجیره ظاهر گردد.[۴و ۹]



شکل شماره ۱– بالا : الگوی الکتروفورزی این موارد در سیترات و استات
پائین: الگوی الکتروفورزی موراد ۱۶ و ۱۷ در سیترات و استات

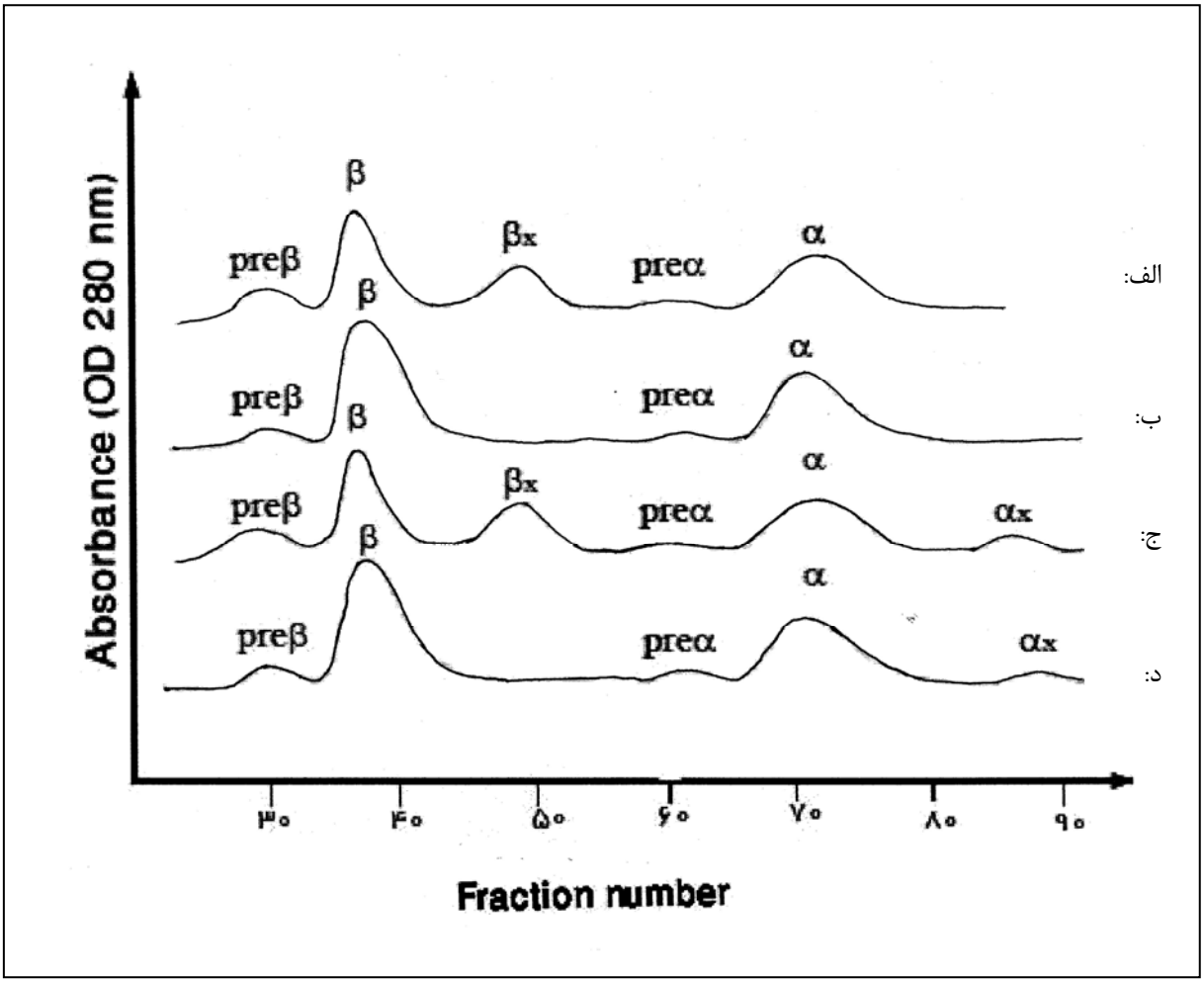
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

جدول شماره ۲- محل باندهای غیرطبیعی بیماران با توجه به الگوی الکتروفورزی

بیماران*	استات سلولز pH قلیایی	سیترات آگار pH اسیدی
۱-۱۱	باند منطبق بر G، D، S	بین S و C
۱۲-۱۳	کمی عقب‌تر از S	بین S و C
۱۴-۱۵	کمی جلوتر از S	بین S و C
۱۶-۱۷	باند در S و C	یک باند در ناحیه S و یک باند بین S و C
۱۸-۲۰	روی G، D، S	بین S و C

*بیماران با توجه به جدول شماره ۱

یک پیک کوچک پشت پیک βA و αA دیده می‌شود که دارای ترکیب آمینواسیدی مشابه زنجیره‌های βA و αA است و به Preβ و Preα معروف هستند، اما تفاوتش با زنجیره βA و αA شناخته نشده است.[۹] بعد از انجام کروماتوگرافی تعویض یونی بر روی CMC مشخص گردید که نمونه‌های ۱-۱۵ در زنجیره آلفا، نمونه ۱۷-۱۶ در هر دو زنجیره بتا و آلفا و نمونه‌های ۲۰-۱۸ روی زنجیره بتا دارای موتاسیون می‌باشند(شکل شماره ۲). نمودار شماره ۱ درصد اختلال زنجیره‌ها را در این بیماران نشان می‌دهد.



شکل شماره ۲- الگوی کروماتوگرافی این بیماران

الف) اختلال در زنجیره بتا، ب) زنجیره‌های طبیعی، ج) اختلال در زنجیره آلفا و بتا، د) اختلال در زنجیره آلفا

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]



نمودار شماره ۱- درصد اختلال در زنجیره‌های این بیماران

بحث

آزمایشات لازم برای تشخیص هموگلوبینوپاتی‌ها شامل CBC، بررسی اندکس‌های خونی، اندازه‌گیری درصد هموگلوبین A2 و F، الکتروفورز هموگلوبین در pH قلیایی و اسیدی و یا استفاده از HPLC(High performance liquid chromatography) و کروماتوگرافی تعویض یونی برای بررسی زنجیره‌های گلوبین و بکارگیری انواع روشهای PCR(polymarase chain reaction) جهت تکثیر ژن زنجیره‌های آلفا یا بتا و در نهایت تعیین توالی بازهای DNA برای تشخیص قطعی می‌باشد.[۱، ۳و ۱۱]

نتایج نشان داد که نمونه‌های شماره ۱۵-۱ دارای اختلال در زنجیره آلفا می‌باشند(بدین سبب که دیرتر از زنجیره طبیعی از ستون خارج گردید). نمونه‌های شماره ۱۶و ۱۷ علاوه بر اختلال در زنجیره آلفا دارای اختلال در بتا نیز بودند. با توجه به نتایج حاصل از آزمایش حلالیت هموگلوبین S و الکتروفورز در pH قلیایی و اسیدی، مشخص گردید که این بیماران دارای هموگلوبین S به همراه هموگلوبین دیگری هستند که روی سیترات آگار نزدیک منطقه C دیده می‌شود. حضور این هموگلوبین در نزدیک منطقه C در اندازه‌گیری درصد هموگلوبین A2 به روش ستونی تأثیر می‌گذارد(به علت هم بار بودن این هموگلوبین با هموگلوبین A2، مقدار هموگلوبین A2 در این نمونه‌ها بطور کاذب افزایش می‌یابد). پس از بررسی نمونه‌های شماره ۲۰-۱۸ با روش فوق، مشخص شد که این موارد دارای اختلال در زنجیره بتا می‌باشند. در این مطالعه از کربوکسی متیل سلولز ۲۳ که یک تعویض کننده کاتیونی(Cation exchanger) ضعیف است بعنوان تکنیک جداسازی زنجیره‌ها استفاده شد. با توجه به شکل شماره ۲، زنجیره دچار اختلال، در مقایسه با نمونه فرد سالم، دیرتر از زنجیره طبیعی از ستون خارج شده است، این امر نشاندهنده این موضوع است که در زنجیره دچار اختلال، اسیدآمینه جایگزین شده، سبب افزایش بار مثبت زنجیره گلوبین گردیده و به همین دلیل دیرتر از حالت طبیعی از ستون خارج می‌گردد. این نتایج با مطالعاتی که کانکنی(Conconi) در مورد هموگلوبین "هاشارون"(α_2 ^{74} ^{Asn} ^{His} β_2)، ودرال(Weatherall) در مورد هموگلوبین O اندونزی(α^{Glu} ^{Lys} β_2 ^{116} $_2$)، باین (Bain) در مورد هموگلوبین G "وایمانلو"(α_2 $^{64\ Asp}$ ^{Asn} β_2) و "هانیگ" در مورد هموگلوبین "اوانستون"(α_2 $^{14\ Trp}$ a ^{Arg} β_2) انجام دادند، مطابقت دارد. این دانشمندان نشان دادند که در این هموگلوبین‌ها، یک اسیدآمینه در زنجیره گلوبین با اسید امینه دیگری، جایگزین و این جایگزینی سبب افزایش بار مثبت زنجیره گلوبین شده است و به این ترتیب دیرتر از حالت طبیعی از ستون خارج می‌گردد.[۴-۷]

با توجه به اینکه این مطالعه در ایران انجام گردیده است، از هموگلوبین‌هایی که زنجیره آلفا آنها دچار اختلال شده می‌توان به هموگلوبین Q ایران(α_2 $^{75\ Asp}$ ^{His} β_2) اشاره نمود و هموگلوبین‌هایی که زنجیره بتا در آنها دچار اختلال شده(۳ مورد آخر)، احتمالاً از نوع هموگلوبین بورک(Burk) ($\alpha_2\beta_2$ $^{107\ Gly\ Arg}$) و هموگلوبین دیکانس(Deaconess) ($\alpha_2\beta_2$ $^{107\ Gly\ Arg}$) بوده‌اند.[۴]

قبل از اینکه اقدام به آنالیز مستقیم ژن زنجیره‌های گلوبین نمائیم، بررسی زنجیره‌های گلوبین به روش کروماتوگرافی تعویض یونی یکی از راه‌هایی است که می‌توان حدس زد جهش در سطح چه مولکولی اتفاق افتاده است، این مسأله باعث صرفه‌جویی در وقت و هزینه می‌گردد.[۴]

همچنین مشخص گردیده که مواردی از واریان‌های هموگلوبین که اختلال در زنجیره بتا دارند، در صورت همراهی با بتا تالاسمی مینور، ایجاد علایم بالینی شدید خواهند نمود. با توجه به این موضوع، هدف دیگر از انجام این پروژه، غربالگری برای تشخیص یک بیماری ارثی است، که افراد یا والدین به آن مبتلا بوده و ممکن است در صورت ازدواج این افراد و همراهی این اختلالات، در فرزندان علائم

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

بالینی شدیدتر بروز نماید؛ در نتیجه لازم است در هنگام بارداری، تشخیص قبل از تولد صورت گیرد و در صورت لزوم به حاملگی خاتمه داده شود.[۴]

این روش وقت گیر است و دو روز کامل برای انجام آزمایش زمان لازم دارد. ستون برای هر آزمایش باید مجدداً پر شود. علی‌رغم این محدودیت‌ها، نظر به اینکه این روش از دقت و صحت و ویژگی خوبی برخوردار است، بعنوان روش مرجع جهت جداسازی زنجیره‌ها مورد قبول می‌باشد.[۹]

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج پژوهش انجام شده؛ با روش جداسازی زنجیره‌های گلوبین به کمک کروماتوگرافی تعویض کاتیونی، نوع زنجیره جهش یافته جهت تعیین ردیف بازهای DNA مشخص می‌گردد و این مسأله موجب صرفه‌جوئی در وقت و هزینه می‌گردد.

با توجه به شیوع هموگلوبینوپاتی‌های مربوط به زنجیره آلفا و بتا، بعضی اوقات حضور توأم این هموگلوبینوپاتی‌ها (بخصوص مربوط به زنجیره بتا) همراه با بتا تالاسمی، می‌تواند موجب بروز علائم شدید بالینی گردد. بنابراین برای موفقیت بیش‌تر طرح کشوری غربالگری ناقلین سالم ژن بتا تالاسمی در داوطلبین ازدواج، بایستی بررسی هموگلوبینوپاتی‌ها با این متد نیز مد نظر قرار گیرد، تا ابتدا مشخص گردد جهش بر روی کدام زنجیره است سپس بر اساس آن، آگاهی لازم به داوطلبین ازدواج از نظر شدت بروز علائم در موارد حضور توأم بتاتالاسمی با این نوع هموگلوبینوپاتی‌ها در فرزندان داده شود(ارائه مشاوره های تخصصی به زوجین دارای این هموگلوبینوپاتی‌ها).

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی ـ درمانی ایران و امکانات موجود در دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی و آزمایشگاه تالاسمی سازمان انتقال خون تهران در قالب طرح تحقیقاتی(شماره ثبت: ۳۲۱) انجام گردیده است، که بدین وسیله نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤولین این مراکز ابراز می‌دارند.

فهرست منابع

1- Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal TP. Williams-hematology. 7td ed. New Yourk: Mcgraw-Hill; 2006. P. 667-700.

2- Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Lader BG. Wintrobe's Clinical Hematology. 11th ed. Philadelphia: Walters Kluwer Company; 2004. P. 1247-313.

3- Bian Barbara J. Haemoglobinopathy Diagnosis. Chapter 1-7.London: Blackwell Science Ltd, UK; 2001. P. 1-215.

4- Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassemia Syndromes. 4th ed. Blackwell Scientific Publications: Oxford; 2001. P. 435-525.

5- Honig G R, Shamsuddin M, Vida L N, Mompoint M, Valcourt E. Hemoglobin Evanston (alpha 14 Trp----Arg), An unstable alpha chain variant expressed as alpha-thalassemia. J Clin Invest 1984 June; 73(6): 1740-9.

6- Conconi F, Alberti R, Mariuzzi GM, Gugluelmini C, Vullo C, Delsenno L. Decrease of alpha- Hasharon globin in Beta – Thalassemia. Br J Haematol 1978; 39: 529.

7- Baine RM, Wright JM, Wilkinson RM. HbG Waimanlo(α 64 Asp Asn) in a Chaild with Homozygous β-thalassemia. Hemoglobin 1979; 3: 293.

۸- دکتر لادن حسینی گوهری، هموگلوبین در سلامت و بیماری، وزارت بهداشت درمان وآموزش پزشکی معاونت سلامت، مرکز مدیریت بیماری‌ها، مردادماه ۱۳۸۴. چاپ اول، فصل ۲، صفحه: ۱۳۸-۶۳.

9- Rahbar S, Asmeron Y. Rapid HPLC Tecniques for Globin Chain Synthesis Studies. Hemoglobin 1989; 13(5): 475-87.

10- Galanello R, Satta S, Pirroni MG, Travi M, Maccioni L. Globin Chain Synthesis Analysis by High- Performance Liquid Chromatography in the Screening of Thalassemia Syndromes. Hemoglobin 1998; 22(5&6); 501-508.

11- Leone L, Monteleone M. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of Human Haemoglobin Chains. Journal of Chromatography 1985; 321: 407-19.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

The Separation of Globin Chains by Ion Exchange Chromatography in order to Identify Hemoglobinopathies

F. Moeini Alishah, MS [I] ****L. Hosseini Gohari, PhD*** [II] ***B.Sh. Shamsian, MD*** [III]
L. Mosta'an, BS [IV]

Abstract

Background & Aim: There are several point mutations in hemoglobin(Hb) genes which can cause hemoglobinopathy. Since the mutant Hbs do not have any obvious electrical charge, globin chain separation is helpful for the diagnosis of unknown Hbs. Therefore, the present study was carried out to detect alpha or beta chain variants by cation exchange chromatography.

Material and Method: In this descriptive study, 20 samples having abnormal Hb were selected. Complete blood cell count(CBC), HbA2 and HbF percentages were determined by routine methods, and cellulose acetate and citrate agar electrophoresis were performed on all the samples. For HbS confirmation, solubility test was performed and globin chains were separated by carboxymethyl cellulose(CMC) chromatography in the presence of 8 M urea. SPSS version 14 was used for statistical analysis.

Results: According to the obtained results, all of the samples had an abnormal band on cellulose acetate and citrate agar electrophoresis. CMC chromatography revealed that three patients had abnormal beta chains, 15 had abnormal alpha chains, and 2 remaining samples had abnormal alpha and beta chains.

Conclusion: Mutant alpha and beta chains can be detected by CMC chromatography and globin chain separation is a helpful guideline for the selection of an appropriate gene for DNA sequencing. Moreover, this method is useful to screen the cases for hemoglobinopathies and beta thalassemia coexistance, which can sometimes lead to severe clinical manifestations.

Key Words: **1) Hemoglobinopathy** **2) Ion Exchange Chromatography**
3) Variants of Globin Chains

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

This article is an abstract of Ms. Moeini Alishah's thesis advised by Dr. Hosseini Gohari and read by Dr. shamsian in partial fulfillment of an Ms degree in clinical biochemistry.

I) *MS Student of Clinical Biochemistry. Faculty of Medicine. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*
II) *Professor of Clinical Biochemistry. Cellular and Molecular Research Center. Faculty of Paramedical Sciences. Shahid Hemmat Expressway. Shahid Chamran Crossroads. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.(*Corresponding Author)*
III) *Assistant Professor of Pediatric Oncology. Mofid Hospital. Shahid Beheshti University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*
IV) *BS in Laboratory Sciences. Hemoglobinopathy & Thalassemia Research Center Laboratory. Tehran Regional Blood Transfusion Center. Tehran, Iran.*