خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۳ شماره ۴ زمستان ۸۵(۳۳۱-۳۲۵)

تعیین نسبت زنجیره α/β در افراد سالم(۴۵-۱۸ سال) با اندکس‌های خونی طبیعی (MCV≥ ۸۰ و MCH≥ ۲۷) و درصد HbA_2 طبیعی به روش کروماتوگرافی تعویض کاتیونی

دکتر لادن حسینی گوهری[۱]، دکتر عیسی نورمحمدی[۲]، دکتر علی‌اکبر شرفی تفرشی مقدم[۳]، لیلا مستعان[۴]، دکتر آنتی دوروزیوتو[۵]

چکیده

سابقه و هدف

برای موفقیت بیشتر برنامه پیشگیری از تالاسمی، انجام آزمایش بیوسنتز زنجیره‌های گلوبین به عنوان یک آزمایش تکمیلی در کنار تجزیه DNA ضروری می‌باشد. با توجه به اهمیت موضوع، هر آزمایشگاهی باید دامنه مرجع این آزمایش را متناسب با روش به کار گرفته جهت افتراق انواع سندرم‌های تالاسمی به دست آورد. روش بیوسنتز زنجیره‌های گلوبین روش نسبتاً مشکل ولی مرجع جهت مطالعه سندرم‌های تالاسمی می‌باشد. هم‌چنین برای تعیین جهش‌های ساختمانی زنجیره‌های گلوبین کاربرد دارد. هدف از این مطالعه، راه‌اندازی روش بیوسنتز زنجیره‌های گلوبین و تعیین نسبت زنجیره‌های α/β در افراد سالم بود.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این مطالعه نسبت زنجیره‌های گلوبین در دو مرحله بر اساس روش کلگ ـ ودرال(تغییر شکل یافته) اندازه‌گیری گردید. آنالیز زنجیره‌های گلوبین بر روی ۳۰ پرسنل آزمایشگاهی سالم و بستگان آن‌ها که دارای درصد HbA_2 و اندکس‌های خونی نرمال بودند صورت گرفت. در این روش، نمونه غنی از رتیکولوسیت با مخلوطی از اسیدهای آمینه که یکی از آن‌ها(لوسین) با مواد رادیو ایزوتوپ نشان‌دار شده، انکوبه می‌گردد. پس از شستشوی اضافه رادیو اکتیویته و رسوب گلوبین، زنجیره‌های مختلف به وسیله کروماتوگرافی تعویض کاتیونی، از یکدیگر جدا می‌شوند.

یافته‌ها

در این تحقیق نسبت زنجیره‌های α/β در همکاران سالم آزمایشگاهی بدون سابقه β تالاسمی در خانواده محاسبه گردید. میانگین نسبت زنجیره، ۰/۱۲ ± ۱/۰۴۵(mean ± 1SD) با دامنه ۱/۱۶۵ – ۰/۹۲۵ به دست آمد که این نسبت با نسبت به دست آمده توسط سایر محققان در دنیا هم‌خوانی داشت.

نتیجه گیری

در هر برنامه غربالگری تالاسمی، مشکلات تشخیص به وجود می‌آید که بدون آزمایش بیوسنتز زنجیره‌ها قابل حل نمی‌باشند. روش کلگ ـ ودرال در حالی که از قابلیت تکرارپذیری و قابلیت اعتماد خوبی برخوردار است، بسیار طولانی می‌باشد(۴ روز کاری). امروزه از روش‌های دیگری مانند HPLC فاز معکوس نیز برای جداسازی زنجیره‌ها استفاده می‌گردد. بنابراین هر آزمایشگاهی متناسب با روشی که به کار می‌برد باید دامنه مرجع خود را تعیین نماید.

کلمات کلیدی: α گلوبین، β گلوبین، هموگلوبین، محدوده طبیعی، کروماتوگرافی تعویض یونی

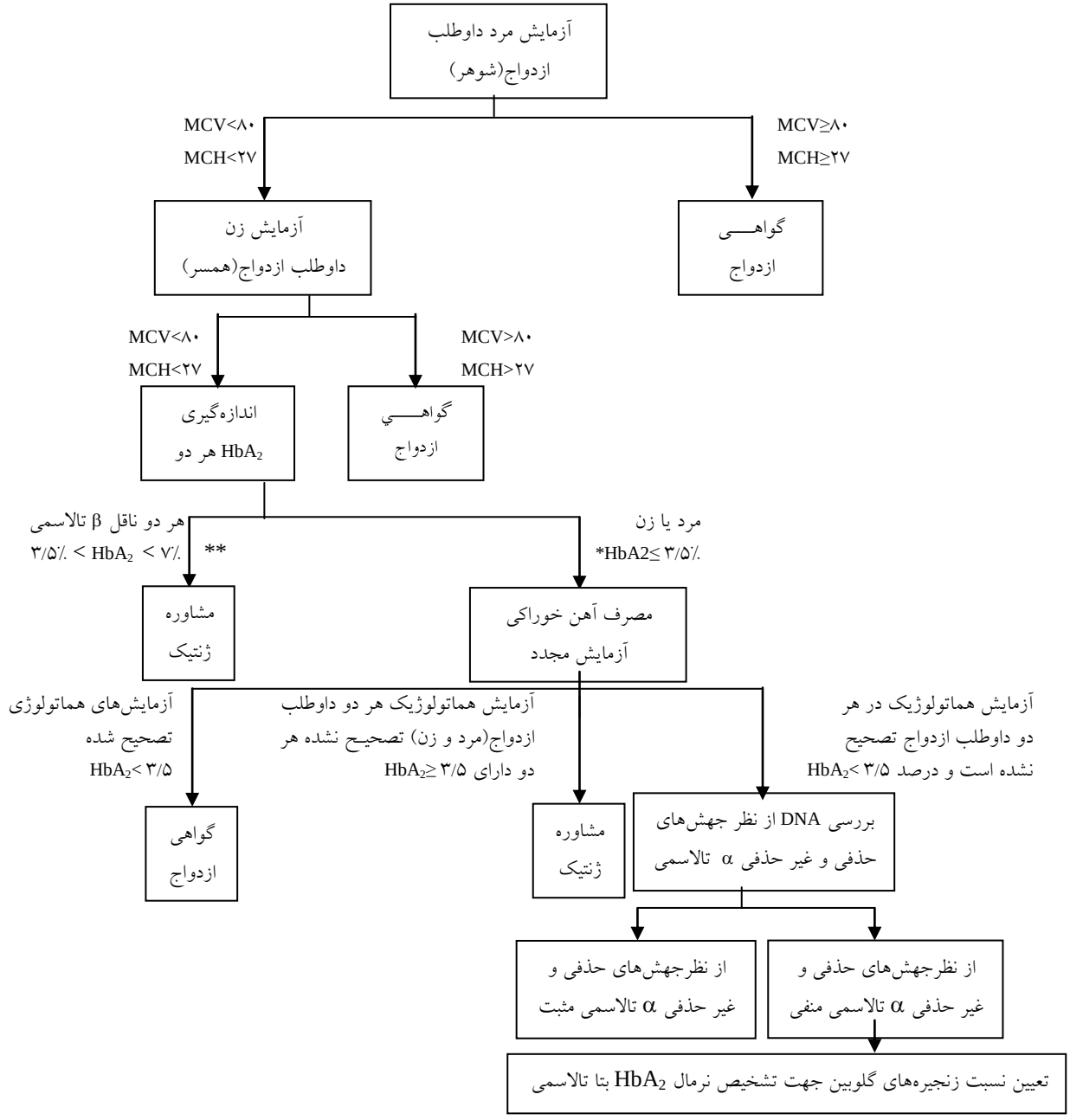
تاریخ دریافت : ۸۵/ ۵/ ۱
تاریخ پذیرش : ۸۵/۱۰/۲۶

۱- مؤلف مسؤول: PhD بیوشیمی بالینی ـ استاد دانشکده پیراپزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران ـ صندوق پستی: ۶۱۸۳-۱۴۱۵۵
۲- PhD بیوشیمی تغذیه ـ دانشیار دانشگاه علوم پزشکی ایران
۳- PhD فیزیک پزشکی ـ دانشیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران
۴- کارشناس علوم آزمایشگاهی ـ آزمایشگاه تحقیقات تالاسمی و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۵- PhD بیوشیمی ـ انستیتو نورولوژی و ژنتیک قبرس

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

مقدمه

برنامه غربالگری تالاسمی در ایران با هدف پیشگیری از بروز موارد جدید بتاتالاسمی از سال ۱۳۷۶ به اجرا درآمده است. اولین استراتژی اصلی در این برنامه، شناسایی زوجین ناقل بتاتالاسمی هنگام ازدواج و مشاوره با ایشان است. در این غربالگری درصدی از زوجین در حالی که اندکس‌های خونی غیر طبیعی دارند(MCV<۸۰ و MCH<۲۷)، درصد HbA_2 آن‌ها طبیعی($HbA_2 \leq$ ۳/۳) می‌باشد و مشکوک به داشتن آلفا تالاسمی خاموش(Trait) و یا بتاتالاسمی خاموش(Normal HbA_2 β-thalassemia) می‌شوند. استراتژی تشخیص این ژنوتیپ‌ها پیچیده است و نیاز به بررسی فامیلی، بررسی آنمی فقر آهن و مطالعه DNA از نظر موتاسیون‌های حذفی و غیر حذفی آلفا تالاسمی و بیوسنتز زنجیره‌های گلوبین دارد(نمودار ۱).



* در تحقیق حاضر درصد HbA_2 بین ۳/۵-۳/۳ منطقه مرزی در نظر گرفته شده و درصد HbA_2 برابر ۳/۳ و یا کمتر از آن نرمال محسوب شده است.
** ٪۷ < HbA_2 نیاز به بررسی‌های تکمیلی دارد.

نمودار ۱: نحوه غربالگری ناقلین سالم ژن تالاسمی پیش از ازدواج

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

بنابراین برای موفقیت بیشتر برنامه پیشگیری از به دنیا آمدن موارد جدید بتاتالاسمی ماژور، مراکز رفرانس متعددی جهت انجام آزمایش بیوسنتز زنجیره‌های گلوبین و تشخیص‌های مولکولی لازم است تا جواب‌گوی این مشکل متقاضیان ازدواج باشند(۲، ۱).

هدف از تحقیق حاضر، راه اندازی آزمایش بیوسنتز زنجیره‌های گلوبین و تعیین محدوده نسبت زنجیره‌های α/β در افراد سالم بود تا بر اساس آن بتوان بعد از مقایسه نسبت زنجیره‌های α/β در افراد مبتلا به تالاسمی با محدوده افراد سالم، تا حد امکان موارد نادر موتاسیون‌های تالاسمی را تشخیص داد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. بیوسنتز زنجیره‌های گلوبین و تعیین نسبت زنجیره‌های α/β بر روی ۳۰ نمونه از افراد سالم از بین کارکنان آزمایشگاه سازمان انتقال خون، دانشگاه علوم پزشکی ایران و بستگان آن‌ها بین سن ۱۸ تا ۴۰ سالگی که هیچ‌گونه سابقه فامیلی ابتلا به تالاسمی نداشتند صورت گرفت. ابتدا آزمایش CBC انجام شد و سپس درصد HbA_2 آن‌ها به روش کروماتوگرافی تعویض یونی تعیین مقدار گردید. برای بررسی هموگلوبینوپاتی‌ها، الکتروفورز استات سلولز صورت گرفت. هیچ کدام دارای باند غیر طبیعی نبودند و در آزمایش CBC، درصد HbA_2 و درصد HbF آن‌ها نرمال بود.

بیوسنتز زنجیره‌های گلوبین به روش کلگ ـ ودرال (Clegg-Weatheral) :

این روش علیرغم طولانی بودن، از قابلیت تکرارپذیری مطلوبی برخوردار است و به عنوان روش مرجع محسوب می‌شود(۴، ۳).

پس از گرفتن خون تام بر روی هپارین و جداسازی پلاسما، در محیط ۴ درجه سانتی‌گراد رتیکولوسیت‌ها جدا می‌شوند. سپس به صورت *In vitro* در محیط کشتی که حاوی ۱۹ اسید آمینه به همراه لوسین نشاندار با تریتیم است عمل بیوسنتز زنجیره‌ها صورت می‌گیرد. آن گاه پس از لیز گلبول‌های قرمز و رتیکولوسیت‌های نشاندار، زنجیره‌ها به وسیله حلال‌های آلی رسوب داده شده و توسط کروماتوگرافی تعویض یونی در حضور اوره ۸ مولار و شیب غلظت بافر فسفات با pH ۶/۵ – ۶/۳۵، زنجیره α و β جدا و به وسیله بتاکانتر با استفاده از محلول بتا کانتر میزان رادیواکتیویته شمارش و نسبت α/β محاسبه می‌گردد(۴، ۳).

مراحل عمل به شرح زیر است:

– تهیه نمونه خون
– جداسازی لایه زیر بافی کوت (غنی از رتیکولوسیت)
– حذف گلبول‌های سفید توسط α سلولز و سلولز میکروکریستالین
– انجام بیوسنتز در حضور لوسین نشاندار
– رسوب دادن زنجیره‌های گلوبین به وسیله استن و اتر
– جداسازی زنجیره‌ها به روش کروماتوگرافی تعویض کاتیونی و شیب قدرت یونیک
– آماده‌سازی لوله‌ها برای شمارش با بتاکانتر
– محاسبه نسبت α/β
– اخیراً جداسازی زنجیره‌ها با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا(High performance Liquid Cromatography) با فاز معکوس نیز مطرح شده است. این روش دارای قابلیت تکرارپذیری مناسب و ساده می‌باشد ولی در مواردی که تعداد رتیکولوسیت‌ها کم باشد، ممکن است اندازه‌گیری رادیواکتیویته زنجیره‌ها توسط بتاکانتر با اشکال مواجه گردد. بنابراین در مورد تعیین نسبت زنجیره‌های گلوبین نمونه‌های سالم این روش کمتر توصیه می‌گردد(۵).

الکتروفورز استات سلولز در pH قلیایی:

الکتروفورز هموگلوبین در pH= ۸/۴ صورت می‌گیرد. در این pH، جمع جبری بار هموگلوبین‌ها منفی است و از کاتد به طرف آند حرکت می‌کنند. هموگلوبین‌های طبیعی از غیر طبیعی بر اساس سرعت حرکت الکتروفورتیک تفکیک می‌شوند.

اندازه‌گیری HbA_2 به روش کروماتوگرافی تعویض یونی:

برای جداسازی HbA_2 از کروماتوگرافی تعویض آنیونی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

استفاده می‌شود.

pH بافر طوری انتخاب می‌شود که از pH ایزوالکتریک HbA_2 پایین‌تر و از pH ایزوالکتریک سایر هموگلوبین‌ها بالاتر باشد.

بنابراین HbA_2 نمی‌تواند به رزین باند شود و با حجم کمتر از ۳ میلی‌لیتر از بافر، از ستون خارج می‌شود. سپس جذب نوری لوله حاوی HbA_2 و شاهد توتال در طول موج ۴۱۵ نانومتر در برابر آب مقطر یادداشت و درصد HbA_2 محاسبه می‌شود(۶).

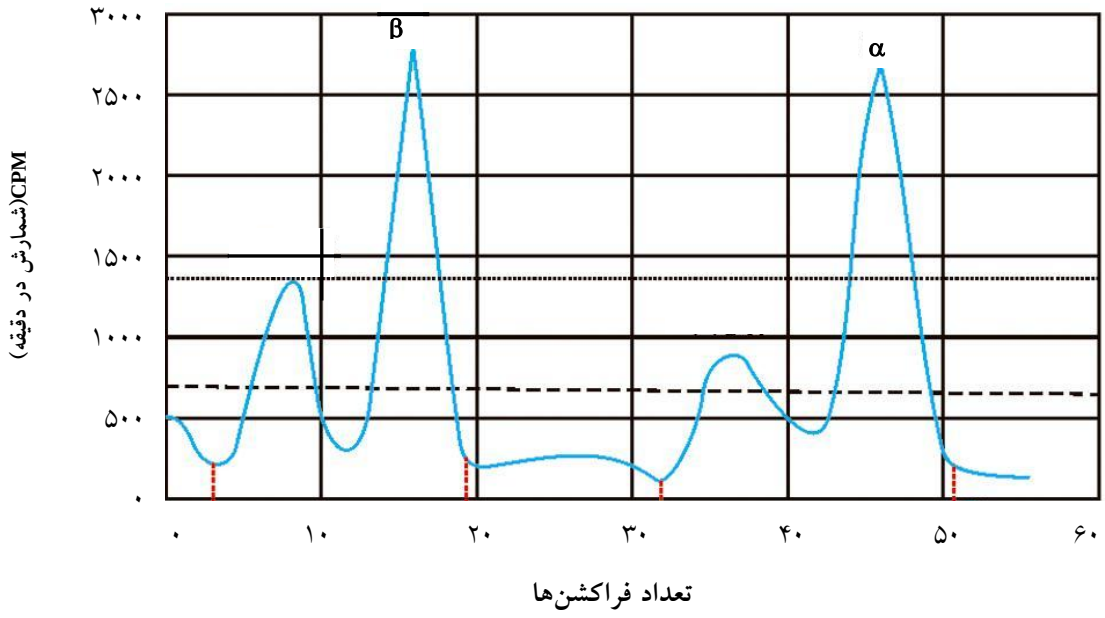
با استفاده از برنامه Excel، میانگین SD (mean ± ۱SD)، پارامترهای MCV و MCH، هموگلوبین توتال و درصد HbA_2 نسبت زنجیره‌های α/β محاسبه گردید.

یافته‌ها

میانگین هموگلوبین توتال برابر ۱/۳ ± ۱۴/۱۸ گرم درصد، MCV برابر ۳/۴۴ fl ± ۸۶/۴۹، MCH برابر ۱/۳۹ pg ± ۲۹/۳، درصد HbA_2 برابر ۰/۳۵ ± ۲/۶۴ و نسبت زنجیره‌های α/β برابر ۰/۱۲ ± ۱/۰۴۵ با میانه ۱/۰۲۵ می‌باشد(جدول ۱). ضمناً CV روش اندازه‌گیری نسبت زنجیره‌های گلوبین، برابر ۳/۸٪ است(نمودار ۲).

جدول شماره ۱: نتایج نسبت زنجیره‌های α/β در افراد با درصد HbA_2 و اندکس‌های خونی طبیعی

α/β	۰/۹۳	۰/۹۱	۰/۹۹	۱/۰۲	۰/۹۲	۱/۰۰۶	۰/۸۸	۱/۰۶	۱/۰۳	۱/۰۶	۰/۹۳	۰/۹۵	۰/۹۱	۰/۹۷	۱/۰۷
	۱/۲	۱/۲	۰/۹	۰/۹	۰/۹۴۶	۱/۲۶	۰/۹۶۶	۱/۱۵	۱/۰۸	۱/۱۰	۱/۱۱	۱/۲۸	۱/۱۸	۱/۲۸	۱/۱۶



نمودار ۲: سطح زیر منحنی با نسبت زنجیره‌های گلوبین در محدوده ۰/۱۲ ± ۱/۰۴۵(نمونه سالم) و نحوه خروج زنجیره‌ها از ستون بر حسب شماره فراکشن‌ها

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

بحث

آزمایش‌های غربالگری ناقلین تالاسمی باید طوری انتخاب شوند که بتوان به کمک آن‌ها β تالاسمی هتروزیگوت، β + α تالاسمی، δβ تالاسمی، β تالاسمی خاموش و یا حضور توأم تالاسمی با هموگلوبینوپاتی‌ها را تشخیص داد بنابراین آزمایش واحدی را نمی‌توان انتخاب نمود، در واقع باید یک گروه از آزمایش‌ها را به صورت مکمل انجام داد تا به تشخیص نهایی رسید. آزمایش‌هایی که باید انجام شود شامل CBC، بررسی لام خون محیطی، اندازه‌گیری درصد HbA_2، الکتروفورز هموگلوبین در pH قلیایی و اسیدی، بررسی آنمی فقر آهن و در نهایت برای تفکیک ژنوتیپی ــ فنوتیپی انواع تالاسمی، بررسی‌های مولکولی و تعیین توالی بازهای DNA و بیوسنتز زنجیره‌های گلوبین جهت تعیین نسبت α/β توصیه می‌گردد(۷، ۶).

علیرغم پیشرفت‌های زیادی که در ارتباط با تجزیه DNA در تشخیص‌های مولکولی تالاسمی صورت گرفته است، همچنان مواردی باقی می‌ماند که از نظر تشخیص نیاز به انجام بیوسنتز زنجیره‌ها می‌باشد(۸، ۵). این موارد عبارتند از:

- افتراق δβ تالاسمی از هموگلوبین F ارثی پایدار(HPFH)
- β تالاسمی خاموش(نرمال HbA_2 بتا تالاسمی)
- مطالعه انواع جهش‌های ساختمانی مربوط به زنجیره‌های α و β

بنابراین با توجه به این که یکی از آزمایش‌هایی که در برنامه غربالگری انواع تالاسمی باید در نظر گرفته شود بیوسنتز زنجیره‌های گلوبین است، ابتدا باید محدوده افراد سالم این نسبت را تعیین نمود تا بر پایه این یافته‌ها بعد از مقایسه نسبت α/β با محدوده افراد سالم تا حد امکان موارد α تالاسمی Trait را از β تالاسمی خاموش تفکیک نمود.

در این تحقیق برای تعیین α/β از روش کلگ ـ ودرال که به عنوان روش مرجع محسوب می‌شود و همان روش کروماتوگرافی کربوکسی متیل سلولز در حضور اوره ۸ مولار است استفاده گردید که از قابلیت تکرارپذیری (reproducibility) و اعتماد(reliability) خوبی برخوردار است.

در این تحقیق نسبت زنجیره‌های α/β در همکاران سالم آزمایشگاهی بدون سابقه β تالاسمی در خانواده تعیین گردید. میانگین نسبت زنجیره‌ها ۰/۱۲ ± ۱/۰۴۵ (mean ± ۱SD) با دامنه ۱/۱۶۵– ۰/۹۲۵ به دست آمد که این نسبت با نسبت به دست آمده توسط سایر محققان در دنیا هم‌خوانی داشت. گالانلو و همکاران این نسبت را در افراد سالم با روش HPLC، ۰/۰۸ ± ۱(mean ±۱SD) گزارش کرده‌اند و ماتیوسان و همکاران این نسبت را در افراد سالم برابر ۰/۱ ± ۱/۰۵(mean ± ۱SD) با روش کروماتوگرافی تعویض یونی(اصول روش تحقیق حاضر) گزارش کرده‌اند(۸، ۵). هم‌چنین محدوده این نسبت در سایر مطالعات، ۱/۰۵–۰/۹۵ ذکر شده است(۱۰، ۹). با توجه به این که ماتیوسان و همکاران در یازده مورد α تالاسمی Trait، این نسبت را ۰/۱۱ ± ۰/۶۸ (۱SD ± mean) و در ۷ مورد β تالاسمی مینور، ۰/۱۵ ± ۱/۳۷ (SD ۱ ± mean) به دست آورده‌اند بنابراین برای پیشگیری از هم‌پوشانی نتایج افراد مبتلا به تالاسمی با حداقل و حداکثر مقادیر افراد سالم به دست آمده در تحقیق حاضر، به ترتیب کسانی که نسبت α/β آن‌ها از $\bar{\chi}$ + ۱ SD بیشتر و از $\bar{\chi}$ + ۲SD کمتر باشد یا این نسبت در دامنه ۱/۲۸۷ تا ۱/۱۶۵ قرار گیرد، مشکوک به β تالاسمی خاموش(نرمال HbA_2 بتا تالاسمی) و افرادی که نسبت α/β آن‌ها کمتر از $\bar{\chi}$–۱SD ولی بیشتر از $\bar{\chi}$–۲SD باشد به عبارت دیگر این نسبت در دامنه ۰/۹۲۵ – ۰/۸۰۵ قرار گیرد مشکوک به α تالاسمی Trait می‌گردند و در این موارد تجزیه DNA باید صورت گیرد. به این نکته نیز باید توجه داشت که در افراد مبتلا به β تالاسمی مینور همراه با Mild α تالاسمی، نسبت زنجیره‌ها مشابه افراد سالم می‌گردد با این تفاوت که درصد HbA_2 آن‌ها در محدوده مرزی یا بالا می‌باشد. لذا در موارد فوق هم زمان با آزمایش بیوسنتز زنجیره‌های گلوبین برای فرد مراجعه کننده و والدین او، اندازه‌گیری HbA_2 با روش معتبر الزامی است.

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت موضوع، توصیه می‌گردد

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

هر آزمایشگاهی بر حسب روش تعیین نسبت زنجیره‌های گلوبین، ابتدا قابلیت تکرارپذیری روش را با محاسبه CV مورد ارزیابی قرار دهد سپس محدوده افراد سالم را با روش مربوطه به دست آورد تا بتواند بر پایه این اطلاعات نسبت زنجیره‌های α/β بیماران را تعیین نماید.

تشکر و قدردانی

از معاون محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران که بودجه این طرح را تأمین نموده‌اند و از همکاران محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران و آزمایشگاه تحقیقات تالاسمی سازمان انتقال خون ایران همچنین خانم‌ها ناگهی و دلفی که در امر نمونه‌گیری این طرح همکاری‌های لازم را مبذول داشته‌اند صمیمانه سپاسگزاریم.

References :

1- Thalassemia prevention program in Iran. TIF Magazine 2002; 35: 13-15.
2- Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinapathies and thalassemia; review and update. Clinical Chemistry 2000; 46: 8 (B): 1284-1290.
3- Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes. 3rd ed. Oxford: Blackwell scientific publications; 1981.
4- Drousiotou A. Globin chain synthesis and separation on CMC columns, for adult and foetal samples. Techniques in the Diagnosis and Monitoring of Thalassemia, A Laboratory Manual, 1999; Nicosia-Cyprus.
5- Galanello R, Satta S, Pirroni MG, Tari M, Maccioni L. Globin chain synthesis analysis by high performance liquid chromatoghraphy in the screening of thalassemia syndromes. Hemoglobin 1998; 22(5,6): 501-508.
۶- دکتر لادن حسینی گوهری هموگلوبین در سلامتی و بیماری، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی معاونت سلامت، مرکز مدیریت بیماری‌ها، مرداد ماه ۱۳۸۴.
7- Hosseini Gohari L, Petrou M, Felekis X, Christopoulos G, Kleanthous M. Identification of α-thalassemia mutation in Iranian Individuals with abnormal hematotogical indices and normal HbA_2. Hemoglobin 2002; 27(2): 129-132.
8- Matthewson Beryl E, Gray GR. Evaluation of a chromatographic method for globin chain biosynthesis in thalassemia. Journal of Clinical Biochemistry 1983; 16(3): 167-170.
9- Bain Borbara J. Hemoglobinopathy diagnosis. UK: Blackwell Science Ltd, 2000.
10- Dacie, Sir John V. Lewis, SM. Practical haematology. 6th ed. Carchill Levingntone Edinburgh; 1984.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

Determination of α/β ratio in healthy individuals (18-45 years old) with normal hematological indices (MCV≥ 80, MCH≥ 27) and normal HbA_2 by cation exchange chromatography

Hosseini Gohari L.[1](PhD),Noormohammadi I.[1](PhD), Sharafi Tafreshi Moghadam A.A.[1](PhD), Mostaan L.[2](BS), Drousiotou A.[3](PhD)

[1]Iran University of Medical Sciences, School of Paramedicine, Cellular and Molecular Research Center, Tehran , Iran
[2]Iranian Blood Transfusion Organization- Research Center
[3]The Cyprus Institute of Neurology and Genetics, Department of Biochemical Genetics, Nicosia, Cyprus

Abstract

Background and Objectives

For a successful prevention program, globin chain synthesis, as a complementary test beside DNA analysis, is necessary. So, it is important that each laboratory establishes its own reference range for the classification of thalassemia syndromes by globin chain synthesis. Globin chain synthesis is a relatively complex test introduced in the study of thalassemia syndromes as a reference method. The technique is also useful for variant chain identification.This study aims to stablish the method of globin chain synthesis to determine α/β chain ratio in healthy individuals.

Materials and Methods

In this study globin chain analysis was performed on 30 healthy laboratory personnels with normal HbA_2 and normal hematological indices. In this method a reticulocyte-rich sample is incubated with a mixture of amino acids, one of which (leucine) radioactively labelled. After washing the excess radioactivity and precipitating the globin, different chains are separated by cation exchange chromatography.

Results

The mean α/β ratio was 1.045 ± 0.12 (mean ± 1SD) in healthy subjects. Our findings were in agreement with those of the other investigators in the world.

Conclusions

In any screening program, diagnostic problems will arise that can not be solved without biosynthetic studies. The Clegg and Weatherall method has been proved to be very reliable and reproducible, but time-consuming (requiring four days). New methods like reverse phase HPLC are now available for chain separation. Therefore, according to the procedures each laboratory should determine its own reference range.

Key words: α globin, β globin, Hemoglobin, Normal range**,** Ion exchange chromatography
SJIBTO 2007; 3(4): 325-331

Received: 23 Jul 2006
Accepted:16 Jan 2007

Correspondence: Hosseini Gohari L., PhD of Clinical Chemisty, Iran University of Medical Sciences, School of Paramedicine, Cellular and Molecular Research Center. P.O.Box: 14155-6183, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88054355; Fax: (+9821)88054355.
E-mail: *lhgh@iums.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]