

خون

فصلنامه علمی تحقیقاتی
دوره ۳ شماره ۴ زمستان ۸۵ (۳۲۵-۳۳۱)

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

دکتر لادن حسینی گوهری^۱، دکتر عیسی نورمحمدی^۲، دکتر علی اکبر شرفی تفرشی مقدم^۳، دکتر آنتی دوروزیوتون^۴

چکیده

سابقه و هدف

برای موقوفیت بیشتر برنامه پیشگیری از تالاسمی، انجام آزمایش بیوسنتر 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 سندروم‌های تالاسمی به دست آورد. روش بیوسنتر زنجیره‌های گلوبین روش نسبتاً مشکل ولی مرجع جهت مطالعه سندروم‌های تالاسمی می‌باشد. هم‌چنین برای تعیین جهش‌های ساختمانی زنجیره‌های گلوبین کاربرد دارد. هدف از این مطالعه، راه‌اندازی روش بیوسنتر زنجیره‌های گلوبین و تعیین نسبت زنجیره‌های α/β در افراد سالم بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این مطالعه نسبت زنجیره‌های گلوبین در دو مرحله بر اساس روش کلگ - ودرال (تغییر شکل یافته) اندازه گیری 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 رتیکولوسيت 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، $۰/۱۲ \pm ۰/۰۴۵$ ($mean \pm 1SD$) با دامنه $۰/۹۲۵ - ۱/۱۶۵$ به دست آمد که این نسبت با نسبت به دست آمده توسط سایر محققان در دنیا هم خوانی داشت.

نتیجه‌گیری

در هر برنامه غربالگری تالاسمی، مشکلات تشخیص به وجود می‌آید که بدون آزمایش بیوسنتر زنجیره‌ها قابل حل نمی‌باشد. روش کلگ - ودرال در حالی که از قابلیت تکرار پذیری 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 مرجح خود را تعیین نماید.

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

تاریخ دریافت: ۱۵/۵/۱

تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۰/۲۶

۱- مؤلف مسؤول: PhD بیوشیمی بالینی - استاد دانشکده پرایپزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران - صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۸۳

۲- PhD بیوشیمی تغذیه - دانشیار دانشگاه علوم پزشکی ایران

۳- PhD فیزیک پزشکی - دانشیار دانشکده پرایپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران

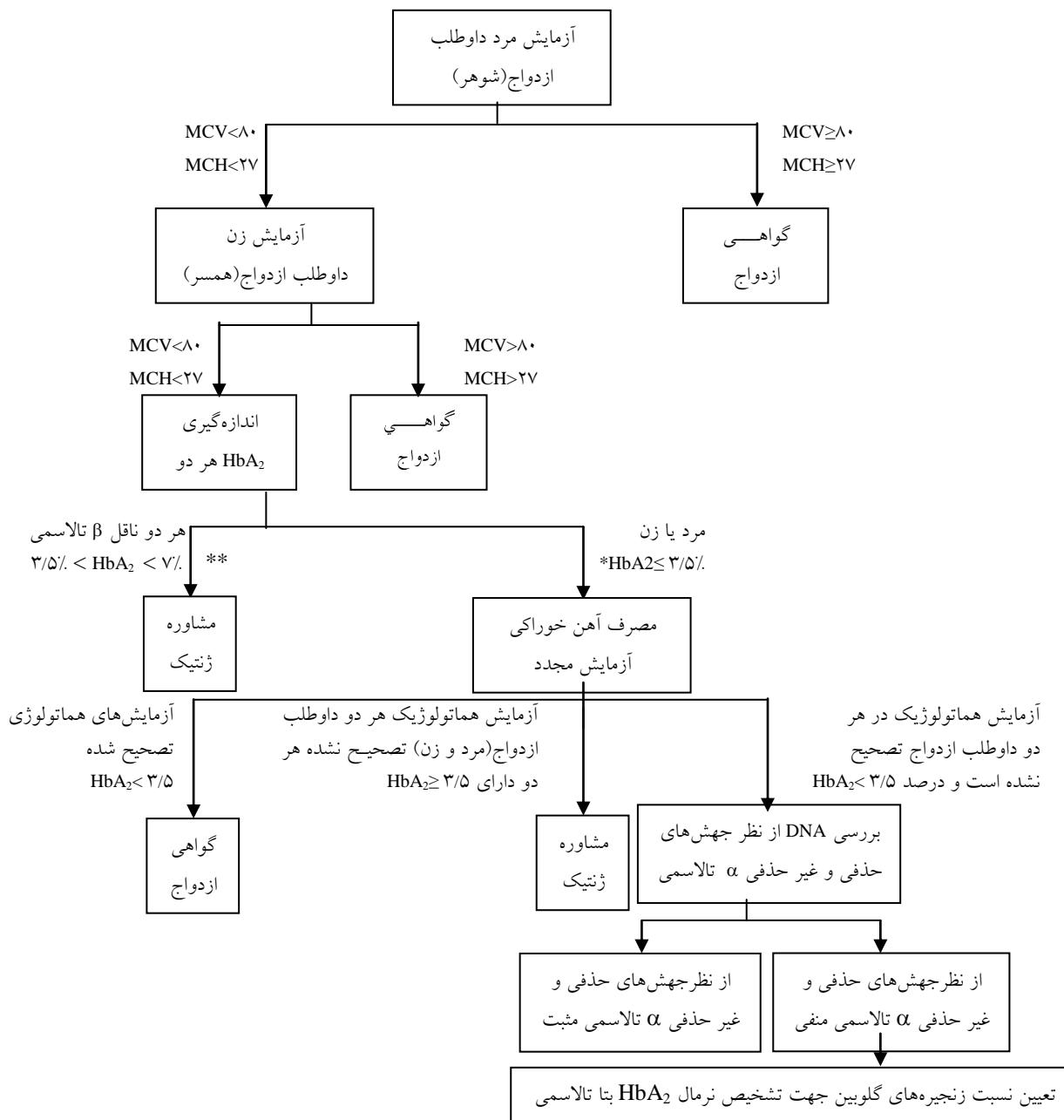
۴- کارشناس علوم آزمایشگاهی - آزمایشگاه تحقیقات تالاسمی و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۵- PhD بیوشیمی - انسستیتو نوروژوژی و ژنتیک قبرس

۴-۲-۶

(HbA₂ ≤ ۳/۳)، درصد HbA₂ آنها طبیعی (MCH < ۲۷ می باشد و مشکوک به داشتن آلفا تالاسمی خاموش (Trait) (Normal HbA₂ β-thalassemia) و یا بتاتالاسمی خاموش (Normal HbA₂ β-thalassemia) می شوند. استراتژی تشخیص این ژنتیپ ها پیچیده است و نیاز به بررسی فامیلی، بررسی آنمی فقر آهن و مطالعه DNA از نظر متاسیون های حذفی و غیر حذفی آلفا تالاسمی و بیوستر زنجیره های گلوبین دارد (نمودار ۱).

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 اندکس های خونی غیر طبیعی دارند ($MCV < ۸۰$ و $MCV \geq ۸۰$ و $MCH \geq ۲۷$) و



* در تحقیق حاضر درصد HbA₂ بین ۵-۳/۳-۳/۳ مانع از نظر گرفته شده و درصد HbA₂ برابر ۳/۳ و یا کمتر از آن نرمال محسوب شده است.
** نیاز به بررسی های تکمیلی دارد.

نمودار ۱: نحوه غربالگری ناقلين سالم ژن تالاسمی پيش از ازدواج

زنجیره‌ها به وسیله حلال‌های آلی رسوب داده شده و توسط کروماتوگرافی تعویض یونی در حضور اوره ۸ مولار α و شیب غلظت بافر فسفات با $6/5 - 6/35\text{H}\beta$ ، 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 (غنى از رتیکولوسیت)
- حذف گلbulهای سفید توسط α سلولز و سلولز میکروکریستالین
- انجام بیوسترز 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 اندازه گیری 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 $pH=8/4$ 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.

اندازه گیری HbA_2 به روش کروماتوگرافی تعویض یونی: برای جداسازی HbA_2 از کروماتوگرافی تعویض آنیونی

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

هدف از تحقیق حاضر، راه اندازی آزمایش بیوسترز زنجیره‌های گلوبین و تعیین محلوده 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. بیوسترز 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 هیچ گونه 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.

بیوسترز زنجیره‌های گلوبین به روش کلگ - ودرال (Clegg-Weatheral)

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

پس از گرفتن خون تام بر روی هپارین و جداسازی پلاسماء، در محیط ۴ درجه سانتی گراد رتیکولوسیت‌ها جدا می‌شوند. سپس به صورت *In vitro* در محیط کشتی که حاوی ۱۹ اسید آمینه به همراه لوسین نشاندار با ترتیب است عمل بیوسترز زنجیره‌ها صورت می‌گیرد. آن گاه پس از لیز گلbulهای قرمز و رتیکولوسیت‌های نشاندار،

پارامترهای MCV و MCH، هموگلوبین توتال و درصد HbA₂ نسبت زنجیره‌های α/β محاسبه گردید.

یافته‌ها

میانگین هموگلوبین توتال برابر $14/18 \pm 1/3$ گرم درصد، MCV برابر $86/49 \pm 3/44$ fl MCH برابر $29/3 \pm 1/39$ pg HbA₂ برابر $0/35 \pm 0/26$ و نسبت زنجیره‌های α/β برابر $0/12 \pm 0/045$ با میانه $1/025$ می‌باشد (جدول ۱). ضمناً CV روش اندازه‌گیری نسبت زنجیره‌های گلوبین، برابر $0/3/8$ است (نمودار ۲).

استفاده می‌شود.

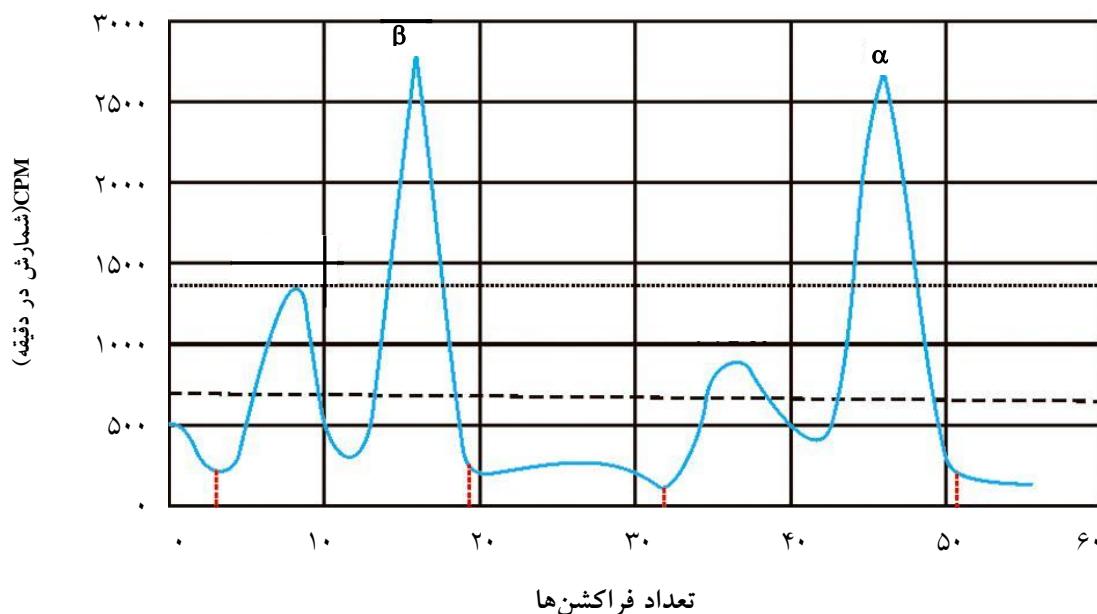
pH بافر طوری انتخاب می‌شود که از pH ایزوالکتریک پایین‌تر و از pH ایزوالکتریک سایر هموگلوبین‌ها بالاتر باشد.

بنابراین HbA₂ نمی‌تواند به رزین باند شود و با حجم کمتر از ۳ میلی‌لیتر از بافر، از ستون خارج می‌شود. سپس جذب نوری لوله حاوی HbA₂ و شاهد توتال در طول موج ۴۱۵ نانومتر در برابر آب مقطر یادداشت و درصد HbA₂ محاسبه می‌شود (۶).

با استفاده از برنامه Excel، میانگین SD (mean \pm 1SD) با استفاده از برنامه Excel میانگین SD (mean \pm 1SD)

جدول شماره ۱: نتایج نسبت زنجیره‌های α/β در افراد با درصد HbA₂ 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 $0/12 \pm 0/045$ (نمونه سالم) و نحوه خروج زنجیره‌ها از ستون بر حسب شماره فراکشن‌ها

بحث

آزمایش‌های غربالگری ناقلین تالاسمی باید طوری انتخاب شود که بتوان به کمک آنها β تالاسمی هتروزیگوت، $\alpha + \beta$ تالاسمی، $\delta\beta$ 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 ، الکتروفوروز هموگلوبین در pH قلیایی و اسیدی، بررسی آنمی فقر آهن و در نهایت برای تفکیک ژنوتیپی-فنوتیپی انواع تالاسمی، بررسی‌های مولکولی و تعیین توالی بازهای DNA و بیوسنتر زنجیره‌های گلوبین جهت تعیین نسبت α/β توصیه می‌گردد^(۷).

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 بیوسنتر زنجیره‌ها می‌باشد^(۸). این موارد عبارتند از:

- افتراق $\delta\beta$ تالاسمی از هموگلوبین F ارثی پایدار (HPFH)
- β تالاسمی خاموش (نرمال HbA_2 بنا تالاسمی)
- مطالعه انواع جهش‌های ساختمنانی 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 بیوسنتر 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 - 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 (reliability) و اعتماد (reproducibility) خوبی برخوردار

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت موضوع، توصیه می‌گردد

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.

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

References :

- 1- Thalassemia prevention program in Iran. TIF Magazine 2002; 35: 13-15.
- 2- Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies 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 chromatography in the screening of thalassemia syndromes. Hemoglobin 1998; 22(5,6): 501-508.
- 6- 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, Felekitis X, Christopoulos G, Kleanthous M. Identification of α -thalassemia mutation in Iranian Individuals with abnormal hematological indices and normal HbA₂. Hemoglobin 2002; 27(2): 129-132.
- 8- Mathewson 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 Barbara J. Hemoglobinopathy diagnosis. UK: Blackwell Science Ltd, 2000.
- 10- Dacie, Sir John V. Lewis, SM. Practical haematology. 6th ed. Carchill Levingstone Edinburgh; 1984.

Determination of α/β ratio in healthy individuals (18-45 years old) with normal hematological indices ($MCV \geq 80$, $MCH \geq 27$) 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)**

¹Iran University of Medical Sciences, School of Paramedicine, Cellular and Molecular Research Center, Tehran , Iran

²Iranian Blood Transfusion Organization- Research Center

³The 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 establish 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 personals 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 \pm 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 Chemistry, 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