استفاده از روش کاپیلاری الکتروفورز جهت غربالگری اختلالات هموگلوبینی شایع در ایران

علیرضا ابراهیمی[۱]، زهره نیکنامی[۲] فهیمه نظری[۳]، مهستی قوامی عادل[٤] امیر آتشی[۱*]، عبدالفتاح صراف‌نژاد[۵]

۱- گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲- گروه ژنتیک، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.
۳- گروه ژنتیک، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
٤- آزمایشگاه پاتوبیولوژی نور، بخش انعقاد و الکتروفورز، تهران، ایران.
۵- گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۳۵۷۹
E-mail: atashia@modares.ac.ir

دریافت: ۱۳۹٤/۰۵/۳۰ ویرایش: ۱۳۹٤/۱۰/۲۷ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۰۷ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۵/۱۰

چکیده

اختلالات هموگلوبینی یکی از شایع‌ترین اختلالات ارثی در جهان هستند که حدود ۷٪ از جمعیت دنیا و ٦-۵٪ از جمعیت ایران، حامل ژن‌های آن‌ها هستند. به‌صورت اتوزومال مغلوب به ارث می‌رسند و در مناطق مدیترانه‌ای و بخش بزرگی از آسیا و آفریقا بسیار شایع می‌باشند. به‌منظور کنترل اختلالات ارثی هموگلوبینی و پیشگیری از انتقال آن‌ها به فرزندان می‌توان از مشاوره ژنتیکی و غربالگری جمعیتی با روش‌های پیشرفته‌تر و دقیق‌تر استفاده نمود. هدف از این مطالعه بیان ویژگی‌های انواع اختلالات هموگلوبینی شایع در ایران، بیان روش‌های قابل دسترسی جهت غربالگری آن‌ها و معرفی بهتر روش کاپیلاری الکتروفورز به‌عنوان روشی سریع و دقیق، می‌باشد. اختلالات هموگلوبینی شامل دو گروه تالاسمی‌ها و واریانت‌های هموگلوبینی هستند که در اثر اختلال در تولید یا ساختار زنجیره‌های مختلف گلوبین ایجاد می‌شوند. هیچ‌یک از روش‌های آزمایشگاهی به‌تنهایی نمی‌تواند به‌عنوان یک روش قطعی جهت غربالگری معرفی شوند. برای شناسایی بهتر بایستی داده‌های کافی فراهم شده و از روش‌های مختلف مانند ژل الکتروفورز، کروماتوگرافی، ایزوالکتریک فوکوسینگ، کاپیلاری الکتروفورز، یا روش‌های مولکولی به‌صورت مکمل استفاده شود. روش کاپیلاری الکتروفورز یک روش دقیق و سریع برای غربالگری می‌باشد و از طرفی به‌دلیل عدم توانایی در تفکیک تمامی اختلالات هموگلوبینی، بایستی جهت تایید از روش‌های بیوشیمیایی، بیوفیزیکی یا مولکولی استفاده شود. بهره گرفتن از روش‌های غربالگری کاپیلاری الکتروفورز و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا به‌عنوان دو روش مکمل، داشتن اطلاعات کافی از انواع اختلالات هموگلوبینی، شرح حال بیمار و شاخص‌های هماتولوژیکی در شناسایی و تشخیص اختلالات هموگلوبینی بسیار موثر است.

کلمات کلیدی: هموگلوبینوپاتی‌ها، الکتروفورز کاپیلاری، تالاسمی، تغییرات ساختاری ژنومی، کروماتوگرافی، الکتروفورز، غربالگری.

هموگلوبین، مولکولی است تترامر با ساختار گلوبولار حاوی دو جفت زنجیره از گلوبین‌های نامشابه γ ،δ ،β ،ζ ،α یا ε که به چهار گروه هم متصل می‌باشند. در یک فرد بالغ سالم مقدار هموگلوبین A حدود ۹۷٪، هموگلوبین A_2 حدود ۲/۵٪ و هموگلوبین F کمتر از ۱٪ می‌باشد.[۳-۱] هموگلوبین A دارای دو جفت زنجیره آلفا و بتا است و هموگلوبین F شامل زنجیره‌های آلفا و گاما می‌باشد. زنجیره‌های دلتا و آلفا، هموگلوبین A_2 را می‌سازند که در تشخیص بتا تالاسمی مینور اهمیت دارد.[۱و٤] ترکیب هموگلوبین خون نوزادان به‌صورت ۸۰-۷۰٪ از هموگلوبین F و ۳۰-۲۰٪ از هموگلوبین A می‌باشد.[۵]

اختلالات هموگلوبین در اثر کاهش تولید زنجیره‌های گلوبین (تالاسمی‌ها) یا تغییر ساختاری گلوبین (واریانت‌های هموگلوبین) اتفاق می‌افتد (جدول ۱ و ۲).[٤] واریانت‌های هموگلوبین و انواع تالاسمی‌ها به‌عنوان دو نوع اختلال ارثی خیلی شایع در جهان شناخته می‌شوند که به‌صورت اتوزومال مغلوب به ارث می‌رسند و در مناطق مدیترانه‌ای و بخش بزرگی از آسیا و آفریقا بسیار شایع می‌باشند، که با غربالگری جمعیتی و مشاوره ژنتیکی می‌توان از انتقال آن‌ها به

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-30]

جدول ۱: خلاصه‌ای از ویژگی‌های اختلالات زنجیره آلفا و واریانت‌های شایع آن در ایران همراه با هموگلوبین‌های H و Bart

جایگاه هموگلوبین در الکتروفورز قلیایی	شیوع	علایم بالینی	اندکس‌ها و مورفولوژی	هموگلوبین (٪)	زنجیره گلوبین	هموگلوبین
کندتر از هموگلوبین A_2، جایگاه C	عرب، چین، یونان، هند، اندونزی، مالزی	آنمی همولیتیک خفیف	میکروسیتوزیس، هیپوکرومیا و همراه با هموگلوبین بارت و A_2 برابر با ۲تا ۱/۸	۷–۵	طویل شدن ۳۱ اسید آمینه‌ای ناحیه انتهایی C زنجیره آلفا	Constant Spring (CS)
		طبیعی	میکروسیتوزیس، هیپوکرومیا و هموگلوبین A_2 برابر با ۲/٤ تا ۳/۱	۲–۱		
جایگاه S	ایران، پاکستان، ترکیه	طبیعی	طبیعی	۱۹–۱۷	جابه‌جایی در زنجیره آلفا	Q-Iran
جایگاه S	ایران، لبنان، عربستان	طبیعی	طبیعی، داسی شدن کاذب با تست متابی سولفیت منفی	۱۵–۱۲	جابه‌جایی در زنجیره آلفا	Setif
جایگاه S	ایران	آنمی خفیف	هموگلوبین ناپایدار	۲۲	جابه‌جایی در زنجیره آلفا	Arya
جایگاه S	سیاهپوستان، چینی، ایتالیایی	-	میکروسیتوزیس و هیپوکرومیا	۱۰۰	جابه‌جایی در زنجیره آلفا	G-Philadelphia
		طبیعی	طبیعی	۳۵–۳۰		
		طبیعی	میکروسیتوزیس و هیپوکرومیا	٤۵		
جایگاه J	ایران	طبیعی	طبیعی	۲۵	جابه‌جایی در زنجیره آلفا	J-Kurosh
حرکت مشابه هموگلوبین A	آلمان، مجارستان، ایران، ژاپن، سوئد	سیانوز، کمبود اکسیژن	طبیعی	۳۰–۲۰	جابه‌جایی در زنجیره آلفا	M-Boston
سریع‌ترین، جایگاه H	جنوب شرق آسیا، خاورمیانه	آنمی همولیتیک، اسپلنومگالی	اریتروسیتوزیس، اجسام انکلوژنی هموگلوبین H، میکروسیتوزیس، هموگلوبین A_2 پایین و بارت ٤۰–۲۰٪	۳۰–۵ (بیماری هموگلوبین H)	Beta-4 (β4) حذف زنجیره آلفا	H
جایگاه بارت، هموگلوبین سریع	منتشر	ناسازگار با حیات (کشنده)	آنیزوسیتوزیس، پوئی کیلوسیتوزیس، میکروسیتوزیس، اریتروبلاستوزیس	چهار زنجیره آلفا (۸۵)	Gama-4 (γ4) حذف زنجیره آلفا	Bart
		از نظر بالینی خاموش	طبیعی	یک زنجیره آلفا (۲–۱ در خون بند ناف)		
		آنمی خفیف	میکروسیتوزیس	دو زنجیره آلفا (۱۰–۵ در خون بند ناف)		

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-30]

جدول ۲: خلاصه‌ای از ویژگی‌های اختلالات زنجیره بتا و واریانت‌های شایع آن در ایران همراه با اختلالات هموگلوبینی لپور و مقاومت ارثی هموگلوبین جنینی

جایگاه هموگلوبین در الکتروفورز قلیایی	شیوع	علایم بالینی	ایندکس‌ها و مرفولوژی	هموگلوبین (٪)	زنجیره گلوبین	هموگلوبین
جایگاه C	هرمزگان	آنمی همولیتیک خفیف، اسپلنومگالی	تارگت سل، کریستال‌های داخل اریتروسیتی، میکروسیتوزیس	هموزیگوت ۹۵	جابه‌جایی در زنجیره بتا	C
		طبیعی	میکروسیتوز خفیف، تارگت سل	هتروزیگوت ۴۵-۲۵		
جایگاه S	سیاهان هندی و آمریکایی، اعراب، حواشی دریای خزر و خلیج فارس	آنمی همولیتیک، یرقان، بحران دردناک، اولسر پا، مننژیت	هموگلوبین F افزایش یافته ۲۰-۱۰٪، تارگت سل، سلول داسی، گلبول قرمز هسته‌دار	هموزیگوت ۹۰-۵۵	جابه‌جایی در زنجیره بتا	S
		طبیعی	طبیعی	هتروزیگوت ۴۰-۳۵		
جایگاه E	شرق آسیا، جنوب ایران	آنمی همولیتیک خفیف	تارگت سل، میکروسیتوزیس، شکنندگی اسمزی پایین، افزایش هموگلوبین F	هموزیگوت ۹۰	جابه‌جایی در زنجیره بتا	E
-	-	آنمی هیپوکرومیک خفیف	میکروسیتوز خفیف، تارگت سل	هتروزیگوت ۳۵-۲۵		
جایگاه C	سیاهان آفریقایی آمریکایی، اعراب، مصریان	آنمی خفیف	میکروسیتوزیس	هموزیگوت ۹۵	جابه‌جایی در زنجیره بتا	O-Arab
		طبیعی		هتروزیگوت ۴۰-۳۰		
جایگاه D	ایران	طبیعی	طبیعی	هموزیگوت ۹۵	جابه‌جایی در زنجیره بتا	D-Iran
		طبیعی	طبیعی	هتروزیگوت ۴۵-۳۶		
سریع، جایگاه J	ایران، ترکیه	طبیعی	طبیعی	۴۷-۴۳	جابه‌جایی در زنجیره بتا	J-Iran
دارای چندین ناحیه بین هموگلوبین‌های A و A_2	نژادها و گروه‌های مختلف	آنمی همولیتیک خفیف	اجسام هاینز، رتیکلوسیتوزیس، هموگلوبین ناپایدار	۳۰	جابه‌جایی در زنجیره بتا	Köln
سریع‌تر از هموگلوبین A	سیاهپوستان، ژاپنی، تایلندی	طبیعی	طبیعی	۵۰-۴۰	جابه‌جایی در زنجیره بتا	Hope
جایگاه S	آفریقا، اسپانیا، یوگسلاوی، ایران، ترکیه	آنمی شدید آنمی خفیف	فقط هموگلوبین‌های لپور و F میکروسیتوز، هیپوکرومیا	هموزیگوت ۳۰ هتروزیگوت ۱۵-۷/۱	هیبرید زنجیره‌های بتا و دلتا	Lepore-Boston
جایگاه F	سیاه‌پوستان	اریتروسیتوز خفیف	اریتروسیتوزیس خفیف	هموزیگوت هموگلوبین F (۱۰۰)	حذف ۸۴۹۱۸ نوکلئوتید از ژن دلتا تا ژن بتا	HPFH-1
		طبیعی	بدون اختلالات هماتولوژیکی	هتروزیگوت هموگلوبین F (۲۸/۲-۲۱/۴)		

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-30]

فرزندان پیشگیری نمود. بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی ۷٪ مردم جهان حامل اختلالات هموگلوبینی هستند.[۴و۸-۶] حدود ۱/۵٪ مردم دنیا حامل بتاتالاسمی می‌باشند.[۹] همچنین ۵٪ جمعیت ایران ناقل ژن تالاسمی و حدود ۱-۰/۵٪ ناقل ژن‌های واریانت هموگلوبینی هستند.[۱۰]

برخی از واریانت‌های هموگلوبینی مانند حالت هموزیگوت هموگلوبین‌های C و S علایم بالینی چشمگیری دارند در حالی‌که هموزیگوت هموگلوبین E یا D علایم بالینی خفیف‌تری دارند. با وجود این‌که موارد هتروزیگوت علایم بالینی ندارند ولی شناسایی آن‌ها برای مشاوره ژنتیکی مهم می‌باشد. تشخیص اولیه اختلالات هموگلوبینی مختلف مانند آنمی سلول داسی‌شکل یا تالاسمی ماژور در اوایل زندگی بیمار اهمیت فراوانی دارد.[۱۱] شناسایی اختلالات هموگلوبینی در سنین پایین می‌تواند در آموزش، درمان و مراقبت از بیماران کمک کند. برای تشخیص و غربالگری اختلالات هموگلوبین به آزمایشات مختلف نیاز است و آزمایشات تشخیصی بر اساس علایم بالینی و نتایج هماتولوژیکی انجام می‌شود. برای بررسی نمونه خون بیمار بایستی ابتدا آزمایش شمارش سلول‌های خونی (Complete blood count, CBC) انجام شده و بررسی لام خون محیطی انجام گیرد.

به‌طور کلی غربالگری همه اشکال اختلالات هموگلوبینی به نتایج CBC و اندکس‌های گلبول‌های قرمز بستگی دارد، افراد با میانگین حجم گلبول قرمز (Mean corpuscular volume, MCV) و میانگین هموگلوبین گلبول قرمز (Mean corpuscular hemoglobin, MCH) پایین به‌طور معمول برای بررسی‌های بیشتر و تشخیص انواع اختلالات هموگلوبینی گزینش می‌شوند.[۱۲] در عین حال بایستی شرح حال بیمار به‌طور کامل بررسی شده و سپس جهت آنالیز اختلالات هموگلوبینی آزمایشات الکتروفورز قلیایی و اسیدی، کاپیلاری الکتروفورز (Capillary zone electrophoresis) یا کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (High-performance liquid chromatography) انجام شود و جهت اطمینان از نتایج آزمایشات تست‌های بیوشیمیایی اختصاصی انجام شده و در نهایت جهت تایید نهایی آزمایشات مولکولی انجام می‌گیرد.

مطالعات مختلفی در زمینه اختلالات هموگلوبینی در ایران انجام شده است که بیشتر به‌صورت مطالعات گزارشی و توصیفی می‌باشد.[۱۵-۱۳] البته مطالعات مروری نیز جهت بیان انواع اختلالات هموگلوبینی شایع در ایران و توزیع آن‌ها در مناطق مختلف کشور انجام شده است.[۱۰]

در مجموع هیچ‌یک از مطالعات انجام شده به‌صورت جامع گویای داده‌های آزمایشگاهی و بالینی اختلالات هموگلوبینی مختلف نیستند. در آزمایشگاه‌های بالینی به‌دلیل فقدان مراجع جامع و کاربردی جهت شناسایی انواع اختلالات هموگلوبینی به‌ویژه شناسایی الگوهای کاپیلاری الکتروفورزی مشکلات فراوانی وجود دارد. پژوهش کنونی جهت پاسخ‌دهی به سوالات رایج در آزمایشگاه‌های بالینی برای شناسایی اختلالات هموگلوبینی فراهم شده است و هدف از این بررسی مرور انواع اختلالات هموگلوبینی شایع در ایران، معرفی و مقایسه روش‌های غربالگری انواع اختلالات هموگلوبینی، همچنین معرفی روش کاپیلاری الکتروفورز به‌عنوان روشی مناسب و کم‌هزینه و تشریح الکتروفورگرام (Electropherogram) هموگلوبین‌های شایع به‌منظور تسهیل دسترسی به داده‌های کافی جهت غربالگری اختلالات هموگلوبینی در آزمایشگاه‌های بالینی می‌باشد.

جهت تشخیص اختلالات هموگلوبینی از روش‌های ژل الکتروفورز و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا استفاده می‌شد ولی امروزه از روش‌های جدیدتر مانند کاپیلاری الکتروفورز و روش‌های مولکولی استفاده می‌شود.[۴] روش کاپیلاری الکتروفورز در سال ۲۰۰۷ برای شناسایی اختلالات هموگلوبینی توسط اداره غذا و دارو (FDA) مورد تایید قرار گرفت.[۱۶] برای تشخیص قطعی اختلالات هموگلوبین بایستی از ترکیب روش‌های بیوفیزیکی، بیوشیمیایی و مولکولی استفاده کرد. علاوه بر این تفسیر نتایج به درک کامل ساختار ژنتیکی و خواص بیوشیمیایی هموگلوبین و ویژگی‌های بالینی انواع اختلالات هموگلوبینی نیاز دارد. ژل الکتروفورز اسیدی و قلیایی روش‌های مکمل هم هستند که انواع هموگلوبین‌ها را با استفاده از ماتریکس پلیمری اسیدی یا بازی جدا می‌کنند.

روش ایزوالکتریک فوکوسینگ (Isoelectric Focusing) انواع هموگلوبین‌ها را مشابه با الکتروفورز قلیایی اما با رزولوشن بهتر جدا می‌کند. این روش به‌طور معمول برای بررسی اختلالات هموگلوبینی یک روش استاندارد طلایی (Gold standard) محسوب می‌شود.[۴] در این روش استفاده از ژل‌های آگارز نازک‌تر همراه با گرادیان pH، رزولوشن بهتری نسبت به روش معمول الکتروفورز ایجاد می‌کند.[۱۷]

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-30]

الکتروفورز هموگلوبین در استات سلولز قلیایی در pH برابر با ۸/٦ به‌عنوان روشی سریع با توانایی جداسازی هموگلوبین‌های S، F، A، C می‌باشد، اما توانایی جداسازی هموگلوبین‌های A_2، C، O و E و همچنین هموگلوبین‌های S، D، G را ندارد. الکتروفورز سیترات آگار اسیدی در pH برابر ٦/۲ هموگلوبین E را از O یا هموگلوبین D را از G جدا نمی‌کند (هموگلوبین‌های A، D، G، E و O با هم حرکت می‌کنند). در نتیجه موارد مثبت کاذب آنمی داسی‌شکل و اختلالات هموگلوبینی جدا نشده در بیشتر مواقع اتفاق می‌افتد. در مجموع همه این روش‌های الکتروفورزی حساسیت کافی برای آنالیز واریانت‌های هموگلوبین با مقادیر اندک را ندارند.[۱۷و۱۸]

کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا روش تشخیصی سریع (سه دقیقه به ازای هر نمونه) برای انواع اختلالات هموگلوبینی است که با استفاده از کروماتوگرافی تعویض کاتیونی عمل جداسازی انجام می‌شود. این روش مقدار هموگلوبین A_2 را از هموگلوبین C جدا می‌کند ولی هموگلوبین‌های S گلیکوزیله، E و لپور (Lepore) در مقدار هموگلوبین A_2 تداخل ایجاد می‌کنند، در نتیجه در تشخیص بتا تالاسمی‌های همراه با الل‌های هموگلوبین S گلیکوزیله و E مشکل ایجاد می‌شود. از طرفی در غلظت‌های پایین حساسیت کافی برای تشخیص هموگلوبین‌ها را ندارد.

از دیگر مشکلات این است که در نمونه‌های نرمال پیک اضافی ایجاد می‌کند، در نتیجه آنالیز نتایج آن نیاز به تجربه و آموزش زیاد دارد[٦] همچنین در این روش نیاز به تجهیزات خاص، آموزش و الگوهای نتایج به‌نسبت پیچیده است به‌همین دلیل بیشتر آزمایشگاه‌های بالینی هنوز هم از ژل الکتروفورز اسیدی و بازی برای غربالگری اختلالات هموگلوبینی استفاده می‌کنند.[۱۱]

در روش کاپیلاری الکتروفورز، فرایند الکتروفورز در بافر قلیایی با pH برابر با ۹/٤ در کاپیلاری‌های سیلیکونی با قطر داخلی ۵۰ µm انجام می‌گیرد، بدین‌صورت که نمونه‌ها به یک طرف کاپیلاری تزریق شده و پروتیین‌ها در شرایط ولتاژ بالا به طرف دیگر حرکت می‌کنند تا بر اساس pH بافر، pH ایزوالکتریک و جریان اندوسمزی جدا شوند. در این روش هموگلوبین A_2 در حضور هموگلوبین E قابل اندازه‌گیری است اما جداسازی هموگلوبین A_2 در حضور هموگلوبین C و O دشوار است[۹] و افزایش کاذب هموگلوبین A_2 در بیماران با هموگلوبین C به‌دلیل حرکت مشابه اتفاق می‌افتد. میزان هموگلوبین F در بیماران دارای هموگلوبین S به روش کاپیلاری الکتروفورز افزایش کاذب نسبت به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا دارد که به‌احتمال به‌دلیل مهاجرت هموگلوبین S تخریب شده همراه با هموگلوبین F می‌باشد.[٤و۵] در این روش حرکت هموگلوبین‌ها بر اساس حرکت هموگلوبین‌های A و A2 تعیین می‌شوند در نتیجه در بیمارانی که هموگلوبین A وجود ندارد (در حالت هموزیگوت و هتروزیگوت ترکیبی اختلالات هموگلوبینی) جهت تعیین جایگاه هموگلوبین‌های بیمار بایستی نمونه بیمار با یک نمونه طبیعی به‌نسبت برابر مخلوط شود.[٤]

روش کاپیلاری الکتروفورز یک روش جدید هست و در نتیجه مطالب جهت تشخیص اختلالات هموگلوبینی با این روش کمتر نوشته شده است[٦] یکی از مزایای اصلی کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا به روش کاپیلاری الکتروفورز وجود الگوهای کروماتوگرافی مربوط به هموگلوبین‌های نادر می‌باشد.[٤و۱۹]

از روش کاپیلاری الکتروفورز می‌توان به‌عنوان روش مکمل کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا استفاده نمود. مطالعات مختلفی جهت مقایسه این دو روش برای آنالیز هموگلوبین‌های با اهمیت از جمله A، A_2، S، C و E انجام شده است.[٦و۲۰] از مزایای روش کاپیلاری الکتروفورز عدم نیاز به کالیبراسیون است. همچنین الکتروفوروگرام‌های مربوط به کاپیلاری الکتروفورز برای آنالیز هموگلوبین واضح‌تر و مشخص‌تر هستند از طرفی کاپیلاری الکتروفورز دارای قدرت تشخیص هموگلوبین بارت (Bart) از پروتیین‌های مداخله‌گر ماند بیلی‌روبین می‌باشد (شکل ۱)، تداخل بیلی‌روبین در نتایج را می‌توان با عمل شستشو از بین برد.[٦]

از روش کاپیلاری الکتروفورز جهت تشخیص هموگلوبین S، بتا تالاسمی‌های ماژور، اینترمدیا و مینور و سایر اختلالات هموگلوبینی جهت غربالگری نوزادان استفاده می‌شود که یک روش معتبر برای غربالگری در نمونه خون تازه و خشک شده در نوزادان می‌باشد. البته برای نوزادان از روش ایزوالکتریک فوکوسینگ و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا نیز می‌توان استفاده کرد. روش کاپیلاری الکتروفورز خیلی سریع بوده و آنالیز هشت نمونه را در مدت هفت دقیقه انجام می‌دهد. همچنین هتروزیگوت هموگلوبین‌های S، C، E با حساسیت و اختصاصیت بالا شناسایی می‌شوند[۲٤-۲۱] و هر کاپیلاری سیلیکونی را می‌توان حدود ۳۰۰۰ بار استفاده کرد،[۲۵] در نتیجه یک روش با صرفه

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-30]

و کم‌هزینه می‌باشد (شکل ۲ و ۳).

انواع واریانت‌های هموگلوبین در ۱۵ قسمت (Zone) با روش کاپیلاری الکتروفورز قرار می‌گیرند، از آنجایی‌که این روش توانایی جداسازی حداقل ۱۸۰ واریانت هموگلوبین را دارد بنابراین در هر قسمت ممکن است چندین هموگلوبین مختلف قرار گیرد. در نتیجه برای شناسایی هموگلوبین واقعی بایستی تست تکمیلی بیوشیمیایی و یا یک تکنیک متفاوت انجام گیرد و در نهایت جهت تایید قطعی از تست مولکولی استفاده شود.[۲۰]

هر دو روش به‌نسبت سریع بوده و دارای حساسیت و اختصاصیت کافی برای شناسایی واریانت‌های هموگلوبین در نوزادان می‌باشند. غلظت هموگلوبین‌های جدا شده در هر دو روش در طول موج ٤١٥ nm تعیین می‌شود.[٤و١٨] استفاده از روش کاپیلاری الکتروفورز و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا به‌صورت همزمان می‌تواند خیلی موثر باشد. پیش‌بینی می‌شود که روش کاپیلاری الکتروفورز روش مورد استفاده عموم آزمایشگاه‌ها جهت غربالگری واقع گردد.[۱۱]

سه روش آزمایشگاهی تست حلالیت سلول داسی، رنگ‌آمیزی اجسام هاینز (Heinz body) و هموگلوبین ناپایدار جهت تایید نتایج حاصل از الکتروفورز یا کروماتوگرافی استفاده می‌شوند. این روش‌ها حساسیت لازم را دارند ولی اختصاصیت کافی ندارند.[١٦] پس از تشخیص اختلالات هموگلوبینی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی تعیین حذف یا جهش در ژن مربوطه برای تایید نهایی لازم و ضروری است. انواع تکنیک‌های مولکولی بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction) برای شناسایی جهش یا حذف انواع اختلالات هموگلوبینی طراحی شده است. از گلبول‌های سفید خون یا آمینوسیت یا بافت کوریونی برای تشخیص انواع اختلالات زنجیره‌های گلوبینی استفاده می‌شود. این روش‌ها به‌طور اختصاصی جهش‌های مربوطه را شناسایی کرده و در مجموع روش‌های بسیار دقیق هستند ولی گران‌قیمت و پرهزینه بوده و فقط جهش‌هایی تعریف شده را تشخیص می‌دهند.[١و٤]

در تالاسمی‌ها سنتز زنجیره گلوبین از نظر کمی کاهش می‌یابد.[١] سندروم بتا تالاسمی ماژور تهدیدکننده زندگی می‌باشد در حالی‌که آلفا تالاسمی ماژور به‌طور معمول با زندگی خارج رحمی ناسازگار است. علایم بتا تالاسمی ماژور در اوایل کودکی مشخص می‌شود و نیاز به تزریق خون مداوم دارد و در صورت امکان بایستی پیوند مغز استخوان انجام گیرد.[٢٦]

تصویر هماتولوژیکی کلیدی برای تالاسمی‌ها آنمی هیپوکروم میکروسیتیک می‌باشد، البته ممکن است کاهش در MCV، MCH و هموگلوبین A_2 به‌دلیل کم‌خونی فقر آهن یا آلفا تالاسمی نیز باشد.[٢٠] در فقر آهن کاهش تعداد گلبول‌های قرمز و افزایش گستره توزیع گلبول قرمز (Red cell distribution width) اتفاق می‌افتد در حالی‌که اختلالات هموگلوبینی با افزایش در تعداد گلبول‌های قرمز و گستره توزیع گلبول قرمز نرمال همراه هستند. علاوه بر این در اختلالات هموگلوبینی به‌طور معمول کاهش هموگلوبین، کاهش MCV، آنیزوپویی کیلوسیتوزیس (Anisopoikilocytosis) و سلول‌های هدف مشاهده می‌شود.[٤] به‌دلیل اثر محافظتی بتا تالاسمی مینور در مقابل عفونت پلاسمودیوم فالسیپاروم این اختلال در مناطق مالاریاخیز مانند آفریقا، مناطق مدیترانه‌ای، خاورمیانه، جنوب شرقی آسیا و خاور دور شایع می‌باشد.[٩و٢٧]

در بتا تالاسمی مینور و اینترمدیا افزایش نسبی در هموگلوبین A_2 دیده می‌شود به‌طوری که غلظت هموگلوبین A_2 بالای ٤٪ با حساسیت ۱۰۰٪ و اختصاصیت ۹۰٪ تایید کننده بتا تالاسمی می‌باشد. داروهای مربوط به بیماری ایدز، هموگلوبین S_{1c} (گلیکوزیله)، هیپرتیرو‌ییدیسم، آنمی مگالوبلاستیک، هموگلوبین‌های ناپایدار و آنمی دیس اریتروپوئیتیک مادرزادی نوع یک باعث افزایش کاذب در هموگلوبین A_2 در بتا تالاسمی‌ها می‌شوند. موارد کاهش کاذب در صورت حذف در ژن‌های آلفا و دلتا یا ابتلا به آنمی فقر آهن، سندروم میلودیس پلاستیک و آنمی سیدروپلاستیک و لوسمی میلوییدی حاد و در نوزادان مشاهده می‌شود. برخی از ژنوتیپ‌های بتا تالاسمی همراه با یا بدون نقایص مولکولی آلفا و دلتا تالاسمی باعث مقادیر لب مرزی هموگلوبین A_2 یعنی ٣/٥±٠/٤٪ می‌شوند.[١و٩] بتا تالاسمی ماژور با کاهش چشمگیر یا فقدان هموگلوبین A همراه است که با هموگلوبین F برابر ۱۰۰-۷۰٪ و هموگلوبین A_2 برابر ٤-٠٪ می‌باشد (شکل ۱-B).[٢٨و٢٩]

با حذف چهار ژن آلفا، آلفا تالاسمی ماژور اتفاق می‌افتد که با آنالیز خون بند ناف جنین ۱۰۰٪ هموگلوبین بارت (تترامر گاما گلوبین) را نشان می‌دهد. با حذف سه ژن آلفا بیماری هموگلوبین H (Hemoglobin H disease) ایجاد می‌شود که بیمار دارای هموگلوبین‌های

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-30]

بارت و H (به‌طور معمول بالای ۵٪) می‌باشد که ۱۰۰–۳۰٪ گلبول‌های قرمز حاوی رسوب هموگلوبین می‌باشند (شکل ۱–A).

بیماری هموگلوبین H شایع‌ترین شکل تالاسمی اینترمدیا می‌باشد که این بیماران به‌طور معمول سطح هموگلوبین پایین دارند و در صورت همراهی با جهش‌های غیر حذفی علایم بالینی شدیدی نشان می‌دهد.[۳۰و۳۱] آلفا تالاسمی با حذف دو ژن آلفا به‌صورت حامل (Carrier) و حذف یک ژن آلفا به‌صورت حامل خاموش بروز می‌کند که به‌طور معمول با روش‌های معمول غربالگری قابل شناسایی نیست. در آلفا تالاسمی مینور به‌ازای ۱۰۰۰۰–۱۰۰۰ سلول یک سلول دارای اینکلوژن یافت می‌شود.[۳۲-۳۴و۴] حضور هموگلوبین بارت (Bart) در خون بند ناف بیان‌کننده وجود تالاسمی آلفا است و افزایش میزان هموگلوبین بارت با تعداد زنجیره‌های آلفا گلوبین ناقص یا حذف شده رابطه مستقیم دارد، مقدار هموگلوبین بارت کمتر از ۳٪ در نوزادان بیانگر حذف یک ژن آلفا و مقدار ۸/۵–۳/۵٪ با حذف دو ژن آلفا گلوبین و مقدار بالای ۸/۵٪ با حذف سه ژن و یا هیدروپس فتالیس (Hydrops fetalis) همراه می‌باشد. در موارد ترکیب هتروزیگوت آلفا تالاسمی و هموگلوبین کنستانت اسپرینگ (Constant spring) نیز هموگلوبین بارت قابل مشاهده می‌باشد.[۳۵]

در صورت وجود همزمان هموگلوبین E با بتا تالاسمی سطح بالاتری از هموگلوبین E با افزایش سطح هموگلوبین F با پیک کوچک یا فقدان هموگلوبین A دیده می‌شود. برای افراد هتروزیگوت هموگلوبین E پیک هموگلوبین A غالب است و هموگلوبین E به‌طور تقریبی زیر ۳۰٪ می‌باشد (شکل ۲–A و B).[۳۶]

هموگلوبین هوپ (Hope) هموگلوبین ناپایدار واریانت زنجیره بتا می‌باشد (شکل ۲–J) که با تشخیص تالاسمی مینور در روش کاپیلاری الکتروفورز تداخل ایجاد کرده و به‌صورت کاذب باعث افزایش هموگلوبین A_2 می‌شود البته در روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا این تداخل وجود ندارد.[۱و۳۳]

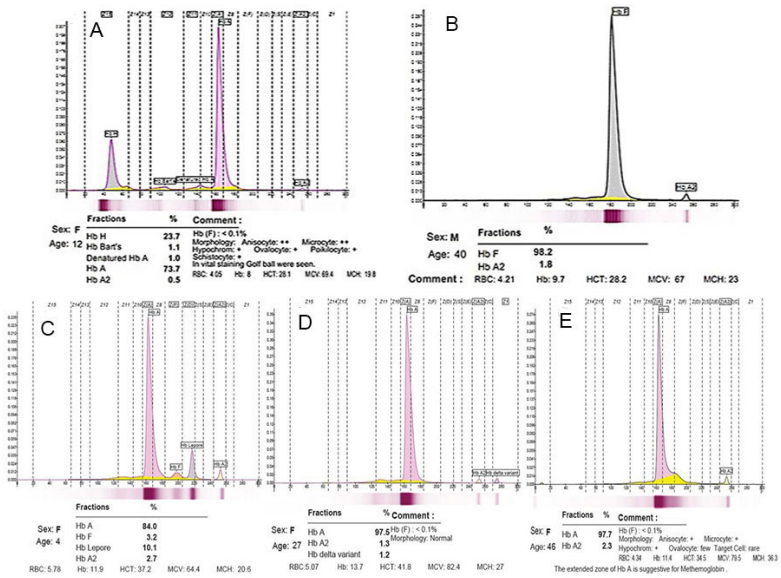
حضور واریانت‌های زنجیره بتا مثل هموگلوبین S و هموگلوبین D-Iran روی سطح هموگلوبین گلیگوزیله (A1c) اثر می‌گذارند. این هموگلوبین در اثر اتصال گلوکز به گروه انتهایی N زنجیره بتا ایجاد شده و اندازه‌گیری آن یک تست مناسب برای بررسی تعادل قندی در ۸–۶ هفته گذشته می‌باشد.[۲۳و۳۹-۳۷]

هموگلوبین کنستانت اسپرینگ (شکل ٤–E) در صورت همراهی با حذف دو ژن آلفا بیماری هموگلوبین H-CS ایجاد می‌شود که بسیار شدیدتر از بیماری هموگلوبین H می‌باشد، بنابرین غربالگری آن جهت مشاوره ژنتیکی لازم و ضروری است. این هموگلوبین اغلب به‌دلیل مقدار کم و ناپایداری، با روش‌های معمول الکتروفورز شناسایی نمی‌شود اما روش کاپیلاری الکتروفورز (۱۰۰٪ موارد) نسبت به (۷٦٪ موارد) در روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا تشخیص هموگلوبین کنستانت اسپرینگ موفق عمل می‌کند. سطح هموگلوبین کنستانت اسپرینگ در حالت هتروزیگوت به‌روش کاپیلاری حدود ۰/۸–۰/٦٪ است در حالی که در بیماری هموگلوبین H-CS حدود ۲/۲٪ می‌باشد.[۴۰و۴۱]

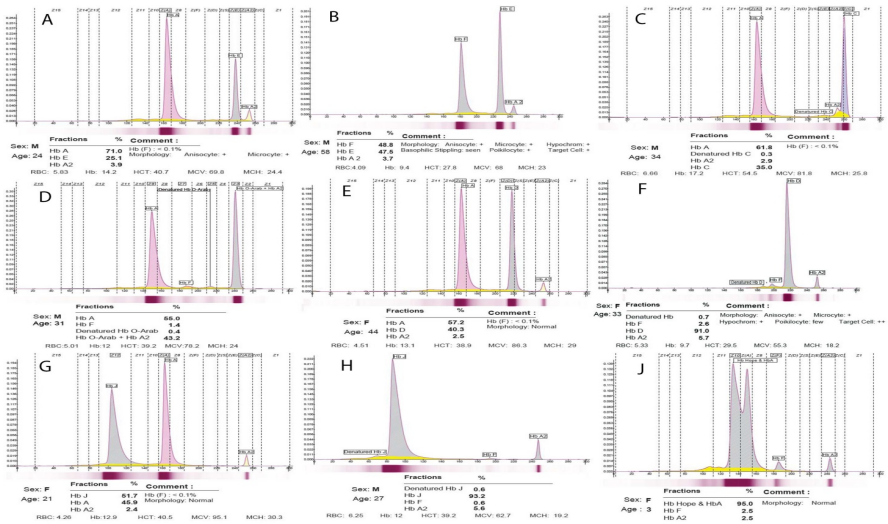
هموگلوبین A_2' (delta 16 Gly→ Arg) شایع‌ترین نوع هموگلوبین‌های واریانت زنجیره دلتا می‌باشد که از نظر بالینی و هماتولوژیکی خاموش است ولی در تخمین مقدار A_2 در تالاسمی مینور حایز اهمیت می‌باشد و در روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا در ناحیه S قرار می‌گیرد.[۴۲] با این وجود در روش کاپیلاری الکتروفورز با دقت زیاد موارد واریانت‌های زنجیره دلتا مانند هموگلوبین‌های NYU یا A_2' قابل شناسایی می‌باشند[۴۳] البته بدون انجام تست مولکولی نمی‌توان به‌طور قطع نوع واریانت دلتا را گزارش کرد و فقط به‌صورت دلتا واریانت گزارش می‌شود (شکل ۱–D).[٤٤] انواع اختلالات هموگلوبینی شایع در ایران و ویژگی‌های آن‌ها در جدول‌های ۱ و ۲ بیان شده است.[۱۵-۱۳و۵۳-٤٤]

با وجود پیشرفت روش‌های غربالگری اختلالات هموگلوبینی، از جمله کاپیلاری الکتروفورز و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا، آنالیز نمونه بیماران به داده‌های جامع و دقیق جهت شناسایی این اختلالات نیاز دارد. هیچ‌یک از روش‌های غربالگری به‌تنهایی نمی‌تواند یک روش قطعی جهت غربالگری تعیین گردد ولی استفاده از روش‌های مختلف به‌صورت مکمل موثرتر خواهد بود.[۲۵] امروزه حتی با وجود آزمایشات پیشرفته، بررسی‌های بالینی می‌تواند به‌ویژه برای شناسایی اختلالات دارای علایم بالینی مانند هموگلوبین S بسیار کمک‌کننده باشد.[٤] شناسایی و غربالگری هتروزیگوت اختلالات هموگلوبینی که فاقد علایم بالینی هستند نیز اهمیت دارد زیرا در صورت همراهی با سایر اختلالات هموگلوبینی می‌تواند علایم بالینی شدیدی نشان دهد.[۴۰و۴۱] برای تایید نهایی تمامی این اختلالات بایستی تست‌های مولکولی انجام گیرد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-30]

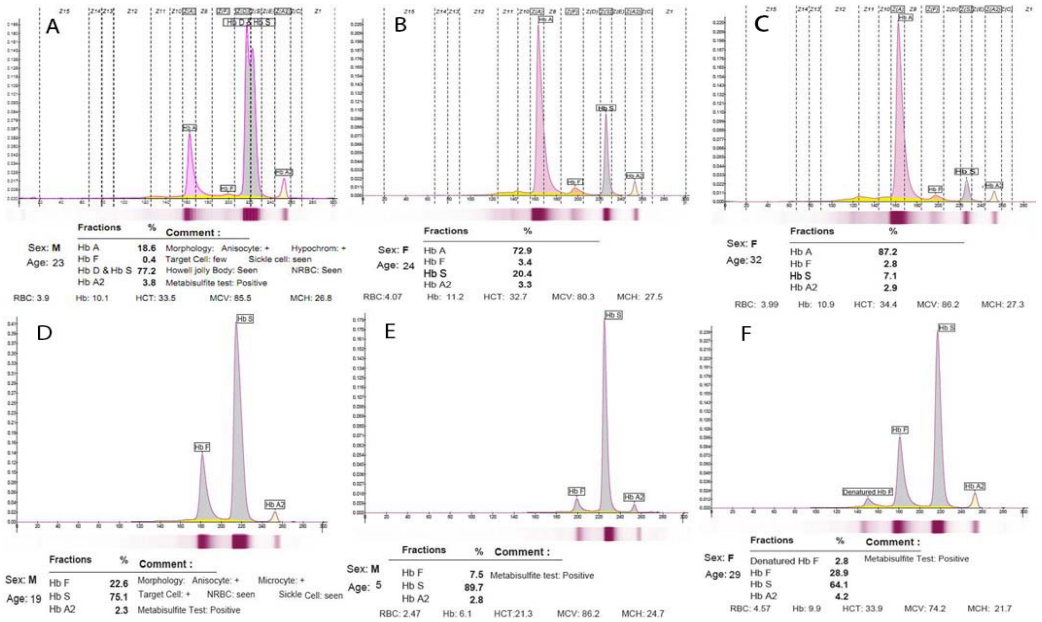


شکل ۱: الکتروفوروگرام مربوط به تالاسمی‌ها و واریانت‌های زنجیره دلتا همراه با مت‌هموگلوبین: تالاسمی آلفا همراه با هموگلوبین‌های H و بارت (A) بتاتالاسمی ماژور بدون دریافت خون، دارای هموگلوبین‌های F و A_2 (B). در حالت هتروزیگوت هموگلوبین لپور همراه با علایم هماتولوژیکی می‌باشد (C). واریانت‌های دلتا با کاهش در مقدار هموگلوبین A_2 همراه بوده و فاقد علایم هماتولوژیکی و بالینی می‌باشد (D). مت‌هموگلوبین با هموگلوبین A همزمان حرکت می‌کند و شناسایی آن نیاز به بررسی و تست‌های تکمیلی دارد، شرح حال بالینی بیمار در این مورد می‌تواند بسیار کمک‌کننده باشد (E).

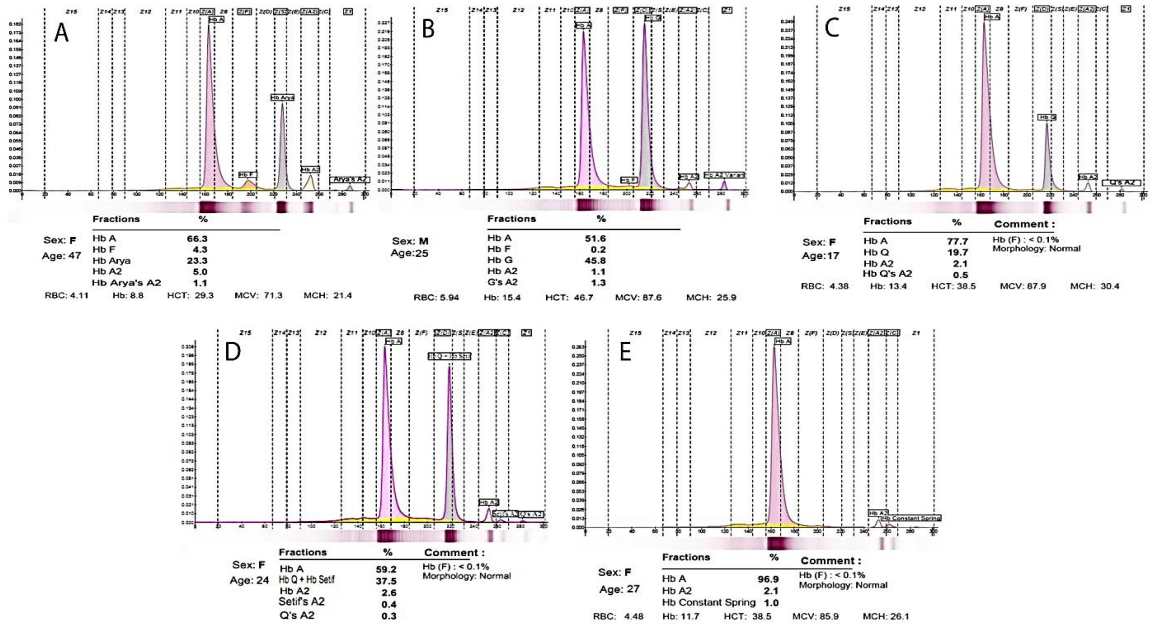


شکل ۲: الکتروفوروگرام مربوط به واریانت‌های زنجیره بتا. مطابق الکتروفوروگرام‌های A و B هموگلوبین E به‌طور کامل در حالت هتروزیگوت و هموزیگوت جدا شده و دارای علایم هماتولوژیکی می‌باشند. اشکال C و D حالت هتروزیگوت هموگلوبین‌های C و O را نشان می‌دهند که با هموگلوبین A_2 تداخل دارند. هموگلوبین D با روش کاپیلاری الکتروفورز به‌راحتی جدا می‌شود (E و F) هموگلوبین J در صورت همراهی با بتا تالاسمی هتروزیگوت (مینور)، بیشترین درصد هموگلوبین را تشکیل می‌دهد (G, H). هموگلوبین Hope کمی سریع‌تر از هموگلوبین A حرکت کرده و در ناحیه ۱۰ الکتروفورگرام قرار می‌گیرد (J).

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-30]



شکل ۳: الکتروفوروگرام‌های مربوط به اشکال مختلف هموگلوبین S با روش کاپیلاری الکتروفورز. در حالت ترکیبی S و D، دو هموگلوبین از هم جـدا نمـی‌شـوند (A). به‌طور معمول در حالت هتروزیگوت حدود ٤٠٪ هموگلوبین S وجود دارد در حالی‌که براساس الکتروفورگرام‌های B و C درصد پای‌ین‌تری ممکن است مشاهده شود که بایستی با تست‌های مولکولی تایید شود. در حالت هموزیگوت هموگلوبین S و یا همراهی با تالاسمی مینور، پیک هموگلوبین A وجود ندارد (D, E, F).



شکل ٤: الکتروفوروگرام مربوط به واریانت‌های شایع آلفا. واریانت‌های Arya، G، Q-Iran، Setif با Q-Iran و CS به‌ترتیب در تصاویر A, B, C, D, E آمده است.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-30]

References

1. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem* 2000;46(8 Pt 2):1284-90.
2. Atashi A, Kaviani S, Soleimani M, Norouzinia M, Mortazavi Y, Hafizi M. Differentiation of cord blood stem cells into erythroid progenitor cells in semisolid culture media containing SCF, IL-3, IL-6 and EPO. *Modares J Med Sci Pathol* 2011;14(2):1-12.
3. Azad M, Kaviani S, Noruzinia M, Mortazavi Y, Mobarra N, Alizadeh S, et al. Gene expression status and methylation pattern in promoter of P15INK4b and P16INK4a in cord blood CD34+ stem cells. *Iran J Basic Med Sci* 2013;16(7):822.
4. Greene DN, Vaughn CP, Crews BO, Agarwal AM. Advances in detection of hemoglobinopathies. *Clin Chim Acta* 2015;439:50-7.
5. Winichagoon P, Svasti S, Munkongdee T, Chaiya W, Boonmongkol P, Chantrakul N, et al. Rapid diagnosis of thalassemias and other hemoglobinopathies by capillary electrophoresis system. *Transl Res* 2008;152(4):178-84.
6. Greene DN, Pyle AL, Chang JS, Hoke C, Lorey T. Comparison of Sebia Capillarys Flex capillary electrophoresis with the BioRad Variant II high pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *Clin Chim Acta* 2012;413(15-16):1232-8.
7. Kumar R, Gupta S, Jindal A, Kakkar S, Kaur A. Screening of -thalassemia trait and other hemoglobinopathies among blood donors in Punjab. *Int J Med Public Health* 2015;5(1):106.
8. Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2011;108(31-32):532-40.
9. Giambona A, Passarello C, Renda D, Maggio A. The significance of the hemoglobin A(2) value in screening for hemoglobinopathies. *Clin Biochem* 2009;42(18):1786-96.
10. Hajizamani S, Jalalifar KJ, Ali M, Jaseb K, Saki N. A Review of Rare Hemoglobinopathies in Iran. *Genet 3rd Millennium* 2013;11(3):3206-17.
11. Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, Ou C-N, Bak R. Comparison of Sebia Capillarys capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *Am J Clin Pathol* 2008;130(5):824-31.
12. Karnpean R, Pansuwan A, Fucharoen G, Fucharoen S. Evaluation of the URIT-2900 automated hematology analyzer for screening of thalassemia and hemoglobinopathies in Southeast Asian populations. *Clin Biochem* 2011;44(10-11):889-93.
13. Rahbar S, Ala F, Akhavan E, Nowzari G, Shoa'i I, Zamanianpoor MH. Two new haemoglobins: haemoglobin Perspolis (alpha 64 (E13) Asp leads to Tyr) and haemoglobin J-Kurosh (alpha 19 (AB) Ala leads to Asp). *Biochim Biophys Acta* 1976;427(1):119-25.
14. Nozari G, Rahbar S, Lehmann H. Haemoglobin Coventry (beta 141 deleted) in Iran. *FEBS Lett* 1978;95(1):88-90.
15. Rahbar S, Bunn HF. Association of hemoglobin H disease with Hb J-Iran (beta 77 His----Asp): impact on subunit assembly. *Blood* 1987;70(6):1790-1.
16. Oyaert M, Van Laer C, Claerhout H, Vermeersch P, Desmet K, Pauwels S, et al. Evaluation of the Sebia Minicap Flex Piercing capillary electrophoresis for hemoglobinopathy testing. *Int J Lab Hematol* 2015;37(3):420-5.
17. Higgins T, Mack M, Khajuria A. Comparison of two methods for the quantification and identification of hemoglobin variants. *Clin Biochem* 2009;42(7):701-5.
18. Ou CN, Rognerud CL. Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs. HPLC. *Clin Chim Acta* 2001;313(1-2):187-94.
19. Afrouzi M, Aghili B, Gholamrezaei M, Adel M, Matin Z. Monoclonal Gammopathy in Iran: Prevalence and Isotype Distribution. *MOJ Immunol* 2014;1(5):1-3.
20. Kim J-E, Kim B-R, Woo K-S, Kim J-M, Park J-I, Han J-Y. Comparison of capillary electrophoresis with cellulose acetate electrophoresis for the screening of hemoglobinopathies. *Korean J Lab Med* 2011;31(4):238-43.
21. Mantikou E, Harteveld C, Giordano P. Newborn screening for hemoglobinopathies using capillary electrophoresis technology: Testing the Capillarys® Neonat Fast Hb device. *Clin Biochem* 2010;43(16):1345-50.
22. Srivorakun H, Fucharoen G, Changtrakul Y, Komwilaisak P, Fucharoen S. Thalassemia and hemoglobinopathies in Southeast Asian newborns: diagnostic assessment using capillary electrophoresis system. *Clin Biochem* 2011;44(5):406-11.
23. Panyasai S, Sukunthamala K, Jaiping K, Wongwiwatthananukit S, Singboottra P, Pornprasert S. Interference of Hemoglobin Hope on -thalassemia diagnosis by the capillary electrophoresis method. *Am J Clin Pathol* 2011;136(1):14-8.
24. Keren DF, Shalhoub R, Gulbranson R, Hedstrom D. Expression of hemoglobin variant migration by capillary electrophoresis relative to hemoglobin A2 improves precision. *Am J Clin Pathol* 2012;137(4):660-4.
25. Wajcman H, Moradkhani K. Abnormal haemoglobins: detection and characterization. *Indian J Med Res* 2011;134(4):538-46.
26. Derderian SC, Jeanty C, Walters MC, Vichinsky E, MacKenzie TC. In utero hematopoietic cell transplantation for hemoglobinopathies. *Front Pharmacol* 2015;5:1-4.
27. Supawadee Yamsri KS, Prajantasena T, Taweenan W, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. A large cohort of β+-thalassemia in Thailand: Molecular, hematological and diagnostic considerations. *Blood Cells Mol Dis* 2015;54(1):164-69.
28. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. O*rphanet J Rare Dis* 2010;5:11.
29. Aessopos A, Kati M, Farmakis D. Heart disease in thalassemia intermedia: a review of the underlying pathophysiology. *Haematologica* 2007;92(5):658-65.
30. Chui DH, Fucharoen S, Chan V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. *Blood* 2003;101(3):791-800.
31. Fucharoen S, Viprakasit V. Hb H disease: clinical course and disease modifiers. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:26-34.
32. Kimura EM, Oliveira DM, Jorge SE, Ribeiro DM, Zaccariotto TR, Santos MNN, et al. Investigating alpha-globin structural variants: a retrospective review of 135,000 Brazilian individuals. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015;37(2):103-108.
33. Yavarian M, Karimi M, Zorai A, Harteveld CL, Giordano PC. Molecular basis of Hb H disease in southwest Iran. *Hemoglobin* 2005;29(1):43-50.
34. Hadavi V, Taromchi AH, Malekpour M, Gholami B, Law HY, Almadani N, et al. Elucidating the spectrum of alpha-thalassemia mutations in Iran. *Haematologica* 2007;92(7):992-3.
35. Munkongdee T, Pichanun D, Butthep P, Klamchuen S, Chalermpolprapa V, Winichagoon P, et al. Quantitative analysis of Hb Bart's in cord blood by capillary electrophoresis system. *Ann Hematol* 2011;90(7):741-6.
36. Khera R, Singh T, Khuana N, Gupta N, Dubey A. HPLC in Characterization of Hemoglobin Profile in Thalassemia Syndromes and Hemoglobinopathies: A Clinicohematological Correlation. *Indian J Hematol Blood Transfusion* 2015;31(1):110-5.
37. Dessi M, Pieri M, Pignalosa S, Martino FG, Zenobi R. Performances of capillary electrophoresis and HPLC methods in HbA1c determination: diagnostic accuracy in HbS and HbD-Iran variants' presence. *J Clin Lab Anal* 2015;29(1):57-60.
38. Ang SH, Thevarajah M, Alias Y, Khor SM. Current aspects in hemoglobin A1c detection: a review. *Clin Chim Acta* 2015;439:202-11.
39. Marinova M, Altinier S, Caldini A, Passerini G, Pizzagalli G, Brogi M, et al. Multicenter evaluation of hemoglobin A1c assay on capillary electrophoresis. *Clin Chim Acta* 2013;424:207-11.
40. Pornprasert S, Panyasai S, Waneesorn J, Kongthai K, Singboottra P. Quantification of hemoglobin Constant Spring in heterozygote and homozygote by a capillary electrophoresis method. *Int J Lab Hematol* 2012;34(2):143-7.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-30]

41. Schrier SL, Bunyaratvej A, Khuhapinant A, Fucharoen S, Aljurf M, Snyder LM, et al. The unusual pathobiology of hemoglobin constant spring red blood cells. *Blood* 1997;89(5):1762-9.
42. Nusrat M, Moiz B, Nasir A, Hashmi MR. An insight into the suspected HbA2'cases detected by high performance liquid chromatography in Pakistan. *BMC Res Notes* 2011;4(1):1-5.
43. Ranney HM, Jacobs AS, Ramot B, Bradley TB Jr. Hemoglobin NYU, a delta chain variant, alpha 2 delta 2 lys. *J Clin Invest* 1969;48(11):2057-62.
44. Gupta A, Saraf A, Dass J, Mehta M, Radhakrishnan N, Saxena R, et al. Compound heterozygous hemoglobin D-Punjab/Hemoglobin D-Iran: A novel hemoglobinopathy. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2014;30(Suppl 1):409-12.
45. Rahbar S, Beale D, Isaacs WA, Lehmann H. Abnormal haemoglobins in Iran. Observation of a new variant--haemoglobin J Iran (alpha-2-beta-2 77 His--Asp). *Br Med J* 1967;1(5541):674-7.
46. Croteau SE, Luo HY, Lehmann LE, Chui DH, Neufeld EJ. Novel dominant β-thalassemia: Hb Boston-Kuwait [codon 139/140(+T)]. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60(10):E131-4.
47. Akar N, Arslan Ç, Kürekçi E. First observation of hemoglobin M Saskatoon (ß63 (E7) His>Tyr(C-T)) in the Iraqi population. *Turk J Haematol* 2012;29(3):287-8.
48. Akar E, Özdemir S, Hakki Timur I, Akar N. First observation of homozygous hemoglobin hamadan (B 56 (D7) GLY ARG) and beta thalassemia (29 G> A) hemoglobin Hamadan combination in a Turkish family. *Am J Hematol* 2003;74(4):280-2.
49. Forget BG. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann N Y Acad Sci* 1998;850(1):38-44.
50. Nishikura YS K, Nagai M, Yoneyama Y. Ethylisocyanide equilibria of hemoglobins M Iwate, M Boston, M Hyde Park, M Saskatoon, and M Milwaukee-I in half-ferric and fully reduced states. *J Biol Chem* 1975;250(1):6679-85.
51. Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham EGD, Green. AR, editors. Postgraduate Haematology. 6th ed. West. Sussex, UK: Wiley-Blackwell; 2010.
52. Rotz S, Arty G, Dall'Amico R, De Zen L, Zanolli F, Bodas P. Prevalence of sickle cell disease, hemoglobin S, and hemoglobin C among Haitian newborns. *Am J Hematol* 2013;88(9):827-8.
53. Atashi A, Soleymani M, Kaviani S, Hajifathali A, Arefian E. In vitro induction of fetal hemoglobin in erythroid cells derived from CD133+ cells by transforming growth factor-β and stem cell factor. *Iran J Biotech* 2008;6(3):157-63.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-30]

TUMJ Tehran University Medical Journal, June 2016; Vol. 74, No. 3: 147-158 Review Article

Usage of capillary electrophoresis for common hemoglobinopathies screening

Alireza Ebrahimi M.Sc.[1]
Zohre Niknami M.Sc.[2]
Fahime Nazari M.Sc.[3]
Mahasti Ghavami Adel B.Sc.[4]
Amir Atashi Ph.D.[1*]
Abdolfattah Sarrafnejad Ph.D.[5]

1- Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2- Department of Genetics, Faculty of Biology, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
3- Department of Genetics, Faculty of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.
4- Department of Electrophoresis, Noor Pathobiology Laboratory, Tehran, Iran.
5- Department of Immunology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Tarbiat Modares University, Jalal AleAhmad Highway, Tehran, Iran.
Tel: +98 21 82883579
E-mail: atashia@modares.ac.ir

Abstract

Received: 21 Aug. 2015 Revised: 17 Jan. 2016 Accepted: 28 Jul. 2016 Available online: 31 Jul. 2016

Hemoglobinopathies are most common inherited disorders in the world; approximately 7 percent of the worldwide population and 5-6 percent of population of Iran are carriers. The hemoglobin disorders inherit as autosomal recessive and are very common in the Mediterranean area and much of the Asia and Africa. The control of this inherited disorders need to genetic counseling and accurate screening by more advanced and more accurate methods. This study explains features of current Iran hemoglobin disorders, nominates the accessible methods for screening them and introduces the capillary zone electrophoresis as a rapid and more accurate method. The required data were extracted of various articles and then for good explanation, current Iran hemoglobinopathies properties were showed in the tables and electropherograms of important hemoglobin disorders in Iran population were provided for help to interpretation results of blood tests by capillary zone electrophoresis method. Hemoglobin disorders are including thalassemias and hemoglobin variants; Disruption in the production and malfunction of globin chains cause types of hemoglobin disorders. We cannot introduce one of clinical laboratory tests as critical and basic method for screening and distinguishing types of inherited hemoglobin disorders as alone. For distinguishing the types of them must be prepared enough information and data of the hemoglobin disorders and for more accurate analysis must be used simultaneously different methods as gel electrophoresis, high performance liquid chromatography, isoelectric focusing, capillary zone electrophoresis or molecular tests. The capillary electrophoresis is an accurate and rapid method for screening types of the hemoglobin disorders. Other side this method cannot analyze all of them, so must be used biochemical, biophysical and molecular methods for confirmation the results. This review showed we can use the capillary electrophoresis and HPLC as two complementary methods for hemoglobinopathies screening. We can analyze by the methods more hemoglobin disorders and decrease more laboratory errors. Moreover, we must have patient history, hematological indices, information and data of types of hemoglobinopathies. The patient history and complete blood count results as red blood cell count, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration can be useful and helpful in screening the hemoglobin disorders and then distinguishing all of hemoglobin disorders.

Keywords: capillary electrophoresis, chromatography, electrophoresis, genomic structural variation, hemoglobinopathies, screening, thalassemia.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-30]