

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

چکیده

دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۳۰ ویرایش: ۱۳۹۴/۱۰/۲۷ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۰۷ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۵/۱۰

اختلالات هموگلوبینی یکی از شایع‌ترین اختلالات ارثی در جهان هستند که حدود ۷٪ از جمعیت دنیا و ۶-۵٪ 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 کارایی 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.

علیرضا ابراهیمی^۱، زهره نیکناهی^۲
فهیمة نظری^۳، مهستی قوامی عادل^۴
امیر آتشی^{۵*}، 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.
۴- آزمایشگاه پاتوبیولوژی نور، بخش انعقاد الکتروفورز، تهران، ایران.
۵- گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه جلال آل احمد،
دانشگاه تربیت مدرس
تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۳۵۷۹
E-mail: atashia@modares.ac.ir

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).^۴ 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

هموگلوبین، مولکولی است تترامر با ساختار گلوبولار حاوی دو جفت زنجیره از گلوبین‌های نامشابه α ، β ، γ ، δ ، ϵ ، ζ یا ϵ که به چهار گروه هم متصل می‌باشند. در یک فرد بالغ سالم مقدار هموگلوبین A حدود ۹۷٪، هموگلوبین A₂ حدود ۲/۵٪ و هموگلوبین F کمتر از ۱٪ می‌باشد.^۳ هموگلوبین A دارای دو جفت زنجیره آلفا و بتا است و هموگلوبین F شامل زنجیره‌های آلفا و گاما می‌باشد. زنجیره‌های دلتا و آلفا، هموگلوبین A₂ را می‌سازند که در تشخیص بتا تالاسمی مینور اهمیت دارد.^{۱،۴} ترکیب هموگلوبین خون نوزادان به‌صورت ۸۰-۷۰٪

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

هموگلوبین	زنجیره گلوبین	هموگلوبین (%)	اندکس‌ها و مورفولوژی	علامه بالینی	شیوع	جایگاه هموگلوبین در الکتروفورز قلبایی
Constant Spring (CS)	طولیل شدن ۳۱ اسید آمینه‌ای ناحیه انتهایی C زنجیره آلفا	۵-۷	میکروسیتوزیس، هیپوکرومیا و همراه با هموگلوبین بارت و A ₂ برابر با ۲ تا ۱/۸	آنمی همولیتیک خفیف	عرب، چین، یونان، هند، اندونزی، مالزی	کندتر از هموگلوبین A ₂ جایگاه C
		۱-۲	میکروسیتوزیس، هیپوکرومیا و هموگلوبین A ₂ برابر با ۲/۴ تا ۳/۱	طبیعی		
Q-Iran	جابه‌جایی در زنجیره آلفا	۱۷-۱۹	طبیعی	طبیعی	ایران، پاکستان، ترکیه	جایگاه S
Setif	جابه‌جایی در زنجیره آلفا	۱۲-۱۵	طبیعی، داسی شدن کاذب با تست متابی سولفیت منفی	طبیعی	ایران، لبنان، عربستان	جایگاه S
Arya	جابه‌جایی در زنجیره آلفا	۲۲	هموگلوبین ناپایدار	آنمی خفیف	ایران	جایگاه S
G-Philadelphia	جابه‌جایی در زنجیره آلفا	۱۰۰	میکروسیتوزیس و هیپوکرومیا	-	سیاه‌پوستان، چینی، ایتالیایی	جایگاه S
		۳۰-۳۵	طبیعی	طبیعی		
		۴۵	میکروسیتوزیس و هیپوکرومیا	طبیعی		
J-Kurosh	جابه‌جایی در زنجیره آلفا	۲۵	طبیعی	طبیعی	ایران	جایگاه J
M-Boston	جابه‌جایی در زنجیره آلفا	۲۰-۳۰	طبیعی	سیانوز، کمبود اکسیژن	آلمان، مجارستان، ایران، ژاپن، سوئد	حرکت مشابه هموگلوبین A
H	Beta-4 (β4) حذف زنجیره آلفا	۵-۳۰ (بیماری هموگلوبین H)	اریتروسیتوزیس، اجسام انکلوژی هموگلوبین H، میکروسیتوزیس، هموگلوبین A ₂ پایین و بارت ۴۰-۲۰٪	آنمی همولیتیک، اسپلنومگالی	جنوب شرق آسیا، خاورمیانه	سریع‌ترین جایگاه H
Bart	Gama-4 (γ4) حذف زنجیره آلفا	چهار زنجیره آلفا (۸۵)	آنیزوسیتوزیس، پوئی کیلوسیتوزیس، میکروسیتوزیس، اریتروبلاستوزیس	ناسازگار با حیات (کشنده)	منتشر	جایگاه بارت، هموگلوبین سریع
		یک زنجیره آلفا (۲-۱) در خون بند ناف)	طبیعی	از نظر بالینی خاموش		
		دو زنجیره آلفا (۱۰-۵) در خون بند ناف)	میکروسیتوزیس	آنمی خفیف		

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

جایگاه هموگلوبین در الکتروفورز قلبایی	شیوع	علامه 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 ۲۵-۴۵		
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 ۵۵-۹۰	جابه‌جایی در زنجیره بتا	S
		طبیعی	طبیعی	هتروزیگوت ۳۵-۴۰		
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 ۲۵-۳۵		
جایگاه C	سیاهان آفریقایی، آمریکایی، اعراب، مصریان	آنمی خفیف	میکروسیتوزیس	هموزیگوت ۹۵	جابه‌جایی در زنجیره بتا	O-Arab
		طبیعی	هتروزیگوت ۳۰-۴۰			
جایگاه D	ایران	طبیعی	طبیعی	هموزیگوت ۹۵	جابه‌جایی در زنجیره بتا	D-Iran
		طبیعی	هتروزیگوت ۳۶-۴۵			
سریع، جایگاه J	ایران، ترکیه	طبیعی	طبیعی	۴۳-۴۷	جابه‌جایی در زنجیره بتا	J-Iran
دارای چندین ناحیه بین هموگلوبین‌های A _۱ و A _۲	نژادها و گروه‌های مختلف	آنمی همولیتیک خفیف	اجسام هاینز، رتیکولوسیتوزیس، هموگلوبین ناپایدار	۳۰	جابه‌جایی در زنجیره بتا	Köln
سریع تر از هموگلوبین A	سیاهپوستان، ژاپنی، تایلندی	طبیعی	طبیعی	۴۰-۵۰	جابه‌جایی در زنجیره بتا	Hope
جایگاه S	آفریقا، اسپانیا، یوگسلاوی، ایران، ترکیه	آنمی شدید آنمی خفیف	فقط هموگلوبین‌های پور و F میکروسیتوز، هیپوکرومیا	هموزیگوت ۳۰ هتروزیگوت ۷/۱-۱۵	هیبرید زنجیره‌های بتا و دلتا	Lepore-Boston
جایگاه F	سیاهپوستان	اریتروسیتوز خفیف	اریتروسیتوزیس خفیف بدون اختلالات هماتولوژیکی	هموزیگوت هموگلوبین F (۱۰۰) هتروزیگوت هموگلوبین F (۲۸/۲-۲۱/۴)	حذف ۸۴۹۱۸ نوکلئوتید از ژن دلتا تا ژن بتا	HPFH-1

می‌باشد.^{۱۰-۱۳} 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 به صورت جامع گویای داده‌های آزمایشگاهی و بالینی اختلالات هموگلوبینی مختلف نیستند. در آزمایشگاه‌های بالینی به دلیل فقدان مراجع جامع و کاربردی جهت شناسایی انواع اختلالات هموگلوبینی به ویژه 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 به عنوان روشی مناسب و کم‌هزینه و تشریح الکتروفورگرام (Electropherogram) هموگلوبین‌های شایع به منظور 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 کارایی 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.^{۱۱} 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 به طور 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}

فرزندان پیشگیری نمود. بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی ۷٪ مردم جهان حامل اختلالات هموگلوبینی هستند.^{۶-۸، ۱۰} حدود ۱/۵٪ مردم دنیا حامل بتاتالاسمی می‌باشند.^۹ همچنین ۵٪ جمعیت ایران ناقل ژن تالاسمی و حدود ۱-۵٪ ناقل ژن‌های واریانت هموگلوبینی هستند.^{۱۰}

برخی از واریانت‌های هموگلوبینی مانند حالت هموزیگوت هموگلوبین‌های C و S علائم بالینی چشمگیری دارند در حالی که هموزیگوت هموگلوبین E یا D علائم بالینی خفیف‌تری دارند. با وجود این که موارد هتروزیگوت علائم بالینی ندارند ولی شناسایی آن‌ها برای مشاوره ژنتیکی مهم می‌باشد. تشخیص اولیه اختلالات هموگلوبینی مختلف مانند آنمی سلول داسی شکل 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 علائم 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.

به طور 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 به طور معمول برای بررسی‌های بیشتر و تشخیص انواع اختلالات هموگلوبینی گزینش می‌شوند.^{۱۲} در عین حال بایستی شرح حال بیمار به طور کامل بررسی شده و سپس جهت آنالیز اختلالات هموگلوبینی آزمایشات الکتروفورز قلیایی و اسیدی، کاپیلاری الکتروفورز (Capillary zone electrophoresis) یا کروماتوگرافی مایع با کارایی 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 به صورت مطالعات گزارشی و توصیفی

دارای هموگلوبین S به روش کاپیلاری الکتروفورز افزایش کاذب نسبت به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا دارد که به احتمال به دلیل مهاجرت هموگلوبین S تخریب شده همراه با هموگلوبین F می‌باشد.^۵ 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 به نسبت برابر مخلوط شود.^۴

روش کاپیلاری الکتروفورز یک روش جدید هست و در نتیجه مطالب جهت تشخیص اختلالات هموگلوبینی با این روش کمتر نوشته شده است.^۶ یکی از مزایای اصلی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به روش کاپیلاری الکتروفورز وجود الگوهای کروماتوگرافی مربوط به هموگلوبین‌های نادر می‌باشد.^{۴،۹}

از روش کاپیلاری الکتروفورز می‌توان به عنوان روش مکمل کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده نمود. مطالعات مختلفی جهت مقایسه این دو روش برای آنالیز هموگلوبین‌های با اهمیت از جمله A₂، S، C و E انجام شده است.^{۶،۱۰} از مزایای روش کاپیلاری الکتروفورز عدم نیاز به کالبراسیون است. همچنین الکتروفورگرام‌های 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.^۶

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 کارایی 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^{۲۴-۲۱} و هر کاپیلاری سیلیکونی را می‌توان حدود ۳۰۰۰ بار استفاده کرد،^{۲۵} در نتیجه یک روش با صرفه

الکتروفورز هموگلوبین در استات سلولز قلیایی در pH برابر با ۸/۶ به عنوان روشی سریع با توانایی جداسازی هموگلوبین‌های S، F، A، C می‌باشد، اما توانایی جداسازی هموگلوبین‌های A₂، C، O و E و همچنین هموگلوبین‌های S، D، G را ندارد. الکتروفورز سیترات آگار اسیدی در pH برابر ۶/۲ 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.^{۱۷،۱۸}

کروماتوگرافی مایع با کارایی 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 A₂ را از هموگلوبین C جدا می‌کند ولی هموگلوبین‌های S گلیکوزیله، E و لپور (Lepore) در مقدار هموگلوبین A₂ تداخل ایجاد می‌کنند، در نتیجه در تشخیص بتا تالاسمی‌های همراه با ال‌های 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.^۱ همچنین در این روش نیاز به تجهیزات خاص، آموزش و الگوهای نتایج به نسبت پیچیده است به همین 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 ۹/۴ در کاپیلاری‌های سیلیکونی با قطر داخلی ۵۰ μm انجام می‌گیرد، بدین صورت 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 A₂ در حضور هموگلوبین E قابل اندازه‌گیری است اما جداسازی هموگلوبین A₂ در حضور هموگلوبین C و O دشوار است^۹ و افزایش کاذب هموگلوبین A₂ در بیمارانی با هموگلوبین C به دلیل حرکت مشابه اتفاق می‌افتد. میزان هموگلوبین F در بیمارانی

و کم هزینه می باشد (شکل ۲ و ۳).

انواع واریانت های هموگلوبین در ۱۵ قسمت (Zone) با روش کاپیلاری الکتروفورز قرار می گیرند، از آنجایی که 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 به نسبت سریع بوده و دارای حساسیت و اختصاصیت کافی برای شناسایی واریانت های هموگلوبین در نوزادان می باشند. غلظت هموگلوبین های جدا شده در هر دو روش در طول موج ۴۱۵ nm تعیین می شود.^{۱۸،۱۹} استفاده از روش کاپیلاری الکتروفورز و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به صورت همزمان می تواند خیلی موثر باشد. پیش بینی می شود که روش کاپیلاری الکتروفورز روش مورد استفاده عموم آزمایشگاه ها جهت غربالگری واقع گردد.^{۱۱}

سه روش آزمایشگاهی تست حلالیت سلول داسی، رنگ آمیزی اجسام هاینز (Heinz body) و هموگلوبین ناپایدار جهت تایید نتایج حاصل از الکتروفورز یا کروماتوگرافی استفاده می شوند. این روش ها حساسیت لازم را دارند ولی اختصاصیت کافی ندارند.^{۱۶} پس از تشخیص اختلالات هموگلوبینی با استفاده از روش های بیوشیمیایی تعیین حذف یا جهش در ژن مربوطه برای تایید نهایی لازم و ضروری است. انواع تکنیک های مولکولی بر اساس واکنش زنجیره ای پلیمرز (Polymerase chain reaction) برای شناسایی جهش یا حذف انواع اختلالات هموگلوبینی طراحی شده است. از گلبول های سفید خون یا آمینوسیت یا بافت کوربونی برای تشخیص انواع اختلالات زنجیره های گلوبینی استفاده می شود. این روش ها به طور اختصاصی جهش های مربوطه را شناسایی کرده و در مجموع روش های بسیار دقیق هستند ولی گران قیمت و پرهزینه بوده و فقط جهش هایی تعریف شده را تشخیص می دهند.^{۱۷}

در تالاسمی ها سنتز زنجیره گلوبین از نظر کمی کاهش می یابد.^۱ سندروم بتا تالاسمی ماژور تهدیدکننده زندگی می باشد در حالی که آلفا تالاسمی ماژور به طور معمول با زندگی خارج رحمی ناسازگار است. علائم بتا تالاسمی ماژور در اوایل کودکی مشخص می شود و

نیاز به تزریق خون مداوم دارد و در صورت امکان بایستی پیوند مغز استخوان انجام گیرد.^{۲۶}

تصویر هماتولوژیکی کلیدی برای تالاسمی ها آنمی هیپوکروم میکروسیتیک می باشد، البته ممکن است کاهش در MCV، MCH و هموگلوبین A₂ به دلیل کم خونی فقر آهن یا آلفا تالاسمی نیز باشد.^{۲۰} در فقر آهن کاهش تعداد گلبول های قرمز و افزایش گستره توزیع گلبول قرمز (Red cell distribution width) اتفاق می افتد در حالی که اختلالات هموگلوبینی با افزایش در تعداد گلبول های قرمز و گستره توزیع گلبول قرمز نرمال همراه هستند. علاوه بر این در اختلالات هموگلوبینی به طور معمول کاهش هموگلوبین، کاهش MCV، آنیزوپوئی کیلوسیتوزیس (Anisopoikilocytosis) و سلول های هدف مشاهده می شود.^۴ به دلیل اثر محافظتی بتا تالاسمی مینور در مقابل عفونت پلاسمودیوم فالسیپاروم این اختلال در مناطق مالاریا خیز مانند آفریقا، مناطق مدیترانه ای، خاورمیانه، جنوب شرقی آسیا و خاور دور شایع می باشد.^{۲۷،۲۸}

در بتا تالاسمی مینور و ایترمدیا افزایش نسبی در هموگلوبین A₂ دیده می شود به طوری که غلظت هموگلوبین A₂ بالای ۴٪ با حساسیت ۱۰۰٪ و اختصاصیت ۹۰٪ تایید کننده بتا تالاسمی می باشد. داروهای مربوط به بیماری ایدز، هموگلوبین S_{1c} (گلیکوزیله)، هیپرتیروئیدسم، آنمی مگالوبلاستیک، هموگلوبین های ناپایدار و آنمی دیس اریتروپوئیتیک مادرزادی نوع یک باعث افزایش کاذب در هموگلوبین A₂ در بتا تالاسمی ها می شوند. موارد کاهش کاذب در صورت حذف در ژن های آلفا و دلتا یا ابتلا به آنمی فقر آهن، سندروم میلودیس پلاستیک و آنمی سیدروپلاستیک و لوسمی میلوئیدی حاد و در نوزادان مشاهده می شود. برخی از ژنوتیپ های بتا تالاسمی همراه با یا بدون نقایص مولکولی آلفا و دلتا تالاسمی باعث مقادیر لب مرزی هموگلوبین A₂ یعنی ۳/۵±۰/۴٪ می شوند.^۹ بتا تالاسمی ماژور با کاهش چشمگیر یا فقدان هموگلوبین A همراه است که با هموگلوبین F برابر ۱۰۰-۷۰٪ و هموگلوبین A₂ برابر ۴-۰٪ می باشد (شکل ۱-۱B).^{۲۸،۲۹}

با حذف چهار ژن آلفا، آلفا تالاسمی ماژور اتفاق می افتد که با آنالیز خون بند ناف جنین ۱۰۰٪ هموگلوبین بارت (تترامر گاما گلوبین) را نشان می دهد. با حذف سه ژن آلفا بیماری هموگلوبین H (Hemoglobin H disease) ایجاد می شود که بیمار دارای هموگلوبین های

با حذف دو ژن آلفا بیماری هموگلوبین H-CS ایجاد می‌شود که بسیار شدیدتر از بیماری هموگلوبین H می‌باشد، بنابراین غربالگری آن جهت مشاوره ژنتیکی لازم و ضروری است. این هموگلوبین اغلب به دلیل مقدار کم و ناپایداری، با روش‌های معمول الکتروفورز شناسایی نمی‌شود اما روش کاپیلاری الکتروفورز (۱۰۰٪ موارد) نسبت به (۷۶٪ موارد) در روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تشخیص هموگلوبین کنستانت اسپرینگ موفق عمل می‌کند. سطح هموگلوبین کنستانت اسپرینگ در حالت هتروزیگوت به روش کاپیلاری حدود ۰/۸-۰/۶٪ است در حالی که در بیماری هموگلوبین H-CS حدود ۰/۲٪ می‌باشد.^{۴۱،۴۲}

هموگلوبین A₂' (delta 16 Gly → Arg) شایع‌ترین نوع هموگلوبین‌های واریانت زنجیره دلتا می‌باشد که از نظر بالینی و هماتولوژیکی خاموش است ولی در تخمین مقدار A₂ در تالاسمی مینور حایز اهمیت می‌باشد و در روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در ناحیه S قرار می‌گیرد.^{۴۳} با این وجود در روش کاپیلاری الکتروفورز با دقت زیاد موارد واریانت‌های زنجیره دلتا مانند هموگلوبین‌های NYU یا A₂' قابل شناسایی می‌باشند^{۴۴} البته بدون انجام تست مولکولی نمی‌توان به‌طور قطع نوع واریانت دلتا را گزارش کرد و فقط به‌صورت دلتا واریانت گزارش می‌شود (شکل ۱- D).^{۴۴} انواع اختلالات هموگلوبینی شایع در ایران و ویژگی‌های آنها در جدول‌های ۱ و ۲ بیان شده است.^{۱۵-۱۳، ۵۳-۴۴}

با وجود پیشرفت روش‌های غربالگری اختلالات هموگلوبینی، از جمله کاپیلاری الکتروفورز و کروماتوگرافی مایع با کارایی 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 علائم بالینی مانند هموگلوبین S بسیار کمک‌کننده باشد.^۴ شناسایی و غربالگری هتروزیگوت اختلالات هموگلوبینی که فاقد علائم بالینی هستند نیز اهمیت دارد زیرا در صورت همراهی با سایر اختلالات هموگلوبینی می‌تواند علائم بالینی شدیدی نشان دهد.^{۴۱،۴۲} برای تایید نهایی تمامی این اختلالات بایستی تست‌های مولکولی انجام گیرد.

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

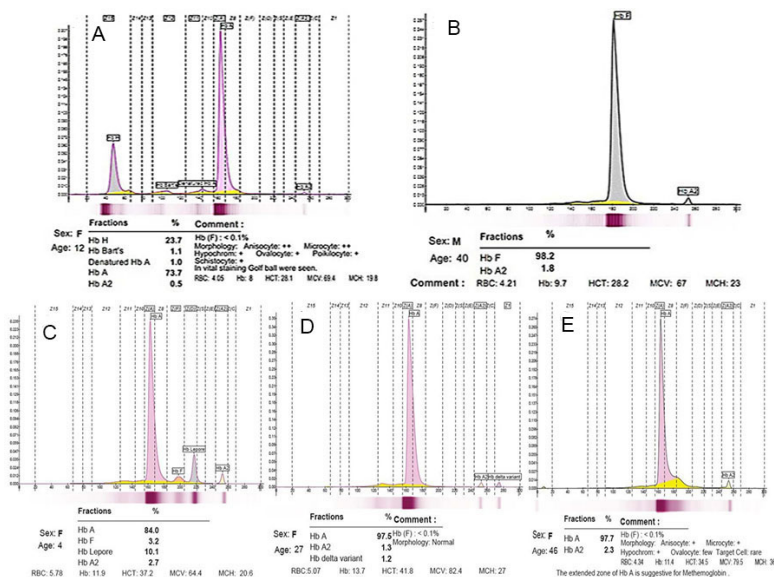
بیماری هموگلوبین H شایع‌ترین شکل تالاسمی ایترمدیا می‌باشد که این بیماران به‌طور معمول سطح هموگلوبین پایین دارند و در صورت همراهی با جهش‌های غیر حذفی علائم بالینی شدیدی نشان می‌دهد.^{۳۱،۳۰} آلفا تالاسمی با حذف دو ژن آلفا به‌صورت حامل (Carrier) و حذف یک ژن آلفا به‌صورت حامل خاموش بروز می‌کند که به‌طور معمول با روش‌های معمول غربالگری قابل شناسایی نیست. در آلفا تالاسمی مینور به‌ازای ۱۰۰۰۰-۱۰۰۰ سلول یک سلول دارای اینکلوزن یافت می‌شود.^{۳۲-۳۱} 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 ۳/۵-۸/۵٪ 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}

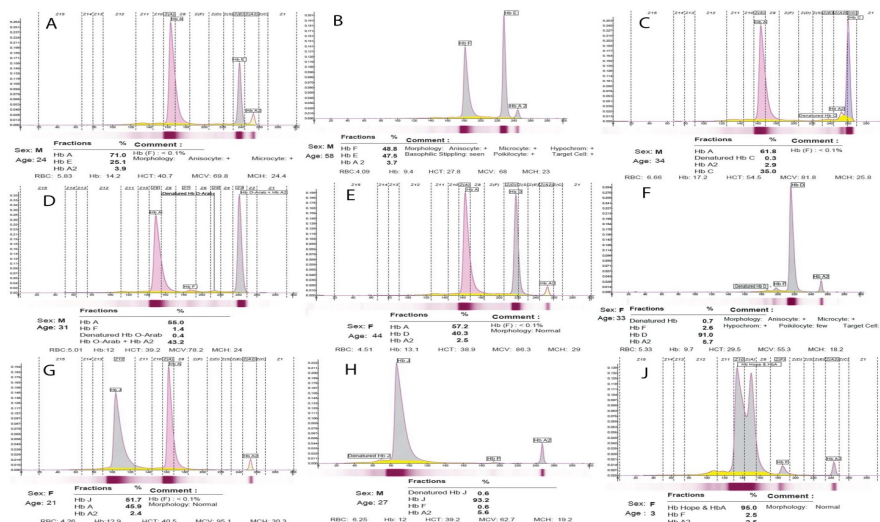
هموگلوبین هوپ (Hope) هموگلوبین ناپایدار واریانت زنجیره بتا می‌باشد (شکل ۲-J) که با تشخیص تالاسمی مینور در روش کاپیلاری الکتروفورز تداخل ایجاد کرده و به‌صورت کاذب باعث افزایش هموگلوبین A₂ می‌شود البته در روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا این تداخل وجود ندارد.^{۳۳}

حضور واریانت‌های زنجیره بتا مثل هموگلوبین S و هموگلوبین D-Iran روی سطح هموگلوبین گلیکوزیله (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 ۶-۸ هفته گذشته می‌باشد.^{۳۷-۳۹، ۲۳}

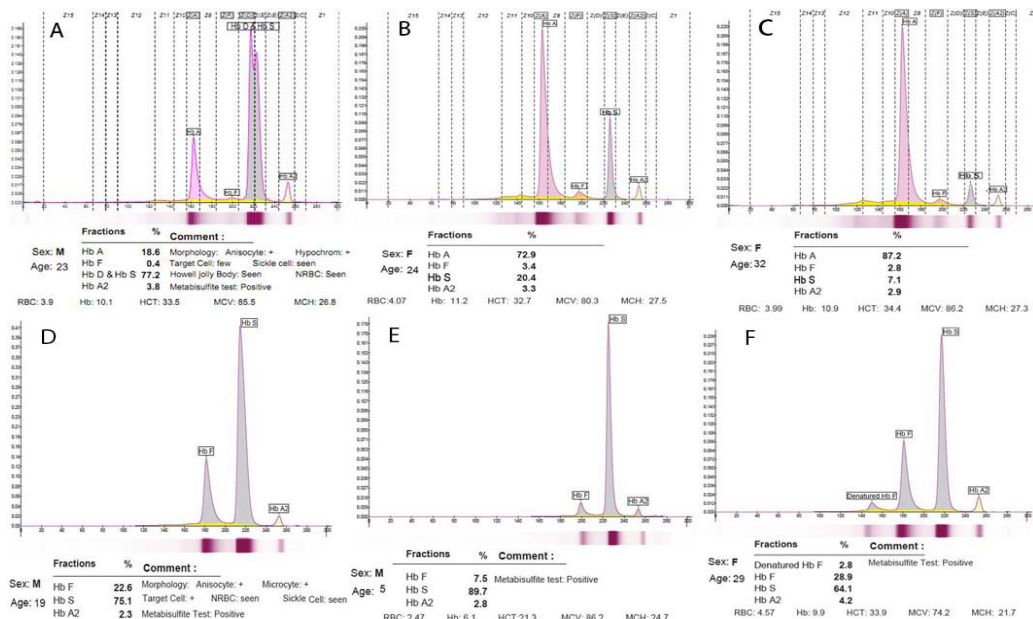
هموگلوبین کنستانت اسپرینگ (شکل ۴-E) در صورت همراهی



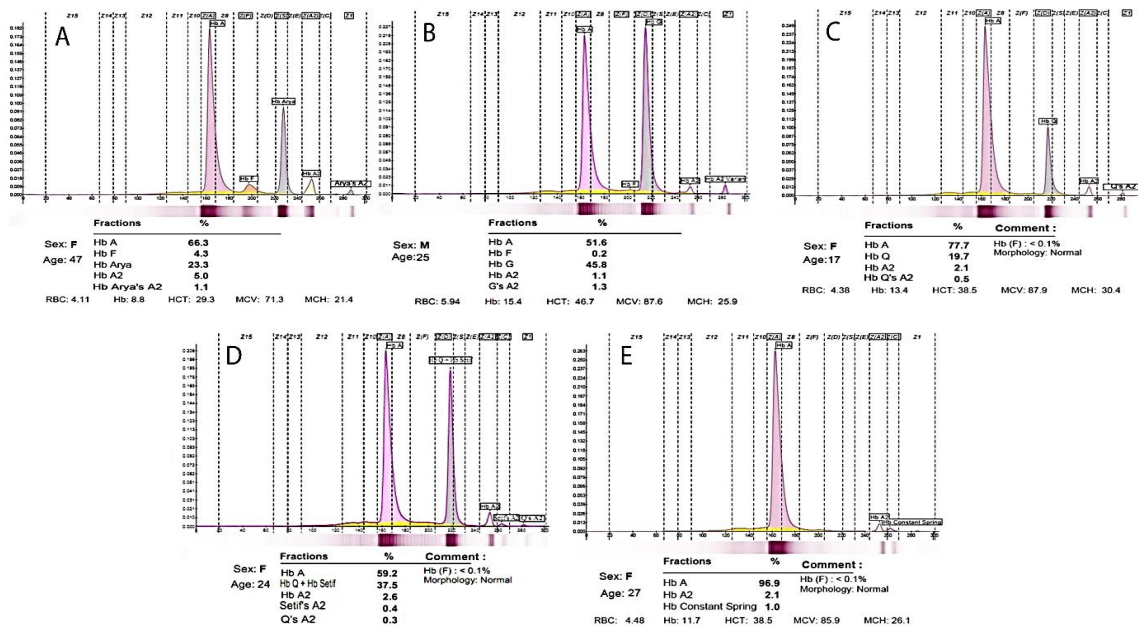
شکل ۱: الکتروفورگرام مربوط به تالاسمی‌ها و واریانت‌های زنجیره دلتا همراه با مت‌هموگلوبین: تالاسمی آلفا همراه با هموگلوبین‌های H و بارت (A) بتا تالاسمی ماژور بدون دریافت خون، دارای هموگلوبین‌های F و A₂. (B). در حالت هتروزیگوت هموگلوبین لپور همراه با علامه هماتولوژیکی می‌باشد (C). واریانت‌های دلتا با کاهش در مقدار هموگلوبین A₂ همراه بوده و فاقد علامه 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: الکتروفورگرام مربوط به واریانت‌های زنجیره بتا. مطابق الکتروفورگرام‌های A و B هموگلوبین E به‌طور کامل در حالت هتروزیگوت و هموزیگوت جدا شده و دارای علامه هماتولوژیکی می‌باشند. اشکال C و D حالت هتروزیگوت هموگلوبین‌های C و O را نشان می‌دهند که با هموگلوبین A₂ تداخل دارند. هموگلوبین D با روش کاپیلاری الکتروفورز به راحتی 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).



شکل ۳: الکتروفورگرام‌های مربوط به اشکال مختلف هموگلوبین S با روش کاپیلاری الکتروفورز. در حالت ترکیبی S و D، دو هموگلوبین از هم جدا نمی‌شوند (A) به‌طور معمول در حالت هتروزیگوت حدود ۴۰٪ هموگلوبین S وجود دارد در حالی که براساس الکتروفورگرام‌های B و C درصد پای‌تری 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 ۴: الکتروفورگرام مربوط به واریانتهای شایع آلفا. واریانتهای Arya، G، Q-Iran، Sef با Q-Iran و CS به ترتیب در تصاویر A, B, C, D, E آمده است.

References

- Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem* 2000;46(8 Pt 2):1284-90.
- 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.
- Azad M, Kaviani S, Norouzinia 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.
- Greene DN, Vaughn CP, Crews BO, Agarwal AM. Advances in detection of hemoglobinopathies. *Clin Chim Acta* 2015;439:50-7.
- 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.
- Greene DN, Pyle AL, Chang JS, Hoke C, Lorey T. Comparison of Sebia Capillary 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.
- 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.
- Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2011;108(31-32):532-40.
- 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.
- 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.
- Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, Ou C-N, Bak R. Comparison of Sebia Capillary capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *Am J Clin Pathol* 2008;130(5):824-31.
- Kampean 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.
- Rahbar S, Ala F, Akhavan E, Nowzari G, Shoa'i I, Zamaniipoor 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.
- Nozari G, Rahbar S, Lehmann H. Haemoglobin Coventry (beta 141 deleted) in Iran. *FEBS Lett* 1978;95(1):88-90.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ou CN, Rognerud CL. Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs. HPLC. *Clin Chim Acta* 2001;313(1-2):187-94.
- 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.
- 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.
- Mantikou E, Hartevelde C, Giordano P. Newborn screening for hemoglobinopathies using capillary electrophoresis technology: Testing the Capillary® Neonat Fast Hb device. *Clin Biochem* 2010;43(16):1345-50.
- 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.
- Panyasai S, Sukunthamala K, Jaiping K, Wongwiwatthanakut 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.
- 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.
- Wajeman H, Moradkhani K. Abnormal haemoglobins: detection and characterization. *Indian J Med Res* 2011;134(4):538-46.
- Derderian SC, Jeanty C, Walters MC, Vichinsky E, MacKenzie TC. In utero hematopoietic cell transplantation for hemoglobinopathies. *Front Pharmacol* 2015;5:1-4.
- Supawadee Yamsri KS, Prajantassena 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.
- Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:11.
- Aessopos A, Kati M, Farmakis D. Heart disease in thalassemia intermedia: a review of the underlying pathophysiology. *Haematologica* 2007;92(5):658-65.
- Chui DH, Fucharoen S, Chan V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. *Blood* 2003;101(3):791-800.
- Fucharoen S, Viprakasit V. Hb H disease: clinical course and disease modifiers. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:26-34.
- 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.
- Yavarian M, Karimi M, Zorai A, Hartevelde CL, Giordano PC. Molecular basis of Hb H disease in southwest Iran. *Hemoglobin* 2005;29(1):43-50.
- 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.
- Munkongdee T, Pichanun D, Butthep P, Klamchuen S, Chalermopolprapa 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.
- 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.
- 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.
- Ang SH, Thevarajah M, Alias Y, Khor SM. Current aspects in hemoglobin A1c detection: a review. *Clin Chim Acta* 2015;439:202-11.
- 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.
- Pornprasert S, Panyasai S, Waneesom 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.

41. Schrier SL, Bunyaratvej A, Khuapinant 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 (B63 (E7) His>Tyr(C-T)) in the Iraqi population. *Turk J Haematol* 2012;29(3):287-8.
48. Akar E, Özdemir S, Hakkı 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.

Usage of capillary electrophoresis for common hemoglobinopathies screening

Abstract

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

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 Sci-
ences, Tehran, Iran.

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

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.