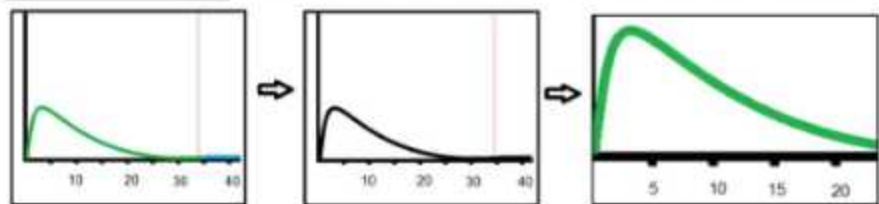
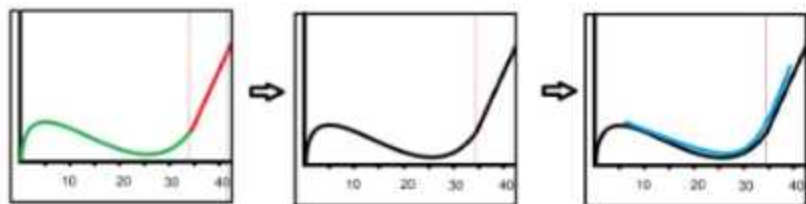
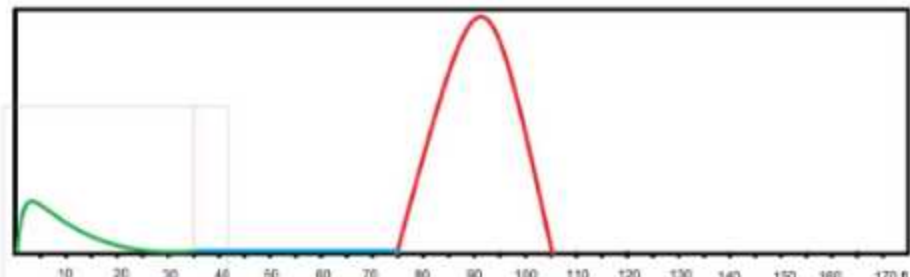
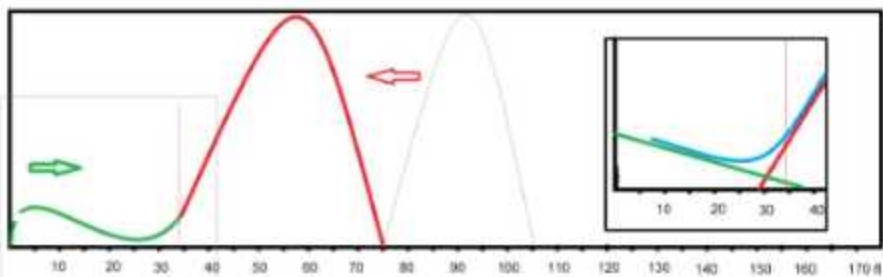
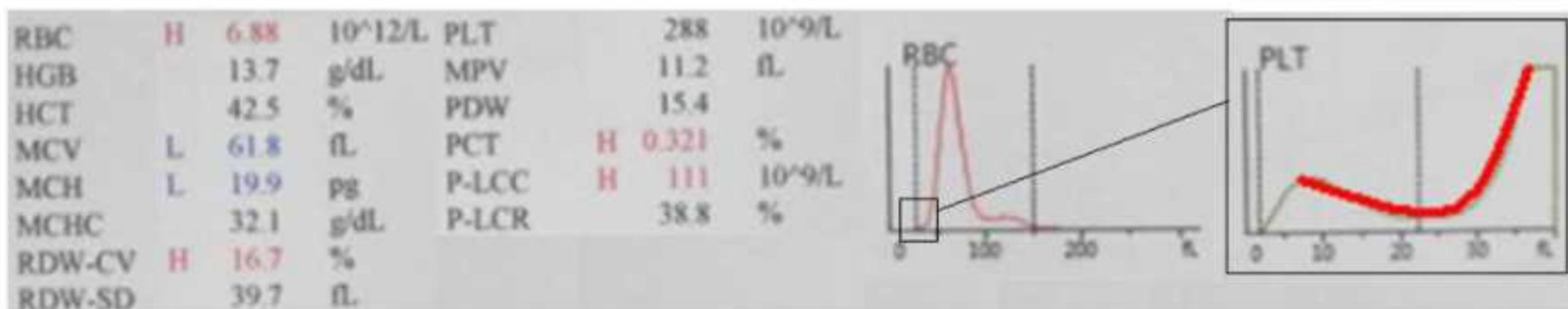


# HB-ELECTROPHORESIS

N.V. Shirani (Ph.D of Hematology)



شکل ۱: هیستوگرام همزمان پلاکت و RBC که برش مقطعی از هر کدام، هیستوگرام‌های مجزای RBC و PLT را تشکیل می‌دهد. در حالت نرمال هیچکدام از این دو هیستوگرام با همدیگر همپوشانی نداشته ولی در صورت میکروسیتوز شدن RBCها و شیفت منحنی آن به سمت پلاکت‌های کوچک، این دو هیستوگرام با یکدیگر اورلپ داشته و لذا محل تقاطع آنها به صورت U دیده می‌شود که در هر دوی آنمی فقر آهن، تالاسمی مینور و دیگر آنمی‌های میکروسیتیک دیده می‌شود.

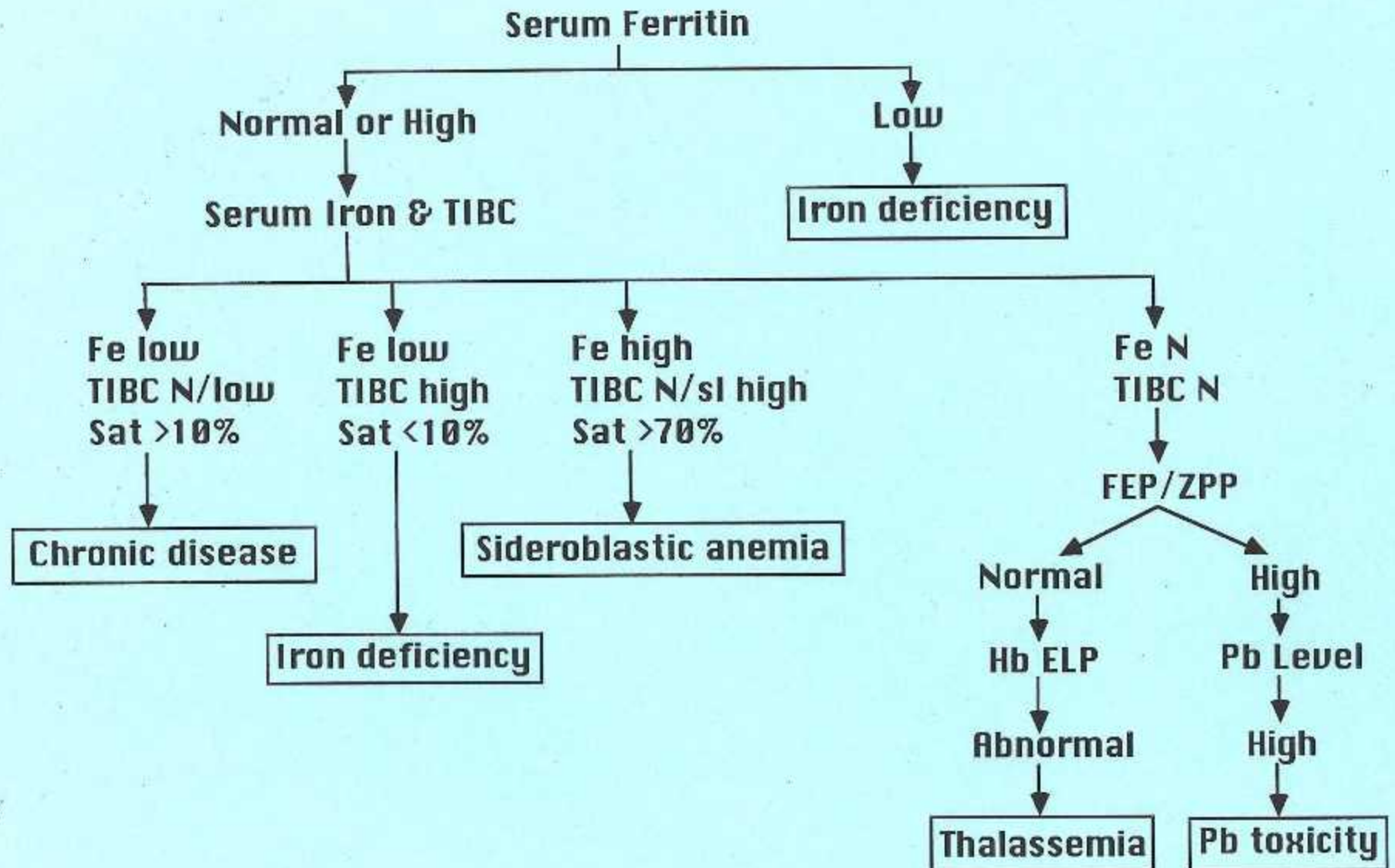


شکل ۲: الگوی U در هیستوگرام پلاکتی فرد مبتلا به میکروسیتیک-هیپوکرومییای شدید ناشی از تالاسمی مینور

جدول ۱: تفاوت اختراقی آنمی فقر آهن، تالاسمی مینور و مقادیر نرمال

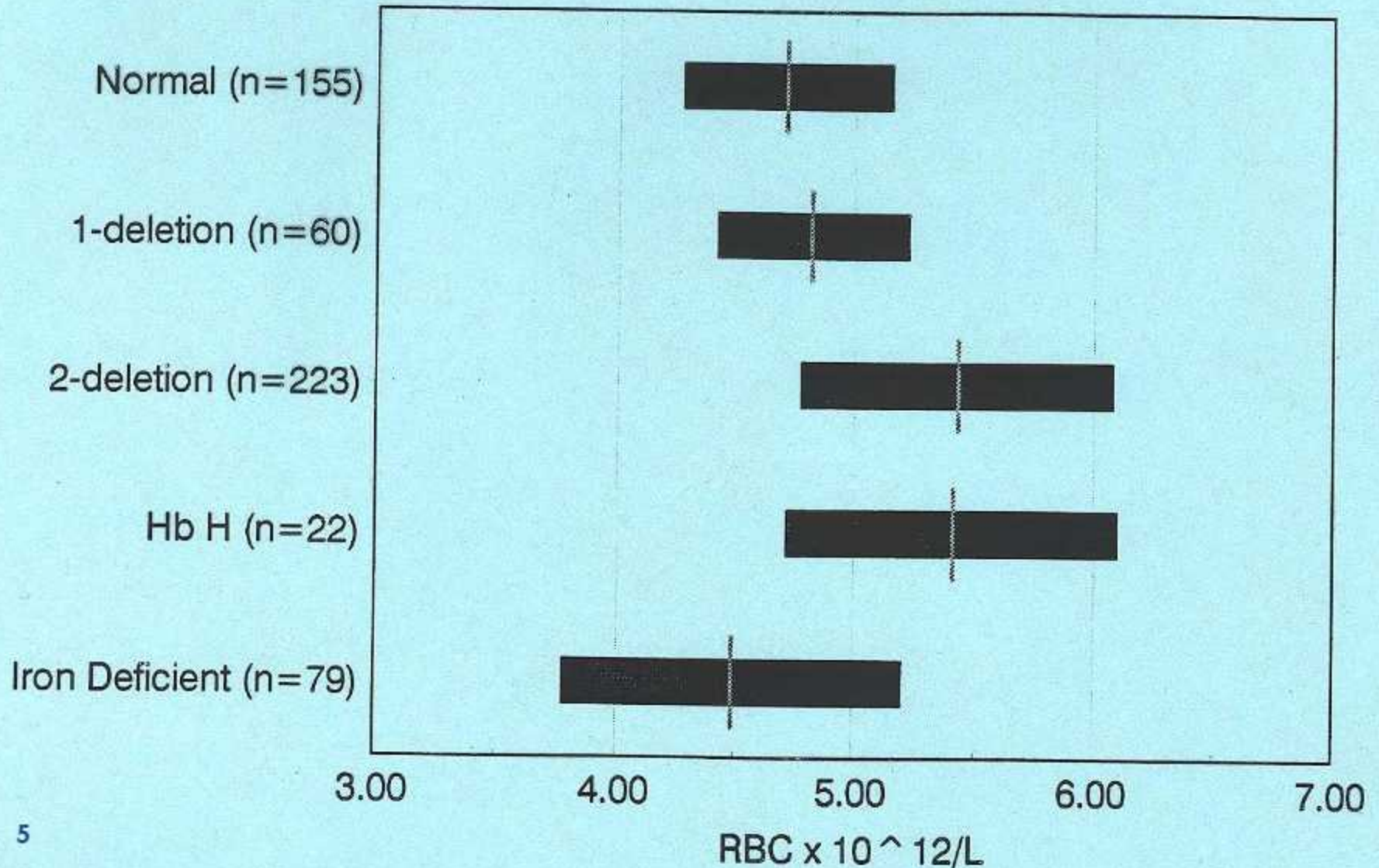
Parameters	Normal	IDA	Minor-Thal
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	5.0	3.5	5.7
Hb (g/dl)	15	8.5	14.3
HCT (%)	45	26.8	43.5
MCV (fl)	90	76.1	75.9
MCH (pg)	30	24.1	25.0
MCHC (g/dl)	33	31.5	32.9
PLT ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	145-450	366	489
RDW-SD (fl)	<46	60	41.4
RDW-CV (%)	<15	>18	15.5
Microcytic/Hypochrome	-	+	+
Anulocyte	-	++	-/+
Leptocyte	-	+	-
Elliptocyte	-	++	+
Target Cell	-	+/-	+
Schistocyte	-	++	+
Tear Drop Cell	-	+	-
ICC	-	-	+
Basophilic Stippling	-	-	+
BM Iron Storage	2-3	0-1	3-4
Ferritin ( $\mu\text{g/l}$ )	40-160	<10	>40
Serum Iron ( $\mu\text{g/dl}$ )	60-165	<25	>35
TIBC ( $\mu\text{g/dl}$ )	250-400	>400	<350
T-SAT (%)	20-55	<15	>20
s-CD71 (mg/L)	3-6	>8	<6
Hepcidin (ng/ml)	5-36	<2	>12
ZPP ( $\mu\text{g/dl}$ )	12-100	>120	<100
GDF15, TWSG1	normal	decrease	increase
Transferrin/Ferritin	3-7	>15	<7
TfR-F index	1.5-1.8	>5	<2
sTfR/log Ferritin			
Sideroblast (%)	40-60	<10	>60
Symptom of anemia	-	+	-
Sex	M=F	F>M	F=M
Heme/Globin Ratio	1.2	<0.8	>3.8
Hb-A <sub>2</sub>	<3.5	<3	$\beta$ -TT: >3.5 $\alpha$ -TT: <3
Hb-F	<1	<1	$\beta$ -TT: >1 $\alpha$ -TT: <1
Hb-H	0	0	$\beta$ -TT: 0 $\alpha$ -TT: >1

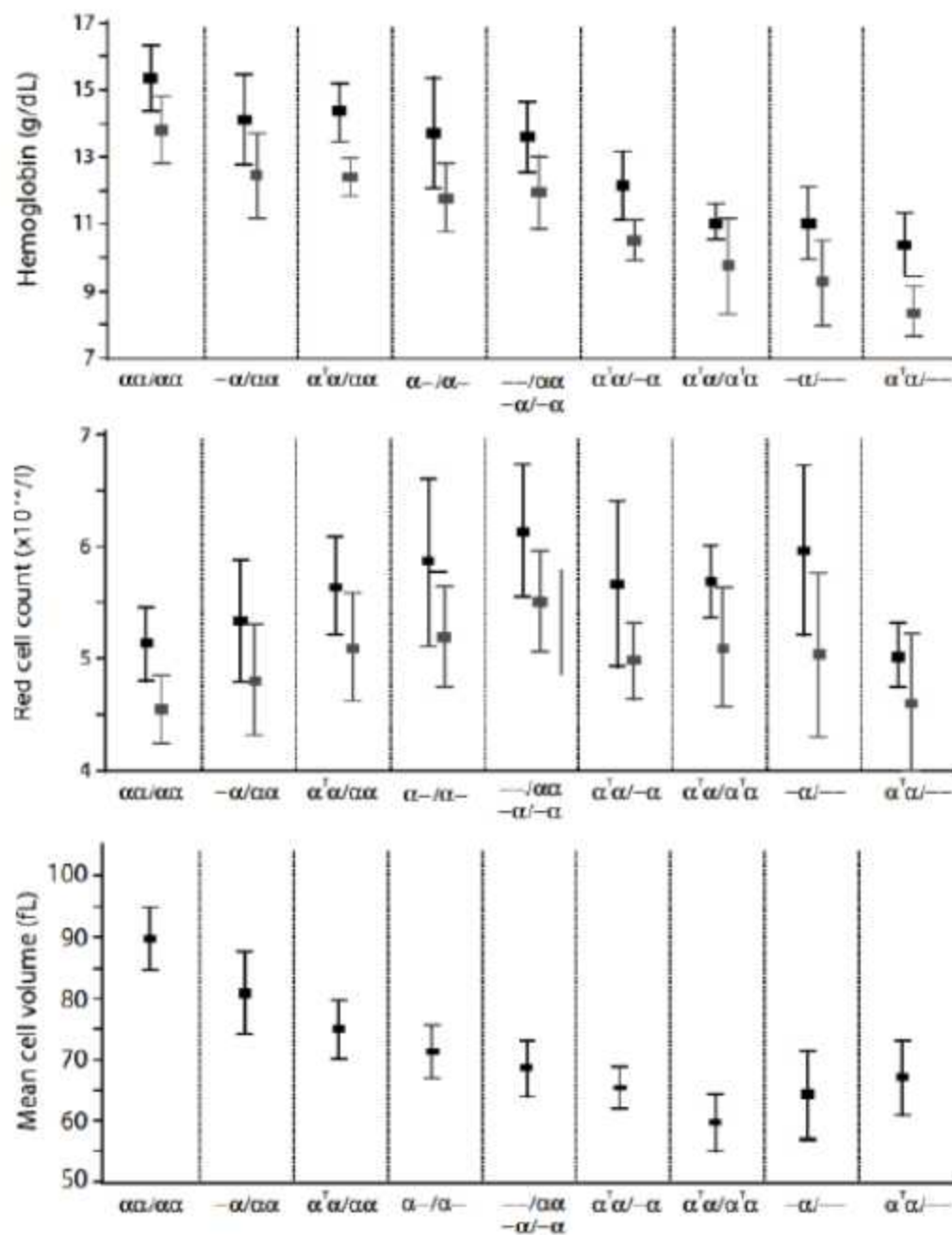
# MICROCYTIC HYPOCHROMIC ANEMIA



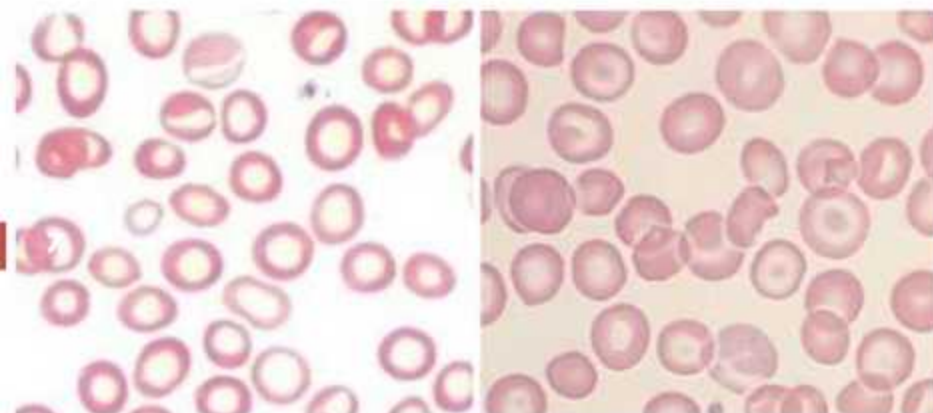


**CBC PARAMETERS (mean  $\pm$  1sd): Normal,  $\alpha$ -Thalassemia, Iron Deficiency**  
**Data from the Hawai'i Hereditary Anemia Project (1992)**

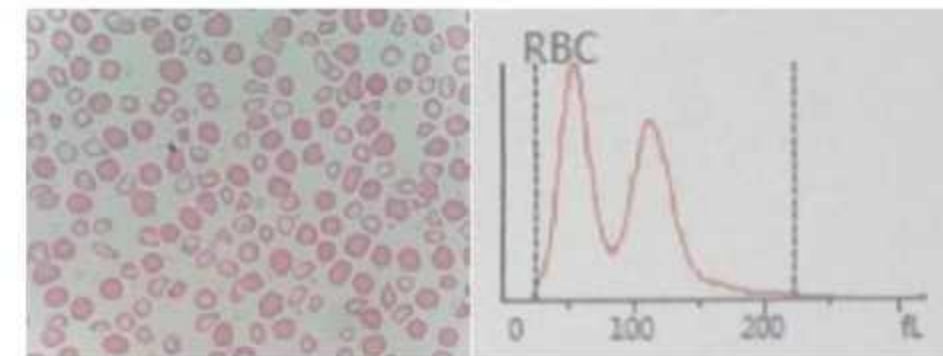




شکل ۲۷: وضعیت مقایسه‌ای CBC در شرایط مختلف تالاسمیک



شکل ۴: تفاوت خون محیطی بیمار مبتلا به آنمی فقر آهن (چپ) و تالاسمی مینور (راست) که غالب بودن سلول‌های آنولوسیت و لپتوسیت در آنمی فقر آهن مشهود بوده و مقدار MCH در تالاسمی مینور برخلاف آنمی فقر آهن، متناسب با شدت هیپوکرومیا در گستره خون محیطی نمی‌باشد.



شکل ۵: تفاوت در سلولاریته BM که منجر به تفاوت در محتوی ذخایر آهن جهت اریتروپوئز نیز می‌شود،



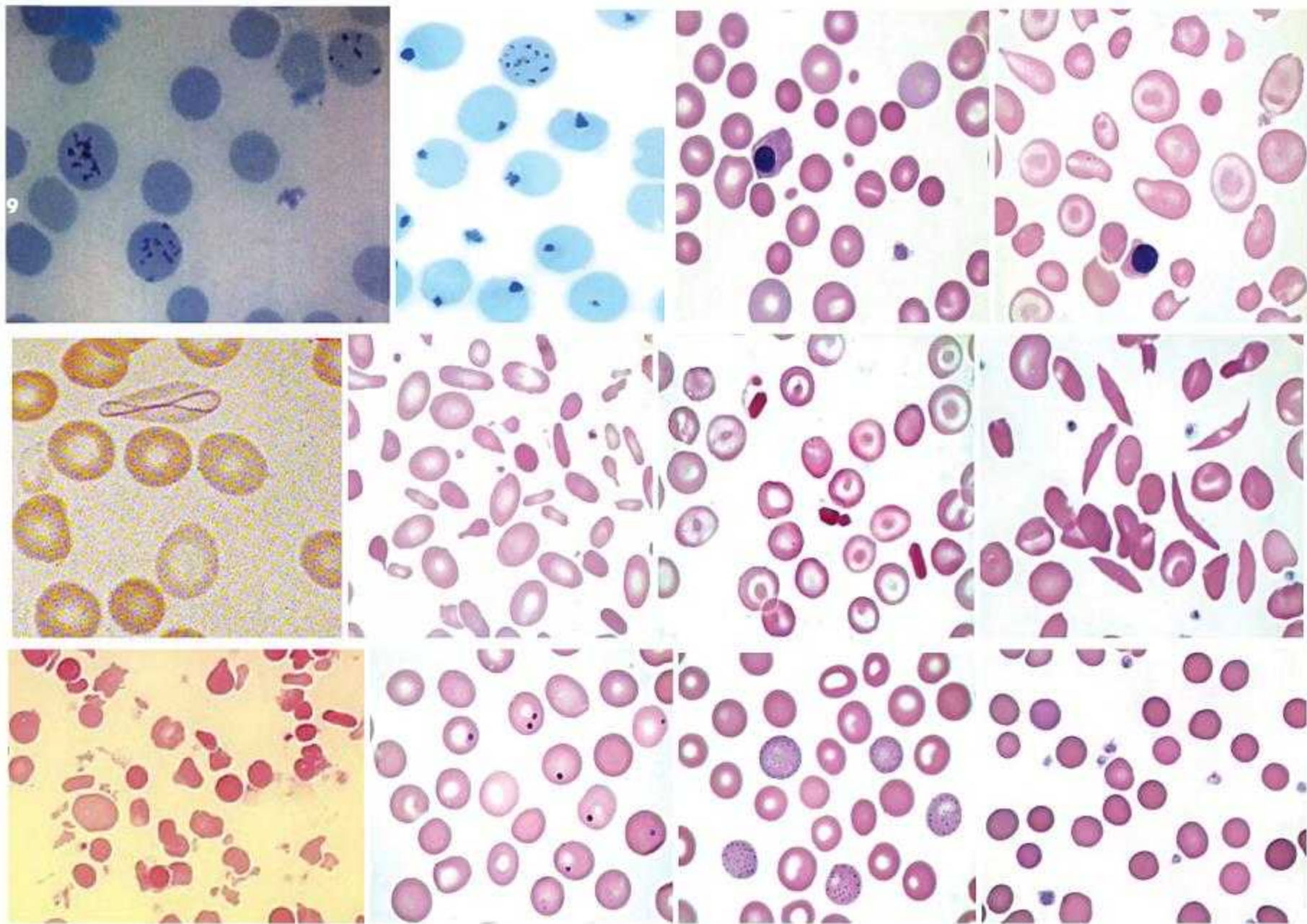
شکل ۳: تفاوت در سلولاریته BM که منجر به تفاوت در محتوی ذخایر آهن جهت اریتروپوئز نیز می‌شود، لذا در آنمی فقر آهن شاهد آنیزوسیتوز و آنیزوکرومیا می‌باشیم. چپ) تفاوت ذخایر آهن در مغزاستخوان بیمار مبتلا به آنمی فقر آهن با گرید ۰-۱ (بالا) و تالاسمی مینور با گرید ۲-۳ (پایین).



TEST	RESULT	ABN	NORMALS	UNIT
WBC	5.14		(4 - 11)	$10^3/\mu\text{L}$
RBC	5.71		(4.2 - 6.1)	$10^6/\mu\text{L}$
HGB	13.0		(12 - 18)	g/dL
HCT	40.7		(37 - 54)	%
MCV		71.3	(80 - 99)	fL
MCH		22.8	(26.4 - 32)	pg
MCHC	31.9		(31 - 36)	g/dL
CHCM	34.3		(31 - 37)	g/dL
RDW	15.1		(11.5 - 16.0)	%
HDW		3.29	(2.2 - 3.2)	g/dL
PLT	185		(130 - 440)	$10^3/\mu\text{L}$

شکل ۷: تالاسمی مینور در دستگاه Advia-2120 که علاوه بر MCHC محاسباتی دارای اندکس مستقیم و دقیق CHCM نیز بوده و همان طوری که مشهود است، دارای مقادیر بیشتری نسبت به MCHC می باشد (۳۴/۳ در برابر ۳۱/۹ g/dl).



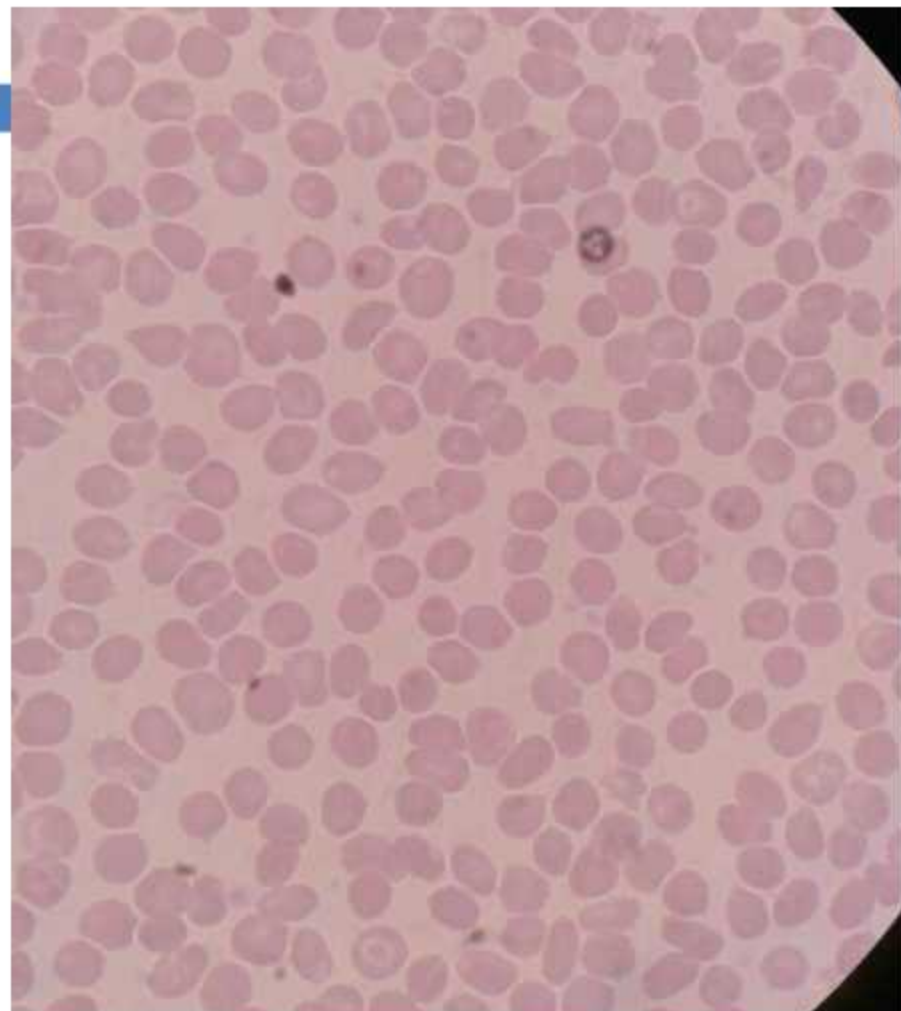


شکل ۴-۴۶: مورفولوژی‌های اریتروسیتی که مشاهده آنها در خون، پزشک را به وجود یک هموگلوبینوپاتی در بیمار مشکوک می‌کند. از آن جمله می‌توان به افزایش رتیکولوسیت‌ها، آنیروسیتوزیس، N-RBC، پونیکیلوسیتوزیس، تارگت سل، پلی کروماتوفیلی، هاینز بادی، کابوت رینگ، هاول جولی، سلول داسی، کریستال هموگلوبین، پیروپونیکیلوسیتوزیس، اسفروسیت، بازوفیلیک منقوط، سلول‌های بی‌قواره و بدشکل اشاره نمود [۲۴].

Mode: AL-WB-CD

10

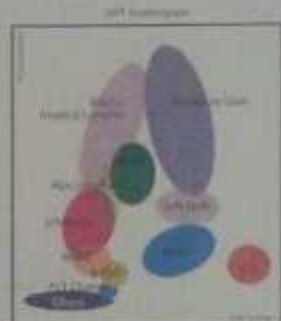
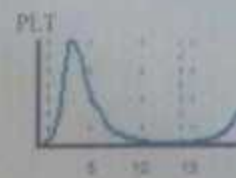
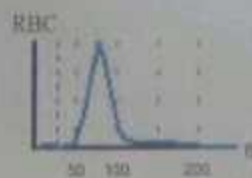
Para.	Result	Unit	Ref. Ranges
1 WBC	7.24	$10^3/\mu\text{L}$	3.50 - 11.10
2 Neu#	4.27	$10^3/\mu\text{L}$	1.70 - 7.50
3 Lym#	2.23	$10^3/\mu\text{L}$	1.00 - 3.20
4 Mon#	0.38	$10^3/\mu\text{L}$	0.20 - 0.90
5 Eos#	0.33	$10^3/\mu\text{L}$	0.06 - 0.46
6 Bas#	0.03	$10^3/\mu\text{L}$	0.01 - 0.30
7 Neu%	59.0	%	43.0 - 78.0
8 Lym%	30.8	%	15.0 - 45.0
9 Mon%	5.2	%	4.0 - 9.0
10 Eos%	4.5	%	1.0 - 7.0
11 Bas%	0.5	%	0.0 - 1.0
12 RBC	7.44	H $10^{12}/\text{L}$	3.90 - 5.70
13 HGB	16.9	g/dL	11.8 - 17.5
14 HCT	50.3	%	35.0 - 51.0
15 MCV	67.6	L fL	81.0 - 98.0
16 MCH	22.8	L pg	27.0 - 33.0
17 MCHC	33.6	g/dL	31.6 - 36.0
18 RDW-CV	16.9	H %	11.5 - 15.6
19 RDW-SD	43.7	fL	40.0 - 61.0
20 PLT	239	R $10^9/\text{L}$	135 - 440
21 MPV	11.8	R fL	6.5 - 12.0
22 PDW	16.0	R	15.0 - 17.0
23 PCT	0.282	R %	0.108 - 0.282
24 P-LCC	105	RH $10^9/\text{L}$	30 - 90
25 P-LCR	43.9	R %	11.0 - 45.0
26 IMG#	0.02	$10^9/\text{L}$	0.00 - 999.99
27 IMG%	0.003		0.000 - 1.000





Sample No.: 26274 Sex: Female Time: 1:05:04

Parameters	Unit	Reference Value
WBC	8.12	[10 <sup>3</sup> /uL] (4.00 - 11.00)
RBC	5.73+	[10 <sup>6</sup> /uL] (4.20 - 5.40)
HGB	14.3	[g/dL] (12.5 - 16.0)
HCT	43.5	[%] (37.0 - 47.0)
MCV	75.9-	[fL] (78.0 - 100.0)
MCH	25.0-	[pg] (27.0 - 31.0)
MCHC	32.9	[g/dL] (32.0 - 37.0)
PLT	489+	[10 <sup>3</sup> /uL] (140 - 450)
RDW-SD	41.4	[fL] (37.0 - 54.0)
RDW-CV	15.5+	[%] (11.5 - 14.0)
PDW	9.5	[fL] (9.0 - 17.0)
MPV	8.5-	[fL] (9.0 - 13.0)
P-LCR	14.9-	[%] (17.0 - 47.0)
PCT	0.42+	[%] (0.17 - 0.35)



\*Reference values has been adjusted by sex and age

NEUT	4.76	[10 <sup>3</sup> /uL]	59.9	[%]
LYMPH	2.82	[10 <sup>3</sup> /uL]	32.3	[%]
MONO	0.54	[10 <sup>3</sup> /uL]	6.7	[%]
EO	0.13	[10 <sup>3</sup> /uL]	1.6	[%]
BAO	0.64	[10 <sup>3</sup> /uL]	0.5	[%]

WBC IP Message(s)

RBC IP Message(s)

PLT IP

Name: F-8005

Sample No.: 26285

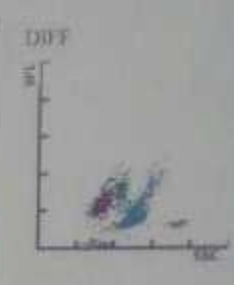
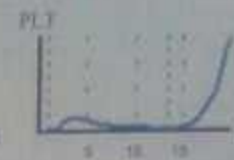
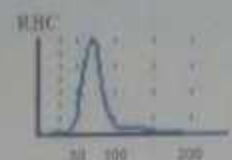
Sex: Female

Time: 12:16:50

Parameters	Unit	Reference Value
WBC	3.70-	[10 <sup>3</sup> /uL] (4.00 - 11.00)
RBC	5.69+	[10 <sup>6</sup> /uL] (4.20 - 5.40)
HGB	12.2-	[g/dL] (12.5 - 16.0)
HCT	36.7	[%] (37.0 - 47.0)
MCV	68.0-	[fL] (78.0 - 100.0)
MCH	21.4-	[pg] (27.0 - 31.0)
MCHC	31.5-	[g/dL] (32.0 - 37.0)
PLT	137-	[10 <sup>3</sup> /uL] (140 - 450)
RDW-SD	39.3	[fL] (37.0 - 54.0)
RDW-CV	16.1+	[%] (11.5 - 14.0)
PDW	15.9	[fL] (9.0 - 17.0)
MPV	11.0	[fL] (9.0 - 13.0)
P-LCR	32.3	[%] (17.0 - 47.0)
PCT	0.15-	[%] (0.17 - 0.35)

\*Reference values has been adjusted by sex and age

NEUT	2.66*	[10 <sup>3</sup> /uL]	71.9*	[%]
LYMPH	0.65-	[10 <sup>3</sup> /uL]	17.6-	[%]
MONO	0.32	[10 <sup>3</sup> /uL]	8.6	[%]
EO	0.05*	[10 <sup>3</sup> /uL]	1.4*	[%]
BAO	0.02*	[10 <sup>3</sup> /uL]	0.5*	[%]



WBC IP Message(s)

Lymphopenia

RBC IP Message(s)

Anisocytosis

Microcytosis

PLT IP Message(s)

اندکس	فرمول و مثال	$\beta$ -Thal minor	(IDA)	% صحت Child/Adult
E&F England and Fraser	$MCV-RBC-5Hb-K^F$ $EF=62-6-5(13.5)-4.5=5.0 \rightarrow \text{Thal}$ $EF=72-3.8-5(11.3)-4.5=7.2 \rightarrow \text{IDA}$	<0	$\Rightarrow 0$	85/87
Shine-Lal (S&L)	$MCV^2 \times MCH/RBC$ $62^2 \times 21.6/6.2 = 13392 \rightarrow \text{Thal}$ $72^2 \times 24.4/4.2 = 30116 \rightarrow \text{IDA}$	< 15300	>15300	92/ 70
Green&King (G&K)	$MCV^2 \times RDW/Hb \times 100$ $62^2 \times 14/13.5 \times 100 = 39.8 \rightarrow \text{Thal}$ $72^2 \times 19.5/11.1 \times 100 = 91.1 \rightarrow \text{IDA}$	<65	$\Rightarrow 65$	84/ 67
Mentzner Index (MI) Hermiston and Mentzer	$MCV/RBC$ $60/6=10 \rightarrow \text{Thal}$ $61/4.1= 14.8 \rightarrow \text{IDA}$	<13	$\Rightarrow 13$	88/ 89
Benington-Serivasta (SI)	$MCH/RBC$ $18.6/6=3.1 \rightarrow \text{Thal}$ $22.4/4.1= 5.4 \rightarrow \text{IDA}$	<3.8	$\Rightarrow 3.8$	89/ 84
Kerman Index 1 (KI-1)	$MCV \times MCH/RBC$ (Mentzer $\times$ MCH) $62 \times 18/6 = 186 \rightarrow \text{Thal}$ $72 \times 23/4.1 = 403 \rightarrow \text{IDA}$	<300 300-400 $\rightarrow \text{IDA} + \text{Thal}$	>400	95/ 97
Kerman Index 2 (KI-2)	$KI-1 \times 10/MCHC$ $186 \times 10/33 = 56 \rightarrow \text{Thal}$ $403 \times 10/31 = 130 \rightarrow \text{IDA}$	<85 85-105 $\rightarrow \text{IDA} + \text{Thal}$	$\Rightarrow 107$	95/ 97
RDW Index (RDWI)	$MCV \times RDW/RBC$ $62 \times 13/6.1 = 132 \rightarrow \text{Thal}$ $72 \times 19/4.3 = 318 \rightarrow \text{IDA}$	<220	>220	81/ 93
MDHL*	$MCHD \times RBC$ (MCH $\times$ RBC/MCV) (Mean Cell Hb Density= MCH/MCV) $18.6 \times 6/60 = 1.86 \rightarrow \text{Thal}$ $22.4 \times 4.1/71 = 1.29 \rightarrow \text{IDA}$	M<10y: >1.75 $\pm$ 0.12 F<10y: >1.98 $\pm$ 0.11 M>10y: >1.81 $\pm$ 0.12 F>10y: >1.76 $\pm$ 0.11	M<10y: $\leq$ 1.75 F<10y: $\leq$ 1.98 M>10y: $\leq$ 1.8 F>10y: $\leq$ 1.76	10/ 66
RBC	-	>5	<5	90/90
RDW	-	<14	>16	74/79



The twenty mathematical indices and formula that used for the discrimination of  $\beta$ -thalassemia minor.

Discrimination index or formula	Cut-off value
Bordbar formula: $( 80 - \text{MCV}  \times  27 - \text{MCH} )$	$> 44.76$
Ehsani Formula: $(\text{MCV} - 10 \times \text{RBC})$	$< 15$
England and Fraser formula: $(\text{MCV} - \text{RBC} - 5 \times \text{Hb} - 3.4)$	$< 0.0$
Green and King Formula: $(\text{MCV}^2 \times \text{RDW} / \text{Hb} \times 100)$	$< 72$
Huber-Herklotz Index: $(\text{MCH} \times \text{RDW} \times 0.1 / \text{RBC}) + \text{RDW}$	$< 22$
Kandhro index #1: $(\text{RBC} / \text{HCT} + 0.5 \times \text{RDW})$	$< 8.2$
Kandhro index #2: $(\text{RDW} \times 5) / \text{RBC}$	$< 16.8$
Keikhaei index: $\text{Hb} \times \text{RDW} \times 100 / (\text{RBC})^2 \times \text{MCHC}$	$< 21$
Kerman Formula #1: $\text{MCV} \times \text{MCH} / \text{RBC}$	$< 300$
Kerman Formula #2: $(\text{MCV} \times \text{MCH} / \text{RBC}) \times 10 / \text{MCHC}$	$< 85$
Matos-Carvalho Index: $(1.91 \times \text{RBC}) + (0.44 \times \text{MCHC})$	$> 23.85$
Mentzer formula: $(\text{MCV} / \text{RBC})$	$< 13$
RDW index: $(\text{RDW} \times \text{MCV}) / \text{RBC}$	$< 220$
Ricerca index: $(\text{RDW} / \text{RBC})$	$< 3.3$
Shine - Lal Formula: $(\text{MCV}^2 \times \text{MCH} / 100)$	$< 1530$
Sirachainan index: $1.5 \times \text{Hb} - 0.05 \text{ MCV}$	$> 14$
Sirdah Formula: $\text{MCV} - \text{RBC} - 3 \times \text{Hb}$	$< 27$
Srivastava formula: $(\text{MCV} / \text{RBC})$	$< 3.8$
Zaghloul index #1: $\text{Hb} + \text{Hct} + \text{RBC}$	Male & females $> 52.5$ Males $> 55.7$ Females $> 51.6$
Zaghloul index #2: $\text{Hb} + \text{Hct} + \text{RBC} - \text{RDW}$	Male & females $> 37.1$ Males $> 40.4$ Females $> 35.6$

شکل ۳۲: الگوی حذف ژن‌های  $\delta$  و  $\beta$  در شرایط مختلف HPFH و  $\delta\beta$ -تالاسمی

Index	Formula	TT	IDA
Mentzer_Hermiston (1973)	MCV/RBC	<13	>13
England_Frazer (1973)	MCV-RBC-5HB-3.4	<0	>0
Serivastava_Bnington (1973)	MCH/RBC	<3.8	>3.8
Shine_Lal (1977)	$MCV^2 \times MCH / 100$	<1530	>1530
Bessman Index (1979)	RDW CV	<16	>16
Makris index (1984)	$[(MCV/RDW) / ((MPV/PDW)) / RBC$	<1.84	>1.84
Ricerca Index (1987)	RDW / RBC	<3.3	>3.3
Green_King (1989)	$MCV^2 \times RDW / HB \times 100$	<65	>65
Kerman Index 1 (1997)	$MCV \times MCH / RBC$	<300	>400
Kerman Index 2 (1997)	$KI1 \times 10 / MCHC$	<85	>107
RDW based Index (1999)	$MCV \times RDW / RBC$	<220	>220
MDHL Index (1999)	$[(MCH / MCV)] \times RBC$	Click	Click
Ehsani Index (2005)	$MCV - (10 \times RBC)$	<15	>15
Keikhaei Index (2007)	$HB \times RDW \times 100 / RBC^2 \times MCHC$	<21	>21
Sirdah Index (2007)	$MCV - RBC - 3 \times HB$	<27	>27
Bordbar Index (2015)	$(80 - MCV) \times (27 - MCH)$	>44.76	<44.76
Disrimination Score (Male)	$(0.096 \times MCV) + (0.415 \times RDW) - (0.319 \times RBC) - 12.722$	<0.3095	>0.3095
Disrimination Score (Female)	$(0.096 \times MCV) + (0.415 \times RDW) - 12.722$	<0.3095	>0.3095
Matos_Carvalho Index (2016)	$(1.91 \times RBC) + (0.44 \times MCHC)$	>23.85	<23.85
RBC	RBC	>5	<5

$M < 10y: > 1.75$  -  $F < 10y: > 1.98$  --  $M > 10y: > 1.81$  -  $F > 10y: > 1.76$

## Information

Name Family Number FE TIBC Ferritin HbA2 

## Input

RBC MCV MCH MCHC HB HCT MPV PDW RDW Age Gender ☒ M ☐ F

Hormat Medical Lab

## Output

<input checked="" type="checkbox"/>	Index	Formula	TT	IDA	Result	Interp
<input checked="" type="checkbox"/>	Mentzer_Hermiston (1973)	MCV/RBC	<13	>13	8.9825	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	England_Frazer (1973)	MCV-RBC-5HB-3.4	<0	>0	-16.98	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Serivastava_Bnington (1973)	MCH/RBC	<3.8	>3.8	2.8924	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Shine_Lai (1977)	MCV*2 x MCH / 100	<1530	>1530	760.02	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Bessman Index (1979)	RDW / CV	<16	>16	16.7	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Makris Index (1984)	[(MCV/RDW) / {(MPV/PDW)}] / RBC	<1.84	>1.84	0.7395	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Ricerca Index (1987)	RDW / RBC	<3.3	>3.3	2.4273	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Green_King (1989)	MCV*2 x RDW / HB x 100	<65	>65	46.555	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Kerman Index 1 (1997)	MCV x MCH / RBC	<300	>400	178.75	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Kerman Index 2 (1997)	KI1 x 10 / MCHC	<85	>107	55.686	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	RDW based Index (1999)	MCV x RDW / RBC	<220	>220	150.00	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	MDHL Index (1999)	[(MCH / MCV)] x RBC	Click	Click	2.2154	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Ehsani Index (2005)	MCV - (10 x RBC)	<15	>15	-7	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Keikhaei Index (2007)	HB x RDW x 100 / RBC*2 x MCHC	<21	>21	15.057	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Sirdah Index (2007)	MCV - RBC -3 x HB	<27	>27	13.82	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Bordbar Index (2015)	( 80 - MCV ) x ( 27 - MCH )	>44.76	<44.76	129.22	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Disrimination Score (Male)	(0.096xMCV)+(0.415xRDW)-(0.319xRBC)-12.722	<0.3095	>0.3095	-2.053	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Disrimination Score (Female)	(0.096xMCV)+(0.415xRDW)-12.722	<0.3095	>0.3095	0.1413	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Matos_Carvalho Index (2016)	(1.91 x RBC ) + (0.44 x MCHC)	>23.85	<23.85	27.264	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	RBC	---	>5	<5	6.88	TT



Information

Name

HOSEIN

Family

VALIPOOR

Number

17531

FE

TIBC

348

Ferritin

53

HbA2

4.1

In put

RBC

5.38

16

MCV

78.9

MCH

27.0

MCHC

32.6

HB

15

HCT

44.6

MPV

11.3

PDW

14.5

RDW

14.1

Age

34

Gender

M

F



Hermati Medical Lab

Out put	Index	Formula	TT	IDA	Result	Interp
<input checked="" type="checkbox"/>	Mentzer_Hermiston (1973)	MCV/RBC	<13	>13	14.665	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	England_Frazer (1973)	MCV-RBC-5HB-3.4	<0	>0	-4.8791	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Serivastava_Bnington (1973)	MCH/RBC	<3.8	>3.8	5.0185	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Shine_Lal (1977)	MCV*2 x MCH / 100	<1530	>1530	1680.8	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Bessman Index (1979)	RDW CV	<16	>16	14.1	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Makris index (1984)	[(MCV/RDW) / ((MPV/PDW)) / RBC	<1.84	>1.84	1.3346	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Ricerca Index (1987)	RDW / RBC	<3.3	>3.3	2.6208	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Green_King (1989)	MCV*2 x RDW / HB x 100	<65	>65	58.516	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Kerman Index 1 (1997)	MCV x MCH / RBC	<300	>400	395.96	IDA+TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Kerman Index 2 (1997)	KI1 x 10 / MCHC	<85	>107	121.46	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	RDW based Index (1999)	MCV x RDW / RBC	<220	>220	206.78	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	MDHL Index (1999)	[(MCH / MCV)] x RBC	Click	Click	1.8410	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Ehsani Index (2005)	MCV - (10 x RBC)	<15	>15	25.1	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Keikhaei Index (2007)	HB x RDW x 100 / RBC*2 x MCHC	<21	>21	22.414	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Sirdah Index (2007)	MCV - RBC -3 x HB	<27	>27	28.52	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Bordbar Index (2015)	( 80 - MCV) x (27-MCH)	>44.76	<44.76	0	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Disrimination Score (Male)	(0.096xMCV)+(0.415xRDW)-(0.319xRBC)-12.722	<0.3095	>0.3095	-1.0121	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Disrimination Score (Female)	(0.096xMCV)+(0.415xRDW)-12.722	<0.3095	>0.3095	0.7039	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Matos_Carvalho Index (2016)	(1.91 x RBC ) + (0.44 x MCHC)	>23.85	<23.85	24.619	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	RBC	---	>5	<5	5.38	TT



## Information

Name BAHMAN

Family KYANI

Number 16658

FE

TIBC 322

Ferritin 46

HbA2 3.1

## In put

RBC 5.2

MCV 92

MCH 34

MCHC 33.5

HB 15

HCT 45.3

MPV 9.9

PDW 14.5

RDW 13.2

Age 45

Gender ☒ M ☐ F

Haman Medical Labs

## Out put

<input checked="" type="checkbox"/>	Index	Formula	TT	IDA	Result	Interp
<input checked="" type="checkbox"/>	Mentzer_Hermiston (1973)	MCV/RBC	<13	>13	17.692	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	England_Frazer (1973)	MCV-RBC-5HB-3.4	<0	>0	8.4	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Serivastava_Brington (1973)	MCH/RBC	<3.8	>3.8	6.5384	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Shine_Lal (1977)	MCV*2 x MCH / 100	<1530	>1530	2877.7	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Besaman Index (1979)	RDW CV	<16	>16	13.2	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Makris Index (1984)	[(MCV/RDW) / ((MPV/PDW)) / RBC	<1.84	>1.84	1.9631	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Ricerca Index (1987)	RDW / RBC	<3.3	>3.3	2.5384	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Green_King (1989)	MCV*2 x RDW / HB x 100	<65	>65	74.483	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Kerman Index 1 (1997)	MCV x MCH / RBC	<300	>400	601.53	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Kerman Index 2 (1997)	RD1 x 10 / MCHC	<85	>107	179.56	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	RDW based Index (1999)	MCV x RDW / RBC	<220	>220	233.53	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	MDHL Index (1999)	[(MCH / MCV)] x RBC	Click	Click	1.9217	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Ehsani Index (2006)	MCV - (10 x RBC)	<15	>15	40	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Keikhaei Index (2007)	HB x RDW x 100 / RBC*2 x MCHC	<21	>21	21.858	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Sirdah Index (2007)	MCV - RBC -3 x HB	<27	>27	41.8	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Bordbar Index (2015)	( 80 - MCV) x (27-MCH)	>44.76	<44.76	84	TT
	Disrimination Score (Male)	(0.096xMCV)+(0.415xRDW)-(0.319xRBC)-12.722	<0.3095	>0.3095	-0.070	TT
	Disrimination Score (Female)	(0.096xMCV)+(0.415xRDW)-12.722	<0.3095	>0.3095	1.588	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Matos_Carvalho Index (2016)	(1.91 x RBC ) + (0.44 x MCHC)	>23.85	<23.85	24.672	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	RBC	—	>5	<5	5.2	TT

## Information

Name	ROYA	Family	SHIRI	Number	13357
FE		TIBC	451	Ferritin	13
				HbA2	25

## Input

RBC	4.38
MCV	75.9
MCH	23.0
MCHC	30.1
HB	13.3
HCT	41.6
MPV	9.3
PDW	13.5
RDW	19.5

Age 22




Gender ☐ M ☒ F

## Output

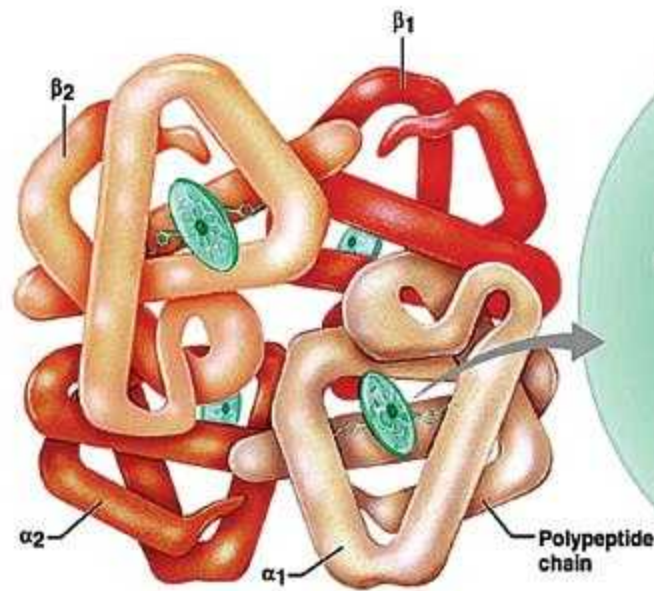
<input checked="" type="checkbox"/>	Index	Formula	TT	IDA	Result	Interp
<input checked="" type="checkbox"/>	Mentzer_Hermiston (1973)	MCV/RBC	<13	>13	17.328	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	England_Frazer (1973)	MCV-RBC-5HB-3.4	<0	>0	1.62	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Serivastava_Bnington (1973)	MCH/RBC	<3.8	>3.8	6.2511	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Shine_Lai (1977)	MCV*2 x MCH / 100	<1530	>1530	1324.9	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Bessman Index (1979)	RDW CV	<16	>16	19.5	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Makris index (1984)	[(MCV/RDW) / ((MPV/PDW))] / RBC	<1.84	>1.84	1.2899	TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Ricerca Index (1987)	RDW / RBC	<3.3	>3.3	4.4520	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Green_King (1989)	MCV*2 x RDW / HB x 100	<65	>65	84.463	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Kerman Index 1 (1997)	MCV x MCH / RBC	<300	>400	398.56	IDA+TT
<input checked="" type="checkbox"/>	Kerman Index 2 (1997)	KI1 x 10 / MCHC	<85	>107	132.41	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	RDW based Index (1999)	MCV x RDW / RBC	<220	>220	337.91	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	MDHL Index (1999)	[(MCH / MCV)] x RBC	Click	Click	1.3272	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Ehsani Index (2005)	MCV - (10 x RBC)	<15	>15	32.1	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Keikhaei Index (2007)	HB x RDW x 100 / RBC*2 x MCHC	<21	>21	44.912	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Sirdah Index (2007)	MCV - RBC -3 x HB	<27	>27	31.62	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Bordbar Index (2015)	( 80 - MCV) x (27-MCH)	>44.76	<44.76	16.4	IDA
	Disrimination Score (Male)	(0.096xMCV)+(0.415xRDW)-(0.319xRBC)-12.722	<0.3095	>0.3095	1.2596	IDA
	Disrimination Score (Female)	(0.096xMCV)+(0.415xRDW)-12.722	<0.3095	>0.3095	2.6569	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	Matos_Carvalho Index (2016)	(1.91 x RBC ) + (0.44 x MCHC)	>23.85	<23.85	21.609	IDA
<input checked="" type="checkbox"/>	RBC	---	>5	<5	4.38	IDA

**Shiran Index=[3+(3RBC-Hb)]×MCHC/RDW**

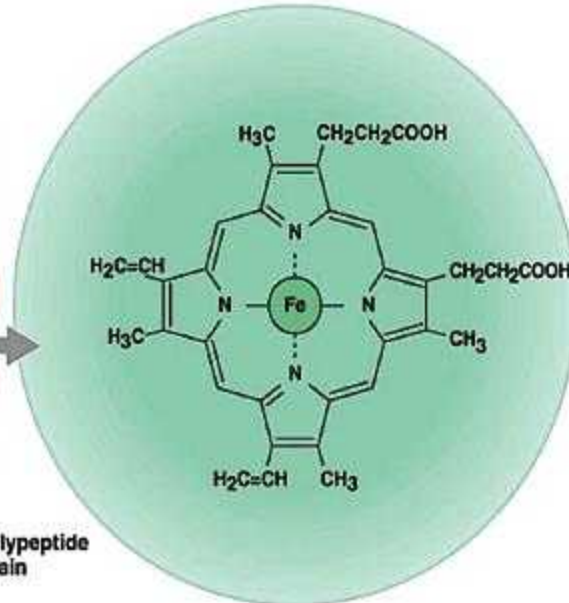
TT>9, IDA<5 and normal:5-9

H2	:	  	=(3*A2-B2+3)*F2/G2						
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	RBC	HB	HCT	MCV	MCH	MCHC	RDW	#VALUE!	
2	5.9	9.3	36.7	62.3	15.9	25.5	21	13.84286	TT
3	4.61	9.1	30.5	66.1	19.8	29.9	19.3	11.97549	TT
4	5.38	15	44.6	78.9	27	32.6	14.1	9.571915	TT
5	4.39	13.3	41.6	75.9	23	30.1	19.5	4.430103	IDA
6	5	15	44.6	89	31.5	33	12	8.25	Normal

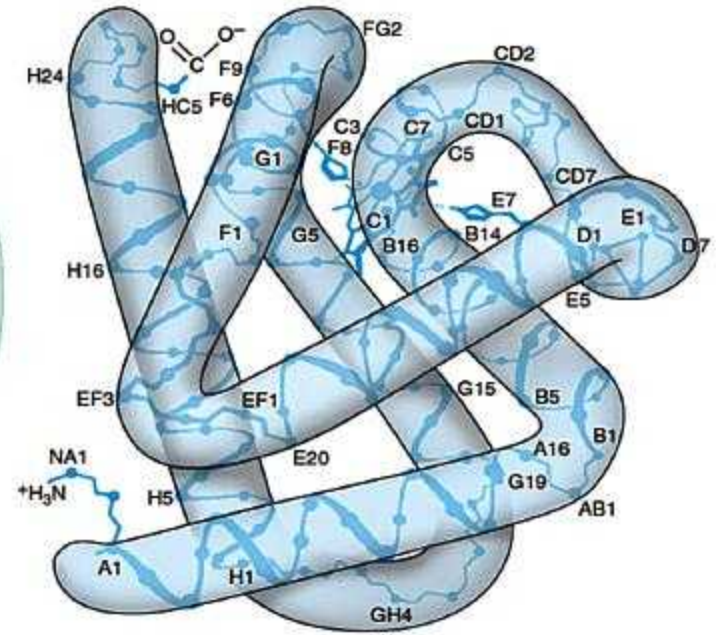




(a) Hemoglobin



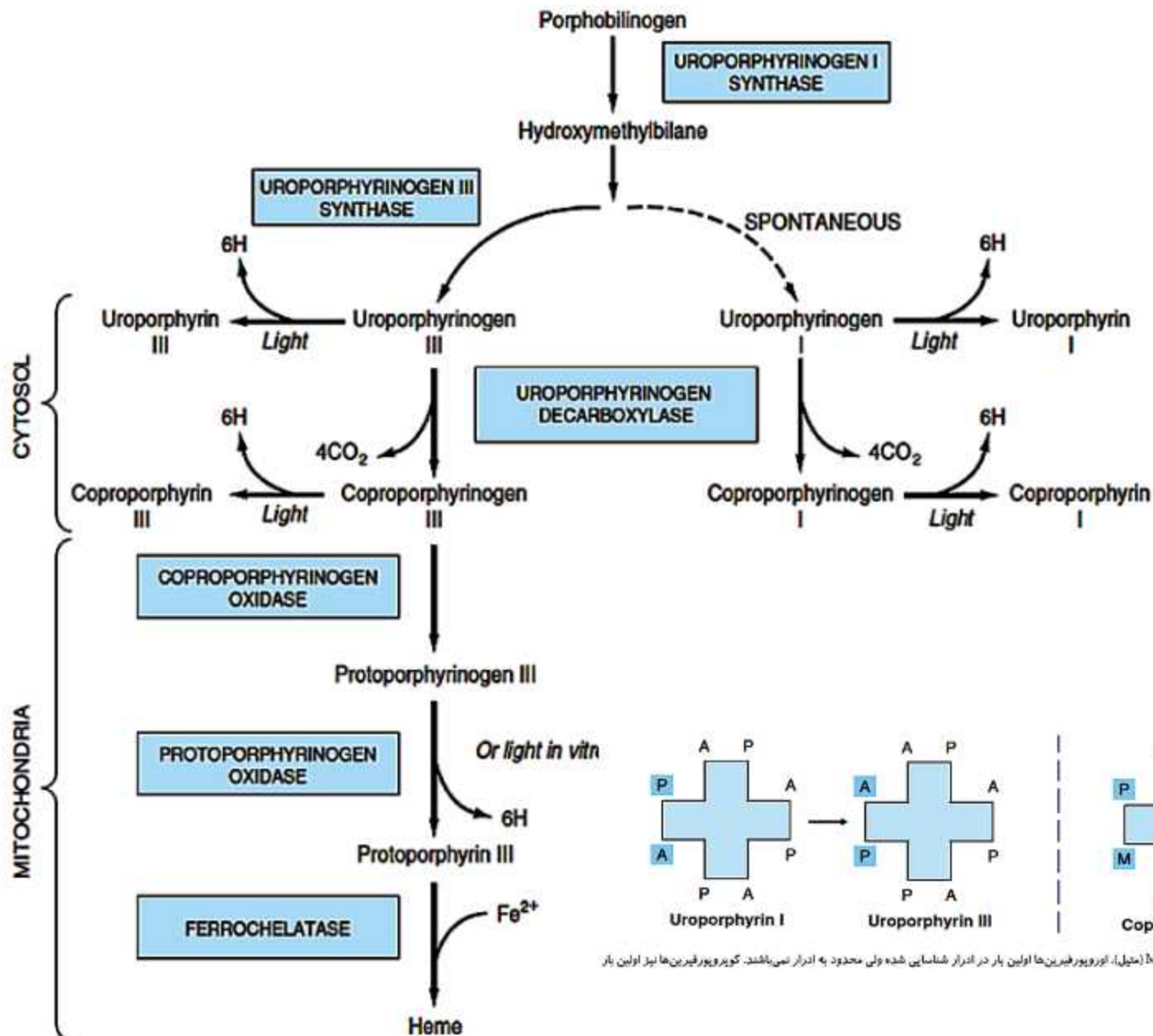
(b) Iron-containing heme group



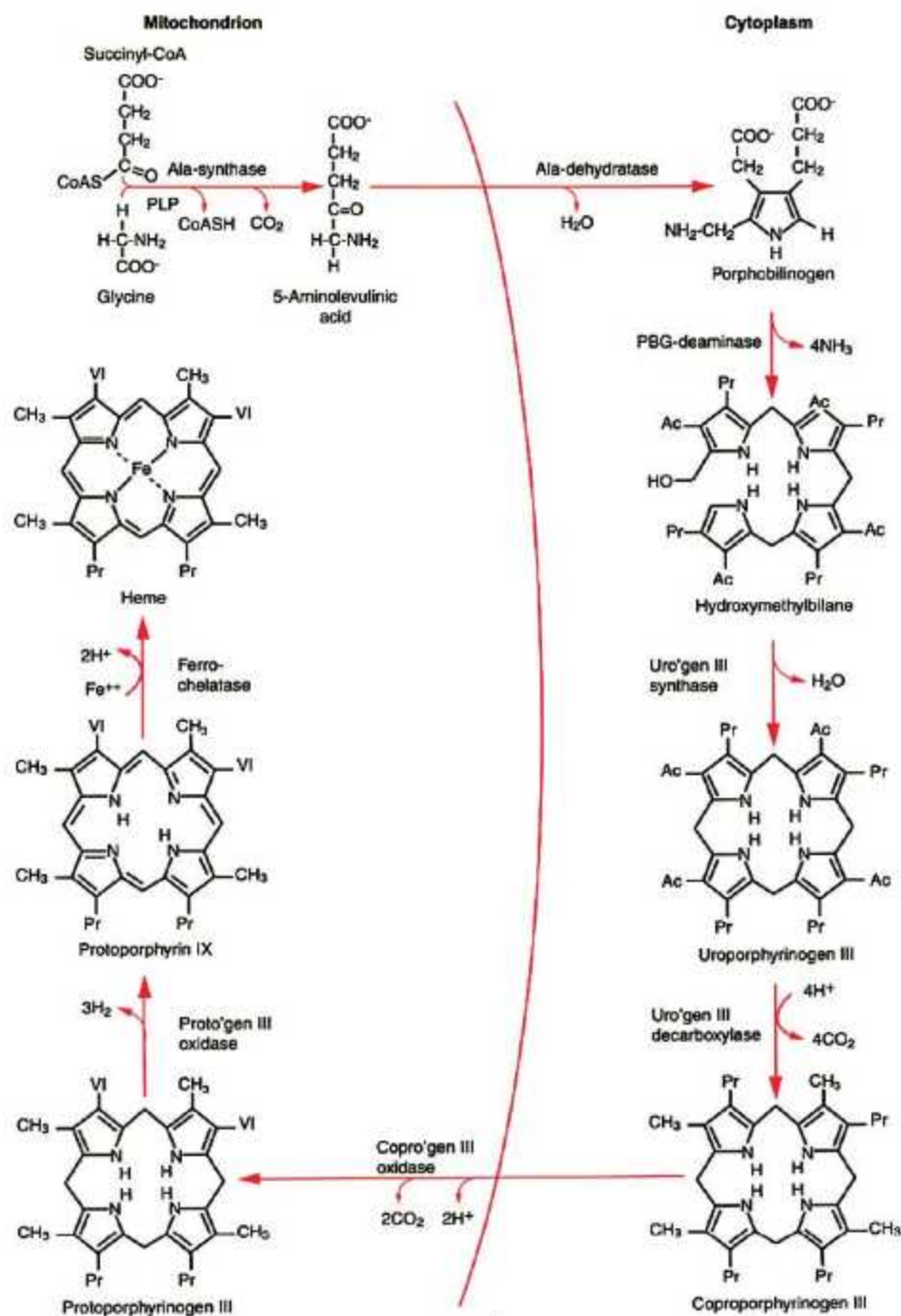
شکل ۱۷-۲۹: تصویر چپ): ساختمان هموگلوبین تترامر (64.5KD) و هم. در ساختار هم. حلقه‌های پیرولی و کربن‌های پل متیلنی در یک صفحه قرار گرفته و اتم آهن ( $Fe^{2+}$ ) نیز تقریباً در همان صفحه قرار می‌گیرد. موقعیت‌های کنوردینانس پنجم و ششم  $Fe^{2+}$  در جهت عمود و مستقیماً در بالا و پایین حلقه هم قرار دارند که یکی از آنها به اکسیژن و دیگری به هیستیدین متصل می‌شود. به ماهیت گروه‌های استخلافی کربن‌های  $\beta$  حلقه‌های پیرولی. اتم آهن مرکزی و موقعیت زنجیره جانبی قطبی حلقه هم توجه نمایید که به سمت سطح مولکول گلوبین می‌باشد. تصویر راست): مدلی از میوگلوبین مونومر (17KD) که تنها اتم‌های زنجیره  $\alpha$  نشان داده شده‌اند. نواحی مارپیچی  $\alpha$  نیز از A تا H نام گذاری می‌شوند.

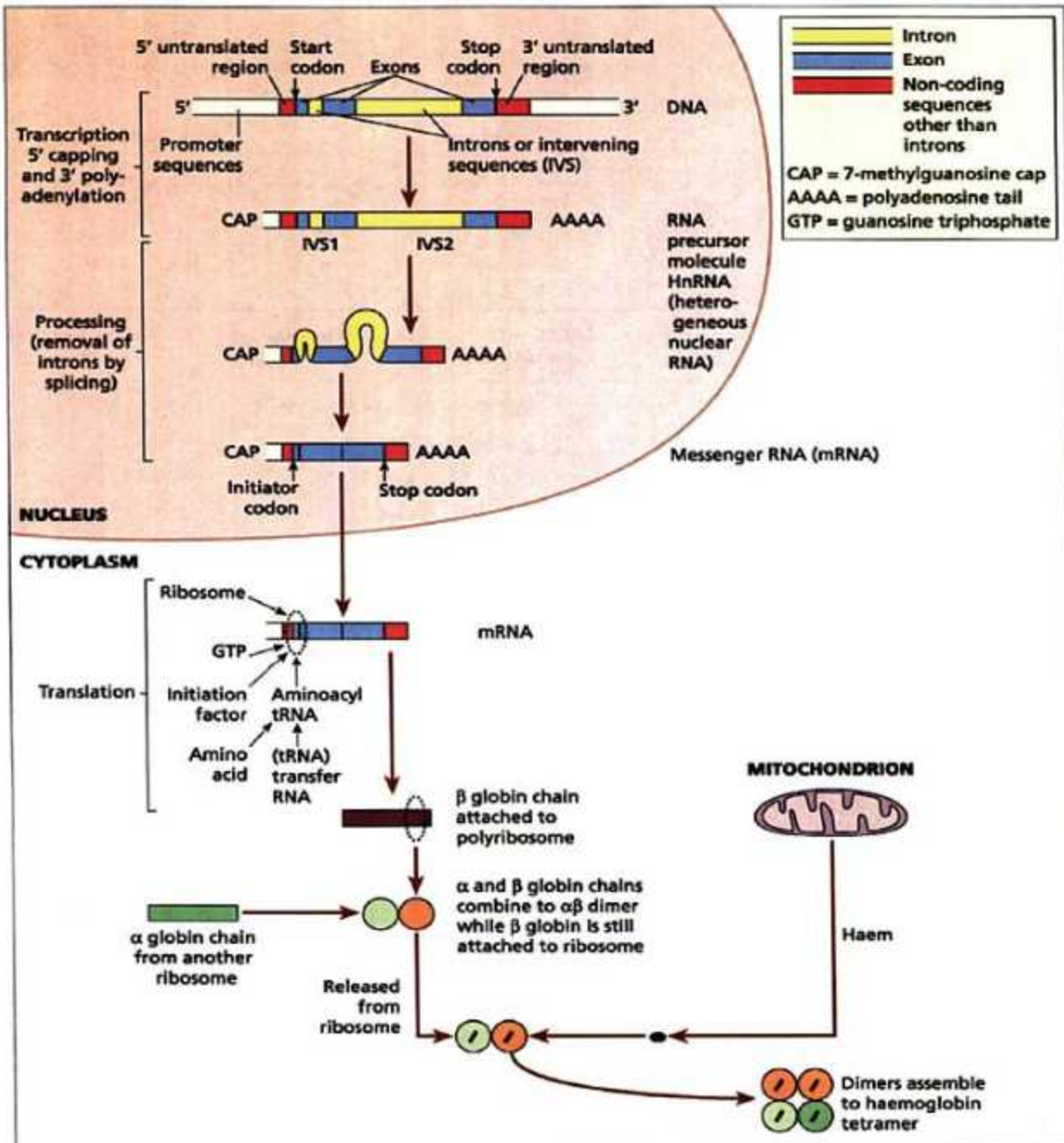


ly+ Succinyl CoA → ALA → PBG → HMB → URO-III → COPRO-III → POROTO-IX → Protoporphyrin-IX  $\xrightarrow{Fe}$  Heme



شکل ۱۰-۲۹: اوروپورفیرین و کوپروپورفیرین. A: (استات)، P: (پروپیونات)، M: (متیل)، اوروپورفیرین‌ها اولین بار در انداز ششایی شده ولی محدود به انداز نمی‌باشد. کوپروپورفیرین‌ها نیز اولین بار در مدفع یافت شده ولی بعدها در انداز نیز مورد شناسایی قرار گرفتند.





شکل ۲۸-۲۹: نمایی شماتیک از سنتز همزمان هم و گلوبین و تشکیل هموگلوبین در نورمو بلاست‌های اریتروئیدی. mRNAی نابالغ گلوبین  $\beta$  از سه اگزون (آبی) و دو اینترون یا IVS (زرد) تشکیل شده است [۲۰].



جدول ۲-۲۹: تفاوت‌های اساسی بین دو نوع از گلوبین‌های خانواده آلفا و غیر آلفا (بتا)

خانواده گلوبینی	$\alpha$	$\beta$ (non- $\alpha$ )
انواع گلوبین‌ها	$\zeta, \alpha, \theta$	$\epsilon, \gamma, \delta, \beta$
نام پروموتور	HS-40 (LCR-like)	LCR
تعداد اسید آمینه‌ها	141	146
وضعیت اینترون‌ها	IVS2>IVS-1	IVS2>>IVS1*
جایگاه کروموزومی	16p13.3	11p15.5
وجود انهناسر یا سایلنسر در ژن	-	+
تعداد ماریچ	7(A-H) ولی بدون D	8 (A-H)
بار الکتریکی کلی زنجیره گلوبینی	+	-

\*Inter Vening Sequence

جدول ۲-۳۰: تعداد کدون‌های اگزونیک و طول بازهای اینترونیک در دو گروه گلوبین آلفا و بتا

	Exon1 codons	IVS1 Length	Exon2 codons	IVS2 Length	Exon3 codons
$\alpha$ -like ( $\alpha$ )	1-31	117bp	32-99	140bp	100-141
$\alpha$ -like ( $\zeta$ )	1-31	1265bp	32-99	341bp	100-141
$\beta$ -like	1-30	122-130bp	31-104	850-904bp	105-146

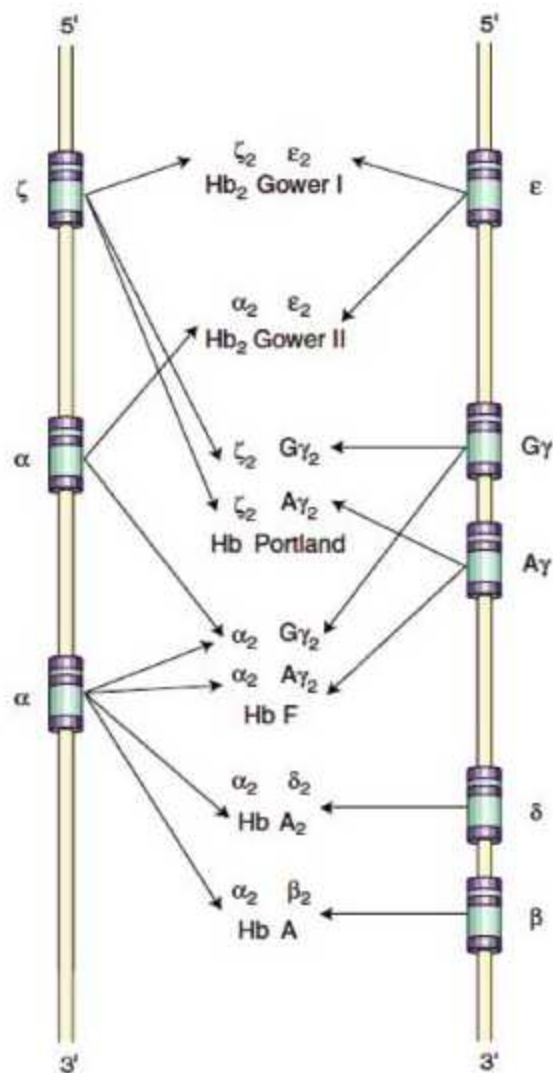
جدول ۱۷-۱، هموگلوبین‌های مختلف حاصل از ترکیب انواع زنجیره‌های گلوبینی

	$\epsilon$	$\gamma$	$\delta$	$\beta$
$\zeta$	Gower1	Portland-1	-	Portland-2
$\alpha$	Gower2	Fetal	Adult-2	Adult

جدول ۱۷-۲، ترکیب، جایگاه سنتز و محدوده زمانی بیان هر کدام از هموگلوبین‌های انسانی به همراه میزان نسبی هر کدام از آنها در سنین مختلف رویانی، جنینی و بالغین

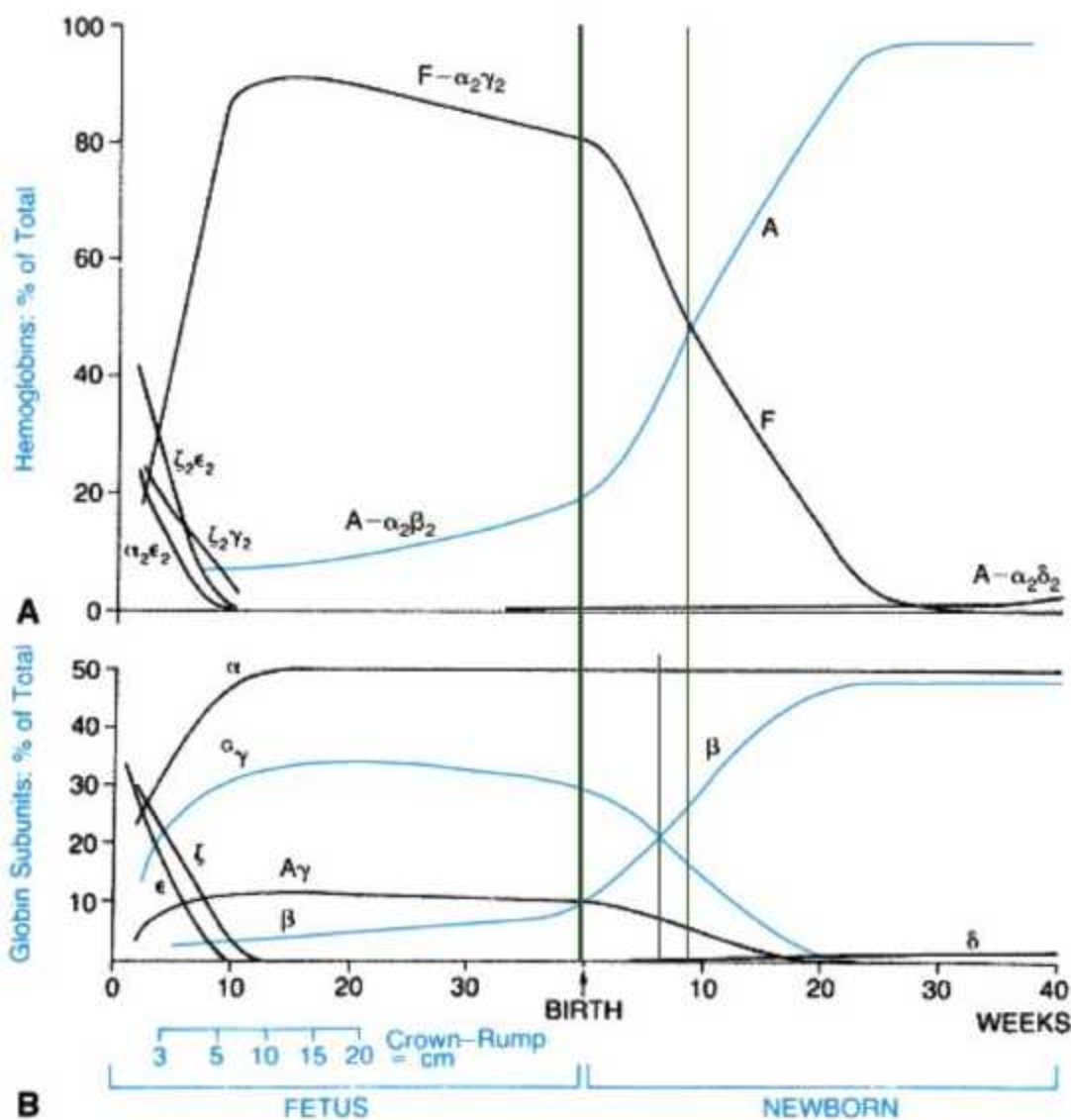
Hb نوع	Gower1	Gower2	Portland-1	Portland-2*	Fetal	Adult	Adult-2
ترکیب	$\zeta_2\epsilon_2$	$\alpha_2\epsilon_2$	$\zeta_2\gamma_2$	$\zeta_2\beta_2$	$\alpha_2\gamma_2$	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\delta_2$
جایگاه سنتز	کیسه زرد	PASP/AGM	PASP/AGM	FL, BM	FL > BM	FL < BM	BM
شروع سنتز	4-6W	4-13W	4-13W	Thalassemia*	4W	9W	35W
% رویانی	20%	35%	35%	0%	10%	0%	0%
% جنینی	0%	0%	0%	0%	55-95%	5-45%	0%
% بالغین	0%	0%	0%	0%	1%	95%	2.5-4%

\* P2 فقد در شرایط تالاسمیک سنتز شده و در افراد نرمل مشاهده نمی‌شود.



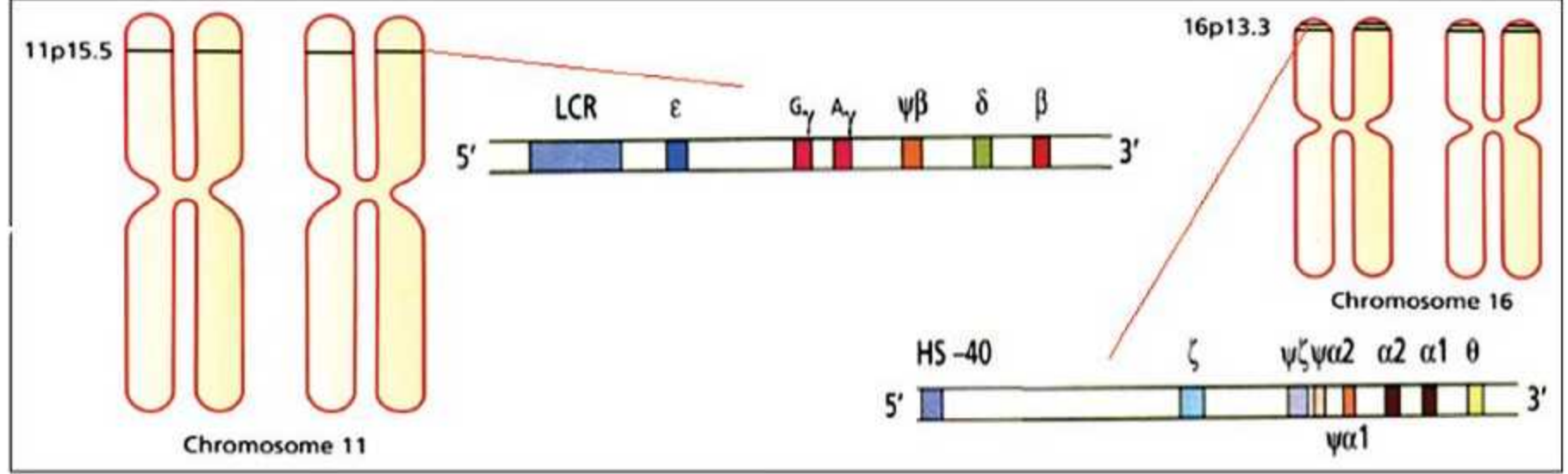
Chromosome 16

Chromosome 11

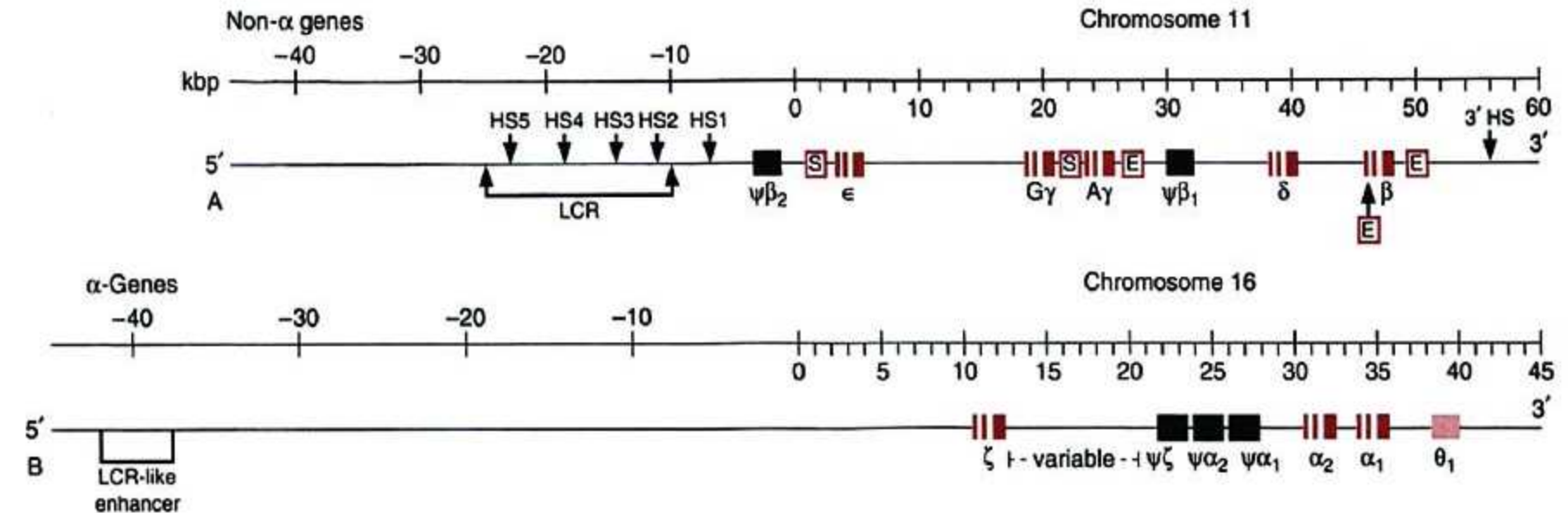


شکل ۱۲-۱۷: مکانهای خون سازی، نوع زنجیره گلوبینی و هموگلوبین های مختلف سنتز شده در دوران مختلف حیات انسان (روییانی، جنینی و بلوغ) و زمان سوییچینگ هر کدام از آنها [۲۶].

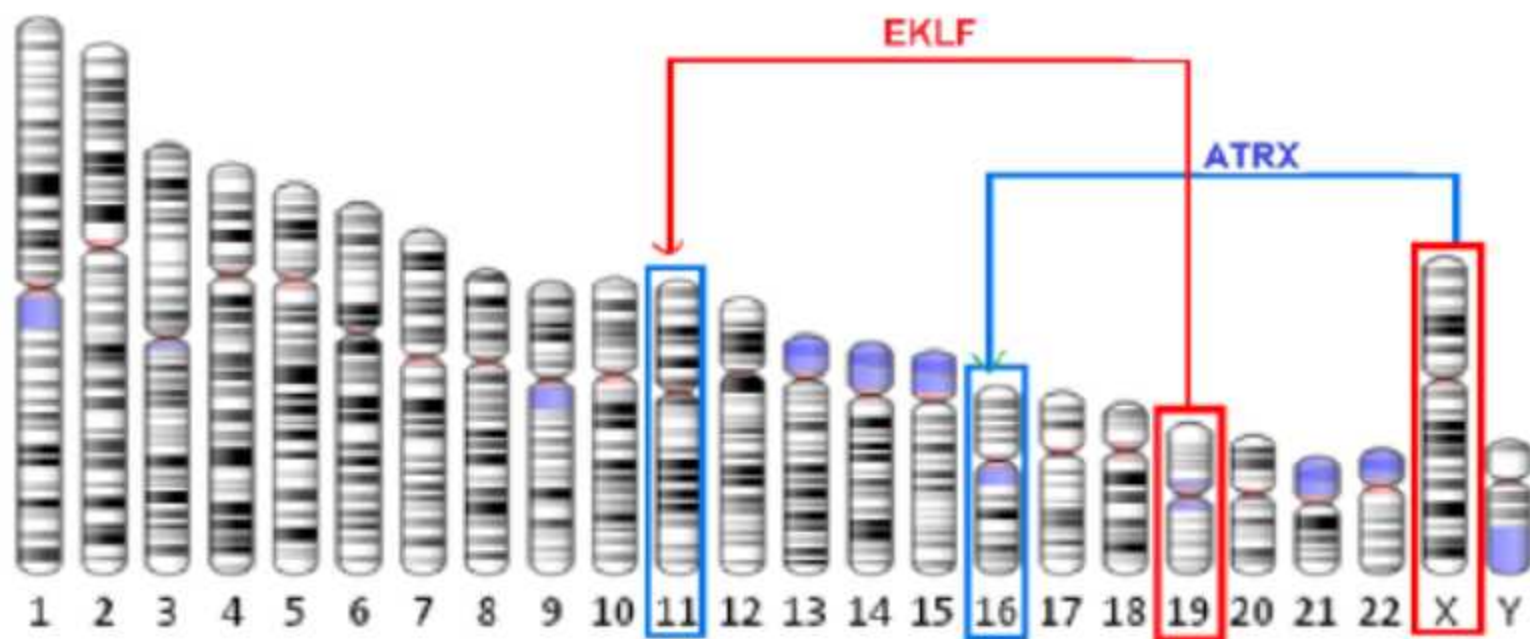




شکل ۱-۴۵: گروه ژنی آلفا (روی کروموزوم ۱۶) حدود ۲۸ کیلو باز طول داشته و به ترتیب دارای یک ژن زتا ( $\zeta$ )، یک ژن تائی کاذب ( $\psi\zeta$ )، دو ژن آلفای کاذب ( $\psi\alpha2, \psi\alpha1$ )، دو ژن آلفای فعال با نام‌های  $\alpha1$  و  $\alpha2$  و یک ژن تتا ( $\theta$ ) است. گروه ژنی  $\beta$  (کروموزوم ۱۱) دارای یک ژن ایسیلون ( $\epsilon$ )، دو ژن گاما ( $\gamma$ ) که به صورت  $\gamma^A, \gamma^G$  نشان داده می‌شوند، یک ژن  $\beta$  کاذب ( $\psi\beta$ )، یک ژن دلتا ( $\delta$ ) و یک ژن  $\beta$  است [۱۴].



شکل ۲۵-۲۹: جایگاه ژنی انواع مختلف گلوبین‌ها در دو کروموزوم ۱۱ و ۱۶ [۵].



شکل ۲۸: الگوی حذف ژن‌های  $\delta$  و  $\beta$  در شرایط مختلف HPFH و  $\delta\beta$ -تالاسمی

جدول ۱۳-۴۵: مقایسه همولوگ‌های انسانی و موشی زنجیره‌های گلوبینی

نوع گلوبین	انسان	موش	نوع گلوبین	انسان	موش
$\alpha$ -Like	$\zeta$	Hb-X	$\beta$ -Like	$\epsilon$	Hb-Y ( $\epsilon^Y$ )
	$\alpha 2$	Hba-a2		$\gamma$	Hb-Z ( $\beta h1$ ) = Hbb-h1
	$\alpha 1$	Hba-a1		$\delta$	-
	-	-		$\beta$	Hb-B1 ( $\beta$ Major) = Hbb-b1 Hb-B2 ( $\beta$ minor) = Hbb-b2
کروموزوم	16	11	کروموزوم	11	7

## تنظیم بیان ژن‌های گلوبینی:

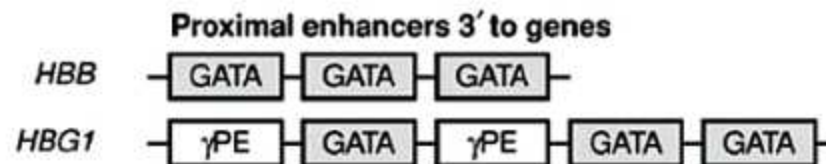
همان‌طوری که اشاره شد، فاکتورهای ترانس نسبتاً اختصاصی برای رده اریثروئیدی شامل فاکتورهای Nrf-2, Nrf-1, SSP, EKLF, NFE2, FOG و TFIID, TFIIB, *GATA-1*, LCR-F1 هستند که از طریق برهمکنش با پروموتورها و نواحی تنظیمی ژن‌های گلوبینی در تنظیم بیان ژن‌های مذکور شرکت می‌کنند. فاکتور *EKLF*<sup>۱</sup> افزایش دهنده ساخت زنجیره بتا، *ATXR* افزایش دهنده ساخت زنجیره آلفا و فاکتور *SSP* افزایش دهنده ساخت زنجیره های  $\epsilon, \gamma$  محسوب می‌شوند. با توجه به موارد فوق، ۴ ناحیه تنظیمی و حفاظت شده در ژن‌های گلوبین وجود دارد:

(۱) پروموتورهای پایه‌ای یا Basal Promoter (در فاصله ۳۲+ تا ۳۷-)

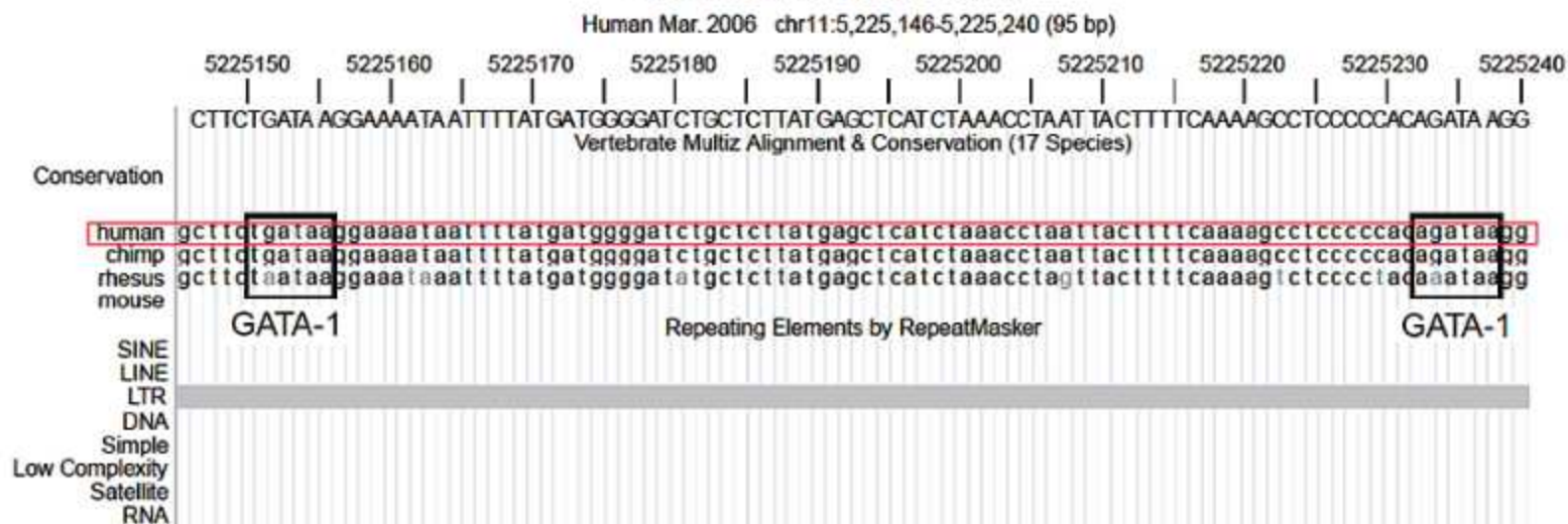
(۲) نواحی تنظیمی بالادست یا UR (در فاصله ۴۰- تا ۲۵۰-)

(۳) انهناسرهای پروکسیمال سمت 3' ژن‌های HBB و HBG1

(۴) مستر رگولاتورهای HS و LCR



### 3' enhancer for *HBG1*

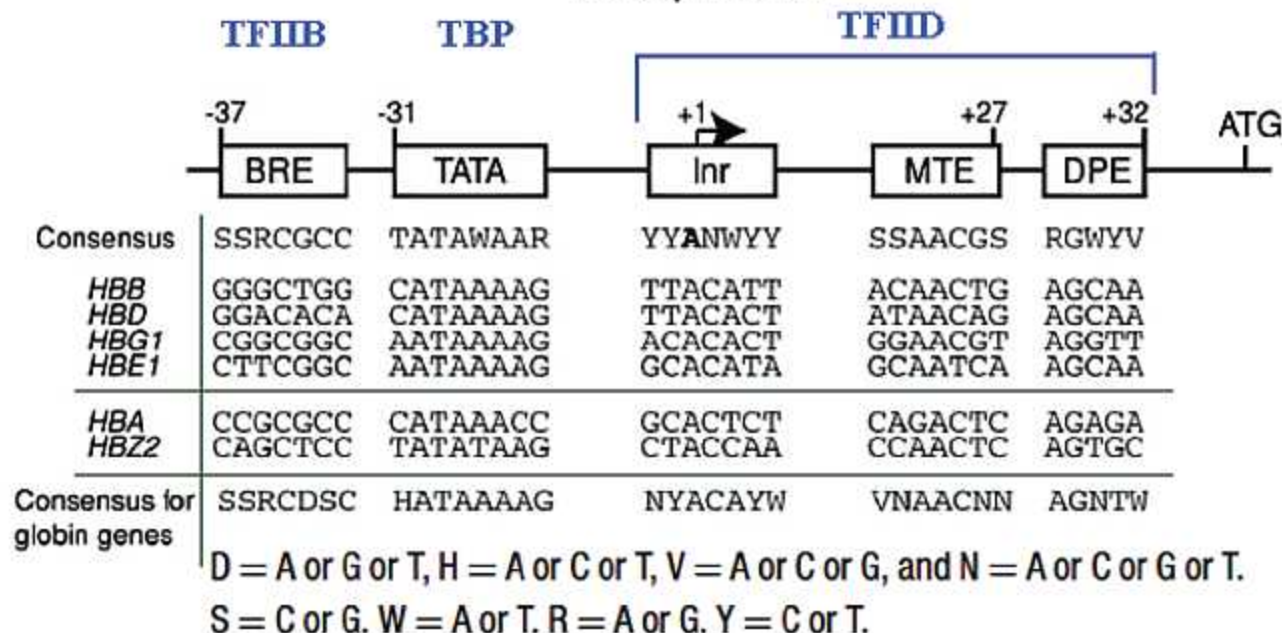




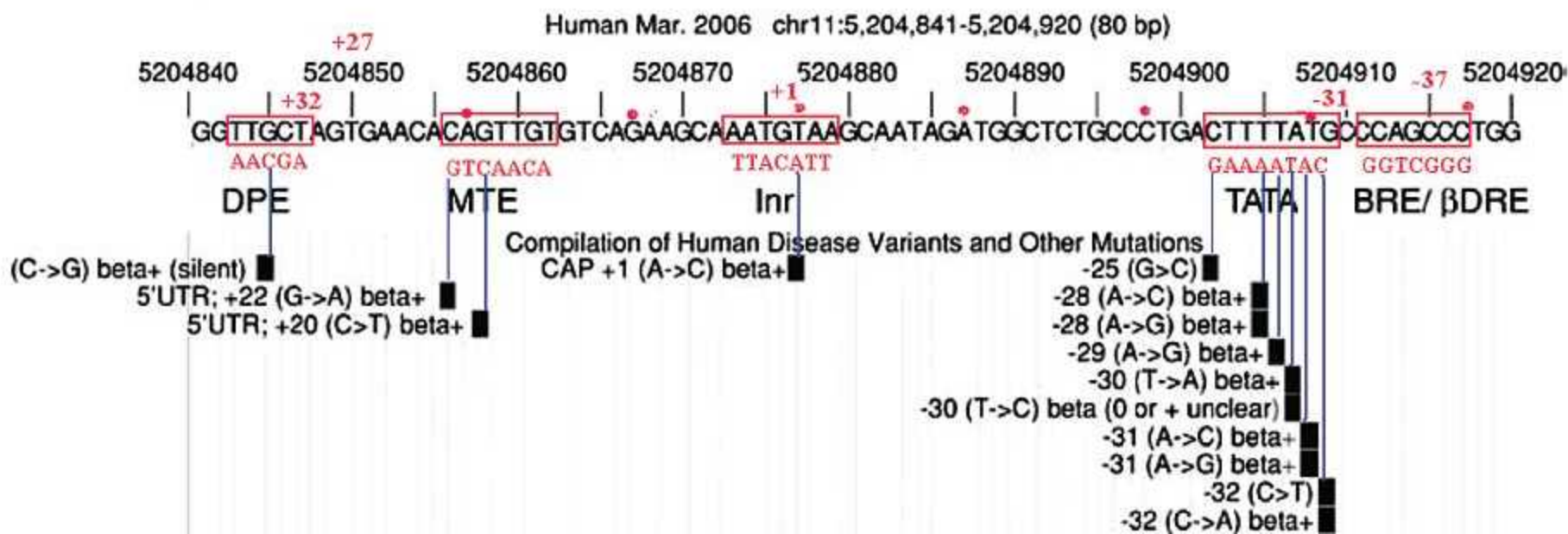


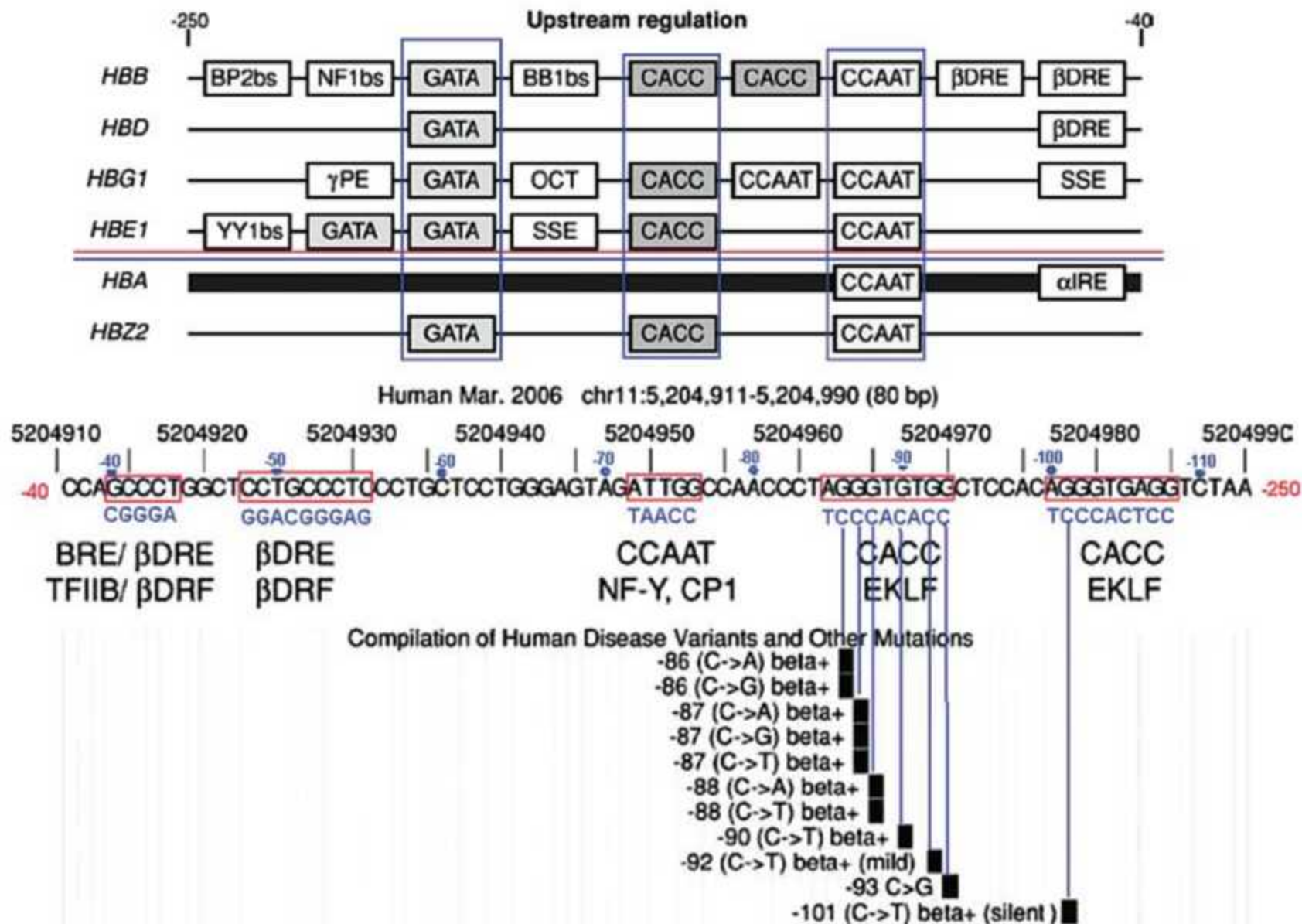
# Basal promoter

31

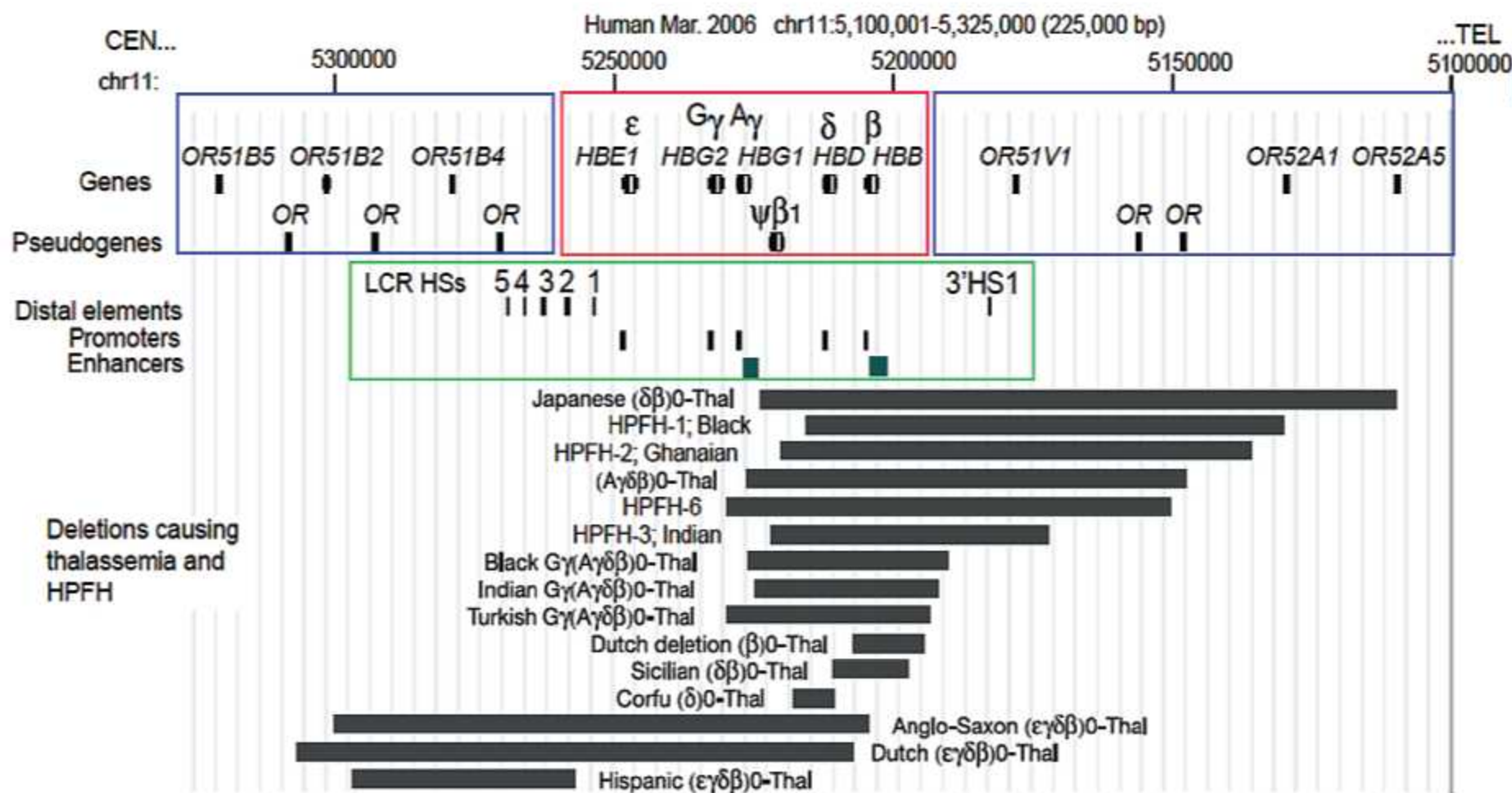


## A. Basal promoter for *HBB*





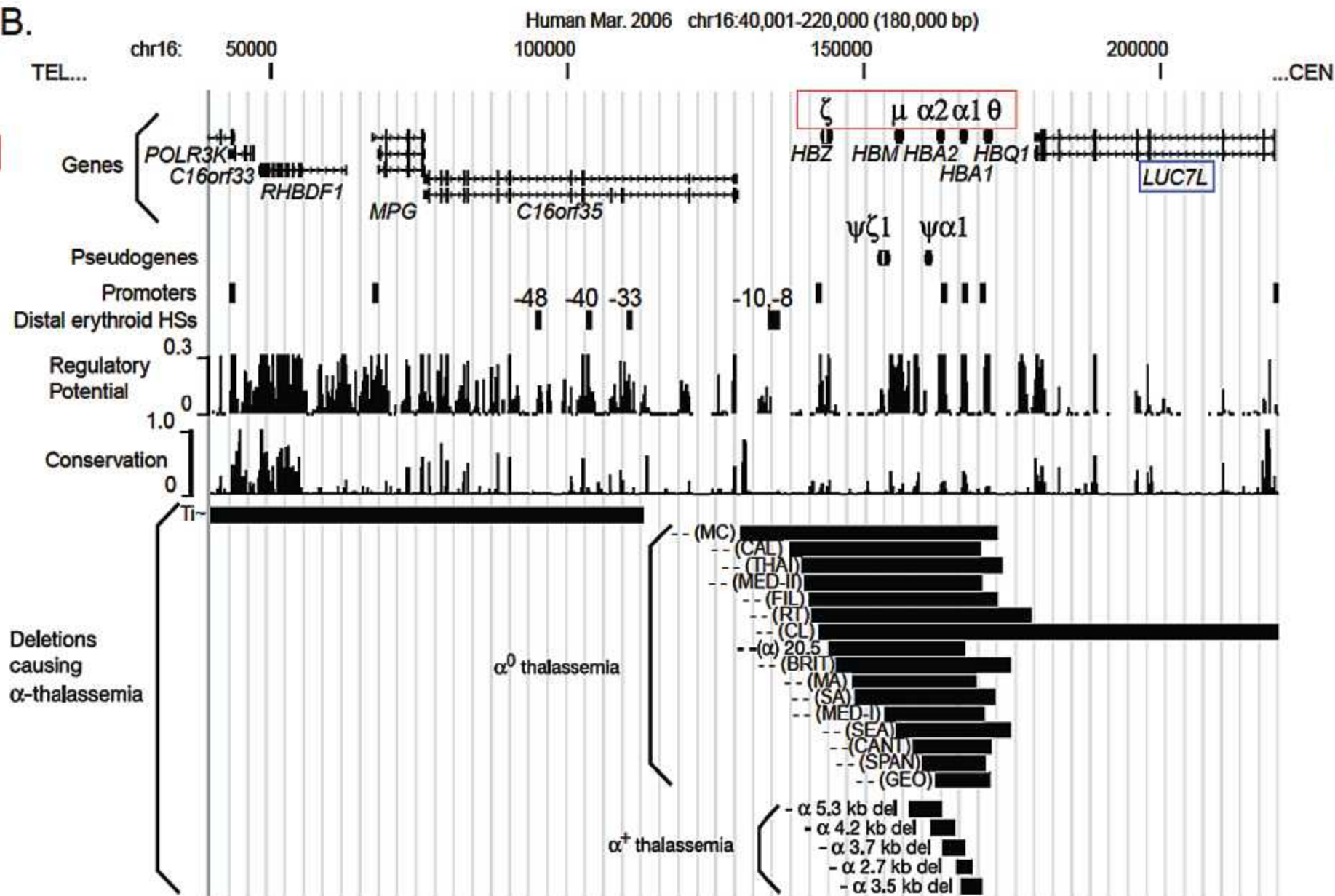




شکل ۵-۴: جایگاه کلاستری ژن‌های  $\beta$ -Like و OR بر روی کروموزوم ۱۱ و جایگاه حذف ژنی در انواع HPFH،  $\delta\beta$ ،  $\gamma\delta\beta$  و  $\epsilon\gamma\delta\beta$  تالاسمی [۳۲].



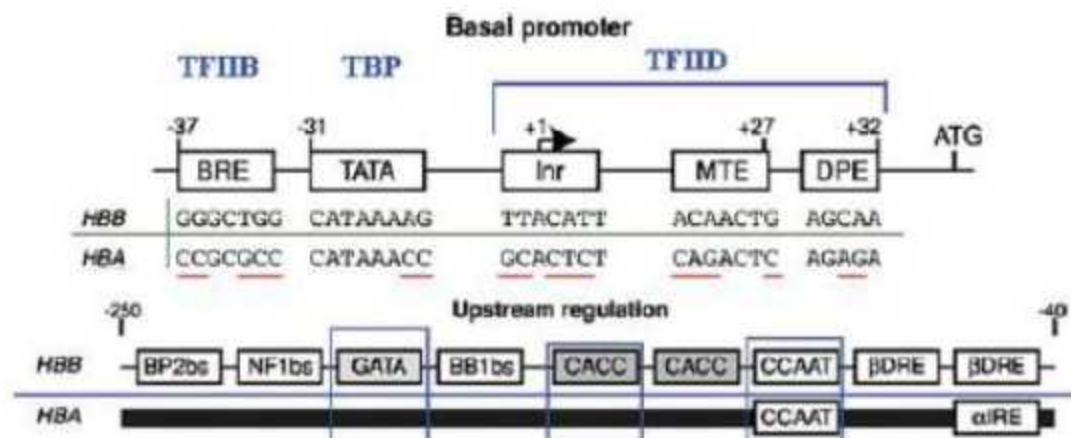
B.



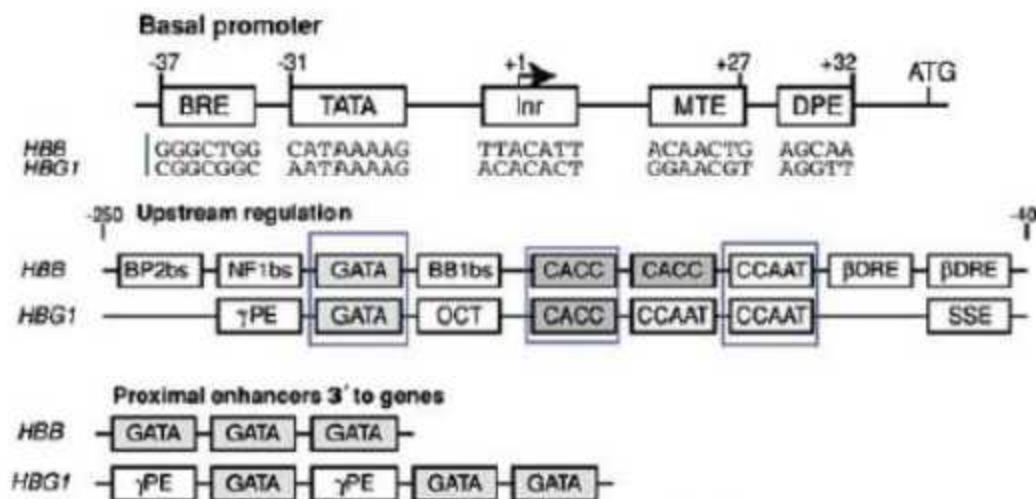
شکل ۴۵-۶: جایگاه کلاستری ژن های  $\alpha$ -Like و ژن های بالادست و پایین دست بر روی کروموزوم ۱۶ و جایگاه های حذف ژنی در انواع  $\alpha$  تالاسمی  $\alpha^+$  و  $\alpha^0$  [۳۲].



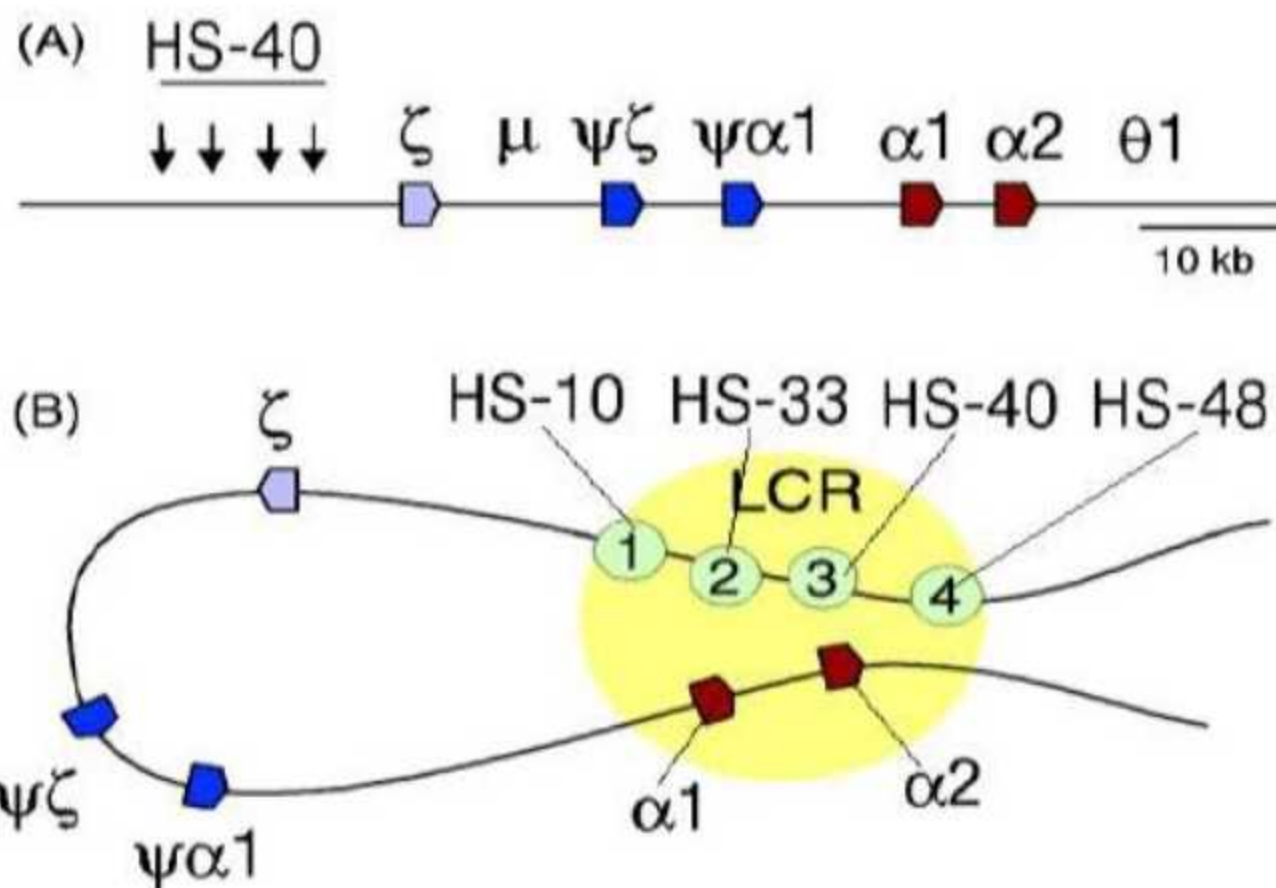
گاهی عنوان می‌شود، وقتی دو ژن  $\beta/\beta$  و چهار ژن  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$  وجود دارد، پس به دلیل بیان کمتر  $\beta$  نسبت به  $\alpha$ ، همه افراد جامعه نوعی  $\beta$ -تالاسمی دارند، حال آنکه نسبت بیان ژن  $\alpha:\beta$  حدود  $1/2$  بوده و ژن  $\beta$  بسیار قدرتمند می‌باشد. در واقع ژن  $\beta$  نسبت به ژن  $\alpha$  دارای یک پروموتور بسیار قوی (۸ باز متفاوت)، دو توالی انهناسر (۳ موتیف GATA) و ۹ موتیف مختلف در نواحی تنظیمی بالادست خود می‌باشد (در برابر ۲ موتیف ژن آلفا)، mRNA آن از نیمه عمر بیشتر و میزان ترجمه بیشتری برخوردار بوده و برخلاف ژن  $\alpha 2$  که رقیب قوی  $\alpha 1$  دارد، ژن  $\beta$  دارای یک رقیب  $\delta$  بسیار ضعیف و ناکارآمد می‌باشد. همه این موارد باعث می‌شوند تا ژن‌های چهارتایی  $\alpha$  نسبت به ژن‌های دوتایی  $\beta$  از برتری زیادی برخوردار نباشند و باعث بروز تالاسمی نشوند.



شکل ۳۲: تفاوت پروموتور (در ۱۸ باز) و رگولاتور بالادست (در ۷ موتیف) ژن بتا و آلفا که البته ژن بتا دارای انهناسر نیز می‌باشد و لذا بیان ژن بتا از قدرت بالایی نسبت به ژن منفرد آلفا برخوردار می‌باشد.



شکل ۳۲: تفاوت پروموتور (در ۱۸ باز) و رگولاتور بالادست (در ۷ موتیف) ژن بتا و آلفا که البته ژن بتا دارای انهناسر نیز می‌باشد و لذا بیان ژن بتا از قدرت بالایی نسبت به ژن منفرد آلفا برخوردار می‌باشد.



شکل ۲۶: برهمکنش بین مستررگولاتور دیستال هاپلوتایپ گلوبین‌های آلفا با دو ژن  $\alpha1$  و  $\alpha2$  که به دلیل نزدیکی HS-40 به ژن  $\alpha2$ ، بیان آن بیشتر از ژن  $\alpha1$  می‌باشد.



جدول ۳: مقدار بیان ژن‌های آلفا در شرایط مختلف تالاسمیک

	$\alpha_2\alpha_1$ (30+20)	$-\alpha_1$ (0+25)	$\alpha_2-$ (35+0)	-- (0+0)	$\alpha_2^T\alpha_1$ (10+15)	$\alpha_2\alpha_1^T$ (30+5)	$\alpha_2^T\alpha_1^T$ (10+5)
$\alpha_2\alpha_1$ (30+20)	N 100	C 75	C 85	T 50	C 75	C 85	T 65
$-\alpha_1$ (0+25)	C 75	T 50	T 60	H 25	T 50	T 60	H 40
$\alpha_2-$ (35+0)	C 85	T 60	C 70	H 35	T 60	C 70	T 50
-- (0+0)	T 50	H 25	H 35	HF 0	H 25	H 35	HF 15
$\alpha_2^T\alpha_1$ (10+15)	C 75	T 50	T 60	H 25	T 50	T 60	H 40
$\alpha_2\alpha_1^T$ (30+5)	C 85	T 60	C 70	H 35	T 60	C 70	T 50
$\alpha_2^T\alpha_1^T$ (10+5)	T 65	H 40	T 50	HF 15	H 40	T 50	H 30

بدین ترتیب شدت تالاسمی  $\alpha/\alpha-$  (0+25/0+25) و  $\alpha\alpha/--$  (0+0/30+20) بیشتر از تالاسمی  $\alpha/\alpha-$  (35+0/35+0) خواهد بود (به ترتیب با بیان ۵۰، ۵۰ و ۷۰ درصد) و جالب آنکه شدت تالاسمی  $\alpha/\alpha\alpha-$  با یک حذف ژنی (0+25/30+20) و بیان ۷۵٪ با شدت تالاسمی  $\alpha/\alpha-$  با دو حذف ژنی (35+0/35+0) و بیان ۷۰٪ برابری می‌کند.

$\beta$ -تالاسمی بیماری است که در آن نسبت زنجیره  $\alpha:\beta$  افزایش می‌یابد. لذا علت بروز آن الزاماً جهش  $\beta^0$  یا  $\beta^+$  در ژن گلوبین بتا و کاهش مقدار مخرج  $\alpha:\beta$  نبوده و گاهی تریپلیکاسیون ژن  $\alpha$  ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$  یا  $\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$ ) نیز با افزایش صورت کسر  $\alpha:\beta$  باعث افزایش نسبت مذکور و بروز  $\beta$ -تالاسمی می‌شود. عکس این قضیه در مورد  $\alpha$ -تالاسمی صادق بوده و گاهی داپلیکاسیون و تریپلیکاسیون ژن  $\beta$  نیز باعث افزایش زنجیره  $\beta$  و کاهش نسبت  $\alpha:\beta$  می‌شود. در نتیجه گاهی علت بروز  $\alpha$ -تالاسمی، اختلال در ژن  $\beta$ -تالاسمی خواهد بود و بالعکس. نکته قابل توجه آنکه در چنین نوعی از بتا-تالاسمی که ناشی از تریپلیکاسیون ژن  $\alpha$  می‌باشد، چون هاپلوتایپ ژن بتا سالم و دست نخورده است، لذا افزایش جبرانی  $Hb-A_2$  و  $Hb-F$  دیده نمی‌شود. عدم افزایش  $Hb-A_2$  در برخی از جهش‌های توالی Poly-A یا نواحی پایین دست کد ختم و همچنین در موارد کاهش کاذب  $Hb-A_2$  مثل فقر آهن، آنمی بیماری مزمن، کمکاری تیروئید، آنمی سیدروبلستیک، مسمومیت با سرب، هموگلوبین لپور و ... دیده می‌شود.

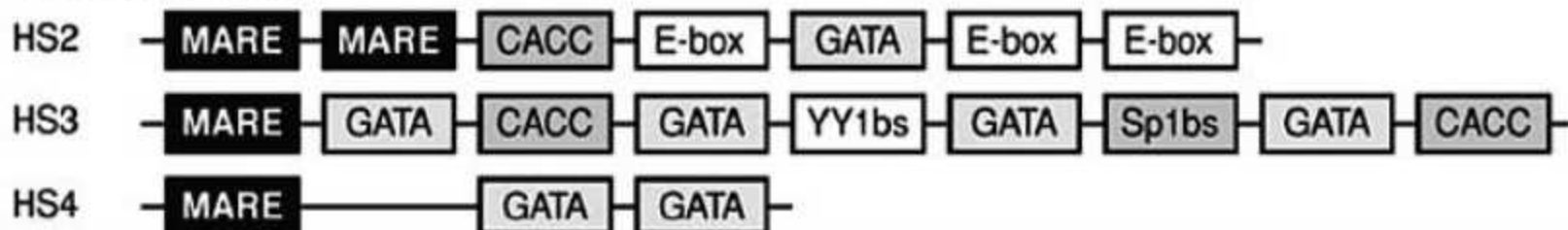


جدول ۲: وضعیت مقایسه‌ای CBC در شرایط مختلف تالاسمیک و سنین مختلف

$\alpha$ Globin Genotype	Age (y)	Hemoglobin (g/dL)	RBC ( $\times 10^{12}/L$ )	MCV (fL)	MCH (pg)	$\alpha/\beta$ ratio % HbH
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	1–4	$12.6\pm 0.8$	$4.55\pm 0.3$	$79\pm 4$	$27.5\pm 2.0$	$1.06\pm 0.11$ 0%
	5–9	$13.2\pm 0.8$	$4.6\pm 0.3$	$81\pm 4$	$28.5\pm 2.0$	
	10–15	$13.9\pm 1.0$	$4.7\pm 0.3$	$84\pm 4$	$29.5\pm 2.0$	
	$\geq 16$ M	$15.5\pm 1.0$	$5.2\pm 0.3$	$90\pm 5$	$30\pm 2.0$	
	F	$14.0\pm 1.0$	$4.6\pm 0.3$			
$\alpha-/\alpha-$	1–4	$10.1\pm 1.7$	$5.08\pm 0.30$	$63.0\pm 6.1$	$19.9\pm 6.1$	$0.72\pm 0.12$ 0%
	5–9	$10.8\pm 1.4$	$5.0\pm 0.5$	$66.2\pm 3.0$	$21.5\pm 0.9$	
	10–15	$12.0\pm 0.9$	$5.47\pm 0.49$	$72.1\pm 8.7$	$22.1\pm 2.3$	
	$\geq 16$ M	$13.9\pm 1.7$	$5.98\pm 0.81$	$71.6\pm 4.1$	$22.9\pm 1.3$	
	F	$12.0\pm 1.0$	$5.30\pm 0.49$			
$--/\alpha\alpha$ $-\alpha/-\alpha$	1–4	$11.2\pm 0.6$	$5.79\pm 0.58$	$60.7\pm 4.9$	$19.6\pm 1.2$	$0.65\pm 0.12$ 0%
	5–9	$11.0\pm 0.8$	$5.47\pm 0.48$	$62.5\pm 3.4$	$20.3\pm 0.8$	
	10–15	$12.2\pm 1.0$	$5.83\pm 0.70$	$67.5\pm 3.4$	$21.4\pm 1.8$	
	$\geq 16$ M	$13.7\pm 1.1$	$6.28\pm 0.63$	$69.1\pm 4.4$	$21.7\pm 1.7$	
	F	$12.1\pm 1.1$	$5.65\pm 0.49$			
$\alpha^T\alpha/-\alpha$	1–4	$10.8\pm 1.7$	$5.78\pm 0.30$	$59.0\pm 6.1$	$18.7\pm 6.1$	$0.82\pm 0.06$ 0%
	5–9	$11.4\pm 1.4$	$5.79\pm 0.5$	$60.2\pm 3.0$	$19.7\pm 0.9$	
	10–15	$12.0\pm 0.9$	$5.47\pm 0.49$	$72.1\pm 8.7$	$22.1\pm 2.3$	
	$\geq 16$ M	$12.3\pm 1.05$	$5.78\pm 0.81$	$66.1\pm 3.3$	$21.0\pm 1.5$	
	F	$10.6\pm 0.65$	$5.10\pm 0.37$			
$\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$	1–4	$7.98\pm 3.2$	$4.25\pm 2.30$	$63.3\pm 2.9$	$18.9\pm 2.8$	$0.47\pm 0.18$ $10.5\pm 7.6$
	5–9	$6.94\pm 1.4$	$3.59\pm 0.5$	$68.2\pm 3.0$	$19.7\pm 0.9$	
	10–15	$10.7\pm 2.8$	$5.97\pm 0.82$	$58.3\pm 5.7$	$17.8\pm 2.8$	
	$\geq 16$ M	$11.2\pm 0.5$	$5.82\pm 0.35$	$60.5\pm 4.77$	$18.9\pm 1.2$	
	F	$9.9\pm 1.4$	$5.21\pm 0.56$			

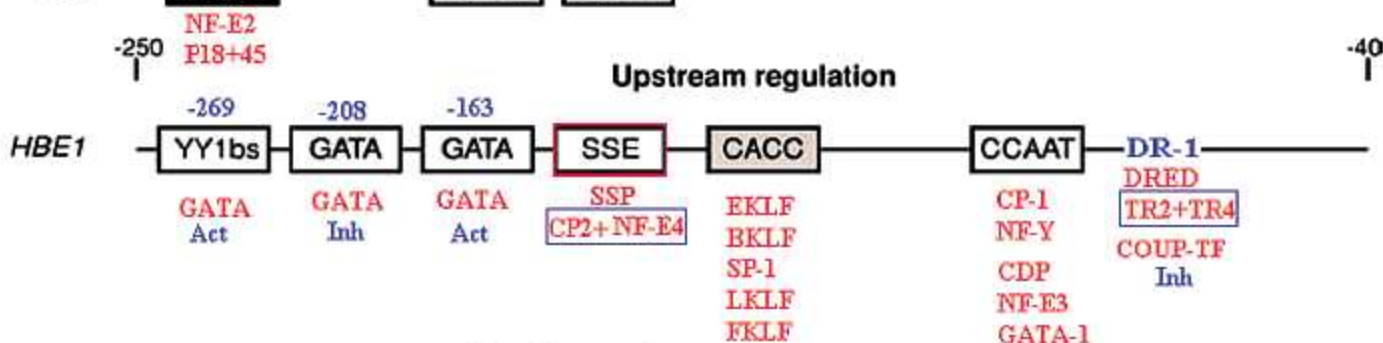
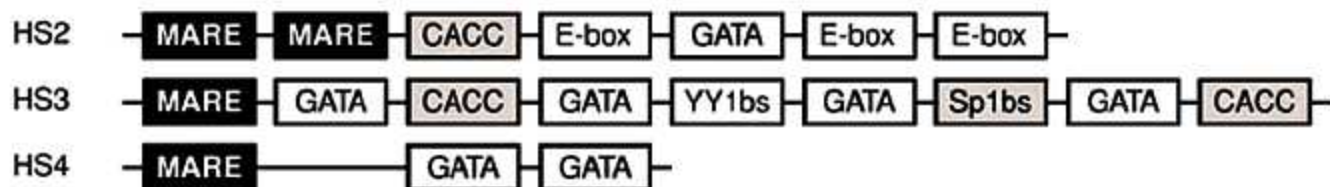
## Distal positive regulators 5' to genes

*HBB* locus control region

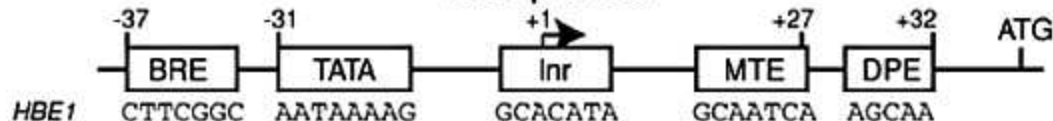


## Distal positive regulators 5' to genes

*HBB* locus control region



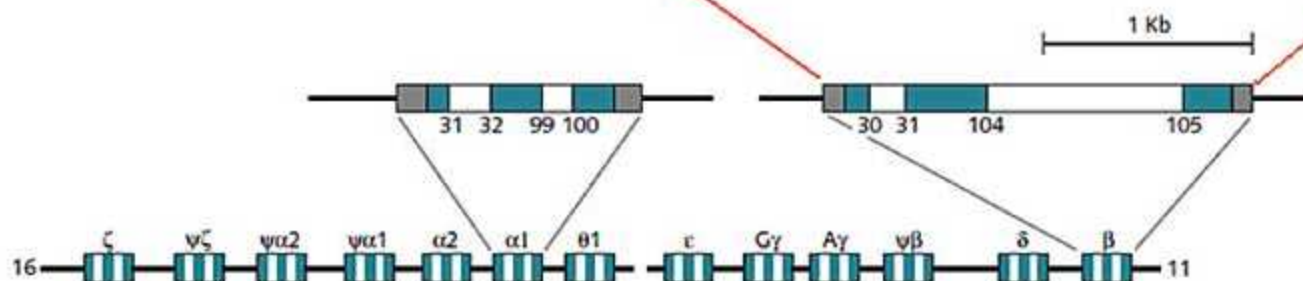
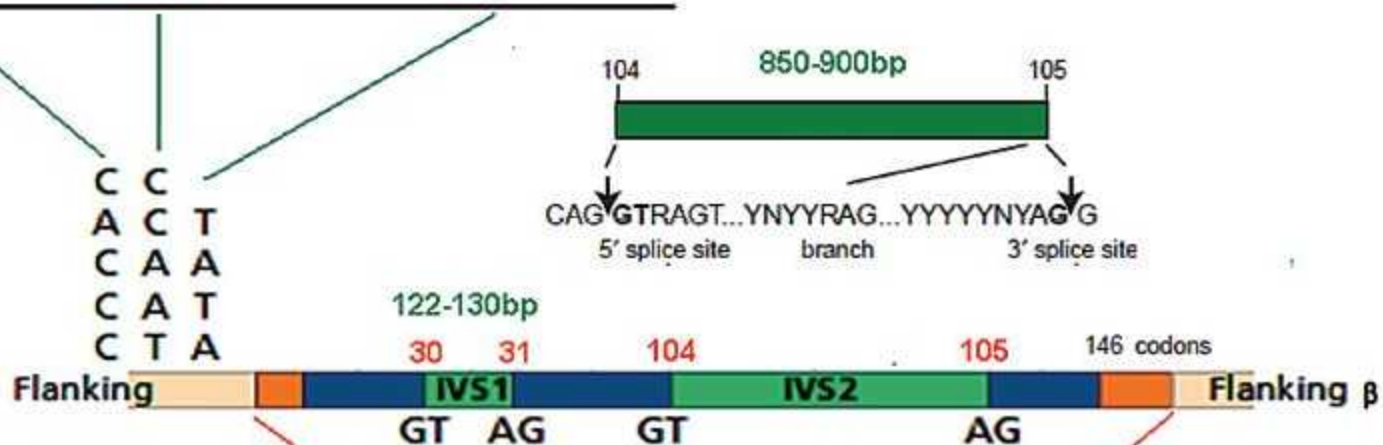
## Basal promoter



شکل ۱۶-۴۵: نواحی بالادست ژن  $\epsilon$  که برخی از موتیف‌های آن مثل DR-1, SSE و GATA:-208 اثر مهاري و خاموش کننده در بیان ژن  $\epsilon$  دارند [۳۲].

90-100bp

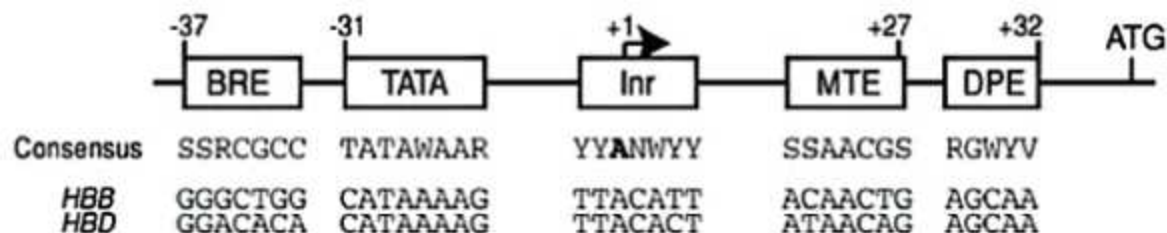
Gene	CACCC homology box	CCAAT homology box 70bp	TATA homology box 30bp
ζ		CCAAT	TATAAAC
α1 and α2		CCAAT	CATAAAC
ε		CCAAT	AATAAAG
γ and Aγ	CACCC	CCAAT/CCAAT	AATAAAA
β	CACCC	CCAAT	CATAAAA
δ		CCAAC	CATAAAA



شکل ۲۳-۲۹: همولوژی و شباهت پروموتور ژن گلوبین های مختلف انسان [۱۳]



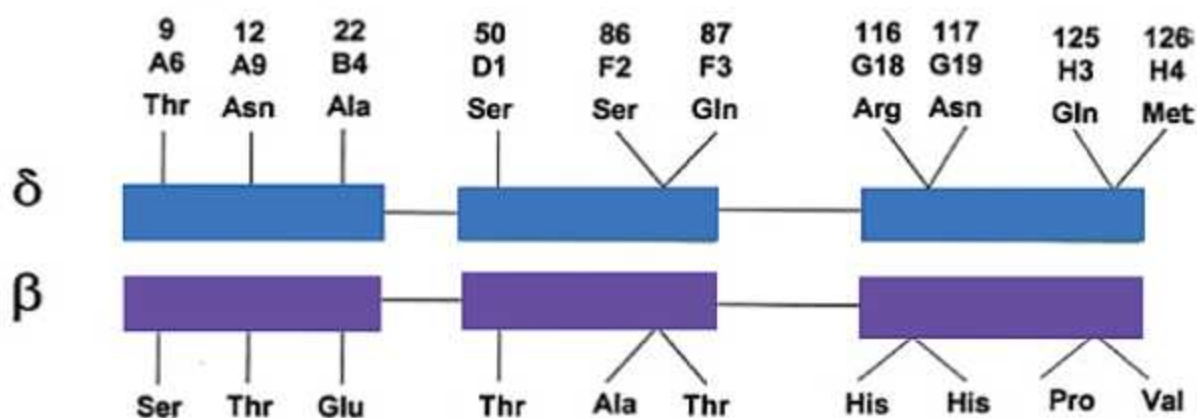
### A. Basal promoter



### B. Upstream regulation

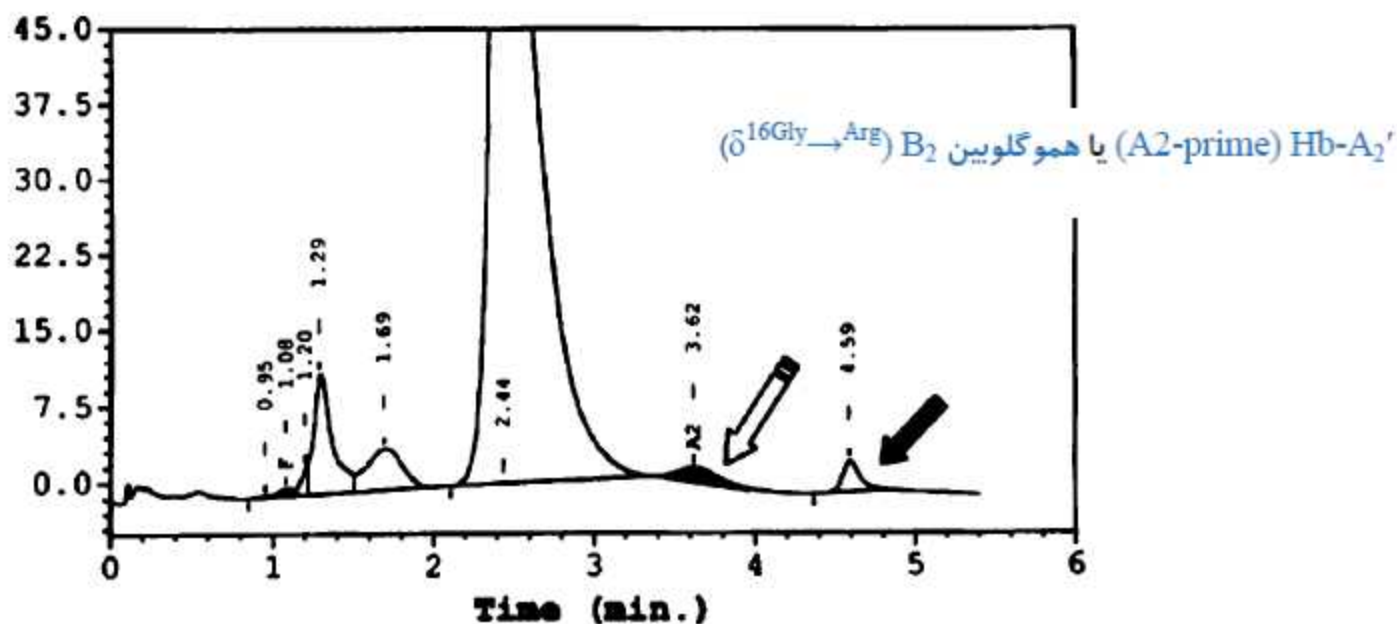


### C. Proximal enhancers 3' to genes



	2 His	10 Ala	11 Val	30 Arg	31 Leu	66 Lys	68 Leu	84 Thr	106 Leu	108 Asn	111 Val	120 Lys	132 Lys	142 Ala	145 Tyr	146 His
$\beta$	CAC	GCC	GTT	AGG	CTG	AAA	CTC	ACC	CTG	AAC	GTC	AAA	AAA	GCC	TAT	CAC
$\delta$	CAT	GCT	GTC	AGA	TTA	AAG	CTA	ACT	TTG	AAT	GTG	AAG	AAG	GCT	TAC	CAT

شکل ۲۹-۴۵: تفاوت‌های بین توالی پروموتوری، تعداد موتیف‌های نواحی تنظیمی، وجود یا عدم آنها و تفاوت آمینواسیدی و نوکلئوتیدی در دو گلوبین  $\delta$  و  $\beta$ . در جدول پایین، تفاوت نوکلئوتیدی مربوط به ۱۶ اسید آمینه نشان داده شده که تغییر کردن آنها باعث تغییر اسید آمینه آنها نشده است. در حالی که در ۱۰ اسید آمینه فوق (با ۱۴ نوکلئوتید متفاوت)، هم تغییر باز و هم تغییر اسید آمینه وجود دارد که اختلاف نوکلئوتیدی آنها نشان داده نشده است.



شکل ۴۷-۲۹: کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC). کروماتوگرام دو پیک مربوط به Hb-A2 را نشان می‌دهد. فلش سفید نمایانگر Hb-A2 و فلش سیاه نمایانگر Hb-A2' است [۱۳].

تاکنون ۶۰ واریانت  $\delta$  شناسایی شده است که شایع‌ترین آنها، Hb-B<sub>2</sub> یا Hb-B<sub>2</sub>-Gly16Arg و Hb-S و Hb-C، سومین واریانت شایع در دنیا محسوب می‌شود. در واریانت‌های  $\delta$ ، نصف Hb-A<sub>2</sub> از نوع واریانت و نصف از نوع نرمال می‌باشد ولی مجموع آنها برابر A2 طبیعی می‌باشد. مقدار متوسط Hb-A<sub>2</sub> حدود ۱/۷٪ و مقدار متوسط Hb-B<sub>2</sub>/A<sub>2</sub>' حدود ۱/۳٪ می‌باشد. تاکنون سه واریانت طبیعی از گلوبین  $\delta$  نیز شناسایی شده است که (i) **Hb-A2 flatbush** یا HBD-Ala22Glu، (ii) **Hb-A2 Coburg** یا HBD-Arg116His و (iii) **Hb-A2 Parchman** یا HBD-Ala22Glu, Ser50Thr نامیده می‌شوند. تالاسمی  $\delta$  در بعضی از نژادهای شایع بوده ولی علائم خاصی را بروز نمی‌دهد، به عنوان مثال، ۱٪ افراد ساردینیا به تالاسمی  $\delta$  مبتلا هستند. تالاسمی‌ها و واریانت‌های زنجیره  $\delta$  دارای اهمیت عملکردی نیستند، با این وجود بعضی از انواع آنها ناپایدار بوده و یا افزایش تمایل نسبت به اکسیژن دارند ولی به هر حال به دلیل مقدار کم آنها و نداشتن علائم بالینی، تشخیص واریانت‌های  $\delta$  بسیار مشکل می‌باشد. نکته قابل توجه این است که وجود این هموگلوبین‌ها تشخیص صفت تالاسمی  $\beta$  را نیز با مشکل روبرو می‌سازند. اتصال گلوبین  $\delta$  با واریانت  $\alpha$  (مثل  $\alpha$ -فیلادلفیا) باعث تشکیل Hb-G2 یا  $\alpha^{\text{Phi}}_2\delta_2$  می‌شود که به دلیل پتانسیل مثبت، اندکی کاتدی‌تر از Hb-A2 حرکت کرده و باند آن را دو تکه یا اسپلیت می‌کند.

**CBC**

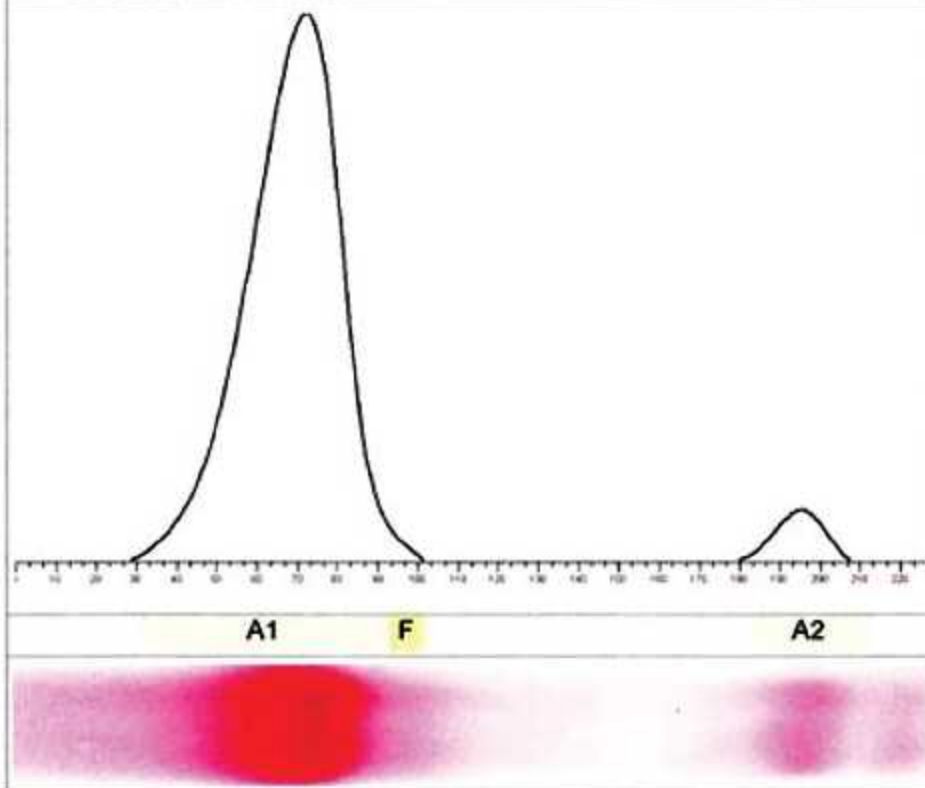
**WBC :** 4.9 x1000/mm<sup>3</sup>    **MCV :** 66.1 fL  
**RBC :** 5.64 mil/mm<sup>3</sup>    **MCH :** 21.8 Pg  
**HGB :** 12.3 g/dl    **MCHC :** 33 %  
**HCT :** 37.3 %    **RDW :** 14.7

**Results**

No.	Fraction	(%)	Flag	Normal (%)	g/dl
1	A1	94.2	L	95 - 98.5	11.6
2	F	1		0 - 2	0.1
3	A2	4.8	H	1.5 - 3.5	0.6

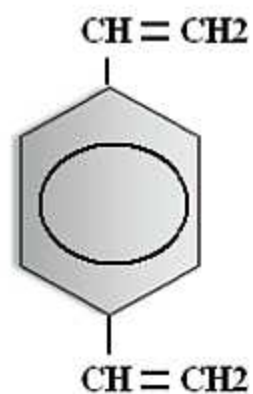
**Chemical Methods**

**Hb A2 ( Ion-Exchange chromatography ) :** 5 %  
**Hb F ( Alkali Denaturation ) :** 0.5 %

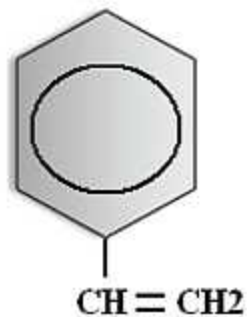
**Electrophoresis Pattern**

شکل ۶۰-۴۶: نتیجه مقدار Hb-A2 در یک بیمار مبتلا به بتا تالاسمی مینور با دو روش الکتروفورز و میکروستون (AEC)

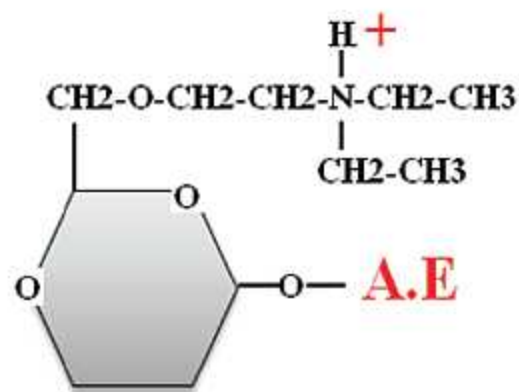
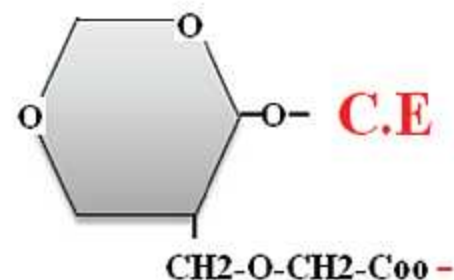




Di Vinyl Benzen

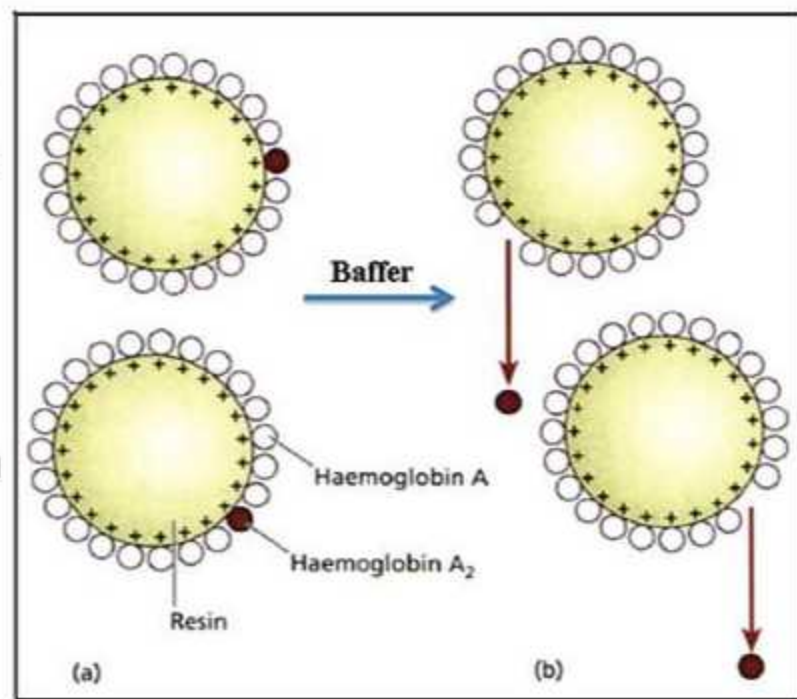
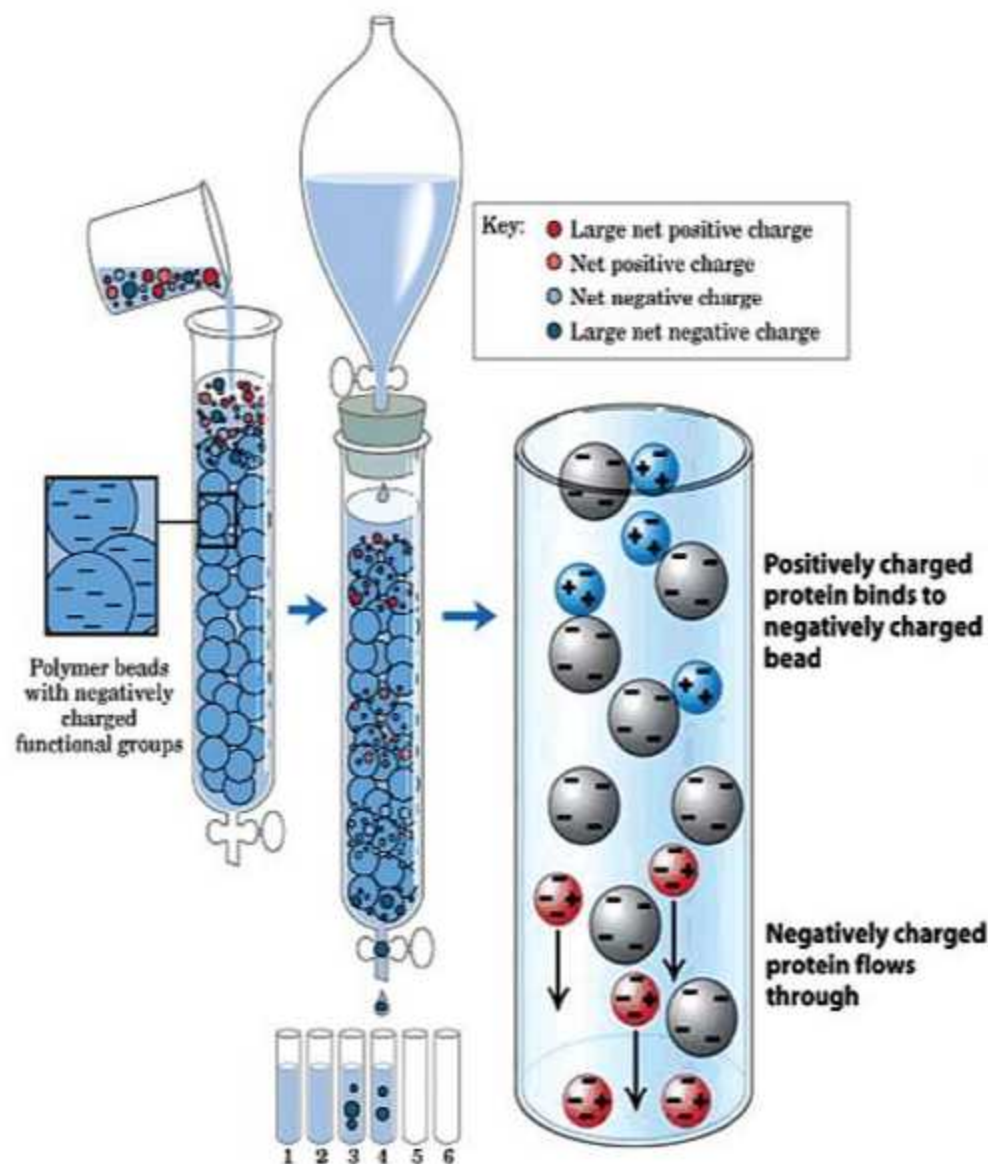


Venyl Benzen

Di Ethyl Amino Ethyl-Cellulose  
DEAE-Cellulose

Carboxy Methyl Cellulose

شکل ۵۷-۴۶: انواع ترکیبات رزینی معروف جهت تعویض یونی با آنیون‌ها و کاتیون‌ها [۱۴].



شکل ۵۶-۴۶: کروماتوگرافی تعویض یونی برای جداسازی Hb-A<sub>2</sub> (با حداقل بار منفی نسبت به هموگلوبین های S.F.A.H) در pH قلیایی هر دو هموگلوبین A (سفید) و A<sub>2</sub> (قرمز) دارای بار منفی بوده و به رزین های دارای بار مثبت Anion Exchange متصل می شوند. (B) با افزودن بافر شستشوی حاوی آنیون (با pH و قدرت یونی مشخص)، Hb-A<sub>2</sub> به دلیل شارژ منفی کم، جای خود را به آنیون های بافر داده و خود از رزین کنده شده و از ستون خارج می شود که با سنجش مقدار آن و محاسبه نسبت آن از کل هموگلوبین، درصد Hb-A<sub>2</sub> بدست می آید [۱۴].

## مراحل آزمایش کروماتوگرافی تعویض یونی:

مرحله اول، تهیه رزین:

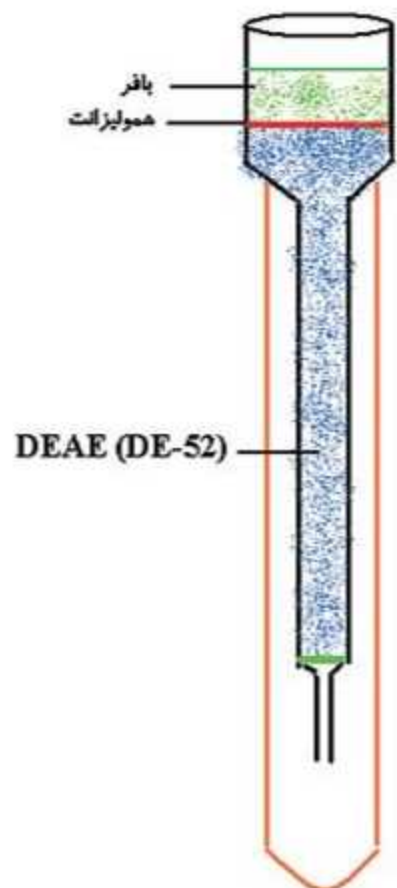
۱۰۰g رزین DEAE cellulose شماره ۵۲ که به DE-52 معروف است را در ۴۰۰ml بافر I (بافر گلیسین) خیس نمایید. از آن جایی که شماره ۵۲، نشانه شدت و میزان اتصال باندهای متصل شده بین مولکولهای رزین و در نتیجه قطر منافذ بین آن است، رعایت آن فوق العاده حائز اهمیت است. بعد از ۱۰ دقیقه محلول رویی را دور ریخته و تا سه بار عمل خیساندن رزین را تکرار نمایید. در پایان، با افزودن بافر گلیسین، pH نهایی را با کمک دستگاه pH متر در حد ۷/۵ تنظیم کنید. در این pH، گروههای فانکشنال رزین بار مثبت به خود گرفته و به عنوان یک Anion Exchange عمل می کند.

**بافر گلیسین با  $\text{pH}=7.5$ :** ۱۵g گلیسین و ۰/۱g سیانور پتاسیم را در یک ارلن یک لیتری ریخته و حجم نهایی را با آب مقطر به یک لیتر می رسانیم. سپس با دستگاه pH متر و با استفاده از HCL یا NaOH (سود)، pH بافر را در ۷/۵ ثابت می نماییم.

در ستونهای تجاری، داخل هر ستون ۳-۴ml بافر I و مقداری رزین وجود داشته و دو انتهای ستون نیز توسط درپوشی مسدود می باشد. هنگام کار با ستون، چندین بار ستون را سرو ته می کنیم تا رزین آن کاملاً مخلوط و هموژن شود، برای اطمینان کار می توان با یک پی پت پاستور نیز رزین داخل ستون را پی پتاژ کرد تا رزین کاملاً یکنواخت شود. بعد از هم دما شدن ستون با دمای محیط، درپوش نوک ستون را برداشته و ستون را به طور عمودی در داخل یک لوله آزمایش قرار می دهیم تا بافر آن خارج و در نتیجه دانه های رزین در داخل ستون ته نشین شوند. با شستشوی چندباره ستون از بالا می توان رسوب رزین را بهتر و متراکم تر نمود.

در ستونهای غیر تجاری، یک پی پت پاستور را به پایه فلزی بسته و به داخل آن یک تکه کوچک پنبه گذاشته و به کمک میله، پنبه را تا ابتدای قسمت نازک پی پت پاستور هل می دهیم. سپس تا ارتفاع ۳-۴cm به داخل پی پت، رزین آماده و خیس را افزوده و اجازه می دهیم تا با خروج بافر اضافی آن، رزین در پی پت رسوب کند (شکل ۵۸-۴۶).





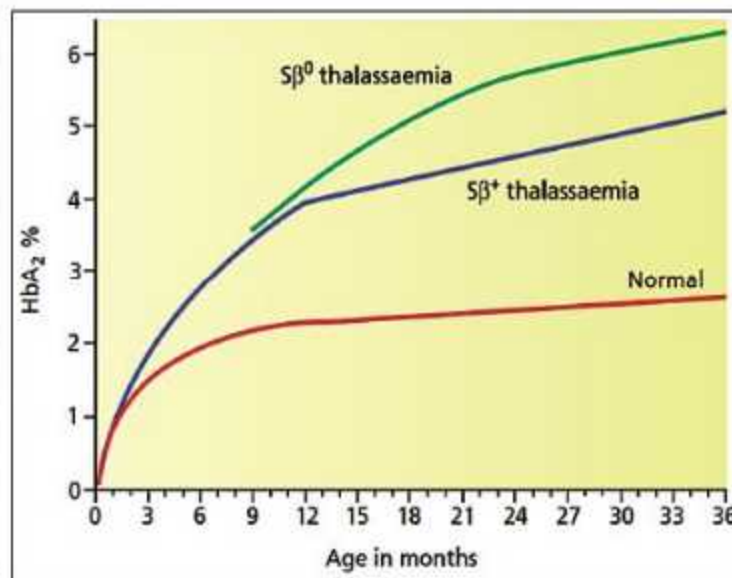
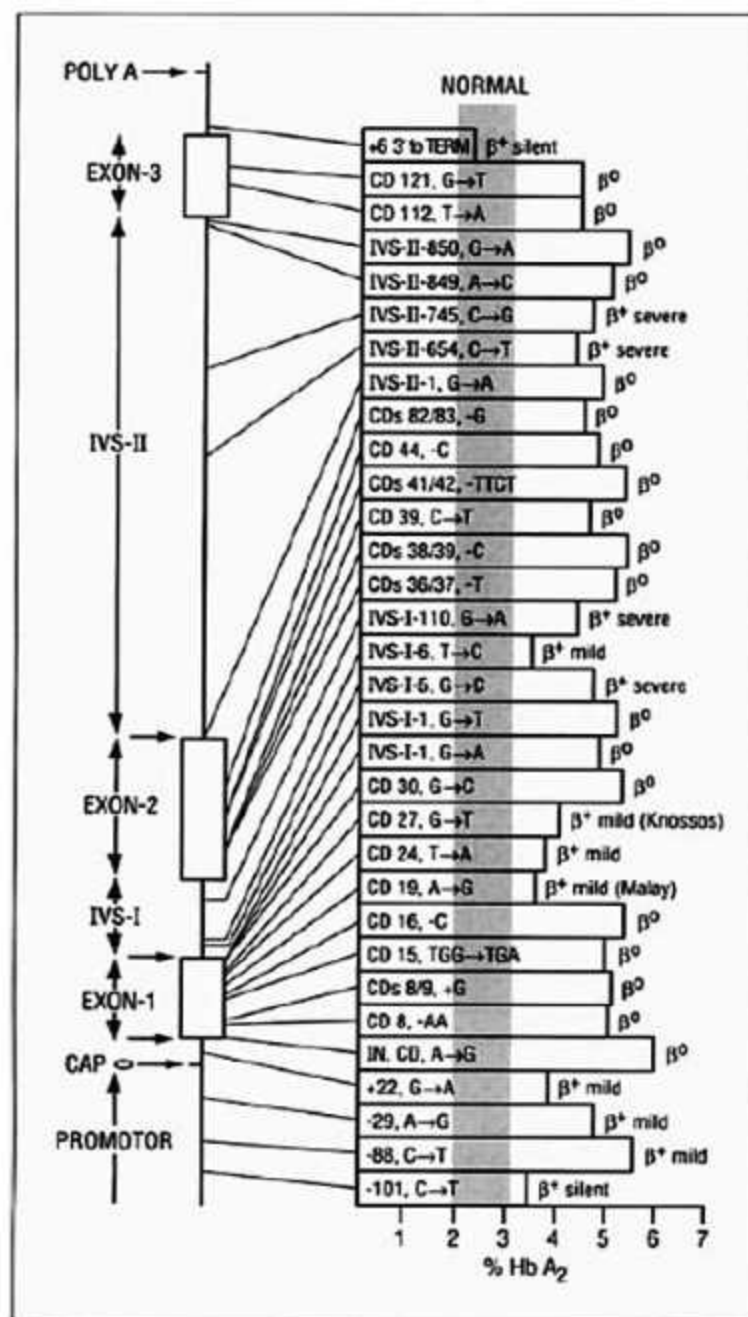
شکل ۵۸-۴۶: آماده سازی ستون تجاری یا پی پی ت پاستور: در این مرحله هر چند بافر قطره قطره از نوک پیپت پاستور خارج می شود، ولی رزین از آن خارج نشده و حتی به تدریج متراکم می گردد. دقت کنید که رزین بدون بافر نمانده و خشک نگردد. اگر پنبه گذاشته شده در ته قسمت بدنه پیپت پاستور کم باشد، رزین نیز همراه با بافر از پیپت پاستور خارج می شود. لذا تعیین مقدار صحیح پنبه ضروری است. آنقدر این کار را ادامه دهید تا حدود ۳ سانتیمتر رزین متراکم شده در پیپت پاستور جمع گردد. توجه داشته باشید که سرعت افزودن بافر اول به ستون برابر با سرعت خروج آن از نوک پیپت پاستور باشد، تا نه رزین خشک گردد و نه لبریز شود.

**در مرحله دوم،** ۱۰۰  $\mu\text{l}$  همولیزانت را بدون اینکه اجازه دهیم آخرین قطرات بافر اولیه خارج شده و باعث خشکی بافر شود، به دیواره پی‌پت پاستور یا میکروستون اضافه نموده و ۵ دقیقه به آن وقت می‌دهیم تا همولیزانت جذب رزین‌های رأس ستون شود. در این مرحله، هموگلوبین‌ها که همگی دارای بار منفی بوده و به‌عنوان آنیون عمل می‌کنند، به رزین‌های مثبت DE-52 متصل شده و در رأس ستون باقی می‌مانند. همزمان با افزودن همولیزانت، (۱) لوله زیر ستون که حاوی بافرهای اضافی است را عوض کرده و به‌جای آن یک لوله خالی قرار می‌دهیم، (۲) برای تهیه Hb توتال، ۱۰۰  $\mu\text{l}$  از همولیزانت را نیز به ۱۴/۹ ml آب مقطر افزوده و آن را در ورتکس، میکس می‌کنیم (حجم کلی ۱۵ ml).

**تهیه همولیزانت:** ۲۵  $\mu\text{l}$  پک‌سل شسته شده را با ۳۰۰  $\mu\text{l}$  محلول لیزانت ترکیب و بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه و ورتکس شدید و سپس سانتریفوژ، ۱۰۰ لانداز همولیزانت رویی آن را مورد استفاده قرار می‌دهند. لازم به ذکر است که در این مرحله، هرچقدر همولیزانت رقیق‌تر باشد، جداسازی Hb-A<sub>2</sub> نیز بهتر انجام می‌شود، لذا گاهی همولیزانت آماده شده را ابتدا با DW به نسبت ۱-۲ رقیق نموده و سپس به ستون اضافه می‌کنند.

**در مرحله سوم،** چند میلی‌لیتر از بافر II (بافر گلیسین حاوی کلرور سدیم با pH~7.5) را به آرامی به دیواره داخلی ستون اضافه می‌کنیم. این بافر به دلیل داشتن آنیون‌های Cl<sup>-</sup> با Hb-A<sub>2</sub> که بعد از Hb-C، کمترین بار منفی را در بین بقیه هموگلوبین‌ها دارد، عمل تعویض آنیونی انجام داده و با جدا کردن Hb-A<sub>2</sub> از رزین، خود بر سر جای آن می‌نشیند. Hb-A<sub>2</sub> جدا شده، همانند یک نوار صورتی رنگ و مشخص شروع به پایین آمدن در طول دیواره ستون کرده و از بقیه هموگلوبین‌ها جدا می‌شود. حلقه A<sub>2</sub> را در لوله آزمایش جمع کرده و چند سی‌سی بافر بیشتر نیز به ستون اضافه می‌کنیم تا تمامی باند A<sub>2</sub> جدا شود (مدت زمان تقریبی ۲۰ دقیقه). حجم کلی بافر حاوی Hb-A<sub>2</sub> را با DW به ۳ ml رسانده و OD آن را در طول موج ۴۱۵ nm اسپکتروفوتومتر به‌عنوان OD-A<sub>2</sub> و در برابر بلانک آب مقطر (یا بافر I) اندازه‌گیری می‌کنیم. سپس OD هموگلوبین توتال Hb-T را نیز در همین طول موج به‌عنوان OD-st اندازه‌گیری می‌کنیم.

**بافر گلیسین حاوی کلرور سدیم با pH~7.5:** ۱۵ g گرم، ۰/۱ سیانور پتاسیم و ۱۱/۷ g کلرور سدیم را در یک ارلن یک لیتری ریخته و حجم نهایی را با آب مقطر به یک لیتر می‌رسانیم. سپس pH بافر را با دستگاه pH متر در ۷/۵ ثابت می‌نماییم.



شکل ۴۶-۲۹: (چپ) متوسط مقدار Hb-A2 در ۶۰۰ بیمار مبتلا به  $\beta$ -تالاسمی که موارد  $\beta^0$  و  $\beta^+$  شدید، از درصد Hb-A2 بالاتری در مقایسه با  $\beta^+$  خفیف برخوردار هستند. در این گراف، متوسط Hb-A2 آلتل هتروزیگوت بررسی شده است. تصویر راست) افزایش محدود Hb-A2 در شرایط مختلف طبیعی و غیرطبیعی ( $\beta$  تالاسمی‌ها)



الف) عوامل افزایش دهنده درصد Hb-A<sub>2</sub>

- پرکاری تیروئید، درمان عفونت HIV با زیدوودین، CDA-I، هموگلوبین ناپایدار، ۲۰٪ موارد سودوگزانتوما الاستیکم
- آنمی مگالوبلاستیک ناشی از فقر فولات یا B12 (در برخی موارد)، مالاریا و برخی از موارد اسفروسیتوز ارثی
- لازم به ذکر است که فقر اسید فولیک باعث کاهش درصد Hb-A<sub>2</sub> در افراد مبتلا به خصیصه بتا تالاسمی (مینور) می‌شود.

ب) عوامل کاهش دهنده درصد Hb-A<sub>2</sub>

- فقر آهن، آنمی بیماری‌های مزمن، آنمی سیدروبلستیک، مسمومیت با سرب، هموگلوبین لپور
- لوسمی JMML، بیماری Hb-H اکتسابی (MDS)، برخی از موارد AML و به‌ویژه M6، برخی از موارد آنمی آپلاستیک، کم-کاری تیروئید و موارد افزایش سنتز Hb-F ناشی از شیمی درمانی و HPFH که Hb-A<sub>2</sub> کاهش دارد.

جدول ۹-۲۹: برخی از علل ارثی و اکتسابی افزایشدهنده یا کاهشدهنده درصد Hb-A<sub>2</sub>Low HbA<sub>2</sub> levels

Iron deficiency	lowest with increasing severity
G-6-PD deficiency	reports are conflicting – levels probably not reduced
α Thalassemia	related to severity of the thalassemia
Myelodysplastic syndromes	only in a minority of cases
Hb Lepore	half normal in heterozygotes
Gene deletion hereditary persistence of HbF	half normal in heterozygotes
δβ Thalassemia	half normal in heterozygotes
δ Thalassemia	usually approximately half normal
HbA <sub>2</sub> variants	variant can be poorly expressed
Sideroblastic anemia	due to impaired α-globin synthesis
Juvenile chronic granulocytic leukemia with increased HbF	only in a minority of cases
Acute myelocytic leukemia	minor reduction
α-Globin gene variants	hybrid HbA <sub>2</sub> might not separate

Increased HbA<sub>2</sub>

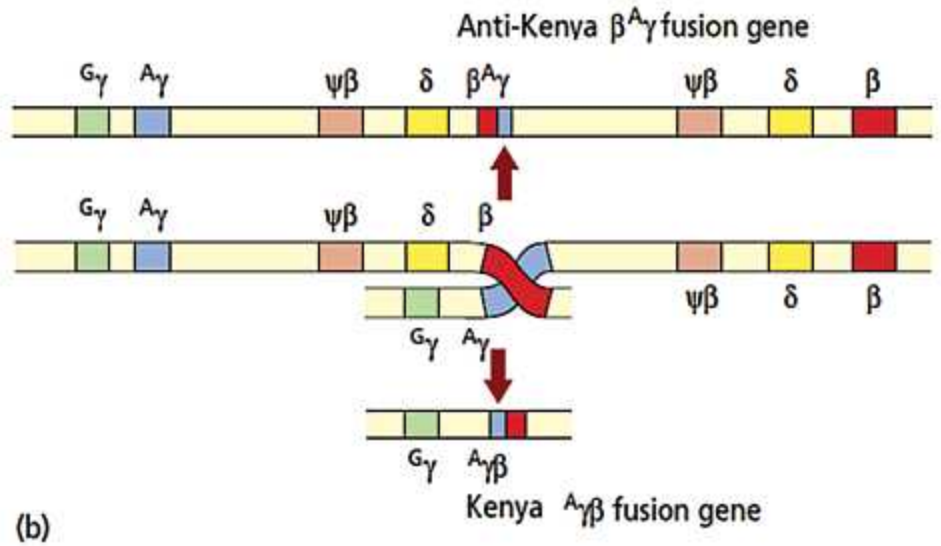
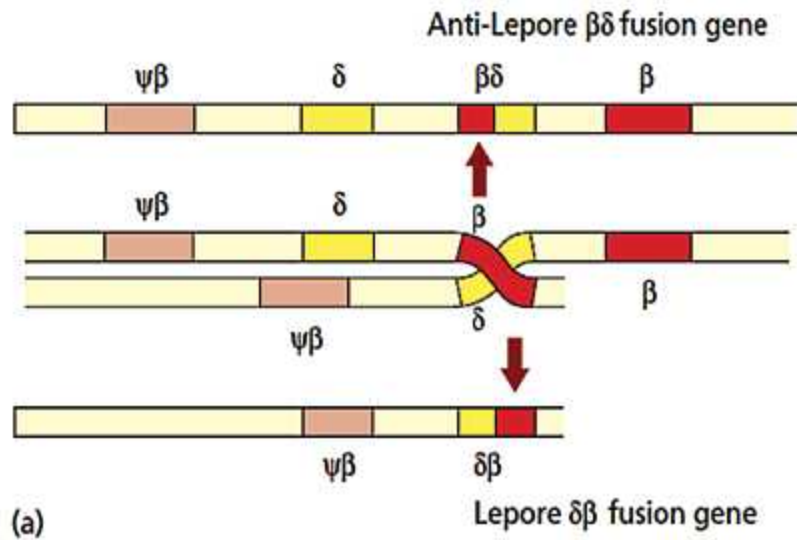
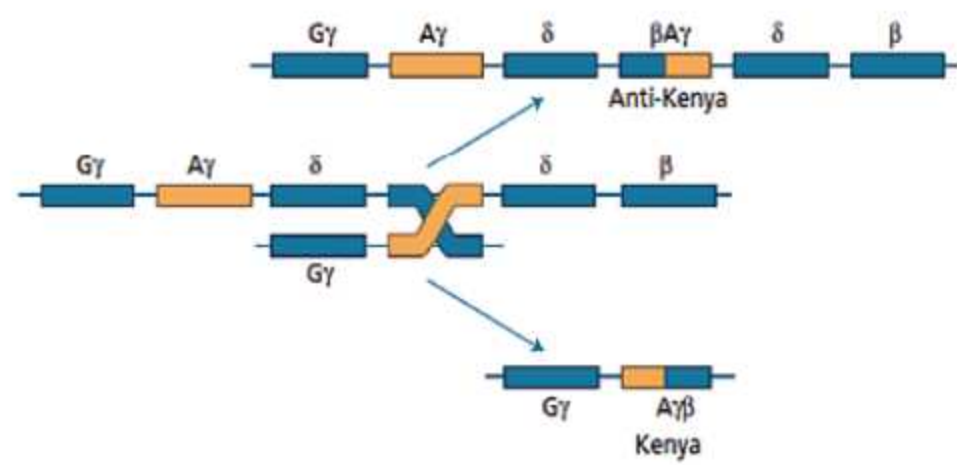
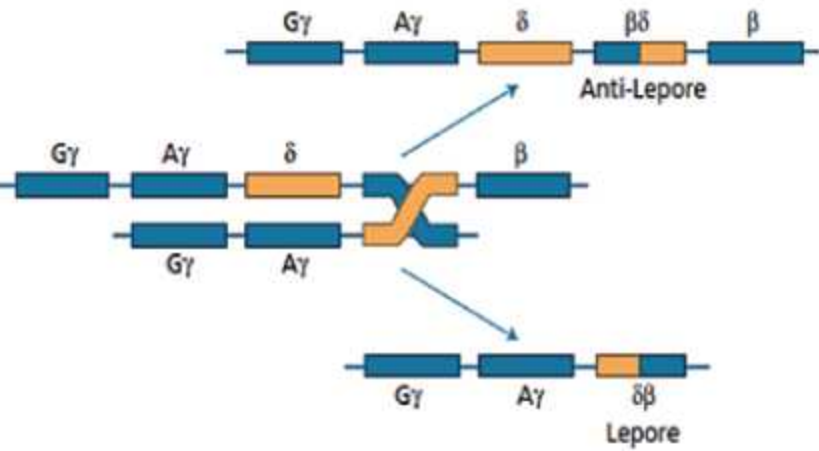
## Proven Cases

β Thalassemia	4%–6%, rarely up to 12%, microcytosis
Sickle cell anemia–α thalassemia	4%–5%, microcytosis, similar to HbS–β <sup>0</sup> thalassemia
Megaloblastic anemia	modest increases
Unstable hemoglobinopathies	not uniformly found
Zidovudine-treated HIV patients	HbA <sub>2</sub> lower than in β thalassemia, macrocytosis
CDA, Type I	HbA <sub>2</sub> lower than in β thalassemia, macrocytosis
Hyperthyroidism	HbA <sub>2</sub> lower than in β thalassemia, rare, normal red blood cell indices, no thalassemia
Normal individuals	

## Doubtful Cases

Malaria
Sickle cell trait
Sickle cell anemia
Hereditary spherocytosis

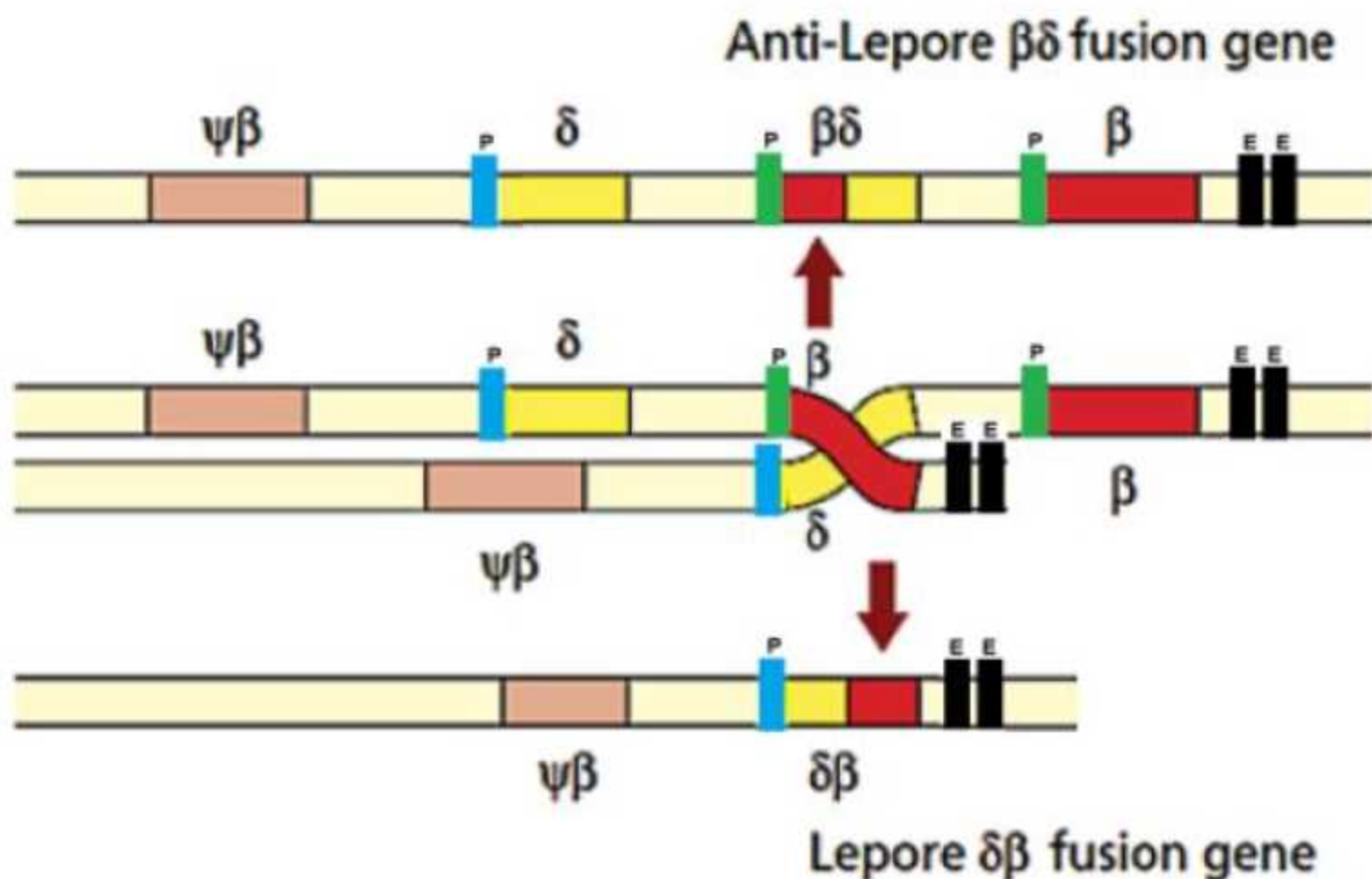
دامنه مرجع %	تفسیر
$> 7\%$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- وجود هموگلوبین A2 به تنهایی بسیار نادر است</li> <li>- موارد نادری از موتاسیون‌های <math>\beta</math> تالاسمی</li> </ul>
$7-8/3\%$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- خصیصه <math>\beta</math> تالاسمی - برخی از هموگلوبین‌های ناپایدار</li> <li>- خصیصه سلول‌های داسی (<math>\beta/S</math>)، آنمی داسی شکل (S/S) و آنمی مگالوبلاستیک</li> </ul>
$7-3/4-3/3\%$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- فقر آهن بسیار شدید همراه با خصیصه <math>\beta</math> تالاسمی</li> <li>- همراهی واریانت‌های زنجیره دلتا (<math>\delta</math>) با خصیصه <math>\beta</math> تالاسمی</li> <li>- تاثیر متقابل تالاسمی <math>\alpha</math> و <math>\beta</math></li> <li>- موتاسیون‌های نادر <math>\beta</math> تالاسمی</li> <li>- حضور هموگلوبین S (در این مورد صحت اندازه‌گیری هموگلوبین A2 مشکل می‌شود)</li> <li>- تاثیر متقابل تالاسمی <math>\alpha</math> و هموگلوبین S</li> <li>- خطاهای آنالیتیکال (آزمایش باید تکرار شود)</li> </ul>
$3-2/3\%$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- فرد طبیعی</li> <li>- <math>\delta\beta</math> تالاسمی (اگر هموگلوبین F بالا باشد)</li> <li>- موارد نادر خصیصه <math>\beta</math> تالاسمی (شامل همراه شدن <math>\beta</math> با <math>\delta</math>، <math>\alpha</math> و خصیصه لپور)</li> <li>- خصیصه <math>\alpha</math> تالاسمی</li> </ul>
$< 2\%$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\delta\beta</math> تالاسمی (اگر هموگلوبین F بالا باشد)</li> <li>- خصیصه <math>\alpha</math> تالاسمی و بیماری Hb-H</li> <li>- حضور واریانت‌های زنجیره دلتا</li> </ul>



شکل ۲۸-۴۵: بعضی از انواع ژن‌های ادغامی که توسط کراسینگ اورهای غیرهومولگ ایجاد می‌شوند. (a) شکل‌گیری ژن‌هایی که هموگلوبین‌های لیپور و آنتی لیپور را تولید می‌کنند. (b) شکل‌گیری ژن‌هایی که هموگلوبین‌های کنیا و آنتی کنیا را تولید می‌کنند. هر دوی آنتی کنیا و لیپور به جز ژن ادغامی دارای ژن‌های طبیعی نیز هستند، از این رو با علائم بالینی همراه نیستند [۷].







شکل ۳۲: در گلوبین لپور برخلاف گلوبین  $\delta$ ، انهناسر ژن  $\beta$  نیز به ارث می‌رسد، لذا علی‌رغم داشتن پروموتور بسیار ضعیف  $\delta$ ، بیان لپور تا حدودی بیشتر از بیان ژن  $\delta$  خواهد بود.

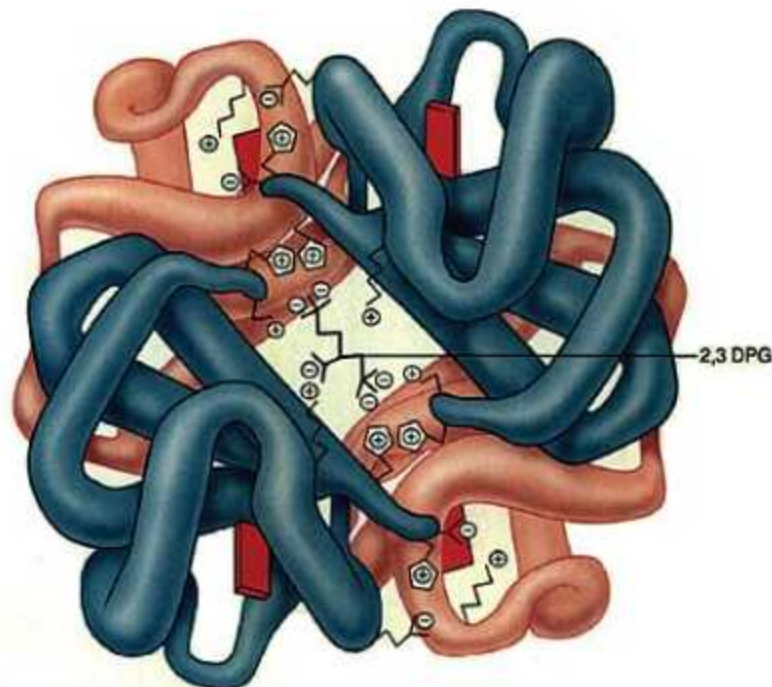
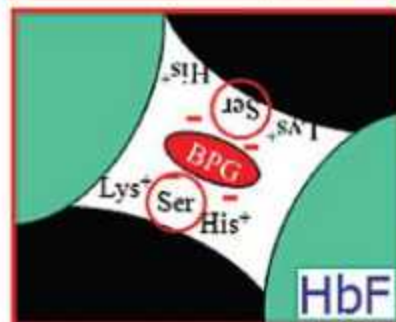
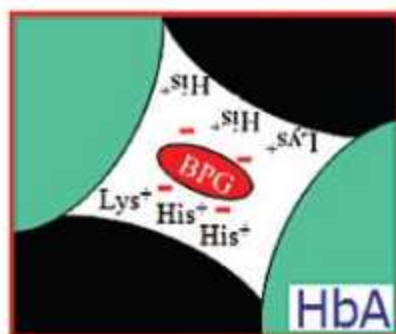
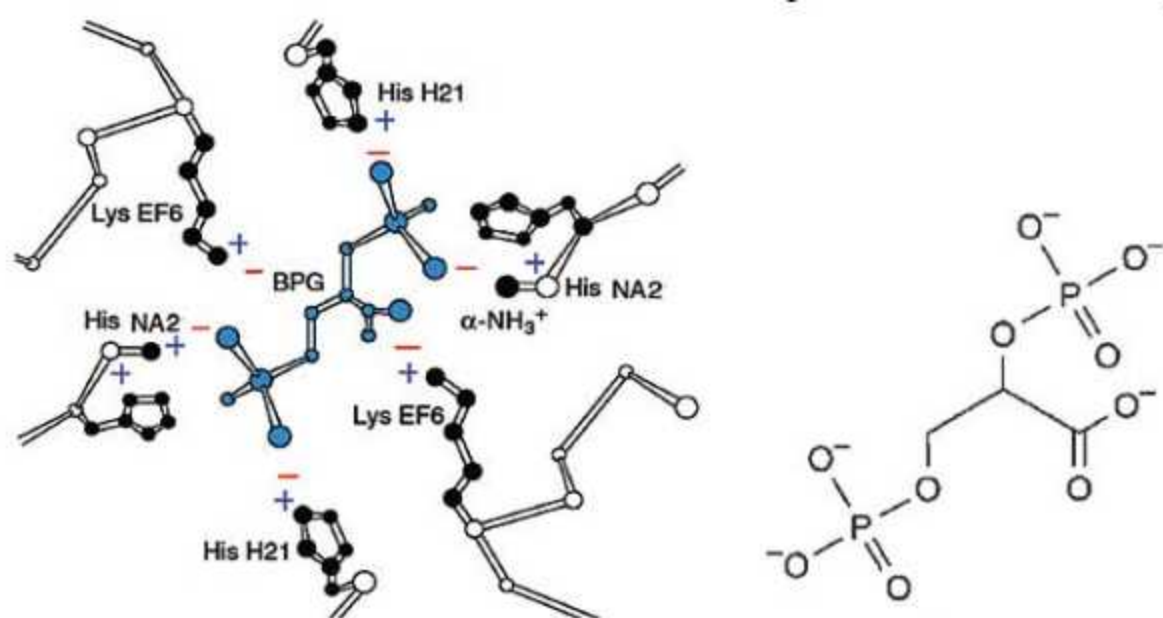
Helix #	Amino Acid Sequence*					
	# $\alpha$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	# $\beta$
NA1	1	Val	Val	Gly	Val	1
NA2	2	Leu	His	His	His	2
NA3			Leu	Phe	Leu	3
A1	3	Ser	Thr	Thr	Thr	4
A2	4	Pro	Pro	Glu	Pro	5
A3	5	Ala	Glu	Glu	Glu	6
A4	6	Asp	Glu	Asp	Glu	7
A5	7	Lys	Lys	Lys	Lys	8
A6	8	Thr	Ser	Ala	Thr	9
A7	9	Asn	Ala	Thr	Ala	10
A8	10	Val	Val	Ile	Val	11
A9	11	Lys	Thr	Thr	Asn	12
A10	12	Ala	Ala	Ser	Ala	13
A11	13	Ala	Leu	Leu	Leu	14
A12	14	Try	Try	Try	Try	15
A13	15	Gly	Gly	Gly	Gly	16
A14	16	Lys	Lys	Lys	Lys	17
A15	17	Val	Val	Val	Val	18
A16	18	Gly				
AB1	19	Ala				
B1	20	His	Asn	Asn	Asn	19
B2	21	Ala	Val	Val	Val	20
B3	22	Gly	Asp	Glu	Asp	21
B4	23	Glu	Glu	Asp	Ala	22
B5	24	Tyr	Val	Ala	Val	23
B6	25	Gly	Gly	Gly	Gly	24
B7	26	Ala	Gly	Gly	Gly	25
B8	27	Glu	Glu	Glu	Glu	26
B9	28	Ala	Ala	Thr	Ala	27
B10	29	Leu	Leu	Leu	Leu	28
B11	30	Glu	Gly	Gly	Gly	29
B12	31	Arg	Arg	Arg	Arg	30
B13	32	Met	Leu	Leu	Leu	31
B14	33	Phe	Leu	Leu	Leu	32
B15	34	Leu	Val	Val	Val	33
B16	35	Ser	Val	Val	Val	34
C1	36	Phe	Tyr	Tyr	Tyr	35
C2	37	Pro	Pro	Pro	Pro	36
C3	38	Thr	Try	Try	Try	37
C4	39	Thr	Thr	Thr	Thr	38
C5	40	Lys	Gln	Gln	Gln	39
C6	41	Thr	Arg	Arg	Arg	40
C7	42	Tyr	Phe	Phe	Phe	41
CD1	43	Phe	Phe	Phe	Phe	42
CD2	44	Pro	Glu	Asp	Glu	43
CD3	45	His	Ser	Ser	Ser	44
CD4	46	Phe	Phe	Phe	Phe	45
CD5	47	Asp	Gly	Gly	Gly	46
CD6	48	Leu	Asp	Asn	Asp	47
CD7	49	Ser	Leu	Leu	Leu	48
CD8			Ser	Ser	Ser	49

Helix #	Amino Acid Sequence*					
	# $\alpha$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	# $\beta$
D1	50	His	Thr	Ser	Ser	50
D2	51	Gly	Pro	Ala	Pro	51
D3			Asp	Ser	Asp	52
D4			Ala	Ala	Ala	53
D5			Val	Ile	Val	54
D6			Met	Met	Met	55
D7			Gly	Gly	Gly	56
E1	52	Ser	Asn	Asn	Asn	57
E2	53	Ala	Pro	Pro	Pro	58
E3	54	Gln	Lys	Lys	Lys	59
E4	55	Val	Val	Val	Val	60
E5	56	Lys	Lys	Lys	Lys	61
E6	57	Gly	Ala	Ala	Ala	62
E7	58	His	His	His	His	63
E8	59	Gly	Gly	Gly	Gly	64
E9	60	Lys	Lys	Lys	Lys	65
E10	61	Lys	Lys	Lys	Lys	66
E11	62	Val	Val	Val	Val	67
E12	63	Ala	Leu	Leu	Leu	68
E13	64	Asp	Gly	Thr	Gly	69
E14	65	Ala	Ala	Ser	Ala	70
E15	66	Leu	Phe	Leu	Phe	71
E16	67	Thr	Ser	Gly	Ser	72
E17	68	Asn	Asp	Asp	Asp	73
E18	69	Ala	Gly	Ala	Gly	74
E19	70	Val	Leu	Ile	Leu	75
E20	71	Ala	Ala	Lys	Ala	76
EF1	72	His	His	His	His	77
EF2	73	Val	Leu	Leu	Leu	78
EF3	74	Asp	Asp	Asp	Asp	79
EF4	75	Asp	Asn	Asp	Asn	80
EF5	76	Met	Leu	Leu	Leu	81
EF6	77	Pro	Lys	Lys	Lys	82
EF7	78	Asn	Gly	Gly	Gly	83
EF8	79	Ala	Thr	Thr	Thr	84
F1	80	Leu	Phe	Phe	Phe	85
F2	81	Ser	Ala	Ala	Ser	86
F3	82	Ala	Thr	Gln	Gln	87
F4	83	Leu	Leu	Leu	Leu	88
F5	84	Ser	Ser	Ser	Ser	89
F6	85	Asp	Glu	Glu	Glu	90
F7	86	Leu	Leu	Leu	Leu	91
F8	87	His	His	His	His	92
F9	88	Ala	Cys	Cys	Cys	93
FG1	89	His	Asp	Asp	Asp	94
FG2	90	Lys	Lys	Lys	Lys	95
FG3	91	Leu	Leu	Leu	Leu	96
FG4	92	Arg	His	His	His	97
FG5	93	Val	Val	Val	Val	98



Helix #	Amino Acid Sequence*					
	#	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	#
G1	94	Asp	Asp	Asp	Asp	99
G2	95	Pro	Pro	Pro	Pro	100
G3	96	Val	Glu	Glu	Glu	101
G4	97	Asn	Asn	Asn	Asn	102
G5	98	Phe	Phe	Phe	Phe	103
G6	99	Lys	Arg	Lys	Arg	104
G7	100	Leu	Leu	Leu	Leu	105
G8	101	Leu	Leu	Leu	Leu	106
G9	102	Ser	Gly	Gly	Gly	107
G10	103	His	Asn	Asn	Asn	108
G11	104	Cys	Val	Val	Val	109
G12	105	Leu	Leu	Leu	Leu	110
G13	106	Leu	Val	Val	Val	111
G14	107	Val	Cys	Thr	Cys	112
G15	108	Thr	Val	Val	Val	113
G16	109	Leu	Leu	Leu	Leu	114
G17	110	Ala	Ala	Ala	Ala	115
G18	111	Ala	His	Ile	Arg	116
G19	112	His	His	His	Asn	117
GH1	113	Leu	Phe	Phe	Phe	118
GH2	114	Pro	Gly	Gly	Gly	119
GH3	115	Ala	Lys	Lys	Lys	120
GH4	116	Glu	Glu	Glu	Glu	121
GH5	117	Phe	Phe	Phe	Phe	122

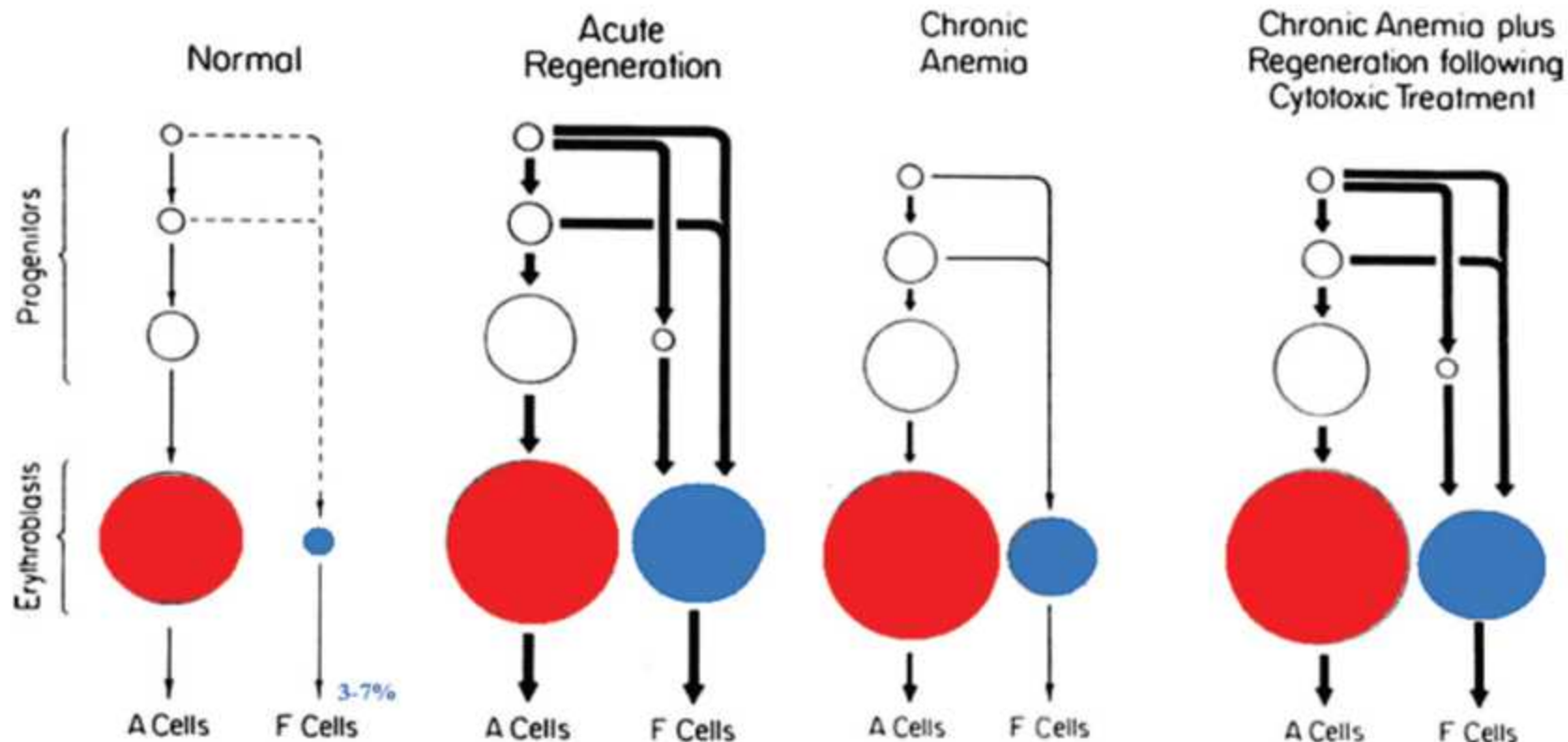
Helix #	Amino Acid Sequence*					
	#	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	#
H1	118	Thr	Thr	Thr	Thr	123
H2	119	Pro	Pro	Pro	Pro	124
H3	120	Ala	Pro	Glu	Gln	125
H4	121	Val	Val	Val	Met	126
H5	122	His	Gln	Gln	Gln	127
H6	123	Ala	Ala	Ala	Ala	128
H7	124	Ser	Ala	Ser	Ala	129
H8	125	Leu	Tyr	Try	Tyr	130
H9	126	Asp	Gln	Gln	Gln	131
H10	127	Lys	Lys	Lys	Lys	132
H11	128	Phe	Val	Met	Val	133
H12	129	Leu	Val	Val	Val	134
H13	130	Ala	Ala	Thr	Ala	135
H14	131	Ser	Gly	Gly†	Gly†	136
H15	132	Val	Val	Val	Val	137
H16	133	Ser	Ala	Ala	Ala	138
H17	134	Thr	Asn	Ser	Asn	139
H18	135	Val	Ala	Ala	Ala	140
H19	136	Leu	Leu	Leu	Leu	141
H20	137	Thr	Ala	Ser	Ala	142
H21	138	Ser	His	Ser	His	143
HC1	139	Lys	Lys	Arg	Lys	144
HC2	140	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	145
HC3	141	Arg	His	His	His	146



شکل ۲۹-۳۳: نحوه اتصال ۲، ۳- فسفوگلیسرات به داکسی هموگلوبین انسانی. ۲، ۳ DPG با سه گروه His-2، His-143 و Lys-82 دارای بار مثبت موجود بر روی هر زنجیر  $\beta$  واکنش می دهد. علاوه بر این ۶ پیوند، چندین پیوند نمکی نیز بین زنجیره های گلوبینی فرم T ایجاد می شود [۲۸].

# Hb-F & F-Cell





شکل ۲۱-۴: مدل تنظیمی تولید F سل‌ها در شرایط اریتروپوئیز حاد، آنمی مزمن و آنمی مزمن توأم با درمان سیتوتوکسیک (مثل 5-آزاسیتیدین و هیدروکسی اوره) که حالت اخیر با دمتیلاسیون ژن نیمه خاموش  $\gamma$  افزایش تولید F سل‌ها و افزایش میل هموگلوبین به اکسیژن باعث کاهش عوارض آنمی سلول‌های داسی (SCA) می‌شود.

## تست کلایهور-بتکه (KB-Test):

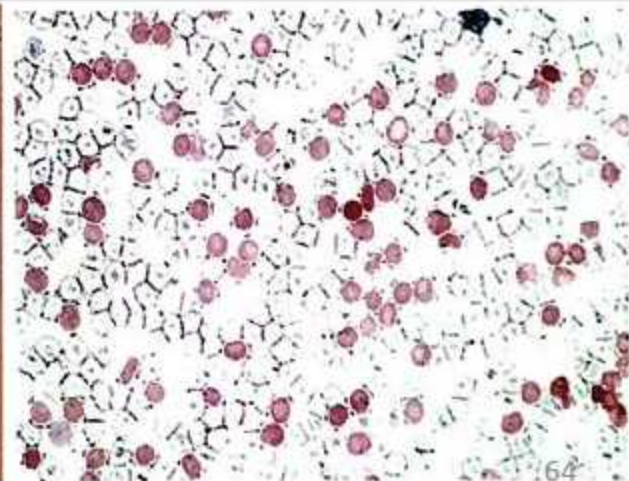
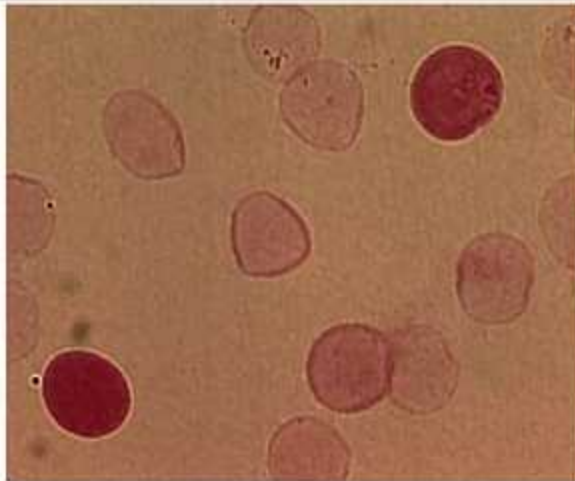
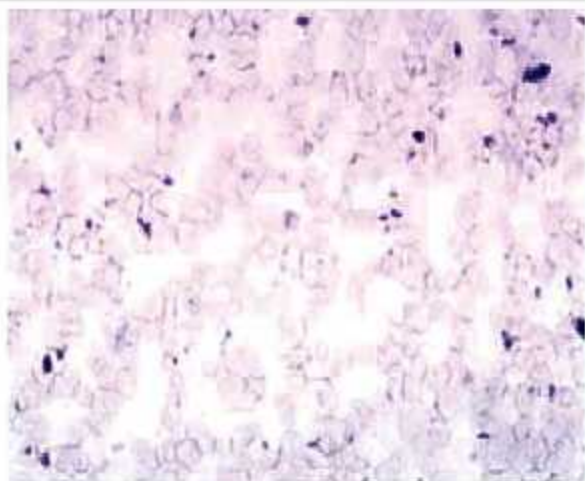
در تست بتکه از محلول MCIL vaine با pH ۳/۳ استفاده می شود که از ۷۵ml اسید سیتریک ۰/۱M و ۲۱ml فسفات سدیم ۰/۲M تشکیل شده است. لام خون بیمار را با نرمال سالین به نسبت ۱ به ۱ رقیق نموده و بعد از تهیه گستره از آن، ۵ دقیقه در اتانول ۸۰٪ قرار داده می شود تا فیکس شود. سپس لام با آب شسته و در داخل محلول MCIL vaine قرار داده می شود (۱۰ دقیقه برای دمای ۲۵ درجه و ۵ دقیقه برای دمای ۳۷ درجه). بعد از زمان مقرر، لام شسته شده و با رنگ آمیزی H&E رنگ می شود، بدین منظور، لام را ۵ دقیقه در محلول رنگی اریتروزین B ۰/۰۵ درصد و سپس ۵ دقیقه دیگر در محلول رنگی هاریس-هماتوکسیلین قرار داده و بعد از شستشوی نهایی مورد بررسی قرار می دهند. در این تست نیز همانند تست رتیک، درصد سلول های جنینی (توپر و قرمز) نسبت به کل RBCها (سلولهای توخالی و کمرنگ) محاسبه می شود:

$$۵۰ \times \text{درصد گلبول های جنینی} = \text{حجم خون وارد شده از جنین مادر بر حسب ml}$$

ضریب ۵۰ در فرمول فوق به دلیل حجم خون مادر (۵ لیتر) است که ۵۰ دسی لیتر در نظر گرفته شده است. هر آمپول روگام برای جلوگیری از ایمنیزاسیون ۳۰cc خون تام (یا ۱۵ml پکسل) بکار می رود، لذا

$$۳۰ \div \text{حجم خون جنین وارده به خون مادر} = \text{تعداد آمپول روگام}$$

اگر عدد اعشاری کمتر از ۰/۵ بود، به طرف عدد بالاتر گرد می شود و اگر بزرگتر یا مساوی ۰/۵ بود، ابتدا به طرف عدد بزرگتر گرد کرده و سپس یک رقم به آن اضافه می شود. مثال: در یک مادر حامله، درصد Fسل ها با تست بتکه ۱/۶٪ محاسبه شده است که با ضرب آن در ۵۰، عدد ۸۰ml (خون جنینی وارد شده به خون مادر) و با تقسیم این عدد بر ۳۰، رقم ۲/۶۶ حاصل می شود که ابتدا به سمت ۳ گرد کرده و سپس با ۱ جمع می شود. لذا در نهایت ۴ آمپول روگام می بایست به مادر Rh- با نوزاد Rh+ تزریق نمود تا مادر در برابر Ag-Rh+ ایمنیزه نشود.



شکل ۶۱-۴۶: تست بتکه-کلایهور: نمونه مثبت (راست و وسط) و منفی (چپ)

## Heterocellular

Some types of non-deletional HPFH

$\delta\beta$  thalassaemia

Haemoglobin Lepore trait

Sickle cell anaemia, sickle cell/haemoglobin C disease and sickle cell/ $\beta$  thalassaemia

$\beta$  thalassaemia heterozygosity and haemoglobin E/ $\beta$  thalassaemia compound heterozygosity

## Pancellular

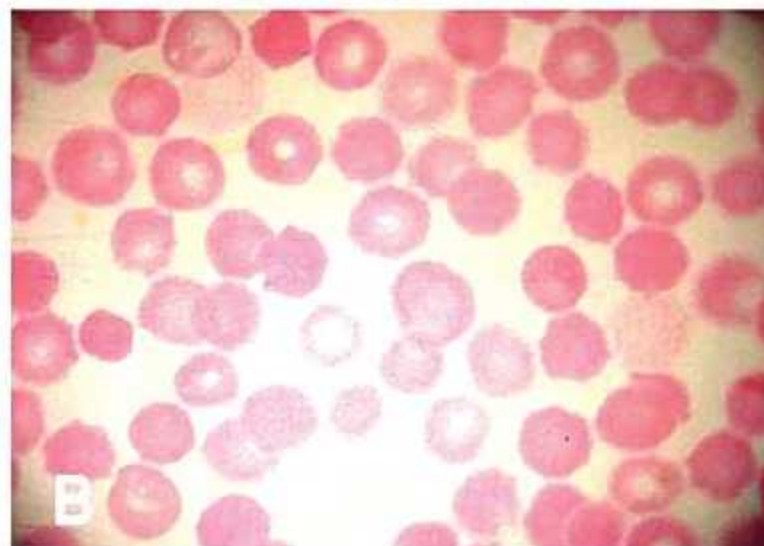
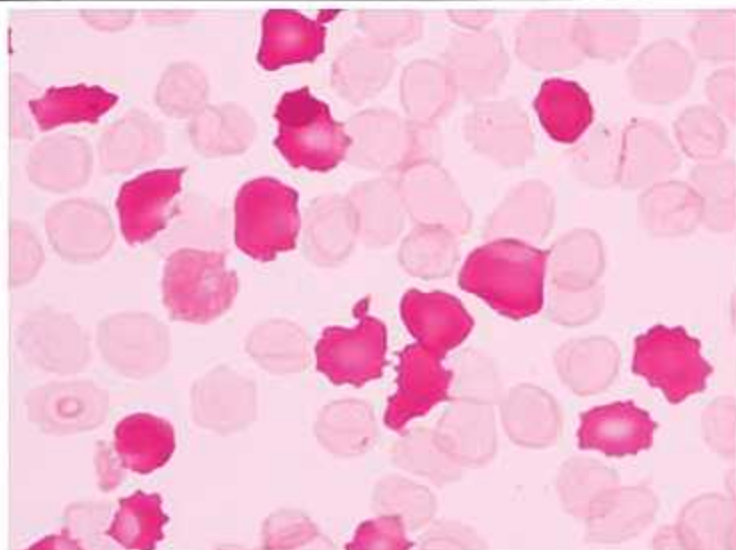
Some types of non-deletional HPFH

Deletional HPFH

Haemoglobin Kenya trait

Sickle cell/deletional HPFH compound heterozygosity

$\beta$  thalassaemia homozygosity and compound heterozygosity

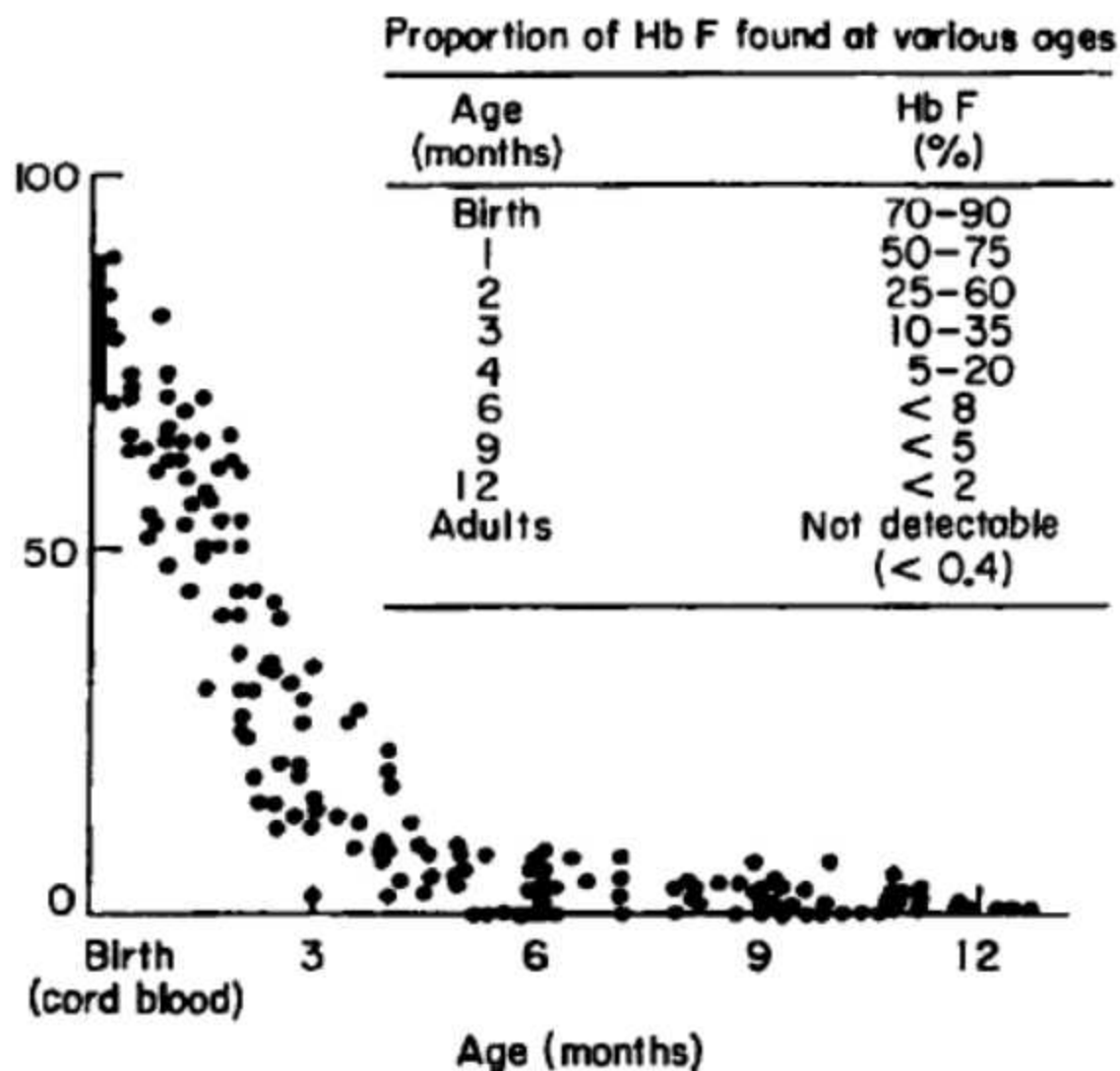


شکل ۷۰-۴۶: دو الگوی پانسلولار (راست) و هتروسلولار (چپ) در رنگ آمیزی بتکه-کلاپهور



جدول ۸-۴۶: برخی از علل اکتسابی افزایش درصد Hb-F [۱۳]

الف) دوران نوزادی (اکتسابی داخل رحمی):	ادامه ستون اول
- نوزادان نارس که زودتر از موعد مقرر متولد می‌شوند.	- سه ماهه دوم و سوم حاملگی (تا ۵٪) که تکثیر و تمایز سریع اریتروئیدی وجود دارد.
- نوزادان کوچک و کم‌وزن فول ترم	- آنمی آپلاستیک، به ویژه در دوران تجویز آندروژن
ب) دوران طفولیت و کودکی (به همراه افزایش Ag-i و کاهش Ag-I):	- آنمی پرنیشیوز
- ابتلا به JMML یا JMML (لوسمی میلومونوسیتیک جوانان)	- برخی از موارد AML (به ویژه M6)، PV MDS و PNH
- دوران ریکآوری و نقاهت بیماری اریتروبلاستوپنی گذرای نوزادان	- تومورهای معدی-روده‌ای، هیپاتوما و میلوم متعدد (MM)
ج) دوران بلوغ و دیگر سنین:	- تیروتوکسیسیستوز
- اریتروپوئیز در شرایط استرس مثل:	- دیابت ملیتوس و نوزادان مربوط به مادران دیابتی
خونریزی یا فلبوتومی (فصد)	- کتواسیدوز ناشی از گرسنگی
همولیز حاد و شدید	- کالآزار
دوران ریکآوری و نقاهت پس از نارسایی BM، مثل دوران پس از درمان لوسمی حاد و یا عفونت شدید	- موارد ناشی از دارو مثل:
دوران ریکآوری و نقاهت ناشی از آپلازی خالص گلبول‌های قرمز	- تجویز هیدروکسی کربامید در آنمی سلول داسی یا بتا تالاسمی
دوران ریکآوری و نقاهت ناشی از آنمی فقر آهن	اینترمدیا
در شرایط تجویز اریتروپوئیتین	- تجویز بوتیرات در آنمی سلول داسی (SCA)
دوران بازسازی متعاقب پیوند مغزاستخوان	- تجویز ۵-آزاسیتیدین و زیدوودین در SCA و AIDS
خون‌سازی های اکسترامدولاری در کبد	- تجویز عوامل آسیله کننده مثل فنیل استات و فنیل بوتیرات در آنمی سلول داسی
تومورهایی مثل سرطان ریه، پستان، تخمدان، بیضه و مول‌های هیپوفارم	- تجویز اریتروپوئیتین و سدیم والهورات



شکل ۵۰-۲۹: درصد Hb-F نوزاد طبیعی در طول یک سال اول زندگی

Gene	Mutation	Percent $A\gamma$ Globin	Percent HbF	Notes
<i>HBG1</i> ( $A\gamma$ )	C-202T	89–96	1.6–3.9	Seen with HbS
	T-198C	90–100	2–13	20% in homozygote
	C-201T		10.2	
	C-196T	80	12–16	also positive for $G\gamma$ -158 C-T
	C-195G	85	4–7	
	T-175G	60–80	38	in HbAS, 41% HbF, 17% HbS; also 40% HbF with HbC trait
	C-158T	51	3–5	
	G-117A	~90	7–19	25% in homozygote
	C-114T	~90	~5	
<i>HBG2</i> ( $G\gamma$ )	C-202G	100	14–21	with HbAS 18%–24% HbF, 25%–35% HbA
	T-175C	100	22	with HbAS 30% HbF, 28% HbA
	C-196T		8.6	also positive for $G\gamma$ -158 C-T
	C-114A	90	0.6–3.5	4%–11% HbF with associated with $\beta$ thalassemia
	C-114G	90	8.6	
	C-114T	~90	11–14	also homozygous for $G\gamma$ -158 C-T
	A-110C	97	0.8	

Some of these mutations are also associated with  $\beta$  thalassemia. References to these polymorphisms can be found at <http://globin.cse.psu.edu/>.

۱- پلی‌مورفیسم در محل ۵۸-۱ از ژن  $G\gamma$  (جایگزینی C→T) که با مقادیر بالاتر Hb-F همراه است.

۲- نوسان تعداد تکرارهای موتیف  $(AT)_xN_{12}GT(AT)_y$  در موقعیت ۵۳۰- جزء HS2 مربوط به  $\beta$ -LCR که به عنوان پروموتور ژن گاما عمل می‌کند. البته هنوز مشخص نشده است که پلی‌مورفیسم LCR در جفت باز ۵۳۰- ژن  $G\gamma$  چگونه بر میزان تولید زنجیره  $\gamma$  اثر می‌گذارد، اما به نظر می‌رسد درمقایسه با  $(AT)_7T_7$ ، توالی  $(AT)_9T_5$  توانایی بیشتری برای اتصال به  $\beta P-1$  داشته باشد. ( $\beta P-1$  یک فاکتور ترانس اکتینگ منفی است).

۳- وجود یک لوکوس- ترانس اکتینگ در 6q22.3-23.2

۴- یک لوکوس ترانس اکتینگ- در 22.3- Xp22.2

۵- یک لوکوس- ترانس اکتینگ در کروموزومی به غیر از کروموزوم ۶



## ج) اندازه‌گیری هموگلوبین F و تعیین الگوی توزیع داخل سلولی آن:

برای اندازه‌گیری مقدار Hb-F می‌توان از (i) HPLC، (ii) الکتروفورز هموگلوبین و متعاقب آن چگالی سنجی یا شویش و سپس اسپکتروفوتومتری، (iii) تقلیب قلیایی<sup>۱</sup> (روش بتکه یا جونکیس) و (iv) روش‌های ایمنولوژیک RIA<sup>۲</sup> استفاده کرد. چگالی سنجی در مقادیر کمتر از ۱۵-۱۰٪ Hb-F قابل اطمینان اطمینان نبوده و لذا تکنیک‌های HPLC یا تقلیب قلیایی به روش چگالی سنجی (دانسیتومتری) ترجیح داده می‌شوند که البته نتایج حاصل از تکنیک HPLC اندکی بیشتر از نتایج روش تقلیب قلیایی می‌باشند. برای مقادیر بالاتر از ۵۰٪ Hb-F نیز، تکنیک‌های چگالی سنجی، شویش-اسپکتروفوتومتری و HPLC نسبت به روش‌های تقلیب قلیایی و RIA ترجیح داده می‌شوند، چراکه در این مقادیر، تقلیب قلیایی نتایج صحیحی را ارائه نمی‌دهد. اگر در تکنیک HPLC، Hb-F افزایش قابل توجهی را نشان دهد، کروماتوگرام‌های دستگاه می‌بایست که به دقت مورد ارزیابی قرار بگیرند، زیرا مقادیر بالای هموگلوبین‌های گلیکوزیله نیز گاهی اوقات به اشتباه Hb-F شناسایی می‌شوند و اگر مقدار Hb-F در تکنیک HPLC بیش از ۱۰٪ باشد، می‌بایست ماهیت آن توسط روش‌های دیگر مورد تأیید قرار بگیرد تا از تشخیص اشتباهی هموگلوبین‌های N یا J به‌عنوان Hb-F جلوگیری شود. همان‌طوری‌که اشاره شد، اندازه‌گیری Hb-F با یک روش ایمنولوژیک مثل RIA نیز امکان پذیر است، ولی این روش از صحت خوبی برخوردار نبوده و قابل توصیه نمی‌باشد. برای بررسی توزیع Hb-F بین گلبول‌های قرمز نیز می‌توان از آزمایش کلایه‌ور یا با اطمینان بیشتر، فلوسایتومتری استفاده نمود.

اساس روش‌های شیمیایی مثل تقلیب قلیایی (دناچوراسیون قلیایی)، بر مبنای مقاومت Hb-F به تغییر شکل فضایی و دناچوراسیون در محیط‌های اسیدی و به خصوص محیط‌های قلیایی بنا شده که در حضور باز KOH (پتاس)، Hb-F دست‌نخورده باقی مانده و مابقی هموگلوبین‌ها دنا توره شده و رسوب می‌کنند. در این رابطه بسته به میزان Hb-F خون تحت بررسی، دو روش از کارایی بیشتری برخوردار می‌باشد: اگر مقادیر Hb-F کم باشد، روش بتکه<sup>۳</sup> که از حساسیت حساسیت بیشتری برخوردار است، پیشنهاد می‌شود ولی اگر همچون آزمایش بر روی خون بند ناف یا موارد تالاسمی ماژور و HPFH، گمان می‌رود که درصد هموگلوبین F مورد بررسی بیشتر از ۵۰٪ باشد، روش جونگیس<sup>۴</sup> ارجح بوده و نتایج بهتری را می‌دهد.

## ۱) روش تقلیب پتاسی:

به یک لوله آزمایش، ۱/۶ml پتاس ۰/۰۸۳ نرمال و ۱۰۰µl همولیزات اضافه نموده و آنها را خوب شیک می‌کنیم و بعد از آن، یک دقیقه زمان می‌دهیم تا همه هموگلوبین‌ها به جز Hb-F در این محیط قلیایی دناتوره شده و تخریب شوند. بسته به نسبت بالای هموگلوبین‌های غیر F، هر لحظه بر میزان کدورت محلول اضافه می‌شود درحالی که نمونه خون بندناف، تالاسمی ماژور و HPFH تقریباً بدون تغییر باقی می‌مانند. بعد از سپری شدن زمان مربوطه، ۳/۴ml سولفات آمونیوم ۱/۲ اشباع اسیدی به لوله‌ها اضافه می‌شود که این محلول با جداکردن لاشه سلول‌ها و هموگلوبین‌های دناتوره، باعث سیاه رنگ شدن محلول می‌شود که باز متناسب با مقدار هموگلوبین‌های غیر F می‌باشد. بعد از ۵ دقیقه، محلول فوق را از یک کاغذ صافی واتمن با شماره ۴۱-۴۲ عبور می‌دهند که در اثر آن، فقط هموگلوبین F محلول در مایع فوق از کاغذ صافی عبور کرده و مابقی هموگلوبین‌های دناتوره شده در روی کاغذ باقی می‌مانند. در این مرحله OD محلول زیرین را در ۵۴۵-۵۴۰nm اندازه‌گیری نموده و به عنوان OD-F ثبت می‌کنند. برای تهیه محلول استاندارد نیز، ۲۰µl از همولیزانت را با ۵ml آب مقطر مخلوط و OD آن را به عنوان OD-st ثبت می‌کنند.

**برای تهیه همولیزانت:** ۱۰۰µl پکسل شسته شده را در ۳۰۰µl آب مقطر حل کرده و بعد از شیک شدید، در دور بالای ۳۰۰۰rpm سانتریفوژ نموده و از مایع رویی آن بعنوان همولیزانت استفاده می‌کنند.

**برای تهیه پتاس ۰/۰۸۳N:** مقدار ۱۰ml پتاس ۱N را با ۱۱۰ml آب مقطر مخلوط می‌کنند.

**برای تهیه سولفات آمونیوم ۱/۲ اشباع اسیدی:** ابتدا ۸۰g سولفات آمونیوم را با ۱۰۰ml آب مقطر مخلوط نموده و سولفات آمونیوم اشباع تهیه می‌کنند، سپس ۴۰ml از محلول اشباع را با ۴۰ml آب مقطر دیگر مخلوط و سولفات آمونیوم ۱/۲ اشباع را تهیه می‌کنند. در نهایت نیز ۲۰۰µl از HCL غلیظ به آن افزوده و سولفات آمونیوم ۱/۲ اشباع اسیدی را تهیه می‌کنند.

در مرحله آخر، درصد هموگلوبین F بیمار را از فرمول زیر به دست آورید:

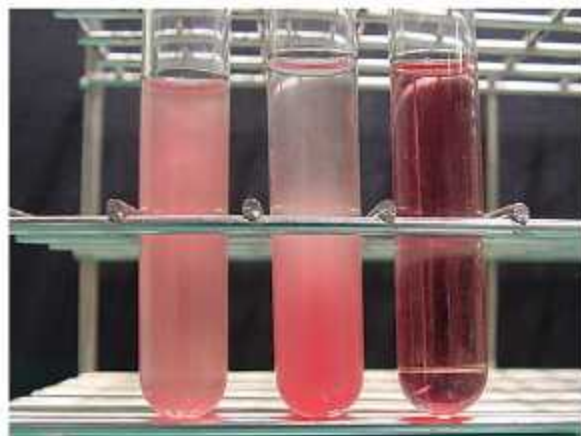
$$\% \text{Hb-F} = \frac{(\text{OD-F})}{(\text{OD-st})} \times 20$$

علت ضریب ۲۰ به این جهت است که در نمونه تست، ۱۰۰µl همولیزانت در ۵ml محلول حل می‌شود ولی در نمونه استاندارد، ۲۰µl همولیزانت (یک پنجم نمونه) در ۵ml محلول حل می‌شود که با احتساب ضریب ۱۰۰٪، مضرب کلی فرمول ۲۰ می‌شود. به عنوان مثال اگر OD-F بیماری، ۰/۰۱۱ و از طرفی OD-st، ۰/۲۲۱ باشد، مقدار Hb-F وی، ۰/۹٪ خواهد بود.



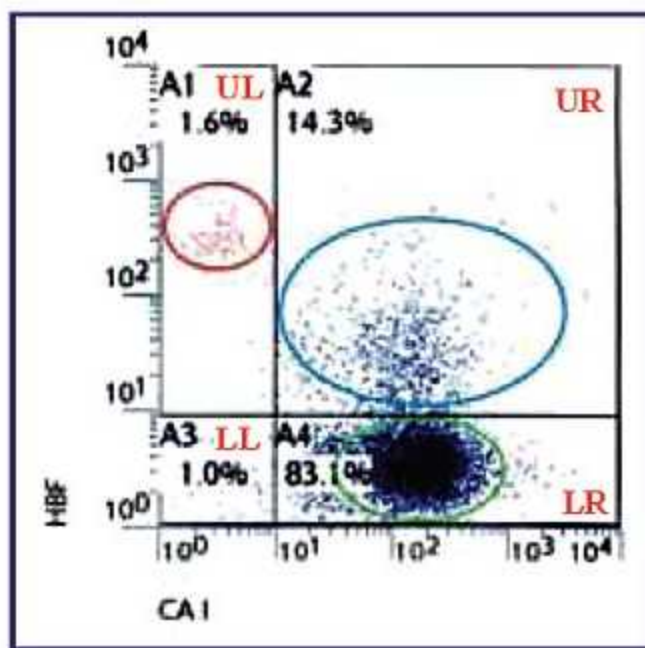
## تست ارزیابی کیفی فون مومود در مدفوع نوزاد:

در تستی به نام تست آپت (Apt Test) یا دائونی برای اینکه منشأ خون داخل معده، مدفوع، استفراغ، اسهال یا مایع آمنیوتیک نوزاد تازه متولد شده را شناسایی کرده و مشخص کنند که آیا نوزاد خونریزی گوارشی داشته یا اینکه خون حین زایمان از واژن مادر وارد سیستم گوارشی (دهان) نوزاد شده است، از تستی مشابه کلایه‌ور استفاده می‌شود که در آن مقداری از نمونه استفراغ، مدفوع یا مایع آمنیوتیک نوزاد را با آب مقطر مخلوط می‌کنند تا خون احتمالی موجود در آن همولیز شود، در مرحله بعد، مخلوط حاصله را سانتریفیوژ نموده و مایع رویی آن را با ۵ml پتاس یا سود قلیایی ۱٪ مخلوط نموده و بعد از ۱۰ دقیقه انکوباسیون و ۵ دقیقه سانتریفیوژ، مایع رویی را زیر نور بررسی می‌کنند. خون مادر به دلیل داشتن مقادیر بالایی از Hb-A حساس به محیط قلیایی، سریعاً در سود یا پتاس حل شده و یک **مایع قهوه‌ای هماتینی** ایجاد می‌کند ولی خون جنینی، به دلیل داشتن Hb-F مقاوم به قلیا، **بدون تغییر و به رنگ قرمز-صورتی** باقی می‌ماند که این شرایط پروگنوز بدی داشته و احتمال وجود یک ضایعه یا بدخیمی در سیستم گوارشی نوزاد را مورد شک قرار می‌دهد. حضور خون در استفراغ یا مدفوع، به جز هنگام زایمان، هنگام نوشیدن شیر از پستان زخمی مادر نیز ممکن است دیده شود که این حالت با شیوع بیشتر هنگام درآوردن دندان در نوزاد دیده می‌شود، البته در این حالت نیز تست دائونی/آپت منفی خواهد بود. لازم به ذکر است که تمامی نوزادان تازه متولد شده، به دلیل شرایط خونریزی دهنده زایمان، تا ۵-۳ روز در مدفوع خود مقادیری از خون مادر را داشته و لذا نسبت به تست  $^{2}OB$  مثبت و نسبت به تست Apt منفی هستند (OB+/Apt-) ولی در شرایط بدخیم فوق، هردو تست مثبت می‌شوند (OB+/Apt+). تست‌های بتکه و آپت حالت غربالگری داشته و برای اقدامات سریع پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند و لازم است همزمان با این تست‌ها، نمونه خون یا استفراغ برای انجام تست الکتروفورز یا HPLC نیز ارسال گردد تا نتایج قطعی آزمایشات نیز مورد بررسی قرار بگیرند.



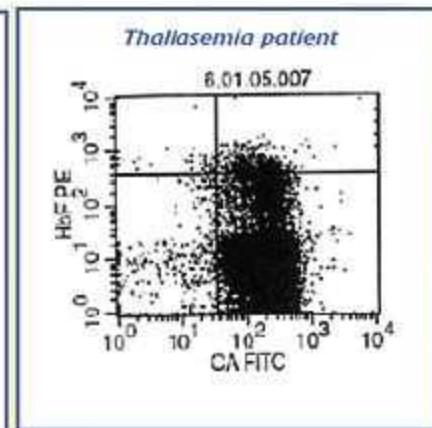
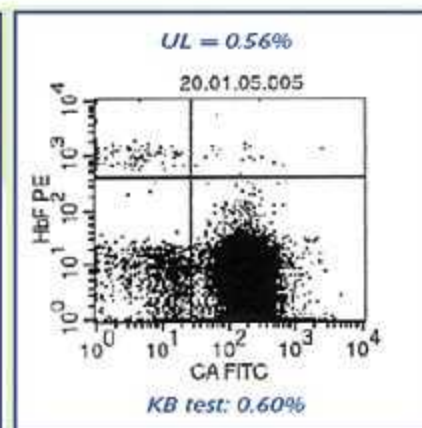
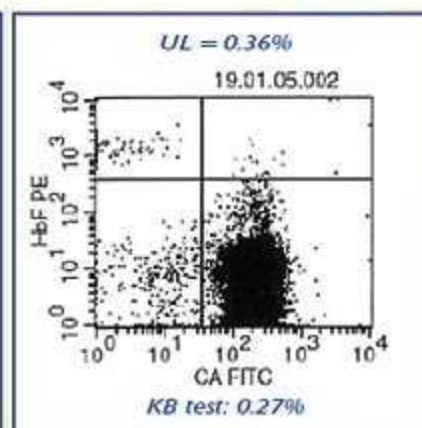
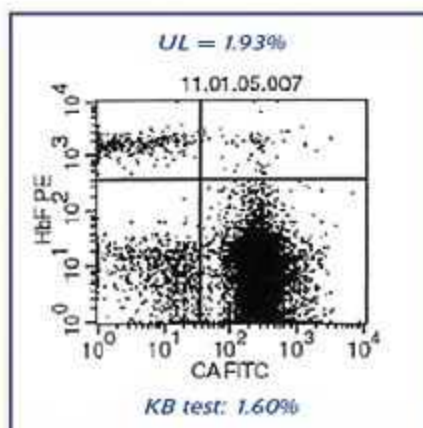
شکل ۶۲-۴۶: تفاوت مایع قهوه‌ای رنگ هماتینی در Hb-A (با منشأ خون مادری) با مایع صورتی رنگ Hb-F مقاوم به قلیا (خون یا منشأ جنینی)

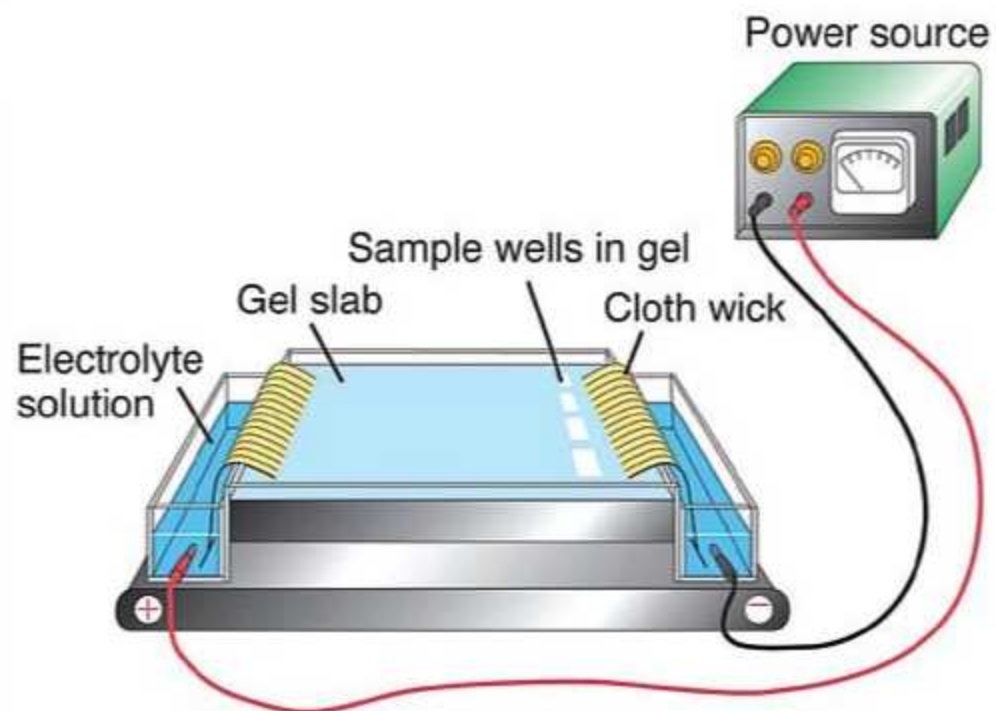
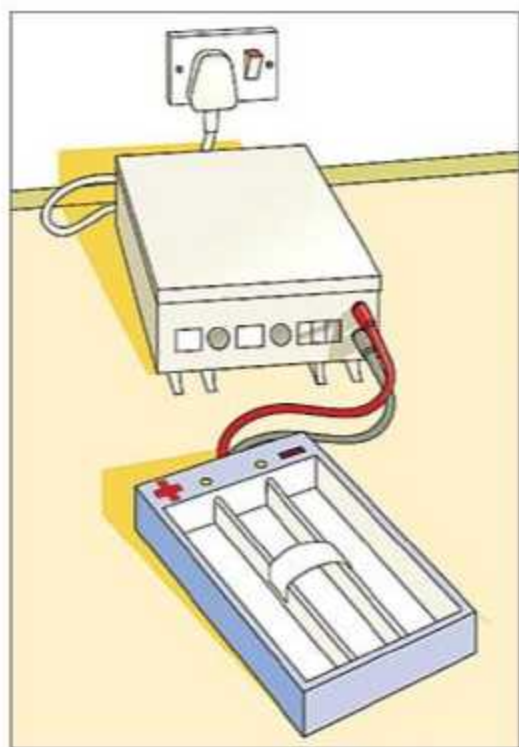




- = fetal RBCs      HbF++
- = maternal F-cells      HbF+/CA++
- = maternal RBCs      HbF-/CA++

شکل ۶۵-۴۶: حضور همزمان سه نوع سلول RBC (ناحیه LR)، fRBC (ناحیه UL) و F-Cell (ناحیه UR) در خون مادری؛ سلول‌های ناحیه A3 یا LL به عنوان سلول‌های مرده یا دبری شناخته می‌شوند.







شکل ۱-۴۶: جمع آوری لکه گائری به صورت مستقیم



شکل ۲-۴۶: جمع آوری لکه های گائری توسط لوله موئینه و سپس انتقال آن به کارت گائری



شکل ۳-۴۶: از راست به چپ: مراحل جمع آوری خون بندناف از بندناف متصل به جفت



نمونه خون بیمار را در ویال حاوی EDTA گرفته و سپس خوب مخلوط کنید. سپس خون را به لوله‌ای منتقل و آن را سانتریفیوژ کرده و بعد از دور ریختن پلاسما، گلبول‌ها را سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده و هموگلوبین خون متراکم و شسته شده را اندازه گیری نمایید. با محاسبه حجم گلبول‌های متراکم بعد از آخرین مرحله شستشو، گلبول‌ها را به نحوی با آب مقطر لیز نمایید که هموگلوبین همولایزیت حدود  $10 \text{ g/dl}$  گردد.

به عنوان مثال اگر حجم گلبول‌های متراکم بعد از آخرین مرحله شستشو،  $1 \text{ ml}$  و هموگلوبین آن  $40 \text{ g/dl}$  باشد، از فرمول  $V_1C_1 = V_2C_2$  استفاده نموده و حجم آب مقطر لازم جهت تهیه همولایزیتی که هموگلوبینی حدود  $10 \text{ g/dl}$  داشته باشد را محاسبه می کنیم، که در این مورد خاص، حجم آب مقطر مورد نیاز  $3 \text{ ml}$  خواهد شد.  $1 \times 40 = 10 \times V_2$   $\leftarrow$   $V_2 = 4 \text{ ml}$  total  $V_2 = 4 \text{ ml}$   $\leftarrow$   $4 - 1 = 3 \text{ ml}$  (حجم آب مقطر مورد نیاز). با توجه به غلظت بالای پک سل شسته شده و عدم امکان دادن نمونه به سل کانتر، مقدار هموگلوبین نمونه را می توان از قبل شستشو بدست آورده و سپس هموگلوبین نهایی همولیزانت را با آن تنظیم نمود. مثلاً اگر هموگلوبین خون بیمار،  $15 \text{ g/dl}$ ، حجم خون اولیه،  $2 \text{ ml}$ ، حجم پک سل شسته شده  $1 \text{ ml}$  و هموگلوبین ایده آل همولیزانت  $10 \text{ g/dl}$  باشد، با احتساب فرمول  $V_1C_1 = V_2C_2$   $\leftarrow$   $2 \times 15 = 10 \times V_2$   $\leftarrow$   $V_2 = 3 \text{ ml}$  total  $V_2 = 3 \text{ ml}$   $\leftarrow$   $3 - 1 = 2 \text{ ml}$ ، حجم آب مقطر مورد نیاز برای تهیه همولیزانت،  $2 \text{ ml}$  خواهد بود.

به وسیله ورتکس، ۱۰ دقیقه محلول همولایزانت را تکان داده تا گلبول‌ها کاملاً تخریب و لیز گردند. در مرحله بعد، محلول همولایزیت را با دور  $4000 \text{ rpm}$  به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده تا بقایای دیواره سلول‌ها ته نشین شوند. از آن جایی که معمولاً سانتریفیوژهای معمولی آزمایشگاه‌ها، قدرت رسوب دیواره RBCها را نداشته و از طرف دیگر وجود مقادیر ولو جزئی غشاء یاخته‌ها در نمونه‌ای که الکتروفورز می شود، موجب خطا در نتیجه آن می شود، لذا بهتر است جداسازی دیواره سلول‌ها به طریق زیر صورت پذیرد.



شکل ۱۵-۴۶: انواع ورتکس‌های آزمایشگاهی که باعث میکس شدید همولیزانت به روش دورانی می شود.

به نسبت ½ حجم همولیزانت، یکی از حلال‌های آلی مثل تتراکلرور کربن (CCl<sub>4</sub>)، تولوئن (Toluen) و یا کلروفرم را به آن اضافه نموده و خوب با ورتکس مخلوط کنید. در مرحله بعد، ۱۰ دقیقه همولیزانت را با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کرده و همولیزانت را از لاشه سلول‌ها جدا کنید. اگر حلال به کار رفته **تتراکلرور کربن** و یا **کلروفرم** باشد، این دو ماده در ته لوله رسوب کرده و بالای آنها یک لایه نازک تقریباً سفید رنگ (حاوی گلبول‌های سفید، پلاکت‌ها و لاشه RBCها) و روی آن همولیزانت قرار می‌گیرد. ولی اگر از **تولوئن** استفاده نمایید، همولایزیت در زیر، بالای آن لایه تقریباً سفید رنگ فوق‌الذکر و در قسمت بالاتر، تولوئن قرار می‌گیرد. واضح است که به علت برداشت آسانتر، تتراکلرور کربن و کلروفرم طرفدار بیشتری نسبت به تولوئن دارند. هر چند در صورت استفاده از تولوئن، جدا نمودن همولایزیت مشکل‌تر است، ولی از آن جایی که کلروفرم موجب تغییر شکل و دناتوراسیون هموگلوبین می‌شود، استفاده از آن چندان پیشنهاد نمی‌شود. در یک روش ساده‌تر از تهیه همولیزانت، حدود ۲۰۰-۴۰۰ µl پک‌سل شسته شده را در ۲ ml ازت مایع ریخته و اجازه می‌دهند تا خون سریعاً منجمد و RBCهای آن متلاشی شود. در مرحله بعد با بخار شدن ازت مایع، همولیزانت اولیه‌ای تهیه می‌شود که با مخلوط کردن آن با حلال‌های آلی می‌توان همولیزانت خالصی را تهیه نمود. در هر حال، همولایزیت را جدا و تا هنگام انجام الکتروفورز در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری کنید. توجه داشته باشید که چون در اثر ماندن همولیزانت (حتی در یخچال)، مقداری از هموگلوبین در اثر مجاورت با اکسیژن هوا اکسید گشته و به مت‌هموگلوبین (M-Hb) تبدیل می‌شود، لذا آزمایش می‌بایست در همان روز انجام شود، چرا که M-Hb باعث ایجاد یک باند گند و کاندیک دوقله‌ای، در پشت باند اصلی (مثلاً Hb-A) می‌شود که ممکن است با باند F اشتباه شود.



## تهیه همولیزانت برای جلوگیری از تشکیل متهموگلوبین:

برای تهیه همولیزانت مناسب از گلبول‌های قرمز، می‌توان به‌جای آب مقطر، یک معرف لیز کننده ساده که در مواقع ترکیبی از EDTA و سیانید پتاسیم است را مورد استفاده قرار داد (۱ گرم در لیتر  $\text{Na}_4\text{EDTA}$  در ۱۰۰ میلی گرم در لیتر سیانید پتاسیم) تا این نوع همولیزانت جلوی تشکیل متهموگلوبین را نیز بگیرد. همولیزانت مستعد اکسیداسیون بوده و حداکثر طی یک هفته می‌بایست مورد استفاده قرار بگیرد و اگر مجبور به نگهداری همولیزانت برای مدت طولانی باشیم، استفاده از محلول تتراکلرید کربن یا تولوئن (toluene) ارجحیت خواهد داشت. روش دیگر تهیه همولیزانت که عمده‌تاً برای نگهداری طولانی مدت نمونه‌های مورد دار، خون کنترل و هموگلوبین‌های نادر به کار می‌رود، منجمد کردن قطرات گلبول‌های قرمز شسته شده است. در این روش قطرات گلبول قرمز را به لایه‌ای از نیتروژن مایع اضافه می‌کنند و وقتی که قطرات گلبول قرمز منجمد شدند و نیتروژن تبخیر گردید، نمونه بدست آمده را تا سالیان طولانی در دمای  $-40^\circ\text{C}$  درجه نگهداری می‌کنند. روش آماده سازی همولیزانت گلبول قرمز بر توانایی آزمایشگاه در شناسایی یک ناهنجاری با اهمیت، تأثیر گذار می‌باشد. به عنوان مثال اندازه گیری Hb-H با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز در pH قلیایی، در صورتی نتایج صحیح خواهد داشت که همولیزانت با استفاده از تتراکلرید کربن تهیه شده باشد. در یک مطالعه آزمایشگاهی، هنگامی که همولیزانت با استفاده از روش‌هایی غیر از تتراکلرید کربن تهیه می‌شد، مقادیر بسیار کمتری از Hb-H شناسایی می‌گردید. این امر ممکن است منجر به عدم تشخیص بیماری Hb-H نیز بشود. بهترین نمونه برای الکتروفورز هموگلوبین، استفاده از گلبول‌های قرمز فشرده لیز شده‌ای است که دارای مقادیر ثابتی از هموگلوبین باشد و هیچ گونه باند نابجایی به علت وجود پروتئین‌های پلاسما ایجاد نکند. اگر از خون کامل (پک سل + پلاسما) استفاده شود، وجود پاراپروتئین‌ها یا غلظت‌های بسیار بالای ایمونوگلوبولین‌های پلی‌کلونال ممکن است موجب تولید باند مشخصی گردد که با یک هموگلوبین واریانت اشتباه شود. به این جهت، اگر در یک آزمایشگاه که از خون کامل برای تهیه همولیزانت استفاده می‌کند، وجود یک باند کاذب مورد شک قرار گرفت، ابتدا قبل از هر تصمیمی می‌بایست اقدام به تهیه همولیزانت از خون متراکم شسته نمود. در مورد هموگلوبین‌های ناپایدار بهتر است الکتروفورز در همان روز تهیه همولیزانت انجام شود، چراکه ممکن است حتی در دمای یخچال نیز در لوله رسوب کرده و از همولیزانت خارج شود و باعث تشخیص منفی کاذب شود.





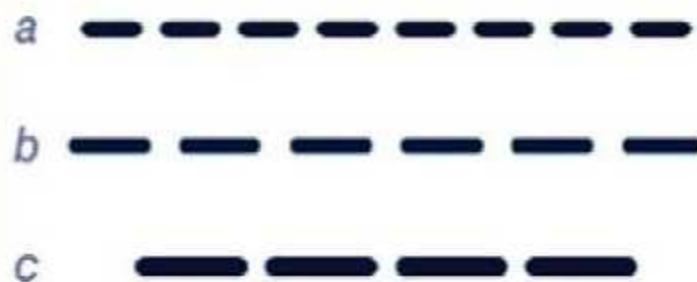
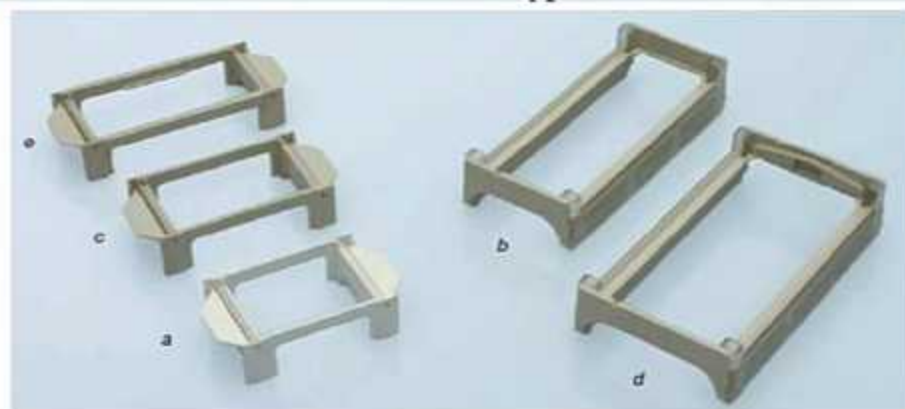
A



B



C



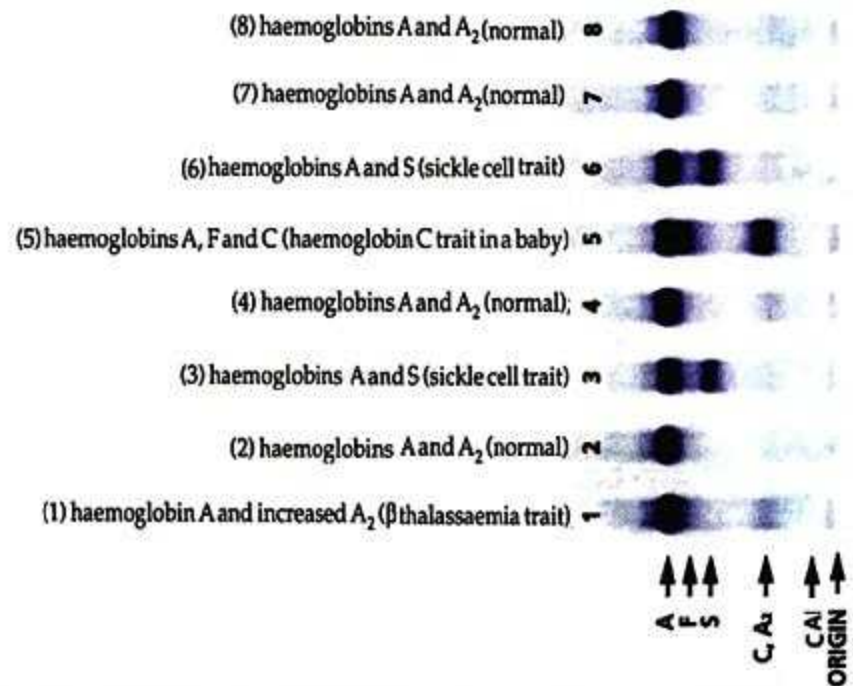
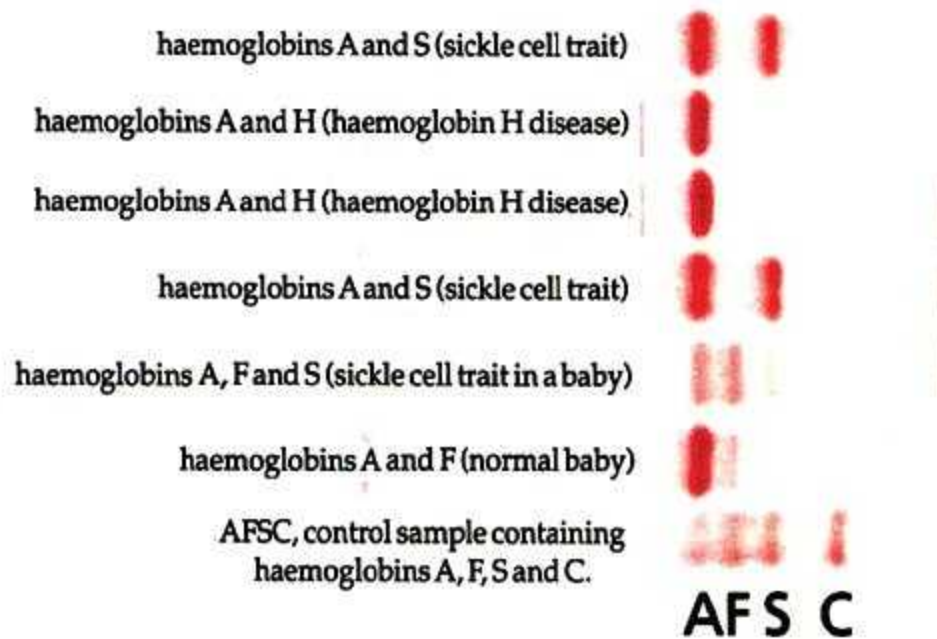
شکل ۱۷-۴۶: بریج‌ها و اپلیکاتورهای مخصوص A، B و C با نوع و الگوی لکه‌گذاری هر کدام از آنها

## رنگ آمیزی، شفاف سازی، آب گیری و دانسیتومتری باندهای هموگلوبین:

بعد از اتمام الکتروفورز، جهت ظهور مواد تفکیک شده از هم، بسته به ویژگی شیمیایی آنها، از رنگ های خاصی استفاده می شود. به عنوان مثال، (i) برای رنگ آمیزی پروتئین ها از **پانسو قرمز**، (ii) برای لیپوپروتئین ها از **سودان سیاه B (SBB)** یا **رنگ O چربی** (Oil Red-O)، (iii) برای هموگلوبین ها از **آبی کوماسی<sup>۱</sup> و یا بنزیدین**، (iv) برای اسیدهای نوکلئیک از **متیلن بلو** و (v) برای آنزیم های مختلف، از سوبسترای اختصاصی و رنگ زای خود آن آنزیم (مثلاً برای میلوپراکسیداز از ۴-کلرو-۱-نفتول و برای لیپاز از استراز ANBE) استفاده می کنند که بنزیدین برای رنگ آمیزی هموگلوبین اختصاصی عمل می کند. از آن جایی که در صورت استفاده از رنگ های پروتئینی مثل پانسیو S و آبی کوماسی، پس زمینه استات سلولوز، فاصله بین باندها و حتی باند کربنیک انیدراز نیز رنگ می شوند، لذا استفاده از رنگ اختصاصی بنزیدین و آبی کوماسی از اولویت بالایی برخوردار می باشد که در این رنگ ها، باند CA و پس زمینه رنگ نمی شوند.

بعد از الکتروفورز، برای رنگ آمیزی، شفاف سازی، آب گیری و خشک کردن صفحه استات سلولوز به ترتیب زیر عمل می شود<sup>۲</sup>:

۵ دقیقه رنگ پانسیو S ← ۵ دقیقه اسیداستیک ۵٪ اول ← ۵ دقیقه اسیداستیک ۵٪ دوم ← ۵ دقیقه متانول ۱۰۰٪ ← ۱۰ دقیقه محلول شفاف کننده ← ۲۰-۱۵ دقیقه در فور ۶۰°C ← اسکن باندها و تعیین دانسیتومتری و درصد نسبی هر کدام از باندها. (برای تهیه محلول شفاف کننده، ۳۵ml متانول خالص را با ۱۵ml اسیداستیک خالص و ۲ml گلیسرین مخلوط نموده و مصرف می کنند). در مراحل مذکور، ابتدا باندهای هموگلوبینی سطح کاغذ استات سلولوز، توسط پانسیو S رنگ می شوند. سپس اسید استیک با هضم و حذف کاغذ روی طلق پلاستیکی، باعث از بین رفتن کاغذ سفید روی طلق شده و در نتیجه باندهای رنگ شده متصل به طلق باقی می مانند. در مرحله بعد، آب موجود در باندها توسط متانول خالص آگیری شده (دهیدراتاسیون) و در نهایت، طلق شفاف حاوی باندهای خشک را در فور ۶۰ درجه خشک کرده و مورد آنالیز چگالی سنجی (دانسیتومتری) قرار می دهند. هر چند در مورد حاملین ژله ای این مرحله مورد نیاز نمی باشد ولی جهت شفاف نمودن استات سلولوز، معمولاً از مخلوط استات اتیل و اسید استیک استفاده می شود.

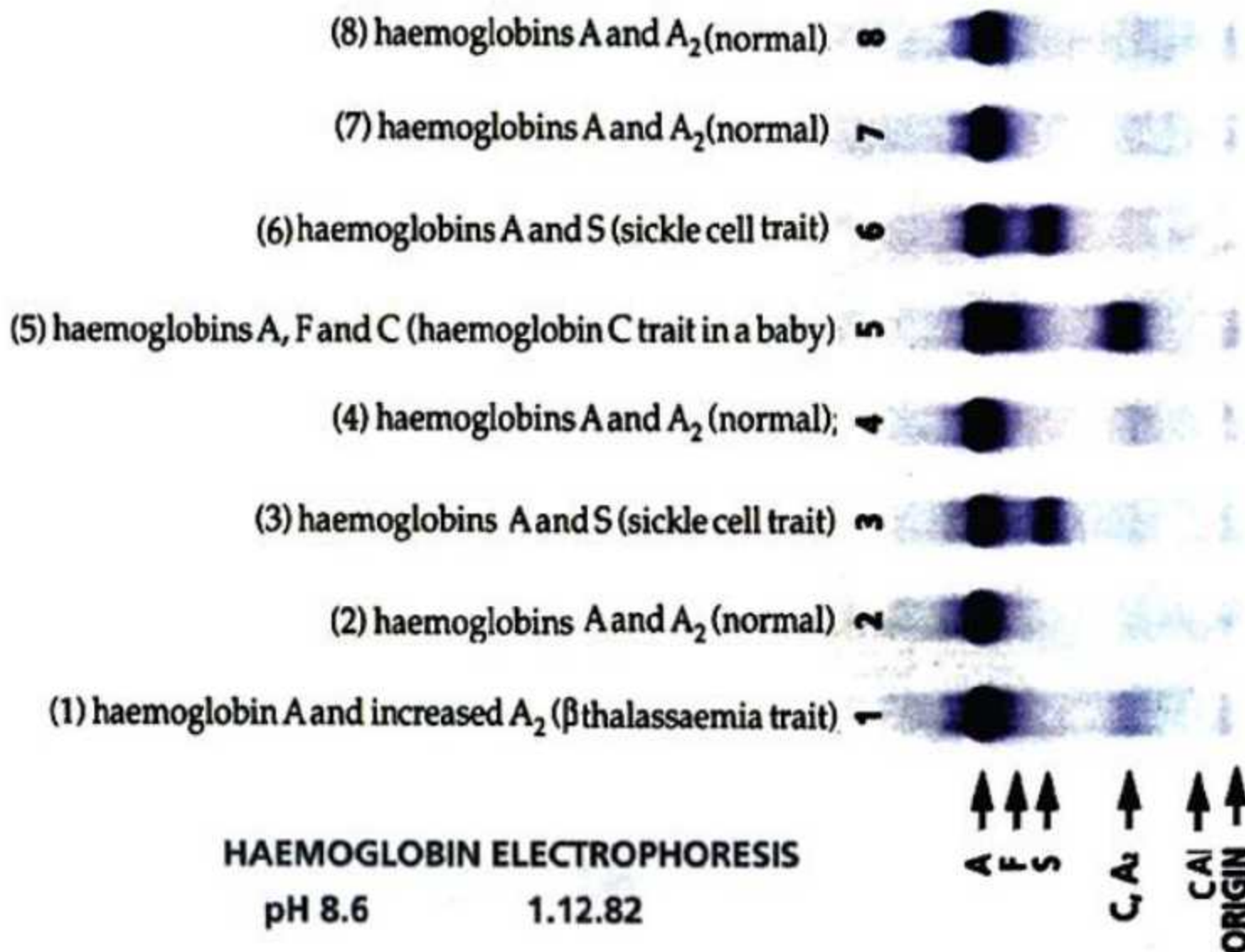


شکل ۲۳-۴۶: باندهای مربوط به اسکن هموگلوبین های مختلف A<sub>2</sub>, F, S, A که توسط آبی کوماسی (تصاویر سمت راست) یا پانسیو S (تصاویر سمت چپ) رنگ شده اند. همان طوری که مشهود است، همواره در کنار نمونه های مجهول، یک یا دو نمونه کنترل معمول (کنترل تجاری AFSC یا خون یک فرد معلوم الحال) نیز ران می شود تا موقعیت باندهای بیمار را مشخص سازند [۱۴].

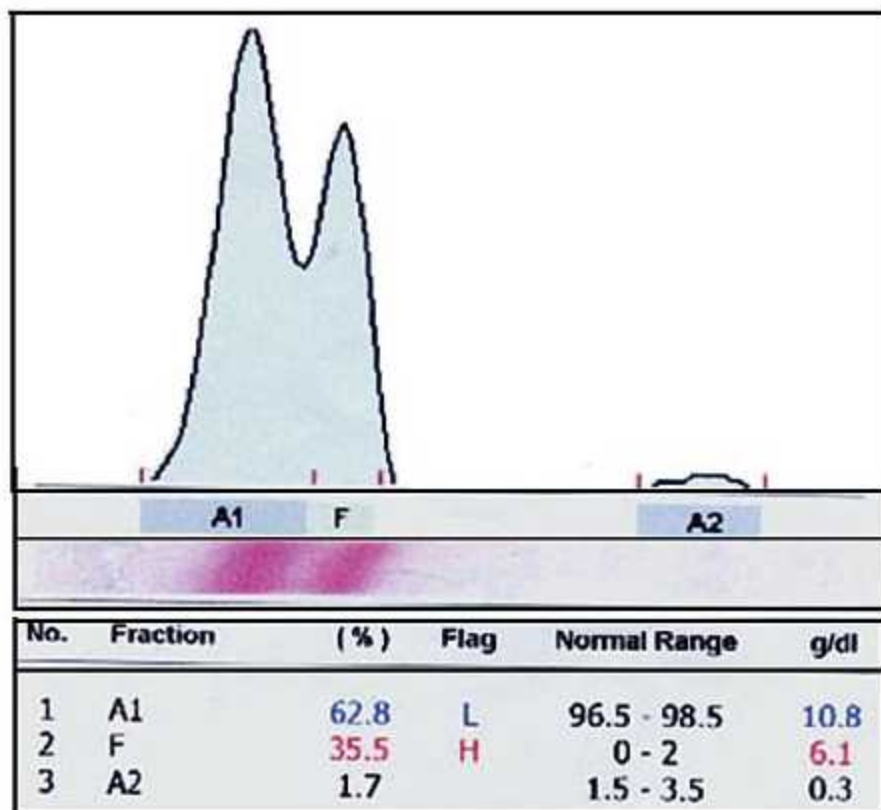


شکل ۲۶-۴۶: وجود یک باند ضعیف ولی بسیار کاندیک (حتی قبل از باند Origin) در یک فرد مبتلا به دو بیماری همزمان هیپرگاماگلوبولینمی (MM) و خصیصه داسی شکل (AS).

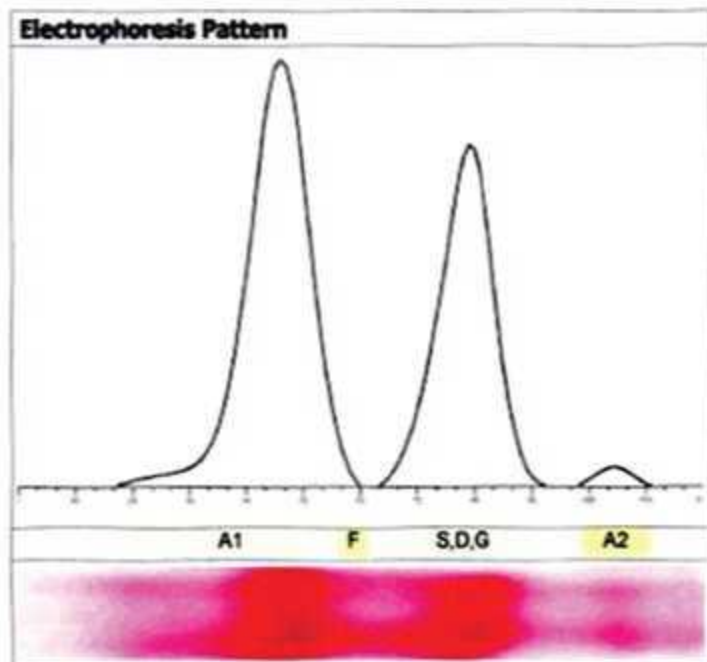




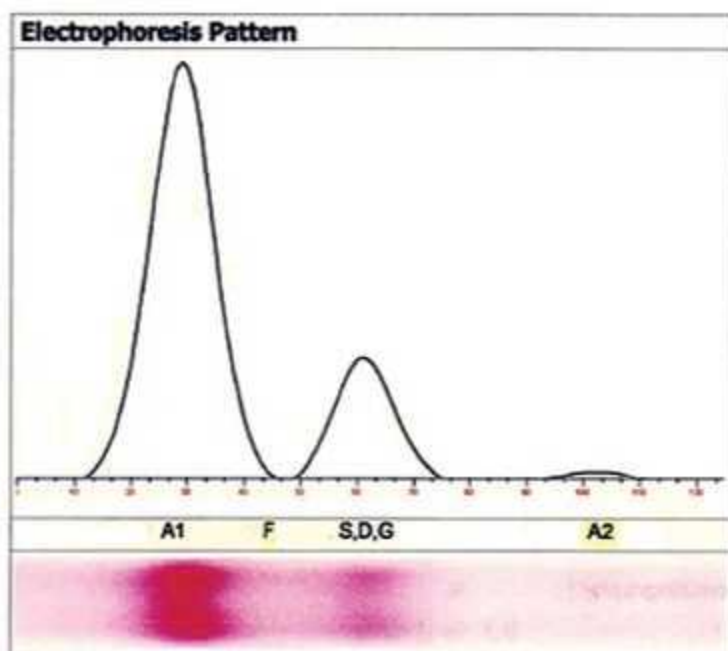
شکل ۲۹-۴۶: الکتروفورز قلیایی در pH=8.6 بر سطح ژل آگاروز که تست آلترناتیو الکتروفورز قلیایی بر سطح استات سلولوز محسوب می شود [۱۴].



شکل ۲۷-۴۶: تأثیر متهموگلوبینمی در ایجاد یک باند کاذب Hb-F در فردی بدون علایم بالینی که مقدار متهموگلوبین آن با روش ایولین-مالوی، ۳۵٪ اندازه گیری شده است.



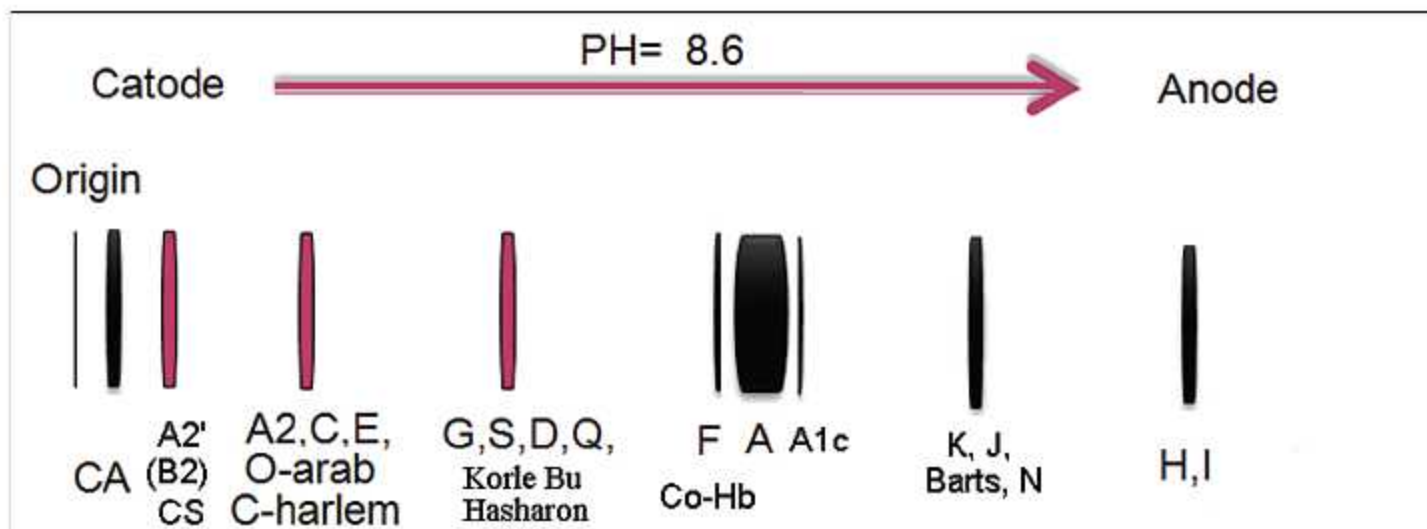
No.	Fraction	(%)	Flag	Normal (%)	g/dl
1	A1	57.3	L	95 - 98.5	8.4
2	F	0.6		0 - 2	0.1
3	S,D,G	40.6	H	0 - 0	6
4	A2	1.5		1.5 - 3.5	0.2



No.	Fraction	(%)	Flag	Normal (%)	g/dl
1	A1	78.1	L	95 - 98.5	9.7
2	F	0.2		0 - 2	0
3	S,D,G	20.7	H	0 - 0	2.5
4	A2	1.0	L	1.5 - 3.5	0.1

شکل ۲۴-۴۶: الگوی باندها و دانسیتومتری الکتروفورز هموگلوبین از دو بیمار مبتلا به فرم هتروزایگوت آنمی داسی شکل (باند مثبت GSD به همراه تست مثبت داسی شدن)





شکل ۱۹-۴۶: باند مربوط به هموگلوبین‌های طبیعی A, A2 و F و باند مربوط به هموگلوبین‌های غیرطبیعی (C, O, S, D, G, I, N, K و ...) که یا جایگاه باند جدیدی داشته (مثل H و S) و یا روی باندهای طبیعی سوار می‌شوند (مثل O, C, E که روی باند A2 سوار می‌شوند). باند Origin محل اپلیکاسیون و باند CA, آنزیم کربنیک انیدراز غشایی را نشان می‌دهد که حتی قبل از A2 ایجاد باند اختصاصی می‌کند [۱۴].

جدول ۳-۴۶: جایگاه باندهای مختلف هموگلوبین در ۱۲ ناحیه از صفحه الکتروفورز در pH قلیایی

جایگاه	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
باند اصلی	A <sub>2</sub> ' C-G CS	E, C, O A <sub>2</sub>	Gun Hill	Siriraj	G, S, D Zurich	Lepore Q	F	A Koln	K Hope	J chesapeake	Barts, N, J, I	H, I

# الکتروفورز اسیدی

(i) به جای کاغذ استات سلولوز، از ژل آگاروز و به جای تانک دومخزنی، از تانک تک مخزنی افقی استفاده می شود.

(ii) به دلیل کاهش ۲ واحدی pH و ایجاد شرایط اسیدی و انبوه یون های  $H^+$  محیط، عمده  $COO^-$  های هموگلوبین به  $COOH$  و  $NH_2$  ها به  $NH_3^+$  تبدیل می شوند، لذا در اکثر هموگلوبین ها از میزان بار منفی کاسته می شود ولی بار  $Hb-C$  که در حالت فیزیولوژیک، کمترین بار منفی را دارد، مثبت شده و لذا  $Hb-C$  به سمت عقب و به طرف کاتد حرکت نموده و یک باند مجزا برای خود تشکیل می دهد.

(iii) برخلاف  $Hb-C$ ، بقیه هموگلوبین ها هنوز بار منفی خود را حفظ کرده و بر اساس میزان بار منفی خود به سمت آند (+) حرکت می کنند که ترتیب حرکت آنها به صورت  $S \leftarrow A \leftarrow F$  می باشد. در نتیجه در این نوع الکتروفورز، به دلیل اینکه حرکت در هردو سمت ناحیه Origin (ناحیه لکه گذاری) انجام می گیرد، لذا ناحیه Origin در مرکز ژل قرار دارد و مثل استات سلولوز در لبه کاتدی کاغذ قرار نمی گیرد.

(iv) در این نوع الکتروفورز، به جز باند Siriraj که با باند C به طرف کاتد حرکت می کند، بقیه باندهای  $O-arab$ ،  $E$ ،  $A_2$  و  $C-harlem$  از باند C جدا شده و دو باند E و  $A_2$  در جایگاه باند A و دو باند  $O-arab$  و  $C-harlem$  نیز در جایگاه باند S قرار می گیرند.

(vi) همانند باند C، باند S نیز یک باند جدا تشکیل می دهد ولی به همراه آن، باند هموگلوبین های  $Hasharon$ ،  $O-arab$ ،  $C-harlem$  و  $Q-India$  نیز در این جایگاه قرار می گیرند.

(vii) باند Handsworth که در استات سلولوز در جایگاه S قرار می گرفت، در الکتروفورز سیترات آگار اسیدی بین S و A حرکت می کند.

(viii) در صورت شک به وجود هموگلوبین با میل ترکیبی بالا (مثل هموگلوبین Koln)، حتی هنگامی که الکتروفورز در pH قلیایی طبیعی باشد، باز الکتروفورز در pH اسیدی درخواست می گردد، چراکه تعدادی از هموگلوبین های با میل ترکیبی بالا فقط در pH اسیدی است که حرکت غیر طبیعی دارند. به عنوان مثال  $Hb-Koln$  مابین دو باند A و F باند مشخصی را ایجاد می کند که در الکتروفورز قلیایی قابل مشاهده نیست.

(ix) الکتروفورز اسیدی قادر به تفکیک  $Hb-A_2$  از  $Hb-A$  نیست.

(x) از مزایای این روش جداسازی مقادیر کم  $Hb-F$  در حضور مقادیر زیاد  $Hb-A$  می باشد.

**بافر استوک و بافرکاری سیترات اسیدی:**

برای تهیه بافر سیترات اسیدی استوک، ۱۴۷g سیترات سدیم را در ۶۰۰ml آب مقطر حل نموده، به کمک اسید سیتریک ۵۰٪ pH آن را بر روی ۶/۰-۶/۲ تنظیم کرده و سپس حجم آن را با آب مقطر به ۱ لیتر برسانید. بافر ذخیره را در دمای ۴°C یخچال نگهداری کنید. هنگام انجام آزمایش، به منظور ساخت ژل و ریختن بافر در تانک الکتروفورز، محلول استوک را به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر رقیق نموده و محلول کاری را تهیه و در دمای یخچال نگهداری نمایید.

**تهیه بستر ژلاتینی-آگاروزی الکتروفورز:**

در یک ارلن نیم لیتری ۱g گرم پودر آگاروز را به ۱۰۰ml از بافر کاری (سیترات اسیدی) اضافه نموده و سپس ارلن را در بن ماری آب جوش قرار دهید. زمانی که محلول شفاف شد، قالب‌های پلاستیکی سفت و محکمی را که از قبل در ابعاد ۷/۵×۱۰cm و با عمق ۳-۵mm بریده شده و برای این کار آماده شده اند را روی یک پلیت صاف و سرد قرار داده و سپس محلول گرم آگاروز را در داخل آن می‌ریزند تا بعد از سرد شدن، به فرم ژل نیمه جامد، صاف، یکنواخت و بدون موج یا حباب هوا دربیاید. قبل از سرد شدن ژل، حباب‌های احتمالی هوا را که ممکن است هنگام ریختن ژل ایجاد شده باشد را با نوک یک سوزن از بین می‌بریم تا مانع از حرکت باندهای هم‌گلوین نشوند. هنگام استفاده از ژل، می‌توان لبه‌های کناری آن را با تیغ بیستوری صاف نموده و بعد از قرار دادن ژل در کف تانک الکتروفورز، در وسط آن، ردیفی از چاهک‌ها را جهت لود کردن همولیزانت ایجاد نمود. بعد از آماده شدن ژل، سطح آن را به طور لب‌به‌لب با بافر سرد سیترات پر کنید تا ژل کاملاً خیس بخورد.

**مملول رنگ آمیزی:**

در یک ارلن ۱ لیتری، ۱۰۰mg از پودر رنگ بروموفنل بلو را در ۱۰ml اسید استیک حل نموده و سپس حجم آن را به ۱ لیتر برسانید. البته می‌توانید از رنگ پانسو S نیز استفاده کنید که در این صورت ۵g رنگ پانسو و ۷/۵g تری کلرواستیک اسید را در یک ارلن یک لیتری ریخته و حجم را با آب مقطر به یک لیتر برسانید.

**روش آزمایش:**

حدود ۱۰μl از هر نمونه همولیزانت و کنترل AFSC را در چاهک‌های مخصوص ژل آگاروز (ژلوز) بریزید. برای این منظور، اپلیکاتور الکتروفورز را در چاهک‌ها وارد نموده و بدون آنکه ژل آگاروز را پاره کنید، نمونه گذاری را در وسط ژلوز انجام دهید، اجازه دهید که نوک اپلیکاتور به مدت ۱۵ ثانیه با ژلوز در تماس باشد. جریان الکتریکی Power را بر روی ۵۰ میلی آمپر و زمان را بر روی ۶۰ دقیقه تنظیم کنید. بعد از پایان مدت، جریان الکتریکی را قطع و ژلوز را به مدت ۳ الی ۵ دقیقه در جار حاوی رنگ پانسو یا بروموفنل بلو غوطه ور سازید. سپس ژلوز را در آورده و در آب روان آبکشی کنید و برای حذف رنگ پس‌زمینه، به مدت ۶ الی ۸ دقیقه نیز آن را در محلول شفاف کننده قرار دهید. در نهایت، با قرار دادن ژلوز در دمای ۸۰°C به مدت ۲ ساعت، آن را خشک کنید. در صورتی که مایل به نگهداری طولانی مدت و بایگانی ژلوز بودید، آن را داخل یک نایلون محافظ در بسته پوشانده و در دمای یخچال قرار دهید.



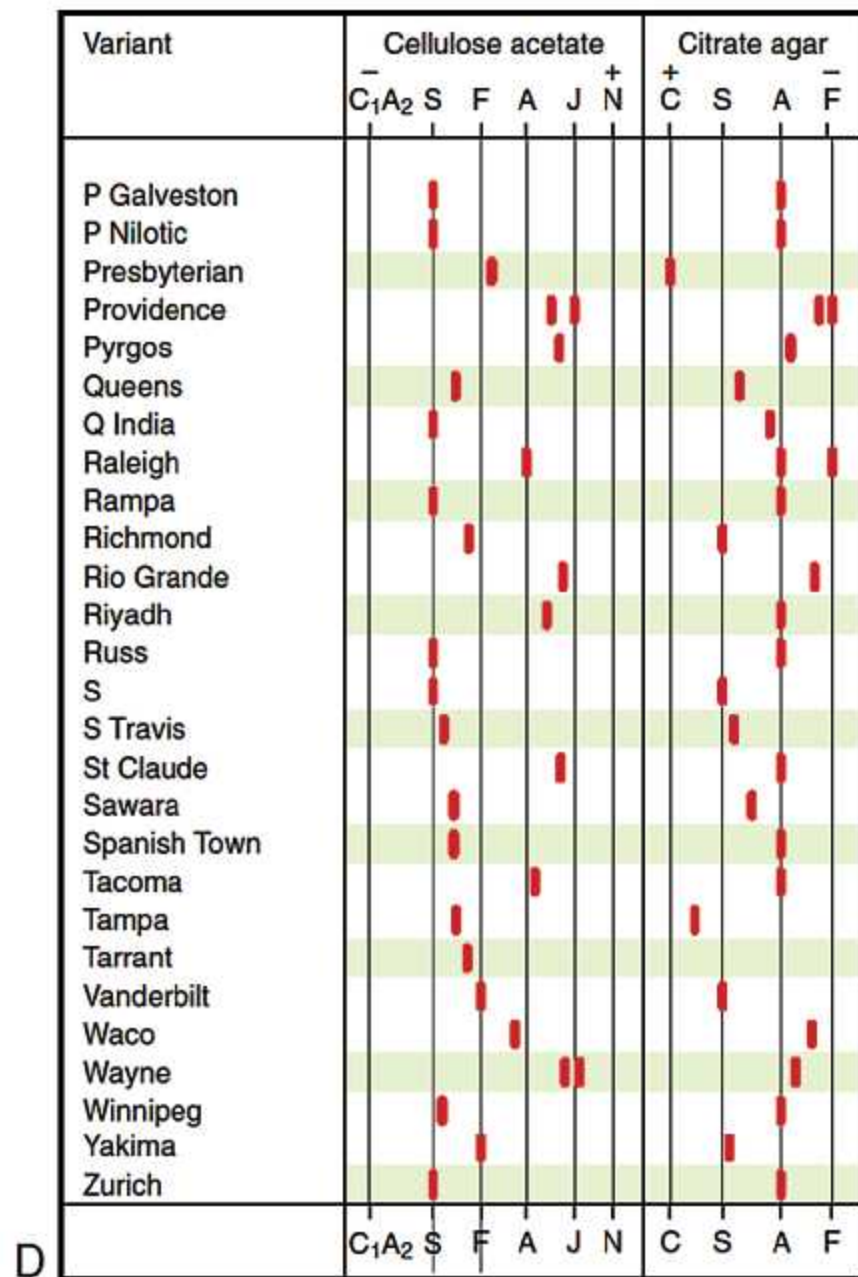
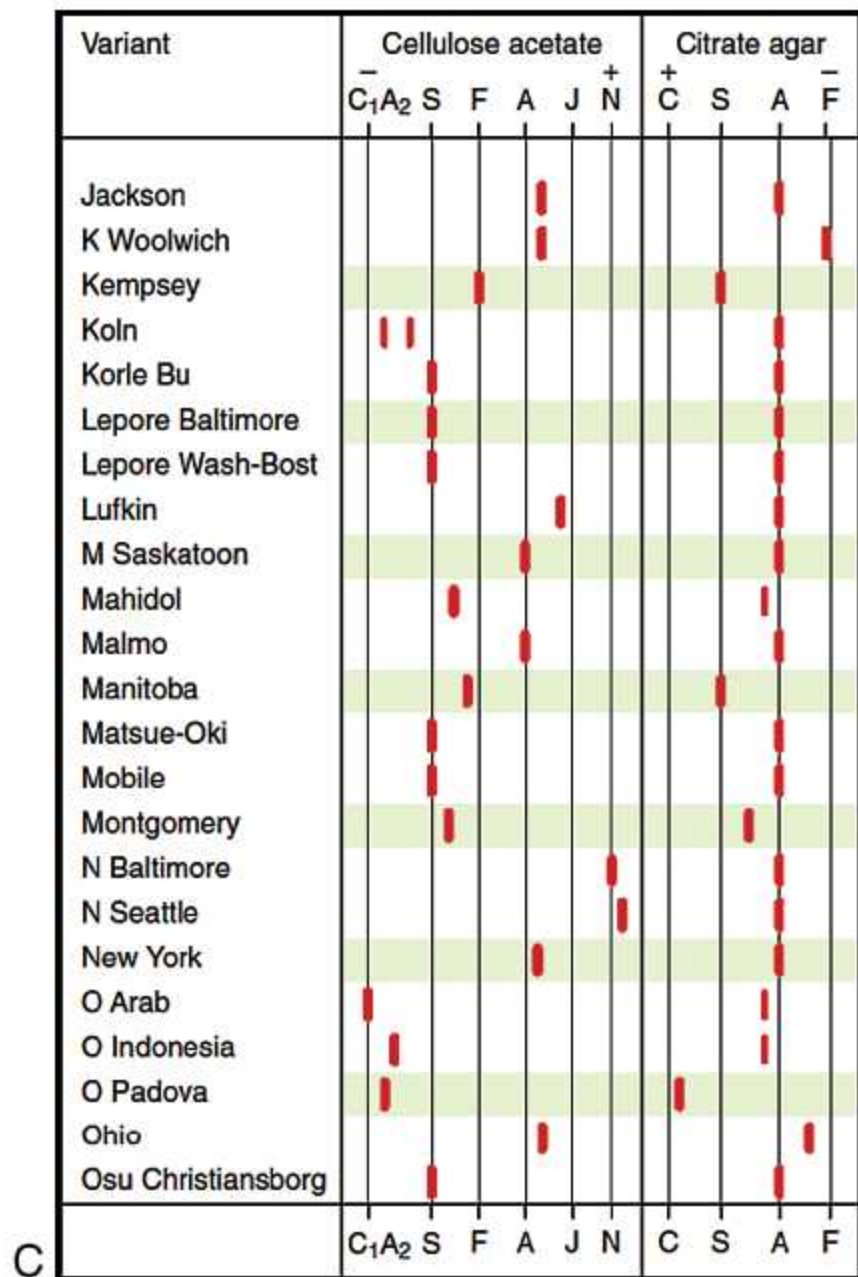


Variant	Cellulose acetate						Citrate agar			
	-	C <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	S	F	A	J	N	+	C	-
Andrew-Minn										
Arya										
Austin										
Belfast										
Bethesda										
Beth Israel										
Brockton										
C										
C Harlem										
Camden										
Camperdown										
Cheverly										
Connecticut										
Dallas										
D Ibadan										
D Iran										
D Los Angeles										
Deaconoss										
Deer Lodge										
Detroit										
Dunn										
E										
Evanston										
Fannin-Lubbock										
Flatbush										
Fort Gordon										
G Ferrara										
	C <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	S	F	A	J	N		C	S	A

A

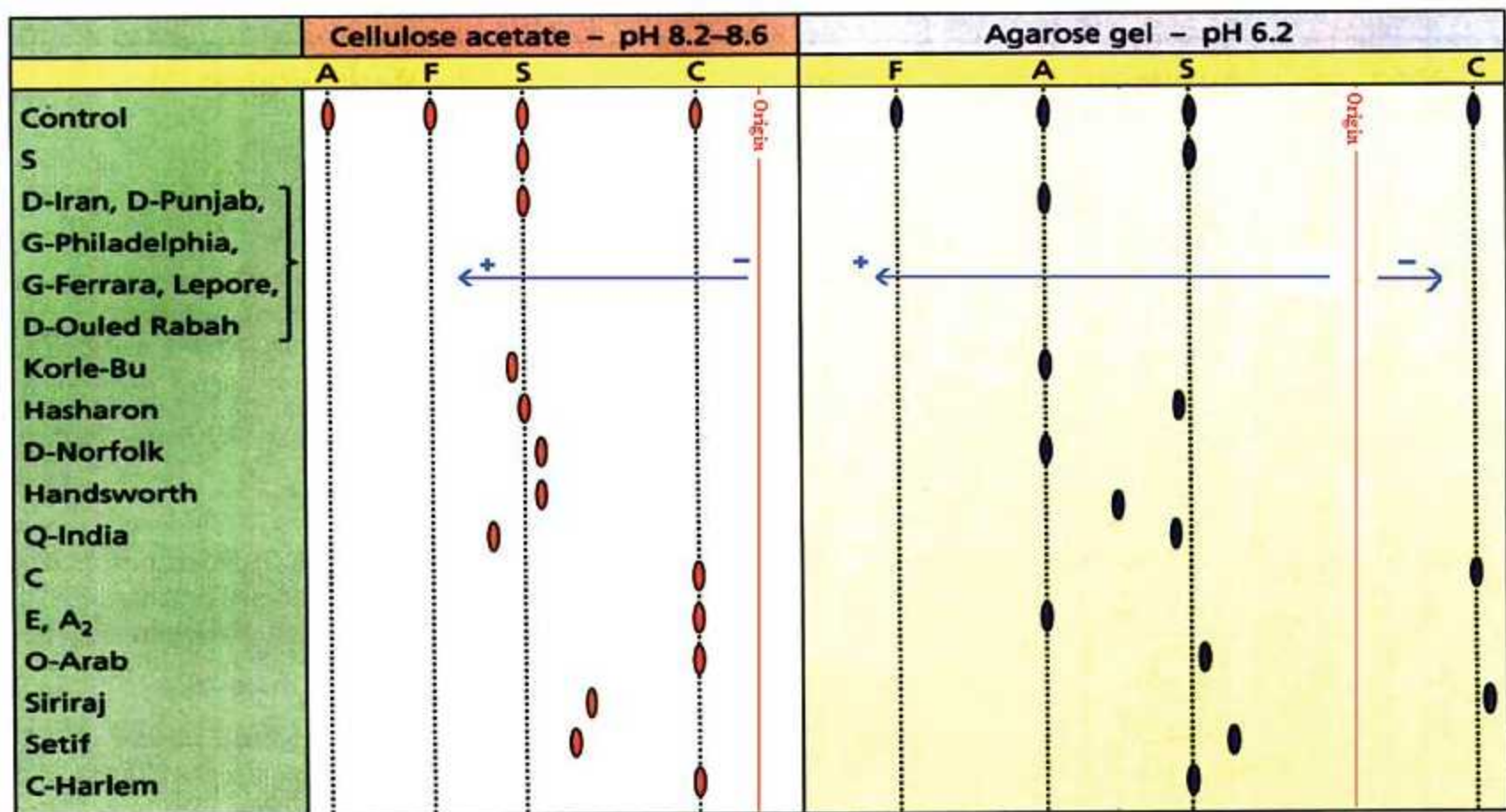
Variant	Cellulose acetate						Citrate agar			
	-	C <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	S	F	A	J	N	+	C	-
G Fort Worth										
G Galveston										
G Honolulu										
G Norfolk										
G Philadelphia										
G San Jose										
G Waimanaio										
Grady										
Hashaton										
Hofu										
Hope										
Hopkins II										
I										
I Interlaken										
Inkstor										
Istanbul										
J Baltimore										
J Bangkok										
J Broussais										
J Cubujuqui										
J Honolulu										
J Norfolk										
J Paris										
J Rovigo										
J Toronto										
	C <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	S	F	A	J	N		C	S	A

B



شکل ۳۱-۴۶: حرکت الکتروفورزی ۱۰۲ هموگلوبین نرمال و واریانت در دو الکتروفورز قلیایی و اسیدی [۶].





شکل ۳۲-۴۶: مقایسه حرکت باندهای هموگلوبین‌های مختلف در دو pH اسیدی و قلیایی (مقایسه استات سلولوز در برابر سیترات آگار) [۱۴].

### Group 1 (H and I)

Examples: H I  
I

مشخصات: وقتی الکتروفورز در pH-۸/۶ تا ۸/۹ اجرا می شود آنودال ترین انواع هموگلوبین هستند.

H\*

### Group 2 (N)

Example: N Baltimore

N Baltimore\*  
Barts\*  
I-Toulouse  
Hikari

N-Memphis  
J-Norfolk  
Nagasaki  
N Seattle

I-High Wycombe  
J-Altgeld Gardens  
Hijiyama

مشخصات: وقتی الکتروفورز در pH-۸/۶ تا ۸/۹ اجرا می شود، جایگاه بسیار آنودال دارند.

### Group 3 (J)

Example: J Baltimore

J-Oxford  
Hiroshima  
J-Bangkok  
J-Cairo  
j-Chicago  
J-Iran  
J-Meerut  
J-Paris 1  
J-sardegna  
J-Sicilia  
J-Taichung  
Jackson  
Pyrgos  
Shepherd's Bush  
Ottawa  
J-Rovigo  
Hopkins-2  
J-Cambridge  
Hofu  
J-Camagüey  
Anantharaj

Grady  
J-Ankara  
J-Broussias  
J-Calabria  
J-Habana  
J-Kurosh  
J-Mexico  
J-Rajappen  
J-Sicilia  
J-Tongariki  
Lyon  
Riyadh (?)  
Tochigi  
Lufkin  
Zambia  
J-Birmingham  
Austin  
J-Guantanamo  
Mosca  
Cardeza

Chesapeake  
Hacettepe  
J-Baltimore\*  
J-Buda  
J-Cape Town  
J-Kaohsiung  
J-Medellin  
J-Nyanza  
J-Rambam  
J-Singapore  
J-Toronto  
Providence  
Seattle  
Wien  
J-Jackson  
Ube-2  
St. Clude  
Fannin-Lubbock  
Thailand  
Wayne

مشخصات: وقتی الکتروفورز در pH-۸/۶ تا ۸/۹ اجرا می شود، جایگاه بسیار آنودال دارند.

## Group 4 (K and Camden)

مشخصات: وقتی الکتروفورز در pH-۸/۶ تا ۸/۹ اجرا می شود به طور ملایمی نسبت به هموگلوبین A آنودال هستند.

Example: J, Camden

Andrew-Minneapolis  
Hope\*  
K-Woolwich  
Tacoma

Camden\*  
K-Ibadan  
New York  
Yoshizuka

Camperdown  
K-Cameroon  
Singapore  
Porto Alegre

J-Abidjan

M-Hyde Park

Vassa

Prato

Prvidence

Osler

Detroit

Wayne

Cretéil

Sherwood Forest

Lufkin

## Group 5 (A)

مشخصات: حرکت الکتروفورزی در pH-۸/۶ تا ۸/۹ مشابه یا واقعاً مشابه با هموگلوبین A است.

Example: Bethesda

Mequon

Arlington Park

Brigham

Créteil

Hammersmith (also position 7)

Köln (also position 9)\*

Louisville

M-Iwate

McKees Rocks

Olympia

Rahere

Ta-Li#

Wood

Helsinki

Perth

Crete

Abraham Lincoln (also position 7)

Atlanta

Bristol

J-Camagüey

Durate

Heathrow

Koya Dora

M-Boston

M-Milwaukee-1

Memphis

Peterborough

Rainier

San Diego

Torino

York

Madrid

Hirosaki

Dunn

Altdorf

Bethesda

Beth Israel

Christchurch

Genova

Little Rock

M-Saskatoon

Malmö

Olmsted

Philly

St. Antoine

Southampton

Volga

Djelfa

Syracuse

Raleigh

Bicêtre

Coventry

Indianapolis

Milledgeville

Mizuho

Petah Tikva

Potomac

Nigeria



## Group 6 (F)

Example: Kempsey

F  
Caserta  
Hammersmith  
Kempsey  
Manitoba \$  
Yakima  
Burke  
Spanish Town  
Santa Ana  
Strumica  
Bryn Mawr  
Savannah  
Tarrant  
Suan-Dok

مشخصات: حرکت الکتروفرز در pH-۸/۶ تا ۸/۹ تقریباً بین راه یا نیمه راه A و S قرار می‌گیرد.

Port Phillip  
Abraham Lincoln  
Deaconess  
Hiroshima\*  
Horise  
Kansas  
St. Louis  
Tokyo  
Richmond  
Ypsilanti  
Borås  
St. Lukes  
Cochin-Port Royal  
Deer Lodge

Singapore  
Atago  
Denmark Hill  
Dhofar  
Freiburg  
Sawara  
Tübingen  
Rush  
British Columbia  
Newcastle  
Niteroi  
F-Sardinia  
Athens-Ga  
Presbyterian

## Group 7 (G and Lepore)

Examples: Lepore

G-Accra (Korle-Bu)  
G-Audhali  
G-Coushatta\*  
Lepore\*  
P-Nilotic  
Chiapas  
Richmond  
Ypsilanti (also position 6 and 11)  
A<sub>2</sub>-Flatbush  
Rush  
Motgomery  
A<sub>2</sub>-Coburg  
G-Galveston

G-Georgia  
G-Pest  
G-Szuhu  
Lincoln Park  
P-Congo  
Mobile  
Tak  
Baylor  
Sawara  
Q-India  
St. Louis  
Okaloosa  
Handsworth

G-Hong Kong  
G-Waimanalo  
Fort Worth  
P-Galveston  
Q-Thailand  
Rampa  
Winnipeg  
Atago  
D-Ibadan  
Tübingen  
Q-Iran  
Alabama  
Vancouver

مشخصات: بر اساس گزارش‌ها، این انواع به‌طور ملایمی حرکت آنودال‌تر نسبت به هموگلوبین S دارند.

## Group 8 (SDG)

شخصیات : حرکت آنودال الکتروفورزی هموگلوبین های این گروه در pH-۸/۶ تا ۸/۹ به طور ملایمی (آنودال تر) نسبت به هموگلوبین S سریع تر تا مشابه با هموگلوبین S دارند. به سیستم الکتروفورز بستگی دارد.

Example: D-Los Angeles, S, G-Philadelphia

Alabama	Queens	Fort de France
D-Iran •	Arya •	D-Los Angeles*
Edmonton	D-Ouled Rabah	Daneshgah-Tehran
Hamadan •	Etobicoke	Montgomery
St. Lukes	Inkster	Stanleyville II
Ottawa	Titusville	Russ
G-Galveston	G-Paris	G-Philadelphia*
Hasharon	G-Copenhagen	G-Taipei
Serbia	Beilinson	Setif
Osu-Christiansborg	Bibba	Ann Arbor
Shimonoseki	Ocho Rios	A <sub>2</sub> -Roosevelt
Cranston	Matsue-Oki	Castilla
Abruzzo	S-Travis	Dhofar
Zürich	G-Hsi-Tsou	Köln (also 5)
G-Pest	Caribbean	L-Persian Gulf
Memphis	G-Chinese	F-Dickinson
Sydney	Persepolis	G-Ferrara
G-Norfolk	F-Victoria Jubilee	Chiapas
G-Makassar	Riverdale-Bronx	P-Congo
Sogn	Saki	D-Bushman
G-Taiwan-Ami	Belfast	Williamette
Hirose	Henri Mondor	S*
Connecticut	Gavello	Chapel Hill

## Group 9

مشخصات : تعداد کمی از انواع هموگلوبین های کمیاب، حرکت الکتروفورزی در pH-۸/۶ تا ۸/۹، درست کاتودال (cathodal) نسبت به هموگلوبین S دارند.

Siriraj	Santa Ana	Ypsilanti
F-Port Roy	F-Victoria Jubilee	

### Group 10

مشخصات : وقتی الکتروفورز در  $\text{pH} = 8/6$  اجرا شود تعداد کمی از انواع هموگلوبین کمیاب حرکت الکتروفورزی تقریباً بین راه جایگاه‌های هموگلوبین S و  $A_2$  دارند.

Example: Istanbul

Istanbul

Sabine

Newcastle

F-Alexandra

Bushwick

$A_2$ -Babinga

Djelfa

Gun Hill

F-Kuala Lumpur

Kenya

Ypsilanti

Bryn Mawr Buenos Aires)

F-Hull

O-Indonesia

F-Malta-1

F-Victoria Jubilee

### Group 11 (CEO)

مشخصات : وقتی الکتروفورز در  $\text{pH} = 8/6$  اجرا می‌شود جایگاه بسیار کاتودال دارند.

Example: E, C

E\*

C-Georgetown

(C-Harlem)

O-Padua

M-Hyde Park

E-Saskatoon

C\*

Istanbul

Sabine

C-Ziguinchor

Chad

O-Arab\*

Agenogi

Nottingham (?)

Miyada

F-Texas-1

F-Texas-2

St. Claude

S-G-Philadelphia

Seal Rock

### Group 12

مشخصات : وقتی الکتروفورز در  $\text{pH} = 8/6$  اجرا می‌شود، بی‌نهایت جایگاه کاتودال دارند. برای اکثریت قسمت‌ها، این انواع در این گروه نادر هستند. استثنائاً هموگلوبین  $A_2'$  ( $B_2$ ) نیز در حدود ۱٪ سیاهان آمریکا دیده می‌شود. هموگلوبین Constant Spring که حدود ۳٪ جنوب شرقی‌های آسیا دیده می‌شود. هموگلوبین Constant Spring چندین باند نشان می‌دهد که شایع‌ترین بین  $HbA_2$  و کربونیک انیدراز است. باند دیگر در دو محل کاربرد الکتروفورز دیده می‌شود. هموگلوبین  $A_2'$  باندی تقریباً بین راه کربونیک انیدراز و محل کاربرد الکتروفورز دیده می‌شود.

Example: Constant Spring ( $\alpha$ -chain extended),  $A_2'^*$

Constant SpringE\*

Icaria

$A_2$ -Sphakia

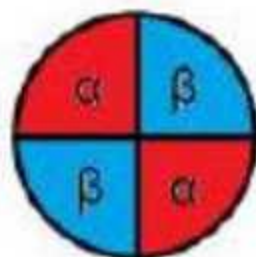
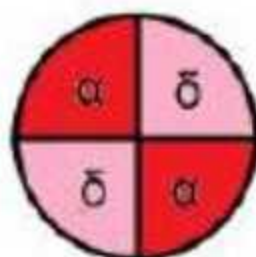
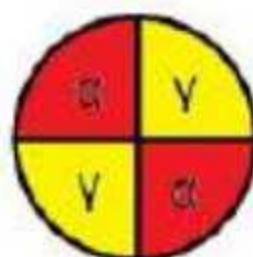
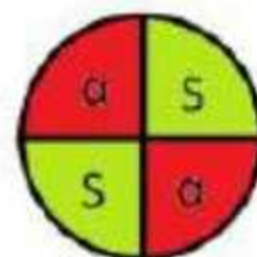
$A_2'^*$

F-Kuala Lumpur

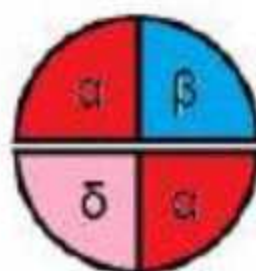
$A_2$  Indonesia

C-G-Philadelphia

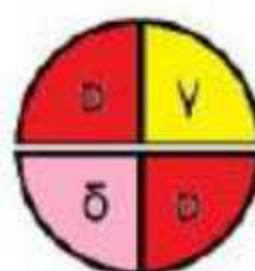


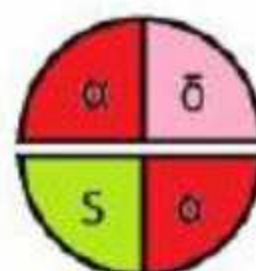

 $\alpha\alpha\beta\beta$ 
 $AA$ 

 $\alpha\alpha\delta\delta$ 
 $A_2A_2$ 

 $\alpha\alpha\gamma\gamma$ 
 $FF$ 

 $\alpha\alpha SS$ 
 $SS$ 

Expected Tetramerization


 $\alpha\alpha\beta\delta$ 
 $AA_2$ 

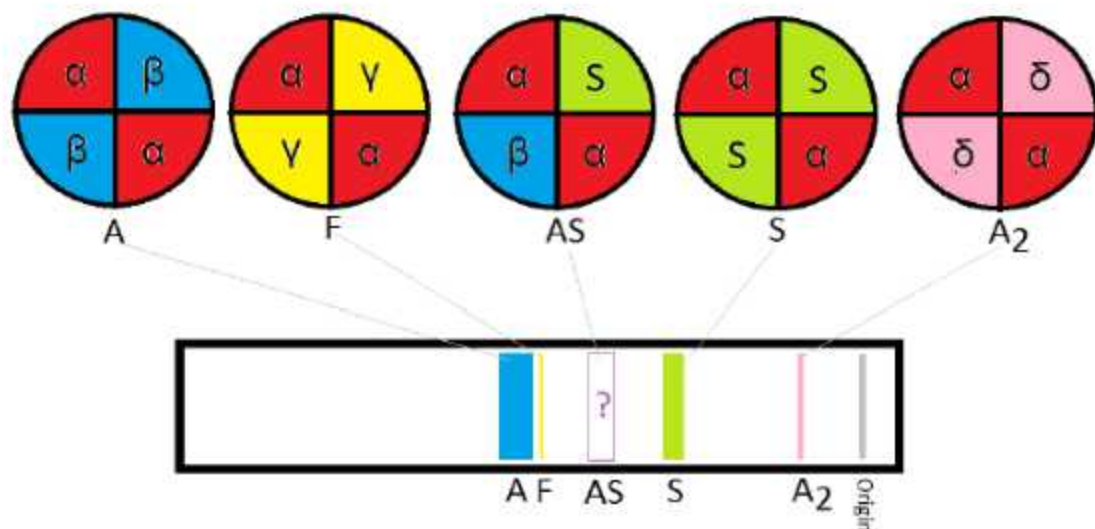
 $\alpha\alpha\beta\gamma$ 
 $AF$ 

 $\alpha\alpha\beta S$ 
 $AS$ 

 $\alpha\alpha\gamma\delta$ 
 $FA_2$ 

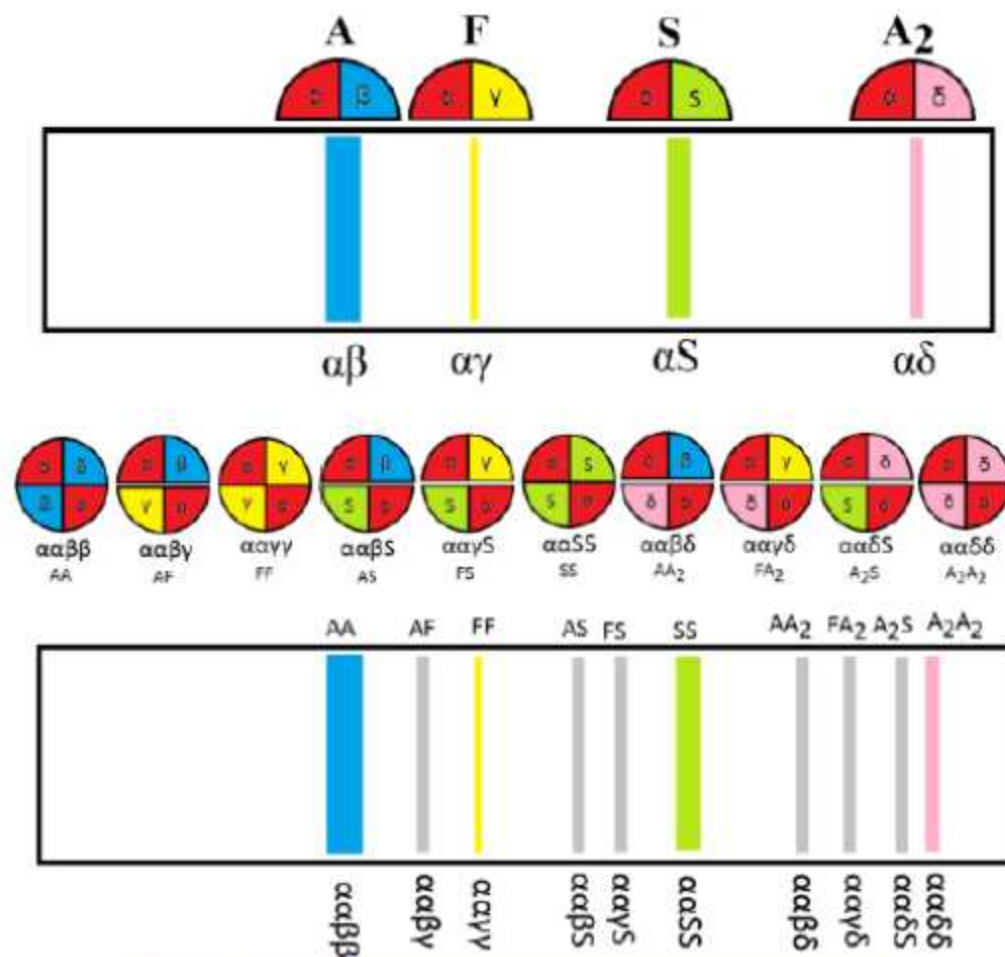
 $\alpha\alpha\gamma S$ 
 $FS$ 

 $\alpha\alpha\delta S$ 
 $A_2S$ 

Unexpected Tetramerization

شکل ۱۰: هتروترامریزاسیون انواع دایمر  $\alpha$ - $\gamma$  و  $\alpha$ - $\delta$ ،  $\alpha$ - $S$ ،  $\alpha$ - $\beta$  با یکدیگر که در مجموع منجر به تشکیل ۱۰ ترکیب مختلف می‌شود، حال آنکه در واقعیت فقط ۴ باند در الکتروفورز قلیایی یا کاپیلاری الکتروفورز دیده می‌شود.



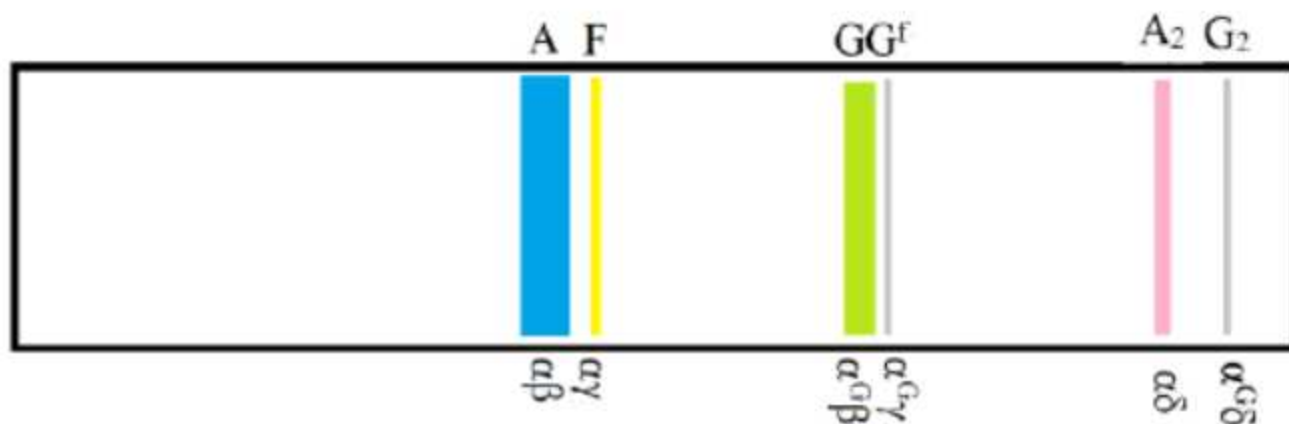
شکل ۱۱: تترامریزه شدن دایمر واریانت و موتانت  $\alpha$ -S در کنار دایمر طبیعی  $\alpha$ - $\beta$  که باعث تشکیل تترامر  $\alpha\beta$ - $\alpha$ S Hb-AS: می‌شود. حال آنکه این باند حتی با درصد کم نیز دیده نمی‌شود (دیگر باندهای احتمالی مورد انتظار نشان داده نشده است). با توجه به آنکه بار گلوبین آلفا  $2+$ ، بار گلوبین بتا  $2-$  و بار گلوبین S نیز  $1-$  هست، لذا برآیند بارها در هموگلوبین تترامر  $\alpha\alpha\beta\beta$  A:، رقم صفر، در هموگلوبین  $\alpha\alpha$ SS S: رقم  $2+$  و در هموگلوبین  $\alpha\alpha$ S $\beta$  AS: رقم  $1+$  هست که باعث ایجاد باند جدید بین S و F می‌شود.



Combination	A:αβ	F:αγ	A <sub>2</sub> :αδ	S:αS
A:αβ	AA	AF	AA <sub>2</sub>	AS
F:αγ	AF	FF	FA <sub>2</sub>	SF
A <sub>2</sub> :αδ	AA <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> F	A <sub>2</sub> A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> S
S:αS	AS	SF	A <sub>2</sub> S	SS

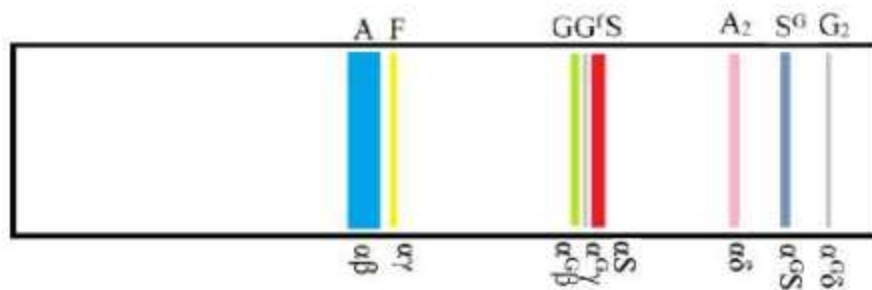
شکل ۱۲: دایمرهای چهارگانه موجود در خصیصه داسی (بالا) که اگر به صورت تترامر تصور می‌شدند، می‌بایست دارای ده باند متفاوت می‌بودند (پایین).



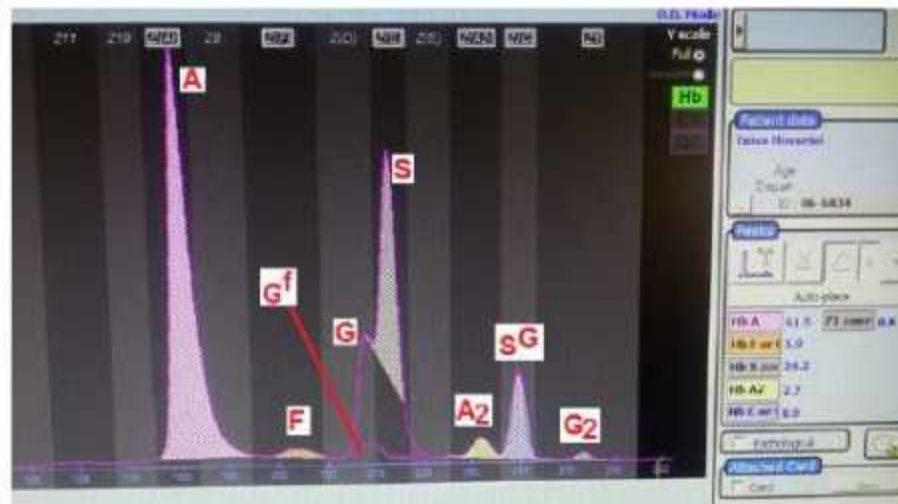


Combination	A:αβ	F:αγ	A <sub>2</sub> :αδ	G:α <sup>G</sup> β	G <sup>f</sup> :α <sup>G</sup> γ	G <sub>2</sub> :α <sup>G</sup> δ
A:αβ	AA	AF	AA <sub>2</sub>	AG	AG <sup>f</sup>	AG <sub>2</sub>
F:αγ	AF	FF	FA <sub>2</sub>	FG	FG <sup>f</sup>	FG <sub>2</sub>
A <sub>2</sub> :αδ	AA <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> F	A <sub>2</sub> A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> G	A <sub>2</sub> G <sup>f</sup>	A <sub>2</sub> G <sub>2</sub>
G:α <sup>G</sup> β	AG	FG	A <sub>2</sub> G	GG	GG <sup>f</sup>	GG <sub>2</sub>
G <sup>f</sup> :α <sup>G</sup> γ	AG <sup>f</sup>	FG <sup>f</sup>	A <sub>2</sub> G <sup>f</sup>	GG <sup>f</sup>	G <sup>f</sup> G <sup>f</sup>	G <sub>2</sub> G <sup>f</sup>
G <sub>2</sub> :α <sup>G</sup> δ	AG <sub>2</sub>	FG <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> G <sub>2</sub>	GG <sub>2</sub>	G <sub>2</sub> G <sup>f</sup>	G <sub>2</sub> G <sub>2</sub>

شکل ۱۳: در خصیصه هتروزیگوت Hb-G ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha^G-\beta/\beta$ ) ۲۱ تترامر قابل تعریف بوده ولی با در نظر گرفتن فرضیه دایمر بودن هموگلوبین در همولیزانت، تعداد ۶ دایمر مطرح می شود که به دلیل نزدیک بودن باندها بهم، ۴ باند A (۵۵٪)، F (۱٪)،  $G+G^f$  (۳۹٪)،  $A_2$  (۳٪) و  $G_2$  (۲٪) در الکتروفورز قابل مشاهده می باشد. باند  $G^f$  به دلیل باریک بودن شدید (۲۵٪ باند F) و نزدیکی به G، مجزا دیده نمی شود. در واقع به دلیل اینکه یکی از ۴ ژن  $\alpha$  به  $\alpha^G$  تبدیل می شود، لذا ۲۵٪ از باندها ماهیت G (مثل  $G^f$  که ۲۵٪ باند F و باند G که ۲۵٪ از باند A است) خواهند داشت.



Combination	A:αβ	F:αγ	A <sub>2</sub> :αδ	G:α <sup>G</sup> β	G <sup>f</sup> :α <sup>G</sup> γ	G <sub>2</sub> :α <sup>G</sup> δ	S:αS	S <sup>G</sup> :α <sup>G</sup> S
A:αβ	AA	AF	AA <sub>2</sub>	AG	AG <sup>f</sup>	AG <sub>2</sub>	AS	AS <sup>G</sup>
F:αγ	AF	FF	FA <sub>2</sub>	FG	FG <sup>f</sup>	FG <sub>2</sub>	SF	FS <sup>G</sup>
A <sub>2</sub> :αδ	AA <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> F	A <sub>2</sub> A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> G	A <sub>2</sub> G <sup>f</sup>	A <sub>2</sub> G <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> S	A <sub>2</sub> S <sup>G</sup>
G:α <sup>G</sup> β	AG	FG	A <sub>2</sub> G	GG	GG <sup>f</sup>	GG <sub>2</sub>	SG	GS <sup>G</sup>
G <sup>f</sup> :α <sup>G</sup> γ	AG <sup>f</sup>	FG <sup>f</sup>	A <sub>2</sub> G <sup>f</sup>	GG <sup>f</sup>	G <sup>f</sup> G <sup>f</sup>	G <sub>2</sub> G <sup>f</sup>	SG <sup>f</sup>	S <sup>G</sup> G <sup>f</sup>
G <sub>2</sub> :α <sup>G</sup> δ	AG <sub>2</sub>	FG <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> G <sub>2</sub>	GG <sub>2</sub>	G <sub>2</sub> G <sup>f</sup>	G <sub>2</sub> G <sub>2</sub>	SG <sub>2</sub>	S <sup>G</sup> G <sub>2</sub>
S:αS	AS	SF	A <sub>2</sub> S	SG	SG <sup>f</sup>	SG <sub>2</sub>	SS	SS <sup>G</sup>
S <sup>G</sup> :α <sup>G</sup> S	AS <sup>G</sup>	FS <sup>G</sup>	A <sub>2</sub> S <sup>G</sup>	GS <sup>G</sup>	S <sup>G</sup> G <sup>f</sup>	S <sup>G</sup> G <sub>2</sub>	SS <sup>G</sup>	S <sup>G</sup> S <sup>G</sup>

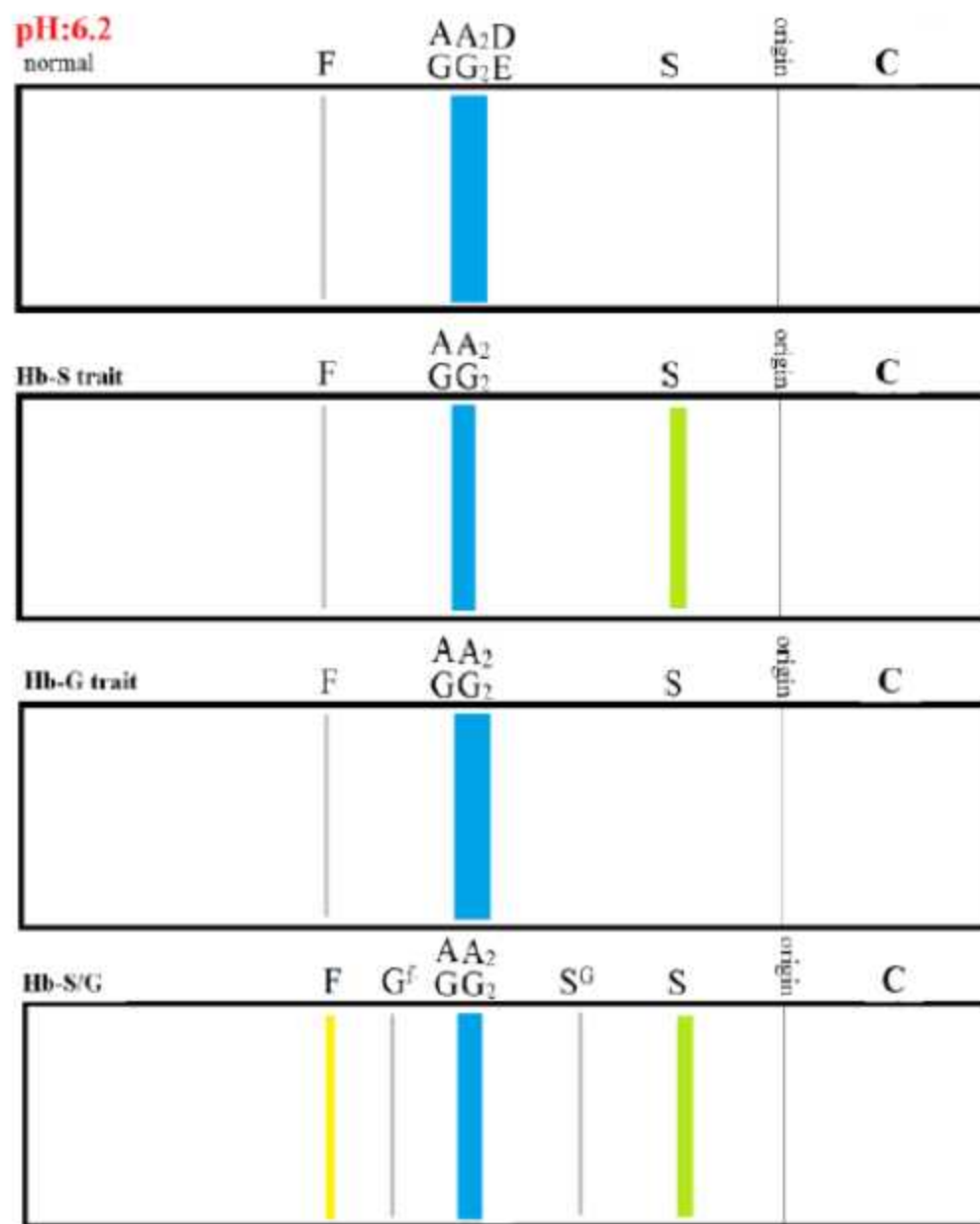


شکل ۱۴: در دوبل هتروزیگوت S/G ( $\alpha\alpha^G/\alpha\alpha-\beta/S$ ) ۳۶ تترامر قابل تعریف بوده ولی با در نظر گرفتن فرضیه دایمر بودن هموگلوبین در همولیزانت، تعداد ۸ دایمر مطرح می‌شود که به دلیل نزدیک بودن باندها بهم، ۵ باند A ( $0.61/5$ )، F ( $0.1/9$ )،  $G+S+G^f$  ( $0.24/2$ )،  $A_2$  ( $0.2/7$ )،  $S^G$  ( $0.8/9$ ) و  $G_2$  ( $0.0/8$ ) در الکتروفورز قابل مشاهده می‌باشد.

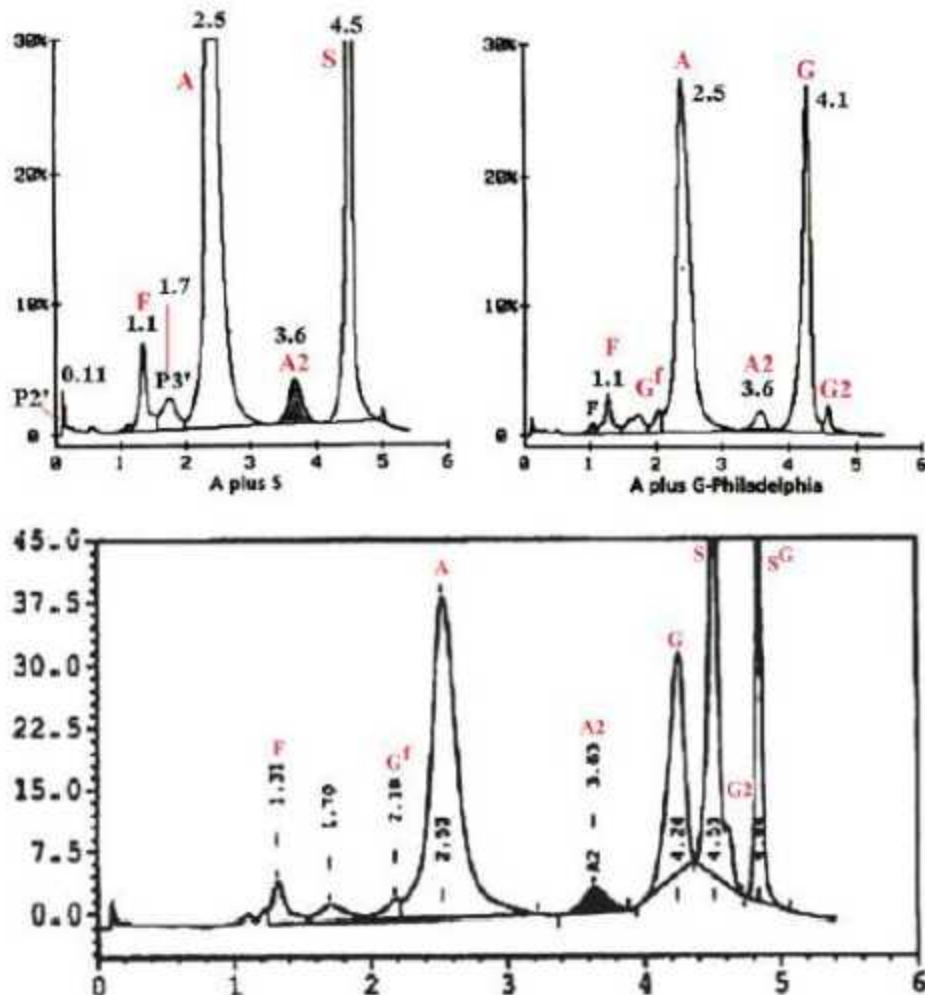


شکل ۱۵: الکتروفورز قلیایی (pH:8.6) در سه بیمار Hb-G trait، Hb-S Trait و Hb-G/S. همان‌طوری که مشهود است، باند S و G و G<sup>f</sup> دارای باند یکسان هستند، ولی وقتی که به صورت دابل هتروزیگوت به ارث می‌رسند، یک باند مازاد SG نیز مابین باند A<sub>2</sub> و G<sub>2</sub> ایجاد می‌کنند که درواقع دایمری از دو زنجیره کاتدیک α<sup>G</sup>S می‌باشد. باند S و G نیز به ترتیب دایمر αS و α<sup>G</sup>β می‌باشند.





شکل ۱۶: الگوی الکتروفورز اسیدی در فرد نرمال، خصیصه Hb-S، خصیصه Hb-G و دابل هتروزیگوت Hb-S/G که سه باند مازاد S، S<sup>G</sup> و G<sup>f</sup> را نیز نشان می‌دهد.

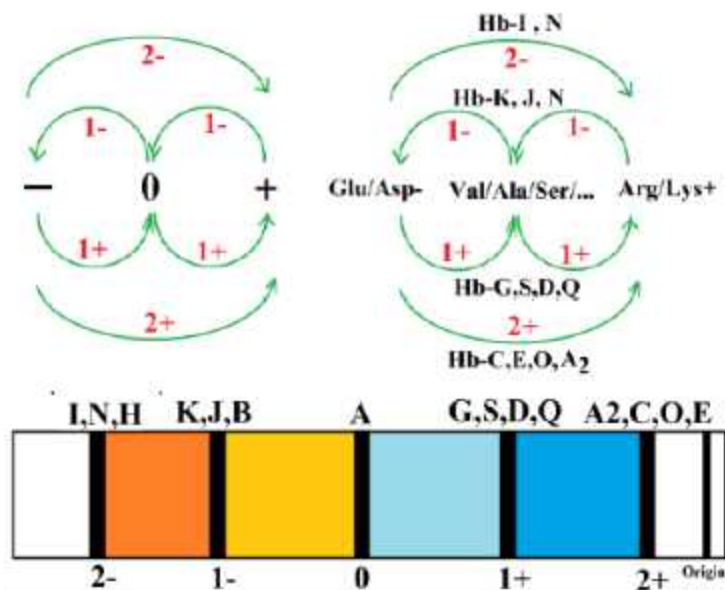


شکل 1۷) a و b: در دستگاه Bio-Rad-II رتنشن تایم (RT) باندهای A، A2، G، S و C به ترتیب 2.5، 3.6، 4.1، 4.5 و 5.1 بوده و لذا به راحتی خصیصه Hb-S و Hb-G trait از طریق باندهای متمایز خود قابل تشخیص هستند ولی در Hb-G trait باند کوچک  $G_2: \alpha^G \delta - \alpha^G \delta$  با RT: 4.7 و باند  $G^f: \alpha^G \gamma$  با RT=2.1 نیز قابل مشاهده هستند. C: اهمیت HPLC در شناسایی Hb-G/S بسیار بارز می باشد، بطوری که در نمودار HPLC، علاوه بر باندهای A: 2.5، A<sub>2</sub>: 3.6، G: 4.2، S: 4.5 و G<sub>2</sub>: 4.7، باند انحصاری S<sup>G</sup>: 4.9 نیز به صورت مجزا دیده می شود.

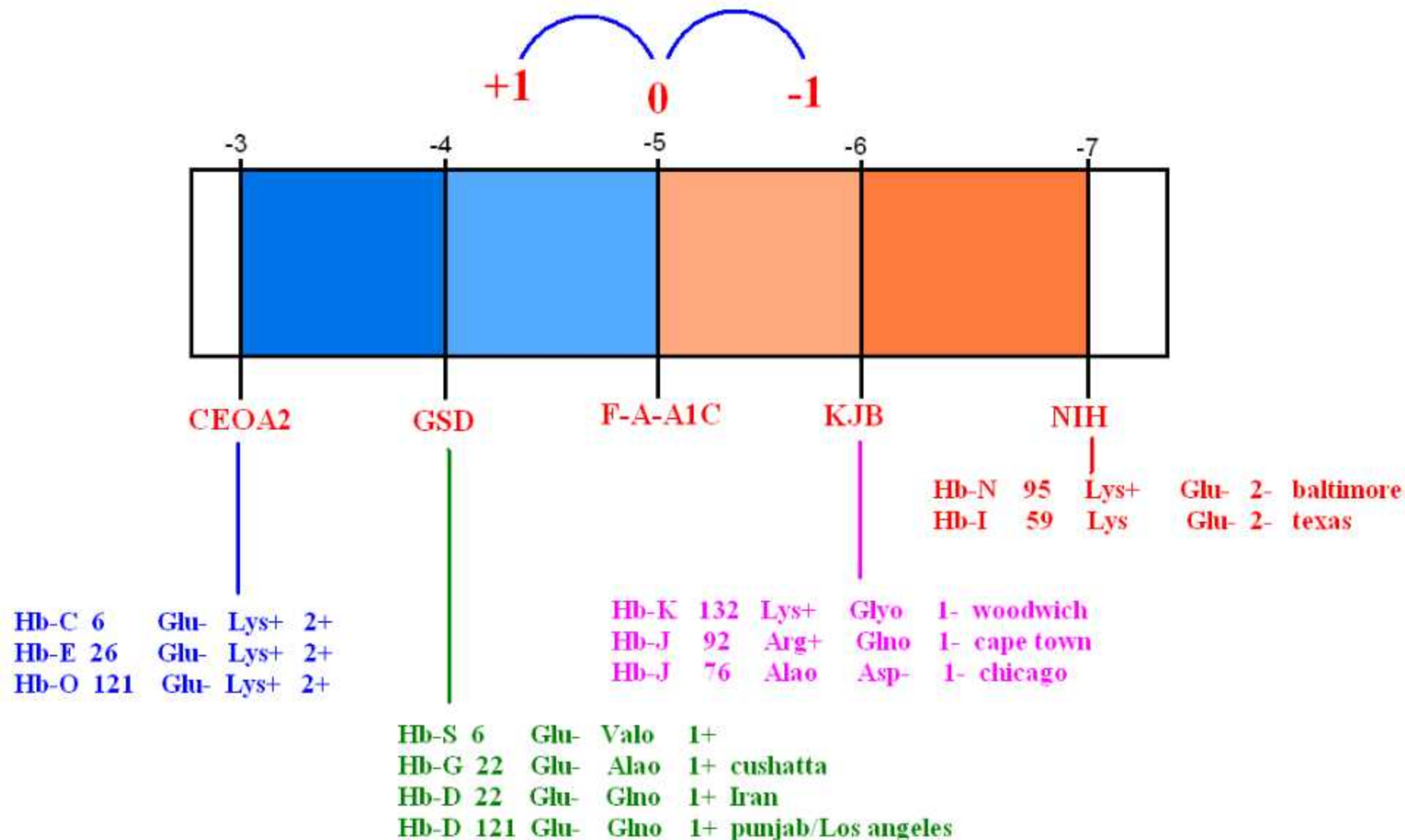
جدول ۱-۴۶: اسیدهای آمینه مختلف ۲۰ گانه که جایگزینی آنها با یکدیگر و تشکیل واریانت‌های مختلف، باعث تغییر خصوصیات فیزیکوشیمیایی هموگلوبین جهش یافته می‌شود [۵].

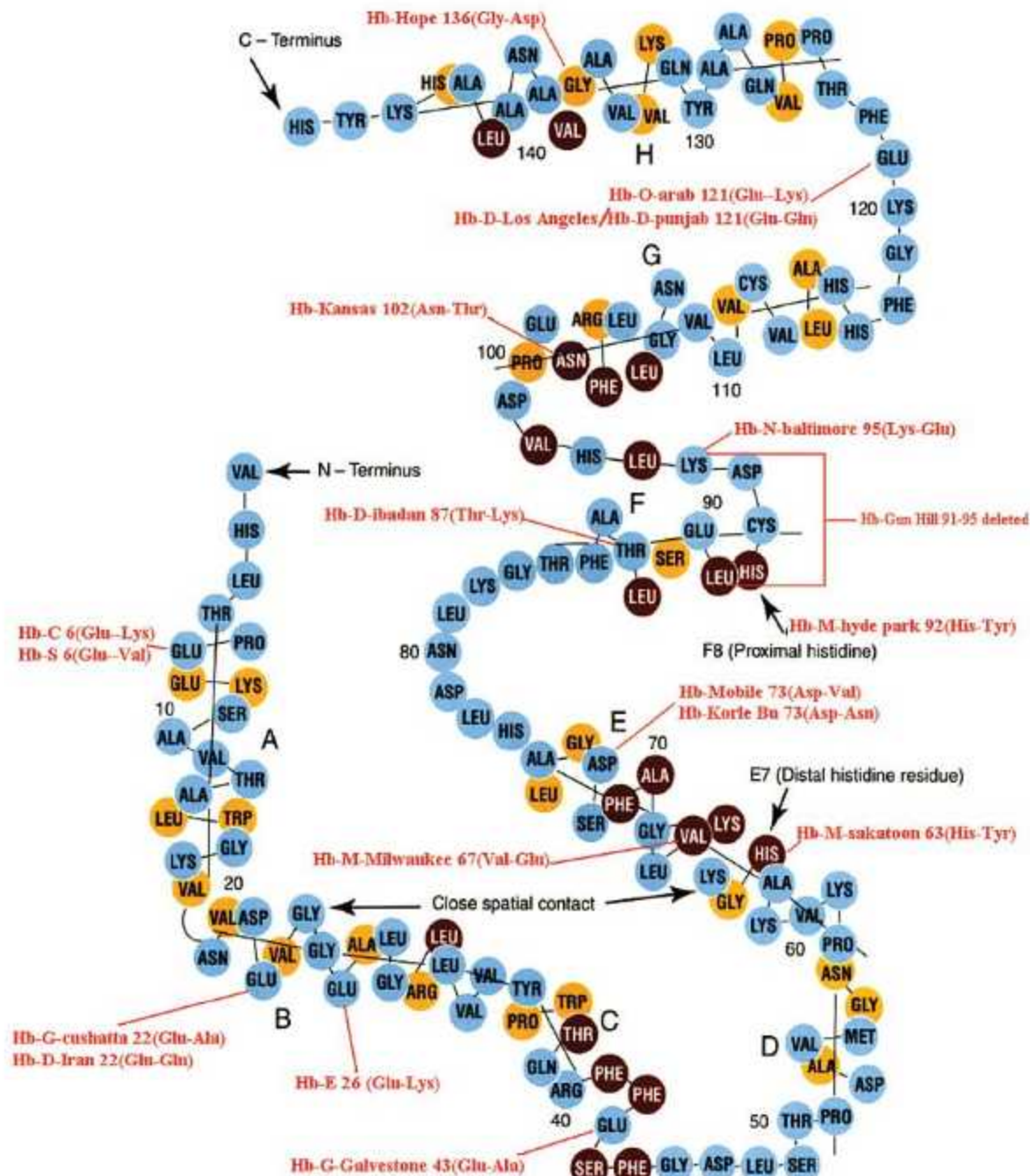
Name	Symbol	Structural Formula	Name	Symbol	Structural Formula
<b>With Aliphatic Side Chains</b>			<b>With Side Chains Containing Basic Groups</b>		
Glycine	Gly [G]		Arginine	Arg [R]	
Alanine	Ala [A]		Lysine	Lys [K]	
Valine	Val [V]		Histidine	His [H]	
Leucine	Leu [L]		<b>Containing Aromatic Rings</b>		
Isoleucine	Ile [I]		Histidine	His [H]	See above.
<b>With Side Chains Containing Hydroxylic (OH) Groups</b>			Phenylalanine	Phe [F]	
Serine	Ser [S]		Tyrosine	Tyr [Y]	
Threonine	Thr [T]		Tryptophan	Trp [W]	
Tyrosine	Tyr [Y]	See below.	<b>Imino Acid</b>		
<b>With Side Chains Containing Acidic Groups or Their Amides</b>			Proline	Pro [P]	
Aspartic acid	Asp [D]		<b>With Side Chains Containing Sulfur Atoms</b>		
Asparagine	Asn [N]		Cysteine	Cys [C]	
Glutamic acid	Glu [E]		Methionine	Met [M]	
Glutamine	Gln [Q]				





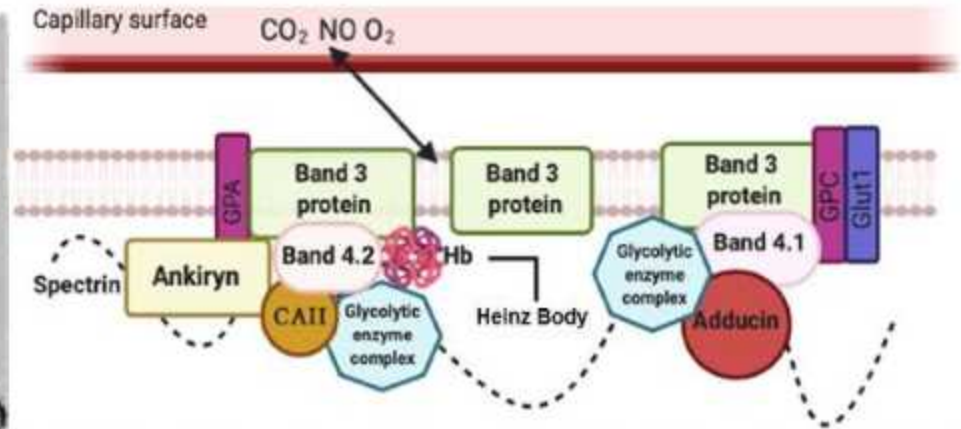
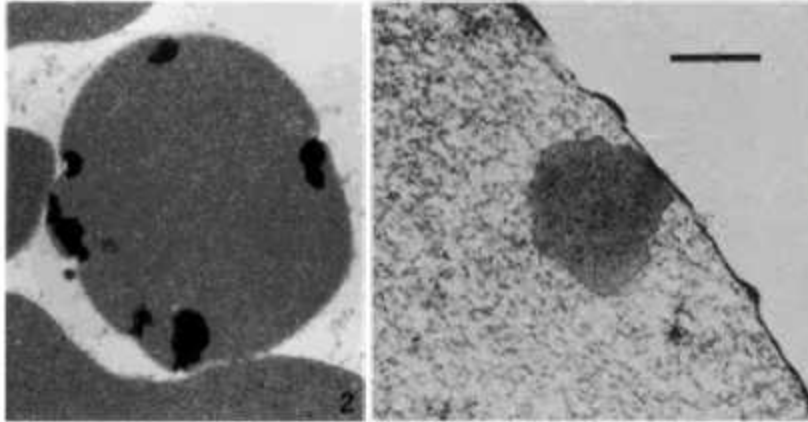
Hb-Variant	Chain	aa1	aa2	charge
Hb-C	β6	Glu-	Lys+	2+
Hb-E	β26	Glu-	Lys+	2+
Hb-O	β121	Glu-	Lys+	2+
Hb-C-harlem	β6	Glu-	Val0	2+
	β73	Asp-	Asn0	
Hb-A2	δ22	Glu-	Ala0	2+
	δ116	His0	Arg+	
Hb-S	β6	Glu-	Val0	1+
Hb-G Phil	α22	Glu-	Ala0	1+
Hb-D-Iran	β22	Glu-	Gln0	1+
Hb-D-Ibadan	B87	Thr0	Lys+	1+
Hb-D-punjab /Los angeles	β121	Glu-	Gln0	1+
Hb-Q-Iran	α75	Asp-	His0	1+
Hb-K-woodwich	β132	Lys+	Gly0	1-
Hb-J-Cape town	β92	Arg+	Gln0	1-
Hb-J-Chicago	β76	Ala0	Asp-	1-
Hb-N-Baltimore	β95	Lys+	Glu-	2-
Hb-I-Texas	β59	Lys+	Glu-	2-



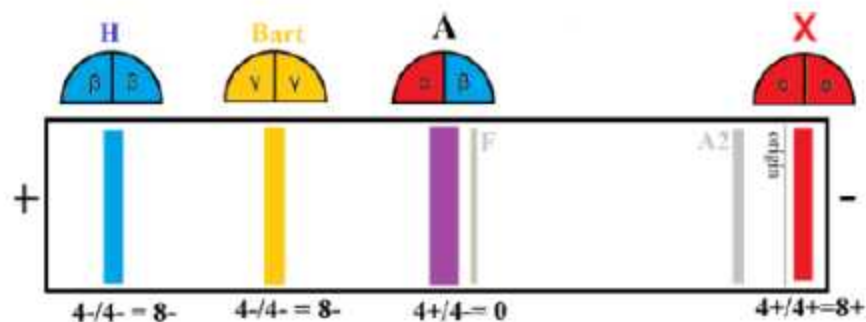


شکل (۲-۴): ساختار دوم زنجیره بتا گلوبین که A تا H را نشان می‌دهد. جهش‌های معروف زنجیره بتا نیز نشان داده شده است.

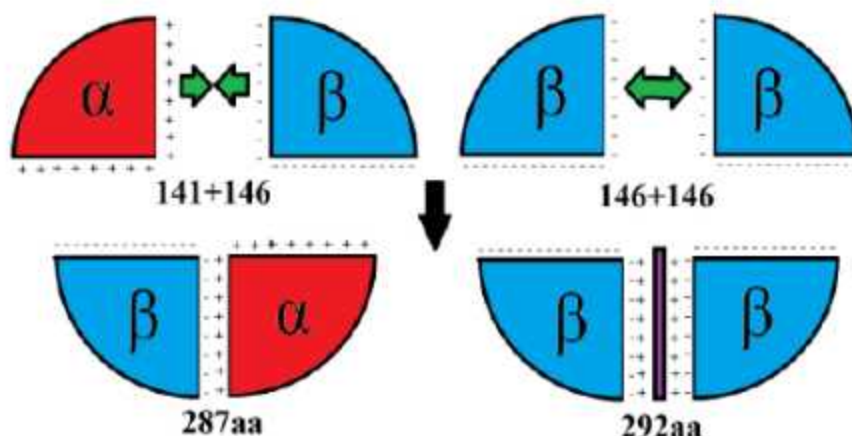




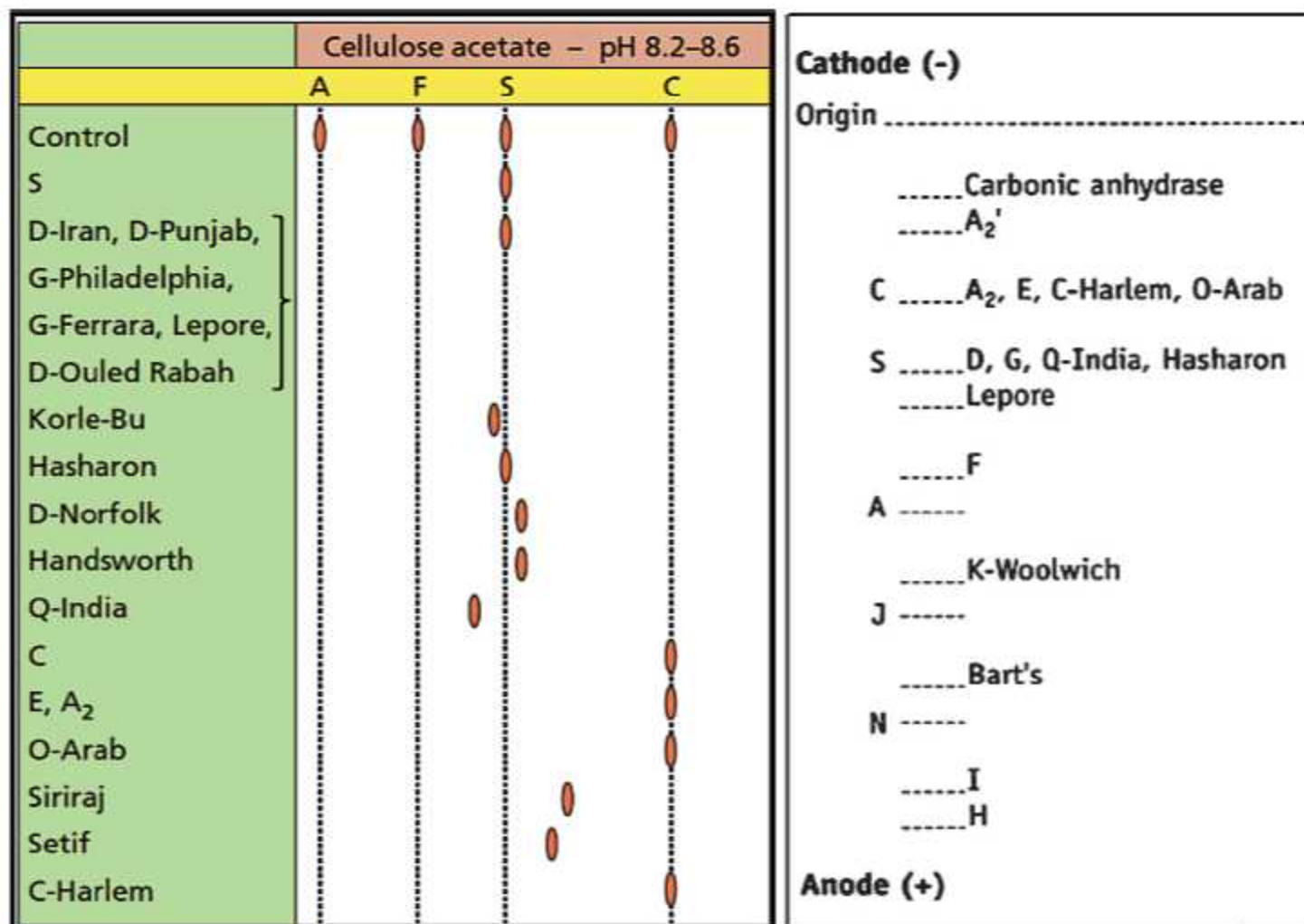
شکل ۲۰: اتصال همودایمرهای Hb و Bart و FB به پروتئین باند III غشاء و تشکیل هاینز بادی‌های بزرگ در غشاء که باعث میل سلول به پیتینگ توسط ماکروفاژهای RES و بروز اریتروپوئز غیرموثر و آنمی همولیتیک خارج عروقی می‌شود.



شکل ۱۸: جایگاه حرکتی باندهای همودایمر H، Bart و FB در الکتروفورز قلیایی که در B و H علی‌رغم سنگینی دایمر، به دلیل شارژ منفی شدید سریع‌تر حرکت نموده و در FB علی‌رغم سبکی دایمر  $\alpha\alpha$  نسبت به  $\alpha\beta$ ، به دلیل شارژ مثبت، قادر به حرکت به سمت الکتروود آند نمی‌باشد.



شکل ۱۹: همودایمر  $\beta\beta$  با ۲۹۲ اسید آمینه شارژ ۴- از هترودایمر  $\alpha\beta$  با ۲۸۷ اسید آمینه شارژ ۰ سنگین‌تر و مثبت‌تر می‌باشد که باعث حرکت سریع آن به سمت الکتروود آند (+) می‌شود ولی در مورد همودایمر  $\alpha\alpha$ ، شارژ مثبت (۴+) باعث توقف حرکت از محل لکه‌گذاری شده و مانع از تشکیل باند مجزای X می‌شود. برای همودایمر شدن  $\beta\beta$  احتمالاً یک واسطه پلی‌کاتیون نیاز هست (فرضیه اثبات نشده).



شکل ۲۰-۴۶: جایگاه استقرار باند مربوط به هموگلوبین‌های واریانت مختلف که در یکی از ۴ باند A, F, S و C قرار می‌گیرند. بسیاری از آنها نیز باهم در یک باند حرکت می‌کنند [۱۴].



										وضعیت الکتروفورزی		تغایر پالینی									
										pH 8.6	pH 6.2	pH 8.6 pH 6.2									
نام	زنجیره	شماره هلیکال	جایگاه آمینواسید	جانشین شدن	تغایر پالینی					نام	زنجیره	شماره هلیکال	جایگاه آمینواسید	جانشین شدن	تغایر پالینی						
A <sub>2</sub> or B <sub>2</sub>	δ	A13	16	Gly → Arg	n	19	A					Castilla	β	B14	32	Leu → Arg	u, a	9	A		
A <sub>2</sub> -Adria	δ	D2	51	Pro → Arg	n	15						Chad	α	B4	23	Glu → Lys	n	13	A		
A <sub>2</sub> -Babinga	δ	H14	136	Gly → Asp	n	11	F					Chapel Hill	α	E13	74	Asp → Gly	e, 0 ↑	8			
A <sub>2</sub> -Coburg	δ	G18	116	Arg → His	n	8						Chesapeake	α	FG4	92	Arg → Leu	e, 0 ↑	3	A		
A <sub>2</sub> -Flasbush	δ	B4	22	Ala → Glu	n	7	A					Chippas	α	GH2	114	Pro → Arg	n	8			
A <sub>2</sub> -Indonesia	δ	E13	69	Gly → Arg	n	20						Cisba	See Hammersmith								
A <sub>2</sub> -Melbourne	δ	CD2	43	Glu → Lys	n	24						Christchurch	β	E15	71	Phe → Ser	u	5			
A <sub>2</sub> -N.Y.U.	δ	A9	12	Asn → Lys	n	18						Cochin-Port Royal	β	HC3	146	His → Arg	n(?)	8	A		
A <sub>2</sub> -Roosevelt	δ	B2	20	Nal → Glu	n	8						Connecticut	β	B3	21	Asp → Gly	a, 0 ↓	9	A		
A <sub>2</sub> -Sphakia	δ	NA2	2	His → Arg	n	17						Constant Spring	α	HC3	141	Chain extension	α1b-1	15, 20, 24, 26			
Abidjan	See J-Abidjan											Coventry	β	H19	deleted	(β-δ fusion)	u	5			
Abraham Lincoln	β	B13	32	Leu → Pro	u, a	5, 7						Cowtown	β	HC3	146	His → Leu	e, 0 ↑	5			
Abruzzo	β	H21	143	His → Arg	βth-1, 0 ↑	8						Cranston	β	HC2	145	Chain extension	u	7			
Aegias	See F-Fessas Not characterized											Crete	β	H7	129	Ala → Pro	u, e, 0 ↑	5	A		
Agencog	β	F6	90	Glu → Lys	a, 0 ↓	12	S-C					Crétail	β	F5	89	Ser → Asn	e(7), 0 ↑	5	A-S		
Aida	See G-Waimanalo											Cyprus-1	Not characterized (TLepore-Boston)								
Alabama	β	C5	39	Gln → Lys	n	9	A					D	See D-Los Angeles								
Alamo	β	B1	19	Asn → Asp	n	4						D-Baltimore	See G-Philadelphia								
Alberta	β	G3	101	Glu → Gly	e, 0 ↑	7						D-Bashman	β	A13	16	Gly → Arg	n(?)	9			
Aldorf	β	H13	135	Ala → Pro	u, a, 0 ↑	5						D-Chicago	See D-Los Angeles								
Ananitharaj	α	A9	11	Lys → Glu	n	3	A					D-Conley	See D-Los Angeles								
Andrew-Minneapolis	β	HC1	144	Lys → Asn	e, 0 ↑	4						D-Cyprus	See D-Los Angeles								
Ankara	See J-Ankara											D-Frankfurt	No characterized								
Ann Arbor	α	F1	80	Leu → Arg	u, a	9	A					D-Ibadan	β	F3	87	Thr → Lys	n	9	A-S		
Arlington Park	β	FG2	95	Lys → Glu	n, s-4(?)	5	C(?)					D-Iran *	β	B4	22	Glu → Glu	n	9	A		
Arya	α	CD5	47	Asp → Asn	u, n	9	A					D-Iran *	β	B4	22	Glu → Glu	n	9	A		
Azago	α	F6	85	Asp → Tyr	n	7						Bristol	β	E11	67	Val → Asp	u, a	5			
Athras	See Constant Spring											D-Los Angeles	β	GH4	121	Glu → Glu	s-1, 0 ↑	9	A		
Athens-GA	β	C6	40	Arg → Lys	n, 0 ↑	6	A-F					D-North Carolina	See D-Los Angeles								
Atlanta	β	E19	75	Leu → Pro	u, n	4						D-Oak Ridge	See D-Los Angeles								
Augusta-1	See Bart's											D-Ouled Rabah	β	B1	19	Asn → Lys	No information	9			
Augusta-2	See Bart's											D-Portugal	See D-Los Angeles								
Austin	β	C6	40	Arg → Ser	n, 0 ↑	6	A-F					D-Punjab	See D-Los Angeles								
Avionana	β	CD6	47	Asp → Ala	n	9	A					D-St. Louis	See G-Philadelphia								
Azuokoti	See G-Philadelphia											D-Thailand	See G-Philadelphia								
Babinga	See A <sub>2</sub> -Babinga											D-Washington	See G-Philadelphia								
Bart's	γa				αth	2	F					Dakar	See Grady								
Baylor	β	EF5	81	Leu → Arg	u, a, 0 ↑	8	A-S					Daneshgah-Tehran	α	EF1	72	His → Arg	n	9	A		
Belinson	α	CD5	47	Asp → Gly	u, a	8	A-S					Deaconess	β	H9	131	Gln deleted	u, n	6	S-C		
Belfast	β	A12	15	Trp → Arg	u, th, 0 ↑	6	A					Deer Lodge	β	NA2	2	His → Arg	n	8	A		
Belgrad	β	GH4	121	Glu → Val	n	9						Denmark Hill	α	FG2	95	Pro → Ala	n, 0 ↑	6			
Beth Israel	β	G4	102	Asn → Ser	e, 0 ↓	5						Detroit	β	FG2	95	Lys → Asn	n	4	A		
Bethesda	β	HC2	145	Tyr → His	e, 0 ↑	5	A-S					Dhofar	β	E2	58	Pro → Arg	No information	6			
Bibba	α	H19	136	Leu → Pro	u, a	9						Djeila	β	FG5	98	Val → Ala	u, 0 ↑	12	A		
Bicêtre	β	E7	63	His → Pro	u, a	5						Drenthe	See Volga								
Birmingham	See Montgomery											Durate	β	E6	62	Ala → Pro	u, a, 0 ↑	5			
Borla	β	F4	88	Leu → Arg	u, a	7, 9						Dunn	α	A4	6	Asp → Asn	n	7	A-S		
Brigham	β	G2	100	Pro → Leu	e, 0 ↑	5	A					Durham-1	Not characterized (TJ-Baltimore)								
Bristol	β	E11	67	Val → Asp	u, a	5						E	β	B8	26	Glu → Lys	u, βth-1, 0 ↓	13	A		
British Columbia	β	G3	101	Glu → Lys	e, 0 ↑	7	C					E-Pittsburgh	Not characterized (TAgencog)								
Broussais	See J-Broussais											E-Siskatone	β	B4	22	Glu → Lys	u, n	13	A		
Bryn Mawr	β	F1	85	Phe → Ser	u, a, 0 ↑	5						Edmonton	β	D1	50	Thr → Lys	n	9	A		
Bucaresti	See Louisville											Egypt	See O-Arab								
Buenos Aires	See Bryn Mawr											Etobicoke	α	F5	84	Ser → Arg	u, n, 0 ↑	9			
Buginese-X	See O-Indonesia											F-Alexandra	γ	A9	12	Thr → Lys	n	12			
Burke	β	G9	107	Gly → Arg	u, a, 0 ↓	7	S					F-Auckland	γ	A4	7	Asp → Asn	n	9			
Bustwick	β	E18	74	Gly → Val	u, a	12						F-Carlin	γ	GH4	121	Glu → Lys	n				
C	β	A2	6	Glu → Lys	s-i	13	C					F-Dickinson	γ	GF4	97	His → Arg	No information	8	F		
C/G = C-G-Philadelphia Hybrid of C and G-Philadelphia																					
C-Georgetown	β	A3	6	Glu → Val	s	13	S						Not characterized								
(C-Harlem)	β	E17	6	Asp → Asn	s	14	S					F-Houston	Not characterized								
C-Zigunchor	β	A3	6	Glu → Val	s	14	S					F-Hull	γ	GH4	121	Glu → Lys	n	12			
Camden	β	E2	58	Pro → Arg	n	4	A-F					F-Jamaica	γ	E5	61	Lys → Glu	n	2			
Camperdown	β	H9	131	Gln → Glu	n	3						F-Kuala Lumpur	γ	B4	22	Asp → Gly	n	12			
Caracas	See North Shore											F-Malaysia	γ	NA1	1	Gly → Cys	n	3			
Cardesa	Not characterized											F-Malta	γ	G19	117	His → Arg	n	9			
Caribbean	β	F7	91	Leu → Arg	u(7), 0 ↓	8	A					F-Malta-1	See F-Malta								
Caserta	β				n	7						F-Melbourne	γ	A13	16	Gly → Arg	n				
Casper	See Southampton											F-Poole	γ	H8	130	Trp → Gly	u, a (in newborn)	4,5			

نام	شماره	جایگاه	جانتسین	تغایر	وضعیت	
					الکتروفروری	pH 6.2
نام	شماره	جایگاه	جانتسین	تغایر	الکتروفروری	pH 6.2
F-Port Royal	125	H3	Gly → Ala	n	10	F
F-Roma	No characterized			n	2	F
F-Sardinia	E19	75	Ile → Thr	n	6	
F-Texas-I	A2	5	Glu → Lys	n	13	F
F-Texas-II	A3	6	Glu → Lys	n	13	
F-Ube	G10	108	Asn → Lys	n	"Slow"	
F-Victoria Jubilee	EF4	80	Asp → Tyr	n	10	F
F-Warren	Not characterized			n	9	
Femin-Lutbock	GH2	115	Gly → Asp	n, n	4	A
Fennu-Papontpyrou	See Bact's					
Fort de France	CD3	45	His → Arg	n, n, 0 ↑	8	A
Fort Gordon	See Oster					
Fort Worth	B8	27	Glu → Gly	n, th	8	A
Frankfurt	Not characterized			n, n	9	
Freiburg	B5	23	Val deleted	n, m, 0 ↑	6	
G	See G-Aucara					
G-Accra	E17	73	Asp → Asn	n	9	A to A-S
G-Audubon	B4	22	Glu → Val	?	9	
G-Azaku	See G-Philadelphia					
G-Baltimore	Not established					
G-Bristol	See G-Philadelphia					
G-Chinese	See G-Hong Kong					
G-Copenhagen	CD6	47	Asp → Asn	No information	9	
G-Couthata	B4	22	Glu → Ala	n	8	A
G-Ferrara	B1	57	Asn → Lys	n	8	
G-Galveston	CD2	43	Glu → Ala	n	9	A
G-Georgia	G2	95	Pro → Leu	n, 0 ↑	9	A-F
G-Honan	See Siraj					
G-Hong kong	B11	30	Glu → Gln	n	9	A
G-Honolulu	See G-Hong Kong					
G-Hsin-Chu	See G-Couthata					
G-Hai-Tsou	EF3	79	Asp → Gly	n, 0 ↑	8	
G-Ibadan	Not established					
G-Knoxville-II	See G-Philadelphia					
G-Mekassar	A3	6	Glu → Ala	n	9	
G-Norfolk	F6	85	Asp → Asn	n	9	A
G-Paris	Not established					
G-Pest	BF3	74	Asp → Asn	7 interacts with J-Buda, e	9	
G-Philadelphia	B17	68	Asn → Lys	n	9	A
G-Port Arthur	See G-Galveston					
G-San Jose	A4	7	Glu → Gly	n, n	8	S-C
G-Saskatoon	See G-Couthata					
G-Singapore	See G-Hong Kong					
G-St-I	See G-Philadelphia					
G-Szabo	EF4	80	Asn → Lys	No information	9	
G-Taipei	See G-Couthata					
G-Taichung	See G-Thailand					
G-Taipei	B4	22	Glu → Gly	No information	9	
G-Taiwan-Ami	B7	25	Gly → Arg	No information	9	
G-Texas	See G-Galveston					
G-Waimanalo	E13	64	Asp → Asn	n	9	
Gallien	See Kohn					
Garden State	F3	82	Ala → Asp	n	3	A
Gavella	CD6	47	Asp → Gly	n	9	
Genova	B10	28	Leu → Pro	n, n, 0 ↑	5	
Gifu	See G-Szechu					
Gothsburgh	See M-Boston					
Gower-I	Embryonic hemoglobin				15	
Gower-II	Embryonic hemoglobin				18	
Grady	G3-H1	115-118	Segmental duplication	n	3	A
Guan Hill	F7-FG2	91-9	Deletion	n, n, 0 ↑	13	A, A-S
H	B4			n, orth, n	1	A
Hooterspe (J-Hooterspe)	H3	127	Gln → Glu	n	3	
Hamadan (D-Hamadan)	D7	56	Gly → Arg	n	9	A
HammerSmith	CD1	42	Phe → Ser	n, n, 0 ↓	5, 7	

نام	شماره	جایگاه	جانتسین	تغایر	وضعیت	
					الکتروفروری	pH 6.2
نام	شماره	جایگاه	جانتسین	تغایر	الکتروفروری	pH 6.2
Handsworth	AB1	19	Ala → Asp	n	8	
Hatharon	CD5	47	Asp → His	n, a	9	S-C
Heathrow	G5	103	Phe → Leu	n, 0 ↑	5	
Heisinki	EF6	82	Lys → Met	n, 0 ↑	3	
Henri Mondor	B8	26	Glu → Val	n, a(?)	<A	A
Hijiyama (I-Hijiyama)	GH3	120	Lys → Glu	n	1	
Hikari (J-Hikari)	E5	61	Lys → Asn	n	3	
Hikoshima	See Shimomura					
Hiroaki	CD1	43	Phe → Leu	n, a	9	
Hirose	C3	37	Tyr → Ser	n, 0 ↑	7	
Hiroshima	HC3	146	His → Asp	n, 0 ↑	3	
Hofu	H4	126	Val → Glu	n(?)	3	A-F
Hollandia	See Leopore-Hollandia					
Hope	H14	136	Gly → Asp	n, s-i	4	F
Hopkins-1	See N-Baltimore					
Hopkins-2	G19	112	His → Asp	n, a, 0 ↑	3	
Hörlein-Weber	See M-Saskatoon					
Hoshida	CD2	43	Glu → Gln	n	9	
Hsin-Chu	See G-Couthata					
I	A14	16	Lys → Glu	n	1	A
I-Burlington	See I					
I-High Wycombe	E3	59	Lys → Glu	n	1	
I-Interlaken	See J-Oxford					
I-Philadelphia	See I					
I-Shamania	See I					
I-Texas	See I					
I-Toulouse	E10	66	Lys → Glu	n, a	1	
Icaris	HC3	141	Chsin	nth, orth-1	21, 23	
Indianapolis	G14	112	Cys → Arg	n, a, th	5	A
Inkater	F6	85	Asp → Val	n(?)	9	A
Istanbul	F8	92	His → Gln	n, a, 0 ↑	13(?)	A
J-Abidjan	CD9	51	Gly → Asp	n	3	
J-Aljezar	See J-Paris-I					
J-Aljezar Gardens	F8	92	His → Asp	n, a	3	
J-Ankara	A7	10	Ala → Asp	n(?)	3	
J-Baltimore	A12	15	Gly → Asp	n	3	A
J-Bangkok	D7	56	Gly → Asp	n	3	A
J-Bari	See J-Calabria					
J-Birmingham	See J-Meerut					
J-Brousseau	FG2	90	Lys → Asn	n	3	A
J-Buda	E10	61	Lys → Asn	Interacts with G-Post, e	3	
J-Cairo	E9	65	Lys → Gln	n(?)	3	A
J-Calabria	E8	64	Gly → Asp	r	3	A
J-Camagney	HC3	141	Arg → Gly	n	3	
J-Cambridge	See J-Rambam					
J-Cape Town	FG4	92	Arg → Gln	n, 0 ↑	3	A
J-Chicago	E20	76	Ala → Asp	n	3	
J-Cosenza	See J-Calabria					
J-Cubajiqui	HC3	141	Arg → Ser	n	3	
J-Georgia	See J-Baltimore					
J-Guantanamo	H6	128	Ala → Asp	n, a, th(?)	3	
J-Habana	E20	71	Ala → Glu	n	3	
J-Honolulu	See J-Kaohsiung					
J-Iran	EF1	77	His → Asp	n	3	
J-Ireland	See J-Baltimore					
J-Kaohsiung	E3	59	Lys → Thr	n	3	
J-Korai	See J-Bangkok					
J-Kurosh	AB1	19	Ala → Asp	n(?)	3	A
J-Lome	E3	59	Lys → Asn	No information	3	
J-Manado	See J-Bangkok					
J-Medellin	B3	22	Gly → Asp	No information	3	
J-Meerut	H3	120	Ala → Glu	n(?)	3	
J-Meinung	See J-Bangkok					
J-Mexico	E3	54	Gln → Glu	n	3	A
J-Norfolk	E6	57	Gly → Asp	n	2	

نام	شماره هلیکال	جایگاه آمینو اسید	جانشین شدن	تظاهر بالینی	وضیعت الکتروفوری		pH 8.6	pH 6.2
J-North Shore	See North Shore							
J-Nyanza	$\alpha$ B2	21	Ala $\rightarrow$ Asp	n(?)	9			
J-Oxford	$\alpha$ A13	15	Gly $\rightarrow$ Asp	n	2	A		
J-Paris-1	$\alpha$ A10	12	Ala $\rightarrow$ Asp	n	3	A		
J-Paris-2	See J-Mexico							
J-Pantolse	$\alpha$ E12	63	Ala $\rightarrow$ Asp	u, n	3	A		
J-Ragappen	$\alpha$ FG2	90	Lys $\rightarrow$ Thr	n	3			
J-Rambam	$\beta$ E13	69	Gly $\rightarrow$ Asp	n	3			
J-Rovigo	$\alpha$ E2	53	Ala $\rightarrow$ Asp	u, n	3			
J-Sardagna	$\alpha$ CD8	50	His $\rightarrow$ Asp	No information	3	A		
J-Scilla	$\beta$ E9	65	Lys $\rightarrow$ Asn	n	3			
J-Singapore	$\alpha$ EF7	78	Asn $\rightarrow$ Asp	n	3			
	EF8	79	Ala $\rightarrow$ Gly					
J-Taichung	$\beta$ H7	129	Ala $\rightarrow$ Asp	n	3			
J-Tongarik	$\alpha$ CH3	115	Ala $\rightarrow$ Asp	n	3			
J-Toronto	$\alpha$ A3	5	Ala $\rightarrow$ Asp	n	3	A		
J-Trinidad	See J-Baltimore							
Jackson (J-Jackson)	$\alpha$ H10	127	Lys $\rightarrow$ Asn	n	3			
Jenkins	See N-Baltimore							
K-Cameroon	$\beta$ H7	129	Ala $\rightarrow$ Glu	n	4			
			Asp	n	4			
K-Madras	Not characterized							
K-Woodwich	$\beta$ H10	132	Lys $\rightarrow$ Gly	n-i	4	F or F-A		
Kagobima	See J-Norfolk							
Kasas	$\beta$ G4	102	Asn $\rightarrow$ Thr	c, 0 ↓	6			
Karamoja	Not characterized							
Karatsu	See Rynch							
Kempsey	$\beta$ G1	99	Asp $\rightarrow$ Asn	c, 0 ↑	6	A-F		
Kenwood	See N-Baltimore							
Kern	$\gamma$ - $\beta$ fusion hemoglobin			n, 0 ↑	10	275, 258		
Khartoum	$\beta$ H2	124	Pro $\rightarrow$ Arg	u, no information	9			
King County	Not characterized							
Knoxville-1	See G-Philadelphia							
Koelliker	Artifact found in plasma due to removal of $\alpha^{141}$ Arg			None	3			
Kokura	See Bellinson							
Kola	$\beta$ FG5	98	Val $\rightarrow$ Met	u, n, 0 ↑	5, 9	A		
Korle-Bu	See G-Accra							
Koya Dora	$\alpha$ HC3	141	Chain extension	th-loc	No information			
L-Bombay	Not characterized (?L-Persian Gulf)							
L-Ferrara	See Hasharon							
L-Gatlin	See Bellinson							
L-Persian Gulf	$\alpha$ E6	57	Gly $\rightarrow$ Arg	n	8			
Legnano	$\alpha$ HC3	141	Arg $\rightarrow$ Leu	e, 0 ↑	2			
Leiden	$\beta$ A4 or A5 6 or 7		Glu deleted	u, n, 0 ↑	9			
Leipzig	See M-Saskatoon							
Lepore-Baltimore	$\delta$ - $\beta$ fusion hemoglobin			None	9			
Lepore-Boston	$\delta$ - $\beta$ fusion hemoglobin			th and $\beta$ th-i	9	A		
Lepore-Cyprus	See Lepore-Boston							
Lepore-Hollandia	$\delta$ - $\beta$ fusion hemoglobin			None	9			
Lepore-Washington	See Lepore-Boston							
Leslie	See Deaconess							
Liberia-I	See N-Baltimore							
			Hemoglobins Liberia-I and -II appear not to have been further characterized		2			
Liberia-II	K Variant (?)				4			
Lincoln Park	$\beta$ - $\delta$ fusion hemoglobin			r	8			
Little Rock	$\beta$ H21	143	His $\rightarrow$ Glu	c, 0 ↑	5	F		
Louisville	$\beta$ CD1	42	Phe $\rightarrow$ Leu	u, n, 0 ↓	5			
Luffkin	$\beta$ H11	92	Gly $\rightarrow$ Asp	u, n	4	A		
Lyon	$\beta$ A14-15	17-18	Lys-Val deleted	u, n, 0 ↑	3			
M-Akita	See M-Hyde Park							
M-Arbus	See M-Saskatoon							
M-Boston	$\alpha$ E7	58	His $\rightarrow$ Tyr	m, c	5			

نام	شماره هلیکال	جایگاه آمینو اسید	جانشین شدن	تظاهر بالینی	وضیعت الکتروفوری		pH 8.6	pH 6.2
M-Chicago	See M-Saskatoon							
M-Emory	See M-Saskatoon							
M-Erlangen	See M-Saskatoon							
M-Gothenburg	See M-Saskatoon							
M-Hamburg	See M-Saskatoon							
M-Hida	See M-Saskatoon							
M-Homburg	Not characterized							
M-Hyde Park	$\beta$ F8	92	His $\rightarrow$ Tyr	m, c, u	13			
M-Iwate	$\alpha$ F8	87	His $\rightarrow$ Tyr	c	5	A-S		
M-Kankakee	See M-Iwate							
M-Kiskunhelas	See M-Boston							
M-Kumamoto	See M-Iwate							
M-Kurume	See M-Saskatoon							
M-Milwaukee-1	$\beta$ E11	67	Val $\rightarrow$ Glu	m, c, 0 ↓	5			
M-Oldenburg	See M-Iwate							
M-Osaka	See M-Boston							
M-Radom	See M-Saskatoon							
M-Reserve	Not characterized							
M-Saskatoon	$\beta$ E7	63	His $\rightarrow$ Tyr	u, n, m, c	5			
Madrid	$\beta$ O17	115	Ala $\rightarrow$ Pro	u, n	5			
Mahidol	See O-Thailand							
Malmö	$\beta$ FG4	97	His $\rightarrow$ Glu	e, 0 ↑	5	Slightly cathodal to A		
Manitoba	$\alpha$ G9	102	Ser $\rightarrow$ Arg	n	6	A		
Matsue-Oki	$\alpha$ EF4	75	Asp $\rightarrow$ Asn	n	9	A(?)		
McKees Rocks	$\beta$ HC2	145	Tyr $\rightarrow$ term.	c, 0 ↑	5			
Memphis	$\alpha$ B4	23	Glu $\rightarrow$ Glu	n	5	Slightly cathodal to S		
Mequon	$\beta$ C7 or CD1	41 or 42	Phe $\rightarrow$ Tyr	u(?), n	5			
Mexico	See J-Mexico							
Michigan-I	See Hasharon							
Michigan-II	See Hasharon							
Milledgeville	$\alpha$ CE2	44	Pro $\rightarrow$ Leu	u, 0 ↑	5	A		
Miyada	$\beta$ - $\delta$ fusion hemoglobin			n	13			
Mtazubo	$\beta$ E12	68	Leu $\rightarrow$ Pro	u, n	5			
Moabit	$\alpha$ F7	86	Leu $\rightarrow$ Arg	u, n	8			
Mobile (G-Mobile)	$\beta$ E17	73	Asp $\rightarrow$ Val	n, 0 ↓	8	A, A-S		
Montgomery	$\alpha$ CD6	48	Leu $\rightarrow$ Arg	n	9	A-S		
Moscow	$\beta$ B6	24	Gly $\rightarrow$ Asp	u, n, 0 ↓	3(?)			
Mugino	See Bellinson							
N	See N-Baltimore							
N-Baltimore	$\beta$ FG2	95	Lys $\rightarrow$ Glu	n	2	A		
N-Cosenza	See J-Oxford							
N-Memphis	$\beta$ Presumed to be N-Baltimore							
N-New Haven-1	Not characterized							
N-New Haven-2	See J-Baltimore							
N-Sardinia	Not established							
N-Seattle	$\beta$ E5	61	Lys $\rightarrow$ Glu	No information	2	A		
Nagasaki (I-Nagasaki)	$\beta$ A14	17	Lys $\rightarrow$ Glu	n	1			
Nancy	See Oster							
New York	$\beta$ G15	113	Val $\rightarrow$ Glu	n	4			
Newcastle	$\beta$ F8	92	His $\rightarrow$ Pro	u, n	(?)			
Nitrosin	$\alpha$ Not established							
Nigeria	$\alpha$ F2	81	Ser $\rightarrow$ Cys	n	5	A		
Niort	Not established (7K05n)							
Nishiki-1, 2, 3	See J-Norfolk							
Nitterol	$\beta$ CD1-4	42-44 or 43-45	Deletion	u, n, 0 ↓	9(?)			
Norfolk	See J-Norfolk							
North Shore	$\beta$ H12	134	Val $\rightarrow$ Glu	u, n, th(?)	4			
Nottingham	$\beta$ FG5	98	Val $\rightarrow$ Gly	u, n, 0 ↑	5			
Novi Sad	See M-Saskatoon							
O-Arab	$\beta$ GH4	121	Glu $\rightarrow$ Lys	n-i	13	A-S		
O-Indonesia	$\alpha$ GH4	116	Glu $\rightarrow$ Lys	n	13.3			
O-Padua	$\alpha$ B11	30	Glu $\rightarrow$ Lys	n(?)	13			
Oak Ridge	See D-Los Angeles							



نام	زنجیره	شماره	جایگاه	آمینواسید	جانشین	تظاهر	بالینی	وضعیت	
								الکتروفورزی	pH 8.6
Oklahoma	$\beta$	CD7	48	Leu $\rightarrow$ Arg	u, n, 0 $\downarrow$	9	A		
Olivier	See O-Indonesia								
Olmsted	$\beta$	H19	141	Leu $\rightarrow$ Arg	u, n	5			
Olympia	$\beta$	B2	20	Val $\rightarrow$ Met	e, 0 $\uparrow$	5			
Oster	$\beta$	HC2	145	Tyr $\rightarrow$ Asp	e, 0 $\uparrow$	4	F-A		
Osu-Christiansburg	$\beta$	D3	52	Asp $\rightarrow$ Asn	n	9	A		
Ottawa	$\alpha$	A13	15	Gly $\rightarrow$ Arg	n	9	A		
P	See P-Galveston								
P-Congo	$\beta$ - $\delta$ fusion hemoglobin								
P-Galveston	$\beta$	G19	117	His $\rightarrow$ Arg	n	8 or 9	A		
P-Niatic	$\beta$ - $\delta$ fusion hemoglobin				No information	9			
Persepolis (Perspolis)	$\alpha$	E13	64	Asp $\rightarrow$ Tyr	n(?)	8	*Separates from A*		
Perth	See Abraham Lincoln								
Petah Tikva	$\alpha$	G17	110	Ala $\rightarrow$ Asp	u, oth-i	5	A		
Peterborough	$\beta$	G13	111	Val $\rightarrow$ Phe	u, a, 0 $\downarrow$	5			
Philly	$\beta$	C1	35	Tyr $\rightarrow$ Phe	u, a	5			
Pontoon	See J-Pontoon								
Port Phillip	$\alpha$	FG3	91	Leu $\rightarrow$ Pro	u, a	7			
Portland-1	$\beta$	2/2 - normal embryonic hemoglobin			n	2			
Pôrto Alegre	$\beta$	A6	9	Ser $\rightarrow$ Cys	n, 0 $\uparrow$	4			
Potomac	$\beta$	G3	101	Glu $\rightarrow$ Asp	e, 0 $\uparrow$	5	A		
Prato	$\alpha$	B12	31	Arg $\rightarrow$ Ser	u, a	4 or 5			
Protestant	$\beta$	G10	108	Asn $\rightarrow$ Lys	a, 0 $\downarrow$	6	C		
Providence	$\beta$	EP5	81	Leu $\rightarrow$ Asn	e, 0 $\uparrow$	3	A-F, F		
(J-Providence)				(Asp)					
Pylos	See Lepore-Boston								
Pyrgos	$\beta$	EF7	83	Gly $\rightarrow$ Asp	n(?)	3	A-F		
Q-Chinese	See Q-Thailand								
Q-India	$\alpha$	E13	64	Asp $\rightarrow$ His	n	8	A-S		
Q-Iran	$\alpha$	EF4	75	Asp $\rightarrow$ His	n	8			
Q-Thailand	$\alpha$	EF3	74	Asp $\rightarrow$ His	oth-i	8	A-S		
Queens	$\alpha$	B15	34	Leu $\rightarrow$ Arg	n	8	S		
Raddcliffe	$\beta$	G1	99	Asp $\rightarrow$ Ala	e, 0 $\uparrow$	7			
Rabere	$\beta$	EP6	82	Lys $\rightarrow$ Thr	e, 0 $\uparrow$	5	F		
Rainier	$\beta$	HC2	145	Tyr $\rightarrow$ Cys	e, 0 $\uparrow$	5	S		
Rajapen	See J-Rajapen								
Raleigh	$\beta$	NA1	1	Val $\rightarrow$ Ala	n, 0 $\downarrow$	5	F		
		(NA1 valine acetylated)							
Rampa (G-Rampa)	$\alpha$	G2	95	Pro $\rightarrow$ Ser	n(?), 0 $\uparrow$	8	A or A-F		
Richmond	$\beta$	G4	102	Asn $\rightarrow$ Lys	n	7, 8	A		
Riverdale-Bronx	$\beta$	B6	24	Gly $\rightarrow$ Arg	u, a	9			
Riyadh	$\beta$	GH3	120	Lys $\rightarrow$ Asn	a(?)	3(?)			
Rothschild	$\beta$	C3	37	Trp $\rightarrow$ Arg	No information	11			
Rush	$\beta$	G3	101	Glu $\rightarrow$ Glu	u, a	8			
Russ	$\alpha$	CD9	51	Gly $\rightarrow$ Arg	n	9	A		
S	$\beta$	A3	6	Glu $\rightarrow$ Val	s, 0 $\downarrow$	9	S		
S-G-Philadelphia	Hybrid ( $\alpha$ G-Phila- $\beta$ S)					13	S		
S-Trans	$\beta$	A3	6	Glu $\rightarrow$ Val	s, 0 $\uparrow$	9	A-S		
Sabine	$\beta$	F7	91	Leu $\rightarrow$ Pro	u, a	10, 12	A		
St. Antoine	$\beta$	E18-19	74-75	Deletion	u, a	5			
St. Claude	$\alpha$	H10	127	Lys $\rightarrow$ Thr	n	13			
St. Etienne	See Istanbul								
St. Louis	$\beta$	B10	28	Leu $\rightarrow$ Glu	u, a, c, 0 $\uparrow$	7			
St. Lakes	$\alpha$	G2	95	Pro $\rightarrow$ Arg	n	9			
Saki	$\beta$	A11	14	Leu $\rightarrow$ Pro	n	5	A		
San Diego	$\beta$	G11	109	Val $\rightarrow$ Met	e, 0 $\uparrow$	5			
San Francisco	See Köln								
San Jose	See G-San Jose								
Santa Ana	$\beta$	F4	88	Leu $\rightarrow$ Pro	u, a	11			
Savannah	$\beta$	B6	24	Gly $\rightarrow$ Val	u, a	9			
Sorenra	$\alpha$	A4	6	Asp $\rightarrow$ Ala	n, 0 $\uparrow$	8	A-S		
Seal Rock	$\alpha$	HC3	141	Chain extension	oth-i	13			
Sealy	See Hasharon								
Seattle	$\beta$	E14	70	Ala $\rightarrow$ Asp	u, a, 0 $\downarrow$	3			
Sendai	Not characterized				u, a, m	5			
Serbia	$\alpha$	G19	112	His $\rightarrow$ Arg	th	(?)			
Seuf	$\alpha$	G1	94	Asp $\rightarrow$ Tyr	u, n	8 or 10*	S(?)		

نام	زنجیره	شماره	جایگاه	آمینواسید	جانشین	تظاهر	بالینی	وضعیت	
								الکتروفورزی	pH 8.6
Shepherd's Bush	$\beta$	E18	74	Gly $\rightarrow$ Asp	u, n, 0 $\uparrow$	3			
Sherwood Forest	$\beta$	G6	104	Arg $\rightarrow$ Thr	n	4			
Shimonoseki	$\alpha$	E3	54	Gln $\rightarrow$ Arg	n	9			A to A-S
Siam	See Ottawa								
Sinai	See Hasharon								
Singapore	$\alpha$	HC3	141	Arg $\rightarrow$ Pro	n	4			
Singapore-Bristol	See G-Philadelphia								
Siraj	$\beta$	A4	7	Glu $\rightarrow$ Lys	n	11			C
Sogn	$\beta$	A11	14	Leu $\rightarrow$ Arg	u, n	9	A		
Southampton	$\beta$	G8	106	Leu $\rightarrow$ Pro	u, a, 0 $\uparrow$	5			
Spanish Town	$\alpha$	B8	27	Glu $\rightarrow$ Val	n	8			
Stanleyville-I	See G-Philadelphia								
Stanleyville-II	$\alpha$	EF7	78	Asn $\rightarrow$ Lys	n	9			A
Strasbourg	$\beta$	B2	20	Val $\rightarrow$ Asp	u, n	5			
Strumica	$\alpha$	G19	112	His $\rightarrow$ Arg	th, n	8			
Swan-Dok	$\alpha$	G16	109	Leu $\rightarrow$ Arg	oth-i	7			
Sud-Vietnam	Not characterized								
Sunshine-Seth	$\alpha$	G1	94	Asp $\rightarrow$ His	n	10			
Suresnes	$\alpha$	HC3	141	Arg $\rightarrow$ His	n, 0 $\uparrow$	3			
Sydney	$\beta$	E11	67	Val $\rightarrow$ Ala	u, a	9			
Syracuse	$\beta$	H21	143	His $\rightarrow$ Pro	e, 0 $\uparrow$	5			A
Tacoma	$\beta$	B12	30	Arg $\rightarrow$ Ser	n, u	4			
Tagawa-1	See J-Brooklyn								
Tagawa-2	See Hasharon								
Taiwan-Ami	See G-Taiwan-Ami								
Tait	$\beta$	HC3	146	Chain extension	n, 0 $\uparrow$	8			
Ta-Li	$\beta$	EF7	83	Gly $\rightarrow$ Cys	n	5(9 in starch gel)			
Tarrant	$\alpha$	H9	126	Asp $\rightarrow$ Asn	n, 0 $\uparrow$	8			S to S-C
Thai	See Constant Spring								
Thailand	$\alpha$	B5	56	Lys $\rightarrow$ Thr	n	3			
Titusville	$\alpha$	G1	94	Asp $\rightarrow$ Asn	u, 0 $\downarrow$	9			S-C
Tochigi	$\beta$	D7-E3	56-59	Deletion	u, n	3			
ToKuchi	See Camden								
Tokyo	Not established				u, a	7			
Torino	$\alpha$	CD1	43	Phe $\rightarrow$ Val	u, a, 0 $\downarrow$	5			
Toulouse	See I-Toulouse								
Tours	$\beta$	F3	87	Deletion	u, a, 0 $\uparrow$	9			
Tsukiji	See Hikari(?)								
Tübingen	$\beta$	G8	106	Leu $\rightarrow$ Glu	u, c, m	7			
Ty Gard	$\beta$	H2	124	Pro $\rightarrow$ Glu	e, 0 $\uparrow$	5			
Ube-1	See Köln								
Ube-2	$\alpha$	E17	68	Asn $\rightarrow$ Asp	n	3			
Ube-3	No published information								
Ube-4	$\alpha$	OH	116	Glu $\rightarrow$ Ala	n	8			
Umi	See Beilinson								
Uppsala	See J-Mexico								
Vassa	$\beta$	C5	39	Glu $\rightarrow$ Glu	u, a	4			
Vancouver	$\beta$	E17	73	Asn $\rightarrow$ Tyr	n, 0 $\downarrow$	8			A to A-S
Vanderbilt	$\beta$	F5	89	Ser $\rightarrow$ Arg	e, 0 $\uparrow$	5			
Volga	$\beta$	B9	27	Ala $\rightarrow$ Asp	u, a	5			
Waco	See Athens-GA								
Wayne	$\alpha$	HC3	141	Chain extension	n	3, 4			
Wien	$\beta$	H8	130	Tyr $\rightarrow$ Asp	u, a	3			
Willemette	$\beta$	D2	51	Pro $\rightarrow$ Arg	u, n, 0 $\uparrow$	9			A-S or A
Winnipeg (G-Winnipeg)	$\alpha$	EF4	75	Asp $\rightarrow$ Tyr	n	8			A
Wood	$\beta$	FG4	97	His $\rightarrow$ Leu	e, 0 $\uparrow$	5			A-F
Yakima	$\beta$	G1	99	Asp $\rightarrow$ His	e, 0 $\uparrow$	7			
Yatsushiro	$\beta$	E4	60	Val $\rightarrow$ Leu	n	No information			
York	$\beta$	HC3	146	His $\rightarrow$ Pro	e, 0 $\uparrow$	5			F-A
Yoshizuka	$\beta$	G10	108	Asn $\rightarrow$ Asp	a, 0 $\downarrow$	4			
Ypsilanti	$\beta$	G1	99	Asp $\rightarrow$ Tyr	e, 0 $\uparrow$	6, 8, 11			
Yukubashi-1	See Dhotar								
Yukubashi-2	See Hasharon								
Zambia	$\alpha$	E9	60	Lys $\rightarrow$ Asn	n	3			
Zürich	$\beta$	E7	63	His $\rightarrow$ Arg	u, a, 0 $\uparrow$	9			

a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	B4- B4- B4- B4- B4-,...
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	B4- B4- B4- B4- B4-,...
Hb-A:100% Hb-V=0%	
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	B4- B4- B4- B4- B4-,...
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	S3- S3- S3- S3- S3-,...
Hb-A:65% Hb-S=35%	
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	B4- B4- B4- B4- B4-,...
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	C2- C2- C2-C2- C2-,...
Hb-A:75% Hb-C=25%	
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	B4- B4- B4- B4- B4-,...
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	K5- K5-K5-K5- K5-,...
Hb-A:35% Hb-K=65%	
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	B4- B4- B4- B4- B4-,...
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	N6- N6- N6-N6- N6-,...
Hb-A:25% Hb-N=75%	
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	B4- B4- B4- B4- B4-,...
G3+G3+G3+G3+G3+,...	B4- B4- B4- B4- B4-,...
Hb-A:70% Hb-G=30%	

شکل ۲۳: نسبت تقریبی هموگلوبین‌های واریانت به Hb-A در انواع مختلف هموگلوبین واریانت هتروزیگوت، بر اساس بار الکتریکی هر نوع زنجیره موتانت

<b>aa/aa: B/S</b>	
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	B4- B4- B4- B4- B4-,...
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	S3- S3- S3- S3- S3-,...
Hb-A:65%	Hb-S:35%
<b>-a/-a: B/S</b>	
-----,...	B4- B4- B4- B4- B4-,...
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	S3- S3- S3- S3- S3-,...
Hb-A:75%	Hb-S:25%
<b>aa/aa: B<sup>0</sup>/S</b>	
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	-----,...
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	S3- S3- S3- S3- S3-,...
Hb-A:0%	Hb-S:100%
<b>aa/aa: B+/S</b>	
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	B4- B4- B4- -----,...
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	S3- S3- S3- S3- S3-,...
Hb-A:40%	Hb-S:60%

شکل ۲۴: نسبت تقریبی هموگلوبین واریانت کاتدیك Hb-S به Hb-A در شرایط مختلف آلفا تالاسمیک (کاهنده) و بتا تالاسمیک (افزاینده)

<b>aa/aa:B/K</b>	
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	B4- B4- B4- B4- B4-,...
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	K5- K5-K5-K5- K5-,...
<b>Hb-A:35% Hb-K=65%</b>	
<b>-a/-a:B/K</b>	
-----,...	B4- B4- B4- B4- B4-,...
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	K5- K5-K5-K5- K5-,...
<b>Hb-A:25% Hb-K:75%</b>	
<b>aa/aa:B<sup>0</sup>/K</b>	
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	-----,...
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	K5- K5-K5-K5- K5-,...
<b>Hb-A:0% Hb-K:100%</b>	
<b>aa/aa:B+/K</b>	
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	B4- B4- B4- -----,...
a4+ a4+ a4+ a4+ a4+,...	K5- K5-K5-K5- K5-,...
<b>Hb-A:15% Hb-K:85%</b>	

شکل ۲۵: نسبت تقریبی هموگلوبین واریانت آندیک Hb-K به Hb-A در شرایط مختلف آلفا تالاسمیک (افزاینده) و بتا تالاسمیک (افزاینده)



a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++	B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B-	A:100%	S:0%	C:0%
a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++	B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- S- S- S- S- S- S- S- S- S- S-	A:60%	S:40%	C:0%
a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++	B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- C C C C C C C C C C	A:70%	S:0%	C:30%
a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ <u>a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++</u>	B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- B-	A:100%	S:00%	C:00%
a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++	B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- <u>B- B- B- B- B- B- B- B- B- B-</u>	A:100%	S:00%	C:00%
a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++	B- B- B- B- B- <u>B- B- B- B- B-</u> S- S- S- S- S- S- S- S- S- S-	A:40%	S:60%	C:00%
a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ <u>a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++</u>	B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- S- S- S- S- S- S- S- S- S- S-	A:70%	S:30%	C:00%
a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++	B- B- B- B- B- <u>B- B- B- B- B-</u> C C C C C C C C C C	A:60%	S:00%	C:40%
a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ <u>a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++</u>	B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- C C C C C C C C C C	A:80%	S:00%	C:20%
a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++ a++	B- B- B- B- B- B- B- B- B- B- J- J- J- J- J- J- J- J- J- J-	A:40%	J:60%	

Haemoglobin	Abnormal globin chain	Usual percentage	Mobility on agarose gel at acid pH	HPLC	Usual ethnic origin
S	$\beta$	40–45*	S	S window	African ancestry, Arab, Indian
D-Punjab	$\beta$	40–45*	With A	D window	Punjabi, Northern European, Greek, Turkish, Yugoslav, Afro-American, Afro-Caribbean, Chinese
G-Philadelphia	$\alpha$	20–25‡ 25–35‡ 35–45‡	With A	D window†	African ancestry, Chinese, Italian
Lepore	$\delta\beta$ fusion	7–15	With A	A <sub>2</sub> window	Greek, Italian, Turkish, Cypriot, Eastern European, English, Spanish, Afro-Caribbean
Korle Bu	$\beta$	40–45	With A§	A <sub>2</sub> window	West African ancestry
G-Coushatta	$\beta$	40–45	With A	A <sub>2</sub> window	Native American, Chinese, Korean, Japanese, Thai, Italian, Turkish, Algerian
D-Iran	$\beta$	36–45	With A	A <sub>2</sub> window	Iranian, Pakistani, Italian, Jamaican
Zurich	$\beta$	22–35	With A	A <sub>2</sub> window	Swiss, Japanese
Hasharon	$\alpha$	15–20 (if Jewish) or 30–35 (if Italian)	With S	Between S and C†	Ashkenazi Jewish, Italians from Ferrara district

HPLC, high performance liquid chromatography.

\* Lower if coexisting  $\alpha$  thalassaemia trait.

† Variant haemoglobin A<sub>2</sub> also present.

‡ Depending on the number of normal  $\alpha$  genes present.

§ Or slightly on the S side of A; if present with S, gives a broader band than S alone.

جدول ۶-۴: خصوصیات مربوط به هموگلوبین‌های واریانته که در الکتروفورز قلیایی بر روی استات سلولوز با Hb-C در یک باند حرکت می‌کنند [۱۴].

Haemoglobin	Relevant globin chain	Usual percentage	Mobility on agarose gel at acid pH	HPLC	Usual ethnic origin
A <sub>2</sub>	δ	2–3.5*	With A	A <sub>2</sub> window	Normal minor haemoglobin
C	β	40–45†	C	C window	West African ancestry
E	β	30–35	With A	A <sub>2</sub> window	South-east Asian
O-Arab	β	40–45	Slightly on C side of S‡	Between S and C windows but closer to C window	Eastern European, Afro-American, Afro-Caribbean
C-Harlem	β	40–45†	With S‡	Between S and C but closer to C window	West African ancestry
E-Saskatoon	β	35–40	With A	S window	Scottish, Turkish

HPLC, high performance liquid chromatography.

\*3.5–8% in most β thalassaemia trait.

†Lower if coexisting α thalassaemia trait.

‡O-Arab and C-Harlem are more readily distinguished from each other on citrate agar than on agarose; on citrate agar at acid pH, C-Harlem moves with S and O-Arab is between S and A but closer to A.

جدول ۱۱-۴۵: نسبت‌های مشخص انواع هموگلوبین در واریانت‌های مختلف هتروزیگوت [۳۲].

Condition	% Hb A	% Variant	Comment
S trait	60	40	See footnote
C trait	60	40	
D trait	60	40	
E trait	70	30	
O-Arab trait	60-70	30-40	Trimodal distribution
	75	25	
G-Philadelphia trait	70	30	
	65	45	
J-Oxford trait	Same as G-Philadelphia trait		
J-Baltimore trait	45	55	A <sub>2</sub> also about 1.5
Lepore trait	85	15	
H disease	85-95	5-15	
Cöln disease	75-80	20-25	
A <sub>2</sub> ' trait	97	about 1.5	
Constant Spring trait	98	1-2	F 5-15
S-C Disease	0	S 55%	
		C 45%	
S-β <sup>+</sup> thalassemia	25	A 70%	F 10-15
S-β <sup>0</sup> thalassemia	0	S 85-90	
S-α thalassemia	65-75	S 25-35	

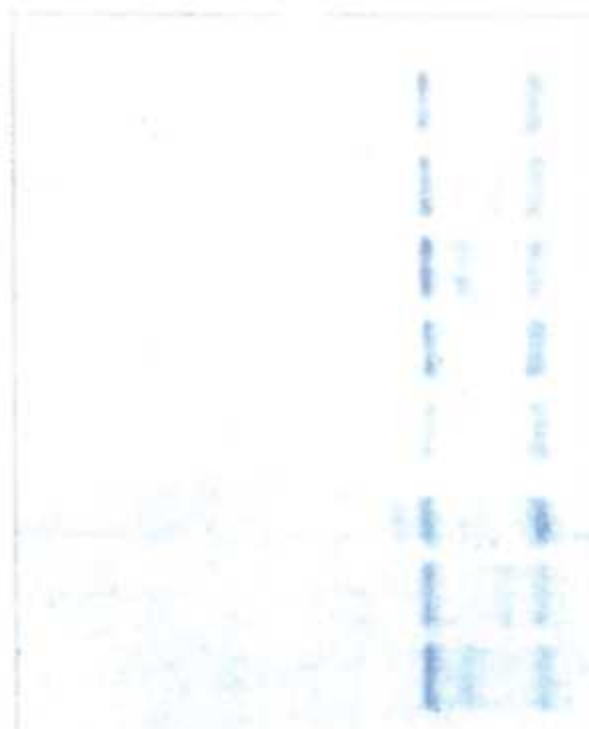
به نظر می‌رسد توزیع خصیصه S تریمودال یا سه‌شکلی باشد، به طوری که مقدار آن در خصیصه ساده (αα/αα/BS) ۴۰٪، در α-Thal 2 trait (α-/αα/BS) حدود ۲۹٪، در α-Thal 1 trait (α-α/BS) حدود ۳۳٪ و در β-تالاسمی (αα/αα/B<sup>+</sup>S) بالای ۵۰٪ باشد.



## الکتروفورز (الزیره گلوبین (بهای هموگلوبین):

الکتروفورز زنجیره گلوبین با استفاده از همولیزانت گلوبول قرمز که به آن DL-dithiothreitol و اوره اضافه شده است انجام می شود. اضافه کردن این دو ماده باعث جدا شدن گروه های هم از زنجیره های گلوبین می شود. سپس الکتروفورز روی غشاهای استات سلولوز و با استفاده از هر دو سیستم اسیدی و قلیایی انجام می شود. الکتروفورز زنجیره گلوبین این امکان را فراهم می سازد که ناهنجاری های زنجیره های  $\alpha$  و  $\beta$  از یکدیگر افتراق داده شوند. هنگامی که از این روش در کنار الکتروفورز هموگلوبین استفاده می شود، آشکارسازی گروه وسیعی از هموگلوبین های واریانت امکان پذیر می شود. با این حال امروزه الکتروفورز زنجیره گلوبین روش پرترفداری محسوب نمی شود چراکه HPLC به عنوان یک روش سریع تر و ساده تر بجای آن استفاده می شود. در این تکنیک، زنجیره آلفا به دلیل داشتن ۱۴۱ اسید آمینه جلوتر از زنجیره بتا با ۱۴۶ اسید آمینه حرکت می کند ولی در بین واریانت های مختلف، بعد از  $\beta$   $\leftarrow B^S \leftarrow \beta^C \leftarrow \alpha \leftarrow$  و سپس واریانت های  $\alpha$  ( $\alpha^X$ ) حرکت می کنند.

26.4.89  
IDENTIFICATION  
1. AA .....  
2. AS .....  
3. AC .....  
4. FA .....  
5. PATIENT P .....  
6. PATIENT P .....  
7. AS .....  
8. AC .....  
Helena Laboratories  
MARLINE G.C.E.P

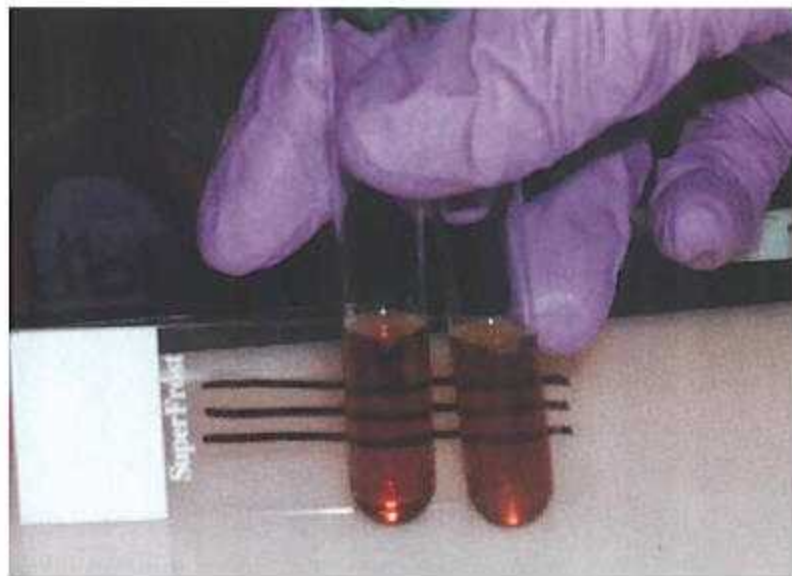


$\alpha$	$\beta$
$\alpha$	$\beta^S \beta$
$\alpha$	$\beta^C \beta$
$\alpha$	$\beta$
$\alpha^X \alpha$	$\beta$
$\alpha^X \alpha$	$\beta$
$\alpha$	$\beta^S \beta$
$\alpha$	$\beta^C \beta$

شکل ۸۹-۴۶. نتایج مربوط به بررسی ساخت زنجیره گلوبین: (۱) زنجیره  $\alpha, \beta$  طبیعی. (۲)  $\beta^S, \alpha$  و زنجیره  $\beta$  (صفت سلول داسی). (۳)  $\beta, \beta^C, \alpha$  (صفت Hb-C). (۴) زنجیره  $\beta, \alpha$  طبیعی. (۵)  $\alpha$  variant و  $\beta, \alpha$  نشان دهنده یک واریان ناشناخته زنجیره  $\alpha$ . (۶)  $\alpha$  variant و  $\beta, \alpha$  (نشان دهنده یک واریان ناشناخته زنجیره  $\alpha$ )  $\beta, \beta^S, \alpha$  (صفت سلول داسی). (۷)  $\beta, \beta^S, \alpha$  (صفت سلول داسی). (۸)  $\beta, \beta^C, \alpha$  (صفت Hb-C).

## آزمایش ۶۰۲ دی کلروفنل ایندوفنولین (DCIP) برای غربالگری Hb-E:

هنگامی که دسترسی کافی به روش‌های تأییدی و تشخیصی وجود ندارد، آزمایش DCIP برای غربالگری Hb-E قابل استفاده است. Hb-E علاوه بر آنکه در اثر جهش در ژن گلوبین  $\beta$  در الکتروفورز قلیایی بر روی باند  $A_2/C/O$  حرکت می‌کند، بلکه تا حدودی خاصیت ناپایداری و خاصیت تالاسمیک نیز داشته و علاوه بر کاهش در میزان سنتز، در محلول ۶۰۲ دی کلروفنل ایندوفنولین ۵٪ (DCIP) نیز کدورت مختصری را ایجاد می‌کند که نسبتاً برای Hb-E اختصاصی بوده و در مورد دیگر هموگلوبین‌های ناپایدار مشاهده نمی‌شود. این روش یک تکنیک غربالگری (و نه تشخیصی) بوده و در نتیجه تعداد نمونه‌هایی را که باید برای تشخیص قطعی به آزمایشگاه مرجع فرستاده شوند را کاهش می‌دهد. تفسیر این آزمایش نیز به صورت چشمی بوده اما تفسیر آن از آزمایش حلالت سلول داسی دشوارتر است. لازم به ذکر است که Hb-E تا حدودی نیز میل پایین به اکسیژن داشته و منحنی تجزای اکسیژن را به سمت راست میل می‌دهد [۱۴].



شکل ۸۶-۴۶: آزمایش ۶۰۲ دی کلروفنل ایندوفنولین (DCIP) که باید در حضور نور و با استفاده از لام شیشه‌ای که خط کشی شده است، بررسی شود، تا بهتر مشاهده گردد.



## تشخیص یک هموگلوبین ناپایدار:

تشخیص هموگلوبین‌های ناپایدار (مثل هموگلوبین Olmsted, Köln, Hb-H<sup>1</sup>, Tacoma, Hb-H<sup>2</sup> و چند مورد دیگر<sup>۳</sup>) با استفاده از تست ناپایداری حرارتی (HIT)<sup>۲</sup> یا تست پرسپیبتاسیون ایزوپروپانول (IPT)<sup>۱</sup> امکان پذیر است؛ این آزمایش‌ها باید با کنترل‌های مثبت (مثل Hb-H) و منفی (مثل Hb-A) انجام شوند و یک نتیجه مثبت، بصورت رسوب هموگلوبینی کرک مانند در انتهای آزمایش مشاهده می‌شود. افزودن سیانید پتاسیم به نمونه خون قبل از انجام تست قادر است تشکیل رسوب با هر دو تست فوق را مهار کند؛ KCN قادر است تشکیل اجسام هاینز در رنگ آمیزی حیاتی<sup>۴</sup> هموگلوبین‌های ناپایدار را نیز مهار کند. تست HIT در دمای ۵۰-۶۰ درجه و تست IPT در دمای ۳۷ درجه انجام می‌شوند.

1 Olmsted β141 (H19) Leu→Arg

2 Tacoma β30 (B 12) arg-ser

3 Hb-Southampton/Casper, Hb-Zurich, Hb-Sogn, Hb-Toulouse

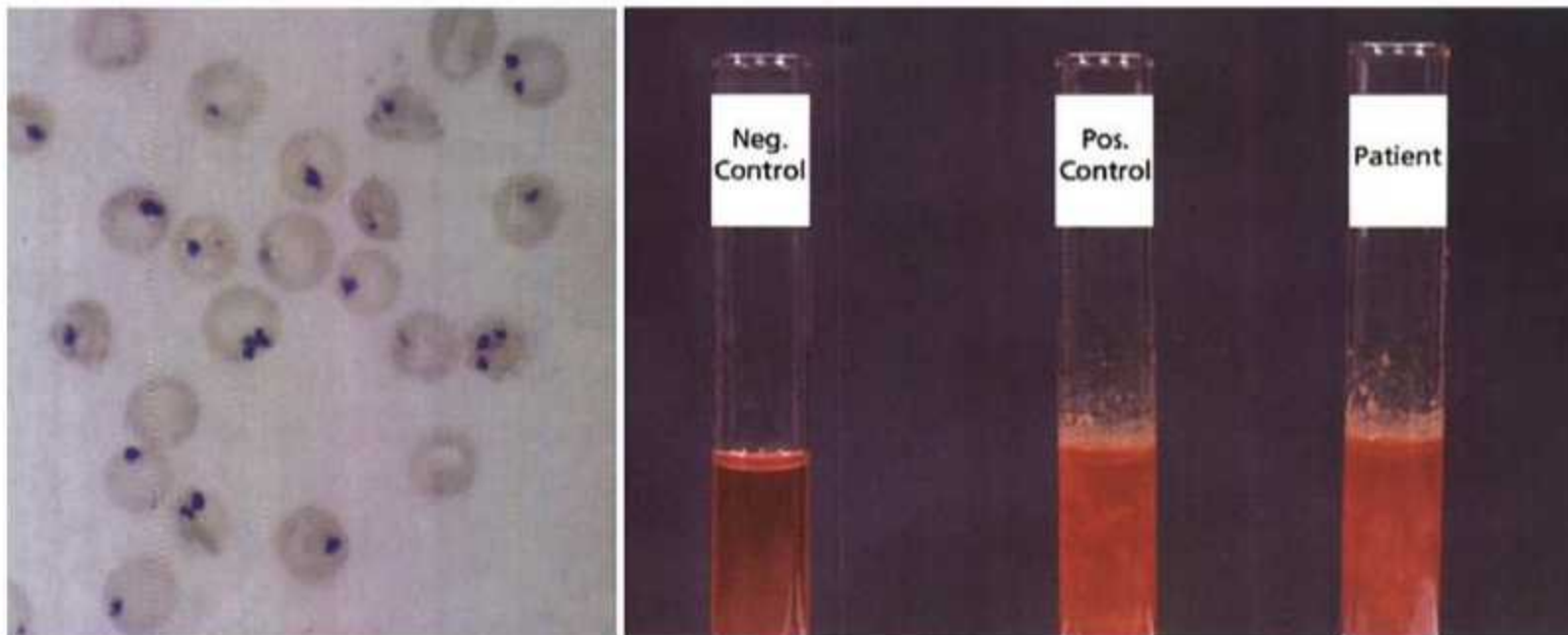
### تست IPT:

برای انجام این تست، ۱-۲ ml خون تازه بیمار را با نرمال سالین شسته و سپس به پکسل نهایی آن چند قطره DW اضافه کنید تا همولیزانت آن تشکیل شود، جهت جلوگیری از رسوب هموگلوبین‌ها در اثر اتصال آنها به لاشه اریتروسیت‌ها، چند قطره تتراکلرید کربن یا تولوئن نیز به آن بیافزایید تا هموگلوبین پیش از حرارت یا افزودن ایزوپروپانول رسوب نکند. در مرحله بعد ۲۰۰ لاندا از همولیزانت آماده بیمار را با ۲ ml از بافر tris-isopropanol مخلوط کرده و بعد از میکس کامل، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه انکوبه کرده و در زمان‌های ۵، ۲۰ و ۳۰ دقیقه از نظر تشکیل رسوب‌های کرک مانند و فلوکولنت بررسی کنید. هموگلوبین‌های ناپایدار در حرارت مذکور طی ۵ دقیقه رسوب کرده و در مدت ۲۰ دقیقه به حداکثر رسوب خود می‌رسند، درحالی که هموگلوبین‌های پایدار حتی در زمان ۶۰-۳۰ دقیقه نیز رسوب نمی‌کنند.

برای تهیه بافر تریس- ایزوپروپانول نیز ابتدا ۱/۲۱ g تریس هیدروکسی متیل آمینومتان را با ۱۰۰ ml آب مقطر مخلوط کرده و PH آن را با 4M HCL به ۷/۴ برسانید. سپس ۸۳ ml از آن را با ۱۷ ml الکل ایزوپروپانول مخلوط نموده و محلول نهایی را در RT نگهداری کنید.

### تست HIT:

برای انجام این تست ۵ ml همولیزانت (مثل روش قبل) را با ۵ ml از بافر فسفات مخلوط کرده و بعد از میکس کامل، آن را در دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و سپس ۲ ml از محلول سوپرناتانت آن را در بن‌ماری ۵۶ درجه انکوبه کرده و در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه از نظر تشکیل رسوب- های کرک مانند و فلوکولنت بررسی کنید.



شکل ۸۴-۴۶: آزمایش ایزوپروپانول مثبت و تشکیل اجسام هاینز (در رنگ آمیزی حیاتی) یک هموگلوبین ناپایدار Hb-Southampton/Casper [۴].



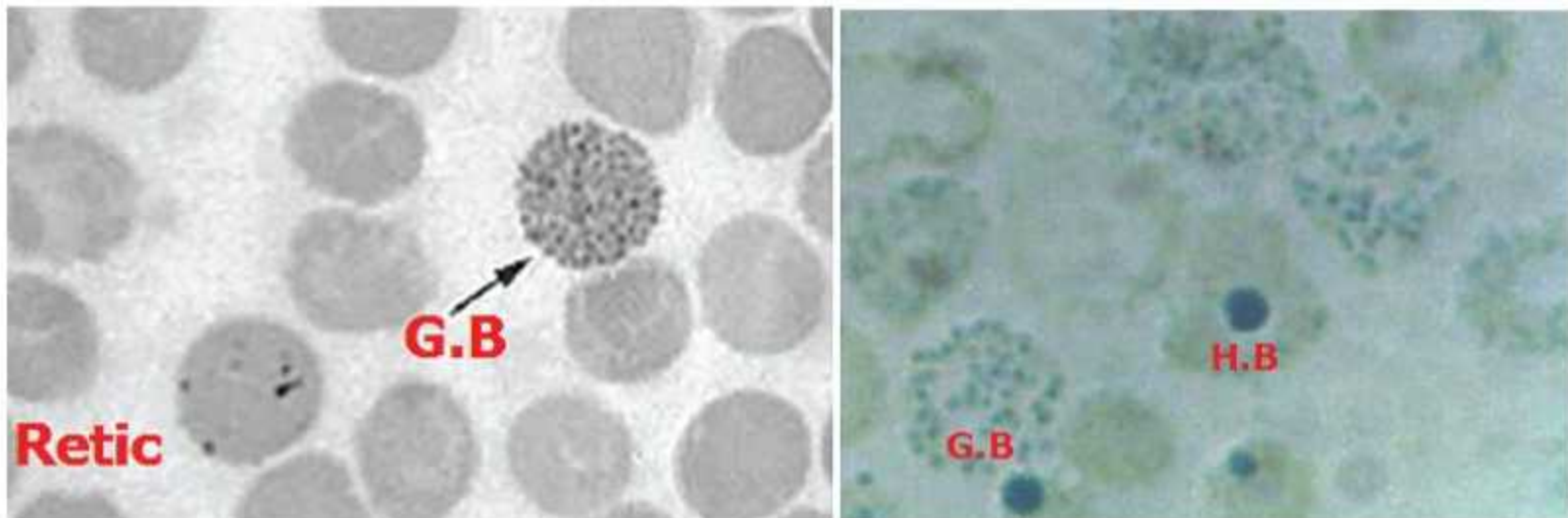
طی دوران نوزادی به دلیل عدم سوئیچ زنجیره گاما به بتا، تست‌های تشخیص هموگلوبین‌های ناپایدار زنجیره  $\beta$  منفی بوده و تنها هموگلوبین‌های ناپایدار با منشاء زنجیره گاما (مثل Hb-Pool) هستند که طی دوران نوزادی (تا یک سالگی) قابل شناسایی می‌باشد ولی نکته مهم در این است که خود Hb-F تا حدودی ناپایدار بوده و باعث واکنش مثبت ضعیف ولی کاذب در نمونه خون بند ناف یا نمونه‌های غنی از Hb-F شود. تست‌های مذکور می‌بایست سریع و بلافاصله پس از نمونه‌گیری انجام شود چراکه ماندن خون و کهنگی آن باعث شکل‌گیری مت‌هموگلوبین و بروز نتیجه مثبت کاذب می‌شود. اگر به اجبار یا ناخواسته تأخیری در انجام آزمایش رخ داد، کنترل منفی نیز می‌بایست به همان مدت زمان که نمونه بیمار باقی مانده است، نگهداری شده باشد. لازم به ذکر است که پایداری  $\alpha$ کسی هموگلوبین بیشتر از  $\alpha$ کسی هموگلوبین می‌باشد، از این رو عمدتاً از خون وریدی برای این تست استفاده می‌شود.

برای کنترل مثبت، علاوه بر Hb-H نمونه خون جنینی کهنه نیز مناسب است. البته این حقیقت که Hb-F در مقایسه با Hb-A پایداری کمتری دارد، انجام آزمایش را در صورت شک به وجود یک هموگلوبین جنینی ناپایدار، با مشکل مواجه می‌سازد، از این رو در این شرایط یک نمونه جنینی با درصد مشابهی از Hb-F باید بعنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار بگیرد. نتایج مثبت کاذب در اثر وجود هموگلوبین S، کهنگی نمونه و Hb-F بالای ۳٪ رخ می‌دهند. آزمون ایزوپروپانول در مقایسه با پایداری در مقابل حرارت (تست حرارتی) از حساسیت کمتری برخوردار بوده و با استفاده از این روش بعضی از هموگلوبین‌های ناپایدار تشخیص داده نمی‌شوند. علایم ناشی از هموگلوبین‌های ناپایدار بسیار متغیر بوده و موارد شدید آن (مثل هموگلوبین زوریخ، کولن و سائوت‌هامپتون) اغلب باعث آنمی همولیتیک شدید، کاهش OFT، تشکیل هاینز بادی شدید، اسپلنومگالی، تشکیل سنگ‌های صفراوی، ندرتاً پریاپیسم و کوله‌سیستکتومی در سنین پایین می‌شود، برعکس مواردی مثل هموگلوبین تاکوما، سوگن و تولوس فاقد علایم بالینی خاصی هستند. هموگلوبین تاکوما در الکتروفورز استات سلولوز قلیایی، یک باند نسبتاً سریع و آندیک در جلوی باند A ایجاد می‌کند ولی با روش الکتروفورز اسیدی در ژل قابل تفکیک نیست. هموگلوبین کولن نیز باندی مابین A و  $A_2$  ایجاد می‌کند.

## آشکار سازی اجسام Hb-H:

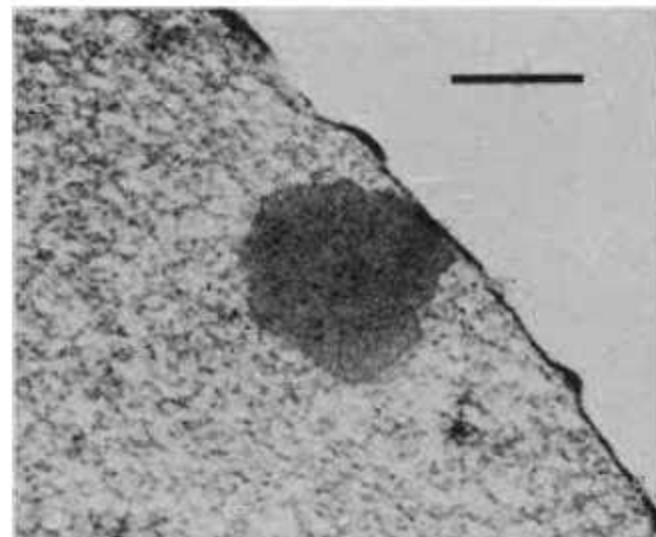
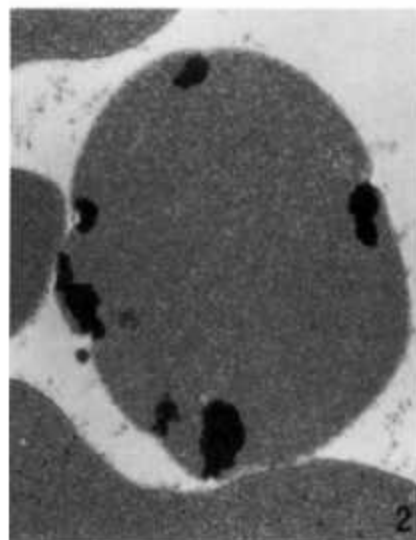
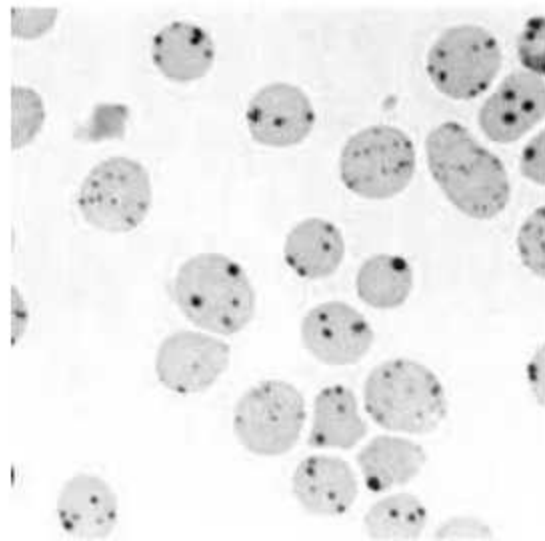
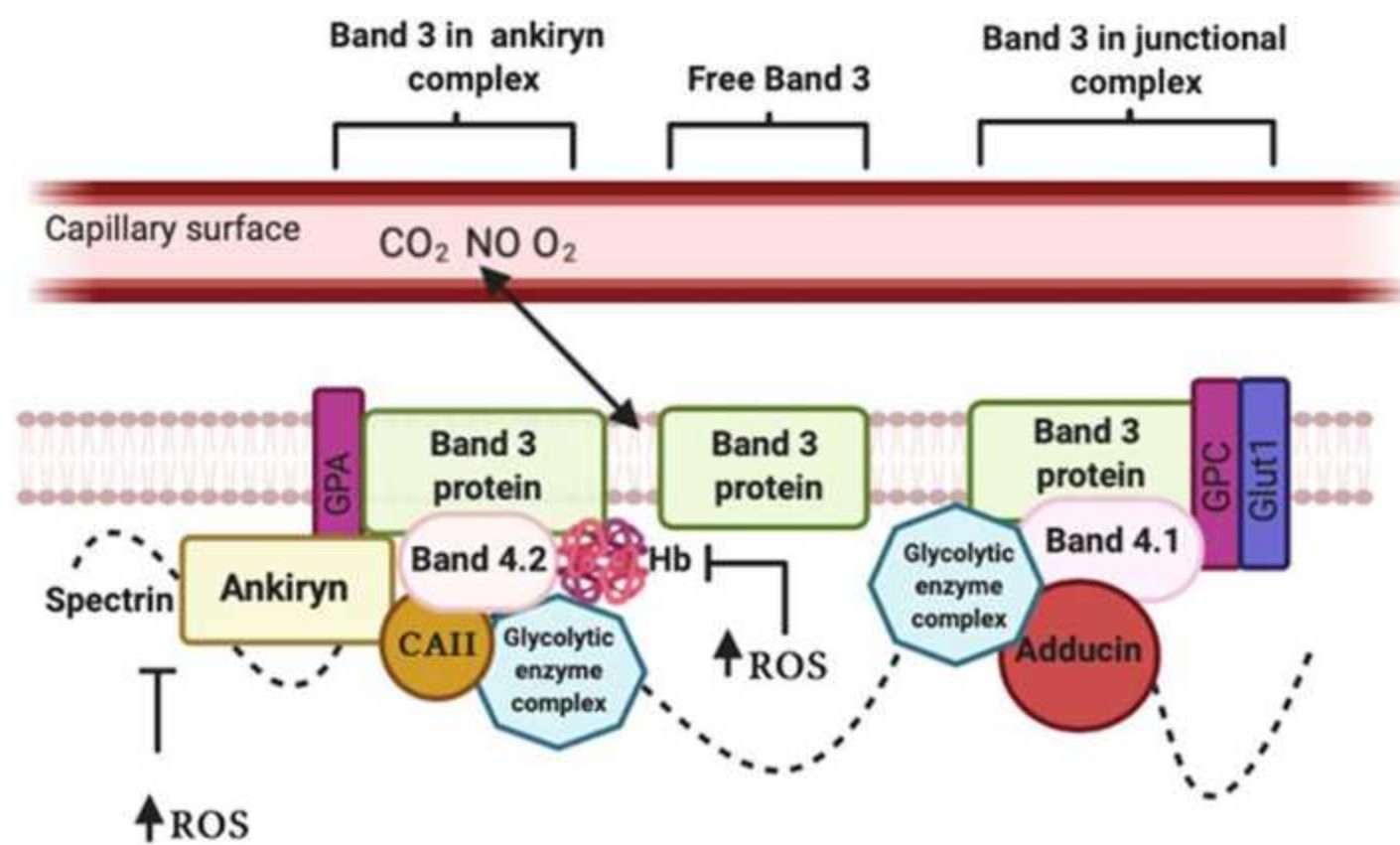
اگر در فردی، بیماری Hb-H و یا آلفا تالاسمی مورد شک قرار بگیرد، یا در الکتروفورز هموگلوبین باندی با حرکت مشابه Hb-H (باند سریع) مشاهده شود، استفاده از این روش برای آشکار کردن اجسام هموگلوبین H ضرورت می‌یابد، البته این که آیا آزمایش باید در بیمار مشکوک به آلفا تالاسمی نیز مورد استفاده قرار بگیرد یا خیر، هنوز مورد بحث است.

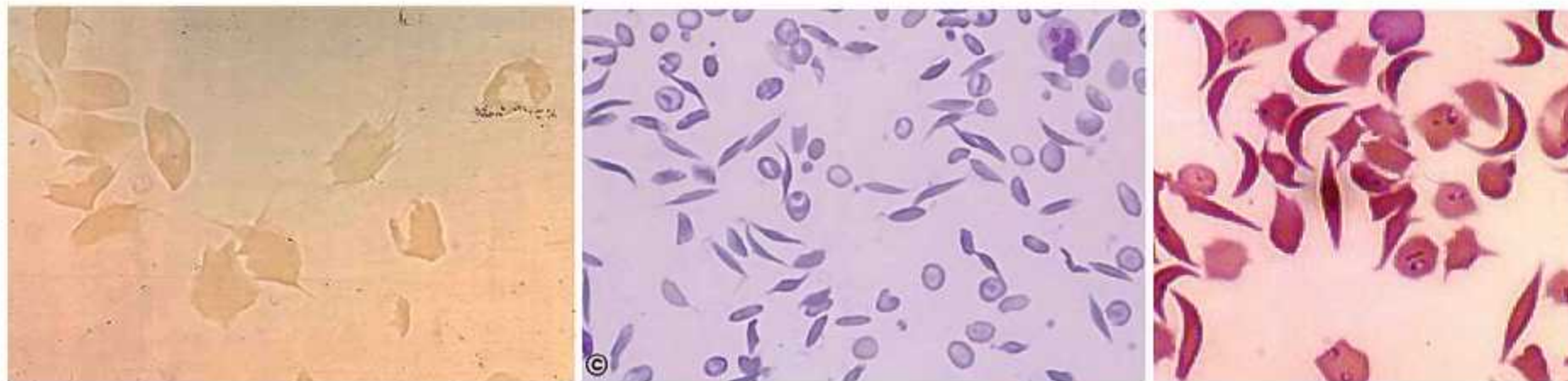
آزمایش مذکور بر این اصل استوار است که Hb-H بعد از تماس با یک اکسید کننده ضعیف مانند برلیانت کریزل بلو (رنگ آمیزی حیاتی)، رسوب می‌کند. ظاهر اجسام Hb-H به این موضوع بستگی دارد که بیمار طحال برداری شده است یا خیر؛ اگر طحال برداری انجام نشده باشد، انکلوژیون‌های کوچک و آبی رنگی که به طور یکسان در گلبول قرمز توزیع شده اند، در تمام سطح RBC مشاهده می‌شوند که به این نما، **منظره توپ گلف (golf ball)** گفته می‌شود. در بیمارانی که بیماری Hb-H داشته و طحال برداری نیز انجام داده‌اند، Hb-H مانند هاینز بادی‌هایی که از قبل تشکیل شده‌اند به نظر می‌رسند. لازم به ذکر است که تشکیل منظره تیپیک گلف بال گاهی به ۲۴-۱۲ ساعت انکوباسیون ۳۷ درجه سلول‌ها در رنگ حیاتی BCB نیاز دارد، از این رو الزاماً توأم با Hb-H گرانول‌های رتیکولوسیتی و اجسام هاینز بادی نیز در رنگ حیاتی رنگ می‌شوند که ممکن است در تعداد بالا با گلف‌بال اشتباه گرفته شوند ولی باید توجه داشت که رسوبات رتیکولوسیتی بصورت گرانول یا فیلامنت و در اندازه‌های کاملاً متغیر و اجسام هاینز نیز به تعداد کمتر، با اندازه بزرگ‌تر و متصل به غشاء دیده می‌شوند و نباید با گلف بال اشتباه گرفته شوند.



شکل ۸۰-۴۶: منظره گلف بال (G.B)، هاینز بادی (H.B) و گرانول‌های رتیکولوسیتی در رنگ آمیزی حیاتی با برلیانت کریزل بلو (BCB) که در آن، رسوب Hb-H به تعداد زیاد، اندازه کوچک و یکنواخت و در تمام سطح RBC دیده می‌شود.







شکل ۷۵-۴۶: داسی شدن و هالی لیف شدن (شکل برگ درخت راج شدن) گلبول‌های قرمز در لام مرطوب و گستره خون محیطی رنگ شده

سوراخ کوچکی را در نوک سرانگشت ایجاد کرده و بلافاصله از آن لام مرطوب و گستره خون محیطی تهیه می‌کنیم که در موارد هتروزیگوت یا هموزیگوت Hb-S باعث تشکیل سلول‌های داسی یا حدواسط فراوان در خون محیطی می‌شود. روش *in vivo* از این جهت که ممکن است در افراد هموزیگوت شدید باعث نکروز پوستی شود، روش پر ریسکی بوده و از این رو علی‌رغم سادگی و هیپوکسی سریع آن، کمتر برای افراد مبتلا به علائم بالینی توصیه می‌شود و امروزه این روش منسوخ شده است.

## ۱) آزمون داسی شدن با پارافین (امتباس بین لام و لامل):

در این آزمایش، داسی شدن گلبول‌های قرمز با داکسیژنه کردن *In Vitro* خون تحریک می‌گردد. یک قطره خون وریدی یا خون سرانگشت بدون حباب هوا را بین یک لام شیشه‌ای و لامل قرار داده، سپس با استفاده از پارافین آب شده، لاک ناخن یا لاک غلط‌گیری چهارگوشه لامل را محکم مسدود کنید تا امکان تبادل هوایی بین خون و هوای محیط وجود نداشته باشد. بدین ترتیب فعالیت متابولیک سلول‌ها باعث کاهش اکسیژن و ایجاد شرایط هیپوکسی و در نتیجه داکسیژناسیون و داسی شدن Hb-S می‌گردد. بعد از گذشت مدت زمان مناسب، قطره خون و داسی شدن اریتروسیت‌های آن با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار می‌گیرد. این تست نیز در هر دو فرم هموزیگوت و هتروزیگوت بیماری مثبت می‌شود ولی با این تفاوت که در حالت هموزیگوت یا S بتا تالاسمی ( $\beta/B^S$  تالاسمی) داسی شدن RBCها معمولاً طی یک ساعت و یا کمتر رخ می‌دهد ولی این فرآیند در موارد هتروزیگوت آهسته‌تر بوده و از شدت کمتری نیز برخوردار می‌باشد، به طوری که برای مشاهده RBCهای داسی شکل به بیش از ۱۲ ساعت انکوباسیون لامل‌ها ترجیحاً در  $37^{\circ}\text{C}$  نیاز می‌باشد.



### ۳) آزمون داسی شدن با افزودن مواد امیاء کننده‌ای مثل دی تیونیت سدیم<sup>۱</sup> یا متابی سولفیت سدیم<sup>۲</sup> به محیط:

در روی یک لام تمیز، به یک قطره از خون حاوی یکی از مواد ضد انعقاد، ۵ قطره از محلول کاری دی تیونیت سدیم یا متابی سولفیت ۲٪ تازه تهیه شده را افزوده و بلافاصله سطح لام را با یک لام یا لامل شیشه‌ای به نحوی بپوشانید که حباب هوا در زیر آن ایجاد نشود. به کمک لاک ناخن یا پارافین مذاب، دور لامل را به نحوی مسدود سازید که هوا به داخل محیط نفوذ ننماید. در صورت وجود Hb-S درون یاخته های سرخ و با کاهش فشار اکسیژن و احیاء اکسیژن در زیر لامل، RBCها به سرعت داسی شکل می‌شوند که موارد هموزیگوت یا S بتا تالاسمی در عرض کمتر از نیم ساعت و در موارد هتروزیگوت، به بیش از یک ساعت زمان نیاز خواهد بود. کیت تجاری این تست امروزه در بازار وجود دارد ولی با این وجود، حساسیت این تست چندان بالا نبوده و امروزه عمدتاً از تست حلالت سلول داسی به عنوان روش معتبر با حساسیت و اختصاصیت بالا استفاده می‌شود. به جز Hb-S، موارد دیگری مثل Hb-C harlem، Hb-I، Hb-S travis و غلظت‌های بالای Hb-Barts نیز در حضور ماده احیاء کننده متابی سولفیت داسی می‌شوند. از طرفی دیگر، این تست در مقادیر کمتر از ۱۰٪ Hb-S (مثل نوزادان) منفی کاذب می‌شود.

#### معرف ها

- A - محلول حاوی دی تیونیت سدیم ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) با غلظت  $0.114 \text{ mol/L}$  معادل  $19.85 \text{ gr/L}$ : این محلول را باید قبل از انجام آزمایش، تازه تهیه نمایید چرا که در اثر ماندن و مجاورت با اکسیژن هوا، سریعاً از قابلیت احیاء کنندگی آن کاسته خواهد شد.
- B - بافر حاوی فسفات دی سدیک (Disodium Hydrogen Phosphate) با غلظت  $0.114 \text{ mol/L}$  مول یا  $16.2 \text{ g/L}$ .
- C - محلول مصرفی: ۲ حجم از محلول A را با ۳ حجم از محلول B مخلوط نموده و PH محلول نهایی را به ۶/۸ برسانید.



شکل ۷۶-۴۶: لام مرطوب از خون محیطی بیمار مبتلا به SCA که سلول‌های داسی، هالی‌ایف و قایقی شکلی را نشان می‌دهد. امروزه کیت دی تیونیت سدیم یا متابی سولفیت به صورت تجاری در بازار وجود دارد.

#### (۴) آزمایش حلالیت سلول داسی (Hb S Solubility Test):

هنگامی که یک هموگلوبین واریانت با خصوصیات الکتروفورزی یا HPLC مربوط به Hb-S مورد شناسایی قرار گرفت، می‌بایست برای تأیید قطعی آن از آزمون حلالیت سلول داسی یا HSST استفاده نمود (تنها استثناء زمانی است که مقدار هموگلوبین واریانت شناسایی شده به حدی ناچیز باشد که موجب مثبت شدن آزمایش حلالیت سلول داسی نشود که باز در این شرایط نیز یک روش دیگر باید برای تعیین هویت هموگلوبین واریانت مورد استفاده قرار گیرد). همچنین در مواقعی که با یک هموگلوبین واریانت با ماهیت نامشخص مواجه می‌شویم، می‌بایست از روی احتیاط آزمون حلالیت سلول داسی را روی آن انجام دهیم تا ماهیت بیماری‌زایی آن مشخص شود، چراکه تعدادی هموگلوبین غیرطبیعی (مثل C-harlem و Cameroon) وجود دارند که علاوه بر جایگزینی والین به جای اسید گلوتامیک، دارای جایگزینی دیگری نیز می‌باشند، این نوع از هموگلوبین‌ها ممکن است دارای حرکت الکتروفورزی متفاوت از Hb-S باشند اما به هر حال وجود آنها موجب داسی شدن گلبول‌های قرمز در داخل و خارج بدن می‌گردد (جدول ۱۴-۴۶).

جدول ۱۴-۴۶: هموگلوبین‌های واریانتی که جهش Hb-S یکی از دو جهش موجود در آنها می‌باشد.

Variant haemoglobin	Second substitution	Mobility on cellulose acetate at alkaline pH
C-Harlem	$\beta 73 \text{ Asp} \rightarrow \text{Asn}$	C
C-Ziguinchor	$\beta 58 \text{ Pro} \rightarrow \text{Arg}$	C
S-Travis	$\beta 142 \text{ Ala} \rightarrow \text{Val}$	S
S-Antilles	$\beta 23 \text{ Val} \rightarrow \text{Ile}$	S
S-Providence	$\beta 82 \text{ Lys} \rightarrow \text{Asn}$	A
S-Oman	$\beta 121 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$	Slower than C
S-Wake	$\beta 139 \text{ Asp} \rightarrow \text{Ser}$	
Cameroon	$\beta 90 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$	
Jamaica Plain	$\beta 68 \text{ Leu} \rightarrow \text{Phe}$	S
South End	$\beta 132 \text{ Lys} \rightarrow \text{Asn}$	S

این آزمایش روش سریعی است که از آن می‌توان جهت افتراق بین موارد هموزیگوت (آئمی سلول‌های داسی) و هتروزیگوت هموگلوبین S (خصیصه سلول‌های داسی)، وجود هموگلوبین غیرطبیعی و تالاسمی استفاده نمود. در عین حال ذکر این نکته ضروری است که تصمیم‌گیری براساس نتایج این آزمایش به تنهایی، در مورد ژنوتیپ بیمار غیر معقول بوده و قطعاً نیاز به انجام آزمایش الکتروفورز هموگلوبین نیز می‌باشد.



### مملول‌های مورد نیاز

الف - بافر فسفات با  $\text{pH} = 7.1$ : جهت تهیه این بافر ۳۳/۷۸ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات<sup>۱</sup> و ۵۹/۳۳ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات<sup>۲</sup> و ۲/۵ گرم **سپونین** (عامل لیز کننده) را به یک ارلن مایر نیم لیتری ریخته و حجم نهایی را به ۲۵۰ ml برسانید.

ب - محلول کار: ۰/۱ گرم دی تیونیت سدیم را درست قبل از مصرف در ۱۰ ml بافر حل نمایید.

### روش دوم:

الف - جهت تهیه بافر فسفات استوک، ۱۶۰/۴۸ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات و ۲۸/۸۸ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات را به یک ارلن مایر یک لیتری ریخته و حجم نهایی را با DW به ۵۰۰ ml و سپس به یک لیتر برسانید.

ب - محلول دی تیونیت سدیم کاری: ۲۰ گرم پودر دی تیونیت سدیم ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) و ۰/۲۵ گرم **سپونین** را در ۸۰ ml بافر فسفات استوک حل نموده و در نهایت با DW به حجم ۱۰۰ ml برسانید.

پایداری این محلول در دمای  $4^\circ\text{C}$  حدود ۱ ماه بوده و باید شفاف و بی‌رنگ باشد و هنگام استفاده از آن نیز می‌بایست بتواند مقدار زیادی از RBCها را لیز کرده و باعث تشکیل رنگ صورتی-آبی شود. این محلول در صورت برخورد با آب و محیط مرطوب می‌تواند مشتعل شده و باعث آتش گرفتن محلول شود، لذا حداقل امکان باید در محیط خشک نگهداری و استفاده شود.

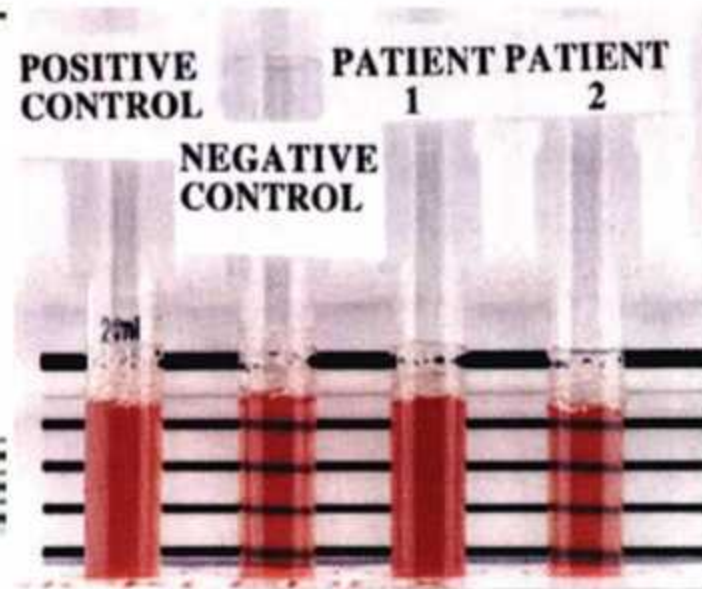
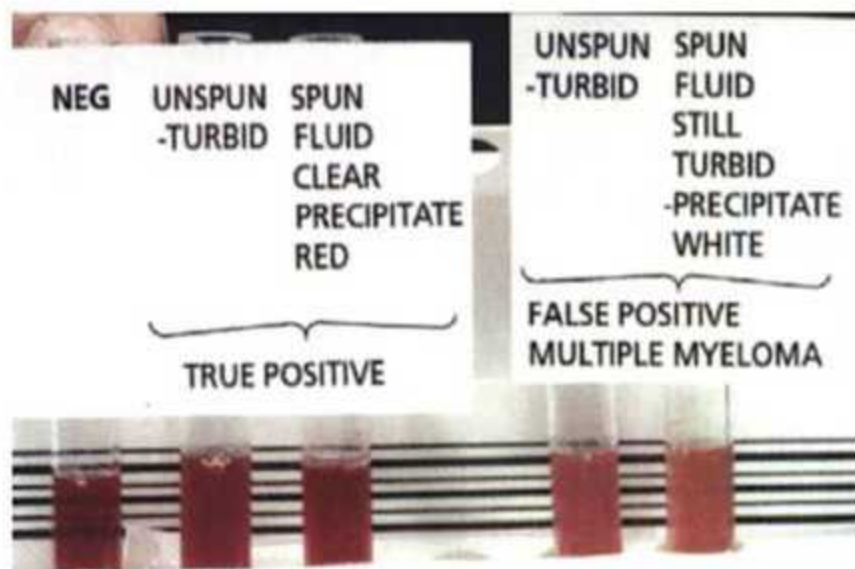
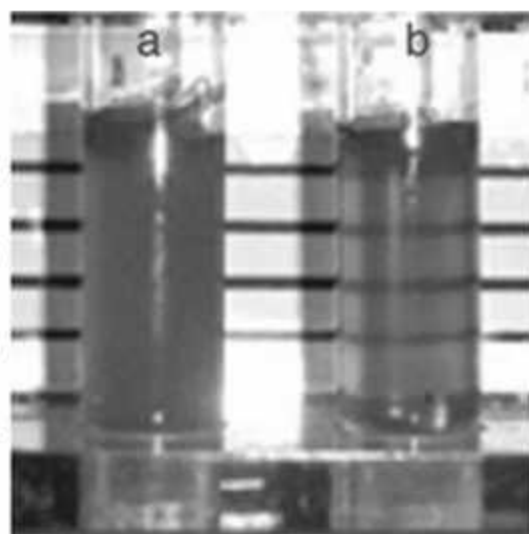
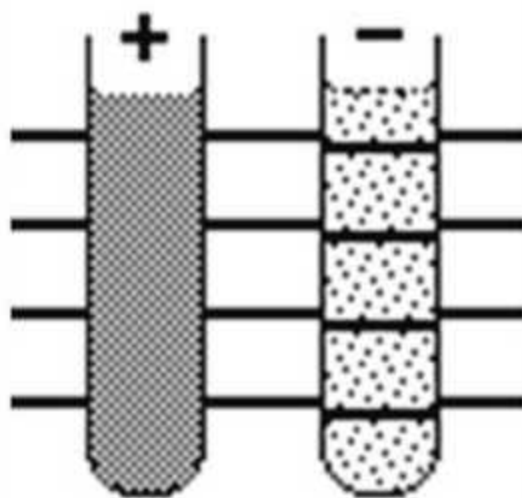
### روش سوم:

جهت تهیه بافر کاری مستقیم، ۱۶۹ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات را در مقداری DW حل کرده و سپس ۲۱۵ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات و ۵ گرم دی تیونیت سدیم را به یک ارلن مایر یک لیتری ریخته و بعد از افزودن ۱ g **سپونین**، حجم نهایی محلول را با DW به یک لیتر برسانید. این محلول قابل فریز هم می‌باشد.



۱- به یک لوله آزمایش متوسط، ۲ml محلول دی تیونیت سدیم کاری (هیدروسولفیت سدیم) و ۲۰۰µl خون EDTA دار ریخته و بعد از میکس آرام، لوله را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ سانتیفریوژ کنید. بدون استفاده از ترمز دستگاه و یا دست، اجازه دهید تا سانتیفریوژ به آرامی بایستد. به آرامی لوله را از سانتیفریوژ بیرون آورده و طوری در جا لوله‌ای قرار دهید که محتویات درون آن بهم نخورد.

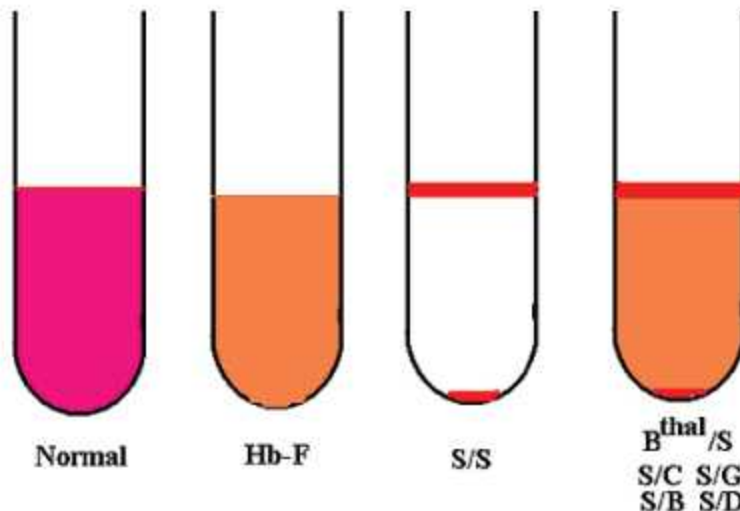
در این محلول پس از تخریب شدن اریتروسیت‌ها و آزاد شدن هموگلوبین، پاره‌ای از هموگلوبین‌ها (مثل هموگلوبین‌های A, C, D و G) کاملاً حل گشته و به محلول رویی رنگ قرمز یکنواختی می‌بخشند. هر چند Hb-F نیز در این محلول حل گشته و رسوب نمی‌کند، ولی تغییر رنگ محلول رویی مشابه حالت فوق نبوده و تنها به رنگ صورتی کم رنگی مشاهده می‌شود. برخلاف موارد فوق، هموگلوبین S در محلول دی تیونات حل نشده و به صورت نامحلول باقی می‌ماند، این هموگلوبین‌های نامحلول بعد از سانتیفریوژ، به صورت باند نامحلول قرمز رنگ و معلق در روی لایه محلول مشاهده گشته و رسوب نمی‌نماید. در تأیید Hb-S علاوه بر بررسی محلول سانتیفریوژ شده، محلول سانتیفریوژ نشده نیز ارزش تشخیص دارد که در صورت قرار دادن آن در مقابل خطوط موازی کاغذ، خطوط مذکور قابل مشاهده نبوده و کدورت محلول مانع از مشاهده آن می‌شود. برای کنترل مثبت می‌توان از سوسپانسیون RBC با Hb: 5g/dl در نرمال سالین و برای کنترل منفی از همان سوسپانسیون ولی محلول در DW استفاده نمود که در این حالت، آب مقطر باعث لیز هموگلوبین‌ها و تشکیل یک محلول شفاف (بدون کدورت) می‌شود ولی نرمال سالین بدون همولیز باعث تشکیل محلولی با کدورت مشخص می‌شود که می‌تواند معادل Hb-S نامحلول در محلول دی تیونات باشد. لازم به ذکر است که هیپرپروتئینمی (مثل مالتیپل میلوما)، هیپرلیپیدمی، اسپلنکتومی، وجود هموگلوبین ناپایدار و اجسام هاینز، لکوسیتوز، N-RBC، ترومبوسیتوز و دیگر موارد مشابه قادر هستند تا با ایجاد کدورت مجازی، باعث پاسخ مثبت کاذب در تست کدورت سنجی شوند. بالعکس، هموگلوبین پایین، لوله باریک (لوله همولیز)،  $Hb-S < 20\%$ ، محلول کهنه یا اکسپایر، انتقال خون اخیر (در عرض ۴ ماه)، خون بند ناف، دوران نوزادی و Hb-F بالا باعث نتایج منفی کاذب می‌شوند که استفاده از یک سل به جای خون تام می‌تواند باعث کاهش خطای کاذب ناشی از هیپرپروتئینمی، هیپرلیپیدمی و هموگلوبین پایین شود، البته به منظور پرهیز از بروز موارد منفی کاذب ناشی از آنمی، می‌توان هماتوکریت بیمار را نیز با برداشت مقداری از پلاسما و رساندن آن به حدود ۵۰٪، تصحیح نمود. برای تأیید نهایی Hb-S، افزودن اوره به محلول حاوی Hb-S باعث حل شدن مجدد آن در بافر می‌شود، همچنین استفاده از HPLC یا الکتروفورز باعث تأیید قطعی تست می‌شوند.



شکل ۷۷-۴۶: نتایج مثبت و منفی تست HSST در حضور کنترل‌های مثبت و منفی و واکنش مثبت کاذب ناشی از مالتیپل میلوما که سانتیفریوژ یا عدم سانتیفریوژ آن تأثیری در کدورت نمونه ندارد.



- ۱- حالت هموزیگوت هموگلوبین S (بیماری یا کم خونی داسی شکل با بیش از ۹۰٪ Hb-S): در این حالت محلول زیرین بی رنگ بوده و روی آن باند قرمز رنگ هموگلوبین S به صورت معلق قرار دارد.
- ۲- حالت هتروزیگوت هموگلوبین S توأم با یکی از هموگلوبین‌های محلول (A, C, D و G): در این حالت محلول زیرین صورتی مایل به قرمز رنگ بوده و روی آن باند نامحلول هموگلوبین S دیده می‌شود.
- ۳- حالت  $\beta/\beta^S$  تالاسمی (با ۳۵-۴۶٪ Hb-S): در این حالت رنگ محلول زیرین صورتی کم رنگ بوده و در روی آن مشابه حالت ۲، باند نامحلول قرمز رنگ هموگلوبین S مشاهده می‌گردد.
- ۴- حالت نرمال  $\beta/\beta$  و یا هموگلوبینوپاتی‌های D, C و G: در این حالت، محلول قرمز رنگ یک دستی مشاهده می‌شود که روی آن باند معلق قرمز رنگی نیز دیده نمی‌شود. از آن جایی که در الکتروفورز معمولی و روتین هموگلوبین که در pH=8.5 انجام می‌گیرد، باند هموگلوبین‌های S, D و G در یک منطقه قرار گرفته و قادر به تفکیک آنمی داسی شکل (SS) از هموگلوبینوپاتی‌های SD, SG و GD نمی‌باشیم، لذا این آزمایش روش مناسبی جهت افتراق حالات فوق از یکدیگر محسوب می‌شود ولی جهت تفکیک انواع هموگلوبینوپاتی‌های D, C و G از یکدیگر و از حالت طبیعی و همچنین افتراق حالات هتروزیگوت SC, SD, SG و SA از یکدیگر (تعیین ژنوتایپ)، روش مناسبی نبوده و همان‌طوری که قبلاً بیان شد، نیاز به الکتروفورز هموگلوبین بیمار به کمک حامل و بافر مناسب می‌باشد.





## (۵) آزمایش عدم عبور Hb-S از ژل آگاروز:

این تکنیک یک روش اصلاح شده تکنولوژی ژل است که عمدتاً برای تعیین گروه خونی به کار می‌رود، ولی در این تست ژل مربوطه برای شناسایی Hb-S طراحی شده و حاوی دی‌تیونات سدیم است. اساس این روش بر این حقیقت استوار است که گلبول‌های قرمز داسی شکل به دلیل شکل خاصی که دارند، قادر به عبور از ژل نبوده و در سطح فوقانی ژل باقی می‌مانند. براساس تحقیقات انجام شده، این آزمایش قابل اعتماد نبوده و استفاده از آن برای تشخیص بیماری توصیه نمی‌گردد. Hb-S با استفاده از روش‌های ایمنولوژیک نیز قابل شناسایی می‌باشد.



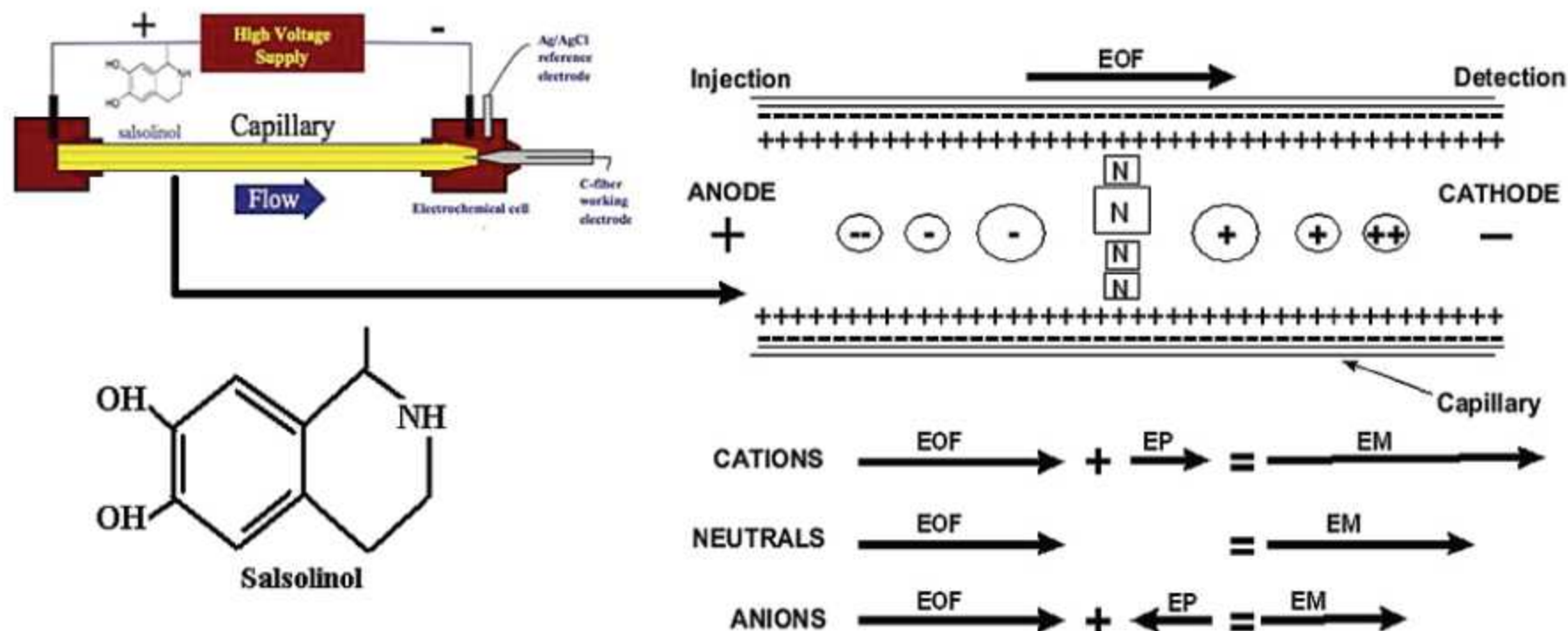




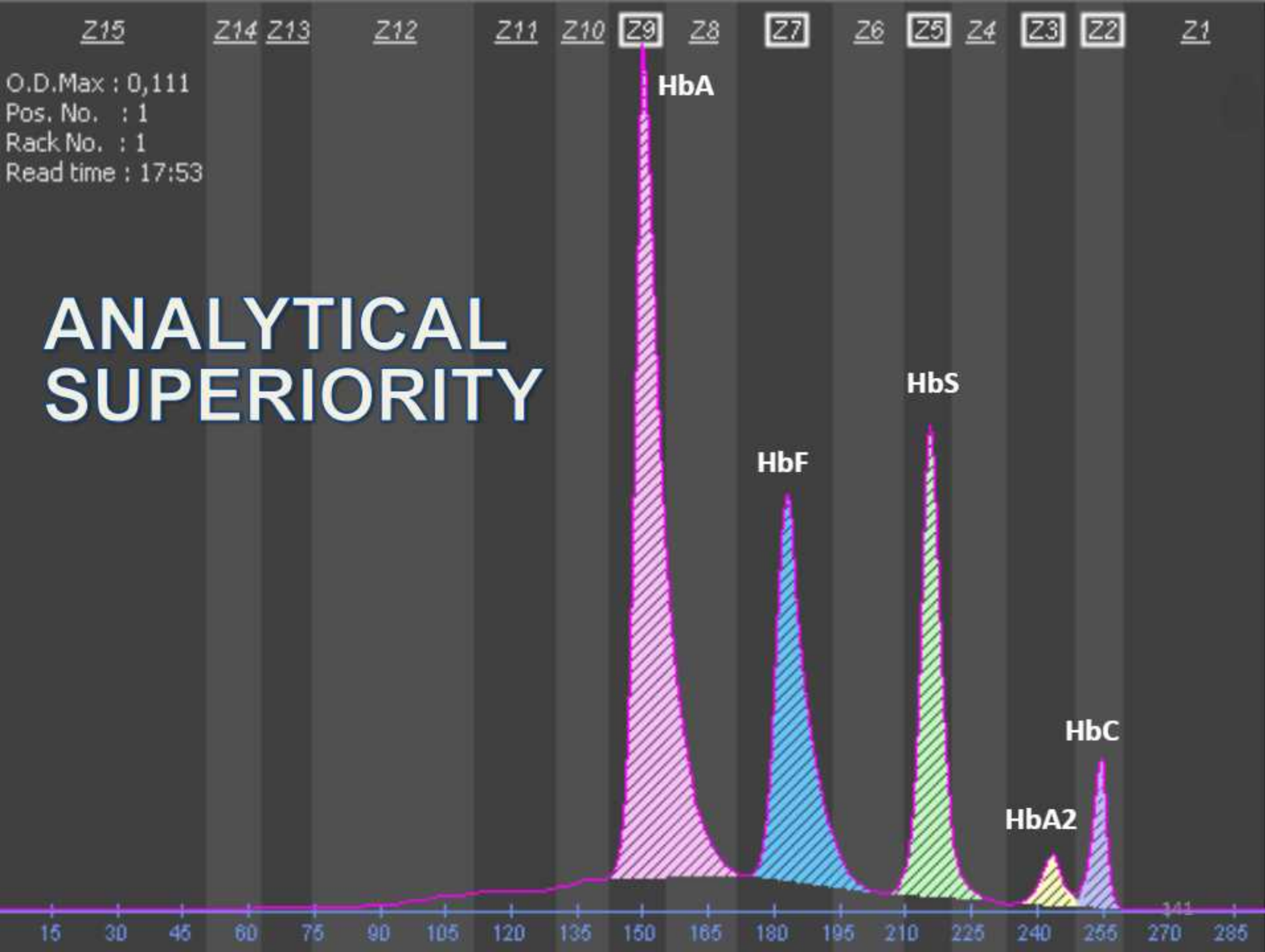


## (i) الکتروفورز لوله موئینه (Capillary Electrophoresis):

در کاپیلاری الکتروفورز، دو نوع حرکت، مهاجرت مولکول‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد که شامل (i) حرکت الکتروفوریتیک (EP)<sup>۱</sup> و (ii) جریان حرکت الکترواوسموتیک (EOF)<sup>۲</sup> می‌باشند. برآیند و مجموع جبری این دو حرکت را نیز، حرکت ظاهری یا EM<sup>۳</sup> می‌نامند. در سطح داخلی لوله موئینه CE، گروه‌هایی به نام Silanol یا Salsolinol قرار دارند که در pH اسیدی ۲ یا بالاتر، یونیزه شده و یک شارژ منفی یکنواخت را در سطح داخلی لوله ایجاد می‌کنند. از طرفی دیگر، وقتی که بافر یونی وارد لوله موئینه می‌شود، کاتیون‌های آن برای خنثی کردن این شارژ منفی، ابری از بارهای مثبت را در سطح آن تشکیل داده و در نتیجه یک لایه دومی (ابر کاتیونی) را در سطح داخلی لوله ایجاد می‌کنند. با برقراری میدان الکتریکی، ابر کاتیونی بافر شروع به حرکت به سمت الکتروود کاتد (-) می‌کند و در نتیجه حرکت یکنواخت و ثابتی را در داخل CE ایجاد می‌کند که به آن EOF گفته می‌شود. این حرکت باعث حرکت بافر به سمت کاتد می‌شود که نه تنها کاتیون‌ها، بلکه مواد خنثی محلول در بافر را نیز به سمت کاتد هدایت می‌کند ولی آنیون‌های موجود در بافر، به جهت میدان الکتریکی قوی موجود در لوله، در جهت عکس EOF، به سمت الکتروود آند (+) حرکت می‌کنند.



حرکت دوم مربوط به حرکت الکتروفورتیک (EP) مواد است که در اثر آن، مواد باردار بسته به (i) مقدار شارژ الکتریکی (g)، (ii) نیروی دافعه و جاذبه یونی و (iii) بسته به قدرت میدان الکتریکی (E)، به سمت الکتروود مخالف خود حرکت می‌کنند، در نتیجه پروتئین‌ها بر اساس شدت و نوع بار خود به سمت کاتد (-) یا آنود (+) حرکت می‌کنند و پروتئین‌های خنثی نیز بدون حرکت، سر جای خود باقی می‌مانند و بدین ترتیب پروتئین‌های مختلف از یکدیگر تفکیک می‌شوند. با حل شدن پروتئین‌هایی مثل هموگلوبین در **بافر اسیدی**، هموگلوبین‌ها بار مثبت یا خنثی به خود می‌گیرند که با قرارگیری آنها در داخل لوله موئینه CE، هموگلوبین‌های مثبت براساس حرکت EP خود به سمت کاتد رفته و هموگلوبین‌های خنثی سر جای خود باقی می‌مانند ولی از طرفی دیگر، نیروی الکترواندوسموز و در نتیجه حرکت EOF نیز به آنها وارد شده و باعث هدایت پروتئین‌های خنثی و مثبت به سمت کاتد می‌شوند که برآیند EOF+EP یا همان EM باعث تفکیک انواع هموگلوبین‌ها می‌شود و در نتیجه باندهای واضحی از آنها در CE ایجاد می‌شود. هموگلوبین‌هایی هم که ممکن است بار منفی داشته باشند، حالت آنیون به خود گرفته و در خلاف جهت EOF به سمت آنود (+) حرکت می‌کنند که به دلیل مخالف جهت هم بودن EP و EOF، برآیند حرکت آنها ناچیز بوده و کمتر یا کندتر از بقیه حرکت کرده و به انتهای CE می‌رسند. با این حساب، هموگلوبین‌های مثبت سریع‌ترین حرکت را داشته و بعد از آنها، هموگلوبین‌های خنثی و در نهایت هموگلوبین‌های منفی از یکدیگر تفکیک شده و از CE خارج می‌شوند. البته این حرکت را می‌توان با تغییر قدرت یونی و pH بافر، تغییر میدان الکتریکی، نوع لوله موئینه و نوع مواد افزودنی به بافر تغییر داد.





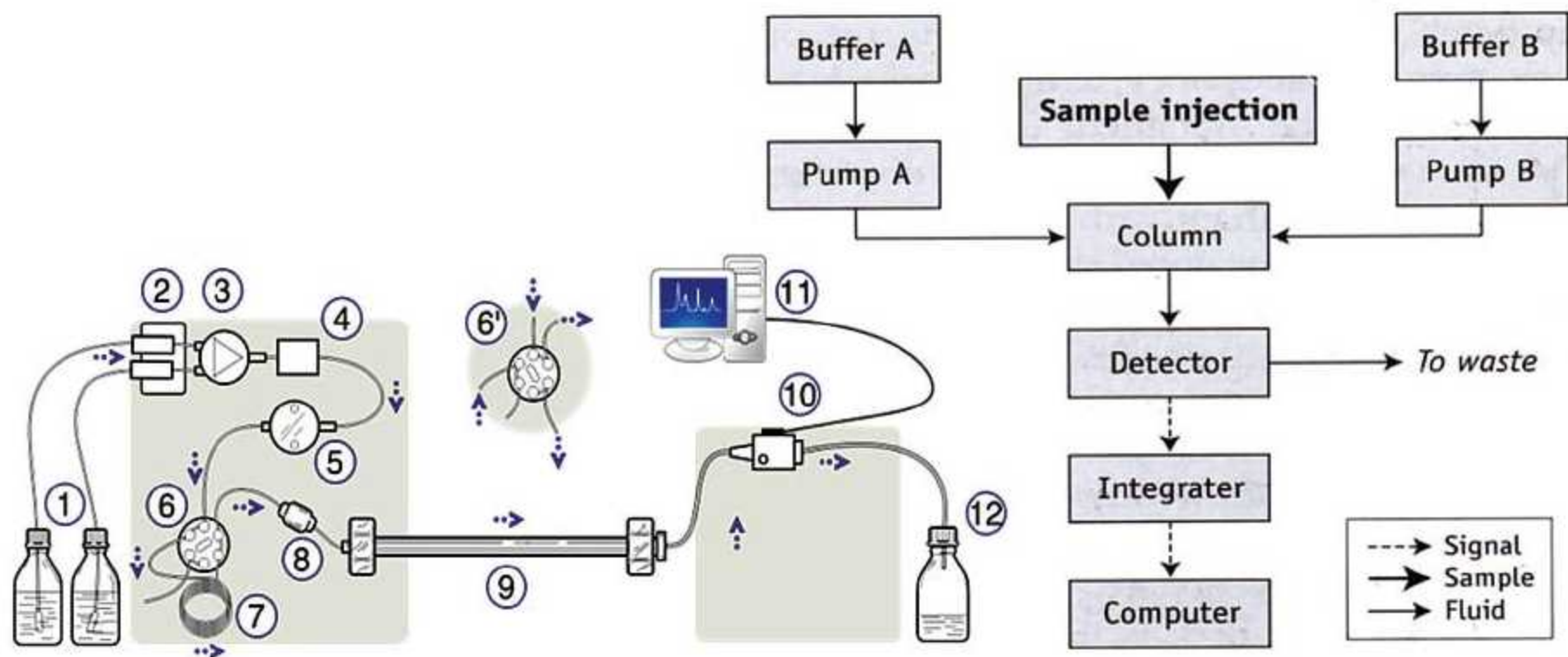
# 300 points with 15 zones Curve

Zone	Hemoglobins (Hb)
Z1	Hb $\delta$ A'2, Hb $\alpha$ A'2, other Hb A2 variants, Hb A2 Hasharon and Hb A2 Winnipeg variants
Z2	Hb C, Hb A2 Setif variant, Hb Constant Spring
Z3	Hb A2, Hb O-Arab
Z4	Hb E, Hb Köln, Hb A2 variants (and degraded Hb C)
Z5	Hb S (and degraded Hb O-Arab), Hb Hasharon
Z6	Hb D-Punjab, Hb D-Ouled Rabah, Hb Lepore, Hb G-Philadelphia, Hb Korle-Bu, Hb Köln, Hb Setif, Hb G-Taipei Hb Winnipeg (and degraded Hb E),
Z7	Hb F, Hb Porto-Alegre, Hb Richmond, Hb G-San Jose (and degraded Hb S)
Z8	Hb Atlanta, acetylated Hb F
Z9	Hb A, Hb Okayama, Hb Camperdown, Hb Fontainebleau, Hb Toulon
Z10	Hb Hope
Z11	Hb J-Kaohsiung (and degraded Hb A)
Z12	Hb Bart's, Hb J-Providence, Hb J-Mexico, Hb J-Baltimore, Hb J, Hb J-Broussais
Z13	Hb N-Baltimore
Z15	Hb H

## ه) کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC):

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جهت تعویض کاتیون (CE-HPLC یا HPLC)<sup>۱</sup> تکنیکی مشابه CE است که طی آن مخلوطی از هموگلوبین‌های طبیعی و واریانت که بار شبکه‌ای مثبت داشته و در pH اسیدی قرار دارند، از طریق اتصال و جذب به فاز ثابت با بار منفی (آنیون) در ستون کروماتوگرافی، به اجزاء تشکیل دهنده خود تفکیک می‌شوند و سپس یک فاز متحرک آنها را شستشو و از ستون مربوطه خارج می‌سازد. فاز متحرک بافری با غلظت در حالت افزایش کاتیون‌ها است که در طول ستون جریان دارد و از افزوده شدن تدریجی بافری با غلظت کاتیونی بسیار بالا (بافر A) به بافر اسیدی با غلظت کاتیونی پایین (بافر B) تشکیل می‌شود. در این تکنیک، کاتیون‌های موجود در فاز متحرک با پروتئین‌های جذب شده به ستون، بر سر اتصال به آنیون‌های ستون رقابت نموده و باعث جداسازی و خارج شدن پروتئین‌های تعویض شده می‌شوند. بنابراین مولکول‌های جذب شده هموگلوبین که دارای بار مثبت هستند، از ستون شسته شده و با سرعتی متناسب با تمایل خود نسبت به فاز ثابت، وارد فاز مایع شده و از ستون خارج می‌شوند که به بازه زمانی مابین شروع تست تا خروج هر نوع هموگلوبین، **زمان احتباس**<sup>۲</sup> یا **رتنشین تایم (RT)** آن هموگلوبین گفته می‌شود که بر اساس نوع دستگاه، نوع بافر، نوع هموگلوبین، میزان گلیکوزیلاسیون یا استیلاسیون آن، برای هر هموگلوبین اختصاصی می‌باشد. در مرحله بعد، پس از اینکه جداسازی بدین طریق انجام شد، هموگلوبین‌های تفکیک شده از طریق بررسی نوری در بافر مربوطه شناسایی می‌شوند که **شناسایی** هموگلوبین‌ها بر اساس زمان احتباس آنها و **اندازه‌گیری** هموگلوبین‌ها، براساس محاسبه مساحت زیر پیک بدست آمده از آن صورت می‌گیرد. بین زمان احتباس هر هموگلوبین در ستون HPLC و حرکت آنها در الکتروفورز استات سلولوز (pH قلیایی)، تاحدودی همخوانی وجود دارد. هموگلوبین‌های با بیشترین بار مثبت (مثل Hb-C, Hb-S) زمان احتباس طولانی‌تری دارند که با حرکت آهسته‌تر آنها در الکتروفورز استات سلولوز همخوانی دارد. کاربرد HPLC در شناسایی واریانت‌های هموگلوبین به این حقیقت بستگی دارد که هر هموگلوبین طبیعی و یا واریانت، در هر سیستم و دستگاه اختصاصی (مثل دستگاه BioRad)، پس از زمان معین از ستون خارج شده و وارد محلول لوشن می‌شود (زمان احتباس) که بدین ترتیب بسیاری از واریانت‌های هموگلوبین از یکدیگر قابل جداسازی هستند. البته امکان بروز همپوشانی و تداخل میان بعضی از هموگلوبین‌ها هنوز هم وجود دارد [۱۴].





شکل ۴۴-۴۶: اساس دستگاه HPLC که در آن ترکیب تدریجی بافر A (با غلظت کاتیونی بالا) به بافر پایه B باعث افزایش قدرت کاتیونی بافر موجود در ستون و در نتیجه افزایش قدرت تعویض یونی آن با هموگلوبین های متصل به ستون HPLC می شود. در نتیجه هموگلوبین ها بسته به شارژ الکتریکی خود و تمایل آنها به آنیون های ستون، از ستون جدا شده و از آن خارج می شوند.





شکل ۴۵-۴۶: دو دستگاه پیشرفته HPLC جهت شناسایی و تشخیص انواع پروتئین‌ها، داروها و هموگلوبین‌های مختلف

بعضی از هموگلوبین‌هایی که توسط الکتروفورز استات سلولوز در pH قلیایی قابل شناسایی نیستند (مثل باندهای GSD)، توسط HPLC قابل شناسایی هستند، بعنوان مثال هموگلوبین‌های D-Punjab/LosAngeles و G-Philadelifia به کمک تکنیک HPLC از Hb-S و از یکدیگر قابل تشخیص می‌گردند. سرعت آهسته‌تر جریان بافر که با تغییر آهسته غلظت کاتیونی همراه می‌باشد، جداسازی انواع هموگلوبین‌های با زمان احتباس مشابه را بهبود می‌بخشد، اما زمان انجام کلی آزمایش HPLC را افزایش می‌دهد. در این دستگاه، هموگلوبین‌هایی که از ستون شسته شده و خارج می‌شوند، به صورت مصور نمایش داده شده و بطور خودکار توسط اسپکتروسکوپی اندازه گیری می‌شوند. زمان احتباس هر هموگلوبین مجهول بر اساس زمان احتباس (RT) هموگلوبین‌های معلوم و استاندارد کنترل‌های تجاری طبیعی یا غیرطبیعی تعیین می‌شود. (معمولاً با توجه به زمان C, S, F, A یا D).

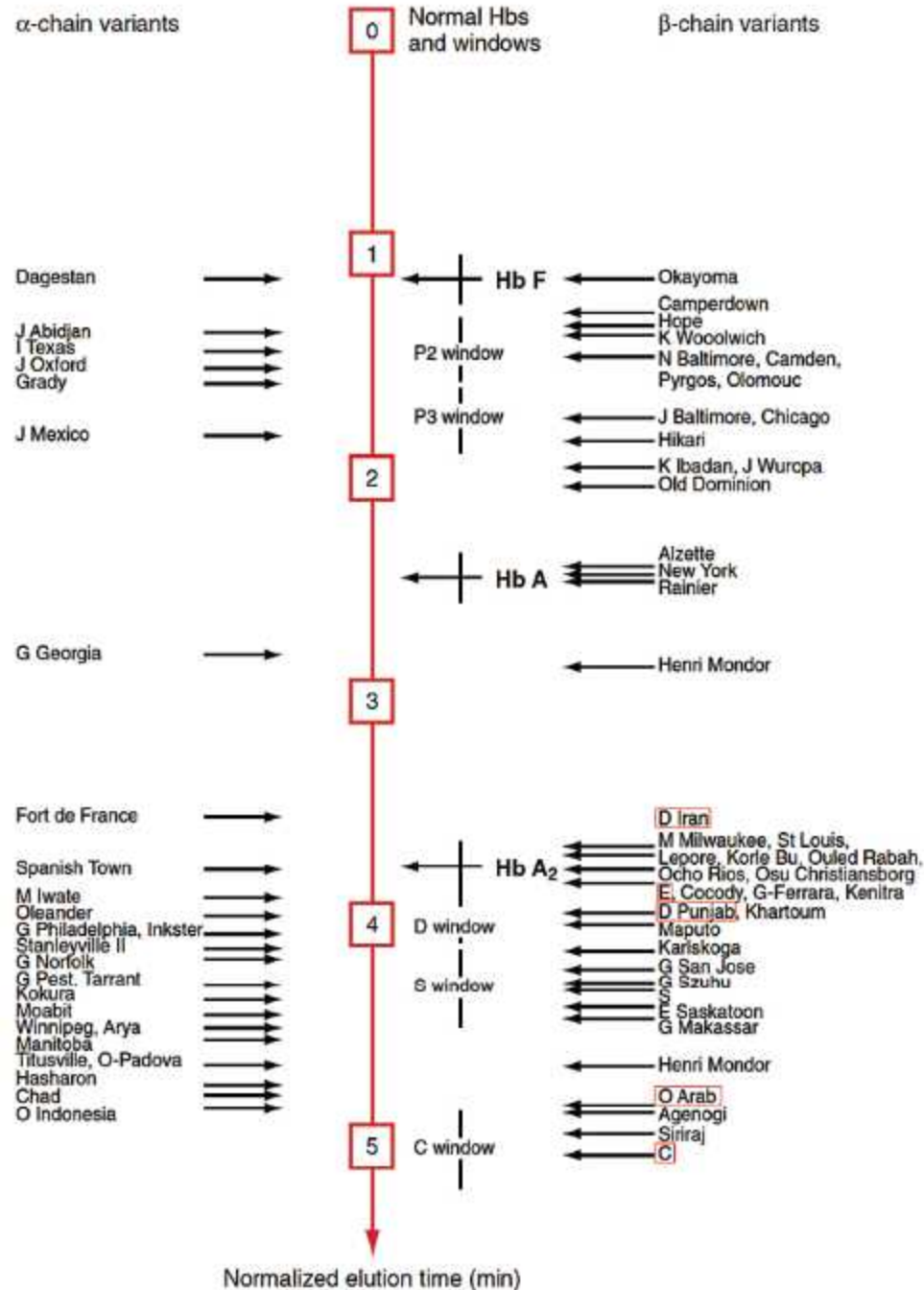
جدول ۷-۴۶: زمان احتباس یا RT مربوط به برخی از مهمترین هموگلوبین‌های طبیعی یا واریانت در دستگاه Bio-Rad (Version II) که برخی از آنها با برخی دیگر از هموگلوبین‌ها همپوشانی دارند

'Window'	Retention time (min)	Window	Haemoglobins that may overlap
F	1.10	0.98–1.22	Okayama
'P2'*	0.11	0.28–1.50	Beckman, Geelong, glycosylated A, Hope, I-Philadelphia, K-Woolwich
'P3'†	1.70	1.50–1.90	Buffalo, Camden, Fannin-Lubbock, Grady, J-Bangkok, J-Meerut, J-Baltimore, J-Norfolk, N-Baltimore
A	2.50	1.90–3.10	A, glycosylated S, New York, Köln (when not denatured)
A <sub>2</sub>	3.60	3.30–3.90	Deer Lodge, D-Ouled Rabah, D-Iran, E, G-Copenhagen, G-Coushatta, G-Ferrara, G-Honolulu, Kenya, Korle Bu, Lepore, M-Saskatoon‡, Osu-Cristiansborg, Spanish Town, Zurich
D	4.10	3.90–4.30	Alabama, D-Punjab, G-Norfolk, G-Philadelphia, Kempsey, Osler
S	4.50	4.30–4.70	Q-Thailand (Mahidol), A <sub>2</sub> ', Manitoba
C	5.10	4.90–5.30	Agenogi, C, Siriraj, Constant Spring

\* A glycosylated fraction of haemoglobin A.

† A minor peak representing modified haemoglobin A.

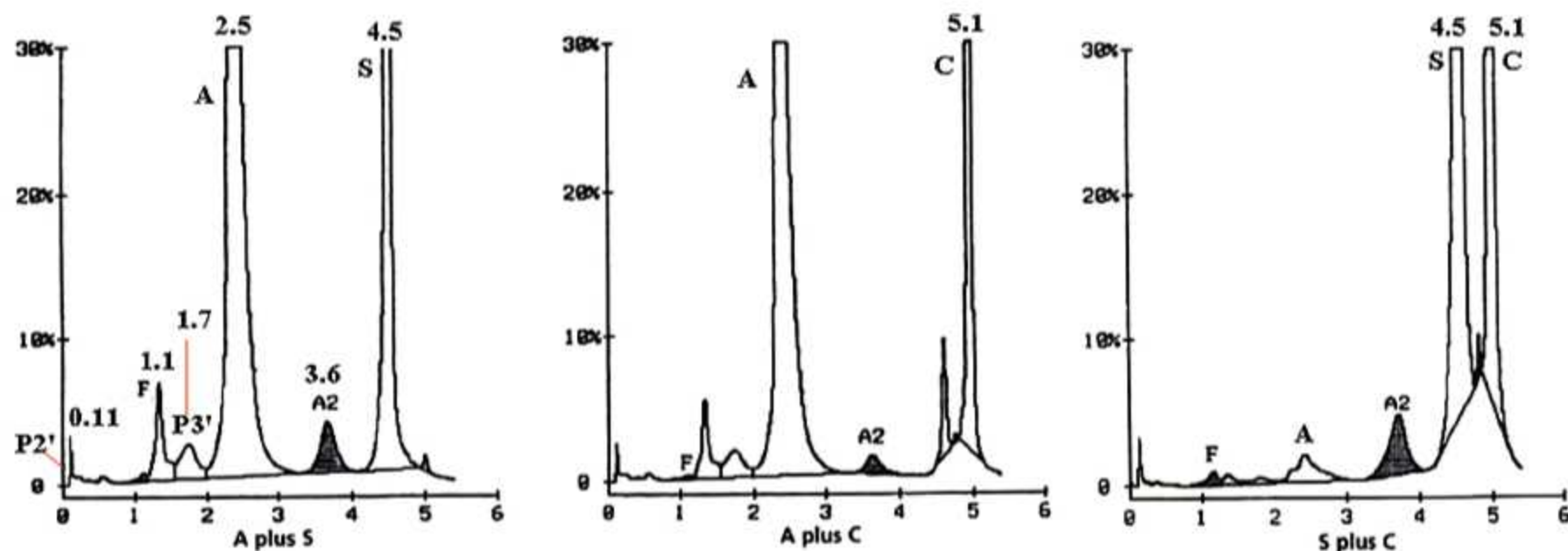
‡ Plus a second peak in the C window.

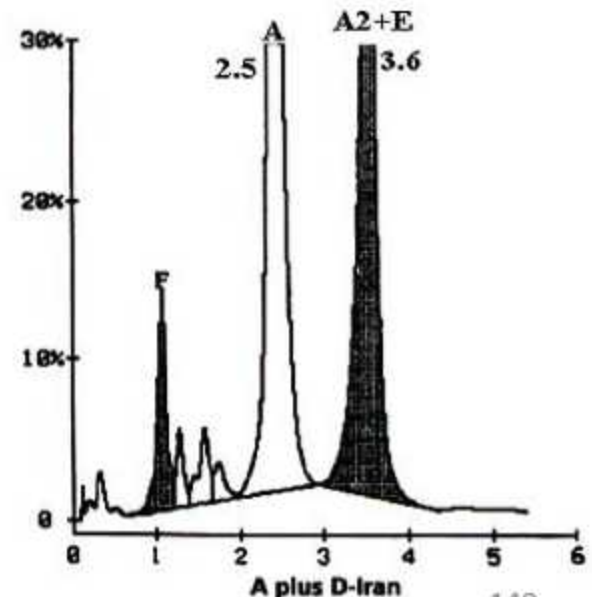
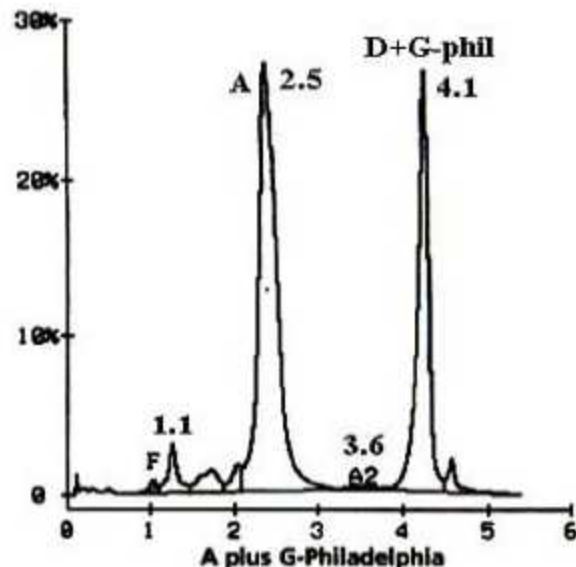
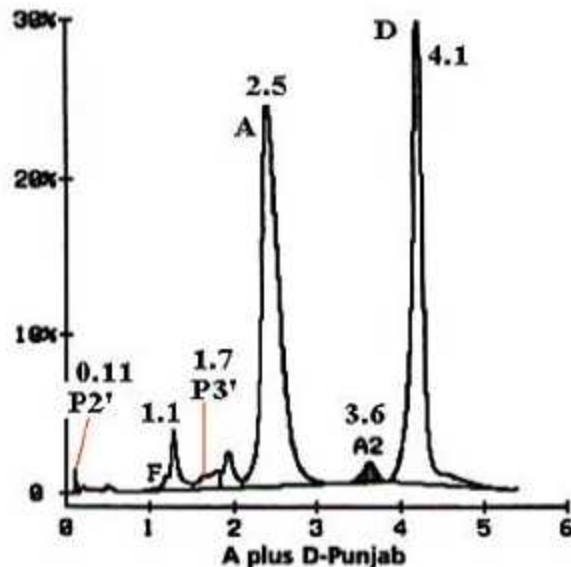
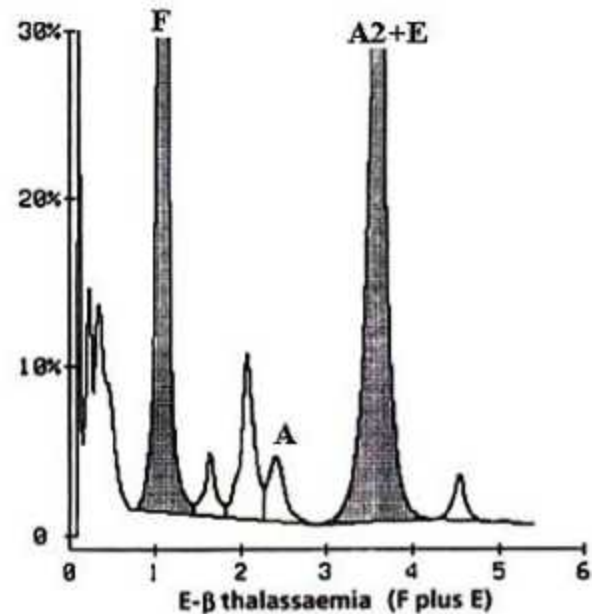
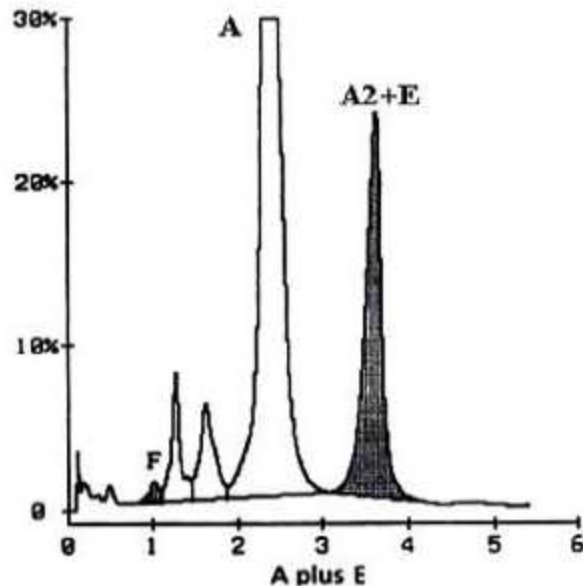
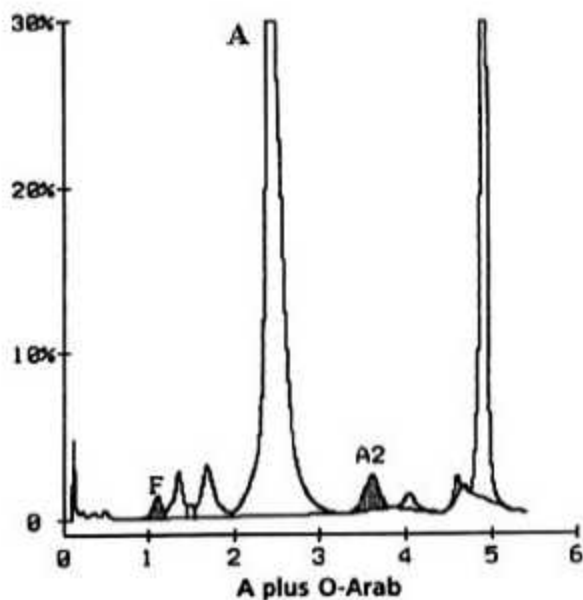


شکل ۵۳-۴۶: زمان شویش یا RT ((زمان احتباس) مربوط به ۷۴ هموگلوبین نرمال و واریانت [۶].

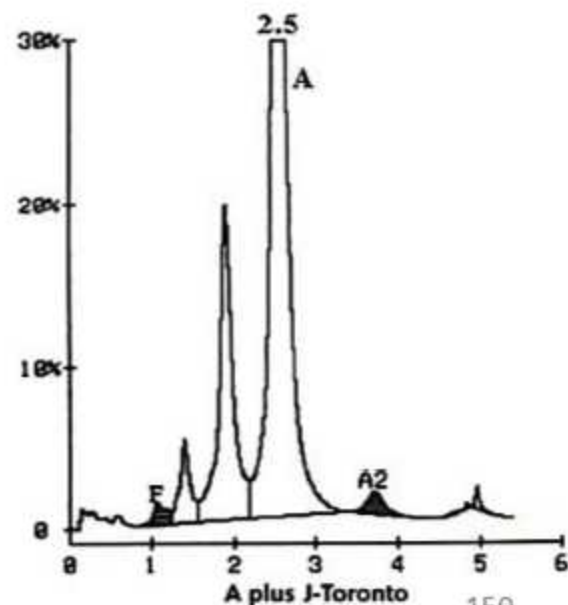
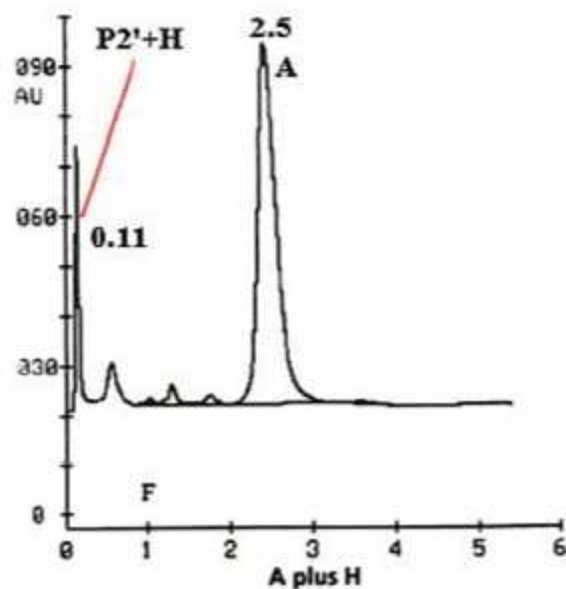
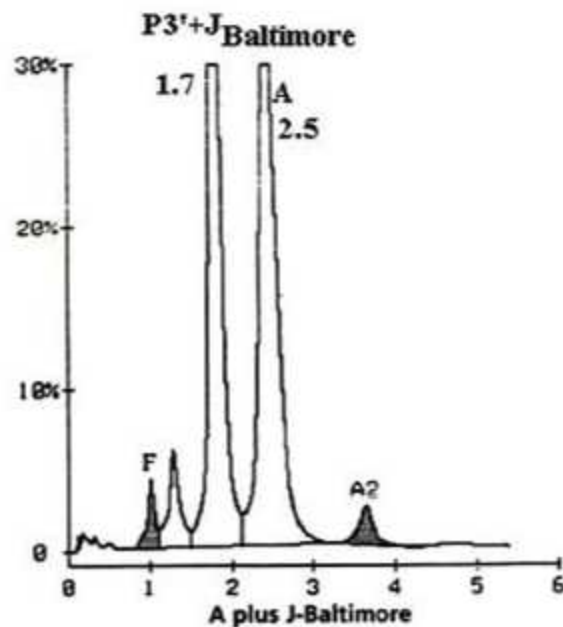
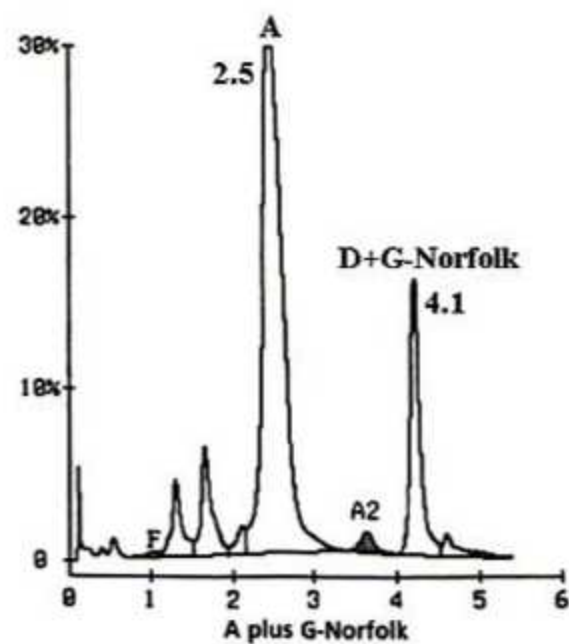
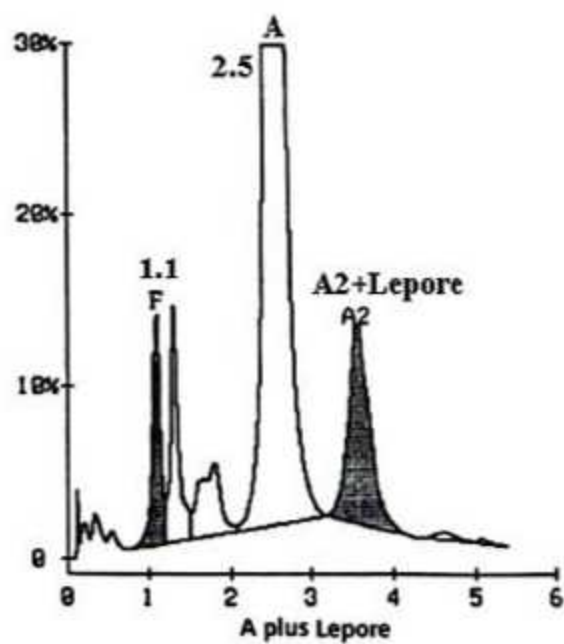
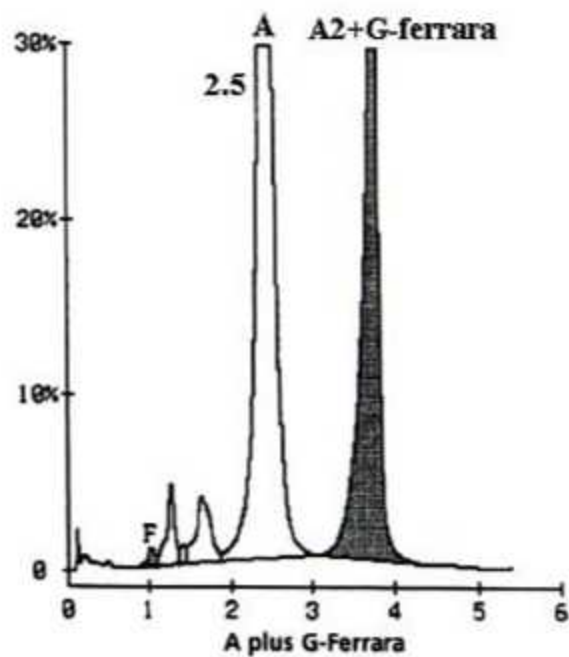


همان طوری که در جدول ۷-۴۶ مشاهده می‌شود، هموگلوبین‌های F ← هموگلوبین A گلیکولیزه یا P2' ← هموگلوبین A تغییر یافته یا A ← P3' ← A2 ← S ← D به ترتیب هموگلوبین‌هایی هستند که از ستون خارج می‌شوند و مجموع سه پیک A + P2' + P3' به عنوان مقدار کمی Hb-A گزارش می‌شود. میزان RT برای Hb-A حدود 3.10-1.90 min است که در دستگاه Bio-Rad به طور میانگین، زمان ۲/۵ min به عنوان پیک تشخیصی Hb-A در نظر گرفته می‌شود. همان طوری که مشهود است، هموگلوبین‌های E, Lepore, KorlBu, D-Iran, Zurich و Kenya با پیک A2، هموگلوبین Koln و Tacoma با پیک A، هموگلوبین‌های D-پنجاب/لوس آنجلس و G-فیلا دلفیا با پیک D، هموگلوبین پلی مورفیسم B2(A2') با پیک S، هموگلوبین همیشه بهار CS با پیک C و هموگلوبین‌های سریعی مثل I, J, Hope, K و N با پیک‌های P2' و P3' حرکت می‌کنند و HPLC هنوز هم قادر به تفکیک آنها نیست. HPLC نه تنها برای شناسایی و اندازه گیری هموگلوبین‌های واریانت، بلکه برای اندازه گیری هموگلوبین‌های F, A2 و A نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۴].

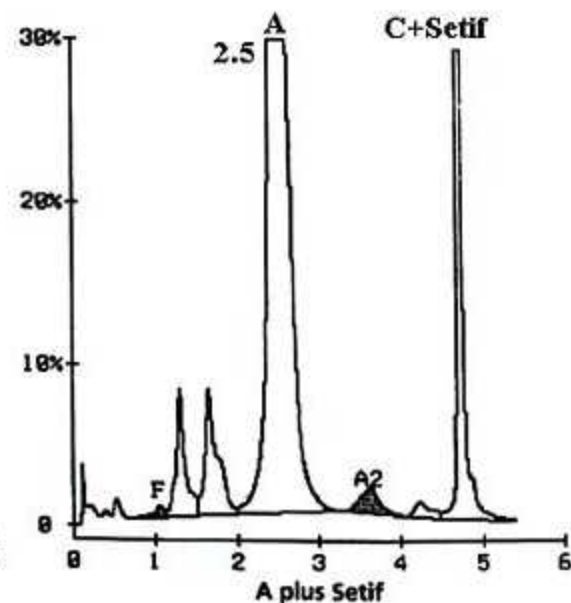
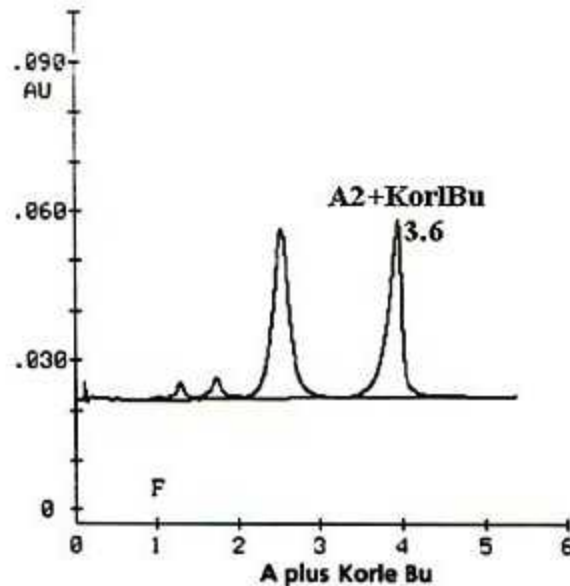
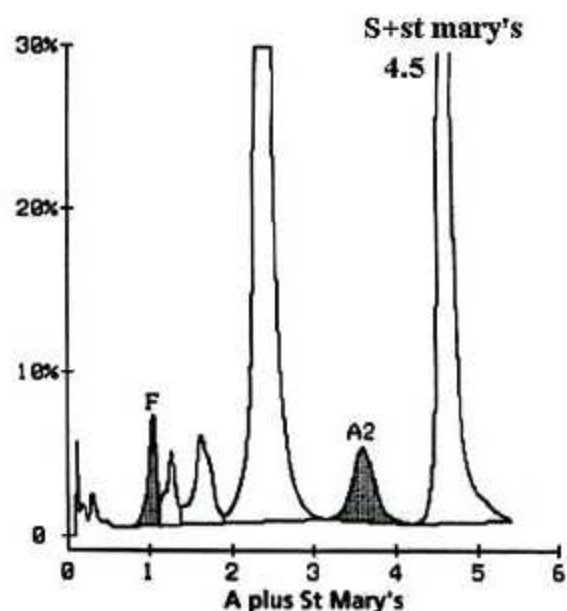
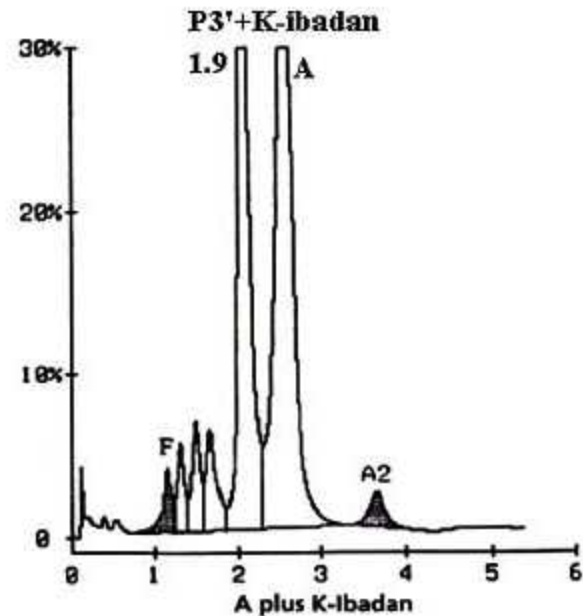
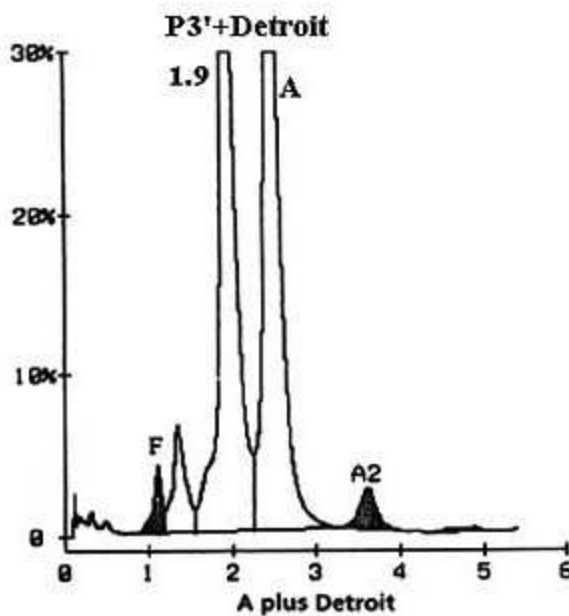
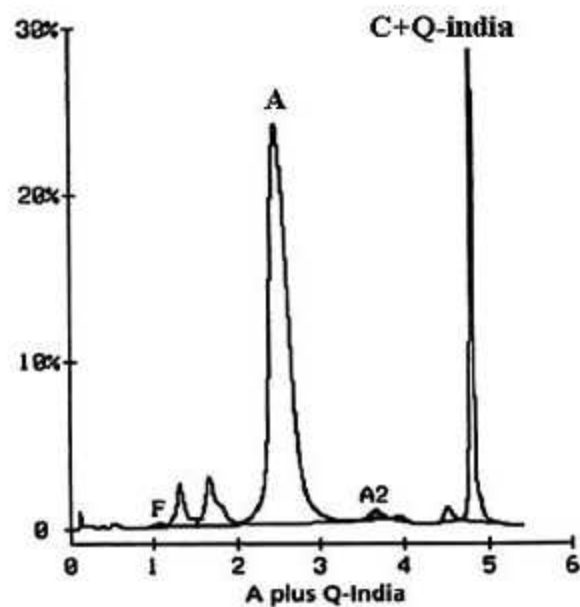




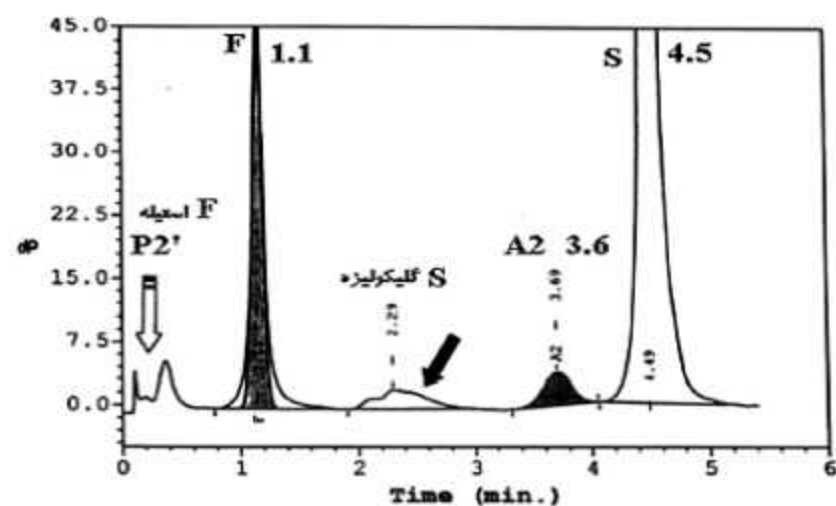
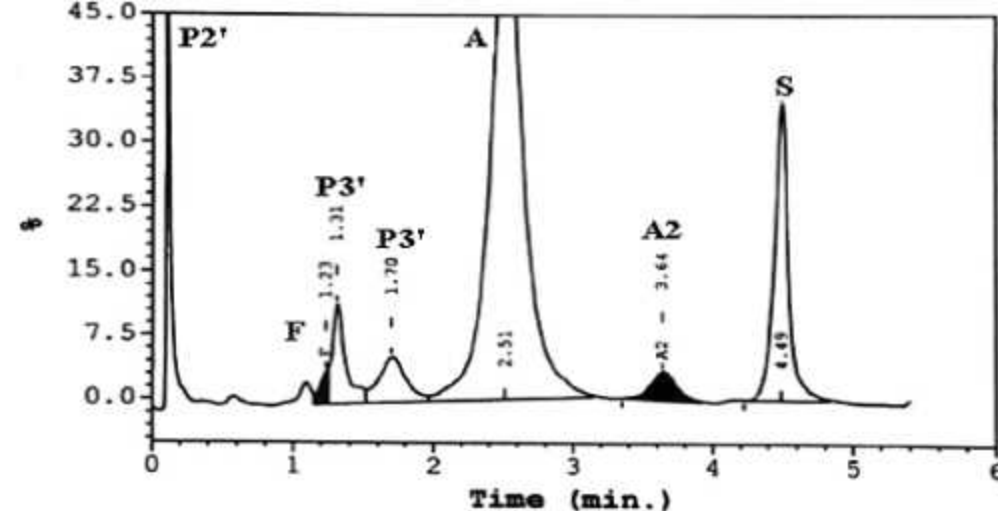
شکل ۴۶-۴۷: جایگاه پیک‌های مربوط به برخی از هموگلوبین‌های طبیعی و واریانت در دستگاه BioRad-II [۴].



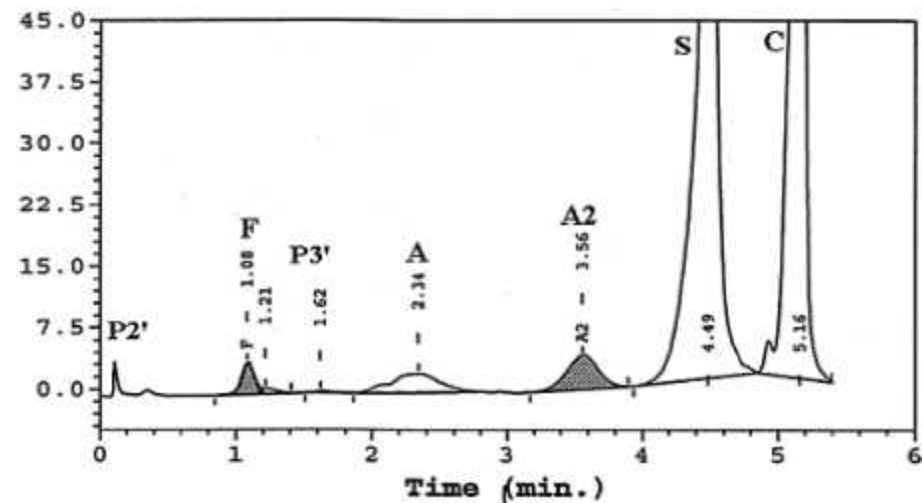
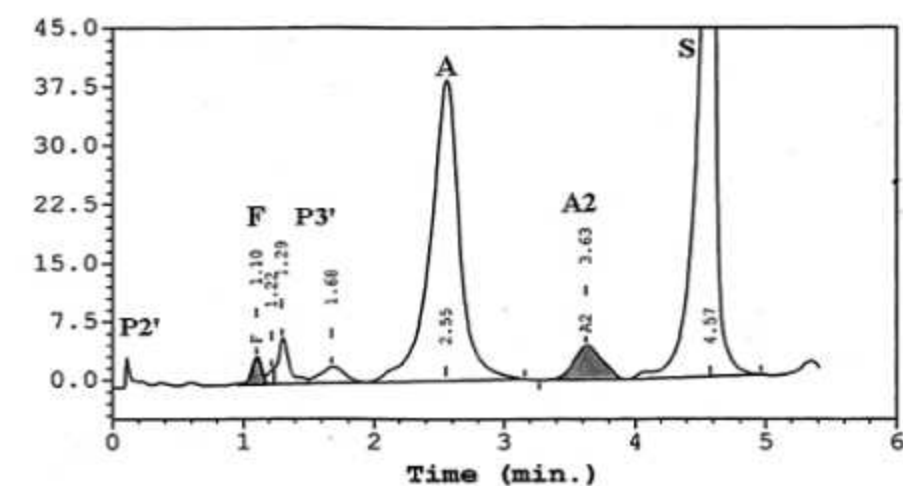




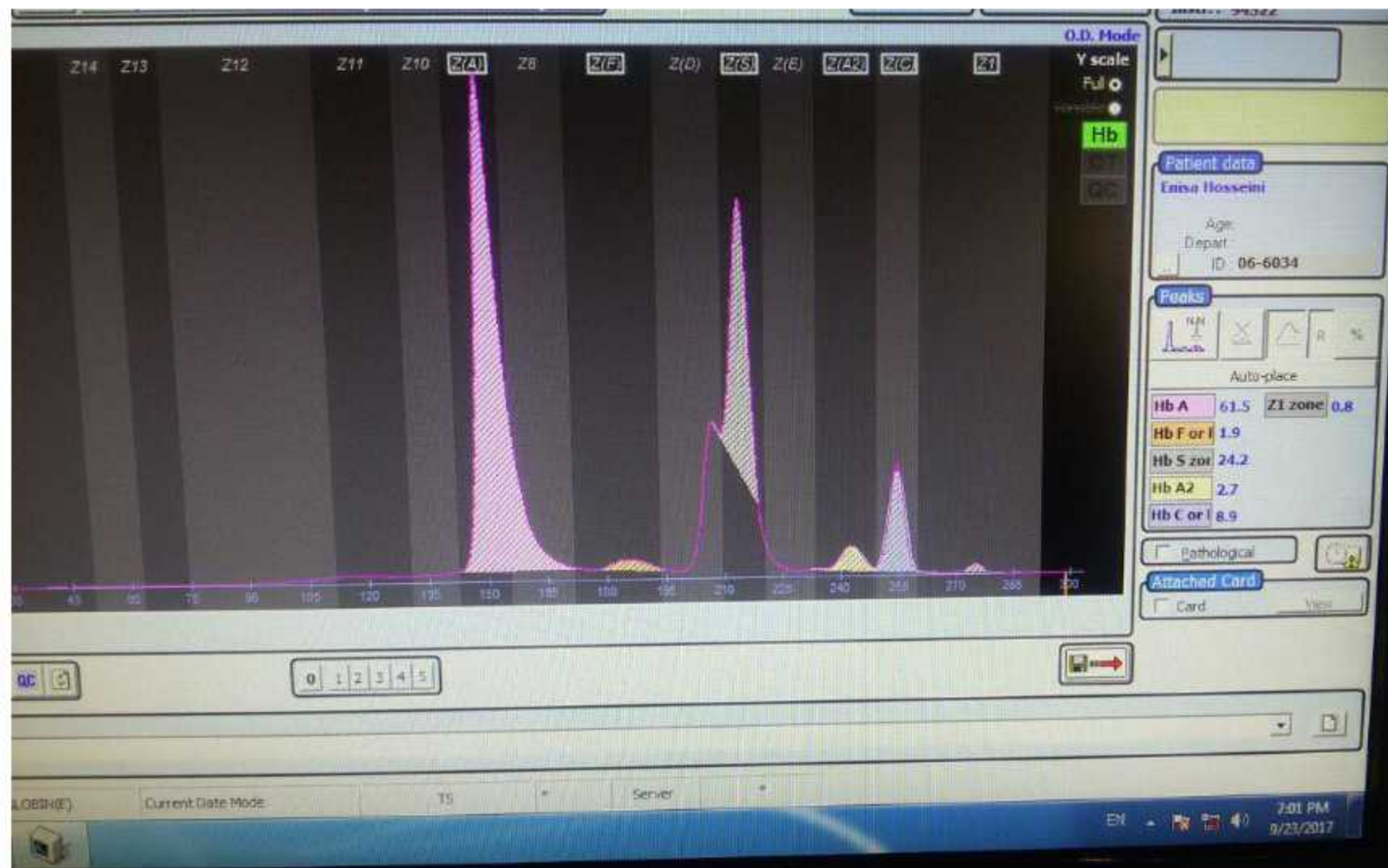
تل ۴۸-۴۶: جایگاه پیک‌های مربوط به برخی از هموگلوبین‌های طبیعی و واریانت در دستگاه BioRad-II. همانطوریکه مشهود است، محور Y هموگلوبین‌های H و KorIBu مربوط به ولتاژ بوده و اند دیگر هموگلوبین‌ها، درصد فراوانی را نشان نمی‌دهد که علت این کار کوتاهی بسیار شدید پیک A<sub>2</sub> می‌باشد [۱۴].



شکل ۴۶-۵۴: شکل سمت راست: کروماتوگرام مربوط به دستگاه Bio-Rad HPLC. این بیمار همزمان به آنمی سلولهای داسی شکل و دیابت مبتلا بوده و در خون دارای Hb-S گلیکوزیله با زمان احتباس معادل Hb-A (فلش مشکی) و Hb-F استیل (فلش سفید) می باشد که S-گلیکولیزه آن ممکن است حضور Hb-A کاذب و در نتیجه تشخیص نادرست خمیسه داسی شکل را تداعی کند. شکل سمت چپ: کروماتوگرام Bio-Rad Variant II- HPLC. این بیمار دارای خمیسه سلولهای داسی، آنمی همولیتیک، پرقان و بیلیروبین معادل 970 mmol/l بوده و یک پیک کاذب را در ناحیه مربوط به هموگلوبین بارترز و P2' با RT=0.11 نشان می دهد. از چپ به راست، پیک ها به بیلیروبین، Hb-F، Hb-A، تغییر یافته یا P3' (دو پیک)، A، Hb-A2 و S مربوط می شوند.



شکل ۴۶-۵۵: شکل سمت راست: کروماتوگرام مربوط به دستگاه Bio-Rad HPLC. این بیمار مبتلا به Hb-C/S می باشد و به دلیل فقدان هموگلوبین A، دو باند P2' و P3' آن نیز کاهش شدید دارد. باند A که ۱۵٪ بوده و بیمار ۱/۳ Hb-F و ۴/۱ Hb-A2 دارد. شکل سمت چپ: کروماتوگرام Bio-Rad Variant II- HPLC. این بیمار دارای خمیسه سلولهای داسی بوده و دارای علائم آزمایشگاهی زیر می باشد. HbF: 1.0%; HbA: 38.7%; HbA<sub>2</sub>: 4.4%; HbS: 56.1% و Sickledex is POSITIVE; Peripheral smear with 2+ sickle cells.







**Test :** Hemoglobin Electrophoresis  
**Date :** 1396/7/10 **Lane :** 2  
**ID No:** 7/326 **Age/Sex :**  
**Patient :** بهاره پویا  
**Physician :**

### Results

Fraction	( % )	Flag	Normal (%)	( g/dl )
A1	94.7	L	95 - 98.5	0
F	0.5		0 - 2	0
A2	4.8	H	1.5 - 3.5	0

### Manual Method Result

Column Chromatography A2 : 4.6  
 Chemical Fetal Hemoglobin ( F ) :

### CBC :

WBC : 9.8	/mm3	MCV : 68.6	Fl
RBC : 5.74	mil/mm3	MCH : 20.9	Pg
HGB : 12.0	g/dl	MCHC : 30.5	%
HCT : 39.4	%	RDW : 15.9	

### Patient Information

**Test :** Hemoglobin Electrophoresis  
**Date :** 1396/7/10 **Lane :** 1  
**ID No:** 7/327 **Age/Sex :**  
**Patient :** حجت اله محمدی  
**Physician :**

### Results

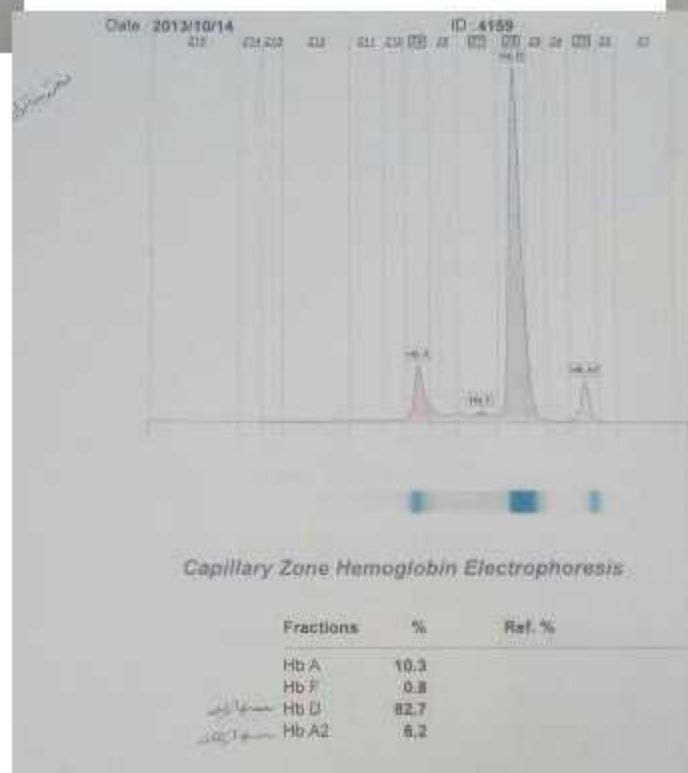
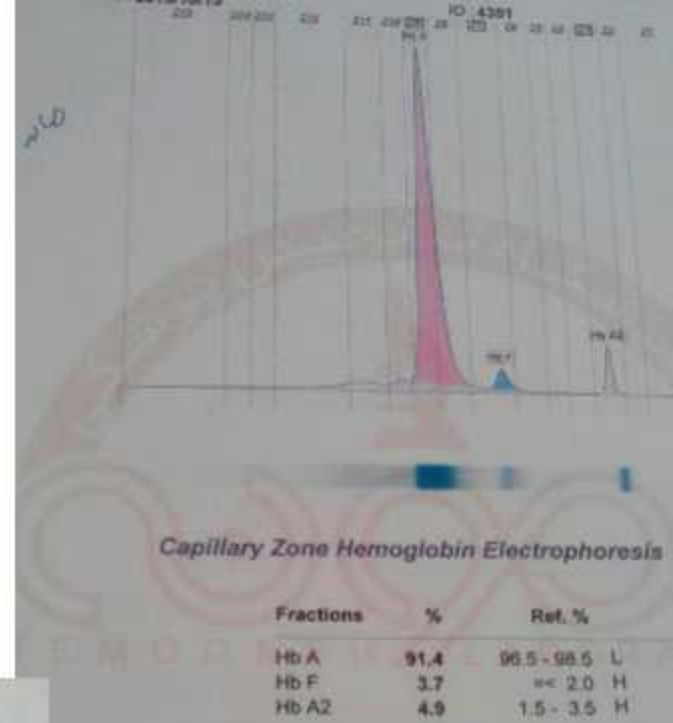
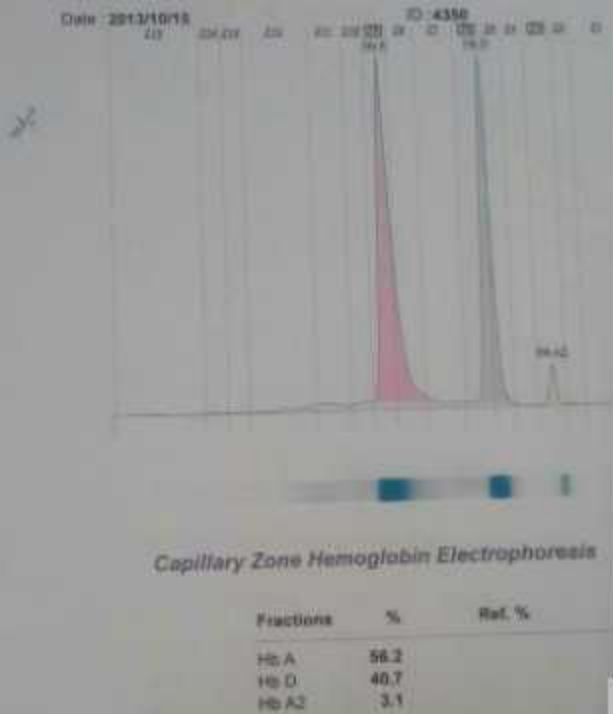
Fraction	( % )	Flag	Normal (%)	( g/dl )
A1	97.0		95 - 98.5	0
F	0.5		0 - 2	0
A2	2.5		1.5 - 3.5	0

### Manual Method Result

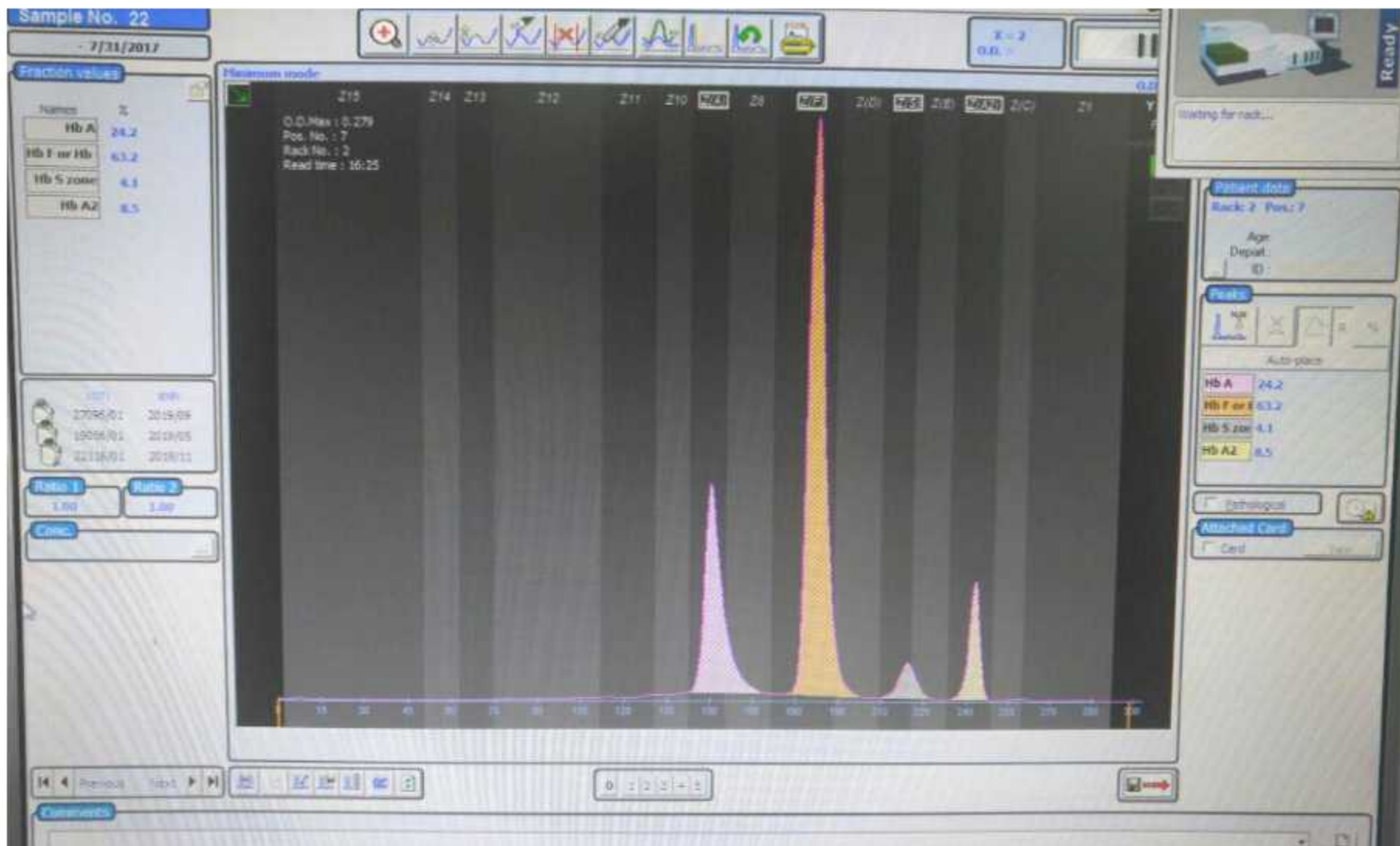
Column Chromatography A2 : 2.7  
 Chemical Fetal Hemoglobin ( F ) :

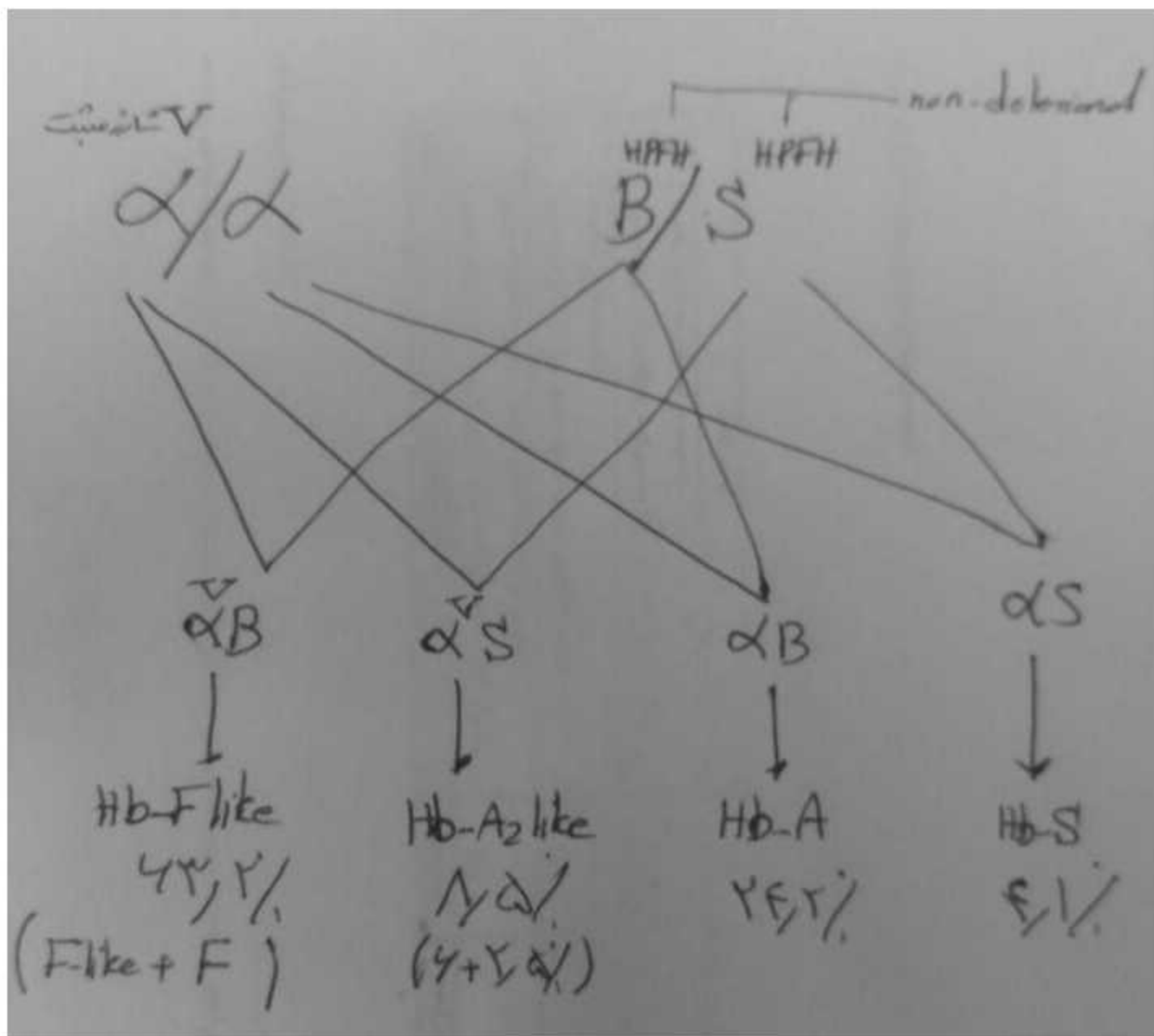
### CBC :

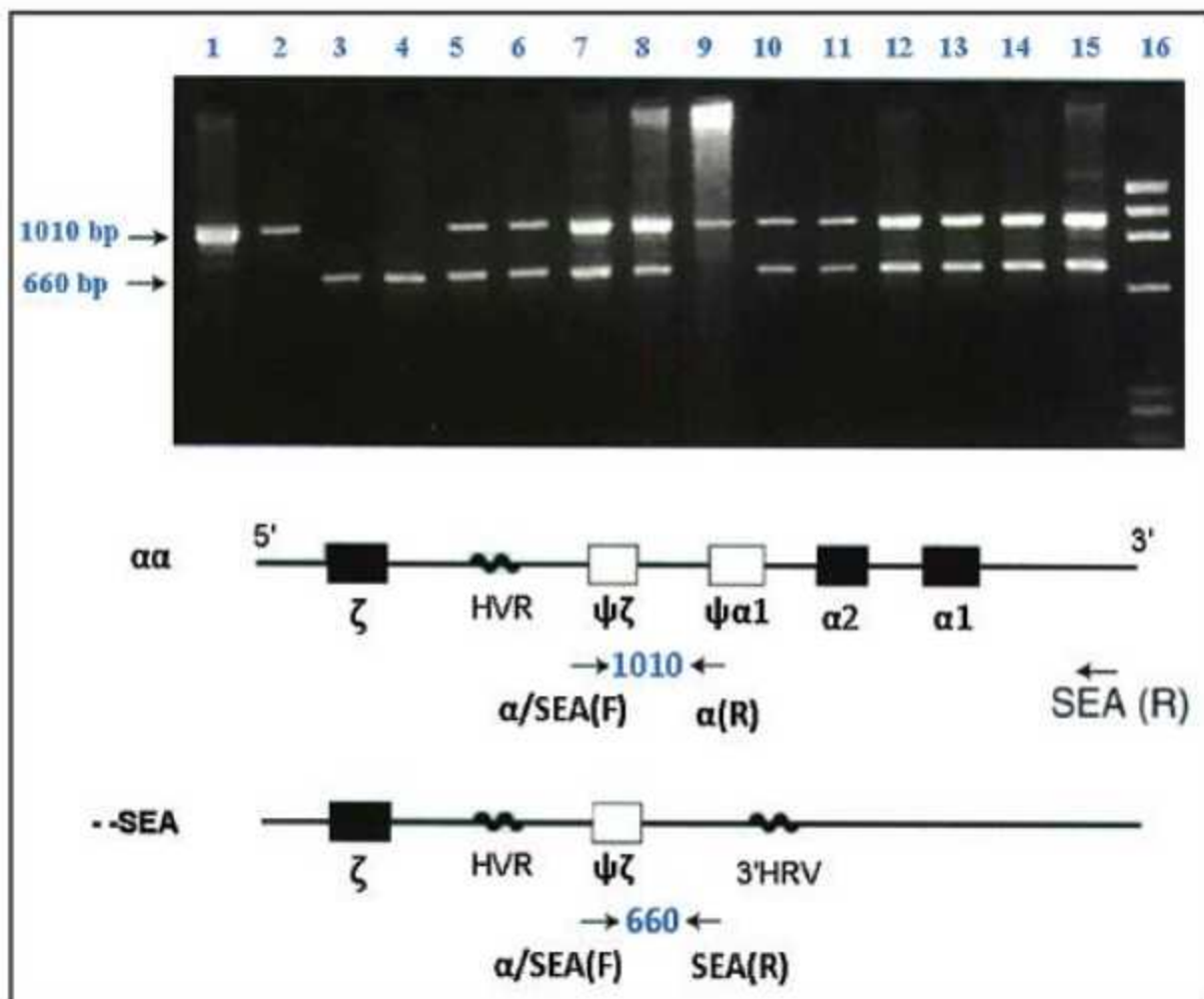
WBC : 6.5	/mm3	MCV : 69.5	Fl
RBC : 6.91	mil/mm3	MCH : 21.6	Pg
HGB : 14.9	g/dl	MCHC : 31	%
HCT : 48.0	%	RDW : 19.2	





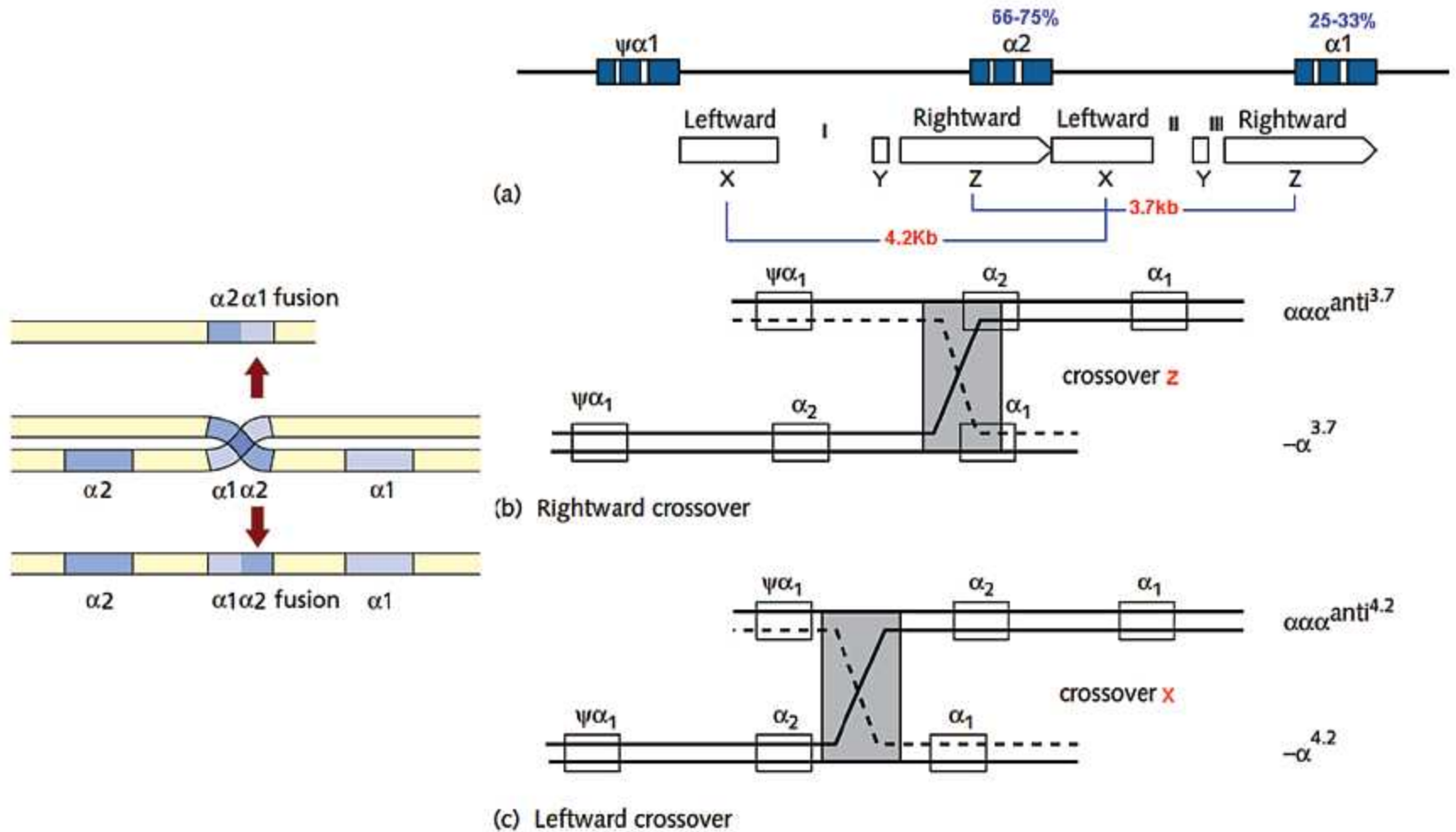




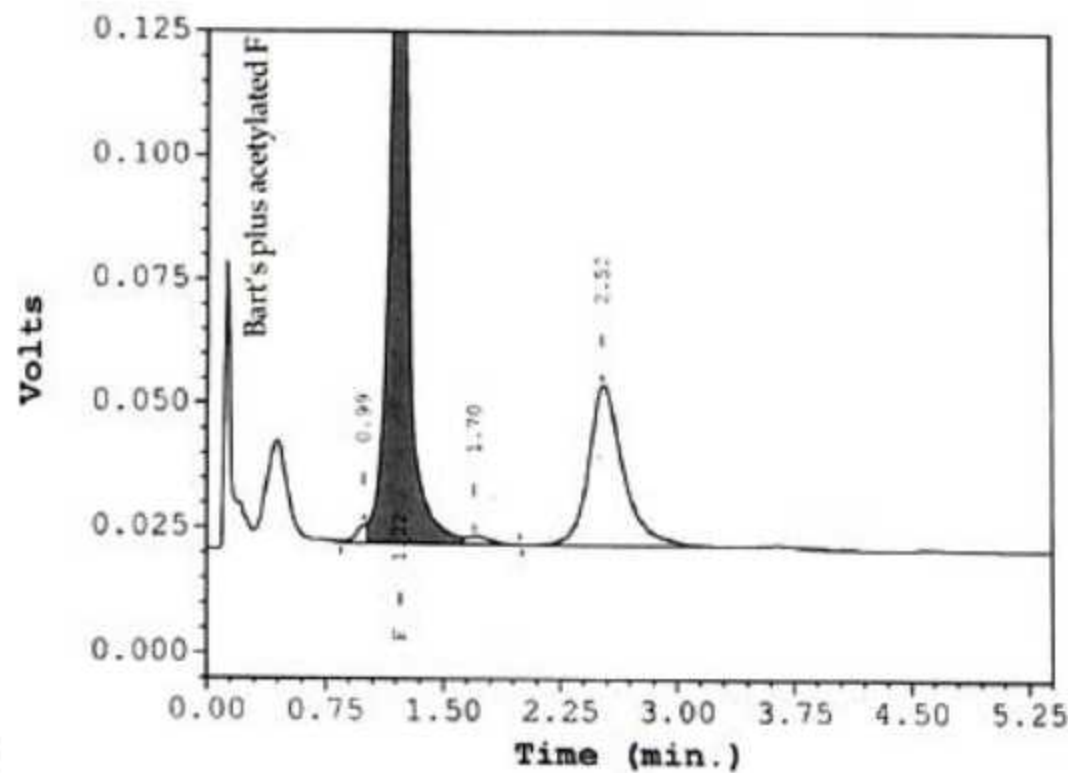
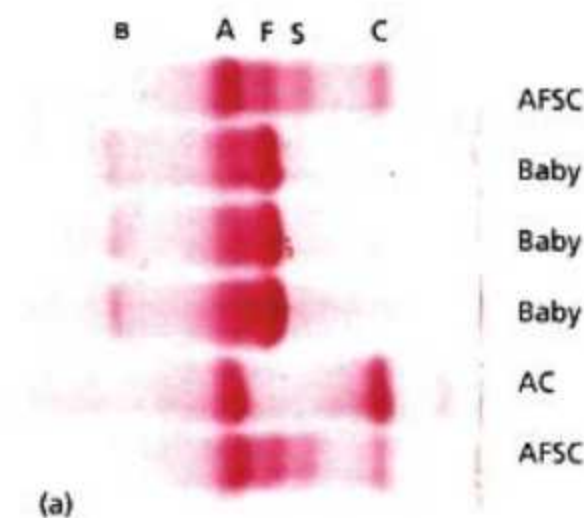


شکل ۹۶-۹۶ استفاده از تکنیک Gap-PCR در تشخیص  $\alpha$ -تالاسمی. (a) در این دیاگرام کلاستر ژنی  $\alpha$  و سه پرایمر  $\alpha$  (R1)،  $\alpha/SEA$  (F) و  $SEA$  (R2) که برای تشخیص  $\alpha$ -تالاسمی ( $SEA$ ) بکار می‌روند، نشان داده شده است. در یک ژنوم طبیعی، پرایمرهای F و R1 قطعه کوچکی از DNA را به اندازه ۱۰۱۰ bp را تکثیر می‌کنند اما پرایمرهای F و R2 از هم بسیار دور بوده و قادر به انجام تکثیر در شرایط طبیعی نمی‌باشند. در اثر حذف بزرگ  $SEA$  توالی که پرایمر R1 باید با آن هیبرید شود، حذف شده و توالی که پرایمرهای F و R2 به آن متصل می‌شوند، به اندازه کافی به هم نزدیک می‌شوند در نتیجه قطعه ژنی حاصل از دو پرایمر مذکور تکثیر می‌گردد. در ژل فوق، نمونه ۱ (کنترل نرمال)، نمونه ۳ و ۴ (کنترل هیدروپس فتالیس هموزیگوت)، نمونه ۵-۷ (کنترل هتروزیگوت)، نمونه ۸ (مایع VCS از جفت جنین مبتلا به هیدروپس) و ۹ (مایع VCS از پرزهای جفت جنین مبتلا به قرم هتروزیگوت)، نمونه ۱۰-۱۲ (نمونه هتروزیگوت پدری)، نمونه ۱۳-۱۵ (نمونه هتروزیگوت مادری) و نمونه ۱۶ (سایز مارکر پروتئینی) نشان داده شده‌اند [۱۴].

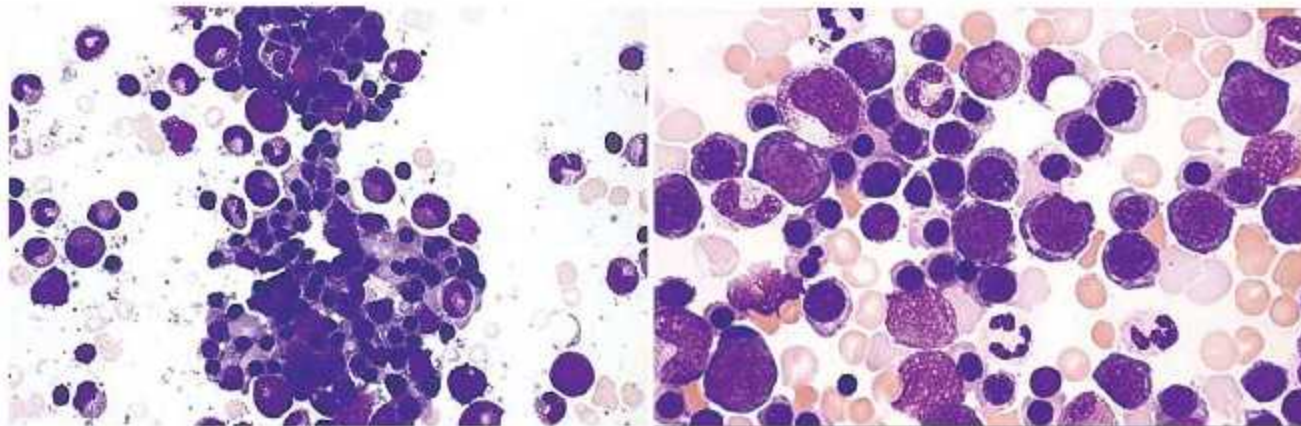




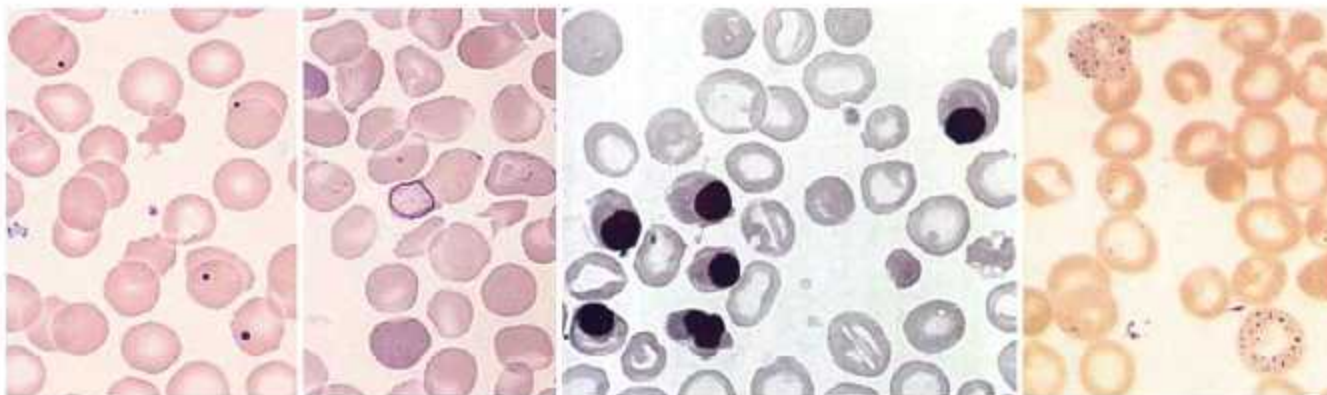
شکل ۸-۴۷: مکانیسم ایجاد  $\alpha^+$  تالاسمی  $\alpha_2$  و  $\alpha_1$  در اثر کراسینگ آور نابرابر بین دو کروموزوم ۱۶ پترنال (پدری) و مترنال (مادری)



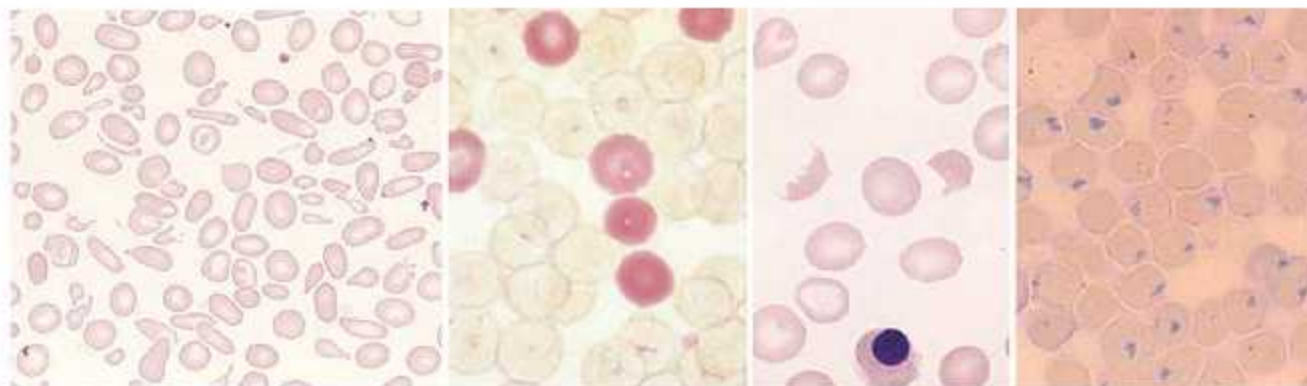
شکل ۱۹-۴۷: تصویر (a) الکتروفورز استات سلولز هموگلوبین، باند سریع B را نشان می‌دهد که مربوط به هموگلوبین بارتز می‌باشد (Baby). AFSC نمونه کنترل حاوی هموگلوبین‌های A, F, S و C می‌باشد. تصویر (b): در این تصویر، کروماتوگرام HPLC هموگلوبین بارتز که روی Hb-F استیله قرار گرفته است را نشان می‌دهد نمونه مربوط به نوزادی از نژاد فیلیپینی است که مبتلا به خصیسه  $\alpha^0$  تالاسمی می‌باشد ( $\alpha^0/\alpha\alpha$ ). از آنجایی که HPLC با استفاده از گلبول‌های قرمز شسته شده انجام شده است، لذا بیلی‌روبین در آن مشاهده نمی‌شود. از چپ به راست، پیک‌ها مربوط هستند به هموگلوبین بارتز به علاوه Hb-F استیله، Hb-F (خاکستری تیره) و Hb-A.



شکل ۲۲-۴۷: هیپرپلازی اریتروئیدی و افزایش تعداد نورموبلاست‌های BM در بیمار مبتلا به Hb-H.



شکل ۲۳-۴۷: مشاهده بازوفیلیک منقوط، اریتروبلاستوز متوسط تا شدید، کابوت رینگ و اجسام هاول جولی در خون محیطی بیماران مبتلا به Hb-H.



شکل ۲۴-۴۷: افزایش اجسام هایز (رنگ نیل یلو سولفات) و پیتینگ ناشی از آن که با ظهور سلول‌های بایت‌سل همراه می‌باشد. در این بیماران N-RBC و مختصری F سل نیز افزایش یافته (رنگ



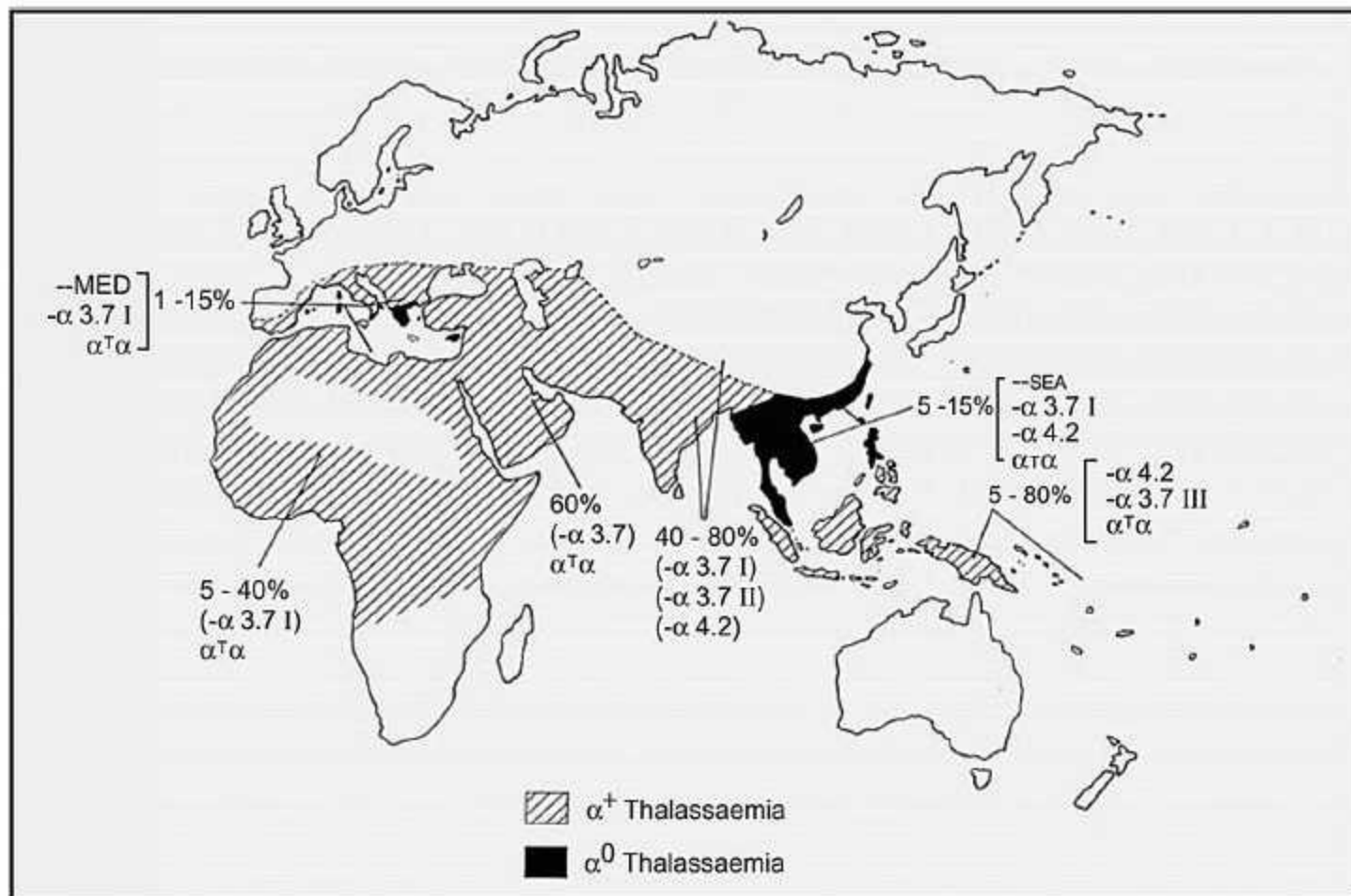
جدول ۱۴-۴۷: فنوتیپ و میزان تولید زنجیره  $\alpha$  در ژنوتیپ‌های مختلف  $\alpha$  تالاسمی

	$\alpha_2\alpha_1$ (35+15)	$-\alpha_1$ (0+25)	$\alpha_2-$ (35+0)	-- (0+0)	$\alpha_2^T\alpha_1$ (5+15)	$\alpha_2\alpha_1^T$ (35+2)	$\alpha_2^T\alpha_1^T$ (5+2)
$\alpha_2\alpha_1$ (35+15)	<b>N</b> 100	<b>C</b> 75	<b>C</b> 85	<b>T</b> 50	<b>C</b> 70	<b>C</b> 87	<b>T</b> 57
$-\alpha_1$ (0+25)**	<b>C</b> 75	<b>T</b> 50	<b>T</b> 60	<b>H</b> 25	<b>T</b> 45	<b>T</b> 62	<b>H</b> 32
$\alpha_2-$ (35+0)	<b>C</b> 85	<b>T</b> 60	<b>C/T</b> 70	<b>H</b> 35	<b>T</b> 55	<b>C</b> 72	<b>T</b> 42
-- (0+0)	<b>T</b> 50	<b>H</b> 25	<b>H</b> 35	<b>HF</b> 0	<b>H</b> 20	<b>H</b> 37	<b>HF</b> 7
$\alpha_2^T\alpha_1$ (5+15)	<b>C</b> 70	<b>T</b> 45	<b>T</b> 55	<b>H</b> 20	<b>T/H*</b> 40	<b>T</b> 57	<b>H</b> 27
$\alpha_2\alpha_1^T$ (35+2)	<b>C</b> 87	<b>T</b> 62	<b>C</b> 72	<b>H</b> 37	<b>T</b> 57	<b>C</b> 74	<b>T</b> 44
$\alpha_2^T\alpha_1^T$ (5+2)	<b>T</b> 57	<b>H</b> 32	<b>T</b> 42	<b>HF/H</b> 7	<b>H</b> 27	<b>T</b> 42	<b>H</b> 14

**N**: نرمال، **C**: حاملین خاموش، **H**: بیماری Hb-H و **HF**: هیدروپس فتالیس

\* ژنوتیپ  $\alpha^{\text{Tasali}}\alpha/\alpha^{\text{Tasali}}$  حتی باعث Hb-H شده و ژنوتیپ  $\alpha^{\text{CS}}\alpha/\alpha^{\text{CS}}$  نیز بیماری جدواسط H و T ایجاد می‌کند.

\*\* در صورت حذف ژن  $\alpha_2$ ، فعالیت جبرانی  $\alpha_1$  افزایش می‌یابد.



شکل ۴۷-۴۸: توزیع جغرافیایی  $\alpha$  تالاسمی که بیشترین مقدار آن در آسیای جنوب شرقی و مناطقی از مدیترانه دیده می‌شود. ژنوتیپ‌های شایع نیز اغلب شامل --SEA، --MED،  $\alpha 3.7$  و  $\alpha^+ \alpha$  هستند که تا ۱۵٪ از موارد را نیز تشکیل می‌دهند [۳۲].

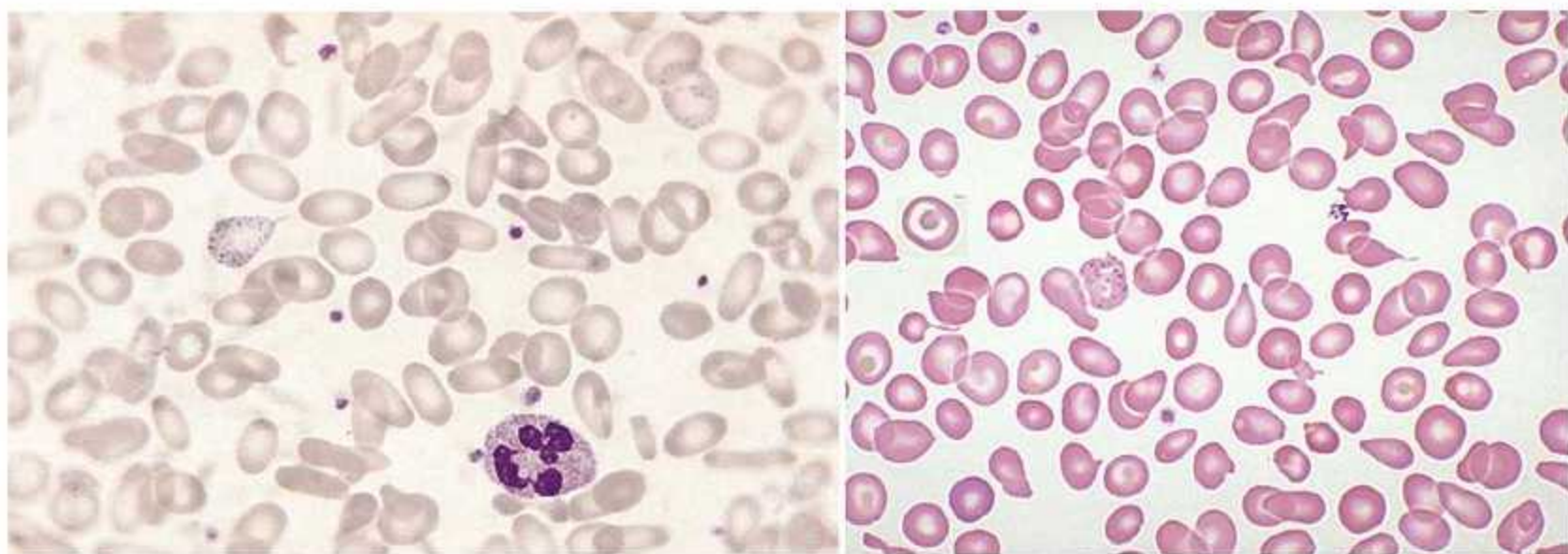
تغییرات کمی انواع هموگلوبین در حالات مختلف آلفا تالاسمی

فنتیپ‌های خفیف $\alpha$ تالاسمی		فنتیپ‌های شدید $\alpha$ تالاسمی		هموگلوبین
$-\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha/\alpha-$	$\alpha/-$	$-/-$	
۹۴	۸۸	۶۴	۰	Hb-A
۲-۳٪	۲٪	۲٪	۰	Hb-A <sub>2</sub>
۱٪	۱٪	۱٪	۰	Hb-F
۱-۲٪	۵-۱۰٪	۲-۴۰٪ در بندناف	۹۰٪ در بندناف	Hb-Barts
۱٪	۱-۲٪	۳-۵٪	۳-۵٪	Hb-H
۰	۰	۱٪	۵-۷٪	Hb-P

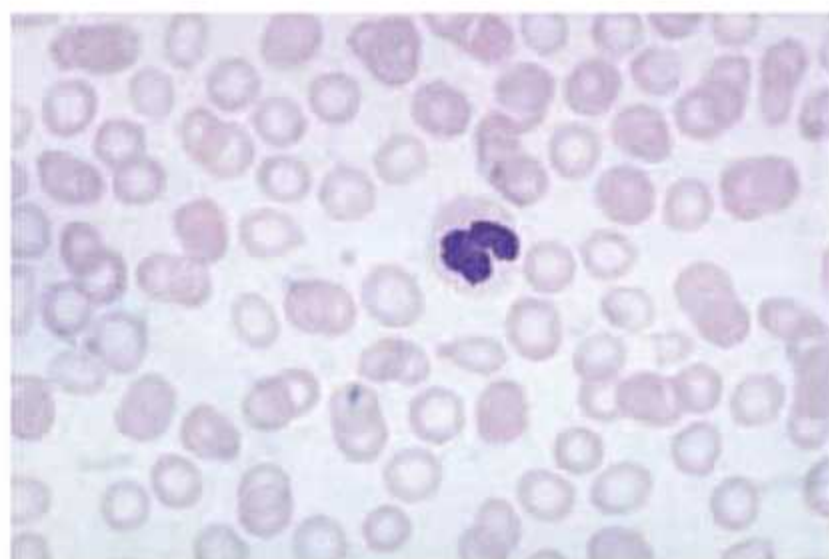
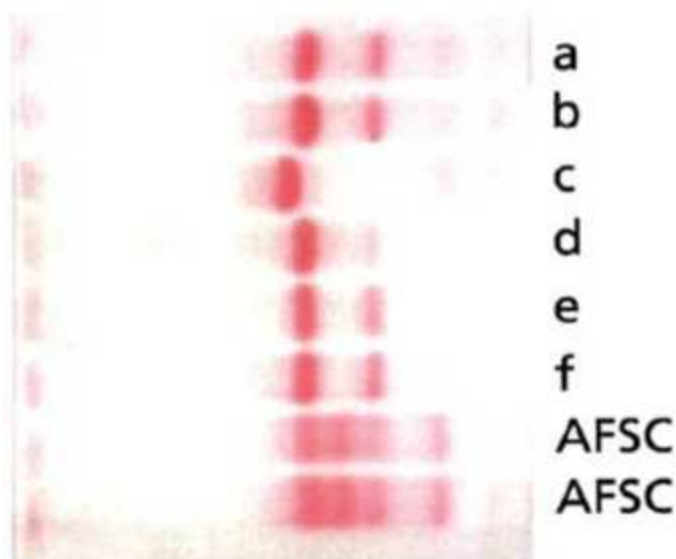


جدول ۳۵-۴۷: نسبت هموگلوبین های مختلف در بتا تالاسمی

$\beta:\alpha$	Hb-A <sub>2</sub>	Hb-A	Hb-F	فنوتیپ		
۰	۵	۰	۹۵	ماژور	-	$\beta^0/\beta^0$
۰/۱	متغیر	۴-۱۱	۸۵-۹۲	ماژور	-	$\beta^0/\beta^+$
۰/۲۵	متغیر	۶۰-۸۰	۲۰-۴۰	اینترمدیا	نوع سیاه پوستان	$\beta^+/ \beta^+$
۰/۱	متغیر	۵-۴۵	۵۰-۹۰	ماژور	نوع مدیترانه ای	



شکل ۷۴-۴۷: گستره خون بیمار مبتلا به  $\beta$  تالاسمی مینور. (راست) در گستره خون محیطی میکروسیتوز، آنیزوکرومیا، سلول قطره اشکلی و بازوفیلی منقوط مشاهده می شوند. اندکس های گلبول قرمز عبارتند از Hb:14g/dL - Hct 0.42- MCV:69fL- MCH:23.2pg- MCHC 33.4 g/dl  $RBC: 4.4 \times 10^{12}/l$  (چپ) گستره خون همان بیماری که به طور غیر معمول الیپتوسیت های مشخصی را نشان می دهند.

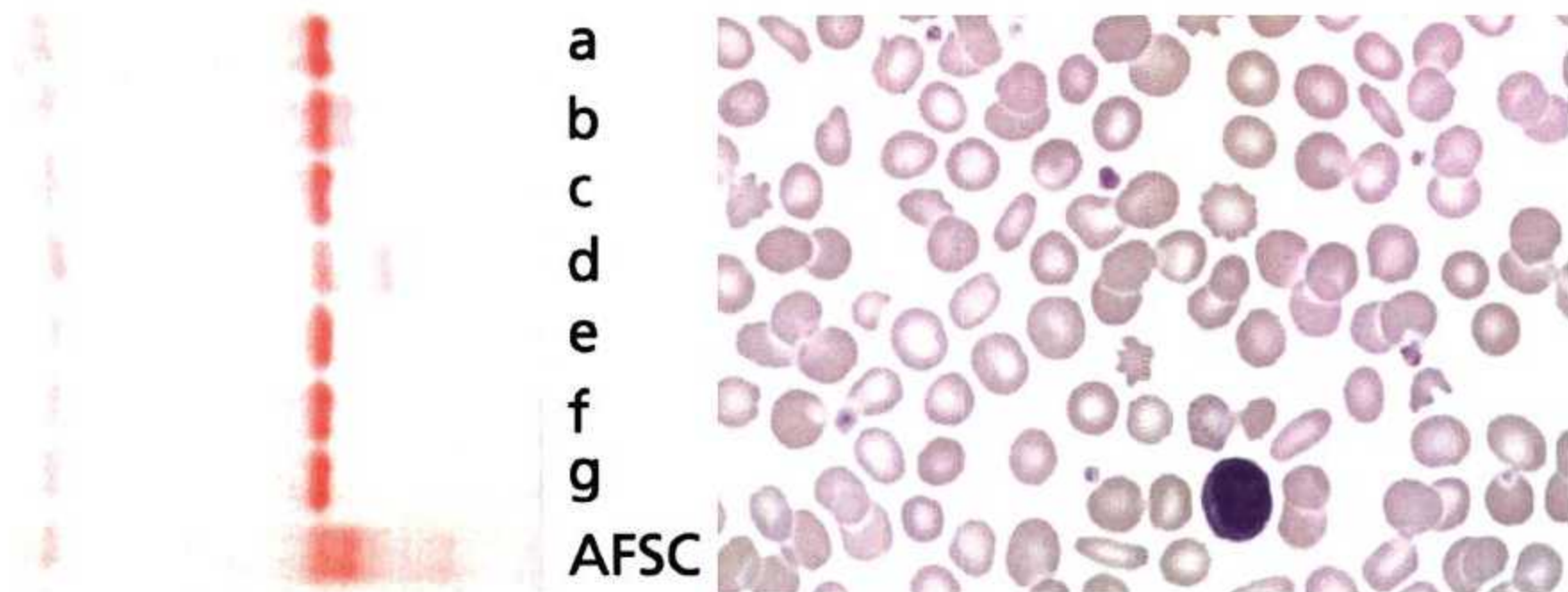


شکل ۸۴-۴۷: گستره خون در خمیه Hb-Lepore اندکس های RBC به صورت MCV:66fL, MCH: 22.2pg, RBC:5.36 $\times 10^{12}$ /L, MCHC:33.8g/dl, Hct:0.35L/L, Hb:12g/dl. شکل سمت چپ نیز الکتروفورز هموگلوبین روی استات سلولوز در pH قلیایی را نشان می دهد. خمیه Hb-Lepore در ردیف d قرار داشته و بقیه بیماران که از باند GSD همیجیم تری برخوردار هستند، به Hb-G هتروزیگوت مبتلا هستند. چراکه مقدار Hb-Lepore در شرایط هتروزیگوت به ندرت از ۱۵٪ فراتر می رود. از این رو باند نازکی را ایجاد می کند (AFSC کنترل شامل هموگلوبین های A, S, F, C).

جدول ۳۴-۴۷: تفاوت‌های افتراقی فقر آهن از بتا تالاسمی مینور

خصوصیات	IDA	m-Thal
ZPP	↑↑	N
SI	↓	N-↑
TIBC	↑	↓
Ferritin	↓	N-↑
$\beta:\alpha$	N	↓
مقدار RDW	↑↑	N-↑
RBC	↓	N-↑
Hb-A <sub>2</sub>	↓	↑
BM	هیپوپلازی	هیپرپلازی
تست متیل ویوله	-	+(هاینزیادی +)
پاسخ به درمان آهن	+	-
تارگت سل	±	+
بازوفیلیک منقوط	-	+
مقدار Hb-F	N	↑





شکل ۱۱۳-۴۷: (a) گستره خون و (b) الکتروفورز هموگلوبین روی استات سلولز در pH قلیایی (ردیف b) در یک فرد مذکر بالغ مبتلا به خصیصه  $\beta^0$  تالاسمی. اندکس های گلبول قرمز عبارت بودند از:  $RBC: 6.04 \times 10^{12}$ ,  $Hb: 14g/dl$ ,  $Hct: 0.42$ ,  $MCV: 69fl$ ,  $MCH: 23.2pg$ ,  $MCHC: 33.4g/dl$ ,  $C.S.F.A$  نمونه کنترل حاوی هموگلوبین های AFSC.

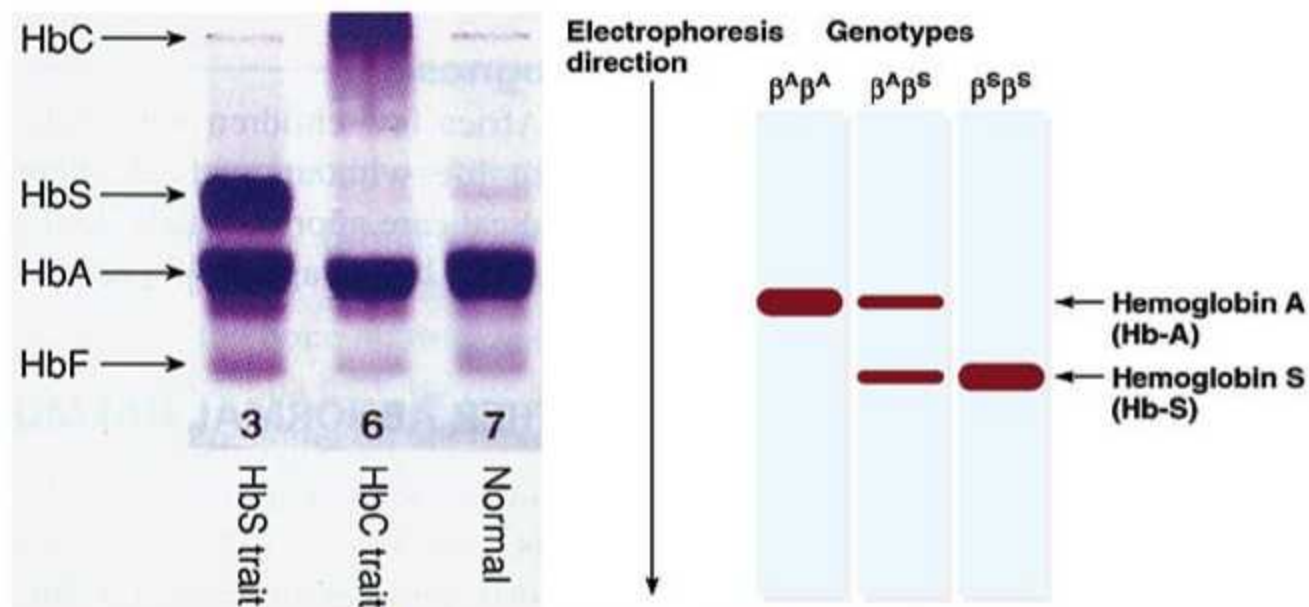
جدول ۴۲-۴۷: تفاوت‌های بین HPFH و  $\delta\beta$ -تالاسمی‌های

خصوصیات	HPFH	$\delta\beta$ -تالاسمی
Hb-F هموزیگوت	٪۱۰۰	٪۱۰۰
شدت علائم فرم هموزیگوت	در حد مینور	در حد اینترمیدیا
تست بتکه کلایه‌ور	هموسلولار	هتروسلولار
نوع آنمی	نورموسیتیک - نورموکروم	میکروسیتیک - هیوکروم
Hb-F هتروزیگوت	۳۰-۱۰٪	۱۵-۵٪
شدت علائم فرم هتروزیگوت	بدون علائم	بدون علائم
Hb-A <sub>2</sub>	نرمال تا کاهش	نرمال تا کاهش
جبران حذف $\delta$ و $\beta$ توسط $\gamma$	تقریباً کامل	ناقص
افزایش Hb-F به موازات پیری سلول	خیر	بله
انکلوزیون داخل سلولی	-	+

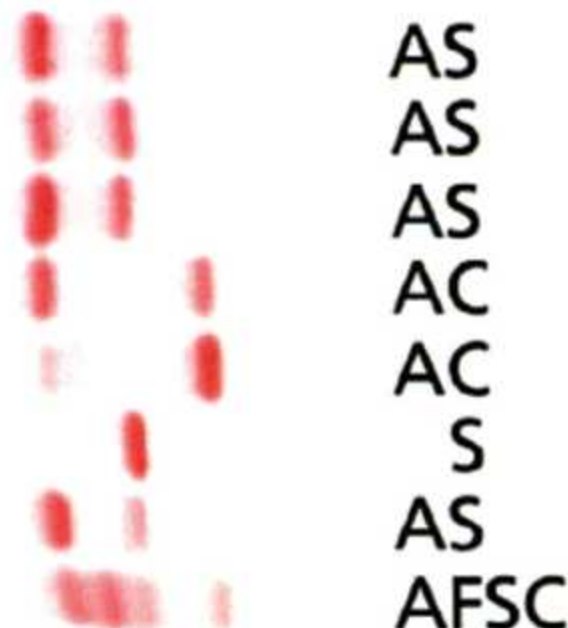
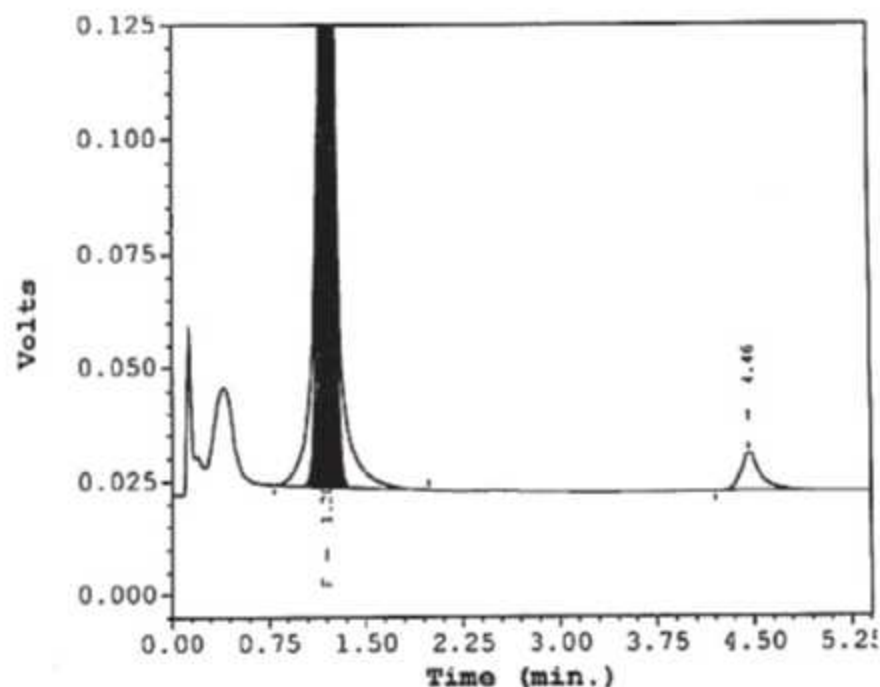
$\Delta\beta$  تالاسمی خود به دو نوع  $G\gamma^A\gamma(\delta\beta)$  با تولید دو نوع زنجیره  $\gamma$  و  $G\gamma^A\gamma(\delta\beta)$  با تولید یک نوع  $\gamma$  تقسیم می‌شود.

جدول ۵-۴۸: مقدار هموگلوبین‌های مختلف در چهار فرم مختلف از بیماری داسی شکل

<i>Genotype</i>	<i>Hb S</i>	<i>Hb A</i>	<i>Hb A<sub>2</sub></i>	<i>Hb F</i>
<i>S/S</i>	80-95	0	NI	2-20
$\beta^0/S$	75-90	0	increas	5-25
$\beta^+/S$	5-85	10-30	increas	5-10
<i>A/S</i>	32-45	52-65	NI	<2



شکل ۱۱-۴۸: الگوی الکتروفورز در سه حالت نرمال، SCT و SCA



شکل ۲۹-۴۸: تصویر راست) الکتروفورز قلیایی هموگلوبین روی استات سلولوز در یک بیمار مبتلا به آنمی سلول داسی S/S (خط سوم از پایین) که تقریباً تمام هموگلوبین موجود، Hb-S می باشد. نمونه کنترل حاوی هموگلوبین های C, S, F, A می باشد. AS خفیفه سلول داسی و AC خفیفه هموگلوبین C می باشد. تصویر چپ) کروماتوگرام HPLC در نوزاد مبتلا به آنمی سلول داسی که عمدتاً Hb-F فقدان کامل Hb-A و حضور اندکی Hb-S را نشان می دهد؛ به طوری که Hb-S: 5.5% و RT آن ۴/۴۶ دقیقه می باشد. پیک های سمت چپ کروماتوگرام نیز نشانگر Hb-F تغییر یافته هستند [۱۴].



جدول ۷-۴: خصوصیات هماتولوژیکی و درصد Hb های واریانت در بالغین مبتلا به آنمی سلول داسی و سایر بیماری‌ها توأم با Hb-A<sub>2</sub>, Hb-F, Hb-S [۱۴]

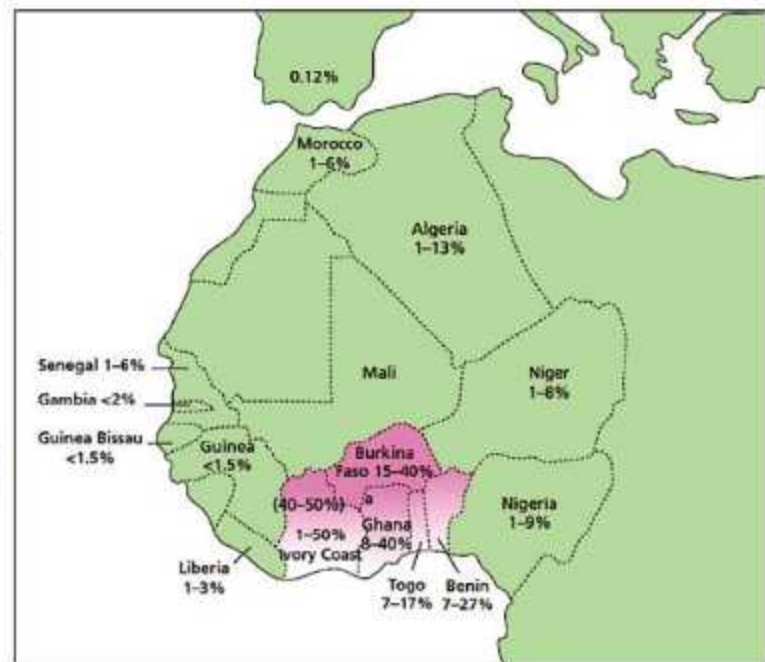
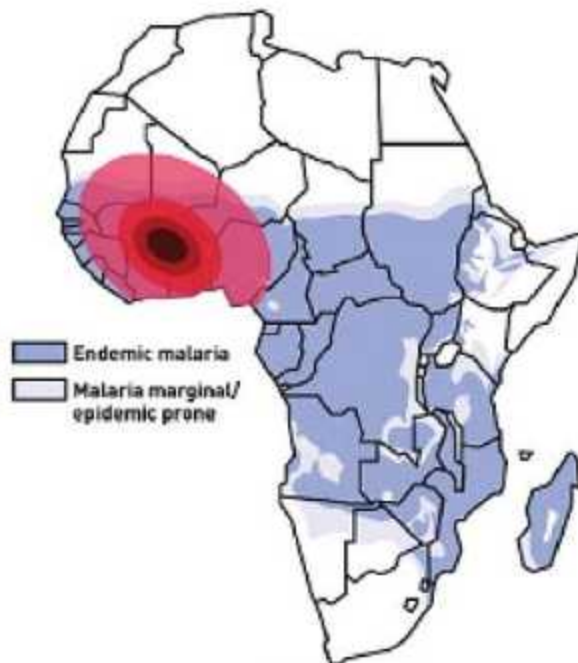
Genotype	Usual Hb (g/dl)	Usual MCV (fl)	Usual reticulocyte count (%)	Usual haemoglobin F (%)	Usual haemoglobin A <sub>2</sub> (%)
SS	6-10	70-100	5-20	Usually 5-10 but up to 40*	1.6-3.6† (occasionally up to 5)‡
Sβ <sup>0</sup>	7-11	60-80	8-9	5-15	4-5.6†
S/δβ <sup>0</sup>	10-12	76-83	2-4	15-25	1.9-2.3
S/HPFH	>12	68-88§	Normal	20-30	1.1-2.2 in the majority

† برخی همپوشانی‌ها ممکن است اتفاق بیفتد. به خصوص وقتی که α+ تالاسمی نیز به صورت همزمان به ارث برسد که در چنین مواقعی مقدار Hb-A<sub>2</sub> در بیماران SS افزایش می‌یابد. در یک بررسی، متوسط سطح Hb-A<sub>2</sub> با حضور ۴ ژن α حدود ۲/۸٪، با حضور ۳ ژن α حدود ۳/۳٪ و با حضور دو ژن α حدود ۳/۸٪ بود ولی در یک تحقیق دیگر، مقادیر حاصله به ترتیب به صورت ۳/۵٪، ۳/۷٪ و ۴/۹٪ بودند.

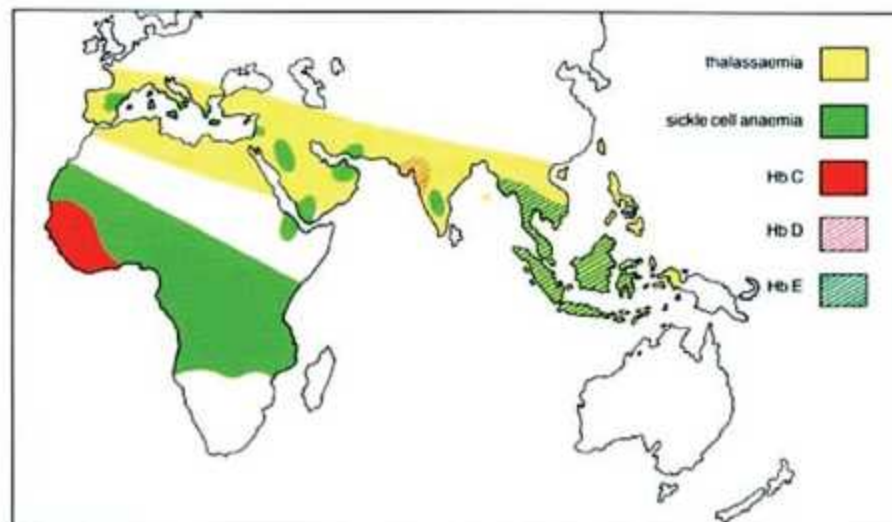
\* مقدار Hb-F در اثر توارث HPFH و یا نوع هاپلوتایپ βs تحت تأثیر قرار می‌گیرد. به طوری که مقدار Hb-F در هاپلوتایپ عرب/هندی حدود ۱۲-۲۵٪، در هاپلوتایپ سنگال حدود ۱۰-۷٪، در هاپلوتایپ بنین و بانتو حدود ۶-۷٪، در هاپلوتایپ کامرون حدود ۵-۶٪ می‌باشد. مقدار متوسط Hb-F در ۱۲۰ نفر از بیماران SS انگلستان، ۴/۲۳±۶/۰۶ بود.

§ اگر توارث همزمان α تالاسمی وجود نداشته باشد، MCV نرمال خواهد بود.

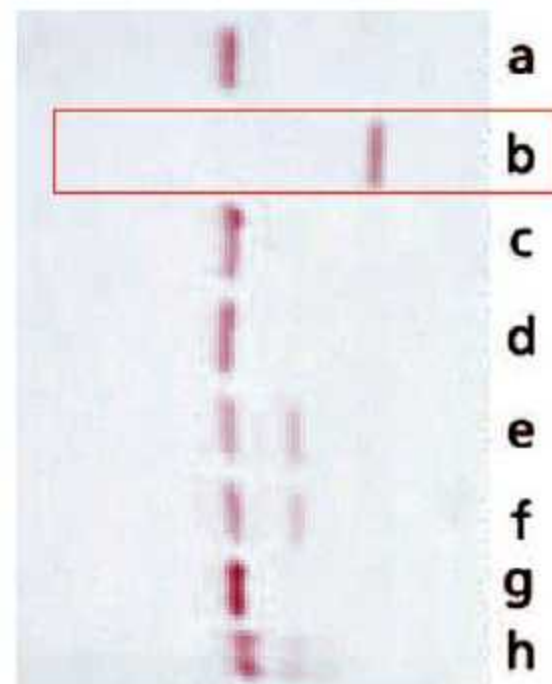
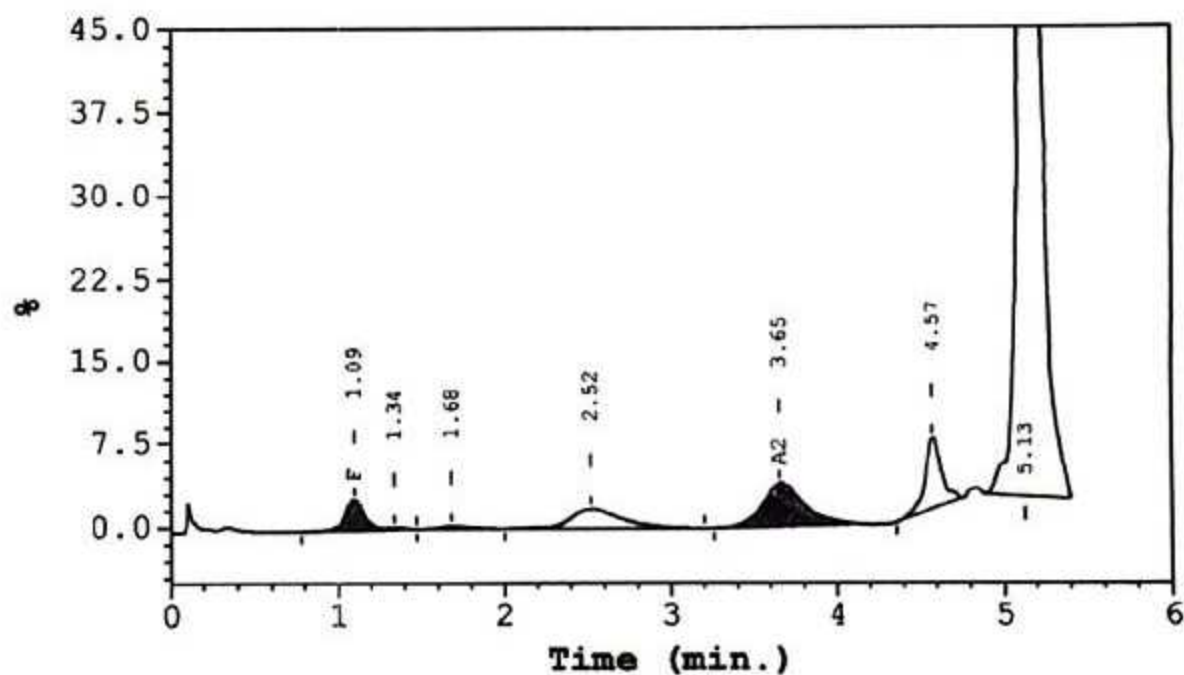
‡ مقادیر بالایی از آن به طور خاص در موتانت‌های عرب/هندی دیده می‌شود.



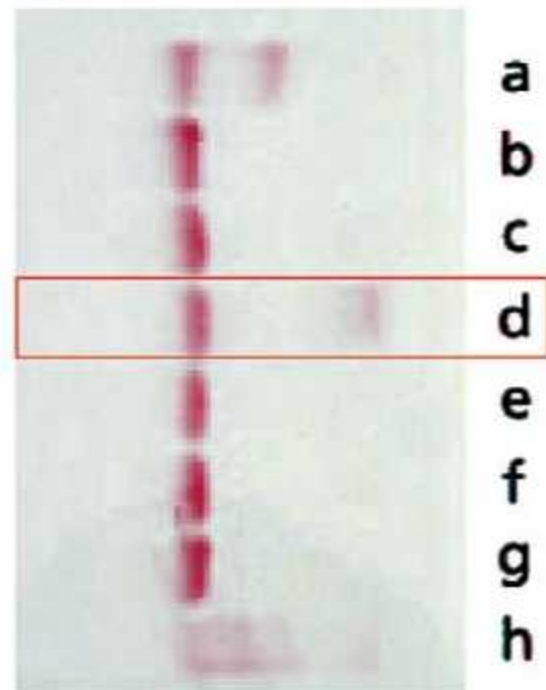
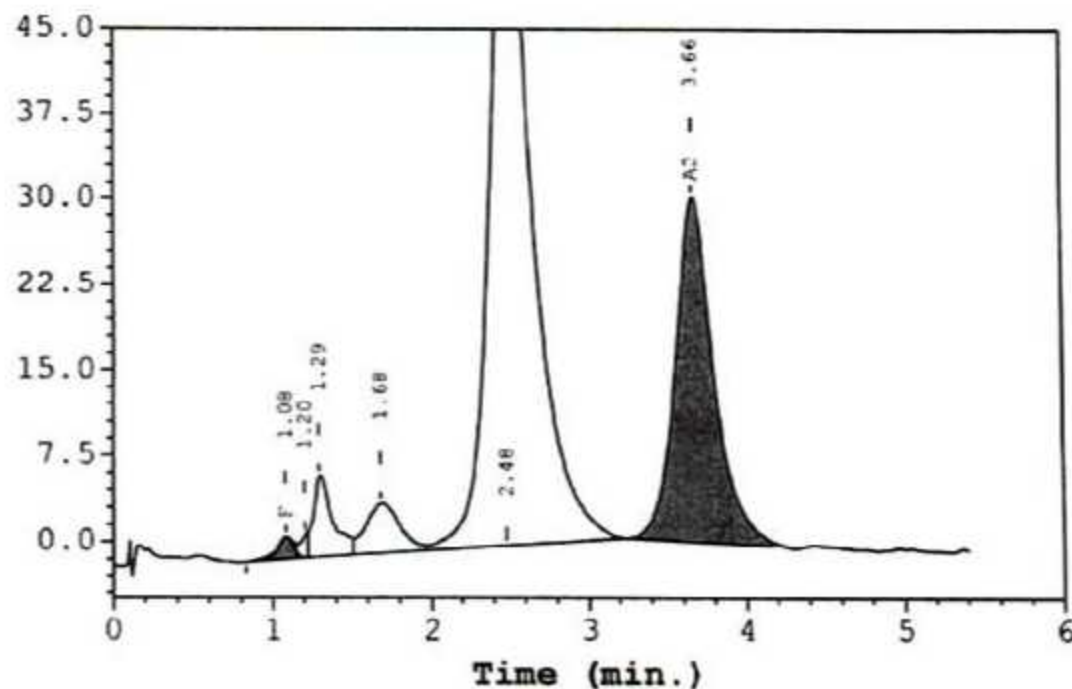
شکل ۵۶-۴۸: توزیع جغرافیایی Hb-C در شمال غربی آفریقا و انطباق آن با کمربند آندمیک مالاریا در آفریقا [۱۴]



شکل ۵۷-۴۸: توزیع جغرافیایی انواع مختلف هموگلوبینوپاتی که انتشار برخی جهانی و برخی محدود به مناطق خاصی از جهان می باشد [۱۱].

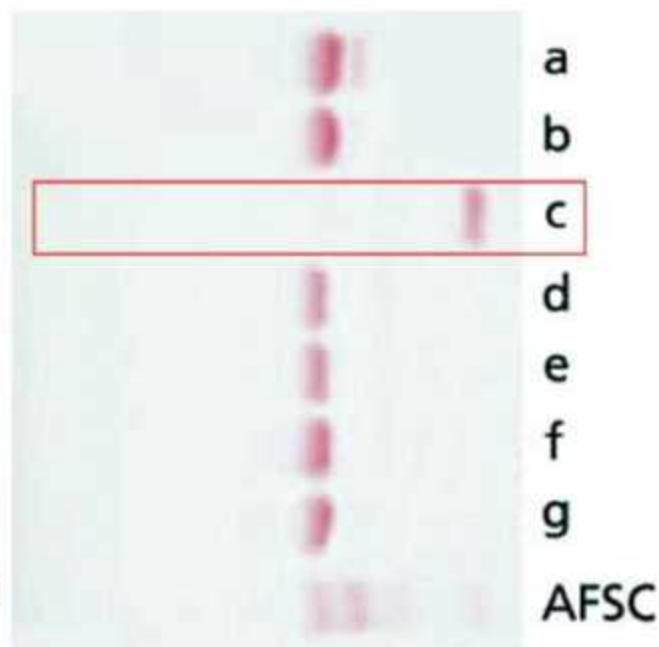
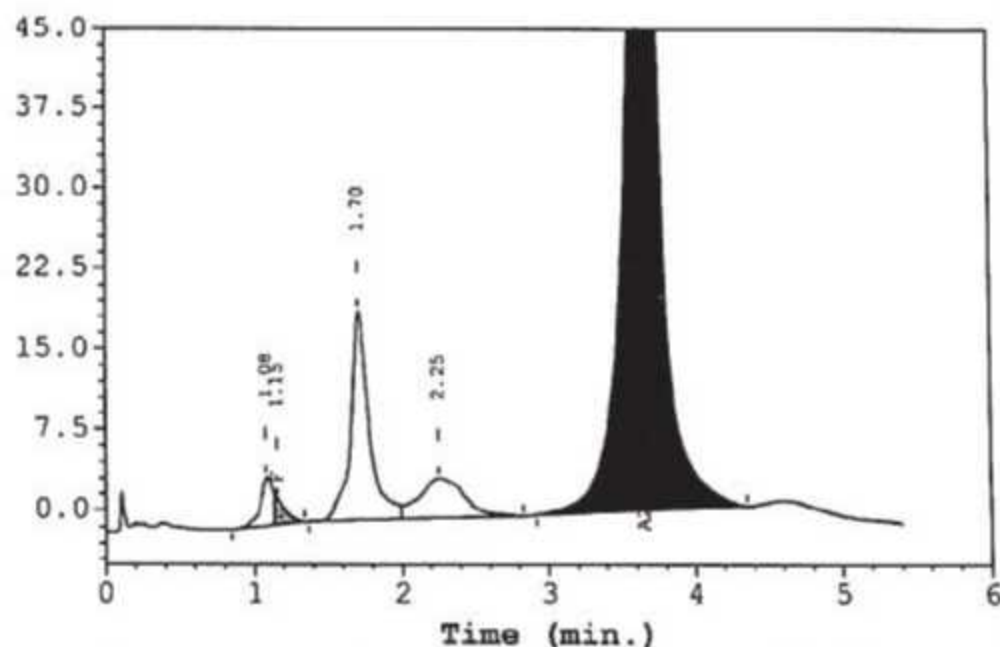


شکل ۶۴-۴۸: راست) الکتروفورز قلیایی بر روی استات سلولوز در بیمار مبتلا به بیماری Hb-C (لاین b) خطوط دیگر، هم Hb-A تنها و هم Hb-AplusS را نشان می‌دهند. چپ) کروماتوگرام HPLC در هموزیگوت Hb-C: پیک‌ها از چپ به راست عبارتند از Hb-F (RT=1.09)، پیک نامشخص (RT=2.5)، Hb-A<sub>2</sub> (RT=3.65)، Hb-C گلیگولیزه (RT=4.57) و Hb-C (با RT=5.13).



شکل ۷۰-۴۸: الکتروفورز قلیایی بر روی استات سلولوز در بیمار مبتلا به خصیصه Hb-E (لاین d). لازم به ذکر است که هموگلوبین واریانت فقط ۳۰٪ از هموگلوبین تام را تشکیل می‌دهد. لاین‌های b-g فقط حاوی Hb-A بوده و باندهای کنترل A و S در لاین h به صورت کم‌رنگ مشخص هستند. چپ) کروماتوگرام HPLC از همان بیمار مبتلا به Hb-E در پنجره A<sub>2</sub> ظاهر یافته و ۳۰٪ از هموگلوبین تام را تشکیل می‌دهد و RT برابر با ۳/۶۶ دقیقه دارد (در دستگاه Bio-Rad variant II). از چپ به راست پیک‌ها عبارتند از Hb-F، Hb-A، تغییر یافته پس از ترجمه (۲ پیک) Hb-A<sub>۲</sub> و Hb-E plus A<sub>۲</sub> [۱۴].





AFSC

شکل ۷۳-۴۸: راست) الکتروفورز قلیایی هموگلوبین روی استات سلولوز در بیمار مبتلا به هموزیگوت Hb-E (لین c). AFSC: نمونه کنترل حاوی هموگلوبین های C,S,F,A (باند ها کم رنگ هستند). چپ) کروماتوگرام HPLC از همان بیمار که Hb-E در پنجره A<sub>2</sub> ظاهر یافته و ۹۴/۱٪ از هموگلوبین تام را تشکیل می دهد و RT برابر با ۳/۶۵ دقیقه دارد. لازم به ذکر است، Hb-E که تحت تغییرات پس از ترجمه قرار می گیرد، در پنجره P<sub>3</sub> و پنجره A<sub>0</sub> ظاهر یافته و لذا نباید به اشتباه به عنوان Hb-A تفسیر شود (دستگاه Bio-Rad variant II). از چپ به راست پیک ها عبارتند از: Hb-E. F. Hb-E plus A<sub>2</sub> (پیک ۲) و پیک ۱

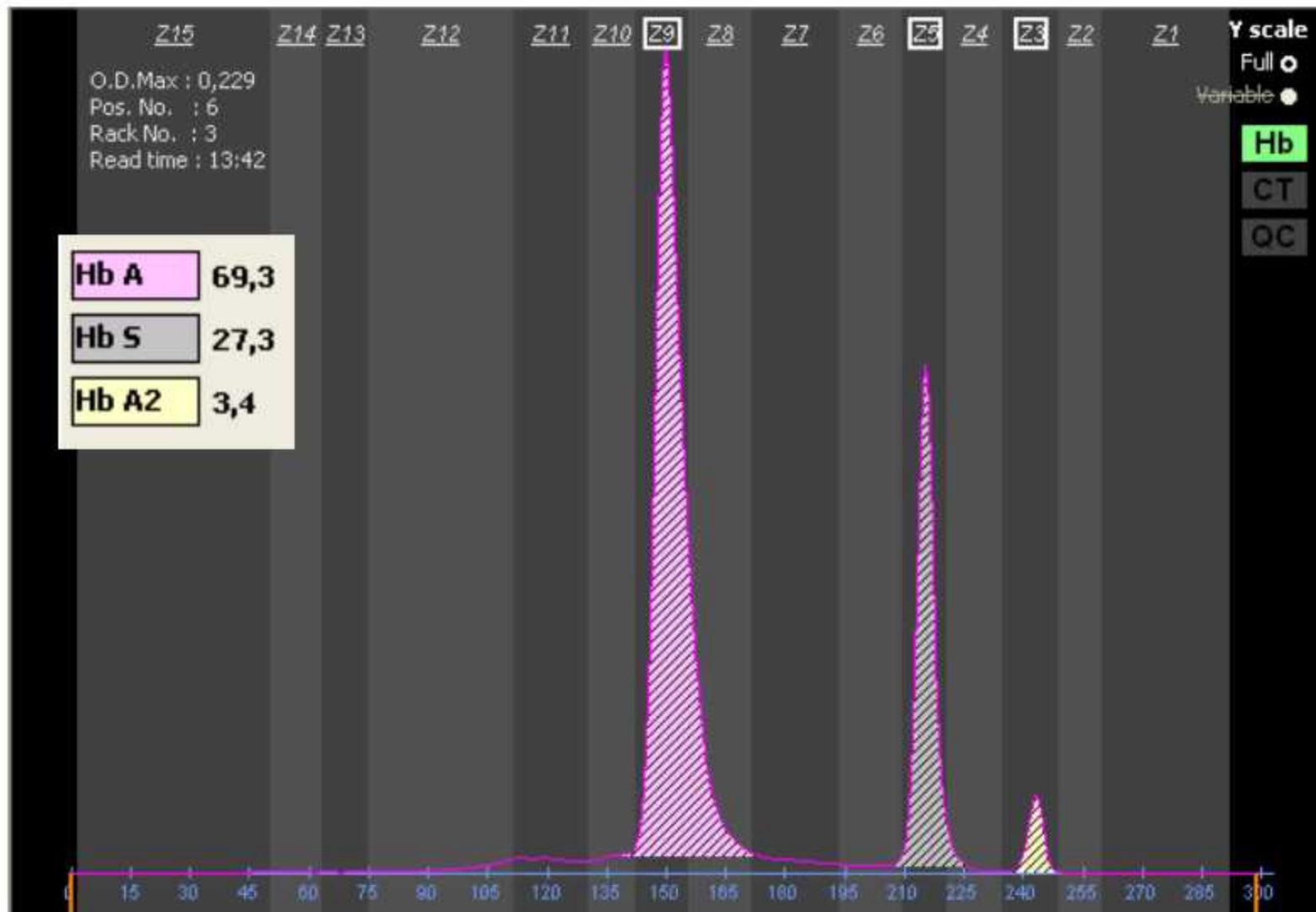
جدول ۷-۴۶: زمان احتباس یا RT مربوط به برخی از مهمترین هموگلوبین‌های طبیعی یا واریانت در دستگاه Bio-Rad (Version II) که برخی از آنها با برخی دیگر از هموگلوبین‌ها همپوشانی دارند

'Window'	Retention time (min)	Window	Haemoglobins that may overlap
F	1.10	0.98–1.22	Okayama
'P2'*	0.11	0.28–1.50	Beckman, Geelong, glycosylated A, Hope, I-Philadelphia, K-Woolwich
'P3'†	1.70	1.50–1.90	Buffalo, Camden, Fannin-Lubbock, Grady, J-Bangkok, J-Meerut, J-Baltimore, J-Norfolk, N-Baltimore
A	2.50	1.90–3.10	A, glycosylated S, New York, Köln (when not denatured)
A <sub>2</sub>	3.60	3.30–3.90	Deer Lodge, D-Ouled Rabah, D-Iran, E, G-Copenhagen, G-Coushatta, G-Ferrara, G-Honolulu, Kenya, Korle Bu, Lepore, M-Saskatoon‡, Osu-Cristiansborg, Spanish Town, Zurich
D	4.10	3.90–4.30	Alabama, D-Punjab, G-Norfolk, G-Philadelphia, Kempsey, Osler
S	4.50	4.30–4.70	Q-Thailand (Mahidol), A <sub>2</sub> ', Manitoba
C	5.10	4.90–5.30	Agenogi, C, Siriraj, Constant Spring

\* A glycosylated fraction of haemoglobin A.

† A minor peak representing modified haemoglobin A.

‡ Plus a second peak in the C window.



**Hb A2**

# Hb S glycated and Hb A2

## Comparison

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
F	0.7	---	1.10	10946
P2	---	3.9	1.29	65931
P3	---	4.7	1.63	78171
Ao	---	51.9	2.47	866703
A2	4.3*	---	3.61	67329
S-window	---	34.8	4.47	581284

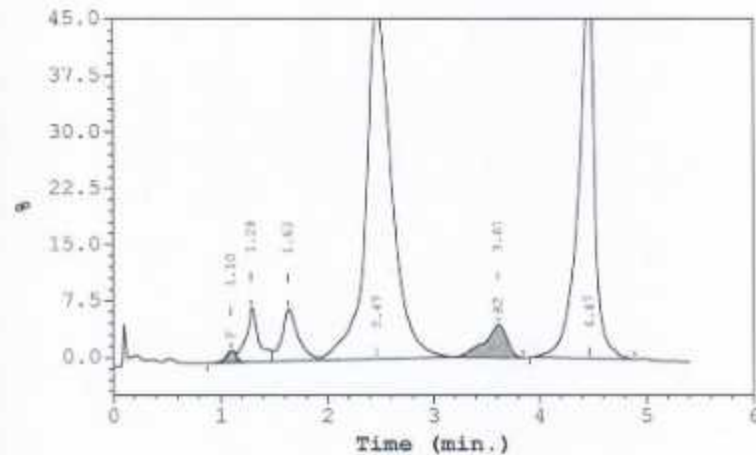
Total Area: 1670363

F Concentration = 0.7 %

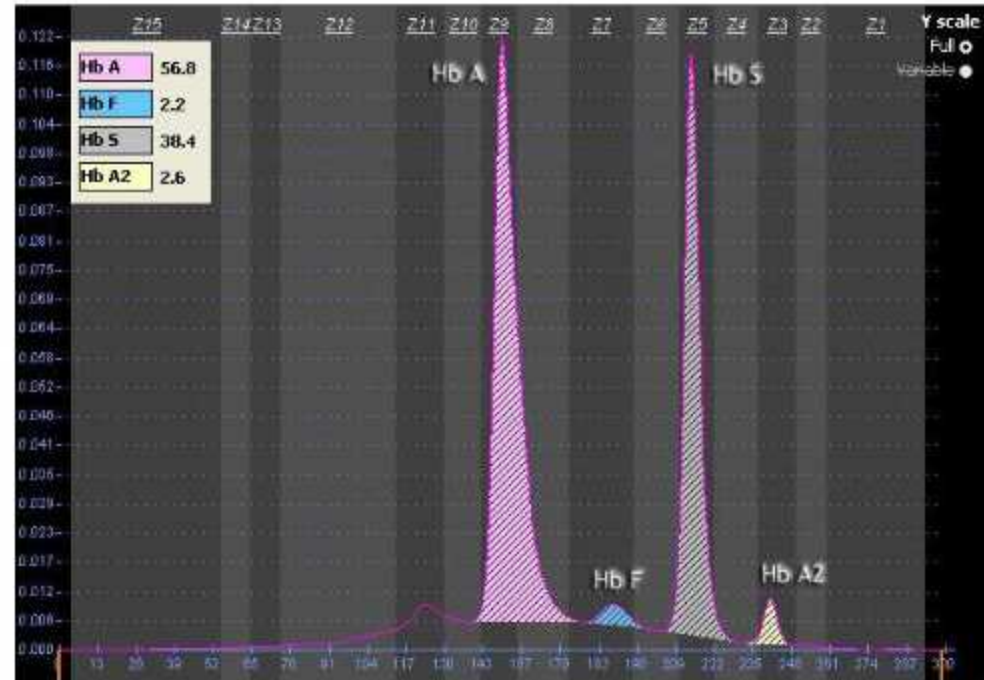
A2 Concentration = 4.3\* %

\*Values outside of expected ranges

Analysis comments:



HPLC



SEBIA CAPILLARYS 2



# Hb S glycated and Hb A2

## *Bibliography*

*“The glycated HbS1c overlaps the HbA2 fraction (...) Therefore, an elevated HbA2 fraction, in the presence of HbS and HbA, should not be considered as an indication for b-thal minor but as an artefact”*

**Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations**

P. Van Delft, E. Lenters, M. Bakker-Vermeij, M. de Korte, U. Baylan, C. L. Harteveld, P.C. Giordano

*2009 International Journal of Laboratory Hematology*

# Hb S glycated and Hb A2

## *Bibliography*

*« High performance liquid chromatography (HPLC) provides precise but inaccurate estimations of haemoglobin A2 in the presence of haemoglobin S.»*

**Some observations on the measurement of HbA2 and HbS percentages by HPLC in the presence and absence of  $\alpha$ -thalassemia**

C E Head, M Conroy, M Jarvis, L Phelan, BJ Bain

*2004 Journal of Clinical Laboratory*

*“Because an increase of only 1% or 2% can be significant for HbA2, we routinely place a caveat noting this carryover in our interpretive reports when the HPLC technique is used.”*

**Comparison of Sebia Capillarys with the Primus HPLC in the evaluation of hemoglobinopathies**

D. Keren, D. Hedstrom, R. Gulbrasnon, C. Ou, R. Bak

*2008 American Journal of Clinical Pathology*

# Hb E and Hb A2

## Comparison

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
F	11.3*	---	1.12	151846
P2	---	3.7	1.29	51032
P3	---	4.0	1.70	55406
Ao	---	56.2	2.50	775791
A2	26.1*	---	3.66	345420

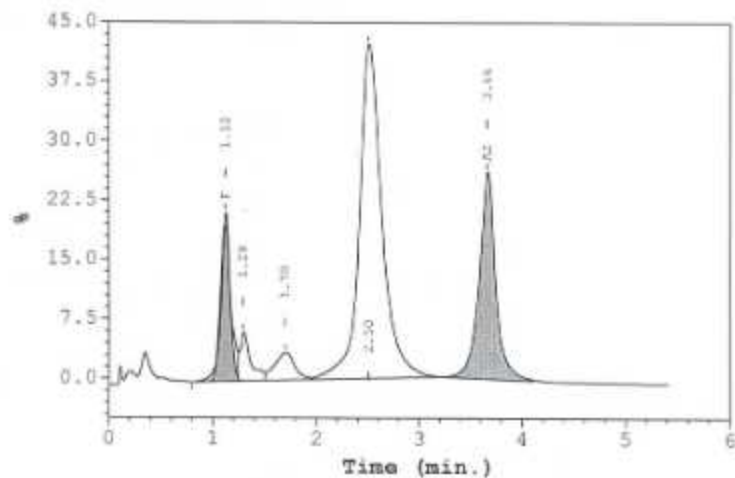
Total Area: 1379495

F Concentration = 11.3\* %

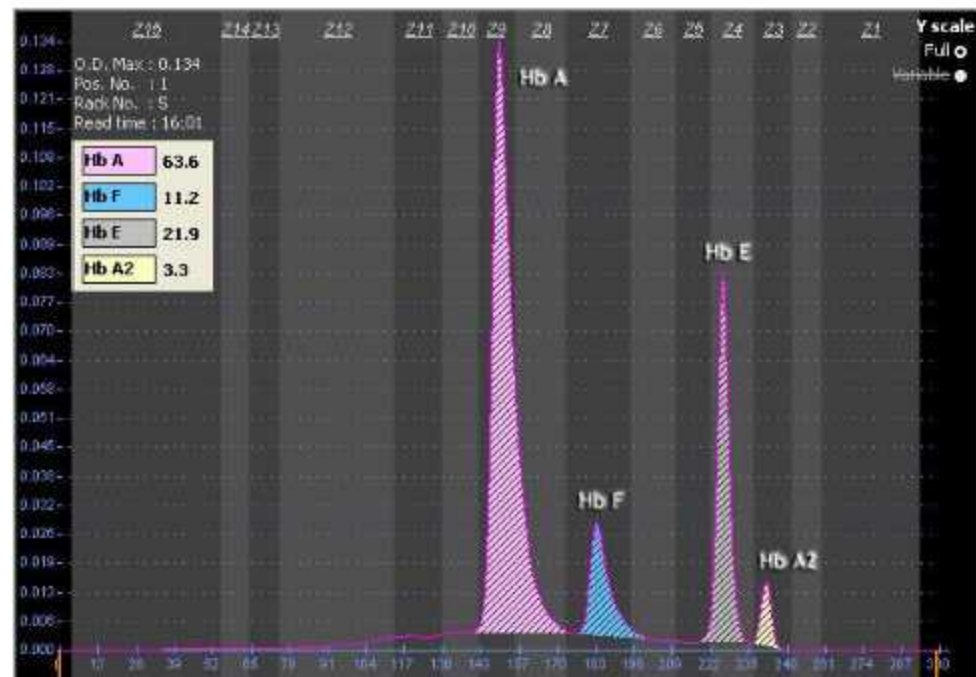
A2 Concentration = 26.1\* %

\*Values outside of expected ranges

Analysis comments:



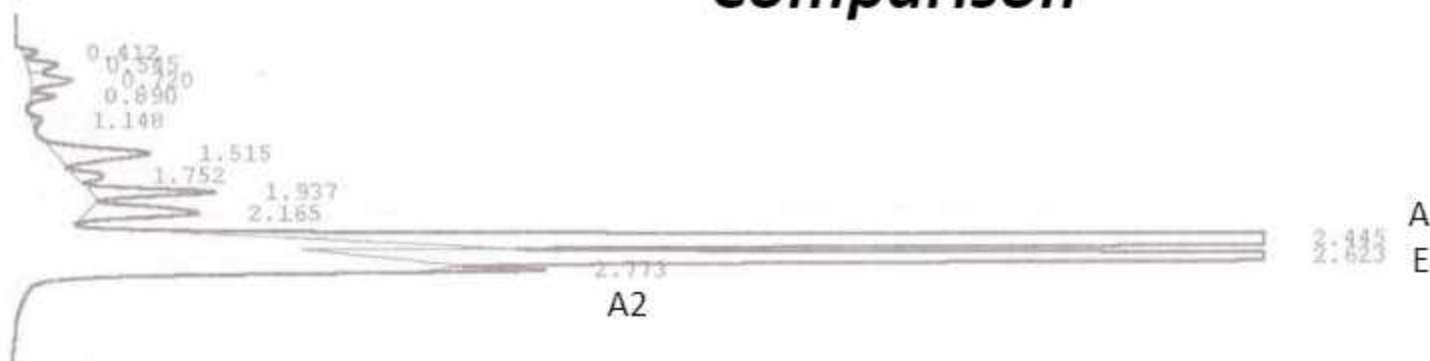
HPLC



SEBIA CAPILLARYS 2

# Hb E and Hb A2

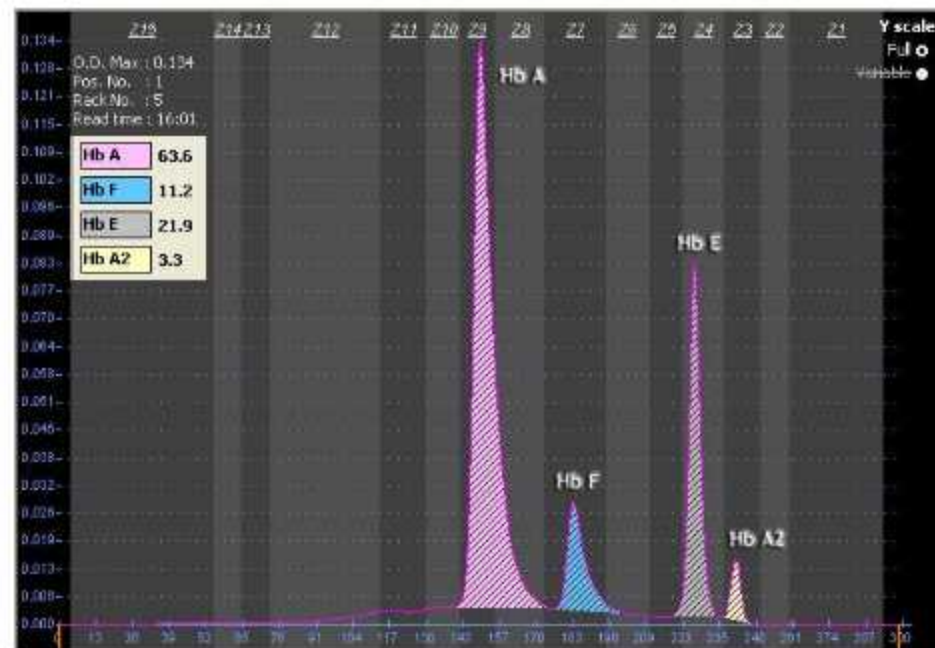
## Comparison



PEAK	RT	REL. RT	% CONC	AREA	COMMENT
1	0.412	F 0.25	0.1%	3263	
2	0.545	F 0.32	0.4%	8986	
3	0.720	F 0.43	0.6%	13996	
4	0.890	F 0.53	0.2%	5316	
5	1.148	F 0.60	0.1%	2684	
6	1.515	F 0.90	1.9%	42945	Aic peak
7	1.752	F 1.04	0.4%	9744	
8	1.937	F 1.15	1.4%	32408	
9	2.165	A 0.89	1.9%	43819	
10	2.445	A 1.01	66.9%	1524518	2 A0 peak
11	2.623	A 1.08	25.4%	578811	3
12	2.773	S 0.92	0.6%	13169	A2 peak

Total Area: 2279659

HPLC



SEBIA CAPILLARYS 2



# Hb E and Hb A2

## *Bibliography*

*« In most rapid HPLC gradients, including the Bio-Rad Laboratories systems, HbE will elute on top of the HbA2 fraction »*

**Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations**

P. Van Delft, E. Lenters, M. Bakker-Vermeij, M. de Korte, U. Baylan, C. L. Harteveld, P.C. Giordano

*2009 International Journal of Laboratory Hematology*

*« CE has been proven superior to HPLC in the measurement of HbA2 in the presence of HbE »*

**The range of Hemoglobin A2 in Hemoglobin E Heterozygotes as Determined by Capillary Electrophoresis**

D.D. Mais, R.D. Gulbranson, D. Keren

*2009 American Journal of Clinical Pathology*

# Hb E and Hb A2

## *Bibliography*

*« The Sebia Capillarys 2 is superior to the Bio-Rad VARIANT II for the quantification of HbA2 in the presence of HbE and HbD Punjab »*

**Quantification of HbA2 in patients with and without  $\beta$ -thalassemia and in the presence of HbS, HbC, HbE and HbD Punjab Hemoglobin Variants**

T. Higgins, A. Khajuria, M. Mack

*2009 American Journal of Clinical Pathology*

*« the complete separation of HbA2 from HbE by CE compared with the lack of measurable HbA2 by HPLC deserves note. Our interpretive report for the HPLC notes that the HbE value includes HbA2. However, the CE pattern in this same case demonstrates a clean separation of HbA2 from HbE »*

**Comparison of Sebia Capillarys with the Primus HPLC in the evaluation of hemoglobinopathies**

D. Keren, D. Hedstrom, R. Gulbrasnon, C. Ou, R. Bak

*2008 American Journal of Clinical Pathology*

# Hb Lepore and Hb A2

## Comparison

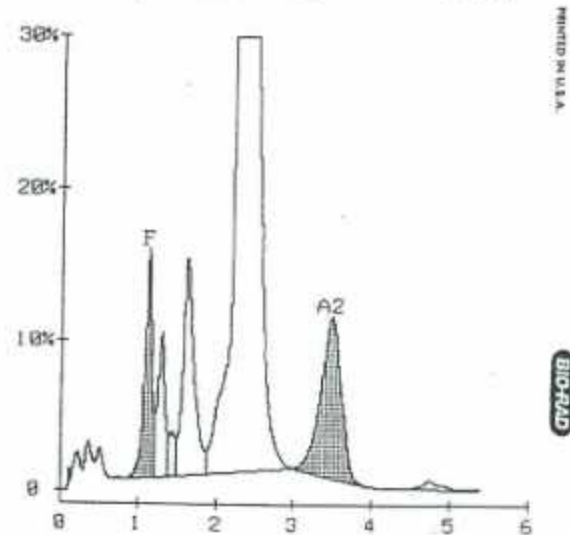
\*\*\*\*\* Beta Thal Short \*\*\*\*\*  
 DATE:96/04/09 TIME:20:16:10

TECH ID# 5  
 VIAL# 79  
 SAMPLE ID# 00000000000000000000

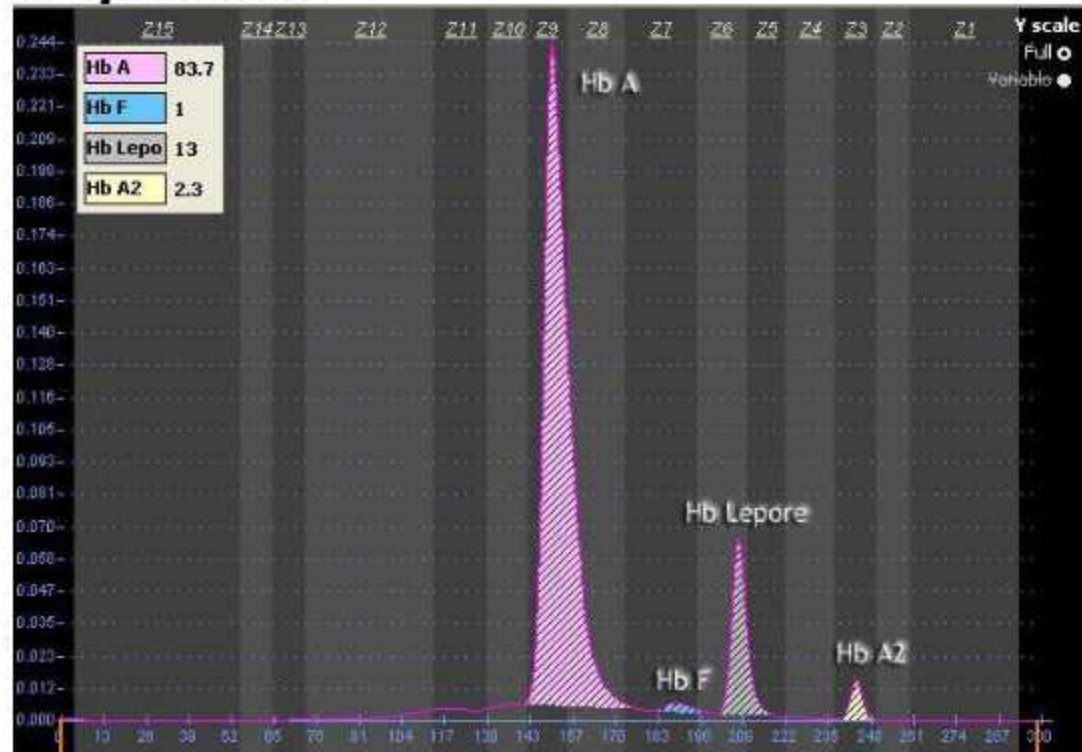
ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	4.8	1.12	191208
P2	3.2	1.29	122244
Unknown 1	0.9	1.42	32677
P3	7.5	1.61	284617
Ao	69.9	2.29	2650512
A2	11.8	3.46	393616
Unknown 2	0.6	4.75	21085

TOTAL AREA 3695959

F 4.8% A2 11.8%



HPLC



SEBIA CAPILLARYS 2

# Hb Lepore and Hb A2

## Comparison

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
F	2.1*	---	1.09	48843
Unknown	---	1.1	1.22	24554
P2	---	5.0	1.29	116727
P3	---	3.8	1.65	88159
Ao	---	76.9	2.38	1790212
A2	12.0*	---	3.44	259237

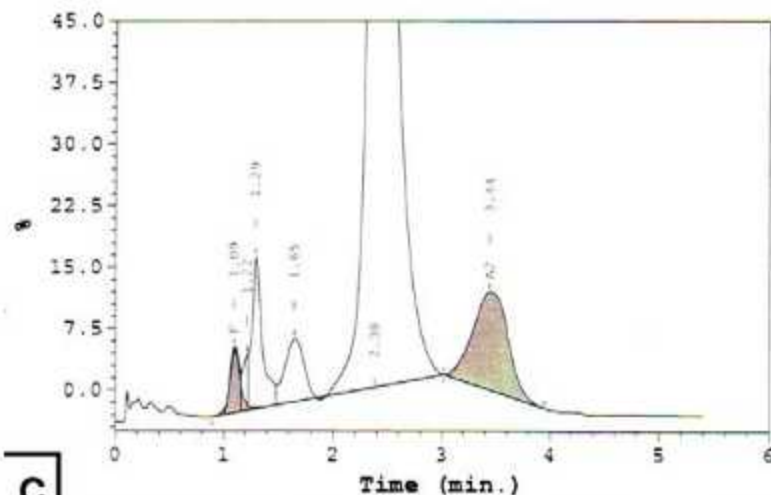
Total Area: 2,327,734

F Concentration = 2.1\* %

A2 Concentration = 12.0\* %

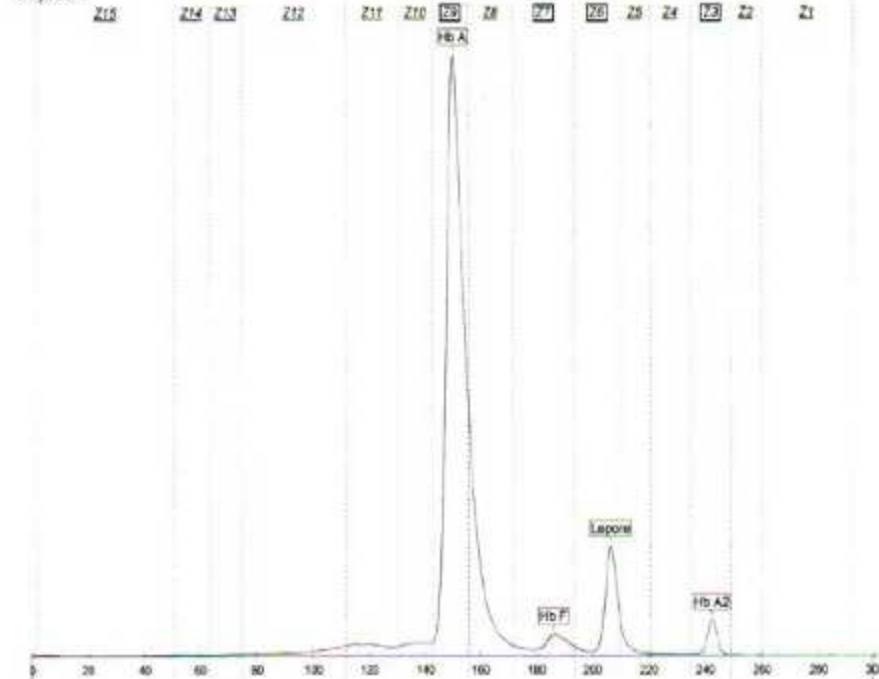
\*Values outside of expected ranges

Analysis comments:



HPLC

Depart. :



### Haemoglobin Electrophoresis

Name	%	Normal Values %
Hb A	85.7	
Hb F	2.4	
Lepore	9.5	
Hb A2	2.4	

SEBIA CAPILLARYS 2



# Hb Lepore and Hb A2

## *Bibliography*

*« HbA2 values around 10–15% with a somewhat asymmetric A2 peak will indicate Hb Lepore with a reasonable degree of confidence (...) Hb Lepore, which migrates on top of the HbA2 fraction on the VARIANT IITM apparatus, is well separated on the G7 apparatus, but within the HbD window »*

**Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations**

P. Van Delft, E. Lenters, M. Bakker-Vermeij, M. de Korte, U. Baylan, C. L. Harteveld, P.C. Giordano

*2009 International Journal of Laboratory Hematology*

*« HPLC methods, although precise, have some limitations, including (...) coelution of various hemoglobins, including HbE, Hb Osu Christianborg, HbG Coushatta, and Hb Lepore with HbA2»*

**Quantification of HbA2 in patients with and without  $\beta$ -thalassemia and in the presence of HbS, HbC, HbE and HbD Punjab Hemoglobin Variants**

T. Higgins, A. Khajuria, M. Mack

*2009 American Journal of Clinical Pathology*

# Hb D and Hb A2

## Comparison

\*\*\*\* Beta Thal Short 51500-A \*\*\*\*  
DATE:08/04/06 TIME:14:14:29

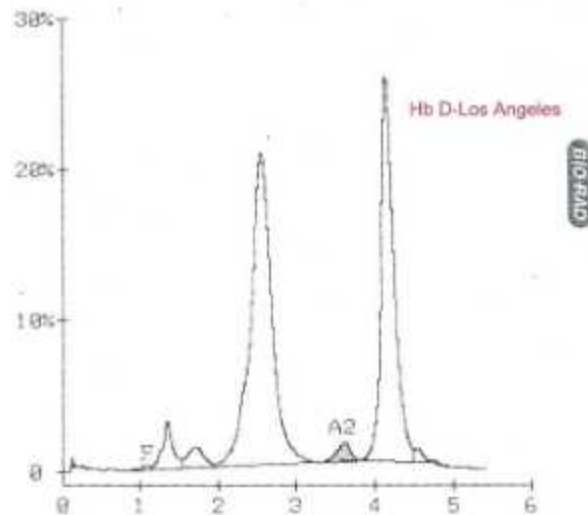
TECH ID# 123  
VIAL# 8  
SAMPLE ID# 0058DB0000000



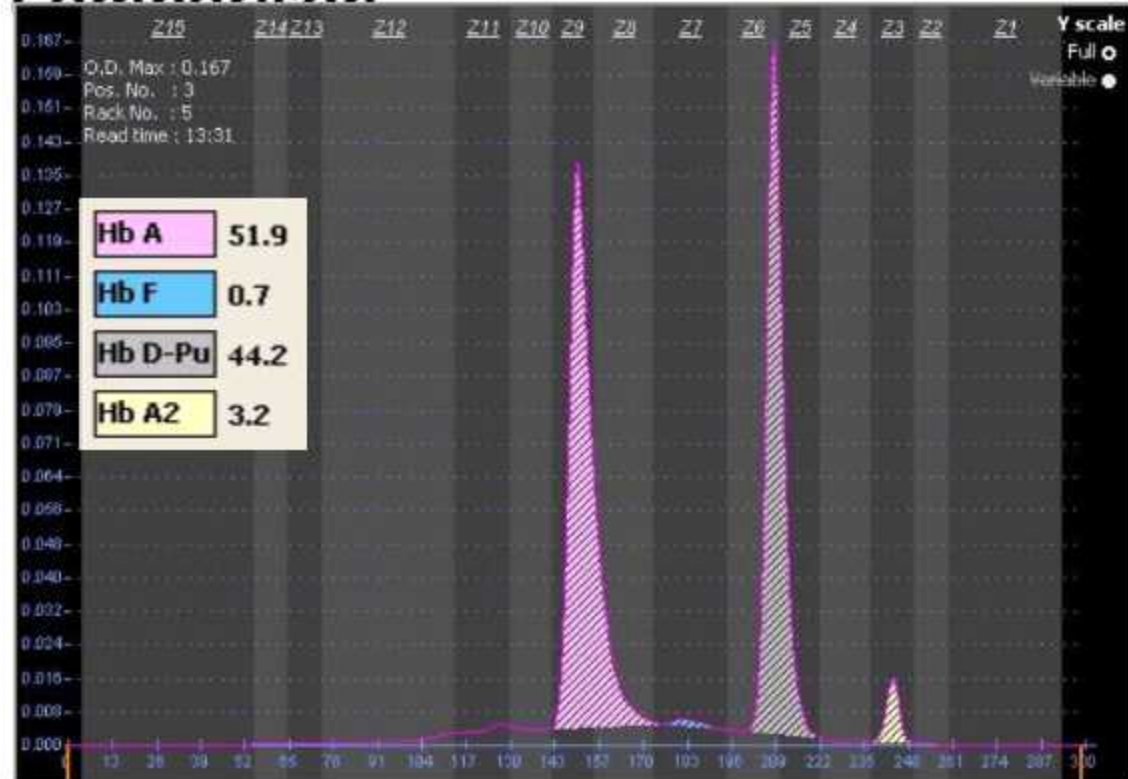
ANALYTE ID	%	UNDILUTED UNBLOCKED	
F	0.3	1.18	6863
P2	3.6	1.34	82258
P3	2.5	1.78	57197
A0	51.5	2.55	1171919
A2	2.8	3.60	42782
D-WINDOW	39.4	4.14	897873
S-WINDOW	0.7	4.54	16696

TOTAL AREA 2275588

F 0.3% A2 2.8%



HPLC



SEBIA CAPILLARYS 2

# Hb D and Hb A2

## *Bibliography*

*« The HbA2 fraction is regularly underestimated in the presence of HbD-Punjab, but then again, in these cases, the HbA2 estimation also has no diagnostic value »*

**Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations**

P. Van Delft, E. Lenters, M. Bakker-Vermeij, M. de Korte, U. Baylan, C. L. Harteveld, P.C. Giordano

*2009 International Journal of Laboratory Hematology*

*« HPLC methods, although precise, have some limitations, including falsely decreased HbA2 levels in patients with the HbD Punjab trait due to a rising baseline »*

**Quantification of HbA2 in patients with and without  $\beta$ -thalassemia and in the presence of HbS, HbC, HbE and HbD Punjab Hemoglobin Variants**

T. Higgins, A. Khajuria, M. Mack

*2009 American Journal of Clinical Pathology*

# Hb A2 on the Capillary Technology

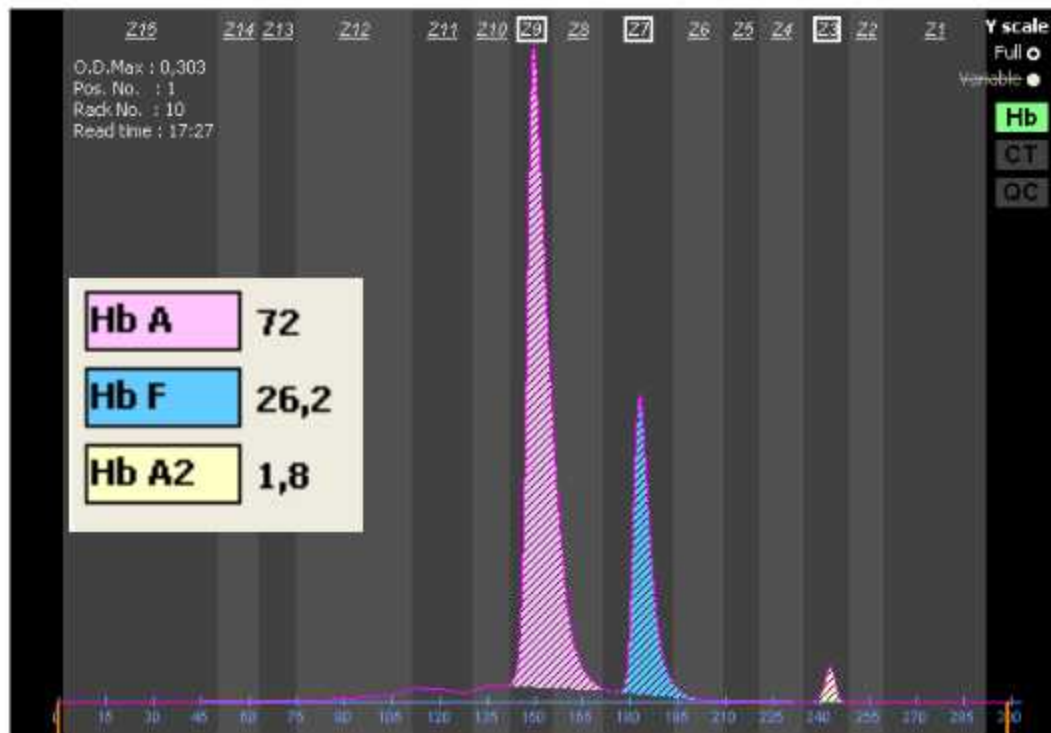
*« it is desirable to have a machine that is able to constantly define what is considered a low, normal and elevated HbA2 level (...) Diagnosis of the high HbA2  $\beta$ -thal carrier is obtained without problem on the CE apparatus»*

**Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations**

P. Van Delft, E. Lenters, M. Bakker-Vermeij, M. de Korte, U. Baylan, C. L. Harteveld, P.C. Giordano

*2009 International Journal of Laboratory Hematology*





**Hb F**

# Hb A glycated and Hb F

## *Bibliography*

*« Using the Beta Thal programme of the Bio-Rad Variant II HPLC instrument, a false elevation of haemoglobin F as a result of an elevated haemoglobin A1c percentage is observed in an appreciable percentage of diabetic patients (41% in this study) (...) Haemoglobinopathy laboratories using this programme for thalassemia and variant haemoglobin diagnosis should be alert to this possible discrepancy and should use an alternative programme or method for quantifying haemoglobin F when this problem occurs »*

**Inaccuracy of HPLC estimation of HbF in the presence of increased HbA1c**

V. Grey, M. Wilkinson, L. Phelan, C. Hughes, B.J. Bain

*2006 International Journal of Laboratory Hematology*

# Hb A glycated and Hb F

## *Bibliography*

*« HbF values higher than 1% after the age of 2 are considered 'abnormal' and should eventually be investigated. Elevation of the HbF expression can be secondary to bone marrow malignancies (...) Because of the different integration factors and to overlapping with the HbA1c peak, the HbF fraction is often imprecisely measured, especially in the low ranges (1–3%) (...) If the HbA1c fraction is significant, the HbF fraction may become falsely increased to above the normal limit of 1%. »*

**Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations**

P. Van Delft, E. Lenters, M. Bakker-Vermeij, M. de Korte, U. Baylan, C. L. Harteveld, P.C. Giordano

*2009 International Journal of Laboratory Hematology*

➤ **On the Capillarys Technology, HbA1c co-migrates with the main HbA<sub>0</sub> peak and do not interfere with HbF**