

**« Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ  
ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΩΝ ΑΝΑΙΜΙΩΝ »**

« Life is either a daring adventure or nothing »

Helen Keller.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Αφιέρωση-Ευχαριστίες.....	10
Πρόλογος .....	11
Εισαγωγή .....	12

### ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

#### 1. ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΟ

1.1. Γενικά για το ερυθροκύτταρο .....	13
1.2. Παραγωγή ερυθροκυττάρου .....	13
1.2.1. Στάδια ερυθροποίησης.....	14
1.2.2. Δομή ερυθροκυττάρου .....	15

#### 2. ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ

2.1. Γενικά για την αιμοσφαιρίνη .....	16
2.2. Σύσταση - δομή και σύνθεση της αιμοσφαιρίνης του ανθρώπου .....	17
2.2.1. Η σύσταση-δομή .....	17
2.2.2. Η Σύνθεση .....	20
2.3. Ρόλος-Λειτουργίες .....	21
2.4. Παράγωγα της αιμοσφαιρίνης .....	25
2.5. Φυσιολογικές τιμές .....	26
2.6. Φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες .....	27
2.7. Κληρονομικές διαταραχές στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης (παθολογικές αιμοσφαιρίνες).....	29

#### 3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

3.1. Γενικά για την ηλεκτροφόρηση .....	33
3.2. Αρχή ηλεκτροφόρησης της αιμοσφαιρίνης .....	33
3.3. Βασικά στάδια ηλεκτροφορητικής τεχνικής .....	35

3.4. Ηλεκτροφόρηση και Παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται .....	36
3.5. Πιθανά λάθη κατά την ηλεκτροφόρηση .....	37
3.6. Είδη ηλεκτροφορητικών τεχνικών .....	38
3.6.1. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη (gel) ή πηκτή αμύλου.....	38
3.6.2. Ηλεκτροφόρηση σε ταινίες πολυοξικής ή οξικής κυτταρίνης .....	38
3.6.3. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης ή άγαρ (agar) .....	41
3.6.4. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη (gel) πολυακρυλαμίδης.....	42
4. ΑΝΑΙΜΙΕΣ	
4.1. Ορισμός αναιμίας.....	45
4.2. Θαλασσαιμίες .....	49
4.2.1. Γενικά για τις θαλασσαιμίες .....	49
4.2.2. α-θαλασσαιμίες .....	51
4.2.3. β-θαλασσαιμίες.....	53
4.2.4. Άλλα θαλασσαιμικά σύνδρομα.....	56
4.3. Αιμοσφαιρινοπάθειες.....	58
4.3.1. Δρεπανοκυτταρική αναιμία .....	58
4.3.2. Ετερόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία .....	60
4.3.3. Άλλα δρεπανοκυτταρικά σύνδρομα .....	61
4.3.4. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια C .....	62
4.3.5. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια D .....	62
4.3.6. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια E .....	63
4.3.7. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια Hb Constant Spring.....	63
4.3.8. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια Knossos .....	63
4.3.9. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια O-Thrace (O- Arab).....	63
4.3.10. Οι Αιμοσφαιρινοπάθειες Hb Bart's και HbH.....	64
4.3.11. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια HbG- Philadelphia.....	64
4.3.12. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια HbI.....	64
4.3.13. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια HbC-Harlem .....	64
4.3.14. Ασταθείς αιμοσφαιρίνες .....	65
4.3.15. Αιμοσφαιρίνες με αυξημένη συγγένεια προς το οξυγόνο .....	65

4.3.16. Αιμοσφαιρίνες με μειωμένη συγγένεια προς το οξυγόνο.....	66
4.3.17. Οι Αιμοσφαιρινοπάθειες M.....	66
4.3.18. Επίκτητες αιμοσφαιρινοπάθειες .....	67
4.4. Θαλασσαιμικές Αιμοσφαιρινοπάθειες .....	67
4.4.1. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια Lepore .....	67
4.4.2. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια Lepore/B+ θαλασσαιμία .....	68
4.4.3. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια SS/ α- θαλασσαιμία .....	68
4.3.4. Η Μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία .....	68
4.3.5. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια S/δβ0 – θαλασσαιμία .....	69
4.3.6. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια S/Lepore .....	69
4.3.7. Στην Αιμοσφαιρινοπάθεια S/HPFH .....	69
4.3.8. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια C/β-θαλασσαιμία .....	69
4.3.9. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια E/β-θαλασσαιμία (E/β0) ή (E/β+) .....	70
4.3.10. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια O-Thrace/ β-θαλασσαιμία .....	70

## ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

### 5. Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΚΛΑΣΙΚΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΩΝ ΑΝΑΙΜΙΩΝ

5.1. Η ηλεκτροφόρηση ως μέθοδος ανίχνευσης αιμοσφαιρινικών κλασμάτων .....	71
5.2. Η Συμβολή της ηλεκτροφόρησης στην ανίχνευση αιμοσφαιρινών .....	71
5.2.1. HbA, HbF και HbA <sub>2</sub> .....	73
5.2.2. Hb S .....	75
5.2.3. HbC .....	75
5.2.4. Hb D.....	76
5.2.5. Hb Constant Spring .....	76
5.2.6. Hb O Arab και Hb Punjab .....	76
5.2.7. Hb E .....	76
5.2.8. Hb Lepore .....	76

5.2.9. Hb Chicago .....	77
5.2.10. Hb Bart's, Hb Acetyl F, Hb H, Hb Hope et al. ....	77
5.3. Η SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης ή αλλιώς, ηλεκτροφόρηση σε γέλη (gel) πολυακρυλαμίδη .....	71
5.4. Η ηλεκτροφόρηση ως μέθοδος επιβεβαίωσης μιας διάγνωσης .....	61
<b>6. Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΠΙΟ ΕΞΕΛΙΓΜΕΝΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΩΝ ΑΝΑΙΜΙΩΝ</b>	
6.1. Η συμβολή της «τριχοειδική ηλεκτροφόρηση», Capillary Electrophoresis (CE) ή Capillary Zone Electrophoresis (CZE), στην ταυτοποίηση των διαφόρων Hb και την διάγνωση των κληρονομικών αναιμιών .....	82
6.2. Η νέα μέθοδος τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης: Capillarys 2, Sebia .....	87
6.3. Οι μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας, στη διάγνωση των κληρονομικών ασθενειών .....	91
6.3.1. Η μέθοδος HPLC (High Performance Liquid Chromatography) .....	91
6.3.2. Η μέθοδος FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) .....	95
<b>7.ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΒΟΛΗΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΩΝ ΑΝΑΙΜΙΩΝ</b>	
7.1. Σύγκριση της CAPLLARYS 2, SEBIA ELECTROPHORESIS με την HPLC ως προς τα αποτελέσματα ποιοτικού και ποσοτικού ελέγχου .....	99
7.1.1. Ποιοτικός έλεγχος αιμοσφαιρινών .....	100
7.1.2. Ποσοτικός έλεγχος αιμοσφαιρινοπαθειών .....	102
7.2. Σύγκριση της HPLC με την Capillary electrophoresis για τον ποσοτικό προσδιορισμό της HbA2 με ταυτόχρονη παρουσία άλλων αιμοσφαιρινών .....	102
7.3. Η συμβολή της ηλεκτροφόρησης Hb σε σχέση με την ανάλυση DNA, ως προς την διάγνωση .....	105
<b>8. Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΜΒΡΥΙΚΗΣ ΚΑΙ ΝΕΟΓΝΙΚΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΩΝ ΑΝΑΙΜΙΩΝ</b>	
8.1. Μέθοδοι διάγνωσης κληρονομικών αναιμιών στον προγεννητικό έλεγχο .....	108
8.2. Πρώιμη διάγνωση θαλασσαιμιών .....	113

8.3. Έλεγχος για παθολογικές αιμοσφαιρίνες στις αναπτυσσόμενες χώρες .....	117
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>120</b>
Περίληψη .....	121
Summary .....	123
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	
1. ΒΙΒΛΙΑ.....	125
2. ΑΡΘΡΑ .....	126
2. ΔΙΑΔΥΚΤΙΟ.....	131

## **ΑΦΙΕΡΩΣΗ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αφιερωμένο στην αξιολάτρευτη οικογένειά μου και σε όσους με στήριξαν δυναμικά, όλον αυτόν τον καιρό!

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Δρ. Κριεμπάρδη Αναστάσιο για την αξιόλογη συνεργασία μας, την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθειά του.



## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Στόχος της εργασίας αυτής είναι η απάντηση στο ερώτημα, αν η ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης συμβάλει στη διάγνωση των κληρονομικών αναιμιών. Στις σελίδες που ακολουθούν, αναλύονται εκτενέστερα η φυσιολογία και οι διάφορες κληρονομικές διαταραχές της αιμοσφαιρίνης, καθώς επίσης οι μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης των διαφόρων τύπων της. Η μελέτη των ανωτέρω είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την κατανόηση, των εννοιών στις οποίες αναφέρεται το θέμα και της ανάγκης να απαντηθεί αυτό το ερώτημα.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από την αρχαιότητα, επικρατούσε η λαϊκή αντίληψη ότι το αίμα διατηρεί την υγεία, τονώνει και παρατείνει τη νεότητα και συμβάλει στη διατήρηση της ζωής. Είναι απαραίτητο στοιχείο του οργανισμού και επιτελεί πολυάριθμες λειτουργίες απαραίτητες για τη σωστή λειτουργεί του. Μια από αυτές τις λειτουργίες, είναι η ανταλλαγή αερίων για την διεξαγωγή της διαδικασίας της αναπνοής των κυττάρων (μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες προς τους ιστούς και μεταφορά, του τοξικού για τους ιστούς, διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς προς τους πνεύμονες με σκοπό την απομάκρυνσή του από τον οργανισμό).

Οποιαδήποτε μεταβολή στη φυσιολογία του αίματος οδηγεί σε μη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι κληρονομικές διαταραχές της σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης. Με βάση τα είδη των διαταραχών στην αιμοσφαιρίνη διακρίνουμε τις «πορφυρίες», που χαρακτηρίζονται από διαταραχές στη σύνθεση της αίμης, τις ανωμαλίες στη σύνθεση των σφαιρινικών αλυσίδων, οι οποίες διακρίνονται σε ποσοτικές και τις καλούμε «θαλασσαιμίες» και σε ποιοτικές και χαρακτηρίζονται ως «αιμοσφαιρινοπάθειες». Ταυτόχρονη παρουσία ποσοτικής και ποιοτικής ανωμαλίας της αιμοσφαιρίνης, συνιστά τις «θαλασσαιμικές αιμοσφαιρινοπάθειες».

Έτσι, εύκολα γίνεται κατανοητή η ανάγκη για άμεση διάγνωση των κληρονομικών αναιμιών, τόσο για την παρακολούθηση και θεραπεία των εκδηλώσεών τους (αν αυτό είναι εφικτό), όσο για τη μη διαίωσή τους, από τους γονείς στα νέα άτομα της οικογένειας. Για το σκοπό αυτό, έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μέθοδοι για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των παθολογικών αιμοσφαιρινών στο αίμα. Μία από αυτές είναι η ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης, η οποία χρησιμοποιείται και ως βασική μέθοδος ανίχνευσης και ταυτοποίησης των διαφόρων τύπων αιμοσφαιρίνης (φυσιολογικών και μη).

## ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

### 1. ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΟ

#### 1.1. Γενικά για το ερυθροκύτταρο

Το ερυθροκύτταρο ή αλλιώς ερυθρό αιμοσφαίριο ή erythrocyte (RBC), όπως καλείται, μετά την παραγωγή του και την ωρίμανση του στο μυελό των οστών, εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος όπου κυκλοφορεί για περίπου 120 μέρες (όσο είναι η διάρκεια ζωής του). Στην ώριμη μορφή του δε φέρει πυρήνα, ούτε ριβοσωμάτια, ούτε μιτοχόνδρια, με αποτέλεσμα να είναι πλέον αδύνατη η πραγματοποίηση πολλών σημαντικών λειτουργιών συνδεδεμένων με τη ζωή των κυττάρων, όπως ο πολλαπλασιασμός του, η σύνθεση πρωτεϊνών και η παραγωγή ATP (λόγο έλλειψης μιτοχονδρίων). Για αυτό το λόγο, το ερυθρό αιμοσφαίριο, προβαίνει σε αναερόβιο μεταβολισμό της γλυκόζης. Σε αυτό γίνεται επίσης η σύνθεση της αιμοσφαιρίνης, την οποία περιέχει και στην οποία οφείλει το ερυθρό του χρώμα. Στο στάδιο του προερυθροβλάστη<sup>1</sup> περιέχει αιμοσφαιρίνη (Hb) 1% ενώ στην μορφή των ΔΕΚ (δύκτιοερυθροκύτταρα) 95% (Ζαραλής, 2008).

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι ελαστικά κύτταρα, για να διέρχονται εύκολα από τα τριχοειδή αγγεία. Τα ώριμα ερυθροκύτταρα έχουν σχήμα αμφίκιουλου δίσκου. Στους άνδρες οι τιμές αναφοράς τους είναι  $4,5 - 6,5 \times 10^{12}/L$  αίματος, ενώ στις γυναίκες  $3,9 - 5,6 \times 10^{12}/L$  αίματος και η εκατοστιαία αναλογία τους ανά μονάδα όγκου αίματος καλείται *αιματοκρίτης*. Αντίθετα, η μείωση του αριθμού των ερυθρών (της ολικής μάζας των ερυθρών) σε σχέση με το φυσιολογικό τους πληθυσμό στον οργανισμό, καλείται *αναιμία* (Σπανός, 2001).

#### 1.2. Παραγωγή ερυθροκυττάρου

Ερυθροποίηση είναι η παραγωγή των ερυθροκυττάρων. Είναι μια από τις πιο σημαντικές διαδικασίες που συμβαίνουν στον ανθρώπινο οργανισμό και συνδέεται άμεσα με τη ζωή καθώς το ερυθρό αιμοσφαίριο είναι απαραίτητο για τη μεταφορά

---

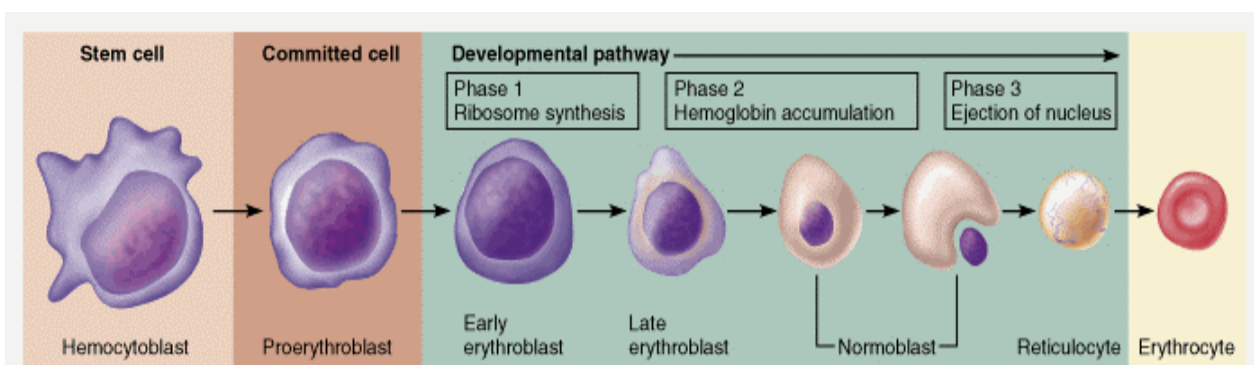
<sup>1</sup>Ο προερυθροβλάστης είναι το πρώτο, θεωρητικά, κύτταρο της ερυθρά σειράς στο μυελό των οστών (Ζαραλής, 2008).

του οξυγόνου στους ιστούς και του διοξειδίου του άνθρακα στους πνεύμονες, λειτουργιών που οφείλονται στην αιμοσφαιρίνη.

Η κατανόηση της παραγωγής, της δομής και της λειτουργίας του ερυθροκυττάρου αποτελεί βάση για την καλύτερη κατανόηση τόσο των αναιμιών όσο και της συμβολής της αιμοσφαιρίνης στη διάγνωσή τους (Ηλιόπουλος, 1999).

### 1.2.1. Στάδια ερυθροποίησης

Η παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων βασίζεται στα στάδια πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης του αρχέγονου πολυδύναμου αιμοποιητικού κυττάρου (P-HSC) (εικόνα 1). Αρχικά, το αρχέγονο πολυδύναμο κύτταρο πολλαπλασιάζεται δίνοντας αποικίες κυττάρων BFU-E και CFU-E, τα οποία με την επίδραση αυξητικών παραγόντων και κυρίως της ερυθροποιητίνης διαφοροποιούνται σε προερυθροβλάστες. Στη συνέχεια, οι προερυθροβλάστες, οι οποίοι έχουν την ικανότητα της αιμοσφαιρινόσυνθεσης, ωριμάζουν σε ερυθροβλάστες, οι οποίοι διαιρούνται και διαφοροποιούνται σταδιακά σε βασεόφιλα (άωρα), πολυχρωματόφιλα και ορθοχρωματικά (ώριμα). Τα δικτυοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ), τα οποία αποτελούν τους ώριμους ερυθροβλάστες χωρίς τον πυρήνα τους, εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και αφού χάσουν και τα οργανιδιά τους μεταπίπτουν στην μορφή των ώριμων ερυθρών (Παπακωνσταντίνου, 2003).



Εικόνα 1. Στάδια ερυθροποίησης του ερυθροκυττάρου (ανατύπωση από [www.medlook.net](http://www.medlook.net)).

### 1.2.2. Δομή ερυθροκυττάρου

Το ερυθρό αποτελείται από εξωτερική κυτταρική μεμβράνη η οποία αποτελείται από δυο στοιβάδες λιπιδίων, μια εξωτερική και μια εσωτερική. Αυτά τα λιπίδια είναι κυρίως φωσφολιπίδια (κεφαλίνη, λεκιθίνη, σφιγγομυελίνη και λυσολεκιθίνη) ενώ φέρονται ανάμεσά τους μόρια χοληστερίνης, γλυκολιπίδια και λιπαρά οξέα. Η διπλή αυτή στοιβάδα αποτελείται από υδρόφοβες και υδρόφιλες ομάδες, οι οποίες διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε τα υδρόφιλα μέρη της μιας στοιβάδας να είναι στραμμένα προς τα υδρόφοβα μέρη της άλλης ενώ τα υδρόφιλα μόρια της μια στοιβάδας είναι στραμμένα προς το κυτταρόπλασμα και της άλλης προς το ενδιάμεσο υγρό (*Μελέτης, 2003*).

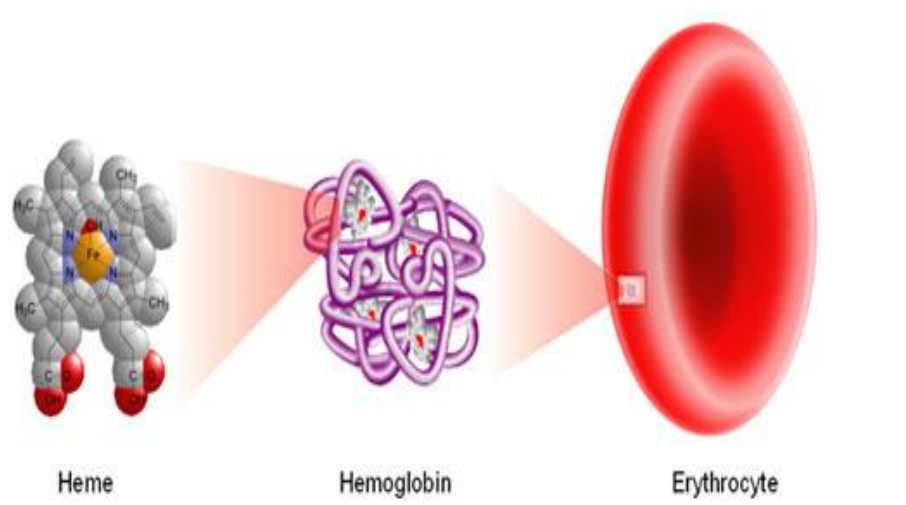
Στην κυτταρική μεμβράνη παρεμβάλλονται πολυπεπτίδια, πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στη δομή της κυτταρικής μεμβράνης και διακρίνονται σε *διαμεμβρανικές* και σε *περιφερειακές*. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, διασχίζουν όλη τη μεμβράνη όπως τα αντιγόνα που καθορίζουν τις ομάδες αίματος (ερυθροκυτταρικά αντιγόνα). Από την άλλη, οι περιφερειακές πρωτεΐνες αποτελούν μέρος του κυτταροπλάσματος και έρχονται σε επαφή και αλληλεπιδρούν με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και τα λιπίδια, χωρίς όμως να εισχωρούν στη λιπιδική στιβάδα (*Ζαράλη, 2008*).

Την κυτταροπλασματική μεμβράνη του ερυθροκυττάρου συγκρατεί το υπομεμβρανικό πρωτεϊνικό σύμπλεγμα, του οποίου κύριο συστατικό αποτελεί η πρωτεΐνη *σπεκτρίνη*, οι οποία είναι και η υπεύθυνη για το σχήμα του ερυθρού (αμφίκοιλου δίσκου) και την ελαστική του ιδιότητα. Επιπλέον, το ώριμο ερυθρό αιμοσφαίριο διακρίνεται από τα άλλα κύτταρα καθώς στερείται πυρήνα αλλά και άλλων οργανιδίων όπως συσκευή Golgi, ριβοσώματα και μιτοχόνδρια. Έτσι, όπως είναι αναμενόμενο, δε δύναται να πολλαπλασιαστούν (*Σπανός, 2001*).

## 2. ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ

### 2.1. Γενικά για την αιμοσφαιρίνη

Το όνομα *αιμοσφαιρίνη (hemoglobin)* δόθηκε το 1864 από το Γερμανό φυσιολόγο και χημικό Horpe-Seyler, με σκοπό να χαρακτηρίσει τη χρωστική των ερυθροκυττάρων ([www.medlook.net](http://www.medlook.net)). Το οργανικό αυτό μόριο, αποτελεί περίπου το 1% του συνολικού ανθρώπινου σωματικού βάρους και βρίσκεται μέσα στα ερυθρά αιμοσφαίρια (το 98% στο κυτταρόπλασμά τους) (εικόνα 2). Η αιμοσφαιρίνη ανήκει στην κατηγορία των μεταλλικών χρωστικών, στις σύνθετες ή αλλιώς συζευγμένες πρωτεΐνες<sup>2</sup> και συγκεκριμένα τις *χρωμοπρωτεΐνες*<sup>3</sup>. Οι βασικότερες λειτουργίες της αιμοσφαιρίνης είναι η ανταλλαγή αερίων (μεταφορά O<sub>2</sub> μέσω του αίματος, από τους πνεύμονες στους ιστούς και η μεταφορά CO<sub>2</sub> από τους ιστούς προς τους πνεύμονες, για την απομάκρυνσή του από τον οργανισμό) καθώς και η διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας του ανθρώπινου οργανισμού (Τσερβένης και Γρίβα, 1999).



Εικόνα 2. Η σύσταση του ερυθρού αιμοσφαιρίου (ανατύπωση από [www.medlook.net](http://www.medlook.net)).

---

<sup>2</sup>Οι σύνθετες ή συζευγμένες πρωτεΐνες, αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό μέρος και μια προσθετική ομάδα. <sup>3</sup>Η αιμοσφαιρίνη υπάγεται στις χρωμοπρωτεΐνες, λόγω της προσθετικής της ομάδας (Kaplan et al., 2003).

## 2.2. Σύσταση – δομή και σύνθεση της αιμοσφαιρίνης του ανθρώπου

### 2.2.1. Η Σύσταση - δομή

Το μόριο της αιμοσφαιρίνης είναι ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών, το οποίο αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες (από 2 όμοια ζεύγη), σε κάθε μια από τις οποίες βρίσκεται συνδεδεμένος σε ειδική θέση ένας δακτύλιος αίμης. Πιο συγκεκριμένα, κάθε μόριο αιμοσφαιρίνης αποτελείται από α) ένα πρωτεϊνικό μέρος, που καλείται *σφαιρίνη* και αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ανά δύο όμοιες, β) τέσσερα μόρια πρωτοπορφυρίνης IX, γ) τέσσερα άτομα σιδήρου σε δισθενή μορφή ( $Fe^{++}$ ), τα οποία ενώνονται με την πρωτοπορφυρίνη IX για να σχηματίσουν τέσσερα μόρια *αίμης*, που είναι η προσθετική ομάδα και δ) ένα μόριο 2,3-DPG, που εισέρχεται και εξέρχεται κάθε φορά που η αίμη αποδίδει και δεσμεύει, αντίστοιχα, το οξυγόνο στο κέντρο της αιμοσφαιρίνης (Μελέτης, 2003).

#### 2.2.1.1. Σφαιρίνη

Η σφαιρίνη (το πρωτεϊνικό μέρος της αιμοσφαιρίνης) είναι μια πρωτεΐνη (λευκωματούχος ουσία), η οποία εντάσσεται στις ιστόνες. Παράγεται στα ριβοσώματα των ερυθρών αιμοσφαιρίων και αποτελείται από τέσσερις πεπτιδικές αλυσίδες (ανά δυο όμοιες μεταξύ τους), οι οποίες συμβολίζονται με τα μικρά γράμματα της ελληνικής αλφαβήτου (α, β, γ, δ, ε και ζ) σύμφωνα με την πρωτοταγή δομή (Ζαραλής, 2008).

Πιο συγκεκριμένα, όλες οι πεπτιδικές αλυσίδες έχουν *πρωτοταγή δομή*, η οποία καθορίζεται από το είδος, τη θέση και την σειρά των αμινοξέων στην πεπτιδική αλυσίδα. *Δευτεροταγή δομή*, η οποία καθορίζεται από τη συσπείρωση της αλυσίδας γύρω από τον εαυτό της. Η ελικοειδής αυτή συσπείρωση δεν εκτείνεται σε όλο το μήκος της αλυσίδας αλλά αφορά συγκεκριμένα τμήματα. *Τριτοταγή δομή*, η οποία ουσιαστικά είναι η στεριοχημική δομή της κάθε αλυσίδας στο χώρο. Για την δομή αυτή που παίρνει κάθε αλυσίδα ευθύνονται ισχυροί δεσμοί (μεταξύ των ελεύθερων χημικών ομάδων που ήρθαν σε επαφή ύστερα από τις αναδιπλώσεις της

αλυσίδας και *τεταρτοταγή δομή*, η οποία χαρακτηρίζει τη σύνδεση των α και β πεπτιδικών αλυσίδων στο χώρο (Χαλεβελάκης, 1991).

Κάθε α-αλυσίδα συνδέεται με δύο β-αλυσίδες. Η σύνδεση με την μια β-αλυσίδα είναι ισχυρότερη από τη σύνθεση με την άλλη. Η ισχυρή σύνδεση αναγράφεται ως σύνδεση  $\alpha_1\beta_1$  ή  $\alpha_2\beta_2$  και η χαλαρότερη ως σύνδεση  $\alpha_1\beta_2$  ή  $\alpha_2\beta_1$ . Η χαλαρή σύνδεση εξυπηρετεί τη δέσμευση και την αποδέσμευση του οξυγόνου από το μόριο της αιμοσφαιρίνης καθότι δίνει τη δυνατότητα στις αλυσίδες να αλλάζουν τις μεταξύ τους ανατομικές σχέσεις (Βοργιάς και Λαουτάρη, 1995).

Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες αιμοσφαιρίνης συντίθενται στα ερυθροβλαστικά ριβοσώματα, σύμφωνα με τη γενετική πληροφορία του πυρήνα του κυττάρου.

- **Οι α-αλυσίδες** κωδικοποιούνται από δυο όμοια γονίδια ( $\alpha_1$  και  $\alpha_2$ ), τα οποία βρίσκονται στο χρωμόσωμα 16, όπως και τα γονίδια για τη σύνθεση των ζ-αλυσών.
- **Οι β-αλυσίδες** κωδικοποιούνται από μοναδικό γονίδιο στο χρωμόσωμα 11, στην περιοχή όπου βρίσκονται και τα γονίδια ε, γ και δ.
- **Οι γ- και δ- αλυσίδες** κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία, όπως προαναφέρθηκε, βρίσκονται στο χρωμόσωμα 11. Για τις γ-αλυσίδες υπάρχουν δύο γονίδια, μεταξύ του ε- γονιδίου και ενός β-ψευδογονιδίου. Για τις δ-αλυσίδες υπάρχει μοναδικό γονίδιο, μεταξύ του β-γονιδίου και ενός β-ψευδογονιδίου. Αυτό έχει ως συνέπεια, σε πιθανή δυσλειτουργία ή έλλειψη κάποιου ή και των δύο β-γονιδίων, την αύξηση των γ-αλυσίδων με συνέπεια την αύξηση της HbF στο αίμα καθώς και την αύξηση των δ-αλυσίδων με συνέπεια την αύξηση της HbA<sub>2</sub> στο αίμα (Ηλιόπουλος, 1999).

#### 2.2.1.2. Αίμη

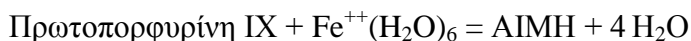
Η αίμη ή αλλιώς σιδηροπρωτοπορφυρίνη IX, είναι η ουσία που προκύπτει από την ένωση δισθενούς σιδήρου στο κέντρο της πρωτοπορφυρίνης IX<sup>4</sup>.

---

<sup>4</sup>Η πρωτοπορφυρίνη IX, συντίθεται μερικώς στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα των ερυθροκυττάρων κατά την ωρίμανσή τους (Μελέτης, 2003).

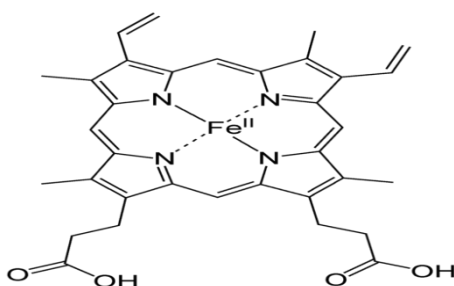


Η σύνθεσή της αρχίζει μέσα στο μιτοχόνδριο και ολοκληρώνεται πάλι μέσα σε αυτό. Συγκεκριμένα παράγεται στα εμπύρηνια ερυθρά και τα δικτυοερυθροκύτταρα (Τσερβένη και Γρίβα, 1999).



Είναι μια έντονη ερυθρά χρωστική και ανήκει στις πορφυρίνες. Αποτελείται από τέσσερα πυρόλια τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με μεθινικούς δεσμούς σχηματίζοντας έτσι τον πετραπολικό δακτύλιο της αίμης. Στο κέντρο του τετραπυρολικού δακτυλίου, βρίσκεται ο σίδηρος, ο οποίος συγκρατείται με δυο ισχυρούς και δυο ασθενέστερους δεσμούς μεταξύ αυτού και N-ομάδων (ομάδων αζώτου) (εικόνα 3) (Τσερβένη και Γρίβα, 1999).

Στην αιμοσφαιρίνη, η αίμη βρίσκεται μεταξύ δύο μορίων ιστιδίνης και η υποδοχή καλύπτεται από υδρόφοβα αμινοξέα. Το ένα μόριο ιστιδίνης συνδέεται με το σίδηρο της αίμης ενώ το άλλο δε συνδέεται άμεσα με το μόριο της αίμης και αντιστοιχεί ακριβώς απέναντι από το σημείο δέσμευσης οξυγόνου  $\text{O}_2$  (Ζαράλης, 2008).



Εικόνα 3. Δομή της αίμης (ανατύπωση από Τσερβένη και Γρίβα, 1999).

### 2.2.1.3 2,3-DPG

Το διφωσφορογλυκερινικό οξύ (2,3-DPG) αποτελεί παράγοντα κλειδί για τη διαδικασία δέσμευσης και αποδέσμευσης οξυγόνου ( $\text{O}_2$ ) με την αιμοσφαιρίνη. Ο Perutz χαρακτήρισε το διφωσφορογλυκερινικό οξύ «μοριακό πνεύμονα». Η σχέση του 2,3-DPG με το οξυγόνο χαρακτηρίζεται ανταγωνιστική ή αντίστροφα ανάλογη,

καθώς η αύξηση της συγκέντρωσης του 2,3-DPG οδηγεί σε ελάττωση της δεσμευτικής ικανότητας της αιμοσφαιρίνης σε οξυγόνο, ενώ η μείωση της συγκέντρωσης του 2,3-DPG προκαλεί αύξηση της δεσμευτικής ικανότητας της αιμοσφαιρίνης προς το οξυγόνο με αποτέλεσμα τον περιορισμό του ελεύθερου οξυγόνου στον οργανισμό (*Metha & Hoffbrand, 2009*). Πιο συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια δέσμευσης και αποδέσμευσης του οξυγόνου, οι β- αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης χαλαρώνουν τους δεσμούς. Επακόλουθο αποτέλεσμα είναι ότι, κατά την αποδέσμευση του οξυγόνου, οι β- αλυσίδες αποκολλώνται μεταξύ τους, επιτρέποντας την είσοδο του 2,3-DPG, εμποδίζοντας την σύνδεση οξυγόνου με την αιμοσφαιρίνη και την απόδοσή του στους ιστούς (*Kaplan et al., 2003*).

Έτσι, συμπεραίνεται ότι, είναι απαραίτητη η επαρκής συγκέντρωση 2,3-DPG, ώστε να δύναται η σωστή παροχή οξυγόνου στους ιστούς (*Metha & Hoffbrand, 2009*).

### **2.2.2. Η Σύνθεση**

Για την σύνθεση του μορίου της αιμοσφαιρίνης αρχικά είναι απαραίτητη η μετατροπή τρισθενή σιδήρου, σε δισθενή. Ο δισθενής πλέον σίδηρος εισέρχεται και συνδέεται στο κέντρο του μορίου της πρωτοπορφιρίνης IX, δημιουργώντας μόριο αίμης. Η αιμοσφαιρίνη προκύπτει από την ένωση της αίμης με αβ διμερή, τα οποία προκύπτουν από τις α- και β- αλυσίδες, ύστερα από την έξοδό τους από τα ριβοσώματα (*Zaralής, 2008*). Κάθε μόριο αιμοσφαιρίνης αποτελείται από δυο διμερή, συνδεδεμένα μεταξύ τους με δεσμό ασθενέστερο από αυτόν με τον οποίο συνδέονται οι α και β αλυσίδες, για το σχηματισμό του διμερούς. Συνοπτικά, η διαδικασία είναι η εξής: η γενετική πληροφορία για κάθε αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης, η οποία βρίσκεται στο αντίστοιχο χρωμόσωμα, υπόκειται σε μεταγραφή και μεταφέρεται στο πρωτόπλασμα υπό μορφή αγγελιοφόρου mRNA. Στη συνέχεια προσκολλάται στα ριβοσώματα και μεταφράζεται σε πολυπεπτιδική αλυσίδα. Οι αλυσίδες συναντούν τα μόρια της αίμης και συνδέονται, συγκροτώντας έτσι μόρια αιμοσφαιρίνης (*Σπανός, 2001*).

### 2.3. Ρόλος - Λειτουργίες

Το 97% περίπου του οξυγόνου μεταφέρεται στους ιστούς συνδεδεμένο με την αιμοσφαιρίνη, ενώ το υπόλοιπο 3% στο πλάσμα. Το O<sub>2</sub> συνδέεται χαλαρά και αμφίδρομα με το δισθενή σίδηρο (Fe<sup>++</sup>) της αιμοσφαιρίνης, ο οποίος μετατρέπεται σε τρισθενή. Ωστόσο, μετά την απόδοση του οξυγόνου επιστρέφει στη δισθενή του μορφή. Όσον αφορά τη μεταφορά του οξυγόνου, ένα μόριο αιμοσφαιρίνης μπορεί να μεταφέρει έως και τέσσερα μόρια οξυγόνου (*Zaralής, 2008*). Ύστερα από την ένωση της πρώτης αίμης με οξυγόνο, διευκολύνεται η πρόσληψη οξυγόνου και από τις άλλες μονάδες αίμης προοδευτικά και μέχρι τον πλήρη κορεσμό της αιμοσφαιρίνης (*www.medlook.net*).

Ο αέρας που εισέρχεται στους πνεύμονες μέσω της αναπνοής είναι πλούσιος σε οξυγόνο<sup>5</sup>. Λόγο διαφοράς μερικής πίεσης μεταξύ του οξυγόνου στις κυψελίδες και μερικής πίεσης του αίματος στα τριχοειδή, το οξυγόνο διαχέεται στο αίμα και δεσμεύεται από την αιμοσφαιρίνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων (*Παπακωνσταντίνου, 2003*). Στη συνέχεια, με την κυκλοφορία του αίματος, μεταφέρεται στους ιστούς. Για την επαρκή μεταφορά και απόδοση του οξυγόνου, η χημική συγγένειά του με την αιμοσφαιρίνη αν είναι πολύ ασθενής δεν θα οξυγονώνεται επαρκώς το αίμα. Αντίθετα, αν είναι ιδιαίτερα ισχυρή δε δύναται η επαρκής απόδοσή του στους ιστούς, ώστε αυτοί να πραγματοποιήσουν τις καύσεις τους (*Τσερβένη και Γρίβα, 1999*).

Σε κάθε μόριο φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης HbA (α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>) οι αλυσίδες α-συνδέονται με τις β- με μια χαλαρή και με μια ισχυρότερη σύνδεση, ενώ ο δεσμός μεταξύ όμοιων αλυσίδων είναι πολύ πιο χαλαρός. Κατά την δέσμευση του οξυγόνου οι β- αλυσίδες «γλιστρούν» πάνω στις α- αλυσίδες και στρέφονται ελαφρά πάνω σε αυτές. Καθ' αυτόν τον τρόπο διευρύνεται το αιμοσφαίριο και γίνεται ευκολότερα η διείσδυση του οξυγόνου στα μόρια της αίμης (αλλαγή της τρισδιάστατης δομής της Hb).

---

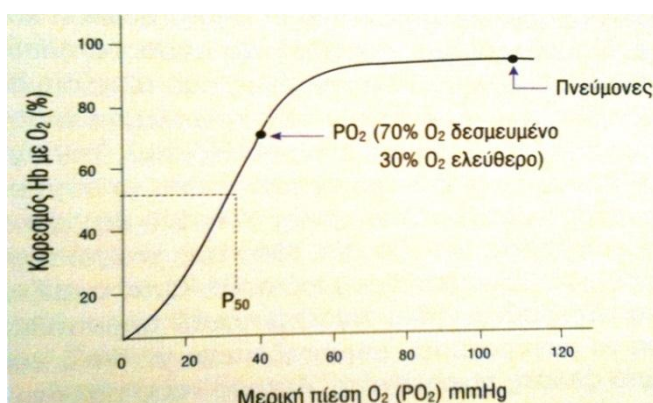
<sup>5</sup>Η μερική πίεση του εισπνεόμενου οξυγόνου (pO<sub>2</sub>) είναι 149 mmHg (*Μελέτης, 2003*).

Ομοίως, κατά την αποδέσμευση του οξυγόνου, οι β- αλυσίδες με αντίθετες κινήσεις επανέρχονται στις αρχικές τους θέσεις (Metha & Hoffbrand, 2009).

Πέρα όμως από αυτή τη χαρακτηριστική ιδιότητα των αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης, η δέσμευση του οξυγόνου ευνοείται και από τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Η ιδιαίτερα αυξημένη συγκέντρωση οξυγόνου στους πνεύμονες, η αυξημένη μερική πίεση του  $pCO_2$  στα ερυθροκύτταρα και το αλκαλικό pH, σε σχέση με την διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ πνευμόνων και τριχοειδών, αποτελούν βασικούς παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν άμεσα την δέσμευση του οξυγόνου από τα μόρια Hb. Ομοίως, για την αποδέσμευση του οξυγόνου στους ιστούς ιδιαίτερη σημασία έχει το φτωχό σε  $O_2$  περιβάλλον των ιστών, η αυξημένη  $pCO_2$  του περιβάλλοντος, η ελαττωμένη  $pCO_2$  στο εσωτερικό των ερυθροκυττάρων καθώς και το όξινο περιβάλλον.

Ο μηχανισμός δέσμευσης και αποδέσμευσης του οξυγόνου, χαρακτηρίζεται και ως σιγμοειδής καμπύλη (καμπύλη κορεσμού της αιμοσφαιρίνης με  $O_2$  ή καμπύλη S) (εικόνα 4). Η μορφή της καμπύλης οφείλεται στις μεταβολές που υφίσταται κάθε μόριο αιμοσφαιρίνης, λόγω της παρουσίας των δυο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλύσεων. Οι δυο συντεταγμένες της γραφικής παράστασης απεικονίζουν τον % κορεσμό της Hb (% οξυαιμοσφαιρίνη) σε σχέση με την οριζόντια μερική πίεση του οξυγόνου σε mmHg που επικρατεί στο περιβάλλον της Hb.

Ο κορεσμός του αρτηριακού αίματος σε  $O_2$  πλησιάζει το 100% στους πνεύμονες, ενώ στο φλεβικό αίμα, ο κορεσμός είναι περίπου 70% (Μελέτης, 2003).



Εικόνα 4. Φυσιολογική καμπύλη αποδέσμευσης οξυγόνου (ανατύπωση από Σπανός, 2001).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ποσότητα του O<sub>2</sub> που δεσμεύεται και αποδεσμεύεται κάθε φορά εξαρτάται από την μερική πίεση που επικρατεί στο περιβάλλον της Hb (εικόνα 3).

- Στις κυψελίδες των πνευμόνων όπου pO<sub>2</sub> > 60 mmHg, έχουμε πλήρη κορεσμό και η καμπύλη είναι σχεδόν επίπεδη.
- Στους ιστούς όταν η pO<sub>2</sub> είναι περίπου 60-20 mmHg, η συγγένεια προς το οξυγόνο ελαττώνεται και η καμπύλη στο εύρος αυτό είναι ιδιαίτερα απότομη.
- Στους ιστούς όταν η pO<sub>2</sub> < 20 mmHg, η αιμοσφαιρίνη έχει χαμηλή συγγένεια προς το οξυγόνο (Σπανός, 2001).

Ωστόσο, μετατόπιση της καμπύλης κορεσμού της αιμοσφαιρίνης προς το οξυγόνο, παρατηρείται είτε προς τα δεξιά (αυξημένη συγγένεια), είτε προς τα αριστερά (ελαττωμένη συγγένεια). Μετατόπιση της καμπύλης προς τα δεξιά παρατηρείται όταν σε περιβάλλον υψηλότερων πιέσεων οξυγόνου έχουμε P<sub>50</sub> (χημική συγγένεια αιμοσφαιρίνης προς οξυγόνο)<sup>6</sup>. Αυτή η δεξιά μετατόπιση, υποδηλώνει μειωμένη χημική συγγένεια της αιμοσφαιρίνης (Hb) προς το O<sub>2</sub>, άρα περισσότερο ελεύθερο οξυγόνο. Αντίθετα, αριστερή μετατόπιση παρατηρείται όταν έχουμε P<sub>50</sub> σε περιβάλλον χαμηλής πίεσης σε οξυγόνο. Αυτές οι μετακινήσεις, οφείλονται στις αλλαγές στη δομή της αιμοσφαιρίνης (Βοργιάς και Λαουτάρη, 1995).

Αρκετοί είναι οι παράγοντες οι οποίοι είναι ικανοί να αλλοιώσουν τη συγγένεια του αίματος του ανθρώπου προς το οξυγόνο. Οι κυριότεροι είναι η θερμοκρασία, το pH, και το 2-3 DPG. Κατά πολύ λιγότερο οι παράγοντες ATP και CO<sub>2</sub>, (Τσερβένης και Γρίβα, 1999).

Ικανή να αλλοιώσει τη συγγένεια του αίματος του ανθρώπου προς το οξυγόνο είναι και οι διάφορες μεταβολές της θερμοκρασίας του σώματος.

---

<sup>6</sup> Το P<sub>50</sub> είναι η πίεση του οξυγόνου στην οποία η αιμοσφαιρίνη είναι κορεσμένη κατά 50% με O<sub>2</sub> (Mario et al., 1999).

Σε αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται απελευθέρωση του οξυγόνου από την αίμη, με άμεσο αποτέλεσμα τη μετατόπιση της καμπύλης προς τα δεξιά. Αντίθετα, σε πτώση της θερμοκρασίας έχουμε μετακίνηση της καμπύλης προς τα αριστερά (Μελέτης, 2003).

Το 2-3 DPG έχει ανταγωνιστική συμπεριφορά προς το οξυγόνο. Έχει την τάση να συνδέεται στο κέντρο του μορίου της αιμοσφαιρίνης και να απομακρύνεται μόλις αυτή δεσμεύσει  $O_2$ . Τυχόν έλλειμμα ή μεταλλαγή αμινοξέος στην ειδική θέση σύνδεσης του 2-3 DPG (όπως στην περίπτωση της HbF της νεογνικής ηλικίας) έχει ως συνέπεια την αλλοίωση της συγγένειας της αιμοσφαιρίνης προς το οξυγόνο και φυσικά την απόδοσή του στους ιστούς. Το ATP είναι επίσης πολύ σημαντικό γιατί παρέχει την κατάλληλη κινητική ενέργεια στο ερυθρό αιμοσφαίριο. Παράλληλα, βοηθά στη συντήρηση της αντλίας καλίου ( $K^+$ ) νατρίου ( $Na^{++}$ ) (Kaplan et al., 2003).

Η αιμοσφαιρίνη εκτός από οξυγόνο μεταφέρει και διοξείδιο του άνθρακα (καρβοαιμοσφαιρίνη ή άνθρακοαιμοσφαιρίνη) (Βοργιάς και Λαουτάρη, 1995). Το αίμα που περιέχει ανθρακοαιμοσφαιρίνη έχει πιο σκούρο χρώμα από το αρτηριακό και ονομάζεται φλεβικό. Από τους ιστούς, όπου απάγεται το  $CO_2$ , η καρβοξυαιμοσφαιρίνη οδηγείται προς τους πνεύμονες όπου και διασπάται με αποτέλεσμα την απομάκρυνσή του  $CO_2$  από τον οργανισμό. Το  $CO_2$  είναι τοξικό για τον ανθρώπινο οργανισμό και μεταφέρεται μέσω του πλάσματος (Ζαράλης, 2008). Το μόριο της αιμοσφαιρίνης φέρει στην επιφάνειά καρβοξυλ- ( $-COOH$ ) και αμινο- ( $-NH_2$ ) ομάδες, οι οποίες της «χαρίζουν» την αμφοτερική ιδιότητα που τη διακρίνει. Άλλοτε να δρα ως οξύ και άλλοτε ως βάση. Στην ύπαρξη πολλών τέτοιων ομάδων, οφείλεται η συμβολή της αιμοσφαιρίνης στη διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας του αίματος (Ηλιόπουλος, 1999).

Η μη οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη, παρουσιάζει μεγαλύτερη δεσμευτική ικανότητα ως προς το  $CO_2$  σε σύγκριση με την οξυαιμοσφαιρίνη (Χαλεβελάκης, 1991). Επίσης, ως βάση είναι ισχυρότερη έναντι της οξυαιμοσφαιρίνης και αυτό την καθιστά ικανή να δεσμεύεται πιο εύκολα τα ιόντα υδρογόνου ( $H^+$ ) που σχηματίζονται λόγω των αυξημένων επιπέδων  $CO_2$  στο αίμα. Αντίθετα, η οξυαιμοσφαιρίνη ελευθερώνει το  $O_2$ , που μεταφέρει, στους ιστούς ενώ δεσμεύει το

CO<sub>2</sub> το οποίο μέσα στο ερυθρό ενώνεται με μόρια νερού και οδηγεί σε σχηματισμό ανθρακικού οξέος (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Στη συνέχεια η μη οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη δρα ως βάση δεσμεύοντας κατιόντα υδρογόνου (H<sup>+</sup>), ενώ παράλληλα συμβάλλει στη μείωση του ανθρακικού οξέος που έχει σχηματιστεί στο ερυθρό αιμοσφαίριο. Ο τελικός σχηματισμός διττανθρακικών ιόντων μέσα στο ερυθροκύτταρο δημιουργεί διαφορά συγκέντρωσης μεταξύ κυττάρου και πλάσματος, η οποία οδηγεί σε διάχυση των διττανθρακικών ιόντων στο πλάσμα. Καθώς το ερυθρό αιμοσφαίριο επιστρέφει στους πνεύμονες η αιμοσφαιρίνη μετατρέπεται ξανά σε οξυαιμοσφαιρίνη, η οποία είναι ένα ισχυρό οξύ, προκαλώντας έτσι την μετατροπή του ανθρακικού οξέος σε νερό (υδρατμούς) και σε CO<sub>2</sub>, το οποίο στη συνέχεια απομακρύνεται από τους πνεύμονες με τη διαδικασία της εκπνοής (Metha & Hoffbrand,2009).

#### 2.4. Παράγωγα της αιμοσφαιρίνης

Σε ορισμένες περιπτώσεις η αιμοσφαιρίνη μεταβάλλεται με άμεσο αποτέλεσμα τη δημιουργία ανώμαλων, μη λειτουργικών σχηματισμών όπως είναι η μεθαιμοσφαιρίνη, η θειαμίνη και η ανθρακυλαιμοσφαιρίνη. Συνέπεια της εμφάνισης όλων αυτών των παραγώγων είναι η διαταραχή της φυσιολογικής κατάστασης του οργανισμού.

- ✓ Μεθαιμοσφαιρίνη ή αμινοσφαιρίνη, είναι το παράγωγο της αιμοσφαιρίνης το οποίο προκύπτει, από φυσιολογικές μεταβολικές δραστηριότητες, ύστερα από την οξείδωση του δισθενή σιδήρου της αίμης σε τρισθενή. Η ένωση αυτή αδυνατεί να δεσμεύσει το ελεύθερο οξυγόνο στο αίμα.
- ✓ Θειοαιμοσφαιρίνη, είναι αποτέλεσμα της προσθήκης υδρόθειου στην αιμοσφαιρίνη. Έχει διαπιστωθεί ότι για την οξείδωση της αιμοσφαιρίνης σε θειοαιμοσφαιρίνη οφείλονται αντιδράσεις που προκαλούνται από χορήγηση χημικών ουσιών π.χ. φαρμάκων. Επίσης, η άχρηστη θειοαιμοσφαιρίνη παραμένει στο ερυθροκύτταρο 120 μέρες (διάρκεια ζωής των

ερυθροκυττάρων) και καθώς υπερβεί την φυσιολογική αιμοσφαιρίνη κατά 20%, έχουμε εκδήλωση κυάνωσης.

- ✓ Ανθρακυλαιμοσφαιρίνη, είναι ο σχηματισμός της ένωσης της αιμοσφαιρίνης με μονοξείδιο του άνθρακα (CO). Υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται στο αίμα κατά <1%. Η συγγένεια της αιμοσφαιρίνης για το CO είναι 200 φορές μεγαλύτερη της αντίστοιχης για το O<sub>2</sub>. Η έκθεση ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις CO θέτει εκτός λειτουργίας (μεταφοράς οξυγόνου) ένα σημαντικό ποσό της αιμοσφαιρίνης, με αποτέλεσμα την ασφυξία (Ζαραλής, 2003).

## 2.5. Φυσιολογικές τιμές

Οι φυσιολογικές τιμές της αιμοσφαιρίνης διαφέρουν από άτομο σε άτομο ανάλογα το φύλλο και την ηλικία (πίνακας 1). Η τιμή της αιμοσφαιρίνης<sup>7</sup> έχει μεγάλη διαγνωστική αξία καθώς μπορεί να αποτελέσει στοιχείο διαπίστωσης αναιμίας.

**Πίνακας 1. Οι τιμές της αιμοσφαιρίνης, στα διάφορα στάδια της ζωής (ανατύπωση από Παπακωνσταντίνου, 2003).**

Νεογνά	16,0 – 20,0 g/dL
1 Έτους	11,2 - 14,0 g/dL
3 Ετών	11,2 – 12,5 g/dL
10 Ετών	12,5 – 13,0 g/ dL
Ενήλικες Άνδρες	13,5 – 18,0 g/ dL
Ενήλικες Γυναίκες	12,5 – 16,0 g/dL

<sup>7</sup>Η τιμή της αιμοσφαιρίνης εκφράζεται σε γραμμάρια (gr) ανά 100 ml αίματος (Παπακωνσταντίνου, 2003).



Γενικά, οι τρεις φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες του ενήλικα απαντώνται, υπό φυσιολογικές συνθήκες και σε υγιή άτομα, με την ακόλουθη αναλογία HbA=97%, HbA<sub>2</sub><3% και HbF<2% (Παπακωνσταντίνου, 2003).

Ωστόσο, ελαφρά ελαττωμένη αιμοσφαιρίνη μπορεί να οφείλεται σε α) σε ύπαρξη α-θαλασσαιμίας, β) σε κληρονομική παραμονή αιμοσφαιρίνης HbF, γ) σε ύπαρξη ετερόζυγης αιμοσφαιρινοπάθειας Lepore, δ) σε ύπαρξη σιδηροπενικής αναιμίας και ε) σε ύπαρξη απλαστικής αναιμίας. Αντίθετα, ελαφρώς αυξημένα επίπεδα αιμοσφαιρίνης ανιχνεύονται α) σε ομόζυγη β-θαλασσαιμία, β) σε ορισμένες λευχαιμίες και γ) σε μεγαλοβλαστικές αναιμίες. Αρκετά αυξημένη HbA διαπιστώνεται σε ετερόζυγη β-θαλασσαιμία, ενώ σε ανίχνευση αρκετά αυξημένης HbA<sub>2</sub>, ενδείκνυται η παρουσία και άλλων αιμοσφαιρινών όπως Hb C, E κτλ. οι οποίες εκλούνται μαζί με την HbA<sub>2</sub> και είναι αδύνατο να διαχωριστούν ([www.nih.gov](http://www.nih.gov)).

Επίσης, αυξημένα επίπεδα HbF μπορεί να οφείλονται σε ομόζυγη β-θαλασσαιμία, σε κληρονομική παραμονή της αιμοσφαιρίνης F (HPFH), σε δρεπανοκυτταρική αναιμία, σε ύπαρξη αιμοσφαιρινοπαθειών όπως SC, C, E ενώ ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα παρατηρούνται σε ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. Όμως σε νεογνά (φυσιολογικά ή πρόωρα), από τη γέννησή τους έως και 1 με 3 μήνες μετά, εμφανίζουν σταδιακή μείωση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης (Hb), περίπου 9%. Έτσι, η μη επαρκής ποσότητα αιμοσφαιρίνης μαζί με τις αυξημένες ανάγκες τους σε οξυγόνο, έχουν ως αναπόφευκτο επακόλουθο την εκδήλωση συμπτωμάτων αναιμίας (Okpala, 2004).

## 2.6. Φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες

Μια αιμοσφαιρίνη χαρακτηρίζεται ως φυσιολογική, όταν η συνθετική διαδικασία και των δυο μερών που την αποτελούν (πρωτεϊνικό και μη πρωτεϊνικό) ακολουθεί, τους προδιαγραμμένους, από γονιδιακούς κώδικες, κανόνες και οι οποίοι

αφορούν την ενζυμική βιοσυνθετική αλυσίδα για την αίμη και την αλληλουχία (θέση και αριθμό) των αμυνοξέων για τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες (Ζαραλής, 2008).

Οι φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες διακρίνονται σε α) εμβρυικές και β) στις εξωμήτριες (που παράγονται σε όλη τη διάρκεια της ζωής). Αναλυτικότερα, κατά τους 3 πρώτους μήνες της ενδομήτριο ζωής εμφανίζονται οι γνωστές και ως εμβρυονικές ή πρωτοεμβρυικές αιμοσφαιρίνες α) Hb Gower-1 με 2ε και 2ζ αλυσίδες, β) Hb Portland-1 με 2γ και 2ζ αλυσίδες και γ) Hb Gower-2 με 2α και 2ε αλυσίδες. Μετά το πρώτο τρίμηνο της εμβρυικής ζωής οι ε και ζ αλυσίδες αδρανοποιούνται, ενώ την θέση τους παίρνουν οι α και β αλυσίδες. Έτσι, στη μετέπειτα ζωή (από τον τρίτο εμβρυικό μήνα ως το τέλος της ζωής) εμφανίζονται οι HbA αιμοσφαιρίνη με 2α και 2β αλυσίδες ( $\alpha_2\beta_2$ ), HbF ή αιμοσφαιρίνη fetus(έμβρυο) με 2α και 2γ αλυσίδες ( $\alpha_2\gamma_2$ ) και η HbA<sub>2</sub> με 2α και 2δ αλυσίδες ( $\alpha_2\delta_2$ ). Σημειώνεται ότι η φυσιολογική ποσοστιαία αναλογία των αιμοσφαιρινών από τον έκτο μήνα της εξωμήτριο ζωής είναι: HbA=97%, HbF περίπου <3% και HbA<sub>2</sub> περίπου <2% (*www.nih.gov*).

Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση της αιμοσφαιρίνης HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) ξεκινά από το δεύτερο εμβρυικό μήνα (όταν ξεκινά η σύνθεση των β αλυσίδων) και ως τη γέννηση αποτελεί το 20% της ολικής αιμοσφαιρίνης του νέου ατόμου. Σταδιακά αυξάνεται ως τους πρώτους 6 μήνες την ζωής όπου πλέον αποτελεί το 97% της ολικής αιμοσφαιρίνης<sup>8</sup> (Ζαραλής 2008, Μελέτης 2003). Αντίθετα, η αιμοσφαιρίνη HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) ξεκινά να παράγεται από την έναρξη της παραγωγής των γ-αλυσίδων. Στη συνέχεια και ειδικότερα μετά του 3 πρώτους μήνες της κύησης αποτελεί την κύρια αιμοσφαιρίνη. Από τον όγδοο μηνά και ύστερα αρχίζει να μειώνεται ενώ αυξάνεται η HbA (Μελέτης, 2003).

Στους ενήλικες, αυξημένη HbF ανιχνεύεται σε ορισμένες κληρονομικές αιμολυτικές αναιμίες π.χ. β-θαλασσαιμία, δρεπανοκυτταρική αναιμία είτε σε επίκτητες όπου εκδηλώνεται με διαταραχές του πολλαπλασιασμού των πρόδρομων ερυθροκυττάρων.

---

<sup>8</sup>Η αιμοσφαιρίνη HbA αντικαθιστά την HbF με ακόμα πιο αργούς ρυθμούς, σε περίπτωση ετερόζυγης β-μεσογειακής αναιμίας (Ζαραλής, 2008).

Το 7% των ερυθρών αιμοσφαιρίων φέρει αιμοσφαιρίνη F και καλούνται F-κύτταρα<sup>9</sup>. Αύξηση των F-κύτταρων (και συνεπώς αύξηση της HbF αιμοσφαιρίνης) παρατηρείται σε κληρονομική παραμονή της HbF στον οργανισμό. Γενικότερα, η αιμοσφαιρίνη HbF σε σχέση με την HbA είναι ανθεκτικότερη σε αλκαλικά διαλύματα και δεσμεύει ευκολότερα το οξυγόνο (ακόμα και σε χαμηλότερη pO<sub>2</sub>) καθώς έχει μεγαλύτερη συγγένεια προς το οξυγόνο από ότι η HbA. Το τελευταίο στοιχείο είναι που την κάνει απαραίτητη κατά την κύηση, αφού μεταφέρει ταχύτερα το οξυγόνο από τη μητέρα στο έμβρυο. Βέβαια η HbF αποδεσμεύει δυσκολότερα το οξυγόνο στους ιστούς του εμβρύου (*Metha & Hoffbrand,2009*).

## **2.7. Κληρονομικές διαταραχές στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης (παθολογικές αιμοσφαιρίνες)**

Παθολογικές αιμοσφαιρίνες (πίνακας 2) προκύπτουν ύστερα από γενετικό λάθος στις α- ή στις β- ή στις γ- ή στις δ- αλυσίδες, τις οποίες φέρει το μόριο της εκάστοτε αιμοσφαιρίνης. Οποιαδήποτε διαταραχή της αιμοσφαιρίνης δύναται να οδηγήσει σε εμφάνιση αναιμίας. Οι διαταραχές αυτές, οφείλονται σε ανωμαλίες στη σύνθεση της αίμης «πορφυρίες», είτε σε ανωμαλίες στη σύνθεση των σφαιρινικών αλυσίδων οι οποίες διακρίνονται σε *ποιοτικές* και χαρακτηρίζονται ως «αιμοσφαιρινοπάθειες» και σε *ποσοτικές*, τις οποίες καλούμε «θαλασσαιμίες». Ταυτόχρονη παρουσία ποσοτικής και ποιοτικής ανωμαλίας της Hb, συνιστά τις θαλασσαιμικές αιμοσφαιρινοπάθειες (π.χ. Hb Lepore) (*Ζαραλής 2008, Μελέτης 2003*).

---

<sup>9</sup>Στο μικροσκόπιο, τα F-κύτταρα εμφανίζονται με έντονο κόκκινο χρώμα όταν είναι γεμάτα με HbF, ενώ τα άλλα (χωρίς HbF) φαίνονται ρόδινα (*www.medlook.net*).

**Πίνακας 2. Ορισμένες παθολογικές αιμοσφαιρίνες (ανατύπωση από Ζαραλής, 2008).**

<b>Όνομα αιμοσφαιρίνης</b>	<b>Ανωμαλία</b>	<b>Αλυσίδες</b>	<b>Κύρια χαρακτηριστικά</b>
Hb S	Αντικατάσταση αμινοξέος	2α+2β	Μειωμένη διαλυτότητα της οξυαιμοσφαιρίνης, σχηματισμός δρεπανοκυττάρων, αιμολυτική αναιμία, αγγειοαπογραφικές εκδηλώσεις
Hb C	Αντικατάσταση αμινοξέος	2α+2β	Ετεροζυγώτες ασυμπτωματικοί, ομοζυγώτες ήπια αναιμία, σχηματισμός κρυστάλων
Hb C Harlem	Αντικατάσταση αμινοξέος	2α+2β	
Hb D	Αντικατάσταση αμινοξέος	2α+2β	Μέτρια αναιμία
Hb E	Αντικατάσταση αμινοξέος	2α+2β	Ήπια μικροκυτταρική υποχρωμία
Hb Knossos	Αντικατάσταση αμινοξέος	2α+2β	
Hb Köln	Αντικατάσταση αμινοξέος	2α+2β	Ασταθής αιμοσφαιρίνη, αιμολυτική αναιμία, σωμάτια του Heinz μετά σπληνεκτομή
Hb Yakima	Αντικατάσταση αμινοξέος	2α+2β	Αυξημένη συγγένεια με το οξυγόνο, ερυθροκυττάρωση
Hb Kansas	Αντικατάσταση αμινοξέος	2α+2β	Μειωμένη συγγένεια με το οξυγόνο, ήπια αναιμία

Hb Gun Hill	Έλλειψη αμινοξέος	$2\alpha+2\beta$	Ασταθής αιμοσφαιρίνη, αδυναμία σύνδεσης με την αίμη, ορθοκυτταρική αναιμία με χαμηλή MCHC
Hb Leslie	Έλλειψη αμινοξέος	$2\alpha+2\beta$	Ασταθής αιμοσφαιρίνη
Hb Lyon	Έλλειψη αμινοξέος	$2\alpha+2\beta$	Ασταθής αιμοσφαιρίνη
Hb Mc Kees Rocks	Έλλειψη αμινοξέος	$2\alpha+2\beta$	
Hb Constant Spring	Επιμήκυνση $\alpha$ αλυσίδας	$2\alpha cs+2\beta$	Ισοδυναμεί με $\alpha$ -θαλασσαιμία
Hb Wayne	Επιμήκυνση $\alpha$ αλυσίδας	$2\alpha w+2\beta$	
Hb Grady	Αύξηση αριθμού αμινοξέων	$2\alpha+2\beta$	
Hb Lepore	Διαφορετικές δομές των άκρων	$2\alpha+2\delta\beta$	
Hb anti-Lepore	Διαφορετικές δομές των άκρων	$2\alpha+2\beta\delta$	
Hb Kenya	Διαφορετικές δομές των άκρων	$2\alpha+2\gamma A\beta$	
Hb anti-Kenya	Διαφορετικές δομές των άκρων	$2\alpha+2\beta\gamma A$	
Hb H	Μόνο $\beta$ αλυσίδες	$4\beta$	Αυξημένη συγγένεια με το οξυγόνο, ερυθροκυττάρωση
Hb Bart's	Μόνο $\gamma$ αλυσίδες	$4\gamma$	Αυξημένη συγγένεια με το οξυγόνο, ερυθροκυττάρωση
Hb D-Punjab	Αντικατάσταση αμινοξέος	$2\alpha+2\beta$	
Hb G-Ferrara	Αντικατάσταση	$2\alpha+2\beta$	

	αμινοξέος		
Hb Setif	Αντικατάσταση αμινοξέος	$2\alpha+2\beta$	
Hb Boston	Αντικατάσταση αμινοξέος	$2\alpha+2\beta$	Μεθαμιοσφαιρίναιμια
Hb O-Thrace	Αντικατάσταση αμινοξέος	$2\alpha+2\beta$	

### 3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

#### 3.1. Γενικά για την ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι η τεχνική που χρησιμοποιείται για τον κλασματικό διαχωρισμό των φορτισμένων σωματιδίων ενός δείγματος, όταν αυτό βρεθεί υπό την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος. Η τεχνική βασίζεται στο ηλεκτρικό φαινόμενο το οποίο πρώτος παρατήρησε το 1807, ο Reuss (Πανεπιστήμιο Μόσχας). Ο Reuss διαπίστωσε ότι η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στο νερό, προκαλεί μη τυχαία, αλλά κατευθυνόμενη μετακίνηση (προς την άνοδο ή την κάθοδο) των διάσπαρτων φορτισμένων σωματιδίων του, ανάλογα με το καθαρό φορτίο τους ([www.medlook.net](http://www.medlook.net)). Οι αιμοσφαιρίνες ως πρωτεΐνες φέρουν ηλεκτρικό φορτίο που απορρέει από την αμινοξική τους σύσταση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνησή τους προς το θετικό πόλο όταν βρεθούν μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο και σε αλκαλικό pH (*Kaplan et al., 2003*). Από τις αιμοσφαιρίνες του ενήλικα, η HbA έχει τη μεγαλύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Πίσω από αυτή κινείται η HbF, ενώ τελευταία η HbA<sub>2</sub> κινείται ελάχιστα, κοντά στο σημείο εναπόθεσης του αιμολήματος (*Zaralής, 2008*).

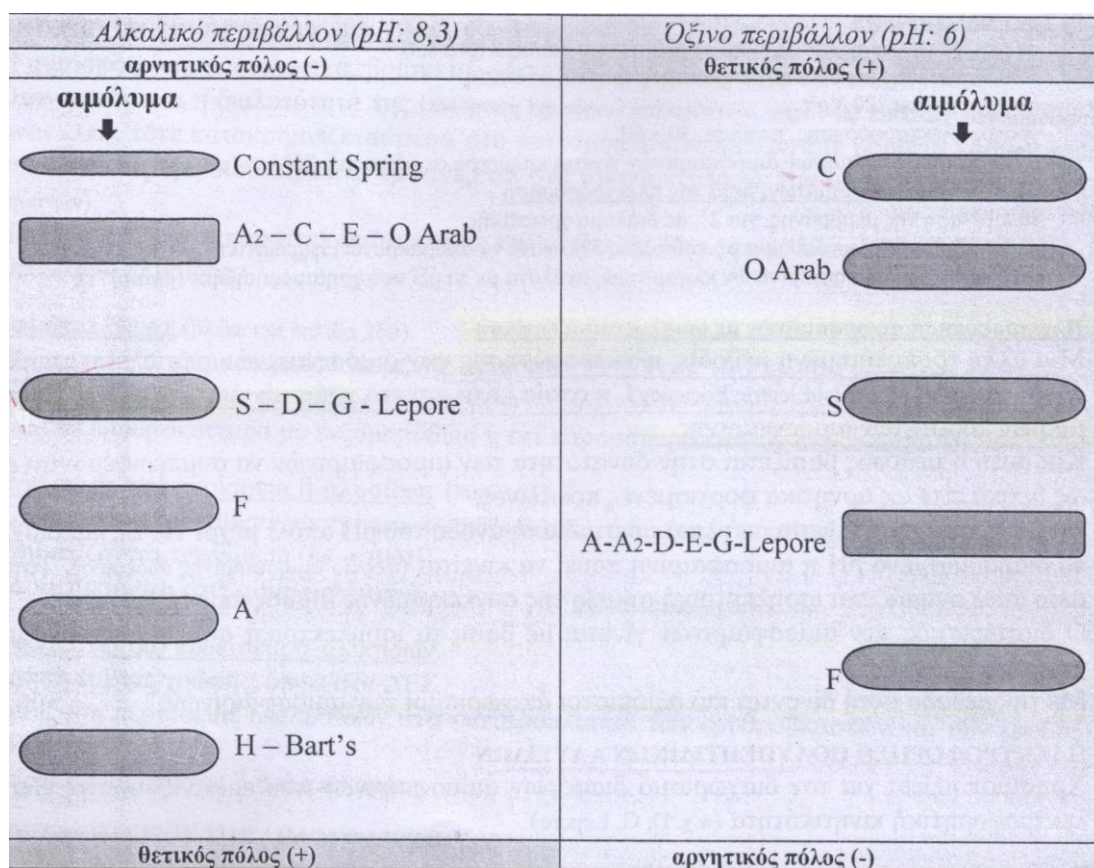
#### 3.2. Αρχή ηλεκτροφόρησης της αιμοσφαιρίνης

Η αρχή της ηλεκτροφόρησης της αιμοσφαιρίνης βασίζεται στην ύπαρξη των ελεύθερων αμινικών (NH<sub>2</sub>) και καρβοξυλικών (COOH<sup>-</sup>) ομάδων των αμινοξέων, τα οποία φέρει στο μόριό της (*Kaplan et al., 2003*). Ως γνωστό, η αιμοσφαιρίνη (φυσιολογική και παθολογική) είναι μία πρωτεΐνη (λευκωματούχος ουσία) η οποία φέρει ηλεκτρικό φορτίο και εμφανίζει αμφολυτική ιδιότητα<sup>10</sup>. Έχει την ικανότητα να μετακινείται προς το θετικό πόλο (άνοδο) όταν βρεθεί σε αλκαλικό pH, ενώ μεταναστεύει στον αρνητικό πόλο (κάθοδο) όταν βρεθεί σε όξινο περιβάλλον. Σε περίπτωση μεταλλαγής ενός και μόνο αμινοξέος στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες των

---

<sup>10</sup> Αμφολυτική ιδιότητα είναι, η συμπεριφορά μιας ουσίας άλλοτε ως οξύ και άλλοτε ως βάση, ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται (*Kaplan et al., 2003*).

αιμοσφαιρινών, μεταβάλλεται το ηλεκτρικό τους φορτίο με άμεσο αποτέλεσμα τη μεταβολή της κινητικότητας της αιμοσφαιρίνης προς την άνοδο και προς την κάθοδο, σύμφωνα με το ηλεκτρικό φορτίο της (Χαλεβελάκης, 1991). Κατ' επέκταση, ο διαχωρισμός των διαφόρων αιμοσφαιρινικών κλασμάτων οδηγεί σε διαπίστωση της παρουσίας ή απουσίας συγγενούς αιμοσφαιρινοπάθειας (Τσερβένη και Γρίβα, 1999). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των αιμοσφαιρινών εξαρτάται από το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση (εικόνα 4) (Χαλεβελάκης, 1991).



Εικόνα 4. Ενδεικτικές εικόνες ηλεκτροφόρησης ορισμένων αιμοσφαιρινών σε αλκαλικό και όξινο pH (ανατύπωση από Ζαραλής, 2008).



### 3.3. Βασικά στάδια ηλεκτροφορητικής τεχνικής

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης της αιμοσφαιρίνης περιλαμβάνει τα εξής:

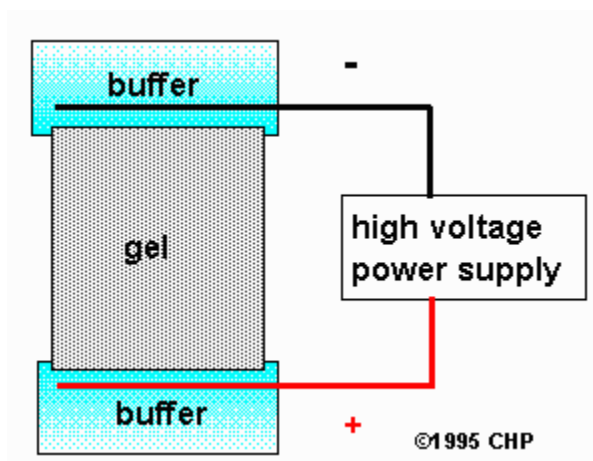
✓ Την παρασκευή αιμόλυματος. Ύστερα από λήψη 2ml αίματος με αντιπηκτικό EDTA, το αίμα φυγοκεντρείται. Τα ερυθροκυττάρια τοποθετούνται σε σωληνάριο και πλένονται. Προστίθεται αποσταγμένο νερό (1/10 της ποσότητας της Hb του αίματος) στο ίζημα των ερυθροκυττάρων και ακολουθεί φυγοκέντριση στις 2000 στροφές/λεπτό για διάρκεια 5 λεπτών, μέχρι να αιμολυθούν τα πλυμένα ερυθρά αιμοσφαίρια και απελευθερωθεί η αιμοσφαιρίνη. Το αιμόλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο έως 24 ώρες (*Westermeier et al., 2001*).

✓ Την ηλεκτροφόρηση, προς διαχωρισμό των κλασμάτων της αιμοσφαιρίνης. Το στάδιο αυτό διαφέρει από μέθοδο σε μέθοδο, ανάλογα με το υλικό που χρησιμοποιείται ως αγωγός (ηλεκτροφορητικό μέσο) μεταξύ των δυο πόλων της ηλεκτροφορητικής συσκευής και του pH, στο οποίο πραγματοποιείται η τεχνική. Γενικά, τοποθετείται στην ειδική ηλεκτροφορητική συσκευή το ηλεκτροφορητικό μέσο, το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, καθώς επίσης σταγόνα αιμόλυματος και στη συνέχεια εφαρμόζεται συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα. Με την εφαρμογή του ρεύματος προκύπτει διαχωρισμός των κλασμάτων της αιμοσφαιρίνης. Ο χρόνος ηλεκτροφόρησης είναι διαφορετικός για την εκάστοτε μέθοδο (*Kaplan et al., 2003*).

✓ Την χρώση των ηλεκτροφορητικών κλασμάτων. Αυτή πραγματοποιείται μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, με τη χρήση ειδικής χρωστικής ουσίας (διαφορετική για κάθε τεχνική) οπότε είναι πλέον εφικτή η ανάγνωση των αποτελεσμάτων (*Χαλεβελάκης, 1999*). Σε ένα φυσιολογικό ηλεκτροφορογράφημα εμφανίζονται δυο κλάσματα τα οποία είναι η HbA και η HbA<sub>2</sub>, ενώ η παρουσία του κλάσματος της HbF δεν είναι εμφανής (A<sub>2</sub>, F<2% ,A). Σε αντίθετη περίπτωση, όπου το κλάσμα της αιμοσφαιρίνης F είναι εμφανές στο ηλεκτροφορογράφημα, τότε θεωρείται ότι τα επίπεδα της είναι αυξημένα και το δείγμα εξετάζεται περαιτέρω (*Metha & Hoffbrand, 2009*).

### 3.4. Ηλεκτροφόρηση και παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή η οποία αποτελείται από ηλεκτοφορητικό θάλαμο. Αυτός, έχει δυο διαμερίσματα τα οποία με την παρουσία ενός τοιχώματος χωρίζονται σε άνοδο (θετικό πόλο) και κάθοδο (αρνητικό πόλο) (εικόνα 5). Στους δυο αυτούς χώρους τοποθετείται ίδια ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα, μέσα στο οποίο γίνεται ο διαχωρισμός των κλασμάτων. Στην κορυφή του τοιχώματος και βυθισμένο στο ρυθμιστικό διάλυμα, τοποθετείται το ηλεκτροφορητικό μέσο, το οποίο λειτουργεί ως «ηλεκτρική γέφυρα» μεταξύ των δυο δοχείων και διαμέσων του οποίου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των κλασμάτων. Στη συνέχεια και αφού τοποθετηθεί το δείγμα στην επιφάνεια του υποστρώματος, εφαρμόζεται σταθερή τάση ηλεκτρικού ρεύματος, το οποίο με τη βοήθεια του ρυθμιστικού διαλύματος προκαλεί την μετακίνηση των σωματιδίων του δείγματος (Kaplan et al.,2003). Η μετακίνηση των μορίων παρουσία αλκαλικού ρυθμιστικού διαλύματος έχει ως εξής: τα θετικά φορτισμένα σωματίδια μεταναστεύουν στον αρνητικό πόλο (κάθοδο), ενώ τα αρνητικά φορτισμένα σωματίδια προς την άνοδο (θετικό πόλο) (Metha & Hoffbrand 2009, Ζαραλής 2008, Χαλεβελάκης 1991).



Εικόνα 5. Συσκευή ηλεκτροφόρησης (ανατύπωση από [www.chemicallabs.com](http://www.chemicallabs.com)).

Γενικά, όσον αφορά την ηλεκτροφόρηση, ο κλασματικός διαχωρισμός ποικίλει και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι το καθαρό φορτίο των μορίων, το μέγεθος κάθε σωματιδίου, η διατομή των πόρων του ηλεκτροφορητικού

μέσου, το είδος του ρυθμιστικού διαλύματος και την ισχύς του ηλεκτρικού φορτίου (τάση του ρεύματος) (*Westermeier et al., 2001*).

Σε ηλεκτροφορητικά υλικά με μεγάλους πόρους ο διαχωρισμός των μορίων εξαρτάται από το φορτίο του μορίου. Αντίθετα, σε ηλεκτροφορητικά υλικά με λεπτούς πόρους καθοριστικό ρόλο παίζει το μέγεθος των μορίων. Τα μικρότερα σε μέγεθος μόρια, περνούν ευκολότερα μέσα από τους πόρους του ηλεκτροφορητικού μέσου και κινούνται ευκολότερα και γρηγορότερα. Έτσι, κατά την ανάγνωση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης, όπου τα κλάσματα εμφανίζονται ως «ζώνες», τα μικρότερα σε μέγεθος μόρια να βρίσκονται πιο ψηλά από τα μεγαλομοριακά σωματίδια (*Χαλεβελάκης, 1999*). Όσον αφορά το ρυθμιστικό διάλυμα, επιλέγεται με ιδιαίτερη προσοχή καθώς δε πρέπει να αντιδρά με το δείγμα. Τα αυξημένα ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος<sup>11</sup>, υπό την εφαρμογή του ρεύματος, ανταγωνίζονται τα φορτισμένα σωματίδια του δείγματος και αυτό μειώνει την απόσταση μετακίνησης των μορίων (*Kaplan et al., 2003*).

Άλλος ένας σημαντικός παράγοντας, ο οποίος άμεσα δύναται να επηρεάσει το ηλεκτροφορητικό αποτέλεσμα, είναι η τάση του παρεχόμενου ρεύματος. Το ρεύμα που παρέχεται κατά την ηλεκτροφόρηση είναι σταθερό και ο χρόνος εφαρμογής του συγκεκριμένος. Σε αντίθετη περίπτωση, πιθανή αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνικών μορίων και να αλλοιώνει το αποτέλεσμα της διαδικασίας (*Westermeier et al., 2001*).

### **3.5. Πιθανά λάθη κατά την ηλεκτροφόρηση**

Τυχόν λάθη κατά την ηλεκτροφόρηση, αλλοιώνουν τα αποτελέσματα της μεθόδου και οφείλονται α) σε παρουσία αυξημένου αριθμού λευκοκυττάρων, το οποίο εμφανίζεται ως μικρό κλάσμα στην άνοδο μετά την αιμοσφαιρίνη HbA, β) σε ύπαρξη μη ρυθμισμένου σακχαρώδους διαβήτη, όπου εμφανίζεται νέο κλάσμα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης μετά την HbA και γ) σε πιθανά τεχνικά σφάλματα, όπως είναι η χρήση ακατάλληλου δείγματος, μετουσίωση των πρωτεϊνών λόγω

---

<sup>11</sup>Όσο μεγαλύτερος ο αριθμός των ελεύθερων ιόντων στο ρυθμιστικό διάλυμα, τόσο περισσότερο ρεύμα μπορεί να μεταφερθεί δια μέσω αυτού (*www.medlook.net*).

αυξημένης θερμοκρασίας, χρήση ακατάλληλων υποστρωμάτων ή ρυθμιστικού διαλύματος, καθυστέρηση χρώσης των ταινιών ή ακόμα και ακατάλληλη επεξεργασία των ταινιών ηλεκτροφόρησης (*Westermeyer et al., 2001*).

### **3.6. Είδη ηλεκτροφορητικών τεχνικών**

Οι μέθοδοι ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των διαφόρων αιμοσφαιρινών, διαφέρουν ως προς το pH και το περιβάλλον, μέσα στο οποίο πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση. Το ηλεκτροφορητικό μέσο τοποθετείται μεταξύ ανόδου και καθόδου και πάνω σε αυτό τοποθετείται το αιμόλυμα (*Σπανός, 2001*). Οι συχνότερες ηλεκτροφορητικές μέθοδοι με βάση το είδος του ηλεκτροφορητικού μέσου που χρησιμοποιείται είναι:

#### **3.6.1. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη (gel) ή πηκτή αμόλυμα**

Στην ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης σε γέλη (*gel*) ή πηκτή αμόλυμα σε αλκαλικό pH 8.6, οι αιμοσφαιρίνες S και D κινούνται μαζί καθώς επίσης η HbC με την HbA<sub>2</sub>. Αντίθετα, η HbF και η HbA διαχωρίζονται, καθώς η αιμοσφαιρίνη F κινείται πιο αργά από την A. Επίσης, μαζί κινούνται και οι αιμοσφαιρίνες H και Bart's, οι οποίες διαχωρίζονται σε pH 6.8 (*Παπακωνσταντίνου, 2003*).

#### **3.6.2. Ηλεκτροφόρηση σε ταινίες πολυοξικής ή οξικής κυτταρίνης**

Η ηλεκτροφόρηση σε πολυοξική ή οξική κυτταρίνη σε pH 8.9, θεωρείται η καλύτερη ηλεκτροφορητική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού των αιμοσφαιρινοπαθειών. Πλεονεκτεί στην γρήγορη απόδοση αποτελεσμάτων και χρησιμοποιείται κυρίως στην ποσοτική μέτρηση της αιμοσφαιρίνης A<sub>2</sub> ([www.labtestonline.org](http://www.labtestonline.org)).

#### **Τεχνική**

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται αιμόλυμα, το οποίο παρασκευάζεται ύστερα από αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων από το δείγμα του ασθενή. Οι θάλαμοι της ηλεκτροφορητικής συσκευής πληρούνται με το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer). Ο προσδιορισμός χαρακτηρίζεται ως «ποιοτικός»

καθώς δεν είναι εμφανής η αναλογία του κάθε κλάσματος του αιμολύματος, παρά μόνον ο διαχωρισμός τους ([www.medlook.net](http://www.medlook.net)).

Ως ηλεκτροφορητικό μέσο για την συγκεκριμένη τεχνική ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιούνται ταινίες οξικής κυτταρίνης (Cellogel), οι οποίες διατηρούνται σε διάλυμα μεθανόλης 30%. Οι ταινίες, αρχικά διαβρέχονται με το buffer ηλεκτροφόρησης (για 15 λεπτά), στυπώνονται ελαφρώς σε διηθητικό χαρτί και στη συνέχεια ακολουθεί σήμανσή τους στο σημείο εκκίνησης, ενώ τοποθετούνται με την διαβρεκτική επιφάνεια τους προς τα πάνω (*Παπακωνσταντίνου, 2003*). Το αιμόλυμα τοποθετείται με τη βοήθεια πιπέτας στην «θαμπή» επιφάνεια της ταινίας και μάλιστα προς την κάθοδο. Η τοποθέτηση του αιμολύματος γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή καθώς το ρύγχος της πιπέτας δεν πρέπει να έρθει σε επαφή με την επιφάνεια των ταινιών. Ακολουθεί τοποθέτηση των ταινιών στην ηλεκτροφορητική γέφυρα του λουτρού, με ιδιαίτερη προσοχή προς αποφυγή τυχόν τραυματισμών των ταινιών και αναμένεται η διέλευση 5 λεπτών έως την κάλυψη της συσκευής με το καπάκι της (*Μελέτης, 2003*).

Στη συνέχεια εφαρμόζεται ρεύμα συνεχούς τάσης για 35-40 λεπτά. Η συνολική ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου μια ώρα και 15 λεπτά, ενώ κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της συνίσταται η παρακολούθηση της πορείας της για πιθανή αναγνώριση «γρήγορων» κλασμάτων, όπως η HbH, τα οποία δύναται να χαθούν προς την άνοδο έως το τέλος της ηλεκτροφόρησης. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των κλασμάτων της αιμοσφαιρίνης πάνω στην εκάστοτε ταινία. Οι ταινίες απομακρύνονται προσεκτικά και σε οριζόντια θέση από το λουτρό και εν συνεχεία, οδηγούνται για χρώση. Μετά τη χρώση, ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις σε διάλυμα οξικού οξέως 5% σε διαφορετικά δοχεία, έως τον πλήρη αποχρωματισμό τους. Έτσι, τα βαμμένα εμφανώς πράσινα αιμοσφαιρινικά κλάσματα, αποχρωματίζονται και πλέον ο διαχωρισμός τους είναι ευκρινής. Αφού στεγνώσουν οι ταινίες ανάμεσα σε 2 διηθητικά φύλλα χαρτιού και μελετηθούν τα αποτελέσματα ύστερα από σύγκριση με φυσιολογικό μάρτυρα, διατηρούνται ως αρχείο (*Βοργίας και Λαουτάρη, 1995*).

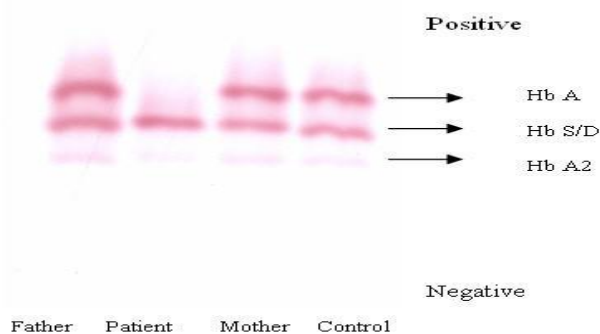
## Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η αιμοσφαιρίνη HbA, η οποία αποτελεί την κύρια αιμοσφαιρίνη (με ποσοστό περίπου 97%), κινείται γρήγορα προς την άνοδο, ενώ η αιμοσφαιρίνη HbF (εμβρυική) ακολουθεί. Η HbA<sub>2</sub> αιμοσφαιρίνη είναι βραδύτερη της HbF και κινείται και αυτή όπως και οι άλλες δυο προς την άνοδο (*Metha & Hoffbrend 2009, Ζαραλής 2008*).

Στην περίπτωση ύπαρξης παθολογικών αιμοσφαιρινών όπως οι HbC, E, O κτλ. κινούνται στο ίδιο ύψος με την HbA<sub>2</sub>. Οι αιμοσφαιρίνες HbS, D, G, και Lepore κινούνται μεταξύ των HbA και HbA<sub>2</sub> και μάλιστα σε ίση απόσταση μεταξύ τους (εικόνες 6). Η αιμοσφαιρίνη H κινείται γρηγορότερα από όλες (*Βοργιάς και Λαουτάρη, 1995*).



Εικόνα 6. Τυπική ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε οξική κυτταρίνη (pH 8.6) (ανατύπωση από Walker et al., 1990).



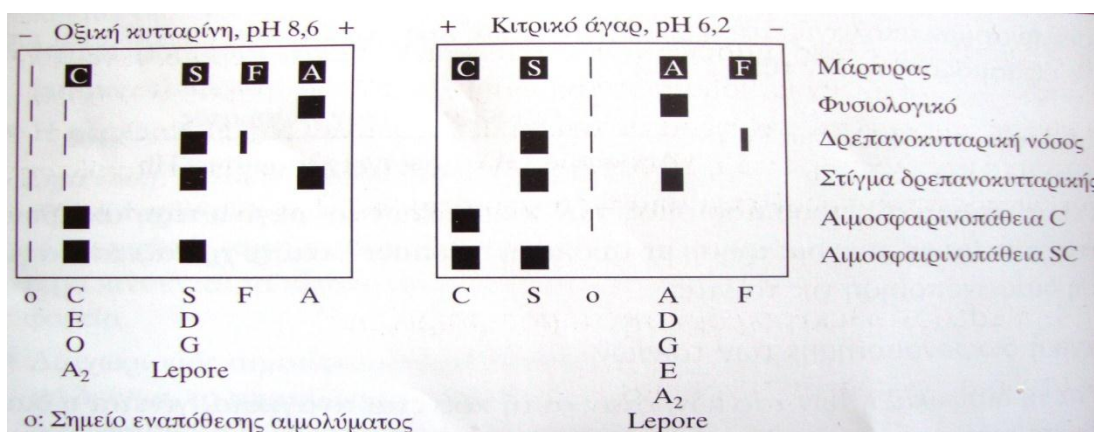
Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε οξική κυτταρίνη σε pH 8.4. Απεικόνιση της αιμοσφαιρινικής κινητικότητας ύστερα από εξέταση δειγμάτων ασθενών που πάσχουν από δρεπανοκυτταρική αναιμία (πατέρα, μητέρας και παιδιού) (ανατύπωση από Desai et al., 1998).

### 3.6.3. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης ή άγαρ (agar)

Η ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης ή άγαρ (agar) (εικόνα 8) σε pH 6,3 χρησιμοποιείται ως «διαφοροδιαγνωστική» (εικόνες 9 και 10) και γίνεται σε ταινίες κιτρικού άγαρ. Διαχωρίζει τις ομάδες της αιμοσφαιρίνης οι οποίες κινούνται μαζί στις άλλες τεχνικές ηλεκτροφόρησης. Σε αυτή την μέθοδο διαχωρίζεται η αιμοσφαιρίνη S από την D, η C από την E, καθώς και η E από την O. Επιπρόσθετα, ιδιαίτερα σημαντική είναι η συμβολή αυτής της τεχνικής στη διάκριση της αιμοσφαιρίνης A από την F, όπως στην περίπτωση ανίχνευσης β-μεσογειακής αναιμίας σε νεογνά όπου η κύρια αιμοσφαιρίνη τους, όπως έχει αναφερθεί, είναι η F (Μελέτης, 2003).

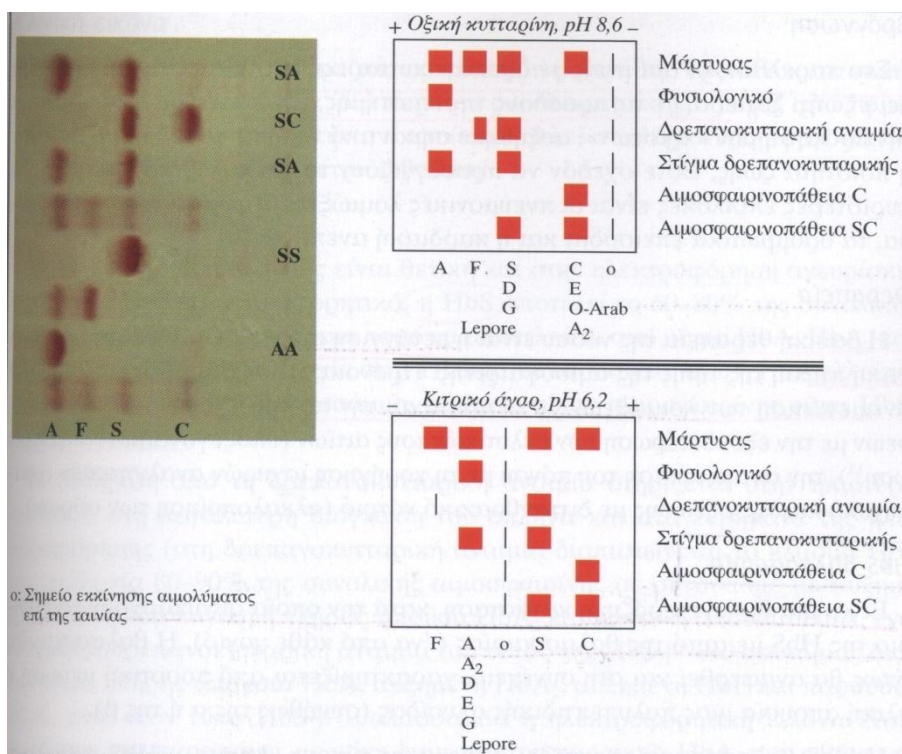


Εικόνα 8. Τεχνική ηλεκτροφόρησης της αιμοσφαιρίνης σε γέλη αγαρόζης (ανατύπωση από [www.labtestonline.org](http://www.labtestonline.org)).



Εικόνα 9. Παρουσιάζονται οι δυο σχηματικές απεικονίσεις, με τις θέσεις των κλασμάτων της αιμοσφαιρίνης σε δυο διαφορετικά υποστρώματα: σε οξική κυτταρίνη σε αλκαλικό pH όπου η κίνηση τους γίνεται από την κάθοδο (-) προς την άνοδο (+) ανάλογα με τα αρνητικά φορτία που περιέχουν στο μόριό τους (αριστερά) και σε κιτρικό άγαρ σε όξινο pH, όπου άλλες

αιμοσφαιρίνες κινούνται προς την άνοδο και άλλες προς την κάθοδο. Έτσι, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός αιμοσφαιρινών που στην ηλεκτροφόρηση σε οξική κυτταρίνη κινούνται με την ίδια ταχύτητα (δεξιά). Από πάνω προς τα κάτω, σε κάθε ταινία εμφανίζεται ο μάρτυρας (control), ένα φυσιολογικό δείγμα και στη συνέχεια παθολογικές αιμοσφαιρίνες (S, C) (ανατύπωση από Παπακωνσταντίνου, 2003).



Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρηση Hb σε οξική κυτταρίνη (επάνω αριστερά). Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης Hb σε οξική κυτταρίνη σε αλκαλικό περιβάλλον (επάνω δεξιά) και σε κίτρινο άγαρ σε όξινο περιβάλλον (κάτω δεξιά). Παρατηρούνται οι θέσεις των κλασμάτων της Hb σε διαφορετικά υλικά και περιβάλλον pH, καθώς και τα κλάσματα Hb σε διάφορες αιμοσφαιρινοπάθειες. Από πάνω προς τα κάτω σε κάθε ταινία εμφανίζεται ο μάρτυρας (control), ένα φυσιολογικό δείγμα (normal) και στη συνέχεια παθολογικές αιμοσφαιρίνες (S, C) (ανατύπωση από Παπακωνσταντίνου, 2003).

### 3.6.4. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη (gel) πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε γέλη (gel) πολυακρυλαμίδη ή αλλιώς SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis) είναι η τεχνική, η οποία έχει μοναδικό σκοπό το διαχωρισμό των πολυπεπτιδικών μορίων με βάση το μοριακό τους μέγεθος (εικόνες 11 και 12). Το SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), είναι



ένα αντιδραστήριο το οποίο έχει την ικανότητα να «λύει» τα υδρόφοβα μόρια φορτίζοντάς τα αρνητικά. Έτσι, η κάθε πρωτεΐνη, ύστερα από την επίδραση του SDS, διατηρεί μόνο την πρωτοταγή της δομή (ώστε να περνά τους πόρους του gel) ([www.medlook.net](http://www.medlook.net)).

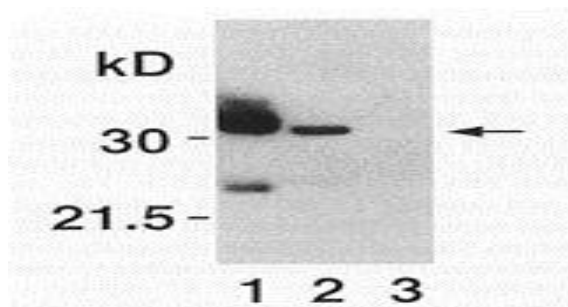
Επειδή όλες οι πρωτεΐνες ύστερα από την επίδραση του SDS έχουν αρνητικό φορτίο, κινούνται μαζικά προς τον θετικό πόλο ύστερα από την εφαρμογή του ρεύματος. Αποτέλεσμα είναι ο μη διαχωρισμός τους. Για το λόγο αυτό, απαραίτητη είναι η χρήση της γέλης πολυακρυλαμίδης<sup>12</sup>, η οποία αποτελείται από πολλούς πόρους, διαφορετικού μήκους και διατομής (εικόνα 13). Αυτό συμβάλει στο διαχωρισμό των μορίων με βάση το μέγεθος τους. Έτσι, οι μικρότερου μεγέθους πρωτεΐνες κινούνται ευκολότερα, γρηγορότερα και πιο μακριά σε αντίθεση με τις μεγαλύτερες ([www.labtestonline.org](http://www.labtestonline.org)).

Αξιοσημείωτο είναι ότι οι πρωτεΐνες ίδιου σχήματος και μεγέθους κινούνται ταυτόχρονα φτάνοντας στην ίδια θέση μέσα στο gel και τελικά εμφανίζονται στην ίδια «ζώνη». Παράταση του χρόνου ηλεκτροφόρησης, αυξάνει την πιθανότητα διαφυγής των μορίων από την άλλη μεριά της γέλης. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται χρώση, ώστε να γίνονται ορατές οι «ζώνες». Έτσι, δύναται η μελέτη της απόστασης που διένυσαν τα μόρια μέσα στο gel, καθώς και ο διαχωρισμός τους. Το πάχος της κάθε «ζώνης» εξαρτάται από την ποσότητα των μορίων ίδιου είδους (*Kaplan et al., 2003*).

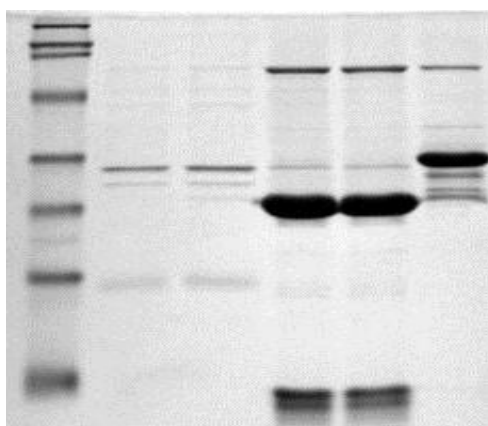
Οι παραπάνω μέθοδοι ηλεκτροφόρησης είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για την διάγνωση και το διαχωρισμό των συνήθων αιμοσφαιρινών. Ωστόσο, σε περιπτώσεις μη ανίχνευσης ή διαχωρισμού κάποιου είδους αιμοσφαιρίνη, χρησιμοποιούνται άλλες, πιο ευαίσθητες τεχνικές.

---

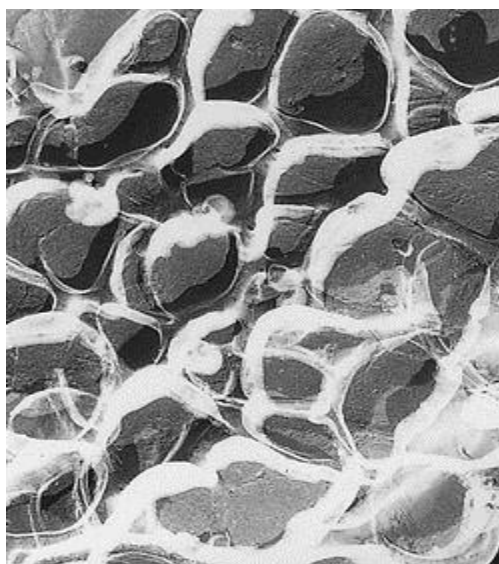
<sup>12</sup>Το πολυμερές της ακρυλαμίδης, μόλις σχηματιστεί μετατρέπεται σε gel μορφή και με την εφαρμογή του ηλεκτρισμού διαπερνάται από τις πρωτεΐνες ([www.labtestonline.com](http://www.labtestonline.com)).



**Εικόνα 11.** Διαχωρισμός αιμοσφαιρινικών κλασμάτων με ηλεκτροφόρηση σε γέλι πολυακρυλαμίδης (SDS-Page electrophoresis) (ανατύπωση από [www.medlook.net](http://www.medlook.net)).



**Εικόνα 12.** Ηλεκτροφόρηση σε γέλι πολυακρυλαμίδης: διαχωρισμός με βάση το μοριακό μέγεθος των μορίων (ανατύπωση από [www.labtestonline.org](http://www.labtestonline.org)).



**Εικόνα 13.** Μετακίνηση των μορίων μέσα σε γέλι πολυακρυλαμίδης, εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (ανατύπωση από [www.medlook.net](http://www.medlook.net)).

## 4. ANAΙΜΙΕΣ

### 4.1. Ορισμός Αναιμίας

Αναιμίες, καλούνται οι παθολογικές καταστάσεις, κατά τις οποίες το ποσό της αιμοσφαιρίνης είναι ελαττωμένο σε σχέση με το φυσιολογικό, το οποίο αντιστοιχεί σε κάθε ηλικία και φύλο. Ο καταλληλότερος προσδιορισμός της σοβαρότητας της αναιμίας είναι με βάση την τιμή της αιμοσφαιρίνης, καθώς σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου του αίματος, από τους πνεύμονες στους ιστούς (*Metha & Hoffbrand, 2009*).

Η αιμοσφαιρίνη, είναι κύριο συστατικό των ερυθρών αιμοσφαιρίων, με αποτέλεσμα οποιαδήποτε μεταλλαγή του μορίου της αιμοσφαιρίνης, (είτε του μεγέθους του μορίου, είτε του σχήματός του, είτε της κινητικότητάς του) να οδηγεί σε αλλοίωση των ιδιοτήτων των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Πιο συγκεκριμένα, πιθανές μεταλλαγές πιθανά να συμβούν α) σε ένα από τα τέσσερα α-γονίδια της, β) σε ένα από τα τέσσερα β-γονίδια, όπου προκύπτουν συχνά ομοζυγωτίες, με σοβαρές εκδηλώσεις, γ) με διαταραχή των αμινοξέων μακριά από τις αλυσίδες της αίμης (εξωτερικές μεταλλάξεις), όπου προκύπτουν παθολογικές αιμοσφαιρίνες με αλλοιωμένη διαλυτότητα μέσα στο κυτταρόπλασμα (π.χ. αιμοσφαιρίνες S, C, D, E, O κ.τ.λ.) και δ) μετάλλαξη γειτονικών αμινοξέων της αίμης, με αποτέλεσμα την παραγωγή παθολογικών ασταθών αιμοσφαιρινών, οι οποίες εμφανίζουν αυξημένη ή μειωμένη συγγένεια προς το O<sub>2</sub>, είτε αδυνατούν να διατηρήσουν το σίδηρο στην δισθενή μορφή με αποτέλεσμα να εμφανίζουν Fe<sup>++</sup> στην τρισθενή μορφή (αιμοσφαιρίνη M) (*Okpala, 2004*).

Το ποσό της αιμοσφαιρίνης μπορεί να είναι ελαττωμένο λόγω διαταραχών στη σύνθεση της αίμης και τότε μιλάμε για «πορφυρίες», είτε λόγω ανωμαλιών στη σύνθεση των σφαιρινικών αλυσίδων οι οποίες διακρίνονται σε ποσοτικές, τις οποίες καλούμε «θαλασσαιμίες» και σε ποιοτικές και χαρακτηρίζονται ως «αιμοσφαιρινοπάθειες». Ταυτόχρονη παρουσία ποσοτικής και ποιοτικής ανωμαλίας της Hb, συνιστά τις «θαλασσαιμικές αιμοσφαιρινοπάθειες» (π.χ. Hb Lepore) (*Metha & Hoffbrand 2009, Ζαραλής 2008*).

## Θαλασσαιμίες

### α- θαλασσαιμίες:

- ✓ Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία (αα/α-)
- ✓ Ετερόζυγη α<sup>0</sup>-θαλασσαιμία (α-/α-) ή (αα/--)
- ✓ Ενδιάμεση α-θαλασσαιμία (α/--) ή αιμοσφαιρινοπάθεια H
- ✓ Ομόζυγη α<sup>0</sup>-θαλασσαιμία ή σύνδρομο Hb Bart's (--/--), (εμβρυικός ύδρωπας)

### β-θαλασσαιμίες:

- ✓ Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία (β/β<sup>0</sup> ή β/β<sup>+</sup>) ή στίγμα μεσογειακής αναιμίας
- ✓ Ομόζυγη β-θαλασσαιμία ή νόσος του Cooley
- ✓ Ενδιάμεση β-θαλασσαιμία

### άλλα θαλασσαιμικά σύνδρομα:

- ✓ αβ-θαλασσαιμία
- ✓ δβ- θαλασσαιμία
- ✓ γδβ- θαλασσαιμία
- ✓ HPFH-Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin

κληρονομική παραμονή της HbF (έλλειψη δ- και β- αλυσίδων)

## Αιμοσφαιρινοπάθειες

- ✓ Δρεπανοκυτταρική αναιμία ή Αιμοσφαιρινοπάθεια S
- ✓ Ετερόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία (αιμοσφαιρινοπάθεια S/A)
- ✓ Άλλα δρεπανοκυτταρικά σύνδρομα
  - Αιμοσφαιρινοπάθεια S/C
  - Αιμοσφαιρινοπάθεια S/D
  - Αιμοσφαιρινοπάθεια S/E
  - Αιμοσφαιρινοπάθεια S/O-Arab
  - Αιμοσφαιρινοπάθεια SS/α-θαλασσαιμία
  - Μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία
  - Αιμοσφαιρινοπάθεια S/δβ-θαλασσαιμία
  - Αιμοσφαιρινοπάθεια S/Lepore
  - Αιμοσφαιρινοπάθεια S/HPFH
  - Αιμοσφαιρινοπάθεια C
  - Αιμοσφαιρινοπάθεια D
  - Αιμοσφαιρινοπάθεια E
  - Αιμοσφαιρινοπάθεια Hb Constant Spring
  - Αιμοσφαιρινοπάθεια « Knossos»
  - Αιμοσφαιρινοπάθεια O-Thrace (O- Arab)
  - Αιμοσφαιρινοπάθεια HbC-Harlem
  - Αιμοσφαιρινοπάθεια HbG- Philadelphia

- Αιμοσφαιρινοπάθεια HbI
- Αιμοσφαιρινοπάθειες Hb Bart's και HbH
- Ασταθείς αιμοσφαιρίνες
- Αιμοσφαιρίνες με αυξημένη συγγένεια προς το οξυγόνο
- Αιμοσφαιρίνες με μειωμένη συγγένεια προς το οξυγόνο
- Αιμοσφαιρινοπάθειες M
- Επίκτητες αιμοσφαιρινοπάθειες
  - Μεθαιμοσφαιριναιμία
  - Θειοαιμοσφαιριναιμία
  - Ανθρακυλαιμοσφαιριναιμία

### **Θαλασσαιμικές Αιμοσφαιρινοπάθειες**

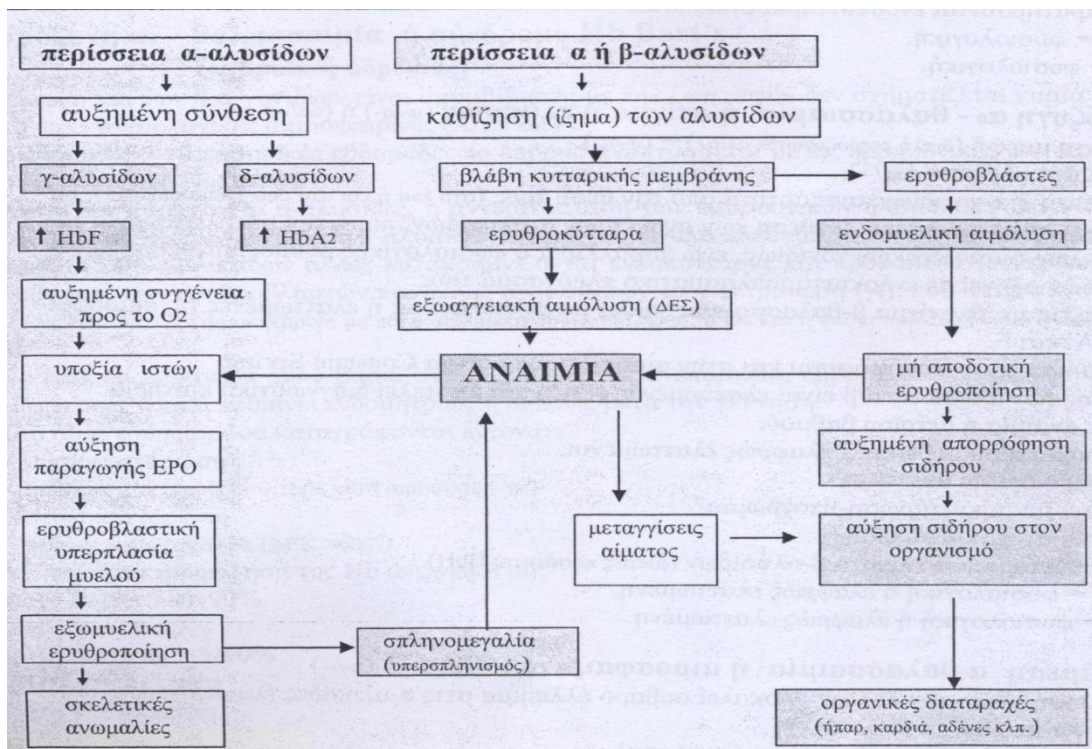
- ✓ Αιμοσφαιρινοπάθεια Lepore
- ✓ Αιμοσφαιρινοπάθεια Lepore /B+ θαλασσαιμία
- ✓ Αιμοσφαιρινοπάθεια SS/α- θαλασσαιμία
- ✓ Μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία
- ✓ Αιμοσφαιρινοπάθεια S/δβ<sub>0</sub> – θαλασσαιμία
- ✓ Αιμοσφαιρινοπάθεια S/Lepore
- ✓ Αιμοσφαιρινοπάθεια S/HPFH
- ✓ Αιμοσφαιρινοπάθεια C/β- θαλασσαιμία
- ✓ Αιμοσφαιρινοπάθεια E/β-θαλασσαιμία
- ✓ Αιμοσφαιρινοπάθεια O-Thrace/β-θαλασσαιμία

## 4.2. Θαλασσαιμίες

### 4.2.1. Γενικά για τις θαλασσαιμίες

Θαλασσαιμίες ή θαλασσαιμικά σύνδρομα ή μεσογειακά σύνδρομα, καλούνται οι κληρονομικές διαταραχές που οφείλονται σε μειωμένη ή πλήρης αναστολή της σύνθεσης μιας ή περισσοτέρων αλύσων. Οι θαλασσαιμίες αποτελούν ποσοτικές διαταραχές της αιμοσφαιρίνης στον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτό διαπιστώνεται εύκολα, ύστερα από σύγκριση του ποσού των διαφόρων αιμοσφαιρινών που ευρίσκονται σε άτομο που πάσχει από θαλασσαιμικό σύνδρομο, σε σύγκριση με της φυσιολογικές τιμές αναφοράς των διαφόρων τύπων Hb, σύμφωνα με την ηλικία και το φύλλο (*Okpala 2004, Ζαραλής 2008*).

Η μειωμένη σύνθεση ή η πλήρης απουσία μιας εκ των δύο αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης, ενώ η άλλη παράγεται φυσιολογικά, οδηγεί σε ελάττωση της φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης, με άμεσο αποτέλεσμα την αναιμία. Ωστόσο, οι περισσότερες των περιπτώσεων θαλασσαιμίες αναφέρονται κυρίως στις αλυσίδες α- και β- (εικόνα 14), καθώς σε διαταραχές των οι γ- και δ-, η HbA υπάρχει φυσιολογικά και δεν τίθεται θέμα σοβαρής αναιμίας (*Βοργίας και Λαουτάρη, 1995*). Έτσι, ανάλογα με το ζεύγος των αλυσίδων που υπολείπεται, οι διαταραχές διακρίνονται σε α- θαλασσαιμίες, όταν υπάρχει έλλειψη των α- αλυσίδων και β- θαλασσαιμίες, σε έλλειψη β-αλυσίδων. Σε περιπτώσεις ομοζυγωτών ή διπλών ετεροζυγωτών, όπου τα γονίδια που εκφράζουν τις αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης πάσχουν και στα δυο χρωμοσώματα, οι εκδηλώσεις του συνδρόμου είναι σοβαρότερες. Αντίθετα, οι κλινικοεργαστηριακές εκδηλώσεις στους ετεροζυγώτες ποικίλουν (από ασυμπτωματικοί έως την παρουσία εμφανούς αναιμίας) και εξαρτώνται από τον βαθμό σύνθεσης της υπολειπόμενης αλυσίδας, καθώς και από το «περίσσευμα» της άλλης (*Ζαραλής, 2008*).



Εικόνα 14. Παθοφυσιολογία των θαλασσαιμικών συνδρόμων (ανατύπωση από Ζαράλης, 2008).

Σύμφωνα με τη βαρύτητα των εκδηλώσεων, διακρίνονται οι εξής μορφές α) *Μείζον θαλασσαιμίες*, στις οποίες η διάγνωση είναι σχετικά εύκολη καθώς γίνονται αντιληπτές από τα πρώτα χρόνια της ζωής, β) *Ελασσον θαλασσαιμίες*, οι οποίες συχνά δε γίνονται αντιληπτές και γ) *Ενδιάμεσες θαλασσαιμίες*. Γεωγραφικά, οι θαλασσαιμίες παρατηρούνται κυρίως στις περιοχές της Μεσογείου, της Αφρικής, της Μέσης Ανατολής, την Ινδία και τη νοτιοανατολική Ασία, περιοχές όπου επικράτησε η ελονοσία, ενώ τα ερυθρά θαλασσαιμικών ατόμων αντιστέκονταν στην καταστροφή λόγω της νόσου (Μελέτης, 2003).

Η τιμές της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη ποικίλουν ανάλογα τον τύπο της αναιμίας. Αντίθετα, το ποσό των ερυθροκυττάρων είναι αυξημένο συγκριτικά με την αναιμία, ενώ η μορφή εμφάνισής τους ποικίλει. Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα ευρήματα εξαρτώνται από τον τύπο της θαλασσαιμίας (Bain, 2006).



#### 4.2.2. α-θαλασσαιμίες

α-θαλασσαιμίες χαρακτηρίζονται όλες τις κληρονομικές διαταραχές οι οποίες σχετίζονται με μειωμένη παραγωγή ή παντελή έλλειψη των α-αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης. Όπως έχει αναφερθεί, οι φυσιολογικές α-αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης κωδικοποιούνται από 4 γονίδια, ανά δυο σε κάθε ομόλογο χρωμόσωμα (αα/αα) (Μελέτης, 2003). Η διαταραχή της α-θαλασσαιμίας οφείλεται στην εξάλειψη<sup>13</sup> (*deletion*) ενός έως και των τεσσάρων γονιδίων ή ακόμη και σε ύπαρξη των γονιδίων αλλά μη λειτουργίας τους (non deletion type of α-thalassemia) ([www.medlook.net](http://www.medlook.net)). Γεωγραφικά, η νόσος συναντάται περισσότερο στη Νοτιοανατολική Ασία, Σαουδική Αραβία, στις Μεσογειακές χώρες με κυριότερες την Σαρδηνία και την Κύπρο, αλλά και στους νέγρους της Αμερικής (Tsilolo et al.,2008).

Οι συνδυασμοί των α-γονιδιακών ελλείψεων είναι 4:

- Έλλειψη ενός α-γονιδίου (αα/α-)
- Έλλειψη δυο α-γονιδίων (α-/α-)
- Έλλειψη τριών α-γονιδίων (α/--)
- Έλλειψη και των τεσσάρων α-γονιδίων (--/--)

Οι κλινικοεργαστηριακές εκδηλώσεις, καθώς και η βαρύτητα του συνδρόμου που προκύπτει εξαρτώνται από τον αριθμό των λειτουργούντων α-γονιδίων (Ζαράλης, 2008).

---

<sup>13</sup>Στο φαινόμενο της εξάλειψης οφείλεται η ετερογένεια της κλινικής εικόνας της α-θαλασσαιμίας (Tsilolo et al.,2008).

### **Η έλλειψη ενός α-γονιδίου**

Γνωστή και ως ετερόζυγη α-θαλασσαιμία ή αφρικανικού τύπου θαλασσαιμία έχει γονότυπο (αα/α-). Χαρακτηρίζεται από έλλειψη ενός από τα τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν τις α-αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν μόνο τα τρία γονίδια (έναντι των 4 που είναι φυσιολογικό), η σχέση των αλυσίδων α/β είναι ελαφρώς ελαττωμένη, δε συνοδεύεται από σοβαρή αιματολογική διαταραχή, αφού τα τρία υγιή γονίδια υπερλειτουργούν ώστε να καλύψουν το έλλειμμα. Έτσι, η τιμή της HbA<sub>2</sub> και της HbF βρίσκονται σε φυσιολογικά πλαίσια (Metha & Hoffbrand, 2009).

### **Η έλλειψη δυο α-γονιδίων**

Η έλλειψη δυο α-γονιδίων, συμβαίνει στο ίδιο χρωμόσωμα και τότε είναι ετεροζυγωτία ή ασιατικού τύπου διαταραχή (αα/--), είτε σε διαφορετικά χρωμοσώματα (ομοζυγωτία) με γονότυπο (α-/α-). Παρά την υπερλειτουργία των υπάρχοντων γονιδίων δεν καλύπτεται η έλλειψη. Οι αιμοσφαιρίνες HbA<sub>2</sub> και HbF είναι ελαφρώς ελαττωμένες (Χαλαβελάκης, 1999).

### **Η έλλειψη τριών α-γονιδίων**

Γνωστή ως ενδιάμεση α-θαλασσαιμία (α/--), είναι σοβαρή αιματολογική διαταραχή, καθώς το άτομο φέρει μόνο ένα από τα τέσσερα γονίδια, που φυσιολογικά κωδικοποιούν τις α-αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης. Οι πλεονάζουσες β-αλυσίδες ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας τετραμερή β<sub>4</sub> (τη γνωστή αιμοσφαιρίνη HbH). Λόγο της ύπαρξης της αιμοσφαιρίνης H, η ενδιάμεση α-θαλασσαιμία καλείται και ως *αιμοσφαιρινοπάθεια H*. Στην ηλεκτροφόρηση, ανιχνεύεται η αιμοσφαιρίνη Hb H, η οποία αποτελεί διαγνωστικό παράγοντα για την ενδιάμεση θαλασσαιμία (Ζαράλης 2008, Μελέτης 2003).

### **Η έλλειψη τεσσάρων α-γονιδίων**

Γνωστή ως ομόζυγη α-θαλασσαιμία ή εμβρυικός ύδρωπας ή αλλιώς σύνδρομο Bart's (--/--), δεν είναι συμβατό με τη ζωή, καθώς δε δύναται ο σχηματισμός καμιάς από τις φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες HbA, HbA<sub>2</sub> ή HbF. Το

έμβρυο αναπτύσσεται φυσιολογικά έως τις πρώτες έξη εβδομάδες της κύησης, αφού η αιμοσφαιρίνη στο αίμα του είναι η Portland-1 (Hb ζ<sub>2</sub>γ<sub>2</sub>). Από την έκτη έως την δέκατη εβδομάδα ξεκινά η παραγωγή των α-αλυσίδων ενώ μειώνονται οι αλυσίδες ζ. Η αδυναμία όμως παραγωγής των α-αλυσίδων οδηγεί σε πλεονασμό των γ-αλυσίδων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό τετραμερών γ<sub>4</sub>, αιμοσφαιρίνης Bart's (που προκύπτει από την ένωση των γ-αλυσίδων μεταξύ τους). Η αιμοσφαιρίνη Bart's, η οποία αν και ικανή να μεταφέρει οξυγόνο, δεν επαρκεί για να καλύψει όλες τις ανάγκες του εμβρύου με αποτέλεσμα, το θάνατό του ενδομητρίως ή αμέσως μετά τη γέννησή του. Ιδιαίτερη διαγνωστική αξία έχει η ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης Hb στην οποία ανιχνεύονται: Hb Bart's 80%-90%, Hb H: 10%-15%, Hb Portland: 5%-10%, Hb A: έλλειψη Hb F: έλλειψη (Ζαραλής, 2008).

#### 4.2.3. β-θαλασσαιμίες

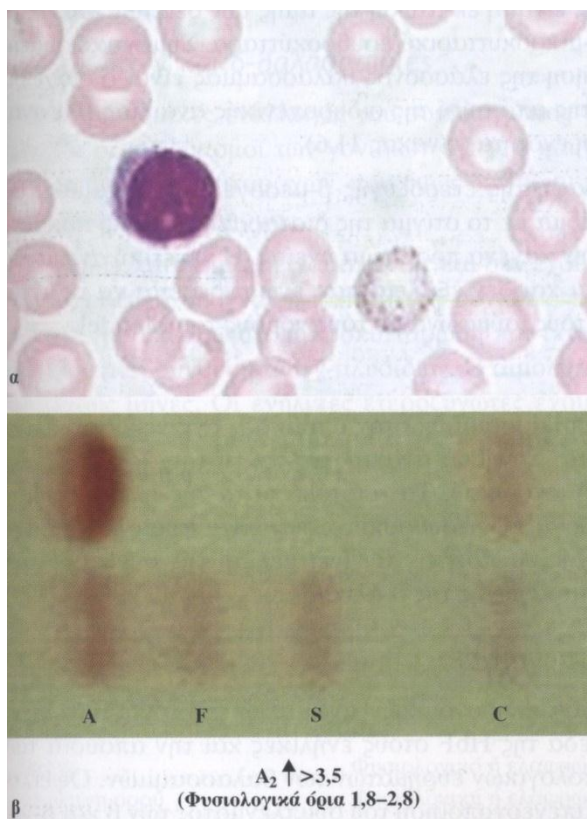
Οι β-θαλασσαιμίες αποτελούν κληρονομικές διαταραχές, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μειωμένη παραγωγή β-αλυσίδων. Η μειωμένη παραγωγή τους οφείλεται σε σημειακές μεταλλαγές (point mutations) κυρίως, όπως αντικατάσταση, έλλειψη ή προσθήκη κάποιων βάσεων του DNA των β-γονιδίων ή πιο σπάνια σε ελλείψεις τμημάτων DNA. Ορισμένες από αυτές οδηγούν σε μηδενική παραγωγή β-αλυσίδων, ενώ άλλες σε μειωμένη ή ακόμη και αυξημένη παραγωγή τους (Metha & Hoffbrand, 2009).

Η μειωμένη σύνθεση ή η έλλειψη των β-αλυσίδων συνοδεύεται από αύξηση της παραγωγής γ- και δ- αλυσίδων, δηλαδή αύξηση των αιμοσφαιρίων HbA<sub>2</sub> και HbF, οι οποίες όμως δεν επαρκούν για να καλύψουν τις ανάγκες που προκύπτουν από την έλλειψη των β-αλυσίδων. Οι υπόλοιπες α-αλυσίδες που πλεονάζουν σχηματίζουν τετραμερή α<sub>4</sub> τα οποία κατακρημνίζονται, ενώ τα ιζήματα και τα αθροίσματα τους προκαλούν την παραγωγή κυτταροπλασματικών εγκλείστων, τα οποία προκαλούν την καταστροφή των ερυθροβλαστών στο μυελό των οστών και των ερυθροκυττάρων και οδηγούν σε υποξία (Okpala, 2004).

Οι μορφές των β-θαλασσαιμιών που εμφανίζονται είναι:

### Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία

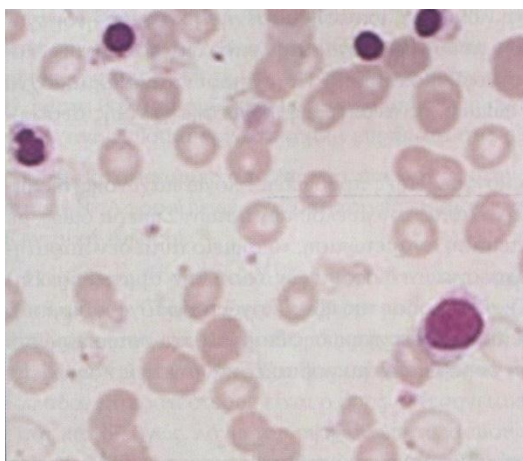
Γνωστή και ως ελάσσων β-θαλασσαιμία ( $\beta/\beta_0$  ή  $\beta/\beta_+$ ) (εικόνα 15), αποτελεί συνήθως ασυμπτωματικό τύπο αναιμίας, με εξαίρεση περιπτώσεων όπου συνυπάρχει λοίμωξη ή εγκυμοσύνη. Το φυσιολογικό β-γονίδιο υπολείπεται αυξάνοντας τη σύνθεση των β-αλυσίδων. Παράλληλα αυξάνεται και η παραγωγή των δ-αλυσίδων και ενώ η σύνθεση των α-αλυσίδων παραμένει σταθερή, οι δεύτερες πλεονάζουν (Μελέτης, 2003). Αποτέλεσμα είναι η μειωμένη σύνθεση HbA και η αύξηση της HbA<sub>2</sub>, οι οποίες ανιχνεύονται και αξιολογούνται κατά την ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης (HbA = 90-95% , HbA<sub>2</sub>=4-8 % και η HbF φυσιολογική ως ελαφρώς αυξημένη) (Okpala,2004).



Εικόνα 15. Αιματολογική εικόνα ατόμου με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. (α) Επίχρισμα περιφερικού αίματος και (β) ταινία ηλεκτροφόρησης οξικής κυτταρίνης (επάνω υπάρχει φυσιολογικό δείγμα για σύγκριση) (Παπακωνσταντίνου, 2003).

### **Ομόζυγη β-θαλασσαιμία**

Γνωστή και ως μείζον β-θαλασσαιμία ή αλλιώς νόσος του Cooley (εικόνα 16), χαρακτηρίζεται η σοβαρότερη μορφή β-θαλασσαιμίας και διαγιγνώσκεται από τα πρώτα κιόλας χρόνια της ζωής. Αμέσως μετά τη γέννηση παρατηρείται ωχρότητα του δέρματος, ικτερική χροιά επιπεφυκότων και έντονη ευερεθιστότητα. Η διάγνωση της νόσου του Cooley βασίζεται στην ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης σε αλκαλικό pH, όπου διαπιστώνεται πλήρη έλλειψη ή ελάττωση του κλάσματος HbA, αύξηση της HbA<sub>2</sub> από 5- 10 % και αύξηση της HbF από 10-90% (Bain, 2006).



**Εικόνα 16.** Επίχρισμα περιφερικού αίματος με ομόζυγη β-θαλασσαιμία (ανατύπωση από Παπακωνσταντίνου, 2003).

### **Ενδιάμεση β- θαλασσαιμία**

Ενδιάμεση β- θαλασσαιμία (thalassemia intermedia) καλείται το σύνδρομο εκείνο του οποίου οι κλινικές εκδηλώσεις είναι ελαφρύτερες από της ομόζυγης β-θαλασσαιμίας και βαρύτερες από της ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας. Η σοβαρότητα της νόσου εξαρτάται από το είδος της γενετικής βλάβης, της διαταραχές δηλαδή, των β-γονιδίων (συνήθως μεταλλαγές των δυο β γονιδίων). Οι κλινικοεργαστηριακή εικόνα και τα επίπεδα αιμοσφαιρίων ποικίλουν και καθορίζονται από τη σοβαρότητα της νόσου (Metha & Hoffbrand, 2009).

#### 4.2.4. Άλλα θαλασσαιμικά σύνδρομα

Τα άτομα που πάσχουν από θαλασσαιμικά σύνδρομα εκδηλώνουν κλινική εικόνα η οποία καθορίζεται από το είδος της γονιδιακής βλάβης που φέρουν στο DNA τους. Έτσι, με βάση την γονιδιακή διαταραχή και το ποσό της εκάστοτε αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης, προκύπτουν σιωπηλοί φορείς ή άτομα με πολύ βαριές εκδηλώσεις. Αρκετά από τα σοβαρά θαλασσαιμικά σύνδρομα οφείλονται σε συνδυασμούς γονιδιακών διαταραχών, δηλαδή σε ελλείψεις περισσότερων από μιας σφαιρικών αλυσίδων (Okpala, 2004).

##### **αβ-θαλασσαιμία**

Οι συνδυασμένες ελλείψεις α- και β- αλυσίδων, εμφανίζουν κλινική εικόνα η οποία καθορίζεται από το λόγο α/β των αλυσίδων αυτών. Στην περίπτωση γονιδιακής διαταραχής και των δυο αλυσίδων (α- και β-), όπου η έλλειψη είναι ανάλογη και ο λόγος α/β παραμένει ίσον με 1, τα άτομα δεν παρουσιάζουν εμφανή συμπτώματα και ο εντοπισμός τους είναι δύσκολος. Αυτό οφείλεται στην ισορροπημένη παραγωγή και των δυο αλυσίδων, με αποτέλεσμα της χρησιμοποίησης τους για σύνθεση των διαφόρων τύπων αιμοσφαιρινών και κυρίως της HbA (κύριας αιμοσφαιρίνης), ώστε δεν υπάρχει περίσσεια κάποιας από τις δυο και κατ' επέκταση δεν επηρεάζονται οι ερυθροκυτταρικοί δείκτες. Για παράδειγμα, σε ομόζυγη β-θαλασσαιμία (όπου υπάρχει περίσσεια α-αλυσίδων) και συνύπαρξη ενδιάμεσης α-θαλασσαιμίας (α/-) όπου υπάρχει περίσσεια β-αλυσίδων, η βαρύτητα της κλινικής εικόνας είναι μειωμένη καθώς η περίσσεια της μιας αλυσίδας αντισταθμίζει την έλλειψη της άλλης.

Αντίθετα, σε περίπτωση σύνθεσης της μιας αλυσίδας (α- ή β-) σε περίσσεια, αυτή κατακρημνίζεται μέσα στο ερυθροκύτταρο (δημιουργεί έγκλειστα), προκαλώντας την πρόωγη καταστροφή του ερυθροκυττάρου. Για παράδειγμα, σε ομόζυγη β-θαλασσαιμία (όπου περίσσεια α-αλυσίδων) και συνύπαρξη ετερόζυγη α-θαλασσαιμίας (αα/α-) όπου υπάρχει περίσσεια β-αλυσίδων, οι κλινικές εκδηλώσεις είναι πιο βαριές, καθώς η μείωση της μιας δεν εξισορροπεί την περίσσεια της άλλης (Okpala 2004, Μελέτης 2003).

### **δβ- θαλασσαιμία**

δβ- θαλασσαιμία, είναι το θαλασσαιμικό σύνδρομο το οποίο αναφέρεται σε γονιδιακές βλάβες του β-γονιδίου, στην περιοχή μεταξύ β- και δ- γονιδίου και στο δ- γονίδιο. Εμφανίζεται με δυο μορφές: α) ομόζυγη δβ-θαλασσαιμία ( $\delta\beta_0/\delta\beta_0$ ) ή ( $\delta\beta_0/\delta\beta_+$ ) ή ( $\delta\beta_+/ \delta\beta_+$ ), όπου εμφανίζεται σαν ενδιάμεσο θαλασσαιμικό σύνδρομο με τις HbA και HbA<sub>2</sub> να απουσιάζουν και την HbF 100%, β) ετερόζυγη δβ-θαλασσαιμία ( $\delta\beta_0/\delta\beta$ ), στην οποία η HbA ελαφρώς ελαττωμένη και HbF περίπου 5-20% (Ζαραλής, 2008).

### **γδβ- θαλασσαιμία**

γδβ- θαλασσαιμία, είναι πολύ σπάνια θαλασσαιμική νόσος. Στην ετερόζυγη μορφή της εμφανίζεται μικροκυτταρική υπόχρωμη αναιμία, ενώ στην ομόζυγη μορφή της οι HbA<sub>2</sub> και HbF είναι φυσιολογικές ή ελαφρώς ελαττωμένες.

### **HPFH**

HPFH είναι η κληρονομική παραμονή της HbF και αναφέρεται στην έλλειψη δ- και β- αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης, λόγω έλλειψης των αντίστοιχων δ- και β- γονιδίων από το DNA. Η αδυναμία σύνθεσης των δυο αυτών αλυσίδων έχει σαν αποτέλεσμα τον πλεονασμό των α- και γ- αλυσίδων, οι οποίες συνθέτουν σε μεγάλες ποσότητες HbF αιμοσφαιρίνη, ενώ οι αιμοσφαιρίνες A και A<sub>2</sub> απουσιάζουν. Έτσι, ακόμη και μετά τον έκτο μήνα της κύησης έως τη διάρκεια της ζωής, συνεχίζεται η παραγωγή της HbF ως κύρια αιμοσφαιρίνη. Η HbF κατανέμεται ομοιογενώς στα ερυθροκύτταρα, οπότε ο συνδυασμός της HPFH με άλλα θαλασσαιμικά σύνδρομα οδηγεί σε αλλοιωμένη εκδήλωση του συνδρόμου. Στην ομόζυγη μορφή, εμφανίζει μέτρια μικροκυτταρική υπόχρωμη αναιμία, μορφολογικές αλλοιώσεις ερυθροκυττάρων και HbF μοναδική αιμοσφαιρίνη. Αντίθετα, στην ετερόζυγη μορφή, διακρίνεται σε δυο τύπους: 1) HPFH των νέγρων- αναστολή σύνθεσης β και δ αλυσών και 2) ελληνικού τύπου HPFH- ικανοποιητική παράγωγη β και δ αλυσίδων λόγω σημειακών μεταλλαγών στα αντίστοιχα γονίδια.

### 4.3. Αιμοσφαιρινοπάθειες

Αντίθετα με τις θαλασσαιμίες, οι αιμοσφαιρινοπάθειες προκύπτουν από διαταραχή της δομής του μορίου των αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης. Η διαταραχή αυτή προκαλείται από αύξηση, μείωση ή ακόμη και αντικατάσταση αμινοξέων της εκάστοτε φυσιολογικής πολυπεπτιδικής αλυσίδας, με άμεσο αποτέλεσμα την δημιουργία μιας νέας, μη φυσιολογικής, αιμοσφαιρίνης (*Okpala, 2004*). Τέτοιους είδους μεταβολές, προκαλούν ποιοτικού τύπου διαταραχές της φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης στον οργανισμό και μεταβιβάζονται από τους γονείς στους απόγονος με αυτοσωμικό χαρακτήρα (*Σπανός, 2001*).

#### 4.3.1 Δρεπανοκυτταρική αναιμία

Δρεπανοκυτταρική αναιμία ή Αιμοσφαιρινοπάθεια S, καλείται η αιμοσφαιρινοπάθεια, η οποία οφείλεται σε δομική ανωμαλία των β-αλυσίδων. Προκαλείται από αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος στη θέση 6 της β-αλυσίδας, με βαλίνη. Με τον όρο «δρεπανοκυτταρική νόσος» αναφερόμαστε στην παρουσία παθολογικής αιμοσφαιρίνης S, ενώ ο όρος « δρεπανοκυτταρική αναιμία» χρησιμοποιείται υπονοώντας την ομόζυγη μορφή της νόσου (βs/βs).

Η βαρύτητα της νόσου εξαρτάται άμεσα από το ποσό της HbA (βαριά μορφή: 0-15%, ήπια: 20-305), το ποσό της αιμοσφαιρίνης S, την συνύπαρξη ή όχι άλλης αιμοσφαιρινοπάθειας, την συνύπαρξη ή όχι ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας, τη συνύπαρξη ή μη α-θαλασσαιμίας και τέλος την ποσότητα της HbF. Αξιοσημείωτο είναι δε, ότι το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας εμφανίζεται στα παιδιά (*Χαλεβελάκης, 1999*).

Η αιμοσφαιρίνη S είναι μια μεταλλαγμένη αιμοσφαιρίνη, η οποία μεταφέρει μεν οξυγόνο προς τους ιστούς όπως η HbA, αλλά διαφέρει από αυτή στο βαθμό διαλυτότητας της στο κυτταρόπλασμα όταν αποχωριστεί το οξυγόνο (*Metha & Hoffbrand, 2009*).

Μόλις το ερυθρό αιμοσφαίριο βρεθεί σε συνθήκες οι οποίες προκαλούν μείωση της διαλυτότητας της HbS, η οποία βρίσκεται στο κύτταρο, αυτή με τη σειρά



της πολυμερίζεται δίνοντας μόρια με ινώδεις δέσμες. Το πλήρως πολυμερισμένο πλέον ερυθρό μεταπίπτει από τη φυσικοχημική του κατάσταση sol σε gel, στη μορφή δηλαδή δρεπανοκυττάρου (κύτταρο με τη μορφή δρεπάνου) (εικόνα 17) και μπορεί να επανέλθει στη φυσιολογική του κατάσταση, όταν βρεθεί πάλι στις κατάλληλες συνθήκες. Αντίθετα, το μερικώς πολυμερισμένο ερυθρό μπορεί να μη μεταπίπτει στη μορφή δρεπανοκυττάρου αλλά καθιστά την ερυθροκυτταρική μεμβράνη μη λειτουργική. Ωστόσο, επανειλημμένοι κύκλοι δρεπάνωσης προκαλούν μόνιμες βλάβες της μεμβράνης του ερυθρού ακόμη και όταν η αιμοσφαιρίνη δεν είναι πολυμερισμένη (σε φυσιολογικές συνθήκες).



**Εικόνα 17. Επίχρισμα περιφερικού αίματος, με χαρακτηριστικά δρεπανοκύτταρα (ανατύπωση από Παπακωνσταντίνου, 2003).**

Οι συνθήκες που ευνοούν τον πολυμερισμό της αιμοσφαιρίνης είναι: η ενδοκυττάρια πυκνότητα της αιμοσφαιρίνης, η πυκνότητα της ίδιας της HbS, η θερμοκρασία, το pH, την πυκνότητα του 2,3 DPG και τη συνύπαρξη άλλων αιμοσφαιρινών. Ακόμη, καταστάσεις όπως η υποξία, ο πυρετός, η αφυδάτωση, η λοίμωξη και η οξέωση, συντελούν στον πολυμερισμό εξίσου. Το όξινο pH (6,5-6,8) καθώς και η αύξηση του DPG, ευνοούν ιδιαίτερα την δρεπάνωση, ενώ η παρουσία της HbF επιδρά προστατευτικά, περιορίζοντας τον πολυμερισμό. Το ίδιο συμβαίνει και με την παρουσία των άλλων αιμοσφαιρινών. Συγκεκριμένα, η συμμετοχή των αιμοσφαιρινών στον πολυμερισμό διαβαθμίζεται ως εξής: HbS>HbA>HbF (Ζαραλής, 2008).

Τα δρεπανοκύτταρα ISC (Irreversible Sickled Cells), όπως αναφέρθηκε, δύναται να επανέλθουν στη φυσιολογική τους μορφή, αλλά οι επαναλαμβανόμενες αλλαγές μπορεί να οδηγήσουν σε μόνιμες βλάβες. Αποτέλεσμα αυτού είναι η παραμονή δρεπανοκυττάρων στην κυκλοφορία για μικρό χρονικό διάστημα έως την καταστροφή τους είτε παγιδευμένα στο ΔΕΣ ή λόγω αιμόλυσης στο περιφερικό αίμα. Ο αριθμός τους στην κυκλοφορία έχει άμεση σχέση με τη συχνότητα και τη βαρύτητα της αιμόλυσης και των αγγειοαποφρακτικών εκδηλώσεων. Γενικά, τα ISC είναι δύσκαμπτα και δύσκολα διέρχονται από τα διάφορα αγγεία, έχουν μειωμένη ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου, μειωμένο χρόνο ζωής (10-15 μέρες) και πολύ συχνά προκαλούν αποφράξεις αγγείων λόγω προσκόλλησής τους στο τοίχωμα των αγγείων (εξαιτίας της δρεπανοειδούς σχήματος). Ακόμη, αυξάνουν τη γλοιότητα του αίματος και επιβραδύνουν περισσότερο την ροή, με επακόλουθο την πρόκληση υποξίας στους διάφορους ιστούς και όργανα (Βοργιάς και Λαουτάρη, 1995).

Στη διάγνωση της νόσου συμβάλλουν οι δοκιμασίες δρεπάνωσης αλλά και η ηλεκτροφόρηση για ανίχνευση του κλάσματος της HbS. Βέβαια απαραίτητος είναι και ο ποσοτικός προσδιορισμός των υπόλοιπων κλασμάτων της αιμοσφαιρίνης. Η HbA στην ομόζυγη μορφή ( $\beta\text{s}/\beta\text{s}$ ) απουσιάζει, η HbF είναι 5-20%, η HbS 80-85% και HbA<sub>2</sub> είναι φυσιολογική. Αξιόλογα και ακριβή αποτελέσματα παρουσιάζει και η εξέταση DNA με τη μέθοδο της PCR, για την ανίχνευση των μεταλλαγμένων γονιδίων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως στον προγεννητικό έλεγχο (Bain, 2006).

#### **4.3.2. Ετερόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία**

Ετερόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία καλείται η αιμοσφαιρινοπάθεια S/A. Το γονίδιο για την παθολογική αιμοσφαιρίνη κληρονομήθηκε από έναν τουλάχιστον γονιό, οποίος θα πρέπει να είναι τουλάχιστον φορέας. Οι ετερόζυγοι για δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι ασυμπτωματικοί φορείς, ενώ εμφανίζουν επώδυνες κρίσεις, αγγειοαποφρακτικά φαινόμενα και δρεπάνωση των ερυθρών, σε συνθήκες που ευνοούν τον πολυμερισμό της αιμοσφαιρίνης π.χ. συνθήκες υποξίας (με

κορεσμό  $O_2 < 40\%$ ). Χαρακτηριστικές εκδηλώσεις αποτελούν η υποσθενουρία και η διαλείπουσα αιματουρία, ενώ στο περιφερικό αίμα απουσιάζουν τα δρεπανοκύτταρα και ανιχνεύονται λίγα στοχοκύτταρα. Τέλος, η διάγνωση της ετερόζυγης μορφή δρεπανοκυττρικής αναιμίας, βασίζεται στις ίδιες δοκιμασίες με την ομόζυγη μορφή. Ωστόσο, στην ηλεκτροφόρηση φαίνεται ότι η HbA είναι 60-80%, η HbS 20-40%, η HbF < 2% και η HbA<sub>2</sub> φυσιολογική (Metha & Hoffbrand, 2009).

#### **4.3.3. Άλλα δρεπανοκυτταρικά σύνδρομα**

##### **Η Αιμοσφαιρινοπάθεια S/C**

Προκύπτει από διπλή ετεροζυγοτία και χαρακτηρίζεται από τη συνύπαρξη αιμοσφαιρίνης S και C. Δυστυχώς όμως, η παρουσία της αιμοσφαιρίνης C αφυδατώνει τα ερυθρά ευνοώντας τον πολυμερισμό τους και κατ' επέκταση τη μετατροπή τους σε δρεπανοκύτταρα. Παρόλα αυτά, η νόσος αυτή εμφανίζει ηπιότερες εκδηλώσει από ότι η ομόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία, με μέτριου βαθμού αιμόλυση και παρουσία σωματίων Howell-Jolly και Pappenheimer (Okpala, 2004). Ως διαγνωστικό μέσο, χρησιμοποιείται η ανίχνευση στοχοκυττάρων με φυσιολογικό MCHC και βέβαια η ηλεκτροφόρηση, όπου ανιχνεύονται HbS 30-60%, HbF 2-15%, HbC 30-60% και απουσία της κύριας HbA (Bain, 2006).

##### **Η Αιμοσφαιρινοπάθεια S/D**

Προέρχεται από διπλή ετεροζυγωτία S/D και μοιάζει με την αιμοσφαιρινοπάθεια S/C ακόμη και στα ποσοστά των αιμοσφαιρινικών κλασμάτων, αλλά εμφανίζει πιο ήπιες κλινικοεργαστηριακές εκδηλώσεις (Μελέτης, 2003).

##### **Η Αιμοσφαιρινοπάθεια S/E**

Στην «Αιμοσφαιρινοπάθεια S/E, ανιχνεύονται και οι δυο παθολογικές αιμοσφαιρίνες HbS και η HbE, όπου HbE < 30%. Συνήθως δεν εμφανίζονται αγγειοαποφρακτικά φαινόμενα, ενώ χαρακτηρίζεται από ήπια αιμολυτική αναιμία και μικροκυττάρωση (Χαλεβελάκης, 1999).

## **Η Αιμοσφαιρινοπάθεια S/O-Arab**

Η Αιμοσφαιρινοπάθεια S/O-Arab, μοιάζει με την αιμοσφαιρινοπάθεια S/C (Bain, 2006).

### **4.3.4. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια C**

Η Αιμοσφαιρινοπάθεια C, συναντάται κυρίως στις ακτές της δυτικής Αφρικής. Χαρακτηρίζεται από ύπαρξη αιμοσφαιρίνης C η οποία προκύπτει από την αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος με λυσίνης. Η αιμοσφαιρίνη C εμφανίζει μειωμένη διαλυτότητα και οδηγεί σε σχηματισμό ενδοερυθροκυτταρικών κρυστάλλων που φυσικά καταλήγει σε κατακρήμνιση. Στα νεογνά, η ύπαρξη HbC προκαλεί αιμολύσεις των ερυθρών, ενώ γενικά η παρουσία της προκαλεί απώλεια  $K^+$ ,  $Na^+$  και νερού, αφυδατώνοντας τα ερυθρά και αυξάνοντας την MCHC.

Στην ετερόζυγη μορφή της δεν εμφανίζει ιδιαίτερα σοβαρές εκδηλώσεις, ενώ εμφανίζει στοχοκύτταρα >10%, HbA:50-60% και HbC:40-50%. Αντιθέτως, στην ομόζυγη εκδοχή της εμφανίζει αρκετά σοβαρές κλινικοεργαστηριακές εκδηλώσεις, ενώ στην ηλεκτροφόρηση αποτυπώνεται η απουσία της HbA, η μέτρια αυξημένη HbF και η παρουσία της HbC κατά 60 έως και 100% (Σπανός, 2001).

### **4.3.5. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια D**

Η Αιμοσφαιρινοπάθεια D διακρίνεται από την παρουσία της αιμοσφαιρίνης D, η οποία οφείλεται σε αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος από γλυκίνη στη θέση 121 της β-αλυσίδας. Η πιο διαδεδομένη μορφή της είναι η αιμοσφαιρινοπάθεια Punjab ή αλλιώς D-Los Angeles και συναντάται κυρίως στους Νέγρους (Χαλεβελάκης, 1999). Στην ετερόζυγη μορφή της είναι συνήθως ασυμπτωματική, ενώ εμφανίζονται λίγα στοχοκύτταρα και η HbA είναι 55-65% και η HbD 35-45%. Επίσης, στην ομόζυγη αιμοσφαιρινοπάθεια D, δεν εμφανίζονται ιδιαίτερα σοβαρές εκδηλώσεις. Ανιχνεύεται ανισοκυττάρωση, μικροκυττάρωση, στόχοκυττάρωση και ελαττωμένη οσμωτική πίεση των ερυθρών. Η HbF είναι αυξημένη ενώ η HbD μπορεί να φτάσει έως και 100%. Αξιοσημείωτο είναι πως για τη διάγνωσή της

απαραίτητη είναι η ηλεκτροφοριστική μελέτη και μάλιστα σε όξινο pH (σε αλκαλικό pH τρέχει μαζί με την HbS) (Bain, 2006).

#### **4.3.6. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια E**

Η Αιμοσφαιρινοπάθεια E, αποτελεί ασταθή ως προς τους οξειδωτικούς παράγοντες αιμοσφαιρίνη. Είναι εξαιρετικά σπάνια και συναντάται κυρίως στη νοτιοανατολική Ασία. Προέρχεται από μεταλλαγή αντικατάστασης του γλουταμινικού οξέως στην θέση 26 της β-αλυσίδας με λυσίνη. Θα μπορούσε να χαρακτηρίζεται ως θαλασσαιμική αιμοσφαιρινοπάθεια, αφού εμφανίζει τόσο ποσοτική όσο και ποιοτική διαταραχή (Μελέτης, 2003). Στους ετεροζυγότες είναι ασυμπτωματική με μέτρια μικροκυττάρωση – υποχρωμία και ανισοκυττάρωση, ενώ η HbA είναι 60-70% και η HbE είναι 30-40%. Στους ομοζυγώτες η αιμολυτική αναιμία είναι μέτριου βαθμού και παρουσιάζει στοχοκύτταρα και αυξημένο γενικά αριθμό ερυθρών αιμοσφαιρίων. Χαρακτηριστική είναι η απουσία HbA, ενώ η HbF είναι φυσιολογική και η HbE αποτελεί την κύρια αιμοσφαιρίνη 96-99%. Στην ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό PH κινείται μαζί με την HbA<sub>2</sub>, ενώ σε όξινο PH μαζί με την HbA (Bain, 2006).

#### **4.3.7. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια Hb Constant Spring**

Για την Αιμοσφαιρινοπάθεια Hb Constant Spring, οφείλεται η σύνθεση μιας, μακρύτερης από τη φυσιολογική, α-αλυσίδας. Στην ομόζυγη εκδοχή της ( $\alpha\alpha_{cs}/\alpha\alpha_{cs}$ ) εκδηλώνεται όπως η β-θαλασσαιμία (Μελέτης, 2003).

#### **4.3.8. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια Knossos**

Η Αιμοσφαιρινοπάθεια Knossos, προέρχεται από μεταλλαγή στη β-αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης και εμφανίζει παρόμοιες κλινικοεργαστηριακές εκδηλώσεις με την αιμοσφαιρινοπάθεια C (Μελέτης, 2003).

#### **4.3.9. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια O-Thrace (O- Arab)**

Η Αιμοσφαιρινοπάθεια O-Thrace (O- Arab), ανιχνεύεται κυρίως στους Πωμάκους της Θράκης κατά 7-8% και προκύπτει από αντικατάσταση του

γλουταμινικού οξέος με λυσίνη στην 121 θέση της β-αλυσίδας. Τα ετερόζυγα άτομα δεν εμφανίζουν συμπτώματα, ενώ τα ομόζυγα (HbO/HbO) εμφανίζουν ήπια αιμολυτική μικροκυτταρική και υπόχρωμη αναιμία (*Βοργιάς και Λαουτάρη, 1995*).

#### **4.3.10. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια HbC-Harlem**

Η Αιμοσφαιρινοπάθεια HbC-Harlem, προέρχεται από αντικαταστάσεις δυο αμινοξέων στην β-αλυσίδα. Σε αυτήν η δοκιμασία διαλυτότητας είναι θετική για τον ίδιο λόγο με την HbS. Αποτελεί σπάνια κατάσταση τόσο στην ετερόζυγη όσο και την ομόζυγη μορφή της (*Ζαραλής, 2008*).

#### **4.3.11. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια HbG- Philadelphia**

Η Αιμοσφαιρινοπάθεια HbG- Philadelphia, εντοπίζεται κυρίως στη νότιο Αφρική και αποτελεί την τρίτη στη σειρά σε συχνότητα αιμοσφαιρίνη στους νέγρους της Αμερικής, μετά την HbS και την HbC. Οφείλεται σε αντικαταστάσεις που συμβαίνουν στις α-αλυσίδες. Η ομόζυγη εκδοχή της δεν είναι συμβατή με τη ζωή αφού δεν παράγονται οι επαρκείς α-αλυσίδες, ενώ σε περίπτωση ετεροζυγωτίας είναι ασυμπτωματική (*Σπανός, 2001*).

#### **4.3.12. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια HbI**

Η Αιμοσφαιρινοπάθεια HbI, είναι σπάνια διαταραχή της αιμοσφαιρίνης, η οποία επηρεάζει το σχηματισμό των α- ή των β- αλυσίδων. Στην ηλεκτροφόρηση κινείται μεταξύ της Hb Barts και της HbH. Οι τρεις αυτές αιμοσφαιρίνες κινούνται στην άνοδο πριν από την HbA (σε οξική κυτταρίνη και αλκαλικό pH). Θεωρείται αιμοσφαιρίνη ταχείας κινητικότητας και διακρίνεται από την HbH λόγω της απουσίας των εγκλείστων τα οποία φέρει η HbH (*Ζαραλής, 2008*).

#### **4.3.13. Οι Αιμοσφαιρινοπάθειες Hb Bart's και HbH**

Οι Αιμοσφαιρινοπάθειες Hb Bart's και HbH, ανευρίσκονται συνήθως σε ασθενείς με α-θαλασσαιμία, οι οποίοι παράγουν λιγότερες α- αλυσίδες από ότι οι μη ασθενείς. Η Hb Barts εμφανίζεται στα νεογνά και αποτελείται από 4 γ-αλυσίδες, ενώ

η HbH παρατηρείται στα παιδιά, ύστερα από αλλαγή της γ- αλυσίδας σε β-αλυσίδα, με την μορφή τετραμερούς από 4 β-αλυσίδες (Χαλεβελάκης, 1999).

#### **4.3.14. Ασταθείς αιμοσφαιρίνες**

Ο όρος ασταθείς αιμοσφαιρίνες, αναφέρεται σε παθολογικές αιμοσφαιρίνες οι οποίες εμφανίζουν μοριακή αστάθεια, με αποτέλεσμα τη μετουσίωσή τους και την κατακρήμνισή τους στο ερυθρό, υπό κάποιες συνθήκες όπως σε περίπτωση λοίμωξης. Οι αιμοσφαιρίνες αυτές προκύπτουν από μεταλλαγές αντικατάστασης ενός οξέος, της β-, συνήθως, αλυσίδας.

Ανάλογα με τη θέση του αμινοξέος ως προς το μόριο της αίμης (άπω ή εγγύς), προκύπτει η διαταραχή στο μόριο της αιμοσφαιρίνης. Τέτοιες διαταραχές είναι η μείωση ή αύξηση της συγγένειας προς το O<sub>2</sub>, αύξηση των επιπέδων της μεθαιμοσφαιρίνης, χαλάρωση του δεσμού μεταξύ αλυσίδας και αίμης, με αποτέλεσμα το νερό να εισέρχεται εύκολα. Η εμφάνιση ή όχι αναιμίας εξαρτάται από το βαθμό συγγένειας της αιμοσφαιρίνης προς το οξυγόνο (μειωμένη συγγένεια, οδηγεί σε μειωμένη αιμοσφαιρίνη- αναιμία) (Okpala, 2004).

Έχουν διαπιστωθεί >100 είδη ασταθών αιμοσφαιρινών με αιμολυτικά ή όχι επεισόδια. Οι πιο χαρακτηριστικές είναι η Hb Hammersmith, Hb Bristol, Hb Genova και Hb Seattle (Μελέτης, 2003).

#### **4.3.15. Αιμοσφαιρίνες με αυξημένη συγγένεια προς το οξυγόνο**

Οι Αιμοσφαιρίνες με αυξημένη συγγένεια προς το οξυγόνο, προκύπτουν από μεταλλάξεις που συμβαίνουν στις αλυσίδες και συγκεκριμένα στο σημείο αλληλεπίδρασης των α- και β- αλυσίδων, στο σημείο σύνδεσης της Hb με το 2,3 DPG και στο σημείο αλληλεπίδρασης των αλυσίδων με τα μόρια της αίμης. Παρόλα αυτά, οι συνέπειες δεν είναι κλινικά εμφανείς στους πάσχοντες (Ζααράλης, 2008).

#### 4.3.16. Αιμοσφαιρίνες με μειωμένη συγγένεια προς το οξυγόνο

Οι Αιμοσφαιρίνες με μειωμένη συγγένεια προς το οξυγόνο, είναι οι παθολογικές αιμοσφαιρίνες, οι οποίες δε δύναται να συγκρατήσουν το οξυγόνο που μεταφέρουν και να το ελευθερώσουν όλο στους ιστούς. Αποτέλεσμα αυτού του φαινομένου είναι η μη σωστή και επαρκής δέσμευση του οξυγόνου στους πνεύμονες και η εύκολη αποδέσμευσή του στους ιστούς με συνέπεια να παρατηρείται ιστική υποξία, κυάνωση (αύξηση της αναχθείσας αιμοσφαιρίνης) και ήπια αιμολυτική αναιμία (Zaralής, 2008).

#### 4.3.17. Οι Αιμοσφαιρινοπάθειες M

Οι Αιμοσφαιρινοπάθειες M, προκύπτουν από αντικαταστάσεις αμινοξέων στις α- και β-αλυσίδες κοντά στις συνδέσεις του μορίου της αίμης. Έτσι, ο σίδηρος οξειδώνεται εύκολα και παραμένει μόνιμα συνδεδεμένος με την τρισθενή του μορφή. Αυτό έχει ως επακόλουθο, τη συσσώρευση μεθαιμοσφαιρίνης και μάλιστα υπεράνω των φυσιολογικών ορίων. Συνεπώς, η αιμοσφαιρίνη χάνει την ικανότητα μεταφοράς 4 μορίων οξυγόνου και μεταφέρει λιγότερα ή καθόλου, με δυσάρεστη συνέπεια την μη επαρκή οξυγόνωση των ιστών και των οργάνων. Στις αιμοσφαιρίνες M ανήκουν οι HbM-Boston ( $\alpha$ -Met-Hb), HbM-Iwate ( $\alpha$ -Met-Hb), HbM-Saskatoon ( $\beta$ -Met- Hb), HbM-Hyde-Park ( $\beta$ -Met-Hb) και HbM-Milwaukee (Okpala, 2004).

Η μεταφορά της νόσου από τους γονείς στο παιδί γίνεται με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα. Οι ομοζυγωτίες είναι ασυμβίβαστες με τη ζωή, ενώ η ετερόζυγη μορφή χαρακτηρίζεται από «κυάνωση» που εμφανίζεται από τη νεογνική ηλικία αμέσως μετά τη γέννηση και μετά το 2-4 ο μήνα ζωής, έως να αντικατασταθούν οι διαταραγμένες αλυσίδες. Εκτός από τη χαρακτηριστική κυάνωση, παρατηρείται ήπια αιμολυτική αναιμία και σωματία Heinz (Metha & Hoffbrand, 2009). Για την ανίχνευση των αιμοσφαιρινών M η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε άμυλο (Bain, 2004).



#### 4.3.18. Επίκτητες αιμοσφαιρινοπάθειες

Στις επίκτητες αιμοσφαιρινοπάθειες ανήκουν οι παθολογικές αιμοσφαιρίνες Μεθαιμοσφαιρίνη, Θειοαιμοσφαιρίνη και Ανθρακυλαιμοσφαιρίνη, οι οποίες μπορεί να συνοδεύονται ή όχι από αιμόλυση. Και στις τρεις αυτές αλλοιωμένες αιμοσφαιρίνες συνοδεύονται από αδυναμία μεταφοράς οξυγόνου, ενώ προκύπτουν από την επίδραση εξωγενών παραγόντων (Μελέτης, 2003).

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες αυτές είναι:

- Μεθαιμοσφαιριναιμία
- Θειοαιμοσφαιριναιμία
- Ανθρακυλαιμοσφαιριναιμία

#### 4.4. Θαλασσαιμικές Αιμοσφαιρινοπάθειες

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ταυτόχρονη παρουσία ποσοτικής και ποιοτικής διαταραχής της αιμοσφαιρίνης, συνιστά τις θαλασσαιμικές αιμοσφαιρινοπάθειες. Πρόκειται δηλαδή, για διπλή ετεροζυγωτία η οποία χαρακτηρίζεται από τη συνύπαρξη θαλασσαιμικού συνδρόμου και ποιοτικού τύπου αιμοσφαιρινοπάθεια (Ζαραλής, 2008).

##### 4.4.1. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια Lepore

Η Αιμοσφαιρινοπάθεια Lepore (ή Πύλος) ([www.medlook.net](http://www.medlook.net)), εμφανίζεται λόγω σύντηξης των γονιδίων β και δ, με αποτέλεσμα την σύνθεση μιας νέας υβριδικής πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Εντοπίζονται δυο μορφές της. Η ετερόζυγη μορφή της, μοιάζει με την ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. Έτσι, η HbA=70-90%, HbA<sub>2</sub>=ελαττωμένη σε φυσιολογικά όρια και HbF=1,5-18%, ενώ το νέο κλάσμα που εμφανίζεται, η Hb Lepore 10-15%. Αντίθετα, η ομόζυγη μορφή της, μοιάζει με την

ενδιάμεση β-θαλασσαιμία και χαρακτηρίζεται από πλήρη απουσία των HbA και HbA<sub>2</sub>, με HbF=80% και την παρουσία της Hb Lepore να φτάνει το 20% (Χαλαβελάκης, 1999).

Κατά την ηλεκτροφόρηση η Hb Lepore κινείται ανάμεσα στην HbA και την HbA<sub>2</sub> (στο ύψος δηλαδή της HbS). Αξιοσημείωτο είναι επίσης ότι έχουν βρεθεί διπλοί ετεροζυγώτες με γονίδιο Lepore στο ένα χρωμόσωμα και γονίδιο β-θαλασσαιμίας ή αιμοσφαιρινοπάθειας S. Στην Ελλάδα περιπτώσεις Lepore έχουν βρεθεί στην Πύλο ([www.medlook.net](http://www.medlook.net)).

#### **4.4.2. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια Lepore/B<sup>+</sup> θαλασσαιμία**

Η Αιμοσφαιρινοπάθεια Lepore/B<sup>+</sup> θαλασσαιμία, εμφανίζει κλινικοεργαστηριακές εκδηλώσεις, όμοιες με την ενδιάμεση β-θαλασσαιμία (Μελέτης, 2003).

#### **4.4.3. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια SS/α- θαλασσαιμία**

Στην Αιμοσφαιρινοπάθεια SS/α-θαλασσαιμία, συνυπάρχει α-θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική αναιμία. Στη συνύπαρξη αυτή, ο ασθενής παρουσιάζει ηπιότερες εκδηλώσεις από ότι εμφανίζει στην ομόζυγη S/S δρεπανοκυτταρική αναιμία. Η νόσος παρουσιάζει ελαττωμένη MCV και MCVC, ανάλογα με το βαθμό έλλειψης των α-αλυσίδων, παρά την αύξηση της HbF (Ζαράλης, 2008).

#### **4.4.4. Η Μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία**

Η Μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία, αποτελεί συνύπαρξη ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας και ετερόζυγης δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Αν και μοιάζει με τη δρεπανοκυτταρική αναιμία, η κλινική του εικόνα χαρακτηρίζεται από την έλλειψη των β-αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης. Στην διπλή ετεροζυγωτία (β<sub>0</sub>/β<sub>s</sub>), δεν συντίθενται οι φυσιολογικές β-αλυσίδες, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται αιμολυτική αναιμία με μορφολογία ερυθρών όπως της β-θαλασσαιμίας. Στην ηλεκτροφόρηση, παρατηρείται πλήρη έλλειψη αιμοσφαιρίνης A, αύξηση των αιμοσφαιρινών A<sub>2</sub> και

F, ενώ εμφανίζεται η HbS ως νέο κλάσμα, το οποίο προηγείται της A<sub>2</sub>. Αντίθετα, στην διπλή ετεροζυγωτία (β<sub>0</sub>/β<sub>s</sub>), η νόσος εμφανίζεται με πιο ήπια συμπτώματα. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης εδώ μοιάζει με της προηγούμενης μορφής, αλλά ευρίσκεται αιμοσφαιρίνη A, περίπου 10-20% (Ζααλής, 2008).

#### **4.4.5. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια S/δβ<sub>0</sub> – θαλασσαιμία**

Η Αιμοσφαιρινοπάθεια S/δβ<sub>0</sub>-θαλασσαιμία, είναι διπλή ετερόζυγη κατάσταση (ιδιαίτερα σπάνια) και εμφανίζει ήπια κλινική εικόνα. Η νόσος αυτή χαρακτηρίζεται από παντελή έλλειψη αιμοσφαιρίνης A, HbA<sub>2</sub> μικρότερη από 2% και HbF 6-8%. Ακόμη, χαρακτηριστική είναι η αναλογία α/β+γ=1,3-1,6 (Ζααλής, 2008).

#### **4.4.6. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια S/Lepore**

Η Αιμοσφαιρινοπάθεια S/Lepore, εμφανίζει παρόμοια και πιο ήπια εικόνα από την δρεπανοκυτταρική αναιμία και την S/β<sub>0</sub>-θαλασσαιμία. Εμφανίζει φυσιολογικά ποσά αιμοσφαιρίνης A, αλλά μικροκυττάρωση και υποχρωμία, ενώ υπό συνθήκες χαμηλής ατμοσφαιρικής πίεσης και περιεκτικότητας οξυγόνου, τα ερυθρά μεταπίπτουν σε δρεπανοκύτταρα (Ζααλής, 2008).

#### **4.4.7. Στην Αιμοσφαιρινοπάθεια S/HPFH**

Στην Αιμοσφαιρινοπάθεια S/HPFH, ανιχνεύεται HbA<sub>2</sub><2,5% και HbF περίπου 15-35%. Η παρουσία της αιμοσφαιρίνης F αποτρέπει την εμφάνιση αναιμίας, αφού δεν επιτρέπει τον πολυμερισμό της αιμοσφαιρίνης S (Μελέτης, 2003).

#### **4.4.8. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια C/β-θαλασσαιμία**

Η Αιμοσφαιρινοπάθεια C/β-θαλασσαιμία, μοιάζει με την αιμοσφαιρινοπάθεια, αλλά διαφέρει από αυτή καθώς φέρει μικρότερες συγκεντρώσεις αιμοσφαιρίνης C (Μελέτης, 2003).

#### **4.4.9. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια E/β-θαλασσαιμία (E/β<sub>0</sub>) ή (E/β<sub>+</sub>)**

Η Αιμοσφαιρινοπάθεια E/β-θαλασσαιμία (E/β<sub>0</sub>) ή (E/β<sub>+</sub>), θεωρείται ως η πιο σοβαρή εκδήλωση αιμοσφαιρίνης E. Κατά την ηλεκτροφόρηση ανιχνεύονται κλάσματα των A, E και F αιμοσφαιρινών, με εξαίρεση την περίπτωση της (E/β<sub>0</sub>), όπου χαρακτηριστική είναι η απουσία της κύριας αιμοσφαιρίνης A (Μελέτης, 2003).

#### **4.4.10. Η Αιμοσφαιρινοπάθεια O-Thrace/ β-θαλασσαιμία**

Η Αιμοσφαιρινοπάθεια O-Thrace/β-θαλασσαιμία, εμφανίζεται με μορφή διπλής ετεροζυγωτίας (HbO/β<sub>0</sub>) ή (HbO/β<sub>+</sub>). Στην περίπτωση της πρώτης, ανευρίσκεται μέτρια μικροκυτταρική υπόχρωμη αναιμία (όμοια με της ετερόζυγη β<sub>0</sub>-θαλασσαιμία), ενώ η δεύτερη περίπτωση είναι συμπτωματική (Ζαράλης, 2008).

## ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

### 5. Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΚΛΑΣΙΚΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΩΝ ΑΝΑΙΜΙΩΝ

#### 5.1. Η ηλεκτροφόρηση ως μέθοδος ανίχνευσης αιμοσφαιρινικών κλασμάτων

Το 1975 η Διεθνής Επιτροπή Τυποποίησης Αιματολογίας έκανε κάποιες προτάσεις σχετικά με τη διάγνωση των μη φυσιολογικών αιμοσφαιρινών και θαλασσαιμιών σε διάφορα κλινικά εργαστήρια. Η επιτροπή πρότεινε βασικές εξετάσεις για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των παθολογικών αιμοσφαιρινών. Αυτές οι εξετάσεις είναι, η γενική εξέταση αίματος, η ηλεκτροφόρηση σε pH 9.2, δοκιμασίες διαλυτότητας και δρεπάνωσης και ο ποσοτικός προσδιορισμός των HbA<sub>2</sub> και HbF. Σε περίπτωση ανίχνευσης παθολογικών αιμοσφαιρινών, περεταίρω εξετάσεις είναι αναγκαίες για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος και την ταυτοποίηση της παθολογικής αιμοσφαιρίνης. Σε αυτές τις τεχνικές διαχωρισμού, συμπεριλαμβάνεται και η ηλεκτροφόρηση σε pH 6.0-6.2 και η μέθοδος ισοηλεκτροεστίασης (IEF). Επίσης, προτάθηκαν ακόμη δυο τεχνικές σχετικά με τις ασταθείς αιμοσφαιρίνες ή τις αιμοσφαιρίνες που έχουν υποστεί μεταλλαγή ως προς τη χημική συγγένεια με το οξυγόνο. Αυτές είναι η αύξηση της θεοκρασίας του περιβάλλοντος όπου βρίσκεται η αιμοσφαιρίνη και η σταθερότητα στην ισοπροπανόλη (*Higgins & Clarke, 2000*).

Η ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό και όξινο pH, είναι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε κατά το πέρασμα των χρόνων και καθιερώθηκε ως μέθοδος για την εξέταση των δειγμάτων με σκοπό την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαφόρων τύπων αιμοσφαιρινών. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης του δείγματος το αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση «ζωνών», ποικίλων μεγεθών, οι οποίες γίνονται ορατές ύστερα από χρώση με Amino Black Ή Acid Violet (ή άλλες κοινές χρωστικές) (*Westemeier et al. 2001, Higgins & Clarke 2000*). Στη συνέχεια, οι «ζώνες» μετριούνται με τη βοήθεια της πυκνομετρικής ανάλυσης και υπολογίζονται

οι ποσοτικές συγκεντρώσεις, που αντιστοιχούν στις αιμοσφαιρίνες που ανιχνεύθηκαν.

Η μετακίνηση των διαφόρων αιμοσφαιρινών σε αλκαλικό pH, όπως αυτές εμφανίζονται σε ένα φυσιολογικό ενήλικο άτομο είναι η HbA (η κύρια αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων) η οποία προηγείται των άλλων, καθώς κινείται γρηγορότερα, ακολουθεί η HbF, ενώ στο τέλος προς την κάθοδο κινείται η HbA<sub>2</sub> (Zaralής, 2008).

Αντίθετα, όταν περιέχονται μη φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες στο δείγμα, η εικόνα του ηλεκτροφορήματος αλλάζει. Η HbC αιμοσφαιρίνη μεταναστεύει κοντά στην κάθοδο μαζί με την HbA<sub>2</sub>, η HbS βρίσκεται μεταξύ των HbA και HbF, ενώ η HbH και η Hb Bart's αιμοσφαιρίνες, οι οποίες είναι ασταθείς, κινούνται γρηγορότερα από τις υπόλοιπες και μάλιστα προηγούνται της HbA. Ωστόσο, πρώτη εμφανίζεται η HbH (εικόνα 18) ([www.medlook.net](http://www.medlook.net)).

<b>cathode(-)</b>					<b>anode(+)</b>
<b>normal</b>	Hb A <sub>2</sub>		Hb F	Hb A	
<b>abnormal</b>	Hb C	Hb S		Bart's	Hb H

Εικόνα 18. Η κίνηση ορισμένων τύπων αιμοσφαιρίνης, κατά την ηλεκτροφόρηση (ανατύπωση από [www.medlook.net](http://www.medlook.net)).

Εξετάζοντας και άλλες μεθόδους, διαπιστώνεται ότι η ποσοτική μέτρηση των διαφόρων αιμοσφαιρινών υστερεί ως προς την ακρίβεια και τον χρόνο έκβασης των αποτελεσμάτων. Για παράδειγμα, μια από τις πιο χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την ανάλυση της αιμοσφαιρίνης, είναι η ηλεκτροφόρηση σε οξική κυτταρίνη και σε αλκαλικό pH 8.6. Είναι γρήγορη, παραγωγική και ικανή να διαχωρίσει τις κοινές αιμοσφαιρίνες όπως HbS, F, A και C, αλλά αδυνατεί να αναλύσει τις HbA<sub>2</sub>, C, O και E καθώς επίσης τις S, D, G και αρκετές άλλες. Συνεπώς, η ηλεκτροφόρηση σε κιτρικό άγαρ σε pH 6.2 (όξινο), είναι απαραίτητη για την επιβεβαίωση αυτών των αιμοσφαιρινών. Παρόλα αυτά, οι ηλεκτροφορητικές μέθοδοι αδυνατούν να διαχωρίσουν την HbE από την HbO, την HbD από την HbG και αρκετές άλλες. Έτσι, η λάθος διάγνωση είναι αναπόφευκτη (Ou & Rongerud, 2001).

Πολλοί θεωρούν τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης χρονοβόρα, ιδιαίτερα απαιτητική ως προς την εμπειρία του προσωπικού και την προετοιμασία των δειγμάτων, όχι ιδιαίτερα αξιόπιστη και ακριβής στον ποσοτικό προσδιορισμό χαμηλών συγκεντρώσεων των αιμοσφαιρινών (π.χ. HbF) ή στην ανίχνευση πολύ γρήγορα μετακινούμενων αιμοσφαιρινών (π.χ. HbB Bart's). Αντίθετα, αρκετοί την επιλέγουν ως μέθοδο ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης των αιμοσφαιρινικών κλασμάτων (*Higgins et al., 2009*).

## **5.2. Η Συμβολή της ηλεκτροφόρησης στην ανίχνευση αιμοσφαιρινών**

Στην ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης, τα ηλεκτρικά φορτισμένα μόρια, με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, μετακινούνται προς τους δυο πόλους (θετικό ή αρνητικό). Τα θετικά φορτισμένα μόρια κινούνται προς τον αρνητικό πόλο ενώ, τα αρνητικά φορτισμένα προς την κάθοδο. Όμως, επειδή σε ένα δείγμα περιέχονται διάφορα είδη αιμοσφαιρινών, οι οποίες αποτελούνται από διαφόρους και διαφορετικούς συνδυασμούς αιμοσφαιρινικών αλυσίδων (φυσιολογικές ή ακόμη και μη φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες), παρατηρούνται ποικίλοι βαθμοί κινητικότητας (*Westermeier et al., 2001*).

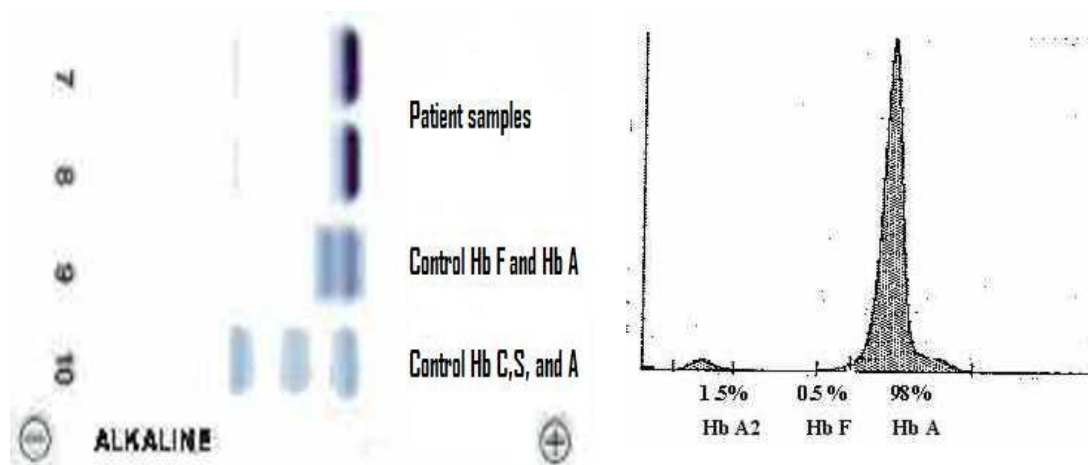
### **5.2.1. HbA, HbF και HbA<sub>2</sub>**

Οι αιμοσφαιρίνες HbA, HbF και HbA<sub>2</sub> είναι φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες και ανιχνεύονται στους υγιείς ενήλικες (εικόνα 19). Η HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) θεωρείται ως κύρια αιμοσφαιρίνη στον ενήλικα και εμφανίζεται φυσιολογικά σε ποσοστό περίπου 95%, ενώ οι άλλες δυο σε μικρές ποσότητες. Η HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) χαρακτηρίζεται εμβρυική και εμφανίζεται στον ενήλικα μαζί με την HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\beta_2$ ) σε ποσοστό περίπου 3,5% (*Zaralής 2008, Μελέτης 2003, Metha & Hoffbrand 2009*).

Οι τρεις αυτές κοινές αιμοσφαιρίνες, ανιχνεύονται με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης και μπορούν να προσδιοριστούν ποσοτικά. Έτσι, δύναται η διάγνωση σε περίπτωση διαταραχής της ποσότητας και της αναλογίας τους. Για την

ακριβή ποσοτική μέτρηση της HbA<sub>2</sub> χρησιμοποιείται η κλασική ηλεκτροφόρηση σε ταινίες οξικής κυτταρίνης. Σε αύξηση της HbA<sub>2</sub> πάνω από 3,5% διαγιγνώσκεται ετερόζυγη β- Μεσογειακή αναιμία. Αν το ποσό της HbA<sub>2</sub> είναι μεγαλύτερο από 7%, τότε επιβάλλεται επαλήθευση των αποτελεσμάτων, καθώς ενδέχεται συνύπαρξη α- και β- Μεσογειακής αναιμίας ή ύπαρξη αιμοσφαιρίνης τύπου Lepore, με την οποία κινούνται μαζί στην ηλεκτροφόρηση (Higgins & Clarke, 2000).

Τυπικά οι φορείς της β-Μεσογειακής αναιμίας έχουν μειωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC) και ελάχιστα μειωμένα επίπεδα αιμοσφαιρίνης. Παρά το γεγονός αυτό, ως δείκτης για τη διάγνωση φορέων β-θαλασσαιμίας αξιολογούνται τα αυξημένα επίπεδα της HbA<sub>2</sub>, τα οποία φυσιολογικά είναι 4-8%, ενώ σε κάποια άτομα η τιμή της HbF πιθανόν είναι ελαφρώς αυξημένη (1-3%). Στην περίπτωση που η τιμή της HbF βρίσκεται πάνω από 5%, πιθανόν μαζί με την β Μεσογειακή αναιμία να συνυπάρχει και άλλη διαταραχή. Ωστόσο, πρόβλημα διαφορικής διάγνωσης προκύπτει στη Μεσογειακή αναιμία, σε περίπτωση συνύπαρξης ασταθής αιμοσφαιρίνης, καθώς σπάνια η ασταθής αιμοσφαιρίνη αναδεικνύεται ως παθολογικό κλάσμα στην ηλεκτροφόρηση (Weatherall & Clegg, 2001).



Εικόνα 19. Η αιμοσφαιρίνη A αποτελεί το 98%, η F το 0,5% και η A<sub>2</sub> το 1.5% (ανατύπωση από [www.medlook.net](http://www.medlook.net)).



### 5.2.2. HbS

Η αιμοσφαιρίνη HbS ανακαλύφθηκε το 1949 από τον Paulin και τους συνεργάτες του (*www.harvard.com*). Η ανίχνευση της αιμοσφαιρίνης HbS καθιστά την ύπαρξη της νόσου της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Η διάγνωση για την δρεπανοκυτταρική αναιμία εξαρτάται από την HPLC<sup>14</sup> και την ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης. Ιδιαίτερα αξιόλογη είναι η δοκιμασία δρεπάνωσης, κατά την οποία τα ερυθρά μετατρέπονται σε δρεπανοκύτταρα, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Σε κάποιες περιπτώσεις δρεπανοκυτταρικής αναιμίας αυξάνονται και τα επίπεδα της HbF. Έτσι, η διάγνωση προκύπτει επίσης από τον προσδιορισμό των HbS και HbF (*Higgins & Clarke, 2000*).

Οι ηλεκτροφορητικές μέθοδοι συμβάλουν σε μια τέτοια διάγνωση, καθώς ανιχνεύουν και ταυτοποιούν τις HbS και HbF. Επίσης, ο ποσοτικός προσδιορισμός τους είναι εφικτός. Όμως, στην περίπτωση που συνυπάρχει HbD ή HbG, στην ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό pH κινούνται μαζί με την HbS και δεν διαχωρίζονται. Έτσι, χρησιμοποιείται η ηλεκτροφόρηση σε όξινο pH, όπου ο διαχωρισμός των HbD και HbG με την HbS, είναι εφικτός (*Ou & Rongrud, 2001*).

### 5.2.3. HbC

Η παρουσία αιμοσφαιρίνης HbC προκύπτει από μεταλλαγή στο γονίδιο της β-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης και διαγιγνώσκεται με μικροσκοπική εξέταση περιφερικού αίματος, όπου ανιχνεύονται στοχοκύτταρα<sup>15</sup>. Βέβαια, η HbC δύναται να ανιχνευθεί ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε όξινο pH και όχι σε αλκαλικό. Σε αλκαλικό περιβάλλον κινείται μαζί με την HbA<sub>2</sub> και υπάρχει ο κίνδυνος λάθος διάγνωσης. Πιθανή σύγχυση με την ετερόζυγη β-θαλασσαιμία (*Bain, 2006*).

---

<sup>14</sup>Η έννοια HPLC (High-performance liquid chromatography), θα αναλυθεί αργότερα (*Higgins & Clarke, 2000*). <sup>15</sup>Ερυθροκύτταρα, τα οποία έχουν διογκωθεί στο κέντρο τους λόγω της αιμοσφαιρίνης και μοιάζουν με στόχους (*Μελέτης, 2003*).

#### **5.2.4. HbD**

Για την ταυτοποίηση της HbD, η ηλεκτροφορητική μέθοδος σε όξινο pH θεωρείται η πιο κατάλληλη, καθώς σε αλκαλικό κινείται μαζί με την HbS και αδυνατούν να διαχωριστούν, οδηγώντας σε ψευδή συμπεράσματα (*Westermeier et al., 2001*).

#### **5.2.5. Hb Constant Spring**

Η Hb Constant Spring είναι αιμοσφαιρινοπάθεια, η εμφάνιση της οποίας οφείλεται σε μεταλλαγή στην α-αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης και οδηγεί σε επιμήκυνση της φυσιολογική α-αλυσίδας. Ανιχνεύεται κατά την ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό pH 8,5 ως μικρό κλάσμα πίσω από την HbA<sub>2</sub> (*Metha & Hoffbrand, 2009*).

#### **5.2.6. HbO Arab και HbD Punjab**

Οι Hb O-Arab και Hb D Punjab, προκύπτουν από μεταλλαγή στο γονίδιο της β-αλυσίδας και δύναται να διαγνωστούν με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρηση (*Ou and Rongerud, 2001*).

#### **5.2.7. HbE**

Η HbE είναι αιμοσφαιρινοπάθεια, η οποία οφείλεται σε δομική διαταραχή. Ανιχνεύεται και ταυτοποιείται με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε όξινο pH και όχι αλκαλικό. Στο αλκαλικό pH, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα της HbE, είναι παρόμοια με της HbA<sub>2</sub>, με την οποία σε αρκετές περιπτώσεις συνυπάρχει (διπλή ετεροζυγωτία για HbE και β-θαλασσαιμία) (*Colah, 2009*).

#### **5.2.8. Hb Lepore**

Η Hb Lepore ( $\alpha_2(\delta\beta)_2$ ) είναι μια αιμοσφαιρίνη, με δομική διαταραχή, στην οποία η παθολογική αιμοσφαιρινική αλυσίδα είναι ένα υβρίδιο δβ και εντοπίζεται σε πολλά έθνη και ιδιαίτερα στους νοτιοευρωπαίους (*Weatherall & Clegg, 2001*). Έχει αποδειχθεί ότι διαγιγνώσκεται με την ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης (SDS-Page). Η διάκριση της αιμοσφαιρινοπάθειας Lepore από τη β-Μεσογειακή αναιμία με φυσιολογική τιμή HbA<sub>2</sub> ή δβ Μεσογειακή αναιμία, γίνεται με την

ηλεκτροφόρηση η οποία αποκαλύπτει το κλάσμα της Hb Lepore, σε αναλογία περίπου 10% μεταξύ της HbA<sub>2</sub> και HbA, στην ίδια θέση με τη HbS (Χαλεβελάκης, 1991).

### 5.2.9. Hb Chicago

Η Hb Chicago κινείται μαζί με την HbA, στην ηλεκτροφόρηση σε οξική κυτταρίνη και σε κιτρικό άγαρ (Ou & Rongerud, 2001).

### 5.2.10. Hb Bart's, Acetyl F, H, Hope et al.

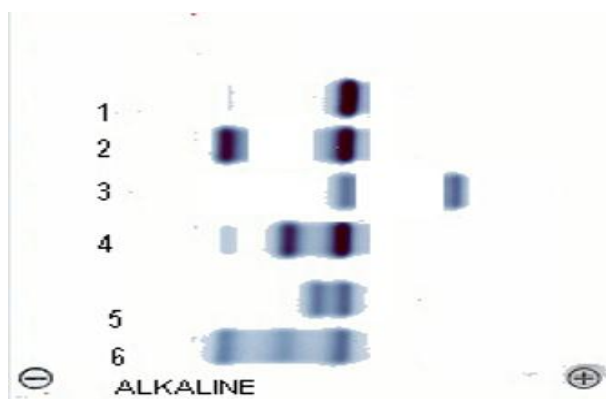
Οι Hb Bart's, Acetyl F, H, Hope, A1c, I, F, Camden, N-Baltimore, I-High Wycombe, J-Baltimore, N-Seattle, Grandy, Fannin-Lubbock, Malmo, South Florida, A, Chicago, G-Georgia, Lepore-Baltimore, P-Galveston, G-Coushatta, Lepore-Boston, E, Zurich, Osu Christiansborg, A<sub>2</sub>, G-Philadelphia, Korle Bu, Russ, E-Saskatoon, Richmond, D-Punjab, Deer Lodge, Koln, Montgomery, S, G-Taichung (Q-Tailand), G-San Jose, A'<sub>2</sub>, Hasharon, Q-India, Tampa, SG hybrid, C-Harlem, O-Arab, British Columbia and C είναι διάφοροι τύποι αιμοσφαιρινών οι οποίες εμφανίζονται πολύ συχνά πλέον (Ou & Rongerud, 2001). Αρκετές από αυτές τις αιμοσφαιρίνες δεν διαχωρίζονται μεταξύ τους ή με την HbA αιμοσφαιρίνη στις ηλεκτροφορητικές μεθόδους. Αυτό, δύναται να οδηγήσει σε λάθος αποτελέσματα και λάθος διάγνωση (Ou & Rongerud, 2001).

Αξιοσημείωτο είναι ότι, η έλλειψη σιδήρου Fe<sup>++</sup> προκαλεί μείωση της σύνθεσης όλων των τύπων αιμοσφαιρίνης, φυσιολογικών και παθολογικών. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να αποκαθιστάται οποιαδήποτε σιδηροπενία και ύστερα να πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης για την ανίχνευση τυχόν αναιμίας. Ωστόσο, αν μετά την θεραπεία της σιδηροπενίας εξακολουθεί η ύπαρξη μικροκυττάρωσης και υποχρωμίας στη γενική αίματος, τότε θα πρέπει να επαναλαμβάνεται ηλεκτροφόρηση σε αιμόλυμα πλυμένων ερυθρών του ασθενή (Ζαραλής, 2008).

### 5.3. Η SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση ή ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης

Υπάρχουν πολλά είδη ηλεκτροφορητικών τεχνικών τα οποία διαφέρουν ως προς το pH και τα χρησιμοποιούμενα είδη ηλεκτροφορητικών μέσων, όπως το χαρτί, το άμυλο, το άγαρ, η οξική κυτταρίνη ή η γέλη ακρυλαμίδης (ή πολυακρυλαμίδης) (Westermeier et al., 2001).

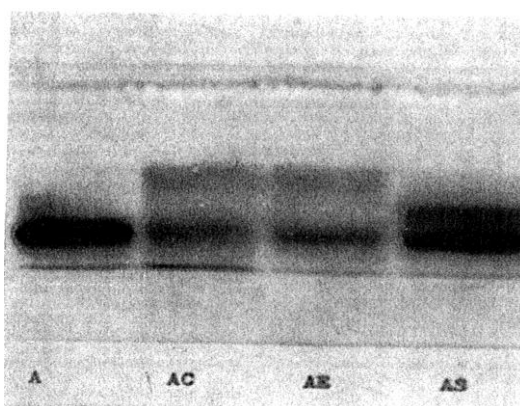
Στα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση, εμπεριέχονται περισσότερα από ένα είδη αιμοσφαιρίνης (εικόνα 20). Για το λόγο αυτό, η χρήση της γέλης πολυακρυλαμίδης, η οποία αποτελείται από πολλούς πόρους, διαφορετικού μήκους και διατομής, είναι απαραίτητη και συμβάλει στο διαχωρισμό των μορίων με βάση το μέγεθος<sup>16</sup> τους. Έτσι, οι μικρότερου μεγέθους πρωτεΐνες κινούνται ευκολότερα, γρηγορότερα και πιο μακριά σε αντίθεση με τις μεγαλύτερες. Στο τέλος, μέσα σε λίγα λεπτά προάγεται ευνοϊκός διαχωρισμός των διαφόρων τύπων της αιμοσφαιρίνης, συμβάλλοντας στην ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους και κατ' επέκταση στη διάγνωση πιθανής ύπαρξης κληρονομικών αναιμιών.



Εικόνα 20. Στην εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα μιας ηλεκτροφόρησης σε αλκαλικό pH. Διαβάζοντας από αριστερά προς δεξιά (από την άνοδο προς την κάθοδο): (1) μικρό ποσό Hb A<sub>2</sub>, κυρίως Hb A, (2) σχεδόν ίσα ποσά Hb C και Hb A, (3) Hb A και Hb H, (4) Hb A<sub>2</sub>, Hb S και Hb A, (5) δείγμα Hb F και Hb A, (6) δείγμα Hb C, Hb S και Hb A (ανατύπωση από [www.medlook.net](http://www.medlook.net)).

<sup>16</sup>Οι πρωτεΐνες διαφορετικού μοριακού μεγέθους «παρατάσσονται» σε διαφορετικές θέσεις «ζώνες» ([www.chemicallabs.com](http://www.chemicallabs.com)).

Το gel πολυακρυλαμίδης, εμφανίζει ιδιότητες που το καθιστούν ιδανικό ηλεκτροφορητικό μέσο για τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των διαφόρων τύπων της αιμοσφαιρίνης. Έτσι, η ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης οδηγεί σε ξεκάθαρο και ακριβή διαχωρισμό των διαφόρων αιμοσφαιρινών ύστερα από 60 λεπτά ηλεκτροφόρησης (εικόνα 21). Η χρήση του υλικού αυτού, καθιστά την μέθοδο απλή και γρήγορη για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαφόρων αιμοσφαιρινών (Ferris et al., 1962).



Εικόνα 21. Η αιμοσφαιρίνη A κινείται μέσα στο gel πολυακρυλαμίδης. Ύστερα από ηλεκτροφόρηση μιας ώρας έχει διανύσει 4,0 cm από το σημείο εκκίνησης. Η λεπτή στοιβάδα που προηγείται της ζώνης A, υπολογίζεται ότι είναι ένα στρώμα ερυθρών αναμιγμένο με buffer (ανατύπωση από Ferris et al., 1962).

Ωστόσο, στην ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό pH οι αιμοσφαιρίνες C, E και O κινούνται μαζί με τις HbS, G, D Iran και D Punjab. Έτσι δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν. Αντίθετα, οι αιμοσφαιρίνες A, D, G, E και O κινούνται μαζί στην ηλεκτροφόρηση σε όξινο pH, με αποτέλεσμα να μην δυναται διάγνωση. Για την ταυτοποίησή τους, απαιτείται η διεξαγωγή και των δυο μεθόδων ώστε τα αποτελέσματά τους να συγκριθούν στο τέλος (Westermeyer et al., 2001).

#### 5.4. Η ηλεκτροφόρηση ως μέθοδος επιβεβαίωσης μιας διάγνωσης

Συνήθως, μετά τον πρώτο έλεγχο για την ανίχνευση μιας αιμοσφαιρινικής διαταραχής και αφού διαπιστωθεί, ακολουθεί και δεύτερος έλεγχος για την επιβεβαίωση και ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων (π.χ. περίπτωση HbS και HbD

Punjab, οι οποίες δεν διαχωρίζονται στην ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό pH). Ως επιβεβαιωτική μέθοδος του αποτελέσματος συνηθίζεται να χρησιμοποιούνται πιο ευαίσθητες και ακριβείς μέθοδοι, αν και αυτό εξαρτάται από το είδος της τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε αρχικά (σαν μέθοδος ρουτίνας).

Οι ηλεκτροφορητικοί μέθοδοι χρησιμοποιούνται και ως μέθοδοι επαλήθευσης, για να επιβεβαιώσουν το αποτέλεσμα μιας έρευνας. Παρόμοια περίπτωση είναι η έρευνα που διεξήχθη για την ανίχνευση της Hb Hasharon. Η πρώτη μελέτη που έγινε έδειξε μια αιμοσφαιρίνη παρόμοια με την HbS. Εξαιτίας αυτού, ακολούθησαν αρκετές εξετάσεις επαλήθευσης, όπως ηλεκτροφόρηση γέλης σε διάλυμα φωσφατάσης pH 6,2 και ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε οξική κυτταρίνη με χρήση διαλυμάτων Tris - EDTA-borate, ουρία και buffer mercaptoethanol (*Chinelato et al., 2006*).

Στην περίπτωση όπου η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται ως πρώτη μέθοδος ανίχνευσης, παρόλο που οδηγεί σε ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό των διαφόρων κλασμάτων της αιμοσφαιρίνης, σε ορισμένες περιπτώσεις η βεβαιότητα των αποτελεσμάτων είναι αμφίβολη. Για παράδειγμα, οι αιμοσφαιρίνες A, D, G, E και O κινούνται μαζί στην ηλεκτροφόρηση σε όξινο pH. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται ως επιβεβαιωτική μέθοδος, η ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό pH και αφού συγκριθούν τα αποτελέσματα των δυο μεθόδων, επέρχεται η διάγνωση.

Σπανίως χρησιμοποιείται η ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης σαν δεύτερη τεχνική επιβεβαίωσης εάν έχει αρχικά χρησιμοποιηθεί άλλη, πιο ευαίσθητη και αυτοματοποιημένη μέθοδος όπως η HPLC (υψηλής ανάλυσης υγρή χρωματογραφία). Αυτό συμβαίνει διότι σε σύγκριση των δυο αυτών μεθόδων η ηλεκτροφόρηση θεωρείται λιγότερο ευαίσθητη και χρονοβόρα (*Bain, 2006*).

Ωστόσο, εάν ύστερα από χρήση της ηλεκτροφόρησης, δεν είναι εφικτό να χρησιμοποιηθεί δεύτερη τεχνική στο εργαστήριο για επιβεβαίωση του αποτελέσματος (συνήθως οικονομικοί λόγοι), δύναται να επαναληφτεί η ηλεκτροφόρηση για δεύτερη φορά (κατά προτίμηση μετά από λίγο καιρό).

Η καλύτερη και πληρέστερη διάγνωση προκύπτει μόνο από ταυτόχρονη χρήση δυο ανεξάρτητων μεθόδων. Π.χ. για την εξέταση ενός δείγματος να γίνεται ανάλυση του DNA, στη συνέχεια ηλεκτροφόρησης της αιμοσφαιρίνης και στο τέλος τα αποτελέσματά να συνυπολογίζονται, με σκοπό την πληρέστερη ενημέρωση και την καλύτερη διάγνωση (*Chinelato et al, 2006*).

## **6. Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΠΙΟ ΕΞΕΛΙΓΜΕΝΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΩΝ ΑΝΑΙΜΙΩΝ**

Η κλασική ηλεκτροφόρηση, είναι αρκετά κουραστική και χρονοβόρα μέθοδος. Ακόμη, κατά την ηλεκτροφόρηση (π.χ. SDS-Page, όπου ο διαχωρισμός γίνεται μόνο με βάση το μέγεθος των μορίων) είναι πιθανό να δημιουργηθούν αρκετά σοβαρά προβλήματα όπως πρόκληση μετουσίωσης των πρωτεϊνών σε αύξηση της θερμοκρασίας ή ακόμη, αλλοιωμένα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε χαμηλές τάσεις ρεύματος. Επιπλέον, στην ηλεκτροφόρηση δεν δύναται ο διαχωρισμός ορισμένων τύπων της αιμοσφαιρίνης, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας ενιαίας «ζώνης» έτσι ώστε καθίσταται αδύνατη η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους (*Ou & Ronggerud, 2001*).

Σήμερα, με την εξέλιξη της τεχνολογίας και ύστερα από μελέτες χρόνων, έχουν ανακαλυφθεί νέα είδη αιμοσφαιρίνης. Έτσι, οι απαιτήσεις των επιστημόνων από την απόδοση των διαφόρων μεθόδων, είναι σαφώς μεγαλύτερες απ' ότι στο παρελθόν. Η Hb Hasharon<sup>17</sup> εμφανίζει παρόμοια ηλεκτροφορητική κινητικότητα με την HbS στην ηλεκτροφόρηση σε οξική κυτταρίνη, ενώ κινείται μεταξύ της HbS και της HbC σε όξινο pH (*Chinelato et al., 2006*).

---

<sup>17</sup>Η Hb Hasharon οφείλεται σε μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί την  $\alpha$ -αλυσίδα αιμοσφαιρίνης, ύστερα από αντικατάσταση του αμινοξέος ασπαράγινη με ιστιδίνη κατά την μετάφραση (*Chinelato et al., 2006*).

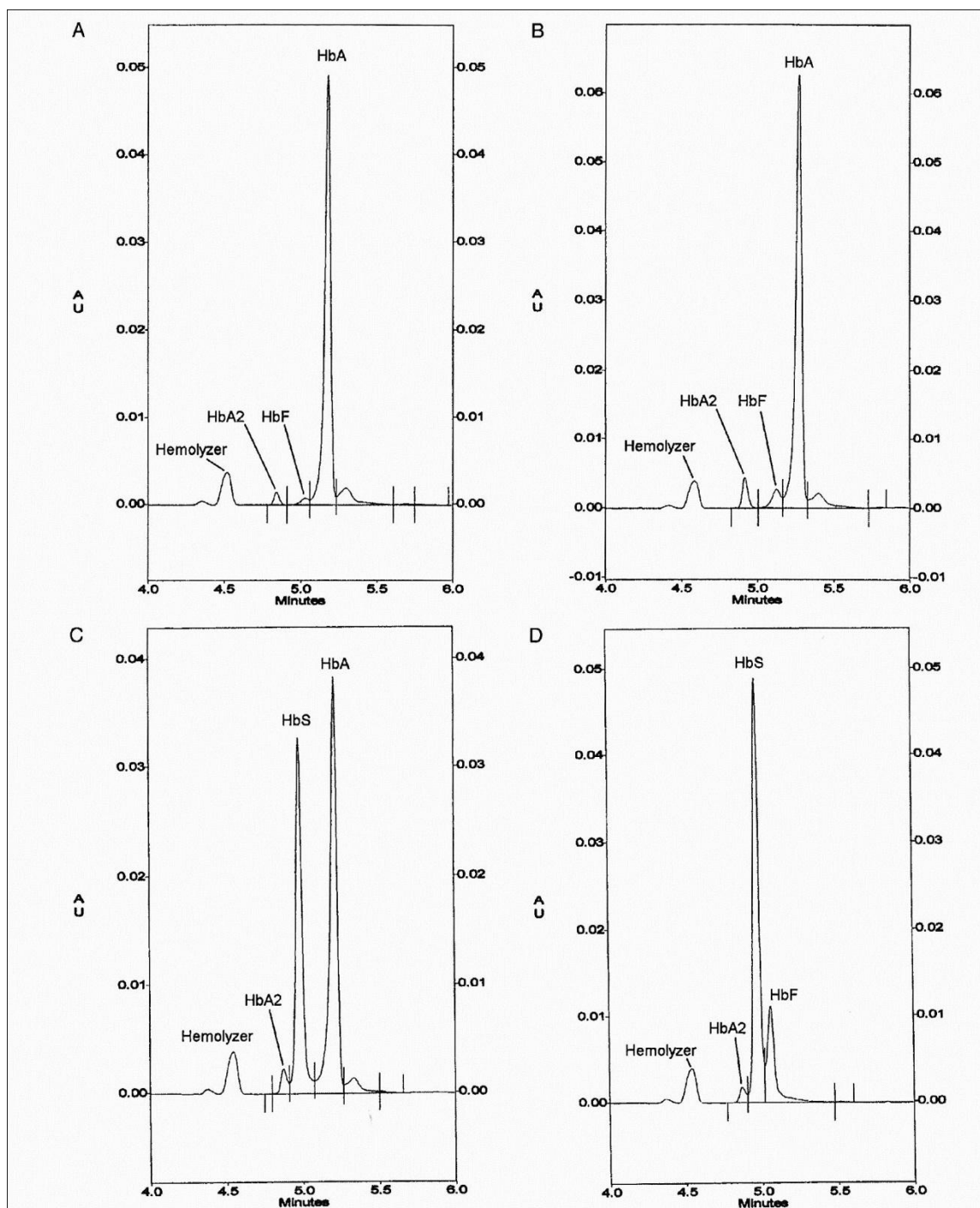
Γενικά, η ηλεκτροφόρηση σε οξική κυτταρίνη και αλκαλικό pH είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος ανίχνευσης και ταυτοποίησης των διαφόρων τύπων αιμοσφαιρίνης (φυσιολογικών ή μη). Ωστόσο, χαρακτηρίζεται από περιορισμένη ευαισθησία ιδιαίτερα για τα διάφορα είδη αιμοσφαιρίνης με παρόμοια ηλεκτροφορητική κινητικότητα, όπως η HbS, HbD, Hb G-Philadelphia και η Hb Hasharon (*Hempe & Craver, 2000*). Η ηλεκτροφόρηση επιτρέπει μόνο το διαχωρισμό κάποιων τύπων αιμοσφαιρίνης. Π.χ. οι HbS και HbD είναι και οι δυο παράγωγα της β-αλυσίδας, με αποτέλεσμα στην ηλεκτροφόρηση να εμφανίζουν παρόμοια μετακίνηση σε αλκαλικό pH, ενώ διαχωρίζονται από τις Hb G-Philadelphia και Hb Hasharon, οι οποίες είναι παράγωγα α-αιμοσφαιρινικών αλυσίδων (*Chinelato et al., 2006*).

Έτσι, ήταν αναγκαία η ανάπτυξη και χρήση νέων, αυτοματοποιημένων και πιο ευαίσθητων μεθόδων για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των αιμοσφαιρινών. Μια από αυτές είναι η Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση ή Capillary electrophoresis (CE), η οποία αποτελεί συνδυασμό της μεθόδου ηλεκτροφόρηση και της υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία ([www.sis.nlm.nih.gov](http://www.sis.nlm.nih.gov)).

### **6.1. Η συμβολή της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης, Capillary Electrophoresis (CE) ή Capillary Zone Electrophoresis (CZE), στην ταυτοποίησης διαφόρων τύπων Hb και στην διάγνωση των κληρονομικών αναιμιών**

Η Capillary electrophoresis (CE), η οποία αποτελεί συνδυασμό της μεθόδου ηλεκτροφόρηση και της υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφίας, πραγματοποιείται μέσα σε ένα πολύ λεπτό τριχοειδικό σωλήνα από πολυακρυλαμίδη ή αγαρόζη. Στα δυο άκρα του σωλήνα, είναι τοποθετημένα δυο δοχεία (ένα σε κάθε άκρο), τα οποία περιέχουν buffer και φέρουν το ένα τον αρνητικό πόλο (άνοδο) και το άλλο τον θετικό πόλο (κάθοδο). Στο σύστημα αυτό συμπεριλαμβάνεται ηλεκτρική πηγή υψηλής τάσης και σύστημα ψύξης ([www.labtestonline.org](http://www.labtestonline.org)). Η CE χρησιμοποιείται ευρέως στα διάφορα κλινικά εργαστήρια σαν μέθοδος ρουτίνας για την ανάλυση των διαφόρων τύπων αιμοσφαιρίνης (εικόνα 22).





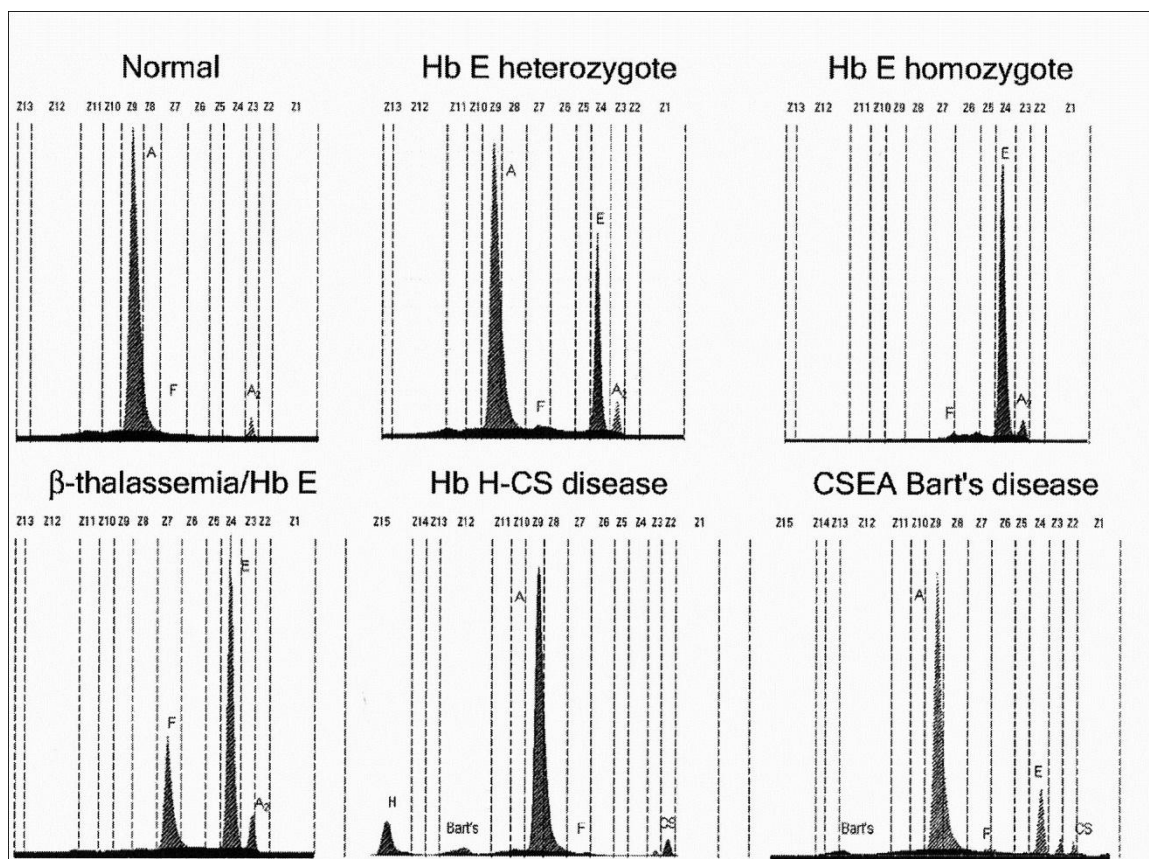
Εικόνα 22. Ηλεκτροφορογράφημα της CE για A) υγιή άτομο, B) ετερόζυγο για β-θαλασσαιμία, C) άτομα ετερόζυγο για HbS και D) άτομο ομόζυγο για HbS (ανατύπωση από Cotton et al., 1999).

Στη CE, ηλεκτρικά φορτισμένα σωματίδια διαχωρίζονται με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα μέσα σε αλκαλικό διάλυμα με συγκεκριμένο pH. Ο διαχωρισμός προκύπτει σύμφωνα με το pH του ηλεκτρολύτη και την ηλεκτροωσμωτική ροή από την κάθοδο στην άνοδο. Τα ερυθροκύτταρα, αιμολύονται αυτόματα με τη χρήση ειδικού αιμολυτικού διαλύματος, το οποίο χορηγείται στο τέλος της ανόδου. Μέσα στο τριχοειδές πραγματοποιείται υψηλής τάσης διαχωρισμός των μορίων. Τα αποτελέσματα του ηλεκτροφορήματος αξιολογούνται για την ανίχνευση τυχόν διαταραχών. Κάθε τύπος αιμοσφαιρίνης εμφανίζεται και σε μια συγκεκριμένη κορυφή με την εξής σειρά Hb Constant Spring= $Z_2$ , HbA<sub>2</sub>= $Z_3$ , HbE= $Z_4$ , HbF= $Z_7$ , HbA= $Z_9$ , HbH= $Z_{15}$  και Hb Bart's= $Z_{12}$  (Winichagoon *et al.*, 2008).

Το 2007, η μέθοδος Sebia Capillarys (Sebia, Norcross, GA) (εικόνα 23) έγινε επίσημα αποδεκτή από την αμερικανική υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων US Food and Drug Administration (FDA), ως μέθοδος αξιολόγησης των αιμοσφαιρινοπαθειών (Bakshi *et al.*, 2005) Σε αυτή, ο διαχωρισμός των διαφόρων κλασμάτων της αιμοσφαιρίνης γίνεται με βάση το φορτίο και τη μάζα των μορίων, μέσα σε αλκαλικό pH 9,4. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται στα 415nm μήκος κύματος (Keren *et al.*, 2008). Επίσης, διαχωρισμός των αιμοσφαιρινών πραγματοποιείται μέσα σε 4 λεπτά και εξαρτάται από το ισοηλεκτρικό σημείο και την ηλεκτροωσμωτική ροή (Winichagoon *et al.*, 2008).

Η CE, υπερτερεί έναντι της κλασικής ηλεκτροφόρησης, καθώς έχει την ικανότητα να διαχωρίζει την HbA<sub>2</sub> από την HbE, κάτι που δεν δύναται η κλασική ηλεκτροφόρηση γέλης (Wang *et al.*, 2006). Παρόλο που οι HbE και HbA<sub>2</sub> κινούνται στην ίδια θέση στην ηλεκτροφόρηση σε οξική κυτταρίνη (pH 8,6), αντίθετα στην CE κινούνται σε διαφορετικές κορυφές HbE = $Z_4$  και HbA<sub>2</sub>= $Z_3$  και έτσι διαχωρίζονται (Winichagoon *et al.*, 2008). Αυτή η μέθοδος, δίνει ταχύτατα ακριβείς πληροφορίες οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε όλο τον κόσμο (Keren *et al.*, 2008). Έτσι, η CE βρίσκεται σε πιο πλεονεκτική θέση όσον αφορά την μέτρηση της HbA<sub>2</sub> παρουσία της HbE, καθώς οι ετεροζυγώτες σε τιμές εκτός ορίων, από αυτά που

ορίζει η τεχνική, μπορούν και αξιολογούνται για επιπλέον διαταραχές στην σύνθεση της αιμοσφαιρίνης, ειδικά για  $\alpha$ - και  $\beta$ -θαλασσαιμίες (Mais *et al.*, 2009).



Εικόνα 23. Ο διαχωρισμός της Hb φυσιολογικών ατόμων, φορέων ή ασθενών θαλασσαιμίας, με την CZE (ανατύπωση από Winichagoon *et al.*, 2008).

Η CE όμως, έχει ακόμη ένα βασικό πλεονέκτημα. Ανιχνεύει τις μικρές συγκεντρώσεις των αιμοσφαιρινών όπως Hb Bart's και HbH, σε ασθένειες όπως η HbH και η HbH-CS. Έτσι, η ασθένεια HbH μπορεί εύκολα να επιβεβαιωθεί από την ανίχνευση εγκλείστων στα ερυθρά ή από την παρουσίασε Hb Bart's στη γέννηση ή της HbH στους ενήλικες (Winichagoon *et al.*, 2008). Δύναται να διαχωρίσει και να μετρήσει όλα τα σημαντικά κλάσματα της αιμοσφαιρίνης. Υπολογίζεται ότι η CE είναι ικανή να μετρήσει τα επίπεδα της HbBart's στα νεογνά, με σκοπό τη διάγνωση των συνδρόμων  $\alpha$ -θαλασσαιμίας λαμβάνοντας υπόψη τα επίπεδα της Hb Bart's 1.8% με απόκλιση 0.5% για (- $\alpha$ / $\alpha\alpha$ ), 9.2% με απόκλιση 1.1% για (- $\alpha$ - $\alpha$  ή --/ $\alpha\alpha$ ) και 24%-25% για HbH. Η νέα αυτή τεχνολογία ωφελεί σε μεγάλο βαθμό τον έλεγχο και την

διάγνωση για σύνδρομο της  $\alpha$ -θαλασσαιμίας, στην νεογνική περίοδο. Επίσης, η υψηλής ανάλυσης διαδικασία, οδηγεί στην ταυτοποίηση των διαφόρων τύπων της αιμοσφαιρίνης και πιο συγκεκριμένα στη διαφοροποίηση της HbS από την HbD και της HbE από την HbC (Winichagoon *et al.*, 2008). Οι επιστήμονες επισημαίνουν ότι σύμφωνα με τα αποτελέσματα ερευνών, η ανάλυση της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης με την μέθοδο της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης, είναι μια αποτελεσματική εναλλακτική λύση έναντι των μεθόδων DNA, στην διάγνωση των σοβαρών θαλασσαιμικών συνδρόμων (Srivorakun *et al.*, 2009).

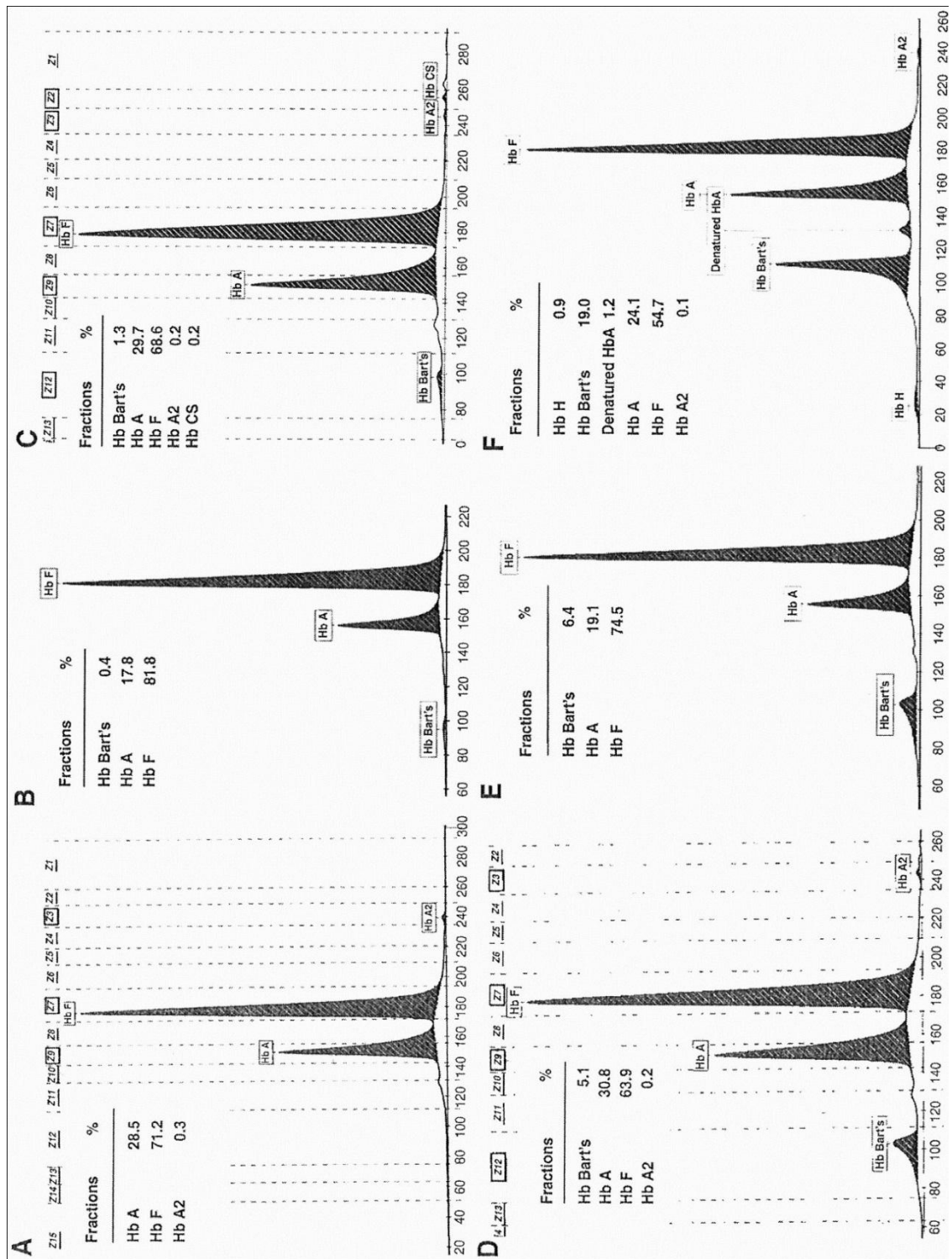
Ύστερα από έρευνα με χρήση της CZE, διαπιστώθηκε ότι κατά την ανάλυση της αιμοσφαιρίνης, η HbS διαχωρίζεται από την HbA και την HbA<sub>2</sub> αλλά όχι από τις HbD Punjab και HbG Philadelphia. Επίσης, η HbC και η HbO Arab διαχωρίζονται από την HbA αλλά όχι πλήρως από την HbA<sub>2</sub>, ενώ η HbE κινείται μαζί με την HbA<sub>2</sub>. Έτσι, σε ταυτόχρονη παρουσία ορισμένων αιμοσφαιρινών όπως οι HbC, HbE και HbO Arab, ο ποσοτικός προσδιορισμός της HbA<sub>2</sub> είναι αδύνατος. Ωστόσο, με τη χρήση «παλαιού» δείγματος, η HbF μειώνεται σε αυτό ή δεν διαχωρίζεται από την HbA, με αποτέλεσμα την εσφαλμένη εντύπωση ότι η HbA είναι αυξημένη. Όμοιο γεγονός συνέβη σε περίπτωση φορέα  $\beta$ -θαλασσαιμίας, στον οποίο παρατηρήθηκε αυξημένη HbA 8.9%, αν και αυτό δεν επηρέασε τη διάγνωση, αλλά πιθανόν να οδηγούσε σε εσφαλμένη διάγνωση HbE- $\beta$  θαλασσαιμίας (Yang *et al.*, 2009).

Αντίθετα, ύστερα από έρευνα, επιβεβαιώθηκε πως τα επίπεδα των αιμοσφαιρινών A, F, A<sub>2</sub> και E δεν αλλοιώθηκαν ύστερα από διατήρηση του δείγματος για έντεκα ημέρες σε θερμοκρασία 4<sup>0</sup> C, ενώ παρατηρήθηκε ήπια μείωση της HbS, όταν έμεινε σε θερμοκρασία δωματίου την έβδομη μέρα. Αντιθέτως, η HbH, Hb Bart's και Hb CS είναι λιγότερο σταθερές αιμοσφαιρίνες. Ήπια ελάττωση των επιπέδων αυτών διαπιστώθηκαν μετά από επτά με έντεκα ημέρες σε θερμοκρασία 4<sup>0</sup>C, καθώς επίσης μειωμένη ήταν η τιμή τους σε θερμοκρασία δωματίου κατά την πρώτη, δεύτερη, τρίτη και έβδομη μέρα (Winichagoon *et al.*, 2008).

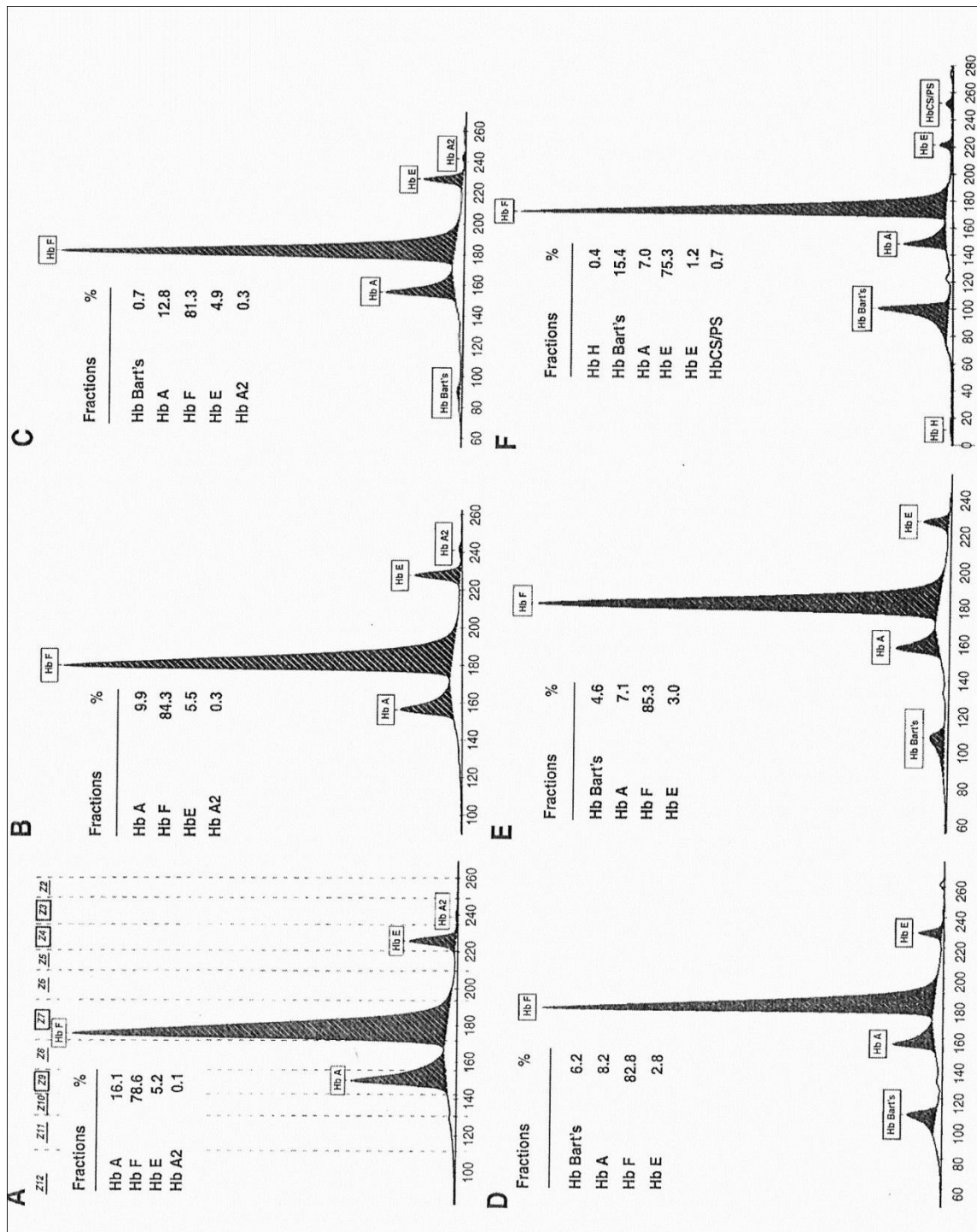
## 6.2. Η νέα μέθοδος τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης (Capillarys 2, Sebia)

Πρόσφατα η Sebia παρουσίασε μια μέθοδο ποιοτικής ταυτοποίησης των αιμοσφαιρινών, με το εμπορικό της όνομα Capillarys 2. Αυτή η μέθοδος, βασίζεται στις αρχές της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης. Οι διάφοροι τύποι της αιμοσφαιρίνης τυποποιούνται ύστερα από σύγκριση του χρόνου μετακίνησης τους, με τους χρόνους περίπου 50 γνωστών αιμοσφαιρινών. Η μέθοδος Sebia Capillarys 2 (έκδοση 6.1), χρησιμοποιεί τις αρχές της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης, σύμφωνα με τις οποίες τα φορτισμένα ηλεκτρικά μόρια διαχωρίζονται μέσα σε ένα αλκαλικό διάλυμα με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα, το pH του ηλεκτρολύτη και την ηλεκτροωσμωτική ροή. Με τη χρήση αλκαλικού ρυθμιστικού διαλύματος ευνοείται η ανίχνευση των φυσιολογικών και παθολογικών αιμοσφαιρινών (εικόνες 24 και 25), οι οποίες ανιχνεύονται από την κάθοδο στην άνοδο με την εξής σειρά: παράγοντας A<sub>2</sub>, C, A<sub>2</sub>/O-Arab, E, S, D, G-Philadelphia, F, A, Hope, Bart, J, N-Baltimore και H. Αυτό το σύστημα προάγει τον προσδιορισμό και μεμονωμένων αιμοσφαιρινών, όπως είναι η HbA<sub>2</sub>, η οποία χρησιμεύει στη διάγνωση της β-θαλασσαιμίας. Οι κοινές αιμοσφαιρίνες HbS, D Punjab, C, A<sub>2</sub> και E, διαχωρίζονται μεταξύ τους, καθώς επίσης η HbA<sub>2</sub> μπορεί να υπολογιστεί ποσοτικά παρά την ταυτόχρονη ύπαρξη της HbE (εικόνα 26) (Higgins et al., 2009).

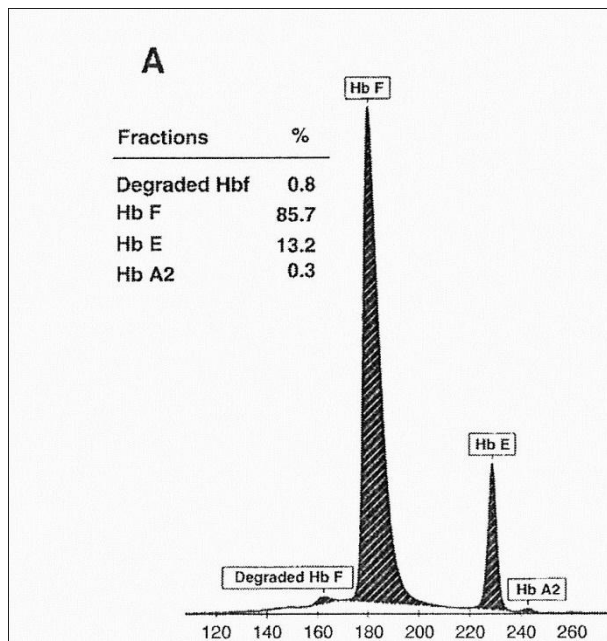
Ύστερα από έρευνα, διαπιστώθηκε ότι η Capillarys 2 συμβάλει στην ανίχνευση των Hb Lepore, HbH, HbJ, Hb O-Arab, Q Tailand, Q India και G Norfolk. Ακόμα, ταυτοποιεί και υπολογίζει ποσοτικά την HbS, HbD Punjab και HbE, παρά την ταυτόχρονη παρουσία της HbA<sub>2</sub>, οι οποίες έως τώρα δεν διαχωρίζονταν από την Capillary electrophoresis. Συμπεραίνεται, ότι αυτή η νέα μέθοδος τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης, είναι ικανή να ταυτοποιήσει και να προσδιορίσει ποσοτικά τις κοινές και τις πιο σπάνιες αιμοσφαιρίνες (Higgins et al., 2009).



Εικόνα 24. Ηλεκτροφορογράφημα της Capillarys 2 από δείγμα νεογνών A) φυσιολογικό δείγμα, B) ετερόζυγο για  $\alpha^+$ -θαλασσαιμία, C) ετερόζυγο για Hb Constant Spring, D) ομόζυγο για  $\alpha^+$ -θαλασσαιμία, E) ετερόζυγο για  $\alpha^0$ -θαλασσαιμία και F) HbH σύνδρομο (ανατύπωση από Srivorakun *et al.*, 2009).



Εικόνα 25. Ηλεκτροφορογράφημα της Capillarys 2 από δείγμα νεογών A) ετεροζυγωτία Hb E, B) διπλή ετεροζυγωτία HbE/ $\alpha^+$ -θαλασσαιμία, C) διπλή ετεροζυγωτία Hb E/ Hb Constant Spring, D) ετεροζυγωτία HbE με ομόζυγη  $\alpha^+$ -θαλασσαιμία, E) διπλή ετεροζυγωτία Hb E/ $\alpha_0$ -θαλασσαιμία και F) ετερόζυγη Hb E με συνδυασμό Hb Constant Spring/Hb Pakse (ανατύπωση από *Srivorakun et al., 2009*).



**Εικόνα 26.** Ηλεκτροφορογράφημα της CE από δείγμα νεογνού ομόζυγου για Hb E (ανατύπωση από *Srivorakun et al., 2009*).

Ωστόσο, εμφανίζει ένα χαρακτηριστικό μειονέκτημα. Η *Capillarys 2* μειονεκτεί ως προς τον ακριβή προσδιορισμό των μικρών ποσοτήτων της HbF. Όμως, ο Higgins και οι συνεργάτες του επισημαίνουν πως παρόλο που αμφισβητείται από κάποιους, η αδυναμία της *Capillarys 2* να δώσει ακριβής απάντηση για τις μικρές ποσότητες της HbF, είναι ασήμαντη. Σύμφωνα με τον Higgins και τους συνεργάτες του, η HbF σχετίζεται με κληρονομική ασθένεια ή άλλη αιτία για τη διάγνωση της οποίας, είναι αποδεκτός ο μη προσδιορισμός της ακριβούς ποσότητας (*Sebia Incorporation, 2006*).

Πολλοί επιστήμονες επισημαίνουν ότι η μέθοδος *Capillarys 2*, *Sebia* θεωρείται ισάξια με την μέθοδο HPLC, ως προς τα περισσότερα αποτελέσματα, ύστερα από την ανάλυση της αιμοσφαιρίνης.

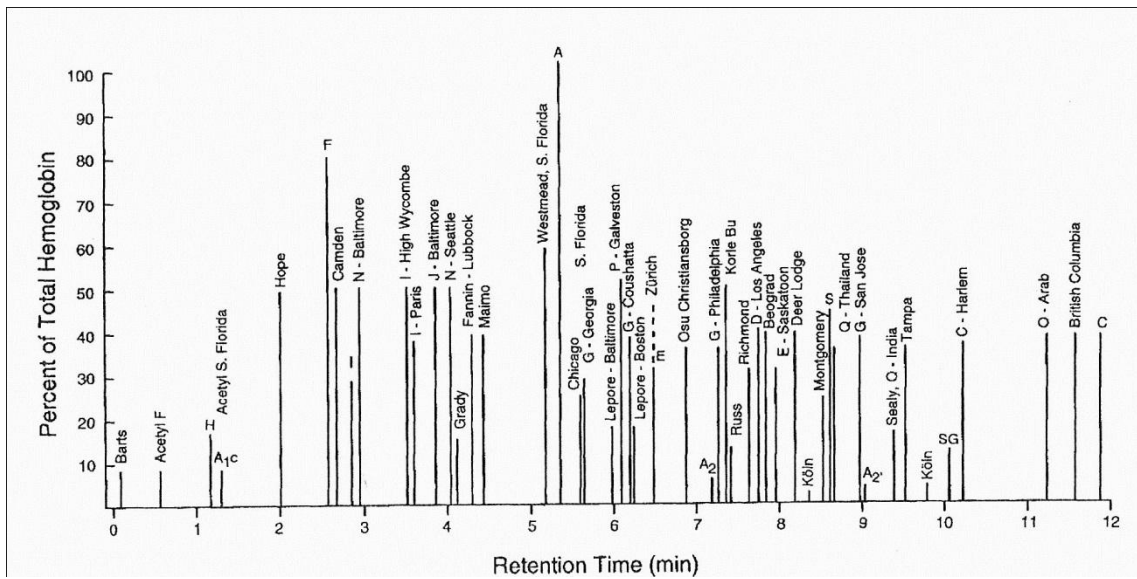


### **6.3. Οι μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας, στη διάγνωση των κληρονομικών ασθενειών**

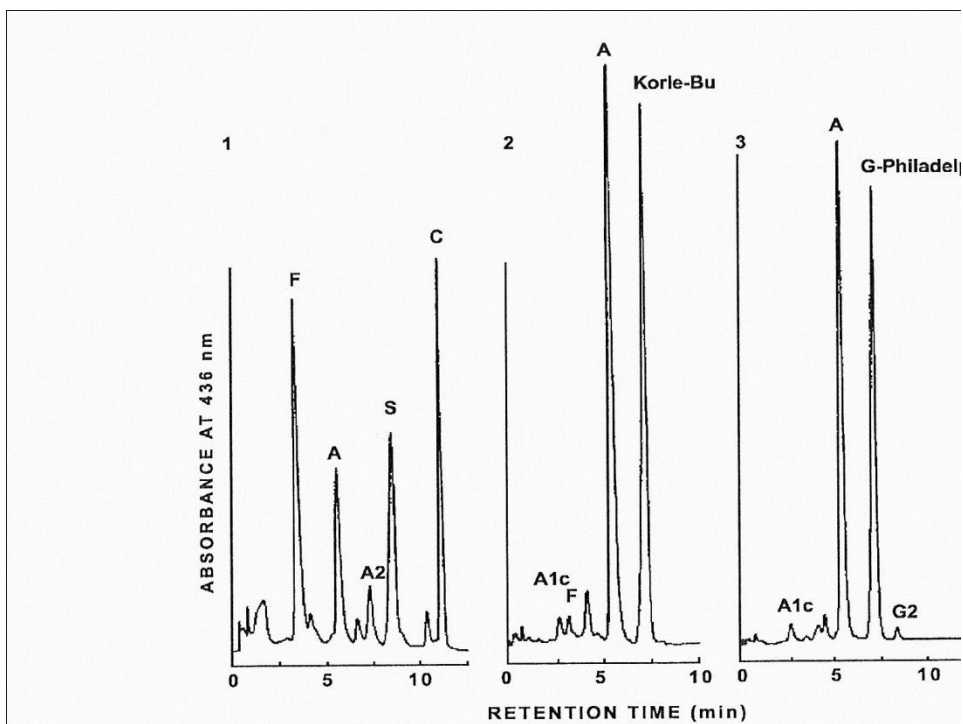
#### **6.3.1. Η μέθοδος HPLC (High Performance Liquid Chromatography)**

Η HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ή αλλιώς υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, είναι μέθοδος η οποία βασίζεται στο συνδυασμό του pH και του ιονισμού. Σύμφωνα με την τεχνική Primus Resolution HPLC, οι χρόνοι κατακράτησης των άγνωστων αιμοσφαιρινών του δείγματος συγκρίνονται με τους αντίστοιχους χρόνους άλλων γνωστών αιμοσφαιρινών και έτσι, προκύπτει η ταυτοποίηση των διαφόρων τύπων αιμοσφαιρίνης του κάθε δείγματος. Ολικό αίμα το οποίο έχει ληφθεί με EDTA, χρησιμοποιείται ως δείγμα, το οποίο στη συνέχεια αιμολύεται, από διάλυμα αιμόλυσης, μέσα στην στήλη της HPLC (*Keren et al. 2008, Tangvarasittichai et al. 2009*).

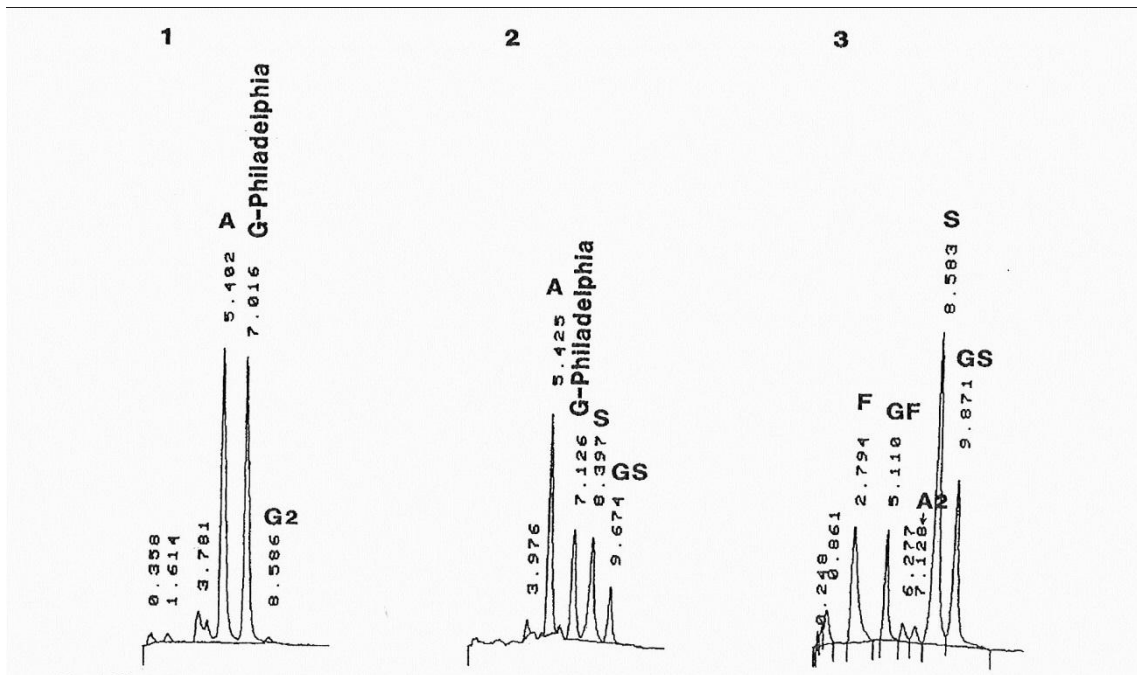
Η HPLC είναι ικανή να διαχωρίσει περισσότερες από 45 κοινές αιμοσφαιρίνες μέσα σε 12 λεπτά (εικόνα 27). Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται οι Hb Bart's, Acetyl F, H, Hope, A<sub>1c</sub>, I, F, Camden, N-Baltimore, I-High Wycombe, J-Baltimore, N-Seattle, Grandy, Fannin-Lubbock, Malmo, South Florida, A, Chicago, G-Georgia, Lepore-Baltimore, P-Galveston, G-Coushatta, Lepore-Boston, E, Zurich, Osu Christiansborg, A<sub>2</sub>, G-Philadelphia, Korle Bu, Russ, E-Saskatoon, Richmond, D-Punjab, Deer Lodge, Koln, Montgomery, S, G-Taichung (Q-Tailand), G-San Jose, A'2, Hasharon, Q-India, Tampa, SG hybrid, C-Harlem, O-Arab, British Columbia and C (εικόνες 28, 29 και 30). Αρκετές από αυτές τις αιμοσφαιρίνες δεν διαχωρίζονται μεταξύ τους ή με την HbA αιμοσφαιρίνη στις ηλεκτροφορητικές μεθόδους και αυτό δύναται να οδηγήσει σε λάθος διάγνωση, χαρακτηρίζοντας έναν ασθενή ως υγιή ή διαγιγνώσκοντας λάθος αιμοσφαιρινοπάθεια. Για παράδειγμα η Hb Chicago δεν διαχωρίζεται από την HbA καθώς κινούνται μαζί στην ηλεκτροφόρηση σε οξική κυτταρίνη ή κιτρικό άγαρ (*Ou & Rongrud, 2001*).



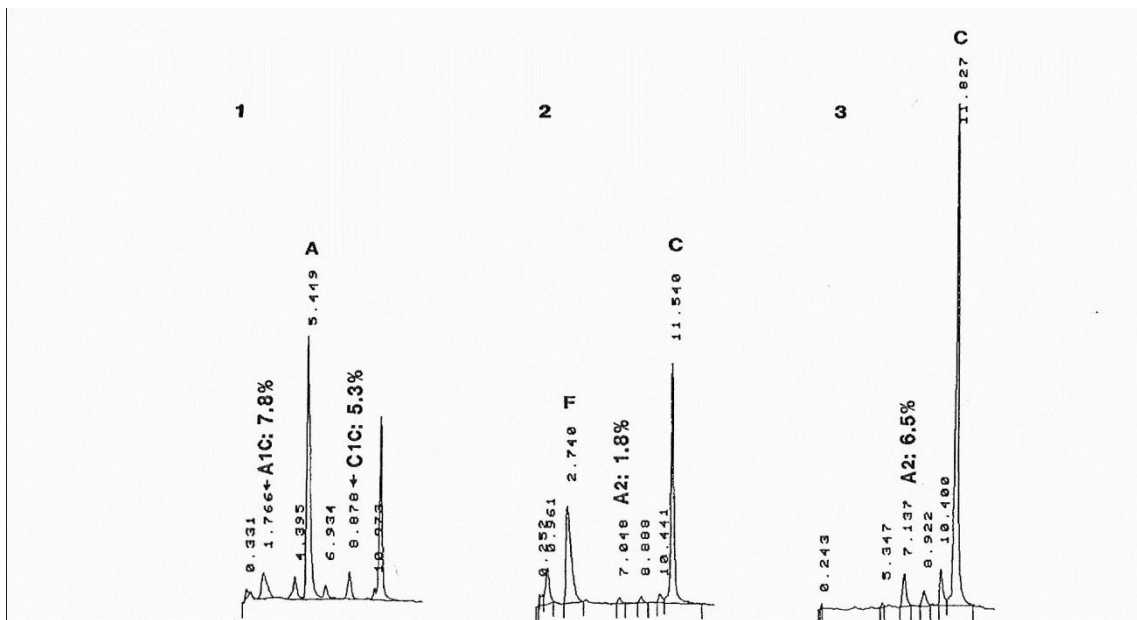
Εικόνα 27. Παραστατικό διάγραμμα του διαχωρισμού και της συγκέντρωσης περισσότερων από 40 κοινών αιμοσφαιρινών (ανατύπωση από Ou & Rongrud, 2001).



Εικόνα 28. HPLC: 1) δείγμα που περιέχει Hb F, A, A<sub>2</sub>, S και C, 2) δείγμα ασθενή με γονίδιο για Hb Korle Bu (ανατύπωση από Ou & Rongrud, 2001).



Εικόνα 29. HPLC: 1) δείγμα με γονίδιο για G-Philadelphia και ομόζυγη θαλασσαιμία, 2) δείγμα με διπλή ετεροζυγωτία για HbS G-Philadelphia και 3) δείγμα με δρεπανοκυτταρική αναιμία και γονίδιο για G-Philadelphia (ανατύπωση από Ou & Rongrud, 2001).



Εικόνα 30. HPLC: 1) δείγμα με γονίδιο για HbC από ασθενή με διαβήτη, 2) δείγμα με ομοζυγωτία για HbC και 3) διπλή ετεροζυγωτία HbC/ $\beta^0$ -θαλασσαιμία (ανατύπωση από Ou & Rongrud, 2001).

Επίσης, στην μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε αλκαλικό pH, η HbE κινείται μαζί με τις αιμοσφαιρίνες C, O Arab και την A<sub>2</sub>. Στην ηλεκτροφόρηση σε όξινο pH κινείται μαζί με την HbA<sub>2</sub>. Αντίθετα, η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία είναι μια γρήγορη και αυτοματοποιημένη μέθοδος, η οποία έχει αποδειχτεί ικανή ως προς την ταυτοποίηση των περισσοτέρων τύπων αιμοσφαιρίνης, ενώ προβαίνει σε ακριβής μέτρηση των HbA<sub>2</sub> και HbF, οι οποίες ανιχνεύονται σε μικρές ποσότητες, ανάμεσα σε αρκετές άλλες (Joutovsky *et al.*, 2004). Παρόλα αυτά, η πρόσφατα αποδεκτή μέθοδος HPLC, δεν μπορεί να διαχωρίσει την HbE από την HbA<sub>2</sub>. Ενώ η HPLC αντίστροφης φάσης, έχει αποδειχτεί ότι, μπορεί να μετρήσει την HbA<sub>2</sub> παρουσία της HbE, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος ρουτίνας στα κλινικά εργαστήρια. Έτσι, αποδεικνύεται αδύνατη η ακριβής ποσοτική μέτρηση της HbA<sub>2</sub> παρουσία της HbE, καθιστώντας απαραίτητο τον έλεγχο του DNA για την οριστική διάγνωση θαλασσαιμίας (Carnley *et al.*, 2006).

Η HPLC, Bio-Rad Variant II είναι μια αυτοματοποιημένη μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό των HbA<sub>2</sub>, HbF, HbA, HbS και HbC. Το Αμερικανικό Κολέγιο Παθολογίας, ύστερα από έρευνα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος αυτή είναι ισότιμη και πιθανόν ανώτερη των ηλεκτροφορητικών μεθόδων. Στην περίπτωση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, εκτός από παρουσία της HbS ανιχνεύεται και αύξηση της HbF, με αποτέλεσμα και τα δυο αυτά γεγονότα να συμβάλλουν στη διάγνωση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Επιπλέον, η ανίχνευση και ο προσδιορισμός της ποσότητας των Hb O Arab και Hb D Punjab, ευνοούν τη διάγνωση τόσο των ομόζυγων όσο και των ετερόζυγων μορφών. Συμβάλει στη διάγνωση ατόμων με γονίδιο για HbE, παρόλο που στην τιμή της HbE παρουσιάζει το σύνολο των αιμοσφαιρινών HbE και HbA<sub>2</sub>, εξαιτίας της αδυναμίας της μεθόδου να τις διαχωρίσει (Higgins *et al.*, 2009). Επίσης, είναι ικανή αν συμβάλει στη διάγνωση της αιμοσφαιρίνης Lepore και της HbC, την οποία εκφράζει σε διαφορετική κορυφή από την HbA<sub>2</sub>, κάτι που αδυνατεί να κάνει η Capillary electrophoresis (Higgins *et al.* 2009, Ropero *et al.* 1999).

Αποτελέσματα ερευνών, δείχνουν ότι η HPLC είναι μέθοδος κατάλληλη και για την ταυτοποίηση κληρονομικών αναιμιών σε νεογνά, χάρη στην υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση της. Έχει την ικανότητα να ανιχνεύει και να συμβάλει στη διάγνωση της Hb Bart's και οποιασδήποτε διαταραχής, έλλειψης ή αύξησης της HbF (Louahabi *et al.*, 2006).

Η HPLC είναι μέθοδος ακριβείας, ωστόσο παρουσιάζει και περιορισμούς. Ορισμένες αιμοσφαιρίνες δεν ανιχνεύονται ούτε διαχωρίζονται από άλλες. Για παράδειγμα, ύστερα από έρευνα που έγινε, σε δείγμα που περιείχε Hb Athens/Waco αιμοσφαιρίνη δεν ανιχνεύτηκε από την HPLC σε αντίθεση με την μέθοδο Capillary. Βέβαια, αυτό δεν εκφράζει απόλυτο γεγονός (Keren *et al.*, 2008). Έχει διαπιστωθεί ότι η HbE, Hb Osu Christiansbourg και HbG Conhagen δεν διαχωρίζονται από την HbA<sub>2</sub>. Επίσης, η μέτρηση της HbA<sub>2</sub> σε άτομα με δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι δύσκολη έως παραπλανητική, αφού η HbA<sub>2</sub> εσφαλμένα αυξάνεται, σε ταυτόχρονη παρουσία με HbS. Αντίθετα, σε άτομα με γονίδιο για HbD, μέτρηση της HbA<sub>2</sub> με Bio Rad Variant II δείχνει εσφαλμένα χαμηλά επίπεδα της αιμοσφαιρίνης αυτής (Higgins & Clarke, 2000). Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι τα λανθασμένα αποτελέσματα σε ταυτόχρονη παρουσία HbA<sub>2</sub> και HbS οφείλονται στην συνέκλυση ορισμένων παραγώγων της HbS με την HbA<sub>2</sub> (Zurbriggen *et al.*, 2005). Έτσι, η δυσκολία του ακριβούς προσδιορισμού της HbA<sub>2</sub> αποτελεί εμπόδιο στην ανίχνευση β-θαλασσαιμίας.

Συμπερασματικά σημειώνεται ότι η HPLC, Bio-Rad Variant II θεωρείται πως υπερτερεί ως προς τη διάγνωση των κληρονομικών αναιμιών, σε σύγκριση με την Capillary Electrophoresis και την κλασική μέθοδο ηλεκτροφόρησης (Higgins *et al.*, 2009).

### **6.3.2. Η μέθοδος FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)**

Η μέθοδος FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Ωστόσο, δεν σχεδιάστηκε εξ' αρχής με σκοπό την διάγνωση στα κλινικά εργαστήρια. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε για διαχωρισμό των

πρωτεϊνών των ούρων, των πρωτεϊνών του πλάσματος και στη συνέχεια προτάθηκε για την διάγνωση της β-θαλασσαιμίας. Σε αυτή, οι χρόνοι που αντιστοιχούν στην HbA<sub>2</sub>, την HbA και την HbF, όπως φαίνεται σε ένα κοινό χρωματογράφημα είναι 0.3 με απόκλιση 0.026, 3.71 με απόκλιση 0.33 και 6.815 με απόκλιση 0.07 (Tangvarasittichai et al., 2009).

Σύμφωνα με την έρευνα<sup>18</sup> του Tangvarasittichai και των συνεργατών του, διαπιστώθηκε ότι η FPLC είναι ικανή να διαχωρίσει τις διάφορες αιμοσφαιρίνες μέσα σε 10 λεπτά. Η HbA<sub>2</sub> στο χρωματογράφημα ενός υγιούς και ενός ατόμου ετερόζυγου για β-θαλασσαιμία, σημείωσε ίδιους χρόνους. Ωστόσο, η συγκέντρωση της HbA<sub>2</sub> στον δεύτερο ήταν αυξημένη.

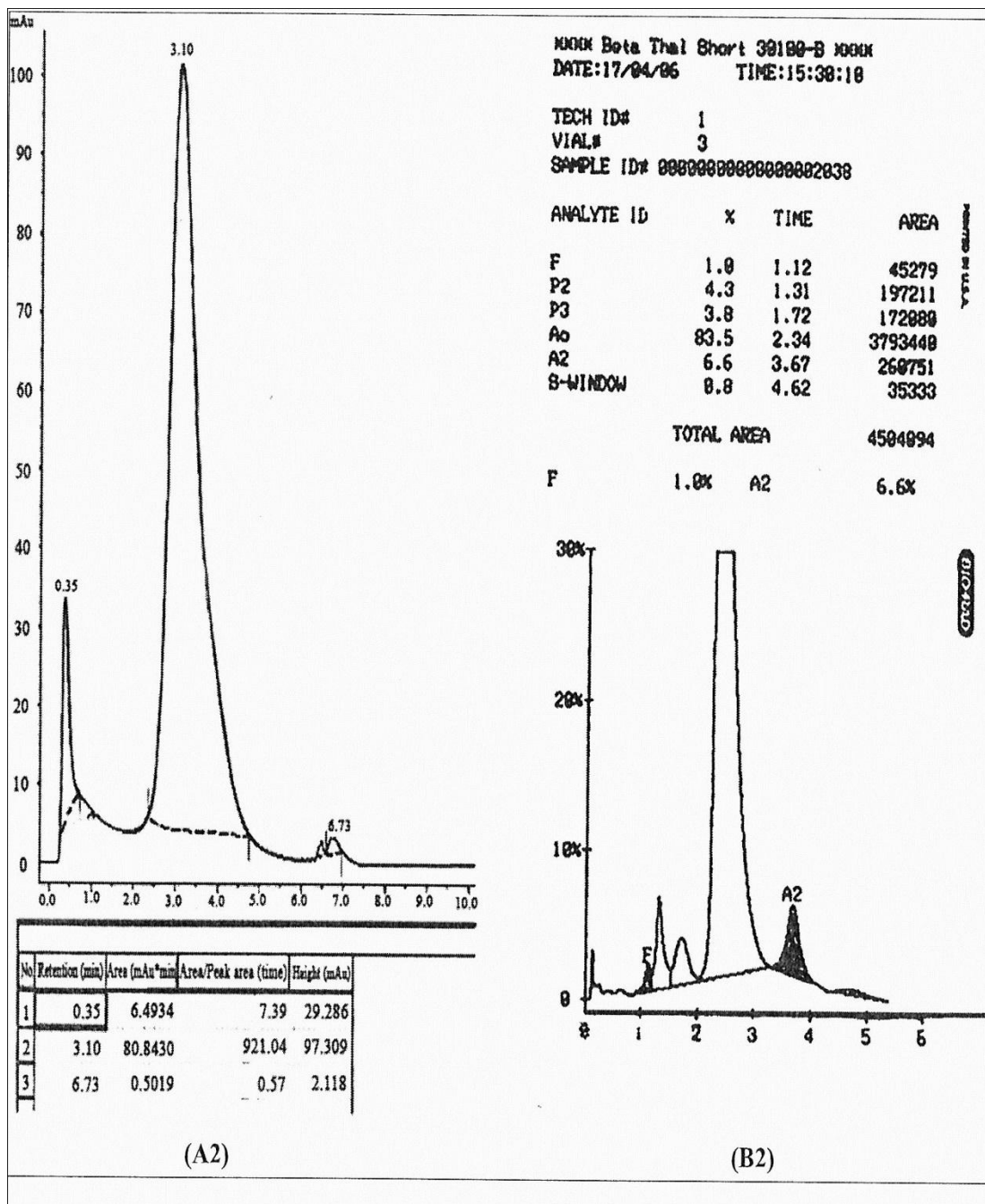
Επίσης παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της HbE, στην περίπτωση ασθένειας ομόζυγης για HbE, οι συγκεντρώσεις της αιμοσφαιρίνης αυτής είναι πολύ μεγαλύτερες από της HbA<sub>2</sub>. Αυτό προφανώς οφείλεται στο ότι η FPLC, όπως και η HPLC δύναται να μετρήσει την HbA<sub>2</sub> (εικόνα 30), αλλά όχι να διαχωρίσει την HbA<sub>2</sub> από την HbE (εικόνα 32 και 33). Ομοίως, στην περίπτωση της αιμοσφαιρίνης HbE, σε άτομα ομόζυγα και ετερόζυγα για HbE, οι χρόνοι για την αιμοσφαιρίνη αυτή είναι ίδιοι και στις δυο περιπτώσεις (Tangvarasittichai et al., 2009).

Σύμφωνα με τον Tangvarasittichai και τους συνεργάτες του, η μέθοδος FPLC Hi Trap<sup>TM</sup> Sepharose, παρουσιάζει πολύ καλή εξειδίκευση, ακρίβεια και αξιοπιστία. Επίσης, το κόστος της κάθε εξέτασης είναι περίπου 10 φορές μικρότερο από της ήδη χρησιμοποιούμενης HPLC.

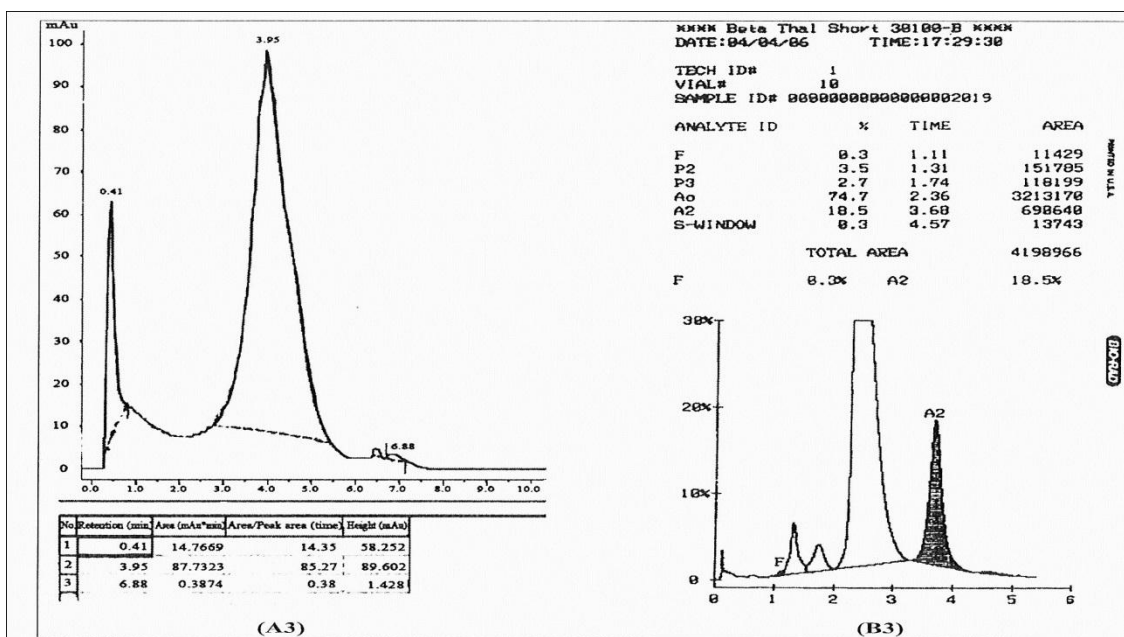
Συμπερασματικά, μπορεί να αναφερθεί ότι η μέθοδος αυτή θεωρείται κατάλληλη και αξιόπιστη για την ταυτοποίηση αλλά και τη διάγνωση της β-θαλασσαιμίας. Έτσι, η FPLC ανταγωνίζεται και πιθανόν υπερτερεί έναντι των ήδη χρησιμοποιούμενων μεθόδων ως προς την διάγνωση της β-θαλασσαιμίας (Colah 2009, Tangvarasittichai et al. 2009).

---

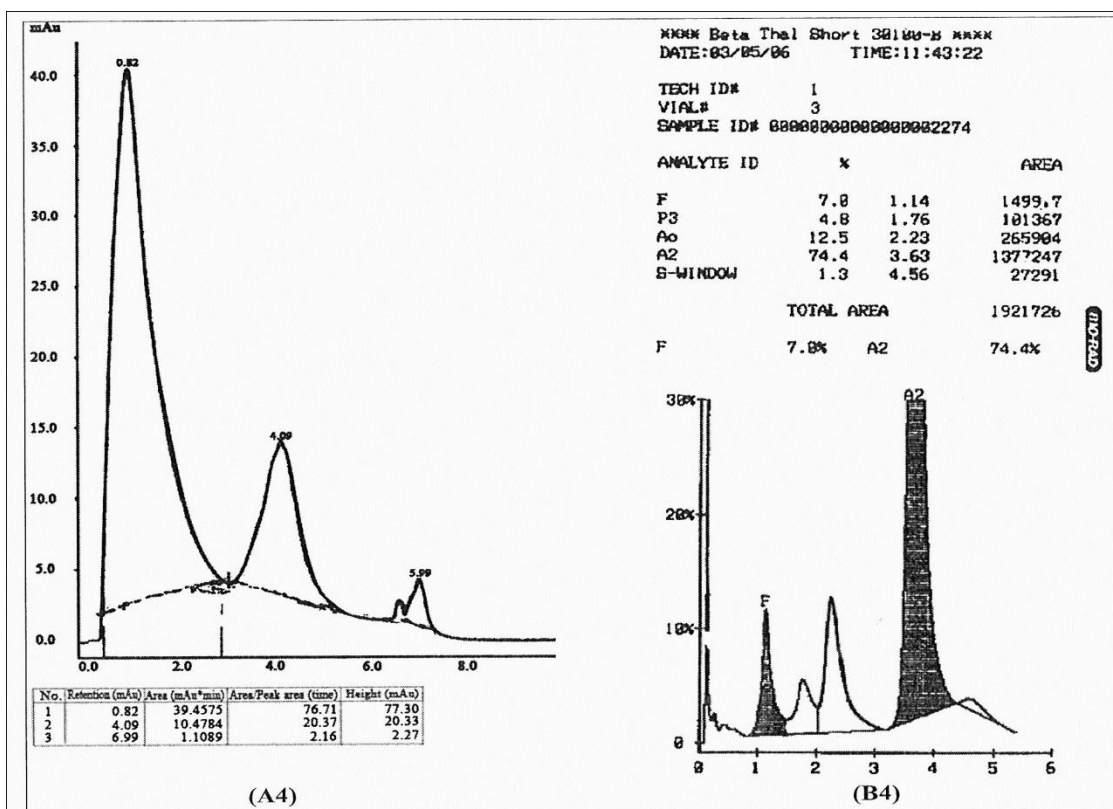
<sup>18</sup>Όπου χρησιμοποίησαν τις μεθόδους FPLC, HPLC, ηλεκτροφόρησης και microcolumn chromatography με σκοπό την σύγκρισή τους για την διάγνωση της β-θαλασσαιμίας (Tangvarasittichai et al., 2009)



Εικόνα 31. Απεικονίζεται η συγκέντρωση της HbA<sub>2</sub>, για ασθενή ετερόζυγο για την β-θαλασσαιμία. Το A2 αντιστοιχεί σε μέτρηση της FPLC και το B2 με την HPLC (ανατύπωση από Tangvarasittichai et al., 2009).



Εικόνα 32. Μέτρηση της HbA<sub>2</sub>/E σε δείγμα ασθενή ετερόζυγο για HbE με A3) FPLC B3) HPLC (ανατύπωση από Tangvarasittichai et al, 2009).



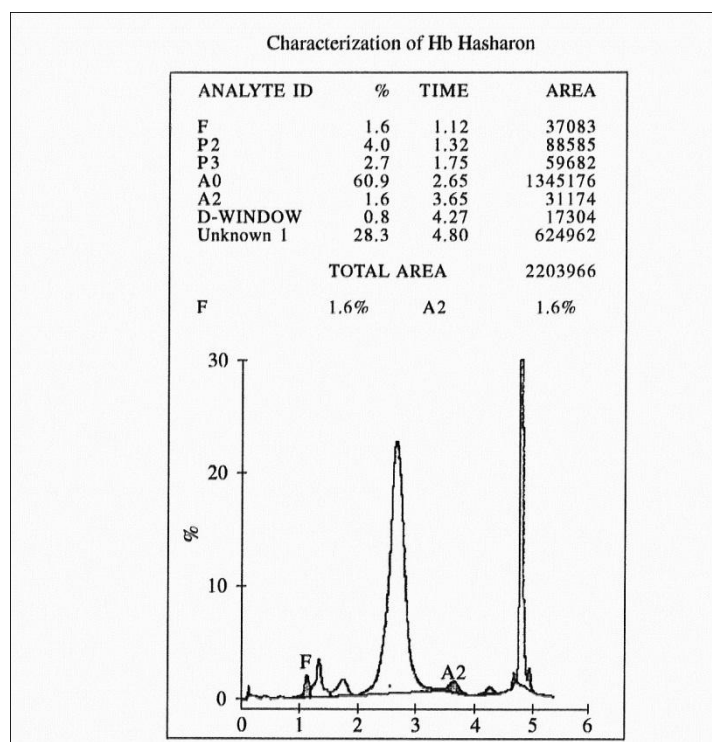
Εικόνα 33. Μέτρηση της HbA<sub>2</sub>/E σε δείγμα ασθενή ομόζυγο για HbE με A3) FPLC B3) HPLC (ανατύπωση από Tangvarasittichai et al, 2009).



## 7. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΒΟΛΗΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΩΝ ΑΝΑΙΜΙΩΝ

### 7.1. Σύγκριση της Capillarys 2, Sebia electrophoresis με την HPLC, ως προς τα αποτελέσματα ποιοτικού και ποσοτικού ελέγχου

Οι διάφοροι μέθοδοι για την ανίχνευση των αιμοσφαιρινοπαθειών χαρακτηρίζονται ως ποιοτικές είτε ως ποσοτικές. Στις ποιοτικές μεθόδους συμπεριλαμβάνεται η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (εικόνα 34), καθώς επίσης η ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό και όξινο pH. Αυτές οι μέθοδοι είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στις εξετάσεις ρουτίνας των κλινικών εργαστηρίων και δίνουν ένα αξιόπιστο (αν και όχι απόλυτο) αποτέλεσμα για την ταυτοποίηση των περισσότερων κοινών αιμοσφαιρινών (*Higgins et al., 2009*).



Εικόνα 34. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της HPLC, Bio Rad Variant II, ύστερα από εξέταση δείγματος από ασθενή ετερόζυγο για Hb Hasharon (ανατύπωση από Chinelato et al., 2006).

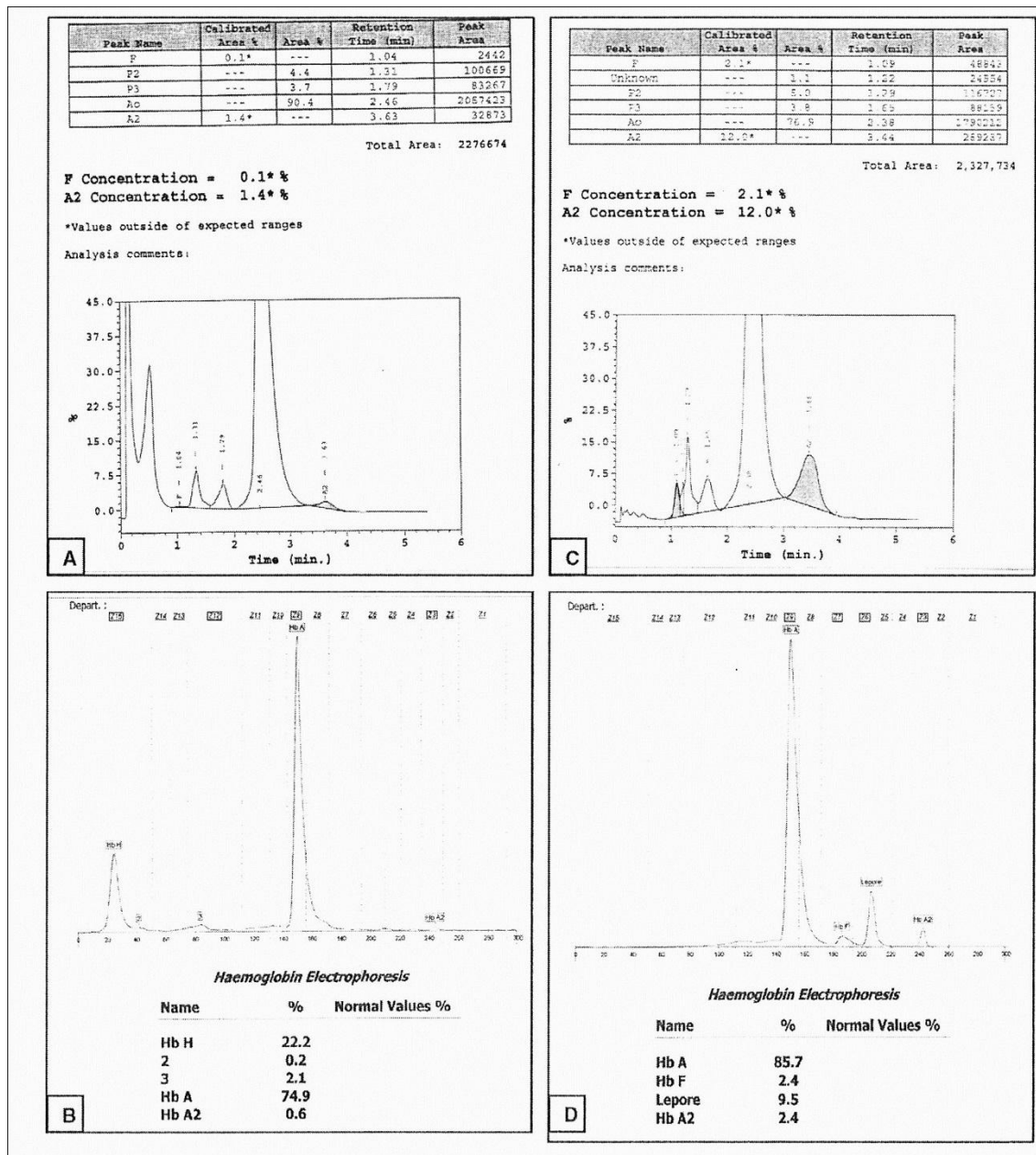
### 7.1.1. Ποιοτικός έλεγχος αιμοσφαιρινών

Όμως, κάθε ποιοτική μέθοδος ανίχνευσης αιμοσφαιρινών, έχει και περιορισμούς. Για παράδειγμα στη μέθοδο HPLC Bio Rad Variant II, οι αιμοσφαιρίνες A<sub>2</sub>, E Lepore, Osu Chrostiansborg, D Iran και G Coushatta σημειώνουν παρόμοιους χρόνους και έτσι δεν δύναται να ταυτοποιηθούν. Ωστόσο το εύρος τιμών (%), για τις διάφορες αιμοσφαιρίνες ποικίλει και δύναται να δώσει πληροφορίες συμβάλουν στην ταυτοποίηση της κάθε αιμοσφαιρίνης. Πάνω από 8% για την HbA<sub>2</sub>, 12 με 15% για την Lepore, 27 με 33% για την E, 40 με 45% για τις Osu Christiansborg, D Iran και G Coushatta (*Higgins et al., 2009*).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, στην ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό pH οι αιμοσφαιρίνες C, E και O κινούνται μαζί με τις S, G, D Iran και D Punjab ενώ, οι αιμοσφαιρίνες A, D, G, E και O κινούνται μαζί στην ηλεκτροφόρηση σε όξινο pH, με αποτέλεσμα για να προκύψει διάγνωση, είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση και των δυο μεθόδων, ώστε τα αποτελέσματά τους να συνυπολογιστούν (*Ou & Rongerud, 2001*).

Από την άλλη, η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση έχει προταθεί, ως εναλλακτική μέθοδος για τον ποιοτικό προσδιορισμό των διαφόρων αιμοσφαιρινών. Η μέθοδος Sebia Capillarys 2, χρησιμοποιεί τις αρχές της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης, οι οποίες συμβάλλουν τον προσδιορισμό μεμονωμένων αιμοσφαιρινών όπως η HbA<sub>2</sub>, η οποία χρησιμεύει στη διάγνωση της β-θαλασσαιμίας.

Έτσι, γίνεται κατανοητό πως η Capillary και η HPLC είναι ικανές να δώσουν αξιόλογα ποιοτικά αποτελέσματα. Ύστερα από σύγκριση της HPLC και της Capillarys 2, σε έρευνα του Higgins και των συνεργατών του το 2009, διαπιστώθηκε πως η δεύτερη είναι ικανή να συμβάλει στη διάγνωση των Hb Lepore, HbH, HbJ, Hb O-Arab, Q Tailand, Q India και G Norfolk. Αντίθετα, η HPLC Bio Rad Variant II δεν κατόρθωσε να ταυτοποιήσει αλλά ούτε να μετρήσει ποσοτικά την HbH (εικόνα 35) (*Higgins et al., 2009*).



Εικόνα 35. Τα αποτελέσματα της έρευνας του Higgins και των συνεργατών του A) αποτέλεσμα εξέτασης δείγματος ασθενή με HbH, με την HPLC, B) αποτέλεσμα εξέτασης δείγματος ασθενή με HbH, με την CE, C) αποτέλεσμα εξέτασης δείγματος με Hb Lepore, με την HPLC και D) αποτέλεσμα εξέτασης δείγματος με Hb Lepore, με την CE (ανατύπωση από Higgins et al., 2009).

### 7.1.2. Ποσοτικός έλεγχος αιμοσφαιρινοπαθειών

Ωστόσο, οι μέθοδοι Capillarys 2 και HPLC, προσδιορίζουν και ποσοτικά τις διάφορες αιμοσφαιρίνες. Ύστερα από έρευνα, σε ομόζυγους για δρεπανοκυτταρική αναιμία η HbS βρέθηκε 61,8% με την Bio Rad και 61,5% με την Capillarys 2, ενώ σε ετερόζυγους βρέθηκε 37,2% και 38,0% αντίστοιχα. Για την HbC 37,2% και 33,2%, την HbD Punjab 35,2% και 38,1%, ενώ για την HbE<sup>18</sup> 30,1% και 23,9% με τη Bio Rad και την Capillarys 2, αντίστοιχα (*Higgins et al., 2009*).

Όπως διαπιστώνεται, οι τιμές της HbS βρέθηκαν σχεδόν ίδιες και στις δυο μεθόδους. Αντίθετα, η διαφορά μεταξύ των δυο μετρήσεων στην περίπτωση της HbD Punjab όπου οι τιμές ήταν χαμηλότερες για την Bio Rad, πιθανόν οφείλεται στην βαζελίνη που χρησιμοποιείται στη HPLC. Ομοίως, οι διαφορετικές τιμές για την HbE, οφείλονται πιθανόν σε αδυναμία της Capillarys 2 να ανιχνεύσει τις μικρές συγκεντρώσεις. Όσον αφορά την HbE στην μέθοδο HPLC, η HbE δεν μπορεί να διαχωριστεί από την HbA<sub>2</sub>, σε αντίθεση με την Capillarys 2 (*Higgins et al. 2009, Keren et al. 2008*).

Συμπερασματικά η μέθοδος Capillarys 2, Sebia αναγνωρίζει τις κοινές και τις πιο σπάνιες αιμοσφαιρίνες. Αυτό είναι πλεονέκτημα έναντι της HPLC, Bio Rad αλλά και έναντι της απλής ηλεκτροφόρησης σε αλκαλικό και όξινο pH, αφού διαθέτει μνήμη με 50 τουλάχιστον γνώστες αιμοσφαιρίνες σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους, όπου ο ειδικός οφείλει να ανατρέχει σε πρότυπους πίνακες (*Higgins et al., 2009*).

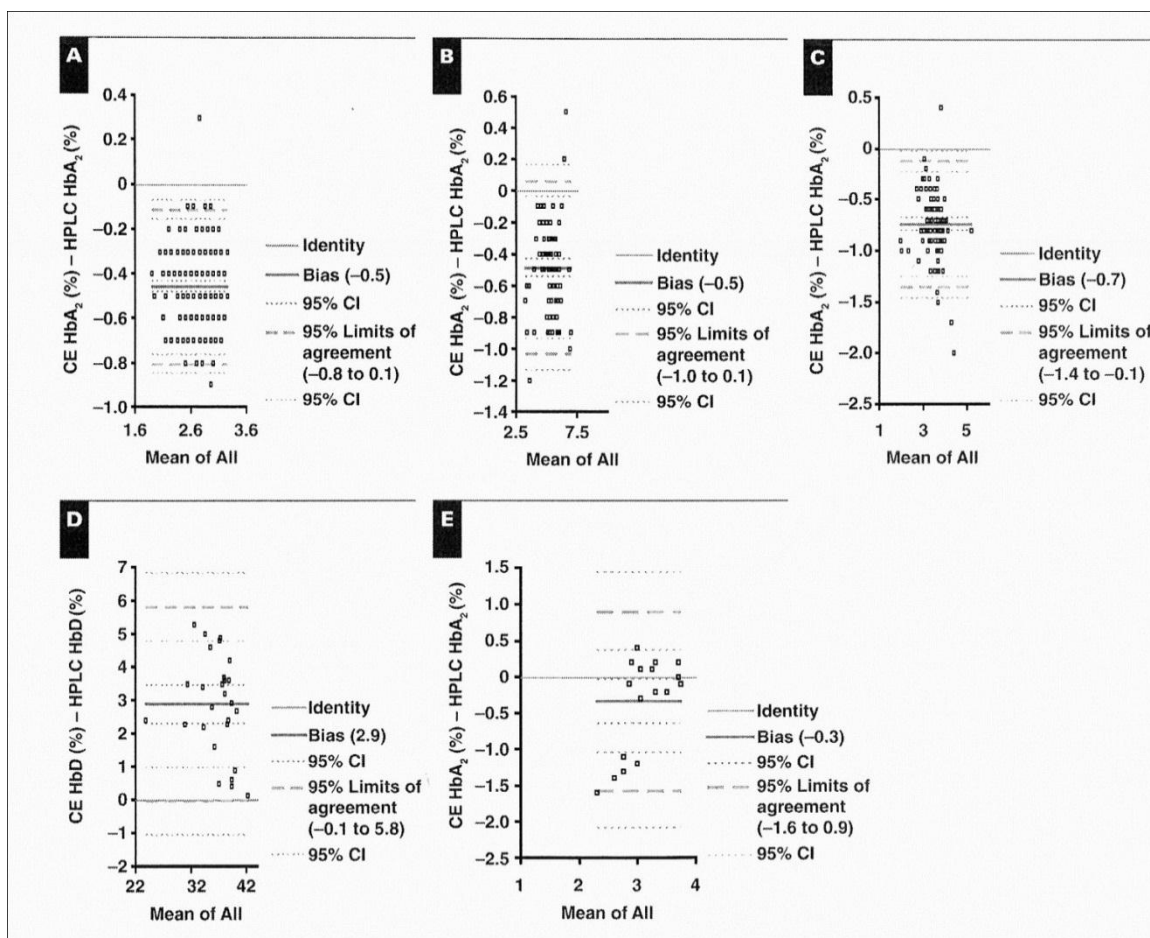
### 7.2. Σύγκριση της HPLC με την Capillary electrophoresis για τον ποσοτικό προσδιορισμό της HbA<sub>2</sub> με ταυτόχρονη παρουσία άλλων αιμοσφαιρινών

Ο ακριβής προσδιορισμός της αιμοσφαιρίνης HbA<sub>2</sub> είναι απαραίτητος για τη διάγνωση περιπτώσεων β-θαλασσαιμίας, καθώς οι διαφορές στις συγκεντρώσεις μεταξύ των ασθενών και αυτών που δεν πάσχουν από την ασθένεια, είναι πολύ

μικρές. Ωστόσο, οι γνώμες ως προς την ικανότητα ποσοτικοποίησης της HbA<sub>2</sub> από την απλή ηλεκτροφόρηση, δίστανται. Το Αμερικάνικο Κολέγιο Παθολογίας (CAP), επισημαίνει ότι οι ηλεκτροφορητικοί μέθοδοι δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται στον ποσοτικό προσδιορισμό της HbA<sub>2</sub>, καθώς δεν είναι ιδιαίτερα ακριβείς (*Keren et al., 2008*).

Ύστερα από έρευνα διάρκειας τεσσάρων μηνών, με σκοπό την σύγκριση της μεθόδου HPLC, Bio Rad Variant II β-thalassemia και Capillarys 2, Sebia electrophoresis διαπιστώθηκε ότι σε ασθενείς με ή χωρίς γονίδιο για β-θαλασσαιμία τα αποτελέσματα της Capillarys 2 ήταν διαρκώς πιο χαμηλά από της HPLC. Για τους ασθενείς με ταυτόχρονη παρουσία HbA<sub>2</sub> και HbS τα αποτελέσματα της Capillarys 2 ήταν διαρκώς πιο χαμηλά για άτομα με ομόζυγη ή ετερόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία, ενώ στην περίπτωση συνύπαρξης HbA<sub>2</sub> με Hb D Punjab τα αποτελέσματα της Capillarys 2 ήταν υψηλότερα από αυτά της HPLC. Επιπλέον, η σύγκριση δεν είναι εφικτή για την μέτρηση της HbA<sub>2</sub> με ταυτόχρονη παρουσία με την HbE, αφού η HPLC δεν δύναται να τις διαχωρίσει, ενώ στην περίπτωση συνύπαρξης HbA<sub>2</sub> με HbC, τα αποτελέσματα έχουν μεγάλες αποκλίσεις και δε είναι εφικτό να συγκριθούν (εικόνα 36).

Η εντύπωση που επικρατεί για την ακρίβεια της μεθόδου Capillarys 2 προς τον προσδιορισμό της HbA<sub>2</sub>, είναι το ίδιο καλή με την άποψη που επικρατούσε έως τώρα για τις μεθόδους τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης. Επίσης, είναι το ίδιο αποδεκτή για την χρήση της ως διαγνωστική μέθοδος για τη β-θαλασσαιμίας (*Higgins et al, 2009*).



Εικόνα 36. Διάφορα σχεδιαγράμματα για την HbA<sub>2</sub> σε ασθενείς A) χωρίς β-θαλασσαιμία, B) με β-θαλασσαιμία, C) με Hb S, D) με Hb D και E) με Hb C (ανατύπωση από Higgins et al., 2009).

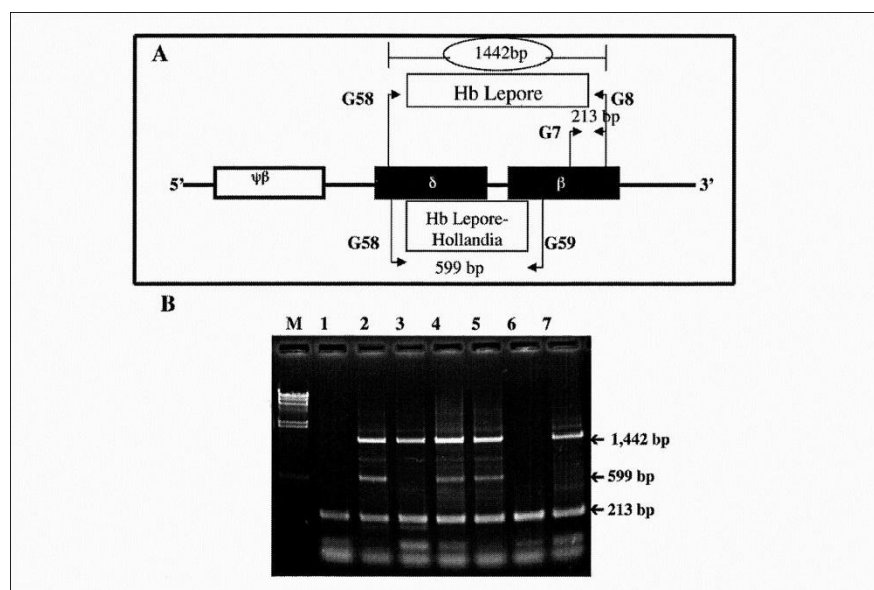
Στην περίπτωση συνύπαρξης Hb D Punjab, τα αποτελέσματα της Capillarys2 βρέθηκαν υψηλότερα έναντι αυτών της HPLC. Το γεγονός αυτό μάλλον οφείλεται σε τεχνικό λάθος της HPLC, λόγο της βαζελίνης που χρησιμοποιείται σε αυτή. Αντίθετα, στην περίπτωση συνύπαρξης HbA<sub>2</sub> και HbC, η Sebia Capillary 2 αδυνατεί να τις διαχωρίσει. Έτσι, σε αυτή την περίπτωση η HPLC υπερτερεί έναντι της πρώτης.

Όμως, όσον αφορά την συνύπαρξη HbA<sub>2</sub> και HbE, στα άτομα με HbE αυξάνεται και η HbA<sub>2</sub>. Σε ασθενείς με τιμές HbE κατώτερες από 25%, ενδέχεται η συνύπαρξη α-θαλασσαιμίας (Bain, 2001). Στην περίπτωση αυτή, η HPLC αδυνατεί να συμβάλει στη διάγνωση και σύμφωνα με τον Higgins και τους συνεργάτες του

ίσως θα έπρεπε η Capillary 2 να καθιερωθεί ως βασική μέθοδος ανίχνευσης τέτοιων περιπτώσεων.

### 7.3. Η συμβολή της ηλεκτροφόρησης Hb στη διάγνωση, σε σχέση με την ανάλυση του DNA

Έχει ήδη αναφερθεί, ότι οι διάφοροι μέθοδοι ηλεκτροφόρησης είναι ικανοί να ταυτοποιήσουν τους περισσότερους τύπους αιμοσφαιρίνης και συμβάλλουν στη διάγνωση των κληρονομικών αναιμιών. Ωστόσο, για να γίνει ο ακριβής προσδιορισμός της γενετικής μεταλλαγής, θα πρέπει να γίνει εξέταση σε μοριακό επίπεδο (εικόνα 37). Αυτό συνήθως συμβαίνει, μετά την πιθανή ταυτοποίηση των αιμοσφαιρινοπαθειών και των θαλασσαιμικών συνδρόμων. Στην ανάλυση τέτοιου επιπέδου, είναι εμφανής πλέον η οποιαδήποτε μεταλλαγή, είτε έλλειψη γονιδίου. Για τον σκοπό αυτό, υπάρχουν αρκετές μοριακές τεχνικές (*Chaibunruang et al., 2010*).



Εικόνα 37. Διαφορική διάγνωση της Hb Lepore, με τη μέθοδο της PCR, A) σχηματικό διάγραμμα, το οποίο δείχνει την δράση των primers και B) αντιπροσωπευτική ηλεκτροφόρηση γέλης νουκλεϊκών μορίων (ανατύπωση από *Chaibunruang et al., 2010*).

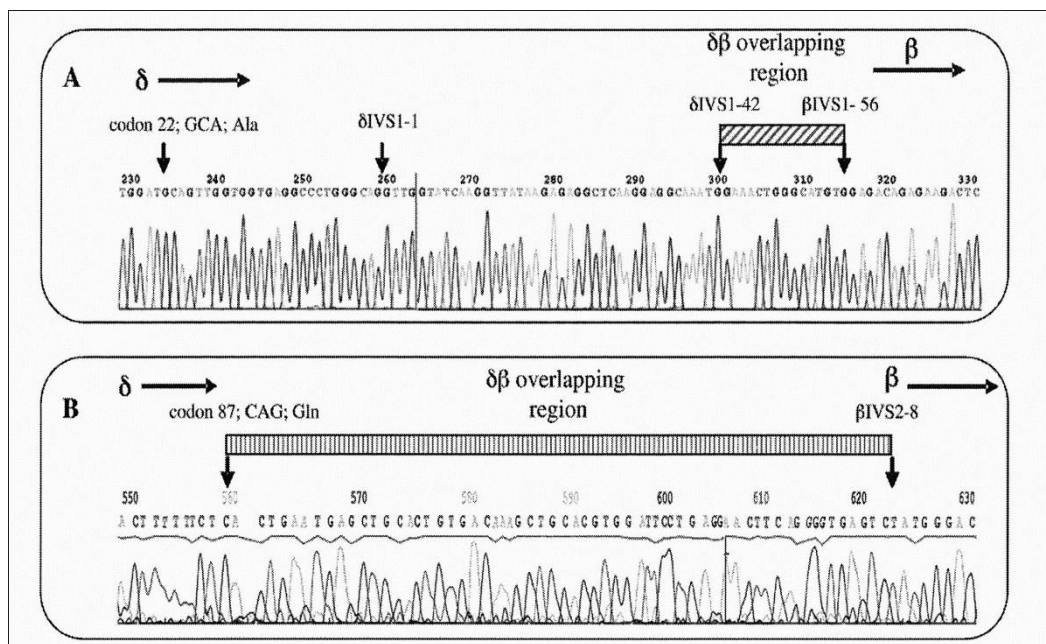
Σε αυτές τις εξετάσεις, χρησιμοποιείται συνήθως DNA από λευκά αιμοσφαίρια, αμνιοκύτταρα ή ιστός από τις χορειακές λάχνες. Αυτό βέβαια, εξαρτάται από την κάθε περίπτωση. Το υλικό, ελέγχεται με την κατάλληλη μοριακή τεχνική και στη συνέχεια διαγιγνώσκεται το είδος της διαταραχής στις α- ή β-αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης. Συχνά, γονιδιακές ελλείψεις προκαλούν α-θαλασσαιμικά σύνδρομα και κάποιες σπάνιες β-θαλασσαιμίες, οι οποίες διαγιγνώσκονται με τη μέθοδο του Southern Blot Hybridization (*Higgins & Clarke, 2000*). Ακόμη, η μέθοδος της PCR, η οποία μετά τον πολλαπλασιασμό του προς εξέταση υλικού, χρησιμοποιεί ιχνηθέτες (probes) και primers για συγκεκριμένα αλληλόμορφα γονίδια, με σκοπό να καθορίσει τις πιθανές μεταλλάξεις ή ελλείψεις στις αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης, όπως η HbE, S, D, O και αρκετές β-θαλασσαιμίες. Στην περίπτωση των αγνώστων μεταλλάξεων επιλέγονται μοριακές τεχνικές όπως, Sequencing, μέθοδοι βασιζόμενες στην PCR κ.α. (*Srivorakun et al., 2009*).

Σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα διαπιστώθηκε πως κατά την μέθοδο ανάλυσης του DNA, για τα γονίδια των δ- και β-αλυσίδων με τη μέθοδο της PCR, η μη φυσιολογική αιμοσφαιρίνη Hb Lepore οφειλόταν σε 2 διαφορετικά Hb Lepore αλληλόμορφα γονίδια π.χ. την Hb Lepore- Hollandia ( $\delta^{IVS\ 1-44}/\beta^{IVS\ 1-56}$ ) και την Hb Lepore Washington- Boston ( $\delta^{87}/\beta^{IVS\ II-8}$ ) (εικόνα 38) (*Chaibunruang et al. 2010, Edison et al. 2005*). Έτσι, αποδεικνύεται ξανά η σημαντικότητα της ανάλυσης DNA έναντι της απλής ανίχνευσης και του προσδιορισμού της αιμοσφαιρίνης ως προς τη διάγνωση της κληρονομικής αιμοσφαιρινικής διαταραχής.

Η ανάλυση λοιπόν του DNA, είναι αδιαμφισβήτητη η πιο ακριβής και κατάλληλη μέθοδος για την διάγνωση των κληρονομικών αναιμιών. Σε σύγκριση με τις μεθόδους ηλεκτροφόρησης της αιμοσφαιρίνης, στις οποίες για διάφορους λόγους, κυρίως τεχνικούς, δεν μπορεί να δοθεί η ακριβής και πλήρης εικόνα της βλάβης (π.χ. στην ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό pH δεν διαχωρίζονται οι HbA<sub>2</sub> και HbE), η ανάλυση του DNA είναι ικανή να αποκαλύψει την ακριβής διαταραχή και μάλιστα σε γενετικό επίπεδο (*Higgins & Clarke, 2000*). Με τη μέθοδο αυτή, δύναται να διαγνωστούν και μεταλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν τις αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης, οι οποίες δεν προκαλούν κλινικές εκδηλώσεις στο ίδιο το άτομο



αλλά μπορούν να μεταβιβαστούν στους απογόνους του (π.χ. ετερόζυγη β-μεσογειακή αναιμία). Επιπρόσθετα, δύναται να διαγνωσθεί και συνυπάρχουσα αιμοσφαιρινική διαταραχή, η οποία δεν εμφανίζει κλινικά συμπτώματα καθώς αυτά συγκαλύπτονται από άλλη (Chaibunruang et al., 2010).



**Εικόνα 38.** Η μέθοδος DNA sequencing απεικονίζει την ακριβής έλλειψης A) Hb Lepore-Hollandia και B) Hb Lepore-Washington-Boston (ανατύπωση από Chaibunruang et al., 2010).

Η ανάλυση λοιπόν του DNA, είναι αδιαμφισβήτη η πιο ακριβής και κατάλληλη μέθοδος για την διάγνωση των κληρονομικών αναιμιών. Σε σύγκριση με τις μεθόδους ηλεκτροφόρησης της αιμοσφαιρίνης, στις οποίες για διάφορους λόγους, κυρίως τεχνικούς, δεν μπορεί να δοθεί η ακριβής και πλήρης εικόνα της βλάβης (π.χ. στην ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό pH δεν διαχωρίζονται οι HbA<sub>2</sub> και HbE), η ανάλυση του DNA είναι ικανή να αποκαλύψει την ακριβής διαταραχή και μάλιστα σε γενετικό επίπεδο (Higgins & Clarke, 2000). Με τη μέθοδο αυτή, δύναται να διαγνωστούν και μεταλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν τις αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης, οι οποίες δεν προκαλούν κλινικές εκδηλώσεις στο ίδιο το άτομο αλλά μπορούν να μεταβιβαστούν στους απογόνους του (π.χ. ετερόζυγη β-μεσογειακή αναιμία). Επιπρόσθετα, δύναται να διαγνωσθεί και συνυπάρχουσα

αιμοσφαιρινική διαταραχή, η οποία δεν εμφανίζει κλινικά συμπτώματα καθώς αυτά συγκαλύπτονται από άλλη (*Chaibunruang et al., 2010*).

Παρόλα αυτά, η ανάλυση του DNA δεν είναι αλάνθαστη. Ένα μικρό τεχνικό λάθος (π.χ. στην PCR ή ανάμειξη ξένου υλικού) και τα αποτελέσματα πιθανόν να είναι εντελώς παραπλανητικά. Επίσης, ως μέθοδος είναι απαιτητική, χρονοβόρα και κοστίζει (*Higgins & Clarke, 2000*). Έτσι, σε σχέση με την ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης, ως μέσο διάγνωσης των κληρονομικών αναιμιών, η ηλεκτροφόρηση προτιμάται ως μέθοδος ρουτίνας, ενώ η ανάλυση DNA ως επιβεβαιωτική μέθοδος σε περιπτώσεις επανάληψης κάποιου αποτελέσματος ή όταν ζητάτε έλεγχο ενός δείγματος για κάτι συγκεκριμένο.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα των ερευνών δηλώνουν ότι η μέθοδος ηλεκτροφόρησης Capillary είναι κατάλληλη για τον διαχωρισμό των διαφόρων τύπων της αιμοσφαιρίνης και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους καθώς είναι ικανή να δώσει αποτελέσματα, τα οποία συναγωνίζονται την κοινή HPLC, ως προς τη διάγνωση των θαλασσαιμιών και των αιμοσφαιρινοπαθειών (*Yang et al., 2009*). Σε σύγκριση με την ανάλυση του DNA, η ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης είναι απλούστερη, πιο εύχρηστη και ταυτόχρονα ακριβής και αξιόπιστη. Αυτό την καθιστά ως την καταλληλότερη μέθοδο ρουτίνας, για τα περισσότερα εργαστήρια και στις περισσότερες περιοχές του κόσμου (*Srivorakun et al., 2001*).

## **8. Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΜΒΡΥΙΚΗΣ ΚΑΙ ΝΕΟΓΝΙΚΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΩΝ ΑΝΑΙΜΙΩΝ**

### **8.1. Μέθοδοι διάγνωσης κληρονομικών αναιμιών στον προγεννητικό έλεγχο**

Οι πιο σοβαρές θαλασσαιμικές ασθένειες, στις οποίες επικεντρώνεται το ενδιαφέρον των επιστημόνων ώστε να ανιχνευθούν κατά τον προγεννητικό έλεγχο, είναι τρεις. Ο εμβρυϊκός ύδρωπας Hb Bart's (ομόζυγη  $\alpha^0$ -θαλασσαιμία), η ομόζυγη

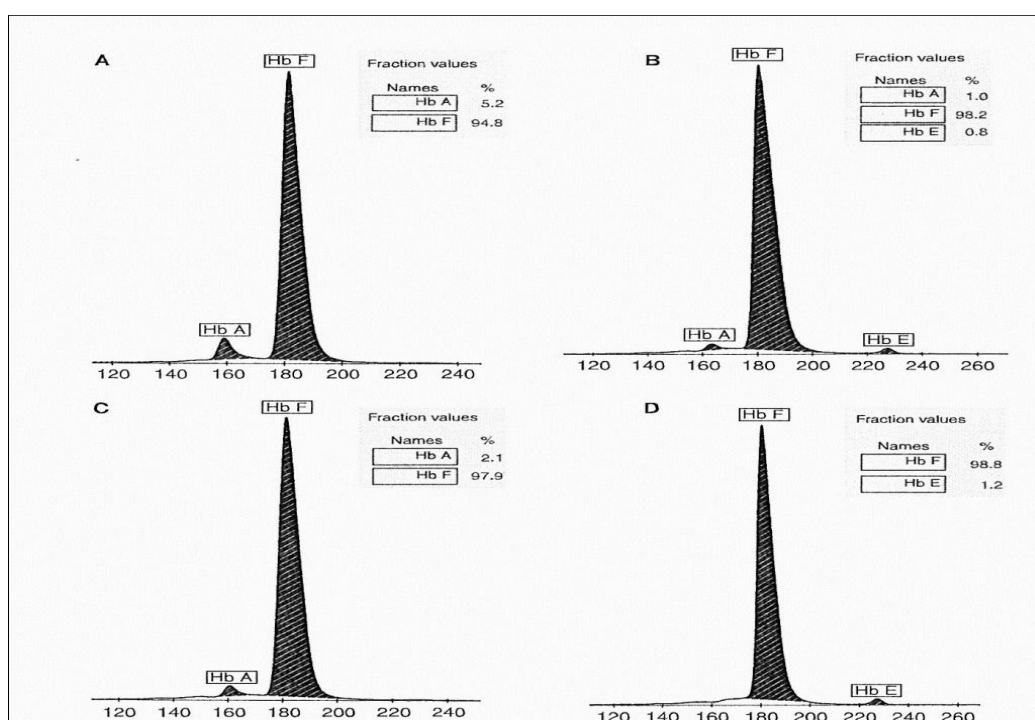
β-θαλασσαιμία και η HbE-β-θαλασσαιμία. Βέβαια, εκτός από τον προγεννητικό έλεγχο, συνιστάται να πραγματοποιείται έλεγχος στους υποψήφιους γονείς με σκοπό την ανίχνευση πιθανών φορέων, ώστε να αποφεύγεται το ρίσκο της γέννησης παιδιών που φέρουν κληρονομικές αιματολογικές διαταραχές. Σήμερα, στον προγεννητικό έλεγχο για τη διάγνωση θαλασσαιμιών συνηθίζεται να χρησιμοποιείται η μέθοδος ανάλυσης DNA σε υλικό εμβρυικό ιστό, ο οποίος να αποτελεί δείγμα από το χρονικό διάστημα μεταξύ 8-12 εβδομάδων από τη σύλληψη ή δείγμα αμνιοπαρακέντησης μεταξύ 14-20 εβδομάδων από τη σύλληψη και δείγμα από τον ομφάλιο λώρο 18 εβδομάδες μετά τη σύλληψη του εμβρύου (*Yang et al., 2009*).

Ωστόσο, μόνο με την ανάλυση του DNA υπάρχει πιθανότητα λάθους διάγνωσης σε περίπτωση «μόλυνσης» του εμβρυικού υλικού από άλλο ξένο (π.χ. αίμα της μητέρας). Έτσι, η χρήση συνδυασμού μεθόδων, αποτελεί την ιδανικότερη επιλογή. Ταυτόχρονη ανάλυση αιματολογικών χαρακτηριστικών και μοριακών πληροφοριών, δύναται να δώσει την πληρέστερη εικόνα ως προς το γενετικό αποτύπωμα, που φέρει κάθε έμβρυο.

Σήμερα, τα περισσότερα κλινικά εργαστήρια, επιλέγουν να εξετάζουν αρχικά τις εμβρυικές αιμοσφαιρίνες με μια απλή αλλά αξιόλογη μέθοδο και στη συνέχεια να προβαίνουν σε ανάλυση του DNA, ιδιαίτερα σε συγκεκριμένες περιπτώσεις (π.χ. σε μη διαχωρισμό κάποιων κλασμάτων αιμοσφαιρίνης στην ηλεκτροφόρηση). Μια απλή και αξιόλογη μέθοδος ανάλυσης της αιμοσφαιρίνης είναι και η κλασική ηλεκτροφόρηση. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως σε όλο τον κόσμο, καθώς προσφέρει αποτελέσματα ικανά να συμβάλουν σε διάγνωση. Ωστόσο, η μέθοδος της κλασικής ηλεκτροφόρησης (SDS-Page), τείνει να αντικαθίσταται από άλλες, νεότερες και πιο αυτοματοποιημένες μεθόδους, λιγότερων απαιτήσεων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πώς ότι η μέθοδος της κλασικής ηλεκτροφόρησης δεν θεωρείται ιδιαίτερα αξιόπιστη και ακριβής για τον ποσοτικό προσδιορισμό των χαμηλών συγκεντρώσεων των αιμοσφαιρινών (π.χ. HbF) ή την ανίχνευση πολύ γρήγορα μετακινούμενων αιμοσφαιρινών (π.χ. HbB Bart's) (*Louahabi et al., 2006*). Σε πρόσφατο δημοσίευμα αναφέρεται ότι η capillary είναι ικανή να αντικαταστήσει την ανάλυση του DNA και να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική επιλογή. Αυτό

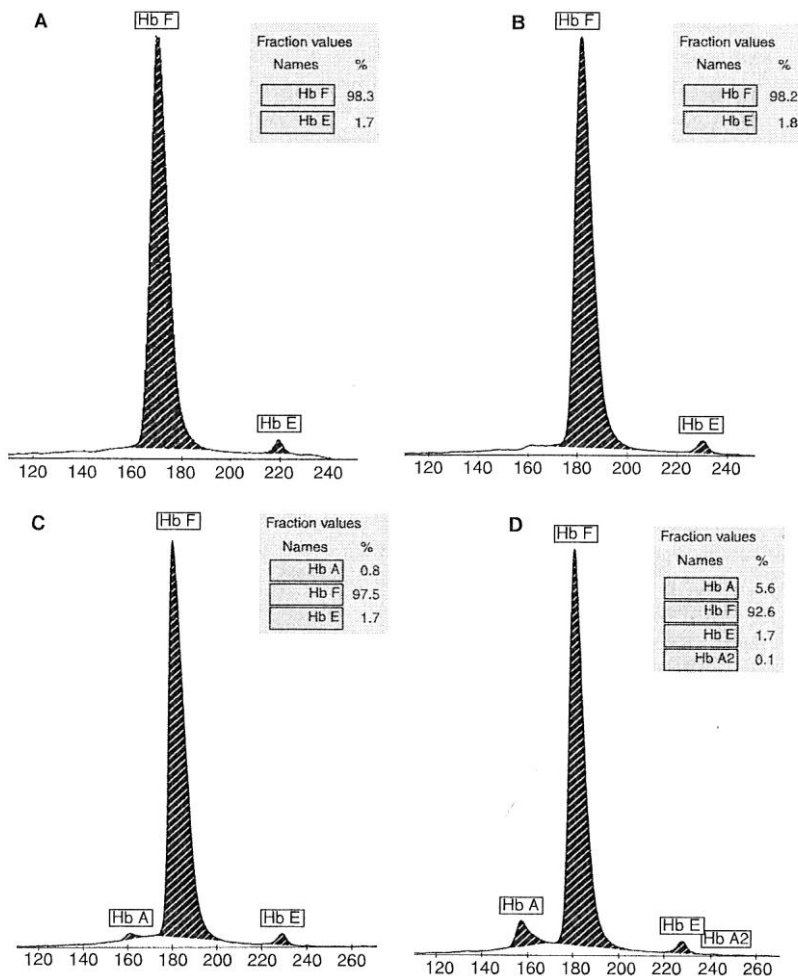
οφείλεται στα αξιόπιστα αποτελέσματα και την αυτοματοποίηση αυτής της μεθόδου (Sebia Incorporation, 2006).

Όπως έχει αναφερθεί, το σύστημα capillary συμβάλλει τόσο στον ποιοτικό όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαφόρων αιμοσφαιρινών με αποτελέσματα υψηλής ανάλυσης (εικόνα 39) και συγκρίσιμα με της HPLC (Louahabi et al. 2006, Winichagoon et al. 2008).



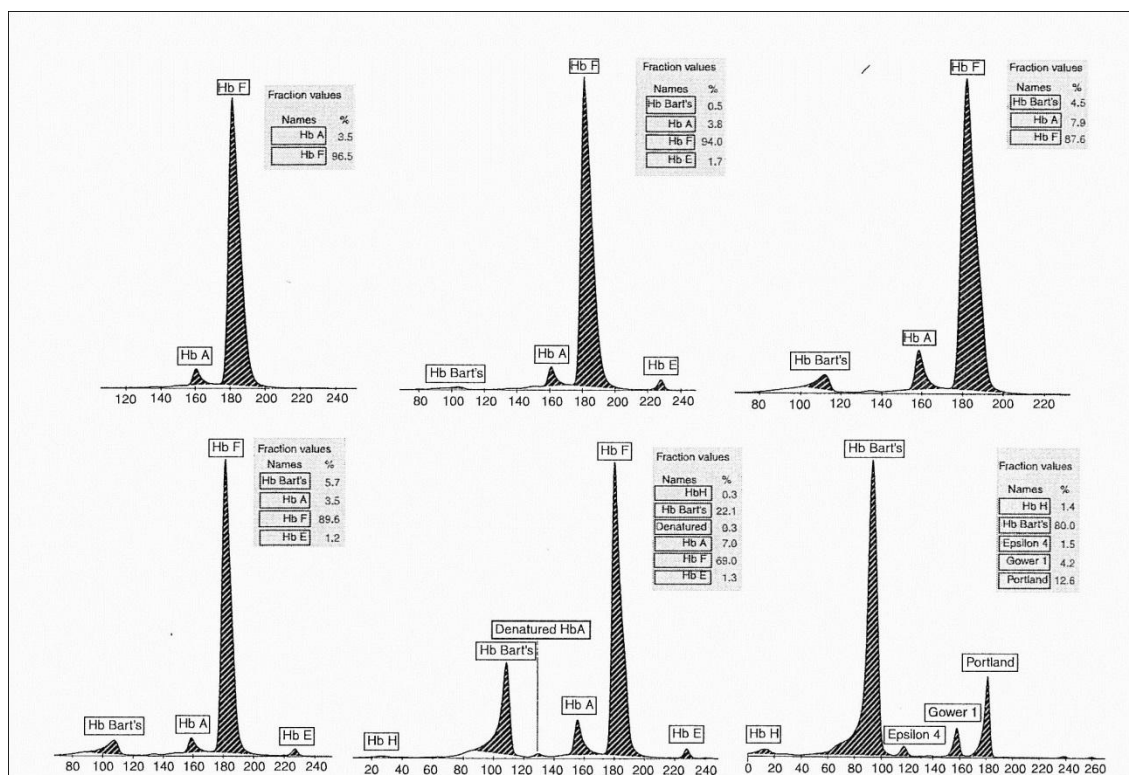
**Εικόνα 39.** Ανάλυση εμβρυική Hb με την μέθοδο CE. A) φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες εμβρύου, B) ανίχνευση HbE και HbF, C) δείγμα με ετερόζυγη  $\beta$ -θαλασσαιμία και D) ανίχνευση HbE και απουσία HbA (ανατύπωση από Srivorakun et al., 2009).

Ωστόσο, το σύστημα capillary μειονεκτεί στην περίπτωση ανάμιξης του εμβρυικού αίματος με αίμα της μητέρας (εικόνα 40). Σε μια τέτοια περίπτωση η ανίχνευση των ενήλικων αιμοσφαιρινών και η αδυναμία της μεθόδου να την προέλευσή τους αυξάνει τον κίνδυνο για εσφαλμένη διάγνωση.



**Εικόνα 40.** Α) αποτελέσματα πριν την ανάμειξη, Β) αποτελέσματα ύστερα από 0,5% ανάμειξη του όγκου του δείγματος, Γ) αποτελέσματα μετά από προσθήκη αίματος ενήλικου (1,0%) και Δ) αποτελέσματα μετά από προσθήκη (3,0%) (ανατύπωση από Srivorakun et al., 2009).

Σύμφωνα με τον Srivorakun και τους συνεργάτες του, η χρήση της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης είναι αποτελεσματική, ακριβής και απλή εναλλακτική επιλογή για την ανάλυση της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης και τη διάγνωση των Hb Bart's εμβρυικό ύδρωπα και HbE/β-θαλασσαιμία καθώς είναι ικανή να διαχωρίσει και μικρά ποσά αιμοσφαιρινικών κλασμάτων όπως η Hb Bart's (εικόνα 41). Αυτό την καθιστά ικανή ως μέθοδο ρουτίνας. Αξιοσημείωτη είναι επίσης, η ικανότητά της capillary να ανιχνεύει καθαρά και σαν ξεχωριστό κλάσμα την HbE σε περίπτωση συνύπαρξης HbE με α-θαλασσαιμία (Trithipsombat et al., 2008).



**Εικόνα 41.** Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εμβρυικής αιμοσφαιρίνης στον προγεννητικό έλεγχο για τη διάγνωση Hb Bart's εμβρυικό ύδρωπα (ομόζυγη  $\alpha^0$ -θαλασσαιμία). Α) φυσιολογικό δείγμα εμβρυικής αιμοσφαιρίνης, αναπαρίσταται η κύρια HbF αιμοσφαιρίνη και η ποσότητα της HbA, Β) Hb Bart's (1,7%) και Hb Bart's (0,5%), με παρουσία των HbF και HbA, σε εμβρυικό δείγμα με διπλή ετεροζυγωτία HbE/ $\alpha^+$ -θαλασσαιμία, C) και D) το ποσό της Hb Bart's υποτιμάται εξαιτίας μερικής απώλειας, η ετερόζυγη  $\alpha^0$ -θαλασσαιμία του εμβρύου σχετίζεται άμεσα με τα υψηλότερα ποσά της HbA σε σχέση με των άλλων (HbF, HbA και HbE), E) Hb Bart's (22,1%) στην περίπτωση συνύπαρξης ετερόζυγη HbE με  $\alpha^0$ -θαλασσαιμία και  $\alpha^+$ -θαλασσαιμία και D) μικρά ποσά HbH ( $\beta_4$ ) (0,8-1,4%) (ανατύπωση από Srivorakun et al., 2009).

Συμπερασματικά, λοιπόν προκύπτει ότι η καλύτερη και πληρέστερη διάγνωση μπορεί να προκύψει από την ταυτόχρονη χρήση δυο ανεξάρτητων μεθόδων. Από τη μια η ανάλυση του DNA και από την άλλη η ανάλυση της αιμοσφαιρίνης με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξέταση του εμβρυικού δείγματος και στη συνέχεια τα αποτελέσματα να συνυπολογίζονται. Επισημαίνεται δε, ότι η επιλογή της μεθόδου ηλεκτροφόρησης που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από τις οικονομικές δυνατότητες του εκάστοτε κλινικού εργαστηρίου. Για παράδειγμα, στην Ταϊλάνδη μαστίζει η  $\alpha$ -θαλασσαιμία

(20-30% του πληθυσμού). Στη διάγνωση της α-θαλασσαιμίας συμβάλει ο προσδιορισμός των επιπέδων της Hb Bart's, μιας αιμοσφαιρίνης η όποια κινείται ταχύτατα στην κλασική ηλεκτροφόρηση. Έτσι, πιθανό αποτέλεσμα λάθους χειρισμού, όπως παράταση του χρόνου ηλεκτροφόρησης, δύναται να οδηγήσει σε απώλεια αυτού του κλάσματος και κατά συνέπεια σε αδυναμία διάγνωσης ή ακόμα σε λάθος διάγνωση (*Srivorakun et al, 2009*).

## 8.2. Πρώιμη διάγνωση θαλασσαιμιών

Οι θαλασσαιμίες, είναι κληρονομικές δομικές διαταραχές της αιμοσφαιρίνης, ανιχνεύονται σε ολόκληρο τον κόσμο. Όπως έχει αναφερθεί οφείλονται σε γενετικές μεταλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν την αιμοσφαιρίνη και οδηγούν σε μειωμένη παραγωγή ή πλήρη έλλειψη κάποιας από τις σφαιρινικές αλυσίδες. Διαταραχές στις α-αλυσίδες προκαλούν α-θαλασσαιμίες, ενώ διαταραχές των β-αλυσίδων οφείλονται για τις β-θαλασσαιμίες. Πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των μορφών, οδηγούν σε ποικιλία κλινικών συνδρόμων α- και β-θαλασσαιμιών.

Η διάγνωση θαλασσαιμίας στον ασθενή γίνεται σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης, π.χ. στην εμβρυική περίοδο, στην νεογνική περίοδο ή ακόμα και στην ενήλικη ζωή. Η διάγνωση στην εμβρυική περίοδο, είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο για τους γονείς οι οποίοι καλούνται να αποφασίσουν για τη συνέχεια ή την διακοπή της κύησης, όσο και για την μετέπειτα ζωή του εμβρύου. Η διάγνωση μετά τη γέννηση, για τη λήψη μέτρων αντιμετώπισης, θεραπείας αλλά και πρόληψης απόκτησης τέτοιου παιδιού σε δεύτερη γέννα (*Yang et al., 2009*).

Διάγνωση των θαλασσαιμιών και των αιμοσφαιρινοπαθειών δύναται να προκύψει από την ανάλυση των ερυθροκυττάρων, καθώς και την ανάλυση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της αιμοσφαιρίνης (*Winichagoon et al, 2008*). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό της αιμοσφαιρίνης είναι η ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης σε αλκαλικό pH,

ισοηλεκτρική εστίαση (IEF) και υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) (Giordano, 2009). Η ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης γίνεται είτε με τη χρήση της κλασικής ηλεκτροφόρησης, είτε με πιο καινούριους αυτόματους αναλυτές οι οποίοι βασίζονται στις αρχές της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης (Van Delft et al., 2009).

Ηλεκτροφορώντας δείγμα νεογνού δύναται η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός της Hb Bart's, η οποία συνυπολογίζεται με τις μειωμένες τιμές των δεικτών Hb, MCV και MCH. Από τον συνδυασμό των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης και των τιμών βασικών δεικτών του αίματος, είναι εφικτή η διάγνωση της ομόζυγης  $\alpha^+$ -θαλασσαιμίας/ετερόζυγης  $\alpha^0$ -θαλασσαιμίας και της διαταραχής HbH.

Ωστόσο, τα ανιχνεύσιμα ποσά Hb Bart's ανιχνεύονται σε έλλειψη α-γονιδίου. Αύξηση της Hb Bart's ανιχνεύεται επίσης σε περιπτώσεις διπλής ετεροζυγωτίας HbE/ $\alpha$ -θαλασσαιμίας και ειδικά  $\alpha_0$ -θαλασσαιμίας και Hb Constant Spring ή Pakse. Σε έρευνα που έγινε, διαπιστώθηκε πως η ηλεκτροφόρηση δεν κατόρθωσε να ανιχνεύσει αυξημένες τιμές Hb Bart's σε όλες τις περιπτώσεις HbE/ $\alpha$ -θαλασσαιμία. Αυτό δηλώνει αδυναμία της capillary να συμβάλλει στη διάγνωση τέτοιων περιπτώσεων (Srivorakun et al., 2011). Όμως, παρόμοιες περιπτώσεις έχουν δημοσιευτεί και για την μέθοδο HPLC (Wichinagoon et al., 2008).

Αξιοσημείωτο είναι, ότι οι φορείς της  $\beta$ -θαλασσαιμίας δεν είναι εφικτό να διαγνωστούν όταν είναι κάτω του ενός έτους, αφού δεν εμφανίζουν ακόμα την πλήρη αιματολογική εικόνα ενός φυσιολογικού παιδιού. Στη γέννηση η σύσταση του αίματος αποτελείται από 70%-80% HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) και 20-30% HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ). Σε φυσιολογικά άτομα οι αναλογίες αυτές αλλάζουν μετά τον πρώτο χρόνο ζωής, 97% HbA, 2,5% HbA<sub>2</sub> και 0,5% HbF (Winichagoon et al, 2008).

Ωστόσο, έχει προταθεί η άποψη ότι τιμές HbA μικρότερες από 15% των τιμών cutoff, ενδείκνυται ύπαρξη  $\beta$ -θαλασσαιμίας. Η επιβεβαίωση όμως απαιτεί περαιτέρω έρευνα για την κάθε περίπτωση. Συμπεραίνεται ότι αποκλειστική χρήση της ηλεκτροφόρησης δεν επαρκεί ώστε να συνεισφέρει στη διάγνωση  $\beta$ -θαλασσαιμίας μετά τη γέννηση. Έτσι, για να διαπιστωθεί η  $\beta$ -θαλασσαιμία σε



νεογνά μικρότερα του ενός έτους απαιτείται είτε εξέταση των γονέων για να διαπιστωθεί πιθανή ύπαρξη γονιδίου β-θαλασσαιμίας ή εξέταση DNA στο νεογνό, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις δεν αποτελεί μέθοδο επιλογής για ορισμένα κλινικά εργαστήρια κυρίως σε αναπτυσσόμενες χώρες (*Mantikou et al., 2009*).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της HbA<sub>2</sub> αποτελεί πρόκληση για τις διάφορες μεθόδους ανάλυσης της αιμοσφαιρίνης, αφού ανιχνεύεται σε μικρά ποσοστά και αυξάνεται μόνο σε αιματολογικές ασθένειες. Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός της απαιτούν τη χρήση μεθόδου με υψηλό βαθμό ακρίβειας, για τέτοιες μετρήσεις. Συνήθως, η HbA<sub>2</sub> μετράται με την HPLC και με την κλασική ηλεκτροφόρηση (*Elghetany & Banki, 2007*). Πρόσφατα, η CZE αποδείχτηκε ως μια ισχυρή τεχνική. Η CZE σε έρευνες που διεξήχθησαν απέδειξε ότι πιθανόν είναι η καταλληλότερη για τη μέτρηση της HbA<sub>2</sub> σε περιπτώσεις δρεπανοκυτταρικής αναιμίας απ' ότι άλλες μέθοδοι (*Shihabi et al., 2000*).

Οι έγκυες, συχνά εμφανίζουν σιδηροπενική αναιμία (IDA), η οποία επίσης να εμφανίζεται επίσης στην ετερόζυγη β-θαλασσαιμία (βΤΤ). Και οι δυο περιπτώσεις εμφανίζουν μικροκυττάρωση και υποχρωμία. Ωστόσο, είναι αναγκαίο να διαφοροποιηθούν, αφού η θεραπεία και οι συνέπειες που ακολουθούν στην κάθε διάγνωση είναι εντελώς διαφορετικές (*Tsilolo et al., 2008*). Είναι γνωστό ότι η μικροκυττάρωση στην β-θαλασσαιμία συχνά χαρακτηρίζεται από χαμηλό MCV και MCH, αυξημένα RBC, φυσιολογικά ή λίγο μειωμένα RDW και φυσιολογική ή λίγο μειωμένη Hb. Όμως, λόγω των μεταβολών που συμβαίνουν στο σώμα της εγκύου, η μέτρηση των δεικτών RBC και RDW είναι αναξιόπιστη (*Srivorakun et al., 2011*). Έτσι είναι αναγκαία η ανάλυση και ο προσδιορισμός της αιμοσφαιρίνης με σκοπό τέτοια διάγνωση. Στις περισσότερες περιπτώσεις ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας, οι τιμές HbA<sub>2</sub> είναι υψηλές. Οπότε, η αναζήτηση αυξημένων ποσών HbA<sub>2</sub> με κατάλληλες μεθόδους είναι αναγκαία. Πιθανή ανίχνευση αυξημένης τιμής HbA<sub>2</sub> αξιολογείται με την ανίχνευση μικροκυττάρωσης και συμβάλλουν στην διάγνωση της βΤΤ.

Βρέθηκε ότι ένας σημαντικός αριθμός αυτών με ήπια αύξηση της HbA<sub>2</sub> δεν έπασχαν από βΤΤ. Από δημοσιεύματα άλλων ερευνών συμπεραίνεται ότι η αύξηση της HbA<sub>2</sub> στην κατάσταση της εγκυμοσύνης μπορεί να οφείλεται είτε σε υπερθυρεοειδισμό είτε σε γονίδιο για δρεπανοκυτταρική αναιμία. Γνωστό είναι ότι, τα οιστρογόνα προκαλούν συχνά την υπερπαραγωγή των ολικών θυρεοειδικών ορμονών κατά την εγκυμοσύνη. Αντίθετα, σε ασθενείς που εξετάστηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης, ανιχνεύτηκε αυξημένη HbA<sub>2</sub>. Μισοί από αυτούς είχαν HbS αιμοσφαιρική διαταραχή και οι άλλοι μισοί ήταν έγκυες γυναίκες. Αυτό λοιπόν αποδεικνύει την επιτυχία της ηλεκτροφόρησης της αιμοσφαιρίνης στον έλεγχο για την ανίχνευση γονιδίου HbS (Yang et al, 2009). Γενικά, σε κάποιους ασθενείς γονίδιο για δρεπανοκυτταρική αναιμία μπορεί να συνυπάρχει με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. Παρόλα αυτά αρκετοί ισχυρίζονται πως δεν είναι δυνατόν και η HbS και η βΤΤ και η εγκυμοσύνη να επηρεάζουν την αύξηση της HbA<sub>2</sub> στις έγκυες με HbS. Πρόσφατα ερευνήθηκαν οι αυξημένες τιμές HbA<sub>2</sub> σε έγκυες, χωρίς να έχουν βΤΤ και διαπιστώθηκε ότι είχαν HIV ή είχαν ακολουθήσει αντιβιοτική θεραπεία (Howard et al., 2005). Έτσι, για όλους αυτούς τους λόγους απαραίτητη είναι η επανάληψη της ηλεκτροφόρησης της αιμοσφαιρίνης μετά την εγκυμοσύνη, ώστε να επιβεβαιωθεί η αύξηση της HbA<sub>2</sub> και να διαπιστωθούν οι λόγοι αύξησης.

Η ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης αν και ικανή να δώσει αξιόπιστα ποσοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα δεν συνίσταται να εφαρμόζεται αυθαίρετα στον γενικό πληθυσμό, καθώς δεν δύναται να συμβάλλει σε διάγνωση ύπαρξης κληρονομικής αναιμίας. Αντίθετα, οι τεχνικές μοριακής ανάλυσης DNA, είναι ικανές να επιβεβαιώσουν την ύπαρξη κληρονομικών αναιμιών οπουδήποτε στιγμή. Βέβαια, θεωρείται ότι η πιο αξιόπιστη διάγνωση της ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας δύναται να βασιστεί μόνο σε μοριακή ανάλυση, όμως τέτοιου είδους εξετάσεις είναι χρονοβόρες και δεν είναι εφικτό να χρησιμοποιηθούν ως εξέταση ρουτίνας, στα διάφορα κλινικά εργαστήρια (Tsilolo et al., 2008).

Ωστόσο, ανάλυση της αιμοσφαιρίνης με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης, δύναται να οδηγήσει σε διάγνωση σε περιπτώσεις όπου υπάρχει η υποψία ύπαρξης κάποια κληρονομικής αιμοσφαιρικής διαταραχής. Αξιοσημείωτο είναι ότι, η

ηλεκτροφόρηση συμβάλλει περισσότερο στη διάγνωση πριν και μετά την περίοδο της κύησης. Τα αποτελέσματα είναι αξιόλογα όταν ελέγχεται κάτι συγκεκριμένο και υπάρχει μέτρο σύγκρισης, παρά στο γενικό πληθυσμό όπου οι λόγοι διακύμανσης των τιμών της HbA<sub>2</sub> ποικίλουν.

### **8.3. Έλεγχος για παθολογικές αιμοσφαιρίνες στις αναπτυσσόμενες χώρες**

Στις δυτικές κοινωνίες ο πληθυσμός εμφανίζει κυρίως ετεροζυγωτίες. Αυτό οδηγεί τα κλινικά εργαστήρια, στην αναζήτηση διαφόρων αιμοσφαιρινικών διαταραχών, αρχικά με τη χρήση μιας μεθόδου ρουτίνας και σε πιθανή θετική ένδειξη για αιμοσφαιρινοπάθεια, πραγματοποιείται πιο εξονυχιστικός έλεγχος. Έτσι, μετά τον πρώτο έλεγχο για ανίχνευση αιμοσφαιρινικής διαταραχής στα νεογνά και αφού διαπιστωθεί κάτι τέτοιο, ακολουθεί δεύτερος έλεγχος για την επιβεβαίωση και ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων (π.χ. περίπτωση HbS και HbD Punjab). Για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος, στα δυτικά εργαστήρια συνηθίζεται να χρησιμοποιείται η HPLC ή η IEF αν και αυτό εξαρτάται από το είδος της τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε αρχικά (σαν μέθοδος ρουτίνας) (*Gulbish et al., 2006*).

Σε περιοχές όπως είναι το Κονγκό και η Μπουρκίνα Φάσο, που επικρατούν χαμηλές συνθήκες διαβίωσης, η εξάπλωση των αναιμιών είναι ιδιαίτερα ραγδαία. Αυτό οφείλεται στη γέννηση παιδιών από γονείς οι οποίοι είτε είναι φορείς, είτε κάποιος ή και οι δύο είναι ομόζυγοι για κάποια αιμοσφαιρινική διαταραχή. Έτσι, η ανάγκη για διάγνωση των αναιμιών δεν περιορίζεται μόνο στα νεογνά αλλά επεκτείνεται και προς τους γονείς πριν τεκνοποιήσουν ή ακόμη και σε αρχικό στάδιο της εγκυμοσύνης. Επίσης, γνωστό είναι ότι σε χώρες με περιορισμένους οικονομικούς πόρους ιδιαίτερα σημαντική είναι η εφαρμογή τεχνικών μεθόδων ταυτοποίησης και διάγνωσης κληρονομικών αιματολογικών ασθενειών, οι οποίες να είναι χαμηλού κόστους, αλλά ταυτόχρονα αξιόπιστες ως προς τα αποτελέσματά τους. Αν για παράδειγμα, οι ετεροζυγώτες για HbS αιμοσφαιρίνη δύναται να γνωστοποιηθούν, τότε τα ζευγάρια να είναι ενήμερα για τις συνέπειες μιας τέτοιας

τεκνοποίησης, μεταξύ δυο ετερόζυγων για δρεπανοκυτταρική αναιμία (*Tsilolo et al., 2008*).

Οι τεχνικές HPLC και IEF (μέθοδος ισοηλεκτρο-εστίασης), οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα για την εξέταση των νεογνών για κληρονομικές αναιμίες, θεωρούνται από τις πιο αποτελεσματικές καθώς είναι υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας. Από αυτές τις τεχνικές πιο κατάλληλη για τις αναπτυσσόμενες χώρες θεωρείται ο IEF καθώς επιμένει λιγότερο στην χρήση «στάνταρ» υλικών και kit. Η γέλη αγαρόζης που χρησιμοποιείται στον IEF μπορεί να παρασκευαστεί και στο εργαστήριο επιτρέποντας κατά μέσο όρο χαμηλότερο κόστος για κάθε εξέταση (*Kafando et al., 2005*). Σήμερα, ο IEF, αποτελεί μια από τις πρώτες επιλογές των κλινικών εργαστηρίων για νεογνικό έλεγχο, ανίχνευσης κληρονομικών αναιμιών. Ο IEF έχει αποδείξει την ικανότητα του να ανιχνεύει τους ετεροζυγώτες και ομοζυγώτες για όλα τα είδη αιμοσφαιρινών και ειδικά τις HbS HbC οι οποίες είναι οι πιο κοινές αιμοσφαιρίνες που ανιχνεύονται στις αναπτυσσόμενες χώρες (εικόνα 42) (*Davies et al., 2000*).

**Table 1** Neonatal screening and clinical care for sickle cell disease (SCD) in Democratic Republic of the Congo (DRC), Burkina Faso, Benin and Ghana.

Country	Number screened	Type of screening	Sample type	Screening technique	SCD frequency (%)
DRC	4116	Systematic	Cord blood on filter paper	IEF	2.3
Burkina Faso	2341	Systematic	Cord blood on filter paper	IEF	1.8
Benin <sup>29</sup>	943	Targeted	Heel prick on filter paper	IEF	9.9
Ghana <sup>35</sup>	177,283	Systematic	Heel prick on filter paper	IEF	1.9

IEF, isoelectric focusing.

**Εικόνα 42.** Έλεγχος για δρεπανοκυτταρική αναιμία με τη μέθοδο IEF (ανατύπωση από *Tsilolo et al., 2008*).

Ωστόσο, στις αναπτυσσόμενες χώρες, ως εναλλακτική λύση για την ανίχνευση και ταυτοποίηση παθολογικών αιμοσφαιρινών, δύναται να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος ηλεκτροφόρησης της αιμοσφαιρίνης. Για παράδειγμα, η ηλεκτροφόρηση σε κιτρικό άγαρ και όξινο pH, όπως έχει αναφερθεί, επιτρέπει την

ανίχνευση των HbS και HbC ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Παρόλα αυτά, σε περιπτώσεις που δεν δύναται οικονομικά, να χρησιμοποιηθεί δεύτερη τεχνική στο εργαστήριο για επιβεβαίωση του αποτελέσματος, είναι δυνατόν επαληθευτεί η εξέταση στο νεογνό, με την ίδια τεχνική για δεύτερη φορά (*Tshilolo et al., 2008*).

Σαν εναλλακτική επιλογή αξιολογείται η άποψη ότι, τα εργαστήρια που δεν διαθέτουν δεύτερη μέθοδο επιβεβαίωσης λόγω οικονομικής δυσχέρειας να στέλνουν τα ύποπτα για κληρονομικές αναιμίες δείγματα, σε άλλα εργαστήρια, πιο σύγχρονα, τα οποία διαθέτουν νέες ευαίσθητες και αυτοματοποιημένες μεθόδους όπως η HPLC ή ο IEF (*Charoenkwan et al., 2010*).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό και όξινο pH, είναι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε κατά το πέρασμα των χρόνων και καθιερώθηκε ως μέθοδος για την εξέταση των δειγμάτων με σκοπό την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαφόρων τύπων αιμοσφαιρινών. Υπάρχουν αρκετά είδη αυτής της τεχνικής, τα οποία διαφέρουν ως προς το pH και είδος του ηλεκτροφορητικού μέσου. Μια από αυτές τις μεθόδους είναι και η ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης ή SDS-Page electrophoresis, η οποία χάρη στην κατασκευή της γέλης, ευνοεί το διαχωρισμό των διαφόρων τύπων της αιμοσφαιρίνης μέσα σε λίγα λεπτά, συμβάλλοντας στην ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους και κατ' επέκταση στη διάγνωση πιθανής ύπαρξης κληρονομικών αναιμιών.

Αντίθετα, αρκετοί τη θεωρούν χρονοβόρα, ιδιαίτερα απαιτητική ως προς την εμπειρία του προσωπικού και την προετοιμασία των δειγμάτων, όχι ιδιαίτερα ακριβής στον ποσοτικό προσδιορισμό χαμηλών συγκεντρώσεων των αιμοσφαιρινών (π.χ. HbF) ή στην ανίχνευση πολύ γρήγορα μετακινούμενων κλασμάτων (π.χ. HbB Bart's). Έτσι, συμπεραίνεται ότι η κλασική ηλεκτροφόρηση υστερεί σε σύγκριση με άλλες νεότερες, αυτοματοποιημένες και πιο ευαίσθητες τεχνικές όπως η Capillary electrophoresis (CE), οι μέθοδοι υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας (HPLC) και διάφορες άλλες.

Ωστόσο, η ηλεκτροφόρηση συνηθίζεται να χρησιμοποιείται στα διάφορα κλινικά εργαστήρια ως μέθοδος ρουτίνας. Δηλαδή, για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαφόρων κλασμάτων της αιμοσφαιρίνης και κατ' επέκταση τη διάγνωση αναιμιών, ενώ ακολουθεί δεύτερη εξέταση του δείγματος για την επαλήθευση και επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, σε πιθανή διάγνωση αναιμίας. Η επιβεβαιωτική εξέταση πραγματοποιείται με τη χρήση νεότερων και πιο ευαίσθητων τεχνικών, είτε με χρήση της ίδια ή άλλης μεθόδου ηλεκτροφόρησης.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αναιμίες, καλούνται οι παθολογικές καταστάσεις, κατά τις οποίες το ποσό της αιμοσφαιρίνης είναι ελαττωμένο σε σχέση με το φυσιολογικό, ανάλογα με την ηλικία και το φύλο. Ο καταλληλότερος προσδιορισμός της σοβαρότητας της αναιμίας είναι με βάση την τιμή της αιμοσφαιρίνης, καθώς σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου του αίματος, από τους πνεύμονες στους ιστούς. Με βάση τα είδη των διαταραχών της αιμοσφαιρίνης διακρίνονται οι «πορφυρίες», που χαρακτηρίζονται από διαταραχές στη σύνθεση της αίμης, οι ανωμαλίες στη σύνθεση των σφαιρικών αλυσίδων, οι οποίες διακρίνονται σε ποσοτικές και τις καλούμε «θαλασσαιμίες» και σε ποιοτικές και χαρακτηρίζονται ως «αιμοσφαιρινοπάθειες». Ταυτόχρονη παρουσία ποσοτικής και ποιοτικής ανωμαλίας της αιμοσφαιρίνης, συνιστά τις «θαλασσαιμικές αιμοσφαιρινοπάθειες».

Για τη διάγνωση των κληρονομικών αναιμιών απαραίτητη είναι η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός του κάθε τύπου αιμοσφαιρίνης, σε κάθε δείγμα. Για να επιτευχθεί αυτό χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές ανάλυσης της αιμοσφαιρίνης. Μία από αυτές είναι η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης. Για την ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης έχουν αναπτυχθεί αρκετές ηλεκτροφορητικές μέθοδοι οι οποίοι διαφέρουν ως προς το pH και το είδος του ηλεκτροφορητικού μέσου. Η ηλεκτροφόρηση δίνει αξιόλογα αποτελέσματα, συμβάλλοντας στη διάγνωση των κληρονομικών αναιμιών.

Ωστόσο, εμφανίζει και αρκετά μειονεκτήματα. Η κλασική ηλεκτροφόρηση, είναι αρκετά κουραστική και χρονοβόρα μέθοδος, ενώ είναι πιθανό να δημιουργηθούν αρκετά σοβαρά τεχνικά προβλήματα, όπως πρόκληση μετουσίωσης των πρωτεϊνών σε αύξηση της θερμοκρασίας ή ακόμη, αλλοιωμένα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε χαμηλές τάσεις ρεύματος. Επιπλέον, στην ηλεκτροφόρηση δεν δύναται ο διαχωρισμός ορισμένων τύπων της αιμοσφαιρίνης, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας ενιαίας «ζώνης» έτσι ώστε καθίσταται αδύνατη η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους.

Με την εξέλιξη της τεχνολογίας, οι απαιτήσεις των επιστημόνων από την απόδοση των διαφόρων μεθόδων, είναι σαφώς μεγαλύτερες απ' ό τι στο παρελθόν. Έτσι, είναι αναγκαία η χρήση νέων, αυτοματοποιημένων και πιο ευαίσθητων μεθόδων για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των αιμοσφαιρινών. Στις μεθόδους αυτές ανήκουν η Capillary electrophoresis (CE) και η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC), οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως και συμβάλουν στην διάγνωση των κληρονομικών αναιμιών.

Για τη διάγνωση των κληρονομικών αναιμιών στα διάφορα στάδια της ζωής (έμβρυο, νεογνό ή ενήλικας), αρκετά κλινικά εργαστήρια χρησιμοποιούν την κλασική ηλεκτροφόρηση ως μέθοδο ρουτίνας. Παρά τα μειονεκτήματα που εμφανίζει, συνεχίζει να επιλέγεται ως αξιόλογη μέθοδος ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού των τύπων της αιμοσφαιρίνης. Ωστόσο, συνήθως χρησιμοποιείται και δεύτερη τεχνική για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος, ύστερα από τη διάγνωση αναιμίας. Ως επιβεβαιωτική μέθοδος χρησιμοποιείται κάποια αυτοματοποιημένη και πιο ευαίσθητη τεχνική, σε σχέση με την κλασική ηλεκτροφόρηση, είτε ο ίδιος ή άλλος τύπος ηλεκτροφόρησης από αυτόν που χρησιμοποιήθηκε αρχικά.



## SUMMARY

Anemias are pathological situations where the amount of hemoglobin is decreased compared to normal, depending on age and gender. The most appropriate definition of the severity of anemia is based on the value of hemoglobin, and is directly related to oxygen carrying capacity of blood from the lungs to the tissues. Based on the types of hemoglobin disorders anemias are characterized as "porfirias" by disturbances in the synthesis of heme. Based on the abnormalities in the synthesis of globin chains, anemias are divided into quantitative and quality. Quantitative anemias are called thalassaemias and quality are classified as haemoglobinopathies. Concomitant presence of quantitative and qualitative abnormalities of hemoglobin, are the thalassemic hemoglobinopathies.

For the diagnosis of hereditary anemias needed is the identification and quantification of each type of hemoglobin in each sample. To achieve this, various analytical techniques are used. One of these is the method of electrophoresis. For electrophoresis of hemoglobin many electrophoretic methods have been developed. They differ in pH and the type of electrophoretic medium. Electrophoresis gives remarkable results, helping in the diagnosis of hereditary anemias.

However, it displays several disadvantages. The classical electrophoresis, is quite tedious, time consuming process and it is possible to create several serious technical problems. For example, causing denaturation of proteins because of temperature increase or even garbled electrophoresis at low voltages. In addition, certain types of hemoglobin, cannot be separated resulting in the emergence of a single band making it impossible to detect and quantify them.

With the evolution of technology, the requirements of scientists from the performance of various methods, is much greater than in the past. Thus, it is necessary to use new, automated and more sensitive methods for the determination and identification of hemoglobin. In these methods belong Capillary electrophoresis (CE) and high-performance liquid chromatography (HPLC), which are widely used and contribute to the diagnosis of hereditary anemias.

For the diagnosis of hereditary anemia in various stages of life (fetus, infant

or adult), several clinical laboratories using the classical method of electrophoresis as a routine method. Despite the disadvantages, electrophoresis continues to be selected as a valuable method for identification and quantification of the types of hemoglobin. However, a second technique to confirm the result after the diagnosis of anemias is used. As a confirmatory method is usually used an automated and more sensitive technique than classical electrophoresis, either itself or other type of electrophoresis than that used at the beginning.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **1. ΒΙΒΛΙΑ**

Bain BJ. Other significant haemoglobinopathies In: Haemoglobinopathy Diagnosis, 2nd edition, editor: Blackwell Publishing, UK 2006, ISBN-10:1-4051-3516-6

Kaplan L, Rhona Jack, Bert Toivola, Lyon A. Clinical chemistry: Interpretation and Techniques, 4η έκδοση, εκδόσεις Πασχαλίδης, επιμέλεια μετάφρασης Α. Καλοφούτης, Αθήνα 2003, ISBN 960-399-148-1

Mehta A. and Hoffbrand V. Hematology at a glance, 3rd edition, editor: Wiley-Blackwell, UK 2009, ISBN 978-1-4051-7970-6

Okpala I. Practical Management of haemoglobinopathies, editor: Blackwell Publishing, London 2004, ISBN 1-4051-0780-4

Walker H, Hall W. and Hust J. Clinical Methods: The history, Physical and Laboratory Examination, 3rd edition, editor: Butterwort Publishers, Boston 1990, ISBN- 10: 0-409-90077-X

Weatherall DJ and Clegg J. The Thalassemia Syndromes, 4th edition, editor: Blackwell Science Ltd., UK., Oxford 2001, ISBN 0-86542-664-3

Westermeier R, Gronau S, Beckett Ph, Berkelman T, Bulles J, Schickle H, Thebeling G. Electrophoresis in Practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separation, 3rd edition, editor: Wiley-VCH, Germany 2001, ISBN 3-527-30300-6

Βοργίας Ν. και Λαουτάρη Ν. Αιματολογία, β' τόμος, επανέκδοση 1995, ISBN:960-7085-20-7

Ζαραλής Α. Ερυθροκύτταρο και αναιμίες, εκδόσεις Ροτόντα, Θεσσαλονίκη 2008, ISBN:978-960-98037-3-1

Ηλιόπουλος Γ. Φυσιολογία και Φυσιοπαθολογία του αίματος και των αιμοποιητικών οργάνων, 3η έκδοση, ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα 1999, SBN 475839

Μελέτης Γ. Από το αιματολογικό εύρημα στη διάγνωση, 6η έκδοση, εκδόσεις Νηρέας, Αθήνα 2003, ISBN:9607597095

Παπακωνσταντίνου Α. Αιματολογία 1, ΒΗΤΑ ιατρικές εκδόσεις ΜΕΠΕ, Αθήνα 2003, ISBN 960-8071-57-7

Σπανός Θ. Στοιχεία Αιματολογίας – Αιμοθεραπείας, εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα 2001.

Τσερβένης Ι. και Γρίβα Ε. Αιμοδοσία, ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα 1999.

Χαλεβελάκης Γ. Αιμοσφαιρινοπάθειες: Γενετική Μηχανική, Μοριακή βλάβη, Παθοφυσιολογία, Κλινική προγεννητική διάγνωση, εκδοτικός οίκος Χ. Χαλεβελάκη, Αθήνα 1991.

## **2. ΑΡΘΡΑ**

Bakshi NA, et al. Serum free light chain (FLC) measurement can aid capillary zone electrophoresis in detecting subtle FLC-producing M proteins. Am J Clin Pathol 2005;124:214-218.

Carnley BP, Prior JF, Gilbert A, et al. The prevalence and molecular basis of hemoglobinopathies in Cambodia. Hemoglobin. 2006;30:463-470.

Charoenkwan P, et al. Cord blood screening for  $\alpha$ -thalassemia and hemoglobin variants by isoelectric focusing in Northern Thai neonates: correlation with genotypes and hematologic parameters. *Blood Cells Mol Dis* 2010;45:53-7.

Chaibunruang A, Srivorakun H, et al. Interactions of hemoglobin Lepore ( $\delta\beta$  hybrid hemoglobin) with various hemoglobinopathies: A molecular and hematological characteristics and differential diagnosis. *Blood Cells, Molecules, and diseases* 2010;44:140-145.

Chinelato-Fernades, Mendiburu C, and Bonini-Domingos, Utilization of different methodologies for the characterization of Hb Hasharon heterozygotes. *Genetics and Molecular Research* 2006;5(1):1-6.

Colah RB. Evaluation of chromatographic & electrophoretic methods for diagnosis of the beta-thalassaemias. *Indian J Med Res.* 2009;129(3):221-2.

Cotton F, Changying L, Fontaine B, et al. Evaluation of a capillary electrophoresis method for routine determination of hemoglobins A2 and F. *Clin Chem.* 1999;45:237-243.

Davies S, Cronin E, Gill M. et al. Screening for sickle cell disease and thalassemia: a systematic review with supplementary research. *Health Technol Assess* 2000;4:1-99

Desai SN, Colah RB, Mohanty D. Comparison of FPLC with cellulose acetate electrophoresis for the diagnosis of  $\beta$ -thalassaemia trait. *Indian J Med Res* 1998;108:145-8.

Edison E, Shaji R, Srivastava A, Chandy M. Compound heterozygosity for Hb E and Hb Lepore-Hollandia in India: first report and potential diagnosis pitfalls, *Hemoglobin* 2005;29:221-224.

Elghetany MT and Banki K. Erythrocytic disorders. In: McPherson RA, Pricus MR, eds. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 21st ed. Philadelphia, PA: Saunders;2007:504-544.

Ferris T, Easterling R. and Budd R. Hemoglobin electrophoresis in Acrylamide Gel. Blood Vol 1962;19:479-482.

Giordano PC. Starting neonatal screening for haemoglobinopathies in The Netherlands. J Clin Pathol 2009;62:18-21.

Gulbish B, Ferster A. et al. Neonatal haemoglobinopathy screening: review of a 10-year program in Brussels. J Med Screen 2006;13:76-8.

Hempe JM and Carver RD, Separation of hemoglobin variants with similar charge by capillary isoelectric focusing: value of isoelectric point for identification of common and uncommon hemoglobin variants. Electrophoresis 2000;21:743-748.

Higgins T. and Clarke G. Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update. Clinical Chemistry 2000;46:8(B)1284-1290.

Higgins T, et al. Quantification of HbA<sub>2</sub> in Patients with and without  $\beta$ -thalassemia and in the presence of HbS, HbC, HbE and HbD Punjab Hemoglobin Variants. Am J Clin Pathol 2009;131:357-362.

Higgins T, Mack M, and Khajuria A. Comparison of two methods for the quantification and identification of hemoglobin variants. Clinical Biochemistry 2009;42:701-705.

Howard J, Henthorn JS, Murphy S, et al. Implications of increased haemoglobin A<sub>2</sub> values in HIV positive women in the antenatal clinic. J Clin Pathol. 2005;58:556-558.

Joutovsky A, Hadzi-Nesic J, Nardi MA. HPLC retentiontime as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: a study of 60,000 samples in a clinical diagnostic laboratory. *Clin Chem*. 2004;50:1736-1747.

Kafando E, Sawadogo M. et al. Neonatal screening for sickle cell disorders in Ouagadougou, Burkina Faso: a pilot study. *J Med Screen* 2005;12:122-4.

Keren D. et al. Comparison of Sebia Capillary Electrophoresis with the Primus High-Pressure Liquid Chromatography in the Evaluation of Hemoglobinopathies, *Am J Clin Pathol* 2008;130:824-831.

Louahabi A, Philippe M, Lali S, et al. Evaluation of a new Sebia kit for analysis of hemoglobin fractions and variants on the Capillary system. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44:340-345.

Mais DD, Gulbranson RD, Keren DF. The range of hemoglobin A2 in hemoglobin E heterozygotes as determined by capillary electrophoresis. *Am J Clin Pathol*. 2009;132(1):34-8.

Mantikou E, et al. A brief review on newborn screening methods for hemoglobinopathies and preliminary results selecting beta thalassemia carriers at birth by quantitative estimation of the HbA fraction. *Clin Biochem* 2009;42:1780-5.

Mario N, Baydin B, Bruneel A, Janssens J. and Vabourdolle M. Capillary Zone Electrophoresis for the Diagnosis of Congenital Hemoglobinopathies. *Clin Chem* 1999;45(2):285-8.

Ou Ching-Nan and Rognerud Ch. Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs. HPLC. *Clinica Chemica Acta* 2001;313:187-194.

Ropero P, et al. Identification of the Hb Lepore phenotype by HPLC, *Haematologica* 1999;84:1081-1084.

Sebia Incorporation, The CapillaryS System. An Instruction Manual. Cedex, France, 2007.

Shihabi ZK, Hinsdale ME, Daugherty HK Jr. Hemoglobin A<sub>2</sub> quantification by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*. 2000;21(4):749-52.

Srivorakun H, et al. Analysis of fetal blood using capillary electrophoresis system: a simple method for prenatal diagnosis of severe thalassemia diseases. *European Journal of Haematology* 2009;83:57-65.

Srivorakun H, et al. Thalassemia and hemoglobinopathies in Southeast Asian newborns: diagnostic assessment using capillary electrophoresis system. *Clinical Biochemistry* 2011.01.006.

Tangavarasittichai S, Tangavarasittichai O. and Jermnim N. Comparison of fast protein liquid chromatography (FPLC) with HPLC, electrophoresis & microcolumn chromatography techniques for diagnosis of  $\beta$ -thalassaemia. *Indian J Med Res* 2009;129:242-248.

Trithipsombat J, et al. Hemoglobin profiles and hematological features of thalassemic newborns: application to screening of  $\alpha$ -thalassemia 1 and hemoglobin E. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1739-45.

Tsilolo L, Kafando E, Sawadogo M, et al. Neonatal screening and clinical care programmes for sickle cell disorders in sub-Saharan Africa: Lessons from pilot studies. *Public Health*. 2008;122:933-941.



Van-Delf P, et al. Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnosis in multi-ethnic populations. *Int Lab Hematol* 2009;31:484-95.

Wang J, Zhou S, Huang W, et al. CE-based analysis of hemoglobin and its applications in clinical analysis. *Electrophoresis*. 2006;27:3108-3124.

Weatherall DJ. Hemoglobinopathies worldwide: Present and future. *Curr Mol Med* 2008;8:592-9.

Winichagoon P, Svasti S, Munkongdee T, et al. Rapid diagnosis of thalassemias and other hemoglobinopathies by capillary electrophoresis system. *Transl Res*. 2008;152:178-184.

Yang Z, Chaffin CH, Easley PL, Thigpen B, Reddy V. Prevalence of elevated hemoglobin A2 measured by the Capillary system. *Am J Clin Pathol*. 2009;131(1):42-8.

Zurbriggen K, Schmutz M, Schmid M, Durka S, Kleinert P, Kuster T, Heizmann CW, Troxler H. Analysis of minor hemoglobins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chem*. 2005;51(6):989-96.

### **3. ΔΙΑΔΥΚΤΙΟ**

[www.chemicalabstracts.com](http://www.chemicalabstracts.com)

[www.harvard.com](http://www.harvard.com)

[www.labtestonline.org](http://www.labtestonline.org)

[www.medlook.net](http://www.medlook.net)

[www.nih.gov](http://www.nih.gov)

[www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)

[www.sis.nlm.nih.gov](http://www.sis.nlm.nih.gov)