



BETA-TALASEMİ VE HEMOGLOBİNOPATİ TARAMASI (Hemoglobin Kromatografisi)

Diğer adları: Hemoglobin elektroforezi, Hb elektroforezi

Kullanım amacı: Talasemi hastalığı, taşıyıcılığı ve hemoglobinopati olasılığının araştırılması amacıyla kullanılır.

Genel bilgiler:

- **Hemoglobin** farklı iki çift polipeptit alt ünitesinden meydana gelen bir tetramerdir. Normal hemoglobinlerde bulunan ve yapıca birbirine çok benzeyen polipeptit alt üniteleri α , β , γ ve δ olarak adlandırılır. α alt ünitesi 141, β , γ ve δ alt üniteleri 146 amino asitten oluşur. HbA₀ olarak adlandırılan normal yetişkin hemoglobinde $\alpha_2\beta_2$, HbF olarak adlandırılan fetal hemoglobinde $\alpha_2\gamma_2$, minor yetişkin hemoglobini olan HbA₂'de $\alpha_2\delta_2$ tarzında polipeptit kompozisyonu bulunur.
- **Talasemiler**, α veya β polipeptit zincirleri üretiminin kısmen azalması veya tamamen durmasından kaynaklanan hastalıklardır. α zincirinin üretimi ile ilişkili defekttten kaynaklanan talasemilere α -talasemi, β zincirinin üretimi ile ilişkili defekttten kaynaklanan talasemilere β -talasemi adı verilir. β -talasemi'ye Akdeniz anemisi adı da verilir. Talasemi tablosuna sebep olan yüzlerce farklı mutasyon tanımlanmıştır.
- 141 amino asitten oluşan α ve 146 amino asitten oluşan β zincirinde, tek bir amino asit değişikliği bile molekülün fonksiyonunda önemli değişikliklere sebep olabilir. Ancak, bu güne kadar tanımlanmış hemogloblin varyantlarının sayısı 800 civarında olmakla birlikte bunların çok az bir kısmı klinik açıdan önem taşıyan hastalık tablosuna neden olmaktadır. Klinik olarak önem taşıyan hemoglobin varyantlarının büyük kısmı kromatografik çalışma veya beraberinde alkali ve asit agaroz jel elektroforezi ile tanınabilir. **Hemoglobin S** klinik olarak önem taşıyan hemoglobin varyantlarının en önemlisidir. β zincirinin 6. amino asidi, polar yapıya sahip glutamik asit yerine nonpolar valin aminoasidinin geçmesi sonucunda, meydana gelen değişiklikler, hipoksiye maruz kalma durumunda hemoglobin moleküllerinin polimerize olmasına sebep olur. Hemoglobin moleküllerinin polimerize olması, eritrositlerin görünümünü değiştirerek orak şekli almalarına sebep olur (orak hücreli anemi). Heterozigot bireylerde şiddetli hipoksiye maruz kalmadığı sürece önemli bir sorun yaşanmaz. Homozigot bireylerde ise damar tıkaçıcı olaylar ve anemi yaşam kalitesini düşürür ve yaşam süresini kısaltır. Homozigot bireylerde orak hücreli anemiye benzer bir tablo yaratan



ancak ülkemizde çok nadir görülen **Hemoglobin C** hastalığında, periferik yayma preparatında yüksek oranda target hücre ve sferosit görülür. Çok tipik ve hastalığa spesifik olmakla birlikte, hemoglobin kristali içeren eritrositlere daha seyrek olarak rastlanır. **Hemoglobin E** hastalığı ise, homozigot bireylerde splenomegali olmaksızın orta şiddette hemolitik anemiye sebep olur. Mikrositoz ve target hücre mevcudiyeti periferik yayma preparatının incelenmesi sonucunda elde edilen başlıca bulgulardır. Heterozigot bireylerde herhangi bir şikâyet ve periferik yayma bulgusu mevcut değildir.

- Agaroz jelde alkali ortamda yapılan **hemoglobin elektroforezinde**, hemoglobinler, başlıca HbA1, HbS ve HbA2 olmak üzere üç zona ayrılır. Nispeten nadir görülen HbD ve HbG varyantları mevcutsa bunlar da HbS zonunda yer alır. HbO ve HbE varyantları ise HbA2 zonunda bulunur. Agaroz gel elektroforezinde HbF, HbA1'e göre hafifçe katodik bir yerleşim gösterir ve düşük oranda mevcut olduğunda çok net bir bant oluşturamayabilir. Hemoglobin zonlarında yer alabilen hemoglobin varyantlarının ayrımı için, ihtiyaç duyulduğunda sitrat tamponu kullanılarak asit ortamda hemoglobin elektroforezi yapılması gerekir.

Geçmişte çok yaygın olarak kullanılan tarama yöntemi olmasına rağmen, hemoglobin elektroforezinin bu amaçla kullanımı gittikçe azalmaktadır. Talasemi taşıyıcılığı kararını verdiren HbA2 oranı ile sağlıklı kişilerdeki referans aralığın üst sınırının birbirine yakın olması ve elektroforez tekniğinin bu düzeydeki tekrarlanabilirliğinin çok iyi olmaması nedeniyle, sınıra yakın ve sınırın üzerindeki değerler katyon değiştirici kolon kromatografisi ile teyit çalışmasını gerektirmektedir. HPLC tekniği, katyon değiştirici kolon kromatografisi ile aynı prensibe dayanan bir teknik olduğundan, teyit amacıyla ilave bir çalışma yapılması gereksinimini ortadan kaldırmaktadır. Gittikçe daha yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanan, hemoglobin varyantlarını belirlemek amacıyla dizayn edilmiş olan tam otomatize HPLC sistemleri, manuel bir uygulama olan kolon kromatografisi çalışmasına göre çok daha düşük impresiyona sahiptir. Bu nedenle tekrar çalışması yapılması ihtiyacı çok nadir olarak duyulur.

HPLC tekniğinin, aynı zamanda HbF ve HbS oranlarını da hassas ve tekrarlanabilir bir şekilde belirlemek için kullanılabileceği gösterilmiştir. HbF, HPLC tekniği ile elde edilen kromatogramlarda bağımsız, izole bir pik olarak görülür. HbS'in beraberce elüe olduğu başka bir Hb varyantı yoktur. Bu nedenle bu teknik, orak hücreli anemi ve beta talasemi teşhi-



sinde olduğu gibi, teşhisi konulmuş hastaların takibinde de güvenli bir şekilde kullanılabilir.

- İlk kademede uygulanan elektroforez veya HPLC ile hemoglobinopati taraması, kişide hemoglobin yapı bozukluğu ve hemoglobin üretimini etkileyen talasemi gibi bir hastalık bulunup bulunmadığı konusunda bilgi verir. Hemoglobinopatilerin kesin tanısı için bazen daha ileri incelemelerin yapılması gerekebilir.

Test sonucunun yorumu:

HPLC tekniği kullanılarak yapılan, beta-talasemi ve hemoglobinopati taraması sonucunun yorumlanması sırasında aşağıdaki hususların göz önünde bulundurulması önerilir.

- Bütün yaş gruplarında, HbA₂ oranının %4,0 üzerinde bulunması talasemi taşıyıcılığı olasılığını destekleyen bir bulgu olarak yorumlanmaktadır. Elektroforez tekniği kullanılarak yapılan tarama çalışmalarında olduğu gibi, HPLC tekniği ile yapılan tarama çalışmalarında da, elde edilen sonuçlar aile öyküsü, klinik bulgular, tam kan sayımı sonuçları, periferik yayma incelemesi, serum demir ve ferritin konsantrasyonu gibi analiz sonuçları da dikkate alınarak yorumlanmalıdır.
- Demir eksikliği olan kişilerde, hemoglobin üretimi ile birlikte, HbA₂ oranında da düşme meydana gelebilir. Bu nedenle demir eksikliği bulunma olasılığı olan kişilerde, HbA₂ oranının sınıra yakın bir seviyede bulunması halinde, çalışmanın demir eksikliği giderildikten sonra tekrarlanması önerilmektedir.
- HbE, HbG, Hb Lepore, HPLC tekniği kullanılarak yapılan hemoglobin kromatografisinde HbA₂ ile birlikte elüe olur ve HbA₂ pikinin bulunduğu pencerede yer alır. Beta talasemi taşıyıcılığı ile ilişkili HbA₂ artışında, oran hiçbir zaman %9'u aşmadığından, bu oranı aşan bir değerle karşılaşıldığında, bu varyantların bulunma olasılığı akla getirilmelidir.
- Alfa talasemide görülen Hb-Bart ve HbH gibi hemoglobin varyantlarının HPLC tekniği ile yapılan tarama çalışmasında belirlenmesi mümkün olmadığından, bu teknik alfa-talasemi taraması için uygun değildir.
- HbS mevcudiyetinde, HbA₂ oranının gerçek değer üzerinde ölçülebileceği bildirildiğinden, böyle durumlarda, HbA₂ oranının belirlenmesi amacıyla, agaroz jel elektroforezi gibi başka bir yöntemden yararlanılabilir.
- Hemoglobin kromatografisi, agaroz jel elektroforezi ile mukayese edildiğinde çok daha yüksek ayırım gücüne sahiptir. Bu özellik nedeniyle, agaroz jel elektroforezinde HbA₁ bandında yer alan glikohemoglobin



(glukozla birleşmiş hemoglobin), karbamino-hemoglobin (üre molekülü ile birleşmiş hemoglobin), asetillenmiş hemoglobin gibi bazı hemoglobin bileşikleri ve hemoglobin fragmanları ayrı fraksiyonlar halinde görülür. Üretim sonrası değişikliğe uğrayan hemoglobin fraksiyonlarının oranlarının ayrı ayrı belirlenerek HbA₀ fraksiyonuna eklenmesiyle HbA₁ oranının hesaplanması mümkünse de, klinik değerlendirmeye herhangi bir katkısı olmadığından, böyle bir uygulama yapılmamaktadır. Talasemi hastalığının ve taşıyıcılığının teşhisi açısından önem taşıyan HbA₂ ve HbF oranları ile mevcut olması halinde hemoglobin varyantlarının oranları raporlarda verilmektedir.

Numune: EDTA'lı tam kan (mor kapaklı tüp). 2 mL.

Çalışma yöntemi: HPLC. Özel istek üzerine veya HPLC'de elde edilen neticelerin teyidi amacıyla gerektiğinde agaroz jel teknikleri de kullanılır.

Referans aralığı:

Yaş	HbA ₂ (%)	HbF (%)	HbS (%)	HbA (%)
0 – 7 gün	< 4.0	69 – 85	< 1.5	15 – 40
7 gün - 1 ay	< 4.0	60 – 82	< 1.5	20 – 40
1 – 6 ay	< 4.0	10 – 70	< 1.5	25 – 95
6 ay – 1 yaş	< 4.0	0.5 – 8.0	< 1.5	87 – 98
1 - 3 yaş	< 4.0	< 3.0	< 1.5	94 – 98
>3 yaş	< 4.0	< 2.0	< 1.5	94 – 98