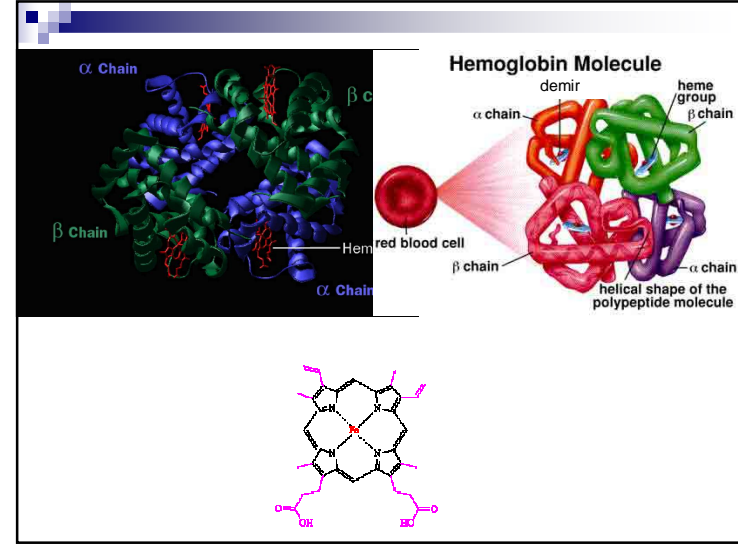


Hemoglobin Elektrofrezisi Hemoglobin Tiplerinin Belirlenmesi

24/12/13



Oksijenlenmiş Hemoglobinin şekli değişir

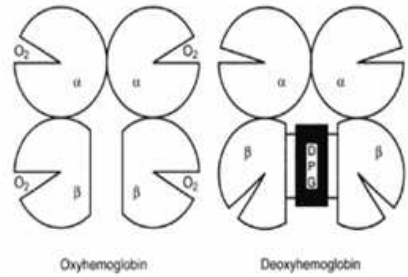


FIGURE 5.3 Hemoglobin molecular changes.

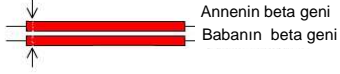
Oksijenlenmiş Hb daha asidik

Tanımlar

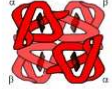
- Hemoglobinopati: Hemoglobin molekülündeki globin zincirinde anormal bir yapıya sebep olan genetik bir bozukluğun varlığı
- Talasemi: Adı α , β , δ , γ olarak geçen hemoglobin zinciri veya zincirlerinin az miktarda ya da hiç yapılmaması ile karakterizedir

Beta Talasemi

İki beta geninden birinde mutasyon olursa düşük miktarda protein sentezleyen taşıyıcı bir bireyden bahsedilir



Mutasyon yoksa yeterli Hb var



Normal

Tek gende Mutasyon Varsa Hb miktarı az



B-Talasemi taşıyıcısı, hafif anemi var hasta değil

Her iki gende Mutasyon Varsa B-globin sentezi yok

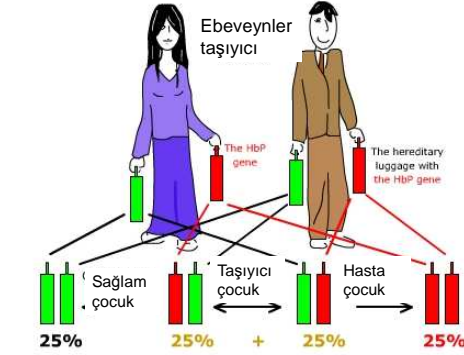


B-Talasemi major, Şiddetli anemi var,

From gene to pr

Alfa zinciri chr 16, diğerleri chr 11 de kodlanır

Hemoglobinopatiler otozomal resessif geçiş gösterir



Semboller:

- Globin zincirini göstermek için "Greek" (Yunan alfabesindeki) harfler kullanılır:

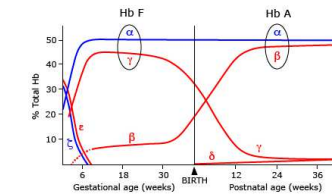
α , β , γ , δ ...
alfa, beta, gama, delta

Doğumdan Sonra sentezlenebilen globin zincirleri

α , β , γ , δ

Normal bireylerde görülebilen Hemoglobin tipleri:

- HbA: α_2, β_2 >%95
- HbA2: α_2, δ_2 %1.5-3.5
- HbF: α_2, γ_2 < %2



Semboller

- Globin zincirini gösteren "Greek" harfler kullanılır

β

Semboller

+: Azalmış ancak genin az miktarda globin sentezlenmesi mümkün oluyor

β^+

Semboller

0 : Globin zinciri hiç üretilmiyor

β^0

Semboller

Üst karakter olarak "T" fonksiyonel olmayan bir geni gösterir

α^T

Hemoglobinopatiler

Yapısal farklılık gösteren bir Hb varlığı

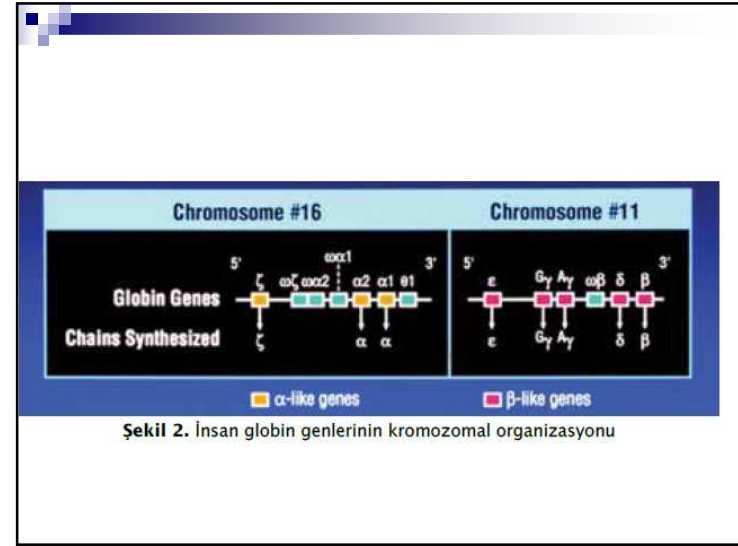
Ör: HbS, HbC, ... **Genellikle nedeni globin zincirindeki bir amino asidin değişimi** ile sonuçlanan gen mutasyonları

Normal HbA sentezinde yetersizlik

- Ör: Talasemiler (Alfa, beta). Sentez bozukluğu hangi zincirde ise hastalık o isim ile anılır.

HbF nin beklenen zamanda azalmaması (çok nadir)

- HbF, Normalde 6.ayda %8, 12.ayda %5 in altına iner . Genetik bir bozukluğa bağlı bu değerler azalmayabilir. Sadece HbF varsa belirti vermeyebilir, eşlik eden bir başka anormal Hb varsa belirti verir



ALFA Talasemiler

- Normal $\alpha\alpha/\alpha\alpha$
- Sessiz taşıyıcı $-\alpha/\alpha\alpha$
- Minor $-\alpha/-\alpha$
 $--/\alpha\alpha$
- Hb H hastalığı $--/-\alpha$
- Barts hidrops fetalis $--/--$

HbA: $\alpha2, \beta2$ >%95
HbA2: $\alpha2, \delta2$ %1.5-3.5
HbF: $\alpha2, \gamma2$ < %2

Tablo 1. Alfa talasemi genetik düzenleyiciler (7,8,14)

Gen Sayısı	Tanım	Fenotip ve Klinik	Genetik Düzenleyici
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Normal	Normal, asemptomatik	-
$-\alpha/\alpha\alpha$	α -tal-2 heterozigot	Sessiz taşıyıcı, asemptomatik Sınırdaki Hb ve MCV, düşük MCH	-
$-\alpha/-\alpha$	α -tal-2 homozigot	Taşıyıcı, asemptomatik, hafif HM anemi	-
$--/\alpha\alpha$	α -tal-1 homozigot	Taşıyıcı, asemptomatik, hafif HM anemi	-
$--/-\alpha$	α -tal-1/ α -tal-2	Hb H, kronik hemolitik anemi	β -tal trait birlikteliği
$--/--$	α -tal-1 homozigot	Hb Barts, hidrops fetalis	-

Tal: talasemi, HM: hipokrom mikrositer

Beta Talasemiler

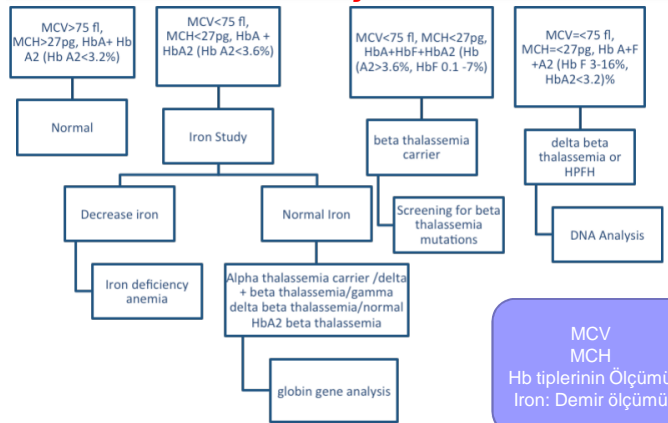
- Normal β/β
- Minor β/β^0
 β/β^+
- Intermedia β^0/β^+
- Major β^0/β^0
 β^+/ β^+

Tablo 2. beta talasemi genetik düzenleyiciler (7,13,14)

Gen Sayısı	Tanım	Fenotip ve Klinik	Genetik Düzenleyici
β/β	Normal	Normal, asemptomatik	-
β^{sessiz}/β^N	Sessiz taşıyıcı	Normal, asemptomatik Normal eritrosit göstergeleri	-
$\beta^{sessiz}/\beta^{sessiz}$ β^{++}/β^N β^{++}/β^N β^0/β^N Daim $\beta^{Th}\beta^N$ β^{++}/β^{++}	Taşıyıcı	Asemptomatik, hafif HM anemi	Alfa genotipi
β^{++}/β^+ β^{++}/β^0 β^{++}/β^{++}	Talasemi intermedia	Anemik, çok düşük MCV, MCH Splenomegali, kemik değişiklikleri Değişken transfüzyon bağımlılığı	Alfa genotipi Hb F yanıtı
β^+/ β^0 β^0/β^0	Talasemi major	Şiddetli HA, çok düşük MCV, MCH HSM, kronik transfüzyon bağımlı	Alfa genotipi Hb F yanıtı

HM: hipokrom mikrositer, HA: Hemolitik anemi, HSM: Hepatosplenomegali

Hemoglobin Bozukluklarına Tanısal Yaklaşım



Hemoglobinopatilerin Laboratuvarada Tesbiti

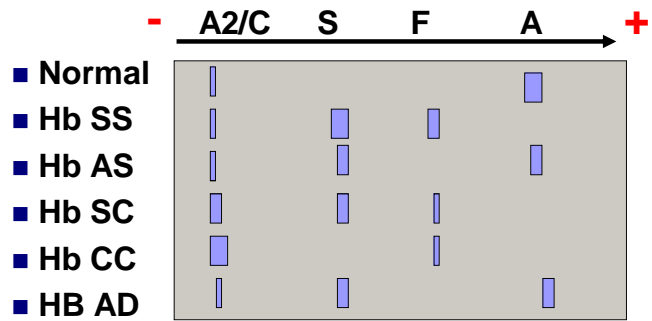
- Hemoglobin elektroforezi - Hb bantlarının ve miktarlarının tesbit edilmesi
 - cellulose acetate (alkali, pH 8.6)
 - citrate agar (asit, pH 6.2)
 - Kapiller Elektroforez
 - "Cation Exchange" HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)
 - İzoelektrik fokuslama
- Çözünürlük testi - sodium dithionite
- Oraklaşma testi - sodium metabisulfite

• Hemoglobin Elektrofrezisi

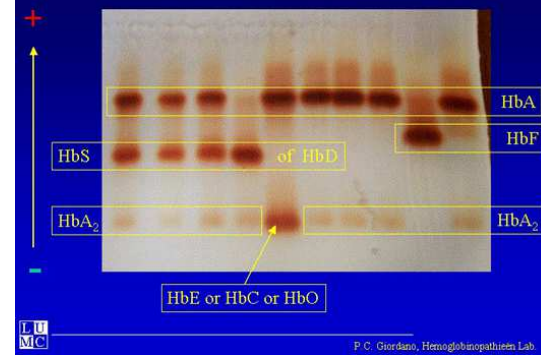
- Tüm Hb molekülleri alkali ortamda negatif yüklüdür ve elektroferez sisteminde anoda doğru hareket ederler
- Talasemi ve Hemoglobinopatileri tanımlamakta en yaygın kullanılan test
- Tipleri
 - Sitrat Agar, Sellüloz Asetat : Alkale pH
 - Sitrat Agar, Sellüloz asetat : Asit pH

<https://www.youtube.com/watch?v=vq759wKCCUQ>

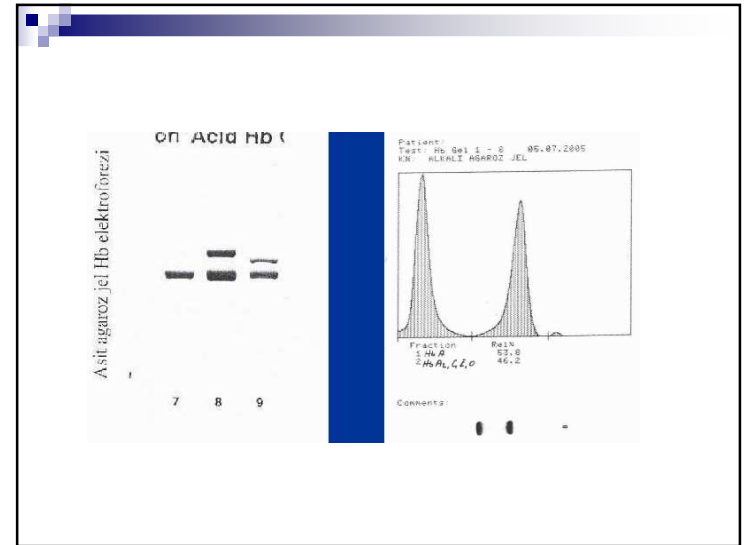
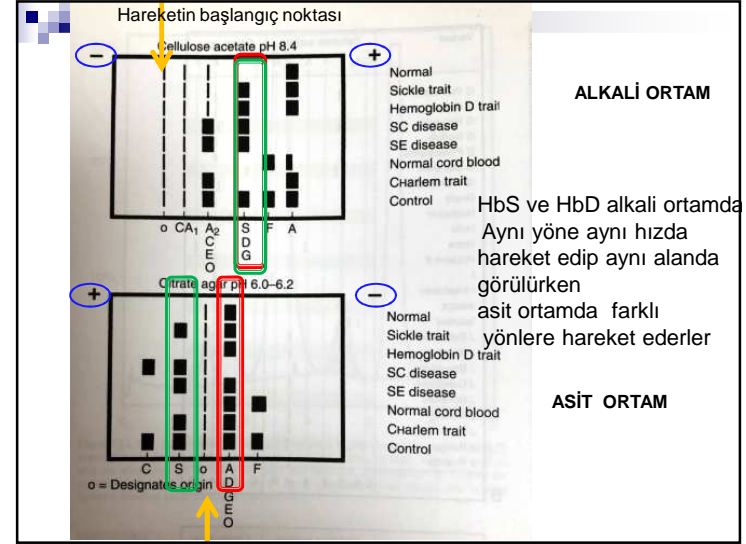
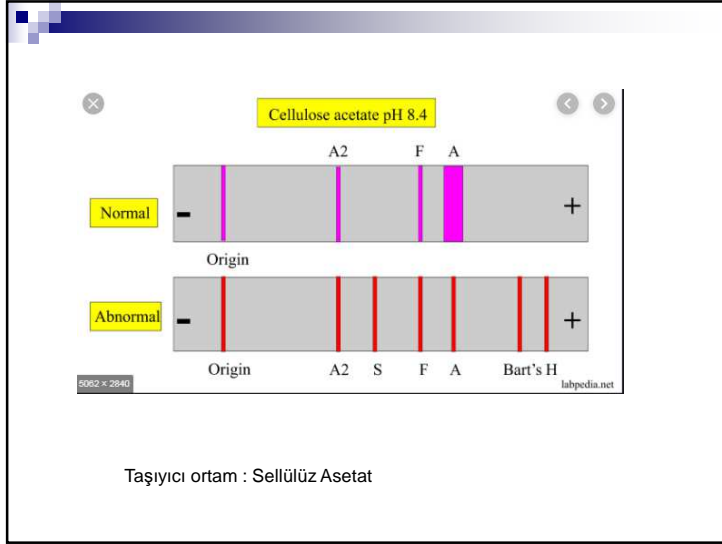
Sellüloz asetat Hb Elektrofrezisi



Starch Gel Hb-Electrophoresis pH 8.6



Taşıyıcı ortam : Agar jel

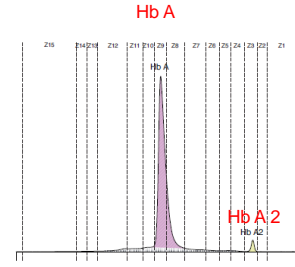


Kapiller Elektroz

- Sellüloz asetat ya da jel elektrozinden daha iyi ayırım gücüne sahip olan otomatik bir elektroz sistemidir
- Elektroz kapiller (kılcal ,çok dar) bir sistemdeki ağarda gerçekleşir
- kılcal sistemde gidilen yol kendi içinde zonlara ayrılır
- Herbir hemoglobinin hangi zonda görünür olacağı bellidir

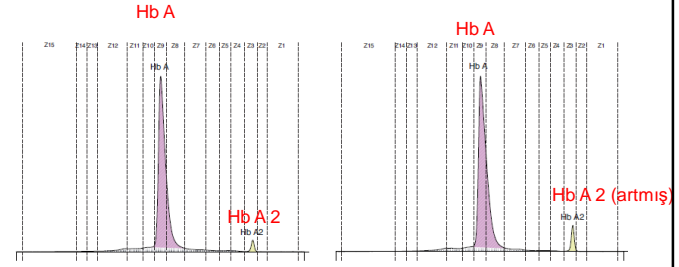
Kapiller Elektroz

Figure 1

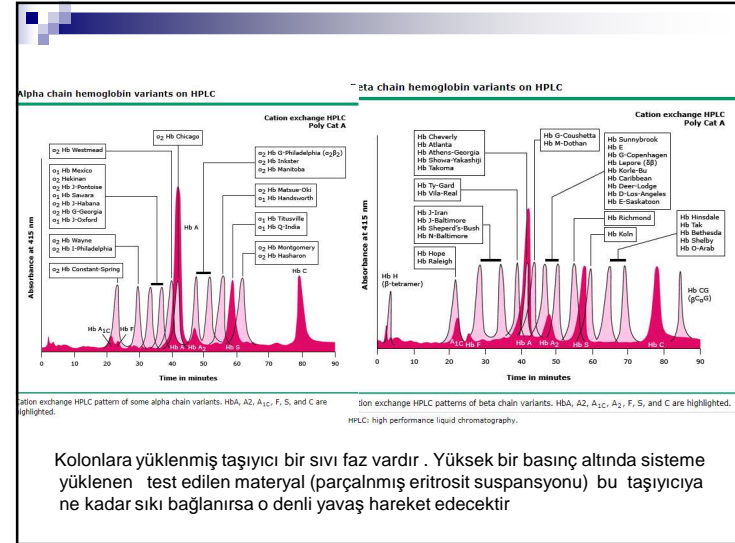
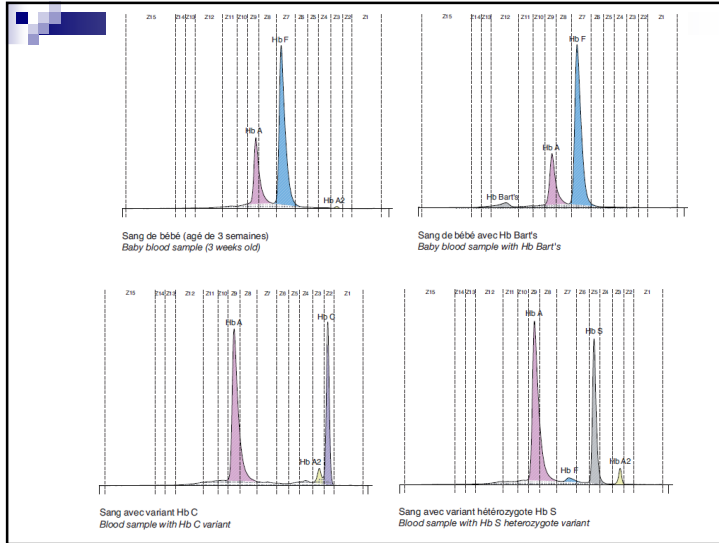


Sang normal
Normal blood sample

Figure 2

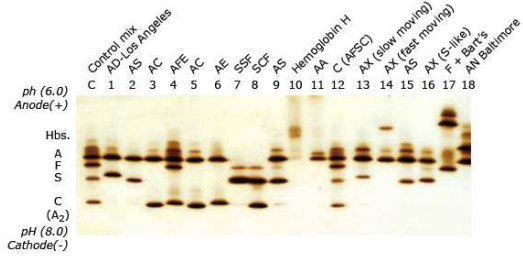


Sang beta-thalassemique
Blood sample with beta-thalassemia



Kolonlara yüklenmiş taşıyıcı bir sıvı faz vardır . Yüksek bir basınç altında sisteme yüklenen test edilen materyal (parçalanmış eritrosit suspansyonu) bu taşıyıcıya ne kadar sıkı bağlanırsa o denli yavaş hareket edecektir

Isoelectric focusing for separation of hemoglobins

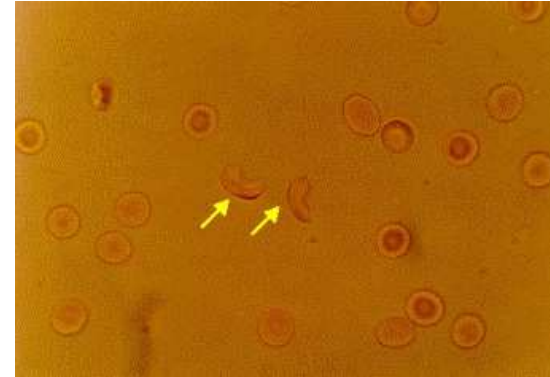
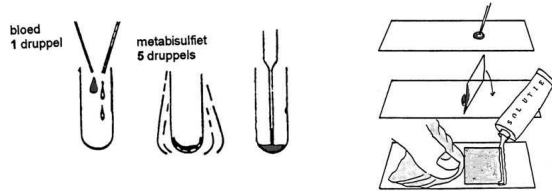


Isoelectric focusing gel showing separation pattern of various hemoglobins. C is a control mix of Hbs A, F, S, and C. Note the differences in mobility of Hb C and E (lanes 5 and 6), and Hb S and D (lanes 1 and 2) using this separation method.

Kullanılan diğer testler

- Fötal Hemoglobin miktar tayini için : Alkali denatürasyon testi
HbF Alkalide bozulmaz, HbA ise denatüre olur, bu süzülüp atılır, kalan Hb (Hb F) tekrar ölçülür
- Elüsyon testi
İstene bant jelden kesilir, bir çözücü ile Hb serbestleştirilir, Hb miktar tayini yapılır
- Asit elüsyon testi: HbF nin hücre içi dağılımının gösterilmesi
- heterojen olması talasemi lehine
- Anstabil hemoglobin testi için: Heinz cisimciklerinin (çözünmeyen denatüre olmuş globin zincirleri) gösterilmesi :
periferik yayma, özel boyalar ör: metil-viyole kullanılarak boyanır
- Oraklaşma testi : Kana sodyum metabisulfit (indirgeyici bir ajan) eklenip oksijensiz bırakılırsa eritrositler hızla oraklaşır

- 1.Kan örneği (tam kan)
- 2.Na-metabisulfit, 1% solusyon/ PBS (taze).
- 3.Düşük HbS oranları ve veya HbF varsa 2% solusyon kullanılır.
- 4.Solusyon hazırlanırken vortekslenmez nazikçe karıştırılır.
- 5.Lam, lamel yapıştırıcı hazırlanır
- 6.Reaksiyon tübünde 1 damla kan 5 damla reaktif karıştırılır
- 7.Karışımdan 1 damla lama koyulur, lamel ile kapatılıp yapıştırılır, hava almamalıdır
- 8.Yarım saat sonra 100 lük büyütmeye değerlendirilir.

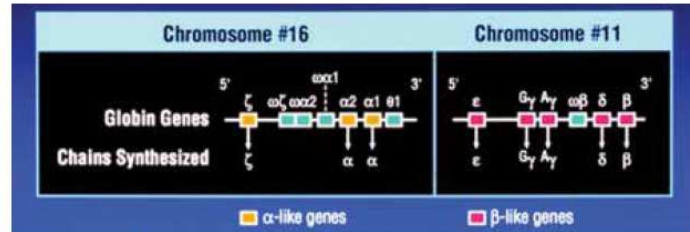


Elektroforezde Hata kaynakları

- Bekleme sürelerinin hatalı olması
- Reaktiflerin doğru hazırlanmaması (PH, Konsantrasyon...)
- Reaktiflerin miyadının geçmiş olması
- Filtreleme işlemlerinin hatalı olması (kötü kalitede kağıt, yırtılma...)

Moleküler Çalışmalar

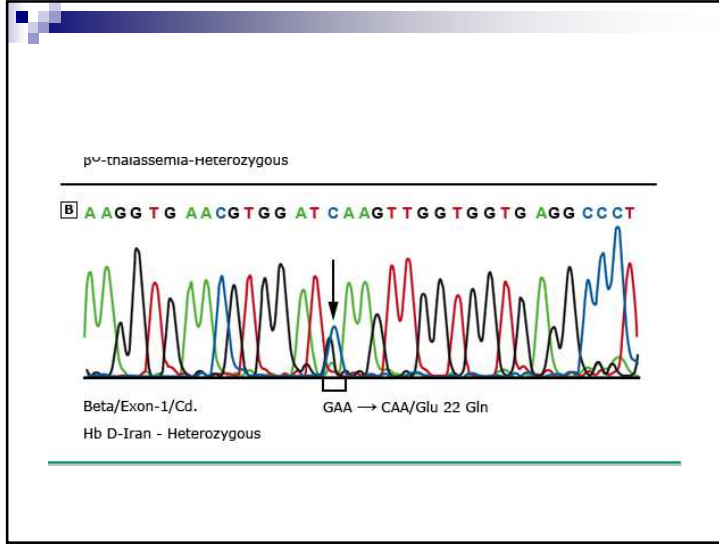
- Hemoglobin zincirlerini kodlayan Genlerin incelenmesini sağlar
- Hücreden elde edilen DNA kullanılarak Hb zincirini kodlayan bölgelerin gen dizilimi incelenir
- Hangi dizilim bozukluğu ortaya koyulursa tanımlanmış olan bilgilere göre



Şekil 2. İnsan globin genlerinin kromozomal organizasyonu

Table 1
Examples of non-deletional α gene mutations and effect on expression or protein structure.

General principle of gene regulation	Type of mutation	Mechanism	Examples	Effect
mRNA processing	Dense acceptor site mutations Poly A signal	Intron retention, frame shift and premature termination	HBA2:c.95 + 2.95 + 6delTG	α^+ or α^0 -thal
			HBA2:c.*93.*94delAA	
			HBA2:c.69C > T	α^+ -thal
mRNA translation	Cryptic splice Initiation codon Non sense or frame shift Termination codon	Multistart coding sequence mutated, failure to initiate translation Premature stop codon and subsequent Nonsense Mediated Decay of mRNA Elongated α chain resulting in unstable hemoglobin tetramer	HBA2:c.146A p.Met11s HBA1:c.1A > G p.Met1Val HBA1:c.44G > A p.Trp15X HBA2:c.60delG p.His21fs HBA2:c.427T > C p.X145Gln (Hb Constant Spring)	α^+ or α^0 -thal α^+ -thal α^+ -thal
Post translational	Misense mutations	'Silent' amino acid substitution not affecting protein function Protein instability, varying from mild to severe anemia from deficiency in α chain synthesis Reduced A1HP binding capacity High oxygen affinity Low oxygen affinity	HBA2:c.154G > A p.Gly52Ser (Hb Riccarton ID) HBA1:c.43 T > G p.Trp15Gly (Hb Extonston) HBA2:c.179G > A p.Gly60Asp (Hb Adams) HBA1:c.358C > T p.Pro120Ser (Hb Greene Hart) HBA2:c.279G > A p.Arg93Gln (Hb J Cape Town) HBA2:c.5 T > C p.Val2Ala (Hb Lyon Brook) HBA2:c.175C > T p.Ile59Tyr (Hb M Boston)	normal hematology, 15-25% Hb variant in carrier α^+ -thal Hb1 hydrolys in homozygote α^+ -thal Erythrocytosis Mild anemia Cyanosis



HEMOGLOBİNOPATİLER

Orak Hücreli Anemi (Sickle Cell Disease)

- Hastalık
 - Anormal HB S geni homozigot kalıtılır.
 - Elektroforezde: **HbS 80%, HbA₂ 3.5%, HbF 1-20%**
- Taşıyıcılık
 - Heterozigot kalıtım söz konusudur. HbS ve Hb A beraber bulunur
 - Doğumda semptom yok, HbF azaldıkça belirtiler başlar, ağrılı nöbetler ve diğer bulgular çok belirgin
 - Elektroforez: **HbS 40%, HbA 60%, HbA₂.**

Hb C Hastalığı(Hb CC)/ Taşıyıcılığı (HbAC)

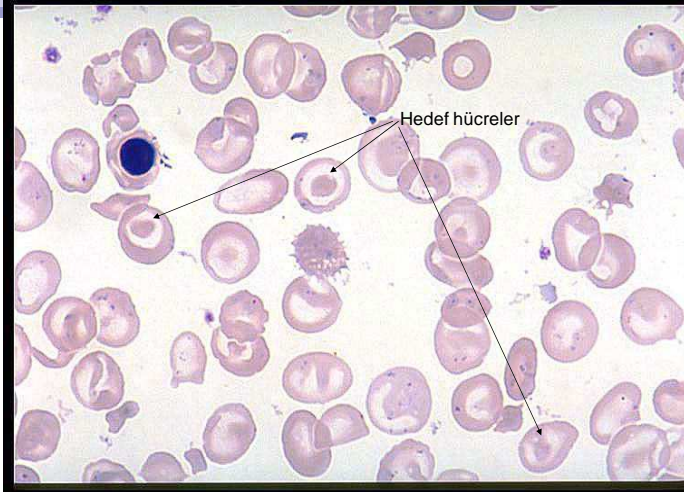
- Beta zincirinin 6. pozisyonunda "glutamik asit" yerine "lizin" gelir
- Hgb C kristalleri (bars) splenektomiden sonra daha çok görülür
- Elektroforez Örneği
 - Hastalık: **Hb C 95%, Hb F < 7%**
 - Taşıyıcılık: **Hb A 60%, Hb C 40%**
 - **HbC ile HbA₂ alkale pH da birlikte hareket ettiğinden asit PH da elektroforez yapılarak doğrulanması gerekir**
- PY da hedef hücreler, katlanmış hücreler, HbC kristalleri görülür

Diğer Hemoglobinopatiler

- Hb D Hastalığı
 - 121. pozisyonda glutamik asit yerine glisin var
 - **HbDD** ve **HbAD** , ikisi de semptom verir
 - **HbD, HbS ile birlikte hareket eder çözünürlük testi ise negatiftir.**
- Hb E Hastalığı
 - 26. pozisyonda glutamik asit yerine lizin var
 - Malarya'dan koruyor
 - Elektroforezde **Hb A₂** ve Hb **C** ile birlikte hareket eder

Talasemiler

- Globin zincirlerinden bir veya birkaçının sentezi hatalıdır veya yoktur.
- İlimli veya şiddetli anemi , hedef hücreler (target cells) görülür
- Mikrositer hücreler , Eritrositler hipokrom
- Serum Demiri genellikle normal
- **HbF ve Hb A₂ düzeyleri artmıştır**



Alfa Talasemi

- Tek veya çift gen kaybı var
- Alpha yoksa , gamma ve beta aşırı miktarlarda yapılır (Hb Barts, Hb H)

Beta Talasemiler

- Major (Cooley's Anemia)
- Intermedia
 - İlimli bir anemi var
- Minor: Genellikle semptom yok
- Minima: Laboratuvarda da bir anomali tesbit edilmez

HbF nin doğuştan sonra da yüksek oranda kalması

- Kalıtsal bir hastalık, sık değil
- Gamma zincirler, beta ve delta'ya dönüştürülemez
- Çok nadir
- Klinik Talasemi Major gibi, fakat:
HbF = 100%

Talasemi ve hemoglobinopatilerin birlikte görülmesi

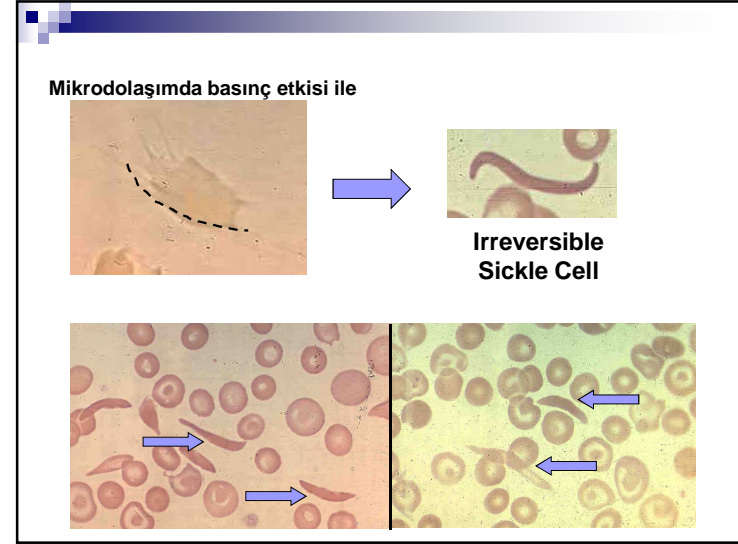
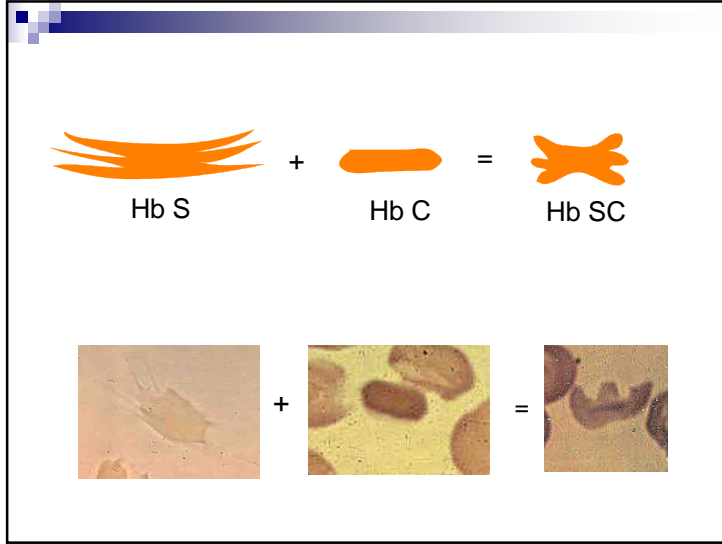
- Yapısal bozukluk yanı sıra normal globin zincirlerinin miktarları da azalmıştır.
- Ör:
 - Hb S/beta thal
 - Hb S/alpha thal

Tedavisiz alfa talasemi

--/--: Doğum öncesi veya doğumda ölüm
--/- α ve --/ $\alpha^{CS}\alpha$: Kronik hemolitik anemi eşliğinde yaşam

Tedavisiz beta talasemi

- Major: ilk 10-20 yaşlarda ölüm
- Intermedia: genellikle normal yaşam
- Minor/Minima: Normal Yaşam



Talasemilerde görülen temel laboratuvar bulguları:

- Mikrositoz
- Hipokromi
- Poikiositoz
- Eritrosit değerlerinin anemi ile uyumsuz şekilde yüksek bulunması
- Retikulosit değerleri değişken
- Dolaşımda çekirdekli eritrositler bulunabilir
- Çeşitli Yöntemlerle Anormal Hb tespit edilir