

TÜRK HEMATOLOJİ DERNEĞİ

HematoLog

2014: 4-1

Dr. Ferdane Kutlar

Medical College of Georgia/Georgia Regents University,
Department of Medicine, GA, USA
e-posta: fkutlar@gru.edu

Anahtar Sözcükler

Hemoglobin, Hemoglobinopati, Laboratuvar tanı

Bu makale Dr. Şule Ünal tarafından İngilizce'den Türkçe'ye tercüme edilmiştir.

HEMOGLOBİNOPATİLERİN LABORATUVAR TANISI

ÖZET

İnsan hemoglobini (Hb) heme ve polipeptid yapıdaki globin zincirlerinden oluşmaktadır. Embriyonik Hb'ler Hb Gower 1= 2ζ 2 ϵ , Gower-2= 2α 2 ϵ ; Portland 1= 2ζ 2 γ olup, embriyonik dönemde görev almakta ve birinci trimesterin sonunda kademeli olarak yerini HbF ve HbA'ya bırakmaktadır. Doğumda yenidoğanda fetal Hb (Hb F= 2α 2 γ) %80 ve erişkin tip Hb (Hb A= 2α 2 β) %20 oranında bulunur. HbA2 (2α 2 δ) bu dönemde bulunmaz. Doğumdan sonra gün geçtikçe Hb bileşenleri değişir ve altıncı ayda major Hb, HbA olup çok az miktarda HbF ve tespit edilen minor bir HbA2 bulunur. Genel olarak hemoglobinopatiler 3 grupta sınıflandırılabilir:

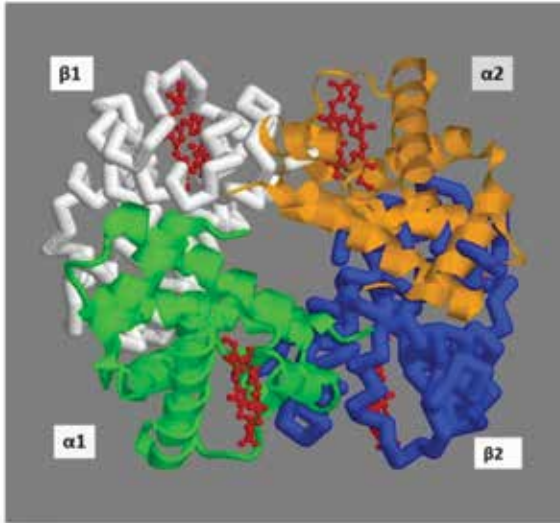
- Kalitatif anormallikler (hemoglobin varyantları),
- Kantitatif anormallikler (talasemiler),
- Hem kalitatif hem de kantitatif anormallikler (hemoglobin varyantları ve talasemiler).

Tanısal yaklaşım klinik gözlem, protein ya da DNA bazlı kan testlerinden oluşur. Burada ayrıntılı olarak laboratuvar tanı testlerinden bahsedilecektir.

GİRİŞ

İnsan hemoglobini (Hb) heme ve polipeptid yapıdaki globin zincirlerinden oluşmaktadır. Heme'nin yapısında bulunan ferroz demir atomları oksijene (O₂) bağlanır ve transportunda görev alır. Heme'nin yapısındaki ferroz iyonu histidinin N ucuna bağlıdır. Porphirin halkası ise bulunduğu cebe, yapısındaki

fenilalanin aracılığı ile oturur. Her heme grubunda oksijen ferröz demire reversibil olarak bağlanır. Oksijene bağlanma gösteren heme grubu oksijenin parsiyel basıncına göre değişiklik gösterir. Oksijen ekilibrium eğrisinin sigmoid şekli oksijenin bağlanma bölgeleri arasında kooperatif bir ilişki olduğuna işaret etmektedir. Bu nedenle oksijenizasyon arttıkça, daha fazla oksijen bağlanması kolaylaşmaktadır. Oksijen ekilibrium (ya da disosiasyon) eğrisi lineer olmayıp, S şeklindedir ve çevresel faktörlere göre değişiklik gösterir. Oksijenin parsiyel basıncı 100 mmHg olduğunda, eritrositlerdeki Hb oksijenle tamamen sature olur. Oksijen disosiasyon eğrisi oksijen saturasyonunun parsiyel oksijen basıncına göre değişimini göstermektedir. Hemoglobin molekülü 4 globin zincirinden ($2\alpha 2\beta$) oluşan bir tetramerdir ve her bir globine 1 heme eşlik etmektedir (Şekil 1). Alfa globin zincirleri N-terminusundaki metionini saymazsak 141 aminoasitten ve β globin zincirleri (ya da β -benzeri= β , γ , δ) N-terminusundaki metionini saymazsak 146 aminoasitten oluşmaktadır. Bu globin dimerleri biraraya gelir ve $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 1$ bağlantı noktalarında hemoglobini stabilize eder. Bu noktalar ya da çevresindeki herhangi bir anormallik Hb molekülünün stabilitesini bozar. Bütün globin genleri bazı ortak yapısal özelliklere sahiptir. Üç kodlayıcı bölge (ekzon) ve aralarında iki kodlayıcı olmayan bölgeden (intron) oluşur. Intron-ekzon kavşakları bu bölgelerde gelişen mutasyonların da talasemi sendromlarına yol açabilmesi nedeniyle önemlidir. İnsan hayatında dört gelişimsel dönem bulunmaktadır: embriyonik, fetal, yenidoğan, erişkin evreleridir. Bu gelişimsel süreçte başlıca 2 büyük değişim, "switch" görülür. Bunlardan birincisi embriyonikten fetal hayata geçerken (1. trimesterin sonunda) ve diğeri de fetal hayattan erişkin hayata geçerkendir (doğumdan sonra). Embriyonik Hb'ler yenidoğanda ve



Şekil 1. Hemoglobin tetramerinin 3D molekülü. Turuncu ve sarı renkli şeritler alfa globin zincirlerini, gri ve mavi arka iskelet parçaları beta globin zincirlerini temsil etmektedir. Kırmızı renkli toplar ve parçalar "heme" molekülüdür. Bu şekil Ferdane Kutlar tarafından PDB ID: 2 hbb template on a RasMol molecular software. SEP2012/ GHSU-MCG'den modifiye edilmiştir

sonrasında bulunmazlar. Embriyonik Hb'ler Hb Gower 1= $2\zeta 2\varepsilon$, Gower-2= $2\alpha 2\varepsilon$; Portland 1= $2\zeta 2Y$ olup, embriyonik dönemde görev almakta ve birinci trimesterin sonunda kademeli olarak yerini HbF ve HbA'ya bırakmaktadır. Doğum sonrası dönemde bulunmadıklarından embriyonik Hb'lere bu yazıda odaklanılmayacaktır. Doğumda yenidoğanda fetal Hb (Hb F= $2\alpha 2Y$) %80 ve erişkin tip Hb (Hb A= $2\alpha 2\beta$) %20 oranında bulunur. HbA₂ ($2\alpha 2\delta$) bu dönemde bulunmaz. Doğumdan sonra gün geçtikçe Hb bileşenleri değişir ve altıncı ayda major Hb, HbA olup çok az miktarda HbF ve tespit edilen minor bir HbA₂ bulunur. Bu sırada HbA %97 ve Hb A₂ %3 kadardır (Tablo 1). Her ne kadar bir tetramer oluşuyor olsalar da α genlerinin lokalizasyonu farklıdır. α -globin genleri kromozom 16'nın kısa kolunda yer alırken, β , γ , δ globin genleri kromozom 11'in kısa kolunda lokalizedir (Şekil 2). Alfa globin genleri 3' UTR ucunda farklılık gösteren iki eş genden oluşur. Bu nedenle ürünleri de idantiktir. β ve δ globin genleri tek genlerdir. γ - globin gen ise duplike olup ürünlerinin arasında çok ufak farklılıklar bulunur. Bunlara G γ ve A γ -globin genleri adı verilir ve ürünleri fetal Hb'nin yapısında bulunur. Bu nedenle fetal hemoglobinin G γ (doğumda %70) ve A γ - globin (doğumda %30) olmak

EMBRIONIC STAGE

Hb Gower-1 ($\zeta_2\varepsilon_2$)

Hb Gower-2 ($\alpha_2\varepsilon_2$)

Hb Portland-1 ($\zeta_2\gamma_2$)

FETAL STAGE

Hb F ($\alpha_2\gamma_2$)->80-85%

Hb A ($\alpha_2\beta_2$)->15-20%

Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$)->undetectable

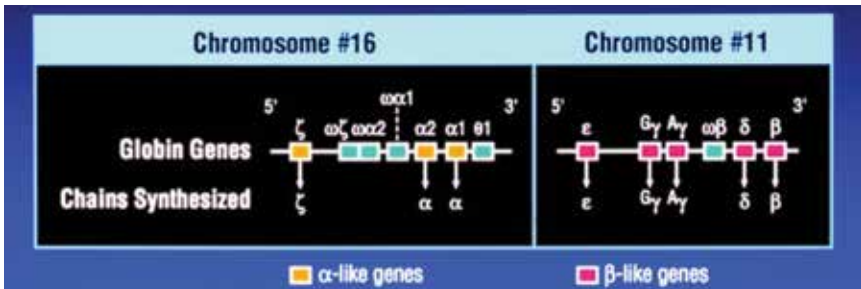
ADULT STAGE

Hb A ($\alpha_2\beta_2$)->96-98%

Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$)->2.5-3.5%

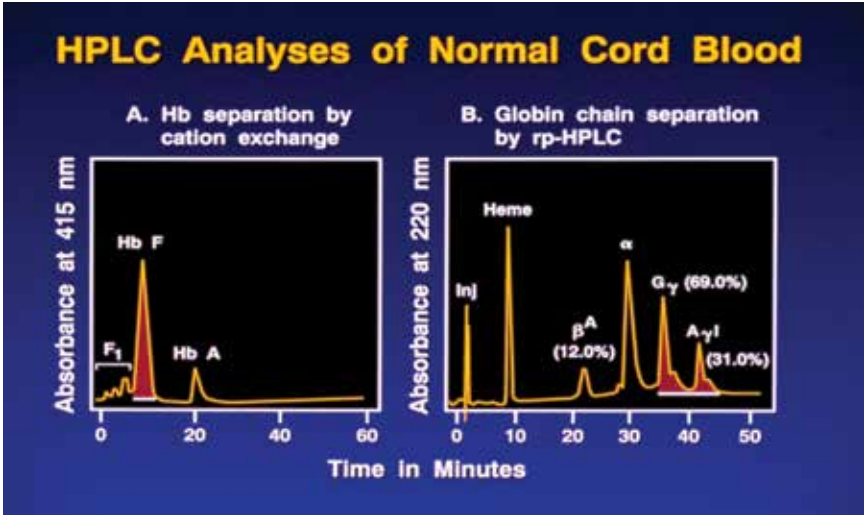
Hb F ($\alpha_2\gamma_2$)-><1.0%

Tablo 1. Üç değişik gelişim evresinde sağlıklı insanda hemoglobin tipleri



Şekil 2. İnsan globin genlerinin kromozomal organizasyonu

üzere 2 şekli vardır. Doğumdan bir yıl sonra bunlar tespit edilemez. Bu zincirlerin farklı hidrofobik özellikleri vardır; protein olarak tek bir HbF gibi davranırlarsa da “reverse-phase high performance liquid chromatography” (HPLC) ile kolaylıkla ayırılabilirler (Şekil 3). Hemoglobopatilerin tanısal analizinde proteine dayalı metodlar ile ilgili ayrıntılı bilgiye belirtilmiş olan kaynaklardan ulaşılabilir (1-4).



Şekil 3. Hb F ve A içeren kord kanının HPLC analizi: Katyon exchange HPLC (solda) ve reverse phase HPLC (sağda) Hb F subgruplarını göstermekte

Moleküler Tanı

Genel olarak hemoglobopatiler 3 grupta sınıflandırılabilir:

- Kalitatif anormallikler (hemoglobin varyantları),
- Kantitatif anormallikler (talasemiler),
- Hem kalitatif hem de kantitatif anormallikler (hemoglobin varyantları ve talasemiler).

Kalitatif anormallikler yapısal bir defekte neden olur ve bu grubun tipik örneği Hb varyantlarıdır. Bunlar protein bazlı IEF ve HPLC gibi yöntemlerle kolaylıkla tespit edilebilir, ancak kesin tanısı ekzon bölgelerinin DNA analizi ile konulabilir. Kantitatif anormalliklerde sorun yapısal olmayıp sentezlenen globin miktarındaki azalmadır. Bu grup hastalarda globin az ya da hiç sentezlenmemektedir. Bu durum HbA'nın hiç sentezlenememesi ya da az sentezlenmesi ile sonuçlanır. Eğer bir hastada kantitatif ya da kalitatif anormallikler bir arada bulunursa aynı hastada talasemi ve Hb varyantının bir arada bulunması söz konusudur.

Tanısal Yaklaşım

Klinik gözlem, protein ya da DNA bazlı kan testlerinden oluşur. Stratejik yaklaşımın ana hatları:

- a) Öykü
- b) Fizik inceleme
- c) Tam kan sayımı ve retikülosit
- d) Çevresel kan yayması
- e) IEF
- f) HPLC
- g) İleri testler
- h) DNA analizidir.

Yazıda bu başlıklara ayrıntılı olarak değinilecektir:

a) Öykü

Hemoglobinopatiler kalıtsal hastalıklar olduğunda özgeçmiş ek olarak aile öyküsünün de sorgulanması önemlidir. Eğer ailede hastalık varsa, ailede her doğan bebeğin ve evlilik öncesi çiftlerin hemoglobinopati yönünden taranması ve genetik danışmanlık verilmesi önemlidir.

b) Fizik Muayene

Büyüme geriliği, hepatosplenomegali, anemi, ikter, priapizm, inme, bacak ülserleri, ağrılı krizler, pulmoner problemler gibi bulguları olan hastalarda bu durumu açıklayabilecek başka bir neden yoksa hemoglobinopati tanısı akılda bulundurulmalıdır.

c) Tam Kan Sayımı

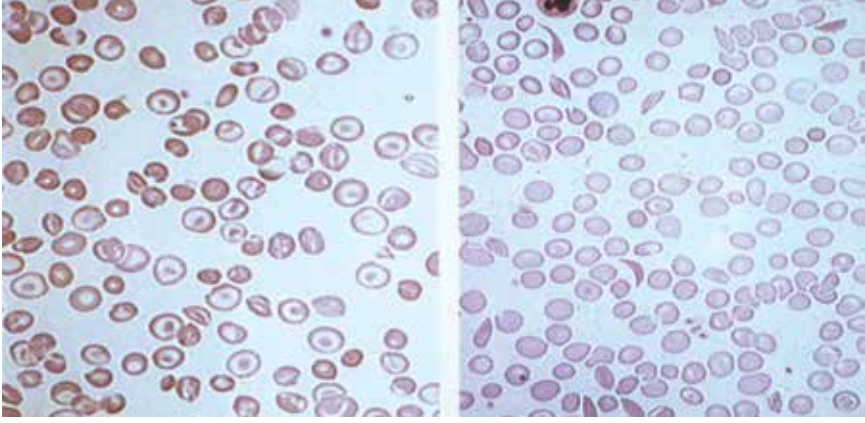
En önemli parameter MCV'dir (mean corpuscular volume, ortalama eritrosit hacmi). Eğer MCV değeri 75 fL'den daha düşük ise sıklıkla üç duruma işaret ediyor olabilir: alfa talasemi, beta talasemi, demir eksikliği. Demir eksikliği, serum demir ve ferritin düzeyleri ölçülerek kolaylıkla dışlanabilir. Alfa talasemi ve beta talasemi minoru birbirinden ayırdetmek için HbA2 ölçümünden yararlanılabilir. Eğer HbA2 %3,5'un üzerindeyse beta talasemi taşıyıcılığı düşünülmelidir. Sağlıklı bireylerde retikülosit %1 dolayındadır. Eğer retikülosit sayısı %2'den fazla ise hemolizle giden durumlar, hemolitik anemiler, orak hücreli anemi ve talasemi major açısından değerlendirilmelidir.

d) Çevresel Kan Yayması

Çevresel kan yayması pek çok hastada yol gösterici olabilir. Eritrositlerin şekilleri bazı hemoglobinopatilerin tanısını kolaylaştırır. Örneğin orak şeklindeki eritrositler, orak hücreli anemiye (Şekil 4), mikrositoz demir eksikliği, alfa ya da beta talasemilere, sferositler herediter sferositoza, ortokromatik ya da polikromatik hücreler hemolize işaret eder.

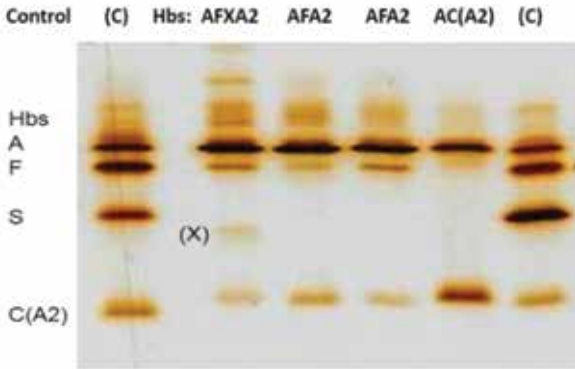
e) Isoelectric Focusing (EF)

IEF (ya da diğer elektroforetik metodlar, kapiller elektroforez-Sabio) bir tarama metodu olarak kullanılır ve farklı Hb'ler izoelektrik değerlerine (pI)



Şekil 4. Beta talasemi majorlu (solda) ve orak hücre anemili (sağda) hastaların çevresel kan yaymaları

göre göç etmeleri nedeniyle IEF’de ayırdedilebilirler. IEF her 10 örnek için farklı kontrol gruplarını içeren (Hbs Bart’s, A, F, S, C ve A2) bir panel ile bakılır (Şekil 5). Bu şekilde anormal migrasyon gösteren Hb yakalanıp, daha ileri testler kullanılarak kesin olarak tanımlanabilir. Tanımlanmış 1000’in üzerinde Hb varyantı vardır ve bunların büyük kısmı IEF’de HbS gibi, diğer bazıları ise HbA ya da HbF’e benzer. Bu nedenle bu örnekler HPLC ile de test edilmelidir.



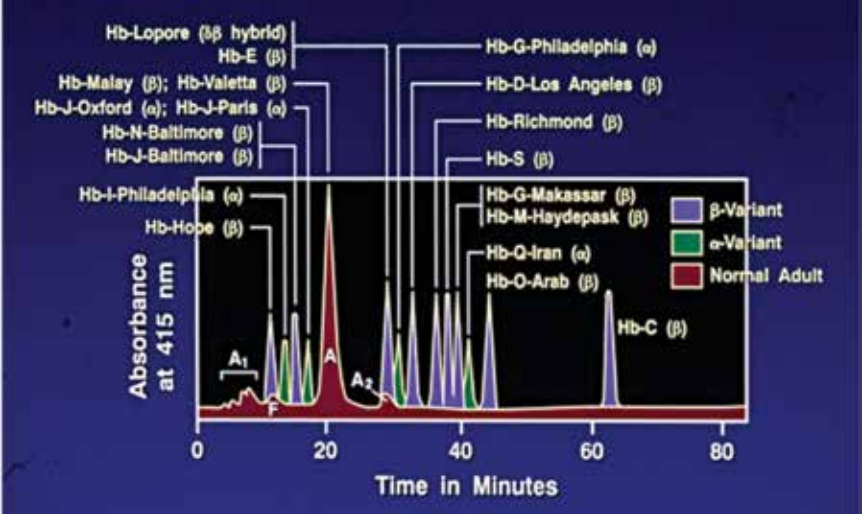
Şekil 5. İnce tabaka agarozda izoelektrik fokus jel görünümü: ph 6,0–8,0

f) HPLC

Hb HPLC (Katyon değişimi)

Çok sayıda Hb HPLC metodu olup, bunların büyük kısmı iyon değişim kolonlarını (anyon ya da katyon) kullanır. Bizim laboratuvarımızda bir

katyon değişim kolonu olan Synkropak CM 300 cihazı kullanılmaktadır. Bu metoda göre farklı Hb'ler yük farklılıklarına göre ayrılır ve kantifiye edilebilirler. Negatif yükü Hb'ler daha elüe olurken, pozitif yüklü olanlar silica parçacıklarına bağlanır ve elüe olmak için daha yüksek katyon konsantrasyonlarına gereksinim duyarak daha geç elüe olurlar. Sık görülen varyant hemoglobinlerden Hbs Bart's, O-Arab, C, E ve S'in elusyon özellikleri HPLC'de IEF'den farklıdır (Şekil 6). Bu nedenle bu sık görülen varyantları daha fazla DNA testi yapılmasına gerek olmadan ayırtetmek mümkün olabilir. Ancak Hb Bart's ya da Hb H varlığı alfa talasemiye işaret eder ve kesin tanısı için DNA analiz gerekir.



Şekil 6. Synkropak CM-300 kolonda katyon exchange HPLC ile alfa ve beta globin zincir varyantlarının dağılım paterni

Globin Zincir HPLC (“reverse phase” HPLC)

Bu metotta “reverse phase” HPLC kolonları, WyDac C4 gibi kullanılır ve Hb bileşenlerini globin zincirleri (α ; β ; δ ; γ) olarak ayırt eder. Hemoglobinleri çok düşük pH tamponunda denature ettikten sonra hidrofobitesine göre ayırır. Bu metodun iki önemli kullanım alanı vardır. Birincisi normal globin zincirini anormal olandan ayırt etmemizi sağlayarak hangi genin sekanslanacağına karar vermemizi kolaylaştırır. İkincisi fetal Hb'nin iki alt tipi olan G γ ve A γ 'yi ayırarak bazı herediter persistan fetal Hb'lerin (HPFH) tanınmasını kolaylaştırır.

g) İleri Testler

Oksijen Afinitesi

Bazı Hb varyantlarının oksijen afinitesi değişmiş olup hemoglobinopatiler arasında önemli bir grubu oluştururlar. Bazı varyantlarda Hb'nin oksijen afinitesi artmış olup eritropeze neden olurken, bazılarında oksijen afinitesi düşük olup anemi görülebilir. Bazı olgularda bu varyantlar IEF ya da Hb



HPLC'de HbA olarak görülebildiğinden bu yöntemler test edilemeyebilir. "Reverse phase" HPLC, ya da genetik analiz bu anormallikleri tespit etmede yararlı metodlardır.

Hemox analiz cihazı ile 37 °C'de oksijenin mmHg olarak parsiyel basıncını ölçmek mümkün olabilmektedir. Bu amaçla taze alınmış kan örneğinden (48 saatten daha yeni hasta örneği ve beraberinde aynı koşullarda laboratuvara ulaştırılmış normal kontrol kanı ile beraber) hemolizat hazırlanır. Daha ideali mümkünse hasta bu teknikle ölçüm yapabilen merkeze gönderilerek taze kandan test edilmesi sağlanır.

İzopropanol Stabilitesi

Bazı Hb varyantları stabil değildir ve konjenital Heinz cisimciği hemolitik anemisi adı verilen bir hemolitik anemi tablosuna neden olurlar. Heme'ye yakın aminoasit rezidüleri ya da $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\beta 1$ kontak noktalarındaki rezidüler Hb molekülünün bir tetramer olarak stabilitesini sağlar. Bu rezidülerdeki aminoasitlerin yerine başka aminoasitler geçerse Hb molekülünün stabilitesi bozulur ve hemolitik anemi gelişir. Bu hastalara tanı koymak için Hb molekülünün stabilitesini ölçmek son derece yararlıdır. Bizim laboratuvarımızda izopropanol stabilite testi rutin olarak kullanılmaktadır. Yüzde 17'lik izopropanol eklenerek globin zincirlerinin hidrofobik bağları zayıflatılır ve stabil olmayan Hb molekülünün presipitasyonu görülür. Bu test için alınan kan örneği de taze olmalıdır ve örnek alındıktan en fazla 24 saat içinde çalışılmalıdır. Kan transferi yapılacaksa normal kontrolden alınan kan örneği de benzer koşullarda transfer edilmelidir. Hemoglobinopatilerin tanısında kullanılan metodlarla ilgili detaylı bilgilere kaynak 1-4 den ulaşılabilir (1-4).

h) DNA analizi

Sekanslama

Globin genlerinin sekanslanması tek gen mutasyonları sonucu gelişen anormalliklerin kesin olarak tanımlanmasına olanak verir. İki tip strateji uygulanabilir:

1. Promotor bölgeden başlayıp Poly A bölgesine kadar tüm genin sekanslanması ve α , β , γ , δ talasemi mutasyonlarının taranması
2. Sadece üç kodlama bölgesinin taranması ve α , β , γ , δ globin genlerindeki mutasyonlara bağlı Hb varyantlarının tanımlanması. Şekil 7'de 4 nükleotid delesyonuna (beta globin geni kodon 41-42 arasında) bağlı Hb E beta talasemisi olan bir hastanın sekanslama analiz sonucu verilmiştir.

Gap PCR

Gap PCR α , β , γ , δ globin genlerindeki delesyonel mutasyonların tespit edilmesinde kullanılabilir. Bu metodla talasemi, HPHF ya da hybrid Hb sendromlarına yol açan (Hb Lepore ya da Kenya gibi) tek gen, ya da iki, üç, dörtlü gen delesyonları tespit edilebilir.

Sekanslama ve Gap PCR

Hb S-HPHF gibi birden fazla globin genetik anormalliğinin bir arada olduğu kompleks olgular için kullanılır.

**Kaynaklar**

1. Kutlar A, Huisman THJ. Detection of hemoglobinopathies. In: Hommes FE, ed. *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual*. New York: Wiley Liss Inc.1991;519-560.
2. *Haemoglobinopathy Diagnoses*, Barbara J. Bain, Blackwell Publishing, 2006.
3. Kutlar F. Diagnostic approach to hemoglobinopathies. *Hemoglobin*. 2007;31:243-250.
4. Kutlar A, Kutlar F. *Laboratory Diagnosis of the Hemoglobinopathies*, UpToDate, Wolters Kluwer Health, 2011. (Updated yearly - 2013).
5. Bunn HF, Forget BG. *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects*. Philadelphia, W.B. Saunders, 1986.
6. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AOM, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. *Blood*. 1989;73:1081-1104.
7. Huisman THJ, ed. *The Hemoglobinopathies*. Edinburg: Churchill Livingstone,1986.
8. Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majerus PW. *The Molecular Bases of Blood Disease*. Philadelphia, W.B. Saunders, 1987.
9. Weatherall DJ, Clegg JB. *The Thalassemia Syndromes*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1981.
10. Kazazian HH Jr, Boehm CD. Molecular bases and prenatal diagnoses of beta thalassemia. *Blood*. 1988;72;1107-1116.
11. Kazazian HH Jr, Orkin SH, Antonarakis SE, et al. Molecular characterization of seven beta thalassemia mutation in Asian Indians. *EMBO J*. 1984;3:593-596.
12. Hardison RC, Chui DHK, Giardine B, et al. HbVar: a relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum Mutat*. 2002;19:225-233.