

Anormal Hemoglobinler'in Farklı Hemoglobin Elektroferezleri ile Belirlenmesi

Azize Alaylı Güngör¹, Yaşar Demir², Nazan Demir^{3,*}

¹Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü, Erzurum Bölge Müdürlüğü, 25100, Erzurum, Türkiye

²Atatürk Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Kimya Eğitimi Bölümü, 25200, Erzurum, Türkiye

^{3*} Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 25200, Erzurum, Türkiye

*Yazışılan yazar e-posta: demirn@yahoo.com

Alınış:28 Mart 2011, Kabul:25 Nisan 2011

Özet: Genetik hastalıklar içinde önemli bir yere sahip olan anormal hemoglobinler pek çok ülkede önemli bir sağlık sorunu olarak bilinmektedir. Dünya göç ve ticaret yolları üzerinde bulunan Türkiye’de anormal hemoglobinleri belirlemek amacıyla özellikle Akdeniz bölgesinde ve çoğunluğu kıyı şeridinde yer alan bazı illerde tarama çalışmaları yapılmıştır. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda ise Erzurum ve çevresinde daha önce, bu tip bir tarama yapıldığına dair bulguya rastlanmamıştır. Bu çalışma 3520 tane kan numunesi ile yapılmıştır. Bölgemizdeki anormal hemoglobinleri belirlemek için yapılan hemoglobin elektroferezleri (asidik, bazik agaroz ve selüloz asetat) ile HbAS, HbS, HbD, HbWood, Hb Malmo ve HbN hemoglobin türlerinin varlığı ve oranları belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Erzurum, hemoglobinopatiler, anormal hemoglobin.

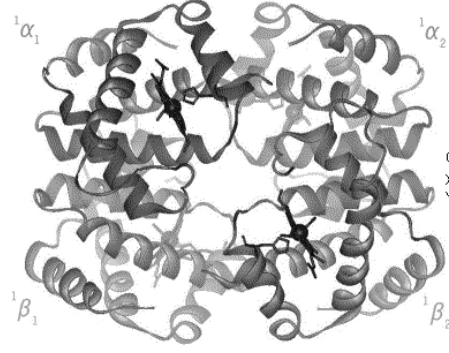
Determination of Abnormal Hemoglobins with Different Hemoglobin Electrophoresis

Abstract: Hemoglobinopathies which have an important place in genetic diseases are known a serious health problem in many countries. Turkey is located in world migration and business band and to be able to determine abnormal hemoglobinopathies, abnormal hemoglobines searching has been made especially in Mediterranean Sea region and the mainly in the cities located sea side. At the result of literature research, it was observed that there is no scientific proof about determination of mutation types by using molecular techniques in Erzurum. In this study was made with 3520 blood samples. The results of hemoglobin electrophoresis (acid, base agarose and cellulose acetate) show that the existing and percentage kinds of abnormal hemoglobin’s are HbAS, HbS, HbD, HbWood, HbMalmo and HbN in region.

Key words: Erzurum, hemoglobinopathies, abnormal hemoglobin.

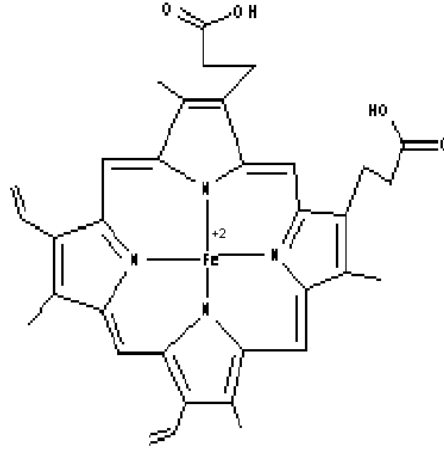
1. Giriş

Sağlıklı bir insanın kanında % 95-96 Hemoglobin A₁, %2.5-3.5 Hemoglobin A₂ ve % 1 den az Hemoglobin F bulunur. Hemoglobin A₁, 2 Alfa ve 2 Beta zincirinden oluşmuştur (Şekil 1). Hemoglobin bileşik bir protein moleküldür. Kanda eritrosit hücrelerinde bulunur. Görevi vücudun neresinde ihtiyaç duyulursa oraya oksijen taşımaktır. Her bir kırmızı kan hücresinde 300 milyon hemoglobin molekülü mevcuttur. Hemoglobin molekülleri 2 parçadan oluşur [2]. Hb molekülü “globin” adı verilen protein kısım ile “hem” denilen prostetik gruptan meydana gelmektedir. Molekülün globin kısmında 4 adet polipeptid zinciri bulunur. Bu polipeptidlerin her biri, bir hem grubuna bağlıdır [3-6].



Şekil 1. Hemoglobin A₁ in yapısı [1]

Tüm Hb'ler de hem grubu aynı yapıdadır. Bu grup, ortasında Fe⁺² bulunan, yan zincirlere sahip, birbirine metil köprüleriyle bağlanmış 4 pirok halkasından oluşmaktadır [2-6] (Şekil 2).



Şekil 2. Hem grubu [6]

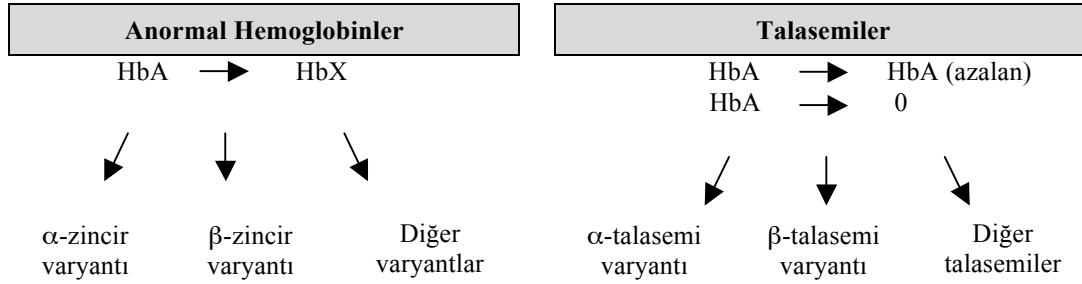
İnsandaki normal hemoglobinler, HbA₁, HbA₂, HbF, Hb Gower 1, Hb Gower 2 ve Hb Portland'dır [3, 7, 8] (Çizelge 1.).

Tablo 1. İnsandaki normal Hb'lerin moleküler yapıları ile yetişkin ve yeni doğanlardaki oranları [4]

Hb Tipi	Moleküler yapı	Yetişkin (%)	Yeni doğan (%)
HbA ₁	$\alpha_2\beta_2$	97	19.5
HbA ₂	$\alpha_2\delta_2$	2	0.5
HbF	$\alpha_2\gamma_2$	1	80
Gower 1	$\zeta_2\varepsilon_2$	0	0
Gower 2	$\alpha_2\varepsilon_2$	0	0
Portland	$\zeta_2\gamma_2$	0	0

1.1. Hemoglobinopatiler

Hb varyantları, polipeptid zincirlerini kodlayan genlerdeki (11 ve 16 nolu kromozomlar üzerindeki) çeşitli mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu genlerin ekson bölgesindeki veya bu bölge dışındaki nokta mutasyonları, insersiyonlar ve delesyonlar çeşitli Hb varyantlarının oluşumuna neden olurlar [3, 5, 9, 10]. Hemoglobinin, otozomal resesif olarak kalıtılan genetik hastalıkları, iki büyük gruba ayrılır [11] (Şekil 3).



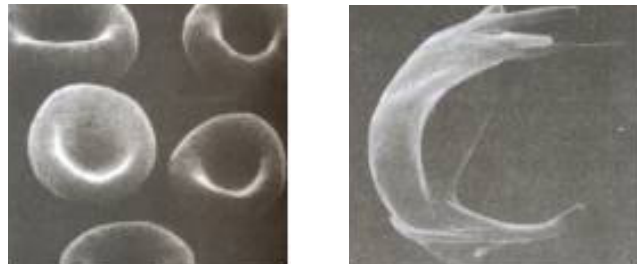
Şekil 3. Hemoglobinopatiler

1.2. Anormal Hemoglobinler (HbX)

Milyonlarca insanın etkilendiği anormal hemoglobinlerden en yaygın olanları S, C, E ve D'dir.

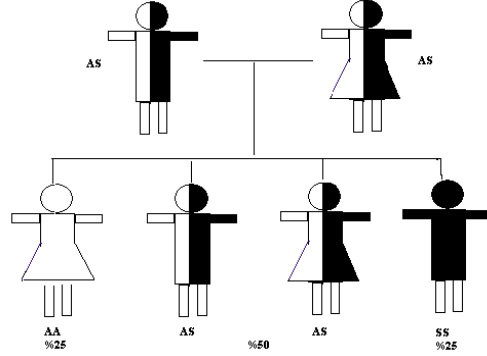
1.3. Orak Hücre Anemisi (HbS)

En sık görülen hemoglobin varyantlarından biride HbS'dir. Afrika kıtasındaki bazı yörelerdeki dağılımı %20-40 civarındadır. Bu oran Azerbaycan Türklerinde %10 iken ülkemizin güneyinde %8.2'dir. Orak hücre hastalarında kana kırmızı rengini veren hemoglobin maddesinin yapısı değişiktir. Bu hastalık nokta mutasyonlar sonucu, normal hemoglobinin beta zincirinin 6. sırasındaki glutamik asit yerine valin amino asitinin gelmesi ile oluşur. Aminoasit dizilişindeki bu değişiklik sonucu oluşan hemoglobin, HbS olarak adlandırılır [3, 12-14] (Şekil 4).



Şekil 4. Normal eritrositler, HbS türü eritrosit [12]

Anne ve babanın HbS taşıyıcısı olduğu durumlarda, doğacak çocuğun HbS taşıyıcısı olma riski % 50, orak hücre hastası doğma riski % 25, normal hemogloblinli doğma oranı ise % 25'dir (Şekil 5). Bu oranlar tüm doğumlar için aynıdır.



Şekil 5. Her iki ebeveynin de HbS taşıyıcısı olma durumunda doğacak çocukların Hb genotipleri ve oranları

1.4. Hemoglobin D (HbD)

Elektroforetik göçlerindeki farklılığa dayanılarak HbD olarak adlandırılan birkaç varyant bulunmaktadır. HbD'ler alkali selüloz asetat elektroforezinde HbS ile birlikte, asidik sitrat agar elektroforezinde ise; HbA ile birlikte aynı yere göç etmektedir [3, 9] Hemoglobinin bu varyantı, Avusturya, İspanya, Yunanistan, İngiltere, Almanya, Portekiz, Türkiye, İran ve Hindistan'da rapor edilmiştir [4, 14].

1.5. Hemoglobin N-Baltimore (HbN)

Bilinen diğer adları Hopkins-I, N-Memphis, Jekins ve Kenwood dur. Beta globülün geninin 95 nolu kodonundaki AAG nin GAG ile yer değiştirmesi sonucu ortaya çıkar. Bu mutasyon ile Lys amino asiti Glu amino asiti ile yer değiştirir. HbN, HbA dan alkali pH larda elektroforezdeki hızlı göç etmesi ile ayrılabilir. Normal bir oksijen afinitesine sahiptir. Amerikalı siyah ırkta ve Türkiyede de Antalya ilinde ve çevresinde görülmüştür[15, 16].

Uluslararası Hemoglobin Danışma Merkezinin 1998 yılı raporunda total anormal hemoglobin varyant sayısının 750'ye ulaştığı rapor edilmişti. Ülkemizin güneyinde yer alan Çukurova bölgesinde (Antakya, Adana ve İçel) orak hücre anemisi taşıyıcı (HbAS) sıklığı %8.2 olarak tespit edilmiştir. HbS taşıyıcı oranı bazı köy ve kasabalarada %44'e kadar ulaşmaktadır [11]. Talasemik özelliğe sahip olan HbE ise ülkemizde sık görülen diğer anormal hemoglobindir. Anormal hemoglobinlerden HbD ülkemizde ender olarak görülürken, HbC ise birkaç vakada tespit edilmiştir. Türkiye'de tespit edilen diğer anormal hemoglobinler talasemili vakaların incelenmesi veya toplum taraması sonucu belirlenmiştir. Anormal hemoglobin varyantlarından 33 tanesi ülkemizde gözlenmiş olup bunlardan 7 tanesi ilk olarak Türklerde belirlenmiştir [17].

Yapılan çalışmada daha önce tarama yapılmayan bir bölgede olan Erzurum ve Çevresinden kan örnekleri alınarak, Farklı elektroforez teknikleri ile hemoglobin türlerinin ve yüzde oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Kullanılan Araçlar ve Kimyasalların Temini

Araçlar; pH metre (Lab Star), Santrifüj (MSE Mistral 1000), Mikro Santrifüj (Hettich Mikro 22R), Buz Dolabı, Mikrodalga fırın (Arçelik), Jel elektroforez cihazı (Sigma-Aldrich), Fotoğraf makinesi Sony Digital, Otomatik pipet (Volac (50,100µL)), Otomatik pipet (Eppendorf (1-20 µL), Vortex (Heidolph Reax), Tarayıcı (Hp Scanjet 2400), Güç Kaynağı (Edit on line), Terazı (Scaltec).

Kimyasal malzemeler; Standart Hemoglobin AFSC-N Analytical Control Systems INC. firmasından, MIDI GEL Hb-asit hemoglobin elektroforezi kiti BIOMIDI firmasından, diğer tüm kimyasallar, Merck, Sigma, Perkin-Elmer, ve Biolab firmalarından temin edilmiştir.

2.2. Standart hemoglobin AFSC-N kontrol çözeltisinin hazırlanışı

Bir vial numunenin üzerine 0.5 mL destile su eklenmiştir. Çalkalamadan nazik bir şekilde karıştırıp ve yarım saat bektetildikten sonra kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

2.2.1. Hemoglobin kiti için kullanılan çözeltiler

Elektroforez jel yatay olarak saklandığı kabından çıkarılarak kullanılmıştır.

2.2.2. Sitrata tamponunun hazırlanması

Sitrata tampon karışımı 1000 mL saf suya tamamlanarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti +4°C'de stabilitesini 30 gün muhafaza etmiştir.

2.2.3. Amido black boyasının hazırlanması

Bir şişe içindeki boya %5'lik 500 mL asetik asit çözeltisi içinde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti +4°C'de stabilitesini 30 gün muhafaza etmiştir.

2.2.4. Fiksasyon Çözeltisi

90 mL metanol 20 mL asetik asit ve 90 mL su karıştırılarak hazırlanmıştır. Asetik asit ve metanol karışımları kararlı olmadığı için her kullanım için çözelti yeniden hazırlanmıştır.

2.2.5. Yıkama Çözeltisi

Jelin rengini açıp bantların ortaya çıkarılması için kullanılmıştır. 300 mL %5 lik asetik asit çözeltisi bu amaçla kullanılmıştır.

2.2.6. Tuz Çözeltisi

Her jel için %0.9 luk 200 mL NaCl çözeltisi hazırlanmış, +4°C de korunmuştur.

2.2.7. Selüloz Asetat Hemoglobin Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

2.2.8. Anot Tamponu

25.2 g Tris, 2.5 g EDTA ve 1.5 g Borik asit destile su ile 1000 mL tamamlanarak pH: 9.1 ve 0.26 M'lık tampon çözelti hazırlanmıştır.

2.2.9. Katot Tamponu

5.15 g Sodyum dietilbarbital 0.92 g dietilbarbütirik asit 1000 mL saf su ile tamamlanarak pH: 8.6 olan barbital tamponu hazırlanmıştır.

2.2.10. Boyama Çözeltisinin Hazırlanması

Çözelti 500 mg Ponceau-S, 100 mL %5 lik Tri kloro asetik asit içinde çözülerek hazırlanmıştır.

2.2.11. Yıkama Çözeltisinin Hazırlanması

%5'lik asetik asit çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır.

2.3. Kan Örneklerinin Alınması ve Kan Sayımı

Kan örnekleri 30.12.2004–23.06.2005 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi Hematoloji Laboratuarından ve AÇSAP (Ana Çocuk Sağlığı-Aile Planlaması Merkezi)'nden hemogram değerleri ile birlikte alınmıştır. EDTA içeren toplama tüplerine alınan kanlar barkodlanmış bir şekilde muhafaza edilmiştir.

2.4. Hemolizat Hazırlanması

Kanlar üç kez serum fizyolojik ile yıkanarak 2400 rpm'de 10 dak santrifüj edilmiştir. Çökelen hücre hacmi kadar su ilave edilerek 5 dakika iyice çalkalandıktan sonra 3000

rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Hemolizat olarak bilinen üst faz hemoglobin elektroforezi, analizlerinde kullanılmıştır [18, 19].

2.5. Hb Varyantlarının İncelenmesi

Laboratuvarlarda incelenen Hb varyantlarının %90'nını HbS, HbC, HbD-Punjab ve HbE gibi sık görülen varyantlar oluşturmaktadır [15, 20]. Hb varyantı sitrat agar elektroforezinde yürütülür. Bu yöntemde Hb molekülünün yapısal modifikasyon içeren bölgelerinin jeldeki agaropektin ile yaptığı etkileşime bağlı olarak verdiği spesifik profil incelenmektedir [21]. Çeşitli Hb Fraksiyonları bu yöntemle birbirinden ayrılabilmiştir [15, 18, 22, 23]. Hb varyantlarının tanımlanmasında, ayrıca klinik çalışmalarla ve rutin hematolojik yöntemlerle elde edilen sonuçların da göz önüne alınması gerekmektedir. Buraya kadar yapılan analizlerle vakaların %90'nında daha ileri bir analize gerek kalmadan Hb varyantı tanımlanabilmektedir [24, 25]. Daha önceden yapılmış çalışmalarda elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucu, internet ortamındaki web sayfasında (<http://globin.cse.psu.edu>), Hb varyantları ve Hb mutasyonları ile ilgili veri tabanı oluşturmuştur [26].

2.6. Hemoglobin Elektroforezi

Hemoglobin sentezinde karşılaşılan kalıtsal anormallikler iki ana grup altında toplanmıştır. Bunlardan biri anormal hemoglobin varyantları diğeri ise talasemi olarak tanımlanmakta olup bunların belirlenmesinde hemoglobin elektroforezinden faydalanılmıştır [27, 28].

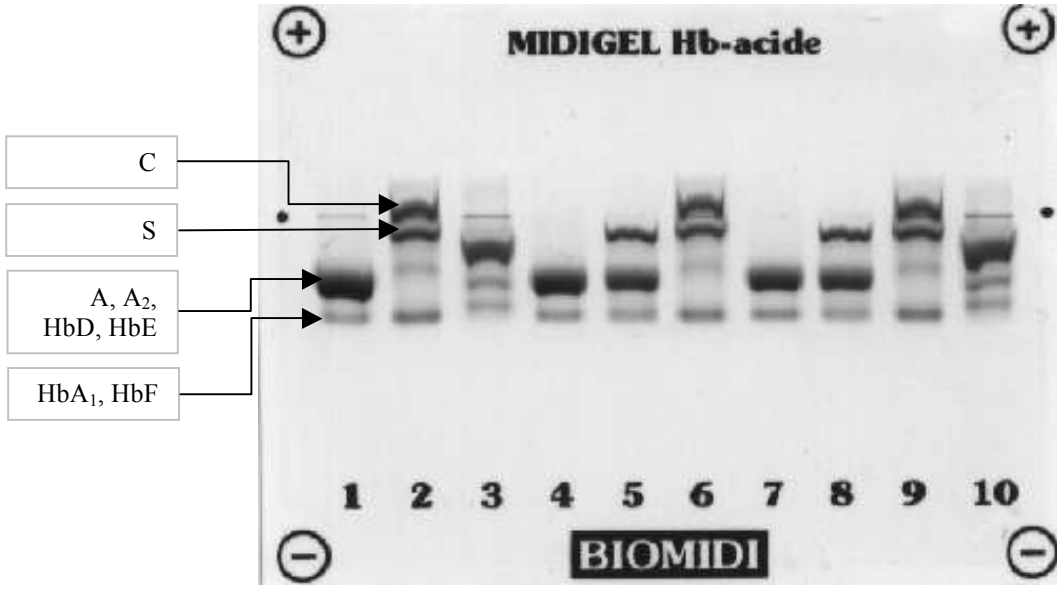
2.6.1. Selüloz Asetat Hemoglobin Elektroforezi

Hemoglobin elektroforezi ilk olarak selüloz asetat ile yapılmıştır. Bu amaçla EDTA'lı tüplere alınan tam kan 10.000xg de 20 dak. Santrifüjlenmiş alta kalan eritrositlerden mikro pipet yardımı ile 50 µL alınmış ve 500 µL ye saf su ile tamalanarak hücrelerin hemoliz olması sağlanmıştır. Elektoroferez tankının katoduna pH'ı 8.6 olan (0,26 M) Barbital tamponu ve anoduna pH'sı 9.1 olan (0.26 M) Tris tamponu konulmuştur. Her iki tampondan eşit miktarda içeren çözelti ile selüloz asetat kâğıdı en az 10 dakika ıslatılmıştır. Sonra bu kâğıda 3 mL hemolizat uygulanıp, elektroforez tankının köprüsüne yerleştirilmiştir. 0.75 mA/cm² akım 45 dakika süreyle uygulanmıştır. Daha sonra Ponceau-S ile boyanan ve yıkama çözeltisi ile temizlenen kâğıtta hemoglobinin tiplendirilmesi yapılmıştır.

2.6.2. Sitrat Agar Hemoglobin Elektroforezi

EDTA lı tüplere alınan tam kan elektroforez için kullanılmıştır. Bu amaçla alınan kan örnekleri 5000 rpm de 5 dakika santrifüjlendikten sonra üstteki plazma ve lökosit tabakası uzaklaştırılmıştır. Daha sonra bir hacim eritrosit çözeltisi 20 hacim izotonik tuz çözeltisi ile muamele edilmiştir. Daha sonra çözelti 5 dakika 5000 rpm de santrifüjlenerek süpernatantı atılmıştır. Bir hacim eritrosit 13 hacim hemoliz solüsyonu

ile karıştırılarak ve çalkalanarak hücrelerin hemoloiz olması sağlanmıştır. Elektroforez yapılmadan numune beş dakika bekletilmiştir. Yatay elektroforez tankı sitrat tamponu ile doldurulmuştur. Sitrat agar kitinin paketi dikkatlice açıldıktan sonra üzerinde kalan sıvı kısımlar bir kâğıt havlu yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Jelin üzerine numunenin uygulanacağı yerleri gösteren kağıt yerleştirilerek jele yapışması sağlanmıştır. Kâğıdın üzerindeki her bir boşluğa 4 µL numune konularak jelin emmesi için 5 dakika beklenmiştir. Jelin emmediği sıvı kısım kâğıt kullanılarak ayrılmıştır. Jelin üzerine yerleştirilen kâğıt jelden uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 30 dakika 80 V akım uygulanarak hemoglobin türlerinin birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Akım kesildikten sonra jel 10 dakika fix çözültisi içinde tutulmuştur. Daha sonra jel 70°C 20 dakika bekletilerek kuruması sağlanmıştır. Ardından jel 10 dakika boya çözültisi içinde tutulup renksizleştirme işleminden sonra 10 dakika 70°C de kurulum bantlarının değerlendirilmesi sağlanmıştır (Şekil 6).



Şekil 6. Sitrat agar hemoglobin elektroforezi

2.6.3. Bazik Agaroz Elektroforezi

Uyguladığımız hemoglobin elektroforezi için %1 lik agaroz kullanılmıştır. 1g agaroz 100 ml 0.05 M TBA içinde mikro dalga fırında eritildikten sonra soğutulup yatay elektroforez kalıbına dökülmüştür. Bu sırada elektroforez tarakları jel donmadan önce yerleştirilerek kuyucukların oluşması sağlanmıştır. Tam kandan santrifüjlenip serumu uzaklaştırıldıktan daha sonrada tuz çözültisi ile yıkandıktan sonra 50 µL numune alınmıştır. Alınan numunenin üzerine 500 µL liz tamponu ilave edilerek eritrositlerin parçalanması sağlanmıştır. Daha sonra 10.000xg de 20 dak santrifüjlenmiş ve üstte kalan çözültiden 5µL alınmıştır. Alınan 5µL'lik kısım aynı hacimde brom timol mavisi içeren numune tamponu ile karıştırılmış ve kuyucuklara uygulanacak hale getirilmiştir. Numuneler her kuyuya ekildikten sonra 100 V ta 75 mA'lik akım altında 2 saat yürütülmüştür.

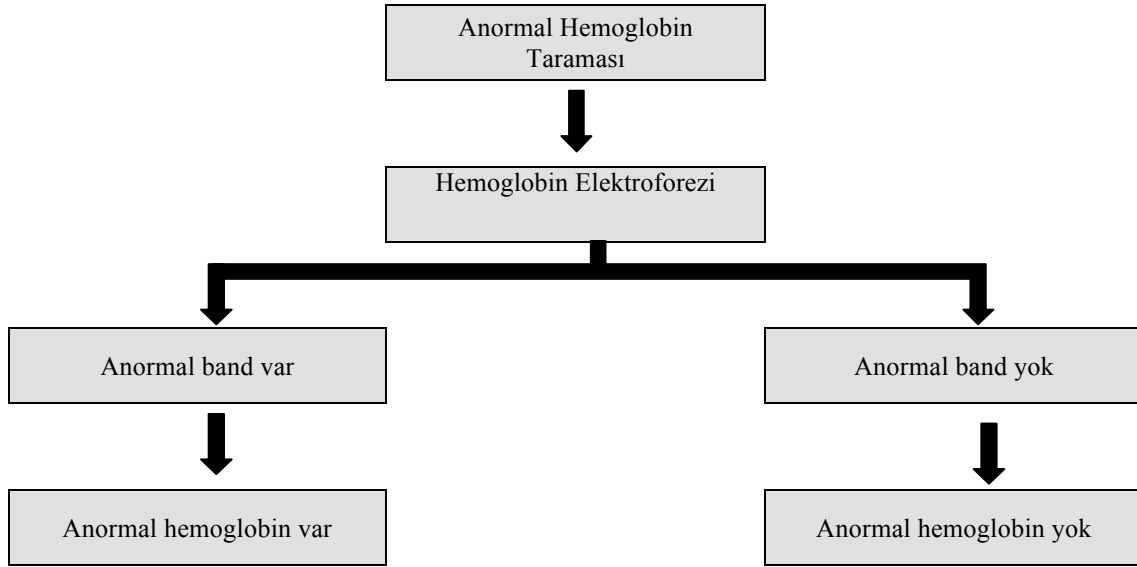
Akım kesildikten sonra jel 500 mg Ponceau-S 100 ml %5'lik trikloroasetik asitte çözülerek hazırlanan çözelti içinde boyanmış ve %5 lik asetik asitle boya açılıncaya kadar muamele edildikten sonra fotoğrafları çekilerek Tablo 2'ye göre değerlendirilmiştir. Hemoglobin elektroforezlerinde hemoglobin türlerini karşılaştırmak için ticari olarak satılan standart kullanılmıştır [29].

Tablo 2. Selüloz asetat ve Sitrat agar elektroforezindeki bazı hemoglobin türlerinin birbirine göre göç hızlarının karşılaştırılması aşağıdaki şekilde gösterilmiştir

	Selüloz Asetat Elektroforezi				Sitrat Agar Elektroforezi			
	+A0	F-2,6	S-5,2	A ₂ -10	+F-4,4	A0	S+5,8	C+10
S				-5,2				
C								
*E							0	
Lepore				-5			0	
G Philadelphia				-5,2			0	
D Punjab				-5,2			0	
O-Arab								
*Hasharon				-5,5				6,25
H	8,5						0	
Constant Spring							0	
Malmö		5,5					-1,1	
A ₂ '								
Wood		0					-2,25	
Barts	7,6							4
*Köln							-2,5	
N Baltimore	6,6						0	5,8
ASG Philadelphia		0		-5,2			0	
J Oxford	4,6						0	
J Baltimore	4,3						0	
*Tacoma		0,9						
*Lufkin	3,2						0	
*Camperdown		0,8					0	
K		0,8						4
Hope								4
Camdem		1,6					-2,8	
New York		1,5					0	
*G San Jose				-3,6				7,5
C Harlem								5,8

3. Bulgular

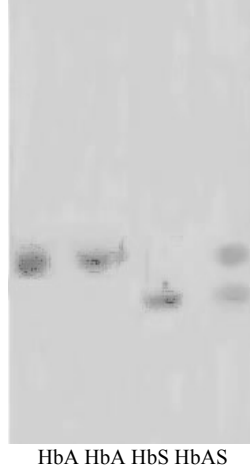
Gerçekleştirilen bu araştırma kapsamında, yapılan literatür incelemeleri sonucunda daha önce Erzurum ili ve çevresinde anormal hemoglobinler belirlenmesi ile ilgili ayrıntılı bir çalışma yapılmadığı anlaşılmıştır. Bu nedenden dolayı araştırmada kullanılan kanlar, 30.12.2004–23.06.2005 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi Hematoloji Laboratuvarından ve AÇSAP (Ana Çocuk Sağlığı-Aile Planlaması Merkezi)'inden hemogram değerleri ile birlikte alınmıştır. Anormal hemoglobinlerin taranması için Ulusal Hemoglobinopati Konseyinin kabul ettiği hemoglobin tarama şeması (Şekil 7) uygulanmış ve alınan kanların anormal hemoglobin içerip içermediğinin araştırılması için farklı türlerdeki hemoglobin elektroforezleri yapılmıştır.



Şekil 7. Anormal Hemoglobinlerin Taraması

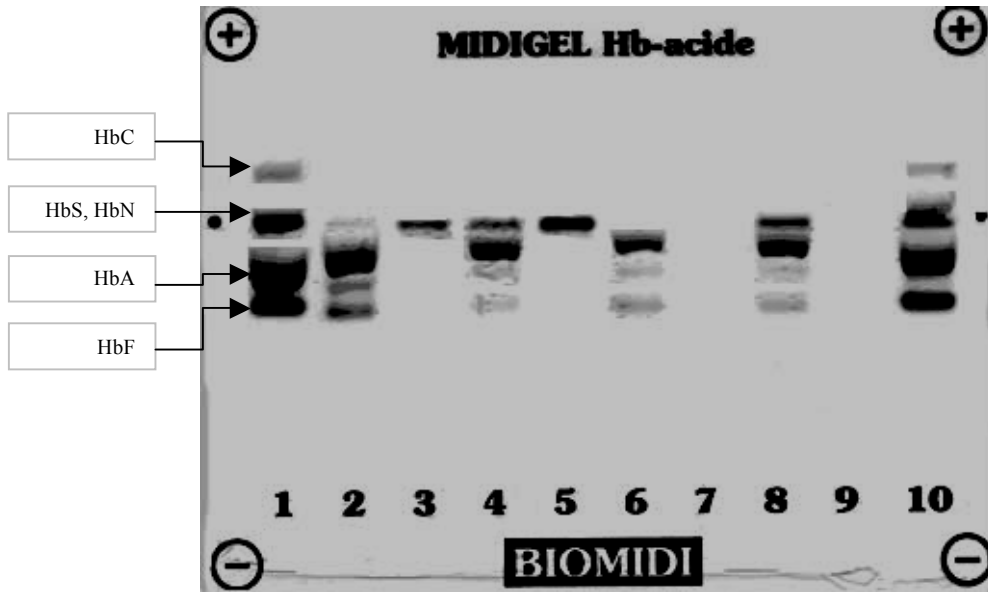
Aşağıda görülen fotoğrafta selüloz asetat kâğıt elektroforezi ile A ve S türü hemoglobinin nasıl ayrıldığı gösterilmiştir (Şekil 8). Selüloz asetat hemoglobin elektroforezi ile A ve S türü hemoglobinler birbirinden ayrılmıştır.

Yapılan selüloz asetat elektroforezi sonucunda HbAS taşıyıcı ve HbS içeren kan normal HbA'dan Şekil 8 de görüldüğü gibi elektroforetik farklılık göstermiştir. 1 ve 2 numaralı kuyu da HbA'lı kan numunelerinin 3 numaralı kuyuda HbS'li kan numunesinin ve 4 numaralı kuyuda ise HbAS'li kan numunesinin selüloz asetat elektroforezi yapıldıktan sonraki fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 8. Selüloz asetat elektroforezi

Asidik hemoglobin elektroforezi kit olarak alınan sitrat agar hemoglobin elektroforezi ile yapılmıştır. Bu hemoglobin elektroforezi ile C, S, F, ve A türü hemoglobinler birbirinden ayrılırken hemoglobin D hemoglobin A ve N ile S ile aynı yere band vermektedir. Bu nedenlerden dolayı daha çok hemoglobin türünün birbirinden ayrılabilmesi için ayrıca bazik agaroz hemoglobin elektroforezi de uygulanmıştır.

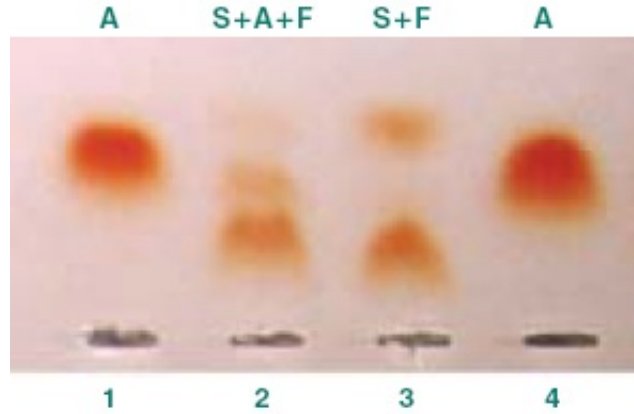


Şekil 9. Sitrata agar elektroforezi

Bandlar içerisinde uygulama noktasına göre anota en yakın yere yürüyen altta görülen F bandıdır, daha sonra A, HbS ve HbC katoda doğru hareket etmişlerdir. Şekil 9 ve Tablo 2 deki hemoglobinlerin göç mesafeleri karşılaştırılarak yapılan hesaplamaların sonucunda aşağıdaki hemoglobin türleri belirlenmiştir. Yukarıdaki fotoğrafta bazı numunelere ait agaroz elektroforez fotoğrafı gösterilmiştir. 1 ve 10 numaralı kuyularda NFASC den oluşan standart yürütülmüştür. Bu elektroforez sonuçları incelendiğinde 2,

3, 4, 5, 6 ve 8 nolu örneklerde anormal hemoglobin bandları görünmüştür. 2 de belirgin 4, 6 ve 8 de nispeten daha az belirgin HbX bandına rastlanmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda bu bandın yüksek oksijen ilgisine sahip ve asidik sitrat elektroforezinde HbA ve HbF arasında band veren Hemoglobin varyantları olan HbWood veya HbMalmö olabileceği anlaşılmıştır. Göç hızları karşılaştırıldığı zaman 2 nolu numunenin Hb Wood ile 4, 6 ve 8 nolu numunelerin ise HbMalmö türü hemoglobin içerdiği belirlenmiştir. 3 ve 5 numaralı kuyularda sadece HbS görülmüş ve kişinin orak hücre hastası olduğu sonucuna varılmıştır. 4 ve 8 numaralı kuyularda ise HbS'in yanında HbA bandının olması hastanın taşıyıcı olduğunu göstermiştir.

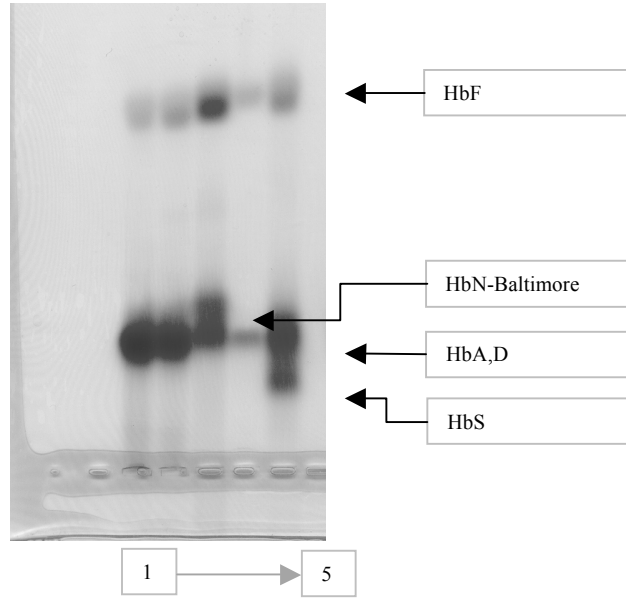
Laboratuarda hazırlanan bazik agaroz elektroforezi ile S bandı ve D bandı birbirinden ayırdığı için sitrat agar elektroforezi ile teşhis edilemeyen hemoglobin türlerinin belirlenebilmesi sağlanmıştır. HbD asidik elektroforez de HbS ile aynı yerde band veriyorken bazik elektroforez de HbA ile aynı yerde band vermiştir. Yapılan agaroz elektroforezleri karşılaştırılarak HbD türü hemoglobine de rastlanmıştır. Ayrıca laboratuarda hazırladığımız elektroforezdeki hemoglobinlerin göç ettiği yerler gerek standart hemoglobin türleri kullanarak gerekse yapılan diğer bazik hemoglobin elektroforezleri ile karşılaştırılarak belirlenmiştir [30].



Şekil 10. Agaroz elektroforezi ile Hb türlerinin ayrılması [30]

Yapılan bazik agaroz elektroforezleri gibi bizim yaptığımız bazik agaroz elektroforezinde de HbF tüm hemoglobin türlerinden hızlı hareket etmiştir. Normal bir bireyde az miktarda hızla ilerleyen HbF daha yavaş ilerleyen büyük miktarda HbA içeren kalın bir band görülmüştür (Şekil 10)

Şekil 11. da yapılmış olan bazik agaroz elektroforezin de, 5 ayrı numune yan yana yürütülmüştür. Sonraki beş numune ilklerin tekrarı olacak şekilde kuyulara yüklenmiş ve elektroforez sonucunda da aynı yerde bant vermişlerdir. İlk bakışta 3. ve 5. hastalarda artan HbF değeri göze çarpmıştır.



Şekil 11. Bazık agaroz elektroforezi

Daha sonra incelendiğın de 2. kuyuya daha önce asidik elektroforezde HbS bandı ile aynı yerde bant veren numune yüklendiğinde elektroforez sonucunda bantın yok olduğu görülmüş ve HbD içerdiği anlaşılmıştır. 5. kuyudaki numunede HbA bandının yanı sıra HbS bandı olduğu da görülmüştür. 3 numaralı kuyudaki numunenin ise HbA bandının yanı sıra HbA dan daha hızlı göç eden başka bir banda sahip olduğu anlaşılmıştır. Yapılan incelemeler ve daha sonra kullanılan hemoglobin standartları sayesinde bu hemoglobin bandının anormal hemoglobinlerden biri olan HbN-Baltimora ait olduğu anlaşılmıştır.

4. Tartışma ve Sonuç

Türkiye'de çok sayıda Hb varyantının görülmesi, Anadolu nun yıllar boyunca çok çeşitli ırk ve kültürlerin yaşadığı göç yollarının üzerinde olması ve akraba evliliklerinden kaynaklanmaktadır. Türkiye'de yapılan her beş evlilikten biri akraba evliliğidir (%21.7) ve bunların %70'i kuzenler arasında gerçekleşmektedir. Bilindiği gibi akraba evlilikleri nadir görülen genetik geçişli hastalıkların toplumdaki sıklığını artırmaktadır [31]. Erzurum ili ve çevresinin de bu geçiş yolları üzerinde olması ve daha önce böyle bir araştırma yapılmamış olmasından dolayı bu tür bir çalışma yapmaya karar verilmiştir.

Yapılan tüm hemoglobin elektroforezlerinin sonucunda Erzurum ve çevresinde anormal hemoglobin türlerinden HbD, HbS, HbWood, HbMalmo ve HbN-Baltimora'un var olduğu anlaşılmıştır. Çalışmamızı sürdürdüğümüz 30.12.2004–23.06.2005 tarihleri arasında aldığımız kan numuneleri üzerinde yaptığımız incelemeler sonunda Erzurum ili ve çevresinde anormal hemoglobin türleri üzerine kapsamlı bir araştırma yapılmış ve konu ile ilgili bulgular çalışmada sunulmuştur.

İncelemeler sonucun da hemoglobin elektroforezlerinin herhangi biri ile tüm Hb varyantlarının belirlenemeyeceği anlaşılmış ve hemoglobin elektroforezleri kombine

olarak kullanılmıştır. Yapılan hemoglobin elektroforezlerin sonucunda, anormal hemoglobin türlerinin HbD, HbS, HbWood, HbMalmo ve HbN-Baltimora un yöremizde var olduğu anlaşılmış ve rastlanma sıklığının %0.20 olduğu hesaplanmıştır. Bu oranın Çukurova bölgesine kıyasla oldukça düşük olduğu göze çarpmıştır. Çalışma sonucunda % 0.057 oranında HbD türü %0.028 oranında HbAS türü, %0.028 HbS türünde anormal hemoglobine rastlanmıştır. Nadir rastlanan anormal hemoglobin türlerinden %0.028 HbN-Baltimor, %0.028 HbWood ve %0.028 HbMalmo tespit edilmiştir.

5. Teşekkür

Yapılan bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığınca Desteklenen BAP- 2004-170 nolu araştırma projesi olup, desteklerinden dolayı Atatürk Üniversitesine, Bilimsel katkılarında dolayı sayın Prof. Dr. M. Akif Çürük'e; Kan temini konusunda yardımlarını aldığımız, Prof. Dr. Mehmet Gündoğdu'ya ve AÇSAP (Ana Çocuk Sağlığı-Aile Planlaması Merkezi) Erzurum Müdürlüğü'ne teşekkür ederiz.

6. Kaynaklar

- [1] Wheeler R., 2007. Wikipedia, ÖzgürAnsiklopedi wikipedia.org/w/index.php?title= Hemoglobine erişim 8.08.2007.
- [2] Dönbak L., 2005. İnsan Hemoglobin (Hb) Varvariantları, *KSÜ. Fen Mühendislik Dergisi*, 8(2): 13-22.
- [3] Huisman T.H.J. 1993. The Structure and Function of Normal and Abnormal Hemoglobins, *Baillière's Clinical Haematology*, 6: 1-30.
- [4] Lukens J.N., Lee G.R. 1993. The Abnormal Hemoglobins, *Wintrobe's Clinical Hematology, Lea and Febiger Com., Pennsylvania*, Ed. Lee, G.R., Bithell, C.T., Foerster, J., Athens, J.W., Wkens, J.N). p. 43.
- [5] Huisman T.H.J. 1995. Human Hemoglobin. Blod Disease of Infancy and Childhood, *Mosby-Year Book. Inc., St Louis*: Ed. Miller, D.R., Baehner, R.L.7.th ed., p. 85.
- [6] Tokullugil A., Dirican M., Ulukaya E. (Çev. Eds.) 1997. Biyokimya, *Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul*, (Champe, P.C., Harvey, R.A. 1994. Biochemistry.) pp. 100-210
- [7] Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Radwell V.W. 1988. Harper's Biochemistry. *21.th ed., Long Medical Book, London*. pp. 57-83.
- [8] Altan N. 2000. Biyokimya. Olgu Sunumlu Yaklaşım, *Palme Yayıncılık*, Ankara. pp. 1-30.
- [9] Bunn H.F., Forget B.G. 1986. Hemoglobin: Molecular, Genetic, and Clinical Aspects. W.B. *Saunders Com. Philadelphia* .pp. 60-90.
- [10] Flint, J., Harding, R.M., Boyce, A.J., Cleg, J.B. 1998. The Population Genetics of The Haemoglobinopathies, *Baillière's Clinical Haematology*, 11: 1-51.
- [11] Başak A.N., 2005. Talasemi ve Moleküler genetiği, Moleküler hematoloji ve sitogenetik alt komitesi. Temel moleküler hematoloji kursu notları. pp. 25-38.
- [12] Öner C. (Çev. Ed.) 2002. Klug, S., Cummings, M. R. *Genetik Kavramlar. Palme Yayıncılık*, Ankara. pp. 55-70
- [13] Cavalli-Sforza L., Menozzi P., Piazza A. 1996. The History and Geography of Human Genes, *University Pres, Princeton*. p. 276.
- [14] Flint J., Harding R.M., Boyce A.J., Cleg J.B. 1998. The Population Genetics of The Haemoglobinopathies. *Baillière's Clinical Haematology*, 11: 1-51.
- [15] Huisman T.H.J. 1986. The Hemoglobinopathies. *Churchill Livingstone Com., Edinburgh*. pp. 47-70.
- [16] Heldlund B. 1980. Hemoglobins of Human Embryos, Fetuses and Neonates. In: Fairbanks VF, ed. Hemoglobinopaties and talasemias. *New York: Brian C Decker*, pp. 14-17.
- [17] Anonim. 2007(a). Anormal hemogloninler sayfasından alınmıştır. www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap6.asp erişim: 12/05/2005.

- [18] Huisman T.H.J., Jonxis J.H.P., 1977. The hemoglobinopathies, Techniques of Identification, *NewYork, Marcel Dekker Inc.* pp. 24-50.
- [19] Güngör A.A., Erzurum ve Çevresinde Hemoglobinopatilerin Anormalhemoglobinler ve Talasemi Mutasyonlarının Moleküler Tekniklerle Belirlenmesi, Doktora tezi, Danışmanı, Prof.Dr. Nazan Demir, 2008, Erzurum. pp. 69-80.
- [20] Basset P., Beuzard Y., Garel M.C., Rosa J. 1978. Isoelectric Focusing of Human Hemoglobin: Its Application to Screening, to The Characterization of 70 Variants, and to The Study of Modified Fractions of Normal Hemoglobins. *Blood*, 51: 971-982.
- [21] Winter W.P., Youdh J. 1983. Interaction of Human Hemoglobin and Its Variants With Agar. *Science*, 221: 175-178.
- [22] Kutlar F., Kutlar A., Nuguid E., Prechal J., Huismann T.H.J. 1993. Use of HPLC Methodology for the Characterization of Combinations of the Common β - Chain Variants HbS, C and O-Arab, and The α - Chain. *Hemoglobin*, 17: 55-66.
- [23] Riou J., Godart C., Hurtrel D., Mathis M., Bimet C., Bardakdjian-Michau J., Prehu C., Wajcman H., Galacteros F. 1997. Evaluation of Cation-Exchange High-Performance Liquid-Chromatography for Presumptive Identification of Hemoglobin Variants. *Journal Clinical Chemistry*, 43: 34-39.
- [24] Wajcman H., Bardakdjian J., Ducrocq R. 1993. Structural Charecterization of Abnormal Hemoglobins from Dried Blood Specimens in a Neonatal Screening Program. *Annales de Biologie Clinique*, 50: 867-870.
- [25] Bain J.B., Ames R.J., Bareford D., Champinon C., Davies S.C., Old J.M., Wild B.J. 1998. The Laboratory Diagnosis of Haemoglobinopathies. *British Journal of Haematology*, 101: 783-792.
- [26] Hardison R.C., Chui D.H.K., Giardine B., Riemer C., Patrinos G.P., Anagnou N., Miller W., Wajcman H. 2002. Hb Var. A Relational Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemia Mutations at the Globin Gene Server. *Human Mutation*, 19: 225-233.
- [27] Zeren F., Genç A., Çürük M.A., 2007. Preliminary data on preimplantation genetic diagnosis for hemoglobinopathies in Turkey, *Hemoglobin*, 31: 273-277.
- [28] Kayrın L., Aksoy K., Tuli A., Çürük MA., Attila G. 2003. Tanıda DNA teknikleri. Adana, 6. Biyokimya Yaz Okulu. p. 124.
- [29] Wiggers T. 2005. The Hemoglobinopathies And Thalassemias MS, H(ASCP) January, merk micromedex.com /bmb/bmptables print. Asp? Page.HGBTHAL.DOC erişim: 26.03.2011.
- [30] Anonim, 2005. European Molecular Genetics Quality Networkweb site <http://www.emqn.org/emqn.php>. Prevent_Book_(layout)_v15 erişim: 12/05/2005
- [31] Anonim, 2007(c). GATA tıbbi genetik anabilim dalı http://www.gata.edu.tr/temelbilimler/genetik/akraba_evlilikleri.htmerişim 28.11.2007

Yaşar Demir e-posta: yasdemi@atauni.edu.tr

Azize Alaylı Güngör e-posta: aalaylister@gmail.com