

Hemoglobinlerin Tanısında İzoelektrik Fokus (İEF)

Uz.Dr.Duran CANATAN*

Globin sentezi ve yapısında oluşan kalıtsal bozukluklara hemoglobinopati denir. Pauling ve arkadaşlarının 1949'da ilk defa HbS'i tanımlamalarından bu yana 500 üzerinde anormal Hemoglobin (Hb) tanımlanmıştır. Anormal Hb'lerin çoğu, değişik globin zincirlerinde tek aminoasit yer değişimi ile oluşur, geri kalanlarda aminoasit delesyonu, füzyon veya uzamış Hb'ler sorumlu tutulur (1).

Anormal hemoglobinlerin tanısında, rutin hematolojik incelemelerden sonra en sık kullanılan metod sellüloz asetat (TEB.pH 8.408.6) elektroforezidir. Pahalı olmayan, hızlı ve güvenilir bir methoddur. Fakat bazı hemoglobin (Hb) varyantlarını özellikle Hb S'in Hb D'den ayırımında, Hb S benzeri varyantların ve sessiz Hb varyantlarının ayırımında yeterli değildir (2). Sellüloz asetat ile tanı konulamaz ise, pH ve tampon değişikliği yapılır veya sitrat agar (pH 6.0-6.2) elektroforez kullanılır (2,3,4,5). Yine tanı konulamaz ise yüksek performanslı likid kromatografisi (6) veya radyoaktif globin zincir kromatografisiyle (7) veya moleküler düzeyde incelemelerle tanı konulur (1).

Anormal Hb tanısında hızlı, güvenilir pahalı olmayan ince tabakalı izoelektrik fokus (İEF) bir başka yöntemdir. Bu yöntemle 70 varyant ayırt edilebilir (3,4,7,8,9). pH 6-8 arasındaki sabit bir ortamda her Hb, 0.01 pH noktalarında kendi izoelektrik noktasında hareket eder. Ya poliakrilamid jel veya hazır agar jel kullanılır (3,8).

Bu yazıda izoelektrik fokus tekniği literatür bilgileri ışığı altında gözden geçirildi.

MATERYAL VE METODLAR

A. İEF Prensipleri

İEF tekniğinde, sabit ve yeterli bir pH ya ve hem bazik, hem asidik reaksiyona girebilen yani amfoterik moleküllere gereksinim vardır. pH 6-8 arasında 0.01 pH ünitelerine kadar moleküller ayırılabilir yani yüksek

rezolüsyon gösterir. Aynı şekilde Hb'lerde bu amfoterik moleküllerle 0.01 pH noktalarında kendi izoelektrik noktalarına göçederler. Hemolizat örneği bu sabit pH ortamına konunca Hb'ler elektrik akımı ile kendi izoelektrik noktalarına varana kadar anoddan katoda doğru hareket ederler (3,7,8).

Hazır Hb kitinde (Resol ve Hb. ISOLAB İNC.) bulunan pH 6-8'de, 1mm kalınlığında agaroz jelde amfoterik denenen amfoterik yapıda moleküller. Hb örneklerini birbirinden ayırıyor. Amfoterikler değişik izoelektrik noktalara hareket eden düşük molekül ağırlıklı amfoterik moleküllerdir. Bu moleküller sabit pH da, jel üstünde kendi izoelektrik noktalarına hareket ederler. Hb varyantları da aynı şekilde beraber göçecek ve kendi izoelektrik noktalarına varana kadar ilerleyecektir. Elektroforez tamamlandıktan sonra Hb varyantları o-Dianisidine boyası ile görünür hale getirilir. o-Dianisidine H₂O₂ ortamında okside olur ve bu reaksiyon Hb oranına göre bir insolubl çöküntü oluşturur (3,7,8).

B. Gerekli Malzemeler

1. "Resol ve Hb" Hb tarama kiti (İsolab Inc.): Kit içinde bulunan malzemeler:

- Agaroz İEF Jeli
- Anod solüsyonu
- Katod solüsyonu
- Hb elüsyon solüsyonu
- Jel boyası
- Boya tamponu
- Hidrojen peroksit
- İEF elektrod fitilleri
- Blotting kağıdı
- Örnek uygulama template

2. Multiphor II horizontal elektroforez uniti

3. Elektrik güç aleti

4. Mikroşırınga

5. Pipetler (5ml'lik)

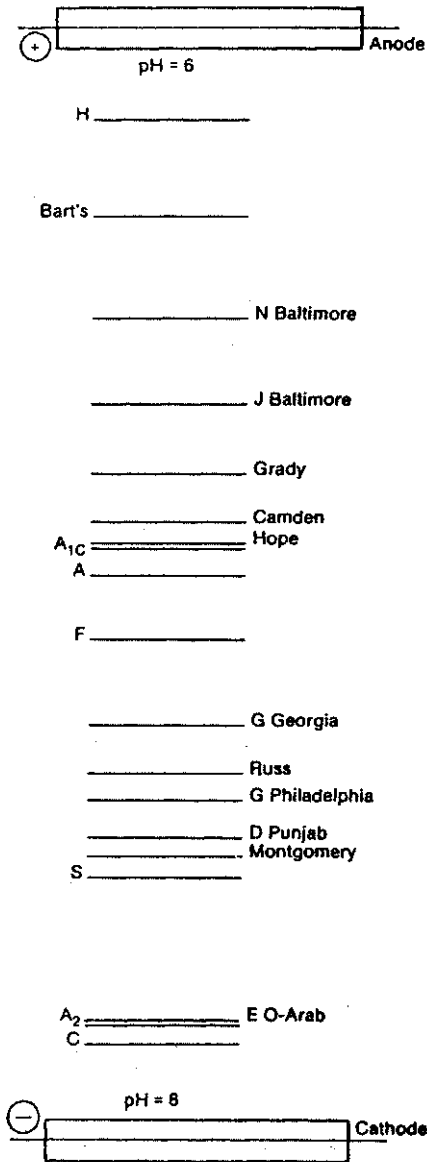
* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Pediatrik Hematoloji BD Dikimevi, ANKARA

6. Fırın (60-70 C'lik)
7. Jel boyama tepsi
8. Dansitometre
9. Kontrol hb örnekleri
- C. Yöntem (8)

1. *Hemolizat hazırlanması:* 200 ul tam kana 25 ul Hb elüsyon solüsyonu eklenir. 10 dk beklenir, 20 ug/ul Hb konsantrasyonu elde edilir.

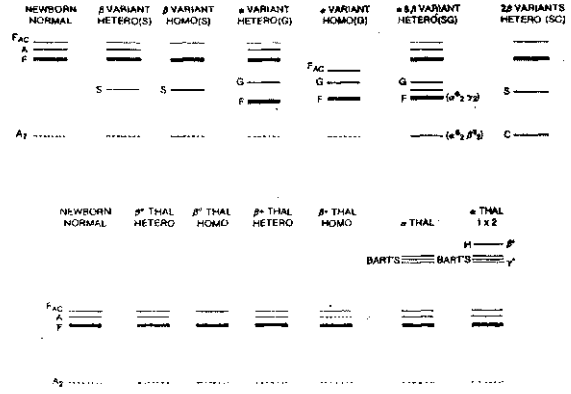
2. *Jel hazırlanması:*

- a) Jel konacak zemin 5-10 C soğutulur.
- b) Jelin agar kısmı üste gelecek şekilde konur.
- c) Üzerine blotting kağıdı konur.



Şekil 1. Erişkinlerde İEF yöntemi ile bantların diagramı

CANATAN
HEMOGLOBİNLERİN TANISINDA İZOELEKTRİK FOKUS (İEF)



Şekil 2. Yenidoğanda İEF yöntemi ile bantların diagramı

- d) 5ml %50 etilalkol hava kabarcığı yapmada jele dökülür
- e) 5 ml Anod solüsyonu fitile emdirilir ve (-) kısma konur
- f) 5 ml Katod solüsyonu fitile emdirilir ve (+) kısma konur.
- g) Örnek uygulanacak template anod fitili önüne konur.

3. *Örnekleri Uygulama:* 3 ml hemolizat örneği template oyuklarına konur. 5,15,31 numaralara kontrol Hb A, F, S, C konur.

4. *Elektroforezis:* Elektrotlar güç kaynağına takılır. 30 watt, 90 dk uygulanır. Adült elektroforezinde HbA_{1c} HbA'dan, yenidoğan elektroforezinde HbFAC, HbA'dan ayrılan kadar yürütülür.

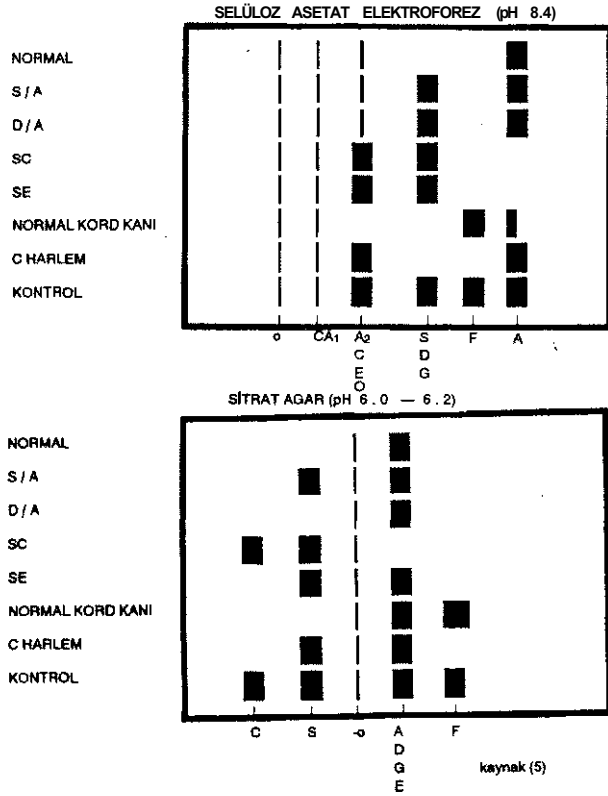
5. *F/irse efme ve boyama:*

- a) Template çıkarılır.
- b) Jel 100 MI % 10 TCA (Triklor asetik asitte) 10 dk bekletilir.
- c) 15 dk. 500 ml distile suda bekletilir.
- d) Boya solüsyonu hazırlanır
20 ml boya tamponu
36 ml Jel boyası
200 ml distile suya tamamlanır.
4 ml H₂O₂ eklenir.
- e) Jel bu solüsyonda 15 dk boyanır.
- f) 60 dk 1 lt distile suda birkaç defa yıkanır.
- g) Jel boyadan çıkarılır, hemen dansitometrede 540 nm de okunur, veya 60-70C'de dk kurutulur kantitatif ölçümü yapılır.

6. Sonuçlar değerlendirilir. Şekil 1'de erişkinlerde, Şekil 2'de yenidoğanda İEF'da Hb varyantlarının diagramı görülmektedir.

TARTIŞMA

İEF anormal Hb varyantlarının tanısında hassas ve güvenilir, bir yöntemdir, yaklaşık 70 Hb varyantını



Şekil 3. Sellüloz asetat (pH 8.4) ve sitrat agar (pH 6.0-6.2) Elektrofrezinde hemoglobinlerin karşılaştırılması

tanımak olasıdır. Dünyada en sık görülen Hb S, D, C ve E gibi anormal Hb'leri ayırt etme avantajı vardır. Sellüloz asetat (pH 8.4) ve sitrat agar (pH 6.0-6.2) ancak beraber kullanıldıklarında bu varyantlar tanınabilir (2,3,4,5,6,7,9) (Şekil 3).

Hb S benzeri varyantları olan HbG Galveston, HbG Norfolk, ve Hb Styanleyville'nin, ayrıca HbD'nin ve Hb Korlu Bu'nun HbS'den ayırımında İEF kullanılır (3,49).

Beta zincirinde glisin yerine aspartik asit gelmesi ile oluşan Hb J Baltimore, J Calabria, Fannin Lubbock ve Hope gibi sessiz varyantları diğer elektrofrez yöntemleri tanımak mümkün değildir, İEF'da ise mümkündür (3,49).

Beta zincirinde glisin yerine aspartik asit gelmesi ile oluşan Hb J Baltimore, J Calabria, Fannin Lubbock ve Hope gibi sessiz varyantları diğer elektrofrez yöntemleri tanımak mümkün değildir. İEF'da ise mümkündür (3,4,9).

Stabil olmayan (unstable) Hb'lerden Hb Bethesda, Brigham, Hammersmith, Köln ve St.Etienne İEF'da Hb A'dan kolaylıkla ayrılarak tanı konur (3).

Bu varyantlar dışında İEF ile, glikozlu HbA (Hba-c) Hb A'dan ve asetilli HbF olan Hb FAC, HbF'den ayrılabilir. HbAıc diabetes mellitusta artar, HbA'ya çok yakındır. Kolon kromatografisi ile net olarak ayırt edilir. HbFAC, yenidoğanlarda HbF'in %10'nu oluşturur. Yeni doğanlarda homozigot HbS'l, heterozigot formundan (S/A) sellüloz asetat ile ayırmakta zorluk vardır. Çünkü HbFAC ve HbA beraber hareket ederler. Bu ayırım agar elektrofrez ile yapılabilir. İEF HbF, HbA ve HbFAC ayırarak tanıda kolaylık sağlar (3,4,7,9,10,11).

Dubart ve arkadaşları (10), hemoglobinopatilerin prenatal tanısında İEF ve radyoaktif globin zincir kromatografisi ile karşılaştırılmalı bir çalışmada 22 hastaya (11'i homozigot HbS ve 11'i homozigot thalassemia) her iki yöntemi uygulayarak, aynı sonuçları elde ediyorlar. Fötuslar homozigot olduğu için medikal abortus yapılıyor, fötal kan örnekleri tekrar İEF ile inceleniyor ve aynı sonuçlar alınıyor. İEF, radyoaktif işaretli kromatografiye göre kısa sürede sonuçlanan, teknik açıdan kolay, birçok örneğin aynı zamanda yapıldığı, radyo aktivitesi olmayan yöntemdir.

İEF, diğer tekniklere göre birkaç avantajı vardır.

1. Hassas olması nedeni ile sellüloz asetatta aynı bantları veren Hb Galvestone ve Hb Coughatta veya HbS, Hb Lepore ve Hb Osu Christianborg'ı ayırır.

2. Sessiz varyant olarak bilinen Hb Saki, Hb San Diego, Hb Creteil, Hb Strasbourg veya Hb Malmö gibi varyantlarını ayırır.

3. HbS benzeri varyantları ayırmak için sellüloz asetat ve sitrat ağarı beraber yapmak yerine tek başına İEF yapmak yeterlidir.

4. Klinik olarak önemli Hb'leri (Hb, S, C, D, E), HbS benzeri varyantları, stabil olmayan Hb'leri ve sessiz Hb varyantları tanımada İEF yöntemi yeterlidir. Ayrıca kısa sürede yapılması, jelin hazır olması ve toksik olmaması önemli avantajlarıdır (3,4,5,7,9,10).

KAYNAKLAR

1. Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG. The hemoglobinopathies. In: Sciver CR, Beaudet AL, Sly WS and Walle D, eds. The metabolic basis of inherited disease. McGraw Hill Information Series Company, 1989: 2281-2339.
2. Schneider RG. Life among the hemoglobins. Acta Haemat 1987; 78:75-9.
3. Basset P, Beuzard Y, Garel Mc and Rosa J. Isoelectric Focusing of Human Hemoglobins: Its application to screening, to the characterization of 70 variants, and to the study of modified fractions of normal hemoglobins. Blood 1978;5(5):971-81.
4. Black J. Isoelectric focusing in agarose gel for detection and identification of hemoglobin variants. Hemoglobin 1984; 8 (2): 117-27.

5. Schmid RM and Brosious EM. Basic laboratory methods of hemoglobinopathy detection. Georgia, Atlanta 1976; 98.
6. Huisman THJ and Wilson JB. High performance liquid chromatographic methods used in the analyses of hemoglobin abnormalities. In: Aksoy M and Huisman THJ, eds. North-Cyprus symposium on abnormal hemoglobins and thalassemia. TÜBİTAK publications No: 605, Ankara 1984: 22-39.
7. Dubart A, Goossens M, Beuzard Y, Monplaisir N, Testa U, Basset P and Rose J. Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies: Comparison of the results obtained by isoelectric focusing of hemoglobins and by chromatography of radioactive globin chains. Blood 1980; 56(6): 1092-9.
8. Resolve-Hb. Instructions for Use. Isolab Inc. Drawer 4350 Akron, Ohio USA 1989; March 1:1-12.
9. Black J. An isoelectric focusing method to detect hemoglobin variants in newborn blood samples including the beta-thalassemsias, Hemoglobin 1989; 12(5-6):681-9
10. Galacteros F, Kleman K, Caburi-Martin J, Beuzard Y, Rosa J, Lubin B. Cord blood screening for hemoglobin abnormalities by thin layer isoelectric focusing. Blood 1980; 56:1068.
11. Beris P and Darbellay R. Diagnosis of hemoglobinopathies. Labolife. Societe Suisse d'Hematologie 1992;4:14-8.