

## HEMOGLOBİN A<sub>2</sub> ÖLÇÜMÜNDE ÜÇ YÖNTEMİN (HPLC, DE-52 MİKROKROMATOĞRAFI, ISOLAB HbA<sub>2</sub> KİTİ) KARŞILAŞTIRILMASI

Gülen ATTİLA<sup>1</sup>, Şule MENZİLETOĞLU YILDIZ<sup>1</sup>, Refik BURGUT<sup>2</sup>,  
Güneş YÜREGİR<sup>3</sup>, Kıymet AKSOY<sup>1</sup>

### COMPARISON OF THREE METHODS (HPLC, DE-52 MICROCHROMATOGRAPHY AND ISOLAB Hb-A<sub>2</sub> kit) IN HbA<sub>2</sub> MEASUREMENT

**Summary:** *Thalassemias are the most common genetic disorders worldwide. It is the result of the deficient synthesis or the absence of one or more globin chain of the normal human hemoglobins. Prenatal diagnosis is the most effective way in the eradication of these diseases. Increased levels of HbA<sub>2</sub> (3.5 to 8 %) is the most consistent feature of heterozygous b-thalassemia. Thus the accurate measurement of HbA<sub>2</sub> is very important in the identification of b-thalassemia carriers.*

*In this study, we measured the HbA<sub>2</sub> levels of 40 subjects by HPLC, DE-52 microcolumn chromatography and Isolab HbA<sub>2</sub> kit methods.*

*Our results showed that these methods are all giving reliable and accurate results and each laboratory can safely choose any of them according to their condition and requirements.*

**Key Words:** *Thalassemia, HbA<sub>2</sub>, HPLC, microcolumn chromatography*

**Özet:** *Talasemiler dünyada en sık görülen genetik bozukluklar olup hemoglobin içeriğinde bulunan globin zincirlerinin bir ya da daha fazlasının sentezindeki azalma veya tamamen yokluğuna bağlı olarak gelişirler. Bu hastalıkların eradikasyonunda doğum öncesi tanı ile hasta bireylerin doğumunun önlenmesi günümüzde en geçerli yoldur. Bu nedenle talasemi taşıyıcılarının saptanması son derece önemlidir. b-talasemi taşıyıcılığının tanısında çok büyük öneme sahip olan Hb A<sub>2</sub> düzeylerinin yüksekliğinin güvenilir yöntemlerle ölçülmesi gerekir. Bu çalışmada 40 olguda HbA<sub>2</sub> düzeyleri HPLC, DE-52 mikrokromatografi ve Isolab HbA<sub>2</sub> kiti kullanılarak ölçüldü. Sonuç olarak her üç yönteminde güvenilir olduğu ve laboratuvarında hangi yöntemin seçileceğine laboratuvar koşullarına bakılarak karar verilmesi gerektiği kanısına varılmıştır.*

**Anahtar Kelimeler:** *Talasemi, hemoglobin A<sub>2</sub>, HPLC, mikrokromatografi*

### GİRİŞ

Talasemiler, dünyada en sık görülen kalıtsal bozukluklar olup, hemoglobin içeriğinde bulunan globin zincirlerinin bir ya da daha fazlasının sentezindeki azalma veya tamamen yokluğuna bağlı olarak gelişirler. a ve b-zincir eksikliğine bağlı olarak gelişen a ve b-talasemilerin en sık gözlemlendiği coğrafi bölgeler, Akdeniz, Orta Asya ve Afrika'nın bazı bölümleridir<sup>(1-3)</sup>.

Sağlıklı bir yetişkinde %96-98 oranında erişkin hemoglobini olan hemoglobin A(a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>)'nin yanı sıra minör hemoglobinlerden hemoglobin A<sub>2</sub>(HbA<sub>2</sub>, a<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>) %2,5-3,5 oranında ve hemoglobin F(HbF, a<sub>2</sub>g<sub>2</sub>) ise %1'in altında bulunur. HbA<sub>2</sub> molekülü gebeliğin 35. haftasından itibaren sentezlenmeye başlar ve kordon kanında eser miktarda bulunur. Doğumda %0,2-0,3 oranında olan HbA<sub>2</sub> erişkin düzeylerine do-



ğumdan sonra 24. ayda ulaşır, normal yaşam süresince de %3,5'un altında bulunur<sup>(4)</sup>.

Fizyolojik olarak fazla bir önem taşımayan HbA2 molekülü klinikte b-talasemi taşıyıcılığının belirlenmesinde çok büyük öneme sahiptir. Taşıyıcıların belirlenmesi bu hastalıkların prenatal tanı yolu ile eradikasyonu için son derece gereklidir. b-talasemi taşıyıcılarında HbA2 düzeyi genellikle %3,5-8 arasında lunur<sup>(5)</sup>. Bunun yanı sıra a-talasemili olgularda ise HbA2 düzeyinde azalma gözlenir<sup>(6)</sup>. HbA2 varlığı hemoglobin elektroforezi yöntemi ile kalitatif olarak saptanabilir<sup>(7)</sup>. Kantitatif HbA2 ölçümleri ise iyon değiştirici kromatografi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemleri ile ölçülebilir<sup>(8)</sup>. Günümüzde HbA2 tayininde DE-52 reçine kullanılarak yapılan mikrokolon kromatografi yöntemi ile güvenilir sonuçlar elde edilmektedir. Ancak hemoglobin elektroforezi ve mikrokromatografi yöntemlerinin de deney süresinin uzunluğu, özenli ve iyi bir manipülasyon gerektirmeleri ayrıca sonuçların metodolojik faktörlerden oldukça etkilenmesi gibi olumsuzlukları vardır<sup>(2)</sup>. Ayrıca bazı anormal hemoglobinlerin (HbS, HbC ve HbE) varlığında bu yöntemler interferens gösterir. Bunlara ek olarak bu yöntemlerle bazı anormal hemoglobinler HbA2'den tam olarak ayrıştırılamazlar<sup>(9)</sup>. Katyon değiştirici HPLC yöntemi ile HbA2 yanı sıra diğer tüm hemoglobin fraksiyonlarının kalitatif ve kantitatif olarak güvenilir bir şekilde ayrıştırılması tek bir analizle mümkün olmaktadır HPLC yönteminde HbA2 ölçümleri HbE varlığı dışında doğru ve güvenilir olarak yapılmaktadır. HbE varlığında ise HbA2 tam olarak ayrıştırılamadığı için doğru kantitasyon yapılamaz<sup>(10-12)</sup>.

b-talasemi taşıyıcılarının saptanmasında en değerli tanı kriterlerinden biri olan HbA2 düzeyindeki artışın özellikle b-talasemi taşıyıcılığının yaygın olduğu bölgelerde doğru ve güvenilir bir şekilde saptanması son derece önemlidir. Bu çalışmada; HbA2 ölçümünde kullanılan üç ayrı yöntemin (HPLC, DE-52 reçine ve Isolab HbA2 kiti) karşılaştırılması ve elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilip

HbA2 düzeylerinin ölçümünde en güvenilir, tekrarlanabilir, çabuk ve ekonomik olan yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma kapsamına tarama çalışmalarından elde edilen EDTA'lı kan örneklerinden rastgele 40 örnek alınmıştır. Hematolojik parametreler Coulter Counter T 890' da çalışıldıktan sonra kan örnekleri soğuk %0,9 serum fizyolojik ile üç kez yıkanmış, eşit miktarlarda saf su ile hemoliz edilerek örneklerin hemolizat hemoglobin konsantrasyonları 100mg olacak şekilde ayarlanır ve yüksek devirde santrifüj edilerek hücresel artıklar uzaklaştırılmıştır. Hb elektroforezleri pH 8,6'da Tris-EDTA-Borat tamponu kullanılarak sellüloz asetat striplerle Kohn yöntemine göre yapılmıştır<sup>(13)</sup>.

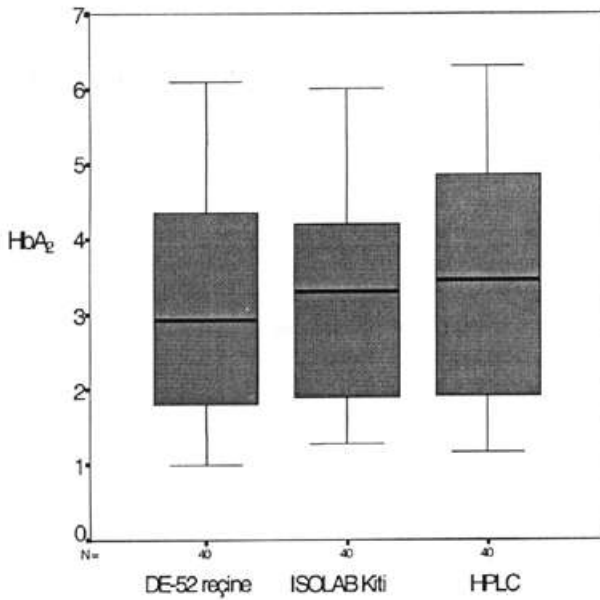
HbA2 ölçümlerinde mikrokolon kromatografi ticari kitleri (Isolab HbA2 kiti) kullanılmış ve yöntem üreticilerin önerdiği şekilde kolona uygulanmıştır. Elde edilen süzüntülerin optik dansiteleri 415nm'de ölçülmüştür. DE-52 mikrokolon kromatografisiyle yapılan HbA2 ölçümleri ise pH 7,25'da Glisin-KCN geliştiricileri kullanılarak, Huisman ve arkadaşları tarafından tanımlanan yöntemine göre yapılmış ve optik dansiteler 415nm'de ölçülmüştür<sup>(11)</sup>.

HPLC (Jasco PU 980) ile HbA2 ölçümünde katyon değiştirici kolon kullanılmıştır. Bu amaca yönelik olarak poliaspartat kaplı Poly Cat-A kolonu (200X4,6mm olup 5mikrometre partikül büyüklüğüne sahip) kullanılmıştır. Kolon bis tris-amonyum asetat-sodyum asetat-KCN (pH 7) ve Bis Tris-Amonyum asetat-KCN (pH 6,47) tamponları ile yıkanarak toplanan eluvatların optik dansiteleri cihaza bağlı spektrofotometrede (Jasco UV 970) 415 nm'de ölçülmüştür.

## BULGULAR

Olguların üç ayrı yöntem ile elde edilen Hb A2 düzeyleri istatistiksel olarak ANOVA tek yönlü varyans analizleri ile karşılaştırılmıştır. ANOVA tek yönlü varyans analizlerine göre yöntemler arasında

doğrusal bir ilişki bulunamamıştır<sup>(14)</sup>. Bu sonuçlara bakılarak her üç yöntemde kullanılabilir olduğu ve her laboratuvarın kendi koşullarına uygun olanı seçmesi gerektiği düşünülmüştür (Şekil 1). Çalışmada ayrıca her bir yöntem için farklı bir örnek 10 kez çalışılarak yöntemlerin ortalamaları (X), standart sapmaları (SD) ve varyasyon katsayıları (CV) hesaplanarak güvenilirlik ve tekrarlanabilirlikleri araştırılmıştır (Tablo I).



Şekil 1. Üç yöntemle elde edilen değerlerin dağılımı

Tablo I. Yöntemlere ait ortalamalar, standart sapmalar ve varyasyon katsayıları

Yöntemler	n	X±SD	%CV
Isolab HbA <sub>2</sub> kiti	40	3,1±0,22	7.1
DE-52 reçine	40	3,2±0,14	4.4
HPLC	40	3,4±0,16	4.7

## TARTIŞMA

Globin zincir sentezi ya da yapısındaki bir bozukluğa bağlı olarak gelişen talasemiler ve hemoglobopatiler dünyada en sık görülen kalıtsal hastalıklar olup çok önemli sağlık sorunları oluşturmaktadır<sup>(3)</sup>. b-talasemi taşıyıcılığında eritrosit sayısı yüksektir ve MCV<79 fl, MCH<25pg'dir. Periferik kan morfolojisi de değişir, hedef hücreler, bazofilik noktalanmalar, anizositoz ve poikilositoz gözlenir. Ayrıca b-talasemi

taşıyıcılarında HbA<sub>2</sub> yüksekliği en karakteristik bulgudur. Bu nedenle HbA<sub>2</sub> düzeylerinin güvenilir bir yöntemle ölçülmesi gerekmektedir<sup>(1)</sup>. b-talasemi taşıyıcılığı belirlenen kişiler taşıyıcı olan kişilerle evlendiklerinde hasta çocuk doğumunu önlemek amacı ile doğum öncesi tanıya gitmeleri gerekmektedir. Bu nedenle taşıyıcılığın belirlenmesi toplumda bu hastalıkların eradikasyonunda son derece önemlidir.

Bu çalışmada b-talasemi taşıyıcılığının dünyada en sık görüldüğü kuşak üzerinde yer alan Çukurova bölgesi için de çok önemli olan HbA<sub>2</sub> ölçümleri için en güvenilir yöntemi bulmak amacı ile HbA<sub>2</sub> düzeyleri üç farklı yöntem (DE-52 reçine, Isolab HbA<sub>2</sub> kiti ve HPLC) ile ölçülmüştür.

Çalışmamız sonucunda elde edilen verilere göre DE-52 reçine mikrokromatografi, Isolab HbA<sub>2</sub> kiti ve HPLC yöntemlerinin üçü de güvenilir sonuçlar vermektedir. Yöntemleri tek tek inceleyecek olursak, DE-52 reçine mikrokromatografi yöntemi madde temininde kolaylığı, ekonomik açıdan ucuzluğu, güvenilir sonuçlar vermesi ve yeni kurulan bir laboratuvar da bile çalışma olanağı sağlaması açısından ilk seçilecek yöntemler arasında yer almaktadır. Buna karşın reçinenin dengelenmesinde ortaya çıkabilecek problemler, ısı farklılıklarına duyarlılığı, iyi bir teknisyene gerek duyulması ve deney süresinin uzunluğu gibi olumsuzluklarının da gözardı edilmemesi gerekir.

Isolab HbA<sub>2</sub> kiti güvenilir, pratik ve uygulamada kolaylığı olan bir yöntem olmasına karşın ticari kromatografi kolonlarının ülkemiz koşullarında teminindeki güçlükler ve oldukça pahalı bir yöntem oluşu gibi bazı dezavantajları vardır.

HPLC yöntemi ise tek bir analiz ile HbA<sub>2</sub> yanı sıra aynı anda HbS, HbC, HbD, HbO-Arab ve HbF'in kantitatif ve kalitatif ayrıştırılmalarını sağlamaktadır. Ayrıca mikrolitre düzeyindeki örneklerle hatta zımba büyüklüğünde filtre kağıdına emdirilip kurutulmuş kan örnekleriyle bile analizler yapılabilen ve güvenilir sonuçlar elde edilmektedir. Otomatik olarak



çalıştığı için deney süresince çalışan kişinin cihazın başında bulunması gerekmemektedir. Bu üstünlüklerinin yanı sıra oldukça pahalı olan HPLC cihazını gerektirmesi, kullanımında özel eğitilmiş personele gereksinim duyulması gibi olumsuzlukları da vardır.

Sonuç olarak çalışmamız göstermiştir ki HbA2 ölçümünde HPLC, DE-52 mikrokromatografi ve Isolab HbA2 kiti yöntemlerinin her üçü de güvenilir yöntemlerdir. Bir laboratuvarında HbA2 ölçümü için hangi yöntemin kullanılacağına laboratuvarın kendi koşulları ve ekonomik olanakları göz önüne alınarak karar verilmelidir.

#### KAYNAKLAR

1. Lukens JN. (1993) The mature erythrocyte in Wintrobe's Clinical hematology.(Eds Telen MJ) Pennsylvania, 5:101-133.
2. Bunn HF, Forget BG, Ranney HM. (1977) Hemoglobinopathies vol. XII, W.B Saunders company, Philadelphia, 1: 1-30.
3. Weatherall DJ, Clegg JB. (2001)The thalassemia syndromes Williams Hematology. (Eds Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman M.A). 4th.ed. Mc Graw-Hill, Liverpool: Blackwell: New York, 493-521.
4. Lukens JN.(1993) Blood formation in the embryo, fetus and newborn, in Wintrobe's Clinical Hematology (Eds Lee GR, BithellCT, Foerster J, Athens JW, Lukens JN) Lea and Febiger, Pennsylvania, p:81-83.
5. Bain BJ. (2001) Haemoglobinopathy Diagnosis (Haemoglobin and the genetics of haemoglobin synthesis) Blackwell: 1:1-19.
6. Bain BJ. (2001) Haemoglobinopathy Diagnosis (Laboratory Techniques for the identification of abnormalities of globin chain synthesis) Blackwell, 2:20-48.
7. Brozovic M, Henthorn F. (1994) Investigation of abnormal hemoglobins and thalassemia in practical hematology (Eds Lewis SM, Daicic JV).Churchill Livingstone, Honkong, 249-286.
8. Schroeder WA, Skelton JB, Skelton JR. (1980) Separation of hemoglobin peptides by high performance liquid chromatography (HPLC). Hemoglobin, 4:551.
9. Galanello R, Barella S, Ideo A, Gasperini D, Rosatelli C, Paderi L, Paglietti E, Sollaino C, Persue L, Loi D. (1994) Genotype of subjects with borderline hemoglobin A2 levels: implication for beta-thalassemia carrier screening. Am J Hematol 46(2) 79-81.
10. Gardiner MB, Carver J, Abraham BL, Wilson JB, Huisman THJ. (1982) Further Studies On the Quantitation of the Hemoglobins A, S,C, And F in Newborn Babies With Different Hemoglobinopathies Using High Pressure Lipuid Chromatography. Hemoglobin, 1:1-13.
11. Huisman THJ, Schroeder WA, Brodie AN, Mayson M Jakway J. (1975) Microchromatography of hemoglobins III. A simplified procedure for the determination of Hb A2. J Lab Clin Med, 86, 700-702.
12. Huisman THJ. (1993) Aplication of High Performance Liquid Choramtographic Methods (HPLC) to the study of Abnormal Hemoglobins. J Chromatogr ,144-146.
13. Kohn J. (1969) Separation of hemoglobin on Cellulose Acetate. J Clin Pathol 22:109-110.
14. SPSS Inc SPSS for Windows.Version 9,0, Chicago: SPSS INC, 2000.