

## TALASEMİ MERKEZLERİNDE TANIYA YÖNELİK KULLANILAN YÖNTEMLER

*Prof. Dr. Yeşim Aydınok*

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Hematoloji BD, İzmir  
e-mail: yesim.aydinok@ege.edu.tr

---

$\beta$  ve  $\delta\beta$  talasemi homozigot olguları veya HbH hastalığı bulunan olgular hastalığa ait semptom ve bulgular taşırken,  $\alpha$ ,  $\beta$  veya  $\delta\beta$  talasemi taşıyıcıları genellikle tarama programları ya da demire dirençli mikrositik anemi olgularının incelemesi sırasında tanınırlar.

Homozigot ve bileşik heterozigot  $\beta$  Talasemi

Homozigot talasemi olguları, yaşamin genellikle ilk yılı içinde solukluk, iştahsızlık, kilo alamama, hepatosplenomegali ve yüz kemiklerinde alın çıkıklığı, burun kökü basıklığı gibi morfolojik değişiklikler ile klinik bulgularını verirler.

Hemen daima şiddetli hipokrom (ortalama eritrosit hemoglobin, OEH, MCH düşüklüğü) ve mikrositer (ortalama eritrosit volümü, OEV, MCV düşüklüğü) anemiye, RDW artışı ve periferik kan yaymasında anizositoz ve poikilositoz yanısıra çok sayıda normoblast eşlik etmektedir. Retikulosit sayısı artmıştır. Hemolitik aneminin diğer laboratuvar bulguları; laktik dehidrogenaz (LDH) artışı, indirek hiperbilirubinemi, idrarda ürobilinojen artışı ve haptogloblin düzeyinde azalma bulunmaktadır.

Bu olgularda, transfüzyon öncesinde yapılan hemoglobin (Hb) elektroforezde, HbA'nın hiç olmaması ve mevcut Hb'nin tama yakınının HbF olması, homozigot  $\beta$  0 talasemi; HbF yanısıra, %10-20 kadar da HbA varlığı homozigot  $\beta+$  talasemi tanısı koydurur.

HbF seviyelerinin kordon kanında %90 civarında olup, 3. ayda total Hb'nin yaklaşık %50'nin HbF olduğu ve bu seviyenin 6.ay civarında %10 ve nihayet 1 yaştan sonra %2'nin altına ineceği, bazen normal seviyelere ulaşmanın (<2%) 2 yaşa kadar gecikebileceği akılda tutulmalıdır (Tablo 1).

Tablo 1. Yaşamın ilk yılında HbF (%) düzeyleri

Yaş	Ortalama	$\pm 2SD$	Normal aralık
1-7 g	74.7	5.4	61 – 79.6
2hf.	74.9	5.7	66 – 88.5
1 ay	60.2	6.3	45.7 – 67.3
2 ay	45.6	10.1	29.4 – 60.8
3 ay	26.6	14.5	14.8 – 55.9
4 ay	17.7	6.1	9.4 – 28.5
5 ay	10.4	6.7	2.3 – 22.4
6 ay	6.5	3.0	2.7 – 13.0
8 ay	5.1	3.6	2.3 – 11.9
10 ay	2.1	0.7	1.5 – 3.5
12 ay	2.6	1.5	1.3 – 5.0
1 -14 y ve erişkin	0.6	0.4	

Shröter W, Natz C. *Helv. Paediatr Acta* 1981, 36: 519-525

Homozigot  $\delta\beta$  talasemi, Hemoglobin Lepore ve Herediter Persistan Fetal Hemoglobinemi (HPFH)

$\delta\beta$  talasemiler,  $\delta$  ve  $\beta$  füzyon geni (Hb Lepore) veya  $\epsilon\gamma\delta\beta$  globin gen kümesinde,  $\delta$  ve  $\beta$  globin genlerini içine alan geniş delesyon ile karakterlidirler.

Homozigot Hb Lepore olguları, genellikle transfüzyona bağımlı şiddetli talasemik özellik gösterirler. Hemogram özellikleri de tipik olarak homozigot  $\beta$  talasemi özelliklerine sahipken, Hb elektroforezde, total hemoglobinin %15 (%8-30) kadarı Hb Lepore ve kalanı HbF olarak bulunur.

Homozigot  $\delta\beta$  talasemi olgularıyla, hafif bir talasemi intermedia kliniğine sahiptirler. Genellikle splenomegali bulunur. Hemogramda, orta derece anemi, mikrositoz ve hipokromi izlenir. Retikulosit sayısı normal veya hafif artmıştır. Hemoglobin elektroforezde %100 HbF bulunmaktadır. Çünkü  $\delta\beta$  talasemide,  $\beta$  zincir üretimindeki defekt,  $\gamma$  zincir üretimi tarafından kompanse edilmektedir. HbA ve A2 yoktur.

Homozigot HPFH olgularında, klinik bulgu yoktur. Hemogramda, sadece talasemi minor özellikleri bulunur ancak hemoglobin elektroforezleri %100 HbF bulundurulur.

#### HbH hastalığı

Genellikle değişik derecelerde talasemi intermedia kliniğine sahiptirler. Hb seviyeleri normal alt sınır değerden yaklaşık 3 gram kadar düşük olduğu, eritrosit sayısı (KKH, RBC) artmış, hipokromi ve mikrositozun belirgin olduğu, anemileri bulunur. Retikulosit sayısı artmıştır (%3-6). Periferik kan yaymasında, hipokromi, anizositoz, poikilositoz, hedef hücreler ve bazofilik noktalanmalar bulunur. Eritrositler, brilliant cresyl blue ile oda ısısında 20 dk. inkübe edildiğinde, HbH inklüzyonları belirir. Hemoglobin elektroforezde, HbA'dan daha erken bir bant olarak HbH ( $\delta\alpha$ ) %1-40 (ortalama %8) oranında belirir. HbA2 yoktur.

Heterozigot  $\beta$ ,  $\delta\beta$  ve  $\alpha$  talasemiler

Bu olgular klinik bulgusu olmayan ve genellikle tarama programları ya da hemogramda eritrosit indeks bulgularına dayanılarak yapılan araştırmanın sonucu saptanırlar.

### **Birinci Basamak Tarama Testi:** Hemogram

Talasemi taşıyıcılarında, hemogloblin seviyeleri normal veya normalden 1-2 g/dl kadar düşüktür. Genellikle eritrosit sayısındaki artışa ( $>5.0 \times 10^9/L$ ), hipokromi (OEH, MCH düşük) ve mikrositoz (OEV, MCV düşük) eşlik eder. RDW değeri normaldir (%12-14). MCH değeri talasemi taşıyıcılığı için MCV'den daha güvenilir bulunmuştur. Özellikle 24 saatten eski örneklerde MCV değeri 5f'e kadar artış gösterebilir. Bu nedenle eski örneklerden kan sayım sonuçlarında MCV değeri şüphe ile karşılanmalıdır. Ayrıca MCV değerinin yaş ile ilişkili olarak değişkenlik gösterdiği hatırlanmalıdır (Tablo 2).

Tablo 2. Yaşla ilişkili olarak MCV normal alt sınır değerleri

Yaş (yıl)	Alt Sınır	Üst Sınır
doğum	95	125
0.5 – 2	70	86
2 - 6	73	85
6 - 12	77	95
12 -18	78	98
> 18	80	95

Talasemi taşıyıcılığı ile toplumda hipokrom mikrositer aneminin en yaygın nedeni olan demir eksikliği anemisi ayırıcı tanısının yapılması önemlidir. Demir eksikliği anemisinde, eritrosit sayısı genellikle normal veya azalmıştır. RDW değeri ise yüksektir. Hemogloblin seviyesi normal veya normale yakın iken, şiddetli hipokromi ve mikrositoz talasemi taşıyıcılığına işaretler. Oysa, demir eksikliğinde, hipokromi ve mikrositoz, aneminin şiddeti ile uyumlu bir düşüklük gösterir. Yine de, demir eksikliği anemisi tanısı, serum demir ve total demir bağlama kapasitesi temelinde hesaplanan Transferrin Satürasyonu (TS (%)) =  $\frac{\text{Demir}}{\text{Total Demir Bağlama Kapasitesi}} \times 100$  ve/veya serum ferritin seviyesi temelinde konulur. Demir eksikliği olgularında;  $TS < \%10$  ve ferritin  $< 12 \mu\text{g/L}$  dir.

$\beta$  ve  $\delta\beta$  talasemi taşıyıcılığında genellikle MCV yaş için normal alt sınır değerinin altında ve  $MCH < 27$  bulunur. Ancak  $\beta$  talasemi taşıyıcısı olup normal MCV ve MCH'e sahip bireyler vardır. Bu durum ya sessiz  $\beta$  talasemi taşıyıcılığı veya  $\beta$  talasemi yanısıra  $\alpha$  talasemi kalıtımı ile ilişkilidir.

### **İkinci Basamak Tarama Testleri:**

HbA2 ölçümü: mikrokolon kromatografi, HPLC ve selüloz asetat elektroforez

HbF ölçümü: alkali denatürasyon, HPLC ve selüloz asetat elektroforez

Hemoglobin yapısal varyantların saptanması: seluloz asetat elektroforez (pH 8.2-8.6), sitrat agar (pH 6.0-6.2), HPLC  
 Sickle solubilité testi  
 İnküzyon cisimlerinin saptanması: brilliant cresyl blue  
 HbF'in interseluler dağılımı: Kleihauer testi  
 Globin zincir sentezi

Seluloz asetat elektroforez (alkali pH -8.2-8.6-)

Seluloz asetat elektroforez A, F, S/G/D, A2/C/E/O-Arab, H, Lepore ve daha az yaygın varyantları belirlemede kullanılır. Seluloz asetat elektroforezde iyi bir teknik HbF'in >%2 düzeylerini gözle ayırmasar ve kantitatif olarak elusyon-spektrofotometre yöntemiyle tespit eder. Ancak belirgin yüksek değerlerde kıymet taşır. HbA2'i ayırt eder. Ancak HbA2'nin bu teknikle ölçümü değerli bulunmaz çünkü bu bandın elusyon ve spektrofotometrik ölçümü,  $\beta$  talasemi taşıyıcılığı tanısı için yeterince duyarlı değildir.

HbS ile aynı mobilitéde bant taşıyan bireylerde sickle solubilité testi yapılarak HbS varlığı doğrulanmalıdır. Bu test negatif ise bu kez HbG ve HbD'i ayırt ettirici başka bir teknik daha uygulanmalıdır.

Ancak HbS/D/G üzerinde tek bir bant gözlenen sickle solubility test pozitif homozigot bireylerde, SS, SD, SG ayırımı için alternatif teknik kullanılmalıdır. Sitrat agar (pH 6.0-6.2) de HbS aynı yerde kalırken, HbD ve G, HbA ile aynı mobilitéde yer alırlar (Tablo 3).

HbC/E/O-Arab ayırıcı tanısında asit pH (sitrat agar veya agar jel yöntemi) kullanılmalıdır. Bu teknik HbC'i, HbC Harlem'den de ayırt ettirir (Tablo 3).

Tablo 3. Yapısal hemoglobin varyantlarının alkali ve asit elektroforezde mobiliteleri

Variant	Seluloz Asetat Elektroforez (pH 8.6)						Sitrat Agar (pH 6.0)			
	-CA <sub>2</sub>	S	F	A	J	N+	+C	S	A	F-
C	■						■			
D		■							■	
E	■								■	
G		■							■	
Lepore		■							■	
O Arab	■								■	
S		■						■		

Sitrat Agar veya Agarose Jel Elektroforez (asit pH 6.0 - 6.2)

Genellikle alkali pH'da seluloz asetat elektroforezi desteklemek için kullanılır. Bu teknik, HbS'i, HbD/G'den ayırt eder. Ancak D ve G'i birbirinden ayırt edemez. HbC'i, HbE, O-Arab ve C-Harlem'den ayırt eder (Tablo 3).

HbD ve HbG'yi ayırt etmede ileri testler kullanılmalıdır. Asit elektroforezde HbS ve HbC-Harlem aynı mobilitede koşarlar. Ayırt etmek için sickle solubility test gereklidir.

HbA2'nin mikrokolon kromatografi ile ölçümü

$\beta$  talasemi taşıyıcılığını saptamada tatmin edici yöntemdir.  $\beta$  talasemi taşıyıcılarında HbA2 düzeylerinin 6. aya kadar normal seviyelerine ulaşmadığı ve ilk 6 ayda yapılan değerlendirmelerde  $\beta$  talasemi taşıyıcılığının atlanabileceği akılda tutulmalıdır.

HbS valığında HbA2'nin ölçümü için özel kolonlar gereklidir. Yine de S/ $\beta$  ve S/A'i ayırt etmek için mutlak gerekli değildir. Çünkü S/ $\beta$  'da HbS>HbA (HbS>%50) iken HbS/A'da HbS<HbA'dır (HbS<%50) dir. Ancak unutulmamalıdır ki alfa talaseminin beraberinde kalıtıldığı durumlarda bu değerler ve yorum etkilenebilmektedir (Tablo 4).

Tablo 4. Sickle cell taşıyıcılığında (HbS/A) beklenen HbS miktarları üzerine  $\alpha$  talaseminin etkisi

$\alpha$ gen	%HbS
( $\alpha \alpha / \alpha \alpha$ )	40
( $\alpha \alpha / \alpha -$ )	34
( $\alpha \alpha / - -$ )	26
( $\alpha - / - -$ )	17

Bazı unstabil Hb'ler HbA2 yüksekliğine neden olabilirler, eğer eritrosit indeksleri  $\beta$  talasemi taşıyıcılığını desteklemiyorsa, unstabil Hb'lere işaret olarak değerlendirilebilir.

Yüksek Performans Sıvı Kromatografi (HPLC) ve Kapiller Elektroforez

HbA2 ve HbF'in doğrulukla ölçümünde, varyant Hb'lerin saptanması, tanımlanması ve ölçümünde kullanılır. HPLC, HbS varlığında HbA2'i doğrulukla saptanamayabilir (bkz. HbA2'nin mikrokolon kromatografi ile ölçümü). Bazı sistemlerde, HbE, HbA2'den ayırt edilemeyebilir. Kapiller elektroforez ile de varyant Hb'ler tanımlanabilmekte ve ölçülebilmekte, HbS ve HbE varlığında HbA2 tayini doğrulukla yapılabilmektedir. Klinik önemi olan bir varyant hemoglobinlerin tespitinde alternatif teknik (moleküler) ile doğrulanmalıdır.

Sickle solubility test

HbS %20 (ve hatta %8)'e kadar olan değerlerde tespit edebilir. Böylece alfa talasemi ile birlikte olduğu durumda dahi tespit edebilir. Test 6 aydan küçük infantlarda negatif bulunabilir.

HbF'in Alkali Denatürasyon yöntemi ile tespiti ve Kleihauer test

HbF ölçümünde alkali denatürasyon testi önerilir. Böylece HbA2 yüksekliğinin eşlik etmediği %5-30 HbF artışı saptandığında,  $\delta\beta$  talasemi ve HPFH tanısı konulabilir.

$\delta\beta$  talasemi ve HPFH ayırıcı tanısında HbF'in interseluler dağılımının Kleihauer testi ile saptanması ( $\delta\beta$  talasemide heteroseluler ve HPFH de panseluler) destekleyici test olarak kullanılabilir.

Sonuç olarak ilk basamak test olan hemogram eklenecek; Hemogloblin elektroforez (seluloz asetat) ve mikrokolon kromatografi (HbA2) ya da HPLC veya kapiller elektroforez yöntemlerinden biri ile Hemoglobinopati tarama programı gerçekleştirilebilir.

MCH düşük ve HbA2 artmış

MCH < 27pg ve HbA2 > %3.5 ise  $\beta$  talasemi taşıyıcı tanısı konmaktadır.

$\beta$  talasemi taşıyıcılarının büyük çoğunluğunda MCH 19-23 fl ve HbA2 %3,5-6 bulunur. HbA2 %3,5-6 arasında bulunması  $\beta$  talasemi taşıyıcılığı için tanı koydurucudur. Bunlar arasında HbA2 nin %3.5-4 arasında olduğu grup  $\beta+$  talasemi olgularına işaret eder. Hatta bu mutasyonlar bazen %3.5'un hafifçe altında (%3.3—3.4) HbA2 değerleri de verebilir (Normal HbA2  $\beta$  tal). Olguların yaklaşık %30'unda HbA2 artışına HbF düzeylerinde %1-3 civarında hafif bir artış eşlik eder.

Bazı  $\beta$  talasemi taşıyıcıları %6-9 gibi yüksek HbA2 düzeyleri ve buna eşlik eden %3-15 HbF değerlerine sahip olabilir. Bu olgular genellikle  $\beta$  globin geninin 5' promotör bölgesindeki geniş delesyonların sonucudur.

$\beta$  globin genindeki bazı moleküler lezyonlar unstabil  $\beta$  zincir üretimine neden olur ve bunlar kemik iliği eritroid prekürsörleri içinde çöker. Böylece perifeik kanda  $\beta$  zincir varyantı tespit edilemez. Bu olguların HbA2 düzeyleri artmıştır ve fenotipik olarak talasemi intermedia kliniğine sahiptirler. Dominant  $\beta$  talasemi allelleri olarak bilinen bu mutasyonlar genellikle 3. exon'da yerleşmişlerdir.

$\beta$  talasemi taşıyıcılarında, beraberinde  $\alpha$  talasemi kalıtımı MCH değerlerinin normale yakın veya normal bulunmasına neden olur. Bu durumun ülkemizde de sık olması beklenmektedir. Bu olgularda HbA2 yüksektir.

$\beta+$  talasemi olgularında beraberinde demir eksikliği anemisi olması bu olgularda %3.3-4.0 arasında beklenen HbA2 seviyelerinin %3.5 altında kalmasına ve olgunun hatalı olarak normal değerlendirilmesine neden olabilir. Bu durumda demir eksikliğinin tedavisini izleyerek test tekrarlanmalıdır.

MCH düşük, HbA2 normal

MCH < 27pg iken HbA2 < %3.5 bulunduğunda, beraberinde HbF de normale; demir eksikliği anemisi

$\alpha$  talasemi taşıyıcılığı

( $\epsilon\gamma\delta\beta$ )0 talasemi

$\beta$  ve  $\delta$  talasemi

hafif  $\beta+$  mutasyonu

$\alpha$ 0 talasemi taşıyıcılarında MCH < 25pg'dır (beraberinde  $\beta$  talasemi de kalıtılırsa MCH 25pg üzerinde ve hatta normal bulunabilir ancak bu kez HbA2 yüksek

bulunur). Bu olgularda demir eksikliği dışlandıktan sonra,  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\delta$  globin gen analizi ile fenotipin tanımlanması sağlanabilir.

Tarama programında HbA2 normal iken tek anormal veri olarak  $MCH < 25$  pg bulunan erkeklerin eşleri de taranmalı ve onda da HbA2 normal iken  $MCH < 25$  pg ise bu çiftlerde demir eksikliği dışlandıktan sonra durumu açıklamada yardımcı moleküler genetik analizlere ( $\alpha$  globin gen analizi) yönelinmelidir. Bu yolla potansiyel bebeklerinde HbH hastalığı ve homozigot  $\alpha^0$  talasemi riski tespiti hedeflenmektedir.

( $\epsilon\gamma\delta\beta$ ) $^0$  talasemi taşıyıcılığı çok nadir bir durumdur. Bu taşıyıcılığa sahip yenidoğanda derin bir anemi vardır ancak 3 aydan sonra hematolojik durum iyileşir ve olgularda sadece MCH ve MCV düşük HbA2 ve HbF normal hafif anemi bulunur.

$\delta$  talasemi yanısıra  $\beta$  talasemi mutasyonu taşıyıcılarında HbA2 %3.5 altında olup,  $\beta$  talasemi taşıyıcılarının atlanmasına neden olur.

Yine hafif  $\beta^+$  mutasyonu taşıyanlarda (IVS1-6 (T-C), CAP+1 (A-C), Poly A (T-C) ) HbA2 normal veya hafif artmış bulunabilir (%3.3-3.7).

MCH düşük, HbA2 normal ve HbF artmış HbA2 normal iken HbF %5-20 arasında bulunduğu olgularda  $\delta\beta$  talasemi veya HPFH taşıyıcılığından şüphe edilir.  $\delta\beta$  talasemi veya HPFH taşıyıcılarının ayırt edilmesi önemlidir. Çünkü HPFH taşıyıcılarının  $\beta$  talasemi bileşik heterozigot durum sessiz veya hafif bir fenotip ile karakterli iken,  $\delta\beta/\beta$  bileşik heterozigotlarında klinik  $\beta$  talasemi majör ile sonuçlanabilir. HPFH'de MCH ve MCV normal ancak  $\delta\beta$  talasemide düşüktür. Ancak  $\delta\beta$  talasemi taşıyıcılığına eşlik eden  $\alpha$  mutasyonu MCV ve MCH'i normale taşıırken, HPFH'e eşlik eden  $\alpha$  mutasyonu düşük indeks değerlerine neden olur. Her ne kadar HbF'in dağılımı  $\delta\beta$  talasemide heterojen ve HPFH'de homojen ise de kesin ayırım ancak moleküler genetik analiz ile konulabilmektedir.

MCH normal, HbA2 normal

Sessiz  $\beta$  talasemi taşıyıcıları (-101(C-T) -92(C-T), IVSII-844 (C-G) ) ve triple  $\alpha$  taşıyıcılarında MCH ve HbA2 normaldir. Bu olguların  $\beta^+$  veya  $\beta^0$  talasemi taşıyıcılığı ile bileşik heterozigot durumları hafif bir talasemi intermedia fenotipi oluşturabilir. Ancak basit taşıyıcılar ve triple  $\alpha$  homozigotları fenotipik olarak normaldir.

Anormal hemoglobinler

En yaygın hemoglobin varyantları (HbS, C, D-Punjab, O Arab ve E) tanımlamak için HPLC veya kapiller elektroforez doğru, hızlı ve kantitatif yöntemlerdir. HbD Punjab'ı diğer HbD varyantlarından ayırt etmede DNA analizi gerekir. HbS'i diğer analog varyantlarından ayırt etmede basitçe sickling test kullanılır. Ancak gerçek bir varyant tanımı için; DNA analizi metodlarından birinin uygulandığı bir referans laboratuvar gerekir.

HbA/S bireylerde HbA<sub>2</sub> düzeyi hafifçe yüksek bulunur. Ancak bu durum HbS >%50 olmadıkça bir HbS/β talasemi olarak yorumlanamaz. HbS>%50 ise bu durumda; genotip HbS/β, HbS/δβ, HbS/HPFH veya HbS/S olabilir. Bu durumda ebeveynlerin hematolojik analizi durumu açıklığa kavuşturur.

Bazı β zincir varyantları (örneğin HbS ve HbE) beraberinde α talasemi kalıtıldığında ekspresyonları azalır. Örneğin HbS taşıyıcısı bireylerde HbS %35-40 civarındadır. HbS ile α+ taşıyıcılığında HbS %29-34 ve homozigot α+ taşıyıcılığında HbS %24-28 dolayında bulunur (Tablo 4).

### **3. Basamak Tanı Testleri; Moleküler Genetik Analiz**

β Talasemi geninde, 170'den fazla nokta mutasyon, bir veya iki nukleotid delesyon/ insersiyonu bulunmaktadır. β talasemi mutasyonlarının tanısı çoğu laboratuarda, başlıca allel spesifik oligonukleotid hibridizasyon veya allel spesifik priming gibi 2 PCR temelli metodla tespit edilmektedir. Az geniş delesyon gap PCR ile saptanabilir. Tanımlanamayan mutasyonlarda DNA sequencing etkin bir şekilde uygulanabilmektedir.

δβ Talasemi, Hb Lepore ve HPFH için gap-PCR yöntemi kullanılır.

α talasemi mutasyonları içinde en yaygın 7'i gap-PCR ile tespit edilebilir.

Bugüne kadar 700'den fazla hemoglobin varyant tanımlanmıştır. Klinik olarak en sık ve önemli olanlar için basit DNA analiz metodları bulunmaktadır.

HbS; CD6(A -T), HbC; CD6 (G-A), HbD-Punjab; CD121 (G-C), Hb O-Arab; CD121 (G-A), HbE; CD26 (G-A).

Diğerleri için DNA sequencing kullanılır.