

## DEĞİŞİK YAŞ GRUPLARINDAKİ ANEMİLİ HASTALARIN FETAL HEMOGLOBİN DÜZEYLERİNİN ALKALİ DENATÜRASYON YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI

Determination of fetal hemoglobin levels of anemic patients in different age groups by alkali denaturation method

Jale ÖZASLAN<sup>1</sup>, Necat YILMAZ<sup>2</sup>

**Özet:** Bu çalışmada, 2-15 yaş grubunda 48 ve erişkin 80 bireyin fetal hemoglobin (HbF) düzeyleri alkali denatürasyon yöntemi kullanılarak saptanmıştır. İki-15 yaş grubunda 30 anemili hasta (20 E, 10 K) ve kontrol grubunda (10 E, 8 K), erişkin anemili hasta grubunda ise (42 K, 18 E) kontrol grubunda ise (10 E, 10 K) yer almıştır. Ayrıca MCV 78 fl den düşük olan 85 anemili hastanın (erişkin, 43 K, 16 E; 3-15 yaş 16 E, 10 K) ve kontrol grubunun da (erişkin 10 K, 10 E; 2-15 yaş 10 E, 8 K) HbF düzeyleri saptanarak, tüm gruplarda HbF ile MCV arasındaki ilişki incelenmiştir. Anemili kadın, 2-15 yaş anemik hasta grubu ile MCV 78 fl olan hastalarda MCV ile HbF arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Yetişkin anemili erkek ile yetişkin kadın ve erkek kontrol grubu ve MCV 78 fl olan kontrol grubunda bu ilişki bulunamamıştır. İki-15 yaş kontrol grubunda ise anlamlı ilişki bulunmuştur. İncelenen gruplarda patolojik değerlerde HbF bulunmaması nedeni ile aneminin HbF'ne bağlı olmadığı düşünülmüştür. Bunun yanısıra alkali denatürasyon yöntemi kolay, ucuz ve tekrarlanabilir olduğundan, % HbF saptamalarında kullanılacak bir yöntem olduğu sonucuna da varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Hemoglobin, Eritrosit indeksi, Anemi

**Abstract:** In this study, fetal hemoglobin levels (HbF) of 48 subjects aged between 2 to 15 years as well as of 80 adults were determined by alkali denaturation method. The pediatric group consisted of 30 anemic (20 M, 10 F) and 18 healthy subjects (10 M, 8 F). Adult group consisted of 60 anemic (42 F, 18 M) and 20 healthy subjects (10 M, 10 F). In addition, HbF levels of 85 anemic patients with mean corpuscular volume (MCV) lower than 78 fl (59 adults, 43 F, 16 M; 3-15 ages 16M, 10F) and of the control group 20 adults (10 F, 10 M) and 18 subjects aged between 2-15 years (10 M and 8 F) were also determined. A positive correlation between HbF % and MCV were investigated in all groups. Significant correlations were observed for anemic females, anemic patients aged 2-15 and the group with MCV 78 fl. Statistically significant correlation was not observed for adult male anemic patients, adult controls and the control group with MCV 78 fl. A significant correlation was also observed for the 2-15 aged control group. It is concluded that the reason of anemia was not related to HbF since all of the examined groups did not have pathologic HbF levels. However, alkali denaturation is an easy, cheap and reproducible method and can be recommended for HbF % estimation.

**Key Words:** Hemoglobins, Erythrocyte indices, Anemia

\*XV. Gevher Nesibe Tıp Günleri, 27-30 Mayıs 1997, Kayseri Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi 27310 GAZİANTEP Biyokimya. Yük.Kimyager<sup>1</sup>, Y.Doç.Dr.<sup>2</sup>.

Geliş tarihi: 28 Mayıs 1997

Fetal hemoglobin dört hem grubuna dört globin zincirinin bağlanması ile meydana gelmiş olup, globin zincirlerinden ikisi  $\alpha$ , ikisi ise  $\gamma$ 'dır (1). Fetal hemoglobin prenatal yaşamda baskın olup, fetüsün oksijenasyonunu sağlar. Fetal hemoglobinin

oksijene olan affinitesi HbA'dan daha fazladır. Bu nedenle HbF plasental kandaki HbA'dan oksijen alabilmektedir. HbF'nin oksijene olan büyük ilgisi dokulara oksijen nakledilmesine engel olacağından doğum sonrası için uygun değildir (2). Fetal hemoglobin altıncı gebelik haftasında sentezlenmeye başlanır ve gebeliğin onüçüncü haftasında en yüksek seviyesine ulaşır. Gebeliğin ilerlemesi ile zincirindeki kademeli azalmaya karşılık zincir sentezinde artma görülür. Otuzbeşinci haftada % 85'e düşen HbF düzeyi azalmaya devam ederken HbA düzeyi artar. Kordon kanında % 773.3 oranında bulunur (3). Doğumdan sonra ilk altı ayda hızla daha sonra yavaş bir azalma göstererek, yaklaşık 24 ay sonra yetişkin değerine ulaşır (% HbF≤2). İki yaşın üzerindeki HbF'nin % 2'nin üzerinde bulunması patolojiktir. Anemi, bazı talassemi ve hemoglobinopati-talassemi bağlantılı hastalıklar, herediter persistan fetal hemoglobin (HPFH), hemoglobinopatiler ve lösemilerin değişik türlerinde, endokrinopati ve bazı kromozomal anormalliklerde (trisomi D1 gibi) HbF düzeyleri değişen oranlarda artabilmektedir (4-6). Fetal hemoglobin saptanmasında birçok yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları asit elüsyon (7-10), HPLC (11-13), radyal immunodiffüzyon (14), ELISA (15) ve agaroz izoelektrik odaklama yöntemidir (16). Alkali denatürasyon ise ilk olarak Singer ve grubu (17) tarafından bulunmuştur, daha sonra da modifiye edilmiştir (18, 19). Yöntemin temeli HbA ve HbA2'nin alkali ortamda denatüre olup, HbF'nin denatüre olmamasına dayanmaktadır.

## HASTALAR VE YÖNTEM

Hastaneye başvuran ve kliniklerden anemi şüphesi ile tam kan, periferik yayma ve HbF saptanması istenen hastalar yaş ve cinsiyete göre gruplandırılmıştır. Buna göre 2-15 yaş anemili hasta grubunda 30 (20 E, 10 K), kontrol grubunda 18 (10 E, 8 K), yetişkin anemili kadın grubunda 42, kontrol grubunda 10, anemili erkek hasta grubunda 18, kontrol grubunda 10 ve MCV 78 fl olan 85 hasta (erişkin 43 K, 16 E, 3-15 yaş 16 E, 10 K) ile kontrol grubunu oluşturan 38 bireyden (erişkin 10 E, 10 K ve 2-15 yaş 10 E, 8 K) EDTA'lı vacutainer tüplere

2 ml venöz kan alınarak, bekletilmeden Sysmex NE-1500 ile tam kan değerleri saptandı. HbF tayininde kullanılan tüm kimyasal maddeler Merck ve Riedel de-Haen firmalarına aittir. Tam kan örnekleri soğuk, % 0.9'luk NaCl çözeltisi ile yıkanarak hazırlanan eritrosit paketinden 200 µl alınıp, 4 ml siyanür-ferrisiyanür çözeltisine (0.2 g KCN, 0.2 g K3Fe(CN)6 suda çözülüp, 1 litreye tamamlandı) eklenerek 10 dakika bekletildi. Hemoliz olan bu örnekten 2.8 ml alınarak, üzerine 200 µl 1.2 N NaOH ilavesiyle denatürasyon yapıldı. İki dakika beklendi. Süre tamamlandıktan sonra 2 ml doymuş (NH4)2SO4 ile denatürasyon sonlandırılıp, 5 dakika beklendikten sonra Whatman No:42 filtre kağıdı ile süzülür. HbF içeren bu filtrat ölçüm tüpüne alındı. Total hemoglobin ise 6.75 ml distile suya 400 µl hemolizat eklenerek elde edildi. Her iki tüpün suya karşı 540 nm'de Spectronic 20D kullanılarak optik dansiteleri okundu. HbF yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (1).

$$\% \text{HbF} = \frac{\text{At} \times 100}{\text{Ab} \times 10}$$

At: HbF içeren filtratın optik dansitesi  
Ab: Örnekteki toplam hemoglobinin optik dansitesi

İstatistiksel hesaplamalar için Statgraphics ve MedCalc istatistik programları kullanılmıştır.

## BULGULAR

Kontrol ve hasta gruplarına ait yaş, HbF, Hb, Hct, RBC ve RBC indisleri için ortalama ve standart sapma değerleri Tablo I'de verilmektedir. Buna göre 2-15 yaş hasta grubu için % HbF 0.87±0.49, 2-15 yaş hasta grubu için 1.12±0.65, erişkin hasta kadın grubunda 0.62±0.40 kontrol kadın grubunda 0.66±0.45, erişkin erkek hasta grubunda 0.69±0.49, kontrol erkek grubunda 0.70±0.48, MCV 78 fl olan hasta grubunda 0.74±0.47 ve MCV 78 fl kontrol grubunda 0.83±0.56 olarak bulunmuştur. Ayrıca Tablo I incelendiğinde hasta gruplarının RBC değerlerinin 4.6±0.9 ile 4.9±0.7, Hb değerlerinin 9.3 ± 1.2 - 9.8±1.8, Hct değerlerinin 31.9±5.0 -34.0 ±8.7, MCV değerlerinin 67.8±7.0-71.9±10.1, MCH'nin 19.9±3.2-21.8±4.1 ve MCHC değerlerinin

ise  $28,3 \pm 1,5$   $30,2 \pm 2,2$  arasında olduğu bulunmuştur. Kontrol gruplarına ait bulunan sonuçlar ise referans sınırların içinde yer almaktadır (3).

Tablo II'de hasta ve kontrol gruplarında MCV ve HbF arasındaki korelasyon sonuçları verilmektedir. Buna göre anemili kadın hastalarda  $r : -0,35$  ( $p < 0,05$ ) iken, erkek hasta, yetişkin kadın ve erkek kontrol grubunda anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ); 2-15 yaş hasta grubunda  $r : -0,36$  ( $p < 0,05$ ), kontrol grubunda ise  $r : -0,65$  ( $p < 0,01$ ) olarak bulunmuştur. MCV < 78 fl olan hasta grubunda  $r : -0,26$  ( $p < 0,05$ ) iken kontrol grubunda ise anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ).

MCV ile HbF arasında anlamlı çıkan korelasyonların regresyon analizleri yapıp temsili olarak anemili kadın hasta grubu verilmiştir. Kadın

hasta grubu için regresyon eşitliği ise  $y = 2,8780 + 0,0323$  olarak bulunmuştur. MCV ile HbF arasındaki ilişkinin regresyon dağılım grafiği Şekil 1'de görülmektedir.

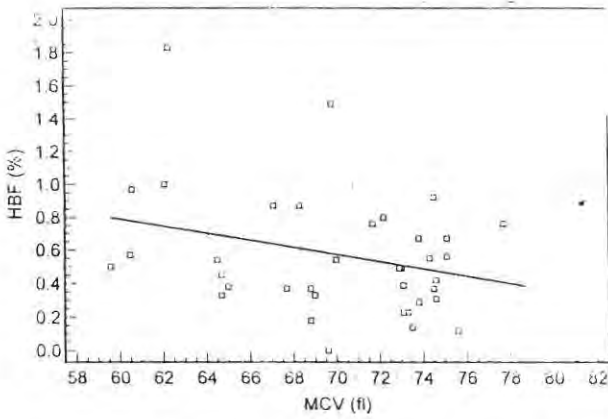
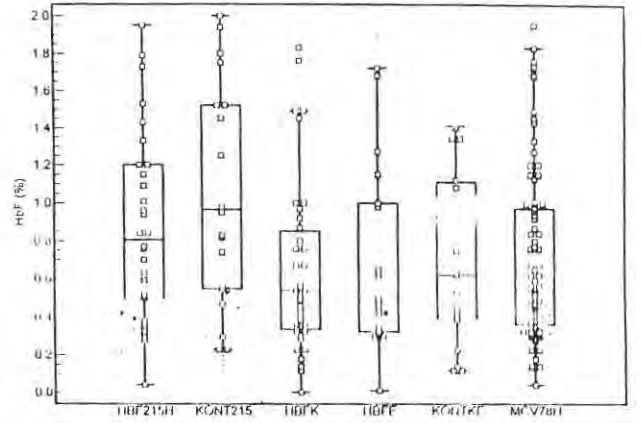
Fetal hemoglobinin hasta ve kontrol gruplarındaki dağılımı Şekil 2'de verilmektedir. Buna göre 2-15 yaş hasta grubu (HBF215H) median değeri 0,80, 2-15 yaş kontrol grubu (KONT215) 0,95, erişkin kadın hasta grubu (HBFK) 0,53, erişkin hasta erkek grubu (HBFE) 0,50, erişkin kontrol grubu (KONTKE) 0,62, MCV 78 fl olan hasta grubu (MCV78H) 0,55 olarak saptanmıştır. Hasta grupları ile bunların kontrol gruplarının ortalama fetal hemoglobin değerleri arasında fark olup olmadığını anlamak için uygulanan farkın önemlilik testi sonucunda grupların hiçbirinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ortaya çıkmıştır ( $p > 0,05$ ).

**Tablo I.** Anemili hasta ve kontrol gruplarında RBC, Hb, Hct, HbF ve RBC indislerinin ortalama ve standart sapma değerleri

	n	Yaş (yıl) X±SD	RBC×10 <sup>6</sup> /μl X±SD	Hb (g/dl) X±SD	Hct (%) X±SD	MCV (fl) X±SD	MCH (pg) X±SD	MCHC (g/dl) X±SD	HbF (%) X±SD
2-15 yaş hasta grubu	30	6,7±4,2	4,6±0,9	9,7±1,8	31,9±5,0	71,9±10,1	21,8±4,1	30,2±2,2	0,87±0,49
2-15 yaş kontrol grubu	18	8,2±4,3	4,7±0,4	12,7±1,1	38,3±3,1	82,1±4,4	27,0±1,2	33,1±1,7	1,12±0,65
Kadın hasta grubu	42	33,9±11,4	4,6±0,7	9,3±1,2	34,4±8,7	71,4±8,7	20,7±3,5	28,3±1,5	0,62±0,40
Kadın kontrol grubu	10	22±22,8	4,7±0,2	12,9±0,4	41,1±1,2	86,8±3,7	27,2±1,0	31,4±1,0	0,66±0,45
Erkek hasta grubu	18	33,9±11,4	5,0±1,0	10,0±2,3	34,4±6,9	67,8±7,0	19,9±3,2	29,2±2,2	0,69±0,49
Erkek kontrol grubu	10	34,0±13,4	5,1±0,7	13,9±1,0	44,3±4,8	88,5±6,3	27,4±3,7	31,3±1,9	0,70±0,48
MCV 78 fl olan hasta grubu	85	26,9±16,4	4,9±0,7	9,8±1,8	33,7±5,0	69,4±6,8	20,1±2,4	28,9±1,9	0,74±0,47
MCV 78 fl kontrol grubu	38	25,5±13,5	4,8±0,5	13,2±0,8	41,3±3,0	85,9±4,8	27,5±1,9	32,1±1,5	0,83±0,56

**Tablo II.** Hasta ve kontrol gruplarında MCV, ve HbF arasındaki korelasyon sonuçları

Hasta grupları	n	r
2-15 yaş hasta grubu	30	-0.36
2-15 yaş kontrol grubu	18	-0.65
Kadın hasta grubu	42	-0.35
Kadın kontrol grubu	10	-0.20
Erkek hasta grubu	18	-0.24
Erkek kontrol grubu	10	-0.19
MCV 78 fl kontrol grubu	38	-0.16
MCV 78 fl hasta grubu	85	-0.26

**Şekil 1.** Anemili kadın hastalarda MCV ile HbF arasındaki ilişkinin regresyon dağılım grafiği**Şekil 2.** Fetal hemoglobinin hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı

## TARTIŞMA

Prenatal yaşamdan postnatal yaşama geçildiğinde HbF'nin HbA ve HbA<sub>2</sub>'ye dönüştüğü ve bu dönüşümün yaklaşık iki yıl sürdüğü bilinmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar fetal hemoglobinin cinsiyetle değişmediğini göstermiştir (20). Bu çalışmada da yetişkin kadın ve erkek hasta grubunda fetal hemoglobin değerleri sırasıyla  $0.62 \pm 0.40$ ,  $0.69 \pm 0.49$ , kadın ve erkek kontrol grubunda ise sırasıyla  $0.66 \pm 0.45$ ,  $0.70 \pm 0.48$  olarak bulunmuştur.

Bulunan sonuçlar literatürle uyumludur (20, 21). Bilindiği gibi tam kan parametrelerinin sınırları 0-15 yaş arasında büyük değişiklikler göstermektedir, fakat yaşla olan bu değişim erişkin yaşa kadar cinsiyetten etkilenmemektedir. Fetal hemoglobin ise 0-2 yaş arasında büyük bir farklılık gösterirken bu yaştan sonra cinsiyet ve yaşla ilgili olarak değişmemektedir (3). Tam kan parametrelerinin yaş ile olan bu farklılığından kaynaklanan değişimin fetal hemoglobinle olası etkileşimi düşünülerek yapılan bu çalışmada, gruplandırma yapıldığı zaman



HbF ile anemili erkek hastalar arasında korelasyon olmadığı buna karşın diğer hasta gruplarında Tablo II'de görüldüğü gibi negatif yönlü anlamlı bir korelasyon olduğu bulunmuştur. MCV 78 fl olan hasta grubu değişik yaşlarda anemili hastayı içermesine rağmen ilişkinin daha önce tespit edilen 2-15 yaş grubu ve anemili hasta grubundan daha zayıf olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin bu grup içerisinde yer alan anemili erkek hastalar olabileceği sonucuna varılmıştır.

HbF'nin MCV ile korelasyonları incelendiğinde anemili kadın, 2-15 yaş grubu ve bunun kontrol grubunda HbF'nin MCV ile negatif yönlü anlamlı korelasyonlarının olduğu saptanmıştır. İki-onbeş yaş kontrol grubunda MCV ile HbF arasında beklenenin dışında bulunan korelasyon ise bu yaş grubunun gelişme çağındaki çocukları içermesine bağlanmış ve dolayısıyla birçok nedene dayalı olabileceği düşünülmüştür. Anemili hastalarda MCV ile HbF arasında bulunan anlamlı negatif ilişki değerlendirildiğinde MCV'nin azalması ile HbF'nin artması beklenmektedir. Fakat bu artışın referans değerinin üzerinde olmaması HbF'nin bilinmesinin mikrositozda klinik açıdan bir yarar sağlamayıp, ilişkinin araştırılmasında yarar sağlayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca HbF dönüşümü genetik kontrol altında olduğunun bilinmesine rağmen dönüşümde normal ve patolojik etkilerin neler olduğu da kesin olarak anlaşılabilmiş değildir ve araştırmaya açık bir konu olmaya devam etmektedir. Bulunan korelasyonlarla ilgili olarak daha önce yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır, fakat HbF'nin üç boyutlu şeklinin ve büyüklüğünün HbA'dan farklı olduğu bilinmektedir (22). Bu nedenle eritrosit büyüklüğüne etkisi olabileceği varsayımıyla beraber sonuçlar tartışmaya açık bırakılmaktadır.

Şekil 1'de görüldüğü gibi hasta ve kontrol gruplarında fetal hemoglobin değerlerinin dağılımları farklıdır, ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur.

İki-onbeş yaş hasta ve kontrol grubu ortalama HbF değerleri erişkin değerlerinin üzerinde yer almaktadır. Bunun ise iki yaş civarında henüz

hemoglobin dönüşümünün sonlanmamış olması, dolayısı ile yüksek çıkan HbF'nin ortalamayı artırmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Tüm hasta ve kontrol gruplarında bulunan değerlerin referans sınırının (HbF2) içinde yer alması aneminin kaynağının fetal hemoglobin olmadığını düşündürmektedir. Toplumun sosyo-ekonomik yapısı ve beslenme alışkanlıklarının Fe eksikliği anemisinin sıklığını arttırdığı bilinmektedir. Yine anemili kadın hastalara erkek hastalardan daha fazla rastlanma nedeninin toplumumuzdaki doğurganlığın fazla olması ve buna bağlı olarak süt verme ve kadınlardaki menstruasyon gibi nedenlere bağlı olabileceği düşünülmüştür (23).

Fetal hemoglobinin saptanabilmesi için birçok yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar arasında alkali denatürasyon yöntemi ucuz kimyasal maddelerle ve kolaylıkla uygulanabilir bir yöntem olması dolayısı ile hala birçok laboratuvarında tercih edilmektedir. Manuel bir yöntem olmasına rağmen sonuçların tekrarlanabilir ve güvenilir olması yöntemin diğer avantajları olarak sayılabilir.

## KAYNAKLAR

1. Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspects of hematology. In : Tietz NW (ed), Text book of Clinical Chemistry . Saunders. Philadelphia 1986, p 1515.
2. Mentş G. Proteinler: myoglobin ve hemoglobin. In: Rodwell VW (Ed), Harper'ın Biyokimyası. Barış Kitapevi, İstanbul 1993, s 70.
3. Tietz NW, Logan NM. Appendix. In : Tietz NW (Ed), Textbook of Clinical Chemistry. Saunders Philadelphia 1986, pp 1829-1830.
4. Cooper M, Hougland HC. Adenyl cyclase hormon responses of certain human endocrine tumors. Mayo Clin Proc 1972 , 47 : 402.
5. Bertles JF. Human fetal hemoglobin : Significance in disease. Ann N Y Acad Sci 1974, 241 : 638.
6. Kiesselbach TH, Wagner RH. Demonstration of factor XIII in human megakaryocytes by a flourescent antibody technique. Ann NY Acad Sci

- 1972, 20 : 318-328.
7. Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear. *Klin Wochenschr* 1957 ; 35 : 637.
  8. Virgilio LA, Simon NV. Measurement of fetal cells in maternal circulation. *Obstet Gynecol* 1977; 50 : 364-366.
  9. Bernstein SC, Bowman JE, Swift HH. Modification of acid elution technique for quantitation of fetal hemoglobin in individual. *Hemoglobin* 1977;1 : 313-331.
  10. Dupre AR, Morrison JC, Martin JN, et al. Clinical application of the Kleihauer-Betke test. *J Rep Med* 1993;38 :621-624.
  11. Kutlar A, Kutlar F, Wilson JB, et al. Quantitation of hemoglobin components by high-performance cation-exchange liquid chromatography : Its use in diagnosis and in the assessment of cellular distribution of hemoglobin variants. *Am J Hem* 1984;17:39-53.
  12. Kutlar A, Kutlar F, Gu L, et al. Fetal hemoglobin in normal adults and -thalassemia heterozygotes. *Hum Genet* 1990; 85 :106-110.
  13. Papadea C, Cate JC. Identification and quantification of hemoglobins A, F, S and C by automated chromatography. *Clin Chem* 1996; 42:57-53.
  14. Marti HR, Fischer S, Killer D. Simple procedures for determination of hemoglobin F and hemoglobin A2 : Radial immunodiffusion and column chromatography with commercial KİTS. *Schweiz Med Wochenschr* 1983;17: 113: 1916-1917.
  - 15 Makler MT, Pesce AJ. ELISA assay for measurement of human hemoglobin A and hemoglobin F. *Am J Clin Pathol* 1980;74: 673-676.
  16. Leary AG, Porter PN, Ogawa M. Quantitation of hemoglobin biosynthesis with agarose isoelectric focusing. *Am J Hematol* 1983;14: 67-73.
  17. Singer K, Chernoff AJ, Singer I . Studies on abnormal hemoglobins. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation. *Blood* 1951;6 :413-419.
  18. Betke K, Marti HI, Schlick I. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. *Nature* 1959;184:1877.
  19. Pembrey ME, Mcwade P, Weatherall DJ. Reliable routine estimation of fetal hemoglobin by alkali denaturation. *J Clin Pathol* 1972;25: 738-740.
  20. Adekile AD, Huisman THJ. HbF in sickle cell anemia. *Experientia* 1993;49 : 20-21.
  21. Özgen Ü, Balat A, Turgut M ve ark. Demir eksikliği anemisinde RBC, MCV, MCH, MCHC, RDW, MPV ve platelet sayısının tanısal değerinin incelenmesi. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 1994;1:185-188.
  22. White A, Handler P, Smith EL. Principles of biochemistry. (5th ed). McGraw-Hill 1973, pp 173.
  23. Attila G, Çukurova bölgesinde hemoglobinopatilerin HPLC yöntemleriyle incelenmesi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi, Adana 1995, ss 70.