

A. Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları ve Sağlığı Kürsüsü

**KORDON KANININ THALASSEMIA VE
HEMOGLOBINOPATİLER YÖNÜNDEN İNCELENMESİ (+)**

Dr. Emel Babacan *

Dr. Ayhan Çavdar **

Dr. Ayten Arcasoy ***

Dr. Bahtiyar Demirağ ****

Thalassemia, bugün genetik olarak intikal eden ve normal polipeptid zincirlerinin strüktürü bozulmaksızın sentezlerinde defekt ile kendini gösteren bir hastalık grubu olarak kabul edilmektedir (1).

Ingram ve Stretton polipeptid zincirlerine göre Thalassemia'yı Alfa ve Beta olarak grublandırırmışlardır (2). Daha sonra delta Thalassemia tipinden de bahsedilmişse de halen Beta ve Alfa Thalassemia daha önemli bir yer almaktadır (1, 2, 3, 5).

Beta Thalassemi'da alfa zincir sentezinin, Beta zincir yapımına göre arttığı ileri sürülmüştür (2). Yeni olarak Bank ve arkadaşları Beta Thalassemia da eritroid hücreler tarafından yapılan alfa zincirlerinin sentez hızının normal olduğu, buna mukabil Beta zincirleri yapımının çok azaltıldığı veya hiç olmadığını iddia etmişlerdir (4).

Beta Thalassemia'nın homozigot veya heterozigot şekilleri iyi bir şekilde incelenmiştir. Buna mukabil alfa Thalassemia'nın homozigot şekli genellikle hayatla kabil'i telif değildir. Ölü doğum ve hidrops fötalis sebebi olur (1, 6, 7). Bu çocuklarda doğumda çok yüksek oranda Bart's hemoglobini bulunduğu ilk defa Lio-Injo tarafından farkedilmiştir (1).

Heterozigot Alfa Thalassemia da genellikle klinik bulgu yok veya çok hafiftir. Ancak laboratuvar tetkikleri ile teşhis konabilir.

* A. Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları ve Sağlığı Kürsüsü Mütchassis Asistanı

** A. Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları ve Sağlığı Kürsüsü Profesörü

*** A. Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları ve Sağlığı Kürsüsü Doçenti

**** A. Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları ve Sağlığı Kürsüsü Profesörü

(+) Asistanlık tezi

Bu arada Hemoglobin H ve Hemoglobin Bart's gibi Alfa zinciri taşımayan hemoglobinler ortaya çıkarlar (1, 3). Elektroforetik olarak Hemoglobin A'dan daha hızlı mobilité gösterirler. Kordon kanında yapılan çalışmaların çoğu Hemoglobin Bart'sı bu devrede göstermenin kabil olduğunu ortaya koymuştur (8, 9, 10). Hemoglobin Bart's fizyolojik olarak görülebileceği gibi, Alfa Thalassemia'nın erken bir işareti de olabilir (1, 9).

Diğer taraftan eski kanaatlerin aksine tekniklerin ilerlemesi ile özellikle nişasta - jel veya kromotografi ile küçük miktarlarda ki normal hemoglobinleri dahi kordon kanında gösterebilmek kabil olmuştur (8, 11).

Burada esas amaç, yeni doğum devrinde elektroferetik usullerle incelenliği takdirde teşhis şansı yüksek olan Alfa Thalassemia üzerinde durmak ve hemoglobinatileri erken olarak incelemektir.

MATERYAL VE METOD

Çalışma Ekim 1968 - Mart 1969 tarihleri arasında yeni doğan 100 bebekten yapıldı. Kan örneklerinin 75'i Ankara Doğumevinde, 25 de A. Ü. Tıp Fakültesi Kadın - Doğum Kliniğinde doğan bebeklerden, hiç bir ön seçim yapılmaksızın alındı. Bu bebekler arasında tesadüfen bulunan bir çift ikiz de çalışmalara dahil edildi.

Bebek doğduktan hemen sonra göbek kordunu henüz bağlanmadan 0.5 cc amonyum oxalate üzerine 5 cc. miktarda alınan kan plâzması atıldıktan sonra serum fizyolojik ile 3 defa yıkandı. Distile su ile hemolize edildi. Lökositleri eritmek için de 1/5 volüm toluen damlatıldı. 5 dakika çalkalandı. 2500-3000 devirde 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen hemolizat filtre kağıdından süzülerek elektroforeze konuncaya kadar buzlukta saklandı.

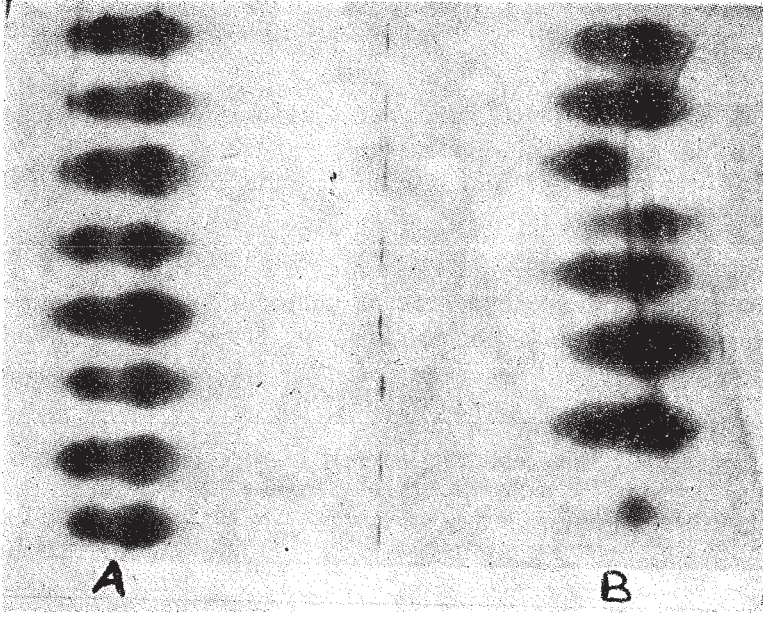
Nişasta - jel elektroforezi pH 8.6 da Tris - EDTA Borate tamponu kullanılarak yapıldı (12).

64 gr. hidrolize nişasta Tris - EDTA - Borate tamponlu distile su ile jel kıvamına gelinceye kadar çalkalanarak ısıtıldı. Sonra vakum teşkil edilerek havası alındı. Özel elektroforez cihazına dökülerek 1 saat buzdolabında tutuldu.

Daha önce hazırlanmış olan kan örnekleri distile su ile belirli oranda dilue edildikten sonra dondurulmuş olan jel üzerinde açılan yerlere 1 cm. mesafe ile vertikal olarak 3 No.lu Whatman filtre kağıdına emdirilerek yerleştirildi.

Orijinal metodda bir defa da 5 tane örneğin elektroforez yapılabilceği bildiriliyordu. Fakat biz elimizdeki hidrolize nişastanın ve Tris maddesinin az

olması nedeniyle 16 örneği ikili sıra olarak (her bir sırada 8 örnek olmak üzere koyduk). Hemoglobın ayrılmasında 5'li tek sıra olarak yaptığımız elektroforezden farklı bir bulgu tespit etmedik (Resim 1).



Resim : I

Kan örnekleri jel içine yerleştirildikten sonra üzeri ince jelâtinle örtüldü. Buz dolabında $+4^{\circ}\text{C}$ de 200 volt da bütün gece kalmak üzere elektroforeze tabi tutuldu. Bu müddet tamamlandıktan sonra örnekler Benzidine ile boyanarak incelendi.

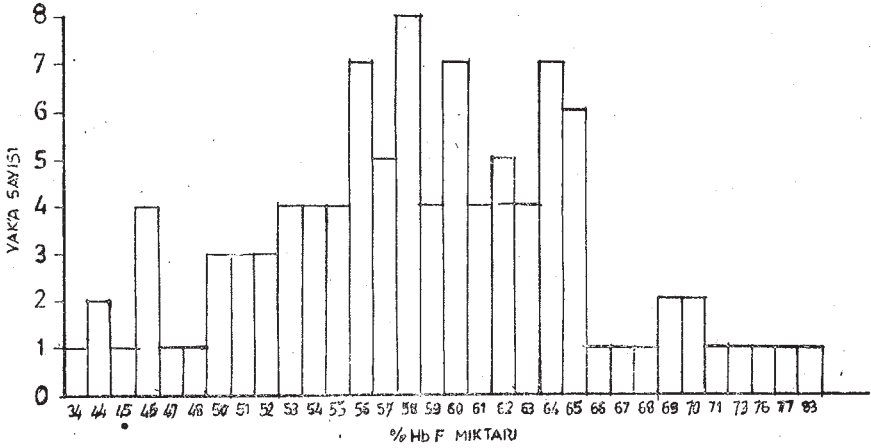
Bu çalışmalarda zaman zaman kontrol olmak üzere daha önce klinik ve hematolojik olarak kesin teşhisi konmuş olan Hemoglobın S trait, Hemoglobın S hastalığı ve normal erişkin kanları da kordon kanları arasına konarak elektroforeze tabi tutuldu

Alınan kordon kanlarından ayrıca fetal hemoglobın miktarı % olarak tayin edildi. Bunun için Singer'in alkali denatürasyon metodu kullanıldı (13).

Kordon kanları arasında normalden farklı görülen örnekler nişasta blok elektroforezine de konarak kontrol edildi ve burada miktar tayinleri yapıldı (14).

SONUÇLAR

Aldığımız 100 kordon kanında yapılan fetal hemoglobin sonuçları (Şekil 1) de gösterilmiştir. Burada en düşük değer % 34, en yüksek değer % 82 bulundu. Büyük çoğunluk % 52 - 65 arasında yer alıyordu. Kabaca ortalama olarak hemoglobin fetal miktarını % 59 bulduk.



Şekil I

Smith'e göre yeni doğan fetal hemoglobin miktarı % 44 - 89 arasında değişmektedir (5).

Chernoff 1952'de 28 vak'ada alkali denatürasyon metodu ile yeni doğumda hemoglobin fetal'i % 50 - 85 oranında tesbit etmiştir (16).

Minnich 1962'de 143 vak'ada kolon kromatografisi metoduyla % 63 - 97 oranlarında Fötal hemoglobin bulmuştur (11, 16).

Armstrong, 1963'de 103 vak'ada da hem alkali denatürasyon, hem de Kolon Kromatografisi metodu ile hemoglobin Fötal'i ölçmüş- ilk metodla % 63 - 87 ikinci metodla % 79 - 91 oranında değiştiğini görmüştür (16).

Hemoglobin Fötal tayinleri prematürlerde zamanında doğanlardan daha yüksek değerler göstermektedir. Ayrıca alkali dena-

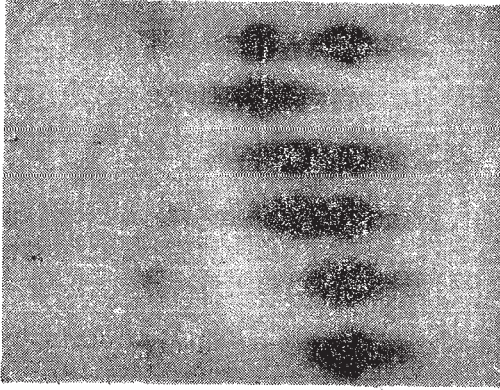
türasyon metodu ile kolon kromatografisi metoduna göre Armstrong tarafından aynı vak'alarda gösterildiği üzere fark vardır.

Bizim bulduğumuz değerler Smith ve Chernoff'un bildirdiği değerlere yakınlık göstermektedir (15, 16).

Üzerinde çalıştığımız 100 kordon kanından 99'unda elektroforetik olarak bir anomali tesbit edilemedi. Bunlarda hemoglobin, hemoglobin F ve Hemoglobin A olmak üzere iki büyük kısma ayrıldı. Hb A₂'nın görünümü ise çok hafifti. Bunun hemoglobin A₂ konsantrasyonunun fizyolojik olarak henüz çok düşük olmasına bağlı olduğunu düşündük.

Ankara Doğumevin den almış olduğumuz kanlar arasında 44 No'yu alan örnekte yukarıda bahsettiğimiz 99 örnekten farklı bir durum gördük Şöyle ki :

44 No'lu kanda hemoglobin A dan daha hızlı mobilite gösteren ufak bir hemoglobin fraksiyonu vardır. Yapılan 3 ayrı elektroforezde de bu görünüm sebat etti (Resim 2, 3).



Hb A₂, S ve A

Hb A₂ ve S

Hb F, A ve Bart

Hb F ve A

Hb A₂ ve A

Hb A₂ ve A

Resim : 2

Bebğin doğumdan ancak 3 ay sonra yapılabilen kontrolünde fizik muayene bulguları tamamen normaldi. Bu devrede tekrar edilen nişasta - jel elektroforezinde hızlı mobilite gösteren hemoglobin komponentinin kaybolduğu, ayrıca hemoglobin A₂ nin daha belirli bir hale geldiği tesbit edildi.



Hb F ve A (Kordon kanı)

Hb F A ve Bart's

Hb A₂ ve A

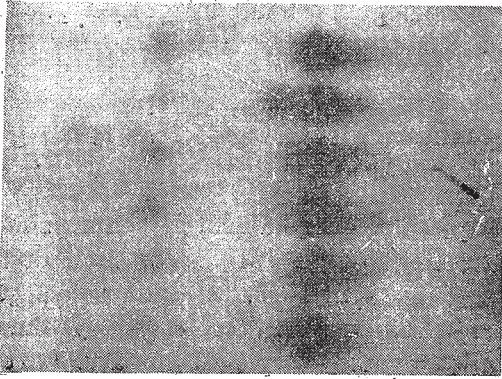
Hb A₂ S ve A

Kordon kanı

Resim : 3

Bebegin, ana baba ve üç kardeşinde anormal hemoglobin yoktu (Resim 4).

Bütün aile de hemoglobin H'e ait inklüzyon cisimleri arandı. Negatif bulundu.



Hb A₂ ve A (Baba)

Hb A₂, F ve A (Bebek)

Hb A₂ ve A (Kardeş I)

Hb A₂ ve A (Kardeş II)

Hb A₂ ve A (Kardeş III)

Hb A₂ ve A (Anne)

Resim : 4

Kordon kanında hızlı giden küçük bir fraksiyon olması çocuk büyüdükçe kaybolması daha evvel neşredilen çalışmalarda bildirilen Bart's a uygunluk göstermesi dolayısıyla bu hemoglobin fraksiyonunun biz de Bart's olduğunu düşünmekteyiz. Bu güne kadar tespit edilmiş ve nişasta - jel elektroforezinde hemoglobin A dan daha

hızlı mobilite gösteren hemoglobinler birden fazladır. Bunlar arasında ençok üzerinde durulan hemoglobin Bart's olmuştur. Ager ve Lehman 1958'de bu hemoglobin fraksionuna ilk defa dikkati çektiler ve kısaca hemoglobin Bart's adını verdiler (1, 9).

1959'da Hunt ve Lehman hemoglobin Bart's molekülünün 4 gama zincirinden ibaret bir tetramer olduğunu yani hiç alfa zincirini taşımadığını gösterdiler (1, 3).

Bundan sonra çeşitli araştırmacılar bu konu üzerinde daha detaylı çalışmalar yaptı : 1959 da Minnich ve arkadaşları Tayland'lı 415 yeni doğanın kordon kanlarının elektroforezinde 22 kanda hızlı hareket eden hemoglobin tesbit ettiler ve Barts' ile aynı özellikleri taşıdığını gördüler (8).

1962'de yine aynı araştırmacı 449 negro ve 90 beyaz bebekte inceleme yaparak 1 beyaz ve 32 negro da hemoglobin Bart's olduğunu gördü (11).

1963'de Weatherall 180 beyaz ve 900 negro bebekte kordon kanlarını elektroforeze tabi tutarak 19'unda bu hemoglobinin mevcudiyetini gösterdi (9). Yine Weatherall yeni olarak hemoglobin Bart's ve Hidrofs Fötalis taşıyanların hemoglobin analizini gözden geçirerek aradaki ilgiyi belirtti (10).

Aksoy ve Erdem Türkiye'de 104 kordon kanında yaptıkları incelemede hızlı hareket eden herhangi bir hemoglobin fraksiyonu görmediklerini bildirdiler (17).

Kordon kanları üzerinde yapılan bu çalışmaların hemen hepsinde tespit edilen önemli bir bulgu, başlangıçta eser halde bulunduğu takdirde bu hemoglobin fraksiyonun aynı bebekten daha sonra çeşitli zamanlarda alınan kan örneklerinin elektroforezinde kaybolmasıdır (8, 9). Nitekim bizim kordon kanında tespit ettiğimiz ve Bart's hemoglobini olduğunu düşündüğümüz hemoglobin fraksiyonunun aynı bebekten 4 ay sonra alınan kan örneğinde görülmemesi yukarıdaki vak'alara uygunluk göstermektedir.

Bugüne kadar tespit edilmiş hemoglobin Bart's gösteren erişkin vak'aların sayısı oldukça azdır. Bunlar çoğunlukla hemoglobin H anomalisi gösteren ailelerde H hemoglobinine ilâveten küçük bir

fraksiyon halindedir. Nitekim Okçuoğlu ve arkadaşları tarafından Türkiye'den bildirilen 2 H hemoglobini ihtiva eden ailede ileri yaşlarda (14 - 18 yaşlar) olmasına rağmen hemoglobin Bart's görülmüştür (14).

Weatherall biraz önce bahsettiğimiz çalışmasında Hemoglobin Bart's tespit ettiği 19 yeni doğanın ailelerini de incelemiş, çeşitli hematolojik değişiklikler bulmuştur. Bunların bir kısmı hipokromi, mikrositoz, target cell'ler osmotik frajilite de azalma niteliğindedir. Bu arada hemoglobin Bart's gösteren bir bebeğin aile fertlerinden ikisinde hemoglobin fetal'i % 5 gibi yüksek bir değerde olduğunu, periferik kanında da hipokromi ve target hücrelerinin mevcudiyetini görerek bunların heterozigot Beta Thalassemia taşıdıklarına karar vermiştir (9).

Biz de bebeğin ailesini hematolojik yönden inceledik. Burada annede demir eksikliği anemisi olduğu görülmektedir. Baba tamamen normal bulunmuştur. Kardeşlerden birinde A₂ diğer ikisinde hemoglobin fetal hafif yüksektir. Bu bulgular Weatherall'in bildirdiği aileye benzerlik göstermektedir (Şekil 2).

Bugün için söyleyebileceğimiz husus bebekte tespit ettiğimiz hızlı hemoglobin fraksiyonunun, neşredilen vak'alara uygunluğu göz-önüne alınarak hemoglobin Bart's olduğudur. Zira nişasta - jel elektroforezinde pH 8.6'da A'dan hızlı, fakat hemoglobinin H'dan yavaş hareket etmekte, nişasta blok ta aynı pH'da aynı mobilitayı göstermekte ve % 1.6 gibi küçük miktarlarda bulunmakta ve 4'üncü ayda kaybolmaktadır. Weatherall'e göre Bart's Hemoglobinin'i vak'aların çoğunda 6 aydan sonra gösterilememektedir (9). Dolayısıyla bu çalışmada Bart's Hemoglobin oranı % 1 dir. Ayrıca aile de heterozigot Beta Thalassemia'yı düşündüren bulgular vardır. Aile Ankara dışından olduğundan müteakip tetkikler için davet edilerek Beta Thalassemia yönünden daha etraflı incelenmesi plânlanmaktadır.

Tespit ettiğimiz bu Bart's Hemoglobinin'in Alfa Thalassemia'nın bir işareti olmaktan ziyade fizyolojik olduğunu düşünmekteyiz. Çünkü bir çok araştırmacı hemoglobin Bart'sın yeni doğum devrinde eser halinde gerek zenci ve gerekse beyaz ırktan bebeklerde görülmesini gama zincirlerinin bu devrede fizyolojik olarak biraz fazla imal edilmesine atfektektedirler. Fazla gama zincirleri de polime-

HEMATOLOJİK BULGUULAR										İsim : D. ailesi	
	Hb gr %	KK x 10 ⁶ /mm ³	Hkt %	BK mm ³	% Retik	OEV μ ³	OHK μμg	OKH %	CE/100 BK	Hb H inklüz-yon cisim	
Bebek (4 ay)	10.0	3.9	32	7200	1.8	82	27	31	θ	θ	
Anne	11.8	4.1	29	9240	1.0	75	29	39	θ	θ	
Baba	14.0	4.6	40	7040	1.4	89	30	35	θ	θ	
Kardeş I	12.6	4.2	36	10200	1.0	85	30	35	θ	θ	
Kardeş II	11.4	4.0	38	11200	1.2	95	29	30	θ	θ	
Kardeş III	11.6	3.9	35	8640	0.6	90	30	33	θ	θ	

Morfolojik Değişiklikler					Serum D				TDBK			Hemoglobin analizleri				
Aniso	Polk	Hipo	Target	% μg†	% μg	Hb A ₂ %	Hb F%									
Bebek (4 ay)	θ	θ	θ	—	—	1.6	20.5									
Anne	θ	θ	+	54	454	2.3	2.9									
Baba	θ	θ	θ	112	442	1.8	2.9									
Kardeş I	θ	θ	θ	60	315	2.7	4.1									
Kardeş II	θ	θ	+	92	332	2.9	3.2									
Kardeş III	θ	θ	+	—	—	4.4	—									
															θ	Menfi bulundu
															—	Yapılmadı

rize olarak az miktarda Bart's Hemoglobini yapmaktadırlar. Buna mukabil Alfa Thalassemia hallerinde gama zincirleri çok daha fazla bulunmakta ve dolayısıyla Bart's Hemoglobini konsantrasyonu artmaktadır (9). Çalışmanın seyrinde bunun dışında bir anormal hemoglobine rastlanılmadı.

Bizim 100 kordon kanı üzerinde yaptığımız bu çalışma Türk populasyonu hakkında istatistik bir netice çıkarmaktan elbette uzaktır. Bu ancak daha ileri çalışmalar için bir ilk adım olabilir.

ÖZET

100 kordon kanında nişasta - jel elektroforezi ile pH 8.6 da Thalassemia ve hemoglobinopati grubu hastalıklar üzerinde araştırma yapıldı. Aynı kanlarda Hemoglobin Fötal miktarları Singer'in Alkali denatürasyon metodu ile tayin edilerek ortalama % 59 bulundu.

100 kan numunesinden bir tanesinde Hemoglobin A dan daha hızlı mobilite gösteren bir hemoglobin fraksiyonu tesbit edildi. Bu fraksiyonun elektroforetik özelliği ve nesredilen vak'alara uygunluğu göz önüne alınarak hemoglobin Bart's olduğuna karar verildi (oran % 1). Başkaca anormal Hemoglobine rastlanmadı.

SUMMARY

Study of cord blood for thalassemia and abnormal hemoglobins

One hundred specimens of cord blood were examined by Starch-gel electrophoresis. One sample contained an electrophoretically «fast» moving fraction of hemoglobin, an incidence of 1 %. No other abnormal hemoglobin could be found in the samples of cord blood.

The abnormal «fast» hemoglobin component was thought to be identical with «Bart's» hemoglobin and disappeared at the age of 4 months. No hematological abnormality, other than Bart's hemoglobin, could be demonstrated on this baby.

LİTERATÜR

- 1 — WEATHERALL, D. J.: The Thalassemia Syndromes, Blackwell Scient. Public, Oxford 1965.
- 2 — INGRAM, V. M.: The Hemoglobins in Genetics and Evolution. Columbia University Press, New York and London, 1963.

- 3 — LEHMANN, H. and HUNTSMAN, R. G.: Man's Hemoglobin. North-Holland Pub. Com., 1966.
- 4 — BANK, A. et al.: Absolute Rate of Globin Chain Synthesis in Thalassemia. Blood 31: 226, 1968.
- 5 — MOTULSKY, A. G. and ECOMINGS, D.: Absence of an Delta Chain in Synthesis in Beta Thalassaemia. Blood 28: 54, 1966.
- 6 — PEARSON, H. A., SHANKLIN, D. R. and BRODINE, C. R.: Alpha Thalassemia as Cause of Nonimmunological Hydrops. Amer. J. Dis. Child. 109: 168, 1965.
- 7 — WAI KAN, Y., ALLEN, A. and LOWENSTEIN, L.: Hydrops. Fetalis with Thalassemia. New Eng. J. Med. 276: 18, 1967.
- 8 — MINNICH, V., TUCHINDA, S.; VAREENIL, C. and BHANCHIT, P.: «Fast» Hb Component Found in umbilical cord blood of Thai Babies. Pediatrics 24: 43 1959.
- 9 — WEATHERALL, D. J.: Abnormal Hemoglobins in the Neonatal Period and Their Relationship to Thalassemia. Brit. J. Haemat. 9: 1963.
- 10 — WEATHERALL, D. J., CLEGG, J. B. and BOON, W. H.: The Hemoglobin Constitution of Infants with the Hemoglobin Bart's Hydrops Fetalis Syndrome. Brit. J. Haemat. 18: 357 1970.
- 11 — MINNICH, V., CORDONNIER, J. K., WILLIAMS, W. J. and MOORE, C. V.: Alpha, beta and gamma Hb Polypeptide Chains in the Neonatal Period with Description of Fetal form of Hb D. Blood 19: 137, 1962.
- 12 — SMITHIES, O.: Zone Electrophoresis in Starch-Gels. Biochem. J. 61: 629, 1955.
- 13 — SINGER, K., CHERNOFF, A. I. and SINGER, L.: Studies on Abnormal I Hb F'-Alkali Denaturation. Blood 6: 413, 1951.
- 14 — OKÇUOĞLU, A., MINNICH, V.; ARCASOY, A. and CİN, Ş.: Thalassemia Sendromları I. Alfa Thalassemia Hb H Hastalığı. A. Ü. Tıp Fak. Mec. 19: 2, 1966.
- 15 — SMITH, C. H.: Blood Diseases of Infancy and Childhood. C. V. Mosby Com., St. Louis, 1966.
- 16 — OSKİ, F. A. and NAIMAN, J. L.: Hematologic Problems in the Newborn. Saunders Comp. Philadelphia, 1966.
- 17 — AKSOY, M., ERDEM, Ş.: Kordon Kanında Thalassemik Grublarda G-6-P D ve diğer enzimlerin anormal ve fetal hemoglobinlerle serbest alfa ve beta zincirlerinin ve hemoglobinlerin tayini. IV. Thalassemia ve anormal hemoglobin problemi. İst. Ü. Tıp Fak. Mec. 31: 19, 1968.