

71859

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

YENİDOĞANLARDA ORAK HÜCRE +  
ANEMİSİNİN TARANMASI

Zeynep ÖZTÜRK

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. M. Akif YEŞİLİPEK

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (Proje No: 2004.02.0122.004 ) tarafından desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

Antalya, 2005

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma, jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Kalıtsal Kan Hastalıkları Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.  
29/07 /2005

**Tez Danışmanı: Prof.Dr. M. Akif YEŞİLİPEK**  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

**Üye: Prof.Dr. Halil ERTUĞ**  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

**Üye: Prof.Dr. Nihal OYGÜR**  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

**Üye: Doç.Dr. İbrahim KESER**  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Üye: Yrd.Doç.Dr. O.Alphan KÜPESİZ**  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

**ONAY:**

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 05/08/2005 tarih ve 12/116 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof.Dr. Ramazan DEMİR**  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Dünyada yaygın olarak görülen hemoglobinopatiler hemoglobinin molekülünün genetik bozukluklarıdır. Hb S en yaygın hemoglobin varyantıdır ve  $\beta$ -globin zincirinin altıncı pozisyonunda glutamik asit yerine valin geçişi ile tek bir aminoasitin yer değiştirmesi sonucu oluşur. Orak hücre hastalıkları Afrika, Akdeniz ülkeleri, Türkiye, Arab yarımadası, Hindistan Yarımadası ve Amerika'da yaygındır. Ülkemiz için özellikle de bölgemiz için önemli bir problemdir. Yetişkinler arasında yapılan bir çalışmada talasemiden sonra en yüksek prevalansa sahip olarak bulunmuştur fakat yenidoğan döneminde yapılmış bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Orak hücre hastalıkları için etkili bir yenidoğan taraması erken tanı ve beraberinde azalmış morbitide sağlayabilir ve bu şekilde orak hücre hastalığı olan çocuğun hayatını kurtarabilir.

Bu çalışmada Antalya popülasyonunda yenidoğan döneminde orak hücre hastalığı veya taşıyıcılığının prevalansını belirlemeyi amaçladık. Çalışma Akdeniz Üniversitesi Hastanesi'nde 8 aylık bir dönemde gerçekleştirildi. Çalışmaya 806 olgu dahil edildi. Yenidoğanların topuk kanları Guthrie filtre kağıtlarına alındı ve 3-mm'lik yuvarlaklar test için kullanıldı. Örnekler Bio Rad Varyant HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) sistemi ile çalışıldı ve test metodu olarak Sickle Cell Short Program seçildi. Bu program özellikle yenidoğan döneminde hemoglobin A, F, S, C, D ve E'yi nitel olarak belirlemek için tasarlanmıştır. Üç yenidoğan orak hücre taşıyıcısı (%0,37) ve bir yenidoğan Hb D taşıyıcısı (%0,12) bulundu. Taşıyıcı olgular, ebeveynleri ve kardeşleriyle daha sonraki dönemlerde çağırıldı ve hemoglobin analizleri çalışılarak konulan tanı doğrulandı. Bu ailelere genetik danışmanlık verildi. Hiç homozigot orak hücre hastası belirlenmedi. Bu sonucun örnek sayısının düşük olmasından kaynaklandığı düşünüldü. Orak hücre hastalığının öldürücü komplikasyonlarını önlemek ve hemoglobinopatilerin yaygın olduğu bölgemizdeki taşıyıcı bireyleri belirlemek için her yenidoğanın orak hücre hastalığı açısından taraması gerektiği sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** Orak hücre hastalığı, yenidoğan taraması, HPLC

## ABSTRACT

Hemoglobinopathies are hereditary disorders of the hemoglobin molecule with a high prevalence worldwide. Hb S is the most common variant hemoglobin and results from a single aminoacid substitution of valine for glutamic acid at the sixth position of the  $\beta$ -globin chain. Sickle cell diseases are common among people from Africa, Mediterranean countries, Turkey, the Arabian peninsula, Indian subcontinent, and United States. It is an important problem for our country especially for our region. In a screening study including adults, Hb S had the highest prevalence after thalassemia but there is no study in literature performed in newborn period. An effective neonatal screening program for sickle cell disease will reduce morbidity by providing early diagnosis and by this way can save lives of children with this disorder.

In this study we aimed to identify prevalence of sickle cell disorder and heterozygous individuals in newborn period in Antalya population. This study was conducted in 8-month period in Akdeniz University Hospital. During the study period, 806 samples were tested. Heel prick samples of newborn taken onto Guthrie filter paper and 3-mm spots used for test. The samples were performed by Bio Rad Variant HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) system and Sickle Cell Short Program was chosen as the test method. This program is specially designed to provide a qualitative result for hemoglobins A, F, S, C, D, and E in neonates. Three newborn was found to be sickle cell trait (0,37%) and one was found to be Hb D trait (0,12%). All four trait infants with their parents and siblings were called later and their hemoglobins analysis were performed again to confirm the diagnosis. Genetic counselling was given to those families. No homozygous sickle cell patient was detected. It may be because of the low number of the samples. In conclusion, every newborn should be screened for sickle cell disease to prevent potentially fatal complications of sickle cell disease and to identify heterozygous individuals in our region where hemoglobinopathies are very common.

**Key words:** Sickle cell disease, newborn screening, HPLC

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans yaptığım dönem boyunca göstermiş olduğu ilgi ve yol göstericiliği için danışmam hocam Prof.Dr. M. Akif YEŞİLİPEK'e,

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen başta Pediatrik Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı çalışanları; Prof.Dr. M. Akif YEŞİLİPEK, Prof.Dr. Volkan HAZAR, Yrd.Doç.Dr. O. Alphan KÜPESİZ, Uzm.Dr. Gülsün TEZCAN, Hemşire Hayriye BAŞER ve Biyolog Pınar KURT olmak üzere tüm Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı çalışanlarına,

Topuk kanlarının toplanmasında emeği geçen Merkezimiz Yenidoğan Polikliniği hemşireleri Ayşe USLU, Birsen ŞAY, Hülya YILMAZ 'a ve Pediatri asistanlarından Dr.Sema ARAYICI, Dr.Gökmen ÖZDEMİR, Dr.Burak ÇAKÇAK'a, aynı şekilde 6, 7, 11 nolu sağlık ocakları ebelerine ve 1 nolu Anaçocuk Sağlığı hemşirelerine,

Yüksek lisans dönemim boyunca gösterdikleri yol göstericilikleri için Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Hayatım boyunca her zaman destek ve sevgilerini esirgemeyen aileme ve her konudaki anlayış ve desteği ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Saffet ÖZTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	SAYFA
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	
2.1. Hemoglobin Yapısı	2
2.2. Hemoglobinopatiler	2
2.2. Hemoglobin S	3
2.2.1.1. Orak Geninin Genetik Epidemiyolojisi	3
2.2.1.2. Patogenez	3
2.2.1.3. Klinik Bulgular	6
2.2.1.4. Tanı	10
2.2.1.5. Tedavi	10
2.2.1.6. Ölüm	11
2.2.1.7. Orak Hücre Taşıyıcılığı	11
2.2.1.8. Hb S'in diğer hemoglobin ile birlikte kalıtımı	12
2.2.2. Hemoglobin C	13
2.2.3. Hemoglobin E	13
2.2.4. Hemoglobin D	13
2.2.5. Hb O Arab	13
2.2.6. Talasemiler	13
2.3. Hemoglobinopatilerin Tanımlanmasında Kullanılan Laboratuvar Yöntemleri	15
2.3.1. Elektroforetik Yöntemler	15
2.3.1.1. Elektroforez	15
2.3.1.2. İzoelektrik Fokuslama (IEF)	16
2.3.2. Santrifügasyon Yöntemleri	16
2.3.2.1. Densiti Gradient (Zonal ) Santrifügasyon	16
2.3.3. Kromatografik Yöntemler ve HPLC Yöntemi	16
2.3.3.1. Kromatografi	16
2.3.3.2. HPLC	17
2.3.4. Yenidoğanlarda Tarama	21
2.3.4.1. Maliyet yararlanım oranı	21
2.3.4.2. Bilgi ve Rıza	21
2.3.4.3. Örnek Tipi	21
2.3.4.4. Laboratuvar Teknikleri	22
2.3.4.5. Sonuçların Yorumlanması	23

2.3.4.6. Sonuçların Doğrulanması	24
2.3.4.7. Sonuçlar ve Problem Bölgeleri	24
2.3.4.8. Sonuçların Raporlanması	24
2.3.4.9. Danışmalık ve Takip	24
2.3.4.10. Sonuç	25
<b>GEREÇ ve YÖNTEMLER</b>	
3.1. Örnekler	26
3.2. Laboratuvar İşlemleri	26
3.2.1. Örneklerin hazırlanması	26
3.2.2. Katyon Değiştirici HPLC	26
<b>BULGULAR</b>	31
<b>TARTIşMA ve SONUÇLAR</b>	36
<b>KAYNAKLAR</b>	41
<b>ZGEMIř</b>	49

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Hb AS</b>	: Orak hücre taşıyıcısı
<b>Hb F</b>	: Fetal hemoglobin
<b>Hb S</b>	: Orak hemoglobin
<b>Hb SS</b>	: Homozigot orak hücre hastası
<b>Hb</b>	: Hemoglobin
<b>Hkt</b>	: Hematokrit
<b>HPFH</b>	: Hereditary Persistence Fetal Hemoglobin
<b>HPLC</b>	:Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
<b>IEF</b>	: İzoelektrik Fokuslama
<b>KIT</b>	: Kemik İliği Transplantasyonu
<b>OEV</b>	: Ortalama eritrosit hacmi
<b>OEH</b>	: Ortalama eritrosit hemoglobini
<b>OEHK</b>	: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
<b>OHA</b>	: Orak Hücre Anemisi
<b>OHH</b>	: Orak Hücre Hastalığı
<b>TM</b>	: Talasemi major
<b>VCAM</b>	: Vasküler hücre adezyon molekülü



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1.a. Normal kırmızı kan hücresi ve normal hemoglobinin primer yapısı,	4
2.1.b. Oraklaşmış kırmızı kan hücresi ve orak hemoglobinin primer yapısı	4
2.2. Bir kırmızı kan hücresinin oraklaşması	5
3.1. Örnek bir sonuç rapor formatı ve kromatogram	28
3.2. HPLC'de görülebilecek olası kromatogram örnekleri	29
4.1. Normal ve taşıyıcı bireylerin kromatogram sonuçları	34

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
2.1. Orak Hücre Hastalığının Klinik Bulguları	7
2.2. Yenidoğan taramalarında saptanabilen orak hücre tipleri	23
3.1. HPLC ile tespit edilebilen hemoglobin fenotipleri	30
4.1. 806 yenidoğanda saptanan Hb tiplerinin kan alım günlerine göre ortalama değerleri	32
4.2. Taşıyıcı yenidoğanların HPLC ile saptanan hemoglobin yüzdeleri	32
4.3. Normal bireyler ile taşıyıcı bireylerin ortalama Hb yüzdelerinin karşılaştırılması	32
4.4. Hb D ve Hb S taşıyıcısı olan yenidoğanların hematolojik parametreleri	33
4.5. Taşıyıcı yenidoğanların ve anne-baba- kardeş elektroforez sonuçları	33

## GİRİŞ VE AMAÇ

Hemoglobinopatiler dünyada en yaygın görülen genetik hastalıklardır. Dünyada 200 milyon hemoglobinopati taşıyıcısı olduğu ve her yıl 300.000 major hemoglobinopati doğum olduğu tahmin edilmektedir (1). Yunanistan, Türkiye, Suudi Arabistan, Hindistan, Pakistan, Bulgaristan, Çin ve Kıbrıs'ta hemoglobinopatiler oldukça yaygındır (2). Bölgemizde de hemoglobinopatiler önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Antalya'da yetişkinler arasında yapılan bir çalışmada Beta-talasemi major (TM) toplumda yaklaşık %10 sıklıkta taşıyıcılık oranı ile ilk sırayı oluştururken ikinci sırada %0.24 sıklık ile orak hücre anemisi (OHA) yer almaktadır (3). Ancak hastaların bir kısmı hayatın erken dönemlerinde araya giren sorunlar nedeniyle kaybedildiği için yenidoğan döneminde hasta bebek sayısının bilinenden daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Bölgemizde yenidoğan döneminde yapılmış bir tarama çalışması olmadığı için kesin bir insidans verilememektedir.

Orak hemoglobinin (HbS) hayatın ilk aylarında henüz yeterince yükselmemesi nedeniyle orak hücre anemili hastalarda klinik bulgular daha geç dönemde çıkmaktadır. Çoğu OHA'li bebek doğumdan sonraki erken dönemde sağlıklı olmasına karşın bebeklik veya çocukluk döneminde fetal hemoglobin (HbF) seviyesinin düşmesi ve Hb S'in yükselmesi ile birlikte semptomatik olur (4). Hastalığın geç tanınması hasta yaşamını olumsuz etkileyecek komplikasyonlara neden olabilmektedir. Erken tanı konulmasıyla ilk iki ay içinde başlanan penisilin profilaksisi ile mortalitesi yüksek bakteri enfeksiyonlarının görülme sıklığını azaltıldığı bildirilmektedir (5-7). Tanının biliniyor olması gelişebilecek komplikasyonlara erken müdahale ve izleminde hastalığın seyir ve ağırlığını değiştiren tedavi yaklaşımlarının uygulanmasını sağlayacak ve belki de hayat kurtarıcı olacaktır (8-10).

Bu çalışma; yenidoğan bebeklerde henüz klinik bulgular ortaya çıkmadan klasik hemoglobin elektroforezinden daha duyarlı bir yöntem olan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile hayatın ilk aylarında orak hücre taraması yaparak bölgemizdeki yenidoğanlarda HbSS (homozigot-hasta) ve HbAS (heterozigot-taşıyıcı) sıklığının belirlenmesi ve hastaların tanınarak olası komplikasyonların önlenmesi amacıyla planlandı.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hemoglobin Yapısı

Hemoglobin (Hb), kırmızı kan hücreleri tarafından taşınan, akciğerlerden oksijeni alıp periferel dokulara dağıtan bir proteindir. Hb globüler yapıda, polipeptid bir tetramerdir ve farklı iki globin zincirinden meydana gelir. Bu zincirlerin her biri bir demir molekülü ile protoporfirin kompleksinden oluşan *hem* denilen prospektif bir gruba bağlanır. Alfa benzeri zincirler (zeta [ $\zeta$ ], alfa [ $\alpha$ ]) 16. kromozom üzerinde iki kopya olarak, beta globin benzeri zincirler (epsilon [ $\epsilon$ ], beta [ $\beta$ ], delta [ $\delta$ ] ve gama [ $\gamma$ ]) ise 11. kromozom üzerinde bir grup olarak kodlanırlar.  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirleri sırasıyla 141 ve 146 aminoasitten oluşur. İki zincir arasında homolog sekanslar (64 aminoasit) vardır.  $\beta$  zinciri,  $\delta$  ve  $\gamma$  zincirlerinden sırasıyla 39 ve 10 aminoasit ile farklılık gösterir. Embriyo, fetus ve erişkinde  $\alpha$  ve  $\beta$  benzeri globinlerden oluşan farklı hemoglobinler sentezlenir. Gestasyonun 4 ve 14. haftalarında yolk sactaki çekirdekli eritroid hücrelerden üç farklı hemoglobin sentezlenir:  $\zeta_2\epsilon_2$  (Hb Gower-1),  $\zeta_2\gamma_2$  (Hb Portland) ve  $\alpha_2\epsilon_2$  (Hb Gower-2). Normal yetişkin eritrositleri bu embriyonik globinleri içermez. 14. haftadan sonra bu embriyonik Hb'lerin yerini HbF almaya başlar. Gestasyonun yaklaşık 38. haftasında fetal hemoglobin yapımından erişkin hemoglobin yapımına geçiş olur. Sağlıklı bir yetişkinde Hb'in %95'i Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ), az bir miktarı (<%3.5) Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ )dir.

### 2.2. Hemoglobinopatiler

Hemoglobinopatiler, hemoglobin molekülündeki globin zincirlerinde anormal bir yapıya neden olan genetik bozukluklardır. Bu anormal hemoglobinler başlıca üç temel sorundan oluşurlar:

1. **Hemoglobin molekülündeki yapısal hasarlar:**  $\alpha$  ve  $\beta$  denilen hemoglobinin iki alt zincirinde oluşan mutasyonlardır. Bir aminoasitteki değişiklik Hb molekülünün davranışını bozar ve bir hastalık durumu oluşturur. Örneğin Orak hemoglobin.
2. **Hemoglobin molekülünün iki alt ünitesinden birinde eksik üretim:** Hemoglobinin normal fonksiyonu için eşit sayıda alfa ve beta zincirleri gereklidir. Hemoglobin zincir üretimindeki düzensizlik kırmızı kan hücrelerine hasar verir, yok eder ve böylece anemi oluşur. Bu duruma yol açan mutasyonlara talasemiler denir.
3. **Hemoglobinin normal alt ünitelerinin anormal birleşimi:** Örneğin ağır  $\alpha$ -talasemilerde  $\beta$  globinler dördü grup oluştururlar ve fonksiyon olarak inaktiftirler ve oksijen taşıyamazlar. Ağır beta talasemilerde ise  $\alpha$ -globin alt üniteleri dördü yapı oluşturarak hızla çökerler.

Yaklaşık 400 farklı anormal hemoglobin tanımlanmıştır. Bunların yarısı klinik olarak önemlidir. Bunlardan en önemli hemoglobin varyantları Hb S, Hb C, Hb E, Hb D ve talasemilerdir.

### 2.2.1. Hemoglobin S

Orak hücre anemisi ilk olarak 1910 yılında James Herrick (11) tarafından Doğu Hindistanlı bir tıp öğrencisinde tanımlandı. Sydenstricker ve arkadaşları (12) çocuklarda ilk ortaya çıkışını, hemolitik anemi ile ilişkisini ve periyodik akut ağrı olaylarını tanımlamak için kriz terimini tanımladılar. Hastalığın patolojik temeli ve hemoglobin molekülü ile ilişkisi 1927 yılında Hahn ve Gillespie (13) tarafından tanımlandı. Linus Pauling ve arkadaşlarının (14) orak hemoglobini normal hemoglobinden ayıran hareketli sıvı elektroforezi kullanmasından kısa bir süre sonra Neel (15) hastalığın genetiğini tanımladı ve orak taşıyıcılarını-heterozigot form (AS)-orak hücre anemisinden – homozigot durum (SS) - tam olarak ayırt etti. Janet Watson (16) ise yalnızca fetal hemoglobin konsantrasyonu düştükten sonra yenidoğanlarda semptomların görüldüğünü belirleyerek hastalığın iyileştirilmesinde Hb F'in yararlı etkisini göstermiş oldu.

#### 2.2.1.1. Orak Geninin Genetik Epidemiyolojisi

Orak geni taşıyıcıları malarya parazitine dirençlidirler (17). Plasmodium öldürücülüğünde doğal bir korunma sağlanmaktadır. Plasmodium falciparum yaşam siklusunu bu hücrelerde tamamlayamaması bunun nedenidir. Populasyondaki orak gen oluşu malaryanın tarihi oluşu ile paraleldir (18). Orak hücre başta Afrika populasyonu olmak üzere Akdeniz ülkelerinde, Karaiplerde, Güney ve Orta Amerika'da, Arablarda ve Doğu Hindistan'da yüksek oranda görülmektedir (19).

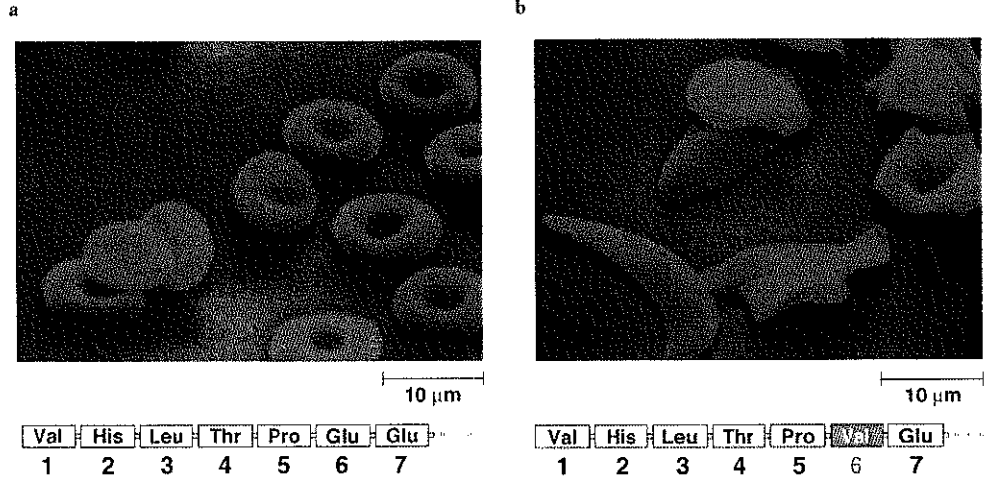
Orak hücreli anemi otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalıktır. OHA geni Hb C, Hb D Los Angeles, Hb O Arab ve talasemi ile birlikte olabilir. Hb S'de  $\beta$  zincirinin NH<sub>2</sub> ucunda 6. pozisyonda bir glutamik asit yerine bir valin aminoasitinin geçtiği yani baz düzeyinde GAG yerine GTG geçtiği bilinmektedir.  $\alpha$  zinciri ise normaldir (20). Bunun için HbS'in kimyasal isimlendirilmesi  $\alpha_2\beta_26\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$ 'dir.

#### 2.2.1.2. Patogenez

$\beta$ -globin geninin 6. kodonunda tek bir nükleotid yerdeğiştirmesi  $\beta$ -globin zincir varyantının yüzeyinde glutamik asit yerine valin geçmesiyle sonuçlanır. Bu değişiklik oksijensiz ortamda Hb S'in polimerize olmasına neden olur bu polimerlerde eritrositlerin oraklaşmasına neden olur (Şekil 2.1). Deoksi durumda Hb S solubilitesi azalır, buna karşın viskozitesi artar. Deoksijenize Hb S'in polimerizasyonu orak hücre hastalığının genetik patogenezinin birincil sorumlu olaydır. Oraklaşma hücre içi eritrositik Hb S konsantrasyonuna, hücrenin deoksijenasyon derecesine, pH'ına ve hücre içi diğer hemoglobin konsantrasyonlarına bağlıdır;

- Normal hücrelerin hemoglobin konsantrasyonu 30g/dL'dir ancak Hb S'in viskozitesinin azalıp jelleşmesi 20.8 g/dL'den daha yoğun konsantrasyonlarda olur. Bu jel polarize ışıkta incelendiğinde küçük, rijit, mekik şeklinde cisimler içerdiği görülür, bu likid kristallere taktoid de denilir.
- Hb S'in en önemli fizyolojik etkileyicisi oksijendir. Polimerize olma yalnızca deoksi durumunda olur. Deoksijenasyonla Hb S'in oksijen afinitesi düşer ve deoksi durumu meydana gelir.
- Orak hücreli kişilerin PH'ı normal kişilerininkinden 0.5 daha düşüktür.

- Diğer hemoglobinlerin Hb S polimerizasyonu üzerine etkisi değişkendir. Hb C ve Hb D oraklaşmayı artırdığı halde Hb A ve Hb F jelleşme üzerinde inhibe edici bir etkileri vardır. Hb S polimerizasyonunun Hb F ile baskılanması asimetrik Hb S/Hb F hibrid formunun ( $\alpha_2\delta\beta^S$ ) oluşması gerekir.



Şekil 2.1.a Normal kırmızı kan hücresi ve normal hemoglobinin primer yapısı,  
2.1.b. Oraklaşmış kırmızı kan hücresi ve orak hemoglobinin primer yapısı (21)

Oraklaşmayı etkileyen bir diğer önemli faktörde dehidrasyon derecesidir. Eritrositlerin dehidrasyonunu etkileyen dört önemli yol vardır:

- **Gardos Kanalı:** Kırmızı kan hücrelerinde hücre içi serbest  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu arttığı zaman Gardos kanalı aktive olur büyük miktarda  $Cl^-$  ile birlikte taşınan  $K^+$  kaybı olur ve su kaybı gerçekleşir. Sonuçta hücre içi hemoglobin miktarı artmıştır bu da deoksijenize Hb S'in polimerize olmasını artırır. Orak eritrositlerin suyunu kaybetmesine dışardan gelen  $Ca^{2+}$  neden olur ve charybdotoxin, nifedipine yada clotrimazole gibi Gardos kanalı inhibitörleri ile engellenebilir (22).

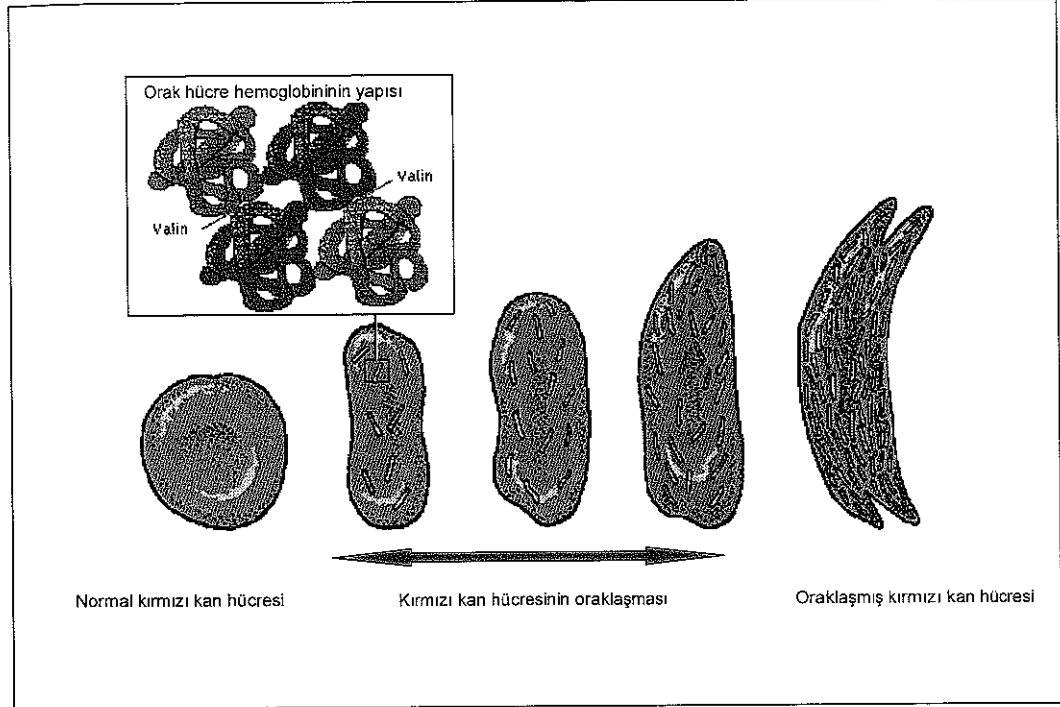
- **K-Cl Kotransportu:** K-Cl kotransportunun aktivasyonu Hb C, S ve  $\beta$ -talasemi intermedia eritrositlerinde gözlenmiştir. Bu aktivasyon çoğunlukla kırmızı hücre membranının oksidatif hasarı sonucu olur ve in vitro olarak DDT (dithiothreitol) 'a maruz bırakılmak koşuluyla azaltılabilir (23).

- **Deoksijenasyon ve Na-K pompası:** Yapılan çalışmalarda  $Na^+$  ve  $K^+$  geçirgenliğinin artmasının eritrosit oraklaşmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (24). Oraklaşmada  $Na^+$  ve  $K^+$  geçirgenliğinin artması  $Ca^{2+}$  artmasıyla ilişkilidir. Na-K pompasının aktive edilmesi hücre dehidrasyonuna neden olabilir.

- **Hücre membranının oksidatif hasarı ve K kaybı:** Orak hücre membranının oksidatif hasarı Hb S'in hızlı okside olması ve denatüre hemoglobinin membran kalıntısı, ferritin, serbest hem ve demir ile demirin birleşmesi sonucu oluşur. Oksidatif hasar K-Cl kotransportunu aktive eder.

Eritrositler oraklaşırken öncelikle periyodik hareketlerini kaybederler, hücre orak şeklini alır, uzar, hilal şeklini alır, katılaşmış hemoglobin hücrenin aksi

istikametindeki hemoglobine uzanır. Deoksijenasyonun devam etmesi halinde deformasyon artar ve hücreden ince filamentler uzanır. Şekil 2.2'de bir eritrosit hücresinin oraklaşması gösterilmektedir.



Şekil 2.2 Bir kırmızı kan hücresinin oraklaşması (25)

KK'ler oraklaştığı zaman  $\text{Na}^+$  alırlar ve  $\text{K}^+$  kaybederler. Bu durumda sodyum-potasyum ATPaz pompasının yetersizliği söz konusudur. Yine Adenozin trifosfataz'a (ATPaz) bağımlı  $\text{Ca}^{2+}$  pompasının bozulması nedeniyle  $\text{Ca}^{2+}$ 'a olan membran geçirgenliği artar. Muhtemelen hücre iskelet proteinlerinin etkileşimindeki değişikliklere bağlı olarak membran daha fazla sertleşir. Kalsiyumun membran sertleşmesinden sorumlu olup olmadığı kesin değildir.

Tekrarlayan oraklaşma olaylarından sonra membran hasarı olur ve normal oksijen basıncı sağlansa dahi hücreler binkonkav şekillerine dönemezler ve bu şekilde irreversible oraklaşmış hücreler haline gelirler. Bu yoğun kısımlar çoğunlukla düşük Hb F ve dehidrate retikülositler içerirler. Hb F'in irreversible oraklaşmış hücrelerde reversible oraklaşmış hücrelere oranla daha az miktarda bulunması primer oraklaşmayı tayin eden faktörün Hb F olduğunu gösterir. Çok su kaybetmiş hücreleri içeren eritrosit parçalarının irreversible oraklaşmış hücre yüzdeleri fazladır. İreversible oraklaşmış hücrelerde potasyum kaybı belirgindir. Bu total katyon miktarındaki azalma suyun hücreden kaybına ve hücre içi Hb konsantrasyonunun artmasına yol açar. Hücre iskelet proteinlerinin etkileşimindeki değişiklikler de irreversible oraklaşmış hücre oluşumuna neden olur. Mikrofilamentlerin dağılması ile birlikte oluşan membran kaybı ile hücre volümü daha da azalır. Volümün azalması ile Hb S konsantrasyonunun artması moleküler polimerizasyonu artırır ve oraklaşmayı hızlandırır ve hemoglobinin oksijen afinitesini

düşürür. Yine hücre içi kalsiyum arttığında ATP düzeyi düşer ancak bunların irreversible oraklaşmış hücreye fazla bir etkisi yoktur. OHA'li kişilerin kırmızı hücrelerinin %4-44'ü irreversible şekilde oraklaşmıştır. Bu sayı kişiye göre değişir

Orak hücreler yüzeylerinde endotel hücre adezyon molekülü ve vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM)-1 ile etkileşen VLA-4 eksprese ederler. VCAM-1 hipoksi ile aktive edilirken nitrik oksit ile inhibe edilir. Hipoksi aynı zamanda bir vazodilatör olan nitrik oksit üretimini azaltır ve bu nedenle orak hücrelerin vasküler endoteliuma adezyonu artar.

Orak hücre anemisindeki klinik belirtilerin herbiri kan viskozitesinin artması ile ilgilidir. Kanın viskozitesi ise membran rijiditesi, hemoglobin polimerizasyonu ve hücre içi hemoglobin konsantrasyonunun artması gibi faktörler ile artar. Artmış yapışkanlıktan dolayı orak hücrelerinin damar endoteliuma yapışmaları artar bu da perfüzyonun azalmasına yol açar ve endotelium hasar görür.

Bozuk orak hücreler CD18 eksprese ederler ve normal hücrelere göre endotele 10 kat daha fazla yapışır ancak irreversible oraklaşmış hücreler yapışmaz. Bu nedenle fazla miktarda irreversible oraklaşmış hücreler üreten kişiler daha fazla oranda normal deforme hücreleri olanlara göre daha az vazo-oklusif kriz geçirirler.

Orak hücre sendromlarında hemoliz değişmez bir bulgudur. Eritrositlerin yaklaşık üçte biri intravasküler hemolize giderler. Bu muhtemelen oksijenasyon ve deoksijenasyon sırasında membran filamentlerinin kaybına bağlıdır. Kalanlar ise eritrofagositoz ve makrofajlarla hemoliz edilir. Orak hücreler aynı zamanda makrofajlara da yapışır. Eritrositlerin yaklaşık 2/3'ü makrofajlarla dolaşımdan alınır

Orak eritrositlerinin yüzeylerinde artmış immunoglobulin G (IgG) vardır. Vazo-oklusif kriz çoğunlukla enfeksiyonlarla tetiklenir. Fibrinojen ve fibronektin seviyeleri ve D-dimer bu hastalarda artmıştır.

Bu fizyolojik değişiklikler başlıca hemolitik anemi, vazo-oklusif kriz ve kalp, iskelet, dalak ve merkezi sinir sistemini içeren mikroyinfarkların neden olduğu çoklu organ hasarı olan bir hastalıkla sonuçlanır.

### **2.2.1.3. Klinik Bulgular**

OHA nin semptomları ve klinik bulguları çok değişiktir ve genel olarak ağrı ve anemiyi içerir. Çizelge 2.1'de Orak hücre hastalığı (OHH)'nda yaygın olarak görülen klinik bulgular özetlenmiştir.



**Çizelge 2.1. Orak Hücre Hastalığının Klinik Bulguları (26)**

- 
- A. Genel
1. Büyüme geriliği
  2. Yaşam süresinin kısalması
- B. Baş ve Boyun
1. Konjunktival damar değişiklikleri
  2. Vitroz kanama
  3. Retinal ayrılma ve körlük
- C. Kardiyovasküler sistem
1. Sistolik üfürüm
  2. Koroner arter hastalığı olmaksızın akut miyokardiyal infarktlar
  3. Kardiyomegali
  4. Kalp yetmezliği
- D. Pulmoner sistem
1. Akut göğüs sendromu
  2. Pnömoni
- E. Gastrointestinal sistem
1. Vazo-oklusif kriz
  2. Hepatomegali, splenomegali
  3. Hepatit, siroz
  4. Kolesistit, kolelityaz
  5. Splenik infarksiyon ve fibrozis
- F. Kas-iskelet sistemi
1. Osteonekroz (özellikle femur başı)
  2. Osteomyelit
  3. Artrit
- G. Ürogenital sistem
1. Priapizm, iktidarsızlık
  2. Hematüri
  3. Pyelonefrit
  4. Böbrek hastalığı
- H. Nörolojik sistem
1. Konvulsiyonlar
  2. Hemoraji
  3. Görme rahatsızlıkları
- I. Dermatolojik sistem
1. Ülserler
- J. Psikolojik
1. Kronik ağrı sendromu
    - a. Uyuşturucu ilaç bağımlılığı
    - b. Depresyon, duyarsızlık
- K. Prenatal
1. Gebelikte tekrarlayan düşükler, ölü doğum
-

Çizelgede özetlenen komplikasyonlardan en yaygın görülenleri şunlardır;

▪ OHA genellikle erken çocukluk döneminde başlar. Yaşamın ilk altı ayı Hb F seviyesinin fazla olmasından dolayı büyük oranda korunurlar ancak sonrasında belirtiler ortaya çıkar. 1 yaşından küçük bebeklerde el ve ayak parmağı iltihabı görülmesi, Hb düzeyinin 7 g/dL'den düşük olması ve enfeksiyonlarda lökositoz oluşması görülen ilk belirtilerdir.

▪ Çocukluk ve ergenlik döneminde hastalarda büyüme geriliği, gecikmiş seksüel olgunlaşma ve kilo alamama görülür. Gençler ergenlik döneminde mental ve fiziksel değişikliklerde problemler yaşayabilirler (27,28). Büyüme ve gelişmede iki yıl geride kalabilirler. Çocukluk çağında pnömokok enfeksiyonları yaygındır. Beş yaşından sonra pnömokoklar yerine Gr (-) bakteriler yaygın olarak enfeksiyona yol açar. İlk dekattan sonra anaerobik ve enterik organizmalar önemli patojenlerdir. OHA'li çocuklarda en yaygın ölüm nedeni enfeksiyonlardır (29,30). Enfeksiyonların bu kadar riskli olmasının sebebi dalağın fonksiyonel olarak asplenik olmasıdır (31) Çünkü dalak iki immunolojik fonksiyonu olan intravasküler alandan partiküllerin temizlenmesi ve antikor sentezi işlemlerini yerine getirememektedir.

▪ El-ayak sendromu çocuklukta görülen diğer bir problemdir. Bu el ve ayakların dış taraflarının ağrılı olarak şişmesi ile görülen bir klinik sorundur.

Orak hücre krizi ilk olarak Diggs (32) tarafından tanımlandı. Orak krizi üç katagoriden oluşur: Vazo-oklusif, sekestrasyon ve aplastik krizler. Hasta üç yaşına gelene kadar bu krizler birkaç kez tekrarlayabilir.

▪ Yetişkinlerde en sık görülen klinik tablo ağrılı (vazo-oklusif) krizlerdir. Hb S molekülünün deoksijenasyon sonucu polimerleşmesi nedeniyle oluşur (33-35). Kriz aniden başlar, bazen bir enfeksiyon, basınçsız uçaklarda ani yükseklik değişikliği yada sıcaklık değişimi sonucunda gelişebilir. İrreversible oraklaşmış hücrelerin damarı tıkanması doku harabiyeti ve nekroz ile sonuçlanır. Azalmış kan akımı, bölgesel hipoksi ve asidoza ve iskemik harabiyete yol açar. Uzun kemikleri içeren ekstremitelerde şiddetli derin bir ağrı olur. Bununla birlikte karın ve yüzde de ağrı oluşabilir. Ağrı ile birlikte ateş, halsizlik ve lökositoz görülebilir. Kriz birkaç saat yada birkaç gün sürebilir. Semptom genellikle yaşamın 2. yılından sonra görülür (36). Homozigot Hb S hastalığı olan bireylerin yaklaşık yarısı vazo-oklusif kriz yaşamışlardır.

▪ Yaşamın ilk yılının ikinci yarısında dalak büyümeye başlar. Genellikle çok sayıda orak hücrenin dalakta toplanıp havuz oluşturmasıyla dalakta aniden ağrılı bir büyüme olur. Bu fenomen splenik sekestrasyon krizi olarak bilinir. Hb ve Hkt düzeylerinde ani düşme ve kanın dalakta göllenmesi ile karakterizedir. Ani gelişen hipovolemi ve şok görülebilir. İki aylık bir bebekte de bu komplikasyon tanımlanmıştır (37). Erişkinlerde ise tekrarlayan infarklar ve fibrozis sonucu otosplenektomi gelişir. Sekestrasyon aynı zamanda karaciğerde de olabilir. Hiperbilirubinemi, artmış anemi ve retikülositoz ile birlikte karaciğer büyümesi ve yumuşaklığı genel klinik belirtilerdir (38).

▪ Anemi tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. Anemiye yol açan en yaygın iki neden splenik sekestrasyon ve aplastik krizdir. Aplastik kriz başta Parvovirus B-19 nedeniyle oluşan enfeksiyonlar sonucu yada folat eksikliği ile olur. Aplastik kriz kemikiliği yavaşladığı yada yeni kırmızı kan hücrelerinin üretimini

durdurduğu zaman oluşur. Pansitopeni ve retikülositopeni nedeniyle ağır anemiye yol açar. Eritrositlerin yaşam ömürleri kısalmıştır ve genellikle 10-20 gündür. 7-10 gün içinde hastalar kendiliğinden iyileşirler. Yine Hb ve Hemotokrit (Hkt) düzeylerinde düşme, retikülosit düzeyinde artma, ateş ve ikter ile seyreden hemolitik kriz de diğer önemli bir komplikasyondur. Bazı ilaçlar ve G6PD eksikliği hemolitik krizi artırır.

▪ Akut göğüs sendromu göğüs ağrısı, ateş, öksürük, takipne, lökositoz ve hipoksi ile kendini gösterir (39). Akut göğüs sendromu vazo-oklusif krizden sonra en yaygın akut komplikasyondur ve OHH 'da ölüme neden olan en yaygın ikinci komplikasyondur (40-42). 100 hastanın 12.8'inde görülür (43). Enfeksiyonlar bu sendromun en yaygın sebebidir (39). Hidroksiüre tedavisi yetişkinlerde görülme sıklığını yüzde 50 azaltır (44). Tıbbi açıdan acil bir durumdur ve hemen tedavi edilmesi gerekir.

▪ Hem çocuklukta hem de ergenlik döneminde yaygın olarak görülen santral sinir sistemi rahatsızlıkları OHA 'nin en çok harap edici durumlarından biridir. Beynin akut infarksiyonu sonucu felç yada değişen derecelerde nörolojik hasarlarla sonuçlanabilir ve OHH olan çocukların yüzde 7'sinde görülür (45,46). Tedavide acil olarak yoğun hidrasyon ve oksijen verilmelidir ve dolaşımdaki Hb S'i %30'dan daha alt seviyeye indirmek için yoğun transfüzyon önerilir.

▪ Kronik anemi ve mikroiinfarklara bağlı olarak kalp ile ilgili sorunlar yaşanabilir. Kardiyomegali, kalpte üfürümler, görülür. Hemoliz ve kan transfüzyonu ise kalp kasında hemosiderin depolanmasına yol açar.

▪ Hastalarda dehidrasyona bağlı olarak aşırı su kaybı olur. Deoksijenasyon nedeniyle oraklaşma diğer organlara göre daha hızlı olur. Genellikle öncesinde proteinüri oluşup sonrasında böbrek yetmezliği ortaya çıkar (47). Nefrotik sendrom yaygın değildir fakat görülebilir.

▪ Tekrarlayan infarklar, kemikler, eklemler, akciğerler, karaciğer, göz, merkezi sinir sistemi ve dalakta organ harabiyetine yol açar. Kemik ve eklemler en sık tutulan yerlerdir. İnfark, çocuklarda el-ayak sendromuna neden olurken ilerleyen yaşlarda el ve ayak parmaklarında eşit olmayan kemik deformitelerine, ağırlı şiş eklemlere ve femur başı aseptik nekroza yol açar. Femur başı aseptik nekroz 35 yaşına gelmiş OHH olan hastaların %50'sinden fazlasında görülmüştür (48).

▪ Bacak ülseri kronik ağırlı bir problemdir. En yaygın bulgusu alt ekstremitelerde yara ve ülserler oluşmasıdır. İyileşmesi uzun zaman alır.

▪ Priapizm hızla gelişen ağır bir komplikasyondur. Puberte sonrası sık görülür. Korpus spongiosum ve korpus kavernosumun tutulumu gerçekleşir. Priapizm hikayesi olan olguların yüzde 46'sının seksüel disfonksiyonu olduğu rapor edilmiştir (49). Tekrarlama olasılığı %50'dir.

▪ Hamilelik sırasında orak hücre taşıyıcısı bayanların idrar yolu enfeksiyonu geçirme olasılıkları fazladır. Hamilelikteki komplikasyonlar hemoliz ve vazo-okluzyonlara bağlıdır. Amerika'da çok merkezli yapılan bir çalışma orak hücre hastalığı olan bayanların iyi bir maternal ve fetal sonuçları olduğunu göstermiştir (50-52). Doğumda bebek prematür yada düşük doğum ağırlıklı olabilir.

▪ Retinopati yaş ve zamana bağlı olarak gelişir. Artan bir retinit Hb SC hastalığında yaygındır ve görme kaybına yol açabilir.

#### 2.2.1.4. Tanı

Fetal dönemde birinci trimesterde yapılan koryon villustan veya ikinci trimesterde yapılan amniyosentezden elde edilen fetal DNA kullanılarak orak hücre mutasyonunun moleküler analizi ile prenatal tanı yapılabilir. Bunun dışında maternal dolaşımdan elde edilen fetal hücrelerin izolasyonu ve preimplantasyon tanı başarılı olarak kullanılmaktadır (53,54)

Orak hücre anemili yenidoğanlar genellikle Hb F'in koruyuculuk etkisinden dolayı genellikle anemik değildirler ve semptom vermezler. Oysa yenidoğan döneminde hastalığın belirlenmesi mortalite ve morbiditeyi engelleyebileceğinden önemlidir ve bu nedenle yenidoğanların taranması önerilir. Süregelen tanı yöntemleri olarak asit ve alkali elektroforez, HPLC ve İzoelektrik fokuslama (IEF) kullanılır. Filtre kağıdından elde edilen DNA'nın PCR amplifikasyonu ile de orak hücre hastalığı belirlenebilir (55).

Birkaç aydan sonra  $\beta^S$ -globin üretimi artar ve Hb F seviyesi düşer. OHA'nin klinik olarak bulguları ortaya çıkar. Anemi ve retikülositoz genellikle 4 aylıktan görülür. Önceleri periferik kan yaymaları ve morfolojik özellikleri normal yenidoğanlarla aynıdır. Yaşamın 3. yılı ile birlikte orak hücreleri, hedef hücreleri, sferositleri, bikonkav diskleri, Howel-Jolly cisimciklerini ve çekirdekli kırmızı hücreleri içeren tipik orak hücre anemisi periferik kan yayması görülür. Yine laboratuvar bulgularında serum bilirubin seviyeleri yükselmiştir ve sedimentasyon azalmıştır. Hemogloblin elektroforezinde Hb S saptanır. Hb F değişik derecelerde yükselmiştir. A<sub>2</sub> normal ve Hb A yoktur Hb F yaş ile birlikte düşer ancak normal çocuklara göre düşüş daha yavaştır (56,57).

#### 2.2.1.5. Tedavi

Orak hücre hastalığının güncel tedavisi sadece destekleyici ve koruyucudur. OHH kronik bir rahatsızlıktır ve hastaların iyi beslenmelerine, bağışıklık kazanmalarına ve aşırı sıcaklıklardan, dehidratasyondan ve aşırı aktiviteden sakınmalarına dikkat edilmelidir. Proflaktik penisilin yaşamın 2 aylık döneminde başlanmalıdır (7,19,58). Proflaktik penisilin çalışmaları, yaşamın 3 ayında günde iki kez 125 mg olarak alınan proflaktik penisilin pnömokok bakteri insidansını %84 azalttığını göstermiştir (7). S. pnömoniae'ye karşı pnömokok aşısının 2 yaş ile birlikte başlanması önerilir. Bu tedavilerle pnömokok enfeksiyonları ve ölüm azaltılır. Yenidoğan taramaları ile orak hücre hastalığı olan bebekler belirlenir ve ebeveynleri kapsamlı bilgilendirme programlarına yönlendirir. Enfeksiyonların tehlikesi, ateş, akut anemik olaylar, önerilen bağışıklık kazandırmaları ve proflaktik penisilin hakkında ailelere yapılan danışmanlık hayat kurtarıcı olabilir. Enfeksiyonlar aplastik ve ağrılı krizlere neden olabilir. Bu nedenle hastalarda enfeksiyonların zamanında teşhis ve tedavi edilmesi gerekir. OHH'nda ağrıların nasıl tedavi edileceği ile ilgili birçok yayın vardır (59,60). Genel olarak ağrılı krizler ağrı kesiciler ve hidrasyonla tedavi edilir. Kan transfüzyonu yapılmasının izoimmunizasyona, demir yüklenmesine ve hepatite neden olabileceği unutulmamalıdır. Kronik kan transfüzyonlarının amacı eritropoezi baskılayarak hastanın Hb S içeren kan hücrelerinin oranını %30'un altında tutmaktır (58,61,62) Merkezi sinir sistemi iskemileri, akut göğüs sendromu, vazo-oklusif krizler, büyüme geriliği ve dalağın

fonksiyonsuz olması durumlarında kronik transfüzyonların bu ağır orak hücre semptomlarını engelleyebileceğini gösteren çalışmalar vardır (63). Hemogloblin düzeyini 10 g/dL'nin üzerine çıkaran transfüzyon, yoğunluğun ve tortulaşmanın artmasına ve felç gibi komplikasyonların oluşmasına neden olabilir.

OHH'da tedavi olarak çoğunlukla Hb F'i artıran tedaviler üzerinde durulmaktadır. Hb F artıran ajanlar arasında en yaygın olarak kullanılanı hidroksiüredir. Hidroksiüre eritroid kök hücrelerin terminal farklılaşmasını azaltarak iliğin baskılanıp Hb F'in sentezinin yapılmasına neden olur ve oraklaşmayı azaltarak kırmızı hücrelerin yaşam sürelerini uzatır. Aynı zamanda lökosit sayısını düşürür ve ağrı ve akut göğüs sendromunun görülme sıklığını azaltır (64). Hidroksiüre oral olarak alınan, kısa dönemde güvenli ve çoğu hasta için faydalı olan bir ilaçtır (44). Ancak tüm hastalarda aynı etkiyi göstermez, hastaların %40'ının tedaviye yanıt vermediği yada ilerleyen organ yetmezlikleri olduğu gösterilmiştir (65,66). Oraklaşma sürecini önleyen veya geri döndüren spesifik bir tedavi bulunamamıştır. Gen tedavisinin bu hastalığı iyileştirme yada tedavi etme olasılığı bulunsa da etkin gen transferi henüz sağlanamamıştır. Transjenik orak modellerinde gen tedavinin hastalık fizyopatolojisini düzelttiği gösterilmiş (67,68) ancak yapılması gereken birkaç basamak daha vardır. Günümüzde OHH'nı tedavi edebilecek tek tedavi allojenik kemik iliği transplantasyonu (KIT)'dur. Genellikle ağır komplikasyonları olan hastalara uygulanır. HLA uyumlu kardeş donörden yapılan kök hücre transplantasyonlarında hayatta kalma oranı %93 ve hastaliksız yaşam oranı %82'dir (69). Başarılı sonuçlar alınmasından dolayı KIT'in orak hücre semptomlarını gösteren ancak daha hafif şiddetteki hastalar için de kullanılması artmaktadır (70).

#### 2.2.1.6. Ölüm

Yapılan çalışmalarla en fazla ölümün 1-3 yaş arasında olduğu ve ölümün de genellikle enfeksiyondan kaynaklandığı gösterilmiştir (71). OHH hastalarının ölüm oranı yüzde 2.6'dır. Genç hastalar birincil olarak pnömokok hastalığından ölürlerken yetişkin hastalar akut göğüs sendromu, ağrılı krizler, kronik organ sistem yetmezliği, kanser ve yetişkinlere özgü diğer hastalıklardan dolayı veya kesin bir sebep olmadan aniden ölürler (29,41,72).

#### 2.2.1.7. Orak Hücre Taşıyıcılığı

Orak hücre taşıyıcılığı Hb S'in heterozigot şeklidir. Taşıyıcılar klinik olarak normaldir ve anemi görülmez. Elektroforez yapıldığında hemoglobinin %50'sinden daha azı Hb S'tir. Bunun dışında Hb A<sub>1</sub>, Hb A<sub>2</sub> ve Hb F bulunur. Periferik kan yaymaları normaldir. Ancak in vitro ortamda çok düşük oksijen basıncına maruz bırakıldığında kırmızı kan hücreleri orak şekline dönüşür. Özellikle uçaklarda indirgenmiş kabin basıncı ile yüksek seviyelere uçmak, deniz seviyesinden yükselmek gibi ağır anoksi ortamlarında taşıyıcı kişilerin eritrositleri oraklaşabilir ve orak hücre hastalığında görülenlere benzer semptomlar görülebilir. Heterozigotluk Afrika kökenli Amerikalıların yaklaşık %8'inde görülür (73).

### 2.2.1.8. Hb S'in diğer hemoglobin ile birlikte kalıtımı

Hb S çift heterozigot durumda diğer hemoglobinler ile kombine biçimde bulunabilir. Bunlar içinde en yaygın olanları Hb C (Hb SC) ve beta talasemi (Hb S-beta talasemi) ile olan birlikteliktir.

Hb SC ( $\alpha_2\beta_26^{Val}$ ,  $\alpha_2\beta_2^{6Lys}$ ) hastalığı homozigot orak hücre hastalığına oranla daha hafiftir. Hb seviyesi 11 g/dL yada daha yüksektir. Hb A yoktur. Kırmızı kürelerin %50'si Hb S, %50'si Hb C'dir. Semptomları OHH'na benzer ama daha nadir ve daha hafiftir. Ancak çoğu OHA'li hasta SC hastalarından daha hafif klinik belirtiler sergilerler (74). Bazı komplikasyonlar SC hastalığında daha yaygındır: göz hastalıkları (75-77), femur başının aseptik nekrozu (78), böbrek papiller nekrozu ve hamilelikle ilişkili problemler. Tanı elektroforez ile konulabilir. Periferik kan yaymasında orak hücreler ve fazla sayıda hedef hücreler olabilir. Mikrositik, dehidrate olmuş yoğun kırmızı küreler görülür. Bu hastaların yaklaşık %60'ında splenomegali görülür. Tedavisi Hb S hastalığına benzerdir.

S/ $\beta$  talaseminin klinik ve hematolojik bulguları heterojendir ve bazen OHH hastalığı ile örtüşebilir bu da iki durumun birbirinden ayırt edilmesini güçleştirebilir (79,80). Hb S sendromunun çoğu klinik belirtileri  $\beta^S$  genine ve oraklaşma miktarına bağlıdır (81). S/ $\beta$ -talasemide klinik belirtiler  $\beta^{tal}$  geninin  $\beta^0$  yada  $\beta^+$  olması gibi mutasyon tipine bağlıdır (80). Hb S-beta<sup>0</sup> talasemide elektroforezde yalnız Hb S bulunur, Hb A bulunmaz. Hb A<sub>2</sub> artmıştır ve dalak büyümesi genellikle görülür. Klinik tablosu OHH'na benzerdir fakat biraz daha ağırdır (79,82-84). Tedavisi OHH'na benzerdir. Hb S-beta<sup>+</sup> talasemide Hb S ile birlikte Hb A da vardır ve genellikle %10 ve %30 arasındadır. Dalak genellikle büyümüştür. OHH'na benzer ancak daha hafif bir hastalıktır.

Hb S diğer Hb varyantları ile de çift heterozigotluk oluşturabilir. Bunlar Hb D, E ve Hb O Arab'tır. SD heterozigotluğu homozigot SS hastalığından daha ağır bir hemolitik anemi vardır. Ağır vazo-oklusif krizler yaşarlar (85-87). HbS O-Arab çift heterozigotluğu nadir görülen ve kronik hemolitik anemi ve vazo-oklusif krizlerle birlikte seyreden ağır bir hastalıktır (88).

Genetik polimorfizm sonucu artmış fetal hemoglobin ile birlikte olan orak hücre sendromu klinik olarak daha hafif seyreder (79,89). Önceki çalışmalarda SS hastalığının klinik şiddetini azaltmak için Hb F'in %10-20 arasında olması gerektiğini söyleniyordu (90,91). Ancak Platt ve arkadaşları (41) HbF'in yüzde 4'ten fazla olmasının ağırlı krizlerin azalmasıyla olan ilişkisini yüzde 7'den fazla olmasının da mortalitenin azalmasıyla olan ilişkisini, göstermişlerdir.

SS- $\alpha$  talasemide hemoglobin elektroforezinde hiç Hb A görülmez, normal HbA<sub>2</sub> ve baskın HbS görülür.  $\alpha$ -talaseminin orak hücre anemisinin hematolojik özellikleri üzerinde bazı etkileri vardır. İlk etkisi hücrel HbS içeriğini azaltmasıdır. Alfa talasemi ile birlikte olan OHA'li hastaların hematolojik parametreleri daha iyidir. Çünkü  $\alpha$ - ve  $\beta$ - zincirleri arasındaki dengesizlik azalmıştır. Bu tip hastaların MCV, MCHC'leri düşük ama hemoglobin seviyeleri, kırmızı hücre değerleri daha yüksektir (92,93). Bunun için bu hastalarda bacak ülseri, akut göğüs sendromu,

böbrek patolojisi ve felçler daha az görülür. Ancak bu hastalarda hemoglobin daha yüksek olduğundan femur başı nekrozu, retinopati gibi diğer komplikasyonların görülmesi artabilir (94).

### 2.2.2. Hemoglobin C

Hb C,  $\beta$  globin zincirinde 6. pozisyonda glutamik asit yerine lizin geçmesiyle oluşan bir hemoglobin varyantıdır. Homozigot formları hafif ile orta şiddette bir hemolitik anemiye neden olurken heterozigot formları genellikle asemptomatiktir. Afrika Amerikalılarında %3 oranında Hb C görülür (95). Brezilyalılarda ise Hb C ikinci en yaygın hemoglobin varyantıdır ve %2.2-%5.2 arasında görülür (96). Hücre içi kristalloidlere neden olarak alyuvarların ömürlerinin kısalmasına neden olur ancak hemoliz orak hücreli anemideki kadar ağır değildir.

Bir ebeveynden Hb S geninin diğerinden Hb C geninin alınması durumunda HbSC hastalığı oluşur. Bu durum homozigot orak hücreli anemiden daha hafif seyretmesine karşın HbSC hastalığı homozigot Hb C hastalığından daha ağır seyreder (11)

### 2.2.3. Hemoglobin E

Güneydoğu Asya'da sık görülen bir beta zincir mutasyonudur. Hb E normal  $\beta$ -globinden daha yavaş bir hızda sentezlenir ve bu da Hb E taşıyıcısı bireylerin hipokromik ve mikrositik belirtiler göstermesine neden olur. Homozigot olanların hafif bir hemolitik anemileri vardır. Hb E talasemi sendromu ile birlikte kalıtılabilir ve Hb E  $\beta$ -talasemi birleşik heterozigotluğu genellikle talasemi major gibi bir klinik sendrom gösterir (97).

### 2.2.4. Hemoglobin D

$\beta$ -globin geninde bir nokta mutasyonu (b 121 Glu-Gln) sonucu oluşan nadir bir hemoglobin varyantıdır. İlk kez Punjab'da İngiliz ve Hintli karışımı bir ailede keşfedildi ve yapısı 1972'de belirlendi (98). Kuzey-batı Hindistan, Punjab ve Çin'in belirli bölgelerinde yüksek olmak üzere dünyanın bir çok yerinde görülmüştür. Ülkemizde Hb D nadir değildir.

### 2.2.5. Hb O Arab

$\beta$  zincirinin 121. Kodonunda Glutamik asit yerine Lizin gelmesi ile oluşan Hb O Arab Araplar, Sudanlılar, Bulgarlar gibi farklı etnik gruplarda ve Türk halkı ile Kıbrıs Türkleri'nde bildirilmiştir.

### 2.2.6. Talasemiler

Talasemi,  $\beta$  yada  $\alpha$  globinlerden birinin miktarsal olarak eksikliği ile karakterize olan ve otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalıktır. İlk defa 1925 yılında Dr. Thomas Cooley tarafından tanımlanmıştır. Akdeniz bölgesinden köken alan insanlarda görüldüğü için talasemi (thalassa-akdeniz, eski yunanca) denilmiştir. Batı Akdeniz, Afrika, Ortadoğu, Hindistan ve Güney Asya hastalığın en yaygın olarak görüldüğü yerlerdir (99). Talasemiler de sıtmaya karşı direnç sağlarlar.

Beta-talasemiler beta-zincir yapımına göre iki gruba ayrılır. Hiç beta globin zincir üretimi yapılmayan  $\beta^0$  talasemi ve anormal de olsa az miktarda beta zincir yapımı gerçekleşen  $\beta^+$  talasemilerdir.  $\beta^+$  homozigot hastalarda normalin altında Hb A yapımı vardır ancak  $\beta^0$  homozigotlarda yalnızca Hb A<sub>2</sub> ve Hb F vardır, Hb A yoktur.

200'den fazla değişik talasemi mutasyonu tanımlanmıştır. Talasemi mutasyonları çoğunlukla üç tiptir; promotör mutasyonlar, RNA splicing mutasyonları (en sık olan) ve mRNA capping ve tailing mutasyonlarıdır (100). Bu defektif genlerin beta zinciri üzerine etkileri değişik olmakla birlikte talasemileri genel olarak üç gruba ayırabiliriz;

I. **Talasemi minör:** Heterozigot bireylerdir. Sınırdan anemileri vardır. Hb A<sub>2</sub> artmıştır. Başka bir talasemi minörle evlenirlerse %25 olasılık ile Talasemi majorlülü hasta çocuk sahibi olabilirler.

II. **Talasemi major:** Homozigot hastalardır. Ağır anemi görülür.

III. **Talasemi intermedia:** Transfüzyon gereksinimleri daha geç başlayan ve daha az olan klinik olarak çok daha hafif seyreden bir gruptur. Ancak bazı hastalarda ikinci veya üçüncü dekatta IM'de görülen anemi, kalp yetmezliği, hipersplenizm, kemik genişlemesi gibi bulgular gelişebilir ve düzenli kan transfüzyonuna başlanması gerekebilir. Talasemi intermedialı hastaların büyük çoğunluğunda hastalığın şiddetinin azalması belirli miktarda  $\beta$  globin zincir üretimine izin veren hafif  $\beta$  talasemi alellerinin ( $\beta^{++}$  ve sessiz) kalıtılmasıyla açıklanabilir. Yine  $\beta$  globin zincir üretiminin yokluğu kalıtsal fetal hemoglobin üretilmesiyle telafi edilebilir. Bazı hastalarda  $\alpha$ -globin delesyonu ile birlikte kalıtılmasıyla hafif şiddette talasemi fenotipi gelişebilir.

Beta talasemide  $\beta$  globin zincir üretimindeki eksiklik globin zincirlerinin üretiminde bir dengesizliğe ve  $\alpha$  globin zincirinde bir artışa neden olur (101, 102). Talaseminin şiddeti  $\alpha$  ve  $\beta$  globinler arasındaki dengesizliğin şiddeti ile orantılıdır. Artmış alfa zincirleri kendi aralarında tetramer oluşturarak öncü kırmızı hücrelerde çöker ve kemik iliğinde olgunlaşmadan bu hücrelerin yok edilmesine yol açarlar (etkisiz eritropoez). Periferik dolaşıma ulaşmayı başaran bazı kırmızı hücreler ise dalakta parçalanır (hemoliz).  $\beta$ -talasemilerdeki anemi etkisiz eritropoez, periferik hemoliz ve azalmış miktarda hemoglobin sentezlenmesinin kombinasyonundan meydana gelir. Yetersiz hemoglobin yapımı hipokromi ve mikrositoza yol açar. IM'lü olgularda azalan fetal hemoglobinin yerine normal erişkin hemoglobini yeterli düzeyde yapılamadığı için genelde hayatın ilk altı ayı içinde anemi gelişir. Anemi, eritropoietin üretimini direk olarak etkiler bu da çoğalmanın artmasına ve kemik iliğinin genişlemesine ve dolayısıyla iskelet hasarlarına yol açar. Kemik hastalıkları, splenomegali, endokrin ve kardiyak hasarlar gibi ikincil komplikasyonlar aneminin şiddetine ve demir yüklenmesine bağlı olarak gelişir. Bu bulgular düzenli transfüzyon tedavisine erken başlanmasıyla engellenebilir.

Talasemi hastalarının hemoglobin düzeyi ortalama 3-4 haftalık aralarla uygulanan eritrosit süspansiyon transfüzyonları ile 10 g/dl'nin üzerinde tutulmalıdır. Eğer yıllık transfüzyon gereksinimi artmışsa bu hastalara splenektomi yapılmalıdır. Gastrointestinal sistemde absorpsiyonun artması ve kan transfüzyonları sonucu hastalarda fazla demir yüklenmekte ve özellikle dalak, karaciğer, endokrin, pankreas,



kalp gibi organlarda demir birikimi nedeniyle fonksiyon bozuklukları gözlenmektedir. Bunu önlemek amacıyla desferrioksamin ve son yıllarda da oral olarak alınan deferiprone kullanılmaktadır. Hastalığın tek kesin tedavisi ise uygun donörden yapılan kemik iliği naklidir.

Alfa talasemiler ise hemoglobinopatiler ve talasemiler arasında en sık olanıdır. Ancak çoğu hafif şekildedir. Beta talasemiden farklı olarak alfa talasemi intrauterin dönemde de hastalığa neden olur. Fetal ve erişkin hemoglobin düzensizliklerinin her ikisini birden etkiler. Doğsun doğmanın bütün olgularda Hb Gower<sub>2</sub>, Hb F, Hb A, ve HbA<sub>2</sub>'nin yapımında azalma vardır.  $\alpha$ - talasemi bir yada daha fazla  $\alpha$ -globin genini etkileyen mutasyonlar yada delesyonlarla olur. Normal bireylerde dört adet alfa globin zincir geni vardır. Oluşan delesyonlara göre alfa talasemiye dört ayrı grupta sınıflandırabiliriz;

- I. Sessiz taşıyıcı (a-/aa), tek bir alfa gen delesyonu vardır. Semptom yoktur.
- II.  $\alpha$ -talasemi taşıyıcılığı a-/a- ya da --/aa). İki gen delesyonu vardır ve hafif anemiktirler.
- III. Hemoglobin H Hastalığı (a-/--). Üç gen delesyonu vardır ve çoğunlukla talasemi intermedia gibi seyrederek. Eşleşemeyen  $\beta$ -globin zincirleri Hb H denilen tetramerleri oluşturur. Hb H ( $\beta_4$ ) eritrositlerde birikerek bu hücrelerde inklüzyon oluşmasına neden olarak bu hücrelerin dalak tarafından ortadan kaldırılmasına yol açarak anemiye neden olur.
- IV. Homozigot  $\alpha$ -talasemiler (--/--), dört  $\alpha$  geninin delesyonunun neden olduğu en ağır alfa talasemi tipidir ve genelde intrauterin veya erken neonatal dönemde ölüm ile sonuçlanır (hidrops fetalis). Eşleşemeyen gamma zincirleri Hb Barts ( $\gamma_4$ ) denilen ve oksijen taşıma kapasitesi olmayan tetramerleri oluşturur.

### 2.3. Hemoglobinopatilerin Tanımlanmasında Kullanılan Laboratuvar Yöntemleri

Anormal hemoglobinlerin belirlenmesinde kullanılan metotlar, çözünürlük testi, bazik ve asidik pH'da zone elektroforezi, izoelektrik fokuslama, bazik ve asidik pH'da globin zincir elektroforezi, katyon değiştirici yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) 'ni içerir.

#### 2.3.1. Elektroforetik Yöntemler

##### 2.3.1.1. Elektroforez

Bir elektrik alanın etkisi altında yüklü bir partikülün göç etmesi olarak tanımlanır. Bu elektrik alan etkisiyle pozitif yüklü iyonlar negatif elektroda ve negatif yüklü iyonlar ise pozitif elektroda doğru hareket ederler. Elektroforezde bir hareketli bir de hareketsiz faz vardır. Sabit faz olarak kağıt, asetat, selüloz, poliakrilamid, agaroz gibi dolgu maddeleri kullanılır. Sabit ortamdaki en önemli özellik moleküllerin porlardan kolaylıkla geçmesine dayanır. Hareketli faz olarak genellikle tamponlar kullanılır. Elektroforezin diğer yöntemlerden farkı bir elektriksel alan yaratılmasıdır. Protein çözeltisi bu elektriksel alanda farklı hızlarla bir elektrotan diğerine hareket ederek molekül ağırlıklarına ve taşıdıkları elektrik yüklerine göre birbirlerinden ayrılırlar. Daha sonra boyama yaparak protein bantları görünür hale gelmektedir. Hareket hızları, elektrik alanının şiddetine, moleküllerin yüküne ve

şekillerine, ortamın vizkositesine ve iyonik şiddetine ve sıcaklığa bağlı olarak değişir. Yenidoğan taramalarında iki elektroforez yöntemi birlikte kullanılır; alkali pH (8,4) ve asidik pH (6,2) 'da agaroz jellerde yapılan ayırma.

### **2.3.1.2. İzoelektrik Fokuslama (IEF):**

Proteinlerin bir pH gradientinde izoelektrik noktalarına göre ayrılması prensibine dayanır. Bu yöntemde yüksek mobiliteye sahip sentetik poliaminopolikarboksilik asitlerin karışımları olan amfoterik bileşikler içeren jel polimerleştirilir. pH gradienti oluşturmak için sisteme akım verilir ve amfolitler izoelektrik noktalarına göre jelde düzenlenirler. En asidik olan anoda, en bazik olanda katoda doğru ilerler. Daha sonra örnek proteinler jele uygulanır ve yüklerine göre anoda ve katoda doğru hareket ederler. Proteinler jel üzerinde net yüklerinin sıfır olduğu pH değerine (pI) kadar göç ederler ve bu noktada hareketsiz kalarak dururlar. En son aşamada protein bantlarının gözlenmesi için boyama yapılır fakat boyamanın olması için öncelikle jelden amfolitlerin uzaklaştırılması gerekir. Çünkü amfolitler jelin tamamen boyanmasına neden olur (103) Hb F, Hb A, S, C, D Punjab, E ve O Arab hemoglobun varyantlarını iyi ayırır. IEF çok sayıda örnek çalışabilmek için otomatik de olabilir. IEF yüklerine göre Hb tiplerini ayırmak için bir pH gradient jel kullanmaktadır.

### **2.3.2. Santrifügasyon Yöntemleri**

#### **2.3.2.1. Densiti Gradient (Zonal ) Santrifügasyon**

Bir protein karışımını santrifügasyon yöntemi ile ayırmak mümkündür. Tüp içerisinde sükröz gibi bileşiklerle bir konsantrasyon gradienti yaratılır. Bunun için plastik tüp içerisinde en yoğunundan en az yoğununa doğru bir sükröz gradienti meydana getirildikten sonra tüpün en üzerine protein karışımı ilave edilir. Bu şekilde hazırlanmış olan tüp yüksek devirde santrifüj edilecek olursa her bir protein kendi dansitesi ile aynı olan sükröz bölgesine toplanacaktır. Tüp içerisinde farklı bantlar halinde ayrılmış olan proteinler daha sonra tüpün altı iğne ile delinip toplanarak veya tüp dondurulduktan sonra bu bantlar buz halinde kesilerek çözündürülür ve bu şekilde proteinler birbirlerinden ayrılmış olur (104).

### **2.3.3. Kromatografik Yöntemler ve HPLC Yöntemi**

#### **2.3.3.1. Kromatografi**

Kromatografi bir karışımda bulunan bileşenlerin birbirinden ayrılmasını gerçekleştiren ve bu sayede kalitatif ve kantitatif analizlerin yapıldığı yöntemlerin genel adıdır (105) Bu yöntemlerde çalışma düzeneği sabit faz ve hareketli (mobil) faz denilen iki bileşenden oluşur. Mobil fazın içerisinde yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesi ile etkileşerek tutulurlar. Bu tutulma örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarlarda olur. Böylece bileşenler sabit fazın sonlarına doğru farklı hızlarda ilerledikleri için birbirinden ayrılmış vaziyette sabit fazı farklı zamanlarda terkederler. Bu şekilde sabit fazdan çıkan bileşenlerin derişimleri ölçülür ve zamana veya mobil fazın kullanılan hacmine karşı y-ekseninde işaretlenerek kromatogram denilen grafikler elde edilir. Kromatografik yöntemlerde kullanılan temel prensipler şunlardır;

**a) Mobil faz:** Örnek bileşenlerini sabit faz boyunca taşıyan, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip çözelti veya çözücü karışımlarıdır.

**b) Sabit faz:** Mobil faz içerisinde gelen örneğe ait bileşenlerin etkileşime girdikleri ve belirli ölçüde alıkondukları fazdır. Kromatografi tekniğine göre tasarlanmış değişik materyallerden imal edilmiş kolon olarak adlandırılan sabit fazlar mevcuttur.

**c) Alıkonma (retention):** Mobil faz içerisinde gelen bileşenlerin sabit faz ile etkileşime girerek belirli oranda tutulması ve sabit fazı daha geç terketmesi olayıdır. Çözünenin bir kolonu kat etmesi için gerekli olan süreye alıkonma süresi denir.

**d) Pompa:** Mobil fazı oluşturan çözeltilerin enjektör, kolon ve dedektör içerisinde belirli basınç altında belirli bir hızda geçmesini sağlar. Sıvı kromatografisinde özellikle de HPLC donanımında temel bir bileşendir.

**e) Dedektör:** Kolonda ayrımı yapılan analizlenecek maddeye ait bileşenlerin alıkonma zamanlarına göre sırayla içerisinde geçerken miktar tayinlerinin yapıldığı HPLC donanımdır.

**f) Kromatogram:** Kromatografik analiz sonucunda elde edilen grafikdir. Y-ekseni, kullanılan dedektörün ölçtüğü fiziksel özelliği (absorbans, fluoresans, iletkenlik, akım, kırılma indisi vb.), X-ekseni ise zamanı göstermektedir. Zamana karşı Y-ekseninde ölçülen fiziksel özelliğin artıp tekrar azalması şeklinde oluşan pik şeklindeki eğrilerin herbiri analizlenen maddeye ait bir bileşeni göstermektedir. Bu piklere ait değerler (pik alanı, yüksekliği, vb.) kullanılarak kalitatif ve kantitatif analizler yapılır.

**g) Hacim akış hızı:** F ile sembolize edilir, birimi  $\text{cm}^3/\text{saniye}$  veya  $\text{cm}^3/\text{dakika}$  olup, alıkonma zamanının alıkonma hacmine bölünmesiyle hesaplanır:  $F=VR / tR$

**h) Lineer akış hızı:** U ile sembolize edilir, kolon uzunluğunun (L) kolon ölü zamanına ( $t_0$ ) bölünmesiyle hesaplanıp birimi  $\text{cm}/\text{saniye}$ 'dir:  $U=L/t_0$ . Lineer akış hızı, çözücü moleküllerinin kolon boyunca hareketleri sırasındaki ortalama hızlarını gösterir.

**i) Çözünürlük:** R ile sembolize edilir. Birbirini takip eden 2 adet bileşene ait piklerin birbirinden ayrımlarının oranını gösterir. Takip eden piklere ait maksimal arası mesafenin 2 pike ait genişliklerin (birimi dakika) toplamına bölünmesiyle hesaplanır.  $R= [2(tR_2-tR_1)] / W_1+W_2$ . Takip eden pikler için iyi bir çözünürlükten bahsedebilmek için hesaplanan R değerinin 1-1,5 civarında olması istenir.

Kromatografik yöntemler kullanılan mobil fazın sıvı veya gaz olmasına göre; Sıvı Kromatografisi ve Gaz Kromatografisi olmak üzere başlıca 2 ana grupta sınıflandırılabilir.

Sıvı kromatografisinin tarihçesi Rus botanikçi M. S. Twsett'in 1906 yılında yaptığı ve yayımladığı çalışmalarına kadar uzanır (106) Sıvı kromatografisi bir çözücüde çözünen iyon yada molekülleri ayırmada kullanılan bir analitik kromatografik yöntemdir. Önceleri düz yüzlemsel yapıda sabit fazlar kullanılmış ve bu teknikler daha sonra kağıt kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi olarak isimlendirilmiştir (107). Modern sıvı kolon kromatografisi ise 1969 yılında HPLC'nin kullanıma girmeye başlamasıyla gelişme göstermiştir (108).

### 2.3.3.2. HPLC

HPLC çözelti içinde çözünen bileşikleri ayırmak için kullanılan bir sıvı kromatografi çeşididir. Karışımdaki farklı bileşikler hareketli faz ve sabit faz

arasındaki ayırma davranışlarındaki farklılığa bağlı olarak farklı hızlarda kolondan geçerler. Standart HPLC donanımı temel olarak 4 bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler sırasıyla pompa, enjektör, kolon (sabit faz) ve dedektör'dür.

**1. Pompa:** HPLC donanımında yer alan pompalama sistemleri, akış hızına göre, pompanın yapımında kullanılan malzemeye göre ve pompanın mobil fazı iletme mekanizmasına göre olmak üzere 3 farklı şekilde katagorize edilebilir;

- Akış Hızına Göre; Küçük Çaplı Pompa Sistemleri, Standart Çaplı Pompa Sistemleri, Preperatif Pompa Sistemleri
- Pompanın Yapıldığı Malzemeye Göre; Metalik, Ametalik
- Mobil Faz İletme Mekanizmasına Göre; Şırınga Tip Pompalar, Piston Pompalar.

**2. Enjektör:** HPLC donanımını oluşturan enjektör örneğin sabit faz (kolon) öncesinde mobil faza enjekte edilmesi için kullanılır. Elle kumanda edilen manuel ve bilgisayar kumandalı oto-enjektörler olmak üzere 2 çeşidi bulunmaktadır.

**3. Kolon:** Modern HPLC donanımının 4 temel yapı taşından birisi olan kolon, karmaşık örneklerde bileşenlerin birbirinden iyi çözünürlükle ayırımından sorumlu sabit fazdır. Birçok analitik kolonun iç çapı 2-5 mm aralığında değişmektedir. Kolon iç çapı arttıkça akış hızı ve iç doldurma hacmi artmakta ama oluşacak piklerin çözünürlüğü dolayısıyla duyarlılık azalmaktadır. Kolonların uzunluğu çok çeşitli olup genellikle 30-300 mm aralığında değişmektedir. Kolon uzunluğu arttıkça örnek bileşenlerinin ayırımı daha iyi olmakta fakat analiz süresi uzadığı için daha fazla mobil faz harcanmaktadır. Kolon boyutlarının tanımlanmasına uluslararası standartlar getirilmiştir. Buna göre önce mm cinsinden uzunluk ve çap yazılmakta, bunu firma adı, sabit faz türü, A<sub>0</sub> türünden poroz yüzey çapı ve µm cinsinden partikül büyüklüğü izlemektedir. Örneğin, 250/4,6 Nucleosil C18 100 - 5 yazıldığında, kolonun 250 mm uzunluk ve 4,6 mm iç çapa sahip olduğu anlaşılmaktadır. Kolonun firması (markası) Nucleosil olup, sabit faz türü normal fazda kullanılan bir tür olan C18 dir. Poroz yüzey çapı 100 A<sub>0</sub> olup, dolgu materyaline ait partikül büyüklüğü 5 µm'dur

**4. Dedektör:** HPLC donanımında 4 temel bileşenden birisi olan dedektörler, örnek bileşenlerini tayin ederken ölçtükleri fiziksel özelliklere göre, 8 çeşittir

- Ultraviyole / Görünür Bölge Dedektörü
- Fotodiyot Array Dedektörü
- Floresans Dedektörü
- İletkenlik Dedektörü
- Refraktif İndeks Dedektörü
- Elektrokimyasal Dedektör
- Kütle Dedektörü
- Evaporatif Işık Dağıtıcı Dedektör

#### **HPLC Sistem Türleri**

- **Isocratic sistem,** tek pompa, tek solvent, solvent karışım olabilir, Bu sistemde ayırım yetersizdir.
- **Düşük basınçlı gradient sistem,** tek pompa, maksimum 4 farklı mobil fazdan oluşur. Karışma pompadan önce gerçekleşir.

- **Yüksek basınçlı gradient sistem**, 2 yada 3 pompa, 2 yada 3 farklı mobil fazdan oluşur ve karışma pompadan sonra gerçekleşir.

#### **HPLC'de Ayırma Teknikleri:**

**a) Normal faz:** Sabit faz güçlü polar özelliğinde iken hareketli faz nonpolardır. Böylece polar materyaller daha az polar olanlara göre kolon yüzeyinde daha uzun kalırlar

**b) Ters faz:** Sabit faz nonpolar iken hareketli faz polar bir sıvıdır. Burda ise nonpolar materyaller daha uzun süre kalırlar.

#### **c) Ters faz iyon çifti**

**d) İyon değiştirici:** Katyon-değiştirici HPLC pozitif yüklü moleküllerin bir karışımının (normal yada varyant hemoglobinlerin) bir kromatografi kolonundaki negatif yüklü sabit faza adsorbsiyonları ile bileşenlerine ayrılmalarını takiben de mobil faz ile eluye edilmelerini içeren bir yöntemdir. Hareketli faz kolon boyunca artan katyon konsantrasyon özelliğine sahip bir sıvıdır; mobil fazdaki katyonlar anyonik bağlanma bölgeleri ile adsorbe olan proteinlerle rekabet eder. Böylece adsorbe olmuş pozitif yüklü hemoglobin molekülleri sabit fazdaki afinitelerine bağlı bir hızda kolondan hareketli faza eluye edilirler. Bu yolla ayıldıklarında sıvı solusyon içinde optik olarak tanımlanabilir. Elusyon zamanlarıyla tanımlanabilir ve elusyon profilinin içinde karşılık gelen pikin altındaki bölge hesaplanarak miktarları ölçülebilir. Otomatik HPLC'de mikrobor kolonlar, yüksek hassasiyetli gradiyent oluşturan sıvı pompalar ve optik dedektörler kullanarak bu işlem daha etkili gerçekleştirilir. Burda bilgisayar kontrolü ve bilgi işleme tarzı vardır. Proteinleri asit ve baz özelliklerine göre ayırmak için kullanılır. Bu tip kromatografi özellikle molekül ağırlıkları birbirine çok yakın olan molekülleri ayırmak için kullanılmaktadır.

**e) Büyüklüklerine göre Ayırma Kromatografisi (SEC):** Kolon por büyüklükleri bilinen materyal ile doldurulur ve örnek çözülebilir molekül büyüklüğüne göre filtre edilir. Büyük moleküller kolon arasından hızla yıkılırken küçük moleküller porlar arasına girerler (109).

**f) Kiral ayırım:** Kiral bileşikler için kiral dedektör ya da kiral sabit faz kullanan sıvı kromatografisidir. Bu kromatografi ile moleküller enantiomerlerine ayrılır (110)

Bu tekniklerin hemoglobin ayırmasında farklı avantaj ve sınırlamaları vardır. Basit ve hızlı olduğu için zonal elektroforez yaygın olarak kullanılır ancak bu tekniğin en büyük dezavantajı benzer izoelektrik noktaları olan farklı varyantları tam olarak ayıramamasıdır. Örneğin Hb S, D, ve G-Philadelphia alkali PH'da aynı zonda hareket eder. Yine alkali PH'da C, O, E ve A<sub>2</sub> aynı zonda geç eder (111).

Selüloz asetat elektroforezinde yalnızca  $\alpha$  zincir varyantı olduğunda aynı bir A<sub>2</sub> bandı oluşur.  $\beta$  zincir varyantı olduğunda ise bu bant gözükmez. Yine diğer düşük konsantrasyonlardaki hemoglobin varyantlarını belirlemede HPLC ve agaroz jel elektroforezi kullanılmalıdır. Agaroz jel selüloz asetata alternatif bir elektroforezdir. Az miktardaki hemoglobin varyantını belirlemede daha duyarlıdır fakat pahalı ve selüloz asetat elektroforezine göre daha az kullanışlıdır.

IEF'deki bantlar selüloz asetatına göre daha keskindir. Yine elektroforezde belirlenemeyen bazı hemoglobin varyantları IEF ile ayrılabilir. Örneğin D ve G varyantları S'den ayrılabilir. Ancak selüloz asetata göre oldukça pahalı bir testtir. Az miktardaki kan örneğinden yada filtre kağıdındaki kurutulmuş kan örneklerinden iyi bant ayırması yenidoğan taramalarında önemlidir. Yenidoğan taramalarında IEF'nin kullanılmasının bazı dezavantajları vardır. Normal olarak bulunan asetlenmiş Hb F, gliserinli Hb gibi fraksiyonlarını da ayırdığından yorum yapmayı güçleştirebilir. Farklı hemoglobin varyantlarının hareket etme düzeni tek değildir ve bu nedenle elde edilen sonuçlar ilgili varyantların tanımlanmasında ancak tahmini bir tanımlama olarak sayılabilir (112). Rutin kullanımda HPLC daha kullanışlı bir tekniktir (113).

HPLC A, A<sub>2</sub>, ve F hemoglobinlerinin miktar ölçümünde ve varyant hemoglobinlerin miktarının ölçümünde ve tanımlanmasında kullanılır. Diğer hemoglobin elektroforezlerine göre şu avantajları içerir:

- teknik daha az iş gücü gerektirir.
- her örnek için normal ve varyant hemoglobinlerin miktarı mevcuttur
- Hemoglobin A<sub>2</sub> ölçüldüğünden hemoglobin elektroforezi ve mikrokolon kromatografisinin birleştirilmesinin yerine bir tek prosedür ile  $\beta$  talasemi taşıyıcısı tanısı konulabilir.
- Varyant hemoglobinlerin daha geniş bir alanı tanımlanabilir.
- Hemoglobin A<sub>2</sub> varyantı kolayca tanımlandığından  $\alpha$  ve  $\beta$  zincir varyantlarının farklılaşmasına izin verir ve  $\delta$  zincir varyantı bulunduğu zaman  $\beta$  talasemi taşıyıcılığının doğru tanısını kolaylaştırır.

En önemli dezavantajı daha fazla sermaye ve ayıraç fiyatıdır. Ancak elektroforezin daha büyük iş gücü göz önüne alındığında genel fiyatlar benzerdir.

Çoğu varyant hemoglobinler HPLC yönteminde birbirinden ayrılırlar ancak birbiriyle örtüşen bazı hemoglobin varyantları da vardır. Hemoglobin A, A<sub>2</sub>, F, S, C, O-Arab, D-Punjab ve G-Philadelphia birbirinden ayrılabilir ancak hemoglobin A<sub>2</sub> ile hemoglobin E birbiriyle örtüşebilir.

HPLC, yaygın hemoglobinlerin yenidoğan taramalarında IEF'ye alternatif olarak duyarlı, verimli ve zaman kazandıran bir yöntemdir (114). Hemoglobinopatilerin laboratuvar tanımlamalarında yeni metotlar içinde HPLC büyük öneme sahip iken IEF ve çeşitli hemoglobinler için immünassay yapılması çok daha az rol oynar (115).

Hemoglobin elektroforezi, izoelektrik fokuslama, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yada DNA analizi ile orak hücre hastalığı yetişkinlerde olduğu gibi yenidoğanlarda da tanımlanabilir. Çözünürlük testi ve orak hücre preparatları uygun olmayan tanı yöntemleridir. Bunlar orak hemoglobini belirleyebilir ancak Hb C ve diğer genetik varyantları kaçırabilir. Diğer taraftan yenidoğanlarda Hb F baskın olduğundan çözünürlük testi bunlarda uygun değildir. Yine ağır anemisi olan kişilerde orak hemoglobini belirlemede hata yapabilir.

#### 2.3.4. Yenidoğanlarda Tarama

Yenidoğan taramasının amacı yenidoğan döneminde orak hücre hastalıkları riski olan infantları belirlemektir. Yenidoğan taramasının yapılabilmesi, bilgiyi, ailelerin eğitilmesini ve rızalarının alınmasını, örnek toplanmasını, taşınmasını, laboratuvar testlerini, raporların sonuçlanmasını ve etkilenmiş çocukların ailelerinin bilgilendirilmesini içeren kompleks bir yapı gerektirir. IEF ve HPLC hemoglobinopati taramalarında şu anda rutin olarak kullanılması uygun olan yüksek kesinlik ve duyarlılığa sahip iki ana laboratuvar tekniğidir. Etkili bir yenidoğan taraması yapmak için yeterli laboratuvar ve teknik uzmanlık temeldir. Bu, kapasite, eğitim ve sağlık sistemlerinin çoğu için maddi kaynak sağlanması problemlerini ortaya çıkarır. Ancak orak hücre hastalıkları için etkili bir yenidoğan tarama programının orak hücre hastalığı olan çocukların yaşamlarını kurtaracağı tartışılmaz.

OHH için yenidoğan taraması, erken tanı alınarak zamanında proflaktik penisilin tedavisine başlanması (7,116,117), anti-pnömonokok aşısı uygulanması (117,118), el ile dalak büyüklüğünün hissedilmesinin ebeveynlere öğretilmesi (19) ve hasta bulunan çocuklara daha geniş kapsamlı dikkat verilmesi gibi bir çok avantajlar sağlar.

##### 2.3.4.1. Maliyet yararlanım oranı

Bir tanıyı koymada laboratuvar fiyatını belirleyen iki ana faktör vardır; çalışılan test sayısı ve kullanılan teknik. Karlı olması için laboratuvarın yılda en az 25000 örnek çalışması gereklidir. IEF ve HPLC bu tür taramalarda kullanılan iki temel tekniktir. Eğer 25000 yada daha fazla örnek çalışılacak olursa her test için ortalama fiyat iki teknikte de benzerdir. HPLC çoğunlukla otomatik olduğu için daha fazla avantaj içerir. Eğer tüketim mallarının fiyatı düşürülebilirse HPLC IEF'den daha ucuza mal olur (119).

Az sayıda merkezileşmiş laboratuvarlarda testlerin çalışılması en karlı olanıdır. Bu laboratuvarlarda çok sayıda örnek çalışılacağı için kar elde edilir. Bu laboratuvarlarda hem testleri çalışacak hem de yorumlayacak elemanlar bulundurulması gereklidir.

##### 2.3.4.2. Bilgi ve Rıza

Hayat boyu hastalığa yol açabilecek temel hemoglobinopatilerin taranmasında ebeveynleri bilgilendirerek onaylarının alınması önemlidir. Testin ne için yapıldığı, sonuçlarının iletilmesinin nasıl sağlanacağı ve etkilenen çocukların takibinin nasıl olacağı konularında aile bilgilendirilmelidir. Bilgi aileye anlaşılır bir dille anlatılmalı ve hemoglobinopati terimi açık olarak anlatılmalıdır.

##### 2.3.4.3. Örnek Tipi

Kullanılması gerekli ideal örnek tipini belirlemede kullanılan birkaç yöntem vardır. Örnek kolay elde edilmeli, kontaminasyondan uzak, stabil, kolay taşınabilir ve test için uygun olmalıdır. Yenidoğan taramasında üç tip örnek kullanılır: kord kanı, sıvı topuk kanı ve topuk kanından Guthrie kartlarına alınan kurutulmuş kan noktaları. Kord kanının transfüzyon yada maternal kan ile kontamine olma riski vardır. Yine transportu zor ve toplanması her doğumda mümkün olmayan örneklerdir. Sıvı

kanların taşınması zordur ve stabil kalmayabilir. Kurutulmuş nokta topuk kanı örnekleri bu tür tarama programları için en uygun örnektir. Toplanması kolay ve maternal kontaminasyon riski yoktur. Bu kanlar zaten fenilketonuri ve hipotroidizm için yapılan yenidoğan tarama programlarında kullanılıyor bu nedenle zaten mevcut yada aynı merkezde çalışılmıyacaksa bile diğerleri için kan alınırken başka bir kağıda da bu tarama için kan alınabilir. Örnek çok stabildir ve kolayca taşınabilir. Tek dezavantajı ise sıradan selüloz asetat ve asit elektroforezlerde kullanılmamasıdır.

#### 2.3.4.4. Laboratuvar Teknikleri

Basit analitik prosedürler kullanarak bütün hemoglobin varyantlarını taramak mümkün değildir. Ancak yenidoğan tarama testi yapan laboratuvarlar yaygın olarak bulunan Hb S ve Hb C gibi ve nadir olarak bulunan Hb D, Hb E, Hb OArab gibi hemoglobin varyantlarının hem heterozigot, hem Hb S ile birlikte olan formlarını tesbit edebilmektedir. B-talasemi majorlü bebekler test edilebilir ancak intermedialar değişken miktardaki Hb A'dan dolayı kaçırılabilir. Diğer bazı nadir bulunan hemoglobin varyantları,  $\beta$ - talasemi taşıyıcıları ve hereditary persistant fetal hemoglobin (HPFH) kaçırılabilir ancak bunlar bireyler için az öneme sahip klinik durumlardır.

Yenidoğan OHH taramalarında üç temel teknik kullanılır. Fakat bunlardan elektroforez çoğunlukla kullanım dışı kalmıştır. Diğer iki teknik HPLC ve IEF her ikisi de klinik olarak önemli hemoglobin varyantlarını belirleyebilir. Orak hücre çözünürlük testi güvenilir bir yöntem değildir. Çünkü düşük seviyelerdeki Hb S'e karşı duyarlı değildir.

Hemoglobinopati taramalarında hangi yöntemin kullanılması gerektiği Campbell tarafından tartışılmış (114) ve HPLC'ye kıyasla IEF ile günlük kullanımda daha fazla örnek çalışılabileceği gösterilmiştir. Ancak bu metodun tutarlılığı daha azdır. Örnek hazırlanması, uygulama ve boyama tekniklerinden dolayı daha fazla tekrar testlerinin yapılmasına neden olur. HPLC'de buna nadiren gerek görülür. HPLC'nin diğer bir avantajı ise hazırlanması daha kolay ve daha az deneyimli elemana ihtiyaç göstermesidir. Ancak Hb D ve Hb E gibi yaygın varyantlarla aynı alıkonma zamanına (retention time) sahip olan diğer bazı hemoglobin varyantlarının bulunabileceği pozisyonlardaki piklerin yorumlanması dikkat ve tecrübe gerektirir. HPLC tam otomatik bir sistemdir ve laboratuvar bilgisayarı ile görüntülenebilir. Bu nedenle sekreterlik ve laboratuvar eleman yükünü en aza indirir.

Gelecek potansiyeli olan diğer metotlar bazı temel hemoglobin varyantlarına karşı antikorları kullanan immunolojik testleri içerir. Kütle spektrofotometresi daha yeni bir yöntemdir (120). Saatte 100 örnek çalışabileceği öne sürülmüştür. Başlangıç malzemelerinin fiyatını oldukça yüksek olmasına ve muhtemelen kar sağlamak için yılda 100000 örneğin çalışılmasına gerek duyulmasına rağmen gelecekte uygun bir metot olabilir. Otomatik DNA teknikleri mevcuttur fakat çok pahalı ve spesifik bir mutasyonu bulmayı hedeflediği zaman daha etkilidir. Ancak daha geniş kapsamlı özellikler gerektiğinde yada transfüzyon almış bir çocuğun tanısını kullanılmasında bu teknikler yararlı olabilir.



Hemoglobinopati tarama testleri çok nadir olarak yanlış pozitif yada yanlış negatif sonuç verebilir (121). Ancak bu durumlar çok kötü sonuçlara yol açabilir. Bu yüzden sonuçların yorumlanmasına ve transkripsiyon hatalarına dikkat edilmelidir.

#### 2.3.4.5 Sonuçların Yorumlanması

- **Etkilenmemiş:** Etkilenmemiş yenidoğanların sonuçları Hb F ve Hb A varlığı gösterir. Hb A genellikle %5-25 arasındadır.

- **Orak hücre hastalığı:** Orak hücre hastalığı olan yenidoğanların sonuçları Hb F ve Hb S varlığı gösterirler. Hb A yoktur. Bu dönem bebeklerde görülen Hb S genellikle %4-10 arasındadır. Diğer varyantlarıyla (örneğin FSC yada S/β talasemi) birlikte görülen durumlarda Hb S miktarı daha fazladır (FSC'de C'den, S/β'da ise A'dan). Orak hücre hastalığında beklenen sonuçlar Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

- **Orak hücre taşıyıcıları:** Bu yenidoğanlar Hb F, Hb A ve Hb S varlığı gösterirler. Hb A miktarı Hb S miktarından fazla olmalıdır. Bazı vakalarda Hb S ve Hb A miktarı eşittir. Ancak S ve A'nın oranları herbiri için %2 oranında olursa orak hücre taşıyıcısı tanısı konulabilir. Hb A ve Hb S gebelik yaşına göre değişebilir.

- **Diğer hemoglobin varyantları için heterozigotluk:** Diğer hemoglobin varyantları açısından taşıyıcı olan bebeklerin sonuçları Hb F ve Hb A ve kalıtılan hemoglobin varyantını gösterir. Varyantın miktarı yine Hb A miktarını geçmemelidir.

- **Orak hücre olmayan durumlarda homozigot yada birleşik heterozigotluk:** Orak hücre hastalığı dışındaki durumlarda homozigot yada birlikte heterozigotluk gösteren bireylerin sonuçları yalnızca Hb F ve o hemoglobin varyantını gösterirler. Hb A görülmez. Örneğin Hb D hastası olan birey yalnız Hb F ve Hb D varyantlarını gösterir.

- **Ağır Beta talasemi:** Bu durumdaki yenidoğanların sonuçlarında yalnızca Hb F görülür. Genellikle Hb A görülmez ancak bazıları çok küçük miktarda Hb A gösterebilirler. Tanıyı doğrulamak için DNA analizi yardımcı olur.

- **Hb Barts Hydrops Fetalis:** Hb Barts Hydrops Fetalis olan bir çocuğun sonucu genellikle Hb F yada Hb A içermez yalnızca Hb Barts içerir. Nadir durumlarda örneğin non delesyonel α talasemi ve +/-α globin varyantlarında az miktarda Hb A bazen üretilebilir.

Çizelge 2.2. Yenidoğan taramalarında saptanabilen orak hücre tipleri

Hastalık	Yenidoğan tarama sonuçları	2. aydaki Hb örnekleri
Hb-SS	FS	FS
Hb-SC	FSC	FSC
Hb-S/β <sup>+</sup> talasemi	FSA yada FS	FSA
Hb-S/β <sup>0</sup> talasemi	FS	FS
Hb-S/δβ talasemi	FS	FS
Hb-S/D <sup>Punjab</sup>	FSD <sup>Punjab</sup>	FSD <sup>Punjab</sup>
Hb-S/HPFH	FS	FS

#### 2.3.4.6. Sonuçların Doğrulanması

Tarama metoduyla bulunan bir anormallik ikinci bir teknik ile doğrulanmalıdır. HPLC/IEF kombinasyonu ile yapılan çoğu Hb S ve Hb C örneklerinin güvenilir olarak tanımlandığı gösterilmiştir. Ancak yine de anormal bulunan çocuklar 8-12 haftalarında çağrılarak test tekrarlanmalıdır. Tekrar çağrılması gereken çocuklar hiç Hb A içermeyen, Hb S, Hb C, Hb D ve Hb E varyantları olan veya yüksek seviyede Hb Barts içeren bebeklerdir.

#### 2.3.4.7. Sonuçlar ve Problem Bölgeleri

Hb A ögesi gestasyon yaşına bağlı olarak değişebilir ve tanı koymadaki problemleri artırabilir. Yüksek seviyede Hb A içerenlerin transfüzyon alıp almadığı ve rapor edilen gebelik yaşının doğru olup olmadığı soruları akla gelmelidir. Bu çocuklar test için tekrar çağrılmalıdırlar. Beklenmeyen düşük Hb A seviyeleri HPFH yada  $\beta$ - zincir varyantlarına bağlı olabilir.

Gama zincir varyantları yenidoğan örneklerinin yedinci gününe kadar testlerde görülebilir ancak 8-12 haftalarda yapılan tekrar testlerinde çok azalmış yada hiç bulunamayabilir.  $\gamma$ -zincir varyantları genellikle hiçbir klinik belirti vermezler.

Çok prematür bebeklerde (<28 gebelik haftası) hemoglobin örneklerinin yorumlanması çok zor olabilir. Bazılarında az yetişkin hemoglobini bulunurken bazılarında hiç Hb A görülmeyebilir (hiç Hb A görülmemesi genellikle bir hemoglobinopati açısından heterozigot olan bebekler için doğrudur).

Transfüzyon hemoglobin örneklerinin ayırtedilmesini güçleştirebilir. Bu nedenle son transfüzyondan 3 ay sonra örneğin tekrar çalışılması gereklidir.

#### 2.3.4.8. Sonuçların Raporlanması

Homozigot ve bileşik heterozigotlar mutlaka raporlanmalıdır fakat basit taşıyıcılar tartışmalıdır. Doğumda orak hücre anemisi (Hb SS), Hb S/beta<sup>0</sup> talasemi ve Hb S/HPFH'yi kesin olarak birbirinden ayırmak mümkün değildir. Çünkü bu durumların hepsinde yalnızca Hb F ve Hb S analiz edilir. Bu durumlarda takip ve tanımlayıcı testleri başlatmak için bütün vakalar ayrıntıya girmeden orak hücre hastalığı olarak rapor edilmelidir (112). Heterozigot bulunanların bildirilmesinin başlıca yararı aileye danışmalık yapmak ve önceden risk altında oldukları bilinmeyen çiftleri belirlemektir. Sonuçlar ailelere ve sağlık profesyonellerine geri bildirilmelidir. Geçikmiş iletişim endişeli bir beklemenin yanında başlangıç tedavisinde bir gecikmeye ve eğitim eksikliğinden dolayı ciddi komplikasyonların tanımlanmasında muhtemel bir gecikmeye neden olabilir.

#### 2.3.4.9. Danışmalık ve Takip

Sonuçlar aileye açıklanmalı ve uygun bir eğitim ve danışmalık sağlanmalıdır. Etkilenen çocuklar bir hemoglobinopati servisine gönderilmelidir. Başlangıç olarak profilaktik penisilin başlanabilir.

#### 2.3.4.10. Sonuç

OHH için yapılan yenidoğan taramalarında başarı sağlamak için farklı elementlerin etkili bir koordinasyonu ve aile ile klinisyenlerin uygun iletişimi temeldir. Eğer klinik bakım zayıf koordine edilmiş yada sağlanamamışsa tarama testlerinin etkinliği azalır. Bu nedenle hastaya mümkün olduğunca yakın mesafede ve yüksek kalitede servisler sağlamak için sistemlerin geliştirilmeye gereksinimleri vardır. Sonuçların görüntülenmesinde, bireylerin bilgilendirilmesinde ve sistemin oluşturulmasında hasta kayıtları önemli bir rol oynar. Bu nedenle hasta bilgileri dikkatli bir şekilde alınmalı ve saklanmalıdır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Doğum Kliniği'nde doğan ve Yenidoğan Bilim Dalı tarafından ilk muayenesi yapılan yenidoğan bebekler ile Sağlam Çocuk ve Yenidoğan Polikliniği'ne kontrole gelen veya İl Sağlık Müdürlüğü tarafından belirlenen 4 sağlık ocağına başvuran bebekler olmak üzere toplam 826 yenidoğan bebeğin topuğundan filtre kağıtlarına kan alındı ve otomatik bir katyon-değiştirici HPLC cihazı olan Bio-Rad Varyant ile çalışıldı. 20 örnek uygunsuz saklama koşullarından dolayı çalışmaya dahil edilmedi ve 806 örnek değerlendirildi.

### 3.1. Örnekler

Yenidoğan bebeklerden alınan topuk kanları için Sergio Bianchi Pheniylalanine kan toplama kartları kullanıldı. Prematür bebekler yada transfüzyon almış bebekler çalışmaya dahil edilmedi. Örnek kağıtlarının üzerine bebeğin doğum tarihi, kan alınma tarihi, anne adı, adres ve telefon bilgileri kaydedildi. Topuk kanı alınırken filtre kağıdı üzerindeki yuvarlak bölgenin tam dolmasına özen gösterildi. Kan alınmadan önce ve sonra el yada başka bir cisim ile filtre kağıtlarına temastan sakınılarak kontaminasyonları engellendi. Alınan kan örnekleri en az dört saat kurumaya bırakıldı ve örnekler çalışmanın öncesi ve sonrasında 4 °C'de muhafaza edildi. Alınan kan örnekleri sonraki iki hafta içinde çalışıldı.

### 3.2. Laboratuvar İşlemleri

#### 3.2.1. Örneklerin hazırlanması

- Her bir hasta örneği için filtre kağıtlarından 3 mm çapında diskler kesildi.
- Her bir disk ayrı örnek şişelerine konuldu.
- Her örnek şişesine 0,5 mL distile su eklendi
- 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Şişelerden diskler uzaklaştırıldı.
- Örnek şişeleri pipetajlama ile karıştırıldı.
- Örnek şişeleri Varyant örnek tablasına yerleştirilerek cihaza yüklendi

#### 3.2.2. Katyon Değiştirici HPLC

Bu çalışmada otomatik HPLC cihazı olan Bio-Rad Variant Hemoglobin Testing System ile orak hücre taraması için "Variant Sickle Cell Short Program" paketi kullanıldı. Bu paket 1000 test için gerekli olan malzemeleri içeriyordu:

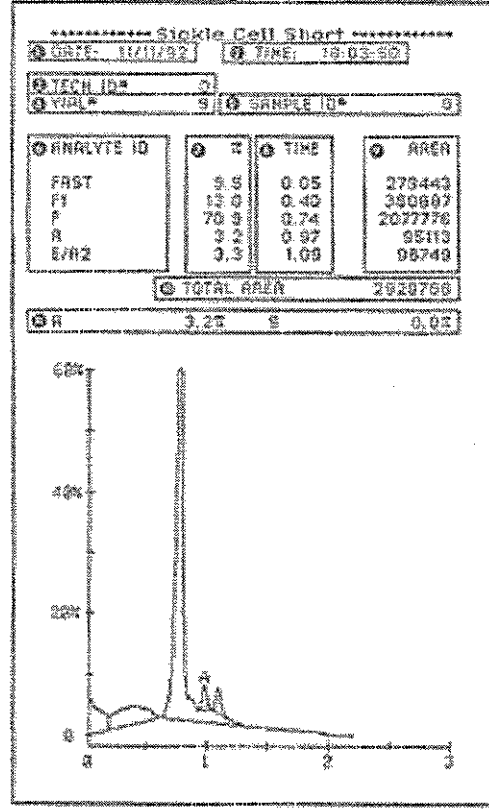
- 2 adet ayırma tamponu 1; 2,5 L Sodyum fosfat tamponu
- 1 adet ayırma tamponu 2; 2,5 L Sodyum fosfat tamponu
- 1 adet yıkama solusyonu; 1,8 L deiyonize su
- 2 adet analitik kartuş; 4,6 mm çapında, 30 mm uzunluğunda, herbiri 500 analiz yapma kapasitesinde olan katyon değiştirici analitik kartuşlar
- 10 şişe tam kan primeri; Lyofilize edilmiş insan kırmızı kan hücreleri hemolizati.

- 10 şişe alıkonma zamanı belirteç seti (retention time marker set); Lyofilize edilmiş insan kırmızı kan hücreleri hemolizati: 5 şişe Hb F, A, E ve S ve 5 şişe Hb F, A, D, C içerir
- 1 adet ROM kart; 86 mm yükseklikte, 54 mm genişlikte ve 1,8 mm kalınlıkta olan bir kart.

Alıkonma zamanı belirteçlerini her şişeye 10 mL distile su eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra kullanıldı. Sulandırılan şişeler +4 °C'de bekletilerek 21 gün saklandı. Aynı şekilde tam kan primeri de 1 mL distile su eklenip 10 dakika bekletildikten sonra kullanıldı.

Çalışmaya başlamadan önce rutinde talasemi short programı kullanıldığı için her çalışmadan önce cihaza orak hücre programını yüklenildi. Bunun için kullanma klavuzu takip edilerek orak hücre kısa program kartı yüklenildi, analitik kartuş yerleştirildi, tamponlar değiştirildi. Her kullanmada örneklerden önce alıkonma zamanı belirteçleri (FAES, FADC) cihaza yüklenip bu suni hemoglobin varyantlarının uygun zaman aralıklarında yürüyüp yürümedikleri kontrol edilerek çalışmaya başlandı.

Kullanma klavuzu kullanılarak örnekler hazırlanıp (bkz 3.2.1) cihaza yüklendi. Sistem iki farklı konsantrasyonda fosfat ayırma tamponu kullanmaktadır. Bunlar 2 mL/dak kontrollü bir hızda akış seline (flow streama) tanıtılmaktadır. Her örnek flow streama otomatik mil ile enjekte edilir. Karışımın konsantrasyonu yükseldiğinde daha güçlü tutulan hemoglobinler kartuştan ayrılırlar. Absorbans değişiklikleri çift dalga boylu filtre fotometresi kullanılarak ölçülür ve değişiklikler zamana karşı çizilir. Her Hb karakteristik alıkonma zamanına sahiptir. Sonuçları grafikler ve sayısal veri olarak gösteren kromatogramlar enjeksiyondan sonraki 3 dakika içinde her örnek için otomatik olarak yazılır. Bir yüklemede çalıştığı maksimum örnek sayısı 100'dür ve 5 saatte çalışır. Bunun öncesinde 20 dakika bir hazırlık aşaması vardır. Hemoglobinlerin suni karışımları olan Hb FAES ve Hb FADC kontrolleri üretici firma tarafından sağlanmaktadır. Bunlar yenidoğan örneklerinde beklenen konsantrasyonlarda hemoglobin içerir ve her çalışmanın başlangıcında ve sonunda test edilir. Her bir örnek için çizilen kromatogramlar incelenerek sonuçları kaydedildi. Varyant cihazı tarafından otomatik olarak çizilen bir kromatogram ve sonuçları içeren rapor örneği Şekil 3.1'de gösterilmektedir.



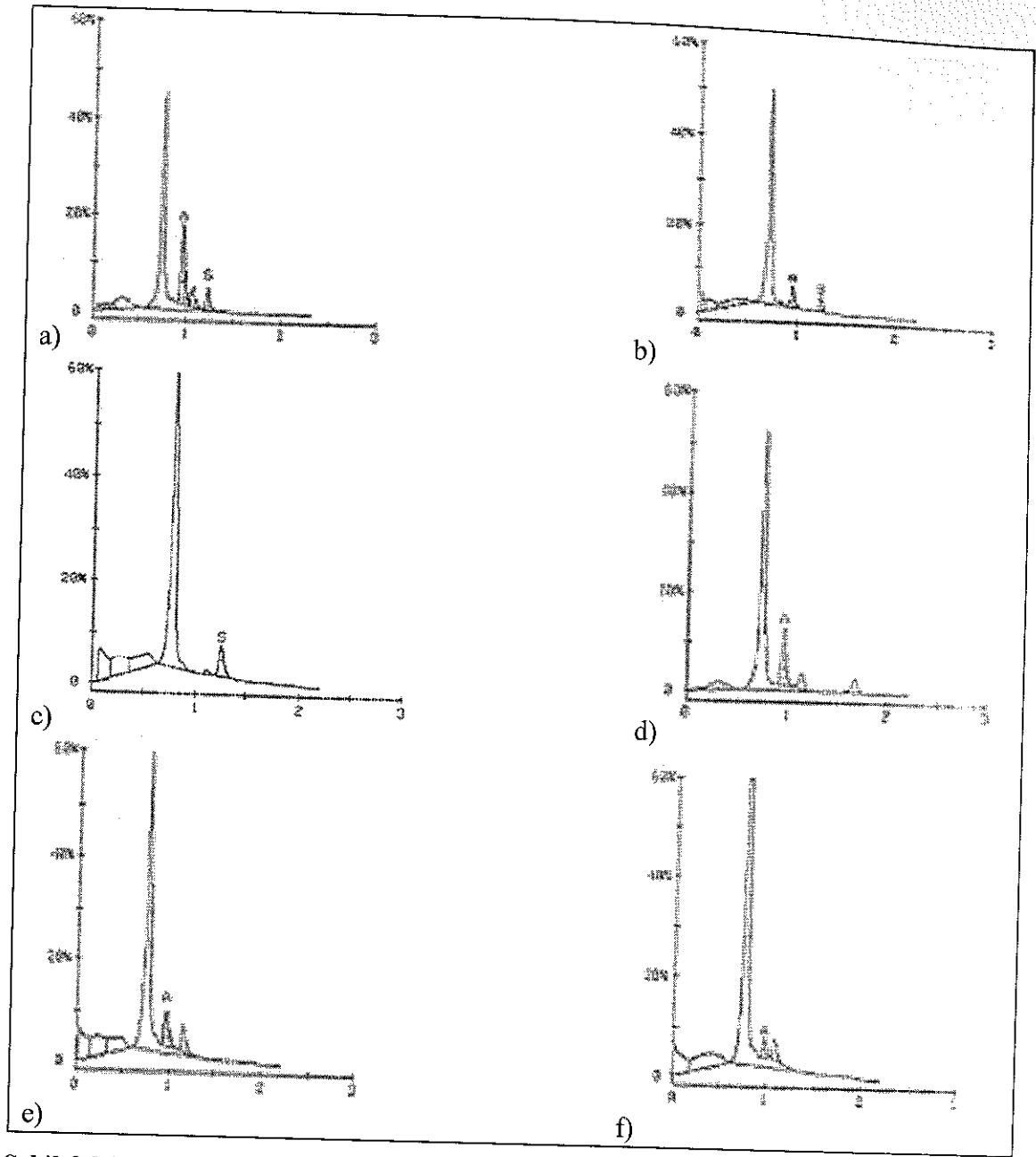
1. Analiz tarihi
2. Analiz zamanı
3. Uygulayıcının kodu
4. Örnek şişesinin cihaz tablasındaki sırası
5. Örnek kodu
6. Analiz türü
7. Analiz edilen bölgenin toplam alana yüzdelik oranı
8. Alıkonma zamanı
9. Analiz bölgesi
10. Toplam analiz bölgesi
11. Anahtar analizin hızlı gösterimi

Şekil. 3.1 Örnek bir sonuç rapor formatı ve kromatogram

Hb S taşıyıcısı bulunan bebekler ve ebeveynleri sonraki aylarda tekrar çağınılarak HPLC yöntemi talasemi short programında hemogloblin analizleri tekrar çalışılarak konunan tanının doğruluğu saptandı. Yine Hb D taşıyıcısı bulunan bebek 2. ayında çağıldı ve anne babasının HPLC ile Hb elektroforezleri çalışılarak tanı doğrulandı.

Bulduğumuz taşıyıcı bebekler dışında Fast oranı çok yüksek çıkan (>25) bebekler de çağınılarak  $\alpha$ -talasemi açısından değerlendirildi. Bunun için bebeklere tekrar elektroforez yapıldı ve ebeveyn ve kendilerinde Heinz body aranması yapıldı. Mutasyon analizleri ise yapılmadı.

Yenidoğan taramasında görülmesi muhtemel hemogloblin varyantları Çizelge 3.1 (Bio-rad Variant Sickle Cell Short Program kullanım klavuzu) 'de özetlenmiştir ve örnek kromatogramlar Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 HPLC’de görülebilecek olası kromatogram örnekleri a) FAES, b) FAS, c) FS, d) FADC, e) FAD, f) FAE

**Çizelge 3.1.** HPLC ile tespit edilebilen hemoglobin fenotipleri

<b>Hasta fenotipi</b>	<b>Tanımlama</b>	<b>Patoloji</b>
Hb FA	Normal hemoglobin örneği	Sağlıklı yenidoğan
Hb FS	Orak Hücre Anemisi	Kronik hemolitik anemi
Hb FAS	Orak Hücre Taşıyıcılığı	Olası hafif anemi
Hb FC	Hemoglobin C Hastalığı	Hafif hemolitik anemi
Hb FAC	Hemoglobin C Taşıyıcısı	Olası hafif anemi
Hb FD	Hemoglobin D Hastalığı	Hafif hemolitik anemi
Hb FAD	Hemoglobin D Taşıyıcılığı	Olası hafif anemi
Hb FE	Hemoglobin E Hastalığı	Hafif hemolitik anemi
Hb FAE	Hemoglobin E Taşıyıcılığı	Olası hafif anemi
Hb FSC	Hemoglobin SC Hastalığı	Kronik hemolitik anemi



## BULGULAR

Bu çalışmada 806 yenidoğan bebeğin topuk kanları HPLC yöntemi ile çalışıldı. Çalışılan kanların 773'ü ilk 15 gününün altında olan yenidoğanlardan alındı. Ancak 33'ü 15. gününün üstünde olan (15-82) bebeklere aitti. Ortalama Hb F ve Hb A değerlerinde bir farklılığa yol açmamaması için bunlar ayrı ayrı değerlendirildi (Çizelge 4.1). 15 günden küçük olan bebeklerin beklenildiği gibi ortalama Hb F ve Fast değerleri daha yüksek, Hb A değerleri ise daha düşük bulundu. Yaptığımız tarama sonucunda 806 bebek arasında 3 Hb S taşıyıcısı 1 de Hb D taşıyıcısı bulundu (%0,5). Bu oran daha önce bölgemizde yetişkinler arasında bulunan orandan daha yüksekti (3). Bu dört taşıyıcı bebeğin HPLC sonuçları Çizelge 4.2'de gösterilmektedir. Şekil 4.1'de ise bu dört hastanın kromatogramları ve hemoglobinin değerleri gösterilmektedir. Bu taşıyıcı bireylerin hemoglobinin düzeyleri normal bireylerin (Hb FA) ortalama hemoglobinin düzeyleri ile karşılaştırıldığında taşıyıcı bireylerin Hb F değerlerinin daha yüksek ancak Hb A ve fast değerlerinin daha düşük olduğu görülüyor (Çizelge 4.3). Taşıyıcı bebeklerin yenidoğan dönemlerindeki ve daha sonraki aylardaki hematolojik parametreleri ise Çizelge 4.4'de belirtilmektedir. Bulduğumuz sonuçları doğrulamak için daha sonraki aylarda bebeklerin ve ailelerinin hemoglobinin parametreleri tekrar çalışıldı. Çalışılan Hb S taşıyıcısı bebeklerin ve ailelerinin Hb elektroforez sonuçları Çizelge 4.5'de gösterilmiştir. 1. Hb S taşıyıcısı bebeğin ailesine ulaşıldığında bu ailenin zaten biri homozigot hasta diğeri taşıyıcı olan iki çocuklarının daha olduğu öğrenildi. Aileye prenatal tanı yapılarak taşıyıcı çocuk sahibi olmaları sağlanmıştı. Bu bebeğin anne ve iki kardeşi ile birlikte elektroforez sonuçları çizelgede gösterilmektedir. Ancak babanın taşıyıcı olduğunu gösteren mutasyon analiz sonucu olduğundan tekrar elektroforez çalışılmasına gerek görülmedi. Bu ailenin OHH ile ilgili bilgileri olmasına karşın 3. taşıyıcı bebeğin ailesinin böyle bir hastalıktan haberleri olmadığı öğrenildi. Yapılan incelemelerde annesinin Hb S taşıyıcısı olduğunu görüldü ve aile konu ile ilgili olarak bilgilendirildi. 1. bebeğin anne ve hasta kardeşi ve 3. bebeğin anne ve taşıyıcı kardeşi yüksek Hb A<sub>2</sub> oranlarından dolayı talasemi taşıyıcısı olarak görülmektedir. 2. Hb S taşıyıcısı olan bebeğe ulaşıldığında babasının Sβ talasemi olduğu öğrenildi. Hb D taşıyıcısı olan bebeğin de anne ve babasının Hb analizleri yapılarak tanı doğrulandı ve bebeğin Hb D mutasyonunu annesinden aldığı görüldü (Çizelge 4.5).

Çalıştığımız örneklerdeki fast değerleri 1,9 ile 39,7 arasında değişiyordu Fast değeri yüksek olan bir bebeğin kromatogramı Şekil 4.1b'de gösterilmektedir. Fast değerleri çok yüksek olan (>25) bebekler ve ebeveynleri tekrar çağırılarak Hb analizleri yapıldı ve sonucunda Hb A<sub>2</sub> değerlerinde bir düşüklüğe rastlanılmadı. New metilen mavisi ile yapılan boyamalarda sonucunda da Heinz body cisimciği görülemedi. Mutasyon analizleri yapılamadığından bu bireylerin kesin olarak α globulin delesyonu içerip içermedikleri hakkında kesin bir şey söylenememektedir.

**Çizelge 4.1.** 806 yenidoğanda saptanan Hb tiplerinin kan alın günlerine göre ortalama değerleri

	Ortalama kan alınma günü	Hb F (%)	Hb A (%)	Hb Barts (%)
15 günden küçük yenidoğanlar (n=773)	4,51 ( $\pm$ 2,66)	61,60 ( $\pm$ 4,95)	12,29 ( $\pm$ 4,66)	9,31 ( $\pm$ 6,27)
15 günden büyük yenidoğanlar (n=33)	32,83 ( $\pm$ 17,50)	55 ( $\pm$ 6,33)	19,87 (10,58)	8,83 ( $\pm$ 6,21)
Genel (n=806)	5,58 ( $\pm$ 6,90)	61,33 ( $\pm$ 5,18)	12,59 ( $\pm$ 5,25)	9,30 ( $\pm$ 6,30)

**Çizelge 4.2.** Taşıyıcı yenidoğanların HPLC ile saptanan hemoglobin yüzdeleri

Taşıyıcı bireyler	Hb F (%)	Hb A (%)	Hb Barts (%)	Hb S (%)	Hb D(%)
1 Hb S	61,2	6,4	7,1	4,7	-
2 Hb S	62,4	3,3	9,1	2,7	-
3 Hb S	68,9	5,7	5,6	5,2	-
4. Hb D	67,4	4,5	4,6	-	3,2

**Çizelge 4.3.** Normal bireyler ile taşıyıcı bireylerin ortalama Hb yüzdelerinin karşılaştırılması

Hemoglobin modeli	Ortalama Hb F	Ortalama Hb A	Ortalama Hb Barts	Ort Hb S	Hb D
FA	61,32 ( $\pm$ 5,18)	12,63 ( $\pm$ 5,24)	9,32 ( $\pm$ 6,31)	-	-
FAS	64,16 ( $\pm$ 4,14)	5,13 ( $\pm$ 1,62)	7,26 ( $\pm$ 1,75)	4,2 ( $\pm$ 1,32)	-
FAD	67,4	4,5	4,6		3,2
Genel	61,33 ( $\pm$ 5,18)	12,59 ( $\pm$ 5,25)	9,30 ( $\pm$ 6,30)	4,2 ( $\pm$ 1,32)	3,2

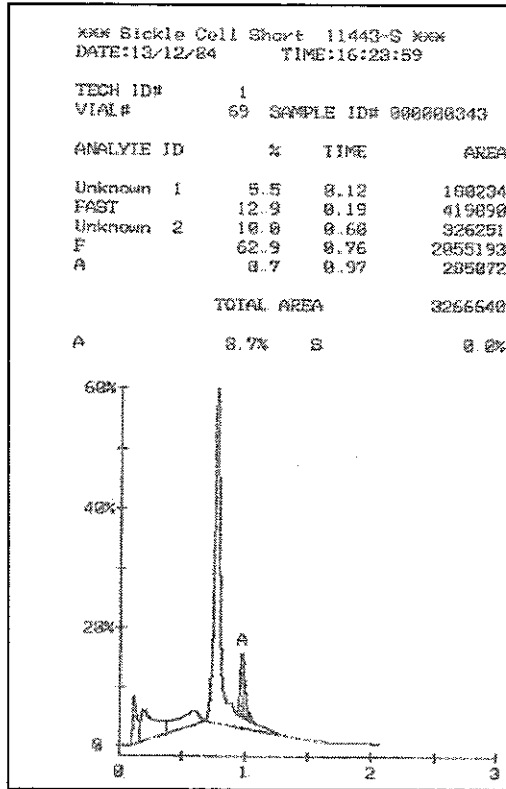
**Çizelge 4.4.** Hb D ve Hb S taşıyıcısı olan yenidoğanların hematolojik parametreleri

Taşıyıcı bireyler	Kan alınma günü	KK (x10 <sup>6</sup> mL)	Hb g/dL	*OEV (fL)	*OEH (pg)	*OEHK (g/dL)
1. Hb S	7.gün	5.06	17.90	100.10	35.30	35.30
	2.ay	3.06	9.50	87.10	31.00	35.60
2. Hb S	5.gün	4.90	17.50	89.70	35.80	39.90
3. Hb S	2.gün	4.86	17.2	104.70	35.40	33.80
	4.ay	3.76	9.90	76	26.40	34.70
4. Hb D	4.gün	3.76	13.6	95.20	36.20	38.00
	2.ay	4.30	10.40	71.90	24.30	33.80

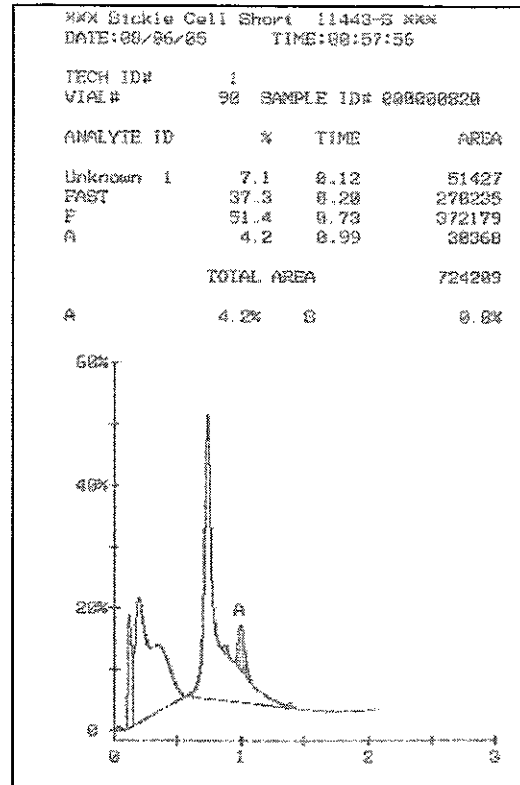
\*OEV ortalama eritrosit hacmi, OEH ortalama eritrosit hemoglobini, OEHK ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu

**Çizelge 4.5.** Taşıyıcı yenidoğanların ve anne-baba- kardeş elektroforez sonuçları

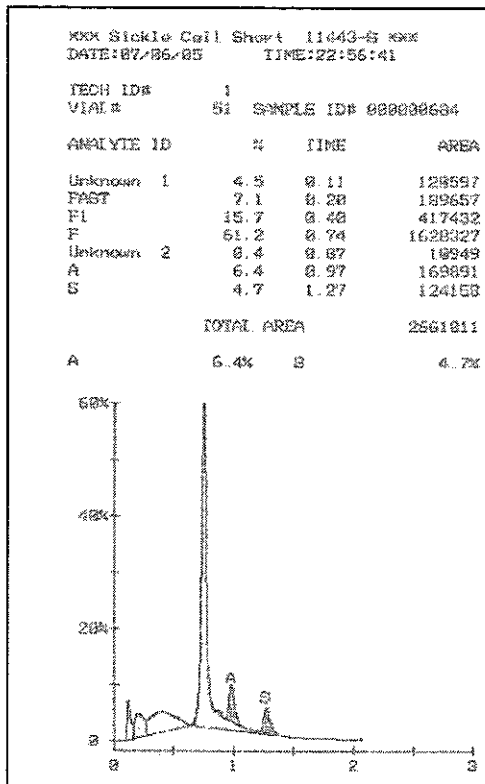
Taşıyıcılar	Birey	Hb A	Hb A <sub>2</sub>	Hb F	Hb S	Hb D
1. Hb S	Kendisi (2. ay)	16.2	0.90	70.40	12.50	
	Anne	53.00	4.10	0.50	42.40	
	Taşıyıcı kardeş	51.70	2.20	-	38.10	
	Hasta kardeş	3.10	4.60	16.10	76.20	
2. Hb S	Baba	11.7	6.9	6.6	74.8	
3. Hb S	Kendisi (4. ay)	42.7	3.10	17.00	37.20	
	Anne	43.8	4.40	-	41.80	
	Baba	97.10	2.90	-	-	
	Kardeş	54.8	4.5	0.30	40.40	
4. Hb D	Anne	58.00	1.90	0.50		39.60
	Baba	95.80	3.10	1.10	-	-



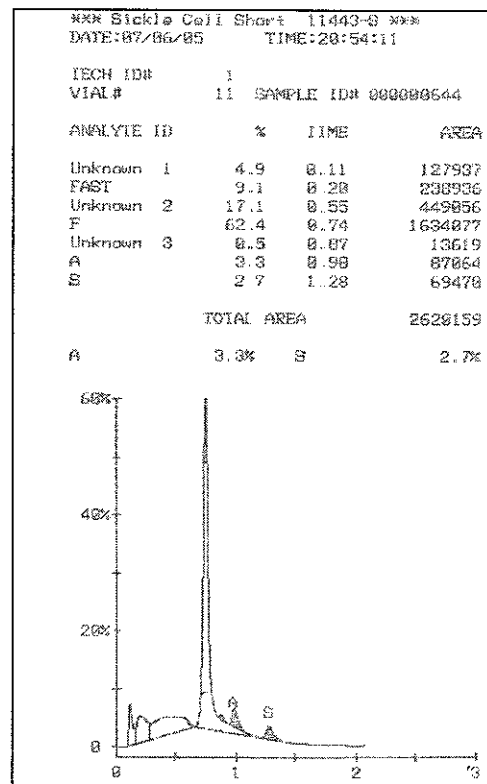
4.1.a. Normal birey (FA)



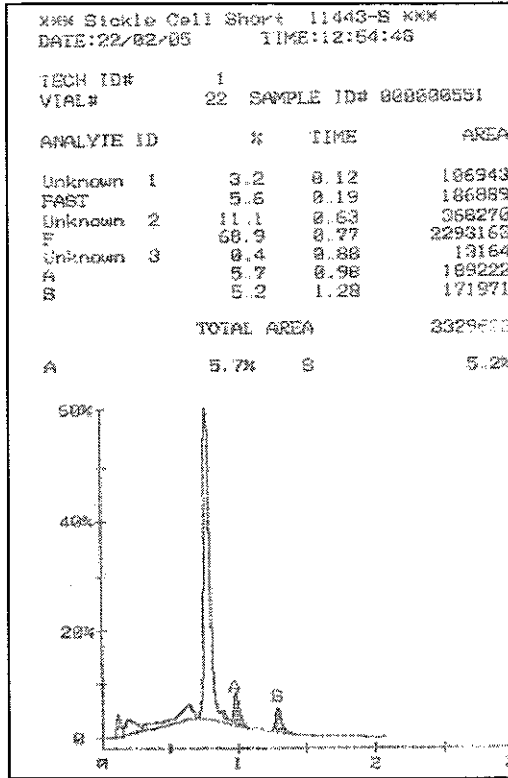
4.1.b. Hb Barts'ı yüksek olan normal birey



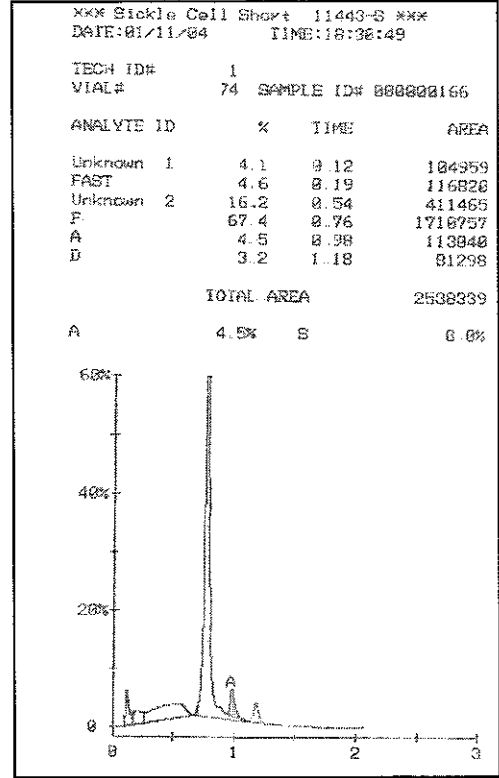
4.1.c. Hb S taşıyıcısı



4.1.d. Hb S taşıyıcısı



4.1.e. Hb S taşıyıcısı



4.1.f. Hb D taşıyıcısı

Şekil 4.1. Normal ve taşıyıcı bireylerin kromatogram sonuçları

## TARTIŞMA

Orak hücreli anemi tüm dünyada yaygın olarak görülen bir hastalıktır. Amerikan zencilerinde 375 kişiden biri orak hücre hastasıdır (122). Türkiye’de ise özellikle Akdeniz bölgesinde yaygın olarak bulunmaktadır. 1616 yetişkin arasında yapılan bir çalışmada anormal hemoglobin sıklığı %0,8, OHA taşıyıcılığı %0,25 olarak bildirilmiştir. OHA hastalığı, belirtilerin yaşam boyu sürmesi, iş gücüne engel olması, uzun dönemde morbiditenin yüksek olması nedeniyle önemli bir sorundur. Orak hücre taşıyıcılarının genel olarak klinik bulgu göstermediği bilinmekle birlikte, literatürde ani ölüm, splenik infarkt gibi vaso-oklusif komplikasyonlar ve 8 vakada akut göğüs sendromu rapor edilmiştir (123). OHA doğum öncesi tanı ve genetik danışmanlık ile önlenabilir kalıtsal hastalıklar grubundadır. Ayrıca klinik bulgular ortaya çıkmadan önce tarama yöntemleri ile hasta bireylerin saptanması ve uygun önlemlerin alınması ile hastalığa bağlı morbidite ve mortalite azaltılabilir.

Çalışmamızda Antalya’da doğan yenidoğanlarda henüz klinik bulgular ortaya çıkmadan HPLC yöntemi ile orak hücre taraması yapılarak bölgemizdeki yenidoğanlarda HbSS (homozigot-hasta) ve HbAS (heterozigot-taşıyıcı)’in sıklığının belirlenmesi amaçlandı. OHA olan hastaların bir kısmının erken çocukluk döneminde gelişen komplikasyonlar nedeni ile kaybedildiği bilinmektedir (71). Bu nedenle yenidoğan dönemindeki Hb S sıklığının erişkin dönemden daha yüksek olması beklenilebilir. Ancak yenidoğan döneminde Hb S sıklığının saptanmasına yönelik Türkiye’den yapılmış böyle bir çalışmaya literatürde rastlanılamamıştır.

Çalışmamıza Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Kliniği’nde doğan veya merkezimiz Yenidoğan Bilim Dalı tarafından ilk muayenesi yapılan veya merkezimiz Sağlam Çocuk ve Yenidoğan Polikliniği’ne kontrole gelen ve İl Sağlık Müdürlüğü tarafından belirlenen dört sağlık ocağına başvuran 806 yenidoğan dahil edildi. 3 olgu Hb S taşıyıcısı, 1 olgu Hb D taşıyıcısı olarak saptandı. Anormal hemoglobin yüzdesi %0,5 ve Hb S yüzdesi %0,37 olarak bulundu. Anormal hemoglobinlerin oranı yetişkinlerde saptanan orandan (%0,8) daha düşük ancak Hb S oranı yetişkinlerde bulunandan (%0,24) daha yüksek olarak saptandı. Çalışmamızda örnekleme yaptığımız sağlık ocakları doğum oranının yüksek olması gerekçesiyle seçilmiş merkezlerdi. 806 örneğin 261’i bu sağlık ocaklarından, 545’i üniversitemize başvuran yenidoğanlardan elde edildi. Çalışmamızda homozigot orak hücre anemisine hiç rastlanmadı ve bunun taranan olgu sayısının az olmasıyla ilişkili olabileceği düşünüldü. Ayrıca bu sonuç hemoglobinopatiler konusunda toplumun bilgilendirilmesi ve prenatal tanının yaygınlaştırılması ile ilişkili olabilir. Nitekim Hb S saptanan bir olgunun, OHA taşıyıcısı ebeveynlerden prenatal tanı yapılarak doğduğu ve homozigot OHH kardeşi olduğu öğrenildi. Merkezimiz kadın doğum polikliniğine başvuran çiftlerden hemoglobin elektroforezi yapılmakta ve her iki bireyin de taşıyıcı olduğu durumlarda prenatal tanı önerilmektedir. Bu şekilde hastalıklı bireylerin doğması engellenebilmektedir. Ancak her yerde özellikle de kırsal kesimlerde aynı titizliğin gösterilememesi, gebelik takibinin düzenli

yapılamaması, sosyokültürel nedenler dolayısıyla gebenin veya hasta çocuğun doktora ulaşamaması gibi ülkemiz gerçekleri göz önüne alındığında, hasta bireyler doğmakta ve bazen de tanı konulamadan bu bireyler kaybedilmektedir. Belki de erken tanı açısından tek şans olarak yenidoğan muayenesi sırasında tarama yapılması ile bu şekil kayıplar engellenebilir.

Orak hücre hastalığı için yenidoğan tarama programlarının gerekliliği halen tartışmalıdır. 15-20 yıldır yenidoğan taraması için gerekli olan teknoloji mevcut olmasına rağmen geniş çaplı tarama programları yaygınlaşmamıştır. Ancak OHH için yapılan tarama programlarının aile eğitimini de içeren uygun klinik takip ile birlikte yapıldığında kesin olarak hastalık ve ölüm oranını azalttığını gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (5-7). Çok merkezli randomize plasebo-kontrollü bir çalışmada; 3 aylık dönemde oral penisilin verilen grupta plasebo verilen gruba oranla pnömokok sepsis görülme insidansının %84 azaldığı gösterilmiştir (7). OHA bebeklerin 4 aylık bir dönem kadar erken yaşta sepsis geçirebilecekleri bildirilmiştir. Bu nedenle profilaktik penisilin kullanımına yaşamın 4. ayından önce başlanması önerilmektedir. Yine pnömokok aşuları yaşam kalitesini artırmak için yapılmalıdır. Sonraki dönemlerde hastaların takibi pediatrik hematoloji-onkoloji uzmanlarının, genetik danışmanlar, sosyal çalışanlar ve nörolog, ortopedist, göz hastalıkları uzmanları gibi yan dal uzmanları ile oluşturdukları bir takım tarafından yapılmalıdır.

Yenidoğan taraması ile bir bebeğin OHH olduğunun belirlenmesi, semptomlar gelişmeden önce ebeveynlerin çocuğun hastalığı konusunda eğitilmelerine olanak sağlar (6,19). Öncelikle olası ağır komplikasyonların erken tanınması konusunda aileler eğitilmeli ve onlara tavsiyelerde bulunulmalıdır. Aileye dalak büyüklüğünün palpe edilmesi öğretilmelidir. Dalak büyüklüğü, ateş, derinin soluklaşması, solunum semptomları, ağrı belirtileri yada ekstremiteleri hareket ettirememesi gibi durumlarda acilen tıbbi tedavi görmeleri gerektiği ailelere söylenmelidir. Aynı zamanda aileye hastalığın geçişi, taşıyıcılık testi, prenatal tanı gibi konuları içeren genetik danışmanlık verilmelidir. Bizim çalışmamızda homozigot OHH saptanmadı. Ancak Hb S taşıyıcısı olduğu saptanan 3 bebek ve Hb D taşıyıcısı olduğu belirlenen 1 bebeğin aileleri çağrılarak onların taşıyıcılıkları da doğrulandıktan sonra aileler konu ile ilgili olarak bilgilendirildi. Taşıyıcıların hastalısız bir yaşam sürdükleri, tıbbi bir takibe gerek duymadığı, yalnızca yüksek sıcaklık, basınçsız uçakta uçuş gibi bazı özel koşullarda semptom gösterebilecekleri anlatıldı. Çağrılan çiftlerden yalnızca eşlerden birinin taşıyıcı olduğu ailelere, bundan sonraki doğumlarında da hasta çocuk sahibi olma olasılıklarının olmadığı söylenerek endişe etmemeleri konusunda bilgi verildi. Hastalığın genetik geçiş gösterdiği ve yalnızca iki ebeveynin de taşıyıcı olması durumunda homozigot hasta çocuklarının olabileceği açıklandı. Yalnız taşıyıcı çocuklarının ileride evleneceği kişinin de hemoglobinopati taşıyıcısı olması durumunda hastalıklı çocuğu olabileceği ancak doğum öncesi tanı ile bunun önüne geçilebileceği anlatıldı. Bu nedenle çocuklarının ve evleneceği kişinin evlenmeden önce yada çocuk sahibi olmaya karar verdikten sonra ilgili kuruluşlara başvurarak genetik analizlerini yaptırmalarının gerekliliği anlatıldı. Şanslılıkla çalışmamızda taşıyıcı saptanan olguların ebeveynlerinden biri hariç diğerlerinde çiftlerden sadece biri taşıyıcı olarak bulundu. Her iki ebeveynin taşıyıcı saptandığı aile, OHA'lı çocuğu

olan ve prenatal tanı uygulanmış olan aile idi. Bu şekil tarama yöntemleri ile her iki ebeveynin taşıyıcı olduğu aileler de saptanabilir ve prenatal tanı ile daha sonraki gebeliklerinden hasta çocuklarının olması engellenebilir

Yenidoğan taramalarında elektroforez, IEF ve HPLC en çok kullanılan tekniklerdir. Çözünürlük testi tarama hedefleri için tatmin edici değildir. Taramalarda kullanılacak tekniklerden, elektroforez yönteminin kullanımı da oldukça azalmıştır. Alkali pH'da seluloz asetat üzerinde yapılan elektroforez sonucu bulunan anormal örnekler sitrat agarda asit elektroforezde ileri incelemeleri yapılarak sonuç verir. Bu tekniklerle Hb S, C ve A güvenilir bir şekilde belirlenir, aynı zamanda ucuz ve basittir. Ancak doğru sonuç vermek için iki ayrı elektroforez işlemi uygulanır ve yine diğer anormal hemoglobinin ayrılmasında sınırlı çözünürlük sağlar. Alkali pH'da Hb C, E, A<sub>2</sub> ve Hb O'nun elektroforetik ayrımı benzerdir. Yine Hb S, D ve Hb G birlikte hareket eder. Asit pH'da Hb C, Hb E ve Hb O'dan ve Hb S, Hb D ve Hb G'den ayrılır ancak Hb E'yi Hb O'dan ve Hb D'yi Hb G'den ayırmak mümkün değildir. Aynı zamanda elektroforez yavaş, laboratuvar yoğunluğu oluşturan bir tekniktir ve düşük konsantrasyonlardaki Hb varyantlarını (örneğin Hb A<sub>2</sub>) ve hızlı Hb varyantlarını (örneğin Hb Barts) belirlemede yetersizdir. IEF laboratuvar yoğunluğu oluşturmaya ve uzun zaman almasına rağmen hemoglobinlerin ayrılmasında ve miktar tayininde kullanılmaktadır (124). Bu yöntem tek bir prosedür ile Hb A, S ve C'yi elektroforeze göre daha iyi ayırır. Ancak daha pahalı olup, kullanımında daha az tecrübe vardır. Kapiller IEF ise kapiller elektroforez ile HPLC'nin birleştirilmesiyle oluşturulmuş hibrit bir tekniktir (19,125). Örnekler izoelektrik noktalarına göre ayrılır. Katyon-değiştirici HPLC yenidoğan taramalarında ve Hb A<sub>2</sub> ve Hb F miktarlarını ölçmede tercih edilen bir metoddur (126). HPLC duyarlı, hızlı ve birçok anormal hemoglobini ayırabilen bir tekniktir. Bu nedenle bizim çalışmamızda da bir çok ülkede olduğu gibi HPLC yöntemi tercih edildi. Bio-Rad Variant Hb A<sub>2</sub>, Hb F, Hb A, Hb S, Hb D ve Hb C miktarlarını ölçmede kullanılan otomatik bir katyon-değiştirici HPLC cihazıdır. HPLC yönteminde kendi içinde yorumlama problemleri vardır. Hb E Hb A<sub>2</sub> ile birlikte yürüdüğünden bu Hb varyantını içeren örneklerde Hb A<sub>2</sub> ölçümü yapılamamaktadır (127). Yenidoğan döneminde Hb A<sub>2</sub> çok az görüldüğü yada hiç görülmediği için, yenidoğanlarda Hb E ve Hb A<sub>2</sub>'nin HPLC ile ayırımında karışıklığa neden olmaz

Ailelerin hemoglobin elektroforez sonuçlarına baktığımızda 1. bebeğin anne ve hasta kardeşi ve 3. bebeğin anne ve taşıyıcı kardeşi yüksek Hb A<sub>2</sub> oranlarından dolayı talasemi taşıyıcısı olarak da görülmektedir. Çocuklar hem Hb S hemde yüksek Hb A<sub>2</sub>'yi annelerinden aldıklarından dolayı bu sonuçların S ve  $\beta$  mutasyonlarının aynı gen üzerinde taşınmasıyla oluşan cis mutasyonlar sonucu ortaya çıktığı düşünülebilir ancak kesin tanının konması için DNA dizi analizinin yapılması gerekmektedir. Zaman kısıtlılığı dolayısı ile bu testler yapılamamıştır. Aileler çağırılarak mutasyon analizleri en kısa zamanda çalışılacaktır. Bu iki mutasyonu taşıyan bireyler klinik olarak S $\beta$  talasemi gibi seyretmezler çünkü yalnızca bir ebeveynen bu iki mutasyonu almışlardır. 1. bebeğin hasta kardeşinin DNA dizi analizi daha önceden yapılmış ve homozigot Hb SS olarak bulunmuştur. Aynı şekilde annesi ve babasına da dizi analizi yapılarak her ikisi de Hb S taşıyıcısı olarak



bulunmuştur. Hasta çocuk ve anneye herhangi bir  $\beta$  mutasyonu içerip içermediğine bakmak için daha ayrıntılı bir dizi analizi yapılacaktır.

HPLC cihazı Hb Barts için de hassas bir cihazdır ve yenidoğan döneminde görülen Hb Barts'ı Fast olarak okur. Doğumda bu oran yüksek olabilir ancak ilerleyen dönemlerde düşmesi gerekir. Olası bir Hb H hastalığı olup olmadığını anlamak için çalışmamızda Fast oranı yüksek olan (>25) olan bebekler ve ebeveynleri sonraki aylarda tekrar çağırılıp hemoglobin ve hematolojik parametrelerine bakıldı. Genetik analiz yapılmadan bu bebeklerin  $\alpha$ -talasemi taşıyıcılığı hakkında kesin bilgi verilememekle birlikte yapılan incelemelerde bu bebeklerin ve ebeveynlerinin Heinz body cisimcikleri içermedikleri, anemik olmadıkları ve HPLC ile yapılan Hb A<sub>2</sub> değerlerinde bir düşüklük olmadığı gözlemlendi.

OHH yenidoğan taramaları ile belirlenen en yaygın hastalıktır. Öyleki Amerika'da her yıl yaklaşık 2000 etkilenmiş bebek doğmaktadır (128). Amerika'da OHH ile doğan pekçok bebek, rutin olarak yapılan yenidoğan taraması ile tanı almaktadır (19,129). Amerika gibi diğer gelişmiş ülkelerde de yenidoğan taraması çok iyi yerleşmiş ve belirlenen vakaların aile eğitimi, bağışıklık kazandırma ve penisilin profilaksisi ile uygun takibi ile hastalık ve ölüm oranı belirgin olarak azaltılmıştır (10,130,131). Yenidoğan döneminde belirlenemeyen etkilenmiş çocuklar genellikle bebeklik yada erken çocukluk döneminde solukluk, ateş, dalak büyüklüğü gibi yakınma ve bulgular nedeniyle araştırılırken tanı alır veya el-ayak sendromu, pnömokok sepsisi yada menenjit, ağır anemi, splenik sekestrayon, akut göğüs sendromu gibi çok daha ağır kliniklerle başvurabilir. Doğumda prenatal tanı yada doğum sonrası yenidoğan taraması yapılmamış yüksek risk grubundaki bebekler doğumdan sonra mümkün olduğunca erken dönemde hemoglobin elektroforezi ile taranmalıdır. Tarama sonucu Hb S yönünden pozitif bir bebek ise doğrulayıcı testler yaşamının 2. ayından önce yapılmalı ve böylece aile eğitimi, penisilin profilaksisi, aşılama gibi önlemlere bir an önce başlanmalıdır (6,19).

Yenidoğan döneminde hemoglobinopatiler açısından bebeklerin taranması için uzun yıllardır teknoloji mevcut olduğu halde taramanın benimsenmesi yaygınlaşmamıştır. Bir hastalıkla ilgili olarak tarama yapılabilmesi için öncelikle erken tanı ile hastalığa bağlı morbidite ve mortalitenin azaltılabilir olması, hastalığın tarama yapılan bölgede yaygın olarak görülmesi ve tarama yönteminin ucuz, maliyet yararlanım oranının yüksek olması gerekmektedir. OHA'de erken teşhis ile başlanan profilaktik penisilin tedavisinin pnömokok sepsis sıklığını ve buna bağlı morbidite ve mortalite oranlarını azalttığını gösteren çalışmalar literatüre sunulmuştur (6,7,132). Ailelerin de eğitilmesiyle olası komplikasyonların önüne geçilebilmektedir. Aynı zamanda ailelere genetik danışmanlık verilerek sonraki çocuklarının hasta doğması da engellenebilmektedir. Hemoglobinopatiler açısından tarama yapılmasının yararları iyi bilinmekle birlikte yaygınlaşmasındaki en önemli kısıtlayıcı faktör maliyetinin yüksek olmasıdır. Yenidoğan taraması için uygun koşulları sağlayan merkezi laboratuvarların belirlenmesi ve altyapının bu merkezlerde yoğunlaştırılması ile taramanın etkinliğinin artması, hata oranının düşmesi sağlanabilir ve bu şekilde maliyet azaltılabilir. Ancak yenidoğan taramasının ekonomik değerlendirilmesi

yapılırken, erken tanı ve tedavi sayesinde kazanılan yıllar, aile ve toplum için hasta birey olarak yaşamının maliyeti ve erken tedavi ile komplikasyonların azaltılmasından sağlanan kar da hesaba katılmalıdır.

Sonuç olarak, çocukluk döneminde orak hücre hastalığının öldürücü komplikasyonlarının önlenmesi ve taşıyıcıların belirlenmesi için hemoglobinopatilerin yaygın olarak görüldüğü bölgelerde orak hücre anemisi açısından yenidoğan taraması yapılmasının yararlı olacağı sonucuna varılmıştır

## KAYNAKLAR

1. Gulbis B, Cotton F, Hansen V, et al. Prevention of hemoglobinopathies in Brussels: a necessity? *Rev Med Brux*. 2001 Jun;22(3):133-40
2. Nietert PJ, Silverstein MD, Abboud MR. Sick cell anaemia: epidemiology and cost of illness. *Pharmacoeconomics*. 2002;20(6):357-66.
3. Bircan I, Sisli S, Güven A, et al. Hemoglobinopathies in district of Antalya, Turkey. *Pediatric Hematol Oncol*. 1993 Jul-Sep;10(3):289-91
4. Karnon J, Zeuner D, Ades AE, Efimba W, Brown J, Yardumian A. The effects of neonatal screening for sickle cell disorders on life time treatment costs and early deaths avoided: a modelling approach. *J Public Health Med*. 2000;22(4):500-11.
5. Bardakdjian-Michau J, Guilloud-Bataillie M, Maier-Redelsperger M, et al. Decreased morbidity in homozygous sickle cell disease detected at birth. *Hemoglobin* 2002 Aug;26(3):211-7
6. Pass KA, Lane PA, Fernhoff PM, et al. US newborn screening system guidelines II: follow-up of children, diagnosis, management, and evaluation *J Pediatr*. 2000;37 (suppl): 1-46
7. Gaston MH, Verter JL, Woods G, et al. Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. A randomized trial. *N Engl J Med*. 1986 Jun 19;314(25):1593-9.
8. David G. Nathan, Frank A. Oski. *Hematology of Infancy and Childhood*. 4<sup>th</sup> Ed. 1993, pp. 746
9. Almeida AM, Henthorn JS, Davies SC. Neonatal screening for haemoglobinopathies: the results of a 10-year programme in an English Health Region *Br J Haematol* 2001 Jan;112(1):32-5.
10. Olney RS Preventing morbidity and mortality from sickle cell disease. A public health perspective. *Am J Prev Med* 1999;16:116-21.
11. Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Intern Med* 1910; 6:517
12. Sydenstricker VP, Mulherin WA, Hauseal RW: Sickle cell anemia: Report of two cases in children with necroscopy in one case. *Am J Dis Child* 1923; 26:132.
13. Hahn EV, Gillespie EB. Sickle cell anemia: Report of a case greatly improved by splenectomy. *Arch Intern Med* 1927; 39:233
14. Pauling L, Itano H, Singer SJ, Wells IC. Sickle cell anemia: a molecular disease. *Science* 1949; 110: 543-48.
15. Neel JV. Inheritance of the sickling phenomon with particular reference to sickle-cell disease. *Blood* 1951;6:389
16. Watson J, Stahman AW, Billelo FP. The significance of the paucity of sickle cells in newborn negro infants. *Am J Med Sci* 1948; 215: 419-23
17. Aluoch JR. Higher resistance to *Plasmodium falciparum* infection in patients with homozygous sickle cell disease in western Kenya. *Trop Med Int Health*. 1997 Jun;2(6):568-71.

18. Roth EF Jr, Friedman M, Ueda Y, Tellez I, Trager W, Nagel RL. Sickling rates of human AS red cells infected in vitro with *Plasmodium falciparum* malaria. *Science* 1978;202(4368):650-2
19. Sickle Cell Disease Guideline Panel. Sickle cell disease: screening, diagnosis, management, and counseling in new-borns and infants. (Clinical Practice Guideline no. 6). Rockville, MD. Agency for Health Care Policy and Research, US Public Health Service, 1993. (AHCPR publication no. 93-0562).
20. Ingram VV. Gene mutation in human haemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* 1957;180:326-328.
21. Pearson education, Inc., publishing as Benjamin cummings.
22. Brugnara C, Gee B, Armsby C, et al. Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J. Clin. Invest.* 1996;97:1227-34.
23. Eaton WA, Hofrichter J. Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. *Blood* 1987;70:1245-66.
24. Joiner CH., Platt O. S., Lux S. E. Cation depletion by sodium pump in red cells with pathological cation leaks: Sickle cells and xerocytes. *J. Clin. Invest.* 1986;78:1487-96.
25. [encarta.msn.com/.../Sickle-Cell\\_Anemia.html](http://encarta.msn.com/.../Sickle-Cell_Anemia.html)
26. Kondylis-deBlois K and Feingold M. Sickle Cell Disease. *Prim Care Update Ob/Gyns.* 1998;5:28-31.
27. Wethers DL. Problems and complications in the adolescent with sickle cell disease. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1982;4 (1):47-53
28. Kinney IR, Ware RE. The adolescent with sickle cell anemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1996;10: 1255-64
29. Seeler RA. Deaths in children with sickle cell anemia. A clinical analysis of 19 fetal instances in Chicago. *Clin Pediatr (Phila)* 1972;11:634-7
30. Barret-Connor E: Bacterial infection and sickle cell anemia. An analysis of 250 infection in 166 patients and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1971; 50:97-112.
31. Pearson HA, Gallagher D, Chilcote R, et al. Developmental pattern of splenic dysfunction in sickle cell disorders. *Pediatrics* 1985;76:392-7.
32. Diggs LW. Sickle cell crises. *Am J Clin Pathol* 1965; 44:1
33. Embury SH, Hebbel RP, Mohandas N, Steinberg MH. Sickle cell disease: basic principles and clinical practice, New York: Raven Press; 1994.
34. Ballas SK, Mohandas N. Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin N Am* 1996;10:1221-39.
35. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1997;337:762-9
36. Baibbridge R, Higgs DR, Maude GH, et al. Clinical presentation of homozygous sickle cell disease. *J. Pediatr* 1985; 106:881-5
37. Pappo A, Buchanan GR: Acute splenic sequestration in a 2-month-old infant with sickle cell anemia. *Pediatrics* 1989; 84:578-9
38. Buchanan GR, Glader BE. Benign course of extreme hiperbilirubinemia in sickle cell anemia: Analysis of six cases. *J. Pediatr* 1977; 91:21-24

39. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, et al. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. *N Engl J Med* 2000;342:1855-65
40. Gray A, Anionwu EN, Davies SC, Brozovic M. Patterns of mortality in sickle cell disease in the United Kingdom. *J Clin Pathol* 1991;44:459-63.
41. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*. 1994 Jun 9;330(23):1639-44.
42. Vichinsky EP. Comprehensive care in sickle cell disease: its impact on morbidity and mortality. *Semin Hematol* 1991;28:220-6.
43. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, et al: The acute chest syndrome in sickle cell disease: Incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 1994;84:643-9
44. Charache S, Terin MI, Moore RD, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N. Engl J Med* 1995; 332:1317-22.
45. Povars D, Wilson B, Imbus C, et al. The natural history of stroke in sickle cell disease. *Am J Med* 1978; 65:461-471
46. Balkaran B, Char G, Morris JS, Thomas PW, Serjeant BE, Serjeant GR. Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. *J Pediatr*. 1992 Mar;120(3):360-6.
47. Falk RJ, Scheinman J, Phillips G, et al. Prevalence and pathologic features of sickle cell nephropathy and response to inhibition of angiotensin-converting enzyme. *N Engl J Med* 1992;326:910-5.
48. Milner PF, Kraus AP, Sebes JJ, et al. Sickle cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head. *N Engl J Med* 1991;325:1476-81.
49. Emond AM, Holman R, Hayes RJ, Serjeant GR. Priapism and impotence in homozygous sickle cell disease. *Arch Intern Med*. 1980 Nov;140(11):1434-7.
50. Dimitrov NV, Douwes FR, Bartolotta B, Nochumson S, Toth MA. Metabolic activity of polymorphonuclear leukocytes in sickle cell anemia. *Acta Haematol*. 1972;47(5):283-91.
51. Koshy M, Burd L, Wallace D, Moawad A, Baron J, Prophylactic red-cell transfusions in pregnant patients with sickle cell disease: a randomized cooperative study. *N Engl J Med*. 1988;319:1447-52.
52. Smith JA, Espeland M, Bellevue R, Bonds D, Brown AK, Koshy M. Pregnancy in sickle cell disease: experience of the cooperative study of sickle cell disease. *Obstet Gynecol*. 1996;87:199-204.
53. Old JM. DNA-based diagnosis of hemoglobin. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, eds. *Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, clinical management*. Cambridge UK: Cambridge University Press, 2001:941-57.
54. Ducrocq R, Pascaud O, Bevier A, Finet C, Benkerrou M, Elion J. Strategy linking several analytical methods of neonatal screening for sickle cell disease. *J Med Screen* 2001;8:8-14.
55. Jinks DC, Minter M, Tarver DA, Vanderford M, Hejtmancik JF, McCabe ER. Molecular genetic diagnosis of sickle cell disease using dried blood specimens on blotters used for newborn screening. *Hum Genet* 1989 Mar;81(4):363-6.

56. Pearson HA. A neonatal program for sickle cell anemia. *Adv Pediatr*. 1986;33:381-400.
57. O'Brien RT, McIntosh S, Aspnes GT, Pearson HA. Prospective study of sickle cell anemia in infancy. *J Pediatr*. 1976 Aug;89(2):205-10.
58. Heart, Lung, and Blood Institute. Management and Therapy of Sickle Cell Disease: lessons from a cohort study. *BMJ*. 1995; 311: 1600-2
59. Guidelines for the management of acute and chronic pain in sickle-cell disease, Glenview: American Pain Society; 1999.
60. Ballas SK, Carlos TM, Dampier C. the Guidelines Committee. Guidelines for standard of care of acute painful episodes in patients with sickle cell disease, Philadelphia: Cardeza Foundation; 2000.
61. Vichinsky EP, ed. Transfusion- related iron overload in sickle cell anemia. *Semin Hematol*. 2001; 38 (suppl):1-84.
62. Pegelow CH, Adams RJ, McKie V, et al. Risk of recurrent stroke in patients with sickle cell disease treated with erythrocyte transfusions. *J Pediatr*. 1995; 126: 896-99.
63. Styles LA, Vichinsky E. Effects of a long-term transfusion regimen on sickle cell-related illnesses. *J pediatrics* 1994;125: 909-11
64. Charache S, Terrin ML, Moore RD, et al. Effect of hydroxyurea in children with sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 1995; 332: 1136-42.
65. Mankad VN, ed. Pediatric pathology and molecular medicine. Jan-Feb edn. London: Taylor and Francis, 2001.
66. Atweh GF, Loukopoulos D. Pharmacological induction of fetal hemoglobin in sickle cell disease and beta-thalassemia. *Semin Hematol* 2001;38:367-73.
67. Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME, et al. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science* 2001;294:2368-71
68. Mccune SL, Reilly MP, Chomo MJ, Asakura I, Townes TM et al. Recombinant human hemoglobins designed for gene therapy of sickle cell disease. *Proc Natl acad Sci USA* 1994;91:9852-6.
69. Vichinsky E. New therapies in sickle cell disease. *Lancet* 2002;360:629-31.
70. Walters MC, Patience M, Leisenring W, et al. Stable mixed hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation for sickle cell anemia. *Biol blood Marrow Transplant* 2001;7:665-73.
71. Leikin SL, Gallagher D, Kinney TR, Sloane D, Klug P, Rida W. Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Pediatrics* 1989 Sep;84(3):500-8.
72. Thomas AN, Pattison C, Serjeant GR: Causes of death in sickle cell disease in Jamaica. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982; 285:633-5
73. Motulsky AG. Frequency of sickling disorders in U.S. blacks. *N. Engl J Med* 1973;288:31.
74. Serjeant GR. Natural history and determinants of clinical severity of sickle cell disease. *Curr Opin Hematol*. 1995 Mar;2(2):103-8.
75. Goldberg MF. Natural history of untreated proliferative sickle retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 1971 Apr;85(4):428-37
76. Serjeant GR, Ashcroft MT, Serjeant BE. The clinical features of haemoglobin SC disease in Jamaica. *Br J Haematol*. 1973 Apr;24(4):491-501.

77. Goldberg MF. Treatment of proliferative sickle retinopathy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1971 May-Jun;75(3):532-56.
78. Barton CI, Cockshott WP. Bone changes in hemoglobin SC disease. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.* 1962 Sep;88:523-32.
79. Serjeant Gr, Ashcroft MT, Serjeant BE, et al: The clinical features of sickle-cell- $\beta$  zero thalassemia in Jamaica. *Br J Haematol* 1973;24:19-30.
80. Serjeant Gr, Sommereux A.M, Stevenson M. Comparison of sickle cell- $\beta^0$  thalassemia with homozygous sickle cells. *Br J Haematol* 1979;41:83-93.
81. Atweh G F, Forget B.G Clinical and molecular correlation in sickle/  $\beta^+$  thalassemia syndrome. *Amer J Haematol.* 1987;24:31-36.
82. Pearson HA. Hemoglobin S-thalassemia syndrome in Negro children. *Ann NY Acad Sci* 1969; 165:83-92
83. Fabian RH, Peters BH. Neurological complications of hemoglobin SC disease. *Arch Neurol.* 1984 Mar;41(3):289-92.
84. Weatherall dj Biochemical phenotypes of thalassemia in the American Negro population. *Ann N Y Acad Sci.* 1964 Oct 7;119:450-62.
85. Sturgeon P, Itano HA, Bergren WR. Clinical manifestations of inherited abnormal hemoglobins. I. The interaction of hemoglobin-S with hemoglobin-D. *Blood.* 1955 May;10(5):389-404.
86. Schneider RG, Ueda S, Alperin JB, Levin WC, Jones RT, Brimhall B. Hemoglobin D Los Angeles in two Caucasian families: hemoglobin SD disease and hemoglobin D thalassemia. *Blood.* 1968 Aug;32(2):250-9.
87. Cawein MJ, Lappat EJ, Brangle RW, Farley CH. Hemoglobin S-D disease. *Ann Intern Med.* 1966 Jan;64(1):62-70.
88. Milner PF, Miller C, Grey R, Seakins M, DeJong WW, Went LN. Hemoglobin O arab in four negro families and its interaction with hemoglobin S and hemoglobin C. *N Engl J Med* 1970 Dec 24;283(26):1417-25.
89. Tadmouri GO, Yuksel L, Basak AN. HbS/beta(del)-thalassemia associated with high levels of hemoglobins A<sub>2</sub> and F in a Turkish family. *Amer J Hematol.* 1998;59:83-86.
90. Powars DR, Schroeder WA, Weiss JN, Chan LS, Azen SP. Lack of influence of fetal hemoglobin levels or erythrocyte indices on the severity of sickle cell anemia. *J Clin Invest.* 1980 Mar;65(3):732-40.
91. Powars DR, Weiss JN, Chan LS, Schroeder WA. Is there a threshold level of fetal hemoglobin that ameliorates morbidity in sickle cell anemia? *Blood.* 1984 Apr;63(4):921-6.
92. Milner PF, Garbutt GJ, Nolan-Davis LV, Jonah F, Wilson LB, Wilson JT. The effect of Hb F and alpha-thalassemia on the red cell indices in sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 1986 Apr; 21(4):383-95.
93. Embury SH. The interaction of coexistent alpha-thalassemia and sickle cell anemia: a model for the clinical and cellular results of diminished polymerization? *Ann N Y Acad Sci.* 1985; 445:37-44.
94. Higgs DR, Alridge BE, Lamb J, et al. The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. *N Eng J Med.* 1982:1441-1446.
95. Bunn HE Sickle hemoglobin and other hemoglobin mutants. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Varnus H, editors. *The*

- molecular basis of blood diseases Philadelphia: WB Saunders Co.;1994. pp. 207-56
96. Azevêdo ES, Alves AFP, silva MCBO, Souza MGF, Lima AMVMD, Azevêdo WC Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in 12000 school children of Bahia, Brazil. *Am J Phys Anthropol* 1980; 53:509-12.
  97. Nathan D. G, Orkin S H. The Thalassemias-Hemoglobin E  $\beta$ - thalassemia. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. pp 843-919, 6th edn Vol 1, 2003
  98. [http://www.medicin角度ankara.edu.tr/interna\\_medical/pediatrics/mol-gen/index.php?Pg](http://www.medicin角度ankara.edu.tr/interna_medical/pediatrics/mol-gen/index.php?Pg)
  99. Pearson HA. The changing profile of homozygous beta-thalassemia: demography, ethnicity, and age distribution of current North American patients and changes in two decades. *Pediatrics* 1996;97(3):352-6.
  100. Weatherall DJ, Clegg JB The molecular pathology of the thalassemias pp. 133-191, 4th edn, Blackwell Science Ltd, Oxford, 2001
  101. Weatherall DJ, Clegg JB The pathophysiology of the thalassemias. *Thalassemia Syndromes*, pp. 192-237. 4th edn., Blackwell Science Ltd, Oxford, 2001:
  102. Schrier SL Pathophysiology of thalassemia *Current Opinion in Hematology* 2002;9:44-46
  103. Daniel M. Bollag and Stuart J. Edelman. *Protein Methods*, 1991
  104. Gözükarar Engin M, *Proteinlerin Saflaştırılması, Biyokimya* 1, 1997:109-118
  105. Yıldız, A., Genç, Ö., *Enstrümenal Analiz, Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-64*, 1993, ISBN : 975-491-028-6, sayfa 421-38.
  106. Tswett, M S., *Ber. Dtsch. Botan. Ges.* 24, 1906, 316-84.
  107. Cramer, F, *Papierchromatographie*, Weinheim, Verlag Chemie, 1958
  108. Snyder, L R., Glacjch, J.L., Kirkland, J.J., *Practical HPLC method development*, John Wiley & Sons, 1988, ISBN 0-471-62782-8, 1-15
  109. Kazakevick Y, McNair H. *Types of HPLC. Textbook on High Performance Liquid chromatography.* 2000
  110. Schmitt U, Ertan M, Holzgrabe U. Chiral capillary electrophoresis: Facts and fiction on the reproducibility of resolution with randomly substituted cyclodextrins. *Electrophoresis*. 2004;25(16):2801-7.
  111. Cherly M Kirk, MD; Christine N. Papadea, PhD; John Lazarchick, MD Laboratory Recognition of a Rare Hemoglobinopathy. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:963-66.
  112. Farrar Lisa, Wild Barbara NHS Sickle cell and thalassemia screening programme Standard Operating Procedure Guidance. King's College Hospital, London.
  113. Barbara J. Bain, *Haemoglobinopathy Diagnosis, 'Laboratory techniques for the identification of abnormalities of globin chain synthesis.* pp 20-49. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 2001
  114. Campell M, Henthorn JS, Davies SC. Evaluation of cation-exchange HPLC compared with isoelectric focusing for neonatal hemoglobinopathy screening. *Clin Chem.* 1997;45(7):969-975.
  115. The Laboratory Diagnosis of Haemoglobinopathies, *Br J Haematol.* 1998;101(4):783.



116. Davies, S C., Cronin, E., Gill, M., Greengross, P, Hickman, M. & Normand, C. (2000) Screening for sickle cell disease and thalassaemia: a systematic review with supplementary research. *Health Technology Assessment*;4:1-99.
117. Riddington C and Owusu-Ofori S. (2002) Prophylactic antibiotics for preventing pneumococcal infection in children with sickle cell disease. *Cochrane Database Systematic Reviews*, 3, CD003427.
118. Lees CM., Davies S. and Dezateux C. (2000) Neonatal screening for sickle cell disease. *Cochrane Database Systematic Reviews*, 2, CD001913.
119. Cronin EK, Normand C, Henthorn JS, Hickman M and Davies SC. (1998) Costing model for neonatal screening and diagnosis of haemoglobinopathies *Archives of Disease in Childhood: Fetal Neonatal Edition*, 79, F161-67.
120. Kiernan UA, Black JA, Williams P. And Nelson RW. Highthroughput analysis of hemoglobin from neonates using matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chem* 2002;48:947-9.
121. Papadea C, Eckman JR, Kuehnert RS and Platt AF. Comparison of liquid and dried blood for neonatal hemoglobinopathy screening: laboratory and programmatic issues. *Pediatrics*.1994;93,:427-32.
122. Bowman JE, Murray RF Jr. Genetic variation and disorders in peoples of African origin. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1990:196-201.
123. Dourakis SP, Alexopoulou A, Papageorgiou C, Kaloteraksis A, Hadziyannis SJ. Acute chest syndrome in sickle-cell trait-Two case reports in persons of Mediterranean origin and review of the literature. *Eur J Int Med* 2004;15:248-250.
124. Hempe JM, Graver RD. Quantification of hemoglobin variants by isoelectric focussing. *Clin Chem* 1994;40:2288-95.
125. Mario N, Baudin B, Aussel C, Gilboudeau J. Capillary isoelectric focusing and high performance cation-exchange chromatography compared for the qualitative and quantitative analysis of hemoglobin variants. *Clin Chem* 1997;43:2137-42.
126. Eastman JW, Wong R, Liao C, Morales D. Automated HPLC screening of newborns for sickle cell anemia and other hemoglobinopathies. *Clin Chem* 1996;42:704-10.
127. Fuchareon S, Winichagoon P, Wisedpanichkiy R, et al. Prenatal and post natal diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC. *Clin Chem*. 1998;44:740-8.
128. The Council of Regional Networks for Genetics Services (CORN). National Newborn Screening Report-1992. New York, NY: The Council of Regional Networks for Genetic Services; 1995.
129. Newborn Screening Task Force. Serving the family from birth to the medical home. *Newborn screening: a blueprint for the future-a call for a national agenda on state newborn screening programs*. *Pediatrics*. 2000;106:383-422.
130. Powars D. Diagnosis at birth improves survival of children with sickle cell anemia. *Pediatrics* 1989;83:830-3.
131. Serjeant GR. *Sickle Cell Disease*, 2nd edn. Oxford: Oxford University Press, 1992;369-96, 429-32.

132. Begue P, Castello-Herbreteau B. Severe infections with sickle cell disease: clinical aspect and prevention. *Arch Pediatr*. 2001;8(4):732-41.

## ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Ankara'da doğdu. 1990 yılında Plevne İlkokul'undan, 1993 yılında Altınordu İlköğretim Okulundan ve 1997 yılında Sincan Yabancı Dil Ağırlıklı Lise'den mezun oldu. Lisans eğitimini 2002 yılında Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'den mezun olarak tamamladı. 2002-2003 Eğitim – Öğretim yılında güz döneminde Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına bağlı Kalıtsal Kan Hastalıkları Yüksek Lisans programına başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Araştırma Görevlisi kadrosunda çalışmaktadır. Zeynep Öztürk İngilizce bilmektedir ve ulusal kongrelerde yayınlanmış 3 kongre bildirisi vardır.