

58837

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

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

Jale ÖZASLAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

GAZİANTEP-1997

**T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

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

Jale ÖZASLAN

58831

**GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

Ocak-1997

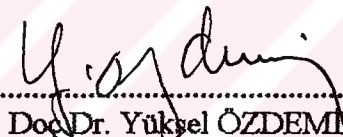


Sevgili aileme en içten şükran dileklerimle...

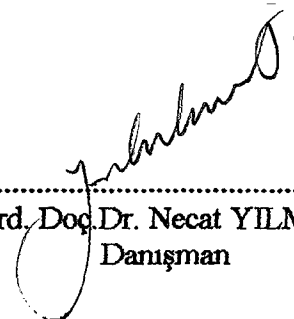
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğünün Onayı


.....
Prof. Dr. Yavuz COŞKUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir "Yüksek Lisans" derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.


.....
Doç. Dr. Yüksel ÖZDEMİR
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez, tarafımdan okunmuş ve her yönü ile bir "Yüksek Lisans" tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

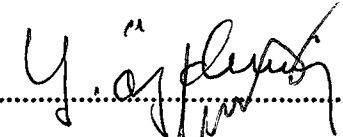
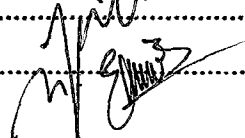


.....
Yrd. Doç. Dr. Necat YILMAZ
Danışman

Tez Jürisi:

Doç. Dr. Yüksel ÖZDEMİR

Yrd. Doç. Dr. Necat YILMAZ

Yrd. Doç. Dr. Emin ERDAL


.....

.....

.....

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ-TEŞEKKÜR	iii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın amacı ve kapsamı	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hemoglobinin Yapısı ve Fonksiyonu	4
2.2. Hemoglobin Sentezi	8
2.2.1. Hem Sentezi	8
2.2.2. Globin Sentezi	10
2.3. Hemoglobinin Parçalanması	10
2.4. Globin Protein Yapısı	11
2.5. Globin Zincirlerinin Gen Yapısı	14
2.6. Normal Hemoglobinler	18
2.7. Prenatal Yaşamdan Postnatal Yaşama Geçildiğinde Hemoglobinde Meydana Gelen Değişmeler	19
2.8. Anormal Hemoglobinler	23
2.9. Fetal Hemoglobinin Yapısal Özellikleri	23
2.10. Fetal Hemoglobinin Arttığı ve Azaldığı Durumlar	25
2.11. Hemoglobinopatiler	27
2.11.1. Hemoglobinopatilerin Sınıflandırılması	27
2.12. Talasemiler	28
2.13. Fetal Hemoglobin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	31

2.13.1. Fetal Hemoglobinin Kimyasal Yöntemlerle Saptanması	31
2.13.2. Fetal Hemoglobinin Elektrophorez ile Saptama Yöntemleri	33
2.13.3. HPLC (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi)	36
2.13.4. Diğer Yöntemler	37
3. GEREÇ ve YÖNTEM	39
3.1. Gereçler.....	39
3.1.1. Aletler	39
3.1.2. Kimyasal Maddeler	39
3.1.3. Örnekleme	40
3.2. Yöntemler	40
3.2.1. Hematolojik Analizler	40
3.2.2. Tam Kan Sayımı	40
3.2.3. Hemolizat Hazırlanışı	45
3.2.4. Alkali Denatürasyon Yöntemi ile Fetal Hemoglobinin Saptanması	46
3.2.4.a. İlke.....	46
3.2.4.b. Ayırıcıların Hazırlanması.....	46
3.2.4.c. İşlem.....	46
3.2.4.d. Hesaplama.....	47
3.2.4.e. Alkali denatürasyon yönteminin uygulanmasında dikkat edilecek noktalar	47
3.2.5. Fetal Hemoglobinin Ölçüm Stabilesinin Saptanması	48
3.2.6. Selüloz Asetat Membran Hemoglobin Elektrophorezi	48
3.2.6.a. İlke.....	48
3.2.6.b. Ayırıcıların hazırlanması.....	49
3.2.6.c. İşlem.....	49
4. BULGULAR	50
4.1. Anemili hasta ve kontrol gruplarında RBC, Hb, Hct, HbF değerlerinin ve RBC indislerinin yaşla değişiminin istatistiksel olarak değerlendirilmesi	51
4.1.1. Yetişkin kadın, erkek, 2-15 yaş grubu, 6 ay-2 yaş grubu ve bunların kontrol grupları ile 2.5-70.0 yaş grubu ve MCV < 78 fL olan hastalarda fetal hemoglobin değerleri ile yaş, RBC ve indisleri, Hb, Hct arasındaki korelasyon sonuçları	52
4.1.2. Yetişkin kadın, erkek, 2-15 yaş grubu, 6 ay-2 yaş grubu ve bunların kontrol grupları ile MCV < 78 fL olan hastalar ve 2.5-70.0 yaş grubunda yer	

alan hastalarda yaş, RBC ve indisleri, Hb, Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları	61
4.2. Hastalık Gruplarında Elde Edilen HbF Düzeyleri	70
4.3. Bir grup hastada alkali denatürasyon ve selüloz asetat elektroforezi kullanılarak elde edilen HbF sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi	71
4.4. Aynı hastalardan farklı zamanlarda çalışılan HbF sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi	72
4.5. Fetal hemoglobinin stabilitesinin ölçüm saptanması	73
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	74
6. KAYNAKLAR	89



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

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

Jale ÖZASLAN

*Gaziantep Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Biyokimya Anabilim Dalı*

Danışman : Yrd.Doç.Dr. Necat YILMAZ

Ocak 1997 - 95 Sayfa

Bu çalışmanın amacı, Gaziantep Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesine anemi şikayeti ile başvuran toplam 119 hasta (6 ay-2 yaş grubu, 29; 2-15 yaş grubu, 30; yetişkin kadın, 42; yetişkin erkek 18) ve 38 kontrol bireyin (6 ay-2 yaş grubu 8; 2-15 yaş grubu 18; yetişkin kadın ve erkek, 12) fetal hemoglobin değerlerini alkali denatürasyon yöntemi ile saptayarak, aneminin kaynağının fetal hemoglobine bağlı olup olmadığını araştırmaktır. Ayrıca MCV < 78 fL 85 ve 2.5-70.0 yaş arası 90 hastanın fetal hemoglobin değerleri saptanarak, yaş, RBC, Hb, Hct ve RBC ve indisleri arasındaki korelasyonlarını araştırmaktır. Sonuçlardan hipokromi ve mikrositoz nedeninin fetal hemoglobine bağlı olmayıp, Fe eksikliğine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda korelasyon sonuçları MCV < 78 fL olan hastaların HbF yönünden araştırılması gerektiğini düşündürmektedir. Kolay, ucuz ve tekrarlanabilir olması nedeni ile alkali denatürasyon yönteminin rutin HbF saptamalarında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler : HbF, Hb, anemi, MCV.

ABSTRACT

M.S. Thesis

DETERMINATION OF FETAL HEMOGLOBIN LEVELS OF ANEMIC PATIENTS IN DIFFERENT AGE GROUPS BY USING ALKALI DENATURATION METHOD

Jale ÖZASLAN

***Gaziantep University-Graduate School of Health Sciences
Department of Biochemistry***

***Supervisor : Asist.Prof: Necat YILMAZ
Ocak-1997, 95 Pages***

The goal of this study is to establish the values of fetal hemoglobin at 119 patients who applied to the Gaziantep University Şahinbey Research and Application Hospital complaining of anemia (6 month-2 age group, 29 ; 2-15 age group, 30 ; adult, women, 42 ; adult men ; 18) and 38 control subjects (6 month-2 age group, 8 ; 2-15 age group, 18 ; adult women and men, 12) using the alkali denaturation method and to study whether or not anemia is related to fetal hemoglobin. In addition, 85 patients with $MCV < 78$ fL and 90 patients between ages of 2.5 -70.0 the correlation values of fetal hemoglobin, age, RBC, Hb, Hct and RBC indices were also examined.

The results showed that the reasons of hypochromia and microcytosis were not associated with fetal hemoglobin but could be as a result of iron deficiency. The negative correlation between HbF values and MCV in patients with $MCV < 78$ fL suggests there is a need for further study of their higher HbF etiology. We concluded that alkali denaturation method is cheap, easy and reproducible for routine and investigation purposes in clinical laboratories.

Key Words : HbF, Hb, anemia, MCV.

TEŞEKKÜR

Eğitim alışmalarımın değişik aşamalarında bilgi ve deneyimleri ile beni ynlendiren başta Sayın Yrd. Do.Dr. Necat YILMAZ, Do. Dr. Yüksel ÖZDEMİR ve Yrd. Do. Dr. İclal MERAM'a, ayrıca bilgi ve desteğini esirgemeyen Sayın Ar. Gör. Binnur ERBAĞCI'ya ve Biyokimya Laboratuvarında görevli tüm çalışanlara teşekkürü bir borç bilirim.

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Normal insan hemoglobinleri	19
Tablo 2.2. Değişik yaş gruplarında RBC ve indisleri, Hb, Hct'nin normal değerleri	20
Tablo 2.3. 1989 yılında yayınlanan varyant tip ve sayıları	23
Tablo 2.4. Fetal hemoglobinin postnatal yaşamdaki değişimi	24
Tablo 2.5. Talasemi, kombine talasemi ve HPFH'deki bazı hemoglobin anormallikleri	30
Tablo 4.1. Anemili hastalarda ve kontrol gruplarında RBC, Hb, Hct, HbF ve RBC indislerinin yaş değişimi	51
Tablo 4.2. Yetişkin anemili kadın hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları.	53
Tablo 4.3. Yetişkin anemili erkek hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları.	54
Tablo 4.4. Yetişkin kadın ve erkek kontrol grubundaki hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları	55
Tablo 4.5. MCV < 78 fL olan hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları	56
Tablo 4.6. 2-15 yaş grubundaki hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları.	57
Tablo 4.7. 2-15 yaş kontrol grubundaki hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları.	58
Tablo 4.8. 6 ay-2 yaş grubundaki hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları	59
Tablo 4.9. 6 ay-2 yaş kontrol grubundaki hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları	60
Tablo 4.10. 2.5-70.0 yaş grubundaki hastalarda HbF değerleri ile yaş,	

Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları.	61
Tablo 4.11. Yetişkin anemili kadın hastalarda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları.	62
Tablo 4.12. Yetişkin anemili erkek hastalarda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları.	63
Tablo 4.13. Yetişkin kadın ve erkek kontrol grubunda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları	64
Tablo 4.14. MCV < 78 fL olan yetişkin kadın ve erkek hastalarda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları	65
Tablo 4.15. 2-15 yaş grubunda bulunan hastalarda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları	66
Tablo 4.16. 2-15 yaş kontrol grubunda bulunan hastalarda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları	67
Tablo 4.17. 6 ay-2 yaş grubunda bulunan hastalarda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları	68
Tablo 4.18. 6 ay-2 yaş kontrol grubunda bulunan hastalarda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları	69
Tablo 4.19. 2.5-70.0 yaş grubunda bulunan hastalarda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları	70
Tablo 4.20. Hastalık gruplarında elde edilen HbF düzeyleri.....	71

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Hemoglobinin yapısı	4
Şekil 2.2. Oksidasyonda demir atomunun hem düzlemi içindeki hareketi	6
Şekil 2.3. Normal insan hemoglobininin oksijen disosiasyon eğrisi	8
Şekil 2.4. Süksinil koenzim A ve glisinden porfobilinojen oluşumu ...	9
Şekil 2.5. Porfobilinojenden Hem oluşumu.....	10
Şekil 2.6. Globin polipeptid zincirinin helikal segmentleri	11
Şekil 2.7. Beta globin polipeptid zincirinin tersiyer yapısı	13
Şekil 2.8. Globin gen kümeleri organizasyonu	14
Şekil 2.9. İnsan hemoglobinlerindeki α , β , γ zincirlerindeki amino asit dizilişleri	16
Şekil 2.10. Globin genlerinin ekspresyonunda gelişimsel değişiklikler	17
Şekil 2.11. Globin gen yapısı	18
Şekil 2.12. Normal hemoglobinlerin alt grupları baskın oldukları gelişim dönemleri ve bu zincirleri kodlayan sekiz genin kromozomal lokalizasyonu	21
Şekil 2.13. Fetüs ve yeni doğanda eritropoezis gelişimi Hemoglobin sentezinden sorumlu hücreler ilişkili organlar ve her evrede sentezlenen globin zincir tipleri	22
Şekil 2.14. Selüloz asetat membran hemoglobin elektroforezi	33
Şekil 3.1. Radyo frekansı ve doğru akımla puls saptama prensibi	41
Şekil 3.2. Radyo frekansı ve doğru akımla puls saptama prensibi	43
Şekil 4.1. Fetal hemoglobinin ölçüm stabilitesi	73

SEMBOLLER

α : *Alfa*

β : *Beta*

δ : *Delta*

γ : *Gama*

ε : *Epsilon*

ξ : *Zeta*

ψ : *Psi*

θ : *Teta*

μ : *Mü*



KISALTMALAR

RBC (Red Blood Cell) : Eritrosit

Hb : Hemoglobin

Hct : Hematokrit

MCV (Mean Corpuscular Volume) : Ortalama eritrosit hacmi

MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin) : Ortalama eritrosit

hemoglobini

MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) : Ortalama

eritrosit hemoglobin konsantrasyonu

ALA : δ - Amino levülinik asit

2,3 - DPG : 2,3 - Difosfogliserat

DC : Doğru akım

RF : Radyo frekansı

SLS-Hb : Sodyum Lauril Sülfat Hemoglobin

1. GİRİŞ

1.1. Çalışmanın amacı ve kapsamı

Crick 1953 yılında santral dogma teorisini ortaya attıktan sonra eritrositlerde yer alan ve respirasyonda görev alan hemoglobinin yapısı anlaşılmaya başlanmıştır. Hemoglobin dört hem ve dört globinden oluşan bir molekül olup, globin zincirlerindeki farklılıktan dolayı HbA ($\alpha_2 \beta_2$), HbA₂ ($\alpha_2 \gamma_2$) ve HbF ($\alpha_2 \delta_2$) olarak alt gruplara ayrılmaktadır.

1961 yılında Dintz hemoglobin sentezinin ribozomlarda olduğunu kanıtlamıştır. Böylece hemoglobinin protein yapısında olduğu ortaya çıkmıştır. Perutz ve Lehmann da X-ışını kristalografisi ile hemoglobinin üç boyutlu yapısını açıklamışlardır (Perutz ve Lehmann 1968, Huisman et al., 1977). Bu gelişmelerden sonra hemoglobin protein yapısı en iyi bilinen molekül olarak moleküler patolojisi diğer kalıtsal hastalıklara oranla daha fazla anlaşılmıştır .

Hemoglobin molekülünün kalıtsal anomalileri iki grupta incelenmektedir. Bunlar,

- 1) Yapısal anomali gösteren hemoglobin varyantları, “hemoglobinopatiler” olarak adlandırılmaktadır.
- 2) Hemoglobin polipeptit zincirlerinden bir yada daha fazlasının sentezinin azalması ya da olmaması nedeni ile ortaya çıkan bozukluklar “talasemiler” olarak sınıflandırılmaktadır (Perutz ve Lehmann 1968, Thompson et al., 1991, Huisman et al., 1993).

Hemoglobinopatiler ve talasemilerin görülme sıklığı ırklara ve coğrafi konuma göre değişiklikler göstermektedir. Türkiye genelinde yapılan çalışmalarda β -talassemi için görülme sıklığı % 3.9, α -talassemi için % 3 olarak bulunmuştur (Yüreğir 1987, 1989a, 1989b, 1990, Huisman 1990). Hemoglobinopatiler içinde en sık görülenler arasında başta HbS gelmektedir. Bunu HbC, HbD, Punjab ve HbE bunları takip etmektedir.

HbS % 30 taşıyıcılık oranı ile en sık ekvator Afrikasında, % 8 Batı Afrika ve bu yörelerden göç eden insanların yaşadığı bölgelerde görülmektedir (Beutler 1986, Lukens ve Lee 1993). Ülkemizde HbS taşıyıcılığı Çukurova bölgesi için % 8.2 oranında bulunmuştur (Arcasoy, 1994).

Eti Türk orijinli kişilerde elektroforetik tarama sonucu HbS % 15.3, HbE % 0.47, β -talasemi % 1.23 olarak bulunmuştur (Altay ve ark.1978).

Hemoglobin molekülü yapısında yer alan globin zincirlerinin (α , β , γ , δ) yapısal özelliklerinin farklılığından dolayı kimyasal ayırıcılardan değişik biçimde etkilenmektedir. Bu hemoglobün varyantlarının nitel ve nicel analizlerine olanak sağlamaktadır. Bu noktadan hareketle bir çok yöntem (alkali denatürasyon, asit elüsyon, elektroforez, HPLC, immunolojik yöntemler ve DNA analizleri v.s.) geliştirilmiştir.

1951 yılında Singer ve grubu yetişkin hemoglobününün % 96'sını oluşturan HbA ve % 3.5 - 4.0'ünü oluşturan HbA₂'nin alkali ortamda çözüldüğünü, buna karşın fetal yaşamda baskın olup, yetişkinde % 2'nin altında bulunan HbF'in alkalilere karşı dirençli olduğunu bulmuşlardır. Bu alkali denatürasyon yönteminin başlangıç noktası olmuştur (Singer et al., 1951). Daha sonraki yıllarda bu yöntem modifiye edilerek hatalardan arındırılmaya çalışılmıştır (Betke et al., 1959, Pembrey et al., 1972). Bugün kullanılan ise yöntemin modifikasyondan sonraki şeklidir.

Günümüzde kalıtsal kan hastalıklarının kesin olarak önlenmesi olası olamamaktadır. Bu konuda yapılabilen en iyi yöntem toplumun taranması ile bölgenin taşıdığı riskin saptanması ve prenatal tanı yoluyla homozigot doğumların önlenmesidir. Son yıllarda DNA analizleri ile hemoglobin hastalıklarının prenatal tanularına yönelik olarak bir çok çalışmalar yapılmaktadır. Bunlar ya doğrudan defektli DNA analizleri veya dolaylı yoldan DNA analizleri şeklinde olmaktadır (Orkin 1984, Copper ve Schmidtke 1991).

Gaziantep Akdeniz Bölgesine yakınlığından dolayı talasemi ve hemoglobinopati hasta bulundurma olasılığı olan bir ildir. Bu hastalıklarla ilgili olarak ilimizde daha önce bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda Gaziantep Üniversitesi

Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesine anemi şikayetleri ile gelen değişik yaş grubundaki 119 hastada (6 ay-2 yaş grubu 29, 2-15 yaş grubu 30, erişkin kadın 42, erişkin erkek 18 ve bunlar için oluşturulan kontrol grupları) bu hastalık gruplarında bilinmesi önemli olan fetal hemogloblin düzeylerini alkali denatürasyon yöntemi ile saptayarak. sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

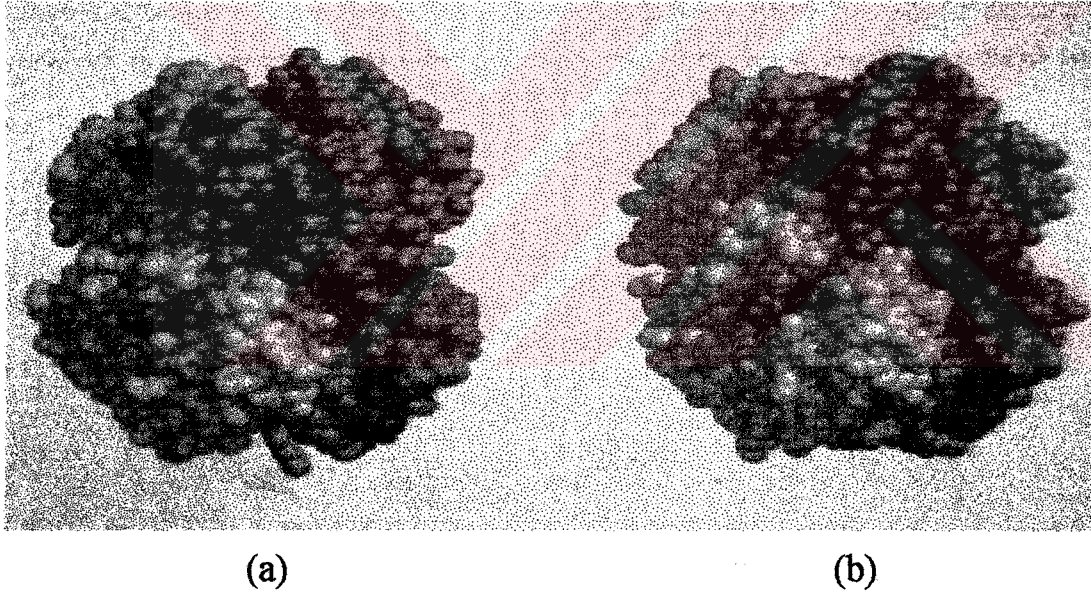
Ayrıca 24 hastanın selüloz asetat membran hemogloblin elektroforezi ve alkali denatürasyonla saptanan fetal hemogloblin değerleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Farklı zamanlarda birbirlerinden değişik şikayetlerle gelen 9 hastanın ikişer kez çalışılan HbF değerleri arasında istatistiksel anlamlılık olup olmadığı araştırılmıştır. Bunların yanı sıra fetal hemogloblinin ölçüm stabilitesi de incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hemoglobinin Yapısı ve Fonksiyonu

Hemoglobin eritrosit hücrelerinde bulunan 64.456 dalton ağırlığında, sferoidal yapıda, maksimum çapı 6.4 nm olan tetrametrik bir protendir. Hemoglobin dört hem ve dört globin zincirinden meydana gelir (Şekil 2.1). Tüm hemoglobinlerde hem grubunun yapısı aynı olmasına rağmen globin zincirleri amino asit sayıları ve dizilerindeki farklılıklarla ayrılır (Huisman, 1993).



Şekil 2.1: Hemoglobinin yapısı (a. Oksijen uzaklaştıktan sonra; b. Oksijen bağlandığı zaman meydana gelen bazı konformasyonel değişiklikleri göstermektedir).

Hem Fe (II) ve protoporfirin bileşiği ile bağlı haldedir. Fe (II) protoporfirin bileşiğinde yer alan dört pirol halkasının azot atomları ile dört valanslı bir koordinasyon kompleksi meydana getirir. İki değerlikli

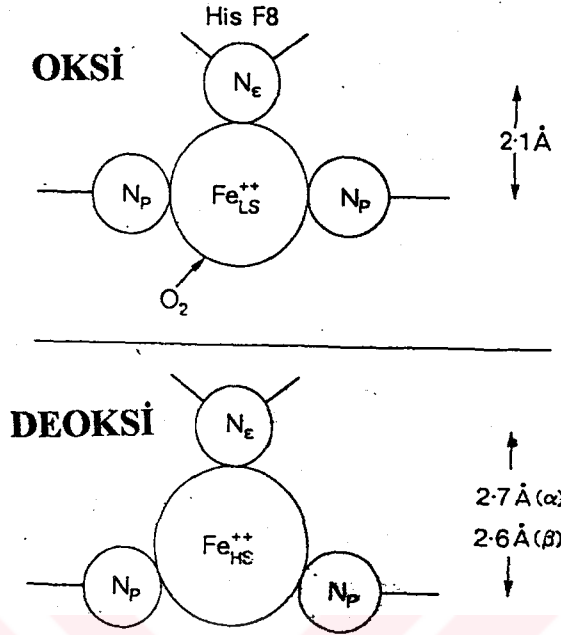
Fe atomları altı tane koordinasyon bağı yapabilme özelliğine sahiptir. Bu nedenle son iki valansının birini globin zincirinin (87. amino asit α yada 92. amino asit β) histidin amino asitinin imidazol azotuna bağlanmasında, son valansını ise oksijene geri dönüşümlü olarak bağlamada kullanır (Fairbank ve Klee 1986, Nelson ve Morris 1984). Demir atomunun oksijene tersinir olarak bağlanması hemoglobinin temel bir fonksiyonudur. Kanın maksimum oksijen bağlama kapasitesi, içerdiği hemoglobin miktarı ile paralellik gösterir. Fizyolojik olarak kanın düşük oksijen afinitesi solunum fonksiyonunu yapabilmesi için oksijen vericisi olarak kullanılmasına olanak vermektedir (Bauer,1982). Hem demirine oksijenin bağlanması hemoglobin molekülünde bir dizi yapısal değişikliklere neden olur. Bunlar,

- 1- T (Tense), deoksihemoglobin formu,
- 2- R (Relaxed), oksihemoglobin formu.

T formu R formundan daha yüksek CO_2 ve daha düşük oksijen afinitesine sahiptir. T formunda iken oksijenin azalması ile konformasyon R formuna dönüştürülür (Bauer,1982). T hali hemoglobin alt birimi arasında çok sayıda iyonik ve alt grup bağlanmalarının sonucudur. Glikolitik yolun bir ara ürünü olan 2,3-DPG (2,3-Difosfogliserat) T halinde merkez boşluğunu doldurur. T durumunda dört hemdeki tüm demirler yüksek spinlidir ve R halinden daha büyük çaplıdır (Fairbank ve Klee,1986). Bu nedenle demir porfirin halkasının düzleminin dışına çıkar (Şekil 2.2). Oksijenasyon şu şekilde anlaşılabilir :

Oksijenin bir molekülü bir α zincirine girer ve hem grubunun Fe^{2+} sine bağlanır. Demir atomu düşük spine geçer ve porfirin halkasının

düzlemine girer (0.28 nm'lik bir değişiklik). Bu yer değiştirme F heliksin proksimal histidinlerine iletilir.



Şekil 2.2: Oksidasyonda demir atomunun hem düzlemi içindeki hareketi.

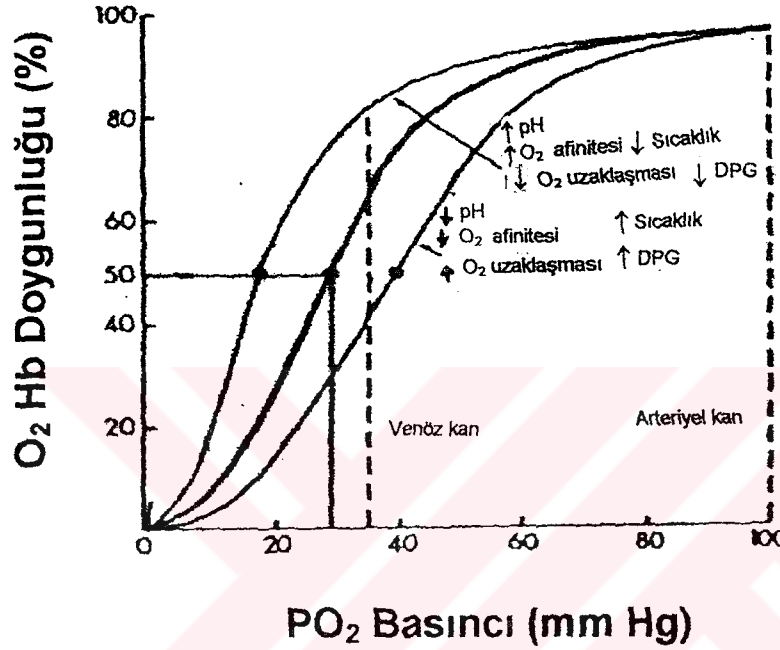
Daha sonra komşu β zincirinin C ve G helikslerinin pozisyonlarında bir değişiklik olur. Bu konformasyonel değişiklikler sonucu alt birimler arası ve içindeki birçok tuz bağları ile 2,3-DPG bağları kırılır. Merkez boşluk daha küçülür ve 2,3-DPG dışarı çıkarılır. Burada tanımlanan konformasyonel değişiklikler oksijen alışverişinde fonksiyonel olan $\alpha\beta$ -dimerleri için geçerlidir. Tetramerde tuz bağları varken ve 2,3-DPG merkezdeki boşlukta iken oksijen uzaklaştırılır ve R durumundaki konformasyonel değişiklikler tersine döndürülür. 2,3-DPG yada H^+ 'da bir artma varsa T konformasyonu tercih edilecektir. Vücutta eritrositlerdeki 2,3-DPG konsantrasyonundaki artma hemoglobinin oksijen afinitesini azaltır ve dokulara oksijen naklini artırır. Bu anemide kompanse edici önemli bir mekanizmadır. Bunun tersine düşük 2,3-DPG konsantrasyonu oksijen disosiyasyon eğrisini sola kaydırır. Bu durumda hemoglobinin oksijen afinitesi artar ve dokulara oksijen aktarımı azalır.

2,3-DPG, fetal hemoglobine erişkin hemoglobininin daha zayıf bir şekilde bağlanır. Çünkü fetal hemoglobinin γ zincirinin H21 artığı histidin yerine serin içerir ve 2,3-DPG'yi santral boşluk içinde tutan tuz köprülerinin oluşumuna katkıda bulunamaz. Bu nedenle, 2,3-DPG, fetal hemoglobinin T şeklinin kararlılığı üzerinde daha yüzeysel bir etkiye sahiptir. Birbirlerinden farklı hemoglobinlerin oksijenle yarı-yarıya doymuş oldukları kısmi basınçları yani P_{50} değerleri farklı olmaktadır. Fetal hemoglobin için bu değer 20 mmHg iken HbA için 26 mmHg'dır. Bu farklılık sayesinde HbF plasental kandaki HbA'dan oksijen çekebilmektedir. Bu doğum sonrası uygun değildir. Çünkü HbF'nin oksijene olan büyük ilgisi dokulara O_2 nakledilmesini engeller. Fetal hemoglobinin oksijene yetişkin hemoglobininin daha büyük bir afiniteye sahip olmasının nedeni bu olaydır (Menteş ve Ersöz,1993).

Hemoglobin tetramerleri bu şekilde kolaylıkla oksijen bağlayıp taşıdıkları halde, hemoglobindeki tetramerler monomerlerden meydana gelirse, (HbH, β_4 ve Hb Barts, γ_4 gibi) oksijen bağlama kapasitesi üç defa daha az olur. Çünkü oksijenin bağlandığı uç α zinciridir. Bu zincirin eksik oluşu veya olmaması nedeni ile oksijen taşınmamaktadır (Fairbank ve Klee,1986). Hemoglobinin sigmoidal şeklindeki oksijen disosiasyon eğrisi akciğerlerdeki oksijenin kısmi basıncının artması ile oksijene afinitenin arttığını gösterir. Hemoglobinin oksijen afinitesindeki bu değişiklikler (pH 7.2 - 7.6) Alkali-Bohr etkisi olarak bilinir (Şekil 2.3).

Dokulardaki $HbO_2 \rightarrow Hb$ dönüşümü, pH azalması ve sıcaklık artması gibi metabolik bazı işlemler sonucu meydana gelir. Oksijenasyonun tersi ise CO_2 'in atılmasıdır. CO_2 plazma kadar eritrositlerde de taşınır. Eritrositlerin az bir kısmında CO_2 çözünür. Az bir miktar karbamino- CO_2

olarak amino gruplarına bağlanır. Fakat daha fazla miktar bikarbonat formunda kalır. Karbonik anhidraz enzimi kapiller doku yataklarındayken eritrositlerdeki karbondioksiti bikarbonata dönüştürme reaksiyonunu katalizler ve akciğerin kapiller yataklarındayken eritrositlerdeki (bikarbonattan CO₂'nin uzaklaşması) ters yöndeki reaksiyonu katalizler (Bauer, 1982).



Şekil.2.3: Normal insan hemoglobininin oksijen disosiyasyon eğrisi. Koyu renkle gösterilen normal yetişkin kanının disosiyasyon eğrisini göstermektedir (sıcaklık 37°C, pH 7.4, P_{CO2} 35 mmHg). x ve y eksenindeki kesim noktaları, P₅₀ ve oksijenin kısmi basıncını (27 mmHg) vermektedir. P₅₀ hemoglobin çözeltisinde %50 oksihemoglobin ve %50 deoksihemoglobin olduğunu ifade eder. Sıcaklık artar, pH azalır ya da P_{CO2} artarsa eğri sağa kaymaktadır. Bu kayma oksijene afinitiyi azaltarak verilen oksijen basıncında, hemoglobinden oksijenin uzaklaşmasını artırmaktadır. Sıcaklık düşer, pH artar ya da CO₂ basıncı azalrsa oksijen disosiyasyon eğrisi sola kayar. Bu kayma ise verilen oksijen basıncında hemoglobinin oksijeni bağlama kapasitesini artırır. Bu nedenle oksijenin serbestleşmesi engellenmiş olur (Bauer,1982).

2.2. Hemoglobin Sentezi

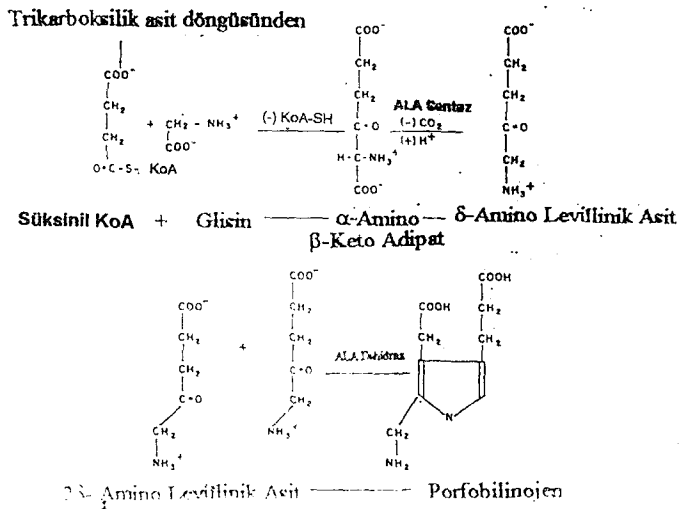
Hemoglobini oluşturan hem ve globin kısmı ayrı sentez yolları izlenerek yapılıp, daha sonra birleşmektedir.

2.2.1. Hem Sentezi

Hem sentezi vücudun birçok hücresinde, mature eritrositler hariç, meydana gelir. Daha çok yapım eritroid öncüllerinde olmaktadır. Süksinil

KoA glisinle kararsız bir ara ürün olan α -amino β -ketoadipik asit üzerinden, dekarboksilasyon ile δ -amino-levülinik asite (ALA) dönüşür. Reaksiyonu ALA sentaz enzimi katalizler. Bu kondensasyonun pridoksal fosfata (B_6 vitamini) gereksinimi vardır ve mitokondride meydana gelir. ALA az miktarda idrarda bulunur. Fakat hem sentezindeki anormalliklerde salgılanması artar. İki mol ALA, ALA dehidraz enzimi aracılığı ile kondanse olarak Şekil 2.4'te görüldüğü gibi porfobilinojeni oluşturur (Nelson ve Morris,1984). Dört molekül porfobilinojen üroporfirinojen III ya da I oluşturmak üzere reaksiyona girer. Tip III izomeri koproporfirinojen III ve protoporfirinojen yolu ile protoporfirine dönüştürülür. Bazı hastalıklarda bu yol kısmen bloke edildiğinde üroporfirinojenin tip I izomerleri ve koproporfirinojen meydana gelir ve bunların oksitlenme ürünleri üroporfirin I ve koproporfirin I miktarı artar (Şekil 2.4, Şekil 2.5).

Protoporfirin normalde mature eritroidlerde bulunur. Kurşun zehirlenmesi ve demir eksikliğinde serbest eritrosit protoporfirin artar. Demir protoporfirine mitokondrial enzim olan ferroşelataz enzimi ile yerleşerek, hem kısmını oluşturur.

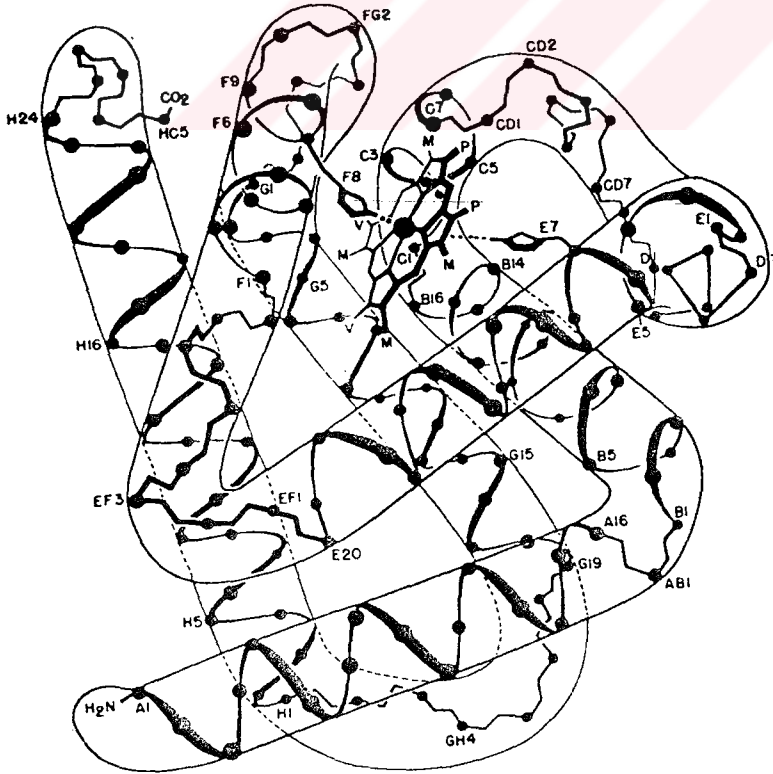


Şekil 2.4: Süksinil koenzim A ve glisinden porfobilinojen oluşumu.

amino asitler, amino asit havuzuna aktarılır. Protoporfirin halkası açılır ve bilirubine dönüştürülerek vücuttan atılır (Nelson ve Morris, 1984).

2.4. Globin Protein Yapısı

Hemoglobin molekülünün protein kısmını oluşturan globin dört tür polipeptid zinciri ihtiva eder. Normal kişilerde doğumdan sonraki yaşamda üç farklı hemoglobin türü vardır. Bunlar HbA, HbA₂ ve HbF'dir. Normal insandaki bu hemoglobinlerin farklı özellikler taşımaları globin zincir yapılarının farklılığından kaynaklanmaktadır. Globin zincirlerinde birincil yapılar farklılık gösterirken, ikincil yapılar birbirlerine oldukça benzerdir. Her zincirin yaklaşık % 75'i sağa dönüşümlü α -heliks yapısı gösterir. D-heliks dışında zincirlerin tümünde A ve H harfleri arasında gösterilen, uzunlukları hemen hemen eşit sekiz helikal segment vardır (Şekil 2.6).



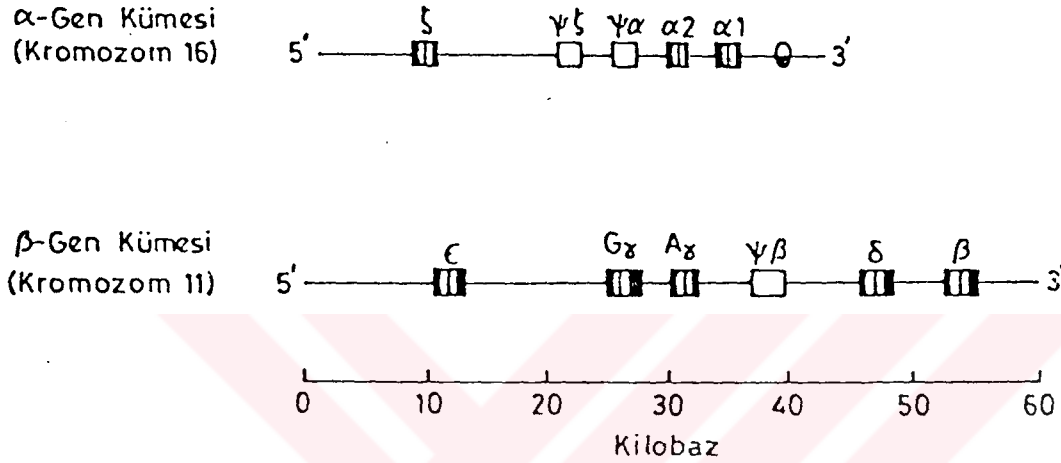
Şekil 2.6: Globin polipeptid zincirinin helikal segmentleri.

D-heliks bu kurala uymaz ve α zincirinde yedi amino asit bulunur. Helikal segmentler arasında ayrıca yedi adet non-helikal segment bulunmaktadır. Non-helikal segmentler NA, AB, CD, EF, FG, GH ve HC şeklinde gösterilir. Bu düzen yapısal olarak çok önemlidir. Non-helikal segmentlerin görevi molekülün eğilip, bükülüp, katlanmasını sağlamaktır. Helikal sistemde her amino asit bir harf ve bir sayı ile belirlenir. Harf heliksi yanındaki sayı ise heliks içindeki pozisyonu gösterir. Örneğin, α zincirinde 87, β , γ ve δ zincirlerinde 92 numaralı amino asit olan ve heme bağlanan histidin helikal düzenlemede tüm normal zincirlerde F8 olarak gösterilir.

Globin zincir yapısı içinde polar amino asitler molekülün yüzeyinde su ile etkileşecek şekilde yerleşerek molekülün çözünebilirliğini artırırken non-polar amino asitler iç bölümde yer alır ve birbirleriyle hidrofobik ve Van der Waal's bağlanma yaparak yapının dayanıklılığını artırır. Bu sferik tersiyer yapı tüm normal hemoglobinlerde aynıdır. Hem demiri, proksimal histidin (F8) ile kovalent bağ yapar, oksijen bağlandığı zaman ise hem ve E7'deki histidin (distal) ile kovalent bağ yapar. Bu sayede E ve F nonpolar bölgede tutulur. Bunun yanı sıra molekülün diğer bölümleri ile Van der Waal's bağları yaparak tersiyer yapıyı güçlendirir (Thompson 1991, Telen 1993).

2.5. Globin Zincirlerinin Gen Yapısı

Globin polipeptid zincirleri α , β , γ , δ , ϵ , ve θ şeklinde Yunan alfabesi kullanılarak isimlendirilmiştir. Bu proteinlerin genleri iki gruba ayrılır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Globin gen kümeleri organizasyonu.

- 1- α -Benzeri globin genleri,
- 2- β -Benzeri globin genleri .

1- α -Benzeri globin genleri : 16. kromozomun kısa koluna yerleşik olup, DNA'da yaklaşık 30 kilobazlık (kb) bir yer tutar.

2- β -Benzeri globin genleri : 11. kromozomun kısa koluna yerleşmiş olup, DNA'da yaklaşık 50 kb'lik bir yer tutar (Diesseroth et al., 1977, Nienhuis ve Benz, 1977a, Diesseroth et al., 1978, Karlsson et al., 1985, Lukens et al., 1993).

Hemoglobin sentezi genetik kontrol altında olduğundan, bunlarla ilgili genlerin yapısı aydınlatıldıktan sonra α ve ξ zincirlerinin 16. kromozom üzerinde ϵ , β , γ , δ genlerinin ise 11. kromozom üzerinde olduğu anlaşılmıştır. Bunların amino asit dizilişleri Şekil 2.9'da verilmektedir (White et al., 1973).

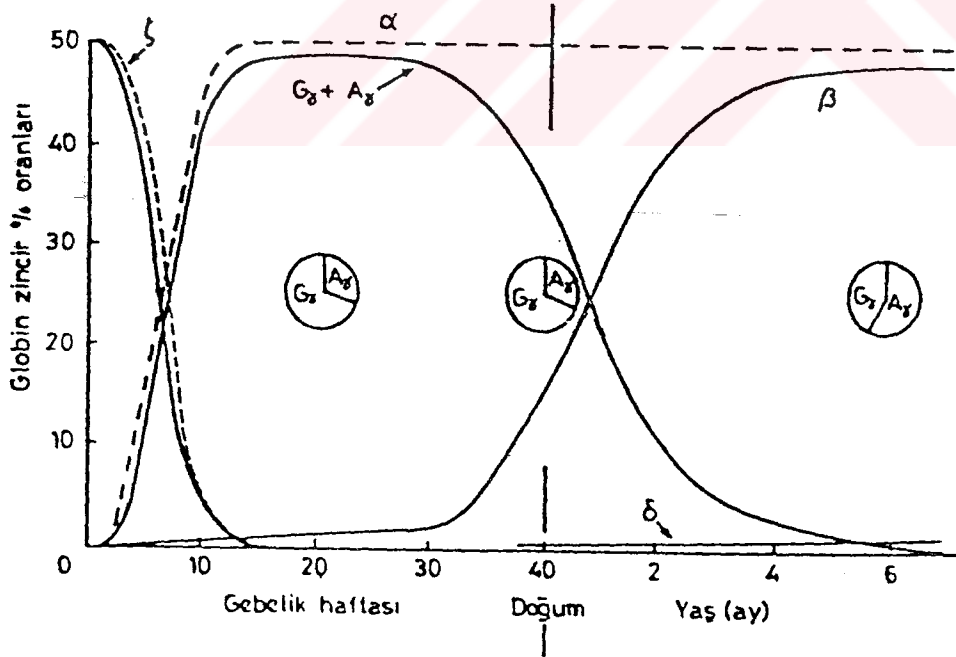
Her bir α globin zincirinde 141 ve β , γ ve δ zincirlerinde 146 amino asit bulunmaktadır. Bunların amino asit sıraları C ve N terminal uçlarından yararlanılarak tespit edilmiştir. β , γ ve δ zincirleri homolog zincirlerdir. β ve δ zinciri birbirinden 10 amino asit farklıdır. δ ve β zinciri arasında 39 amino asitte farklılık vardır. Ayrıca γ zincirinde dört adet izolosin bulunurken, β zincirinde bu amino asit yoktur. Normal insan hemoglobinlerinin (HbA, HbA₂ ve HbF) yapısında ξ , α_2 , α , ϵ , G γ , A γ ve δ ve β görev alırken, $\psi\xi$, $\psi\alpha_2$, ve $\psi\alpha$, θ ve $\psi\beta$ 'nin hiçbir fonksiyonu yoktur. θ geninin fonksiyonel önemi henüz bilinmemektedir. ψ geninin tek başına rolü bilinmemekle birlikte Switch mekanizmasına göre fetal hayatın son bir kaç haftasında γ 'nın β ve daha sonra da δ 'ya dönüşümünde yer aldığı düşünülmektedir. γ zincir yapısını belirleyen iki gen lokusu vardır. β genlerinin yakınında lokalize olup, her ikiside bir tek amino asit dışında birbirinin aynısı olan proteinleri kodlar. Bu genlerden biri δ zincirinin diğeri β zincirinin yapısını saptar. Bunlar G γ ve A γ olarak gösterilir. A γ , 136. pozisyonda alanin ve 75. pozisyonda treonin ve G γ ' da 136. pozisyonda glisin ve 75. pozisyonda izolosin bulunur. A γ T varyantı özellikle bazı ırksal gruplarda gözlenmektedir.

	10	20
α	Val·Leu·Ser·Pro·Ala·Asp·Lys·Thr·Asp·Val·Lys·Ala·Ala·Try·Gly·Lys·Val·Gly·Ala·His·Ala·Gly·Glu·Tyr	
β	Val·His·Leu·Thr·Pro·Glu·Glu·Lys·Ser·Ala·Val·Thr·Ala·Leu·Try·Gly·Lys·Val·Asp·Val·	Asp·Glu·Val·
γ	Gly·His·Phe·Thr·Glu·Glu·Asp·Lys·Ala·Thr·Ileu·Thr·Ser·Leu·Try·Gly·Lys·Val·Asp·Val·	Glu·Asp·Ala·
	10	20
α	Gly·Ala·Glu·Ala·Leu·Glu·Arg·Met·Phe·Leu·Ser·Phe·Pro·Thr·Thr·	40
β	Gly·Gly·Glu·Ala·Leu·Gly·Arg·Leu·Leu·Val·Val·Tyr·Pro·Try·Thr·Glm·Arg·Phe·Phe·Glu·Ser·Phe·Gly·Asp·Leu·	Lys·Thr·Tyr·Phe·Pro·His·Phe·Asp·Leu·
γ	Gly·Gly·Glu·Thr·Leu·Gly·Arg·Leu·Leu·Val·Val·Tyr·Pro·Try·Thr·Glm·Arg·Phe·Phe·Asp·Ser·Phe·Gly·Asp·Leu·	40
	30	60
α	Ser·His·Gly·Ser·Ala·	Glm·Val·Lys·Gly·His·Gly·Lys·Val·Ala·Asp·Ala·Leu·Thr·Asp·
β	Ser·Thr·Pro·Asp·Ala·Val·Met·Gly·Asp·Pro·Lys·Val·Lys·Ala·His·Gly·Lys·Lys·Val·Leu·Gly·Ala·Phe·Ser·Asp·	
γ	Ser·Ser·Ala·Ser·Ala·Ileu·Met·Gly·Asp·Pro·Lys·Val·Lys·Ala·His·Gly·Lys·Val·Leu·Thr·Ser·Leu·Gly·Asp·	70
	50	90
α	Ala·Val·Ala·His·Val·Asp·Asp·Met·Pro·Asp·Ala·Leu·Ser·Ala·Leu·Ser·Asp·Leu·His·Ala·His·Lys·Leu·Arg·Val·	
β	Gly·Leu·Ala·His·Leu·Asp·Asp·Leu·Lys·Gly·Thr·Phe·Ala·Thr·Leu·Ser·Glm·Leu·His·Cys·Asp·Lys·Leu·His·Val·	
γ	Ala·Ileu·Lys·His·Leu·Asp·Asp·Leu·Lys·Gly·Thr·Phe·Ala·Glm·Leu·Ser·Glu·Leu·His·Cys·Asp·Lys·Leu·His·Val·	90
	80	110
α	Asp·Pro·Val·Asp·Phe·Lys·Leu·Leu·Ser·His·Cys·Leu·Leu·Val·Thr·Leu·Ala·Ala·His·Leu·Pro·Ala·Glu·Phe·Thr·	
β	Asp·Pro·Glm·Asp·Phe·Arg·Leu·Leu·Gly·Asp·Val·Leu·Val·Cys·Val·Leu·Ala·His·His·Phe·Gly·Lys·Glu·Phe·Thr·	
γ	Asp·Pro·Glu·Asp·Phe·Lys·Leu·Leu·Gly·Asp·Val·Leu·Val·Thr·Val·Leu·Ala·Ileu·His·Phe·Gly·Lys·Glu·Phe·Thr·	110
	100	130
α	Pro·Ala·Val·His·Ala·Ser·Leu·Asp·Lys·Phe·Leu·Ala·Ser·Val·Ser·Thr·Val·Leu·Thr·Ser·Lys·Tyr·Arg	141
β	Pro·Pro·Val·Glm·Ala·Ala·Tyr·Glm·Lys·Val·Val·Ala·Gly·Val·Ala·Asp·Ala·Leu·Ala·His·Lys·Tyr·His	
γ	Pro·Glu·Val·Glm·Ala·Ser·Try·Glm·Lys·Met·Val·Thr·Gly·Val·Ala·Ser·Ala·Leu·Ser·Ser·Arg·Tyr·His	146
	130	

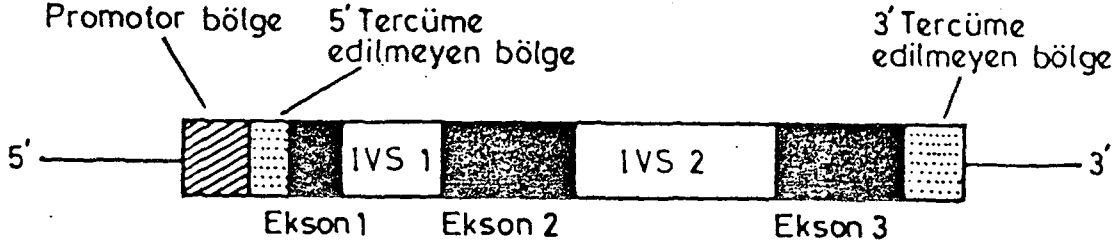
Şekil 2.9: İnsan hemoglobinindeki α , β , γ zincirlerindeki amino asit dizilişleri.

Fetal yaşamda toplam γ zincirlerinin % 75'ini Gy, % 25'ini ise Ay oluşturur. Doğum sonrası bu oran değişmekte ve erişkinde % 60 Ay ve % 40 Gy'ya dönüşmektedir (Karlsson ve Nienhuis 1985, Fairbank ve Klee 1986, Huisman 1993)(Şekil 2.10).

Tüm fonksiyonel globin genleri 3 ekson (globin zincirlerini kodlayan diziler) ve 2 intron (protein translasyonunda rol oynamayan) içerirler. Translasyona uğramamasına rağmen genin 5¹ ve 3¹ bölgelerindeki diziler oldukça önemli olup, gen ekspresyonunda rol oynarlar. Promotor bölge ise transkripsiyonun başladığı bölgenin önünde 100 baz çiftlik bir alanı kapsar (Şekil 2.11).



Şekil 2.10: Globin genlerinin ekspresyonunda gelişimsel değişiklikler.



Şekil 2.11: Globin gen yapısı (Lukens et al., 1993).

2.6. Normal Hemoglobinler

Normal erişkin bir insanda hemoglobinin % 97'si HbA olup, bileşiminde 2 normal α ve 2 normal β zinciri vardır. $\alpha_2\beta_2$ şeklinde gösterilir. Erişkinde HbA'ya ek olarak iki minor hemoglobin daha vardır. Bunlar HbA₂ ve fetal hemoglobin adı verilen HbF'dir. HbA₂ genellikle toplam hemoglobinin % 2.5 - 3.0'ünü oluşturur. Bu yapıda ise β zinciri yerine δ zinciri gelir ve $\alpha_2\delta_2$ şeklinde ifade edilir. HbF'de ise 2 α ve 2 γ zinciri vardır. $\alpha_2\gamma_2$ olarak gösterilir. Normal yetişkindeki değeri % ≤ 2 'dir. Embriyonik dönemde ise Portland, Gower I ve Gower II hemoglobinleri bulunur (Fairbank ve Klee, 1986).

Tablo 2.1 : Normal insan hemoglobinleri (Tietz ve Logan 1986,Telen et al., 1993).

İsim	Sembol	Moleküler Yapı	Oranlar	
			Erişkin	Yeni Doğan
Erişkin hemoglobin	A	$\alpha_2 \beta_2$	% 97	% 20
Hemoglobin A ₂	A ₂	$\alpha_2 \delta_2$	% 2.5	% 0.5
Portland (Embriyonik)		$\zeta_2 \gamma_2$	0	0
Gower-I (Embriyonik)		$\zeta_2 \delta_2$	0	0
Gower - II (Embriyonik)		$\alpha_2 \delta_2$	0	0
Fetal Hemoglobin	F	$\alpha_2 \gamma_2$	≤ % 2	77.0±7.3

Değişik yaş gruplarında RBC ve indisleri ile Hb, Hct değerlerinin değişimi Tablo 2.2’de görülmektedir.

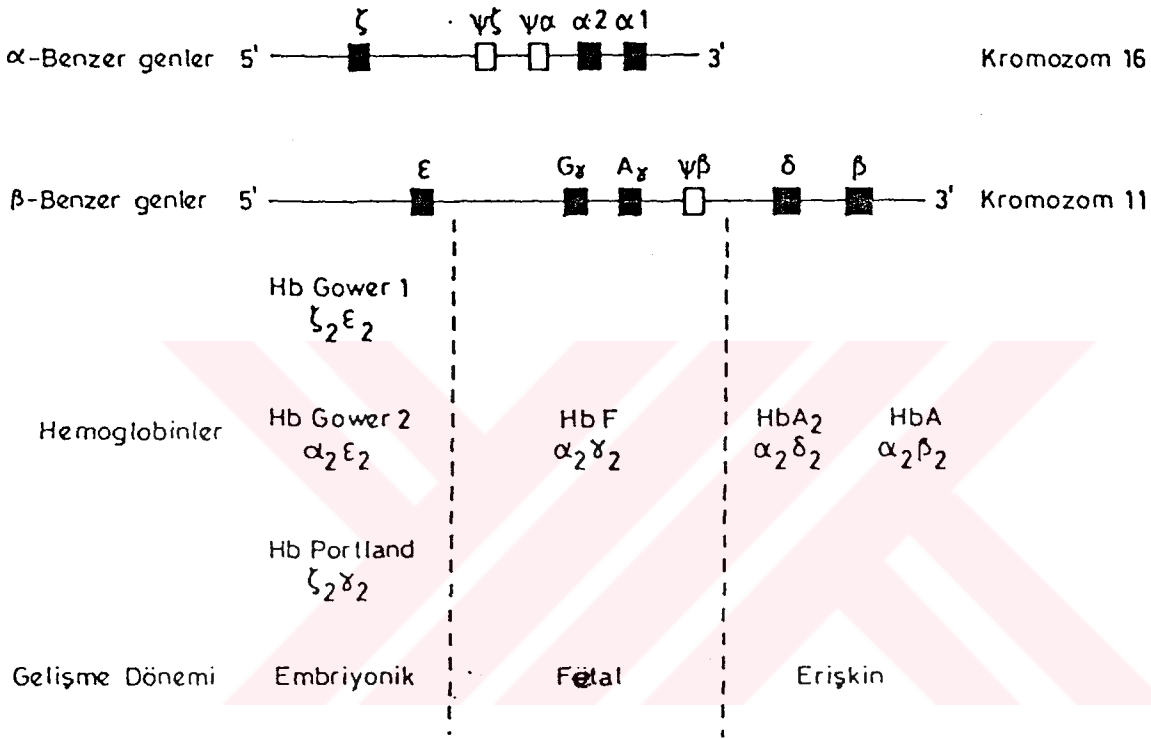
2.7.Prenatal Yaşamdan Postnatal Yaşama Geçildiğinde Hemoglobinde Meydana Gelen Değişmeler

Hemoglobin sentezi prenatal ve postnatal yaşam süresince belirgin gelişimsel değişim gösterir. Tüm evrelerde değişmeyen α ve β benzer zincirler arasındaki dengedir. İkisinden birinin az sentezlenmesi diğerinin sentez hızının değişmesine neden olur. α ve β genlerinin her ikisi de gelişim evrelerinin farklı dönemlerinde (embriyo, fetüs, yeni doğan ve erişkin) aktive olurlar. Bu genlerin ardışık aktivasyonu sonucu değişik evrelerde farklı hemoglobinler sentezlenir. Bu aktivasyona neden olan olayların ne olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir (Nienhuis 1977a, Nienhuis 1977b, Huisman 1993).

Tablo 2.2 : Değişik yaş gruplarında RBC ve indisleri, Hb, Hct'nin normal değerleri (Tietz ve Logan 1986, Tuzcu ve Tuzcu 1992).

<u>YAŞ(YII)</u>	<u>RBC($10^9/\mu\text{L}$)\pmSD</u>	<u>HGB(g/dL)\pmSD</u>	<u>HCT(%)\pmSD</u>	<u>MCV(fL)\pmSD</u>	<u>MCH(pg)\pmSD</u>	<u>MCHC(g/dL)\pmSD</u>
Kordon Kanı	5.1 \pm 1.0	13.5-20.0	42-60	106	38	36
1-3 gün	5.1	14.5-22.5	45-67	105	37	35
1 Hafta	5.1	13.5-21.5	42-66	103	36	35
2 Hafta	5.0	12.5-20.5	39-63	98	33	34
1 Ay	4.7 \pm 0.9	10.0-18.0	31-55	90	30	33
2 Ay	4.7 \pm 0.9	9.0-14.0	28-42	90	30	33
3-6 Ay	4.5 \pm 0.7	9.5-13.5	29-41	80	27	34
0.5-2 Yaş	4.6	10.5-13.5	33-39	77	26	33
2-6 Yaş	4.6	11.5-13.5	34-40	78	25	32
6-12 Yaş	4.7	11.5-15.5	35-45	80	27	34
11-15 Yaş	4.8	13.4	39	82	28	34
Erişkin						
Kadın	4.10-5.10	14.0 \pm 2.0	42.0 \pm 5.0	87 \pm 5	29 \pm 2	34 \pm 2
Erkek	4.52-5.90	16.0 \pm 2.0	47.0 \pm 5.0	88 \pm 5	29 \pm 2	34 \pm 2

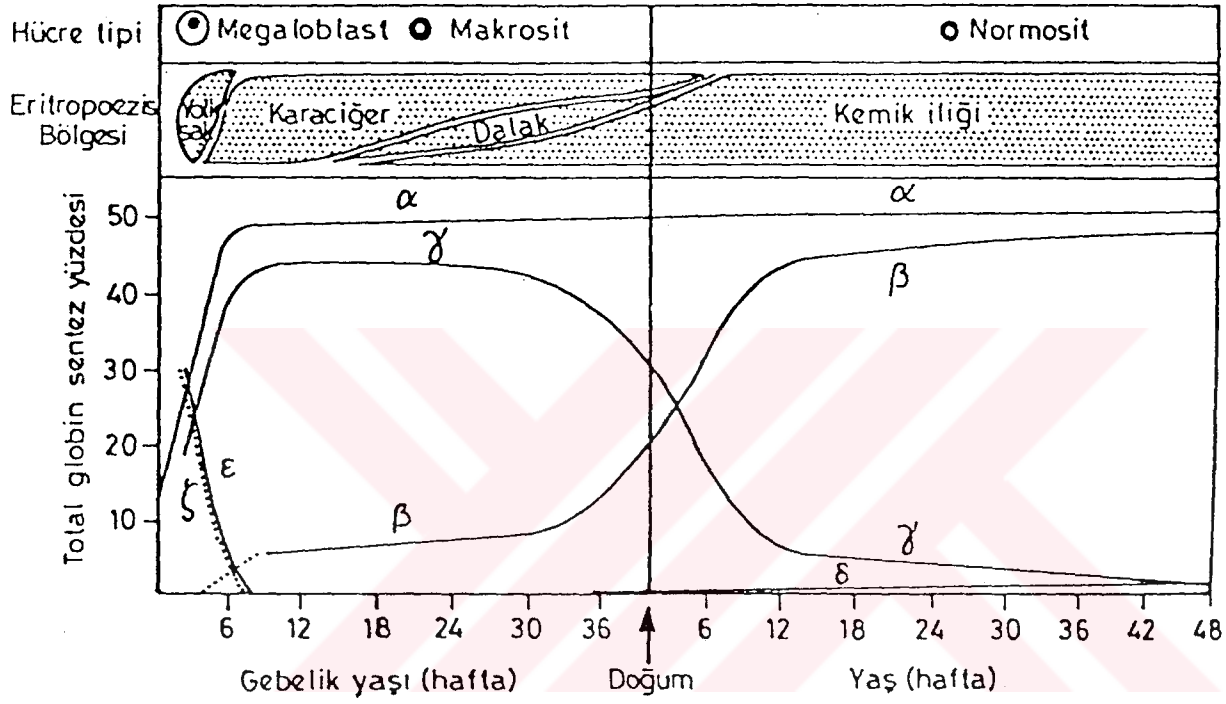
Eritropoezin mezoblastik döneminde ilk sentezlenen hemoglobin, 2 zeta (ζ_2) ve 2 epsilon (ϵ_2) zincirlerinden oluşan ($\zeta_2\epsilon_2$) Hb Gower-I'dir. Bundan kısa bir süre sonra α ve β zincir sentezi başlar (Şekil 2.12).



Şekil 2.12: Normal hemoglobinlerin alt grupları baskın oldukları gelişim dönemleri ve bu zincirleri kodlayan sekiz genin kromozomal lokalizasyonu.

Bu sırada iki embriyonik hemoglobin, Hb Gower-II ($\alpha_2 \epsilon_2$) ve Hb Portland ($\zeta_2 \gamma_2$) gözlenir. Altıncı gebelik haftasından sonra ise γ zincir sentezi başlar ve gebeliğin on üçüncü haftasında fetüstaki hemoglobin HbF olup, embriyonik hemoglobinler kaybolur. Gebeliğin ilerlemesiyle γ zincirlerindeki kademeli azalmaya karşın β zincir sentezinde artma

gözlenir. Otuzbeşinci haftada % 85'e düşen HbF düzeyleri % 3-4 oranında azalmaya devam ederken HbA düzeyleri artar (Şekil 2.13).



Şekil 2.13: Fetüs ve yeni doğanda eritropoezis gelişimi. Hemoglobinin sentezinden sorumlu hücreler, ilişkili organlar ve her evrede sentezlenen globin zincir tipleri.

HbA₂'nin yapısında yer alan δ-globin geni ise fetal yaşamın son dönemine kadar aktive değildir. Kordon kanında eser miktarda bulunur ve normal yetişkinin yaşamı boyunca ise % 3.3'in altında bulunur (Huisman, 1993).

2.8. Anormal Hemoglobinler

1910 yılında Birleşmiş Milletlerde Herrick'in orak hücre anemisini tanımlamasının ardından Pauling, İtano, Singer ve Wells 1941 yılında orak hücre anemisinin moleküler bir hastalık olduğunu tespit etmişlerdir. Günümüzde 700'ün üzerinde Hb varyantı bilinmektedir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3 : 1989 yılında yayınlanan varyant tip ve sayıları (Daniel et al.,1987, Kutlar et al., 1991).

Zincir tipi	Toplam
α - Zincir varyantları	146
β - Zincir varyantları	264
γ - Zincir varyantları	54
δ - Zincir varyantları	17
Füzyon hemoglobinleri	9
Delisyon hemoglobinleri	13
İki (ya da daha fazla) nokta mutasyonlu Hb.ler	11
Uzamış zincirli Hb.ler (C- terminal)	7
Uzamış zincirli Hb.ler (N- terminal)	3
Uzamış zincirli Hb.ler (insersiyon)	3

2.9. Fetal Hemoglobinin Yapısal Özellikleri

Fetal hemoglobin F_1 ve F_2 olmak üzere birbirine benzeyen iki fraksiyondan oluşmuştur (Lechner et al.,1977). Fetal yaşamda baskın olan bu hemoglobin, total hemoglobinin % 90-95'ini oluşturur. Bunun % 20'si F_1 fraksiyonu geri kalanı F_2 fraksiyonudur. Hamileliğin yaklaşık altı

ayından sonra HbF değerleri yavaş yavaş % 80'e düşer. Bu nedenle doğum esnasında kordon kanı % 70-80 HbF, % 10-15 HbA ve % 0.5'den daha az HbA₂ içerir. Fetal hemoglobinin prenatal yaşamdan postnatal yaşama geçişten sonra ki değişimleri Tablo 2.4'te verilmektedir. F₁ fragmanı γ zincirinin N-terminalinden asetillenmiş amino grubu bulundurur (Roberts ve Cederbaum, 1972).

Tablo 2.4: Fetal hemoglobinin postnatal yaşamdaki değişimi (Tietz ve Logan, 1986).

	Kordon Kanı	5.Gün	3.Hafta	6-9 Hafta	3-4 Ay	6.Ay	11-18 Ay	Erişkin
HbF (%)	77.0±7.3	76.8±5.8	70.0±7.3	52.9±11.0	23.2±16.0	4.7±2.2	1.6±1.0	≤ 2

Gebeliğin maternal HbF sentezini aktifleştirdiği bu nedenle HbF içeren eritrosit sayısında yaklaşık beş misli bir artma ile maternal HbF seviyesinin yaklaşık % 10-15 arasında olduğu düşünülürken daha sonraları yapılan çalışmalarda bunun tüm gebelere genellenemeyeceği gösterilmiştir. Bazı gebelerde artarken bazısında değişmemiştir. Maternal HbF'deki artmaya ise transplental kanamanın neden olabileceği sonucuna varılmıştır (Virgilio ve Simon 1977, James et al., 1983).

Fetal hemoglobinin diğer özelliklerini şöyle sıralayabiliriz (Bauer, 1982).

1- Elektroforetik hareketi HbA'dan daha yavaştır.

2- Alkali denatürasyona dirençlidir. Bu özelliği Singer'in alkali denatürasyon testinin temelidir.

3- Asit elüsyona direnci HbA'dan iki kat daha fazladır. Bu HbF'in karakteristik hareketi Kleihauer'in asit elüsyon tekniğinin temelidir.

4- HbF HbA'dan iki kat daha hızlı Met-Hb'ne oksitlenir. Bu durum kısmen yeni doğanın Met-Hb oluşturmaya eğilimini açıklamaktadır.

5- HbF oldukça yüksek oksijen afinitesine sahip ve 2,3-DPG'ye bağlanması ile oksijen affinitesi azalmaktadır.

2.10. Fetal Hemoglobinin Arttığı ve Azaldığı Durumlar

HbF düzeyi birçok hematolojik neoplastik ve endokrin hastalıklarda artarken, azalmasına sadece birkaç hastalık tablosunda rastlanır. Bunlar aşağıda verilmektedir (Cooper ve Hougland 1972, Bertles 1974).

I- HbF'in Arttığı Durumlar

a) Anemi : Birçok edinsel ve konjenital anemide HbF % 2-5 arası bir artma gösterir. % 25'e kadar artmış HbF değerleri myelofibrosis (primer ya da sekonder), aplastik anemi (primer ve sekonder) ve paroksizmal nokturnal hemoglobinüride görülmektedir.

b) Talasemiler : Yüksek HbF değerleri (% 50 ve üzeri) homozigot β -talasemilerde ve hemoglobinopati-talasemi bağlantılı hastalıklarda

görülür. Daha düşük değerler (% 20'ye kadar) $\delta\beta$ -talassemilerde görülmektedir.

c-) Herediter persistan fetal hemoglobin (HPFH) : HPFH homozigotlarda HbF % 100, heterozigotlarda ise % 20 civarında bulunur.

d-) Hemoglobinopatiler : Homozigot HbS hastalığı ve kararsız hemoglobinlerde HbF sırasıyla % 20 ve % 10 oranlarında bulunur.

e-) Lösemiler : En yüksek değeri (% 50) Philadelphia kromozomu negatif juvenil myelositik lösemide görülmektedir. Löseminin değişik türlerinde de HbF konsantrasyonları artabilmektedir (Kiesselbach ve Wagner, 1972).

f-) Endokrinopatiler : Endokrinopatiler ektojik sekresyonların ve tirotoksikozun sebep olduğu tümörleri kapsamaktadır.

g-) Kromozomal anormallikler : Trisomi D₁.

2. HbF'in Azaldığı Durumlar

- a. Heterozigot α -talassemi,
- b. Heterozigot β - talassemi,
- c. Down Sendromu : (trisomi G₁) (Wilson,1968).

2.11. Hemoglobinopatiler

Hemoglobinin protein kısmında yani globinde görülen ve genetik bir bozukluğa dayanan yapı değişikliğini ifade eder. Bu değişiklikler hemoglobinde çözünürlük ve dayanıklılık azalması ve oksijene karşı ilgide artma ortaya çıkararak, eritrosit fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır (Berkarda ve Ulutin, 1977).

2.11.1. Hemoglobinopatilerin Sınıflandırılması

Anormal hemoglobin sayısı bugün 700 civarında olmasına rağmen, yalnız bir kısmı hastalık yapmaktadır. Fonksiyonel özelliklerine göre anormal hemoglobinler şöyle sınıflandırılabilir (Berkarda ve Ulutin, 1977).

a-)Fizyolojik değişiklik yapmayan anormal hemoglobinler klinik önemleri yoktur.

b-)Hemoglobin sentezinde dengesizlik durumları veya talasemi sendromları. Burada hemoglobinde yapı bozukluğu yoktur. Fakat polipeptid zincirlerinden bir tanesinin sentezi diğerlerine göre az veya çok azalmıştır. Bazı tiplerinde Heinz cisimcikleri görülebilir.

c-) Deforme olan hemoglobinler ; S ve C hemoglobinleri gibi.

d-)Dayanıksız hemoglobinler. Bu hemoglobinler oksidasyona dayanıksız olup, Heinz cisimcikleri şeklinde çökerler.

e-)Anormal "hem" fonksiyonuna sahip olan hemoglobinler. Bu gruba M hemoglobinleri (methemoglobinemi) verilebilir.

2.12. Talasemiler

Genetik bir mutasyon nedeni ile globin polipeptidlerinden (α , β , γ , δ) bir tanesinin sentezinin azalması veya tamamen durmasıyla meydana gelen ağır ve hafif hipokrom mikrositer anemilerdir. Talasemilerde anemi, iki mekanizmanın birlikte bulunmasından meydana gelir.

I. mekanizma, eritroblastta hemoglobinin sentezinin yetersiz olmasıdır. Bunun sonucunda, eritrosit hemoglobini azalır ve hipokrom anemi meydana gelir.

II. mekanizma, hemolitikdir. Eritroblastta bir polipeptid zinciri yapılamadığı için diğer zincirler birikir ve tetramerler oluşur. Bunlar denatüre olup çökerek, eritroblastın veya eritrositin kemik iliğinde ve dalakta çabuk yıkılmasına yol açarlar (Berkarda ve Ulutin, 1977). Talasemiler eksik olan polipeptid zincirine göre sınıflandırılırlar. β -talasemi, α - talasemi v.s. gibi. Her iki tipte de hastalığın homozigot ve heterozigot olması durumuna göre izlenen klinik tablolar değişik olmaktadır. En iyi tanınan tipleri α -, β , $-\delta\beta$, $-\delta$ ve $\gamma\delta\beta$ talasemilerdir. Bunlara benzer başka bir bozukluk ise herediter persistan fetal hemoglobin (HPFH) olup β globin sentezindeki azalma γ globin sentezindeki artışla tam olarak kompanse edilmektedir (Fairbank ve Klee, 1986).

Akdeniz anemisi Cooley anemisi veya konjenital leptositoz isimleriyle de tanınan bu hastalık grubu özellikle Akdeniz bölgesinde, Arap yarımadası ve bu ülke halklarının göç ettiği yerlerde (ABD, İngiltere gibi)

görülmektedir. Talasemilerde HbA sentezinde bir bozukluk vardır. Bozukluk nedeni olarak,

1. Hem sentezinde bozukluk,
2. Talasemik ribozomların lösini bağlama yeteneğinin yetersiz oluşu,
3. m-RNA'da bir bozukluk olduğu görüşü ileri sürülmektedir (Tangün, 1974).

Talasemiler, kombine talasemiler ve HPFH'de bazı parametrelerin nasıl değiştiği Tablo 2.5'de verilmektedir (Fairbank ve Klee, 1986).

Tablo 2.5 : Talasemi, kombine talasemi ve HPFH'deki bazı hemoglobin anormallikleri.

Anormallik	Target hücre			Deoksihemoglobin çözünürlüğü	Mikrositozis	Anemi	HbE	HbF hücre dağılımı	Diğer özellikler
	+	Normal	+						
α -Talasemi									
3α -Zincir eksikliği	+	Normal	+	Orta dereceden şiddetliye değişebilir	Antarabilir				Kararsız hemoglobinlerden dolayı hemolitik anemi
$\delta\beta$ -Talasemi	+	Normal	+	+	%5-15				-
Heterozigot									
$\delta\beta$	+	Normal	Belirgin	Belirgin	%70-90				İskelet anormallikleri, kutanöz ülserler gelişme geriliği
Homozigot									
β									
$\delta\beta$ -Çift heterozigot	+	Normal	Orta derece	±	% 100				-
HbS- β -Talasemi	Var	Anormal	+	Orta veya şiddetli	artar				Orak hücre hastalıklarının özelliklerinin tümünü gösterebilir.
HbC- β -Talasemi	Var	Normal	+	Orta derece	artar				Sıklıkla dalak büyür.
HbE- β -Talasemi	Var	Normal	+	Orta veya şiddetli	artar				Homojen değil
Herediter peristan fetal hemoglobin									-
HbS-HPFH	o	Anormal	o	o	%10-20				Genellikle asemptomatik
Heterozigot	o	Normal	o	o	%10-20				Asemptomatik
Homozigot	o	Normal	o	o	%100				Asemptomatik

2.13. Fetal Hemoglobinin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Fetal hemoglobinin saptanmasında bir çok yöntem kullanılmaktadır.

2.13.1. Fetal Hemoglobinin Kimyasal Yöntemlerle Saptanması

a-) Alkali Denatürasyon Yöntemleri

i) Singer ve arkadaşlarının 1951 yılında yaptıkları farklı iki çalışmada, yetişkin hemoglobinlerine oranla fetal hemoglobinin alkaliye (KOH) karşı dirençli olduğunu göstermişlerdir. Denatürasyonu yarı doymuş amonyum sülfat ile sonlandırarak, denatüre hemoglobinleri çöktürmüşlerdir. Fakat bazı aralıklarda ($HbF < \%5$ ve $HbF > \%40$) Singer yönteminin kullanılmaması sonucu Betke yöntemin modifikasyonunu yapmıştır (Betke et al., 1959).

ii) Fetal hemoglobinin % 5'in altındaki seviyelerinde Singer'in alkali denatürasyon yönteminin iyi sonuç vermemesi üzerine Betke yöntemi modifiye ederek, daha geniş bir aralıkta kullanımını sağlamıştır. Fetal hemoglobinin % 2 ile % 40 arasında bu yöntemin güvenle kullanılabileceği ICSH'de (International Committee for Standardization in Hematology) kabul edilmiştir. Pembrey 1972 yılında yeni bir modifikasyon gerçekleştirmiştir. Bunun için hemolizati sulandırmış ve hemoglobini de siyanmethemoglobine dönüştürmüştür. Bunun sonucunda çok küçük miktarda HbF içeren örneklerde ve % 50'nin üzerinde HbF bulunduran kan örneklerinde iyi sonuçlar alınmıştır (Pembrey,1972). Bizim çalışmamızda da bu yöntem uygulanmıştır.

b) Asit Elüsyon Tekniği

Asit elüsyon tekniği 1957 yılında Kleihauer tarafından ortaya atılmıştır. Yöntemin temeli düşük PH'da HbF'in çöktürülerek, HbA'nın çözümlenmesine dayanmaktadır. HbF araması yapılacak hastadan alınan kan ile yayma yapılıp, alkolle tespit edilir. Sitrik asit fosfat tamponu (pH 3.2) ile HbA'nın çözünmesi sağlanır. HbF içeren eritrositlerin eosin yada eritrosin ile boyanarak, mikroskopik taraması yapılır (Kleihauer et al., 1957). Bu teknik transplental kanamanın miktarını saptamada kullanılan iyi bir yöntemdir (Virgilio ve Simon 1977, Dupre et al., 1993). Normal kişilerde tüm eritrositler % 0.2 oranında fetal hemoglobin içerirken, HPFH gibi HbF'in yüksek olduğu hastalıklarda eritrositlerin çoğunluğu HbF içerir. Talasemi veya hemoglobinopatili bir hasta da ise HbF dağılımı heterojendir (Bauer,1982).

Sonuçların değerlendirilmesinde ise, aşağıdaki yol izlenmektedir.

1 HbF / 1 milyon yetişkin hücre = % 0,47 HbF

4 HbF/ 1 milyon yetişkin hücre = % 1 HbF

8 HbF/ 1 milyon yetişkin hücre = % 2 HbF

100 HbF/100 100 milyon yetişkin hücre = % 10 HbF

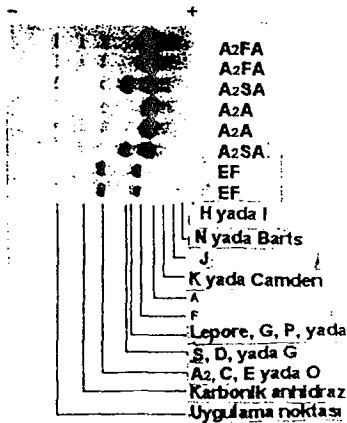
Bernstein ve grubu 1977'de mikrodansitometre kullanarak bu tekniğin modifikasyonunu gerçekleştirmiştir (Bernstein et al., 1977).

2.13.2. Fetal Hemoglobinin Elektroforez ile Saptama Yöntemleri

Hemoglobin elektroforezi hemoglobin varyantlarının saptanmasında temel bir yöntemdir. Fakat tek başına yeterli değildir. Hastanın klinik ve hematolojik parametreleri birlikte değerlendirilmelidir.

1. Selüloz Asetat Membran Hemoglobin Elektroforezi

Selüloz asetat membran hemoglobin elektroforezinin temel prensipleri ve uygulaması Bölüm 3.2.6'da ayrıntılı olarak verilmektedir. Selüloz asetat alkali tampon sisteminin kullanılması ile fetal hemoglobinin saptanmasında HbF ve HbA'nın aynı yere göçü nedeni ile kantitasyonunu yapmak sorun olmaktadır. HPFH gibi HbF'in çok yüksek olduğu hastalıklarda tam bir sonuca gidilememektedir. Kullanıldığında da Kleihauer boyama yöntemi ile onaylanmalıdır. Bu nedenle HbF'in saptanması ve miktarının belirlenmesinde spesifik özelliklerinin kullanılması gerekmektedir (Bauer, 1982). Şekil 2.14'te pH 8.6'da yapılan selüloz asetata elektroforezi görülmektedir.



Şekil 2.14. Selüloz asetata membran hemoglobin elektroforezi (pH:8.6).

2. Sitrat Agar Jel Elektroforezi

Değişik hemoglobinlerin ayrılması kısmen asit pH'da hemoglobin molekülü üzerindeki yüke, kısmende agardaki çözünürlüğüne bağlıdır. Sitrat agar jel elektroforezi de HbD'den HbS, HbE'den HbC'yi ayırmada kullanılabilen elektroforetik bir yöntemdir (Chanarin, 1989).

3. İzoelektrik Focusing

Numune amfolit taşıyıcı içeren ince tabakalı bir poliakrilamid jel yüzeye uygulanır. Akım geçirildiğinde lineer bir pH gradyanı meydana gelir ve hemoglobinler zıt yüklü elektroda doğru hareket eder. Her molekül kendi pH gradyanına doğru göç eder. Hareket izoelektrik nokta yüküne eşit pH'ya kadar devam eder ve bu değere ulaşıldığında hareket sonlanır. Her hemoglobin izoelektrik pozisyonuna uygun bir bant verir. Bu yöntem yeni doğan, fetus ve embriyonik hemoglobinlerin saptanmasında oldukça hassastır (Bauer, 1982).

Leary ve arkadaşları agarozda yapılan izoelektrik focusing yöntemini geliştirmişlerdir. İzoelektrik focusing yaparak elde ettikleri bantların radyoaktivite ölçümü (likit sintilasyon sayımı) ile kantitasyonunu yapmışlardır. Bu yöntem sentezlenmiş olan hemoglobinlerdeki radyoaktivitenin bağımsız olarak saptanmasına olanak verdiği gibi klonlanmış hücre kültüründeki eritroidin biyosentetik özelliklerinin anlaşılmasına da olanak sağlamaktadır (Leary et al., 1983).

4. Globin Zincir Elektrofözezi

Globin zincir elektrofözezi hemoglobinin globin zincirlerinden α -zincirlerini α -olmayan zincirlerden (β , γ ve δ) ayıran bir tekniktir. Amino asit süstitüsüyonu olan ya da farklı amino asit bulunduran zincirler (varyant zincirler) verilen bir tampon pH'sında normal zincirin mobilitesinden farklı bir mobilite gösterir. Globin zincir elektrofözezi bir hemoglobin varyant zincirinin taşıdığı anormalliği saptar. Bu nedenle yükleri benzer olduğundan selüloz asetat ya da sitrat agarda aynı hızla hareket eden hemoglobinlerin ayrılmasına olanak verir.

Hemolizatin elektrofözezi üre-2-merkaptöetanol tamponunda selüloz asetat üzerinde yapılır. Üre, α - ve α -olmayan zincirlerin ayrılmasını sağlar. Her globin zinciri asit pH'da olduğu gibi alkali pH'da da karakteristik bir mobiliteye sahiptir. Bu yüzden normal α - ve normal-olmayan α -zinciri, varyant zincirin pozisyonu ile karşılaştırılabilir (Bauer,1982).

5. Kapiller Elektrofözezi

Kapiller elektrofözezi son yıllarda geliştirilmiş klasik bant elektrofözezi, izotakoföz, izoelektrik focusing ve jel elektrofözezini içine alan kombine bir tekniktir. 25-75 μ m por çaplı silika doldurulmuş kolonlar kullanılmaktadır. Kapiller bir uçtan kolona diğer uçtan da dedektöre ve yüksek voltaj (25-30 kV) güç kaynağına bağlanmıştır. Yüksek voltaja bağlı olarak açığa çıkan ısının uzaklaştırılması yöntemin iyi bir özelliği

olup, ayırmanın verimliliğini artırmakta ve ayırma süresini kısaltmaktadır. pL ve nL gibi eser miktarda madde içeren örneklerle iyi bir ayırıcılık ile miktar tayini olası olmaktadır (Burtis et al.,1994). Kullanılan dedektörler analizin başarısını belirlemekte olup, bugün için LIF (Laser-Induced Fluorescence) detektörler en iyi ayırıcılığı sağlamaktadır (Ulfelder, 1993).

2.13.3. HPLC (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi)

1984 yılında major ve minor normal ve anormal hemoglobinlerin nicel analizinin ve ayırımının yapılabilmesi amacı ile katyon değiştirici kolon kullanılarak HPLC yapılmıştır (Kutlar et al., 1984, Kutlar et al., 1990, Papadea ve Cate 1996). Yöntemin yetişkin ve yeni doğanda bazı hemoglobinopatilerin teşhisinde kullanılabileceği gösterilmiştir. 1986 yılında yöntem anyon değiştirici kolon kullanılarak, anaerobik koşullarda HbF içeren asimetric hibritlerin ayrılmasında kullanılmıştır (Ip ve Asakura, 1986).

HPLC anaerobik koşullar altında polietilenimin silika jel kolon ile yapılmıştır. Bu yöntem ile sabit pH'da (PH 6.5) AS ve FS hibrit hemoglobinlerinin ayrışma hızları saptanmıştır. Bu yöntemle elde edilen sonuçlar FS hibrit hemoglobininin AS hibrit hemoglobininin daha az kararlı olduğunu ve F hemoglobini içeren asimetric hibritlerin serbest enerjilerinin simetric ana hemoglobinden yaklaşık 0.6 kcal/mol daha büyük olduğu gösterilmiştir.

1993 yılında HPLC ile talasemi taraması yapılarak, alkali denatürasyon ve radyal immuno diffüzyon ile elde edilen HbF değerleri ile karşılaştırılarak

çok uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. HPLC tekrarlanabilir bir yöntem olduğundan önerilmiştir (Tan et al., 1993).

2.13.4. Diğer Yöntemler

1. DEAE (Dietilaminoetil) - selüloz kromatografisinde, glisin-KCN-NaCl çözeltileri geliştirici olarak kullanılarak, NaCl gradyanı ile hemoglobün fraksiyonları ayırt edilmiştir. HbF % 2'nin üzerinde olduğu durumlarda yöntemle iyi bir ayırma yapılabildiğini göstermişlerdir (Abraham et al., 1977).

2. CM (Karboksimetil)-selüloz destek ortam olarak kullanılarak HbF miktarı % 15 yada daha fazla olduğu düşünülen kan örneklerinde ince tabaka kromatografisi ile HbA, S, C'nin farklı kombinasyonları yanında HbF tayin edilebilmektedir. İşlemden CM-selülozu ile tris-HCl, NaCl, ve KCN çözeltileri kullanılmaktadır (Schroeder ve Nelson, 1975).

3. Mikrotiter lateks aglutünasyon-inhibisyon testi HbA ve HbF saptanmasında kullanılmak üzere geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu yöntemde insan HbA yada HbF antikorunu biyolojik boyalarla absorbe ettirilip, aglutünasyon için azalmış olan antikorlar, ilgili antijenle kaplı, lateks partikülleri kullanılarak, mikrotiter tekniği ile titre edilmiştir. Testin duyarlı, spesifik ve tekrarlanabilir olduğu gösterilmiştir (Itoh ve Matsuzawa, 1990).

4. Nomarski Mercekleri kullanılarak fetal hemoglobinler görünür hale getirilmeye çalışılmıştır. Daha önce asit elüsyon tekniği ile fetal

hemoglobinin ışık mikroskopisi yardımı ile izlenmiştir. Fakat hücrelerin yoğun olması nedeni ile takibi zor olmuştur. Bu nedenle yöntemin modifikasyonu yapılmış ve alkali denatürasyon yöntemi ile yapılan çalışma sonuçları ile iyi bir korelasyon gösterdiği saptanmıştır (McCormack ve Toke, 1983).

5. HbF, radyal immuno diffüzyon ve mikrokolon kromatografisi ile ticari laboratuvar kitleri kullanılarak saptanmıştır. Yöntemin duyarlılığı alkali denatürasyon ile uyumlu bulunmuştur. Kolay ve zaman kazandırıcı olmasına rağmen kitlerin pahalı oluşu nedeni ile rutin kullanıma çok uygun olmamaktadır (Marti et al., 1983).

6. Agaroz izoelektrik focusing yöntemi ile HbF kantitasyonu yapılmıştır. Poliakrilamid jel üzerinde yapılan ayırma florografi yada otografi kullanılarak tespit edilmiştir. Ayrılan bantlardaki toplam radyoaktivite ile kantitasyon yapılmıştır. İzoelektrik focusing yapıldıktan sonra protein bantları agarozdan elüe edilip, likit sintilasyon sayımı ile radyoaktivite miktarı değerlendirilmiştir (Leary et al., 1983).

7. ELİSA yöntemi ile HbF tayini nanogram seviyesinde yapılabilmektedir. Yöntem hemoglobinin polistiren tüplere bağlanarak, hemoglobin tipine uygun tavşan antikoru eklenmesi ile antijen miktarının saptanmasına dayanmaktadır (Makler ve Pesce, 1980).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Aletler

1. Tam Kan Sayım Cihazı	Sysmex NE-1500
2. Santrifüj	NÜVE NF 415
3. Vorteks	Sanke ve Kuntel VF2
4. Spektrofotometre	MILTON ROY Company Spectronic 20D
5. Otomatik pipet	Socorex, 100-1000 µL
6. Elektroforez tankı ve güç kaynağı	LKB, 5305
7. Dansitometre	Beckman, Appraise

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Sodyum hidrokisit (NaOH) : Merck, 6495.1000.

Amonyum Sülfat (NH₄)₂ SO₄ : Merck, 1216.

Potasyum Siyanür (KCN) : Merck, 4967, 0100.

Potasyum Heksasiyanoferrat (K₃ Fe (CN)₆) : Riedel-de Haen, 12643

Saponin : Fluka, 84510.

Titan III plak : Helena Laboratories, 3023.

Tris (hidroksimetil) aminometan : Fluka, 93352.

Borik Asit (HBO₃): Botafarma, 10795.

Metanol (CH₃OH) : Merck, 6008.2500.

Glasiyel Asetik Asit (CH₃COOH) : Merck, 1.00056.

Serum Fizyolojik (% 0.9 NaCl): Medifleks, Eczacıbaşı.

Ponceau - S : LKB, 6068.

3.1.3.Örnekleme

Çalışmada kullanılan kan örnekleri, Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesine gelen (6 ay-2 yaş 29, 2-15 yaş 30, yetişkin erkek 18, kadın 42) değişik yaş grubundan toplam 119 anemili hasta ve 38 kontrol bireyden sağlanmıştır. EDTA'lı tüplere 2 mL alınan kan örnekleri, +4 °C'ta en fazla beş gün saklanmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hematolojik Analizler

Anemili hasta gruplarının oluşturulabilmesi amacı ile alınan kan örneklerinden öncelikle tam kan sayımı yapılmıştır. Hastanın kliniği ile birlikte tam kan sayımında elde edilen sonuçlar doğrultusunda hemoglobinopati veya talasemi düşünülen hastaların tümünde, alkali denatürasyon yöntemi ile HbF tayini, 24 hastada ise alkali denatürasyon yanısıra selüloz asetat elektroforezi ile HbF saptaması yapılmıştır. Yapılan çalışmalar ile ilgili ayrıntılı bilgiler aşağıda verilmektedir.

3.2.2. Tam Kan Sayımı

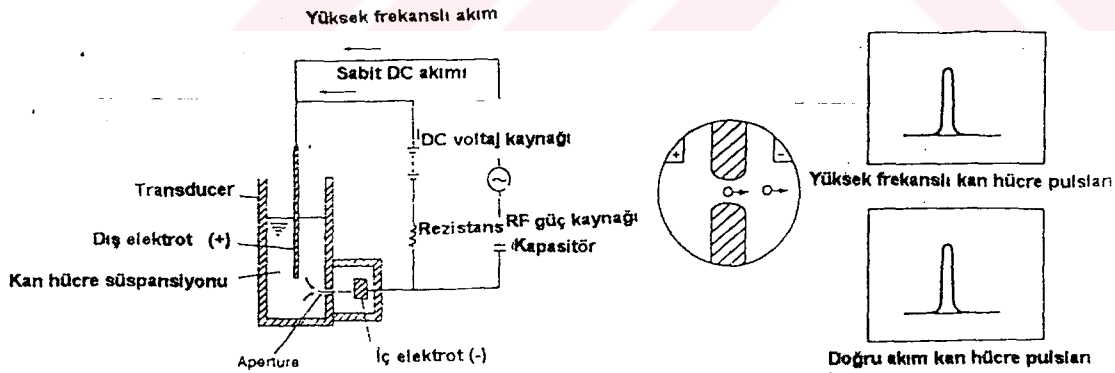
Tam kan sayımı Sysmex NE-1500 ile yapılmış olup, konu ile ilgili parametrelerden RBC, MCV, MCHC, MCH, Hb, Hct için aletin çalışma prensipleri aşağıda verilmektedir (Sysmex NE-1500,1991).

Sysmex NE-1500 Çalışma Prensipleri : Kan hücreleri partiküller ve diluent arasındaki elektriksel fark saptanarak hesaplanır. Eritrosit ve hematokrit Hydrodynamic Focusing, doğru akım saptama yöntemi ile yapılmaktadır.

Analiz basamakları :

1- Kan hücreleri elektriksel olarak iletken bir çözelti içinde seyreltilir. Hücreler ve çözeltinin elektriksel özellikleri arasında çok büyük farklılık olduğundan, bu farklılıktan yararlanılarak hücrelerin miktar ve hacim tayinleri yapılabilmektedir.

2- Çözeltide askıda kalan kan hücreleri transducer'in iç ve dış kısmına aspire edilir. İçteki elektrottan DC (direct current) doğru akım ve hem içteki hemde dıştaki elektrottardan RF (Radio Frequency) yüksek frekanslı akım geçirilir.



Şekil 3.1: Radyo frekansı ve doğru akımla puls saptama prensibi.

3- Bir kan hücresi aletten geçtiğinde elektrotlar arasında voltaj değişikliğine neden olarak, RF ve DC akımlarındaki değişikliklerle

orantılı olan bir sinyale dönüştürülür. Aletten geçen hücrenin toplam hacmi puls yüksekliği ile orantılıdır.

4- DC saptanmasındaki voltaj değişikliği aşağıda verilen Ohm yasasına göre açıklanmaktadır.

$$E = I \times R \quad E = \text{Voltaj}$$

$$I = \text{Akım}$$

$$R = \text{Direnç}$$

Aletten geçen hücreler, elektron akışını engelleyen "R" direncinin artmasına neden olur. Eğer "I" akımı sabitse, R'deki artma E'nin artmasına sebep olacaktır. "E" voltaj değişimi ise hücre hacmi ile orantılı olan "R" direnci ile orantılıdır.

Hücre membranının elektriksel özellikleri toplam hücre hacmi ile orantılı olan bir plus meydana getirerek doğru akım sinyalini azaltır.

5- RF saptama yöntemindeki voltaj değişikliği şu şekilde tanımlanabilir :

RF sinyal değişimi "Z" ile sembolize edilirse,

$$E = Z \times I$$

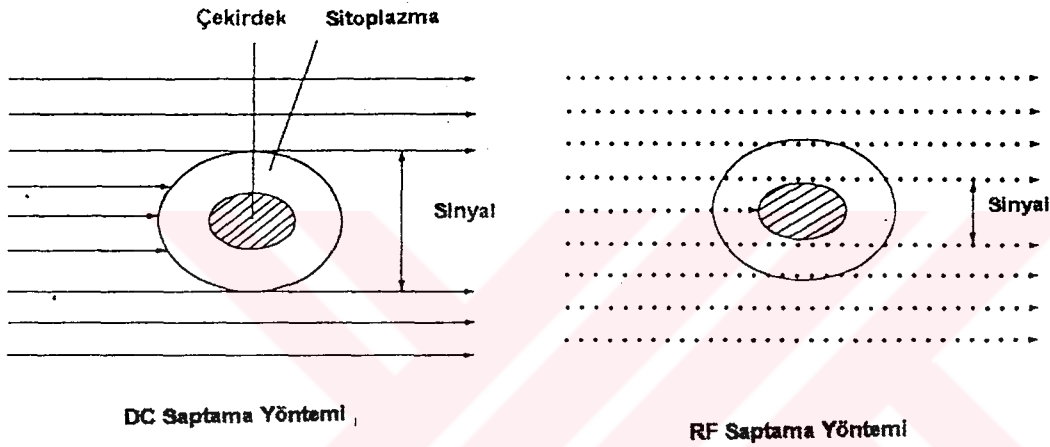
$$I = \text{Akım}$$

$$Z = \text{Impedance}$$

$$E = \text{Voltaj}$$

Z, elektron akışına neden olduğundan aletten geçen hücre Z'nin artmasına neden olur. Eğer radyo frekans akımı "I" sabitse, "Z"deki

herhangi bir artma E'deki artmaya neden olacaktır. "E", voltaj çekirdeğin büyüklüğü ve yoğunluğu ile orantılı olan Z'deki değişikliklerle orantılıdır. Hücre çekirdeği ve sitoplazmik granüller yüksek RF yoğunluğuna sahiptir. RF saptama yöntemi kullanılarak saptanan hücre pulsları çekirdek büyüklüğü yoğunluğu ve sitoplazmik granülasyonla orantılıdır. Sysmex NE-1500 tam kan sayım cihazı DC ve RF kombine teknoloji ile çalışmaktadır.



Şekil 3.2. Radyo frekansı ve doğru akım saptama yöntemi.

6- Küçük voltaj değişimleri amplifiye edilir ve herhangi bir yapay sinyal ile hava kabarcıkları oluştuğunda akım filtresi ile elimine edilir.

Hemoglobinin Saptanması

Sodyum Lauril Sülfat-Hemoglobin (SLS-Hb) yöntemi ile ölçülür. Deterjan, (SLS), eritrosit membranını parçalayarak hemoglobinin serbestleşmesini sağlar. Hemoglobin molekülünün globin grubu SLS'nin hidrofilik alkil grubu ile denatüre edilir. Bu methemoglobini oluşturmak için Fe^{2+} yi Fe^{3+} e dönüştürür ve SLS-Hb hemikrom molekülünü

oluşturmak için SLS ile birleşir. Daha sonra SLS-Hb yöntemi ile elde edilen hemoglobin bileşiğinin konsantrasyonu 555 nm'de ışık absorpsiyon yöntemi ile tayin edilir. Hb sonucu,

Örnek Absorpsiyonu - Kır Absorpsiyonu = Hb Absorpsiyonu.

Hb Absorpsiyonu mikrokomputer sistemi yardımıyla matematiksel bir büyüklük haline dönüştürülür ve sonuç g/dL olarak verilir.

Eritrosit İndislerinin Hesaplanması :

Aletin çalışma prensibine göre MCV, MCH ve MCHC hesaplanmaktadır. Hesaplama kullanılan formüller aşağıda verilmektedir.

1- MCV (Mean Corpuscular Volume) : Ortalama Eritrosit Hacmi

$$\text{MCV (fL)} = \frac{\text{Hct (\%)}}{\text{RBC (x 10}^6/\mu\text{L)}} \times 10$$

2-MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin) : Ortalama Eritrosit Hemoglobini

$$\text{MCH (pg)} = \frac{\text{Hb (g/dL)}}{\text{RBC (x 10}^6/\mu\text{L)}} \times 10$$

3-MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) :
Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu

$$\text{MCHC (g/dL)} = \frac{\text{Hb(g/dL)}}{\text{Hct (\%)}} \times 100$$

3.2.3.Hemolizat Hazırlanışı

3.2.3.a. Alkali Denatürasyon Yöntemi İçin Hemolizat Hazırlanması

Yaklaşık 2 mL venöz kan EDTA'lı tüpe alınarak önce tam kan parametreleri ölçülür. Daha sonra üzerine 3 kez 10 mL soğuk serum fizyolojik (% 0.9 NaCl çözeltisi) eklenerek 2000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir, supernatant atılır. Hazırlanan hücre paketinden 200 µL alınarak, 4 mL siyanür - ferrisiyanür karışımına ilave edilir. 10 dakika beklenir. Süre sonunda elde edilen hemolizatın hemen kullanılması gereklidir (Fairbank ve Klee,1986).

3.2.3.b.Selüloz Asetat Membran Hemoglobin Elektrofrezisi İçin Hemolizat Hazırlanması

1 mL venöz kan / 20 IU heparin olacak şekilde 2-3 mL venöz kan alınır. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, plazma atılır. Eritrositler 7-8 mL soğuk serum fizyolojik ile süspanse edilerek 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip, supernatant atılır. İşlem üç kez tekrar edilir. Çalışma hemen yapılmayacaksa, hazırlanan hücre paketi + 4°C 'ta saklanır. Hazırlanan hücre paketinden bir hacim alınarak, 4 hacim saponin çözeltisi ilave edilerek hemolizat elde edilir (Bauer,1982).

3.2.4. Alkali Denatürasyon Yöntemi ile Fetal Hemoglobinin Saptanması

3.2.4.a. İlke : İnsan hemoglobinlerinin çoğu, alkali pH'da kolaylıkla denatüre olur. Fetal hemoglobin ise alkali denatürasyona dirençlidir ve çözelti fazında kalır. Bu farklılık, insan kanında bulunan fetal hemoglobin miktarının basit ve hızlı olarak saptanmasını sağlar. Bu yöntemde ilk olarak bütün hemoglobinler $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ve CN ilavesi ile siyanmethemoglobine dönüştürülür. Daha sonra alkali (NaOH) ilave edilerek hemoglobinler denatüre edilir. Amonyum sülfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eklenmesi ile denatüre olmuş hemoglobinler çöker. Karışımın filtrasyonundan elde edilen supernatanttan spektrofotometrik olarak HbF ölçülür (Betke et al., 1959, Pembrey 1972, Fairbank ve Klee, 1986).

3.2.4.b. Ayıraçların Hazırlanması

1- Siyanür-Ferrisiyanür Çözeltisi : 0.2 g KCN ve 0.2 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ distile suda çözülür ve son hacim 1 litreye tamamlanıp, koyu renkli bir şişede saklanır.

2- Doymuş Amonyum Sülfat Çözeltisi : 750 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 L su içinde çözülür.

3- 1.2 N Sodyum Hidroksit Çözeltisi : 48 g NaOH bir miktar suda çözülerek, son hacim 1 L'ye tamamlanır.

3.2.4.c. İşlem

1- Daha önce tarif edildiği gibi hazırlanan hemolizattan bir tüpe 2.8 mL alınarak üzerine 0.2 mL NaOH eklenir ve vorteks kullanılarak karıştırılıp, 2 dakika bekletilir.

2- Süre tamamlandığında çözeltinin üzerine 2 mL amonyum sülfat eklenir ve 5 dakika beklenir.

3- Süzülerek filtratın absorbanansı 540 nm’de okunur. Bu değer formülde “ A_t ” ile gösterilen değerdir.

4- Orijinal kan-siyanür-ferrisiyanür çözeltisinden 0.4 mL alınıp, 6.75 mL distile suya eklenir. Toplam hemoglobinin değerlerinin absorbanansı bu hazırlanan çözeltinin 540 nm’de okunması ile elde edilir. Formülde “ A_b ” ile gösterilmektedir. A_t ve A_b değerleri suya karşı okunmaktadır (Fairbank ve Klee,1986).

3.2.4.d.Hesaplama

$$\% \text{HbF} = \frac{A_t \times 100}{A_b \times 10}$$

A_t : HbF içeren filtratın optik dansitesi.

A_b : Örneğin içerdiği toplam hemoglobinin optik dansitesi.

3.2.4.e. Alkali Denatürasyon Yönteminin Uygulanmasında Dikkat Edilecek Noktalar

1- Hemolizli ve pıhtılı kan kullanılmamalıdır.

2-Siyanür-ferrisiyanür çözeltisi zehirli olduğundan ağızla pipetlenmemelidir.

3-Hücre paketinin hazırlanması sırasında, eritrositlerin hemoliz olmaması için santrifüjün devrine ve süreye uyulmalıdır.

4-Serum fizyolojik ile yıkama yapıldıktan sonra eritrosit paketinden ayrılması yapılırken, örneğin serum fizyolojiktan tamamen ayrılması

sağlanmalıdır. Aksi takdirde pipetleme yapılırken eritrositlerle birlikte taşınan serum fizyolojik eritrositlerin az alınmasına bağlı olarak hatalı sonuçların alınmasına neden olacaktır.

3.2.5. Fetal Hemoglobinin Ölçüm Stabilitesinin Saptanması

Fetal hemoglobinin ölçüm stabilitesini saptamak için, 5 farklı kan örneği alkali denatürasyon yöntemi ile saptama yapılacak şekilde hazırlandıktan sonra HbF ve total hemoglobin içeren tüplerin (0-60 dakika) her 15 dakikada bir absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen verilerden HbF değerleri hesaplanmıştır.

3.2.6. Selüloz Asetat Membran Hemoglobin Elektrofrez

3.2.6.a. İlke: Selüloz asetat membran hemoglobin elektrofrez hızlı, ucuz, tekrarlanabilir semikantitatif bir hemoglobin tarama testidir. Bu testle HbA₁, A₂ (F), S, G, C, E, O ve D saptanması olasıdır. Tris-EDTA-borat tamponu kullanılarak, pH 8.4'te, negatif yüklü hemoglobinlerin çoğu anoda doğru göç ettirilir. Bu göç, farklı Hb türlerinin amino asit sayı ve çeşitindeki farklılıktan, taşıdıkları elektriksel yük ve kimyasal özelliklerinden kaynaklanır. Ponceau-S gibi bir protein boyası kullanılarak çok düşük derişimdeki proteinler görünür hale getirilir. Görsel bir değerlendirme yapılabildiği gibi dansitometrik, spektrofotometrik olarak da tayin yapılabilir. Fakat HbA₂ ve F kantitasyonu dansitometrik olarak bu elektrofrez türünde değerlendirilmemelidir (Bauer, 1982).

3.2.6.b. Ayıraçların Hazırlanması

1- **Saponin** : 0.1 g saponin alınıp, 100 mL suda çözülerek çalışma çözeltisi hazırlanır.

2- **Tris-EDTA-Borat Tamponu**

Tris (hidroksimetil)aminometan	10.2 g
EDTA	0.6 g
Borik Asit	3,2 g

Karışım bir miktar su ile çözülerek son hacim 1000 mL'ye tamamlanır.

3- **% 5 Glasiyel asetik asit** : 5 mL glasiyel asetik asitten alınıp, son hacim 100 mL'ye tamamlanır.

4- **Ponceau-S Boyası** : 1/10 oranında sulandırılarak kullanılır.

3.2.6.c. İşlem : Titan III selüloz asetat plak tampon çözeltisine batırılarak ıslatılır, sonra çıkarılıp filtre kağıtları yardımıyla kurulanır. Daha sonra hemolizat aplikatör yardımı ile plaklara applike edilir. Hazırlanan plak tankın içerisine alınır. Elektroforez 400 V'da 20 dakika sürer. Sürenin sonunda akım kesilerek alınan plak Ponceau-S boyası içerisine daldırılır. 3 dakika beklendikten sonra 2-dakika % 5 glasiyel asetik asit ile etkileştirilerek boyanın fazlası alınır. Bu işlem üç kez tekrar edilir. Daha sonra metanol içinde 3 dakika bekletilerek boya sabitleştirilir. Bu işlem de tamamlandıktan sonra plak kurumaya bırakılır ve daha sonra kantitatif analiz için dansitometrik okuma yapılır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesine anemi şikayeti ile başvuran 60 yetişkin (42 kadın, 18 erkek), 2-15 yaş grubu 30 ve 6 ay-2 yaş grubu 29 çocuk olmak üzere toplam 119 hastada alkali denatürasyon yöntemi kullanılarak fetal hemoglobin değerleri RBC, Hb, Hct, RBC ve indisleri ile birlikte saptanmıştır. Ayrıca yetişkin kadın ve erkek için 12, 2-15 yaş grubu çocuk için 18, 6 ay-2 yaş grubu için 8 sağlıklı bireyden kontrol grubu oluşturularak yukarıda bahsedilen parametre düzeyleri saptanmıştır. Yukarıda bahsedilen çalışma grupları içinden seçilen MCV < 78 fL olan 85 hasta (yetişkin 43 kadın, 16 erkek, 3-15 yaş 26 çocuk) ve 6 ay-2 yaş grubu hariç diğer anemili hastaların oluşturduğu (2.5-70.0) grupların da istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapılmıştır. Sonuçlar üç ana başlık altında değerlendirilmiştir.

1. Her grubun fetal hemoglobin değerleri ile yaş, RBC ve indisleri, Hb ve Hct değerlerine ait ortalama (\bar{x}), standart sapma (SD), maksimum (max) ve minimum (min) değerleri,
2. HbF ile yaş, RBC ve indisleri, Hb, Hct arasındaki korelasyon sonuçları,
3. Yaş, RBC ve indisleri ile Hb, Hct'nin birbirleri ile olan korelasyonları şeklinde değerlendirilmiştir.

Çalışmada ayrıca anemi şikayeti ile gelen 24 hastadan hem alkali denatürasyon yöntemi hem de selüloz asetat elektroforezi ile fetal hemoglobin tayini yapılarak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı araştırılmıştır.

Hastaneye birbirlerinden farklı şikayetlerle gelen (anemi, talasemi major, lösemi) 9 takipli hastadan değişik aralıklarla alınan kan örneklerinden ikişer kez HbF değeri saptanarak elde edilen sonuçlarda istatistiksel farklılık olup olmadığı incelenmiştir.

Fetal hemoglobinin bu yöntem için ölçüm stabilitesi 5 değişik olgu kullanılarak saptanmıştır.

4.1. Anemili hasta ve kontrol gruplarında RBC,Hb,Hct,HbF değerlerinin ve RBC indislerinin yaşla değişiminin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

Tablo 4.1 : Anemili hastalarda ve kontrol gruplarında RBC, Hb, Hct, HbF ve RBC indislerinin yaşla değişimi.

	X±SD (MİNİMUM-MAKSİMUM)							
	YAŞ (yıl)	RBC x 10 ⁹ / µL	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	HbF (%)
6 Ay -2 Yaş grubu n=29	1.4±0.5 (0.5-2.0)	4.6±0.8 (1.9-6.1)	8.7±1.3 (5.8-10.4)	30.2±4.5 (17.2-37.1)	66.5±8.4 (47.8-91.5)	19.4±3.6 (12.3-30.9)	29.0±2.8 (19.2-34.2)	1.21±0.80 (0.11-3.62)
6 Ay - 2 Yaş kontrol grubu n=8	1.25±0.5 (0.5-2.0)	4.8±0.3 (4.3-5.3)	10.8±0.8 (9.9-12.4)	35.3±1.7 (33.3-38.8)	73.0±3.9 (68.3-80.9)	22.4±1.5 (20.4-24.2)	30.6±1.3 (29.4-32.9)	1.57±0.72 (0.64-2.71)
2-15 Yaş grubu n=30	6.7±4.2 (2.5-15.0)	4.5±0.9 (2.4-6.1)	9.7±1.8 (3.9-11.5)	31.9±5.0 (16.3-38.8)	71.9±10.1 (50.1-93.2)	21.8±4.1 (12.5-30.6)	30.2±2.2 (23.9-34.2)	0.87±0.49 (0.04-1.95)
2-15 Yaş kontrol grubu n=18	8.2±4.3 (2.0-15.0)	4.7±0.4 (4.2-5.8)	12.7±1.1 (11.3-15.0)	38.3±3.1 (33.3-44.5)	82.1±4.4 (75.0-90.0)	27.0±1.2 (24.8-28.9)	33.1±1.7 (30.5-34.9)	1.12±0.65 (0.23-2.36)
Yetişkin kadın grubu n=42	33.9±11.3 (18.0-70.0)	4.6±0.7 (3.4-6.1)	9.3±1.2 (6.0-11.7)	34.0±8.7 (25.1-84.4)	71.4±8.7 (59.6-104)	20.7±3.5 (15.4-32.4)	28.3±1.5 (23.9-31.9)	0.62±0.40 (0.14-1.83)
Yetişkin erkek grubu n=18	33.8±11.4 (25.0-63.0)	5.0±1.0 (2.7-7.1)	10.0±2.3 (5.9-14.2)	34.4±6.9 (21.4-46.5)	67.8±7.0 (52.9-79.9)	19.9±3.2 (13.2-25.4)	29.2±2.2 (23.7-31.8)	0.69±0.49 (0.01-1.72)
Kadın, erkek kontrol grubu n=12	38.5±20.8 (18.0-75.0)	5.0±0.5 (3.9-6.3)	13.5±0.8 (12.5-15.6)	43.0±2.9 (39.0-50.6)	87.4±5.2 (80.4-99.0)	27.4±2.7 (24.8-35.3)	31.4±1.5 (29.6-35.6)	0.75±0.47 (0.12-1.41)
2.5-70.0 Yaş grubu n=90	24.8±16.0 (2.5-70.0)	4.6±0.8 (2.4-7.1)	9.0±1.7 (3.9-14.0)	32.8±4.8 (16.3-46.5)	71.3±8.9 (50.1-104)	20.9±3.7 (12.5-32.4)	29.2±2.3 (23.7-39.0)	0.72±0.46 (0.01-1.95)
MCV < 78 fL olan hasta grubu	25.9±16.4 (3.0-70.0)	4.9±0.7 (2.4-7.1)	9.8±1.8 (3.9-14.2)	33.7±5.0 (16.3-47.1)	69.4±5.8 (50.1-77.7)	20.1±2.4 (12.5-24.1)	28.9±1.9 (23.7-32.2)	0.74±0.47 (0.04-1.95)

Tüm gruplar, dahil oldukları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında tam kan parametrelerinden RBC ve indisleri ile Hb ve Hct değerlerinin normal sınırlarının altında olduğu, erişkin kadın için ortalama HbF değerinin 0.62 ± 0.40 (kontrol kadın 0.75 ± 0.47), erkek için 0.69 ± 0.49 (kontrol erkek 0.75 ± 0.47), 2-15 yaş grubundaki çocuklar için 0.77 ± 0.50 (2-15 yaş kontrol grubu 1.12 ± 0.65) ve 6 ay-2 yaş grubu için 1.21 ± 0.80 (6 ay-2 yaş kontrol grubu 1.57 ± 0.72) olarak bulunmuştur. Ayrıca MCV < 78 fL olan hastalarda ortalama HbF ile standart sapma değeri 0.74 ± 0.47 , 2.5-70.0 yaş grubundaki hastalarda ise 0.72 ± 0.46 olarak bulunmuştur.

4.1.1. Yetişkin kadın, erkek, 2-15 yaş grubu, 6 ay-2 yaş grubu ve bunların kontrol grupları ile 2.5-70.0 yaş grubu ve MCV < 78 fL olan hastalarda fetal hemoglobin değerleri ile yaş, RBC ve indisleri, Hb, Hct arasındaki korelasyon sonuçları.

Yukarıda bahsedilen grupların ayrı ayrı incelenmesi sonucu elde edilen istatistiksel sonuçlar aşağıda verilmektedir.

1. Yetişkin anemili kadınlara ait korelasyon sonuçları Tablo 4.2'de verilmektedir. Tablo incelendiğinde bu grupta MCV ve HbF arasında anlamlı bir korelasyon olduğu ($r : - 0.348$; $p : 0.024$) görülmüştür.

Tablo 4.2 : Yetişkin anemili kadın hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları.

	HbF (%)	
	n=42	
	r	p
YAS (yıl)	-0.221	0.159
RBC x 10 ⁶ / µL	0.172	0.276
Hb (g/dL)	-0.073	0.644
Hct (%)	-0.004	0.979
MCV (fL)	-0.348	0.024
MCH (pg)	-0.236	0.133
MCHC (g/dL)	0.114	0.472

2. Yetişkin anemili erkeklere ait korelasyon sonuçları Tablo 4.3'te verilmektedir. Bu grupta HbF ile diğer parametreler arasında hiçbir anlamlı korelasyon saptanamamıştır.

Tablo 4.3 : Yetişkin anemili erkek hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları.

	HbF (%)	
	n=18	p
YAS (yil)	-0.345	0.161
RBC x 10 ⁶ / µL	0.233	0.352
Hb (g/dL)	-0.086	0.712
Hct (%)	-0.392	0.733
MCV (fL)	-0.243	0.107
MCH (pg)	-0.060	0.330
MCHC (g/dL)	0.114	0.814

3. Yetişkin kadın ve erkek kontrol grubuna ait korelasyon sonuçları Tablo 4.4'te verilmektedir. Bu grup incelendiğinde HbF ile diğer parametreler arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır.

Tablo 4.4 : Yetişkin kadın ve erkek kontrol grubunda olan hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları.

	HbF (%)	
	n = 12	
	r	p
YAŞ (yıl)	-0.275	0.387
RBC x 10 ⁶ / µL	0.011	0.974
Hb (g/dL)	-0.006	0.984
Hct (%)	-0.046	0.886
MCV (fL)	-0.104	0.748
MCH (pg)	-0.039	0.903
MCHC (g/dL)	0.078	0.809

4. MCV < 78 fL olan yetişkin kadın ve erkek hastalara ait korelasyon sonuçları Tablo 4.5'te verilmektedir. Bu grup içerisinde yaş ve MCV arasında anlamlı bir korelasyon olduğu bulunmuştur. HbF ile MCV arasında $r : -0.256$, $p : 0.018$, yaş ile HbF arasındaki korelasyon değerleri ise $r : -0.353$, $p : 0.001$ olarak bulunmuştur.

Tablo 4.5: MCV < 78 fL olan hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları.

	HbF (%)	
	n = 85	
	r	p
YAŞ (yil)	- 0.353	0.001
RBC x 10 ⁶ / µL	0.002	0.984
Hb (g/dL)	- 0.077	0.482
Hct (%)	- 0.156	0.154
MCV (fL)	- 0.256	0.018
MCH (pg)	- 0.086	0.431
MCHC (g/dL)	0.166	0.129

5. 2-15 Yaş grubunda bulunan hastalara ait korelasyon sonuçları Tablo 4.6'da verilmektedir. Bu grup değerlendirildiğinde HbF ile MCV arasında anlamlı bir korelasyon olduğu görülmüştür.

Tablo 4.6 : 2-15 yaş grubundaki hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları.

	HbF (%)	
	n = 30	
	r	p
YAS (yıl)	-0.292	0.117
RBC x 10 ⁶ / µL	0.272	0.146
Hb (g/dL)	-0.093	0.625
Hct (%)	-0.003	0.988
MCV (fL)	-0.356	0.053
MCH (pg)	-0.347	0.060
MCHC (g/dL)	-0.212	0.260

6. 2-15 yaş kontrol grubuna ait korelasyon sonuçları Tablo 4.7’de verilmektedir. Bu grup içinde HbF’in yaş (r : -0.664; p : 0.003), MCV (r : -0.650 ; p : 0.003) ve MCHC (r : 0.591; p : 0.001) arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.

Tablo 4.7 : 2-15 yaş kontrol grubundaki hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları.

	HbF (%)	
	n = 18	
	r	p
YAŞ (yıl)	-0.664	0.003
RBC x 10 ⁶ /µL	0.147	0.559
Hb (g/dL)	0.033	0.895
Hct (%)	-0.249	0.319
MCV (fL)	-0.650	0.003
MCH (pg)	-0.253	0.311
MCHC (g/dL)	0.591	0.001

7. 6 ay-2 yaş grubuna ait korelasyon sonuçları Tablo 4.8'de verilmektedir. Tablo değerlendirildiğinde MCV (r : 0.497 ; p : 0.006), MCH (r : 0.530 ; p : 0.003) ile HbF arasında anlamlı ilişki olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.8 : 6 ay-2 yaş grubundaki hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları.

	HbF (%)	
	n = 29	
	r	p
YAŞ (yıl)	-0.256	0.179
RBC x 10 ⁶ / µL	-0.332	0.079
Hb (g/dL)	0.060	0.757
Hct (%)	-0.118	0.543
MCV (fL)	0.497	0.006
MCH (pg)	0.530	0.003
MCHC (g/dL)	0.356	0.058

8. 6 ay-2 yaş kontrol grubuna ait korelasyon sonuçları Tablo 4.9'da verilmektedir. Bu grup içerisinde HbF ile Hb (r : -0.768 ; p : 0.026) arasında anlamlı korelasyon bulunmuştur.

Tablo 4.9 : 6 ay-2 yaş kontrol grubundaki hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları.

	HbF (%)	
	n = 8	
	r	p
YAŞ (yıl)	- 0.205	0.626
RBC x 10 ⁶ / µL	- 0.584	0.129
Hb (g/dL)	- 0.768	0.026
Hct (%)	- 0.632	0.092
MCV (fL)	0.240	0.566
MCH (pg)	- 0.274	0.511
MCHC (g/dL)	- 0.694	0.056

9. 2.5-70.0 yaş grubunda bulunan hastalara ait korelasyon sonuçları Tablo 4.10'da verilmektedir. Bu grubun istatistik değerlendirmesine göre HbF ile yaş (r : - 0.324 ; p : 0.002), MCV (r : - 0.336 ; p : 0.001), MCH (r : -0.234 ; p : 0.026) arasında anlamlı korelasyon olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.10: 2.5-70.0 yaş grubundaki hastalarda HbF değerleri ile yaş, Hb, Hct, RBC ve indisleri arasındaki korelasyon sonuçları.

	HbF (%)	
	n = 90	
	r	p
YAŞ (yıl)	-0.324	0.002
RBC x 10 ⁶ / µL	0.197	0.063
Hb (g/dL)	-0.010	0.925
Hct (%)	-0.036	0.736
MCV (fL)	-0.336	0.001
MCH (pg)	-0.234	0.026
MCHC (g/dL)	0.018	0.862

4.1.2. Yetişkin kadın, erkek, 2-15 yaş grubu, 6 ay-2 yaş grubu ve bunların kontrol grupları ile MCV < 78 fL olan hastalar ve 2.5-70.0 yaş grubunda yer alan hastalarda yaş, RBC ve indisleri, Hb, Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları.

1. Yetişkin anemili kadın hastalara ait anlamlı korelasyon sonuçları Tablo 4.11'de verilmektedir. Tablo incelendiğinde yaş ile MCHC (r : - 0.340 ; p : 0.027), RBC ile Hb (r : 0.528; p : 0.000), Hct (r : 0.322; p : 0.038), MCV (r : - 0.667; p : 0.000), MCH (r : - 0.553; p : 0.000), Hb ile Hct

($r : 0.403$; $p : 0.008$), MCH ($r : 0.387$; $p : 0.011$), MCHC ($r : 0.672$; $p : 0.000$), MCV ile MCH ($r : 0.938$; $p : 0.000$), MCHC ($r : 0.390$; $p : 0.010$) ve MCH ile MCHC ($r : 0.590$; $p : 0.000$) arasında anlamlı korelasyon bulunmuştur.

Tablo 4.11 : Yetişkin anemili kadın hastalarda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları.

n=42	YAŞ (yıl)	RBC $10^9/\mu\text{L}$	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fl.)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
YAŞ							
r							-0.340
p							0.027
RBC							
r			0.528	0.322	-0.667	-0.553	
p			0.000	0.038	0.000	0.000	
Hb							
r				0.403		0.387	0.672
p				0.008		0.011	0.000
MCV							
r						0.938	0.390
p						0.000	0.010
MCH							
r							0.590
p							0.000
MCHC							
r							
p							

2. Yetişkin anemili erkek hastalara ait anlamlı korelasyon sonuçları Tablo 4.12'de verilmektedir. Tablo incelendiğinde RBC ile Hb ($r : 0.774$; $p : 0.000$), Hct ($r : 0.888$; $p : 0.000$), Hb ile Hct ($r : 0.963$; $p : 0.000$), MCHC ($r : 0.525$; $p : 0.025$) MCV ile MCH ($r : 0.929$; $p : 0.000$), MCHC ($r : 0.604$; $p : 0.008$), MCH ile MCHC arasında ($r : 0.853$; $p : 0.000$) anlamlı korelasyon sonuçları bulunmuştur.

Tablo 4.12 : Yetişkin anemili erkek hastalarda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları.

n=18	YAŞ (yıl)	RBC ($10^9/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
YAŞ							
r							
p							
RBC			0.774	0.988			
r			0.000	0.000			
p							
Hb				0.963			0.625
r				0.008			0.025
p							
MCV						0.929	0.604
r						0.000	0.008
p							
MCH							0.853
r							0.000
p							
MCHC							
r							
p							

3. Yetişkin kadın ve erkek kontrol grubunda anlamlı korelasyon sonuçları Tablo 4.13'te verilmektedir. Tablo'ya göre RBC ile Hb ($r : 0.660$; $p : 0.020$), Hct ($r : 0.917$; $p : 0.000$), MCV ($r : - 0.848$; $p : 0.000$), MCH ($r : - 0.771$; $p : 0.003$), Hb ile Hct ($r : 0.785$; $p : 0.003$), MCV ile MCH ($r : 0.882$; $p : 0.000$), MCH ile MCHC ($r : 0.835$; $p : 0.000$) arasında anlamlı korelasyon olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.13 : Yetişkin kadın ve erkek kontrol grubunda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları.

n=12	YAŞ (yıl)	Rbc (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
YAŞ							
r							
p							
RBC							
r			0.660	0.917	-0.848	-0.771	
p			0.020	0.000	0.000	0.000	
Hb							
r				0.785			
p				0.003			
MCV							
r						0.882	
p						0.000	
MCH							
r							0.835
p							0.000
MCHC							
r							
p							

4. MCV < 78 fL olan yetişkin kadın ve erkek hastalarda anlamlı bulunan korelasyon sonuçları Tablo 4.14’te görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre yaş ile Hct (r : 0.242 ; p : 0.026), MCHC (r : - 0.242 ; p : 0.001), RBC ile Hb (r : 0.750 ; p : 0.000), Hct (r : 0.835 ; p: 0.000), MCV (r : - 0.312 ; p : 0.004), MCHC (r : 0.260 ; p : 0.016), Hb ile Hct (r : 0.955 ; p : 0.000), MCV ile Hb (r : 0.330 ; p : 0.002), Hct (r : 0.255 ; p : 0.018), MCH (r : 0.868 ; p : 0.000), MCHC (r : 0.382 ; p : 0.000), MCH ile Hb (r : 0.597 ; p : 0.000), Hct (r : 0.421; p : 0.000), MCHC ile Hb (r : 0.711 ; p : 0.000), Hct (r : 0.477 ; p : 0.000), MCHC (r : 0.787 ; p : 0.000) arasında anlamlı korelasyon olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.14 : MCV < 78 fL olan yetişkin kadın ve erkek hastalarda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları.

n=85	YAS (yil)	RBCx 10 ⁹ /µL	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
YAS							
r				0.242			-0.366
p				0.026			0.001
RBC							
r			0.760	0.836	-0.312		0.260
p			0.000	0.000	0.000		0.016
Hb							
r				0.956			
p				0.000			
MCV							
r			0.330	0.266		0.868	0.382
p			0.002	0.018		0.000	0.000
MCH							
r			0.597	0.421			
p			0.000	0.000			
MCHC							
r			0.711	0.477			0.787
p			0.000	0.000			0.000

5. 2-15 yaş grubunda bulunan hastalarda anlamlı bulunan korelasyon sonuçları Tablo 4.15'te verilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre RBC ile Hb (r : 0.553 ; p : 0.001), Hct (r : 0.705 ; p : 0.000), MCV (r : - 0.582 ; p : 0.000), MCH (r : - 0.434 ; p : 0.016), Hb ile Hct (r : 0.959 ; p : 0.000), MCH (r : 0.494 ; p : 0.005), MCHC (r : 0.742 ; p : 0.000), MCV ile MCH (r : 0.953 ; p : 0.000), MCHC (r : 0.603 ; p : 0.000) arasında anlamlı korelasyon olduğu görülmüştür.

Tablo 4.15 : 2-15 yaş grubunda bulunan hastalarda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları.

n=30	YAŞ (yıl)	RBCx 10 ⁹ /µL	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fl.)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
YAŞ							
r							
p							
RBC							
r			0.553	0.706	-0.582	-0.434	
p			0.001	0.000	0.000	0.000	
Hb							
r				0.959		0.494	0.742
p				0.000		0.006	0.000
MCV							
r						0.953	0.603
p						0.000	0.000
MCH							
r							
p							
MCHC							
r							
p							

6. 2-15 yaş kontrol grubunda bulunan hastalarda anlamlı bulunan korelasyon sonuçları Tablo 4.16'da verilmektedir. Buna göre yaş ile MCV (r : 0.869 ; p 0.000), MCHC (r : -0.859 ; p : 0.000), RBC ile Hb (r: 0.881 ; p : 0,000), Hct (r : 0.819 ; p : 0,000), Hb ile Hct (r : 0.890; p: 0.000), MCV ile MCH (r : 0.674; p : 0.002), MCHC (r : -0.620;p : 0.006) arasında anlamlı korelasyon bulunmuştur.

Tablo 4.16 : 2-15 yaş kontrol grubunda bulunan hastalarda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları.

n=18	YAŞ (yıl)	RBC (10 ¹² /µL)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
YAŞ					0.869		-0.869
r					0.000		0.000
p							
RBC			0.881	0.818			
r			0.000	0.000			
p							
Hb				0.890			
r				0.000			
p							
MCV						0.874	-0.620
r						0.002	0.006
p							
MCH							
r							
p							
MCHC							
r							
p							

7. 6 ay-2 yaş grubundaki hastalarda anlamlı bulunan korelasyon sonuçları Tablo 4.17'de verilmektedir. Buna göre RBC ile Hb (r : 0.569 ; p : 0.001), Hct (r : 0.817 ; p : 0.000), MCV (r : - 0.704 ; p : 0.000), MCH (r : - 0.739 p : 0.000), MCHC (r : - 0.456 ; p : 0.013), Hb ile Hct (r : 0.811 ; p : 0.000), MCV ile MCH (r : 0.895 ; p : 0.000), MCHC (r : 0.495 ; p : 0.009), MCH ile MCHC (r : 0.797 ; p : 0.000) arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.

Tablo 4.17 : 6 ay-2 yaş grubunda bulunan hastalarda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları.

n=29	YAŞ (yıl)	RBC ($10^9/L$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
YAŞ							
r							
p							
RBC							
r			0.669	0.817	-0.704	-0.739	-0.466
p			0.001	0.000	0.000	0.000	0.013
Hb							
r				0.811			
p				0.000			
MCV							
r						0.895	0.475
p						0.000	0.009
MCH							
r							0.797
p							0.000
MCHC							
r							
p							

8. 6 ay-2 yaş kontrol grubundaki hastalarda anlamlı bulunan korelasyon sonuçları Tablo 4.18'de verilmektedir. Tablo değerlendirildiğinde yaş ile MCV ($r : - 0.701$; $p : 0.053$), MCH ($r : - 0.744$; $p : 0.034$), RBC ile MCV ($r : - 0.737$; $p : 0.037$), Hb ile Hct ($r : 0.870$; $p : 0.005$), MCHC ($r : 0.847$; $p : 0.008$), MCV ile MCH ($r : 0.751$; $p : 0.032$) arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.

Tablo 4.18 : 6 ay-2 yaş kontrol grubunda bulunan hastalarda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları.

n-8	YAS (yil)	RBCx 10 ⁹ /µL	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
YAS							
r					-0.701	-0.744	
p					0.053	0.034	
RBC							
r					-0.737		
p					0.037		
Hb							
r				0.870			0.847
p				0.005			0.008
MCV							
r						0.751	
p						0.032	
MCH							
r							
p							
MCHC							
r							
p							

9. 2.5-70.0 yaş grubunda anlamlı bulunan korelasyon sonuçları Tablo 4.19'da verilmektedir. Tabloya göre yaş ile MCHC (r : - 0.252 ; p : 0.016), RBC ile Hb (r : 0.624 ; p : 0.000), Hct (r : 0.770 ; p : 0.000), MCV (r : - 0.551 ; p : 0.000), MCH (r : - 0.435 ; p : 0.000), Hb ile Hct (r : 0.939 ; p : 0.000), MCV (r : 0.247 ; p : 0.018), MCH (r : 0.406 ; p : 0.000), MCHC (r : 0.570 ; p : 0.000), Hct ile MCHC (r : 0.314 ; p : 0.002), MCV ile MCH (r : 0.934 ; p : 0.000), MCHC (r : 0.414 ; p : 0.000), MCH ile MCHC (r : 0.633 ; p : 0.000) arasında anlamlı korelasyon olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.19 : 2.5-70.0 yaş grubunda bulunan hastalarda yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct arasında anlamlı bulunan korelasyon sonuçları.

n=80	YAŞ (yıl)	RBCx 10 ⁹ /µL	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fl.)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
YAŞ							
r							-0.262
p							0.016
RBC							
r			0.624	0.770	-0.551	-0.435	
p			0.000	0.000	0.000	0.000	
Hb							
r				0.939	0.247	0.406	0.570
p				0.000	0.018	0.000	0.000
MCV							
r						0.934	0.414
p						0.000	0.000
MCH							
r							0.633
p							0.000
MCHC							
r							
p							

4.2. Hasta Gruplarında Elde Edilen HbF Düzeyleri

Gaziantep Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesine birbirinden farklı şikayetlerle başvuran hastalardan alkali denatürasyon yöntemi ile saptanan HbF değerlerinden patolojik olanlar ve bunların hastalık grupları Tablo 4.20’de verilmektedir

Tablo 4.20 : Hasta Gruplarında Elde Edilen HbF Düzeyleri.

HASTALIK GRUBU	HbF(%)
Talasemi Major	
1. Hasta	41.2
2. Hasta	5.1
3. Hasta	44.8
4. Hasta	43.1
Lösemi	
1. Hasta	3.8
2. Hasta	5.6
Gebe	
1. Hasta	4.7

4.3. Bir grup hastada alkali denatürasyon ve selüloz asetat elektroforezi kullanılarak elde edilen HbF sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

Hastaneye anemi şikayetleri ile başvuran ve sebebi araştırılan 24 hastanın alkali denatürasyon yöntemi ve selüloz asetat elektroforezi ayrı ayrı çalışılarak elde edilen HbF değerlerinden istatistiksel bir ilişkinin olup

olmadığı araştırılmıştır. Her iki yönteme ait ortalama, standart sapma değerleri aşağıda verilmektedir.

HbF (Alkali Denatürasyon) $x \pm SD = 1.00 \pm 0.99$ (n : 24)

HbF (Elektroforez) $x \pm SD = 0.22 \pm 0.77$ (n : 24)

Ortalamalar arasındaki fark 0.78 olup, p ise 0.004 bulunmuştur.

4.4. Aynı hastalardan farklı zamanlarda çalışılan HbF sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

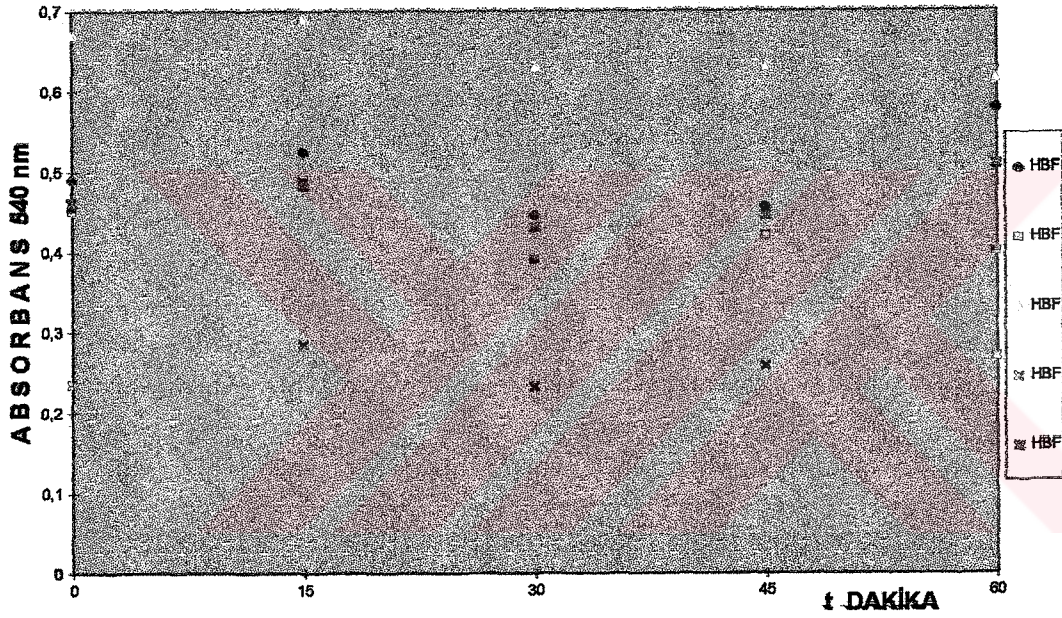
Birbirlerinden farklı şikayetlerle gelen (anemi, talasemi major, lösemi) 9 hastanın değişik zamanlarda alınan kan örneklerinde alkali denatürasyon yöntemi ile saptanan HbF değerleri karşılaştırılarak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmektedir. Bu hasta grubunda % HbF değerleri (0.21-44.7) arasında değişmektedir.

n=9	1. Çalışma HbF(%)	2. Çalışma HbF(%)
$x \pm SD$	5.9 \pm 14.6	5.7 \pm 14.0

Ortalamalar arasındaki fark 0.20 ve p değeri 0.98 olarak bulunmuştur.

4.5. Fetal hemoglobinin ölçüm stabilitesinin saptanması

HbF'nin ölçümü sırasında stabilitesinde bir değişiklik olup olmadığını anlamak için 5 ayrı olguya ait kan örnekleri Bölüm 3.2.5'te bahsedildiği şekilde hazırlanıp, 0-60 dakika arası, her 15 dakikada bir absorbans değerleri okunarak, alınan verilerden hesaplanan HbF değerleri ile elde edilen grafik Şekil 4.1'de görülmektedir.



Şekil 4.1: Fetal hemoglobinin ölçüm stabilitesi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Gaziantep, talasemi ve hemoglobinopatinin en sık görüldüğü Akdeniz Bölgesine komşu bir il olduğundan bu yörede yaşayan kişilerin de taşıdığı bir risk olduğu düşünülmüştür. Daha önce bu konuda ilimizde herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Talasemi tarama çalışmalarında olgular öncelikle α ve β talasemi taşıyıcılarında ortak özellik olan mikrositoz ve hipokromi yönünden araştırılmaktadır. Otomatik kan sayım cihazı ile hipokromik ve mikrositik hücrelerin varlığının belirlenmesi kişinin talasemi taşıyıcısı olabileceğinin göstergesi olup, ek testlere gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle hipokromik ve mikrositik kırmızı hücre varlığında HbA₂ ve HbF konsantrasyonları belirlenmelidir.

Bu düşüncelerden hareketle çalışmanın I. aşamasında Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesine anemi şikayetleri ile başvuran 6 ay-2 yaş grubundan 29, 2-15 yaş grubundan 30, yetişkin 42 kadın, 18 erkek hastadan alınan kan örneklerinden öncelikle otomatik tam kan sayım cihazı ile hematolojik veriler elde edilip, bunların Hb, MCV, MCHC, MCH değerleri temel alınarak, anemili olduğu kesinleştirildikten sonra alkali denatürasyon yöntemi ile HbF değerleri tespit edilmiştir. Ayrıca 6 ay-2 yaş grubu için oluşturulan 8, 2-15 yaş grubundan 18 ve yetişkin kadın-erkek hasta grubu için 12 sağlıklı bireyden tam kan parametreleri ve HbF değerleri tespit edilerek hasta ve kontrol grupları istatistiksel olarak değerlendirilip, sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Tablo 4.1’de farklı yaş gruplarındaki yaş, RBC ve indisleri ile Hb ve Hct değerleri ve deneysel saptanan HbF’nin minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri verilmektedir.

1. Referans değerlerle karşılaştırıldığında, 6 ay-2 yaş grubunda RBC, Hb, Hct, MCH ve MCHC değerlerinin düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca bu grup için oluşturulmak istenen kontrol grubunda hemogloblin değerleri normal sınırların içine giren olgularda bile MCV’nin normal değerlerinin altında olduğu görülmüştür. Kontrol grubunda MCV 73.0 ± 3.9 iken hasta grubunda 66.5 ± 8.4 olarak saptanmıştır. Bu durum toplumun sosyoekonomik yapısı ve beslenme alışkanlıkları ile ilişkili olarak yorumlanmış ve demir eksikliği anemisi varlığının araştırılması gerektiği düşünülmüştür. Diğer kontrol gruplarında böyle bir değişiklik gözlenmemiştir. Büyüme çağındaki çocukların bu durumdan daha fazla etkilendiği sonucuna varılmıştır.

Grubun ortalama fetal hemogloblin değeri 1.21 ± 0.80 olarak bulunmuştur. Bu değer ise literatür ile uyumludur. Bu gruba ait kontrol grupları için bulunan ortalama fetal hemogloblin değerleri 1.57 ± 0.72 olup, literatürde belirlenen normal sınırlar arasında yer almaktadır (Tietz ve Logan 1986, Tuzcu ve Tuzcu,1992).

2. 2-15 yaş arasındaki anemili hastalar seçilerek bunların tam kan parametreleri ve fetal hemogloblin değerleri saptanmıştır. Elde edilen verilere göre ortalama HbF 0.89 ± 0.49 , kontrol grubu için bu değer 1.12 ± 0.65 olarak bulunmuştur. Her iki grup için alınan sonuçlar daha önce belirlenen değerlerle uyumlu bulunmuştur (Tietz ve Logan 1986, Tuzcu ve Tuzcu 1992). Fakat anemili grubun ortalama Hb, Hct, MCV, MCH,

MCHC değerleri normal sınırlarının altında bulunmuştur. Hb, MCH ve MCV'nin düşmesi Fe eksikliği anemisinde görüldüğünden hastaların bu yönden araştırılması gerektiği düşünülmüştür.

3. Bu grup içerisinde yer alan 42 anemili yetişkin kadın hastanın tam kan parametreleri incelendiğinde eritrosit değerlerinin normal değerlere yakın olduğu gözlenirken, Hb, Hct, MCH ve MCHC değerlerinin normalden düşük olduğu görülmüştür. Bu grup için bulunan ortalama fetal hemoglobin değeri 0.62 ± 0.40 'dir. Yetişkin kadın ve erkek için fetal hemoglobinle ilgili olarak hem referans değerleri hem cinsiyetle ilgili bir fark bugüne kadar tespit edilmediği için yetişkin kadın ve erkek hasta grubu için tek kontrol grubu oluşturulmuştur (Adekile ve Huisman,1993). Buna göre elde edilen ortalama HbF değeri ise 0.75 ± 0.47 'dir. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi hasta ve kontrol grubunda bulunan değerler referans değerlerinin içinde yer aldığından literatürle uyumlu olarak değerlendirilmiştir (Tietz ve Logan 1986, Tuzcu ve Tuzcu 1992).

4. Yetişkin 18 anemili erkek hastada yapılan inceleme sonucu, Hb, Hct, MCV, MCH ve MCHC'nin referans değerlerinden düşük olduğu, ortalama HbF değerinin hasta grubunda 0.69 ± 0.49 , kontrol grubunda ise 0.75 ± 0.47 olduğu bulunmuştur. Bu grupta da hemoglobin F yönünden herhangi bir patolojik sonuç elde edilmemiştir. Bulunan değerler yetişkinde olması gerekli değerlerle uyumludur (Tietz ve Logan 1986, Tuzcu ve Tuzcu 1992).

5. 2.5-70.0 yaş grubunda anemili hastalar alınarak, istatistiksel değerlendirme yapılmıştır. 6 ay-2 yaş grubu HbF ve tam kan parametreleri açısından çok değişken olduğundan çıkarılıp, diğer

grupların değerlendirilmesi yapıldığında ortalama HbF 0.72 ± 0.46 bulunmuştur. Bu diğer gruplarla uyumludur. Bu grup içinde yer alan 2-15 yaşı grubunda RBC, Hb, Hct, MCV, MCH ve MCHC değerleri yetişkinden farklı aralıklarda olduğundan grup değerlendirmesi yapılmasında fayda görölmüş ve bu farklılık istatistiksel olarakta gösterilmiştir.

6. MCV<78 fL olan yetişkin 43 kadın, 16 erkek ve 3-15 yaşı arası 26 çocuk olmak üzere toplam 85 kişiden bir grup oluşturularak, elde edilen verilerden istatistiksel değerlendirme yapılmıştır. Bu anemili grup içinde Hb, Hct, MCH ve MCHC referans değerlerin altında iken, ortalama HbF'in 0.74 ± 0.47 olup, literatürle uyumlu olduğu görölmüştür (Tietz ve Logan 1986, Tuzcu ve Tuzcu 1992).

İstatistiksel değerlendirmenin II. aşamasında her grup için HbF değerleri ile yaşı, RBC indisleri, Hb ve Hct arasındaki korelasyon araştırılmıştır. Alınan sonuçlar aşağıda görölmektedir.

1. Tablo 4.2'de göröldüğü gibi yetişkin anemili kadın hastalarda MCV ile HbF arasında anlamlı bir korelasyon ($r : -0.348 ; p : 0.024$) olduğu bulunmuştur. Buna göre MCV değeri azaldıkça HbF değeri artmaktadır. Bu durumda MCV'si düşük yetişkin kadın hastaların HbF değerlerinin saptanması gerektiğini düşündürmektedir.

2. Tablo 4.3'te göröldüğü gibi yetişkin anemili erkeklerde ise HbF'in yukarıda bahsedilen parametrelerle hiçbir anlamlı korelasyonunun olmadığı görölmektedir. Erkeklerde kadınlardan farklı olarak doğum, süt verme ve menstrasyon olmaması özellikle Fe eksikliği anemisinin daha

az görülmesine neden olmaktadır. Toplumumuzda doğumun fazla olması kadınlarda aneminin daha fazla olmasını açıklamaktadır. Bu grup için fazla sayıda hasta bulunamaması da bir ölçüde bu nedene bağlanmıştır.

3. Tablo 4.4.'te görüldüğü gibi yetişkin erkek ve kadın kontrol grubunda da HbF'nin yaş, RBC ve indisleri, Hb, Hct arasındaki korelasyonda anlamlı bir sonuç bulunamamıştır.

4. Tablo 4.5.'te görüldüğü gibi $MCV < 78$ fL olan hastalarda ise yaş ve MCV ile HbF arasında anlamlı korelasyon olduğu bulunmuştur. Korelasyon değerleri sırasıyla, ($r : -0.353 ; p : 0.001$) ve ($r : -0.256 ; p : 0.018$) olarak bulunmuştur. Bunlar ise beklenen korelasyon değerleridir. Çünkü bu grup içinde tümü anemili olmak üzere 3-15 yaş arası 26 çocuk, yetişkin 16 erkek ve 43 kadın bulunmaktadır. MCV değeri yaş ile negatif yönlü bir ilişki içindedir. Ayrıca grubun çoğunluğunu anemili kadınlar oluşturmaktadır. Anemili kadınlarda da MCV ve HbF arasında daha önce bahsedildiği gibi anlamlı bir korelasyon olduğu görülmüştür. Bu nedenle grubu oluşturan hastalara ait beklenen korelasyon saptanmıştır.

5. Tablo 4.6.'da görüldüğü gibi 2-15 yaş grubundaki hastalarda da kadın grubuna benzer şekilde MCV ve HbF arasında anlamlı bir korelasyon ($r-0.356 ; p 0.053$) saptanmıştır. İlişki negatif yönlü olup, MCV azaldığı zaman HbF artmakta veya tersi gözlenmektedir. Bu grup için HbF ortalamalarına bakıldığında 0.87 ± 0.49 olduğu bulunmuştur. Bunların ortalama MCV değerleri ise 71.9 ± 10.1 'dir. Bu grubun MCV değeri 78-82 fL olması beklenirken yaklaşık 60-80 fL arasında olduğu görülmektedir. Bu nedenle de yukarıda bulunan korelasyon ile birlikte

değerlendirildiğinde, azalan MCV değerine karşılık yetişkin ortalama HbF değerinden daha yüksek bir değer elde edilmesi beklenen bir sonuçtur.

6- Tablo 4.7’de görüldüğü gibi 2-15 yaş kontrol grubunda ise fetal hemoglobinin yaşla ($r : - 0.664 ; p : 0.003$), MCV ($r : - 0.650 ; p : 0.003$) ve MCHC ile ($r : 0.591 ; p : 0.001$) anlamlı korelasyonlarının olduğu görülmüştür. 2-15 yaş hasta ve kontrol grubunun her ikisinde de MCV ve HbF arasında negatif yönlü anlamlı korelasyon olduğu görülmüştür.

7- Tablo 4.8’de görüldüğü gibi 6 ay-2 yaş grubu diğer gruplardan farklı bir özellik taşımaktadır. Bu yaş grubunda kan parametreleri çok sayıda değişkenden etkilenmekte ve yetişkinden farklı değerler almaktadır. HbF ile olan korelasyona bakıldığında beklenildiği gibi diğer gruplardan değişik korelasyonların olduğu görülmüştür. HbF’in MCV ile ($r : 0.497 ; p : 0.006$), MCH ile ($r : 0.530 ; p : 0.003$) korelasyonlarının olduğu görülmüştür. Bu grupta diğer gruplardan farklı olarak MCV ile HbF arasında pozitif yönlü bir korelasyon olduğu bulunmuştur. MCV değeri azaldıkça HbF değerinde bir azalma veya tersi görülmektedir. Bu sonuç Tablo 2.4 incelendiğinde ise fetal hemoglobin değerinin ilk altı ayda hızla daha sonra yavaş bir azalma ile 2 yaşına kadar yetişkin değerine ulaştığı görülmektedir. HbF’deki bu azalmanın MCV’de de olduğu görülmektedir. Bu nedenle bulunan korelasyon literatürle uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

8- Tablo 4.9’da görüldüğü gibi 6 ay-2 yaş kontrol grubuna bakıldığında ise fetal hemoglobinin hemoglobinle negatif yönlü bir korelasyonu ($r : -0.768 ; p : 0.026$) bulunmuştur. Yani hemoglobin arttıkça fetal hemoglobin değeri azalmakta veya tersi görülmektedir. Tablo 2.2’de

görüldüğü gibi bu yaş grubunda Hb değeri yetişkinden düşüktür. Büyüme ile artan hemoglobin değeri ile birlikte fetal hemoglobin değeri azalmaktadır. Bu ise büyüme çağındaki sağlıklı çocuklarda normal hemoglobin dönüşüm mekanizmasıdır.

9- Tablo 4.10'da görüldüğü gibi 2.5-70.0 yaş grubu ile ilgili olarak HbF, RBC ve indisleri, Hb, Hct arasındaki korelasyon sonuçları, gruplar tek tek incelendiğinde bulunan sonuçlarla uyumlu bulunmuştur. Bunlar HbF ile yaş ($r : -0.324 ; p : 0.002$), MCV ($r : -0.336 ; p : 0.001$) ve MCH ($r : -0.234 ; p : 0.026$) değerleri arasındaki korelasyonlar olup, diğer sonuçlarla uyumlu bulunmuştur.

İstatistiksel değerlendirmenin III. aşamasında yaş, eritrosit ve indisleri ile Hb ve Hct değerlerinin birinin diğeri ile arasında anlamlı bulunan korelasyon değerleri, her grup için ayrı ayrı incelenmiştir. Saptanan değerlerde her grupta ortak olarak anlamlı bulunan sonuçlar olduğu gibi farklı korelasyonların varlığı da ortaya çıkmıştır. Sonuçlar aşağıda verilmektedir.

1. Tablo 4.11'de görüldüğü gibi yetişkin anemili kadın hastalarda yaş ile MCHC arasında ters yönlü bir korelasyon ($r : - 0.340 ; p : 0.027$), RBC ile Hb, Hct arasında pozitif bir korelasyon varken, bu korelasyonun Hb ile daha kuvvetli olduğu görülmektedir. Ayrıca RBC ile MCV ve MCH arasında da negatif bir ilişki olduğu bulunmuştur. Her ikisinde de kuvvetli bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Yine bu grup içinde Hb ile Hct, MCH ve MCHC arasında kuvvetli bir korelasyonun varlığı anlaşılmıştır. MCV ile MCH ve MCHC arasında da pozitif yönlü MCH ile çok kuvvetli

olmak üzere korelasyon saptanmıştır . MCH ile de MCHC arasında çok anlamlı bir korelasyon olduğu ortaya çıkmıştır.

2. Tablo 4.12’de görüldüğü gibi yetişkin anemili erkeklerde RBC ile Hb ve Hct arasında kuvvetli pozitif korelasyon saptanmıştır. Hb ile Hct arasında kuvvetli Hb ile MCHC arasında ise daha zayıf bir korelasyon olduğu bulunmuştur. MCV ile MCH arasında çok anlamlı pozitif bir korelasyon varken MCV ile MCHC arasında biraz daha zayıf bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Bu grup içinde de MCH ile MCHC arasında oldukça anlamlı pozitif yönlü bir korelasyon varlığı ortaya çıkmıştır.

3. Tablo 4.13’te görüldüğü gibi yetişkin kadın ve erkek kontrol grubunda ise RBC korelasyonu ile ilgili olarak bulunan değerlerin anemili kadın hasta değerlerine benzediği ancak Hb ve Hct, MCV ve MCH arasındaki korelasyonların daha kuvvetli olduğu görülmüştür. Bu ise beklenen bir sonuçtur. Çünkü normal bireylerde olması gereken korelasyonlar gözlenmiştir. Hb ile Hct arasında da beklendiği biçimde pozitif çok anlamlı bir korelasyon bulunurken, MCV ile MCH ve MCH ile MCHC arasında da kuvvetli pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır.

4. Tablo 4.14’te görüldüğü gibi $MCV < 78$ fL olan hastalarda ise birçok parametrenin birbirleri ile korelasyonu olduğu görülmüştür. Diğer gruplardan farklı olarak bu grupta yaş ile Hct arasında anlamlı bir pozitif ilişki olduğu bulunmuştur. Anemili kadın grubuna benzer biçimde yaş ile MCHC arasında negatif yönlü kuvvetli bir ilişki saptanmıştır. RBC ile ilgili korelasyon değerlerine baktığımızda ise bu grubun kapsadığı yaş gruplarından en fazla erkek yaş grubuna benzer şekilde RBC, Hb ve

RBC, Hct arasında ilişki bulunurken, RBC ile MCV arasında bu grupta yer alan diğer korelasyonlardan daha zayıf negatif bir ilişki olduğu anlaşılmıştır. Yine bu grubun diğer grup korelasyonlarından farklı olarak RBC ile MCHC arasında da pozitif zayıf bir korelasyonun olduğu bulunmuştur. Tüm gruplarda olduğu gibi bu grupta da farklı bir korelasyon vardır. Diğer gruplardan farklı olarak MCV ile Hb arasında kuvvetli bir pozitif korelasyon varken, MCV'nin MCH ve MCHC ile de korelasyonu saptanmıştır. Bu grupta diğer gruplardan farklı olarak bulunan korelasyonlardan bir başkası MCH ile Hb ve Hct ve MCHC ile Hb ve Hct arasında olup çok anlamlı sonuçlar alınmıştır. Ayrıca MCHC ile MCH arasında da pozitif kuvvetli bir ilişki bulunmuştur.

5. Tablo 4.15'te görüldüğü gibi 2-15 yaş grubundaki korelasyon değerleri incelendiğinde anemili kadınlara ait korelasyon parametreleri ile benzerlik gösterdiği dikkati çekmiştir. Fakat korelasyonun değerleri farklı bulunmuştur. Buna göre RBC ile Hb ve Hct arasında kuvvetli pozitif yönlü bir korelasyon olduğu ortaya çıkmıştır. Hb ile Hct, MCH ve MCHC arasında ayrıca MCV ile MCH ve MCHC arasında da çok anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur.

6. Tablo 4.16'da görüldüğü gibi 2-15 yaş kontrol grubunda ise bulunan korelasyonların yaş ile MCV ve MCHC, RBC ile Hb ile Hct, Hb ile Hct ve MCV ile MCH ve MCHC arasında olduğu bulunmuştur. Yaş ile MCV arasında beklenene uygun pozitif yönlü MCHC ile negatif yönlü bir korelasyon saptanmıştır. Bu yaş grubunda RBC ile Hb ve Hct arasında çok kuvvetli pozitif, MCV ile MCH arasında pozitif korelasyon varken MCHC ile negatif yönlü bir korelasyon vardır. Tablo 2.2'ye bakıldığında bu korelasyonların bu yaş grubu için uygun olduğu görülmektedir.

7. Tablo 4.17’de görüldüğü gibi 6 ay-2 yaş grubuna ait sonuçlara bakıldığında ise bulunan korelasyon sonuçları diğer gruplarla benzerlik gösterirken bazı farklılıklara da rastlanmıştır. RBC ile Hb ve Hct arasında pozitif yönlü bir korelasyon varken, MCV, MCH ve MCHC arasında negatif yönlü bir ilişki saptanmıştır. Hb ile Hct, MCV ile MCH ve MCHC ve MCH ile MCHC arasında pozitif yönlü korelasyon bulunmuştur. Grubun referans değerleri incelendiği zaman bu korelasyonların uygun olduğu görülmektedir.

8. Tablo 4.18’de görüldüğü gibi 6 ay-2 yaş kontrol grubunda ise yaş ile MCV ve MCH, RBC ile MCV arasında pozitif, Hb ile Hct ve MCHC, MCV ile MCH arasında pozitif çok anlamlı korelasyon olduğu görülmüştür. Tablo 2.2’ye bakıldığında bu korelasyonların bu yaş grubu için uygun olduğu görülmektedir.

9. Tablo 4.19’da görüldüğü gibi 2.5-70.0 yaş anemili hasta grubunda yaş, RBC ve indisleri, Hb, Hct’nin birbirleri ile olan korelasyon sonuçlarına göre, yaşla MCH arasında anlamlı negatif bir korelasyon varken, RBC ile Hb ve Hct arasında çok anlamlı pozitif, RBC ile MCV ve MCH arasında da çok anlamlı fakat negatif bir korelasyon olduğu görülmüştür. Hb ile Hct, MCH ve MCHC arasında çok anlamlı MCV arasında daha az anlamlı sonuç bulunmuştur. Hct ile MCHC arasında pozitif anlamlı, MCV ile MCH, MCHC ve MCH ile MCHC arasında da çok anlamlı korelasyon olduğu görülmüştür.

Görüldüğü gibi 6 ay-2 yaş grubundaki anemili hastalar çıkarıldığında bulunan korelasyon sonuçları gruplar ayrı ayrı değerlendirildiğinde elde

edilen sonuçlardan daha değişik bulunmuştur. Bu hasta sayısı ile ilgili olabileceği gibi her grubun kendine özgü değişen parametrelerinin tüm grupta değerlendirilmesinin ile bazı noktaların değerlendirilememesine neden olabileceğini düşündürmektedir.

Daha önceden kliniklerde kesin tanı konularak laboratuvara başvuran bazı hastaların HbF değerleri saptanmıştır. Talasemi major tanısı ile gelen 4 hastanın alkali denatürasyon ile saptanan % HbF değerleri aşağıda verilmektedir.

<u>Hasta sayısı</u>	<u>% HbF</u>
1. Hasta	41.2
2. Hasta	44.8
3. Hasta	43.1
4. Hasta	5.1

Buna göre 1,2,3 nolu hastalara ait bulunan sonuçlar literatürle uyumlu iken 4. hastanın HbF değeri talasemi major tanısı ile uyumlu değildir. Bu hasta araştırıldığında ise alınan kan örneğinin kan transfüzyonundan bir hafta sonra alındığı saptanmıştır. bu nedenle beklenenden daha düşük bir sonuç bulunmuştur (Gringras et al.,1994, Bachir ve Galacteros 1994).

ALL tanısı konulmuş iki hastadan alınan kan örneğinden elde edilen HbF değerleri sırasıyla % 3.8 ve % 5.6 olarak bulunmuştur. Bazı lösemilerde HbF'nin artması beklendiğinden alınan sonuçlar literatüre uygunluk göstermektedir (Kiesselbach ve Wagner, 1972).

Ayrıca daha önce hastaneye anemi şikayeti ile gelerek normal HbF değeri elde edilen bir hastadan daha sonra yapılan bir çalışmada HbF değeri 4.7 olarak bulunmuştur. Son çalışma sırasında gebe olduğu tespit edilen hastanın bu bulunan sonucu da literatürle uyumludur. Bazı gebelerde transplental hemorajinin maternal HbF değerini artırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmektedir (Virgilio ve Simon 1977, James et al., 1983, Sebring ve Polesky 1990).

Anemi şikayeti ile hastanemize gelen 24 hastanın selüloz asetat elektroforezi ve HbF değerleri birlikte çalışılarak elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde sonuçlar arasında anlamlı bir farklılık olduğu saptanmıştır. Bu alkali denatürasyonun kantitatif iyi bir yöntem olmasını açıklamaktadır. Ayrıca HbF tayin edilmesinde bazı araştırmacılar selüloz asetat elektroforezini HbF ve HbA'nın aynı yere göçü dolayısı ile önermemektedirler (Bauer, 1982).

Aynı hastalardan farklı zamanlarda alınan değişik kan örneklerinden ikişer kez HbF değerleri saptanarak sonuçlar arasında istatistiksel anlamlılık olup olmadığı araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre p 0.98 bulunmuştur. Buna göre anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu ise fetal hemoglobinin yetişkinde zamanla yeni gelişen bir patoloji yoksa, sabit olduğunu ve yöntemin çok büyük saptamalara neden olmadığını göstermektedir.

Fetal hemoglobinin ölçüm stabilitesi, 5 normal bireyden HbF çalışılarak saptanmaya çalışılmıştır. Şekilde 4.1'de görüldüğü gibi çok önemli bir değişiklik görülmemektedir. Buna göre HbF'nin stabilitesinin bir saat

içerisinde bozulmadığı ifade edilebilir. Fakat her spektroskopik çalışmada ideal okuma zamanının ilk 15 dakika olduğu da unutulmamalıdır.



SONUÇLAR

1. 6 ay-2 yaş grubunda anemili hastalara ait ortalama % HbF değeri 1.21 ± 0.80 , aynı gruba ait kontrol % HbF değeri 1.57 ± 0.72 olarak bulunmuştur.
2. 2 -15 yaş grubunda anemili hastalara ait ortalama % HbF değeri 0.87 ± 0.49 iken kontrol grubunda ortalama % HbF değeri 1.12 ± 0.65 olarak bulunmuştur.
3. Anemili kadınlarda ortalama % HbF değeri 0.62 ± 0.40 , anemili erkek hastalarda ortalama % HbF 0.69 ± 0.49 , bunların kontrol gruplarında ise ortalama % HbF 0.75 ± 0.47 olarak saptanmıştır.
4. MCV <78 fL olan hastalarda ortalama % HbF değeri 0.74 ± 0.47 bulunmuştur.
5. Değişik yaş grubunda 119 anemili hastada yapılan alkali denatürasyon yöntemi ile HbF tayini sonucu, HbF değerlerinde beklenen değerlerin üzerinde artma olmadığı görülmüştür. Bu anemilerin talasemi veya hemoglobinopatilere bağlı olmadığını daha çok hipokromi ve mikrositoz sebebinin Fe eksikliği anemisine bağlı olabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle bu yörede yaşayanların anemi sebebinin Çukurova Bölgesi gibi talasemi ve hemoglobinopati yönünden yaygın bir dağılım göstermediği düşüncesini vermiştir. Fakat ilimiz için istatistiksel anlamda % HbF insidansı vermek için yeterli veri toplanamadığı için sayısal bir yorum yapılamamaktadır.
6. Tüm kontrol gruplarında bulunan HbF değerleri hasta grupları ile karşılaştırıldığı zaman hafif yükselmiş olarak görülmektedir. Bu durum ise kontrol gruplarındaki hasta sayısının daha az olmasının istatistikte önemli olması, çalışmanın manuel olmasından kaynaklanan kişisel

hatalardan ve anemili gruplarda bazen çok düşük olarak saptanan HbF değerinin ortalamayı azaltıcı yöndeki etkisine dayandırılmaktadır.

7. Yaş, RBC ve indisleri ile Hb'in birbirleri ile olan korelasyon sonuçları her yaş grubu için değiştigi gibi, anemili hasta ve kontrol gruplarında da değişmektedir.

8. Selüloz asetat elektroforezi yerine alkali denatürasyon yöntemi kullanılarak fetal hemoglobün değeri daha doğru, kolay ve ucuz olarak saptanabilmektedir.

9. Alkali denatürasyon ile fetal hemoglobün ölçümü alet gerektirmemesi, ucuz kimyasallar ile çabuk sonuç vermesi ve tekrarlanabilirliği nedeni ile olanakları kısıtlı laboratuvarlar için önerilebilecek bir yöntemdir.

6. KAYNAKLAR

1. **PERUTZ, MF., LEHMANN H.:** Molecular Pathology of Human Haemoglobin. Nature, 219 : 902-905, 1968.
2. **HUISMAN, THJ., JONIX, JHP.:** The Hemoglobinopathies : Techniques of Identification (Clinical and Biochemical Analysis). New York, Marcel Dekker, 1977, 1-5; 124-200.
3. **THOMPSON, M., Mc INNES, RR., WILLARD, HF.:** The Hemoglobinopathies Models of Molecular Disease in Genetics in Medicine, Philadelphia, Saunders, 1991, 247-270.
4. **HUISMAN, THJ.:** The Structure and Function of Normal and Abnormal Hemoglobins. Bailieres Clin. Haematol. 6:1-30, 1993.
5. **YÜREĞİR, G., DONMA, O., DİKMEN, N., İSBİR, T., ÇINAR, M.:** Population Studies of Hemoglobin S and Other Variants in Çukurova. The Southern Part of Turkey. Acta Haematol. 50: 757-765, 1987.
6. **YÜREĞİR, GT., KUTLAR, F., KUTLAR, A., AKSOY, M., HUISMAN, THJ.:** Incidence and Types of β -Thalassemia mutations in South Turkey. Ç.Ü. Tıp Fak. Der. 1:111-115, 1989a.
7. **YÜREĞİR, G., PAULINE, A.:** A Survey of High A₂ β -Thalassemia Hemoglobin Variants, G6PD Deficiency and Iron Deficiency Anemia in Karataş, Çukurova, Southern Turkey. Doğa, 3-13, 1989b.
8. **YÜREĞİR, GT., AKSOY, K., DİKMEN, N.:** Alfa-Talasemi Taramasında Tek Ozmotik Frajlitenin yeri. Doğa Tr J Med Sci. 14:374-380, 1989.
9. **HUISMAN, THJ.:** Frequency of Common β -Thalassemia in Four Mediterranean Countries : An Editorial Commentary. Hemoglobin, 14:35-39, 1990.

- 10. BEUTLER, E.:** Erythrocyte Disorders-Anemias Related to Abnormal Hemoglobin In : The Sickle Cell Diseases and Related Disorders in Hematology. 3th Ed., Williams, WJ., Beutler, E., Erslev, AJ., Lichtman, MA (Eds)., Singapore, McGraw-Hill, 1986, 583-608.
- 11. LUKENS, JN., LEE, GR.:** The Abnormal Hemoglobins. In : General Principles in Wintrobe's Clinical Hematology, Lee, GR., Bithell, CT., Foerster, J., Athens, JW., Lukens, JN (Eds)., Pennsylvania, Lea and Febiger, 1993, 1023-1053.
- 12. ARCASOY, A.:** Türkiye'de Talasemi Taşıyıcı Sıklığı ve Anormal Hemoglobinler. Ankara Talasemi Derneği, 2, 1994.
- 13. ALTAY, C., YETKİN, S., ÖZSOYLU, S., KUTLAR, A.:** HbS and some other Hemoglobinopathies in Eti-Turks. Hum Hered. 28 (1): 56-61, 1978.
- 14. SINGER, K., CHERNOFF, AJ., SINGER, I. :** Studies on Abnormal Hemoglobins. Their Demonstration in Sickle Cell Anemia and Other Hematologic Disorders by Means of Alkali Denaturation. Blood, 6 : 413, 419, 1951.
- 15. BETKE, K., MARTI, HL., SCHLICK, L.:** Estimation of Small Percentages of Foetal Haemoglobin. Nature, 184 : 1877, 1959.
- 16. PEMBREY, ME., McWADE, P. and WEATHERALL, DJ.:** Reliable Routine Estimation of Fetal Hemoglobin by Alkali Denaturation. J-Clin Pathol. 25 : 738-740, 1972.
- 19. ORKIN, SH.:** Prenatal Diagnosis of Hemoglobin Disorders by DNA Analysis. Blood, 63(2) : 249-253, 1984.
- 18. COPPER, DN., SCHMIDTKE, J.:** Diagnosis of Genetic Disease using Recombinant DNA . Hum Genet. 87 : 519-560, 1991.
- 19. FAIRBANKS, VF., KLEE, GG.:** Biochemical Aspects of Hematology. In : Text book of Clinical Chemistry, Tietz, NW (Ed)., Philadelphia, Saunders, 1986, 1514-1522, 1551-1552.

- 20. NELSON, DA., MORRIS, MW.:** Basic Methodology. In : Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, Henry, JB (Ed). 17 th Ed., Philadelphia, Saunders, 1984, 632-634.
- 21. BAUER, JD.:** Clinical Laboratory Methods, London, Mosby, 1982, 38-39, 51-54, 66-68.
- 22. MENTEŞ, G. :** Proteinler : Myoglobin ve Hemoglobin. In: Harper'in Biyokimyası, Rodwell, VW (Ed). Barış Kitapevi, İstanbul, 1993, 70.
- 23. TELEN, MJ.:** The Mature Erythrocyte. In: Wintrobe's Clinical Hematology, Lee, GR., Bithell, C.T., Foerster, J., Athens, JW., Lukens, JN (Eds)., Pennsylvania, Lea and Febiger, 1993, 101-133.
- 24. KARLSSON, S., NIENHIUS, AW.:** Developmental Regulation of Human Globin Genes. Ann Rev Biochem. 54:1071-1078, 1985.
- 25. NIENHUIS, AW., BENZ, EJ.:** Regulation of Hemoglobin Synthesis During the Developmental of the Red Cell . New Eng J Med. 297: 1318-1328, 1977a.
- 26. DIESSEROTH, A., NIENHUIS, A., TURNER, P.:** Localization of the Human α -Globin Structural Gene to Chromosome 16 in Somatic Cell Hybrids by Molecular Hybridization Assay. Cell, 12: 205-218, 1977.
- 27. DIESSEROTH, A., NIENHUIS, A., LAWRENCE, J., GILES, R., TURNER, P., RUDDLE, FH.:** Chromosomal Localization of the Human β Gene to Chromosome 11 in Somatic Cell Hybrids. Proc Natl Acad Sci. 75: 1456-1480, 1978.
- 28. WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, EL.:** Principles of Biochemistry. 5 th Ed., New York, Mc Graw-Hill, 1973, 173.
- 29. TIETZ, NW ., LOGAN, NM.:** Appendix. In : Textbook of Clinical Chemistry, Tietz, NW (Ed)., Philadelphia, Saunders, 1986, 1829-1830.
- 30. NIENHUIS, AW., BENZ, EJ.:** Regulation of Hemoglobin Synthesis During the Developmental of the Red Cell . New Eng J Med. 297 : 1430-1436, 1977b.

31. TUZCU, M., TUZCU, S.: Teşhiste Laboratuvar Testleri. Yüce Yayınları, İstanbul, 1992, 6.
32. DANIEL, N., MOHLER, A., OSKAR, A., THORUP, JR.: Fundamentals of Clinical Hematology. 5th Ed., 1987, 270-271.
33. KUTLAR, A., HUISMAN, THJ. : Detection of Hemoglobinopathies Techniques in Diagnostic. Hum Biochem Genet. 519-560, 1991.
34. LECHNER, K., NIESSNER, H. AND THALER, E.: Coagulation Abnormalities in Liver Disease. Semin Throm Hemostas. 4 : 40-56, 1977.
35. ROBERTS, HR. AND CEDERBAUM, AL: The Liver on Coagulation: Physiology and Pathology. Gastroenterology. 63 : 297, 1972.
36. VORGILIO, LA., SIMON, NV.: Measurement of Fetal Cells in the Maternal Circulation. Obstet Gynecol. 50(3) : 364-6, 1977.
37. JAMES, RF., SZUMSKI, R., GILLETTE, PG., SHUSTER, J., GOLD, P.: Maternal Plasma HbF Levels in Pregnancy. Oncodev Biol Med. 4(4) : 239-244, 1983.
38. COOPER, MA., HOUGLAND, HC.: Adenyl Cyclase Hormon Responses of Certain Human Endocrine Tumors. Mayo Clin Proc. 47 : 402, 1972.
39. BERTLES, JF.: Human Fetal Hemoglobin : Significance in Disease. Ann N Y Acad Sci. 241 : 638, 1974.
40. KIESSELBACH, TH., WAGNER, RH.: Demonstration of factor XIII in Human Megakaryocytes by a Flourescent Antibody Tecnique. Ann NY Acad Sci. 20 : 318-28, 1972.
41. WILSON, MG., SCHOEDER, WA., GRAVES, DA.: Postnatal Change of Hemoglobins F and A₂ in Infants with Down's Syndrome (G Trisomy). Pediatrics. 42: 349, 1968.
42. BERKARDA, B., ULUTİN, O.: Kan Hastalıkları. Kazım Terzioğlu Matematik Araştırma Ens. Baskı Atölyesi, İstanbul. 1977, 64-72.

43. **TANGÜN, Y.:** Kan Hastalıkları. Cilt 2, Sermet Matbaa, İstanbul, 1974, 53-54.
44. **DUPRE, AR., MORRISON, JC., MARTIN, JN., FLOYD, RC., BLAKE, PG.:** Clinical Application of the Kleihauer-Betke Test. J Rep Med. 38(8):621-24, 1993.
45. **KLEIHAUER, E., BRAUN, H., BETKE, K.:** Demonstration of Fetal Hemoglobin in Erythrocytes of a Blood Smear. Klin Wochenschr. 35:637, 1957.
46. **BERNSTEIN, SC., BOWMAN, JE., SWIFT, HH.:** Modification of Acid Elution Technique for Quantitation of Fetal Hemoglobin in Individual Hemoglobin, 1 (4):313-31, 1977.
47. **CHANARIN, L.:** Laboratory Haematology, Edinburg, Churchill Livingstone, 1989, 37.
48. **LEARY, AG., PORTER, PN., OGAWA, M.:** Quantitation of Hemoglobin Biosynthesis with Agarose Isoelectric Focusing. Am J Heamatol. 14 (1): 67-73, 1983.
49. **TIFFANY, TO.:** Fluorometry, Nephelometry and Turbidimetry. In: Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Burtis, CA., Ashwood, ER (Eds)., 2 th Ed. Saunders, Philadelphia, 1994, 203.
50. **ULFELDER, KJ.:** Capillary Electrophoresis of dsDNA Fragments with UV and Laser - Induced Fluorescence Detection. Application Information. Beckman. 1-4, 1993.
51. **KUTLAR, A., KUTLAR, F., WILSON, JB., HEADLEE, MG., HUISMAN, THJ.:** Quantitation of Hemoglobin Components by High-Performance Cation-Exchange Liquid Chromatography: Its Use in Diagnosis and in the Assessment of Cellular Distribution of Hemoglobin Variants. Am J Hem. 17:39-53, 1984.
52. **KUTLAR, A., KUTLAR, F., GU, L., MAYSON, SM., HUISMAN, THJ.:** Fetal Hemoglobin in Normal Adults and β -Thalassemia Heterozygotes. Hum Genet. 85 : 106-110, 1990.

53. **PAPADEA, C., CATE, JC.:** Identification and Quantification of Hemoglobins A, F, S and C by Automated Chromatography. *Clin Chem.* 42(1) : 57-63, 1996.
54. **IP, CY., ASAKURA, T.:** Separation of Asymmetrical Hybrid Containing Hemoglobin F by Anaerobic Anion-Exchange HPLC. *Anal Biochem.* 156 : 348-353, 1986.
55. **TAN, GB., AW, TC., DUNSTON, RA., LEE, SH.:** Evaluation of High-Performance Liquid Chromatography for Routine Estimation of Haemoglobins A₂ and F. *J Clin Pathol.* 43:852-856, 1993.
56. **ABRAHAM, EC., REESE, A., STALLINGS, M., GORVER, FA., HUISMAN, THJ.:** An Improved Chromatographic Procedure for Quantitation of Human Fetal Hemoglobin. *Hemoglobin*, 1 (6): 547-60, 1977.
57. **SCHROEDER, WA., NELSON, NC.:** Microchromatography of Hemoglobins. Thin-Layer Chromatography of Some Hemoglobins on CM-Celulose. *J Chromatogr.* 24:115(2): 527-33, 1975.
58. **ITOH, Y., MATSUZAWA, S.:** Detection of Human HbA and Human Hemoglobin F in Biological Stains by Microtiter Latex Agglutination-Inhibition test. *Forensic Sci Int.* 47(1): 79-89, 1990.
59. **Mc CORMACK, MK., TOKE, D.:** Improved Visualization of Fetal Hemoglobin-Containing Cells Using Normarski Optics. *Clin Biochem.* 16(3): 188-90, 1983.
60. **MARTL, HR., FISCHER, S., KILLER, D.:** Simple Procedures for Determination of Hemoglobin F and Hemoglobin A₂: Radial Immunodiffusion and Column Chromatography with Commercial KITS. *Schweiz Med Wochenschr.* 113(50): 1916-17, 1983.
61. **MAKLER, MT., PESCE, AJ.:** ELISA Assay for Measurement of Human Hemoglobin A and Hemoglobin F. *Am J Clin Pathol.* 74 (5) : 673-6, 1980.
62. **Sysmex NE-1500 Automatic Hematology Analyses Operator's Manuel :** Principles of Blood Cell Counting, Sec 2, TOA Medical, 1991.

- 63. ADEKILE, AD., HUISMAN, THJ.:** HbF in Sickle Cell Anemia. *Experientia*. 49: 20-21, 1993.
- 64. GRINGRAS, P., WONKE, B., OLD, J., FITHES, A., VALLER, D., KUAN, AM., HOFFBRAND, V.:** Effect of Alfa Thalessemia Traith and Enhanced Gamma Chain Production on Disease Severity in Beta Thalessemia Major and Intermedia. *Arch Dis Child*. 70(1) : 30-4, 1994.
- 65. BACHIR, D., GALACTEROS, F.:** Potential Alternatives to Erythrocytes Transfusion in Hemoglobinopathies : Hydroxyurea (HU), Erythropoietin (EPO), Butyrate Derivatives, Blood Substitutes. *Transfus Clin Biol*. (1) : 35-9, 1994.
- 66. SEBRING, ES., POLESKY, HF.:** Fetomaternal Hemorage : Incedence, Risk Factors, Time the Occurrence and Clinical Effects. *Transfusion*. 30(4) : 344-57, 1990.

ÖZGEÇMİŞ

1964 yılında Gaziantep'te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Gaziantep'te tamamladı. 1981 yılında Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümüne girerek 1986 yılında mezun oldu. Aynı yıl Norveç Sor-Al aluminyum Fabrikasında stajını yaptı. 1986-1987 öğretim yılında aynı Fakültenin İnorganik Kimya Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. 1988 yılında Kömür Kimyasında Yüksek Lisansını aldı. 1989 yılında Gaziantep Üniversitesi Biyokimya Bölümünde çalışmaya başladı. Halen görevine devam etmektedir.

Evli ve iki çocuk annesi olup İngilizce bilmektedir.