

T. C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANA BİLİMDALI

HEMOGLOBİNLERİN HPLC YÖNTEMİ KULLANILARAK İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

Erol Ömer ATALAY
Kimyager

Adana - 1988

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

Bu tez çalışması üniversite öğrenciliği yıllarından başlayan bilimsel araştırma çalışmalarımda bir kilometre taşı oluşturmaktadır. Bu çalışmaların başlangıcında bende araştırma heyecanını uyandıran ve bu yolu seçmemde etken olan değerli hocam Prof.Dr.Muzaffer AKSOY'a teşekkürü bir borç biliyorum.

(c)

İhtisas ve tez çalışmalarının başlangıcından itibaren araştırmalarımın sürekli destek alacağı bilgi ve deneyimi bana kazandıran, tezimi yöneten Ç.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Güneş YÜREGİR'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Kendisinin ve Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm arkadaşlarımdan destek ve katkılarını her zaman şükranla anacağım.

Son olarak çalışmamda kullandığım örnekleri sağlamamda katkıları olan Ç.Ü. Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalından Doç.Dr.Yurdanur KILINÇ'ı, ve bu tezin deneysel çalışmalarını yürüttüğüm Gebze/TÜBİTAK TBAE Biyoloji Bölümü başkanı Prof.Dr.Engin BERMEK'i, çalışmaya yönlendiren Doç.Dr.Beyazıt ÇIRAKOĞLU'nu ve teknik yardımlarından ötürü Gazi TURGUT'u teşekkürle anıyorum.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa No.</u>
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1- 5
2. GENEL BİLGİLER.....	6-25
a.Kırmızı Küreler ve Genel Özellikleri	
b.Hemoglobin: Moleküler Yapısı ve Sentezi	
c.Hemoglobinopatiler	
3. HEMOGLOBİNOPATİLERDE TOPLUM TARAMASI VE DOĞUM-ÖNCESİ(PRENATAL) TANI YÖNTEMLERİ.....	26-27
4. HPLC (ve) BİOMEDİKAL UYGULAMALARI.....	28-29
5. HEMOGLOBİNOPATİLERİN İNCELENMESİNDE HPLC YÖNTEMİNİN KULLANIMI.....	30-34
6. GEREÇLER VE YÖNTEMLER.....	35-40
7. BULGULAR.....	41-61
8. TARTIŞMA.....	62-70
9. KAYNAKLAR.....	71-78

1.) GİRİŞ VE AMAÇ

1669 yılında LEEUWENHOEK'un ilk ışık mikroskopunu bilimin hizmetine sunması ile insanoglu canlıların yapıtaşları olan hücreleri görmeye ve içerdiği gizemi araştırmaya başladı. Bu ça-ba burada isimlerinin teker teker verilmesine olanak tanımayan sayıdaki bilim adamının şonsuz çalışması ile 1869'lara kadar geldi. Bu yılda; MİESCHER, DNA'yı keşfederek canlıları oluşturan yapıtaşlarına ait en küçük, bununla birlikte en önemli kıs-mına dikkatleri çekmiş oldu. 1953 yılında WATSON ve CRICK; DNA'nın çift sarmal yapılı bir molekül olduğunu açıklayınca günümüz-deki moleküler biolojinin ilk temellerini atmış oldular. 1958 yılına geldiğimizde CRICK; moleküler genetiğin temeli olan "san-tral dogmayı" ortaya koymuştu. Buna göre; DNA molekülündeki nük-leotid dizilerinin(ki bunlar adenin, guanin, sitozin ve timindir) belirli bir sıraya göre yanyana getirilerek kodlanması ile sak-lanan bilgiler RNA'ya aktarılmakta ve oradan da bir amino asit zinciri olan proteinler oluşturulmakta idi.

Genetik bozuklukların varolduğu yüzyıllardır bilinmektedir. Ancak; genetik metabolik hastalıklar kavramı 1908'de GARROD'un Lancet dergisinde yayınladığı "Inborn Errors of Metabolism" baş-lıklı makalesinden sonra kabul edildi. 1948'de HÖRLEIN ve WEBER'in 1949'da ise PAULING ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar tıp alanında "moleküler hastalıklar kavramını" getirerek konuya yeni boyutlar kazandırdı. Zaman içerisinde yapılan araştırmalar, santral dogma ürünü olan özgün bir protein yapımında oluşabilecek bozukluklar şeklinde tanımlandı.

Bir genetik bozukluk olan "orak hücre anemisi" 1910 yılında HERRICK tarafından, talasemi ise 1925 yılında COOLEY tarafından tanımlanmışlardı. Ancak buna karşın; bu hastalıkların nedeninin tam olarak aydınlatılabilmesi ve hatta tedavi edici genetik uy-gulamaların tartışma gündemine gelebilmesi için moleküler gene-tiğin gelişmesini beklemek gerekmekteydi. Çünkü; bir protein olan hemoglobinin yapımındaki bir genetik bozukluktan köken alan bir hastalık grubuydu orak hücre ve talasemi!

Dünya'da yaklaşık 190 milyon insan hemoglobinopati geni taşımaktadır. Bu yaklaşık sayının yarısından fazlası talasemi genini, kalanı ise diğer hemoglobinopatili gen taşıyan bireyleri içermektedir. Yapılan doğum istatistiklerine göre; yılda yaklaşık 240,000 çocuk majör beta-hemoglobinopatili olarak doğmaktadır. Bu doğumların %78'i HbSS veya HbSC hastalıklıdır(1). Tablo-1'de değişik kıtalarda hesaplanan beta-hemoglobinopatili doğum istatistikleri, şekil-1'de ise dünyadaki beta-hemoglobinopati dağılımı verilmiştir. Bu verilere göre; yılda 295,059 beta-hemoglobinopatili doğum olmakta, bunun 230,648'i patolojik görü-

TABLO-1) Yıllık Beta-Hemoglobinopatili Doğum Oranları (a)

Bölge	HbSS	HbS/atal.	HbSC	β -tal.	Toplam (b)
Afrika	126,708	1,181	31,582	3,112	170,903
Amerika	(c) 4,399	960	1,999	508	8,426
Asya	18,819	1,432	-	21,263	114,810
Avrupa	284	+	+	1,236	1,520
Okyanusya	-	-	-	100	100
TOPLAM:	150,210	3,573	33,581	26,219	295,059

(a) Dünya Sağlık Örgütü(W.H.O.) 1985 raporuna göre(kaynak-1)

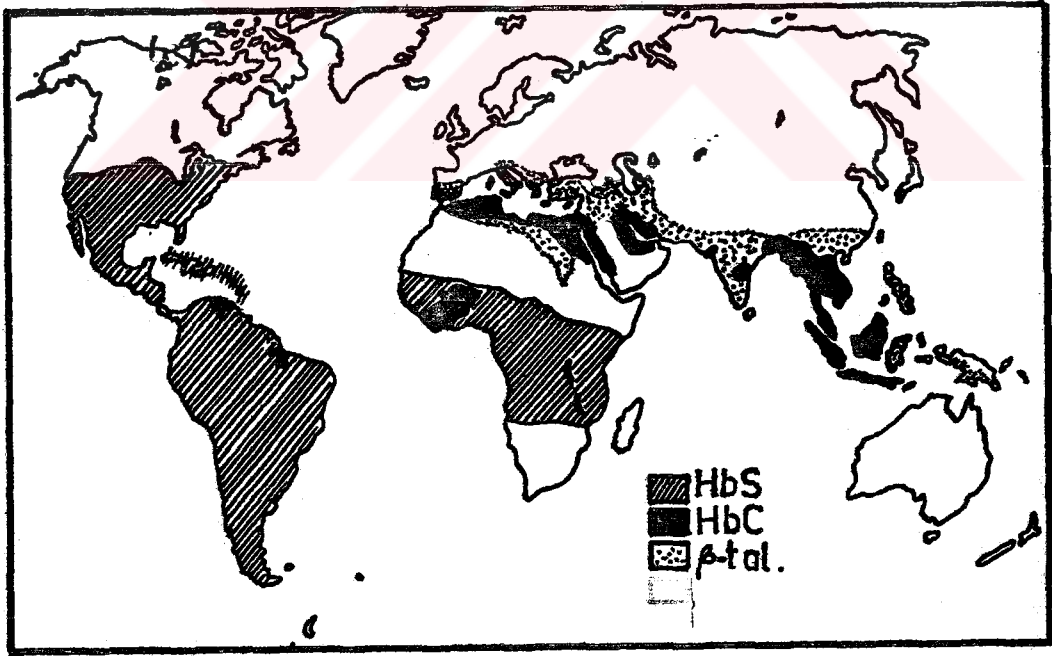
(b) Toplam beta-hemoglobinopatili doğum sayısı olup, tablo-da verilmeyen diğer beta-hemoglobinopatileri de içerir.

(c) Toplam yıllık doğum oranı $129,594 \times 10^3$ 'tür.

nüm vermektedir. Yıllık doğum oranına göre ise; her bin doğumda 2.28 doğum beta-hemoglobinopatili, aynı zamanda da her bin doğumun 1.78'i patolojik beta-hemoglobinopatili olmaktadır.

+ Olgular saptanmış olmakla birlikte, istatistiksel veriler bulunmamaktadır.

Ülkemizde ise; beta-hemoglobinopatilerin varlığı bilinmektedir. Özellikle ülkemizin güney bölgelerinde(Çukurova, Hatay gibi) yer yer önemli derecede toplum sağlığı problemi şekline dönüşmektedir. Bu bölgelerde; yoğun olarak orak hücre anemisi olarak tanımlanan "HbSS" ve "beta-talasemi" bulunmaktadır(2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). Örneğin; Üniversitemiz hastanesinde yoğun bir şekilde bu hastalık grubuna rastlanılmakta, Pediatrik Hematoloji Polikliniği tarafından bu hastalar çocukluktan başlamak üzere belirli zaman aralıkları ile takip edilerek tedavileri yapılmaktadır. Bu konuda yurt dışından örnek verilecek olursa; İtalya'nın Sardinya adasında toplumu tehdit eder hale gelen talasemi nedeni ile bu konuya özel bir hastane ve araştırma merkezi kurulmuştur. Bu çalışma sonucunda beta-talasemili doğum oranı, 1984 yılı dikkate alınarak, %50 oranında azalmıştır(1).



ŞEKİL-1) Dünyada Beta-Hemoglobinopatilerden; HbS, HbC ve beta-talaseminin dağılımı. (Kaynak-21).

Gelişen teknolojik birikime karşın, yine de bu tür genetik hastalıkların tedavisi(sağıtımı) gelecek yüzyıla kalmış gibi gözükmektedir. Günümüzde yapılabilinecek olan ise; hastalığı saptayarak bireyleri bilgilendirmek yolu ile semptomatik olan homozigot bireylerin doğmasını engellemekten öte değildir. Dünya Sağlık Örgütünün önderliğinde gerçekleştirilen 4 talasemi kontrol programına ait veriler tablo-2'de verilmiştir. Bu program çerçevesinde; riskli hamileliklerde(heterozigot çiftlerde) doğum öncesi tanı ile düşük yaptırılmış ve tanının doğruluğu irdelenmiştir. Bu dört talasemi kontrol programında toplam 58

TABLO-2)Dört Talasemi Kontrol Programındaki Doğum-Öncesi Tanı Sonuçları

Merkez	Toplam Fetal Tanı	Homozigot Düşük	Yanlış Tanı	Fetus Kaybı	Sağlıklı Doğum
Kıbrıs ^a	960	231	8	46	664
Yunanistan (1)	1,947	512	15	67	1,323
Sardinya	1,425	348	2	64	1,001
Londra	841	224	8	55	554

^aKıbrıs Rum Kesimi(Lefkoşa)

olguda(Kıbrıs Rum Kesiminde, 11 tane; Yunanistan'da 27 tane; Sardinya'da 10 tane; Londra'da 10 tane) olguda tanı konulamamıştır. 1984 yılı dikkate alınarak yapılan bu program çerçevesinde toplam 5,137 olgudan %25.4'ü(1,315 tane) homozigot olduklarından düşük yaptırılmış, %4.5 oranında(232 tane) fetus operasyonda kaybedilmiş, buna karşın %68.5 oranında(3,542 tane) sağlıklı doğum sağlanmıştır. Yine bu program çerçevesinde; Kıbrıs Rum Kesiminde %97 oranında, Yunanistan'da %60 oranında, Sardinya ve Londra'da ise %50 oranında talasemi majörlü doğum azaltılabilmiştir.

Yapılan bu önleme çalışmaları, daha önce de belirtildiği gibi, homozigot bireylerin doğumunu engellemek üzerine kurulduğundan herşeyden önce heterozigot(ya da taşıyıcı) bireylerin ortaya çıkarılması gereksinimini doğurmaktadır. Heterozigot bireylerin yapılan toplum taramaları ile ortaya konularak bilgilendirilmesi sonucunda, prenatal(doğum öncesi) tanı yöntemleri işlerlik kazanarak önleme programları başarılı olabilecektir. Bu açıdan, hemoglobiⁿ tiplendirmesinin ve globin sentez oranının çabuk, güvenilir bir şekilde yapılması tarama çalışmalarının temelini oluşturmaktadır.

Günümüzde gelişen ^{teknolojiye} koşut olarak, moleküler genetiğin de katkıları ile doğum-öncesi tanı yöntemleri DNA düzeyine kadar inmekle birlikte, rutin incelemelerde, genetik hastalıkların protein temelinde incelenmesi güncelliğini korumaktadır. Bölgemizde de, bu tür genetik hastalıkların yoğun olarak bulunduğunu gözönünde tutarak konunun daha ayrıntılı izlenmesi ve araştırılması yönünde gerekli alt yapıyı oluşturmak amacı ile protein düzeyindeki uygulamalı çalışmalara katkıda bulunmayı amaçladık. Bu düşünce ile, çalışmamızda hemoglobinopatilerin incelenmesinde çağdaş bir yöntem olan HPLC(High Performance Liquid Chromatography)'nin uygulanabilirliğini irdeledik.

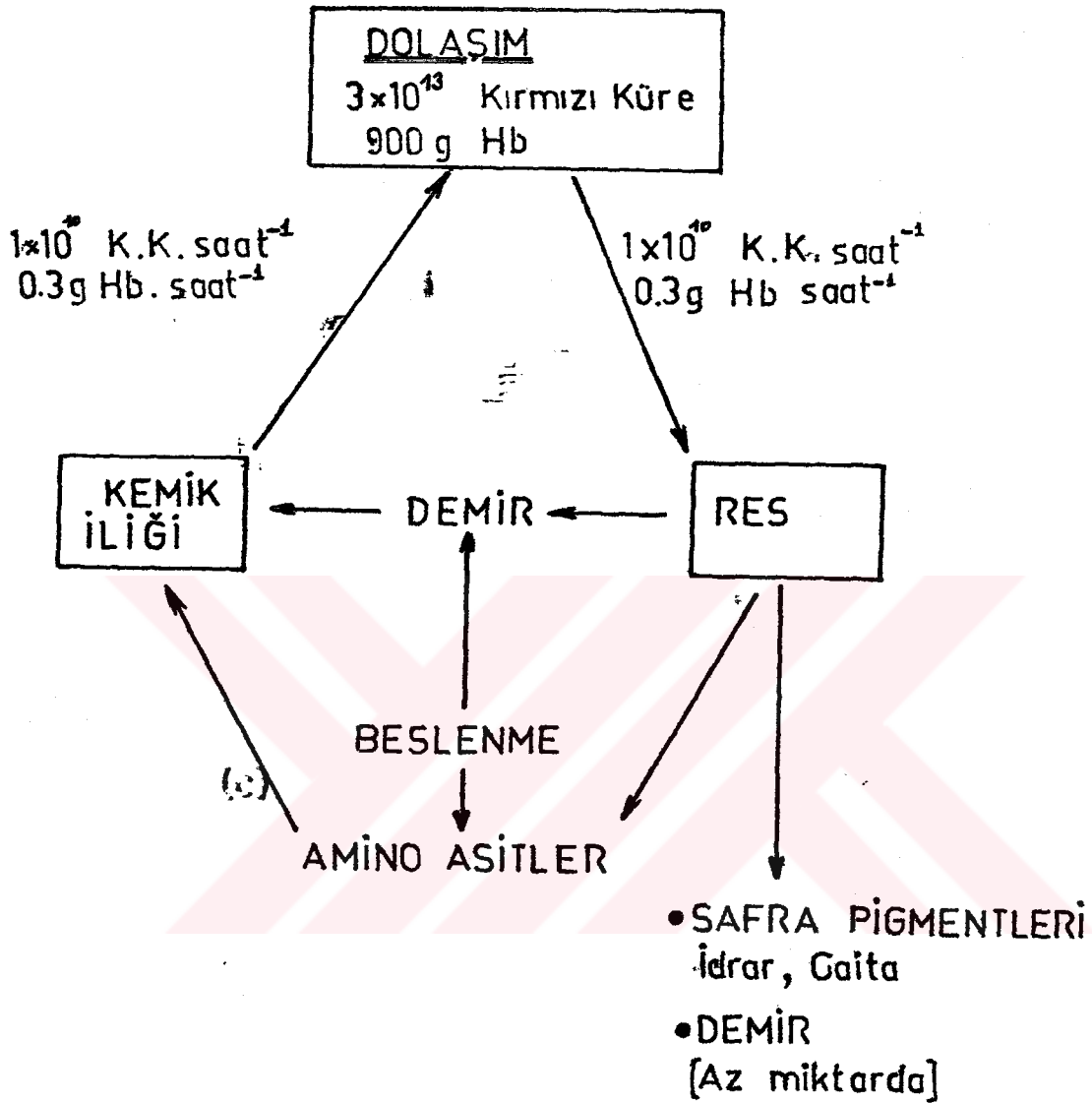
2.) GENEL BİLGİLER

a.Kırmızı Küreler ve Genel Özellikleri

Dolaşımdaki oksijenin taşınmasından sorumlu olan hemoglobin; kemik iliği tarafından üretilen, morfolojik olarak çift yüzlü içbükey(biconcave) yapı gösteren kırmızı küreler(eritrositler) içinde yer alırlar. Kırmızı küreler; kemik iliğinde üretildikten sonra dolaşımdaki işlevlerini yerine getirebilmek amacı ile olgunlaşırlarken hücre çekirdeklerini kaybederler.

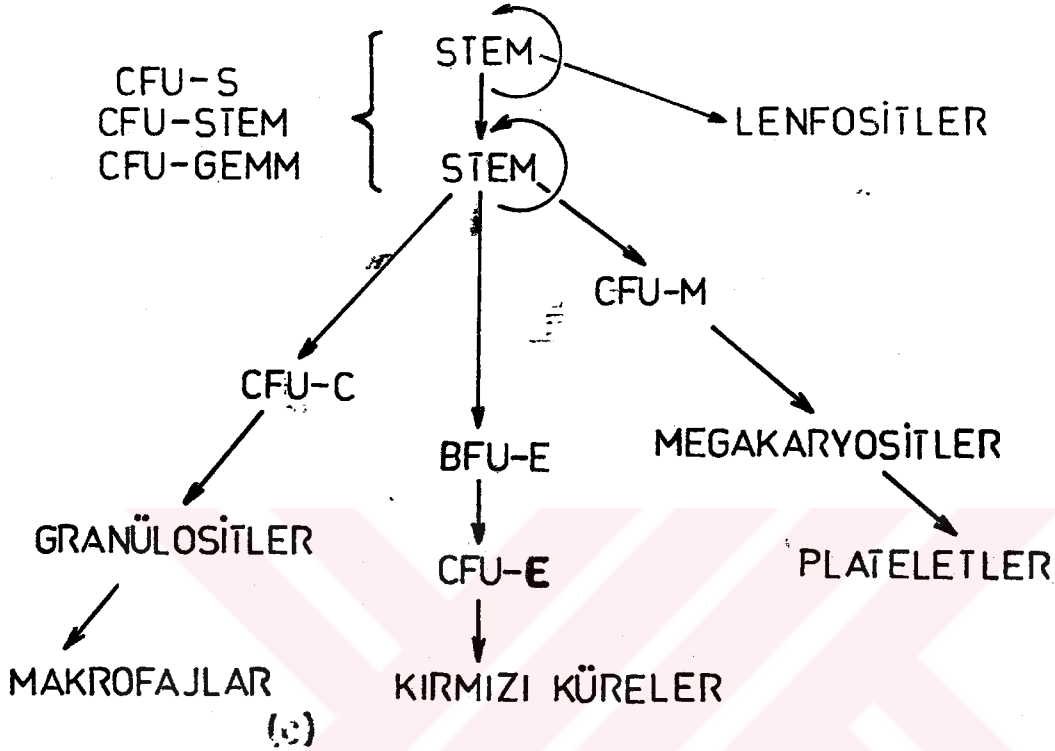
Erişkinde; kırmızı kürelerin kemik iliğinde yapıldığını, bununla birlikte fetus,dalak, karaciğer, böbrekler ve lenf ganglionlarında da bazı patolojik durumlarda kırmızı küre yapımının kemik iliği dışında da sağlandığını(kronik myeloid lösemi, myeloid metaplazi gibi) görmekteyiz.

Normal erişkine ait eritropoez; proeritroblast ile başlayan bir dizi hücre farklılaşması ile gelişir. Proeritroblastlardan olgun kırmızı küre oluşumuna kadar gelişen süre 4-6 gündür. Proeritroblast ile başlayan dizinin ilk evresinde hemoglobin oluşumu için gerekli demir hücre içine alınır. Olgun kırmızı küreye geçişte; hücre çekirdeği piknotik(pycnotic) oluncaya kadar küçülür, ve olgun kırmızı kürede dışarı atılır. Bu süreç içerisinde hemoglobin sentezi artar ve bazofilik(basophilic) materyal kaybolmaya başlar. Bu şekilde de; sitoplazma, Romanowsky boyaları ile(eozin-metilen mavisi karışımları) maviden gri ve pembeye doğru bir renk değişimi gösterir. Hücre çekirdeğinin dışarı atılması ile retikülositler oluşurlar. Bu olaydan sonra, kemik iliğinde birkaç gün daha kalan retikülositler olgun kırmızı kürelere dönüşmek üzere dolaşımdaki kana karışırlar. Retikülositlerin dolaşımdaki miktarları %2.0'yi geçmemektedir. Kemik iliğinde yapılan kırmızı küreler; retiküloendotel sistemde(R.E.S.) yıkılarak, içerikleri ya tekrar kullanılmak üzere kemik iliğine gönderilir, ya da vücuttan atım için safra pigmentlerine dönüştürülür(şekil-2).



ŞEKİL-2) Kırmızı küre oluşumu ve yıkımı.(bkz kaynak-9).

Daha önce de belirtildiği gibi; kırmızı küreler ve diğer hematopoetik hücreler normal olarak kemik iliğinde üretilir. Kırmızı küreler, granülositler, plateletler, monositler ve lenfositler(hematopoetik hücreler) kemik iliğinde bulunan stem(kök) hücrelerinden farklılaşarak(diferansiye olarak) oluşurlar. Bu kök hücreler; CFU-S, CFU-STEM ya da CFU-GEMM (granulosit-kırmızı küre"eritrosit"-makrofaj-megakaryosit) hücre grupları olarak anılırlar(bkz şekil-3)(10). Eritroid



ŞEKİL-3) Hematopoetik Hücre Farklılaşması Modeli
(bkz kaynak-10)

CFU-S...:Dalakta koloni oluşturan hücreler

CFU-STEM: Dalakta kök hücreleri(koloni oluşturan)

CFU-GEMM: Kök hücreleri(granülosit-kırmızı küre-makrofaj-megakaryosit oluşturan, koloni meydana getiren)

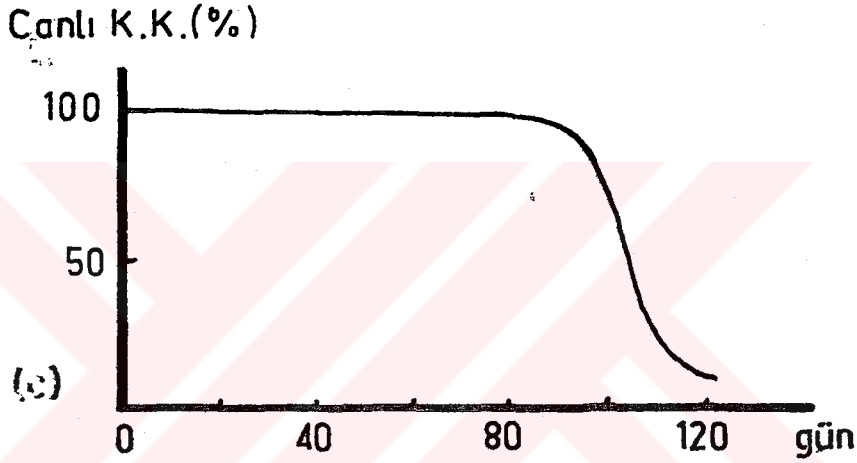
CFU-M...:Megakaryosite farklılaşmaya aday koloni hücreleri

CFU-C...:Myeloid diziye farklılaşmaya aday koloni hücreleri

CFU-E...:Kırmızı kürelere farklılaşmaya aday koloni hücreleri(geç evre eritroid koloni hücre)

BFU-E...:Kırmızı küreleri oluşturacak CFU-E'ye farklılaşmaya aday koloni hücreleri(erken evre eritroid koloni hücreleri)

hücre farklılaşmasının 6-8. günlerinde sentez edilen hemoglobin, retikülositlerde 1-2 gün kadar düşük düzeyde sentez edilmeye devam edilirse de olgun kırmızı kürelerde sentez kesilir. Ortalama yaşam süreleri 120 gün olan kırmızı küreler(bkz şekil-4); erişkin erkekte $5.4 \text{ milyon.}\mu\text{l}^{-1}$, erişkin kadında ise $4.8 \text{ milyon.}\mu\text{l}^{-1}$ sayıya sahip olup, $7.5\mu\text{m}$ çapında, $2\mu\text{m}$ kalınlığındadırlar. Her bir kırmızı küre, ortalama olarak 29pg kadar hemoglobin taşımaktadır(8, 9, 10, 11 12, 13).



ŞEKİL-4) Kırmızı Kürelerin Yaşam Süresinin Ölçümü.

(Bu amaçla; kırmızı kürelerin içinde bulunan hemoglobin molekülünün yapısına işaretli bir amino asit veya demir atomu yerleştirilir. Bu yerleştirme işlemi, kemik iliğinde gelişmekte olan hücreler üzerinde etkili olur. Kırmızı kürelerin yaşam süresi boyunca işaretli kalmalarına karşın kandaki işaretli madde kaybolur. Kırmızı kürelerin yıkımı ile birlikte bu işaretli madde tekrar ortaya çıkar.

Bu deneye göre; kırmızı küreler, yaşam sürelerinin 100. gününde yıkılmaya başlamakta, 120. günde ise yaşam sürelerini tamamlamaktadırlar.)

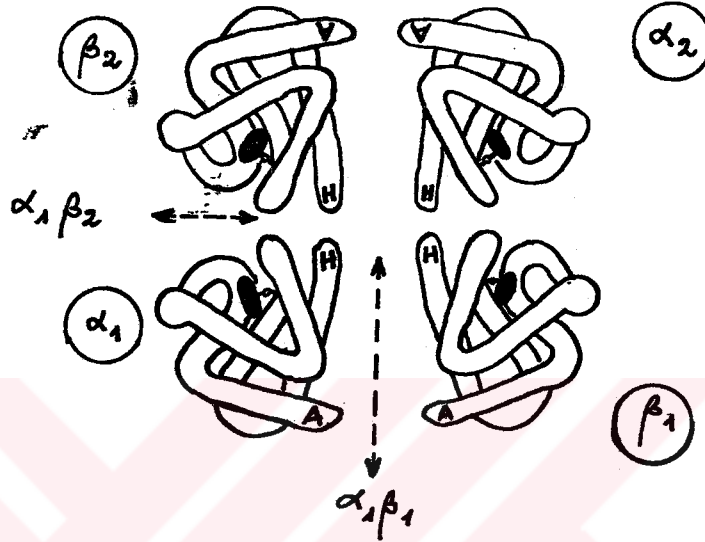
•Bkz kaynak-11, sf.15

b.Hemoglobin: Moleküler Yapısı ve Sentezi

Hemoglobin; üçüncül(tertiary) ve dördüncül(quaternary) yapısı tam olarak x-ışını analizi ile ortaya konan ilk oligomerik proteindir. Bu bulgulara; İngiltere'de M.F.Perutz ve arkadaşlarının 25 yılı aşkın çalışmaları ile ortaya çıkmıştır. Oksihemoglobinin $2.8\text{\AA}$ 'lık seçicilik(resolution) ile yapılmış atomik modeli 1968 yılında, deoksihemoglobinin ise 1970 yılında ortaya konulmuştur(14, 15, 16).

Hemoglobin; herbiri içerisinde gömülü durumda bulunan hem grubu içeren dört polipeptid zincirinden oluşmuştur (şekil-5). Bu alt birimlerin üç boyutlu yapılanması zayıf non-kovalent bağlar ile sağlanır. Globin adı verilen bu alt birimlerin polipeptid yapısında oldukları, ve yapıyı oluşturan polar amino asit yan gruplarının dış yüzeyde, non-polar yan grupların ise iç yüzeyde olduğu bilinmektedir. Bu davranış; sulu bir ortam olan kan içerisindeki yapılanmanın gereğidir, aynı zamanda da üçüncül yapıyı belirleyen etkindir. Her polipeptid zinciri(ya da globin) içinde yer alan hem ile zincir arasındaki bağlar hidrofobik etkileşimler ile sağlanmaktadır. Tüm moleküldeki globinler arasındaki değme bölgelerinden benzer zincirler arasında olanlar(alfa-alfa globinler ile beta-beta globinler arasında) tuz köprüleri ile sağlanmakta olup sayıca azdır. Buna karşın; benzer olmayan zincirler arasındaki değme noktaları çok sayıda olup, önem taşır. En uzun değme bölgesi, alfa-1 ile beta-1 arasındadır ve B,G,H heliks bölgeleri olarak anılan 34 amino asitlik uzunluktadır. Bununla birlikte; alfa-1 ile beta-2 arasındaki değme bölgesinden 19 amino asit sorumludur. X-ışını kristalografi çalışmaları; hemoglobinin oksi ve deoksi formlarının dördüncül(quaternary) yapı açısından farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Oksijen ile bağlı durumdaki hemoglobin daha sıkışık bir yapı ortaya koyar. Bu dördüncül yapıda oluşan değişiklikten hem içerisinde bulunan demir atomu ile globinler arasındaki değme noktaları sorumludur.

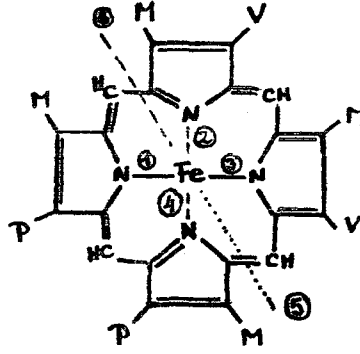
Demir atomu; globin içerisine gömülü durumda bulunan hem ile düzlemsel-kare düzenleşim kompleksleri(square



(c) ŞEKİL-5) Hemoglobin molekülünde polipeptid zincirlerinin düzeni ve zincirler arasındaki değme bölgeleri.

planar coördination complexes) oluşturmaktadırlar(şekil-6). Bu kompleksler; non-polar R-grupları ile globinler içine gömülüdür. Bu şekilde yapıda yer alan demir atomlarının beş numaralı düzenleşim(coordination) bağı globindeki histidine ait imidiazol nitrojenine bağlı durumda, oksijen hemoglobinde altı numaralı düzenleşim bağı moleküler oksijene bağlı buna karşın deoksi hemoglobinde ise yine altı numaralı düzenleşim bağı globine ait diğer histidinin imidiazol nitrojeni ile bağ yapmış durumdadır(şekil-7).

Hemoglobin molekülü; moleküler oksijeni aldığı zaman, beta zincirlerine ait demir atomları arasındaki uzaklık 40.3 Å 'den 33.4 Å 'e inmektedir. Bu olay; demir atomunun oksijen molekülüne doğru hem düzlemi içerisinden harekete geçmesi ile gerçekleşmektedir(bkz şekil-8a, 8b).



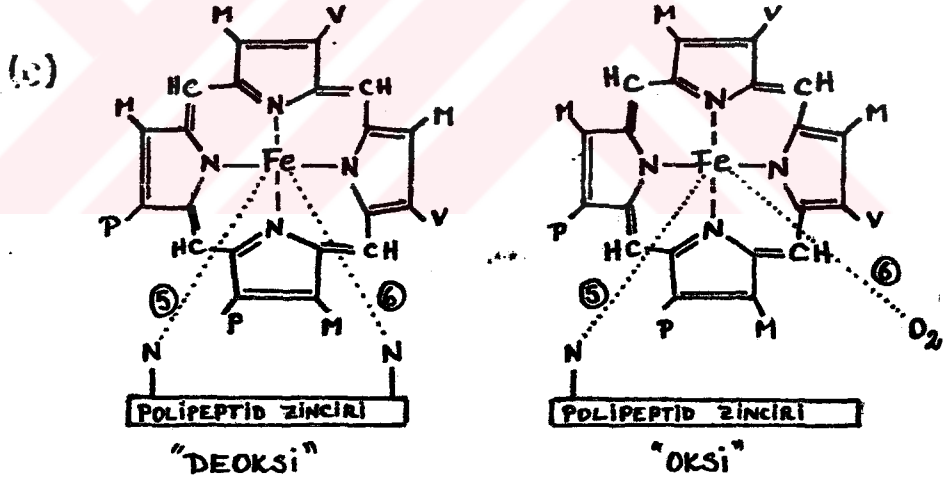
ŞEKİL-6) Demir-Hem kompleksinin şematik görünümü.

M...:Metil

V...:Vinil

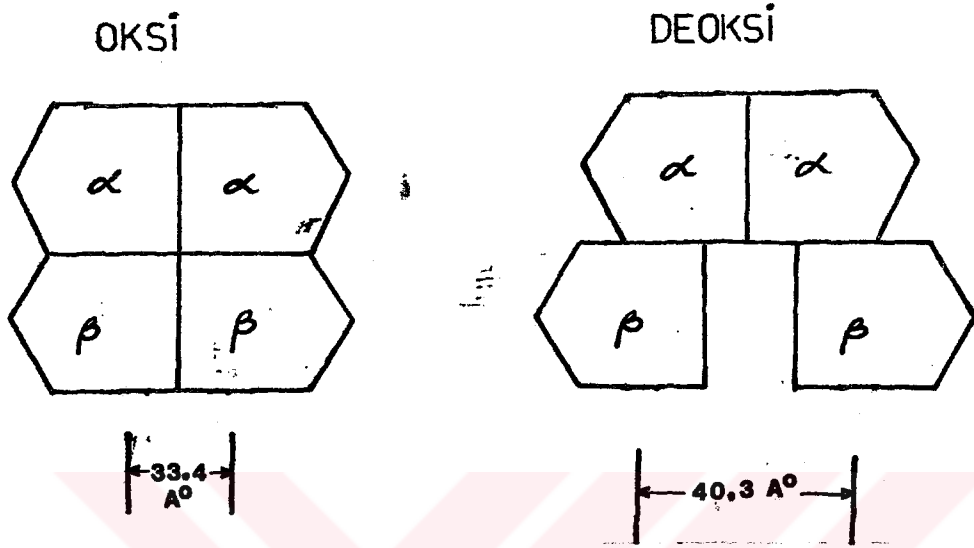
P...:Propionil

Demir bağlarındaki sayılar düzenleşim bağ numaralarıdır.



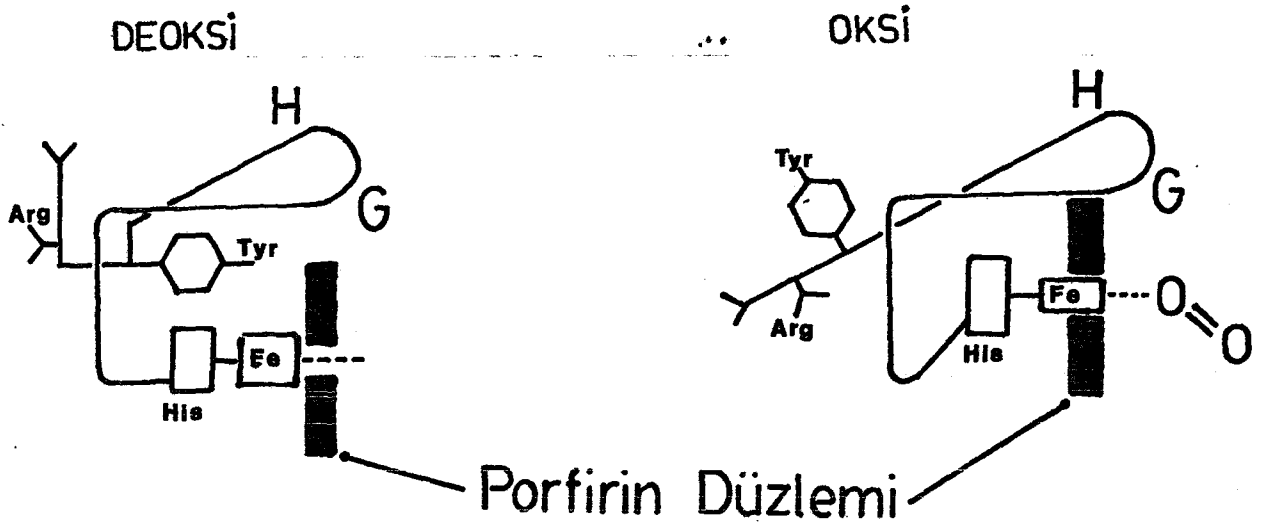
ŞEKİL-7) Demir-Hem kompleksinin "deoksi" ve "oksi" formlarındaki, demire ait, düzenleşim bağlarının moleküler oksijeni tutmadaki kullanımı.

(bkz kaynak-9, sf.431)



ŞEKİL-8a) Oksijenasyon sırasında hemoglobin molekülüne ait beta alt birimleri arasında oluşan uzaklık değişimi.

(c)



ŞEKİL-8b) Oksijenasyon işlemi sırasında demir atomunun "hem düzlemi" içerisinden hareketi ve polipeptid zincirinde bağlı olduğu amino asitlerin konumları ile ilgili değişiklikler.

Oksijenasyon işlemi sırasındaki bir diğer ilgi çekici nokta ise; hemoglobın molekülünün alt birimleri olan polipeptid zincirleri(globinler) arasındaki değme noktalarında oluşan değişimlerdir. Alfa.1/beta.1 değme bölgesindeki değişiklik önemsiz olmakla birlikte, alfa.1/beta.2 arasındaki değme bölgesi değişikliği önemli boyuttadır. Alfa.1/beta.1 değme bölgesinde; beta.1 alt birimi, alfa.1 alt birimine göre 4° lik bir dönme gerçekleştirir. Bu dönme ise; değme bölgesindeki atomlar arasında 1 A° 'lük bir açılma yaratır. Oysa ki; alfa.1/beta.2 değme bölgesinde, beta.2 alt birimi, alfa.1 alt birimine göre 13.5 A° 'lük bir dönme gerçekleştirerek değme bölgesindeki atomlar arasında 1.9 A° 'lük bir açıklık yaratır. Tüm bu olayların sonucunda ise; toplam olarak, beta.1 ile beta.2 alt birimleri arasında $6-7 \text{ A}^{\circ}$ 'lük bir ötelenme ortaya çıkar.

Tüm bilgileri biraraya getirecek olursak; hemoglobın molekülünde oksijenasyon işlemi sırasında ortaya çıkan üç boyutlu uzaydaki yapı değişikliğinin tetikleyici işlergesinin(mechanism) yapıda bulunan demir atomlarından kaynaklandığını görürüz. Çünkü; deoksihemoglobinde demir atomu, porfirin düzleminin 0.75 A° kadar dışındadır ve proksimal F8-histidine doğrudur. Bunun nedeni ise; altıncı düzenleşim bağı moleküler oksijeni bağlamadığı anda atom çapının porfirin düzlemi içindeki boşluktan geçemeyecek kadar büyük olduğundandır. Altıncı düzenleşim bağını moleküler oksijen ile dolduran demir atomu çapına daraltarak, porfirin düzleminin içinden harekete başlar. Bu şekilde de; atom çapını daraltan demir atomu, porfirin düzlemi içerisinden harekete başladığında bağlı olduğu F8-histidini kendisine çeker. Bu hareket sonucunda hem-demir kompleksi ile bağlantılı polipeptid bölgesinde yeni bir şekillenme oluşur. Oluşan bu şekillenme; üçüncül yapıda değişiklik yaratır(bkz şekil-8b)(14, 15, 16, 17, 18, 19).

Tüm bu özellikleri ile hemoglobin molekülü; dört temel görevi üstlenmiş durumdadır. Bunlar sırasıyla; organizmanın gereksinimleri doğrultusunda moleküler oksijenin bağlanma karakteristiğinin ayarlanması, hem grubunun karbon monoksit'e karşı olan eğiliminin azaltılması, tüm hemoglobin molekülünün sulu ortamda çözünürlüğünün artırılması, ve demir nüvenin korunması şeklindedir.

Hemoglobin molekülünün temel yapısından sonra yaşamın değişik evrelerinde görülen sentezini ve tiplerini inceleyecek olursak; yaşamın işlevsel hemoglobin tipinin, 141 amino asitten oluşmuş iki alfa zinciri ile 146 amino asitten oluşmuş iki beta zinciri içeren HbA olduğunu görürüz. Ancak; embriyonik yaşamdan başlayarak erişkin yaşama kadar uzanan süreç içerisinde evrelerin özelliklerine koşut olarak değişik hemoglobin tiplerinin sentez edildiği göze çarpar. Bu sentez; hemoglobin tetramerini oluşturan alt birimlerin(globinlerin) kontrollu olarak yapılmasına dayanan bir sistemden köken alır. Daha önce morfolojik olarak açıklanan farklılaşmanın değişik evrelerinde kontrol edilmesi ile, evrelere özgü hemoglobin alt birimleri sentezlenebilir(bkz tablo-3, şekil-9).

Normal erişkin bireydeki hemoglobin içeriğinin HbA çoğunluğuna sahip olduğunu belirtmiştik. Ancak; düşük oranda da olsa, HbA₂ ve HbF de bulunmaktadır. Dolaşımdaki kırmızı küreleri; "A-tipi" ve "F-tipi" olarak ikiye ayırabiliriz. "A-tipi" kırmızı kürelerde sadece erişkin hemoglobini(HbA) bulunmakta, bununla birlikte, dolaşımdaki kırmızı kürelerin % 8.0'nden az oranda bulunan "F-tipi" hücrelerde ise hücre içeriğinde % 15-30 oranında HbF bulunmaktadır(20). Fetal yaşamda öncü hücrelerden(BFU-E) farklılaşarak fetal eritroblastlar oluşturulur ve bunlar da "F-tipi" hücreye farklılaşırlar. Ancak doğum öncesinde oluşan bir kontrol ile bu öncü hücreler(BFU-E) çoğunluğu

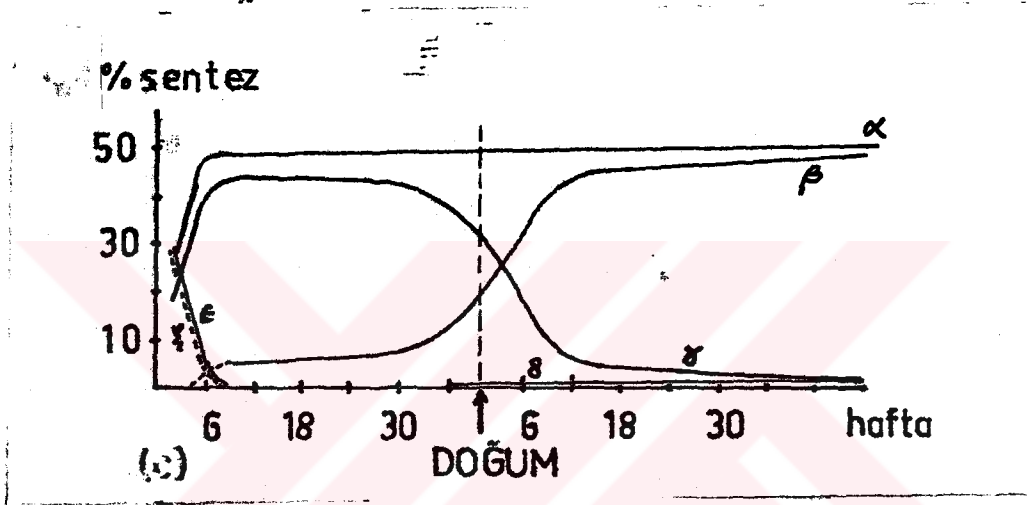
"A-tipi" hücre oluşturmak üzere etkinleşmeye başlarlar ve erişkin hayatta dolaşımdaki kırmızı kürelerin meydana gelmesini gerçekleştirirler. Doğal olarak bu olay meydana getirilirken kullanılan işlerge gen düzeyinde olup sonuca RNA sentezi yolu ile gitmektedir(bkz şekil-10, şekil-11)(20, 21).

TABLO-3) İnsanda normal hemoglobinlere ait globin zincir bileşimi.

● Embriyonik Hemoglobinler	
Hb-Gower.1	$\zeta_2\epsilon_2$
Hb-Gower.2	$\alpha_2^A\epsilon_2$
Hb-Portland	$\zeta_2\delta_2$
● Fetal Hemoglobin	
HbF	$\alpha_2^A\delta_2$
● Erişkin Hemoglobinler	
HbA	$\alpha_2^A\beta_2^A$
HbA ₂	$\alpha_2^A\delta_2$
HbF(Fetal hayattan sonra da düşük oranda sentezi sürdürülür. Ancak temelde fetal hayata ait hemoglobin tipidir.)	

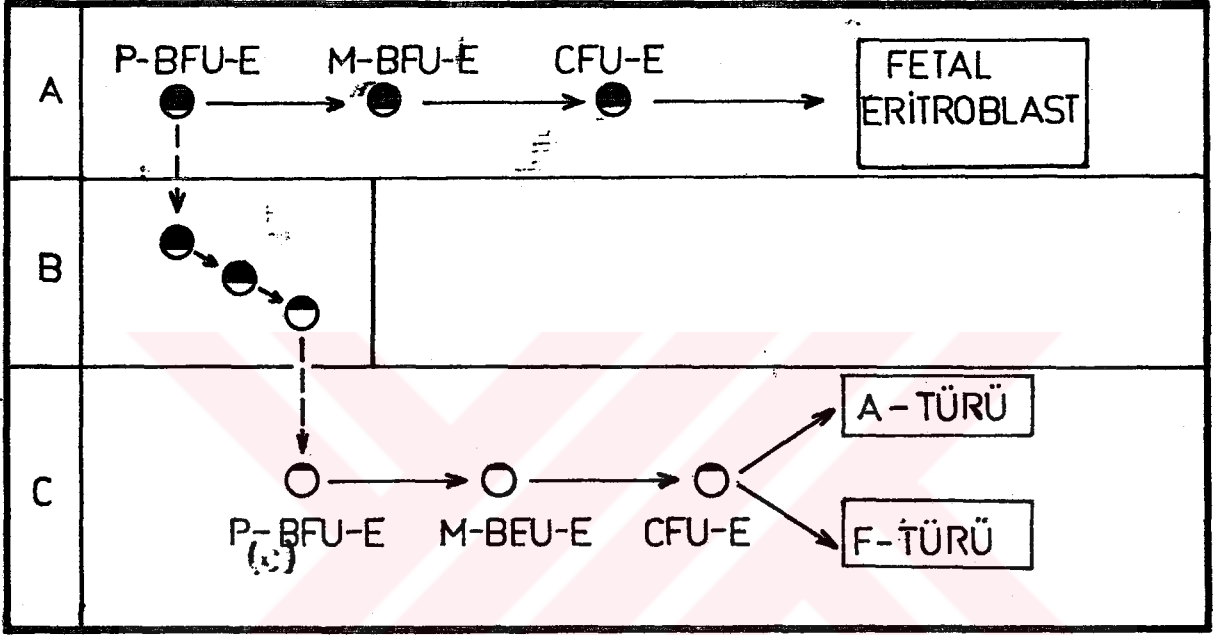
Kırmızı kürelerin oluşumundaki farklılaşma özelliği; başka bir anlatımla, aynı kök hücreden farklılaşarak "A-tipi" ve "F-tipi" hücre üretilmesi(daha önce belirtildiği gibi erişkin hayatta "F-tipi" hücre çok düşük orandadır) bu konuda çalışma yapan araştırmacılara birtakım kimyasal maddeler kullanarak, doğum sırasında oluşan kontrol sisteminin benzerini oluşturmak fikrini vermiştir. Buna göre; "F-tipi" hücre sayısını artırmak, böylelikle de orak hücre, beta-talasemi gibi hastalıklarda tedavi edici rol oynayabilecektir. Örneğin; 5-azasi tsin, cytarabine, hidroksiüre bu tür kimyasal maddelerdir. Bu tür

bu çalışmalar; etki işlergesi, sitotoksitesi gibi konularda açık noktalara sahip olmakta ve bu yüzden klinikte tedaviye yönelik, güvenilir yöntemler değildir. Buna karşın bu yöndeki çalışmalar güncelliğini kaybetmeyip araştırmacıların ilgisini çekmekte ve eritroid hücre farklılaşmasına da katkı oluşturma sıgasına sahiptirler(21, 22, 23, 24).



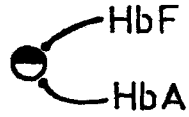
ŞEKİL-9) İnsanda yaşamın değişik evrelerindeki hemoglobin alt birimlerinin(globinler) sentezi.

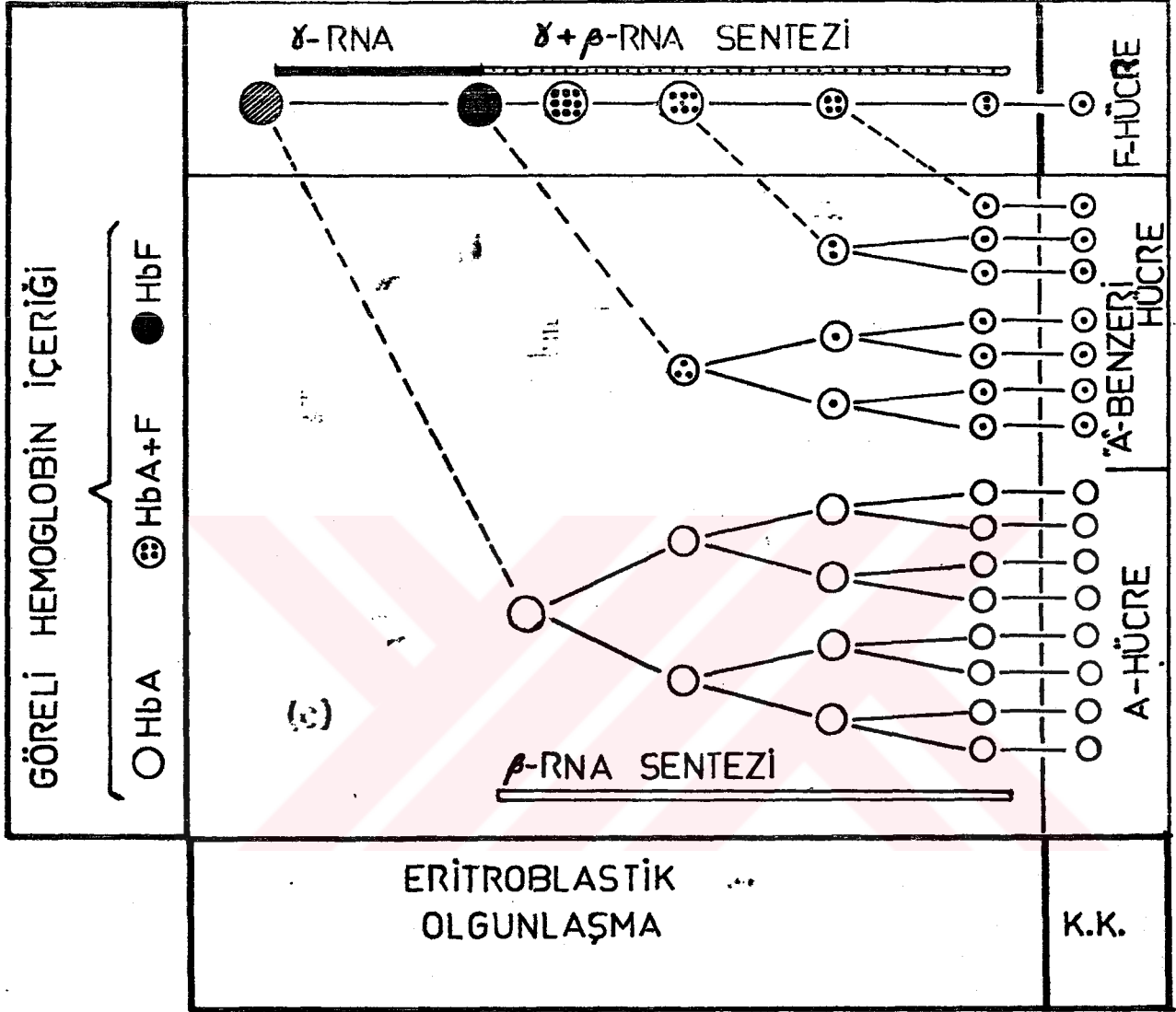
Klinikte; hemoglobinopatilerin incelenmesinde, fiziksel muayenenin yanı sıra laboratuvar tetkikleri olarak anormal bir hemoglobin tipinin var olup olmadığı, normalde bulunan hemoglobin tiplerinin(bkz tablo-3) oranlarının saptanması önem taşır. HbA, HbA₂ ve HbF gibi normal erişkinde bulunan hemoglobin tiplerinin oranı; uygulanan yöntemle ilgili olarak değişiklik göstermekle birlikte, temel olarak % 0.0-2.0 HbF, % 1.0-4.0 HbA₂, kalan ise HbA şeklindedir(bu hemoglobin tiplerinin normal erişkinde ve bazı patolojik durumlardaki oranları için bkz tablo-4).



ŞEKİL-10) Hemoglobin sentezinin düzenlenmesi
(kaynak 21)

Hemoglobin Sentez Programı





ŞEKİL-11) "A-tipi" ve "F-tipi" hücrelerin(kırmızı küreler) oluşturulması.

(Burada eritroblastik olgunlaşma evresindeki farklılaşma ele alınarak model oluşturulmuştur)
(kaynak 21)

TABLO-4) Normal ve bazı patolojik durumlarda hemoglobin tipleri ve oranları

	HbA ₂ (a)	HbF (b)	HbA (xx)	HbS (xx)
Normal Erişkin	1.3-3.7	0.2-1.0	95.3-98.5	-
β^0 -talasemi (homozigot)	2.0	98.0	-	-
β^+ -talasemi (heterozigot)	3.5-7.0	0.2-1.0	x	-
HbS/ β^0 -talasemi	5.0	10.0	-	85.0
HbS/ β^+ -talasemi (zenci tipi)	5.0	5.0	25.0	65.0
HbS/ β^+ -talasemi (Akdeniz tipi)	5.0	5.0	10.0	80.0

(a) DE-52 mikrokolon kromatografisi yöntemine göre(%)

(b) Betke alkali denatürasyon yöntemine göre(%)

(x) HbA₂ ve HbF dışında kalan hemoglobin

(xx) HbA ve HbS değerleri de "%" olarak verilmiştir.

c. Hemoglobinopatiler

Bundan önceki bölümde de belirtilği gibi; bir protein olan hemoglobinin üretimi genetik kontrol altındadır. Günümüzde edinilen bilgi birikiminin ışığı altında; eldeki tüm veriler, makromoleküler sentezin(ki burada konumuz yüksek canlılardır) düzenlenmesinin transkripsiyon evresinden çok transkripsiyon evresinde olduğunu göstermektedir. Genel olarak bir türde bulunan hemoglobin tipi daima gelişimsel değişiklikle ilişki olarak belirlenir. Bu gelişimsel değişim; embriyodan başlar, fetusta devam eder, ve erişkin organizmada son şeklini alır. Klinik olarak; insan hemoglobin sentezinde rol oynayan genetik kontrolün düzgün işlememesi sonucunda ağır tablolar ortaya çıkar(İnsan hemoglobinlerinin genetik kontrolü için bakınız Tablo-5).

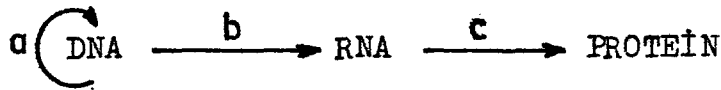
TABLO-5)İnsan hemoglobinlerinin genetik kontrolü (x)

Ortaya Çıktığı Evre ve Sentez Yeri	Hb Tipi	Kromozom ilişkisi
● Embriyonik İlkel Yolk Sac	Hb-Gower.1 Hb-Gower.2 Hb-Portland	Bilinmiyor Bilinmiyor Bilinmiyor
● Fetus Karaciğer, dalak kemik iliği	HbF	α -kromozom.16 $A\gamma$ -kromozom.11 $G\gamma$ -kromozom.11
● Erişkin Kemik iliği	HbA ₂ HbA	δ -kromozom.11 α -kromozom.16 β -kromozom.11 α -kromozom.16

(x) bkz kaynak 25, sayfa 365

Genetik kontrol altında olan hemoglobin sentezi, moleküler açıdan DNA'nın denetimi altındadır. Bu denetim RNA aracılığı ile proteine(hemoglobine) aktarılır(şekil-12). Santral Dogma olarak da anılan bu işlergeye göre; DNA'yı oluşturan alt birimler olan nükleotid dizileri ile saklanan bilgiye göre, hemoglobinin alt birimleri olan amino asitler biraraya getirilerek tüm protein oluşturulur. Bu bilgi akışı; replikasyon, transkripsiyon, translasyon adı verilen evrelerden geçerek sonuca ulaşır(bkz şekil-12).

DNA yapısındaki nükleotidlerden her üç tanesi bir amino asidi kodlamaktadır. Bu üçlü nükleotid "kodon" olarak anılır. Kodonlardaki üçlü nükleotidte oluşacak farklılık, amino asit tipinin farklı olmasına yol açacaktır. Buna benzer şekilde; ilgili genlerdeki DNA içeriğinin okunarak aktarılmasını başlatan ya da bitiren kodlardaki değişiklikler de, olması gereken amino asit dizisine etki ederek, normalden farklı protein yapıları ortaya koyacaktır. Ayrıca; DNA'daki bilginin RNA'ya aktarılması(transkripsiyon) ve RNA'daki bilginin protein şekline dönüştürülmesi evrelerinde oluşacak yanlış işlergeler de sonuçta normalden farklı protein yapıları ortaya koyacaklardır(8, 26).



ŞEKİL-12) Santral Dogma

- a.Replikasyon
- b.Transkripsiyon
- c.Translasyon

Anormal Hemoglobinler

Fizyolojik hemoglobinlerin dışında; normal globin zincirlerinden birinin amino asitlerinden bir veya birkaçının yerine bir başka amino asit geçmesi ile oluşan moleküllere verilen addır(8). Örneğin; orak hücre hemoglobini, beta globin zincirinin 6 no.'lu amino asidi olan glutamik asit

yerine valin geçmesi ile oluşur ve homozigot durumlarda ağır anemi tablosu ortaya koyar. Orak hücre hemoglobininin 1949 yılında ilk defa gösterilmesinden sonra birçok sayıda anormal hemoglobin değişik araştırmacılar tarafından saptanmıştır(19, 27, 28). Bugüne kadar; 199 tane alfa, 232 tane beta, 30 tane gama ve 19 tane delta globin varyantı bildirilmiş durumdadır(8, 28)(Tablo-6).

TABLO-6) Bazı Anormal Hemoglobiñlerde Globin Bileşimi (a)

• Beta Globin Zincirinde Oluşan Yerdeğiştirmeler

HbS.....	$\alpha_2^A \beta_2^S$ ($\alpha_2^A \beta_2^G$Glu→Val)
HbC.....	$\alpha_2^A \beta_2^C$ ($\alpha_2^A \beta_2^G$Glu→Lys)
HbD _{Punjab}	$\alpha_2^A \beta_2^D$ ($\alpha_2^A \beta_2^{L1}$Glu→Gln)
HbE.....	$\alpha_2^A \beta_2^E$ ($\alpha_2^A \beta_2^{26}$Glu→Lys)

• Alfa Globin Zincirinde Oluşan Yerdeğiştirmeler

HbG _{Philadelphia}	$\alpha_2^G \beta_2^A$ (α_2^{68} —Asn→Lys, β_2^A)
-----------------------------------	--

(c)(a) Kaynak-59

Talasemiler

Hemoglobin zincirleri; genetik kodun okunup, amino asitlerin okunan genetik koda göre birbiri ardına konulmasından meydana gelir. Ancak sentezin çeşitli evrelerinde oluşan değişik nedenlerle, hemoglobin tetramerlerini oluşturan globin zincirlerinin biri veya birkaç tanesi, ya hiç yapılmaz ya da diğer karşılık gelen zincire göre daha az oranda yapılır ise talasemi adı verilen hastalık grubu ortaya çıkmaktadır. Genetik olarak hemoglobin sentezindeki bir bozukluk sonucu oluşan ve çoğu kez hipokrom mikrositer anemiye sebep olan talasemilerin kelime anlamı, Yunanca "Thalas-Akdeniz"den gelmektedir. Bu hastalık grubunu bugünkü anlamı ile ilk defa tanımlayan Cooley'dir. Önceleri olguların Yunan, İtalyan ve Suriye(Ermeni asıllı)'lı kişilerde görülmesinden dolayı "Akdeniz Anemisi" de denilmiş, ancak sonraları olguların tüm dünyada görülebilmesi ile bu tanımlama terkedilmiştir.

Daha önce de belirtildiği gibi, talasemideki temel bozukluk mRNA'nın yetersiz oranda üretimi veya mRNA'nın globin zinciri sentezinin kodlanmasını içeren işlevsel yetmezliğindedir. Bu dengesiz sentez, hemoglobin sentezindeki transkripsiyon, mRNA processing(mRNA işlenmesi), ve translasyon evrelerinden birinde ortaya çıkabilir. Doğal olarak, globin sentezindeki kantitatif bir eksiklik(ki bu eksiklik gen ürünüde kalitatif bir değişiklik oluşturmuyor ise), gen işlevini veya regülasyonunu etkileyerek değiştiren bir faktörün varlığını yansıtır(29).

Talasemiler genellikle azalmış oranda sentezlenen globin zincirine göre isimlendirilirler. Burada; sentezi azalmış globin zinciri bir veya birden fazla olabilmektedir. Ortaya çıkan bu durum sonucunda, normal olarak sentezi sürdürülen globin zincirleri, diğer globin zincirlerinin eksik oranda sentezlenmelerinden ötürü, eritrositler içinde precipitasyona uğrarlar. En iyi tanımlanmış talasemi tipleri; alfa, beta, gama/delta/beta, delta, delta/beta-talasemilerdir. Bu talasemi tiplerinden bazıları HPFH(herediter persistan fetal hemoglobinüri)defektif delta, beta veya alfa üretiminin yoğun olarak bulunduğu durumlardır. Ancak, bu başlık altında toplanan grupta kalıcı olarak gama globin zinciri yüksek oranda sentezlenmeye devam etmektedir(8, 29, 30).

Füzyon Hemoglobinleri

Bazı hemoglobin zincirlerinin, bazı bölümlerinin birleştirilerek sentezlenmesinden ortaya çıkan hemoglobin türleridirler. Bu tür anormal hemoglobin tipinin ilk örneği 1958 yılında Gerald ve Diamond tarafından saptanmış olan Hb-Lepore'dur(8). Hb-Lepore; bir kromozomdaki beta geni ile diğer kromozomdaki delta geninin non-homolog çaprazlaşmasından oluşmuştur. Başka bir anlatımla; amino ucu beta genine ait, buna karşın karbonil ucu ise delta genine

aittir. Bu hemoglobin tipinin daha sonraları; Hb-Lepore-Hollandia, Hb-Lepore-Baltimore, Hb-Lepore-Washington-Boston Hb-Lepore-Pylos gibi değişik tipleri saptanmıştır. Türkiye'-de Lepore hemoglobini 1974 yılında bir ailede, Çavdar ve Arcasoy tarafından saptanmış olup Boston tipidir(31).

Uzamış Zincir Hemoglobinleri

Mutasyona uğramış hemoglobin zincirleri normalden uzun ya da kısa oluşurlarsa yeni bir grup hemoglobin türü ortaya çıkar ki bunlara uzamış hemoglobin zincirli anormal hemoglobinler adı verilir(8).

(c)

3.) HEMOGLOBİNOPATİLERDE TOPLUM TARAMASI VE DOĞUM-ÖNCESİ (PRENATAL) TANI YÖNTEMLERİ

Hemoglobinopatilerde; bir veya birden fazla genin işlevinde görülen bir defekt söz konusudur. Heterozigot durumlarda; herhangi bir semptom gözlenmemekte, buna karşın homozigot durumlarda ise belirgin bir klinik tablo ortaya çıkmaktadır. Toplum taraması ve doğum-öncesi tanı çalışmaları, talasemi majör(homozigot beta-talasemi), homozigot HbS hastalığı, Hb-Bart's Hidrops Fetalis(homozigot alfa-talasemi) riskli doğumlarının önlenmesine yöneliktir. Heterozigot bireylerin toplum taraması ile belirlenmesi de uzun dönemde bu riskli doğumların önüne geçilmesi açısından önem taşır. Bu çalışmalar; protein ve gen düzeyinde olmak üzere yönlüdür.

a.Protein Düzeyindeki Çalışmalar: Burada amaç; gerek doğum öncesi ve gerekse de toplum taramalarında, sentez edilen hemoglobin tipinin saptanması veya hemoglobin alt birimlerinin(globinler) sentez oranının ortaya çıkarılmasına yöneliktir.

Protein düzeyinde tanı için kullanılan laboratuvar yöntemlerini; izoelektrik odaklama(isoelectric focusing IEF), CMC-kolon kromatografisi ve yüksek basınçlı sıvı kolon kromatografisi(HPLC) yöntemleri şeklinde özetleyebiliriz. Bu yöntemler de kendi içlerinde; kalitatif sonuca gitmek ve biosentetik bilgiler edinmek amacı ile iki alt gruba ayrılırlar.

Kalitatif sonuçlandırmada; sadece var olan hemoglobin tiplmesi yapılır. Buna karşın; biosentetik uygulamada, hemoglobin tetramerine ait alt birimler arasındaki sentez oranı(alfa/beta oranı), veya hemoglobin tetramerleri arasındaki sentez oranı(HbA/HbF oranı gibi) saptanabildiğinden, özellikle talasemilerde, daha bilgilendirici bulgular elde edilir.

Biosentetik uygulamada; in vitro olarak, hastaya ait hücrelerde, hemoglobin sentezi gerçekleştirilir. Bu in vitro hemoglobin sentez işlemi sırasında sentez edilen hemoglobin tetramerlerini(veya globinleri) izleyebilmek amacı ile, ortama radyoaktif işaretli amino asit konularak ürünün radyoaktif olarak işaretlenmesi sağlanır. Daha sonra zincirler veya hemoglobin tipleri; selüloz asetat elektroforezi, akrilamid jel elektroforezi, CMC-Kolon kromatografisi, IEF ve HPLC gibi yöntemlerle incelenir, ve inkorpore olmuş radyoaktivite izlenerek sentez oranı belirlenir.

b.Gen Düzeyindeki Çalışmalar

Bu tür çalışmalar; defektif gen kökenli olması nedeni ile, konunun kaynağında saptanması amacına yöneliktir. Bireyden alınan örneklerden hazırlanan DNA temel inceleme materyalidir. Doğum öncesi tanı işleminde DNA kaynağı amniotik sıvı ve chorionic villus, doğum sonrası tanı yönteminde ise beyaz küre(granulösit, monosit ve lenfosit) çekirdekleri olmakta, post-mortem ya da cerrahi doku örneklerinde ise karaciğer, dalak, timus ve lenf nodu gibi dokular DNA kaynağını oluşturmaktadır.

Bu tip bir çalışmada; defektif bir geni inceleyebilmek amacı ile, yine bir izleyiciye gereksinim vardır. Bu izleyici genel olarak radyoaktif olmakla birlikte, biotin izleme yöntemleri de geliştirilmektedir. Ancak; biotin izleme yöntemleri henüz tam anlamı ile verimli ve kullanılabılır aşamada değildir.

Gen düzeyindeki çalışmaları; doğrudan genin tanımlanması, mutasyonun doğrudan restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak saptanması, RFLP(restriction fragment length polymorphism) kullanılarak DNA polimorfizmlerinin belirlenmesi, sentetik proplar kullanarak mutasyon odağının saptanması, in vitro DNA amplifikasyonu kullanarak mutasyon odağının saptanması başlıkları altında toplayabiliriz(32-45).

4.) HPLC VE BİOMEDİKAL UYGULAMALARI

Kromatografi kelimesi; Yunanca "renk" ve "yazmak" kelimelerinin biraraya gelmesinden oluşan bir sözcüktür. Temel amacı; bir karışımı oluşturan bileşenlerine ayırmak şeklinde tanımlanabilir. Bu nedenle; biomedikal alandan birçok araştırmacı ve klinik kimyacı bu yöntemi değerli bir araç olarak görür ve uygular.

HPLC kısaltması; "yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (high pressure liquid chromatography) anlamına gelen İngilizce kökenli kelimelerin baş harflerinden oluşur. Temelde; klasik açık-sistem kromatografi tekniklerinden farklı değildir. Buna karşın; bu sistemde, yüksek akış hızlarında (0.1 ml/dk ile 50-100 ml/dk arasında), daha çabuk, yüksek seçicilikte(rezolüsyonda) sonuçlar elde edilebilmektedir. Çağdaş HPLC sistemleri 1960'lı yılların sonlarında ortaya çıkmıştır. HPLC'yi güçlü bir teknik haline getiren özellikler; seçicilik, hassaslık, çabuk ve çok iş görme sığası(kapasitesi) olarak özetlenebilir. Bu yöntemin kökleri; Martin ve Synge'nin 1940'lardaki çalışmalarına dayanır(46).

HPLC tekniğinde sağlanan kazanç ve üstünlükleri; hız, hassaslık, stabilite(sonuçlardaki dengelilik), saflaştırma, analiz üstünlüğü(doğruluk ve kesinlik), uygulama kolaylıkları(çok küçük miktarlardaki örneklerle çalışabilme) sağlanması şeklinde özetleyebiliriz.

a.Hız: Deney, dakikalar düzeyindeki bir çabuklukta bitirilebilmektedir.

b.Hassaslık: Bu yöntemle; pikomol ve hatta pikomol altı düzeyde materyal incelenebilmektedir.

c.Stabilite: Isısal olarak dengesiz bileşikler oda ısısında uygulanabilmekte, elde edilen sonuçlarda tam bir dengelilik sağlanabilmektedir.

d.Saflaştırma: Daha ileri çalışmalarda kullanılmak üzere; bir karışımdan istenilen bir bileşik uygun saflıkta elde edilebilmektedir.

e.Analiz: HPLC'ye verilen örnekler; % 1.0'lık bir doğruluk ve kesinlikte işlem den geçirilebilmektedir.

f.Kolaylık: Analiz ve saflaştırma için oldukça küçük miktarlarda çalışılabilmesi, programlanabilir olması gibi nedenlerle kullanımı kolay bir yöntemdir.

HPLC yönteminde; temel ilke olarak, adsorpsiyon, partisy on, iyon değ iş tiri ci sterik eksklüzyon(exclusion-dış lama) kromatografi sistem leri kullanılmaktadır. Karmaş ık materyal-lerin ayrılması için; adsorpsiyon tekniğ i, partisy on tekniğ i ve iyon değ iş tiri ci kromatografi tekniğ i, buna karş ın yüksek moleküler ağı rlıklı materyallerin ayırımında ise sterik eks-klüzyon tekniğ inin kullanımı amaca uygunluk gösterir.

HPLC; nükleotid analizi, ilaç ve metabolit analizi, ste-roid ve vitamin analizi, kanser araşt ırmaları, enzim çalış -maları, B.O.S/ıdrar/plazma metabolitleri ve biojenik amin-leri analizi, proteinlerin kalitatif ve kantitatif analizi gibi biyomedikal çalış malarda geniş kullanım alanına sahip-tir. Yöntem in süratli ve güvenilir sonuç lar vermesi temel bilimsel çalış maların yanısı ra klinik alanda da rutine yö-nelik iş levlere sahip olmaktadır(46, 47, 48).

5.) HEMOGLOBİNOPATİLERİN İNCELENMESİNDE HPLC YÖNTEMİNİN KULLANIMI

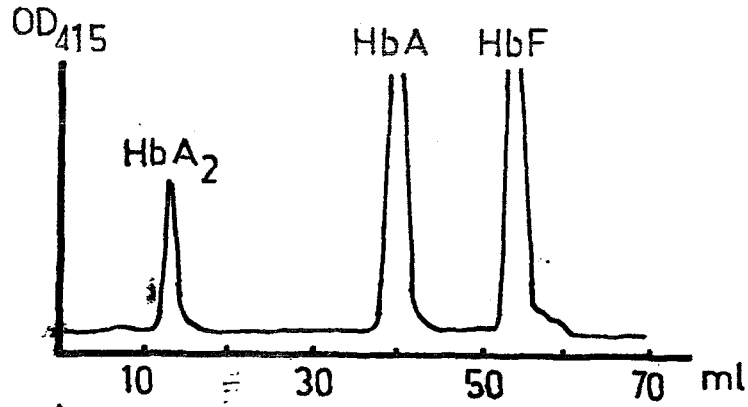
Bir önceki bölümde; HPLC'nin biomedikal uygulamalarını açıklarken, proteinlerin incelenmesinde de kullanıldığı belirtilmişti. HPLC'nin hemoglobinopatilerin incelenmesindeki kullanımının her geçen gün, gelişen teknolojiye uygun olarak, yoğunlaştığını ve daha geniş uygulama alanı bulunduğunu görmekteyiz. Hemoglobinopatilerin incelenmesinde kullanılan HPLC sistemlerini; iyon değiştirici kromatografik sistemler olarak anyon ve katyon değiştiriciler, ters-evre(reverse-phase) sistemi olarak özetleyebiliriz. Bu kromatografik yöntemleri kullanarak; hemoglobin tipleme yapılabileceği gibi, alt birimler arasındaki ilişkiler ve kan içindeki oranları gibi oldukça bilgi verici sonuçlar elde edilebilecektir.

a.Anyon Değiştirici HPLC Sistemi

Bu sistemde; hemoglobin tipleme oldukça kısa sürede, çok az miktarda örnek kullanılarak kolaylıkla yapılabilmektedir. Geliştirici tamponlar; Tris-KCN tamponları olup, pH 8.6'da sodyum asetat gradyanı ile sağım(elution) gerçekleştirilmektedir(49, 50). Kolondan alınan fraksiyonlar; HPLC'nin bir bileşeni olan spektrofotometrik kaydedicide 415 nm veya 280 nm filtre ile incelenir, elde edilen veriler grafik yazıcıda grafik haline dönüştürülür(bkz şekil-14).

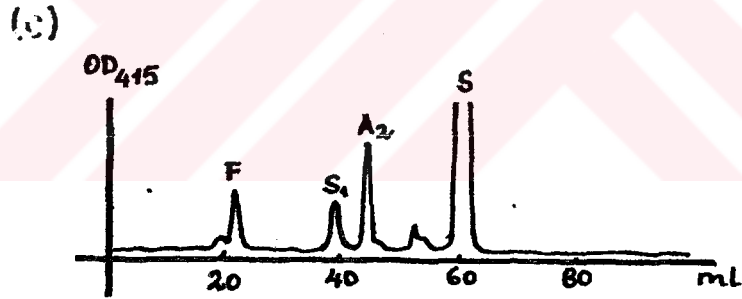
b.Katyon Değiştirici HPLC Sistemi

Bu sistemde; bis-tris/KCN tamponları ile pH 6.4'te yine sodyum asetat gradyanı ile sağım gerçekleştirilir. Katyon değiştirici kolonlar kullanılarak normal ve yavaş hareketli(elektroforetik olarak) hemoglobinler başarılı bir şekilde ayrılabilir(49, 50). Bu sistemde; HbF'in önce çıkması nedeni ile, özellikle yeni doğandaki analizler ideal kabul edilmektedir. Kolondan çıkan fraksiyonların incelenip kaydedilmesi anyon değiştirici sistemdeki gibidir(bkz şekil-15).



ŞEKİL-14) Beta talasemili bir hastada anyon değiştirici kolon ile hemoglobin tiplendirmesi.

(Kaynak-49)



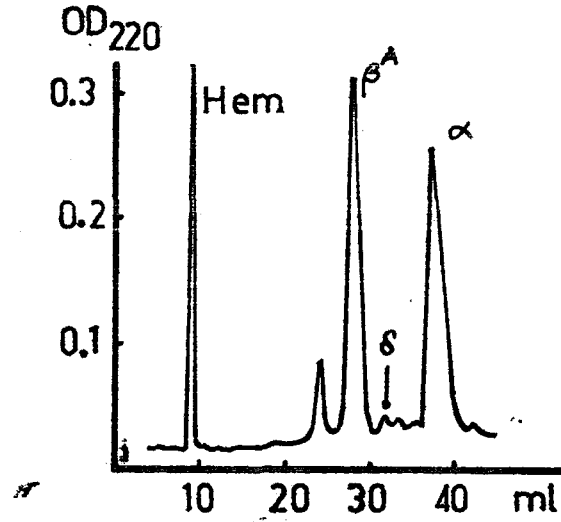
ŞEKİL-15) HbS/β⁰-talasemi kombinasyonlu hastada kasyon değiştirici kolon ile yapılan HPLC sonucu.

(Kaynak-49)

c.Ters Faz(Reverse Phase) HPLC Yöntemi ile Globin Analizi

Bu yöntem; Shelton, Congote ve Huisman tarafından geliştirilmiştir. Yöntemde, hemoglobini oluşturan globin zincirleri, asetonitril/metanol/fosfat sisteminde fosfat gradyanı kullanılarak birbirlerinden ayrılmakta ve kolondan sağılmaktadırlar(elue edilmektedirler)(49, 52). Bu yönleme ait kolonlarda organik(asetonitril/metanol) ve inorganik(fosfat) olmak üzere iki faz bulunmaktadır. Sisteme uygulanan proteinler hidrofobik davranışlarına göre kolonu terketmektedirler. Buna göre; en fazla hidrofobik özellik gösteren zincirler daha önce kolondan çıkmak eğiliminde olacaktırlar. Hidrofobik davranış, hemoglobin tetramerindeki globin zincirleri için, en fazladan en aza doğru sırasıyla, alfa-delta-beta şeklindedir(Şekil-16). Bu yöntemin geliştirilerek uygulanması olan asetonitril/TFA(trifloroasetik asit) geliştirici sisteminde; globin zincirleri %0.1'lik TFA kullanılarak birbirlerinden ayrı tutulmakta ve sağım asetonitril gradyanı ile gerçekleştirilmektedir(54-56). Buna göre; normal erişkin ve yeni doğanda yapılan uygulamada elde edilen sonuçlara göre, globin sentez oranları başarılı olarak ortaya konulabilmiştir. Yeni doğanda yapılan uygulamada; doğal olarak yüksek olan HbF'e ait iki değişik tip gama-globin zinciri başarı ile ayrılabilmekte, ayrıca gama varyantı olan A γ T(A γ 75--treonin) de gösterilebilmiştir(56). Bu tür globin varyantlarının başarılı olarak saptanabilmesi için gerekli olan koşul, oluşan varyantın diğerleri ile hidrofobik davranış açısından da farklı olabilmesindedir. Şekil-17'de de görülebileceği gibi; A γ (γ ₁₃₆-Alanin), G γ (γ ₁₃₆-Glisin) ve bir A γ varyantı olan A γ T(A γ -75-Treonin), farklı hidrofobik özellikleri nedeni ile kolondan farklı yerlerde ayrılmışlardır. Bu fraksiyonların hidrofobik davranışları; en fazladan en aza doğru olmak üzere sırasıyla, A γ , G γ , A γ T şeklindedir.

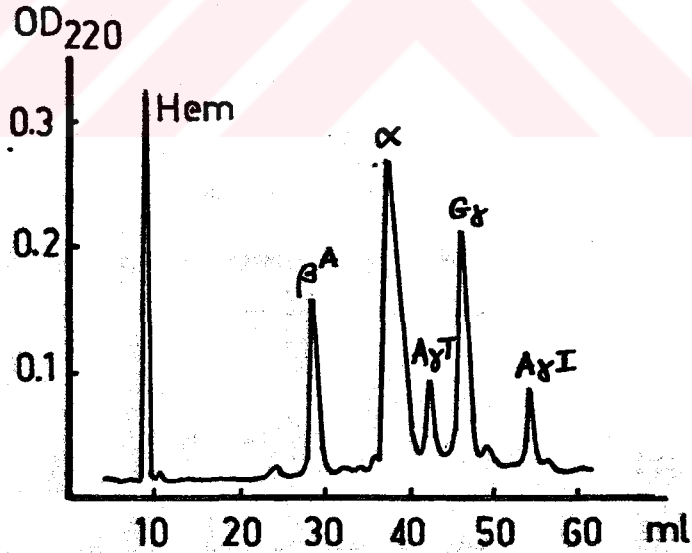
Brennan tarafından geliştirilen bir yöntemde de HPLC kullanılarak globin zincirleri birbirlerinden ayrılabilmişlerse de, bu sistem kolon olarak katyon değiştirici kolon kullanması ve geliştirici sistemi olarak da 6M üre varlığında zincirleri ayrı tutarak sodyum klorür gradyan sistemini



ŞEKİL-16) Normal erişkinde Reverse-Phase(Vydac-C₄ tipi) kolon ile globinlerin ayrımı.

Örnek Miktarı: 0.12 mg
Akış Hızı.....: 1.00 ml/dk
Geliştiriciler: %0.1TFA-Su-Asetonitril
Gradyan.....: Asetonitril Gradyanı
%44-%57 arasında

(c)



ŞEKİL-17) Yeni doğanda Reverse-Phase(Vydac-C₄ tipi) kolon ile globinlerin ayrımı.

Örnek Miktarı...: 0.10 mg
Akış Hızı.....: 1.00 ml/dk
Geliştiriciler.: %0.1TFA-Su-Asetonitril
Gradyan.....: Asetonitril Gradyanı
%44-%57 arasında

kullanması nedeni ile ters faz(reverse phase) kolon yöntemi prensiplerine uymamaktadır. Başka bir anlatımla tek faz olarak(inorganik faz) çalışan sistem ters faz yöntemi değildir(53).

d.HPLC ile Peptid Analizleri

Bu yöntem; hemoglobin zincirlerinin tripsin , kimo-tripsin , termolizin gibi enzimlerle kesilmesinden ortaya çıkan peptidlerin incelenmesine olanak tanır. Bu peptidlerin incelenmesinden ortaya çıkan verilerle anormal hemoglobin yapıları ortaya konulabilmektedir. Burada kullanılan kolon tipi; 10 μ m'lik oktadesil-C₁₈-kimyasal bağlı ters evre kolonudur. Peptidlerin birbirlerinden ayrılması; kolon ile peptidteki non-polar amino asit yan grupları arasındaki etkileşime dayanır. İzole edilmiş globin zincirleri oda ısısında istenilen enzim ile kesildikten sonra, pH 8.5'te ayırım amonyum asetat/asetonitril çözücü sisteminde gerçekleştirilir(49, 57, 58).

6.) GEREÇLER VE YÖNTEMLER

a.Kimyasal Maddeler: Kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Merck, Sigma ve BDH firmalarından sağlanmıştır.

b.Cihazlar: LKB-Bromma HPLC Controller 2152, LKB-Bromma HPLC Pump 2150, LKB-Bromma HPLC Uvicord 2158, LKB Produkter AB Ultröpac Column TSK DEAE 3SW, LKB-Bromma 2 Channel Recorder 2210.

c.Örneklerin Sağlanması: Çalışmada kullanılan örnekler; Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı, İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalından sağlanmıştır.

Kan örnekleri; transfüzyon uygulaması öncesinde alınmaya çalışılarak, Na_2EDTA (1.0 mg/ml kan) içeren tüplere alınmıştır. Örneklerden, homozigot orak hücre anemili hasta grubu 6-10 yaşları arasında, talasemili hasta ile heterozigot orak hücre anemili hasta grubu 29-30 yaşlarında olup, kordon kanı ise yeni doğandır.

d.Yöntemler:

Hemolizatların Hazırlanması

Kan örnekleri, süpernatant renksiz/berrak oluncaya kadar(en az üç kez) % 0.85'lik NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır. Elde edilen kırmızı küreler, 2 hacim saf su ile parçalanmış, hemolizi kolaylaştırmak amacı ile -20°C de 10 dk bekletilmiştir. Bu işlemden sonra; stroma CCl_4 ile ekstre edilmiştir. Ekstraksiyon 1 hacim CCl_4 eklenecek vortekste karıştırıldıktan sonra 3,000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan hemolizat ortalama % 8.0-10.0 g Hb içermektedir. Hemolizatlar, 1.5 ml'lik eppendorf santrifüj tüple-

ri içerisinde parçalara bölünerek -70°C 'de saklanmıştır. Kontrol amacı ile tekrarlamalar dondurulan kısımlardan yapılmış, buna karşın örneklerin taze olarak hazırlanıp çalışılması sağlanmıştır(30, 50).

HPLC Gradyan Sistemi

Kullanılan HPLC sistemi; peristaltik pompa, gradyan karıştırıcı, UV-cord spektrofotometrik detektör(276 nm filtrelili), grafik kaydedici, fraksiyon toplayıcı, ve tüm sistemi kontrol eden bilgisayar modülünden oluşmuştur(şekil-18).

Bilgisayar modülü; bağımsız kontrollü "fraksiyon toplayıcı" dışında kalan dört bölümü, kullanıcı tarafından yazılan programa göre kontrol altında tutmaktadır. Buna göre; bilgisayardan gelen bilgi ve emirler kolona istenilen zaman, hız ve gradyan programında geliştirici verilmesini sağlamakta, kolondan çıkan spektrofotometrik veriler ise grafik kaydedici tarafından grafik haline dönüştürülmektedir.

Geliştirici Tamponların Hazırlanması

Geliştirici tamponlar, Tris-KCN temeline dayalı olup pH 8.6'da kolona sodyum asetat gradyanı uygulayacak şekilde hazırlanmışlardır.

Tampon-A: 15.0 mM Tris-baz
1.5 mM KCN^x

pH:8.6

(pH; % 25'lik asetik asit ile ayarlanır)

Tampon-B: 15.0 mM Tris-baz
1.5 mM KCN^x

150.0 mM Sodyum asetat

pH:8.6

(pH; % 25'lik asetik asit ile ayarlanır)

Yukarıdaki içerikte hazırlanan geliştirici tamponlar 0.45 μm 'lik filtreden geçirildikten sonra 20 dk süre ile "sonik banyo"da degaze etmek amacı ile tutuldu. Bu işlem-den sonra kullanıma hazır hale gelen geliştirici tamponlar, HPLC sisteminin girişlerine bağlandı.

^xKCN: Potasyum siyanür

Uygulanan Gradyan Programı

HPLC sisteminin bir bölümü olan bilgisayar modülü; daha önce de belirtildiği gibi, kullanıcı tarafından yazılan program çerçevesinde kolona gradyan programı uygulamaktadır. En uygun ayrımı yapabilecek gradyan programının %10 B'den %100B'ye çıkacak program olduğu saptanmış ve tüm örnekler bu program ile incelenmiştir(Gradyan programı için bakınız tablo-16).

TABLO-)Örneklerin incelenmesinde kullanılan Gradyan Programı

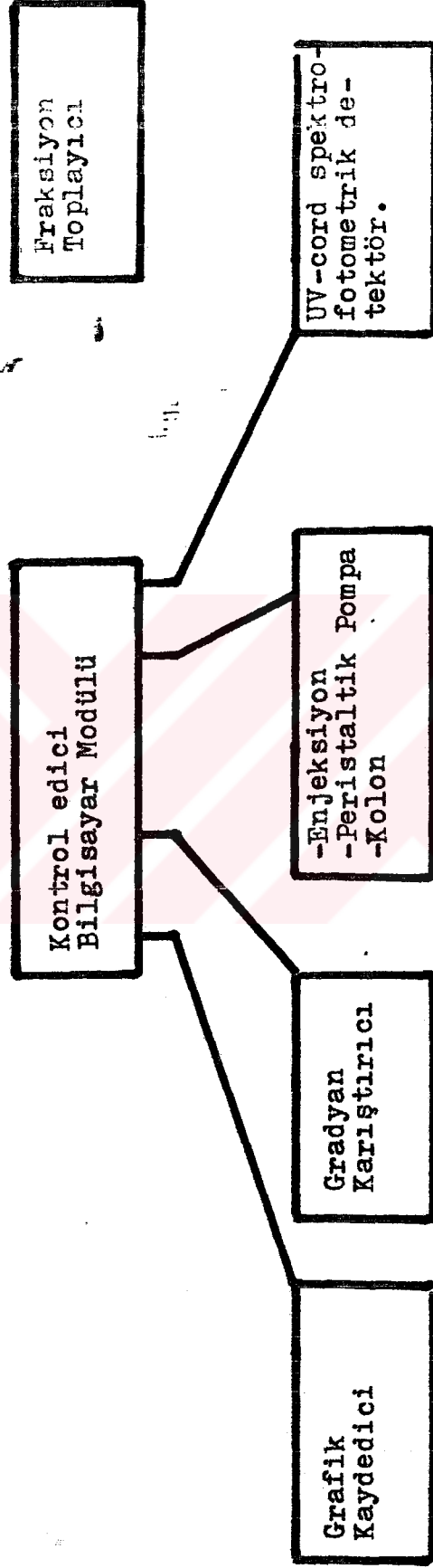
Süre(dk)	Akış Hızı(ml/dk)	Gradyan ^(a)
0 - 10	1.00	% 10B
10 - 50	1.00	% 10B → % 100B
50 - 60	1.00	% 100B

(a) Gradyan programında kullanılan; % 10B'de yapılan 10 dk'lık uygulama ile, % 100B'de yapılan 10 dk'lık uygulama, sırası ile kolonun dengelenmesi ve temizlenmesi amacına yöneliktir.

Tablo-16'da verilen gradyan programı; 100 ul'lik örneğin sisteme verilmesini takip eden 15. saniyede başlatılmış olup, aynı anda da grafik kaydedici devreye sokulmuştur. Ayrıca; program sona erdikten sonra da; % 100B'de kolon beş dakika daha tutulmuş, daha sonra 10 dk % 0B uygulandıktan sonra % 10B'ye çıkılmıştır. % 10B'de 5 dk süre ile kalan kolona örnek enjekte edilerek yukarıda da belirtilen 15 sn'lik aradan sonra program devreye sokulmuştur. Tüm bu hazırlık işlemleri sırasında, akış hızı 1.00 ml/dk'da tutulmuştur.

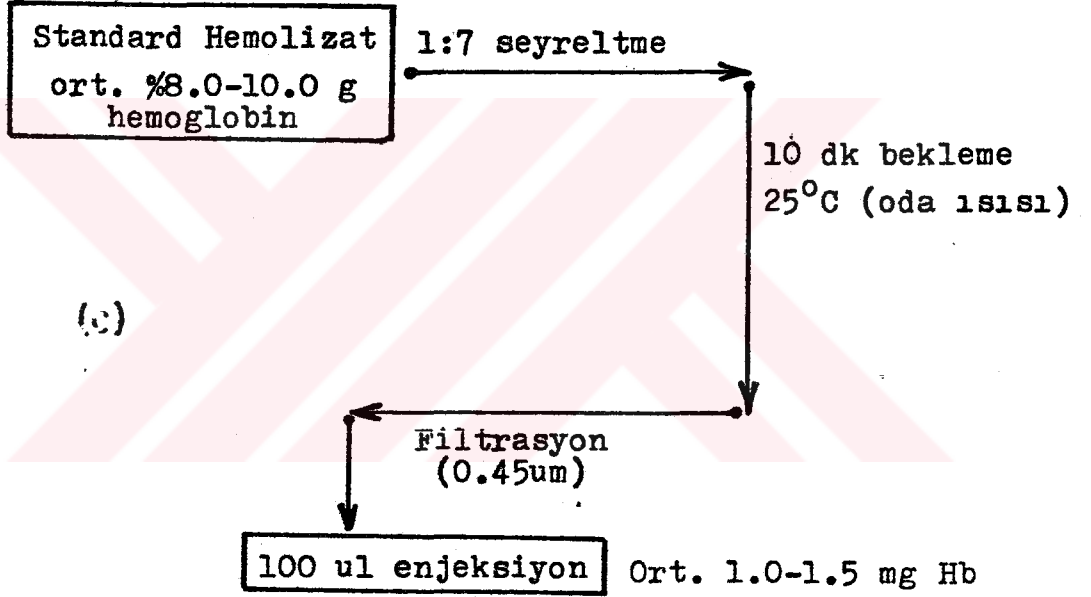
ŞEKİL-18) Çalışmada kullanılan HPLC sistemi şeması.

(c)



Örneklerin HPLC için Hazırlanması

Hazırlanan standard hemolizatlar(ortalama %8.0-10.0 g Hb içeren); geliştirici tampon.A ile 1:7 oranında seyreltilmiş, 10 dk oda ısısında bekletildikten sonra, 0.45 μ m'lik filtreden geçirilmiştir. Filtre edilen örneklerden 100 μ l kolona verilmek üzere, HPLC sisteminin enjeksiyon bölümüne ait halka("loop") içerisine doldurulmuştur. Bu amaç için özel enjektör kullanılmaktadır. Hemolizatların kolona verilmek amacı ile hazırlanış şeması şekil-19'da gösterilmiştir.



ŞEKİL-19) Standard hemolizatların HPLC kolonlarına verilmek üzere hazırlanışı.

e.Kullanılan Kolon Tipi: Örneklerin analizinde; IKB-Bromma TSK/DEAE-3SW tipi kolon kullanılmıştır. Kolon aktif hacmi 6.6 ml'dir.

7.) BULGULAR

Yapmış olduğumuz çalışmada, HPLC sistemi kullanılarak, 6 klinik olarak normal(bir tanesi şekil-20'de gösterilmiştir) 5 homozigot orak hücre anemili, 2 talasemili, 2 heterozigot orak hücre anemili hastaya ve 1 yeni doğana ait hemolizatlara LKB/TSK DEAE 3SW Ultropac Kolumnunda incelenmiştir(Tablo-8).

Örnekler incelenirken kullanılan HPLC sistemine ait parametreler tablo-9'da belirtildiği gibi uygulanmıştır.

TABLO-8)Örneklere ait bilgiler

Sıra No.	Şekil No.	Klinik Tanı	Yaş/Cinsiyet
1	20	Normal(Kontrol)	26/Erkek
2	21	Kordon Kanı/Normal	Yeni Doğan
3	22	Homozigot Orak Hücre Anemisi	6/Erkek
(c) 4	23	Homozigot Orak Hücre Anemisi	8/Kız
5	24	Homozigot Orak Hücre Anemisi	10/Erkek
6	25	Homozigot Orak Hücre Anemisi	8/Kız
7	26	Heterozigot Beta Talasemi	29/Erkek
8	27	Heterozigot Orak Hücre Anemisi	30/Kadın
9	28	Homozigot Orak Hücre Anemisi	10/Erkek
10	29	Heterozigot Orak Hücre Anemisi	30/Erkek
11	30	Homozigot Beta Talasemi Intermedya	30/Erkek

TABLO-9)Örneklere Uygulanan HPLC Parametreleri

a.Oda Isısı.....	18°-20°C
b.Geliştirici Tampon Akış Hızı.....	1.00 ml/dk
c.Kolon Basıncı.....	10.00 Bar
d.Recorder(Kaydedici) Ayarı.....	100 mV
e.Recorder(Kaydedici) Kağıt Hızı.....	0.2 cm/dk
f.UV-cord Filtresi.....	276 nm
g.UV-cord/Kaydedici Aralığı (Maksimum Absorbans)	0.200
h.Enjeksiyon Halka Hacmi.....	100 ul

Değişik örneklerden izole edilen fraksiyonlar(hemoglobin A, hemoglobin S, hemoglobin F ve hemoglobin A₂) tek tek tekrar kolona uygulanmış, daha sonra ise karıştırılarak kolona verilmiştir(Şekil-31, 32, 33, 34). Bu fraksiyonlar, daha sonra karıştırılarak tekrar kolona uygulanmış ve elüsyon profili incelenmiştir(Tablo-10, Şekil-35).

Kolona uygulanmadan önce yapılan 1:7 oranındaki seyreltmenin rezolüsyon(seçicilik) üzerine etkisini incelemek amacı ile aynı örnek kullanılarak 1:3 ve 1:7 oranında seyreltmeler yapılarak örnek incelenmiştir(Şekil-36).

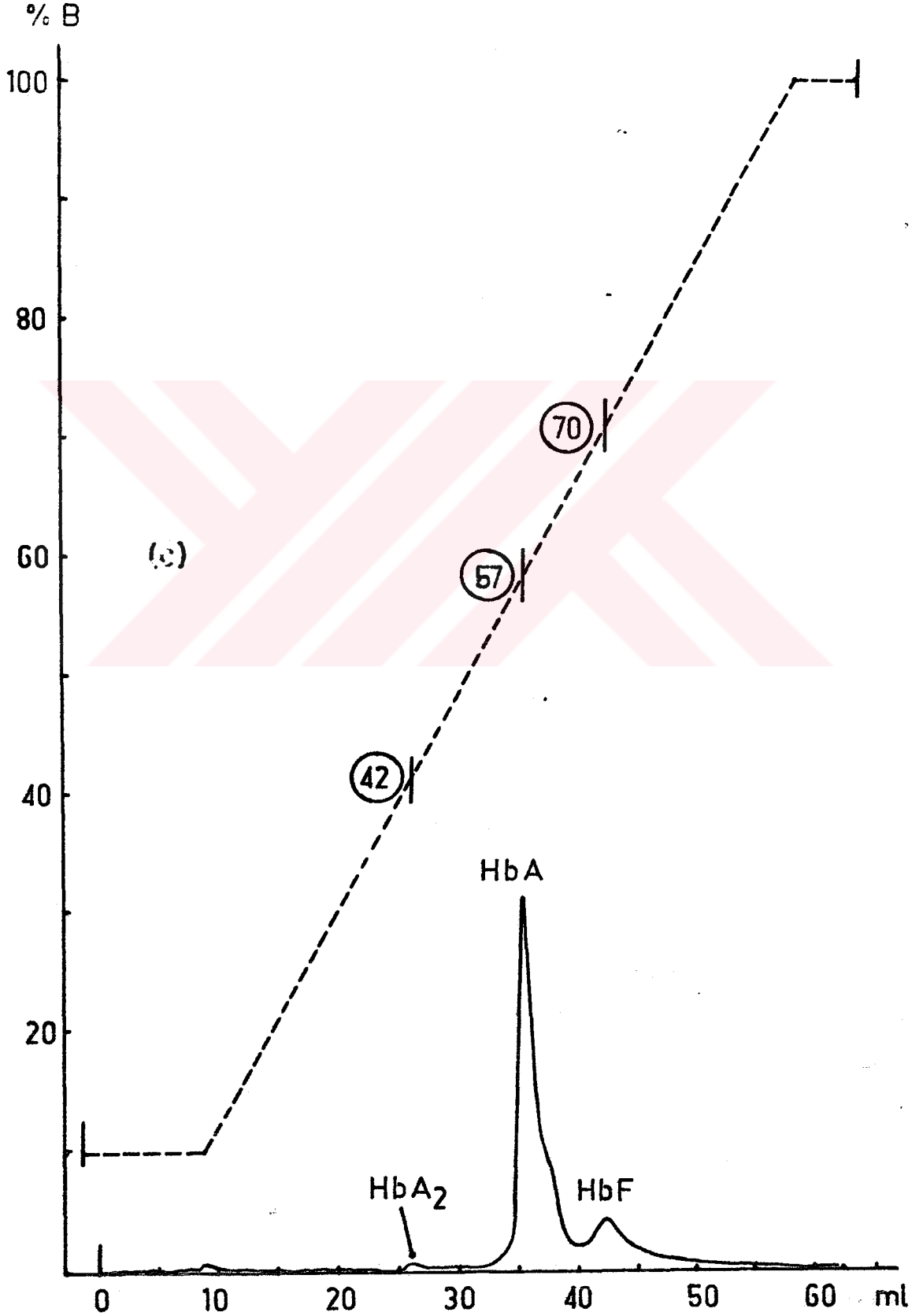
TABLO-10) İzole edilen fraksiyonlara ait HPLC parametreleri

	HbA	HbS	HbF	HbK ^a
UV cord/Kaydedici Aralığı(Maksimum Absorbans).....	0.05	0.05	0.05	0.02
----- -Diğer tüm parametreler tablo-9'daki ile aynıdır. -----				
^a HbK: İzole edilen fraksiyonların karışımıdır.				

ŞEKİL-20) HPLC Grafik Kaydedici
Çıktısı (Recorder Output)

ÖRNEK NO: 1

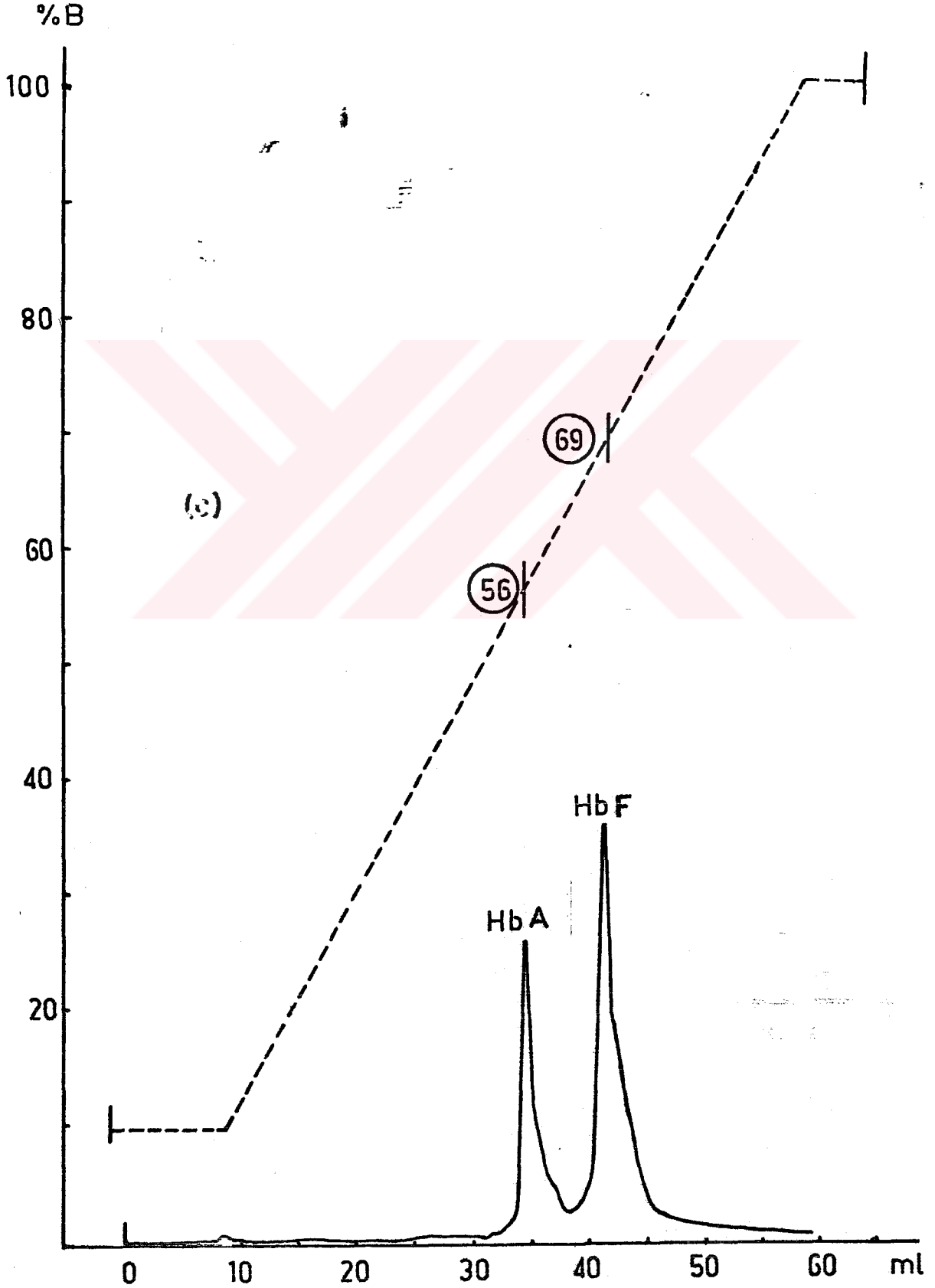
TANI..... Sağlıklı, herhangi bir
hematolojik problemi
yok.



ŞEKİL-21) HPLC Grafik Kaydedici
Çıktısı (Recorder Output)

ÖRNEK NO: 2

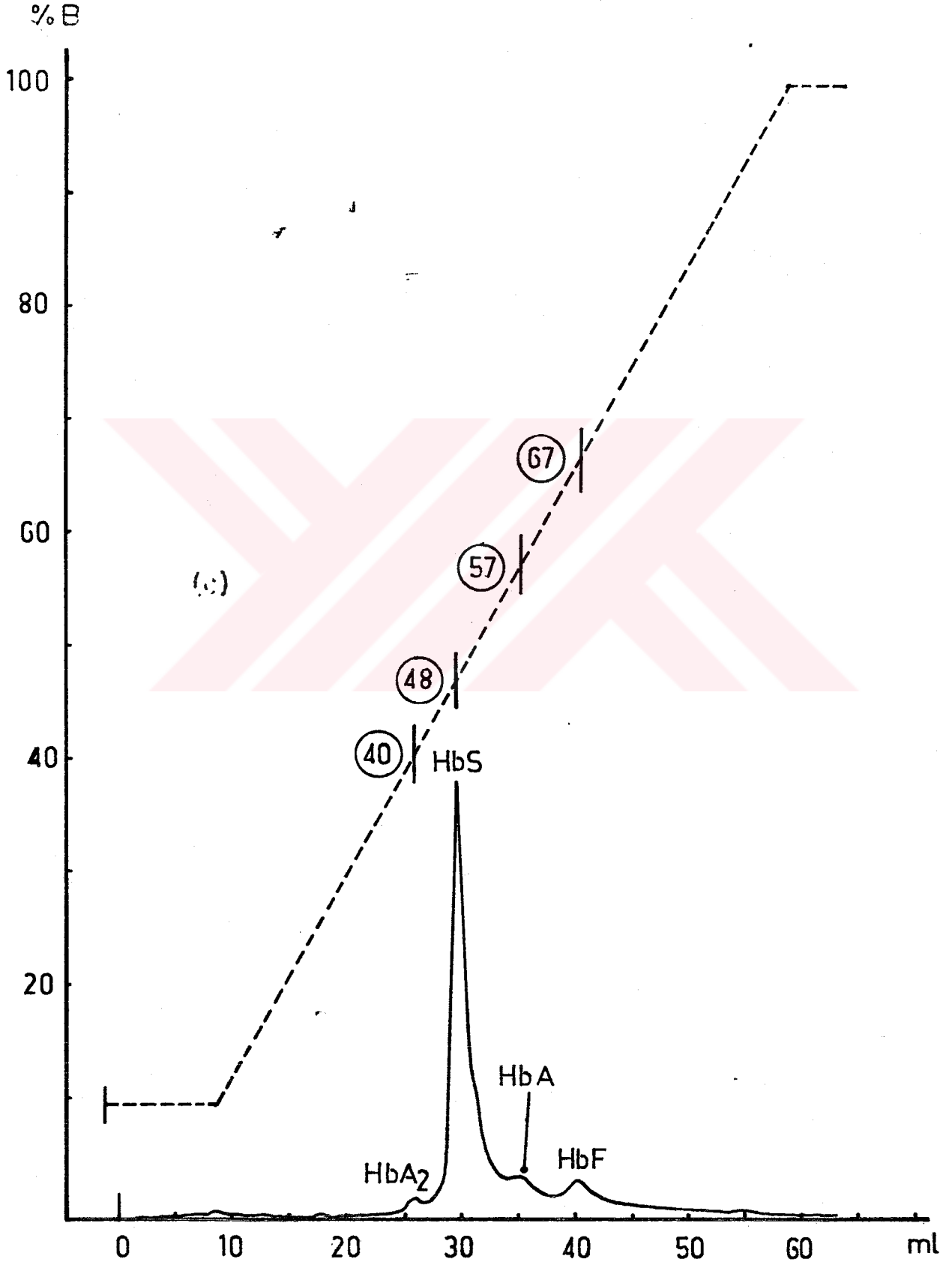
TANI.....: Kordon Kanı



ŞEKİL-22) HPLC Grafik Kaydedici
Çıktısı (Recorder Output)

ÖRNEK NO: 3

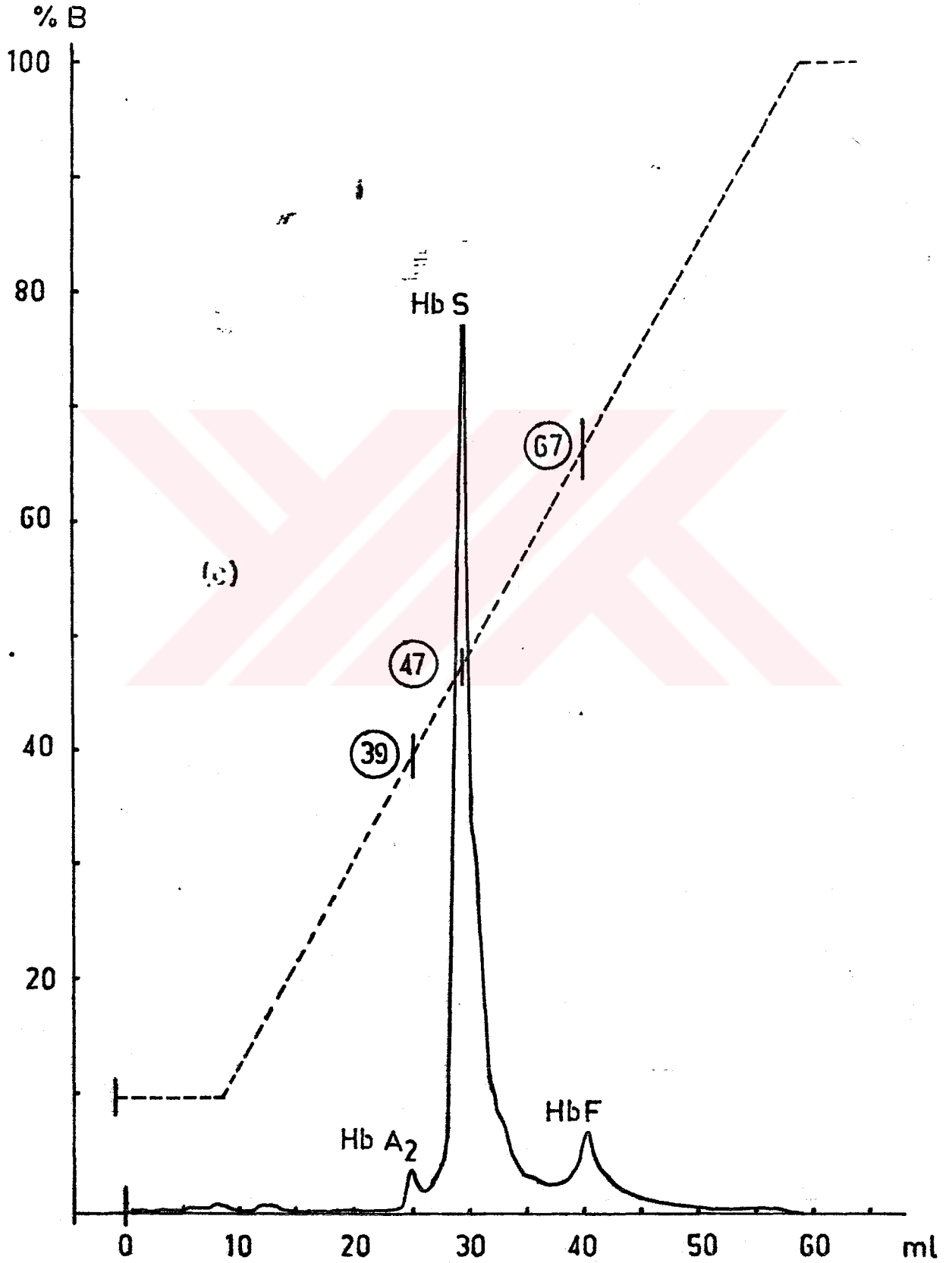
TANI.....: Orak Hücre
Anemisi
Homozigot



ŞEKİL-23)HPLC Grafik Kaydedici
Çıktısı(Recorder Output)

ÖRNEK NO: 4

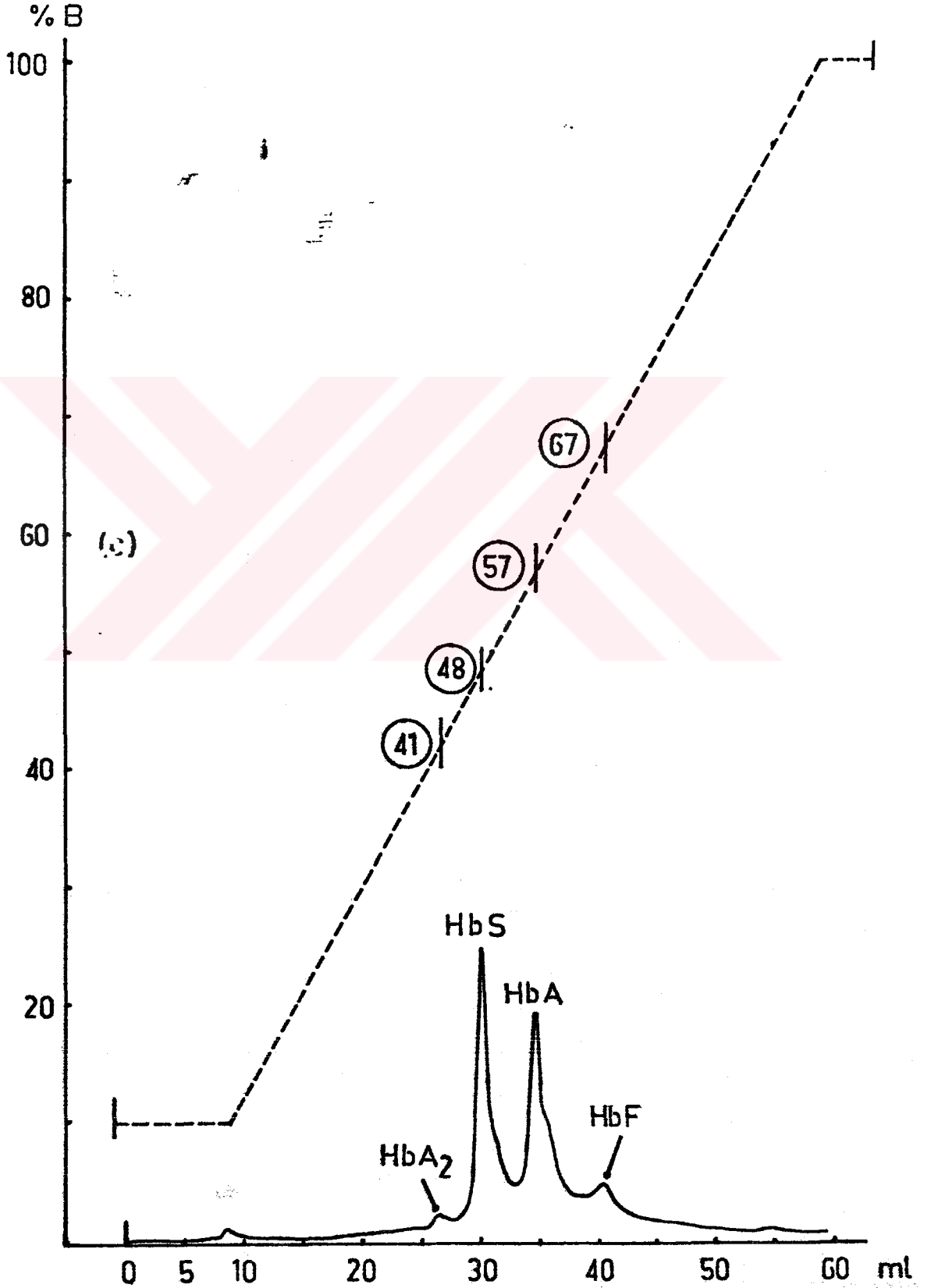
TANI.....: Orak Hücre Anemisi
Homozigot



ŞEKİL-24)HPLC Grafik Kaydedici
Çıktısı(Recorder Output)

ÖRNEK NO:5

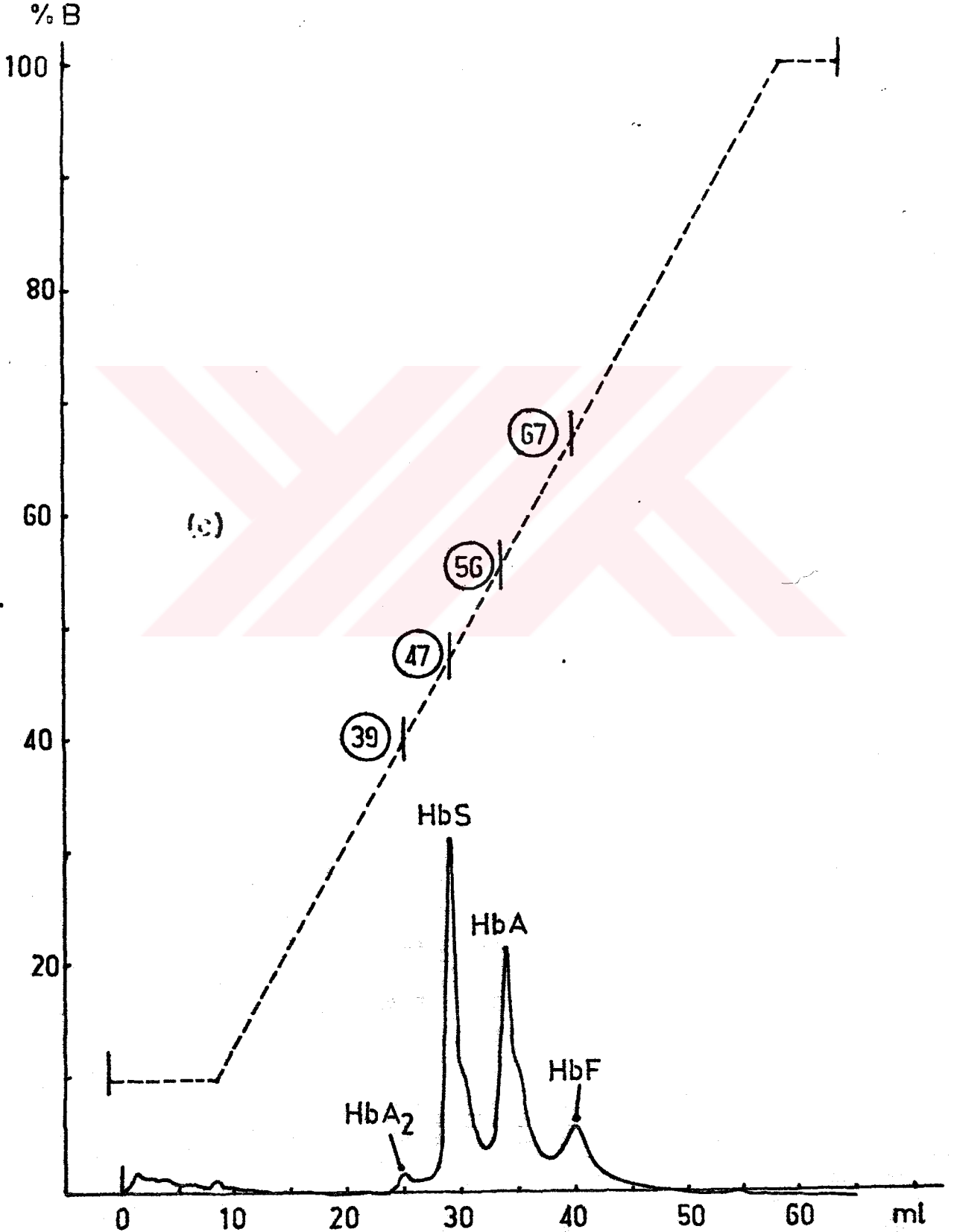
TANI.....: Orak Hücre Anemisi
Homozigot



ŞEKİL-25)HPLC Grafik Kaydedici
Çıktısı(Recorder Output)

ÖRNEK NO: 6

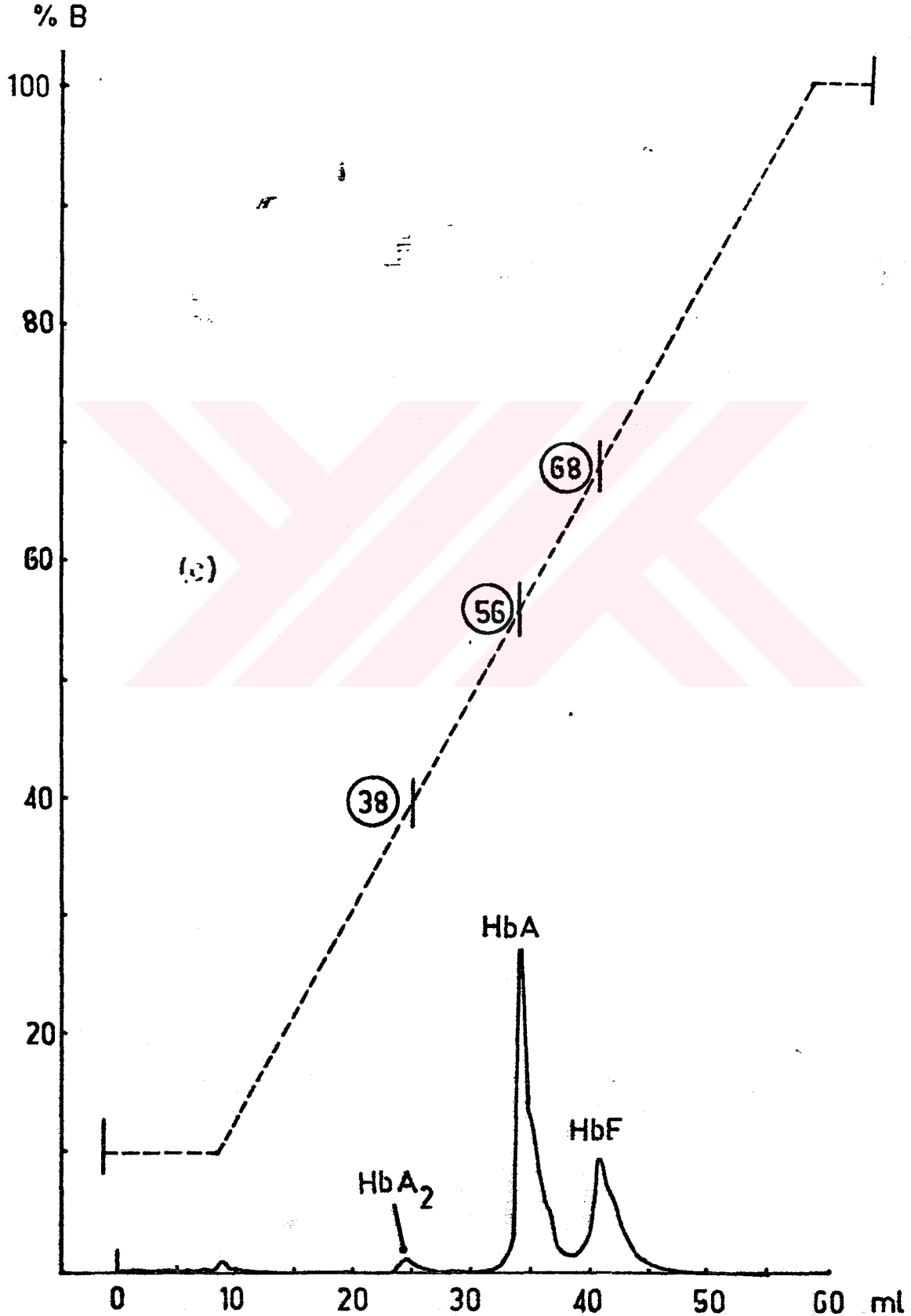
TANI.....: Orak Hücre
Anemisi
Homozigt



ŞEKİL-26) HPLC Grafik Kaydedici
Çıktısı (Recorder Output)

ÖRNEK NO: 7

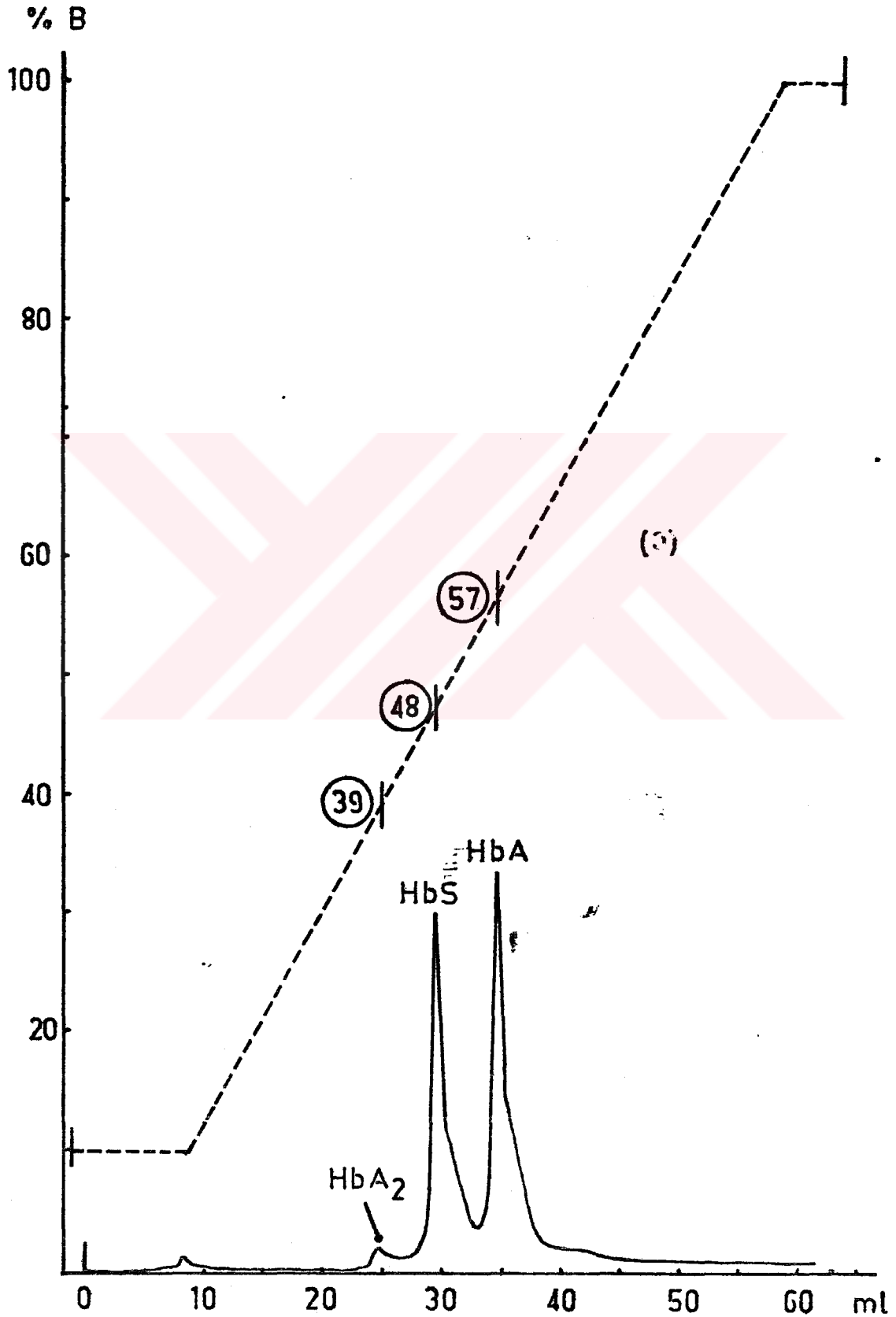
TANI.....: Heterozigot
beta-talasemi



ŞEKİL-27) HPLC Grafik Kaydedici
Çıktısı (Recorder Output)

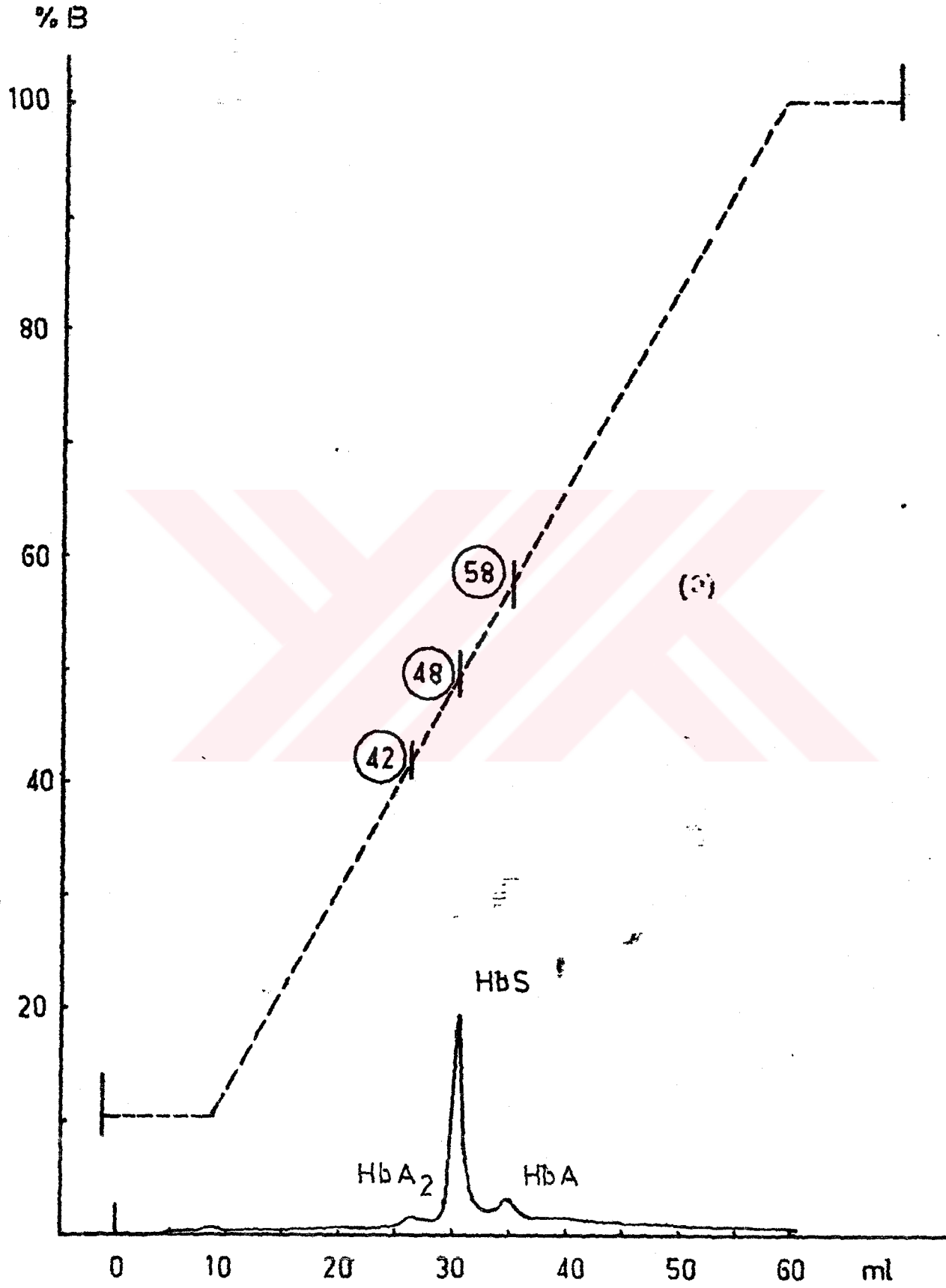
ÖRNEK NO: 8

TANI.....: Orak Hücre Anemisi
Heterozigot



ŞEKİL-28) HPLC Grafik Kaydedici
Çıktısı (Recorder Output)

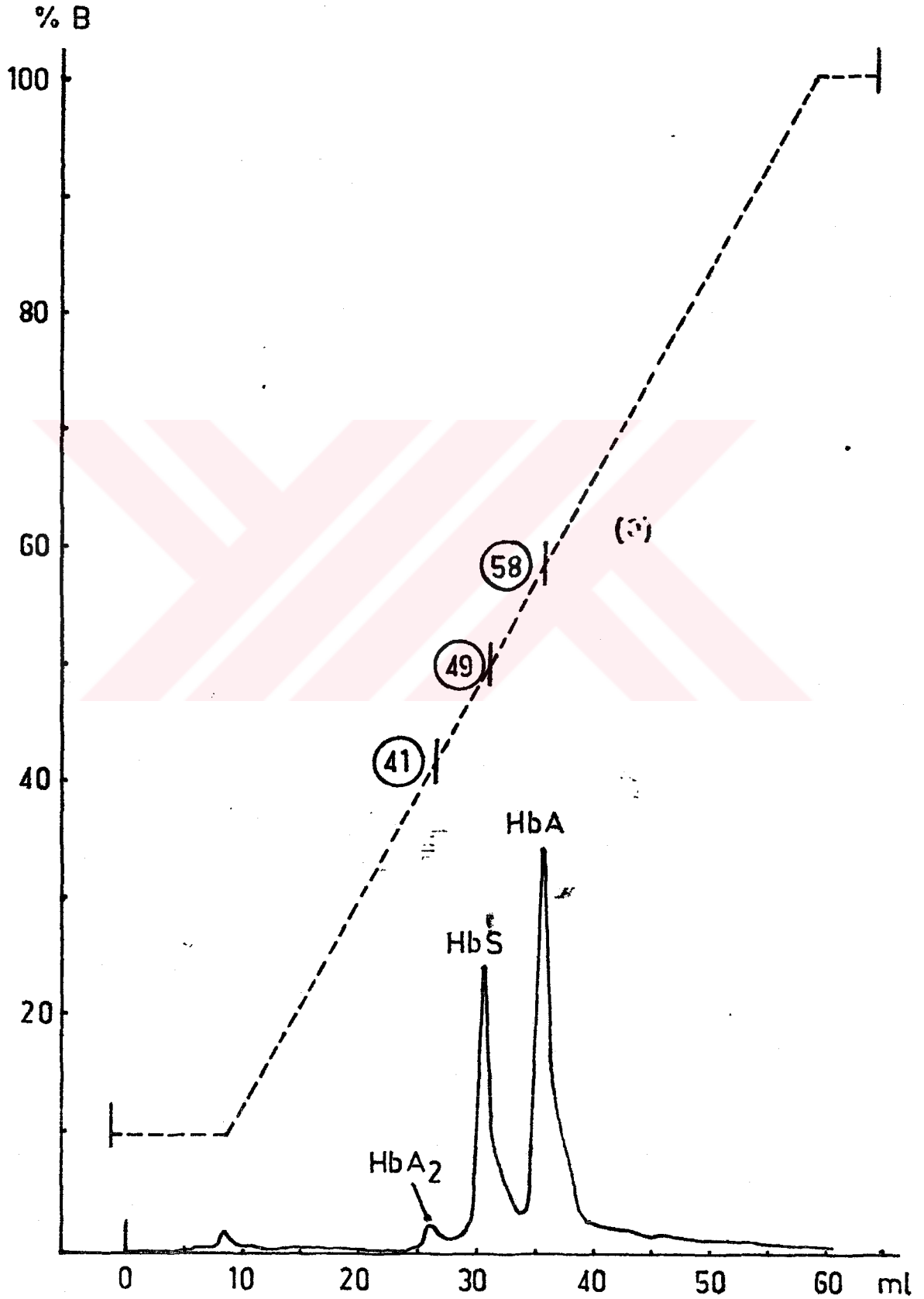
ÖRNEK NO: 9
TANI.....: Homozigot
Orak Hücre
Anemisi



-51-

ŞEKİL-29) HPLC Grafik Kaydedici
Çıktısı (Recorder Output)

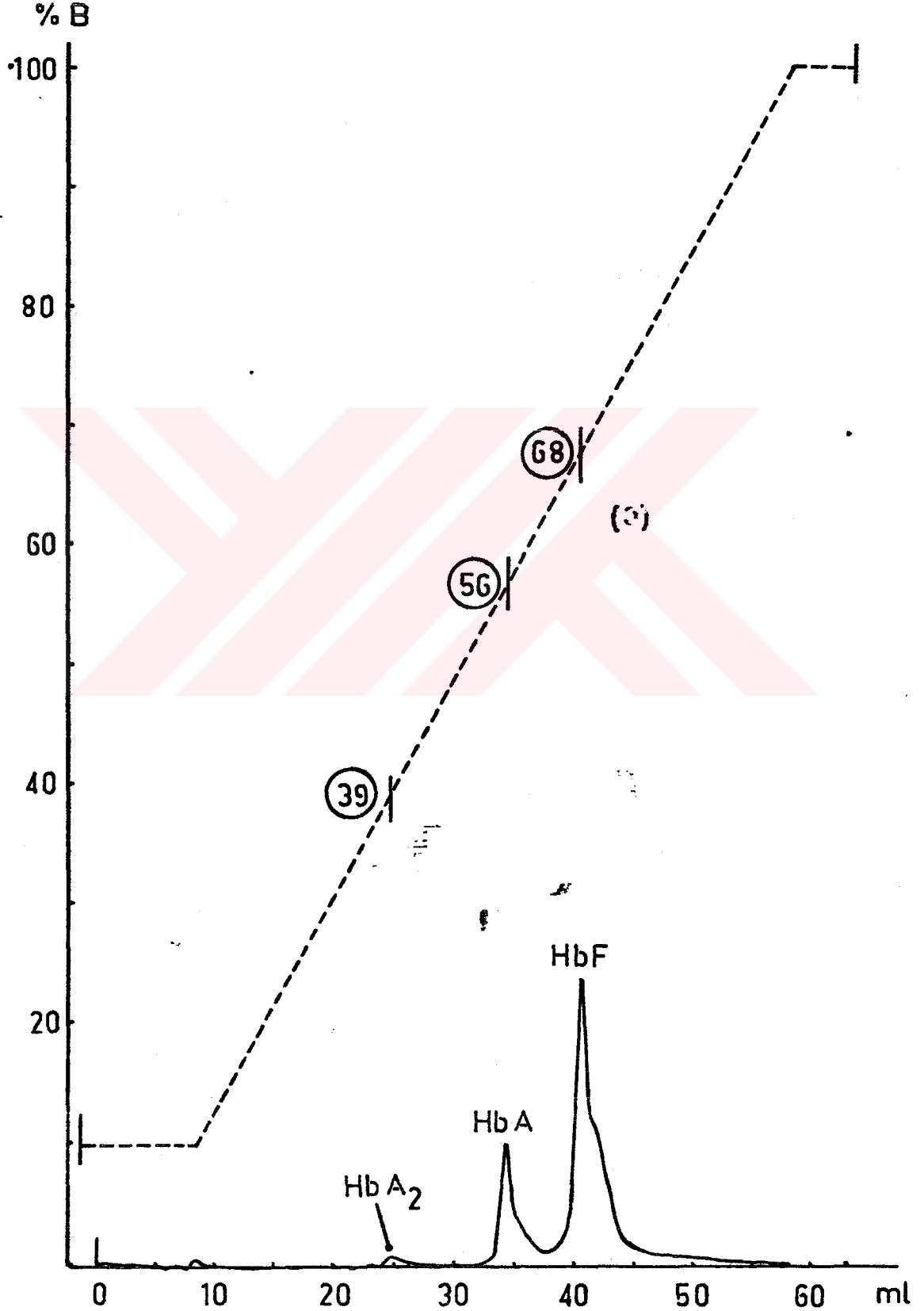
ÖRNEK NO: 10

TANI.....: Orak Hücre An
Heterozigot

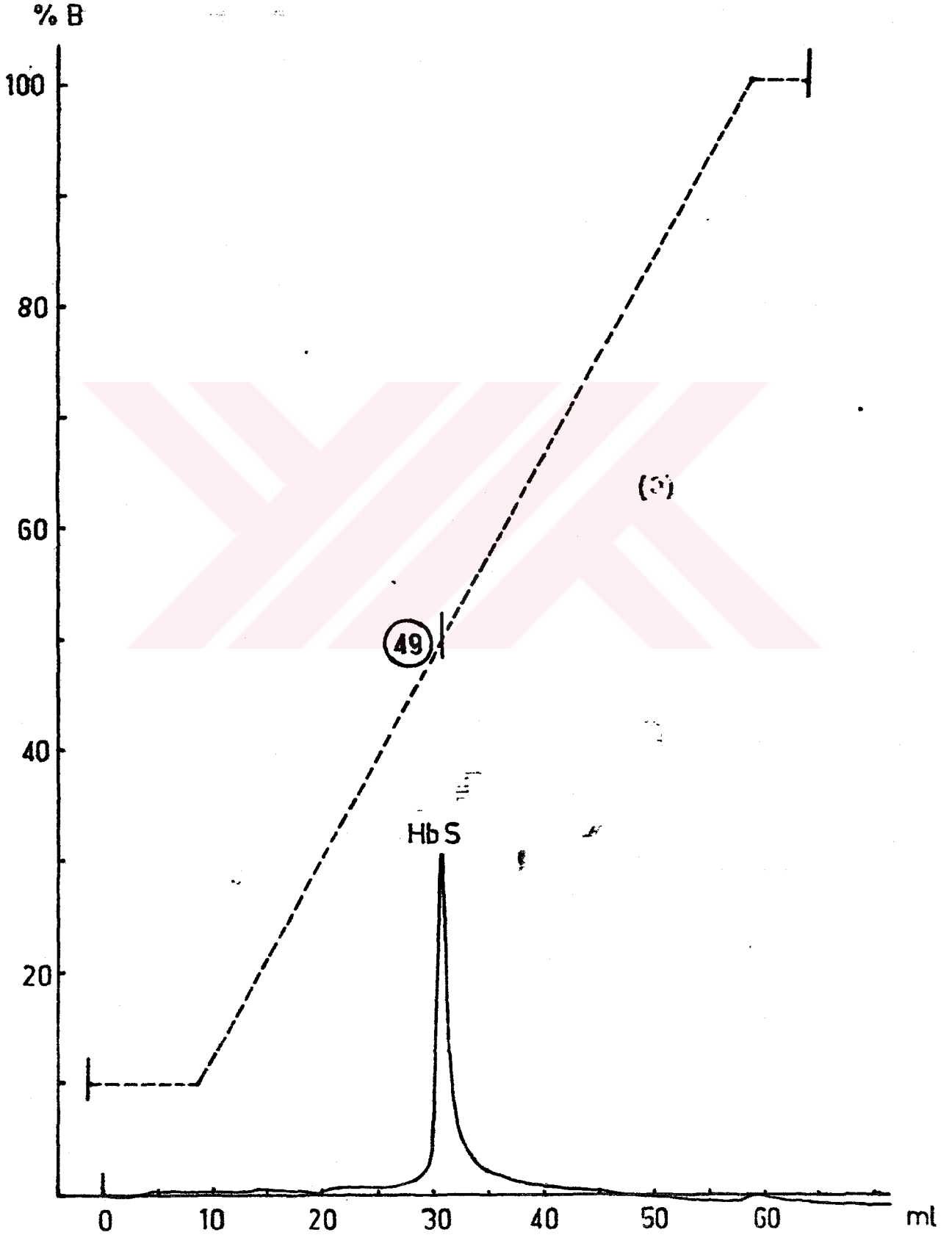
ŞEKİL-30) HPLC Grafik Kaydedici
Çıktısı (Recorder Output)

ÖRNEK NO: 11

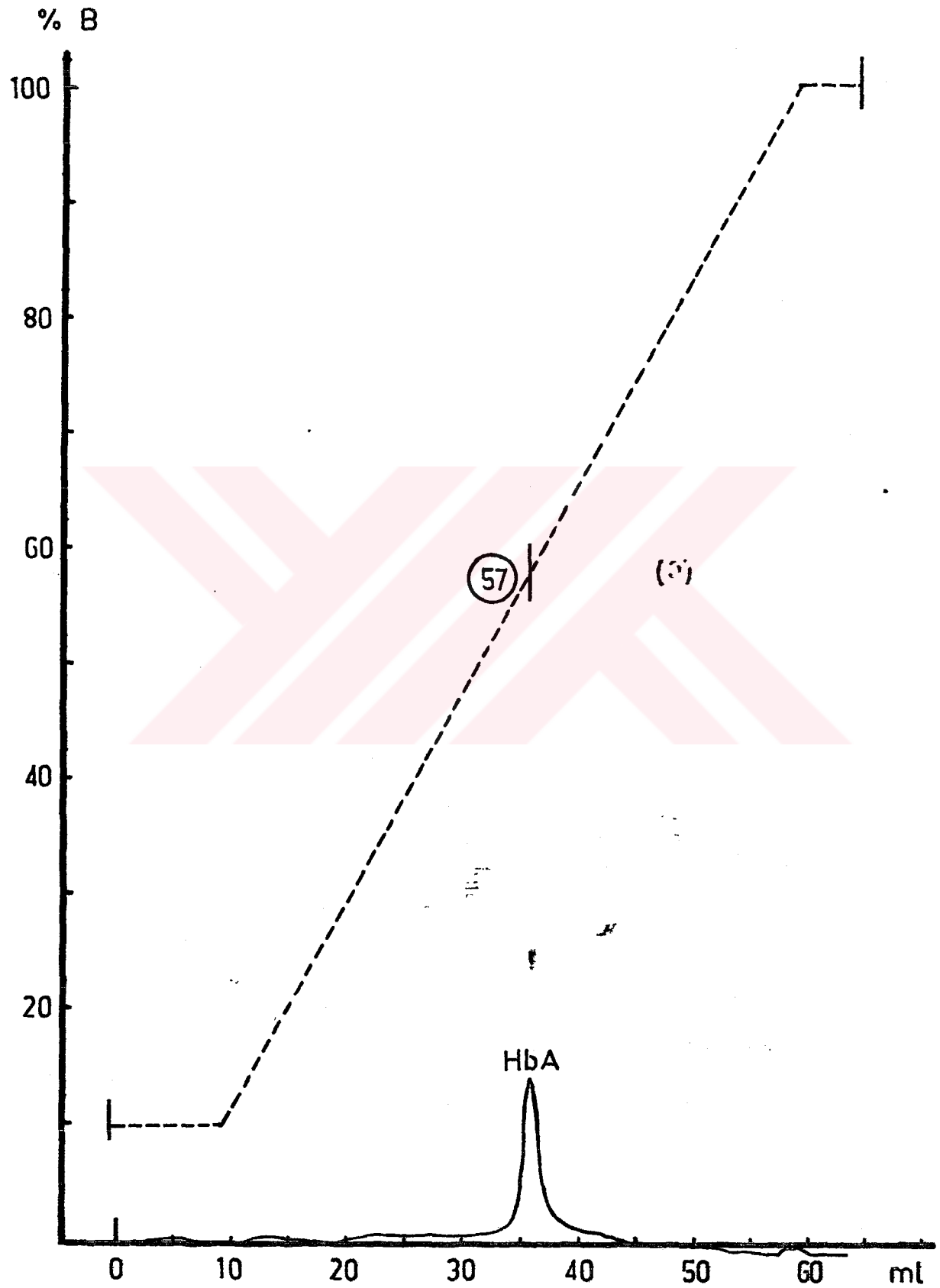
TANI.....: Beta Talasemi
İntermedya
(Homozigot)



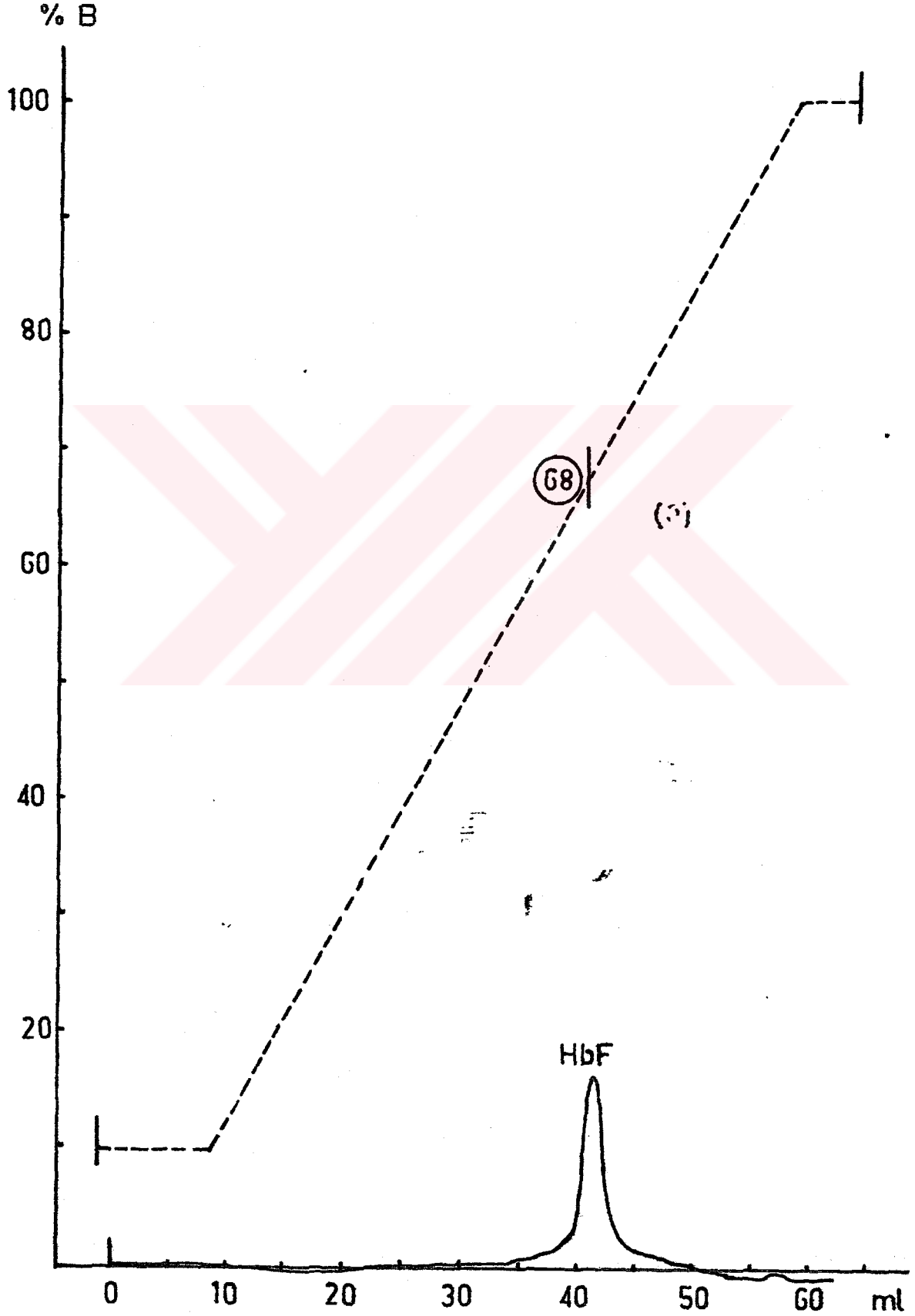
ŞEKİL-31) İzole edilmiş HbS fraksiyonu



ŞEKİL-32) İzole edilmiş HbA fraksiyonu

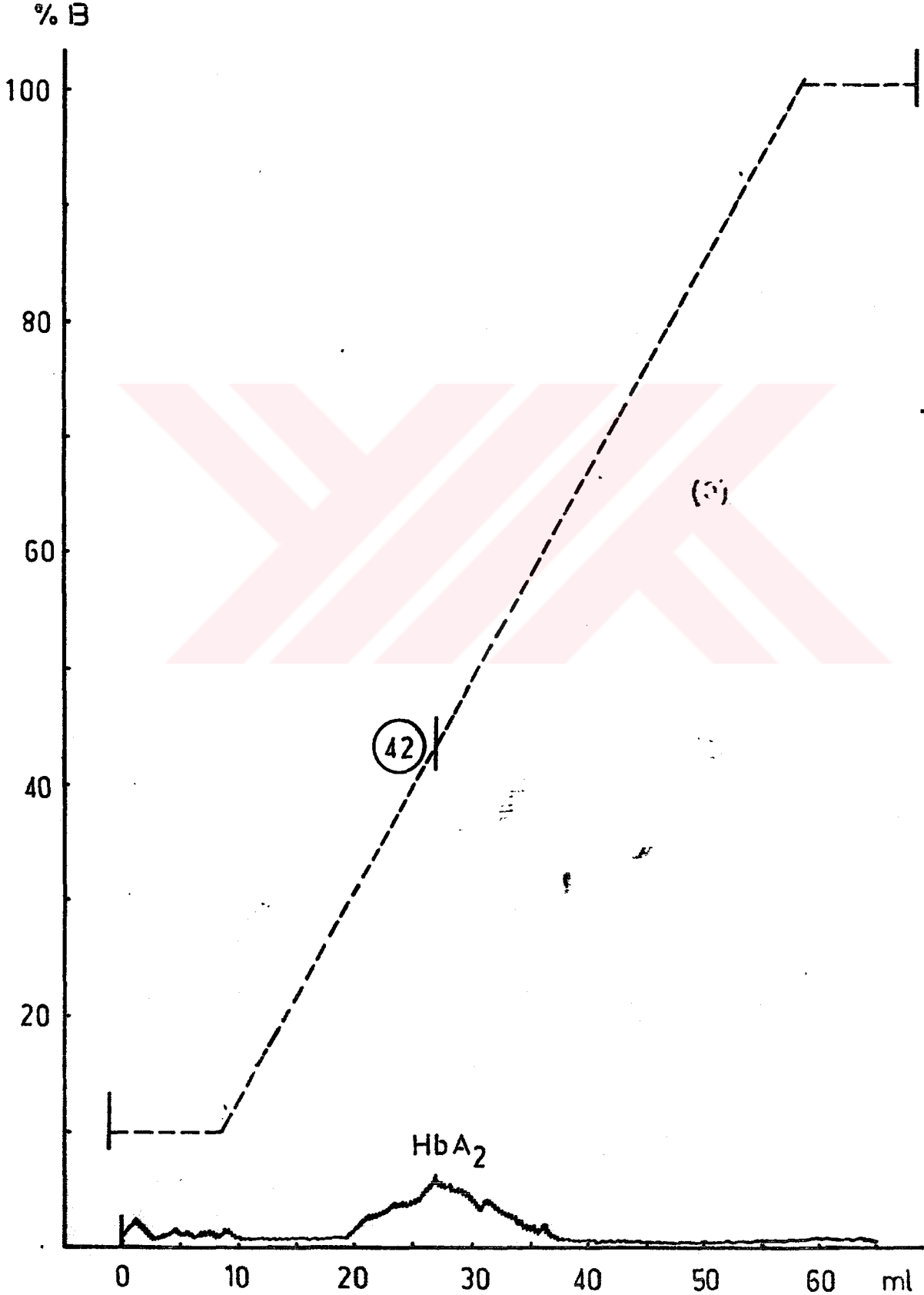


ŞEKİL-33) İzole edilmiş HbF fraksiyonu

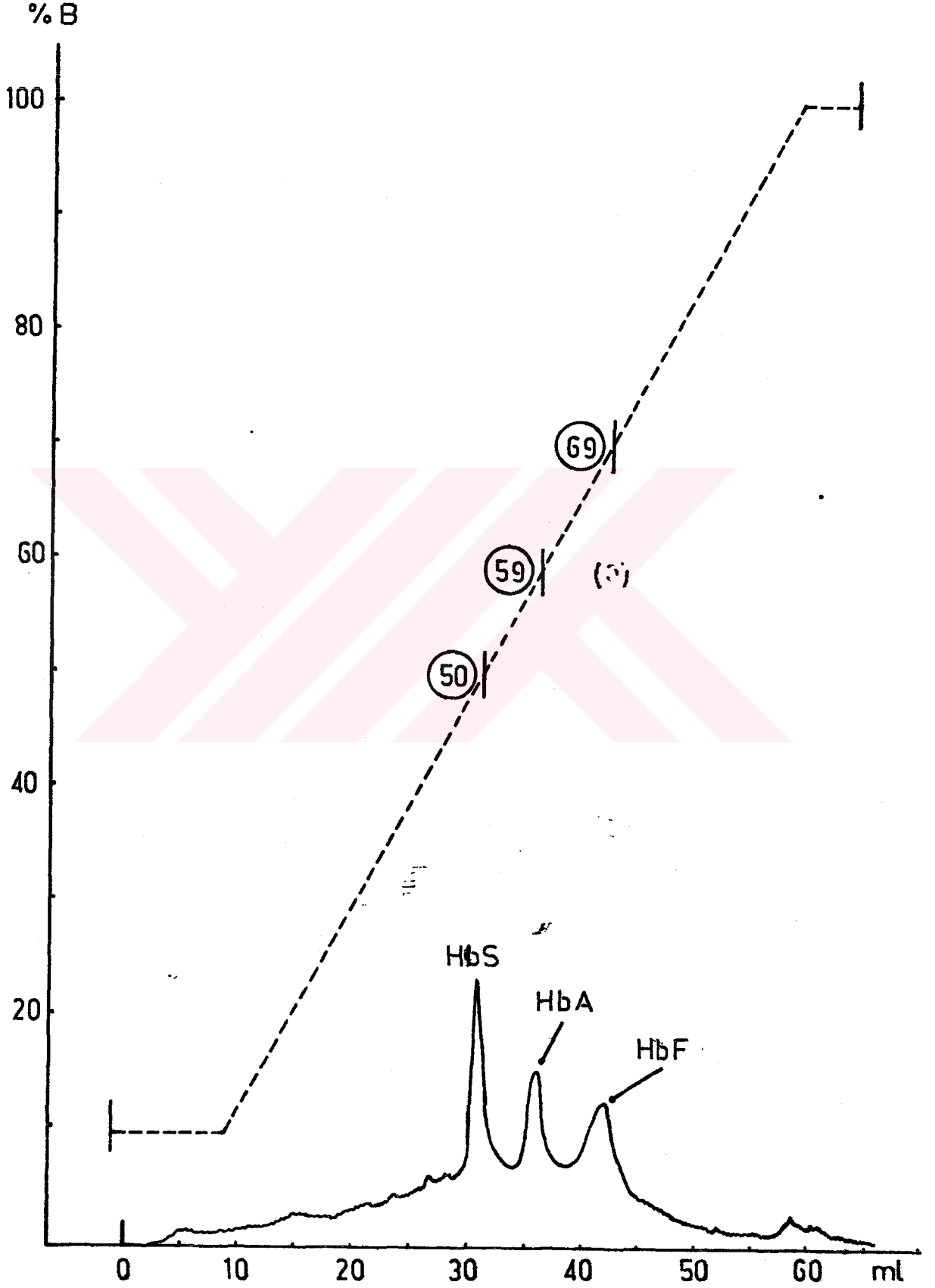


ŞEKİL-34) İzole edilmiş HbA₂ fraksiyonu.

(Bu fraksiyonunun incelemesinde tüm parametreler tablo-9'daki gibidir. Ancak, uygulanan hemoglobin miktarı çok düşük olduğundan maksimum absorbans 0.01'dir.)



ŞEKİL-35) İzole edilmiş fraksiyonların karıştırılarak tekrar incelenmesi



Şekil-35'te elüsyon profili gösterilen izole fraksiyon karışımı, daha önce de belirtilen farklı örneklerden izole edilen fraksiyonların biraraya getirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada izlenen yola göre, 1.0 ml'de toplanan hemolizatlara ait fraksiyonlar sırasıyla, HbA'dan 100 ul, HbS'den 100 ul, HbF'den 100 ul olacak şekilde alınmış ve karıştırılarak oluşturulan solüsyondan 100 ul kolona uygulanmıştır. HbA₂ fraksiyonu çok küçük olduğundan bu karışım içerisinde gösterilememiştir.

Şekil-37'de saklama koşulları ile ilgili bulgular yer almaktadır. Şekil-19'da gösterildiği gibi hazırlanan örnekler HPLC sistemine verildiğinden, sisteme verilen örneğin -20°C'de 1 ay süre ile tutulmasının elüsyon profiline etkisi incelenmiştir. Bu şekilde hazırlanan örnek; başlangıç tamponu olan geliştirici tampon-A'da saklanmış olmaktadır. Taze olarak hazırlanmış örnek ise; yine -20°C'de 1 ay standard hemolizat halinde tutulduktan sonra tampon-A ile taze olarak hazırlanmıştır.

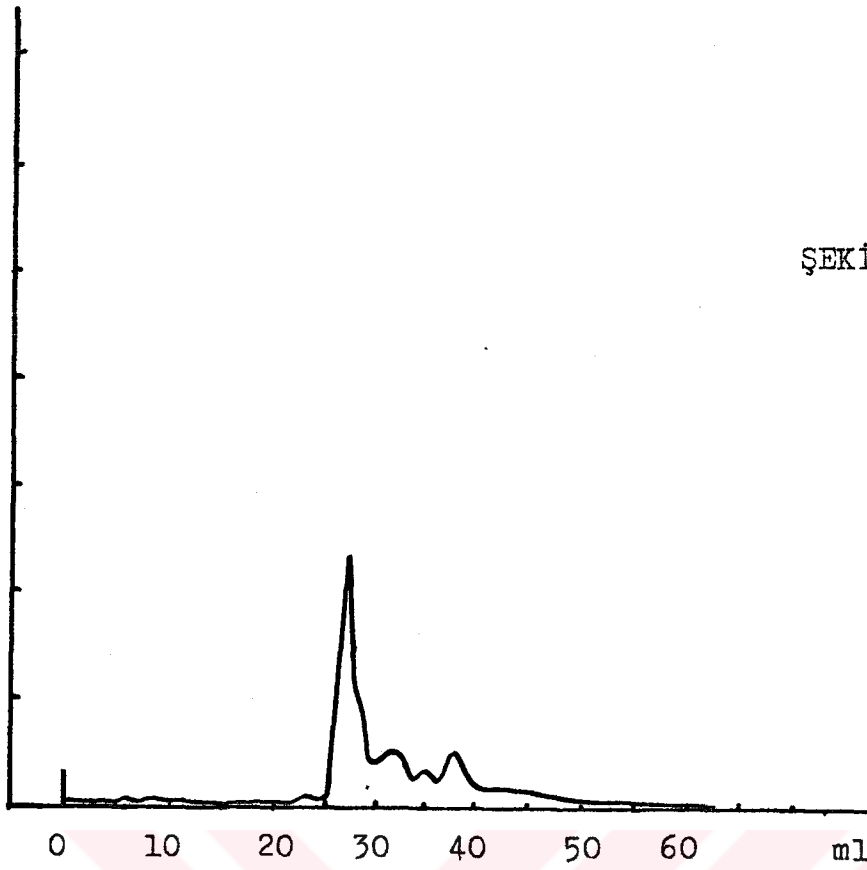
(3)

Şekil-38'de ise; farklı gradyan programının etkisi incelenmiştir. Gradyan-A ön-yıkamasız program olup süre açısından daha kısadır(%10B'den %100B'ye 35 dakikada çıkmaktadır). Buna karşın gradyan-B ise ön-yıkamalı bir programdır ve gradyan-A'ya oranla daha uzundur(%10B'de 10 dakika yıkama işlemini içermekte, %10B'den %100B'ye 50 dakikada çıkmakta ve %100B'de 10 dakika kalarak kolonu temizlemektedir. Buradaki son temizleme işleminin program ile bir bağlantısı yoktur ve gradyan-A'da da program dışı olarak yapılabilir.)

O.D.276

0.100

ŞEKİL-36a) Homozigot Orak
Hücre Anemisi
Enjeksiyon Önce-
si 1:7 seyreltme

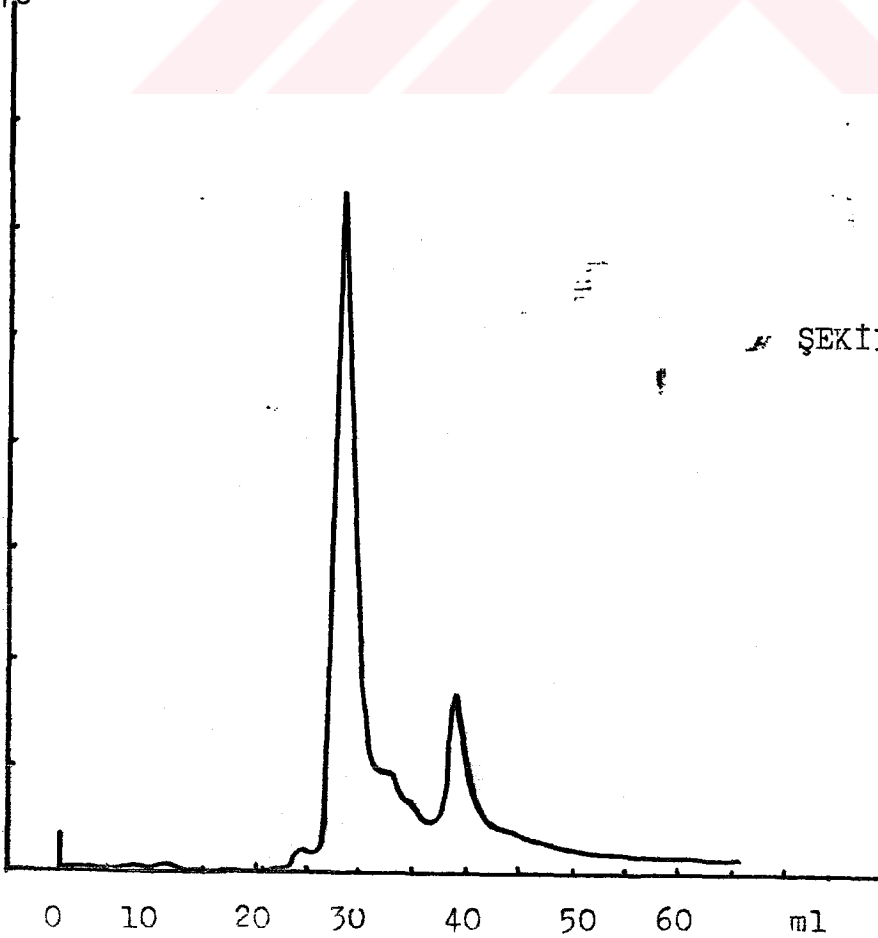


(3)

O.D.276

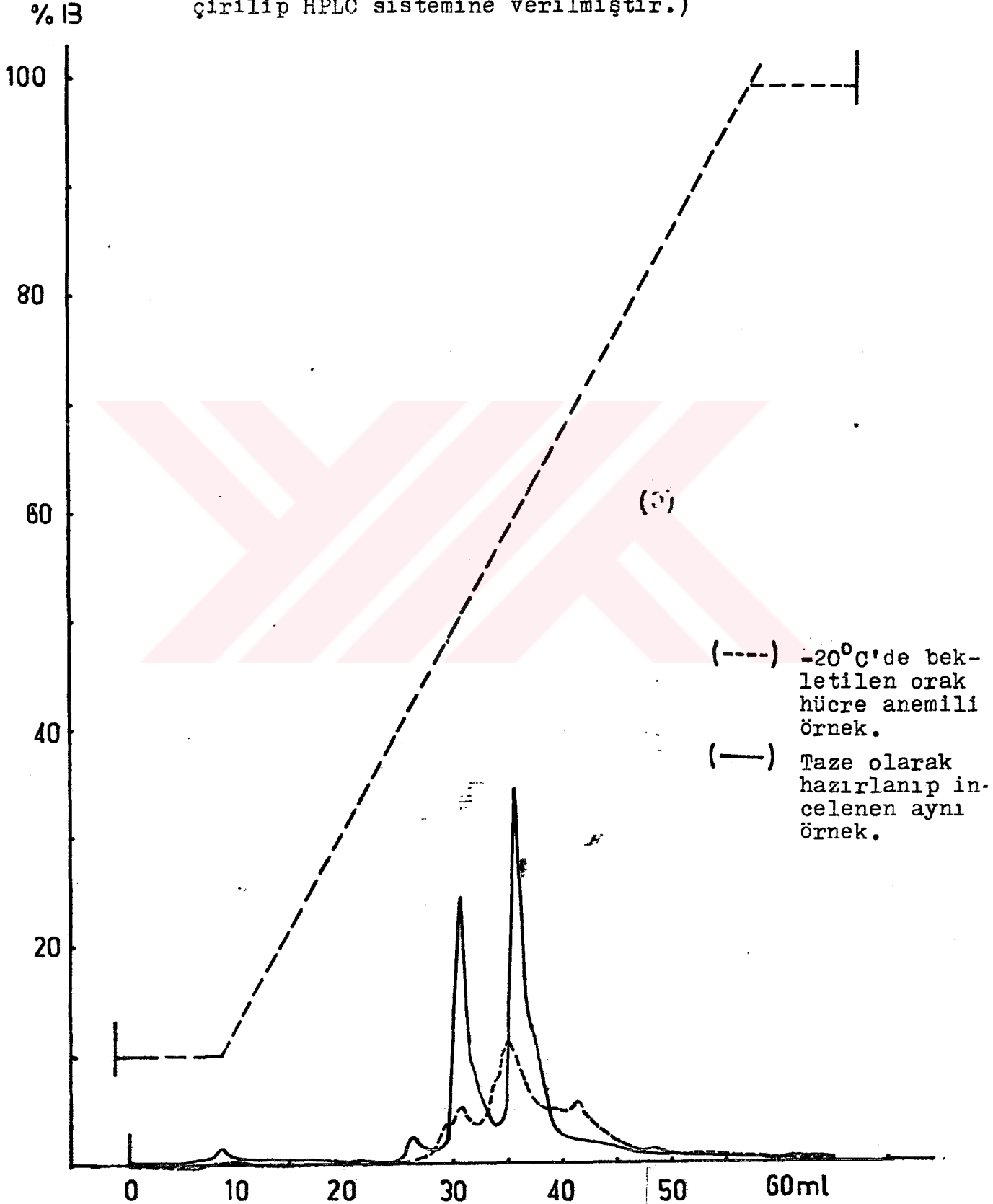
0.100

ŞEKİL-36b) Homozigot Orak
Hücre Anemisi
Enjeksiyon Önce-
si 1:3 seyreltme



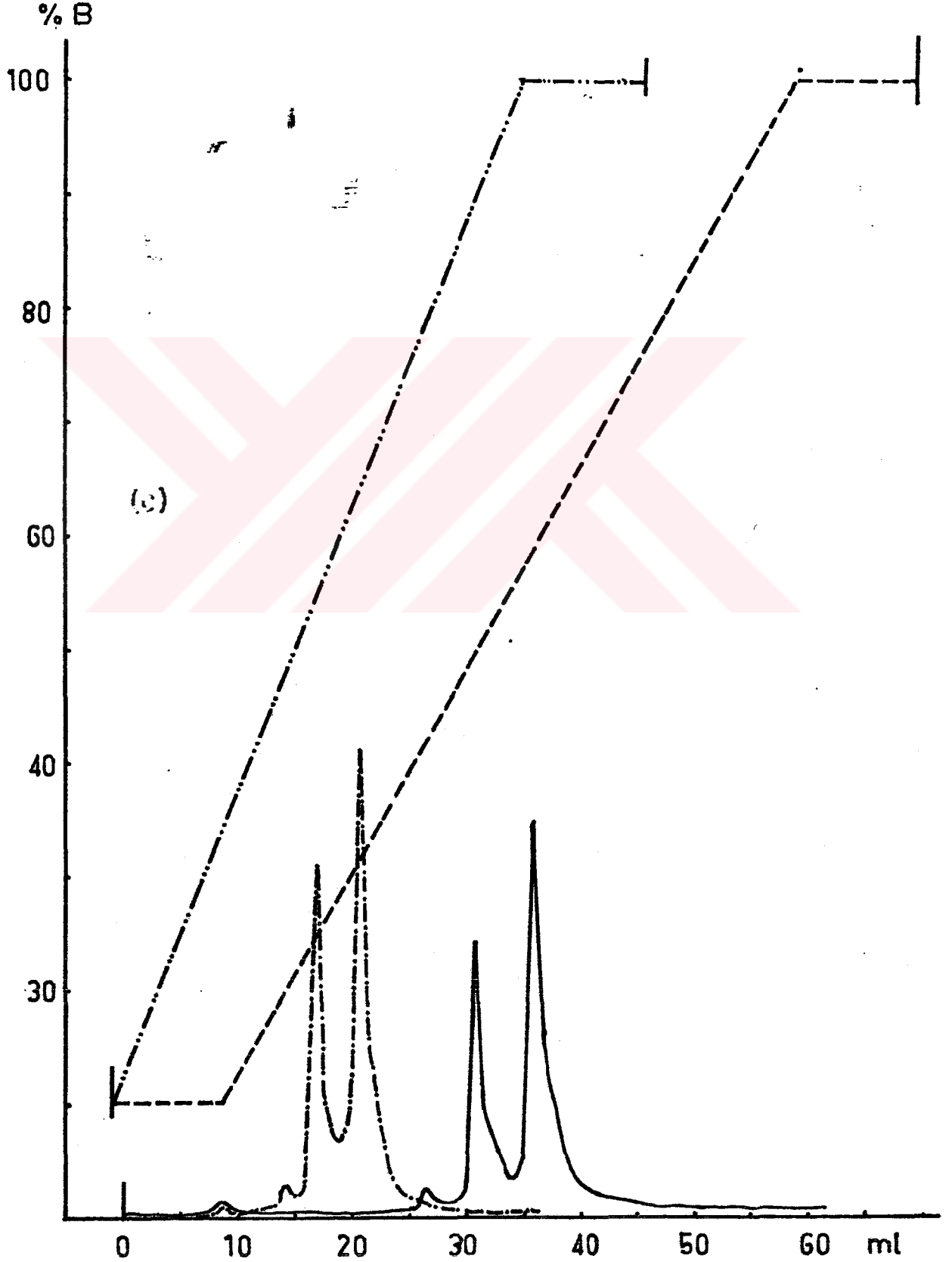
ŞEKİL-37)Başlangıç tamponu içerisinde saklanan örneklerin incelenmesi.

(Saklama koşullarının incelenmesi amacı ile, başlangıç tamponu olan A'da 1 ay süre ile -20°C 'lik koşullarda bekletilen örnekler çözülerek filtre işleminden geçirilip HPLC sistemine verilmiştir.)



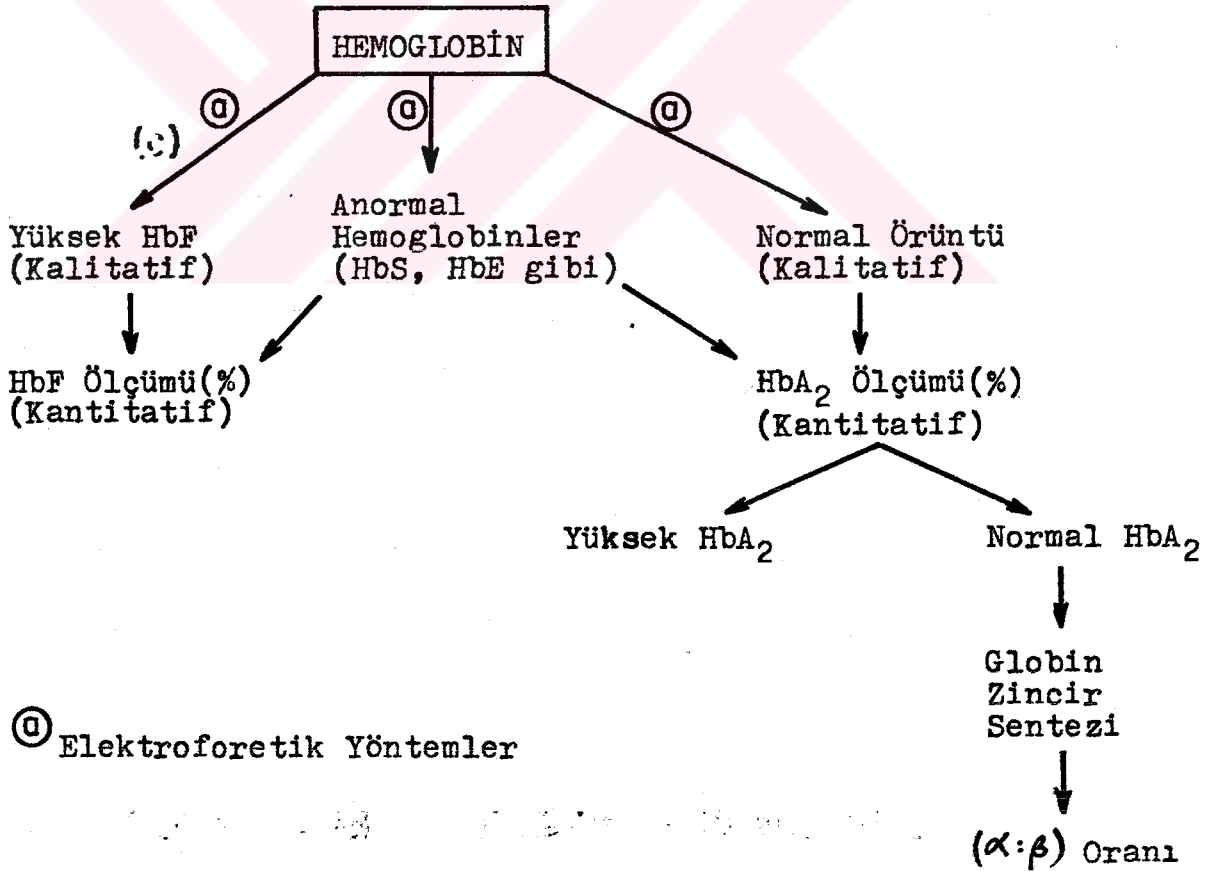
ŞEKİL-38) Farklı gradyan programında elde edilen elüsyon profili.

{---}: Gradyan-A
{---}: Gradyan-A Elüsyon Profili
{---}: Gradyan-B
{---}: Gradyan-B Elüsyon Profili



9.) TARTIŞMA

Çalışmamızın temel amacı; hemoglobinopatilerin protein düzeyinde incelenmesinde HPLC yönteminin uygulanabilirliğini irdelemektir. Protein düzeyinde yapılabilecek çalışmalar; doğum-öncesi(pre-natal) ve doğum-sonrası(post-natal) olmak üzere iki ayrı bölüm halindedir. Ancak; kullanılan örnekleme teknikleri dışında protein düzeyindeki çalışmalara konu olan materyal hemoglobindir. Bir hemoglobinopati incelemesi söz konusu olduğunda atılması gereken adımlar sırasıyla hemoglobinin tiplendirilmesi ve bu tiplerin birbirlerine olan oranlarının saptanması şeklindedir(bkz şekil-39).



ŞEKİL-39) Protein düzeyinde hemoglobin analizi.

Bu iki ana sorunu çözebilmek amacı ile yapılması gereken laboratuvar tetkikleri ise, hemoglobin elektroforezi, sapta-
nan hemoglobin tiplerinin miktarlarının belirlenmesi (HbA₂,
HbF gibi), in vitro globin sentezi yapılarak alfa/beta glo-
bin oranının ortaya konulmasıdır. Bu tetkikler fakültemizde,
gerek rutin hizmetlere ve gerekse de araştırma çalışmalarına
yönelik olarak uygulanmaktadır.

Yaptığımız bu çalışmada, zayıf anyon değiştirici kolon
olan TSK DEAE 3SW'nin hemoglobin tiplendirilmesi ve miktar
tayinindeki rutine uygulanabilirliği incelenmiştir.

Kullanılan kolona uygun olarak; pH 8.6'da sisteme 100 ul
standard hemolizat verilmiş, asetat gradyanı uygulanarak
farklı hemoglobin tiplerinin kolondan ayrılmaları sağlanmış-
tır. Kolon pH'sı tris tamponu ile sabit tutulmuş, örnekler-
deki hemoglobinler 1.5 mM KCN ile siyanmethemoglobin şekli-
ne dönüştürülerek sistemden geçirilmişlerdir. Bu formdaki
hemoglobinlerin 415 nm'de incelenmesi, diğer proteinlerin
girişimini ortadan kaldırmaktadır. Ancak, elimizde 415 nm
filtre bulunmadığından, 276 nm filtrede çalışma gerçekle-
ştirilmiştir.

Gradyan programını HPLC Bilgisayar Modülüne yazarken
örnek uygulandıktan sonraki ilk 10 dakikalık ön-yıkama
süresi verilmeksizin daha kısa bir program uygulandığında
farklı hemoglobin tiplerinin birbirlerine çok yakın çıkma-
ları nedeni ile tablo-7'deki program uygulanmıştır. Daha
yaygın gradyan programı; amaçtaki çabukluk ilkesine uyma-
dığından en uygun program 60 dk'lık program olarak belir-
lenmiştir. Ancak, programlayıcı bilgisayar modülüne ekle-
nen bilgi ile kolonun temizlenmesine yönelik olmak üzere
10 dakikalık yıkama sağlanmıştır (Şekil-38).

Şekil-19'da belirtildiği gibi hazırlanan örneklerin,
sisteme 100 ul olarak verilmesinin nedeni elimizdeki en
küçük enjeksiyon halkasının 100 ul olmasından dolayıdır.
Bu miktar; seyreltme oranı da düşünüldüğünde 15 ul stan-
dard hemolizat (ya da 1.0-1.5 mg Hb) anlamına gelmektedir.
Bu kadar küçük miktardaki standard hemolizat parmaktan
alınabilecek kan örneğinden sağlanabilecektir.

HPLC sistemine verilen kan örneklerinin sisteme verilmeden 0.45 um filtreden geçirilmesi önemli bir noktadır. Çünkü; sistemde oluşabilecek en ufak bir kirlilik ya da hava kabarcığı kolonun tıkanmasına ve sistem basıncının yükselerek kolona ve peristaltik pompalara zarar verecektir. Bu açıdan hazırlanan geliştirici tamponların da 0.45 um filtreden geçirilmesi ve de sonik banyoda degaze edilmesi önemlidir.

Kolona uygulanan örnekler şekil-19'da gösterildiği gibi 1:7 oranında geliştirici tampon-A'da seyreltilerek hazırlanmaktadır. Seyreltmenin seçicilik(rezolüsyon) üzerindeki etkisini incelemek üzere 1:3 ve 1:7 oranında seyreltilerek deney tekrarlandığında 1:7 oranında seyreltmede seçiciliğin daha belirgin olduğu saptanmıştır(Şekil-36).

HPLC sistemi oda ısısında çalışabilecek şekilde düzenlendiğinden deneyler 18°-20°C'de yapılmıştır. Sistemin bu açıdan sağladığı kolaylık oda ısısında çalışabilme şeklindedir.

Tampon akış hızı olarak 1.00 ml/dk kullanılmıştır. Bu akış hızı üretici firma olan LKB-Bromma'nın kolon çalışma koşulları konusunda önerilen akış hızıdır. Bu akış hızında kolonda 10-14 Bar'lık basınç oluşmaktadır. Kullandığımız kolon tipi için 20 Bar'lık basıncın üzerinde çalışılmaması gerekmektedir.

Yukarıda belirtilen bulgularla optimize edilen sistemde orak hücre anemili ve talasemili olgular incelendiğinde, HbA₂, HbS, HbA ve HbF'in başarılı olarak birbirlerinden ayrılabilirdiği saptanmıştır(Tablo-11). Ayrıca; hemoglobinin fraksiyonlarının birbirleri ile olan etkileşimlerini incelemek amacı ile değişik bireylerden izole edilen fraksiyonlar ayrı ayrı sistemde incelenmiş, daha sonra da karıştırılarak aynı uygulama yapılmıştır(Şekil-31, 32, 33, 34, 35). Bu incelemede; her hemoglobin tipinin kendisine ait yerde çıktığı saptanmıştır(Tablo-12). Ancak tüm bu çalışmalar; yöremizde yoğun olarak karşılaşılan orak hücre ve talasemi için yapılmıştır. Çalışmanın diğer anormal hemoglobin tipleri ile de genişletilmesi gerekmektedir.

TABLO-11) TSK DEAE 3SW Kolonundan Ayrılan Hemoglobin Tipleri ve Gradyandan Çıkış Değerleri

No.	Örneğin Klinik Tanı	Gradyandan Çıkış (x)			
		HbA ₂	HbS	HbA	HbF
1	Sağlıklı Kontrol	42	-	57	70
2	Kordon Kanı	-	-	56	69
3	Homozigot Orak Hücre Anemisi	40	48	57	67
4	Homozigot Orak Hücre Anemisi	39	47	-	67
5	Homozigot Orak Hücre Anemisi	40	48	57	67
6	Homozigot Orak Hücre Anemisi	39	47	56	67
7	Heterozigot Beta Talasemi	38	-	56	68
8	Heterozigot Orak Hücre Anemisi	39	48	57	-
9	Homozigot Orak Hücre Anemisi	42	48	58	-
10	Heterozigot Orak Hücre Anemisi	41	49	58	-
11	Homozigot Beta Talasemi Inter- medya	39	-	56	68

(x) Hemoglobin tiplerinin kolondan ayrılış yerleri gradyandaki çıkış değerleri ile saptanmış ve % B geliştirici tampon ile belirtilmiştir. Bu değerler verilirken, hemoglobin miktarları dikkate alınmaksızın, sadece görülen tepe noktaları gözönünde tutulmuştur. Homozigot orak hücreli olgulara ait HbA tepeleri, transfüzyondan kaynaklanan yalancı tepelerdir.

TABLO-12) İzole Edilmiş Fraksiyonlara Ait Gradyan Çıkışı

Fraksiyon Tipi	Gradyan Çıkışı(% B)
HbS	49
HbA	57
HbF	68
Karışım(HbS:HbA:HbF/1:1:0.8)	50, 59, 69

Çalışma içerisindeki bir diğer gözlemimiz hazırlanan örneklerin saklama koşulları ile ilgilidir. Daha önce de belirtildiği gibi; örnekler standard hemolizat halinde hazırlandıktan sonra geliştirici tampon-A (Tris/KCN, pH 8.6) ile seyreltilerek kolona verilmektedir. Bu seyreltilmiş örneklerin hemolizattan taze olarak hazırlanması gerekmektedir. Geliştirici tampon içinde -20°C 'de 1 ay bekletilerek incelenen örneklerde profilin bozulduğu gözlenmiştir. Bunun nedenini tam olarak açıklayabilmek için daha ileri çalışmalar yapılması gereklidir. Ancak bu bulgunun ışığı altında, uzun süreli saklamalarda örneklerin standard hemolizat halinde saklanması önermekteyiz. (Şekil-37).

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları değerlendirdiğimizde bu sistemin hemoglobinopatilerin incelenmesinde gerekli olan laboratuvar yöntemlerini biraraya getirebileceğini ve de uygulamada kolaylık, çabukluk, hassasiyet sağlayacağını düşündük. Bu değerlendirmele(i) yapabilmemiz için söz konusu olan temel laboratuvar yöntemleri ile önerdiğimiz HPLC yöntemini karşılaştırmamız gereklidir. Başlangıç noktası olarak tüm yöntemler standard hemolizat kullanırlar. Ancak, HPLC yöntemi dışındaki tüm yöntemler kendilerine özgün karakterlerinden ötürü, kullanılan araç, gereç, materyal miktarı, deney süresi, personel emeği gibi noktalarda büyük farklılıklar ortaya koyarlar. Bu farklılıkları aşağıdaki başlıklar altında inceleyebiliriz;

A.) HPLC yönteminin dışındaki tüm yöntemler deneyin yapılabilmesi için gerekli ön hazırlıklar açısından daha uzun süre ve ek laboratuvar malzemesi gerektirirler. Örneğin, DE-52 kolon kromatografisi ile HbA₂ miktarının belirlenmesinde, kolon materyali hazırlanmakta, kolonlar ayrı ayrı dökülerek fraksiyonların toplanacağı tüpler sabit hacimlere işaretilenmektedir. Bu tür ek hazırlıkları diğer yöntemler için de verebiliriz.

B.)Deneylerde kullanılan ayıraç sayısı bakımından bir karşılaştırma yapıldığında HPLC yönteminin göze çaracak düzeyde ekonomik olduğunu görürüz(Tablo-13). Tablodan da anlaşılabilceği gibi, HPLC yöntemi dışındaki tüm yöntemler toplam olarak 13 ayıracın hazırlanmasını gerektirirken, önerdiğimiz yöntemde sadece 4 ayıracın hazırlanması gerekmektedir. (Bu karşılaştırmada in vitro sentez için gerekli ayıraçlar değerlendirmeye alınmamıştır. Bunun nedeni ise, her iki yöntemin de in vitro inkübasyonda aynı materyali kullanmasından dolayıdır.)

C.)Yöntemlerin karşılaştırılmasında göze çarpan bir diğer önemli farklılık deney süreleri açısından (Tablo-14). Karşılaştırmaya konu olan klinik biyokimya deneylerinin toplam süresi 40 saat iken, HPLC yönteminde sonuçlar 2 saatte alınabilmektedir. Kağıt üzerinde global olarak verilen bu süreler deneylerin aynı anda üst üste getirilerek yapılması sonucu kısaltılabilirse de, durumda büyük bir farklılık doğmamaktadır.

D.)Önerdiğimiz yöntem; personel sayısında da önemli bir kazanç sağlamaktadır. HPLC sistemi kullanan bir personel; tek başına çalışarak, 1.5 iş günü içerisinde tüm tetkikleri bitirebilmektedir. Bu süre belirtilirken tüm hazırlıklar düşünülmüştür. Ayrıca; sistemin bilgisayar kontrollu olmasından dolayı, deney yapılırken personelin birimi ile ilgili diğer çalışmaları yapabilmesi mümkündür.

Örneğin; sabah 9.00'da alınan bir kan işleme konulduğunda, aynı gün 1.grup deneyler(Hb tiplemesi, HbA₂ ve HbF düzeyleri) sonuçlandırılmış ve globin zincir ayırımına ait tüm hazırlıklar tamamlanmış durumda olacaktır. Ertesi gün; sabah 9.00'da çalışmaya başlanıldığı düşünülerek, sonuçlar saat 11.30'da elde edilmiş olacaktır. Başka bir anlatımla; saat 13.00'te rapor düzenlenmiş olacaktır. Geçen bu süre içerisinde; gerek görüldüğü taktirde,

TABLO-13) Karşılaştırmada kullanılan deneylere ait gerekli ayıraç sayıları

Deney	Ayıraç Sayısı
Hb Elektroföresi	4
HbA ₂ (DE-52 kolonu ile) ^a	2
HbF(Alkali Denatürasyon)	3
İn vitro Globin Sentezi	4
HPLC Sistemi	4 ^b

^aBu yöntem; glisin/KCN geliştirici sistemini kullanan sistemdir.

^bHPLC sisteminde; globin zincir ayırımı için RP-4(Reverse Phase C₄) kolonu, diğer deneyler için TSK-DEAE3SW anyon değiştirici kolonu önerildiğinden, her bir kolon iki adet geliştirici tampona gereksinim duyar.

TABLO-14) Karşılaştırmada kullanılan deneylere ait gerekli deney süreleri(x)

Deney	Deney Süresi(saat)
Hb Elektroföresi	1.0
HbA ₂ (DE-52/Glisin-KCN kolon kromat.)	3.0
HbF(Alkali Denatürasyon)	0.3
İn vitro Globin Sentezi	35.0 ^a
HPLC Sistemi	2.0 ^a

^xDeney süreleri çözelti hazırlanması ve ön hazırlık sürelerini içermemekte, yalnız deneyin yapıldığı süreye karşılık gelmektedir.

^aİn vitro globin sentezinde; her bir fraksiyon 10 dk süre ile sayılarak cpm değerleri verilmekte, toplam 90 fraksiyon sayılmaktadır. HPLC sisteminde ise; sistemin komponenti olan radyoaktif sayım bölümü fraksiyonlar çıktığı anda sayarak grafiğe geçirmektedir.

deneylerin tekrarlanması da hesaplanmıştır.

E.)Önerilen sistemde, otomasyon kolaylığı, personelden kaynaklanan el hatalarının(pipetleme, deney işlemleri sırasındaki hatalar gibi) en aza indirilmesi, radyoaktif madde kullanımı söz konusu olduğunda güvenlilik gibi noktalarda önemli yararlar sağlanabilmektedir.

F.)HPLC sistemi tüm bileşenleri ile kompleks bir yapıdadır. Bu nedenle, tüm deneyler için gerekli araç, gereç alanı bakımından da avantaj sağlanmaktadır. Sistemin kapladığı alan(kullandığımız sistem olan LKB-Bromma sistemine göre) 2.00m X 0.60m boyutlarındadır. Bu alan içerisinde, sistemin dışında deney için gerekli ön-hazırlıklarda kullanılabilecek boş alan da bulunmaktadır.

Bulgularımızı klasik laboratuvar yöntemleri olan hemoglobin elektroforezi(30), HbA₂ ve HbF miktar tayini(30, 50), in vitro globin zincir sentezi(60) yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirdiğimizde HPLC yönteminin rutin uygulamalarda alternatif yöntem olarak önerilebileceği ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmamıza başlarken, TSK DEAE 3SW ve Vydac-C₄(RP4) kolonlarını uygulamayı planlamış, ancak bize Georgia(USA) Tıp Fakültesi Protein Biokimyası Laboratuvarı tarafından gönderilen RP4 kolonunun çalışmaması nedeni ile gerçekleştirememiştik. Bu nedenle; tartışmamızdaki RP4 kolonuna ait bilgiler literatürden alınmıştır(52, 54-56).

Elde ettiğimiz bulgular literatürdeki diğer anyon değiştirici kolonlara ait bulgularla uyumludur(49, 51).

Kullandığımız TSK DEAE 3SW kolonu ile, in vitro globin sentezi dışarıda tutulmak üzere, elde ettiğimiz verilerden sağlıklı sonuçlar elde edilmiştir. HPLC sisteminin getirdiği kazançlar, çalışmamızda kullandığımız TSK DEAE 3SW kolonuna ek olarak RP4 kolonunun da uygulama alanına sokulması sistemin radyoaktif sayaç ve integratör ile zenginleştirile-

rek rutin kullanıma alınması, gerek araştırma ve gerekse de poliklinik hizmetlerin çabukluğu, hassaslığı, güvenilirliği açısından önemli katkılar sağlayacaktır.

Günümüzde çalışmamıza konu oluşturan bu tür genetik hastalıkların kökenine yönelik yöntemler geliştirilmekte ise de, bu yöntemler gelişmiş alt yapıyı gerektirirler. Fakültemizde bu yönde birtakım eğilimler ve çalışmalar olmakta ise de, konunun incelenmesinde protein düzeyindeki çalışmalar güncelliğini korumaktadır. Çünkü bu tür çalışmalar klinik tanıya tamamlayıcı katkılar ortaya koyarlar, ve de parasal giderler yönünden moleküler çalışmalara oranla daha ekonomiktirler. Bu nedenlerden dolayı terkedilmemesi gereken yöntemler grubu olan hemoglobin elektroforezi, hemoglobin-A₂ ve hemoglobin-F tayini, in vitro globin zincir sentez oranı gibi deneylere alternatif bir yöntem olarak HPLC yönteminin rutin hizmete sokulması gerek poliklinik ve gerekse de araştırma çalışmalarına büyük katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

- 1.) "Update of the Progress of Hemoglobinopathies Control"; WHO Report No.HMG/WG/85.8; WHO Hereditary Diseases Programme-Division of Non-communicable Diseases; 1985; Zurich.
- 2.) AKSOY M.; "Sickle Cell Anemia in South Turkey: A Study of 15 Cases in 12 Families"; Blood; 11: 460, 1956.
- 3.) AKSOY M., LEHMANN H.; "Sickle Cell Thalassemia Disease in South Turkey"; Brit.Med.J.; 1: 734, 1957.
- 4.) AKSOY M.; "Hemoglobin S and E in Turkish People"; Nature; 193: 786, 1962. (5)
- 5.) AKSOY M., DİNÇOL G., ERDEM Ş.; "Different Types of Beta-thalassemia Intermedia: A Genetic Study in 20 Patients"; Acta Hematol.; 59: 178, 1978.
- 6.) YÜREGİR G.T., İSBİR T.; "Çukurova'da HbS ve G6PD Enzim Eksikliği ve Aralarındaki İlişki"; Doğa Bilim Dergisi; 8(2): 232, 1984.
- 7.) YÜREGİR G.T., DONMA O., DİKMEN N. et al; "Population Studies of Hemoglobin S and other Variants in Çukurova, The Southern Part of Turkey"; Acta Hematol.(Japan); 50(4): 1, 1987.
- 8.) AKSOY M.; "Anormal Hemoglobinler ve Talasemik Sendromla"; TÜBİTAK Yayınları No.521; Ankara; 1982.
- 9.) GANONG W.F.; "Review of Medical Physiology"; 12th edition; Lange Medical Publications; California; 1985.
- 10.) KANSU E.; "The Role of Microenvironment in Aplastic Anemia"

- 10.) KANSU E.; "The Role of Microenvironment in Aplastic Anemia"; içinde AKSOY M., ROATH S., ÖZSOYLU Ş.; North Cyprus Symposium on Aplastic Anemia; TÜBİTAK Yayınları No.606; 1984.
- 11.) CHANARIN I., BROZOVIC M., TIDMARSH E. et al; "Blood and its Diseases"; Churchill Livingstone; London; 1980.
- 12.) BERKARDA B., MÜFTÜOĞLU A.Ü., ULUTİN O.; "Kan Hastalıkları"; İ.Ü.C.T.F Yayınları Rektörlük No.2823; İstanbul; 1981.
- 13.) BERKARDA B., EYÜBOĞLU H.; "Hematoloji Laboratuvar Yöntemleri"; Ar Basım-Yayın ve Dağıtım A.Ş.; İstanbul; 1983.
- 14.) PERUTZ M.F., MUIRHEAD H., COX J.M. ⁽³⁾ et al; "Three Dimensional Fourier Synthesis of Horse Oxyhemoglobin at 2.8 Å Resolution; Nature; 219: 131, 1968.
- 15.) BRIEHL R.; "Sickle-Cell: A Metastable Disease"; Nature; 276: 666, 1978.
- 16.) FINCH J.T., PERUTZ M.F., BERTLES J.F. et al; "Structure of Sickled Erythrocytes and of Sickle Cell Hemoglobin Fibers"; Proc.Nat.Acad.Sci.USA; 70(3): 718, 1973.
- 17.) PERUTZ M.F. and LEHMANN H.; "Molecular Pathology of Human Hemoglobin"; Nature; 219: 902, 1968.
- 18.) SODEMAN W.A. and SODEMAN T.M.; "Pathologic Physiology"; 6th edition; W.B. Saunders Company; Philadelphia; 1974.

- 19.) HUISMAN T.H.J.; "Separation and Characterization of Hemoglobins"; içinde FORMAN D.T. and MATTON R.W.; Clinical Chemistry; ACS(American Chemical Society) Symposium Series No.36; Washington; 1976.
- 20.) BOYER S.H., BELDING L., MARGOLET L. et al ; "Fetal Hemoglobin Restriction to Few Erythrocytes(F Cells) in Normal Human Adult"; Science; 188: 361, 1985.
- 21.) PESCHLE C., MIGLIACCIO R., MIGLIACCIO G. et al.; "A Model for HbF Synthesis in Adult Life: Evidence for Regulation at the Level of Erythroblasts"; Ann. N.Y.Acad.Sci.; 445: 225, 1985.
- 22.) DOVER G.J., HUMPRIES R.K., MOORE J.G. et al; "Hydroxy-urea Induction of Hemoglobin F Production in Sickle Cell Disease: Relationship Between Cytotoxicity and F-Cell Production"; Blood; 67(3): 735, 1986.
- 23.) VEITH R., GALANELLO R., PAPAYANNOPOULOU T. et al; "Stimulation of F-Cell Production in Patients with Sickle Cell Anemia Treated with Cytarabine or Hydroxy-urea"; New.Eng.J.Med.; 313: 1571, 1985.
- 24.) CHARACHE S., DOVER G., SMITH K. et al; "Treatment of Sickle Cell Anemia with 5-Azacytidine results in Increased Fetal Hemoglobin Production and is Associated with Non-random Hypomethylation of DNA around the β -Globin Gene Complex"; Proc.Nat.Acad.Sci.USA; 80: 4842, 1983.
- 25.) MAINWARING W.I.P., PARISH J.H., PICKERING J.D. et al; "Nucleic Acid Biochemistry and Molecular Biology"; Blackwell Scientific Publications; London; 1982.

- 26.) LEHNINGER A.L.; "Biochemistry: The Molecular Basis of Cell Structure and Function"; Worth Publishers, Inc.; New York; 1977.
- 27.) PAULING L., ITANO H.A., SINGER S.J. et al; "Sickle Cell Anemia: A Molecular Disease"; Science; 110: 543, 1949.
- 28.) IHIC(International Hemoglobin Information Center) Variant List; Hemoglobin; 9(3): 227, 1985.
- 29.) NIENHUIS A.W., ANAGNO N.P., LEY T.J.; "Advances in Thalassemia Research"; Blood; 63(4): 738, 1984.
- 30.) WEATHERALL D.J.; "The Thalassemias"; Methods in Hematology v.6; Churchill Livingstone; Edinburgh; 1983.
(3)
- 31.) ÇAVDAR A.G., ARCA SOY A.; "Hb-Lepore-Boston in a Turkish Family"; içinde AKSOY M.; International İstanbul Symposium on Abnormal Hemoglobins; August 24-27, 1974; TÜBİTAK Yayınları; Ankara; 1974.
- 32.) ORKIN S.H., KAZAZIAN H.H., ANTONARAKIS S.E. et al; "Linkage of Beta-thalassemia Mutations and Beta-globin Gene Polymorphisms with DNA Polymorphisms in Human Beta-globin Gene Cluster; Nature; 296: 627, 1982.
- 33.) DIAZ-CHICO J.C., YANG K., EFREMOV D.G. et al; "The Detection of Beta-globin Gene Mutations in Beta-thalassemia Using Oligonucleotide Probes and Amplified DNA"; Biochim.Biophys.Acta; 949: 43, 1988.
- 34.) DIAZ-CHICO J.C., YANG K., STOMING T.A. et al; "Mild and Severe Beta-thalassemia Among Homozygotes from Turkey: Identification of the Types by Hybridization of Amplified DNA with Synthetic Probes"; Blood; 71(1): 248, 1988.

- 35.) YANG K.G., STOMING T.A., FEI Y.J. et al; "Identification of Base Substitutions in the Promoter Regions of the A and G Globin Genes in A (or G) -HPFH Heterozygotes Using the DNA Amplification Synthetic Oligonucleotide Procedure"; Blood; 71(5): 1414, 1988.
- 36.) LOUKOPOULOS D.; "Prenatal Diagnosis of Thalassemia and of the Hemoglobinopathies: A Review"; Hemoglobin; 9(5): 435, 1985.
- 37.) CAO A., PIRASTU M., ROSATELLI C.; "The Prenatal Diagnosis of Thalassemia(Annotation)"; Brit.J.Hematol.; 63: 215, 1986.
- 38.) OPPENHEIM A., COHEN S., GOLDFARB A. et al; "Detection of Specific Beta-globin Mutations in ⁽⁵⁾ Kurdish Jews with Beta-thalassemia"; Hemoglobin; 12(1): 31, 1988.
- 39.) GEEVER R.F., WILSON L.B., NALLASETH F.S. et al; "Direct Identification of Sick Cell Anemia by Blot Hybridization"; Proc.Nat.Acad.Sci.USA; 78(8): 5081, 1981.
- 40.) PONCZ M., SCHWARTZ E., BALLANTINE M. et al; "Nucleotide Sequence Analysis of the β -globin Gene Region in Humans"; J.Biol.Chem.; 120: 11599, 1983.
- 41.) ANTONARAKIS S.E., KAZAZIAN H.H., ORKIN S.H.; "DNA Polymorphism and Molecular Pathology of the Human Globin Gene Clusters"; Hum.Genet.; 69: 1, 1985.
- 42.) ORKIN S.H., MARKHAM A.F., KAZAZIAN H.H.; "Direct Detection of the Common Mediterranean Beta-thalassemia Gene with Synthetic DNA Probes"; J.Clin.Invest.; 71: 775, 1983.

- 43.) FRANCOMANO C.A., KAZAZIAN H.H.; "DNA Analysis in Genetic Disorders"; Ann.Rev.Med.; 37: 377, 1986.
- 44.) PAGLIETTI E., GALANELLO R., ADDIS M. et al; "Genetic Councelling and Genetic Heterogeneity in the Thalasse-mias"; Clin.Genet.; 28: 1, 1985.
- 45.) WATSON J.D., TOOZE J., KURTZ D.T.; "Recombinat DNA: A Short Course"; Scientific American Books; W.H. Freeman and Company; New York; 1983.
- 46.) DWYER M.E. and BROWN P.R.; "High Speed Liquid Chromatography: A Review"; J.Liq.Chromatogr.; 10(8-9): 1769, 1987.
- 47.) "Biomedical Applications of HPLC ; Liquid Chromatography Review; Du Pont Instruments Co. Bulletin.
- 48.) SEEGAL R.F., BROSCHE K.D., BUSH B.; "High Performance Liquid Chromatography of Biogenic Amines and Metabolites in Brain, Cerebrospinal Fluid, Urine and Plasma; J.Chromatogr.; 377: 131, 1986.
- 49.) AKSOY M., HUISMAN T.H.J.; "North Cyprus Symposium on Abnormal Hemoglobins and Thalassemia"; TÜBİTAK Yayın-ları No.605; Ankara; 1984.
- 50.) SCHROEDER W.A., HUISMAN T.H.J.; "The Chromatography of Hemoglobin"; Marcel Dekker Inc.; New York; 1980.
- 51.) WILSON J.B., HEADLEE M.E., HUISMAN T.H.J.; "A New High Performance Liquid Chromatographic Procedure for the Separation and Quantitation of Various Hemoglobin Variants in Adults and Newborn Babies"; J.Lab.Clin.Med.; 102(2): 174, 1983.

- 52.) BRENNAN S.O.; "The Separation of Globin Chains by High Pressure Cation Exchange Chromatography"; Hemoglobin; 9(1): 53, 1985.
- 53.) SHELTON J.B., SHELTON J.R., SCHROEDER W.A.; "Preliminary Experiments in the Separation of Globin Chains by High Performance Liquid Chromatography"; Hemoglobin; 3: 353, 1979.
- 54.) SHELTON J.B., SHELTON J.R., SCHROEDER W.A.; "Further Experiments in the Separation of Globin Chains by High Performance Liquid Chromatography"; J.Liq. Chromatogr.; 4: 1381, 1981.
- 55.) SHELTON J.B., SHELTON J.R., SCHROEDER W.A.; "High Performance Liquid Chromatography (Separation of Globin Chains on a Large Pore C₄ Column"; J.Chromatogr.; 7(10): 1969, 1984.
- 56.) KUTLAR F., KUTLAR A., HUISMAN T.H.J.; "Separation of Normal and Abnormal Hemoglobin Chains by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography"; J.Chromatogr.; 357: 147, 1986.
- 57.) RAHBAR S., LEE T.D., BAKER J.A. et al; "Reverse Phase HPLC and Secondary Ion Mass Spectrometry: A Strategy for Identification of Ten Human Hemoglobin Variants"; Hemoglobin; 10(4): 379, 1986.
- 58.) YITAO Z., SHUZHENG H., REYNOLDS A. et al; "Application of High Pressure Liquid Chromatography and Microsequencing Methodology in the Structural Analysis of Human Hemoglobin Variants"; Scientia Sinica; 17(8): 836, 1983.
- 59.) FLEMING A.F.; "Sickle Cell Disease: A Handbook for the General Clinician"; Churchill Livingstone; London; 1982.

- 60.) HUISMAN T.H.J., JONXIS J.H.P.; "The Hemoglobinopathies: Techniques and Identification"; Marcel Dekker Inc.; New York; 1977.

Ö Z E T

İnsan hemoglobinlerinin ayrımı ve miktar tayininde kromatografik yöntemler artan oranda önem kazanmaya başlamıştır. Son yıllarda; protein yapılarının incelenmesinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi(HPLC) yöntemi yoğun olarak kullanılmaktadır.

Bir hemoglobin anomalisini tanımlayabilmek amacı ile selüloz asetat elektroforezi, HbA₂ ve HbF miktar tayini, in vitro globin zincir sentez oranı gibi hematolojik laboratuvar, tetkiklerinin yapılması gereklidir. Bu yöntemler zaman alıcı ve el hatası üretmeye eğilimli yöntemler olması nedeni ile, belirtilen bu yöntemleri basitleştiren ve rutin uygulamaya elverişli olan HPLC yöntemini önermekteyiz.

Çalışmamızda; HbA, HbS, HbF ve HbA₂ gibi hemoglobin tiplerinin karakterize edilebilmesini optimize ederek, rutin poliklinik uygulamalardaki HPLC sisteminin yararlarını, bir zayıf anyon değiştirici kolon olan TSK DEAE 3SW(LKB-Bromma) kolonu kullanarak tartıştık.

S U M M A R Y

Chromatographic procedures have become increasingly important for the separation and quantitation of human hemoglobin variants in blood. In recent years; high performance liquid chromatography(HPLC) is commonly used for the investigation of protein structures.

To identify the type of hemoglobin abnormalities, it is necessary to carry out many hematologic laboratory tests like cellulose acetate electrophoresis, HbA₂ and HbF quantifications, in vitro globin chain synthesis ratio. Since these procedures are time-consuming and manual error productive, we proposed the application of HPLC system for the routine purposes which simplifies the whole laboratory procedures mentioned above.

In our proposal; we optimized the separation of hemoglobins like HbA, HbS, HbF and HbA₂ and discussed the benefits of the HPLC system for routine policlinic application by using a weak anion exchanger TSK DEAE 3SW (LKB-Bromma) column.