

**HEREDİTER SFEROSİTOZ TANISINDA KLASİK VE FLOW
SİTOMETRİK OZMOTİK FRAJİLİTE İLE EOZİN-5-MALEİMİD
BAĞLANMA TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CEMİL GÜLÜM

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
OCAK - 2019**

**HEREDİTER SFEROSİTOZ TANISINDA KLASİK VE FLOW
SİTOMETRİK OZMOTİK FRAJİLİTE İLE EOZİN-5-MALEİMİD
BAĞLANMA TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CEMİL GÜLÜM

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

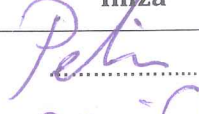
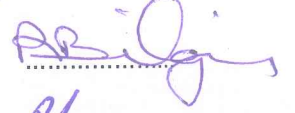
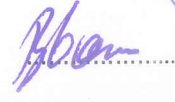
**KİMYA
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Pelin EROĞLU**

**MERSİN
OCAK - 2019**

ONAY

Cemil GÜLÜM tarafından Dr. Öğr. Üyesi Pelin EROĞLU danışmanlığında hazırlanan "Hereditör Sferositoz Tanısında Klasik ve Flow Sitometrik Ozmotik Frajilite İle Eozin-5-Maleimid Bağlanma Testlerinin Karşılaştırılması" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 11 Ocak 2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Dr. Öğr. Üyesi Pelin EROĞLU	
Üye	Prof. Dr. Ramazan BİLGİN	
Üye	Prof. Dr. Belgin GÖZMEN SÖNMEZ	

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 1.S./02./2019 tarih ve 2019...08./244... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Cahit BİLİM
Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
 - Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi
- beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

11 Ocak 2019 / 11 January 2019


Cemil GÜLÜM

ÖZET

HEREDİTER SFEROSİTOZ TANISINDA KLASİK VE FLOW SİTOMETRİK OZMOTİK FRAJİLİTE İLE EOZİN-5-MALEİMİD BAĞLANMA TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Hereditör Sferositoz (HS), hemolitik aneminin en sık görülen türüdür. Eritrosit membran proteinlerinde meydana gelen kalıtsal hasar nedeniyle eritrositler, bikonkav ve santral solukluğu olan disk şekilli hücrelerden, santral solukluğu olmayan küre şeklindeki (sferosit) hücrelere dönüşürler. Hemolize yatkınlığın artması, anemi, sarılık ve dalağın büyümesiyle seyreden bir hastalıktır. Batı toplumlarındaki prevalansı 1:5000'dir.

Hereditör Sferositoz tanısına yönelik birçok test geliştirilmiştir. Ozmotik frajilite (OF) testi, en geleneksel türüdür. Son dönemlerde flow sitometri ile çalışılan eozin-5-Maleimid (EMA) bağlanma testi ve flowsitometrik ozmotik frajilite (FC-OF) testi geliştirilmiştir. Araştırmamızda akan hücre ölçer (FACSCalibur, Becton Dickinson, USA) ile çalıştığımız bu testler, geleneksel olarak çalışılan, Parpart ve arkadaşlarının önerdiği klasik OF testi (K-OF) ile karşılaştırıldı. Testlerin hastalığı ayırt etme gücü ve eşik değerleri (cut-off) değerleri belirlendi.

Araştırmamızda klasik OF testine ait spesifite (80) ve sensitivite (96,7) değerleri literatüre göre biraz daha yüksek bulundu. İnkübasyonlu OF testine ait bulgular ile taze örnekle yapılan OF testine ait bulgular istatistiksel olarak farklı değildi. EMA bağlanma testinin cut-off, spesifite ve sensitivite değerleri sırasıyla >222,64 - % 85 - % 90 olarak bulundu. İnkübasyonlu numune ile yapılan EMA bağlanma testi de taze örneğe göre istatistiksel olarak farklı değildi. FC-OF testine ait cut-off, spesifite ve sensitivite değerleri sırasıyla >67,29 - % 100 - % 100 olarak bulundu. FC-OF testinin inkübasyonlu çalışılması istatistiksel anlamda fark yaratmadı. Flowsitometrik iki yöntemi (EMA / FC-OF) birbirleriyle karşılaştırdığımızda FC-OF testinin EMA bağlanma testine göre daha iyi performans gösterdiği ve bulguların istatistiksel olarak anlamlı olduğu (p=0,0397) saptandı.

Anahtar Kelimeler: Hereditör Sferositoz, Flow Sitometrik Ozmotik Frajilite, Eozin-5-Maleimid, EMA bağlanma testi, Ozmotik Frajilite, Flow sitometri

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Pelin EROĞLU, Mersin Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

COMPARISON OF CLASSICAL AND FLOW CYTOMETRIC OSMOTIC FRAGILITY AND EOSIN-5-MALEIMIDE BINDING TEST IN THE DIAGNOSIS OF HEREDITARY SPHEROCYTOSIS

Hereditary spherocytosis (HS) is the most common type of hemolytic anemia. Because of inherited damage in erythrocyte membranous proteins, erythrocytes are transformed into spherical (spherocyte) cells without central pallor from disc shaped cells with biconvex and central pallor. Increased susceptibility to hemolysis is a disease characterized by anemia, jaundice and spleen growth. The prevalence in Western societies is 1: 5000.

Many tests have been developed for the diagnosis of hereditary spherocytosis. Osmotic fragility (OF) test is the most traditional type. Eosin-5-maleimide (EMA) binding test and flow-flow osmotic fragility (FC-OF) test have been developed in recent years with flow cytometry. In our study, these tests, which we studied with the flowing cell meter (FACSCalibur, Becton Dickinson, USA), were compared with the traditional OF test (K-OF) proposed by Parpart et al. Discrimination power of these tests and cut-off values were determined.

In our study, the specificity (80) and sensitivity (96,7) values of the classical OF test were found to be slightly higher than the literature. Results of the OF test with incubated sample and the results of the OF test with fresh sample were not statistically different. Cut-off, specificity and sensitivity values of EMA binding test were found as $>222,64$ - 85 % - 90 %, respectively. The EMA binding test with the incubated sample was not statistically different compared to the fresh sample. Cut-off, specificity and sensitivity values of FC-OF test were found as $>67,29$ - 100 % - 100 %, respectively. The incubation of the FC-OF test did not make any statistical difference. When the flow cytometric two methods (EMA / FC-OF) were compared with each other, the FC-OF test performed better than the EMA and the findings were statistically significant ($p=0,0397$).

Keywords: Hereditary spherocytosis, Flow cytometric osmotic fragility test, Eosin-5-Maleimide, EMA binding test, Osmotic fragility, Flow cytometry

Advisor: Asst. Prof. Pelin EROĞLU, Department of Chemistry, University of Mersin, Mersin.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım başta danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Pelin EROĞLU ve Kimya bölümünün kıymetli hocalarına,

Çalışma hayatım ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen, tez çalışmamın her aşamasında bana yol gösteren, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalının değerli hocaları Prof. Dr. Gürbüz POLAT, Prof. Dr. Lülüfer TAMER, Prof. Dr. Gülçin ESKANDARİ, Prof. Dr. Burak ÇİMEN ve Doç. Dr. Necati MUŞLU'ya,

Tez çalışmamın planlanması aşamasında katkı sağlayan, hastaların belirlenmesinde ve örneklerin toplanmasında yardımcı olan Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi Çocuk Hematoloji ve Yetişkin Hematoloji Bilim Dalının kıymetli üyeleri Prof. Dr. Selma ÜNAL, Prof. Dr. Naci TİFTİK, Doç. Dr. Anıl TOMBAK, Uzm. Dr. Erdem GÜL, Uzm. Dr. Feryal KARAHAN ve Mersin Şehir Hastanesinden Çocuk Hematoloji uzmanı Dr. Funda ERKASAR ÇITAK'a,

Tezimin istatistik çalışmalarını yapan ve bu konudaki bilgi ve tecrübelerini cömertçe paylaşan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı üyesi Doç. Dr. Gülhan TEMEL'e,

Eğitim ve tez sürecinde, bilgi ve deneyimiyle bana yardımcı olan sevgili arkadaşım Dr. Şenay BALCI FİDANCI'ya,

Araştırmamdaki örneklerin toplanması ve çalışılmasında yardımcı olan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma,

Tezimin yazımı konusunda yardımcı olan Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Türk Dili ve Edebiyatı bölümünden Dr. Öğr. Üyesi Naciye KARAHAN KÖK'e,

Yüksek Lisans Tezime, 2017-2-TP2-2549 numaralı proje ile maddi destek sağlayan Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babam Orhan GÜLÜM ve annem Sıdika GÜLÜM başta olmak üzere sevgili aileme,

Yüksek lisans eğitimime başlamam konusunda beni yönlendiren, her zaman olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca da bana destek olan sevgili eşim Kader KARAHAN GÜLÜM'e,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	2
2.1. Herediter Sferositoz	2
2.1.1. Eritrositler ve Eritrositlerin Yapısal Özellikleri	3
2.1.1.1. Eritrositlerin Şekli	3
2.1.1.2. Eritrositlerin Membran Yapısı	5
2.1.1.2.1. Eritrositlerin Membran Lipidleri	6
2.1.1.2.2. Eritrositlerin Membran Proteinleri	7
2.1.1.2.2.1. Transmembran Proteinleri	8
2.1.1.2.2.2. İskelet Proteinleri	9
2.1.1.2.2.3. Bağlayıcı Proteinler	10
2.1.2. Eritrosit Membran Bozuklukları ve Herediter Sferositoz İlişkisi	11
2.1.3. Herediter Sferositozun Tanısı	15
2.2. Ozmotik Frajilite Testi	17
2.3. Flow Sitometri	20
2.3.1. Flow Sitometri Tanımı ve Tarihiçesi	20
2.3.2. Flow Sitometri Çalışma Prensibi	22
2.3.3. Florokromlar	27
2.3.4. Flow Sitometri Kullanım Alanları	29
2.4. Eozin-5-Maleimid Bağlanma Testi	30
2.5. Flowsitometrik Ozmotik Frajilite Testi	32
3. MATERYAL ve YÖNTEM	35
3.1. Materyal	35
3.1.1. Çalışma Grubu	35
3.1.2. Örneklerin Alınması ve Saklanması	36
3.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler	36
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar	37
3.1.5. Kullanılan Sarf Malzemeler	37
3.2. Yöntem	38
3.2.1. Ozmotik Frajilite Testi	38
3.2.1.1. Hipotonik NaCl Solüsyonunun Hazırlanması	38
3.2.1.2. Farklı Konsantrasyonlardaki NaCl Solüsyonunun Hazırlanması	38
3.2.1.3. Ozmotik Frajilite Test Protokolü	39
3.2.1.4. Ozmotik Frajilite Sonuçlarının Değerlendirilmesi	40
3.2.2. Eozin-5-Maleimid Bağlanma Testi	40
3.2.2.1. Eozin-5-Maleimid Boyasının Hazırlanması	41
3.2.2.2. Eozin-5-Maleimid Bağlanma Test Protokolü	41
3.2.2.3. Eozin-5-Maleimid Bağlanmasının Akan Hücre Ölçer ile Tespiti	42
3.2.3. Flow Sitometrik Ozmotik Frajilite Testi	43
3.2.3.1. Eritrosit Süspansiyonunun Hazırlanması	43

	Sayfa
3.2.3.2. Ozmotik Frajilitenin Akan Hücre Ölçer ile Tespiti	44
3.2.4. İstatistiksel Yöntemler	45
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	46
4.1. Bulgular	46
4.1.1. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Demografik Bulgular	46
4.1.2. Taze Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajilite Testine Ait Bulgular	47
4.1.3. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajilite Testine Ait Bulgular	49
4.1.4. Taze Örnekten Yapılan Eozin-5-Maleimid Bağlanma Testine Ait Bulgular	51
4.1.5. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan Eozin-5-Maleimid Bağlanma Testine Ait Bulgular	53
4.1.6. Taze Örnekten Yapılan Flow Sitometrik Ozmotik Frajilite Testine Ait Bulgular	55
4.1.7. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan Flow Sitometrik Ozmotik Frajilite Testine Ait Bulgular	57
4.1.8. Taze ve İnkübasyonlu Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajilite, Eozin-5-Maleimid Bağlanma ve Flow Sitometrik Ozmotik Frajilite Testlerinin Kıyaslanması	59
4.2. Tartışma	61
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	71

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Normal İnsan Eritrositindeki Lipid İÇeriği	6
Tablo 2.2. Eritrosit Membran Proteinleri ile İlişKili Hastalıklar	13
Tablo 2.3. Herediter Sferositoza Neden Olan Protein Kusurlarının Görülme Sıklığı	15
Tablo 2.4. Herediter Sferositozda Kullanılan Laboratuvar Testleri	16
Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler	36
Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar	37
Tablo 3.3. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler	37
Tablo 3.4. Farklı Konsantrasyonlardaki NaCl Solüsyonunun Hazırlanması	39
Tablo 4.1. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Demografik Bulgular	46
Tablo 4.2. Taze Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajilite Testine Ait Sonuçlar	48
Tablo 4.3. Taze Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajilite Testine Ait İstatistikî Bulgular	48
Tablo 4.4. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajilite Testine Ait Sonuçlar	49
Tablo 4.5. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajilite Testine Ait İstatistikî Bulgular	50
Tablo 4.6. Taze Örnekten Yapılan EMA Bağlanma Testine Ait Sonuçlar	51
Tablo 4.7. Taze Örnekten Yapılan EMA Bağlanma Testine Ait İstatistikî Bulgular	52
Tablo 4.8. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan EMA Bağlanma Testine Ait Sonuçlar	53
Tablo 4.9. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan EMA Bağlanma Testine Ait İstatistikî Bulgular	54
Tablo 4.10. Taze Örnekten Yapılan FC-OF Testine Ait Sonuçlar	55
Tablo 4.11. Taze Örnekten Yapılan FC-OF Testine Ait İstatistikî Bulgular	56
Tablo 4.12. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan FC-OF Testine Ait Sonuçlar	57
Tablo 4.13. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan FC-OF Testine Ait İstatistikî Bulgular	58
Tablo 4.14. Tüm Parametrelerin AUC (Area under the ROC curve) Değerleri	59
Tablo 4.15. Tüm Parametrelerin Birbirleri ile Karşılaştırılmasından Elde Edilen AUC Farkları ve p Değerleri	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Küre Şeklini Almış Eritrositler (Sferositler)	2
Şekil 2.2. İzotonik Ortamdaki Bir Eritrositin Şematik Kesiti	4
Şekil 2.3. Eritrositlerin Periferik Kanda Mikroskopik Görüntüsü	4
Şekil 2.4. Farklı Durumlardaki Eritrositlerin Elektron Mikroskobu Altındaki Görüntüsü	5
Şekil 2.5. Hücre Membranında Lipidlerin Yerleşimi	7
Şekil 2.6. SDS-PAGE ile Saptanan İnsan Eritrosit Membran Proteinleri	7
Şekil 2.7. Spektrin Molekülünün Yapısı	9
Şekil 2.8. Spektrin-Aktin-Protein 4.1 Kompleksinin Oluşturduğu Altıgen Kafes Yapısı	11
Şekil 2.9. Eritrosit Membran Yapısı	12
Şekil 2.10. Herediter Sferositozda Etkili Olan Proteinlerin Membran Yerleşimi	14
Şekil 2.11. Herediter Sferositoz Patofizyolojisi	14
Şekil 2.12. Eritrositlerin Hipertonik ve Hipotonik Ortamdaki Davranışları	17
Şekil 2.13. Ozmotik Frajilite Deneyi	18
Şekil 2.14. Ozmotik Frajilite Deney Grafiği	19
Şekil 2.15. Leeuwenhoek Mikroskobu	20
Şekil 2.16. Coulter Counter Prensibi ve İlk Dönemlerde Üretilen Bir Coulter Counter	21
Şekil 2.17. A-Leonard Herzenberg ve FACS (1970) B-Günümüz FACS Teknolojisi	21
Şekil 2.18. Akan Hücre Ölçerin Temel Çalışma Prensibi	22
Şekil 2.19. Akan Hücre Ölçerde Hidrolik Sistem	23
Şekil 2.20. Akan Hücre Ölçerde Analizi Yapılabilecek Hücreler ve Boyutları	23
Şekil 2.21. Akan Hücre Ölçerde Optik Sistem	24
Şekil 2.22. Akan Hücre Ölçerde Detektörler Yardımıyla Büyüklük ve Granülarite Tespiti	25
Şekil 2.23. Periferik Kan Hücrelerinin FSC/SSC Histogramı	25
Şekil 2.24. FSC/SSC Histogramı ile Yapılan Bir Veri Analizi Örneği	26
Şekil 2.25. Akan Hücre Ölçerde Elektronik Sistem	26
Şekil 2.26. Akan Hücre Ölçerde Hücre Ayrıştırma	27
Şekil 2.27. Stokes Kaymasının Şematik Gösterimi	28
Şekil 2.28. Akan Hücre Ölçerde Kullanılan Bazı Florokromlar ve Spektrumları	28
Şekil 2.29. Eozin-5-Maleimid'in Kimyasal Yapısı	30
Şekil 2.30. HS Hastalarındaki Eozin-5-Maleimid Bağlanmasındaki Azalışın Gösterimi	31
Şekil 2.31. Eritrositlerin Deiyonize Su İlavesi Öncesi ve Sonrası FSC/SSC Grafiği	33
Şekil 2.32. Eritrositlerin Deiyonize Su İlavesi Öncesi ve Sonrası FSC/ ZAMAN Grafiği.	33
Şekil 3.1. Ozmotik Frajilite Eğrisi	40
Şekil 3.2. RBC Süspansiyonuna Ait FSC/SSC Grafiği.	42
Şekil 3.3. Ema Histogramı.	43
Şekil 3.4. Fsc/Zaman Grafiği.	44
Şekil 3.5. FSC/Zaman Grafiğinde Distile Su Öncesi ve Sonrası.	45
Şekil 4.1. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Demografik Bulgular	46
Şekil 4.2. Taze Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajilite Testine Ait ROC Grafiği	48
Şekil 4.3. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajilite Testine Ait ROC Grafiği	50
Şekil 4.4. Taze Örnekten Yapılan EMA Bağlanma Testine Ait ROC Grafiği	52
Şekil 4.5. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan EMA Bağlanma Testine Ait ROC Grafiği	54
Şekil 4.6. Taze Örnekten Yapılan FC-OF Testine Ait ROC Grafiği	56
Şekil 4.7. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan FC-OF Testine Ait ROC Grafiği	58
Şekil 4.8. Tüm Parametrelere Ait ROC Grafiği	59
Şekil 4.9. Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait Hemoliz (%) – Nacl (%) Grafikleri	63

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μmol	Mikromol
AGLT	Asidifiye Gliserol Lizis Testi
AUC	Area Under the ROC Curve
BSA	Bovine Serum Albumin
$\text{C}_{24}\text{H}_9\text{Br}_4\text{NO}_7$	Eozin-5-maleimid
CD	Cluster Of Differentiation
CHT	Kriyohemoliz Testi
Cl^-	Klorür
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EMA	Eozin-5-Maleimid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FC-OF	Flow Sitometrik Ozmotik Frajilite Testi
FL	Floresan Dedektör
FSC	İleri Saçılım Kanal Detektörü
Hac	Hereditör Akantositoz
Hb	Hemoglobin
HCO_3^-	Bikarbonat
HE	Hereditör Eliptositoz
HİV	Human Immunodeficiency Virus / İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HPP	Hereditör Piropoikilositoz
HS	Hereditör Sferositoz
HSt	Hereditör Stomatositoz
K^+	Potasyum İyonu
kD	Kilo Dalton
km	Kilometre
K-OF	Klasik Ozmotik Frajilite Testi
LDH	Laktat Dehidrogenaz
MCF	Ortalama Kanal Florensı
MCHC	Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu
MCV	Ortalama Eritrosit Hacmi
MFI	Ortalama Floresan Yoğunluğu
mm^3	Milimetre küp
Na^+	Sodyum İyonu
Na_2HPO_4	Di sodyum hidrojen fosfat
NaCl	Sodyum Klorür
nm	Nanometre
OF	Ozmotik Frajilite
PAS	Periyodik Asit-Schiff Boyaması
PBS	Phosphate Buffered Saline
PS	Fosfatidilserin
RBC	Red Blood Cell /Eritrosit
RCS	Rapid Cell Spectrophotometer
RDW	Eritrosit Dağılım Genişliği
ROC	Receiver Operator Characteristics Curve
SAO	Hereditör Ovalositoz
SDS-PAGE	Sodyum Dodesilsülfat Kullanılarak Çalışılan Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SSC	Yana Saçılım Kanal Detektörü

*Varlığıyla beni dünyanın en mutlu insanı yapan
Sevgili kızım İpek'e...*

1. GİRİŞ

Hereditör Sferositoz (HS), eritrosit membran proteinlerinin kalıtsal hasarı nedeniyle, eritrositlerin, morfolojik olarak, bikonkav ve santral solukluğu olan disk şekilli hücrelerden, santral solukluğu olmayan küre şeklindeki (sferosit) hücrelere dönüşmeleri sonucu, hemolize yatkınlığın artması, anemi, sarılık ve dalak büyüklüğü gelişmesiyle seyreden bir hastalıktır. Periferik kanda görülen sferositler, eritrosit membranındaki spektrin, ankrin, band 3 veya protein 4.2 gibi zar proteinlerinden birinin eksikliği veya işlev bozukluğundan kaynaklanır. Batı toplumlarında kronik hemolizin en sık görülen nedenidir ve prevalansı 1:5000'dir. Türkiye'de de sık görülmekle birlikte kesin sıklığı ve protein bozukluk tipleri hakkında veriler henüz yeterli değildir [1-7].

Hereditör Sferositoz tanısına yönelik birçok test geliştirilmiştir. Bu testler iki kategoriye ayrılır. Birincisinde; kırmızı kan hücrelerinin değişik ortamlardaki dayanıklılığı ölçülür. Ozmotik fragilite (OF) testi, en geleneksel türüdür. Diğerinde ise, eritrosit membran proteinlerinin sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile tespiti veya band 3 veya Rh ile ilgili proteinlere bağlanan eozin-5-maleimid'in (EMA) flow sitometri ile ölçülmesinde olduğu gibi membran proteinlerinin doğrudan tespit edilmesi şeklindedir [8].

Bununla birlikte son zamanlarda geleneksel OF testinin yerine geçmek üzere flow sitometrik ozmotik fragilite (FC-OF) testi geliştirilmiştir. Hipotonik solisyonlara maruz bırakılan eritrositlerden kalan artık eritrosit sayısının flow sitometri ile ölçülmesine dayalı bu yöntemin HS taramasında kullanılıp kullanılmayacağına dair çalışmalar yapılmaktadır [8].

Klasik OF (K-OF) testi atipik veya hafif HS olgularını tespit etmedeki başarısızlığına bağlı olarak zayıf özgüllük ve hassasiyete sahiptir. Bununla birlikte 37 °C'de inkübe edilen örnekler ile yapılan OF testinin daha iyi sonuç verdiği rapor edilmiştir. SDS-PAGE yönteminin pahalı ekipman, hatalı proteinin niteliğine bağlı değişken tespit hassasiyeti ve etnik varyasyon gibi bazı dezavantajları vardır. FC-OF ve EMA bağlanma testinin HS'un tanısı için diğer testlere kıyasla oldukça duyarlı ve spesifik olduğu bildirilmiştir [8].

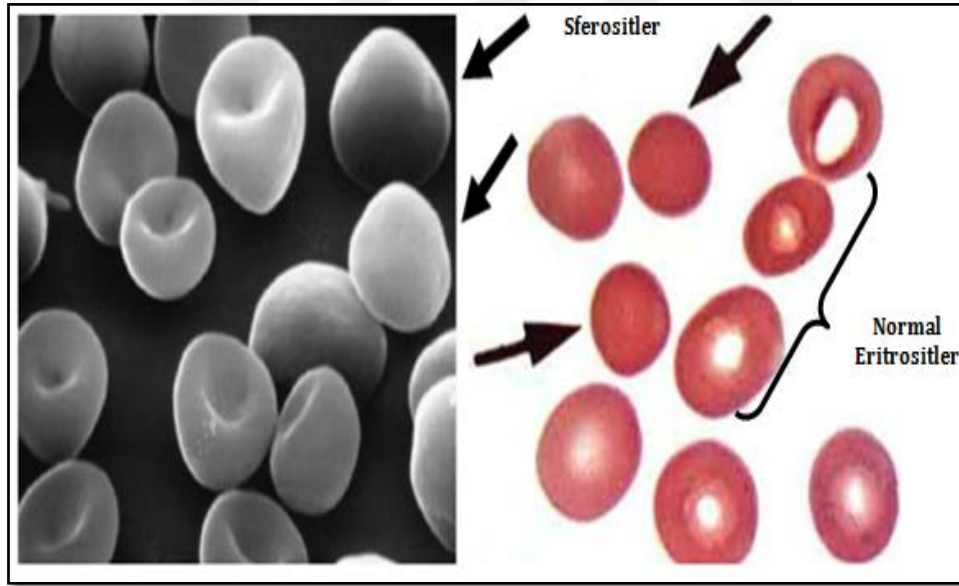
Bu çalışmada, geleneksel olarak kullanılan K-OF, FC-OF ve EMA bağlanma testlerinin HS'yi tespit etme gücünü, optimum kesme değerlerini, hassasiyet ve duyarlıklarını hesaplama, karşılaştırma ve ayrıca inkübasyonun testlerin performansını ne yönde etkilediğini belirleyebilmeyi amaçladık.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Herediter Sferositoz

Herediter Sferositoz, eritrosit membranını oluşturan proteinlerin bir ya da birkaçının kalıtsal hasarı veya eksikliği nedeniyle, eritrositlerin bikonkav disk şeklindeki morfolojik yapılarını kaybederek küre şeklini (sferosit) (Şekil 2.1.) almaları sonucu meydana gelen kalıtsal bir hastalıktır [1-7].

Herediter Sferositoz, ilk olarak 1871 yılında Belçikalı bilim insanları Vanlair ve Masius tarafından tanımlanmıştır. Siyah ırkta daha az olmakla beraber bütün ırklarda ve etnik gruplarda görülmektedir. Kuzey Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da en sık görülen kronik hemolitik anemi tipidir ve sıklığı yaklaşık olarak 1/5.000 olarak bildirilmiştir. Ancak kan vericilerinin incelenmesi sonucunda sessiz olgular da tanı almış ve sıklık 1/2000'e yükselmiştir. Hastaların yaklaşık % 75'inde otozomal baskın geçiş, yaklaşık % 25'inde otozomal resesif geçiş ya da denovo mutasyonlar söz konusudur [1-7].



Şekil 2.1. Küre Şekli Almış Eritrositler (Sferositler) [1,4].

Hastalık, hemolize yatkınlığın artmasına bağlı anemi, sarılık, hasarlı eritrositlerin dalakta birikmesi ve dalak büyümesi (splenomegali) ile karakterizedir. Klinik şiddet değişkendir. Aseptomatik formdan hayatı tehdit eden anemiye kadar değişkenlik görülebilir. Hatta nadir olarak hidrops fetalis ve fetal ölümlere neden olduğu rapor edilmiştir. Hastalığın şiddeti hafif, orta ve ağır olarak sınıflandırılmaktadır [1-7,9].

Hafif HS, olguların % 20-30'unda görülür. Kemik iliği tarafından sürekli yıkıma uğrayan eritrositler telafi edilebildiğinden anemi görülmez ancak orta dereceli bir dalak büyüklüğü ile sarılık dikkati çeker. Bu gruptaki hastalar genellikle asemptomatik olduğundan, adolesan ve erişkin yaşlarda tanı konur. Orta HS, olguların % 60-75'inde görülür. Hafif ve orta şiddette anemi ve sarılık ön plandadır. Hastalar kriz dönemlerinde kan tranfüzyonuna ihtiyaç duyabilir. Genellikle çocukluk çağında tanı konur. Hafif ve orta HS hastalarının yaşlılıklarında ağır anemiye sahip oldukları bildirilmiştir. Ağır HS ise, olguların % 5'inde görülür. Şiddetli hemoliz, anemi, sarılık, dalak büyüklüğü vardır. Düzenli kan transfüzyonuna ihtiyaç duyulmaktadır [3,10,11].

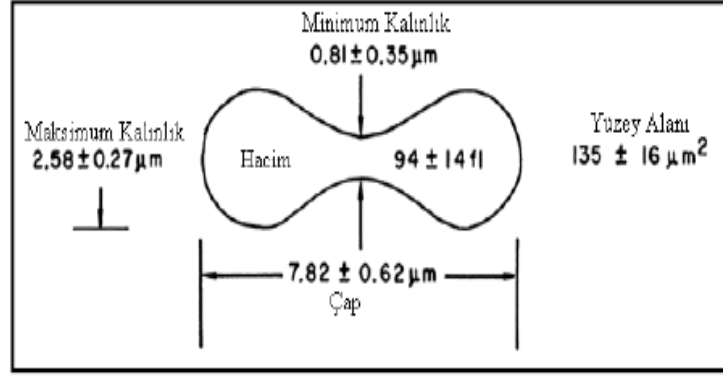
2.1.1. Eritrositler ve Eritrositlerin Yapısal Özellikleri

Hereditör Sferositoz mekanizmasının anlaşılabilmesi için eritrositin membran yapısının iyi bilinmesi gerekir. İnsanlarda ve diğer canlılarda yaşamsal fonksiyonların devamlılığı için en önemli ihtiyaçlardan biri de oksijendir. Eritrositler oksijen taşımak için özelleşmiş hücrelerdir ve ilk kez mikroskobun da mucidi olan Hollandalı Leeuwenhoek tarafından tanımlanmıştır. Oksijen solunum havası ile alınarak kapillerler yolu ile kana geçer ve hemoglobine bağlanarak eritrositler tarafından dokulara ulaştırılır. Metabolizma sonucu dokuda oluşan karbondioksit ve proton ise vücuttan atılır. [1,10,12,13].

Erişkin kanındaki ortalama eritrosit sayısı erkeklerde $4,6-6,2 \times 10^6/\text{mm}^3$ (kan hacminin yaklaşık % 48'i); kadınlarda $4,2-5,4 \times 10^6/\text{mm}^3$ (kan hacminin yaklaşık % 42'i) civarındadır. Çekirdek, mitokondri, ribozomlar gibi sitoplazmik organellere sahip olmayan eritrositler protein sentezi yapamaz, mitokondri ile ilişkili oksidatif reaksiyonları gerçekleştiremez ve mitozu uğrayamazlar. Mitoz bölünme gerçekleştiremediklerinden eritrositlerin dolaşımında 100 ila 120 günlük bir ömrü vardır, bu sırada kardiyovasküler sistem boyunca 250 km yol alırlar [12-14].

2.1.1.1. Eritrositlerin Şekli

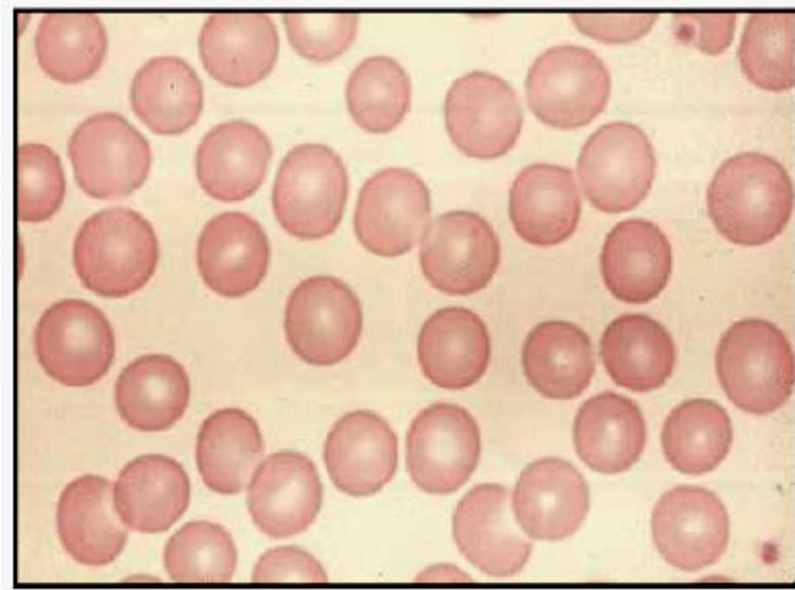
Eritrositler yaklaşık 6-9 μm çapında, kalınlığı merkezde 1 μm , kenarlarda 2-2,5 μm kalınlığında, bikonkav disk şeklindedir (Şekil 2.2.) [15].



Şekil 2.2. İzotonik Ortamdaki Bir Eritrositin Şematik Kesiti [13].

Eritrositlerin sahip oldukları bikonkav disk şekli, fonksiyonlarını sürdürebilmelerini sağlar. Bu özel şekil sayesinde, hücre yüzey alanının hacmine oranı mümkün olan en yüksek değere ulaşmakta ve böylece gaz transferi kolaylaşmaktadır. Ayrıca bikonkav disk yapısının, küreye göre şekil değiştirme yeteneğinin (deformabilitesinin) daha fazla oluşu eritrositlerin mikrodolaşımında daha kolay hareket edebilmelerini sağlar. Eritrositler bikonkav disk şeklinde değil de küresel yani sferoidal bir yapıda olsaydı, kapillerden geçerken çok daha kolay parçalanırlardı [1,10,16].

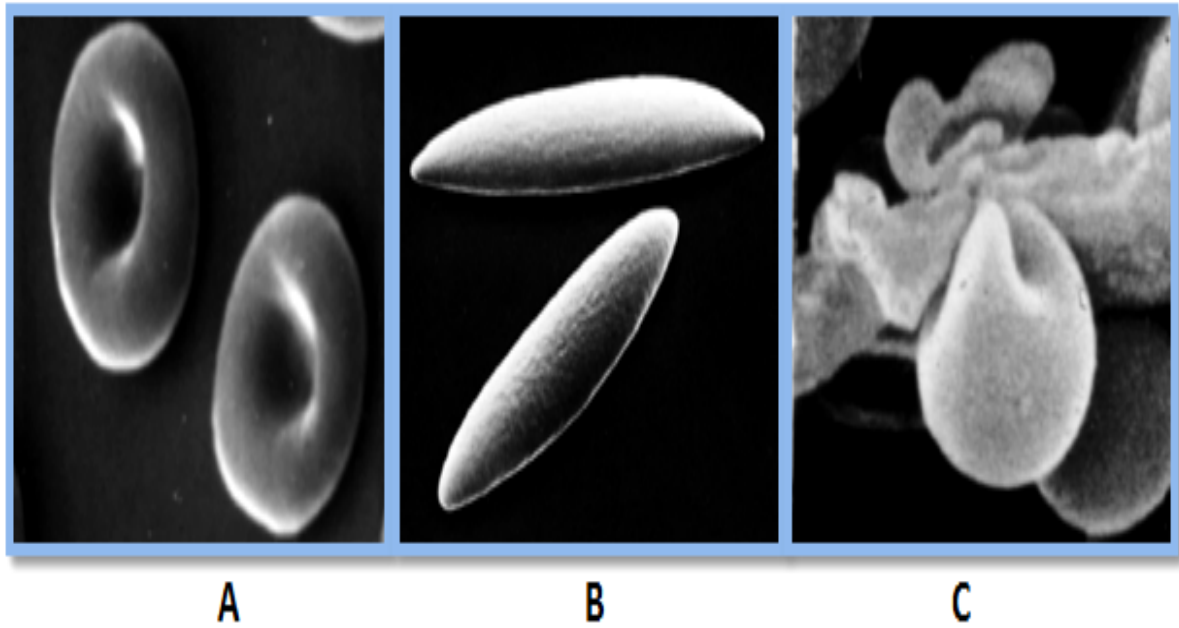
Şekil 2.3.'te görüldüğü üzere, mikroskop altında incelenen eritrositlerin daire şeklinde oldukları; merkezlerinde ise hücre çapının yaklaşık 1/3'ü genişliğinde soluk bir alan (merkezi solukluk) olduğu görülür [13].



Şekil 2.3. Eritrositlerin Periferik Kanda Mikroskopik Görüntüsü [13].

2.1.1.2. Eritrositlerin Membran Yapısı

8 µm çapındaki bir eritrosit dar dalak sinuzoidlerinden ve 2 µm çapındaki kapillerlerden geçebilecek esneklikte ve yüksek kan basınçlarında kan akımının yol açacağı yüksek akım streslerine (shear stres) karşı dayanabilecek güçte olmalıdır. Gerçekten de eritrositler yapısal direnç anlamında çelikten daha güçlü ve oldukça elastiktir (karşılaştırılabilir kalınlıktaki kauçuk yüzeyden 100 kat daha yumuşak). Uygulanan baskılara hızlı tepki verir (100 milisaniye içerisinde). Dar alanlardan geçerken incelererek bir torpil biçimini alır ve daha sonra eski şekline döner (Şekil 2.4.) [2-12,13].



Şekil 2.4. Farklı Durumlardaki Eritrositlerin Elektron Mikroskobu Altındaki Görüntüsü **(A)** Normal Bir Eritrosit, **(B)** Kapillerden Geçerken Şekil Değiştirmiş Bir Eritrosit, **(C)** Eritrositin Dar Endotelial Yarıktan Geçerken Maruz Kaldığı Deformasyon [1].

Eritrositin içinde bulunduğu koşullara göre şeklini değiştirebilme (deformabilite) özelliği, eritrositin yaşam süresini belirleyen en önemli etmenlerin başında gelir. Eritrositin bu şekilsel esnekliği gösterebilmesi, membran ve özellikle iskeletinin yapısına bağlıdır [4-5].

Eritrosit membranı diğer hücre membranlarında olduğu gibi, iki katlı lipid tabakadan (lipid bilayer) ve onun hemen altında yer alan ve lipid tabakaya bağlı proteinlerin oluşturduğu membran iskeletinden meydana gelir. Membranın % 40'ını lipidler, % 52'sini proteinler ve % 8'ini ise karbohidratlar oluşturmaktadır [3,10,12,15,17].

2.1.1.2.1. Eritrositlerin Membran Lipidleri

İki katmanlı lipid tabaka, esterleşmemiş kolesterol (% 47,5), fosfolipid (% 49,5) ve glikolipidden (% 3,4) oluşur (Tablo 2.1.). Dört farklı major fosfolipid vardır. Membran fosfolipid içeriğinin büyük kısmını fosfatidilkolin (lesitin) (% 30), fosfatidiletanolamin (% 28), sfingomyelin (% 25) ve fosfatidilserin (PS) (% 14) oluşturur [10,13].

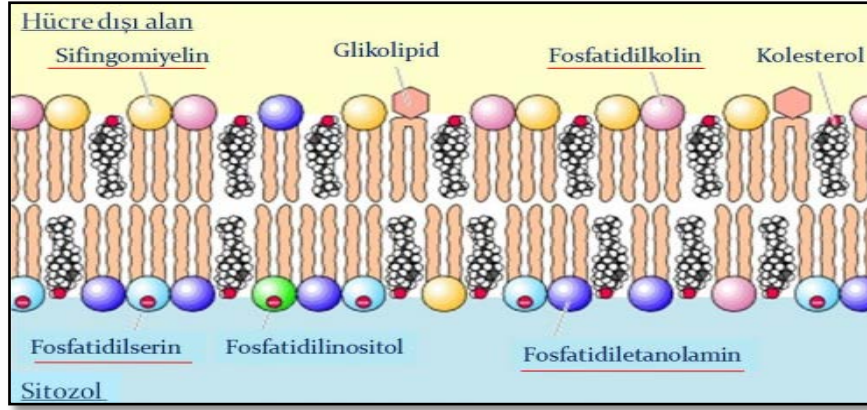
Tablo 2.1. Normal İnsan Eritrositindeki Lipid İçeriği [10].

Lipid	Molar Konsantrasyon $\mu\text{mol}/10^{10}$ hücre	%
Fosfolipidler	4,20	49,5
<i>Fosfatidilkolin (Lesitin)</i>	<i>1,30</i>	
<i>Fosfatidiletanolamin</i>	<i>1,20</i>	
<i>Sfingomyelin</i>	<i>1,00</i>	
<i>Fosfatidilserin (PS)</i>	<i>0,60</i>	
<i>Diğer</i>	<i>0,11</i>	
Kolesterol	4,00	47,1
Glikolipid	0,21	3,4
Total Lipid	8,41	100

Şekil 2.5.'de görüldüğü üzere, fosfolipidler membranın iki tabakasında asimetrik olarak dizilirler. Fosfatidilkolin ve sfingomyelin membranın dış yüzeyinde, fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserin ise iç kısımda yer alır [12,13,15,18].

Esterleşmemiş kolestroller membran lipidlerinin diğer önemli kısmını oluşturur. Lipid tabakada fosfolipidler arasına dağılmışlardır. Kolesterolün membran akışkanlığı üzerinde belirgin bir etkisi vardır ki dış katmanda iç katmana göre daha fazla kolesterol yer aldığından eritrosit dış yüzeyi iç yüzeye göre daha katı ve daha viskozdur [10,13,15,19].

Eritrosit membran lipidlerinin küçük bir kısmını da glikolipidler oluşturur ve membranın dış yüzeyinde yer alırlar. En sık rastlanan eritrosit membran glikolipidi de globoziddir. Eritrosit membranında yer alan glikolipidler antijenik aktivite gösterirler ve Lewis kan grupları ile ilişkilidirler [10,13,16].



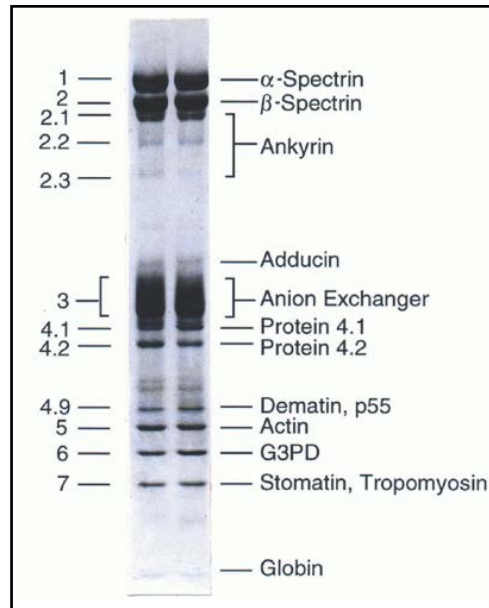
Şekil 2.5. Hücre Membranında Lipidlerin Yerleşimi [19].

2.1.1.2.2. Eritrositlerin Membran Proteinleri

Eritrosit membranının esnekliğini ve sağlamlığını sağlayan diğer bir unsurda membran yapısında yer alan proteinlerdir. Membran proteinlerinin ayrıca transport, haberleşme ve enerji dönüşümü gibi dinamik fonksiyonları da vardır [13,18,19].

Eritrosit membran proteinleri genellikle SDS-PAGE yöntemiyle yapılan çalışmalarla tanımlanmaya çalışılmıştır. Membran proteinlerinin jel üzerinde molekül ağırlıklarına göre sıralanmasına dayalı bir tanımlama yapılmıştır (Şekil 2.6).

Eritrosit membran proteinleri transmembran (integral) proteinler, iskelet proteinleri ve bağlayıcı (linking) proteinler olmak üzere 3 grupta incelenmektedir [13,20,21].



Şekil 2.6. SDS-PAGE ile Saptanan İnsan Eritrosit Membran Proteinleri [11].

2.1.1.2.2.1. Transmembran Proteinleri

Her bir kırmızı hücrede yaklaşık yüz ile bir milyon arasında değişen sayıda, elli farklı transmembran proteini tanımlanmıştır. Transmembran proteinleri (integral proteinler) lipid çift tabakayı dik bir şekilde delip geçerler. Membran lipidleri ile yaptıkları güçlü bağlar aracılığıyla da membrana sıkıca bağlanırlar. Lipid tabakaya gömülü haldedirler [1,2,13].

Membranın her iki tarafında, birbirinden farklı, yapısal ve fonksiyonel kısımlara sahiptirler. Bu sayede bazı fonksiyonel işlemlerde örneğin katyon, su ve üre taşıyıcısı olarak, hücre sinyal olaylarında, endotel hücreler ve diğer kan hücreleri ile kırmızı hücre etkileşimlerinde bağlayıcı protein olarak rol alırlar [2,3,13,20,21].

Eritrosit membranında yer alan transmembran proteinlerinin en önemlileri band 3 ve glikoforinlerdir [1,10,12,13,20].

Band 3; 100 kD molekül ağırlığında, glikoprotein yapılı bir proteindir. Anyon kanalı ya da anyon değiş tokuş proteini olarak da bilinir. Transmembran proteinlerinin % 25'ini oluşturan ve membranı 12 kez geçen band 3 proteini iskelet proteinleri ile etkileşime geçen ana transmembran proteindir. Dimer ya da tetramer formunda olan band 3 proteininin C terminal ucu membranın dış yüzeyinde kalır ve klorür (Cl^-) ile bikarbonat (HCO_3^-) anyonlarının karşılıklı olarak yer değiştirmesine izin veren bir kanal görevi görür. İç kısımda yer alan N terminal ucu ankirin, protein 4.1 ve protein 4.2 ile iskelet proteinlerine bağlanarak membranın bütünlüğünün korunmasında görev alır. İskelet proteinlerinin lipid tabakaya bağlanmasında band 3'ün zorunlu olmadığı ancak membran bütünlüğünün sağlanması açısından zorunlu olduğu gösterilmiştir [3-5,10,12,13,18,20,21].

Membran bütünlüğünün korunmasına yardımcı olan diğer transmembran proteinleri de glikoforinlerdir. Sialoglikoprotein yapısındaki glikoforinler hücre dışı, membran içi ve hücre içi olmak üzere 3 bölgeden oluşur. Hücre dışında kalan bölge reseptör görevi görürken hücre içinde kalan kısmı ise protein 4.1 aracılığıyla iskelet proteinlerine bağlanır. Membran içinde kalan kısım ise fosfolipidlere bağlanır. Ayrıca yapılarındaki siyalik asit nedeniyle eritrositin yüzeyine negatif yük kazandırır. Bu da eritrositin, diğer eritrositler, damar endoteli ve diğer hücrelerle olan etkileşimleri için önemlidir [13,20,22].

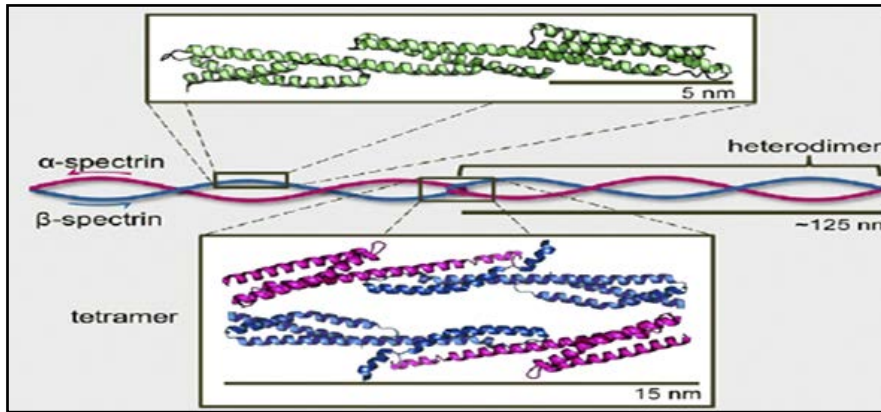
Yapılan periyodik asit-Schiff (PAS) boyamalarıyla glikoforin A, B, C, D olmak üzere glikoforinin dört farklı izoformu tespit edilmiştir. Büyük bir kısmını da glikoforin A (% 85) oluşturur [13,20,22].

2.1.1.2.2.2. İskelet Proteinleri

Eritrosit membranı hücre iskeleti olarak adlandırılan ve membranın iç yüzeyine paralel uzanan bir protein ağı ile güçlendirilmiştir. Eritrosit hücre iskeleti, yoğun fibriller bir iskeletten oluşur. İskelet proteinleri olarak adlandırılan proteinlerden oluşan bu ağ yapı birçok noktada bağlayıcı proteinler vasıtasıyla transmembran proteinlerine bağlanır. Böylece eritrosit membranına sağlamlık ve esneklik kazandırılır. Membran iskelet ağında yer alan iskelet proteinlerinin başlıcaları spektrin, aktin, miyozin, tropomiyozin ve tropomodulin'dir [2,4,13,20].

Spektrin eritrosit membranının temel proteindir. α ve β -spektrin olarak adlandırılan iki polipeptid zinciri vardır. Bu zincirler 106 aminoasitin oluşturduğu üçlü helikal yapının α -spektrinde 20, β -spektrinde ise 16 tekrar yapmasıyla oluşur. Bu iki alt ünite de bir heterodimer oluşturmak üzere beraberce dönme hareketi yaparak birbirlerine antiparalel olarak uzanır. α -spektrin C-terminal ucu ile β -spektrin N-terminal ucu arasındaki güçlü etkileşimler iki zinciri bir arada tutar. Ayrıca β -spektrin N-terminal ucu aktin ile zayıf bir etkileşim içindedir ki bu etkileşim protein 4.1 ile önemli ölçüde kuvvetlendirilir. Böylece spektrin molekülleri birbirlerine bağlanırlar. Spektrin dimer-dimer etkileşmesi ve spektrin-aktin-protein 4.1R'nin üçlü kompleksi, membranın mekanik bütünlüğünde kritik bir rol oynar. Şekil 2.7'de verilen uzun filamentöz yapıdaki spektrin bu eşsiz yapısal özelliği ilk defa eritrositlerde fark edilmiştir [2,10,12,13,20,23].

Bu yapı membran sertliğinin azaltılması ve normal eritrositlere olağanüstü elastikiyetinin sağlanması açısından önemlidir. Dolaşım sırasında eritrosit dar dalak sinuzoidlerinden ve kapillerlerden geçerken spektrin molekül kıvrımları açılır, diğer protein ve bağlantılar ise sıkılaşıp katlanır. Şekilsel bir değişim meydana gelirken eritrositin yüzey alanı değişmez [2,13].



Şekil 2.7. Spektrin Molekülünün Yapısı [23].

Band 5 olarak da tanımlanan diğer bir iskelet proteini de aktindir. Yapı ve fonksiyon bakımından diğer hücrelerdekine çok benzemesine rağmen, farklı olarak eritrosit membranında 10-12 aktin monomeri bir araya gelerek çift sarmallı aktin filamentlerini oluştururlar. Aktin filamentleri spektrin tetramerleri ile diğer bir iskelet proteini olan protein 4.1'le birleşerek altıgen kafesli bir ağ oluşturur (Şekil 2.8.) [10,13,15,24,25].

Eritrosit miyozin, molekül ağırlığı 200 kDa olan ağır bir zincir ile molekül ağırlıkları 26 ile 19,5 kDa olan iki hafif zincirden oluşan bipolar bir moleküldür. Eritrosit membranında yer alan miyozin diğer kaynaklarda bulunan miyozinlerle şekilsel olarak benzerlik gösterir. 150 nm uzunluğundaki ağır zincir ve bu zincirin ucunda yer alan globüler başlık şeklindedir. Bu baş kısım miyozinin aktin ile bağlanma bölgesidir. Miyozin hücre başına yaklaşık 6000 kopya ile oldukça nadir bir proteindir. Eritrositin şekil değiştirmesi sırasında aktin ile miyozin arasındaki kasılma hareketinin düzenlenmesinde görev alır [13,26,27].

Tropomiyozin molekül ağırlığı 27 ve 29 kDa olan iki alt birimden oluşan bir heterodimerdir. Bu iki alt birim, uzunluğu 33-34 nm olan aktin filamana sarmal yaparak bağlanır. Tropomyozin aktin filamentlerini mekanik olarak stabilize etmek ve spektrinle aktin arasındaki ilişkiyi düzenlemekle görevlidir. Tropomodulin yaklaşık 40 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahip bir proteindir. İlk olarak tropomiyozine bağlanma proteini olduğu düşünülmüş ancak daha sonra, tropomodulinin aktin filamanın sivri ucuna spesifik olarak bağlandığı, aktin monomerlerin polimerizasyonunu ve depolimerizasyonunu inhibe ettiği anlaşılmıştır [13,20,27,28].

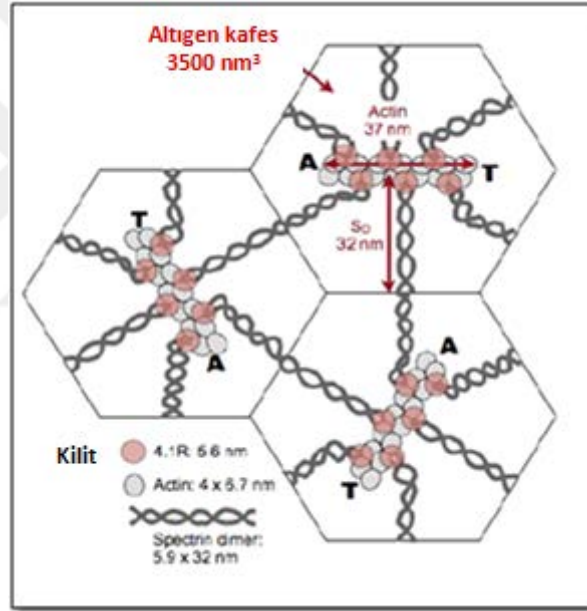
2.1.1.2.2.3. Bağlayıcı Proteinler

Eritrosit membranına sağlamlık ve esneklik kazandıran diğer membran protein grubudur. Membranın iç yüzeyine paralel uzanan iskelet proteinleri ile membrana dik şekilde yerleşmiş, transmembran proteinlerini birbirine bağlayarak üç boyutlu protein ağının oluşmasında önemli rol oynarlar. Ankirin (band 2.1), protein 4.1 ve protein 4.2 membran yapısında yer alan bağlayıcı proteinlerdir [13,20].

Molekül ağırlığı yaklaşık 210 kDa olan ve her bir eritrosit hücresinde yaklaşık 100.000 kopyası bulunan ankirin iskelet proteini olan β -spektrin ile transmembran proteini olan band 3 arasındaki bağlantıyı sağlayarak membran iskeletinin lipid çift tabakaya tutunmasında ve membranın stabilize edilmesinde hayati bir rol oynar. Protein 4.2, band 3 ve ankirine bağlanarak bu bağı güçlendirir. Ankirin yokluğunda spektrin heterodimerleri membran üzerindeki band 3 proteinine tutturulamaz ve bozular. Bu nedenle, ankirindeki primer bir defekt, hem ankirin hem de spektrin kombine eksikliğine yol açar [4,10,11,13,18,20,29].

Monomer halinde yaklaşık 72 kDa molekül ağırlığında olan protein 4.2, membran proteinlerinin yaklaşık % 5'ini oluşturur ve band 3'ün stoplazmik parçası ile etkileşerek ankirin-band 3 bağlantısını kuvvetlendirmek suretiyle membran yapısında önemli rol oynar. Bu nedenle protein 4.2 eksikliği sıklıkla ankirin veya band 3 eksikliği ile birlikte bulunabilir. Bununla birlikte, bazı HS hastalarında, izole protein 4.2 eksikliği görülebilir [4,5,10,13,25,29].

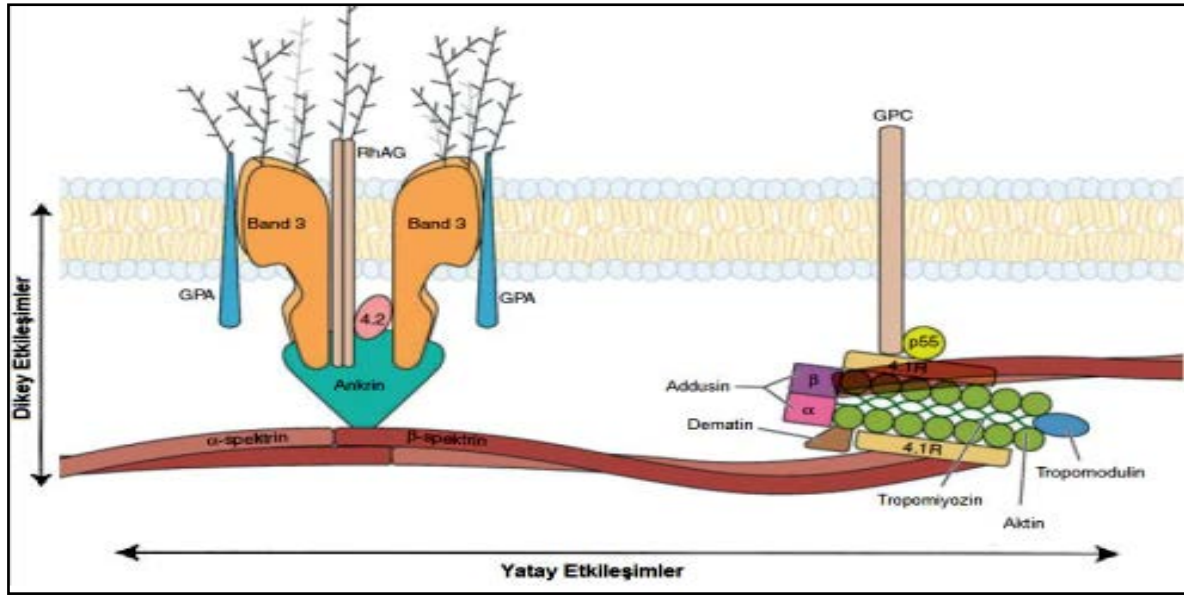
Protein 4.1; 622 aminoasitten oluşan dairesel yapıda globüler bir proteindir. Her bir hücrede yaklaşık olarak 200.000 kopyası vardır. Protein 4.1'in en önemli görevi spektrin ve aktin arasındaki zayıf bağlantıyı kuvvetlendirmek ve stabilize etmektir. Oluşturulan bu üçlü kompleks membranın mekanik bütünlüğünde kritik rol alır ki bu yapı eritrositin deformasyon sonrasında tekrar eski halini almasını sağlar. Protein 4.1 spektrin ve aktin dışında membran lipidlerine ve diğer transmembran proteinlerinin bir veya birkaçına da bağlanabilir. Bu anlamda spektrin ile birlikte membran iskeletini ayakta tutar denilebilir [2,10,13,24,25].



Şekil 2.8. Spektrin-aktin-protein 4.1 Kompleksinin Oluşturduğu Altıgen Kafes Yapısı [30].

2.1.2. Eritrosit Membran Bozuklukları ve Hereditör Sferositoz İlişkisi

Eritrositin birçok fizyolojik fonksiyonundan, bikonkav disk şeklinden, esnekliğinden ve sağlamlığından sorumlu olan eritrosit membranı çok bileşenli bir yapıdır. Kavramsal olarak, bu bileşenler arasında iki temel etkileşim vardır: membran iskeleti ve lipid iki tabaka arasındaki dikey etkileşimler ve membran iskelet ağını oluşturan bileşenler arasındaki yatay etkileşimler [2,5,11]. Eritrositin membran yapısı (Şekil 2.9.)'da verilmiştir.



Şekil 2.9. Eritrosit Membran Yapısı [4].

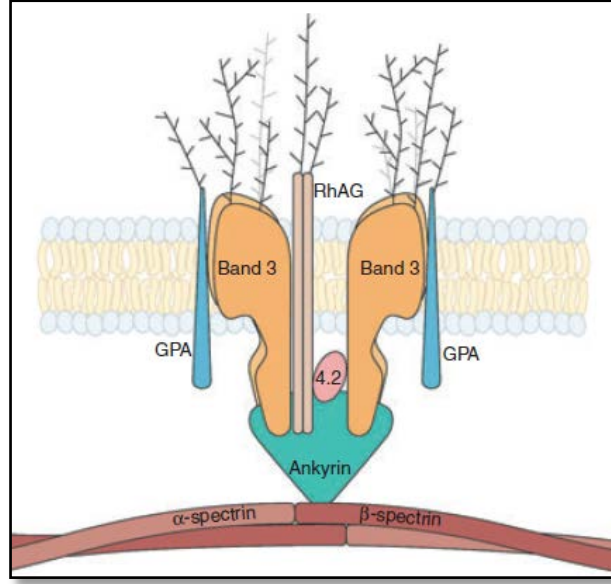
Dikey etkileşimler membran iskeleti ve lipit tabaka arasındaki yapışıklığın korunmasında, yatay etkileşimler ise membranın mekanik stabilitesinde kilit rol oynar. Dikey etkileşimde band 3, ankirin, spektrin ve protein 4.2, yatay etkileşimde ise α -spektrin ile β -spektrin, β -spektrin ile protein 4.1 ve protein 4.1 ile aktin proteinleri arasındaki bağlantılar söz konusudur. Bu bileşenlerin herhangi birindeki kusurlar, eritrositleri içeren klinik bozukluklar olarak ortaya çıkabilir [2,5,11].

Biyokimyasal tekniklerin ilerlemesi ve moleküler biyolojideki gelişmeler eritrosit membran hasarlarını ve ilişkili hastalıkların ortaya konmasında önemli mesafeler kaydetmiştir ki Tablo 2.2.'de eritrosit membranında yer alan proteinlerdeki kusurların hangi hastalıklarla ilişkili olduğu verilmiştir.

Tablo 2.2. Eritrosit Membran Proteinleri ile İlişkili Hastalıklar [11].

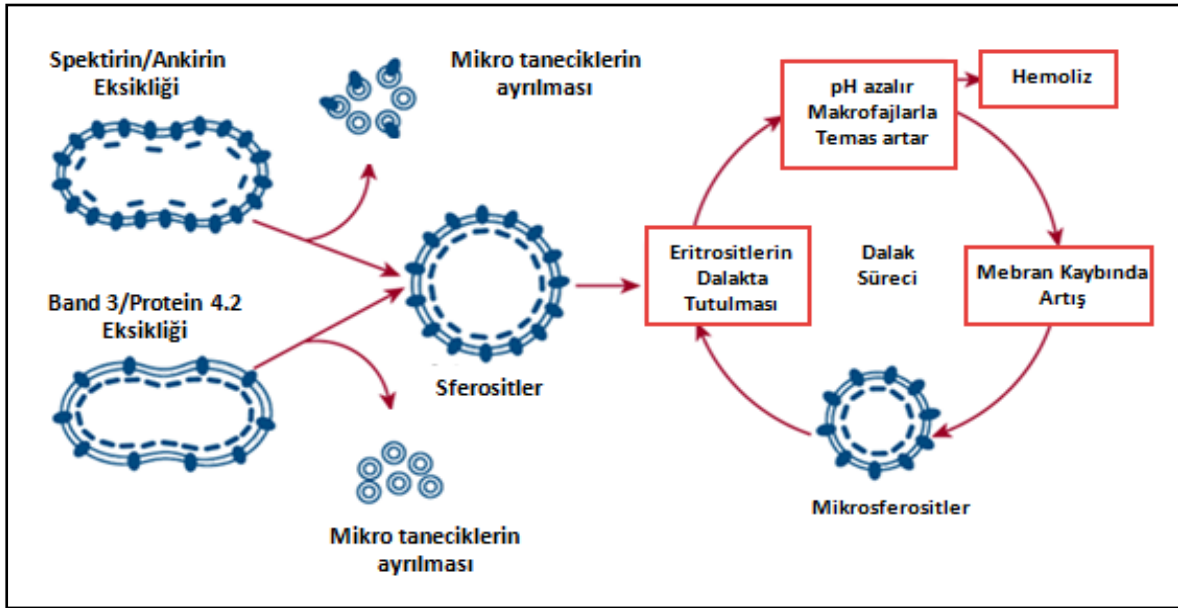
SDS-PAGE Band	Protein	İlişkili Hastalıklar
1	α -Spectrin	Hereditör Eliptoz (HE) Hereditör Piroptoz (HPP) HS
2	β -Spectrin	Hereditör Eliptoz (HE) Hereditör Piroptoz (HPP) HS
2.1a	Ankirin-1	HS
3	Band 3	HS Hereditör Akantoz (Hac) Hereditör Ovaloz (SAO) Hereditör Stomatoz (HSt)
4.1b	Protein 4.1R	Hereditör Eliptoz (HE)
4.2	Protein 4.2	HS
7	Stomatin	Hereditör Stomatoz (HSt)
PAS-2c	Glycophorin C	Hereditör Eliptoz (HE)
PAS-3c	Glycophorin D	Hereditör Eliptoz (HE)

Tablo 2.2.'de görüldüğü gibi HS, eritrosit membranında yer alan α -spektrin, β -spektrin, ankirin, protein 4.2 ve band 3 proteinlerinden bir veya daha fazlasının hasarlı ya da eksik olmasından kaynaklanır. Bu proteinlerin membran yerleşimi Şekil 2.10.'da verilmiştir.



Şekil 2.10. Hereditör Sferositozda Etkili Olan Proteinlerin Membran Yerleşimi [2].

Şekil 2.11.'de görüldüğü gibi, spektrin, ankrin ve protein 4.2'deki defektler, membran iskeletinin yoğunluğunu azaltır, üstteki lipid tabakanın dengesini bozar ve band 3 içeren mikro tanecikleri serbest bırakır. Band 3'ün kusurları, lipid tabakanın stabilize edilmesini engeller ve lipid tabakadan band 3 içermeyen mikro taneciklerin serbest kalmasına neden olur. Her iki yol da, membran yüzey alanının azalması, yüzey hacim oranının düşmesi ve dalakta tutulan ve hasar gören deforme olabilirliği azalmış sferositlerin oluşumu ile sonuçlanır [3,11,29,31].



Şekil 2.11. Hereditör Sferositoz Patofizyolojisi [31].

SDS-PAGE yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda HS hastalarının % 30-45'inde ankrin ve spektrin birlikte eksikliği, % 30'unda izole spektrin eksikliği, % 20'sinde band 3 eksikliği, % 5 (Amerikalı ve Avrupalı hastalarda) civarında da protein 4.2. eksikliği görülmüştür. Japon hastalarda protein 4.2 eksikliğine bağlı HS görülme sıklığının daha fazla olduğu bildirilmiştir. Tablo 2.3.'de HS'ye neden olan protein kusurlarının görülme sıklığı verilmiştir [3,4,10,22,32].

Tablo 2.3. Herediter Sferositoza Neden Olan Protein Kusurlarının Görülme Sıklığı [4,22,32].

Protein Defekti	Görülme Sıklığı (%)
Spektrin-Ankrin	35-45
İzole spektrin	30
Band 3	20
Protein 4.2	5

2.1.3. Herediter Sferositozun Tanısı

Herediter Sferositoz tanısı; aile öyküsü, klinik bulgular, periferik yaymada sferosit varlığı ve laboratuvar verilerine dayanılarak konulur [6,7,33].

Herediter Sferositoz hastalarının çoğunda otozomal dominant geçiş olduğundan aile öyküsüne bakılmalıdır. Ailede % 75 oranında benzer yakınmalar vardır. Bu nedenle ailede anemi, sarılık, safra kesesinde taş, dalak büyüklüğü, aile üyelerinden birinin HS olup olmadığı, aile üyelerinin splenektomi ya da kolesistektomi operasyonu geçirip geçirmediği mutlaka sorgulanmalıdır [3,7,10].

Herediter Sferositozlu hastaların klinik bulguları oldukça değişkendir ve doğumdan ileri yaşlara kadar herhangi bir dönemde hatta şiddetli HS vakalarında hamilelikte dahi ortaya çıkabilir. Anemi, sarılık ve dalak büyüklüğü en sık görülen bulgulardır.

Periferik yaymada, küre şeklini (sferosit) alan eritrositlerin tespiti hastalığı düşündürür (Şekil 2.1). Fakat hafif HS vakalarında periferik yaymada sferositlerin tespit edilmesi güçtür hatta hastaların % 20-25'inde yayma normal de olabilmektedir. Ayrıca immün hemolitik anemi vakalarında da sferositler görülür. Bu nedenle ayırıcı tanıda ekstra testlere gereksinim duyulur [3,7,10].

Türk hematoloji derneğinin HS tanısında bakılmasını önerdiği laboratuvar testleri tam kan sayımı, periferik yayma, retikülosit, direkt antiglobulin testi, biyokimyasal testler ve OF testidir. Bu testler Tablo 2.4.'te verilmiştir.

Yapılan tam kan sayımında ortalama eritrosit hacmi (MCV) ve hemoglobin (Hb) normal ya da azalmış, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) ve eritrosit dağılım genişliği (RDW) ise genellikle artmış olarak bulunur. Hb seviyesi hastalığın şiddetine göre 6-13 g/dL aralığında iken aplastik krizlerde 2-3 g/dL'ye kadar düşebilmektedir. Hemoliz nedeniyle direkt antiglobulin testinin negatif olması, kemik iliğinin hemolize yanıtı nedeniyle de retikülosit sayısı ve yüzdesinin yükselmesi beklenir. Bunun yanında hasta serumunda indirekt bilirubin ve laktat dehidrogenaz (LDH) artışı olur. Eritrosit membranının esnekliği ve sağlamlığının zayıflaması nedeniyle hipotonik tuzlu suya karşı direnç azalmıştır (artmış ozmotik frajilite) [3,6-8,10,33].

Tablo 2.4. Herediter Sferositozda Kullanılan Laboratuvar Testleri [33].

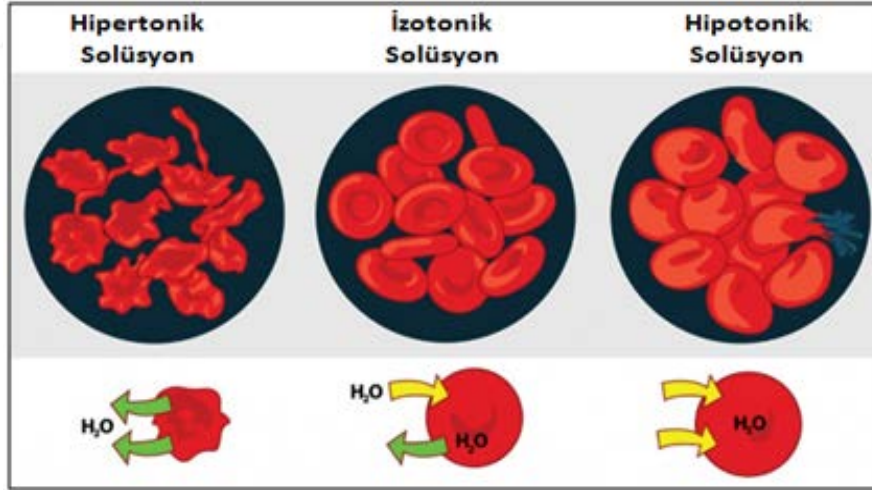
TESTLER	BULGULAR
Tam Kan Sayımı	Hb ve MCV'de Azalma, MCHC ve RDW'de Artma
Periferik Yayma	Anormal Morfoloji, Sferosit Artışı
Retikülosit	Artmış
Direkt Antiglobulin Testi	Negatif
Biyokimyasal Testler	İndirekt Hiperbilirubinemi, LDH Yüksekliği
OF / İnkübasyonlu OF	Artmış

Rutinde bakılan en önemli laboratuvar testi OF testidir. Yukarıdaki rutin testlerin dışında asidifiye gliserol lizis testi (AGLT), pink test, kriyohemoliz testi (CHT), ozmotik gradient ektasitometri testi, EMA bağlanma testi, FC-OF testi ve SDS-PAGE (sodyum dodesilsülfat kullanılarak çalışılan poliakrilamid jel elektroforezi) testi rutinde bakılmayan diğer laboratuvar testleridir. Bunların dışında genetik bozuklukların bakılması ile de tanı konulabilir [8,34].

2.2. Ozmotik Frajlite Testi

Ozmotik frajlite testi, başka bir deyişle ozmotik kırılma testi, eritrositlerin fiziksel durumunu araştıran en eski yöntemlerden biridir. İsmi nedeniyle eritrositlerin kırılma eğiliminin ölçüldüğü algısı oluşsa da aslında ölçülen eritrositlerin dayanıklılığıdır [36,36].

Eritrosit membranı diğer biyolojik membranlar gibi kendi plazma ozmolaritesinden daha farklı ozmolariteye sahip bir ortama maruz kaldığında ortamdaki sıvının ozmolaritesine bağlı olarak membran içerisine sıvı alıp verecek şekilde düzenlenmiştir. Şekil 2.12.'de görüldüğü üzere, eritrositler düşük ozmolariteye sahip hipertonic bir sıvı içerisine konulduğunda membran içerisindeki sıvı dışarıya çıkıp hücre büzölmeye başlar, yüksek ozmolariteye sahip hipotonik bir sıvı içine konulduğunda ise, sıvı membran içerisine girmeye başlar. Sıvı alışverişini kontrol eden $\text{Na}^+\text{-K}^+$ aktif transport pompasının kapasitesi aşılabılır ve sıvı girişi devam ederse eritrositler şişmeye başlar ve küre şeklini alır. Eritrosit şişmesine rağmen, oldukça sağlam ve esnek yapıda olan membranı sayesinde hacmi artarken yüzey alanı aynı kalır. Kritik bir hacme kadar şişen eritrosit, devam eden sıvı girişi karşısında daha fazla şişemez ve parçalanır. Böylece membran içerisindeki hemoglobin gibi moleküller de serbest kalır (hemoliz) [37-40].

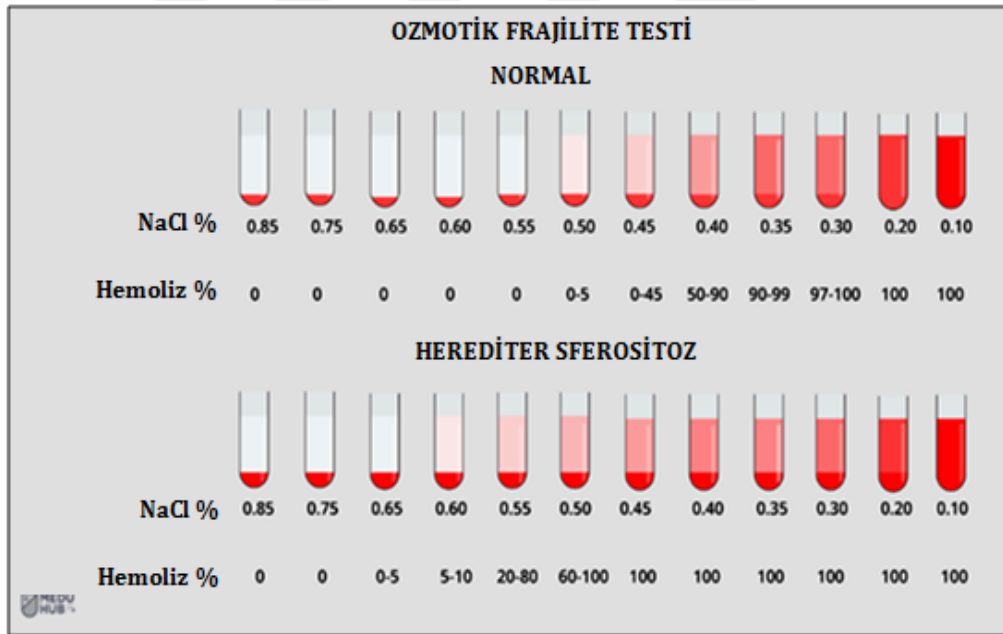


Şekil 2.12. Eritrositlerin Hipertonik ve Hipotonik Ortamdaki Davranışları [41].

Ozmotik frajlite testinde, farklı hipotonik konsantrasyonlardaki tuz çözeltileri karşısındaki eritrositlerin direnci ölçülür. Her bir hipotonik derişimdeki parçalanma miktarı, çözelti içine dağılan ve çözeltiye kırmızı renk veren hemoglobinin kolorimetrik olarak ölçülmesiyle bulunur [8,37-39].

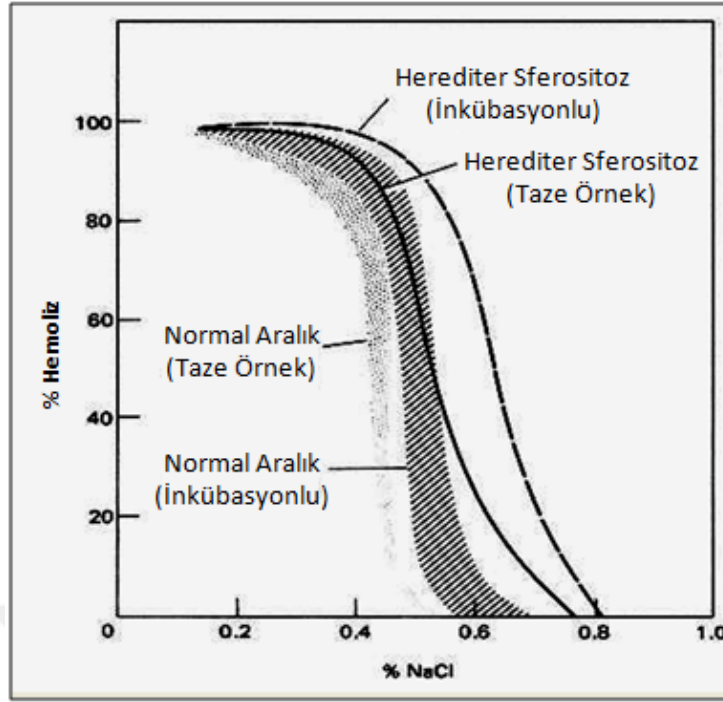
Şekil 2.13.'de görüldüğü üzere, normal eritrositler % 0,9 – 0,5'lik NaCl çözeltisi içinde hiçbir şekil değişikliğine uğramazlarken, % 0,5'lik NaCl çözeltisi içinde hemoliz olmaya başlar ve % 0,3'lük NaCl çözeltisi içinde hemoliz tamamlanır. Eritrositlerin parçalanmaya başladığı hipotonik solüsyonun NaCl konsantrasyonuna "Minimal Ozmotik Direnç", bütün eritrositlerin parçalandığı NaCl konsantrasyonuna "Maksimal Ozmotik Direnç" denir [8,37-39,42].

Herediter Sferositoz hastalarında görülen sferositlerin yüzey/hacim oranları yani dirençleri düşüktür ve hipotonik çözeltilerde bikonkav disk şeklindeki normal eritrositlere oranla daha az genişleme kapasiteleri vardır. Bu nedenle daha yüksek konsantrasyonlardaki NaCl solüsyonlarında parçalanmaya başlarlar. Normal eritrositlerden daha yüksek konsantrasyonda parçalanan eritrositler için OF'nin artmış veya hemolitik direncin azalmış olduğu söylenir. Dolayısıyla HS hastalarında OF artmıştır. Bunun yanında hipokromik, düz ve yassı hücreler (Beta talasemi... vb) hipotonik çözeltilerde daha büyük genişleme kapasitesine sahiptirler ve normal eritrositlerden daha düşük NaCl derişiklerinde lizis olurlar. Bunlar içinse OF'nin azaldığı veya hemolitik direncin arttığı söylenir [2,4,7,8].



Şekil 2.13. Ozmotik Frajlite Deneyi [43].

İnkübe edilen kandan yapılan OF testi, taze kandan yapılan teste göre daha duyarlıdır. İnkübasyonlu OF testinde diğerinden farklı olarak örnek 37 °C derecede 24 saat bekletildikten sonra çalışılır. 37 °C derecede 24 saat bekletilen örnek metabolik olarak tükendiğinden ve membran yüzeyi daha geçirgen hale geldiğinden yüzey alanını daha kolay kaybeder. İnkübasyonlu OF testinde normal eritrositlerin minimal ozmotik direnci % 0,55-0,65 NaCl arasındadır (Şekil 2.14.) [7,10,31].



Şekil 2.14. Ozmotik Frajlite Deney Grafiği [44].

Genel olarak HS tanısında en yaygın kullanılan test olarak karşımıza çıkan OF testinin duyarlılığı düşüktür. Test HS'yi, sferosit oluşumunun gözleendiği farklı hastalıklardan ayıramadığı gibi demir eksikliği, tıkanma sarılığı ve retikülosit artışının olduğu HS hastalarında da normal sonuç verebilir. Hastaların yaklaşık % 20'si özellikle tanı koymanın zor olduğu hafif HS hastaları atlanır. Dolayısıyla OF sonucunun normal olması HS tanısından uzaklaştırılmaz [7,45].

Klasik OF testinin duyarlılığının düşük olması ve HS'nin daha ucuz, pratik ve güvenilir olarak tespit edilebilmesi için yapılan çalışmalarda OF testinin çeşitli modifikasyonları türetilmiştir. AGLT, pink test ve CHT K-OF testinin değişik modifikasyonlarıdır [8,34].

Son zamanlarda Won ve Suh tarafından geleneksel OF testinin yerine geçmek üzere flow sitometrik OF (FC-OF) testi geliştirilmiştir. Bu yöntem; hipotonik solisyonlara maruz bırakılan eritrositlerden kalan artık eritrosit sayısının flow sitometri ile sayılması esasına dayanır. Flow sitometri kullanılarak yapılan diğer bir test de EMA bağlanma testidir. Hücre membran proteinlerine bağlanması dolayısıyla uzun zamandır hücre membranı çalışmalarında kullanılan maleimid aynı zamanda HS'nin tespitinde de kullanılmaktadır [8,34,46-48].

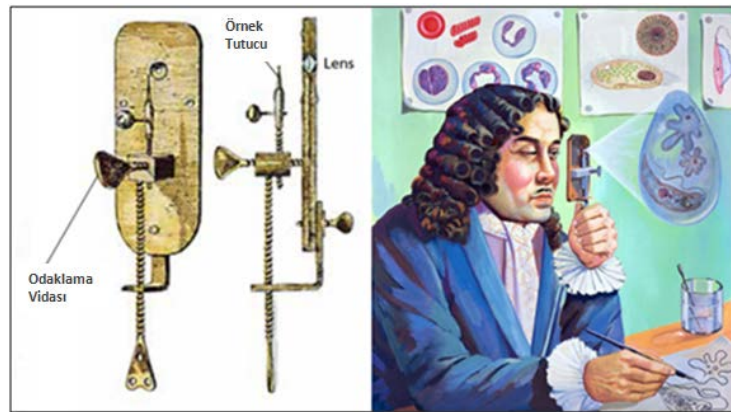
FC-OF testinin de HS taramasında kullanılıp kullanılmayacağına dair çalışmalar devam etmektedir ki bizde bu çalışmalara katkıda bulunmak amacıyla flow sitometri kullanılarak yapılan bu iki testin HS'yi ayırt etme gücünü araştırdık.

2.3. Flow Sitometri

2.3.1. Flow Sitometri Tanımı ve Tarihçesi

Flow sitometri kelimesi, ingilizce flow (akış)-cyto (hücre)-metry (ölçüm) kelimelerinin birleştirilmesinden türetilmiştir. Kabaca akmakta olan hücrelerin ölçülmesi olarak ifade edilebilen yöntemin ülkemizde kullanılmaya başlandığı dönemlerde “Flowcytometry” kelimesi yaygın olarak kullanılsa da Türkçeleştirme çabalarıyla birlikte yerini “Flow sitometri” ifadesine ve son yıllarda da “Akan hücre ölçer” ismine bırakmıştır.

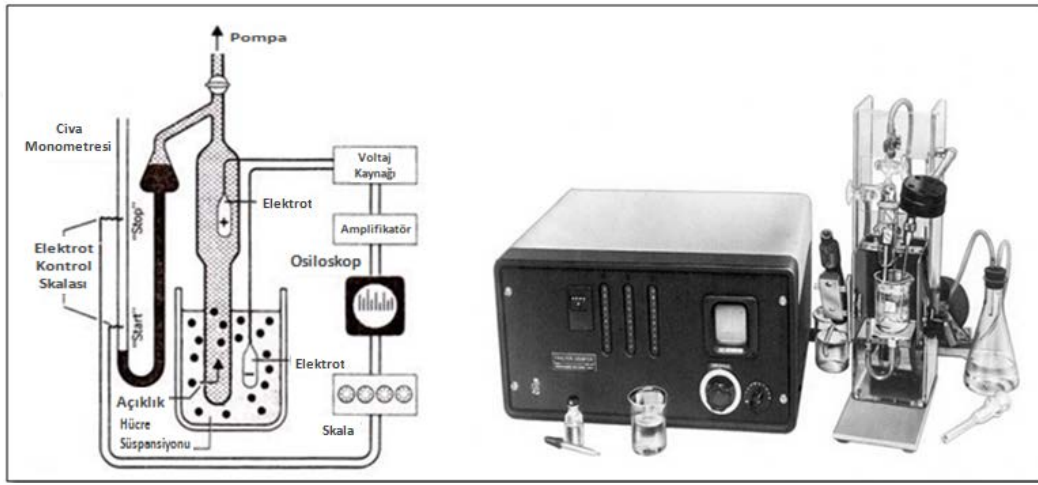
Yöntem mikroskop, kan sayım cihazları ve hatta yazıcılardaki mürekkep püskürtme teknolojilerindeki ilerlemeler gibi birçok buluşun bir araya gelmesiyle birlikte gelişmiştir. 17. Yüzyılda Leeuwenhoek adlı Hollandalı bir tekstilcinin kişisel merakı sonucu mikroskobu yapması (Şekil 2.15.), 1742 de Lomonosow’un ışığın saçılımından bahsetmesi, 1870 yılında Savart’ın hızla akan sıvının yüksek frekansla vibrasyonu sonrası ayrışmasını (sorting) geliştirmesi ve 1934 yılında Andrew Moldavan’ın hücre ve parçacıkları mikroskop önündeki kapiller bir borudan geçirerek saymasının (fotodedeksiyon) ardından 1949-1956 yılları arasında Wallace Coulter bu buluşlardan faydalanarak “Coulter Counter” isimli kan sayım cihazını yapmıştır. Akan hücre ölçerin atası olarak da kabul edilebilecek “Coulter Counter”, hücre süspansiyonunun belirli bir aralıktan geçtiği sırada hücrelerin gösterdiği empedansın ölçülmesine dayanan ve Coulter prensibi olarak adlandırılan yöntem ile çalışır (Şekil 2.16.) [49-52].



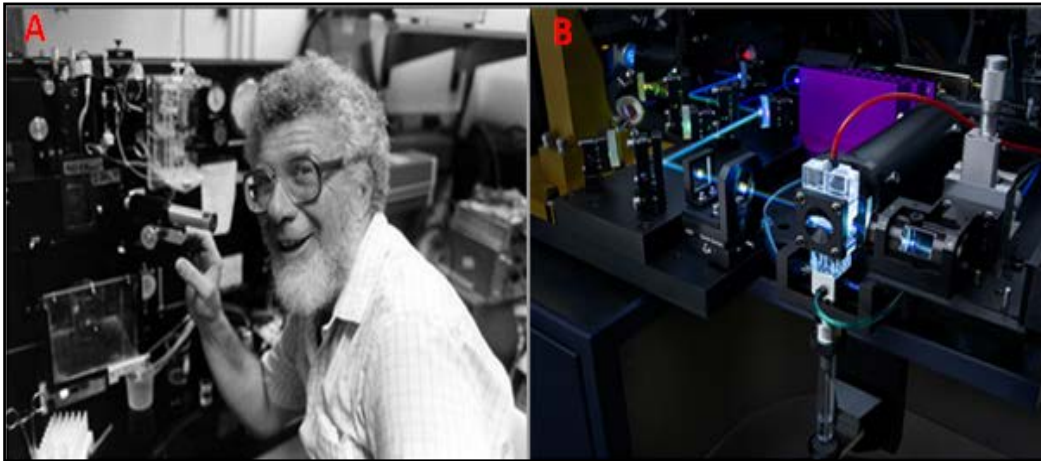
Şekil 2.15. Leeuwenhoek Mikroskobu [53,54].

1963 yılında Kamensky kanser hücrelerini normal hücrelerden ayırabilmek için hücre çekirdeğinin boyanabilmesi ve ışık saçılımı ilkelerinden yola çıkarak “Rapid Cell Spectrophotometer-RCS” isimli bir sistem geliştirmiştir. 1965 yılında Mack Fulwyler ise “İnk Jet”

yazıcılardaki mürekkep püskürtme teknolojisini “Coulter Counter” ile birleştirerek ilk hücre ayırıcıyı (cell sorter) geliştirmiştir. 1968 yılında Wolfgang Göhde ilk kez floresans boya kullanılarak ölçüm yapabilen akan hücre ölçeri geliştirdi. 1969 yılında argon lazerin Marvin Van Dilla tarafından sisteme monte edilmesi ve Cesar Milstein tarafından monoklonal antikor teknolojisinin geliştirilmesi sonrasında Leo Herzenberg tarafından floresan ve rodaminle işaretlenen hücrelerin argon lazerle gösterdikleri floresansa göre ayrıştırılabileceği raporlandı. Kısaca FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter-Floresanla aktive edilmiş hücre ayırıcı) olarak adlandırılan bu sistem, günümüzde akan hücre ölçer sistemleri için genel bir isim olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.17.) [49-52].



Şekil 2.16. Coulter Counter Prensibi ve İlk Dönemlerde Üretilen Bir Coulter Counter [55,56].

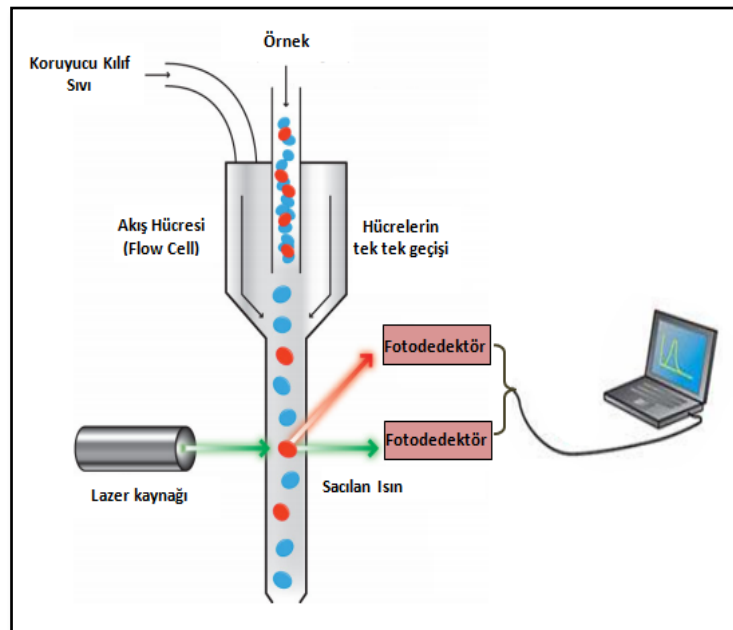


Şekil 2.17. A-Leonard Herzenberg ve FACS (1970) B-Günümüz FACS Teknolojisi [57,58].

Akan hücre ölçer teknolojisi nispeten yeni ve hızlı ilerleyen bir teknolojidir. 1985 yılından önce dünya genelinde 1.000 civarında akan hücre ölçer olduğu tahmin ediliyordu ki bu cihazların pek çoğu araştırma amaçlı kullanılmakta idi. Özellikle HIV hastalarında CD 4 (+) hücrelerin ölçülmesi gerektiğinin anlaşılması, immünofenotipleme alanında hızlı ilerlemeler sağlanmasına ve akan hücre sistemlerinin tıbbi laboratuvarlarda kullanılmaya başlanmasına neden olmuştur. 1992'ye geldiğimizde dünyada yaklaşık 7.000 akan hücre ölçer kullanılmakta iken 2000'li yıllarda bu sayının 30.000'e ulaştığı tahmin ediliyor. Optik, yazılım, bilişim ve monoklonal antikor teknolojilerindeki inanılmaz hızlı gelişmelerin yanında akan hücre ölçerin tıp dışında pek çok alanda kullanılmaya başlanması günümüzde bu sayıyı çok daha fazla arttırmıştır. Ülkemizde ise ilk kez 1980'li yıllarda kullanılmaya başlanan akan hücre ölçerlerin sayısının bugün 150'yi geçtiği tahmin ediliyor [50,59].

2.3.2. Flow Sitometri Çalışma Prensibi

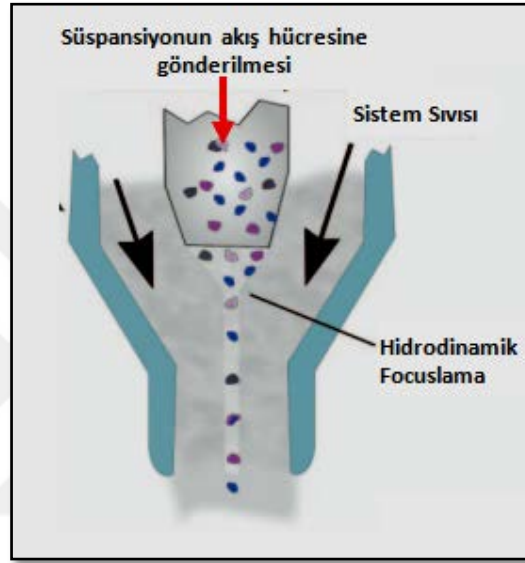
Akan hücre ölçer yöntemi, lazer önünden bir akış kanalı boyunca sürekli akmakta olan heterojen bir süspansiyondaki tek bir taneciğin (genellikle hücrelerin) fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini aynı anda multi parametrik olarak ölçmeye yarar. Sistem, florokrom ile işaretlenmiş taneciğin, lazer önünden geçerken yansıttığı ışını foto detektörler vasıtasıyla yakalayıp, elektrik sinyaline çevirir ve elde edilen verileri analiz edilmek üzere bilgisayar ortamına aktarır. Akan hücre ölçerin temel çalışma prensibi Şekil 2.18.'de verilmiştir [50-52,59-63].



Şekil 2.18. Akan Hücre Ölçerin Temel Çalışma Prensibi [63].

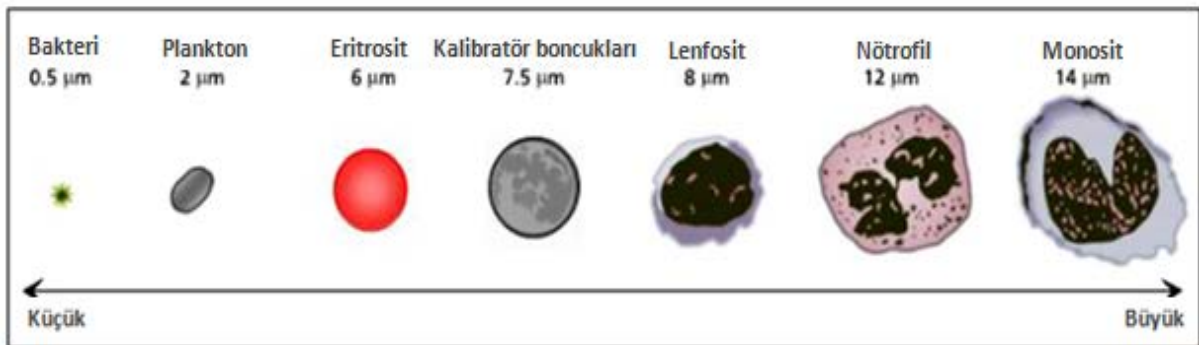
Sistem üç temel kısımdan oluşur;

1. **Hidrolik sistem;** Analizi yapılacak süspansiyondaki taneciklerin, sistem sıvısı ile birlikte lazer önünden tek tek akmasını sağlayan sistemdir. Bir nevi taşıyıcı görevi görür. Süspansiyon haldeki tanecikler hava basıncı ile sistem sıvısı içinden geçirilir. Bu sırada hidrostatik basınç meydana gelir ki tanecikler bu basınçla akış hücresine gelir. Cam veya quartzdan yapılmış olan akış hücresinin özel yapısı sayesinde de tanecikler tek tek lazer önünden akarlar. Bu olaya "hidrodinamik focuslama" adı verilir (Şekil 2.19.) [50,51,61,64,65].



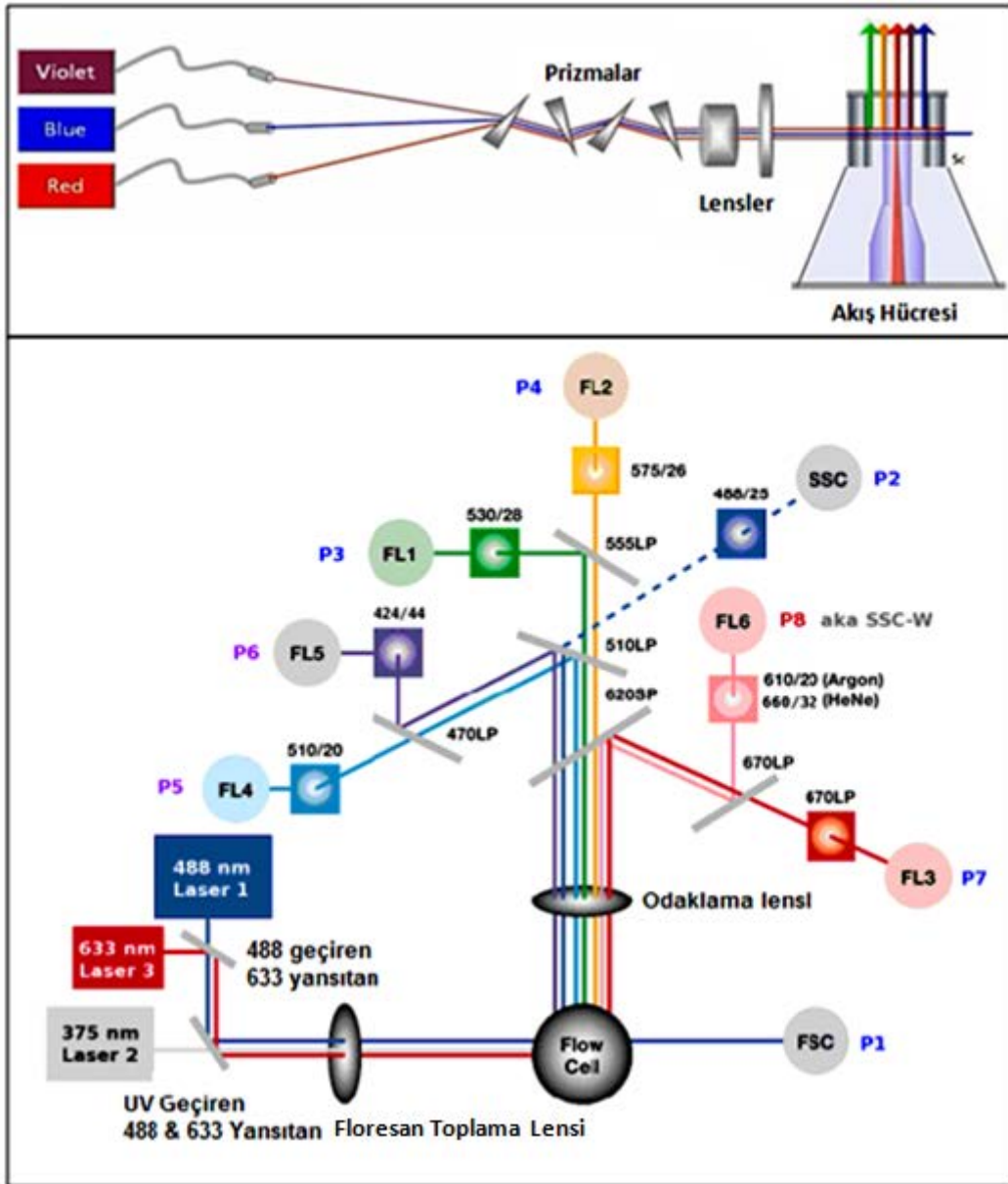
Şekil 2.19. Akan Hücre Ölçerde Hidrolik Sistem [65].

Ölçümü yapılacak taneciğin büyüklüğü akış hücresinin (flow cell) çapı ile ilgilidir ki akan hücre ölçerler de 0,2–150 μm büyüklüğündeki taneciklerin ölçümü yapılabilmektedir [50,51]. Akan hücre ölçer ile analiz edilebilecek bazı hücre tipleri ve boyutları Şekil 2.20.'de verilmiştir.



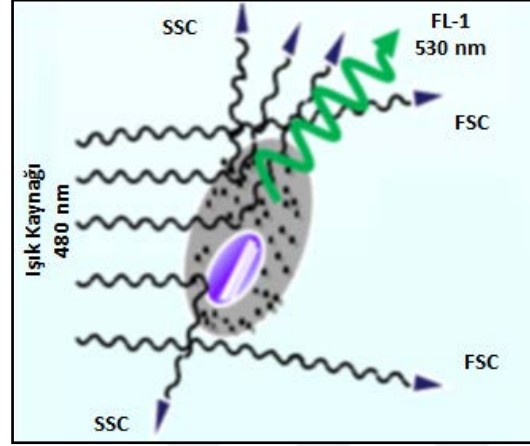
Şekil 2.20. Akan Hücre Ölçerde Analizi Yapılabilecek Hücreler ve Boyutları [66].

2. **Optik sistem;** Sistem lazerlerden çıkan ışını akış hücresine yönlendiren prizma ve mercekler ile florokromla boyanmış taneciklerin saçtığı ışını özel aynalar yardımıyla filtre edip ölçüm yapan foto detektörlerden oluşur. Bu detektörler öne doğru saçılan ışını tespit eden ileri saçılım kanal detektörü (FSC), yana doğru saçılan ışını tespit eden yana saçılım kanal detektörü (SSC) ve farklı dalga boylarında ölçüm yapabilen floresans (FL-1, FL-2, FL-3, FL-4 vs.)detektörleridir [50,51,61,64,65]. Optik sistemi oluşturan prizma, lens, ayna ve dedektörler ile dedektörlerin hangi dalga boylarındaki ışığı detekte ettiği Şekil 2.21.'de verilmiştir.



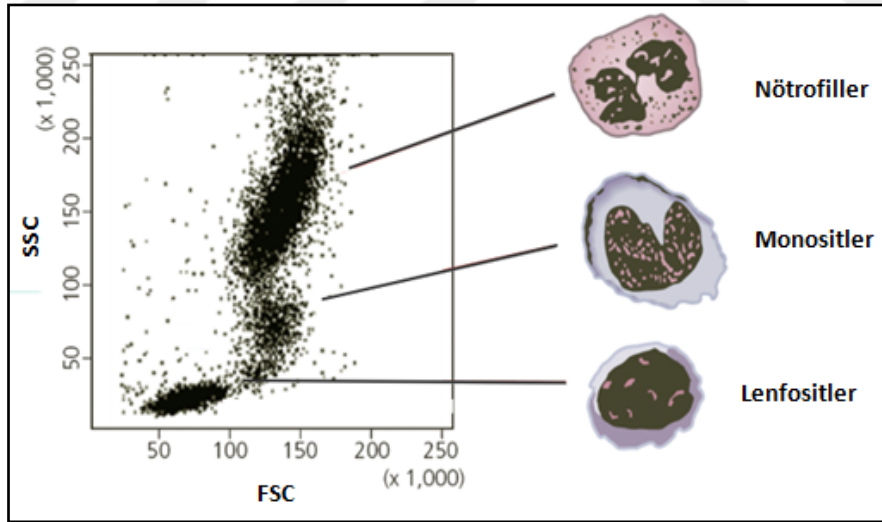
Şekil 2.21. Akan Hücre Ölçerde Optik Sistem [63,67].

İleri saçılım kanal detektörü sayesinde taneciklerin büyüklüğü hakkında, SSC ile taneciklerin granülaritesi hakkında, floresans detektörler ile de floresan miktarı hakkında bilgi alırız (Şekil 2.22.) [50,51].



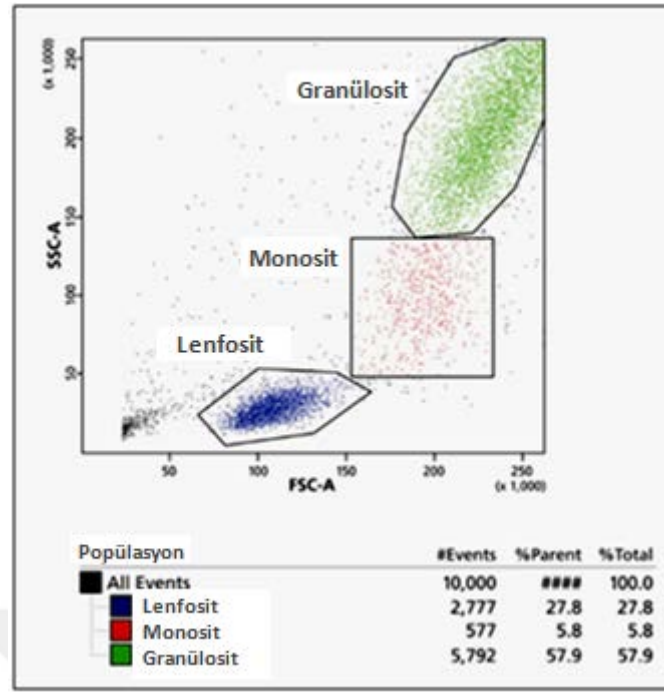
Şekil 2.22. Akan Hücre Ölçerde Detektörler Yardımıyla Büyüklük ve Granülarite Tespiti [63].

Şekil 2.23.'te gösterildiği gibi FSC/SSC histogramı ile süspansiyon içindeki farklı büyüklük ve granülaritedeki tanecikleri birbirinden ayırt edebiliriz [50,51].



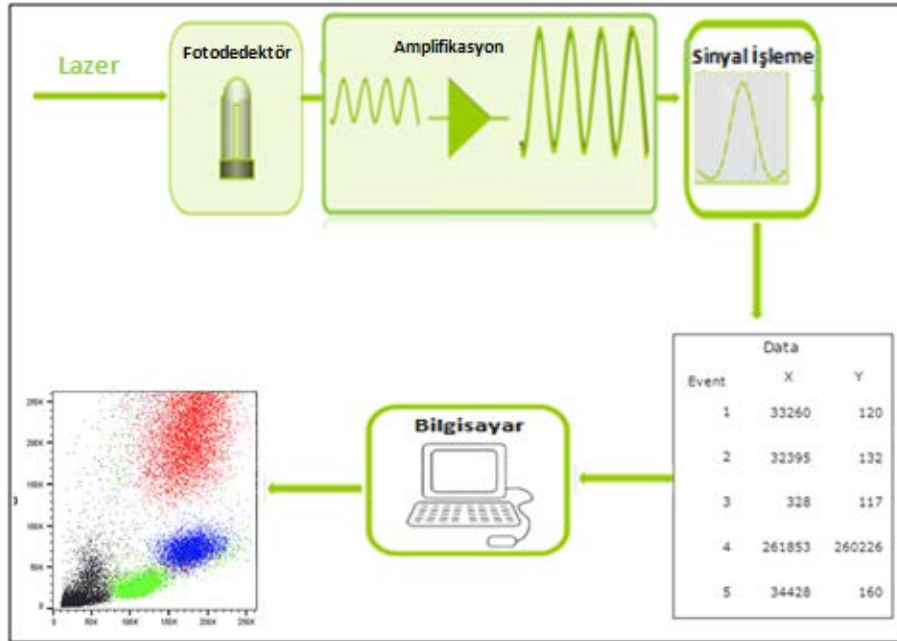
Şekil 2.23. Periferik Kan Hücrelerinin FSC/SSC Histogramı [68].

FSC/SSC histogramı ile büyüklük ve granülaritelerine göre birbirinden ayırt edilen gruplardan istenilen popülasyon seçilerek (gating/kapılama) o popülasyon hakkında veri analizi yapılabilir (Şekil 2.24.) [50,51].



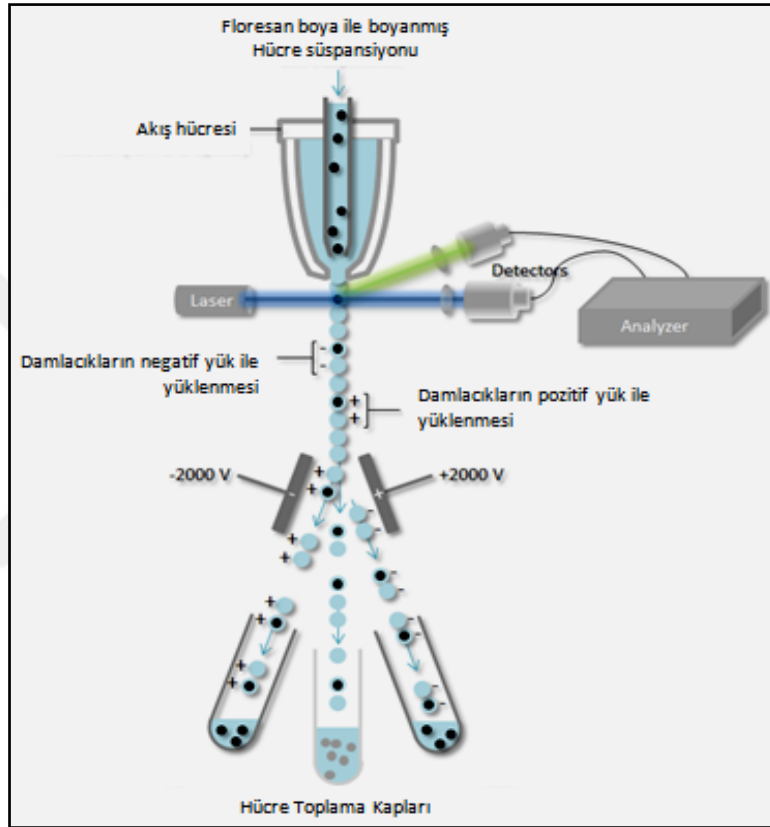
Şekil 2.24. FSC/SSC Histogramı ile Yapılan Bir Veri Analizi Örneği [69].

- Elektronik sistem;** Şekil 2.25.'te gösterildiği gibi detektörlere gelen optik sinyaller elektrik sinyallerine, elektrik sinyalleri de sayısal verilere dönüştürülerek analiz edilmek üzere bilgisayar ortamına aktarılır [50,51].



Şekil 2.25. Akan Hücre Ölçerde Elektronik Sistem [70].

Bu temel bölümlerin yanı sıra bazı akan hücre ölçerlerde sorting (hücre ayırıştırma) sistemleri de bulunur. Bu sistemler hücreleri alt gruplarına kadar tek hücre bazında fiziksel olarak yüksek saflık ve verimlilikle hızlı ve ucuz bir şekilde ayırıştırabilir. Florokrom boyalarla boyanan hücreler akış hücresinden ayrılırken damlacıklar içine alınır. Hücrelerden hangisinin ayırıştırılması isteniyorsa o hücelere elektrik akımı verilerek damlacıklar artı veya eksi yüklerle yüklenir. Elektrik yüklü damlacıklar saptırma plakaları yardımıyla toplama kabına yönlendirilir (Şekil 2.26.) [50,51,63,71].

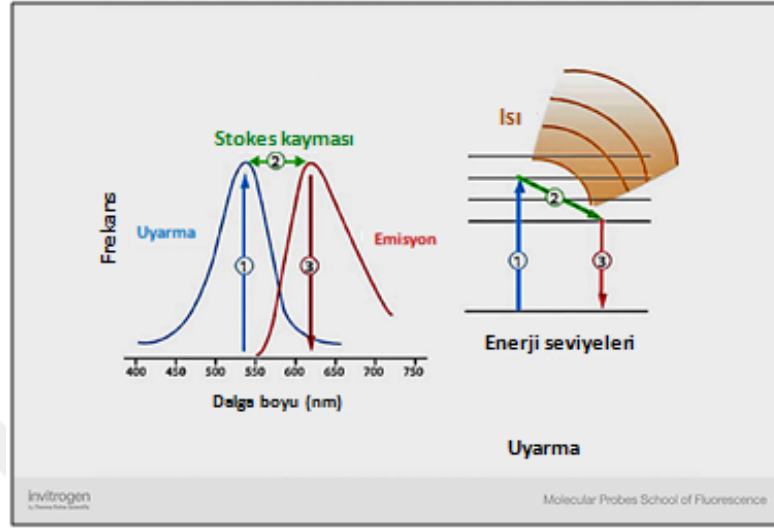


Şekil 2.26. Akan Hücre Ölçerde Hücre Ayırıştırma [72].

2.3.3. Florokromlar

Akan hücre ölçer ile analizi yapılacak taneciğin kimyasal ve biyolojik özelliklerini tespit edebilmek için taneciğin sahip olduğu antijenlere spesifik olarak bağlanan antikolar (monoklonal antikor) ile işaretleme yapılır. Floresan özellik gösteren bu antikolarla "florokromlar" adı verilir. Florokromların yapısında ışığı absorbe eden aromatik halkalar ile protein yapısındaki antijenin serbest amino grubuna spesifik olarak bağlanan aktif gruplar yer alır [50,51].

Florokrom ile işaretlenen tanecikler lazer önünden geçerken, florokromun aromatik halkaları tarafından absorbe edilen enerji çok kısa bir sürede tekrar serbest bırakılır (floresans). Serbest bırakılan enerjinin bir kısmı ısı olarak verildiğinden açığa çıkan ışığın enerjisi daha düşük, dalga boyu daha uzundur (stokes kayması) (Şekil 2.27.) [50,51].



Şekil 2.27. Stokes Kaymasının Şematik Gösterimi [73].

1970'li yıllarda başlayan monoklonal antikor üretimi, teknolojiye paralel olarak hızla artmakta ve teşhisten tedaviye farklı alanlarda kullanılmaktadır. Günümüzde optik ve yazılımdaki gelişmelerle birlikte daha spesifik, daha yüksek affiniteye sahip, farklı renkte ışımaya yapan antikorların üretilmesi, akan hücre ölçerlerde, pek çok alanda çok renkli analizlerin aynı anda yapılabilmesine imkan vermektedir [50,51,62].

Akan hücre ölçer sistemlerinde kullanılan bazı florokromlar ve ışımaya yaptıkları dalga boyları ve renkleri Şekil 2.28.'de verilmiştir;

Floresan Türleri	Uyarma Max (nm)	Emisyon Max (nm)	Floresan Rengi
FITC (Fluorescein)	494	520	Yeşil
Alexa Fluor 488	495	519	Yeşil
PE (Phycoerythrin)	496	578	Sarı
Alexa Fluor 594	590	617	Oran
Alexa Fluor 633	632	647	Kırmızı
APC (Allophycocyanin)	650	660	Kırmızı
PerCP (Peridinin Chlorophyll)	482	678	Kırmızı
PerCP-Cy5.5 (PerCP-cyanine)	482	695	Kırmızı
Alexa Fluor 700	702	723	Kırmızı

Şekil 2.28. Akan Hücre Ölçerde Kullanılan Bazı Florokromlar ve Spektrumları [74].

2.3.4. Flow Sitometri Kullanım Alanları

Akan hücre ölçerin atası sayılabilecek “coulter counter” kandaki hücrelerin sayımı için üretilmiştir. Kanın kendisi bir süspansiyon olduğundan akan hücre ölçerler için ideal bir örnek teşkil etmektedir. Dolayısıyla akan hücre ölçerlerin kullanımı da daha çok tıp alanında yaygınlaşmıştır ki klinik uygulamalarda sıklıkla akan hücre ölçerlerden faydalanılmaktadır. Elbette akan hücre ölçerde kullanılacak materyaller kan ile sınırlı değildir. Kan dışında kemik iliği, ince iğne aspirasyonları, çeşitli vücut sıvıları, solid doku örnekleri, lenf nodu biyopsi örnekleri, hücre kültürü örnekleri kısaca süspansiyon haldeki ya da süspansiyon haline getirilebilen materyaller akan hücre ölçerlerde analiz edilebilir [50,51,61,62].

Akan hücre ölçerlerin klinik uygulamalarından hematoloji, onkoloji, immünoloji, transplantasyon immünolojisi, moleküler biyoloji, enfeksiyon, yardımcı üreme teknikleri, mikrobiyoloji, kan bankacılığı ve patoloji alanlarında yaygın şekilde faydalanılmaktadır. Sistem ile hızlı sonuçlar alınabilmesi, çok kısa sürede çok fazla sayıda hücre ya da taneciğin analiz edilebilmesi, aynı anda birden fazla parametrenin incelenebilmesi ve yüksek duyarlılıkta sonuçlar elde edilebilmesi sistemin kullanımını hızla yaygınlaştırmıştır. Özellikle hücreler üzerinde yapılan immünofenotipleme çalışmaları hematologlara tanı koymada önemli katkı sağlar. Klinik uygulamalardan bazıları şunlardır;

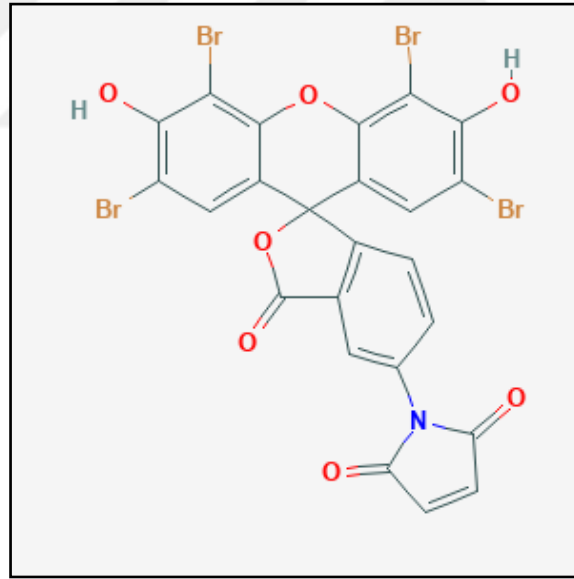
- Lösemi ve lenfomaların tanımlanması ve sınıflandırılması için yapılan immünofenotipleme çalışmaları
- Lökosit alt gruplarının ve sayılarının belirlenmesi
- Otoimmün hastalıklarda ve immün yetmezliklerde lenfosit alt gruplarının belirlenmesi
- HIV hastalarında CD 4 (+) hücrelerin mutlak değerinin belirlenmesi
- Organ nakillerinde doku uyumuna bakılması
- Kök hücre sayımı
- DNA analizi
- İlaç alım ölçümleri
- Hücre canlılık tayini
- Hücre içi glutatyon tayini
- Trombosit fonksiyon çalışmaları
- Retikülosit/Eritrosit analizi
- Kan bankacılığı
- Sperm analizi
- Mikroorganizmaların tanımlanması, canlılığının tespiti ve sayımı [50,51,61,62].

Akan hücre ölçerler tıp dışında çok farklı disiplinlerde de kullanılmaktadır. Tıp dışı kullanım alanları ve uygulamalarından bazıları şunlardır;

- Gıda (şarap üretiminde maya hücrelerinin tespiti ve sayımı)
- Çevre (sularda bulunan bazı parazit ve mikroorganizmaların tespiti)
- Veterinerlik (boğa spermlerinde sayı, canlılık ve cinsiyet tespiti)
- Ziraat (bitki hücre çekirdeklerinin DNA içeriğinin belirlenmesi)
- Farmakoloji (ilaç buluşu ve üretimi süreci)
- Su ürünleri (deniz suyundaki planktonlar ile ilgili yapılan araştırmalar) [63,71,75-77].

2.4. Eozin-5-Maleimid Bağlanma Testi

Hereditör Sferositozun tanımlanmasına yönelik son klavuzlar EMA bağlanma testinin bir tarama testi olarak kullanılmasını tavsiye etmektedir. Testin temeli floresan bir boya olan EMA'nın eritrosit membranında yer alan band 3, CD47 ve Rh ile ilişkili glikoproteinlere bağlanmasına dayanır [47,73].

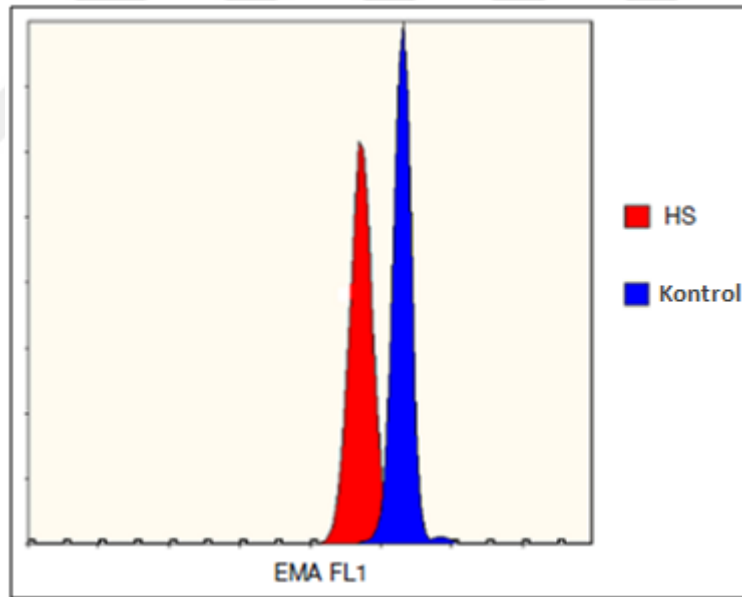


Şekil 2.29. Eozin-5-Maleimid'in Kimyasal Yapısı [46].

Molekül formülü $C_{24}H_9Br_4NO_7$, IUPAC isimlendirmesi ise "1-(2',4',5',7'-tetrabromo-3',6'-dihydroxy-3-oxospiro[2-benzofuran-1,9'-xanthene]-5-yl)pyrrole-2,5-dione", olan EMA yapısındaki eozin dolayısıyla floresans özellik gösteren pirrol türevi bir florokromdur (Şekil 2.29.)

Yapılan literatür taramalarında maleimid'in hücre membran proteinlerine bağlanması dolayısıyla uzun zamandır EMA'nın hücre membranı ile ilgili araştırmalarda kullanıldığı görülmektedir. Maleimid membran proteinleri ile etkileşirken eozin renk veren maddedir. 1997 yılında Stoya ve arkadaşları tarafından EMA'nın HS taramasında etkili bir yöntem olduğu gösterilmiştir [46-48].

Maleimid eritrosit membranında yer alan transmembran proteinlerine (band 3, CD47 ve Rh ile ilişkili glikoproteinler) bağlanır. Eozin-5-maleimidin etkileşimde olduğu ana transmembran proteini band 3'tür ki SDS-PAGE ile birlikte yapılan EMA bağlanma testinde bağlanmanın % 75 - % 95 oranında band 3 proteini olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla EMA bağlanma testinde daha çok band 3 proteinine bağlanmadan bahsedilir. Band 3 proteininin C terminal ucu membranın dış yüzeyinde kalırken N terminal ucu membranın içinde kalır. Maleimid band 3 proteini membran dışındaki kısmında yer alan Lisin 430 ile etkileşir. Band 3 proteininin eksik ya da kusurlu olması durumunda maleimidin bağlanmasında normal eritrositlere kıyasla bir azalma olacaktır (Şekil 2.30.). Bu azalış, akan hücre ölçer ile floresans yoğunluğuna bakılarak tespit edilir [46,47,78-80].



Şekil 2.30. HS Hastalarındaki Eozin-5-Maleimid Bağlanmasındaki Azalışın Gösterimi [8].

Her ne kadar EMA bağlanmasının band 3 ile sınırlı olduğu, HS'ye neden olan diğer protein eksikliklerini yansıtmayabileceği düşünülse de spektrin, ankirin ve protein 4,2 eksikliklerinde, band 3 üzerindeki EMA bağlanma bölgesinde olabilecek bir değişiklik, EMA bağlanmasında dolayısıyla da floresan yoğunluğunda bir azalmaya neden olabilecektir. Bu konuda yapılan bir çalışmada ankryn eksikliği olan HS hastalarında band 3 eksikliği olsun

olmasın, floresans yoğunluğunda normal eritrositlere göre % 25 -30 azalış olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla EMA bağlanma testinin sadece band 3 protein kusuru ya da eksikliği ile sınırlı olduğunu söylemek doğru olmaz [79-80].

Hereditör Sferositoz tarama testleri arasında EMA bağlanma testi yüksek duyarlılık (% 99±1) ve özgüllüğü (% 92±1) ile dikkat çekmektedir. Testin 2 saat gibi kısa bir sürede yapılabilmesi ve çok az miktarda (5 µl) örnek kullanılması büyük avantaj sağlamaktadır. Ayrıca 2-8 °C de 7 gün saklanan numunelerdeki EMA bağlanmasında taze örneklerle göre anlamlı bir fark olmadığı ve EMA boyaması yapılmış örneklerin buzdolabında 24 saat stabil kaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur ki bu da EMA bağlanma testini daha kullanışlı yapmaktadır. Bunun yanında EMA bağlanma sonuçları splenektomiden etkilenmez ve kan transfüzyonu sonrasında dahi en küçük hasarlı eritrosit populasyonları EMA ile tespit edilebilir. Daha da önemlisi EMA bağlanma testi HS dışında diğer eritrosit membran kusurları sonucu oluşan hastalıkların taramasında da kullanılabilir [8,73,81,82].

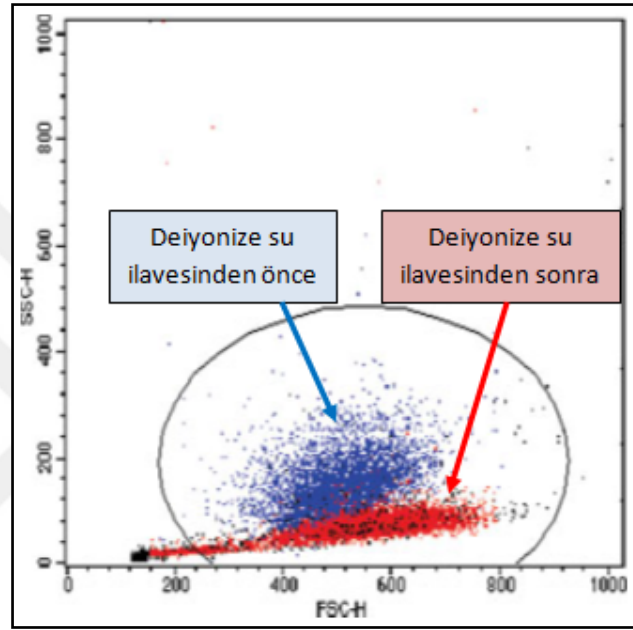
Eozin-5-Maleimid bağlanma testinin sayılan bu olumlu yönlerinin yanında bir takım olumsuz yönleri de vardır. Akan hücre ölçer cihazının rutin çalışma yapan her laboratuvarında olmayışı, saklama koşullarına bağlı olarak EMA boyasının floresan verme gücünün azalması ve test sonuçlarının rapor etme şeklinin standartlaştırılmaması testin olumsuz yönleridir. EMA bağlanma test sonuçları kimi laboratuvar tarafından floresan yoğunluğu (ortalama kanal floresansı (MCF) ya da ortalama floresan yoğunluğu (MFI)) şeklinde verilmektedir ki bu değerler kullanılan akan hücre ölçer cihazının modeline göre değişebilmektedir. Kimi laboratuvar ise hasta numunesindeki EMA bağlanmasını kontrol örneğindeki EMA bağlanması ile kıyaslayarak, sonuçları kontrole göre yüzde floresan azalışı şeklinde rapor etmektedir. Bu noktada hasta numunesi ile birlikte aynı şartlarda 5-6 kontrol numunesinin de çalışılması önerilmektedir. Bu olumsuzluklarının yanı sıra EMA bağlanma testinin sağlıklı yetişkinler ve çocuklar için evrensel referans aralıkları oluşturulmamıştır. EMA bağlanma testinin kullanımına ve referans değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir [8,73,82,83].

2.5. Flowsitometrik Ozmotik Frajlite Testi

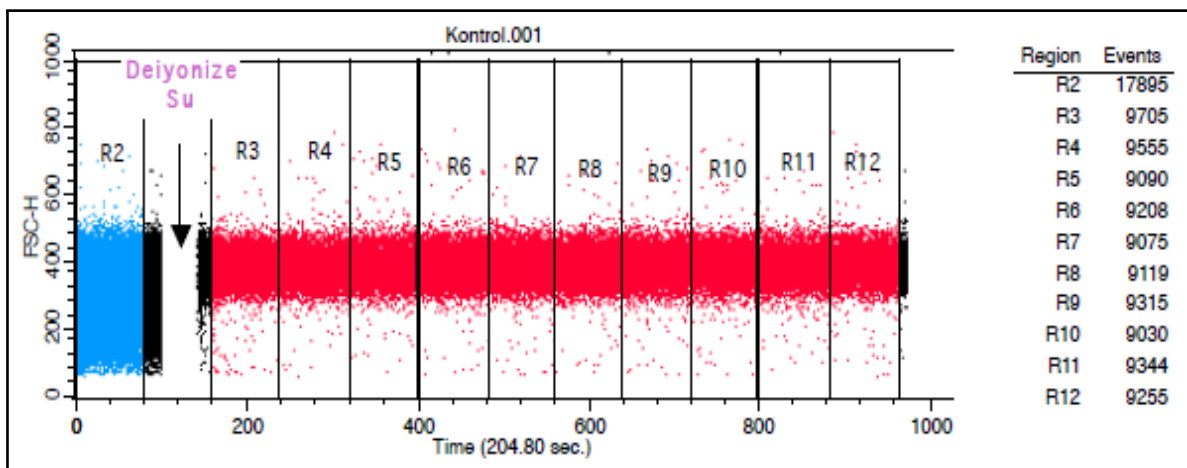
2009 yılında Won ve Suh tarafından HS taramasında kullanılabilecek yeni bir test önerilmiştir. Araştırmacılar eritrositlerin deiyonize su ile hemoliz edildikten sonra ortamda kalan sağlam eritrositlerin ki "artık eritrosit" olarak da ifade edilir, akan hücre ölçer ile sayılabileceğini, artık eritrosit sayısının da eritrositlerin dayanıklılığını ve ozmotik kırılma derecesini yansıtabileceğini ileri sürmüşlerdir [8,82,84].

Flowsitometrik ozmotik frajlite testinde (FC-OF) % 0,9'lük NaCl çözeltisi içerisindeki eritrositler akan hücre ölçerde belirli bir süre sayıldıktan sonra karışıma deiyonize su ilave

edilerek eritrositlerin hemoliz olması indüklenir. Eritrosit süspansiyonu üzerine deiyonize su ilave edildiği zaman eritrositler sıvıyı içeriye alıp şişmeye başlayacaklar ve bir süre sonrada parçalanarak hemoliz olacaklardır. Şekil 2.31.' de verilen FSC/SSC grafiği ile indüksiyon esnasındaki daha büyük ve yüzey alanı daha düz eritrositlerin oluşumu gösterilmiştir. İndüklenen karışımdaki artık eritrositler akan hücre ölçer ile belirli bir zaman dilimi içerisinde gerçek zamanlı olarak sayılır (Şekil 2.32.). Hemoliz öncesi ve hemoliz sonrası sayımı yapılan eritrositlerin oranı artık eritrosit yüzdesi olarak ifade edilir [8,82,84].



Şekil 2.31. Eritrositlerin Deiyonize Su İlavesi Öncesi ve Sonrası FSC/SSC Grafiği [84].



Şekil 2.32. Eritrositlerin Deiyonize Su İlavesi Öncesi ve Sonrası FSC/ ZAMAN Grafiği.

Won ve Suh çalışmalarında HS'li hastalar, demir eksikliği anemisi olan hastalar ve sağlıklı bireyleri karşılaştırmışlar ve HS'li hastaların artık eritrosit yüzdesi ile diğer iki grubun artık eritrosit yüzdeleri arasındaki farkın büyük olduğunu, dolayısıyla testin ayırım gücünün yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Testin ayırım gücü farklı araştırmalarla da desteklenmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda testin HS'yi taramada gösterdiği duyarlılık (% 93,9) ve hassasiyet (% 97,5) performansı da oldukça tatmin edicidir. Testin diğer bir önemli özelliği de splenektomiden etkilenmemesidir [82,84-86].

Flowsitometrik ozmotik frajilite testi inkübasyona gerek olmaması, analiz süresinin kısa oluşu (yaklaşık 5-6 dk.), objektif bir sonuç vermesi, uygulamasının kolay ve ucuz olması açısından gayet kullanışlı bir test olarak karşımıza çıkmaktadır. Testin bu olumlu yanlarının yanında olumsuz olarak sayılabilecek yönü ise akan hücre ölçer cihazının her laboratuvarında olmayışı ve numune bekleme süresidir. Won ve Suh analizi yapılacak numunenin mümkünse bekletilmeden çalışılması değilse 4 °C de en fazla 24 saat bekletilmesini tavsiye etmişlerdir [8,82,84,85].

Testin HS'nin yanında diğer eritrosit membran bozukluğu hastalıklarını ve hemoglobinopatileri tespit edip etmediği araştırılmaktadır. Ayrıca araştırmacılar ufak modifikasyonlar yaparak ayırım gücü, hassasiyet ve duyarlılık değerlerini arttırmaya çalışmaktadırlar. FC-OF testinin kullanımına ve referans değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir [82,84,85,87].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Grubu

2007-2016 yılları arasında Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi Çocuk Hematoloji ve Yetişkin Hematoloji Bilim Dalı polikliniklerine başvuran hastalar geriye dönük olarak taranmış, HS tanısı almış 60 hasta olduğu tespit edilmiştir. Yapılan istatistiki değerlendirme neticesinde popülasyonun uygun şekilde tahmin edilebilmesi için popülasyonun en az 0,40'una ulaşmanın yeterli olacağı dolayısıyla yapılacak çalışmaya minimum 24 hasta alınmasının yeterli olacağı değerlendirildi. Bu bilgiler ışığında çalışmada 30 hasta ile 30 kontrol çalışılması hedeflendi.

Geriye dönük olarak yapılan taramada belirlenmiş olan, HS tanısı almış hastalar ile Temmuz 2017-Ekim 2018 tarihleri arasında yeni tanı almış HS hastaları çalışmaya dahil edildi.

Hastaların; yaşları, 90 gün içerisinde kendilerine kan transfüzyonu yapıp yapılmadığı, gebe olup olmadıkları, çocuk emzirip emzirmedikleri, HS dışında kronik başka bir hastalıklarının olup olmadığı sorgulandı. Kan transfüzyonu yapılmış olanlar, gebe, emziren ve başka bir kronik hastalığı olanlar, 1 yaşından küçükler ile 68 yaşından büyük olanlar çalışmadan dışlandı. Ayrıca acil olgular çalışmaya dahil edilmedi.

Kontrol grubuna dahil edilen bireylerin Hb değerlerinin kendi cinsiyet ve yaş grubuna ait referans değerleri arasında olup olmadığına bakıldı. Hb değeri referans aralığı dışında olan bireyler çalışmadan dışlandı. Ayrıca bireylere yaş bilgileri, herhangi bir hastalıkları olup olmadığı, gebe ve emzirme döneminde olup olmadıkları soruldu. 1 yaşından küçükler ile 68 yaşından büyük olanlar, gebe ve emzirme döneminde olanlar ile hasta olanlar çalışmadan dışlandı. Ayrıca acil olgular çalışmaya dahil edilmedi.

Çalışmaya 5-51 yaş arası, HS tanısı almış 16 farklı aileden toplam 20 hasta ile herhangi bir hastalığı olmayan 5-47 yaş arası 30 sağlıklı birey dahil edildi.

Hasta ve kontrol grubunda yer alan tüm bireyler çalışma hakkında bilgilendirildi ve kendilerine bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalatıldı.

Bu çalışma, Helsinki Deklerasyonu özelliklerine göre yapılmış, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 13.04.2017 tarihli 2017/104 sayılı kurul kararı ile onaylanmıştır.

3.1.2. Örneklerin Alınması ve Saklanması

Bu çalışmada hasta ve kontrol grubundaki bireylerin venöz tam kanları kullanılmıştır. Kan, içerisinde etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) olan 5 mL'lik tüplere alınmış olup örnekler bekletilmeden çalışıldı.

3.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

Çalışmada kullanılan araç ve gereç bilgisi Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler

Adı	Marka	Model	Üretim Yeri
Akan Hücre Ölçer	Becton Dickinson	FACSCalibur	ABD
Spektrofotometre	Shimadzu	UV Mini 1240	Japonya
Kan Sayım Cihazı	Sysmex	XN-1000	Japonya
Vorteks	Heidolph	Reaxtop	Almanya
Santrifüj	Nüve	NF 800	Türkiye
Santrifüj	Sigma	Sartorius 1-15	Almanya
Su Banyosu	Elektro Mag	M48K	Türkiye
Derin Dondurucu (-80 °C)	Elcold	HCMix2036	Danimarka
Buzdolabı	Electrolux	ERD4697NF	İsveç
Hassas Terazı	Mettler Toledo	AB204-S	İsviçre
Otomatik Pipet (2-20 µl)	Eppendorf	Research	Almanya
Otomatik Pipet (20-200 µl)	Socorex	Aqura 825	İsveç
Otomatik Pipet (100-1000 µl)	Eppendorf	Research	Almanya
Otomatik Pipet (1000-5000 µl)	Eppendorf	Research	Almanya

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve solüsyonlar Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar

Adı	Marka	Üretim Yeri
Eozin-5-Maleimid (EMA)	Sigma-Aldrich	ABD
Bovine Serum Albumin (BSA)	Biomatik	Kanada
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck	Danimarka
Di sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	Merck	Almanya
Di sodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck	Almanya
PBS tampon (BD CellWash Solüsyonu)	Becton Dickinson	Polonya
Distile su	Medısın	Türkiye

3.1.5. Kullanılan Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan sarf malzemeler Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

Adı	Marka	Üretim Yeri
EDTA'lı kan toplama tüpü	Xinle	Çin
Polietilen tüp (5 mL)	Falcon	Meksika
Otomatik pipet ucu (1-200 μl)	AHN	Almanya
Otomatik pipet ucu (100-1000 μl)	İsolab	Almanya
Otomatik pipet ucu (5000 μl)	İsolab	Almanya
Eppendorf tüp (200 μl)	İsolab	Almanya
Eppendorf tüp (500 μl)	İsolab	Almanya

3.2. Yöntem

Araştırmamızda geleneksel olarak kullanılan OF testi, nispeten yeni olmakla birlikte kılavuzlarda kullanımı tavsiye edilen EMA bağlanma testi ve çok daha yeni bir yöntem olan FC-OF testinin HS'yi ayırt etme gücünü tespit etme, seçicilik ve duyarlıklarını hesaplama, karşılaştırma ve optimum kesme değerlerini (cut-off) belirleyebilmeyi amaçladık.

Geleneksel olarak kullanılan OF testinin, ayırım gücünün, hassasiyet ve duyarlılığının örneklerin 37 °C'de inkübe edildikten sonra çalışılması durumunda daha iyi olduğunu biliyorduk. Bu nedenle projemiz de EMA ve FC-OF testlerinin de 37 °C' de inkübasyon sonrası ayırt etme gücünü, hassasiyet ve duyarlıklarını araştırdık.

3.2.1. Ozmotik Frajlite Testi

Ozmotik frajlite testi Parpart ve arkadaşlarının açıkladığı yöntem baz alınarak yapılmıştır. Bu yöntemin prensibi, pH'ı 7,4 olarak ayarlanan tamponlu hipotonik NaCl solüsyonunun farklı konsantrasyonlarına bir miktar kan ilave edilmesinden sonra oluşan hemolizin kolorimetrik yöntemle ölçülüp hesaplanmasına dayanır.

3.2.1.1. Hipotonik NaCl Solüsyonunun Hazırlanması

Çalışmada kullanılmak üzere önce % 10'luk stok NaCl çözeltisi (tamponlu) hazırlandı. Analizlerin yapılacağı günlerde ise % 1'lik çalışma solüsyonları hazırlandı.

Stok çözeltinin (% 10'luk NaCl) hazırlanması:

NaCl'den 90 g, Na₂HPO₄'den 13.65 g ve Na₂HPO₄.2H₂O'den 2.34 g tartılarak bir miktar distile suda çözüldü. Daha sonra hacim 1 litreye tamamlandı. Stok NaCl çözeltisinin saklama koşulları oda ısısında 2-3 ay, 4 °C'de 1 yıldır.

Çalışma çözeltisinin (% 1'lik NaCl) hazırlanması:

Stok çözeltiden 10 mL alındı ve üzerine 90 mL distile su ilave edildi.

3.2.1.2. Farklı Konsantrasyonlardaki NaCl Solüsyonunun Hazırlanması

% 1'lik çalışma solüsyonu kullanılarak 16 farklı konsantrasyonda NaCl çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan tüplerin konsantrasyonu ile nasıl hazırlandığı Tablo 3.4.'de verilmiştir.

Tablo 3.4. Farklı Konsantrasyonlardaki NaCl Solüsyonunun Hazırlanması

Tüp No	% 1'lik NaCl (mL)	Distile Su (mL)	Konsantrasyon (% NaCl)
1	18	2	0,90
2	17	3	0,85
3	16	4	0,80
4	15	5	0,75
5	14	6	0,70
6	13	7	0,65
7	12	8	0,60
8	11	9	0,55
9	10	10	0,50
10	9	11	0,45
11	8	12	0,40
12	7	13	0,35
13	6	14	0,30
14	5	15	0,25
15	3	17	0,15
16	0	20	0

3.2.1.3. Ozmotik Frajlite Test Protokolü

Çalışmada hasta ve kontrol grubundaki bireylerden alınan EDTA'lı tam kan örnekleri kullanıldı. Örnek en geç 3 saat içerisinde çalışmaya alındı. Bu sürede örnek oda sıcaklığında bekletildi. Çalışma aşağıdaki işlem basamakları takip edilerek yapıldı;

1. 16 adet 5 mL'lik polietilen tüp alındı ve 1'den 16'ya kadar numaralandırıldı.
2. Hazırlanan tüplere 10 kez alt üst edilmek suretiyle karıştırılan EDTA'lı tam kandan 10 µl konuldu.
3. Üzerlerine Tablo 3.5'te belirtildiği şekilde hazırlanan NaCl çözeltilerinden 2 mL ilave edildi ve hafifçe vortekslendi.
4. Hazırlanan karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletildi.
5. Süre sonunda tüpler santrifüje alındı ve 5 dk., 1200 g'de santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası tüpler üzerinde kalan süpernatant spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okutuldu.
7. 1. Tüp (% 0,9 NaCl) kör olarak kullanıldı.

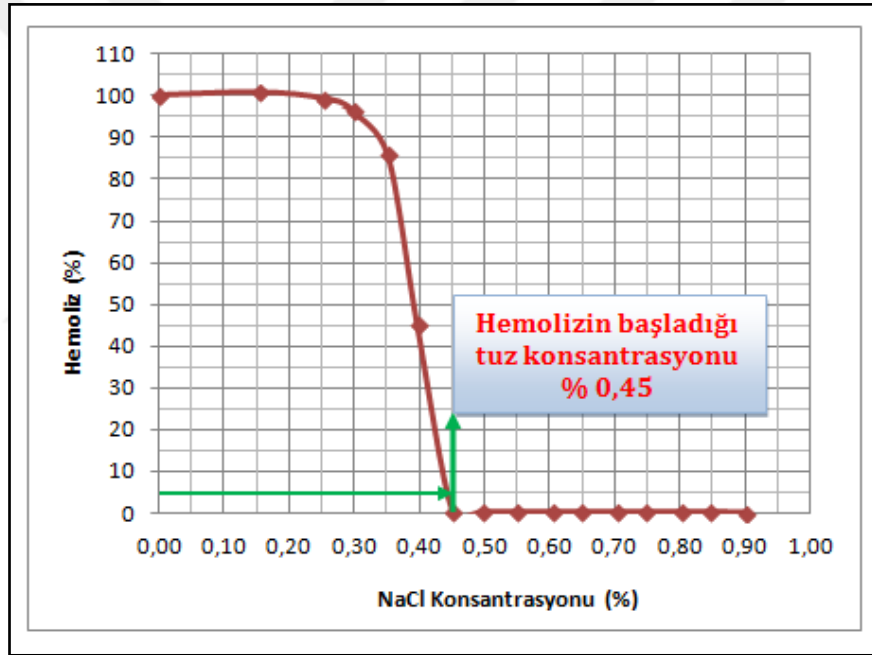
İnkübasyonlu OF testi için; kan 37 °C'de 20-24 saat su banyosunda bekletildikten sonra yukarıdaki işlem basamakları bekletilen kan içinde uygulandı.

3.2.1.4. Ozmotik Frajilite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Spektrofotometreden elde edilen absorbans değerleri kullanılarak her bir tüpteki hemoliz yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Hesaplama 16 numaralı tüpteki hemoliz oranının % 100, 1 numaralı tüpteki hemoliz oranının % 0 olduğu kabul edildi.

$$\text{X nolu tüpteki hemoliz yüzdesi} = \frac{\text{X nolu tüpün absorbansı} \times 100}{\text{16 nolu tüpün absorbansı}}$$

Elde edilen veriler kullanılarak aşağıda bir örneği olan (% NaCl-% Hemoliz) grafiği oluşturuldu. Hemolizin % 5 olduğu konsantrasyon hemoliz başlangıcı kabul edilerek grafik yardımıyla hemolizin başladığı tuz konsantrasyonu tespit edildi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Ozmotik frajilite eğrisi

3.2.2. Eozin-5-Maleimid Bağlanma Testi

Eozin-5-Maleimid bağlanma testi King ve arkadaşlarının açıkladığı yöntem baz alınarak yapılmıştır. Bu yöntemin prensibi, EMA'nın eritrosit membranında yer alan transmembran proteinlerine (band 3, CD47 ve Rh ile ilişkili glikoproteinler) bağlanması ve akan hücre ölçer ile floresans yoğunluğuna bakılmak suretiyle bağlanma miktarının tespit edilmesine dayanır.

3.2.2.1. Eozin-5-Maleimid Boyasının Hazırlanması

Çalışmamızda Sigma-Aldrich marka EMA boyası kullanıldı. Boya liyofilize halde temin edildi ve 2-8 °C'de saklandı.

Çalışma boyası olarak kullanılmak üzere liyofilize haldeki EMA, PBS ile konsantrasyonu 0,5 mg/mL olacak şekilde sulandırıldı. Ancak EMA boyasının saklama koşullarına bağlı olarak floresan verme gücünün azalması nedeniyle temin edilen boyanın tamamı sulandırılmadı. Her seferinde 1 mL'lik çalışma solüsyonları hazırlanarak küçük miktarlarda alıktlandı ve -80 °C'de saklandı. Bu çalışma boyası 3 aylık periyotlarda yeniden hazırlandı.

3.2.2.2. Eozin-5-Maleimid Bağlanma Test Protokolü

Çalışmada hasta ve kontrol grubundaki bireylerden alınan EDTA'lı tam kan örnekleri kullanıldı. Örnek en geç 3 saat içerisinde çalışmaya alındı. Bu sürede örnek oda sıcaklığında bekletildi. Çalışma aşağıdaki işlem basamakları takip edilerek yapıldı;

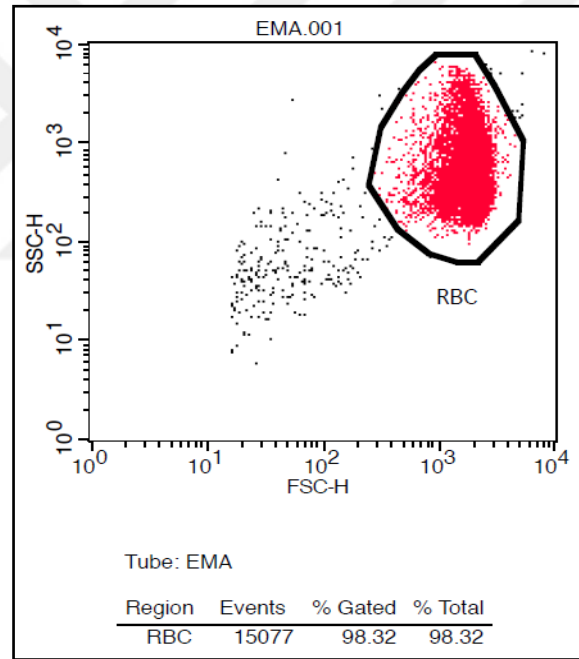
1. 10 kez alt üst edilmek suretiyle karıştırılan EDTA'lı tam kandan 100 µl alındı ve 5 mL'lik polietilen tüp içerisine konuldu.
2. Üzerine 2 mL PBS ilave edildi ve hafifçe karıştırıldı.
3. 300 g devirde 5 dk santrifüj edildi.
4. Üstte kalan süpernatant pipet yardımıyla alınıp atıldı.
5. 2-3 ve 4. adımlar tekrarlanmak suretiyle yıkama yinelenildi.
6. Kalan çökelti hafifçe karıştırıldıktan sonra içerisinden 5 µl alınıp kapaklı gode içerisine konuldu.
7. Üzerine 25 µl EMA (Daha önceden 0,5 mg/mL olacak şekilde hazırlanan çalışma boyası) ilave edilip hafifçe karıştırıldı ve 1 saat oda ısısında, karanlıkta bekletildi.
8. 12.000 rpm devirde 1 dk., santrifüj edildi.
9. Üstte kalan süpernatant pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
10. Çökelti üzerine 500 µl % 0,5'lik BSA/PBS karışımı ilave edildi. Hafifçe karıştırıldı.
11. 300 g devirde 5 dk., santrifüj edildi.
12. Üstte kalan süpernatant pipet yardımıyla alınıp atıldı.
13. 10-11 ve 12 nolu adımlar tekrarlanmak suretiyle yıkama yinelenildi.
14. Çökelti üzerine 500 µl % 0,5'lik BSA/PBS karışımı ilave edildi. Hafifçe karıştırıldı.
15. Bu RBC süspansiyonundan 100 µl alındı ve 5 mL'lik polietilen tüp içerisine konuldu. Üzerine 1,4 mL % 0,5'lik BSA/PBS karışımı ilave edildi. Hafifçe karıştırıldı.
16. Elde edilen son RBC süspansiyonu akan hücre ölçer ile analiz edildi.

İnkübasyonlu EMA bağlanma testi için; kan 37 °C'de 20-24 saat su banyosunda bekletildikten sonra yukarıdaki işlem basamakları bekletilen kan içinde uygulandı.

3.2.2.3. Eozin-5-Maleimid Bağlanmasının Akan Hücre Ölçer ile Tespiti

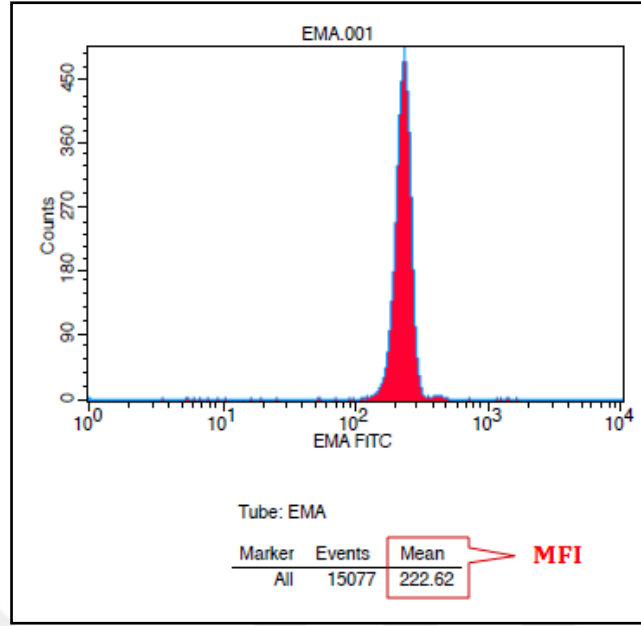
Hasta ve kontrollerden elde edilen son RBC süspansiyonları, FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) cihazı ve CellQuest Pro programı kullanılarak analiz edildi. Cihazın voltaj ve kompenzasyon ayarları, cihaz üreticisi tarafından temin edilen standardize edilmiş boncuklar (Calibrate3) kullanılarak yapıldı. FSC, SSC ve FL1 detektörleri logaritmik olarak ayarlandı.

Eozin-5-Maleimid bağlanma düzeylerinin belirlenmesinde önce FSC/SSC grafiği alındı. Yüksek FSC ve SSC'ye sahip RBC'ler kapılandı ve kapılanan bölge içerisinde 15.000 RBC olana kadar sayım yapıldı (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. RBC Süspansiyonuna Ait FSC/SSC Grafiği.

Kapılanan bu bölgedeki RBC popülasyonunun, 494-520 nm dalga boyunda (FL1 kanalı) floresan veren EMA'yı ne kadar bağladığını tespit edebilmek için FL1 histogramı oluşturuldu ve FL1 kanalındaki MFI bakıldı (Şekil 3.3.). MFI değeri EMA bağlanmasını göstermektedir.



Şekil 3.3. EMA Histogramı.

3.2.3. Flow Sitometrik Ozmotik Frajlite Testi

Flow sitometrik ozmotik frajlite testi Won ve Suh tarafından açıklanan yöntem baz alınarak yapılmıştır. Yöntem eritrositlerin su ile hemoliz edildikten sonra ortamda kalan artık eritrositlerin akan hücre ölçer ile sayılmasına dayanır. Artık eritrosit sayısı eritrositlerin dayanıklılığını ve ozmotik kırılabilirliğin derecesini yansıtır.

3.2.3.1. Eritrosit Süspansiyonunun Hazırlanması

Won ve Suh her bir çalışma için analiz edilen eritrosit miktarının standart olması gerektiğini savunmuş ve RBC süspansiyonundaki eritrosit sayısını sabitleyebilmek için de başlangıçta kullanılan kan miktarının ayarlanması gerektiğini belirtmişlerdir. Biz de çalışmamızda onların izlediği yöntemi kullanarak eritrosit sayısı sabit olan RBC süspansiyonları hazırladık. Bu işlem için;

1. Çalışmada hasta ve kontrol grubundaki bireylerden alınan EDTA'lı tam kan örnekleri kullanıldı. Örnek en geç 3 saat içerisinde çalışmaya alındı. Bu sürede örnek oda sıcaklığında bekletildi.
2. 10 kez alt üst edilmek suretiyle karıştırılan EDTA'lı tam kan örneği, kan sayım cihazında okutularak numunedeki eritrosit sayısı tespit edildi.
3. Eritrosit sayısı aşağıdaki formülde yerine konularak kullanılması gereken kan hacmi hesaplandı.

$$\text{Kullanılması Gereken Kan Hacmi } (\mu\text{l}) = \frac{130}{\text{Eritrosit sayısı } \left(\frac{10^6}{\mu\text{l}}\right)}$$

Hazırlanacak süspansiyonun bekletilmeden analiz edilmesi gerektiğinden sonraki aşamaya geçmeden önce akan hücre ölçer analize hazır hale getirildi.

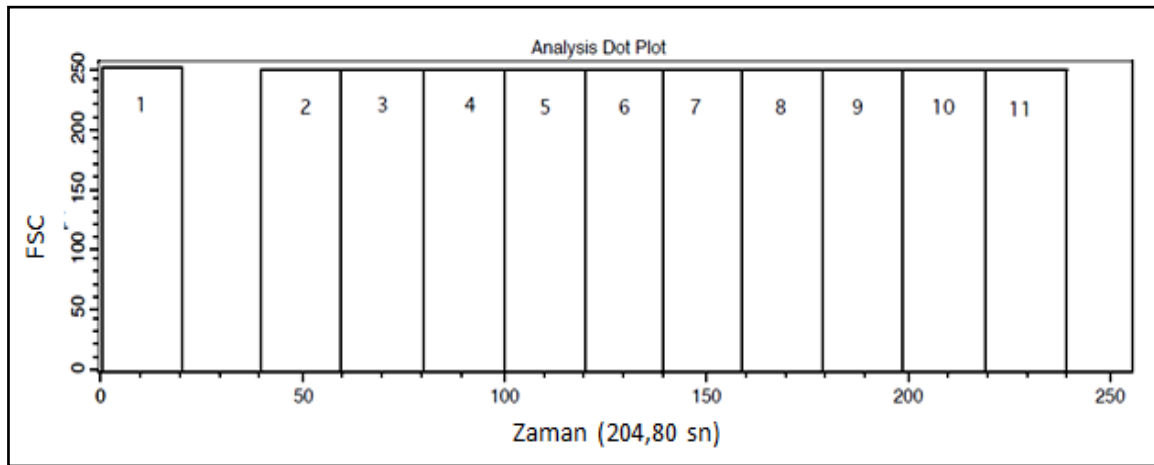
4. Hesaplanan kan hacmi gode içerisine alındı ve üzerine 1 mL PBS ilave edildi. Hafifçe karıştırıldı.
5. Hazırlanan bu süspansiyondan alınan 10 μl numune, içerisinde 1,1 mL PBS olan 5 mL'lik polietilen tüp içerisine konuldu. Hafifçe karıştırıldı.
6. Elde edilen son RBC süspansiyonu akan hücre ölçer ile hemen analiz edildi.

Kan 37 °C'de 20-24 saat su banyosunda bekletildikten sonra yukarıdaki işlem basamakları bekletilen kan içinde uygulandı.

3.2.3.2. Ozmotik Frajlitenin Akan Hücre Ölçer ile Tespiti

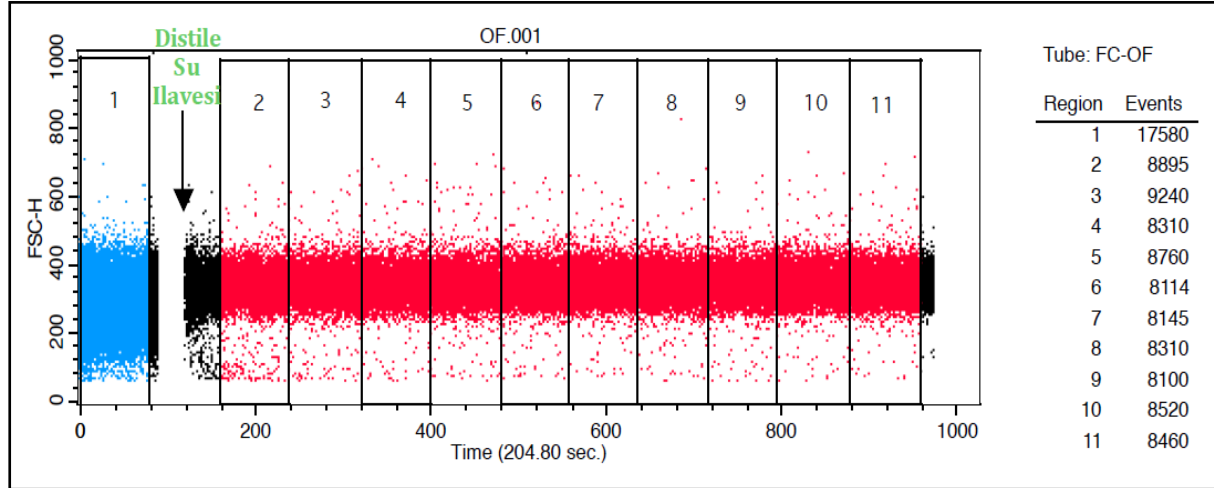
Hasta ve kontrol grubundan elde edilen son RBC süspansiyonları, FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) cihazı ve CellQuest Pro programı kullanılarak analiz edildi. Cihazın voltaj ve kompenzasyon ayarları, cihaz üreticisi tarafından temin edilen standardize edilmiş boncuklar (Calibrate3) kullanılarak yapıldı. FSC ve SSC detektörleri lineer olarak ayarlandı.

Zaman x ekseninde olacak şekilde, FSC/zaman (204,80 sn) grafiği oluşturuldu. 11 adet kapı almak suretiyle grafik her biri yaklaşık 15 saniye süren 11 bölgeye ayrıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. FSC/Zaman Grafiği.

İyice karıştırılmış son RBC süspansiyonu cihazın enjeksiyon bölümüne yerleştirildi. Analiz sırasında ilk bölge geçtikten sonra analiz bitirilmeden tüp çıkarıldı ve ozmotik hemolizi indüklemek için 0,9 mL distile su tüpe ilave edildi. İyice karıştırılan tüp daha sonra enjeksiyon bölümüne yeniden yerleştirildi ve ölçüm on birinci bölgeye kadar sürdürüldü. Bir tüpün ölçüm süresi yaklaşık 3 dakikadır.



Şekil 3.5. FSC/Zaman Grafiğinde Distile Su Öncesi ve Sonrası.

Şekil 3.5.'de verilen FSC/Zaman grafiğinde distile su karıştırılmasından önceki ve sonraki her bir bölge için olay sayısı, artık eritrositlerin sayısını yansıtan bir parametre olarak seçildi. Ozmotik hemoliz derecesini belirlemek üzere aşağıdaki formülden faydalanılarak artık eritrositlerin yüzdesi hesaplandı. Birinci bölgedeki olay sayısı seyreltmenin etkisini gidermek üzere seyreltme faktörü ile çarpıldı.

$$\text{Artık Eritrosit Yüzdesi} = \frac{7 \text{ ve } 8. \text{ bölgedeki olay sayısının ortalaması}}{1. \text{ bölgedeki olay sayısı} \times \left(\frac{1,1}{2}\right)} \times 100$$

3.2.4. İstatistiksel Yöntemler

Klasik ozmotik frajilite (K-OF), EMA bağlanma testi ve FC-OF parametrelerinin, HS hastası olanlar ve hasta olmayanlar; üzerindeki ayırma gücüne Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve analizi ile bakıldı. Verilerin analizi MedCalc paket programının demo sürümü kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

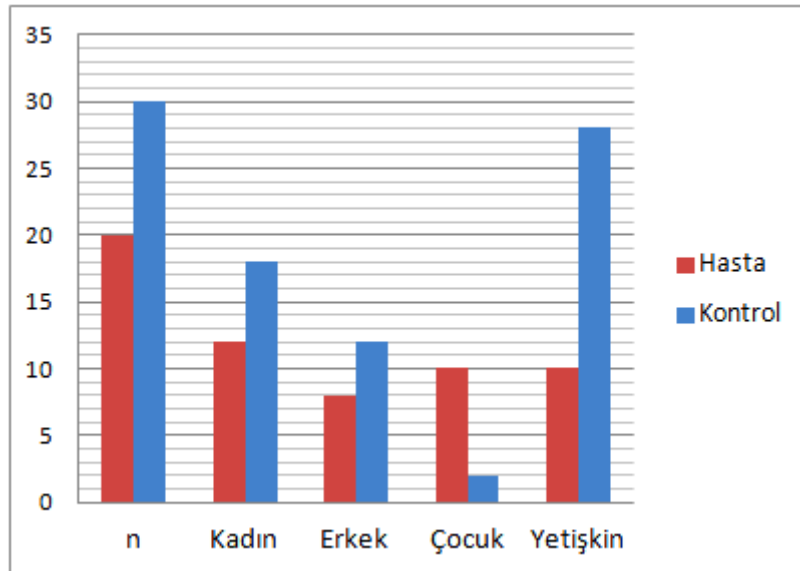
4.1. Bulgular

4.1.1. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Demografik Bulgular

Bu çalışmaya Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi Çocuk Hematoloji ve Yetişkin Hematoloji Bilim Dalı polikliniklerine başvuran 5-51 yaş arası, HS tanısı almış 16 farklı aileden toplam 20 hasta ile herhangi bir hastalığı olmayan 5-47 yaş arası 30 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Hasta ve kontrol grubuna ait demografik bulgular Şekil 4.1. ve Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Demografik Bulgular

Grup	n	Kadın	Erkek	Çocuk	Yetişkin
Hasta	20 (% 40)	12 (% 60)	8 (% 40)	10 (% 50)	10 (% 50)
Kontrol	30 (% 60)	18 (% 60)	12 (% 40)	2 (% 7)	28 (% 93)



Şekil 4.1. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Demografik Bulgular

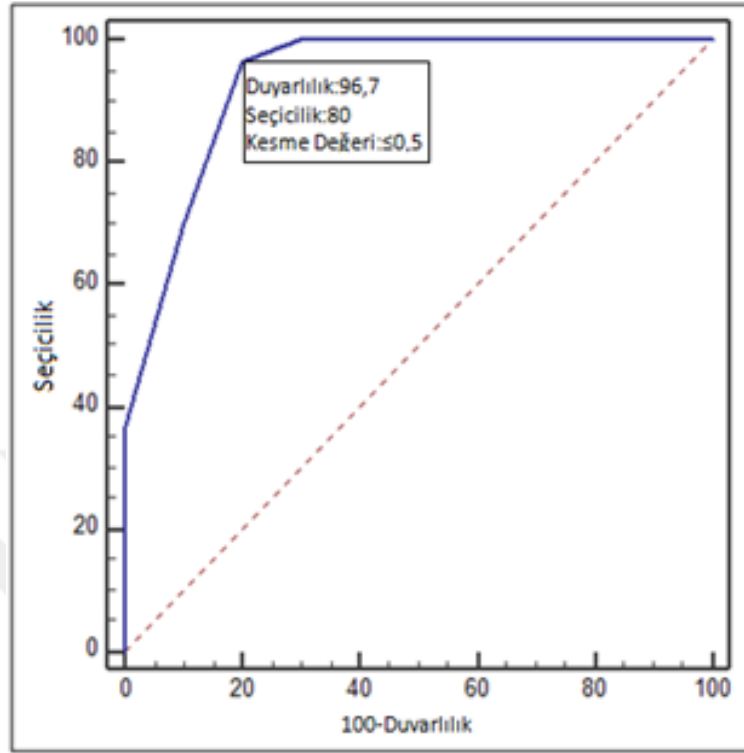
4.1.2. Taze Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajlite Testine Ait Bulgular

Taze örnekten yapılan K-OF testine ait sonuçlar Tablo.4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Taze Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajlite Testine Ait Sonuçlar

K-OF (TAZE)		
NO	Hasta (% NaCl)	Kontrol (% NaCl)
1	0,80	0,45
2	0,55	0,40
3	0,55	0,45
4	0,70	0,50
5	0,70	0,50
6	0,70	0,45
7	0,60	0,50
8	0,75	0,50
9	0,80	0,45
10	0,80	0,55
11	0,60	0,50
12	0,60	0,45
13	0,80	0,45
14	0,80	0,45
15	0,75	0,50
16	0,70	0,50
17	0,45	0,50
18	0,50	0,45
19	0,50	0,45
20	0,45	0,40
21	**	0,40
22	**	0,40
23	**	0,40
24	**	0,35
25	**	0,40
26	**	0,40
27	**	0,45
28	**	0,40
29	**	0,40
30	**	0,40
Ort	0,7	0,4

Taze örnekten yapılan K-OF testine ait istatistiki bulgular Şekil 4.2. ve Tablo.4.3.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Taze Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajilite Testine Ait ROC Grafiği

Tablo 4.3. Taze Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajilite Testine Ait İstatistiki Bulgular

Parametre	cut-off (Eşik Değeri)	AUC [% 95 CI]	p	Duyarlılık [% 95 CI]	Seçicilik [% 95 CI]
K-OF (Taze)	≤0,5	0,935 [0,828-0,985]	<0,0001	96,67 [82,8 – 99,9]	80,0 [56,3 – 94,3]

Klasik ozmotik frajilite test (Taze) parametresinin HS olan ve olmayanlar üzerindeki ayırma gücüne ROC analizi ile bakıldı. Parametrenin sınıflamadaki başarısı istatistiki açıdan anlamlı bulundu. ($p < 0,0001$). Eğri altında kalan alan $AUC = 0,935$ [0,828-0,985]. Kesim değeri olarak $\leq 0,5$ anlamlı bulundu. Bu modele göre K-OF parametresinin değeri 0,5 ve üzerindeki bireyler HS olarak sınıflanmıştır.

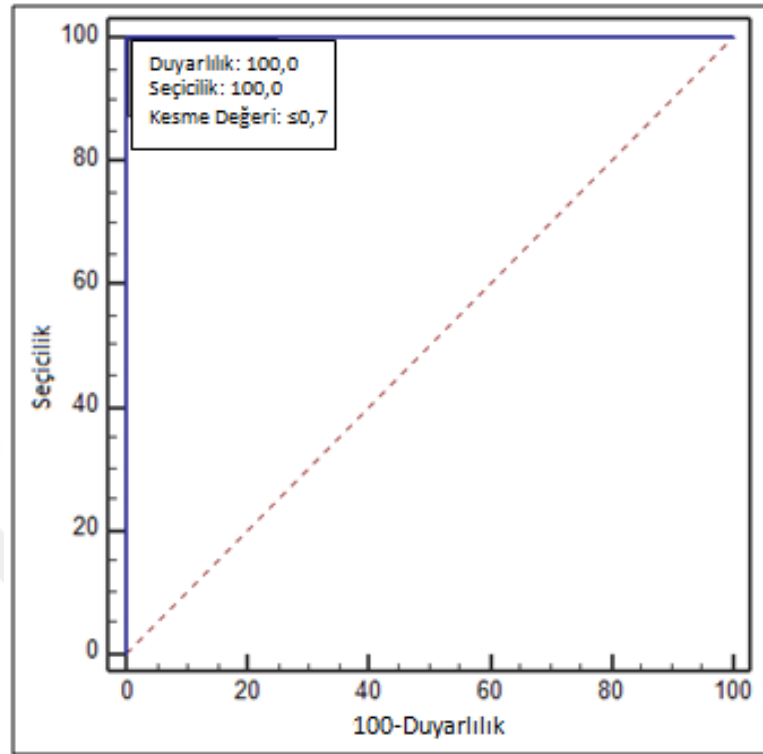
4.1.3. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajilite Testine Ait Bulgular

İnkübe edilmiş örnekten yapılan K-OF testine ait sonuçlar Tablo.4.4.'de verilmiştir.

Tablo 4.4. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajilite Testine Ait Sonuçlar

K-OF (İNKÜBASYONLU)		
NO	Hasta (% NaCl)	Kontrol (% NaCl)
1	0,85	0,70
2	0,85	0,60
3	0,85	0,60
4	0,85	0,70
5	0,85	0,65
6	0,85	0,55
7	0,85	0,55
8	0,85	0,70
9	0,85	0,65
10	0,85	0,70
11	0,85	0,65
12	0,85	0,60
13	0,85	0,60
14	0,85	0,65
15	0,85	0,65
16	0,85	0,70
17	0,85	0,70
18	0,85	0,65
19	0,88	0,65
20	0,85	0,65
21	**	0,55
22	**	0,70
23	**	0,60
24	**	0,65
25	**	0,65
26	**	0,60
27	**	0,60
28	**	0,65
29	**	0,65
30	**	0,60
Ort	0,85	0,64

İnkübe edilmiş örnekten yapılan K-OF testine ait istatistiki bulgular Şekil 4.3. ve Tablo.4.5.'te verilmiştir.



Şekil 4.3. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajlite Testine Ait ROC Grafiği

Tablo 4.5. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan Klasik Ozmotik Frajlite Testine Ait İstatistiki Bulgular

Parametre	cut-off (Eşik Değeri)	AUC [% 95 CI]	p	Duyarlılık [% 95 CI]	Seçicilik [% 95 CI]
K-OF (İnkübasyonlu)	≤0,7	1,000 [0,929-1,00]	<0,0001	100,0 [88,4 – 100,0]	100,0 [83,2 – 100,0]

Klasik Ozmotik Frajlite Test (İnkübasyonlu) parametresinin HS olan ve olmayanlar; üzerindeki ayırma gücüne ROC analizi ile bakıldı. Parametrenin sınıflamadaki başarısı istatistik açıdan anlamlı bulundu. ($p < 0,0001$). Eğri altında kalan alan $AUC = 1,000 [0,929-1,00]$. Kesim değeri olarak $\leq 0,7$ anlamlı bulundu. Bu modele göre K-OF (İnkübasyonlu) parametresinin değeri 0,7 ve üzerindeki bireyler HS olarak sınıflanmıştır.

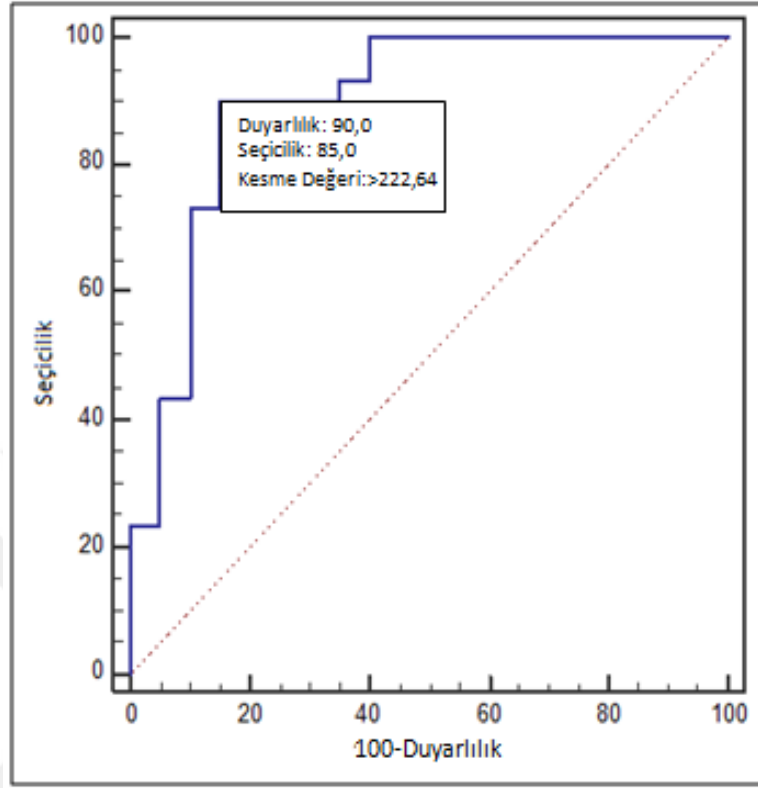
4.1.4. Taze Örnekten Yapılan Eozin-5-Maleimid Bağlanma Testine Ait Bulgular

Taze örnekten yapılan EMA bağlanma testine ait sonuçlar Tablo 4.6.'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Taze Örnekten Yapılan EMA Bağlanma Testine Ait Sonuçlar

EMA (TAZE)		
NO	Hasta (MFI)	Kontrol (MFI)
1	180,0	225,0
2	174,9	414,0
3	266,5	420,0
4	210,0	473,4
5	203,5	242,1
6	186,3	487,0
7	213,2	460,6
8	304,7	261,4
9	235,7	269,3
10	140,7	298,5
11	222,6	392,0
12	155,5	274,2
13	138,3	247,0
14	150,4	245,6
15	162,8	231,0
16	180,0	236,9
17	218,4	207,0
18	218,3	237,9
19	173,4	327,6
20	171,9	244,0
21	**	211,9
22	**	204,2
23	**	285,0
24	**	223,4
25	**	226,6
26	**	222,7
27	**	239,8
28	**	241,0
29	**	270,6
30	**	279,4
Ort	195,4	286,6

Taze örnekten yapılan EMA bağlanma testine ait istatistiki bulgular Şekil 4.4. ve Tablo.4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Taze Örnekten yapılan EMA Bağlanma Testine Ait ROC Grafiği

Tablo 4.7. Taze Örnekten Yapılan EMA Bağlanma Testine Ait İstatistiki Bulgular

Parametre	cut-off (Eşik Değeri)	AUC [% 95 CI]	p	Duyarlılık [% 95 CI]	Seçicilik [% 95 CI]
EMA (Taze)	>222,64	0,897 [0,778-0,965]	<0,0001	90,0 [73,5- 97,9]	85,0 [62,1 - 96,8]

EMA (Taze) parametresinin HS olan ve olmayanlar üzerindeki ayırma gücüne ROC analizi ile bakıldı. Parametrenin sınıflamadaki başarısı istatistiki açıdan anlamlı bulundu ($p < 0,0001$). Eğri altında kalan alan $AUC = 0,897$ [0,778-0,965]. Kesim değeri olarak >222,64 anlamlı bulundu. Bu modele göre EMA parametresinin değeri 222,64 ve altındaki bireyler HS olarak sınıflanmıştır.

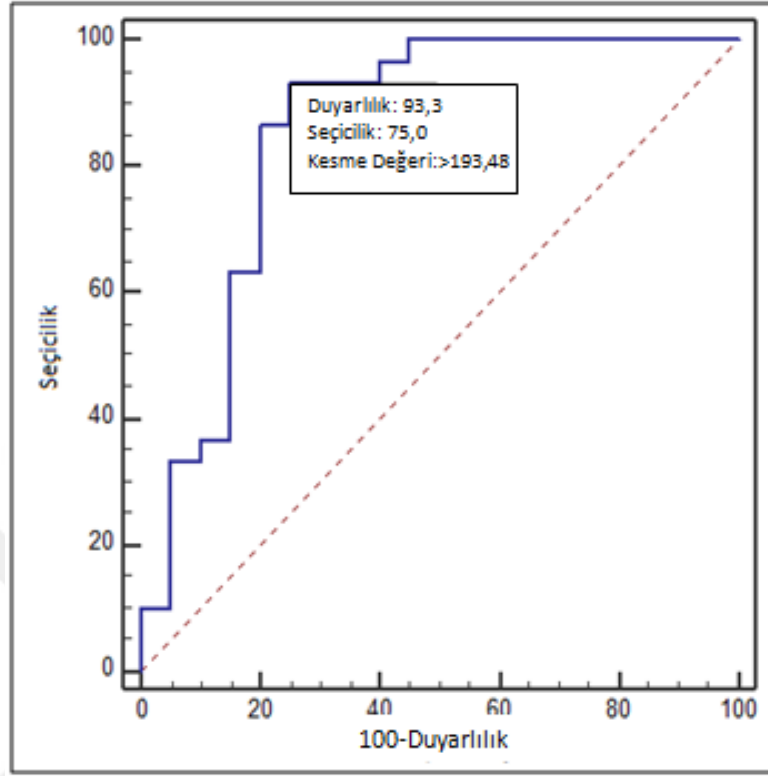
4.1.5. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan Eozin-5-Maleimid Bağlanma Testine Ait Bulgular

İnkübe edilmiş örnekten yapılan EMA bağlanma testine ait sonuçlar Tablo.4.8.'de verilmiştir.

Tablo 4.8. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan EMA Bağlanma Testine Ait Sonuçlar

EMA (İNKÜBASYONLU)		
NO	Hasta (MFI)	Kontrol (MFI)
1	170,0	227,0
2	193,5	432,7
3	180,8	427,3
4	169,9	376,4
5	300,2	206,6
6	148,6	289,5
7	175,6	277,1
8	266,1	262,8
9	231,4	284,2
10	186,3	244,6
11	155,5	254,2
12	172,5	237,8
13	206,5	195,2
14	256,9	181,9
15	167,9	232,5
16	130,8	242,8
17	148,6	256,5
18	159,2	287,1
19	138,8	277,2
20	190,6	178,1
21	**	275,2
22	**	268,8
23	**	221,3
24	**	209,3
25	**	221,8
26	**	216,7
27	**	206,2
28	**	215,1
29	**	235,8
30	**	255,1
Ort	187,5	256,6

İnkübe edilmiş örnekten yapılan EMA bağlanma testine ait istatistiki bulgular Şekil 4.5. ve Tablo.4.9.'da verilmiştir.



Şekil 4.5. İnkübe Edilmiş Örnekten yapılan EMA Bağlanma Testine Ait ROC Grafiği

Tablo 4.9. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan EMA Bağlanma Testine Ait İstatistiki Bulgular

Parametre	cut-off (Eşik Değeri)	AUC [% 95 CI]	p	Duyarlılık [% 95 CI]	Seçicilik [% 95 CI]
EMA (İnkübasyonlu)	>193,48	0,853 [0,725-0,937]	<0,0001	93,33 [77,9– 99,2]	75,0 [50,9 – 91,3]

EMA (İnkübasyonlu) parametresinin HS olan ve olmayanlar üzerindeki ayırma gücüne ROC analizi ile bakıldı. Parametrenin sınıflamadaki başarısı istatistiki açıdan anlamlı bulundu. ($p < 0,0001$). Eğri altında kalan alan $AUC = 0,853 [0,725-0,937]$. Kesim değeri olarak $>193,48$ anlamlı bulundu. Bu modele göre EMA parametresinin değeri 193,48 ve altındaki bireyler HS olarak sınıflanmıştır.

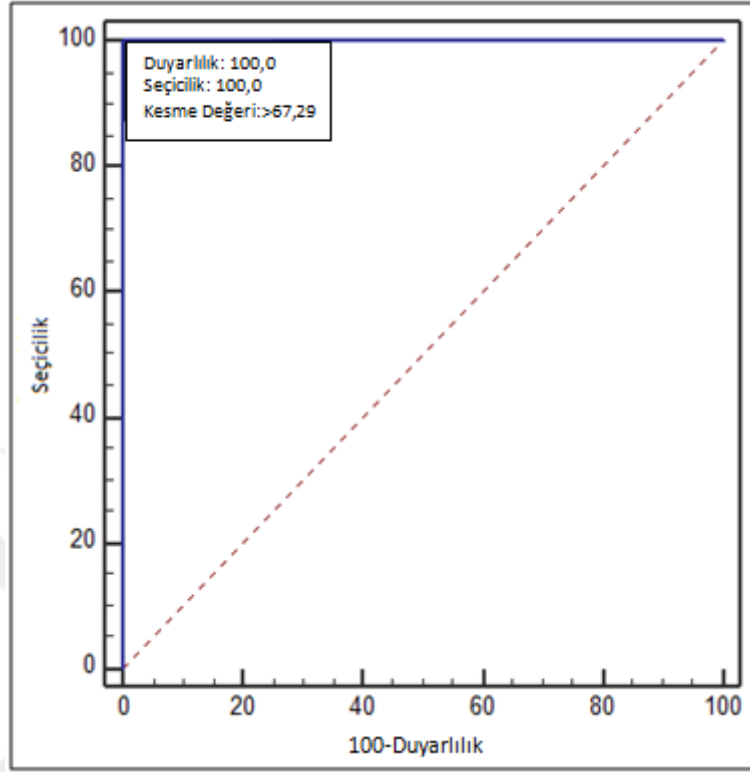
4.1.6. Taze Örnekten Yapılan Flow Sitometrik Ozmotik Frajlite Testine Ait Bulgular

Taze örnekten yapılan FC-OF testine ait sonuçlar Tablo.4.10.'da verilmiştir.

Tablo 4.10. Taze Örnekten Yapılan FC-OF Testine Ait Sonuçlar

FC-OF (TAZE)		
NO	Hasta (%)	Kontrol (%)
1	23,00	99,76
2	55,95	97,55
3	29,12	93,98
4	23,11	85,22
5	17,37	93,28
6	30,72	91,16
7	23,33	92,19
8	26,01	98,52
9	47,52	96,05
10	22,10	87,63
11	37,33	91,23
12	33,59	91,92
13	67,29	89,69
14	19,00	91,60
15	16,46	90,08
16	18,52	92,55
17	53,22	97,42
18	8,54	93,65
19	2,32	94,71
20	32,70	88,34
21	**	94,19
22	**	91,40
23	**	91,5
24	**	99,39
25	**	84,99
26	**	85,01
27	**	80,40
28	**	98,14
29	**	87,82
30	**	97,05
Ort	29,36	92,21

Taze örnekten yapılan FC-OF testine ait istatistiki bulgular Şekil 4.6. ve Tablo.4.11.'de verilmiştir.



Şekil 4.6. Taze Örnekten Yapılan FC-OF Testine Ait ROC Grafiği

Tablo 4.11. Taze Örnekten Yapılan FC-OF Testine Ait İstatistiki Bulgular

Parametre	cut-off (Eşik Değeri)	AUC [% 95 CI]	p	Duyarlılık [% 95 CI]	Seçicilik [% 95 CI]
FC-OF (Taze)	>67,29	1,000 [0,929-1,000]	<0,0001	100,0 [88,4- 100,0]	100,0 [83,2 - 100,0]

Flow sitometrik ozmotik fragilite (Taze) parametresinin HS olan ve olmayanlar üzerindeki ayırma gücüne ROC analizi ile bakıldı. Parametrenin sınıflamadaki başarısı istatistiki açıdan anlamlı bulundu. ($p < 0,0001$). Eğri altında kalan alan $AUC=1,00$ [0,929-1,000]. Kesim değeri olarak >67,29 anlamlı bulundu. Bu modele göre FC-OF parametresinin değeri 67,29'un altındaki bireyler HS olarak sınıflanmıştır.

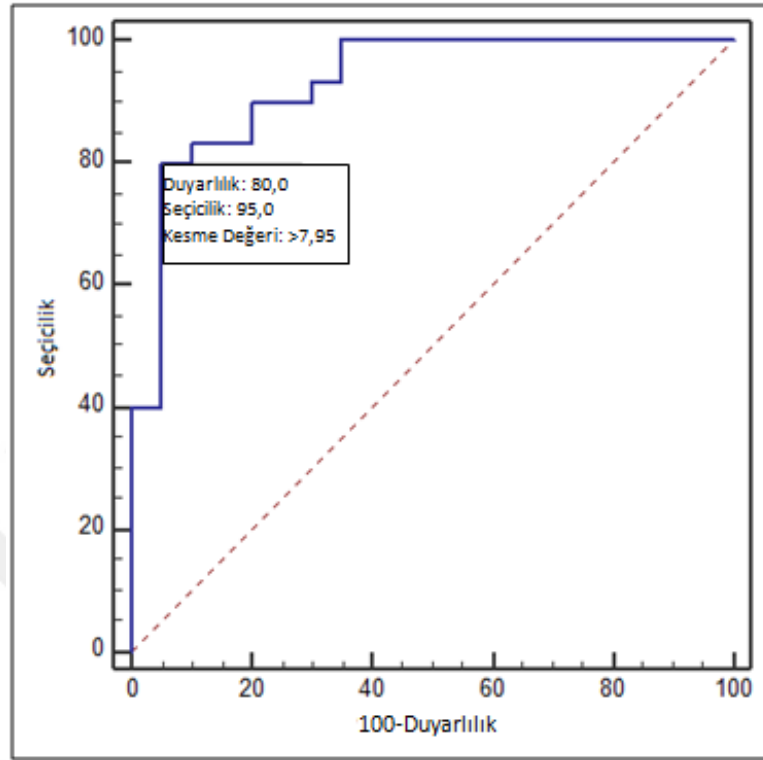
4.1.7. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan Flow Sitometrik Ozmotik Frajilite Testine Ait Bulgular

İnkübe edilmiş örnekten yapılan FC-OF testine ait sonuçlar Tablo.4.12.'de verilmiştir.

Tablo 4.12. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan FC-OF Testine Ait Sonuçlar

FC-OF (İNKÜBASYONLU)		
NO	Hasta (%)	Kontrol (%)
1	2,17	8,37
2	5,16	16,24
3	3,24	23,01
4	5,35	35,72
5	1,26	8,05
6	3,05	38,38
7	1,38	30,46
8	2,73	15,20
9	2,27	43,79
10	2,48	19,00
11	6,81	15,27
12	0,62	12,62
13	18,75	18,26
14	6,70	12,41
15	1,92	17,53
16	2,37	28,03
17	3,23	5,48
18	5,23	12,10
19	1,58	33,41
20	7,95	6,82
21	**	32,54
22	**	9,99
23	**	23,17
24	**	22,10
25	**	4,02
26	**	5,21
27	**	57,2
28	**	8,00
29	**	5,96
30	**	3,33
Ort	4,20	19,10

İnkübe edilmiş örnekten yapılan FC-OF testine ait istatistiki bulgular Şekil 4.7. ve Tablo.4.13.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. İnkübe Edilmiş Örnekten yapılan FC-OF Testine Ait ROC Grafiği

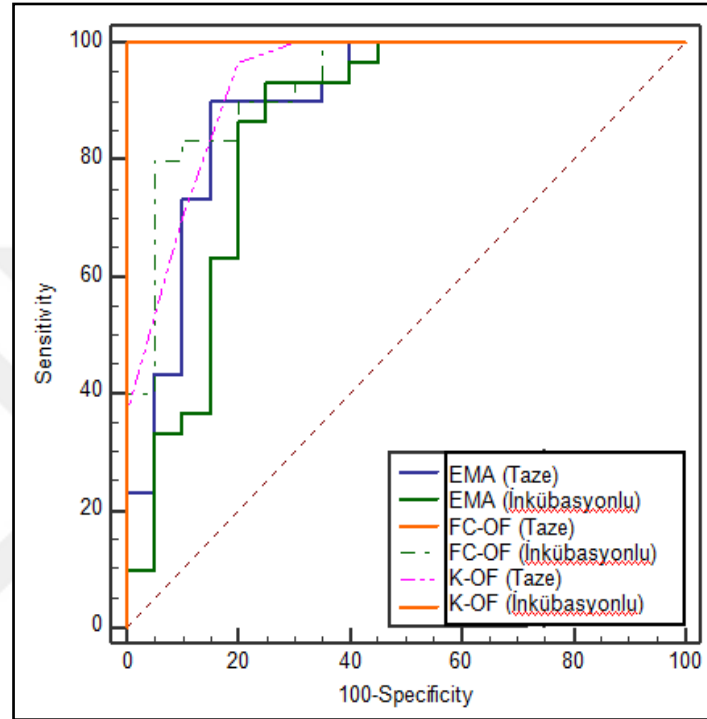
Tablo 4.13. İnkübe Edilmiş Örnekten Yapılan FC-OF Testine Ait İstatistiki Bulgular

Parametre	cut-off (Eşik Değeri)	AUC [% 95 CI]	p	Duyarlılık [% 95 CI]	Seçicilik [% 95 CI]
FC-OF (İnkübasyonlu)	>7,95	0,930 [0,821-0,983]	<0,0001	80 [61,4-92,3]	95 [75,1-99,9]

Flow sitometrik ozmotik fragilite (İnkübasyonlu) parametresinin HS olan ve olmayanlar üzerindeki ayırma gücüne ROC analizi ile bakıldı. Parametrenin sınıflamadaki başarısı istatistiki açıdan anlamlı bulundu. ($p < 0,0001$). Eğri altında kalan alan $AUC = 0,930$ [0,821-0,983]. Kesim değeri olarak $>7,95$ anlamlı bulundu. Bu modele göre FC-OF parametresinin değeri 7,95'in altındaki bireyler HS olarak sınıflanmıştır.

4.1.8. Taze ve İnkübasyonlu Örneklerle Yapılan Klasik Ozmotik Frajlite, Eozin-5-Maleimid Bağlanma ve Flow Sitometrik Ozmotik Frajlite Testlerinin Kıyaslanması

Taze ve İnkübe edilmiş örnekler ile yapılan K-OF, EMA ve FC-OF testlerinin HS olan ve olmayanlar üzerindeki ayırma gücü birbirleri ile kıyaslanmış olup parametrelere ait AUC ve p değerleri toplu olarak Şekil 4.8. ve Tablo 4.14.'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Tüm Parametrelere Ait ROC Grafiği

Tablo 4.14. Tüm Parametrelerin AUC (Area under the ROC curve) Değerleri

PARAMETRE	AUC [% 95 CI]
K-OF (Taze)	0,935 [0,828-0,985]
K-OF (İnkübasyonlu)	1,000 [0,929-1,000]
EMA (Taze)	0,897 [0,778-0,965]
EMA (İnkübasyonlu)	0,853 [0,725-0,937]
FC-OF (Taze)	1,000 [0,929-1,000]
FC-OF (İnkübasyonlu)	0,930 [0,821-0,983]

Her bir parametrenin birbirlerine olan üstünlükleri irdelenmiş olup, parametrelerin AUC farkları ve p değerleri Tablo 4.15.'de verilmiştir.

Tablo 4.15. Tüm Parametrelerin Birbirleri ile Karşılaştırılmasından Elde Edilen AUC Farkları ve p Değerleri

PARAMETRELER		AUC FARKLARI	p*
K-OF (Taze)	K-OF (İnkübasyonlu)	0,0650	0,0642
K-OF (Taze)	EMA (Taze)	0,0383	0,5517
K-OF (Taze)	EMA (İnkübasyonlu)	0,0817	0,2990
K-OF (Taze)	FC-OF (Taze)	0,0650	0,0642
K-OF (Taze)	FC-OF (İnkübasyonlu)	0,00500	0,9224
K-OF (İnkübasyonlu)	EMA (Taze)	0,103	0,0397
K-OF (İnkübasyonlu)	EMA (İnkübasyonlu)	0,147	0,0211
K-OF (İnkübasyonlu)	FC-OF (Taze)	0,000	1,0000
K-OF (İnkübasyonlu)	FC-OF (İnkübasyonlu)	0,0700	0,0576
EMA (Taze)	EMA (İnkübasyonlu)	0,0433	0,5309
EMA (Taze)	FC-OF (Taze)	0,103	0,0397
EMA (Taze)	FC-OF (İnkübasyonlu)	0,0333	0,6120
EMA (İnkübasyonlu)	FC-OF (Taze)	0,147	0,0211
EMA (İnkübasyonlu)	FC-OF (İnkübasyonlu)	0,0767	0,2896
FC-OF (Taze)	FC-OF (İnkübasyonlu)	0,0700	0,0576

* p: gruplar arası anlamlılık derecesi ($p < 0,05$ olmalı)

4.2. Tartışma

Herediter Sferositoz, eritrosit membran proteinlerinin kalıtsal hasarı nedeniyle, eritrositlerin normal yaşam süresinden önce hemoliz olması sonucu meydana gelen bir hemolitik anemi türüdür. Batı toplumlarında kronik hemolizin en sık görülen nedenidir ve prevalansı 1:5000'dir. Türkiye'de de sık görülmekle birlikte kesin sıklığı ve protein bozukluk tipleri hakkında veriler henüz yeterli değildir. Hastaların yaklaşık % 75'inde otozomal baskın geçiş, yaklaşık % 25'inde otozomal resesif geçiş ya da denovo mutasyonlar söz konusudur [1-7].

Klinik şiddet değişkendir. Bazı hastalarda herhangi bir klinik bulguya rastlanmazken bazı hastalarda ise hayati tehlike söz konusudur. Hastalığın şiddeti hafif, orta ve ağır olarak sınıflandırılmaktadır [1-7,9].

Hastalığın tanısı; aile öyküsü, klinik bulgular, periferik yaymada sferosit varlığı ve laboratuvar verilerine dayanılarak konulur [6,7,33].

Periferik yaymada, küre şeklini (sferosit) alan eritrositlerin tespiti hastalığı düşündürür. Fakat hafif HS vakalarında periferik yaymada sferositlerin tespit edilmesi güçtür hatta hastaların % 20-25'inde yayma normal de olabilmektedir. Ayrıca immün hemolitik anemi vakalarında da sferositler görülür [3,7,10]. Bu nedenle ayırıcı tanıda ekstra testlere gereksinim duyulur.

Rutinde bakılan en önemli laboratuvar testi OF testidir. OF testi eritrositlerin dayanıklılığını ölçen ve HS tanısında kullanılan en eski yöntemlerden biridir. Testin duyarlılığı ile ilgili farklı görüşler olsada genel olarak testin duyarlılığının düşük olduğu ve inkübe edilmiş örnek ile yapılan OF testinin taze örneğe göre daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir [35,37,88,89].

Geleneksel olarak kullanılan OF testinin yerine geçmek üzere farklı yöntemlerle çalışan birçok test geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden birisi de flow sitometri yöntemidir. Flow sitometri kullanılarak yapılan testler ise EMA bağlanma ve FC-OF testleridir.

Herediter Sferositozun tanımlanmasına yönelik son klavuzlar EMA bağlanma testinin bir tarama testi olarak kullanılmasını tavsiye etmektedir. Testin temeli floresan bir boya olan EMA'nın eritrosit membranında yer alan proteinlere bağlanmasına dayanır. EMA bağlanma testinin HS taramasında etkili bir yöntem olduğu rapor edilmiştir [47,48,73].

Won ve Suh flow sitometri yöntemi kullanılarak eritrositlerin dayanıklılığının ölçülebileceğini rapor etmişlerdir. Önerdikleri yöntem (FC-OF); deiyonize su ile hemoliz olması indüklenen eritrosit süspansiyonundaki hemoliz edilemeyen eritrositlerin (artık eritrosit), belirli bir zaman dilimi içerisinde, sayılması esasına dayanır. Won ve Suh önerdikleri testin HS hastalarını ayırt etme gücünün yüksek olduğunu tespit etmişlerdir [8,82,84].

Bu çalışmada HS'nin taramasında kullanılan geleneksel OF testi ile akan hücre ölçer ile yapılan OF ve EMA bağlanma testlerinin HS'yi tespit etme gücü taze ve inkübasyonlu örnekler kullanılarak araştırılmış, bu testlere ait eşik değerleri (cut-off) belirlenmiş ve parametrelerin sınıflamadaki başarıları birbirleri ile kıyaslanmıştır. Çalışmamızda;

Taze örnek ile yapılan K-OF'a ait cut-off değeri ($\leq 0,5$), sensitivitesi (% 96,67) ve spesifitesi (% 80,0) bulundu. İnkübasyonlu örnek ile yapılan K-OF'a ait cut-off değeri ($\leq 0,7$), spesifitesi (% 100) ve sensitivitesi (% 100) olarak bulundu. Taze ve inkübasyonlu örnek ile yapılan K-OF arasında istatistiksel anlamda bir farklılık görülmedi ($p=0,0642$).

Taze örnek ile yapılan EMA bağlanma testine ait cut-off değeri ($\geq 222,64$), spesifitesi (% 85) ve sensitivitesi (% 90) olarak bulundu. İnkübasyonlu örnek ile yapılan çalışmada eşik cut-off değeri ($\geq 193,48$), spesifite (% 75) ve sensitivite ise (% 93) olarak bulundu. İnkübasyonlu örnek ile yapılan EMA bağlanma testi ile taze örnekten yapılan EMA bağlanma testi arasında istatistiksel anlamda bir fark görülmedi ($p=0,5309$).

Taze örnek ile yapılan FC-OF testine ait cut-off değeri ($>67,29$), spesifitesi ve sensitivitesi (% 100) olarak bulundu. İnkübasyonlu örnek ile yapılan çalışmada ise cut-off değeri ($>7,95$), spesifite (% 95) ve sensitivite ise (% 80) olarak bulundu. İnkübasyonlu örnek ile yapılan FC-OF testi ile taze örnekten yapılan FC-OF testi arasında istatistiksel anlamda bir fark görülmedi ($p=0,0576$).

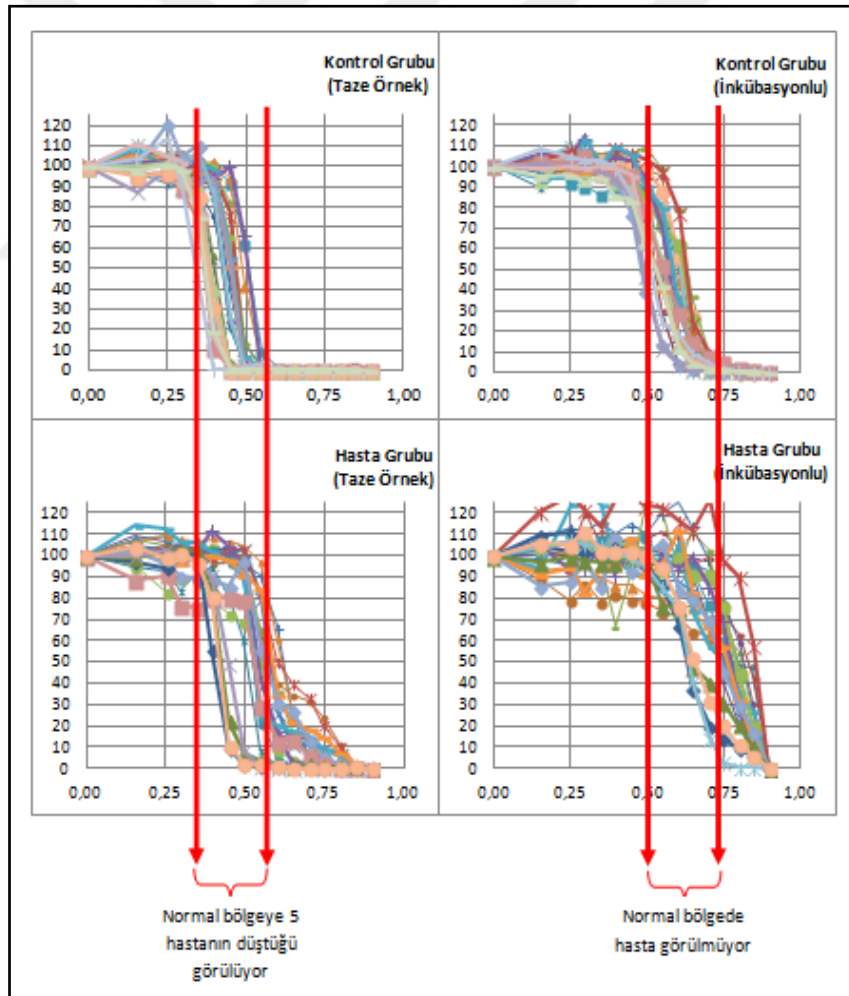
Parametrelerin sınıflamadaki başarılarını birbirleri ile kıyasladığımızda, Tablo 4.9'da da kırmızı ile işaretlendiği üzere K-OF (İnkübasyonlu)-EMA (Taze), K-OF (İnkübasyonlu)-EMA (İnkübasyonlu), EMA (Taze)-FC-OF (Taze) ve EMA (İnkübasyonlu)-FC-OF (Taze) parametreleri arasındaki farkın istatistiki açıdan anlamlı olduğu, diğer parametreler açısından istatistiki açıdan bir fark olmadığı görüldü.

Bianchi ve ark. [88], yaptıkları bir çalışmada, EMA bağlanma testi ile taze ve inkübasyonlu örnek ile yapılan K-OF testini karşılaştırmışlar ve EMA bağlanma testinin daha yüksek spesifiteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. EMA bağlanma testinin spesifitesinin % 98, sensitivitesinin % 93, taze örnek ile yapılan K-OF testinin spesifitesinin % 68, inkübe edilen örnek ile yapılan K-OF testinin spesifitesinin ise % 81 olduğunu rapor etmişlerdir.

Bizim yaptığımız çalışmada ise taze örnek ile yapılan EMA bağlanma testinin spesifitesi (% 85) ile K-OF testinin spesifitesinden (% 80) biraz daha yüksek çıkmış olsada istatistiksel olarak birbirinden farklı değildi ($p=0,5517$). Bizim çalışmamızda EMA bağlanma testinin spesifitesinin biraz daha düşük çıkmasının nedeni, farklı cihazlarla çalışılması ve raporlama şeklinin farklı olması olarak düşünüldü. Bianchi ve ark., çalışmalarında FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) cihazını kullanmışlar ve EMA bağlanmasındaki azalışın yüzdesini rapor etmişlerdir.

Stoya ve ark. [90], tarafından yapılan çalışmada EMA bağlanma testinin HS yi ayırt edip etmediği araştırılmış ve en uygun kesme değeri $MFI < 400$ belirlenmiştir. Testin sensitivitesi % 96,6, spesifitesi ise % 99,1 olarak tespit edilmiştir. MFI değerinin bizim çalışmamızdan ve Bianchi ve ark., çalışmasından farklı oluşu farklı bir cihaz kullanılmış olmasıyla açıklanabilir.

Çalışmamızda Bianchi ve ark. yaptığı çalışmada olduğu gibi inkübasyonlu örnek ile yapılan K-OF testinin spesifitesi (% 100) taze örnek ile yapılan K-OF testinin spesifitesinden (% 80) yüksek çıktı ancak bizim çalışmamızda bu parametreler istatistiksel olarak birbirinden farklı değildi ($p=0,0642$). Literatürde de inkübasyonlu K-OF testinin taze K-OF testine göre daha duyarlı olduğu rapor edilmektedir. Ancak bizim çalışmamızdaki inkübasyonlu K-OF testinin yüksek ayırım gücü ($AUC=1,000$) dikkat çekiciydi. Nispeten subjektif bir değerlendirme olsada hasta ve kontrol grubuna ait taze ve inkübasyonlu K-OF sonuçları (% NaCl-% Hemoliz) grafiğinde toplu olarak gösterildiğinde dahi inkübasyonlu testin daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait Hemoliz (%) – NaCl (%) Grafikleri

Kedar ve ark. [48], tarafından yapılan çalışmada, EMA bağlanma testinin eritrosit membran bozukluğu olan hastalardaki performansını araştırmışlar ve HS hastalarındaki MCF değerinin 202 ± 27 olduğunu, bu MCF azalışının da istatistiki açıdan anlamlı ($p < 0,001$) olduğunu rapor etmişlerdir. Bu bulgular bizim çalışmamız ile örtüşmektedir ki çalışmamızda EMA bağlanma testinin cut-off değerinin $>222,64$ olduğunu ve bu değer istatistiki açıdan anlamlı olduğunu ($p < 0,0001$) tespit ettik. Her iki çalışmada da aynı cihazın kullanılmış olması ve raporlama şeklinin aynı olması, benzer bulguların elde edilmesini sağladığını düşünüyoruz.

Park ve ark. [82], hem EMA bağlanma testi ($AUC=0,996$) hem de FC-OF testinin ($AUC=0,992$) HS olan ve olmayanları tatmin edici şekilde ayırt ettiklerini tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da hem EMA bağlanma testi ($AUC=0,897$) hem de FC-OF testi ($AUC=1,000$) HS olan ve olmayanları tatmin edici şekilde ayırt ediyordu, ancak bizim çalışmamızda EMA (Taze)-FC-OF (Taze) parametreleri arasındaki fark istatistiki açıdan anlamlı bulundu ($p=0,0397$).

Bennaoum ve ark. [91], tarafından yapılan çalışmada Bekman Epics XL cihazı kullanılarak FC-OF testinin HS taramasında kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmış ve testin sensitivitesinin % 100, spesifitesinin ise % 96 olduğu rapor edilmiştir.

Shim ve Won, yaptıkları araştırmada [86], HS hastalarına ait FC-OF ve K-OF test sonuçlarını geriye dönük olarak taradılar. Araştırmacılar FC-OF testinin cut-off değerinin % 61,9, sensitivitenin % 91,3, spesifitenin ise % 87,5 olduğunu tespit ettiler. Taze örnek ile yapılan K-OF testinin sensitivitesinin % 73,6, spesifitesinin % 86,7 olduğunu, inkübe edilmiş örnek ile yapılan K-OF testinin sensitivitesinin % 72,3, spesifitesinin ise % 81,8 olduğunu, inkübe edilen kanın kullanılmasının, K-OF testinin tanısal duyarlılığını geliştirmediğini rapor ettiler. Bizim araştırmamızda tespit ettiğimiz cut-off değeri (% 67,29) ile Shim ve Won'un tespit ettiği cut-off değeri benzerlik göstermektedir. Yine aynı şekilde bizim çalışmamızda da istatistiksel açıdan, inkübe edilen kanın kullanılmasının, K-OF testinin tanısal duyarlılığını geliştirmediğini tespit ettik.

Literatür taramalarımızda EMA bağlanma ve FC-OF testlerinin inkübasyonlu çalışıldığına rastlamadık. Ancak FC-OF testini ortaya atan Won ve Suh'un [84] test performansına yönelik denemelerinde, örneği anlık ve farklı sıcaklıklarda ($4-25-37$ °C) 24 saat beklettikten sonra çalışmışlar ve artık eritrosit yüzdesini sırasıyla % 66.1 ± 9.8 ($N=14$), % $61. \pm 12.0$ ($N=8$), % 31.3 ± 4.4 ($N=5$) ve % 6.2 ± 1.7 ($N=7$) olarak bulmuşlardır. 4, 25 ve 37 °C'de depolanan numuneler arasındaki farkın anlamlı olduğunu, anlık ve 4°C'de depolanmış numuneler arasındaki farkın anlamlı olmadığını rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da istatistiksel açıdan, inkübe edilen kanın kullanılmasının, EMA bağlanma ve FC-OF testinin tanısal duyarlılığını geliştirmediğini tespit ettik.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu bulgular doğrultusunda;

Tüm parametreler dikkate alındığında, inkübasyonlu örnek ile çalışmanın istatistiksel anlamda fark yaratmadığı anlaşılmaktadır. Dolayısıyla zaman ve emek açısından inkübasyonlu çalışma yapılmasına gerek olmadığı görülmektedir. Ancak literatüre ve deneyimlerimize bakarak K-OF testinin inkübasyonlu örnek ile yapılmasını öneriyoruz.

Akan hücre ölçer olmayan merkezlerde, inkübasyonlu K-OF testi HS tanısı açısından etkin bir belirteç olarak kullanılabilir. Ancak akan hücre ölçere sahip merkezlerde K-OF yerine yüksek sensitivite ve spesifite değerlerinin yanında oldukça ucuz ve çok kısa zamanda sonuç vermesi nedeniyle FC-OF testinin kullanılması gerektiğini düşünüyoruz.

Bizim araştırmamızda, EMA bağlanma testinin spesifite ve sensitivite değerleri literatüre göre daha düşük bulundu. Buna rağmen hastalığı ayırt etme gücü istatistiksel olarak anlamlı idi. Diğer parametrelerle kıyasladığımızda taze örnek ile yapılan EMA bağlanma testinin K-OF testi (taze) ile arasında istatistiksel anlamda fark gözlenmezken FC-OF testi (taze) ile istatistiksel anlamda farklı olduğu görüldü. Dolayısıyla akan hücre ölçere sahip merkezlerin, özellikle de test sayısı az olan merkezlerin, EMA boyasının saklama koşullarına bağlı olarak floresan verme gücünün azalması yanında zaman, emek ve maliyet faktörlerini de dikkate alarak EMA yerine FC-OF testini tercih etmesinin daha doğru bir yaklaşım olacağı düşünülmektedir.

Eozin-5-Maleimid bağlanma testinin rapor verme metodunun merkezden merkeze farklılık göstermesi ve EMA boyasının floresan verme gücünün saklama koşullarına bağlı olarak azalması sorunu bu testin zayıf noktalarıdır. EMA bağlanma testi çalışılırken hasta numunesiyle birlikte en az 2-3 kontrol numunesinin de çalışılması ve sonuçların kontrole göre MFI değerindeki yüzde azalış şeklinde verilmesi bu iki soruna çözüm olabilir.

Hem EMA bağlanma testi hem de FC-OF testlerinin her ikisi için de çalışmayı yapacak merkezde akan hücre ölçerin olup olmaması elbette oldukça önemli bir sorun. Ancak akan hücre ölçerlerin kullanım alanlarının gittikçe yaygınlaşması, bu alandaki teknolojilerin hızla ilerlemesi ve üretici firmaların çoğalması bize cihazın daha yaygın kullanılacağını dolayısıyla bu testlerin kısa zamanda kılavuzlarda tarama testi olarak önerileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca Warang ve ark. [85], önerdiği akan hücre ölçerlerle aynı çalışma prensibine sahip olan ve hemen hemen her merkezde yer alan kan sayım cihazlarına yapılacak çok basit müdahalelerle kan sayım cihazlarında FC-OF testinin çalışılabileceği düşüncesini destekliyoruz.

Bunun yanında hem EMA bağlanma hem de FC-OF testlerinin farklı hemolitik anemi tiplerindeki performanslarının ve referans aralıklarının belirlenmesine yönelik olarak daha fazla denek sayılarını kapsayan ileri araştırmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- [1]. Mohandas, N.; Gallagher, P.G., Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, **2008**, 112, (10), 3939.
- [2]. An, X., Mohandas, N., Disorders of Red Cell Membrane. *British Journal of Haematology*, **2008**, 141, 367-375.
- [3]. İliçin, G., Biberoglu, K., Süleymanlar, G., Ünal, S., *İç Hastalıkları*; Güneş Kitabevi: Ankara, 2005; p 1813.
- [4]. Peker, S., Herediter Sferositozda Membran Protein Eksikliklerinin Elektroforetik ve Spektrometrik Yöntemler İle Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 2011
- [5]. Tse, W., T., Lux, S., E., Red blood cell membrane disorders. *British Journal of Haematology*, **1999**, 104, 2-13.
- [6]. Celkan, T., Karaman, S., Apak, H., Özkan, A., Soyca, Y., L., Yıldız, İ., Herediter Sferositozlu süt çocuklarında rekombinan eritropoetin tedavisi. *Türk Pediatri Arşivi*, **2004**, 39: 125-128.
- [7]. Celkan, T., Kalıtsal Sferositoz. *Türk Pediatri Arşivi*, **2009**, 44: 27-34.
- [8]. Ciepiela, O., Old and new insights into the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Ann Transl Med*, **2018**, 6(17):339.
- [9]. Gallagher, P., G., Weed, S., A., Tse, W., T., Benoit, L., Morrow, J., S., Marchesi, S., L., Mohandas, N., Forget, B., G., Recurrent Fatal Hydrops Fetalis Associated with a Nucleotide Substitution in the Erythrocyte β -Spectrin Gene. *J Clin Invest.*, **1995**, 95(3): 1174-1182.
- [10]. Greer, J., P., Foerster, J., Lukens, J., N., Rodgers, G., M., Paraskevas, F., Glader, B., *Wintrobe's Clinical Hematology*. 11th ed; Lippincot Williams & Wilkins: Philadelphia, 2004; p 217-227.
- [11]. Greer, J., P., Daniel, A., A., Glader, B., List, A., F., Means, R., T., Paraskevas, F., Rodgers, G., M., *Wintrobe's Clinical Hematology*. 13th ed; Lippincot Williams & Wilkins: Philadelphia, 2014; p 707-727.
- [12]. Burçak, G., *Biyokimya Ders Kitabı*; İstanbul Üniversitesi Yayınları: İstanbul, 2012; p 919-936.
- [13]. Tiftik, N., İnsan Eritrositlerinde Rho/Rho-Kinaz Sinyal İleti Mekanizmasının Fonksiyonel Önemi, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 2009.
- [14]. Warule, S., Bidkar, J., Bidkar, S., Dama, G., Loaded Erythrocyte: A review article. *World Journal of Pharmaceutical Research*, **2017**, 6, 10, 154-173.
- [15]. Onat, T., Emerk, K., Sözman, E. Y., *İnsan Biyokimyası*; Palme Yayıncılık: Ankara, 2002; p 642.
- [16]. Özkan, H., Kordon Kanı Eritrosit Membran Lipid Değerleri, Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, 1988.
- [17]. Babior, B. M., Stossel, T. P., *Hematology A Pathophysiological Approach*; Churchill Livingstone Inc: New York, 1990; p 105.
- [18]. Şimşek, G., Eritrosit Membranının Yapısı ve Eritrosit Membran Bozuklukları. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **1995**, 12, 282-286.
- [19]. Toker, M., Eritrosit Membranı Lipid Bileşimi Üzerine Sigaranın Etkisi, Doktora Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat, 2000.
- [20]. Üyüklü, M., Aorvastadin Tedavisiyle Plazma Kolesterol Konsantrasyonunun Düşürülmesinin Eritrosit Mekaniğine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 2006.
- [21]. Delaunay, J., The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood Reviews*, **2007**, 21, 1-20.
- [22]. Taşdemir, P., Gen Haritalama Çalışmalarına Giriş: Otozomal Dominant Herediter Sferositoz'da Bağlantı Analizi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, 2009.

- [23]. Hill, S., A., Kwa, L., G., Shammas, S., L., Lee, J., C., Clarke, J., Mechanism of Assembly of the Non-Covalent Spectrin Tetramerization Domain from Intrinsically Disordered Partners. *Journal of Molecular Biology*, **2014**, 426, 21-35.
- [24]. Paksu, C., Yüksek gerilim hattında çalışan ve yakınında yaşayan bireylerin eritrosit membran proteinlerinin SDS poliakrilamid jel disk elektroforezi yöntemi ile araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep, 1997.
- [25]. Vanizor, B., Eritrosit membranı proteinlerinin amonyum sülfat ile ayrılması, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 1995.
- [26]. Fowler, V., Davis, Q., J., Bennett, V., Human Erythrocyte Myosin: Identification and Purification. *The Journal Of Cell Biology*, **1985**, 47-55.
- [27]. Wong, A., J., Kiehart, D., P., Pollard, T., D., Myosin From Human Erythrocyte. *The Journal Of Cell Biology Chemistry*, **1985**, 46-49.
- [28]. Kostyukova, A., S., Tropomodulin/Tropomyosin Interactions Regulate Actin Pointed End Dynamics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **2008**, 283-292.
- [29]. Scriver, C., R., Beaudet, A., L., Sly, W., S., Valle, D., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th ed; McGraw-Hill: USA, 1995; p 3513-3560.
- [30]. Lux, S., E., Mechanism Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood*, **2014**, 12.
- [31]. Gallagher, P., Red Cell Membrane Disorders. *American Society of Hematology*, **2005**, 13-18
- [32]. Reliene, R., Effect of splenectomy on opsonization and deformability of erythrocytes in hereditary spherocytosis with band 3 and spectrin/ankyrin deficiency, Doktora Tezi, University of Vilnius, Vilnius, 2001.
- [33]. Eritrosit Hastalıkları Ve Hemoglobin Bozuklukları Tanı Ve Tedavi Kılavuzu, TÜRK HEMATOLOJİ DERNEĞİ, 2011
- [34]. Andolfo, I., Russo, R., Gambale, A., Iolascon, A., New insights on hereditary erythrocyte membrane defects. *Haematologica*, **2016**, 101(11):1284-1294.
- [35]. Beutler, E., Kuhl, W., West, C., The Osmotic Fragility of Erythrocytes After Prolonged Liquid Storage and After Reinfusion. *Blood*, **1982**, 59(6):1141-1147.
- [36]. <https://www.meduhub.com/mod/view.php?id=130&type=15> adresinden alınmıştır.
- [37]. Öztürk, B., Sıçanlarda alüminyumun farklı doz ve sürelerde uygulanmasının eritrosit ozmotik frajilitesi ve eser elementler üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2011.
- [38]. Elmas, S., Çok düşük frekanslı elektromanyetik alan maruziyetinin eritrosit yaşam süresi üzerine olası etkilerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, 2015.
- [39]. Karabulut, İ., Toluenin in vitro ve in vivo olarak eritrosit zar stabilitesine etkisi , Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2007.
- [40]. Kolanjiappana, K., Manoharana, S., Kayalvizhib, M., Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. *Clinica Chimica Acta*, **2002**, 326:143-149.
- [41]. <https://opentextbc.ca/biology/chapter/22-1-osmoregulation-and-osmotic-balance/> adresinden alınmıştır.
- [42]. Akkuş, İ., Gürbilek, M., Çağlayan, O., *Klinik Biyokimya Laboratuvarı El Kitabı*. Öz Eğitim Yayınları: İstanbul, 1997.
- [43]. <https://www.meduhub.com/mod/view.php?id=130&type=15> adresinden alınmıştır.
- [44]. <http://pedsinreview.aappublications.org/content/23/3/75.figures-only> adresinden
- [45]. Jung, H., L., A new paradigm in the diagnosis of hereditary hemolytic anemia. *Blood Research*, **2013**, 48 (4).
- [46]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Maleimido-eosin#section=Top> adresinden alınmıştır.

- [47]. Kar, R., Mishra, P., Patı, H., P., Evaluation of Eosin-5-maleimide Flow Cytometric Test İn Diagnosis of Hreditary Spherocytosis, *İnternational Journal of Hematology.*, **2010**; 32:8-16.
- [48]. Kedar, P., S., Colah, R., B., Kulkarnı, S., Ghosh, K., Mohanty, D., Experience with eosin-5'-maleimide as a diagnostic tool for red cell membrane cytoskeleton disorders, *Clin. Lab Haem.*, **2003**; 25:373-376.
- [49]. Herzenberg L., A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., Herzenberg, L., A., The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford. *Clinical Chemistry*, **2002**, 48(10): 1819-1827.
- [50]. Deniz, G., Demirel, Y., G., *Akan Hücre Ölçer*. Yelken Ajans Reklamcılık ve Matbaacılık: İstanbul, 2014.
- [51]. Erten, G., Deniz, G., Demirel, Y., G., *Akan Hücre Ölçer ve Uygulama Alanları*. Matbaa Çözümleri San. ve Dış Tic. Ltd. Şti.: İstanbul, 2009.
- [52]. Givan, A., L., *Flow Cytometry: First Principles*. Wiley-Liss Inc.: New-York, 2001.
- [53]. <https://www.herkesebilimteknoloji.com/haberler/yasam/anton-van-leeuwenhoek-bilesik-mikroskobun-oykusu adresinden alınmıştır>.
- [54]. <http://discovermagazine.com/2015/june/21-leeuwenhoeks-lucky-break adresinden alınmıştır>.
- [55]. <http://www.biologydiscussion.com/cell/electronic-enumeration-of-cells-electronic-gating-and-flow-cytometry-with-diagram/2899 adresinden alınmıştır>.
- [56]. <https://www.news.gatech.edu/features/wallace-coulter-100 adresinden alınmıştır>.
- [57]. <https://alchetron.com/Leonard-Herzenberg adresinden alınmıştır>.
- [58]. <http://www.bd.com/en-us/offerings/brands/lrsfortessa adresinden alınmıştır>.
- [59]. Mandy. F.F., Bergeron, M., Minkus, T. Principles of Flow Cytometry: *Transfus. Sci.*, **1995**, 16(4): 303-314.
- [60]. Bakke, A., C., The Principles of Flow Cytometry. *Laboratorymedicine*, **2001**, 4(32).
- [61]. Taneli. F., "Flow" Sitometri Tekniği ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı: *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, **2007**; 5(2): 75-82.
- [62]. Kanev, M., O., Muranlı, F., D., G., Flow Sitometri ve Kullanım Alanları: *SAÜ Fen Bilimleri Dergisi*, **2016**; 20(1): 33-38.
- [63]. Güner, U., Flow Sitometrinin Hidrobiyolojide kullanımı: *Journal of FisheriesSciences.com*, **2012**; 6(1): 9-17.
- [64]. Macey, G., M., *Flow Cytometry: Principles and Applications*. Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 2008.
- [65]. Bernas, T., Gregoris, G., Asem, E., K., Robinson, J., P., Integrating Cytomics and Proteomics: *Molecular & Cellular Proteomics*, **2006**; 5(1): 2-13.
- [66]. <https://conferences.ncl.ac.uk/media/sites/conferencewebsites/practicalities/7%20Flow%20Cytometry.pdf adresinden alınmıştır>
- [67]. http://static.bdbiosciences.com/training/itf/03-optics/story_html5.html? ga=2.78185300.1941915292.1539822148-1071689584.1539822148 adresinden alınmıştır.
- [68]. http://static.bdbiosciences.com/training/itf/5-Optical_Measurements/story_html5.html? ga=2.261751501.1941915292.1539822148-1071689584.1539822148 adresinden alınmıştır.
- [69]. http://static.bdbiosciences.com/training/itf/6-Data_Analysis/story_html5.html? ga=2.26937213.1941915292.1539822148-1071689584.1539822148 adresinden alınmıştır.
- [70]. http://static.bdbiosciences.com/training/itf/04-Electronics/story_html5.html? ga=2.99720862.1253412509.1539853288-1278951023.1537181609 adresinden alınmıştır.
- [71]. Karaboz, İ., Kayar, E., Akar, S., Flow Sitometri ve Kullanım Alanları, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, **2008**; 6(2) 1-18.

- [72]. <http://www.sinobiological.com/flow-cytometry-fcm-facs-fluorescence-activated-cell-sorting-facs.html> adresinden alınmıştır.
- [73]. Falay, M., Uluşan, G., E., Şenes, M., Acar, İ., O., Are the Reference Ranges and Cutoff Values of Eosin-5'-Maleimide (EMA) Binding Test for Hereditary Spherocytosis Specific for Each Age Group?, *Clin. Lab.*, **2018**; 64.
- [74]. <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/fluorescence-basics/anatomy-fluorescence-spectra.html#stokes> adresinden alınmıştır.
- [75]. Yazıcı, M., Yardımcı, R.E., Akım Sitometri ve Su Ürünleri Uygulamaları, *Journal Of Aquaculture Engineering And Fisheries Research*, **2016**; 2(4) 159-175.
- [76]. Shapiro, H., M., *Practical Flow Cytometry*. 4th ed; Wiley-Liss Inc.: New Jersey, 2003.
- [77]. Comas-Riu, J., Rius, N., Flow cytometry applications in the food industry, *J Ind Microbiol Biotechnol*, **2009**; 36: 999-1011.
- [78]. El Gendya, W., M., Hassabb, H., M., Ghanem, A., M., Lewisk, I., M., Naward, S., M., The application of eosin maleimide-binding test in the diagnosis of hereditary spherocytosis among undiagnosed cases of chronic hemolytic anemia in children, *Egyptian Journal of Haematology*, **2014**; 39(3):109-113.
- [79]. Agarwal, A.M., Liew, M., A., Nussenzveig, R., H., Sangle, N., Heikal, N., Yaish, H., Christensen, R., Improved Harmonization of Eosin-5-Maleimide Binding Test Across Different Instruments and Age Groups. *Cytometry Part*, **2016**; 90B: 512-516.
- [80]. King, M., Smythe, J., S., Mushens, R., Eosin-5-maleimide binding to band 3 and Rh-related proteins forms the basis of a screening test for hereditary spherocytosis. *British Journal of Haematology*, **2004**; 124, 106-113.
- [81]. François, G., Garçon, L., Bergoin, Emillie, B., Largier, M., Delaunay, J., Thibault, M., Maynadie, M., Couialloud, G., Moreira, S., Cynober, T., Usefulness of the eosin-5- ϵ -maleimide cytometric method as a first-line screening test for the diagnosis of hereditary spherocytosis: comparison with ektacytometry and protein electrophoresis. *British Journal of Haematology*, **2007**; 140, 464-474.
- [82]. Park, S., Park, C., Lee, B., Cho, Y., Jang, S., Kim, N., Koh, K., Im, H., Seo, J., Park, E., Lee, J., Yoo, K., Jung, H., Comparison Study of the Eosin-5'-Maleimide Binding Test, Flow Cytometric Osmotic Fragility Test, and Cryohemolysis Test in the Diagnosis of Hereditary Spherocytosis. *Am J Clin Pathol*, **2014**; 142:474-484.
- [83]. King, M., Telfer, P., MacKinnon, H., Langabeer, L., McMahon, C., Darbyshire, P., Dhermy, D., Using the Eosin-5-maleimide Binding Test in the Differential Diagnosis of Hereditary Spherocytosis and Hereditary Pyropoikilocytosis. *Clinical Cytometry*, **2008**; 74B:244-250.
- [84]. Won, D., L., Suh, J., S., Flow Cytometric Detection of Erythrocyte Osmotic Fragility. *Clinical Cytometry*, **2009**; 76B:135-141.
- [85]. Warang, P., Gupta, M., Kedar, P., Ghosh, K., Colah, R., Flow Cytometric Osmotic Fragility—An Effective Screening Approach for Red Cell Membranopathies. *Clinical Cytometry*, **2011**; 80B:186-190.
- [86]. Shim, Y., J., Won, D., L., Flow Cytometric Osmotic Fragility Testing Does Reflect the Clinical Severity of Hereditary Spherocytosis. *Clinical Cytometry*, **2014**; 86B:436-443.
- [87]. Ciepiela, O., Adamowicz, A., Zgodzinska, A., Lazowska, M., Kotula, I., Flow Cytometric Osmotic Fragility Test: Increased Assay Sensitivity for Clinical Application in Pediatric Hematology. *Clinical Cytometry*, **2018**; 94B:189-195.
- [88]. Bianchi, P., Fermo, E., Vercellati, C., Marcello, A.P., Porretti, L., Cortelezzi, A., Barcellini, W., Zanella, A., Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: a comparison study on 150 patients grouped according to the molecular and clinical characteristics. *Haematologica*, **2012**; 97(4): 516-523.
- [89]. Bilgiç, T., H., Hereditör Sferositoz Tanılı Çocuk Hastaların Geriye Dönük Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2013.

- [90]. Stoya, G., Gruhn, B., Vogelsang, H., Eckehard, B., Linss, W., Flow Cytometry as a Diagnostic Tool for Hereditary Spherocytosis. *Acta Haematol*, **2006**;116:186-191.
- [91]. Bennaoum MN, Lazreg H, Adda A. Evaluation of the flow cytometric osmotic fragility in the diagnostic of hereditary spherocytosis. *Adv Lab Med Int*. **2015**; 5(3): 32 - 38.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Cemil GÜLÜM

Doğum Tarihi : 06.04.1976

E-mail : cemilgulum@mersin.edu.tr

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Kimya	Karadeniz Teknik Üniversitesi	1993-1997
Yüksek Lisans	Kimya	Mersin Üniversitesi	2015-

Görevler :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Kimyager	Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma Ve Uygulama Merkezi	2000 -

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

1. TEMEL, G.; ÖZDEMİR, A.; TÜRKEGÜN, M.; GÜLÜM, C., REFERANS ARALIK HESAPLAMA ÇALIŞMALARININ BİYOİSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRMESİ. 6. Uluslararası Doğu Akdeniz Aile Hekimliği Kongresi, 2017-05-11, 2017-05-14, Adana, Türkiye, 2017.