



T.C.

**HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**ORAK HÜCRE ANEMİSİ HASTALARINDA GEN
POLİMORFİZMLERİ İLE HASTALIĞIN
KOMPLİKASYONLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Güner AKGÜNER
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Hasan KAYA**

HATAY – 2021

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

ORAK HÜCRE ANEMİSİ HASTALARINDA GEN
POLİMORFİZMLERİ İLE HASTALIĞIN
KOMPLİKASYONLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Güner AKGÜNER
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Hasan KAYA

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 20.TU.001 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

ORAK HÜCRE ANEMİSİ HASTALARINDA GEN POLİMORFİZMLERİ İLE HASTALIĞIN KOMPLİKASYONLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Güner AKGÜNER

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

(İmza).....

Prof. Dr. Yusuf ÖNLEN
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

(İmza).....

Prof. Dr. Hasan KAYA
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

(İmza).....

Prof. Dr. Hasan KAYA
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof. Dr. Hasan KAYA.....(imza)
2. Prof. Dr. Edip UÇAR(imza)
3. Prof. Dr. Adnan TAŞ.....(imza)

III. İÇİNDEKİLER

III. İÇİNDEKİLER	iii
IV. TABLO LİSTESİ.....	iv
V. ŞEKİL LİSTESİ	v
VI. KISALTMALAR LİSTESİ	vi
VII. TEŞEKKÜR	viii
VIII. ÖZET.....	ix
IX. ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Orak Hücreli Anemi	4
2.1.1. Tanım	4
2.1.2. Epidemiyoloji	5
2.1.3. Patofizyoloji.....	5
2.1.4. Klinik	8
2.1.5. Tanı	14
2.1.6. OHA’ da Tedavi Stratejileri.....	15
2.1.7. İnsan Gen Çalışmaları.....	16
2.1.8. Genetik Faktörlerin OHA Komplikasyonlarıyla İlişkisi.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması	25
3.2. DNA İzolasyonu.....	25
3.3. Real-Time PCR ile Genotipleme.....	27
4. BULGULAR.....	30
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
7. KAYNAKLAR	46
8. EKLER.....	63
9. ÖZGEÇMİŞ	66

IV. TABLO LİSTESİ

Tablo 1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kit İçeriği	26
Tablo 2. PCR’da kullanılan kit içeriği.....	27
Tablo 3. PCR’ da kullanılan sıcaklık, zaman, döngü sayıları	28
Tablo 4. Grupların yaş ve cinsiyete göre dağılımları	30
Tablo 5. Grupların kan değerlerinin analizi	31
Tablo 6. Grup 1 ve Grup 2’de üç polimorfizme ait genotiplerin dağılımı.....	32
Tablo 7. eNOS rs2070744 polimorfizminin OHA komplikasyonlarıyla ilişkisi.....	33
Tablo 8. VEGF rs2010963 polimorfizminin OHA komplikasyonlarıyla ilişkisi	34
Tablo 9. ANXA2 rs1033028 polimorfizminin komplikasyonlarıyla ilişkisi	35

V. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Periferik Yayımda Orak Şeklini Almış Eritrositler.....	4
Şekil 2. Doku Faktörü, FXa ve Trombinin Vazo-oklüzyonda Rolü.....	7
Şekil 3. OHA’da Vazo-oklüzyon ve Doku Hasarı Mekanizması.....	7
Şekil 4. OHA’lı hastalarda ANXA2 rs1033028 Polimorfizminin real-time PCR ile Genotiplemesi.....	28
Şekil 5. OHA’lı Hastalarda ANXA2 rs1033028 Polimorfizminin PCR ile Genotiplere Göre Dağılımı.....	28



VI. KISALTMALAR LİSTESİ

ACVRL1	: Aktivin Reseptör Benzeri Kinaz 1
AGS	: Akut Göğüs Sendromu
ALP	: Alkalen Fosfataz
ANXA2	: Annexin A2
AQP1	: Aquaporin-1
AVN	: Avasküler Nekroz
BMP	: Kemik Morfogenik Protein
BMPR1B	: Kemik Morfogenik Protein Reseptör 1B
BMPR2	: Kemik Morfogenik Protein Reseptör 2
CYBR5	: Sitokrom b5 Redüktaz
CYP2D6	: Sitokrom P450 2D6
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
eNOS	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
ET1	: Endotelin-1
FVIIa	: Faktör 7a
FXa	: Faktör 10a
GFR	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
GWAS	: Genom Bazında İlişkilendirme Çalışmaları
Hb	: Hemoglobin
HbA	: Hemoglobin A
HbC	: Hemoglobin C
HbE	: Hemoglobin E
HbF	: Hemoglobin F
HbS	: Hemoglobin S
ICAM-1	: Hücre-içi Adezyon Molekülü-1
ITGA3	: İntegrin $\alpha 3$
HLA	: İnsan Lökosit Antijen
HPLC	: Yüksek Performans Likit Kromatografi
İGP	: İnsan Genom Projesi

KBH	: Kronik Böbrek Hastalığı
KL	: Klotho Geni
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LTB4	: Lökotrien B4
NO	: Nitrik Oksit
NrCAM	: Nöronal Hücre Adezyon Molekülü
MTHFR	: Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz
MR	: Manyetik Rezonans
MY	: Mitral Yetmezlik
OHA	: Orak Hücreli Anemi
OR	: Otozomal Resesif
PAF	: Platelet Aktive Edici Faktör
PAR	: Proteaz Aktive Edici Faktör
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PHT	: Pulmoner Hipertansiyon
PMNL	: Polimorfonükleer Lökosit
PHT	: Pulmoner Hipertansiyon
PTH	: Parathormon
RDW	: Kırmızı Kan Hücresi Dağılım Genişliği
SDBY	: Son Dönem Böbrek Yetmezliği
SMURF1	: Smad Ubiquitin Düzenleyici Faktör 1
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
TF	: Doku Faktörü
TY	: Triküspit Yetmezliği
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
UGT1A	: Üridindifosfat Glukuronozil Transferaz-1A
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WBC	: Beyaz Kan Hücresi

VII. TEŞEKKÜR

İç Hastalıkları Uzmanlık eğitimim süresince destek ve katkılarını esirgemeyen, meslek hayatımda tıbbi ve sosyal yönden bilgi ve donanımlarımı artıran, birlikte çalışmaktan onur duyduğum tez danışmanım İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hasan Kaya'ya,

Çalışmam boyunca çalışmanın kurgulanmasından sonuçlanmasına kadar her aşamada çok büyük emeği olan değerli hocam Hematoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Gül İlhan'a,

Çalışmamın yürütülmesinde her zaman desteğini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Meral Urhan Küçük'e ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına,

Uzmanlık eğitimime katkı sağlayan, hastalara özenle ve güncel tıbbi bilgiler ışığında yaklaşmamı sağlayan, üzerimde büyük emekleri olan bütün saygıdeğer İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Öğretim Üyelerine,

Tez çalışmamda desteklerini esirgemeyen ve hasta toplamamızda katkıları olan hasta yoğunluklarına ve yüksek tempolu çalışmalarına rağmen hastaları bana yönlendiren kıymetli asistan arkadaşlarıma,

Tez çalışmam boyunca en büyük destekçim ve varlığıyla bana güç veren sevgili eşim Fatma Gül Akgüner'e,

Tüm hayatım boyunca en büyük sevgi ve desteği vererek beni bugünlere getiren, her konuda yanımda duran, gerek maddi gerekse manevi varlıkları ile huzur bulduğum kıymetli aileme,

Asistanlık eğitimimde hastanedeki sağ kolum, arkadaşım, ablam Sayın Mediha Okur Şallıel'e

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım kıymetli İç Hastalıkları Anabilim Dalı ve Acil Tıp Anabilim Dalı asistan arkadaşlarıma,

Çalışma kanlarının alınmasında ve saklanmasında yardımcı olan tüm hemşire ve laboratuvar çalışanı arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Güner Akgüner

VIII. ÖZET

ORAK HÜCRE ANEMİSİ HASTALARINDA GEN POLİMORFİZMLERİ İLE HASTALIĞIN KOMPLİKASYONLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Orak hücreli anemi ilerleyici organ hasarına neden olan, otozomal resesif kalıtılan bir hemoglobinopatidir. Orak hücreli anemi hastalarında genlerin rolünün saptanması, hastalığın takip ve tedavisinde önemli derecede katkı sağlayabilir. Bu çalışmanın amacı, orak hücre anemili hastalarda gen polimorfizmleri ile hastalığın komplikasyonları arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

Gereç ve yöntem: Çalışmamıza HbSS genotipine sahip 89 OHA hastası ve 100 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 189 hasta dahil edildi. eNOS rs2070744, VEGF rs2010963, ANXA2 rs1033028 gen polimorfizmlerine ait genotipleme için tüm hasta ve kontrol grubundan EDTA'lı tüplere periferik kan örneği alınıp; bu örneklerden genomik DNA izole edildi. Elde edilen genomik DNA'lardan primerler kullanılarak real-time PCR yapıldı. PCR verileriyle genotipleme yapıldı. Tüm sonuçlar uygun istatistik yöntemleri ile değerlendirildi. Hastaların komplikasyonlarla ilgili bilgileri dosyalarından yararlanılarak elde edildi.

Bulgular: eNOS rs2070744 polimorfizmi için hasta grubunun % 44,9'ü mutant, % 38,2'si heterozigot, % 16,9'u wild tip genotipe; kontrol grubunun % 43'ü mutant, % 41'i heterozigot, % 16'sı wild tip genotipe sahipti. İki grup arasında eNOS rs2070744 polimorfizmi genotip sıklıkları açısından istatistiksel olarak farklılık saptanmadı ($p=0,926$). VEGF rs2010963 polimorfizmi için hasta grubunun % 42,7'si heterozigot, % 32,6'sı mutant, % 24,7'si wild tip genotipe; kontrol grubunun % 51'i heterozigot, % 35'i mutant, % 14'ü wild tip genotipe sahipti. İki grup arasında VEGF rs2010963 polimorfizmi genotip sıklıkları açısından istatistiksel olarak farklılık saptanmadı ($p=0,164$). ANXA2 rs1033028 polimorfizmi için hasta grubunun % 49'4'ü heterozigot, % 29,2'si mutant, % 21,3'ü wild tip genotipe; kontrol grubunun % 45'i mutant, % 41'i heterozigot, % 14'ü wild tip genotipe sahipti. ANXA2 rs1033028 polimorfizminin genotip sıklıkları iki grup arasında farklı olmasına rağmen, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,07$). eNOS rs2070744, VEGF rs2010963, ANXA2 rs1033028 polimorfizmleri ile orak hücre anemisi komplikasyonları arasında istatistiksel olarak ilişki saptanmadı.

Sonuç: Orak hücreli anemide komplikasyonların gelişimiyle gen polimorfizmleri arasında ilişki saptanmamıştır. Orak hücreli anemide eNOS, VEGF ve ANXA2 gen polimorfizmlerinin komplikasyon gelişiminde rolünün anlaşılması için daha geniş araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Orak hücreli anemi, gen, polimorfizm, eNOS, VEGF, ANXA2

IX. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN GENE POLYMORPHISMS AND THE COMPLICATIONS OF THE DISEASE IN SICKLE CELL ANEMIA PATIENTS

Aim: Sickle cell anemia is an autosomal recessive inherited hemoglobinopathy that causes progressive organ damage. Determining the role of genes in sickle cell anemia patients may contribute significantly to the follow-up and treatment of the disease. The aim of this study is to investigate the relationship between gene polymorphisms and complications of the disease in patients with sickle cell anemia.

Material and methods: A total of 189 individuals, including 89 SCA patients with HbSS genotype and 100 healthy controls, were included in our study. For genotyping of eNOS T-786C, VEGF rs2010963, ANXA2 rs1033028 gene polymorphisms, peripheral blood samples were taken into EDTA tubes from all patients and the control group, and genomic DNA was isolated from these samples. Real-time PCR was performed using primers from the obtained genomic DNAs. Genotyping was done with PCR data. All results were evaluated with appropriate statistical methods. Information about the complications of the patients was obtained by using their files.

Results: For the eNOS rs2070744 polymorphism, 44,9% of the patient group was mutant, 38,2% heterozygous, 16,9% wild type genotype; 43% of the control group had mutant, 41% heterozygous and 16% wild type genotype. There was no statistical difference between the two groups in terms of genotype frequencies of eNOS rs2070744 polymorphism ($p=0,926$). For VEGF rs2010963 polymorphism, 42,7% of the patient group was heterozygous, 32,6% mutant, 24,7% wild type genotype; 51% of the control group had heterozygous, 35% mutant and 14% wild type genotype. There was no statistical difference between the two groups in terms of VEGF rs2010963 polymorphism genotype frequencies ($p=0,164$). For the ANXA2 rs1033028 polymorphism, 49,4% of the patient group were heterozygous, 29,2% mutant, 21,3% wild type genotype; 45% of the control group were mutant, 41% heterozygous, and 14% had wild type genotype. Although genotype frequencies of ANXA2 rs1033028 polymorphism were different between the two groups, this difference was not statistically significant ($p=0,07$). There was no statistical relationship between eNOS rs2070744, VEGF rs2010963, ANXA2 rs1033028 polymorphisms and complications of sickle cell anemia.

Conclusion: No relationship was found between the development of complications and gene polymorphisms in sickle cell anemia. Further studies are needed to understand the role of eNOS, VEGF and ANXA2 gene polymorphisms in the development of complications in sickle cell anemia.

Key words: Sickle cell anemia, gene, polymorphism, eNOS, VEGF, ANXA2

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Orak hücreli anemi (OHA), kronik hemoliz ve vazo-oklüziv krizlerle seyreden, birçok organı etkileyen hemoglobinopatidir. Hemoglobin molekülünde β globin zincirinin amino (-NH₂) ucunda altıncı pozisyondaki glutamik asitin valin aminoasidi ile yer değiştirmesiyle anormal bir hemoglobin olan Hemoglobin S (HbS) oluşur. Otozomal resesif (OR) kalıtım gösteren bu hastalıkta HbS'i homozigot durumda taşıyan hastalar için Orak hücreli anemi terimi kullanılırken, HbS'i diğer hemoglobinlerle birlikte taşıyan kişilerde görülen tabloya oraklaşma sendromları denilmektedir (1).

Hemoglobin S molekülü hemoglobin A'ya göre kanda daha az çözünür ve polimerizasyona yatkındır. Hemoglobin yapısındaki bozulma, eritrositlerde şekil değişikliğine sebep olur ve HbS bulunan eritrositler yeterince esnek olmayan; kanda yarım ay ya da diğer adıyla orak şekline dönüşür.

OHA taşıyıcılığı sıklığı Türkiye genelinde %0.3-0.6 arasındayken, özellikle Çukurova bölgesinde bazı yörelerde bu sıklık %3-44'e ulaşmaktadır (1). Hastalıkta görülen akut ve kronik komplikasyonlar hastaları uzun dönemde etkiler, hastalarda yaşam kalitesini düşürür, toplumda morbidite ve mortaliteyi artırır, sağlık hizmeti maliyetlerinde artışa sebep olur.

Hastalığın klinik belirti ve bulguları değişkenlik gösterip; komplikasyonlar hematolojik ve hematolojik olmayan olarak 2 grupta incelenebilir.

Hematolojik komplikasyonlar; aplastik kriz, hemolitik kriz, vazo-oklüziv kriz ve sekestrasyon krizleri iken;

Hematolojik olmayan komplikasyonlar; büyüme gelişme geriliği, enfeksiyonlar, bacak ülserleri, göz (retinal hemoraji ve sklerada ikter), kemik ve eklem hastalıkları (ağrı, Salmonella enfeksiyonu, el ve ayakta daktilit, avasküler kemik nekrozu, osteoporoz) genitoüriner sistem bulguları (priapizm, renal papiller nekroz, renal tübüler asidoz ve hematüri), hepatobiliyer sistemde uzun süreli hemoliz ve artmış demir yüküne bağlı safra taşları, kronik karaciğer hastalığı ve siroz, kalp ve akciğer hastalıkları (kardiyomegali, kalp kapak problemleri, miyokard enfarktüsü, pulmoner enfarkt, pulmoner hipertansiyon...), akut göğüs sendromu, nörolojik sistemde serebrovasküler hastalık, geçici iskemik atak, iskemi, intraserebral ve

subaraknoidal kanamalar, epilepsi, nöropati, denge ve duyma kayıpları olarak sıralanabilir.

Orak hücre hastalarında pek çok komplikasyon bir arada görülmekte ancak komplikasyonların şiddeti ve sıklığı hastalarda değişkenlik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda birçok farklı gen ve bu genlerdeki polimorfizmler komplikasyonların gelişiminde rol oynamaktadır (2).

Akut göğüs sendromu (AGS), OHA tanılı hastalarda mortalitenin en önde gelen sebebi olup, hastaneye yatırılmanın 2. en sık sebebidir. Akut akciğer hasarının bir formu olup pnömoni, pulmoner yağ embolisi, pulmoner infarkt ve emboli; akut göğüs sendromuna sebep olmaktadır. Akciğerlerdeki deoksijene eritrositler oraklaşarak vazo-oklüzyona neden olur ve respiratuar semptomlarla beraber solunum yetmezliği gelişebilir. Tedavisinde solunum desteği, antibiyoterapi, analjezik ilaçlar, kan transfüzyonu ve kan değişimi (exchange transfüzyon) bulunmaktadır (3).

Akut göğüs sendromu için tedaviye aday ajanlardan biri de nitrik oksittir. Nöronal (nNOS), indüklenebilir (iNOS) ve endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimleri tarafından üretilen nitrik oksit; akciğer kapiller damarlarda endotel üzerinden vazodilatasyon yapar. eNOS geninin T-786C (rs2070744) polimorfizmini bulunduran bireylerde eNOS geninin promotor aktivitesi azalmıştır ve bu durum akciğerlerde endotelial disfonksiyonla sonuçlanır (4). Orak hücre hastalarında eNOS T-786C polimorfizmi akut göğüs sendromu riskini artışında suçlanmaktadır (4).

Vazooklüziv ağırlı krizler OHA'lı hastalarda hastaneye sık yatış gerektiren ve yaşam kalitesini etkileyen bir komplikasyondur. Oraklaşmış eritrositlerin mikrovasküler tıkanıklığa sebep olmasıyla, lökosit aktivasyonu, inflamatuvar medyatörlerin salınımı ağırlı krizlere sebep olur. Bu ağırlı krizler lokalize ya da generalize olabilir. HgbF düzeyi, hidroksiüre kullanımı, alfa-talasemi birlikteliği gibi birçok faktör ağırlı krizlerin sıklığını etkilerken birçok genetik varyasyon da bundan sorumludur. Doku düzeyindeki hipoksi ve inflamatuvar medyatör salınımı ile ilişkili olarak vasküler endotelial büyüme faktör (VEGF); vasküler permeabilite artışı, anjiyogenez, ICAM-1 ve VCAM-1 artışıyla ağırlı epizodlardan sorumlu tutulan bir glikoproteindir (5). VEGF genindeki birçok polimorfizm, ağırlı krizlerin oluşumunda rol oynayıp VEGF genindeki rs2010963 polimorfizmi de ağırlı kriz sıklığının artışında suçlanmaktadır (5).

OHA'lı hastalarda gelişen kemik avasküler nekrozu, hastalarda morbiditeye sebep olur. Hastaların birçoğunda kalıcı kemik ve eklem deformiteleri, sakatlıklar gelişmektedir. Birçok hasta bu sebeple tekrarlayan cerrahi tedavilere ihtiyaç duymaktadır. Annexin 2 proteini ANXA2 geniyle kalıtılan, kalsiyum bağımlı fosfolipit bağlayıcı protein ailesinin bir üyesi olup hücre büyümesi ve sinyal iletim yollarında görev alır (6). Annexin 2 proteini osteoblast mineralizasyonunda, alkalen fosfataz aktivitesinde önemli olup, hipoksiye nöronal cevapta da rol oynamaktadır (6). OHA'lı hastalarda ANXA genindeki polimorfizmler avasküler nekroz oluşumunda rol oynayabilir. ANXA 2 geni rs1033028 polimorfizminin OHA'lı hastalarda osteonekroz riskini arttırdığına dair kanıtlar vardır (6).

OHA'lı hastalarda komplikasyonların yönetimi hastalarda morbidite ve mortalitenin azaltılmasına katkı sağlayacaktır. Hastalara verilen tedaviler kısmen bunu sağlasa da gen temelli araştırmaların yapılmasıyla hastalığın patogenezi daha iyi anlaşılacak ve komplikasyonların yönetiminde çalışmadan çıkacak sonuçlar yeni tedavilerin gelişimi konusunda yol gösterici olabilir. Komplikasyonların erken teşhisi ve önlenmesi için ileride genetik analiz çalışmaları OHA'lı hastalarda uygulanabilir.

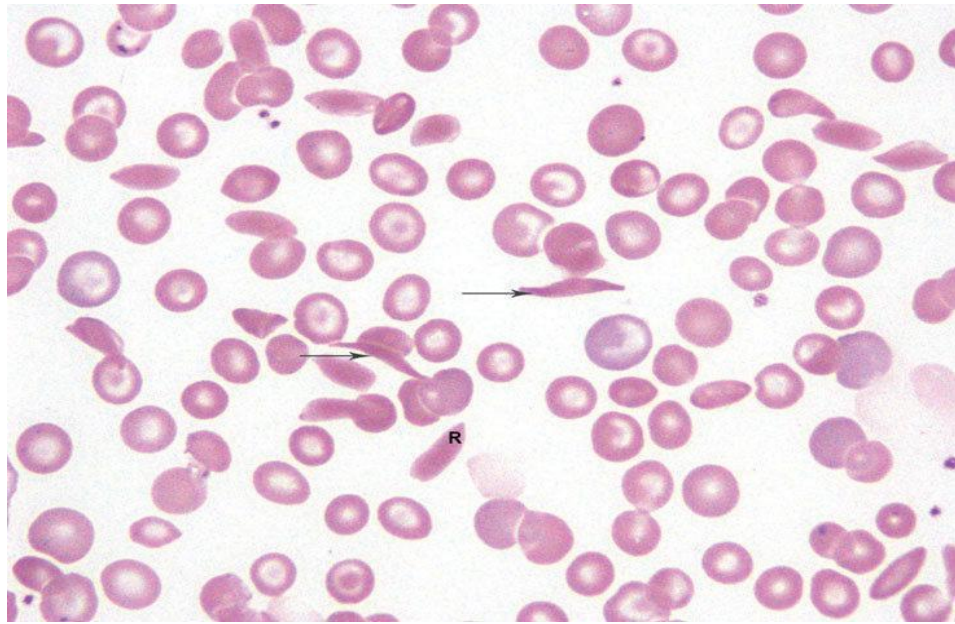
Bu çalışmanın amacı; orak hücre hastalarında hastalığın komplikasyonları ile eNOS rs2070744 (T-786C), VEGF rs2010963, ANXA2 rs1033028 gen polimorfizmleri arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Orak Hücreli Anemi

2.1.1. Tanım

Orak hücreli anemi (OHA), hemoglobin molekülünün beta globin zincirinin –NH₂ (amino) ucunun altıncı pozisyonunda bulunan glutamik asit yerine valin aminoasidinin gelmesiyle oluşan hemoglobin S (HbS) in varlığıyla karakterize pek çok farklı klinik sonuçları olan bir hemoglobinopatidir. Deoksijene HbS' i taşıyan eritrositler, kan akımının yavaşladığı bölgelerde yarım ay şeklini alır ve orak şekilli eritrositler oluşur. Bu hemoglobini homozigot veya heterozigot durumda taşıyan kişilerde veya diğer hemoglobinlerle kombine olarak taşıyan kişilerde görülen semptomların oluşturduğu tabloya “oraklaşma sendromları” (sickling sendromları) adı verilir. HbS'i homozigot durumda taşıyan hastalar için orak hücreli anemi terimi kullanılır (1).



Şekil 1. Periferik yaymada orak şeklini almış eritrositler (7)

2.1.2. Epidemiyoloji

Hemoglobinopatiler, dünyada en sık görülen genetik bozukluklardır. Dünya nüfusunun yüzde 7'sinde hemoglobinopati taşıyıcılığı vardır ve her yıl 300.000-400.000 bebek bu hastalıklarla doğmaktadır (8).

Hemoglobinopatiler, dünya üzerinde özellikle Sahra altı Afrika, Akdenize kıyısı olan ülkeler, Orta Doğu ülkeleri, Güneydoğu Asya ülkelerinde görülmektedir. İnsidans her bölgede farklılık göstermektedir. Orak hücre geni taşıyıcı sıklığı yüzde bu bölgelerde yüzde 5 ile yüzde 40 arasında değişmektedir (9).

Bugüne kadar dünyada 700'den fazla hemoglobin molekülü saptanmıştır. Hemoglobinopatilerin dağılımına bakıldığında ülkemizde en sık Hb S, sonra Hb D, Hb E ve Hb O Arap olduğu, bunlardan başka 42 anormal Hb'nin ülkemizde bulunduğu yayınlanmıştır (10).

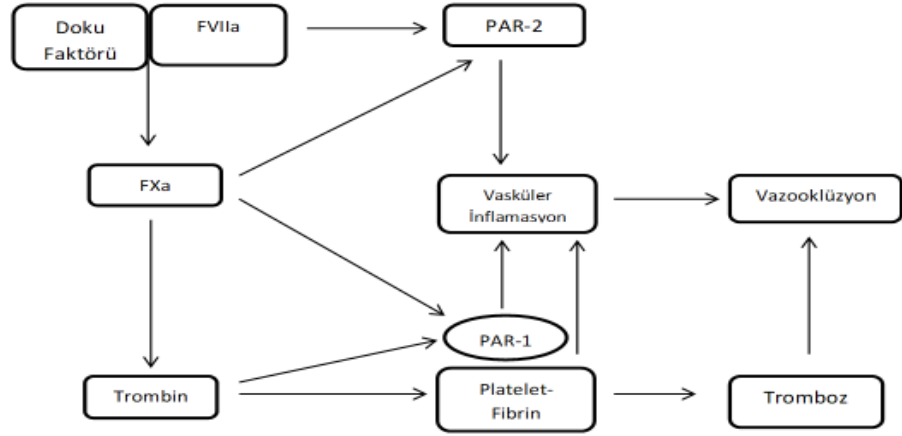
OHA sıklığı Türkiye genelinde %0,37-0,6 arasında iken, özellikle Çukurova bölgesinde bazı yörelerde bu sıklık %3-44 arasında saptanmıştır (11).

2.1.3. Patofizyoloji

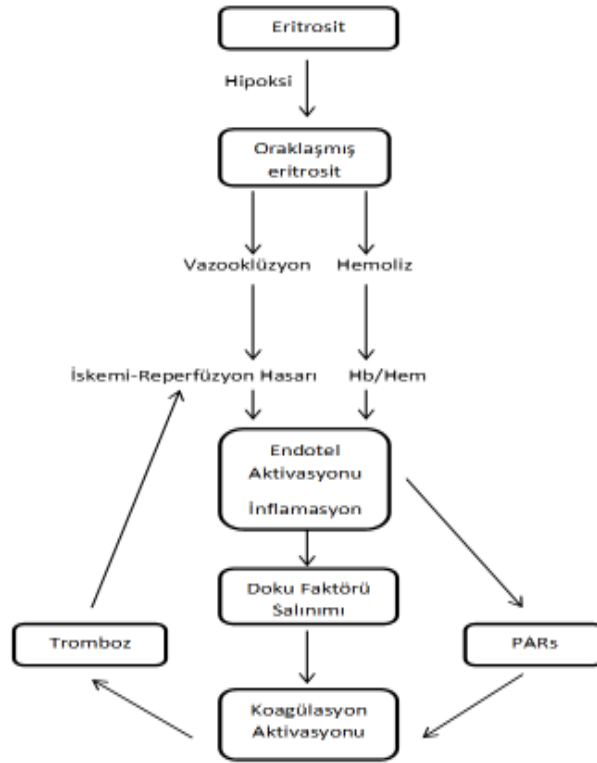
Hb S molekülü, orak hücre hastalığının patofizyolojisinde temel öneme sahip olup akut, tekrarlayıcı ve kronik komplikasyonları başlatır (12). Hemoglobin molekülünde beta -globin gen zincirinin 6. pozisyonunda bulunan glutamik asit yerine valin aminoasidi gelmesiyle eritrositlerde hücre zarındaki hidrofilik aminoasitler yerine hidrofobik aminoasitler geçer. Bu durum hemoglobin molekülünün çözünürlüğünü olumsuz etkiler (13). Deoksijene durumlarda polimerizasyona yatkın olan hemoglobin S oluşur. HbS polimerizasyonu; dehidratasyon, sıcaklık, HbS düzeyi, Hb F düzeyi, talasemi birlikteliği, G6PD (glukoz 6-fosfat dehidrogenaz) eksikliği, deoksijenizasyon, vasküler staz, kan pH'ı, kan viskozitesi, eritrosit ortalama hemoglobin konsantrasyonu (MCHC), 2,3-difosfogliserat düzeyi, Hb bağlayıcı moleküller gibi faktörlere bağlı değişir (12,14). Hb S polimerizasyonu eritrositlerin şekil değiştirip orak şeklini almasına sebep olur. Normal eritrositlerin yüzeylerinde adezyon molekülleri ekspresyonu yok ya da çok azdır (15). Oraklaşmış eritrositler ise damar duvarına adezyona sebep olan proteinler

eksprese etmektedir (16). Bu OHA'lı hastalarda kan dolaşımında eritrositlerin ve nötrofillerin damar duvarına yapışmasına sebep olmaktadır. Sonuçta kan dolaşımında mikrosirkülasyon bozulur vazo-oklüzyon meydana gelir. OHA'lı hastalarda damar endotelinden VCAM, P-selektin, E-selektin gibi adezyon molekülleri salınmaktadır. Endotel aktivasyonu, inflamasyona katkı sağlamaktadır (17,18). Oraklaşmış eritrosit-endotel etkileşimleri post-kapiller venüllerde tekrarlayıcı vazooklüziv olaylarla sonuçlanır. Kan akımı tekrar sağlandığında; dokuda iskemi-reperfüzyon hasarıyla kronik inflamasyon oluşarak zamanla dokularda kalıcı hasara meydana gelir (19). İskemi-reperfüzyon hasarı ksantin oksidaz enzimini aktive eder ve endotel düzeyinde serbest radikaller açığa çıkar. Bu radikallerin oluşumu endotelde oksidan stresi tetikler. Oksidan stres, endotelden platelet aktive edici faktör (PAF), lökotrien B4 (LTB4) salınımına sebep olur (20). Sonunda aktive olan polimorfonükleer lökositler (PMNL) ve monositler inflamatuvar maddelerin salınımıyla inflamasyona katkıda bulunur (21). Devam eden kronik inflamasyon OHA'lı hastalarda koagülasyon kaskadını da tetikler. Platelet aktivasyonu, doku faktörü (TF) salınımının artması prokoagülan mediatörlerin salınımına böylece vazo-oklüzyonun artışına sebep olarak doku inflamasyonuna katkıda bulunur (22). TF, proteaz aktive eden faktör (PAR) üretimini artırır. PAR, eritrositlerin endotele adezyonunu arttırarak, mikrovasküler damar tıkanıklığını arttırarak, vazo-oklüzyona katkıda bulunur (23).

OHA'lı hastalarda artmış hemolizden dolayı eritrositlerdeki hemoglobin kan dolaşımına çıkar. Hemoglobin ve yapısındaki hem molekülü methemoglobin ve nitrat üretirken dokuda nitrik oksit (NO) kullanır, bu sebeple endotel düzeyinde NO düzeyi azalır (24). NO; vazodilatasyonu ve platelet aktivasyonunun inhibe edilmesini sağlayan bir medyatördür; eksikliği OHA'lı hastalarda vazo-oklüzyonu ve inflamasyonu tetikler.



Şekil 2. Doku Faktörü, FXa ve Trombinin Vazo-oklüzyonda Rolü (25)



Şekil 3.OHA'da Vazo-oklüzyon ve Doku Hasarı Mekanizması (25)

2.1.4. Klinik

OHA'lı hastalarda birçok farklı doku ve organda hasar gelişebilmektedir. Hastalığın fenotipi her hastada farklılık göstermekte olup; komplikasyonların sıklığı ve şiddetinin farklı olmasında birçok faktör rol oynamaktadır. Hastalarda α -talasemi varlığı, Hb F düzeyi, genetik faktörler, tekrarlayan kan transfüzyonlarına bağlı vücutta demir birikimi bu faktörlerdendir. OHA hastalarında komplikasyonlar 2 grupta incelenebilir.

2.1.4.1. Akut Komplikasyonlar

2.1.4.1.1. Vazo-oklüziv Ağrılı Krizler

OHA'lı hastalarda mikrovasküler düzeyde meydana gelen vazo-oklüzyon inflamatuvar mediatörlerin salınımına sebep olur (26). İnflamatuvar mediatörlerin salınımıyla duysal sinirlerin uyarılması sonucu ağrılı krizler meydana gelir. Tedavisinde yeterli hidrasyonun sağlanması, analjezik tedavi esas tedavidir (1). Ağrılı krizler, enfeksiyonlar, vücutta stres oluşturabilecek geçirilmiş cerrahi, psikolojik faktörler, HbF seviyesinin düşmesi, hemoliz vb. birçok faktörden etkilenebildiğinden; OHA'lı hastalarda ağrılı kriz meydana geldiğinde tetikleyici faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Ağrılı krizler OHA'lı hastalarda hastaneye yatışların önemli bir sebebidir.

2.1.4.1.2. Enfeksiyonlar

OHA'lı hastalarda oraklaşmış eritrositler dalakta sekestre olarak, dalakta infarkt ve trombozlar meydana gelir, ilk 6 yaşta dalak zamanla atrofiye gider ve fibrotik bir hal alır (otosplenektomi). Dalağın fonksiyon göstermemesi kapsüllü bakteriyel enfeksiyonlara karşı yatkınlık oluşturur. Haemophilus influenzae tip b (Hib) ve pneumococcus, klebsiella spp. enfeksiyonları görülme sıklığı sağlıklı topluma nazaran artmıştır (27). Penisilin profilaksisi ve kapsüllü organizmalara karşı geliştirilen aşılar ile OHA'lı hastalarda bu suşların görülmesi azalmıştır.

Salmonella enfeksiyonu sıklığı OHA'lı hastalarda normal popülasyona göre göre 25 kat artmış olup, OHA'lı hastalarda en sık osteomyelit etkenidir (28).

Parvovirüs B19 enfeksiyonu eritroid seri üretimini engelleyerek OHA'lı hastalarda aplastik krizi tetikleyebilir (29).

2.1.4.1.3. Akut Göğüs Sendromu (AGS)

AGS, OHA'lı hastalarda sık görülen bir komplikasyon olup, akut akciğer hasarının bir formudur (30). OHA hastalarında ateş, göğüs ağrısı, öksürük, takipne, dispne gibi semptom ve bulgularla akciğerlerde yeni infiltrasyon artışının olması ile prezente olur. Pulmoner vasküler oklüzyon AGS'nin patogenezinde temel rol oynar. Akciğerlerde mikrovasküler sistemde endotel disfonksiyonu ile damar adezyon molekülleri üretimi artar, platelet ve plazma koagülasyon aktivasyonu ve azalmış NO düzeyi akciğerlerde hemoliz ve infarktlara neden olur. Deoksijene akciğerlerde eritrositlerdeki HbS polimerize olarak eritrositlerde oraklaşmayı arttırarak; mikrovasküler ortamda vazo-oklüzyon, iskemi ve endotel hasarı meydana gelir (31). Akciğer infarktına bağlı olarak, hipoksemi, ventilasyon-perfüzyon bozukluğu, akut akciğer hasarı meydana gelir (32). AGS, gelişiminde pnömoniyi taklit edebilen bir komplikasyondur. Hafif hipoksemiden saatler içerisinde pulmoner yetmezliğe yol açabilen tablolar görülebilir. Enfeksiyonlar, yağ embolisi, hipoventilasyon AGS'yi tetikleyebilir (33,34). Tedavisinde oksijen desteği, antibiyotikler, yeterli hidrasyon, analjezik tedavisi ve kan transfüzyonu yer alır (35). Solunum yetmezliğine bağlı olarak ventilatör desteği gerekebilir. Hızlı progresyon ya da ciddi solunum yetmezliğinde hastalara exchange transfüzyon gerekebilir (36).

2.1.4.1.4. Priapizm

Priapizm, peniste istemsiz, uzun süre devam eden, ağrılı ereksiyondur. OHA'lı erkek hastaların yarısını etkilemektedir (37). Penis kan dolaşımında iskemik venooklüzyon sonucu gelişir. Tedavisinde analjezik kullanımı, yeterli hidrasyon önerilip, yanıt alınamayan vakalarda kan transfüzyonu, exchange transfüzyon, cerrahi tedaviler uygulanmaktadır (37). Tekrarlayan vakalar erektil disfonksiyona yol açabilir.

2.1.4.1.5. Santral Sinir Sistemi (SSS) Komplikasyonları

Felç (inme), serebral damarlarda tıkanıklık ya da kanam sebebiyle meydana gelir. OHA'lı hastalarda önemli bir morbidite nedenidir. OHA'lı hastalarda tedavi edilmediğinde 14 yaşa kadar çocukların yüzde 8'ini etkilemektedir (38). Geçirilmiş AGS , inme öyküsü olanlarda, hipertansif hastalarda, hemoglobin düşüklüğünde, α -talasemi varlığında, artmış hemolizde inme riski artmaktadır (39).

2.1.4.1.6. Akut Hematolojik Komplikasyonlar

2.1.4.1.6.1 Aplastik Kriz:

Genellikle çocukluk çağında görülüp, etken genelde parvovirüs B19'dur. OHA'lı hastalarda en sık akut hematolojik komplikasyondur (29). Parvovirüs B19 kemik iliğindeki eritroid seriye ait hücrelere direk toksik etki ile anemi oluşturur (40). Tedavisinde kan transfüzyonu yapılır. Hastalık genelde 10 gün içinde kendini sınırlasa da bazı hastalarda kemik iliği nekrozu nedeniyle kalıcı anemiye yol açabilir.

2.1.4.1.6.2. Splenik Sekestrasyon Krizi:

Dalak sekestrasyon krizi, genelde OHA'lı çocuk hastalarda görülen; dalakta masif ani büyüme, hemoglobin seviyesinde 2mg/dL'den fazla düşüş ile karakterize akut komplikasyondur. Oraklaşmış eritrositlerin dalağın kırmızı pulpasında birikimi ile dalak kan akımını drene eden ven tıkanır (41), kan dolaşımındaki eritrositler ise dalağa gelmeye devam eder ve dalakta ani, aşırı büyüme meydana gelir. Kanın dalakta göllenmesiyle de anemi meydana gelir. Tedavisinde kan transfüzyonu önerilir. Aneminin şiddetli düzeltilmesi dalakta sekestre olan kanın tekrar kan dolaşımına geçmesine yol açıp hiperviskozite yapabileceğinden (41) ; aşırı kan transfüzyonundan kaçınılmalıdır. Uzun dönem tedavisinde kan transfüzyonu ve splenektomi yer alır.

2.1.4.1.6.3. Hepatik Sekestrasyon Krizi:

Genelde OHA'lı çocuk hastalarda görülür. Oraklaşmış eritrositlerin karaciğerde sekestrasyonu ile karaciğerde ani, aşırı büyüme ve ağrı meydana gelir

(42). Kanın karaciğerde sekestre olmasına bağlı olarak anemi şiddetlenir. Tedavisinde kan transfüzyonu önerilir (43).

2.1.4.2. Kronik Komplikasyonlar

2.1.4.2.1 Büyüme ve Gelişme Geriliği

OHA'lı hastalarda çocukluk çağından itibaren büyüme ve gelişme geriliği başlar (44). Yaşıtlarına göre birçok hasta daha kısa boya, düşük kiloya sahip olup, puberte gecikir. Normal Hb konsantrasyonunun az olması, hızlı eritrosit yaşam döngüsü nedeniyle metabolik ihtiyacın artması etyolojide suçlanmaktadır (29,45).

2.1.4.2.2. Kemik ve Eklem Problemleri

2.1.4.2.2.1. Osteopeni ve Osteoporoz:

OHA'lı hastalarda osteopeni ve osteoporoz görülme sıklığı yüzde 72'lere kadar çıkmaktadır (46). Hastalarda kemik bozuklukları multifaktöriyeldir. Kemik iliği genişlemesi, kemik kortikalinde incelleme, hipogonadizm, aşırı demir yüküne bağlı kemiklerde demir birikimi, kalsiyum, çinko, vitamin-D eksiklikleri, azalmış fiziksel aktivite, düşük BMI, bazı genlerdeki polimorfizmler, kronik inflamasyon, kronik anemi, artmış protein döngüsü, oksidatif stres gibi faktörler OHA'lı hastalarda osteoporoza katkıda bulunur (47,48). Tedavisinde yeterli D-vitamini, kalsiyum alınması, inaktif hayat tarzından kaçınılması yer alır. OHA'lı hastalar osteoporoz riskinden dolayı hipogonadizm açısından takip edilmelidir. Belirli aralıklarla kemik dansitometri (DEXA) ile osteoporoz taranmalıdır.

2.1.4.2.2.2. Avasküler Nekroz (AVN)

AVN, OHA'lı hastalarda özellikle femur başında, humerus başında ve vertebralarda görülen sık bir komplikasyondur. Femur AVN'u görülme sıklığı OHA'lı hastalarda yüzde 2'den yüzde 17'ye kadar değişmektedir (49). OHA'lı hastalarda şiddetli ağrı ve morbidite sebebidir. Erken evre tedavisinde analjezik

ilaçlar, eklem koruyucu egzersizler yer alırken, ileri evre AVN’de tedavi total eklem replasmanıdır.

2.1.4.2.2.3. Radyografik Değişiklikler

OHA’lı hastalarda vertebraların orta kısımları iskemiden dolayı vertebraların kenarları kadar iyi beslenemez. Omurgalarda ‘balık-ağızı’ deformitesi oluşur. Panoramik radyografik görüntülemelerde çenede kemik trabekül boşluğunda artış, mandibular kemik gelişiminde bozulmalar görülebilir (50).

2.1.4.2.3. Merkezi Sinir Sistemi (MSS) Problemleri

HbSS fenotipi taşıyan OHA’lı hastalarda nörolojik defisit yapan serebrovasküler olay görülme sıklığı yaklaşık yüzde 11’dir (51). OHA’lı hastalarda görülen MSS komplikasyonları başlıca; kronik baş ağrısı, epilepsi, iskemik veya hemorajik inme, kronik anemiye bağlı kognitif bozukluklar (hafıza problemleri, dikkat, konsantrasyon, aritmetik, görsel-motor bağlantılar), hipoksi, sessiz infarktlar olarak sıralanabilir (29). OHA’lı hastalarda çocukluk çağından itibaren nörokognitif eksiklikler yapan sessiz infarktlar MR (manyetik rezonans) taramalarında görülmektedir.

2.1.4.2.4. Hepatobilier Problemler

OHA’lı hastalarda karaciğer problemleri karaciğer enzimlerinin hafif yüksekliğinden karaciğer yetmezliğine kadar değişebilmektedir. Oraklaşmış eritrositlerin intrahepatik kan dolaşımında bulunmasına bağlı hepatik hasar, kronik inflamasyon, tekrarlayan transfüzyonlara bağlı artan demir yükü, transfüzyonlarla ilişkili hepatit B ve C enfeksiyonları, hepatik sekestrasyon krizleri, kronik kolestaz; hastalarda görülen karaciğer hasarının sebepleridir (52).

Kronik hemolize bağlı bilirubin seviyelerinde artış, hastalarda safra taşı görülme sıklığını arttırır. Bilier karaciğer sirozu gelişebilir (52).

2.1.4.2.5. Pulmoner Problemler

Akciğer problemleri OHA'lı hastalarda önemli bir mortalite nedenidir. Artmış hava yolu reaktivitesi, nokturnal oksihemoglobin desaturasyonu, kronik pulmoner tromboemboli, pulmoner hipertansiyon (PHT) OHA'lı hastalarda görülen kronik pulmoner problemlerdir (53). Tekrarlayan akciğer infarktları, enfeksiyonlar PHT 'ye neden olur. PHT, solunum ve kalp yetmezliği yaparak OHA'lı hastalarda mortaliteyi artırır.

2.1.4.2.6. Nefropati

OHA'lı hastalarda nefropati çocukluk çağında başlamakta olup; tübüler defektler, hematüri, glomerülopati, proteinüri, son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) gelişebilmektedir. Erken dönemde hiperfiltrasyon, hipostenüri görülmekte olup, zamanla proteinüri, idrar asidifikasyon yeteneğinde bozulma, böbrek korteksinde skar ve son olarak SDBY gelişir (26). Böbreklerde vazo-oklüzyon, glomerül ve böbrek medullasında mikrosirkülasyondaki kronik iskemik süreç ve reaktif oksijen radikallerine bağlı doku hasarı hastalardaki nefropati gelişiminden sorumlu tutulmaktadır. OHA'lı hastalarda renal etkilenme genelde kronik böbrek hastalığı (KBH) olarak prezente olur ve OHA'lı hastaların %11,6'sında KBH geliştiği gösterilmiştir (54). Hipertansiyon böbrek hasarına bağlı zamanla gelişebilmektedir (55).

2.1.4.2.7. Retinopati

OHA'lı hastalarda retinopati, retinal damarlarda oklüzyon ve kronik inflamasyona bağlı meydana gelir ve kalıcı hasar oluşturabilir. Periferik arteriyel oklüzyonlar, arteriyovenöz anastomozlar, neovaskülarizasyon, vitreus hemorajileri, retina dekolmanı OHA'lı hastalarda görülen retina problemleridir (56). Proliferatif retinopati görme kaybıyla sonuçlanabilir.

Hifema, gözde ön kameradaki kanama olup ani körlüğe yol açabilen OHA komplikasyonudur (29).

2.1.4.2.8. Cilt Ülserleri

Cilt ülserleri genellikle malleol düzeyinde ve bacak distalinde görülür. OHA'lı hastalarda en sık görülen kutanöz problemdir (57). Risk faktörleri; 20 yaşından büyük olmak, HbF düşüklüğü, şiddetli anemi, antitrombin-3 eksikliği, bazı HLA allelleri, bacak ülseri öyküsü ve trombositozdur (57). Cildi besleyen küçük damarlardaki vazo-oklüzyon ve iskemi; kan dolaşımını bozarak ciltte nekroza yol açıp, ülserlere sebep olur (29). Tedavisinde istirahat, düzenli pansuman, yanıt alınamayan vakalarda exchange transfüzyon önerilmektedir.

2.1.4.2.9. Fertilite ve Gebelik

OHA'lı erkeklerde infertilite kadınlara nazaran daha sık görülür. Hipogonadizm, sperm anormallikleri, priapizme bağlı erektil disfonksiyon OHA'lı erkeklerde fertiliteyi olumsuz etkiler. OHA'lı erkeklerin %24'ünde hipogonadizm görülmektedir (58).

OHA'lı kadınlarda normal popülasyona göre infertilitede artış yoktur (59) ancak gebelik sürecinde topluma nazaran maternal ve fetal risk artmıştır. Anemi, idrar yolu enfeksiyonları, tromboz riski ve gebelikte 3.trimesterde akciğer, kalp problemleri, preeklampsi riski topluma nazaran artmıştır (29).

2.1.5. Tanı

Orak hücreli anemi hastalığı tanısı koymak için hastanın etnik kökeni, ailesinde hemoglobinopati varlığı, kan transfüzyon öyküsü, hastada şikayetlerin ne zaman başladığı, hastanın büyüme ve gelişimi ile ilgili incelemeler yapılmalıdır. Fizik muayenede hemolitik anemi bulguları olarak, sarılık, solukluk, hepatomegali, splenomegali, taşikardi gibi özelliklere dikkat edilmelidir. Hastaların periferik yaymasında orak şeklini almış eritrositler bulunur. Hastaların hemogramında normokrom normositer anemi, RDW yüksekliği, retikülositoz görülür. Kan biyokimyasında indirek bilirubinemi, LDH (laktat dehidrogenaz) yüksekliği görülür.

Orak hücreli anemi hemoglobinopati olduğundan hemoglobin elektroforezi ve oraklaşma testi tanıda yardımcıdır. Elektroforez, en yaygın Hb molekülleri olan HbF, HbA, HbA2, HbS, HbC gibi hemoglobinleri ayırır. Az görülen bazı hemoglobinleri bazı hemoglobin türlerinden ayırmak zordur, (örneğin HbS'yi HbD ve HbG'den; HbC'yi HbE ve HbArab'tan) bu durumlarda HPLC (Yüksek Performans Likit Kromatografi) yöntemi kullanılabilir (60). Doğum öncesi amniyosentez ve koryonik villus örnekleme ile PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile de hastalığın tanısı konulabilir.

2.1.6. OHA' da Tedavi Stratejileri

OHA'da tedavinin temel prensipleri; HbF üretimini arttırmak, kan transfüzyonu, akut ve kronik komplikasyonların yönetimi ve gen tedavisidir (26).

Hidroksiüre, gama globin gen ekspresyonunu artırarak HbF üretimini artırır. HbF üretiminin artmasıyla HbS konsantrasyonu azalarak oraklaşmanın azalması sağlanır (61,62). Hidroksiürenin vazoklüziv ağırlı kriz sıklığının, AGS, daktilitin azalmasında, hastaneye yatışların azalmasında etkili olduğu gösterilmiştir (63).

Eritrosit transfüzyonu, akut ve kronik komplikasyonların tedavisinde kullanılmaktadır (64). Transfüzyon OHA'da aneminin şiddetini azaltır ve endojen eritrosit üretimini baskılar (64). Kronik transfüzyonlar, karaciğerde demir birikimine yol açabilir. Demir birikimi olan hastalarda şelasyon tedavisi gerekebilmektedir (65).

L-glutamin; oraklaşmış eritrositlerin oksidatif hasara olan duyarlılığını azaltan bir ajan olup (66); hidroksiüre kullanan hastalarda yapılan bir çalışmada ağırlı kriz sıklığını ve hastaneye yatışı azalttığı gösterilmiştir (67).

Hematopoetik kök hücre transplantasyonu, OHA'da tek küratif tedavidir (65,68). Tekrarlayan AGS epizodları, serebrovasküler hastalıklar, tekrarlayan vazoklüziv ağırlı krizler, kronik böbrek hastalığının geliştiği hastalarda tedavi seçeneği olup; pediatrik yaş grubunda başarı şansı daha fazladır (69).

Krizanlizumab, p-selektine bağlanarak lökosit ve eritrositlerin damar endoteline adezyonunu inhibe eden insan monoklonal antikordur (65). Çalışmalarda

hidroksiüre kullanan ve kullanmayan hastalarda vazooklüziv ağırlı kriz epizodlarını ve şiddetini azalttığı gösterilmiştir (66).

Vokselotor, hemoglobinin α zincirine bağlanarak hemoglobin polimerizasyonunu hedef alan bir ajandır (70). Hemoglobinde oksijen affinitesini arttırarak, deoksijene HbS polimerizasyonunu azaltır (70). Randomize çift körlü faz 1 ve faz 2 çalışmalarında hemolizi azalttığı ve hemoglobin seviyesini arttırdığı gösterilmiştir (71).

OHA tedavisinde son dönemlerde genom yeniden düzenleme amaçlı çalışmalar sürmektedir (72).

Çinko eksikliği OHA'lı hastalarda büyüme, gelişme geriliği ve oraklaşmaya sebep olduğundan hastalara çinko desteği sağlanmalıdır (73).

2.1.7. İnsan Gen Çalışmaları

İnsan Genom Projesi (İGP) ile insan genomunun gen haritası çıkarılarak ; birçok hastalığın temelinde rol oynayan genetik faktörlerin anlaşılabilmesi , tedavisi olmayan genetik hastalıklara yatkınlığı, sorumlu genlerin yerlerini, yapılarını belirlemek amaçlanmıştır (74). Hastalıkların anlaşılabilmesi için farklı türde gen bazlı çalışmalar yapılmaktadır. Bunlar; genetik-epidemiolojik çalışmalar, aday gen bazlı çalışmalar, genom bazında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), derin DNA dizileme (ChIP tahlilleri ve ardından büyük dizileme) çalışmalarıdır.

2.1.7.1. Genetik-Epidemiolojik Çalışmalar

Aile temelli, soyağacı yapısı içeren kardeş ve ikiz çift çalışmalarıdır. Bu çalışmalarda kalıtsal bir fenotip ile bağlantıyı tanımlamak için düşük sayıda genetik belirteç kullanır. Çalışmanın yapılması için düşük sayıda örnek yeterlidir. Çoklu gen içeren hastalıklarda, çevresel faktörlere bağlı aile kümelenmelerinde, genetik mutasyon ve polimorfizmlerin görülme oranının yüksekliğinde bu çalışmalar yetersiz kalır (2) .

2.1.7.2. Aday Gen Bazlı Çalışmalar

Fenotipi etkileyen yeni mutasyonlar ve değişken SNP (Single Nükleotid Polimorfizm)' ler, kontrol ve vaka gruplarında taranır. Temel PCR teknikleriyle yapılabilmesi bu çalışmaları avantajlı kılar. Hastalık patogeneğinde rol oynadığı bilinen birkaç gen / protein varsa çoklu testin gerekli olması ve çoklu testlere bağlı yanlış pozitiflik oranını artması, küçük allel frekansı ve istatistiksel güce bağlı olarak ihtiyaç duyulan örnek sayısının (yüzler ile binler arasında) artması bu çalışmaların dezavantajıdır (2).

2.1.7.3. Genom Bazında İlişkilendirme Çalışmaları (GWAS)

Yüksek çözünürlüklü genetik haritada genetik varyasyonların milyonlarcasının DNA dizilerini eşleştirmek ve karşılaştırmak için kullanılır. Hastalıklarla ilgili kodlanmayan bölgelerin identifikasyonu, bir hastalığın oluşumunda etkisi olan bir geni saptamada, hastalık için düşük rölatif genetik riske sahip genetik varyantın saptanmasında bu çalışmalar kullanılır. Yüksek örnek sayısına (binlerce, onbinlerce) ihtiyaç duyulması, yanlış pozitiflik oranının yüksek olması bu çalışmaların dezavantajlarıdır (2).

2.1.7.4. Derin DNA Sıralamaları

ChIP dizilimi (ChIP-Seq); kromatin immünopresipitasyon (ChIP) tahlillerini dizileme ile birleştirerek, transkripsiyon faktörleri ve diğer proteinler için genom çapında DNA bağlanma bölgelerinin belirlenmesi için güçlü bir yöntemdir. ChIP protokollerini takiben, DNA'ya bağlı protein, spesifik bir antikor kullanılarak immüno-çökeltirilir. Bağlı DNA daha sonra birlikte çökeltirilir, saflaştırılır ve dizilenir (2).

2.1.8. Genetik Faktörlerin OHA Komplikasyonlarıyla İlişkisi

Moleküler biyolojideki gelişim, hastalığın klinik yansımasındaki farklılıklardan birçok genin sorumlu olduğunu göstermektedir. Genetik kalıtım gösteren hemoglobinopatilerde görülen fenotipik farklılıkların temelinde birçok

farklı gen ve aynı gen içindeki polimorfizmlerin olduğu saptanmıştır. OHA, monogenik kalıtılan bir hemoglobinopati olmasına rağmen, hastalarda fenotipik farklılıklar geniş bir heterojenite barındırır. Farklı genlerdeki polimorfizmler OHA'lı hastalarda komplikasyonların görülmesini, sıklığını, şiddetini, hidroksiüre tedavisine yanıtı etkileyerek morbidite ve mortaliteyi etkiler. OHA'lı hastalarda α -talasemi varlığı, β -globin gen kümesinin haplotipleri ve pek çok tek nükleotid polimorfizm (SNP) leri fenotipik farklılığa katkıda bulunur (2).

2.1.8.1. OHA'lı Hastalarda α -Talasemi Geni Varlığı

α -Talasemi taşıyıcılığı OHA'lı hastalarda fenotipik farklılıklara sebep olur. Bu hastalarda ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) düşük olup; oraklaşma ve hemoliz azalmış, HbF konsantrasyonu artmıştır (75,76). Buna bağlı olarak retikülosit sayısı ve plazma laktat dehidrogenaz (LDH) seviyesi α -talasemi taşıyıcısı olmayan OHA'lı hastalara göre daha düşüktür.

2.1.8.2. OHA'lı Hastalarda Beta-Talasemi Geni Varlığı

HbS- β talaseminin klinik özellikleri, tamamen asemptomatik bir durumdan homozigot orak hücre hastalığına benzer ciddi bir bozukluğa kadar son derece değişkendir (77). Bu heterojenliğin farklı β -talasemi allellerinin varlığından veya α -talasemi gibi modüle edici genetik faktörlerle ve/veya HbF üretimini arttıran bir genle etkileşiminden kaynaklanması muhtemeldir (78). Homozigot HbS ve HbS- β -talasemi hastalarında AGS, hemolitik kriz, splenik sekestrasyon ve kan transfüzyon sıklığı benzerdir. Vazo-oklüziv kriz sıklığı ve hastanede yatış süresi HbSS genotipinde HbS- β -talasemi hastalarına nazaran artmıştır (79).

2.1.8.3. OHA Komplikasyonlarıyla İlişkili Diğer Genetik Faktörler

2.1.8.3.1. Vazo-Oklüziv Olay Gelişiminde Genetik Faktörler

Orak hücre ağırlı epizodların klinik şiddetini etkilediği açıklanan ilk genetik özellik, HbF seviyesidir. Yüksek HbF seviyeleri daha düşük kriz insidansı ve

dolayısıyla daha düşük mortalite ile ilişkilidir (80). Orak hücre α -talasemi birlikteliği olan hastalarda HbF seviyesi daha yüksek olmayıp; hemoglobin konsantrasyonu artmıştır. Bu kan viskozitesini yükselterek, bazı vazo-oklüziv olayların olasılığında artışa sebep olsa da yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar vardır (81,82,83). CYP2D6 geninin bazı polimorfizmleri, kodeinin morfine metabolizasyonunun azaltarak; çocuklarda ağrılı kriz için kodein tedavisinin başarısızlığı ile ilişkilendirilmiştir (84).

MBL2 genindeki polimorfizmler OHA'lı çocuklarda vazo-oklüziv olaylarla ilişkili bulunmuştur. Serum mannoz bağlayıcı lektin (MBL) seviyesinin düşüklüğüne yol açan genotipler ağrılı kriz sıklığında artış ile ilişkilendirilmiştir (85,86).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ; arter, ven ve lenfatiklerden üretilerek vasküler endotel hücreleri için mitojen etki yapar (87). Endotel hücrelerinde proliferasyonu uyarır, kemoatraksiyon, ve endotelde integrin ekspresyonunu regüle eder (88,89). Vasküler geçirgenliği arttırarak endotel düzeyinde inflamasyona katkıda bulunur (90). ICAM-1 ve VCAM-1' in endotelden ekspresyonunu uyararak, endotel adezyonunu arttırır (91,92). OHA'lı hastalarda endotel hücrelerinde artmış antiapoptotik etkiden VEGF'nin sorumlu olduğu gösterilmiştir (93).

Vazooklüziv ağrılı kriz ataklarında VEGF düzeyinin arttığı gösterilmiştir (94). VEGFA geninin rs2010963, rs833068 ve rs3025020 polimorfizmleri ile vazooklüziv kriz arasında pozitif korelasyon bulunmuş olup; OHA'lı hastalarda rs2010963, rs833068 genotiplerinde serum VEGF düzeyinde artış saptanmıştır (5). Pediatrik hastalarda VEGFA -583C>T (rs3025020) ile AGS arasında ilişki bulunmuş olup; (minör) -583T alleli ile -583T/T allelinin AGS riskini arttırdığı saptanmıştır (95).

Akut göğüs sendromu (AGS), mortalitesi yüksek bir vazo-oklüziv kriz olup, gelişimi multifaktöriyeldir. TGFBR3 ve SMAD7 gibi genlerdeki polimorfizmlerin AGS oluşumu ile ilişkili olduğu bulunmuş olup; TGF- β gen yolağı AGS patogenezinde rol oynamaktadır (96).

PIK3CG geni; hücre-hücre adezyonunda rol alan PI3K/PI4K ailesinden olup, OHA'lı çocuklarda AGS ile ilişkili SNP'ler içermektedir. Büyük çocuklar ve yetişkinlerde SMAD1, NrCAM, SMAD3, Klotho (KL) ve STARD13 genlerindeki polimorfizmler AGS ile ilişkili bulunmuştur. Klotho proteini, KL gen tarafından kodlanıp, β -glukosidaz benzeri proteindir, endotel tarafından NO üretimini uyarır. Üretimini etkileyen polimorfizmler mikrosirkülasyondaki oksidatif stresi etkileyerek AGS gelişimini etkileyebilir (97). NO sentaz enzimini kodlayan eNOS geninin T-786C polimorfizmi OHA'lı kadın hastalarda AGS sıklığında artışla suçlanmaktadır (98). Endotelin-1 (ET1) geninin T8002C polimorfizminin CC genotipi, AGS riskinde artış ile ilişkilendirilmiştir (99).

2.1.8.3.2. Avasküler Nekroz (AVN) Gelişiminde Genetik Faktörler

OHA'lı hastalarda AVN patogenezi net anlaşılamamış olup, hiperkoagülabilité ve doku hipoksisi AVN oluşumunda rol alır. Trombofilik mutasyonların varlığı AVN gelişimine katkı sağlar. 5,10-metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimini kodlayan MTHFR geninin C677T polimorfizmi AVN gelişim riskini artırır (100). Platelet adezyonu OHA'da vazo-oklüzyonda rol oynar. Platelet glikoproteinleri kodlayan genlerdeki polimorfizmler oklüziv arteriyel hastalıkla ilişkilidir. Bir çalışmada insan platelet antijeni-5 (HPA-5B) allelinin osteonekroz, priapizm, stroke, AGS ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (101).

α -talasemi varlığı OHA'lı hastalarda osteonekroz riskini artırır (102). Hematokritin homozigot HbS hastalarına göre daha yüksek olduğu HbS- β^+ Talasemi ve HbSC genotipine sahip hastalarda avasküler nekroz sıklığı HbS hastalarına kıyasla artmış olup, daha erken yaşta ortaya çıkar (103). ANXA2 rs7170178 gen polimorfizminin OHA'da osteonekroz riskini arttırdığı gösterilmiştir (104).

ANXA2 proteini kalsiyum bağımlı fosfolipid bağlayıcı bir protein olup, hücre büyümesi ve sinyal iletim yollarında görev alır. Kemikte alkalen fosfataz (ALP) aktivitesinde görev alarak kemik mineralizasyonuna katkı sağlar. Hipoksiye nöronal yanıtta görev alır (105). ANXA2 proteinini kodlayan ANXA2 geninde 6 SNP, osteonekroz ile ilişkili bulunmuştur (106). Osteonekroz gelişen ANXA2*5681

rs7170178 AA genotipine sahip OHA'lı hastalarda; genotipi AA olmayan hastalara göre osteonekroz riskinin arttığı gösterilmiştir (107).

TGF- β /SMAD/BMP yolağında tip2 ve tip3 TGF- β reseptör (TGFR2 ve TGFR3) genlerindeki SNP'ler AVN riski ile ilişkilendirilmiştir (106). BMP (Kemik Morfogenik Protein) 'ler BMP6 dahil olmak üzere TGF- β ve aktivinlerle ilişkili pleiotropik salgılanan proteinlerdir. BMP6, inflamatuvar süreçlerde yer alıp, paratiroid hormonu (PTH) ve D-vitamini ile birlikte kemik gelişiminin indüklenmesinde ve kırıkta gelişiminde rol oynamaktadır. AVN'de artiküler kırıkta dejenerasyonu görüldüğünden BMP6 genindeki 5 SNP; AVN gelişimiyle ilişkili bulunmuştur (106,108).

2.1.8.3.3. İnme (Stroke) Gelişiminde Genetik Faktörler

İnme, OHA'lı hastalarda görülme sıklığı % 5 ile % 10 arasında olan bir komplikasyondur (51). Birçok genetik faktör; OHA'lı hastalarda inme gelişimini etkiler. Bazı HLA (İnsan Lökosit Antijeni) tipleri serebrovasküler olay için risk barındırmaktadır. HLA sınıf 1 ve HLA sınıf 2 OHA'lı hastalarda inme fenotipinin genetik modülasyonuna katkı sağlamakta olup; farklı HLA allelleri inme riskinde artıştan sorumludur (109). ANXA2 rs11853426 genotipine sahip pediatrik hastalarda inme riski artmaktadır (110).

2.1.8.3.4. Biliyer Genetik Faktörler

OHA'lı hastalarda kronik hemolizden dolayı safra taşı sıklığı artmıştır. OHA'lı hastalardaki çalışmalar, bilirubin konjugasyonunda görevli üridindifosfat glukuronoziltransferaz 1A enzimini kodlayan UGT1A geninin promotor bölgesindeki polimorfizmin safra taşı oluşumuyla ilişkili olduğunu göstermiştir (111). UGT1A geni promotor bölgesinde TA tekrarlarının sayısının serum bilirubin seviyeleri üzerinde önemli bir etkisi olduğu gösterilmiştir (112,113). UGT1A geni için (TA)₇ alleleline sahip OHA'lı hastalarda daha erken yaşta safra taşı oluşumu ve artmış safra taşı insidansı saptanmış ve (TA)₇ alleli semptomatik biliyer hastalığı olan erişkinlerde daha yüksek kolesistektomi riski ile ilişkilendirilmiştir (114).

OHA'lı hastalarda α -talaseminin varlığı hemolizi azaltır ve bu nedenle bilirubin seviyelerini düşürebilir, ancak safra taşı oluşum sıklığını azalttığına dair veriler çelişkilidir (114,115).

2.1.8.3.5. Renal Komplikasyonlarla İlişkili Genetik Faktörler

Bir çok renal komplikasyon OHA'lı hastalarda görülebilmektedir. OHA'lı hastalarda TGF- β /BMP yolağında, TGFBR1 genindeki polimorfizmlerin glomerüler filtrasyon hızı (GFR) üzerinden OHA nefropatisi gelişimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (116).

BMP reseptör 1B (BMPR1B) genindeki bazı polimorfizmlerin glomerüler filtrasyon hızı üzerinden OHA nefropatisi için risk faktörü olduğu gösterilmiştir (116).

VEGF geninin promotör bölgesinin -2549 pozisyonunda 18 bp insersiyon-delesyon (I/D) polimorfizminin OHA'lı hastalarda VEGF düzeyini arttırarak nefropati riskini arttırdığı gösterilmiştir (117).

2.1.8.3.6. Bacak Ülserleri ile İlişkili Genetik Faktörler

HbSC, HbS- β , HbS- α -genotipine sahip OHA'lı hastalarda homozigot HbS hastalarına göre daha az hemoliz mevcut olup, bacak ülserleri daha az oranda görülür (118). KL genindeki rs685417 ve rs516306 polimorfizmleri bacak ülserasyonu ile ilişkilendirilmekle birlikte AGS, inme, osteonekroz, priapizm gelişiminde de rol alırlar (119).

TGF- β süperaillesinin üyeleri; SMAD sinyal yoluyla hücre proliferasyonu, inflamasyon, doku hasarına yanıtta görev alan MAP kinaz aktivasyonu yapar. Bu yolda reseptör kodlayan TGFBR2, TGFBR3, BMPR1B, BMP6 genleri, sinyal iletim proteinlerini kodlayan SMAD7, SMAD9, SMURF1 genleri OHA'lı hastalarda bacak ülseri riskini arttıran SNP'ler barındırır (119).

2.1.8.3.7. Pulmoner Hipertansiyon (PHT) İle İlişkili Genetik Faktörler

PHT, OHA'lı hastalarda önemli bir mortalite sebebidir. HbSC ve HbS- β -talasemi genotipine sahip hastalarda hemoliz; homozigot HbS hastalarına göre daha düşük olduğundan PHT riski daha düşüktür (120). Klotho (KL) ve TEK geni ile TGF- β /BMP yolağına ait Aktivin Reseptör Benzeri Kinaz 1 (ACVRL1), BMPR2 , BMP6 proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar PHT riskinde artışla ilişkili bulunmuştur (121,122,123).

Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimini kodlayan eNOS geni 786T>C polimorfizmi vazo-oklüziv olaylarla ilişkili bulunsa da PHT riskini arttırdığına dair sonuçlar çelişkilidir (123).

NEDD4L geninin intron 1 bölgesindeki SNP'ler, OHA'lı hastalarda serumda N-terminal-pro-brain natriüretik peptid (NT -pro-BNP) artışı ile ilişkilidir. Artmış NT-pro-BNP seviyeleri yüksek mortalite ve PHT gelişimi ile ilişkili bulunduğundan NEDD4L geni PHT patogenezinde suçlanmaktadır (124).

Sitokrom c5-redüktaz (CYBR5) enzimi, eritrositlerde membran bağlı bir mikrozim olup, yağ asidi desatürasyonu ve ilaç metabolizmasında, anti-oksidan yollarda görev alır. Enzimi kodlayan CYBR5 geninde T116S mutasyonu varlığında OHA'lı hastalarda hemolizde ve triküspit kapak yetmezliğinde azalmaya bağlı olarak PHT riskinde düşüş gözlenmiştir (125).

2.1.8.3.8. Priapizm İle İlişkili Genetik Faktörler

Priapizm gelişiminde birçok gen suçlanmaktadır. KL genindeki iki SNP'nin (rs211239 ve rs211234) G/G haplotipleri priapizm ile ilişkili bulunmuştur (126). TEK, TGFBR3, ITGAV, AQP1 ve F13A1; priapizm ile ilişkili bulunan diğer genlerdir. AQP1 geni eritrosit membranında su kanalı olarak görev yapan aquaporin-1 proteinini kodlar. Aquaporin-1 hücre volümünde ve eritrosit membranından karbondioksit geçirgenliğinde rol oynayarak oraklaşmaya etki eder (127,128).

Faktör XIII α -altbirimindeki (F13A1) bazı polimorfizmler priapizm ile ilişkili bulunmuş olup; aynı gen iskemik stroke riskinde artışla da ilişkilidir (129). İnsan

platelet antijen-5 gen (ITGA2) polimorfizmleri de priapizm ile ilişkili bulunmuştur (101).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamız Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Araştırma Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı tarafından prospektif bir çalışma olarak planlanmıştır. Çalışmaya HMKU Etik Kurulu (Karar No: 01 03/09/2020) onayı ile Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hastanesi Hematoloji Polikliniği'ne başvuran, yaşları 18 ve üzeri olan, HbSS genotipine sahip 89 OHA hastası ve kontrol grubu olarak 100 sağlıklı birey olmak üzere toplam 189 birey dahil edilmiş, 18 yaşın altında olanlar, engelliler, gebeler ve imza yetkisi olmayanlar dışlanmıştır.

OHA tanıli hastalar: Grup 1

Sağlıklı kontrol grubu: Grup 2 olmak üzere 2 gruba ayrıldı.

Orak hücreli anemi hastaları ve kontrol grubu 18-75 yaş aralığında seçildi. Diabetes mellitus, hipertansiyon, aktif enfeksiyon ya da inflamasyon bulguları olanlar, gebeler ve imza yetkisi olmayanlar çalışmaya alınmadı.

Çalışmaya katılan tüm bireylerin anamnezleri alındı, fizik muayeneleri yapıldı ve OHA'lı hastaların hidroksiüre, folik asit, çinko, asetil salisilik asit kullanımı ve OHA komplikasyonları açısından verileri toplandı.

Hemogram, C-Reaktif Protein (CRP) ve biyokimyasal analizler (LDH, ferritin, b12, folat) yapıldı. Elde edilen veriler OHA hasta grubu ve sağlıklı gönüllüler için kıyaslandı.

3.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu ticari kit (Thermo; GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Catalog number: K0721) kullanılarak yapıldı. Kitin İçeriği tablo 1 de gösterilmiştir.

Tablo 1. DNA izolasyonunda kullanılan kit içeriği

GeneJET Genomic DNA Purification Kit	#K0721 50 preps
Proteinase K Solution	1.2 ml
RNase A Solution	1 ml
Digestion Solution	11 ml
Lysis Solution	24 ml
Wash Buffer I	10 ml
Wash Buffer II	10 ml
Elution Buffer (10 mM Tris-Cl, PHT 9.0, 0.5 mM EDTA)	30 ml
Collection Tubes (2 ml)	50
Collection Tubes (1.5 ml)	50

Hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerden DNA izolasyonu için alınan her bir kan örneği için 2 ml'lik santrifüj tüpleri etiketlendi ve aşağıdaki kit protokolü uygulandı.

Protokol

- 500 µl olacak şekilde 2ml'lik santrifüj tüpüne konulan her bir kan örneğinin üzerine 800 µL Lysis solüsyonu eklendi. Yavaşça vortextlendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Tüplerin kapakları kapatılarak 2000 xg'de 3 dakika santrifüj edildi. Pellet leylak renginde olacak şekilde bir önceki adım tekrarlandı.
- Üzerine 200 µL Elüsyon Tamponu ve 500 µL TBM tamponu eklendi ve şiddetli bir şekilde vortekslendi. Üzerine 3 µL Proteinaz K eklendi ve 55 C°'de 30 dakika inkübe edildi.
- Inkübasyon tamamlandıktan sonra 2500 xg'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant başka bir 2 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılarak üzerine 260 µL soğuk absolute etanol eklendi.
- Elde edilen karışım 2 mL'lik Collection tüpteki kolona aktarıldı ve 8000 xg'de 2 dakika santrifüj edilerek kolonun altında kalan akış uzaklaştırıldı.
- 500 µL Wash Buffer I eklendi ve 8000 xg'de 1'er dakika iki kez santrifüj edildi.
- 500 µL Wash Buffer II eklendi ve 8000 xg'de 1'er dakika iki kez santrifüj edildi.

- Kolon temiz bir 1.5 mL'lik santrifüj tüpüne alındı ve kolonun ortasına 50 µL Elüsyon Tamponu eklenerek 37 C°'de 2 dakika inkübe edildi.
- DNA'yı kolondan ayırmak için 8000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüplerindeki izole DNA örneklerinin konsantrasyonu ve A260/A280 absorbands oranı nükleik asit ölçer (Thermo, Multiskan GO) ile belirlenerek Real-Time PCR deneyleri için kullanıldı.
- Real-Time PCR deneyleri için izole edilen DNA örnekleri 4 ng/µL olacak şekilde dH₂O ile dilüe edilerek seyreltildi.

3.3. Real-Time PCR ile Genotipleme

Genotipleme elde edilen DNA'lar kullanılarak Real Time PCR ile yapıldı. Çalışmada eNOS (rs2070744), VEGF-A (rs2010963) ve ANXA (rs1033028) gen polimorfizmlerinin genotiplenmesinde bu SNP'lere özgü assay kitleri kullanıldı (Thermo Fisher,4351379.rs2070744,NOS3 rs2070744 Taqman SNP Assay 300 rxn; Thermo Fisher,4351379.rs2010963,VEGFA rs2010963 Taqman SNP Assay 300 rxn; Thermo Fisher,4351379.rs1033028,ANXA2 rs1033028 Taqman SNP Assay 300 rxn). Kit içindeki Thermo Taqman Assay stok 40X SNP serileri 1:1 seyreltilerek 20X dilüsyonda kullanıldı.

Tablo 2. PCR'da kullanılan kit içeriği

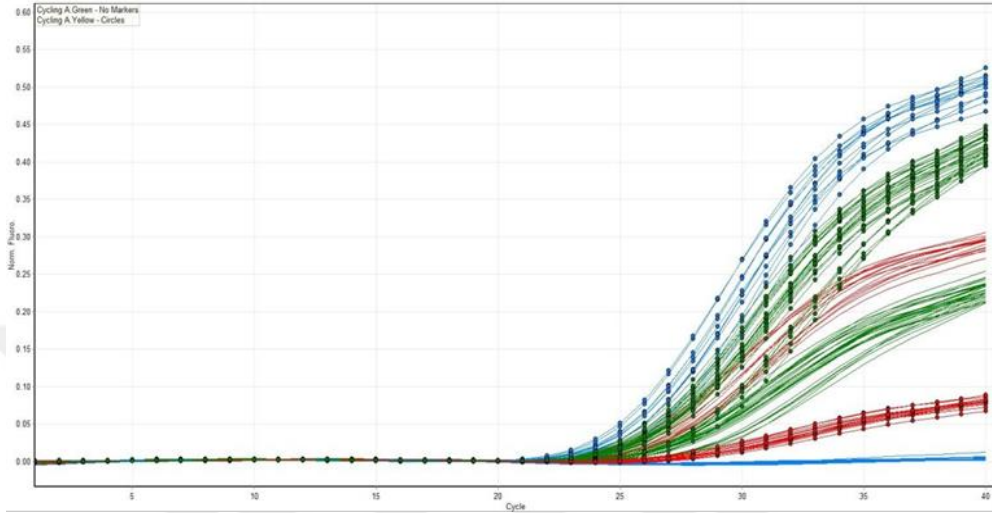
Bileşen	20µL/reaksiyon
5X HOT FIREPol Probe Universal qPCR Mix	4 µL
Prob	0.4 µL
Kalıp DNA	5 µL
dH ₂ O	11 µL
Total	20 µL

Protokol

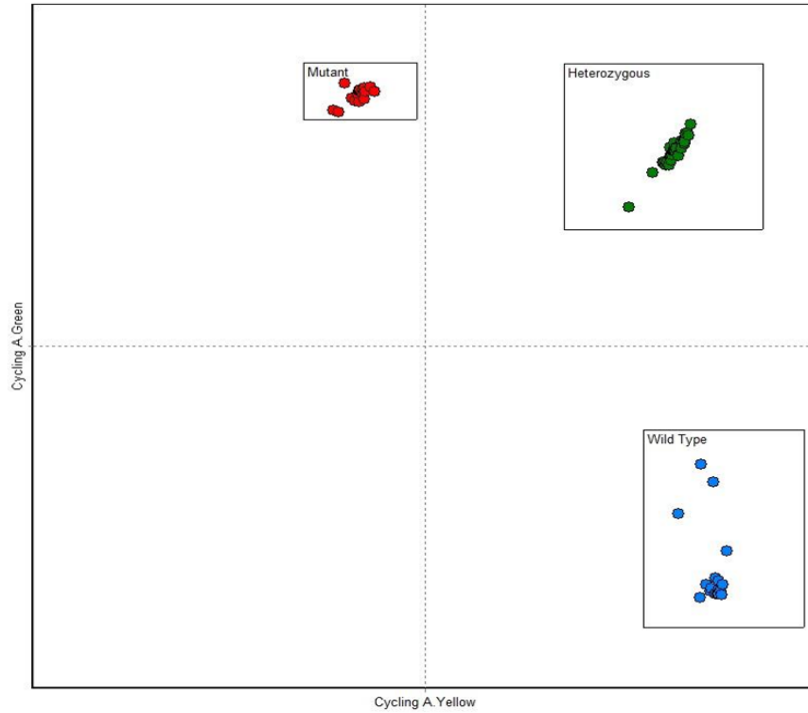
- Her bir örnek tüpüne 4 µL 5X HOT FIREPol Probe Universal qPCR Mix, 0.4 µL Prob, 11 µL dH₂O ve 5 µL DNA örneği eklenerek tüplerin kapakları kapatıldı.
- Tüpler cihaza yerleştirilerek aşağıda verilen koşullarda PCR gerçekleştirildi.

Tablo 3. PCR’ da kullanılan sıcaklık, zaman, döngü sayıları

Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
95 °C	10 dakika	1
95 °C	20 saniye	40
60 °C	60 saniye	40



Şekil 4. OHA'lı hastalarda ANXA2 rs1033028 polimorfizminin Real-time PCR ile genotiplemesi. (Mavi renk wild tip , yeşil renk heterozigot, kırmızı renk mutant genotipe sahip örneklerin dağılımını göstermektedir.)



Şekil 5. OHA'lı hastalarda ANXA2 rs1033028 polimorfizminin PCR ile genotiplere göre dağılımı

İstatistik analizleri

Elde edilen tüm değişkenler önemlilik testlerine geçilmeden önce normallik yönünden Kolmogorov-Smirnov testi ile, varyansların homojenliği yönünden ise Levene testi ile incelendi. Demografik veriler ve kan parametreleri için sırasıyla frekans tablosu ve tanımlayıcı istatistikler hesaplandı. Kan parametrelerinin gruplar arasındaki farklılığı Mann- Whitney U testi kullanılarak belirlendi. Komplikasyon, kontrol ve hasta gruplarının genotiplerle ilişkisi ki-kare testi ile araştırıldı. Tüm istatistiksel analizler %5 hata payı ile incelendi. Tüm analizler IBM SPSS 23.0 istatistik paket programı aracılığı ile gerçekleştirilmiş olup; $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Çalışmamıza 89 OHA tanılı hasta ve 100 sağlıklı kontrol olmak üzere 200 kişi dahil edilmiştir. Çalışmaya katılanlar;

OHA tanılı hastalar: Grup 1 olarak; Sağlıklı kontrol grubu : Grup 2 olmak üzere 2 gruba ayrıldı.

Tablo 4 incelendiğinde Grup 1’de 48 erkek ve 41 kadın , Grup 2’de 55 erkek, 45 kadın çalışmaya katılmıştır. Grup 1’in yaş ortalaması ($34,83 \pm 10,71$), grup 2’de ($38,35 \pm 16,69$) olarak saptanmıştır.

Tablo 4. Grupların yaş ve cinsiyete göre dağılımları

		Grup 1		Grup 2	
		n (%)	Ort. $\pm$ SS	n (%)	Ort. $\pm$ SS
CİNSİYET	Erkek	48 (53,9)		55 (55)	
	Kadın	41 (46,1)		45 (45)	
YAŞ			$34,83 \pm 10,71$		$38,35 \pm 16,69$

Çalışmamızda Grup 1’in ortalama boy seviyesi ($168,96 \pm 7,21$) cm, ortalama kilo seviyesi ($64,01 \pm 8,38$) kg olup, eğitim durumları incelendiğinde % 34,8’i lise, % 28,1’i ortaokul, % 22,5’i ilkokul, % 14,6’sı üniversite mezunudur.

Tablo 5’te ikili karşılaştırma sonuçları incelendiğinde; WBC ortalama değerlerinin Grup 1’de ($13,11 \pm 8,87$) $10^3/\mu\text{l}$ ve Grup 2’de ($7,55 \pm 3,43$) $10^3/\mu\text{l}$ olup, Grup 1’in ortalama WBC düzeyinin Grup 2’den yüksek olduğu gözlenmiştir ($p=0,001$).

Platelet ortalama değerlerinin Grup 1’de ($388,16 \pm 213,72$) $10^3/\mu\text{l}$, Grup 2’de ($246,96 \pm 92,89$) $10^3/\mu\text{l}$ olup, Grup 1’in ortalama platelet düzeyinin Grup 2’den yüksek olduğu gözlenmiştir ($p=0,001$).

Ferritin ortalama değerlerinin Grup 1’de (1215,28 ± 1679,2) ng/ml, Grup 2’de (120,91 ± 206,63) ng/ml olup, Grup 1’in ortalama ferritin düzeyinin Grup 2’den yüksek olduğu gözlenmiştir (p=0,001).

CRP ortalama değerlerinin Grup 1’de (14,28 ± 30,81) mg/L , Grup 2’de (3,17 ± 3,93) mg/L olup, Grup 1’in ortalama CRP düzeyinin Grup 2’den yüksek olduğu gözlenmiştir (p=0,001).

LDH ortalama deęerinin Grup 1’de (612,65 ± 442,52) IU/L, Grup 2’de (207,77 ± 73,05) IU/L olup, Grup 1’in ortalama LDH düzeyinin Grup 2’den yüksek olduğu gözlenmiştir (p=0,001).

Vitamin B12 ortalama düzeyinin Grup 1’de (442,18 ± 283,32) pg/ml, Grup 2’de (491,16 ± 282,22) pg/ml olduğu gözlenmiş olup, vitamin B12 ortalama değerleri arasında Grup 1 ve Grup 2 arasında istatiksel olarak fark saptanmamıştır (p=0,316).

Ortalama folat düzeyinin Grup 1’de (15,75 ± 14,47) ng/ml, Grup 2’de (10,47 ± 8,73) ng/ml olduğu gözlenmiř olup, Grup 1’in ortalama folat düzeyinin Grup 2’den yüksek bulunduğu gözlenmiştir (p=0,007).

Tablo 5. Grupların kan değerlerinin analizi

	Grup 1	Grup 2	p
	Ort. ± SS(min-maks)	Ort. ± SS(min-maks)	
WBC (10 ³ /μl)	13,11 ± 8,87 (1,54 ± 73,31)	7,55 ± 3,43 (0,44 ± 25,29)	<0,001
Platelet (10 ³ /μl)	388,16 ± 213,72 (33,00 ± 1192,00)	246,96 ± 92,89 (60,00 - 547,00)	<0,001
Ferritin(ng/ml)	1215,28 ± 1679,2 (36,00 ± 7947,00)	120,91 ± 206,63 (3,50 - 1164,00)	<0,001
CRP (mg/L)	14,28 ± 30,81 (2,00 ± 171,00)	3,17 ± 3,93 (0,00 - 24,00)	<0,001
LDH (IU/L)	612,65 ± 442,52 (218,00 ± 2724,00)	207,77 ± 73,05 (118,00 - 548,00)	<0,001
B12 (pg/ml)	442,18 ± 283,32 (114,00 ± 2010,00)	491,16 ± 282,22 (158,00 - 1613,00)	0,316
Folat (ng/ml)	15,75 ± 14,47 (22,50 ± 95,00)	10,47 ± 8,73 (2,00 - 64,00)	0,007
HbS (%)	69,97 ± 16,26 (19,00 - 95,80)		-
HbF (%)	9,16 ± 6,56 (1,00 - 32,70)		-

Grup 1’de ortalama HbS yüzdesi ($69,97 \pm 16,26$) , ortalama HbF düzeyi ($9,16 \pm 6,56$) olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda Grup 1’in % 29,2’si hidroksiüre kullanmamakta olup; % 30’unun günlük 1500 mg, % 32’sinin günlük 1000 mg, % 1,1’inin günlük 500mg hidroksiüre kullandığı saptanmıştır.

Grup 1’de çinko kullanım sıklığının % 44,9 , folik asit kullanım sıklığının % 61, asetilsalisilik asit kullanımının % 11 olduğu saptanmıştır.

Tablo 6. Grup 1 ve Grup 2’de üç polimorfizme ait genotiplerin dağılımı

		Grup 1 n (%)	Grup 2 n (%)	*p
eNOS (rs2070744)	Wild tip (TT)	15 (16,9)	16 (16,0)	0,926
	Mutant (CC)	40 (44,9)	43 (43,0)	
	Heterozigot (TC)	34 (38,2)	41 (41,0)	
VEGF (rs2010963)	Wild tip (GG)	22 (24,7)	14 (14,0)	0,164
	Mutant (CC)	29 (32,6)	35 (35,0)	
	Heterozigot (GC)	38 (42,7)	51 (51,0)	
ANXA2 (rs1033028)	Wild tip (TT)	19 (21,3)	14 (14,0)	0,07
	Mutant (GG)	26 (29,2)	45 (45,0)	
	Heterozigot (TG)	44 (49,4)	41 (41,0)	
*: Ki-kare testine göre hesaplanmıştır.				

Tablo 6 incelendiğinde eNOS (rs2070744) polimorfizminin genotip dağılımları açısından Grup 1 ve Grup 2’de en çok mutant (CC), ikinci sıklıkla heterozigot (TC) ve en az sıklıkla wild tip (TT) genotipin görüldüğü saptanmış olup; iki grup arasında genotip dağılımları açısından fark saptanmamıştır ($p=0,926$).

VEGF rs2010963 polimorfizminin genotip dağılımları açısından her iki grupta en çok heterozigot (GC), ikinci sıklıkla mutant (CC) ve en az sıklıkla wild tip (GG) genotipin görüldüğü saptanmış olup; iki grup arasında genotip dağılımları açısından fark saptanmamıştır ($p=0,164$).

ANXA2 rs1033028 gen polimorfizminin genotip dağılımları açısından Grup 1’de en çok heterozigot (TG), ikinci sıklıkla mutant (GG), en az sıklıkla wild tip (TT) genotipin görüldüğü; Grup 2’de en çok mutant (GG), ikinci sıklıkla heterozigot (TG), en az sıklıkla wild tip (TT) genotipin görüldüğü saptanmış olup; iki grup arasında genotip dağılımları açısından fark saptanmamıştır ($p=0,07$).

Tablo 7’ye göre Grup 1’de eNOS rs2070744 polimorfizmi ile OHA komplikasyonları arasındaki ilişki incelendiğinde; komplikasyonların gelişimi ile rs 2070744’ün farklı genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 7. eNOS rs2070744 polimorfizminin OHA komplikasyonlarıyla ilişkisi

		Wild Tip n (%)	Mutant n (%)	Heterozigot n (%)	*p
Yıllık ağırlı kriz sayısı	<1	5 (17,2)	9 (31,0)	15 (51,7)	0,342
	1-2	5 (15,6)	18 (56,3)	9 (28,1)	
	>2	5 (17,9)	13 (46,4)	10 (35,7)	
AGS	Evet	0 (0,0)	6 (60,0)	4 (40,0)	0,290
	Hayır	15 (19,0)	34 (43,0)	30 (38,0)	
Serebrovasküler hastalık	Evet	1 (8,3)	5 (41,7)	6 (50,0)	0,567
	Hayır	14 (18,2)	35 (45,5)	28 (36,4)	
Osteoporoz	Evet	3 (13,6)	10 (45,5)	9 (40,9)	0,795
	Hayır	12 (17,9)	30 (44,8)	25 (37,3)	
AVN	Evet	6 (10,7)	25 (44,6)	25 (44,6)	0,081
	Hayır	19 (27,3)	15 (45,5)	10 (27,3)	
Bacak ülseri	Evet	0 (0,0)	4 (50,0)	4 (50,0)	0,396
	Hayır	15 (18,5)	36 (44,4)	30 (37,0)	
Priapizm	Evet	0 (0,0)	1 (33,3)	2 (66,8)	0,529
	Hayır	15 (17,4)	39 (45,3)	32 (37,2)	
Safra taşı	Evet	10 (15,4)	30 (46,2)	25 (38,5)	0,822
	Hayır	5 (20,8)	10 (41,7)	9 (37,5)	
Kr. karaciğer hastalığı	Evet	2 (25,0)	3 (37,5)	3 (37,5)	0,796
	Hayır	13 (16,0)	37 (45,7)	31 (38,3)	
Kardiyak hastalık	TY	2 (14,3)	6 (42,9)	6 (42,9)	0,900
	TY+MY	0 (0,0)	2 (66,7)	1 (33,3)	
	Hayır	13 (18,1)	32 (44,4)	27 (37,5)	
Proteinüri**	1+	3 (21,4)	7 (50,0)	4 (28,6)	0,467
	2+	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	
	3+	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	
	Hayır	11 (15,5)	30 (42,3)	30 (42,3)	
Hematüri	Evet	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	0,345
	Hayır	14 (16,1)	39 (44,8)	34 (39,1)	
KBH	Evet	0 (0,0)	3 (60,0)	2 (40,0)	0,559
	Hayır	15 (17,9)	37 (44,0)	32 (38,1)	
PHT	Evet	1 (7,1)	5 (35,7)	8 (57,1)	0,246
	Hayır	14 (18,7)	35 (46,7)	26 (34,7)	

*:Ki-kare testine göre hesaplanmıştır.

** :Tam idrar tetkikinde Dipstick testine göre hesaplanmıştır.

AGS: Akut göğüs sendromu, AVN: Avasküler nekroz, Kr: Kronik TY: Triküspit yetmezliği, MY: Mitral yetmezlik KBH: Kronik Böbrek Hastalığı PHT: Pulmoner hipertansiyon

Tablo 8. VEGF rs2010963 polimorfizminin OHA komplikasyonlarıyla ilişkisi

		Wild Tip n (%)	Mutant n (%)	Heterozigot n (%)	*p
Yıllık ağırlı kriz sayısı	<1	8 (27,6)	10 (34,5)	11 (37,9)	0,536
	1-2	5 (15,6)	10 (31,3)	17 (53,1)	
	>2	9 (32,1)	9 (32,1)	10 (35,7)	
AGS	Evet	3 (30,0)	1 (10,0)	6 (60,0)	0,262
	Hayır	19 (24,1)	28 (35,4)	32 (40,5)	
Serebrovasküler hastalık	Evet	4 (33,3)	2 (16,7)	6 (50,0)	0,434
	Hayır	18 (23,4)	27 (35,1)	32 (41,6)	
Osteoporoz	Evet	3 (13,6)	7 (31,8)	12 (54,5)	0,298
	Hayır	19 (28,4)	22 (32,8)	26 (38,8)	
AVN	Evet	15 (26,8)	15 (26,8)	26 (46,4)	0,315
	Hayır	7 (21,2)	14 (42,4)	12 (36,4)	
Bacak ülseri	Evet	2 (25,0)	0 (0,0)	6 (75,0)	0,082
	Hayır	20 (24,7)	29 (35,8)	32 (39,5)	
Priapizm	Evet	0 (0,0)	2 (66,7)	1 (33,3)	0,379
	Hayır	22 (25,6)	27 (31,4)	37 (43,0)	
Safra taşı	Evet	17 (26,2)	18 (27,7)	30 (46,2)	0,266
	Hayır	5 (20,8)	11 (45,8)	8 (33,3)	
Kr.karaciğer hastalığı	Evet	0 (0,0)	5 (62,5)	3 (37,5)	0,098
	Hayır	22 (27,2)	24 (29,6)	35 (43,2)	
Kardiyak hastalık	TY	3 (21,4)	3 (21,4)	8 (57,1)	0,513
	TY+MY	1 (33,3)	0 (0,0)	2 (66,7)	
	Hayır	18 (25,0)	26 (36,1)	28 (38,9)	
Proteinüri**	1+	5 (35,7)	7 (50,0)	2 (14,3)	-
	2+	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	
	3+	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	
	Hayır	17 (23,9)	22 (31,0)	32 (45,1)	
Hematüri	Evet	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	-
	Hayır	21 (24,1)	28 (32,2)	38 (43,7)	
KBH	Evet	1 (20,0)	2 (40,0)	2 (40,0)	0,930
	Hayır	21 (25,0)	27 (32,1)	36 (42,9)	
PHT	Evet	5 (35,7)	2 (14,3)	7 (50,0)	0,256
	Hayır	19 (22,7)	32 (36,0)	34 (41,3)	

*:Ki-kare testine göre hesaplanmıştır.

** :Tam idrar tetkikinde Dipstick testine göre hesaplanmıştır.

AGS: Akut göğüs sendromu AVN: Avasküler nekroz Kr: Kronik TY: Triküspit yetmezliği MY: Mitral yetmezlik KBH: Kronik Böbrek Hastalığı PHT: Pulmoner hipertansiyon

Tablo 8'e göre Grup 1'de VEGF rs2010963 polimorfizmi ile OHA komplikasyonları arasındaki ilişki incelendiğinde; komplikasyonların gelişimi ile rs 2010963'ün farklı genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 9. ANXA2 rs1033028 polimorfizminin komplikasyonlarıyla ilişkisi

		Wild Tip n (%)	Mutant n (%)	Heterozigot n (%)	*p
Yıllık ağırlı kriz sıklığı	<1	10 (34,5)	4 (13,8)	15 (51,7)	0,132
	1-2	5 (15,6)	12 (37,5)	15 (46,9)	
	>2	4 (14,3)	10 (35,7)	14 (50,0)	
AGS	Evet	1 (10,0)	5 (50,0)	4 (40,0)	0,280
	Hayır	18 (22,8)	21 (26,6)	40 (50,6)	
Serebrovasküler hastalık	Evet	2 (16,7)	2 (16,7)	8 (66,7)	0,423
	Hayır	17 (22,1)	24 (31,2)	36 (46,8)	
Osteoporoz	Evet	5 (22,7)	7 (31,8)	10 (45,5)	0,910
	Hayır	14 (20,9)	19 (28,4)	34 (50,7)	
AVN	Evet	9 (16,1)	17 (30,4)	30 (53,6)	0,278
	Hayır	10 (30,3)	9 (27,3)	14 (42,4)	
Bacak ülseri	Evet	2 (25,0)	1 (12,5)	5 (62,5)	0,549
	Hayır	17 (21,0)	25 (30,9)	39 (48,1)	
Priapizm	Evet	0 (0,0)	1 (33,3)	2 (66,7)	-
	Hayır	19 (22,1)	25 (29,1)	42 (48,8)	
Safra taşı	Evet	15 (23,1)	16 (24,6)	34 (52,3)	0,289
	Hayır	4 (16,7)	10 (41,7)	10 (41,7)	
Kr karaciğer hastalığı	Evet	3 (37,5)	0 (0,0)	5 (62,5)	0,139
	Hayır	16 (19,8)	26 (32,1)	39 (48,1)	
Kardiyak patoloji	TY	4 (28,6)	3 (21,4)	7 (50,0)	-
	TY + MY	0 (25,0)	0 (0,0)	3 (100,0)	
	Hayır	15 (20,8)	23 (31,9)	34 (47,2)	
Proteinüri**	1+	2 (14,3)	5 (35,7)	7 (50,0)	-
	2+	0 (0,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	
	3+	0 (0,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	
	Hayır	17 (23,9)	19 (26,8)	35 (49,3)	
Hematüri	Evet	0 (0,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	-
	Hayır	19 (21,8)	25 (28,7)	43 (49,4)	
KBH	Evet	2 (40,0)	2 (40,0)	1 (20,0)	0,367
	Hayır	17 (20,2)	24 (28,6)	43 (51,2)	
PHT	Evet	5 (35,7)	4 (28,6)	5 (35,7)	0,326
	Hayır	14 (18,7)	22 (29,3)	39 (52,0)	

*:Kikare testine göre hesaplanmıştır.

** :Tam idrar tetkikinde Dipstick testine göre hesaplanmıştır.

AGS: Akut göğüs sendromu AVN: Avasküler nekroz Kr: Kronik TY: Triküspit yetmezliği MY: Mitral yetmezlik KBH: Kronik Böbrek Hastalığı PHT: Pulmoner hipertansiyon

Tablo 9 incelendiğinde Grup 1’de ANXA2 rs1033028 polimorfizminin genotipleri ile komplikasyonların gelişimi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA

Orak hücreli anemi, kronik hemolizle seyreden otozomal resesif kalıtılan bir hemoglobinopatidir. Hastalığın pek çok komplikasyonu mevcut olup, bu komplikasyonların görülmesi hastadan hastaya değişkenlik göstermektedir. Gen polimorfizmlerinin komplikasyonların gelişiminde rolü olduğu bilinmektedir (2). eNOS, ANXA2 ve VEGF genlerindeki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) OHA'da komplikasyonların gelişiminde suçlanmaktadır (2,6,5).

Çalışmamızın amacı orak hücre anemisi hastalarında gen polimorfizmleri ile hastalığın komplikasyonları arasındaki ilişkiyi sağlıklı kontrol grubu ile de kıyaslayarak araştırmaktır.

OHA'da nitrik oksit (NO) , kronik inflamasyon ve vazo-oklüzyon sürecinde rolü olan moleküldür. Oraklaşmış eritrositlerin parçalanmasıyla açığa çıkan HbS, NO tüketimini arttırarak kapiller düzeyde NO eksikliğine neden olur (130,131). NO eksikliği; mikrosirkülasyonda vazokonstrüksiyon ve platelet agregasyonuna neden olur (132). eNOS geni, endotelde nitrik oksit üreten NOS enzimini kodlar. eNOS genindeki polimorfizmler; NOS enziminin çalışmasını etkileyerek dokuda NO seviyesini etkileyerek vazo-oklüzif olaylardan sorumlu tutulmaktadır (133). Yapılan çalışmalarda eNOS T-786C gen polimorfizminin ile OHA komplikasyonlarıyla ilişkisini gösteren sonuçlar çelişkilidir.

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu eNOS T-786C (rs2070744) polimorfizminin genotip dağılımları açısından kıyaslandığında genotiplerin dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Hasta grubunda OHA komplikasyonlarının gelişimi ile eNOS T-786C polimorfizminin genotip dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır. Antwi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada vazo-oklüzif kriz, bacak ülserleri veya priapizm görülen 88 OHA hastası ile bu komplikasyonların görülmediği 46 OHA hastası eNOS T-786C polimorfizmi genotip dağılımları açısından değerlendirilmiştir. Çalışmada

komplikasyon görülen grupta en çok mutant, ikinci sıklıkla heterozigot, en az wild tip genotip saptanmış olup; eNOS T-786C genotip dağılımının her iki grupta istatistiksel olarak farklı olduğu saptanmıştır (134). Bizim çalışmamızda da yıllık ağırlı kriz sıklığı yılda 1-2 veya 2'den fazla olan hastaların en çok mutant, ikinci sıklıkla heterozigot, en az wild tip genotipe sahip olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda eNOS T-786C polimorfizminin genotip dağılımı ile yıllık vazo-oklüziv ağırlı kriz sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmasa da yıllık ağırlı kriz sıklığı 1-2 veya 2'den fazla olan hastalardaki genotip dağılımı, Antwi ve arkadaşlarının çalışmasını desteklemektedir.

Thakur ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya 145 OHA hastası ve 244 sağlıklı birey dahil edilmiş ve eNOS rs2070744 polimorfizmi genotip sıklıkları açısından karşılaştırılmıştır. Çalışmada her iki grupta da en sık wild tip, ikinci sıklıkla heterozigot ve en az sıklıkla mutant genotip görüldüğü saptanmış olup; hasta ve kontrol grubunda genotip dağılımları açısından istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır (135). Bizim çalışmamızda da hasta ve kontrol grubu arasında eNOS rs2070744 polimorfizminin genotip dağılımında istatistiksel olarak farklılık yoktu ancak her iki grupta da en sık mutant, ikinci sıklıkla heterozigot ve en az wild tip genotip görüldüğü saptanmıştır.

Akut göğüs sendromu (AGS); akciğerlerde vazoklüzion, enfeksiyon ya da yağ embolisi sonucu meydana gelen OHA komplikasyonudur. Sharan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya AGS öyküsü olan 41 OHA hastasıyla, AGS öyküsü olmayan 46 OHA hastası dahil edilip; eNOS T-786C polimorfizmi genotip dağılımı ile AGS arasındaki ilişki araştırılmıştır. Kadın cinsiyette AGS gelişimi ile eNOS T-786C polimorfizmi genotip dağılımı arasında ilişki saptanmıştır. Çalışmaya göre AGS öyküsü olan kadınların % 50'sinde wild tip (TT), % 44'ünde heterozigot (TC), % 6'sında mutant (CC) genotip saptanmıştır (98). Bizim çalışmamızda AGS öyküsü olan hastaların % 54,5'i mutant (CC), % 45,5'i heterozigot (TC) genotipe sahip olup, wild tip (TT) genotipe sahip hasta saptanmamıştır. Çalışmamızda komplikasyonların gelişiminde cinsiyet faktörünü baz almadık. AGS gelişimi ile T-786C genotip dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamış olsa da T-786C mutant ve heterozigot genotiplerinin AGS gelişimiyle ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Vilas-Boas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 60 OHA hastası ve 81 sağlıklı birey eNOS T-786C gen polimorfizmi genotip dağılımı açısından karşılaştırılmış olup; her iki grubun da en sık wild tip, ikinci sıklıkla heterozigot ve en az sıklıkla mutant genotip taşıdığı görülmüştür (136). Aynı çalışmada OHA hastalarında komplikasyonların gelişimi ile eNOS T-786C polimorfizmi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışmaya göre akut göğüs sendromu, bacak ülseri, avasküler nekroz, safra taşı, inme gelişimi ile eNOS T-786C gen polimorfizmleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamış olup; çalışmamızdaki veriler de bunu desteklemektedir. Vilas-Boas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan farklı olarak hasta grubumuzda T-786C genotip dağılımında en çok mutant, ikinci sıklıkla heterozigot, en az wild tip genotip görülmektedir. Çalışmalardaki genotip sıklığındaki değişkenliğin; farklı popülasyonlar arasında genotiplerin heterojen dağıldığının göstergesi olduğunu düşünmekteyiz.

Cheng ve arkadaşlarının yaptığı, inme öyküsü olan 309 hastayla 309 sağlıklı kontrol grubunun kıyaslandığı çalışmada eNOS 786C>C (mutant) genotipi iskemik inme ile ilişkili bulunmuştur (137). Bizim çalışmamızda OHA grubunda serebrovasküler hastalıkla eNOS T-786C polimorfizminin genotipleri arasında ilişki saptamadık. Çalışmamızda serebrovasküler hastalık öyküsü olan 12 hasta mevcuttu. Daha geniş hasta gruplarıyla yapılacak çalışmaların eNOS gen polimorfizmi ile serebrovasküler hastalık arasında ilişki kurabileceğini düşünmekteyiz.

Armenis ve arkadaşlarının 79 OHA, 48 sağlıklı kontrol grubunu dahil edip yaptığı çalışmada eNOS T-786C polimorfizminin genotip dağılımları arasında iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (138). Bu çalışmada OHA hastaları ayrıca (S/S ve β 0/S) ile (β +/S $\delta\beta$ /S, Lepore/S) genotipleri olarak iki gruba ayrılmış olup; avasküler nekroz, retinopati, osteoporoz, bacak ülseri, vazooklüziv ağrılı kriz sebebiyle yılda 1'den fazla hastaneye yatış öyküsü, kronik ağrı, AGS ile T-786C polimorfizmi genotipleri arasındaki ilişki incelenmiştir. (S/S ve β 0/S) grubunda CC genotipinin retinopati riskini arttırdığı gösterilmiştir (138). Bizim çalışmamızda retinopati görülen hastamız olmadığından T-786C polimorfizmi ile retinopati arasındaki ilişkiyi göstermek için daha geniş örnek büyüklüğüne sahip çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Yousry ve arkadaşlarının 100 OHA ve 80 sağlıklı kontrol grubunu dahil ettiği çalışmada; eNOS T-786C (rs2070744) polimorfizmi ile vazoklüziv kriz sayısı, AGS öyküsü, pulmoner hipertansiyon ve renal yetmezlik komplikasyonlarının ilişkisi incelenmiştir. İki grup arasında eNOS T-786C polimorfizminin genotip dağılımı açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır. AGS öyküsü olan ve olmayan hastalar kıyaslandığında 786C>C (mutant) allelinin OHA grubunda AGS riskinde artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (139). Aynı çalışmada AGS öyküsü olan 16 hastada en sık mutant, ikinci sıklıkla heterozigot ve en az wild tip genotip saptanmıştır. Çalışmamızda AGS görülen 10 hastamızın genotip dağılımı literatürü desteklemektedir.

Kumar ve arkadaşlarının yaptığı meta-analizde; akut göğüs sendromu ile eNOS T-786C gen polimorfizmi arasındaki ilişki araştırılmıştır. 5 çalışmaya ait 231 OHA hastası ve 274 kontrol grubunun dahil edildiği meta-analizde akut göğüs sendromu gelişimi ile eNOS T-786C gen polimorfizmi arasında ilişki saptanmamıştır (140).

VEGF; endotel hücrelerinde proliferasyonu uyarır, kemoatraksiyon, ve endotelde integrin ekspresyonunu düzenler (88,89). Vasküler geçirgenliği artırır; inflamasyona katkıda bulunur (90). ICAM-1 ve VCAM-1'in endotelden salınımını uyatarak, endotel adezyonunu artırır (91,92). VEGF ailesinin üyesi olan PlGF seviyesinin vazoklüziv krizlerde görülen inflamatuvar değişikliklerle ilişkili bulunmuştur (141).

Çalışmamızda VEGF rs2010963 polimorfizminin genotip dağılımını OHA ve sağlıklı kontrol grubunda kıyasladığımızda genotip dağılımı açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Her iki grupta da en çok heterozigot, ikinci sıklıkla mutant, en az wild tip genotip görülmektedir. Hasta grubunda VEGF rs2010963 polimorfizminin genotip dağılımı ile komplikasyonların gelişimi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Habboubi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya 210 OHA hastası ve son 9 ayda vazooklüziv ağırlı kriz geçirmeyen 114 OHA hastası dahil edilmiştir. İki grup arasında VEGF geninin rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963, rs833068, rs833070, rs3025020 ve rs3025039 polimorfizmleri ile vazoklüziv olaylar arasındaki

ilişki araştırılmış olup; rs833068, rs2010963 ve rs3025020 polimorfizmleri vazoklüziv ağırlı krizlerle ilişkili bulunmuştur. Rs2010963 polimorfizminin mutant ve heterozigot allellerinin vazooklüziv olay riskini arttırdığı gösterilmiştir (5).

Redha ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada AGS öyküsü olan 90 OHA hastasıyla AGS öyküsü olmayan 261 OHA hastası VEGF rs3025020 polimorfizmi açısından değerlendirilmiştir. Rs3025020 polimorfizminin pediatrik OHA hastalarında AGS riskinde artışla ilişkili olduğu gösterilmiştir (95).

Çalışmamızda yıllık vazooklüziv ağırlı kriz sıklığı ile VEGF rs2010963 polimorfizmi genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Bizim çalışmamızda bacak ülseri görülen 8 hastanın % 75'inde rs2010963 heterozigot, % 25'inde wild tip genotip görülmekte olup; mutant genotipe sahip hasta saptanmamıştır. Bacak ülseri olmayan 81 hastanın % 39,5'inde heterozigot, % 35,8'inde mutant, % 24,7'sinde wild tip genotip görülmüştür. Çalışmamızda OHA hastalarında VEGF rs2010963 polimorfizm genotip dağılımları ile bacak ülseri gelişimi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamış olsa da VEGF rs2010963 heterozigot allelinin bacak ülseri gelişim riskini arttırdığını düşünmekteyiz. Literatür araştırması yapıldığında OHA hastalarında bacak ülseri ile VEGF rs2010963 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi gösteren başka çalışmaya rastlanmamıştır. Bacak ülseri görülen hastalarda mutant genotip taşıyan hastanın olmaması sebebiyle; bu genotipin bacak ülseri gelişim riskini azalttığını düşünmekteyiz. OHA'lı hastalarda bacak ülseri gelişimi ile VEGF rs2010963 gen polimorfizmi arasındaki ilişkinin saptanabilmesi için geniş örneklem büyüklüğüne sahip çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda 8 OHA hastasında kronik karaciğer hastalığı gelişmiş olup; bu hastaların % 62,5'inin mutant, % 37,5'inin VEGF rs2010963 heterozigot genotipe sahip olduğu görülmüş olup; wild tip genotip taşıyan hasta saptanmamıştır. Kronik karaciğer hastalığı görülmeyen OHA grubunda hastaların en çok heterozigot, daha az sıklıkla mutant genotip, en az sıklıkla wild tip genotip taşıdığı görülmüştür. Kronik karaciğer hastalığı gelişimi ile VEGF rs2010963 polimorfizmi genotip dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamış olsa da kronik karaciğer

hastalığı gelişen hastalarda wild tip genotipin olmaması sebebiyle; wild tip genotipe sahip hastaların diğer genotiplere sahip hastalara göre kronik karaciğer gelişimi açısından düşük risk barındırdığını düşünmekteyiz. Genotip dağılımları dikkate alındığında mutant genotipin kronik karaciğer hastalığı riskini arttırabileceğini düşünmekteyiz. Literatür araştırması yapıldığında OHA hastalarında kronik karaciğer hastalığı ile VEGF rs2010963 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmaya rastlanmadı.

Niu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada OHA'lı hastalarda plazma VEGF düzeyinde artışın triküspit yetmezliği riskinde düşüşle ilişkili olduğu gösterilmiştir (142). Çalışmamızda hastaların % 16'sında triküspit yetmezliği , % 4'ünde triküspit ve mitral yetmezlik beraber bulunmuştur. Çalışmamızda VEGF rs2010963 polimorfizmi ile triküspit ve mitral kapak yetmezlikleri gelişimi arasında genotip dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ve plazmada VEGF düzeyi ölçülmemiştir. Plazma VEGF düzeylerinin inflamatuvar süreci etkileyerek OHA hastalarında komplikasyonların gelişimiyle ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda ANXA2 rs1033028 polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda genotip dağılımına baktığımızda her iki grupta genotip dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Hasta grubunda ANXA2 rs1033028 polimorfizmi ile komplikasyon gelişimi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Çalışmamızda kronik karaciğer hastalığı görülen hastaların % 62,5'inde heterozigot, % 37,5'inde wild tip genotip görülmekte olup; mutant genotip taşıyan hasta saptanmamıştır. Kronik karaciğer hastalığı görülmeyen hastaların en sık heterozigot, ikinci sıklıkla mutant ve en az wild tip genotipe sahip olduğu görülmüştür. Kronik karaciğer hastalığı gelişen ve gelişmeyen hastalar kıyaslandığında; ANXA2 rs1033028 polimorfizminin genotip dağılımları açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamış olsa da, OHA'da mutant genotip taşıyan hastalarda kronik karaciğer gelişim riskinin wild tip ya da heterozigot genotip taşıyan hastalara göre daha düşük olduğunu düşünmekteyiz.

Literatüre baktığımızda kronik karaciğer hastalığı ile ANXA2 rs1033028 polimorfizminin ilişkisini gösteren başka çalışmaya rastlanmadı.

Çalışmamızda ANXA2 rs1033028 genotip dağılımlarına bakıldığında; yılda 1-2 ve 2'den fazla ağırlı kriz öyküsü olan hastalarda en sık heterozigot, ikinci sıklıkla mutant ve en az wild tip genotip görüldüğü saptanmıştır. Ortalama yılda 1'den az ağırlı kriz geçiren hastalarda en sık heterozigot, ikinci sıklıkla wild tip, en az mutant genotip görüldüğü saptanmıştır. Yıllık ağırlı kriz sıklığı ile ANXA2 rs1033028 polimorfizminin genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ancak wild tip genotipe sahip hastalarda ağırlı kriz sıklığının azaldığını düşünmekteyiz.

In vitro deneyler annexin proteinlerinin sinyal iletim olayları, apoptoz (143), kan pıhtılaşmasının inhibisyonu (144), fosfolipaz A2 inhibisyonu, vezikül kaçakçılığının yanı sıra kalsiyum sinyalizasyonu ve taşınması (145) dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda rol oynadığını ileri sürmüştür. Annexinler, kıkırdakta ve kemikte mineralizasyon sürecini başlatmada kritik role sahip olan matris veziküllerinin ana bileşenleridir (146,147,148).

Baldwin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 442 osteonekrozlu hasta ile 455 sağlıklı kontrol grubu ANXA2 gen polimorfizmleri açısından karşılaştırılmıştır. Çalışmada rs7163836, hCV11770326, rs7170178, rs1033028, hCV26910500, hCV1571628 polimorfizmlerinin OHA'lı hastalarda osteonekroz riskinde artışla ilişkili olduğu görülmüştür (6). Bizim çalışmamızda ANXA2 rs1033028 polimorfizmi ile AVN ve osteoporoz komplikasyonları arasında ilişki saptanmamıştır. OHA'lı hastalarda annexin 2 proteinin AVN gelişiminde rolünün daha iyi anlaşılabilmesi için geniş hasta gruplarıyla çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Flanagan ve arkadaşlarının inme öyküsü olan 103 OHA hastası ile inme öyküsü olmayan 103 OHA hastasını dahil ettiği çalışmada ANXA2 rs11853426 polimorfizminin pediatrik OHA'lı hastalarda inme riskinde artışla ilişkili olduğu gösterilmiştir (110). Çalışmamızda rs1033028 polimorfizminin genotipik dağılımı ile inme gelişimi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır. ANXA2 gen

polimorfizmlerinin OHA komplikasyonlarıyla ilişkisinin anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmaya alınan hasta sayımızın sınırlı oluşu, çalışmamızın tek merkezli bir çalışma oluşu, bazı komplikasyonların ve ilaç kullanım öykülerinin hastaların beyanına dayanması çalışmamızın kısıtlılıkları arasındadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamıza katılan hasta ve kontrol grubu genç yaştaki bireylerden oluşmaktaydı.

OHA'lı hastalar komplikasyonların sıklığı açısından değerlendirildiğinde;

Hastaların % 31,5'i yılda 3'ten fazla, % 36'sı yılda 1-2 kez ağırlı kriz geçirmekte olup; % 32,6'sı yılda 1'den az ağırlı kriz geçirmekte idi.

Hastaların % 11,2'sinin akut göğüs sendromu, % 13,5'inin serebrovasküler hastalık, % 24,7'sinin osteoporoz, % 62,9'unun avasküler nekroz, % 9'unun bacak ülseri, % 3,4'ünün priapizm, % 73'ünün safra taşı öyküsü var idi.

Hastaların % 9'unda kronik karaciğer hastalığı, % 15,7'sinde pulmoner hipertansiyon, % 5,6'sında kronik böbrek hastalığı gelişmiş idi. Kardiyak patolojiler açısından OHA'lı hastaların % 15,7'sinde triküspit yetmezliği, % 3,4'ünde hem triküspit hem mitral yetmezliği var idi.

Hastalarda idrarda Dipstick testine göre % 15,7'sinde 1+ proteinüri, % 2,2'sinde 2+ proteinüri, % 2,2'sinde 3+ proteinüri var idi. Hastaların % 2,2'sinde hematüri görülmekte idi.

Hasta ve kontrol grubu eNOS T-786C (rs2070744), VEGF rs2010963 ve ANXA2 rs1033028 gen polimorfizmlerinin genotip dağılımları açısından kıyaslandığında; her üç polimorfizmde de genotip dağılımları açısından iki grup arasında istatistiksel olarak farklılık yoktu.

OHA'lı hastalarda eNOS T-786C gen polimorfizminin OHA komplikasyonlarıyla ilişkisine baktığımızda, eNOS T-786C polimorfizminin genotipler dağılımları ile komplikasyonların gelişimi açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı.

OHA'lı hastalarda VEGF rs2010963 gen polimorfizminin OHA komplikasyonlarıyla ilişkisine baktığımızda, VEGF rs2010963 gen polimorfizminin genotip dağılımları ile komplikasyonların gelişimi açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı.

OHA'lı hastalarda ANXA2 rs1033028 gen polimorfizminin OHA komplikasyonlarıyla ilişkisine baktığımızda, ANXA2 rs1033028 gen polimorfizminin genotipleri ile komplikasyonların gelişimi açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı.

Bu çalışmada orak hücreli anemi hastalarında hastalığın komplikasyonları ile gen polimorfizmleri arasındaki ilişki, sağlıklı kontrol grubu ile kıyaslanarak araştırılmıştır.

Sonuç olarak, orak hücreli anemi hastalarında birçok gendeki farklı polimorfizmlerin komplikasyonların görülmesiyle ilişkili olduğunu göstermek için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Orak hücreli anemi hastalarında gen polimorfizmleri ile komplikasyonlar arasındaki sürecin net anlaşılabilmesi; genetik tedaviler için yol gösterici olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Kılınç Y, BD Pht. Orak Hücre Anemisi: Tanı, Takip, Tedavi ve Transfüzyon.
2. Fertrin, K. Y., & Costa, F. F. (2010). Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. Expert review of hematology, 3(4), 443-458.
3. Akay, N., Tuğcu, D., Tuna, R., Ocak, S., Karaman, S., Ünüvar, A., ... & Karakaş, Z. (2019). Orak Hücreli Anemili Hastada Akut Göğüs Sendromu: Vaka Sunumu ve Literatürün Gözden Geçirilmesi. Journal of the Child/Cocuk Dergisi, 19(1).
4. Sharan, K., Surrey, S., Ballas, S., Borowski, M., Devoto, M., Wang, K. F., ... & Keller, M. (2004). Association of T-786C eNOS gene polymorphism with increased susceptibility to acute chest syndrome in females with sickle cell disease. British journal of haematology, 124(2), 240-243.
5. Al-Habboubi, H. H., Mahdi, N., Abu-Hijleh, T. M., Abu-Hijleh, F. M., Sater, M. S., & Almawi, W. Y. (2012). The relation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms on VEGF levels and the risk of vasoocclusive crisis in sickle cell disease. European journal of haematology, 89(5), 403-409.
6. Baldwin C, Nolan VG, Wyszynski DF, Ma Q-L, Sebastiani P, Embury SH, et al. Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. Blood. 2005;106(1):372-5.
7. Alvarez, O., Montague, N. S., Marin, M., O'Brien, R., & Rodriguez, M. M. (2015). Quantification of sickle cells in the peripheral smear as a marker of disease severity. Fetal and pediatric pathology, 34(3), 149-154.
8. Williams TN, Weatherall DJ. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2(9):a011692.
9. Organization WH. Guidelines for the control of haemoglobin disorders. Report of the VIth Annual Meeting of the WHO Working Group on

Haemoglobinopathies. World Heal Organ Geneva Cagliari, Sardinia. 1989;

10. Altay, C., Yetgin, S., Özsoylu, S., & Kutsal, A. (1978). Hemoglobin S and some other hemoglobinopathies in Eti-Turks. Human heredity, 28(1), 56-61.
11. Derneği TH. Çocuklarda Demir Eksikliği Anemisi Tanı ve Tedavi Klavuzu II. Bölüm; 2011.
12. Steinberg MH, Rodgers GP. Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers. In: Seminars in hematology. Elsevier; 2001. p. 299–306.
13. Yüksel, R. (2014). Homozigot Hbss Erişkin Orak Hücre Anemili Hastalarda Serum pedf Düzeyleri ile Hscrp arasındaki ilişkinin incelenmesi. Uzmanlık tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay.
14. Harmening DM, Sacher RA. Clinical hematology and fundamentals of hemostasis. FA Davis Company Philadelphia; 2002.
15. Joneckis, C. C., Ackley, R. L., Orringer, E. P., Wayner, E. A., & Parise, L. V. (1993). Integrin alpha 4 beta 1 and glycoprotein IV (CD36) are expressed on circulating reticulocytes in sickle cell anemia.
16. Gee, B. E., & Platt, O. S. (1995). Sickle reticulocytes adhere to VCAM-1.
17. Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. Microcirculation. 2004;11(2):129–51.
18. Ataga KI, Moore CG, Hillery CA, Jones S, Whinna HC, Strayhorn D, et al. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. Haematologica. 2008;93(1):20–6.
19. Frenette, P. S. (2002). Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. Current opinion in hematology, 9(2), 101-106.
20. Carden, D. L., & Granger, D. N. (2000). Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. The Journal of pathology, 190(3), 255-266.

21. Hofstra, T. C., Kalra, V. K., Meiselman, H. J., & Coates, T. D. (1996). Sickie erythrocytes adhere to polymorphonuclear neutrophils and activate the neutrophil respiratory burst.
22. Embury SH, Matsui NM, Ramanujam S, Mayadas TN, Noguchi CT, Diwan BA, et al. The contribution of endothelial cell P-selectin to the microvascular flow of mouse sickle erythrocytes in vivo. *Blood*. 2004;104(10):3378–85.
23. Chantrathammachart, P., Mackman, N., Sparkenbaugh, E., Wang, J. G., Parise, L. V., Kirchhofer, D., ... & Pawlinski, R. (2012). Tissue factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse model of sickle cell disease. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 120(3), 636-646.
24. Kato, G. J., Gladwin, M. T., & Steinberg, M. H. (2007). Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood reviews*, 21(1), 37-47.
25. Sparkenbaugh, E., & Pawlinski, R. (2013). Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, 162(1), 3-14.
26. Canatan D. Orak hücre anemisi. XXX Ulus Hematol Kongresi Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu kitabı Sayfa. 2003;93.
27. Magnus, S. A., Hambleton, I. R., Moosdeen, F., & Serjeant, G. R. (1999). Recurrent infections in homozygous sickle cell disease. *Archives of Disease in Childhood*, 80(6), 537-541.
28. Ware RE. Salmonella infection in sickle cell disease: a clear and present danger. 1997.
29. Karakaş Z. Türk Hematoloji Derneği.
30. Charache, S., Scott, J. C., & Charache, P. (1979). 'Acute Chest Syndrome'in Adults With Sickle Cell Anemia: Microbiology, Treatment, and Prevention. *Archives of Internal Medicine*, 139(1), 67-69.

31. Telen, M. J. (2007). Role of adhesion molecules and vascular endothelium in the pathogenesis of sickle cell disease. *ASH Education Program Book*, 2007(1), 84-90.
32. Abbas, H. A., Kahale, M., Hosn, M. A., & Inati, A. (2013). A review of acute chest syndrome in pediatric sickle cell disease. *Pediatric annals*, 42(3), 115-120.
33. Young Jr, R. C., Castro, O., Baxter, R. P., Dunn, R., Armstrong, E. M., Cook, F. J., & Sampson, C. C. (1981). The lung in sickle cell disease: a clinical overview of common vascular, infectious, and other problems. *Journal of the National Medical Association*, 73(1), 19.
34. Barrett-Connor, E. (1973). Pneumonia and pulmonary infarction in sickle cell anemia. *JAMA*, 224(7), 997-1000.
35. Haynes Jr, J., Taylor, A. E., Dixon, D. O. N. N. A., & Voelkel, N. O. R. B. E. R. T. (1993). Microvascular hemodynamics in the sickle red blood cell perfused isolated rat lung. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 264(2), H484-H489.
36. Howard, J., Hart, N., Roberts-Harewood, M., Cummins, M., Awogbade, M., Davis, B., & BCSH Committee. (2015). Guideline on the management of acute chest syndrome in sickle cell disease. *British journal of haematology*, 169(4), 492-505.
37. Chinegwundoh, F. I., Smith, S., & Anie, K. A. (2020). Treatments for priapism in boys and men with sickle cell disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4).
38. Balkaran, B., Char, G., Morris, J. S., Thomas, P. W., Serjeant, B. E., & Serjeant, G. R. (1992). Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. *The Journal of pediatrics*, 120(3), 360-366.
39. Verduzco, L. A., & Nathan, D. G. (2009). Sickle cell disease and stroke. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 114(25), 5117-5125.

40. Rao, S. P., Miller, S. T., & Cohen, B. J. (1992). Transient aplastic crisis in patients with sickle cell disease: B19 parvovirus studies during a 7-year period. *American Journal of Diseases of Children*, 146(11), 1328-1330.
41. Brousse, V., Buffet, P., & Rees, D. (2014). The spleen and sickle cell disease: the sick (led) spleen. *British journal of haematology*, 166(2), 165-176.
42. Sheehy, T. W. (1977). Sickle cell hepatopathy. *Southern medical journal*, 70(5), 533-538.
43. Hatton, C. S., Bunch, C., & Weatherall, D. J. (1985). Hepatic sequestration in sickle cell anaemia. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 290(6470), 744-745.
44. Platt, O. S., Rosenstock, W., & Espeland, M. A. (1984). Influence of sickle hemoglobinopathies on growth and development. *New England Journal of Medicine*, 311(1), 7-12.
45. Rhodes, M., Akohoue, S. A., Shankar, S. M., Fleming, I., Qi An, A., Yu, C., ... & Buchowski, M. S. (2009). Growth patterns in children with sickle cell anemia during puberty. *Pediatric blood & cancer*, 53(4), 635-641.
46. Miller, R. G., Segal, J. B., Ashar, B. H., Leung, S., Ahmed, S., Siddique, S., ... & Lanzkron, S. (2006). High prevalence and correlates of low bone mineral density in young adults with sickle cell disease. *American journal of hematology*, 81(4), 236-241.
47. Özdemir ZT, Özkan EA, Akkoca AO, Ekim M, Börekçi E, Yıldırım T, et al. Deficiency in Patients with Sickle Cell Disease Orak Hücre Anemili Hastalarda Vitamin D Eksikliği ve Osteoporoz.
48. Akohoue, S. A., Shankar, S., Milne, G. L., Morrow, J., Chen, K. Y., Ajayi, W. U., & Buchowski, M. S. (2007). Energy expenditure, inflammation, and oxidative stress in steady-state adolescents with sickle cell anemia. *Pediatric research*, 61(2), 233-238.
49. Serjeant GR. Sickle cell disease. 2nd. Oxford: Oxford Medical Publications; 1992.

50. Neves, F. S., de Almeida, D. A., Oliveira-Santos, C., dos Santos, J. N., Toralles, M. B. P., da Silva, M. C. B. O., ... & Crusoé-Rebello, I. (2011). Radiographic changes of the jaws in HbSS and HbSC genotypes of sickle cell disease. *Special Care in Dentistry*, 31(4), 129-133.
51. Ohene-Frempong, K., Weiner, S. J., Sleeper, L. A., Miller, S. T., Embury, S., Moohr, J. W., ... & Sickle Cell Disease, T. C. S. O. (1998). Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 91(1), 288-294.
52. Theocharidou, E., & Suddle, A. R. (2019). The liver in sickle cell disease. *Clinics in liver disease*, 23(2), 177-189.
53. Siddiqui, A. K., & Ahmed, S. (2003). Pulmonary manifestations of sickle cell disease. *Postgraduate medical journal*, 79(933), 384-390.
54. Powars, D. R., Chan, L. S., Hiti, A., Ramicone, E., & Johnson, C. (2005). Outcome of sickle cell anemia: a 4-decade observational study of 1056 patients. *Medicine*, 84(6), 363-376.
55. Scheinman, J. I. (2009). Sickle cell disease and the kidney. *Nature clinical practice Nephrology*, 5(2), 78-88.
56. Elsayed, M. E. A., Mura, M., Al Dhibi, H., Schellini, S., Malik, R., Kozak, I., & Schatz, P. (2019). Sickle cell retinopathy. A focused review. *Graefes's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 257(7), 1353-1364.
57. Trent, J. T., & Kirsner, R. S. (2004). Leg ulcers in sickle cell disease. *Advances in skin & wound care*, 17(8), 410-416.
58. Taddesse, A., Woldie, I. L., Khana, P., Swerdlow, P. S., Chu, J. W., Abrams, J., & Abou-Samra, A. B. (2012). Hypogonadism in patients with sickle cell disease: central or peripheral?. *Acta haematologica*, 128(2), 65-68.
59. Dunne, G. D., & Joseph, R. R. (1970). Fertility in hemoglobin SS and hemoglobin SC disease. *Fertility and sterility*, 21(8), 630-634.
60. Sabath, D. E. (2017). Molecular diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies: an ACLPS critical review. *American journal of clinical*

pathology, 148(1), 6-15.

61. Franco, R. S., Yasin, Z., Palascak, M. B., Ciraolo, P., Joiner, C. H., & Rucknagel, D. L. (2006). The effect of fetal hemoglobin on the survival characteristics of sickle cells. *Blood*, 108(3), 1073-1076.
62. Ballas, S. K., Dover, G. J., & Charache, S. (1989). Effect of hydroxyurea on the rheological properties of sickle erythrocytes in vivo. *American journal of hematology*, 32(2), 104-111.
63. Thornburg, C. D., Files, B. A., Luo, Z., Miller, S. T., Kalpatthi, R., Iyer, R., ... & Wang, W. C. (2012). Impact of hydroxyurea on clinical events in the BABY HUG trial. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 120(22), 4304-4310.
64. Rees, D. C., Williams, T. N., & Gladwin, M. T. (2010). Sickle-cell disease. *The Lancet*, 376(9757), 2018-2031.
65. Kapoor, S., Little, J. A., & Pecker, L. H. (2018, December). Advances in the treatment of sickle cell disease. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 93, No. 12, pp. 1810-1824). Elsevier.
66. Kutlar, A., Kanter, J., Liles, D. K., Alvarez, O. A., Cançado, R. D., Friedrich, J. R., ... & Ataga, K. I. (2019). Effect of crizanlizumab on pain crises in subgroups of patients with sickle cell disease: a SUSTAIN study analysis. *American journal of hematology*, 94(1), 55-61.
67. Niihara, Y., Miller, S. T., Kanter, J., Lanzkron, S., Smith, W. R., Hsu, L. L., ... & Vichinsky, E. P. (2018). A phase 3 trial of l-glutamine in sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, 379(3), 226-235.
68. Kato, G. J., Piel, F. B., Reid, C. D., Gaston, M. H., Ohene-Frempong, K., Krishnamurti, L., ... & Vichinsky, E. P. (2018). Sickle cell disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1-22.
69. Tanyeli, A. Orak Hücre Anemisinde Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 23(1), 42-48.
70. Oksenberg D, Dufu K, Patel MP, Chuang C, Li Z, Xu Q, et al. GBT440

increases haemoglobin oxygen affinity, reduces sickling and prolongs RBC half-life in a murine model of sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2016;175(1):141–53.

71. Howard, J., Hemmaway, C. J., Telfer, P., Layton, D. M., Porter, J., Awogbade, M., ... & Lehrer-Graiwer, J. (2019). A phase 1/2 ascending dose study and open-label extension study of voxelotor in patients with sickle cell disease. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 133(17), 1865-1875.
72. Çetin Z. Orak hücre hastalığında genom düzenleme aracılı tedavi yaklaşımları; Son teknoloji. Kılınç Y, editör. Orak Hücre Anemisi. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2021. p.77-86.
73. Arcasoy, A., Canatan, D., Sinav, B., Kutlay, L., Oğuz, N., & Şen, M. (2001). Serum zinc levels and zinc binding capacity in thalassemia. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 15(2-3), 85-87.
74. Superhumans, P. (2020). İnsan Genom Projesinin Korkulan Rüyası; Ayrıcalıklı İnsan Yaratma.
75. Noguchi, C. T., Dover, G. J., Rodgers, G. P., Serjeant, G. R., Antonarakis, S. E., Anagnou, N. P., ... & Schechter, A. N. (1985). Alpha thalassemia changes erythrocyte heterogeneity in sickle cell disease. *The Journal of clinical investigation*, 75(5), 1632-1637.
76. Embury, S. H., Dozy, A. M., Miller, J., Davis Jr, J. R., Kleman, K. M., Preisler, H., ... & Mentzer, W. C. (1982). Concurrent sickle-cell anemia and α -thalassemia: effect on severity of anemia. *New England Journal of Medicine*, 306(5), 270-274.
77. Serjeant, G. R., Serjeant, B. E., Fraser, R. A., Hambleton, I. R., Higgs, D. R., Kulozik, A. E., & Donaldson, A. (2011). Hb S- β -thalassemia: Molecular, hematological and clinical comparisons. *Hemoglobin*, 35(1), 1-12.
78. Mukherjee, M. B., Nadkarni, A. H., Gorakshakar, A. C., Ghosh, K., Mohanty, D., & Colah, R. B. (2010). Clinical, hematologic and molecular variability of sickle cell- β thalassemia in western India. *Indian journal of human genetics*, 16(3), 154.

79. Koren, A., Segal-Kupershmit, D., Zalman, L., Levin, C., Hana, M. A., Luder, A., & Attias, D. (1999). Effect of hydroxyurea in sickle cell anemia: a clinical trial in children and teenagers with severe sickle cell anemia and sickle cell beta-thalassemia. *Pediatric hematology and oncology*, 16(3), 221-232.
80. Benesch, R. E., Edalji, R., Benesch, R., & Kwong, S. (1980). Solubilization of hemoglobin S by other hemoglobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(9), 5130-5134.
81. Platt, O. S., Thorington, B. D., Brambilla, D. J., Milner, P. F., Rosse, W. F., Vichinsky, E., & Kinney, T. R. (1991). Pain in sickle cell disease: rates and risk factors. *New England Journal of Medicine*, 325(1), 11-16.
82. Ballas, S. K., Lerner, J., Smith, E. D., Surrey, S., Schwartz, E., & Rappaport, E. F. (1988). Rheologic predictors of the severity of the painful sickle cell crisis.
83. Billett HH, Nagel RL, Fabry ME. Paradoxical increase of painful crises in sickle cell patients with α -thalassemia [1]. *Blood*. 1995;86(11):4382.
84. Brousseau, D. C., McCarver, D. G., Drendel, A. L., Divakaran, K., & Panepinto, J. A. (2007). The effect of CYP2D6 polymorphisms on the response to pain treatment for pediatric sickle cell pain crisis. *The Journal of pediatrics*, 150(6), 623-626.
85. Oliveira, M. C. V. C., Mendonça, T. F., Vasconcelos, L. R. S., Moura, P., Bezerra, M. A. C., Santos, M. N. N., ... & Cavalcanti, M. S. M. (2009). Association of the MBL2 gene EXON1 polymorphism and vasoocclusive crisis in patients with sickle cell anemia. *Acta haematologica*, 121(4), 212-215.
86. Mendonça, T. F., Oliveira, M. C. V. C., Vasconcelos, L. R. S., Pereira, L. M. M. B., Moura, P., Bezerra, M. A. C., ... & Cavalcanti, M. S. M. (2010). Association of variant alleles of MBL2 gene with vasoocclusive crisis in children with sickle cell anemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 44(4), 224-228.
87. Ferrara, N. (1999). Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *Journal of molecular medicine*, 77(7), 527-543.

88. Connolly, D. T., Heuvelman, D. M., Nelson, R., Olander, J. V., Eppley, B. L., Delfino, J. J., ... & Feder, J. (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 84(5), 1470-1478.
89. Senger, D. R., Ledbetter, S. R., Claffey, K. P., Papadopoulos-Sergiou, A., Peruzzi, C. A., & Detmar, M. (1996). Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the α v β 3 integrin, osteopontin, and thrombin. *The American journal of pathology*, 149(1), 293.
90. Connolly, D. T., Olander, J. V., Heuvelman, D., Nelson, R., Monsell, R., Siegel, N., ... & Feder, J. (1989). Human vascular permeability factor: isolation from U937 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 264(33), 20017-20024.
91. Nourse, M. B., Halpin, D. E., Scatena, M., Mortisen, D. J., Tulloch, N. L., Hauch, K. D., ... & Murry, C. E. (2010). VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(1), 80-89.
92. Stannard, A. K., Khurana, R., Evans, I. M., Sofra, V., Holmes, D. I., & Zachary, I. (2007). Vascular endothelial growth factor synergistically enhances induction of E-selectin by tumor necrosis factor- α . *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(3), 494-502.
93. Solovey, A., Gui, L., Ramakrishnan, S., Steinberg, M. H., & Hebbel, R. P. (1999). Sick cell anemia as a possible state of enhanced anti-apoptotic tone: survival effect of vascular endothelial growth factor on circulating and unanchored endothelial cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 93(11), 3824-3830.
94. Gürkan, E., Tanrıverdi, K., & Başlamışlı, F. (2005). Clinical relevance of vascular endothelial growth factor levels in sickle cell disease. *Annals of hematology*, 84(2), 71-75.
95. Redha, N. A., Mahdi, N., Al-Habboubi, H. H., & Almawi, W. Y. (2014). Impact of VEGFA- 583C> T polymorphism on serum VEGF levels and the susceptibility to acute chest syndrome in pediatric patients with sickle cell disease. *Pediatric blood & cancer*, 61(12), 2310-2312.

96. Martinez-Castaldi, C., Nolan, V. G., Baldwin, C. T., Farrer, L. A., Steinberg, M. H., & Klings, E. S. (2007). Association of Genetic Polymorphisms in the TGF- β Pathway with the Acute Chest Syndrome of Sick Cell Anemia.
97. Saito, Y., Yamagishi, T., Nakamura, T., Ohyama, Y., Aizawa, H., Suga, T., ... & Nagai, R. (1998). Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochemical and biophysical research communications*, 248(2), 324-329.
98. Sharan, K., Surrey, S., Ballas, S., Borowski, M., Devoto, M., Wang, K. F., ... & Keller, M. (2004). Association of T-786C eNOS gene polymorphism with increased susceptibility to acute chest syndrome in females with sickle cell disease. *British journal of haematology*, 124(2), 240-243.
99. Chaar, V., Tarer, V., Etienne-Julan, M., Diara, J. P., Elion, J., & Romana, M. (2006). ET-1 and ecNOS gene polymorphisms and susceptibility to acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crises in children with sickle cell anemia. *Haematologica*, 91(9), 1277-1278.
100. Kutlar, A., Kutlar, F., Turker, I., & Tural, C. (2001). The methylene tetrahydrofolate reductase (C677T) mutation as a potential risk factor for avascular necrosis in sickle cell disease. *Hemoglobin*, 25(2), 213-217.
101. Castro, V., Alberto, F. L., Costa, R. N. P., Lepikson-Neto, J., Gualandro, S. F. M., Figueiredo, M. S., ... & Costa, F. F. (2004). Polymorphism of the human platelet antigen-5 system is a risk factor for occlusive vascular complications in patients with sickle cell anemia. *Vox sanguinis*, 87(2), 118-123.
102. Ballas, S. K., Talacki, C. A., Rao, V. M., & Steiner, R. M. (1989). The prevalence of avascular necrosis in sickle cell anemia: correlation with α -thalassemia. *Hemoglobin*, 13(7-8), 649-655.
103. Milner, P. F., Kraus, A. P., Sebes, J. I., Sleeper, L. A., Dukes, K. A., Embury, S. H., ... & Smith, J. (1991). Sickle cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head. *New England Journal of Medicine*, 325(21), 1476-1481.
104. Pandey, S., Ranjan, R., Pandey, S., Mishra, R. M., Seth, T., & Saxena, R. (2012). Effect of ANXA2 gene single nucleotide polymorphism (SNP) on the development of osteonecrosis in Indian sickle cell patient: a PCR-RFLP approach.

105. Gillette, J. M., & Nielsen-Preiss, S. M. (2004). The role of annexin 2 in osteoblastic mineralization. *Journal of cell science*, 117(3), 441-449.
106. Steinberg MH, Nolan VG, Baldwin CT et al. Association of polymorphisms in genes of the transforming growth factor- β pathway with sickle cell osteonecrosis. *Blood* 102, 262a–263a (2003).
107. Pereira-Martins, D. A., Coelho-Silva, J. L., Domingos, I. F., Weinhäuser, I., Silveira, D. R., Cunha, A. F., ... & Bezerra, M. A. (2020). Association between ANXA2* 5681 polymorphism (rs7170178) and osteonecrosis in haemoglobin SS-genotyped patients. *British journal of haematology*, 188(3), e8-e11.
108. Ulug, P., Vasavda, N., Awogbade, M., Cunningham, J., Menzel, S., & Thein, S. L. (2009). Association of sickle avascular necrosis with bone morphogenic protein 6. *Annals of hematology*, 88(8), 803-805.
109. Styles, L. A., Hoppe, C., Klitz, W., Vichinsky, E., Lubin, B., & Trachtenberg, E. (2000). Evidence for HLA-related susceptibility for stroke in children with sickle cell disease. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 95(11), 3562-3567.
110. Flanagan, J. M., Frohlich, D. M., Howard, T. A., Schultz, W. H., Driscoll, C., Nagasubramanian, R., ... & Ware, R. E. (2011). Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 117(24), 6681-6684.
111. Bosma, P. J., Chowdhury, J. R., Bakker, C., Gantla, S., de Boer, A., Oostra, B. A., ... & Chowdhury, N. R. (1995). The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *New England Journal of Medicine*, 333(18), 1171-1175.
112. Carpenter, S. L., Lieff, S., Howard, T. A., Eggleston, B., & Ware, R. E. (2008). UGT1A1 promoter polymorphisms and the development of hyperbilirubinemia and gallbladder disease in children with sickle cell anemia. *American journal of hematology*, 83(10), 800-803.
113. Martins, R., Morais, A., Dias, A., Soares, I., Rolao, C., Ducla-Soares, J. L., ... & Faustino, P. (2008). Early modification of sickle cell disease clinical course by UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene promoter polymorphism. *Journal of*

human genetics, 53(6), 524-528.

114. Chaar, V., Kéclard, L., Diara, J. P., Leturdu, C., Elion, J., Krishnamoorthy, R., ... & Romana, M. (2005). Association of UGT1A1 polymorphism with prevalence and age at onset of cholelithiasis in sickle cell anemia. *haematologica*, 90(2), 188-199.
115. Vasavda, N., Menzel, S., Kondaveeti, S., Maytham, E., Awogbade, M., Bannister, S., ... & Thein, S. L. (2007). The linear effects of α -thalassaemia, the UGT1A1 and HMOX1 polymorphisms on cholelithiasis in sickle cell disease. *British journal of haematology*, 138(2), 263-270.
116. Nolan, V. G., Ma, Q., Cohen, H. T., Adewoye, A., Rybicki, A. C., Baldwin, C., ... & Steinberg, M. H. (2007). Estimated glomerular filtration rate in sickle cell anemia is associated with polymorphisms of bone morphogenetic protein receptor 1B. *American journal of hematology*, 82(3), 179-184.
117. Amle, D. B., Patnayak, R. L., Verma, V., Singh, G. K., Jain, V., Khodiar, P. K., & Patra, P. K. (2019). VEGF Promoter Region 18-bp Insertion-Deletion Polymorphism in Sickle Cell Disease Patients with Microalbuminuria: A Pilot Study. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 35(2), 278-283.
118. Koshy, M., Entsuaah, R., Koranda, A., Kraus, A. P., Johnson, R., Bellvue, R., Flournoy-Gill, Z., & Levy, P. (1989). Leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Blood*, 74(4), 1403-1408.
119. Nolan, V. G., Adewoye, A., Baldwin, C., Wang, L., Ma, Q., Wyszynski, D. F., ... & Steinberg, M. H. (2006). Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF- β /BMP pathway. *British journal of haematology*, 133(5), 570-578.
120. Taylor, J. G., Ackah, D., Cobb, C., Orr, N., Percy, M. J., Sachdev, V., ... & Gladwin, M. T. (2008). Mutations and polymorphisms in hemoglobin genes and the risk of pulmonary hypertension and death in sickle cell disease. *American journal of hematology*, 83(1), 6-14.
121. Roberts, K. E., McElroy, J. J., Wong, W. P. K., Yen, E., Widlitz, A., Barst, R. J., ... & Morse, J. H. (2004). BMPR2 mutations in pulmonary arterial hypertension with congenital heart disease. *European Respiratory Journal*, 24(3), 371-374.

122. Trembath, R. C., Thomson, J. R., Machado, R. D., Morgan, N. V., Atkinson, C., Winship, I., ... & Morrell, N. W. (2001). Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *New England Journal of Medicine*, 345(5), 325-334.
123. Ashley-Koch, A. E., Elliott, L., Kail, M. E., De Castro, L. M., Jonassaint, J., Jackson, T. L., ... & Telen, M. J. (2008). Identification of genetic polymorphisms associated with risk for pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 111(12), 5721-5726.
124. Klings, E. S., Dworkis, D. A., Sedgewick, A., Hartley, S. W., Allison, A. K., Telen, M. J., ... & Steinberg, M. H. (2009). Genetic Polymorphisms in NEDD4L Are Associated with Pulmonary Hypertension of Sickle Cell Anemia. *Blood*, 114(22), 2562.
125. Nouraie, M., Reading, N. S., Campbell, A., Minniti, C., Rana, S. R., Luchtman-Jones, L., ... & Gordeuk, V. R. (2009). Cytochrome b5 Reductase T116S Mutation and Hemolysis in Sickle Cell Disease. *Blood*, 114(22), 903.
126. Elliott, L., Ashley-Koch, A. E., Castro, L. D., Jonassaint, J., Price, J., Ataga, K. I., ... & Telen, M. J. (2007). Genetic polymorphisms associated with priapism in sickle cell disease. *British journal of haematology*, 137(3), 262-267.
127. Blanc, L., Liu, J., Vidal, M., Chasis, J. A., An, X., & Mohandas, N. (2009). The water channel aquaporin-1 partitions into exosomes during reticulocyte maturation: implication for the regulation of cell volume. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 114(18), 3928-3934.
128. Endeward, V., Musa-Aziz, R., Cooper, G. J., Chen, L. M., Pelletier, M. F., Virkki, L. V., ... & Gros, G. (2006). Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO₂ transport across the human erythrocyte membrane. *The FASEB Journal*, 20(12), 1974-1981.
129. Pruissen, D. M. O., Slooter, A. J., Rosendaal, F. R., van der Graaf, Y., & Algra, A. (2008). Coagulation factor XIII gene variation, oral contraceptives, and risk of ischemic stroke. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 111(3), 1282-1286.

130. Reiter, C. D., Wang, X., Tanus-Santos, J. E., Hogg, N., Cannon, R. O., Schechter, A. N., & Gladwin, M. T. (2002). Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nature medicine*, 8(12), 1383-1389.
131. Rother, R. P., Bell, L., Hillmen, P., & Gladwin, M. T. (2005). The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*, 293(13), 1653-1662.
132. Schäfer, A., Widder, J., Eigenthaler, M., Ertl, G., & Bauersachs, J. (2004). Reduced basal nitric oxide bioavailability and platelet activation in young spontaneously hypertensive rats. *Biochemical pharmacology*, 67(12), 2273–2279.
133. Nishank, S. S., Singh, M. P. S. S., Yadav, R., Gupta, R. B., Gadge, V. S., & Gwal, A. (2013). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with sickle cell disease patients in India. *Journal of human genetics*, 58(12), 775-779.
134. Antwi-Boasiako, C., Dzudzor, B., Kudzi, W., Doku, A., Dale, C. A., Sey, F., ... & Donkor, E. S. (2018). Association between eNOS gene polymorphism (T786C and VNTR) and sickle cell disease patients in Ghana. *Diseases*, 6(4), 90.
135. Thakur, T. J., Guindo, A., Cullifer, L. R., Li, Y., Imumorin, I. G., Diallo, D. A., & Thomas, B. N. (2014). Endothelin-1 but not Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism is Associated with Sickle Cell Disease in Africa. *Gene regulation and systems biology*, 8, 119–126.
136. Vilas-Boas, W., Figueiredo, C. V., Pitanga, T. N., Carvalho, M. O., Santiago, R. P., Santana, S. S., Guarda, C. C., Zanette, A. M., Cerqueira, B. A., & Gonçalves, M. S. (2016). Endothelial Nitric Oxide Synthase (-786T>C) and Endothelin-1 (5665G>T) Gene Polymorphisms as Vascular Dysfunction Risk Factors in Sickle Cell Anemia. *Gene regulation and systems biology*, 10, 67–72.
137. Cheng, J., Liu, J., Li, X., Yu, L., Peng, J., Zhang, R., ... & Nie, S. (2008). Effect of polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase on ischemic stroke: a case-control study in a Chinese population. *Clinica Chimica Acta*, 392(1-2), 46-51.

138. Armenis, I., Kalotychou, V., Tzanetea, R., Kollia, P., Kontogeorgiou, Z., Anastasopoulou, D., ... & Rombos, I. (2017). Prognostic value of T786C and G894T eNOS polymorphisms in sickle cell disease. *Nitric Oxide*, 62, 17-23.
139. Yousry, S. M., Ellithy, H. N., & Shahin, G. H. (2016). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of vasculopathy in sickle cell disease. *Hematology*, 21(6), 359-367.
140. Kumar, R., Mishra, S., & Shrivastava, S. (2021). A meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene T786C polymorphism as a risk factor for acute chest syndrome in sickle cell disease. *Meta Gene*, 27, 100827.
141. Perelman, N., Selvaraj, S. K., Batra, S., Luck, L. R., Erdreich-Epstein, A., Coates, T. D., ... & Malik, P. (2003). Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity. *Blood*, 102(4), 1506-1514.
142. Niu X, Nouraie M, Campbell A, Rana S, Minniti CP, Sable C, et al. Angiogenic and inflammatory markers of cardiopulmonary changes in children and adolescents with sickle cell disease. *PLoS One*. 2009 Nov 23;4(11).
143. Reutelingsperger, C. P. M., & Van Heerde, W. L. (1997). Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 53(6), 527-532.
144. Yoshizaki, H., Tanabe, S., Arai, K., Murakami, A., Wada, Y., Ohkuchi, M., Hashimoto, Y., & Maki, M. (1992). Effects of calphobindin II (annexin VI) on procoagulant and anticoagulant activities of cultured endothelial cells. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 40(7), 1860–1863.
145. Gerke, V., & Moss, S. E. (1997). Annexins and membrane dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1357(2), 129-154.
146. Anderson, H. C. (1995). Molecular biology of matrix vesicles. *Clinical orthopaedics and related research*, (314), 266-280.

147. Xiao, Z., Camalier, C. E., Nagashima, K., Chan, K. C., Lucas, D. A., de la Cruz, M. J., Gignac, M., Lockett, S., Issaq, H. J., Veenstra, T. D., Conrads, T. P., & Beck, G. R., Jr (2007). Analysis of the extracellular matrix vesicle proteome in mineralizing osteoblasts. *Journal of cellular physiology*, 210(2), 325–335.
148. Balcerzak M, Malinowska A, Thouverey C, Sekrecka A, Dadlez M, Buchet R, et al. Proteome analysis of matrix vesicles isolated from femurs of chicken embryo. *Proteomics*. 2008;8(1):192–205.



8. EKLER

HATAY MKÜ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Orak hücre hastalarında gen polimorfizmleri ile hastalığın komplikasyonları arasındaki ilişkinin araştırılması
ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2020/96

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	MKÜ TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	MKÜ Alahan Kampüsü Antakya HATAY
	TELEFON	0326 245 51 14
	FAKS	0326 245 51 14
	E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Hasan KAYA (Arş.Gör Dr.Güner AKGÜNER'in uzmanlık tezi)			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İç Hastalıkları Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	HMKÜ Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLÇİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLAR ARASI ☐

Etik Kurulu
Unvanı
İmza:

HATAY MKÜ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Orak hücre hastalarında gen polimorfizmleri ile hastalığın komplikasyonları arasındaki ilişkinin araştırılması
ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2020/96

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	02/03/2020-101	1
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU		1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU		1	Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	SIGORTA	☐		
		☐		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
KARAR BİLGİLERİ	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☐		
	Karar No: 01	Tarih: 03/09/2020		

KARAR 01- Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü İç Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Hasan KAYA'nın (Arş.Gör Dr.Güner AKGÜNER'in uzmanlık tezi) "Orak hücre hastalarında gen polimorfizmleri ile hastalığın komplikasyonları arasındaki ilişkinin araştırılması" isimli çalışması görüşülmüş olup; çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve etik kurallara uygun bulunmuş olup; çalışmanın finans kaynağı olarak gösterilen, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nden (BAP) çalışmanın maddi olarak desteklendiğine dair alınan belgelerin Kurulumuza ulaştıktan sonra Çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	PROF.DR.NAZAN SAVAŞ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım	İmza
Prof.Dr.Nazan SAVAŞ	Halk Sağlığı	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Aydiner KALACI	Ortopedi ve Travmatoloji	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Burçin ÖZER	Tıbbi Mikrobiyoloji	MKÜ			E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Neslihan PINAR	Tıbbi Farmakoloji	MKÜ			E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Erhan YENGİL	Aile Hekimliği	MKÜ			E ☒ H ☐	

Etik Kurul Başkanı
Unvanı
İmza

HATAY MKÜ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Orak hücre hastalarında gen polimorfizmleri ile hastalığın komplikasyonları arasındaki ilişkinin araştırılması							
ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		2020/96							
Av.Nefise Yeşil YILDIZ	Hukuk	MKÜ Hukuk Müşavirliği	E ✓	K □	E □	H ✓	E □	H ✓	Katılmadı
Gül Ayşe GÜLPINAR	Öğretmen	Millî Eğitim Bakanlığı Hacılar İlköğretim Okulu	E □	K ✓	E □	H ✓	E ✓	H □	
İbrahim PARA	Bilgisayar	Esnaf	E ✓	K □	E □	H ✓	E ✓	H □	
Hakan BORAZAN	Öğretmen	Millî Eğitim Bakanlığı İslahiye Yeşilyurt İlköğretim Okulu	E ✓	K □	E □	H ✓	E ✓	H □	
Dr. Öğr. Üyesi Müge ÖZSAN YILMAZ	İç Hastalıkları	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E □	K ✓	E □	H ✓	E ✓	H □	
Doç. Dr. Mehmet Hanifi KOKAÇYA	Ruh Sağlığı	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E ✓	K □	E □	H ✓	E ✓	H □	
Dr.Öğr.Üyesi Uğur KOÇAK	Adli Tıp	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E ✓	K □	E □	H ✓	E ✓	H □	
Dr. Öğr. Üyesi İbrahim KAHRAMAN	Biyofizik	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E ✓	K □	E □	H ✓	E □	H ✓	
Dr.Öğr. Üyesi Umut BAKKALOĞLU	Fizyoloji	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E ✓	K □	E □	H ✓	E ✓	H □	

*:Toplantıda Bulunma

Etik
Unv:
İmza

9. ÖZGEÇMİŞ

■■■■■■■■■■ yılında ■■■■■■■■■■'da doğdum. İlköğretime Remzi Oğuz İlköğretim Okulu'nda başlayıp Atatürk İlköğretim Okulu'nda bitirdim. Lise eğitimini Kayseri Fen Lisesi'nde aldım. Ardından 2009-2015 yılları arası Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimi aldım. Mezun olduktan sonra Erzin Devlet Hastanesi'nde, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'nda görev yaptım. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda 2017 yılından beri uzmanlık eğitimimi sürdürmekteyim.

