

**ANAMUR YÖRESİNİN β -TALASEMİ MUTASYON
TİPLENDİRİLMESİ**

Seran ALTUNKILIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Kıymet AKSOY

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından SBE2002YL12 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:.....

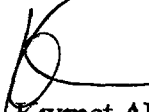
ADANA-2004

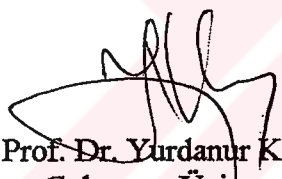
KABUL ve ONAY SAYFASI

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Seran Altunkılıç tarafından yüksek lisans programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Anamur Yöresinin β -Talasemi Mutasyon Tiplendirilmesi” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05.01.2004

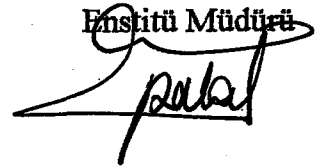

Prof. Dr. Kıymet AKSOY
Çukurova Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Yurdanur KILINÇ
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi


Doç. Dr. M. Akif ÇÜRÜK
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulu'nun 26.01.2004... tarih ve 3/14-2... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Z. POLAT
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde büyük emeği geçen başta Hocam **Prof. Dr. Kıymet Aksoy** olmak üzere, Prof. Dr. Levent KAYRIN, Prof. Dr. Nurten DİKMEN, Doç. Dr. Abdullah TULİ, Doç. Dr. M. Akif ÇÜRÜK, Doç. Dr. Gülen ATTİLA ve Yrd. Doç. Dr. Tamer İNAL'a ve Ç.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm çalışanlarına katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında bana her türlü teknik konuda yardım eden bölümümüz çalışanları Halil Gülsev, Mikail Kalaycı, Erdal Özdolap ve Ali Sönmez'e ayrıca teşekkür ederim.

Anamur'dan örneklerin toplanması sırasında bizden yardımlarını esirgemeyen Mersin Prof. Dr. Muzaffer AKSOY Kalıtsal Kan Hastalıkları Tanı Merkezi çalışanı Dr. Fatma TOSUN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı SBE2002YL12 nolu proje ile destekleyen Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Lisans eğitimim sonrasında beni Yüksek Lisans eğitimi alma konusunda yüreklendiren ve her türlü olumsuzluğa karşı maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen başta annem olmak üzere, aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Seran ALTUNKILIÇ

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1. Anamur'un Tarihi ve Coğrafi Özellikleri	4
2.2. Hemoglobin'in Yapısal Özellikleri	5
2.3. Hemoglobin Tipleri	7
2.4. Hemoglobin Sentezi	7
2.4.1. Globin Genlerinin Gelişimsel Kontrolü	9
2.4.1.1. Locus Control Region (LCR)	10
2.4.1.1.1. LCR'nin Özellikleri	11
2.4.1.1.2. LCR'nin Çalışma Modeli	11
2.4.1.1.3. Eritroid Lineage Spesifik Transkripsiyon Faktörleri	14
2.4.1.1.3.1. GATA-1	14
2.4.1.1.3.2. Nükleer Faktör-Eritroid 2 (NF-E2)	14
2.4.1.1.3.3. Eritroid Kruppel-like Faktör (EKLF)	14
2.4.1.1.3.4. TAL1/SCL ve RBTN2	15
2.4.1.1.3.5. Nükleer Faktör-Eritroid 4 (NF-E4)	16
2.4.1.1.4. Eritroid Hücrelerde Yaygın Olarak Eksprese Edilen Transkripsiyon Faktörleri	16
2.4.1.1.4.1. GATA-2	16
2.4.1.1.4.2. Yin Yang-1 (YY1)	16
2.5. β -Talasemiler	16
2.5.1. β -talasemik mutasyon tipleri	17
2.5.1.1. Gen Delesyonları	22
2.5.1.2. Transkripsiyonel Mutasyonlar	22
2.5.1.3. RNA Processing Mutasyonları	23
2.5.1.3.1. Splice Kavşağındaki Mutasyonlar	23
2.5.1.3.2. Konsensus Dizi Değişikliklerine Neden Olan Mutasyonlar	23
2.5.1.3.3. İntronlardaki Değişiklikler	23
2.5.1.3.4. Kodlanan Bölgedeki Mutasyonlar	24
2.5.1.4. RNA Translasyon Mutasyonları	24
2.5.1.4.1. Anlamsız Mutasyonlar	24
2.5.1.4.2. Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonları	24
2.5.1.5. Dominant Geçen β -Talasemi ve Stabil Olmayan β Globin Varyantları	25
2.5.1.6. Başlık Bölgesi (Cap Site) Mutasyonları	25
2.5.1.7. Başlangıç Kodonu Mutasyonları	25

2.5.1.8. 3' UTR Mutasyonları	25
2.5.1.9. Poliadenilasyon Sinyal Mutasyonları	26
2.6. β -Talasemi Tedavisi	26
2.6.1. Tedavide Yeni Bir Yakalaşım: Gen Terapisi	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. Gereçler	29
3.1.1. Cihazlar	29
3.1.2. Kimyasal Malzemeler	29
3.2. Örnek Toplama	31
3.3. Yöntemler	31
3.3.1. Hematolojik İncelemeler	31
3.3.1.1. Kan Sayımı	32
3.3.1.2. Hemoglobin Elektroforezi	32
3.3.1.2.1. Prensiptir	32
3.3.1.2.2. Ayırıcılar	32
3.3.1.2.3. Yöntem	33
3.3.1.3. Hemoglobin A ₂ Ölçümü	33
3.3.1.3.1. Prensiptir	33
3.3.1.3.2. Hemolizat hazırlama	33
3.3.1.3.3. Ayırıcılar	33
3.3.1.3.4. Yöntem	34
3.3.1.3.5. Yorum	34
3.3.1.4. HbF Ölçümü	35
3.3.1.4.1. Prensiptir	35
3.3.1.4.2. Ayırıcılar	35
3.3.1.4.3. Yöntem	35
3.3.1.4.4. Yorum	36
3.3.2. Tam Kandan DNA İzolasyonu	36
3.3.2.1. Lökositlerden DNA İzolasyonu (Kısa Yöntem)	36
3.3.2.1.1. Ayırıcılar	36
3.3.2.1.2. Yöntem	37
3.3.2.1.3. Konsantrasyon ve Verim Hesabı	38
3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Belirli Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu	38
3.3.4. ARMS (Amplification Refractory Mutation System) Yöntemiyle β Globin Gen Bozukluklarının Tanımlanması	39
3.3.4.1. Yöntem	40
3.3.4.2. Amplifikasyon Protokolü	40
3.3.4.3. ARMS yönteminde kullanılan primerler	41
3.3.4.4. Termal döngü Protokolü	42
3.3.5. Agaroz Jel Elektroforezi	42
3.3.5.1. Çözeltiler	42
3.3.5.2. Yöntem	43
4. BULGULAR	44
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇLAR	62
7. KAYNAKLAR	63
8. ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Dünya üzerindeki talasemi dağılımı	1
Şekil 1.2. Türkiye’de β -talasemi dağılımı	2
Şekil 2.1. Eritrositin yapısı	5
Şekil 2.2. Hemoglobin A’nın yapısı	6
Şekil 2.3. Hem molekülü	6
Şekil 2.4. İnsan globin genleri arasındaki zamana dair ilişki	8
Şekil 2.5. İnsan β -globin lokusunun organizasyonu	9
Şekil 2.6. İnsan hemoglobinlerinin genetik yapısı	10
Şekil 2.7. β -globin geni ve LCR	10
Şekil 2.8. LCR’nin çalışma modelleri	13
Şekil 2.9. LCR Holokompleksi	13
Şekil 2.10 HS2 ve HS3 içerisindeki transkripsiyon faktörleri	14
Şekil 2.11. İnsan ve sıçan EKLF’leri	15
Şekil 2.12 TNS9 ve RNS1 lentiviral vektörlerinin yapısı	28
Şekil 2.13. TNS9 ile muameleden sonra talasemik kemik iliği hücrelerinde görülen düzelmenin yayma kan preparatlarında gösterimi	28
Şekil 4.1. IVS1-110 mutasyon taraması için ARMS yöntemi ile yapılan amplifikasyonun %2’lik agaroz jeldeki görünümü	53
Şekil 4.2. Mutasyonların dağılım grafiği	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Hemoglobin tipleri	7
Çizelge 2.2. β -talaseminin moleküler patolojisi	17
Çizelge 2.3. Farklı etnik kökenlere özgü β -talasemik mutasyon tipleri	18
Çizelge 2.4. Talasemi tedavi tipleri	26
Çizelge 3.1. ARMS yönteminde kullanılan ortak ve sabit primerlerin baz dizisi	41
Çizelge 3.2. β talasemi mutasyonlarına özgü ARMS primerlerin baz dizisi	41
Çizelge 4.1 Olguların Hemoglobin tipleri	44
Çizelge 4.2. Olguların hematolojik verileri, hemoglobin tipleri, HbA ₂ ve HbF düzeyleri	45
Çizelge 4.3. Olguların β -talasemi mutasyon tipleri	49
Çizelge 4.4. Mutasyonu saptanamayan olgular	52
Çizelge 4.5. MCV değeri 80 fl'nin altında, HbA ₂ değeri % 1,5-3,7 arasında olup β -talasemi mutasyonu saptanan olgular	52
Çizelge 4.6. Hb tipleri AE ve EE olan iki olgunun hematolojik verileri	52
Çizelge 4.7. Olguların mutasyon tipleri ve görülme sıklıkları	53
Çizelge 4.8. Kadın ve erkek olguların hematolojik verilerinin istatistiksel dağılımı	54
Çizelge 4.9. Olguların hematolojik verilerinin mutasyonlara göre istatistiksel dağılımı	55
Çizelge 4.10. Türkiye'de saptanan β -talasemik olguların mutasyon tipleri ve sıklığı	56

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

α :	Alfa
β	Beta
β^0	Beta zero (Beta sıfır)
β^+	Beta plus (Beta artı)
δ	Delta
ε	Epsilon
γ	Gama
G_γ	G gama
A_γ	A gama
Ψ	Pseudo
ζ	Zeta
bç	Baz çifti
bp	Base pair (Baz çifti)
dNTP	Deoksi nükleozit trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
cDNA	Komplementer DNA
gDNA	Genomik DNA
DE-52	Dietil amino etil-52
e	Enhancer
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikası
EKLF	Eritroid Kruppel-like Faktör
EtBr	Ethidyum bromür
Fsc	Frameshift
Hb	Hemoglobin
Hct	Hematokrit
HS	Hipersensitive Site (Hipersensitif Bölge)
KCl	Potasyum klorür
KCN	Potasyum siyanür
$K_3Fe(CN)_6$	Potasyum ferro siyanür
kb	Kilo baz (1000 bç)
LCR	Locus Control Region (Lokus kontrol bölgesi)
RNA	Ribonükleik Asit
mRNA	Messenger RNA (Mesajcı RNA)
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin (Ortalama eritrosit hemoglobini)
MCV	Mean Corpuscular Volume (Ortalama eritrosit hacmi)
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Consantration (Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu)
$MgCl_2$	Magnezyum klorür

NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
NF-E2	Nükleer Faktör-Eritroid 2
NF-E4	Nükleer Faktör-Eritroid 4
5' Cap site	5 üssü başlık bölgesi
Cd	Codon (Kodon)
IVS	Intervening sequence (İntron dizileri)
3' UTR	3' untranslated region (3' translasyonu yapılmayan bölge)
OD	Optik Dansite
poly(A) Signal	Polyadenilation signal (Poliadenilasyon sinyali)
p	Promotor
RBC	Eritrosit
RRE	Rev-response element
SA	Splice akseptör
SD	Splice donör
SDS	Sodyum dodesil sülfat
ARMS	Amplificatory Refractory Mutation System
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
TBE	Tris Borat EDTA
TI	Talasemi intermedia
TM	Talasemi majör
YY1	Ying Yang-1

ÖZET

ANAMUR YÖRESİNİN β -TALASEMİ MUTASYON TİPLENDİRİLMESİ

Talasemi; yaşamın erken evrelerinde şiddetli anemiye yol açan, bir ya daha fazla globin zincirinin azalması ile karakterize bir grup kalıtsal hastalıktır. Talasemi 1925 yılında Detroit'li bir pediatrist olan Thomas Cooley'in bir İtalyan çocukta derin anemi, splenomegali ve kemik deformiteleri ile karakterize bir sendromu tanımlamasına kadar klinik bir hastalık olarak kabul edilmiyordu.

β -talasemiler azalmış ya da bozuk gen ekspresyonuna yol açan mutasyonların sebep olduğu konjenital anemilerdir. Dünya üzerinde yaklaşık 250 milyon taşıyıcı ile β -talasemi morbidite ve mortalitenin başlıca genetik sebebidir.

β -talasemi diğer Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi Türkiye'de de en sık görülen tek gen hastalığıdır. Türkiye'nin üç kıtanın birleşimi üzerinde yerleşmiş olması, Asya ve Avrupa arasında köprü görevi yapması, farklı popülasyonların göçüne neden olmuştur. Bundan dolayı etnik farklılık Akdeniz bölgesindeki ülkelere paralel değildir ve bu durum Türkiye'deki β -talasemi mutasyonlarının çok sayıda olmasının ana nedenidir.

Bu çalışmada; Anamur bölgesinde talasemi taşıyıcılarının mutasyon tipleri saptanmıştır. Talasemi mutasyonlarının tiplendirilmesinde ARMS yöntemi kullanılmış, IVS1-110'nun (%68,5) Anamur bölgesinde görülen en sık mutasyon, bunu azalan oranlarda, IVS2-745 (%11,1), -30 (%9,3), IVS1-6 (%3,7), IVS2-1 (%3,7), Cd 8 (%1,9) ve Fsc 5 (%1,9)'in izlediği gösterilmiştir.

Anamur bölgesinde β -talasemi mutasyon tipi saptanmış ve bölgenin talasemi açısından riskli olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: β -talasemi, ARMS, Prenatal tanı.

ABSTRACT

β -THALASSEMIA MUTATION TYPES OF ANAMUR REGION

Thalassemia is a group of related inherited disorders characterized by the reduced synthesis of one or more globin chains leading to severe anemia early in life. Thalassemia was not recognized as a clinical entity until 1925, when Thomas Cooley, a Detroit pediatrician, described a syndrome among children of Italian descent characterized by profound anemia, splenomegaly, and bony deformities.

β -thalassemias are congenital anemias caused by mutations that reduce or abolish β -globin gene expression. With an estimated 250 million carriers worldwide β -thalassemia is a major genetic cause of morbidity and mortality.

β -thalassemia is one of the most common genetic disorders in Turkey as it is several other Mediterranean countries. Consistent with the history of Turkey, which is situated at the meeting point of three continents and stands as a crossroad between Asia and Europe, the country has attracted migrations of different populations; thus it has ethnic diversity unparalleled in any country of the Mediterranean region. This admixture is the probable cause of the large number of β -thalassemia mutations observed in Turkey.

In this study; we investigated thalassemia mutations of β -thalassemia carriers in Anamur region. ARMS method was used for characterization of molecular mutations types. The IVS1-110 (68,5%) mutation is the most common β -thalassemia defect in Anamur region, decreasing order by IVS2-745 (11,1%), -30 (9,3%), IVS1-6 (3,7%), IVS2-1 (3,7%), Cd 8 (1,9%) and Fsc 5 (1,9%) mutations.

We conclude that β -thalassemia mutations exist in Anamur region and β -thalassemia is a potential risk in same region.

Key Words: β -thalassemia, ARMS, Prenatal Diagnosis.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Talasemiler; genetik olarak hemoglobin sentezindeki bir bozukluk nedeni ile hipokrom, mikrositer, hemolitik anemiye sebep olan otozomal resesif hastalıklardır. İlk kez; 1925 yılında Detroitli pediastrist Dr. Thomas Cooley ve Pearl Lee tarafından şiddetli anemisi, dalak büyüklüğü ve karakteristik kemik değişiklikleri olan bir çocuk hastada tanımlanmıştır¹. Önceleri sadece Akdeniz ülkelerinde yaygın olduğu sanıldığından adı Yunanca “Thalas” Akdeniz sözcüğünden gelmektedir. Ancak günümüzde; Kuzey Afrika, Ortadoğu, Hindistan, Çin, Güneydoğu Asya gibi malyanın sık olduğu ülkelerde, Avrupa ve Amerika’da bulunduğu bilinmektedir^{2,3} (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Dünya üzerindeki talasemi dağılımı (sarı ile işaretli alanlar)⁴.

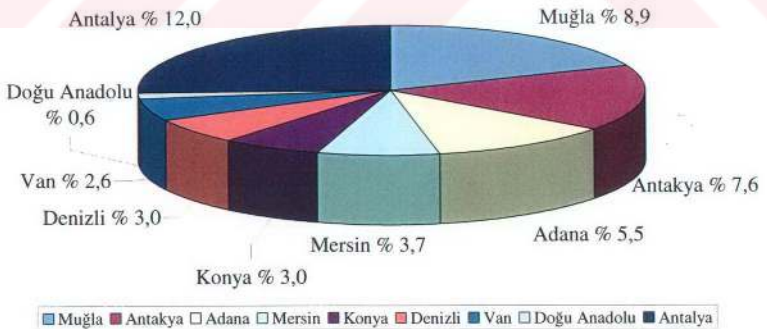
Talaseminin dünya üzerindeki en yaygın genetik hastalık olduğu kabul edilir^{5,6}. Dünya Sağlık Örgütü’nün yayınlarına göre, dünyada talasemi ve anormal hemoglobin sıklığı %5,1’dir ve yaklaşık 266 milyon taşıyıcı vardır. Her yıl dünyada 144 milyon bebek doğmakta, doğan bebeklerin %6,5’i, yani 9.285.000’u taşıyıcı olarak dünyaya gelmektedir. Ayrıca her yıl yaklaşık 300.000 hasta çocuk dünyaya gelmektedir⁷. Dünya nüfusunun %4,5’i ise β -talasemi taşıyıcısıdır⁸.

Talasemi, hemoglobinin globin zincirlerinden bir ya da bir kaçının sentezinde azalma veya hiç sentez edilememesi ile karakterize olan bir hastalıktır. β -talasemi

Türkiye'nin de üzerinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinden başlayarak, Ortadoğu, Hindistan ve Güneydoğu Asya'ya kadar uzanan ve Dünya Talasemi Kuşağı olarak adlandırılan geniş bir bölgede değişik oranlarda görülmektedir⁹.

β -talasemi özellikle İtalya ve Yunanistan'da oldukça yaygındır. İtalya'da Po Nehri deltasında talasemi taşıyıcılık oranı %20, Sicilya'da %10 ve Sardinya'da %11-34'tür¹⁰. Kıbrıs'ta talasemi taşıyıcılığı %15 civarındadır. Akdeniz bölgesinde, batıya doğru gidildikçe talasemi insidansı düşmeye başlar. İspanya'da Bask bölgesinde %3,5, Yugoslavya'da %4,7'dir. Bulgaristan'da hastalık her bölgede görülürse de güneyde daha sıktır ve taşıyıcı oranı %30'a ulaşmaktadır. Bulgaristan'ın kuzeydoğusunda ise talasemi taşıyıcılığı %0,5-2,1 arasında değişmektedir. Ayrıca Azerbaycan'da %6,3-7,8, Özbekistan'da %0,2-15 ve Dağıstan'da %3,2-16,8 arasında görülmektedir⁷.

Türkiye'de en önemli sağlık probleminden biri olan β -talasemi ile ilgili ilk çalışmalar Prof. Dr. Muzaffer Aksoy tarafından başlatılmıştır. Ülkemizde ilk tarama çalışması da Çavdar ve Arcasoy tarafından yapılmış olup Türkiye insidansının %2,1 (1.300.000 taşıyıcı birey) olduğu bildirilmiştir. Fakat bazı bölgelerde daha yoğun olarak bulunduğu (%0,6-12) bilinmektedir⁷ (Şekil 1.2). T.C. Sağlık Bakanlığı kayıtlarına göre Türkiye'de yaklaşık olarak 4000 β -talasemi hastası bulunmaktadır¹¹.



Şekil 1.2. Türkiye'de β -talasemi dağılımı¹¹

Daha sonraki çalışmalarda β -talasemi mutasyon tipleri moleküler düzeyde saptanmış ve bugüne kadar ülkemizde 30'dan fazla mutasyon tipi bulunmuştur. Bu mutasyonların türü ve sıklığı bölgeden bölgeye farklılıklar göstermektedir.

Heterozigotların taramalarla belirlenmesi ve prenatal tanı ile, başta Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, Güney Kıbrıs, Yunanistan ve İtalya'da olmak üzere Akdeniz ülkelerinde talasemi sorunu büyük ölçüde çözülmüştür.

Türkiye'de de yapılan tarama çalışmaları ve buna ek olarak kayıtlı hasta sayısı dikkate alındığında β -talaseminin ulusal bir sağlık sorunu olduğu görülmektedir. Bu nedenle, 30.12.1993 Tarih ve 21804 sayılı Resmi Gazete'de 3960 sayılı Kalıtsal Kan Hastalıkları ile Mücadele Kanunu çıkmış ve bu çerçevede, 5 ana üniteden oluşması planlanan Kalıtsal Kan Hastalıkları Araştırma ve Tedavi Merkezleri kurulmasına karar verilmiştir.

Bu tez çalışmasında da talasemi açısından daha önce herhangi bir çalışma yapılmamış olan İçel'e bağlı Anamur ilçesinde mutasyon tipleri belirlenerek riskli çiftlere prenatal tanıda yardımcı olmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

β -talasemi otozomal resesif geçiş gösteren genetik hastalıklar arasında dünyada en yaygın olanıdır. Akdeniz lkeleri, Ortadoğu, Afrika ve Güneydoğu Asya başta olmak üzere, gler ve kitlesel etkileşimler nedeniyle dünyanın her yerinde yaygın olarak gözlenmektedir. Talasemi kuşağında bulunan ülkemizde de hastalığa her bölgede rastlanabilmektedir. β -talasemi taşıyıcı sıklığı yörelere göre değişmekle birlikte Türkiye ortalaması %2,1 olarak bildirilmiştir^{3,12-15}.

Talasemi eritrositler içerisindeki hemogloblin molekülünü oluşturan globlin zincirlerinden birinin ya da daha fazlasının yapılamaması veya yetersiz yapımı ile ortaya çıkan anemidir^{16,17}.

2.1. Anamur'un Tarihi ve Coğrafi zellikleri

Akdeniz bölgesinde bulunan Anamur ilçesi doğuda Bozyazı, batıda Antalya iline bağlı Gazipaşa, kuzeyde Karaman iline bağlı Ermenek ilçesi, güneyde Akdeniz ile çevrilidir. İlçe merkezi Mersin'e 230 km., Antalya'ya 265 km., Karaman'a 230 km., Kıbrıs'a 40 Mil (76 km) uzaklıkta olup, Mersin-Antalya Devlet Karayolu üzerinde kurulmuş, yzlcm 1241 km². 'dir. am ormanlarıyla örtülü dağlarla çevrili, 18 km'lik kumul sahiliyle Akdeniz'le kucaklaşan, Sultan suyu ve Dragon aylarının suladığı verimli bir ovada kurulmuş olan Anamur kentinin Antik dönemlerdeki adı Anamerium'dur. Anamur M.. 8.yy'da Asurluların eline geçmiş, daha sonra Roma İmparatoru Calicula tarafından Kommagene Kralı IV. Antiochos'a verilmiştir. M.S. 395 yılında ise Bizans dönemi başlamıştır. M.S. 8.yy'da Arap ve Bizanslılar arasında el değiştiren kent 11. ve 12.yy'larda önce Selçukluların, daha sonra Karamanoğulları'nın egemenliğinde kalmıştır. 15. yy.'ın ikinci yarısında ise Osmanlı'lara bağlanmıştır.

Coğrafi konumu itibariyle, Türkiye'nin en güneyinde bulunması ve ikliminin çok uygun olması nedeniyle tarım alanında, özellikle seracılık, muz, ilek ve yer fıştığı retiminde Türkiye'de n kazanmıřtır¹⁸.

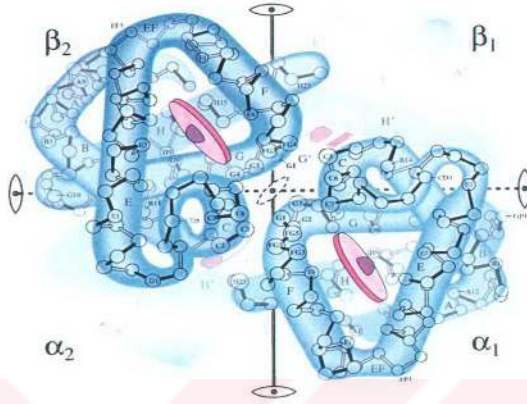
2.2. Hemoglobin'in Yapısal Özellikleri

Hemoglobin, kırmızı kan hücrelerinin oksijen taşıyan proteindir (Şekil 2.1). Eritrositin yaklaşık %30'unu içerir. Kırmızı hücrelerin 1 ml'si oksijen gazının yaklaşık 0,5 ml'sini tutar. Eritrositler akciğerlerden geçerken hemoglobin molekülü oksijeni bağlar, kırmızı hücre dokuların kapillerine eriştiğinde ise yükünü boşaltır. Hemoglobinin oksijen bağlama özellikleri çoğu dokularda hakim olan nispeten yüksek oksijen geriliminde dahi kendi oksijenini boşaltabilme şeklindedir^{19,20}.



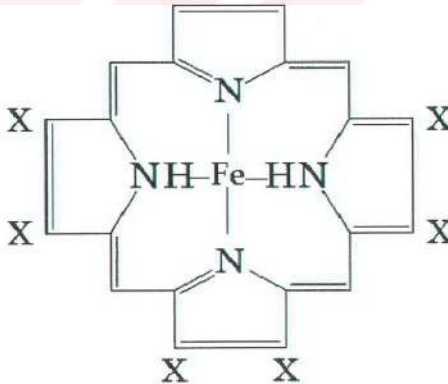
Şekil 2.1. Eritrositin yapısı²¹

Hemoglobin (Hb) globin ve hem'den oluşan 64400 dalton ağırlığında tetramer bir yapıdır. İki çift özdeş olmayan polipeptid zinciri ve dört molekül hem'den oluşur. Globüler hemoglobin molekülünün kompleks yapısındaki hem molekülü tüm insan hemoglobin tiplerinde aynıdır ve hidrofobik bir ortam oluşturan hem cepleri içerisinde yerleşmiştir. Oksijenin kanda taşınması O_2 'nin hemoglobinle reversibil kombinasyonlar yapmasıyla sağlanır²² (Şekil 2.2)



Şekil 2.2. Hemoglobin A'nın yapısı²³.

Hemoglobin prostetik grup olarak hem adında bir siklik tetrahidropirole sahiptir ve bu grup, proteinlerin kırmızı renginden sorumludur. Tetraپیoller, düzeysel bir halkada, dört α -metenil köprüleri ile birbirine bağlanmış 4 pirol molekülünden meydana gelirler (Şekil 2.3)¹⁹.



Şekil 2.3. Hem molekülü²¹

2.3. Hemoglobin Tipleri

Hemoglobini oksijen transportu için kullanan bütün canlılar gelişmelerinin erken ve geç safhalarında farklı hemoglobin türlerine sahiptirler. İnsanlarda iki gen kümesi gelişim sırasında hemoglobinlerin sentezini yönetir; embriyonik ζ geni ve iki yetişkin α genini içeren α lokusu ile ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ ve β genlerini içeren β lokusu²⁴.

Erişkin hemoglobininin yaklaşık %97'sini majör hemoglobin olan HbA ($\alpha_2\beta_2$), geri kalanları ise minör erişkin hemoglobini HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) ve fetal hemoglobin olan HbF ($\alpha_2\gamma_2$) oluşturur^{17,25-28}.

α zinciri 141 aminoasit, β ve diğer insan hemoglobinlerinden HbA₂ ve HbF'in yapısına giren δ ve γ zincirleri ise 146 aminoasit içermektedir. Embriyonik gelişimde tanımlanan hemoglobinler Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) ile hemoglobin Portland I ($\zeta_2\gamma_2$) ve hemoglobin Portland II ($\zeta_2\beta_2$)'dir^{22,27,29} (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Hemoglobin tipleri²².

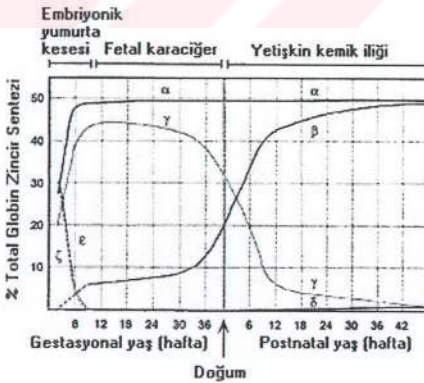
İsim	Dönem	Formül	Erişkin değeri	Fetusta Yapım Zamanı
Hb Gower I	Embriyonik Hb	$\zeta_2\epsilon_2$	-	İlk 3 ayda
Hb Gower II	Embriyonik Hb	$\alpha_2\epsilon_2$	-	İlk 3 ayda
Hb Portland I	Embriyonik Hb	$\zeta_2\gamma_2$	-	İlk 3 aydan sonra ve kordon kanında
Hb Portland II	Embriyonik Hb	$\zeta_2\beta_2$	Hb H ve talasemi taşıyıcılarında az miktarda	İlk 3 aydan sonra
Hb F	Fetal Hb	$\alpha_2\gamma_2$	%1'den az	Intrauterin 10-12. haftada
Hb A	Erişkin Hb	$\alpha_2\beta_2$	%96	3. trimesterde
Hb A ₂	Erişkin Hb	$\alpha_2\delta_2$	%2,5-3,5	6-8. haftada yapımı başlar

2.4. Hemoglobin Sentezi

Ontojeniteleri sırasında insan kırmızı kan hücreleri farklı α ve β benzeri globin genleri eksprese eder. Bu fenomen "hemoglobin switching" olarak bilinir ve iki farklı gelişimsel basamakta ortaya çıkar; (i) gestasyonun ilk evrelerinde meydana gelen α ve β

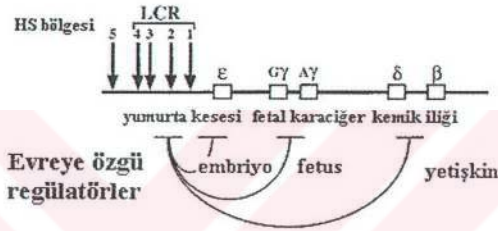
gen kümelerinin ikisinde birden ekspresyonal değişim gerektiren embriyonik→fetal globin dönüşümü ve (ii) doğum esnasında sadece β gen kümesinde meydana gelen fetal→yetişkin dönüşümü şeklindedir²⁴⁻³⁰. $\epsilon \rightarrow \gamma$ ve $\gamma \rightarrow \beta$ globin gen ekspresyonunda dönüşüm yalnız transkripsiyonel düzeyde kontrol edilir. $\alpha \rightarrow \zeta$ dönüşümünde ise her ne kadar post-transkripsiyonel mekanizmalar rol oynasa da transkripsiyonel düzeyde de kontrol edilir. İnsan dışındaki pekçok türde, erken gelişim sırasında ortaya çıkan sadece bir tane embriyonikten son globin ekspresyonuna dönüşüm vardır. Fetal periyod süresince γ geninin ekspresyonu, yaklaşık 35-55 milyon yıl önce, primatların evrimi sırasında yer alan oldukça yeni bir olaydır²⁴.

Memelilerin çok erken gelişim basamakları sırasında eritroid farklılaşması çok fazla anlaşıl原因amamıştır, ama primitif eritroblastlarda embriyonik α ve β benzeri globin genlerinin aktivasyonunu gerektiren embriyonik yumurta kesesinin kan adacıklarında başladığına inanılır. İnsanlarda bu hemoglobin dönüşümü gestasyonun beş ya da altıncı haftaları sırasında meydana gelir. Böylece, embriyonik globin genleri insan gelişiminin çok erken bir safhasında aktive edilir ve tekrar kapanmadan önce sadece birkaç haftalığına eksprese edilir. Fetal eritropoez perinatal periyoda kadar hakimdir, eritropoez tekrar değişime başladığında kemik iliği ve globin gen ekspresyonunun yetişkin modelinin çatısı kurulur. İnsan globin genlerinin embriyonik değişimi Şekil 2.4'de özetlenmiştir (Şekil 2.4)³⁰.



Şekil 2.4. İnsan globin genleri arasındaki zamana dair ilişki³⁰

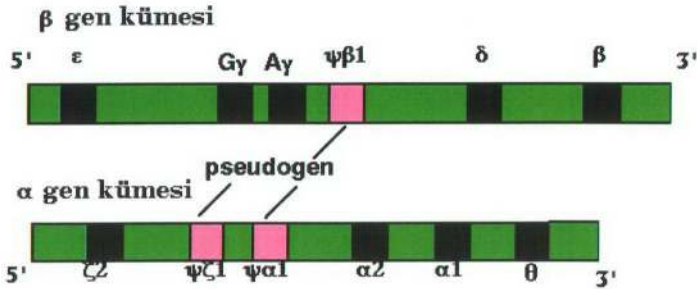
Gebeliğin erken devrelerinde Hb Portland I ($\zeta_2\gamma_2$), Hb Portland II ($\zeta_2\beta_2$), Hb Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$) ve Hb Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$), dominant tespit edilen embriyonik hemoglobinlerdir. Ancak, çok az miktarlarda HbF ve HbA da vardır. Gebeliğin 10-11. haftalarında eritropoezin karaciğer ve dalakta başlaması ile embriyonik Hb'ler azalarak kaybolur ve HbF ($\alpha_2\gamma_2$) yapımı başlar. HbF'nin gama zincirinin 136. pozisyonunda Alanin içeriyorsa A γ veya Glisin içeriyorsa G γ olmak üzere iki farklı gama zinciri vardır. G γ /A γ oranı doğumdan önce 3/1 iken doğumdan sonra 2/3'e iner (Şekil 2.5)^{27,29,30,31}.



Şekil 2.5. İnsan β -globin lokusunun organizasyonu³⁰.

2.4.1. Globin Genlerinin Gelişimsel Kontrolü

Hemoglobin zincirleri iki ayrı kromozomdaki iki ayrı gen kümesi tarafından sentez edilmektedir. α benzeri genler 16. kromozomun kısa kolunda, β benzeri gen kümesi ise 11. kromozomun kısa kolunda yer almaktadır. Alfa gen kümesinde teta, α_1 , α_2 , psödo α_1 , psödo zeta ve zeta geni vardır. β gen kümesi 5' bölgesinden itibaren bir adet embriyonik epsilon, G γ , A γ genleri, psödobeta, delta ve beta genlerini içerir²² (Şekil 2.6).

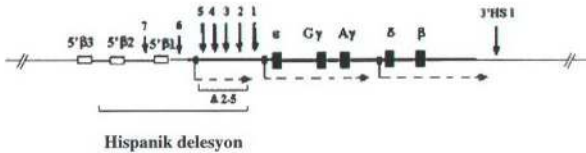


Şekil 2.6. İnsan hemoglobinlerinin genetik yapısı³².

Globin genlerinin gelişimsel kontrolü globin genleri ve asıl düzenleyici element, lokusun 5' bölgesinde yerleşmiş bulunan LCR (Locus Control Region) arasındaki kompleks etkileşimler sayesinde kurulur. LCR; globin genlerinin pozisyonla bağımsız ekspresyonu için yüksek seviyede gereken β lokus kromatin domainini aktive eder²⁴.

2.4.1.1. Locus Control Region (LCR)

LCR; bir dokunun her bir hücresinde ekspresyonun yüksek seviyelerde ilerlemesi için birlikte davranır gibi gözüken DNase hipersensitiv bölgeler (HS) olarak bilinen kümelerden oluşur³³. LCR ilk olarak memelilerde β-globin lokusu ile ilgili yaygın incelemeler sırasında tanımlanmıştır³³⁻³⁵. β-globin LCR'si bir grup gelişimsel olarak sabit, 5' uçtan embriyonik ε genine kadar olan bölgede yerleşmiş bulunan eritroid-spesifik HS'ler içerir. Bu element yaklaşık 16 kb uzunluğundadır ve dört tanesi eritroid-lineage spesifik olan beş adet DNase I hipersensitiv bölge içerir^{24,30,34-38}. LCR üzerinde sonradan tanımlanmış 2 adet daha hipersensitiv bölge yer alır^{33,38,39} (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. β-globin geni ve LCR³³

2.4.1.1.1. LCR'nin Özellikleri

LCR'ler fenotipik olarak başlıca üç özelliği ile karakterize olan güçlü genetik regülatör elementlerdir³⁶. 1) Bağlı oldukları genlerde dokuya özgü ve fizyolojik seviyelerdeki ekspresyonu sağlarlar, 2) transkripsiyonu kopya sayısına bağımlı, pozisyonundan bağımsız biçimde aktive ederler, 3) DNA replikasyon zamanı ile başlama noktasına karar verirler³⁵⁻³⁹.

LCR'ler promotorlar ile klasik enhancer'lar ve kromozomal insulatörlerden farklı, yeni elementlerdir. Gerçekte her iki fonksiyonu da içerirler³⁶.

LCR'ler yüksek seviyede enhancer aktivitesine sahiptirler^{33,35,36}. LCR'nin enhancer aktivitesi 5'HS2, 3 ve 4'de bulunur, 5'HS1 ve 5'de yoktur^{30,35,36,38}. 5'HS 2 ve 3 LCR'nin majör enhancer aktiviteye sahip elemanları gibi gözükür. LCR mikrolokusunda herhangi birinin delesyonu transgenik farelerdeki β geninde globin gen ekspresyonunda %50'ye varan azalmalara neden olur. RNA analizleri sonucu HS2'nin 3'den daha kuvvetli promotor aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir³⁹. 5'HS3 ve 4'deki aktivite sadece kromatine entegre olduklarında ortaya çıkar^{35,36}. 5'HS5 kromatin insulatörü olarak fonksiyon görür³⁵. 5'HS1'in fonksiyonu ise tanımlanmayı beklemektedir^{35,36}. Geçmiş çalışmalar 5'HS5 ve yeni tanımlanan 5'HS6'daki delesyonların globin gen ekspresyonu üzerine majör etkilerinin olmadığını göstermiştir³⁶.

LCR'nin delesyonu sadece globin gen ekspresyonu üzerine değil, aynı zamanda kromatin yapısı ve bütün lokus boyunca replikasyon zamanına da etki eder³⁰.

LCR'nin yokluğunda β -globin lokusunun transkripsiyonu tamamen ortadan kalkar³⁸.

2.4.1.1.2. LCR'nin Çalışma Modeli

LCR fonksiyonlarına dair dört model önerilmiştir; looping, tracking, kolaylaştırılmış tracking ve linking modelleri (Şekil 2.8). Eldeki veriler herhangi birini güçlü bir biçimde desteklemediği gibi dışarıda da bırakmaz³⁵.

Looping modeli uygun konformasyonda holokompleksi zorlayan core-flanking sekanslar ve transkripsiyon faktörlerini bağlayan aktif bölge oluşturan HS iç elementleri ile holokompleks oluşturmak için LCR'nin 5'HS'sinin katlandığını öne sürer. Bu yapı

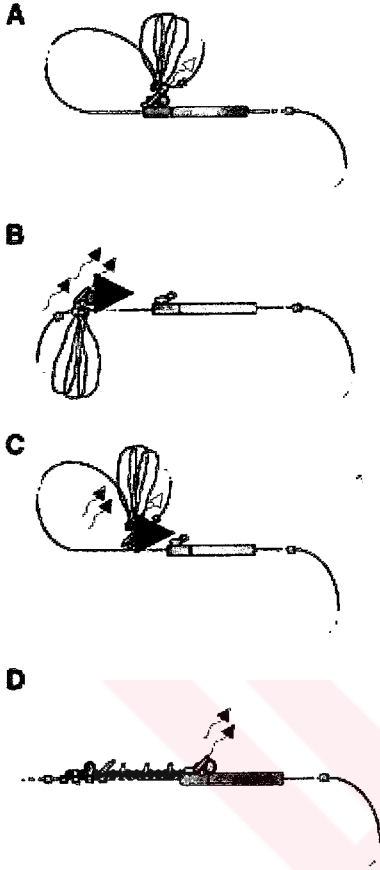
fiziksel olarak ilmeklenir, böylece LCR uygun promotora yaklaşır (Şekil 2.9)^{30,35-39}. Pekçok veri looping modelini desteklemektedir^{30,35-39}.

Holokompleks fikrini destekleyen kanıtlar gelişim safhasına dayanan iki ya da daha fazla promotor arasında takla atabilen ve bir tek gen promotoruna aynı anda LCR'nin etki ettiğini göstermektedir. Bu modelde, LCR holokompleksi genden gene hareket etmekte özgürdür³⁵.

Tracking ya da scanning modelinde eritroid-spesifik ve mevcut transkripsiyon faktörleri ve kofaktörleri LCR sekansındaki tanınan sekanslara bağlanır, lokusun DNA heliksi boyunca çizgisel olarak göç eden ya da lokusu takip eden bir aktivasyon kompleksi oluşturur. Bu transkripsiyon kompleksi gelişimsel safhaya göre doğru promotorda yerleşmiş bulunan bazal transkripsiyon makinesi ile karşı karşıya geldiğinde bütün transkripsiyonel takım bir araya gelir ve bu genin transkripsiyonu başlatılır. Eğer bu model geçerli ise bazı anormal transkriptlerin lokus boyunca kriptik başlangıç yerlerinden kalktığı beklenebilir. Gerçekte transkriptler eritroid hücrelerdeki interjenik bölgelerde ve LCR içinde keşfedilirler. Bununla birlikte bu transkriptler nukleusa özgüdürler, stoplazmada bulunmazlar. Olgun mRNA ile işleme girmedikleri öne sürülür³⁵⁻³⁹.

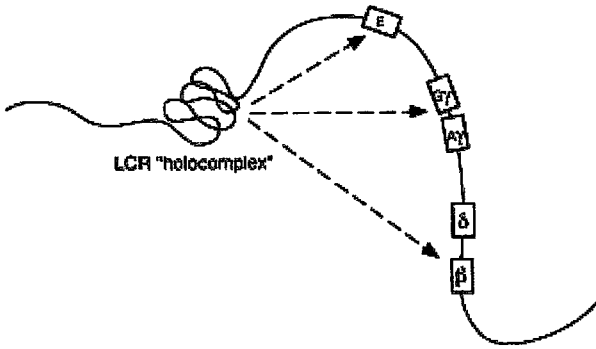
Kolaylaştırılmış tracking modeli görünüşte looping ve tracking modellerini birleştiren bir modeldir. Bir LCR bağlayan transkripsiyon faktörü ve kofaktör kompleksi, transkripsiyon faktör kompleksi serbest kaldığında promotor-distal bölgedeki DNA'yla temas etmek için ilmeklenir. Sonra bu kompleks bağlı proteinlere bağlı uygun promotor ile karşı karşıya gelene kadar kromatin boyunca küçük basamaklarla ilerler. Sabit bir ilmek yapısı oluşturularak gen ekspresyonu ilerler³⁵⁻³⁹.

Linking modeline göre, kromozomdaki kolaylaştırıcı proteinler domainin transkribe olması için tanımlayıcı lokusa bağlanır ve evreye özgü transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına aracılık ederler. Non-DNA bağlayan kolaylaştırıcı proteinler LCR'den transkribe olan globin genine kadar, sürekli bir protein zinciri oluştururlar, zincirlenen proteinler transkripsiyonel olarak genden gene bağlanırlar³⁵.



Globin geni yeşil dikdörtgen kutu ile gösterilmiş, promotor bölge ise açık yeşil ile işaretlenmiştir. Transkripsiyon faktörleri renkli daireler ile, 4 eritroid-spesifik hipersensitiv bölge (HSs) küçük kırmızı kutularla gösterilmiştir. Mavi kutular 5'HS5 ve 3'HS1'in yerleridir, insulator elementleri simgelerler. HS'lerin yanındaki DNA sekansları içleri arasında ilmekler şeklinde çizilmiştir. Transkriptler dalgalı oklarla gösterilmiştir. (A) Looping Modeli. Transkripsiyon faktörleri LCR HS'leri ve gen promotorlarına bağlanır. LCR arada bulunan DNA'dan ilmek yapan gen promotoru ile direkt etkileşir, böylece gen promotorunda aktif transkripsiyon kompleksi oluşur. (B). Tracking Modeli. Sekans-spesifik transkripsiyon faktörleri LCR'ye bağlanır, DNA sekansını izleyerek bulan bir kompleks oluşturur. Bu kompleks büyük siyah ok başlığı ile gösterilmiştir. Karşı karşıya gelen transkripsiyon faktörleri uygun gen promotoruna bağlanana kadar yüksek seviyede gen ekspresyonu başlatılır. (C) Kolaylaştırılmış Tracking Modeli. Görünüşte tracking ve looping modellerinin birleşimi gibidir. Sekans-spesifik transkripsiyon faktörleri LCR'ye bağlanır, ilmeklenir, sonra gen promotoruna proksimal bağlı transkripsiyon faktörlerinin bırakılması gerçekleşir, bunu tracking izler, uygun gen promotoruna bağlı transkripsiyon faktörleri karşı karşıya gelene kadar işlem devam eder. (D) Linking Modeli. DNA boyunca olan transkripsiyon faktörlerinin sekansa bağlanması kromatin konformasyonunda değişikliklere neden olur ve transkripsiyonel domaini şekillendirir. Transkripsiyon faktörleri non-DNA bağlayan proteinler ve kromatin modifiye edicileri ile (küçük renkli daireler ile gösterilmiştir) LCR'den gen promotoruna bağlanırlar³⁵.

Şekil 2.8. LCR'nin çalışma modelleri³⁵



Şekil 2.9. LCR Holokompleksi³⁰

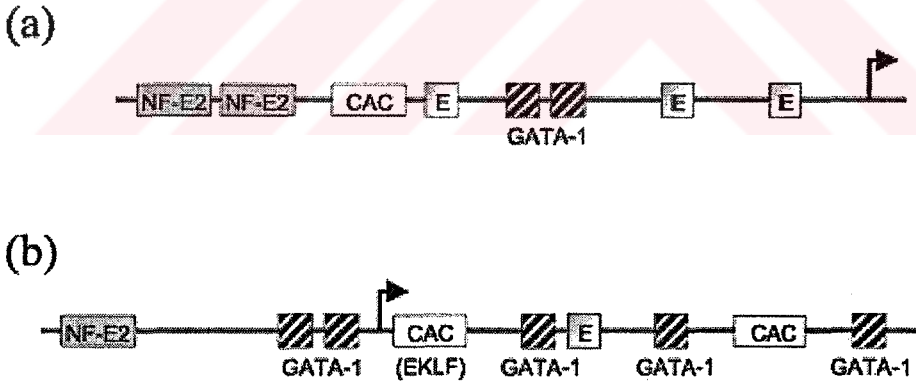
2.4.1.1.3. Eritroid Lineage Spesifik Transkripsiyon Faktörleri

2.4.1.1.3.1. GATA-1

İlk olarak tanımlanan ve klonlanan eritroid spesifik transkripsiyon faktörü “zinc finger” proteini GATA-1’dir. Üzerinde fikir birliğine varılan GATA tanıma motifi (T/A)GATA(A/G), incelenen bütün eritroid spesifik genlerin promotor bölgelerinde bulunan bir cis-regülatör elementtir. LCR’nin aktif HS bölgelerinde de yer alır. Omurgalılarda tanımlanmış altı GATA üyesi vardır³⁰. ϵ geninin bastırılması GATA-1’in over-ekspresyonu ile başılır²⁴.

2.4.1.1.3.2. Nükleer Faktör-Eritroid 2 (NF-E2)

NF-E2 LCR’de AP-1 benzeri bölgeleri bağlayan basit bir lösin fermuar proteindir³⁰. 5’HS2’ye bağlanan NF-E2 seviyesi ile globin gen ekspresyonu yakın paralellik gösterir³⁵. GATA-1 ve NF-E2 serbest kromatin yapısını stabilize ederek güçlü HS yapısının oluşumunu sağlar³⁸. Şekil 2.10’da HS2 ve HS3 içindeki transkripsiyon faktörleri gösterilmektedir³⁹.

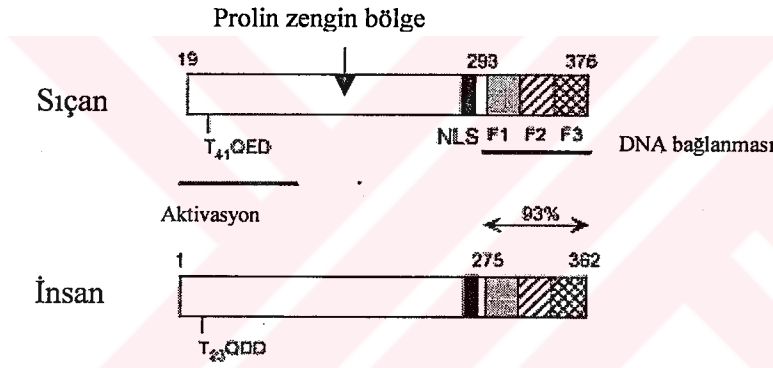


Şekil 2.10. HS2 ve HS3 içersindeki transkripsiyon faktörleri. a HS2’yi, b HS3’ü simgelemektedir³⁹.

2.4.1.1.3.3. Eritroid Kruppel-like Faktör (EKLF)

EKLF olarak adlandırılan ve eritroid hücrelerde bol bulunan nükleer protein, globin gen promotoru üzerinde yer alan CACCC motifini bağlar ve β -globin lokus regülasyonunda major transkripsiyon faktörü olarak gösterilir^{30,37,38,40,41}. Pek çok

transkripsiyon faktörü gibi bir fosfo protein olan insan EKLF'si ilk olarak kemik iliği cDNA kütüphanesinden klonlanmış olup sıçan EKLF'si ile homoloji gösterir (Şekil 2.11). İnsan EKLF'si 362 aminoasitlik bir proteini şifreler ve 19. kromozomun kısa kolunda 19p13 lokalizasyonunda yer alır⁴¹. Bütün insan β -globin genleri promotor bölgelerinde potansiyel EKLF bağlayan bölgeyi içerirler³⁸. Mast hücrelerinde düşük seviyelerde eksprese edilirler. Yetişkin β -globin genini fetal β benzeri globin geninden (γ) çok daha fazla aktive ederler³⁰. EKLF $\gamma \rightarrow \beta$ dönüşümü sırasında β -globin genine kompetitif bir avantaj sağlar²⁴. EKLF'nin yokluğunda DNase I HS β -globin promotorunda ve de LCR'de oluşmadığından yüksek γ globin seviyelerinin devamı sebebiyle $\gamma \rightarrow \beta$ dönüşümü aksayacaktır. EKLF geninin inaktivasyonu farelerde β -talasemiye yol açar³⁷.



Şekil 2.11. İnsan ve sıçan EKLF'leri⁴¹

2.4.1.1.3.4. TAL1/SCL ve RBTN2

TAL1/SCL ve RBTN2 onkogenleri ilk olarak kendi kromozomal translokasyon kaynaklarında ve daha sonra da bazı T hücre lösemilerinde ektopik aktivasyon sırasında tanımlanmışlardır. Her ikisinin de normal eritroid gelişimi için gerekli olduğu gösterilmiş olup, adı geçen hücrelere fiziksel olarak etki ettikleri anlaşılmıştır. Yapısal olarak aralarında bir bağlantı yoktur; TAL1 transkripsiyon faktör ailesinin temel heliks-loop-heliks kısmına aittir, buna karşılık RBTN2 sisteince zengin bir "zinc finger" benzeri domain ihtiva eder. RBTN2'nin sadece TAL1 ile değil, aynı zamanda GATA-1 ile de etkileştiği ortaya konmuştur³⁰.

2.4.1.1.3.5. Nükleer Faktör-Eritroid 4 (NF-E4)

Eritroid ve evreye özgü bir protein olan NF-E4 yeni tanımlanmış bir transkripsiyon faktörüdür^{30,37}. Fonksiyon gösterirken GATA-1 ile birlikte hareket eder ve transkripsiyonu aktive eder. NF-E4 içeren gen henüz klonlanamamıştır³⁷.

2.4.1.1.4. Eritroid Hücrelerde Yaygın Olarak Eksprese Edilen Transkripsiyon Faktörleri

2.4.1.1.4.1. GATA-2

Akrabası olan GATA-1'in aksine GATA-2 proteini erken eritroid progenitörlerinde gereklidir. GATA-1'in yokluğunda tamamen represe edilir. GATA-2'nin GATA-1 tarafından negatif olarak regüle edildiği düşünülmektedir³⁰.

2.4.1.1.4.2. Yin Yang-1 (YY1)

YY1 GLI-Kruppel protein ailesinin bir üyesidir. Bu bifonksiyonel protein promotor kontektine dayanarak transkripsiyonu represe ya da aktive eder. İnsan embriyonik ve fetal β -benzeri globin genleri ϵ ve γ 'nın YY1 bağlayan nükleer proteinlere sahip oldukları ispatlanmıştır. ϵ globin geni içindeki YY1 bağlayan bölgelerdeki mutasyonlar eksiksiz olarak eritroid hücrelerdeki durdurma ile etkileşirler³⁰.

2.5. β -Talasemiler

β -talasemideki moleküler bozukluk β zincir yapımının azlığı ya da yokluğudur. β globin sentezinin azalması β^+ -talasemiye, yokluğu ise β^0 -talasemiye yol açar. α globin/non α globin oranında oluşan bu dengesizlik talaseminin şiddetinin tayininde en önemli faktördür^{8,9}. Moleküler çalışmalar ile şimdiye kadar 200'ün üzerinde talasemi alleli bulunmuştur. Bu mutasyonların tipleri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir⁸. β zincir sentezindeki yetersizliğe karşı α zincir sentezinde stabil olmayan artış gözlenir. Artan α zincir ise kırmızı hücrelerde birikerek inklüzyon cisimlerinin oluşmasına neden olur⁴².

Çizelge 2.2. β -talaseminin moleküler patolojisi²⁵

β^0 veya β^+ -talasemi	Dominant β -talasemi	Normal HbA ₂ düzeyli β -talasemi	İntron/ekson bağlantısı
Gen delesyonları	Tek baz değişimi aşırı stabil olmayan ürünler	β -talasemi + δ -talasemi, cis veya trans	Splice site konsensus sekansları
Promotor bölge mutasyonları	Kodon delesyonları	Sessiz talasemi	Eksondaki kriptik bölgeler
CAP site	Ekson 3'te erken sonlanma	Bazı promotor bölge mutasyonları	İntrondaki kriptik bölgeler
5' untranslated bölge	Frameshift uzamış, stabil olmayan ürünler	CAP + 1	Poli(A) sinyali
		CAP + 33	β globin mRNA'nın translasyonu
		5' ucu kopyalanmayan bölgeler	İnisiyasyon
		IVS II 844 (C→G) splice mutasyonu	Nonsense
		Kodon + 6'da sonlanma	Frameshift Stabil olmayan β globin zincirleri

2.5.1. β -talasemik mutasyon tipleri

β globin geninde β -talasemiye neden olan yaklaşık 200'e yakın mutasyon bildirilmiştir. Bunların çoğunu öncelikle β -talasemideki nokta mutasyonları ve daha az sıklıkla delesyonlar şeklindedir. Nokta mutasyonları RNA transkripsiyonunun başlamasını, RNA işlemlenmesini ve RNA stabilitesini önleyerek globin sentezini etkilemektedir. Buna karşın frameshift veya zincir mutasyonları translasyonu bloke ederek globin zincir sentezini engeller⁴³. Farklı etnik kökenlere özgü β -talasemik mutasyon tiplerinin dağılımı Çizelge 2.3'te gösterilmektedir.

Çizelge 2.3 Farklı etnik kökenlere özgü β -talasemik mutasyon tipleri⁴⁴.

Mutasyon	Tip	EtnikGrup	Mutasyon	Tip	EtnikGrup
A. Transkripsiyonel Mutasyonlar (n=22)					
-101, C->T	β^+	Türkler, Bulgarlar, İtalyanlar	-31, A->C	β^+	İtalyanlar
-92, C->T	β^+	Akdenizliler	-31, A->G	β^+	Japonlar
-90, C->T	β^+	Portekizliler	-30, T->A	β^+	Türkler, Bulgarlar, Makedonlar
-88, C->A	β^+	Kürtler	-30, T->C	β^+	Çinliler
-88, C->T	β^+	Zenci popülasyon	-29, A->G	β^+	Amerikalı zenciler, Çinliler
-87, C->A	β^+	Amerikalı zenciler	-28, A->C	β^+	Kürtler
-87, C->G	β^+	Akdenizliler	-28, A->G	β^+	Çinliler
-87, C->T	β^+	Almanlar, İtalyanlar	+10, -T	β^+	Yunanlılar
-86, C->A	β^+	İtalyanlar	+22, G->A	β^+	Türkler, Bulgarlar, İtalyanlar
-86, C->G	β^+	Lübnanlılar, Thai	+33, C->G	β^+	Kıbrıslı Yunanlar
-32, C->A	β^+	Tayvanlılar	+43'den +40'a -AAAC	β^+	Çinliler

Mutasyon	Tip	Etnik Grup
B-a. RNA İşlenmesi ile İlgili Mutasyonlar: Splice Kavşağındaki Mutasyonlar		
IVS-I (-3), C->T (codon 29; Gly->Gly)	β^+	Lübnanlılar
IVS-I (-2), A->G (codon 30; Arg->Gly)	β^0	İspanyol Museviler
IVS-I (-1), G->A (codon 30; Arg->Lys)	β^0	Bulgarlar
IVS-I (-1), G->C (codon 30; Arg->Thr)	β^0	Amerikalı zenciler, Tunuslular, BAE, Hintliler
IVS-I-1, G->A	β^0	Akdenizliler, Asya Hintlileri
IVS-I-1, G->T	β^0	Asya Hintlileri
IVS-II-1, G->A	β^0	Akdenizliler, Amerikalı zenciler, Tunuslular
IVS-II-1, G->C	β^0	İranlılar
IVS-I-2, T->A	β^0	Cezayirliler
IVS-I-2, T->C	β^0	Amerikalı zenciler
IVS-I-2, T->G	β^0	Tunuslular
IVS-II-2,3, +11 bp, -2 bp	β^0	İranlılar
IVS-I, -17 nts (3' end)	β^0	Kuveytliiler
IVS-I-130, G->A	β^0	Mısırlılar
IVS-I-130, G->C	β^0	Türkler, Japonlar
Codon 30, G->C [IVS-I-130 (+1)]	β^0	Ortadoğulular
IVS-II-849, A->C	β^0	Amerikalı zenciler
IVS-II-849, A->G	β^0	Amerikalı zenciler
IVS-II-850, -G	β^0	İtalyanlar

IVS-II-850, G->A	β^0	İngilizler, İskoçlar
IVS-II-850, G->C	β^0	Yugoslavlar
IVS-II-850, G->T	β^0	Japonlar
B-b. RNA İşlemlenmesi ile İlgili Mutasyonlar: Konsensus Dizilerdeki Mutasyonlar		
IVS-I-5, G->A	β^+	Cezayirliler, Akdenizliler
IVS-I-5, G->C	β^+	Asya Hintlileri, Çinliler, Melanezyalılar
IVS-I-5, G->T	β^+	Akdenizliler, Amerikalı zenciler
IVS-II-4,5, -AG	$\beta^0?$	Portekizliler
IVS-II-5, G->C	β^+	Çinliler
IVS-I-6, T->C	β^+	Akdenizliler
IVS-I-128, T->G	β^+	Suudi Arabistanlılar
IVS-II-837, T->G	?	Asya Hintlileri
IVS-II-843, T->G	β^+	Cezayirliler
IVS-II-844, C->G	β^+	İtalyanlar
IVS-II-848, C->A	β^+	Amerikalı zenciler, Mısırlılar, İranlılar
IVS-II-848, C->G	β^+	Japonlar
B-c. RNA İşlemlenmesi ile İlgili Mutasyonlar: IVS-I ya da IVS-II'deki Değişiklikler		
IVS-I-110, G->A	β^+	Akdenizliler
IVS-I-116, T->G	β^0	Akdenizliler
IVS-II-654, C->T	β^+	Çinliler
IVS-II-705, T->G	β^+	Akdenizliler
IVS-II-745, C->G	β^+	Akdenizliler
B-d. RNA İşlemlenmesi ile İlgili Mutasyonlar: Kodlanan Bölgedeki Mutasyonlar		
Codon 10, C->A (Ala->Ala)	β^+	Asya Hintlileri
Codon 19, A->G (Hb Malay; Asn->Ser)	β^+	Malezyalılar
Codon 24, T->A (Gly->Gly)	β^+	Amerikalı zenciler, Japonlar
Codon 26, G->A (Hb E; Glu->Lys)	β^+	Güneydoğu Asyalılar
Codon 27, G->T (Hb Knossos; Ala->Ser)	β^+	Akdenizliler
C-a. RNA Translasyon Mutasyonları: Anlamsız Mutasyonlar		
Codon 15, TGG->TAG	β^0	Asya Hintlileri, Türkler
Codon 15, TGG->TGA	β^0	Portekizliler
Codon 17, A->T	β^0	Çinliler
Codon 22, G->T	β^0	Reunion Adalılar
Codon 26, G->T	β^0	Tayvanlılar
Codon 35, C->A	β^0	Tayvanlılar
Codon 37, G->A	β^0	Suudi Araplar, İspanyollar
Codon 39, C->T	β^0	Akdenizliler
Codon 43, G->T	β^0	Çinliler
Codon 61, A->T	β^0	Zenciler
Codon 90, G->T	β^0	Japonlar
Codon 112, T->A	β^0	Slovaklar
C-b. RNA Translasyon Mutasyonları: Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonlar		
Codon 1, -G	β^0	Akdenizliler

Codon 2/3/4, -9 bp; +31 bp	β°	Cezayirliler
Codon 5, -CT	β°	Akdenizliler
Codon 6, -A	β°	Akdenizliler, Amerikalı zenciler
Codon 8, -AA	β°	Akdenizliler
Codon 8/9, +G	β°	Asya Hintlileri
Codon 9/10, +T	β°	Yunanlılar
Codon 11, -T	β°	Meksikalılar
Codon 14/15, +G	β°	Çinliler
Codon 15, -T	β°	Malezyalılar
Codon 16, -C	β°	Asya Hintlileri
Codon 22/23/24, -AAGTTGG	β°	Türkler
Codon 24, -G; +CAC	β°	Mısırlılar
Codon 25/26, +T	β°	Tunuslular
Codon 26, +T	β°	Japonlar
Codon 27/28, +C	β°	Çinliler
Codon 28, -C	β°	Mısırlılar
Codon 28/29, -G	β°	Japonlar, Mısırlılar
Codon 31, -C	β°	Çinliler
Codon 35, -C	β°	Malezyalılar
Codon 36/37, -T	β°	İranlılar, Kürtler
Codon 37/38/39, -GACCCAG	β°	Türkler
Codon 38/39, -C	β°	Çekler
Codon 38/39, -CC	β°	Belçikalılar
Codon 40, -G	β°	Japonlar
Codon 40/41, +T	β°	Çinliler
Codon 41, -C	β°	Tayvanlılar
Codon 41/42, -TTCT	β°	Çinliler
Codon 42/43, +G	β°	Japonlar
Codon 42/43, +T	β°	Japonlar
Codon 44, -C	β°	Kürtler
Codon 45, -T	β°	Birleşik Arap Emirlikleri
Codon 47, +A	β°	Surinamlılar
Codon 47/48, +ATCT	β°	Pencaplılar
Codon 51, -C	β°	Macarlar
Codon 53/54, +G	β°	Japonlar
Codon 54, -T	β°	Cezayirliler, İsveçliler
Codon 54/55, +A	β°	Hintliler
Codon 56-60, +14 bp	β°	-
Codon 57/58, +C	β°	Pencaplılar
Codon 59, -A	β°	İtalyanlar
Codon 64, -G	β°	İsviçreliler
Codon 67, -TG	β°	Filipinliler
Codon 71/72, +A	β°	Çinliler
Codon 71/72, +T	β°	Çinliler
Codon 72/73, -AGTGA; +T	β°	Britanyalılar

Codon 74/75, -C	β^0	Türkler
Codon 76, -C	β^0	İtalyanlar
Codon 82/83, -G	β^0	Azerbaycanlılar, Çekler, Hırvatlar
Codon 84/85, +C	β^0	Japonlar
Codon 84/85/86, +T	β^0	Japonlar
Codon 88, +T	β^0	Asya Hintlileri
Codon 89/90, -GT	β^0	Koreliler
Codon 95, +A	β^0	Tayvanlılar
Codon 106/107, +G	β^0	Amerikalı zenciler
D. Dominant Beta-Thal ve Stabil Olmayan Beta Zincir Varyantları		
Codon 24/25, -GGT	β^0	Japonlar
Codon 28, <u>CTG</u> -> <u>CGG</u>	β^0	(Hb Chesterfield)
Codon 31/32, +CGG	β^0	İspanyollar
Codon 32, <u>CTG</u> -> <u>CAG</u> (Leu->Gln); Codon 98, <u>GTG</u> -> <u>ATG</u> (Val->Met)	β^0	(Hb Medicine Lake)
Codon 33/34, -GTG	β^0	(Hb Korea) Koreliler
Codon 60, <u>GTG</u> -> <u>GAG</u> (Val->Glu)	β^0	(Hb Cagliari) İtalyanlar
Codon 94, +TG	β^0	(Hb Agnana) İtalyanlar
Codon 100, -CTT, +TCTGAGAACTT	β^0	Güney Afrikalılar
Codon 108/109/110/111/112, -12 bp	β^0	İsviçreliler
Codon 109, -G	β^0	(Hb Manhattan) Askenazi Yahudileri
Codon 110, T->C	β^0	(Hb Showa-Yakushiji) Japonlar
Codon 114, -CT; +G	β^0	(Hb Geneva) İsviçreli Fransızlar
Codon 114, T->C	β^0	(Hb Durham-N.C.; Hb Brescia) İtalyanlar
Codon 115, C->A	β^0	[Hb Hradec Kralove (Hb HK)] Çekler
Codon 120/121, +A	β^0	Filipinliler
Codon 121, G->T	β^0	Polonyalılar, İsviçreliler, Japonlar, İngilizler, Çekler
Codon 123, -A	β^0	(Hb Makabe) Japonlar
Codon 123/124/125, -ACCCCACC	β^0	Tayvanlılar
Codon 124, -A	β^0	Ruslar
Codon 124/125/126, +CCA	β^0	Ruslar
Codon 125, -A	β^0	Japonlar
Codon 126, -T	β^0	(Hb Vercelli) İtalyanlar
Codon 126, <u>GTG</u> -> <u>GGG</u>	β^0	(Hb Neapolis) İtalyanlar, Almanlar, Tayvanlılar
Codon 126/127/128/129/130/131, -17 bp	β^0	Pakistanlılar
Codon 127, <u>CAG</u> -> <u>TAG</u> (Gln->stop codon)	β^0	İngilizler
Codon 127, <u>CAG</u> -> <u>CCG</u> (Gln->Pro)	β^0	(Hb Houston) Britanyalılar
Codon 127, <u>CAG</u> -> <u>CGG</u> (Gln->Arg)	β^0	Fransızlar
Codon 127/128, -AGG (Gln-Ala->Pro)	β^0	(Hb Gunma) Japonlar
Codon 128/129, -4 bp, +5 bp and Codon 132/133/134/135, -11 bp	β^0	İrlandalılar

Codon 134/135/136/137, -10 bp, +4 bp	β^0	Portekizliler
E. Başlık Bölgesi (Cap Site) Mutasyonları		
Cap +1, A->C	β^+	Asya Hintlileri
F. Başlangıç Kodonu Mutasyonları		
<u>A</u> TG-> <u>G</u> TG	β^0	Japonlar
<u>A</u> TG-> <u>A</u> CG	β^0	Yugoslavlilar
<u>A</u> TG-> <u>A</u> GG	β^0	Çinliler, Koreliler, Kuzey Avrupalılar
<u>A</u> TG-> <u>A</u> T <u>A</u>	β^0	İtalyanlar, İsveçliler
<u>A</u> TG-> <u>A</u> T <u>C</u>	β^0	Japonlar
<u>A</u> TG-> <u>A</u> T <u>T</u>	β^0	İrlandalılar
G. 3'UTR Mutasyonları		
3'UTR +6, +1,480; C->G	β^+	Yunanlılar (+6, C->G olarak da bilinir)
3'UTR +1,565 to +1,577; -13 bp	$\beta^+?$	Türkler
3'UTR +1,570; T->C	$\beta^+?$	İrlandalılar
H. Poliadenilasyon (poly A) ile İlgili Mutasyonlar		
AAT <u>A</u> AAA->AAC <u>A</u> AAA	β^+	Amerikalı zenciler
AAT <u>A</u> AAA->AAT <u>G</u> A <u>A</u>	β^+	Akdenizliler
AAT <u>A</u> AAA->AAT <u>A</u> G <u>A</u>	β^+	Malezyalılar
AAT <u>A</u> AAA->AAT <u>A</u> A <u>G</u>	β^+	Kürtler
AAT <u>A</u> AAA->AAAA (-AT or -TA)	β^+	Fransızlar
AAT <u>A</u> AAA->A (-AATAA)	β^+	Araplar

2.5.1.1. Gen Delesyonları

α -talasemilerin aksine β -talasemide gen delesyonları çok sık gözlenmez. Bugüne kadar yaklaşık 17 tane gen delesyonu tanımlanmıştır. β geninin 3' ucundaki 619-bp delesyonu Pakistan ve Hindistan'daki, Sind ve Gujarati popülasyonunda görülen β -talasemilerin %50'sinden sorumludur^{1,3,25,29}

2.5.1.2. Transkripsiyonel Mutasyonlar

β geninin promotor bölgesinde birçok baz değişimi tanımlanmıştır. CAP bölgesinde CCAAT ve ATA kutusunda görülen mutasyonlar RNA polimerazın, β genine bağlanma ve transkripsiyonu başlatma yeteneğini azaltır. β mRNA transkripsiyonu bu durumdan etkilenir ve β mRNA miktarı azalır²⁵. Bütün olguların fenotipi, β^+ -talasemidir²⁹.

2.5.1.3. RNA Prosessing Mutasyonları

mRNA'nın nukleusa girmesini engelleyen tek baz mutasyonudur. Ekson ve intronun bağlanma noktasında 5' GT (donor) 3' AG (receptör) bölgesinde gözlenir. Bu splice noktasındaki tek baz değişikliği splisingi bozar ve β^0 -talasemi fenotipini oluşturur^{1,25,29}. β -talaseminin farklı tipleri IVS-1 konsensus sekansındaki tek baz değişimine bağlıdır¹.

2.5.1.3.1. Splice Kavşağındaki Mutasyonlar

Bu sekanstaki mutasyonlar splicingi farklı oranlarda etkiler ve kriptik bölge çevresinde alternatif bir splicing oluşturur. IVS I-5'deki bir mutasyonla G→ C veya T değişimi; β zincir üretiminde orta derecede bir azalma ve şiddetli β^+ -talasemi ile sonuçlanır. Diğer taraftan IVS I-6'da T'nin C ile değişimi β yapımında orta derecede bir azalmaya neden olur. Bu mutasyon Akdeniz bölgesinde görülen β -talaseminin Portekiz formu olarak adlandırılmaktadır¹.

2.5.1.3.2. Konsensus Dizi Değişikliklerine Neden Olan Mutasyonlar

Ökaryotik hücre genlerindeki intron-ekson bağlanma bölgelerinde yer alan konsensus dizilerde meydana gelen değişiklikler de β -talasemiye neden olmaktadır. Bu diziler donör bölgelerdeki eksonların son üç nükleotidi ile intronun ilk altı nükleotidini, akseptör bölgede ise intronun son 10 nükleotidi ile eksonun ilk nükleotidinden oluşur. Bu mutasyonlar β^+ -talasemiye sebep olurlar⁶.

2.5.1.3.3. İntronlardaki Değişiklikler

β geninin içinde GT ve AG dinükleotidleri splice kavşakları dışında birçok yerde bulunabilir. Ancak bunlar normal splicing işleminde donör ve akseptör olarak kullanılmazlar. Kriptik bölgeler olarak adlandırılan bu yerlerde oluşan bazı mutasyonlar yeni splice bölgelerini oluştururlar. En yaygın görüleni IVS-1 110'daki baz değişimidir. Bu bölge 3' akseptör splice bölgesinde A-G yokmuş gibi işlem görür. 110. pozisyondaki G→A değişikliği β^+ -talasemi fenotipine neden olur^{1,6}.

β globin geninin ikinci intronunda da mutasyon saptanmıştır. IVS-2'de pozisyon 654'te A→G değişimi anormal β globin zincir sentezine neden olur. Fenotipi ise β^0 -talasemidir¹.

2.5.1.3.4. Kodlanan Bölgedeki Mutasyonlar

β globin geninin ekson 1'de kodon 24-27 IVS-1 donor bölgesinde gizli mutasyon bölgesi vardır. Bu bölge G-T dinükleotidini içerir ve komşu değişimler bu bölgenin aktivasyonunu sağlar. Normal ekson/intron bağlantı bölgesi yerine burada anormal splicing oluşur ve şiddetli β^+ -talasemi oluşur¹.

Kodon 19 (A→G) , 26 (G→A) ve 27 (G→T) mutasyonları mRNA azalması ve anormal splicing ile sonuçlanır¹.

2.5.1.4. RNA Translasyon Mutasyonları

2.5.1.4.1. Anlamsız Mutasyonlar

Tek bir nükleotidin yer değiştirmesi sonucu normalde bir aminoasidi kodlayan kodon, translasyonun durdurulması sinyalini veren durdurucu kodon (stop codon: UAA, UAG veya UGA) haline gelir. Mutasyonun olduğu kodondan itibaren globin zincir üretimi normalden önce durur. En yaygın görüleni Kodon 39 C→T (CAG→TAG) mutasyonudur. Akdeniz Bölgesi'nde yüksek sıklıkta görülen bu mutasyon sonucu β^0 -talasemi fenotipi ortaya çıkar⁴⁵.

2.5.1.4.2. Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonları

Bir veya birden fazla nükleotidin delesyonu veya insersiyonu sonucu öne veya arkaya doğru (5'→3' veya 3'→5' yönünde) oluşan nükleotid kayması ile mutasyon bölgesinden sonraki kodonların şifreleri değişerek farklı aminoasitlerin şifreleri ortaya çıkar. Bu mRNA β^0 -talasemi fenotipine neden olur⁴⁶.

2.5.1.5. Dominant Geçen β -Talasemi ve Stabil Olmayan β Globin Varyantları

Son 20 yılda ağır β -talasemiden ayrılamayan sporadik vakalar tanımlanmıştır. Bu tip vakalarda eritrosit prekürsörlerinde inklüzyon cisimcikleri çokça gözlenmektedir. Sekans analizleri moleküler düzeyde heterojenite göstermektedir. Fakat çoğu β globin geninde ekson 3'te mutasyon içermektedir. Frameshift veya prematür zincir sonlanması gözlenir. Bu düzensizlik uzamış unstabil β globin gen ürünlerini oluşturur. En sık görülen mutasyon ise kodon 121'de GAA→TAA değişikliğidir^{43,47}.

Bazı β globin zincir varyantları oldukça unstabildir ve tetramer yapma eğilimi gösterirler. Oluşan unstabil hemoglobinler eritrosit prekürsörlerinde ve kanda birikirler. Dominant geçen β -talasemiden hemolitik anemiye kadar değişik klinik gösterirler. Buna örnek olarak hemoglobin Indianapolis verilebilir^{1,47}.

2.5.1.6. Başlık Bölgesi (Cap Site) Mutasyonları

β^+ -talasemi fenotipi ile sonuçlanan +1 A→C yer değişimi sonucu transkripsiyon azalır, başlıklanma yavaşlar ve mRNA kararlılığı bozulur. Homozigot olarak bulunması halinde bile kişide heterozigot gibi bulgu veren bir fenotiptir⁴⁵.

2.5.1.7. Başlangıç Kodonu Mutasyonları

Başlangıç kodonu olan ATG'deki nükleotid değişiklikleri sonucu transkripsiyon başlatılamaz ve bunun sonucunda β^0 -talasemi fenotipi oluşur⁶.

2.5.1.8. 3' UTR Mutasyonları

3' UTR bölgesinde +1565'den +1577 nükleotidine kadar olan kısmın delesyonu sonucu β^+ -talasemi fenotipi ortaya çıkar⁶.

2.5.1.9. Poliadenilasyon Sinyal Mutasyonları

β globin mRNA'nın 3'untranslated bölgesinde AAUAAA dizisi β gen transkripsiyonunun klevaj ve poliadenilasyonu için uygundur. Örneğin β globin geninin bu bölgesinde T $\rightarrow$ C değişimi orta şiddette β^+ -talasemi ile sonuçlanmaktadır¹.

2.6. β -Talasemi Tedavisi

Talasemi; çocukluktan itibaren transfüzyona gereksinim duyulan tipinden, tıbbi müdahaleye çok az ihtiyaç duyulan hafif tipine kadar klinik olarak çok geniş bir çeşitlilik gösterir. Talasemi majör (TM), hastalığın şiddetli formudur ve genellikle yaşamın ilk yılında transfüzyona bağlı anemi tablosuyla ortaya çıkar. Talasemi intermedia (TI) ise hastalığın daha az şiddetli olan formudur ve çok değişkendir.

TI'yı TM'den ayırt etmede kullanılan en önemli işaret transfüzyon ihtiyacının yokluğudur. Ancak, bu farklılığa karşın klinik olarak talasemi hastalarının karşılaştığı pek çok problem hem TI, hem de TM hastalarında karşımıza çıkar. Örneğin; bütün TM hastaları şelasyona ihtiyaç duyduğu halde, bazı TI hastaları da transfüze olmasalar dahi şelasyona ihtiyaç duyabilirler.

Tedavi genel olarak ikiye ayrılır; destekleyici tedavi ve ilaç tedavisi⁴⁸ (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Talasemi tedavi tipleri⁴⁸.

Destekleyici Tedavi		İlaç Tedavisi	
Transfüzyon Terapisi		Kemik İliği Transplantasyonu (KİT)	Geleneksel allogenik KİT
Şelasyon Terapisi	İntravenöz Şelasyon		Kord Kanı Transplantasyonu
	Oral Şelasyon		İntrauterin KİT
Fetal Hemoglobini Teşvik Eden Tedavi	Hidroksiüre Terapisi	Gen Terapisi	
	Eritropoietin Terapisi		
	Bütirat Türevleri Terapisi		
	Hemin Terapisi		
Antioksidant Tedavisi			

2.6.1. Tedavide Yeni Bir Yakalaşım: Gen Terapisi

Hemoglobinopatiler, tek bir genin transferi ile teorik olarak tedavi edici bir etki sağlanabileceğinden gen terapisi için dūřınılen ilk hastalıklardan birisidir. Anemilerin patofizyolojisi ve globin gen ekspresyonu izerindeki bilgiler bu hastalıkların gen terapisi ile iyileştirilmesi konusunda onları kusursuz birer aday yapmaktadır⁴⁹.

β -talaseminin tek bir genin fonksiyonundaki azalma ya da yok olması ile ilgili olduğu gerçeği gen terapisi ile tedavi için en erken aday olarak dūřınılmesine yol ağmaktadır. Bu dūřınce ilk olarak yaklaşık 15 yıl önce transgenik bir fare modelinde farelere β -globin geninin transferi ve talaseminin iyileştirilmesini kapsayan başarılı deneylerle desteklenmiřtir⁴⁸.

β -talasemi gen tedavisi için  genel strateji dūřınılmıřtır. Birincisi gen transferidir, insan hematopoetik hücrelerine eksojen bir genin eklenmesi. Bu doğrultuda en yaygın kullanılan metod viral aracılıklı gen transferidir. Çok sayıda vektör tipleri kullanılmakla birlikte, en yaygın olanları retrovirüsler ve adeno virslerdir⁴⁸. Retroviral vektör ailesinden olan ve yeni keşfedilen lentivirsler de tedavide kullanılmaktadır, ancak henüz insanlarda denenmemiştir. Ancak lentiviral vektör dizaynındaki pekçok avantaj yakın gelecekte klinik kullanımlarının artmasını saęlayacaktır⁵⁰.

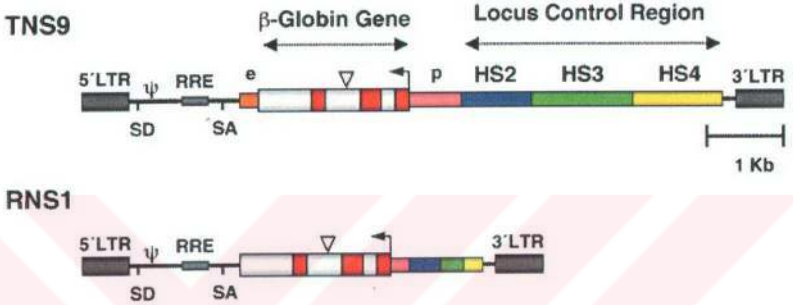
Talaseminin genetik terapisi için kullanılan ikinci strateji farklı biyolojik moleküller, yani “trik”ler kullanarak mutasyonu düzeltmektir. Sonuçta DNA’yı düzelterek ya da mutant RNA transkriptinin düzeltilmesi olarak tasarlanmaktadır.

Son strateji, α -globin geninin verimini aşağıya doğru regüle etme modellerini geliştirmektir. Bu şekilde zincir dengesizliği azaltılacaktır. Bu metod TI’nın tedavisi için en yararlısı olabilir⁴⁸.

Gen terapisi konusunda yapılan bir çalışmada; May ve arkadaşları TNS9 adını verdikleri lentiviral bir vektör aracılığıyla talasemi tedavisinde ilerleme kaydetmişlerdir. TNS9 vektörü insan β -globin genini şifrelemektedir. Genişletilmiş bir promotor ve iki tane proksimal enhancer ile insan β -globin LCR’sinden türetilen  büyük fragman ve sentetik olarak eklenen GATA-1 transkripsiyon faktörünü bağlayan bölge ierir⁵¹.

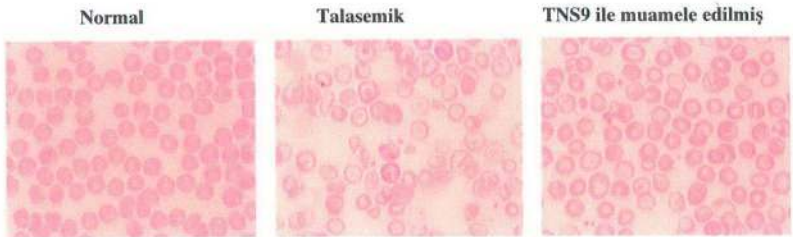
Seçime maruz bırakılmayan kemik iliği hücreleri, öldürücü röntgen ışınlarına tutulan normal farelere transplante edilmiştir. Minimal düzeyde HS2 (423 b), HS3 (280 b) ve HS4 (283 b) elementlerine sahip vektör içeren hücrelerde 24 hafta sonunda β -globin transkripsiyon seviyeleri %2,8’den yaklaşık %7,0’a çıkmıştır. Ancak, maksimum

HS2 (840 bp), HS3 (1308 bp) ve HS4 (1069 bp) elementlerine sahip vektör içeren hücrelerde aynı süre sonunda β -globin transkripsiyon seviyeleri %10-20 artmıştır^{49,52} (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. TNS9 ve RNS1 lentiviral vektörlerinin yapısı. TNS9 840 baz çiftlik (bp) bir HS2, 1308 bp'lik bir HS3, 1069 bp'lik bir HS4 fragmanına sahiptir. Buna karşın RNS1 423 bp'lik HS2, 280 bp'lik bir HS3 ve 283 bp'lik bir HS4 fragmanına sahiptir. Toplam LCR sekansları TNS9'un 3,2 kb, RNS1'in ise 1,0 kb'dir. TNS9'un β -globin geni -610'dan başlamakta olup 3' enhancer bölgesi içermektedir. RNS1'de ise β -globin geni -265'den başlamaktadır ve 3' enhancer bölgesi içermez. İnsan β -globin geninin ekson ve intronları dolu ve boş kutular ile gösterilmiştir. İntron 2'de 374 bp'lik bir delesyon mevcuttur. SD, Splice donör, SA, Splice akseptör, ψ , Paketlenen bölge, RRE, Rev-response element, p, Promotor, e, Enhancer⁵².

TNS9 ile tedavi edilen farelerde anemide azalma ve hematopoezin normalleştiği görülmüştür (Şekil 2.13)⁵¹⁻⁵³.



Şekil 2.13. TNS9 ile muameleden sonra talasemik kemik iliği hücrelerinde görülen düzelmenin yayma kan preparatlarında gösterimi⁵².

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Cihazlar

- Kan sayım cihazı (Coulter counter T 890)
- Mikro santrifüj (Fisher Model 235 B, Heraeus Biofuge pico)
- Gelman elektroforez tankı
- Spektrofotometre (Spectronic 20-D)
- pH metre (Beckman, Century SS-1)
- Kar makinası (Scotsman AF-10)
- Santrifüj (Centrikon T-124)
- Etüv (Heraeus)
- Derin dondurucu (-20°C Bosch)
- Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus)
- Mikrodalga fırın (Vestel Goldstar)
- Jel elektroforez cihazı (Pharmacia GNA-100)
- Kamera (Polaroid MP-4 Land Camera)
- Otomatik pipet (Gilson 5, 10, 20, 100, 200, 1000 µL)

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

- TRİS (Amresco)
- EDTA (Riedel-de haën)
- Borik asit (Carlo Erba Reagenti)
- Sodyum dietil barbital (Merck)

- Dietil barbitürik asit (Merck)
- Ponceau-S (Sigma)
- Triklor asetik asit (Merck)
- Asetik asit (Merck)
- DE-52 (Whatman)
- Glisin (Merck)
- Potasyum siyanür (Merck)
- NaCl (Merck)
- $K_3Fe(CN)_6$ (Merck)
- KCN (Merck)
- NaOH (Merck)
- $(NH_4)_2SO_4$ (Sigma)
- Proteinaz K (Sigma)
- Amonyum klorür (Merck)
- Amonyum bikarbonat (Sigma)
- SDS (Sigma)
- Fenol (Merck)
- Kloroform (Merck)
- Hidroksikinolin (Merck)
- Etil alkol
- KCl (BDH)
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Merck)
- $MgCl_2$ (Sigma)
- Jelatin (Merck)
- dNTP (Promega)

- Spermidin (Sigma)
- Sodyum asetat-3H₂O (Merck)
- Taq Polimeraz (Sigma)
- Neusive Agaro (BMA)
- Agaro (Sigma)
- Bromfenol mavisi (Sigma)
- Gliserol (Merck)
- Ficoll (Sigma)
- Ethidium bromür (Sigma)

3.2. Örnek Toplama

Anamur Bölgesi'nden talasemi tarama çalışmasında kullanılmak üzere EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri, soğuk zincir kurallarına uyularak Adana'ya getirilmiştir. Örneklerin kan sayımları otomatik kan sayım aygıtıyla yapıldıktan sonra, hemoglobin tipleri selüloz asetat elektroforez yöntemiyle, HbA₂ ve HbF düzeyleri mikrokolon kromatografisi ve alkali denatürasyon yöntemleriyle çalışılmıştır. Toplam 109 örneğin DNA'ları Poncz yöntemiyle izole edildikten sonra ARMS yöntemiyle β -talasemi mutasyon tipleri saptanmıştır.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hematolojik İncelemeler

Hematolojik analizlerden Hemoglobin (Hb), Hematokrit (Hct), Eritrosit (RBC), Ortalama Eritrosit Hacmi (MCV), Ortalama Eritrosit Hemoglobini (MCH) ve Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu (MCHC) Coulter Counter cihazı ile ölçülmüştür^{17,54}.

3.3.1.1. Kan Sayımı

İletken sıvı ortamda iki elektrod ve aralarında daralıp genişleyebilen bir lobül sistemi vardır. Tam kandaki şekilli elemanların oluşturduğu parçacıklar ortama süspanse edildiğinde büyüklük ve yoğunluklarına göre tübül sistemi daralıp genişlemektedir. Bu sırada sistemin potansiyel enerji farkı değişmekte ve ekranda çırpıntılar (pulse) oluşmaktadır. Çırpıntılarının büyüklüğü ve sayısı, hücre sayısı ve büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Sisteme giren parçacıklar bu şekilde değerlendirilmektedir^{17,54,55}.

3.3.1.2. Hemoglobin Elektroforezi

3.3.1.2.1. Prensip

Proteinler elektriksel alanda taşıdıkları yükler nedeniyle farklı uzaklıklara göç ederler. Hemoglobin alkali pH'da negatif yüklüdür ve elektriksel alanda anoda göç etmektedir. Selüloz asetat kağıdına uygulanan hemoglobinler elektriksel güç kaynağı ile yaratılan elektriksel alanda yüklerine göre farklı uzaklıklara göç ederek birbirlerinden ayrılırlar^{17,55,56}.

3.3.1.2.2. Ayıraçlar

1. Anod Tamponu: 0.26 M Tris Tamponu, pH 9.1

Tris	→	25.2 gr	} distile su ile 1 litreye tamamlanır.
EDTA	→	2.5 gr	
Borik asit	→	1.5gr	

2. Katod amponu: Barbital Tamponu pH 8.6

Sodyum dietil barbital	→	5.15 gr	} distile su ile 1 litreye tamamlanır.
Dietil barbütirik asit	→	0.92 gr	

3. Selüloz asetat elektroforez kağıdı (Sartorius 12200)

4. Boyama çözeltisi:

Ponceau-S → 500 mg, 100 ml %5'lik Triklor asetik asitte çözülür.

5. Yıkama çözeltisi: %5'lik asetik asit

6. Whatman Kurutma Kağıdı

3.3.1.2.3. Yöntem

Elektroforez tankının anot ve katot kısımlarına uygun tamponlar konulur. Başka bir kapta her iki tampondan eşit hacim içeren bir karışım hazırlanır ve işaretlenen selüloz asetat elektroforez kağıdı en az 10 dakika bu karışımda ıslatılır. Kurutma kağıdı ile hafifçe kurutulan kağıda hemolizattan 3µL aplike edilerek elektroforez tankının köprüsüne yerleştirilir. 0.75 mA/cm akım verilerek 45 dakika yürütülür. Tanktan çıkarılıp Ponceau-S ile boyanan ve yıkama çözeltisi ile temizlenen kağıtta hemoglobin tiplendirilmesi yapılır.

3.3.1.3. Hemoglobin A₂ Ölçümü

3.3.1.3.1. Prensip

DE-52 reçinesi ile hazırlanmış kolona uygulanan hemolizat içindeki Hb A₂ özgül pH'da, iyonik gücüne bağlı olarak reçineye bağlanarak diğer hemoglobinlerden ayrıştırılır. Kolondan elüve edilen fraksiyonların absorbansları spektrofotometrik olarak ölçülerek konsantrasyonları hesaplanır⁵⁷⁻⁵⁹.

3.3.1.3.2. Hemolizat hazırlama

Serum fizyolojik ile üç kez yıkanan tam kandan 50 µL alınıp, üzerine 950 µL distile ya da deiyonize su eklenerek hemolizat hazırlanır.

3.3.1.3.3. Ayıraçlar

1) Geliştirici A:

Glisin 0,2 M	→	15 g	} 1000 mL saf suda çözülür.
Potasyum Siyanür (KCN) 0,01 M	→	0,1 g	

2) Geliştirici A₂:

Glisin 0,2 M	→	15 g ve	} 1000 mL saf suda çözülür.
Potasyum Siyanür (KCN) 0.01 M	→	0,1 g	
NaCl 0,2 M	→	1,17 g	

3) Geliştirici B:

Glisin 0,2 M → 15 g ve
Potasyum Siyanür (KCN) 0,01 M → 0,1 g
NaCl 2 M → 11,7 g

} 1000 mL saf suda çözülür.

4) İyon Değiştirici DE-52 setinin hazırlanması: Bir birim DE-52 jeli üzerine yaklaşık üç birim Geliştirici A çözeltisi eklenerek jel yıkanır, bu yıkama işlemine en az üç kez, jelin pH'sı 7.2-7.6 arasında oluncaya kadar devam edilir.

3.3.1.3.4. Yöntem

Hemolizat haline getirilen örnekler; DE-52 kolonuna tatbik edilir. Kolon, Geliştirici A₂ ile yıkamış, HbA₂'nin kolondan ayrılması sağlanır. Hb A₂ bandı ayrıldıktan sonra geriye kalan hemoglobinler Geliştirici B ile toplanır. Hb A₂'li süzüntü 8ml'ye ve diğer hemoglobinleri içeren süzüntü saf su ile 25 ml'ye tamamlandıktan sonra spektrofotometrede 415 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunur. Hb A₂ yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplanır.

$$\% \text{ Hb A}_2 = \frac{\text{OD Hb A}_2 \times 100}{(\text{OD Hb A}_2 + 3.125 \times \text{OD Hb A})}$$

3.3.1.3.5. Yorum

Normal erişkinlerdeki Hb A₂ düzeyi % 2,5±0,9 arasındadır. β-talasemi heterozigotlarda bu değer yaklaşık iki katına kadar çıkar. Buna karşın α-talasemili vakalarda azalmış Hb A₂ seviyesi görülür⁶⁰.

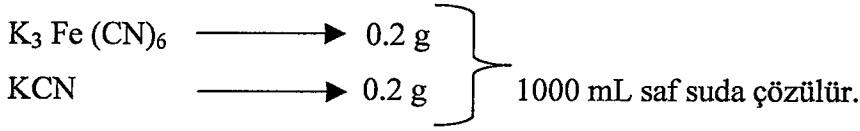
3.3.1.4. Hemoglobin F Ölçümü

3.3.1.4.1. Prensip

HbF'nin alkaliye karşı en dirençli hemoglobin olması özelliğinden yararlanılarak HbF düzeyi belirlenir. NaOH ile denatürasyon işleminden sonra diğer hemoglobinler doymuş amonyum sülfat ile çöktürülerek ortamdan uzaklaşılır ve geriye HbF kalır.

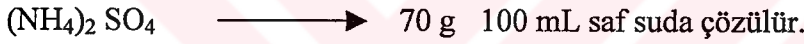
3.3.1.4.2. Ayıraçlar

1-Siyanür çözeltisi:



2- 1.2 N Sodyum Hidroksit

3- Doymuş Amonyum Sülfat:



3.3.1.4.3. Yöntem

Hemolizattan 0,2 mL alınarak üzerine 3,8 mL siyanür çözeltisi eklenir. 10 dakika sonunda bu karışımdan 2,8 mL alınarak, üzerine 0,2 mL 1.2 N sodyum hidroksit eklenir. 2 dakika sonra karışım üzerine 2 mL doymuş amonyum sülfat eklenir ve oluşan çökelti süzülür. Süzüntü 10 dakika sonra spektrofotometrede 540 nm'de saf su körüne karşı okunur.

Ayrıca total hemoglobin miktarı ölçülür. 6,75 mL saf suya, 0,4 mL siyanürlü hemolizat (0,2 mL hemolizat, 3,8 mL siyanür) eklenerek absorbans değeri 540 nm'de spektrofotometrede okunur.

$$\% \text{HbF} = \frac{\frac{\text{OD F}}{\text{OD Total}}}{10,1} \times 100$$

3.3.1.4.4. Yorum

Erişkinlerdeki HbF ortalaması % 1'in altındadır. Anemilerde, lösemilerde ve karsinomalarda yükselmiş HbF seviyesi görülebilir.

3.3.2. Tam Kandan DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüplere alınan tam kandan santrifüj edilerek plazma ayrıştırılır ve eritrositler paket halinde çöktürülür. Eritrositler hipotonik bir çözelti ile patlatılarak lökositler ayrıştırılır. Lökositlerin hücre zarı proteinaz K, sodyum klorür, EDTA Na₂ ve SDS içeren tamponla patlatılır. Fenol kloroform karışımı ile hücre artıklarından arındırılan DNA, saf etanolde çöktürülerek elde edilir^{17,61,62}.

3.3.2.1. Lökosit DNA İzolasyonu (Kısa Yöntem)

3.3.2.1.1. Ayıraçlar

1. Parçalayıcı (Lizis) Tampon

Amonyum Klorür	→	131,0 mM, 3,570 g	} distile su ile 1 litreye tamamlanır.
Amonyum Bikarbonat	→	0,9 mM, 0,0350 g	

2. Tampon A

4M NaCl	→	3,75 ml	} distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
0,5 M EDTA Na ₂ (pH 7,5)	→	5,0 ml	
SDS (%0,1)	→	100 mg	
Proteinaz K (25mg/mL)	→	0,2 ml	

3. Doymuş Fenol Çözeltisi

Kristal halde 250 g fenol, 50 mL distile suda eritilip, üzerine pH'sı 8'e ayarlanmış 50 mL, 0,5 M TRIS-HCl tamponu eklenerek karıştırılır. Fenol ve tampon fazı ayrıldıktan sonra üstte kalan fazın pH'sı 8.0'ın altındaysa bu faz atılır yeniden tampon eklenerek pH 8.0'a ayarlanır. Ardından konsantrasyonu %0,1 olacak şekilde

hidroksikinolin eklenir. Üstte bir miktar tampon fazı bırakılarak +4 °C'de renkli şişede saklanır.

4. Kloroform
5. %70'lik Etil Alkol
6. Saf Etil Alkol

3.3.2.1.2. Yöntem

- 1 mL EDTA'lı tam kan alınarak üzerine 3 mL soğuk parçalayıcı tampon eklenir, 10 dakika buz içinde bekletilir.
- +4°C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılır, bu işlem iki kez tekrar edilir.
- Lökosit pelleti üzerine 1 mL tampon A eklenip, hafifçe karıştırılır ve 37 °C'de bir gün bekletilir.
- Süre sonunda tüplere 400µL fenol, 400 µL kloroform eklenerek karıştırılır ve 5000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek altta kalan fenol kloroform karışımı atılır. Bu işlem 2 kez tekrar edilir.
- Aynı işlem 2 kez sadece kloroform eklenerek tekrarlanır.
- Santrifüj sonunda süpernatant 10 mL %95'lik etil alkol içeren tüpe aktarılır. Tüp yavaşça altüst edilerek DNA'nın ipliksi bir görünüm alışı sağlanarak 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır, DNA çöktürülür. DNA üzerine 1mL % 70'lik etil alkol eklenip karıştırılır ve 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır ve tüp ters çevrilerek alkol kurutulur.
- Pelletin büyüklüğüne göre üzerine 40-100 µL saf su eklenip DNA'nın çözünmesi için bir saat 37 °C'de bekletilir.
- DNA çözüldükten sonra konsantrasyonu hesaplanır.

3.3.2.1.3. Konsantrasyon ve Verim Hesabı

- 5 µL DNA çözeltisi 595 µL saf su ile karıştırılıp 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbansları ölçülür.
- Konsantrasyon (µg/mL) = $OD_{260} \times \text{Sulandırma oranı (120)} \times 50$
- Verim= $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$

Bu oranın 1,5-1,8 arasında olması istenir.

3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Belirli Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu genomik DNA'nın istenilen bölgesinin, in vitro koşullarda, bu hedeflenen bölgeye özgü primer kullanılarak konsantrasyonunun moleküler açıdan değerlendirilebilir düzeye çıkartılması işlemidir.

Amplifikasyon işleminde DNA 95°C'ye kadar ısıtılır, çift iplikli DNA ayrılarak tek iplikli DNA haline gelmesiyle denaturasyon sağlanır. İkinci aşamada ısı 65°C'ye ayarlanarak spesifik primerlerin komplementer dizilerine yapışması (annealing) gerçekleştirilir. Son aşamada 72°C'de DNA polimerazın yerini tutan ve yüksek ısıdan etkilenmeyen Taq polimeraz enzimiyle, ortamda bulunan deoksiniükleozid trifosfatların (dNTP'ler) 5'→3' yönünde eklenmesiyle zincir uzaması (ekstensiyon) sağlanır. Bu ısı değişimi döngüsünde iki katına çıkan hedef diziler de tekrarlanan döngüde şablon olarak kullanılarak; her döngünün (n) geometrik olarak artışı sağlanır^{8,63-70}.

3.3.4. ARMS (Amplification Refractory Mutation System) Yöntemiyle β Globin Gen Bozukluklarının Tanımlanması

Nokta mutasyonlarını veya küçük delesyonları tanımlamak için ARMS (Amplification Refractory Mutation System) yöntemi geliştirilmiştir.

Tipik bir ARMS yöntemi iki tamamlayıcı tepkimeden oluşur. Birinci tepkime, normal DNA dizisine özgül ARMS primeri içerir ve belirli bir yerdeki mutant DNA'yı amplifiye edemez. Benzer olarak, ikinci tepkime mutanta özgül primer içerir ve normal DNA'yı amplifiye edemez. Klasik PCR'dan farklı olarak mutasyona özgü amplifikasyon yapılarak mutant β globin alelleri saptanmaya çalışılır. Mutant β globin alelline özgü primer sadece mutasyonun olduğu bölgeyi tanırken, mutasyonun olmadığı bölgeye yapışmayacak ve amplifikasyon sonuçsuz kalacaktır. Böylece bir tane mutant alelle özgü, bir tane bunun zıt bölgesini karşılayan (özgün amplifikasyon), iki tane de genin herhangi bir bölgesini çoğaltarak koşulların doğruluğunu kontrol etmeye yarayacak (kontrol amplifikasyon) toplam dört primerin tek bir tüpte kullanılmasıyla β geninin bilinen mutasyonları saptanabilir^{8,63,65,71,72}.

Stok Çözeltiler

KCl	→	2 M
TrisHCl, pH 8,3	→	1 M
MgCl ₂ -6H ₂ O	→	1 M

+4°C' da saklanır.

10X Cetus Tamponu

2M KCl	→	1,25mL
1M Tris.HCl	→	0,5 mL
1M MgCl ₂	→	75 μ L
Jelatin	→	5 mg
Steril distile su	→	3,2 mL

Jelatinin erimesi için 37 °C'de bekletilir.

Spermidin 1 M

PCR Karışımı (4 mL)

10X Cetus tamponu	→	500 μ L
Steril distile su	→	2700 μ L
1,25mM dNTP karışımı	→	800 μ L
Spermidin .1M	→	4 μ L

dNTP karışımı

dNTP'lerin (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) her birinden (100 mM'lık stoktan) 60 µL alınıp üzerine 4740 µL steril distile su eklenerek 1,25 mM'lık çözelti hazırlanır.

Primerler

Primerler 5 pmol/µL olacak şekilde sulandırılır.

10X TBE Tamponu, pH 8,3

Tris.HCl	→ 2 M	} Saf su ile 1 litreye tamamlanır ve pH'sı glasiyel asetik asit ile ayarlanır.
Sodyum Asetat 3H ₂ O	→ 1 M	
EDTA-Na ₂	→ 10 mM	

3.3.4.1. Yöntem

Amplifikasyon ısıya dayanıklı mikrotüpler içinde Termal Döngü Düzenleyici Alet ile (Thermal Cycler) yapılır. Amplifikasyon tüplerinin yerleştirildiği bir ısı bloğu ve ısı değişimlerini kısa sürede gerçekleştiren bir mikroişlemciden oluşan bu alette termal döngü protokolleri önceden belirlenerek uygulanır.

3.3.4.2. Amplifikasyon Protokolü

PCR karışımı, mutasyonu içeren bölgeye özgü ARMS primeri, ortak primer (1 veya 2) sabit primer, genomik DNA (gDNA) ve Taq polimeraz içerir.

PCR karışımı	20 µl
ARMS primeri	1 µl
Ortak primer 1 veya 2	1 µl
5' Sabit primer	1 µl
3' Sabit primer	1 µl
gDNA (0.5-1 µg/mL)	1 µl
<u>Taq polimeraz (5 U/µL)</u>	<u>0.1µl</u>
Toplam hacim	25.1 µl

3.3.4.3. ARMS yönteminde kullanılan primerler

ARMS yönteminde kullanılan ortak ve sabit primerler Çizelge 3.1’de, β -talasemi mutasyonlarına özgü ARMS primerleri ise Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. ARMS yönteminde kullanılan ortak ve sabit primerlerin baz dizisi.

Ortak primer 1	5’ACC TCA CCC TGT GGA GCC AC 3’
Ortak primer 2	5’CCC CTT CCT ATG ACA TGA ACT TAA 3’
5’sabit primer	5’CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC 3’
3’sabit primer	5’GAG TCA AGG CTG AGA GAT GCA GGA 3’

Çizelge 3.2. β talasemi mutasyonlarına özgü ARMS primerlerin baz dizisi.

IVSI-110 (G→A) (M)	5’ ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC ACT 3’
IVSI-110 (G→A) (n)	5’ ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC ACC 3’
IVSI-1 (G→A) (m)	5’ TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAT 3’
IVSI-1 (G→A) (n)	5’ TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAC 3’
Cd 39 (C→T) (m)	5’ CAG ATC CCC AAA GGA CTC AAA GAA CCT GTA 3’
Cd 39 (C→T) (n)	5’ TTA GGC TGC TGG TGG TCT ACC CTT GGT CCC 3’
IVSI-6 (T→C) (m)	5’ TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATG 3’
IVSI-6 (T→C) (n)	5’ TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATA 3’
IVSII-1 (G→A) (m)	5’ AAG AAA ACA TCA AGG GTC CCA TAG ACT GAT 3’
IVSII-1 (G→A) (n)	5’ AAG AAA ACA TCA AGG GTC CCA TAG ACT GAC 3’
Cd 8 (-AA) (m)	5’ ACA CCA TGG TGC ACC TGA CTC CTG AGC AGG 3’
Cd 8 (-AA) (n)	5’ ACA CCA TGG TGC ACC TGA CTC CTG AGC AGA 3’
-30 (T→A) (m)	5’ GCA GGG AGG GCA GGA GCC AGG GCT GGC CAT 3’
-30 (T→A) (n)	5’ GCA GGG AGG GCA GGA GCC AGG GCT GGC CAA 3’
IVSII-745 (C→G) (m)	5’ TCA TAT TGC TAA TAG CAG CTA CAA TCG AGG 3’
IVSII-745 (C→G) (n)	5’ TCA TAT TGC TAA TAG CAG CTA CAA TCG AGC 3’
Fsc 5 (-CT) (m)	5’ ACA GGG CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCG CGA 3’
Fsc 5 (-CT) (n)	5’ ACA GGG CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCG CTC 3’
IVSI-5 (G→C) (m)	5’ CTC CTT AAA CCT GTG TTG TAA CCT TGT TAG 3’
IVSI-5 (G→C) (n)	5’ CTC CTT AAA CCT GTG TTG TAA CCT TGT TAC 3’
Fsc 8/9 (+G) (m)	5’ CCT TGC CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAC ACC 3’
Fsc 8/9 (+G) (n)	5’ CCT TGC CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAC ACT 3’

(m:mutant, n:normal)

3.3.4.4. Termal döngü Protokolü

Termal döngü protokolünün ısı ve süreleri.

94°C	1	dakika	→25 döngü
65°C	1	dakika	
72°C	1	dakika	
72°C	3	dakika	→1 döngü

3.3.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi; amplifiye edilmiş DNA molekülünün tanımlanması, ayrıştırılması ve saflaştırılması için kullanılır. Agaroz jelde DNA moleküllerinin içerdikleri nükleotid sayısının logaritması ile ters orantılı olarak anoda doğru göç ederler, bu göç hızı jele eş zamanlı uygulanan kontrol DNA ile birlikte değerlendirilir⁶².

3.3.5.1. Çözeltiler

%2'lik Neusive-Agaroz jel:

NuSieve → 1 g
Agaroz → 1 g } 100 mL 0,5×TBE tamponu içinde
mikrodalga fırında eritilerek hazırlanır.

Yükleme tamponu

Brom fenol mavisi → %0,05
Gliserol → %10
Ficoll → %15 } 0,5×TBE tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır.

5×Tris Borat EDTA (TBE) Tamponu pH 8,0:

Tris baz → 54,0 g
Borik asit → 27,5 g
EDTA [0,5 M, pH:8.0] → 20 mL } 1 L saf suda çözülerek hazırlanır.

Etidyum Bromür çözeltisi:

EtBr 5 µg/µL olacak şekilde saf suda çözülerek hazırlanır.

3.3.5.2. Yöntem

0,5×TBE tamponu içinde mikrodalga fırında çözölen %2'lik Neusive-Agaroz jel elektroforez kapları içine döktöldükten sonra soğumaya bırakılır. 0,5×TBE tamponuyla dolu elektroforez tankı içine yerleştirilerek jel içindeki tarak çıkarıldığında oluşun kuyulara, amplifiye örnekten 20 µL alınarak 2 µL yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra jele aplike edilip, 150 voltta 30 dakika yürütölür. Elektroforez sonrası jel etidyum bromür ile 3 dakika boyanır ve saf su ile yıkanarak boya atıklarından temizlenir. DNA fragmanları UV ile göröünür hale getirilip, fotoğrafı çekilerek değeriendirilir.

Agaroz jel elektroforez göröünümünde; homozigot olgular mutant çalışmada çift bant, normal çalışmada tek bant verirken, heterozigot olgular hem mutant hem de normal çalışmada çift bant normal vakalar ise mutant çalışmada tek bant, normal çalışmada ise çift bant verirler.



4. BULGULAR

Anamur Bölgesi'nden talasemi tarama çalışmasında kullanılmak üzere EDTA'lı tüplere alınan ve soğuk zincir kurallarına uyularak Adana'ya getirilen toplam 109 kan örneğinin kan sayımı otomatik kan sayım aygıtıyla, hemoglobin tipleri selüloz asetat elektroforez yöntemiyle, HbA₂ düzeyi mikrokolon kromatografisi yöntemiyle ve HbF değeri de alkali denatürasyon yöntemiyle belirlenmiştir.

Tüm olguların hemoglobin tipleri selüloz asetat elektroforez yöntemiyle çalışıldığında 107 olgunun hemoglobin tipinin HbAA, bir olgunun HbEE ve bir olgunun da HbAE olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

Örneklerin hematolojik verileri, HbA₂ ve HbF düzeyleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. DNA'ları Poncz yöntemine göre izole edilen olguların, hematolojik verileri incelenerek MCV değeri 80 fl'nin altında ve hemoglobin A₂ değeri %3,7'nin üzerinde olan bütün olguların ARMS yöntemiyle β -talasemi mutasyon tipleri saptanmıştır. Bu olguların mutasyon tipleri ve hematolojik verileri Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Olguların Hemoglobin tipleri.

Hemoglobin tipi	N	%
AA	107	98
AE	1	1
EE	1	1
Toplam	109	100

Çizelge 4.2 . Olguların hematolojik verileri, hemoglobinin tipleri, HbA₂ ve HbF düzeyleri.

No	İsim	C	Yaş	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Hb Etk.	Hb A ₂ (%)	HbF (%)
1	A.N.A.	K	27	4,73	10,4	34,5	73,0	21,9	30,1	AA	5,0	0,5
2	C.A	E	35	4,72	14,4	40,0	93,2	30,5	32,7	AA	1,8	0,4
3	E.A.	K	37	4,23	12,5	39,1	92,4	29,6	32,0	AA	2,5	0,6
4	H.B.A.	K	26	4,84	10,1	33,9	70,0	20,9	29,8	AA	4,6	0,5
5	B.A.	E	27	5,78	12,1	41,6	72,1	21,0	29,1	AA	5,1	1,1
6	S.A.	K	28	5,48	11,4	37,3	68,1	20,9	30,6	AA	5,0	0,9
7	C.A.	K	39	4,23	13,0	39,1	92,3	30,8	33,4	AA	2,8	4,2
8	E.A.	K	12	4,78	13,2	41,4	86,7	27,5	31,7	AA	2,8	0,7
9	V.A.	E	-	4,35	12,8	39,7	90,5	29,4	32,5	AA	2,8	0,4
10	Ş.A.	E	32	4,71	14,0	44,3	94,0	29,7	31,6	AA	1,8	0,4
11	A.F.A.	K	30	4,50	9,7	33,9	75,3	21,6	28,6	AA	4,0	0,9
12	A.A.	E	28	6,81	13,0	43,3	63,5	19,0	30,0	AA	4,2	1,4
13	G.A.	K	21	5,63	10,0	34,3	61,0	17,7	29,0	AA	4,0	0,8
14	N.B.	K	30	5,78	11,8	39,7	68,8	20,5	29,8	AA	2,2	0,9
15	H.B.	K	33	5,26	11,3	37,1	70,6	21,5	30,5	AA	4,7	2,7
16	A.B.	E	15	5,71	12,0	39,3	68,9	20,9	30,4	AA	5,4	0,7
17	A.B.	K	34	4,63	13,6	42,4	91,5	29,3	32,0	AA	1,8	0,8
18	S.B.	K	33	6,03	12,4	40,5	67,2	20,5	30,5	AA	4,2	0,8
19	M.B.	K	31	4,03	9,2	31,1	77,2	22,9	29,7	AA	4,5	1,7
20	S.B.	E	28	6,12	12,9	42,6	69,7	21,1	30,3	AA	4,2	0,5
21	Z.B.	E	26	5,54	11,3	37,8	68,2	20,3	29,8	AA	4,8	1,9
22	A.K.B.	K	19	5,66	11,3	37,8	66,8	20,0	29,9	AA	5,2	0,9
23	Z.B.	K	40	4,96	13,2	41,4	83,3	26,5	31,8	AA	2,9	0,6
24	H.U.B.	K	29	6,14	12,7	41,8	68,0	20,7	30,5	AA	5,0	1,4
25	F.Ç.	K	71	5,80	12,0	39,9	68,8	20,6	30,0	AA	3,7	1,2

No	İsim	C	Yaş	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Hb Elk.	Hb A ₂ (%)	HbF (%)
26	A.Ç.	K	30	3,39	8,3	29,8	88,0	24,4	27,8	AA	4,4	5,6
27	H.Ç.	E	10	3,60	9,4	31,4	87,3	26,0	29,8	AA	5,4	2,2
28	A.Ç.	K	30	5,87	12,4	41,2	70,2	21,1	30,0	AA	5,1	1,5
29	Y.Ç.	E	36	4,63	14,4	45,0	97,0	31,1	32,0	AA	2,6	0,4
30	A.Ç.	E	32	6,47	13,4	45,4	70,2	20,7	29,5	AA	4,2	1,8
31	F.Ç.	K	39	3,72	8,3	28,1	75,5	22,4	29,7	AA	5,3	0,7
32	A.D.	E	40	6,32	11,7	40,0	63,5	18,5	29,2	AA	5,1	0,9
33	V.D.	E	36	5,37	11,1	37,0	68,9	20,8	30,2	AA	5,6	1,3
34	G.D.	K	34	4,10	11,5	37,3	90,9	28,0	30,8	AA	2,2	2,1
35	N.D.	K	23	5,30	10,8	36,3	68,4	20,4	29,8	AA	4,9	0,6
36	E.D.	K	12	5,28	10,8	35,9	68,0	20,4	30,0	AA	3,8	1,3
37	Ç.D.	E	8	6,06	10,6	36,0	59,3	17,4	29,4	AA	4,4	1,0
38	G.D.	K	4	4,34	12,3	32,2	88,0	28,3	32,2	AA	2,8	0,4
39	M.D.	E	28	5,41	15,6	48,7	90,0	28,9	32,1	AA	2,7	0,4
40	M.E.	K	30	4,46	12,2	42,5	95,4	27,5	28,8	AA	3,4	1,2
41	H.E.	K	47	4,04	6,9	23,1	57,3	17,1	29,8	AE	67,5	3,0
42	F.E.	K	24	3,74	6,9	24,9	66,7	18,6	27,8	EE	50,1	8,3
43	H.E.	K	20	5,51	11,5	38,6	70,0	20,9	29,9	AA	3,5	0,7
44	A.E.	E	29	6,69	13,8	45,2	67,5	20,6	30,5	AA	1,5	0,9
45	H.V.İ.	E	38	6,42	13,9	45,9	71,5	21,7	30,4	AA	5,5	0,4
46	V.İ.	E	35	6,38	12,7	43,1	67,5	20,0	29,6	AA	4,7	0,8
47	S.İ.	K	5	5,79	11,0	36,7	63,4	19,0	30,0	AA	5,5	0,3
48	A.K.	E	30	6,06	17,1	54,8	90,4	28,1	31,1	AA	2,9	1,2
49	H.K.	E	30	5,16	11,2	36,6	71,0	21,6	30,5	AA	4,7	0,5
50	F.K.	K	23	4,41	9,1	30,7	69,5	20,7	29,7	AA	3,8	0,6

No	İsim	C	Yaş	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Hb Elk.	Hb A ₂ (%)	HbF (%)
51	E.K.	E	31	6,45	12,6	41,6	64,5	19,5	30,3	AA	5,1	0,7
52	O.K.	E	25	3,39	5,0	20,9	61,9	14,7	23,8	AA	1,8	1,0
53	G.K.	E	37	5,99	14,0	45,9	76,6	23,3	30,5	AA	5,6	1,7
54	S.K.	K	30	4,24	13,2	39,4	93,1	31,2	33,6	AA	2,8	0,5
55	C.K.	K	41	4,43	12,8	40,5	91,5	29,0	31,7	AA	2,8	0,5
56	N.K.	K	46	4,11	11,4	36,5	88,9	27,9	31,3	AA	1,7	0,5
57	H.K.	K	21	4,92	11,1	37,3	75,8	22,6	29,8	AA	4,1	1,5
58	L.K.	K	27	5,26	11,4	36,0	68,5	21,7	31,7	AA	4,7	0,4
59	M.K.	K	35	4,63	11,9	38,6	83,3	25,6	30,8	AA	2,7	0,4
60	M.K.	K	32	3,94	7,5	27,9	70,9	19,0	26,9	AA	2,2	0,4
61	H.O.	K	19	5,37	11,1	37,2	69,3	20,6	29,7	AA	5,1	0,6
62	S.O.	E	36	6,73	13,5	45,7	68,0	20,0	29,4	AA	4,9	1,1
63	E.Ö.	K	18	4,96	13,9	43,7	88,3	28,0	31,8	AA	2,4	1,1
64	E.Ö.	K	17	4,43	13,2	41,0	92,7	29,9	32,2	AA	2,9	0,4
65	H.Ö.	K	22	5,40	10,8	36,8	68,1	20,1	29,4	AA	5,4	0,5
66	D.Ö.	K	28	6,59	12,8	43,2	65,5	19,5	29,8	AA	5,0	1,8
67	F.Ö.	E	48	5,33	14,7	47,5	89,0	27,6	31,0	AA	2,4	0,8
68	F.Ö.	K	38	4,45	13,4	42,0	94,2	30,1	32,0	AA	2,7	0,6
69	N.P.	K	31	4,57	10,9	36,3	79,7	23,8	29,9	AA	2,4	0,9
70	N.S.	K	30	5,25	10,8	35,2	67,2	20,7	30,7	AA	3,5	1,0
71	Ş.S.	K	18	4,13	11,9	36,9	89,3	28,7	32,2	AA	2,5	2,6
72	M.K.Ş.	E	25	5,11	15,1	46,1	90,2	29,6	32,8	AA	3,0	0,4
73	O.Ş.	E	25	6,33	12,9	42,4	67,0	20,4	30,5	AA	5,5	0,9
74	H.Ş.	E	39	4,59	14,9	44,8	97,6	32,5	33,3	AA	2,7	0,4
75	S.Ş.	K	32	4,70	14,9	45,5	96,9	31,8	32,8	AA	2,5	1,1

No	İsim	C	Yaş	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Hb Etk.	Hb A ₂ (%)	HbF (%)
76	T. Ş.	K	28	4,31	9,9	32,5	75,2	22,8	30,3	AA	5,4	0,8
77	G. T.	K	38	4,24	12,8	39,9	94,1	30,1	32,0	AA	2,6	0,6
78	A.L.T	E	32	6,13	12,7	41,6	67,7	20,7	30,5	AA	5,9	0,6
79	N. T.	K	20	5,25	11,1	36,5	69,7	21,2	30,4	AA	3,8	0,9
80	H. T.	E	-	4,31	12,6	38,8	90,1	29,2	32,4	AA	3,0	0,6
81	H. T.	K	-	4,10	12,1	37,3	90,8	29,5	32,4	AA	3,1	0,6
82	B.A.T	E	-	4,99	15,1	47,2	94,6	30,3	32,0	AA	2,3	1,2
83	A.Ö.T	E	-	4,87	14,9	45,9	94,3	30,6	32,5	AA	2,7	1,2
84	A.Ö.T	K	-	4,07	12,3	38,2	93,9	30,2	32,1	AA	2,6	0,5
85	E.O.T	K	39	3,78	9,6	32,2	85,2	25,4	29,8	AA	3,6	0,4
86	F. T.	K	37	4,19	11,0	35,1	83,7	26,2	31,3	AA	2,5	0,5
87	M. T.	E	42	4,47	12,6	39,3	87,9	28,3	22,2	AA	1,8	1,3
88	S. T.	K	22	5,00	10,9	36,6	73,2	21,9	29,9	AA	5,1	1,3
89	H.Ö.T	E	13	4,42	12,1	37,2	84,2	27,5	32,6	AA	3,0	1,3
90	C. T.	E	11	4,63	12,1	38,3	82,8	26,1	31,5	AA	2,8	0,9
91	M.E.T	E	9	4,20	11,6	35,6	84,8	27,6	32,6	AA	2,3	0,8
92	K. T.	E	28	6,23	13,7	44,8	71,9	22,0	30,5	AA	4,5	0,8
93	G.E.T	K	27	5,37	12,5	41,5	77,4	23,2	30,0	AA	4,6	0,5
94	N. T.	K	42	5,32	12,1	39,9	75,1	22,8	30,4	AA	3,1	1,3
95	S. T.	K	14	5,25	11,3	37,9	72,2	21,5	29,8	AA	5,3	2,0
96	F. T.	E	2,5	5,39	11,3	35,9	66,7	21,0	31,5	AA	3,7	1,2
97	N. T.	K	34	4,47	12,7	40,1	89,8	25,5	31,5	AA	3,0	0,3
98	B. U.	E	44	4,78	13,1	41,1	86,1	27,4	31,8	AA	2,3	0,6
99	G. U.	K	39	3,71	8,9	30,3	81,8	24,2	29,5	AA	2,4	0,4
100	M. U.	E	66	6,57	13,0	43,8	66,7	19,7	29,6	AA	2,8	0,9

No	İsim	C	Yaş	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Hb Elk.	Hb A ₂ (%)	HbF (%)
101	S. U.	K	33	4,33	11,9	37,3	86,2	27,6	32,0	AA	2,7	0,2
102	G. Ü.	K	33	4,08	12,1	38,3	93,8	29,7	31,6	AA	2,3	0,2
103	H. Y.	K	42	4,89	10,7	37,2	76,0	22,0	29,0	AA	5,8	1,0
104	C. Y.	E	28	6,12	13,0	42,7	69,8	21,3	30,5	AA	5,7	0,8
105	F. Y.	K	33	4,46	11,7	37,2	83,5	26,2	31,4	AA	2,5	0,2
106	İ. İ. Y	E	9	4,85	13,2	41,0	84,5	27,2	32,2	AA	3,0	1,0
107	U. DY	E	4	4,53	12,7	38,4	84,7	28,1	33,2	AA	3,0	0,3
108	M. Y.	E	95	3,26	9,5	30,2	92,6	29,2	31,5	AA	2,4	0,5
109	A. Y.	K	27	4,76	10,0	33,2	69,7	21,0	30,1	AA	4,7	0,8

Çizelge 4.3. Olguların β talasemi mutasyon tipleri.

No	İsim	C	Yaş	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Hb Elk.	Hb A ₂ (%)	HbF (%)	Mutasyon Tipi
1	AN.A	K	27	4,73	10,4	34,5	73,0	21,9	30,1	AA	5,0	0,5	IVS1-110/N
2	H.B.A	K	26	4,84	10,1	33,9	70,0	20,9	29,8	AA	4,6	0,5	IVS1-110/N
3	B. A.	E	27	5,78	12,1	41,6	72,1	21,0	29,1	AA	5,1	1,1	IVS1-110/N
4	S. A.	K	28	5,48	11,4	37,3	68,1	20,9	30,6	AA	5,0	0,9	IVS1-110/N
5	A.F.A	K	30	4,50	9,7	33,9	75,3	21,6	28,6	AA	4,0	0,9	IVS1-6/N
6	A. A.	E	28	6,81	13,0	43,3	63,5	19,0	30,0	AA	4,2	1,4	Codon 8/N
7	G. A.	K	21	5,63	10,0	34,3	61,0	17,7	29,0	AA	4,0	0,8	Fsc 5/N
8	H. B.	K	33	5,26	11,3	37,1	70,6	21,5	30,5	AA	4,7	2,7	IVS1-110/N
9	A. B.	E	15	5,71	12,0	39,3	68,9	20,9	30,4	AA	5,4	0,7	IVS1-110/N
10	S. B.	K	33	6,03	12,4	40,5	67,2	20,5	30,5	AA	4,2	0,8	IVS1-110/N
11	M. B.	K	31	4,03	9,2	31,1	77,2	22,9	29,7	AA	4,5	1,7	IVS1-110/N
12	S. B.	E	28	6,12	12,9	42,6	69,7	21,1	30,3	AA	4,2	0,5	IVS1-110/N

No	İsim	C	Yaş	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Hb Elk.	Hb A ₂ (%)	HbF (%)	Mutasyon Tidi
13	Z.B.	E	26	5,54	11,3	37,8	68,2	20,3	29,8	AA	4,8	1,9	IVS1-110/N
14	A.K.B	K	19	5,66	11,3	37,8	66,8	20,0	29,9	AA	5,2	0,9	IVS1-110/N
15	H.U.B	K	29	6,14	12,7	41,8	68,0	20,7	30,5	AA	5,0	1,4	IVS1-110/N
16	F.Ç.	K	71	5,80	12,0	39,9	68,8	20,6	30,0	AA	3,7	1,2	IVS2-745/N
17	A.Ç.	K	30	5,87	12,4	41,2	70,2	21,1	30,0	AA	5,1	1,5	IVS1-110/N
18	A.Ç.	E	32	6,47	13,4	45,4	70,2	20,7	29,5	AA	4,2	1,8	IVS2-1/N
19	F.Ç.	K	39	3,72	8,3	28,1	75,5	22,4	29,7	AA	5,3	0,7	IVS2-1/N
20	A.D.	E	40	6,32	11,7	40,0	63,5	18,5	29,2	AA	5,1	0,9	IVS2-745/N
21	V.D.	E	36	5,37	11,1	37,0	68,9	20,8	30,2	AA	5,6	1,3	IVS2-745/N
22	N.D.	K	23	5,30	10,8	36,3	68,4	20,4	29,8	AA	4,9	0,6	IVS1-110/N
23	E.D.	K	12	5,28	10,8	35,9	68,0	20,4	30,0	AA	3,8	1,3	IVS2-745/N
24	Ç.D.	E	8	6,06	10,6	36,0	59,3	17,4	29,4	AA	4,4	1,0	IVS2-745/N
25	H.E.	K	47	4,04	6,9	23,1	57,3	17,1	29,8	AE	67,5	3,0	IVS1-110/N
26	F.E.	K	24	3,74	6,9	24,9	66,7	18,6	27,8	EE	50,1	8,3	IVS1-110/N
27	H.E.	K	20	5,51	11,5	38,6	70,0	20,9	29,9	AA	3,5	0,7	IVS1-110/N
28	A.E.	E	29	6,69	13,8	45,2	67,5	20,6	30,5	AA	1,5	0,9	IVS1-110/N
29	H.V.İ.	E	38	6,42	13,9	45,9	71,5	21,7	30,4	AA	5,5	0,4	IVS1-110/N
30	V.İ.	E	35	6,38	12,7	43,1	67,5	20,0	29,6	AA	4,7	0,8	IVS1-110/N
31	S.İ.	K	5	5,79	11,0	36,7	63,4	19,0	30,0	AA	5,5	0,3	IVS1-110/N
32	H.K.	E	30	5,16	11,2	36,6	71,0	21,6	30,5	AA	4,7	0,5	IVS2-745/N
33	F.K.	K	23	4,41	9,1	30,7	69,5	20,7	29,7	AA	3,8	0,6	IVS1-110/N
34	O.K.	E	25	3,39	5,0	20,9	61,9	14,7	23,8	AA	1,8	1,0	-30/N
35	H.K.	K	21	4,92	11,1	37,3	75,8	22,6	29,8	AA	4,1	1,5	IVS1-110/N
36	L.K.	K	27	5,26	11,4	36,0	68,5	21,7	31,7	AA	4,7	0,4	IVS1-110/N
37	H.O.	K	19	5,37	11,1	37,2	69,3	20,6	29,7	AA	5,1	0,6	IVS1-110/N
38	S.O.	E	36	6,73	13,5	45,7	68,0	20,0	29,4	AA	4,9	1,1	IVS1-110/N
39	H.Ö.	K	22	5,40	10,8	36,8	68,1	20,1	29,4	AA	5,4	0,5	IVS1-110/N
40	D.Ö.	K	28	6,59	12,8	43,2	65,5	19,5	29,8	AA	5,0	1,8	IVS1-110/N

No	İsim	C	Yaş	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Hb Elk.	Hb A ₂ (%)	HbF (%)	Mutasyon Tidi
41	N. S.	K	30	5,25	10,8	35,2	67,2	20,7	30,7	AA	3,5	1,0	IVS1-110/N
42	O. Ş.	E	25	6,33	12,9	42,4	67,0	20,4	30,5	AA	5,5	0,9	IVS1-110/N
43	T. Ş.	K	28	4,31	9,9	32,5	75,2	22,8	30,3	AA	5,4	0,8	IVS1-110/N
44	A.L.T	E	32	6,13	12,7	41,6	67,7	20,7	30,5	AA	5,9	0,6	IVS1-110/N
45	N. T.	K	20	5,25	11,1	36,5	69,7	21,2	30,4	AA	3,8	0,9	-30/N
46	S. T.	K	22	5,00	10,9	36,6	73,2	21,9	29,9	AA	5,1	1,3	IVS1-110/N
47	K. T.	E	28	6,23	13,7	44,8	71,9	22,0	30,5	AA	4,5	0,8	IVS1-110/N
48	G.E.T	K	27	5,37	12,5	41,5	77,4	23,2	30,0	AA	4,6	0,5	IVS1-6/N
49	N. T.	K	42	5,32	12,1	39,9	75,1	22,8	30,4	AA	3,1	1,3	-30/N
50	S. T.	K	14	5,25	11,3	37,9	72,2	21,5	29,8	AA	5,3	2,0	-30/N
51	F. T.	E	2,5	5,39	11,3	35,9	66,7	21,0	31,5	AA	3,7	1,2	-30/N
52	M. U.	E	66	6,57	13,0	43,8	66,7	19,7	29,6	AA	2,8	0,9	IVS1-110/N
53	C. Y.	E	28	6,12	13,0	42,7	69,8	21,3	30,5	AA	5,7	0,8	IVS1-110/N
54	A. Y.	K	27	4,76	10,0	33,2	69,7	21,0	30,1	AA	4,7	0,8	IVS1-110/N

Ancak, MCV değeri 80 fl'nin üzerinde, fakat HbA₂'si %3,7'nin üzerinde olan iki olgunun mutasyon noktası saptanamamıştır. Bu iki olgunun HbF düzeyi de normalden yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.4). Bunun yanında MCV değeri 80 fl'nin altında, fakat HbA₂ değeri %1,5-3,7 arasında olan 8 olgunun β-talasemi mutasyonu içerdiği saptanmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4. Mutasyonu saptanamayan olgular.

İsim	C	Yaş	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Hb Elk.	HbA ₂ (%)	HbF (%)
A. Ç.	K	30	3,39	8,3	29,8	88,0	24,4	27,8	AA	4,4	5,6
H. Ç.	E	10	3,60	9,4	31,4	87,3	26,0	29,8	AA	5,4	2,2

Çizelge 4.5. MCV değeri 80 fl'nin altında, HbA₂ değeri %1,5-3,7 arasında olup β-talasemi mutasyonu saptanan olgular.

İsim	C	Yaş	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Hb Elk.	HbA ₂ (%)	HbF (%)	Mutasyon Tipi
F. Ç.	K	71	5,80	12,0	39,9	68,8	20,6	30,0	AA	3,7	1,2	IVS2-745/N
H. E.	K	20	5,51	11,5	38,6	70,0	20,9	29,9	AA	3,5	0,7	IVS1-110/N
A. E.	E	29	6,69	13,8	45,2	67,5	20,6	30,5	AA	1,5	0,9	IVS1-110/N
D. K.	E	25	3,39	5,0	20,9	61,9	14,7	23,8	AA	1,8	1,0	-30/N
N. S.	K	30	5,25	10,8	35,2	67,2	20,7	30,7	AA	3,5	1,0	IVS1-110/N
N. T.	K	42	5,32	12,1	39,9	75,1	22,8	30,4	AA	3,1	1,3	-30/N
F. T.	E	2,5	5,39	11,3	35,9	66,7	21,0	31,5	AA	3,7	1,2	-30/N
A. U.	E	66	6,57	13,0	43,8	66,7	19,7	29,6	AA	2,8	0,9	IVS1-110/N

Hemoglobin tipleri Hb AE ve EE olarak saptanan iki olgunun IVS1-110 mutasyonu içerdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Hb tipleri AE ve EE olan iki olgunun hematolojik verileri.

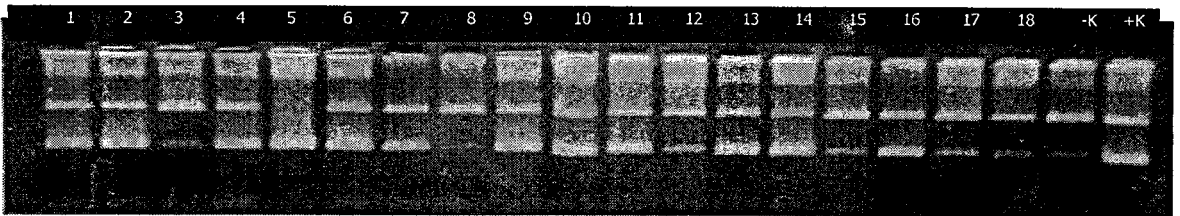
İsim	C	Yaş	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Hb Elk.	HbA ₂ (%)	HbF (%)	Mutasyon Tipi
H. E.	K	47	4,04	6,9	23,1	57,3	17,1	29,8	AE	67,5	3,0	IVS1-110
F. E.	K	24	3,74	6,9	24,9	66,7	18,6	27,8	EE	50,1	8,3	IVS1-110

ARMS yöntemiyle 54 örneğin mutasyon tipi saptandığında; 37 tanesinin IVS1-110 (%68,5), 6 tanesinin IVS2-745 (%11,1), 5 tanesinin -30 (%9,3), 2 tanesinin IVS1-6 (%3,7), 2 tanesinin IVS2-1 (%3,7), 1 tanesinin Cd 8 (%1,9) ve 1 tanesinin ise Fsc 5 (%1,9) içerdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Olguların mutasyon tipleri ve görülme sıklıkları.

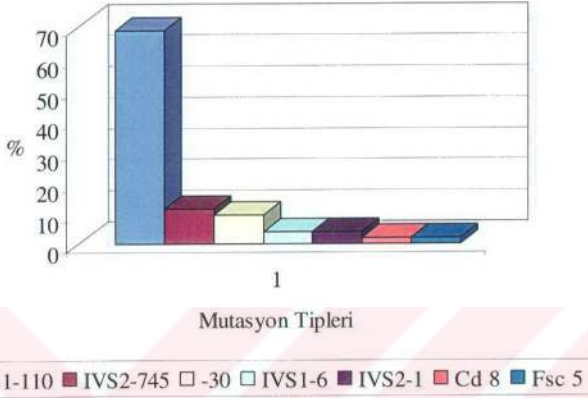
Heterozigot olgu sayısı		
Mutasyon tipi	n	%
IVS1-110	37	68,5
IVS2-745	6	11,1
-30	5	9,3
IVS1-6	2	3,7
IVS2-1	2	3,7
Cd 8	1	1,9
Fsc 5	1	1,9
Toplam	54	100

IVS1-110 mutasyon taraması için ARMS yöntemi ile yapılan amplifikasyonun %2'lik agaroz jeldeki görünümü Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. IVS1-110 mutasyon taraması için ARMS yöntemi ile yapılan amplifikasyonun %2'lik agaroz jeldeki görünümü. 1,2,4,5,6,7,9,10,11,13,14 ve 16 nolu örnekler adı geçen mutasyon için pozitif, 3,8,12,15,17,18 nolu örnekler negatiftir. -K negatif, +K ise pozitif kontrolü ifade etmektedir.

Saptadığımız mutasyonların % dağılım grafiği aşağıdadır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Mutasyonların dağılım grafiği.

Olguların cinsiyetlere göre hematolojik verilerinin dağılımı ve ortalama $\pm$ SD değerleri Çizelge 4.8'de verilmiştir. Olguların mutasyonlara göre hematolojik verilerinin dağılımı ve ortalama $\pm$ SD değerleri Çizelge 4.9'da verilmiştir. Bu çalışmada saptanan mutasyonların sıklığı ile Türkiye'de yapılan çalışmaların karşılaştırılması Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.8. Kadın ve erkek olguların hematolojik verilerinin istatistiksel dağılımı⁷⁴

	n	Yaş	RBC ($10^{12}/L$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	HbA ₂ (%)	HbF (%)
Erkek	44	29,8 $\pm$ 16,7 3-95	5,4 $\pm$ 0,9 3,26-6,81	12,8 $\pm$ 1,9 5,0-17,1	41,2 $\pm$ 5,6 20,9-54,8	78,4 $\pm$ 11,8 59,3-97,6	24,3 $\pm$ 4,6 14,7-32,5	30,7 $\pm$ 2,1 22,2-33,3	3,7 $\pm$ 1,4 1,5-5,4	0,9 $\pm$ 0,5 0,3-2,2
Kadın	65	29,4 $\pm$ 10,6 4-71	4,8 $\pm$ 0,7 3,39-6,59	11,3 $\pm$ 1,6 6,9-14,9	36,9 $\pm$ 4,4 23,1-45,5	78,6 $\pm$ 10,7 57,3-96,9	24,1 $\pm$ 4,0 17,1-31,8	30,6 $\pm$ 1,3 26,9-33,6	5,4 $\pm$ 9,8 1,7-67,5	1,1 $\pm$ 1,3 0,2-8,3
Toplam	109	29,6 $\pm$ 13,2 3-95	5,01 $\pm$ 0,9 3,26-6,81	11,9 $\pm$ 1,9 5,0-17,1	38,6 $\pm$ 5,3 20,9-54,8	78,5 $\pm$ 11,1 57,3-97,6	24,2 $\pm$ 4,2 14,7-32,5	30,6 $\pm$ 1,7 22,2-33,6	4,67 $\pm$ 7,6 1,5-67,5	1,039 $\pm$ 1,040 0,2-8,3

Çizelge 4.9. Olguların hematolojik verilerinin mutasyonlara göre istatistiksel dağılımı⁷⁴

	n	Yaş	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	HbA ₂ (%)	HbF (%)
IVS1-110	37	28,2±9,5 5-66	5,6±0,8 3,74-6,73	11,6±1,6 6,9-13,9	38,4±5,2 23,1-45,9	68,9±3,6 57,3-77,2	20,7±1,2 17,1-22,9	30,1±0,6 27,8-31,7	7,7±12,6 1,5-67,5	1,2±1,3 0,3-8,3
IVS2-745	6	32,83±22,7 8-71	5,7±0,5 5,16-6,32	11,2±0,5 10,6-12	38,0±1,9 35,9-40,0	66,6±4,3 59,3-71,0	19,9±1,6 17,4-21,6	29,9±0,5 29,2-30,5	4,6±0,7 3,7-5,6	1,0±0,3 0,5-1,3
-30	5	23,1±16,3 3-42	5,4±0,3 5,25-5,99	12,0±1,2 11,1-14	39,2±4,0 35,9-45,9	72,1±4,0 66,7-76,6	22,0±1,0 21,0-23,3	31,0±0,6 29,8-31,5	4,3±1,1 3,1-5,6	1,4±0,4 0,9-2,0
IVS1-6	2	29,0±2,1 27-30	4,9±0,6 4,50-5,37	11,1±1,9 9,7-12,5	37,7±5,4 33,9-41,5	76,4±1,5 75,3-77,4	22,4±1,1 21,6-23,2	29,3±1,0 28,6-30,0	4,3±0,4 4,0-4,6	0,7±0,3 0,5-0,9
IVS2-1	2	36,0±5,0 32-39	5,1±1,9 3,72-6,47	10,9±3,6 8,3-13,4	36,8±12,2 28,1-45,4	72,9±3,8 70,2-75,5	21,5±1,2 20,7-22,4	29,6±0,1 29,5-29,7	4,8±0,8 4,2-5,3	1,3±0,8 0,7-1,8

Çizelge 4.10. Türkiye'de saptanan β -talasemik olguların mutasyon tipleri ve sıklığı.

Mutasyon Tipi	Kendi çalışmamız		Yüregir ve ark. ⁷³		Evrensel ⁷⁵		Topal ⁷²		Tadmouri ve ark. ¹²	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
IVS1-110	37	68,5	140	54,6	59	75,6	63	60,6	312	39,3
IVS2-745	6	11,1	5	1,9	-	-	2	1,9	40	5,0
-30	5	9,3	6	2,4	-	-	4	3,8	25	3,1
IVS1-6	2	3,7	12	4,7	6	7,7	5	4,8	80	10,1
IVS2-1	2	3,7	7	2,7	-	-	3	2,9	37	4,7
Cd 8	1	1,9	9	3,5	5	6,4	10	9,6	43	5,5
Fsc 5	1	1,9	-	-	-	-	-	-	-	-
IVS1-1	-	-	24	9,4	-	-	9	8,6	40	5,0
Cd 39	-	-	22	8,7	2	2,6	4	3,8	30	3,8
Cd 5	-	-	-	-	6	7,7	3	2,9	17	2,1
-28	-	-	-	-	-	-	1	0,9	1	0,1
Diğer	-	-	31	12,1	-	-	-	-	98	13,2
Bilinmeyen	-	-	-	-	-	-	-	-	72	9,1
Toplam	54	100,0	256	100,0	78	100	104	100,0	795	100,0

5. TARTIŞMA

β -talaseminin dünya üzerinde yaklaşık 250 milyon taşıyıcı ile morbidite ve mortaliteye yol açan başlıca genetik hastalık olduğu bildirilmiştir⁷⁶.

Türkiye üç kıtanın birleşimi üzerine yerleşmiş olduğundan farklı popülasyonların göçünden çok fazla etkilenmiştir. Bundan dolayı etnik farklılığın diğer Akdeniz ülkelerine göre daha yoğun olması Türkiye’de β -talasemi mutasyon tiplerinin çok sayıda olmasına neden olmuştur¹². Türkiye’de β talasemi taşıyıcı sıklığı %2,1 olmakla birlikte bölgelere göre değişmektedir⁷. Ülkenin güney illerinde hastaların yoğunlukta olması talaseminin bu bölgede büyük bir halk sağlığı sorunu oluşturmasına neden olmuştur^{15,77,78}.

Bu çalışmada β -talasemi mutasyonu saptanan toplam 109 olgunun hematolojik verilerinin ortalaması, standart sapması, alt ve üst değerleri Çizelge 4.8’de verilmiştir. Hemogloblin değerleri 5,0-17,1 g/dL arasında değişmekle birlikte ortalama $11,9 \pm 1,9$ SD’dir. Aksoy ve arkadaşları 14 olguda hibridizasyon yöntemiyle β -talasemi mutasyon tiplerini araştırmışlar ve bu olguların hemogloblin değerlerini 7,8-14,5 g/dL arasında bulmuşlardır⁷⁹. Arpacı ve arkadaşları yaptıkları çalışmada hibridizasyon yöntemi ile mutasyonları saptamışlar ve hemogloblin değerlerini 7,8-14,5 g/dL olarak bulmuşlardır⁶⁴. Tanrıverdi çalışmasında 21 β -talasemi taşıyıcısı olgunun hemogloblin değerini 5,7–14,4 g/dL arasında saptamıştır⁷¹. Topal doktora tez çalışmasında Antakya, Kayseri ve İzmir bölgesinin β -talasemi mutasyonlarını çalışmış ve hemogloblin değerlerini heterozigot taşıyıcılarda 9,0-12,9 g/dL arasında bulmuştur⁷². Evrensel Kayseri bölgesinde β -talasemi mutasyonlarını çalışmış ve hemogloblin değerlerini heterozigot taşıyıcılarda 8,7-14,9 arasında bulmuştur⁷⁵.

Bu çalışmadaki olguların hematokrit değerleri %20,9-54,8 olarak bulunmuştur. Bu değerlerin Aksoy ve arkadaşlarının çalışmasında; %25,0-44,4, Arpacı’nın çalışmasında %25,0–44,0, Tanrıverdi’nin çalışmasında; %23,5-46,1, Topal’ın çalışmasında; heterozigot taşıyıcılarda %31,9-48,9 ve Evrensel’in çalışmasında heterozigot taşıyıcılarda %29,6-47,2 arasında olduğu bildirilmiştir^{64,71,72,75,78}.

Talasemi tanısında en çok başvurulanan değer olan MCV’ler irdelendiğinde; 57,3-97,6 arasında değiştikleri görülmüştür. Aynı değerler Aksoy’un çalışmasında 60-79 fL, Arpacı’nın çalışmasında; 59,8-83,0 fL, Tanrıverdi’nin çalışmasında; 60,1-71,0 fL,

Topal'ın çalışmasında; heterozigotlarda 65,4-82,6 fL ve Evrensel'in çalışmasında ise heterozigotlarda 56,2-71,7 fL arasında bulunmuştur^{64,71,72,75,79}.

Hemoglobin elektroforez sonuçları incelendiğinde; 109 olgudan 107'sinde HbAA, 1'inde HbAE, birinde de HbEE bulunmuştur (Çizelge 4.1). HbAE ve Hb EE saptanan 2 olgunun da IVS1-110 mutasyonu için heterozigot özellik gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 4.6). HbAA saptanan olgulardan 35'i IVS1-110, 6'sı IVS2-745, 5'i -30, 2'si IVS1-6, 2'si IVS2-1, 1'i Cd 8 ve 1'i de Fsc 5 mutasyonu taşımaktadırlar (Çizelge 4.7). Arpacı'nın çalışmasında; IVS1-110 mutasyonu saptanan örneklerden ikisinin HbAA, ikisinin HbAS, birinin HbSF olduğu, Cd 39 mutasyonu saptanan iki örnekten 1'nin HbSF, 1'nin HbAS olduğu ve IVS2-745 mutasyonu saptanan iki olgunun birisinin HbAA, birisinin de HbSS olduğu bulunmuştur. Tanrıverdi'nin çalışmasında; IVS1-1 mutasyonu saptanan 3 olgudan ikisinin HbAA, 1'nin HbSF, Cd 39 mutasyonu saptanan 3 olgunun HbAA, IVS1-110 mutasyonu saptanan 15 olgudan; 12'sinin HbAA, 2'sinin HbSS ve 1'nin HbSF olduğu bulunmuştur. Topal'ın çalışmasında; Kayseri örneklerinde 27 kişide HbAA, 3 kişide HbF, bir kişide HbAF saptanmış, HbF değerleri yüksek olan olguların ikisi IVS1-110 ve IVS1-6 mutasyonu için heterozigot iken diğer ikisi Cd 8 için homozigot özellikte olduğu saptanmıştır. Evrensel'in çalışmasında; elektroforez sonucu Hb AA olarak saptanan olgulardan 29'unun IVS1-110, 4'ünün Cd 5, 3'ünün Cd 8 ve 1'inin de Cd 39 mutasyonu taşıdığı bulunmuştur. Elektroforez sonucu Hb AF olarak saptanan 2 olgunun ise birisinin IVS1-110, diğerinin de IVS1-6 mutasyonu taşıdıkları bulunmuştur^{64,71,72,75,78}.

Mikrokolon kromatografisi yöntemiyle saptanan HbA₂ düzeyleri %1,5-67,5 arasında bulunmuştur. (Çizelge 4.8). 51 olgunun HbA₂ düzeyleri %3,7'nin üzerinde bulunmuştur. Aksoy'un çalışmasında; tüm olguların HbA₂ düzeyleri normal sınırın üzerinde bulunmuştur (%3,6-5,6). Arpacı'nın çalışmasında; 3'ü haricinde tüm olguların HbA₂ düzeyleri normal sınırın üzerinde bulunmuştur (%4,0-5,8). Tanrıverdi'nin çalışmasında; HbA₂ düzeyleri 5'i hariç, 13 olguda normal sınırın üzerinde bulunmuştur (%4,0-7,0). Topal'ın çalışmasında HbA₂ düzeyleri heterozigot taşıyıcılarda %3,9±0,7, homozigotlarda %2,5±0,9 bulunmuştur. Yüreğir ve arkadaşlarının Kahramanmaraş ve çevresinde yaptıkları tarama çalışmasında %3,5'in üzerindeki HbA₂ düzeyi sıklığını %0,68 olarak saptamışlardır. Evrensel'in çalışmasında ise Hb A₂ değerleri taşıyıcılarda %2,4-5,6, hastalarda ise %1,5-5,6 arasında bulunmuştur^{64,71,72,75,78,80}.

Alkali denatürasyon yöntemiyle HbF değerleri %0,2-8,3 arasında bulunmuştur (Çizelge 4.8). 7 olgunun HbF değerleri %2,0'ın üzerinde belirlenmiş olup bu olgulardan üçünde IVS1-110 mutasyonu bulunmuştur (Çizelge 4.3). Arpacı'nın çalışmasında; HbF değeri yüksek 2 olguda hemoglobin tipi HbAA ve IVS1-110 mutasyonu, 2 olguda hemoglobin tipi HbAS ve IVS1-110 mutasyonu ve bir olguda da hemoglobin tipi HbSF ve IVS1-110 mutasyonu bulunmuştur. Tanrıverdi'nin çalışmasında; HbF düzeyleri %0,2-5,6 aralığında olup; 10 olgunun HbF değerleri normal ve 7 olgunun yüksek olduğu bildirilmiştir (%2,1-5,6). Topal'ın çalışmasında HbF değerleri; heterozigot taşıyıcılarda %3,1±0,7, homozigotlarda %10,1±0,2 bulunmuştur. Evrensel'in çalışmasında ise Hb F değerleri %0,5-36,0 arasında olup, HbF değeri normal sınırın üzerinde belirlenen 17 olgunun 8'inde IVS1-110/ IVS1-110, 2'sinde IVS1-110/IVS1-6, 1'inde Cd 5/Cd 5, 2'sinde IVS1-110, 2'sinde Cd 5, 1'inde Cd 8 ve 1'inde IVS1-6 mutasyonu bulunmuştur^{64,71,72,75}.

Çalışmamızın ana konusunu oluşturan β -talasemi mutasyon tiplendirilmesi konusunda mutasyonların belirlenmesine yönelik pek çok farklı çalışmalar yapılmıştır. Özellikle Akdeniz'in doğusunda IVS1-110 pozisyonunda alternatif splice bölgesini oluşturan G→A değişiminin neden olduğu IVS1-110 mutasyon tipi en yaygın olanıdır. IVS1-110 (G→A) mutasyonu Güney Kıbrıs'ta %79,8, Kuzey Kıbrıs'ta %74,1, Lübnan'da %62,0, eski Yugoslavya'da %45,4, Arnavutluk'ta %43,2, Yunanistan'da %42,6, Azerbeycan'da ve Türkiye'de % 41,2 sıklıkta görülmektedir⁸¹⁻⁸³.

Türkiye'de yapılan çalışmaların bir kısmı Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. Yüreğir ve arkadaşlarının Çukurova bölgesini kapsayan çalışmalarında IVS1-110 mutasyonun sıklığı %54,6 olarak bulunmuştur⁷³.

Topal çalışmasında; IVS1-110 mutasyonunu Antakya bölgesinde %63,7, Kayseri'de %68,3 ve İzmir bölgesinde %46,7 oranında bulmuştur. Antakya bölgesi için; mutasyon sıklığını sırasıyla; IVS1-1 (G→A) için % 18,2, Cd 39 (C→T), IVS1-6 (C→T) ve IVS2-1 (G→A) için % 6,0 olarak saptamıştır. Kayseri örneklerinde ise; IVS1-110 (G→A) %68,3, Cd 8 (-AA) %19,5, IVS1-6 (C→T) ve Cd 5 (-CT) %4,9 ve IVS1-1 (G→A) %2,4 olarak belirlemiştir. İzmir örneklerinde en sık IVS1-110 (G→A) %46,7 oranında bulunmuş olup, bunu %13,3 ile -30, %6,7 ile IVS1-1(G→A), Cd 39 (C→T) ve Cd 8, %3,3 ile de Cd 5 (-CT), IVS1-6, IVS2-1, IVS2-745 ve -28 izlemiştir.

Aksoy ve arkadaşları Çukurovada β -talasemili bir ailenin mutasyon tiplemesinde sadece IVS1-110 ve IVS1-1 mutasyonlarını saptamışlardır^{72,79}.

Öner ve arkadaşlarının Türkiye genelinde yaptığı bir çalışmada yaygın olarak görülen mutasyon tipleri ve sıklıklarını şu şekilde bildirilmiştir; IVS1-110 (G→A) %42,5, IVS1-6 (T→C) %18,0, IVS2-1 (G→A) %11,5, Cd 8 (-AA) %7,14, Cd 39 (C→T) %6,0, IVS2-745 (C→G) %4,4, IVS1-1 (G→A) %2,5, -30 (T→A) %2,2 ve Cd 5 %1,1⁷⁶. Atalay ve arkadaşları; Türkiye'de β -talasemi mutasyon tiplerinin bölgesel dağılımına yönelik yaptıkları çalışmada, mutasyon tipleri ve sıklıklarını şu şekilde bildirmişlerdir: IVS1-110 (G→A) %35,9, IVS1-6 (T→C) %21,6, IVS1-1 (G→A) %13,0, Cd 39 (C→T) %7,2, IVS2-745 (C→G) %3,6, Cd 8 (-AA) %2,2 ve IVS2-1 (G→A) %1,4⁶³. Öner ve arkadaşları Doğu Anadolu bölgesinde yaptıkları çalışmada, Cd 8, -30 (T →A), IVS1-110 (G→A), IVS1-130 (G→A) ve IVS2-1 (G→A) mutasyonlarını bulmuşlardır⁸⁴.

Tadmouri ve arkadaşları İstanbul, İzmir, Adana ve Antalya'daki farklı hastanelerden 795 olgunun β -talasemi mutasyonu çalıştıklarında 31 farklı mutasyon tipi saptamışlardır. Bu çalışmada IVS1-110'un (G→A) Türkiye'de en sık görülen mutasyon olduğunu, bunu azalan oranlarda IVS1-6 (T→C), Cd 8 (-AA), IVS2-745 (C→G), IVS1-1 (G→A), IVS2-1 (G→A), Cd 39 (C→T), -30 (T→A), Cd 5 (-CT) ve -28 mutasyonunun izlediğini rapor etmişlerdir¹².

Tadmouri çalışmasında mutasyon dağılımının coğrafi bölgeler arasında farklılıklar gösterdiğini ve Anadolu'nun doğusundan batısına doğru mutasyon çeşitliliğinin azaldığını ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmada Karadeniz bölgesine ait örnekler Orta Anadolu'dan gelen örneklerle göre oldukça belirgin bir genetik heterojenite göstermişlerdir. Anadolu'daki muhtemelen en eski β -talasemi mutasyonu olan IVS1-110'un yaklaşık M.Ö. 6500-2000 senelerinde sıtma seleksiyonu ile çoğaldığı yönünde bulgular mevcuttur. Türkiye'de sıklıkla görülen diğer β -talasemi mutasyonlarının bu tarihten sonra oluştuğu ve 13. y.y. civarında yaklaşık bugünkü oranlarına ulaştıkları düşünülmektedir⁸⁵.

Tadmouri'nin çalışmasında; IVS1-110 (G→A) mutasyonu orta ve batı Anadolu'da en sık görülen mutasyondur (%52,3). Bu çalışma bizim bulgularımızla uyumludur. IVS1-6 (T→C) mutasyonu; Türkiye'nin farklı bölgelerinde eşit olarak dağılmaktadır. Cd 8 (-AA); doğu Anadolu'da (%8,3) ve Marmara bölgesinde (%8) en

sık görülen mutasyondur. Bizim çalışmamızda Cd 8 mutasyonu bir tane (%1,9) bulunmuştur. Cd 39 (C→T) Marmara bölgesinde en sık görülen mutasyondur. Bu bulgu diğer Balkan ülkeleri ile uyumludur¹². Bizim çalışmamızda ise bu mutasyona hiç rastlanamamıştır. Akdenizlilere özgü bir mutasyon olan IVS1-1'e bölgemizde sıkça rastlanmasına rağmen bizim çalışmamızda bu mutasyon saptanamamıştır.

Türk ve Bulgarlara özgü bir mutasyon olan -30 mutasyonu için Türkiye ortalaması %3,6'dır⁸¹. Bizim çalışmamızda ise bu oran %9,3 olarak bulunmuştur.

Yine bir Akdeniz mutasyonu olan IVS2-745 için Türkiye ortalaması %1,9 olmasına rağmen bizim çalışmamızda aynı mutasyona %11,1 oranında rastlanmıştır⁸¹.

Türkiye'nin bölgeleri mutasyon sıklığı açısından karşılaştırıldığında her coğrafik bölgedeki mutant allellerin dağılımında bir farklılık olduğu gözlenmiştir. Farklı bölgelerde daha geniş kapsamlı çalışmalar yapılarak Türkiye'nin talasemi mutasyonları açısından tam bir haritası çıkarılmalıdır. Riskli popülasyonlarda taşıyıcıların taranması, halkın eğitilmesi ve genetik danışmanlık verilmesi gerekmektedir. Ayrıca gebelik öncesinde prenatal tanıya yardımcı olmak amacıyla mutasyon tiplendirilmesi yapılmalıdır. Riskli çiftlerde ise prenatal tanı uygulanması ulusal politika olarak benimsenmeli ve finansmanı devlet tarafından karşılanmalıdır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Yapılan bu çalışma ile Anamur Bölgesi'nin de β -talasemi için riskli bir bölge olduğu saptanmıştır.
2. Türkiye'nin diğer bölgelerinde olduğu gibi IVSI-110 β -talasemik mutasyon tipi Anamur bölgesinde de en sık olarak bulunmuştur.
3. Türkiye'nin β -talasemik mutasyon haritasının çıkartılabilmesi için tarama çalışması yapılarak riskli bölgelerinin saptanması gerekmektedir.
4. Riskli bölgelerde hasta çocuk doğumunu engellemek için halk talasemi konusunda eğitilmelidir.
5. Prenatal tanı merkezleri devlet tarafından desteklenerek ücretsiz yapılmalıdır.



7. KAYNAKLAR

1. Weatherall DJ. The Thalassemias. In; Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H. Eds. *The Molecular Basis of Blood Diseases*, 3th Ed., Philadelphia: WB Saunders Company, 2001; 183-226.
2. Bunn HF, Forget BG. *Hemoglobin: Molecular Genetic and Clinical Aspects*, Philadelphia; W.B. Saunders Company, 1986; 60-90.
3. Kazazian HH, Boehm CD. Molecular basis and prenatal diagnosis of β -thalassemia. *Blood*, 1988; 72(4): 1107-1116.
4. Erişim: <http://www.abanet.it/fondazioneberloni/ing/talassemi.htm>. Erişim Tarihi: 10.05.2003.
5. Loukopoulos D. Thalassemia: genotypes and phenotypes. *Ann Hematol*, 1991; 62(4):85-94.
6. Kazazian HH Jr. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol*, 1990; 27(3):209-228.
7. Arcasoy A, Canatan D. D nyada ve T rkiye’de Talasemi ve Hemoglobinopatiler. Arcasoy A, Canatan D, K se M,  st lndağ M. *Hemoglobinopati ve Talasemi,  nlem-Tanı-Tedavi*. Antalya; Siyah Grafik Matbaacılık Ltd. şti., 2002; 13-17.
8. T zmen ř, Schechter AN. Genetic diseases of hemoglobin: Diagnostik method for elucidating β -thalassemia mutations. *Blood Rev*, 2001; 15(1):19-29.
9. Lukens J. The thalassaemia and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis. In; Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP and Rodgers GM. Eds. *Wintrobe’s Clinical Hematology*, 10th Ed., Baltimore, 1999; 1405-1448.
10. Cao A, Furbetta M, Galanello R, Melis MA, et al. Status of thalassemia studies in Italy. *Am J Pediatr Haematol Oncol*, 1983; 5:219-223.
11. Erişim: <http://www.akhav.org.tr/html/talasemi.asp>. Erişim Tarihi: 10.05.2003.
12. Tadmouri GO , T zmen ř ,  z elik H.  zer A, Baig SM, Senga EB, Başak AN. Molecular and population genetic Analyses of Turkey. *Am J Hematol*, 1998; 57: 215-220.
13. Cao A. β -thalassaemia mutations in Mediterrean populations. *Br J Haematol*, 1989; 71: 309-312.

14. Diaz-Chico JC, Yang K, Yang K, Efremov DG, Stoming TA, Huisman THJ. The detection of β globin gene mutations in β thalassemia using oligonucleotide probes and amplified DNA. *Biochim Biophys Acta*, 1988; 949: 43-48.
15. Arcasoy A. Türkiye’de thalassemia taşıyıcı sıklığı ve anormal hemoglobinler. *Ankara Talasemi Derneği*, 1994.
16. Weatherall DJ, Clegg JB. In; Gibbons R, Higgs DR, Old JM, Oliveri NF, Thein SL, Wood WG. Eds. Historical perspectives: The Many and Diverse Routes to Our Current Understanding of the Thalassemias. *The Thalassemia Syndromes*, 4th Ed., Oxford: Blackwell Science Ltd; 2001; 3-62.
17. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: Review and update. *Clin Chem*, 2000; 46(8B): 1284-1290.
18. Erişim: <http://www.anamur.gen.tr>. Erişim Tarihi:29.04.2003.
19. Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW. *Harper’in Biyokimyası*. 22. Baskı, İstanbul; Sistem Matbaası, 1993.
20. Klinken SP. Red blood cells. *IntJ Biochem Cell Biol*, 2002; 34:1513-1518.
21. Macromedia Inc. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Version 3/e [CD-ROM], The Mona Group, 2000.
22. Higgs DR, Thein SL, Wood WG. Human Haemoglobin. In; *The Thalassemia Syndromes*, Eds; Gibbons R, Higgs DR, Old JM, Oliveri NF, Thein SL, Wood WG, 4th Ed, Blackwell Science Ltd, Oxford, 2001; 65-120.
23. Erişim: [http://www.chemlearn.chem.indiana.edu /S125/ Biochem/Background%20fo...](http://www.chemlearn.chem.indiana.edu/S125/Biochem/Background%20fo...) Erişim Tarihi: 11.05.2003.
24. Swank AR, Stamatoyannopoulos G. Fetal gene reactivation. *Curr Opin Genet Dev*, 1998; 8:366-370.
25. Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG. The Thalassemias. In; Scriver CR, Arthur AL, Sly WS, Valle D. Eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Ed., New York: McGraw Hill Publishing Division, 2001; 4571-4636.
26. Aksoy M. Anormal hemoglobinler ve hemoglobinopatiler. *Çocuk Hematolojisi ve İmmünoolojisi*, İstanbul, 1973; 33-71.
27. Olivieri NF, Weatherall DJ. Thalassemias. In; Lilleyman JS, Hann IM, Blanchette VS Eds. *Pediatric Hematology*, 2th Ed., London: Churchill & Livingstone, 1999; 307-327.

28. **Gürgey A.** Talasemi ve Hemoglobinopatilerde Yeni Görüşler. Tübitak, Ankara, 1986.
29. **Weatheral DJ.** The Thalassemias. In; Beutler E, Coller BS, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U. Eds. *Williams Hematology*, 6th Ed., New York: Mc Graw Hill Publishing Co, 2001; 547-580.
30. **Baron MH.** Transcriptional control of globin gene switching during vertebrate development. *Biochim Biophys Acta*, 1997; 1351:51-72.
31. **Gümrük F.** Hemoglobin ve hemoglobinopatiler. İliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalin HE, Süleymanlar G, Eds. *Temel İç Hastalıkları*, 1. Baskı, Güneş Kitabevi Ltd, Ankara, 1996; 1233-1243.
32. **Erişim:** http://www.blc.arizona.edu/courses/181gh/rick/expression2/graphics2/globin_cluster.gif. Erişim Tarihi: 10.6. 2003
33. **Li X, Liu D, Liang C.** Beyond the locus control region: new light on β -globin locus regulation. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001; 33: 914-923.
34. **Kioussis D, Festenstein R.** Locus control regions: overcoming heterochromatin-induced gene inactivation in mammals. *Curr Opin Genet Dev*, 1997; 7:614-619.
35. **Li Q, Peterson KR, Fang X, Stamatoyannopoulos G.** Locus control regions. *Blood*, 2002; 100:3077-3086.
36. **Li Q, Peterson KR, Harju S.** Locus control regions coming of age at a decade plus. *TIG*, 1999; 15:403-408.
37. **Cao A, Moi P.** Regulation of the globin genes. *Pediatr Res*, 2002; 51: 415-421.
38. **Fu XH, Liu DP, Liang CC.** Chromatin structure and transcriptional regulation of the β -globin locus. *Exp Cell Res*, 2002; 278:1-11.
39. **Routledge SJE, Proudfoot NJ.** Definition of transcriptional promoters in the human β -globin locus control region. *J Mol Biol*, 2002; 323:601-611.
40. **Ristaldi SR, Casula S, Porcu S, Marongiu MF, Pirastu M, Cao A.** Activation of the δ -globin gene by the β -globin gene CACCC motif. *Blood Cells Mol Dis*, 1999; 31:193-209.
41. **Perkins A.** Erythroid Kruppel like factor: from fishing expedition to gourmet metal. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999; 31:1175-1192.
42. **Weatheral DJ.** Disorders of the Synthesis or Function of Haemoglobin. In; Ledingham JGG, Warrell DA. Eds. *Concise Oxford Textbook of Medicine*, 1st Ed., Oxford: Oxford University Press, 2000; 234-246.
43. **Rund D, Rachmilewitz E.** Pathophysiology of α - and β -thalassemia: Therapeutic implications. *Sem Hematol*, 2001; 38(4): 343-349.

44. Huisman THJ, Carver MFH, Baysal E. A Syllabus of Thalassemia Mutations (1997). The Sickle Cell Anemia Foundation, Augusta, USA, 1997.
45. Rosatelli MC, Dozy A, Faa V, Meloni A, Sardu R, Saba L, Kan YW, Cao A. Molecular characterization of β -thalassemia in the Sardinian population. *Am J Hum Genet*, 1992; 50: 422-426.
46. Nienhuis AW, Anagnou NP, Ley TJ. Advances in thalassaemia research. *Blood*, 1984; 63(4): 738-758.
47. Weatherall DJ. The Thalassemias. In; Williams WJ, Beutler E, Coller BS, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U. Eds. *Williams Hematology*, 5th Ed., New York: McGraw Hill Publishing Co, 1995; 581-615.
48. Rund D, Rachmilevitz E. New trends in the treatment of β -thalassemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2000; 33: 105-118.
49. Stathopoulos PB. Taking the good out of the bad: lentiviral-based gene therapy of the hemoglobinopathies. *Biotechnology Advances*, 2003; 21: 513-526.
50. Logan AC, Lutzko C, Kohn DB. Advances in lentiviral vector design for gene-modification of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Biotechnol*, 2002; 13:429-436.
51. Rivella S, May C, Chadburn A, Riviere I, Sadelain M. A novel murine model of Cooley anemia and its rescue by lentiviral-mediated human β -globin gene transfer. *Blood*, 2003; 101:2932-2939.
52. May C, Sadelain M. A promising genetic approach to the treatment of β -thalassemia. *Trends Cardiovasc Med*, 2001; 11:276-280.
53. May C, Rivella S, Chadburn A, Sadelain M. Successful treatment of murine β -thalassemia intermedia by transfer of the human β -globin gene. *Blood*, 2002; 99:1902-1908.
54. Perkins SL. Examination of the Blood and Bone Marrow. In; Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP and Rodgers GM. Eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*, 10th Ed., Baltimore, 1999: 9-35.
55. Bain BJ, Amos RJ, Chapman B, Davies SC, Old JM, Wild BJ. The laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. *Br J Haematol*, 1998; 101: 783-792.
56. Kohn J. Separation of hemoglobin on cellulose acetate. *J Clin Path*, 1969; 22: 109-110.
57. Akar N, Uysal Z, Yeşil N, İnce E, Arcasoy A, Ata Y. Mustafakemalpaşa ve köylerinde anormal hemoglobin ve HbA₂ yüksekliği ile karakterize β -thalassemia taşıyıcılığı araştırılması. *Turk J Med Sci*, 1990; 14: 551-554.
58. Huisman THJ, Schroeder WA, Brodie AN, Mayson M, Jakway J. Microchromatography of hemoglobin III. A simplified procedure for the determination of hemoglobin A₂. *J Lab Clin Med*, 1975; 86: 700-702.
59. Singer K, Chernof AA, Singer L. Studies on abnormal hemoglobins I. Alkali Denaturation. *Blood*, 1951; 6: 413-424.
60. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia Syndromes. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1981.

61. Poncz M, Solowiejzk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S. Construction of human gene library from small amounts peripheral blood. Analysis of β -like globin genes. *Hemoglobin*, 1982; 6: 27-36.
62. Yüregir GT, Arpacı A, Tuli A. Temel ve Klinik Biyokimya İleri Teknoloji Yöntemleri. Adana: Ç Ü Tıp Fak Yay, 1995.
63. Atalay EÖ, Çırakoğlu B, Dinçol G, Atalay A, Kılınç Y, Aytekin H, Yüregir GT, Arpacı A, Benuek E, Aksoy M. Regional distributions of β -thalassaemia mutations in Turkey. *Int J Hematol*, 1993; 57: 207-211.
64. Arpacı A, Aksoy K, Yüregir GT. Preliminary studies for prenatal diagnosis: Incidence and mutation sites of β thalassemia in Antakya, Türkiye. *Ann Med Sci*, 1992; 1: 103-110.
65. Arcasoy MO, Gallagher PG. Molecular diagnosis of hemoglobinopathies and other red blood cell disorders. *Semi Hematol*, 1999; 36(4): 328-339.
66. Old J, Petrou M, Varnavides L, Layton M, Modell B. Accuracy of prenatal diagnosis for haemoglobin disorders in the UK: 25 years' experience. *Prenat Diagn*, 2000; 20: 986-989.
67. Brandt RLS, Brandt SJ. Molecular Genetics and Hematology. In; Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. Eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*, 10th Ed., Baltimore, 1999; 124-142.
68. Remick DG, Kunkel SL, Holbrock EA, Hanson CA. Theory and applications of the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol*, 1990; 93(4): S49-54.
69. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer directed amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988; 239: 487-491.
70. Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian DJ, Erlich HA. Diagnosis of sickle cell anemia and β thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele specific oligonucleotide probes. *N Eng J Med*, 1988; 319(9): 537-541.
71. Tanrıverdi K. β -talasemi mutasyon tiplerinin moleküler düzeyde incelenmesi. *Bilim uzmanlığı tezi*, Ç.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 1993.
72. Topal K. Antakya, Kayseri ve İzmir örneklerinde β -talasemi mutasyon tiplerinin saptanması. *Doktora tezi*, Ç.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 1998.
73. Yüregir GT, Arpacı A, Aksoy K, Tuli A, Dikmen N, Özgünen FT, Kılınç Y. Population at risk for hemoglobinopathies in Çukurova, Türkiye: need for prenatal diagnosis. *Ann Med Sci*, 1995; 4: 61-65.
74. SPSS Inc. *SPSS for Windows*. Version 10.0, Chicago: SPSS Inc., 1999.
75. Evrensel E. Kayseri bölgesindeki β -talasemi mutasyon tipleri. *Biyokimya Uzmanlık Tezi*, Adana, 2002.
76. Weatherall DJ, Clegg JB. Thalassemia-a global public health problem. *Nat Med.*, 1996; 2(8): 847-9.
77. Altay Ç, Gürgey A. Distribution of hemoglobinopathies in Turkey. *Tr J Pediatr*, 1986; 28: 218-29.

78. **Öner AF, Özer R, Üner A, Arslan Ş, Gümrük F.** β -thalassaemia mutations in the east of Turkey. *Tr J Haematol*, 2001; 18(4): 239-242.
79. **Aksoy K, Çürük MA, Arpacı A, Dikmen N, Yüregir GT.** β Talasemili bir ailenin mutasyon tipinin Dot-Blot hibridizasyon yöntemi ile saptanması. *Ç Ü Sağlık Bil Der*, 1992; 7: 87-91.
80. **Yüregir GT, Kılınç M, Ekerbiçer H, Bilaloğlu N, Tekin N.** Screening of Hemoglobinopathies in Kahramanmaraş, Turkey. *Turk J Haematol*, 2001; 18(2): 79-83.
81. **Boletini E, Svobodova M, Divoky V, Baysal E, Çürük MA, Dimovski AJ, Liang R, Adekile AD, Huisman THJ.** Sick cell anemia, sickle β thalassemia, and thalassemia major in Albania: Characterization of mutations. *Hum Genet*, 1994; 88: 182-187.
82. **Çürük MA.** Azerbaycan Türklerinde Beta Talasemi'nin DNA ve Globin Zincir Analizi ile Belirlenmesi. *Doktora Tezi*, Ç.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 1994.
83. **Baysal E, Indrak K, Bozkurt G, Berkalp A, Arıtkan E, Old JM, Iannou P, Angastiniotis M, Droushiotou A, Yüregir GT, Kılınç Y, Huisman THJ.** The β thalassemia mutations in the population of Cyprus. *Br J Haematol*, 1992; 81: 607-609.
84. **Öner R, Altay C, Gürgey A, Aksoy M, Kılınç Y, Stoming TA, Reese AL, Kutlar A, Kutlar F, Huisman THJ.** β -thalassemia in Turkey. *Hemoglobin*, 1990; 14: 1-13.
85. **Tadmouri GO.** β -thalassemia in Turkey: distribution, diversity, evolution and phenotype-genotype correlations. *Doktora tezi*, İstanbul, 1999.

8. ÖZGEÇMİŞ

Seran ALTUNKILIÇ 1976 yılında İstanbul'da dünyaya geldi. Kırşehir Hacı Fatma Erdemir Anadolu Lisesi'nden 1994 yılında mezun olduktan sonra, 1995 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde okumaya hak kazandı. 2000 yılında adı geçen üniversiteden mezun oldu. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda başladığı Yüksek Lisans eğitimini 2004 yılında Anamur Yöresinin β -Talasemi Mutasyon Tiplendirilmesi adlı tezi ile bitirdi. Kendisi İngilizce ve Almanca bilmektedir.

