

T.C.
ÇUKURAVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KONYA BÖLGESİNİN ANORMAL HEMOGLOBİN VE TALASEMİ MUTASYON TİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Sedefgöl YÜZBAŞIOĞLU ARIYÜREK

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Kıymet AKSOY

ADANA – 2009

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca bana yol gösteren, hoşgörü ve sabırla her konuda daima destek veren **Prof. Dr. Kıymet AKSOY**'a saygı ve şükranlarımla teşekkür ederim.

Doktora öğrenimime bilgi birikimi ve görüşleriyle bilimsel bakış açımı katkıda bulunan Biyokimya Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Deneyisel çalışmalarım boyunca katkı ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm öğretim hayatım boyunca beni her konuda destekleyen sevgili aileme şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamı SBE.2004.D.4 No'lu proje olarak destekleyen **Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü**'ne ve **Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi**'ne ve 2005K120320-E No'lu proje ile destekleyen **DPT**'ye ayrıca teşekkür ederim.

Uzman Biyolog Sedefgöl YÜZBAŞIOĞLU ARIYÜREK

Adana, 2009

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hemoglobin	3
2.2. Hemoglobinlerin Kalıtsal Bozuklukları	6
2.2.1. Anormal Hemoglobinler	7
2.2.1.1. Hemoglobin S	9
2.2.1.2. Hemoglobin D Los Angeles	9
2.2.1.3. Hemoglobin E	9
2.2.1.4. Hemoglobin C	10
2.2.2. Talasemiler	10
2.2.2.1. α Talasemiler	10
2.2.2.2. β Talasemiler	11
2.3. Mikroarray	14
2.3.1. Mikroarray Teknolojisinin Uygulama Basamakları	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Gereçler	16
3.1.1. Cihazlar	16
3.1.2. Kimyasal Maddeler	17
3.2. Örnek Seçimi	19
3.3. Yöntemler	19
3.3.1. Hematolojik Analizler	19
3.3.2. Selüloz Asetat Hemoglobin Elektroforezi	19
3.3.3. Oraklaşma Testi	20
3.3.4. Mikrokolon Kromatografisi ile Hb A ₂ Tayini	21
3.3.5. Modifiye Betke Yöntemi ile Hb F Tayini	22
3.3.6. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Hemoglobin Tiplendirmesi	23
3.3.7. Lökosit DNA İzolasyonu	23
3.3.8. ARMS (Amplification Refractory Mutation System) Yöntemiyle β Talasemi, Hb S Mutasyonlarının Tanımlanması	25
3.3.9. RFLP (Restriction Fragment Length Polimorfizm) ile β Talasemi, Hb S ve Hb D Mutasyonlarının Tanımlanması	29
3.3.10. PCR Temelinde α -Talasemi Mutasyonlarının Tanımlanması	31
3.3.11. Agaroz Jel Elektroforezi	33
3.3.12. Mikroarray Yöntemiyle β Talasemi Mutasyonlarının ve Anormal Hemoglobinlerin Tanımlanması	34
3.3.13. Tanımlayıcı Tasarımı	37
3.3.14. Okuma Yönteminin Oluşturulması	38
4. BULGULAR	42
5. TARTIŞMA	91
6. SONUÇLAR	97
7. KAYNAKLAR	98
EK-1	104
EK-2	105
EK-3	106
EK-4	107
EK-5	108
ÖZGEÇMİŞ	109

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Türkiye'nin talasemi haritası	2
Şekil 2.1. Hemoglobin A'nın yapısı	3
Şekil 2.2. Hem molekülü	4
Şekil 2.3. İnsan globin zincirlerinin sentez zamanı	4
Şekil 2.4. Globin gen kümeleri	6
Şekil 2.5. Talasemi, orak hücre anemisi ve diğer yaygın hemoglobin hastalıklarının dünya üzerindeki yayılımı	6
Şekil 4.1. Talasemi ve anormal hemoglobinde tarama şeması	42
Şekil 4.2: Tanımlayıcı tasarımı yapılan mutasyonların β geni üzerindeki yerleşimi	52
Şekil 4.3. β geni üzerinde çoğaltma primerlerinin tanıma bölgeleri 1, 2, 3, 4, 5	53
Şekil 4.4. 24°C'de alınan sinyallerin grafiği	55
Şekil 4.5. 28°C'de alınan sinyallerin grafiği	56
Şekil 4.6. 32°C'de alınan sinyallerin grafiği	57
Şekil 4.7. 36°C'de alınan sinyallerin grafiği	58
Şekil 4.8. 40°C'de alınan sinyallerin grafiği	59
Şekil 4.9. 28°C'de alınan sinyallerin grafiği	60
Şekil 4.10. 29°C'de alınan sinyallerin grafiği	61
Şekil 4.11. 30°C'de alınan sinyallerin grafiği	62
Şekil 4.12. 31°C'de alınan sinyallerin grafiği	63
Şekil 4.13. 32°C'de alınan sinyallerin grafiği	64
Şekil 4.14. Hb J Antakya için standart protokolde elde edilen sinyallerin bar grafiği	65
Şekil 4.15. ARMS ile IVS I-110 mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü	68
Şekil 4.16. ARMS ile Cd 8 mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü	68
Şekil 4.17. ARMS ile Cd 39 mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü	68
Şekil 4.18. ARMS ile IVS I-1 mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü	69
Şekil 4.19. ARMS ile IVS II-745 mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü	69
Şekil 4.20. ARMS ile Cd 44 mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü	69
Şekil 4.21. ARMS ile -87 mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü	70
Şekil 4.22. PCR temelinde $\alpha^{-3,7}$ mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü	70
Şekil 4.23. RFLP ile Cd 5 mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü	70

Şekil 4.24. RFLP ile Hb D mutasyonu için agaroz jel görüntüsü	71
Şekil 4.25. RFLP ile Hb S mutasyonu için agaroz jel görüntüsü	71
Şekil 4.26. Hb S belirlenen olgunun HPLC görüntüsü	72
Şekil 4.27. Hb D Los Angeles belirlenen olgunun HPLC görüntüsü	72
Şekil 4.28. IVS I-110 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği – Kısım I	80
Şekil 4.29. IVS I-110 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği – Kısım II	80
Şekil 4.30. IVS I-110 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği – Kısım III	81
Şekil 4.31. Cd 39 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği	82
Şekil 4.32. Cd 44 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği	83
Şekil 4.33. IVS I-1 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği	84
Şekil 4.34. IVS II-745 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği	85
Şekil 4.35. Cd 8 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği	86
Şekil 4.36. Cd 5 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği	87
Şekil 4.37. - 87 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği	88
Şekil 4.38. Hb D işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği	89
Şekil 4.39. Hb S işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Hemoglobin tipleri	5
Çizelge 2.2. Türkiye’de saptanan anormal hemoglobinler	7
Çizelge 2.3. Türkiye’de saptanan β talasemi mutasyonları	12
Çizelge 2.4. Çukurova’da saptanan β talasemi mutasyonları	13
Çizelge 4.1. Olguların hematolojik değerleri	43
Çizelge 4.2. Hb A ₂ miktarının mikrokolon ve HPLC ile ölçümünün tanımlayıcı istatistik değerleri	51
Çizelge 4. 3: Mikroarray yönteminde çoğaltma ürünlerindeki yerlerine göre mutasyonlar	54
Çizelge 4.4. 24°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi	55
Çizelge 4.5. 28°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi	56
Çizelge 4.6. 32°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi	57
Çizelge 4.7. 36°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi	58
Çizelge 4.8. 40°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi	59
Çizelge 4.9. 28°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi	60
Çizelge 4.10. 29°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi	61
Çizelge 4.11. 30°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi	62
Çizelge 4.12. 31°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi	63
Çizelge 4.13. 32°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi	64
Çizelge 4.14. Hb J Antakya için standart protokole göre okutma sonuçları	65
Çizelge 4.15. Mutasyonların ayırım sıcaklıkları ve okuma yöntemleri	66
Çizelge 4.16. Olguların moleküler analiz sonuçları	73
Çizelge 4.17. β Talasemi mutasyonu taşıyan olgu sayısı ve yüzdeleri	78
Çizelge 4.18. IVS I-110 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları	78
Çizelge 4.19. Cd 39 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları	82
Çizelge 4.20. Cd 44 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları	83
Çizelge 4.21. IVS I-1 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları	84
Çizelge 4.22. IVS II-745 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları	85
Çizelge 4.23. Cd 8 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları	86
Çizelge 4.24. Cd 5 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları	87
Çizelge 4.25. -87 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları	88

Çizelge 4.26. Hb D işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları	89
Çizelge 4.27. Hb S işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları	90

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

T.C.	Türkiye Cumhuriyeti
%	Yüzde
<	Küçük
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
ε	Epsilon
γ	Gama
ζ	Zeta
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μmol	Mikromol
bç	Baz çifti
fl	Fento litre
g	Gram
kb	Kilobaz
kcal	Kilokalori
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
mAmp	Miliamper
mbar	Milibar basınç
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
pg	Pikogram
Tm	Erime sıcaklığı
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Amonyum sülfat
CH_3COOH	Asetik asit
CO_2	Karbondioksit
dH_2O	Deiyonize su
DMSO	Dimetilsülfoksit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
Fe^{+2}	Ferrus
HAc	Asetik asit
HCl	Hidroklorik asit
Hct	Hematokrit
$\text{K}_3\text{Fe}_3(\text{CN})_6$	Potasyum ferrisiyanür
KCl	Potasyumklorür
KCN	Potasyum siyanür
Na_2HPO_4	Disodyum hidrojen fosfat
NaCl	Sodyumklorür
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sodyum dihidrojen fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
O_2	Oksijen
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBE	Tris borik asit etilendiamintetraasetik asit
TEMED	N,N,N,N-Tetrametil-etilendiamin
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
Cd	Kodon
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
gDNA	Genomik deoksiribonükleik asit
Hb	Hemoglobin
Hct	Hemotokrit
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

IVS
MCH
MCHC
MCV
OD
PCR
RBC
RFLP
RNA
UV

Intron dizileri
Ortalama eritrosit hemoglobini
Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
Ortalama eritrosit volumü
Optik dansite
Polymerase chain reaction
Eritrosit hücresi
Restriction fragment length polymorphism
Ribonükleik asit
Ultraviyole

ÖZET

Konya Bölgesinin Anormal Hemoglobin ve Talasemi Mutasyon Tiplerinin Belirlenmesi

Anormal hemoglobinler globin zincirleri üzerindeki aminoasitlerin değişikliği sonucu oluşmaktadır. Ülkemizde ve dünyada en yaygın olarak gözlenen anormal hemoglobinler Hb S, Hb D, Hb E ve Hb C'dir. Bugüne kadar β talasemiye neden olan 200'den fazla beta globin geni mutasyonu tanımlanmış olup ülkemizde 30'dan fazla tipine rastlanmıştır. Türkiye'de en sık rastlanan β talasemi mutasyonu IVS-I-110'dur. Türk populasyonunda beta talasemi taşıyıcı sıklığı % 2,1'dir. Bu çalışmada başlıca amaçlarımız; 1) kalıtsal kan hastalıklarına neden olan çeşitli mutasyonlar için hızlı ve güvenilir bir tanımlama yöntemi olan mikroarray cihazına tanımlayıcı tasarımı yapmak, 2) olası risk bölgelerini belirlemek ve 3) doğum öncesi tanı çalışmalarına katkı sağlamaktır. Konya bölgesinden toplanan tam kan örneklerinin geleneksel yöntemler ve yeni tasarlanan 29 adet mikroarray tanımlayıcısı ile anormal hemoglobin ve talasemi tipleri belirlenmiştir. Toplam 164 olgunun 84'ünde β talasemi mutasyonu taşıyıcılığı, birinde $\alpha^{3,7}$ talasemi mutasyonu taşıyıcılığı ve birinde Hb S mutasyonu taşıyıcılığı belirlenmiştir. Mutasyon taraması yapılan olgulardan 3 tanesi IVS I-110/ IVS I-110 homozigot mutant, 3 tanesi IVS II-745/ IVS I-110 ve 1 tanesi D/ IVS I-110 çifte heterozigot olarak belirlenmiştir. β talasemi taşıyıcılığı belirlenen olguların %74'ü IVS I-110, % 9'u Cd 8, % 5'i Cd 39, % 4'ü Cd 5, % 4'ü IVS I-1, % 2'si IVS II-745, % 1'i Cd 44 ve -87 mutasyonu taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Anormal hemoglobin, talasemi, prenatal tanı, mikroarray

ABSTRACT

The Determination of Hemoglobinopathies and Thalassemia Mutation Types in Konya Region

Abnormal hemoglobin is obtained by the change of the amino acids on the globin chains. The most popular abnormal hemoglobins in Turkey as well as in the world are Hb S, Hb D, Hb E, and Hb C. Beta (β) thalassemias are due to mutations in the β globin gene on chromosome 11 and to date 200 thalassemia causing globins have been discovered around the world but only 30 different kinds have been identified so far in Turkey. IVS-I-110 is the most widely seen thalassemia mutation in Turkey. The reported cases of frequency of people carrying beta thalassemia is 2.1% in Turkish population. In this study, the main objectives were; 1) to do reporter design of the microarray machine that a method to fast and safety identify process various mutations caused by inherited blood disease; 2) to determine regions where the risk of disease may be high; 3) to aid prenatal diagnosis. In the Konya region all the collected blood samples have been identified with use conventional methods and new designed 29 microarray reporters for abnormal hemoglobin and thalassemia types. As a result, out of total 164 samples; β thalassemia mutation as a carrier has been found in 84, $\alpha^{3,7}$ was discovered in one of them and finally Hb S was found in one case. The cases of which mutation scanning have been completed, three were IVS I-110/IVS I-110 homozygote mutant, another three were IVS II-745/IVS I-110 double heterozygote mutant and lastly one of them was D/IVS I-110 double heterozygote. The cases which have been identified as β thalassemia carrier; 74% IVS I-110, 9% Cd 8, 5% Cd 39, 4% Cd 5, 4% IVS I-1, 2% IVS II-745, 1% Cd 44, and -87.

Key Words: Abnormal hemoglobin, thalassemia, prenatal diagnosis, microarray

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Genetik olarak hemoglobin sentezindeki bir bozukluk nedeni ile ortaya çıkan anormal hemoglobinler ve talasemiler dünyada en yaygın görülen otozomal resesif geçiş gösteren kan hastalıklarıdır. Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınlarına göre, dünyada talasemi ve anormal hemoglobin sıklığı %5'dir ve yaklaşık 266 milyon taşıyıcı vardır. Her yıl yaklaşık 365.000 hasta çocuk dünyaya gelmektedir^{1,2}.

Talasemi sendromları oldukça geniş bir genetik bozukluk nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Sentezi bozulan globin zincirine göre α , β , γ , δ , $\delta\beta$, $\epsilon\gamma\delta\beta$ talasemiler olarak adlandırılırlar. En sık görülen tipleri α ve β talasemilerdir. α talasemi daha çok Uzak Doğu'da görülürken, β talasemi Akdeniz ülkeleri ve Türkiye'de yaygındır. Günümüzde β talasemiye neden olan moleküler bozukluklar oldukça iyi bir şekilde incelenmiştir. Moleküler çalışmalar ile 200'den fazla β talasemiye neden olan mutasyon belirlenmiştir. Bunların çoğunu nokta mutasyonları daha az bir kısmını delesyonel mutasyonlar oluşturmaktadır. Nokta mutasyonları RNA transkripsiyonunun başlamasını, RNA işlenmesini ve stabilitesini önleyerek normal globin sentezini önler. Buna karşın çerçeve kayması ve zincir mutasyonları translasyonu bloke ederler³.

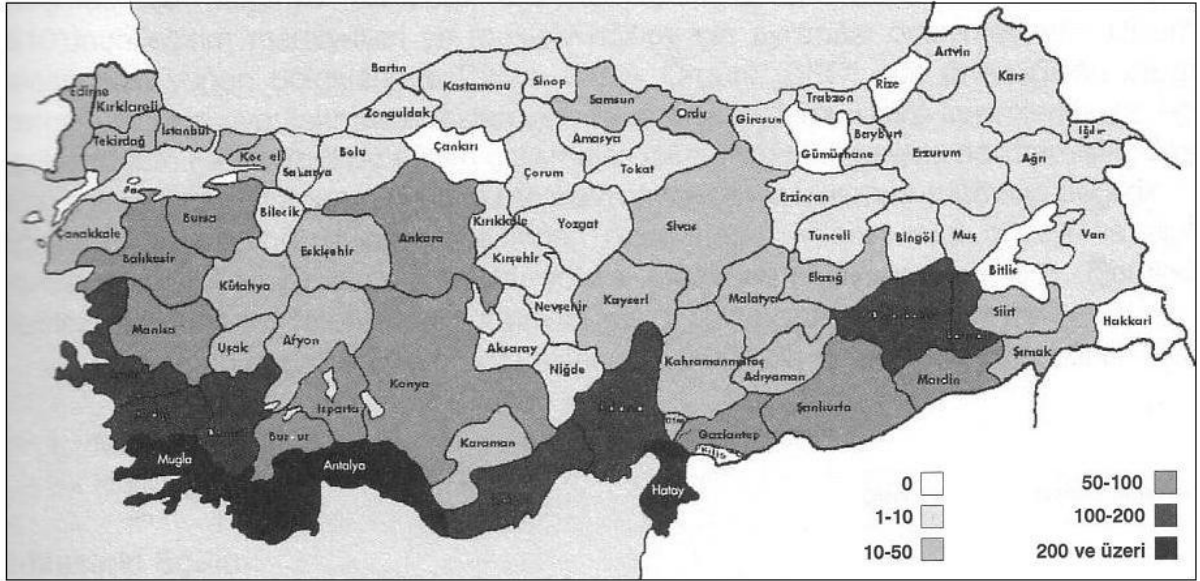
Ülkemizde ilk tarama çalışması Çavdar ve Arcasoy tarafından yapılmış olup Türkiye insidansının % 2,1 olduğu bildirilmiştir. Ancak bu oran bölgelere göre değişmektedir. T.C. Sağlık Bakanlığı'nın kayıtlarına göre Türkiye'de yaklaşık 4000 talasemi hastası bulunmaktadır².

Ülkemizde yapılan çalışmalarda 30'dan fazla talasemi mutasyon tipi bulunmuştur. En yaygın beş β talasemi mutasyonu sırasıyla IVSI-110 (%40), IVSI-6 (%10), IVSII-1 (%8), IVSII-745 (%6) ve IVSI-1 (%5)'dir. Bu mutasyonların görülme sıklıkları bölgeler arasında farklılık göstermektedir. Örneğin; Türkiye'de en sıklıkla rastlanan β talasemi mutasyonu IVS I-110'un %40 olan sıklığı, Orta Anadolu'da % 50'yi aşmakta, Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da %25'lere düşmektedir⁴. Bu yüzden farklı bölgelerde geniş kapsamlı çalışmalar yapılarak Türkiye'nin talasemi mutasyonları açısından tam bir haritasının çıkarılması gerekmektedir. Şekil 1.1'de Türkiye'deki vaka sayısına göre talaseminin illere göre dağılımı görülmektedir. Ayrıca doğum öncesi tanı çalışmalarına da yardımcı olmak amacıyla mutasyon tiplendirmesi yapılmalıdır.

Türkiye'de yapılan tarama çalışmaları ve buna ek olarak kayıtlı hasta sayısı dikkate alındığında talasemi ve anormal hemoglobinlerin 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 çıkarılmıştır. Ülkemizde akraba evliliklerinin fazla olması, evlilik öncesi tarama testleri ile yeni hasta doğumunun engellenebilmesi için Hemoglobinopati Kontrol Programı başlatılmıştır. Bu çerçevede taşıyıcı sıklığının yüksek olduğu Konya, Isparta, Denizli, Çanakkale, Gaziantep, Diyarbakır ve Kayseri gibi 33 ilde tarama merkezleri kurulmuştur².

Bu çalışmada kalıtsal kan hastalıklarına neden olan çeşitli mutasyonların hızlı ve güvenilir biçimde taranarak tanımlanması, olası risk bölgelerinin belirlenmesi ve doğum öncesi tanı çalışmalarına katkı sağlamak amacıyla yeni mikroarray tanımlayıcıları tasarlanarak okutma yöntemleri oluşturulacaktır. Bu güne kadar sistematik tarama çalışması yapılmayan Konya Bölgesinde anormal hemoglobin ve talasemi mutasyon tipleri moleküler düzeyde araştırılarak ülkemizin talasemi haritasının oluşturulmasına veri sağlanacaktır.

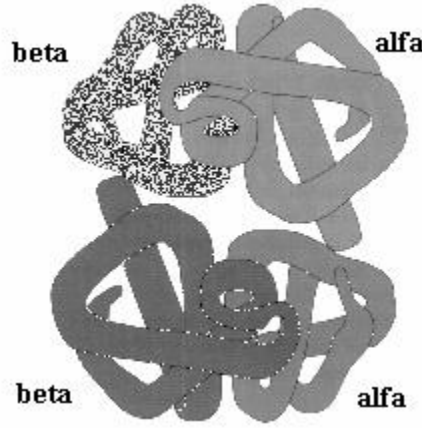


Şekil 1.1: Türkiye'nin talasemi haritası².

2. GENEL BİLGİ

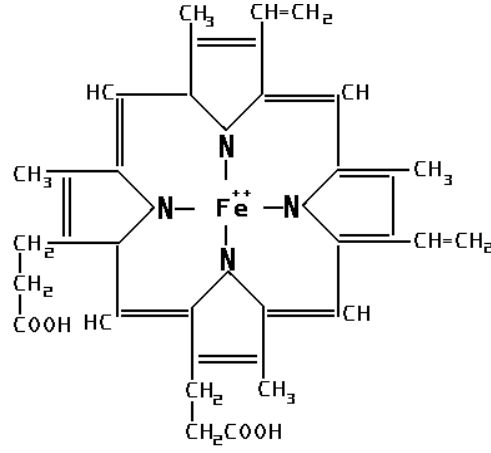
2.1. Hemoglobin

Hemoglobin O_2 'i akciğerlerden alıp dokulara götüren ve dokulardan CO_2 'i alarak akciğerlere getiren taşıyıcı bir proteindir. Eritrositin yaklaşık %30'unu içerir. 64400 dalton ağırlığında tetramerik bir yapıdadır. Polipeptid zincirlerinden oluşan iki çift globin ve her birine bağlı hem adı verilen renkli prostetik gruplar içerir⁵⁻⁷ (Şekil 2.1).



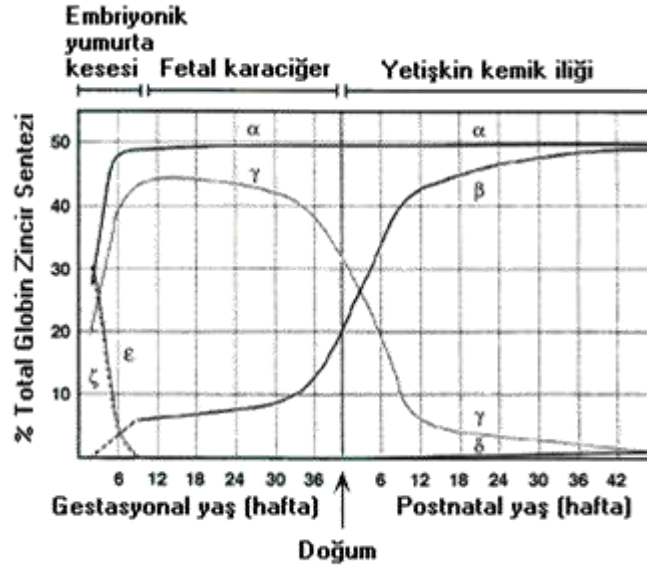
Şekil 2.1: Hemoglobin A'nın yapısı

Kana kırmızı rengin verilmesinden sorumlu olan hem, ferrus (Fe^{+2}) şeklinde demir atomu ve dört pirol halkasından meydana gelen protoporfirin kompleksinden oluşur (Şekil 2.2). Meten köprüleri ile birbirine bağlanan dört pirol halkasından meydana gelen tetrapirel halkasına yan zincir olarak dört metil, iki vinil ve iki propiyonat eklenmiştir. Hem içindeki demir atomları O_2 'i bağlayarak taşınmasını sağlar. Tüm hemoglobinlerde hem grubunun yapısı aynıdır ve hidrofobik bir ortam oluşturan hem cepleri içerisinde yerleşmiştir fakat globin zincirlerinin amino asit sayıları ve cinsleri farklıdır^{8,9}.



Şekil 2.2: Hem molekülü

Embriyogenezin ilk haftaları dışında globin zincirlerinden ikisi daima alfa'dır. Embriyoda ilk sentezlenen globin zinciri zeta (ζ) ve epsilondur (ϵ). Gestasyonun ilk haftalarında Hb Gower I (ζ_2, ϵ_2) major hemoglobin olarak gözlenir. Hb Gower II (α_2, ϵ_2) 4-13 haftalar arası embriyoda gözlenir, diğer erken dönem hemoglobinleri ise Portland I (ζ_2, γ_2) ve Portland II (ζ_2, β_2)'dir. Hb F (α_2, γ_2) fetal hayatın major hemoglobindir¹⁰ (Şekil 2.3).



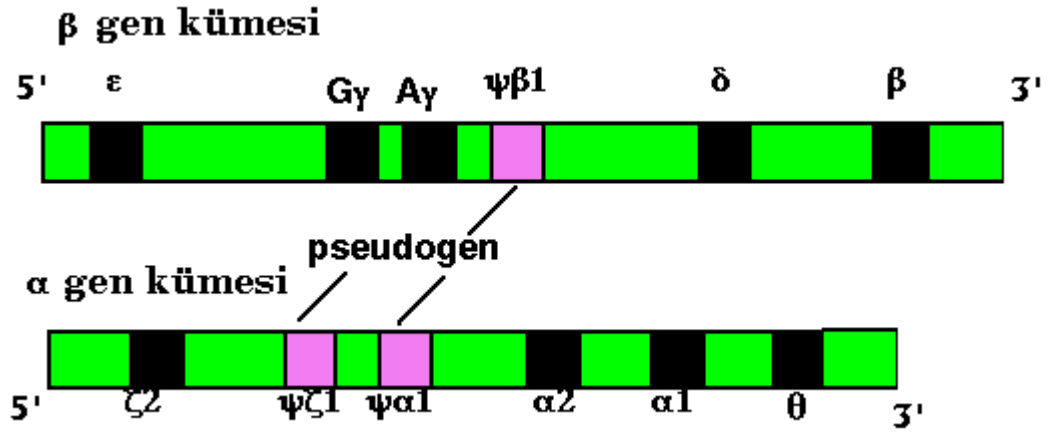
Şekil 2.3: İnsan globin zincirlerinin sentez zamanı¹⁰

Erişkin hemoglobininin yaklaşık %97'sini majör hemoglobin olan HbA ($\alpha_2\beta_2$), geri kalanlarını ise minör erişkin hemoglobini HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) ve fetal hemoglobin olan HbF ($\alpha_2\gamma_2$) oluşturur¹¹ (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1: Hemoglobin tipleri⁹

İsim	Dönem	Formül	Erişkin değeri	Fetusta Yapım Zamanı
Hb Gower I	Embriyonik Hb	$\zeta_2\varepsilon_2$	-	İlk 3 ayda
Hb Gower II	Embriyonik Hb	$\alpha_2\varepsilon_2$	-	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	İntrauterin 10-12. haftada
Hb A	Erişkin Hb	$\alpha_2\beta_2$	%97	3. trimesterde
Hb A ₂	Erişkin Hb	$\alpha_2\delta_2$	%2,5-3,5	6-8. haftada yapımı başlar

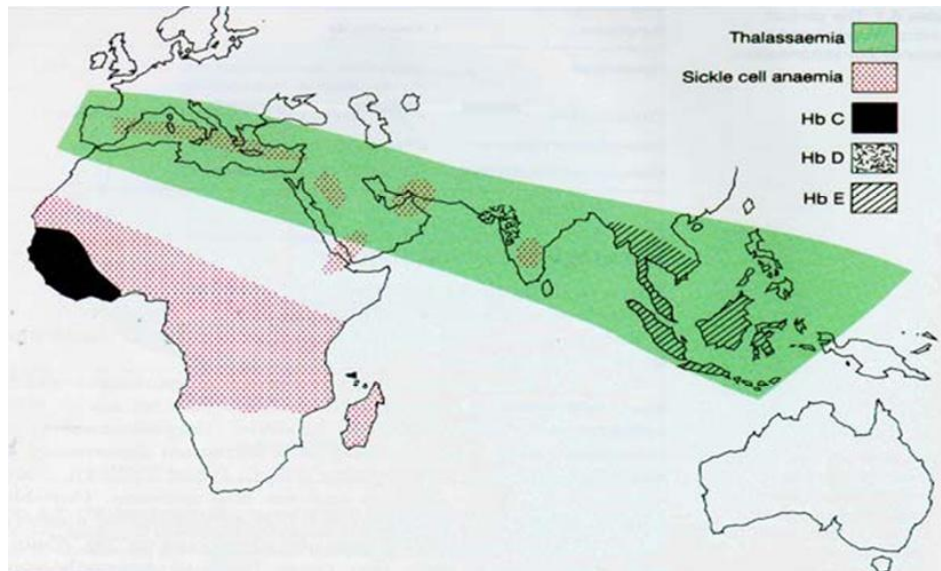
Globin zincirleri iki ayrı kromozomdaki iki ayrı gen kümesi tarafından sentez edilir. α benzeri gen kümesi 16. kromozomun kısa kolunda, β benzeri gen kümesi ise 11. kromozomun kısa kolunda yer almaktadır. Alfa gen kümesinde 3' bölgesinden itibaren teta, α_1 , α_2 , psödo α_1 , psödo zeta ve zeta geni vardır, DNA'da yaklaşık 30 kb'lık yer tutarlar ve 141 amino asit kodlarlar. β gen kümesi 5' bölgesinden itibaren bir adet embriyonik epsilon, G_γ ve A_γ genleri ile psödobeta, delta ve beta genlerini içerir, DNA'da yaklaşık 50 kb'lık yer tutar ve 146 amino asit kodlarlar (Şekil 2.4). Globin genlerinin ifadeleri ve düzenlenmeleri birçok farklı birbiri arasında etkileşen düzenleyici proteinlerin varlığına bağlıdır. Bu proteinler ilgili genin yakınında veya uzağında bulunan özgün dizilerle etkileşerek görev yaparlar. Globin genlerinin önemli düzenleyici dizileri: destekleyici (promoter), arttırıcı (enhancer), eleman serileri ve temel (master) düzenleyici bölgeleri içerir. Bu bölgeler α ve β globin gen kümelerinin tamamının düzenlenmesinde görev alırlar^{9,12-15}.



Şekil 2.4: Globin gen kümeleri¹⁵

2.2. Hemoglobinlerin Kalıtsal Bozuklukları

Hemoglobin sentezinin kalıtsal bozuklukları tek gen hastalıklarının dünya genelinde en yaygın görülenidir (Şekil 2.5). Bunların dünyadaki dağılımına bakılacak olursa yapısal olarak anormal hemoglobinlerin ve farklı talasemi formlarının yüksek sıklıkla gözlemlendiği görülür. Dünya Sağlık Örgütü dünya genelinde hemoglobin bozukluklarının taşıyıcı sıklığını %5 olarak ve her yıl yaklaşık 365 000 hasta çocuk doğduğunu bildirmektedir¹⁶⁻¹⁹.



Şekil 2.5: Talasemi, orak hücre anemisi ve diğer yaygın hemoglobin hastalıklarının dünya üzerindeki yayılımı¹⁹.

2.2.1. Anormal Hemoglobinler

Anormal hemoglobinler globin zincirleri üzerindeki aminoasitlerin değişikliği sonucu oluşmaktadır. Globin genlerinin ekzon bölgelerindeki veya bu bölge dışındaki insersiyonlar ve delesyonlar sonucu anormal hemoglobinler ortaya çıkmaktadır²⁰.

Ülkemizde ve dünyada en yaygın olarak gözlenen anormal hemoglobinler Hb S, Hb D, Hb E ve Hb C'dir. Bu güne kadar Türkiye genelinde 49 anormal hemoglobin tipi gösterilmiş olup bunların 16 tanesi α globin zincirinde, 29 tanesi β globin zincirinde, biri γ globin zincirinde ve birisi de δ zincirinde yer almaktadır, ikisi de hibrit hemoglobin olarak belirlenmiştir^{21,22} (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2: Türkiye'de saptanan anormal hemoglobinler^{21,22}

Anormal Hemoglobin	Mutasyon
α globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb O Padova	$\alpha 30(B1)Glu \rightarrow Lys$ (GAA $\rightarrow$ AAG)
Hb Hasharon	$\alpha 47(CE5)Asp \rightarrow His$ (GAC $\rightarrow$ CAC)
Hb Montgomery	$\alpha 48(CE6)Leu \rightarrow Arg$ (CTG $\rightarrow$ CGG)
Hb Adana	$\alpha 59(E8)Gly \rightarrow Asp$ (GGC $\rightarrow$ GAC)
Hb J Anatolia	$\alpha 61(E10)Lys \rightarrow Thr$ (AAG $\rightarrow$ ACG)
Hb Ube 2	$\alpha 68(E17)Asn \rightarrow Asp$ (AAC $\rightarrow$ GAC)
Hb Q İran	$\alpha 75(EF4)Asp \rightarrow His$ (GAC $\rightarrow$ CAC)
Hb Moabit	$\alpha 86(F7)Leu \rightarrow Arg$ (CTG $\rightarrow$ CGG)
Hb M Iwate	$\alpha 87(F8)His \rightarrow Tyr$ (CAC $\rightarrow$ TAC)
Hb Çapa	$\alpha 94(G1)Asp \rightarrow Gly$ (GAC $\rightarrow$ GGC)
Hb G Georgia	$\alpha 95(G2)Pro \rightarrow Leu$ (CCG $\rightarrow$ CTG)
Hb Strumica	$\alpha 112(G19)His \rightarrow Arg$ (CAC $\rightarrow$ CGC)
Hb J Meerut	$\alpha 120(H3)Ala \rightarrow Glu$ (GCG $\rightarrow$ GAG)
Hb Setif	$\alpha 94(G1)Asp \rightarrow Tyr$ (GAC $\rightarrow$ TAC)
Hb Bronova	$\alpha 103His \rightarrow Leu$ (CAC $\rightarrow$ CTC)
Hb Constant Spring	$\alpha 142(H19) + 31$ kalıntı
β globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb S	$\beta 6(A3)Glu \rightarrow Val$ (GAG $\rightarrow$ GTG)

Hb C	$\beta 6(A3)Glu \rightarrow Lys (GAG \rightarrow AAG)$
Hb Ankara	$\beta 10(A7)Ala \rightarrow Asp (GCC \rightarrow GAC)$
Hb E Saskatoon	$\beta 22(B4)Glu \rightarrow Lys (GAA \rightarrow AAA)$
Hb G Coushatta	$\beta 22(B4)Glu \rightarrow Ala (GAA \rightarrow GCA)$
Hb D İran	$\beta 22(B4)Glu \rightarrow Gln (GAA \rightarrow CAA)$
Hb E	$\beta 26(B8)Glu \rightarrow Lys (GAG \rightarrow AAG)$
Hb Knossos	$\beta 27(B9)Ala \rightarrow Ser (GCC \rightarrow TCC)$
Hb Hakkari	$\beta 31(B13)Leu \rightarrow Arg (CTG \rightarrow CGG)$
Hb G Copenhagen	$\beta 47(CD6)Asp \rightarrow Asn (GAT \rightarrow AAT)$
Hb Summer Hill	$\beta 52(D3)Asp \rightarrow His (GAT \rightarrow CAT)$
Hb Hamadan	$\beta 56(D7)Gly \rightarrow Arg (GGC \rightarrow CGC)$
Hb J Antakya	$\beta 65(E9)Lys \rightarrow Met (AAG \rightarrow ATG)$
Hb City of Hope	$\beta 69(E13)Gly \rightarrow Ser (GGT \rightarrow AGT)$
Hb J İran	$\beta 77(EF1)His \rightarrow Asp (CAC \rightarrow GAC)$
Hb G Szuhu	$\beta 80(EF4)Asn \rightarrow Lys (AAC \rightarrow AAA \text{ veya } AAG)$
Hb İstanbul	$\beta 92(F8)His \rightarrow Gln (CAC \rightarrow CAA \text{ veya } CAG)$
Hb N Baltimore	$\beta 95(FG2)Lys \rightarrow Glu (AAG \rightarrow GAG)$
Hb Köln	$\beta 98(FG5)Val \rightarrow Met (GTG \rightarrow ATG)$
Hb D Los Angeles	$\beta 121(GH4)Glu \rightarrow Gln (GAA \rightarrow CAA)$
Hb O Arab	$\beta 121(GH4)Glu \rightarrow Lys (GAA \rightarrow AAA)$
Hb Beograd	$\beta 121(GH4)Glu \rightarrow Val (GAA \rightarrow GTA)$
Hb Sarrebourg	$\beta 131(H9)Gln \rightarrow Arg (CAG \rightarrow CGG)$
Hb Brockton	$\beta 138(H16)Ala \rightarrow Pro (GCT \rightarrow CCT)$
Hb Volga	$\beta 27(B9)Ala \rightarrow Asp (GCT \rightarrow GAT)$
Hb Siirt	$\beta 27(B9)Ala \rightarrow Gly (GCT \rightarrow GGT)$
Hb Tyne	$\beta 5(B9)Pro \rightarrow Ser (GCT \rightarrow TCT)$
Hb Pyrgos	$\beta 83(EF7)Gly \rightarrow Asp (GCT \rightarrow GAT)$
Hb Antalya	Kodon 3-5 Lue-Thr-Pro $\rightarrow$ Ser-Asp-Ser
γ globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb F Başkent	$\gamma 128(H6)Ala \rightarrow Thr (GCT \rightarrow ACT)$
δ globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb A2 Yialousa	$\delta 82C-T Ala28Ser$
Hibrit hemoglobinler	

Hb Lepore Boston	
Hb P-Nilotic	

2.2.1.1. Hemoglobin S

Hb S dünyada birinci sıklıkla gözlenen ve ilk belirlenen anormal hemoglobindir. β globin zincirinde 6. pozisyondaki glutamik asit yerine valin geçmesine neden olan glutamik asiti kodlayan GAG dizisinde adenin yerine timinin geçerek GTG dizisini oluşturan nokta mutasyonu sonucunda meydana gelmektedir. Hb S içeren eritrositler O_2 azlığı durumunda polimerleşerek hücreleri orak şeklini almaktadırlar. Oluşan bu hücreler kısa ömürlüdürler ve kapiller kan damarlarında geçerken tıkanmalara neden olarak normal kan akımında bozulmaya ve lokal hipoksiye neden olmaktadır. Hb S genini heterozigot taşıyan bireylerde dolaşımdaki Hb S miktarı %50'den azdır. Bu bireylerin kan morfolojileri, fiziksel gelişimleri, aktiviteleri ve yaşam süreleri normaldir. Hb S genini homozigot olarak taşıyan bireylerde ise otozomal resesif kalıtım gösteren orak hücre anemisi görülür. Anemi, bazı enfeksiyonların şiddetinde artış, organ hasarına neden olabilecek doku enfarktüsleri ve tekrarlayan ağrılı krizler klinik belirtilerini oluşturur²³⁻²⁶.

2.2.1.2. Hemoglobin D Los Angeles

Hb D, β globin zincirindeki 121. pozisyonda glutamik asit yerine glutamin geçmesi ile meydana gelmektedir. Ülkemizde ikinci en yaygın görülen anormal hemoglobin olup görülme sıklığı %0,2 olarak bildirilmektedir. Taşıyıcılarda klinik, hematolojik ya da fizyolojik bir anormallik yokken homozigot olgularda orta derecede hemolitik anemi ve dalak büyümesi gözlenmektedir. pH 8,6'da elektroforetik olarak Hb S ile aynı yerde göç etmektedir. Bu iki hemoglobinin ayrımı basit olarak oraklaşma testiyle olabileceği gibi asit pH'da farklı göç etmesi, HPLC ve genetik olarak da yapılır^{24,27-29}.

2.2.1.3. Hemoglobin E

Hb E β globin zincirindeki 26. pozisyonda glutamik asit yerine lizin geçmesini sağlayan GAG dizisinin AAG'ye dönüşmesiyle meydana gelmektedir. Dünyada ikinci sıklıkla görülen anormal hemoglobindir. Olguların %80'i Güneydoğu Asya'da bulunmaktadır.

Ülkemizde 3. Sıklıkla özellikle Çukurova bölgesinde görülmektedir ve taşıyıcı sıklığı %0,16 ile %2,4 arasında bildirilmektedir. Taşıyıcılarında herhangi bir semptom görülmezken homozigot olgularda orta derecede anemi ile birlikte eritrosit ömrü kısalmıştır. Bunun yanında diğer anormal hemoglobinlerden farklı olarak eritrositlerde mikrositoz ve hipokromi gözleendiğinden talasemik fenotip ortaya çıkar^{20,21,29-31}.

2.2.1.4. Hemoglobin C

Hb C β globin zincirindeki 6. pozisyonda glutamik asit yerine lizin geçmesini neden olan GAG dizisinin AAG'ye dönüşmesiyle ortaya çıkmaktadır. Bu değişiklik eritrositlerin dikdörtgen şeklinde kristalleşerek çökmesine neden olmaktadır. Dünya genelinde en yaygın olarak Batı Afrika'da %25 oranında taşıyıcı sıklığı gözlenmektedir. Taşıyıcılar asemptomatikken homozigotlarda kronik hemolitik anemi ve splenomegali görülmektedir. Periferik yaymalarında hedef hücreleri yoğun olarak gözlenir^{23,25,26,29,32}.

2.2.2. Talasemiler

Hemoglobin molekülünün yapısında bulunan globin zincirlerinin yapımındaki bir bozukluk nedeniyle ortaya çıkan, otozomal resesif kalıtım gösteren, hipokromik mikrositer anemiye talasemi adı verilir. Talasemiler genellikle, globin zincirinin yetersiz sentezi ya da hiç sentez edilmeyişi ile karakterizedir. Normal hemoglobin molekülü oldukça kararlı suda çözünürlüğü yüksek olmasına rağmen talasemilerde dengesiz sentez sonucu biriken fazla α veya β zincirleri aynı özelliği gösteremez. Eritrosit içinde biriken fazla globin zincirleri çökelerek bu hücrelerin erken yıkımına neden olur. Bu durum, talasemilerde başarısız eritropoez ve hemolize neden olmaktadır. Talasemiler yetersiz oranda sentezlendiği bilinen globin zincirlerine göre sınıflandırılabilirler³²⁻³⁶.

2.2.2.1. α Talasemiler

α -Talasemide en sık rastlanılan patoloji gen delesyonudur, nadiren de nondelesyonel mutasyonlar görülür. Dört α geninden bir tanesi delesyona uğradığında α^+ -talasemi, (sessiz talasemi veya α - talasemi-2), iki α geni delesyona uğradığında α^0 -talasemi, üç α -geni delesyona uğradığında ise Hb H (β 4) hastalığı adı verilen hastalık ortaya çıkar. Hb Bart's (γ 4)

(hidrops fetalis) ise dört α -geni de delesyona uğramıştır, bu durumda intra uterin tedavi yapılmazsa fetal ölüm veya doğumu takiben 1-2 dakika içinde bebek ölümü gerçekleşir^{37,38}.

α Talasemiler dünyada en yaygın gen hastalığı olarak bilinmektedir. En çok Uzak Doğu, Orta Doğu, Hindistan yarımadası, Akdeniz havzası ve Afrika'da görülmektedir. Yapılan çalışmalarda Türkiye'de Hb SS ve α talasemi çifte heterozigotluğu olan olgular bildirilmiştir. Eti Türklerinde yapılan bir çalışmada orak hücre anemisi olan olgularda α talasemi sıklığı %17 olarak bulunmuştur. Yüregir ve arkadaşları Adana Karataş bölgesinde yaptıkları çalışmada 3.7 kb delesyonu içeren ve α gen triplikasyonlu olguları tespit etmişlerdir. Kılınç ve arkadaşları Adana bölgesinde doğan bebeklerde kordon kanı çalışması ile α talasemi taşıyıcılık sıklığını %3,3 olarak bulmuşlardır³⁹⁻⁴⁴.

2.2.2.2. β Talasemiler

11. kromozomdaki β geninde çeşitli ve çok sayıda genetik mutasyonlar sonucu, β globin zincir yapısının azalması β^+ -talasemi veya hiç yapılmaması ile β^0 -talasemi hastalığı ortaya çıkmaktadır. β -talaseminin en önemli nedenini, α -talasemide görülen büyük delesyonlar değil gen içindeki nokta mutasyonları oluşturmaktadır. α globin/non α globin oranında oluşan dengesizlik talaseminin şiddetinin tayininde en önemli faktördür⁴⁵⁻⁴⁸.

β talaseminin ortaya çıkması doğumdan sonra fetal hemoglobinin ($\alpha_2\gamma_2$) erişkin hemoglobini ($\alpha_2\beta_2$) ile yer değiştirmesi sonucunda oluşur. β talasemiler klinik olarak sessiz heterozigot β talasemiden sürekli transfüzyona bağımlı talasemi majöre kadar değişen çeşitli fenotiplerde gözlenen genetik bir bozukluktur. β talaseminin büyük bir kısmında heterozigot durumda Hb A₂ düzeyi yükselmiştir. Çok az bir kısmında Hb A₂ düzeyi normaldir, bu olguların büyük bölümünde ise δ talaseminin bileşik kalıtımı vardır⁴⁹.

β globin zincirinin eksikliği veya yokluğuyla gama ve delta zinciri artışı HbA₂ ve HbF artmasına neden olmaktadır. β -talasemi'li hastalarda intrauteri γ globin sentezi yeterli olduğu için β globin sentezindeki bozukluk HbA'nın HbF ile yer değiştirmesi gereken dönemde başlar. Klinik bulguların yaşamın ilk birkaç ayında görülmemesinin nedeni budur⁵⁰.

Ülkemizde yer aldığı yüksek oranda talasemi geni taşıyan toplumları içine alan dünya talasemi kuşağı Akdenizden başlayıp Ortadoğu üzerinden Güneydoğu Asya ülkelerine kadar uzanmaktadır. Dünya nüfusunun %3'ünün β talasemi geni taşıdığı bildirilmektedir. Türkiye'de yaklaşık 1.300.000 taşıyıcı ile 4000 kadar hasta birey bulunduğu rapor edilmiştir. Bugüne kadar β talasemiye neden olan 200'den fazla beta globin geni mutasyonu tanımlanmış

olup ülkemizde 30'dan fazla tipine rastlanmıştır (Çizelge 2.3). IVS-I-110 Türkiye'de en sıklıkla rastlanan β talasemi mutasyonudur. Yüregir ve arkadaşları Çukurova'daki beta talasemi taşıyıcı oranlarını Hatay'da %5,7, Mersin'de %1,8 ve Adana'da %3 olarak belirlemiştir^{2,4,51-54}. Çizelge 2.4'de Çukurova'da saptanan β talasemi mutasyonları görülmektedir⁵⁵.

Çizelge 2.3: Türkiye'de saptanan β talasemi mutasyonları^{54,55}.

No	Mutasyon Yeri	Baz Değişimi
1	-101	C→T
2	-87	C→G
3	-30	T→A
4	-28	G→C
5	+22	G→A
6	Cd 5	-CT
7	Cd 6	-A
8	Cd 8	-AA
9	Cd 8/9	+G
10	Cd 15	TGG→TAG
11	Cd 15	TGG→TGA
12	Cd 22/23/24	-AAGTTGG
13	Cd 27	G→T
14	Cd 30	G→C
15	Cd 36/37	-T
16	Cd 37	G→A
17	Cd 39	C→T
18	Cd 44	-C
19	Cd 74/75	-C
20	Cd 82/83	-G
21	IVS I-1	G→A
22	IVS I-1	G→C
23	IVS I-1	G→T
24	IVS I-5	G→A

25	IVS I-5	G→C
26	IVS I-5	G→T
27	IVS I-6	T→C
28	IVS I-110	G→A
29	IVS I-116	T→G
30	IVS I-130	G→A
31	IVS I-130	G→C
32	IVS II-1	G→A
33	IVS II-654	C→T
34	IVS II-745	C→G
35	IVS II-848	C→A
36	3' UTR	-13bp
37	Poly A	TAAA→TAAG
38	Poly A	TAA→TGA
39	-290 bp del	

Çizelge 2.4: Çukurova’da saptanan β talasemi mutasyonları⁵⁵.

Mutasyon	Baz Değişimi	% Sıklığı
IVS I-110	G→A	57,3
IVS I-1	G→A	8,3
Cd 39	C→T	6,4
IVS I-6	T→C	5,7
Cd8	-AA	5,5
-30	T→A	5,1
IVS II-1	G→A	2,1
IVS II-745	C→G	4,2
Cd 5	-CT	5,1
Cd 44	-C	3,4
Cd 74/75	-C	2,1
IVS I-5	G→C	0,4
Cd 8/9	+G	0,8

Cd 36/37	-T	0,8
Cd 22/23/24	-AAGTTGG	0,8
IVS I-130	G→C	0,8
IVS I-5	G→A	0,4
-28	G→C	0,2
Cd15	TGG→TGA	0,2
Cd 82/83	-G	0,2

2.3. Mikroarray

Sıklıkla kullanılan geleneksel laboratuvar yöntemleri, genellikle tek bir gen veya proteinin araştırılmasına yöneliktir. Hastalıkların çoğunda birçok gen etkilenmekte ve birçok faktöre bağlı olarak oluşmaktadır. Bu da, birçok farklı genin ve proteinin bir arada, kolay ve verimli olarak incelenebilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Gelişen bilgisayar teknolojisinin biyolojiye uyarlanması ile ortaya çıkan DNA mikroarray yöntemi yüzlerce genin ekspresyonunu inceleme imkanını sağlamıştır^{56,57}.

DNA mikroarray kavramı 1995’de Brown tarafından ortaya atılmış olup yüksek güvenilirlikle nükleik asit analizini sağlamaktadır ve yüksek duyarlılıkla geleneksel yöntemlerle belirlenmesi zor olan küçük farklılıkların tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Mikroarray teknolojisi moleküler biyoloji yöntemleriyle fizikokimyasal yöntemlerin gelişmesiyle ortaya çıkan ve geliştirmeye elverişli bir bilim dalıdır. Temeli Nouthern ve Southern blotlama tekniğine dayanan mikroarray teknolojisi farklı düzeylerde yıllardır kullanılan bir teknik olmasına rağmen son zamanlarda kullanılan DNA mikroarray teknolojisiyle hızlı bir gelişme kaydedilmiştir. Mikroarray yöntemleri ilk olarak tıp alanında gen ekspresyon analizlerinde kullanılmıştır. Hibridizasyon tepkimelerine dayalı yöntemle mutasyon taraması, polimorfizm analizleri ve haritalama gibi çalışmalarda kullanılabilmektedir. Mikroarray uygulamaları ve dizileme tabanlı yöntemler gen ekspresyon çalışmalarına ve dolayısıyla genomik çalışmalara yeni boyutlar katmışlardır. Genom hücreden hücreye sabit olmakla birlikte gen ekspresyonu hücrenin bulunduğu şartlara göre değişebilmektedir. Bu şartlara göre genlerin ekspresyonlarındaki değişimler incelenerek kodladıkları proteinlerin işlevleri hakkında bilgi edinilebilir.⁵⁸⁻⁶¹.

Mikroarray yöntemlerinin en önemli avantajları, aynı anda birçok genle ilgili bilgi alınması, hızlı sonuç elde edilmesi, az sayıda deney yapılması, güvenilir olması ve sistem kurulduktan sonra ucuz olmasıdır. Otomasyona adapte edilebilir olması nedeniyle rutin analizlerde kullanılma avantajı teknolojinin hızla yaygınlaşmasına neden olmuştur. Diğer yandan değişik oranlarda ve çeşitlilikte hibridizasyon sonuçları kısa zamanda çok sayıda veri üretir. Mikroarray yöntemleriyle çok fazla veri elde edilmesi ve bu verilerin analizi için yazılım programlarına ihtiyaç duyulması yöntemin dezavantajlarıdır⁶²⁻⁶⁴.

2.3.1. Mikroarray Tekniğinin Uygulama Basamakları

Nanogen array çalışma sistemi diğer array sistemlerinden farklı olarak kullanıcının isteğine bağlı olarak tasarım yapma imkanı veren, elektronik array teknolojisinde nokta mutasyonlarının analizinde yüksek güvenilirlik sunan bir sistemdir.

Çalışılmak istenen genle ilgili mutasyon tanımlayıcıları tasarlandıktan sonra standart uygulamalar yapılmaktadır. PCR temelinde çoğaltma işleminden sonra biyotinle işaretlenmiş ürün elde edilir. Streptavidin kaplı yonga üzerine gönderilen tuzdan arındırılmış ürün elektrik akımı yardımıyla sıkıca tutunur. Kırmızı ve yeşil ışımaya yapan mutasyona özgü tanımlayıcılar ile hibridizasyon sonrası alınan sinyaller kamera tarafından kaydedilerek otomatik olarak analiz edilir⁶⁵.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Cihazlar

- | | | |
|-----|----------------------|--|
| 1) | Kan Sayım Cihazı | Coulter Counter T-890 |
| 2) | Analitik terazi | Mettler AJ100 |
| 3) | Hassas terazi | Mettler P1210 |
| 4) | Manyetik karıştırıcı | Heidolph MR2002 |
| 5) | pH metre | WTW pH S25 |
| 6) | Elektroforez tankı | Bio-Rad |
| 7) | Güç kaynağı | Gelman Hawksley
Pharmacia ESP 500/400
Bio-Rad Power PAC 300
Hoefer Scientific Instruments PS 500 XT DC
Uninterruptible Power Supply Inform |
| 8) | Vorteks | Nüve NM 110
Electromag M16
Heidolph |
| 9) | Mikroskop | Nikon |
| 10) | Spektrofotometre | Shimadzu UV 260
Shimadzu UV 120-02 |
| 11) | Su Banyosu | Nüve BM 101 |
| 12) | Santrifüj | Eppendorf Centrifuge 5810 R
Beckman Microfuge E |
| 13) | Çalkalayıcı | IRMA-Shaker |
| 14) | Derin dondurucu | Bosch |
| 15) | Buz makinası | Scotsman AF-10 |
| 16) | Mikrodalga fırın | Arçelik |
| 17) | Etüv | Memmert |
| 18) | HPLC | Agilent 1100 |
| 19) | Otomatik pipetler | Gilson 0-10µL, 0-20µL, 0-100µL, 0-200µL 0-1000µL |

20)	Isısal döngü cihazı	Eppendorf Mastercycler Gradient
21)	Fotoğraf makinası	Polaroid MP4
22)	Filmler	Polaroid/siyah-beyaz Tip 52, 57
23)	UV kaynağı	FotoDyne
24)	Mikroarray	Nanogen Molecular Biology Work Station
25)	Vakum	Millipore
26)	İletkenlik ölçer	Twin Cond Horiba

3.1.2. Kimyasal Maddeler

1)	Na-Barbital	Merck
2)	Barbital	Merck
3)	Tris-Baz	Sigma
4)	Etilendiamin Tetraasetikasit (EDTA)	Merck
5)	Borik Asit	Merck
6)	Ponceau-S	Sigma
7)	Trikloroasetik Asit	Merck
8)	Asetik Asit	Merck
9)	Entellan	Merck
10)	Sodyummetabisülfid	Merck
11)	Glisin	Merck
12)	Potasyum Siyanür	Merck
13)	Sodyum Klorür	Merck
14)	DE-52 Reçine	Whatman
15)	Potasyum ferrisiyanür	Merck
16)	Sodyum Hidroksit	Merck
17)	Hidroklorik Asit	Merck
18)	Amonyum Sülfat	Merck
19)	Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma
20)	Magnezyum Klorür	Merck
21)	Tris-HCl	Sigma
22)	2-Merkaptoetanol	Merck
23)	Amonyum Klorür	Sigma
24)	Amonyum Bikarbonat	Sigma

25)	Proteinaz K	Sigma
26)	Fenol	Qbiogene
27)	Kloroform	Merck
28)	Potasyum Klorür	Merck
29)	Jelatin	Merck
30)	Spermidin	Sigma
31)	Nükleotid karışımı	Promega
32)	Taq Polimeraz	Promega, Fermentas
33)	Restriksiyon enzimleri	Promega, Fermentas
34)	Sığır Serum Albumini	Sigma
35)	DMSO	Merck
36)	Agaroz	Sigma
37)	Gliserol	Merck
38)	Ficoll	Sigma
39)	Etidyum Bromür	Sigma
40)	Histidin	Sigma
41)	Sodyum fosfat	Sigma
42)	Çoğaltma primerleri	
43)	Tanımlayıcı	

3.2. Örnek Seçimi

Örnekler toplanmadan önce çalışmanın bilimsel uygunluğu için etik kurul onayı alınmıştır (EK 1). Kan örnekleri, Konya İl Sağlık Müdürlüğü tarafından organize edilen merkez ve ilçe sağlık ocaklarının aracılığı ile ortaklaşa çalışma sonucu tarama amaçlı olarak toplanmıştır. Konya il merkezinden 108, Ilgın'dan 64, Seydişehir'den 58, Akşehir'den 34 ve Çumra'dan 13 olmak üzere toplam 277 kişi konu hakkında bilgilendirilip anket formları doldurulduktan sonra hasta ve yakınları gönüllü olarak çalışmaya katılmıştır (EK 2-3). Kan örnekleri yaklaşık 10 ml olacak şekilde EDTA'lı tüpe alınarak soğuk zincir kurallarına uygun şekilde laboratuara getirilmiştir. Tüm örneklerin kan sayımı, hemoglobin tiplendirmesi, Hb A2 ve Hb F düzeyleri manuel ve HPLC yöntemleriyle belirlenmiştir. Moleküler çalışmalar için tüm örneklerin DNA'ları izole edilerek +4°C'de saklanmış mutasyonlar klasik ve biyoteknolojik yöntemler (ARMS ve RFLP) ve nanoteknolojik yöntem (mikroarray) ile belirlenmiştir.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hematolojik Analizler

EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinin, Hemoglobin (Hb), Hematokrit (Hct), Eritrosit (RBC), Ortalama Eritrosit Hacmi (MCV), Ortalama Eritrosit Hemoglobini (MCH) ve Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu (MCHC) değerleri kan sayım cihazı ile ölçülmüştür.

3.3.2. Selüloz Asetat Hemoglobin Elektroforezi

Alkali pH'da hemoglobin molekülü negatif yüklüdür ve elektriksel ortamda anoda doğru göç ederken hemoglobin yapısı farklı olanlar göç hızlarına göre ayrışırlar⁶⁶.

Ayırıcılar:

1. Katot Tamponu pH 8,6:

Na-Barbital 5.15 g

Barbital 0.92 g çözülerek dH₂O ile bir litreye tamamlanır.

2. Anot Tamponu pH 9,1:
Tris-Baz 25.2 g
EDTA 2.5 g
Borik Asit 1.9 g çözülerek dH₂O ile bir litreye tamamlanır.
3. % 0,5 Ponceau-S
% 5'lik Trikloroasetik Asit ile hazırlanır.
4. % 5 Asetik Asit

Hemolizat hazırlanışı: EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri santrifüj edilip plazma ayrıldıktan sonra eritrositler serum fizyolojik ile en az 3 defa yıkanır. Elde edilen eritrositlerden 60 µl alınıp 1 ml dH₂O ile patlatılarak hemolizat hazırlanır.

Yöntem: Selüloz asetat kağıdı üzerine anot, katot ve uygulama noktası işaretlenerek örnek numarası yazılıp eşit hacimde karıştırılan anot ve katot tamponu içinde 5 dakika ıslatılıp filtre kağıdı arasında hafifçe kurutularak örnekler uygulama noktasına tatbik edilir. Katotik olarak elektroforez tankına yerleştirilen striplere 45 dakika süreyle 0.75 mA/cm olacak şekilde elektrik akımı verilip elektroforez sonunda stripler 5 dakika Ponceau-S içerisinde boyandıktan sonra boya artıkları %5'lik asetik asit ile temizlenir.

3.3.3. Oraklaşma Testi

Elektroforez ile Hb S olarak belirlenen örnekler için Hb D ile ayırım sağlamak amacıyla oraklaşma testi yapılır. Oksijensiz ortamda sodyum metabisülfid varlığında eritrositlerin orak şeklini almasıyla tanımlanır⁶⁷.

Ayırıcılar:

1. Entellan
2. %2 Sodyummetabisülfid

Yöntem: Tam kan örneğinden 20 µl alınıp lam üzerine konularak %2 sodyum metabisülfid damlatılır. Lamelle kapatılarak kenarları entellan ile hava almaması için

sabitlenir. 5-30 dk beklendikten sonra mikroskopta eritrositlerin orak şekli alıp almadığı incelenir.

3.3.4. Mikrokolon Kromatografisi ile Hb A₂ Tayini

Mikrokolon kromatografisi ile Hb A₂ fraksiyonunun ayırımı hemoglobin molekülü üzerindeki yüklü gruplar ile iyon değiştirici reçine üzerindeki yüklü gruplar arasındaki etkileşime dayanır. Hemolizat reçine üzerine adsorbe edildiğinde hemoglobin molekülünün iyonik gücüne bağlı olarak reçineye bağlanır. Reçineye bağlı moleküller iyonik gücü daha fazla olan tampon ile yarışa girerek reçineden ayrıştırılır⁶⁶.

Ayıraçlar:

1. Ayıraç A:

Glisin 15 g
KCN 0.1 g çözülerek dH₂O ile bir litreye tamamlanır.

2. Ayıraç A₂:

Glisin 15 g
KCN 0,1 g
NaCl 1,17 g çözülerek dH₂O ile bir litreye tamamlanır.

3. Ayıraç B:

Glisin 15 g
KCN 0.1 g
NaCl 11.7 g çözülerek dH₂O ile bir litreye tamamlanır.

4. İyon değiştirici reçine DE-52

Jel hazırlanışı: İyon değiştirici reçine DE-52 üzerine üç hacim ayıraç A eklenip karıştırılır. Reçine tanecikleri şişmeye başlayınca süpernatant kısmı atılıp yıkama işlemi 4 defa tekrarlanır.

Kolon hazırlanışı: Plastik kısa uçlu kolonun ucuna reçinenin akmasını engellemek için küçük bir parça cam pamuğu yerleştirilerek dikey durumda çalışma seti hazırlanır. Pamuk, ayıraç A ile nemlendirildikten sonra kolon reçine ile doldurulur.

Hemolizat hazırlanışı: Tam kan örneğinin serum fizyolojik ile yıkanmasıyla elde edilen eritrositlerden 60 µl alınıp 1ml dH₂O ile hemoliz edilir.

Yöntem: Reçine kolonda dengelendikten sonra üzerine 60 µl hemolizat uygulanır ve tamamının reçineye adsorbe olması için beklenir. Kolon ayıraç A₂ ile yıkanarak 8 ml süzüntü (elüvat) toplanır. Bu esnada Hb A₂'nin kolondan ayrılması sağlanmış olur. Total Hb'nin reçineden yıkanması için kolon, ayıraç B ile yıkanır. Toplanan süzüntü dH₂O ile 25 ml'ye tamamlanır. İki ayrı tüpte toplanan süzüntülerin spektrofotometrede absorbansları 415 nm dalga boyunda dH₂O körüne karşı ölçülür.

Hesaplama: Aşağıdaki eşitliğe göre hesaplama yapılır.

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

3.3.5. Modifiye Betke Yöntemi ile Hb F Tayini

Hemoglobinler içinde alkaliye en dirençli olanı Hb F'dir. Hazırlanan hemolizat kuvvetli baz ve yoğun tuz ayırıcı ile muamele edilerek diğer hemoglobinler çöktürülür. Çöküntüler filtre kağıdından geçirildiğinde elde edilen süzüntüdeki Hb F düzeyi spektrofotometrede 540 nm'de okunan absorbans değerinden hesaplanır⁶⁶.

Ayıraçlar:

1. Siyanür ayırıcı:

K₃Fe₃(CN)₆ 0.2 g

KCN 0.2 g çözülerek dH₂O ile bir litreye tamamlanır.

2. 1.2 N NaOH

3. Doymuş Amonyum Sülfat

Hemolizat hazırlanışı: Tam kan örneğinin serum fizyolojik ile yıkanmasıyla elde edilen eritrositlerden 60 µl alınıp 1ml dH₂O ile hemoliz edilir.

Yöntem: Her bir örnek için 3 deney tüpü hazırlanır. 1. tüpe 3.8 ml siyanür çözeltisi konup 0.2 ml hemolizat ile karıştırılarak 10 dakika bekletilir. Bu karışımdan 2.8 ml 2.tüpe alınıp üzerine 1.2 N NaOH'dan 0.2 ml ilave edilip 2 dakika bekletilir. Daha sonra 2. tüpün üstüne 2 ml amonyum sülfat eklenip 15-20 dakika bekletilerek filtre kağıdından süzülür. Total Hb tayini için I. tüpten 0.4 ml alınıp 6.75 ml saf su ilave edilerek III. tüp hazırlanır. Süzüntü ve III. tüpün absorbansları spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda saf su körüne karşı okunur.

Hesaplama: Aşağıdaki eşitliğe göre hesaplama yapılır.

$$\% \text{ Hb F} = \frac{\text{OD F}}{\text{OD Total} \times 10.1} \times 100$$

3.3.6. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Hemoglobin Tiplendirmesi

Agilent 1100 serisi HPLC cihazı ile hemoglobin tiplendirmesi yapılır. Cihazın çalışma prensibi hareketli fazın kolon içine yüksek basınçla pompalanarak durgun faz, hareketli faz ve örnek arasındaki etkileşimin tipine bağlı olarak ayrışması esasına dayanır. Özel kolonlar, duyarlı saptayıcılar ve yüksek akış hızı ile üstün ayırma özelliğine sahiptir^{68,69}.

3.3.7. Lökosit DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüplere alınan kandan eritrositler hemoliz edilerek uzaklaştırılırken lökositler saf olarak elde edilir. Lökosit membranı tampon ile bir gece 37°C'de bekletilerek parçalandıktan sonra fenol ve kloroform ile muamele edilerek elde edilen çözünür haldeki DNA alkol ile çöktürülür⁷⁰⁻⁷².

Ayırıcılar:

1. Parçalayıcı Tampon:

Amonyum Klorür 3,570 g

Amonyum Bikarbonat 0,0350 g çözülerek dH₂O ile bir litreye tamamlanır.

2. Lökosit parçalayıcı tampon:

4 M NaCl 3,75 ml

0,5 M EDTA-Na₂ pH 7,5 5,0 ml

SDS 100 mg

Proteinaz K (10 mg/ml) 1 ml alınıp dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır. Tek kullanımlık parçalara ayrılarak -20°C'de saklanır.

3. Sıvı Fenol pH 8,0

4. Kloroform

5. %70 Etil Alkol

6. Saf Etil Alkol

Yöntem:

1. 1 ml EDTA'lı tam kan alınarak üzerine 3 ml soğuk parçalayıcı tampon eklenip şiddetlice çalkalanır ve 10 dakika buz içinde bekletilir.

2. +4°C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılıp bu işlem iki kez tekrar edilir.

3. Lökosit pelleti üzerine 1 ml lökosit parçalayıcı tampon eklenip karıştırılır ve 37°C'de bir gece bekletilir.

4. Tüplere 400 µl fenol ile 400 µl kloroform eklenerek karıştırılır ve 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek altta kalan fenol kloroform karışımı atılır. Bu işlem 2 kez tekrar edilir.

5. Tüplere 400 µl kloroform eklenerek 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.

6. Santrifüj sonunda üst faz 10 ml %95'lik etil alkol içeren tüpe aktarılır. Tüp yavaşça karıştırılarak DNA'nın ipliksi bir görünüm alışı sağlanıp 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.

7. Süpernatant atılıp DNA üzerine 1ml %70'lik etil alkol eklenerek karıştırılır ve 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.

8. Süpernatant atılıp alkol kurutulur.

9. Pelletin büyüklüğüne göre üzerine 40-100 µl steril dH₂O eklenip DNA'nın çözünmesi için 37°C'de bekletilir.

10. DNA çözüldükten sonra konsantrasyonu hesaplanır.

Hesaplama: DNA derişimi ($\mu\text{g/ml}$) = $\text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 50^*$

$$\text{DNA verimi} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

* : 1 cm ışıık yollu küvette 1 OD'ye karşılık gelen $\mu\text{g/ml}$ birimindeki DNA miktarı.

3.3.8. ARMS (Amplification Refractory Mutation System) Yöntemiyle β Talasemi, Hb S Mutasyonlarının Tanımlanması

Nokta mutasyonlarını veya küçük delesyonları tanımlamak için ARMS yöntemi geliştirilmiştir.

Klasik PCR'dan farklı olarak mutasyona özgü çoğaltma (amplifikasyon) işlemi yapılarak mutant β globin alelleri saptanmaya çalışılır. Mutant β globin alelline özgü primer sadece mutasyonun olduğu bölgeyi tanıırken, mutasyonun olmadığı bölgeye yapışmayacak ve çoğaltma işlemi sonuçsuz kalacaktır. Böylece bir tane mutant alelle özgü primer, bir tane bunun zıt bölgesini karşılayan primer ve iki tane de genin mutasyon içermeyen herhangi bir bölgesini çoğaltarak koşulların doğruluğunu kontrol etmeye yarayacak toplam dört primerin tek bir tüpte kullanılmasıyla β geninin bilinen mutasyonları saptanabilir⁷³⁻⁷⁷.

Ayıracılar:

1. 10X Cetus Tamponu:

2M KCI	1,25 ml
1M Tris.HCI	0,5 ml
1M MgCl ₂	75 μl
Jelatin	5 mg
Steril dH ₂ O	3,2 ml karıştırılıp jelatinin erimesi için 37 ⁰ C'de bekletilir.

2. 1 M Spermidin

3. 1,25 mM dNTP

4. PCR Karışımı:

10X Cetus tamponu	500 μl
Steril distile su	2700 μl

1,25mM dNTP 800 µl
1M Spermidin 4 µl alınıp karıştırılır.

5. Primerler (5 pmol/µl):

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'

ARMS Primerleri

-101 (C→T)¹: 5'-GGT ACG GCT GTC ATC ACT TAG ACC TCA GCT-3'

-101 (C→T)²: 5'-GGT ACG GCT GTC ATC ACT TAG ACC TCA GCC-3'

-87 (C→G)¹: 5'-CAC TTA GAC CTC ACC CTG TGG AGC CAC CCG-3'

-87 (C→G)²: 5'-CAC TTA GAC CTC ACC CTG TGG AGC CAC CCC-3'

-30 (T-A)¹: 5' GCA GGG AGG GCA GGA GCC AGG GCT GGC CAT 3'

-30 (T-A)²: 5' GCA GGG AGG GCA GGA GCC AGG GCT GGC CAA 3'

IVSI-1 (G-A)¹: 5' TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAT 3'

IVSI-1 (G-A)²: 5' TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAC 3'

IVSI-5 (G-C)¹: 5' CTC CTT AAA CCT GTG TTG TAA CCT TGT TAG 3'

IVSI-5 (G-C)²: 5' CTC CTT AAA CCT GTG TTG TAA CCT TGT TAC 3'

IVSI-6 (T-C)¹: 5' TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATG 3'

IVSI-6 (T-C)²: 5' TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATA 3'

IVSI-110 (G-A)¹: 5' ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC ACT 3'

IVSI-110 (G-A)²: 5'ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC ACC 3'

IVS I-25 bç del¹: 5'-CTC TGG GTC CAA GGG TAG ACC ACC AGC ATA-3'

IVS I-25 bç del²: 5'-GCA GCC TAA GGG TGG GAA AAT AGA CCA ATA-3'

IVSII-1 (G-A)¹: 5' AAG AAA ACA TCA AGG GTC CCA TAG ACT GAT 3'

IVSII-1 (G-A)²: 5' AAG AAA ACA TCA AGG GTC CCA TAG ACT GAC 3'

IVSII-745 (C-G)¹: 5' TCA TAT TGC TAA TAG CAG CTA CAA TCG AGG 3'

IVSII-745 (C-G)²: 5' TCA TAT TGC TAA TAG CAG CTA CAA TCG AGC 3'

Cd 6 (-A)¹: 5'-CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAG ACT TCT GCC-3'

Cd 6 (-A)²: 5'-CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAG ACT TCT GCT-3'

Cd 8 (-AA)¹: 5' ACA CCA TGG TGC ACC TGA CTC CTG AGC AGG 3'

Cd 8 (-AA)²: 5' ACA CCA TGG TGC ACC TGA CTC CTG AGC AGA 3'

Cd 8/9 (+G)¹: 5' CCT TGC CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAC ACC 3'

Cd 8/9 (+G)²: 5' CCT TGC CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAC ACT 3'

Cd 39 (C-T)¹: 5' CAG ATC CCC AAA GGA CTC AAA GAA CCT CTG 3'

Cd 39 (C-T)²: 5' TTA GGC TGC TGG TGG TCT ACC CTT GGT CCC 3'

Cd 41/42 (-TTCT)¹: 5'-GAG TGG ACA GAT CCC CAA AGG ACT CAA CCT-3'

Cd 41/42 (-TTCT)²: 5'-GAG TGG ACA GAT CCC CAA AGG ACT CAA AGA-3'

Cd 44 (-C)¹: 5' ACA GCA TCA GGA GTG GAC AGA TCC CCT AAG 3'

Cd 44 (-C)²: 5' CAG CAT CAG CAG TGG ACA GAT CCC CAT AGG 3'

CAP+1(A→C)¹: 5'ATA AGT CAG GGC AGA GCC ACT TAT TGG TTC D3'

CAP+1(A→C)²: 5'ATA AGT CAG GGC AGA GCC ACT TAT TGG TTA D3'

Hb S (A→T)¹: 5' CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAG ACT TCT GCA 3'

Hb S (A→T)²: 5' CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAG ACT TCT GCT 3'

(1: Mutant primeri, 2: Normal primeri)

6. Taq polimeraz (5 Ü/µl)

Yöntem: Çoğaltma ısıya dayanıklı mikrotüpler içinde ısısal döngüleyici cihaz (Thermal Cycler) ile yapılır. Mikrotüplerin yerleştirildiği bir ısı bloğu ve ısı değişimlerini kısa sürede gerçekleştiren bir mikroişlemciden oluşan bu alette ısısal döngü programları önceden belirlenerek uygulanır.

Her bir örnek için aşağıdaki şekilde işaretlenmiş mikrotüpler hazırlanıp ısısal döngüleyici cihaza yerleştirilerek uygun PCR programı başlatılır.

β genini çoğaltma karışımı:

PCR karışımı	20 µl
ARMS primeri 1 veya 2	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</u>	<u>0.1µl</u>
Toplam hacim	25.1 µl

PCR programı:

Denatürasyon	94°C	1 dakika	} 25 döngü
Yapışma	65°C	1 dakika	
Uzama	72°C	1.30 dakika	
Son döngü	72°C	3 dakika	

Elde edilen çoğaltılmış gen ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülüp oluşan bantlar görüntülenerek mutasyonlar saptanır.

3.3.9. RFLP (Restriction Fragment Length Polimorfizm) ile β Talasemi, Hb S ve Hb D Mutasyonlarının Tanımlanması

Uygun restriksiyon enzimi ile yapılan işlem sonucu çoğaltılmış gen ürünü kesilerek farklı uzunluktaki gen parçalarına ayrılır. İlgili gen bölgesinde bir mutasyon bulunması oluşacak gen parçalarının uzunluklarının değişmesine neden olur. Enzimle kesim sonucu elde edilen ürünlerin elektroforezinde oluşan bantların incelenmesi ile mutasyon olup olmadığı gözlenir⁷⁸.

Ayırıcılar:

1. 10X Cetus Tamponu:

2M KCl	1,25 ml
1M Tris.HCl	0,5 ml
1M MgCl ₂	75 μ l
Jelatin	5 mg
Steril dH ₂ O	3,2 ml karıştırılıp jelatinin erimesi için 37 ⁰ C’de bekletilir.

2. 1 M Spermidin

3. 1,25 mM dNTP

4. PCR Karışımı:

10X Cetus tamponu	500 μ l
Steril distile su	2700 μ l
1,25mM dNTP	800 μ l
1M Spermidin	4 μ l

5. Primerler (10 pmol/ μ l):

Primer 11: 5' GGC CAA TCT ACT CCC AGG AG 3'

Primer 12: 5' ACA TCA AGG GTC CCA TAG AC 3'

Primer 23: 5'ATA CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC 3'

Primer 24: 5'GTA TTT TCC CAA GGT TTG AAC TAG CTC 3'

Primer 109: 5' CCC TTC CTA TGA CAT GAA CTT AAC CAT 3'

Primer 662: 5' AGA TCC ATC TAC ATA TCC CAA AGC 3'

6. Dde I, Eco R1, Hae III restriksiyon enzimi

7. Taq polimeraz (5 Ü/ul)

Yöntem: RFLP yöntemi ile mutasyonların belirlenmesinde ilgili gen bölgesi uygun primerler ile önceden belirlenmiş programla ısısal döngüleyici cihazda çoğaltılıp uygun restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra oluşan gen parçaları elektroforezle ayrıştırılıp değerlendirilir.

Her bir örnek için aşağıdaki şekilde işaretlenmiş mikrotüpler hazırlanıp ısısal döngüleyici cihaza yerleştirilerek uygun PCR programı başlatılır.

RFLP çoğaltma karışımı:

PCR karışımı	20 µl
Primerler	2+2 µl (Hb S, Cd 5 ve IVS I-130 için 11,12 ; Hb D için 23/24; Cd 74/75 için 109,662)
Taq polimeraz	0,1 µl
<u>gDNA (0.5-1 µg/ml)</u>	<u>1µl</u>
Toplam hacim	25 µl

PCR programı:

Denatürasyon	95°C	1 dakika	} 30 döngü
Yapışma	62°C	1 dakika	
Uzama	72°C	1.30 dakika	
Son döngü	72°C	3 dakika	

Çoğaltma işleminden sonra 15 µl çoğaltılmış gen ürününün üzerine 1 µl Hb S ve Cd 5 için Dde I, IVS I-130 ve Hb D için Eco R1, Cd 74/75 için Hae III enzimi eklenerek 37°C’de bir gece inkübe edilir. Enzimle kesim işleminden sonra %3'lük agaroz jel elektroforezi uygulanarak oluşan bantlar kontrol edilir.

3.3.10. PCR Temelinde α -Talasemi Mutasyonlarının Tanımlanması

Lökositlerden elde edilen DNA α -globin gen mutasyonları için uygun primerler kullanılarak önceden belirlenmiş programla ısısal döngüleyici cihazda çoğaltılır⁷⁹⁻⁸¹.

Ayırıcılar:

1. 10×PCR Tamponu pH 8,8:

1M Tris-HCl	6,7 ml
1M MgCl ₂	400 µl
1M (NH ₄) ₂ SO ₄	1,66 ml
2-Merkapto etanol	69,76 µl
BSA	10 mg karıştırılıp 10 ml'ye dH ₂ O ile tamamlanır.

2. Primerler (25 pmol/µl):

$\alpha^{20,5}$

Primer 1: 5' - GGCAAGCTGGTGGTGTACACA- 3'

Primer 2: 5' -TGGAGGGTGGAGACGTCCTG- 3'

Primer 3: 5' -CCATGCTGGCACGTTTCTGAG G- 3'

MED-I

Primer 4: 5' -ACAGTCACTCCTGAGGCCAGTC- 3'

Primer 5: 5' -TACAGCAGAGTGAGTGCTGCAT- 3'

Primer 6: 5' -GGAGAAGTAGGTCTTCGTGGC- 3'

$\alpha^{3,7}$

Primer A: 5' -CTTTCCCTACCCAGAGCCAGGTT- 3'

Primer B: 5' -CCCATGCTGGCACGTTTCTGAGG- 3'

Primer C: 5' -CCATTGTTGGCACATTCCGGGACA- 3'

3. %100 DMSO

4. 6mM dNTP

5. Taq polimeraz (5 Ü/ul)

Yöntem: α -Talasemi mutasyonlarının belirlenmesinde iki adet mikrotüp, mutant ve normal olarak işaretlenir. Mutasyona özgü tüpe ortak ve mutant primerler, normal tüpüne ise ortak ve normal primerler olmak üzere her bir tüp için iki primer kullanılır.

Her bir örnek için aşağıdaki şekilde işaretlenmiş 2'şer mikrotüp hazırlanıp ısısal döngüleyici cihaza yerleştirilerek uygun PCR programı başlatılır.

α genini çoğaltma karışımı:

10×Tampon	2,5 µl
DMSO (%100)	2,5 µl
dNTP (6mM)	0,9 µl
Primerler (25 pmol/µl)*	0,25 + 0,25 µl
dH ₂ O	18,6 µl
Taq polimeraz	0,1 µl
<u>gDNA (0.5-1 µg/ml)</u>	<u>1µl</u>
Toplam Hacim	26,1 µl

* : Her mutasyona özgü kullanılan primerler ortak ve mutant ya da normal olarak aşağıdaki şekilde seçilir.

<u>Mutasyon</u>	<u>Ortak primer</u>	<u>Mutant primeri</u>	<u>Normal primeri</u>
MED-I	Primer 6	Primer 4	Primer 5
$\alpha^{-20,5}$	Primer 3	Primer 1	Primer 2
$\alpha^{-3,7}$	Primer A	Primer B	Primer C

PCR programı:

Denatürasyon	94°C	1 dakika	} 30 döngü
Yapışma	69°C	1 dakika	
Uzama	72°C	5 dakika	
Son döngü	72°C	5 dakika	

Isısal döngüleyici cihazında çoğaltma işlemi tamamlandıktan sonra ürünler %2'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılır.

3.2.11. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jelde DNA molekülleri içerdikleri nükleotid sayısının logaritması ile ters orantılı olarak anoda doğru göç ederler, bu göç hızı jele eş zamanlı uygulanan kontrol DNA ile birlikte değerlendirilir⁷².

Ayırıcılar:

1. Agaroz:

0,5×TBE tamponu ile mikrodalga fırında eritilerek hazırlanır.

1. Yükleme boyası:

Brom Fenol Mavisi 50 mg

Gliserol 10 ml

Ficoll 15 g 0,5×TBE tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. 5×TBE Tamponu pH 8,0:

Tris Baz 54,0 g

Borik Asit 27,5 g

0,5 M EDTA pH 8,0 20 ml çözülerek dH₂O ile bir litreye tamamlanır.

3. Etidyum Bromür (5 µg/µl)

Yöntem: 0,5×TBE tamponu içinde mikrodalga fırında çözülen agaroz jel elektroforez tabağına döküldükten sonra soğumaya bırakılır. 0,5×TBE tamponuyla dolu elektroforez tankı içine yerleştirilerek jel içindeki tarak çıkarıldığında oluşan kuyulara, çoğaltılmış örnekten 20 µl alınarak 2 µl yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra jele yüklenip, 30 dakika 150 volt elektrik akımı verilir. Elektroforez sonrası jel Etidyum Bromür ile 1 dakika boyanır ve dH₂O ile yıkanarak boya atıklarından temizlenir. DNA parçaları UV ile görünür hale getirilip, fotoğrafı çekilerek değerlendirilir.

3.3.12. Mikroarray Yöntemiyle β Talasemi Mutasyonlarının ve Anormal Hemoglobinlerin Tanımlanması

İlgili gen bölgesi uygun primerler kullanılarak çoğaltıldıktan sonra tuzlardan arındırılan ürün cihazın kartuşuna yüklenir. Her bir ürün farklı mutasyon noktalarını içermektedir. Yonga üzerine tespit edilen örnekler her bir mutasyona özgü tanımlayıcılar kullanılarak hibridize edilir ve okutma işlemi yapılır. Elde edilen veriler EK-4’de görülen cihaz tarafından değerlendirilerek mutasyon tanımı yapılır⁸².

Ayırıcılar

1. 10×Tampon (KCl’lü):

100 mM Tris-HCl pH 8,8

500 mM KCl

2. 25 mM MgCl₂

3. 10 mM dNTPs

4. Taq DNA polimeraz

5. 5 μ M Primer:

Primer A: F GTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACC
R-bio biotin-GCAGCTCACTCAGTGTGGC

Primer B: F-bio biotin-ACGTGGATGAAGTTGGTGGT
R CCCCTTCCTATGACATGAACTTAACC

Primer C: F ATCATGCCTCTTTGCACCATTCT
R-bio biotin-TAGGCAGAATCCAGATGCTCAAG

Primer D: F-bio biotin- GACAGGTACGGCTGTCATCACT
R TCTCTGTCTCCACATGCCCA

Primer E: F GTACTGATGGTATGGGGCCAAGAG
R-bio biotin-CTTCATCCACGTTACCTTGCC

6. 50 mM L-Histidin
7. 100 mM L-Histidin
8. 0,3 M NaOH

9. Düşük yoğunluklu tuz çözeltisi:

50 mM Sodyum fosfat, pH 7

10. Yüksek yoğunluklu tuz çözeltisi:

50 mM Sodyum fosfat, pH 7,4

500 mM Sodyum klorür

11. Evrensel işaretleyici:

Normal: *TGTCGTCTGTGGCTTTGT-Cy3*

Mutant: *GTATGTTGCGGGTTCAGT-Cy5*

12. Evrensel kuyruk:

Normal: *ACAGCAGACACCGAAACA*

Mutant: *CATACAACGCCCAAGTCA*

13. Tanımlayıcı karışımı:

%1 Normal işaretleyici

%1 Mutant işaretleyici

%1 Sabitleyici

%1 Normal evrensel işaretleyici

%1 Mutant evrensel işaretleyici

%95 Yüksek yoğunluklu tuz çözeltisi

Çoğaltma karışımı:

dH ₂ O	16,6 µl
10×Tampon (KCl'li)	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	1,1 µl
5 µM Primer karışımı	2 µl
10 mM dNTPs	0,5 µl
Taq polimeraz	0,3 µl
<u>gDNA(1-2 µg/ml)</u>	<u>1,5 µl</u>
Toplam hacim	24,5 µl

PCR programı:

Denatürasyon	95°C	30 sn	} 35 döngü
Yapışma	57°C	45 sn	
Uzama	72°C	45 sn	
Son döngü	72°C	10 dk	

Elde edilen çoğaltılmış gen ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütölüp oluşan bantlar görölntölener.

Tuzdan arındırma

Çoğaltılmış ürünlerin tuzlardan arındırılması için dH₂O ile karışırılıp vakum uygulanır.

Yöntem

1. 20 µl çoğaltılmış ürün dH₂O ile 100 µl'ye tamamlanıp arındırma tabağının kuyularına aktarılır.
2. 8-10 mbar arasında olacak şekilde basınç uygulanır.
3. Filtreler kurumaya başlamadan hemen önce kuyulara 100 µl dH₂O eklenip işlem bir kez daha tekrarlanır.
4. Tüm kuyularda sıvı kalmadığında basınç kesilip 65 µl dH₂O eklenip yatay çalkalayıcıda 10-15' karışırılır.
5. Karışırılan arındırılmış ürün 3-5 kez hızlıca pipetaj yapılarak kuyucuklardan mikrotüplere alınır.

Elde edilen tuzdan arındırılmış ürünler %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütölüp oluşan bantlar görölntölener.

Kartuşa yükleme

Cihazın yükleyici kısmında hazırlanan örnekler istenilen şekilde EK-5'de görölün kartuş üzerinde bulunan yongaya tespit ettirilir.

Yöntem

1. Kartuş ve 50 mM Histidin +4°C'den, 100 mM Histidin ve 0.3 M NaOH -20°C'den çıkarılıp oda sıcaklığına geldikten sonra histidin çözeltilerinin iletkenliği ölçölür.
2. 50 mM Histidin şişesi yükleyiciye yerleştirilip yıkama işlemi yapılır.

3. Bu sırada kartuş 50 mM L-Histidin ile 3 kez yıkanır ve yonga yüzeyinde histidin kalacak şekilde bırakılıp 5-10' bekletilir.
4. İstenilen şekilde yükleme haritası oluşturulur.
5. Yükleme tabağının kuyularına 30 µl arındırılmış ürün ile 30 µl 100 mM'lık L-Histidin karışımı, en sona da 60 µl 50 mM'lık L-Histidin pipetlenir.
6. Yükleme tabağı ve kartuş cihaz üzerine yerleştirilir ve yükleme işlemi başlatılır.

Hibridizasyon ve Okutma

Yonga üzerine tespit edilen örnekler cihazın okutucu kısmında mutasyona özgü tanımlayıcılar ile hibridize ettirilerek analizi yapılır.

Yöntem

1. Okuyucudaki su şişelerinin yerine yüksek ve düşük yoğunluklu tuz çözeltileri yerleştirilip yıkama işlemi yaptırılır.
2. Kartuş oda sıcaklığına geldikten sonra denatürasyon için yonga yüzeyini kaplayacak şekilde 0,3 M NaOH konup 3 dk beklenir.
3. Yonga yüzeyi dH₂O ile 2-3 defa iyice yıkandıktan sonra yüksek yoğunluklu tuz çözeltisi konup 10'-15' bekletilir.
4. Yonganın üzerindeki yüksek yoğunluklu tuz çözeltisi çekilip 40 µl tanımlayıcı konup cihaza yerleştirilir.

Analiz

Her mutasyona özgü tanımlayıcılar kullanılarak yapılan okutma işleminden sonra cihaza bağlı bulunan bilgisayarda analiz yazılımı kullanılarak örneklerde mutasyon tiplendirmesi saptanır.

3.3.13. Tanımlayıcı Tasarımı

Tanımlanmak istenen mutasyona özgü tanımlayıcıların tasarımı için internet kaynaklı programlar kullanılır. Bir tanımlayıcı işaretleyici, sabitleyici, evrensel kuyruk ve evrensel işaretleyici kısımlarından oluşur⁸².

1. Öncelikle doğru gen dizisi bulunur.
2. Gen dizisi üzerinde tanımlanmak istenen mutasyon noktası belirlenir.
3. Mutasyon noktasını içeren gen bölgesini çoğaltmak için uygun primerler belirlenir.
4. Belirlenen primerin gende başka bir bölgeyi çoğaltıp çoğaltmadığı kontrol edilir.
5. İşaretleyicinin mutasyon noktasından hangi yöne doğru bağlanacağı baz-yapışma enerjisi büyük olan tercih edilerek belirlenir. Buna göre çoğaltma primerlerinin de hangisinin biotinli olacağı belirlenmiş olur.
 - a. İşaretleyici ~10 bç uzunluğunda olmalı.
 - b. Mutasyon işaretleyicinin 3' ucunda olmalı.
 - c. Tm 45°C'nin altında olmalı.
 - d. Mutant ve normal işaretleyicinin Tm farkı 1,5°C'nin altında olmalı.
6. Sabitleyici işaretleyicinin ters yönünde uzanır.
 - a. 25-40 bç uzunluğunda olmalı.
 - b. Tm'i 65-70°C olmalı.
7. Sanal ortamda çoğaltma ürününün ikincil yapılanması kontrol edilerek mutasyon noktası katlanma bölgesinin içinde kalıyorsa ikinci bir sabitleyici tasarlanır.
8. Tasarlanan tanımlayıcının ikincil yapılanmaları kontrol edilir.
 - a. Mutasyon bölgesi için dimer enerjisi -9 kcal/mol, saç tokası enerjisi -3 kcal/ml'den büyük olmalı.
 - b. Sabitleyici için dimer enerjisi -11 kcal/mol, saç tokası enerjisi -3 kcal/mol'den büyük olmalı.

3.3.14. Okuma Yönteminin Oluşturulması

Her bir mutasyona özgü sentetik olarak sentez edilen tanımlayıcıların örneklerle doğru hibridizasyonunu sağlamak için sistemde okuma yöntemi oluşturulur⁸².

Yöntem

1. İlk olarak ayırım sıcaklığı belirlenir.

- a. 24°C'den başlayarak her adımda 4°C artırılarak elde edilen sinyaller değerlendirilir.
- b. Mutant normal ayırımı ile sinyal seviyesi ters orantılıdır. Bu yüzden her ikisinin de ideal olduğu nokta belirlenmelidir.
- c. Mutant normal ayırımında mutant sinyal/normal sinyal veya normal sinyal/mutant sinyal oranı ideal olarak 50 olmalıdır.

i. Ayırım sıcaklığını belirleme protokolü

- 1.adım: 24°C'de yüksek yoğunluklu tuz çözeltisi ile yıkanır
2. adım: Lazer ile okuma yapılır
3. adım: 28°C'de düşük yoğunluklu tuz çözeltisi ile iki defa yıkanır
- 4.adım: Lazer ile okuma yapılır
- 5.adım: 32°C'de düşük yoğunluklu tuz çözeltisi ile iki defa yıkanır
6. adım: Lazer ile okuma yapılır
- 7.adım: 36°C'de düşük yoğunluklu tuz çözeltisi ile iki defa yıkanır
- 8.adım: Lazer ile okuma yapılır
- 9.adım: 40°C'de düşük yoğunluklu tuz çözeltisi ile iki defa yıkanır
- 10.adım: Lazer ile okuma yapılır

- d. Okuma sonuçları değerlendirilerek sinyal seviyesinin yüksek, ayırımın çok iyi olmadığı sıcaklık ile sinyal seviyesinin düşük, ayırımın çok iyi olduğu sıcaklık arasındaki dereceler tek tek yükseltilerek işlem tekrar edilip ideal ayırım sıcaklığı belirlenir.

2. Mutant normal ayırımının ideal olduğu sıcaklık belirlendikten sonra standart protokolden başlayarak en iyi okuma protokolü belirlenir.

- a. İlk olarak standart protokol denenir.

1. adım: 56°C'de 1 dk beklenir
2. adım: Touch-down sıcaklığa (Ayırım sıcaklığı +6°C) inip 1 dk beklenir
3. adım: Yüksek yoğunluklu tuz çözeltisi ile 5 defa yıkanır

4. adım: 24°C'ye indirilip lazer ile okuma yapılır
- b. Standart protokol ile sinyaller iyi okunamazsa genişletilmiş protokol uygulanır.
1. adım: 56°C'de 1 dk beklenir
 2. adım: Touch-down sıcaklık +6°C'ye inip 1 dk beklenir
 3. adım: Touch-down sıcaklık +3°C'ye inip 30 sn beklenir
 - 4.adım: Touch-down sıcaklık +1°C'ye inip 30 sn beklenir
 5. adım: Touch-down sıcaklığa inip 1 dk beklenir
 6. adım: Yüksek yoğunluklu tuz çözeltisi ile 5 defa yıkanır
 7. adım: 24°C'ye inip lazer ile okuma yapılır
- c. Okuma iyi değilse düşük yoğunluklu tuz çözeltisi ile yıkama adımı eklenir.
1. adım: 56°C'de 1 dk beklenir
 2. adım: Touch-down sıcaklık +6°C'ye inip 1 dk beklenir
 3. adım: Touch-down sıcaklık +3°C'ye inip 30 sn beklenir
 - 4.adım: Touch-down sıcaklık +1°C'ye inip 30 sn beklenir
 5. adım: Touch-down sıcaklığa inip 1 dk beklenir
 6. adım: Yüksek yoğunluklu tuz çözeltisi ile 5 defa yıkanır
 7. adım: Ayırım sıcaklığına inilir
 8. adım: Düşük yoğunluklu tuz çözeltisi ile yıkanır
 9. adım: Yüksek yoğunluklu tuz çözeltisi ile yıkanır
 10. adım: 24°C'ye inip lazer ile okuma yapılır
- * 8 ve 9. adımlar 2 veya 3 defa tekrarlanabilir.
- d. Farklı olarak genişletilmiş protokol sinyallerin daha iyi okunması için bekleme süreleri iki katına çıkarılarak denenir.
1. adım: 56°C'de 1 dk beklenir
 2. adım: Touch-down sıcaklık +6°C'ye inip 2 dk beklenir
 3. adım: Touch-down sıcaklık +3°C'ye inip 1 dk beklenir

- 4.adım: Touch-down sıcaklık $+1^{\circ}\text{C}$ 'ye inip 1 dk beklenir
 5. adım: Touch-down sıcaklığa inip 2 dk beklenir
 6. adım: Yüksek yoğunluklu tuz çözeltisi ile 5 defa yıkanır
 7. adım: Ayırım sıcaklığına inilir
 8. adım: Düşük yoğunluklu tuz çözeltisi ile yıkanır
 9. adım: Yüksek yoğunluklu tuz çözeltisi ile yıkanır
 10. adım: 24°C 'ye inip lazer ile okuma yapılır
- * 8 ve 9. adımlar 2 veya 3 defa tekrarlanabilir.

e. Son olarak genişletilmiş protokol direk düşük yoğunluklu tuz çözeltisi ile yıkama yapılarak denenir.

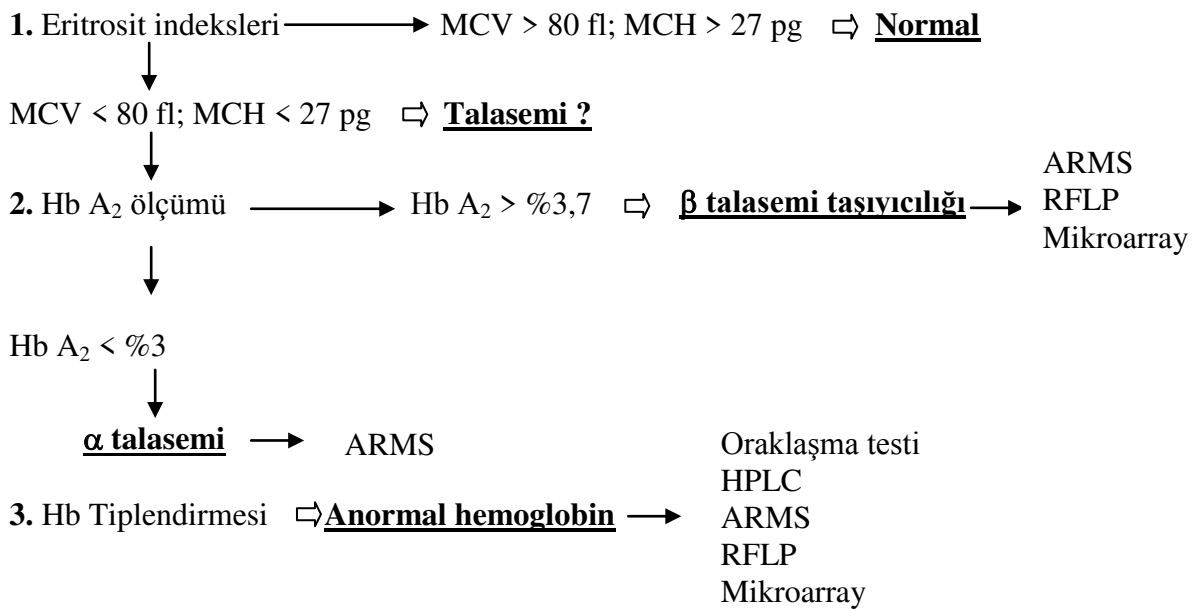
1. adım: 56°C 'de 1 dk beklenir
2. adım: Touch-down sıcaklık $+6^{\circ}\text{C}$ 'ye inip 2 dk beklenir
3. adım: Touch-down sıcaklık $+3^{\circ}\text{C}$ 'ye inip 1 dk beklenir
- 4.adım: Touch-down sıcaklık $+1^{\circ}\text{C}$ 'ye inip 1 dk beklenir
5. adım: Touch-down sıcaklığa in 2 dk beklenir
6. adım: Yüksek yoğunluklu tuz çözeltisi ile 5 defa yıkanır
7. adım: Düşük yoğunluklu tuz çözeltisi ile yıkanır
8. adım: Yüksek yoğunluklu tuz çözeltisi ile yıkanır
9. adım: 24°C 'ye inip lazer ile okuma yapılır

Yine de sonuç alınmazsa tanımlayıcı tasarımının yeniden yapılması gerekir.

4. BULGULAR

Konya İl Sağlık Müdürlüğü tarafından organize edilen merkez ve ilçe sağlık ocakları ile ortaklaşa çalışma sonucu tarama amaçlı olarak il merkezinden 108, Ilgın'dan 64, Seydişehir'den 58, Akşehir'den 34 ve Çumra'dan 13 olmak üzere toplam 277 kişiden toplanan kan örnekleri soğuk zincir kurallarına uygun şekilde laboratuara getirilmiştir. 10 ml olacak şekilde EDTA'lı tüpe alınan tüm örneklerin kan sayımı, hemoglobin tiplendirmesi, Hb A₂ ve Hb F düzeyleri ölçülmüş, kalıtsal kan hastalığı bulguları gözlenen olgular belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Kalıtsal kan hastalığı bulguları belirlenen olguların moleküler çalışmalar için DNA'ları izole edilerek +4°C'de saklanmış ve anormal hemoglobin, β ve α talasemi mutasyonları yönünden incelenmiştir.

Örneklerin incelenmesinde Şekil 4.1'deki tarama şeması kullanılmıştır. Kan sayımı sonuçları incelendiğinde 120 olgunun MCV değerinin 80 fl'nin altında olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Bu olguların 81'inde Hb A₂ değeri %3.7'nin üzerinde, 34'ünde %3.0'ın altında ve 5 olguda normal sınırdan bulunmuştur. Hemoglobin tiplendirmesinde bir olgu Hb AS, bir olgu Hb DD ve bir olgu da Hb AH diğer olgular ise Hb AA olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1: Talasemi ve anormal hemoglobinde tarama şeması

Çizelge 4.1: Olguların hematolojik değerleri.

No	Olgu	Yaş	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	Elek	HbA2 %	Hb F %	HPLC HbA2	HPLC Hb F
Konya merkezden alınan örnekler												
1	A.Y.	33	4,08	9,9	33,0	80,9	24,4	AA	2,1	0,9	2,4	0,0
2	A.Ü.	30	5,73	11,7	38,7	67,5	20,3	AA	5,1	2,6	4,7	1,0
3	A.A.	25	5,66	11,0	36,6	64,7	19,4	AA	4,6	2,5	4,8	1,7
4	A.E.	17	3,05	5,8	24,8	81,3	19,0	AA	2,8	1,4	2,4	0,0
5	A.S.	38	4,31	12,9	39,9	92,4	29,9	AA	3,1	1,9	2,5	0,0
6	A.F.	47	4,80	11,8	39,3	81,9	24,5	AA	2,5	1,5	2,4	0,0
7	A.E.	9	5,16	13,6	42,9	83,2	26,5	AA	2,9	1,8	2,8	0,0
8	A.H.	43	4,00	12,3	38,4	96,0	30,8	AA	2,9	1,3	2,8	0,0
9	A.L.	32	4,46	13,3	40,6	90,9	29,8	AA	2,8	1,5	2,7	0,0
10	Ç.N.	56	6,08	11,4	38,5	63,3	18,8	AA	4,8	0,9	4,9	0,0
11	Ç.T.	29	5,65	16,8	51,1	90,5	29,6	AA	2,9	0,8	2,4	0,0
12	Ç.N.	36	4,11	11,9	37,4	91,1	29,0	AA	2,6	1,0	2,5	0,0
13	Ç.Ö.	21	5,49	11,6	38,1	69,3	21,1	AA	4,7	1,6	4,7	0,8
14	Ç.M.	34	5,30	16,0	47,9	90,3	30,2	AA	2,6	0,7	2,6	0,0
15	Ç.Y.Ş.	24	4,62	13,0	41,5	89,7	28,1	AA	2,5	1,3	2,5	1,0
16	D.S.	19	4,58	10,0	33,2	72,4	21,9	AA	1,8	1,5	2,1	0,0
17	D.F.	44	4,41	13,0	41,8	94,7	29,5	AA	2,5	1,3	2,6	0,0
18	D.Ö.	18	4,72	14,5	44,9	95,1	30,7	AA	2,9	2,0	2,7	0,0
19	D.S.	28	4,82	10,6	35,3	73,2	22,0	AA	4,6	1,9	4,4	2,0
20	D.C.	27	6,11	11,8	40,0	65,4	19,3	AA	6,1	1,7	5,4	0,0
21	E.A.	44	4,25	9,4	31,3	73,7	22,2	AA	2,6	1,2	2,3	0,0
22	E.N.	22	4,52	13,6	40,7	90,2	30,1	AA	2,8	0,7	2,9	0,0
23	E.S.	24	5,33	15,6	47,1	88,3	29,2	AA	3,1	0,9	2,9	0,0
24	E.A.	12	4,24	13,1	40,0	94,3	30,9	AA	2,0	2,0	2,8	0,9
25	E.M.	14	4,25	12,7	39,2	92,1	29,9	AA	2,5	1,5	2,8	0,0
26	E.D.	45	4,87	15,6	48,2	98,8	32,0	AA	2,7	2,0	2,9	1,0
27	E.M.	6	5,29	10,1	34,1	64,4	19,0	AA	4,3	3,8	5,1	5,3
28	E.Ş.	17	5,84	12,5	40,6	69,4	21,5	AA	4,5	2,5	4,8	3,0
29	E.Ü.	45	5,02	9,2	32,4	64,7	18,5	AA	4,7	2,1	4,8	1,5
30	F.Z.	26	5,80	11,4	38,9	67,2	19,7	AA	4,3	1,7	4,6	0,9
31	G.A.	39	4,32	9,2	31,5	72,9	21,3	AA	1,1	0,8	1,4	0,0
32	G.G.	23	4,23	12,2	39,6	93,6	29,0	AA	2,7	1,8	2,6	1,6
33	İ.Ş.	30	4,24	12,5	38,5	90,9	29,5	AA	2,2	1,7	2,7	0,0
34	K.G.	34	4,90	12,6	37,7	77,0	25,8	AA	2,0	1,0	2,4	0,0

No	Olgu	Yaş	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	Elek	HbA2 %	Hb F %	HPLC HbA2	HPLC Hb F
35	K.M.	23	4,09	11,6	34,2	83,6	28,4	AA	4,5	2,1	5,0	1,5
36	K.F.	17	4,47	13,7	43,6	97,5	30,6	AA	2,9	1,6	2,9	0,9
37	K.S.	20	4,44	11,0	36,8	82,9	24,9	AA	2,7	1,5	2,2	0,0
38	K.Z.	35	5,03	10,0	31,9	63,4	20,0	AA	2,6	1,0	2,7	0,0
39	K.D.	35	4,47	13,1	41,0	91,7	29,2	AA	2,1	1,9	2,6	0,0
40	K.A.C.	11	4,58	12,4	38,8	84,6	27,0	AA	3,0	1,7	2,8	1,6
41	K.H.	36	5,97	13,1	44,6	74,7	21,9	AA	4,2	3,5	4,9	5,2
42	K.N.	16	4,86	14,1	44,0	90,5	29,1	AA	3,2	1,8	2,9	0,0
43	K.Ş.	12	4,48	12,6	39,6	88,6	28,1	AA	3,2	2,2	2,8	0,0
44	K.Ş.	37	5,64	12,0	40,3	71,4	21,3	AA	4,8	2,0	4,9	0,0
45	K.U.	20	4,99	14,9	46,0	92,1	29,8	AA	2,8	2,0	2,5	0,0
46	K.Y.	18	5,18	15,0	46,1	89,0	28,9	AA	2,3	1,7	2,4	0,0
47	K.Y.E.	13	4,35	13,3	41,1	94,4	30,5	AA	2,4	2,3	2,9	1,4
48	K.H.	16	4,78	12,6	40,0	83,6	26,3	AA	3,5	1,7	3,1	0,0
49	K.E.	27	4,41	13,5	41,8	94,9	30,6	AA	2,1	2,0	2,7	0,7
50	K.M.	10	4,94	13,9	43,4	87,8	28,2	AA	3,1	2,8	2,7	2,0
51	K.R.	22	4,49	10,7	36,2	80,7	23,8	AA	2,8	2,5	2,5	0,0
52	K.A.R.	32	5,26	14,3	45,3	86,2	27,1	AA	2,6	2,3	2,4	0,0
53	K.R.	60	4,66	12,9	41,4	89,0	27,7	AA	2,5	1,9	2,4	0,0
54	K.Z.	30	2,47	5,5	23,0	93,4	22,1	AA	2,7	1,9	2,8	3,3
55	K.H.	34	4,67	14,1	44,1	94,6	30,2	AA	2,5	1,8	2,6	1,3
56	K.K.	12	4,54	12,8	39,8	87,8	28,2	AA	2,8	1,7	2,8	1,2
57	K.S.	18	4,46	10,3	35,1	78,6	23,2	AA	2,4	1,7	2,1	0,0
58	K.S.	40	4,24	12,5	40,2	94,8	29,4	AA	2,6	1,3	2,5	0,0
59	K.G.	38	5,26	16,3	49,3	93,8	30,9	AA	2,8	1,0	2,6	0,0
60	O.Ç.H.	24	5,00	10,3	35,4	70,9	20,6	AA	4,4	1,9	4,7	0,0
61	Ö.M.S.	8	5,76	12,2	40,6	70,4	21,3	AA	6,1	2,3	6,2	2,3
62	Ö.S.	41	4,34	13,2	40,6	93,6	30,3	AA	2,7	1,9	3,0	1,0
63	Ö.N.	26	4,67	12,4	39,4	84,4	26,5	AA	2,6	2,1	2,5	0,0
64	Ö.O.	12	6,91	12,2	42,3	61,2	17,7	AA	2,3	2,3	2,7	1,5
65	Ö.V.	37	5,98	11,2	38,8	64,9	18,8	AA	2,0	2,3	2,4	0,0
66	Ö.F.	45	4,39	12,8	39,8	90,6	29,2	AA	2,1	2,3	2,4	0,0
67	Ö.S.	9	5,28	13,8	43,2	81,8	26,2	AA	2,7	2,2	2,8	0,0
68	Ö.Ş.	13	5,03	13,3	41,5	82,5	26,4	AA	2,8	2,5	2,6	0,0
69	Ş.Ö.A.	24	5,37	10,7	36,4	67,8	20,0	AA	4,4	4,0	4,7	4,8
70	Ş.Ş.	28	4,22	13,3	41,5	98,5	31,6	AA	2,5	1,9	2,3	0,0

No	Olgu	Yaş	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	Elek	HbA2 %	Hb F %	HPLC HbA2	HPLC Hb F
71	T.M.	18	4,97	15,2	47,0	94,5	30,6	AA	2,5	2,3	2,6	0,0
72	T.Ş.		4,43	13,7	42,4	95,6	30,9	AA	2,4	1,3	2,8	0,0
73	U.A.N.	3	5,43	9,7	33,7	62,1	17,9	AA	4,7	5,8	4,8	5,5
74	U.S.Z.	8	6,05	11,5	39,4	65,2	19,0	AA	4,6	2,3	5,5	2,6
75	Ü.A.	6	5,08	13,5	42,0	82,6	26,6	AA	3,1	1,6	2,8	0,0
76	Ü.B.	8	4,35	12,4	37,9	87,2	28,5	AA	2,5	1,7	2,8	0,0
77	Ü.B.	8	4,61	12,6	39,6	86,0	27,4	AA	2,4	1,7	2,8	0,0
78	Ü.M.A.	39	4,76	14,7	45,6	95,6	30,9	AA	2,3	1,9	2,8	0,0
79	Ü.M.	12	4,35	12,0	38,4	88,2	27,7	AA	1,7	1,5	2,4	0,0
80	Ü.N.	39	4,34	12,5	40,4	93,3	28,9	AA	2,0	2,6	2,2	0,0
81	Y.A.	29	5,16	12,2	40,2	77,9	23,7	AA	1,5	1,7	2,3	0,0
82	Y.N.	21	5,61	11,0	37,8	67,3	19,7	AA	5,3	2,5	5,3	1,2
83	Y.A.	31	4,61	11,2	37,4	81,1	24,3	AA	1,4	1,6	1,3	0,0
84	Y.E.	38	5,36	10,3	35,7	66,5	19,3	AA	3,6	2,1	4,3	1,7
85	D.A.	6	6,21	17,1	52,3	84,3	27,6	AA	2,7	0,3	3,0	0,0
86	D.A.	9	4,81	13,0	39,0	81,0	27,1	AA	2,8	0,4	2,7	0,0
87	A.D.	3	4,75	12,9	39,3	82,6	27,3	AA	2,9	0,9	2,6	0,0
88	Y.H.	31	4,81	14,3	44,8	93,3	29,8	AA	3,1	0,3	2,9	0,0
89	Y.M.	7	5,01	13,5	42,2	84,1	26,9	AA	1,6	0,3	1,4	0,0
90	B.A.	44	6,65	14,8	51,4	77,4	22,3	AA	4,6	0,2	4,5	0,0
91	B.A.	33	5,22	13,9	48,5	92,9	26,6	AA	2,6	1,5	2,3	0,0
92	B.F.	51	6,15	13,6	45,9	74,6	22,1	AA	4,9	1,2	4,3	2,2
93	B.M.	26	5,71	14,7	49,3	86,3	25,7	AA	3,1	0,4	2,4	0,0
94	B.M.	28	7,00	14,2	47,4	67,7	20,2	AA	5,2	0,4	4,8	0,0
95	B.N.	24	4,60	14,0	43,9	95,6	30,4	AA	3,0	0,5	2,6	0,0
96	B.N.	40	6,12	12,5	43,8	71,6	20,4	AA	5,3	0,8	4,4	0,0
97	B.Y.	20	4,65	12,2	38,9	83,6	26,2	AA	2,6	4,4	2,6	7,4
98	G.İ.	16	5,62	11,8	40,9	72,8	21,1	AA	5,5	1,2	4,6	2,0
99	G.K.	30	6,16	12,6	44,5	72,3	20,5	AA	6,0	1,5	4,6	2,3
100	Ö.A.	39	5,10	16,5	53,8	105,6	32,3	AA	3,1	1,0	2,7	0,0
101	Ö.E.	33	5,44	11,2	37,8	69,5	20,5	AA	5,4	0,5	4,6	0,0
102	Ö.H.	26	3,58	10,7	35,2	98,3	29,8	AA	3,1	1,2	2,8	0,0
103	Ö.K.	4	4,74	12,8	39,3	82,9	27,1	AA	3,2	1,2	2,8	1,4
104	Ö.M.	14	4,47	13,0	43,8	97,9	29,1	AA	3,4	1,7	2,4	2,6
105	Ö.V.	12	4,78	13,5	44,3	92,7	28,3	AA	3,3	0,9	2,6	0,0
106	Ö.V.	5	5,49	10,3	35,1	64,0	18,9	AA	5,5	1,9	4,4	0,0

No	Olgu	Yaş	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	Elek	HbA2 %	Hb F %	HPLC HbA2	HPLC Hb F
107	Ö.H.	39	3,23	6,7	20,8	64,3	20,8	AA	1,8	0,8	2,2	0,0
108	P.S.	27	4,13	12,3	36,4	88,2	29,7	AA	2,8	0,6	3,0	0,0
İlgın'dan alınan kan örnekleri												
109	A.F.	40	4,84	14,2	43,9	90,8	29,3	AA	2,5	0	2,8	0,6
110	A.Ö.F.	13	5,29	13,7	42,0	79,5	25,9	AA	2,6	2,0	2,6	0,4
111	A.T.	6	5,70	10,6	34,9	61,1	18,6	AA	5,7	0,8	5,1	0,9
112	A.G.	20	5,13	10,7	34,6	67,5	20,9	AA	5,2	0,4	4,8	0,7
113	A.M.	25	5,64	16,4	48,7	86,3	29,1	AA	2,8	0	2,6	0
114	A.H.	24	5,13	11,1	35,7	69,5	21,6	AA	4,2	0,4	4,4	0,8
115	A.C.E.	24	4,84	13,6	40,7	84,2	28,1	AA	2,7	1,9	2,6	1,3
116	A.A.	39	4,62	14,0	41,5	89,7	30,4	AA	2,7	0	2,6	0
117	A.A.	27	3,63	11,8	36,0	98,9	32,5	AA	2,8	0	2,9	0
118	A.B.	49	5,73	17,0	50,3	87,7	29,6	AA	2,6	0	2,9	0,3
119	A.Z.	43	5,70	11,9	38,8	68,0	20,8	AA	5,3	0	5,3	1,2
120	B.Y.	33	4,87	15,1	44,0	90,3	31,0	AA	3,7	0	2,9	0,2
121	B.R.	28	4,86	15,9	46,9	96,4	32,6	AA	2,8	0	2,9	0,5
122	Ç.F.	18	5,28	10,6	34,1	64,5	20,1	AA	5,4	1,3	5,0	1,4
123	Ç.U.	19	5,08	15,0	44,5	87,6	29,6	AA	3,3	0	3,2	0
124	Ç.A.	2	6,02	10,2	34,9	58,0	17,0	AA	1,8	0,5	2,0	0
125	Ç.K.	36	4,50	13,5	40,5	90,0	30,1	AA	2,8	1,1	2,8	0,5
126	Ç.M.	40	6,81	13,1	43,0	63,2	19,3	AA	6,6	0,8	5,8	0,5
127	Ç.Ş.	14	5,92	11,5	37,3	62,9	19,4	AA	5,7	2,5	5,2	1,2
128	D.M.	42	4,51	14,4	42,3	93,9	32,0	AA	2,8	0	2,7	0,4
129	D.S.	29	4,39	13,3	39,3	89,4	30,3	AA	3,2	0,3	3,0	0,6
130	E.A.	24	6,00	11,9	38,5	64,2	19,9	AA	5,8	0,9	4,7	1,0
131	E.E.	23	5,04	15,1	45,2	89,6	29,9	AA	3,1	0	2,4	0,5
132	E.G.	29	5,12	10,6	35,1	68,6	20,7	AA	3,8	0,5	4,6	1,2
133	E.S.	13	3,25	9,3	27,9	86,0	28,7	AA	2,3	0	2,6	1,5
134	E.S.	10	5,46	10,6	34,2	62,7	19,4	AA	4,9	0,4	4,1	0,4
135	E.S.	15	3,40	9,8	29,4	86,6	29,0	AA	2,7	0,3	2,6	1,6
136	E.S.	5	4,05	11,2	33,8	83,4	27,8	AA	2,4	0	2,4	0,6
137	E.B.	47	5,37	16,5	48,3	89,8	30,7	AA	2,9	0	2,7	0
138	E.E.	42	5,57	18,6	45,5	81,8	33,3	AA	2,9	0	2,6	0
139	E.F.		4,88	15,5	38,5	78,9	31,7	AA	3,2	0,7	3,0	0,3
140	E.M.	43	5,13	15,5	47,1	91,7	30,2	AA	2,4	0	2,5	0
141	E.Ş.	37	4,86	11,2	36,3	74,8	23,1	AA	2,9	0,4	2,7	0,5

No	Olgu	Yaş	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	Elek	HbA2 %	Hb F %	HPLC HbA2	HPLC Hb F
142	G.Ö.	27	4,61	14,0	43,1	93,5	30,5	AA	2,8	0,7	2,7	0,8
143	İ.F.	21	5,59	15,6	50,1	89,6	27,9	AA	2,8	0	2,8	0,3
144	İ.F.	24	4,61	13,5	41,1	89,1	29,4	AA	2,8	0	2,8	0,3
145	K.C.	21	5,47	11,0	36,0	65,8	20,2	AA	5,2	0,4	4,8	0,8
146	K.M.	28	6,48	13,1	43,2	66,6	20,2	AA	5,1	0,8	5,0	0,5
147	K.A.	39	5,49	15,8	49,5	90,3	28,9	AA	2,5	0	2,6	0
148	K.D.	28	4,90	14,1	42,7	87,3	28,8	AA	2,1	0	1,8	0,3
149	K.T.	6	4,97	13,2	39,9	80,4	26,6	AA	1,8	0,4	1,9	0,6
150	O.A.	12	4,96	13,9	41,6	83,9	28,0	AA	3,4	0,8	2,6	0,4
151	O.F.	41	5,42	11,7	39,2	72,4	21,6	AA	2,1	0	1,9	0
152	O.S.	18	5,30	15,0	45,3	85,3	28,2	AA	2,6	0	2,7	0,3
153	Ö.G.	21	7,10	15,0	49,2	69,3	21,2	AA	5,0	0	4,8	1,0
154	Ö.H.	21	5,01	14,4	43,3	86,3	28,7	AA	2,8	0,7	2,6	0
155	Ö.K.	56	5,20	10,6	35,1	67,5	20,4	AA	4,7	2,1	4,5	1,2
156	Ö.M.	56	4,68	16,0	48,5	103,6	34,2	AA	3,0	1,4	2,6	0,9
157	Ö.T.	6	4,41	12,0	36,9	83,8	27,3	AA	2,5	1,0	2,4	0
158	S.M.	32	5,09	15,0	44,9	88,3	29,4	AA	3,2	0,4	2,8	0
159	S.M.	17	6,24	11,5	38,3	61,4	18,5	AA	5,4	0,7	5,1	0,7
160	Ş.E.	50	5,73	11,7	38,5	67,3	20,4	AA	5,4	1,2	4,5	1,0
161	Ş.R.	60	4,85	15,3	47,9	98,9	31,6	AA	3,4	0,3	2,6	0
162	Ş.A.	27	4,67	13,7	41,9	89,7	29,4	AA	3,6	1,0	2,8	0,5
163	Ş.M.	25	5,26	16,3	48,2	91,5	30,9	AA	3,8	0,7	2,8	0,4
164	T.E.	16	5,05	14,9	44,5	88,1	29,4	AA	3,0	1,4	2,5	0,3
165	T.H.	18	5,44	11,3	37,0	68,0	20,7	AA	5,2	1,8	4,7	0,7
166	T.M.	52	6,62	13,9	44,8	67,7	21,0	AA	6,4	2,3	5,1	1,4
167	T.N.	19	6,09	12,1	39,8	65,3	19,8	AA	5,0	1,6	4,8	1,0
168	V.F.	35	4,71	12,1	38,2	81,1	25,7	AA	3,6	1,5	2,5	0,3
169	V.K.	15	7,00	12,9	42,8	61,2	18,4	AA	6,5	1,5	5,6	0,7
170	V.N.	9	5,68	10,6	35,0	61,6	18,6	AA	5,9	1,7	5,4	0,9
171	V.Ş.	13	5,01	13,5	40,7	81,2	27,0	AA	3,8	1,3	2,7	0,3
172	Y.A.	37	6,02	12,4	40,2	66,8	20,5	AA	5,6	1,6	5,2	0,4
Seydişehir'den alınan örnekler												
173	A.A.	19	7,16	14,0	48,2	67,3	19,6	AA	4,1	1,2	3,2	2,5
174	A.A.	44	4,97	10,1	34,5	69,4	20,3	AA	4,3	1,1	4,4	1,4
175	E.S.	52	4,99	14,1	45,0	90,0	28,2	AA	2,9	1,2	2,5	0,0
176	G.B.	3	5,44	9,7	32,6	59,9	17,9	AA	5,8	3,5	5,6	4,6

No	Olgu	Yaş	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	Elek	HbA2 %	Hb F %	HPLC HbA2	HPLC Hb F
177	G.E.	32	6,21	10,9	37,6	60,5	17,6	AA	4,6	1,1	4,7	0,0
178	G.F.	49	6,02	11,3	38,7	64,3	18,7	AA	5,5	1,2	5,3	0,9
179	G.H.	9	5,22	13,5	42,3	80,9	25,8	AA	2,3	0,9	2,7	0,0
180	G.M.	27	4,56	12,4	39,7	86,9	27,2	AA	2,7	0,9	2,6	0,0
181	H.A.	6	4,35	11,9	38,0	87,3	27,3	AA	2,3	0,9	2,8	0,0
182	H.A.	9	4,86	13,3	41,9	86,3	27,4	AA	3,0	1,0	3,3	0,0
183	H.A.	20	3,94	10,9	34,5	87,5	27,7	AA	2,8	1,4	2,6	4,3
184	H.D.A.	19	5,14	14,9	45,6	88,7	29,1	AA	2,4	1,1	2,6	0,0
185	H.E.	48	4,47	9,4	32,8	73,4	21,1	AA	4,1	3,2	4,5	3,6
186	H.H.	37	4,70	12,7	39,6	84,3	27,0	AA	3,1	1,3	2,7	0,0
187	H.H.	35	5,45	10,5	37,2	68,3	19,3	AA	1,9	1,8	2,3	0,0
188	H.M.	41	5,60	13,2	51,2	91,4	23,6	AA	3,0	1,1	2,8	0,0
189	H.M.	44	5,10	14,6	48,8	95,7	28,7	AA	1,9	1,5	2,5	0,0
190	H.R.	8	4,77	13,1	42,5	89,1	27,5	AA	3,2	1,5	3,1	0,0
191	H.R.	12	4,5	11,9	35,6	79,0	26,4	AA	1,8	1,1	3,0	0,0
192	H.S.	6	4,86	12,0	36,5	75,1	24,7	AA	2,6	0,8	3,0	0,0
193	H.Ü.	4	4,58	13,5	41,0	89,6	29,5	AA	1,8	1,4	2,7	0,0
194	H.Ü.	39	6,24	11,9	38,6	61,8	19,2	AA	2,6	1,4	2,9	0,0
195	H.Y.	46	4,73	13,7	42,4	89,7	28,9	AA	4,4	1,1	5,0	0,0
196	H.Z.	40	4,33	12,3	37,1	85,7	28,5	AA	1,8	1,0	2,7	0,0
197	K.A.	27	5,15	13,5	41,0	79,7	26,2	AA	4,0	1,3	4,2	0,8
198	K.G.	8	4,79	12,7	38,0	79,3	26,5	AA	2,2	1,3	2,6	0,0
199	K.S.	9	4,37	11,6	35,8	81,8	26,6	AA	2,2	1,3	2,5	0,0
200	K.İ.	51	4,55	13,1	40,3	88,4	28,7	AA	2,7	1,1	2,9	0,0
201	K.M.	19	5,52	12,2	40,3	73,0	22,1	AA	2,5	1,4	2,8	0,0
202	K.N.	49	4,73	10,3	33,2	70,3	21,9	AA	4,8	1,0	4,6	0,0
203	Ö.E.	5	6,39	11,7	39,0	61,1	18,4	AA	4,8	1,2	4,8	0,0
204	Ö.R.	4	5,44	13,9	43,0	79,2	25,7	AA	3,1	0,6	2,9	0,0
205	S.E.	4	5,81	10,8	34,7	59,8	18,6	AA	4,8	1,7	5,2	1,5
206	S.H.	28	4,70	13,2	40,0	85,2	28,2	AA	2,3	0,9	2,5	0,7
207	S.O.	6	4,54	10,8	34,5	75,6	23,7	AA	2,4	1,4	2,5	2,4
208	S.R.	57	5,11	10,2	33,5	65,6	19,9	AA	4,2	2,3	4,3	2,7
209	S.A.	39	4,95	15,4	45,9	92,8	31,2	AA	3,4	1,2	2,6	0,0
210	S.N.	36	4,79	13,2	40,9	85,4	27,5	AA	2,8	1,0	2,6	0,0
211	S.A.	26	6,22	12,5	40,8	65,7	20,1	AA	5,4	2,0	4,9	2,4
212	T.Ç.	37	5,53	11,2	36,3	65,7	20,3	AA	4,9	2,4	5,1	1,0

No	Olgu	Yaş	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	Elek	HbA2 %	Hb F %	HPLC HbA2	HPLC Hb F
213	T.K.	10	5,53	11,1	36,6	66,1	20,1	AA	4,2	5,2	4,6	4,9
214	U.D.	18	4,96	11,4	36,8	74,2	22,9	AA	2,2	1,4	2,1	0,0
215	U.İ.	54	5,46	15,8	47,7	87,3	29,0	AA	2,5	1,2	2,7	0,0
216	U.M.	49	6,49	13,2	42,8	66,0	20,4	AA	5,5	1,7	4,6	0,0
217	U.M.	22	7,54	14,4	47,6	63,1	19,2	AA	5,1	1,2	4,8	0,0
218	U.S.	45	4,78	13,4	41,9	87,7	28,0	AA	2,7	1,0	2,7	0,0
219	U.R.	58	4,73	12,8	40,4	85,3	26,9	AA	2,7	1,1	2,5	0,0
220	U.S.	26	5,13	13,3	41,2	80,3	26,0	AA	2,5	1,5	2,6	0,0
221	U.H.	45	4,30	7,8	27,3	63,4	18,2	AA	2,3	2,2	1,8	0,0
222	U.E.	8	4,34	12,0	35,8	82,5	27,6	AA	2,6	1,2	2,8	0,0
223	U.H.	37	4,85	10,1	33,3	68,8	20,8	AA	2,3	1,1	2,1	0,0
224	U.M.	5	5,21	9,4	31,2	59,8	18,0	AA	5,3	2,7	5,7	2,8
225	Ü.F.	23	5,01	12,7	39,7	79,3	25,3	AA	2,4	1,1	2,4	0,0
226	Ü.H.	25	5,17	12,5	39,5	76,4	24,1	AA	2,3	1,7	2,2	0,0
227	Ü.K.	2	5,13	12,3	38,0	74,1	24,0	AA	2,5	3,2	2,4	3,6
228	Y.H.İ.	48	5,25	16,3	48,6	92,7	31,0	AA	2,3	1,9	2,7	0,0
229	Y.S.	45	5,21	14,9	45,5	87,3	28,6	AA	2,5	1,7	2,8	0,0
230	Y.A.	30	4,32	12,1	36,5	84,4	27,9	AA	2,4	1,9	2,7	0,0
Akşehir’den alınan kan örnekleri												
231	A.A.	32	4,21	12,3	38,1	90,5	29,1	AA	3,1	0	2,7	0,3
232	A.A.	34	4,05	12,1	35,8	88,3	29,8	AA	3,8	0,3	2,8	0,4
233	A.H.N.	10	4,77	12,2	37,9	79,3	25,5	AA	2,9	0,6	2,7	0,4
234	A.İ.	35	7,20	14,0	45,6	63,4	19,5	AA	5,6	1,6	5,5	0,9
235	A.A.	23	5,37	16,1	47,9	89,1	30,0	AA	3,2	1,2	2,7	0
236	A.F.	43	4,41	15,8	33,8	76,6	35,8	AA	3,5	0,7	2,6	0
237	A.M.	22	5,87	13,4	35,9	61,1	22,9	AA	4,4	1,5	4,5	1,0
238	A.H.	18	4,91	13,9	42,8	87,2	28,3	AA	2,7	0,8	1,9	0
239	A.S.	45	4,78	12,9	40,1	84,0	27,1	AA	2,5	0,9	2,6	0,3
240	B.A.	18	4,43	13,0	39,4	88,9	29,3	AA	2,9	0,3	2,6	0,2
241	Ç.Ö.	20	5,05	12,7	30,4	60,1	25,1	AA	5,4	1,3	4,6	1,0
242	Ç.S.	40	5,35	19,2	42,1	78,6	35,8	AA	2,7	1,1	2,7	0,3
243	Ç.A.	27	4,49	13,3	33,8	75,3	29,7	AA	2,6	1,8	2,3	0,3
244	Ç.G.	48	4,75	12,5	38,7	81,5	26,2	AA	2,8	0,9	2,3	0,4
245	Ç.M.	19	6,32	11,8	39,6	62,6	18,6	AA	6,0	1,5	5,3	0,6
246	D.M.	30	4,36	12,8	39,3	90,1	29,3	AA	3,4	1,6	2,9	0,8
247	D.H.	17	6,03	11,7	38,9	64,5	19,3	AA	5,8	2,4	5,4	0,7

No	Olgu	Yaş	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	Elek	HbA2 %	Hb F %	HPLC HbA2	HPLC Hb F
248	E.M.A.	23	7,10	15,9	39,6	55,7	22,4	AA	4,6	1,6	4,4	0,2
249	G.G.	5	4,86	11,7	30,2	62,2	24,1	AA	5,7	2,9	5,0	1,9
250	G.H.	30	4,97	13,3	31,8	63,9	26,9	AA	4,6	13,5	4,4	8,9
251	G.G.	41	5,43	13,0	34,6	63,8	23,9	AA	6,3	1,6	4,7	0,7
252	H.M.	25	5,81	16,1	49,3	84,9	27,6	AS	3,2	1,9	4,4	0,5
253	K.M.A.	45	4,89	15,4	45,8	93,6	31,4	AA	3,1	1,3	2,4	0
254	K.E.	47	5,76	11,7	38,0	66,1	20,3	DD	2,3	2,5	5,0	1,4
255	Ö.H.	56	4,57	13,6	39,4	86,3	29,8	AA	2,7	0,7	2,3	0
256	Ö.F.	48	5,77	12,0	38,6	66,8	20,8	AA	6,0	1,3	4,9	0,9
257	S.H.	29	4,33	12,0	36,7	84,9	27,7	AA	3,0	1,1	2,6	0,3
258	Ş.M.	29	4,61	11,4	35,8	77,5	24,8	AA	3,3	1,2	2,2	0,5
259	Ş.R.	27	5,12	15,8	47,5	92,9	30,9	AA	3,3	1,2	2,3	0,6
260	U.K.G.	26	4,69	12,6	39,0	83,2	26,9	AA	2,9	2,5	2,5	1,5
261	Ü.H.	31	6,51	15,9	50,4	77,4	24,4	AA	2,8	0,8	2,5	0,2
262	Y.Ö.	21	5,60	17,0	50,7	90,6	30,3	AH	1,9	1,3	2,0	0,4
263	Y.A.	53	5,98	12,4	40,1	67,0	20,6	AA	5,2	1,1	4,2	0,3
264	Y.E.		4,05	12,7	38,4	94,8	31,5	AA	3,2	1,1	2,3	0,2
Çumra'dan alınan kan örnekleri												
265	B.R.	27	5,53	15,8	47,2	85,5	28,6	AA	3,3	0,2	2,9	0,0
266	G.A.	24	5,93	11,3	38,4	64,8	19,1	AA	4,3	1,4	4,5	0,0
267	K.A.		4,69	12,6	38,3	81,7	26,8	AA	2,4	1,5	3,1	0,0
268	K.G.	29	6,08	12,7	40,4	66,4	20,8	AA	2,8	0,8	2,9	0,0
269	K.H.	49	7,03	12,8	41,2	58,5	18,2	AA	2,5	1,5	2,6	0,0
270	K.M.	23	4,56	12,1	35,9	78,7	26,6	AA	5,0	1,3	4,8	0,0
271	K.O.	11	4,25	12,5	38,0	89,3	29,6	AA	2,4	1,4	2,9	0,0
272	K.R.	28	5,77	11,3	36,7	63,7	19,5	AA	4,3	1,9	5,0	2,1
273	Ö.A.	22	4,63	13,5	40,4	87,4	29,2	AA	4,8	3,2	5,0	0,0
274	Ö.M.	25	6,34	11,7	38,8	61,2	18,5	AA	2,1	1,4	1,9	0,0
275	S.L.	32	4,36	13,0	38,7	88,7	29,7	AA	2,8	1,4	2,6	0,0
276	Y.A.	56	5,07	14,2	43,2	85,2	27,9	AA	3,1	1,4	2,8	0,0
277	Y.Ş.	30	5,81	11,7	36,7	63,2	20,2	AA	3,4	2,7	4,7	1,2

Hb A₂ değerinin mikrokolon ve HPLC yöntemleri ile ölçüm sonuçları student *t* testi ile karşılaşıtırıldığında anlamlı fark olmadığı (*p*<0,05) grlmşıtır (izelge 4.2).

Çizelge 4.2: Hb A₂ miktarının mikrokolon ve HPLC ile ölçümünün tanımlayıcı istatistik değerleri.

	Mikrokolon	HPLC
Ortalama	3,3	3,2
Orta değer	2,9	2,8
Mod	2,8	2,6
Minimum	1,1	1,3
Maksimum	6,6	6,2
Standart sapma	1,2	1,1

Moleküler çalışmalarda örneklerin anormal hemoglobin, β ve α talasemi yönünden incelemeleri ARMS, RFLP ve mikroarray yöntemleri ile yapılmıştır. Mikroarray alışması için öncelikle mutasyona özgü tanımlayıcıların tasarımı yapılmıştır.

Tasarım çalışmasında ilk olarak mutasyonların β geni üzerindeki yerleşimleri belirlenmiştir (şekil 4.2). Mutasyonların yerleşim yerleri dikkate alınarak maliyet ve uygulama kolaylığı açısından genin beş parçada çoğaltılmasına karar verilmiştir. Gen üzerinde primerlerin tanıma bölgeleri ve çoğaltıma ürünleri şekil 4.3’de gösterilmiştir. Bundan sonra tanımlayıcı tasarımı yapılmak istenen mutasyonlar için web tabanlı serbest programlar yardımı ile gereç ve yöntemin 3.3.12. bölümünde anlatıldığı gibi mutasyon taramasının mikroarray yöntemi ile yapılması için 19 β talasemi mutasyonu ve 10 anormal hemoglobin mutasyonu için tanımlayıcı tasarımı yapılmıştır. Yöntemde oğaltıma ürünlerindeki yerlerine göre izelge 4.3’de mutasyon listesi verilmiştir.

.....CATCCATTCTGTCCTGTAAGTATTTTGC
 ATATTCTGGAGACGCAGGAAGAGATCCATCTACATATCCCAAAGCTGAATTATGGTAGACAAAACCTCT
 TCCACTTTTAGTGCATCAACTTCTTATTTGTGTAATAAGAAAATTGGGAAAACGATCTTCAATATGCT
 TACCAAGCTGTGATTCCAAATATTACGTAAATACACTTGCAAAGGAGGATGTTTTTAGTAGCAATTTG
 TACTGATGGTATGGGGCCAAGAGATATATCTTAGAGGGAGGGCTGAGGGTTGAAGTCCAACCTCTAA
 GCCAGTGCCAGAAGAGCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCACCCTGTGGAGCCACAC
 CCTAGGGTTGGCCAATCTACTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCA⁻⁸⁷AAAAGTCAGG
 -30
 GCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACAC
 CATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAG^{Cd5HbCHbs}AAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATG
 Cd8 Cd8/9 HbESaskatoon
 HbDİran
 AAGTTGGTGGTGAAGGCCCTGGGCAG^{ivsl-1}CTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGA
 HbGCoushatto ivsl-5 ivsl-6
 AACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGG
 ivsl-110
 TCTATTTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACC^{cd39}CAGAGGTTCTTTGAGTC^{cd44}CTTTGGG
 ivsl-130
 GATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGG
 Hb Hamadan HbJ-Antakya
 TGCCTTTAGTGATGGCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACACTGAGTGAGCTGC
 Cd74/75
 ACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGCTGAGTCTATGGGACGCTTGATGTTTTCTT
 ivs 2-1
 TCCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTTCATAGGAAGGGGATAAGTAACAGGGTACAGTTTAGAAT
 GGGAAACAGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTCTTTTATTTGCTGT
 TCATAACAATTGTTTTCTTTTGTTTAATTCTTGCTTTCTTTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTACTAT
 TATACTTAATGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACCTTAA
 AAAAACTTTACACAGTCTGCCTAGTACATTACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGCATATTCA
 TAATCTCCCTACTTTATTTTCTTTTATTTTAAATTGATACATAATCATTATACATATTTATGGGTAA
 AGTGTAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTAA
 AAATGCTTTCTTCTTTTAAATATACTTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCT
 TTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTT
 CTGGGTAAAGGCAATAGCAATATCTCTGCATATAAATTTCTGCATATAAATTGTAAGTATGTAAG
 AGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAA
 ivs 2-745
 GGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCCTCCC
 ACA^{ivsl-848}GCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAA^{ivsl-849}GATTACCCCACCAG
 ivs2-848 2-849 HbDLosAng&HbBeograd
 HbOArab
 TGCAGGCTGCCTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGCCCACAAGTATCACTAAGCT
 CGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCTTTGTTCCTAAGTCCAACCTACTAAACTGGGGG
 ATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTTCATTGCAATGATG
 TATTTAAATTATTTCTGAATATTTTACTAAAAAGGGAATGTGGGAGGTCAGTGCATTTAAACATAAA
 GAAATGAAGAGCTAGTTCAAACCTTGGGAAAATACACTATATCTTAACTCCATGAAAGAAGGTGAGG
 CTGCAAAC.....

Şekil 4.2: Tanımlayıcı tasarımı yapılan mutasyonların β geni üzerindeki yerleşimi.

.....CATCCATTCTGTCCTGTAAGTATTTTGC
 ATATTCTGGAGACGCAGGAAGAGATCCATCTACATATCCCAAAGCTGAATTATGGTAGACAAAACCTCT
 TCCACTTTTGTAGTGCATCAACTTCTTATTTGTGTAATAAGAAAATTGGGAAAACGATCTTCAATATGCT
 TACCAAGCTGTGATTCCAAATATTACGTAAATACACTTGCAAAGGAGGATGTTTTTAGTAGCAATTTG
 TACTGATGGTATGGGGCCAAGAGATATATCTTAGAGGGAGGGCTGAGGGTTGAAGTCCAACCTCTAA
 GCCAGTGCCAGAAGAGCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCACCTGTGGAGCCACAC
 CCTAGGGTTGGCCAATCTACTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCATAAAAAGTCAGG
 GCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACAC
 CATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATG
 AAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGGCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAAGGAGACCAATAGA
 AACGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGG
 TCTATTTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCTTTGGG
 GATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGG
 TGCCTTTAGTGATGGCCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACACTGAGTGAGCTGC
 ACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTCTATGGGACGCTTGATGTTTTCTT
 TCCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCTAGGAAGGGGATAAGTAACAGGGTACAGTTTAGAAT
 GGGAAACAGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTCTTTTATTTGCTGT
 TCATAACAATTGTTTTCTTTGTTAATTCTTGCTTCTTTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTACTAT
 TATACTTAATGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACCTTAA
 AAAAACTTTACACAGTCTGCCTAGTACATTACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGCATATTCA
 TAATCTCCCTACTTTATTTTCTTTATTTTAAATTGATACATAATCATTATACATATTTATGGGTAA
 AGTGTAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTAA
 AAATGCTTTCTTCTTTTAAATATACTTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCT
 TTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTT
 CTGGGTAAAGGCAATAGCAATATCTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAACCTGATGTAAG
 AGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAA
 GGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCCTCCC
 ACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTCACCCCACCAG
 TGCAGGCTGCCTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGCCCACAAGTATCACTAAGCT
 CGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCTTTGTTCCCTAAGTCCAACCTACTAACTGGGGG
 ATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCAATTGCAATGATG
 TATTTAAATTATTTCTGAATATTTTACTAAAAAGGGAATGTGGGAGGTCAGTGCATTTAAACATAAA
 GAAATGAAGAGCTAGTTCAAACCTTGGGAAAATACACTATATCTTAAACTCCATGAAAGAAGGTGAGG
 CTGCAAAC.....

Şekil 4.3: β geni üzerinde çoğaltma primerlerinin tanıma bölgeleri. 1, 2, 3, 4, 5

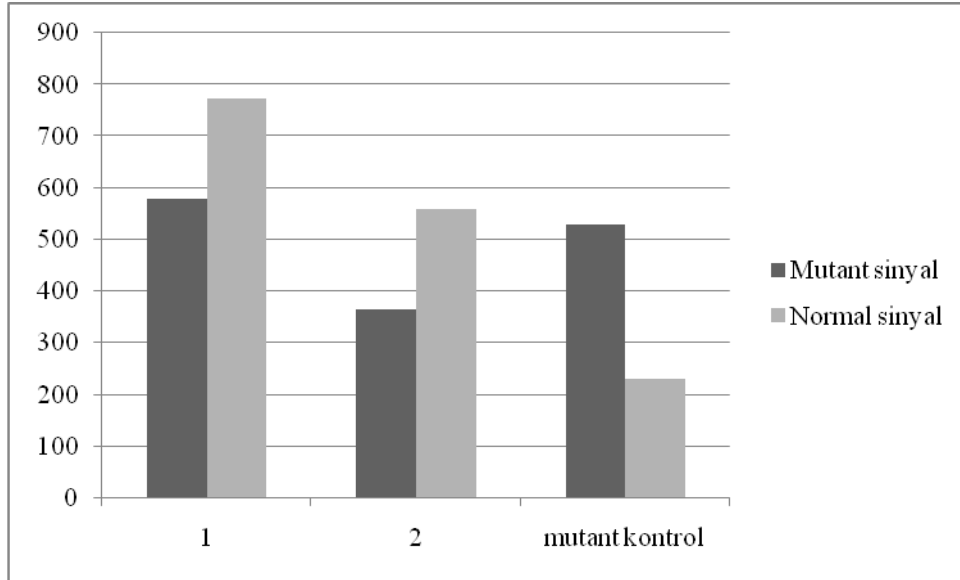
Çizelge 4. 3: Mikroarray yönteminde çoğaltma ürünlerindeki yerlerine göre mutasyonlar.

Çoğaltma ürünü	β talasemi mutasyonu	Anormal hemoglobin
1	IVS I-110 (G→A)	
1	IVS I-130 (G→C)	
1	IVS I-130 (G→A)	
1	Cd 39 (C→T)	
1	Cd 44 (-C)	
1		Hb J Antakya
2	IVS I-1 (G→A)	
2	IVS I-5 (G→A)	
2	IVS I-5 (G→C)	
2	IVS I-6 (T→C)	
2	IVS II-1 (A→G)	
2	Cd 74/75 (-C)	
3	IVS II-745 (C→G)	
3	IVS II-848 (C→A)	
3	IVS II-849 (A→G)	
3		Hb D Los Angeles (G→C)
3		Hb O Arab (G→A)
3		Hb Beograd (A→T)
4	-87 (C→G)	
4	Cd 8 (-AA)	
4	Cd 8/9 (+G)	
4		Hb G Coughatta (A→C)
4		Hb E Saskatoon (G→A)
4		Hb D İran (G→C)
4		Hb Hamadan (G→C)
5	-30 (T→A)	
5	Cd 5 (-CT)	
5		Hb S (A→T)
5		Hb C (G→A)
Toplam	19	10

Tanımlayıcıların tasarımının ardından okutma protokollerinin oturtulması için gereç ve yöntemin 3.3.13. bölümündeki ayırım sıcaklığının belirlenmesi ile ilgili işlemlerde elde edilen analiz sonuçlarına ait veriler Çizelge 4.4-4.8, grafikler Şekil 4.4-4.8’de verilmiştir. Çizelge ve şekiller incelendiğinde sinyal seviyesinin yüksek, ayırımın çok iyi olmadığı 28°C ile sinyal seviyesinin düşük, ayırımın çok iyi olduğu 32°C sıcaklık arasındaki dereceler tek tek yükseltilerek işlem tekrar edilmiş ve analiz sonuçlarına ait veriler Çizelge 4.9-4.13, grafikler Şekil 4.9-4.13’de verilmiştir. Sonuçlara göre en iyi ayırım sıcaklığı 32°C olarak belirlenerek standart okuma protokolü uygulanmış veriler Çizelge 4.14 ve Şekil 4.14’de verilmiştir.

Çizelge 4.4: 24°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi

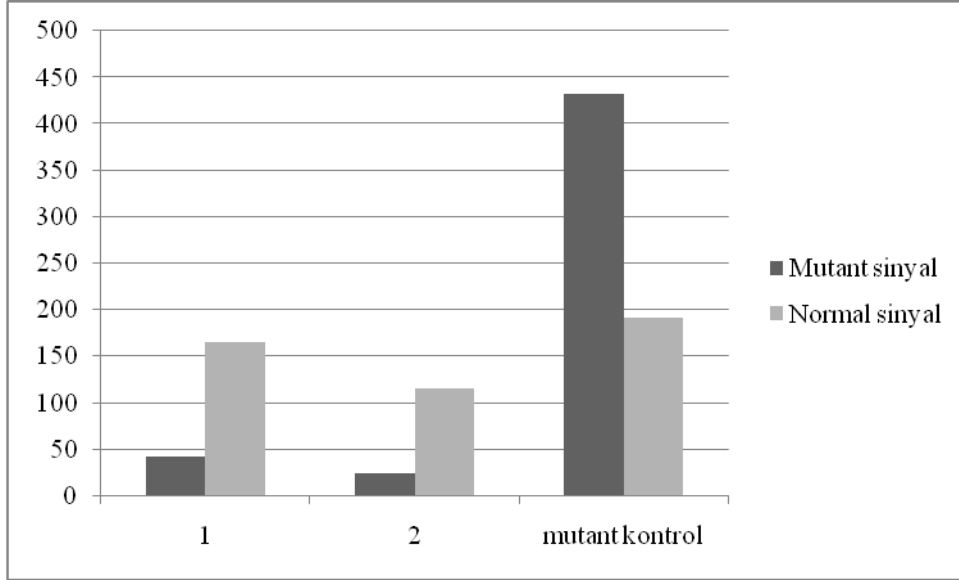
Örnek	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
1	579	772	1:1,33	Mutant/Normal
2	365	558	1:1,53	-
Mutant kontrol	529	229	2,31:1	-



Şekil 4.4: 24°C’de alınan sinyallerin grafiği

Çizelge 4.5: 28°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi

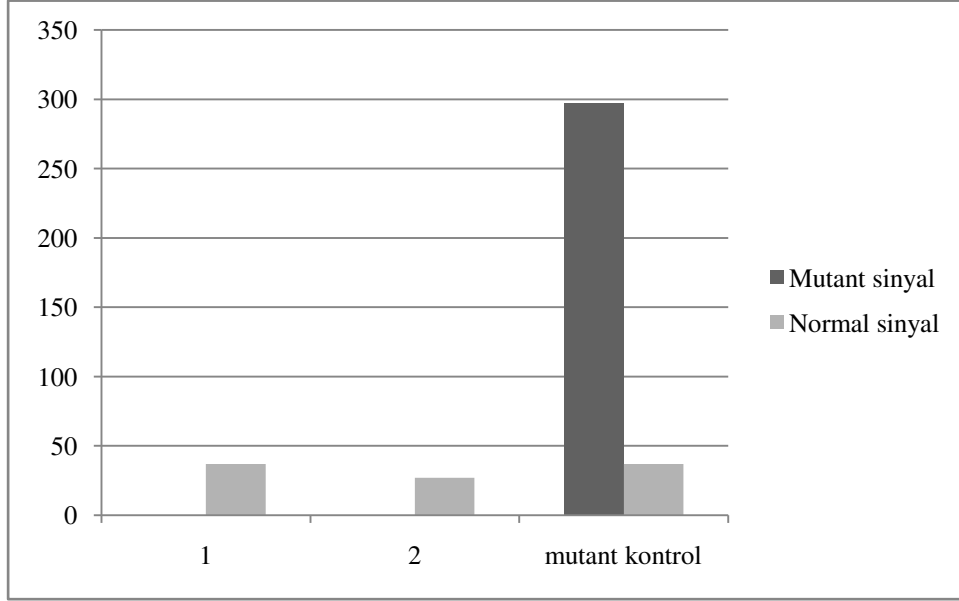
Örnek	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
1	42	165	1:3,93	-
2	23	115	1:5	Normal/Normal
Mutant kontrol	432	191	2,26:1	-



Şekil 4.5: 28°C’de alınan sinyallerin grafiği

Çizelge 4.6: 32°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi

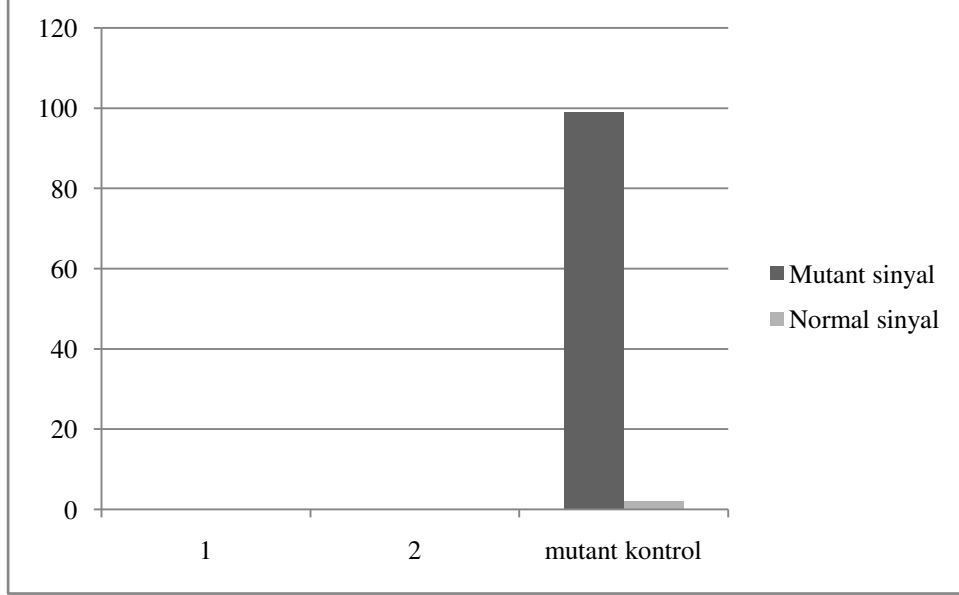
Örnek	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
1	0	37	Sonsuz	Normal/Normal
2	0	27	Sonsuz	Normal/Normal
Mutant kontrol	297	37	8:1	Mutant/Mutant



Şekil 4.6: 32°C’de alınan sinyallerin grafiği

Çizelge 4.7: 36°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi

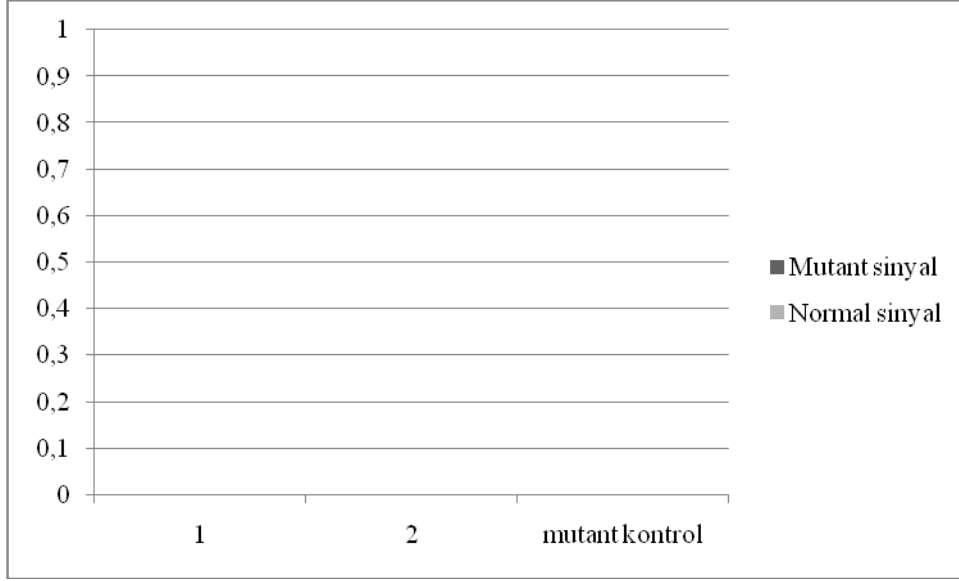
Örnek	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
Mutant kontrol	99	2	49,5:1	Mutant/Mutant



Şekil 4.7: 36°C’de alınan sinyallerin grafiği

Çizelge 4.8: 40°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi

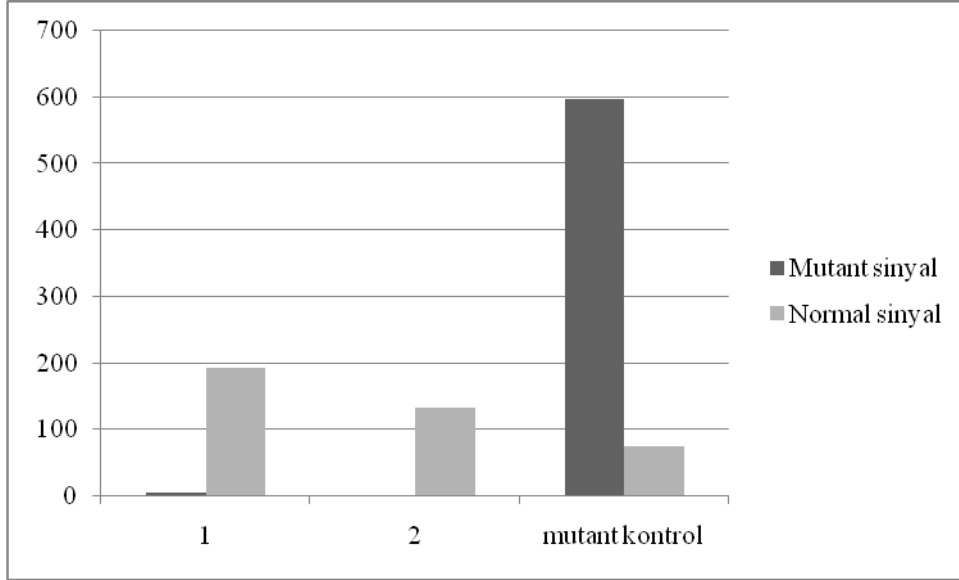
Örnek	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
Mutant kontrol	-	-	-	-



Şekil 4.8: 40°C’de alınan sinyallerin grafiği

Çizelge 4.9: 28°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi

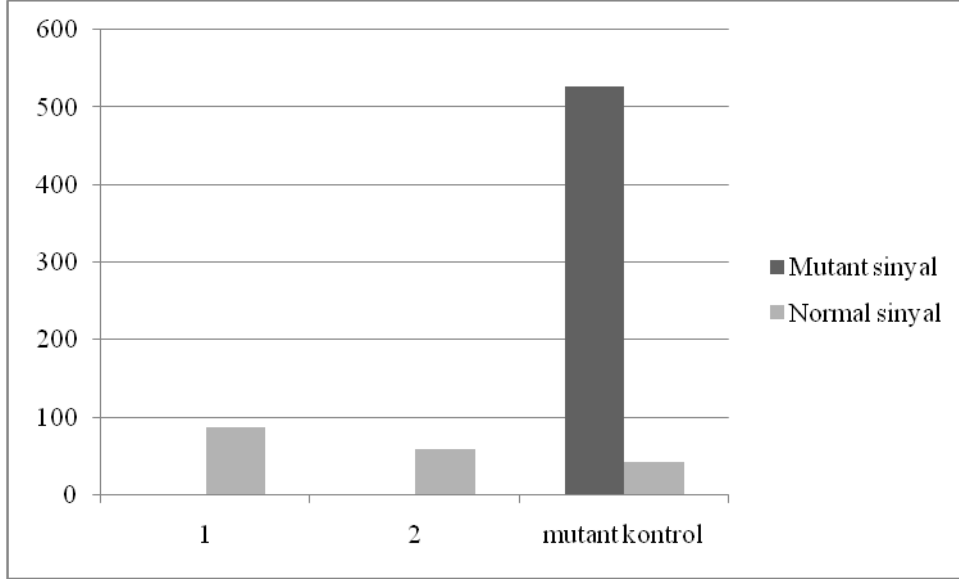
Örnek	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
1	3	192	1:64	Normal/Normal
2	0	131	Sonsuz	Normal/Normal
Mutant kontrol	597	73	8,18:1	Mutant/Mutant



Şekil 4.9: 28°C’de alınan sinyallerin grafiği

Çizelge 4.10: 29°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi

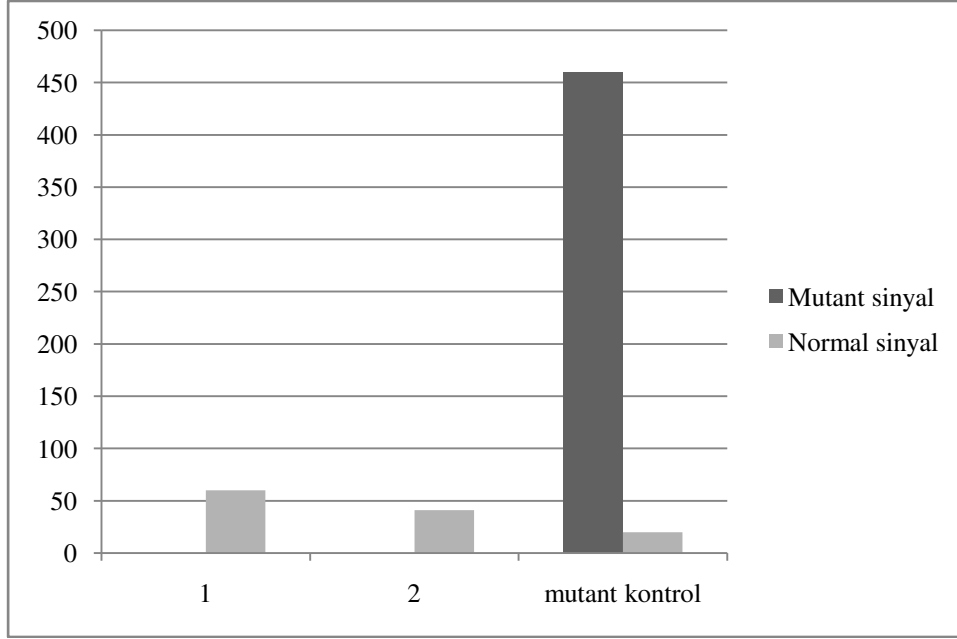
Örnek	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
1	0	87	Sonsuz	Normal/Normal
2	0	59	Sonsuz	Normal/Normal
Mutant kontrol	527	41	12,85/1	Mutant/Mutant



Şekil 4.10: 29°C’de alınan sinyallerin grafiği

Çizelge 4.11: 30°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi

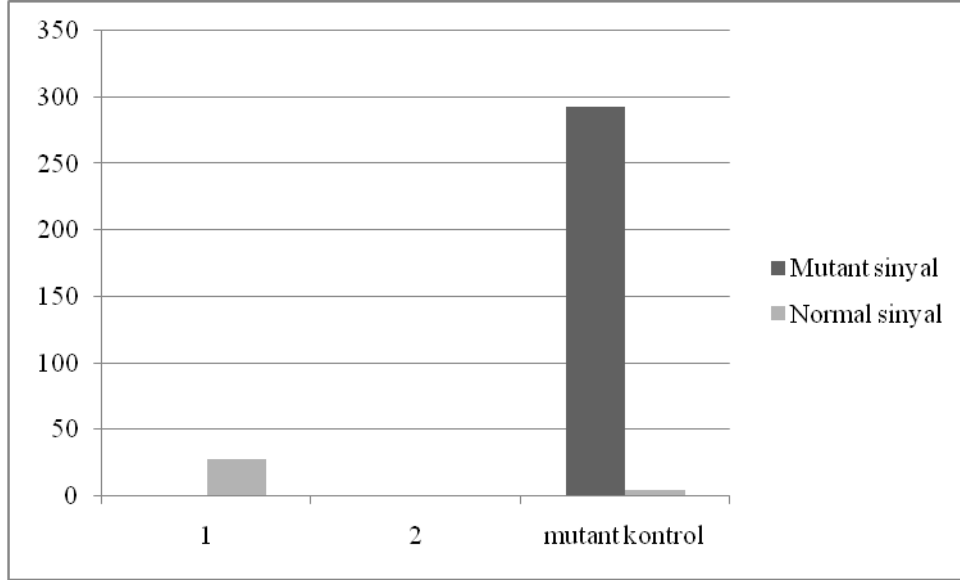
Örnek	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
1	0	60	Sonsuz	Normal/Normal
2	0	41	Sonsuz	Normal/Normal
Mutant kontrol	460	20	23:1	Mutant/Mutant



Şekil 4.11: 30°C’de alınan sinyallerin grafiği

Çizelge 4.12: 31°C'de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi

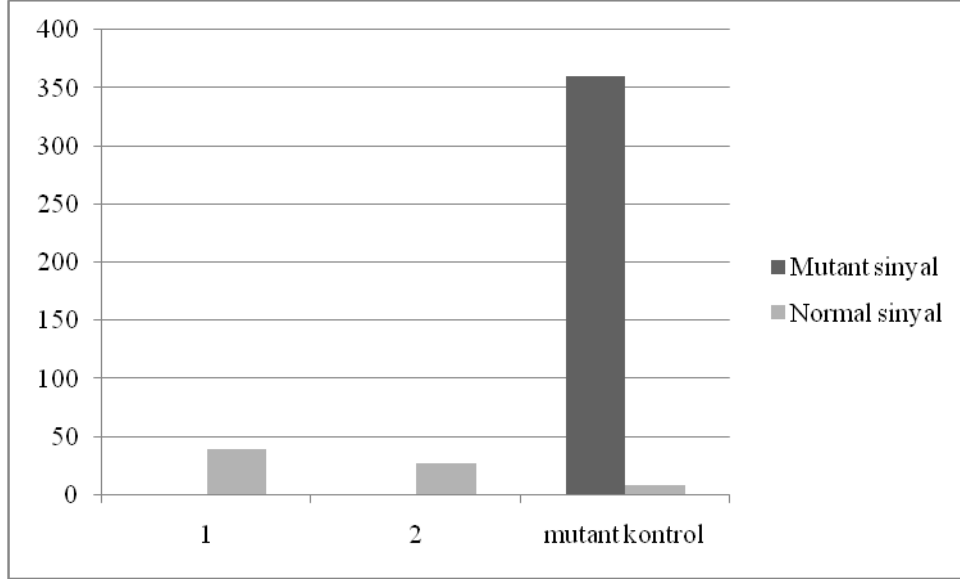
Örnek	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
1	0	27	Sonsuz	Normal/Normal
2	0	0	0	-
Mutant kontrol	293	4	73,25:1	Mutant/Mutant



Şekil 4.12: 31°C'de alınan sinyallerin grafiği

Çizelge 4.13: 32°C’de alınan sinyallerin sayısal değerleri, oranları ve genotipi

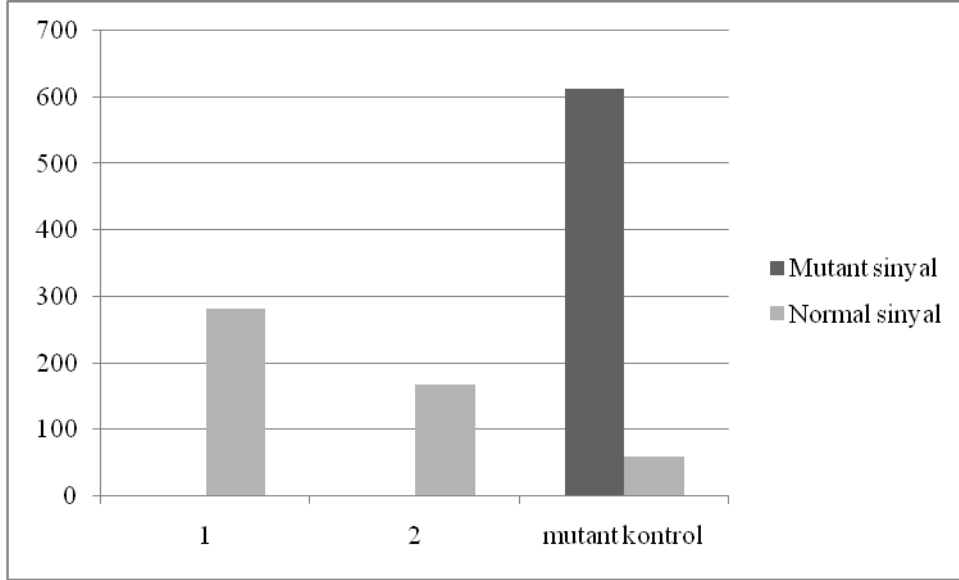
Örnek	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
1	0	39	Sonsuz	Normal/Normal
2	0	27	Sonsuz	Normal/Normal
Mutant kontrol	360	8	45:1	Mutant/Mutant



Şekil 4.13: 32°C’de alınan sinyallerin grafiği

Çizelge 4.14: Hb J Antakya için standart protokole göre okutma sonuçları

Örnek	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
1	0	281	Sonsuz	Normal/Normal
2	0	166	Sonsuz	Normal/Normal
Mutant kontrol	612	58	10,55:1	Mutant/Mutant



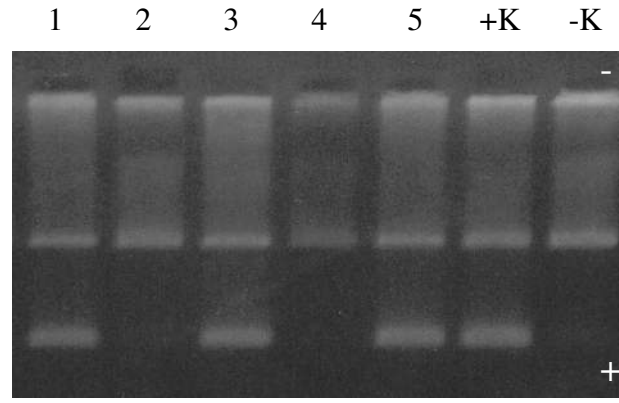
Şekil 4.14: Hb J Antakya için standart protokolde elde edilen sinyallerin bar grafiği.

Her bir mutasyon için ayrı ayrı yapılan bu çalışma sonucu elde edilen ayırım sıcaklıkları ve buna göre belirlenen okuma protokolleri Çizelge 4.15’de verilmiştir.

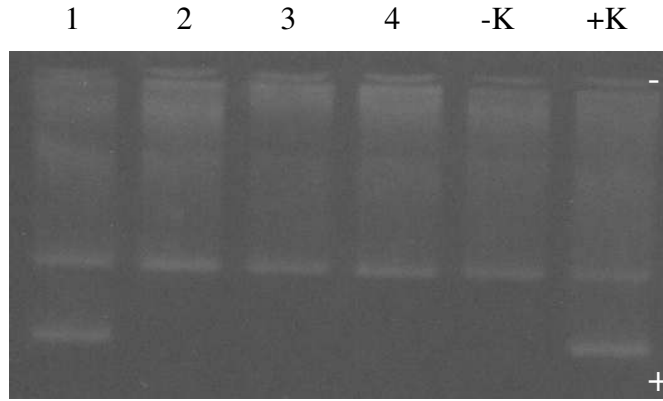
Çizelge 4.15: Mutasyonların ayırım sıcaklıkları ve okuma yöntemleri.

Mutasyon	Ayırım Sıcaklığı °C	Okuma Yöntemi
IVS I-110	34	56 °C-60s-40 °C-30s-37 °C-30s-35 °C-30s-34 °C-60s-HSWx5-28 °C-Scan-LSW-HSW-24 °C-Scan
Cd 44	48	56 °C-60s-54 °C-30s-51 °C-30s-49 °C-30s-48 °C-60s-HSWx5-24 °C-Scan
Cd 39	36	56 °C-60s-42 °C-30s-39 °C-30s-37 °C-30s-36 °C-60s-HSWx5-24 °C-Scan
IVS I-130(C,A)	38	56 °C-60s-44 °C-30s-41 °C-30s-39 °C-30s-38 °C-60s-HSWx5-32 °C-Scan-LSW-HSW-24 °C-Scan
IVS I-1	24	56 °C-60s-30 °C-30s-27 °C-30s-25 °C-30s-24 °C-60s-HSWx5-Scan-LSW-HSW-24 °C-Scan
IVS I-5 (C,A)	42	56 °C-60s-48 °C-30s-45 °C-30s-43 °C-30s-42 °C-60s-HSWx5-24 °C-Scan
IVS I-6	42	56 °C-60s-48 °C-30s-45 °C-30s-43 °C-30s-42 °C-60s-HSWx5-24 °C-Scan
IVS II-1	39	56 °C-60s-45 °C-30s-42 °C-30s-40 °C-30s-39 °C-60s-HSWx5-24 °C-Scan
Cd 74/75	34	56 °C-60s-40 °C-30s-37 °C-30s-35 °C-30s-34 °C-60s-HSWx5-24 °C-Scan
IVS II-745	42	56 °C-60s-48 °C-30s-45 °C-30s-43 °C-30s-42 °C-60s-HSWx5-36 °C-Scan-LSW-HSW-24 °C-Scan
IVS II-848/849	33	56 °C-60s-39 °C-30s-36 °C-30s-34 °C-30s-33 °C-60s-HSWx5-24 °C-Scan
-87	42	56 °C-60s-48 °C-30s-45 °C-30s-43 °C-30s-42 °C-60s-HSWx5-24 °C-Scan
Cd8	33	56 °C-60s-39 °C-30s-36 °C-30s-34 °C-30s-33 °C-60s-HSWx5-24 °C-Scan
Cd8/9	30	56 °C-60s-36 °C-30s-33 °C-30s-31 °C-30s-30 °C-60s-HSWx5-24 °C-Scan-LSW-HSW-24 °C-Scan
-30	34	56 °C-60s-40 °C-30s-37 °C-30s-35 °C-30s-34 °C-60s-HSWx5-24 °C-Scan
Cd5	34	56 °C-60s-40 °C-30s-37 °C-30s-35 °C-30s-34 °C-60s-HSWx5-28 °C –Scan-LSW-HSW-24 °C-Scan
HbS	34	56 °C-60s-40 °C-30s-37 °C-30s-35 °C-30s-34 °C-60s-HSWx5-28 °C –Scan-LSW-HSW-24 °C-Scan
HbC	34	56 °C-60s-40 °C-30s-37 °C-30s-35 °C-30s-34 °C-60s-HSWx5-28 °C –Scan-LSW-HSW-24 °C-Scan
HbD Los Angeles	30	56 °C-60s-36 °C-30s-33 °C-30s-31 °C-30s-30 °C-60s-HSWx5-24 °C-Scan
HbO-Arab	30	56 °C-60s-36 °C-30s-33 °C-30s-31 °C-30s-30 °C-60s-HSWx5-24 °C-Scan
HbBeograd	30	56 °C-60s-36 °C-30s-33 °C-30s-31 °C-30s-30 °C-60s-HSWx5-24 °C-Scan
HbG Coughatta	34	56 °C-60s-40 °C-30s-37 °C-30s-35 °C-30s-34 °C-60s-HSWx5-28 °C -Scan-LSW-HSW-24 °C-Scan
HbD İran	34	56 °C-60s-40 °C-30s-37 °C-30s-35 °C-30s-34 °C-60s-HSWx5-28 °C -Scan-LSW-HSW-24 °C-Scan
HbE Saskatoon	34	56 °C-60s-40 °C-30s-37 °C-30s-35 °C-30s-34 °C-60s-HSWx5-28 °C -Scan-LSW-HSW-24 °C-Scan
HbJ Antakya	32	56 °C-60s-38 °C-30s-35 °C-30s-33 °C-30s-32 °C-60s-HSWx5-24 °C-Scan
Hb Hamadan	24	56 °C-60s-30 °C-30s-39 °C-30s-37 °C-30s-36 °C-60s-HSWx5-24 °C-Scan

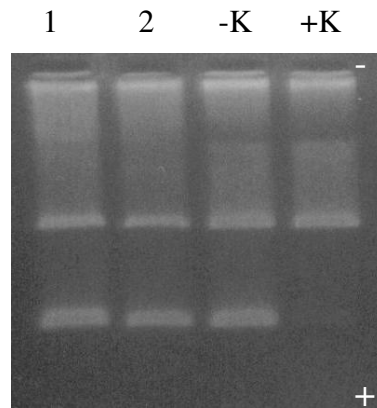
Hematolojik verileri ve hemoglobin tiplendirmesi talasemi ya da anormal hemoglobin taşıyıcılığını gösteren olguların tüm aile bireylerinin de mutasyon taraması yapılmıştır. β talasemi için IVS I-110 (G→A), IVS I-1 (G→A), Cd 39 (C→T), Cd 8(-AA), IVS II-1 (G→A), IVS I-6 (T→C), IVS II-745 (C→G), -30 (T→A), IVS I-5 (G→A), Cd 8/9 (+G), Cd 44 (-C), -101 (C→T), -87 (C→G), Cap+1 (A→C), Cd 6 (-A), IVS I-25bç del (-GGTCTATTTTCCCACCCTTAGGCTG), Cd 41/42 (-TTCT), α talasemi için $\alpha^{3,7}$, $\alpha^{20,5}$ ve MED I mutasyonları ARMS yöntemi, β talasemi için Cd 5 (-CT), IVS I-130 (G→C), Cd 74/75 (-C) mutasyonları RFLP ve anormal hemoglobinlerden Hb S (A→T) mutasyonu ARMS ve RFLP, Hb D Los Angeles (G→C) mutasyonu RFLP yöntemleri ile taranmıştır. Tarama sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 4.15-25’de verilmiştir. Bunlara ek olarak IVS I-130 (G→A), IVS I-5 (G→C), IVS II-848 (C→A) ve IVS II-849 (A→G), Hb J Antakya (A→T), Hb O Arab (G→A), Hb Beograd (A→T), Hb G Coughatta (A→C), Hb E Saskatoon (G→A), Hb D İran (G→C), Hb C (G→A) ve Hb Hamadan (G→C) mutasyonları mikroarray yöntemiyle taranmıştır. Toplam 164 olgunun 84’ünde β talasemi mutasyonu taşıyıcılığı, 1’inde $\alpha^{3,7}$ talasemi mutasyonu taşıyıcılığı ve 1’inde Hb S mutasyonu taşıyıcılığı belirlenmiştir. Mutasyon taraması yapılan olgulardan 3 tanesi IVS I-110/IVS I-110 homozigot mutant, 3 tanesi IVS II-745/IVS I-110 ve 1 tanesi de D/IVS I-110 çift heterozigot olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.16). β talasemi taşıyıcılığı belirlenen olguların %74’ü IVS I-110, %9’u Cd 8, %5’i Cd 39, %4’ü Cd 5, %4’ü IVS I-1, %2’si IVS II-745, %1’i Cd 44, %1’i -87 mutasyonu taşıyıcısı olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.17). Hb S ve Hb D mutasyonu taşıdıkları belirlenen olgulara ait HPLC görüntüleri Şekil 4.26 ve 27’de verilmiştir.



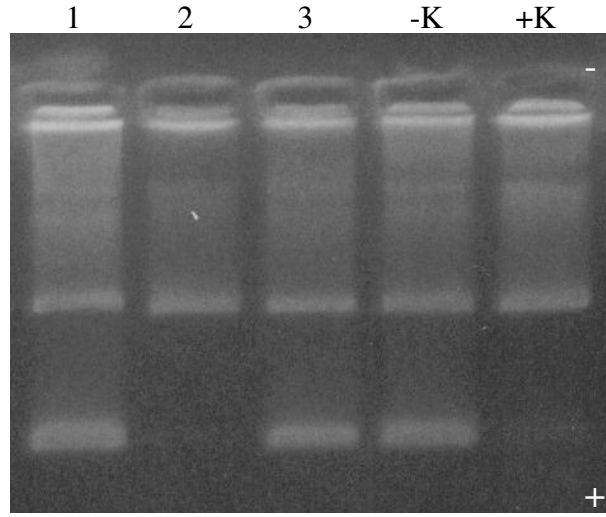
Şekil 4.15: ARMS ile IVS I-110 mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü.



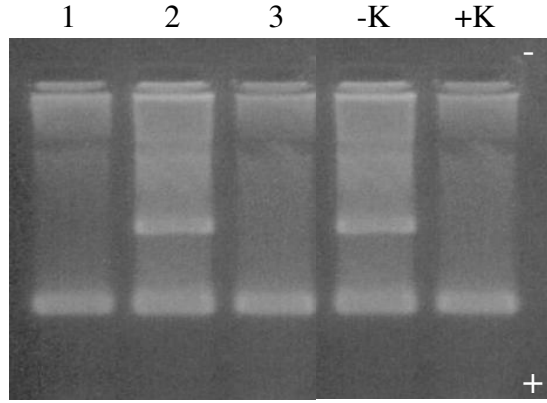
Şekil 4.16: ARMS ile Cd 8 mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü.



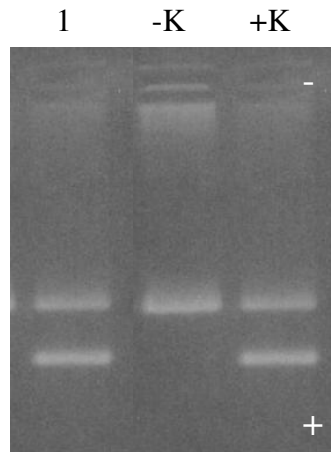
Şekil 4.17: ARMS ile Cd 39 mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü.



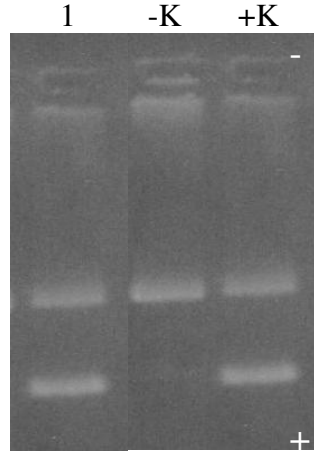
Şekil 4.18: ARMS ile IVS I-1 mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü.



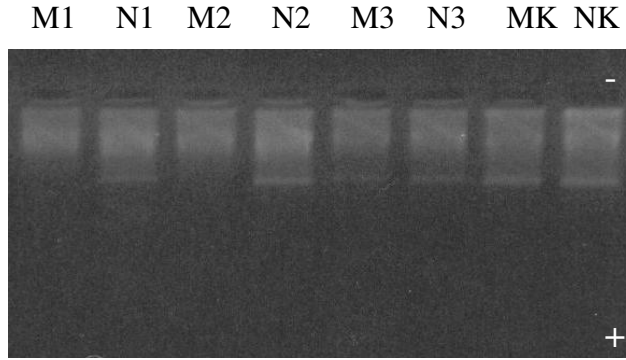
Şekil 4.19: ARMS ile IVS II-745 mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü.



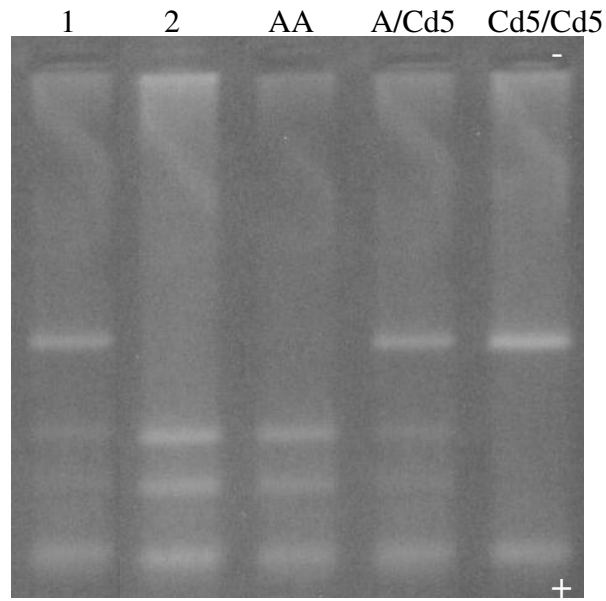
Şekil 4.20: ARMS ile Cd 44 mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü.



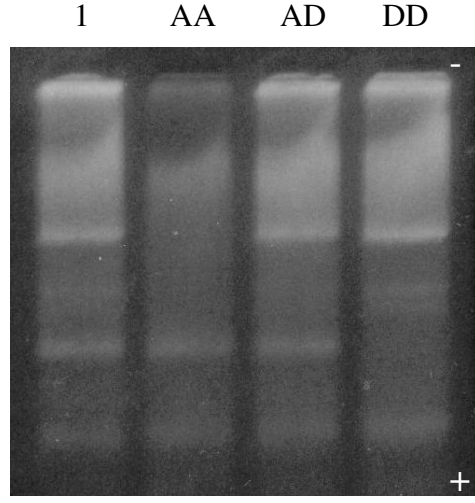
Şekil 4.21: ARMS ile -87 mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü.



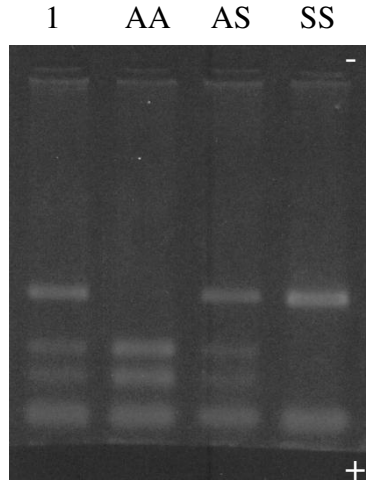
Şekil 4.22: PCR temelinde $\alpha^{-3,7}$ mutasyonu için agaroz jel görüntüsü.



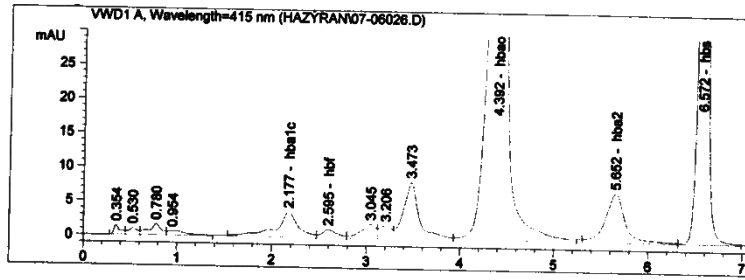
Şekil 4.23: RFLP ile Cd 5 mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü.



Şekil 4.24: RFLP ile Hb D mutasyonu için agaroz jel görüntüsü.



Şekil 4.25: RFLP ile Hb S mutasyonu için agaroz jel görüntüsü.



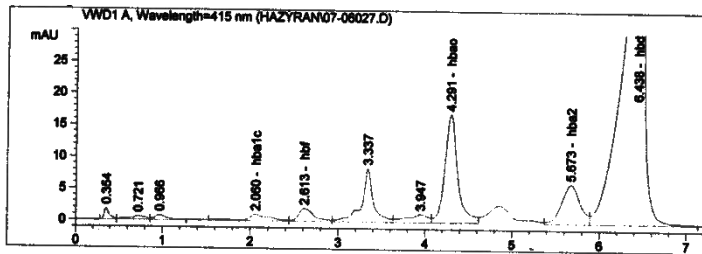
Area Percent Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 07.06.2005 15:47:32
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=415 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %	Name
1	0.354	BV	0.0709	6.64018	0.2690	?
2	0.530	VV	0.0949	6.73147	0.2727	?
3	0.780	VV	0.1261	15.06343	0.6102	?
4	0.954	VB	0.1880	9.69889	0.3929	?
5	2.177	BV	0.2323	61.58121	2.4947	hba1c
6	2.595	VV	0.1556	13.63035	0.5522	hbf
7	3.045	VV	0.1449	22.66596	0.9182	?
8	3.206	VV	0.1348	17.41172	0.7054	?
9	3.473	VV	0.1686	99.55063	4.0328	?
10	4.392	VB	0.1655	1205.88037	48.8508	hbao
11	5.000		0.0000	0.00000	0.0000	hbe
12	5.652	BV	0.2198	108.57476	4.3984	hba2
13	6.150		0.0000	0.00000	0.0000	hbd
14	6.572	VB	0.0696	901.06885	36.5027	hbs
15	7.600		0.0000	0.00000	0.0000	hbc

Şekil 4.26: Hb S belirlenen olgunun HPLC görüntüsü.



Area Percent Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 07.06.2005 15:50:13
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=415 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %	Name
1	0.354	PV	0.0607	6.99006	0.3818	?
2	0.721	VV	0.1622	7.37711	0.4029	?
3	0.966	VB	0.1550	8.12313	0.4437	?
4	2.060	BV	0.2539	19.52816	1.0666	hba1c
5	2.613	VV	0.1902	24.90624	1.3604	hbf
6	3.337	VV	0.1349	80.42339	4.3928	?
7	3.947	VV	0.2349	22.27415	1.2166	?
8	4.291	VV	0.1567	177.45059	9.6925	hbao
9	5.000		0.0000	0.00000	0.0000	hbe
10	5.673	VV	0.2247	91.62554	5.0047	hba2
11	6.438	VB	0.1240	1392.10583	76.0379	hbd
12	6.850		0.0000	0.00000	0.0000	hbs
13	7.600		0.0000	0.00000	0.0000	hbc

Şekil 4.27: Hb D Los Angeles belirlenen olgunun HPLC görüntüsü.

Çizelge 4.16: Olguların moleküler analiz sonuçları.

No	Olgu	Yaş	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	Elek	HbA ₂ %	Hb F %	Talasemi Mutasyonu
Konya örnekleri											
2	A.Ü.	30	5,73	11,7	38,7	67,5	20,3	AA	5,1	2,6	IVSI-110
3	A.A.	25	5,66	11,0	36,6	64,7	19,4	AA	4,6	2,5	IVSI-110
10	Ç.N.	56	6,08	11,4	38,5	63,3	18,8	AA	4,8	0,9	20 β mutasyonu yok
13	Ç.Ö.	21	5,49	11,6	38,1	69,3	21,1	AA	4,7	1,6	IVSI-110
16	D.S.	19	4,58	10,0	33,2	72,4	21,9	AA	1,8	1,5	3 α mutasyonu yok
19	D.S.	28	4,82	10,6	35,3	73,2	22,0	AA	4,6	1,9	IVSI-110
20	D.C.	27	6,11	11,8	40,0	65,4	19,3	AA	6,1	1,7	Cd 8
26	E.D.	45	4,87	15,6	48,2	98,8	32,0	AA	2,7	2,0	IVSI-110 yok
27	E.M.	6	5,29	10,1	34,1	64,4	19,0	AA	4,3	3,8	IVSI-110
28	E.Ş.	17	5,84	12,5	40,6	69,4	21,5	AA	4,5	2,5	IVSI-110
29	E.Ü.	45	5,02	9,2	32,4	64,7	18,5	AA	4,7	2,1	IVSI-110
30	F.Z.	26	5,80	11,4	38,9	67,2	19,7	AA	4,3	1,7	IVSI-110
31	G.A.	39	4,32	9,2	31,5	72,9	21,3	AA	1,1	0,8	3 α mutasyonu yok
34	K.G.	34	4,90	12,6	37,7	77,0	25,8	AA	2,0	1,0	3 α mutasyonu yok
35	K.M.	23	4,09	11,6	34,2	83,6	28,4	AA	4,5	2,1	IVSI-110
38	K.Z.	35	5,03	10,0	31,9	63,4	20,0	AA	2,6	1,0	3 α mutasyonu yok
40	K.A.C.	11	4,58	12,4	38,8	84,6	27,0	AA	3,0	1,7	IVSI-110 yok
41	K.H.	36	5,97	13,1	44,6	74,7	21,9	AA	4,2	3,5	IVSI-110
42	K.N.	16	4,86	14,1	44,0	90,5	29,1	AA	3,2	1,8	IVSI-110 yok
43	K.Ş.	12	4,48	12,6	39,6	88,6	28,1	AA	3,2	2,2	IVSI-110 yok
44	K.Ş.	37	5,64	12,0	40,3	71,4	21,3	AA	4,8	2,0	IVSI-110
45	K.U.	20	4,99	14,9	46,0	92,1	29,8	AA	2,8	2,0	IVSI-110 yok
46	K.Y.	18	5,18	15,0	46,1	89,0	28,9	AA	2,3	1,7	IVSI-110 yok
47	K.Y.E.	13	4,35	13,3	41,1	94,4	30,5	AA	2,4	2,3	IVSI-110 yok
54	K.Z.	30	2,47	5,5	23,0	93,4	22,1	AA	2,7	1,9	20 β mutasyonu yok
57	K.S.	18	4,46	10,3	35,1	78,6	23,2	AA	2,4	1,7	3 α mutasyonu yok
60	O.Ç.H.	24	5,00	10,3	35,4	70,9	20,6	AA	4,4	1,9	IVSI-110
61	Ö.M.S.	8	5,76	12,2	40,6	70,4	21,3	AA	6,1	2,3	-87
62	Ö.S.	41	4,34	13,2	40,6	93,6	30,3	AA	2,7	1,9	-87 yok
64	Ö.O.	12	6,91	12,2	42,3	61,2	17,7	AA	2,3	2,3	IVSI-110
65	Ö.V.	37	5,98	11,2	38,8	64,9	18,8	AA	2,0	2,3	IVSI-110
69	Ş.Ö.A.	24	5,37	10,7	36,4	67,8	20,0	AA	4,4	4,0	20 β mutasyonu yok
73	U.A.N.	3	5,43	9,7	33,7	62,1	17,9	AA	4,7	5,8	Cd 5

No	Olgu	Yaş	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	Elek	HbA ₂ %	Hb F %	Talasemi Mutasyonu
74	U.S.Z.	8	6,05	11,5	39,4	65,2	19,0	AA	4,6	2,3	Cd 5
81	Y.A.	29	5,16	12,2	40,2	77,9	23,7	AA	1,5	1,7	$\alpha^{-3.7}$
82	Y.N.	21	5,61	11,0	37,8	67,3	19,7	AA	5,3	2,5	IVSI-110
84	Y.E.	38	5,36	10,3	35,7	66,5	19,3	AA	3,6	2,1	IVSI-110
89	Y.M.	7	5,01	13,5	42,2	84,1	26,9	AA	1,6	0,3	3 α mutasyonu yok
90	B.A.	44	6,65	14,8	51,4	77,4	22,3	AA	4,6	0,2	IVSI-110
91	B.A.	33	5,22	13,9	48,5	92,9	26,6	AA	2,6	1,5	IVSI-110 yok
92	B.F.	51	6,15	13,6	45,9	74,6	22,1	AA	4,9	1,2	IVSI-110
93	B.M.	26	5,71	14,7	49,3	86,3	25,7	AA	3,1	0,4	IVSI-110 yok
94	B.M.	28	7,00	14,2	47,4	67,7	20,2	AA	5,2	0,4	IVSI-110
95	B.N.	24	4,60	14,0	43,9	95,6	30,4	AA	3,0	0,5	IVSI-110 yok
96	B.N.	40	6,12	12,5	43,8	71,6	20,4	AA	5,3	0,8	IVSI-110
97	B.Y.	20	4,65	12,2	38,9	83,6	26,2	AA	2,6	4,4	IVSI-110/IVSI-110
98	G.İ.	16	5,62	11,8	40,9	72,8	21,1	AA	5,5	1,2	IVSI-110
99	G.K.	30	6,16	12,6	44,5	72,3	20,5	AA	6,0	1,5	IVSI-110
101	Ö.E.	33	5,44	11,2	37,8	69,5	20,5	AA	5,4	0,5	IVSI-110
102	Ö.H.	26	3,58	10,7	35,2	98,3	29,8	AA	3,1	1,2	IVSI-110 yok
103	Ö.K.	4	4,74	12,8	39,3	82,9	27,1	AA	3,2	1,2	IVSI-110 yok
104	Ö.M.	14	4,47	13,0	43,8	97,9	29,1	AA	3,4	1,7	IVSI-110/IVSI-110
105	Ö.V.	12	4,78	13,5	44,3	92,7	28,3	AA	3,3	0,9	IVSI-110 yok
106	Ö.V.	5	5,49	10,3	35,1	64,0	18,9	AA	5,5	1,9	IVSI-110
107	Ö.H.	39	3,23	6,7	20,8	64,3	20,8	AA	1,8	0,8	3 α mutasyonu yok
İlgın örnekleri											
110	A.Ö.F.	13	5,29	13,7	42,0	79,5	25,9	AA	2,6	2,0	IVSI-110 yok
111	A.T.	6	5,70	10,6	34,9	61,1	18,6	AA	5,7	0,8	IVSI-110
112	A.G.	20	5,13	10,7	34,6	67,5	20,9	AA	5,2	0,4	IVSI-110
114	A.H.	24	5,13	11,1	35,7	69,5	21,6	AA	4,2	0,4	IVSI-110
119	A.Z.	43	5,70	11,9	38,8	68,0	20,8	AA	5,3	0	IVSI-110
122	Ç.F.	18	5,28	10,6	34,1	64,5	20,1	AA	5,4	1,3	IVSI-110
124	Ç.A.	2	6,02	10,2	34,9	58,0	17,0	AA	1,8	0,5	3 α mutasyonu yok, Cd 39 yok
125	Ç.K.	36	4,50	13,5	40,5	90,0	30,1	AA	2,8	1,1	Cd 39 yok
126	Ç.M.	40	6,81	13,1	43,0	63,2	19,3	AA	6,6	0,8	Cd 39
127	Ç.Ş.	14	5,92	11,5	37,3	62,9	19,4	AA	5,7	2,5	Cd 39
130	E.A.	24	6,00	11,9	38,5	64,2	19,9	AA	5,8	0,9	IVSI-110
132	E.G.	29	5,12	10,6	35,1	68,6	20,7	AA	3,8	0,5	IVSII-745

No	Olgu	Yaş	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	Elek	HbA ₂ %	Hb F %	Talasemi Mutasyonu
133	E.S.	13	3,25	9,3	27,9	86,0	28,7	AA	2,3	0	II-745/I-110
134	E.S.	10	5,46	10,6	34,2	62,7	19,4	AA	4,9	0,4	IVSII-745
135	E.S.	15	3,40	9,8	29,4	86,6	29,0	AA	2,7	0,3	II-745/I-110
136	E.S.	5	4,05	11,2	33,8	83,4	27,8	AA	2,4	0	II-745/I-110
141	E.Ş.	37	4,86	11,2	36,3	74,8	23,1	AA	2,9	0,4	3 α mutasyonu yok
145	K.C.	21	5,47	11,0	36,0	65,8	20,2	AA	5,2	0,4	IVSI-110
146	K.M.	28	6,48	13,1	43,2	66,6	20,2	AA	5,1	0,8	IVSI-110
148	K.D.	28	4,90	14,1	42,7	87,3	28,8	AA	2,1	0	3 α mutasyonu yok
151	O.F.	41	5,42	11,7	39,2	72,4	21,6	AA	2,1	0	3 α mutasyonu yok
153	Ö.G.	21	7,10	15,0	49,2	69,3	21,2	AA	5,0	0	IVSI-110
155	Ö.K.	56	5,20	10,6	35,1	67,5	20,4	AA	4,7	2,1	IVSI-110
159	S.M.	17	6,24	11,5	38,3	61,4	18,5	AA	5,4	0,7	Cd 39
160	Ş.E.	50	5,73	11,7	38,5	67,3	20,4	AA	5,4	1,2	IVSI-110
164	T.E.	16	5,05	14,9	44,5	88,1	29,4	AA	3,0	1,4	Cd 8 yok
165	T.H.	18	5,44	11,3	37,0	68,0	20,7	AA	5,2	1,8	Cd 8
166	T.M.	52	6,62	13,9	44,8	67,7	21,0	AA	6,4	2,3	Cd8
167	T.N.	19	6,09	12,1	39,8	65,3	19,8	AA	5,0	1,6	Cd 8
168	V.F.	35	4,71	12,1	38,2	81,1	25,7	AA	3,6	1,5	Cd 8 yok
169	V.K.	15	7,00	12,9	42,8	61,2	18,4	AA	6,5	1,5	Cd8
170	V.N.	9	5,68	10,6	35,0	61,6	18,6	AA	5,9	1,7	Cd 8
171	V.Ş.	13	5,01	13,5	40,7	81,2	27,0	AA	3,8	1,3	Cd 8 yok
172	Y.A.	37	6,02	12,4	40,2	66,8	20,5	AA	5,6	1,6	IVSI-110
Seydişehir örnekleri											
173	A.A.	19	7,16	14,0	48,2	67,3	19,6	AA	4,1	1,2	IVSI-110
174	A.A.	44	4,97	10,1	34,5	69,4	20,3	AA	4,3	1,1	IVSI-110
176	G.B.	3	5,44	9,7	32,6	59,9	17,9	AA	5,8	3,5	IVSI-1
177	G.E.	32	6,21	10,9	37,6	60,5	17,6	AA	4,6	1,1	IVSI-110
178	G.F.	49	6,02	11,3	38,7	64,3	18,7	AA	5,5	1,2	IVSI-1
179	G.H.	9	5,22	13,5	42,3	80,9	25,8	AA	2,3	0,9	IVSI-110 yok
180	G.M.	27	4,56	12,4	39,7	86,9	27,2	AA	2,7	0,9	IVSI-1 yok
181	H.A.	6	4,35	11,9	38,0	87,3	27,3	AA	2,3	0,9	IVSI-110 yok
182	H.A.	9	4,86	13,3	41,9	86,3	27,4	AA	3,0	1,0	IVSI-110 yok
183	H.A.	20	3,94	10,9	34,5	87,5	27,7	AA	2,8	1,4	IVSI-110/IVSI-110
184	H.D.A.	19	5,14	14,9	45,6	88,7	29,1	AA	2,4	1,1	IVSI-110 yok
185	H.E.	48	4,47	9,4	32,8	73,4	21,1	AA	4,1	3,2	IVSI-110

No	Olgu	Yaş	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	Elek	HbA ₂ %	Hb F %	Talasemi Mutasyonu
186	H.H.	37	4,70	12,7	39,6	84,3	27,0	AA	3,1	1,3	IVSI-110 yok
187	H.H.	35	5,45	10,5	37,2	68,3	19,3	AA	1,9	1,8	3 α mutasyonu yok, IVSI-110 yok
188	H.M.	41	5,60	13,2	51,2	91,4	23,6	AA	3,0	1,1	IVSI-110 yok
189	H.M.	44	5,10	14,6	48,8	95,7	28,7	AA	1,9	1,5	3 α mutasyonu yok, IVSI-110 yok
190	H.R.	8	4,77	13,1	42,5	89,1	27,5	AA	3,2	1,5	IVSI-110 yok
191	H.R.	12	4,5	11,9	35,6	79,0	26,4	AA	1,8	1,1	3 α mutasyonu yok, IVSI-110 yok
192	H.S.	6	4,86	12,0	36,5	75,1	24,7	AA	2,6	0,8	3 α mutasyonu yok, IVSI-110 yok
193	H.Ü.	4	4,58	13,5	41,0	89,6	29,5	AA	1,8	1,4	3 α mutasyonu yok, IVSI-110 yok
194	H.Ü.	39	6,24	11,9	38,6	61,8	19,2	AA	2,6	1,4	3 α mutasyonu yok, IVSI-110 yok
195	H.Y.	46	4,73	13,7	42,4	89,7	28,9	AA	4,4	1,1	IVSI-110
196	H.Z.	40	4,33	12,3	37,1	85,7	28,5	AA	1,8	1,0	IVSI-110 yok
197	K.A.	27	5,15	13,5	41,0	79,7	26,2	AA	4,0	1,3	IVSI-110
198	K.G.	8	4,79	12,7	38,0	79,3	26,5	AA	2,2	1,3	IVSI-110 yok
199	K.S.	9	4,37	11,6	35,8	81,8	26,6	AA	2,2	1,3	IVSI-110 yok
200	K.İ.	51	4,55	13,1	40,3	88,4	28,7	AA	2,7	1,1	IVSI-110 yok
201	K.M.	19	5,52	12,2	40,3	73,0	22,1	AA	2,5	1,4	3 α mutasyonu yok, IVSI-110 yok
202	K.N.	49	4,73	10,3	33,2	70,3	21,9	AA	4,8	1,0	IVSI-110
203	Ö.E.	5	6,39	11,7	39,0	61,1	18,4	AA	4,8	1,2	IVSI-110
204	Ö.R.	4	5,44	13,9	43,0	79,2	25,7	AA	3,1	0,6	IVSI-110 yok
205	S.E.	4	5,81	10,8	34,7	59,8	18,6	AA	4,8	1,7	IVSI-110
206	S.H.	28	4,70	13,2	40,0	85,2	28,2	AA	2,3	0,9	IVSI-110 yok
207	S.O.	6	4,54	10,8	34,5	75,6	23,7	AA	2,4	1,4	3 α mutasyonu yok, IVSI-110 yok
208	S.R.	57	5,11	10,2	33,5	65,6	19,9	AA	4,2	2,3	IVSI-110
211	S.A.	26	6,22	12,5	40,8	65,7	20,1	AA	5,4	2,0	Cd 39
212	T.Ç.	37	5,53	11,2	36,3	65,7	20,3	AA	4,9	2,4	Cd 8
213	T.K.	10	5,53	11,1	36,6	66,1	20,1	AA	4,2	5,2	Cd 8
214	U.D.	18	4,96	11,4	36,8	74,2	22,9	AA	2,2	1,4	3 α mutasyonu yok, IVSI-110 yok
215	U.İ.	54	5,46	15,8	47,7	87,3	29,0	AA	2,5	1,2	IVSI-110 yok
216	U.M.	49	6,49	13,2	42,8	66,0	20,4	AA	5,5	1,7	IVSI-110
217	U.M.	22	7,54	14,4	47,6	63,1	19,2	AA	5,1	1,2	IVSI-110
218	U.S.	45	4,78	13,4	41,9	87,7	28,0	AA	2,7	1,0	IVSI-110 yok
221	U.H.	45	4,30	7,8	27,3	63,4	18,2	AA	2,3	2,2	3 α mutasyonu yok
222	U.E.	8	4,34	12,0	35,8	82,5	27,6	AA	2,6	1,2	Cd 5 yok
223	U.H.	37	4,85	10,1	33,3	68,8	20,8	AA	2,3	1,1	3 α mutasyonu yok, Cd 5 yok
224	U.M.	5	5,21	9,4	31,2	59,8	18,0	AA	5,3	2,7	Cd 5

No	Olgu	Yaş	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	Elek	HbA ₂ %	Hb F %	Talasemi Mutasyonu
225	Ü.F.	23	5,01	12,7	39,7	79,3	25,3	AA	2,4	1,1	3 α mutasyonu yok
226	Ü.H.	25	5,17	12,5	39,5	76,4	24,1	AA	2,3	1,7	3 α mutasyonu yok, IVSI-110 yok
227	Ü.K.	2	5,13	12,3	38,0	74,1	24,0	AA	2,5	3,2	3 α mutasyonu yok, IVSI-110 yok
Akşehir örnekleri											
234	A.İ.	35	7,20	14,0	45,6	63,4	19,5	AA	5,6	1,6	Cd 44
236	A.F.	43	4,41	15,8	33,8	76,6	35,8	AA	3,5	0,7	IVSI-110 yok
237	A.M.	22	5,87	13,4	35,9	61,1	22,9	AA	4,4	1,5	IVSI-110
241	Ç.Ö.	20	5,05	12,7	30,4	60,1	25,1	AA	5,4	1,3	IVSI-110
243	Ç.A.	27	4,49	13,3	33,8	75,3	29,7	AA	2,6	1,8	3 α mutasyonu yok
245	Ç.M.	19	6,32	11,8	39,6	62,6	18,6	AA	6,0	1,5	IVSI-110
247	D.H.	17	6,03	11,7	38,9	64,5	19,3	AA	5,8	2,4	IVSI-110
248	E.M.A.	23	7,10	15,9	39,6	55,7	22,4	AA	4,6	1,6	IVSI-110
249	G.G.	5	4,86	11,7	30,2	62,2	24,1	AA	5,7	2,9	IVSI-110
250	G.H.	30	4,97	13,3	31,8	63,9	26,9	AA	4,6	13,5	IVSI-110
251	G.G.	41	5,43	13,0	34,6	63,8	23,9	AA	6,3	1,6	IVSI-110
252	H.M.	25	5,81	16,1	49,3	84,9	27,6	AS	3,2	1,9	AS
254	K.E.	47	5,76	11,7	38,0	66,1	20,3	DD	2,3	2,5	D/IVSI-110
256	Ö.F.	48	5,77	12,0	38,6	66,8	20,8	AA	6,0	1,3	IVSI-110
258	Ş.M.	29	4,61	11,4	35,8	77,5	24,8	AA	3,3	1,2	3 α mutasyonu yok
261	Ü.H.	31	6,51	15,9	50,4	77,4	24,4	AA	2,8	0,8	3 α mutasyonu yok
262	Y.Ö.	21	5,60	17,0	50,7	90,6	30,3	AH	1,9	1,3	3 α mutasyonu yok
263	Y.A.	53	5,98	12,4	40,1	67,0	20,6	AA	5,2	1,1	IVSI-110
Çumra örnekleri											
266	G.A.	24	5,93	11,3	38,4	64,8	19,1	AA	4,3	1,4	IVSI-110
268	K.G.	29	6,08	12,7	40,4	66,4	20,8	AA	2,8	0,8	3 α mutasyonu yok
269	K.H.	49	7,03	12,8	41,2	58,5	18,2	AA	2,5	1,5	3 α mutasyonu yok, IVSI-110 yok
270	K.M.	23	4,56	12,1	35,9	78,7	26,6	AA	5,0	1,3	IVSI-110
271	K.O.	11	4,25	12,5	38,0	89,3	29,6	AA	2,4	1,4	IVSI-110 yok
272	K.R.	28	5,77	11,3	36,7	63,7	19,5	AA	4,3	1,9	IVSI-1
273	Ö.A.	22	4,63	13,5	40,4	87,4	29,2	AA	4,8	3,2	IVSI-110
274	Ö.M.	25	6,34	11,7	38,8	61,2	18,5	AA	2,1	1,4	3 α mutasyonu yok
277	Y.Ş.	30	5,81	11,7	36,7	63,2	20,2	AA	3,4	2,7	IVSI-110

Çizelge 4.17: β Talasemi mutasyonu taşıyan olgu sayısı ve yüzdeleri.

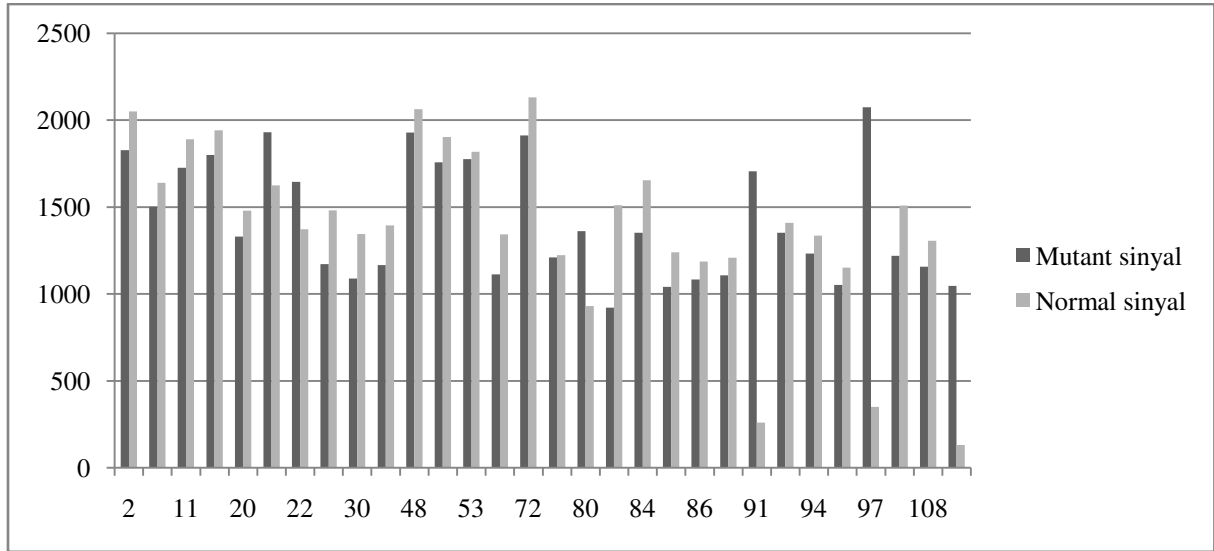
Mutasyon	Olgu sayısı	Yüzde
IVS I-110	69	74
Cd 8	8	9
Cd 39	4	5
Cd 5	3	4
IVS I-1	3	4
IVS II-745	2	2
Cd 44	1	1
-87	1	1

ARMS ve RFLP ile mutasyonu belirlenen tüm örneklerin analizi mikroarray yöntemiyle de çalışılmış ve sonuçların %100 doğruluk gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.18-4.27 ; Şekil 4.28-4.39).

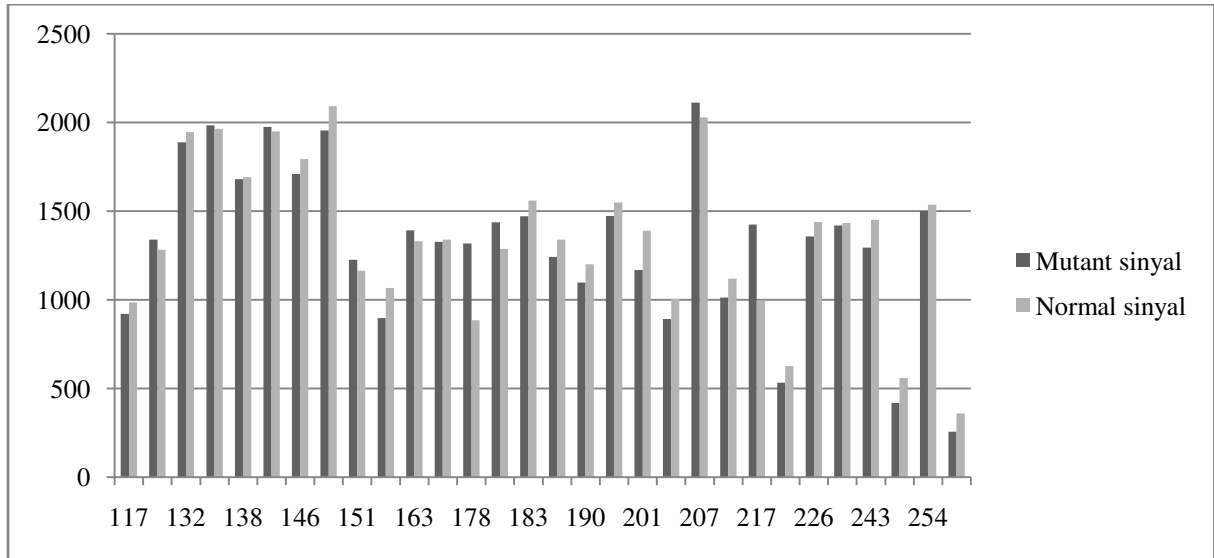
Çizelge 4.18: IVS I-110 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları

Örnek No	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
2	1827,49	2051	1:1,12	Mutant/Normal
3	1501,05	1639	1:1,09	Mutant/Normal
11	1726,81	1891	1:1,1	Mutant/Normal
15	1800,04	1942	1:1,08	Mutant/Normal
20	1330,2	1479	1:1,11	Mutant/Normal
21	1931,23	1625	1,19:1	Mutant/Normal
22	1644,44	1373	1,2:1	Mutant/Normal
23	1171,55	1482	1:1,26	Mutant/Normal
30	1089,17	1344	1:1,23	Mutant/Normal
33	1165,45	1395	1:1,2	Mutant/Normal
48	1928,17	2063	1:1,07	Mutant/Normal
52	1757,32	1903	1:1,08	Mutant/Normal
53	1775,63	1819	1:1,02	Mutant/Normal
70	1113,58	1343	1:1,21	Mutant/Normal
72	1912,92	2132	1:1,11	Mutant/Normal
78	1211,21	1223	1:1,01	Mutant/Normal
80	1360,71	930	1,46:1	Mutant/Normal
82	921,37	1511	1:1,64	Mutant/Normal
84	1351,55	1655	1:1,22	Mutant/Normal
85	1040,36	1239	1:1,19	Mutant/Normal
86	1083,07	1186	1:1,1	Mutant/Normal
88	1107,48	1208	1:1,09	Mutant/Normal
91	1705,95	259	6,59:1	Mutant/Mutant

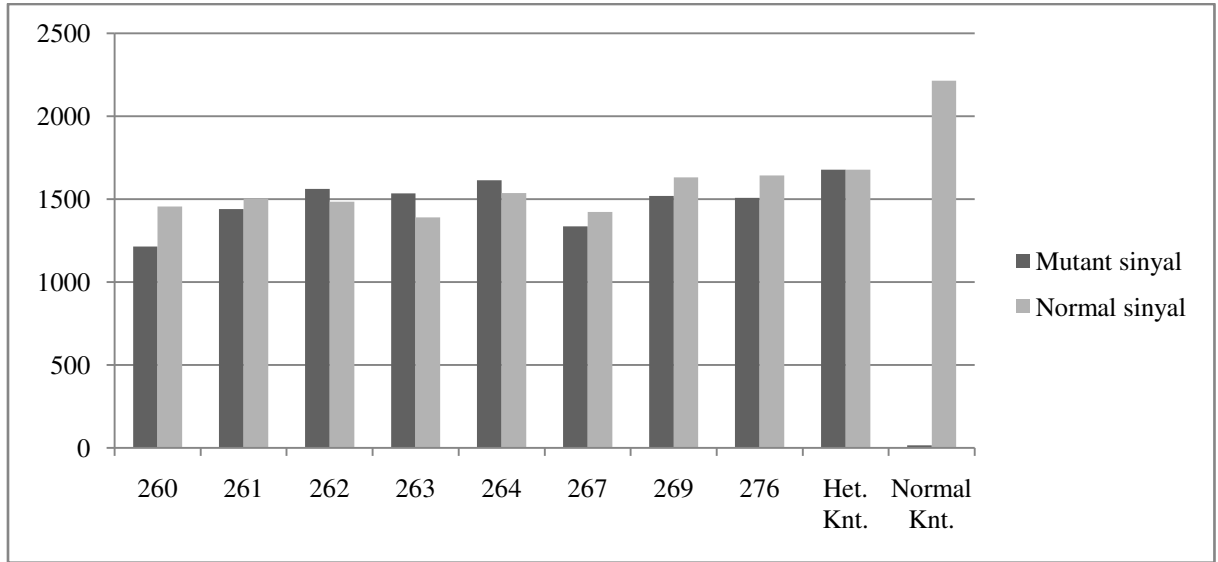
93	1351,55	1409	1:1,04	Mutant/Normal
94	1232,57	1336	1:1,08	Mutant/Normal
95	1052,56	1151	1:1,09	Mutant/Normal
97	2074,8	350	5,93:1	Mutant/Mutant
106	1220,36	1508	1:1,24	Mutant/Normal
108	1156,29	1306	1:1,13	Mutant/Normal
115	1046,27	130	8,05:1	Mutant/Mutant
117	921,37	985	1:1,07	Mutant/Normal
127	1339,35	1282	1,04:1	Mutant/Normal
132	1888,51	1946	1:1,03	Mutant/Normal
134	1983,09	1964	1,01:1	Mutant/Normal
138	1681,05	1692	1:1,01	Mutant/Normal
144	1973,94	1949	1,01:1	Mutant/Normal
146	1708,51	1795	1:1,05	Mutant/Normal
148	1955,63	2092	1:1,07	Mutant/Normal
151	1226,47	1165	1,05:1	Mutant/Normal
154	896,97	1067	1:1,19	Mutant/Normal
163	1391,21	1330	1,05:1	Mutant/Normal
164	1327,15	1339	1:1,01	Mutant/Normal
178	1317,99	885	1,49:1	Mutant/Normal
182	1436,98	1287	1,12:1	Mutant/Normal
183	1470,54	1559	1:1,06	Mutant/Normal
185	1241,72	1340	1:1,08	Mutant/Normal
190	1098,33	1200	1:1,09	Mutant/Normal
193	1473,59	1549	1:1,05	Mutant/Normal
201	1168,5	1390	1:1,19	Mutant/Normal
206	890,87	1006	1:1,13	Mutant/Normal
207	2111,23	2029	1,04:1	Mutant/Normal
216	1012,9	1120	1:1,11	Mutant/Normal
217	1424,77	996	1,43:1	Mutant/Normal
224	532	627	1:1,18	Mutant/Normal
226	1357,65	1438	1:1,06	Mutant/Normal
231	1418,67	1433	1:1,01	Mutant/Normal
243	1293,59	1451	1:1,12	Mutant/Normal
250	417,97	559	1:1,34	Mutant/Normal
254	1501,05	1537	1:1,34	Mutant/Normal
258	256,28	360	1:1,4	Mutant/Normal
260	1214,26	1455	1:1,2	Mutant/Normal
261	1440,03	1504	1:1,04	Mutant/Normal
262	1562,07	1484	1,05:1	Mutant/Normal
263	1534,61	1389	1,1:1	Mutant/Normal
264	1613,93	1536	1,05:1	Mutant/Normal
267	1336,3	1422	1:1,06	Mutant/Normal
269	1519,35	1631	1:1,07	Mutant/Normal
276	1507,15	1642	1:1,09	Mutant/Normal
Het. Knt.	1678	1678	1:1	Mutant/Normal
Normal Knt.	15,25	2214	1:145,14	Normal/Normal



Şekil 4.28: IVS I-110 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği – Kısım I



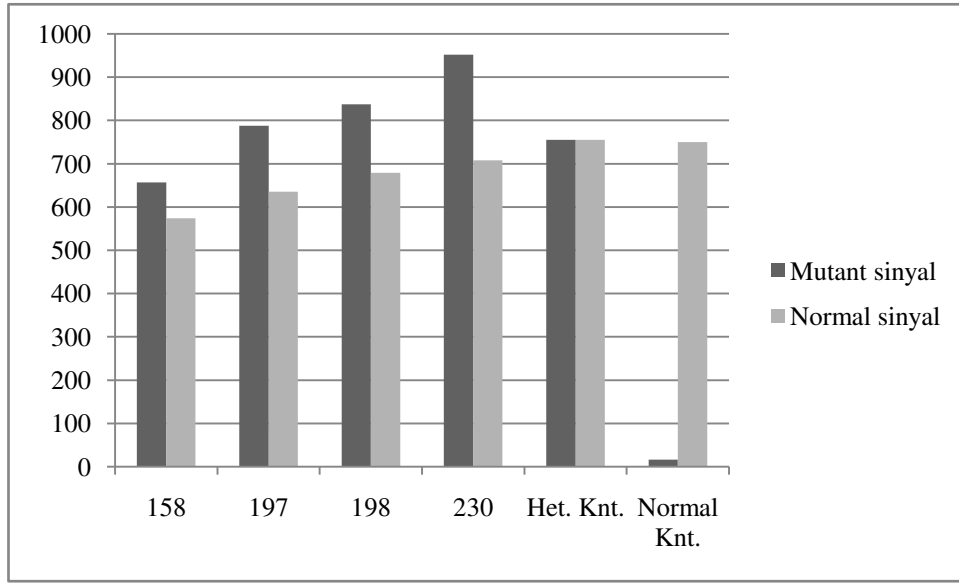
Şekil 4.29: IVS I-110 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği – Kısım II



Şekil 4.30: IVS I-110 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği – Kısım III

Çizelge 4.19: Cd 39 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları

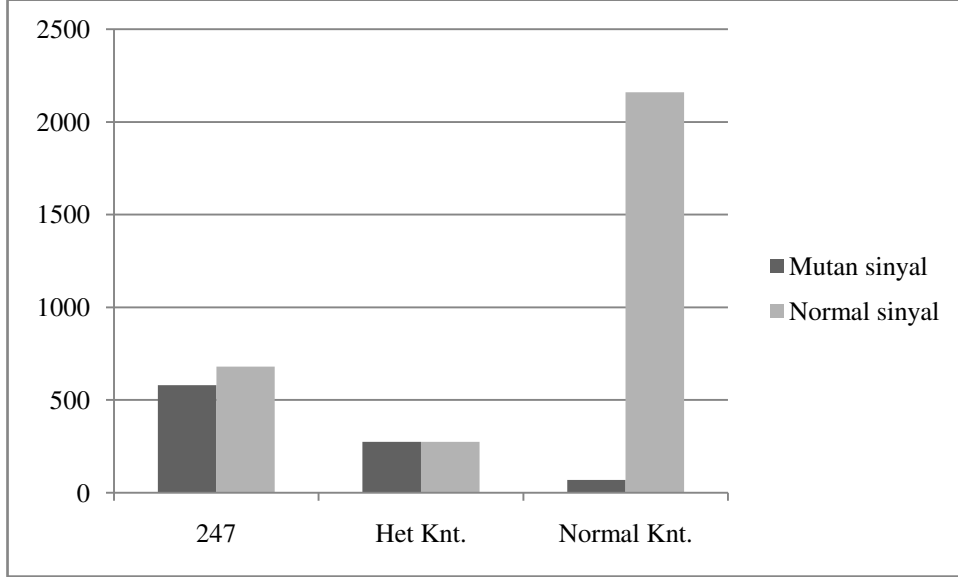
Örnek No	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
158	656,52	574	1,14:1	Mutant/Normal
197	787,83	635	1,24:1	Mutant/Normal
198	837,07	679	1,23:1	Mutant/Normal
230	951,96	708	1,34:1	Mutant/Normal
Het. Knt.	755	755	1:1	Mutant/Normal
Normal Knt.	16,41	750	1:45,7	Normal/Normal



Şekil 4.31: Cd 39 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği

Çizelge 4.20: Cd 44 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları

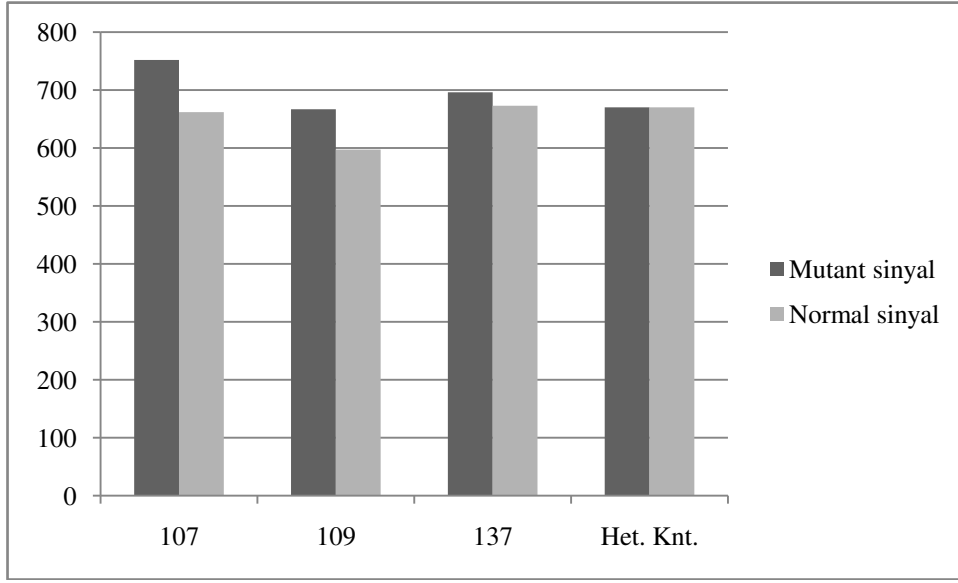
Örnek No	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
247	580	680,02	1:1,17	Mutant/Normal
Het. Knt.	274	274	1:1	Mutant/Normal
Normal Knt.	69	2159,62	1:31,3	Normal/Normal



Şekil 4.32: Cd 44 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği

Çizelge 4.21: IVS I-1 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları

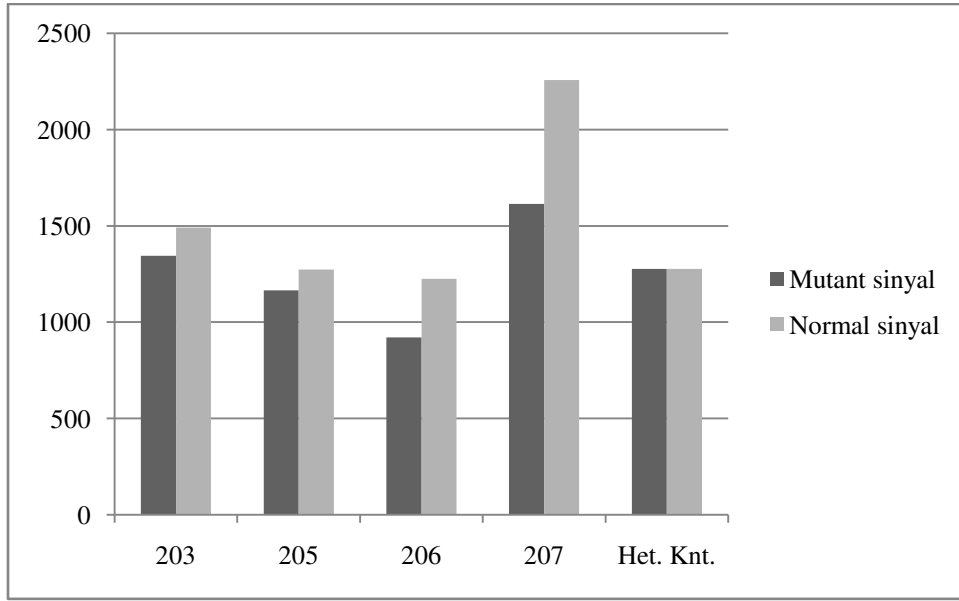
Örnek No	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
107	752	662,1	1,14:1	Mutant/Normal
109	667	597,31	1,12:1	Mutant/Normal
137	696	673,16	1,03:1	Mutant/Normal
Het. Knt.	670	670	1:1	Mutant/Normal



Şekil 4.33: IVS I-1 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği

Çizelge 4.22: IVS II-745 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları

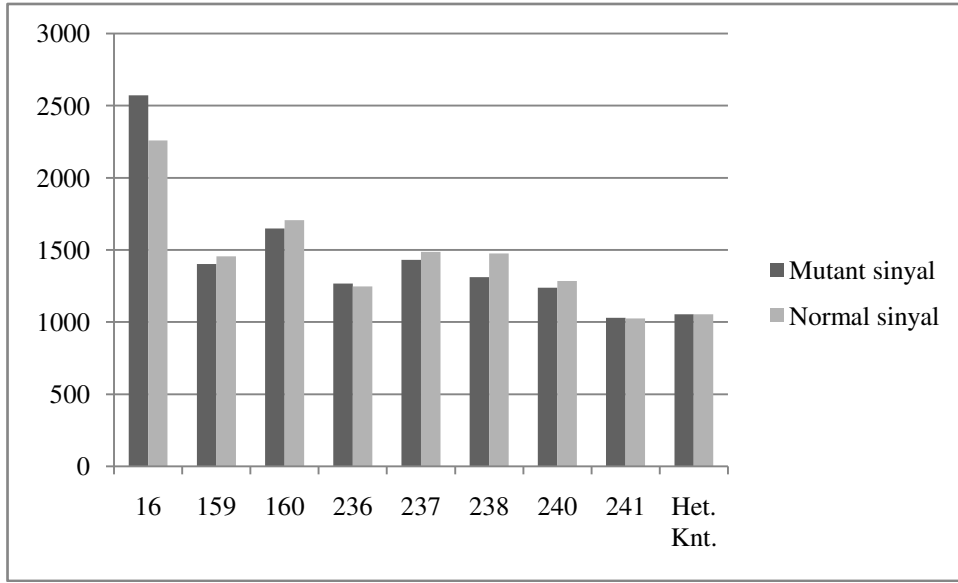
Örnek No	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
203	1344	1490,71	1:1,11	Mutant/Normal
205	1166	1273,5	1:1,09	Mutant/Normal
206	921	1224,45	1:1,33	Mutant/Normal
207	1614	2257,96	1:1,4	Mutant/Normal
Het. Knt.	1277	1277	1:1	Mutant/Normal



Şekil 4.34: IVS II-745 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği

Çizelge 4.23: Cd 8 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları

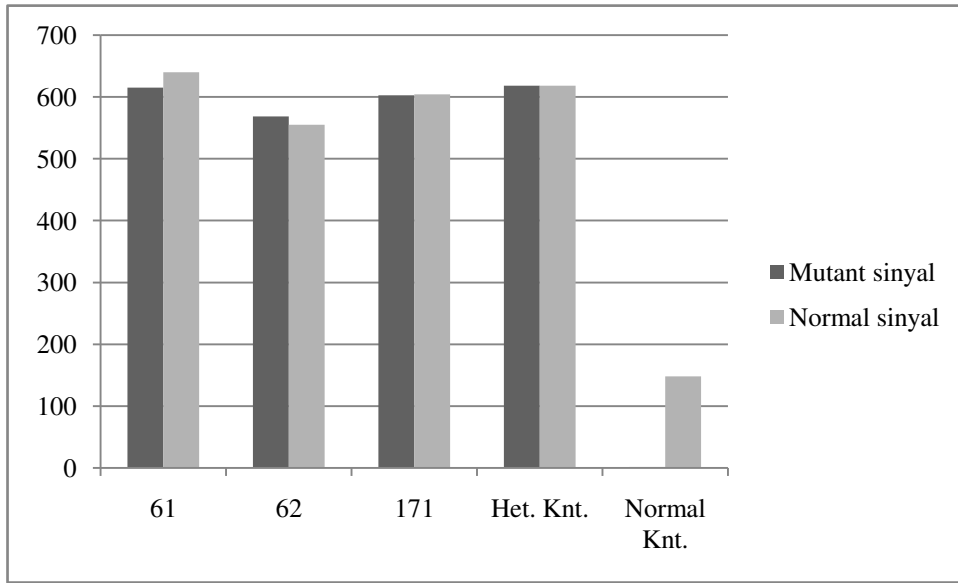
Örnek No	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
16	2572	2258,36	1,14:1	Mutant/Normal
159	1402	1454,75	1:1,04	Mutant/Normal
160	1649	1706,13	1:1,03	Mutant/Normal
236	1266	1248,69	1,01:1	Mutant/Normal
237	1431	1487,71	1:1,04	Mutant/Normal
238	1312	1475,35	1:1,12	Mutant/Normal
240	1239	1285,78	1:1,04	Mutant/Normal
241	1030	1026,15	1:1	Mutant/Normal
Het. Knt.	1055	1055	1:1	Mutant/Normal



Şekil 4.35: Cd 8 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği

Çizelge 4.24: Cd 5 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları

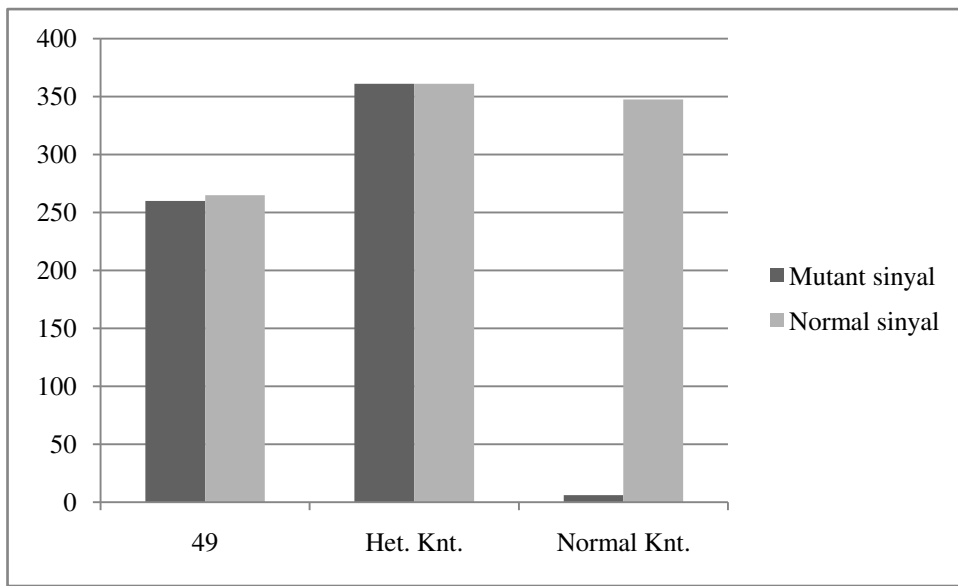
Örnek No	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
61	615,17	640	1:1,04	Mutant/Normal
62	568,5	555	1,02:1	Mutant/Normal
171	602,44	604	1:1	Mutant/Normal
Het. Knt.	618	618	1:1	Mutant/Normal
Normal knt.	1,37	148	1:108,29	Normal/Normal



Şekil 4.36: Cd 5 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği

Çizelge 4.25: -87 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları

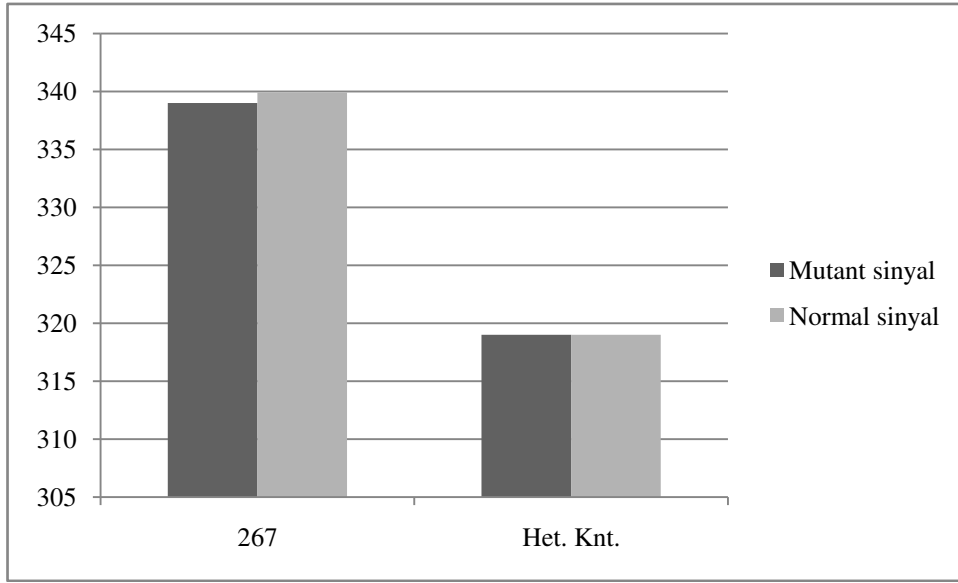
Örnek No	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
49	260	264,99	1:1,02	Mutant/Normal
Het. Knt.	361	361	1:1	Mutant/Normal
Normal Knt.	6	347,56	1:57,93	Normal/Normal



Şekil 4.37: - 87 işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği

Çizelge 4.26: Hb D işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları

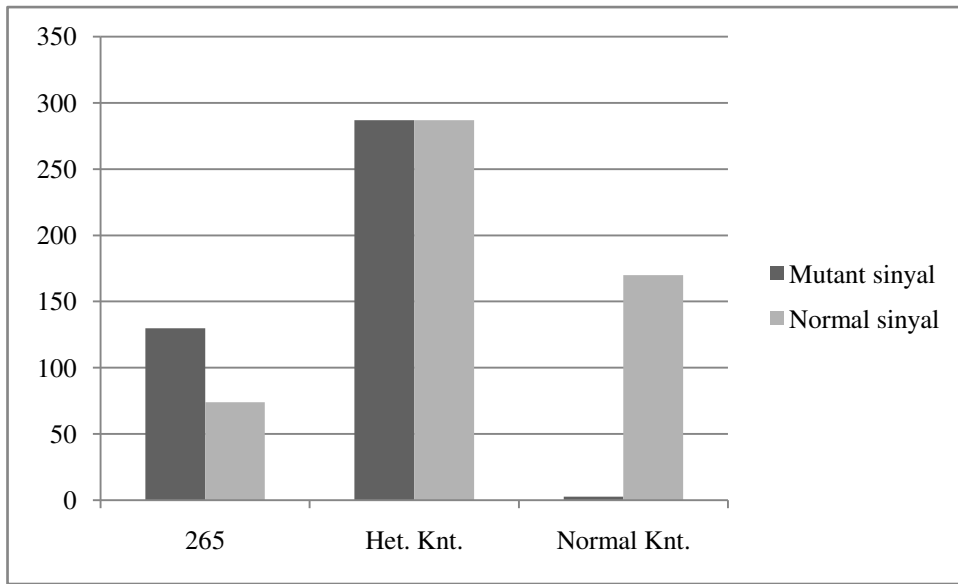
Örnek No	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
267	339	339,92	1:1	Mutant/Normal
Het. Knt.	319	319	1:1	Mutant/Normal



Şekil 4.38: Hb D işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği

Çizelge 4.27: Hb S işaretleyicisi ile yapılan okutma sonuçları

Örnek No	Mutant sinyal	Normal sinyal	Mutant:Normal	Genotip
265	129,83	74	1,75:1	Mutant/Normal
Het. Knt.	287	287	1:1	Mutant/Normal
Normal Knt.	2,73	170	1:62,2	Normal/Normal



Şekil 4.39: Hb S işaretleyicisi ile yapılan okutma sonucunun bar grafiği

5. TARTIŞMA

Talasemi yaşamın erken dönemlerinden itibaren ciddi anemiye neden olan globin zincirlerinin eksik sentezlenmesine bağlı kalıtsal bir hastalıktır. Hemoglobin molekülünün yapısında yer alan globin zincirleri üzerindeki amino asitlerin değişmesi sonucu ise anormal hemoglobinler meydana gelmektedir⁸³. Hemoglobinopatinin neden olduğu kalıtsal hastalıklar konusundaki bilgi birikimi hastalıkların molekül düzeyinde tanımlanılmasında öncülük etmiştir¹⁶.

Genetik alanında yürütülen çalışmalar, özellikle rekombinant DNA teknolojilerinin yaygınlaşmasıyla hemoglobin sentezinin genetik kontrolü ve gen kümelerinin tanımlanmasına yardımcı olmuştur. Hemoglobinopatilerin oluşmasındaki temel prensipler birçok diğer klinik hastalığın moleküler nedeninin anlaşılmasına da model oluşturmıştır⁸⁴.

Hemoglobinopatiler tüm dünyada en yaygın olarak gözlenen genetik anormalliklerden birisidir. Dünya Sağlık Örgütü hemoglobin bozukluklarının dünya genelinde sıklığını %5 olarak bildirmektedir. 1980 yıllarından beri dünyanın altı bölgesinden toplanan verilere göre Afrika'da Hb S + Hb C + β talasemi %15, Uzak Doğuda Hb E + α talasemi %6,5, Orta Doğu'da Hb S + β talasemi %5,5, Batı Pasifik'te Hb E + α + β talasemi %3, Amerika'da Hb S + β talasemi %3 ve Avrupa'da beta talasemi sıklığı %1,5'dur. Ülkemizde Çukurova, Akdeniz kıyı şeridi, Ege ve Marmara bölgelerinde talasemi taşıyıcılığı çok sık görülmektedir. T.C. Sağlık Bakanlığı verileri ve Ulusal Hemoglobinopati Konseyi'nin çalışmalarına göre sağlıklı Türk popülasyonunda beta talasemi taşıyıcı sıklığı %2,1'dir ve Türkiye'de yaklaşık 1.300.000 taşıyıcı ile 4000 kadar hasta bulunmaktadır. Adana'da β talasemi taşıyıcı sıklığı %3,7 iken Hb S sıklığı ise %10 olarak bildirilmektedir².

Bugüne kadar β talasemiye neden olan 200'den fazla beta globin geni mutasyonu tanımlanmış olup ülkemizde 30'dan fazla tipine rastlanmıştır ve mutasyonların görülme sıklıkları bölgeler arasında farklılık göstermektedir. Anormal hemoglobinlerin de dağılımı coğrafik olarak ve ırksal gruplara göre oldukça farklılık göstermektedir. Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de en yaygın olarak gözlenen Hb S'in yanı sıra diğer anormal hemoglobinlerden Hb D, Hb E ve Hb C de gözlenmektedir²³. Yüregir ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada Çukurova bölgesi için β talasemi sıklığını %3,5 ve en yaygın mutasyon tipini IVS I-110 olarak bildirmişlerdir⁸⁵. Yine Yüregir ve arkadaşları bir başka çalışmalarında ise Çukurova bölgesinde Hb S taşıyıcılığını %8,2 olarak belirlemiştir⁸⁶. Arpacı ve arkadaşları

Samandağ'da yaptıkları çalışmada Hb S sıklığını %22,1, β talasemi sıklığını ise %5,1 olarak bildirmişler⁸⁷.

Attila ve arkadaşları çalışmalarında Çukurova'da Hb S oranını %10, β talasemi oranını %3,7 ve α talasemi oranını %3,3 olarak bildirmektedir. Doğum öncesi tanı yapılan 249 fetustan 49 tanesini homozigot ya da çift heterozigot hasta olarak belirlemişlerdir. Bunların %13,7'sinde Hb S, %5,6'sında β talasemi, %0,4'ünde α talasemi ve %0,4'ünde Hb S+ β talasemi mutasyonu tespit etmişlerdir⁸⁸.

Tadmouri ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Türkiye'de en yaygın görülen β talasemi mutasyonunun IVS I-110 olduğunu ve bunu IVS I-6, Cd 8, IVS I-1, IVS II-745, IVS II-1, Cd 39, -30 ve Cd 5 mutasyonlarının izlediğini bildirmişlerdir. IVS I-110 mutasyonunun bölgelere göre dağılımının Marmara Bölgesi için %34,1, Ege ve Akdeniz Bölgesi için %42,4, İç Anadolu için %52,3, güneybatı Anadolu için %26,4, Karadeniz Bölgesi için %31,0 ve batı Anadolu için %27,1 olarak değiştiğini rapor etmişlerdir⁴. Bir başka çalışmalarında ise yaygın olarak görülen mutasyonlardan 7 tanesinin Türk populasyonunda görülen mutasyonların %72'sini oluşturduğunu ve bunların sırasıyla %41 IVS I-110, %13 IVS I-6, %8 IVS II-1, %6 Cd8, %5 IVS I-1 ve %5 IVS II-745 mutasyonları olduğunu bildirmişlerdir⁵⁴.

Altay çalışmasında 9'u kararlı, 4'ü kararsız, 1'i uzamış toplam 14 α , 19'u kararlı, 2'si kararsız, 3'ü talasemik, 1'i delesyon/insersiyon toplam 25 β , 1 γ globin zinciri mutasyonu ile oluşan ve 2 de hibrit hemoglobin olmak üzere toplam 42 anormal hemoglobin rapor etmiştir. Akar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise bunlara ek olarak 2002 yılından sonra Türkiye'de 2 α , 4 β ve 1 δ globin zinciri mutasyonu sonucu oluşan anormal hemoglobin tiplerini bildirmişlerdir^{21,22}.

Ülkemizde ilk α talasemi çalışması 1979 yılında Aksoy ve arkadaşları tarafından yapılmış olup, $\alpha^{3,7}$ ve $\alpha^{20,5}$ mutasyonlarının birlikte Hb H hastalığına neden olduğu gösterilmiştir. Altay ve arkadaşları Hb H hastalarında yaptıkları çalışmalarında en sık $\alpha^{20,5}$ mutasyonunun gözlemlendiğini ardından da $\alpha^{3,7}$ mutasyonunun takip ettiğini bildirmişlerdir⁸⁹.

Polat ve arkadaşları Mersin merkeze bağlı bir köyden topladıkları kan örneklerinde yaptıkları çalışmada 8 olguda $\alpha^{3,7}$, bir olguda $\alpha^{20,5}$ ve 6 olguda IVS I-110 mutasyonu belirlemişlerdir⁸¹.

Yalın doktora tez çalışmasında α talasemiye neden olan mutasyonlardan $\alpha^{3,7}$ yi %45, MED I'i %28,3, $\alpha^{20,5}$ u %1,7 sıklıkla gözlerken, $\alpha^{4,2}$ mutasyonuna rastlamamıştır⁹⁰.

Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak görülen α ve β talasemi gibi anormal hemoglobinlerin de birbirinden ayrılmaları ve doğru tanımlanmaları önemlidir. Bunun yanında hemoglobinopatilerde günümüzde radikal bir tedavi yapılamadığından farklı bölgelerde geniş kapsamlı çalışmalar yapılarak Türkiye'nin talasemi mutasyon haritasının çıkarılması doğum öncesi tanı için önemlidir. Rutin klinik laboratuvarlarda Rbc, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, Hb A₂ ve Hb F düzeylerinin kantitatif tayini ve hemoglobin elektroforezi gibi birkaç basit analizle çoğu talasemi ve hemoglobinopati tipinin tanımlanması mümkündür. Kalıtsal hastalıkların genetik olarak tanımlanmasında ise geleneksel moleküler tanı yöntemlerinin yanı sıra gelişen teknoloji sayesinde modern, hızlı ve güvenilir yöntemler geliştirilmektedir ve mikroarray yöntemi de bunlardan birisidir.

Bu çalışmada kalıtsal kan hastalıklarına neden olan çeşitli mutasyonların hızlı ve güvenilir biçimde taranarak tanımlanması, olası risk bölgelerinin belirlenmesi ve doğum öncesi tanı çalışmalarına katkı sağlamak amacıyla yeni ilk defa mikroarray tanımlayıcıları tasarlanarak Konya bölgesinin anormal hemoglobin ve talasemi tipleri belirlenmiştir.

Talasemi tanısında en iyi yol öncelikle hematolojik verilerin incelenmesidir. Taşıyıcılarda MCV ve MCH değerleri sırasıyla 80fl ve 27pg'ın altındadır. α ve β talasemilerin ayırt edilmesindeki en önemli değişken ise Hb A₂ düzeyleridir. β talasemi taşıyıcılarında Hb A₂ düzeyleri normal kabul edilen %3,7'nin üzerinde, α talasemi taşıyıcılarında ise %3'ün altındadır. Çalışmamızda buna göre 81 olguda β talasemi, 34 olguda ise α talasemi taşıyıcılığı şüphesi ile aile bireyleriyle birlikte toplam 164 olgunun mutasyon taraması yapılmıştır. Yalnızca bir olguda $\alpha^{3,7}$ talasemi mutasyonu taşıyıcılığı, bir olguda Hb S mutasyonu taşıyıcılığı, birisinde D Los Angeles/ IVS I-110 çifte heterozigotluğu gözlenmiştir. β talasemi mutasyonu belirlenen 84 olgunun %74'ünde IVS I-110, %9'unda Cd 8, %5'inde Cd 39, %4'ünde Cd 5, %4'ünde IVS I-1, %2'sinde IVS II-745, %1'inde Cd 44 ve -87 mutasyonu belirlenmiştir.

Güler ve arkadaşları Konya'da evlilik öncesi tarama çalışmalarında taşıyıcılıkları belirlenen çiftler üzerinde yaptıkları çalışmada beta talasemi taşıyıcı oranını %2 ve Hb S taşıyıcı oranını %0,05 olarak bulmuşlardır⁹¹.

Yüregir ve arkadaşlarının Çukurova bölgesini kapsayan çalışmalarında IVS I-110 mutasyonu sıklığını %55 ve β talasemi taşıyıcı sıklığını ise % 3,5 olarak bildirmişlerdir. Aksoy ve arkadaşları Çukurova'da β talasemili bir ailenin mutasyon tiplerinde IVS I-110 ve IVS I-1 mutasyonlarını saptamışlardır⁸⁶.

Çürük ve arkadaşları Çukurova’da β talaseminin mutasyon çeşitliliğini vurgulamış ve görülme sıklıklarını %57 IVS I-110, %8 IVS I-1, %6 Cd 39, %6 IVS I-6 ve %6 Cd 8 olarak, Cd 15 ve Cd 82/83 mutasyonlarını da ilk kez rapor etmişlerdir⁵⁵.

Öner ve arkadaşlarının Türkiye genelinde yaptıkları çalışmada mutasyonlar ve sıklıkları %43 IVS I-110, %18 IVS I-6, %12 IVS II-1, %7 Cd 8, %6 Cd 39, %4 IVS II-745, %3 IVS I-1, %2 olarak -30 ve %1 olarak da Cd 5 bildirmişlerdir. Doğu Anadolu bölgesinde yaptıkları çalışmalarında sırasıyla Cd8, -30, IVS I-110, IVS I-130 ve IVS II-1 mutasyonlarının olduğunu bildirmişlerdir^{92,93}.

Atalay ve arkadaşları Türkiye’de β talasemi mutasyon tiplerini ve bölgesel dağılımlarını inceledikleri çalışmalarında %36 IVS I-110, %22 IVS I-6, %13 IVS I-1, %7 Cd 39, %4 IVS II-745, %2 Cd 8 ve %1 IVS II-1 olarak bildirmişlerdir⁷⁴.

Topal ve arkadaşları IVS I-110 mutasyonu yüzdesini Antakya’da %64, Kayseri’de %68, İzmir’de %47 olduğunu Antakya bölgesinde %18 IVS I-1, %6 Cd39, %6 IVS I-6 ve %6 IVS II-1 olduğunu, Kayseri bölgesinde %20 Cd8, %5 IVS I-6, %2 Cd5 ve IVS I-1 olduğunu ve İzmir bölgesinde %7 IVS I-1, %7 Cd5 ve Cd39 olduğunu bildirmişlerdir⁹⁴.

Evrensel ve arkadaşları Kayseri bölgesinde yaptıkları çalışmalarında en yüksek sıklıkla IVS I-110 mutasyonu olduğunu (%76), Cd5’in %8, IVS I-6’nın %8, Cd8’in %6 ve Cd39’un ise %3 olduğunu bildirmişlerdir⁹⁵.

Kılınç bir çalışmasında β talasemi sıklığının Çukurova’da %2,3-4,6 arasında, Güney bölgelerde %2,4-13,1, Doğu bölgesinde %0,7-3,6, Ege bölgesinde %2,6-5,1, Marmara bölgesinde %3,4-11,7 ve İç Anadolu bölgesinde ise %2,1 olduğunu rapor etmiştir⁹⁶.

İnce ve arkadaşları Güneydoğu bölgesinde en yaygın β talasemi mutasyonunun yine IVS I-110 olduğunu (%27,8) ve bunu %11,1 oranlarında IVS I-6 ve Cd 8, %8,3 oranında IVS II-1 ve %5,5 oranında IVS II-745 mutasyonlarının izlediğini bildirmişlerdir⁹⁷.

Çalışmalar incelendiğinde Türkiye’nin bölgeleri mutasyon sıklığı açısından her coğrafik bölgedeki mutant allellerin dağılımının farklı olduğu gözlenmektedir. Bunun içindir ki mutasyonların özellikle hasta çocuk doğumunu engellemek amacıyla halen 33 ilde kanun gereği uygulanan evlilik öncesi tarama çalışmalarına destek olmak amacıyla farklı bölgelerde benzer çalışmaların yapılarak ülkemizin tam bir talasemi mutasyon haritasının çıkarılması önem taşımaktadır. Aynı zamanda mutasyonların hızlı, güvenilir ve etkin olarak tanımlanması

için yeni teknolojilerden faydalanılarak yöntemlerin geliştirilmesinin önemi de bir kez daha ortaya çıkmaktadır.

Bu amaçla Yalın ve arkadaşları ülkemizde yaygın olarak gözlenen geleneksel moleküler yöntemlerle belirlenen 15 β talasemi ve anormal hemoglobin mutasyonunu mikroarray yöntemi ile de belirlemişlerdir⁹⁸.

Özkaralı ve arkadaşları çalışmasında β talasemilerin moleküler tanısı için geleneksel yöntemlerle mikroarray yöntemini karşılaştırmış ve avantajlarını göstermişlerdir⁹⁹.

Seydel ve arkadaşları Çukurova bölgesinde bu güne kadar rastlanan anormal hemoglobin mutasyonlarının mikroarray yöntemiyle tiplendirmelerini yapmışlardır¹⁰⁰.

Foglieni ve arkadaşları İtalya’da mikroarray cihazı ile IVS I-110, IVS I-1, IVS I-6, IVS II-1, IVS II-745, Cd 8 ve Cd39 mutasyonlarının tanımlanmasını yapmışlar ve aletin güvenilirliğini kanıtlamışlardır¹⁰¹.

Anabilim Dalımız Nanotıp laboratuvarında yer alan mikroarray cihazı ile mutasyonların tanımlanması amacıyla bölgemizde sık rastlanan mutasyonlar başta olmak üzere 19 β talasemi ve 10 anormal hemoglobin mutasyonu için tanımlayıcı tasarımı yapılmıştır. Bunlar; IVS I-110 (G $\rightarrow$ A), Cd44 (-C), Cd39 (C $\rightarrow$ T), IVS I-130 (G $\rightarrow$ C) ve (G $\rightarrow$ A), IVS I-1 (G $\rightarrow$ A), IVS I-5 (G $\rightarrow$ A) ve (G $\rightarrow$ C), IVS I-6 (T $\rightarrow$ C), IVS II-1 (G $\rightarrow$ A), Cd 74/75 (-C), IVS II-745 (C $\rightarrow$ G), IVS II-848 (C $\rightarrow$ A), IVS II-849 (A $\rightarrow$ G), -87 (C $\rightarrow$ G), Cd8 (-AA), Cd 8/9 (+G), -30 (T $\rightarrow$ A), Cd5 (-CT), HbD Los Angeles (G $\rightarrow$ C), HbO Arab (G $\rightarrow$ A), Hb Beograd (A $\rightarrow$ T), Hb G Coughatta (A $\rightarrow$ C), Hb E Saskatoon (G $\rightarrow$ A), Hb D İran (G $\rightarrow$ C), Hb S (A $\rightarrow$ T), Hb C (G $\rightarrow$ A), Hb J Antakya (A $\rightarrow$ T) ve Hb Hamadan (G $\rightarrow$ C) mutasyonlarıdır. Sentetik kontroller kullanılarak okutma yöntemleri oluşturulan tanımlayıcılar genomik DNA örnekleri ile de denenmiştir. Geleneksel yöntemlerle mutasyonları belirlenen örneklerin mikroarray çalışmasında da %100 doğrulukla mutasyonları belirlenmiştir.

Sonuç olarak hazırlanan tanımlayıcılar ile yüksek sayıda örneğin mutasyon taraması hızlı ve güvenilir şekilde yapılabilmektedir. Tarama çalışmaları gibi fazla sayıda örneğin inceleneceği ya da doğum öncesi tanı gibi durumlarda zaman ve güvenilir sonuç elde etmek önemlidir. Bu tez çalışması sonucunda elde edilen tanımlayıcılar ile nanoteknolojik bir yöntem olan mikroarray ile klasik yöntemlerle uyumlu sonuçlara ulaşılmış, zaman yönünden de önemli bir avantaj sağlanmıştır. Böylece ülkemizin anormal hemoglobin ve talasemi haritasının çıkarılması için yapılacak çalışmalara aynı zamanda hasta çocuk doğumunu

önlemek amacıyla evlilik öncesi tarama çalışmaları ile doğum öncesi tanı çalışmalarına önemli katkı sağlanmıştır. Yöntem ihtiyaca göre tanımlayıcıların tasarlanmasıyla bölgelere göre uygun çalışma panelleri oluşturulmasına da uygundur. Bundan sonra uygun çalışma panelleri geliştirilerek yöntemin yaygınlaştırılması ve benzer genetik hastalıklara uyarlanarak kullanım alanının genişletilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca Konya bölgesinde saptanan β talasemi mutasyonlarının Türkiye ve Çukurova bölgesindeki sıklıklara uyumlu olduğu ve anormal hemoglobin açısından da farklı olmadığı gösterilmiştir.

6. SONUÇLAR

1. Bu çalışmada toplam 277 olgu incelenmiştir. Anormal hemoglobin ya da talasemi taşıyıcılığı saptanan olgular ve aile bireylerinin hematolojik verilerine bakılmaksızın toplam 164 olgunun moleküler ve nanoteknolojik yöntemlerle mutasyon taraması yapılmıştır. Bu olguların 84'ünde β talasemi mutasyonu taşıyıcılığı, 1'inde $\alpha^{3,7}$ talasemi mutasyonu taşıyıcılığı ve 1'inde Hb S mutasyonu taşıyıcılığı belirlenmiştir. Mutasyon taraması yapılan olgulardan 3 tanesi IVS I-110/IVS I-110 homozigot mutant, 3 tanesi IVS II-745/IVS I-110 ve 1 tanesi de D/IVS I-110 çift heterozigot olduğu bulunmuştur.
2. Nanoteknolojik olarak mikroarray yöntemiyle çalışma yapmak için bu sisteme ilk defa uygulanan 19 β talasemi ve 10 anormal hemoglobin mutasyonuna özgü tanımlayıcı tasarımı yapılmıştır. Bu mutasyonlar: β talasemi için IVS I-110 (G→A), IVS I-1 (G→A), Cd 39 (C→T), Cd 8(-AA), IVS II-1 (G→A), IVS I-6 (T→C), IVS II-745 (C→G), -30 (T→A), IVS I-5 (G→A), Cd 8/9 (+G), Cd 44 (-C), -87 (C→G), IVS I-130 (G→A), IVS I-5 (G→C), IVS II-848 (C→A), Cd 5 (-CT), IVS I-130 (G→C), Cd 74/75 (-C) ve IVS II-849 (A→G) ve anormal hemoglobinler için de Hb S (A→T), Hb D Los Angeles (G→C), Hb J Antakya (A→T), Hb O Arab (G→A), Hb Beograd (A→T), Hb G Coughatta (A→C), Hb E Saskatoon (G→A), Hb D İran (G→C), Hb C (G→A) ve Hb Hamadan (G→C)'dır.
3. Kalıtsal kan hastalıklarının önlenmesinde taşıyıcıların belirlenmesi ve doğum öncesi tanı çalışmaları önemlidir. Bunun yanında hemoglobinopatilerde günümüzde radikal bir tedavi yapılamadığından farklı bölgelerde geniş kapsamlı çalışmalar yapılarak Türkiye'nin talasemi mutasyon haritasının çıkarılması doğum öncesi tanı için önemlidir. Bu çalışmalarda mutasyonların hızlı, doğru ve güvenilir olarak belirlenmesi için yeni teknolojilerden faydalanılması gerekmektedir. Bu tez çalışması sonucunda tasarımı yapılan 29 tanımlayıcının mikroarraye uygulanmasıyla kullanım alanı genişletilmiştir.
4. Nanoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi ve kullanım alanlarının genişletilmesi ile epigenetik çalışmalara katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Cao A, Saba L, Galanello R, Rosatelli MC.** Molecular diagnosis and carrier screening for β thalassemia. *JAMA*, **1997**; 278(15): 1273-1277.
2. **Canatan D.** Dünyada ve Türkiye’de talasemi ve anormal hemoglobinler. Canatan D, Aydınok Y. *Talasemi ve Hemoglobinopatiler*, Retma, **2007**: 11-19.
3. **Rund D, Rachmilewitz E.** Pathophysiology of α - and β - thalassemia: Therapeutic implication. *Sem Hematol*, **2001**; 38(4): 343-349.
4. **Tadmouri GO, Tüzmen Ş, Özçelik H, Özer A, Baig SM, Senga EB, Başak AN.** Molecular and population genetic analyses of β thalassemia in Turkey. *Am J Hem*, **1998**; 57: 215-220.
5. **Brozovic M, Henthorn J.** Investigation of Abnormal Haemoglobins and Thalassemia in Practical Haematology (Eds Dacie JV, Lewis SM). Churchill Livingstone, Hong Kong, **1995**: 249-256.
6. **Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW.** *Harper’s Biochemistry*. 22nd Ed., Norwalk, Appleton & Lange, **1990**: 54-55.
7. **Klinken SP.** Red blood cells. *IntJ Biochem Cell Biol*, **2002**; 34:1513-1518.
8. **Onat T, Erk K, Sözmen Y.E.** *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık. **2002**: 135,535-536.
9. **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.
10. **Erişim:** (chem.purdue.edu/chm 333) Erişim tarihi: 12.8.2004
11. **Clarke GM, Higgins TN.** Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: Review and update. *Clin Chem*, **2000**; 46(8B): 1284-1290.
12. **Chen H, Christopher H, Lowrey CH, Stamatoyannopoulos G.** Analysis of enhancer function of the HS-40 core sequence of the human α globin cluster. *Nucleic Acids Research*, **1997**; 25: 2917-2922.
13. **Elnitski L, Li J, Noguchi CT, Miller W, Hardison R.** A negative cis-element regulates the level of enhancement by hypersensitive site 2 of the β globin locus control region. *J Biol Chem* **2000**; 276: 6289-6298.
14. **Sawado T, Igarashi K, Groudine M.** Activation of β major globin gene transcription is associated with recruitment of NF-E2 to the β globin LCR and gene promoter. *Proc Natl Acad Sci*, **2001**; 98: 10226-10231.
15. **Erişim:**(http://www.blc.arizona.edu/courses/181gh/rick/expression2/graphics2/globin_cluster.gif) Erişim Tarihi: 10.6. 2003
16. **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.
17. **Weatherall 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.
18. **Stamatoyannopoulos G, Grosfeld F.** Hemoglobin Switching. In: Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H. *The Molecular Basis of Blood Diseases*. 3rd Ed., USA: W.B. Saunders. Company, **2001**: 135-182.

19. **Hoffbrand V.A, Pettit J.E.** *Color Atlas of Clinical Hematology* .3th Ed., Spain: Harcourt Publishers Limited, **2000**: 85-87.
20. **Bunn HF, Forget BG.** Hemoglobin. In: *Molecular, Genetic and Clinical Aspects*. W.B. Saunders Com, **1986**.
21. **Altay Ç.** Abnormal hemoglobins in Turkey. *Turkish J Heamatol*, **2002**; 19(1): 63-74.
22. **Akar E, Akar N.** A review of abnormal hemoglobins in Turkey. *Turk J Hematol*, **2007**; 24:143-145
23. **Lukens JN, Lee GR.** The Abnormal Hemoglobins. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*, Eds Lee GR, Bithell CT, Foester J, Athens JW, Lukens JN. Lee and Febiger Com, Pennsylvania **1993**.
24. **Thomson M, Mcinnes RR, Willard HF.** *Genetics in Medicine*. 5th ed. Philadelphia, B.Saunders Company **1991**.
25. **Huisman THJ.** Human Hemoglobin In: *Blood Disease of Infancy and Childhood*. 7th ed, St Louis, Mosby, Inc ,st Lowis **1995**.
26. **Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC.** Sickle -cell anemia. a molecular disease. *Science*, **1949**; 110:543.
27. **Altay Ç, Gürgey A.** Distribution of hemoglobinopathies in Turkey. *Turk J Pediatr*, **1986**; 8:219.
28. **Kutlar A, Huisman THJ.** Dedection of hemoglobinopathies techniques in diagnostic. *Hum Biochem Gen*, **1991**; 519.
29. **Huisman THJ.** The structure and function of normal and abnormal hemoglobins. *Br Clin Haematol*, **1993**; 6:1.
30. **Kazazian HH Jr, Waber PG, Boehm CD ,Lce Jt, Antonanrakis SE, Fairbanks VF.** Hemoglobin E in Europeans further evidence for multiple origins of the beta E-globin gene. *Am J Hum Genet*, **1984**; 36(1):212.
31. **Sanguanserm Sri T, Flatz G, Flatz SD.** Distribution of hemoglobine E and beta-thalassemia in Kampuchea(Cambodia). *Hemoglobin*, **1987**; 11(5):481.
32. **Kazazian HH Jr.** The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol*, **1990**; 27(3):209-228.
33. **Lukens JN.** The Thalassemias and Related Disorders In: *Quantitative Disorders of Hemoglobin Synthesis*; Eds: Lee GR, Bithell CT, Foester J, Athens JW, Lukens JN. Lee and Febiger Com, Pennsylvania **1993**.
34. **Loukopoulos D.** Thalassemia: genotypes and phenotypes. *Ann Hematol* **1991**; 62:85.
35. **Weatherall DJ.** The Thalassemia. in Hematology; Eds: *Williams WJ*, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA. 3th ed, Mc Graw-Hill, Singapore **1986**.
36. **Lukens JN.** The Thalassemias and Related Disorders: Quantitative disorders of hemoglobin synthiesis. In: Lee GR, Foerster J, Lukens JN, Paraskvas F, Greer JP. Rodgers GM. Bds. *Wintrobe's Clinical Hematology*: 10th Ed., Egypt: Mass Publishing Co., **1999**: 1405-1448.
37. **Weatherall D.J, Clegg JB;** The Thalassaemia Syndromes. 4th ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford, **2001**: 224-225.
38. **Küçük M.** Hemoglobinopatiler. Uysal A,V. Klinik Hematoloji, Ankara, Anadol Yayıncılık, **1984**: 124-128.
39. **Higgs DR.** α -thalassemia. *Bailliere's Clin Haematol*, **1993**; 6:117-150.

40. **Flatz G.** Hemoglobinopathies in Thailand. *Br J Haematol*, **1965**; 11: 216-227.
41. **Aksoy M.** Hemoglobinopathies in Turkey. *Hemoglobin*, **1985**; 9:209-216.
42. **Yüregir GT, Aksoy K, Dikmen N.** Alfa talasemi taramasında tek tüp osmotik frajilitenin yeri. *Doğa Tr J Med Sci*, **1990**; 14:374-380.
43. **Yüregir GT, Kutlar K, Kutlar A, Aksoy M, Huisman THJ.** Incidence and types of β -thalassemia mutations in South Turkey. *Ç. Ü. Tıp Fak Der*, **1989**; 1:111-115.
44. **Kılınç Y, Kümi M, Gürgey A, Altay Ç.** Adana Bölgesi'nde doğan bebeklerde kordon kanı çalışması ile alfa talasemi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz. enzim eksikliği ve hemoglobin S sıklığının karşılaştırılması. *Doğa J Med Sci*, **1986**; 10:162-167.
45. **Weatherall DJ.** Thalassemias. In Williams WJ, Beutler E, Erslev A, Lichtman MA, *Haematology*, 4th ed, New York, McGraw-Hill, **1990**; 510-539.
46. **Chakraborty D, Bhattacharyya M.** Antioxidant defense status of red blood cell of patients with β thalassemia and E β thalassemia. *Clin Chim Acta*, **2001**; 305: 123-129.
47. **Tüzmen Ş, Schechter AN.** Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic method for elucidating β -thalassemia mutations. *Blood Rev*, **2001**; 15(1): 19-29.
48. **Olivieri NF, Weatherall DJ.** Thalassemias. In; Lilleyman JS, Hann IM, Blanchette VS Eds. *Pediatric Hematology*, 2th Ed., London: Churchill & Livingstone, **1999**; 307-327.
49. **Trent RJ, Higgs DR, Clegg JB, Weatherall DJ.** A new triplicated α -globin gene arrangement man. *Br J Haematol*, **1981**; 49: 149.
50. **Ulusal Hemoglobinopati Konseyi Kitapçığı.** 2th Ed. Tunç B, Timur H.İ, Tarama Programları ve Yöntemleri. **2003**, 33-42.
51. **Weatherall DJ, Clegg JB.** *The Thalassemia Syndromes*, 4th ed., Blackwell, Oxford. **2000**.
52. **Tbein SW:** β -Thalassemia. *Br Clin Haem*, **1993**; 6:151.
53. **Yüregir GT, Donma O, Dikmen N, İspir T, Çınar M:** Population studies of hemoglobin S and other variants in Çukurova: The southern part of Turkey. *Acta Haematol* **1987**; 50: 757-765.
54. **Tadmouri G, Başak N.** β thalassemia in Turkey: A review of the clinical, epidemiological, molecular, and evolutionary aspects. *Hemoglobin*, **2001**; 25(2): 227-239.
55. **Çürük M A, Arpacı A, Atilla G, Tuli A, Kılınç Y, Aksoy K, Yüregir GT:** Genetic heterogeneity of β thalassemia at Çukurova in Southern Turkey. *Hemoglobin* **2001**; 25(2): 241-245.
56. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** *Molecular Biology of Cell*. 4th ed. Garland Science, New York **2002**.
57. **Connor M, Ferguson SM.** *Essential Medical Genetics*. 5th ed, Blackwell Science, New York **1997**.
58. **Bowden JR, Brennan PA.** DNA microarray technology: insights for oral and maxillofacial surgeons. *Br J Oral Maxillofac Surg*, **2004**; 42: 542-545.
59. **Bryant PA, Venter D, Browne RR, Curtis N.** Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infect Dis*, **2004**; 4: 100-111.
60. **Fadiel A, Naftolin F.** Microarray applications and challenges: A vast array of possibilities. *Int Arch Biosci*, **2003**; 1111-1121.

61. **Schena M, Davis RW.** Genes, Genomes, and Chips. Eds; Schena M. In. *DNA Microarrays A Practical Approach.*, New York: Oxford University Press, **2001**; 1-16.
62. **Amaratunga D, Cabrera J.** *Exploration and Analysis of DNA Microarray and Protein Array Data.* New Jersey: Wiley-Interscience, **2004**; 23-38.
63. **Karaca M, Onus AN.** Array gen ekspresyon teknolojisi ve bitkisel üretimde kullanımı. *Alatarım* **2004**; 3:5-10.
64. **Kashi Y, King D, Soller M.** Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Gen*, **1997**; 13:74-78.
65. Nanogen Nanochip Molecular Biology Work Sataion Türkçe Kullanım Klavuzu.
66. **Yüregir GT, Attila G.** *Hemoglobinopatiler ve Tanı Yöntemleri*, Ç.Ü. Tıp Fak., Adana, **1997**; 1-18.
67. **Huisman THJ, Jonxis JHP:** The Hemoglobinopathies. *Techniques of Identification.* Marcel Dekker Inc, New York **1977**.
68. **Huisman THJ:** High Performance liquid chromatogrphy as a method to identify haemoglobin abnormalities. *Acta Haemat*, **1987**; 78-123
69. **Aksoy K, Kayrın L, Tuli A, Çürük MA, Atilla G.** *Anormal Hemoglobinler ve Talasemi Tanısında Kullanılan Yöntemler.* 8. Biyokimya Yaz Okulu, Adana, **2006**.
70. **Clarke GM, Higgins TN.** Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: Review and update. *Clin Chem*, **2000**; 46(8B): 1284-1290.
71. **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.
72. **Yüregir GT, Arpacı A, Tuli A.** *Temel ve Klinik Biyokimyada İleri Teknoloji Yöntemleri.* Adana: Ç Ü Tıp Fak Yay, **1995**.
73. **Altunkılıç S.** Anamur yöresinin β -talasemi mutasyon tiplendirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, ÇÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, **2004**.
74. **Atalay EÖ, Çirakoğlu B, Dinçol G, Atalay A, Kılınç Y, Aytakin H, Yüregir GT, Arpacı A, Benuek E, Aksoy M.** Regional distributions of β -thalassaemia mutations in Turkey. *Int J Hematol*, **1993**; 57: 207-211.
75. **Arcasoy MO, Gallagher PG.** Molecular diagnosis of hemoglobinopathies and other red blood cell disorders. *Semi Hematol*, **1999**; 36(4): 328-339.
76. **Tanrıverdi K.** β -talasemi mutasyon tiplerinin moleküler düzeyde incelenmesi. *Bilim Uzmanlığı Tezi*, Ç.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **1993**.
77. **Bain BJ, Amos RJ, Chapman B, Davies SC, Old JM, Wild BJ.** The laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. *Br J Haematol*, **1998**; 101: 783-792.
78. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular cloning: A Laboratory Manuel.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory, **1989**.
79. **Baysal E, Huisman THJ.** Detection of common deletional α -lhalassemia-2 determinants by PCR. *Anı J Hematol*, **1994**; 46:208-213.
80. **Bowderı DK, Vickers MA, Higgs DR.** A PCR-based strategy to detect the common severe determinants of α -thalassemia. *Br J Hematol*, **1992**; 81:104-108

81. **Polat G.** Alfa talasemili bir ailenin mutasyon tiplerinin moleküler düzeyde incelenmesi. *Uzmanlık Tezi.* Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana. **1995.**
82. Nanogen guide.
83. **Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Cleg JB.** The population genetics of the haemoglobinopathies. *Br Clin Haematol*, **1998**; 11: 1-51.
84. **Gümrük F.** Hemoglobin ve Hemoglobinopatiler. İliçin G, Ünal S, Biberoğlu K, Akalın HE, Süleymanlar G, Eds. *Temel İç Hastalıkları*, 1.Baskı, Güneş Kitabevi Ltd, Ankara, **1996**: 1233-1243.
85. **Yüregir GT, Arpacı A, Aksoy K, Azar AM, Tanrıverdi K.** Çukurova'da beta talasemik gen sıklığının taranması ve mutasyon odaklarının belirlenmesi. TÜBİTAK, TAG:0758 **1993.**
86. **Yüregir GT, Arpacı A, Aksoy K, Tuli A, Dikmen N, Özgünen T, Kılınç Y.** Population at risk for hemoglobinopathies in Çukurova. Türkiye: Need for prenatal diagnosis. *Ann Med Sci*, **1995**; 4:61-60.
87. **Arpacı A.** Antakya yöresinde β talasemik gen sıklığı ve mutasyonların gen amplifikasyon yöntemi ile saptanması. *Uzmanlık Tezi*, ÇÜ Tıp Fakültesi, **1991.**
88. **Attila G, Çürük MA, Arpacı A, Özgünen FT, Kılınç Y, Aksoy K, Yüregir GT.** Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in southern Turkey. *Ann Med Sci*, **1999**; 8(2): 93-97.
89. **Gürgey A, Altay Ç, Beksaç MS, Bhattacharya R, Kutlar F, Huisman THJ.** Hydrops fetalis due to homozygosity for α thalassemia-1, $-(\alpha)20,5$ kb: The first observation in a Turkish family. *Acta Haematol*, **1989**; 81: 169-171.
90. **Yalın E.** α talasemi ve g6pd enzim eksikliğine neden olan mutasyonların moleküler düzeyde incelenmesi. *Doktora Tezi*, ÇÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, **2004.**
91. **Güler E, Karacan M.** Prevalans of beta-thalassemia and sickle cell anemia trait in premarital screening in Konya urban area, Turkey. *J Ped Hem Onco*, **2007**; 29(11): 783-785.
92. **Öner AF, Özer R, Üner A, Arslan Ş, Gümrük F.** β -thalassemia mutations in the east of Turkey. *Tr J Haematol*, **2001**; 18(4):239-242
93. **Öner R, Altay Ç, 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.
94. **Topal K.** Antakya, Kayseri ve İzmir örneklerinde β -talasemi mutasyon tiplerinin saptanması. *Doktora Tezi*, Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **1998.**
95. **Evrensel E, Yalın AE, Aksoy K.** Kayseri Yöresinde β -Talasemi Mutasyon Dağılımı. Tanıda Moleküler Tıp Sempozyumu. **2003.**
96. **Kılınç Y.** Hemoglobinopathies in Turkey. *Türk J Hematol* **2006**; 23:214-216.
97. **İnce HH, Ayyıldız O, Kalkanlı S, Batun S, Müftüoğlu E.** Molecular basis of β thalassemia mutations in Diyarbakır in the southeastern region of Turkey. *Hemoglobin*, **2003**; 27(4): 275-278.
98. **Yalın AE, Yüzbaşıoğlu S, Yıldız ŞM, Yenilmez ED, Düzgünce D, Özkaralı E, Tuli A, Aksoy K.** DNA Mikroarray Teknolojisi Kullanılarak Beta Talasemi ve Anormal Hemoglobin Mutasyonlarının Tanımlanması. VI. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi. Antalya, **2006.**
99. **Özkaralı E.** β -Talasemi moleküler tanısında klasik yöntemlerle mikroarray yönteminin karşılaştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*; Çukurova Üniversitesi, Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2007.**
100. **Seydel GŞ.** Hemoglobinopatilerin mikroarray yöntemiyle belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi* Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2007.**

101. **Foglieni B, Cremonesi L, Travi M, Ravani A, Glambona A, Rosatelli M A, Perra C, Fortina P Ferrari M.** β thalassemia Microelectronic Chip: A Fast and accurate method for mutation detection. *Clin Chem*, **2004**; 50:73-79.

EK-1: Etik kurul onay formu



**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURULU**



T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU

Toplantı Sayısı	Tarih
7	06.07.2004

KARAR No 6- Biyokimya Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Kıymet Aksoy yönetiminde Arş. Gör. Sedatgöl Yüzbaşıoğlu tarafından doktora tez çalışması olarak yürütülmesi öngörülen "Konya bölgesinin anormal Hemoglobün ve Talasemi Mutasyon tiplerinin belirlenmesi" başlıklı proje araştırma etiği yönünden değerlendirildi, toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

Prof. Dr. İlter Üzel
Etik Kurulu Başkanı

Toplantıya Katılmadı

Prof. Dr. Fatma Tuncay Özgüven
Etik Kurulu Üyesi

Toplantıya Katılmadı

Prof. Dr. Ayhan Usal
Etik Kurulu Üyesi

Prof. Dr. Bilgin Yüksel
Etik Kurulu Üyesi

Prof. Dr. Behman Alper
Etik Kurulu Üyesi

Doç. Dr. Recep Tuncer
Etik Kurulu Üyesi

Doç. Dr. Davut Alptekin
Etik Kurulu Üyesi

Yar. Doç. Dr. Esin Akpınar
Etik Kurulu Üyesi

Toplantıya Katılmadı

Ar. Gör. Dr. Yurdaer Dönmez
Etik Kurulu Üyesi

Başhekim Nuriye Kabukçu
Etik Kurulu Üyesi

Toplantıya Katılmadı

Öğrenci Temsilcisi Boray Altunay
Etik Kurulu Üyesi

EK-2: Anket formu örneği

Örnek No: Tarih:/...../.....

Adı Soyadı:

Yaş:

Cinsiyet:

Doğum Yeri / Yılı:

Adres:

Telefon:

1) Akrabalık bilgileri

Anne-Baba Yok ☐ Var ☐ Varsa Derecesi:

Karı-Koca Yok ☐ Var ☐ Varsa Derecesi:

2) Kardeş Sayısı:

3) Çocuk Sayısı:

4) Hasta kardeşiniz var mı? Yok ☐ Var ☐

5) Hasta çocuğunuz var mı? Yok ☐ Var ☐

6) Sosyal güvence durumu

Emekli Sandığı ☐ Yeşil Kart ☐ SSK ☐

Bağ-Kur ☐ Diğer ☐ Yok ☐

7) Meslek

Ev hanımı ☐ İşçi ☐ Memur ☐ Çiftçi ☐

İşsiz ☐ Serbest ☐ Diğer:

8) Eğitim durumu

a) Okuryazar değil b) Okur yazar c) İlkokul mezunu d) Ortaokul mezunu

e) Lise mezunu f) Üniversite mezunu

9) Akrabalarınızda bilinen kan hastalığı veya kalıtsal hastalık var mı?

☐ G6PD Eksikliği

☐ Akdeniz Anemisi (Talasemi) taşıyıcısı

☐ Akdeniz Anemisi (Talasemi) hastası

☐ Orak Hücre Anemisi taşıyıcısı

☐ Orak Hücre Anemisi hastası

☐ Anormal hemoglobin taşıyıcısı

☐ Anormal hemoglobin hastası

☐ Demir Eksikliği Anemisi

10) Sıtma geçirdiniz mi? ☐ Evet ☐ Hayır

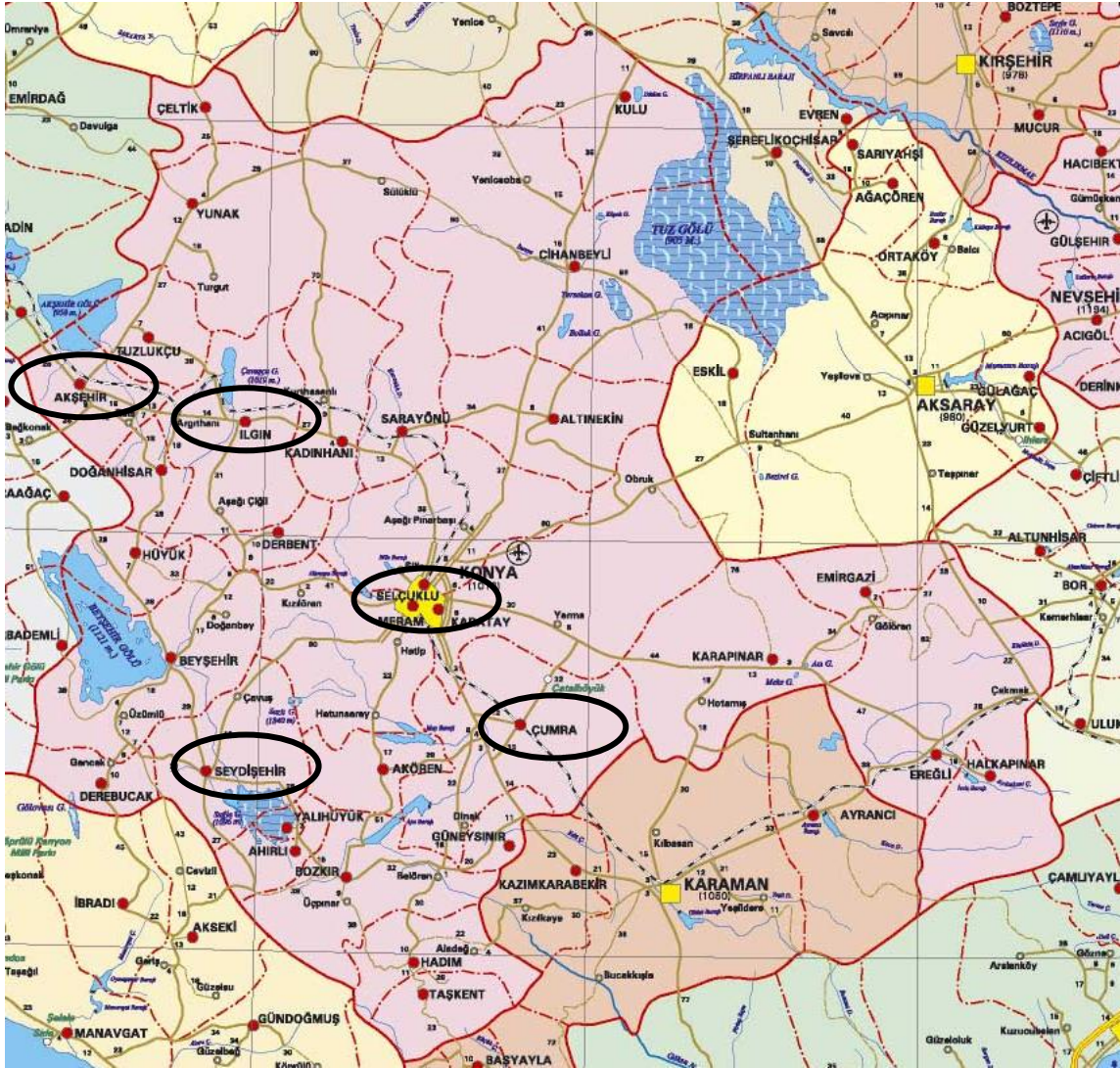
11) Sarılık geçirdiniz mi? ☐ Evet ☐ Hayır

12) Sürekli kullandığınız ilaç var mı? ☐ Evet ☐ Hayır

13) Cevabınız EVET ise hangisi?

.....

EK-3: Konya il haritası



EK-4: Nanogen mikroarray cihazı



EK-5: Nanogen mikroarray cihazında kullanılan kartuşların yakından görünüşü



ÖZGEÇMİŞ

1976 Yılında Mersin’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini burada tamamladıktan sonra 1994 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans öğrenimine başladı. 1998 yılında buradan mezun oldu. 1999 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine ve aynı yıl Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Doktora öğrenimine aynı bölümde devam etti. Evli ve bir kızı var.