



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**GST OMEGA 1 ve OMEGA 2 GEN POLİMORFİZMLERİNİN
TALASEMİ HASTALARINDAKİ KAN METAL DÜZEYLERİNE
ETKİSİ**

Bilge Ahsen KARA

**DİSİPLİNLER ARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
ADLİ KİMYA VE ADLİ TOKSİKOLOJİ
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN**

2019-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OMEGA 1 ve OMEGA 2 GEN POLİMORFİZMLERİNİN
TALASEMİ HASTALARINDAKİ KAN METAL DÜZEYLERİNE
ETKİSİ**

Bilge Ahsen KARA

DİSİPLİNLER ARASI ADLİ BİLİMLER DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN**

2019-ANKARA

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum **“OMEGA 1 ve OMEGA 2 Gen Polimorfizmlerinin Talasemi Hastalarındaki Kan Metal Düzeylerine Etkisi”** başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Bilge Ahsen KARA

Tarih:

İmza:

Kabul ve Onay

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinler Arası Adli Bilimler Anabilim Dalı Bilge Ahsen KARA tarafından hazırlanan

“OMEGA 1 ve OMEGA 2 Gen Polimorfizmlerinin Talasemi Hastalarındaki Kan Metal

Düzeylerine Etkisi” adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile

kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ii
Çizelgeler	iv
1. GİRİŞ	1
1.1. Hemoglobin Molekülü ve Hemoglobin Molekülünün Yapısı	6
1.2. Talasemi	11
1.2.1. Tanım	11
1.2.2. Talasemi Tipleri	11
1.2.2.1. Alfa Talasemi	12
1.2.2.2. Beta Talasemi	16
1.2.2.3. Beta Talasemide Klinik Semptomlar	17
1.2.2.4. Beta Talaseminin Patofizyolojisi	19
1.2.2.5. Beta Talasemide Karşılaşılan Komplikasyonlar	21
1.3. Metaller	28
1.3.1. Tanım	28
1.3.2. Demir	29
1.3.2.1. Demirin Vücutta Dağılımı	30
1.3.2.2. Demir Metabolizması	31
1.3.2.3. Demir Toksisitesi	35
1.3.3. Kurşun	38
1.3.3.1. Kurşunun Metabolizması	40
1.3.3.2. Kurşun Toksisitesi	41
1.4. Ksenobiyotiklerin Metabolizması	49
1.4.1. Biyotransformasyonun Yer Aldığı Organlar	49
1.4.2. Biyotransformasyon Reaksiyonları	49
1.5. Genetik Polimorfizm	55

1.5.1. Tek Nükleotid Polimorfizimi	55
1.5.1.1. GST Omega 1 ve Omega 2'nin Polimorfizmi	56
1.6 Amaç	56
2. GEREÇ VE YÖNTEM	58
2.1. Gereçler	58
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	58
2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	59
2.1.3. Deney Protokolü	60
2.1.3.1. Çalışma Grubunun Seçilmesi	60
2.1.3.2. Çalışma Grubundan Biyolojik Materyalin Toplanması	61
2.1.4. Yöntem	61
2.1.4.1. Metal Analizi	61
2.1.4.2. GSTO1 ve GSTO2 GEN POLİMORFİZMLERİ	68
3. BULGULAR	78
3.1. Örneklerin Genel Değerlendirilmesi	78
3.2. Talasemili Bireylerin GSTO1 Genindeki C→A Tek Nükleotid Polimorfizminin Belirlenmesi	78
3.2. Talasemili Bireylerin GSTO2 Genindeki A→G Tek Nükleotid Polimorfizminin Belirlenmesi	84
4. TARTIŞMA	91
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	95
ÖZET	98
SUMMARY	99
KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ	118

ÖNSÖZ

Çalışmamızda Talasemili hastalarında,GSOT1 (OMEGA 1) ve GSOT2 (OMEGA 2) Gen Polimorfizminin,kan metal düzeylerine etkisi araştırılmıştır.Demir ve kurşun düzeyleri atomik absorbsiyon spektrometri yöntemi ile ölçülmüştür.Gen polimorfizmleri PCR-RFLP ve ASO-PCR yöntemi ile belirlenmiştir.

Çalışmamızın GSOT1 ve GSOT2 gen polimorfizminin,Talasemili hastaların,kan metal düzeylerine etkisi araştırılmıştır.

Tezimiz; "Talasemi Hastalarında Metallerin Toksikokinetiğinde Rol Oynayan Enzim ve Talasemi Gen Polimorfizmlerinin Kan Metal Düzeyleri İle İlişkisinin Araştırılması" başlıklı ve 114S312 numaralı TÜBİTAK Projesi tarafından desteklenmiştir.

Başarılı genç bilim insanlarına yardım eden, toplumuzda bilim ve teknoloji ile ilgili bilincin ve kültürün oluşmasını destekleyen, TÜBİTAK kurumuna,

Çalışmanın tamamlanması ve sonuçlanmasında ,yardım ve desteğini esirgemeyen ,değerli danışman hocam Sayın Prof.Dr.H.Sinan SÜZEN'e ,doktoraya başlamama vesile olan Prof.Dr.Tülin SÖYLEMEZOĞLU'na,

Anlayış ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Bülent KARA ve canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
AAAS	Alevli Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi
AAS	Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi
ACO2	Mitokondriyal Akonitaz
ALAS2	Eritroit 5-aminolevulinate Sentaz
ApoTf	Apotransferrin
ASO-PCR	Alel Spesifik PCR
bp	Baz Çifti
C	Sitozin
Cd	Kadmiyum
DMT1	Divalent Metal Transporter 1
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleozid Trifosfatlar
EDTA	Etilen-diamin-tetra-asetik Asit
L-fer	L-ferritin
F primer	Forward Primer
	G Guanin
Fe	Demir
Fe ⁺²	Ferröz Demir
Fe ⁺³	Ferrik Demir
FPN	Ferroportin
GFAAS	Grafit Fırınli Atomik Absorbsiyon Spektrometresi
GSOT1	Glutasyon S-Tranferaz 1
GSOT2	Glutasyon S-Tranferaz 2
Hb Gower 1	Hemoglobin Gower 1
Hb Gower 2	Hemoglobin Gower 2
HbF	Hemoglobin F
Hb Portland	Hemoglobin Portland
Hb	Hemoglobin
HbA	Hemoglobin A
HbA ₂	Hemoglobin A ₂

H-Fer	H-ferritin
HIF2 α	Hipoksiyle İndüklenen Faktör
IRE	Demir Responsive Element
IRP	Demir Düzenleyici Protein
Pb	Kurşun
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ppb	Milyarda Bir Ölçütü
R primer	Reverse Primer
ppm	Milyonda Bir Ölçütü
RFLP	Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
$\alpha_2\beta_2$	Hb A
$\alpha_2\gamma_2$	Hb F
$\alpha_2\delta_2$	Hb A ₂
α -globin	Alfa Globin
α -talasemi	Alfa Talasemi
β -globin	Beta Globin
β -talasemi	Beta Talasemi
RE	Restriksiyon Endonükleaz
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotid Polymorphism)
T	Timin
TBE	Tris-borikasit-edta
TE	Tris-edta
Tf	Transferin
TfR1	Transferrin Reseptörü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. α - and β - Talasemi Hastalığının Global Dağılımı	4
Şekil 1.2. Patolojik Hemoglobin Bozukluğu Dünya Dağılımı	5
Şekil 1.3. Talasemi Hastalığının Ülkemizdeki Görülme Sıklığına Ait Harita (Canatan ve ark., 2007).	5
Şekil 1.4. Hemoglobin (Hb) Molekülü	6
Şekil 1.5. Hemoglobin Molekülünün Yapısı (X Işınları Yardımıyla) Ve Eritrositlerdeki Temsili (Schechter, 2008).	7
Şekil 1.6. İnsanlara ait globin proteininin evrim şeması	8
Şekil 1.7. α ve β - globin genlerinin genomik yapısı ve Hb içerikleri (Schechter,2008).	9
Şekil 1.8. İnsan globin zincir sentezinin evreleri (Schechter, 2008).	10
Şekil 1.9. α -Talasemi Kromozomu	12
Şekil 1.10. Hb- Bart's Hidrops Fetal Sendromu.	15
Şekil 1.11 β -talasemi kromozomu ve β -globin gen yapısı (Cao ve Galanello, 2010).	16
Şekil 1.12. β -talasemi etkisi - Serbest α -globin zincir üretimindeki artış (Cappellini ve ark., 2014).	21
Şekil 1.13. Komplikasyonları gösteren çizelge (Yatmark ve ark, 2014)	22
Şekil 1.14. Demir kullanımını gösteren çizelge (Abbaspour ve ark., 2014).	30
Şekil 1.15. Hücrel demir homeostazının kontrolü (Anderson ve ark., 2012).	32
Şekil 1.16. Demir elementinin varlığında Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları neticesinde OH- radikal oluşumu (Halliwell ve Gutteridge, 1990 yılından itibaren uyarlanmıştır).	36
Şekil 1.17. ROS oluşması ve zararları (CAT: Katalaz, GSH: İndirgenmiş glutatyon, GSSG: Oksitlenmiş glutatyon, SOD: Süperoksit dismutaz, GPX: Glutatyon peroksidaz, GR: Glutatyon redüktaz) (Henrotin ve ark., 2009).	38
Şekil 1.18. Kurşun Alma Yolları	43

Şekil 1.19. Kurşunun kalmoduline bağlanması (kalsiyuma alternatif olarak) (PLC: Fosfolipaz C ; PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat; IP3: Inositol trifosfat; DAG: Diaçilgliserol) (Nussey ve Whitehead, 2001).	46
Şekil 1.20. Kurşun zehirlenmesi (Klinik gösterim)	48
Şekil 1.21. Ksenobiotic Metabolizma safhalarının Özeti (http://www.preskorn.com dan alınmıştır.)	50
Şekil 1.22. Glutathione S-transferase ait kristolografik yapı	51
Şekil 1.23. Glutatyonun kimyasal yapısı (https://tr.depositphotos.com/130746872/stock-photo-molecular-structure-of-glutathione.html)	52
Şekil 1.24. Glutatyon Sentezi	52
Şekil 1.25. Glutathione S-transferase omega kristal yapısı	53
Şekil 2.1. Demir analizine ait örnek kalibrasyon grafiği.	63
Şekil 2.2. Kurşun analizine ait örnek kalibrasyon grafiği.	66
Şekil 2.3. PCR ile çoğaltılan 472 bp'lık baz dizilimi ve tek nokta mutasyonu.	72
Şekil 2.4. PCR ile çoğaltılan 185 bp'lık baz dizilimi ve tek nokta mutasyonu.	75
Şekil 3.1. 471 bp uzunluğundaki PCR ürününün homozigot tipik CC bireylerde, Cac8I enzimi ile kesiminin şematik gösterimi.	79
Şekil 3.2. GSTO1 genindeki rs4925 polimorfizminin PCR-RFLP ile saptanmasına ait jel görüntüsü [PCR ürünü 471 bp. M=100 bp Ladder; 1 nolu örnek: Heterozigot genotipli birey (CA)= 410bp+265bp+145bp+61bp; 2,3 ve 5 nolu örnekler: Yabanıl tipli birey (CC)= 265bp+145bp+61bp; 4 nolu örnek: Mutant tipli birey (AA) = 410bp+ 61bp]	80
Şekil 3.3. Kurşun ve Demir Düzeyleri	83
Şekil 3.4. 185 bp uzunluğundaki PCR ürününün homozigot atipik GG bireylerde, MboI enzimi ile kesiminin şematik gösterimi.	85
Şekil 3.5. GSTO2 genindeki rs156697 polimorfizminin PCR-RFLP ile saptanmasına ait jel görüntüsü [PCR ürünü 185 bp. M=100 bp Ladder; 1 nolu örnek: Mutant birey (GG) = 122bp+ 63bp; 2 ve 3 nolu örnekler: Yabanıl tip birey (AA)= 185bp; 4 ve 5 nolu örnekler: Heterozigot genotipli birey (AG)= 185bp+122bp+63bp]	86
Şekil 3.6. Demir ve Kurşun Düzeyi	89

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Faz-I Reaksiyonları (Vural, 2005)	49
Çizelge 1.2. Faz-II Reaksiyonları (Vural, 2005)	49
Çizelge 2.1. Mikrodalga fırına ait tam kan yakma programı.	62
Çizelge 2.2. Alevli atomik absorpsiyon cihazı kullanılarak kan örneğinde demir metalinin analizi için uygulanan metot.	64
Çizelge 2.3. Kan örneklerinde kurşun analizine ait grafit fırın sıcaklık programı.	65
Çizelge 2.4. Kurşun analizi için grafit fırın teknikli atomik absorpsiyon cihazında uygulanan metot.	67
Çizelge 2.5. GSTO1 geninin amlifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri.	71
Çizelge 2.6. GSTO1 geninin çoğaltılmasında kullanılan primerler ve özellikleri.	72
Çizelge 2.7. GSTO1 gen polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PCR	73
Çizelge 2.8. GSTO2 geninin amlifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri.	74
Çizelge 2.9. GSTO2 geninin çoğaltılmasında kullanılan primerler ve özellikleri.	74
Çizelge 2.10. GSTO2 gen polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PCR	75
Çizelge 3.1. Bireylerin GSTO1*A140D tek nükleotid polimorfizmi ile oluşan genotiplerin frekansı.	81
Çizelge 3.2. Bireylerin GSTO1 C→A tek nükleotid polimorfizmi ile oluşan alel frekansı.	81
Çizelge 3.3. Çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti (GSTO1rs4925)	82
Çizelge 3.4. Talasemili bireylerde GSTO1 gen polimorfizmi ile kan Fe ve Pb düzeylerinin istatistiksel değerlendirmesi.	82
Çizelge 3.5. Bireylerin GSTO2*N142D tek nükleotid polimorfizmi ile oluşan genotiplerin frekansı.	86
Çizelge 3.6. Bireylerin GSTO2 A→G tek nükleotid polimorfizmi ile oluşan alel frekansı.	87
Çizelge 3.7. Çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti (GSTO2 rs156697)	87
Çizelge 3.8. Talasemili bireylerde GSTO2 gen polimorfizmi ile kan Fe ve Pb düzeylerinin istatistiksel değerlendirmesi.	88

1. GİRİŞ

Talasemi kelime olarak Yunanca "haima" (kan) ve "thalassa" (deniz) sözcüklerinden türetilmiştir. "Beta Talasemi" geninin kalıtsal olarak geçtiği bir tür "kansızlık" hastalığı olan Talesemi yeryüzünden en sık rastlanan otozomal resesif hastalıkların başında gelmektedir.

Tek gen hastalıkları dikkate alındığında dünyada en çok rastllanan hastalıklardan birisi olan Taleseminin meydana gelme sebebi globin zincirinin veya birden çok global zincirlerinin sentezinin var olmaması veya az sentezlenmesidir (Flint ve ark., 1998; Galanello ve Origa, 2010; Weatherall ve ark., 2002).

Alfa talasemili ve beta talesemili bireyler arasında bir takım farklılıklar bulunmaktadır. Karşılaştırma yapıldığında α -globin zinciri sentezinde bozukluk olduğunda Alfa talasemili bireyler ve β -globin zincir sentezinde bozukluk görüldüğünde beta talasemili bireyler söz konusudur. Alfa ve Beta talesemili bireyler, hangi tür globin zincir sentezinde bozukluk olduğuna göre isimlendirilir (Weatherall, 2001).

Talasemiye tarihte ilk kez 1925 yılında pediyatrist Pearl Lee ve Thomas Cooley tanımlamıştır. Pearl Lee ve Thomas Cooley Talesemiye Akdenizden göç eden küçük yaştakilerde "Cooley anemisi" olarak ortaya çıkarmıştır.

Cooley anemisi daha sonraları Akdeniz anemisi veya talesemi major olarak tanımlanmıştır. Talesemi hastalığının en yaygın belirtileri arasında büyüyen dalak, gelişmede gerilik, derin anemi ve kemiklerde deformite gelmektedir.

Aynı yıllarda İtalya’da tanımlanan bir diğer hatalık ise şu anda talasemi intermedia olarak bilinmektedir. Riatti tarafından tanımlanan ve Cooley anemisi ile benzerlik gösteren talasemi intermedia hastalığı, Cooley anemesine benzemekle beraber, bu hastalık ile kıyaslandığında semptomları daha hafiftir.

Aynı dönemlerde büyük oranda Yunanistan, İtalya, Malta gibi çevre adaları kapsayan bir coğrafyada daha sık rastlanan talasemi hastalığı, zaman geçtikçe bu ülkelerin dışına da çıkmış, daha uzak ülkeleri de kapsayan (tropikal ülkeler vb) geniş bir coğrafyada da tespit edilmiştir (Vallance ve Ford, 2003).

Yeryüzünde 190 milyondan fazla kişi genetik mutasyonlar ile bağlantılı farklı hemoglobinopatilere sahiptir. Bu kişilerin neredeyse yarısına yakını (%48) talaseminin oluşmasında ol oynayan kusurlu genlere sahiptir (Ambekar ve ark., 2001).

Bunun yanı sıra dünyada Asya ülkeleri ile birlikte Orta Doğu ülkeleri talasemi hastası yeni doğanların neredeyse tamamını oluşturmaktadır (%95 oran). Günümüzde de devam eden araştırmalar çerçevesinde 2000 - 2020 yılları arasında yaklaşık bir milyon talasemili hastanın dünyaya geleceği ön izlenmektedir (Lorey ve ark., 2001; Weatherall ve Clegg, 2001).

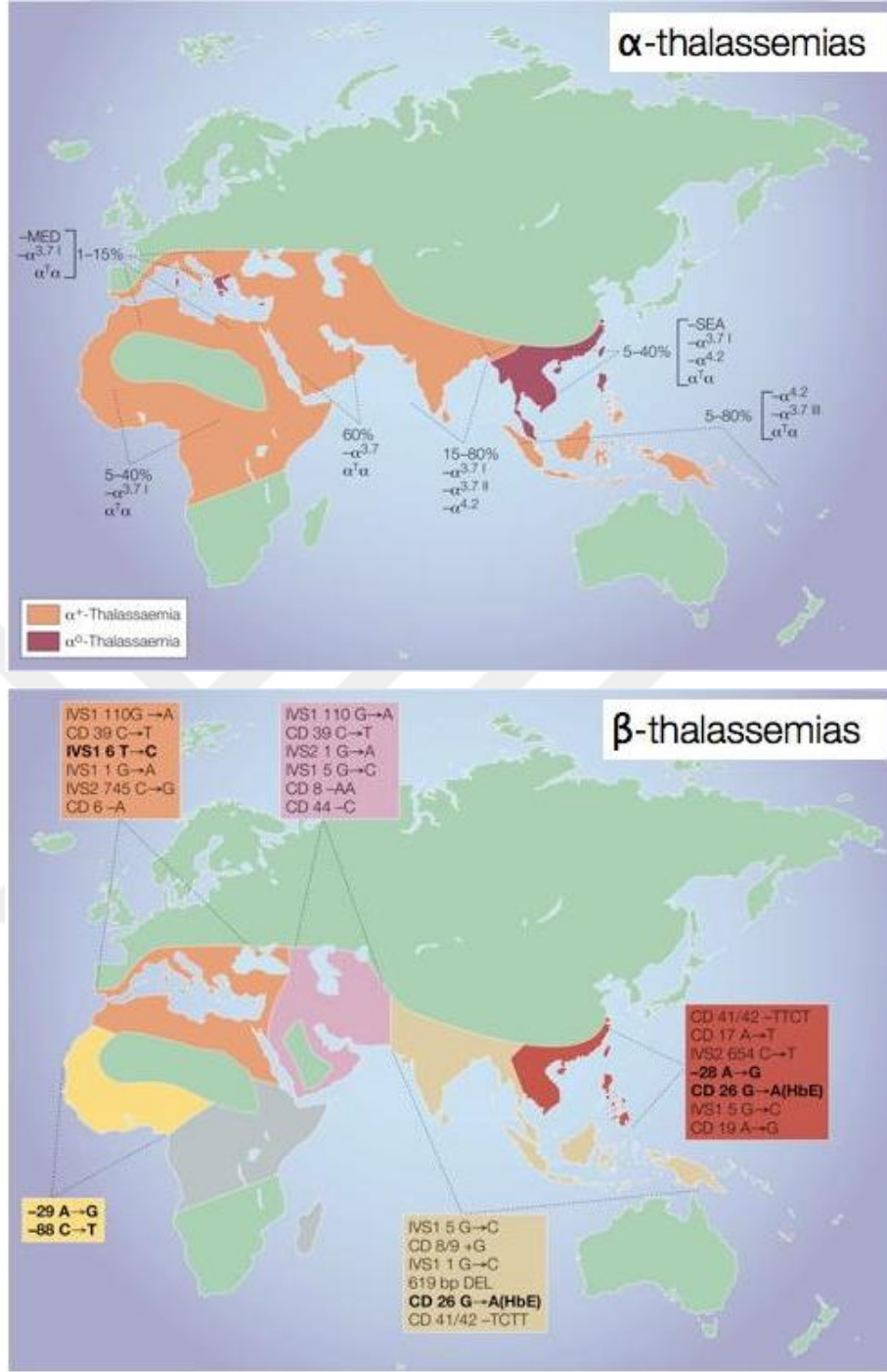
Dünya üzerinde en sık rastalana tek gen bozukluğu hastalığı Talasemi hastalığıdır (Şekil 1.1) (Pan ve ark., 2007; Quek ve Thein, 2007). Günümüzde oldukça önemli bir klinik durum haline gelen Talasemi hastalığı için en yüksek insidans Kıbrıs, Sardinya (İtalya) ve Güney Doğu Asya ülkelerinde kaydedilmiştir (Flint ve ark., 1998; Galanello ve Origa, 2010).

Dünyada bazı coğrafyalarda göç ve değişik etnik kimliklerin evlenmesi nedenleriyle Talasemi Hastalığı diğer bölgelere göre daha yaygın olarak görülür.

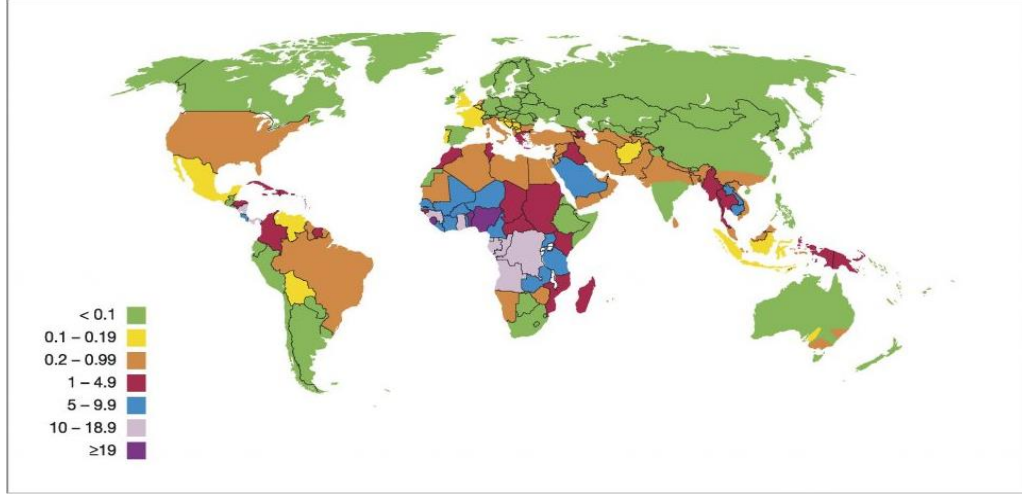
Sıtma hastalığının endemik şekilde görüldüğü bölgelerde olduğu gibi Talasemi hastalığına Güney Amerika, Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'da daha fazla rastlanır (Cao ve Galanello, 2010).

Yunanistan, İtalya gibi Akdeniz ülkelerinde de olduğu gibi Türkiye'de Talasemi hastalığının görülme sıklığı oldukça fazladır. Ülkemizde en yüksek oranda görülen genetik hastalıkların başında gelen Talasemi Hastalığının ülkemizde yaklaşık 1.5 milyona yakın taşıyıcısı ve 5000'e yakın talasemi hastalığı olduğu bildirilmektedir.

Türkiye nüfusu ile karşılaştırıldığında Talasemi Hastalığının görülme oranı ülke genelinde %2 olarak rapor edilmiştir. Buna karşılık bazı bölgelerimizde (Ege ve Akdeniz) %2 olarak rapor edilen oran %10'lara kadar çıkabilmektedir (Şekil 1.1, (Şekil 1.3) (Basak, 2007; Canatan ve ark., 2006).

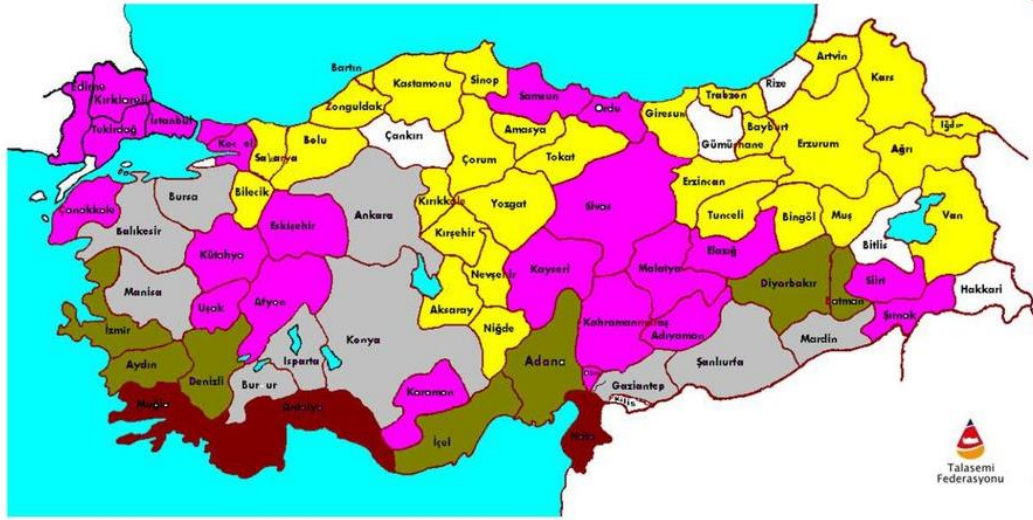


Şekil 1.1 α- and β- Talasemi Hastalığının Global Dağılımı



Şekil 1.2 Patolojik Hemoglobin Bozukluğu Dünya Dağılımı

Dünya üzerinde her 1000 doğumda rastalanan Patolojik Hemoglobin Bozukluğu sıklığını gösterir harita Şekil 1.2’de görülmektedir.



BEYAZ: 0, SARI: 1-10, MOR: 10-50, GRİ: 50-100, YEŞİL: 100-200, BORDO: 200 üzeri

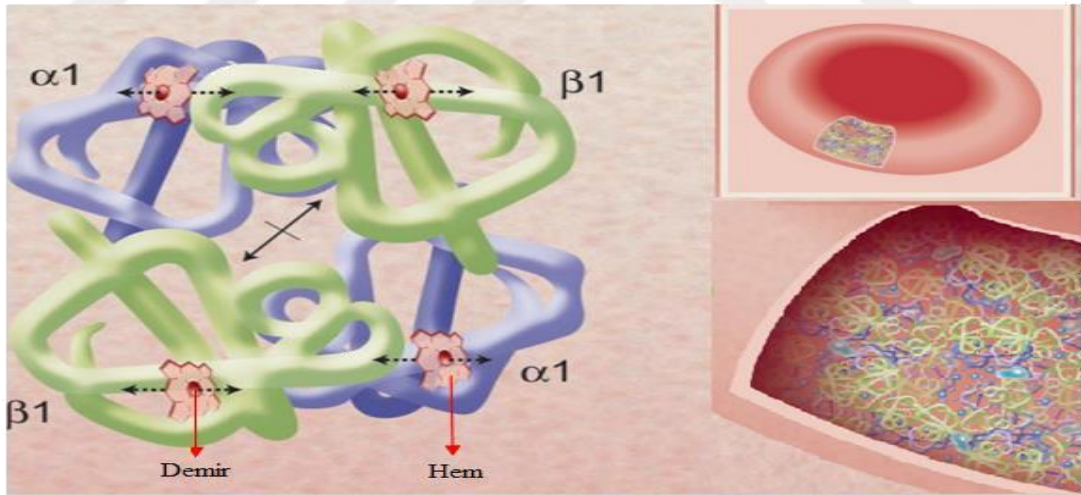
Sağlık Bakanlığı AÇSAP Genel Müdürlüğü: Hemoglobinopati Kontrol Programı. Editörler: Canatan D, Aydınok Y: Talasemi ve Hemoglobinopatiler: Tanı-Tedavi. Sağlık Bakanlığı-Talasemi Federasyonu, Antalya, 2007.

Şekil 1.3 Talasemi Hastalığının Ülkemizdeki Görülme Sıklığına Ait Harita (Canatan ve ark., 2007).

1.1. Hemoglobin Molekülü ve Hemoglobin Molekülünün Yapısı

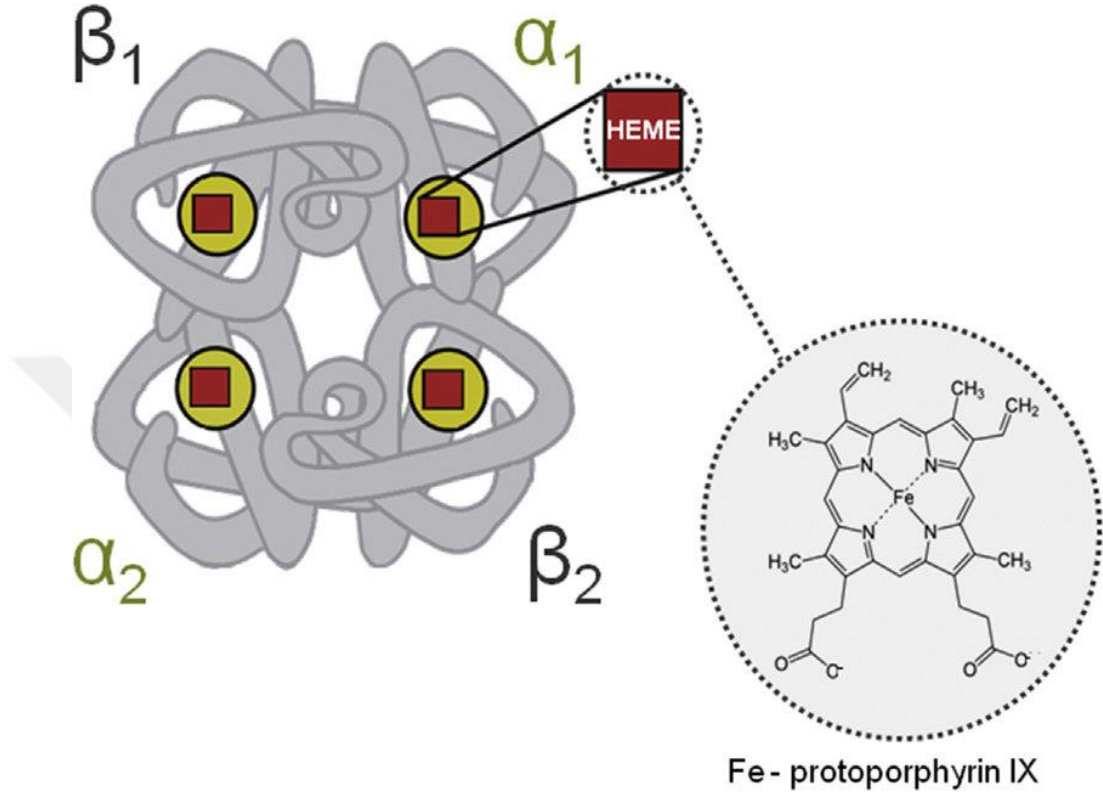
Hemoglobin (Hb) molekülünün, çapı ortalama 6.4 nanometredir ve Hb molekülünün ağırlığı ise 64.500 dalton molekül ağırlığındadır (Schechter, 2008). Hb molekülü kırmızı kan hücrelerinde yer alır ve Hb molekülünün asıl görevi dokulara akciğerden aldığı oksijeni taşımasıdır. Esas fonksiyonu olan akciğerden dokulara oksijen taşımasının yanı sıra Hb molekülü nitrikoksit (NO), karbonmonoksit (CO) ve karbondioksit (CO₂) gibi 3 biyolojik rolleri önemli gazla da etkileşimde bulunmaktadır (Perutz, 1997).

Hb molekülünü oluşturan gruplara “hem” ve “globin” adı verilmektedir. “hem” ve “globin” ismiyle anılan gruplar hücrelerde farklı yerde sentezlenmektedir. Sentezlenme işleminden sonra birleşerek Hb molekülünü oluşturmaktadır. (Nagel ve ark., 2003).



Şekil 1.4 Hemoglobin (Hb) Molekülü

Hemoglobin (Hb) molekülünün globin tarafında 2 beta ve 2 alfa olmak üzere (α - β) 4 adet polipeptid zinciri mevcuttur. Bu bu polipeptidlere ayrı ayrı bağlanan 1 tane protestetik grubu ve 1 tane de demir protoporfirin IX molekülü vardır (Şekil 1. 4).

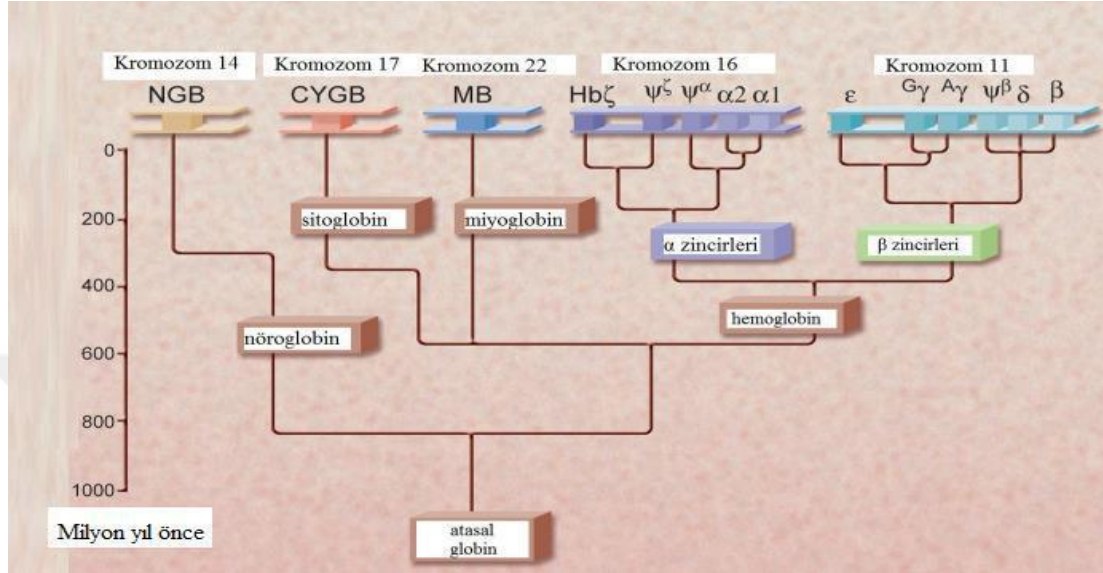


Şekil 1.5. Hb Molekülünün Yapısı (X Işınları Yardımıyla) ve Eritrositlerdeki Temsili (Schechter, 2008).

Hemoglobin (Hb) molekülünün karmaşık yapısındaki hem molekülleri her insan hemoglobin tipinde aynı olmakla beraber ve Hemoglobin (Hb) molekülü yapısında toplam olarak 4 hem grubu mevcut olduğu için oksijen için de 4 bağlanma noktası bulunmaktadır.

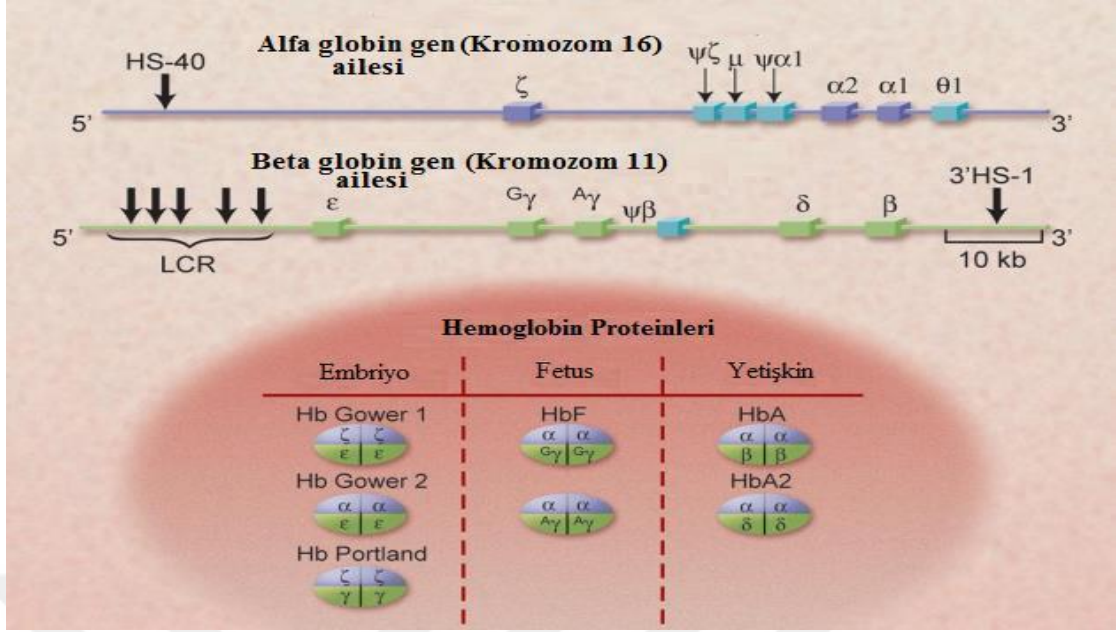
Globin zincirini sentezleyen genler alfa ve beta olarak 2 gruba ayrılır (α ve β gen). Bununla birlikte evrimsel süreç sırasında miyoglobin ve diğer globin genleri, bahsi geçen alfa ve beta genlerinden ayrılmıştır. Bahsi geçen 2 gen sırasıyla 11. ve 16. kromozomlarda gelişmiştir. Genlerin gelişimsel kontrolleri ve genlerin sayısı türlerine

göre oldukça fazla değişim göstermektedir. Ancak temel globin yapıları ile birlikte protein katlanmaları memelilerin evrim süreci boyunca korunmuştur (Şekil 1.6.) (Schechter, 2008).



Şekil 1.6. İnsanlara ait globin proteininin evrim şeması

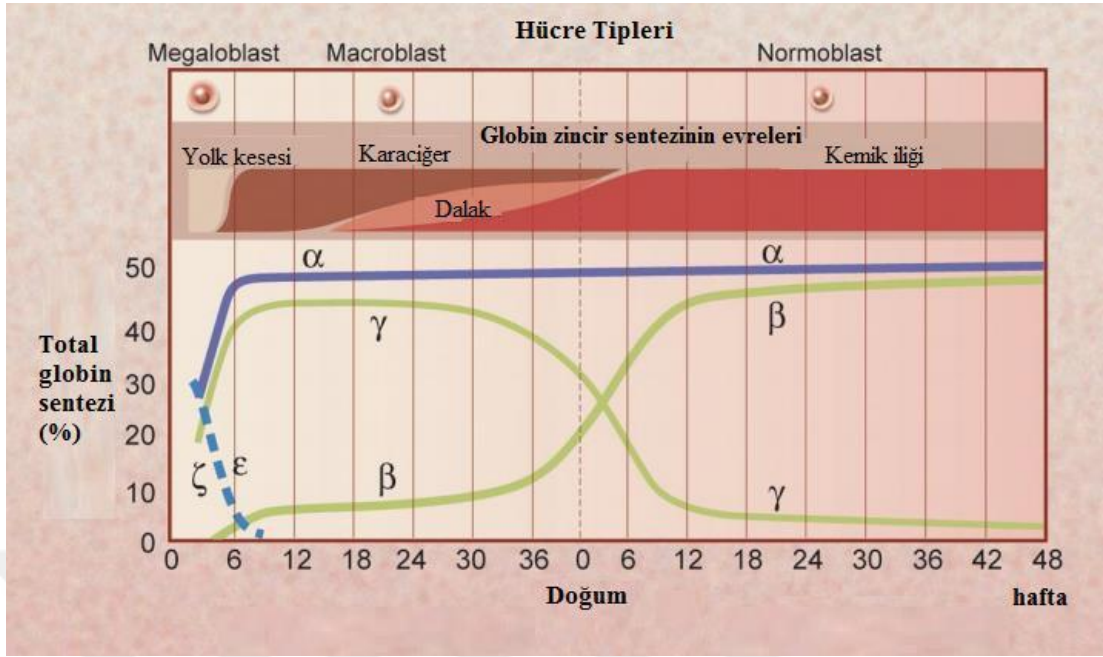
Genlerin kromozomlar üzerindeki dizilimi α gen kümesinde ζ - $\psi\zeta$ - $\psi\alpha$ 1- α 2- α 1- θ 1 düzeninde olduğu izlenmektedir. (Şekil 1.7). Sentez ζ geninin üst kısmında bulunan hipersensitif bölge 40 (HS-40) tarafından kontrol edilmektedir. α geni duplike olarak α 1 ve α 2 zincirlerini oluşturmaktadır. Genlerin kromozomlar üzerindeki dizilimi β gen kümesinde ise ϵ - $G\gamma$ - $A\gamma$ - $\psi\beta$ - δ - β düzenindedir (Şekil 7). Bu genlerin sentezi ise, 5' kısmında yer alan lokus kontrol bölgesi tarafından (LCR) düzenlendiği izlenmektedir. $\psi\zeta$ - $\psi\alpha$ 1 ve $\psi\beta$ gibi psödo genler gelişimin erken evrelerinde aktif olmakla birlikte ilerleyen dönemlerde fonksiyonlarını kaybetmektedirler. (Grosveld ve ark., 1987; Weatherall, 2010).



Şekil 1.7 α ve β globin genlerinin genomik yapısı ve Hemoglobin içerikleri (Schechter, 2008).

Ontojeni boyunca insanın oksijen gereksinimlerindeki farklılığa bağlı olarak gelişiminin her aşamasında farklı Hb molekülüleri; embriyonik Hb, fetal Hb, yetişkin Hb sentezlendiği bilinmektedir. Tüm Hb'ler tetramerik yapıya sahiptir ancak her biri farklı iki çift globin zinciri içerir. (Wilber ve ark., 2011). Örneğin, 141 aminoasitten oluşan α polipeptid zincirleri embriyonik ve yetişkin hemoglobinlerinde yer almaktayken, β zinciri yetişkin hemoglobinde ($\alpha 2\beta 2$), gama zinciri fetal hemoglobinde ($\alpha 2\gamma 2$), delta zinciri ise HbA2'de yer alır. (Marengo-Rowe, 2006). Ayrıca yetişkin Hb'nin yaklaşık %97'si hemoglobin A ($\alpha 2\beta 2$), %2'si hemoglobin A2 ($\alpha 2\delta 2$) ve %1'i fetal hemoglobin ($\alpha 2\gamma 2$) olarak bilinmektedir. (Schechter, 2008).

Embriyonik hemoglobinlerin üç farklı tipi mevcuttur. Fetüste ζ ve ϵ genleri öncelikle yolk kesesinde, sonra para-aortik bölgede ve ardında da karaciğerde ekspres edilmektedir. Bunun neticesinde Hb Gower I ($\zeta 2\epsilon 2$), Hb Gower II ($\alpha 2\epsilon 2$), Hb Portland ($\zeta 2\gamma 2$) sentezlenmektedir. Hamileliğin 6-8. haftasında embriyonik ϵ globinden fetal γ -globine, doğumdan az bir süre sonra ise γ -globinden yetişkin β ve δ globine geçiş gözlenir. (Şekil 1.8) (Harju ve ark., 2002).



Şekil 1.8. İnsan globin zincir sentezinin evreleri (Schechter, 2008).

Embriyonik globin sentezi ilk olarak vitellus kesesinin kan adacıklarında meydana gelir. Hamileliğin yaklaşık beşinci haftasında eritropoezin yeri fetal karaciğere doğru geçiş göstermektedir ve eritropoezin karaciğerde başlamasıyla hamileliğin son iki trimesterinde baskın olan ve 2,3 BPG'ye (bifosfogliserat) daha gevşek bağlamasına bağlı olarak yetişkin hemoglobinlerine nazaran oksijen affinitesi daha yüksek olan hemoglobin F sentezlenir. Aynı zamanda bu görev hamileliğin 18. haftasından doğuma kadar fetal karaciğerden yavaş yavaş kemik iliğine geçer ki burası yetişkinin yaşam boyunca eritropoezinin gerçekleşeceği yerdir (Forget, 1998; Harju ve ark., 2002).

Son 30 yılda talasemi ve anormal hemoglobinlerin tedavilerine yönelik yapılan çalışmaların artarak sürdürülmesi α ve β globin genlerinin ekspresyonundaki değişikliklerin moleküler ve hücresel mekanizmalarını anlamamıza katkı sağlamaktadır (Stamatoyannopoulos ve Grosfeld, 2001).

1.2. Talasemi

1.2.1. Tanım

Talasemi, genetik olarak hemoglobin molekülünü oluşturan globin zincirlerinin birinin ya da birden fazlasının sentezindeki azalma veya tamamen kaybolmasına bağlı ortaya çıkan ve otozomal resesif geçiş gösteren genetik bir hastalıktır. Ayrıca etkin olmayan eritropoez ve aşırı kırmızı kan hücresi hemolizi anemiye neden olur (Marengo-Rowe, 2006).

1.2.2. Talasemi Tipleri

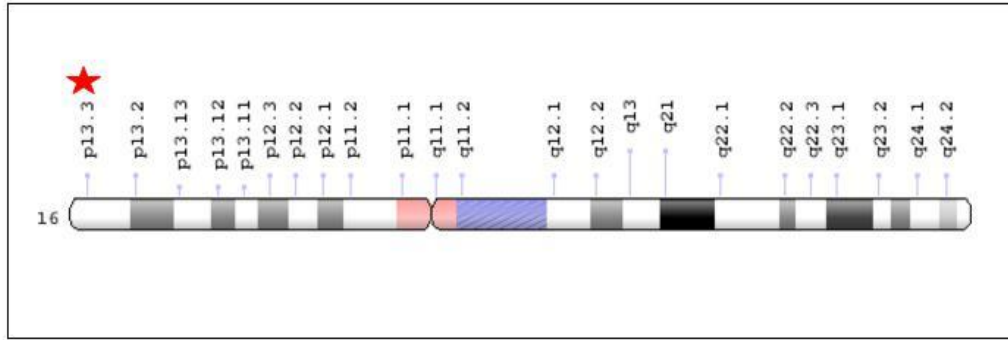
Retikülositler eşit miktarda α ve β zinciri ürettiği için olgun eritrositlerde her zincirden eşit miktarda molekül bulunmaktayken, talasemili hastalarda α ve β polipeptid zincirlerinden eşit miktarda üretilmediği için yeterli miktarda Hemoglobin-A ($\alpha_2\beta_2$) bulunmamaktadır.

Talasemiler Alfa (α) ve Beta (β) talasemi olmak üzere iki gruba ayrılır. Hemoglobin tetramerini meydana getiren globin zincirindeki yetersizlikler ve ya dengesizlikler talasemi tiplerinde ortak özellik olmaktadır (Marengo-Rowe A, 2006).

1.2.2.1. α -Talasemi

Alfa talasemi en yaygın hemoglobin genetik anormalliklerindendir ve α -talasemili kişiler α zincirlerinin yetersiz yapımıyla karakterize edilir. α -talasemi sıtmanın epidemik olduğu bölgeler olarak bilinen tropikal ve subtropikal dünya bölgelerinde yaygındır ve hemoglobinopati taşıyıcılığının sıtmaya karşı seçici bir avantaj sağlayarak koruduğu düşünülür (Bernini, 2001; Higgs, 2013).

α -globin genleri 16. kromozomun telomerik bölgesinde (16p13.3) yer alır. (Şekil 9).



Şekil 1.9. α -talasemi Kromozomu

(https://en.wikipedia.org/wiki/Chromosome_16_human)

Sağlıklı bir bireyde her bir homolog kromozom üzerinde iki tane olmak üzere toplam dört tane α - globin geni ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) yer alır. α gen kümesi ζ - $\Psi\zeta$ - $\Psi\alpha$ 1- α 2- α 1- θ 1 düzenindedir ve α gen ekspresyonunda iki α geni arasında transkripsiyon düzeyinde farklılıklar bulunmaktadır. α 2 geni α 1 geninden yaklaşık iki ya da üç kat fazla sentezlenir (Galanello ve Cao, 2011). İki α geni arasındaki bu farklı ekspresyon düzeyinin α talasemili bireylerde oluşan delesyonel ve delesyonel olmayan mutasyonların patofizyolojisi ve α 1 ya da α 2 globin mutasyonlarını kapsayan hemoglobin varyantların miktarı üzerinde önemli etkileri mevcuttur (Harteveld ve Higgs, 2010).

α -talasemiye sebep olan farklı moleküler defektler popülasyonda değişken frekanslarda ve formlarda ortaya çıkar. α -talaseminin iki tane taşıyıcı ve iki tane klinik olarak anlamlı formu mevcuttur.

Fenotipik seviyede taşıyıcılık durumu sessiz α -talasemi taşıyıcı tipi ve α -talasemi taşıyıcı tipi olarak ikiye ayrılır. Sessiz α -talasemi taşıyıcı tipinde dört α geninden tek bir tanesi delesyona uğrar ve (α -/ $\alpha\alpha$) genotipindedir. α -talasemi taşıyıcı tipinde ise iki kromozomun her birindeki ya da aynı kromozomdaki iki α -globin geni delesyona uğrar ve (α -/ α -) ya ($--$ / $\alpha\alpha$) genotipindedir.

Klinik olarak anlamlı formlar ise Hb-H ve Hb-Bart's Hidrops Fetalis Sendromu'dur. Hb-H üç α -globin gen delesyonu durumunda görülür ve (α -/ $--$) genotipindedir. Hb-Bart's Hidrops Fetalis Sendromu'nda ise dört α -globininde delesyon gerçekleşmektedir ve ($--$ / $--$) genotipindedir.

Delesyonel olmayan mutasyonlar α gen ifadesini kontrol eden kritik bölgelerde gerçekleşen bir ya da daha fazla tek nükleotid değişimleri neticesinde oluşur. Ayrıca fenotipin şiddeti yalnızca etkilenmiş α gen sayısı ile bağlantılı değildir. Delesyonel ya da delesyonel olmayan mutasyonların değerlendirilmesi yapılırken epigenetik etkileşimlerde göz önünde tutulmalıdır (Berdasco ve Esteller, 2013; Galanello ve Cao, 2011; Harteveld ve Higgs, 2010).

1.2.2.1.1. Sessiz α -Talasemi Taşıyıcı Tipi

Sessiz α -talasemi taşıyıcı tipi, α -globin alellerinden birinin işlev görmemesine bağlı oluşur. Geriye kalan üç fonksiyonel alel yeterli miktarda α -globin zinciri sentezlenir. Bu sebeple klinik fenotipleri asemptomatiktir. Kişilerin Hb, hematokrit ve ortalama eritrosit hacmi normaldir. Klinik olarak herhangi bir sorunla karşılaşılmadığı

için tam kan sayımı yapılmadığı sürece hayat boyunca fark edilmeyip saptanamayabilir (Harteveld, C. L. and Higgs, D. R, 2010).

1.2.2.1.2. α - talasemi Taşıyıcı Tipi

α - talasemi taşıyıcı tipi, iki α -globin alelinin işlev görmemesine bağlı olarak ortaya çıkar. Yeterli miktarda α globin sentezlenemez ve buna bağlı olarak Hb-A miktarı ile eritrositlerdeki Hb içeriği azalır. Klinik olarak hafif anemi, mikrositoz ve hipokromi görülür (Galanello ve Cao, 2011).

1.2.2.1.3. Hb-H Hastalığı

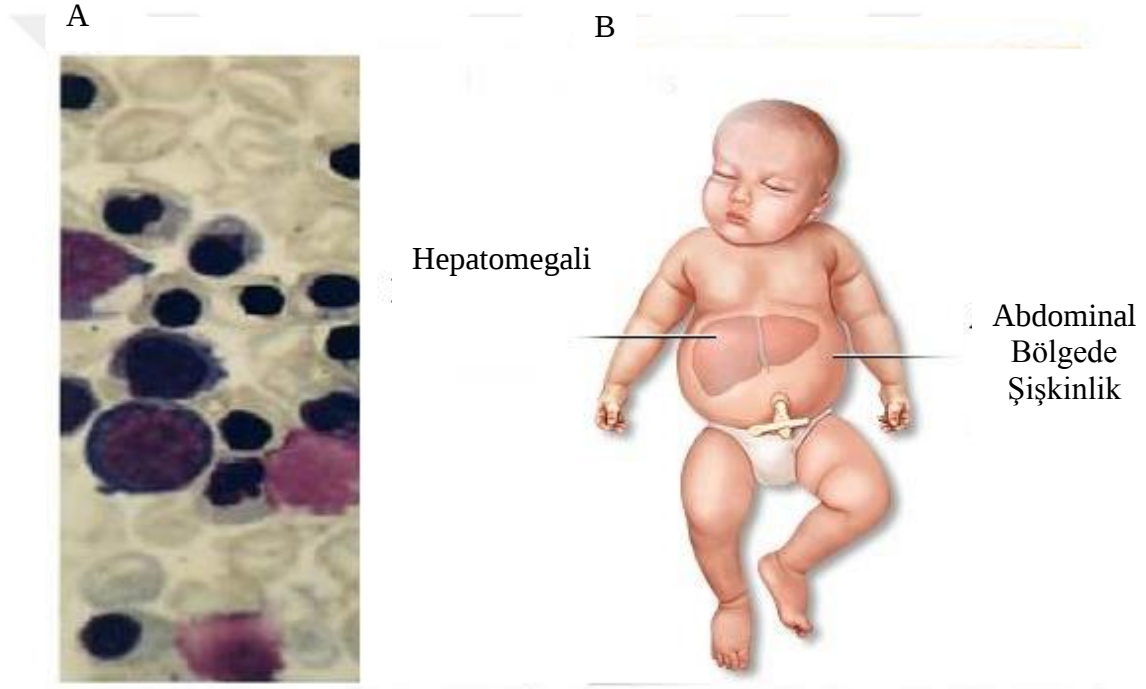
Klinik ve hematolojik açıdan değişkenlik gösteren Hb-H hastalığı üç α -globin alelinin işlev görmemesine bağlı olarak ortaya çıkar (Origina ve ark., 2007). Hastalarda %30 daha az α -globin sentezlenirken β - globin sentezi normal olarak devam eder. Bu sebeple Hb molekülünde yüksek miktarda β -globin zinciri bulunur ve β_4 tetramerini oluşturur.

Hb-H hastalığının en belirgin klinik semptomları hemolitik anemi, hepatosplenomegali, derecesi farklılık gösteren sarılık ve orta α -talasemi benzeri kemik modifikasyonlarıdır. Bazen bu tabloya periferik kandaki Hb-Bart eşlik eder. Ayrıca Hb-H küçük yaştakilerde gelişme azlığına neden olabilir. Diğer komplikasyonlar içinde enfeksiyonlar, bacak ülserleri, safra taşları ve folik asit azlığı bulunur (Laosombat ve ark., 2009; Weatherall ve Clegg, 2001).

Düzenli transfüzyon alan yaşlı hastalarda ise çoğu zaman demir yüklemesine bağlı gelişen demir toksisitesi sonucu oluşan komplikasyonlar görülebilmektedir.

1.2.2.1.4. Hb- Bart's Hidrops Fetalis Sendromu

α -talaseminin en ağır formu olan Hb- Bart's Hidrops Fetalis Sendromu dört alfa alelinin de işlev görmemesine bağlı ortaya çıkmıştır. Hb- Bart's Hidrops Fetalis Sendromlu infantların eritrositlerinde alfa zincir sentezlenemediği için fizyolojik olarak fonksiyonel olmayan γ_4 ve β_4 tetramerleri oluşur. Bu infantlarda fonksiyonel olan Hb, embriyonik Hb- Portland ($\zeta_2\gamma_2$) olup bireylerde değişik miktarlarda bulunur ve O₂ taşıyarak infantların canlı kalmasını sağlayan tek Hb çeşitidir. Klinik belirtileri yaygın ödem, kalp yetmezliği ve uzamış intrauterin anemidir (Şekil 1.10).



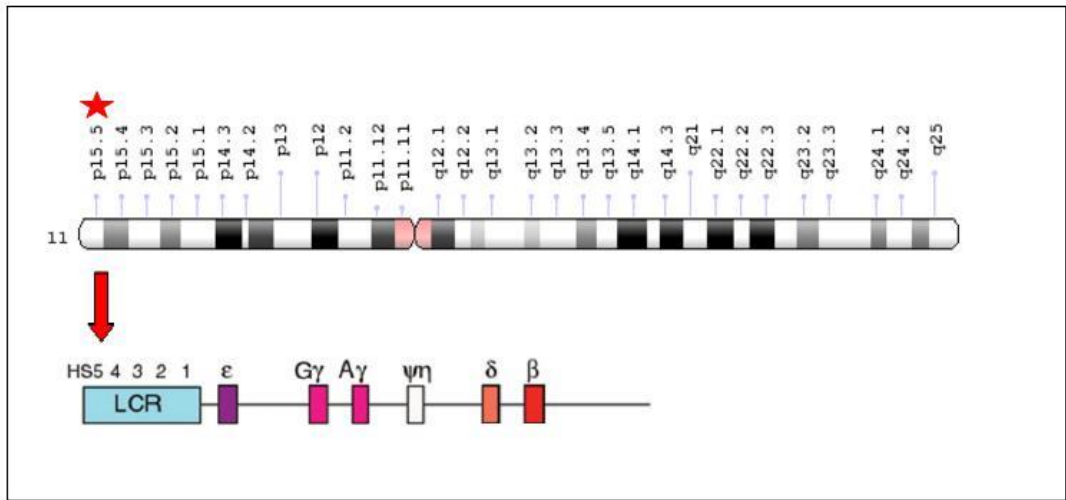
Şekil 1.10. Hb -Bart's Hidrops Fetal Sendromu.

A.Periferik yaymada olgunlaşmamış kırmızı hücre öncülleri, mikrositoz, anizositoz ve poikülositozu göstermektedir. B. Yenidoğan hidropik bebek (Weatherall ve Clegg, 2001).

Klinik özelliklerin içinde hepatosplenomegali, beyin gelişiminde gerileme, plesanta büyümesi, iskelet ve kalp-damar deformiteleri de yer alır. Hb- Bart's Hidrops Fetalis Sendromlu infantlarda ya gebeliğin 23-38. haftasında düşük gözlenmekte ya da doğumdan hemen sonra ölümü olur. Bununla birlikte literatürde sayısı az da olsa yaşayan Hb- Bart's Hidrops Fetalis vakaları bulunmaktadır. Bu durumdaki hastalara yoğun yaşam destek tedavileri ve kan transfüzyon uygulamaları yapılır (Beaudry ve ark., 1986; Bianchi ve ark., 1986; Yi ve ark., 2009).

1.2.2.2. β -Talasemi

Hemoglobin (Hb) tetramerindeki β -globin zincirlerinin sentezlenememesi ya da eksik senteziyle karakterize edilen β -talasemi, kalıtsal olarak aktarılabilen bir kan hastalığıdır. β -globin geni 11. kromozomun p15.5 bölgesinde yer alır ve δ globin geni, embriyonik ϵ geni, fetal $A\gamma$ ile $G\gamma$ genlerini kapsayan 80 kilobaz uzunluğundaki DNA bölgesinde lokalizedir (Şekil 1.11.) (Cao ve Galanello, 2010).



Şekil 1.11. β -talasemi kromozomu ve β -globin gen yapısı (Cao ve Galanello, 2010).

TATA, CAAT ve CACC kutularının bulunduğu 5' promotor bölgesi ile lokus kontrol bölgesi (LCR) β geninin regulasyonunda önemli rol oynar. LCR, eritroid transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgeleri olan eritroid spesifik DNase hipersensitif bölgeleri (HSS) içerir. (Cao ve Galanello, 2010; Palstra ve ark., 2008). Bu bölgelerde oluşan mutasyonlar β - globin zincir sentezinde önemli rol oynar. Yapılan çalışmalarda bu güne kadar β -globin geninde 200' ün üzerinde farklı mutasyon saptanmıştır.

Farklı talasemi alellerinin oluşmasında nokta mutasyonları major rol oynar. Bu nokta mutasyonları üç farklı kategoride incelenir:

β gen transkripsiyonunda hataya sebep olan promotor mutasyonları ve 5'UTR (untranslate bölge) mutasyonları,

Splice-junction mutasyonları ve mRNA sürecini etkilemekte olan 3'UTR mutasyonları,

Anormal mRNA translasyonuna sebep olan non-sense, çerçeve kayması ve başlama kodon mutasyonları (Nienhuis ve Nathan, 2012).

1.2.2.3. Beta Talasemide Klinik Semptomlar

Klinik Semptomlara göre β talasemi üç sınıfa ayrılır ;

1.2.2.3.1. Talasemi Major (Homozigot β Talasemi)

Cooley anemisi veya homozigot β talasemi olarak bilinen Talasemi major, klinik olarak en önemli β talasemi türüdür. 11. kromozomda yer alan β -talasemi

geninin homozigot yada birleşik heterezigot aktarılması ile oluşur. (kişiler iki β talasemi aleline sahiptir).

Hayatta kalabilmek için talasemi majorlu hastalar yaşamlarının ilk iki senesinde kan transfüzyonuna başlar ve yaşamları boyunca düzenli olarak transfüzyona devam gerekir. Düzenli transfüzyon almayan bireylerin ise yaşamları ölümle sonuçlanır. Ayrıca düzenli transfüzyonlar ve inefektif eritropoez sonucunda vücutta demir yükünün artmasına bağlı olarak demir toksisitesi görülür. Bu sorunun üstesinden gelebilmek için de hastalara uygun şelasyon yöntemleri uygulanması gerekmektedir.

β talasemi majorlu hastaların belirgin özellikleri kasların zayıflaması, büyüme geriliği, sarılık, hepatosplenomegali ve deride kahverengi pigmentasyondur. İskelet yapısında bacaklarda yapı bozukluğu ve kraniyofasial değişiklikler gibi önemli deformalitelere görülebilmektedir. Kraniyofasial değişiklikler içinde alın ve yanak kemiklerinin belirgin olarak ortaya çıkması, maxillalar kemikte hipertrofi ve burun köprüsünde çökme yer alır. Ayrıca yüzde belirgin bir mongoloid şekil mevcuttur (Weatherall ve Clegg, 2001; Cao ve Galanello, 2010).

Hastalarda şiddetli mikrositik ve hipokromik anemi görülür. Ayrıca ortalama eritrosit hacminde (MCV) ve ortalama eritrosit hemoglobininde (MCH) azalma oluşur. Bunlara ek olarak periferik kan yaymada anisositosis ve poikilositoz görülür (Cao ve Galanello, 2010).

1.2.2.3.2. Talasemi İntermedia

Talasemi intermedia, β talaseminin ara formudur. Tedavi hastalığın gidişine bağlı olarak değişmekle beraber çoğu zaman transfüzyona ihtiyaç az olmaktadır.

Talasemi intermedia hastalarında talasemi minöre yakın bir seyirden talasemi majöre yakın bir tabloya kadar değişebilen heterojen bir klinik seyir söz konusudur. Dolayısıyla hastadan hastaya farklı semptomlar izlenmektedir. Bu semptomlar içerisinde anemi, sarılık, safra kesesi taşı, karaciğer ve dalak büyümesi, iskelet yapısında değişiklikler ve trombotik komplikasyonlar yer alır (Eldor ve Rachmilewitz, 2002; Weatherall ve Clegg, 2001).

1.2.2.3.3. Talasemi Minör (Heterozigot Beta Talasemi)

Talasemi minor, heterozigot β talasemi ya da β talasemi taşıyıcısı olarak da bilinir ve β talasemi mutasyon geninin heterozigot taşınması durumunda görülür. Hatalı genin görevini yapan bir de sağlam gen bulunduğu için, en hafif seyir gösteren β talasemi türüdür.

β talasemi taşıyıcıları mikrositoz, hipokromi, artan Hb -A2 düzeyi, hafif ya da minimal anemi gibi karakteristik hematolojik özellikleri taşır. Klinik olarak asemptomatiktir ve spesifik bir tedavi uygulanmasına ihtiyacı bulunmamaktadır (Cao ve Galanello, 2010).

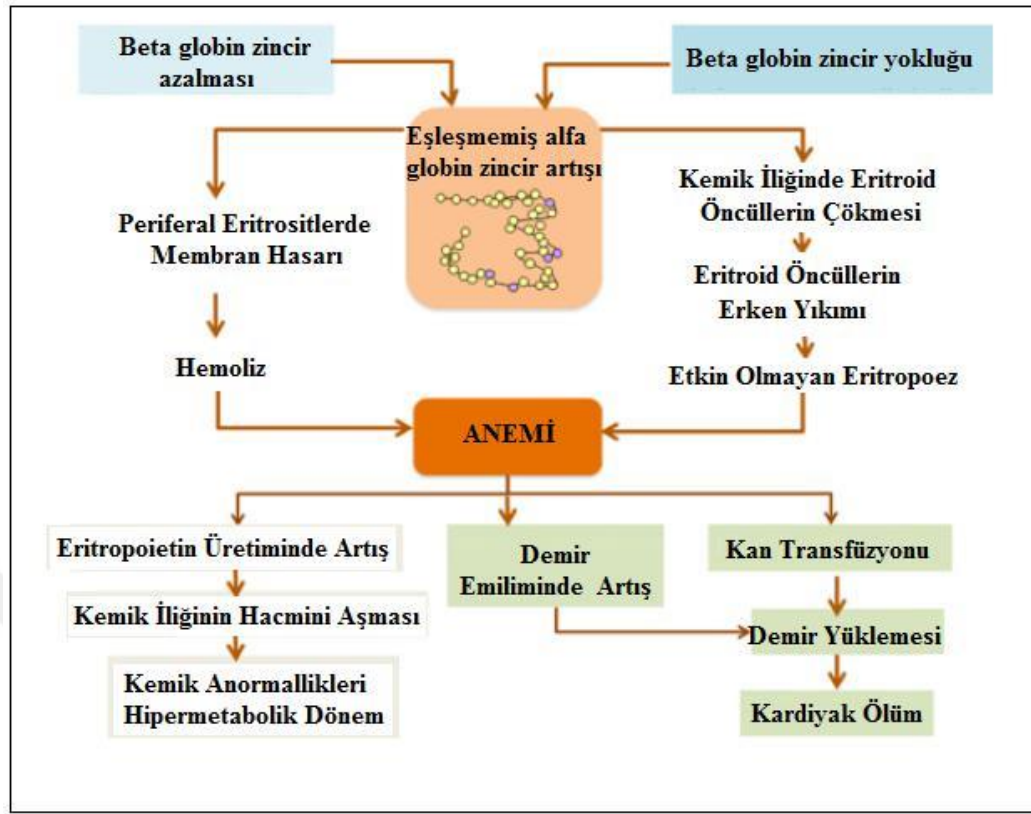
1.2.2.4. Beta Talaseminin Patofizyolojisi

β talasemide α -globin zincir sentezi etkilenmemekteyken, β -globin zincir sentezinin yeterli ya da hiç yapılamamasına bağlı olarak eritroid öncüllerde eşleşmeyen aşırı α -globin zincir birikimi gerçekleşmektedir. Bu durumda serbest α zincirleri geçerli bir tetramer yapısı oluşturamayarak ve kemik iliğindeki kırmızı hücre öncüllerinde inklüzyon cisimcikleri halinde çökmektedirler. Işık ya da elektron mikroskobu yardımıyla görüntülenebilen bu inklüzyon cisimcikleri eritroid öncüllerinin intramedüller hasarlanmasına neden olur. Ayrıca eşleşmeyen aşırı α -globin zincirleri periferik eritrositlerin membran hasarına neden olur (Şekil 1.12).

β -talasemi hastalığının şiddetini α ve α olmayan zincirler arasındaki dengesizlik ve serbet α zincir havuzunun boyutu belirler. Bu nedenle, zincir dengesizlikleri ve kırmızı hücre öncüllerindeki α zincirindeki aşırı artış β -talasemi fenotipini etkilenir.

β -talasemi hastalığının temelini oluşturan inefektif eritropoezin klinik özellikleri ortalama hücre hacminde azalma, ekstrameduller alanda ve kemik iliğinde erken Hb yıkımlarıdır. İnektif eritropoez, periferel hemoliz ve hemoglobin sentezindeki azalma sonucunda anemi görülür. Anemi, β -talasemili hastalarda önemli kalp yetmezliğine neden olabilir. Ayrıca inefektif eritropoez ve anemiye cevap olarak hastalarda eritropoietin üretiminde artış görülür. Bu artış belirgin bir şekilde eritroid hücrelerde hiperplazi oluşumuna sebep olmakla birlikte iskelet deformitelerin, osteoporozun ve splenomegalinin oluşumuna katkı sağlar. Yetersiz tedavi edilen ya da tedavi edilmeyen talasemi major hastalarında aneminin ve aşırı metabolik yükün sonucunda büyümede yavaşlama oluğu izlenmektedir.

İnektif eritropoez artmış demir emilimi ile alakalıdır. Tekrarlayan kan transfüzyonları, inefektif eritropoez ve demir absorpsiyonundaki artış karaciğer, endokrin dokular ve kalp olmak üzere birçok dokuda demir birikimine neden olur ve şelasyon terapisi uygulanmazsa çok önemli sonuçlar doğurur (Cappellini ve ark., 2014; Thein, 2005; Wood ve Higgs, 2009).



Şekil 1.12. β -talasemi etkisi - Serbest α -globin zincir üretimindeki artış (Cappellini ve ark., 2014).

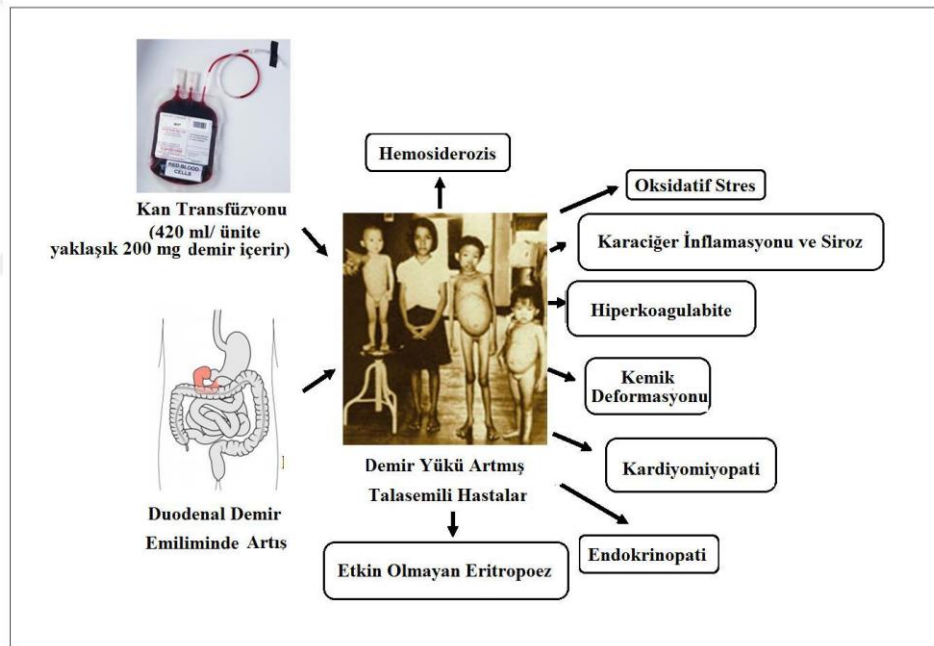
1.2.2.5. Beta Talasemide Karşılaşılan Komplikasyonlar

Infertilite, hepatobilyer, endokrinopati, hipersplenizm, , kardiyopulmoner ve kas-iskelet hastalıklar β - talasemi hastalarında sık görülen komplikasyonların başında gelmektedir.

β -talasemi hastalarında sık görülen komplikasyonlarının nedenleri arasında, kemik iliğinin fazlaca uyarılma durumu, eritropoezin yeter düzeyde bulunamaması, demir yükü kapasitesinin fazlalaşması, antioksidan ve oksidan denge düzeyinin anormalleşmesi ile doğrudan bağlantılıdır (Şekil 13) (Muncie ve Campbell, 2009;

Perera ve ark., 2010). Hastalarda görülen bu komplikasyonların sayısı kan transfüzyonuyla büyüme ve gelişim sağlanıp minimum düzeye indirgenebilse de tedavi sırasında ortaya çıkan demir yükü β - talasemi hastaları için çok önemlidir.

Duodenal demir emilimi sağlıklı bir bireyde günlük yaklaşık 1-2 mg olarak ölçülmüştür. Talasemi intermedialı hastaların çok büyük bir bölümünde tedavi esnasında kan transfüzyona almamış olmalarına rağmen normal düzeylerin ötesinde demir emilimiyle vücutta demir yükünde artma izlenmektedir. (3-9 mg/gün) (Hershko ve ark., 1998). Bu sebepten dolayı kan transfüzyonu ve gastrointestinal demir emiliminlerinde meydana gelen artma organlarda önemli problemlere yol açmaktadır.



Şekil 1.13. Komplikasyonları gösteren çizelge (Yatmark ve ark, 2014)

1.2.2.5.1. Endokrinopati

Puberte gecikmesi, bozulmuş glikoz toleransı, büyüme geriliği ve osteoporoz gibi endokrinopatiler talasemili hastalarda oldukça sık gelişebilmektedir. Demir yükündeki artışın sonucu olarak gonadotropin azlığı meydana gelebilmektedir ve talasemi hastalarında sıkça görülen komplikasyonların başında hipogonadizm gelmektedir (Chatterjee ve Bajoria, 2009; Perera ve ark., 2010; Raiola ve ark., 2003).

Endokrinopatiye rastlanma nedenlerinin başında çinko azlığı ve ön hipofiz bezinin etkilenmesi bulunmaktadır. Artan demir yükü ile ön hipofiz bezi etkilenmekte ve bu etkileşim ile büyüme hormonu azlığı izlenmektedir (De Sanctis ve ark., 2011).

Hipogonadizm büyüme sürecini etkilediği gibi diğer yandan interfertiliteye de neden olabilmektedir. Tüm bunlar göz önüne alındığında β -talasemili hastaları için erken tanı ve uygun tedavi alınması kritik öneme sahiptir. Diğer tedavi yöntemleri arasından yer alan hormon tedavisi büyümenin normalleşmesi ve pubertenin uyarılması için yapılmaktadır.

Merchant ve ark., araştırmalarında yaş aralıkları 13 ve 16 arasında bulunan ve %60'ı puberteye erişemeyen 35 talasemili hasta bulunmaktadır (Merchant ve ark., 2011). Yaşları 13-16 arasından bulunan β -talasemili hastalara hormon tedavisi uygulanmış ve hormon tedavisine ilave olarak demir yükü artışı engellenerek hastaların boylarında uzama ve puberteye girişleri tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra çinko da β -talasemili hastalarda hipogonadizm gelişmesinde kritik önem sahiptir (Chatterjee ve ark., 2011; Perera ve ark., 2010). Bu sebeple hormon tedavisi alan talasemili hastalar için belirli ölçülerde çinko takviyesi önerilmektedir (Perera ve ark., 2010).

1.2.2.5.2. Hipersplenizm

Dalak bağışıklık sistemizi korumasının yanı sıra, yaşamlarının sonuna gelen kan hücrelerini parçalayıp, vücudumuzun dolaşım sisteminden uzaklaşmaları gibi görevleri de üstlenen bir yapıya sahiptir.

Parçalanmış hücreden çıkan demir vücut hücrelerinin tekrar yapımında kullanılmaktadır. Bu sebepten dolayı, dalak olgun eritrositlerin dönüştürülme sürecinde kritik rol oynamaktadır.

Talasemili hastaların bir çoğunda demirin geri kullanım sürecinde problem izlenmektedir ve nihayetinde dalak giderek büyüyüp β - talasemi hastalarında oldukça fazla karşılaşılan bir komplikasyona dönüşebilmektedir.

Hipersplenizm lökopeni, trombositopeni ve artan transfüzyon ihtiyacı ile doğrudan bağlantılıdır. Splenomegali karşılaşılan hastalara kan transfüzyonu gereksinimini indirmek üzere splenektomi uygulanmaktadır. Ancak bu uygulamanın platelet aktivasyonu (Eldor ve Rachmilewitz, 2002), ve trombin üretimi uyarılması ve hemoliz miktarının artışı gibi önemli yan etkileri bulunmaktadır (Barnett ve ark., 2008). Bu sonuçlarından dolayı dalağın bir kısmı çıkarılarak splenektominin meydana getireceği komplikasyon önlenebilmektedir.

1.2.2.5.3. Infertilite

β -talasemi hastası bayanlar incelendiğinde kan transfüzyonu sonrasında endokrin organlarda demir yığılması ile ortaya çıkan fertilite sorunları sıkça karşımıza çıkabilmektedir. Bunun yanında, günümüzde tedavilerdeki iyileşmeler ve gelişmeler sonucunda talasemili bayanların da hamile kalma oranlarında artışlar izlenmektedir.

Talasemi majorlu hamile bayanların hemoglobin düzeyleri minimum 10 g/dL seviyesinde tutulmalıdır ve bu duruma uygun olarak kan transfüzyonları uygulanmalıdır. (Patel ve ark., 2012). Kardiyak disfonksiyon tanısı olan bayanlardaki hamilelik süresince kardiyak fonksiyonları değerlendirilmelidir ve bu bayanlara klinik değerlendirilme yapılmadan gebelik önerilmektedir (Patel ve ark., 2012; Cogliandro ve ark., 2008).

Talasemili hastalarına hamileli esnasında desferalla (DFO) demir şelasyon tedavi şekli uygulanması önerilmemektedir. (Origina ve ark., 2010; Patel ve ark., 2012).

Ancak karaciğer ve kalpte demir birikme riski taşıyan talasemi hastaları şöşn desferal ile şelasyon tedavi seçeneği 2. trimestere yakın olarak uygulanabilir (Origina ve ark., 2010). Gebelik sonrasında ise bebeklere düzenli olarak kan transfüzyonları ve gerekli şelasyon tedavi olanağı sağlamak gerekmektedir.

1.2.2.5.4. Hepatobilyer Hastalıklar

Düzenli olarak kan transfüzyonu uygulanan talasemi hastalarında birincil demir birikiminin ortaya çıktığı organ karaciğerdir. Kan transfüzyon nedeniyle demir konsantrasyonun kabul edilebilir düzeyi geçmesi dokuların harap olmasına, kollajen meydana gelmesine ve portal fibrozise sebep olan hepatoselüler hasarların oluşmasına sebebiyet vermektedir (Deugnier ve ark., 2011). Bununla daha farklı komplikasyon düşünüldüğüne talasemi hastaların safra keselerinde de taş oluşma riski yüksektir.

Fibrotik doku oluşumunun karaciğerde siroz meydana gelme riskini artırdığı bilinmektedir. Bazı enfeksiyonların (Hepatit C virüsü) karaciğer organında fibrojeniz oluşumunu daha da artırdığı söylenmektedir. Bunun yanı sıra karaciğer oranında demir konsantrasyonunun 7 mg/gün değerinden yukarı çıkması mortalite ve morbiditeyeve

sebepe verebilmektedir (Deugnier ve ark., 2011). Bu sebepten dolayı, β - talasemi hastalarında demir yükünün minimize edilmize kritik öneme sahiptir. Uygun demir şelasyon metotları ile karaciğer organındaki demir yükü ve fibrozisi azalma göstermektedir.

1.2.2.5.5. Kas-İskelet Sistemi Bozuklukları

Tedavi sırasında kan nakli yapılan alan ve bunun yanı sıra düzenli demir şelasyon uygulaması gerçekleştirilen β - talasemili hastaların bir kısmında osteopeni ve osteoporoz gibi bir takım kemik hastalığı görülmeye devam etmektedir (Chatterjee ve Bajoria 2009).

Talasemi hastalığı ile ilgili yapılan çalışmalar ışığında talasemi majör hastalarında bu kemik bozuklukların meydana gelmesini bir çok etken belirleyebilmektedir.

Yoğun olarak demir şelasyon tedavi protokolü gören ve optimal transfüzyon alan kemik erimesi tanısı bulunan talasemi hastaları için bifosfonat tedavi planı ve hormon replasman tedavi planı uygulanmaktadır.

Araştırmalar neticesinde bifosfonat tedavi protokolü gören β - talasemi hasta nüfusunun kemik mineral yoğunlukları ölçüldüğünde önemli düzelmeler tespit edilmiştir (Skordis ve ark., 2008). Başka araştırmalar da göstermiştir ki hormon replasman tedavi planı alan β - talasemi hasta nüfusunun aynı tedaviyi görmeyen kesme kıyasla kemik yoğunluğunda önemli iyileşmeler tespit edilmiştir (Lasco ve ark., 2001). Bunun yanı sıra β - talasemi hasta nüfusuna kalsiyum takviyesi ve D vitamini de tavsiye edilmektedir.

1.2.2.5.6. Kardiyopulmoner Bozukluklar

Kardiyak anormallik β - talasemili kişilerin ölüm sebepleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Önemle vurgulanmalıdır ki demir birikimi kalp yetmezliğine yol açabileceğinden, β -talasemili kişilerin %75'ine yakınında ölüme sebebiyet verebilmektedir ve ayrıca bahsi geçen kişilerin büyük bir çoğunluğuna 25-30 yaş arasında hayatını kaybetmektedir (Maggio ve ark., 2011). En çok rapor edilen kardiyak hastalıklar arasında diyastolik disfonksiyonlar, pulmoner hipertansiyon, sol ventriküler sistolik, perikardit ve valvulopatiler, kardiyak aritmiler gelmektedir.

Kardiyomiopatiler endokrin disfonksiyonu, koagülasyon anomalileri, inflamatuvar yanıtta ve demir yükündeki artma gibi bir çok sebebin neticesinde ortaya çıkmaktadır. Bunun yanı sıra demir yükü artması oksidatif stres ve hemoliz β - talasemi hastalarda mortalite ve morbiditeye sebep veren sekonder pulmoner hipertansiyonun ortaya çıkmasındaki payı büyüktür.

Demir yükü artması β - talasemili hastalarda lipid peroksidasyon ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS) oluşmasına katalizleyerek ve hücrelerin ölmesi suretiyle kardiyak disfonksiyonlara sebep olabilmektedir (Barnett ve ark., 2008; Morris ve Vichinsky, 2010). Demir yükü artması bununla beraber interstisyel kardiyak hemosiderozisi pulmoner fibrozisi uyabilir ve pulmoner damar sağlığını etkilemektedir (Fikry ve ark., 2003).

Kardiyak komplikasyon olumşasını tesipt edebilmek için belirteç görevinde serum ferritin tercih edilmektedir. Uygun şelasyon tedavisinin verimliliği için erken teşhis çok önemlidir (Barnett ve ark., 2008). Optimum transfüzyon tedavi planı ve şelasyon tedavi planındaki uyum, kardiyak komplikasyonun engellenmesi anlamında kritik öneme sahiptir. Tedavi uygulama esnasında hemoglobin düzeyinin minimum

9.5 g/dL, ferritin düzeyinin ise 2.500 ng/mL'den küçük olmaması son derece önemlidir (Cogliandro ve ark., 2008; Muncie ve Campbell, 2009)

Oral antikoagülan ya da antiplatelet, oksijen tedavisi ve FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) onaylı pulmoner hipertansiyon ilaçları özellikle pulmoner hipertansiyonu olan β - talasemi hastalara uygun yardımcı tedavi planları arasında sayılabilir (Barnett ve ark., 2008; Cogliandro ve ark., 2008; Fikry ve ark., 2003; Morris ve Vichinsky, 2010).

1.3. Metaller

1.3.1. Tanım

Metallerin en önemli görevleri arasında hücre büyümesine yardımcı olmak, hücrelerin gelişim safhasında destek olmak (Valko ve ark., 2006) ve hücrelerin önemli faaliyetlerini gerçekleştirebilmek adına pek çok biyolojik olay gelir. Metallerin bir çok transkripsiyon faktörünü aktive edip hücrelerin döngüsünün, kanser fenotipi ve proliferasyonun ve karakteristik özellik olarak karşımıza çıkan farklılaşmanın düzenlenmesinde kritik görevleri vardır (Evan ve Vousden, 2001).

Metaller iki bölümde incelenebilir. Bunlar; esansiyel olanlar; çinko (Zn), demir (Fe), bakır (Cu) ve esansiyel olmayanlar; kadmiyum (Cd), cıva (Hg), kurşun (Pb).

Metal (Zn,Fe,Cu) azlığı veya metale aşırı maruz kalma olayları insan sağlığı açısından önemli etkilere sebebiyet verebilmektedir. Bu sebepten dolayı insan vücudunda belli bir seviyede olması gerekmektedir ve homeostazının sağlanması adına metal iyonu alımı, metal iyonunun depolanması ve bu iyonların atılması etkin bir mekanizma vasıtasıyla düzenlenmesi gerekmektedir (Bertini ve Cavallaro, 2008).

Bununla birlikte bir metalin yapacağı etki, insan vücudundaki emilimi, metal dağılımı, fizyolojik olaylarla etkileşim derecesi ile tespit edilmektedir (Abbaspour ve ark., 2014).

1.3.2. Demir

Tarihin ilk zamanlarından bu yana demirin hastalıklar bakımından önemli bir metal olduğu bilinmektedir. Tıp alanında ilk kullanım ise Yunanlılar, Mısırlılar ve Romalılar tarafından uygulanmıştır (McDowell, 2003; Wood ve Ronnenberg, 2006).

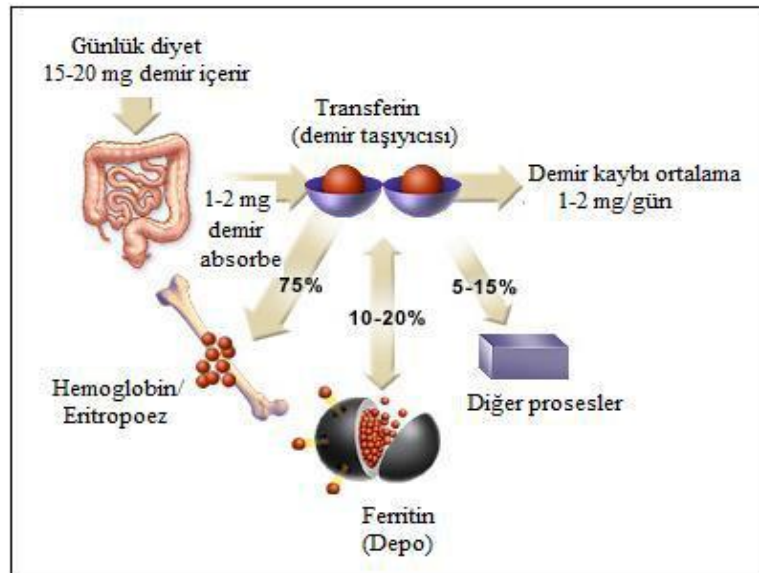
Onyedinci yüzyılda kloroz tedavisi sürecinde demir kullanılırken inorganik demirin hemoglobin sentezi sürecindeki gerekliliğine dair kritik gelişmeler 1932’de gerçekleşmiştir (Guggenheim ve Martin, 1995). Bunun yanında uzun süre demirin oksijen transportundaki ve hemoglobin yapımındaki rolü bilinmektedir (Underwood, 1999; Yip ve ark., 1996). Demir elementi hem enzimlerinde, miyoglobin veya hemoglobin gibi hem bileşiklerinde yer aldığı gibi flavin demir enzimleri, transferrin ve ferritin gibi non-hem bileşikler de bulunmaktadır (McDowell, 2003).

İnsan vücudu için çok kritik bir element olarak bilinen demir sistemik ve hücresel düzeyde oluşan pek çok biyolojik olayda kritik görev üstlenmektedir. Demir elementi dokulara oksijen götürülmesinde, ayrıca enerji üretiminde, esansiyel reaksiyonların katalizinde görev yapan enzimlerin fonksiyon ve yapısında yer almaktadır. Bununla beraber demir spesifik kimyasal özelliği sebebiyle serbest radikal oluşmasında da önemli rol üstlenmektedir (Da Silva ve Williams, 1991). Örnek olarak, ROS varlığında, membran protein ve lipidlerine, nükleik asitlere zarar vermekte olan reaktif hidroksil radikallerinin meydana gelmesini katalizlemektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Bu sebepten dolayı, yeryüzü üzerinde bol miktarda bulunan bir demir elementinin konsantrasyonu yaşam anlamında sınırlayıcı bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (Wood ve Ronnenberg, 2005; Quintero Gutiérrez ve ark., 2008).

1.3.2.1. Demirin Vücutta Dağılımı

Demir elementinin her canlı için önemli bir besin ögesi olduğu bilinmektedir. İnsan vücudundaki toplam demir elementinin dağılım yüzdesi incelendiğinde, %10'a yakın kesimi kas liflerinde (miyoglobin), sitokrom ve enzimlerde diğer kesimiyse depo şeklinde karaciğer organında yer almaktadır. %60 oranından daha büyük kesmini oluşturan yüzde incelendiğinde ise, kemik iliğinde 300 mg, kırmızı kan hücrelerinde 1800 mg,, dalak retiküloendotelial makrofajlarda 600 mg demir bulunmaktadır (Hentze ve ark., 2004). Normal diyetin 20 miligram civarında demir içerdiği bilinmektedir. İntestinal mukoza hücre gruplarının parçalanması ve menstrüel evre esnasında oluşan kayıpların telafisiyle denge korunması için diyetle temin edilen demir elementinin 1-2 miligramı emilmektedir.

Bu sebepten dolayı demir elementinin internal geri dönüşümü düşünüldüğünde eritropoez ve kemik iliği kritik rol oynamaktadır (20-30 mg) (Andrews ve ark., 1999; Munoz ve ark., 2009; Siah ve ark., 2006) (Şekil 1.14).



Şekil 1.14. Demir kullanımını gösteren çizelge (Abbaspour ve ark., 2014).

Sağlıklı bireyin ve hücrel rejenerasyonu ve protein sentezi yapmak adına ihtiyaç duyduğu demir miktarı 25 ila 30 miligram arasındadır.

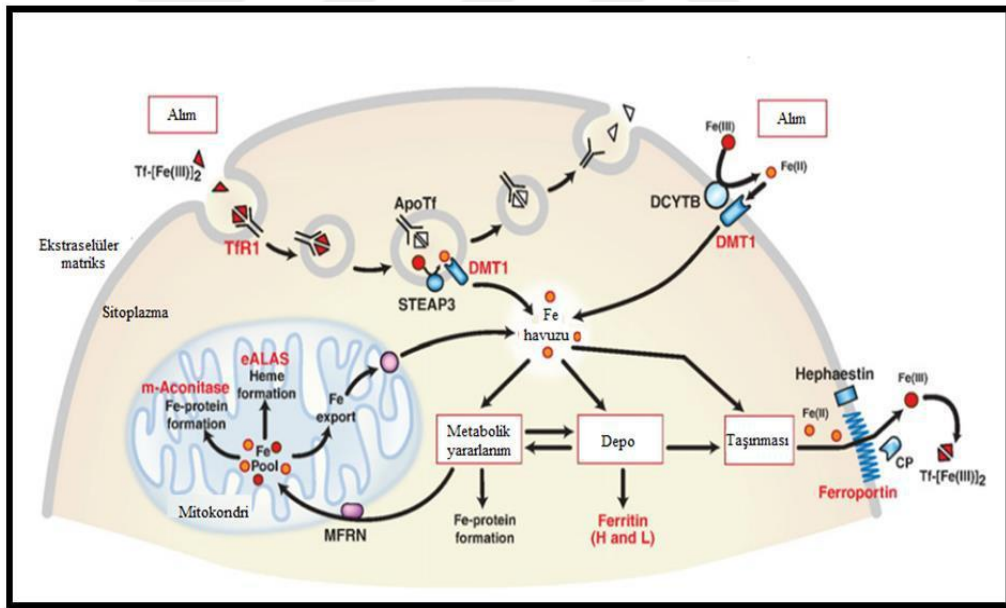
Bahsi geçen demir ihtiyacın çok büyük bir kısmı dalak makrofajları vasıtasıyla olgun eritrosit geri dönüşüm yöntemiyle karşılanmaktadır. Küçük bir kısmı ise deskuamasyon ve kan kaybı ve gibi demir kaybedildiği durumlarda bunu telafi etmek adına diyet ile tedarik edilmektedir. Bunun yanı sıra günlük demir tüketiminin çok büyük bir kısmı kırmızı kan hücrelerinin eritropoetik dokularda üretimi esnasında oluşmaktadır (Zhang ve ark., 2014).

Demir elementinin yeterli miktarda bulunmadığı zamanlarda vücut ihtiyacı için gereken enerjinin kesilmeden üretimi, DNA onarımı ve hücrelere için gerekli oksijenin nakli gibi birçok hücrel işlevde önemli hasarlar oluşmaktadır (Andrews ve Schmidt, 2007). Bunun yanı sıra, demir elementi, reaktiftir ve insan vücudunda önemli miktarda yer alması hücrelerde hasar yol açmaktadır (Prohaska ve ark., 2012). Bu sebeple demir elementinin eksik ya da fazla miktarlarda olması hücrelere hasar verebileceğinden önemle düzenlenmelidir (De Domenico ve ark., 2008). Demir homeostazı memelilerin hücresinde demir elementinin alımı, taşınması ve depolanmasına ile ilgili düzenlemelerle oluşmaktadır (Hentze ve ark., 2010).

1.3.2.2. Demir Metabolizması

Sistemik demir homeostazı duodenumdan demir emilimi, dalak makrofajları vasıtasıyla demir elementinin geri dönüşmesi, eritropoez vasıtasıyla iliklerde demir elementinin kullanılması ve karaciğer organında demir elementinin depolanmasıyla oldukça yakından ilgilidir. Bundan dolayıdır ki demir elementinin emilimi ve bunun nedeni faktörler kritik öneme sahiptir (Zhang ve ark., 2014).

İnsanlarda, deskuamasyon, ter ve idrar vasıtasıyla meydana gelen demir azlığının giderilmesi sebebiyle günlük ortalama 1-3 miligram demir emilimi meydana gelir. Memelilerde demir elementinin atılımıyla alakalı fizyolojik olayların meydana gelmesinde bazı eksiklikler bulunmasına karşın intestinal demir absorpsiyonu gayet iyi düzeyde düzenleyen bir prosestir. Demir emilimin en çok yapıldığı alan duodenum ve jejunumun üst kısımlar olmakla birlikte gastrointestinal kanalın bütün bölümlerinde absorbe edilebilmektedir. Bağırsakların alt kısımlarında demir emilimi gitgide düşmektedir. (Hagar ve ark., 2002). Bunun yanı sıra diyetle alınan non-hem demirin (ferrik demir) enterositlere absorpsiyonu membrana bağlı ferric redüktaz (duodenal sitokrom b; CYBRD1; DCYTB) vasıtasıyla ferrik demirin (Fe^{+3}) ferröz yapıya yani Fe^{+2} şekline dönüştürülmesi sonrası divalent metal taşıyıcı 1 (DMT1) vasıtasıyla meydana gelir (Şekil 15). Demirin Fe^{+3} formu suda çözünme yetisine sahip değildir ve ferröz forma dönüştürülerek suda çözünür hale dönüştürülmelidir.



Şekil 1.15 . Hücresel demir homeostazının kontrolü (Anderson ve ark., 2012).

Hücresel demir ya ferritin şeklinde depolanır ya da transferrine bağlanıp dolaşım sistemine dahil olmak üzere bazolateral taşıyan olan ferroportin 1 vasıtasıyla taşınmaktadır. Demir elementinin transferi membrana bağlı multicopper oksidaz

hephaestin vasıtasıyla oksidasyonuna bağlıdır. Hephaestin vasıtasıyla yeniden Fe⁺³ şekline değiştirilerek plazma transferrine (Tf) bağlanması sağlanmaktadır.

Diferrik Tf (Tf-Fe(III)) hücre yüzeyindeki transferrin reseptör 1 (TfR1)'e bağlanmasından sonra Tf-Fe(III)-TfR1 kompleksi klatrin aracılı endositoz ile hücre içine alınmaktadır.

Endozomal asidifikasyon sonrası (pH değeri 5.5 değeri altın) Tf'den ferrik demir kopar ve bir metalloreduktaz olan STEAP3 aracılığıyla indirgenerek DMT1 tarafından sitoplazmaya taşınmaktadır. Sitozolik demir, demir taşıyan proteinlerin oluşturulması (Fe-S kümeleri ve hem biyosentezi) için mitokondri kullanılır.

Vücut demir depoları ve eritropoez yeterli miktarda bulunduğunda, enterositten demir taşınması hepsidin aracılı internalizasyon ve ferroportin degradasyonu ile azalır ve bunun yerine demir ferritin olarak depolanır. Ferritindeki demir elementi üç gün içerisinde intestinal hücrelerin deskuamasyonu ile kaybolmaktadır. Dolaşımdaki demirin kritik bir parçasını retikuloendotel makrofajlar vasıtasıyla yaşam süresini tamamlamış eritrositlerin yıkımı sonrasında meydana gelen hem geri dönüşümü sağlamaktadır. Hem molekülünden ayrılan demir dolaşıma ferroportin vasıtasıyla dahil olmaktadır ve apoTf'e bağlanarak hemoglobin sentezi gerçekleştirmek için kemik iliğine taşınmaktadır. Artmış hepatik demir depoları ve inflamasyon hepsidin üretim miktarını fazlalaştırmaktadır. Hepsidin, plazma demir miktarını indirmek için retikuloendotel makrofajlar ve intestinal hücrelerde ferroportin degradasyonuna aracılık etmektedir (Anderson ve ark., 2012).

Demir hemosiderin ve ferritin şeklinde öncelikle dalak, karaciğer ve kemikte depo edilmektedir (Wood ve Ronnenberg, 2006). Demirin önemli bir bölümü evrimsel süreçte gayet iyi bir şekilde muhafaza edilmiş bir demir bağlayıcı protein olan ferritine bağlanmaktadır (Nadadur ve ark., 2008) Bu nedenle serum ferritin konsantrasyonu total vücut demir depoları ile koreledir (Hunt, 2001). Dolayısıyla demir depolarını incelemekte kullanılan en iyi laboratuvar aracıdır.

Çinko, kurşun, kobalt ve manganez gibi bazı ağır metaller demir ile intestinal emilim yolağı için yarışır. Demir azlığı çoğu zaman kurşun intoksikasyonu ile birlikte bir arada izlenmektedir ve bu etkileşim küçük yaştakilerde çok önemli tıbbi komplikasyonlara sebebiyet vermektedir (Piomelli ve ark., 1987). Kurşun demir metabolizması için tehlikeli bir unsur olarak karşımıza çıkmaktadır (Goyer, 1993). Kurşun absorpsiyonu DMT1 vasıtasıyla oluşur ve demiri yarışmalı olarak inhibe eder. Bunun yanı sıra, kurşun hem biyosentezi gibi demir bağımlı metabolik bir dizi basamağı engel oluşturmaktadır. Bu çok yönlü etkiler özellikle küçük yaştakilerde kritik öneme sahiptir. Çünkü kurşun anemiye neden olmamaktadır fakat bilişsel gelişimin azalmasına sebep olmaktadır. Bunun yanında kurşun bazı bölgelerde yeraltı

suyunda ve toprakta yüksek düzeylerde bulunmaktadır. Bu sebepten dolayı küçük yaştakilerin sağlığını bozabilecek önemli bir metal olarak değerlendirilir.

1.3.2.3. Demir Toksisitesi

Demir DNA sentezi, oksijenin taşınması ve solunum gibi hücresel olaylara katılan proteinlerin prostetik grubu olduğundan organizmada önemli göreve sahiptir.

Demir azlığı hücresel proliferasyonun bozulmasına neden olurken, hücresel demirin üst seviyelerde olması lipitlere, DNA ve proteinlere zarar veren serbest radikallerin üretimini katalizlemektedir. İnsanlarda üst seviyelerde hücresel demir birikimi siroz, diabetes mellitusa ve kardiyomiyopatiye sebebiyet vermektedir (Fleming ve Ponka, 2012).

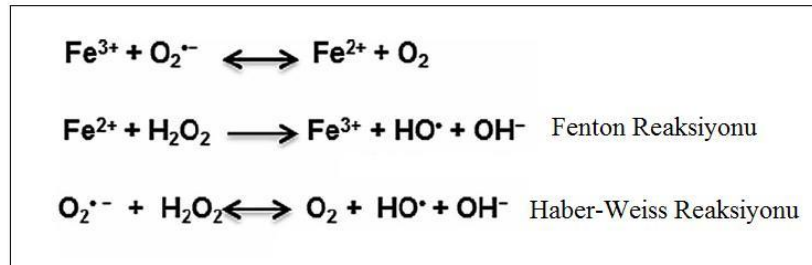
İnsan beyninde çok fazla demir yığılması Parkinson, Alzheimer gibi önemli nörodejeneratif hastalıklar ile birlikte Friedreich's ataksi (FA) benzeri birçok kalıtsal nörodejeneratif hastalıkla da bağlantı göstermektedir (Fleming ve Ponka, 2012; Madsen ve Gitlin, 2007). Bununla birlikte, demir azlığı yetişkin bireylerde anemi, küçük yaştaki bireylerde kognitif hasarlara sebebiyet vererek dünya çapında milyonlarca insanı etkilemektedir. Bu sebeple, hücresel demir içeriği demir seviyesinin (az ya da fazla) olumsuz etkilerini engellemek için dar bir aralık içerisinde bulunmalıdır.

Demir elementi biyokimyasal olaylarda görev alan enzimlerin kofaktörü olarak görev yapar ve ayrıca redoks tepkimelerinde de görev alan kimyasal bir katalizördür. Demir Fe⁺³ ve Fe⁺² şeklinde olup elektron vericisi ve alıcısı olarak görev yapar (Kalinowski ve Richardson, 2005). pH ve diğer kimyasal özellikler demir elementinin hücredeki biyokimyasal fonksiyonlarını etkilemektedir. Fe⁺³ fizyolojik oksijen

konsantrasyonlarında biyolojik komplekslerinin en kararlı formudur. Redoks potansiyeli (Eh) demir ve diğer biyomolekül kompleksinin görev yaptığı reaksiyonlarda kritik görev yapmaktadır.

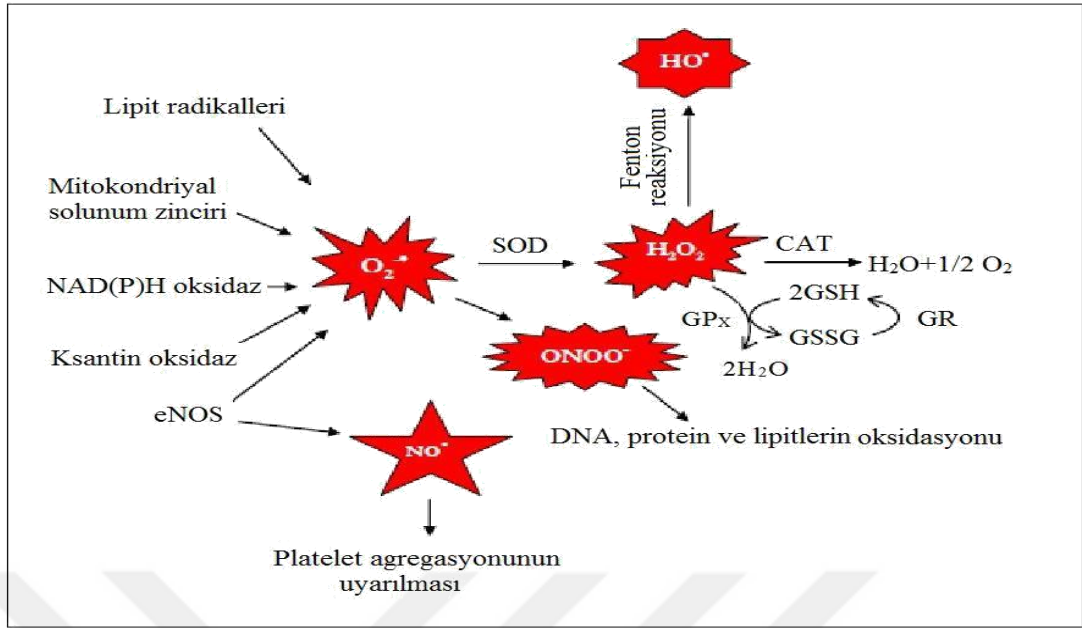
Biyolojik bir oksidan aralığında demirin Eh değeri +820 mV iken redüksiyon değeri -320 mV'tur. Ayrıca redoks tepkimeleri geri dönüşümlü bir prosestir (Aisen ve Wessling-Resnick, 2001).

Demir Haber Weiss ve Fenton reaksiyonları aracılığı ile süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikallerini ($OH^{\cdot}$) içeren ROS oluşumunu katalizlemektedir (Şekil 1.16).



Şekil 1.16 Demir elementinin varlığında Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları neticesinde $OH^{\cdot}$ - radikal oluşumu (Halliwell ve Gutteridge, 1990 yılından itibaren uyarlanmıştır).

Serbest durumndaki radikallerin fazlalaşması sonrası oluşan oksidatif stres biyolojik makromoleküllerde metabolik zararlara neden olmaktadır. β -talasemili hastalarda oksidatif stres birçok etkene göre oluşmaktadır. Örneğin serbest, eşleşmemiş ve stabil durumda olmayan globin alt üniteleri protein agregasyonu ve DNA hidroksilasyonuna sebep olan ($O_2^{\cdot-}$) ve ($OH^{\cdot}$) radikallerini meydana getirmektedir. Bunun yanı sıra $OH^{\cdot}$ -radikalleri membran iskeletinde lipid peroksidasyonuna, deformabiliteye, ve membran hasarına sebebiyet vermektedir (Şekil 1.15) (Comporti ve ark., 2002).



Şekil 1.17. ROS oluşması ve zararları (CAT: Katalaz, GSH: İndirgenmiş glutatyon, GSSG: Oksitlenmiş glutatyon, SOD: Süperoksit dismutaz, GPX: Glutatyon peroksidaz, GR: Glutatyon redüktaz) (Henrotin ve ark., 2009).

Normal koşullarda plazmadaki demir transferine bağlanma şeklinde taşınmaktadır. Ağır transfüzyon hastalarında transferinin demir bağlama kapasitesi geçildiğinde plazma kompartmanında hem plazmada transferine bağlı olmayan serbest demir ve kararsız demir havuzları meydana gelmektedir. Bu sebepten dolayı transferrin kapasitesi gastrointestinal sistem veya retiküloendotelial hücre kaynaklı demir elementi için sınırlayıcı bir etken olarak karşımıza çıkar (Porter, 1997).

Plazmada transferrine bağlı durumda olmayan serbest demir, karaciğer, kalp ve endokrin organlar gibi bir çok yapıda zarar yol açabilmektedir. Örnek olarak, kalpte demir yığılması oksidatif stres ve hücresel hasara sebebiyet vermektedir (Kremastinos ve ark., 1984; Schellhammer ve ark., 1967; Sonakul ve ark., 1988). Demir yüklemesi olan hemosiderotik β - talasemi hastaların %60'ına yakınında kalp yetmezliği neticesinde ölüm meydana gelmektedir (Aldouri ve ark., 1990; Bannerman ve ark., 1967; Kremastinos ve ark., 1995). Metallerin hem enzimatik reaksiyonlarda hem de

oksidatif strete önemli rol oynaması mitokondride de kritik öneme sahip olmasına sebep olmaktadır.

Mitokondri canlı hücrelerinde enerji üreten primer organeldir. Bu enerjinin üretimi demir ve sülfür-demir bağlantılı sitokromların görev yaptığı enzimatik kompleksler aracılığı ile oluştuğu için mitokondri oksidatif zarara ciddi oranda duyarlı bir organeldir. Bunun yanı sıra kalp mitokondri anlamında zengin bir organdır ve kardiyak fonksiyonların meydana gelmesinde demir gibi metaller önemli görevler üstlenmektedir (Rines ve Ardehali, 2012). Kalp hücrelerinde normal seviyelerin üstünde demir yığılması neticesinde miyokardiyal işlemlerin değişmesi ve Fenton reaksiyonları ile hidrojen peroksitin DNA hasarına sebep olur (Andrews, 1999; Bartfay ve Bartfay, 2000). Demir yüklemesi olan β -talasemi majorlu hastalarda tespit edilen kardiyak disfonksiyonların tedavisi için etkin demir şelasyon metotları denemelidir (Freeman ve ark., 1989).

Sitozolik kararsız demir havuzları Fe^{+2} ve Fe^{+3} formlarından meydana getirmektedir ve redoks kapasitesini belirlemek anlamında önemli görevi bulunur (Esposito ve ark., 2003; Hershko ve ark., 2005). Redoks-aktif demir formları için kavşak işlevinde olan kararsız demir havuzları ROS üretimini önemli derecede etkilemektedir ve demir yükündeki yükseliş bu havuzların meydana gelmesine katkı sağlamaktadır (Katerelos ve ark., 1979).

1.3.3. Kurşun

Yeryüzünde doğal olarak görülen ve mavi gri renkte olan kurşun elementi periyodik cetvelde IVA grubundadır. Kurşun elementinin (Pb), atomik ağırlığı 207.19, atom numarası 82, kaynama noktası 1740°C, yoğunluğu 11.3 g/cm³ ve erime noktası 327.5°C'dir (Bergdahl ve Skerfving ve, 2008). 208, 206, 207 ve 204 atom ağırlıklarıyla

4 doğal izotop formu vardır. Bu izotop oranları mineral kaynaklar anlamında çeşitlilik gösterebilmektedir.

Kurşun metabolik işlevi bulunmayan ve doğada oldukça fazla bulunan bir elementtir. Tarih süreci içinde bilinen en eski metallere biri olan kurşun kolay şekil alması, işlenmesinin kolay olması ve paslanmaya karşı dirençli olması gibi özelliklerinden dolayı çok eski çağlardan beri sıklıkla kullanılmaktadır. Doğada nadiren metal formda bulunan kurşun, genellikle iki veya daha çok elementle birleşerek kurşun bileşiklerini meydana getirmektedir. Kurşun ve alaşımlarının ise radyasyon yalıtımı, boru izolasyonu, mühimmat yapımı, akü yapımı ve pil yapımı olmak üzere modern endüstride de önemli bir yeri vardır. Bununla birlikte endüstriyel açıdan önemi bulunan organik kurşun bileşikleri tetra metil kurşun ve tetra etil kurşundur (ATSDR, 2007).

Kurşuna maruz kalma çeşitli kaynaklar ile meydana gelebilmektedir. 1995 yılı öncesinde kurşuna maruz kalmanın en yaygın şekli konserve kutularındaki kurşun lehim olarak saptanmıştır ve daha sonraki yıllarda yemek saklama kutularında kurşun miktarını sınırlayan yasalar yürürlüğe girmiştir. ABD’de bu kapsamda uzun zamandan beri tercih edilmemesine rağmen çoğu ülkede kullanımı günümüzde sürmektedir. Diğer bir önemli neden ise kurşun içeren boyalardır. Yapılan çalışmalar ışığında göre Amerika Birleşik Devletleri’nde 2002 yılı itibariyle 38 milyon hanenin %60’dan fazlasının kurşun içeren boya kullandığı tespit edilmiştir. Bu boyaların dermal yolla teması veya solunması toksik etkilerin ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir (Toscano ve Guilarte, 2005).

Kurşun metaline maruz kalma durumu su kaynaklarından olduğu gibi kurşun ve alaşımlarını içinde barındıran su borulardan da doğabilir. Son çalışmalar ışığında Amerika Birleşik Devletleri’nin DC bölgesinde bulunan evlerin %20’sine yakınında kurşun bulunan su borularının bulunduğu ve bu hanelerde ikamet edenlerin %30’una

yakınının kan kurşun düzeylerinin 5 µg/dl' den daha fazla olduğu kaydedilmiştir. Bunun yanı sıra bu düzeyin küçük yaştakilerde bilişsel hasara sebebiyet verebilecek derecede fazla miktarda olduğu tespit edilmiştir (Toscano ve Guilarte, 2005).

Kurşun ile kontamine olan toprak işlenmesi ise diğer kaydedeğer kaynaktır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1923 ve 1986 yılları arasında kurşunlu benzin kullanılması neticesinde 4 milyon tondan fazla kurşunun toprağa ve atmosfere ve karıştığı ve kurşun metalinin %90'ından fazlasının atmosferde depolandığı rapor edilmiştir (Brochin ve ark., 2014). Çeşitli yaptırımlar sayesinde sanayide işlenen kurşun düzeyi minimize edilerek boyalar %0.06'dan çok, benzin ise 0.1g/L'den daha çok kurşun içermemektedir (Markowitz, 2000).

1.3.3.1. Kurşunun Metabolizması

Kurşunun vücuda girmesi dermal, solunum ve sindirim vasıtasıyla olmaktadır. Fetusa giriş ise plasenta aracılığıyla meydana gelmektedir (Goyer, 1990). Anorganik kurşuna maruz kalma dermal, solunum ve sindirim aracılığıyla meydana gelirken, organik kurşun bileşikleriyle maruz kalma dermal yolla absorpsiyon neticesinde meydana gelebilir. Dermal ve solunum yolla maruz kalma daha çok mesleki sebeplerle oluşurken primer maruziyet daha çok kurşun ile kontamine olan besin tüketimiyle oluşmaktadır (Goyer, 1996).

Kurşunun vücuda absorpsiyon seviyesini maruz olunan kaynak ve özellikleri, maruz kalan kişinin yaşı, partikül büyüklüğü, genetik özellikleri, cinsiyeti, beslenme alışkanlıklarına bağlıdır (ATSDR, 1999). Beslenme alışkanlıkları kurşun emilimi ve zehirlenme potansiyelini farklı düzeylerde etkilemektedir. Çinko, kalsiyum ve demir gibi elementler kurşunun emiliminde çok önemlidir. Bunun yanı sıra vitamin D ve demir eksikliği diyetle beslenme kurşun emilimi miktarını fazlaştırmaktadır (Goyer, 1996).

Kan dolaşımının içine giren kurşunun bağlandığı yer eritrositlerdir ve buralarda taşınır. Emilen kurşunun %98-99'u 20-40 gün civarında kan dolaşımında eritrositlere bağlı halde olur (Silbergeld ve ark., 1988). Dolaşımın içine giren kurşun böbrek, karaciğer, dalak ve akciğer gibi yumuşak dokular ve diş ve kemik gibi mineral doku olmak kaydıyla üzere 2 kompartmana yönelmektedir (Rabinowitz, 1991). Kurşun büyük oranda kemikte depolanmaktadır ve yaşın artmasıyla beraber kemikteki kurşun oranı % 902dan fazla artış gösterebilir. Kemikte bulunan kurşun internal kurşun maruziyetinin kaynağı ve depo merkezi olarak kan kurşun seviyesi üzerine kritik bir etkiye sahiptir Bunun yanı sıra kurşunun insan vücudundaki birikim alanı yıllar geçtikçe değişebilir. Kemik içinde saklanan kurşun gebelikte ve emzirme periyodunda bebeği etkilemektedir (Silbergeld ve ark., 1988).

Kurşun solunum aracılığıyla alınırken partiküllerin büyüklüğü, ventilasyon değeri ve bileşiğin biyolojik sıvıda erime özelliği çok önemlidir. Solunum aracılığıyla absorbe edilen kurşunun bir bölümü savunma sistemi ile tutularak atılırken bir bölümü de absorbe edilerek kan dolaşıma geçmektedir (ATSDR, 1999).

Böbrekler emilen kurşunun isan vücudundan uzaklaştırılmasında son aşamayı oluştırmaktadır. Bunun yanı sıra gastrointestinal şekilde, safra, tükrük, tırnak ve sa ile de eliminasyon olmaktadır.

1.3.3.2. Kurşun Toksisitesi

Kurşun toksisitesi kardiyovasküler, renal ve üreme sistemleri dahil olmak üzere vücudun birçok sistemi üzerinde önemli etkilere sebebiyet vermektedir (şekil 1.18).



Şekil 1.18. Kurşuna Maruz Kalma Yolları

1.3.3.2.1. Merkezi Sinir Sisteminde Kurşun Toksisitesinin Etkisi

Kurşunun en kritik ve zararlı etkileri merkezi sinir sisteminde görülmektedir. Kurşun sinir sisteminde beyin plastisitesinin oluşmasında etkin rol üstlenen N-metil-D-aspartat reseptörünü bloklar ve bu reseptörün bloklanma aşaması uzun periyotlu potansiyasyonda kesinti meydana getirmektedir. Sonuç olarak yeni öğrenilen bilgilerin saklanması konusunda sıkıntı yaratmaktadır. Bununla birlikte artmış kan kurşun seviyeleri kan beyin bariyeri işlevleri anlamında kritik etkilere sebebiyet vermektedir.

Beynin ekstrasellüler ortamının düzenlenmesinde önemli rolü olan kan beyin bariyeri sistemi, sıkı bağlantılarla bağlı endotelyal hücrelerden meydana gelmektedir ve bahsi geçen endotelyal hücreler astrositlerle çevrelenmiş durumdadır. Araştırmalar kurşun zehirlenmesinin astrositler ve endotelyal hücreler arası haberleşmede kritik görevi olduğunu ortaya çıkarmıştır (Brochin ve ark., 2014).

Artmış seviyede kurşun maruziyeti esnasında kan beyin bariyeri sistemi plazma, beynin intersitisyel bölgelerine ilerler ve akabinde ödem oluşur.

Ödem geri dönüşümü olmayan beyin hasarlarına sebebiyet verebilmekte aşırı basınç yükselmesine yol açabilmektedir (Brochin ve ark., 2014). Bununla birlikte buna benzer beyin hasarı dikkat dağınıklığına yol açabilirken, görsel-motor muhakeme yeteneğine, sosyal davranışlarına, okuma ve matematiksel yeteneklerinde de sorunlara yol açabilir (Toscano ve Guilarte, 2005).

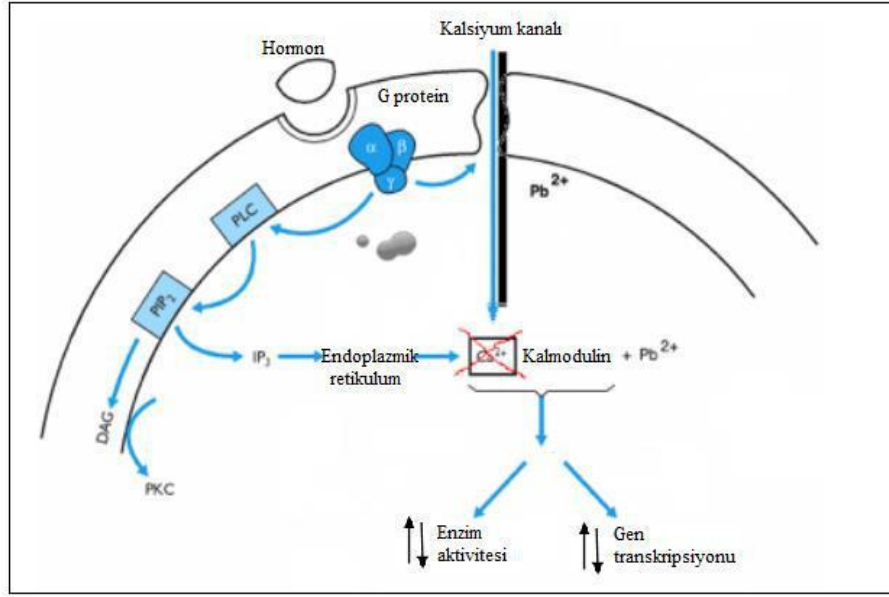
1.3.3.2.2. İkincil Haberci Sistemi Üzerine Kurşun Toksisitesinin Etkisi

Hücresele seviyede gerçekleştirilen çok sayıda araştırma kurşunun hücresele haberci sistemlerini etkilediği hipotezini güçlendirmektedir. İkincil habercil sistemleri genellikle proteinler, aminler, ve peptidler gibi non-steroid hormonları kapsamaktadır. Adı geçen hormonlar hücrelerin üzerinde bulunan spesifik reseptör alanlarını etkilemektedir. Bahsi geçen etkilerini hücre membran proteinlerinin aktivitesinde ve hücre içinde biyokimyasal değişikliklere neden olarak göstermektedirler (Butler ve ark., 2007). Bunun yanı sıra çalışmalar sonucunda kurşunun kalsiyum (Ca^{+2}) ile yer değiştirebileceği tespit edilmiştir.

Ca^{+2} 'un hücre içi konsantrasyonları artışı büyük çoğunlukla endoplazmik retikulumda saklanan kalsiyumun salınmasıyla ya da hücre membranındaki kalsiyum kanallarının açılmasıyla olur. Her 2 durum G-proteinin uyarılmasıyla meydana gelmektedir. Birincil habercilerin bağlanma alanına bağlanma sonrası G-proteini hücre membranının hücre iç tarafına doğru olan yüzüne bağlanır ve aktif hale gelmektedir. Bu durum kalsiyum kanalının açılmasını uyarır ve hücre dışındaki kalsiyum hücreye girerek kalmodulin ile birleşmektedir (Nussey ve Whitehead, 2001). Kalmodulin inflamasyon, metabolizma, apoptoz, kas kasılması, hücre içi taşınma ve immün yanıt benzeri birçok hücre içi işlevi etkilemekte ve uyarmaktadır. Kurşun hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun fazlalaşmasına neden olan bu 2 yolu da etkileyebilir.

Kurşunun kalmoduline bağlanma sürecini inceleyen bir çalışmada kurşunun kalmoduline yönelik daha fazla bir afiniteye sahip olduğu ve az düzeylerde dahi bağlanabildiği saptanmıştır (Kursula ve Majava, 2007). Ayrıca kalmodulin 4Ca^{+2} bağlanma alanına sahiptir. Kurşun yalnızca bahsi geçen bölgelere bağlanmakla kalmamakta ve bu süreçte kalsiyumun bağlanamadığı 2 sınıf kalmodulin bağlanma alanlarına da bağlanmaktadır.

Protein kinazlar fosfat gruplarını ATP moleküllerinden protein substrat moleküllerine aktarmaktadır ve bu fosforilasyon neticesinde de substrat molekülünün formu değişmekte, inaktif formdan aktif forma dönüşmektedir. Bir sonraki aşamada bu aktif proteinler daha çok enzimi aktif etmek, membran geçirgenliğini değiştirmek, belirli proteinlerin sentezini ve metabolik yolları uyarmak ya da inhibe etmek gibi bir çok hücresel işlemleri değiştirmektedir (Butler, 2007). Dolayısıyla kalmoduline kalsiyum yerine kurşun bağlanması protein konformasyonunu değiştirmektedir (Simons, 1986). Bu durum ise protein kinazların aktivasyonunu değiştirecek etkiye sebebiyet verebilmektedir (Şekil 1.19).



Şekil 1.19. Kurşunun kalmoduline bağlanması (kalsiyuma alternatif olarak) (PLC: Fosfolipaz C ; PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat; IP3: Inositol trifosfat; DAG: Diaçilgliserol) (Nussey ve Whitehead, 2001).

1.3.3.2.3. Utero Döneminde Kurşun Toksisitesi

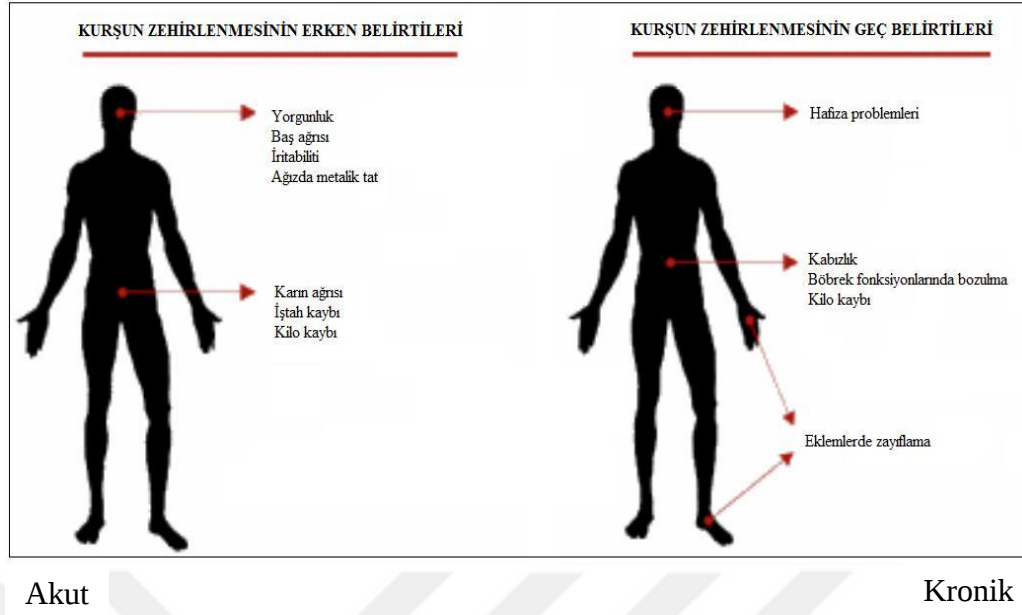
Kurşun toksisitesinin muhtemelen en önemli ve zararlı süreci utero dönemidir. Utero süreci boyunca fetüs gelişim durumundadır ve bu nedenle kendini çok fazla koruyamamaktadır. Bu sebepten dolayı hastalıklara ve toksinlere duyarlılığı bu periyotta daha çoktur. Bu süreç zarfında kurşuna maruz kalma ileriki yaşlarda çocuğun yaşamını etkileyebilecek kritik gelişimsel ve nörolojik problemler getirebilmektedir. Bahsi geçen belirtilerin kısa zamanda görülmesinden bahsedilmese dahi utero periyodunda kurşuna maruz kalan bir kişi hayatının sonraki aşamalarında yüksek ihtimalle kriik merkezi sinir sistemi problemleri tecrübe edecektir (Brown ve ark., 1990).

Kurşun gebelik esnasında plasenta aracılığıyla annenin kan dolaşımından bebeğin kan dolaşımına rahatlıkla geçme kabiliyetine sahiptir (Crocetti ve ark., 1990). Çünkü anne kan düzeyi ile kordon kan düzeyleri arasında güçlü bir korelasyon vardır ve kurşun geçişi ile göbek kordon kan akım hızı arasında doğrusal ilişki vardır.

Kan beyin bariyeri gelişim süreci doğum sürecinden yaklaşık olarak 6 altı sonraya kadar devam etmektedir (Brochin ve ark., 2014). Bu anlamda kurşun metali toksisite riski doğumun gerçekleşmesini takip eden periyotta da devam etmektedir.

Kurşun zehirlenmesinden fetüs dışında en fazla etkilenenler küçük yaştaki bireyler, gebe kadınlar ve kurşun element ile teması olan meslek alanlarında görev yapan kişilerdir. Küçük yaştakilerdeki maruziyet nedenleri içerisinde davranışsal karakterleri (hijyen anlamında dikkatsiz davranışları, ellerini dikkat etmeden daha fazla ağızlarına götürmeleri), beslenme eksikliklerinde karşılaşılan yaygınlıklar (vitamin D ve kalsiyumdan az beslenme gastrointestinal sistemden kurşun emilimini çoğaltır) ve yetişkin bireylere nazaran kurşun elementi için nörolojik ve hematolojik unsurların daha minimal eşik düzeylerde meydana gelmesi yer almaktadır (Brunekreef, 1985). Bunun yanı sıra küçük yaştakilerde büyüme periyodu süresince kurşun zehirlenmesi daha çok bilişsel ve öğrenmede görülen bozukluk ile bağlantılıdır. Kurşun N-metil-aspartatın (NMDA) baskılanmasına sebebiyet vermektedir. NMDA reseptörleri ise insan beynini gelişimi ve sinaptik plastisitede en çok hippocampusun uzun süreli potansiyasyonu açısından oldukça önemlidir (Gularte ve McGlothlan, 1998).

Yetişkin bireylerde kurşuna maruz kalma, üreme, yüksek tansiyon, sindirim ve boşaltım sistemi problemleri ile eklem ve kas ağrıları dahil bir çok problemle ortaya çıkabilmektedir (Şekil 1.20).



Şekil 1.20. Kurşun zehirlenmesi (Klinik gösterim)

Kurşun toksisitesi yetişkin bireylerde de hafıza ve konsantrasyon sorunlarına sebebiyet vermektedir (Brochin ve ark., 2014). Yapılan araştırmalar ışığında kurşuna çevresel maruziyet yetişkin bireylerde bilişsel fonksiyonlar anlamında kalıcı etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Shih ve ark., 2006). Bunun yanı sıra kurşun Parkinson hastalığı ve amiotrofik lateral skleroza da yol açabilmektedir.

Klinik anlamda kurşun toksisitesine anemili yetişkin bireylerde ve küçük yaştakilerde rastlanabilmektedir. Kurşun formasyonunu etkilediği gibi, mikrositik anemiye de sebebiyet vermektedir. Kurşun proteinlerdeki sülfidril gruplarına bağlanır ve işlev bozukluğuna sebebiyet vermektedir. Bunun yanı sıra kurşun ferrokelatazi ve porfobilinojen halkasının meydana gelmesini katalize eden delta-aminolevulinik asit dehidratazi inhibe etmektedir.

1.4. Ksenobiyotiklerin Metabolizması

Metabolizma, hayatsa faaliyetlerin deamı için gerekli olan ve organizmada meydana gelen tüm kimyasal reaksiyonlardır. Organizma için yabancı olan kimyasal maddeler ise “Ksenobiyotik” olarak tanımlanır. Biyotransformasyon (metabolizma), Organizma bünyesindeki ksenobiyotiklerin kimyasal değişimine denir (Ada, 2013).

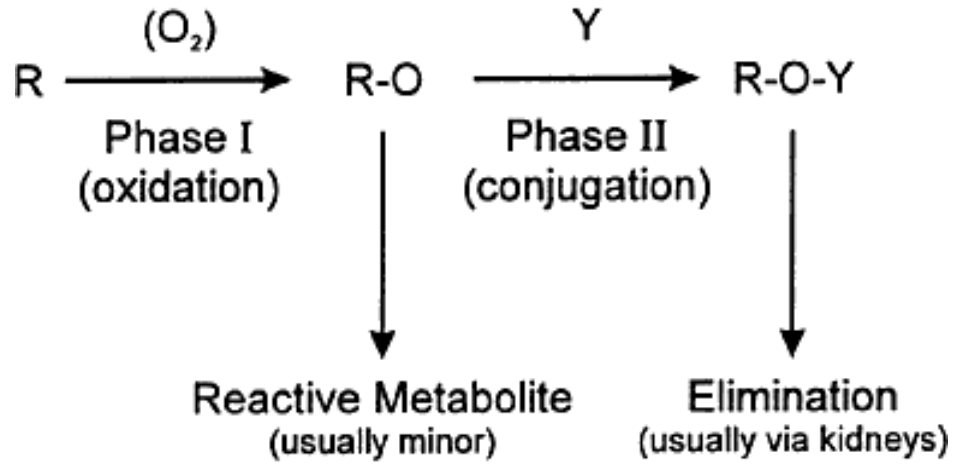
Biyotransformasyon neticesinde ilaçlar vücutta genelde daha az etkili veya etkisiz bileşikler haline getirilir. Bu nedenle biyotransformasyon, biyoinaktivasyon veya detoksikasyon (zehirden arındırma) da denir (Vural, 2005).

1.4.1. Biyotransformasyonun Yer Aldığı Organlar

Biyotransformasyon için en önemli organ karaciğerdir. Karaciğer dışında biyotransformasyon sınırlı olacak şekilde, akciğer, böbrek ve kolonlarda; daha da sınırlı olarak deri, erkeklerde testiste, plasenta ve adrenal bezlerde gerçekleşebilmektedir (Ada, 2013).

1.4.2. Biyotransformasyon Reaksiyonları

Biyotransformasyonla ilgili enzimatik olaylar esas olarak iki fazda gerçekleşir.



Şekil 1.21: Ksenobiotic Metabolizma Safhalarının Özeti (<http://www.preskorn.com> dan alınmıştır.)

1.1. Faz-I Reaksiyonları (Vural, 2005)

Yükseltgenme	Sitokrom P450 (CYP)'ler Ksatin Oksidaz Peroksidazlar Aminooksidaz Dioksijenaz Süperoksit dismutaz
İndirgenme	Sitokrom P450 (CYP)'ler Ketoredüktaz Glutastyon Peroksidaz
Hidroliz	Epoksit hidrolaz Karboksitetraz Amidazlar

1.2. Faz-II Reaksiyonları (Vural, 2005)

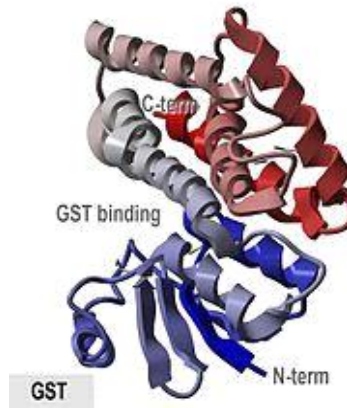
Konjugasyon Reaksiyonları	Glukronil Transferaz Sülfonil Transferaz Glutasyon S- Transfraz (GST) Glukozil Transferaz Tiyol Transferaz
Diğer Metilasyon Asetilasyon	O, N, S – metiltransferaz N – asetiltransferaz Açıltransferaz Sülfotransferaz

Birinci fazda genellikle yağ çözüdür ve ksenobiyotikler polar moleküller haline geçerler. İkinci fazda ise endojen maddelerle birleşen bu polar metabolitler inaktif olarak eliminasyona uğrarlar (Vural, 2005).

Glukronatlar genellikle inaktif olup, kısmen böbreklerden kısmen de karaciğer hücreleri tarafından safra içine atılırlar. Glutasyon ile konjigasyonda, “Glutasyon S-Transfraz (GST)” enzimi ile katalizlenir. Örnek Aromatik hidrokarbonlar.

Glutasyon S- Transfraz (GST)

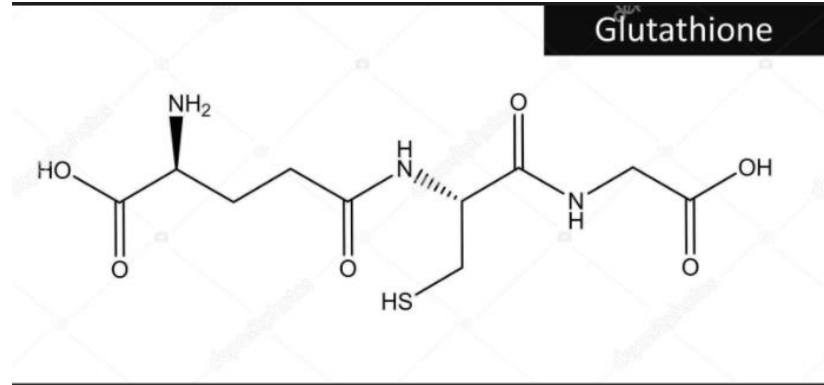
Glutathione S-transferase (GST) enzimleri, ikinci faz reaksiyonlar içersinde önemli multifonksiyonel antioksidan enzim ailesinin rolünü üstlenen olarak tanınır. GST, Aktif ksenobitiklerindetoksifikasyonu ve ilaç metabolizması için sorumlu olan sitozolik enzimlerdir (Mannervik ve ark., 1992). GST, 25000 MW küçük molekül ağırlığına sahip olup, genel olarak iki alt yapısı vardır (Coleman ve ark., 2005) (Şekil 1.22).



Şekil 1.22. Glutathione S-transferase ait kristolografik yapı

([http://en.wikipedia.org/HYPERLINK\"http://en.wikipedia.org/HYPERLINK\"http://en.wikipedia.org/](http://en.wikipedia.org/HYPERLINK\))")")

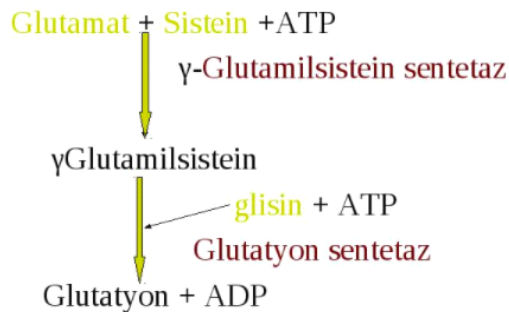
Glutasyon (GSH), glisin, sistein ve glutamik asisten meydana gelmektedir (Casarett ve ark., 2001) (Şekil 1.23).



Şekil 1.23. Glutasyonun kimyasal yapısı
(<https://tr.depositphotos.com/130746872/stock-photo-molecular-structure-of-glutathione.html>)

GSH, koruyucu role sahiptir ve görevi hücrel hedefleri oksidatif ve elektrofilik kimyasallara karşı savunmaktır. Glutasyon (GSH), Hb ve diğer önemli eritrosit proteinlerini oksidatif hasardan koruyan bir tripeptittir. Glutasyon (GSH), Hb ve diğer önemli eritrosit proteinlerini oksidatif hasardan koruyan bir tripeptittir. Glutasyon sentezinde görevli γ -glutamilsistein sentetaz ve glutasyon sentetazın eksiklikleri nadirdir. Ancak eksikliklerinde glutasyon sentezlenemez. Oksidatif stres arttığında yetersiz glutasyon nedeniyle hemoliz meydana gelmektedir.

Glutasyon Sentezi

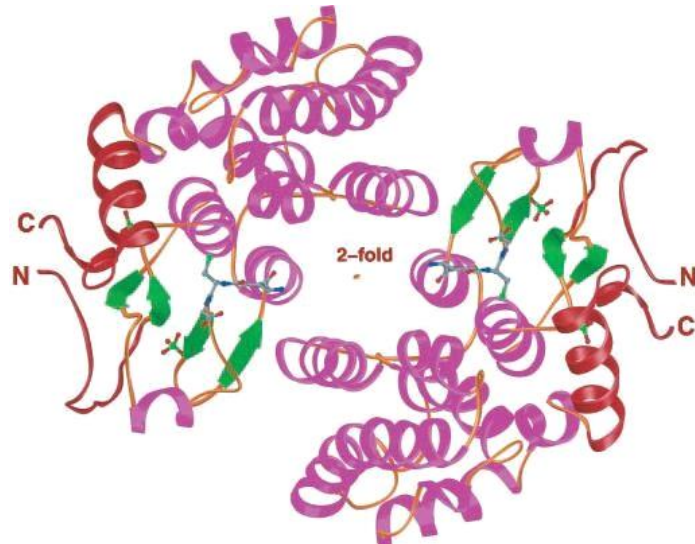


Şekil 1.24. Glutasyon Sentezi

Glutathione S-transferase enzim ailesi, insan organizması içinde yedi ana sınıfa sahiptir; Alpha, Mu, Pi, Theta, Zeta, Sigma and Omega (Hayes of Pulford, 1995). GST'nin bazı grupları sitozolun içinde bulunurken, diğer kısmı ise endoplazmik redikulum içine eklenir. Lipofilik GST'ler farklı yapıya sahiptir. GST, prostaglandinleri ve lökotrienleri metabolize ederler. Sitosolik GST'ler zararlı toksik moleküllerin detoksifikasyonundan ve bazı hasarlı proteinlerin onarılmasından sorumludur (Coleman, 2005).

Ayrıca, glutathione S-transferase enziminin seviyesi bazı hastalıkların belirlenmesinde önemli bir indikatördür. Örneğin, yüksek GST seviyesi viral bir enfeksiyonun habercisi olabileceği gibi bir organdaki toksikasyonunda habercisi olabilir (Loguercio et al., 1998 and Beckett et al., 1985). Mesela; GSTP sınıf enzim renal tüpler içindeki varlığı, yani GSTP nin yüksek seviyede olması nefrotoksisteyi gösterebilir (Sundberg ve ark., 1994 ve Harrison ve ark., 1989).

Glutathione S-transferase omega sınıfı iki izoforma sahiptir. Bunlar; GST omega 1 ve GST omega 2 (Whitbread et al., 2003). Glutathione S-transferase yapısını, Şekil 1.25.'te görmekteyiz.



Şekil 1.25. Glutathione S-transferase omega kristal yapısı

İki alan vardır; N terminali ve C terminali. N-terminali tioredoksin benzeri bir alandır ve C-terminali alfa sarmal yapıları içerir. Diğer GST'lerin aksine, omega sınıfının 19 kalıntı N-terminal uzantısı vardır. Bu bölge prolin zengindir ve hidrojen bağlarıyla C-terminali ile konjuge edilir. Bu yapının işlevi açık değildir. Ayrıca, aktif bölge kalıntısı, sistein bulunan GST omega familyasında farklıdır, diğer GST'ler ise serine ve tirozine sahiptir (Board ve ark., 2000). Bu tortu nedeniyle omega ailesi, hidrojen bağından ziyade GSH molekülü arasında disülfür bağı oluşturur (Board ve ark., 2000).

Omega ailesi glutatyon bağımlı detoksifikasyon reaksiyonunu katalize eder. GST omega dokuların çoğunda bulunur, ancak bu enzim karaciğer, pankreas, iskelet kası, prostat, dalak, kolon ve yumurtalıkta bol miktarda bulunur. Beyindeki ekspresyon düşüktür, çoğunlukla glial hücrelerde bulunurlar (Yin ve ark., 2001). GST omega ailesinin substratı diğer GST'lerden farklıdır. Diğer GST ailesi üyelerinin aksine, bu enzimler 1-kloro 2, 4-dinitroklorobenzen, 7-kloro-4-nitrobenzo-2-oksa-1, 3-diazol ve p-nitrofenil asetat gibi substratlara sahiptir (Board ve ark., 2000). Glutatyon S-transferaz omega familyası ayrıca, tiyotransferazlar ve dehidroaskorbat reduktazlar gibi hidroksietil disülfid ve dehidroaskorbatı içeren bir antioksidan aktivite rolünü oynar (Board ve ark., 2000). Ayrıca, omega sınıfının bazı formları büyük ve açık hidrofobik bir bağlanma alanına sahiptir, bu nedenle protein tamirinde reaksiyona katkıda bulunabilirler (Coleman, 2005).

Dahası, GSTO1, hücre içi klorid kanal proteinleri (CLIC) ile benzer bir yapıya sahiptir, bu nedenle bu enzim, CLIC tarafından gonododin reseptörleri gibi tanıtılan reseptörleri bağlayabilir (Yin ve ark., 2001). Bu reseptörler, bir tür Ca kanalı ve endoplazmik retikulumda bulunurlar. Bu nedenle, GSTO1, Ca tarafından indüklenen apoptoz sürecini modüle edebilir (Dulhunty ve ark., 2001). Ayrıca GST omega 1 sınıfı, sitokinleri ve interlökin 1 β 'i posttranslasyonda modifiye ederek etkileyerek inflamasyon sürecinin aktivasyonunu teşvik etmektedir (Laliberte ve ark., 2003).

Mekanizma tamamen açık olmamasına rağmen, GSTO1 enzimleri östrojen reseptör negatif meme kanserinin düzenlenmesinde de rol oynar (Adam ve ark. 2002).

Arsenik metabolizmasında glutatyon S-transferaz omega 1 ve 2 önemli rol oynamaktadır. Arsenik maruz kalan çevresel toksik bir elementtir ve oksidatif stres için bir kaynaktır (Sampayo- Reyes ve ark., 2010). Arseniklerin zararlı etkisi GST omega ailesi tarafından katalizlenen reaksiyon ile azalır. Arsenik, GST omega familyası tarafından teşvik edilen reaksiyon yoluyla daha az toksik olan iki tip metabolit, monometilarsenik asit (MMA) ve dimetilarsenik aside (DMA) dönüştürülür (Zakharyan vd., 2001). Bu nedenle, bazı kanser türleri, nörotoksisite, hiperkeratoz, serebral enfarktüs vb. Gibi inorganik arseniklerin katkıda bulunabileceği hastalıkların risk ve şiddeti GST omega enzimleri ile azaltılabilir (Sampayo- Reyes ve ark., 2010 ve Paiva ve ark., 2010).

1.5. Genetik Polimorfizm

Genetik polimorfizm, bir popülasyonun bireyleri arasında DNA dizisinde çeşitliliğin varlığıdır. Bu çeşitlilik, fonksiyonel veya fonksiyonel olmayabilir. Çeşitlili fonksiyonel olduğunda fenotipleri, homeostaziye, enzim aktivitesini vb. etkiler. İki temel polimorfizm türü vardır: uzunluk polimorfizmleri ve tek baz değişimleri. Birincisi üç sınıfa ayrılır: ters çeviriler, ekleme-silme ve basit sekans tekrarları (mikrosatelitler gibi). Diğer tip polimorfizm iki gruba ayrılır: tek nükleotid polimorfizmleri ve nokta mutasyonları.

1.5.1. Tek Nükleotid Polimorfizmi

Tek nükleotid polimorfizmi, en az bir popülasyonda %1'den daha fazla bir frekans ile DNA molekülünde sadece bir nükleotidin değiştiği anlamına gelir. SNP, DNA içinde kodlu veya kodlu olmayan bölgede yer alabilir. Kodlama bölgesinde yer

alan SNP'nin iki etkisi vardır. Gen fonksiyonlarını etkilemezler. SNP'lerin çoğu bu gruba dahildir. Eğer amino asit değişimi meydana gelmezse, sessiz mutasyonlar denir. Bu durum homeostazdaki biyokimyasal reaksiyonu etkiler.

1.5.1.1. GST Omega 1 ve Omega 2'nin Polimorfizmi

Ala140Asp ve Asn142Asp polimorfizmleri, missense mutasyonlarıdır ve sırasıyla GSTO1 ve GSTO2 genlerinde meydana gelirler. GSTO1 Ala140Asp ekson 4'te bulunur. 419 nükleotid sitozin adenine dönüşür, bu nedenle amino asit alanin aspartik aside ikame edilir. Asp genotipi azalmış enzim aktivitesine neden olur (Tanaka-Kagawa ve ark, 2003).

GSTO2 Asn142Asp polimorfizmi de ekzon 4'te bulunur. GSTO2 Asn142Asp polimorfizmi, 424 konumunda guanininden, adenine olan baz değişimidir. Bu değişim ile genin 142. amino asidinde, asparajinden aspartik aside değişim olur (Rafiee ve ark., 2010). Önceki bir çalışmaya göre, bu polimorfizm daha düşük enzim aktivitesi ile ilişkili olabilir (Whitbread ve ark., 2003).

Literatürde GSTO1 ve GSTO2 gen polimorfizmleri ile ilgili bazı çalışmalar, bu genlerin ifade ettiği enzimlerin çeşitli atamalarına odaklanarak yapılmaktadır. Glutatyon S-Transferaz omega familyasının arsenik metabolizması üzerindeki işlevi nedeniyle, GST omega genlerindeki SNP'nin kanser dokularındaki etkisi araştırıldı. Çevresel arsenik kanser için bir risk faktörüdür ve GST omega ailesi organizmada arsenik detoksifikasyonundan sorumludur. Ürotelyal karsinom hastalarında GSTO1 Ala140Asp ve GSTO2 Asn142Asp polimorfizmlerinin etkileri incelenmiştir (Chung ve ark., 2011).

Başka bir çalışmada arsenik metabolizması ve ateroskleroz arasında bir ilişki olduğu öne sürülmüştür. Bu nedenle, inorganik arsenikin GST omega 2 gibi daha az toksik moleküllere dönüştürülmesinden sorumlu genler üzerindeki polimorfizmler araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, arsenik metabolizması bozulduğunda karotis ateroskleroz riskinin arttığını göstermiştir (Hsieh ve ark., 2011).

GSTO1 enzimi redoks homeostazında rol oynar, bu nedenle bu durum Alzheimer hastalığını etkileyebilir ve bu nedenle sporadik Alzheimer hastalığı hastalarında Ala140Asp polimorfizmi çalışılmıştır (Capurso ve ark., 2010). Ayrıca, glutatyon S-transferaz enzimleri ile sigara ve pestisit metabolizması arasındaki ilişkiden dolayı, Parkinson hastalığında GST Omega genlerinde polimorfizm etkisi araştırılmıştır. Sigara ve pestisitler Parkinson hastalığı riskini azaltır, bu nedenle GSTO1 genindeki Ala140Asp ve GSTO2 genindeki Asn142Asp polimorfizmleri hastalığın şiddetini etkileyebilir (Kiyohara ve ark., 2010 ve Wahner ve ark., 2007). Türk populasyonunda GSTO1-C419A ve GSTO2-A424G genetik polimorfizme sahip olmanın iskemik inme riski açısından ilişkisi bulunmazken, diyabetes mellitusu ve sigara içiciliği olan bireylerde mutant allele sahip olmanın inme riskini arttırdığı bildirilmiştir. (Bilgin ve ark 2018)

1.6 Amaç

β -talasemi majorlu hastalarda efektif olmayan eritropoez, bağırsaklardan demir emiliminin artması ve klinik tedavide regüler kan transfüzyonlarının uygulanması sonucunda hastaların vücutlarında demir birikimine bağlı olarak toksisite görülmektedir. Bu toksisitede metallerle doğrudan ya da dolaylı etkileşen genlerin polimorfik yapıları da önemli rol oynamaktadır.

Bu nedenle yapılan çalışmada metal metabolizmasında önemli rol oynayan GSTO1 ve GSTO2 genlerindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin talasemi

hastalarında incelenmesi, genetik farklılıkların ve bu farklılıkların bireylerin metal düzeylerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçle

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Restriksiyon enzimi (Cac8I, MboI)	Neb (New England Biolab)
Primerler Alpha DNA,	Montreal
NEBuffer 4	New England Biolab
PCR Buffer, 10X	Qiagen
Deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP Mix)	Fermentas
DNA's RNA's free water	Qiagen
Hot Star Taq DNA polimeraz	Qiagen
Agaroz	Prona
Etidyum bromür	Applichem
6X loading çözeltisi	Qiagen
Etanol	Merck
Fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1)	Applichem
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Applichem
Proteinaz K	Fermentas
100 bp ladder	Fermentas
Sodyum klorür (NaCl)	Merck
Trizma Base	Merck
EDTA	Merck A
Borik asit	Merck
Fe Standart Çözeltisi	AA Standart Etanol pour SCP Science
Pb Standart Çözeltisi	AA Standart Etanol pour SCP Science
Ammonyum dihidrojen fosfat	Merck
Nitrik asit (%65'lik)	Merck

2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Jel görüntüleme cihazı	Syngene
Laminar flow kabin	Esco
Thermal Cycle PCR cihazı	Techne Tc 512
Soğutmalı santrifüj cihazı	Hettich
Otoklav	Nüve
Su banyosu	Nüve Bm 402
Etüv	Memmert
Su purifikasyon sistemi	Human UP 900 Scholar-UV
Vorteks karıştırıcı	Biosan
Dijital hassas terazi	Mettler Toledo
pH metre	Mettler Toledo
Yatay elektroforez cihazı	Scie-Plas
Güç kaynağı	Bio-Rad
Mikrodalga fırın	Arçelik
Eppendorf tüpler (1.5 ml ve 0.2 ml'lik)	Axygen Genuine
Otomatik mikro pipetler	Eppendorf, Thermo
Pipet uçları (100 µl, 1000 µl, 5 ml, 10 ml)	Finntip
Manyetik Karıştırıcı	Mirak
Mikro santrifüj	Hettich
Steril eldiven	TopGloves
Derin dondurucu	Regal
Atomik Absorpsiyon Spektrometresi	VarianAA24OFS Fast Sequential
Atomik Absorpsiyon Spektrometresi	Varian AA24OZ Zeeman
Grafit Tüp Atomizer	Varian GTA 120
Grafit Komponent Tüpler	Varian GTA
Oyuk Katot Lambası	Varian Spectra AA Lamp
Vial (2 ml)	Pothtech Elkay
Santrifuj	Heraeus Sepatech Labofyge 200
Polipropilen, Kapaklı Tüpler (15, 25 ml'lik)	
Hava-Asetilen Tüpü	

Argon gaz tüpü
Cam malzemeler
Parafilm

2.1.3. Deney Protokolü

2.1.3.1. Çalışma Grubunun Seçilmesi

Çalışma grubunu 2010 ile 2013 tarihleri arasında Balcalı Hastanesi Hematoloji Bölümü'ne kan transfüzyonuna düzenli olarak gelen β -talasemi majorlu hastalar oluşturmaktadır. Planlanan çalışmaya seçilen 100 birey, talasemi dışında başka bir hematolojik hastalığı ve çevresel toksik metallere maruziyeti olmayan hasta bireylerdir. Ek olarak, hastalar 18–45 yaş arasında olup, en az bir yıldır eritrosit süspansiyonu transfüzyonu yapılan bireylerdir. Bireyler çalışma hakkında bilgilendirildikten sonra kanları alınarak demir ve kurşun konsantrasyonları ile GSTO1ve GSTO2 gen polimorfizmleri belirlendi.

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 29.04.2013 tarih ve 07-286-13 sayılı kararı ile yürütüldü ve genetik çalışmalar ile metal analizleri Ankara Üniversitesi Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Ek olarak tüm talasemili hastalar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulları Araştırma Projesi Bilgi ve Taahhüt Formu'nda belirtilen kurallara göre bilgilendirilme onam formları doldurularak incelemeye alındı.

2.1.3.2. Çalışma Grubundan Biyolojik Materyalin Toplanması

Balcalı Hastanesi Hematoloji Bölümü'ne düzenli olarak kan transfüzyonuna gelen 50 erkek 50 kadın toplam 100 β -talasemi majorlu bireyden kan örnekleri alındı.

Demir ve kurşun analizleri ile genetik çalışmalar (GSTO1ve GSTO2 gen polimorfizmleri) için kullanılan kan örnekleri, K2EDTA içeren mor kapaklı tüplere alınıp soğuk zincirde korundu. Genetik analizler için gerekli miktarda kan kurutulup ayrıldıktan sonra polietilen tüplere aktarılan örnekler çalışma zamanına kadar dondurularak -20°C'de saklandı.

2.1.4. Yöntem

Çalışmada tam kan örneklerinde demir ve kurşun düzeyleri atomik absorpsiyon spektrometri yöntemiyle ölçülerek GSTO1ve GSTO2 gen polimorfizmleri ile ilişkisi olup olmadığı araştırıldı.

2.1.4.1. Metal Analizi

2.1.4.1.1. Metal Düzeylerinin Belirlenmesi için Yapılan Ön İşlemler

Çözünürleştirme ait mikrodalga fırın programı Çizelge 3'te verilmiştir. Çözünürleştirme işlemi yüksek sıcaklığa dayanıklı teflon tüplere konulmuş olan 1'er ml tam kan örneğine, 9 ml %65'lik Nitrik Asit (HNO_3) eklenerek yapıldı. Yakılan örnekler 50 Ml'lik döner kapaklı polipropilen tüplere aktarılıp, toplam hacim deiyonize su ile 40 Ml'ye tamamlandı. Karışım vorteksle karıştırıldıktan sonra örnekler analiz anına dek kapaklı polipropilen tüplerin içinde +40 °C 'de saklandı.

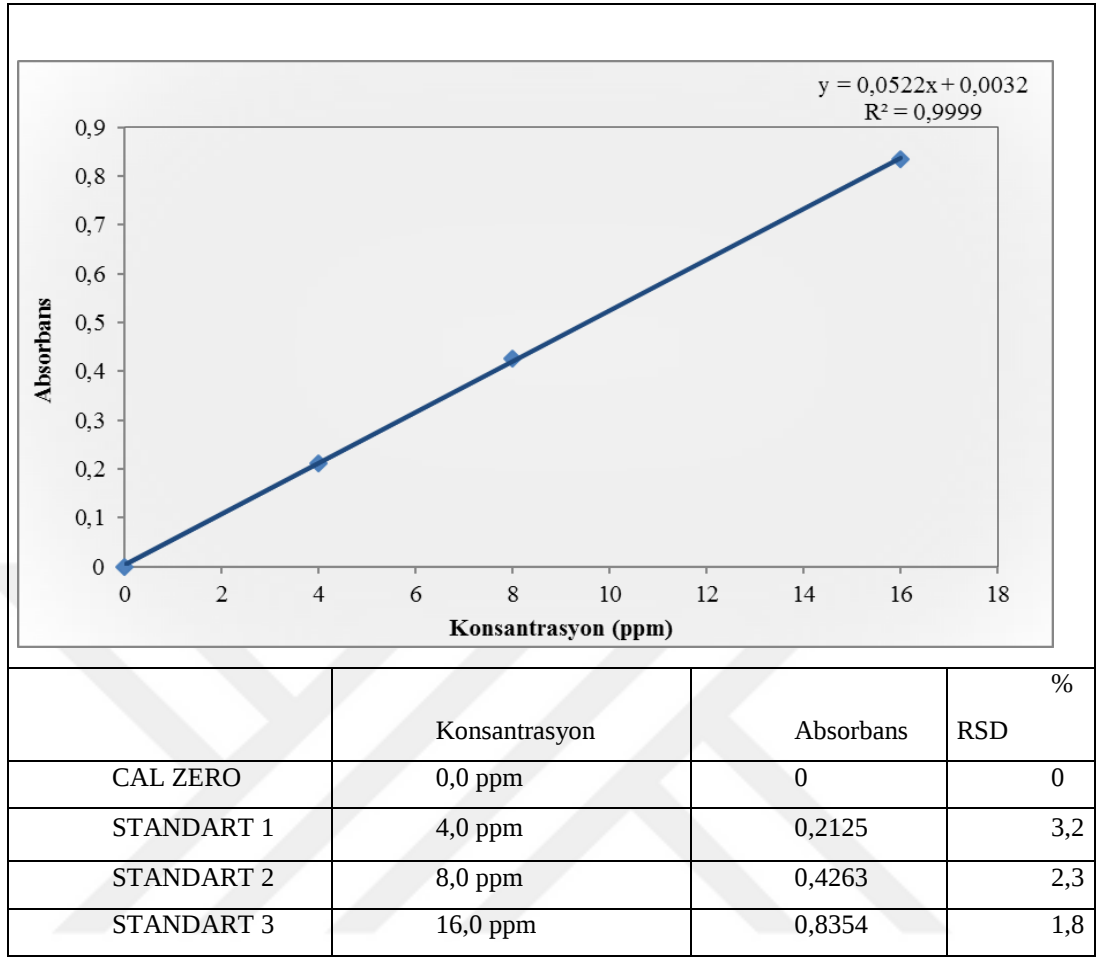
Çizelge 2.1. Mikrodalga fırına ait tam kan çözünürleştirme programı.

Max. Güç (Watt)	Güç %	Zaman (dak.)	Sıcaklık (oC)	Bekleme (dak.)
800	100	15:00	200	5:00

2.1.4.1.2. Tam Kan Örneklerinde Demir Analizi

Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometre (Varian AA24OFS Fast Sequential Flame Atomic Absorption Spectrometry) cihazı ile çözünürleştirilmiş olan örneklerin demir düzeyi belirlendi. Demir analizi yönteminde kalibrasyon eğrisi (Şekil 2.1) oluşturmak için 1000 ppm olan demir ana stok çözeltisinden öncelikle 0, 4, 8, 16 ppm'lik konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Demir ana stoğundan demir standartları hazırlanırken %4'lük nitrik asit kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken her bir standart çözelti için 3 kez ölçüm yapıldı. Ek olarak, kalibrasyon 20 örnekte bir tekrarlandı ve örnekler için 3'er kez ölçüm yapıldı.

Çalışmada demir analizinde dalga boyu ise 372.0 nm olarak ayarlandı. Ortam gazı olarak hava-asetilen kullanıldı; hava akışı 13,50 L/dak, asetilen akışı 2,00 L/dak'dır. Ölçüm sonucu kalibrasyon eğrisi yapıldı.



Şekil 1.26. Demir analizine ait örnek kalibrasyon grafiği.

Çizelge 2.2. Alevli atomik absorpsiyon cihazı kullanılarak kan örneğinde demir metalinin analizi için uygulanan metot.

Element - matriks	: Fe – Kan
Enstrüman	: Alev
Konsantrasyon birimi	: mg/L
Enstrüman modu	: Absorbans
Örnekleme	: Manuel
Kalibrasyon modu	: Konsantrasyon
Ölçüm modu	: PROMT
Standart tekrarı	: 3
Örnek tekrarı	: 3
Ekspansiyon faktör	: 1,0
Eğri çizimi	: 7 noktalı
Konsantrasyon ondalık aralığı	: 3 basamak
Dalga boyu	: 372,0 nm
Slit genişliği	: 0,2 nm
Gain	: %75
Akım	: 5,0 Ma
Background	: BC off
Lamba Pozisyonu	:1
Standart 1	: 4,000 mg/L
Standart 2	: 8,000 mg/L
Standart 3	: 16,000 mg/L
Reslope standardı	: Standart 2
Reslope alt limit	: %75
Reslope üst limit	: %125
Rekalibrasyon	: 20 örnekte bir
Kalibrasyon algoritması	: New Rational
Kalibrasyon alt limit	: %20
Kalibrasyon üst limit	: %150
Ölçüm Zamanı	: 10s
Okuma öncesi bekleme	: 5s
Alev tipi	: Hava / Asetilen
Hava akışı	: 13,50 L/dak
Asetilen akışı	: 2,00 L/dak

2.1.4.1.3. Tam Kan Örneklerinde Kurşun Analizi

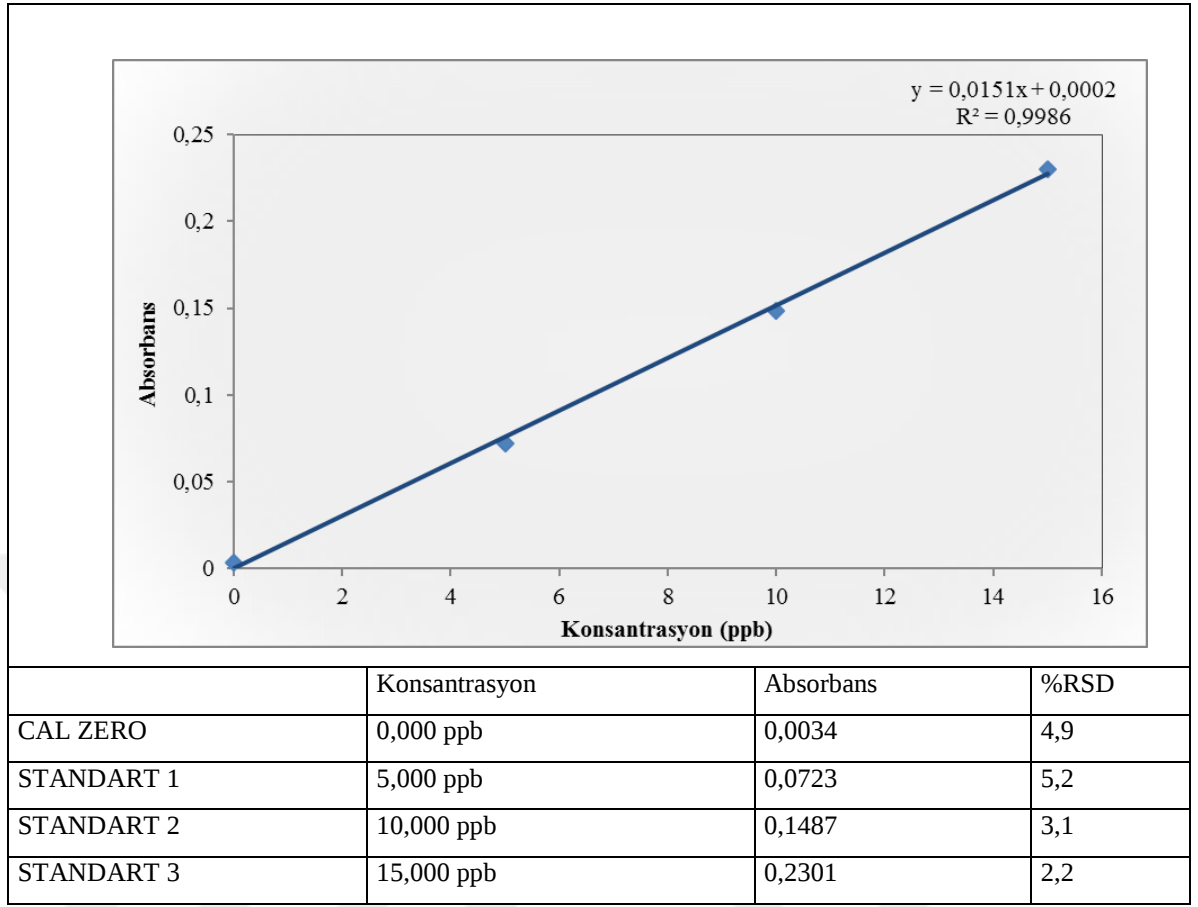
Grafit Fırın Atomik Absorpsiyon Spektrometresi (Varian AA240Z Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry) ile yakılmış olan örneklerde kurşun

düzeyleri belirlendi. Çalışmada talasemili bireylerden alınan kan örneklerindeki kurşun analizine ait grafit fırın sıcaklık programı Çizelge 2.3.'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Kan örneklerinde kurşun analizine ait grafit fırın sıcaklık programı.

Step	Sıcaklık (oC)	Zaman (s)	Akış (L/min)	Sinyal Toplama	Okuma
1	85	5	0,3	×	Hayır
2	95	50	0,3	×	Hayır
3	120	15	0,3	×	Hayır
4	550	5	0,3	×	Hayır
5	550	5	0,3	×	Hayır
6	550	2	0,3	×	Hayır
7	200	6,1	0,3	✓	Evet
8	200	2	0,0	✓	Evet
9	2150	0,9	0,0	✓	Evet
10	2150	2	0,0	✓	Evet
11	2150	2	0,3	✓	Evet
12	2600	2	0,3	×	Hayır
13	2600	2	0,3	×	Hayır

Kurşun analizi yönteminde kalibrasyon eğrisi (Şekil 2.2.) oluşturmak için 1000 ppm olan stok çözeltisinden öncelikle 5, 10, 15 ppb'lik konsantrasyonlarda standart çözelti hazırlandı. Kurşun ana stoğundan kurşun standartları hazırlanırken %2'lik nitrik asit kullanıldı. Piklerin ölçümü pik yüksekliği ile, kalibrasyon hesabı ise konsantrasyon modu ile yapıldı. Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken her bir standart çözelti için 3 kez ölçüm yapıldı. Ayrıca kalibrasyon 20 örnekte bir tekrarlandı ve örnekler için 3'er kez ölçüm yapıldı.



Şekil 2.2. Kurşun analizine ait örnek kalibrasyon grafiği.

Çalışmada ortam gazı olarak argon gazı ve atomlaştırıcı olarak grafit fırın kullanıldı. Dalga boyu 283,3 nm olarak ayarlandı. Matriks modifier olarak %1'lik amonyum dihidrojen fosfat solüsyonu kullanıldı. Toplam enjeksiyon 20 µl olacak şekilde ana standart seyreltilerek, matriks modifier eklenmiştir. Kurşun analizi için kullanılan metod Çizelge 2.4.'de yer almaktadır.

Çizelge 2.4. Kurşun analizi için grafit fırın teknikli atomik absorpsiyon cihazında uygulanan metot.

Element - matriks	:Pb - Kan
Enstrüman	: Zeeman
Konsantrasyon birimi	: µg/L
Enstrüman modu	: Absorbans
Örnekleme	: Otomatik
Kalibrasyon modu	: Konsantrasyon
Ölçüm modu	: Pik Yüksekliği
Standart tekrarı	: 3
Örnek tekrarı	: 3
Ekspansiyon faktör	: 1.0
Eğri çizimi	: 7 noktalı
Konsantrasyon ondalık aralığı	: 2 basamak
Dalga boyu	: 283,3 nm
Slit genişliği	: 0,5 nm
Gain	: %47
Akım	: 10,0 mA
Background	: BC on
Lamba Pozisyonu	: 1
Standart 1	: 5,000 µg/L
Standart 2	: 10,000 µg/L
Standart 3	: 15,000 µg/L
Reslope standardı	: Standart 2
Reslope alt limit	: %75
Reslope üst limit	: %125
Rekalibrasyon	: 20 örnekte bir
Kalibrasyon algoritması	: Lineer
Kalibrasyon alt limit	: %20
Kalibrasyon üst limit	: %150
Toplam enjeksiyon hacmi	: 25 µl
Ana standart konsantrasyonu	: 15 µg/L

2.1.4.2. GSTO1 ve GSTO2 GEN POLİMORFİZMLERİ

2.1.4.2.1. Yöntemde Kullanılan Çözeltiler

TE çözeltisi (100 ml)

0,121 gram tris tartıldı ve 80 ml distile su içerisinde çözöldü. 0,037 gram EDTA ilave edildi. pH 7,5'a ayarlandı. Distile su ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

1 M Sodyum Klorür (NaCl) (1000 ml)

58,44 gram sodyum klorür 1000 ml distile su içerisinde çözöldü. Çözelti +4oC'de muhafaza edildi.

Proteinaz K hazırlanması (1250 µl)

25 mg Proteinaz K, 1250 µl distile su içersinde çözöldü. 20 µl – 10 µl ve 5 µl'lik hacimlerde epondorf tüplere koyuldu. -20oC'de muhafaza edildi.

%20'lik Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) çözeltisi (500 ml)

100 gram sodyum dodesil sülfat (SDS) tartıldı. 300 ml distile su içerisinde çözölerek 500 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

2.1.4.2.2. Sıvı Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Kan örneklerindeki nDNA'yı açığa çıkarabilmek için fenolkloroform-izoamil-alkol ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Yöntemin detayları aşağıda verilmiştir.

1. Sıvı kan örneğinden 200 µl alınarak 1,5 ml'lik ependof tüp içersine konuldu.
2. 100 µl sıvı kan örneğinin üzerine 1000 µl Tris-EDTA konularak 1200 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Alt faz 100 µl kalıncaya kadar üst faz atıldı. Bu işlem 3 defa tekrarlandı.

3. Pelet üzerine;

45 µl NaCl (1 M),

40 µl SDS (%10'luk),

410 µl TE

- 5 µl Proteinaz K eklenerek kısaca vortekslendi.
4. 56 °C'lık su banyosunda 1.5-2 saat inkübe edildi.
5. İnkübasyondan sonra fenol-kloroform-izoamil alkol karışımından (25:24:1) 500 µl ilave edildi.
6. Ependorf tüpleri 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
7. Alt faz hareket ettirilmeden süpernatant kısmı yeni bir ependorf tüpe alındı ve alt faz atıldı.
8. 1000 µl soğuk saf etil alkol ilave edildi.
9. 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
10. Alkol oluşan pelete zarar vermeden dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
11. 500 µl %70'lik oda sıcaklığında etil alkol ilave edildi.
12. 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
13. Ependorf tüpün içerisinde bulunan tüm alkol dikkatlice uzaklaştırıldı.
14. Tüpün dibinde kalan alkol de tamamen uçurulduktan sonra 100 µl DNase-RNase free su ilave edildi. Tüm DNA örnekleri diğer analizlere alınıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

2.1.4.2.3. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi ve %0.5'lik Agaroz Jel Hazırlanması

Genomik DNA'nın kan örneklerinden izole edilip edilmediğinin analizi %0.5'lik agaroz jel elektroforezi ile belirlendi.

1. 0.6 gr agaroz tartıldı ve 120 ml 1X TBE çözeltisi bir erlen içinde karıştırıldı.
2. Ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı ve üzerinde birkaç delik açılarak mikrodalga fırında kaynatıldı.
3. Çözelti oda sıcaklığında 50–60°C'ye düşünceye kadar bekletildi.
4. Üzerine 8 µl EtBr (10 mg/ml) ilave edildi ve çözelti homojen bir yapı kazanana kadar erlen çalkalandı.

5. Bu karışım jel tarakları yerleştirilmiş jel kalıplarına hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. Ayrıca jel üzerinde hava kabarcıkları oluşmuş ise, jel katılaşmaya başlamadan pipet ucu yardımı ile patlatıldı.

6. Jelin katılaşması için bir süre oda sıcaklığında bekletildi.

7. Taraklar ve bariyerler dikkatlice çıkarılarak kalıp elektroforez tankına yerleştirildi. Bu esnada jel kuyucuklarının, yürütme tankının katot elektrot (-) tarafına yerleştirilmesine dikkat edildi.

8. Jelin üzerini kaplayacak miktarda tank içerisine 1X TBE çözeltisi konuldu.

Agaroz jel hazırlandıktan sonra örnekler jele yüklenmek üzere hazırlanmış ve yürütülmüştür. Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

15 cm uzunluğunda parafilm kesilerek buz kalıbı üzerine yerleştirildi.

1 µl 6X Jel Loading Buffer ve 5 µl DNA örneği parafilm üzerine konuldu ve homojenizasyon için mikropipet yardımı ile yavaşça karıştırıldı.

Toplam 6 µl karışım jeli delmeden dikkatli bir şekilde jel kuyucuklarına yerleştirildi.

Tank kapağı kapatıldı ve anot ile katot uçlarının bağlantıları takıldı.

Güç kaynağı 100 V ve 70 mA'e ayarlanarak, numuneler 45 dakika jel üzerinde yürütüldü.

UV ışığında, jel görüntüleme cihazında sonuçlar değerlendirildi.

2.1.4.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İzole edilen genomik DNA örneklerinde, GSTO1 (rs4925) ve GSTO2 (rs156697) tek nükleotid polimorfizmlerini içeren gen bölgeleri Forwad ve Reverse primer çiftleri kullanılarak PCR yöntemi ile amplifiye edilmiştir. Bu işlem TECHNE TC 512 Thermal Cycle cihazında gerçekleştirilmiştir ve hedeflenen DNA bölgesinin her biri 235 defa çoğaltılmıştır. Ayrıca her PCR analizinde kontrol amacıyla, pozitif ve negatif örnekler de kullanılmıştır.

2.1.4.2.4.1. GSTO1 Gen Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP) Yöntemi İle Belirlenmesi

2.1.4.2.4.1.1. GSTO1 Geninin Amplifikasyonunda Kullanılan PCR Bileşenleri ve PCR Programı

GSTO1 genindeki C→A tek nükleotid polimorfizminin (rs4925) belirlenmesinde PCR-RFLP yöntemi kullanıldı. PCR reaksiyonunda PCR Buffer, Hot Star Taq DNA Polimeraz, dNTP karışımı, F Primer, R Primer ve DNA bileşenleri bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan PCR reaksiyonunun bileşenlerine ait bilgiler Çizelge 2.5.'de verilmiştir.

Çizelge 2.5. GSTO1 geninin amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri.

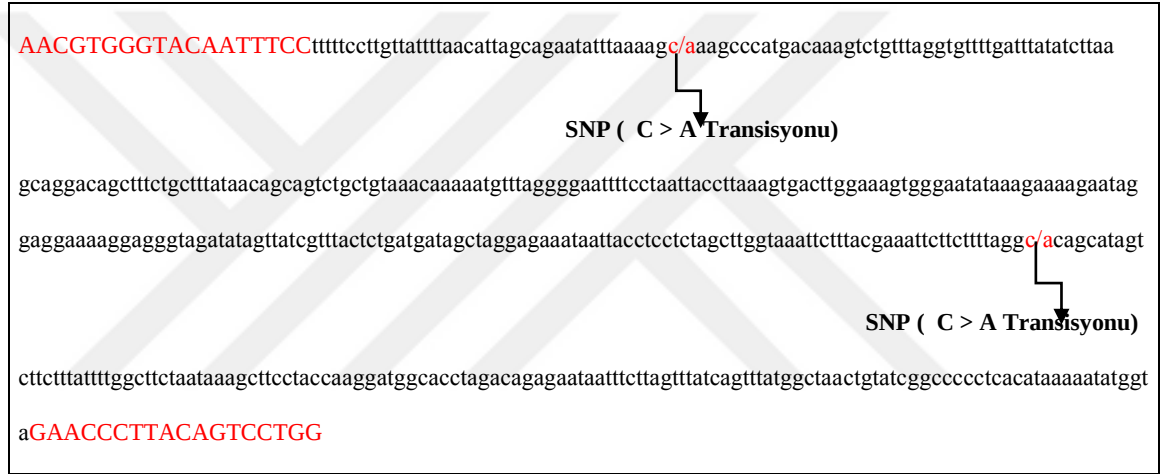
PCR Bileşenleri	Stok Konsantrasyon	Reaksiyona konulan miktar	25 µl'lik reaksiyon karışımındaki final konsantrasyon
10X PCR Buffer	10X	2,5 µl	1X
dNTP karışımı	2 mM	2 µl	200 µM
F Primer	10 pmol/ µl	0,5 µl	10 pmol/ µl
R Primer	10 pmol/ µl	0,5 µl	10 pmol/ µl
Hot Star Taq DNA Polimeraz	5 U/ µl	0,125 µl	1,25 U
DNA		5 µl	~200 ng
Steril H2O		17 µl	

Primerler HPSF yöntemi ile Montreal'deki Alpha DNA firmasına sentezletirildi. Kullanılan primerler ve özellikleri Çizelge 2.6.'da gösterilmiştir (Xu ve ark ,2009).

Çizelge 2.6. GSTO1geninin çoğaltılmasında kullanılan primerler ve özellikleri.

GSTO1	F PRİMER	R PRİMER
	5'- AACGTGGGTACAATTTCC 3'.	5'- CCAGGACTGTAAGGGTTC -3'
Uzunluk	18 baz	18 baz
GC içeriği	%44,4	%55,5
Tm	53,1 C	52,7 C
Tm fark	0,4°C	

PCR sonucunda GSTO1 geni için 471 bp'lık PCR ürünleri elde edildi. Bu ürünün baz dizilimi ve primer dizilimleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3 PCR ile çoğaltılan 471 bp'lık baz dizilimi ve tek nokta mutasyonu.

GSTO1 genindeki C→A tek nükleotid polimorfizminin (rs4925) belirlenmesinde kullanılan PCR programı Çizelge 2.7.'de verildiği şekildedir. PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütülünceye kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Çizelge 2.7. GSTO1gen polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PCR programı.

Şartlar	oC	Süre (dakika)
Başlangıç denatürasyonu	94°C	10
Denatürasyon	94°C	1
Bağlanma	55°C	1
Uzama	72°C	1
Son uzama	72°C	5
	4°C	∞ dakika
Siklus sayısı	35 döngü	

2.1.4.2.4.2. GSTO2 Geninin Amplifikasyonunda Kullanılan PCR Bileşenleri ve PCR Programı

GSTO2 genindeki A→G tek nükleotid polimorfizminin (rs156697) belirlenmesinde PCR-RFLP yöntemi kullanıldı. PCR reaksiyonunda PCR Buffer, Hot Star Taq DNA Polimeraz, dNTP karışımı, F Primer, R Primer ve DNA bileşenleri bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan PCR reaksiyonunun bileşenlerine ait bilgiler Çizelge 2.8.'de verilmiştir.

Çizelge 2.8. GSTO2 geninin amlifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri.

PCR Bileşenleri	Stok Konsantrasyon	Reaksiyona konulan miktar	25 µl'lik reaksiyon karışımındaki final konsantrasyon
10X PCR Buffer	10X	2,5 µl	1X
dNTP karışımı	2 mM	2 µl	200 µM
F Primer	10 pmol/ µl	0,5 µl	10 pmol/ µl
R Primer	10 pmol/ µl	0,5 µl	10 pmol/ µl
Hot Star Taq DNA Polimeraz	5 U/ µl	0,125 µl	1,25 U
DNA		5 µl	~200 ng
Steril H2O		17 µl	

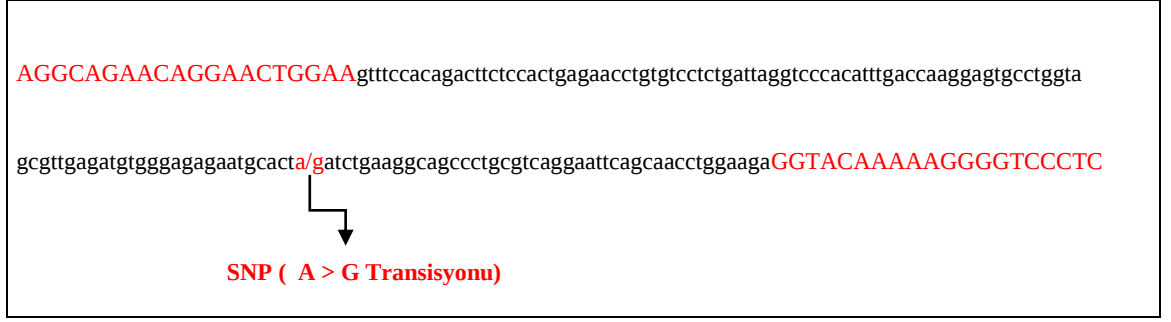
2.1.4.2.4.2.1. Klasik PCR' da Kullanılan Primerler ve PCR Programı

Primerler HPSF yöntemi ile Montreal'deki Alpha DNA firmasına sentezletirildi. Kullanılan primerler ve özellikleri Çizelge 2.9.'da gösterilmiştir (Xu ve ark., 2009).

Çizelge 2.9. GSTO2 geninin çoğaltılmasında kullanılan primerler ve özellikleri.

GSTO2	F PRİMER	R PRİMER
	5'- AGGCAGAACAGGAACTGGAA -3'	5'- GAGGGACCCCTTTTGTACC -3'
Uzunluk	20 baz	20 baz
GC içeriği	%50	%55
Tm	59,8°C	59,7°C
Tm fark	0.1°C	

PCR sonucunda GSTO2 geni için 185 bp'lık PCR ürünleri elde edildi. Bu ürünün baz dizilimi ve primer dizilimleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. PCR ile çoğaltılan 185 bp'lık baz dizilimi ve tek nokta mutasyonu.

GSTO2 genindeki A→G tek nükleotid polimorfizminin (rs156697) belirlenmesinde kullanılan Klasik PCR programı Çizelge 2.10.'da verildiği şekildedir.

Çizelge 2.10. GSTO2gen polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PCR programı.

Şartlar	oC	Süre (dakika)
Başlangıç denatürasyonu	94°C	10
Denatürasyon	94°C	1
Bağlanma	60°C	1
Uzama	72°C	1
Son uzama	72°C	5
	4°C	∞ dakika
Siklus sayısı	35 döngü	

PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütülünceye kadar -20°C'de muhafaza edildi.

2.1.4.2.5. PCR Ürünleri İçin Agaroz Jel Hazırlanması

PCR işleminin ardından istenilen dizinin amplifikasyonunun doğru olarak gerçekleştiğini kontrol etmek amacıyla 8 µl PCR ürünü ile 1 µl 6X Jel Loading Buffer ile karıştırılarak %2'lik normal agaroz jele yüklendi. Bu jelin hazırlanması için 2,4 gr

agaroz tartılarak 120 ml 1X TBE içerisinde çözöldü. Ayrıca 100 bp DNA ladder'dan 1 µl, 6X Jel Loading Buffer'dan 1 µl ve distile sudan 6 µl karıştırılarak yükleme yapıldı. Jel 100 Volt ve 70 Amperde 45 dakika elektroforeze tabi tutuldu ve PCR ürünleri UV ışığında, jel görüntöleme sistemi ile değeriendirildi.

2.1.4.2.6. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi (RFLP)

Çalışmamızda GSTO1 genindeki C→A polimorfizmini belirlemek için (Ala→Asp), amplifikasyon sonucunda oluşan PCR ürünü, Cac8I restriksiyon enzimi ile kesildi. GSTO2 genindeki A→G polimorfizmini belirlemek için ise (Asn→Asp), MboI restriksiyon enzimi kullanıldı. PCR ürünlerinin RFLP yöntemi ile kesim işleminde negatif ve pozitif örnekler de kontrol amacıyla analizlere alındı.

2.1.4.2.6.1. Restriksiyon Enzim Kesim Koşulları

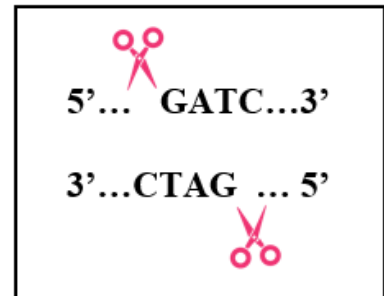
GSTO1 (rs4925) gen bölgesi için kesim koşulları: Cac8I enziminin tanıma bölgesi:

10 µl Nükleaz Free H₂O
2 µl NEB4 Buffer
10 µl PCR ürünü
0,5 µl Cac8I



GSTO2 (rs156697) gen bölgesi için kesim koşulları: MboI enziminin tanıma bölgesi:

18 µl Nükleaz Free H₂O
2 µl NEB4 Buffer
10 µl PCR ürünü
1 µl MboI



Örnekler gece boyu 37 °C'de inkübe edildi.

2.1.4.2.7. Restriksiyon Enzimleri İle İnkübasyondan Sonra AgaroZ Jel Hazırlanması

GSTO1*A140D ve GSTO2*N142D gen polimorfizmlerinin belirlenmesi için, kesim ürünleri 6X yükleme boyası ile (8 µl kesim ürünü 1 µl boya ile karıştırıldı) bölüm 2.1.4.2.5.' te anlatıldığı şekilde %2'lik jelle yüklendi ve elektroforeze tabi tutuldu. Sonuçlar UV ışığında, jel görüntüleme sistemi ile değerlendirildi.

2.1.4.2.8. İstatistiksel Analizler

Tüm istatistiksel analizlerde SPSS V16 programı kullanıldı. Kategorik veriler için χ^2 testi kullanıldı. Datalar ortalama $\pm$ S.S ve median, minimum, maksimum değerleri kullanılarak verildi. $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

Çalışma örnekleminde yer alan 100 β -talasemi majorlu hastadan toplanan kan örneklerinde demir eser element düzeyi Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometre (Varian AA240FS Fast Sequential Flame Atomic Absorption Spectrometry) cihazı ile kurşun düzeyi Grafit Fırın Atomik Absorpsiyon Spektrometresi (Varian AA240Z Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry) kullanarak tespit edilmiştir. GSTO1*A140D ve GSTO2*N142D gen polimorfizmleri ise PCR-RFLP yöntemi ile belirlenmiştir.

3.1. Örneklerin Genel Değerlendirilmesi

Çalışmaya katılan bireyler metal maruziyeti olmayan, en az bir yıldır eritrosit süspansiyon transfüzyonu yapılmakta olan ve talasemi dışında başka bir hematolojik hastalığı olmayan bireylerdir. Çalışma grubunu yaşları 18–45 yaş arasında değişen 100 hasta (50 erkek, 50 kadın) oluşturmaktadır.

3.2. Talasemili Bireylerin GSTO1 Genindeki C→A Tek Nükleotid Polimorfizminin Belirlenmesi

GSTO1 geni 10. kromozomda yer alan bir gen bölgesidir. Bu gen bölgesinde C→A tek nükleotid polimorfizmi (rs4925) yabanıl tip bireylerde "C" iken, mutant bireylerde "A" ya değişim göstermektedir.

GSTO1 genindeki C→A polimorfizmini göstermek amacıyla, bu noktayı da içeren 471 bp'lik bölge amplifiye edildi ve sonuçlar jel görüntüleme sisteminde, UV ışık altında değerlendirilerek fotoğraflandı.

Çalışmamızdaki agaroz jel analizlerinin değerlendirilmesi sonucunda üç farklı varyasyon elde edilmiştir:

"CC" yabanıl tip (homozigot tipik)

"AA" mutant tip (homozigot atipik)

"CA" heterozigot genotip varyantları belirlenmiştir.

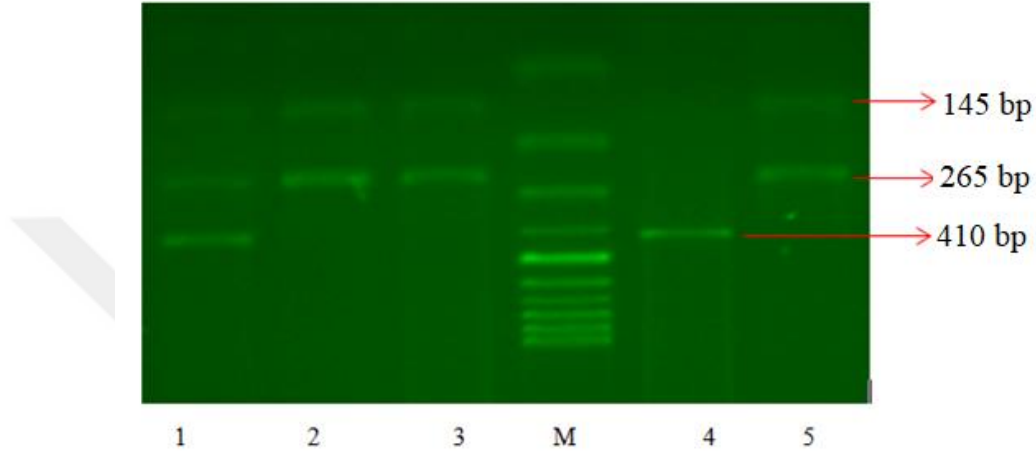
Cac8I enzimi, 471 bp'lik bölgeyi hem 5' ucundan GCNNGC dizisini tanıyarak GCN/NGC noktasından hem de 3' ucundan CGNNCG dizisini tanıyarak CGN/NCG noktasından keser (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. 471 bp uzunluğundaki PCR ürününün homozigot tipik CC bireylerde, Cac8I enzimi ile kesiminin şematik gösterimi.

Sonuç olarak, C/C genotipli yabanıl tip (homozigot tipik) bireylerde enzim kesimi sonucu 265 bp, 145 bp ve 61 bp'lik olmak üzere üç oligonükleotid parçası

oluşur. Bununla birlikte, A/A genotipli homozigot mutant bireylerde Cac8I enzimi 471 bp'lik bölgeyi 410 bp ve 61 bp'lik olmak üzere iki oligonükleotid parçasına ayırır. C/A genotipli heterozigot bireylerde ise restriksiyon enzimi 471 bp'lik bölgeyi hem homozigot tipik hem de homozigot atipikler gibi keser, böylece 410 bp, 265 bp, 145 bp ve 61 bp'lik olmak üzere dört oligonükleotid parçası oluşur (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. GSTO1 genindeki rs4925 polimorfizminin PCR-RFLP ile saptanmasına ait jel görüntüsü [PCR ürünü 471 bp. M=100 bp Ladder; 1 nolu örnek: Heterozigot genotipli birey (CA)= 410bp+265bp+145bp+61bp; 2,3 ve 5 nolu örnekler: Yabanıl tipli birey (CC)= 265bp+145bp+61bp; 4 nolu örnek: Mutant tipli birey (AA) = 410bp+ 61bp]

Çalışmaya katılan 100 hastanın %51'i GSTO1*A140D tek nükleotid polimorfizmi açısından yabanıl tip (CC), %40'ı heterozigot (CA) ve %9'unun da mutant tip (AA) genotipe sahip oldukları belirlenmiştir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Bireylerin GSTO1*A140D tek nükleotid polimorfizmi ile oluşan genotiplerin frekansı.

GSTO1 Polimorfizmi	Genotip Frekansı (n:100)	
	N	%
CC (Yabanıl tip)	51	51
CA (Heterozigot)	40	40,0
AA (Mutant tip)	9	9

GSTO1*A140D tek nükleotid polimorfizmi ile oluşan alel frekansları (n:200) gruplandırılmış, 100 bireye ait alel frekansı C aleli için %71 (n:142), A aleli içinse %29 (n:58) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2 Bireylerin GSTO1 C→A tek nükleotid polimorfizmi ile oluşan alel frekansı.

GSTO1 Alel(C/A)	Alel Frekansı (n:200)	
	N	%
C	142	71,0
A	58	29,0

Çalışmamızın GSTO1*A140D gen polimorfizmi açısından Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu olup olmadığı incelendi. Hardy-Weinberg uygunluk hipotezinin istatistik olarak karşılaştırılmasında χ^2 testi kullanıldı. Bu işlemler sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 3.3.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti (GSTO1rs4925)

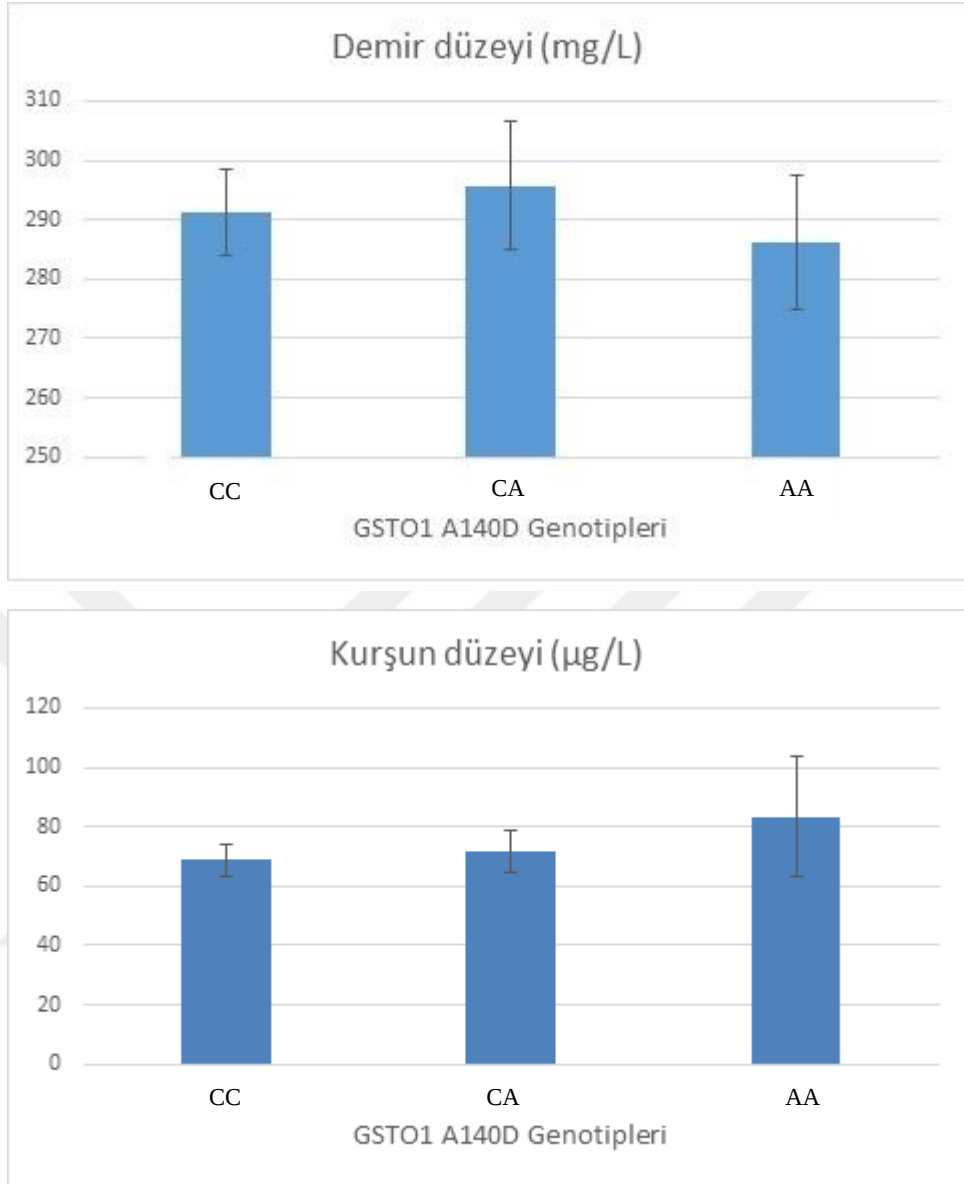
GSTO1 (rs4925)	CC (yabanıl tip) (n)	CA (Heterozigot) (n)	AA (mutant tip) (n)	Toplam (n)
Gözlenen	51	40	9	100
Beklenen	50,41	41,18	8,41	100
Serbestlik Derecesi: 2	$\chi^2=0,08$			$*p>0,05$

Buna göre GSTO1*A140D gen polimorfizmindeki genotip ve alel frekans dağılımının Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu olduğu hesaplanmıştır ($p>0,05$).

Fe ve Pb düzeyleriyle GSTO1 rs4925 polimorfizminin genotipleri arasındaki ilişkiler One-Way ANOVA testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir ve Çizelge 3.4.'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.4. Talasemili bireylerde GSTO1 gen polimorfizmi ile kan Fe ve Pb düzeylerinin istatistiksel değerlendirmesi.

GSTO1	n	Ortalama $\pm$ SS (Standart Sapma)	Minimum	Maksimum	P değeri
Fe					
CC	51	291,27 $\pm$ 51,38	97,99	413,02	0,878
CA	40	295,76 $\pm$ 68,45	102,32	396,73	
AA	9	286,08 $\pm$ 33,95	228,85	329,74	
Toplam	100				
Pb					
CC	51	68,67 $\pm$ 38,09	20,99	227,78	0,646
CA	40	71,68 $\pm$ 45,90	21,26	247,66	
AA	9	83,38 $\pm$ 61,17	23,00	202,14	
Toplam	100				



Şekil 3.3. Kan Kurşun ve Demir Düzeyleri

Şekil 3.3’de görüldüğü gibi AA genotipli bireyler, CA ve CC genotipli bireylerle karşılaştırıldığında daha düşük demir düzeylerine sahiptir. Kurşun düzeyi ise CC genotipli bireylerde daha düşüktür ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir ($p>0,05$).

Kan demir düzeyi bakımından AA, CA ve CC grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ($p=0,878$). Kan demir düzeyleri bakımından CC,

CA ve AA gruplarına ait ortalama±standart sapma değerleri ise 291,27±51,38, 295,76±68,45 ve 286,08±33,95 olarak bulunmuştur.

Kan kurşun düzeyi bakımından AA, AC ve CC grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ($p=0,646$). Kurşun bakımından CC, CA ve AA gruplarına ait ortalama±standart sapma değerleri ise 68,67±38,09, 71,68±45,90 ve 83,38±61,17 olarak bulunmuştur

3.2. Talasemili Bireylerin GSTO2 Genindeki A→G Tek Nükleotid Polimorfizminin Belirlenmesi

GSTO2 geni 10. kromozomda yer alan bir gen bölgesidir. Bu gen bölgesinde A→G tek nükleotid polimorfizmi (rs156697) tipik bireylerde "A" iken, atipik bireylerde "G" ye değişim göstermektedir.

GSTO2 genindeki A→G polimorfizmini göstermek amacıyla, bu noktayı da içeren 185 bp'lik bölge amplifiye edildi ve sonuçlar jel görüntüleme sisteminde, UV ışık altında değerlendirilerek fotoğraflandı.

Çalışmamızdaki agaroz jel analizlerinin değerlendirilmesi sonucunda üç farklı varyasyon elde edilmiştir:

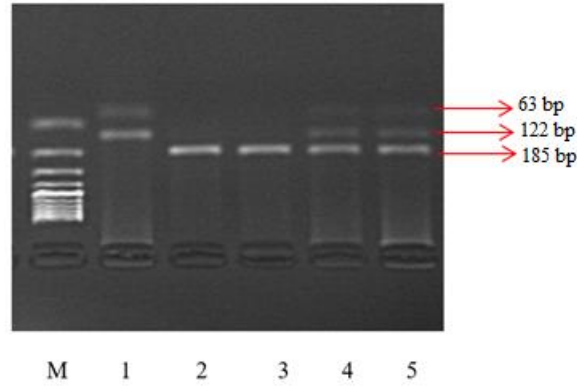
- "AA" yabanıl tip (homozigot tipik),
- "GG" mutant tip (homozigot atipik),
- "AG" heterozigot genotip varyantları belirlenmiştir.

MboI enzimi, 180 bp'lik bölgeyi hem 5' ucundan GATC dizisini tanıyarak /GATC noktasından hem de 3' ucundan GATC dizisini tanıyarak /GATC noktasından keser (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. 185 bp uzunluğundaki PCR ürününün homozigot atipik GG bireylerde, MboI enzimi ile kesiminin şematik gösterimi.

Sonuç olarak, G/G genotipli mutant bireylerde enzim kesimi sonucu 122 bp ve 63 bp'lik olmak üzere iki oligonükleotid parçası oluşur. Bununla birlikte, A/A genotipli yabancı tip bireylerde MboI enzimi 185 bp'lik bölgeyi kesmez ve bu amplifikasyon ürünü tek 185 bp'lik oligonükleotid parçası olarak görüntülenir. A/G genotipli heterozigot tipik bireylerde ise restriksiyon enzimi 185bp'lik bölgeyi hem yabancı tip hem de mutant tiplerdeki gibi keser, böylece 185 bp, 122 bp ve 63 bp'lik olmak üzere üç oligonükleotid parçası oluşur (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. GSTO2 genindeki rs156697 polimorfizminin PCR-RFLP ile saptanmasına ait jel görüntüsü [PCR ürünü 185 bp. M=100 bp Ladder; 1 nolu örnek: Mutant birey (GG) = 122bp+ 63bp; 2 ve 3 nolu örnekler: Yabanıl tip birey (AA)= 185bp; 4 ve 5 nolu örnekler: Heterozigot genotipli birey (AG)= 185bp+122bp+63bp]

Çalışmaya katılan 100 hastanın %42'si GSTO2*N142D tek nükleotid polimorfizmi açısından yabanıl (AA), %45'i heterozigot (AG) ve %13'ü de mutant (GG) genotipe sahip oldukları belirlenmiştir (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. Bireylerin GSTO2*N142D tek nükleotid polimorfizmi ile oluşan genotiplerin frekansı.

GSTO2 Polimorfizmi	Genotip Frekansı (n:100)	
	N	%
AA (Yabanıl tip)	42	42,0
AG (Heterozigot)	45	45,0
GG (Mutant tip)	13	13,0

GSTO2*N142D tek nükleotid polimorfizmi ile oluşan alel frekansları (n:200) gruplandırılmış, 100 bireye ait alel frekansı A aleli için %64,5 (n:129), G aleli içinse %35,5 (n:71) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.6.).

Çizelge 3.6. Bireylerin GSTO2 A→G tek nükleotid polimorfizmi ile oluşan alel frekansı.

GSTO2 Alel(A/G)	Alel Frekansı (n:200)	
	N	%
A	129	64,5
G	71	35,5

Çalışmamızın GSTO2*N142D gen polimorfizmi açısından Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu olup olmadığı incelendi. Hardy-Weinberg uygunluk hipotezinin istatistik olarak karşılaştırılmasında χ^2 testi kullanıldı. Bu işlemler sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 3.7.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti (GSTO2 rs156697)

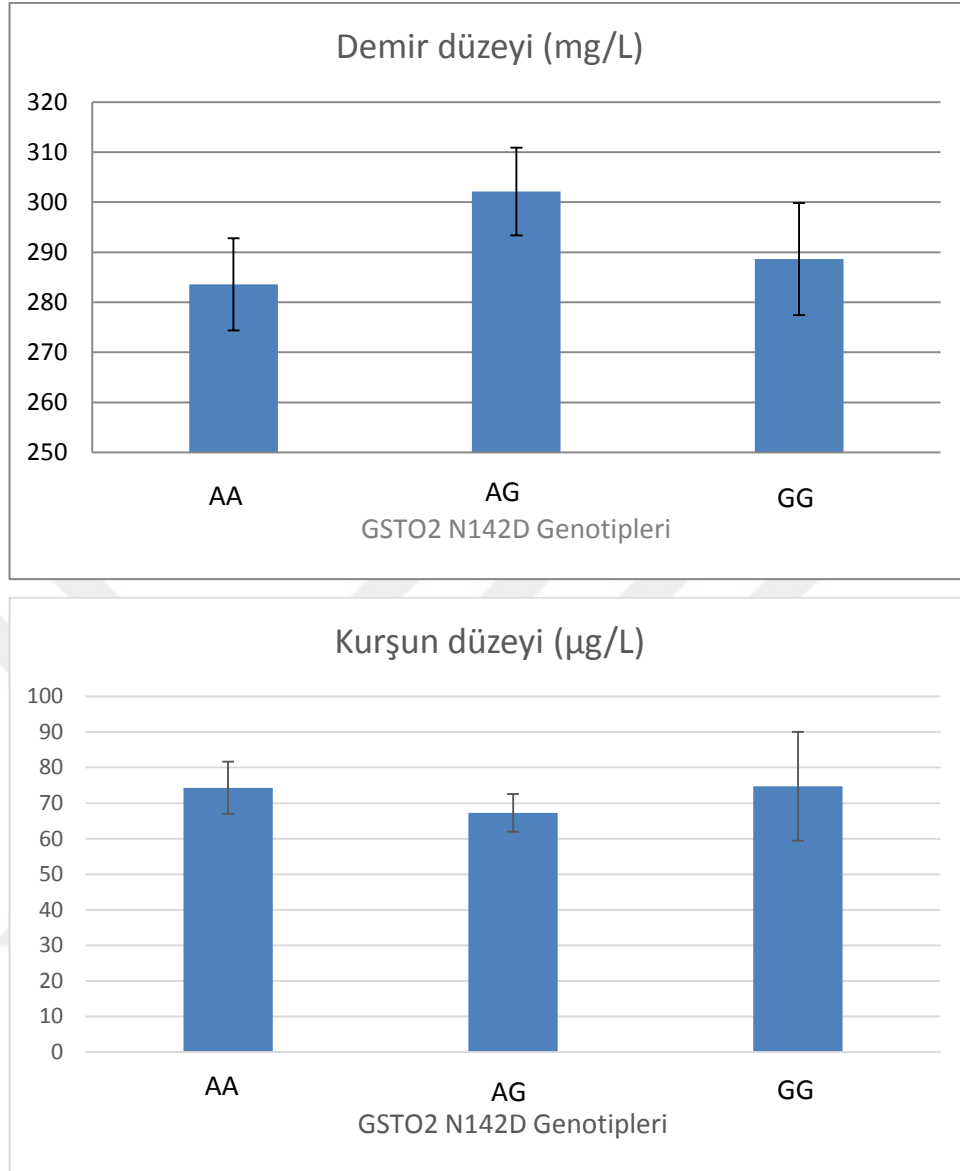
GSTO2 (rs156697)	AA (Yabanıl tip) (n)	AG (Heterozigot) (n)	GG (Mutant tip) (n)	Toplam (n)
Gözlenen	42	45	13	100
Beklenen	41,60	45,79	12,60	100
Serbestlik Derecesi: 2		$\chi^2=0,03$		*p>0,05

Buna göre GSTO2*N142D gen polimorfizmindeki genotip ve alel frekans dağılımının Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu olduğu hesaplanmıştır (p>0,05).

Fe ve Pb düzeyleriyle GSTO2 rs156697 polimorfizminin genotipleri arasındaki ilişkiler One-Way ANOVA testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir ve Çizelge 3.8. 'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.8. Talasemili bireylerde GSTO2 gen polimorfizmi ile kan Fe ve Pb düzeylerinin istatistiksel değerlendirmesi.

GSTO2		n	Ortalama $\pm$ SS (Standart Sapma)	Minimum	Maksimum	P değeri
Fe (mg/L)	AA	51	283,59 $\pm$ 59,69	97,99	396,73	0,312
	AG	40	302,14 $\pm$ 58,69	102,32	413,03	
	GG	9	288,65 $\pm$ 40,29	210,55	336,69	
	Toplam	100				
Pb (μ g/L)	AA	51	74,30 $\pm$ 47,55	20,99	247,66	0,719
	AG	40	67,27 $\pm$ 35,60	21,26	186,44	
	GG	9	74,76 $\pm$ 55,22	23,00	202,14	
	Toplam	100				



Şekil 3.6. Demir ve Kurşun Düzeyi

Şekil 3.6.'da görüldüğü gibi AA genotipli bireyler, AG ve GG genotipli bireylerle karşılaştırıldığında daha düşük Fe düzeyine sahiptir. Pb düzeyi açısından karşılaştırıldığında ise AG genotipli bireyler, AA ve GG genotipli bireylere göre düşük Pb düzeyine sahiptir. Fakat istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, bu farklar anlamlı düzeyde değildir ($p>0,05$).

Kan demir düzeyi bakımından AA, AG ve GG grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ($p=0,312$). Demir bakımından AA, AG ve GG gruplarına ait ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ise $283,59\pm59,69$, $302,14\pm58,69$ ve $288,65\pm40,29$ olarak bulunmuştur.

Kan kurşun düzeyi bakımından AA, AG ve GG grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ($p=0,719$). Kurşun bakımından AA, AG ve GG gruplarına ait ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ise $74,30\pm47,55$, $67,27\pm35,60$ ve $74,76\pm55,22$ olarak bulunmuştur.



4. TARTIŞMA

Türk popülasyonunu kapsayan ve Talasemili hastaları içeren, GSOT1 ve GSOT2 gen polimorfizmi ile ilgili yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Dünya genelinde görülen yaygın otozomal resesif hastalıklardan birisi olan talasemi, hemoglobin molekülünü oluşturan globin zincirlerinin bir veya birden fazlasının sentezinin olmayışı ya da yetersiz sentezlenmesi sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir. α -talasemi α -globin zincir sentezinde aksaklık yaşanması ile karakterize edilirken, β -talasemi ise β -globin zincir sentez aşamasının etkilenmesi neticesinde meydana gelmektedir. (Rund ve ark., 2005). Talaseminin en sık görülen tipi β -talasemi olup, β -talasemide görülen patolojilerin oluşma sebebi, azalmış β -globin sentezine bağlı olarak oluşan eşleşmemiş α -globin zincirindeki artış ve eritroblastlarda oluşan erken apoptotik yıkımdır (Makis ve ark., 2016). İki β -globin geninde de defect meydana gelmesi neticesinde β -globin üretiminde azalma olan β -talasemi majorlu hastalar ömür boyu kan transfüzyonuna bağımlı haldedir. (Nagar ve ark., 2015).

Klinik tedavi aşamasında yapılan transfüzyonla vücuda demir girişinin olması, efektif olmayan eritropoez ve bağırsaklarda demir emilimindeki artış neticesinde vücutta bir süre sonra demir birikimi oluşmaktadır. Hücrelerde katabolik demirin artması transferrinin demir taşıma kapasitesinin aşılmasına ve transferrinden bağımsız serbest demir havuzlarının oluşmasına sebep olmaktadır. Oluşan kararsız demir havuzları serbest radikallerin meydana gelmesini katalizlemektedir ve mitokondrilerde, lizozomlarda, lipid membranda, proteinlerde ve DNA'da hasar meydana gelmesine sebep olan oksidatif stresin gelişimine ciddi katkı sağlamaktadır. (Roussou ve ark., 2013). Bu sebeple β -talasemili hastalarda pro-oksidan/antioksidan dengesinde oldukça önemli değişiklikler oluşmaktadır. Örneğin, oksidatif strese karşı eritrosit ve lökositlerin muhafaza edilmesinde hayati önemi olan glutatyon enzimi, Mahdi'nin 2014 yılında yaptığı çalışmada β -talasemili hastalarda glutatyon enziminin

düzeyinin 2-3 kat daha düşük olduğu bulunmuştur (Mahdi, 2014). Benzer biçimde reaktif tiol gruplarının ve antioksidan muhafazasında görev alan diğer enzimlerin düzeylerinin de talasemili hastalarda kontrol grupları ile karşılaştırıldığında düşük olduğu bulunmuştur (Kalpravidh ve ark., 2005). Farklı bir çalışmaya göre hücrelerin serbest radikallere karşı muhafazasında önemli rol alan çinkonun seviyesinin β -talasemili hastalarda kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu bulunmuştur ve bu azalmanın demir yükündeki artışa bağlı olarak intestinal sistemden çinkonun emiliminin azalmasına bağlı olarak gelişebileceği öneri sürülmüştür (Farazin ve ark., 2012). Bu nedenle talasemili hastalarda esansiyel iz elementlerin de düzeylerinde değişiklikler söz konusudur (Nasr ve ark., 2002).

Hücrel demir içeriğinin fazla olması oksidatif strese neden olurken, az olması hücrel proliferasyonun bozulmasına, büyüme geriliğine hatta ölüme bile neden olabilmektedir (Muckenthaler ve ark., 2008). Çünkü, demir yaşayan tüm organizmalar için hayati öneme sahip olup oksijen taşınmasında, elektron transportunda, nükleotid biyosentezinde kritik rol oynamaktadır. Bu nedenle hücrel demir homeostazının sağlanması için demirin alımı, depolanması ve taşınmasını düzenleyen mekanizmaların kusursuz olması gerekmektedir. Demir homeostazı demir metabolizmasına katılan proteinlerin ekspresyonunu kontrol eden post-transkripsiyonel feedback mekanizmaları ile sağlanmaktadır (Kühn, 2015).

Talasemili hastalarda demir toksikokinetiğinde rol oynayan proteinleri kodlayan genlerdeki polimorfizm, bu proteinler için yarışan kurşun düzeylerini etkilemektedir. Hücrel demir dağılımı ve konsantrasyonu kurşun toksisitesi açısından büyük önem arz etmektedir. Çünkü, demir eksikliği genellikle kurşun intoksikasyonu ile birlikte bir arada görülmekte olup, bu etkileşim çok ciddi tıbbi komplikasyonlara sebebiyet verebilmektedir (Wang ve ark., 2012).

Talasemili bireylerden alınan kan örneklerinde GSOT1 geninde yer alan C>A (rs 867469) tek nükleotid polimorfizminin kan kurşun düzeyine etkisi irdelendiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiş olmakla beraber ($p=0,646$), mutant (AA) bireylerin ($83,38\pm61,17$ ppb) heterozigot (CA) ($71,68\pm45,90$ ppb) bireylere göre ve yabanıl tip (CC) ($68,67\pm38,09$ ppb) bireylere göre daha yüksek kan kurşun düzeyine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 16).

Talasemili bireylerden alınan kan örneklerinde GSOT1 geninde yer alan C>A (rs 867469) tek nükleotid polimorfizminin demir düzeyine etkisi irdelendiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiş olmakla beraber ($p=0,878$), mutant (AA) bireylerin ($286,08\pm33,95$ mg/L);

Heterozigot (CA) bireylere ($295,76\pm68,45$ mg/L) göre ve yabanıl tip (CC) ($291,27\pm51,38$ mg/L) bireylere göre daha yüksek demir düzeyine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 16).

Yapılan çalışmalarda demir eksikliği görülen çocuklarda kan kurşun seviyesinin yüksek olduğu saptanmıştır. Çünkü, kurşun demir ile aynı emilim mekanizması yoluyla vücuda alınmakta ve yarışmalı olarak demiri inhibe etmektedir (Hegazy ve ark., 2010). Bunun yanında bir çok çalışmada demir ve kurşun arasında negatif korelasyon saptanmıştır (Khan ve ark., 2011; Keramati ve ark., 2013; Willows ve Gray-Donald, 2002; Wright ve ark., 2003). Dolayısıyla elde ettiğimiz değerler istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen literatür bilgileri ile uyumsuzluk göstermemektedir.

Talasemili bireylerden alınan kan örneklerinde GSOT2 genindeki A>G (rs 156697) tek nükleotid polimorfizminin kan kurşun düzeyine etkisi incelendiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiş olmasına rağmen

($p=0,719$), mutant tip (GG) bireylerin ($74,76\pm55,28$ ppb), heterozigot (GA) ($67,27\pm35,60$ ppb) ve yabanıl tip (AA) ($74,30\pm47,55$ ppb) bireylere göre daha yüksek kan kurşun düzeyine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 20).

Talasemili bireylerden alınan kan örneklerinde GSOT2 genindeki A>G (rs 156697) tek nükleotid polimorfizminin kan demir düzeyine etkisi incelendiğinde aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki görülmemiş olmasına rağmen ($p=0,312$), heterozigot (AG) bireylerin ($302,14\pm58,69$ mg/L), yabanıl tip (AA) ($283,59\pm59,69$) ve mutant tip (GG) ($288,65\pm40,29$) bireylere göre daha yüksek demir düzeylerine sahip olduğu, yabanıl tip (AA) bireylerin ise düşük demir düzeyine sahip olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda görülen demir ve kurşun arasındaki negatif korelasyon yapılan pek çok çalışmada da bulunmuştur (Bradman ve ark., 2001; Kaufmann ve ark., 2000).

Organizmada metal metabolizmasının önemli ölçüde değiştiği talasemide, metallerin toksikokinetiğinde önemli rol oynayan gen polimorfizmlerinin kan metal düzeyleri ile ilişkisi son derece önemlidir. GSOT1 ve GSOT2 genlerindeki farklılıkların ise bu ilişkinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Yapmış olduğumuz literatür taramalarında, GSOT1 ve GSOT2 gen polimorfizmlerinin talasemi hastalarının kan ve demir, düzeylerine etkisini Türk popülasyonunda araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple çalışmamızın bundan sonraki talasemi ve diğer transfüzyon bağımlı anemi türlerinin araştırılacağı diğer çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Talasemi hastalarında klinik seyir ve tedavi sürecinde, artmış hemoliz, intestinal demirin fazla absorbe edilmesi ve tedavide uygulanan sık transfüzyonlar sonucunda vücut demir yükü kronik olarak artmaktadır ve bu olgularda ortaya çıkan aşırı demir yükü birikimlere neden olacağından, organ disfonksiyonları gelişebilmektedir. Bununla birlikte demir toksikokinetiğinde görev alan enzimlerle ilgili polimorfizminin, bu enzimler için yarışan özellikle kurşun başta olmak üzere toksik metal düzeylerine etkisi de ciddi önem arz etmektedir. Bu nedenle GSOT-1 ve GSOT-2 genlerindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin kan demir ve kurşun düzeylerine etkisi araştırılmıştır.

Bu çalışmada, Eylül 2010-Kasım 2010 ile Temmuz 2013-Ağustos 2013 tarihleri arasında Adana Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Hematoloji Bölümü'ne düzenli olarak kan transfüzyonuna gelen 100 β -talasemi majorlu hastanın kan örneklerinde belirlenen;

GSOT1 gen polimorfizmi, genotip frekansları; %51 yabanıl tip (CC), %40 heterozigot (CA), %9 mutant tip(AA).

GSOT1 gen polimorfizmi alel frekansları (n:200) gruplandırılmış, 100 bireye ait alel frekansı A aleli için %29 (n:58), C aleli içinse %71 (n:142).

GSOT2 gen polimorfizmi genotip frekansları; %42 yabanıl tip (AA), %45 heterozigot (GA) ve %13 mutant tip (GG).

GSOT2 gen polimorfizmi alel frekansları (n:200) gruplandırılmış, 100 bireye ait alel frekansı A aleli için %64,5 (n:129), G aleli içinse %35,5 (n:71).

GSOT1 ve GSOT2 gen polimorfizmlerindeki genotip ve alel frekans dağılımı Hardy-Weinberg dengesi ile uyumludur. ($p>0,05$).

Bu sonuçlara göre; GSOT1 (rs4925 C/A):

-Demir düzeyi AA genotipine sahip bireylerde ($286,08 \pm 33,95$ mg/L) CA ($295,76 \pm 68,45$ mg/L) ve CC genotipli bireylere ($291,27 \pm 51,38$ mg/L) göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$).

-Kurşun düzeyi CC genotipine sahip bireylerde ($68,67 \pm 38,09$ ppb) CA ($71,68 \pm 45,90$ ppb) ve AA genotipli bireylere ($83,38 \pm 61,17$ ppb) göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla demir ve kurşun arasında negatif bir korelasyon gözlemlenmiştir ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$).

GSOT2 (rs156697 A/G):

-Demir düzeyi AA genotipine sahip bireylerde ($283,59 \pm 59,69$ mg/L), AG ($302,14 \pm 58,69$ mg/L) ve GG genotipli bireylere ($288,65 \pm 40,29$ mg/L) göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$).

-Kurşun düzeyi GG genotipine sahip bireylerde ($74,76 \pm 55,22$ ppb), AG ($67,27 \pm 35,60$ ppb) ve AA genotipli bireylere ($74,30 \pm 47,55$ ppb) göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla demir ve kurşun arasında negatif bir korelasyon gözlemlenmiştir ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$).

Genetik farklılıkların metal maruziyetinde etkili olması metallerle doğrudan veya dolaylı etkileşen proteinlerin polimorfik yapısının önemini arttırmaktadır. Araştırmamız bu hastalarda bir taraftan iz element ile toksik metaller arasındaki ilişkinin genetik açıdan değerlendirilmesine diğer taraftan ise metal maruziyetinden etkilenme mekanizmalarının aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır.

Literatür taramalarında araştırmamızda çalışılan gen polimorfizmlerinin talasemi hastalarının kan demir ve kurşun düzeylerine etkisini araştıran bir çalışmaya

rastlanmamıştır. Bu açıdan çalışmamız bir ilk olma özelliği taşımaktadır. Diğer yandan; bu polimorfizm çalışmalarının Türk popülasyonunun genetik havuzunun oluşturulmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Talasemi hastalarında, bireysel genetik farklılıklara dikkat edilerek, tedavi yaklaşımlarında bulunulmasının tedavi etkinliğini arttırmada avantaj oluşturabileceği, böylelikle etkin tedavi yöntemleri ile zaman ve ekonomik kaybın önlenilebileceği düşünülmektedir.



ÖZET

GST Omega 1 Ve Omega 2 Gen Polimorfizmlerinin Talasemi Hastalarındaki Kan Metal Düzeylerine Etkisi

Bu çalışma ile organizmada metal homeostazının önemli ölçüde değiştiği bir hastalık olan talasemide, demir toksikokinetiğinde rol olduğu düşünülen GSOT1 (rs4925 C/A) ve GSOT2 (rs156697 A/G) gen polimorfizmlerinin kan demir ve kurşun düzeylerine olan etkisinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda talasemi dışında başka bir hematolojik hastalığı ve metal maruziyeti olmayan, en az bir yıldır eritrosit süspansiyonu transfüzyonu yapılmakta olan 100 hasta bireyden elde edilen kan örnekleri kullanılmıştır. Kan örneklerinde demir iz elementi konsantrasyonları Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometre (Varian AA240FS) cihazı ile, kurşun konsantrasyonları ise Grafit Fırın Atomik Absorpsiyon Spektrometresi (Varian AA240Z) ile belirlenmiştir. Genetik araştırmalar için izole edilen DNA'larda GSOT1 C/A (rs4925) tek nükleotid polimorfizmini belirlemek amacıyla Alel Spesifik Oligonükleotid- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ASO-PCR) yöntemi, GSOT2 A/G (rs156697) tek nükleotid polimorfizmini belirlemek amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi kullanılmıştır.

Çalışmanın sonucunda talasemili hastalarda GSOT1 ve GSOT2 gen polimorfizmlerinin kan demir ve kurşun düzeylerine etkisi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, GSOT1 gen polimorfizmi genotip frekansları; %51 yabancıl tip (CC), %40 heterozigot (CA), %9 mutant tip (AA) olarak belirlenmiştir. Demir düzeyi AA genotipine sahip bireylerde ($286,08 \pm 33,95 \text{ mg/L}$), CA ($295,76 \pm 68,45 \text{ mg/L}$) ve CC genotipli bireylere ($291,27 \pm 51,38 \text{ mg/L}$) göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). Çalışmamızda demir ve kurşun arasında negatif bir korelasyon gözlemlenmiştir ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$).

GSOT2 gen polimorfizmi genotip frekansları; %42 yabanıl tip (AA), %45 heterozigot (GA) ve %13 mutant tip (GG) olarak belirlenmiştir. Demir düzeyi AA genotipine sahip bireylerde ($283,59 \pm 59,69$ mg/L) AG ($302,14 \pm 58,69$ mg/L) ve GG genotipli bireylere ($288,65 \pm 40,29$ mg/L) göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Çalışmamızda demir ve kurşun arasında negatif bir korelasyon gözlemlenmiştir ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

Anahtar Sözcükler: Gen polimorfizmi GSOT-1, GSOT-2, Metal, Talasemi.



SUMMARY

Effect Of Gst Omega 1 And Omega 2 Gene Polymorphism On Blood Metal Levels In Thalassemia Patients

The aim of this study was to clarify the effect of GSTO1 (rs4925 C / A) and GSTO2 (rs156697 A / G), thought to be involved in iron toxicokinetics, gene polymorphisms on blood iron and lead levels in thalassemia, a disease in which metal homeostasis in the organism is significantly altered.

In our study, blood samples obtained from 100 patients who had undergone erythrocyte suspension transfusion for at least one year without any hematological disease and metal exposure other than thalassemia were used. Iron trace element concentrations in blood samples were determined by Flame Atomic Absorption Spectrometer (Varian AA240FS) and lead concentrations were determined by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer (Varian AA240Z). DNAs isolated for genetic research; Allele Specific Oligonucleotide-Polymerase Chain Reaction (ASO-PCR) method to determine single nucleotide polymorphism for GSTO1 C / A (rs4925), and Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method for GSTO2 A / G (rs156697) was used.

As a result of this study, when the effect of GSTO1 and GSTO2 gene polymorphisms on blood iron and lead levels in thalassemia patients were statistically evaluated, GSTO1 gene polymorphism genotype frequencies were identified as; 51% wild type (CC), 40% heterozygous type (CA), 9% mutant type (AA). Iron levels were lower in individuals with AA genotype ($286.08 \pm 33.95 \text{ mg / L}$) than CA ($295.76 \pm 68.45 \text{ mg / L}$) and CC genotype ($291.27 \pm 51.38 \text{ mg / L}$). However, this result was not statistically significant ($p > 0.05$). In our study, a negative correlation was observed between iron and lead levels, but this result was not statistically significant ($p > 0.05$).

GSTO2 gene polymorphism genotype frequencies were identified as; 42% wild type (AA), 45% heterozygous type (GA) and 13% mutant type (GG). Iron levels were lower in individuals with AA genotype ($283.59 \pm 59.69 \text{ mg / L}$) than AG ($302.14 \pm 58.69 \text{ mg / L}$) and GG genotype ($288.65 \pm 40.29 \text{ mg / L}$). However, this result was not statistically significant ($p > 0.05$). A negative correlation was observed between iron and lead levels, but this result was not statistically significant ($p > 0.05$).

Keywords: Gene polymorphism, GSTO1, GSTO2, Metal, Thalassemia.

KAYNAKLAR

ABBASPOUR, N., HURRELL, R., KELISHADI, R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, **19**: 164.

ADA, TUGBA GUZIDE (2013). "Association between Glutathione S-Transferase Omega 1 A140D Polymorphism in the Turkish Population and Susceptibility to Non- Small Cell Lung Cancer." *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, **64**: 61-67.

ADAM, G. C., SORENSEN, E. J., CRAVATT, B. F. (2002). Proteomic profiling of mechanistically distinct enzyme classes using a common chemotype. *Nature Biotechnology*, **20**: 805.

AISEN, P., ENNS, C., WESSLING-RESNICK, M. (2001). Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *The International Journal Of Biochemistry Cell Biology*, **33**: 940-959.

ALDOURI, M. A., WONKE, B., HOFFBRAND, A. V., FLYNN, D. M., WARD, S. E., AGNEW, J. E., HILSON, A. J. W. (1990). High incidence of cardiomyopathy in beta-thalassaemia patients receiving regular transfusion and iron chelation: reversal by intensified chelation. *Acta haematologica*, **84**: 113-117.

AMBEKAR, S. S., PHADKE, M. A., BALPANDE, D. N., MOKASHI, G. D., KHEDKAR, V. A., BANKAR, M. P., ... BASUTKAR, D. G. (2001). The prevalence and heterogeneity of beta thalassemia mutations in the western Maharashtra population: a hospital based study. *International Journal of Human Genetics*, **1**: 219-223.

ANDERSON, C. P., SHEN, M., EISENSTEIN, R. S., LEIBOLD, E. A. (2012). Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1823**: 1468-1483.

ANDREWS, N. C. (1999). Disorders of iron metabolism. *New England Journal of Medicine*, **341**: 1986-1995.

ANDREWS, N. C., SCHMIDT, P. J. (2007). Iron homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.*, **69**: 69-85.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2007. Toxicological Profile for Lead Case No. 7439-92-1 Atlanta, Georgia ATSDR.

ATSDR, U. (1999). Toxicological profile for mercury. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, USA.

BAJORIA, R., CHATTERJEE, R. (2009). Current perspectives of fertility and pregnancy in thalassemia. *Hemoglobin*, **33**: S131-S135.

BANNERMAN, R. M., KEUSCH, G., KREIMER-BIRNBAUM, M., VANCE, V. K., VAUGHAN, S. (1967). Thalassemia intermedia, with iron overload, cardiac failure, diabetes mellitus, hypopituitarism and porphyrinuria. *The American Journal Of Medicine*, **42**: 476-486.

BARNETT, C. F., HSUE, P. Y., MACHADO, R. F. (2008). Pulmonary hypertension: an increasingly recognized complication of hereditary hemolytic anemias and HIV infection. *Jama*, **299**: 324-331.

BARTFAY, W. J., BARTFAY, E. (2000). Systemic oxygen-free radical production in iron-loaded mice. *Western Journal Of Nursing Research*, **22**: 927-935.

BAŞAK NAZI, A. (2007). The molecular pathology of β -thalassemia in Turkey: The Boğaziçi University experience. *Hemoglobin*, **31**: 233-241.

BASUTKAR, D. G. (2001). The prevalence and heterogeneity of beta thalassemia mutations in the western Maharashtra population: a hospital based study. *International Journal of Human Genetics*, **1**: 219-223.

BEAUDRY, M. A., FERGUSON, D. J., PEARSE, K., YANOFSKY, R. A., RUBIN, E. M., KAN, Y. W. (1986). Survival of a hydropic infant with homozygous α -thalassemia-1. *The Journal Of Pediatrics*, **108**: 713-716.

BECKETT, G. J., CHAPMAN, B. J., DYSON, E. H., HAYES, J. D. (1985). Plasma glutathione S-transferase measurements after paracetamol overdose: evidence for early hepatocellular damage. *Gut*, **26**: 26-31.

BERDASCO, M., ESTELLER, M. (2013). Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. *Human genetics*, **132**: 359-383.

BERGDAHL, I. A., SKERFVING, S. (2008). Biomonitoring of lead exposure—alternatives to blood. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **71**: 1235-1243.

BERNINI, L. F. (2001). Geographic distribution of α thalassemia: In Steinberg MH, Forget B, Higgs DR, Nagel RL, eds. Disorders of hemoglobin. Genetics, pathophysiology, and clinical management.

BERTINI, I., CAVALLARO, G. (2008). Metals in the “omics” world: copper homeostasis and cytochrome c oxidase assembly in a new light. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, **13**: 3-14.

BIANCHI, D. W., BEYER, E. C., STARK, A. R., SAFFAN, D., SACHS, B. P., WOLFE, L. (1986). Normal long-term survival with α -thalassemia. *The Journal Of Pediatrics*, **108**: 716-718.

BILGIN, E., CAN DEMIRDÖĞEN, B., TÜRKANOĞLU ÖZÇELİK, A., DEMIRKAYA, Ş., ADALI, O. (2018). Association analysis of Glutathione S-transferase omega-1 and omega-2 genetic polymorphisms and ischemic stroke risk in a Turkish population. *Neurological Research*, 1–7. doi:10.1080/01616412.2018.1544385

BOARD, P. G., COGGAN, M., CHELVANAYAGAM, G., EASTEAL, S., JERMIIN, L. S., SCHULTE, G. K., ... ROSNER, M. H. (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 24798-24806.

BRADMAN, A., ESKENAZI, B., SUTTON, P., ATHANASOULIS, M., GOLDMAN, L. R. (2001). Iron deficiency associated with higher blood lead in children living in contaminated environments. *Environmental Health Perspectives*, **109**: 1079-1084.

BROCHIN, R., LEONE, S., PHILLIPS, D., SHEPARD, N., ZISA, D., ANGERIO, A. (2014). The cellular effect of lead poisoning and its clinical picture. *Management*, **8**: 1

BROWN, E. O., SUNDSTROM, S. A., KOMM, B. S., YI, Z., TEUSCHER, C., RICHARD LYTTLE, C. (1990). Progesterone regulation of estradiol-induced rat uterine secretory protein, complement C3. *Biology of reproduction*, **42**: 713-719.

BRUNEKREEF, B., FISCHER, P., REMIJN, B., LENDE, R. V. D., SCHOUTEN, J., QUANJER, P. (1985). Indoor air pollution and its effect on pulmonary function of adult non-smoking women: III. Passive smoking and pulmonary function. *International Journal Of Epidemiology*, **14**: 227-230.

BUTLER, J. (2007). El género en disputa: el feminismo y la subversión de la identidad. Paidós.

CANATAN, D., KOSE, M. R., USTUNDAG, M., HAZNEDAROGLU, D., OZBAS, S. (2006). Hemoglobinopathy control program in Turkey. *Public Health Genomics*, **9**: 124-126.

CANATAN, D., TALASEMI, A. Y., TANI, H. (2007). Tedavi. Retma Matbaacılık Antalya Şubat.

CAO, A., GALANELLO, R. (2010). Beta-thalassemia. *Genetics in medicine*, **12**: 61.

CAPPELLINI, M. D., COHEN, A., PORTER, J., TAHER, A., VIPRAKASIT, V. (EDS.). (2014). Guidelines for the management of transfusion dependent thalassaemia (TDT) (pp. 148-9). Nicosia, Cyprus: Thalassaemia International Federation.

CAPURSO, C., PANZA, F., SERIPA, D., FRISARDI, V., IMBIMBO, B. P., VERDILE, G., ... SOLFRIZZI, V. (2010). Polymorphisms in glutathione S-transferase omega-1 gene and increased risk of sporadic Alzheimer disease. *Rejuvenation research*, **13**: 645-652.

CASARETT L. J., AMDUR M. O., KLAASSEN C. D., Doull J. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 5th. McGraw-Hill, New York 2001

CHATTERJEE, R., BAJORIA, R. (2009). New concept in natural history and management of diabetes mellitus in thalassemia major. *Hemoglobin*, 33(sup1), S127-S130.

CHATTERJEE, R., KATZ, M., BAJORIA, R. (2011). Use of hormone replacement therapy for correction of high turnover bone disease in hypogonadal β -thalassemia major patients presenting with osteoporosis: comparison with idiopathic premature ovarian failure. *Hemoglobin*, **35**: 653-658.

CHUNG, C. J., PU, Y. S., SU, C. T., HUANG, C. Y., HSUEH, Y. M. (2011). Gene polymorphisms of glutathione S-transferase omega 1 and 2, urinary arsenic methylation profile and urothelial carcinoma. *Science of the Total Environment*, **409**: 465-470.

COGLIANDRO, T., DERCHI, G., MANCUSO, L., MAYER, M. C., PANNONE, B., PEPE, A., ... MAGGIO, A. (2008). Guideline recommendations for

heart complications in thalassemia major. *Journal of Cardiovascular Medicine*, **9**: 515-525.

COLEMAN, S. H., VAN DAMME, N., DAY, J. R., NOVIELLO, C. M., HITCHIN, D., MADRID, R., ... GUATELLI, J. C. (2005). Leucine-specific, functional interactions between human immunodeficiency virus type 1 Nef and adaptor protein complexes. *Journal of Virology*, **79**: 2066-2078.

COMPORTI, M., SIGNORINI, C., BUONOCORE, G., CICCOLI, L. (2002). Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radical Biology and Medicine*, **32**: 568-576.

CROCETTI, A. F., MUSHAK, P., SCHWARTZ, J. (1990). Determination of numbers of lead-exposed US children by areas of the United States: an integrated summary of a report to the US Congress on childhood lead poisoning. *Environmental health perspectives*, **89**: 109-120.

DA SILVA, J. F., WILLIAMS, R. J. P. (2001). The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life. Oxford University Press.

DE DOMENICO, I., WARD, D. M., KAPLAN, J. (2008). Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nature reviews Molecular cell biology*, **9**: 72.

DE SANCTIS, V., SOLIMAN, A. T., ELSEDFY, H., SKORDIS, N., KATTAMIS, C., ANGASTINIOTIS, M., ... RAIOLA, G. (2013). Growth and endocrine disorders in thalassemia: The international network on endocrine complications in thalassemia (I-CET) position statement and guidelines. *Indian Journal Of Endocrinology and Metabolism*, **17**: 8.

DEUGNIER, Y., TURLIN, B., ROPERT, M., CAPPELLINI, M. D., PORTER, J. B., GIANNONE, V., ... BRISSOT, P. (2011). Improvement in liver pathology of patients with β -thalassemia treated with deferasirox for at least 3 years. *Gastroenterology*, **141**: 1202-1211.

DULHUNTY, A., GAGE, P., CURTIS, S., CHELVANAYAGAM, G., BOARD, P. (2001). The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 3319-3323.

ELDOR, A., RACHMILEWITZ, E. A. (2002). The hypercoagulable state in thalassemia. *Blood*, **99**: 36-43.

ESPOSITO, B. P., BREUER, W., SIRANKAPRACHA, P., POOTRAKUL, P., HERSHKO, C., CABANTCHIK, Z. I. (2003). Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood*, **102**: 2670-2677.

EVAN, G. I., VOUSDEN, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *nature*, **411**: 342.

FARAZIN L, SAJADI F, KUPAI L. SERUM ANTIOXIDANT LEVELS IN CHILDREN WITH BETA THALASSEMIA MAJOR. *IJBC* 2012; **4**: 1-5.

FIKRY, S. I., SALEH, S. A., SARKIS, N. N., MANGOUD, H. (2003). Study of serum zinc in relation to nutritional status among thalassemia patients in Damanshour Medical National Institute. *The Journal of the Egyptian Public Health Association*, **78**: 73-93.

FLEMING, R. E., PONKA, P. (2012). Iron overload in human disease. *New England Journal of Medicine*, **366**: 348-359.

FLINT, J., HARDING, R. M., BOYCE, A. J., CLEGG, J. B. (1998). 1 The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillière's clinical haematology*, **11**: 1-51.

FORGET, B. G. (1998). Molecular basis of hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **850**: 38-44.

FREEMAN, A. P., GILES, R. W., BERDOUKAS, V. A., TALLEY, P. A., MURRAY, I. P. C. (1989). Sustained normalization of cardiac function by chelation therapy in thalassaemia major. *Clinical Laboratory Haematology*, **11**: 299-307.

GALANELLO, R., CAO, A. (2011). Alpha-thalassemia. *Genetics in medicine*, **13**: 83.

GALANELLO, R., ORIGA, R. (2010). Beta-thalassemia. *Orphanet Journal Of Rare Diseases*, **5**: 11.

GOYER, R. A. (1990). Transplacental transport of lead. *Environmental health perspectives*, **89**: 101-105.

GOYER, R. A. (1993). Lead toxicity: current concerns. *Environmental health perspectives*, **100**: 177-187.

GOYER, R. A. (1996). Results of lead research: prenatal exposure and neurological consequences. *Environmental Health Perspectives*, **104**: 1050-1054.

GROSVELD, F., G. BLOM VAN ASSENDELFT, D. GREAVES, AND G. KOLLIAS. 1987. Position-independent, high-level expression of the human β -globin gene in transgenic mice. *Cell* **51**: 975-985.

GUGGENHEIM, S., MARTIN, R. T. (1995). Definition of clay and clay mineral: joint report of the AIPEA nomenclature and CMS nomenclature committees. *Clays and clay minerals*, **43**: 255-256.

GULARTE, T., AND MCGLOTHAN, J. (1998). Hippocampal NMDA receptor mRNA undergoes subunit specific changes during developmental lead exposure. *Brain Research*, **790**: 98-107.

HAGAR, W., THEIL, E. C., VICHINSKY, E. P. (2002). Diseases of iron metabolism. *Pediatric clinics of North America*, **49**: 893-909.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. (1990). [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 1-85). Academic Press.

HARJU, S., MCQUEEN, K. J., PETERSON, K. R. (2002). Chromatin structure and control of β -like globin gene switching. *Experimental biology and medicine*, **227**: 683-700.

HARRISON, T. M., SPEAR, F. S., HEIZLER, M. T. (1989). Geochronologic studies in central New England II: Post-Acadian hinged and differential uplift. *Geology*, **17**: 185-189.

HARTEVELD, C. L., HIGGS, D. R. (2010). α -thalassaemia. *Orphanet Journal Of Rare Diseases*, **5**: 13.

HAYES, J. D., PULFORD, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part I. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, **30**: 445-520.

HEGAZY, A. A., ZAHER, M. M., ABD EL-HAFEZ, M. A., MORSY, A. A., SALEH, R. A. (2010). Relation between anemia and blood levels of lead, copper, zinc and iron among children. *BMC research notes*, **3**: 133.

HENROTIN, Y., PESESSE, L., SANCHEZ, C. (2009). Subchondral bone in osteoarthritis physiopathology: state-of-the art and perspectives. *Bio-medical materials and engineering*, **19**: 311-316.

HENTZE, M. W., MUCKENTHALER, M. U., ANDREWS, N. C. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *cell*, **117**: 285-297.

HENTZE, M. W., MUCKENTHALER, M. U., GALY, B., CAMASCHELLA, C. (2010). Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*, **142**: 24-38.

HERSHKO, C., HOFFBRAND, A. V., KERET, D., SOUROUJON, M., MASCHLER, I., MONSELISE, Y., LAHAD, A. (2005). Role of autoimmune gastritis, *Helicobacter pylori* and celiac disease in refractory or unexplained iron deficiency anemia. *haematologica*, **90**: 585-595.

HERSHKO, C., KONIJN, A. M., LINK, G. (1998). Iron chelators for thalassaemia. *British Journal Of Haematology*, **101**: 399-406.

HIGGS, D. R. (2013). The molecular basis of α -thalassemia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, **3**:a011718.

HSIEH, Y. C., LIEN, L. M., CHUNG, W. T., HSIEH, F. I., HSIEH, P. F., WU, M. M., ... CHEN, C. J. (2011). Significantly increased risk of carotid atherosclerosis with arsenic exposure and polymorphisms in arsenic metabolism genes. *Environmental research*, **111**: 804-810.

HUNT, J. R. (2001). How important is dietary iron bioavailability?.

KALINOWSKI, D. S., RICHARDSON, D. R. (2005). The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacological reviews*, **57**: 547-583.

KALPRAVIDH, R. W., WICHIT, A., SIRITANARATKUL, N., FUCHAROEN, S. (2005). Effect of coenzyme Q₁₀ as an antioxidant in β -thalassemia/Hb E patients. *Biofactors*, **25**: 225-234.

KATERELOS, C., CONSTANTOPOULOS, A., AGATHOPOULOS, A., CONSTANTZAS, N., ZANNOS-MARIOLEA, L., MATSANIOTIS, N. (1979). Serum levels of retinol, retinol-binding protein, carotenoids and triglycerides in children with β -thalassemia major. *Acta haematologica*, **62**: 100-105.

KAUFMANN, R. B., CLOUSE, T. L., OLSON, D. R., MATTE, T. D. (2000). Elevated blood lead levels and blood lead screening among US children aged one to five years: 1988–1994. *Pediatrics*, 106:e79-e79.

KERAMATI, M. R., MANAVIFAR, L., BADIEE, Z., SADEGHIAN, M. H., FARHANGI, H., MOOD, M. B. (2013). Correlation between blood lead concentration and iron deficiency in Iranian children. *Nigerian Medical Journal: Journal Of The Nigeria Medical Association*, **54**: 325.

KHAN, D. A., ANSARI, W. M., KHAN, F. A. (2011). Synergistic effects of iron deficiency and lead exposure on blood lead levels in children. *World Journal of Pediatrics*, **7**: 150-154.

KIYOHARA, C., MIYAKE, Y., KOYANAGI, M., FUJIMOTO, T., SHIRASAWA, S., TANAKA, K., ... OEDA, T. (2010). GST polymorphisms, interaction with smoking and pesticide use, and risk for Parkinson's disease in a Japanese population. *Parkinsonism related disorders*, **16**: 447-452.

KREMASTINOS, D. T., TINIAKOS, G., THEODORAKIS, G. N., KATRITSIS, D. G., TOUTOUZAS, P. K. (1995). Myocarditis in β -thalassemia major: a cause of heart failure. *Circulation*, **91**: 66-71.

KÜHN, V., DIEDERICH, L., KELLER IV, T. S., KRAMER, C. M., LÜCKSTÄDT, W., PANKNIN, C., ... CORTESE-KROTT, M. M. (2017). Red blood cell function and dysfunction: redox regulation, nitric oxide metabolism, anemia. *Antioxidants redox signaling*, **26**: 718-742.

KURSULA, P., MAJAVA, V. (2007). A structural insight into lead neurotoxicity and calmodulin activation by heavy metals. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, **63**: 653-656.

LALIBERTE, R. E., PERREGAUX, D. G., HOTH, L. R., ROSNER, P. J., JORDAN, C. K., PEESE, K. M., ... GABEL, C. A. (2003). Glutathione S-transferase omega 1-1 is a target of cytokine release inhibitory drugs and may be responsible for their effect on interleukin-1 β posttranslational processing. *Journal of Biological Chemistry*, 278:16567-16578.

LAOSOMBAT, V., VIPRAKASIT, V., CHOTSAMPANCHAROEN, T., WONGCHANHAILERT, M., KHODCHAWAN, S., CHINCHANG, W.,

SATTAYASEVANA, B. (2009). Clinical features and molecular analysis in Thai patients with HbH disease. *Annals of hematology*, **88**: 1185-1192.

LASCO, A., MORABITO, N., GAUDIO, A., BUEMI, M., WASNIEWSKA, M., FRISINA, N. (2001). Effects of hormonal replacement therapy on bone metabolism in young adults with beta-thalassemia major. *Osteoporosis International*, **12**: 570-575.

LOGUERCIO, C., DE GIROLAMO, V., CUOMO, A., ARGENZIO, F., IANNOTTA, C., DISALVO, D., ... BLANCO, C. D. V. (1998). Determination of plasma α -Glutathione-S-transferases in chronic alcohol abusers: relationship with alcohol intake and liver involvement. *Alcohol and Alcoholism*, **33**: 366-372.

LOREY F, CHAROENKWAN P, WITKOWSKA HE, LAFFERTY J, PATTERSON M, ENG B, WAYE JS, FINKLESTEIN JZ, CHUI DH. (2001). Hb H hydrops foetalis syndrome: A case report and review of literature. *Br J Haematol* **115**: 72-78.

MADSEN, E., GITLIN, J. D. (2007). Copper and iron disorders of the brain. *Annu. Rev. Neurosci.*, **30**: 317-337.

MAGGIO, A., FILOSA, A., VITRANO, A., ALOJ, G., KATTAMIS, A., CECI, A., ... PORTER, J. B. (2011). Iron chelation therapy in thalassemia major: a systematic review with meta-analyses of 1520 patients included on randomized clinical trials. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **47**: 166-175.

MAHDI, E. A. (2014). Relationship between oxidative stress and antioxidant status in beta thalassemia major patients. *Acta Chim Pharm Indica*, **4**: 137-145.

MAKIS, A., HATZIMICHAEL, E., PAPASSOTIRIOU, I., VOSKARIDOU, E. (2016). 2017 Clinical trials update in new treatments of β -thalassemia. *American Journal Of Hematology*, **91**: 1135-1145.

MANNERVIK, B., AWASTHI, Y. C., BOARD, P. G., HAYES, J. D., DI ILIO, C., KETTERER, B., ... PEARSON, W. R. (1992). Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochemical Journal*, 282(Pt 1), 305.

MARENGO-ROWE, A. J. (2006, July). Structure-function relations of human hemoglobins. In *Baylor University Medical Center Proceedings* (Vol. 19, No. 3, pp. 239-245). Taylor Francis.

MARKOWITZ, G., ROSNER, D. (2000). "Cater to the children": the role of the lead industry in a public health tragedy, 1900-1955. *American Journal of Public Health*, **90**: 36.

MCDOWELL, L. R. (2003). Minerals in animal and human nutrition(No. Ed. 2). Elsevier Science BV.

MERCHANT, R. H., JOSHI, A., AHMED, J., KRISHNAN, P., JANKHARIA, B. (2011). Evaluation of cardiac iron load by cardiac magnetic resonance in thalassemia. *Indian pediatrics*, **48**: 697.

MORRIS, C. R., VICHINSKY, E. P. (2010). Pulmonary hypertension in thalassemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1202**: 205-213.

MUCKENTHALER, M. U., GALY, B., HENTZE, M. W. (2008). Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu. Rev. Nutr.*, **28**: 197-213.

MUNCIE, J. H., CAMPBELL, J. (2009). Alpha and beta thalassemia. *American family physician*, **80**: 339-344.

MUÑOZ, M. J., SANTANGELO, M. S. P., PARONETTO, M. P., DE LA MATA, M., PELISCH, F., BOIREAU, S., ... BIRD, G. (2009). DNA damage regulates alternative splicing through inhibition of RNA polymerase II elongation. *Cell*, **137**: 708-720.

NADADUR, S. S., SRIRAMA, K., MUDIPALLI, A. (2008). Iron transport homeostasis mechanisms: their role in health disease. *Indian Journal of Medical Research*, **128**: 533.

NAGAR, R., SINHA, S., RAMAN, R. (2015). Genotype–phenotype correlation and report of novel mutations in β -globin gene in thalassemia patients. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **55**: 10-14.

NAGEL, P. H. A. F., BRUGGINK, E. D. M., WOBBS, T. H., STROBBE, L. J. A. (2003). Arm morbidity after complete axillary lymph node dissection for breast cancer. *Acta Chirurgica Belgica*, **103**: 212-216.

NASR, M. R., ALI, S., SHAKER, M., EL GABRY, E. (2002). Antioxidant micronutrients in children with thalassaemia in Egypt. *EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal*, **8**: 490-495, 2002.

NIENHUIS, A. W., NATHAN, D. G. (2012). Pathophysiology and clinical manifestations of the β -thalassemias. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, **2**:a011726.

NUSSEY, S., WHITEHEAD, S. (2001). The pituitary gland. In Endocrinology: An Integrated Approach. BIOS Scientific Publishers.

ORIGA, R., GALANELLO, R., GANZ, T., GIAGU, N., MACCIONI, L., FAA, G., NEMETH, E. (2007). Liver iron concentrations and urinary hepcidin in β -thalassemia. Haematologica, **92**: 583-588.

ORIGA, R., PIGA, A., QUARTA, G., FORNI, G. L., LONGO, F., MELPIGNANO, A., GALANELLO, R. (2010). Pregnancy and β -thalassemia: an Italian multicenter experience. haematologica, **95**: 376-381.

PAIVA, B., ALMEIDA, J., PÉREZ- ANDRÉS, M., MATEO, G., LÓPEZ, A., RASILLO, A., ... ORFAO, A. (2010). Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell- related disorders. Cytometry Part B: Clinical Cytometry, **78**: 239-252.

PALSTRA, R. J., DE LAAT, W., GROSVELD, F. (2008). β -globin regulation and long- range interactions. Advances in genetics, **61**: 107-142.

PAN, H. F., LONG, G. F., LI, Q., FENG, Y. N., LEI, Z. Y., WEI, H. W., ... LING, S. Y. (2007). Current status of thalassemia in minority populations in Guangxi, China. Clinical genetics, **71**: 419-426.

PATEL, H. V., QARI, M., MOUSA, S. A., BLOEMEN, S., LAAT, B. D., HEMKER, H. C., HAJJAR, W. M. (2012). Iron balance in β -thalassemia: Maintaining an antioxidant/oxidant ratio. J Appl Hematol, **3**: 4-11.

PERERA, N. J., LAU, N. S., MATHEWS, S., WAITE, C., HO, P. J., CATERSON, I. D. (2010). Overview of endocrinopathies associated with β -thalassaemia major. Internal Medicine Journal, **40**: 689-696.

PERUTZ, M. F. (1997). Mutations make enzyme polymerize. Nature, **385**: 773.

Piomelli, S., Seaman, C., Kapoor, S. (1987). Lead- Induced Abnormalities of Porphyrin Metabolism The Relationship with Iron Deficiency a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **514**: 278-288.

PORTER, J. B. (2001). Practical management of iron overload. *British Journal Of Haematology*, **115**: 239-252.

PROHASKA, R., SIBON, O. C., RUDNICKI, D. D., DANEK, A., HAYFLICK, S. J., VERHAAG, E. M., ... WALKER, R. H. (2012). Brain, blood, and iron: perspectives on the roles of erythrocytes and iron in neurodegeneration. *Neurobiology of disease*, **46**: 607-624.

QUEK, L., THEIN, S. L. (2007). Molecular therapies in β -thalassaemia. *British Journal Of Haematology*, **136**: 353-365.

QUINTERO-GUTIÉRREZ, A. G., GONZÁLEZ-ROSENDO, G., SÁNCHEZ-MUÑOZ, J., POLO-POZO, J., RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. (2008). Bioavailability of heme iron in biscuit filling using piglets as an animal model for humans. *International Journal Of Biological Sciences*, **4**: 58.

RABINOWITZ, M. B. (1991). Toxicokinetics of bone lead. *Environmental health perspectives*, **91**: 33-37.

RAFIEE, M. A., RAFIEE, J., SRIVASTAVA, I., WANG, Z., SONG, H., YU, Z. Z., KORATKAR, N. (2010). Fracture and fatigue in graphene nanocomposites. *small*, **6**: 179-183.

RAIOLA, G., GALATI, M. C., DE, V. S., CARUSO, M. N., PINTOR, C., DE, M. S., ... ANASTASI, S. (2003). Growth and puberty in thalassemia major. *Journal of Pediatric Endocrinology Metabolism: JPEM*, **16**: 259-266.

ROUSSOU, P., TSAGARAKIS, N. J., KOUNTOURAS, D., LIVADAS, S., DIAMANTI-KANDARAKIS, E. (2013). Beta-thalassemia major and female fertility: the role of iron and iron-induced oxidative stress. *Anemia*.

RUND, D., RACHMILEWITZ, E. (2005). β -Thalassemia. *New England Journal of Medicine*, **353**: 1135-1146.

SAMPAYO-REYES, A., HERNÁNDEZ, A., EL-YAMANI, N., LÓPEZ-CAMPOS, C., MAYET-MACHADO, E., RINCÓN-CASTAÑEDA, C. B., ... HINOJOSA-GARZA, D. (2010). Arsenic induces DNA damage in environmentally exposed Mexican children and adults. Influence of GSTO1 and AS3MT polymorphisms. *Toxicological Sciences*, **117**: 63-71.

SCHECHTER, A. N. (2008). Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, **112**: 3927-3938.

SCHELLHAMMER, P. F., ENGLE, M. A., HAGSTROM, J. W. (1967). Histochemical studies of the myocardium and conduction system in acquired iron-storage disease. *Circulation*, **35**: 631-637.

SHIH, R. A., HU, H., WEISSKOPF, M. G., SCHWARTZ, B. S. (2006). Cumulative lead dose and cognitive function in adults: a review of studies that measured both blood lead and bone lead. *Environmental Health Perspectives*, **115**: 483-492.

SIAH, C. W., OMBIGA, J., ADAMS, L. A., TRINDER, D., OLYNYK, J. K. (2006). Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders. *Clinical Biochemist Reviews*, **27**: 5.

SILBERGELD, E. K., SCHWARTZ, J., MAHAFFEY, K. (1988). Lead and osteoporosis: mobilization of lead from bone in postmenopausal women. *Environmental research*, **47**: 79-94.

SIMONS, T. J. (1986). Passive transport and binding of lead by human red blood cells. *The Journal of Physiology*, **378**: 267-286.

SONAKUL, D., PACHAREE, P., THAKERNGPOL, K. (1988). Pathologic findings in 76 autopsy cases of thalassemia. *Birth Defects Original Article Series*, **23**: 157-176.

STAMATOYANNOPOULOS, G., GROSVELD, F. (2001). In Stamatoyannopoulos. G., Majerus, PW, Perlmutter, RM and Varmus, H.(eds), *Molecular Basis of Blood Diseases*. 3rd edn: WB Saunders Publishing Company, Philadelphia, PA, 135-182.

SUNDBERG, J. P., ELSON, C. O., BEDIGIAN, H., BIRKENMEIER, E. H. (1994). Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology*, **107**: 1726-1735.

TANAKA-KAGAWA, T., JINNO, H., HASEGAWA, T., MAKINO, Y., SEKO, Y., HANIOKA, N., ANDO, M. (2003). Functional characterization of two variant human GSTO 1-1s (Ala140Asp and Thr217Asn). *Biochemical and biophysical research communications*, **301**: 516-520.

THEIN, S. L. (2005). Genetic modifiers of beta-thalassemia. *haematologica*, **90**: 649-660.

TOSCANO, C. D., GUILARTE, T. R. (2005). Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects. *Brain Research Reviews*, **49**: 529-554.

UNDERWOOD, B. A. (1999). Micronutrient deficiencies as a public health problem in developing countries and effectiveness of supplementation, fortification, and nutrition education programs: Is there a role for agriculture?. International Food Policy Research Institute.

VALKO, M., RHODES, C., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. M., MAZUR, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, **160**: 1-40.

VALLANCE, H., FORD, J. (2003). Carrier testing for autosomal-recessive disorders. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, **40**: 473-497.

Vural, N. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73: 381. 2005.

WAHNER, A. D., GLATT, C. E., BRONSTEIN, J. M., RITZ, B. (2007). Glutathione S-transferase mu, omega, pi, and theta class variants and smoking in Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, **413**: 274-278.

WEATHERALL, D. J. (2010). The inherited diseases of haemoglobin are an emerging global health burden. *Blood*, 115: 4331-4336.

WEATHERALL, D. J., CLEGG, J. B. (2001). Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization*, **79**: 704-712.

WEATHERALL, D. J., MILLER, L. H., BARUCH, D. I., MARSH, K., DOUMBO, O. K., CASALS-PASCUAL, C., ROBERTS, D. J. (2002). Malaria and the red cell. *ASH Education Program Book*, **2002**: 35-57.

WHITBREAD, A. K., TETLOW, N., EYRE, H. J., SUTHERLAND, G. R., BOARD, P. G. (2003). Characterization of the human Omega class glutathione transferase genes and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics and Genomics*, **13**: 131-144.

WILBER, A., NIENHUIS, A. W., PERSONS, D. A. (2011). Transcriptional regulation of fetal to adult haemoglobin switching: new therapeutic opportunities. *Blood*, **117**: 3945-3953.

WILLOWS, N. D., GRAY-DONALD, K. (2002). Blood lead concentrations and iron deficiency in Canadian aboriginal infants. *Science of the total environment*, **289**: 255-260.

WOOD, B., HIGGS, D. (2009). Molecular basis of thalassaemia syndromes. *ESH Handbook on Disorders of Erythropoiesis, Erythrocytes and Iron Metabolism*, 250-263.

WOOD, R. J., RONNENBERG, A. G. (2006). Iron. In M. E. Shils, M. Shike, A. C. Ross, B. Caballero, R. J. Cousins (Eds.), *Modern nutrition in health and disease* (10 ed., pp. 248–270). Baltimore: Lippincott Williams Wilkins.

WRIGHT, R. O., TSAIH, S. W., SCHWARTZ, J., WRIGHT, R. J., HU, H. (2003). Association between iron deficiency and blood lead level in a longitudinal analysis of children followed in an urban primary care clinic. *The Journal Of Pediatrics*, **142**: 9-14.

XU, Y., LI, X., ZHENG, Q., WANG, H., WANG, Y., SUN, G. (2009). Lack of association of glutathione-S-transferase omega 1 (A140D) and omega 2 (N142D) gene polymorphisms with urinary arsenic profile and oxidative stress status in arsenic-exposed population. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **679**: 44-49.

YATMARK, P., MORALES, N. P., CHAISRI, U., WICHAIYO, S., HEMSTAPAT, W., SRICHAIRATANAKOOL, S., ... FUCHAROEN, S. (2014). Iron distribution and histopathological characterization of the liver and heart of β -thalassemic mice with parenteral iron overload: Effects of deferoxamine and deferiprone. *Experimental and toxicologic pathology*, **66**: 333-343.

YI, P., CHEN, Z., ZHAO, Y., GUO, J., FU, H., ZHOU, Y., ... LI, L. (2009). PCR/LDR/capillary electrophoresis for detection of single- nucleotide differences between fetal and maternal DNA in maternal plasma. *Prenatal diagnosis*, **29**: 217-222.

YIN, Z. L., DAHLSTROM, J. E., LE COUTEUR, D. G., BOARD, P. G. (2001). Immunohistochemistry of omega class glutathione S-transferase in human tissues. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, **49**: 983-987.

YIP, R., DALLMAN, P. R., ZIEGLER, E. E., FILER, L. (1996). Present knowledge in nutrition. Iron, 7th ed.; Ziegler, EE, Filer, LJ, Eds, 278-292.

ZAKHARYAN, R. A., SAMPAYO-REYES, A., HEALY, S. M., TSAPRAILIS, G., BOARD, P. G., LIEBLER, D. C., APOSHIAN, H. V. (2001). Human monomethylarsonic acid (MMAV) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chemical research in toxicology*, **14**: 1051-1057.

ZHANG, D. L., GHOSH, M. C., ROUAULT, T. A. (2014). The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis-an update. *Frontiers in pharmacology*, **5**: 124.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Dr. Bilge Ahsen KARA

Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara / 31.07.1978

Medeni Durum : Evli

Çocuk Sayısı : 3

İş Bilgileri : Ankara Ertuğrul Şimşek Sağlık Ocağı
Ankara Cevizlidere Sağlık Ocağı
Ankara Gölbaşı Hasvak Devlet Hastanesi
Ankara Ulusal Zehir Danışma Merkezi (114-Uzem)
Ankara Gazi Mustafa Kemal Devlet Hastanesi

Eğitim Bilgileri : Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Adli Toksikoloji Doktorasi

Seminer ve Sertifikalar : Aile Hekimliği Eğitimi
ÇPGD Eğitimi
Klinik Toksikoloji Eğitimi

Bilimsel Yayın : Marmaris Adli Bilimler Kongresi 2014 Yılı Talyum Poster
Uluslararası Adli Toksikoloji Kongresi Mantar Zehirlenmesi Poster
The Turkish Journal Of Occupational Environmental Medicine And
Safety (Mantar Zehirlenmesi Poster)
Türk Farmakope Dergisi (Talyum Elementinin Tıbbi Alanda
Kullanımı Ve Toksisitesinin Klinik Özellikleri)

Görev Aldığı Projeler : Tübitak Talasemili Hastalarda Ağır Metal Düzeyleri