TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TALASEMİ HASTALARINDA MANGAN SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (Mn-SOD) GEN POLİMORFİZMİ

Fatih ÖZTÜRK

DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİMDALI
ADLİ KİMYA VE ADLİ TOKSİKOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof.Dr.Aslıhan AVCI
Doç.Dr.Zeliha KAYAALTI

2015 - ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TALASEMİ HASTALARINDA MANGAN SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (Mn-SOD) GEN POLİMORFİZMİ

Fatih ÖZTÜRK

DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİMDALI
ADLİ KİMYA VE ADLİ TOKSİKOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof.Dr.Aslıhan AVCI
Doç.Dr.Zeliha KAYAALTI

Bu tez "Talasemili Hastalarında Mangan Süperoksit Dismutaz Gen Polimorfizmi (MnSOD) " başlıklı olup 114S312 numaralı Tübitak 1001 Projesi tarafından desteklenmiştir.

2015-ANKARA

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı
Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Tezli Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

03.07.2015

Jüri Başkanı
Prof. Dr.Aslıhan AVCI
Ank.Ü.Tıp Fakültesi

Üye
Prof.Dr.Asuman SUNGUROĞLU
Ank.Ü.Tıp Fakültesi

Üye
Doç.Dr.Cemal AKAY
G.A.T.A.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay **ii**

İçindekiler **iii**

Önsöz **v**

Simgeler ve Kısaltmalar **vi**

Şekiller **ixx**

Çizelgeler **x**

1. GİRİŞ **1**

1.1 Hemoglobin 4
1.1.1 Hemoglobin Molekülü ve Yapısı 4
1.2 Talasemi 9
1.2.1 Tanım 9
1.2.2 Talasemi Türleri 9
1.2.2.1 Alfa Talasemiler 10
1.2.2.1.1 Sessiz α- Talasemi Taşıyıcı Tipi 12
1.2.2.1.2 α- Talasemi Taşıyıcı Tipi 13
1.2.2.1.3 Hb H Hastalığı 13
1.2.2.1.4 Hb Bart's Hidrops Fetalis Sendromu 13
1.2.2.2 Beta Talasemi 14
1.2.2.2.1 Beta Talasemise Klinik Bulgular 18
1.2.2.2.1.1 Talasemi Major (Homozigot Beta Talasemi) 18
1.2.2.2.1.2 Talasemi İntermedia 19
1.2.2.2.1.3 Talasemi Minör (Heterezigot Beta Talasemi) 20
1.3 Demir 20
1.3.1 Demir Metabolizması 20
1.3.1.1 Demirin Vücutta Dağılımı 22
1.3.1.2 Demir Emilimi 24
1.3.1.3 Demir Toksisitesi 28
1.4 Oksidatif Stres 30
1.4.2 Mangan Süperoksit Dismutaz 33
1.5 DNA 35
1.5.1 Genetik Polimorfizm 35
1.5.1.1 Polimorfizm Çeşitleri 35
1.5.1.1.1 Tek Nükleotid Değişim (Single Nucleotide Polymorphism:SNP) 35
1.5.1.1.1.1 SNP'lerin Protein Oluşumu Üzerine Etkileri 38
1.6 DNA İzolasyonu 39
1.6.1 Fenol kloroform İzolasyonu 39
1.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR) 40
1.7.1 PCR'ın Aşamaları 41
1.7.2 PCR Bileşenleri 42

1.8 RFLP (Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi: Restriction Fragment Length Polymorphism) Yöntemi 44

2. GEREÇ VE YÖNTEM 46

2.1 Mn - SOD Gen Polimorfizmi 46
2.1.1 Gereçler 46
2.1.1.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler 46
2.1.1.2 Kullanılan Araç ve Gereçler 46
2.1.2 Hasta Rızası 47
2.1.3 Yöntem 47
2.1.3.1 Sıvı Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu 48
2.1.3.2 Agaroz Jel Elektroforezinde Genomik DNA'nın Yürütülmesi 50
2.1.3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 50
2.1.3.4 Primerler 51
2.1.3.5 PCR Programı 52
2.1.3.6 PCR Ürünleri İçin Agaroz Jel Elektroforezinin Hazırlanması 52
2.1.3.7 PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi 53
2.1.3.8 BsawI Restriksiyon Enzimi ile Kesim İşlemi 54

3. BULGULAR 56

3.1 Talasemili Hastalarda Demir Toksisitesi Maruz Kalan Bireylerde MnSOD Gen Polimorfizmin Analiz Sonuçları 56
3.1.1 MnSOD Ala16Val C/T Tek Nükleot Polimorfizminin PCR Yöntemiyle Amplifiye Edilmesi 58
3.1.1.1 DNA Örneklerinin Genotiplendirilmesi 59
3.2 Çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinin tespiti 60

4. TARTIŞMA 62

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 68

ÖZET 71

SUMMARY 72

KAYNAKLAR 73

EKLER 87

ÖZGEÇMİŞ 89

ÖNSÖZ

Çalışmamızın amacı, Türkiye popülasyonunda Talasemili hastalarda ve kontrol grupları arasında MnSOD Ala16Val C/T Tek nükleotid polimorfizmini belirlemek ve bu polimorfizmin cinsiyet ile ilişkinin olup olmadığını tespit etmektir.

Tez konusu seçiminde, tezimin hazırlanmasında yol gösteren, ufkumu açan değerli danışman hocam Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Müdür Vekili, **Sayın Prof. Dr.Aslıhan AVCI'ya,**

Çalışmalarımın her aşamasında, kapısını çaldığım günden itibaren tüm akademik bilgi ve birikimini benimle paylaşan, tezimin her aşamasında bana yol gösteren, yetiştiren, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen istatistiksel analizlerin yorumlanmasında çok büyük katkıları olan ve gölgesinde yetişmekten büyük onur duyduğum değerli danışman hocam **Sayın Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI'**na,

Laboratuvar çalışmalarında ve yüksek lisans eğitimim boyunca zamanını, sabrını, yardımını esirgemeyen ve her türlü fedakarlığını esirgemeyen değerli hocalarım **Dr. Dilek KAYA AKYÜZLÜ**'ye ve **Bilim Uzmanı Biyolog Fezile ÖZDEMİR'e**

Benden hiçbir zaman sevgisini, desteğini, güvenini eksik etmeyen ve her takılmamda tekrar doğrulabilmem için her daim yanımda bulunan ve beni destekleyen değerli eşim **Esra ALTAY ÖZTÜRK**'e tüm desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Fe	Demir
Fe^{+2}	Ferröz demir
Fe^{+3}	Ferrik demir
β-talasemi	Beta talasemi
α-talasemi	Alfa talasemi
γ-talasemi	Gamma talasemi
δ-talasemi	Delta talasemi
δβ-talasemi	DeltaBeta talasemi
ε**γ**δβ-talasemi	Epsilon Gamma Delta Beta talasemi
β-globin	Beta globin
α-globin	Alfa globin
MnSOD	Mangan Süperoksit Dismutaz
HbA	HemoglobinA
HbA_2	HemoglobinA_2
HbF	HemoglobinF
$\alpha_2\beta_2$	HbA
$\alpha_2\delta_2$	HbA_2
$\alpha_2\gamma_2$	HbF
Hb Portland	Hemoglobin Portland
Hb Gower 1	Hemoglobin Gower 1
Hb Gower 2	Hemoglobin Gower 2
$\zeta_2\gamma_2$	Hb Portland

$\zeta_2\varepsilon_2$	Hb Gower 1
$\alpha_2\varepsilon_2$	Hb Gower 2
Aγ	Alanin [Gamma]
Gγ	Glisin [Gamma]
β^+	β-globin zincirinin normal sentezinin azalması
β^o	β-globin zincirinin normal sentezinin kaybolması
IVS	İntervening Sekans
DNA	Deoksiribonükleik asit
Hct	Hematokrit
SNP	Tek nükleotid poimorfizm (Single Nucleotid Polymorphism)
A	Adenin
C	Sitozin
T	Timin
G	Guanin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyon (Polymerase chain reaction)
dNTP	Deoksiribonükleozidtrifosfatlar
RNA	Ribonükleik asit
bp	Baz çifti (base pair)
RFLP	Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
RE	Restriksiyon Endonükleaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TE	Tris-Edta
EDTA	Etilen-diamin-tetra-asetik asit
F primer	Forward Primer (İleri doğru olan primer)

R primer	Reverse Primer (Aksi yönde olan primer)
Tf	Transferin
TfR	Transferrin reseptörü
ApoTf	Apotransferrin
HNO_3	Nitrik Asit

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Dünya'da talasemi hastalığının sıklıkla görüldüğü bölgeler (Weatherall D. ve ark., 2001b). 2
Şekil 1.2. İllere göre talasemi haritası (Canatan D.,2007). 4
Şekil 1.3. Hb molekülü (chemistry.wiki.elanco.net). 5
Şekil 1.4. Hem grubu'nun yapısı (chemistry.wiki.elanco.net). 6
Şekil 1.5. Hb gen kümeleri (Weatherall D. ve ark., 2001b). 7
Şekil 1.6. Globin zincir sentezinin evreleri (Sankaran V. ve ark.,2010). 8
Şekil 1.7. Talasemi tipleri (Higgs D., 2004). 10
Şekil 1.8. α talasemi kromozomu (http://tr.wikipedia.org/wiki/Kromozom_16). 10
Şekil 1.9. α ve β talasemi'nin patofizyolojisi (Higgs D., 2004). 11
Şekil 1.10. Alfa talaseminin dünya üzerindeki dağılımı (Weatherall D., 2001a). 12
Şekil 1.11. β talasemi kromozomu (http://tr.wikipedia.org/wiki/Kromozom_11). 15
Şekil 1.12. β-globin gen yapısı. 15
Şekil 1.13. İnefektif eritropoez (Rund D., 2005 makalesinden derlenmiştir). 17
Şekil 1.15. Erişkinde vücut demir dağılımı (Andrews N., 1999). 23
Şekil 1.16. Bağırsakta non-hem demir emilimi (Andrews N., 1999). 26
Şekil 1.17. Transferrin siklüsü (Andrews N., 1999). 28
Şekil 1.18. Tek nükleotid polimorfizm (http://www.mygenetree.com/images/img-snps.jpg). 36
Şekil 1.19. Transisyon ve transversiyonla tek nükleotid değişim oluşumunun şematik gösterimi. 37
Şekil 1.20. İnsersiyonla (nükleotid eklenmesi) şematik gösterimi (http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/mutationtypes?show=insertion). 37
Şekil 1.22. Delesyon ile amino asit eksilmesinin şematik gösterimi (http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/mutationtypes?show=deletion). 38
Şekil 1.23. Fenol-Kloroform İzolasyon Yöntemi (Butler, 2005). 39

Şekil 2. 1. Kesim ürünlerinin UV ışık altında gösterimi 55
Şekil 2. 2. Kesim ürünlerinin UV ışık altında gösterimi 55

Şekil 4. 1 Kanser oluşumu için MnSOD ve reaktif oksijen türleri arasındaki ilişkiyi gösteren bir mekanizma**.** 63
Şekil 4. 2. Val-MnSOD formu iç membranın içerisine gömülürken, Ala- MnSOD formu mitokondri matriksine girebilmek için mitokondri membranında bulunur 66

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Hb çeşitleri (Weatherall D.,2001a) 8
Çizelge 1.2. Standart bir PCR'da bulunması gereken bileşenler ve miktarları 44

Çizelge 2.1. Fenol- Kloroform İzolasyon yönteminde kullanılan enzim, proteinler ve görevleri 48
Çizelge 2.2. PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları 51
Çizelge 2.3. MnSOD AlaVal16 gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan F ve R primerlere ait özellikler 51
Çizelge 2.4. MnSOD Gen bölgesinin amplikasyonunda kullanılan PCR programı. 52
Çizelge 2.5. MnSOD Ala16Val gen polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan restriksiyon enzimi ve kesim ürünlerinin uzunlukları (bp) 54

Çizelge 3.1. Demir toksisitesine maruz kalan bireylerin MnSOD polimorfizmine ait genotip frekansları 57
Çizelge 3.2. Kontrol numuleri alınan bireylerin maruz MnSOD polimorfizmine ait genotip frekansları 57
Çizelge 3.3 Demir toksisitesine maruz kalan bireylerin MnSOD polimorfizmine ait genotip frekansları 58
Çizelge 3.4. Kontrol numuleri alınan bireylerin maruz MnSOD polimorfizmine ait alel frekansları 58
Çizelge 3.5. PCR'da kullanılan primerler, kromozom üzerindeki lokalizasyonları ve amplifiye edilen bölgenin nükleotid dizilimleri 59
Çizelge 3.6. Hastalar için çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti 60
Çizelge 3.7 Kontrol numuneleri için çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti 61

1. GİRİŞ

Talasemi hastalığı, hemoglobin (Hb) molekülü yapısındaki alfa veya beta globin zincirinin protein sentezinde ortaya çıkan genetik bozukluk olup otozomal resesif geçiş gösteren bir kansızlık türüdür. Talasemililerde başlıca problemin globulinin yapımının yeteri kadar sağlanamaması olarak açıklanmaktadır. Talasemi aneminin bir çeşit formudur. Talasemiler, dünyada en çok karşılaşılan tek gen hastalıkları arasındadır. Globin desteğinin azalması hemoglobin tetramerlerinin yapımını azaltır, hipokromi ve mikrositoza sebebiyet verir. Tutulmayan globinlerin yapımı normal hızda olduğundan alfa ve beta subunitlerinin dengesiz birikimi oluşur. Dengesiz zincir birikimi klinik fenotipe baskındır. Tutulan globin sentez azalması derecesine bağlı olarak, diğer globin zincirlerinin değişmiş sentezi diğer anormal globin allellerinin birlikte kalıtımına bağlı olarak klinik şiddet geniş farklılıklar gösterir. Braunwalde E., 2004). Alfa talasemililerde α-globin zinciri biyosentezinde beta talasemililerde ise β-globin zinciri biyosentezinde bozukluk oluşmaktadır. (Weatherall D., 2001a).

Talasemi, tarihte ilk olarak 1925'te Thomas Cooley ve Pearl Lee tarafından İtalyan ve Yunan kökenli çocuklarda gözlemlenmiş. Talasemili çocuklarda şiddetli kansızlık, dalak büyümesi, büyüme geriliği ve karakteristik kemik deformitelerine benzer bulgulara sahip bir hastalık olarak açıklanmıştır (Weatherall D, 2004a). Benzer bulguların görülmesi nedeniyle bu genetik kan hastalığına Van Jaksch anemisi, splenik anemi, Akdeniz anemisi gibi isimlerle ifade edilmiştir (Vallance H. ve ark., 2003). 1936'ya gelindiğinde ise George Whipple ve Lesley Bradford ilk inceleme alanı olarak Akdeniz coğrafyasına ait ülkelerdeki bebeklerde daha sık ortaya çıkmasından dolayı Antik Yunanca'da deniz anlamını ifade eden ''thalass'' kelimesi ile anemi anlamı ifade eden ''eamia'' kelimelerinin birleşmesiyle ''thalasseamia'' olarak isimlendirilmiştir. (Weatherall D., 2004b). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar neticesinde hastalığın sadece Akdeniz civarı ülkelerinde görülmediği çok geniş bir coğrafyayı da kapsadığı görülmüştür.

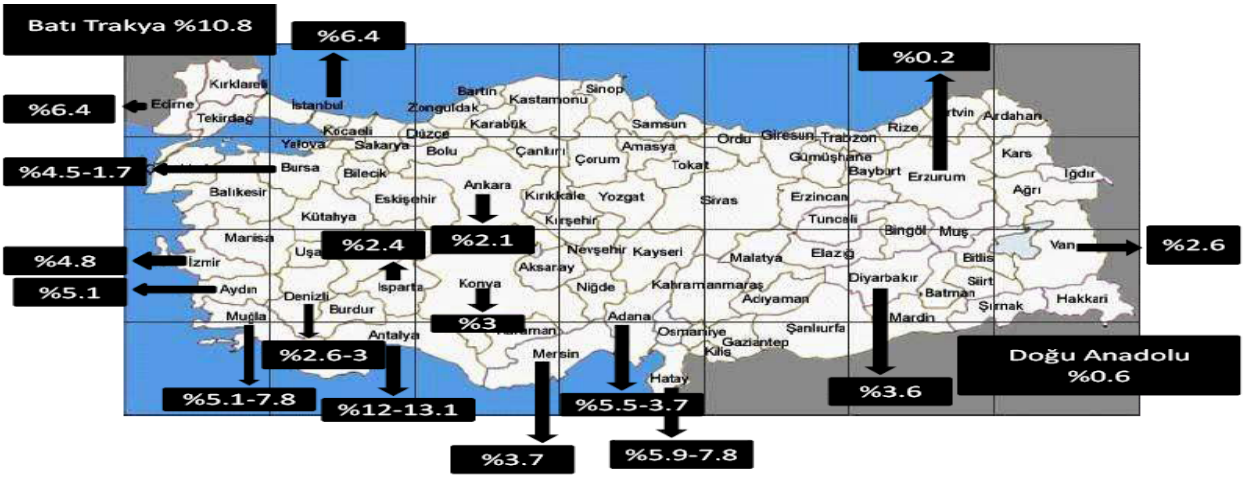
Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) verilerine göre, dünyada talasemi ve anormal hemoglobinlerin görülme sıklığı %5,1, taşıyıcı sayısı 266 milyon ve her sene yaklaşık 365,000 hasta çocuğun popülasyona dahil edildiğini ve bunların da 80 milyonunu beta talasemi taşıyıcı olduğunu rapor etmişler. (Canatan D., 2007). Talasemi hastalığı dünyada karşılaşılan tek gen bozuklukları arasındadır. (Rund D., ve ark., 2005). Farklı ülkelerde ve coğrafi bölgelerde görülebilir, fakat bazı bölgelerde önemli bir sağlık sorunu olarak da ortaya çıkmaktadır. Bu kalıtsal hastalık yaygın olarak Afrika, Ortadoğu, Hindistan, Güney Çin, Güneydoğu Asya'da görülmekle beraber Avrupa, Amerika ve Avustralya'ya da göçler vasıtasıyla geçtiği düşünülmektedir (Weatherall D., 2004a) (Şekil 1.1.). Talasemililer genellikle malaryanın endemik olduğu bölgelerde yüksek frekansta olduğu gözlemlenmiştir. (Hedrick P., 2011). Talasemi taşıyıcıları eritrositlerde malaryal parazitlerinin konaklamasına engel olmaktadır. Hastalık taşıyıcıları malaryaya karşı kendilerini genetik olarak korurlar. Heterozigot taşıyıcılar ise malaryaya karşı daha fazla direnç göstermişlerdir. (Weatherall D. ve ark., 2010).



Şekil 1.1. Dünya'da talasemi hastalığının sıklıkla görüldüğü bölgeler (Weatherall D. ve ark., 2001b).

İtalya ve Yunanistan'da son yıllarda yapılan incelemeleri hastalıklı bireylerin tespitinde etkili olmuştur. Bu inceleme neticesinde evlilik yapılmadan taşıyıcıların belirlenmesi, aile danışmanlığı, genetik danışmanlık, toplumun aydınlatılması ve prenatal tanı uygulamaları yapılmış olup, böylelikle talasemi taşıyıcısı çocuk doğumu büyük ölçüde azalması sağlanmıştır. Ülkemiz de akraba evliliklerinin fazla olması, kayıt bilgisinin yetersizliği, prenatal tanı uygulanan çocuk sayısının az olması, aile planlamasının gerektiği ölçüde yapılamaması, eğitim ve bilgilendirme faaliyetlerinin azlığı gibi nedenlerle talasemili doğumlar istenilen düzeyde önlenebilmiş değildir. Fakat son yıllarda Sağlık Bakanlığı ciddi çalışmalar yapmaktadır. 2000 yılında UHK, 2002 yılında Hemoglobinopati Kontrol Programı ile Tanı ve Tedavi Merkezleri Yönetmeliği basılmıştır. Bu yönetmelik gereği Türkiye'de hemoglobinopatilerle ilgili organizasyonlarıdüzenler (Yaprak I., 2004)

Talasemi birçok Akdeniz ülkerinde olduğu gibi ülkemizde de sıklıkla görülen kalıtsal hastalıklar arasındadır. Ülkemizin güney va batı illerinde görülen ciddi bir halk sağlığı problemi oluşturur (Tadmouri G. ve ark., 1998). Ülkemiz de ilk talasemi tanısı 1941 yılında görülmüştür. Fakat hastalığın halk arasında ciddi bir sağlık sorunu olduğu düşüncesi 1950'li yıllarda ortaya çıkmıştır. (Tadmouri G. ve ark., 2001). Ülkemizde talasemiyle ilgili ilk araştırmaları Aksoy ve arkadaşları başlatmştır (Aksoy M., 1991). İlk tarama çalışmasını ise 1971 yılında Çavdar ve arkadaşları tarafından yapılmış ve Türkiye'de talasemi hastalığı oranının %2 olduğunu rapor etmişlerdir. Fakat, hastalığın görülme oranı bölgeden bölgeye farklılık göstermektedir (Yıldız S. ve ark., 2005). Sağlık Bakanlığı 2000-2006 yılları arasında onaltı merkezde toplam 377,339 sağlıklı kişiyi taramış olup, taranan kişi sayısı ile talasemi ve anormal hemoglobin görülme sıklığının illere göre dağılımı tespit etmiştir. Adana:%3,7 (68460), Antakya:%4,6 (47755), Antalya: %13,1 (19594), Aydın: %5,1 (2209), Bursa: %1,7 (4040), Denizli: %2,6 (20000), Diyarbakır: %3,6 (2830), Edirne: %6,4 (2610), Isparta: %2,4 (6654), İstanbul: %4,5 (4944), İzmir: %4,8 (97510), K.Maraş: %0,7 (2398), Kırklareli:%3,4 (2439), Mersin: %2,3 (40977), Muğla: %4,5 (52042) ve Urfa: %6,4 (2913) (Canatan D., 2007). Bu verilere göre Türkiye'de talasemi ve hemoglobinopatilerin oranı %4,3 olarak rapor edilmiştir. (Kılınç Y., 2006) (Şekil 1.2.). Türkiye'de yaklaşık 1.300.000 talasemi taşıyıcısı ve ortalama 4000 talasemi hastası olduğunu belirtmiştir. (Canatan D.,2007).



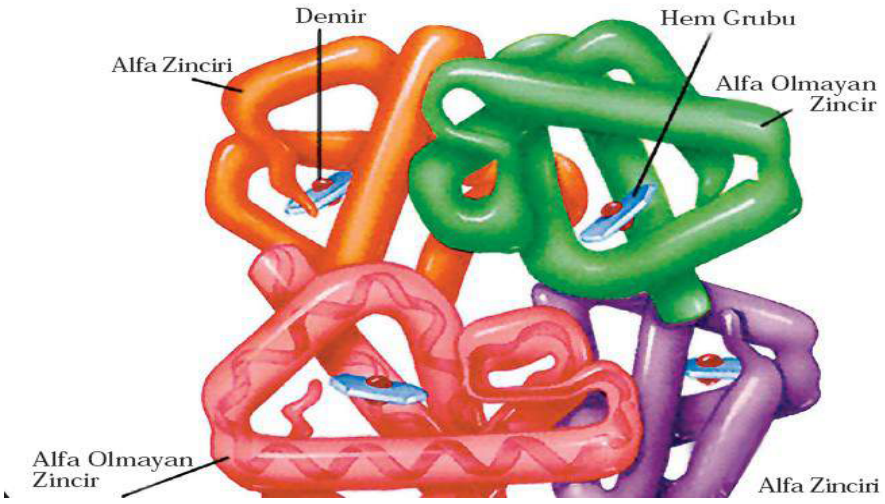
Şekil 1.2. İllere göre talasemi haritası (Canatan D.,2007).

1.1 Hemoglobin

1.1.1 Hemoglobin Molekülü ve Yapısı

Hemoglobin (Hb) molekülü, omurgalılarda eritrositlerde oksijen taşıyan, hem ve dört globin zincirinin bir araya gelmesi ile oluşan, kırmızı kan hücrelerinde bulunan ve oksijene bağlama kapasitesine sahip bir çeşit proteindir ve başlıca görevi akciğerlerden dokulara oksijen (O_2) taşımak ve dokularda bulunan karbondioksiti (CO_2) akciğerlere taşımaktır. Her bir zincirine tetraprotoporfirin-IX'dan oluşan demir içeren bir hem grubu kovalent olarak bağlanmıştır. Eritroblastlar altı değişik polipeptid zinciri sentezleyebilmektedir. Bunlar alfa, beta, gama, delta, epsilon ve zetadır. Embriyonik globin sentezi vitellus kesesinde gebeliğin 3. Haftasından 8. haftasına kadar olan dönemde oluşmakta, ancak yaklaşık 5. Haftada hematopoenzim başlıca yeri olan fetal karaciğere doğru hareket etmektedir. Embriyonik Hb'ler farklı olarak epsilon ve zeta zincirlerini içeren; Gower-1, Gower-2 ve Portland'dır. Gestasyonun 8. Haftasından sonra baskın olan HbF fetal yaşam boyunca çoğunluk teşkil eden hemoglobindir. Gestasyonun 6. ayından total Hb'nin %90'ı HbF'den oluşmaktadır. Sonrasında HbF oranı haftada %3-4 azalırken erişkin Hb'i olan HbA sentezi başlamaktadır. Erişkin insanlarda Hb'nin en az %96'sı HbA, %2,5-3 kadarı HbA2, ⟨%1 HbF'dir. HbA iki alfa ve iki beta zincirinden ($\alpha_2\beta_2$), HbA2 iki alfa ve iki delta zincirinden ($\alpha_2\delta_2$), HbF ise iki alfa ve iki gama zincirinden ($\alpha_2\gamma_2$) oluşmaktadır. HbA2 ve HbF, erişkin Hb'nin çok az bir kısmını oluşturduğu için,

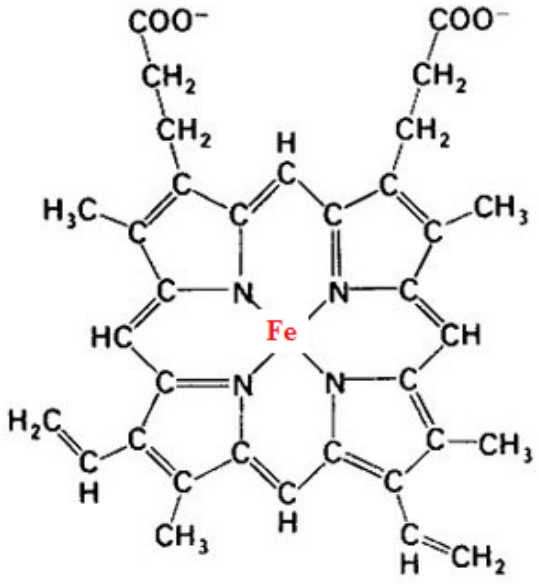
delta ve gama talasemiler genellikle klinik olarak belirti vermemektedirler (Ress DC., 1999) Hb'nin yapmakta olduğu bu görev organ ve dokuların fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri için yaşamsal öneme sahiptir (Klinken S., 2002). Hb molekülü ortalama 6,4 nm çapında 64,500 dalton molekül ağırlığında ve tetramerik yapıda bir moleküldür (Weatherall D.,2001a).



Şekil 1.3. Hb molekülü (chemistry.wiki.elanco.net).

Hb molekülü globin denilen protein kısmıyla birlikte hem adı verilen gruptan meydana gelmektedir**.** Hb molekülünün globin kısmında dört tane polipeptid zinciri bulunur ve bu polipeptidlerin her birine, bir hem grubu bağlanır. Polipeptidlerin hem grubuna bağlanması Hb molekülüne oksijen bağlanmasını ve kanın kırmızı renkli olmasını sağlamaktadır (Huisman T., 1993). Hb yapısı içinde yer alan hem grubu ve globin zincirleri hücrede farklı yerlerde sentezlendikten sonra birleşerek Hb molekülünü meydana getirmektedir (Nagel R. ve ark., 2003) (Şekil 1.3.).

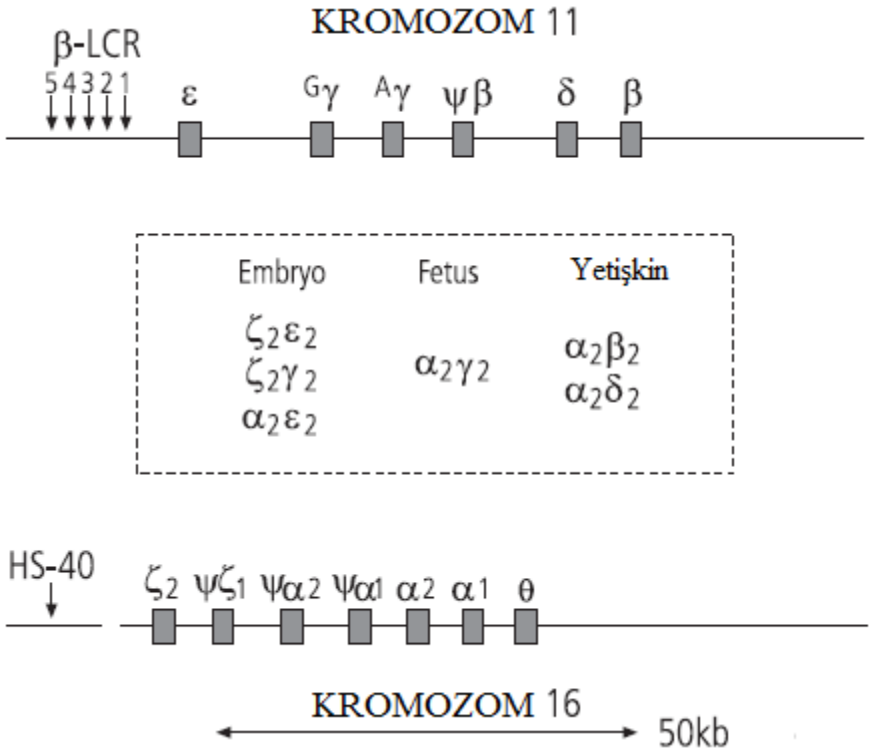
Tüm Hb'lerde hem grubu aynı yapıya sahiptir. Bu grup, ortasında ferröz (Fe^{+2}) bulunan, yan zincirlere sahip, birbirine metil köprüleriyle bağlanmış dört pirol halkasından meydana gelmektedir (Huisman T., 1993) (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. Hem grubu'nun yapısı (chemistry.wiki.elanco.net).

Globin zincirlerini sentezleyen genler alfa (ζ_2–$\Psi\zeta_1$–$\Psi\alpha_2$–$\Psi\alpha_1$-α_2-α_1-θ) ve beta (ε-Gγ-Aγ-Ψβ-δ-β) genler olmak üzere iki kümede toplanmışlardır. α polipeptid zincirleri 141 amino asitten, β polipeptid zincirleri ise 146'şar aminoasitten oluşmaktadır (Weatherall D., 2001a). Hb molekülündeki farklılıklar globin zincirleri üzerindeki aminoasit değişimi sonucunda oluşmaktadır. Bu değişim ise Hb molekülünün sentezinden sorumlu genler tarafından kodlanmakta olup 11 ve 16 nolu kromozomlar içinde yerleşmiştir (Weatherall D ve ark., 2001b) (Şekil 1.5.).

α ve β gen kümesinde bulunan püsodo genlerin ($\Psi\zeta$-$\Psi\alpha_2$-$\Psi\alpha_1$ ve $\Psi\beta$) bilinen bir işlevi bulunmamaktadır. İşlevi olmayan bu genlerin evrimsel kalıntılar olduğu düşünülmektedir. Teta (θ_1) geninin korunmuş yapısı ve aktif olmayan hiçbir mutasyon bulundurmaması işlevsel olabileceğini düşündürmektedir. Şimdiye kadar genin protein ürünü bulunamamış olup θ_1'in rolü bilinmemektedir (Weatherall D., 2010).



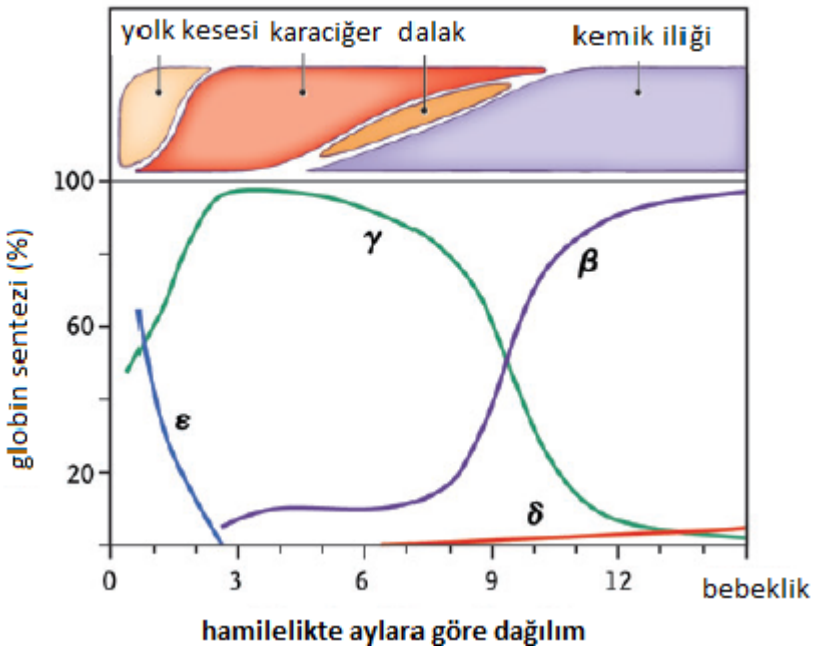
Şekil 1.5. Hb gen kümeleri (Weatherall D. ve ark., 2001b).

Embriyonik, fetal ve yetişkin yaşam sırasında farklı oksijen ihtiyaçları olmakla birlikte buna bağlı olarak gelişimin her evresinde farklı Hb molekülleri üretilmektedir. Tüm Hb'ler aynı tetramerik yapıya sahiptirler ancak; her biri farklı iki çift globin zinciri muhteva etmekte ve her biri bir hem molekülüne bağlanmaktadır. Erişkin ve fetal evrede Hb'ler β, δ, γ zincirlerinin α zincirleriyle birleşmesinden oluşmaktadır. Erişkin Hb'leri HbA ($\alpha_2\beta_2$), HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$) ve fetal Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) yapısındadır (Weatherall D. ve ark., 2001a). Yetişkin Hb'nin yaklaşık olarak %96'sı major hemoglobin HbA'dır, geri kalanı ise %2-3 kısmını minör yetişkin hemoglobini HbA_2'yi meydana getirmektedir. Fetal dönemin başlıca hemoglobini Hb F'dir (Weatherall D., 2004a). Embriyonik hayatın erken gelişim döneminde üç farklı Hb tipi sentezlenmektedir. Bunlar Hb Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$), Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$)'dır (Weatherall D. ve ark., 2001a).

Çizelge 1.1. Hb çeşitleri (Weatherall D.,2001a).

Hemoglobin Adı	Sentezlendiği Dönem	Formülü
Hb Gower I	Embriyonik Hb	$\zeta_2\varepsilon_2$
Hb Gower II	Embriyonik Hb	$\alpha_2\varepsilon_2$
Hb Portland	Embriyonik Hb	$\zeta_2\gamma_2$
Hb F	Fetal Hb	$\alpha_2\gamma_2$
Hb A	Erişkin Hb	$\alpha_2\beta_2$
HbA_2	Erişkin Hb	$\alpha_2\delta_2$

Embriyonik globin sentezi yolk kesesinde gebeliğin üçüncü haftasından sekizinci haftasına kadar olan bölümde oluşur, ancak yaklaşık beşinci haftada eritropoezin başlıca yeri olan yolk kesesinden fetal karaciğere doğru geçiş göstermeye başlar. Eritropoezin karaciğerde başlamasıyla fetal eritrositler oluşmakta ve yaklaşık onikinci haftadan başlayarak dalakta HbF sentezi görülmektedir.



Şekil 1.6. Globin zincir sentezinin evreleri (Sankaran V. ve ark.,2010).

Gebeliğin onsekizinci haftasından doğuma kadar kırmızı hücre üretim görevi yavaş yavaş fetal karaciğerinden kemik iliğine geçmektedir (Fathallah H. ve ark.,

2006). Embriyonik, fetal ve erişkin yaşamda hemoglobinlerin birinin sentezi azalırken diğerinin artmaya başladığı gözlenmektedir (Weatherall D.,2001a) (Şekil 1.6.).

Hb'lerin tümü farklı iki çift globin zincirinden meydana gelen ve her bir globin zincirinin bir hem parçasına bağlandığı, bir tetramerik yapıya sahiptir (Wood G. ve ark.,1983). Bu farklı globin zincirlerinin amino asit dizilimlerinin belirlenmesi hemoglobinin üç boyutlu yapısını anlamada önemli bir ilerlemedir ve bu ilerleme hemoglobinin bir oksijen taşıyıcısı olarak allosterik özelliklerinin incelenmesini kolaylaştırmıştır (Weatherall D., 2004a).

1.2 Talasemi

1.1.1 Tanım

Talasemililer, α, β, γ, δ olarak tanımlanan kalıtsal olarak hemoglobin molekülünü oluşturan globin zincirlerinin birinin yada birden fazlasının sentezindeki azalma veya tamamen yokluğuna bağlı ortaya çıkan otozomal resesif geçiş gösteren (cinsiyet kromozomlarıyla ilişkisi olmayan, kızlarda ve erkeklerde eşit oranda görülen) genetik bir hastalık olarak karakterize edilir. Bu tanıma göre, alfa globin yapımı azlığı alfa talasemiye, beta globin yapım azlığı beta talasemiye neden olur (Weatherall D., 2001a).

1.2.2 Talasemi Türleri

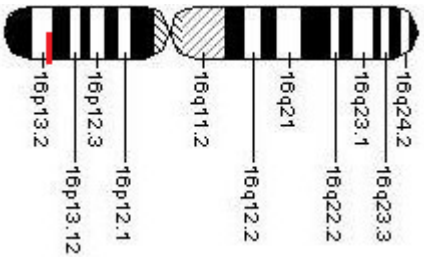
Talasemiler alfa ve beta talasemi olmak üzere iki grupta sınıflandırılırlar. Alfa talaseminin hafif alt grupları sessiz taşıyıcı ve alfa talasemi taşıyıcı tipiyken en önemli alt grupları Hb H hastalığı ve Hb Barts hidrops fetalis sendromu'dur (Şekil 1.7.). Beta talasemililerin major, intermedia ve minör şeklinde alt grupları mevcutur. Bütün talasemi tiplerindeki ortak özellik hemoglobin tetramerini oluşturan globin zincir sentezindeki dengesizliktir (Wearherall D.,2001a).



Şekil 1.7. Talasemi tipleri (Higgs D., 2004).

1.2.2.1 Alfa Talasemiler

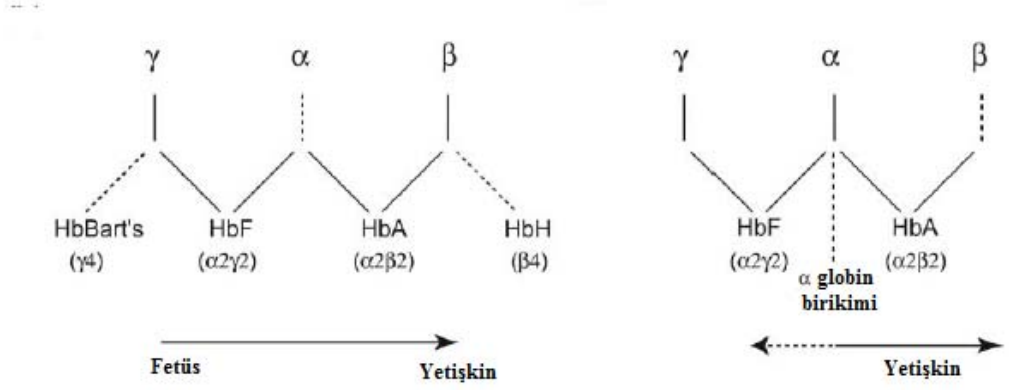
α gen kümesinde θ, α_1, α_2, $\psi\alpha_1$, ψζ ve ζ geni vardır. α benzeri genleri (ζ ve α) 16. kromozomun kısa kolunun p13.3 bölgesinde (Şekil 1.8.) her bir homolog kromozom üzerinde ikişer tane olmak üzere dört tanedir ve 30 kilobaz uzunluğundaki DNA bölgesinde bulunmaktadır. Aynı kromozom üzerindeki α-genlerine, 5′→3′ doğrultusunda, alfa 2 (α_2) ve alfa 1 (α_1) olarak adlandırılmaktadır (Weatherall D., 2001a).



Şekil 1.8. α talasemi kromozomu (http://tr.wikipedia.org/wiki/Kromozom_16).

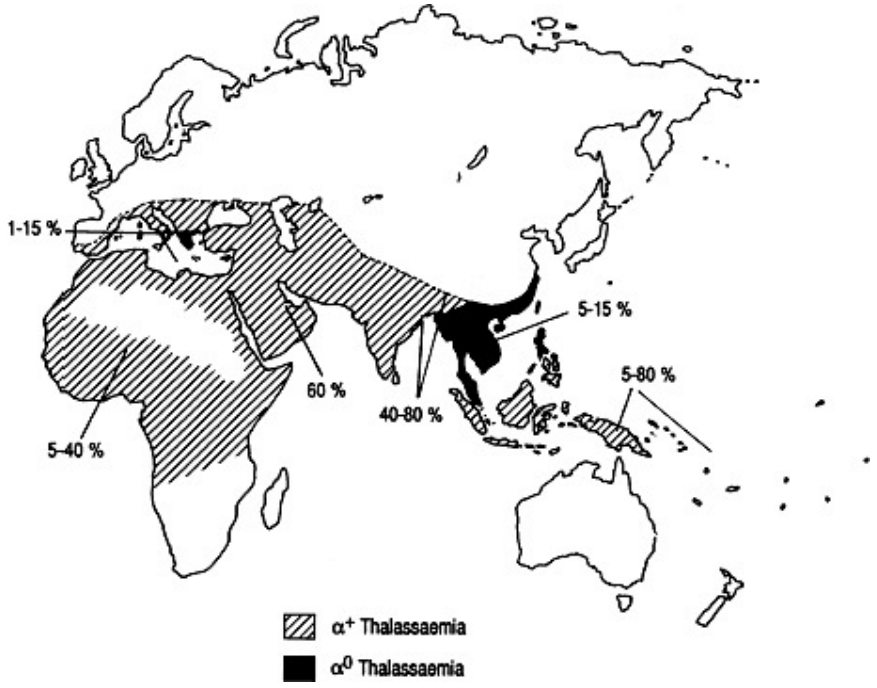
İnsanda iki α-globin zincir geni babadan, iki tanesi anneden gelmek üzere toplam dört adet α-globin zinciri bulunur. α talasemide en çok görülen patoloji gen delesyonudur (Higgs D., ve ark., 1990b). α talasemi nadir görülen genetik bir özellik değildir aksine insanlar tarafından bilinen en yaygın görülen genetik anormalliklerden biridir (Harteveld C. ve ark.,2010). Normal α genotipi αα/αα şeklinde gösterilmektedir. α talasemilerde α-globin genlerinin biri, ikisi, üçü yada

dördü birden etkilenmiş olabilir. Dört α-geninden bir tanesi delesyona uğradığında α^{+} talasemi (sessiz talasemi veya alfa talasemi-2) (α-/αα), iki α geni delesyona uğradığında α^{0} talasemi (α talasemi taşıyıcılığı veya α talasemi 1) (α-/-α) veya (--/αα), üçünün sentezlenmemesi durumunda HbH (α-/--), dördünün sentezlenmemesine bağlı Hb Barts Hidrop Fetalis Sendromu (--/--) ortaya çıkar. (Higgs D., 1990a). α zincirlerinin hem fetal hemde yetişkin hemoglobininde (Şekil 1.9.) bulunması delesyona uğramış α zincir yapımının her iki evresinde kliniğe yansımasına sebep olmaktadır (Weatherall D. ve ark., 1988).



Şekil 1.9. α ve β talasemi'nin patofizyolojisi (Higgs D., 2004).

α talasemi genel olarak β talasemiye benzer bir coğrafik alanda dağılım göstermektedir. Akdeniz bölgesi, Afrika boyunca, Ortadoğu, Hindistanı da içine alan kısımda, Doğu ve Güneydoğu Asya bölgesinde yoğun bir şekilde bulunmaktadır Ortadoğu ve Afrika populasyonunda nadir olarak bulunur. Ancak; bu populasyonlarda α talaseminin delesyon yapısı oldukça fazladır (Higgs D. ve ark., 2008) (Şekil 1.10.).



Şekil 1.10. Alfa talaseminin dünya üzerindeki dağılımı (Weatherall D., 2001a).

α^0 talasemiler Güneydoğu Asya ülkelerinde yüksek frekansta ve Güneydoğu Asya'nın bazı ülkelerinde nüfusun %10'dan fazlası α^0 taşıyıcısıdır. α^0 talasemiler ayrıca Doğu Akdeniz adalarında ve anakaradaki insanlarda yaygın olarak bulunduğu ancak Hindistan ve Ortadoğu bölgelerinide içine alan bölümde düzensiz bir yayılıma sahip olduğu rapor edilmiştir. α^+ talaseminin delesyonlu formları tropikal kuşağın tam karşısındaki alanlarda yüksek frekanslarda bulunmaktadır. Bu bölgedeki bazı populasyonlarda α^+ taşıyıcılığı yaklaşık olarak %2-70 arasında değişmektedir (Higgs D. ve ark.,2008).

Alfa talasemi taşıyıcılığının falciparum malaria alanlarında selektif avantaja sahip olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda alfa talasemi taşıyıcılığının polimorfik frekansının %1'den büyük olduğu bulunmuştur (Harteveld C. ve ark.,2010; Weatherall D. ve ark., 2002).

1.2.2.1.1 Sessiz α- Talasemi Taşıyıcı Tipi

Alfa globin zincir geninin dört tanesinden birinin çalışmasına bağlı olarak α^+-talasemi (sessiz talasemi yada α- talasemi-2) oluşur. Genotip olarak α-/αα şeklinde

olup fenotipte sessizdir. Klinikte herhangi bir sorunla karşılaşılmamaktadır (Lin C. ve ark.,1991).

1.2.2.1.2 α- Talasemi Taşıyıcı Tipi

α talasemi taşıyıcılığı iki α-globin zincir geninin delesyonu ve görevsel olarak iki α-globin geninin bulunması neticesinde ortaya çıkar. Klinikte hafif kansızlık gözlenir. Bu anemi türünün en sık karşılaşıldığı hali 3,7 kb'lık delesyonunun homozigotluğudur ($\alpha^{3,7}/\alpha^{3,7)}$. Genotip olarak --/αα farklı bir fenotip olarak ortaya çıkar. β talasemi taşyıcılarında da aynı hematolojik bulgulara sahiptir. Doğumdan sonra %5-10 Hb Barts vardır fakat 6 ay sonra ortadan kaybolur (Lin C. ve ark.,1991).

1.2.2.1.3 Hb H Hastalığı

Hb H talasemi tipi yetişkinlerde, α talasemi çeşidinin en ciddi görülen tipidir. Hb H talasemi çoğunlukta Güneydoğu Asya, Ortadoğu ve Akdeniz coğrafyasında yaygındır. Hb H Hastalığı α-globin zincir geninin üçünün de görev görmemesine neden olarak ortaya çıkmaktadır. Bu hastalığı taşıyan genin bireylerin ebeveynleri sessiz taşıyıcı yada α talasemi taşıyıcısıdır (Higgs D. ve ark.,1989). Hb molekülünde yüksek oranda β-zinciri bulunmakta ve bunun neticesinde β4 tetramerini oluşturmaktadır. Hb'nin oksijene bağlanma eğilimi fazla olduğundan dokulara yeteri kadar oksijen gitmez, bunun neticesinde orta şiddette anemi ve dalak büyümesi de gözlemlenebilir (Weatherall D. ve ark., 2010). Klinikte genel olarak hafif seyreder ve hafif veya orta seviyede hemolitik anemi bulgular gösterir. Doğumdan hemen sonra %20-40 oranında Hb Barts gözlenir daha sonra kaybolup bunun yerini %5-30 oranında HbH alır.

1.2.2.1.4 Hb Bart's Hidrops Fetalis Sendromu

Dört α-globin allelinin tümünün delesyona uğraması veya aktif olmaması sonucu α-globinin sentezlenemediği takdirde alfa talaseminin en ağır formu olan Hb Bart's hidrops fetalis ortaya çıkmaktadır. Çift gen delesyonlu vakaların (--/αα) homozigot veya çift heterozigot olanları hidrops fetalis'e sebep olacağı için yaşamaları mümkün

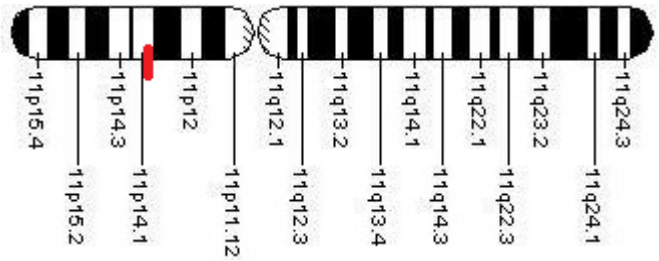
değildir (Gürgey A, ve Ark., 1989). Eğer derin fetal anemi ve hipoksiye müdahale edilmezse gebeliğin son döneminde veya doğumdan hemen sonra bebek ölümü gerçekleşmektedir. Etkilenen fetus HbF ve A yapmak için herhangi bir α-globin zinciri sentezleyemez. Fetal kan içerisinde başlıca Hb Bart's (γ4) bulunur. Değişken miktarda bulunan Hb Portland O_2 taşıması yaparak bebekleri canlı tutar. Ağır intrauterin anemi kalp yetmezliğine sebep olur. Belirgin hepatosplenomegali, yaygın ödem, asit, iskelet ve kardiyovasküler deformiteler gelişmesine neden olur ve plasenta genişler. Doğumdan sonra ağır anemiye bağlı gelişen şok tedavisinde kan transfüzyonu, yaşam destek tedavisi yapılması gerekir yoksa kısa sürede bebek ölümü gerçekleşir. Gebeliğin erken döneminde tanı konulurak intrauterin transfüzyonlarla gebelik takip edilerek erken doğum yaptırılır. Hasta doğum sonrasında düzenli transfüzyon ve demir şelasyonu ile izlenmektedir (Waye JS, ve Ark., 2013). Gebelik sırasında maternal komplikasyonlar pre eklampsi (hipertansiyon, proteinürili ve proteinürisiz sıvı retansiyonu) polihidramnios (amniotik sıvının fazla olması), kanama, anemi ve sepsis gelişebilir. Literatürde yaşayan Hb Bart's hidrops fetalis vakalarına nadir rastlanmaktadır. Bu vakalarla birlikte iskelet ve ürogenital sistem anomalileri, ağır nörolojik bozukluklar bildirilmiştir (Viprakasit V., 2013; Cunningham MJ., 2010).

α talaseminin fetal dönemdeki, en ciddi alt grubu Hb Bart's Hidrops Fetalis Sendromudur (Weatherall D., 2010). Hastalarda α-globin zincir geninin dördü birden hasara uğramakla birlikte etkilenen kromozomda α zincir yapımı durmaktadır (--/--) (Harteveld C. ve ark.,2010). Fetal dönemde α zinciri sentezlenmesi olmaz bunun neticesinde fazladan γ zinciri sentezlenir ve γ4 tetramerini oluşturur (Higgs D. ve ark., 2008). Bu kansızlık türünün oksijene eğilimi fazla olduğu için dokulara oksijen taşımaz ve bu nedenden dolayı vücut dokusunda oksijen azalır (Weatherall D. ve ark., 2010). Bu hastalığa yakalanan fetusun ebeveynleri α talasemi taşıyıcısıdır (Harteveld C. ve ark.,2010).

1.2.2.2 Beta Talasemi

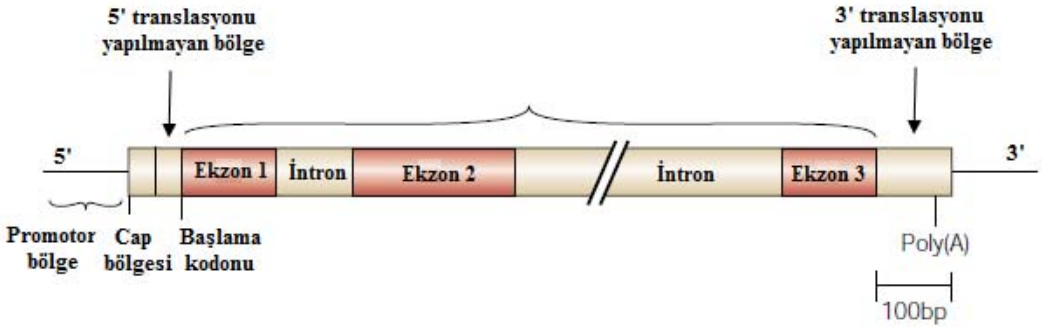
β-globin genleri (ε, γ, δ ve β) 11. kromozomun kısa kolu üzerindeki p14 bölgesinde (Weatherall D., 2001a), yaklaşık olarak 50 kilobaz uzunluğundaki DNA

bölgesindedir (Fritsch E. ve ark. , 1980;) (Şekil 1.11.). β-globin gen kümesi 5'-ε, Gγ, Aγ, Ψβ, δ, β-3' şeklinde sıralanmıştır (Weatherall D., 2001a).



Şekil 1.11. β talasemi kromozomu (http://tr.wikipedia.org/wiki/Kromozom_11).

B üzerinde bulunan Gγ ile Aγ genleri yapısal olarak aynı protein ürününü oluşturmaktadır. γ globin zincirlerinin bu iki geni 136. aminoasitlerinin farklı olmasından kaynaklanılarak ayırt edilebilir. G gama (Gγ) geni 136. pozisyonunda glisini kodlarken, A gama (Aγ) aynı pozisyondaki alanini de kodlamaktadır (Wood W. ve ark., 1983; Olivieri N., ve ark., 1998). β globin geninde üç kodlanan ekzon, iki kodlanmayan intron bölgesi bulunur. β globin geni β globin zincirinde bulunan 146 aminoasidi kodlamak için gerekli veriyi üç ekzon, iki intron 3' →5' düzenleyici bölgelerden oluşan ortalama 1,8 kb üzerinde taşımaktadır (Thein S., 1993) (Şekil 1.12.).

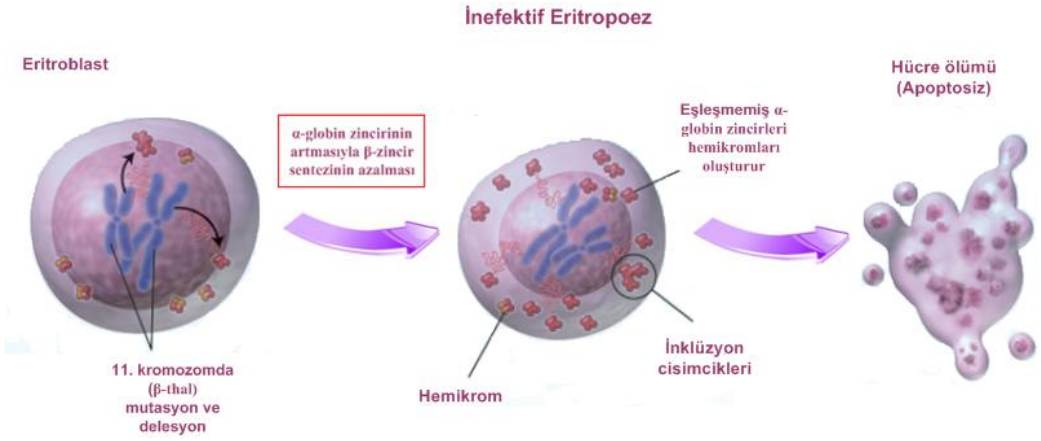


Şekil 1.12. β-globin gen yapısı.

β globin geninin Cap bölgesinde 5' tarafındaki DNA dizisine promotor bölge olarak adlandırılır. Üç ekzon ve iki introndan oluşan her genin 5' tarafında yaklaşık olarak 50 baz çifti uzunluğunda bir Cap bölgesi ile aminoasit sentezini başlatan kodon (AUG) bulunur. Ekzon üç'ün sonunda stop kodonunu takip eden ve Poli A kuyruğuna (AATAAA) kadar uzanan DNA dizisi transkripsiyonun bitiş sinyallerini bulundurmaktadır. Bu işlemin her everesinde hata gözlenir ve bu evreleri olumsuz etkileyen mutasyonlar, genetik hastalıklara sebep olmaktadırlar (Lukens J., 1999).

β-globin genindeki mutasyonlar, beta zincirinin oluşmamasına yada yeteri kadar oluşmamasına sebep olmaktadır. β-globin sentezinin tamamen oluşmamasıyla β^0, beta zinciri azda olsa oluşmasıyla β^+ talasemi tipi oluşmaktadır (Kazazian H. ve ark.,1998).

β talaseminin oluşmasındaki başlıca neden, hemoglobin molekülü yapısınıdaki alfa ve beta globin zincirlerinin sentezindeki eşitsizliktir (Weatherall D., 2001a). Bu eşitsizlik hastalığın derecesini belirler. β-globin sentezinin yapılmayışı ve α-globin sentezi normal hızda devam etmesiyle, α-globin tarafına bir sentez dengesizliği meydana gelir. Normal olarak sentezlenen α-globinden etkilenmeyen α-geni eritrosit hücreleri içerisinde birikir ve serbest α-zincir havuzunu oluşturur. Serbest halde bulunan α-zincirleri bir hemoglobin zincirini oluşturmaz bunun yerine eritrosit hücrelerine depositlenirler ve inklüzyon cisimciklerini oluşturular. Bu inklüzyon cisimcikleri eritrosit hücrelerinin intramedüllerin hasara uğramasına, anormal hücrelerin olgunlaşmasına ve kemik iliğinde önceden Hb yıkımına (inefektif eritropoieze) neden olur (Şekil 1.13.) (Tuzmen S. ve ark.,2001; Efremov G., 2007). Kemik iliği normal boyutunun üzerine çıkar ve normalin üzerinde eritrosit hücresi sentezlemek için çaba harcar. Bütün bu çabaları yetersiz kalır çünkü sentezlenen eritrositler yeterli miktarda Hb taşımaz ve kemik iliğinden çıkmadan ölüm gerçekleşir (Apoptozis). İliğin normalden daha fazla çalışması kemiklerin genişlemesine, zayıflamasına, yapı bozulmasına ve çeşitli kemik deformitelerine sebep olur. Yanak ve alın kemikleri belirginleşir. Hastaların yüzü herkesin farkında olabileceği spesifik mongoloid bir hale dönüşür. Eritrosit yıkımı neticesinde fazla hemosiderin ciltte birikir, cilt pigmentasyonu artış olur ve koyu sarı bir renk gözlemlenir (Wonke B., 2001; Benetatos L. ve ark., 2008).



Şekil 1.13. İnefektif eritropoez (Rund D., 2005 makalesinden derlenmiştir).

Eritrosit hücre zarı tahribatı iki nedenden dolayı gerçekleşir. Bunlardan ilki fazla miktarda α zincirden hemikrom oluşması diğeri ise fazla α zincir ürünlerinin parçalanmasıdır. Serbest halde α zincirlerinin yıkımı da eritrosite zarar verir. Aşırı demir oluşumu nedeniyle, serbest halde bulunan oksijen radikalleri oluşturarak eritrosit membranındaki lipid ve protein gibi makro bileşiklere ve hücre içi organellere hasar verir. Tüm bunlar, esnekliği olmayan sert ve sıvı hacmi az eritrosit yapımına neden olur. Eritrosit içerisinde esnekliği olmayan cisimciklerin varlığı, eritrositlerin dalaktan geçişi sırasında yıkılmasına neden olur (Weatherall D., 1998). Anormal eritrosit hücreleri daima dalak tarafından dolaşımdan kaldırıldığı için dalak hücreleri büyümeye başlar. Böylece splenomegali (dalak büyümesi) meydana gelir (Rund D., 2005).

β talasemili hastalarda dokularda demir birikmesinin iki başlıca sebebi vardır. Bunlar birincisi; etkin olmayan eritropoez sebebiyle düzenli olarak kan transfüzyonları yapılması ve bunun neticesinde intestinal demir emiliminin tetiklenmesidir (Farmakis D. ve ark., 2003). Talasemili hastalara uygulanan tedavide her 2-4 haftada 1-3 ünite düzenli olarak eritrosit transfüzyonu yapılır. Bunun başlıca nedeni; intestinal demir emilimini azaltmak ve eritropoezi baskılamak. Transfüzyon neticesinde yaklaşık olarak günde 15-20 mg dokularda demir birikimine ve Hb yıkımı sonrasında serbest hale geçen demirin salınmasına sebep olur. Demirin indirgeyici özelliği dolayı hemoglobine bağlanmayan demirlerin oluşturduğu demir

birikimi toksik oksijen radikallerinin üretimine sebep olur (Kontoghiorghes G., 2006). Demir birikimi, vücutta kemik deformiteleri, dalak büyümesi, siroz, endokrin ve kalp hasarlarına sebep olur (Weatherall D., 1998).

β talasemi alelleriyle ilgili yapılan araştırmalarda ortalama 25 mutasyonun tüm toplumlarda risk oluşturduğu rapor edilmiştir (Tuzmen S. ve ark.,2001). β talasemi'nin Türkiyede şuana kadar 30'un üzerinde mutasyon türü rapor edilmiştir (Tadmouri G. ve ark.,1998).

β talasemi ile alakalı Hb molekülünde β-globin geninde şimdiye kadar 200'ün üzerinde farklı polimorfiz ortaya çıkarılmıştır (Weatherall D., 2001a). Bu polimorfizmler büyük delesyonların aksine, nokta mutasyonlarından nükleotid eklenmeleri ya da delesyonları olduğu bilinmektedir.

1.2.2.1.5 Beta Talasemise Klinik Bulgular

Beta Talasemide klinik bulgular üç tip olarak tasniflendirilir.

1.2.2.1.5.1 Talasemi Major (Homozigot Beta Talasemi)

Talasemi major diğer bir ismi cooley anemisidir. Talasemi major eksik veya hiç sentezlenmeyen β-globin zincirlerine karşılık α- globin zincirlerinin birikmesi ve az eritrosit hemoglobini nedeniyle meydana gelen kronik hemolitik kansızlık kliniğin temelini oluşturur. Talasemi majorlü doğan bebeklerde ilk aylarda yüksek miktarda HbF sebebi ile asemptomatik olup yaklaşık 4-6 ay HbF'in yerini HbA almaya başlanmasıyla semptomatikleşirler. Az beslenme, solukluk, büyüme gecikmesi ve sık enfeksiyonlar bu hastalığın klinik bulguları arasındadır. Etkin olmayan eritropoez kemik iliğini genişleterek kemik zayıflamasına ve TM'a özgü değişk kemik formlarına sebep olmaktadır. Örnek olarak yüzde frontal kemiklerde belirginlik, burun kökü basıklığı, maksiler kemikte öne doğru gelişme, diş gelişim anomalikleri ve daha çok adolesa evrede ortaya çıkan osteoporoza bağlı kırıklıklar verilebilir. İyi tedavi edilmemiş bulgularda belirgin hepatosplenomegali ile Hepatit C ve hemosiderozise bağlı bronzlaşmış cilt, safra kesesi taşları görülebilmekte ve tedavisiz vakalar ölebilmektedirler. Fakat günümüzde tedaviler ile hastalar yaklaşık olarak beşinci dekada kadar yaşatılabilmektedir. Talasemi majorde ilk olarak 2. ayda en geç

ise 2. yaşta transfüzyona ihtiyaç vardır. Sürekli kan transfüzyonları, etkin olmayan eritropoez ve hemoliz ile gastrointestinal sistemden arta kalan emilim vücutta demir birikimini çoğaltarak kalp, karaciğer ve endokrin organlarda toksik etkileri ortaya çıkar. Tedavisi yapılamayan olgular ise yirmili yaşlarda kalp yetmezliği ve talasemi minörler sebebiyle ölüm gerçekleşir. Endokrin organlarla alakalı boy kısalığı, şeker hastalığı, hipogonadotropik hipogonadizm, hipotiroidi, hipoparatiroidi ve osteoporoz nedeni ile görülen patolojik kırılmalar ile diğer klinik bulguları oluşturmaktadır. Karaciğerde demir birikimi neticesinde transaminazlarda yükselme ve önemli fonksiyon bozukluğuna sebep olabilmektedir. Bu komplikasyonların çoğu etkili şelasyon tedavisiyle önlenebilmektedir (Thein SL., 2005)

Doğumdan altı ay sonra hastalığın tanıları meydana çıkar. Hastalığın seyri büyük ölçüde sürekli bir transfüzyon uygulanıp uygulanmamasına bağlıdır. β talasemili majörlü hastalar yaşamlarının ilk yılında talasemi tedavisine başlar ve sonuç olarak hayat boyunca düzenli olarak kan transfüzyonu almaları gerekmektedir. İnefektif eritropoez ve düzenli transfüzyonlar nedeniyle demir birikiminin artmasıyla sorun olmaya başlar. Ergenlik döneminde ölüm gözlenebilir (Olivieri N., 1999).

1.2.2.1.5.2 Talasemi İntermedia

Etkin olmayan eritropez, kansızlık ve demir birikimine sebep olur. Yetişkin hayata kadar tamamen asemptomatik olabileceği gibi daha önemli klinik ile karakterize olmuş hastalar genellikle 2-6 yaş arasında tanı almakta, nadiren veya hiç transfüzyon gereksinimi olmadan yaşamlarını devam ettirebilmektedirler. Fakat büyüme geriliği yanında altta yatan moleküler patoloji, alfa gen sayısı, etkisiz eritropoez seviyesi, kronik anemi ve buna bağlı olarak yükselmiş gastrointestinal demir emilimi ve demir birikimi nedeni ile Talasemi Major'deki gibi organ işlevsel bozuklukları görülebilmektedir. Hastalarda hafif\orta seviyeli hepatosplenomegali meydana gelebilir. Talasemi İntermedia hastalarında Hb genellikle 6-7 g\dl'nin üstünde, HbF %10-50, HbA2>%4 arasında bulunmaktadır. Talasemi Major-Talasemi İntermedia ayrımı her zaman kolaylıkla yapılamaz. Bu sebeple klinikte, hematolojik, genetik ve moleküler enstrumantel teknikler kullanılanarak uygun tedavi için ayırt edilebilmelidirler (Smolkin V. ve Ark., 2008).

1.2.2.1.5.3 Talasemi Minör (Heterezigot Beta Talasemi)

Tek bir defektif β-globin genine sahip taşıyıcılar semptomsuz bir yaşam sürmektedirler. Fiziki muayeneleri doğaldır. Rutin kan sayımlarında veya aile öyküsü olanların araştırılması ile tanı alırlar. Hafif anemi, MCHC ve MCV'de belirgin düşüklük, normal RDW ve retikülosit sayısı, eritrosit sayısında artış (>5 milyon/mm3) görülmektedir. Serum demiri, TDBK ve ferritin normal düzeyde saptanmaktadır. Periferik kan yaymasında eritrositlerde hipokromi, mikrositoz ile target hücreleri, anizositoz ve bazofilik noktalanma görülmektedir. Kemik iliği aspirasyonu normal veya hafif eritroid hiperplazi ile uyumludur. Talesemi minor'de hemoliz azdır ve erişkin dönemde renal tübüler hasar nedeni olabilmektedir (Kalman S ve Ark., 2005).

Heterozigot β-talasemilerde (β^+ veya β^0) δ zincir sentezi etkilenmemiş olmasına rağmen HbA2 seviyesi yüksek olup (%3.5-4) tanısal kriterdir (Melody JC ve Ark., 2009). Bazen HbF seviyesinin hafif olarak yükseldiği görülmektedir. Heterozigot β-talasemi allelleri ile hematolojik parametreler arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda ılımlı (sessiz) taşıyıcılarda MCHC ve MCV'nin β^+ veya β^0 allellerini taşıyan gruba oranla daha yüksek, HbA2 değerinin ise daha az olduğu rapor edilmiştir. Bu sebeple HbA2 ile MCV arasında ters yönde bir ilişki olduğu saptanmıştır. Ayrıca β globin geninin 5' promotor bölgesindeki geniş delesyonlarda HbA2 ve HbF düzeylerinde beklenmeyen yüksek değerler saptanmıştır. Neticede genetik mutasyonlardan etkilendiği neticesi ortaya çıkmaktadır. Bu kliniği, genetik konsültasyon için α-talasemi taşıyıcılığından ve gereksiz demir tedavisini önlemek için demir eksikliği anemisinden ayırmak önemlidir (Higgs DR., 2001).

1.3 Demir

1.1.1 Demir Metabolizması

Demirin biyolojik önemi eski çağlardan beri bilinmektedir. Ancak, özellikle son 10 yılda emilim, depolanma, moleküler kontrol ve hücrelerdeki döngüsünün moleküler yolları ile ilgili yeni proteinlerin keşfi sonucu, demir metabolizması ile ilgili bilgilerimizde büyük ilerlemeler olmuştur. Demir pek çok canlı ve insan için

yaşamsal öneme sahip temel bir elementtir. Demirin vücut içerisinde önemli fonksiyonları vardır; elektron alıp verme özelliği nedeniyle oksijen taşınmasında, enerji yapımındaki birçok enzimin katalizlenmesinde (sitokromlar), bağışıklık sisteminde (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz, lakroferrin, siderokalin), deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA) ve protein sentezinde görev almaktadır (Ganz T, Nemeth E., 2006). Kolaylıkla ferröz (Fe^{+2}) ve ferrik (Fe^{+3}) şeklinde değişebilen redoks kimyası ile insan yaşamı demire bağlıdır ve demir metabolizmasındaki değişiklikler insan sağlığını önemli şekilde etkilemektedir (Ganz T., 2006; Ganz T., 2004; Beutler E., 2006; Ponka P., 1997; Andrews N., 1999).

İnsan gibi karmaşık organizmalarda, demirin çok sayıda farklı hücreye seçimli olarak taşınması oldukça önemli bir problemdir. İlk olarak demirin etkin bir şekilde besinlerden alınması gereklidir. Örneğin, demir şelatlayıcı indirgen askorbat (vitamin C) ve indirgen olmayan fakat demiri bağlayan fosfatlar demirin hızlı resorpsiyonunu sağlayabilir. Demirin yakalanması ve kullanılacağı yerlere (başlıca kemik iliği) taşınması özel demir proteini olan transferin ile sağlanır (Baker and Lindley, 1992).

Demirin elektron alıp verme özelliği nedeniyle dokulara oksijen transferi, enerji üretimi, DNA, RNA, protein sentezinde görev almakta ayrıca; oksidatif metabolizma, hücre büyümesi ve çoğalmasında, esansiyel reaksiyonların katalizinde kullanılan ve pek çok yaşamsal ve kimyasal özelliği olan enzimin yapı ve fonksiyonunda görev yapan demir, hayat için vazgeçilmez elementler arasındadır. Ferröz (Fe^{2+}) ve ferrik (Fe^{3+}) formuna dönüşebilen redoks kimyası ile insan yaşamı demire bağlıdır ve demir metabolizmasındaki değişiklikler insan sağlığını önemli ölçüde etkilemektedir (Ganz T., 2006; Ganz T., 2004; Beutler E., 2006; Ponka P., 1997; Andrews N., 1999).

Hb ve miyoglobin üretiminde ve diğer sitokrom, sitokrom oksidaz, peroksidaz ve katalaz gibi maddeler için demir kritik önem taşımaktadır. Demirin ana görevi aynı zamanda hemoglobinin bir parçası olan Hem'in yapısını oluşturur. Kanda oksijen transferi ile görevli olan Hb'nin görevini yapabilmesi için yapısında

demir bulunması gereklidir. Hb, vücutta bulunan tüm demir miktarının üçte ikisini bünyesinde bulundurur. Oksijen ayrıca kastaki diğer bir hem proteini olan miyoglobulin ile bağlanır. Son yıllarda hücresel düzeyde yeni proteinlerin keşfi ile moleküler kontrol, emilim, depolanma ve organizma demir döngüsünün moleküler yolları ile ilgili demir metobolizmasında çok büyük değişiklikler ve ilerlemeler olmuştur (Ganz T., 2006; Ganz T., 2004; Bülbül S.,2004).

1.3.1.1 Demirin Vücutta Dağılımı

İnsanda demir miktarı cins ve yaşa bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Normal bir yetişkinde yaklaşık olarak 70 mmol (4 g) demir vardır. Bunun % 70'i hemoglobinde, % 5-10'u ise hem grubu içeren diğer proteinlerde bulunur (Crichton and Ward, 1992). Tam zamanlı doğan bir yenidoğanda ise 75 mg/kg olan vücut demiri bulunur ve bir yaşında 40-50 mg/kg'a kadar düşer (Oski F. ve ark, 1982).

İnsanda demirin metabolizması klinik bir öneme sahiptir. Demir vücuttan deskuamasyon (sindirim kanalından atılım) ve kanama yoluyla atılım meydana gelir. İdrarda çok az demir bulunur. Deskuamasyonla günde yaklaşık 1 mg demir atılımı olur. Menüstrüel kayıp ise 28 mg/döngü kadardır. Böylece herhangi başka bir yerde kanama yoksa doğurgan çağda erkeklerde 1 mg/gün, kadınlarda 2 mg/gün demir kaybı olmaktadır. Bu nedenle, demir dengesini sağlamak için hergün bu miktarlarda demir alınmalıdır. Günlük besinlerle alınması gereken demir 10-20 mg arasındadır ve ortalama olarak bunun sadece % 10'u emilerek kullanılır. Gebelikte ise fetusun gereksinimi için ek miktarda demir alınmalıdır. Hem özellikle gelişmekte olan ülkelerde söz konusu olan demir eksikliği, hem de aşırı demir alımı kalp rahatsızlıkları ve bazı patolojik hastalıklar için risk faktörü oluşturmaktadır (Scrimshaw, 1991).



Şekil 1.14. Erişkinde vücut demir dağılımı (Andrews N., 1999).

Demir vücutta günlük 1-2 mg kadar atılımı gerçekleşir ve diyetle alınan demirin sadece % 10'u (~1–2 mg) günlük kayıpları gidermek yada vücudun ihtiyacına bağlı olarak depolanmak üzere kaybedilen demir bağırsak epitel hücreleri tarafından aynı miktarda emilir (Gantz T., 2006; Gantz T., 2004; Pietrangelo A., 2006).

İnsanlarda demir, yaşlanan eritrositlerden ve diğer kaynaklardan geri dönüşümü sıkı bir şekilde korunmaktadır. Yaşam süresini tamamlamış eritrositlerin yıkılması ile hergün yaklaşık 20 mg kadar demir açığa çıkar, eritrosit yıkımı sonrası demir yeniden dolaşıma verilerek transferrine bağlanır ve yeni kırmızı hücre prekürsörlerinin yapısına katılmak üzere primer olarak kemik iliğine dağılır (Kemik iliginin ihtiyacı olan yaklaşık 20 mg/gün'dür) ve 2,5 mg kadar demir tekrar hemoglobin yapısına girer (Gantz T., 2006; Gantz T., 2004; Pietrangelo A., 2006).

Doğurganlık çağındaki kadınlarda menstrüel evrede ve gebelik sırasında demir ihtiyacı belirgin olarak artmaktadır (Brittenham G., 2000). Günlük demir gereksinimi çocuklarda ilk 6 ayda günde 10 mg, ikinci 6 ayda 15 mg'dır. 1-11 yaş

arasında 10 mg/gün demir yeterli olurken, bu yaştan sonra 18 mg/gün demir ihtiyacı vardır. Günlük besinsel demir gereksinimi erkek 1mg, ergenlerde 2-3 mg, gebelerde 3-4mg'dır (Ulukol B. ve ark., 2004). Kanın her mililitresinde 0,4 mg demir vardır ve aylık 60 ml'lik menstrual kayıp, her ay ek olarak 20-30 mg'lık demir emilimi ihtiyacı oluşturur (Pettersson T. ve ark., 1994).

1.3.1.2 Demir Emilimi

Demirin emilimi, demirin emilebilir formda olup olmaması, miktarı, diyetin bileşimi, sindirim sistemi etmenleri, bireyin demir ihtiyacı ve sağlık durumu gibi faktörler etkilemektedir (Yıldız İ., 2009). Diyetten elde edilen demir, hemoglobin ve miyoglobin, et kaynaklı organik hem demiri ve et dışı kaynaklardan sağlanan inorganik demir olmak üzere iki şekildedir. Hem demiri ve inorganik demirinin ince barsaktan emilim yolları birbirinden farklıdır**.** Demir, mide, duedonum, jejenum ve kolondan emilebilir. Ancak en aksif emildiği bölge duedonum ve jejenumun üst kısmıdır. Mukoza hücrelerinden emilimin iki aşamda olduğu düşünülmektedir. Bunlar intestinal demir emilimi ve Mukozal hücrelerden dolaşıma demirin transferidir (Flangen PR 1989, Wheby MS 1970).

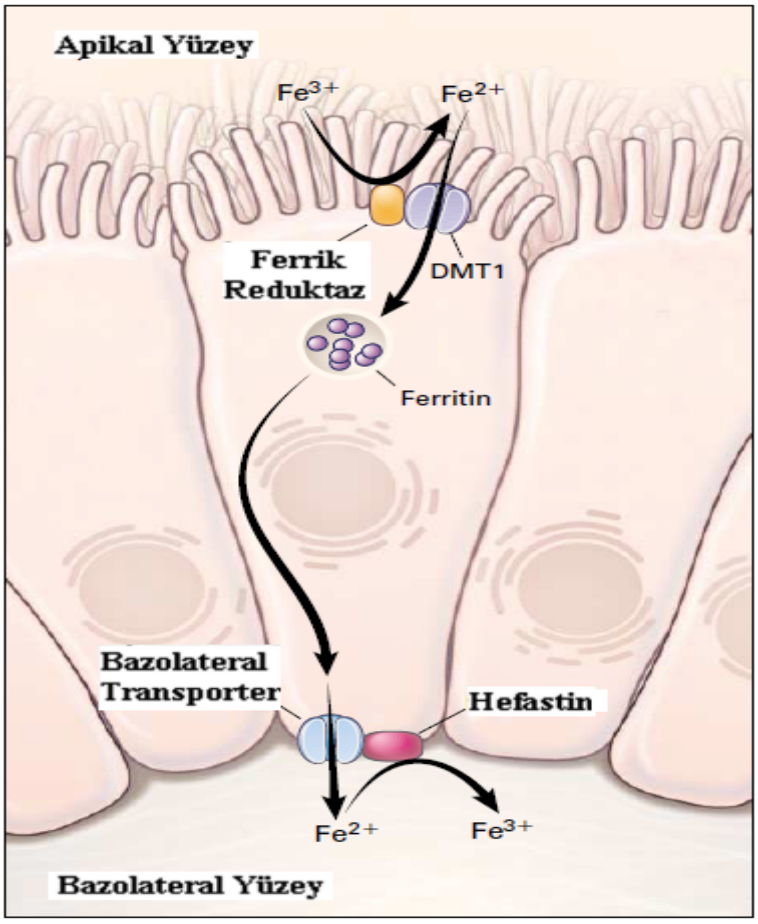
Besinlerde hem kompleksi içinde bulunan demirin emilimi ilk aşamada hem olmayan demirden farklıdır. Hem olmayan demirin mukoza hücresine girmesi için fırça kenarlı membranda bulunan özgün reseptörlere bağlanması gereklidir. Daha sonra demir hücre içine ulaştırılır. Taşınma metabolik enerjiyi gerektirir (Flangen PR 1989, Heubersl HA ve Ark., 1971). Demirin mukoza hücresine taşınması ile ilgili son bulgular demir bağlayıcı ve taşıyıcı öğelerin lipid yapısında olduğunu göstermektedir. Yağ asitleri arasında linoleik asit ve oleik asitin en etkin demir taşıyıcısı oldukları saptanmıştır (Peters TJ ve Ark., 1988; Simpson, RJ ve Ark. 1986). O halde demir membrandaki yağ asitleri ile kompleks oluşturarak taşınır ve hem Fe^{+2} ve Fe^{+3} formu bu yolla transfer edilir (Hauser H., ve Ark., 1980). Hem demirinin emilimi için porfin Fe^{+2} kompleksi barsak lümeni, içinde globinden ayrılır ve kompleks bütün halde hücre içine girer (Martin DW ve Ark., 1983; Halberg L. Ve Ark., 1967). Hem oksijenaz enzimi tarafından parçalanır ve hücre içi proteine bağlanarak eriyebilir hale dönüşür. Ya taşıyıcı protein transferrine yada depolayıcı

protein olan ferritine bağlanır. Ferritin yapısındaki demir gaita içerisinde dışarı atılır (Thomas JH., ve Ark., 1989). Mukoza hücresine giren hem olmayan demirde hücre içinde transferrine benzeyen bir proteine bağlanarak taşınmaktadır (Pollack S., ve Ark. 1976).

Demir emilimi mukozal reseptör ile yönetilmektedir. Buradaki hücreler demire doyunca emilim durur. Demirin dolaşıma transferi vücudun demir deposuna ve verilen demir mitarına bağlıdır. Mukozal geçiş aktif, serozal geçiş ise pasiftir. Hem demiri bir apoferritin molekülünün iç poru ile mukoza hücresine girer, oksitlenir ve kapiller kenara diffüze olarak indirgenir. Plazmada transferine bağlanır, mukozal hücreye fazla demir girince bir kısmı apoferritine bağlanarak ferritin yapısında tutulur, apoferritin porları dolar ve sonuçta emilim durur (Thomas JH., ve Ark., 1989). Son çalışmalarda barsak mukozasındaki ferritin miktarı ile demir emilimi arasındaki ilşkinin pasif bir ilişki olduğu, ferritin miktarı ile demir emilimi aktif olarak regüle etmediği düşünülmektedir (Cook JD., ve Ark., 1990).

Demir emiliminin ilk basamağında, duodenumun fırçamsı kenarlarında yer alan "ferrik redüktaz" enzimi, Fe^{3+} ferrik demiri Fe^{2+} haline, yani ferröz yapıya dönüştürür. Ferröz yapıdaki demir suda çözünür olduğundan emilebilir bir yapıya kavuşur. Böylelikle incebağırsak lümeninde, enterosite alınımı kolaylaştırılmış olur. Enterositin bağırsak boşluğuna bakan membranı üzerinde "divalent metal taşıyıcı 1 (DMT1)" yer alır. Ferröz demiri bağlar enterosit içine taşır ve enterositlerin bazolateral membranından plazmaya transferini kolaylaştırmak için enterositlerin villöz yüzeylerinin bazolateralinde lokalize bir protein olan hephaestin tarafından tekrar Fe^{+3} dönüşümü sağlanır (Yen A. ve ark., 2006) (Şekil 1.16.).

Enterosit içideki demirin yapısı Fe^{+2} değerliğindedir. Bu değerlikteki demir, serbest radikallerin oluşumunu hızlandırdığından biyolojik ortamlarda toksik etki gösterir. Bundan dolayı hızlı bir işleme tabi tutulması gerekir. Herhangi bir işlemde kullanılmayan ve plazmaya transfer olamayan Fe^{+2} ikinci basamakta ya ferritin olarak depolanır, ya da transferine bağlanıp dolaşıma katılmak üzere, ferroportin 1 (FPN 1) tarafından bazolateral membran boyunca taşınır (Feder J. ve ark., 1996).

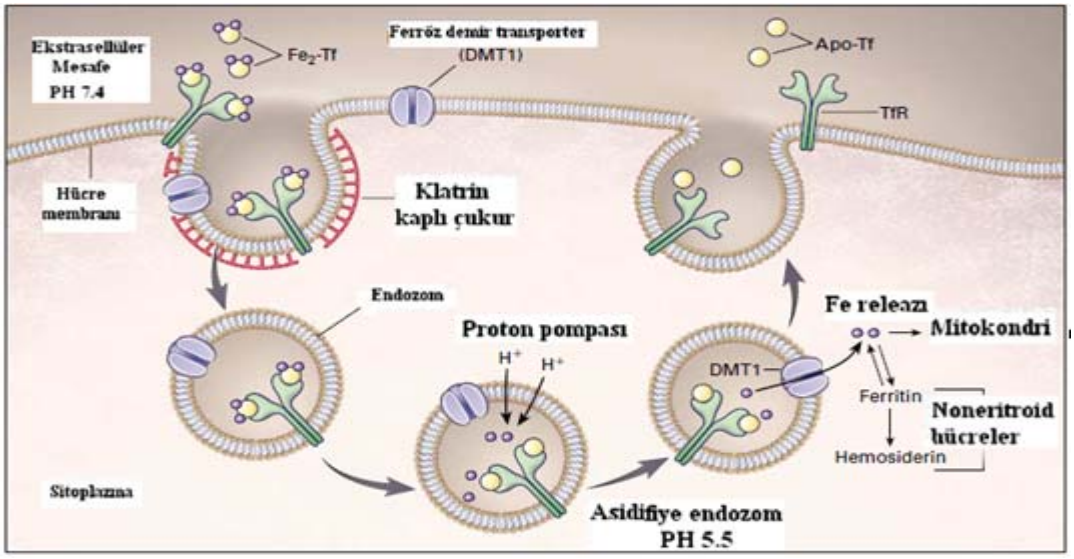


Şekil 1.15. Bağırsakta non-hem demir emilimi (Andrews N., 1999).

Demirin, demir transfer eden hücreler olan enterosit, hepatosit ve makrofajlardan çıkışını sağlayan tek protein olan FPN aracılı salınımı, demir dengesinin önemli bir belirtisidir. Plazmada demiri bağlayan proteinin adı, apotransferrindir. Demir ile birleşmiş apotransferrine, transferrin (TfR) denir ve bu şekilde kan plazmasında taşınır. Demirin taşınmasında ana rolü oynayan glikoprotein yapısındaki transferin molekülü, karaciğer parankim hücreleri tarafından yapılmaktadır. Dolaşıma salınan demir transferine bağlanmakta, demir ihtiyacı olan hücrelerin yüzeyinde bulunan transferrin reseptörü 1 (Tfr1) aracılığı ile hücrelere endositoz şeklinde alınmaktadır (Umbreit J., 2005; Atanasiu V. ve ark., 2007; Fleming R. ve ark., 2005; Charlton R.W. ve ark., 1983; Layrisse M. ve ark., 1974; Baynes R.D., 1996). Transferrin iki formda bulunur; tek molekül bağlayan tipine monoferrik (bir demir atomu içerir), çift molekül bağlayanına diferrik transferrin (iki demir atomu içerir) adı verilir (Andrews N., 2000).

Transferrin demir metabolizmasında ana rol oynar. Çünkü demir plazmada transferin ile taşınarak gereksinimi olan dokuya verilir. Hücrelerin çoğu demiri plazmadan transferrin aracılığı ile alır. Serbest demir eritrosite geçemez. Eritroid hücre içlerine demirin girebilmesi için transferrinin transferrin reseptörlerine bağlanması gerekir. Bu reseptörlerin diferrik transferrine afiniteleri daha fazladır. Transferrin ile hücre yüzeyine gelen demir, hücre yüzeyindeki transferrin reseptörleri yoluyla hücre içine alınır. Endozom zarı üzerindeki H^+ pompası enterosit sitoplazmasında bulunan H^+ iyonlarını endozom içine pompalayarak içerinin pH'sını 6'ya kadar düşürür (Andrews N., 2000). "Transferrin-demir" molekülünün hücre yüzeyindeki transferrin reseptörlerine bağlanmasından sonra "transferrin reseptörü-transferrin-demir kompleksi" endositozla hücre içine alınır. Asidik ortamda (pH:5.5'in altında) demir, transferrinden ayrılır ve sitoplazma içine ve buradan da mitokondriye hem sentezinde kullanılmak üzere bırakılır. Ayrılan demir hücre tarafından kullanılır ya da ferritin olarak depolanır (Roy C. ve ark., 2000a; Griffiths W. ve ark., 1999; Roy C. ve ark.,2000b). Endozomal asidifikasyondan sonra demirsiz kalan apotransferrinin, transferrin reseptörüne affinitesi yüksektir. Apotransferrin-reseptör kompleksi endositozla birlikte tekrar hücre yüzeyine transfer edilir. Hücre yüzeyinde nötral pH ile temas sonucu apotransferrin, reseptöre olan affinitesini kaybeder. Böylece reseptör yüzeyi, tekrar kullanıma uygun hale gelir (Hunt J.,2001). Normal 8 günlük ömrü süresince transferin reseptörü yaklaşık olarak 100 kez bu işlemi yapar. Eritrositlerin olgunlaşması süresince yüzeylerindeki transferrin reseptör sayısı değişir. Eritrositler olgunlaştıkça bu reseptörler eritrositten ayrılır ve plazmaya geçerler. Plazma transferin reseptör konsantrasyonu eritropoez hızı ile orantılıdır (Thomas C. ve ark., 2002).

Hb sentezi için gerekli olan demirin ana kaynağı, dolaşımdaki yaşlanmış eritrositlerin dalak makrofajları tarafından fagosite edilmesi ile sağlanır. Yaşlı eritrositlerden salınan demir, transferin ile hızlı bir şekilde kemik iliğine taşınarak hemoglobin sentezinin ihtiyacı için kullanılır. Fazla olan demir ise ferritin ve hemosiderin olarak depo edilir (Gantz T., 2006) (Şekil 1.17.).



Şekil 1.16. Transferrin siklüsü (Andrews N., 1999).

1.3.1.3 Demir Toksisitesi

Demir, tüm hücrelerin fonksiyonlarına katılmaktadır ve oksidasyon durumuna göre (ferröz demir; Fe^{+2} ve Ferrik demir; Fe^{+3}) elektron alıp verebilmektedir (Swinkels D ve Ark. 2006; Pietrangelo A. Ve Ark. 2002; Andrews NC, 1999). Demirin bu özelliği hemoglobin ve miyoglobin gibi oksijen bağlayan moleküllerin özellikle demir içeren mitokondrial sitokrom enzimleri için önemlidir (Swinkels D ve Ark. 2006; Andrews NC, 1999). Demirin bulunmaması durumunda hücreler elektron taşıma kapasitelerini yitirirler (Swinkels D ve Ark. 2006). Öte yandan ortamda fazla bulunması halinde demir hidroksil radikalleri oluşumunu katalizleyerek hücre membranında, proteinlerde ve DNA'da hasar meydana getirir (Swinkels D ve Ark. 2006; Andrews NC, 1999). Demirin yol açacağı hasardan korunmak için demir vücutta proteinlere bağlı olarak bulunmaktadır (Swinkels D ve Ark. 2006; Pietrangelo A. Ve Ark. 2002; Andrews NC, 1999). Plazma içerisinde demir transferrine bağlı olarak dolaşır ve hücrelere iletimini yüksek çözünürlüklü ferrik demiri Transferrin reseptörü (TfR) sağlar (Swinkels D ve Ark. 2006). Hücre içerisinde depolanması ise ferritin ve hemosiderin şeklindedir (Swinkels D ve Ark. 2006; Pietrangelo A. Ve Ark. 2002;). Kullanılmayıp depolanan demirin büyük kısmı hepatositte ve retiküloendotelial makrofajlarda bulunur (Andrews NC, 1999).

Demir toksisitesi uzamış transfüzyon tedavisinin istenmeyen sonuçlarından biridir. Çünkü her 200 ml eritrosit suspansiyonunda 200 mg olan demir fizyolojik olarak vücuttan atılamamaktadır. Vücudumuzda biriken demirin atılması için düzenleyici bir mekanizma bulunmamaktadır. Transfüzyona bağlı anemilerde demir birikimine bakacak olursak; splenektomisiz olgularda 0,5 mg/kg /gün splenektomili olgularda 0,4 mg/kg/gün kadardır. Transfüzyonlarla alınan demir ilk olarak, görece zararsız olduğu, kemik iliği ve retiküloendotelyal sistem makrofajları tarafından depolanmaktadır. Retiküloendotelyal sistem hücrelerinin demir depolama kapasitesi aşılınca eritrosit katabolizmasından ortaya çıkan demir, plazma transferrinine bağlanarak parankimal hücrelere girer. Parankimal hücrelerdeki, katabolik olarak aktif, labil demir havuzu genişler ve böylece transferrin demirinin hücre içine girişi engellenir. Ancak transferrin doyuma ulaşınca, transferine bağlı olmayan serbest demir hücre içine girmeye devam eder ve bu durum labil demir havuzunun aşırı genişlemesine yol açmasına neden olur ve oksiradikal oluşumunu katalize eder. Oksiradikaller lipidler, nükleik asitler ve proteinler gibi hemen tüm hücresel komponentleri hasarlandırarak hücre nekrozu ve fibrozisine yol açmaktadır. Demir birikimi yer aldığı dokularla bağlı olarak akut ve kronik patolojik süreçlere neden olmaktadır. Talasemide bu süreçler:

1- Demirin kendisinin yol açtığı etki: Retiküloendotelyal sistemde demirin depolanma sürecini aştıktan sonra parankimal hücrelerde depolanmaya başlaması ile oluşmaktadır (Angelucci E, ve Ark., 2000). Bu durum ilk olarak vücudun en büyük demir deposu kaynağı olan karaciğer organında başlayıp, belli bir yüklenme sonrasında diğer endokrin parankimal organlar ve miyokard hücrelerinde devam ettiği öngörülürdü. Ancak dokulardaki birikimin belirli bir düzen izlemediği ve homojen bir dağılım göstermediği anlaşılmıştır.

2- Demirin serbest radikal oluşumuna yol açan tepkimelerde yer alması: Demirin ($^{2+}$) ve ($^{3+}$) değerleri arasında yükseltgenip indirgenme özelliğinden dolayı demir, pek çok biyokimyasal reaksiyonda elektron transferi yapan ideal atom özelliği taşımaktadır. Bu özelliği sayesinde oksijen taşıma dışında enzim sistemlerinin çalışmasında vazgeçilmez olmaktadır (Olynk JK, ve Ark., 1994). Bu

tepkimelerde ortaya çıkan serbest radikallerin sonucunda endotel disfonksiyonu ve akut organ disfonksiyonu ortaya çıkar. Bunun en şiddetli şekilde gözlendiği organ kalptir.

Demirin toksisitesinin ana nedeni redoks reaksiyonlarını katalizlemesidir. Normal hücresel reaksiyonlar sonucu oluşan reaktif oksijen ara ürünleri olan süperoksit ($O_2^{\cdot}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2), vücuttan uzaklaştırılamadığı takdirde vücutta oksidatif stres oluşturmaktadır. Oksijen ara ürünleri demire bağımlı Fenton reaksiyonu ile hücresel zedelenme ortaya çıkaracak oksijen radikallerine dönüşebilmektedir (Wu AC., ve Ark., 2002; . Saltman P., 1989).

$$O_2^{\cdot} + Fe^{+3} \rightarrow O_2 + Fe^{+2}$$

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + {}^{\cdot}OH + OH^{-}$$

$$O_2^{\cdot} + H_2O_2 \rightarrow {}^{\cdot}OH + OH^{-} + O_2$$

Hidroksil radikaller, DNA ve protein gibi makromoleküllere zarar verebileceği gibi hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonunu da artırır. Hücre içi yapılar ve özellikle lizozomlar bu çeşit peroksidasyona çok duyarlı olduğundan böylesi bir hücre zedelenmesi lizozom membranının da zarar görmesi sonucu lizozomal enzimler hücre proteolizine neden olur, sonuçta hücre ölümü gerçekleşir. Tüm bu reaksiyonlar ve hücre zedelenmesi demirin aşırı birikimi ile giden klinik durumlarda daha fazla olarak görülür ve bu da aşırı demir birikiminde görülen doku ve buna bağlı organ zedelenmesi ve yetmezliklerinin başlıca nedenidir (Wu AC., ve Ark., 2002).

1.4 Oksidatif Stres

Oksijen, yaşam için vazgeçilmez bir moleküldür ancak, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücuda ciddi şekilde zarar vermektedir (Diplock, 1998). Çoğunu serbest radikaller (SR)'in oluşturduğu reaktif oksijen türleri normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, serbest radikal reaktif oksijen türlerinin kimyasal reaktivitesinin daha yüksek olduğu ortaya çıkmaktadır (Nawar, 1996).

Atomlar, içerisinde nötron ve proton bulunan bir çekirdekle ve bu çekirdeğin çevresinde dönen elektronlar bulutlarından oluşurlar. Atom çekirdeginin etrafında, elektronların bulundugu bosluga orbital denir. Her bir orbitalde spinleri birbirinin tersi yönünde iki elektron bulunur. Bu elektronlara eşleşmiş veya ortaklanmış elektronlar denir. Atom veya moleküller, yörüngelerindeki elektronlar eslesmis ve ters pozisyonda yer aldıklarında kararlı bir hal oluşturular. Bu kararlı hal eslesmemis veya ortaklaşmamış elektron bulundurduklarında bozulur (Nawar, W.W., 1996.).

Serbest radikaller bir veya birden çok ortaklaşmamış elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır (Valko M, ve Ark., 2007). Serbest radikal oluşumu, pato-mekanizmanın bir parçasıdır ve pek çok ksenobiyotigin toksisitesi, serbest radikal oluşumu ile doğrudan veya dolaylı olarak ilgilidir (Abdollahim, Bahreini-Moghadam A, 2003; Kalender S, ve Ark., 2004).

Serbest radikallerinin artması, oksidatif stresi tetiklemektedir. Esas olarak oksidatif stres, biyolojik süreçte prooksidanlarla antioksidanlar arasındaki dengenin, prooksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanır (Bhuvarahamurthy et al., 1996; Berk ve ark., 2008). Hücreler hafif oksidatif stresi tolere edebilseler de genel olarak antioksidan enzim sistemlerini aktive ederler. Fakat, hücre içi savunma sistemlerinin yetersiz olduğu durumlarda, oksidatif stresin tanımında belirtildiği gibi, reaktif oksijen türleri (ROS) ile antioksidanlar arasındaki denge bozulur, bu nedenle oksidan hasara duyarlı DNA, protein, karbohidratlar ve lipitler gibi makromoleküller zarar görür. (Gutteridge, 1994; Zadák et al., 2009; Wildburger, 2009; Berger, 2005; Halliwell and Gutteridge, 1989). Oksidatif stres, serbest radikal oluşumu artışı ve antioksidan savunmanın azalması neticesi olabildiğinden oksidatif stres biyobelirteci olarak antioksidan tüketiminin incelenmesi antioksidan miktarlarındaki azalış veya onların metabolitlerindeki artışın yorumlanabilmesi ile mümkün olabilir (Blumberg, 2004).

Oksidatif streste sebep olan reaktif oksijen türleri olarak süperoksit (O^{2-}), hidroksil (OH^{-}), peroksil (RO_2), hidroperoksil (HRO_2^{-}) gibi serbest radikaller ve hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit (HOCl) gibi nonradikal türlerini sayabiliriz. Reaktif nitrojen türleri ise nitrik oksit (NO), nitrojen dioksit (NO_2^{-}) gibi serbest

radikaller ve peroksinitrit ($ONOO^-$), nitröz oksit (HNO_2), alkil peroksinitrat (RONOO) gibi nonradikallerdir. Serbest oksijen radikalleri (SOR) veya reaktif nitrojen türlerinin oluşması radikal zincir reaksiyonları ile diğer ürünlerin üretimine sebep olurlar. Süperoksit radikali (O^{2-}), organizmada NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, siklooksijenaz gibi çeşitli oksidazlar aracılığı ile ve bazı şartlarda endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) aracılığı ile oksijenin bir elektron indirgenmesi sonucu oluşur.

Ayrıca ATP üretimi için gerekli olan normal oksidatif fosforilasyon esnasında mitokondrial elektron taşıma zinciri tarafından üretilir. Normal şartlar altında O^{2-} antioksidan savunma mekanizmaları tarafından hızla elimine edilir. O^{2-} mitokondride manganez süperoksit dismutaz (Mn-SOD), sitoplazmada bakır süperoksit dismutaz (Cu-SOD) ile H_2O_2'e dönüştürülür. H_2O_2 ise mitokondride glutatyon peroksidaz (GSH-Px), lizozomda katalaz (CAT) tarafından H_20 ve O_2'e parçalanır. H_2O_2 ayrıca Fe, Cu gibi elementlerin varlığında reaktif hidroksil (OH^-) radikaline dönüştürülebilir (Fenton reaksiyonu) (Johansen JS, ve Ark., 2005).

Serbest radikaller hücre ve dokularda yol açtıkları zararlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

a) DNA' nın hasara uğraması,

b) Nükleotit temelli koenzimlerin yıkımı,

c) Lipit peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonunun değişime uğraması,

d) Enzim aktiviteleri ve lipit metabolizması üzerinde değişiklikler,

e) Protein ve lipitlerle kovalent bağlantıların oluşması,

f) Zar proteinlerinin zarar görmesi ve taşıma sistemlerinin bozulması,

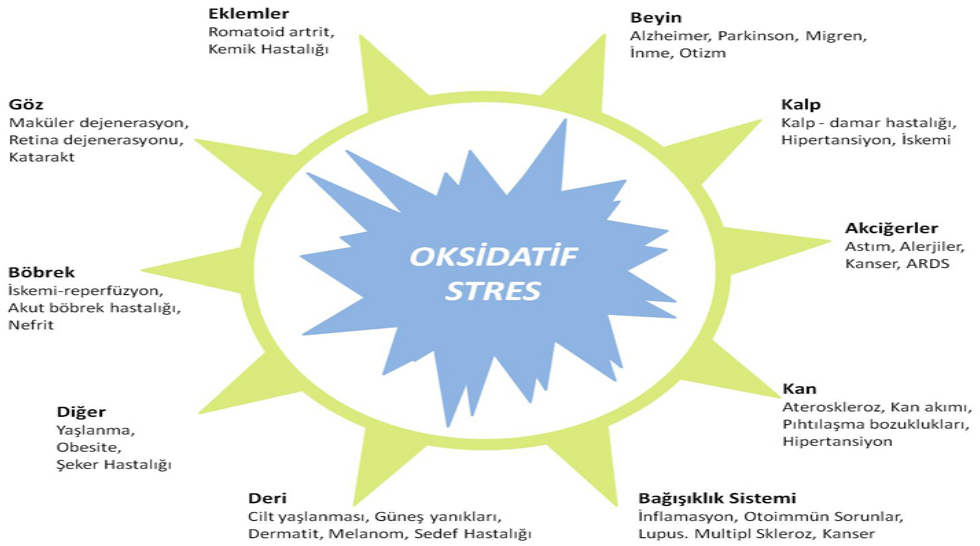
g) Steroid ve yaş pigmenti olarak adlandırılan bazı maddelerin birikmesi,

h) Proteinlerin zarar görmesi ve protein "turnover" nin yükselmesi,

i) Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiol/disülfit oranının değişmesi,

j) Kollojen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerlerde aterofibrotik değişikliklerin meydana gelmesi,

k) Mukopolisakkaritlerin yıkımı şeklinde sıralanabilir (Uysal, 1998).



Şekil 1.18. Oksidatif Stres (www.oksantest.oksante.com.tr)

Serbest radikallerin yol açtığı oksidatif stres hücrelerde ve dokularda birçok zarara yol açarlar. Oksidatif stresin neden olduğu hücresel zararlar arasında DNA hasarı, enzim aktivitelerinde ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler, lipit peroksidasyonu yoluyla zar yapısı ve fonksiyonlarının bozulması, zar proteinlerinin ve taşıyıcı proteinlerin tahribi yer almaktadır. Serbest radikallerin yaşlanma, ateroskleroz, kanser, iskemi reperfüzyon, inflamasyon, romatoid artrit, nörodejeneratif hastalıklar, karaciğer hastalıkları gibi birçok patolojik durumda etken rol oynadığı kabul edilmektedir.

1.4.3 Mangan Süperoksit Dismutaz

Birincil antioksidan kategorisinde yer alan süperoksit dismutaz enzimi (SOD), glutatiyon peroksidaz (GSHPx) ve katalaz gibi enzim sistemleri serbest radikalleri yok etme yeteneğinde olan bir enzimdir. Bu enzimler genel olarak serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidler gibi hücresel bileşenlere zarar vermesini önlemek amacıyla, radikallerin bir hücresel bölgeden diğerine geçişini de engelleyebilmektedirler (Diplock 1998).

Bu enzim, süperoksit anyonunun ($\cdot O^{2-}$), hidrojen perokside (H_2O_2) ve oksijene dönüşümünü katalize ederler ve böylece bu radikallerin etkisini azaltırlar. Bu

dönüşüm olayında SOD enziminin aktif bölgesini oluşturan Mn minerali önemli rol oynamaktadır.

$$\bullet O^{2-} + \bullet O^{2-} \xrightarrow[SOD]{2H^+} H_2O_2 + O_2$$

Bu reaksiyon, süperoksit anyonunun pH 11 ve altında oldukça stabil olmasına rağmen, enzim katalizi olmasa bile normal fizyolojik pH değerlerinde oldukça hızlı yürümektedir. Bununla birlikte, gerçekte tüm aerobik organizmaların SOD içerdiği belirlenmiştir. SOD enzimi reaksiyon hızını artırmak için yeterince güçlü bir katalizdir. Süperoksit anyonu ($.O^{2-}$) da, H_2O_2 gibi bir oksidan olarak çoğu organik bileşikle direkt olarak reaktif değildir ancak muhtemelen daha reaktif ve yüksek toksisiteye sahip oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Tütün bitkisinin yaşlı yapraklarında membran zararlanmasının bir işareti olarak SOD ve katalaz enzim aktiviteleri azalma göstermektedir. Bu iki enzimin aktivitesi ve yapraklardaki lipid peroksidasyonunun derecesi arasında çok açık bir korelasyon belirlenmiştir. Bu enzimlerin, yaprağı lipid peroksidasyonunun zararlı etkilerinden korumada önemli rolleri olduğu ileri sürülmektedir (Larson 1988).

Kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre üç sınıf dismutaz enzimi vardır:

(a) Bakır ve Çinko içeren dismutazlar (Cu, Zn SOD) genel olarak ökaryotik hücrelerin sitozolünde ve kloroplastlarda bulunur. Tek disülfit bağı ile birbirine bağlı iki aynı alt birimden oluşur ve alt birim başına birer çinko ile bakır içerirler. Enzimin etkinliği için bakır mutlaka gerekli iken çinko; Co^{2+}, Hg^{2+}, Ca^{2+} ile yer değiştirebilir. Dismutasyon bakır ile süperoksit radikali arasındaki etkileşimle başarılır.

(b) Mangan içeren dismutazlar (Mn SOD) prokoryotlarda ve mitokondri matriksinde bulunur. Birbirinin aynı iki alt birimden oluşan ve her alt birimde bir atom Mn içeren dismutazlardır.

(c) Demir içeren dismutazlar (Fe SOD) prokaryotlarda ve bazı bitkilerde bulunur. Mn süperoksit dismutaza benzer yapıdadır.

1.5 DNA

1.1.1 Genetik Polimorfizm

Bir genin belli bir bölgesinde meydana gelen alternatif kopyalarından her birine allel denir. Genel populasyonda alellerde bir karakter için iki veya daha fazla varyasyon bulunuyorsa ve bu varyasyonların her biri toplumda %1'den daha fazla sıklıkla görülüyorsa bu bireyler arasında bir fiziksel farklılık, hastalıklara eğilim veya direnç bakımından bir farklılık oluşturuyorsa bu duruma "genetik polimorfizm", bulunma sıklığı %1'den daha az sıklıkta ise bu genetik değişikliklere "genetik mutasyon" denir. Polimorfizmler doğrudan hastalıklara neden olmayıp canlıların üreme potansiyelini etkilemezler, bu nedenle nesilden nesile aktarılabildiklerinden dolayı frekansları fazladır. Mutasyonlarda ise canlıların üreme potansiyelleri ve canlılıklarını sürdürebilme özelliklerini doğrudan etkilendiğinden toplumdaki frekansları fazla değildir (Gonzalez, 1999).

1.5.1.1 Polimorfizm Çeşitleri

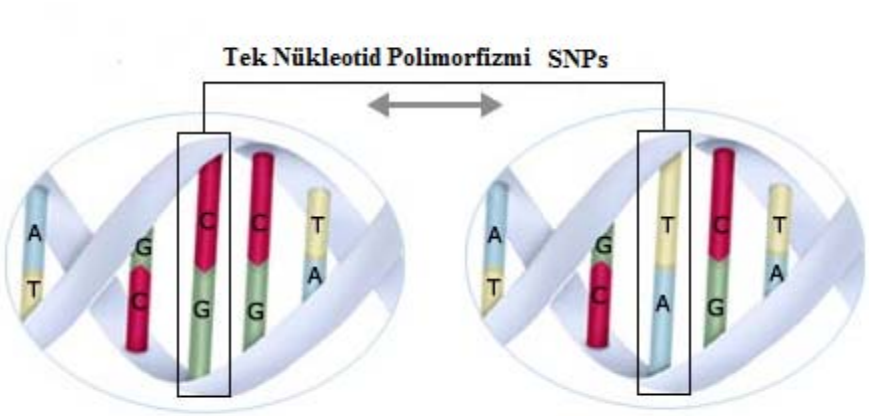
Polimorfizmler, genetik yapıda meydana gelen küçük değişimlerdir ve toplumun en az % 1'inde görülürler. Örneğin, bir genetik "harf" (genetik kodu oluşturan bir birim) bir diğeri ile yer değiştirebilir. Polimorfizmler vücutta değişik süreçlere neden olabilirler, sadece bir genetik harfi etkilerse buna "tek nükleotid polimorfizmi" (SNP) denir.

SNP'lerin yanı sıra, delesyon/insersiyon adı verilen polimorfizmler de bulunmaktadır. Bu prolimorfizmlerde genin bir kısmı veya tamamının 'silinmesi' yani bulunmaması söz konusudur. Bu durumda genin 'silinmiş' versiyonuna 'delesyon', 'silinmemiş' versiyonuna ise 'insersiyon' adı verilmektedir.

1.5.3.1.1 Tek Nükleotid Değişim (Single Nucleotide Polymorphism:SNP)

SNP'ler genetik bir lokusta farklı alleller oluşturacak biçimde spesifik bir bölgedeki bir baz veya bazlarda meydana gelen nokta mutasyonlarının neden olduğu polimorfizmlerdir (Şekil 1.18.). SNP insan genomundaki en basit ve en yaygın genetik polimorfizm çeşididir. Çoğunlukla her iki allelde de meydana gelir (Öktem

S. ve ark.,2001). Bir kişideki kromozom ile diğer kişideki aynı kromozomu karşılaştırdığımız zaman aradaki fark tahmini olarak $7.51x10^{-4}$ olarak karşımıza çıkmaktadır (Miller R. ve ark, 2001). Buda bize ortalama her 1000 bazda bir nükleotit değişiminin ortaya çıktığını göstermektedir (Öktem S. ve ark.,2001). İki X kromozomunu ve iki Y kromozomunu farklı kişilerde karşılastırdığımız da X ve Y kromozomlarında sırasıyla her 2.132 ve 6.625 baz da bir tek nükleotit değişiminin görüldüğü karşımıza çıkmaktadır (Miller R. ve ark, 2001).



Şekil 1.17. Tek nükleotid polimorfizm (http://www.mygenetree.com/images/img-snps.jpg).

Varyasyonun SNP olduğunun düşünülebilmesi için, populasyonun en az %1' inde bulunması gerekmektedir. SNP'ler insan genetik varyasyonlarının %90'ını oluştururlar. Polimorfizimler genin farklı kalıtsal formlarını veya genomun farklı bölgelerini ayırt edebilmek için kullanılmaktadır (Öktem S. ve ark.,2001).

2001 yılında tamamlanan insan genom projesi'nden sonra birbiriyle ilişkisi olmayan farklı bireylerin genomları arasında %99'dan fazla benzerlik olduğu anlaşılmıştır (Venter ve ark., 2001; Sachidanandam ve ark., 2001). Genom içerisindeki bu farklılık kodlanan ve kodlanmayan bölgelere dağılmasına göre tahmini 4,5 milyon tek nükleotid polimorfizimden meydana gelmektedir Aynı zamanda bu farklılıklar bireylerin birçok açıdan farklı niteliklerine sahip benzeri olmayan bireyler olmasında etkili bir rol oynamaktadır (Gareth ve ark., 2005). A ve G insanlarda en çok gözlemlenen tek nükleotit değişimidir. İnsanda tek nükleotit

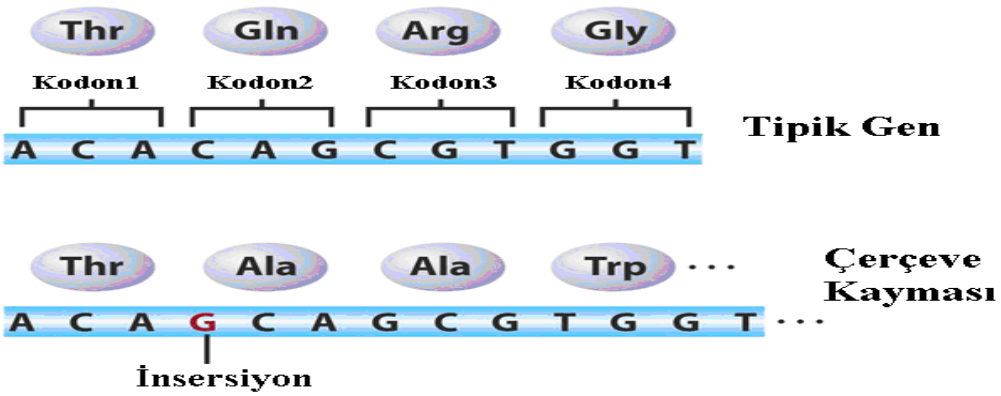
değişimlerinin dağılımı incelediğinde %63 A/G (ve T/C), %17 A/C (ve T/G), %8 CG, %4 AT ve %8 insersiyonu ve delesyonları saptanmıştır (Miller R. ve ark, 2001). Tek nükleotid değişim polimorfizminin bazı alt grupları vardır.

Dizi içindeki bir pürin bazının (A, G) diğer bir pürin bazına veya bir primidin bazının (T, C) diğer bir pirimidin bazına dönüşmesine **transisyon** denir. Dizi içindeki bir pürin bazının (A,G) bir primidin bazına (T,C) veya bir primidin bazının bir pürin bazına dönüşmesine **transversiyon** denir (Şekil 1.19.).



Şekil 1.18. Transisyon ve transversiyonla tek nükleotid değişim oluşumunun şematik gösterimi.

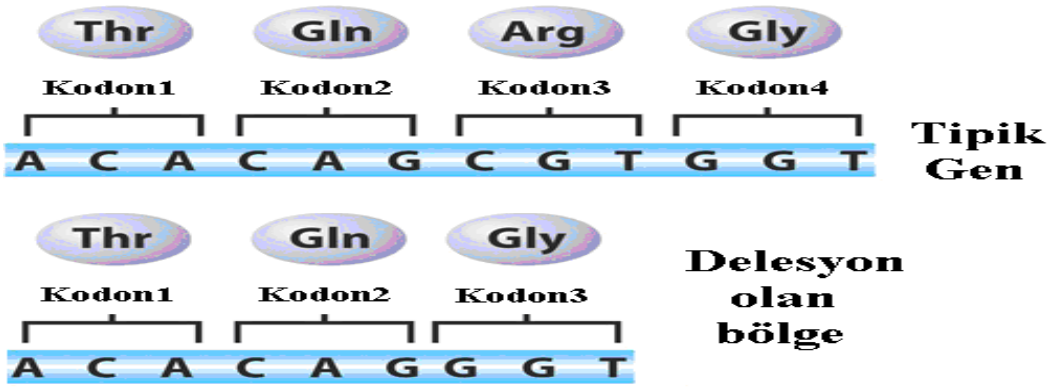
DNA içerisine tek bir nükleotid ya da nükleotidlerin eklenmesine **insersiyon** denir. Nükleotidlerin eklenmesi, genin normal uzunluğundan daha uzun olmasına sebep olur. Bu protein kodlayan bir gen ise, proteinin amino asit dizisinde artış söz konusudur (Şekil 1.20.).



Şekil 1.19. İnsersiyonla (nükleotid eklenmesi) şematik gösterimi (http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/mutationtypes?show=insertion).

İnsersiyonla tek bir nükleotid eklendiğinde bile çerçeve kayması meydana gelerek tüm proteinin amino asit dizilimi değişebilir bu nedenle sentezlenecek olan proteinin tamamen yapısı bozulabilir

DNA dizisi içerisinden tek bir nükleotidin ya da nükleotidlerin kırılıp birbirinden ayrılması **delesyon** denir. DNA üzerindeki bir delesyon, genin normal uzunluğundan daha kısa olmasına sebep olur (Emir ve Özden, 2006) (Şekil 1.22).



Şekil 1.20. Delesyon ile amino asit eksilmesinin şematik gösterimi (http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/mutationtypes?show=deletion).

1.5.3.1.1.1 SNP'lerin Protein Oluşumu Üzerine Etkileri

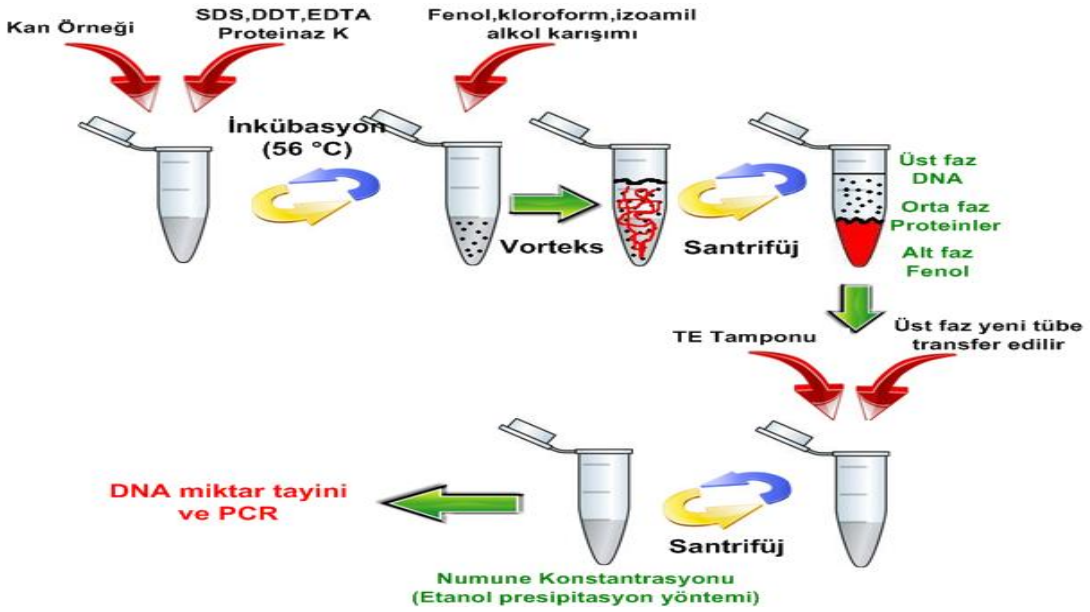
Tek nükleotid polimorfizmi; DNA üzerindeki bulunduğu bölge ve oluş şekline göre, proteinin yapısı ve işlevi üzerinde değişik etkiler oluşturabilmektedir. Kodlanan bölgede oluşan sessiz (silent) bir SNP, protein farklılığı oluşturmuyorsa, üretilen proteinin yapı ve fonksiyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmayacaktır. DNA üzerinde oluşan bir SNP, raslantısal olarak "Dur" kodonunu (TAA, TAG, TGA) meydana getiriyorsa, SNP'nin bulunduğu yerden itibaren amino asit üretimi duracak ve yarım kalan protein aktif olarak işlevini yerine getiremeyecektir. SNP, bir genin üretimi ile ilgili düzenlemeleri içeren promotor bölgede oluşuyorsa, transkripsiyonla oluşan mRNA seviyesi ve durağanlığı, dolayısı ile gen ekspresyon seviyesi farklı olacaktır (Williams ve Hayward, 2001).

1.6 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda amaç DNA yapısının analizi DNA hibridizasyonu, DNA analizi, PCR'a dayanan metodlarla, polimorfizm çalışmaları ve gen klonlanması gibi genetik araştırmalarda büyük moleküler ağırlıktaki, saflaştırılmış genomik DNA'nın temiz ve yeterli derecede elde edilmesidir. DNA laboratuvarlarında DNA izolasyonu için üç farklı metot kullanılmaktadır: Fenol-Kloroform İzolasyon, Chelex İzolasyon, FTA Kagıt ve Silika Yönetemi. Biyolojik materyalin özelliğine göre DNA izolasyon metotu farklılık gösterir. Kan lekesi veya kemik dokusu birbirinden farklı metotlarla izole edilir. DNA ekstraksiyon işlemi yapıldıktan sonra tris-EDTA tamponu içerisinde ve -20^{0}C'de saklanır (Butler, 2005)

1.1.1 Fenol kloroform İzolasyonu

Fenol kloroform izolasyonu en çok tercih edilen yöntemlerin başında gelir. Fenol ile proteinler ve DNA parçaları birbirinden ayrılır ve uzaklaşmaları sağlanır. Fenol proteinlerin sekonder yapısını parçalayan denatüre edici bir ajandır. Fenol kloroform izolasyonu birçok kimyasalın arka arkaya eklenmesi ile gerçekleştirilir (Şekil 1.23.).



Şekil 1.21. Fenol-Kloroform İzolasyon Yöntemi (Butler, 2005).

1) **Sodyum dodesil sülfat (SDS):** SDS bir tür deterjandır. Proteinlerin disülfit bağlarını kırarak proteinlerin 3D yapısını bozarak çekirdek membran yapısını bozar ve çekirdeğin parçalanmasına yol açar.
2) **Proteinaz K:** Proteinlerin degrede olmasını sağlar. 56 derecede yarım saat inkübe edilir. İnkübasyonun sebebi çekirdek membranlarının parçalanmasını sağlamaktır.
3) **EDTA:** Sıvı kanlarda pıhtılaşmayı önlemek içim kullanılır. EDTA pek çok nükleaz için gerekli olan Mg iyonlarına bağlanır. Böylece DNA nükleazlardan korunmuş olur.
4) **NaCI:** NaCI bir tuzdur. Nükleaz tamponu olarak kullanılır.
5) **TE BUFFER:** Tris- EDTA buffer istenen ph'da solüsyonları tutmak için.
6) **Fenol Kloroform:** Fenol ve kloroform proteinlerin sekonder yapısını parçalayarak onların denatüre olmasını ve solüsyonda presipitasyonunu ve DNA'dan proteinlerin ayrılmasını sağlar. Hücre lizis aşamasından sonra santrüfüj edildiğinde, üst fazda daha küçük olan DNA molekülleri alt fazda da proteinler ve diğer hücre bileşenleri yer alır.
7) **ETOH:** DNA alkol içerisinde çözünemez. Böylelikle DNA'ya alkol konulduğunda, DNA'nın çökmesi sağlanır. DNA iplikleri oluştuktan kısa bir süre sonra alınmalıdır ki DNA'nın denatürasyona uğraması engellenmiş olur.

Deney hazırlanırken DNA tercihen buz üzerinde tulmalıdır. Etanol presipitasyonundan sonra genomik DNA'nın çok fazla kurutulmasından sakınılmalı; oda ısısında kurtulmasu sağlanmalıdır. Tris içeren tamponlarda çözülmeli. Suda çözdürülen DNA asit hidrolizlerin hedefi olduğu için tercih edilmemelidir. Çözünmesine yardımcı olmak için tüp hafifçe ters yüz edilebilir. Genomik DNA vortekslenmemelidir.

1.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR)

İlk defa 1985 yılında Kary Mullis tarafından bulunmuş ve araştırmacı bu buluşu ile 1993 yılında kimya dalında Nobel Ödülünü kazanmıştır (Kubista ve ark., 2006). PCR, sıradan bir organizmaya ait DNA'daki dizisi bilinen herhangi bir bölgenin çoğaltılmasını sağlayan hücre-dışı (in vitro) bir DNA çoğaltma metodudur. İzole

edilen DNA veya patolojik bulgu üzerinde bulunan DNA'nın, istenilen bölgesinin uygun primerler vasıtasıyla, enzimatik reaksiyonlarla çoğaltılması PCR metodunun prensibini oluşturmaktadır (Dinkel A. ve ark., 2004).

PCR analizi; moleküler genetik, insan biyolojisi, farmakoloji, toksikoloji, gibi çok geniş disiplinlerde; farmakogenetik ve toksikogenetik çalışmalarda, mutasyon ve polimorfizm çalışmalarında, adli tıp'ta, hücre dışı mutasyon oluşturulmasında, genetik bozuklukların teşhisinde, sekanslama amacıyla DNA hazırlanmasında, enfekte hastalıklarda virüs ve bakterilerin teşhisinde, fosillerden DNA amplifiye edilmesi ve evrimin aydınlatılmasında, onkogenlerin belirlenmesinde, doğum öncesi genetik teşhis konulması gibi çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Butler, 2005; Wright ve Wynford-Thomas, 1990).

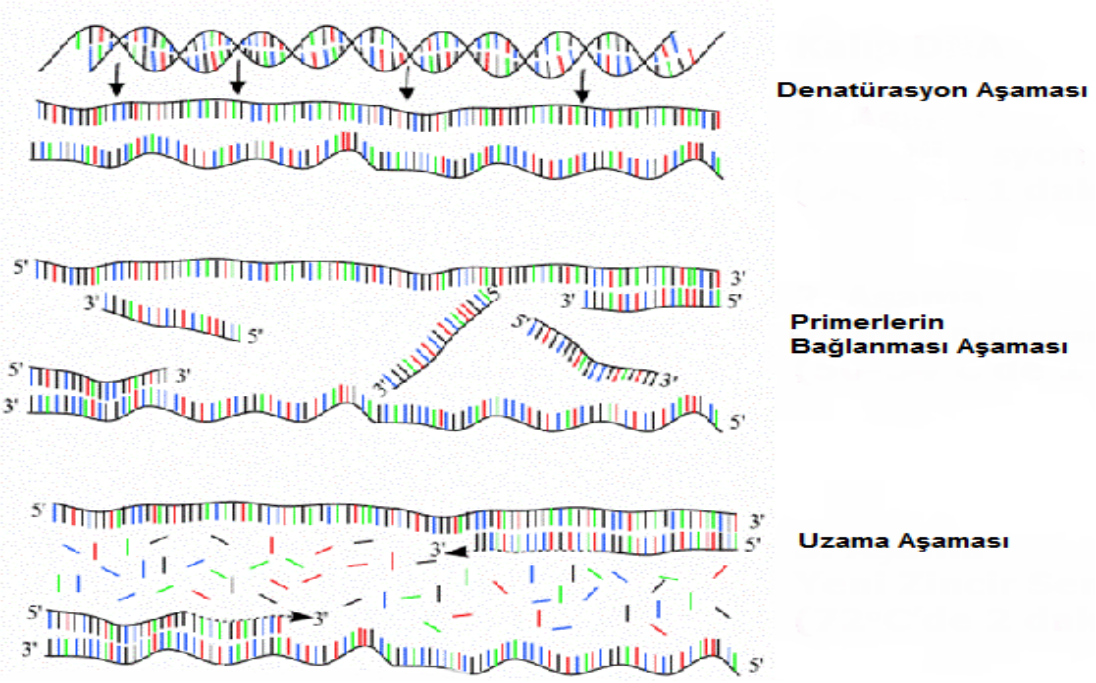
1.1.1 PCR'ın Aşamaları

PCR aşamaları: Denatürasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve amplifikasyon (extension) olmak üzere üç aşamada gerçekleşmektedir (Dinkel A. ve ark., 2004)

1- **Denatürasyon Aşaması:** Çoğaltılacak olan çift sarmal haldeki DNA'nın denatüre edilerek tek sarmal haline getirildiği bu aşama, 90- 95 ^{0}C'de 5- 15 dakikada yapılmaktadır (Şekil 1.23.).

2- **Primerlerin bağlanması (Annealing) Aşaması:** Primerlerin açılan DNA zincirlerinde hedef bölgeye bağlanması (anneling) cihazda sıcaklık primerlerin Tm değerine göre 50-70 ^{0}C arasında bir değere düşürülür. Primerler; 17- 30 nükleotid uzunluğunda, çoğaltılmak istenen DNA bölgesine spesifik ve DNA sentezini meydana getiren DNA polimeraz enziminin senteze başlaması için 3'- hidroksil gruba sahip sentetik oligonükleotitlerdir. İşlem sırasında kendilerine özgü spesifik bölgeye bağlanırlar ve bu bölgeler DNA bölgesinin çoğalmaya başladığı noktadır. Bu aşama ise baz uzunluğuna göre 30- 60 saniye kadar sürmektedir (Şekil 1.23.).

3- Primerlerin Uzatılması (polimerizasyon, extention, elongation) Aşaması: 72 °C civarında gerçekleşir. Isıya dayanıklı bir DNA polimeraz olan Taq polimeraz reaksiyon ortamına ilave edilir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5'ten 3'e doğru ekleyerek primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli bir kopyasını oluşturur (Şekil 1.23.)



Şekil 1.23. PCR'ın aşamaları (https://genotyping.files.wordpress.com/2007/03/pcr.gif sitesinden düzenlenmiştir).

Her döngü koşullara bağlı olarak değişir ancak ortalama 5 dk. sürer ve istenildiği kadar tekrar edilir. DNA parçaları geometrik olarak artar. Teoride özgül DNA parçası; devir sayısı (n) ve başlangıçtaki hedef sayısına (t) bağlı olarak yaklaşık $tx2^n$ sayısına ulaşır. Böylelikle incelenecek bölgenin milyarlarca kez çoğaltılmasıyla PCR ürününün kolay analiz edilmesi olanaklı hale gelir (Kubista M. ve ark., 2006; Bozkurt G., ve ark., 2000; Nelson D., 1991; Siqueira J., 2003; Butler, 2005).

1.7.4 PCR Bileşenleri

PCR işlemi için önemli beş madde vardır: kalıp DNA örneği, çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan saran primer, deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP), yüksek ısıya

dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi ve kullanılan DNA polimeraz için uygun bir tampon çözeltilerdir (Wilson, 1997).

1) **Kalıp DNA örneği:** Nükleer, mitokondriyal veya bakteriyal DNA olabilir. DNA herhangi bir biyolojik örneklerden (kan, kıl, tükürük, sperm, vajinal sıvılar, tırnak ve doku) elde edilebilir.
2) **Primerler**: Bir amplifikasyonda Forward (Up-stream) ve Reverse (Down-stream) olmak üzere iki primer kullanılır. Primerler 18-15 bp uzunluğunda amplifiye edilecek hedef DNA'ya bağlanabilen oligonükleotidlerdir. Primer seçiminde dikkat edilmesi gereken özellikler:
    - Primerler 18-25 bp uzunluğunda olmalı,
    - Sadece amplifikasyonu yapılacak bölgeye olmalı,
    - PCR yapılacak hedef bölge 100-1000 bp uzunluğunda olmalı,
    - Primerlerin bağlanma sıcaklıklarının benzer olması için, içerdikleri pürin ve pirimidin bazları birbirine yakın sayıda olmalı
    - Primer dizisinde kendi içinde bağlanmaya neden olacak dizi bulunmamalıdır. (Pusterla ve ark., 2006).
3) **dNTP'ler (A,T,C,G):** Guanin, Adenin, Timin, ve Sitozin bazlarını içerir.
4) **Taq DNA Polimeraz enzimi:** *Thermus Aquaticus* adlı bakteriden izole edilmiş, sıcaklığa oldukça dayanıklı bir enzimdir. DNA amplifikasyonunda primerlerin olduğu bölgeyi tanır ve kalıp DNA'yı rehber alarak dNTP'leri doğru bir şekilde sırasına göre takar ve target DNA'nın eşini oluşturur.
5) **Tampon karışımı:** Tampon içerisinde Tris, magnezyum (Mg), KCl, çeşitli deterjanlar ve tuzlar bulunur. KCl, Taq polimeraz'ın sentez hızını artırmaktadır. $MgCl_2$, PCR reaksiyonunda kofaktör olarak kullanılır. Reaksiyon sonucunda miktarsal olarak azalmaz. Çok kullanıldığında, Taq DNA polimeraz hızlı bir şekilde bazları takmaya başlacak ve yanlışlık yapacaktır. Az kullanıldığında ise, Taq DNA polimeraz bazları takmada yavaş kalacak ve istenilen kalitede DNA kopya sayısına erişilemeycektir.

Çizelge 1.2. Standart bir PCR'da bulunması gereken bileşenler ve miktarları.

Bileşen	50 µl'lik Reaksiyon Tüpündeki Konsantrasyon
10X PCR Buffer	1X
$MgCl_2$ (25mM stok çözelti)	1-5Mm
dNTP mix	Her birinden 0.2 mM
Primer 1	0.2-0.5 µM
Primer 2	0.2-0.5 µM
Taq DNA Polimeraz	1.25-2.5 Unit
Genomik DNA	200 ng

1.8 RFLP (Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi: Restriction Fragment Length Polymorphism) Yöntemi

Çift sarmal yapılı DNA'da belli bölgeler kesilerek, DNA'dan bir genin veya gen taşıyan bir DNA'nın çıkarılmasında etkili olan enzimlere restriksiyon enzimleri denir. DNA bu enzimler dolayı kesime uğratıldıktan sonra agaroz jel elektroforezine tabi tutulur ve sonra standart ethidium bromid ile boyanan jelde oluşan DNA bandlarının yeri ve sayısı mukayese edilmesi işlemine Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) adı verilir (Xue H. ve ark., 1993; McManus D. ve ark.,1994).

DNA 4-6 baz çifti uzunluğundadır ve yapısında nükleotidlerin sıralanması ve nükleotid yapısındaki kesim noktasının durumuna göre farklılık oluşturmaktadır (Green K., 1998).

Restriksiyon enzimleri kesim işlemini gerçekleştirir ve agaroz jelde farklı uzunlukta bant aralıklarına, mutasyon bölgeleri, gen polimorfizmler, delesyon ve insersiyon gözlemlenebilir. Restriksiyon enzimleri yalnızca işlem yapılacak bölgeye karakterize olurlar (Dowling ve ark., 1996).

Genetik mutasyonlar çağımızın önde gelen problemlerinden biridir, oluşan mutasyonlarla vücutta bazı proteinler fonksiyonlarını kaybetmekte ve buna bağlı olarak vücutta birtakım hastalıklar meydana getirmektedir. Talasemili bireylerin biyolojik örneklerinden yapılan MnSOD Ala16Val gen polimorfizm analizleri talasemili bireyler hakkında çalışanların mutasyon maruziyeti hakkında bilgilendirilmesi açısından önemlidir. MnSOD Ala16Val C/T tek nükleotid polimorfizm frekansı talasemililerde kontrol gruplarında bilinmemektedir ve bununla ilgili bir çalışmanın olmaması göz önüne alınarak, çalışmamızda, talasemili hastalarda MnSOD Ala16Val (rs4880) tek nükleotid polimorfizminin belirlenmesi, bu polimorfizmin hasta bireylerde ve konrol gruplarında genotip ve alel frekanslarının belirlenmesi ve cinsiyet ile ilişkinin olup olmadığının tespit edilmesi amaçlandı.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 MnSOD Gen Polimorfizmi

2.1.1 Gereçler

2.1.1.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Doku DNA izolasyon kiti	Qiagen
Restriksiyon Enzimi (BSawI)	Neb (New England Biolab)
Primerler	Alpha DNA, Montreal
Etanol	Merck
Agaroz	Prona
Trizma Base	Merck
Borik asit	Merck
EDTA	Merck
DTT	Sigma
Etidyum Bromür	Applichem
6X loading çözeltisi	Qiagen
Saf etanol	Scharlau, Dop
DNA’s RNA’s free water	Qiagen
Hot Star Taq DNA polimeraz	Qiagen
Fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1)	Applichem
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Applichem
Sodyum klorür (NaCl)	Merck
Proteinaz K	Merck
100 bp ladder	Fermentaz
Triton X	Scharlau

2.1.1.2 Kullanılan Araç ve Gereçler

Laminar Flow kabin	Esco
Thermal Cycle PCR cihazı	Techne Tc 512

Jel Görüntüleme cihazı	Syngene
Yatay elektroforez cihazı	Scie-Plas
Güç Kaynağı	Bio-Rad
Su banyosu	Nüve Bm 402
Otoklav	Nüve
Soğutmalı santrifüj cihazı	Hettich
Mikrodalga fırın	Arçelik
Elektrikli hassas terazi	Schimadzu Libror
Vorteks karıştırıcı	Biosan
pH metre	Mettler Toledo
Laptop Cooler (–20°C)	Sigma
1.5 ml. ve 0.2 ml'lik ependorf steril tüpler	Axygen Genuine
pirojen free filtreli, pipet uçları (10 µl, 100 µl, 1000 µl.)	Finntip
Otomatik mikropipet	Ependorf, Thermo, Tipor-V
Etüv	Memmert
Santrifüj	Heraeus Sepatech Labofyge 200
Manyetik Karıştırıcı	Mirak
Ph metre	Seven Multi Mettler Toledo
Su Purifikasyon Sistem	Human Up 900
Mikrodalga fırın	Mars X Press
Hassas terazi	Mettler Toledo 4 Digit

2.1.2 Hasta Rızası

Bu incelemede yer alan tüm talasemili hastalar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulları Araştırma Projesi Bilgi ve Taahhüt Formunda belirtilen kurallara göre hazırlanmış ve Bilgilendirilme Onam Formları doldurularak incelemeye alınmıştır.

2.1.3 Yöntem

Tez çalışmamız için sürekli kan transfüzyonu yapılan 25 kadın ve 25 erkek toplamda 50 talasemili hastadan ve yine 25 kadın ve 25 erkek toplamda 50 kontrol numuneleri alındı. En az bir yıldır düzenli kan transfüzyonu yapılan hastalar incelemeye alındı. Alınan bu kan numunelerinden DNA izole etmek için kullanıldı.

2.1.3.1 Sıvı Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Moleküler incelemelerin yapılması için DNA'nın saf olarak elde edilmesi gerekmektedir. Bazı kimyasal maddeler ve enzimler yardımı ile hücre duvarı, hücre zarı ve proteinlerin uzaklaştırılması ile DNA'nın saf elde edilmesi işlemi DNA İzolasyonu olarak adlandırılmaktadır. DNA ekstraksiyonu için başlıca Chelex İzolasyonu, Fenol- Kloroform İzolasyonu veya FTA Kağıt İzolasyon yöntemleri bulunmaktadır. Çalışmamızda Fenol- Kloroform yöntemi ile izolasyon yapılmıştır. Yöntemde kimyasallar ve enzimler ile DNA ekstrasiyonu yapılmaktadır (Wang, 2012; Ghatak, 2013). Fenol-Kloroform İzolasyon yönteminde kullanılan kimyasallar, enzimler ve kullanım amaçları Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Fenol- Kloroform İzolasyon yönteminde kullanılan enzim, proteinler ve görevleri.

Kullanılan Kimyasal/ Enzim	Görevi
Fenol	Protinleri denatüre ederek, proteinlerin DNA'dan ayrılmasını sağlamak
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) ve Proteinaz K	Hücra duvarını parçalamak, kromozomlar içinde bulunan DNA' yı koruyan proteinleri parçalamak
Fenol	Proteinleri bağlar
Kloroform	Fenolü ve fenolün kendine bağladığı proteinleri bağlayarak uzaklaştırır
İzoamil alkol	DNA'nın sulu faz içinde ayrılmasını sağlar
Saf Etanol	Ortamdaki su molekülleri ile rekabet ederek DNA'nın çökmesini sağlar
%70' lik alkol	Na^+ gibi tek değerlikli katyonlar ve tuzların çözünerek ortamdan uzaklaşmasını sağlar

Sıvı kan örneklerinden nükleer DNA'yı açığa çıkarabilmek için fenol- kloroform-izoamil- alkol izolasyon yöntemi uygulanmıştır. Yöntemin basamakları;

1. Kan örneklerinden 100 µl alınıp 1,5 ml'lik ependorf tüplerine konulmuştur.

2. 1000 µl Tris-EDTA (TE) tüpe ilave edilerek karışım 12000 rpm'de 1dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Alt faz 100 µl kalıncaya kadar süpernatant (üst faz) atılmıştır. TE ile yıkama işlemi tüp dibinde kalan peletin uçuk pembe- beyaz bir renk alıncaya kadar (ortalama olarak 3 defa) işleme devam edilmiştir.

3. Pelet üzerine;
   - 1M' lık NaCl'den 45µl,
   - %20' lik SDS'den 40 µl,
   - 400 µl Tris-EDTA ve
   - 10µl proteinaz K ilave edilerek vortekslenmiştir.

4. Karışımlar 56^0C' lik su banyosunda 1,5- 2 saat inkübasyona bırakılmıştır.

5. Sırasıyla 25:24:1 oranında hazırlanmış fenol-kloroform ve izoamil-alkol karışımından 500 µl ilave edilmiş ve karışım ayran rengi görünümünü alana kadar kısaca vortekslenmiştir.

6. 2500 rpm'de 2 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra fenol proteinleri çöktürülür, kloroformda fenolü kendisine bağlar ve pelet oluşumu gerçekleşir.

7. Alt faz hareket ettirilmeden süpernatant yeni bir ependorf tüpüne alınır, tüpler üzerine numaralandırma yapılmıştır.

8. Tüplere 1000 µl soğuk saf etanol ilave edilerek 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

9. Tüplerde bulunan tüm alkol pelete zarar vermeden dikkatli bir şekilde atılmıştır.

10. %70'lik oda sıcaklığındaki etil alkolden 500 µl ilave edilerek, 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

11. Daha sonra tüm alkol dikkatli bir şekilde atılmıştır.

12. Tüpün dibinde kalan alkolün uçması için gece boyunca laminar kabin içerisinde bekletilmiştir.

13. Tüplerdeki alkol tamamen uçurulduktan sonra 100 µl DNA's- RNA's free su ilave edilmiş ve DNA örnekleri analiz zamanına kadar – 20^0C'de muhafaza edilmiştir.

2.1.3.2 Agaroz Jel Elektroforezinde Genomik DNA'nın Yürütülmesi

Çalışmada kullandığımız 50 kontrol ve 50 hasta örneğinin tamamı, DNA izolasyon işleminden sonra agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Her bir örneğin DNA'larının izole edildiği görüldü.

2.1.3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Çalışmamızda, izole edilen DNA örneklerinden Glut1 gen polimorfizimlerini içeren gen bölgelerini çoğaltmak amacıyla TECHNE TC 512 Thermal Cycle cihazı kullanılmıştır. Gen bölgeleri cihaz ile 2^{35} defa çoğaltılmıştır.

Çalışmada kullanılan PCR bileşenleri, bileşenlerin stok konsantrasyonu, reaksiyondaki miktarları ve reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonları Çizelge 2.2.'te belirtildiği şekildedir.

Çizelge 2.2. PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları

PCR Bileşenleri	Stok konsantrasyon	Reaksiyona konulan miktar	25 µl'lik reaksiyon karışımındaki son konsantrasyon
10 X PCR Buffer	10X	2.5 µl	1X
dNTP karışımı	2mM	2 µl	200 Mm
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	

2.1.3.4 Primerler

DNA'da üretilecek bölgeler için spesifik olan (Forward:F ve Reverse:R) primerler kullanılmıştır. F ve R primerleri HPSF (High Performance Salt Free) yöntemi ile Montreal'deki Alpha DNA firması tarafından sentezlettirilmiştir.

Çizelge 2.3. MnSOD AlaVal16 gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan F ve R primerlere ait özellikler.

Glut1	**F Primer**	**R Primer**
	5'- CAGCCTGCGTAGACGGTCCC 3'	5'- CGTGGTGCTTGCTGTGGTGC-3'
Uzunluk	20 bp	20 bp
Erime Sıcaklığı Tm	67.5 ºC	68.6 ºC
Primerler arası Tm farkı	0.9 ºC	

2.1.3.5 PCR Programı

MnSOD gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılacak PCR programı Çizelge 2.4.'te verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.4. MnSOD Gen bölgesinin amplikasyonunda kullanılan PCR programı.

Aşama	°C	Süre (dakika)	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94	10	1
Denatürasyon	94	1	35
Bağlanma	60	1	
Uzama	72	1	
Son Uzama	72	5	
Bekleme	4	∞	-

2.1.3.6 PCR Ürünleri İçin Agaroz Jel Elektroforezinin Hazırlanması

Sıvı kan örneklerinden genomik DNA'nın başarılı bir şekilde izole edilip edilmediğinin belirlenmesi için %1' lik agaroz jel elektroforezi ile görüntüleme yapılmıştır.

1. 1,2 gram agaroz tartılarak 120 ml 1x TBE çözeltisinde çözülmüş ve mikro dalga fırında ağzı alimünyum folyo ile kapatılıp üzerine delikler açılarak kaynatılmıştır.
2. Kaynatılan çözeltinin sıcaklığı 50 – 60^0C'ye düşünceye kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir.
3. Çözeltiye 10 µl EtBr eklenir ve hafifçe çözelti pembeleşip homojen karışım sağlanıncaya kadar erlen çalkalanmıştır.
4. Karışım, jel tarakları ve bariyerleri yerleştirilen jel kaplarına dökülmüştür. Bu işlem sırasında karışım kalıba aktarılırken hava kabarcığının oluşmamasına özen gösterilmelidir, oluşmuş ise pipet ucu yardımı ile jel katılaşmadan kabarcıklar giderilmelidir.

5. Jelin katılaşması için oda sıcaklığında 30 – 45 dakika bekletilmiştir.
6. Jel katılaşınca taraklar ve bariyerler çıkartılmış ve kalıp elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jel kuyucuklarının, yürüme tankının katot elektrot (-) tarafına gelecek şekilde yerleştirilmesine dikkat edilmiştir.
7. Tank içine jelin üzerini 2- 3 mm kaplayıncaya kadar 1x TBE çözeltisinden ilave edilmiştir.
8. 15 cm uzunluğunda parafilm kesilerek buz kalıbı üzerine yerleştirilmiştir.
9. 1 µl 6x Jel Loading Buffer ve 8 µl PCR'da çoğalıtlan DNA örneği parafilm üzerine konulmuştur ve mikropipet yardımıyla pipetaj yapılarak homojenizasyon sağlanmıştır.
10. Karışım jel kuyucuklarına yerleştirilmiştir. Ayrıca, PCR ürünlerinin boyutlarını karşılaştırmak için her jele 100 bp DNA ladder yüklenmiştir.
11. Tankın kapağı kapatılarak, anot ve katot uçların bağlantıları takılmıştır.
12. Güç kaynağı 100 volt ve 70 ampere ayarlanarak, numuneler 1,5 saat jelde yürütülmüştür.
13. UV ışığı altında, jel görüntüleme cihazında sonuçlar değerlendirilmiştir.

2.1.3.7 PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi

Çalışmada MnSOD Ala16Val polimorfizmini belirlemek için PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri, BsawI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan restriksiyon enzimi, kesim koşulu ve PCR ürünlerinin söz konusu enzim ile kesilmesiyle elde edilen DNA fragmanlarının uzunlukları Çizelge 2.5.'de verilmiştir.

Çizelge 2.5. MnSOD Ala16Val gen polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan restriksiyon enzimi ve kesim ürünlerinin uzunlukları (bp).

Polimorfizm	Restriksiyon Enzimi	Kesim Ürünleri
MnSOD Ala16Val	zBsaWI	TT: 124+ 78 bp CC:202 bp CT: 202+124+78 bp

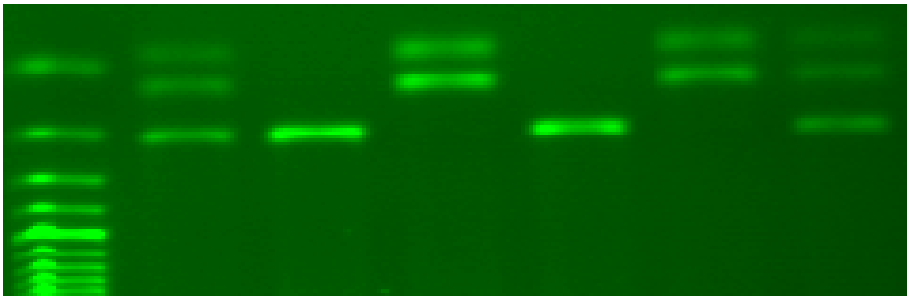
2.1.3.8 BsawI Restriksiyon Enzimi ile Kesim İşlemi

MnSOD Ala16Val polimorfizminin genotiplendirilmesi amacıyla, bir önceki aşamada çoğaltılan 202 bp' lik DNA dizisi, BsawI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Kesim işlemi için; 30 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. BsawI restriksiyon enzimi, ...W CCGGW... ve ...WGGCC W...dizilerini tanıyarak kesim yapar. Kesim işleminin meydana gelmesi için için 1,5-2 saat inkübasyon yapılmış ve 60°C'de bekletilmiştir.

BsawI restriksiyon enzimin kesim koşulları:

- 18 µl H_2O
- 2 µl Cutsmart(tampon)
- 0,4 µl BsawI
- 10 µl PCR ürünü olmak üzere,

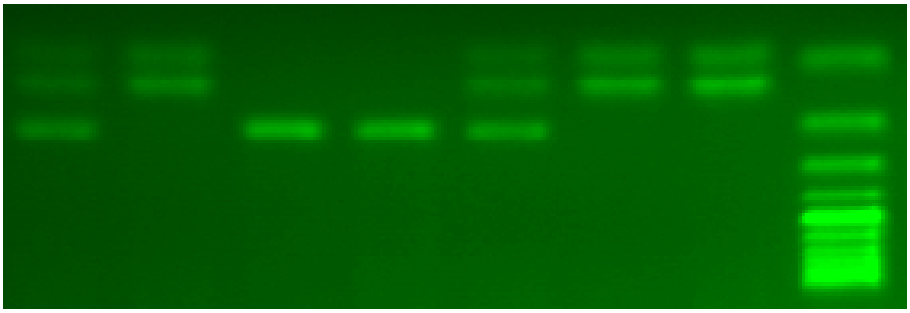
her bir örnek için toplam hacim 30 µl'dir.



M 1 2 3 4 5 6

Şekil 2. 1. Kesim ürünlerinin UV ışık altında gösterimi

- M: 100 bp ladder
- 1 ve 6: CT (202+124+78 bp)
- 2 ve 4: CC (202 bp)
- 3 ve 5: TT (124+78 bp)



1 2 3 4 5 6 7 M

Şekil 2. 2. Kesim ürünlerinin UV ışık altında gösterimi

- MnSOD
- M: 100 bp ladder
- 1,5: CT (202+124+78 bp)
- 3,4: CC (202 bp)
- 2,6,7: TT (124+78 bp)

3. BULGULAR

Çalışmada istatistiksel analizler SPSS V16 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Genlerin genotip ve alel frekansları çıkarılmış ve Hardy- Weinberg eşitliği (p^2+ 2pq+ q^2=1) hesaplanmıştır. Elde edilen değişkenler bakımından iki grubun karşılaştırılması için "Student T" testi ve bağımsız iki grubun karşılaştırılmasında ise "Oneway ANOVA" varyans analizi kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistik olarak nitel değişkenlerde oran, nicel değişkenlerde ise ortalama± standart sapma ve minimum ile maksimum değerler verilmiştir. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.1 Talasemili Hastalarda Demir Toksisitesi Maruz Kalan Bireylerde MnSOD Gen Polimorfizmin Analiz Sonuçları

MnSOD Ala16Val polimorfizminin genotipleri, agaroz jelde UV ışık altında farklı uzunluktaki 3 banda göre belirlenmiştir. 202 bp, 124 bp ve 78 bp uzunluğunda bant veren örnekler CC; 202 bp uzunluğunda bant veren örnekler, TT; 124 bp+78 bp ve 202bp+124bp+78 bp uzunluğunda bant veren örnekler ise CT olarak genotiplendirilmiştir.

Demir toksisitesine maruz kalan bireylerde (n:50), MnSOD Ala16Val polimorfizminin genotip frekansları %30 homozigot tipik (CC), %42 heterozigot (CT) ve %28 homozigot atipik (TT) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1.). Kontrol numunesi alınan bireylerde ise (n:50) MnSOD Ala16Val polimorfizminin genotip frekansları %10 homozigot tipik (CC), %52 heterozigot (CT) ve %38 homozigot atipik (TT) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.2.). Demir toksisitesine maruz kalan bireylerde (n:100), MnSOD Ala16Val polimorfizminin alel frekansları %51 C aleli, %49 T aleli olarak belirlenmiştir. (Çizelge 3.3.). Kontrol numunesi alınan bireylerde ise (n:10) MnSOD Ala16Val polimorfizminin alel frekansları %36 C aleli, %64 T aleli olarak belirlenmiştir. (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.1. Demir toksisitesine maruz kalan bireylerin MnSOD polimorfizmine ait genotip frekansları.

MnSOD AlaVal16 Polimorfizmi	**Genotip Frekansı (n:50)**	
	N	**%**
CC (Homozigot tipik)	15	30
CT (Heterozigot)	21	42
TT (Homozigot atipik)	14	28

Çizelge 3.2. Kontrol numuleri alınan bireylerin maruz MnSOD polimorfizmine ait genotip frekansları.

MnSOD AlaVal16 Polimorfizmi	**Genotip Frekansı (n:50)**	
	N	**%**
CC (Homozigot tipik)	5	10
CT (Heterozigot)	26	52
TT (Homozigot atipik)	19	38

Çizelge 3.3 Demir toksisitesine maruz kalan bireylerin MnSOD polimorfizmine ait genotip frekansları.

Alel (A/T)	**Alel Frekansı (n:100)**	
	N	**%**
C	51	51
T	49	49

Çizelge 3.4. Kontrol numuleri alınan bireylerin maruz MnSOD polimorfizmine ait alel frekansları.

Alel (A/T)	**Alel Frekansı (n:100)**	
	N	**%**
C	36	36
T	64	64

3.1.1 MnSOD Ala16Val C/T Tek Nükleot Polimorfizminin PCR Yöntemiyle Amplifiye Edilmesi

β-globin genleri (ε, γ, δ ve β) 11. kromozomun kısa kolu üzerindeki p14 bölgesinde yaklaşık olarak 50 kilobaz uzunluğundaki DNA bölgesindedir. Bu noktadaki, MnSOD Ala16Val C/T Tek Nükleotid Polimorfizmi tipik bireylerde nükleotid C iken, atipik bireylerde T'ya değişim göstermektedir. MnSOD Ala16Val (rs4880) gen polimorfizmi G**T**T: Val/Val formunu, G**C**T Ala/Ala formunu oluşturur.

Kullanılan primerler ile amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Çizelge.3.5).

Çizelge 3.5. PCR'da kullanılan primerler, kromozom üzerindeki lokalizasyonları ve amplifiye edilen bölgenin nükleotid dizilimleri.

Primerler	**11. Kromozomda Primerlerin Bağlandığı Nokta**	**Amplifiye Edilen Bölge**
		(160033743-160033944) (202 bp)
F PRİMER	5'- CAGCCTGCGTAGACGGTCCC -3' 160033743	5′CAGCCTGCGTAGACGGTCCC gcggcgctgactgaccgggc tgtgctttctcgtcttcagc accagcaggcagctggctcc ggtttggggtatctgggct ccaggcagaagcacagcctc cccgacctgccctacgact acggcgccctggaacctcac atcaacgcgcagatcatgc agctGCACCACAGCAAGCAC CA 3′
R PRİMER	5'- CGTGGTGCTTGCTGTGGTGC-3' 160033944	

3.1.1.1 DNA Örneklerinin Genotiplendirilmesi

Hasta ve kontrol gruplarına ait DNA örneklerinin genotiplendirilmesi, kesme sonrası jel analizi sonuçları baz alınarak yapılmıştır. Amplifiye PCR Ürünlerinin Kesilmesi ve DNA Örneklerinin Genotiplenmesi kesme sonrası jel analizlerinde üç farklı sonuç gözlendi. Bunlardan *CC* ve *TT* genotipleri homozigot olarak değerlendirilmektedir. *CC* genotipi, her iki allelinde de polimorfizm taşımaması açısından homozigot; *TT* genotipi, her iki allelinde de polimorfizm taşıması bakımından homozigottur. *CT* genotipi ise bir allelinde polimorfizm taşıyıp diğer allelinde taşımaması bakımından heterozigottur.

BsaWI enzimiyle kesme işleminin gerçekleştiği 202 bp'lik amplifikasyon ürününden; 202bp uzunluğunda bant veren örnekler CC, 124bp+78bp uzunluğunda

bant veren örnekler TT, 202bp+124bp+78bp uzunluğunda bant veren örnekler ise CT olarak genotiplendirildi.

3.2 Çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinin tespiti

Belirlenen sonuçlar açısından yaptığımız istatiksel analizler çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde uyumlu olduğu saptanmıştır.Hardy-Weinberg uygunluk hipotezinin istatistiksel olarak karşılaştırılması yapılıp χ^2 testi kullanıldı. Bu işlemler hasta ve kontrol mununeleri için ayrı ayrı yapıldı. Bunun neticesinde elde edilen bulgular Çizelge 3.6.'da ve Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Hastalar için çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti.

Genotipler	Hasta Sayısı (n:50)	
	Gözlenen	Beklenen
CC	15	13,01
CT	21	24,99
TT	14	12,00
Toplam	50	50
P	0,266	

Çizelge 3.7 Kontrol numuneleri için çalıştığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti.

Genotipler	Hasta Sayısı (n:50)	
	Gözlenen	Beklenen
CC	5	6,48
CT	26	23,14
TT	19	20,48
Toplam	50	50
P	0,540	

Elde edilen sonuçlara göre hastalar için populasyon gen bakımından Hardy-Weinberg dengesindedir $p>0.05$. Kontrol numuneleri için populasyon gen bakımından Hardy-Weinberg dengesindedir $p>0.05$.

Bir populasyonda alel frekansları Hardy-Weinberg dengesinde bulunur. Belirli sabit şartlar altında her iki alelin frekansının ve genotipik oranının stabil kalması durumudur. Bu genetik dengenin sağlanabilmesi için aşağıda belirilen koşulların olması gerekmektedir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda çalıstığımız populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olduğu bulunmuştur

a) Populasyon genetik analizler için yeterli sayıda olmalıdır.
b) Mutasyon gözlenmemelidir.
c) Populasyondan dışarı ve içeri fazla sayıda göç olmamalıdır.
d) Üreme tamamen rasgele olmalıdır.

Hardy-Weinberg dengesi ise;

$p^2 + 2pq + q^2 = 1$ eşitliği ile hesaplanmalıdır.

p: birinci alelin frekansı

q: diğer alelin frekansı. (Ayala ve Kiger 1980).

4. TARTIŞMA

Talesemi kalıtsal (genlerin ebeveynlerden çocuklara aktarılması) kan hastalıkları içerisinde yer alan, hemoglobin molekülünün üretimi süresince, globin zincir sentezlerindeki düzenlenme dengesizliklerine dayalı, globin zincir sentez bozukluğudur. Dengesiz, globin zincir sentezi düşük hemoglobin üretiminin başlıca nedenidir ve anemiye neden olur. Talesemi (özellikle beta-talasemi), en önemli küresel sağlık sorunlarından biridir ve Akdeniz, Afrika. Hindistan ve Güney Asya'da yaygın olarak bulunmaktadır. Beta talaseminin ana nedeni β-globin sentezinin yetersiz olması dengesiz globin zincir üretimine ve α-zincirlerinin aşırı birikimine neden olmaktadır.

Birincil antioksidan kategorisinde yer alan süperoksit dismutaz enzimi (SOD), glutatiyon peroksidaz (GSHPx) ve katalaz gibi enzim sistemleri serbest radikalleri yok etme yeteneğinde olan bir enzimdir. Bu enzimler genel olarak serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidler gibi hücresel bileşenlere zarar vermesini önlemek amacıyla, radikallerin bir hücresel bölgeden diğerine geçişini de mani olunur. SOD2 (MnSOD) enzimi, süperoksit anyonunun ($\bullet O^{2-}$), hidrojen perokside (H_2O_2) ve oksijene dönüşümünü katalize ederler ve böylece bu radikallerin etkisini azaltırlar. Bu dönüşüm olayında SOD enziminin aktif bölgesini oluşturan Mn minerali önemli rol oynamaktadır (Diplock A., 1988).

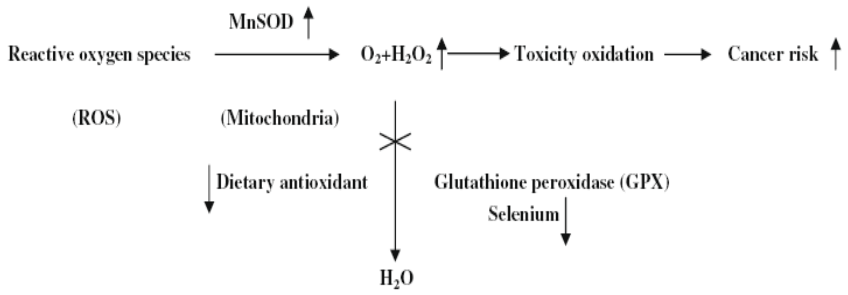
$$\bullet O2^- + \bullet O2^- \xrightarrow[SOD]{2H^+} H2O2 + O2$$

Ülkemizde MnSOD Ala16Val (rs4880) gen polimorfizmi üzerine yapılan çalışmalardan birisi Atılgan ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Böbrek kanserli hastalarda ve kontrol numunelerinde MnSOD Ala16Val genotip frekansları (Türkiye'de alınan örneklerde) 41 hasta için Val/Val %24, Ala/Val %42, Ala/Ala %34, 50 kontrol için Val/Val %46, Ala/Val %38, Ala/Ala %16. Kontrol ve hastalar arasında MnSOD genotip dağılımında büyük farklılıklar olduğu belirlenmiştir.

Ala/Ala+Ala/Val %76 (Hasta), %54(Kontrol). Val-SOD2 enzimi mitokondri matriksine girememesi nedeniyle hücre içresinde H_2O_2 miktarı azalır. Bu nedenle hücre içresinde Val-SOD2 enzimi aktivitesi Ala-SOD2 enzimi aktivitesine göre daha düşüktür (Atılgan D., 2014).

Enstitiümüz öğrencilerinden Derya Söylemez tarafından yapılan çalışmada, 50 talasemi tanısı konumuş bireylerde DMT1 C→A tek nükleotid polimorfizmi (SNP) incelendi. İzole edilmiş DNA'ların DMT1 bölgesi, PCR tekniği kullanılarak çoğaltıldı ve amplifiye edildi. PCR ürünü amplifiye nükleotidler RFLP tekniği ile kesim işlemi gerçekleştirildi. Talasemili bireylerde DMT1 tek nükleotid polimorfizmin genotip frekansları; % 30.0 CC homozigot tipik, %.46,0 CA heterozigot % 46.0 AA homozigot atipik genotip % 24.0 olarak belirlendi. C aleline sahip bireylerde %53, A aleline sahip olmayan bireylerde %47 olarak tespit edildi. Talasemi bireyler cinsiyetlere göre belirlendiğinde, kadın ve erkekler arasında DMT1 polimorfizmi açısından frekans dağılımı arasında farklılık bulunamadı ($p>0.05$) (Söylemez D., 2011).

Aşağıdaki tablo kanser oluşumu için MnSOD ve reaktif oksijen türleri arasındaki ilişkiyi gösteren bir mekanizmadır. Mitokondri matriksi içerisinde reaktif oksijen türleri MnSOD tarafından dismüte edilerek O_2 ve H_2O_2 dönüştürülür. Mitokondride glutatyon peroksidaz enzimi (GPX) H_2O_2'i suya dönüştürerek detoksite eder. Yüksek seviyede MnSOD aktivitesi O_2 ve H_2O_2 seviyesini arttırır. Buna ek olarak eğer günlük alınan antioksidan ve selenyum minerali yetersiz olursa glutatyonperoksidaz enzimi (GPX) aktivitesi düşük olur ve bu da toksisiteyi arttırır. Oksidanlara karşı Val-MnSOD' ün aktivitesi Ala-MnSOD' a göre 30-40% daha düşüktür (Wang S., 2009).



Şekil 4. 1 Kanser oluşumu için MnSOD ve reaktif oksijen türleri arasındaki ilişkiyi gösteren bir mekanizma.

rs4880 Val/Val genotipi refinopati diyabet hastalığı yakalanma riskini artırırken nefropati diyabet hastalığında bu durum söz konusu değildir. Bu çalışmada rs4880 SOD2 Ala genotipi ise düşük çıkmıştır. SOD2'nin Val izoformu Ala izoformuna göre mitokondri içerisinde üretilen süperoksit radikallerine karşı daha az direnç gösterir. SOD2 Val izoformu, oksidatif strese maruz kalmış proteinler mitokondride SOD2 taşımasına engel olurlar (Wegner M., ve Ark., 2015).

Demirin toksisitesinin ana nedeni redoks reaksiyonlarını katalizlemesidir. Normal hücresel reaksiyonlar sonucu oluşan reaktif oksijen ara ürünleri olan süperoksit ($O_2^{\cdot}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2), vücuttan uzaklaştırılamadığı takdirde vücutta oksidatif stres oluşturmaktadır. Oksijen ara ürünleri demire bağımlı Fenton reaksiyonu ile hücresel zedelenme ortaya çıkaracak oksijen radikallerine dönüşebilmektedir (Wu AC., ve Ark., 2002).

$$O_2^{\cdot} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\cdot}OH + OH^{-}$$

$$O_2^{\cdot} + H_2O_2 \rightarrow {}^{\cdot}OH + OH^{-} + O_2$$

MnSOD sadece mitokondri içinde mevcut antioksidan enzimi olarak bilinir, ve hücre ölümü olaylarının düzenlemesinde çok önemli bir rol gösteren eşsiz bir tümör süpürücü protein olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, belirli koşullar altında, MnSOD aktivitesinin artması, H_2O_2'nin aşırı üretilmesi, özellikle bireylerde GPx ya da CAT tarafından bu son derece zehirli ROS kaldırma kapasitesi azalması, hücreye zarara yol açabilir. MnSOD Ile58 formu, Thr58 formuna kıyasla insan meme kanseri hücrelerinde daha iyi bir tümör süpürücüdür. Bununla birlikte, en sık çalışılan MnSOD SNP, ekson 2'de yapısal bir mutasyon olan sitosin (C) timin (T) yer değiştirmesiyle karakteristik olan Ala16Val'dır. Çeşitli çalışmalar göstermiştir ki MnSOD, nörotoksik koşullarda, belirli tümörler, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabetik kaynaklı anormalliklere karşı korumak için uyarılabilir.

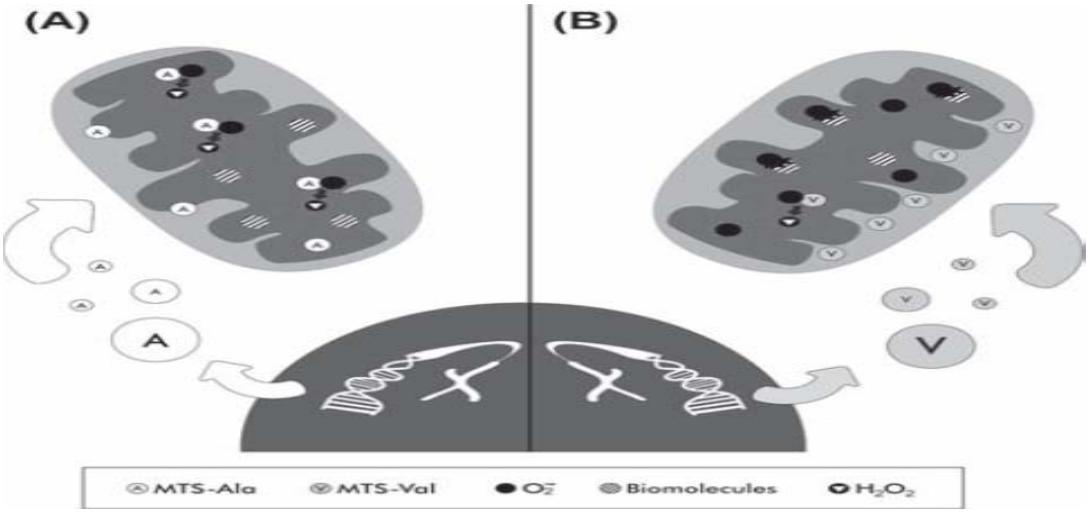
MnSOD eksikliği olan farelerde önemli ölçüde ölümcül olduğu gösterilerek yaşam için MnSOD, gerekli olduğu söylenebilir. Buna ek olarak, farelerin sadece % 50'si normal MnSOD içeriği, yüksek ROS üretimine bağlı oksidatif stres ve şiddetli mitokondriyal disfonksiyon yatkınlığında artış göstermektedir. Bu nedenle, O_2 metabolizmasının olağanüstü rolünü dikkate alınarak, hastalıklar ile MnSOD Ala16Val SNP arasındaki ilişkiyi gösteren gösteren çalışmalar artmıştır. (G. Bresciani, 2013).

Aşırı oksidatif stres diyabet başlangıcında önemli bir faktör olarak kabul edilmiştir ve mitokondriyal $O_2^{\bullet-}$ aşırı üretimi diyabet komplikasyonlarının gelişiminde önemli bir rol oynar. Yaş, cinsiyet, sistolik kan basıncı, total kolesterol ve vücut kitle indeks için düzeltme yapıldıktan sonra, Val / Val taşıyıcılı MnSOD'un aktivitesi daha yüksek olup Ala taşıyıcılara kıyasla diyabet gelişimi için yüksek riskli bulunmaktadır. Japon tip 2 diyabetli hastalarda nefropati ile Ala16-Val SNP ilişkilidir. Danimarkalı hastalarda ise Val alel ve diyabetik nefropati arasında güçlü bir ilişki bulunmuştur. Finli ve Danimarkalı hastalar Val/Val genotipi ile diyabetik nefropatinin artan riski ilişkisi, diyabet süresi, sigara, cinsiyet ve başlangıç süresi kontrol edilererek rapor edilmiştir. MnSOD'lu Ala16Val geni aynı zamanda diyabetik hastalarda nöropati ile gelişme riski daha yüksek olan Val alleli homozigot ve Val / Val genotipi ile ilişkilendirir. Aynı doğrultuda, Val / Val genotipi Sloven hastalarda diyabetik retinopati ile ilişkilidir. Daha yüksek Ala alel ve Ala / Ala genotip sıklığı retinopatili Fin hastalarında bulundu. Özellikle, MnSOD SNP'nin farklı alel ve genotip frekansları makroanjiyopati olan ve olmayan diyabetik hastalar arasında rapor edilmiştir. Çok yakın zamanda gösterilmiştir ki, MnSOD'ün polimorfik varyasyonları tip 2 diyabet veya diyabetik kardiyovasküler Çinli hastalarda plazma trigliserid düzeylerinin yükselmesini sağladı. Ala/Ala taşıyıcılarına kıyasla Ala/Val ve Val/Val taşıyıcılarının ox-LDL(oxidized low-density lipoprotein) seviyesi yüksektir (Gottlieb MG., 2005).

ROS üretimindeki artışın karaciğer ile ilişkili hastalıklar da rolü olduğu bilinmektedir örnek olarak alkol zehirlenmesi,hemokromatoz ve kronik hepatit C virüs enfeksiyonu.

Diğer metabolik hastalıklar MnSOD Ala16Val SNP ile ilgili olabilir. Cinsiyet, obezite, yaş, diyabet, dislipidemi, hipertansiyon ve metabolik sendrom ile Val / Val geninin ilişkisi Brezilyalı toplumda rapor edilmiştir. Alkolik siroz olan hastalarda Karaciğerde yüksek demir miktarı Ala alleli ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Nahon P., 2009).

Val-MnSOD formu iç membranın içerisine gömülürken, Ala- MnSOD formu mitokondri matriksine girebilmek için mitokondri membranında bulunur. Bu nedenle Ala içerikli süpürücülerin α-sarmal yapıları nedeniyle MnSOD aktivitesini hızlandırır. Ala-MnSOD süpürücüleri Val-MnSOD süpürücüleri ile kıyaslandığında 30 – 40% daha fazla aktifdir (Sutton A., 2003).



Şekil 4. 2. Val-MnSOD formu iç membranın içerisine gömülürken, Ala- MnSOD formu mitokondri matriksine girebilmek için mitokondri membranında bulunur

MTS-Ala MnSOD (A) süpürücüsü, artan süperoksit dismutazları mitokondriyal membran boyunca taşır. Membran geçirgenliği nedeniyle H_2O_2 sitozole kolaylıkla geçer ve bu yüzden mitokondride ROS toksisitesi azalır. MTS-Val MnSOD süpürücüsü ise mitokondri iç membranında tutulur. Bunun sonucunda mitokondri içinde antioksidant savunması azalır ve yüksek miktarda ($O^{2\bullet}$) doku oksidasyonuna yol açabilecek farklı moleküllerle reaksiyon verebilir.

SOD enzimi süper oksit radikallerinin (ROS) temizlenmesinde hayati rol oynar. Bu nedenle SOD mide mukozası içerisinde tumör oluşumunu baskılayabilir. SOD2-Val16Ala polimorfizmi birçok kanser oluşumuna neden olur. Bu çalışmada, SOD2 Ala/Ala+Ala/Val (OR:12.86, %95 CI:3.36-49.25) genotip taşıyıcılarının mide kanseri yakalanma riski Val/Val (OR:6.34, %95 CI:2.75-14.59) genotip taşıyıcılarına göre 2 veya 3 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Beyin tümörlerinde, akciğer kanseri, prostat kanseri, pankreas kanseri, göğüs kanseri gibi hastalıklarda aynı sonuçlar önceki çalışmalarda da rapor edilmiştir (Jian Feng Y., ve Ark., 2010).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, sürekli kan transfüzyonu yapılan, talasemi hastalığı tanısı konmuş yaş ortalaması 26,13±7,27 olan 25 kadın ve 25 erkek toplamda 50 gönüllü hastadan ve yaş ortalaması 28,37±8,45 olan 25 kadın ve 25 erkek toplamda 50 kontrol numunesi kan örneklerinde belirlenen;

Sonuçlara göre;

Sürekli kan transfüzyonu yapılan Talasemi hastalarından alınan 50 adet kan örneğinin, MnSOD AlaVal16 C→T Tek Nükleotid Polimorfizminin;

1. Demir toksisitesine maruz kalan bireylerde (n:50), MnSOD Ala16Val polimorfizminin genotip frekansları %30 homozigot tipik (CC), %42 heterozigot (CT) ve %28 homozigot atipik (TT) olarak belirlenmiştir.
2. Kontrol numunesi alınan bireylerde ise (n:50) MnSOD Ala16Val polimorfizminin genotip frekansları %10 homozigot tipik (CC), %52 heterozigot (CT) ve %38 homozigot atipik (TT) olarak belirlenmiştir.
3. Demir toksisitesine maruz kalan bireylerde (n:100), MnSOD Ala16Val polimorfizminin alel frekansları %51 C aleli, %49 T aleli olarak belirlenmiştir.
4. Kontrol numunesi alınan bireylerde ise (n:10) MnSOD Ala16Val polimorfizminin alel frekansları %36 C aleli, %64 T aleli olarak belirlenmiştir.
5. Elde edilen sonuçlara göre hastalar için populasyon gen bakımından Hardy-Weinberg dengesindedir ($p>0.05$).
6. Kontrol numuneleri için ise olduğundan populasyon gen bakımından Hardy-Weinberg dengesindedir ($p>0.05$).
7. Talasemi hastaları için genotip (CC, CT, TT) açısından mukayese edildiğnde istatistiksel olarak tamamen anlamlı olduğu tespit edildi ($p=0,266$).
8. Kontrol numuneleri için genotip (CC, CT, TT) açısından mukayese edildiğnde istatistiksel olarak tamamen anlamlı olduğu tespit edildi ($p=0,540$).

9. Oksidatif strese karşı koruma amaçlı farklı gen bölgelerindede (metal taşıyıcı genler) çalışabilir.

10. Talasemi hastalığının tedavi sürecinde değişikliğe gidilebilir. Hastalara dışarıdan antioksidan takviyesi yapılabilir.

11. Oksidanlara karşı Val-MnSOD' ün aktivitesi Ala-MnSOD' a göre 30-40% daha düşüktür Sürekli kan transfüzyona maruz kalan Talasemili hastalarda ve kontrol numunelerinden alınan kan örneklerinde yapılan incelemeler sonucunda demir toksisitesinin polimorfizm çalışmaları ve polimorfizmlerin biyolojik örneklerdeki demir etkisinin araştırılmıştır.

12. Talasemi hastalarına dışarıdan hastaya verilen kan transfüzyonun verme sıklığı değişebilir.

13. Ülkemizde sıklıkla meydana gelen akraba evliliği sonucunda taşıyıcı anne ve taşıyıcı babadan çocuğa geçen genler hasta bireyler oluşmasına neden olur.

14. Ülkemizde talasemi hastalığının en yüksek görülme sıklığı çukuova bölgesi illerinde olduğu tespit edilmiştir. Sağlık Bakanlığı 2000-2006 yılları arasında onaltı merkezde toplam 377,339 sağlıklı kişiyi taramış olup, taranan kişi sayısı ile talasemi ve anormal hemoglobin görülme sıklığının illere göre dağılımı tespit etmiştir. Adana:%3,7 (68460), Antakya:%4,6 (47755), Antalya: %13,1 (19594), Aydın: %5,1 (2209), Bursa: %1,7 (4040), Denizli: %2,6 (20000), Diyarbakır: %3,6 (2830), Edirne: %6,4 (2610), Isparta: %2,4 (6654), İstanbul: %4,5 (4944), İzmir: %4,8 (97510), K.Maraş: %0,7 (2398), Kırklareli:%3,4 (2439), Mersin: %2,3 (40977), Muğla: %4,5 (52042) ve Urfa: %6,4 (2913).

15. Ayrıca Türk populasyonu üzerinde bunun gibi yapılan polimorfizm çalışmaları neticesinde Türk toplumunun genetik havuzunun oluşturulabileceğine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

16. Zamanla artış gösteren demir toksisitesine bağlı meydana gelen hastalıklar ve kanser gelişiminin önüne geçilmesi maksadıyla yapılan polimorfik çalışmalar, bireylerin demire karşı duyalılığının belirlenmesinde önem taşımaktadır.

17. Talasemili hastalar ve kontrol grupları arasında MnSOD Ala16Val genotip frekansları istatistiksel anlamda önemli bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). MnSOD Ala16Val gen polimorfizmi ile cinsiyet arasında önemli bir fark yoktur ($p>0.05$).

18. Sonuç olarak bu çalışmalar, metal toksisitesi biyolojik organizmalarda toksikokinetiğinin tespiti ile zehirlenmenin sebebi belirlenerek toksikasyonun hastalığın tedavi sürecinde mi, çevresel mi, yoksa adli kovuşturmaya sebep olabilecek kaza, intihar, zehirlenme veya olarak cinayet mi olduğunu belirlemek önemlidir.

ÖZET

Çalışmamızın amacı: Türkiye popülasyonunda Talasemili hastalarda ve kontrol grupları arasında MnSOD Ala16Val C/T Tek nükleotid polimorfizmini belirlemek ve bu polimorfizmin cinsiyet ile ilişkinin olup olmadığını tespit etmektir.

Talesemi kalıtsal (genlerin ebeveynlerden çocuklara aktarılması) kan hastalıkları içerisinde yer alan, hemoglobin molekülünün üretimi süresince, globin zincir sentezlerindeki düzenlenme dengesizliklerine dayalı, globin zincir sentez bozukluğudur. Dengesiz, globin zincir sentezi düşük hemoglobin üretiminin başlıca nedenidir ve anemiye neden olur. Talesemi (özellikle beta-talasemi), en önemli küresel sağlık sorunlarından biridir ve Akdeniz, Afrika. Hindistan ve Güney Asya'da yaygın olarak bulunmaktadır. Beta talaseminin ana nedeni β-globin sentezinin yetersiz olması dengesiz globin zincir üretimine ve α-zincirlerinin aşırı birikimine neden olur.

Çalışmamızda 50 talasemili bireyde MnSOD Ala16Val C/T tek nükleotid polimorfizmi (SNP) araştırıldı. İzole edilen DNA'ların MnSOD bölgesi, PCR tekniği ile çoğaltılarak, amplifiye edildi. PCR ürünü amplifiye edilen oligonükleotid'ler RFLP tekniği ile kesildi. Talasemili hastalarda MnSOD tek nükleotid polimorfizmin genotip frekansları; % 30.0 homozigot tipik, %.42 heterozigot, % 28.0 homozigot atipik genotip olarak belirlendi. Alel frekansı C aleline sahip bireylerde A(+) %51, C aleline sahip olmayan bireylerde %49 A(-) T olarak tespit edildi.

50 kontrol gruplarında MnSOD Ala16Val C/T tek nükleotid polimorfizmi (SNP) araştırıldı. İzole edilen DNA'ların MnSOD bölgesi, PCR tekniği ile çoğaltılarak, amplifiye edildi. PCR ürünü amplifiye edilen oligonükleotid'ler RFLP tekniği ile kesildi. Kontrol gruplarında MnSOD tek nükleotid polimorfizmin genotip frekansları; % 5 homozigot tipik, %.26 heterozigot, % 19 homozigot atipik genotip olarak belirlendi. Alel frekansı C aleline sahip bireylerde A(+) %36, C aleline sahip olmayan bireylerde %64 A(-) T olarak tespit edildi.

Hasta ve kontrol gruplar arasında MnSOD Ala16Val genotip frekansı arasında önemli bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Fakat MnSOD Ala16Val gen polimorfizmi ile cinsiyet arasında önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Anahtar Sözcükler: MnSOD, PCR, Polimorfizm, Talasemi, Türkiye

SUMMARY

The aim of our study, both thalassemia patients and control groups in relationship between MnSOD Ala16Val C/T is determined the single nucleotide polymorphisms and to determine whether this polymorphism relationship with gender in Turkey population.

Thalassemias are hereditary blood diseases (that is, they're passed from parents to children through the genes) due to unbalanced globin chain synthesis. Unbalanced globin chain synthesis is the major cause of low level hemoglobin production leading to anemia. The Thalassaemias (especially beta-thalassemia) pose by far the most important global public health problem which are widespread throughout the Mediterranean region Africa, the Middle East, the Indian subcontinent, and Southeast Asia. Main cause of the beta thalassemias is defective β-globin synthesis, which leads to imbalanced globin chain production and an excess of α-chains.

In this study, determine genetic polymorphism of the MnSOD were analyzed in 50 blood samples. C→T single nucleotide polymorphism (SNP) was investigated in MnSOD Ala16Val (rs4880) region C/T extraction DNAs, were amplified with the PCR technique. Then, the amplified oligonucleotides were cut with the RFLP technique. The genotype frequencies of the SNP in the patients MnSOD Ala16Val (rs4880) region C/T were determined as follows; 30.0% homozygote typical (CC), 42.0% heterozygote (CT) and 28.0% homozygote atypical (TT) genotype. Additionally the frequency of C allele A(-) was found as 51.0% and of T allele A(+) as 49.0%.

To determine genetic polymorphism of the MnSOD were analyzed in 50 control samples. C→T single nucleotide polymorphism (SNP) was investigated in MnSOD Ala16Val (rs4880) region C/T extraction DNAs, were amplified with the PCR technique. Then, the amplified oligonucleotides were cut with the RFLP technique. The genotype frequencies of the SNP in the patients MnSOD Ala16Val (rs4880) region C/T were determined as follows; 10.0% homozygote typical (CC), 52.0% heterozygote (CT) and 38.0% homozygote atypical (TT) genotype. Additionally the frequency of C allele A(-) was found as 36.0% and of T allele A(+) as 64.0%.

There was a statistically significant difference between the patient and control groups in MnSOD Ala16Val (rs4880) genotip frekansı ($p<0.05$). A significant difference was not found between MnSOD Ala16Val (rs4880) gene polymorphism and genders ($p>0.05$).

Key Words: MnSOD, PCR, Polymorphism, Thalessemia, Turkey

KAYNAKLAR

ABDOLLAHIM, BAHREINI-MOGHADAM A, EMAMI B, FOOLADIAN F, ZAFARI K., (2003). Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stres in rat submandibular saliva. Comparative Biochemistry and Physiology Part C . **135**; 331-336.

AHAMED, M., SIDDIQUI, M.K.J. (2007). Environmental lead toxicity and nutritional factors. *Clinical. Nutrition*., **26** (4): 400–408.

AKSOY, M. (1968). Abnormal Hemoglobins and Thalassemia in Eti Turks Living in Antakya. *Med. Bull. Ist*, **1**:296-301.

AKSOY, M. (1991). The history of β-thalassemia in Turkey. *Turk. J. Pediat*., **33** (3):195-7.

ANDREWS, N.C. (1999). Disorders of iron metabolism. *N. Eng. J. Med*., **341** (26): 1986-1995.

ANDREWS, N.C. (2000). Iron Hemostasis: Insights from genetics and animal models. *Nat. Gene. Rev*., **1**: 208–217.

ANDREWS, N.C., LEVY, J.E. (1998) Iron is hot: an update on the pathophysiology of hemochromatosis. Blood . **92**:1845–1851.

ANDREWS, N.C., (1999). Disorders of iron metabolism. N Engl J Med ;**341**(26):1986-95.

ANDY VIERSTRATE. Principle of the PCR 199. http://users.ugent.be/~avierstr/

ANGELUCCI, E., BRITTENHAM, GM., MCLAREN, CE., et. al. (2000). Hepatic iron concentration and total body iron stores in Thalassemia Major. N Engl. J Med. ; 343: 327-31.

ATANASIU, V., MANOLESCU, B., STOIAN, I. (2006). Hepcidin the link between inflammation and anemia in chronic renal failure. *Rom J Intern Med*., **44**(1):25-33.

ATANASIU, V., MANOLESCU, B., STOIAN, I. (2007). Hepcidin-central regulator of iron metabolism. European Journal of Haematology Journal Compilation. **78** (1):1-10.

ATSDR. (2007). Toxicological profile for lead.

AUDESİRK T., AUDESİRK G., BYERS E.B. (1999). Life on Earth. 248-250.

AYALA, F. J., KIGER, F. J. (1980). Modern Genetics. Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc, California. syf.: 601-605.

BAKER, N.A. and LINDLEY, P.F., (1992). New perspectives on the structure and function of transferrins, J. Inorg. Biochem., 47, 147.

BALDWIN, D.R., MARSHALL, W.J. (1999). Heavy Metal Poisoning and Its Laboratory Investigation. *Annals of Clinical Biochemistry*., **36** (3): 267-300.

BALLATORI N. (2002). Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ Health Perspect.*, **5**:689-94.

BANNON, D.I., ABOUNADER, R., LEES P.S., BRESSLER, J.P. (2003). Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.,* **284**(1):C44-50.

BARLTROP, D., KHOO, H.E. (1975). The influence of nutritional factors on lead absorption. *Postgrad. Med. J.,* **51**:795-800.

BARLTROP, D., MEEK, F. (1979). Effect of particle size on lead absorption from the gut. *Arch. Environ. Health.,* **34**:280-285.

BASAK, N. (2007). Molekular Pathology of beta-Thalassemia: the Boğaziçi university experience in Turkey. *Heamoglobin*., **31** (2): 233-241.

BAYNES, R.D. (1996). Assesment of Iron Status. *Clinical Observations.* **29**(3): 15.

BERK, M., NG, F., DEAN. O., DODD, S., BUSH, A. I. (2008). Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. Trends in Pharmacological Science, **29**(7), 346-351.

BELLINGER, D.C. (2004). Lead. *Pediatrics*. **113**(4):1016-22.

BENETATOS, L., ALYMARA, V., VASSOU, A., BOURANTAS, K.L. (2008). Malignancies in □-thalassemia patients: a single-center experience and a concise review of the literature. *Int Jnl Lab Hem.,* **30:** 167–172.

BENNETT, P.A., ROTHERY, E. (1983) Introducing Atomic Absorption Analysis. Mulgrave, Australia : Varian Associates.

BEUTLER, E. (2006). Hemochromatosis: genetics and pathophysiology. *Annu. Rev. Med.,* **57**:331-47.

BEUTLER, E., GELBART, T., LEE, P., TREVİNO, R., FERNANDEZ, M.A., FAIRBANKS V.F. (2000). Molecular characterization of a case of atransferrinemia. *Blood*., **96**(13):4071-4074.

BIRGENS, H., LJUNG, R. (2007). The Thalassaemia Syndromes. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.,* **67** (1): 11–25.

BLUMBERG J., (2004). Use of biomarkers of oxidative stres in research studies. J Nutr., **134**;3188S-3189S.

Birgens H, Ljung R. (2007). The Thalassaemia Syndromes. *Scand J Clin Lab Invest*., **67**: 11–26.

BHUVARAHAMURTHY, V., BALASUBRAMANIAN, N., GOVINDASAMY, S. (1996). Effect of radiotherapy and chemoradiotherapy on circulating antioxidant system of human uterine cervical carcinoma. Molecular and Cellular Biochemistry, **158**(1), 17-23.

BOND, G.L., HU, W., ARNOLD, LEVINE, A. (2005). A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene: From a Molecular and Cellular Explanation to Clinical Effect. Cancer Res., **65** (13):5481-4.

BOND, G.L., HU, W., LEVINE, A. (2005). A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene: From a Molecular and Cellular Explanation to Clinical Effect. *Cancer Res.,* **65**(13):5481-4.

BOTTEMA, C.D., SOMMER, S.S. (1993). PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutation and polymorphisms. *Mutat. Res*., **288**:93-102.

BOZKURT G, ALGÜNEŞ Ç. (2000). Tıpta moleküler genetik uygulamaları genel prensipleri. Trakya Üniversitesi Matbaa Tesisleri, p.:42-46, 66-69.

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

BRAUNWALD E., FAUCİ RAUNWALD E., FAUCİ A., KASPER D., Talasemi Sendromları. IN SAĞLIKERLI Y., SARICA Y., İNAL (çevirenler) *HARRİSON iç hastalıkları prensipleri. 15.Edisyon, istanbul; Nobel matbaacılık 2004: s. 672.*

BRESSLER, J.P., OLIVI, L., CHEONG, J.H., KIM, Y., BANNONA, D. (2004). Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. *Ann N Y Acad Sci*., **1012**:142-52.

BRIDGES, C.C., ZALUPS, R.K. (2005). Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Tox. Appl. Pharm.,* **204**: 274–308.

BRITTENHAM, G.M. (2000). Disorders of iron metabolism: iron deficiency and overload. In hematology, basic principles and practice. Ed: R. Hoffman, E. Benz, S. Shattıl, B. Furie, H. Cohen, L. Sılberstein, P. Mcglave P. New York: Churchill Livingstone, p.:397-428.

BURTON, G.W. (1989). Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutr.,* **119** (1):109-11.

BUTLER, J. M. (2005). Forensic DNA typing. Biology Technology and Genetics of

BUTLER, J.E. AND KADONAGA, J.T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.,* **16**(20):2583-92.

BUTLER, J.M. (2005). Forensic DNA typing. Biology Technology and Genetics of STR Markers.USA: Elsevier Press, p.: 33-84.

BUYS, S.S., MARTIN, C.B., ELDRIDGE, M., KUSHNER, J.P., KAPLAN, J. (1991). Iron absorbtion hypotransferrinemic mice. *Blood*., **78**(12):3288-3290..

BÜLBÜL SH. (2004). Çocuk beslenmesinde demirin yeri ve önemi.Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi., 13(12):446-50.

CANATAN, D. (2007). Dünyada ve Türkiye'de Talasemi ve Anormal Hemoglobinler. Canatan D, Aydınok Y. *Talasemi ve Hemoglobinopatiler,* p: 11-19.

CHARLTON, R.W., BOTHWELL, T.H. (1983). Iron absorption. *Annu. Rev. Med*., **34**: 55-68.

CHEESEMAN, K.H., SLATER, T.F. (1993). An Introduction To Free Radical Biochemistry. *Br.Med.Bull*., **49** (3): 479-80.

CLARKSON, T.W**. (**1993). Molecular and ionic mimicry of toxic metals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol***.,** **33**:545-71**.**

COLLINS, F.S. (1997). Sequencing the human genome. *Hosp. Pract. (Minneap.),* **32** (1):35-43.

COMPORTI M.,SIGNORINI C., BUONOCORE G., CICCOLI L. (2002). Iron Release, Oxidative Stres and Erythrocyte Ageing. *Fre Rad Bio Med*., **32**(7):568-57.

COMPORTI, M., SIGNORINI, C., BUONOCORE, G., CICCOLI, L. (2002)., Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radic Biol Med.*, **32**(7):568-76.

CONAWAY, R.C., CONAWAY, J.W. (1993). General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.,* **62**:161-190.

CONRAD, M.E., UMBREIT, J.N. (1993). A concise review: Iron absorption the mucin-mobilferrinintegrin pathway. A competitive pathway for metal absorption. *Am. J. Hematol.*, **42** (1): 67-73.

CONSOLINI, R., CALLERI, A., LEGITIMO, A., MASSEI, F. (2001). Immunological evaluation of patients with beta-thalassemia major. *Acta. Haematol*., **105**: 7-12..

COOK JD.,(1990). Adaptation in iron metabolism, Am J Clin Nutr, 51:301-8.

CRICHTON, R.R., WARD R.J., (1992). Iron metabolism - New perspectives in view, Biochem., 31, 1255.

SOYLEMEZ D., KAPLAN B., KAYAALTI Z., 2011. Talasemi Hastalarında DMT1 Polimorfizminin Kan Kurşun ve Demir Düzeyleri ile ilişkisinin araştırılması

DIAMOND, G.L. (2005). Risk assessment of nephrotoxic metals. Ed: J. Tarloff, L. Lash, The Toxicology of the Kidney. London, England: CRC Pres, p.:1099-1132.

DİPLOCK, A. 1998. Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59 p., Belgium.

DINKEL, A., NJOROGE, E.M., ZIMMERMANN, A., WALZ, M., ZEYHLE, E., ELHAMDI, I.E., MACKENSTDT, U., ROMIG, T. (2004). A PCR system for detection of species and genotypes of the Echinococcus granulosus–complex, with reference to the epidemiological situation in Eastern Africa. *Int. J. for Parasitol*., **34**(5): 645-653.

DOWLING, T.E., MORITZ, C., PALMER, J.D., RIESEBERG, L.H. (1996). Nucleic acids III: analysis of fragments and restriction sites. *Molecular Systematics,* **88** (9):249-320.

EFREMOV, G.D. (2007). Thalassemias and Other Hemoglobinopathies in the Republic of Macedonia. *Hemoglobin.* **31** (1): 1–15.

EMİR, F., ÖZDEN, A. (2006). Genetik polimorfizm ve polimorfizm çalışmaları. *Güncel Gastroenteroloji*., **10** (1): 24-28.

IMLAY J.A. (2003). Patways of oxidative damage. Annu. Rev. Microbiol.: 57; 395-418.

EPA. (2002). National primary drinking water regulations. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency. EPA816F02013.

ERNHART, C.B., WOLF, A.W., SOKOL, R.J., BRITTENHAM, G.M., ERHARD, P. (1985). Fetal lead exposure: antenatal factors. *Environ Res.,* **38**(1):54-66.

FARMAKIS, D., GLAKOUMIS, A., POLYMEROPOULOS, E., AESSOPOS, A. (2003). Pathogenetic aspects of immune deficiency associated with Beta-thalassemia. *Med. Sci. Monit*., 9(1): RA19-22..

FARMAKİS D, GLAKOUMİS A, POLYMEROPOULOS E, AESSOPOS A. (2003). Pathogenetic aspects of immune deficiency associated with β thalassemia. *Med Sci Monit.,* **9**(1): RA19-22.

FATHALLAH, H., ATWEH, F.G. (2006). DNA hypomethylation therapy for hemoglobin disorders:Molecular mechanisms and clinical applications. *Blood Reviews*., **20** (4): 227-234.

FEDER, J.N., GNIRKE, A., THOMAS, W, ET, AL. (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.,* **13**(4): 399–408.

FIRTSCH, E.F., LAWN, R.M., MANATIS, T. R.M. (1980). Molecular cloning and characterization of human beta like globin gene cluster. *Cell.,* **19** (4), 959 -972.

FLANAGEN PR., (1989). Mechanism and regulation of intestinal up take and transfer of iron, Acta Pediatr Scand Suppl, 361:21-30.

FLEGAL, A.R., SMITH, D.R. (1992). Lead levels in preindustrial humans. *New. Eng. J. Med.,* **326** (19):1293-1294.

FLEMING, R.E., BACON, B.R. (2005). Orchestration of Iron Homeostasis. *New England Journal of Medicine.,* **352**(17):1741-4.

FLORA, S.J.S., SINGH, S., TANDON, S.K. (1989). Thiamine and zinc in prevention or therapy of lead intoxication. *J. Intern. Med. Res*., **17** (1):68–75.

FLORA, S.J.S., TANDON, S.K. (1990). Beneficial effects of zinc supplementation during chelation treatment of lead intoxication in rats. Toxicology, **64** (2):129–139.

FRİDOVİCH, I. (2001). Reflections of a fortunate biochemist. *J Biol Chem*., **276**(31):28629-36.

GANONG W.F. (1991). Digestion and Abserption. Review of Medical Phyorology. 15th Edition. Applelen and Lange. p: 25:437–447.

GANZ, T. (2004). Hepcidin in iron metabolism. *Current Opinion in Hematology*. **11**(4):251-4.

GANZ T, NEMETH E. (2006). Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 290(2): 199-203.

GANZ, T. (2006). Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.,* **507**:29-35.

GANZ, T. (2006). Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am. Soc*., **507**: 29-35.

GIARDINA, P.J., HILGARTNER, M.W. (1992). Update on Thalassemia. *Pediatr. Rev*., **13**(2):55-62.

GONZALEZ, F. J. (1999). Polymorphisms in xenobiotic metabolism. In Molecular and Applied Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes. *Life Sciences Pharmacogenetics*., **303**: 91-110.

GOYER, R.A. (1993). Lead toxicity: current concerns. *Environ Health Perspect*., **100**:177-87.

GOYER, R.A., CHERIAN, M.G., JONES, M.M. (1995). Role of chelating agents for prevention, intervention, and treatment of exposures to toxic metals. *Environ. Health Perspect.,* **103**:1048–52.

GUTTERIDGE, J. M. C. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. Chemico-Biological Interactions, **91**, 133-140, 1994.

GREEN, D.W., WALTERS, L., ACKERMAN, N.B. JR. (1994). Pathological case of the month. Case 1. Bart's hemoglobin hydrops fetalis syndrome. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med*., **148** (3):283-284.

GREEN, E.K. (1998). Restriction Fragment- Length Polymorphism. Eds; Rapley R, Walker J. In. Molecular Biomethods Handbook. *New Jersey: Humana Press*, **8**: 271-279.

GRIFFITHS, W.J.H., KELLY, A.L., COX, T.M. (1999). Inherited disorders of iron storage and transport. *Mol Med Today*., **5**(10):431-8.

GRIFFITHS, W.J.H., KELLY, A.L., COX, T.M. (2000). Localization of iron transport and regulatory proteins in human cells. *American Journey of Dis. Chi.,* **93**(9): 575-87.

GUNSHIN, H., MACKENZIE, B., BERGER, U.V., GUNSHIN, Y., ROMERO, M.F., BORON, W.F., NUSSBERGER, S., GOLLAN, J.L., HEDIGER, M.A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metaliontransporter. *Natur.,* **388**:482– 488.

HAGAR, W., THEIL, E.C., VICHINSKY, E.P. (2002). Diseases of iron metabolism. *Pediatr. Clin. N. Am*., **49**(5):893-909.

HALBERG L, SOLWELL L, (1967). Absorbtion of hemoglobin iron in man, Acta Med Scand, 181:354-55.

HALLBERG, L., ROSSANDER, L., SKANBERG, A.B. (1987). Phytates and the inhibitory effect of bran on iron absorption in man. *Am J Clin Nutr*., **45**(5):988-96.

HALLIWELL, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*. **52**:253-65.

HAMMAD, T.A., SEXTON, M., LANGENBERG, P. (1996). Relationship between blood lead and dietary iron intake in preschool children. A cross-sectional study. *Ann. Epidemiol,* **6**(1):30-3.

HAUSER H, HOWELL K, DAWSON RM, (1980). Rabbit small intestinal brush-border membran preperation and lipid compation, Biochim, Biophy Acta,602:567-77.

HARRISON, S.A., BACON, B.R. (2003). Hereditary hemochromatosis: update for 2003. *J. Hepatol*., **38** (1): 14–23.

HEDRİCK, P.W. (2011). Selection and Mutation for α Thalassemia in Nonmalarial and Malarial Environments. *Ann Hum Genet*., **75** (4):468-74.

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 Res Notes***, 12**;3:133.

HEUBERSL HA, HEUBERS E, FORTH W, (1971). Binding of iron to a non-ferritin in the mucosal cells of normal and iron deficient rats during absorbtion, Life Sci, 10:1141-45.

HIGGS, D.R. (1990a). 1990 Mack Forster Prize lecture. The molecular genetics of the alpha globin gene family. *Eur J Clin Invest*., **20** (4):340-7.

HIGGS, D.R. (2004). Gene regulation in hematopoiesis: New lessons from thalassemia. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ.Program*. p.:1-13.

HIGGS, D.R., VERNIMMEN, D., WOOD, B. (2008). Long-range regulation of alpha-globin gene expression. *Adv Genet.,* **61**:143-73.

HIGGS, D.R., VICKERS, M.A., WILKIE, A.O., PRETORIUS, I.M., JARMAN, A.P., AGGARWAL, A.K. (1995). Structure and function of restriction endonucleases.*Curr. Opin. Struct. Biol*., **5**(1):11-9.

HIGGS, D.R., VICKERS, M.A., WILKIE, A.O., PRETORIUS, I.M., JARMAN, A.P., WEATHERALL D.J. (1989). A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. *Blood.,* **73**(5):1081-104.

HIGGS, D.R., WOOD, W.G., JARMAN, A.P., SHARPE, J., LIDA, J., PRETORIUS, I.M., AYYUB, H. (1990). A major positive regulatory region located far upstream of the human alpha-globin gene locus. *Genes Dev*., **4**(9):1588-601.

HIGGS DR., THEIN SL., (2001). The pathophysiology of The thalassemias. The Thalassemia syndromes, 4th edition, 192-236, Blackwell Scientific, Oxford UK.

HIGGS, D.R., WOOD, W.G., JARMAN, A.P., VICKERS, M.A., WILKIE, A.O., LAMB, J., VYAS, P., BENNETT, J.P. (1990b). The alpha-thalassemias. *Ann. N. Y. Acad. Sci.,* **612**:15-22.

HO, P.J., THEIN, S.L. (2000). Gene regulation and deregulation: a β globin perspective. *Blood Reviews*., **14** (2): 78-93.

HORNICK, R.B., GREISMAN, S.E., WOODWARD, T.E., DUPONT, H.L., DAWKINS, A.T., SNYDER, M.J. (1970). Typhoid Fever, Pathogenesis and Immunologic Control. *New England Journal of Medicine*., **283** (13), 686-91.

HUISMAN, T.H.J. (1993). The Structure and Function of Normal and Abnormal Hemoglobins. Bailieres Clin. *Haematol*., **6**(1):1-30.

HUNT, J. (2001). How important is dietary iron bioavability? *American Journey of Clin. Nutr.,* **73**(1): 3-4.

JOHANSEN JS, HARRIS AK, RYCHLY DJ, ERGUL A., (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. Cardiovasc Diabetol; **29**;4(1):5.

KALMAN S, ATAY AA, SAKALLIOĞLU O, ÖZGÜRTAŞ T, GÖK F, KURT I, KÜREKÇİ O ve Ark., (2005). Renal tubular fuction in children with beta-thalassemia minor. Nephrology **10**(5):427-9.

KALENDER S, KALENDER Y, OGUTCU A, UZUNHİSARCİKLİ M, DURAK D, AÇİKGÖZ F., (2004). Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolizm in rats: the protective effect of vitamin E. Toxicology **202**; 227-235.

KAYAALTI, Z., ODABAŞI M., SÖYLEMEZOĞLU, T. (2010). Genotype and allele frequencies of divalent metal transporter 1 polymorphism in Turkish population. *Mol Biol Rep.,* **38**(4):2679-84.

KAZAZIAN, H.H. JR. (1990). The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin. Hematol*., **27**(3):209-228.

KAZAZIAN, H.H. JR., MORAN, J.V. (1998). The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nat Genet*., **19**(1):19-24.

KILINÇ, Y. (2006). Hemoglobinopathies in Turkey. *Turk J Hematol.* **23**: 214-216.

KLINKEN, S.P. (2000). Red blood cells. *IntJ Biochem Cell Biol.,* **34**:1513-1518.

KOLLER, K., BROWN, T., SPURGEON, A., LEVY, L. (2004). Recent developments in low-level lead exposure and intellectual impairment in children.*Environ Health Perspect*., **112**(9):987-94.

KONTOGHIORGHES, G.J. (2006). Iron Mobilization From Transferin And Non-Transferin-Bound-Iron by Deferiprone. Implications in the Treatment of Thalassemia,Anemia of Chronic Disease, Cancer and Other Conditions. *Hemoglobin*, **30**(2): 183–200.

KONTOGHIORGHES, G.J. (2006). Iron mobilization from transferrin and non-transferrin-bound-iron by deferiprone. Implications in the treatment of thalassemia, anemia of chronic disease, cancer and other conditions. *Hemoglobin.* **30**(2):183-200.

KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONÁK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJÖBACK, R., SJÖGREEN, B., STRÖMBOM, L., STÅHLBERG, A., ZORIC, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.,* **27**(2-3):95-125.

KUIPER-KRAMER, E.P., COENEN, J.L.M., HUISMAN, C.M.S. (1998). Relationship between soluble transferrin receptors in serum and membran bound transferrin receptors. *Acta Haematol*., **99**(1): 8-11.

KWONG, W.T**.,** FRIELLO, P**.,** SEMBA, R.D. (2004). Interactions between iron deficiency and lead poisoning: epidemiology and pathogenesis**.** *Sci Total Environ*.**,** **330**(1-3):21-37.

LAYRISSE, M., MARTINEZ-TORREZ, C.. GONZALEZ, M. (1974). Measurement of total daily dietary iron absorption by the extrinsic tag model. *American Journey of Clin. Nutr*., **27**: 152-62.

LARSON, R.A. 1988. The antioxidants of higher plants. Phytochemistry. **27**(4); 969-978.

LEITA, L., ENNE, G., DE NOBILI, M., BALDINI, M., SEQUI, P. (1991). Heavy Metal Bioaccumulaüon in Lamp and Sheep Bred in Smelting and Mining Areas of S. W. Sardinia (Italy). *Bull. Environ. Contam. Toxicol*., **46**(6): 887-893.

LEONG, W.I., BOWLUS, C.L., TALLKVIST, J., LONNERDAL, B. (2003). DMT1 and FPN1 expression during infancy: developmental regulation of iron absorption. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.,* **285** (6):G1153-61.

LIEBHABER, S.A. (1989). Alpha thalassemia. *Hemoglobin*, **13** (7-8):685-731.

LIN, C.K., YANG, M.L., JIANG, M.L., CHIEN, C.C., LIN, H.H., PENG, H.W. (1991). Comparison of two screening methods, modified Hb H preparation and the osmotic fragility test, for alpha-thalassemic traits on the basis of gene mapping. *J. Clin. Lab. Anal***., 5**(6):392-395.

LOUKOPOULOS, D. (1991). Thalassemia: Genotypes and phenotypes. *Ann Hematol.,* **62** (4): 85-94.

LUKENS, J.N. (1999). The Thalassemias and Related Disorders: Quantitative disorders of hemoglobin synthiesis. Ed: G.R. Lee, J. Foerster, J.N. Lukens, F. Paraskcvas, J.P. Greer, G.M. Rodgers. Bds. W*introbe's Cliuical Hematology.* Egypt: Mass Publishing Co, p.:1405-1448.

LUSTBERG, M., SILBERGELD, E. (2002). Blood lead levels and mortality. *Arch Intern Med.,* 162:2443-2449.

MARTIN DW, MAYERS PA (1983). Harper's review of biochemistry, Lange Medical publications; Los Altos.

MARFURT, J., NIEDERWIESER, I., MAKIA DIVINE, N., BECK, H., FELGER, I. (2003). Diagnostic genotyping of Old and New World Leishmania species by PCR-RFLP. *Diagnoistic Microbiology and Infectıous Disease*., **46**:115-124.

MCMANUS, D.P., DING, Z., BOWLES, J. (1994). A molecular genetic survey indicates the presence of a single, homogeneous strain of *Echinococcus granulosus* in North-Western China. *Acta Trop.,* **56** (1): 7-14.

MCPHERSON M. J.; MOLLER S. G.(2000). PCR. *Heredity,* 86: 513–514.

MEISEL, A., MACKELDANZ, P., BICKLE, T.A., KRUGER, D.H., SCHROEDER, C. (1995). Type III restriction endonucleases translocate DNA in a reaction driven by recognition site-specific ATP hydrolysis. *Embo J*., 14(12)**:**2958-66.

MELODY JC, VIJAY GS, DAVID GN, STUART HO. (2009). Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 7th edition, 1015-76, W.B. Saunders, Philadelphia.

MILLER, R.D., TAILLON, M.P., KWOK, P.Y. (2001). Regions of Low Single-Nucleotide Polymorphism Incidence in Human and Orangutan Xq: Deserts and Recent Coalescences. Genomics., **71**(1); 78-88.

MURRAY, N.E. (2000). Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol Mol Biol Rev*., **64**(2):412-34.

NAGEL, R. L. (2003). Disorder of Hemoglobin Function and Stability. Ed.: Handin, R I,, Lux, S.E. and Stossel, T.P. Philadelpphia. Lippincott Williams&Wilkins, Blood: Principles and Practice of Hematology. p.:1597-1654.

NAWAR, W.W., (1996). Lipids. In "Food Chemistry", O.R. Fennema (Ed), pp: 225-319. Marcel Dekker, New York.

NEEDLEMAN, H. (2004). Lead poisoning. *Annu Rev Med.,* **55**:209-222.

NEEDLEMAN, H.L., SCHELL, A., BELLINGER, D., LEVITON, A., ALLRED, E.N. (1990). The long-term effects of exposure to low doses of lead in childhood. An 11-year follow-up report. *N Engl J Med*., **322**(2):83-8.

NELSON, D.L. (1991). applications of polymerase chain reaction methods in genome mapping. *Curr. Opin. Genet. Dev.,* **1**(1):62-68.

NICOLAS, G., VIATTE, L., BENNOUN, M., BEAUMONT, C., KAHN, A., VAULONT, S. (2002). Hepcidin, A New Iron Regulatory Peptide. *Blood Cells, Molecules, and Diseases.,* **29** (3):327–335.

OLIVIERI, N.F. (1999). The Beta-Thalassemias. *N. Engl. J. Med*., **341**(2): 99-109.

OLIVIERI, N.F., WEATHERALL, D.J. (1998). The therapeutic reactivation of fetal haemoglobin. *Hum Mol Genet*., **7**(10):1655-8.

OLYNK, JK., O'NEIL, R., BRİTTON, RS., BACON, BR., (1994). Determination of hepatic iron in fresh and paraffin embedded tissue: diagnostic implications. Gastroenterology ; 106: 674-677

OSKI, F.A., NAIMAN, J.L. (1982). Hematologic problems in the newborn. Third edition. Major problems in clinical pediatrics, 4(1);1-360.

ÖKTEM. S., ÖZHAN, M. (2001). Apoptozisin önemi. Toraks dergisi, **2**(1): 91-95.

PETERS TJ, RAJA KB, SIMPSON RJ (1988). Mechanisms and regulation of intestinal iron absorbsion, Ann. N.Y. Aca d.Sci. 526:141-7.

PETTERSSON, T., KIVIVUOR, S.M., SIIMES, M.A. (1994). Is serum transferrin receptor useful for detecting iron deficiency in anaemic patients with chronic inflammatory diseases. *Brit. J.Rheum*., **33**(8):740-744..

PHILIP, A.T., GERSON, B. (1994). Lead poisoning – Part II. Effects and assay. *Clin Lab Med.,* **14**:651-670.

PHILLIP, A.T., GERSON, B. (1994a). Lead poisoning – Part I. Incidence, etiology, and toxicokinetics. *Clin. Lab. Med.,* **14**:423-444.

PIETRANGELO, A. (2006). Hereditary Hemochromatosis. *Biochimica et Biophysica Acta.,* **1763** (7): 700–710.

PIETRANGELO, A., (2002). Mechanism of iron toxicity. Adv Exp Med Biol ;509:19-43.

PINGOUD, A, JELTSCH, A. (1997). Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases. *Eur J Biochem*., **246**(1):1-22.

PIOMELLI, S. (2002). Childhood lead poisoning. *Pediatr. Clin. North. Am*., **49** (6): 1285-1304.

POLLACK S, LASKY FD, (1976). A new iron binding protein isolated from intestinal mucosa, J.Lab Clin Med, 55:216-220.

PONKA, P. (1997). Tissue Spesific Regulation of Iron Metabolism and Heme Synthesis: Distinct Control Mechanisms in Erythroid Cells. *Blood*., 89(1): 1-25.

POUNDS, J.G., LONG, G.J., ROSEN, J.F. (1991). Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environ Health Perspect*., **91**:17-32.

principles/pcr.html (Erişim tarihi: 30 Mayıs 2010).

PUSTERLA, N., MADIGAN, J.E., LEUTENEGGER, C.M. (2006). Real-Time Polymerase Chain Reaction: A Novel Molecular Diagnostic Tool for Equine Infectious Diseases N. *J Vet Intern Med.,* **20**:3–12.

RABINOWITZ, M.B., WETHERILL, G.W., KOPPLE, J.D. (1976). Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J. Clin. Invest.,* **58**:260-270.

RAMIREZ-MUNOZ, J. (1968) Atomic-absorption spectroscopy and analysis by atomicabsorption flame photometry. Amsterdam, New York, Elsevier Pub. Co.,

ROBERTS, R.J., MACELIS, D. (1991). Restriction enzymes and their isoschizomers. *Nucleic Acids Res*., **19**:2077-2109.

ROSATELLI, M.C., DOZY, A., FAA, V., MELONI, A., SARDU, R., SABA, L., KAN, Y.W., CAO, A. (1992). Molecular characterization of β-thalassemia in the Sardinian population. *Am. J. Hum. Genet.,* **50** (2):422-426.

ROY, C., CARISON, E.,ANDERSON, L. (2000b). Interactions of the ectodomain of HFE with the transferrin receptor are criticil for iron homeostasis in cells. 484(3); 271-274.

ROY, C., ENNS, C. (2000a). Iron homeostasis: New tales from the crypt. *Blood.* ,**96**(13): 420-427.

RUND, D, RACHMILEWITZ, E. (2000). New treatment of β-thalassemia. *Critical Reviews in Oncol. Hematol.,* **33** (2):105-118..

RUND, D., RACHMİLEWITZ, E. (2001). Pathophysiology of alpha- and beta-thalassemia: therapeutic implications. *Semin Hematol*., **38**(4):343-9.

SACHIDANANDAM, R., WEISSMAN, D., SCHMIDT, S.C., KAKOL, J.M., STEIN, L. D., MARTH, G., SHERRY, S., MULLIKIN, J. C., MORTIMORE, B.J., WILLEY, D.L., HUNT, S.E., COLE, C.G., COGGILL, P.C., RICE C,.M., NING, Z., ROGERS, J., BENTLEY, D.R., KWOK, P.Y., MARDIS, E.R., YEH, R.T., SCHULTZ, B., COOK, L., DAVENPORT, R., DANTE, M., FULTON, L., HILLIER, L., WATERSTON, R.H., MCPHERSON, J.D., GILMAN, B., SCHAFFNER, S., VAN ETTEN, W.J., REICH, D., HIGGINS, J., DALY, M.J., BLUMENSTIEL, B., BALDWIN, J., STANGE-THOMANN, N., ZODY, M.C., LINTON, L., LANDER, E.S., ALTSHULER, D. (2001). International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.,* **409**(6829):928–33.

SALTMAN, P., (1989). Oxidative stress: A radical view. Semin Hematol ;26(4):249-256.

SANKARAN, V.G., NATHAN, D.G. (2010). Reversing the hemoglobin switch. N. *Engl. J. Med*., **363**(23):2258-60.

SCHELL, L.M., DENHAM, M., STARK, A.D., GOMEZ, M., RAVENSCROFT, J., PARSONS, P.J., AYDERMIR, A., SAMELSON, R. (2003). Maternal blood lead concentration, diet during pregnancy, and anthropometry predict neonatal blood lead in a socio-economically disadvantaged population. *Environ. Health Perspect.,* **111**:195– 200.

SCRIMSHAW N.S., (1991). Iron deficiency, Sci. Am., 265, 4.

SIMPSON, RJ, PETERS TJ (1986). Cholate soluble and insoluble iron binding components of rabbit duedonal brush-border membrane vesicles, Biochim Biophys. Acta 859:227-236.

SILBERGELD, E.K. (2004). Commentary: the role of toxicology in prevention and precaution. *Int J Occup Med Environ Health*., **17**(1):91-102.

SIQUEIRA, J.F., ROCAS, I.N. (2003). PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J. Dent*., **31**(5): 333-9.

SIRIRATMANAWONG, N., CHANSRI, W., SINGSANAN, S., FUCHAROEN, G., FUCHAROEN, S. (2009). Complex interaction of Hb E [beta26(B8)Glu—>Lys], Hb Korle-Bu [beta73(E17)Asp-->Asn] and a deletional alpha-thalassemia-1 in pregnancy. *Hemoglobin.,* **33**(6):507-14.

SIX, K.M., GOYER, R.A., (1972). The influence of iron deficiency on tissue content and toxicity of ingested lead in the rat. *J. Lab. Clin. Med*., **79**:128– 136**.**

SMITH, C.M., WANG, X., HU, H., KELSEY K.T. (1995). A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. *Environ Health Perspect.,* **103**:248-253.

SMITH, L.H. J.R. (1990). Overview of hemochromatosis. *West J. Med.,* **153** (3): 296-308.

STR Markers.USA: Elsevier Press, p.: 33-84.

SMOLKIN V, HALEVY R, LEVIN C, MINES M, SAKRAN W, ILIA K, KOREN A. (2008). Renal function in children with beta-thalassemia major and thalassemia intermedia. Pediatric Nephrology, 23(10):1847-51.

SWINKELS D, JASSEN M, BERGMANS J, MARX J., (2006). Hereditary Hemochromatosis: Genetic complexity and New Diagnostic Approaches. Clin Chem;52(6):950-68.

TADMOURI, G.O., TUZMEN, S., ÖZÇELİK, H., ÖZER, A., BAIG, S.M., SENGA, E.B., BAŞAK, A.N. (1998). Molecular and population genetic analyses of β-thalassemia in Turkey. *Am. J. Hem*., **57** (3): 215-220.

TADMOURİ, G.O., BAŞAK, A.N. (2001). β-Thalassemia in Turkey: A Review of the Clinical, Epidemiological, Molecular and Evolutionary Aspects *Hemoglobin.,* **25** (2), 227-239.

TADMOURİ, G.O., TUZMEN, S., OZÇELİK, H., OZER, A., BAİG, S.M., SENGA, E.B., BASAK, A.N. (1998). Molecular and Population Genetic Analyses of β-Thalassemia in Turkey. *Am J Hematol.,* **57**: 215–220.

THEIN, S.L. (1993). β-thalassemia. *Bailliere's Clinical Haematology*. **6**:1, 151-175.

THEIN, S.L (2005). Genetic modifiers of beta-thalassemia. Haematologica. 90(5):649-60.

THOMAS, C., THOMAS, L. (2002). Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem*., **48**(7):1066-1076.

THOMPSON, K., MOLINA, R.M., BRAIN, J.D., WESSLING-RESNICK M. (2007). Belgrade rats display liver iron loading. *J Nutr.*, **136**(12):3010-4..

TURAN, C. (2002). Genetik. Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Ders Kitabı, Yayın No: 2, Hatay, 169 s.

TUZMEN, S., SCHECHTER, A.N. (2001). Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating β-talasemia mutations. *Blood. Reviews*., **15** (1): 19-29.

ULUKOL, B., TEZCAN, S., AKAR, N., GÖKCE, H., CİN, S. (2004). Evaluation of Erythropoiesis by Serum Transferrin Receptor and Ferritin in infants aged 0-6 months. *Pediatric Hematology and Oncology*., **21**(4); 293-305.

UMBREIT J. (2005). Iron deficiency: a concise review. *Am. J. Hematol.*, **78** (3): 225-31.

UYSAL M., (1998). Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik Gelişim, **11**: 336-340.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T., MAZUR, M., TELSER, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J.Biochem. Cell. Biol*.,**39**(1): 44-84.

VALLANCE, H., FORD, J. (2003). Carrier testing for autosomal-recessive disorders. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, **40**(4): 473-97.

Varian Basic Atomic Absorption Theory Australia Pty Ltd (A.C.N. 004 559 540)1997.

VENTER, J.C., ADAMS, M,D., MYERS, E.W. et all. (2001). The sequenceof the humangenome. *Science*, **291**(5507):1304–51.

VURAL, N. (2005). Toksikoloji, *Ankara Üniversitesi Basımevi,* Ankara, p.:504-508.

WEATHERALL D.J., CLEGG J.B. (2002). Genetic variability in response to infection: malaria and after. *Genes Immun*., **3**(6):331-7.

WEATHERALL, D.J. (1998). Pathophysiology of thalassaemia. *Baillieres Clin Haematol*., **11**(1):127-46.

WEATHERALL, D.J. (2001a). Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet*. **2**(4):245-55.

WEATHERALL, D.J. (2004a). Thalassaemia: the long road from bedside to genome.*Nat Rev Genet*., **5**(8):625-31.

WEATHERALL, D.J. (2010). The Thalassemias: Disorders of Globin Synthesis . Ed : K. Kaushansky, M Lichtman, U. Seligson, T. Kipps, and T. Prchal, Williams Hematoloji, 8th ed. New York: McGraw-Hill, pp.: 675-707.

WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B. (2001b). Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ*;**79**(8):704-12.

WEATHERALL, D.J., HIGGS, D.R., CLEGG, J.B. (1988). The molecular pathology of the alpha globin genes. *Br J Cancer Suppl.,* **9**:17-22.

WEATHERALL, D.J., PRESLEY, L., WOOD, W.G., HİGGS, D.R., CLEGG, J.B. (1981). Molecular basis for mild forms of homozygous beta-thalassaemia. *Lancet.* **1**(8219):527-9.

WEATHERALL, D.J., WİLLİAMS, T.N., ALLEN, S.J., O'DONNELL, A. (2010). The population genetics and dynamics of the thalassemias. *Hematol Oncol Clin North Am.,* **24** (6):1021-31.

WEATHERALL. D.J. (2004b). The Thalassemias: the role of molecular genetics in an evolving global health problem. *Am J Hum Genet.,* **74**(3):385-92.

WEST, A.R., OATES, P.S. (2008). Mechanisms of heme iron absorption: current questions and controversies. *World J Gastroenterol.,* **14**(26):4101-10.

WHEBY MS, (1970). Site of iron absorbtion in man. Scand J Hematoll, 7:56-62.

WILDBURGER, R., MRAKOVCIC L., STROSER M., ANDRISIC L., BOROVIC SUNJIC S., ZARKOVIC K., ZARKOVIC,N. (2009). Lipid peroxidation and age-associated diseases-cause or consequence: Review Citation. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi **29**(1), 189193.

WILLIAMS, S.J., HAYWARD N.K. (2001). The impact of the human genome project on medical genetics. *Trends in Molecular Medicine.,* **7**(5). 187-231.

WILSON, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ*. *Microbiol.,* **63**:3741-3751.

WITTMERS, L.E. JR., AUFDERHEIDE, A.C., WALLGREN, J. (1988). Lead in bone. IV. Distribution of lead in the human skeleton. *Arch. Environ. Health.,* **43**:381-391.

WOLF, A.W., JİMENEZ, E., LOZOFF, B. (2003). Effects of iron therapy on infant blood lead levels. *J Pediatr.,***143**(6):789-95.

WONKE, B. (2001). Clinical Management of β-Thlasemia Major. *Semin Hematol*., **38**: 350-359.

WOOD, W.G., WEATHERALL, D.J. (1983). Developmental genetics of the human haemoglobins. *Biochem J.,* **215**(1):1-10.

WRIGHT, P.A., WYNFORD-THOMAS, D. (1990). The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *J Pathol*., **162**(2):99-117.

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 clinc. *J. Pediatr*., **142**(1):9-14.

WU, AC., LESPERANCE, L., BERNSTEIN, H., (2002). Screening for iron deficiency. Pediatr Review; 23(5):171-178.+

XUE, H.C., QIU, L.S., ZHU, C.W. (1993). RFLP analysis of DNA from Echinococcus granulosus collected from four provinces/autonomous region in China. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*., **11** (3): 201-203.

YAPRAK, I. (2004). Beta Talasemi Tanı ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. STED. **13** (2) 58-59.

YEN, A.W., FANCHER, T.L., BOWLUS, C.L. (2006). Revisiting Hereditary Hemochromatosis: Current Concepts and Progress. *The American Journal of Medicine*., **119** (5): 391–399.

YILDIZ, S., ATALAY, A., BAĞCI, H., ATALAY, E.Ö. (2005). Beta-thalassemia mutations in Denizli province of Turkey. *Turk J Hematol.,* **22**: 19-23.

ZADÁK, Z., HYSPLER, R., TICHÁ, A., HRONEK, M., FIKROVÁ, P., RATHOUSKÁ, J., HRNCIARIKOVÁ, D., STETINA, R. (2009). Antioxidants and vitamins in clinical conditions. Physiological Research, **58** (Suppl 1), 13-17.

ZALUPS, R.K. (2000). Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev*., **52**(1):113-43.

ZALUPS, R.K., AHMAD, S. (2003). Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol Appl Pharmacol*., **186**(3):163-88.

ZIEGLER, E.E., EDWARDS, B.B., JENSEN, R.L., MAHAFFEY, K.R., FORMON, S.J. (1978). Absorption and retention of lead by infants. *Pediatr. Res*., **12**: 29–34.

ZOLLER, H., PIETRANGELO, A., VOGEL, W., WEISS, G. (1999). Duodenal metal-transporter (DMT-1,NRAMP-2) expression in patients with hereditary haemochromatosis. *Lancet.,* **353** (9170):2120-3.

ZWART DE, L.L., MEERMAN, J.H.N., COMMANDEUR, J.N.M., VERMEULEN, N.P.E. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicin*, **26**(1-2): 202-226.

YAPRAK I. Beta Talasemi Tanı ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. Sted 2004; 13(2):58-9.

YILDIZ İ., (2009). Demir Eksikliği Anemisi. Türk Pediatri Arşivi; 44(Sup 1): 14-8.

EKLER

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Talasemi Hastalarında Metallerin Toksikokinetiğinde Rol Oynayan Enzim ve Proteinlerin Gen Polimorfizmlerinin Kan Metal Düzeyleri ile İlişkisinin Araştırılması			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Zeliha Kaynaltı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Adli Kimya ve Adli Toksikoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz: Prospektif Çalışma			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

ASLI GİBİDİR
Emrah DURAL
Enstitü Sekreteri
26 Mart 2014

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
BİLGİLENDİRİLEN ONAYLI BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐	
	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	HASTA KARTI/GÖNÜLLÜLERİ	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	

KARAR BİLGİLERİ		
	Karar No:07-286-13	Tarihi: 29 Nisan 2013
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri i bilgilendirilmiş gönüllü olur formu incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen nitelikte gerçekleştirilmesinde etik v bilimsel sakınca bulunmadığına, bilgilerinize karar Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ADASI: Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

BAŞKANIN ÜNVANI / ADI / SOYADI: Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Üyelerin		Araştırma ile ilgili		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E:☒	K:☐	E:☐	H:☒	E:☒	H:☐	
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E:☒	K:☐	E:☐	H:☒	E:☒	H:☐	
Prof.Dr.Mehmet GÜREL	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E:☒	K:☐	E:☐	H:☒	E:☒	H:☐	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü.Eczacılık Fakültesi	E:☒	K:☐	E:☐	H:☒	E:☐	H:☒	Dersde
Prof.Dr.Nahide FURALI	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E:☒	K:☐	E:☐	H:☒	E:☒	H:☐	
Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E:☒	K:☐	E:☐	H:☒	E:☒	H:☐	
Prof.Dr.Seydar ÖZTÜRK	Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E:☒	K:☐	E:☐	H:☒	E:☒	H:☐	
Prof.Dr.Serap BİVİL	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E:☐	K:☒	E:☐	H:☒	E:☐	H:☒	Telefonla
Prof.Dr.Zafer ŞENOCAK	Halıcılık	A.Ü.Halıcılık Fakültesi	E:☐	K:☒	E:☐	H:☒	E:☐	H:☒	Dış üyelik
Prof.Dr.Recai ÇAKİR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E:☐	K:☒	E:☐	H:☒	E:☒	H:☐	
Doç.Dr.Cengiz UTKAN	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E:☒	K:☐	E:☐	H:☒	E:☒	H:☐	
Doç.Dr.Derya ÖZYURDA	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E:☐	K:☒	E:☐	H:☒	E:☒	H:☐	
Yrd.Doç.Dr.Nilüfer KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E:☐	K:☒	E:☐	H:☒	E:☐	H:☒	Telefonla
Yrd.Doç.Dr.Volkan KAVAS	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E:☒	K:☐	E:☐	H:☒	E:☒	H:☐	
Gülsün ASLAN	Arkeoloji	-	E:☐	K:☒	E:☐	H:☒	E:☐	H:☒	

Emrah DURAL
Emekli Sekreter

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Fatih

Soyadı: ÖZTÜRK

Doğum yeri ve tarihi: Şişli, 1988

Uyruğu: T.C

II. Eğitimi

2013- : Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Enstitüsü, Disiplinlerarası Adli Bilimler A.D. Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Bölümü (Yüksek Lisans)

2011-2012: Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi, Analitik Kimya A.D. Bölümü (Yüksek Lisans)

2007-2011: Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (Lisans)

Yabancı Dili: İngilizce

III. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Adli Toksikoloji Derneği

IV. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler:

F.Ozturk, E. Altay Ozturk, E. Coskunsu, (2014). "Bonzai Is Not Natural, Is The Chemical. Kill!",1. International Forensic Toxicology Congress, 29-30 November 2014, Ankara.

Fatih Ozturk, Esra Altay Ozturk, Melda Altıkoğlu, Tarık Eren, (2014). " New Generation Of Non-Toxic synthetic Polymers", 1. International Forensic Toxicology Congress, 29-30 November 2014, Ankara.

V. Diğer Akademik Aktiviteler:

Katıldığı Bilimsel Kurslar, Sempozyumlar, Çalıştaylar

1. "Adli Bilimlerde Yeni Ufuklar Sempozyumu", 2014, Ankara.
2. "Adli Psikoloji Günleri", 2014, Ankara.

Katıldığı Bilimsel Kongreler

1. "2. Ulusal Felaket Kurbanlarının Kimliklendirilmesi Kongresi", 2014, Ankara.
2. " 1st International Congress of Forensic Biology and Genetics", 2014, Ankara.
3. "1st International Congress and Workshop of Forensic Toxicology.", 2014, Ankara.