

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şule ULUTAŞ

KOZAN’DA BETA TALASEMİ MUTASYONLARI

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2022

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOZAN'DA BETA TALASEMİ MUTASYONLARI

Şule ULUTAŞ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof.Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK
Yıl , 2022, Sayfa:77
Jüri : Prof. Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK
: Prof. Dr. Ali Erdiç YALIN
: Prof. Dr. Salih ÇETİNER

Ülkemizde beta talasemi taşıyıcı sıklığı %2 olup, bazı bölgelerde bu oran %10'a kadar artmaktadır. IVS1-110 (G>A) ülkede en yaygın beta talasemi mutasyonudur. Bu çalışmadaki amacımız Kozan'da beta talasemi mutasyonlarını belirlemektir. Beta talasemi hastası ve taşıyıcılarından 5 ml kan örneği alındı. Hematolojik verileri kan sayım cihazı ile elde edildi. HbA2 değeri HPLC ile belirlendi. On farklı beta talasemi mutasyonu [-30 (T>A), Fsc 8 (-AA), Fsc 8/9 (+G), IVS 1-1 (G>A), IVS 1-5 (G>C), IVS 1-6 (T>C), IVS 1-110 (G>A), Cd 39 (C>T), IVS2-1 (G>A), IVS2-745 (C>G)] ARMS metodu ile tarandı. Beş çift IVS 1-110 heterozigot, bir genç ve iki çocuk homozigot olarak belirlendi. Toplam 32 kişide yedi mutasyon (Fsc8, Fsc8/9, IVS1-1, IVS1-6, IVS1-110, IVS2-1 ve -30) bulundu. IVS1-110 (G>A)'nın Kozan'da en yaygın beta talasemi mutasyonu olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Beta talasemi, IVS1-110 (G>A)

ABSTRACT

MSc THESIS

BETA THALASSEMIA MUTATIONS IN KOZAN

Şule ULUTAŞ

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof.Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK
Year, 2022, Sayfa:77
Jury : Prof. Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK
: Prof. Dr. Ali Erdiñ YALIN
: Prof. Dr. Salih ÇETİNER

Beta thalassaemia trait is about 2% but at some region this ratio increase as to 10% in Turkey. IVS1-110 is the most common beta thalassaemia mutation in the country. In this study, our aimed was determine beta thalassemia mutations in Kozan. Five mL venous blood was taken from thalassemia trait and patients. Haematological datas were obtained by cell counter. HbA2 was determined by HPLC. Ten beta globin gene mutations [-30 (T>A), Fsc 8 (-AA), Fsc 8/ 9 (+G), IVS 1-1 (G>A), IVS 1-5 (G>C), IVS 1-6 (T>C), IVS 1-110 (G>A), Cd 39 (C>T), IVS 2-1 (G>A), IVS 2-745 (C>G)] were screened by ARMS method. Five of the couples were detected as IVS1-110 heterozygous. Also one adults and two children were homozygous. Seven beta thalassemia mutations (Fsc8, Fsc8/9, IVS1-1, IVS1-6, IVS1-110, IVS2-1 and -30) were found in 32 samples. IVS 1-110 (G>A) was detected the most common beta thalassemia mutation in Kozan.

Keywords: Beta thalassaemia, IVS1-110 (G>A)

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Erişkin bir insanın kırmızı kan hücreleri içinde üç farklı hemoglobin molekülü bulunmaktadır. Bu moleküllerin yapısında farklı globin zincirleri [HbA ($2\alpha 2\beta$), HbA2 ($2\alpha 2\delta$), HbF ($2\alpha 2\gamma$)] yer almaktadır. Sağlıklı bir insandaki hemoglobinlerin dağılımı (HbA $\cong$ %96, HbA2 $\cong$ %3 ve HbF $\leq$ %1) önemlidir. Bunlardan HbA2 miktarının yükselmesi (≥ 3.5) β -talasemi taşıyıcılığı için önemlidir. Taşıyıcıların evlenmesi sonucu mutant genleri alan çocuklarda β zincir sentezinin azalması veya kesin yokluğu sonucu ağır anemi ile seyreden β -talasemi hastalığı meydana gelmektedir. Beta talaseminin dağılımı yöreden yöreye değişim göstermektedir. Çukurova bölgesinde β -talasemi taşıyıcı sıklığı %3.9 oranında bulunmuştur. Genetik heterojenitesi fazla olup ülkemizde 40, bölgemizde ise 20 mutasyon belirlenmiştir.

Hb varyantları α , β , γ veya δ zincirlerinden birinin üzerindeki aminoasit değişimleri sonucu meydana gelmektedir. Ülkemizde yapılan toplum taramasında 60 Hb varyantı keşfedilmiş olup çoğu anemiye neden olmaz. Ancak HbS, HbE ve HbC gibi varyantlar bazı bölgelerde yaygın olarak görülmekte olup insan sağlığını ciddi şekilde tehdit etmektedir. Orak Hücreli Anemiye neden olan HbS, Çukurova bölgesinde yaşayan Eti-Türklerinde çok yaygındır. Bölgedeki taşıyıcı sıklığı [HbAS; $\beta 6$ Glu $\rightarrow$ Val (GAG $\rightarrow$ GTG)] % 8.2 dir. HbS'den başka bölgemizde üç Hb varyantı daha [HbE: $\beta 26$; Glu $\rightarrow$ Lys (GAG $\rightarrow$ AAG), HbD: $\beta 121$ Glu $\rightarrow$ Gln (GAA $\rightarrow$ CAA), HbC: $\beta 6$ Glu $\rightarrow$ Lys (GAG $\rightarrow$ AAG)] vardır. HbE talasemik bir varyant olup bölgemizdeki sıklığı %0.16-2.4 arasındadır. HbD taşıyıcı sıklığı ise %0.2 dir. HbC Türkiye'de ender görülen bir varyanttır. Kırmızı kan hücreleri içerisinde kristalize olmaya eğilim gösteren HbC orta derecede hemolitik anemiye neden olmaktadır. Çukurova bölgesinde halk sağlığı sorunu olan β -talaseminin doğum öncesi teşhisi çok büyük önem taşımaktadır. Prenatal tanı işlemi için

Kozan’da beta talasemi mutasyon türlerinin belirlenmesi riskli ailelere büyük katkı sağlayacaktır.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bana her konuda rehberlik eden danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK'e sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım. Tez çalışmamın yürütülmesi aşamasında destek ve yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Yusuf DÖĞÜŞ'e ayrıca teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında olduğu gibi tez süresi boyunca yanımda olan, annem Elif ÖZDEMİR ULUTAŞ, babam Şuayip ULUTAŞ ve kardeşim Özdemir ULUTAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı FLY-2019-12225 no'lu proje ile destekleyen Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Projeleri Birimine de ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Hemoglobin Molekülünün Yapısı ve İşlevi.....	3
2.1.1. Hem ve Globin Zincirleri	3
2.1.2. Globin Gen Yapısı.....	8
2.1.2.1. α -Benzer Gen Kümesi.....	9
2.1.2.2. β -Benzer Gen Kümesi.....	10
2.2. Hemoglobin Sentezi ve Hemoglobin Tipleri	12
2.3. Hemoglobin Molekülünün Kalıtsal Bozuklukları.....	15
2.3.1. Anormal Hemoglobinler.....	18
2.3.1.1. HbS (Orak Hücre Anemisi)	19
2.3.1.2. Hemoglobin C (HbC)	20
2.3.1.3. Hemoglobin E (HbE).....	21
2.3.1.4. Hemoglobin D (HbD).....	22
2.3.1.5. Türkiye’de Anormal Hemoglobinlerin Dağılımı	23
2.3.1.6. Çukurova Bölgesinde Görülen Anormal Hemoglobinlerin Dağılımı	26
2.4. β -Talasemiler.....	26
2.4.1. Beta Talasemi dağılımı	26

2.4.2. Beta Talaseminin Prenatal Tanısı.....	32
2.4.3. Koryonik Villus Örneklemesi (CVS)	33
2.4.4. Mutasyon analizi	34
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	35
3.1. Kullanılan Cihazlar	35
3.2. Kimyasal Maddeler.....	35
3.2.1. Katı Maddeler.....	35
3.2.2. Sıvı Maddeler	36
3.3. Kan Örnekleri	36
3.3.1. Kan	36
3.4. Yöntemler	37
3.4.1. Hematolojik İncelemeler	37
3.4.2. Hemolizat hazırlanması	37
3.4.3. Moleküler Yöntemler	38
3.4.3.1. DNA İzolasyonu.....	38
3.4.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Beta Gen Amplifikasyonu.....	40
3.4.3.3. Agaroz Jel Elektforezi.....	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	51
4.1. Bulgular	51
4.2. Tartışma	61
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1.	İnsan hemoglobinlerinin yapısı ile fetus ve erişkindeki miktarı	15
Çizelge 2.2.	Hemoglobin molekülünün kalıtsal bozuklarının sınıflandırılması	16
Çizelge 2.3.	Hemoglobin bozukluğu olan yıllık doğum sayısı	16
Çizelge 2.4.	Türkiye’de Anormal hemoglobinlerin dağılımı.....	25
Çizelge 2.5.	Türkiye’de gözlenen beta talasemi mutasyonları	29
Çizelge 2.6.	Çukurova bölgesinde gözlenen beta talasemi mutasyonlarının dağılımı	30
Çizelge 2.7.	Prenatal tanı yapılan ailelerde β -talasemi mutasyon türleri ve dağılımı	31
Çizelge 3.1.	ARMS ve RFLP için bazı PCR protokolleri.....	41
Çizelge 3.2.	ARMS yönteminde kullanılan ortak ve kontrol primerleri.....	44
Çizelge 4.1.	Beta talasemi hastası ve taşıyıcı sonuçları.....	51
Çizelge 4.2.	Kan örneklerinin hematolojik değerleri ve mutasyon sonuçları	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 2.1.	Hemoglobin ve hem grubu	4
Şekil 2.2.	Beta zinciri üzerindeki hem bağlanma bölgeleri	5
Şekil 2.3.	Amino asitlerin oluşturduğu hem cebinin şematik gösterimi	6
Şekil 2.4.	Hb molekülünün deoksi ve okside formundaki yapısal farklılıklar.....	7
Şekil 2.5.	Epsilon, A gama, G gama, delta, beta ve alfa globin genleri	8
Şekil 2.6.	Alfa benzer gen kümesi	10
Şekil 2.7.	Alfa benzer gen kümesinin sentezini düzenleyen hipersensitif bölgeler.....	10
Şekil 2.8.	Beta benzer gen kümesi.....	11
Şekil 2.9.	Beta globin gen kümesinin sentezini düzenleyen hipersensitif bölgeler.....	12
Şekil 2.10.	Globin genlerinin gelişim sürecine göre sentezledikleri hemoglobinler.....	13
Şekil 2.11.	Gelişme sürecinde globin zincir sentezindeki değişimler	14
Şekil 2.12.	Hemoglobinopatilerin yeryüzündeki dağılımı.....	18
Şekil 2.13.	HbS taşıyan hücrelerin yapısı ve damar içindeki hareketleri	20
Şekil 2.14.	Hemoglobin C hastasına ait hemoglobin elektroforez	21
Şekil 2.15.	HbA, C, D ve S'in elektroforetik olarak karşılaştırılması	23
Şekil 2.16.	Dünyada talasemi ve anormal hemoglobinlerin dağılımı.....	27
Şekil 2.17.	Transabdominal ve transvajinal koryonik villus örneğinin alınması (60).....	34
Şekil 3.1.	Beta globin gen dizisi, PCR primerleri ve Dde I kesim yerleri.	45
Şekil 3.2.	ARMS yöntemi ile mutasyon taraması.....	48
Şekil 3.3.	Beta globin gen dizisi üzerindeki beta talasemi mutasyonları.....	49
Şekil 4.1.	IVS1-110 G→A mutasyonunun ARMS yöntemi ile sonuçları	53

Şekil 4.2.	Fsc 5 mutasyonu taşıyan allellerin Dde I enzimi ile belirlenmesi.	54
Şekil 4.3.	IVS1-6 mutasyonunun ARMS yöntemi ile belirlenmesi.....	55
Şekil 4.4.	30 mutasyonunun ARMS yöntemi ile belirlenmesi	56
Şekil 4.5.	IVS1-1 mutasyonunun ARMS yöntemi ile belirlenmesi.....	57
Şekil 4.6.	IVS2-1 mutasyonunun ARMS yöntemi ile belirlenmesi.....	57
Şekil 4.7.	Fsc8 (-AA) mutasyonunun ARMS yöntemi ile belirlenmesi.	58
Şekil 4.8.	HPLC ile HbA2 değeri % 2.5 bulunan bir hastanın sonucu.....	59
Şekil 4.9.	HPLC ile HbA2 değeri % 6.6 bulunan beta talasemi taşıyıcısı.....	60
Şekil 4.10.	Ç.Ü. Tıp Fakültesi Prenatal Tanı Merkezinin yıllara göre sonuçları	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Hb	: Hemoglobin
A	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
δ	: Delta
ζ	: Zeta
ε	: Epsilon
ε	: DemirFe
His	: Histidin

1. GİRİŞ

Hemoglobin molekülünün yapısında yer alan globin zincir sentezinin azalması, tamamen engellenmesi ya da zincir üzerinde yer alan amino asitlerde meydana gelen değişiklikler sonucu hemoglobinopatiler ortaya çıkmaktadır. Hemoglobinopatiler, hemoglobin varyantları (anormal hemoglobinler) ve talasemiler şeklinde iki ana grupta incelenmektedir. Anormal hemoglobinler ve talasemiler, ülkemizin de içinde yer aldığı Akdeniz kuşağında en sık rastlanılan kalıtsal hastalıklardandır. Dünya Sağlık Örgütü'nün bildirilerine göre dünyada talasemi ve anormal hemoglobin taşıyıcı sıklığı %5,1 olup yaklaşık 269 milyon taşıyıcı vardır.

Alfa talasemiler, hemoglobin molekülünün yapısında yer alan alfa globin zincir sentezinin azalması veya tamamen engellenmesi ile karakterize yaygın genetik hastalıklardır. Alfa talasemiler çoğunlukla α -globin gen delesyonları, nadiren de nokta mutasyonları sonucu meydana gelmektedir. Alfa talasemi determinantlarının çoğu aynı kromozom üzerinde yer alan bir alfa [α -thal-2 ($-\alpha/\alpha$)] veya iki alfa genini [α -thal-1 ($--/\alpha\alpha$)] içine alan delesyonlardan kaynaklanmaktadır. Nondelesyonel α -talasemiler ise çoğunlukla $\alpha 2$ ($\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$), nadiren de $\alpha 1$ globin geni üzerinde ($\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$) bulunan mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. Toplam dört alfa geninden ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) üçüne sahip olan bir kişi ($-\alpha/\alpha\alpha$) anemik değildir. Fakat iki alfa gen delesyonu ($--/\alpha\alpha$) bulunan heterozigot kişi orta derecede hipokrom mikrositer anemiye sahiptir. Ağır (α -thal-1) ve hafif (α -thal-2) determinantların kombinasyonu ($--/-\alpha$) HbH hastalığına neden olmaktadır. Kalıtım ile tek bir alfa genine sahip olan hastalarda kronik hemolitik anemi görülür. Türkiye'de beş farklı gen delesyonu [α -thal-1 (-17.4kb, -26.5kb ve -20.5kb) ve α -thal-2 (-3.7kb ve -4.2kb)] ile $\alpha 2$ geni üzerinde iki PolyA mutasyonu belirlenmiştir.

Çukurova bölgesinde orak hücre anemisi ve beta talasemi hemoglobin hastalıklarının büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır. Her iki hastalık da resesif olarak seyretmektedir. On bir numaralı kromozomun kısa kolunda yer alan β globin

geni üzerindeki mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. Orak hücre anemisi, hemoglobin molekülünün yapısında yer alan beta globin geninin 6.kodonundaki A→T dönüşümü ile glutamik asitin valin ile (GAG→GTG) yer değiştirmesi sonucu meydana gelmektedir. Bu amino asit değişikliği sonucunda HbS'nin deoksijene durumda çözünürlüğü azalmakta ve eritrositler içinde çökerek oraklaşma sonucu hemolitik anemiye neden olmaktadır.

Beta talasemi, β globin zincir sentezinin azalması (β^+) veya yokluğu (β^0) ile karakterizedir. Beta talasemi sendromlarının şiddeti mutasyonun türüne ve globin miktarına bağlı olarak değişmektedir. Mutasyona bağlı azalmış β globin miktarı, eşleşemeyen α globin zincir fazlalığına neden olarak kırmızı kan hücresi öncüllerinin normal gelişimini ve canlı kalabilmesini zorlaştırmaktadır. Homozigot ya da birleşik heterozigot β talasemi vakaları kronik anemiye neden olurken, taşıyıcılarında hiçbir semptom gözlenmemektedir. Beta talasemi mutasyonlarının sıklığı ve yaygınlığı ülkeden ülkeye, hatta bölgeden bölgeye değişebilmektedir. Yapılan çalışmalarda ülkemizde 40'a yakın beta talasemi mutasyonunun olduğu ve en yüksek beta talasemi frekansının Türkiye'nin güney ve güneybatısında tespit edildiği bildirilmiştir. Çukurova bölgesinde 25 farklı mutasyon bulunduğu, en yaygın beta talasemi mutasyonunun ise IVS-I-110 (G>A) olduğu bildirilmiştir.

Beta talasemiler ülkemizin güneyinde sık görülen hastalıklardan biridir. Genetik olarak seyreden bu hastalığın DNA analizi ile tanısı güncel bir konudur. Adana'nın Kozan ilçesinde yapılan bu tez çalışmasında; beta talasemi taşıyıcılığı bulunan çiftlere genetik danışmanlık verilmesi ve bu bireylerin evlenmesi sonucu hasta bebek dünyaya gelmesinin önlenmesi amaçlanmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Hemoglobin Molekülünün Yapısı ve İşlevi

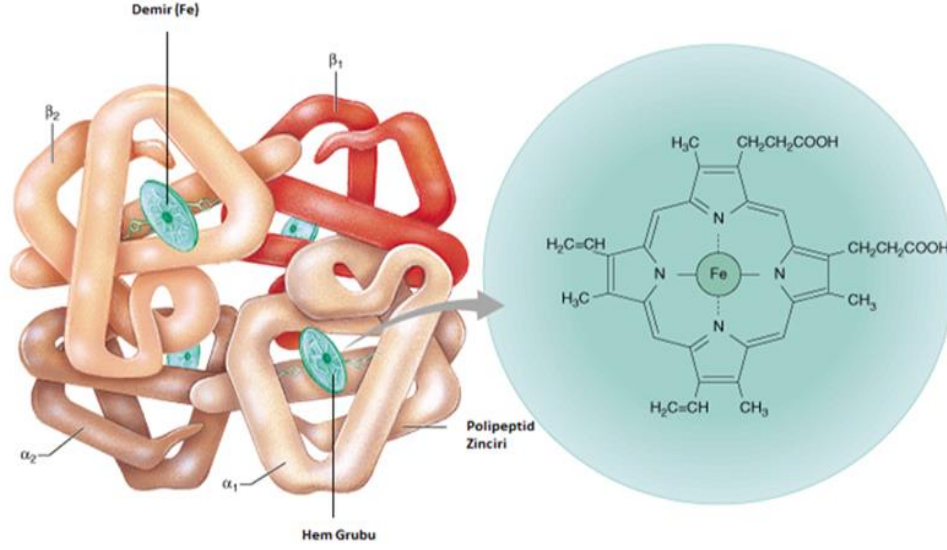
Hemoglobin (Hb) kırmızı kan hücrelerinin temel proteini olup akciğerlerden dokulara oksijen, dokulardan akciğerlere karbondioksit ve protonları taşımadan sorumludur (Thompson, 1991). Her bir kırmızı kan hücresi yaklaşık 200-300 milyon hemoglobin molekülü içermektedir. Hemoglobin molekülü hücrenin kuru ağırlığının %60'ını ve kan proteinlerinin de 2/3'ünü oluşturmaktadır. Kadınlarda 100 ml kanda ortalama 13 gram hemoglobin bulunurken erkeklerde bu ortalama 15 gramdır (Murray, 1998).

Hemoglobin A molekülü, her biri 141 amino asit kalıntısından oluşan iki alfa ve her biri 146 amino asit kalıntısından meydana gelen iki beta zinciri olmak üzere toplam dört polipeptid zincirinden oluşur. Hemoglobin yapısındaki globinler içindeki amino asitlerin çoğu alfa heliksleri oluşturur ve bu heliksler kısa heliksel olmayan segmentlerle bağlanır. Alfa ve beta zincirleri farklı amino asit dizilerine sahiptir, ancak benzer üç boyutlu yapıları oluşturmak için katlanır.

Hemoglobin molekülü, 55 angström çapında, neredeyse küresel olup 64.500 dalton molekül ağırlığına sahiptir. Dört zinciri tetramer oluşturmak için bir araya getirilir. Hem grupları, her alt birimden bir tane olmak üzere, globin molekülünün dış kısmına yakın hidrofobik yarıklara gömülü şekilde bulunur. Her alfa zinciri her iki beta zinciri ile temas halindedir. Bununla birlikte, iki alfa zinciri arasında veya iki beta zinciri arasında çok az etkileşim vardır (Şekil 2. 1).

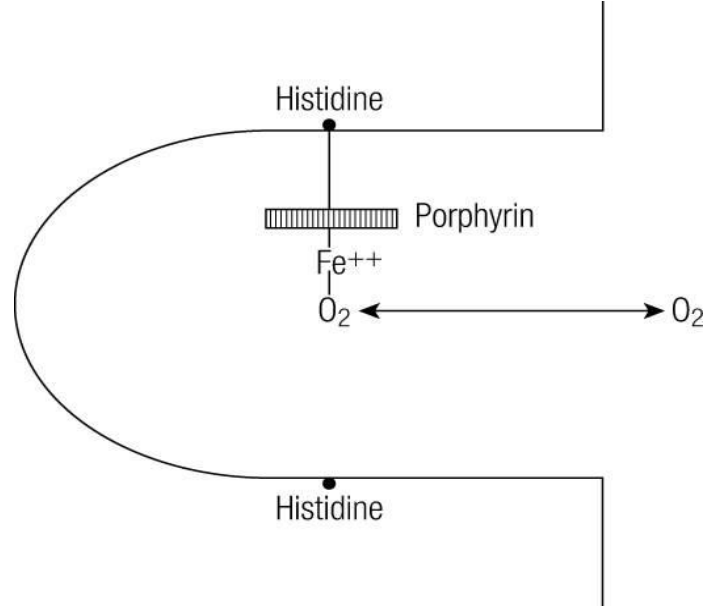
2.1.1. Hem ve Globin Zincirleri

Hemoglobin molekülü üzerinde oksijen bağlanması için dört tane hem hem grubu içerir. Hem grupları, alfa zincirindeki 58. ve 87. amino asitler ile beta zincirindeki 63. ve 92. pozisyonundaki F8 histidin'ler aracılığı ile bağlanmıştır (Şekil 2.2.) (Çürük, 2017). Hidrojen bağları, bu protein içindeki sarmal bölümleri stabilize ederek her polipeptit zincirinin belirli bir şekilde katlanmasına neden olur.



Şekil 2.1. Hemoglobin ve hem grubu

Hem molekülü organik bir yapı olup içinde bir demir atomu bulundurur (Şekil 2.1). Hem içindeki Fe, protoporfirin halkasının merkezindeki dört nitrojene bağlanır ve demir atomu globin içerisine gömülü biçimde bulunan hem grubu ile bir kompleks oluşturur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Amino asitlerin oluşturduğu hem cebinin şematik gösterimi

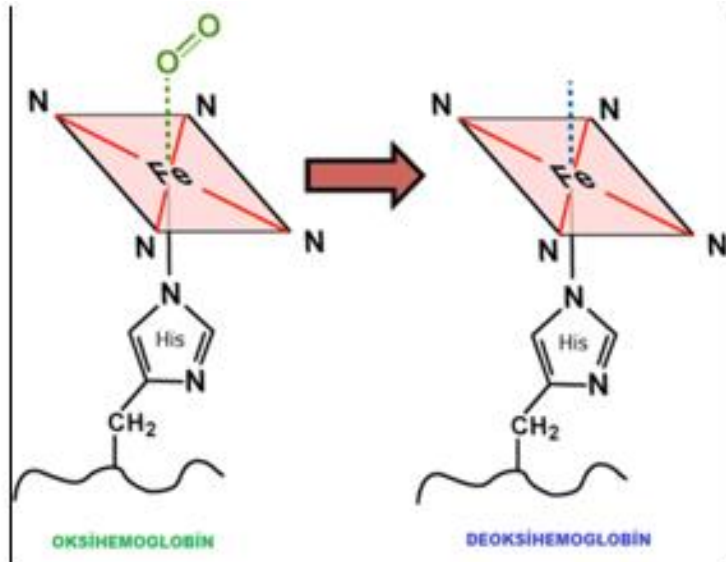
İnsan hemoglobininde, polipeptit zinciri arasındaki uyum kritik olup hemoglobin molekülündeki polipeptit zincirlerinin ikisi arasındaki boşluk, oksijen molekülleri demir atomlarına bağlandığında daralır. Bu Max Perutz tarafından moleküler bir paradoksal solunum formuna benzetilmiştir: akciğerlerin aksine, hemoglobin molekülü oksijen girdiğinde büzülür ve oksijen ayrıldığında ise genişler (Cappellini, 2008).

Hemoglobinin yapısı röntgen analizi ile kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Kuaterner yapı olarak bilinen alt birimler, oksijen ve deoksi hemoglobinde farklılık gösterir (Alain, 2006). Hemoglobin molekülünün alfa ve beta zincirleri arasında iki önemli temas bölgesi [$\alpha 1\beta 1$ ($\alpha 2\beta 2$) ile $\alpha 1\beta 2$ ($\alpha 2\beta 1$)] bulunmaktadır. Deoksi formda alfa zincirinin 40.amino asidi lizin ile beta'nın 146.amino asidi olan histidin arasındaki ($\alpha 1\beta 2$ veya $\alpha 2\beta 1$) bağ oksijenlenme ile koparak, beta zincirinin 94.amino asidi olan aspartik asit ile alfa zincirinin lizini arasında kurulmaktadır. Buna karşın $\alpha 1\beta 1$ veya $\alpha 2\beta 2$ dimeri arasında 150 lik bir dönüş ile Hb gergin durumdan (T) gevşemiş (R) hale geçecek şekilde bulunmaktadır (Şekil 2.4.). Bu yapısal değişikliklerin kararlı bir biçimde korunmasında globin alt birimleri

arasındaki tuz köprülerinin katkısı olduğu bilinmektedir (Liddington, 2006, Shaanan, 1982).

Demir iyonu Fe^{2+} veya Fe^{3+} durumunda olabilir, ancak methemoglobin (Fe^{3+}) oksijeni bağlayamaz. Bağlamada, oksijen geçici olarak ve geri dönüşümlü olarak (Fe^{2+}) ile (Fe^{3+}) oksitlenirken, oksijen geçici olarak süperoksit iyonuna dönüşür, bu nedenle oksijeni bağlamak için demir +2 oksidasyon durumunda bulunmalıdır. Fe^{3+} ile ilişkili süperoksit iyonu protonlanırsa, hemoglobin demiri oksitlenmeye devam eder ve oksijen bağlayamaz. Bu gibi durumlarda, methemoglobin redüktaz enzimi, sonunda demir merkezini azaltarak methemoglobini yeniden aktive edebilecektir (Shaanan, 1983).

Nitrik oksit ve karbon monoksit gibi oksijen dışındaki bileşikler de hemoglobinin demir atomu ile birleşebilir. Karbon monoksit, demir atomuna oksijenden daha sıkı bir şekilde yapışır. Karboksihemoglobin oluştuğunda, oksijen karbon monoksiti hiçbir ölçüde değiştiremez. Bu durum kömür gazı zehirlenmesinin moleküler temelini oluşturur.

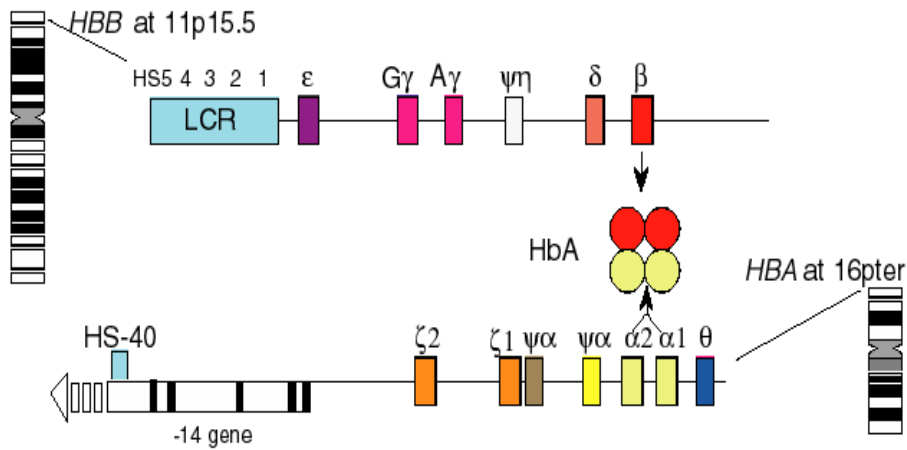


Şekil 2.4. Hb molekülünün deoksi ve okside formundaki yapısal farklılıklar

2.1.2. Globin Gen Yapısı

Yapılan araştırmalar α ve β globin zincirlerinin iki farklı gen ailesinden sentezlendiğini ortaya koymuştur. Her polipeptid zinciri bir latin alfabesi harfleri ile adlandırılır. Normal insan hemoglobinleri; α , β , γ , δ , ϵ , ζ globin zincirlerinden oluşur. Bu globin zincirleri ise; α -globin gen kümesi ve β -globin gen kümesi tarafından sentezlenir (Çürük, 2017; Steinberg, 2009) (Şekil 2.5).

Alfa benzer genlerinden zeta, embriyonik hayatta aktif olup fetal ve erişkin dönemde görev almaz. Beta benzer genlerinden biri olan epsilon embriyonik hayatta, gama genleri de fetal dönemde etkindir. Erişkin dönemde ise delta ve beta genleri daha aktiftir. Hayatın farklı dönemlerinde etkinlik gösteren bu genlerin bazı ortak özellikleri bulunmaktadır.



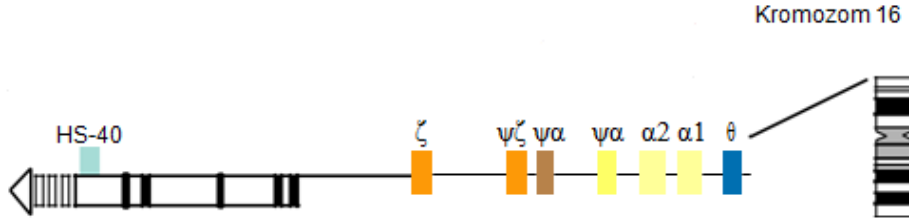
Şekil 2.5. Epsilon, A gama, G gama, delta, beta ve alfa globin genleri

Üç ekzon ve iki introndan meydana gelen her genin 5' tarafında yaklaşık 50 nükleotid uzunluğunda bir Cap bölgesi ve protein sentezini başlatan kodon (AUG) bulunur. Ekzon 3'ün sonunda ise stop kodonunu takip eden ve Poly A kuyruğuna kadar uzanan DNA dizisi transkripsiyonun bitiş sinyallerini içerir. Transkripsiyon ünitesinin sonunda yer alan Poly A kuyruğu (AATAAA) ise mRNA'nın stabilitesini ve ribozomlara bağlanmasını sağlamaktadır.

Alfa ve beta benzer globin genlerinin farklı gelişme evrelerindeki (embriyonik dönemden erişkinliğe) aktive olma sırası 5'den 3'e doğru organize edilmiştir. Gelişme dönemi boyunca farklı globin genlerinin aktif olması, farklı hemoglobinlerin sentezine neden olmaktadır. Bu dizisel aktivasyonun sorumlu olduğu olayların doğası (alfa benzer genlerinden zetanın alfaya, beta benzer genlerinden epsilonun gamaya ve onun da betaya geçişi) bütünüyle aydınlatılamamıştır. Fakat embriyodaki Yolk-sac'dan fetal karaciğere ve oradan da kemik iliğine eritropoezin aktif geçişinde bir paralellik vardır. İkinci geçiş ise beta benzer globin genlerinde meydana gelmektedir. Yenidoğan'da HbF'in yapısında bulunan gama zincir oranındaki G γ /A γ %70'den %30'a kadar azalma ile total gama zincir üretiminin azalması paralellik göstermektedir. Erişkinlerin çoğunda %1'den az olan HbF'deki G γ /A γ oranı %40-60 arasındadır (Çürük, 2017).

2.1.2.1. α -Benzer Gen Kümesi

Alfa benzer globin gen kümesi, 16.kromozomun kısa kolunun 13.3 lokusu boyunca yaklaşık 80 kb'lık yer alır (Tang Y, 2008) (Şekil 2. 6). Bu gen kümesi üç ekzon ve iki intron bölgesinden oluşup toplamda 141 amino asidi kodlamaktadır. Alfa geninin ekzon-1 bölgesinde ilk 31 amino asit, ekson-2'de 62 amino asit (32-99) ve ekzon-3'te 42 amino asit (100-141) kodlanmaktadır. Alfa globin gen kümesi ve bu bölgeleri sentezleyen DNA parçası; 5 Alu tekrar ailesi, CpG bölgeleri ve G-C'den zengin bölgeler içermektedir (Higgs, 1989, Chan, 1999) Alfa globin gen kümesi, üç fonksiyonel alfa geni ($\alpha 1$, $\alpha 2$) ve bir embriyonik zeta geni (ζ) ile üç psödogeni ($\psi\zeta$, $\psi\alpha 2$, $\psi\alpha 1$) ve bir de teta genini (θ) içerir. Genlerin hepsi 5'-3' yönünde olup ζ , $\psi\zeta$, $\psi\alpha 2$, $\psi\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 1$ ve θ şeklinde sıralanmaktadır (Çürük, 2017).



Şekil 2.6. Alfa benzer gen kümesi

Alfa ($\alpha 2$ ve $\alpha 1$) genleri yapısal olarak benzer protein ürününü vermektedir ve sadece UTR (kodlanmayan) 5' ve 3' bölgelerinde dizi farkı yer almaktadır. Alfa benzer gen kümesinde yer alan psödogenlerin işlevleri tam olarak bilinmediğinden evrimsel kalıntılar oldukları düşünülmektedir. Teta genine ait herhangi bir protein ürünü bulunmamasına karşın korunmuş yapısı ve inaktive edici hiçbir mutasyonu taşıması işlevsel olduğunu düşündürmektedir. Alfa benzer genlerinden biri olan zeta, embriyonik hayat boyunca aktiftir ancak fetal ve erişkin dönemde görev yapmaz. Alfa globin gen kümesinin sentezinin kontrolü upstream düzenleyici elementler (α -URE) ile düzenlenmekte olup beş farklı DNaz I hipersensitif (HS) dizileri tarafından ekspresyonu kontrol edilmektedir. Bu diziler (HS4, HS8, HS10, HS33 ve HS40) upstream bölgede lokalizelerdir. Bu bölgeler α -benzer globin gen kümesinin aşırı ekspresyonu durumunda sentezi kontrol altına almaktadır (Tang 2006, 2008) (Şekil 2. 7).



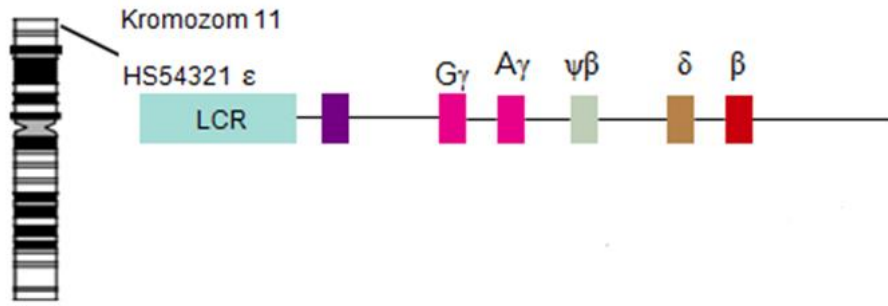
Şekil 2.7. Alfa benzer gen kümesinin sentezini düzenleyen hipersensitif bölgeler

2.1.2.2. β -Benzer Gen Kümesi

İnsanda β -benzer globin gen kümesi 11. kromozomun kısa kolunda yaklaşık 50 kb'lık yer tutar. Üç ekzon ve iki intron içeren β -geni 5' ucundan 3'

ucuna doğru ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, $\psi\beta$, δ ve β şeklinde sıralanmış olup 146 amino ait kodlamaktadır (Barbour, 2000, Steinberg, 2009, (Şekil 2.8).

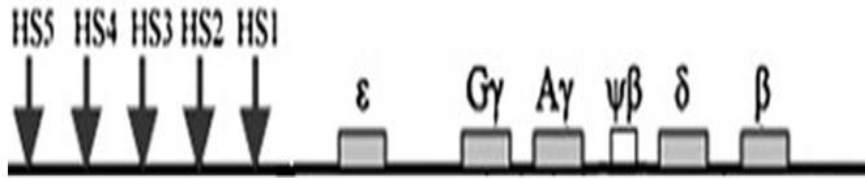
Globin zinciri şifreleyen dizilerin olduğu gen bölgelerine ekzon, proteine dönüşmeyen dizilerin bulunduğu bölgelere ise intron adı verilmektedir. 5' ve 3' bölgelerindeki translasyona uğramayan diziler oldukça önemli gen ekspresyonlarında rol almaktadır (Weatherall, 2001).



Şekil 2.8. Beta benzer gen kümesi

Beta globin geni, zincir üzerindeki 146 amino asidi kodlamak için gerekli bilgi (3 ekzon ve 2 intron) ile 5' ve 3' düzenleyici bölgelerini de kapsayan yaklaşık 18 kb uzunluğunda gen bölgesine sahiptir. Beta genine ait ekzon-1 bölgesinde ilk 30 amino asit, ekzon 2'de 74 (31-104) amino asit ve ekzon 3'de ise 42 (105-146) amino asit kodlanmaktadır. β -globin gen kümesi 8 Alu tekrar ailesi içermesine karşın CpG bölgesi içermemektedir (Steinberg, 2009). β gen lokusu üzerinde bulunan $G\gamma$ ve $A\gamma$ genleri yapısal olarak benzer protein ürünleri vermektedir. Gama globin zincirleri; $G\gamma$ globin zincirinde 136. amino asidinde Glisin, $A\gamma$ globin zincirinde ise aynı pozisyonda Alanin bulundurmasıyla farklılık gösterir. Bunlara ek olarak $A\gamma$ globin zincirinin iki varyantı bulunmaktadır. Bu varyantlardan 75.amino asidinde Treonin içeren $A\gamma T$, izolösin içeren ise $A\gamma I$ olarak adlandırılmaktadır. Fetal yaşamda toplam gama zincirlerinin %75'ini $G\gamma$, %25'ini

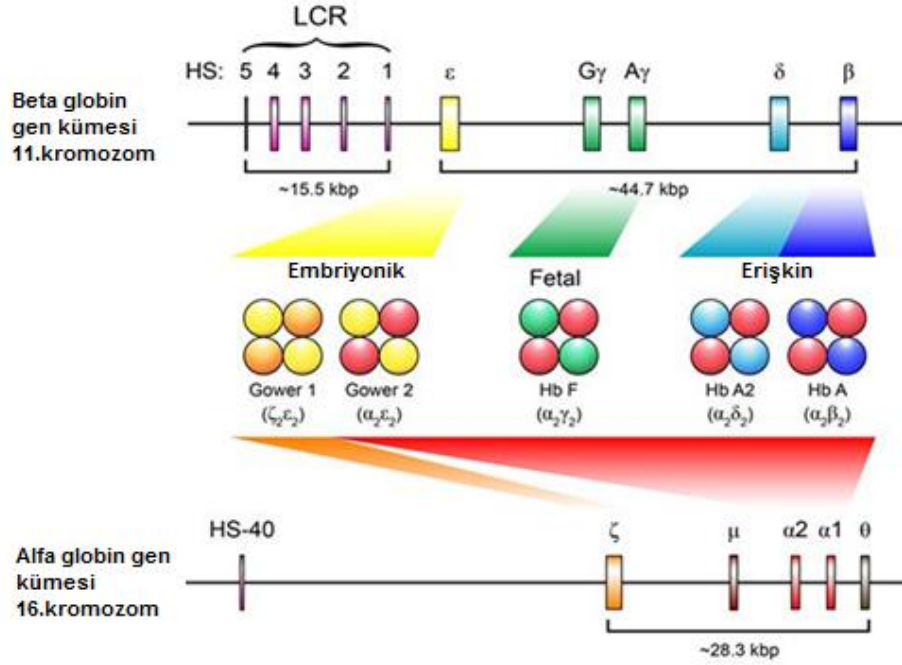
A γ oluşturmaktadır. Doğum sonrası ise bu oran değişir ve erişkinlik döneminde A γ oranı %60'a yükselirken, G γ oranı %40 civarına düşer. Beta gen grubunda yer alan genlerden bir diğeri olan $\psi\beta$ 'nin bilinen bir işlevi bulunmamaktadır (Weatherall, 2001). β -benzer gen lokusunun transkripsiyonel düzenlenme bölgesi LCR (Locus Control Region) yaklaşık 20 kb uzunluğunda, ϵ geninin 6-18 kb önünde yer almaktadır. Bu diziler HS1, HS2, HS3, HS4 ve HS5 olup her biri transkripsiyonu aktifleştirme ve baskılamada görev almaktadır (Plant, 2001) (Şekil 9).



Şekil 2.9. Beta globin gen kümesinin sentezini düzenleyen hipersensitif bölgeler

2.2. Hemoglobin Sentezi ve Hemoglobin Tipleri

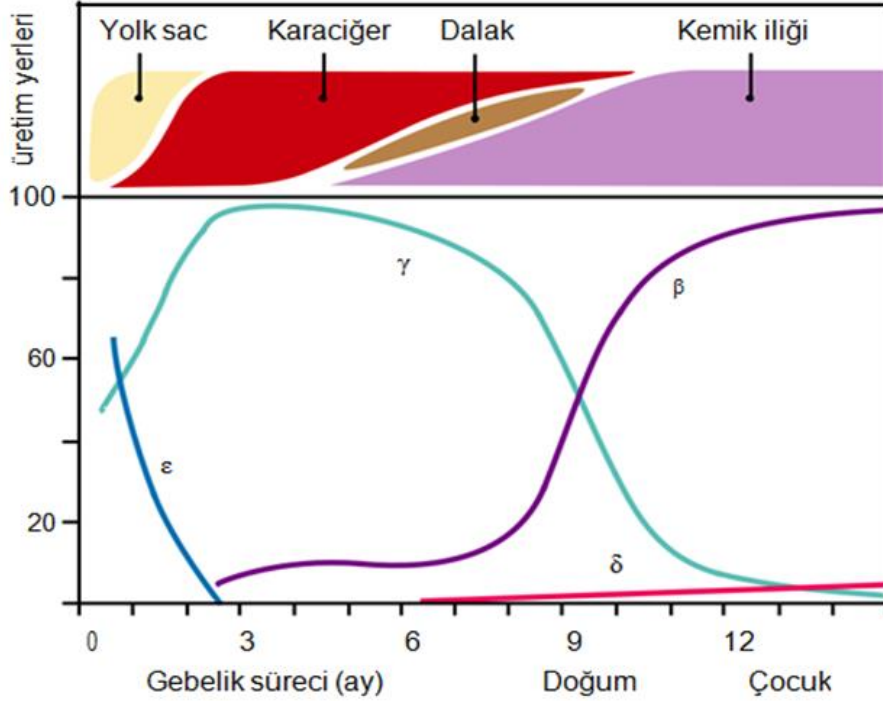
Hem grubu ve globin zincirlerinin ortak üretimiyle hemoglobin sentezi gerçekleşmektedir. Hem grubu, eritrosit öncüllerinin mitokondri ve sitoplazma kısımlarında sentezlenmektedir. Olgun eritrositler mitokondri içermediklerinden hem grubu sentezleyemez (Yüreğir, 1990). Normal erişkin hemoglobin molekülünün protein kısmını oluşturan alfa ve beta globin zincirleri, globin genlerinin ürünleri olarak sentezlenmektedir. Genel olarak, globin genleri aynı yapısal özellikleri göstermektedir. İnsan globin genleri; üç ekzon, iki intron, 5' ve 3' uçlarında ise gen ifadesini düzenleyen kısımlar içermektedir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Globin genlerinin gelişim sürecine göre sentezledikleri hemoglobinler

Globin zincirlerine ait genler 5' ucundan 3' ucuna doğru gelişim süresi boyunca ifade edilmektedir. Bu ifade sonucunda alfa, beta ve benzeri genlerin ürünleri dengeli miktarda üretilmektedir. Globin genlerinin sırayla ifade edilmesi aşamalarında eritropoezin gerçekleştiği organlar da değişmektedir (Şekil 2.11).

Normal erişkin bir insanda, total hemoglobinin %95-98'ini HbA1, %2-3'ünü HbA2 ve %1'ini HbF oluşturmaktadır. Büyük çoğunluğu oluşturan HbA molekülünün yapısında iki alfa ve iki de beta zinciri ($\alpha_2\beta_2$) vardır. Fetal ve yenidoğan döneminde baskın hemoglobin türü olan HbF ($\alpha_2\gamma_2$) iki alfa (α) ve iki gama (γ) zincirinden meydana gelmektedir.



Şekil 2.11. Gelişme sürecinde globin zincir sentezindeki değişimler

Erişkindeki başlıca hemoglobin olan Hb A ($\alpha_2\beta_2$) doğumdan kısa bir süre sonra Hb F'in yerini alır. Doğumdan sonra, 3. ayda Hb A baskın olmaya başlar. Bu durum γ ve β globin genleri arasında dönüşüm göstermesi sonucunda gerçekleşmektedir. Hemoglobin F sıklıkla yaşamın ikinci yılında %2'ye kadar iner ve ilerleyen dönemlerde erişkin insandaki seviyesi %1'in altına inmektedir. Yapısında iki alfa ve iki delta (δ) zinciri bulunan HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) ise normal erişkinde %2-3 oranında bulunmaktadır.²³ Embriyonik hayatın erken dönemlerinde Hb Gower ve Hb Portland sentezlenmektedir (Çizelge 2.1.). Hb Gower, Hb Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$) ve Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) formlarında görülebilirken; Hb Portland, Portland 1 ($\zeta_2\gamma_2$) ve Portland 2 ($\zeta_2\beta_2$) olarak iki formda bulunur. Bu moleküllerin yapısında yer alan alfa benzer zinciri zeta (ζ), beta benzer zincirleri ise epsilon (ε) ve gama

(γ)’dır. Gebeliğin ikinci trimesterinden sonra epsilon zincirleri görülmemektedir. Kord kanında Hb Portland az da olsa tespit edilebilir (Çürük, 2007)

Çizelge 2. 1. İnsan hemoglobinlerinin yapısı ile fetus ve erişkindeki miktarı

Hb Cinsi	Yapısı	Erişkindeki Miktar	Fetustadaki Miktar ve Yapım Zamanı
Hb Gower 1	$\zeta_2\epsilon_2$	-	İlk üç ayda
Hb Gower 2	$\alpha_2\epsilon_2$	-	İlk üç ayda
Hb Portland 1	$\zeta_2\gamma_2$	-	İlk üç aydan sonra ve kordon kanında
Hb Portland 2	$\zeta_2\beta_2$	HbH ve alfa talasemi taşıyıcılarında az miktarda	İlk üç aydan sonra
Hb F	$\alpha_2\gamma_2$	%1-2*	İntrauterin 10-12. haftada
Hb A ₂	$\alpha_2\delta_2$	%2-3*	Üçüncü trimestirde
Hb A	$\alpha_2\beta_2$	% 95*	6-8. haftada yapımı başlar

* Total hemoglobinin %’si

2.3. Hemoglobin Molekülünün Kalıtsal Bozuklukları

Hemoglobinin kalıtsal bozuklukları hemoglobinopati olarak adlandırılmaktadır. Hemoglobin molekülünün yapısındaki globin zincirlerinde meydana gelen değişikliklerin tümü hemoglobin varyantlarını meydana getirmektedir (Çizelge 2.2.). Hemoglobinopatiler üç ana grupta incelenmektedir; globin zincirlerinin yapısal değişimi sonucu oluşan anormal hemoglobinler, globin zincirlerinin yetersiz ya da hiç sentezlenmemesi sonucu oluşan talasemiler ve erişkin dönemde fetal hemoglobin sentezinin devam etmesi sonucu oluşan meydana gelen HPFH (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin) hastalığıdır (Weatherall, 2001a, 2001b).

Çizelge 2.2. Hemoglobin molekülünün kalıtsal bozuklarının sınıflandırılması

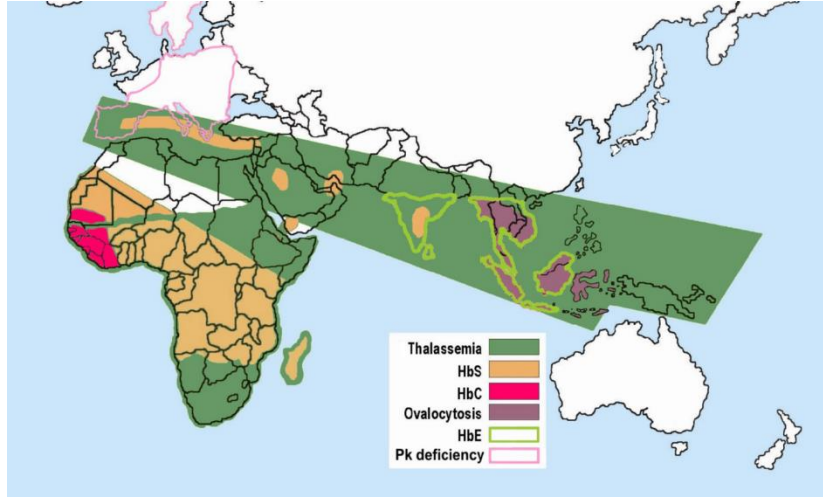
Anormal Hemoglobinler	Talasemiler	HPFH
α -Zinciri	α -Talasemi	Delesyonel
β -Zinciri	β -Talasemi	Nondelesyonel
γ -Zinciri	$\delta\beta$ -Talasemi	β -gen kümesine bağlı olan
δ -Zinciri	$\gamma\delta\beta$ -Talasemi	β -gen kümesine bağlı olmayan
Füzyon zincirleri ($\delta\beta$, $\beta\delta$, $\gamma\beta$)	γ -Talasemi	β -gen kümesine bağlı olmayan
	δ -Talasemi	

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) ait son verilere göre hemoglobin bozuklukları başlangıçta 229 ülkenin %60'ında endemikti ve potansiyel olarak doğumların %75'ini etkiliyordu, ancak şu anda ülkelerin %71'inde endemik olup, doğumların %89'unu etkilediği için, tüm dünyada hastalığın önlenmesine yönelik yerel stratejiler geliştirilmektedir (Modell, 2008). Dünya nüfusunun en az %7'si anormal bir hemoglobin geni taşımaktadır (yaklaşık 270 milyon) ve her yıl 300.000-400.000 çocuk anlamlı hemoglobin bozukluğu tanısıyla doğmaktadır. Hastaların yaklaşık %90'ı düşük ya da orta gelir düzeyindeki ülkelerde doğan çocuklardır. Doğumların %70'ini orak hücre hastalığı, kalanları da talasemi sendromları oluşturur (Williams 2012). Orak hücre hastalığı tanısı alan doğumların %70'i Afrika'da görülür (Çizelge 2.3.). Dünya nüfusunun en az %2'si alfa talasemi taşıyıcısıdır.

Çizelge 2.3. Hemoglobin bozukluğu olan yıllık doğum sayısı

β talasemi major	22.989
HbE β talasemi	19.128
HbH hastalığı	9.568
Hb Barts Hidrops	5.183
SS hastalığı	217.331
S β -talasemi	11.074
S C hastalığı	54.736

Dünyada çiftlerin yaklaşık %1 hemoglobin bozukluğuna sahip çocuğa sahip olma riski bulunmaktadır. Yılda 400.000'lere ulaşan doğumların 275.000'i orak hücre hastalığına sahip olup, erken tanı ve profilaksiye ihtiyaç duyar. En az 30.000'i düzenli transfüzyon gerektiren yaklaşık 70.000 beta talasemi, 5.000 kadarı perinatal ölüme neden olan alfa talasemilidir. Doğumların %75'i hemoglobin bozukluklarının endemik olduğu bölgelerde görülür. Yılda 9 milyon taşıyıcı kadın gebe kalmaktadır. Taşıyıcıların eşlerinde taşıyıcılık riski %0,1-40 (ortalama %14) arasında değişmektedir. Yılda en az 948.000 yeni taşıyıcı çift belirlenmektedir. Yılda 1,33 milyon riskli gebelik vardır ve tümüne prenatal tanı uygulanmalıdır. Doğan çocukların yaklaşık %12'si transfüzyona bağımlı talasemi major tanısı almakta, bunların yalnızca %40'ına uygun demir şelasyon tedavisi verilebilmektedir. Orak hücre anemisi bozukluklarına ilişkin karşılaştırılabilir veri ise yoktur (Çizele 2.3.). Beta talasemi prevalansı Akdeniz ülkeleri, Orta Doğu, Asya, Güneydoğu Çin, Uzak Doğu ülkeleri yanı sıra Kuzey Afrika kıyıları ve Güney Amerika'da yüksektir. En yüksek taşıyıcı sıklığı Kıbrıs (%14), Sardunya (%10,3) ve Güneydoğu Asya'da rapor edilmiştir. Tüm dünya nüfusunun %1,5'i dolayında (80-90 milyon kişi) beta talasemi taşıyıcılığı olduğu tahmin edilmektedir. Çoğu gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere, her yıl yaklaşık 60.000 semptomatik talasemili doğum olmaktadır. Total yıllık semptomatik birey insidansının dünyada 100.000'de 1, Avrupa Bölgesinde 10.000'de 1 olduğu düşünülmektedir. Birçok bölge nüfusunda taşıyıcı oranlarına ilişkin doğru veri yoktur. Uluslararası Talasemi Federasyonu'na göre dünyada, hayatta olan 200.000 talasemili hastaya düzenli tedavi uygulanabilmektedir. Beta talaseminin anormal Hb veya yapısal bir Hb varyantıyla en çok görülen kombinasyonu HbE-β-talasemi olup Güneydoğu Asya'da taşıyıcı sıklığı oldukça (%50) yüksektir (Anasa, 2008) (Şekil 2.12) .



Şekil 2.12.Hemoglobinopatilerin yeryüzündeki dağılımı

2.3.1. Anormal Hemoglobinler

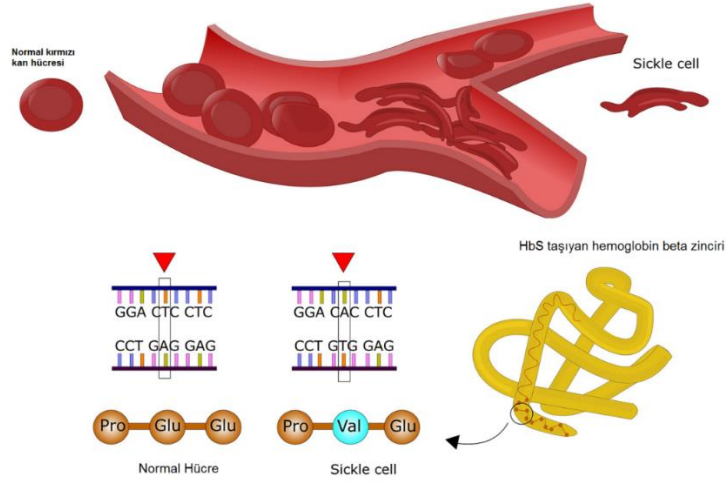
Anormal hemoglobinler hemoglobin molekülünün yapısında yer alan globin zincirleri üzerindeki aminoasit değişiklikleri sonucu meydana gelmektedir. Hemoglobin molekülünün polipeptid zincirlerini kodlayan genlerin ekzon bölgelerinde meydana gelen bu mutasyonlar ile hemoglobinin yapısı, ekspresyonu, globin genlerinin gelişimsel düzenlenmesi değişir. Bunların dışında bazı insersiyonlar ve delesyonlar çeşitli hemoglobin varyantlarının oluşumuna neden olmaktadır. Bu varyantların çoğu klinik hastalık oluşturmaz (Ahmed, 2001, Çürük, 2017).

Anormal hemoglobinleri oluşturan bu varyantların hematolojik özellikleri, elektroforezdeki hareketleri ile temelinde amino asit değişikliği olduğu belirlenmiştir (Akar, 2012). Birçoğu genetik kodlamaya göre globin DNA molekülünde tek nükleotid (baz) değişimi ile oluşurken (beta zincir varyantları Hb S, Hb C, HbD, HbE); bazılarında iki amino asit yer değişimi de vardır (HbC-Harlem, HbS-Travis, Arlington Park). Bilinen anormal hemoglobinlerin çoğunluğu beta zincir varyantlarıdır; delta ve gamma zincir varyantları da tanımlanmıştır. Bazı hemoglobin varyantları dayanıksız, bazılarında ise aminoasit yer değiştirmesinden

farklı olarak 1-5 amino asit delesyonları sonucu oluşabilirler (Hb Gun Hill, Hb Koriyama). Delesyon ve insersiyonlara ek olarak füzyon hemoglobinleri de oluşabilir (Hb Lepore, Hb Kenya) (Carver, 1995, Arıyürek, 2009)

2.3.1.1. HbS (Orak Hücre Anemisi)

Hemoglobin molekülünün ilk keşfedilen varyantı HbS olup, orak hücre anemisine neden olduğu iyi bilinir. HbA molekülünden farklı olarak globin geni üzerindeki bir nokta mutasyonu olan β -globin zincirinin 6.pozisyonunda yer alan glutamik asit amino asidi yerine valin amino asidi ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$) gelmiştir. Bu yan zincir kalıntısı ile başka bir tetramerin $\beta \text{Ala}70$, $\beta \text{Phe}85$ ve $\beta \text{Leu}88$ amino asit kalıntılarının oluşturduğu hidrofobik oluklar arasındaki kovalent olmayan etkileşimler yoluyla tetramerik hemoglobin moleülleri arasındaki ilişki, ardından uzatılmış polimerin çökmesi, oksijensiz ortam içinde orak şeklini alan kırmızı kan hücrelerinin oluşumuna yol açar (Şekil 2.13). Polimeri stabilize eden iplik içi ve iplikler arası kalıntılar arasında çok sayıda kovalent olmayan etkileşim vardır. Gerçekleşen bu tek amino asit değişikliği eritrositlerin parçalanmasıyla çeşitli klinik problemleri ortaya çıkmaktadır. Normal eritrosit ömrü 120 gün iken HbS taşıyan eritrositlerin ömrünün 16 gün olduğu tespit edilmiştir (Huisman, 1992; Öner, 2002; Mandal, 2020).



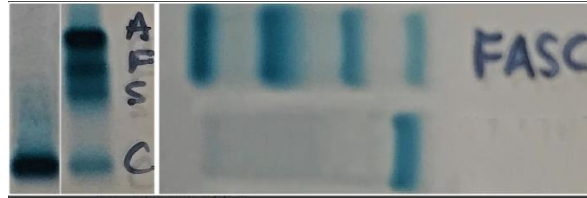
Şekil 2.13. HbS taşıyan hücrelerin yapısı ve damar içindeki hareketleri

Kırmızı kan hücrelerinin oraklaşması ilk olarak 1910 yılında Afrikalı bir hastada orak hücre anemisi şeklinde kendini göstermiştir. Ayrıca bu bölgelerde yüksek oranda malarya görülmesine rağmen HbS heterozigot bireylerin hastalığa neden olan Plasmodium falciparum parazitiye karşı HbA taşıyan bireylerden daha dirençli olduğu ve hastalığın seyrinin daha hafif olduğu saptanmıştır. Hastalığın moleküler nedeni on yıllarca süren araştırmalar boyunca iyi anlaşılmış ve bugüne kadar çeşitli tedavi prosedürleri araştırılmış olsa da, orak hücre anemisi için etkili bir tedavi stratejisi henüz keşfedilmemiştir (Mandal, 2020). HbS genini heterozigot (HbA/S) taşıyan bireyler orak hücre anemisi taşıyıcısı olarak adlandırılır. Yani eritrositlerinde HbA ve HbS birlikte bulundurulur. Bu bireylerin dolaşımındaki Hemogloblin S yoğunluğu %50'den daha azdır ve kan morfolojileri dahil fiziksel gelişimleri ve yaşam süreleri de normaldir (Huisman, 1986, Lukens, 1993).

2.3.1.2. Hemoglobin C (HbC)

Hemoglobin C, beta globin zincirinin 6.pozisyonunda bulunan glutamik asitin lizin yer ile değişmesinden kaynaklanan beta globin zincirindeki mutasyondur (GAG→AAG). Bu mutasyon sonucu pozitif yüklü beta-6-lizil

grupları ile negatif yüklü bitişik moleküller arasında elektrostatik bir etkileşime neden olarak HbC'nin kırmızı hücrelerdeki çözünürlüğünün azalmasına yol açar (Şekil 2.14.). Bundan dolayı, kristal oluşumu meydana gelirken artmış kan viskozitesine ve kırmızı kan hücresi ömrünün kısalmasına neden olur. Ancak, glutamik asit yerine valinin gelmesinden kaynaklanan orak hücre hastalığından farklı olarak, HbC, düşük oksijen gerilimi sırasında hücre içi polimerizasyona neden olmaz. Bu nedenle, genel olarak, orak hücre ile birleştirilmediği sürece (Hb SC) hemoglobin C hastalığı görülmez (Bibek, 2020).



Şekil 2.14. Hemoglobin C hastasına ait hemoglobin elektroforez

Hemoglobin C'nin diğer hemoglobin varyantları ile birkaç heterozigot kombinasyonu görülmektedir. Bir vaka çalışması, daha önce tanımlanmayan nadir bir Hb kombinasyonu olan Hb-D-Ibadan ve HbC için bileşik heterozigotluğu olan genç bir kadın bildirdi. Bu kombinasyon prenatal tarama sırasında tespit edildi ve kombinasyonda HbD-Ibadan fazla miktarda mevcuttu (%70,3-%24,4). Kombinasyon klinik olarak sessizdir ve talasemi-minör benzeri kırmızı hücre indekslerini gösterir (Bibek, 2018). Hemoglobin C-Harlem, alkalın elektroforezde HbC'ninki ile aynı elektroforetik hareketliliğe sahip başka bir nadir durumdur. Ancak HbSS'ye benzeyen bu molekül oksijensiz ortamda polimerize olabilir ve bu nedenle orak hücre hastalığına benzer bir klinik seyir gösterir (Zacharia, 2013).

2.3.1.3. Hemoglobin E (HbE)

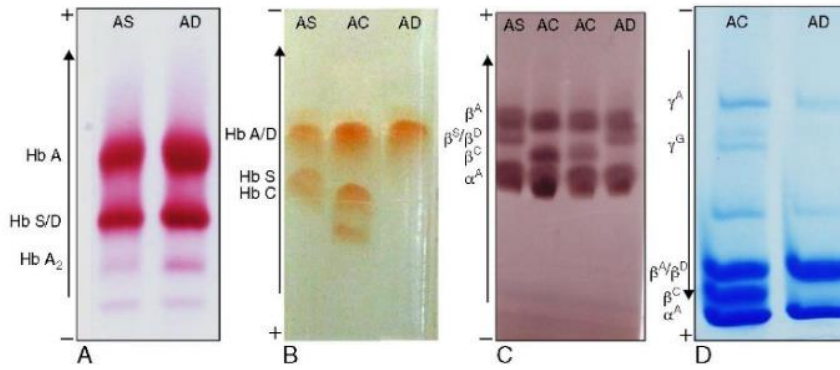
Hemoglobin E ($\alpha 2\beta 226$ Glu→Lys), β -globin zincirinin 26. pozisyonunda glutamik asit yerine lizin geçmesi ile olur. Aynı zamanda β -globin genindeki

GAG→AAG değişimi ile talasemik bir varyant olarak bilinir. HbE, homozigot (HbEE) ve HbE/β-talasemi (E/β-thal) ve orak hücre gibi çeşitli bileşik heterozigot (HbSE) durumları da mevcuttur. Hemoglobinin E elektroforez ile tespit edilebilir. Taşıyıcılarda E miktarı A ile karşılaştırıldığında daha düşük bir oranda sentezlenir. Bunun nedeni, mutasyonun bir ekson içinde alternatif bir yapılaşma bölgesi oluşturmasıdır. Sonuç olarak heterozigotlar, bileşik heterozigotlar ve homozigotlar bazı β talasemik özellikler gösterir (Bachir, 2004). Hemoglobinin E aleli için homozigot olan bebeklerde HbF den dolayı (fetal hemoglobin) semptom göstermezler. Yaşamın ilk aylarında fetal hemoglobin kaybolur ve hemoglobinin E miktarı artar. Hemoglobinin E aleli için homozigot olan kişilerde (HbEE) hafif bir hemolitik anemi ve dalakta hafif genişleme vardır. Hemoglobinin E heterozigot kişiler asemptomatik olup genellikle bir sağlık sorunu yaşamaz. Düşük MCV ve anormal kırmızı kan hücrelerine (hedef hücreler) sahip olabilirler HbSE hastalığına sahip bileşik heterozigotlar, hemoglobinin E geni bir ebeveyninden ve hemoglobinin S geni diğerinden miras alındığında ortaya çıkar (Bachir, 2014). Fetal hemoglobin miktarı azaldıkça ve hemoglobinin S arttıkça, gelişimin erken aşamasında hafif bir hemolitik anemi ortaya çıkar. Bu hastalığa sahip hastalar, orta derecede anemi, artmış enfeksiyon riski ve ağrılı krizler dahil olmak üzere orak hücre anemisinin bazı semptomlarını yaşarlar.

2.3.1.4. Hemoglobin D (HbD)

Hemoglobin D, beta globin zincirinin 121. pozisyonundaki glutamik asidin glisin ile yer değiştirmesi sonucu oluşur (GAG→CAG). Ülkemizde ikinci sıklıkta görülen hemoglobin varyantı olup görülme sıklığı %0,2'dir. Hemoglobinin D'nin en yaygın görülen formu HbD-Punjab'dır. Bu varyant Hindistan'ın Punjab bölgesinde ve Pakistan'da yaygın olarak görülmektedir. Hemoglobinin bu varyantı, Avusturya, İspanya, Yunanistan, İngiltere, Almanya, Portekiz, Türkiye, İran ve Hindistan'da görülmektedir. Taşıyıcılarda klinik, hematolojik ya da fizyolojik bir anomali

görülmezken; homozigot olgularda orta derecede hemolitik anemi görülmekte olup buna dalak büyümesi de eşlik etmektedir (Bachir, 1998).



Şekil 2.15. HbA, C, D ve S'in elektroforetik olarak karşılaştırılması

HbD pH 8,6'da selüloz asetat elektroforezinde HbS ile birlikte göç etmektedir. Asidik sitrat elektroforezinde ise HbA ile birlikte göç etmektedir. Bu iki hemoglobin varyantının ayırımını yapmak oldukça basit bir yöntem olan oraklaşma testi ile gerçekleştirilir. Ayrıca asidik pH'da elektroforez sırasında farklı hızda göç etmeleri veya HPLC yöntemi ile ya da genetik olarak ayırımı yapılmaktadır (Altay, 1986, Huisman, 1993)

2.3.1.5. Türkiye'de Anormal Hemoglobinlerin Dağılımı

Türkiye'de yapılan çalışmalarda 60 anormal hemoglobin türü tanımlanmıştır (Çizelge 2.4). Cavdar ve arkadaşları 1976'da Hb Lepore Boston'ı Türkiye'de ilk kez raporlamıştır (Cavdar, 1976). Alfa zincir varyantlarından olan Hb Adana'nın Hb Barts ile birlikteliği Çürük ve arkadaşları tarafından 1993 yılında gösterilmiştir (Çürük, 1993). Yenice ve arkadaşları 2000 yılında Nazilli'de gerçekleştirdikleri çalışmada 28 yaşındaki bir kadın hastada HbG-Coushata, Muğla'da 14 yaşındaki bir erkek hastada da HbJ-İran olarak isimlendirilen anormal hemoglobinleri saptamışlardır (Yenice, 2000). 2003 yılında Akar ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışma ile bir Türk ailesinde Hb Hamadan ve β talasemi

kombinasyonu bulmuşlardır (Akar, 2003). Beta zincir varyantlarından Hb Çapa, Hb Ankara, Hb Hakkâri, HbJ-Antakya ve Hb İstanbul ilk Kez Türkiye’de tanımlanmıştır (Altay, 2002). Hb İstanbul Fransız araştırmacılar tarafından başka bir hastada Hb Saint Etienne olarak da rapor edilmiştir. İlk kez toplumumuzda saptanan Hb Hakkâri ve Hb Adana’nın unsatbil anormal hemoglobin varyantı olduğu bildirilmiştir. Bu unsatbil varyantlara ek olarak Hb Moabit İsviçre’de yaşayan bir Türk ailesinde ve Hb Köln de birkaç ülkede rapor edilen unstabil hemoglobinler arasındadır (Aksoy M, 1972). Köşeler ve arkadaşları Denizli’de 32 yaşındaki bir erkek hastada HbD-Ouled Rabah [beta19(B1)Asn→Lys] Türkiye’de ilk defa saptamışlardır (Koseler, 2008).Alfa ve beta varyantlarına ek olarak bir gama zincir varyantı olan HbF-Başkent (Ala→Thr) ülkemizde ilk kez tanımlanmıştır (Akar, 2007). Çürük ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılan bir çalışmada β -talasemi varyantlarından biri olan Hb Hamilton Türkiye’de ilk kez gösterilmiştir (Yıldız, 2019) (Tablo 2.4.).

Çizelge 2.4. Türkiye’de Anormal hemoglobinlerin dağılımı

No	Name	Chain/Mutation	No	Name	Chain/Mutation
1	Adana*	α 59 Gly>Asp	31	J-Antakya*	β 65 Lys>Met
2	Ankara*	β 10 Ala>Asp	32	J-Iran	β 77 His>Asp
3	A2 Yialousa	δ 82 Ala>Ser	33	J-Meerut	α 120 Ala>Glu
4	Antalya*	Deletion/insertion	34	Knosos	β 27 Ala>Ser
5	Başkent*	γ 128 Ala>Thr	35	Köln	β 98 Val>Met
6	Beograd	β 121 Glu>Val	36	Lepore-Boston	Hybrid
7	Brocton	β 138 Ala>Pro	37	M-Iwate	α 87 His>Tyr
8	Bronova	α 103 His>Leu	38	Moabit	α 86 Leu>Arg
9	C	β 6 Glu>Lys	39	Monthgomery	α 48 Leu>Arg
10	City of Hope	β 69 Gly>Ser	40	M-Saskatoon	β 63 His>Tyr
11	Costant Spring	Prolonged α chain	41	N-Baltimore	β 95 Lys>Glu
12	Crete	β 129 Ala>Pro	42	Noah	δ 143 His>Tyr
13	Çapa*	α 94 Asp>Gly	43	O-Arab	β 121 Glu>Lys
14	D-Iran	β 22 Glu>Gln	44	O-Podova	α 30 Glu>Lys
15	D-Punjab	β 121 Glu>Gln	45	P-Nilotic	Hybrid
16	D-Ouled Rabah	β 19 Asn>Lys	46	Pyrgos	β 83 Gly>Asp
17	E	β 26 Glu>Lys	47	Q-Iran	α 75 Asp>His
18	Ernz	β 123 Thr>Asn	48	S	β 6 Glu>Val
19	E-Saskatoon	β 22 Glu>Lys	49	Sarrebouurg	β 131 Gln>Arg
20	G-Copenhagen	β 47 Asp>Asn	50	Setif	α 94 Asp>His
21	G-Cousatta	β 22 Glu>Ala	51	Siirt*	β 27 Ala>Gly
22	G-Georgia	α 95 Pro>Leu	52	South Florida	β 1 Val>Met
23	G-Szuhu	β 80 Asn>Lys	53	Strumica	α 112 His>Arg
24	Hakkari*	β 31 Leu>Arg	54	Summer Hill	β 52 Asp>His
25	Hamadan	β 56 Gly>Arg	55	Tunis	β 124 Pro>Ser
26	Hamilton	β 11 Val>Ile	56	Tyne	β 5 Pro>Ser
27	Hasharon	α 47 Asp>His	57	Ube-2	α 68 Asn>Asp
28	Istanbul*	β 92 His>Gln	58	Volga	β 27 Ala>Asp
29	Izmir*	β 86 Ala>Val	59	Yauzi	β 79 Asp>Asn
30	J-Anatolia	α 61 Lys>Thr	60	Westeinde	α 125 Leu>Gln

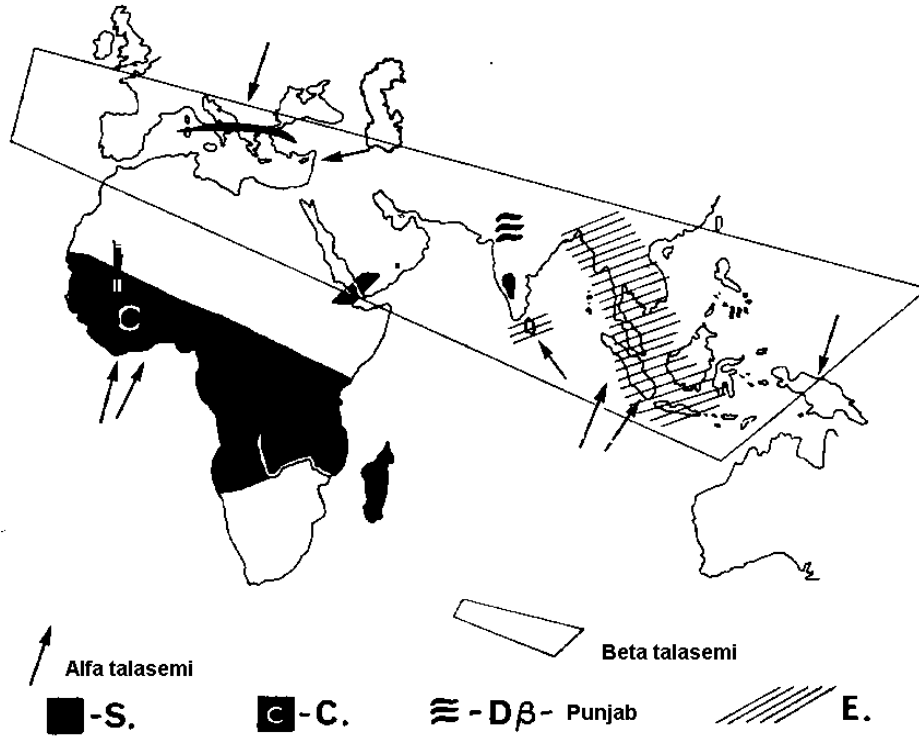
2.3.1.6. Çukurova Bölgesinde Görülen Anormal Hemoglobinlerin Dağılımı

Yüreğir ve arkadaşlarının Çukurova Bölgesinde gerçekleştirdikleri çalışmanın sonucunda HbS geninin görülme sıklığının %8,2 oranından olduğu ve yöresel olarak %3 ile %44 arasında değiştiğini saptamışlardır. Bu genin Antakya, Adana, Mersin ve özellikle Tarsus'ta görülme sıklığının yüksek, klinik seyrin ise ağır seyrettiğini ortaya koymuşlardır (Yüreğir, 1984). Karataş ilçesinde yaptıkları tarama çalışmasında % 9,5 AS ve % 0,3 SF bulduklarının rapor etmişlerdir (Yüreğir, 1989). Kılınç ve arkadaşları ise Mersin il genelinde 6746 kişide yaptıkları tarama sonucunda orak hücre anemisi taşıyıcılık oranını % 6,4 olarak saptamışlardır (Kılınç, 1999). Yüreğir ve arkadaşları Çukurova'da orak hücre anemili hastalarda haplotip çalışması yapmışlar ve Çukurova Bölgesinde rastlanan HbSS'li olguların Amerikan zenci HbSS'li olgular ile benzerlik gösterdiğini, Çukurova'da rastlanan HbSS'lilerin Benin Cezayir (haplotip 19) tipi olduğunu, Amerikan zencilerinin ise Benin-Cezayir ile birlikte Merkezi Afrika tipi (haplotip 20) olduğunu bildirmişlerdir (Kılınç, 1988). Kılınç ve arkadaşları Adana bölgesinde hemoglobin S sıklığını % 0,78 olarak rapor etmişlerdir. Bir vakada Hb Q-İran, diğer bir vakada Hb O-Padova ve iki vakada HbD bulmuşlardır (Kılınç, 1986).

2.4. β -Talasemiler**2.4.1. Beta Talasemi dağılımı**

Beta talasemi, β globin zincir sentezinin azalması veya yokluğu ile karakterizedir. Beta talasemi sendromlarının şiddeti mutasyonun türüne ve globin miktarına bağlıdır. Mutasyona bağlı olarak azalmış β globin miktarı, eşleşemeyen α globin zincir fazlalığına neden olarak kırmızı hücre öncülerinin normal gelişimini ve canlı kalabilmesini zorlaştırmaktadır. Homozigot veya çift heterozigot β talasemi vakaları kronik hemolitik anemiye neden olurken, taşıyıcılarında hiçbir semptom gözlenmemektedir (Weatheral, 2001, Bunn, 1986,

Lukens, 1999). Yüksek oranda talasemi geni taşıyan toplumları içine alan dünya talasemi kuşağı, Akdeniz'den başlayıp Ortadoğu üzerinden Güneydoğu Asya ülkelerine kadar uzanmaktadır (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Dünyada talasemi ve anormal hemoglobinlerin dağılımı

Dünya nüfusunun %3'ü (150 milyon) beta talasemi geni taşımaktadır. Beta talaseminin dünyadaki dağılımı büyük farklılıklar göstermektedir. En sık olarak, Akdeniz ülkelerinde (%0.5-14) Afrika ve Amerikalı siyahlarda (%1.5), Güneydoğu Asya ülkelerinde (%5) görülmektedir. Akdeniz ülkelerinde de oldukça farklılık gösteren beta talasemi insidansı, Kıbrıs'ta %14.7, Yunanistan'da %8, Arnavutluk'ta %7.1, İtalya'da %3.7, Sardinya'da %12.6, Sicilya'da %5.9, Libya'da %4.6, Azerbaycan'da % 10, Bulgaristan'da %2 ve Tunus'da %4.4 olarak bulunmuştur (Efremov 1992). Türkiye, Lübnan, İsrail, Malta, Cezayir, Fas ve Korsika'da ise

taşıyıcı insidansı %2-3 arasında saptanmıştır. Yugoslavya (%1.4), ve Fransa'da (%0.1) talasemi taşıyıcılığı daha düşük gözlenmiştir. Akdeniz ada ülkelerinden Kıbrıs (%14.7), Sardinya (%12.6), Sicilya (%5.9) ve Yunan adalarında (%5-20) talasemi insidansının yüksek bulunması, kapalı toplum olmalarından kaynaklanmaktadır (Efremov, 1992). Anormal hemoglobin ve talasemilerin dünya üzerindeki dağılımı Şekil 2.16'da gösterilmiştir (Lukens, 1999).

Bugüne kadar moleküler düzeyde yapılan çalışmalar ile dünyada beta talasemiye neden olan yaklaşık 200 mutasyon belirlenmiştir (Huisman, 1997). Bunlardan 40 tane farklı mutasyon Türkiye'de de rapor edilmiştir (Çizelge 2.5) (Başak, 1992; Çürük, 2001; Öner, 1990).

Çukurova bölgesinde talasemi ve anormal hemoglobinler yönünden tarama çalışmaları Ç.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından 1980'li yıllarda başlatılmıştır (Yüregir, 1987, 1989).

Beta talasemi taşıyıcısı olarak belirlenen örneklerden DNA izole edilerek mutasyon türleri belirlenmiştir. Ç.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Kliniklerinde takip edilen bazı hastaların anne, baba ve kardeşlerinde de mutasyon analizleri yapılmıştır. Bunlara ek olarak prenatal tanı amacıyla da mutasyon türleri belirlenmiş olup türleri ve dağılımı Çizelge 2.6. da gösterilmiştir (Çürük, 2001)

Çizelge 2.5. Türkiye’de gözlenen beta talasemi mutasyonları

Mutasyonun Yeri	Mutasyon Türü	Mutasyonun Yeri	Mutasyon Türü
-101	(C→T)	IVS1-6	(T→C)
-87	(C→G)	IVS1-110	(G→A)
-30	(T→A)	IVS1-116	(T→G)
-28	(G→C)	IVS1-130	(G→A)
22	(G→A)	IVS1-130	(G→C)
Fsc 5	(-CT)	Fsc 36/37	(-T)
Fsc 6	(-A)	Cd 37	(G→A)
Fsc 8	(-AA)	Cd 39	(C→T)
Fsc 8/9	(+G)	Fsc 44	(-C)
Cd 15	(TGG→TAG)	Fsc 74/75	(-C)
Cd 15	(TGG→TGA)	Fsc 82/83	(-G)
Fsc 22/23/24	(-AAGTTGG)	IVS2-1	(G→A)
Cd 27	(G→T)	IVS2-654	(C→T)
Cd 30	(G→C)	IVS2-745	(C→G)
IVS1-1	(G→A)	IVS2-848	(C→A)
IVS1-1	(G→C)	3’ UTR	(-13 bp)
IVS1-1	(G→T)	Poly A	(TAAA→TAAG)
IVS1-5	(G→A)	Poly A	(TAA→TGA)
IVS1-5	(G→C)	-290 bp del	
IVS1-5	(G→T)		

Orak hücre anemisi ve β talaseminin bugüne kadar kesin bir tedavisi ulunamamıştır. Bu nedenle hasta çocuk doğumunu önlemek için prenatal tanı yapılmaktadır. Bu konuda ilk çalışmalar fetal kan örneği alınarak yapılmaya başlanmıştır (Weatheral, 1991). Hamileliğin 18-20. haftaları arasında fetal kan örneği alınarak in vitro globin zincir sentezi ile hasta fetuslar belirlenmektedir.

Çizelge 2.6. Çukurova bölgesinde gözlenen beta talasemi mutasyonlarının dağılımı

Mutasyon tipi		Kromozom sayısı	%
IVS1-110	(G→A)	304	57.3
IVS1-1	(G→A)	44	8.3
Cd 39	(C→T)	34	6.4
IVS1-6	(T→C)	30	5.7
Fsc 8	(-AA)	13	5.5
-30	(T→A)	12	5.1
IVS2-1	(G→A)	5	2.1
IVS2-745	(C→G)	10	4.2
Fsc 5	(-CT)	12	5.1
Fsc 44	(-C)	8	3.4
Fsc 74/75	(-C)	5	2.1
IVS1-5	(G→C)	1	0.4
Fsc 8/9	(+G)	2	0.8
Fsc 36/37	(-T)	2	0.8
Fsc 22/23/24	(-AAGTTGG)	2	0.8
IVS1-130	(G→C)	2	0.8
IVS1-5	(G→A)	1	0.4
-28	(G→C)	1	0.2
Cd 15	(TGG→TGA)	1	0.2
Fsc 82/83	(-G)	1	0.2
Toplam		530	100.0

Son yıllarda gebeliğin 10-12. haftaları arasında koryonik villus örneği alınarak izole edilen DNA örneklerinde anne ve baba adaylarından gelen mutasyonlar belirlenerek prenatal tanı yapılmaktadır (Cao, 1986; Tüzmen, 1996; Attila, 1999). Ç.Ü. Tıp Fakültesi Prenatal Tanı Ünitesinde 1992-2000 yılları arasında toplam sekiz yıl boyunca 537 doğum öncesi teşhis yapılmış olup 121 fetus

hasta (105 homozigot ve 16 çift heterozigot) olarak belirlenmiştir. Bunlardan çoğunluğu orak hücre anemisi (HbSS: 83) olmak üzere, 7 tane S- β -talasemi, 26 β -talasemi, 2 HbSE, 1 HbE- β talasemi, 1'er vaka da HbSD ve HbDD olarak belirlenmiştir. Prenatal tanısı yapılan fetusların anne ve baba adaylarında HbS, HbE ve HbD yanında 17 farklı beta talasemi mutasyonu belirlenmiş olup dağılımı Çizelge 2.7.'de gösterilmiştir (Çürük, 2000).

Çizelge 2.7. Prenatal tanı yapılan ailelerde β -talasemi mutasyon türleri ve dağılımı

Mutasyon türü		Kromozom sayısı	%
IVS1-110	(G→A)	114	48.1
Cd 39	(C→T)	23	9.8
IVS1-1	(G→A)	15	6.4
Fsc 8	(-AA)	13	5.5
Fsc 5	(-CT)	12	5.1
-30	(T→A)	12	5.1
IVS1-6	(C→T)	10	4.2
IVS2-745	(C→G)	10	4.2
Fsc 44	(-C)	8	3.4
Fsc 74/75	(-C)	5	2.1
IVS2-1	(G→A)	5	2.1
Fsc 36/37	(-T)	2	0.8
Fsc 22/23/24	(-AAGTTGG)	2	0.8
IVS1-130	(G→C)	2	0.8
Fsc 8/9	(+G)	2	0.8
IVS1-5	(G→C)	1	0.4
IVS1-5	(G→T)	1	0.4
Toplam		237	100.0

Hasta fetus taşıyan anneler için abortus kaçınılmaz olup bu travmatik yöntemi 2-3 kez yaşayanlar çocuk isteminden bile vazgeçmektedirler (Verlinsky, 1999). Son yıllarda prenatal tanı istemeyen anne adaylarına preimplantasyon genetik tanı imkânı sağlanmaktadır. Prenatal tanının çok erken formu olarak bilinen PGD ile in vitro fertilizasyon sonucu elde edilen embriyolardan birer hücre alınarak DNA düzeyinde genetik analizler yapılmaktadır. Sağlam olarak teşhis edilen embriyolar annenin uterusuna transfer edilmektedir (De Rycke, 2001). Anne adayları hasta fetus taşımadığını gebelik süreci başlamadan öğrenmektedir. Böylece gebeliğin sonlandırılması gibi bir işleme de gereksinim yoktur.

Beta talasemi alleli taşıyan aileler prenatal veya preimplantasyon genetik tanı için adaydır. Bu aileler her gebelik için %25 oranında hasta çocuk sahibi olma riskine sahiptirler. Beta talaseminin prenatal tanısı çiftlerden her ikisi de fertil ve β talasemi mutasyonu taşıyor ise anne ve baba adaylarından kan alınıp DNA izole edildikten sonra mutasyon taraması yapılır. Mutasyon tespitinden sonra annenin gebe kalması tavsiye edilir. Gebeliğin 10-12. haftaları arasında CVS alınarak anne ve babanın taşıdığı mutasyonlar kontrol edilir. Hasta olmayan fetusun gebeliği sürdürülürken hasta tespit edilen fetus ailenin vereceği kararla sonlandırılır.

Prenatal ve preimplantasyon genetik tanının amacı risk altındaki çiftlerin hasta çocuk sahibi olmasını önlenmektedir. PGD'nin üstün yanı, 10-12. haftalarda prenatal tanıya gitmenin ve %25 oranındaki hasta fetusu taşıma endişesinin giderilmiş olmasıdır. Ayrıca hasta fetusun abortusu sonucu meydana gelen travma da elimine edilmiş olacaktır (Hui, 2002).

2.4.2. Beta Talaseminin Prenatal Tanısı

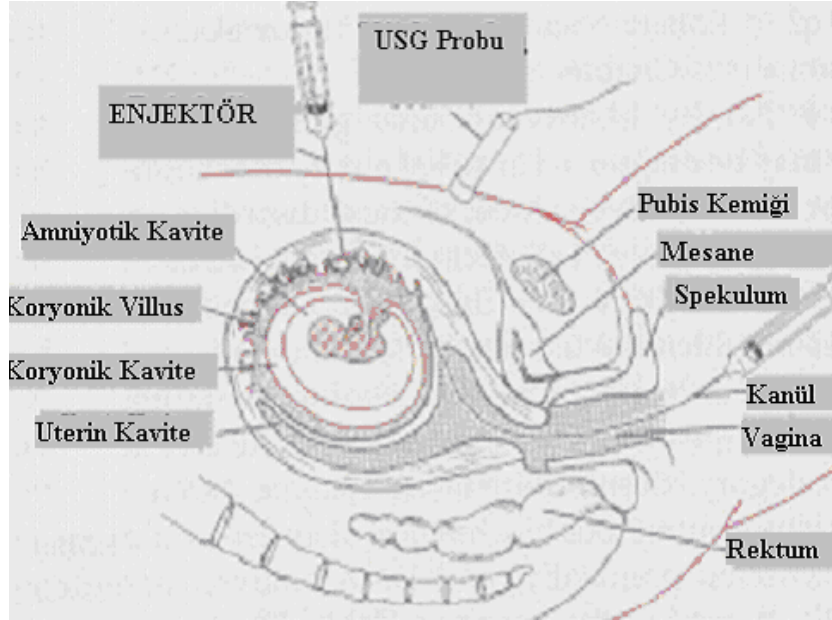
Prenatal tanı, fetusdaki normal dışı bulguların gebeliğin mümkün olduğunca erken döneminde tespit edilmesi ve gerekiyorsa sonlandırılmasıdır. Bunlar kalıtsal geçiş gösteren hastalıklar olabildiği gibi, değişik nedenlerle oluşan malformasyonlar, intrauterin enfeksiyonlar ve benzeri patolojilerde olabilir (Beksaç, 1996).

Doğum öncesi teşhiste invaziv yaklaşımlar amniyosentez, koryonik villüs örnekleme, fetal kan örnekleme ve diğer fetal dokuların elde edilmesidir. Non-invaziv yaklaşımlar ise daha ziyade anatomik bozukluklara yönelik görüntüleme tekniklerinin kullanılması, maternal kanda fetal hücrelerin incelenmesi ve biyokimyasal testlerdir (Beksaç, 1996).

2.4.3. Koryonik Villus Örnekleme (CVS)

Prenatal tanı amacıyla gebeliğin 10-12. haftaları arasında plasental doku elde etmek için koryonik villus örnekleme yapılır. CVS, transabdominal veya transvajinal yolla (Şekil 2.17.) yapılmaktadır (Beksaç, 1996). Elde edilen doku ve hücreler amniyosenteze oranla daha fazla olduğundan DNA ve enzim çalışmaları için çok uygundur. Materyalden kısa sürede DNA elde edilerek PCR tekniklerinin rahat uygulanması nedeniyle CVS tercih edilmektedir. Ancak CVS alınmadan önce anne ve baba adaylarından kan örneği alınarak mutasyon tipleri belirlenmelidir. Böylece CVS örneğinde çiftlerin sahip olduğu mutasyonlar kısa sürede teşhis edilmektedir. CVS materyali direkt olarak veya kültür aşamaları sonrasında da kullanılabilir (Beksaç, 1996).

Koryonik villus örnekleme enfeksiyon nedeniyle anne açısından önemli komplikasyonlara neden olabilmektedir. İşlemden sonra bazen düşük meydana gelmekte olup bu konuda kesin bilgi vermek güçtür. Anne yaşı ve yeterli örnek alabilmek için yapılan girişim sayısı bu oranları etkilemektedir. Genel olarak deneyimli kişilerce alınan CVS'in yaşa bağlı düşük oranını (%1-2) artırdığı kabul edilmektedir (Beksaç, 1996; Thompson, 1991.).



Şekil 2.17. Transabdominal ve transvajinal koryonik villus örneğinin alınması

2.4.4. Mutasyon analizi

Genetik hastalıklara neden olan mutasyonlar, tek nükleotid değişiminden kromozomun bir kısmının delesyonuna kadar geniş bir spektrumu içine almaktadır. Prenatal tanıda kromozom anomalileri için sitogenetik yöntemler kullanılmaktadır (Beksaç, 1996). Az miktardaki genomik DNA, polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) ile çoğaltılarak üzerindeki mutasyonlar tayin edilmektedir. Bu konuda çok çeşitli teknikleri mevcut olup devamlı gelişim ve değişim söz konusudur. (Weatheral, 1991). PCR temeline dayalı yöntemlerden Amplification Refractory Mutation Systems; ARMS (Newton, 1989), Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP (Andreas, 1989; Çürük, 1993) ve DNA Dizi Analizi (Çürük, 1994, Sanger, 1977) beta talasemilerin moleküler tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM**3.1. Kullanılan Cihazlar**

Otomatik pipet	Gilson 20,100,200 µl
Mikrosantrifüj	Heraeus Biofuge pico
Spektrofotometre	Shimadzu UV-120-02
Thermo-cycler	DNA Termal Cycler
Minijel elektroforez tankı	Bio-Rad
Düşük voltaj güç kaynağı	Bio-Rad
Mikrodalga fırın	Arçelik
UV lamba	Cole-Parmer 9814
MP4 kamera	Polaroid MP4 Land Camera
Isıtıcı blok	Lab-line 2050-1
Dikey jel elektroforez cihazı	Bio-Rad Protean II
pH metre	Beckman, Century SS-1
Etüv	Nüve-EN 500
Vorteks	Nüve
Derin dondurucu (-20°C)	Bosch

3.2. Kimyasal Maddeler**3.2.1. Katı Maddeler**

Proteinaz K	Sigma P 6556
Agaroz	Bio-Rad 162-0126
Etidyum bromür	Sigma E 8751
Tris	Amresco 0826
Tris baz	Sigma T6066
Borik asit	Sigma B 0252
Amonyum sülfat	Sigma A-2939

Amonyum klorür	Sigma A-5666
Ksilen siyanol	Sigma X-4126
Sodyum EDTA	Merck 347
Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma L-5750
Potasyum klorür	BDH 6698770
Tris HCl	Amresco 0324
Magnezyum klorür ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	Merck 834
Jelatin	Merck 839
Spermidin	Sigma S-0266
Agaroz	Sigma A-0169
Bromfenol mavisi	Sigma B-0149
Ficoll	Sigma F-4375
Hidroksi kinolin	Merck 7098

3.2.2. Sıvı Maddeler

Taq polimeraz	Sigma D 6677
Deoksi Adenozin trifosfat	Sigma D-4788
Deoksi Sitozin trifosfat	Sigma D-4913
Deoksi Guanozin trifosfat	Sigma D-5038
Timidin trifosfat	Sigma T-9656
Fenol	SigmaP-4557
Kloroform	Merck 711

3.3. Kan Örnekleri

3.3.1. Kan

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı hastanesine doğum öncesi tanı amacıyla başvuran talasemi taşıyıcısı anne ve baba adaylarından EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Kan sayımları otomatik cihazla yapıldıktan sonra HbA₂ düzeyi

yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlendi. Tam kan örneklerinden DNA izole edilerek anne ve baba adaylarının mutasyon analizleri yapıldı

3.4. Yöntemler

3.4.1. Hematolojik İncelemeler

EDTA'lı tüplere toplanan kanlar yavaşça birkaç defa karıştırılarak homojen hale getirildikten sonra hematolojik analizlerden Hemoglobin (Hb), Hematokrit (Hct), Eritrosit (RBC), Ortalama Eritrosit Hacmi (MCV), Ortalama Eritrosit Hemoglobini (MCH) ve Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu (MCHC) otomatik kan sayım cihazı ile ölçüldü.

3.4.2. Hemolizat hazırlanması

Kanlar üç kez serum fizyolojik ile yıkanarak 2400 rpm'de 10 dak santrifüj edilmiştir. Çökelen hücre hacmi kadar su ilave edilerek 5 dakika iyice çalkalandıktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmistir. Hemolizat olarak bilinen üst faz HPLC ve hemoglobin elektroforezi, HbA2 ve HbF analizlerinde kullanılmıştır.

Kontrol hazırlanması; HbAA, HbSS ve HbF olduğu bilinen kanlardan hemolizat hazırlanarak Hb konsantrasyonları ölçüldü. Örneklerin Hb konsantrasyonu 12 g/dL olacak şekilde ayarlandı. Her üç hemolizattan eşit hacimde alınarak karıştırıldı ve daha sonra küçük şişelere bölünerek +4°C'de saklandı (Huisman and Jonxis, 1977).

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC): Hemoglobin varyantlarının belirlenmesinde kullanılan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Zayıf katyon değiştirici kolonlar Hb'lerin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Globin zincirleri ters faz kolonları kullanılarak HPLC ile analiz edilmektedir. Bu işlem globinlerin hidrofobik özelliklerinden faydalanılarak yapılmaktadır (Huisman and Jonxis, 1977).

HPLC cihazı Agilent 1100

Kolon: Poly CAT katyon değiştirici (3.54CT 0315, 3µL 100)

Çözeltiler:

Mobil Faz A: 20 mM Bis Tris, 100 mg KCN pH 6.2

Maobil Faz B 20 mM Bis Tris, 200 mM NaCl pH 6.5

3.4.3. Moleküler Yöntemler

3.4.3.1. DNA İzolasyonu

Prensip

Periferal kandaki kırmızı hücreler hipotonik bir çözelti ile patlatıldıktan sonra santrifüj edilerek lökositler ayrıştırılır. Sodyum klorür-Tris-EDTA (STE) solüsyonu ile süspanse edilerek sodyumdodesilsülfat (SDS) ve Proteinaz K eklenmesiyle proteinler sindirilir. Fenol-Kloroform ekstraksiyonu ile purifiye edildikten sonra saf etanolde çöktürülerek genomik DNA elde edilir (Poncz M, 1982).

Ayırıcılar

- 10xRetikülosit salin solüsyonu

70 mM NaCl 40.90 g

25 mM M KCl 1.85 g

35 mM MgCl₂ x 6H₂O 7.10g distile suda çözülerek litreye tamamlanır.

- Hemoliz solüsyonu: her gün taze hazırlanır.

131 mM NH₄Cl 7.14 g

0.9 mM NH₄HCO₃ 0.07 g suda çözülerek litreye tamamlanır.

- STE solüsyonu
0.1 M NaCl 5.84 g
0.05 M Tris 6.05 g
1 mM EDTA 0.37 g distile su ile litreye tamamlanmadan önce
pH 7.4'e NaOH veya HCl ayarlanarak +4°C'de saklanır.
- Proteinaz K
25 mg proteinaz K, 2.5 mL 10 mM Tris-HCl pH 7.5 içerisinde çözülür ve -
20°C saklanır.
- Fenol
1000 g fenol 500 mL saf suda çözülür. Üzerine eşit hacimde 200 mM Tris-
HCl pH 8 ilave edilerek bir kaç kez iyice çalkalanır. Fazlar ayrılıncaya
kadar beklenir. Tamponun üst fazının pH'sı kontrol edilir. pH 8.0'ın altında
ise üst faz atılıp yeni tampon eklenir. Aynı işleme pH 8.0 oluncaya kadar
devam edilir. İşlemin sonunda fenol fazının üzerinde bir miktar tampon
bırakılıp, fazlası atılır. Fenol konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde hidroksi
kinolin eklenir. Bu maddenin çözülmesiyle fenol sarı bir renk alır ve
buzdolabında uzun süre saklanabilir.
- Fenol/Kloroform/İzoamil alkol: 25/24/1
- Kloroform/izoamil alkol: 24/1

Yöntem

EDTA'lı tüplere alınan 2.5 mL kan 10 mL'lik ağzı kapaklı plastik santrifüj tüpüne aktarılır. On dakika santrifüj (2500 rpm) edilerek plazması atılır. Çökelen kan hücreleri üzerine 1xretikülosit solüsyonu konularak karıştırılır. 10 dakika +4°C'de santrifüj edildikten sonra üst faz atılır. Bu işlem üç kez tekrarlanır. Çökelen hücreler üzerine hemoliz solüsyonu konularak eritrositlerin patlaması için

10 dakika buz içinde bekletilir. Santrifüj edilerek hemolizat ayrılır, tüpün dibindeki lökositler içinde kırmızı hücreler kalmış ise işlem tekrar edilir. Beyaz hücreler 4 mL STE solüsyonu ile süspanse edilerek üzerine 125 µL %20'lik SDS ve 50 µL proteinaz K (10 µg/µL) eklenerek hafifçe karıştırılır. Etüvde (37°C) bir gece inkübe edilen bu karışıma 5 mL fenol eklenerek 10 dakika nazikçe karıştırılıp santrifüj edilir. Üst faz alınır, kendi hacmi kadar kloroform-izoamil alkol ile 10 dakika karıştırılır. Santrifüj işleminden sonra üst faz soğuk absolü etanol içine alınır. Hava kabarcıkları çıkararak çökelen DNA santrifüj edilerek ayrılır. Tüpün dibinde biriken DNA üzerine 1 mL %70'lik etil alkol ilave edilerek karıştırılır. Üç dakika santrifüj edilerek alkol dökülür. Tüpün ağzı açık bırakılarak alkol tamamen buharlaştıktan sonra DNA çökeleği üzerine (DNA çökeleğinin miktarına göre) 100-200 µL saf su konur. Oda sıcaklığında bir gece veya 37°C de 2-3 saat bekletilir. DNA tamamen çözününce 10 µL'si 590 µL saf su ile karıştırılıp 260 nm'deki absorbansı ölçülerek konsantrasyonu hesaplanır.

$$OD_{260} \times \text{Sulandırma oranı}(60) \times 50 = \mu\text{g/mL}$$

Hazırlanan DNA'nın 280 nm'deki absorbansı da ölçülerek OD_{260}/OD_{280} oranından verimi kontrol edilir. Bu oran $1.5 \leq$ ise kaliteli DNA elde edilmiştir.

3.4.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Beta Gen Amplifikasyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu ile genomik DNA'nın istenilen bölgesi, ilgili gene spesifik bir çift primer yardımıyla çoğaltılmaktadır. Amplifikasyon olarak bilinen bu işlemde DNA 95°C' ye kadar ısıtılır. Böylece çift iplikli DNA ayrılarak tek iplikli DNA haline gelmesiyle denatürasyon sağlanmış olur. İkinci aşamada ısı (55°C-65°C) düşürülerek spesifik primerlerin komplementer dizilerine yapışması (annealing) sağlanır. Üçüncü aşamada taq polimeraz enzimi ile deoksinükleozid trifosfatlar (dNTP) primerlerin 3' ucuna, eklenerek yeni zincir 5'→3' yönünde sentezlenmektedir. Bu üç basamaktan meydana gelen ısı değişiminin her tekrarında

(döngü) sentezlenen zincir sayısı iki katına çıkar. Thermal Cycler ile sağlanan bu ısı döngüsü 25-30 kez tekrarlanarak gen amplifikasyonu sağlanır (Saiki, 1985).

Thermal Cycler cihazı PCR tüplerinin yerleştirildiği bir ısıtıcı blok ve ısı değişimlerini ayarlayan ısıtıcı ve soğutucu sistemler ile bunların sürelerini ayarlayan bir mikro işlemciden oluşmaktadır. Bu alette termal döngü protokolleri önceden girilerek uygulanır.

İnsan beta globin geni üzerinde bulunan mutasyonları tayin etmek için PCR temeline dayalı yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada PCR-RFLP, ARMS ve genel amaçlı PCR yöntemi kullanılarak analizler yapılmıştır. Beta globin geni 11 ve 12 nolu primerler ile amplifiye edilmektedir (Çizelge 3.1.). PCR sonucu elde edilen fragmant 585 bp uzunluğunda olup bu ürün agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmektedir.

Çizelge 3.1. ARMS ve RFLP için bazı PCR protokolleri

ARMS Program 70			RFLP Program 76		
Sıcaklık	Zaman (saniye)	Döngü (n)	Sıcaklık	Zaman (saniye)	Döngü (n)
94 °C	60	25	94 °C	60	30
65 °C	60		62 °C	60	
72 °C	90		72 °C	90	
72 °C	180	1	72 °C	60	1

a. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Prensip

PCR ile amplifiye edilen gen parçaları, mutasyon noktasını tanıyan bir restriksiyon endonükleaz ile inkübe edilerek jel elektroforezinde ayrıştırılır. Fragmant parça uzunluklarına göre genotipi belirlenir (Kayrın, 2003).

Beta globin geni 11 ve 12 nolu primerler ile #76 nolu program kullanılarak amplifiye edilmiştir (Tablo 6). Agaroz jelde kontrol edildikten sonra 10 µL PCR

ürünü bir ependorf tüpüne alınıp üzerine 1µL Dde I (5U/µL) enzimi eklenir. Bir gece 37°C de inkübe edildikten sonra % 2'lik Agaroz jel (NuSieve Agaroz 1 g, Agaroz 1 g) elektroforezinde yürütülüp etidyum bromür ile boyanarak değerlendirilir. Beta globin geni üzerindeki 11 ve 12 no'lu primerler ve Dde I enziminin kesim yerleri Şekil 6'de gösterilmiştir.

b. Amplification Refractory Mutation System (ARMS)

Prensip

Önceden karakterize edilen nokta mutasyonları veya küçük delesyonlar ARMS yöntemi ile belirlenebilmektedir. ARMS yönteminde iki ayrı PCR tüpü kullanılır. Normal DNA dizisine özgü ARMS primeri, sadece normal alleli belirlerken mutant alleli amplifiye edemez. Benzer şekilde, ikinci tüpde mutant allele spesifik primerler mutasyonu belirlerken, normal diziyi amplifiye edemez (Newton, 1989).

Klasik PCR'dan farklı olarak her mutasyon için ayrı bir amplifikasyon yapılarak β globin geni taranmaktadır. Mutant β globin alelline özgü primer sadece mutasyonun olduğu bölgeyi tanıırken, tek bir nükleotid farklı olsa bile amplifikasyon gerçekleşmeyecektir. Birinci PCR tüpüne mutasyona spesifik primer (#44M) ile ona zıt yönde çalışan diğer primer (#30) PCR koşullarını sağlamak için eklenir. Normal allele özgü primer (#45N) ile buna zıt çalışan diğer primer (#30) de ikinci PCR tüpüne konularak thermal cycler da #70 nolu program kullanılarak amplifikasyon yapılır. Böylece her iki tüpde amplifikasyon gözlenirse taşıyıcı, sadece mutant primerin bulunduğu birinci tüpte amplifikasyon var ise hasta, birinci tüpte yok sadece ikinci de varsa, spesifik mutasyon mevcut değildir denir. Ayrıca beta geni 15 ve 16 no'lu primerler ile amplifiye edilerek PCR koşulları kontrol edilmektedir. Kısaca her tüpte iki farklı fragmant amplifiye edilmektedir (Şekil 3.1.) (Kayrın L, 2003).

Ayırarlar

• Stok Çözeltiler

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

• 10X Tris Tamponu

2M KCl	1.25mL
1M Tris-HCl	0.5 mL
1M MgCl ₂	75µL
Jelatin	5mg
Steril distile su	3.2mL

Etüvde (37⁰ C) jelatinin erimesi için bekletilir.

• PCR karışımı (4 mL)

10X PCR tamponu	500 µL
Steril distile su	2700 µL
1,25mM dNTP karışımı	800 µL
Spermidin 1M	4 µL

- dNTP karışımı; dNTP'lerin (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) her birinden (100 mM'lık stoktan) 60 µL alınıp üzerine 4740 µL steril distile su eklenerek 1.25 mM'lık çözelti hazırlanır.
- Primerler; Primerler 5 pmol/µL olacak şekilde sulandırılır.
- Taq polimeraz enzimi; 5 U/L

Yöntem

PCR karışımına mutant allel için #15, #16, #30 ve #44, normal allel için #15, #16, #30 ve #45 no'lu primer, genomik DNA ve taq polimeraz eklenir.

	Normal PCR tüpü	Mutant PCR tüpü
PCR karışımı	20 µl	20µl
Normal ARMS primeri #45	1 µl	-
Mutant ARMS primeri #44	-	1 µl
Ortak primer #30	1 µl	1 µl
5' Kontrol primer #15	1 µl	1 µl
3' Kontrol primer #16	1 µl	1 µl
DNA (0.5-1 µg/µL)	1 µl	1 µl
Taq polimeraz (5 U/µL)	0.1µl	0.1 µl
Toplam hacim	25.1 µl	25.1 µl

ARMS yönteminde kullanılan kontrol ve ortak primerler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. ARMS yönteminde kullanılan ortak ve kontrol primerleri

5'Ortak primer # 30	5'ACC TCA CCC TGT GGA GCC AC 3'
5'Kontrol primer #15	5'CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC 3'
3'Kontrol primer #16	5'GAG TCA AGG CTG AGA GAT GCA GGA 3'
Cd 5 (-CT) # 44	5' ACA GGG CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCG CGA 3'
Cd 5 (-CT) #45	5' CAC AGG GCA GTA ACG GCA GAC TTC TCG TCG 3'

```

-148 ccagaagagc caaggacagg tacggctgtc atcacttaga cctcaccctg tggagccaca
          #11-----> #30-----{PRIVATE}
-88 ccctagggtt ggccaatcta ctcccaggag cagggagggc aggagccagg gctgggcata
-28 aaagtcaggg cagagccatc tattgcttAc atttgcttct gacacaactg tgttcactag
+24 caacctcaaa cagacacc          #45N
Ekson 1 ATG GTG CAC CTG ACT C↓CT GAG GAG AAG TCT GCC GTT ACT GCC CTG TGG
          #44M
Cd 16 GGC AAG CTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GGT GAG GCC CTG GGC AG
IVS1 1 gttggtatca aggttacaag acaggtttta ggagaccaat agaaactggg catgtggaga
61 cagagaagac tcttgggttt ctgataggca ctgactctct ctgcctattg gtctattttc
121 ccacc↓cttag
Ekson 2 G CTG CTG GTG GTC TAC CCT TGG ACC CAG AGG TTC TTT GAG TCC TTT GGG
Cd 47 GAT CTG TCC ACT CCT GAT GCT GTT ATG GGC AAC C↓CT AAG GTG AAG GCT
Cd 63 CAT GGC AAG AAA GTG CTC GGT GCC TTT AGT GAT GGC CTG GCT CAC CTG
Cd 79 GAC AAC CTC AAG GGC ACC TTT GCC ACA ↓ CTG AGT GAG CTG CAC TGT GAC
Cd 95 AAG CTG CAC GTG GAT C↓CT GAG AAC TTC AGG
          #12
IVS2 1 gtgagtctat gggacccttg atgtttttct tccccttctt ttctatgggt aagtcatgt
61 cataggaagg ggagaagtaa cagggtacag tttagaatgg gaaacagacg aatgattgca
121 tcagtgtgga agtctcagga tctgttttagt ttcttttatt tgctgttcat aacaattgtt
181 ttcttttgtt taattcttgc ttcttttttt ttcttctctc gcaattttta ctattatact
241 taatgcctta acattgtgta taacaaaagg aaatatctct gagatacatt aagtaactta
301 aaaaaaaact ttacacagtc tgcttagtac attactatct ggaatatatg tgtgcttatt
361 tgcataattca taatctccct actttatttt cttttatttt taattgatac ataatacatta
421 tacataattta tgggttaaag tgtaattgtt taatatgtgt acacatatgt accaaatcag
481 ggtaattttg catttgtaat tttaaaaaat gctttcttct ttaatatata tttttgtttt
541 atcttatttc taatactttc cctaactctt ttctttcagg gcaataatga tacaatgtat
          #15
601 catgcctctt tgcaccattc taaagaataa cagtataat ttctgggtta aggcaatagc
661 aatatttctg catataaata tttctgcata taaattgtaa ctgatgtaag aggtttcata
721 ttgctaatag cagctacaat ccagctacca ttctgctttt attttatggt tgggataaag
781 ctggattatt ctgagtccaa gctaggccct tttgctaate atgttcatac ctcttatctt
841 cctccacag
Ekson 3 CTC CTG GGC AAC GTG CTG GTC TGT GTG CTG GCC CAT CAC TTT GGC AAA
Cd 121 GAA TTC ACC CCA CCA GTG CAG GCT GCC TAT CAG AAA GTG GTG GCT GGT
Cd 137 GTG GCT AAT GCC CTG GCC CAC AAG TAT CAC TAA
UTR 1 gctcgcttct ttgctgtcca atttctatta aaggttcctt tgttccctaa gtccaactac
UTR 61 taaactgggg gatattatga agggccttga gcatctggat tctgcctAAT AAAAaacatt
UTR 121 tattttcatt gcaatgatgt atttaaatta tttctgaata ttttactaaa aagggaatgt
UTR 181 gggaggtcag tgcattttaa acataaagaa atgaagagct agttcaaac ttgggaaaat
UTR 241 acactatata ttaaaactcca tgaaagaagg tgaggctgca aacagctaag gcacattggc
UTR 301 aacagccctg atgcctatgc cttattcatc cctcagaaaa ggattcaagt agaggcttga
UTR 361 tttggaggtt aaagttttgc tatgctgtat tttacattac ttattgtttt agctgtcctc
UTR 421 atgaatgtct tttcactacc catttgctta tcttgcattc ctacgccttg actccactca
          #16

```

Şekil 3.1. Beta globin gen dizisi, PCR primerleri ve Dde I kesim yerleri.

3.4.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, amplifiye edilmiş DNA fragmantlarının kontrolü için kullanılır. Agaroz jelde DNA, moleküllerinin içerdikleri nükleotid sayısının logaritması ile ters orantılı olarak anoda doğru göç ederler, bu göç hızı jele eş zamanlı uygulanan kontrol DNA ile birlikte değerlendirilir.

Ayırıcılar:

- 5×Tris Borat EDTA (TBE) Tamponu pH 8.0

Tris baz 54.0 g

Borik asit 27.5 g

EDTA [0,5 M, pH:8.0] 20 mL bir litre saf suda çözülerek hazırlanır.

- %2'lik NuSieveAgaroz-Agaroz jel

NuSieve Agaroz 1 g

Agaroz 1 g

100 mL 0.5×TBE Tamponu içinde mikrodalga fırında eritilerek hazırlanır.

- Yükleme tamponu

Bromfenol mavisi 0.05

Gliserol %10

Ficoll %15

0.5×TBE tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır.

- Etidyum Bromür çözeltisi; 5 µg/µL olacak şekilde saf suda çözülerek hazırlanır.

Yöntem

Bir erlen içine 1 g NuSieveAgaroz, 1 g Agaroz tartılarak üzerine 100 mL 0.5×TBE tamponu eklenir. Mikrodalgada eritilen jel, elektroforez kalıpları içine döküldükten sonra taraklar yerleştirilerek soğumaya bırakılır. 0.5×TBE tamponuyla

dolu elektroforez tankı içine yerleştirilerek jel içindeki tarak çıkarıldığında oluşan kuyulara, amplifiye örnekten 20 µL alınarak 2 µL yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra jele applike edilip, 150 volt'da 30 dakika yürütülür. Elektroforez sonrası jel etidyum bromür ile 3 dakika boyanır ve saf su ile yıkanarak fazla boya artıklarından temizlenir. Ultraviyole ile görünür hale getirilen DNA fragmanlarının fotoğrafı çekilerek değerlendirilir.

Uygulama

IVS1-110 (G→A) mutasyonu için bir çalışma özeti aşağıda gösterilmiştir. Kontrol çalışması hem normal hem de mutant allel için hazırlanır

PCR Mix	20 µL	PCR Mix	20 µL
Primer Mix (IVS1-110N)	4 µL	Primer Mix (IVS1-110N)	4 µL
DNA (IVS1-110K)	1 µL	DNA (IVS1-110K)	1 µL
Taq polimeraz	0.1µL	Taq polimeraz	0.1µL

Her çalışma için örnek sayısına bir tane kontrol DNA eklenerek hesap yapılır. Üç kişi analiz edilecek ise hesap toplam 3 reaksiyon için hazırlık yapılır. Normal ve Mutant allel için ayrı tüplerde hazırlanır.

Normal allel için PCR karışımı

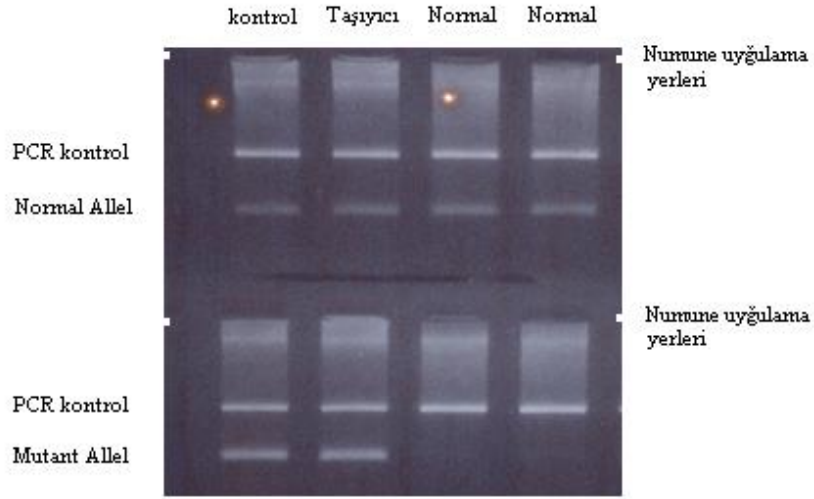
PCR Mix	3x20 µL
IVS1-110 N	3x4 µL
Taq polimeraz	3x0.1µL

Mutant allel için PCR karışımı

PCR Mix	60 µL
IVS1-110 M	12 µL
Taq polimeraz	0.3µL

Her örnek için 24 µL reaksiyon karışımı üzerine 1µL genomik DNA (0.5 µg) eklenir. PCR işlemi tamamlandıktan sonra %2 agaroz jel hazırlanır, 60 V

elektrik akımı verilir. 30 dakika yürütülen PCR ürünleri Etidum bromür ile boyanır, UV transiliminatörde incelenir (Şekil 3.2.)



Şekil 3.2. ARMS yöntemi ile mutasyon taraması

Beta globin gen dizisi üzerinde görülen mutasyonlar Şekil 3.3 de gösterilmiştir. Mutasyonlar baz değişimi, baz eklenmesi veya baz delesyonu şeklindedir.

```

661 cagtgccaga agagccaagg acaggtacgg ctgtcatcac ttagacctca ccctgtggag
721 ccacacccta gggttggcca atctactccc aggagcaggg agggcaggag ccagggctgg

-30(t>a) -28(a>c) Cap+1 Cap+22(g>a)
781 gcataaaagt cagggcagag ccatctattg cttacatttg cttctgacac aactgtgttc

Fsc5(-CT) Fsc8(-AA) Fsc8/9(+G)
841 actagcaacc tcaaacagac accATGGTGC ACCTGACTCC TGAGGAGAAG ICTGCCGTTA
IVS1-5(g>t)
Fsc15(G>A) IVS1-1(g>a) IVS1-5(g>c)
901 CTGCCCTGTG GGGCAAGGTG AACGTGGATG AAGTTGGTGG TGAGGCCCTG GGCAGgttgg
IVS1-6(t>c)
961 tatcaaggtt acaagacagg tttaaggaga ccaatagaaa ctgggcatgt ggagacagag

IVS1-110(g>a)
1021 aagactcttg ggtttctgat aggcactgac tctctctgcc tattggtcta ttttccacc

IVS1-128(t>g) Fsc36/37(-I) Cod39(C>T) Fsc44(-C)
1081 cttagGCTGC TGGTGGTCTA CCCTTGGACC CAGAGGTTCT TTGAGTCCTT TGGGGATCTG
1141 TCCACTCCTG ATGCTGTTAT GGGCAACCCT AAGGTGAAGG CTCATGGCAA GAAAGTGCTC

Fsc82/83(-G)
1201 GGIGCCTTTA GIGATGGCCT GGCTCACCTG GACAACCTCA AGGGCACCTT TGCCCACTG

IVS2-1(g>a)
1261 AGTGAGCTGC ACTGTGACAA GCTGCACGTG GATCCTGAGA ACTTCAGGgt gagtctatgg
1321 gacccttgat gttttctttc cccttctttt ctatgggttaa gttcatgtca taggaagggg
1381 agaagtaaca gggtagagtt tagaatggga aacagacgaa tgattgcatc agtgtggaag
1441 tctcaggatc gtttttagttt cttttatttg ctgttcataa caattgtttt cttttgttta
1501 attcttgcct tctttttttt tcttctcgcg aatttttact attatactta atgccttaac
1561 attgtgtata acaaaaaggaa atatctctga gatacattaa gtaacttaaa aaaaaacttt
1621 acacagtcct cctagtacat tactatttgg aatatatgtg tgcttatttg catattcata
1681 atctccctac tttattttctt tttattttta attgatacat aatcattata catatttatg
1741 ggttaaagtg taatgtttta atatgtgtac acatattgac caaatcaggg taattttgca
1801 tttgtaattt taaaaaatgc tttcttcttt taatatactt tttgttttat cttattttcta
1861 atactttccc taatctcttt ctttcagggc aataatgata caatgtatca tgcctctttg
1921 caccattcta aagaataaca gtgataattt ctgggttaag gcaatagcaa tattttctgca
1981 tataaatatt tctgcatata aattgtaact gatgtaagag gtttcatatt gctaatagca

IVS2-745(c>g)
2041 gctacaatcc agctaccatt ctgcttttat tttatggttg ggataaggct ggattattct
2101 gagtccaagc taggccctttt tgctaatacat gttcatacct cttatcttcc tcccacagCT
2161 CCTGGGCAAC GIGCTGGTCT GTGTGCTGGC CCATCACTTT GGCAAAGAA TCACCCACC
2221 AGTGCAAGCT GCCTATCAGA AAGTGGTGGC TGGTGTGGCT AATGCCCTGG CCCACAAGTA
2281 TCACTAAgct cgcttttctg ctgtccaatt tctattaaag gttcctttgt tccctaagtc
2341 caactactaa actgggggat attatgaagg gccttgagca tctggattct gcctaataaa
2401 aaacatttat tttcattgca atgatgtatt taaattattt ctgaatattt tactaaaaag
2461 ggaatgtggg aggtcagtcg atttaaaaca taaagaaatg aagagctagt tcaaaccttg
2521 ggaaaataca ctatatctta aactccatga aagaaggtga ggctgcaaac agctaatagca
2581 cattggcaac agccctgatg cctatgcctt attcatccct cagaaaagga ttcaagtaga

```

Şekil 3.3. Beta globin gen dizisi üzerindeki beta talasemi mutasyonları

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Bu tez çalışmasında tarama ile kozandan kan örnekleri toplandı. Bazı örnekler ise Ç.Ü. Tıp Fakültesi Merkez laboratuvarına kan sayımı, HbA₂ ve Hb elektroforezi için gönderilen kan örneklerinin arta kalan kısımlarından DNA izole edilerek mutasyon analizleri yapıldı. Hemogloblin A₂ seviyeleri %3,7 nin üzerinde olan örneklerde beta talasemi mutasyon taraması yapıldı. Sonuç olarak toplam 32 vakadan 26 taşıyıcı ve 8 tane de hasta olarak belirlenmiştir. Bunlardan biri IVS1-6/IVS2-1 çift heterozigot olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Beta talasemi hastası ve taşıyıcı sonuçları

	IVS1-110	Fsc5	Fsc8	Fsc8/9	IVS1-1	-30	IVS1-6	IVS2-1
Taşıyıcı	13	2	4	2	3		-	-
Homozigot	3	1	1	1	-	1	-	
Çift Heterozigot			-	-	-	-	1	1

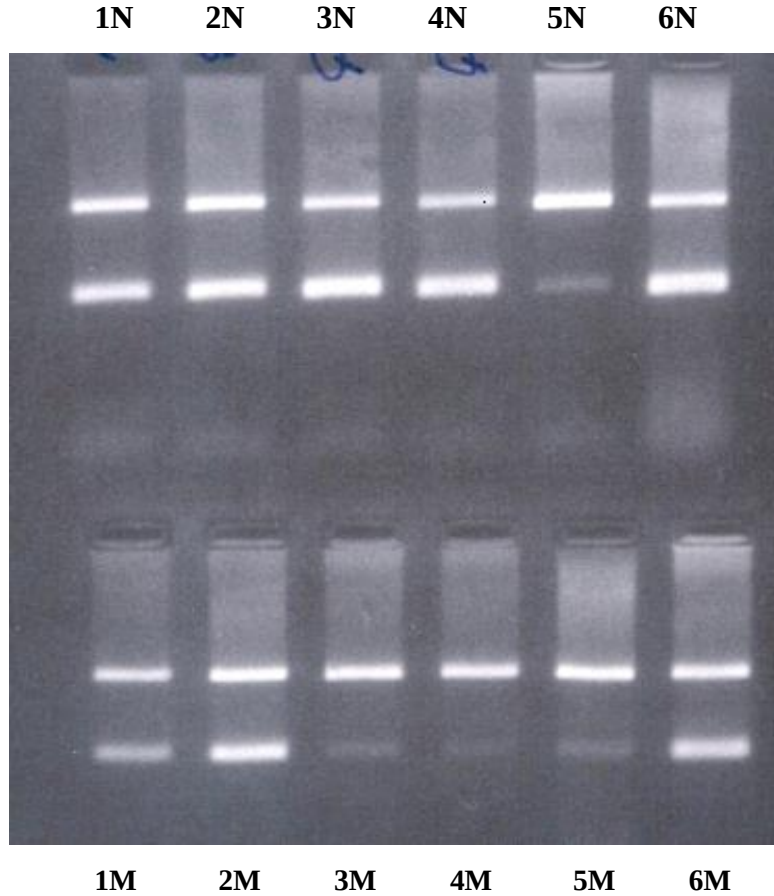
IVS1-6/IVS2-1 kombinasyonu sadece 1 vakada gözlenmiştir.

Bu çalışmada analiz edilen kan örneklerinin hematolojik verileri, Hb analiz sonuçları ve genotipleri Çizelge 4.2 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Kan örneklerinin hematolojik değerleri ve mutasyon sonuçları

No	SEX	YAŞ	RBC	HB	HCT	MCV	MCH	MCHC	HBA2	HbF	Hb	GENOTİP
1	K	21	5,89	11	41,3	70,1	19,2	27,4	4,6	1,9	AA	N/Fsc8/9 (+G)
2	E	23	6,15	12	43,8	71	19,2	26,9	4,9	0,8	AA	N/Fsc8/9 (+G)
3	K	1	3,72	7,4	26,2	70,4	19,9	28,2	0,5	43	FF	Fsc8/9 (+G) Fsc8/9 (+G)
4	E	33	3,2	8,8	30,8	96,3	27,5	28,6	2,4	32	AF	IVS1-6 (T>C) IVSII-I (G>A)
5	E	28	7,05	14	48,3	68,5	19,6	28,6	4	2,7	AA	N/Fsc8 (-AA)
6	K	22	5,18	11	36,3	70,1	20,8	29,8	3,1	3,3	AA	N/Fsc8 (-AA)
7	E	1	3,87	9	29,1	75,2	23,3	30,9	0,5	7,3	FF	Fsc8 (-AA) Fsc8-AA)
8	K	7	3,75	8	31,7	84,5	21,3	25,2	2,0	1,1	AA	Fsc5 (-CT) Fsc5 (-CT))
9	K	22	6,01	12	47,5	79	20,5	25,9	4,6	2,1	AA	N/Fsc5(-CT)
10	E	23	6,65	13	56,9	85,6	19,4	22,7	4,1	1	AA	N/Fsc5(-CT)
11	K	37	6,39	9,8	35,7	55,9	15,3	27,5	5,9	3,3	AA	N/IVS1-1 (G-A)
12	K	10	6,23	11	36,6	58,7	17,8	30,3	5,6	1,5	AA	N/IVS1-1 (G-A)
13	K	2	3,72	7	22,8	61,3	18,8	30,7	2,8	66	AF	IVS 1-110 (G>A) IVS1-110 (G>A)
14	K	33	5,74	12	37,6	65,5	20,6	31,4	4,3	0,5	AA	N/IVS1-110 (G-A)
15	E	30	8,14	16	49,7	61,1	19,1	31,2	4,6	0,6	AA	N/IVS1-110 (G>A)
16	E	36	5,86	12	39,7	67,7	21	31	3,5	0,4	AA	N/IVS1-110 (G>A)
17	K	8	5,7	11	35,8	62,8	19,1	30,4	4	1,2	AA	N/IVS1-110 (G>A)
18	E	1	3,93	10	30,4	77,4	26,2	33,9	1,7	26	AF	IVS1-110/IVS1-110
19	K	36	4,95	8,6	31	62,6	17,4	27,7	4,4	1,9	AA	N/Fsc8 (-AA)
20	E	10	4,9	8,2	28,9	59	16,7	28,4	4,6	2,1	AA	N/Fsc8 (-AA)
21	K	29	5,81	11	37,4	64,4	19,6	30,5	4,1	1	AA	N/IVS I-I (G-A)
22	E	5	5,45	10	35,3	64,8	18,5	28,6	4	0	AA	N/IVS1-110 (G>A)
23	K	28	5,43	11	39,8	73,3	20,4	27,9	4,2	0	AA	N/IVS1-110 (G>A)
24	K	18	7,5	26	85,2	24,2	28,4	4,4	33	33	AF	IVS1-110 (G>A) IVS1-110 (G>A)
25	K	58	4,91	11	34,3	69,9	21,8	31,2	3,5	0	AA	N/IVS1-110 (G>A)
26	E	60	6,78	13	43,5	64,2	18,7	29,2	3,9	0,7	AA	N/IVS1-110 (G>A)
27	K	1	5,38	9,9	34,6	64,3	18,4	28,6	4,1	17	A/F	N/IVS 1-110 (G>A)
28	K	20	6,26	12	41,2	65,8	19,5	29,6	3,6	1,3	A/A	N/IVS 1-110 (G>A)
29	K	28	5,42	11	32,3	59,7	20,1	33,7	4,2	0,8	A/A	N/IVS 1-110 (G>A)
30	K	24	6,13	13	40,5	65,7	20,1	20,5	4,3	1,8	A/A	N/IVS 1-110 (G>A)
31	K	25	5,54	12	36,5	63,9	19	32	3,4	1,4	A/A	N/IVS 1-110 (G>A)
32	E	28	7,05	14	48,3	68,5	19,6	28,6	4	2,7	AA	N/-30 (T>A)

ARMS yöntemi ile bir ailenin mutasyon taraması sonucu anne ve baba IVS1-110 (G→A) mutasyonunu taşıdığı, çocuğun ise sağlam olduğu görülmektedir
Şekil 4.1



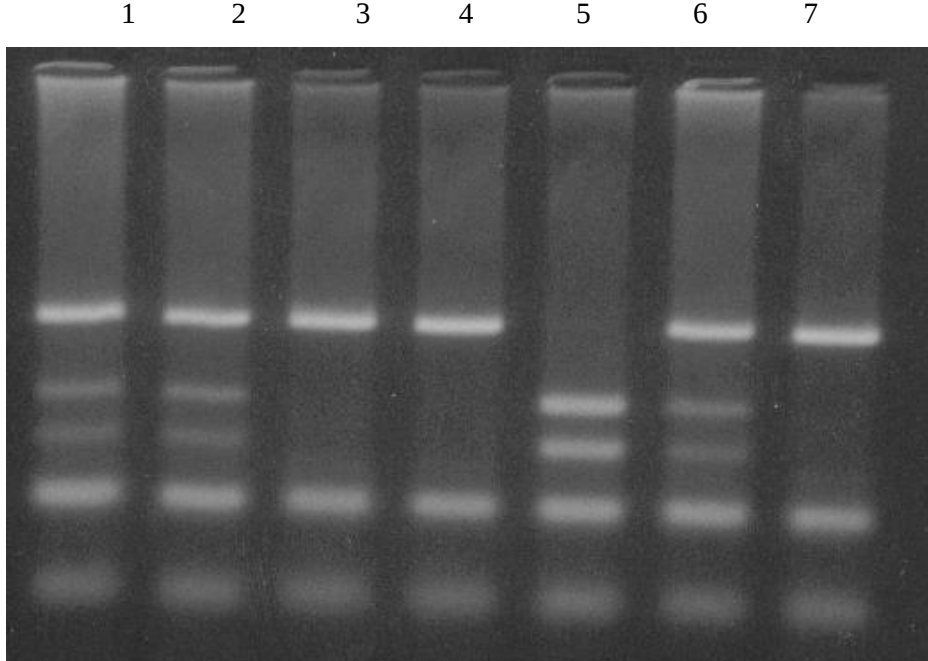
1 anne 2 baba, 3 ve 4 çocuklar, 5 negatif kontrol, 6 pozitif kontrol.

Şekil 4.1. IVS1-110 G→A mutasyonunun ARMS yöntemi ile sonuçları

Bazı nokta mutasyonları PCR-RFLP yöntemi ile de belirlenebilmektedir. Bu yöntem ile mutasyon noktasını içine alan gen bölgesi PCR ile çoğaltılır. Elde

edilen ürün restriksiyon endonükleaz enzimi ile bir gece inkübe edildikten sonra jel elektroforezi ile parça uzunlukları kontrol edilerek teşhis yapılmaktadır.

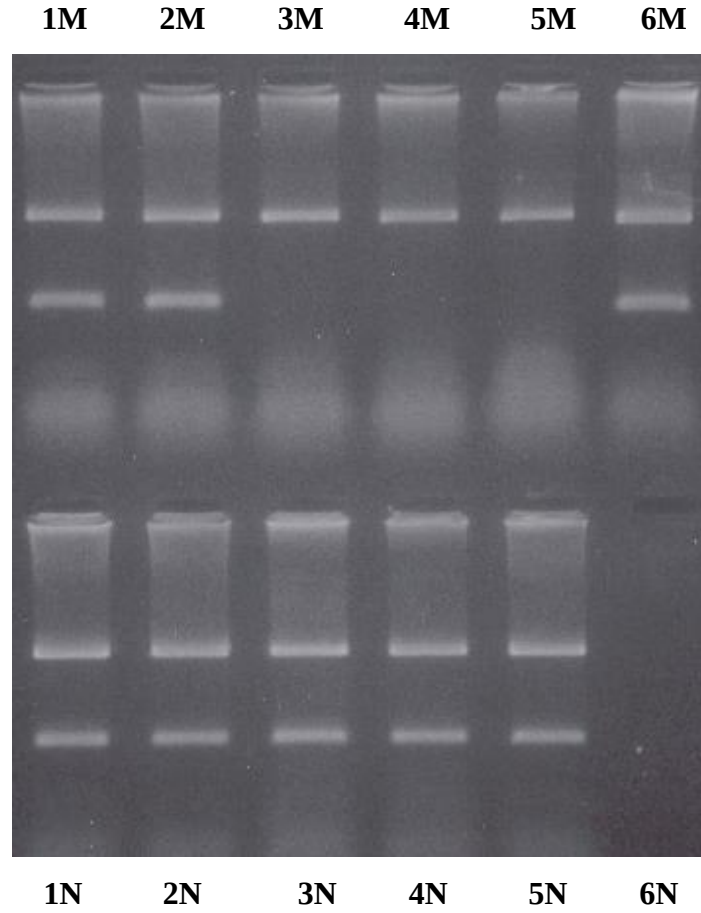
Ekson 1 ve ekson 2 bölgelerini içine alan 585 bp'lik beta globin geni PCR ile amplifiye edilmektedir. Altıncı kodondaki A→T değişimini sonucu meydana gelen HbS ve beşinci kodondaki iki nükleotid (-CT) kaybı ile meydana gelen çerçeve kayması (Fsc5) DdeI enziminin bu bölgedeki kesim yerini yok etmektedir. Bir ailenin RFLP sonucu Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



1 anne, 2 baba, 3 ve 4 çocuklar, 5 kontrol A/A, 6 Taşıyıcı, 7 Hasta

Şekil 4.2. Fsc 5 mutasyonu taşıyan allellerin Dde I enzimi ile belirlenmesi.

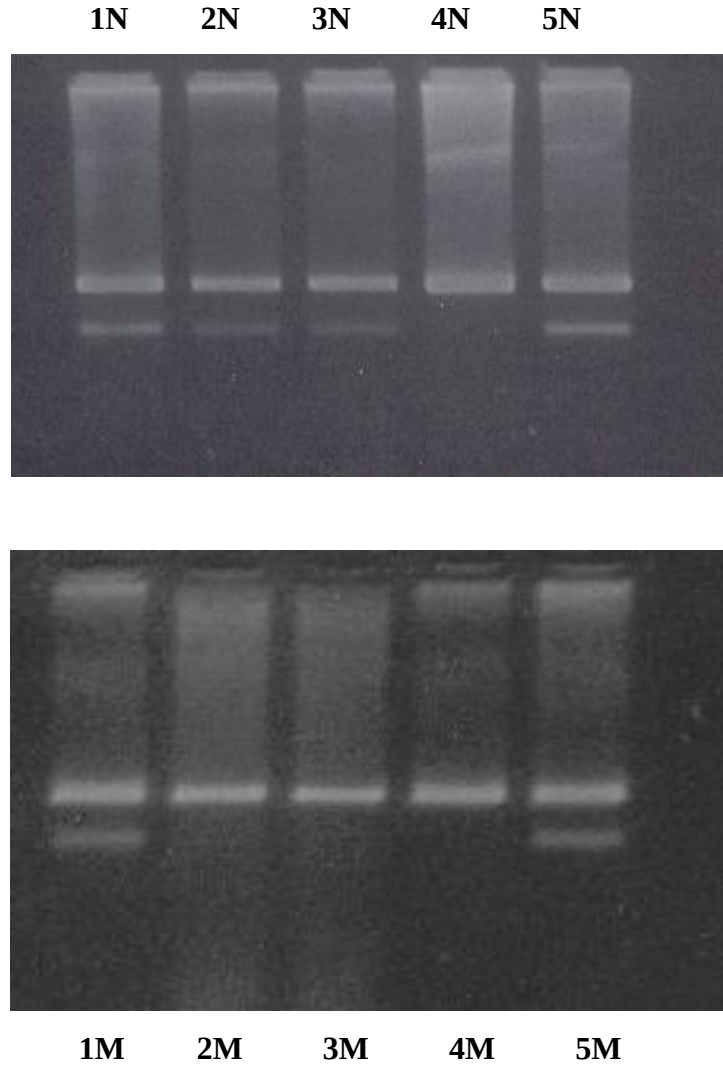
Bir ailenin mutasyon taraması yapılarak annenin IVS1-6, babanın ise IVS2-1 allellerine sahip olduğu belirlendi. Şekil 4.3'de anneden IVS1-6 mutasyonunu alarak heterozigot olduğu gösterilmiştir.



1 Çocuk, 2 anne, 3 baba, 4 kontrol A/A, 5 IVS1-6 (-), 6 IVS1-6 (+).

Şekil 4.3. IVS1-6 mutasyonunun ARMS yöntemi ile belirlenmesi.

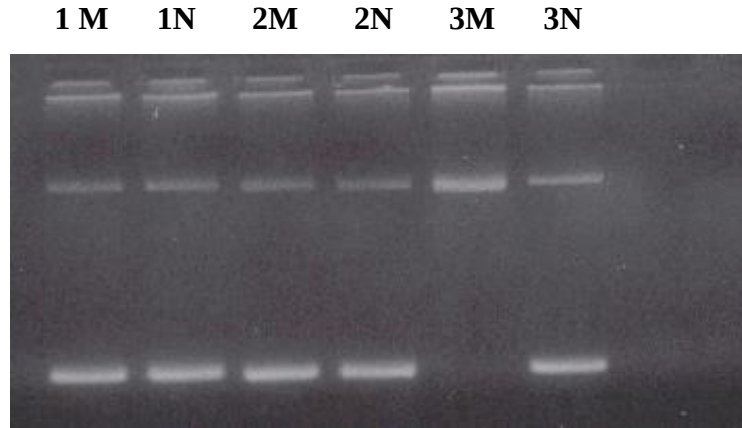
Bir ailede promotor bölge mutasyonu olan –30 için heterozigot olan anne ve baba ile fetusun ARMS yöntemi ile tanısı Şekil 4.4’de gösterilmiştir.



1 anne, 2-3 Çocuklar, 4 kontrol (-), 5 baba.

Şekil 4.4. 30 mutasyonunun ARMS yöntemi ile belirlenmesi

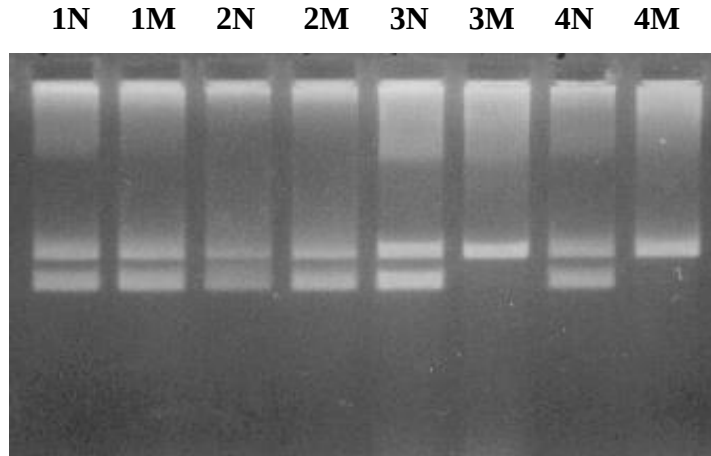
Bir ailenin mutasyon taraması yapılarak annenin IVS1-1 heterozigot olduğu Şekil 4.5. de gösterilmiştir.



1 kontrol, 2 anne, 3 Çocuk

Şekil 4.5. IVS1-1 mutasyonunun ARMS yöntemi ile belirlenmesi.

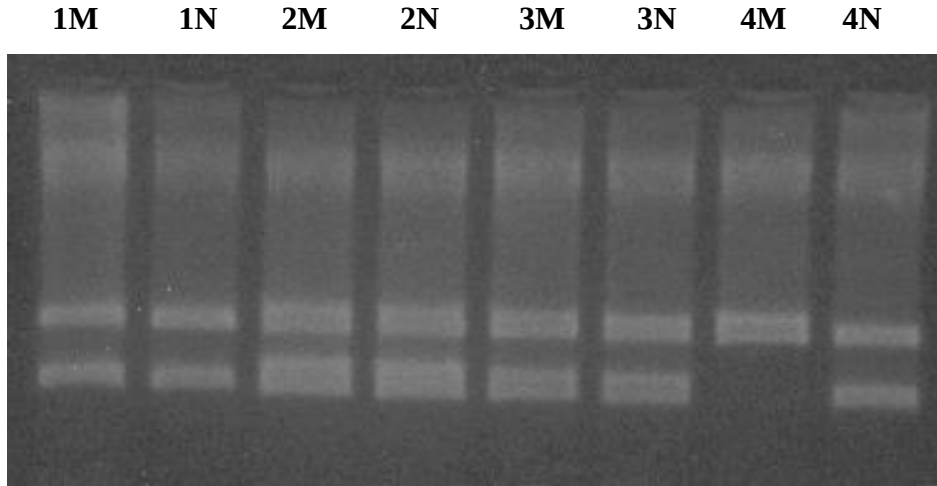
Mutasyon taraması yapılarak babanın IVS2-1 allellere sahip olduğu belirlenen bir aile Şekil 4.6. da gösterilmiştir.



1 kontrol pozitif, 2 baba, 3 Çocuk, 4 kontrol negatif.

Şekil 4.6. IVS2-1 mutasyonunun ARMS yöntemi ile belirlenmesi.

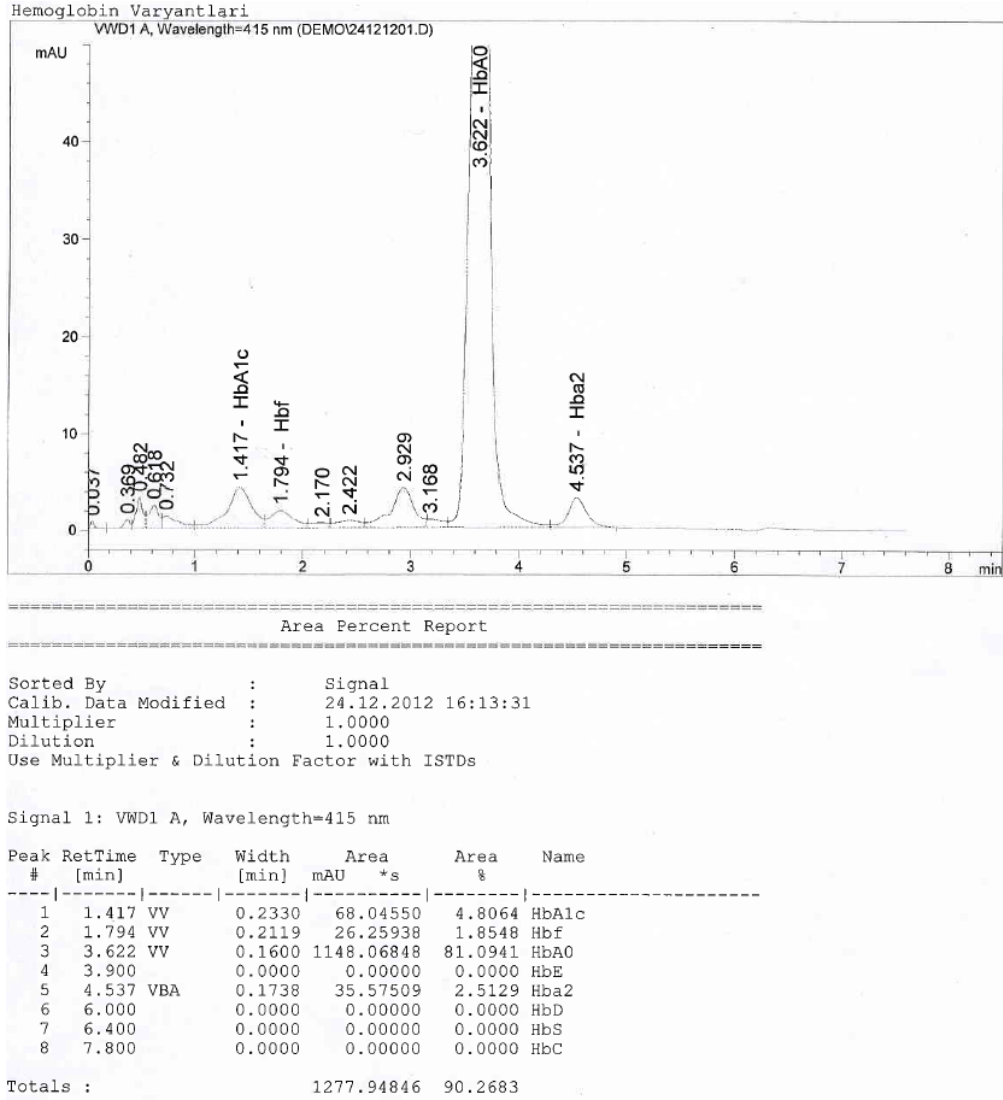
Bir ailenin mutasyon taraması yapılarak annenin Fsc8 (-AA) olduğu Şekil 4.7. de gösterilmiştir.



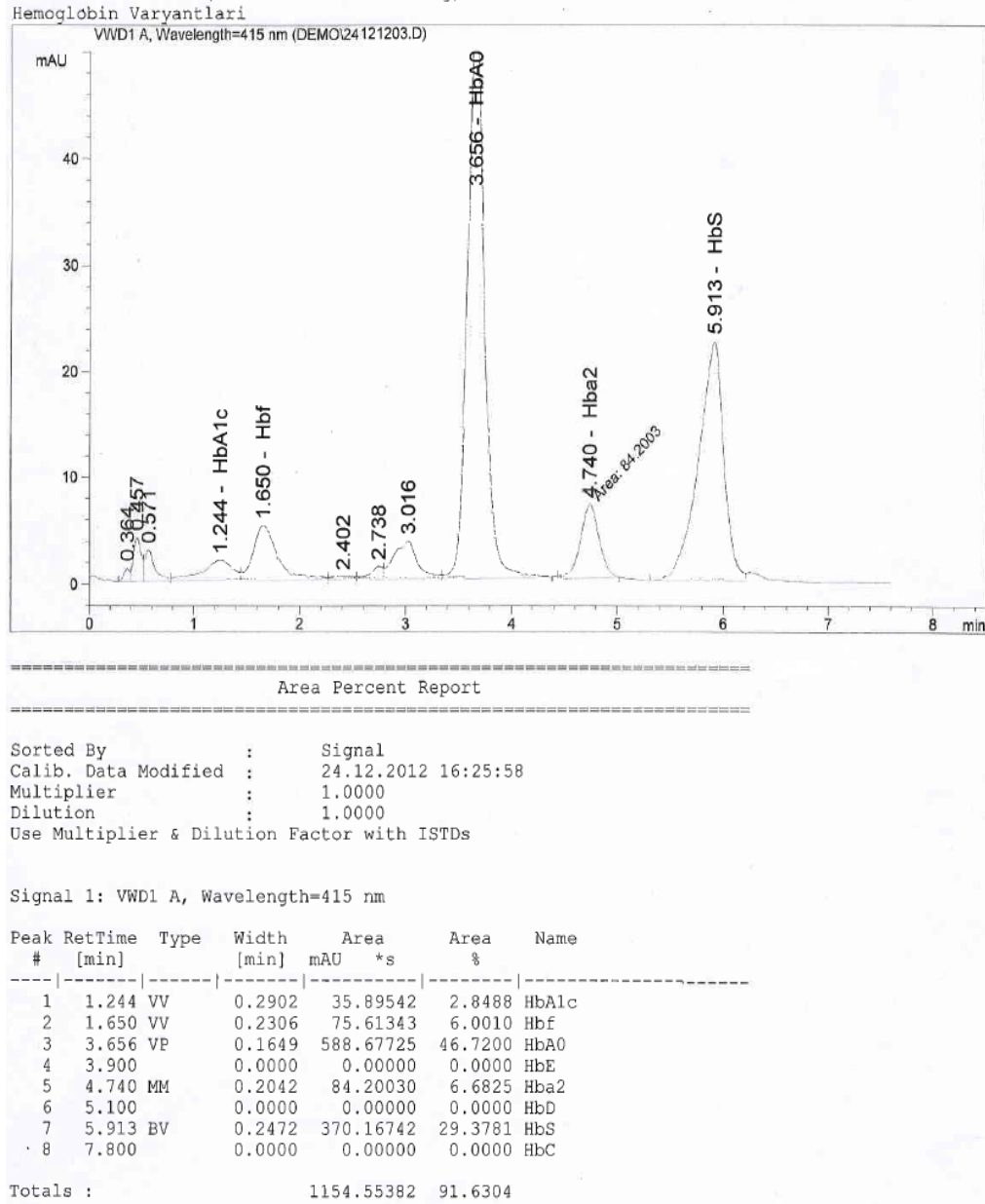
1 baba (Fsc8/N), 2 Çocuk (Fsc8/N), 3 pozitif kontrol, 4 negatif kontrol.

Şekil 4.7. Fsc8 (-AA) mutasyonunun ARMS yöntemi ile belirlenmesi.

Bu çalışmada elde edilen biri normal diğeri ise beta talasemi taşıyıcısı olan iki kromatogram aşağıda Şekil 4.8. ve 4.9. da gösterilmiştir. Diğer hastalar ile ailelerine ait kişilerin sonuçları çizelge 4.2 de verilmiştir.



Şekil 4.8. HPLC ile HbA2 değeri % 2.5 bulunan bir hastanın sonucu



Şekil 4.9. HPLC ile HbA2 değeri % 6.6 bulunan beta talasemi taşıyıcısı

4.2. Tartışma

Hemoglobin molekülünün yapısında bulunan globin zincirlerinin sentezindeki azalma veya tamamen yokluğu talasemi sendromlarına neden olmaktadır. Beta globin zincirlerinin azlığı sonucu alfa zincirleri eritrosit içinde eşleşmeden kalmaktadır. Artakalan bu zincirler proteolize uğrarken, atıklar hücre zarını etkileyerek kemik iliğinde ve periferel dolaşımında erken yıkılmaya neden olmaktadır. Böylece eritrosit içinde hemoglobin miktarının azalması ile hipokromi, hücre hacminin küçülmesi sonucu mikrositoz ile seyreden beta talasemiler meydana gelmektedir.

Beta talasemi Atlas Okyanusundan, Cebelitarık boğazına, oradan Akdeniz ülkeleri, Ortadoğu, Hindistan ile Güneydoğu Asya ülkeleri ve Pasifik adalarını içine alan geniş bir alana yayılmıştır (Lukens. 1999). Beta talaseminin dünyadaki dağılımı büyük farklılıklar göstermektedir. En sık olarak, Akdeniz ülkelerinde (% 0.5-14), Güneydoğu Asya ülkelerinde (%5), Afrika ve Amerikalı siyahlarda (%1.5) görülmektedir. Dağılımı Akdeniz ülkelerinde de oldukça farklılık gösteren beta talasemi insidansı, Kıbrıs'ta %14.7, Yunanistan'da %8, Arnavutluk'ta %7.1, İtalya'da %3.7, Sardinya'da %12.6, Sicilya'da %5.9, Libya'da %4.6 ve Tunus'da %4.4 olarak bulunmuştur. Türkiye, Lübnan, İsrail, Malta, Cezayir, Fas da ise taşıyıcı insidansı %2-3 arasında saptanmıştır. Akdeniz ada ülkelerinden Kıbrıs (%14.7), Sardinya (%12.6), Sicilya (%5.9) ve Yunan adalarında (%5-20) talasemi insidansının yüksek bulunması, kapalı toplum olmalarından kaynaklanmıştır (Efremov 1992; Baysal, 1992, Cao, 1989).

Dünya talasemi kuşağı üzerinde bulunan Türkiye'de beta talasemi mutasyonlarını belirlemek amacı ile tarama çalışmaları yapılmıştır. Değişik yörelerde yapılan araştırmalar taşıyıcı insidansının %2-3 arasında olduğunu göstermiştir (Yüregir GT 1987, 1995). Türkiye'de 1958 yılında İlk klinik ve hematolojik çalışmalar Aksoy ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Aksoy M, 1958). β -talasemi majörlü ilk hasta 1941'de rapor edilmiştir. (Aksoy M, 1991) 1958 yılında ilk klinik ve hematolojik çalışmalar Aksoy ve ark. tarafından yapılmıştır. 1971

yılında Çavdar ve Arcasoy β -talasemi insidansının %2,1 olduğunu bildirmişlerdir (Çavdar AO, 1971). 1983 yılında, hemoglobinopatileri tanımlamak için ilk doğum öncesi tanı Beksaç ve ark. tarafından yapılmıştır (Beksaç MS, 2011). 1987 yılında Akar ve ark. tarafından, Türk popülasyonunda en sık görülen talasemi allelinin IVS-I-110 (G> A; HBB: c.93-21G> A) mutasyonu olduğunu, bunun da Akdeniz bölgesinde görülen en sık mutasyon olduğunu bildirilmiştir (Akar N, 1987). İlk kök hücre naklinin Özerkan ve arkadaşları tarafından tarafından beta talasemili bir hastada gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Canatan D, 1993). 1992 yılında Başak ve ark. tarafından Türk popülasyonunda meydana gelen β -thal mutasyonlarının spektrumunu yayınlanmıştır (Başak AN 1992). En sık görülen altı alell IVS-I-110, IVS-I-6, Fsc 8, IVS-I-1, -30 ve Fsc 5 tüm mutasyonların mutasyonların %70 kadarını oluşturmuştur. 2004 yılında Kahraman ve ark. Türkiye'de talasemi için HLA tiplmesi ile birlikte preimplantasyon genetik tanı gerçekleştirmiştir (Kahraman S, 2004).

Altay ve arkadaşları tarafından IVS I-6, IVS I-110, IVS II-1, IVS II-745 ve IVS I-1 mutasyonlarının tüm β -talasemi mutasyonlarının %71'ini oluşturduğunu, IVS I-110'un Ülkemizdeki bütün bölgelerde en yaygın mutasyon olduğu Akdeniz Bölgesinde %47 ve Marmara Bölgesinde %27,5 oranında olduğu bildirilmiştir. Ayrıca ülkemizde en sık görülen 2. mutasyonun IVS I-6 olduğu bildirilmiştir. IVS I-1 mutasyonunun en sık Ege Bölgesinde, onu takiben Marmara, Karadeniz, İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu'da görüldüğü, IVS II-745 mutasyonunun da en sık Akdeniz Bölgesinde olduğu bildirilmiştir. Fsc 8(-AA), IVSII-1 (G>A) ve -30 (T→A) mutasyonları en sık Doğu Anadolu'da bunu takiben de Güneydoğu Anadolu'da, Akdeniz ve Ege bölgesinde görülmektedir. β -talaseminin en yüksek oranda görüldüğü yer (% 10) Antalya olup, en az oranında görüldüğü yerde % 0,2 oranıyla Doğu Anadolu Bölgesindir (Altay, 2002).

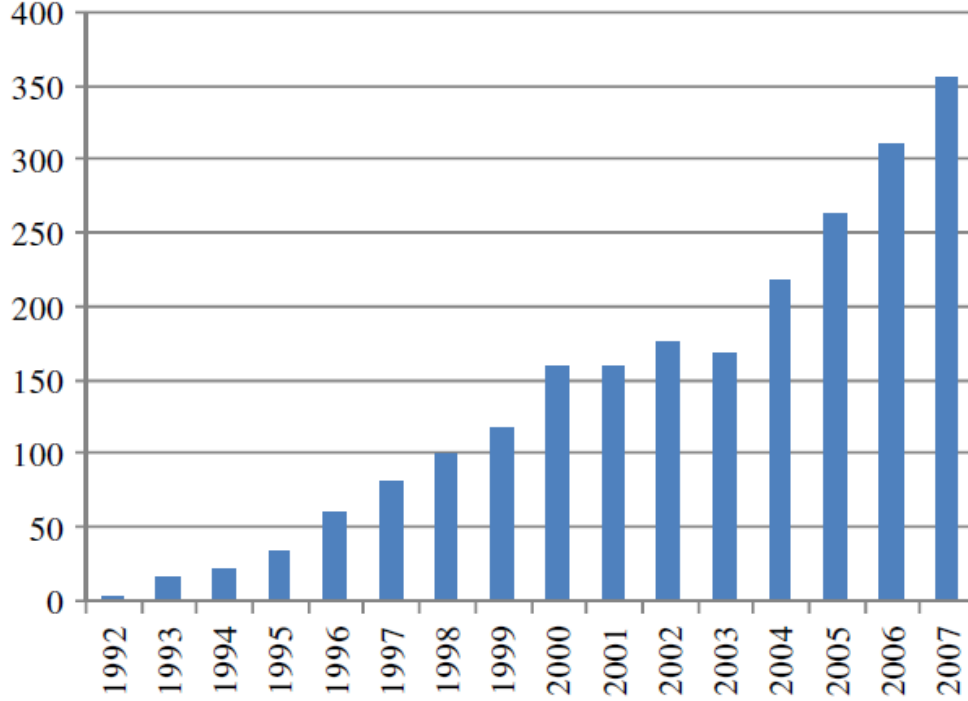
Yüreğir ve arkadaşları Türkiye'nin güney bölgesinde beta talasemi sıklığı ve mutasyon tiplerini çalışmışlar, HbA2 'si yüksek beta talasemi sıklığını %3,9 olarak saptamışlar ve en yüksek oranda IVS I-110 mutasyonu görüldüğünü rapor

etmişlerdir. Ayrıca Mersin’de Orak hücre anemisi taşıyıcılığını %6,4 ve beta talesemi sıklığı da %3,1 olarak tespit etmişlerdir (Yüreğir, 1988).

Talasemiye önlemeye yönelik ilk çalışmalar 1970’li yıllarda Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından Akdeniz ülkelerinde başlatılmıştır. Hb bozukluklarının kontrolüne yönelik WHO kılavuzları, hastalar için optimal yönetim, toplum temelli önleme eğitimi, taşıyıcı tarama programları, genetik danışmanlık ve doğum öncesi tanı hizmetlerini içermektedir (Cao, 2013, Model, 2008).

Beta globin zincir sentezini kontrol eden gen 11 nolu kromozomun kısa kolu üzerinde bulunmaktadır. Beta globin gen dizisi moleküler düzeyde analiz edilmiş olup yeryüzünde yaklaşık 200 tane mutasyon belirlenmiştir (Huisman THJ, 1997). Bu çalışmalara göre insidansında olduğu gibi genetik heterojenitesi de bölgeye ve topluma göre değişmektedir. Taşıyıcı oranı yüksek olan Kıbrıs, Sardinya, Sicilya gibi toplumlarda hasta doğumu önlemek için taşıyıcıların belirlenmesi, genetik danışma verilmesi ve prenatal tanı yapılarak homozigot doğumlar önemli sayıda azaltılmıştır (Cao 1986; Baysal, 1992).

Ülkemizde farklı grupların kendi bölgelerinde yaptığı araştırmalarda 40 farklı beta talasemi mutasyonu belirlenmiştir (Başak, 1992; Tüzmen, 1996; Öner, 1990; Aulchla-Scholz 1996; Çürük, 2001; Gürgey, 1989). Çukurova bölgesinde yapılan tarama çalışmaları ile beta talasemi taşıyıcı sıklığı %3.9 olarak tespit edilmiş olup 20 farklı mutasyon saptanmıştır. Moleküler düzeyde yapılan bu çalışmalar prenatal tanı için bir zemin hazırlamıştır. Çukurova bölgesinde orak hücre anemisi başta olmak üzere beta talaseminin de önemli bir sağlık sorunu olduğu, kayıtlı hasta sayısı ve tarama sonuçlarından oldukça iyi anlaşılmıştır. Bu iki hastalığın prenatal tanısı Ç.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında otuz yıl önce (1992) başlatılmıştır. İlk yılda 9, 1993’de 21, 1994’de 28, 1995’de ise 28 doğum öncesi teşhis yapılmış olup başvurular yıldan yıla artarak devam etmiştir (Attila, 1999, Çürük, 2009). İlk on beş yıllık sonuçlar Şekil 4.10 da gösterilmiştir (Çürük, 2009).



Şekil 4.10. Ç.Ü. Tıp Fakültesi Prenatal Tanı Merkezinin yıllara göre sonuçları

Bu tez çalışması, moleküler tanı konusunda deneyim sahibi olmak ve Kozan ilçesi hakkında edinilen birikimler ile prenatal tanının alt yapısını veri sunmak amacıyla yapılmıştır. Altı ay süresince toplam 32 örnek üzerinde çalışılarak elde edilen veriler Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Bunlardan 7 tanesi hasta olarak belirlenmiştir. Vakaların üç tanesi beta talasemi homozigot ve bir vakada ise β talasemi çift heterozigot olarak belirlenmiştir.

Çukurova bölgesinde yapılan taramalarda ise 20 farklı beta talasemi alleli belirlenmesine rağmen bu gruptaki vakalarda sadece 7 tanesi görülmüştür. Çukurova toplumunda HbS taşıyıcılığı %8.2 ve beta talasemi taşıyıcılığı ise %3.9 olarak belirlenmiş olup Kozan’da orak hücre anemisi ve taşıyıcılarına rastlanmamıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Akdeniz ülkelerinde hemoglobin hastalıklarının oldukça heterojen olduğu çok iyi bilinmektedir. Ülkemizde 40 dan fazla beta talasemi mutasyonu ve 60 tane de anormal hemoglobin belirlenmiştir. Bunlardan sık görülen 10 beta talasemi mutasyonu, toplamın %90'ından sorumludur. Bu çalışmada 8 farklı beta talasemi mutasyonu Kozan'da tespit edilmiştir. Hemoglobin S, Çukurova bölgesinde %8.2 oranında görülmesine rağmen Kozan'da hiç bir taşıyıcı veya hasta tespit edilmediği gibi diğer anormal hemoglobine de (HbC, HbD, HbE, Hb O-Arab) rastlanmamıştır. Toplumda görülen mutasyonların teşhisi ve sıklığının belirlenmesi, risk altındaki çiftlerin prenatal tanısında hızlı sonuç alınması yönünden çok önemlidir. Kozan'da daha önce genotip çalışması yapılmadığı için bu tez projesinin konusu olmuştur.

Türkiye Cumhuriyeti Hükümeti 1993 yılında genetik hastalıklar ile mücadele yasasını çıkardı. Bu kanun uyarınca talasemilerin sık görüldüğü 40 ilde evlilik öncesi tarama merkezleri kurularak taşıyıcıların taranması ve genetik danışmanlık verilmesi sağlandı. Bu çalışmalar hasta çocuk doğumlarının azaltılmasında çok etkili oldu. 2018 yılında T.C. Sağlık Bakanlığı evlilik öncesi tarama programını genişleterek aile hekimliği uygulaması ile tüm illerde hizmet vermeye başladı. Tarama sonucu belirlenen taşıyıcı çiftler aile hekimleri tarafından izlenmekte olup gebeliğin 10-12. haftaları arasında prenatal tanı merkezlerine yönlendirilerek doğum öncesi teşhis yapılması sağlandı.

Bu tez çalışması, Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Prenatal Tanı Merkezine Kozanlı ailelerin talasemi mutasyonları hakkında bilgi sunmak amacı ile yapılmıştır. Sağlık Bakanlığı tarafından yürütülmekte olan evlilik öncesi tarama sonucu riskli çiftlerin mutasyon analizlerinin gebelikten önce yapılmasının hem aileler hem de prenatal tanı yapan merkeze önemli katkı sağlayacaktır. Bu nedenle ortak çalışma yapılmasını tavsiye ediyoruz. Mutasyon analizi yapılmadan doğum öncesi teşhis olmaz.

KAYNAKLAR

- Ahmed, M., (2001). Stuhrman, M., Bashawri L, Kühnau, W, El-Harith A, Hairth E., (2001). The β -globin genotype E121Q/W15X (cd121GAA→TGA) underlines HbD/ β -(0) thalassaemia marked by domination of haemoglobin D. *Ann Hematol* 2001; 80:629-633.
- Akar, E, Ozdemir, S., Timur H.I.I., Akar N., (2003). First Observation of homozygous hemoglobin Hamadan (B 56(D7) GLY-ARG) and beta thalassemia (-29 G>A) hemoglobin Hamadan combination in a Turkish family. *Am J Hematol* 2003; 74:280-282.
- Akar, E., Akar, N.A., (2007). Review of Abnormal Hemoglobins in Turkey, 24:143-145.
- Akar, N., (2012). Anormal hemoglobinlerin Türk popülasyonunda Güncellenmesi.
- Aksoy, M, Erdem Ş, Efremov GD, Wilson JB, Huisman THJ, Schroeder J, Müftüoğlu A. (1972). Hemoglobin İstanbul: Substitution of glutamine for histidine in a proximal histidine (F8(92) β). *J Clin Inv* 1972; 51:1380-1387.
- Alain, J. Marengo-Rowe, M.D. (2006). Structure-function relations of human hemoglobins, *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 19(3): 239–245.
- Altay, Ç, Gürgey A., (1986). Distribution of hemoglobinopathies in Turkey. *Turk J Pediatr*, 1986; 8:219.
- Altay, Ç. (2002). Abnormal Hemoglobins in Turkey. *Turk J Hematol* 2002; 19:63-74
- Anasa, A., (2008). Recipe for Protein Crystallography" (PDF). Educational Brief. National Aeronautics and Space Administration. Archived from the original (PDF) on 2008-04-10. Retrieved 2008-10-12.

- Andreas, E, Kulozık L, Kohne E, Bartman C R, Kleihauer, E. (1988). Rapid and non-radioactive prenatal diagnosis of b-thalassemia and sickle cell disease: aplication of the poymerase chain reaction (PCR). Br J Haematol, 1988; 70: 455-458.
- Arıyürek, S.Y., (2009). Konya Bölgesinin Anormal Hemoglobin ve Talasemi Mutasyon Tiplerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Attila, G, Çürük M. A, Arpacı A, Özgünen F T, Kılınç Y, Aksoy K and Yüregir G T. (1999). Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in Southern Turkey. Ann Med Sci, 1999; 8:93-97.
- Bachir, D; Galacteros, F., (2014) (November 2004), Hemoglobin E disease. (PDF), Orphanet Encyclopedia, retrieved January 13, 2014.
- Bachir1, D, Galacteros F. (2004). Hemoglobin E disease. Orphanet Encyclopedia. November.
- Barbour, V.M., Tufarelli C., Sharpe J.A., Smith Z.E., Ayyub H., Heinlein C.A., Stanley J.S., Indrak K., Wood W.G., Higgs D.R. (2000). A-Thalassemia resulting from a negative chromosomal position effect. Blood, 2000, 96(3): 800-807.
- Başak, A N, Özçelik H, Özer A, Tolun A, Aksoy M, Ağaoğlu L, Ridolfi F, Ulukutlu L, Akar N, Gürgey A, Kırdar B. (1992). The molecular basis of β - thalassemia in Turkey. Hum Genet, 1992; 89: 315-318.
- Bibek, K Suman K. Jha; Eiman Al Zaabi. (2020). Hemoglobin C Disease. November 16, 2020.
- Bunn, H F, Forget B G. (1986). Hemoglobin; Molecular Genetic and Clinical Aspects. Philadelphia, W.B. Saunders Comp., 1986; 60-90.
- Cao, A, Gossens M, Pirastu M. (1989). Beta thalassemia mutations in mediterranean population. Br J Haematol, 1989; 71: 309-312.

- Cao, A, Pirastu M, Rosetelli C. (1986). The prenatal diagnosis of thalassemia. *Br J Haematol*, 1986;63:215-220.
- Cappellini, M.D, Cohen A, Eleftheriou A, Piga A, Porter J, Taher A., (2008). *Guidelines for the Clinical Management of Thalassaemia*, 2nd edition. Nicosia (CY), Thalassaemia International Federation.
- Carver, M.F.H., Kutlar, A. (1995). International hemoglobin Information Center Variants list. *Hemoglobin* 1995; 19:37.
- Cavalli, SL, Menozzi P, Piazza A. (1996). *The History and Geography of Human Genes*. Princeton: University Press, 1996.
- Cavdar, AO, Acarsoy A. (1976). Haemoglobin Lepore Boston in a Turkish family. *J Med Genet* 1976, 13:363-365.
- Chan, V. (1999). Education Session 9: Thalassemia: Molecular Defects in α -thalassemia. IX Congress of ISH-Asian-Pacific Division. Bangkok-Thailand; 24-28 September 1999: 100-103
- Çürük, M A, Aksoy K, Arpacı A, Kılınç Y, Yüreğir GT. (1993). Orak hücre anemisinin DNA gen amplifikasyonu ve restriksiyon endonükleaz analizi ile saptanması. *Ç. Ü. Tıp Fak. Der*, 1993: 18, 55-58.
- Çürük, M A, Arpacı A, Attila G, Tuli A, Kılınç Y, Aksoy K, and Yüreğir G T. (2001). Genetic heterogeneity of beta thalassemia at Çukurova in Southern Turkey. *Hemoglobin*, 2001;25(2):241-245.
- Çürük, M A, Attila G, Tuli A, Arpacı A, Evrücke C, Özgünen F T, Kılınç Y, Aksoy K, Yüreğir G T. (2000). Çukurova bölgesinde orak hücre anemisi ve beta talasemi sıklığı; 537 prenatal tanı sonucu. 1st International Summerschool on thalassemia. Antalya-TURKEY, 22 –26 April 2000: 133-134.
- Çürük, M A. (1994). *Azerbaycan Türklerinde beta talaseminin DNA ve globin zincir analizi ile belirlenmesi*. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.

- Çürük, M.A. (2017). Hemoglobin ve Hemoglobinopatiler, Temel ve Klinik Biyokimya, Editör; Hatice Paşaoğlu, 52:709-733.
- Çürük, M.A., Yalın E, Aksoy K., (2013). Prevention of hemoglobinopathies in Turkey, 3:e1.
- Çürük, MA, Dimovski AJ, Baysal E, Gu LH, Kutlar F, Molchanova TP, Webber BB, Altay Ç, Gürgey A, Huisman TH. (1993). Adana or alpha 2 (59) (E8) Gly→Asp beta 2, a severely unstable alpha 1-globin variant, observed in combination with the -(alpha) 20.5 kb alpha-thal-1 deletion in two Turkish patients. Am J Hematol 1993; 44:270-275.
- De Rycke, M, Van de Velde H, Sermon K, Lissens W, De Vos A, Vandervorst M, Vanderfaellie, Van Steirteghem A, Liebaers I. (2001). Preimplantation genetic diagnosis for sickle-cell anemia and for b-thalassemia. Prenat Diagn, 2001;21:214-222.
- Efremov, G D. (1992). Overview of hemoglobin variants in the mediterranean basin. In: Rooth S, Huisman THJ. Eds.Current Views on Thalassemia. Singapore:Harwood Academic Publishers, 1992; 43-59.
- Flint, J, Harding RM, Boyce AJ, Cleg JB. (1998). The population genetics of the haemoglobinopathies. Bailliers Clin Haematol 1998; 11:1-51.
- 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, 1989; 73: 1081-1104.
- Huisman, T H J. (1997).The Syllabus of Thalassemia Mutations. Augusta GA USA:The Sickle Cell Anemia Foundation, 1997.
- Huisman, THJ, Jonxis JHP. (1977). The hemoglobinopathies, Techniques of Identification. New York: Marcel Dekker Inc, 1977.
- Huisman, THJ. (1986). The Hemoglobinopathies. Edinburgh: Churchill Livingstone Com, 1986.

- Huisman, THJ. (1993). The Structure and function of normal and abnormal hemoglobins. *Bailiers Clin Haematol* 1993; 6:1-30.
- Kayrın, L., Aksoy K, Tuli A, Çürük M A, Attila G. (2003). Tanıda DNA teknikleri. Adana: 6.Biyokimya Yaz Okulu, 2003.
- Kılınç, M, Koçak F, Yüreğir GT, Aksoy K. (1999). İçel ilinde orak hücre anemisi ve β talasemi taşıyıcı sıklığı. *ÇÜ Tıp Fak Der* 1999; 2:62–65.
- Kılınç, Y, Kumi M, Gurgey A, Altay C. (1986). Adana bölgesinde doğan bebeklerde kordon kanı çalışması ile alfa talasemi, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği ve hemoglobin S sıklığının araştırılması. *Doğa Tıp Ecz Der* 1986; 10:162-167.
- Koseler, A, Bahadır A, Koyuncu H, Atalay A, Atalay EO. (2008). First Observation of HbD-Ouled Rabah [β 19(B1)Asn>Lys] in the Turkish population. *Turk J Hematol* 2008; 25:51-53.
- Kundrapu, S, Janaki N, Meyerson HJ. (2018). Compound Heterozygosity for Hb D-Ibadan (HBB: c.263C>A) and Hb C (HBB: c.19G>A). *Hemoglobin*. 2018 Jul;42(4):269-271.
- Liddington, R. (1992). High resolution crystal structures and comparisons of T state deoxyhemoglobin and two liganded T-state hemoglobins. *J. Mol. Biol.* 228: 551, 1992.
- Linberg, R., Conover C.D., Shum, K.L., Shorr, R.G.L. (1998). *Art. Cells, Blood Subs., and Immob. Biotechnol.* 26 (2): 133–48. doi:10.3109/10731199809119772. PMID 9564432, 1998
- Lukens, J N. (1999) The thalassemia and related disorders: Quantitative disorders of hemoglobin synthesis: General principles. In; Lee GR, Foerster J, Lukens J, Poraskev F, Greer J and Rodgers GM. Eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10th ed., Eygp: Mass Publishing Co., 1999; 1405-1435.

- Lukens, JN, Lee GR. (1993). The Abnormal Hemoglobins. In Lee GR, Bithell CT, Foester J, Athens JW, Wkens JN, Eds. Wintrobe's Clinical Hematology, Pennsylvania: Lea nad Febiger Com, 1993.
- Mandal, A.K, Mitra, A, Das, R. (2020). Sickle Cell Hemoglobin, 2020; 94:297-322.
- Modell, B., Darlison M. (2008). Global epidemiology of hemoglobin disorders and derived service indicators. Bull World Health Organ 2008; 86:480-487.
- Murray, R.K, Granner D.K., Mayes P.A., Radwell V.W., (1988). Harper's Biochemistry. 21th ed. London: Long Medical Book.
- Newton, C R, Graham A, Heptinstall L E, Powell S J, Summers C, Kalsheker N, Smith J C, Markham A F. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Res, 1989; 17: 2503-2516.
- Öner, C. (2000). Genetik Kavramlar, Palme Yayıncılık, Ankara, 2002. (Çev. Der.) (Klug S, Cummings, M.R. Concepts of Genetics, 2000)
- Öner, R, Altay Ç, Aksoy M, Kılınç Y, Stoming TA, Reese A L, Kutlar A, Kutlar F, Huisman T H J. (1990). Beta thalassemia in Turkey. Hemoglobin, 1990; 14: 1-13.
- Plant, K.E., Routledge S.J.E., Proudfoot N.J., (2001). Intergenic transcription in the human β -globin gene cluster. Mol Cell Biol, 2001; 19(21): 6507-6514
- Poncz, M, Solowiejczyk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S. (1982). Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood: analysis of a-like globin genes. Hemoglobin, 1982; 6: 27-36.
- Saiki, R.K, Scharf S, Faloona F, Mullis K B, Horn G T, Erlich H A, Arnheim N. (1985). Enzymatic amplifications of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 1985;230: 1350-1354.

- Sanger, F, Nicklen S, Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74: 5463-5467.
- Shaanan, B., (1982). The iron-oxygen bond in human oxyhemoglobin. *Nature*. 296: 683.
- Shaanan, B. (1983). Structure of human oxyhemoglobin at 2.1 resolution. *J. Mol. Biol.* 171: 31.
- Steinberg, M.H., Forget B.G., Higgs D.R., Weatherall D.J. (2009). *Disorders of Hemoglobin*. 2nd Ed. UK: Cambridge University.
- Tang, Y., Huang Y., Shen W., Liu G., Wang Z., Tang X.B., Feng D.X., Liu D.P, Liang C.C. (2008). Cluster specific regulation pattern of upstream regulatory elements in human alpha- and beta-globin gene clusters. *Exp Cel Res*, 2008; 314(1):115-22.
- Tang, Y., Wang, Z., Huang, Y., Liu, G., Shen, W., Tang, X., Feng, D., Liang, C.C., (2006). Gene order in human α -globin locus is required for their temporal specific expressions. *Genes to Cells*, 2006; 11:123-131.
- Thompson, M., McInnes R.R, Willard H.F. (1991). *Genetics in Medicine*. 5th Ed. Philadelphia: B. Saunders Comp, 1991: 247-270
- Tüzmen, Ş, Tadmouri G O, Özer A, Bag SM, Özçelik H, Başaran S and Başak N. (1996). Prenatal diagnosis of b-thalassemia and sickle cell anemia in Turkey. *Prenat Diagn*, 1996; 16:252-258.
- Verlinsky, Y. Rechitsky S, Verlinsky O, Ivakhnenko V, Lifchez A, Strom C, Kaplan B, Moise J, Valle J, Borkowski A, Nefedova J, Goldsman E, Storm C, Kuilev A. (1999). Prepregnancy testing for single-gene disorders by polar body analysis. *Genetic Testing*, 1999; 3(2): 185-190.
- Weatherall, D J, Clegg J B. (2001). *The Thalassemia Syndromes*. 4th Ed., Oxford: Blackwell Scientific Publication, 2001.
- Weatherall D J. (1991). *The New Genetics and Clinical Practice*. 3rd ed., New York: Oxford University Press, 1991.

- Weatherall, D.J., Clegg J.B, Higgs D.R, Wood W.G. (2001). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th Ed. USA: International Edition.
- Weatherall, D.J., Clegg J.B., Higgs D.R., Wood W.G., (2001). The Hemoglobinopathies. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Vale D, Eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. USA: International Edition, 2001.
- Weatherall, DJ. (1990). The thalassemias. In William WJ, Beutler E, Erslev A, Lichtman MA (eds), Haematology, 4th ed, New York, McGraw-Hill Publishing Company, 1990, 510-539.
- Williams, T.N., Weatherall, D.J., (2012). World distribution, population genetics, and Health burden of the hemoglobinopathies. Cold Spring Harb Perspect Med 2012; 2:1-14
- Yenice, S., Kemahlı S, Bilenoglu O, Gul O, Akar E, Basak AN, Akar N. (2000). Two rare hemoglobin variants in the Turkish population (HbG-Coushatta (B22(B4) GLU-ALA and HbJ Iran (B77(EF1) HIS-ASP) Turk J Hematol 2000; 17:27-28.
- Yıldız, İ., Oral D, Tekeş S, Çürük MA. (2019). ‘First Observation of Hemoglobin Hamilton [β 11(A8) Val→Ile] in Turkey’ XXVII. Balkan Clinical Laboratory Biochemical Society TBS 2019.
- Yüreğir, G T, Donma O, Dikmen N, İspir T and Çınar M. (1987). Population studies of hemoglobin S and other variants in Çukurova. The Southern Part of Turkey. Acta Haematol, 1987; 50:757-765.
- Yüreğir, G T, Kutlar F, Kutlar A, Aksoy M, Huisman T H J. (1989). Incidence and types of β -thalassemia mutations in South Turkey. Ç Ü Tıp Fak Der, 1989; 1; 111-115.

- Yüreğir, GT, Aksungur P, Burgut R. (1989). A survey of high A2 β Talasemi, hemoglobin variants, G6PD deficiency anemia in Karatas, Cukurova, Southern Turkey. Doğa Tu Med Sci 1989; 13:203-210.
- Yüreğir, GT, Bakioğlu İ, Çürük A, Kılıç Y, Aksoy M, Huisman THJ. (1988). Çukurova'da orak hücre anemili hastalarda haplotipler. ÇÜ Sağlık Bil Der 1988; 2:83-94.
- Yüreğir, G.T. ve Ispir, T. (1984). Çukurova'da HbS ve G6PD enzim eksikliği ve aralarındaki ilişki. Doğa Tu Tıp Ecz Der 1984; 8:232-244.
- Yüreğir, G.T. (1990). Hemoglobin Yapısı ve Özellikleri. Klinik Biyokimya 1990; 1:132-143.
- Zacharia, G., Maronge, G.F., Brazda F.W., Boulmay B.C., (2013). Hemoglobin SO-Arab and α -thalassemia diagnosed in an adult: A case-based review of the hemoglobinopathies. Am J Med Sci. 2013 Oct;346(4):325-7.

ÖZGEÇMİŞ

Şule ULUTAŞ, İlk, orta ve lise eğitimini Kozan'da tamamladı. 2010 yılında Kozan Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesinden mezun olduktan sonra Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başladı. Stajyer olarak ilk deneyimini Haziran-Ağustos 2012 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı'nda gerçekleştirdi. 2018 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisansa başladı ve talasemiler konusunda çalışmalara katıldı. Türk Biyokimya Derneği tarafından düzenlenen 27th Balkan Clinical Laboratory Federation Congress BCLF 2019 ve 30th National Biochemistry Congress TBS 2019' da Alfa Talasemiler, 2020 yılında Türk Biyokimya Derneğinin XXXI. Kongresinde ise Beta Talasemiler konusunda iki poster sunumu yaptı. 2020 yılından beri Adana Şehir Hastanesi Genetik Tanı Merkezinde biyolog olarak çalışmaktadır.