

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**ELAZIĞ İLİNİN BETA TALASEMİ
TAŞIYICILIĞI VE MUTASYONLARIN
SAPTANMASI**

DOKTORA TEZİ

Ahmet Murat MAMUR

ELAZIĞ-2007

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Necip İLHAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Necip İLHAN

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Danışman

Prof. Dr. M. Ferit GÜRSU

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Necip İLHAN

Prof. Dr. M. Ferit GÜRSU

Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ

Doç. Dr. Saadet AKARSU

Doç. Dr. Aysun BAY KARABULUT

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamın gerçekleşmesinde büyük emeği geçen başta Hocam Prof. Dr. Ferit GÜRSU olmak üzere, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Necip İLHAN'a ve Anabilim Dalı Öğretim üyeleri Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ'a, Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU'na, Doç. Dr. Nevin İLHAN'a, metodun kurulmasındaki katkılarından dolayı Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi Doç. Dr. M. Akif ÇÜRÜK'e ve Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalının tüm çalışanlarına teşekkür ediyorum.

Verilerin toplanması ve çalışılması esnasında yardımlarını esirgemeyen Elazığ Sağlık Müdürlüğü Halk Sağlığı Laboratuvarı Müdürü Mehmet ELMALI Beye, Laboratuvarını kullanmama izin veren Özel Ufuk Tıp Merkezi sorumlularına da ayrıca teşekkür ediyorum.

Ayrıca beni tüm çalışmalarımnda destekleyen aileme, babama ve özellikle her zaman motivasyonumu artıracak şekilde destekleyen, fakat bugünleri göremeyen rahmetli anneme teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Ahmet Murat MAMUR

İÇİNDEKİLER

A. TEŞEKKÜR.....	iii
B. ŞEKİL LİSTESİ	vi
C. TABLO LİSTESİ	vii
D. ÖZET.....	viii
E. ABSTRACT	ix
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. ELAZIĞ'IN TARİHİ VE COĞRAFİ ÖZELLİKLERİ	4
3. GENEL BİLGİ.....	5
3.1.Hastalığın patolojisi	5
3.2.Hemoglobinin yapısal özellikleri ve Hemoglobin türleri.....	6
3.3.Hemoglobinin Sentezi.....	9
3.4.β- Talasemiler	10
3.5.β- Talasemi Tedavisi.....	12
3.5.1.Tedavide Yeni Bir Yaklaşım: Gen Terapisi.....	13
3.6. β- Talaseminin Mutasyon Tipleri.....	15
3.6.1. Gen Delesyonları.....	16
3.6.2.Transkripsiyonel Mutasyonlar	16
3.6.3. RNA Processing Mutasyonları.....	17
3.6.4. RNA Translasyon Mutasyonları	17
3.6.4.1. Anlamsız Mutasyonlar	17
3.6.4.2. Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonları	17
3.6.5. Dominant Geçen β- Talasemi ve Stabil Olmayan β- Globin Varyantları ..	18

3.6.6. Başlık Bölgesi (Cap Site) Mutasyonları.....	18
3.6.7. Başlangıç Kodonu Mutasyonları.....	19
3.6.8. 3' UTR Mutasyonları	19
3.6.9. Poliadenilasyon Sinyal Mutasyonları.....	19
4.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	24
4.1.Gereçler	25
4.2.Örnek Toplama.....	25
4.3.Yöntemler.....	28
4.3.1.Kan Sayımı.....	28
4.3.2.HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)	28
4.3.3. DNA İzolasyonu.....	30
4.3.3.1.Çözeltiler	30
4.3.3.2.Yöntem.....	31
4.3.4. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	32
4.3.4.1.Çözeltiler	33
4.3.4.2.Yöntem.....	33
4.3.5. β -Globin Strip Assay.....	34
5-BULGULAR.....	37
6-TARTIŞMA	46
7- SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	52
8. KAYNAKLAR	53
9. ÖZGEÇMİŞ	61

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Dünya üzerindeki talasemi dağılımı(sarı ile işaretli alanlar)	1
Şekil 2.Türkiye’de β -talasemi dağılımı.....	3
Şekil 3. Türkiye’de talasemi taşıyıcılığı sıklığı dağılımı	7
Şekil 4.Hem molekülü.....	7
Şekil 5. İnsan globin genleri arasındaki zamana dair ilişki.....	10
Şekil 6. TNS9 ile muameleden sonra talasemik kemik iliği hücrelerinde görülen düzelmenin yayma kan preparatlarında gösterimi	15
Şekil 7. Mutasyonların yüzde dağılım grafiği.....	42
Şekil 8. Olguların yaşa göre dağılımı.....	43
Şekil 9.Olguların Hb değerlerine göre dağılımı.....	43
Şekil 10. Olguların MCV değerlerine göre dağılımı.....	44
Şekil 11. Olguların HbA2 değerlerine göre dağılımı	44
Şekil 12.Olguların HbF değerlerine göre dağılımı	45

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.Hemoglobin tipleri.....	8
Tablo 2. Talasemi tedavi tipleri	13
Tablo 3. Farklı etnik kökenlere özgü β -talasemik mutasyon tipleri	20
Tablo 4.Bazı talasemi mutasyonları ve tespit için kullanılan enzimler	34
Tablo 5.Tüm vakaların kan sayım verileri	37
Tablo 6.Tespit edilen vakaların hematolojik verileri	38
Tablo 7. Çalışmada tespit olunan vakaların mutasyon tipleri ve görülme sıklığı	40
Tablo 8.Türkiye’de saptanan olguların mutasyon tipleri	41
Tablo 9. Kadın ve erkek olguların verilerinin istatistiksel dağılımı.....	42

ÖZET

ELAZIĞ YÖRESİNİN β -TALASEMİ MUTASYON SAPTANMASI

Talasemi; yaşamın erken evrelerinde şiddetli anemiye yol açan, bir veya daha fazla globin zincirinin azalması ile karakterize bir grup kalıtsal hastalıktır.

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

Bu çalışmada; Elazığ'da rastgele seçilen 1500 vatandaştan alınan kan örneklerinin hemogramına bakıldı. 76 vakada MCV ve Hb değerleri düşük bulundu. Bu vakalarda HPLC ile HbA2, HbF düzeylerine bakıldı. HbA2 düzeyleri % 3,5 üzerindeki 9 vaka tanı olarak mutasyonların tespitine tabi tutuldu. Mutasyonların moleküler tanısında β -globin assay yöntemi uygulandı.

Talasemi mutasyonlarını tiplendirilmesinde PCR ve β -globin strip yöntemi kullanılmıştır. % 55,5 ile Elazığ bölgesinde görülen en sık mutasyonun IVSI-110 olduğu tespit edilmiştir. Bunu azalan oranlarda IVS2-1(%11.1) , CD 39 (%11.1), FSC-5 (%11.1), -30T (%11.1) 'in izlediği saptanmıştır. Elazığ bölgesinde β -Talasemi mutasyon tipi saptanmış ve sıklığı % 0,6 tespit edilmiştir. Bu oran bölgenin talasemi açısından çok riskli olmadığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: β -talasemi, β -globin strip assay, Prenatal Tanı

ABSTRACT

TYPIFICATION OF β –THALASSEMIA MUTATION OF ELAZIĞ REGION

Thalassemia is a group of hereditary disease characterized with lessening one or more chain of globins and causes to anemia in the early phase of life.

β –Thalassemiyas are congenital anemia that decreased or causing spoilt structure of expression of genes. With approximate carrier of 250 thousand in the world, β -Thalassemiyas are the main cause of morbitites and mortalities.

In this study, hemogram of blood samples, which were taken from 1500 people chosen randomly, were examined. The dose of MCV and Hb was found low out of the 76 of the cases. The levels of HPLC, HbA2 and HbF were examined in the cases. The 9 cases whose HbA2 levels were above %3,5 were subjected to determining of mutations.

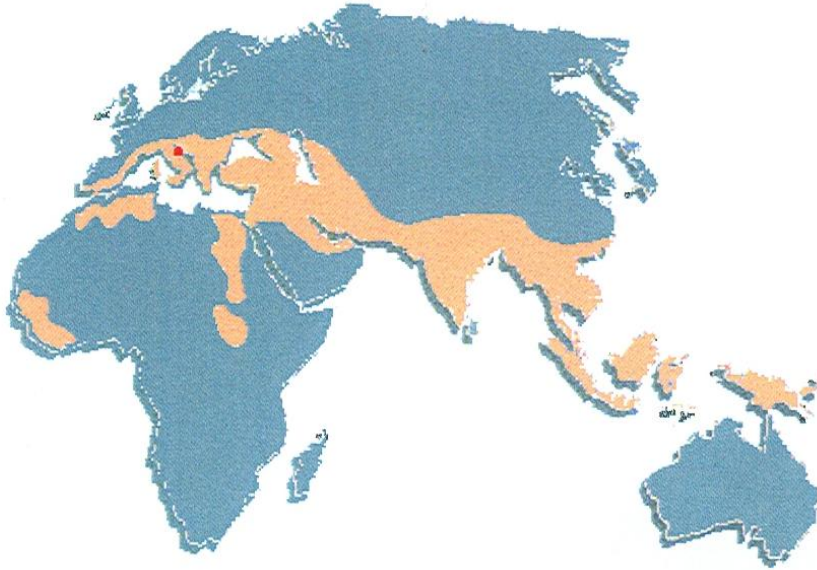
The methods of β -globins strip assay and PCR were applied in the typification of thalassemia mutations. It was determined that the most frequend seen mutation is IVSI–110 with a percentage of %55,5 in the region of Elazığ. It was fixed that IVS2–1 (%11.1), CD39 (%11.1), FSC–5 (%11,1) and -30T (%11,1) followed it in a decreasing proportions. The type of β -Thalassemia mutation was found in Elazığ region with a density of %0,6.

This proportions showed that the region was not at risk concerning thalassemia.

Key words: β -Thalassemia, β -globin assay, prenatal diagnose

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Genetik olarak hemoglobin sentezindeki bir bozukluk nedeni ile hipokrom, mikrositer, hemolitik anemiye sebep olan otozomal resesif hastalık olarak tarif edilen Talasemi, ilk kez; 1925 yılında Detroitli pediatrist Dr. Thomas Cooley ve pearl Lee tarafından şiddetli anemisi olan, dalak büyüklüğü ve karakteristik kemik değişiklikleri olan bir çocuk hastada tanımlanmıştır. Önceleri sadece Akdeniz ülkelerinde yaygın olduğu sanıldığından adı Yunanca "Thalas" Akdeniz sözcüğünden gelmektedir. Ancak günümüzde; Kuzey Afrika, Ortadoğu, Hindistan, Çin, Güneydoğu Asya gibi malaryanın sık olduğu ülkelerde Avrupa ve Amerika da bulunduğu bilinmektedir (15,30).



Şekil 1. Dünya üzerindeki talasemi dağılımı(sarı ile işaretli alanlar) (40)

Talaseminin dünyadaki en yaygın genetik hastalık olduğu kabul edilir. Dünya Sağlık Örgütünün verilerine göre, dünyada talasemi ve anormal

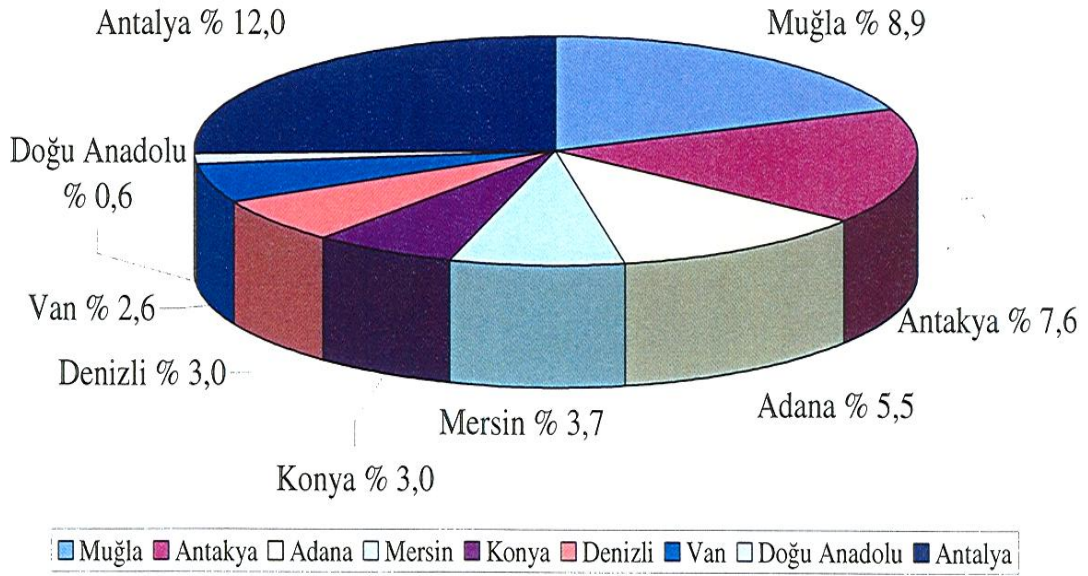
hemoglobin sıklığı % 5,1'dir ve yaklaşık 266 milyon taşıyıcı vardır. Bir yıl içinde yeni doğan 144.000.000 bebeğin, 9.285.000'i taşıyıcı olarak dünyaya gelmektedir. Bu da ortalama yıllık % 6,5, başka bir ifade ile 300.000 yeni hasta çocuk istatistiklere eklenmektedir (5,73).

Beta talasemi özellikle Yunanistan'da ayrıca İtalya'da çok sık görülen bir hastalıktır. Po nehrinin deltasında yaşayan insanlarda hastalığın görülme sıklığı %20 civarındadır. Bu oran Sardinya'da %11 Sicilya'da ise %10'dur. Bölgede batıya doğru ilerlendiği zaman hastalık insidansı düşmeye başlar. Kıbrıs'ta %15, İspanyada %3,5, Yugoslavya'da %4,7 'dir. Bazı ülkelerin kendi içlerinde dahi değişen coğrafi özelliklerle hastalığın insidansı değişmektedir. Bulgaristan'ın güneyinde %30 gibi olan bir oran kuzeye gidildikçe % 0,5–2,1 arasında değişen değerlere inmektedir. Dünyanın daha doğusunda Orta Asya Cumhuriyetleri diye nitelendirilen bölgede ise Azerbaycan'da %6,3–7,8, Dağıstan'da %3,2–16,8, Özbekistan'da %0,2–15 arasında değişmektedir (5,20).

Ülkemizde Beta talasemi konusunda ilk taramalar Çavdar ve Arcasoy tarafından yapılmış, sonuç olarak Türkiye ortalaması %2,1 olarak bulunmuştur (6). Daha öncede ifade ettiğimiz gibi bölgesel farklılıklar göz önüne alındığı zaman, %0,6 ile %12 arasında bir aralık ortaya çıkmaktadır. Bu verilere dayanarak Türkiye'de 1.300.000 taşıyıcı insan olduğu sonucuna varabiliriz. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 4000 civarında beta talasemi hastası ülkemizde bulunmaktadır. Ülkemizde bu konudaki ilk çalışmaları başlatan Prof. Dr. Muzaffer AKSOY'dur (3). Türkiye'deki anormal hemoglobinler ve hemoglobinopatiler konusunda çalışmaları bu konuda çok insana rehber olmuştur.

Yapılan mutasyon tiplerinin tespiti sayesinde, bölgelere ve ırklara has genetik özellikler tespit edilmiş, prenatal tanı yöntemleri arasında rutine girerek hasta çocukların erken trimesterlerde gebeliğin sonlandırılması, hasta veya taşıyıcı bireylerin evlenmesini engelleyici tavsiye kararları verilmiştir (46).

Bu kararlar sayesinde hastalığın tedavisi için harcanan para ve insan emeğinden tasarruf sağlanmıştır. Ülkemizde de bu noktadan hareketle 30.12.1993 Tarih ve 21804 sayılı Resmi Gazete'de 3960 sayılı Kalıtsal Kan Hastalıkları İle Mücadele Kanunu çıkarılmış ve beş ana üiteden oluşan merkezler kurulması istenmiştir.



Şekil 2. Türkiye’de β -talasemi dağılımı (6)

Yaptığımız bu çalışma ile Elazığ ilinin mutasyon tipi ve hastalık insidansı tespit edilmesi amaçlanmıştır. Tespit edilen bu mutasyonun genetik tedavilerde zemin oluşturması en önemli hedefimiz olmuştur.

2. ELAZIĞ'IN COĞRAFI ÖZELLİKLERİ

Elazığ büyük bölümü ile Fırat havzasında bulunan bir Doğu Anadolu Bölgesi ilidir. Elazığ ili 40–21 derece ve 30–30 derece doğu boylamları ile 38–17 derece ve 39–11 derece kuzey enlemleri arasında yer alır.

İl merkezinin denizden yüksekliği 1020 metredir. Türkiye topraklarının binde 12'ni kaplamaktadır. Toplam su yüzeyleri dâhil 9153 kilometrekaredir. Tektonik bir alanda yer alan il toprakları doğu ve güneyden Doğu Torosların batı uzantıları, kuzeyden ve batıdan ise Murat ve Fırat vadileriyle çevrilidir. Batısında Malatya, doğusunda Bingöl, kuzeyde Tunceli son olarak ta güneyinde Diyarbakır ile çevrilidir. Elazığ'ın iklimi genel anlamda karasal iklim olarak bilinmektedir. Oysa Keban ve Karakaya barajlarının yapımını takiben iklim oldukça değişmiş, Akdeniz iklimine benzemiştir.

Toplam nüfusun %51,7'si şehirde, %48,3'ü kırsalda yaşamaktadır. Toplam nüfus il merkezi, 10 ilçe merkezi, 14 bucak ve 558 köyde yaşamaktadır. Nüfus büyüklüğü açısından 41. sırada yer alan ilde nüfus yoğunluğu 54 kişi/ km² dir. İlin yıllık nüfus artış oranı %0.59'dur.

İktisaden %63,8'i tarım, %16'sı toplum hizmetleri, %5,4'ü imalat sanayi, %4,8'inşaat, %10'u diğer sektörlerde çalışmaktadır. Faal nüfusunun %59,7'si erkek %40,3'ü kadından oluşmaktadır.

Hastalığın bölgesel tanımlama ile anlatılması coğrafi özelliklerden bahsetmemizi gerektirmiştir (72).

3. GENEL BİLGİ

Beta talasemi, yaklaşık 200 gen mutasyonunun neden olduğu, kalıtımla geçen prenatal tanısı ve taraması olan bir kan hastalığıdır. Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz iklim kuşağı üzerinde bulunan ülkelerde ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Dünyada bu hastalığın taşıyıcılık oranı %5,1'dir. Bu oran ülkelerin durumuna ve ülke içerisindeki bölgelerin özelliğine göre farklılıklar göstermektedir. Ülkemizde bu oran Antalya ilimizde % 10,2 iken Samsunda %0,6 olarak değişmektedir. Türkiye'de 1.300.000 taşıyıcı ve 4000 hasta mevcuttur. Bunların içinde akraba evliliği %25'tir (% 70'i 1° akraba). Aynı şekilde İtalya'nın kuzeyi ile orta kesimlerinde bu oran %0,5–2 arasında değişmektedir (79,81).

3.1.Hastalığın patolojisi

Normal bir erişkinde yapısal olarak birbirinden farklı üç hemoglobin vardır: bunlar Hb A, Hb F ve HbA2 dir. Talasemi bu üç farklı hemoglobin yapısındaki dört farklı zincirden bir veya birden fazlasının yapım azlığı veya hiç yapılmama durumudur. Normal yetişkinde majör hemoglobin Hb A'dır, dolayısı ile ancak alfa ve beta zincirlerinin sentezindeki patolojiler önemli bir hastalığa yol açabilirler. HbA2 nin yapısında bulunan delta zincirindeki ve Hb F yapısında bulunan gama zincirindeki patolojiler erişkinde doğrudan belirgin bir hastalığa yol açmazlar. Ancak bazı durumlarda, özellikle beta zincir genini ilgilendiren bir patoloji varsa, gerek delta gerekse gama zincirindeki mutasyonlar beta talaseminin klinik ve hematolojik seyrini etkileyebilir (15,28,31).

3.2.Hemoglobinin yapısal özellikleri ve Hemoglobin türleri

Hemoglobin hem ve globin'den oluşan eritrositlerde oksijen taşıyan 64400 dalton ağırlığında tetramer yapıda bir proteindir. Eritrositler Akciğerden geçerken Hemoglobin molekülü oksijeni bağlar, dokulara ulaştığı zaman kapillerin geçirgenlik özelliğinden faydalanarak yükünü dokulara bırakır. Hemoglobin iki çift özdeş olmayan polipeptid zincir ve dört molekül hem'den oluşmaktadır. Hemoglobin globüler yapıda kompleks bir moleküldür. İçindeki hem molekülü tüm insanlarda aynı özelliktedir ve hidrofobik olarak oluşmuş bir cephenin içindedir. Oksijenle reversibl kombinasyonlar yapabilmesi sebebi ile kanda oksijeni kolaylıkla taşıyabilmektedir. Hemoglobinin sahip olduğu prostetik grup proteinin kırmızı renginden sorumludur (24,26,34,44,47,78).

Bu hemoglobin yapıları aşağıdaki gibi bir zincir yapısına sahiptir. Hb A ($2\alpha-2\beta$), HbA2 ($2\alpha-2\delta$), HbF ($2\alpha-2\gamma$). HbA bütün hemoglobinlerin %97'sini oluşturmaktadır. Ayrıca HbA3 adı verilen ve muhtemelen HbA'nın yıkım ürünü olan bir grubun varlığı bilinmektedir. HbF ise yeni doğanın kanında %80 civarında rastlanmaktadır. Bu oran bebek 1 yaşına girmesi ile %1 olmaktadır (21,30,77).

Tablo1.Hemoglobin tipleri (26)

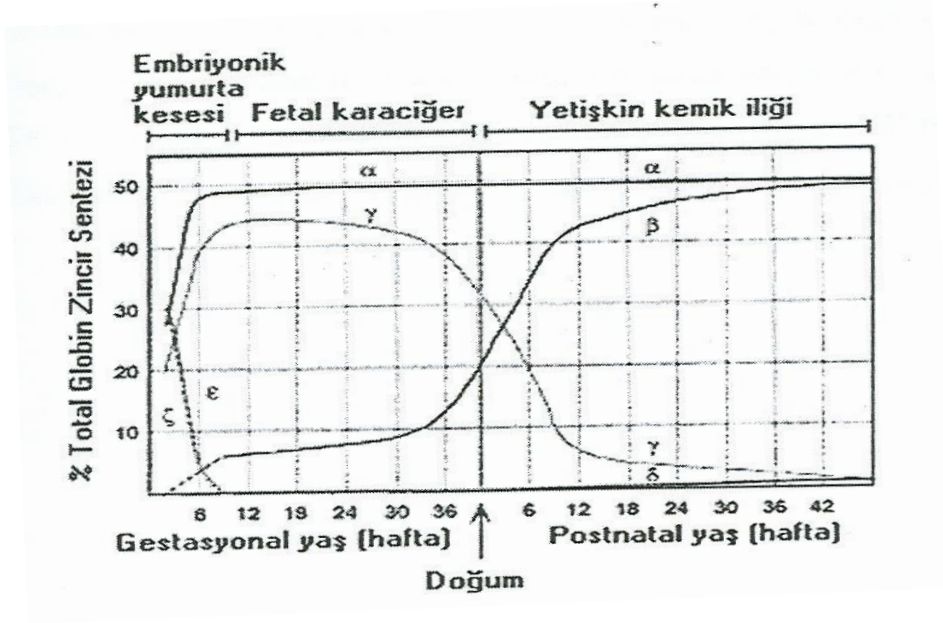
İsim	Dönem	Form ül	Erişkin değeri	Fetüste Zamanı	Yapım
Hb Gower I	Emrionik Hb	$\zeta_2 \epsilon_2$	-	İlk 3 ayda	
Hb Gower II	Embriyonik Hb	$\alpha_2 \epsilon_2$	-	İlk 3 ayda	
Hb PortlandI	Embriyonik Hb	$\zeta_2 \gamma_2$	-	İlk 3 aydan sonra ve kordon Kanında	
HbPortlandII	Embriyonik Hb	$\zeta_2 \beta_2$	Hb H ve Talasemi Taşıyıcılarında miktarda az	İlk 3 aydan sonra	
Hb F	Fetal Hb	$\alpha_2 \gamma_2$	% 1'den az	İntrauterin 10-12. hafta	
Hb A	Erişkin Hb	$\alpha_2 \beta_2$	% 96	3. trimesterde	
Hb A2	Erişkin Hb	$\alpha_2 \delta_2$	% 2,5-3,5	6.ve 8.haftada yapımı başlar	

Anlatılanlardan başka sıra dışı protein yapısına sahip farklı hemoglobinler de mevcuttur. Bunlar HbS, HbC, HbE olarak isimlendirilir ve farklı patolojide anemi tipleri oluştururlar (orak hücreli anemi gibi). HbA2 ise kemik iliğinde bulunan öncü bir hemoglobin türüdür (7,18,21,27,63).

3.3.Hemoglobinin Sentezi

Hemoglobin farklı iki gelişimsel basamakta sentezlenmesini tamamlamaktadır. Gestasyonunun ilk evrelerinde meydana gelen alfa ve beta gen kümelerinin ekspresyonel değişim gerektiren embriyonikten fetal globin dönüşümü, ikinci evre doğum esnasında sadece beta gen kümesinde meydana gelen fetalden yetişkin tipi globine dönüşüm şeklindedir (67).

Memelilerin çok erken gelişim basamakları sırasında eritroid farklılaşması çok fazla anlaşılammıştır. Primitif eritroblastlarda embriyonik alfa ve beta benzeri globin genlerinin aktivasyonunu gerektiren embriyonik yumurta kesesinin kan adacıklarında başladığına inanılmaktadır. İnsanlarda bu hemoglobin dönüşümü gestasyonun beş ya da altıncı haftaları sırasında meydana gelir. Böylece, embriyonik globin genleri insan gelişiminin çok erken safhasında aktive edilir ve tekrar kapanmadan önce sadece birkaç haftalığına eksprese edilir. Fetal eritropoez perinatal peryoda kadar hâkimdir, eritropoez tekrar değişime başladığında kemik iliği ve globin gen ekspresyonunun yetişkin modelinin çatısı kurulur (26,47,75).



Şekil 5. İnsan globin genleri arasındaki zamana dair ilişki (11)

3.4.Beta Talasemiler

Talaseminin oluşmasında Hb A'nın yapımının azalması söz konusudur. Bu eksikliği gidermek için kemik iliğinde HbA2 yapımı artar. Ama bu işlem eksikliğin giderilmesine yetmediği gibi durumu daha da ağırlaştırmaktadır. Bu üretimin tam veya kısmen olmayışının sebebi, bu hemoglobine ait protein zinciri yapımını denetleyen gende nedeni bilinmeyen bir mutasyon olmasıdır. β-Talasemi tamamen kalıtsal kökeni olan bir hastalıktır (40).

Hem annenin hem de babanın hastalığın taşıyıcısı olması halinde çocuk %25 hasta, %50 taşıyıcı, %25 sağlam olma olasılığı ile doğar. Bu durumda oluşmuş hastalık homozigot olarak adlandırılır ve çok ağır biçimde ortaya çıkabilir. Bu tablo Cooley kansızlığı veya β-talasemi majör olarak adlandırılır.

Anne ve babadan birinin taşıyıcı olması durumunda %50 sağlam, %50 taşıyıcı olma ihtimali vardır. Taşıyıcı durumunda oluşan klinik tablo β-talasemi

minör veya β -talasemi taşıyıcısı olarak adlandırılır. Bir üçüncü tabloda ara bir kliniğe sahip belirti vermeyen bir gruptur ki bunlarda talasemi minime diye adlandırılır (30,40).

Doğumu takip eden aylarda başlayan sarılık, solukluk ve hepatosplenomegali olan hastalarda β -talasemi majör düşünülmelidir. Çocukta ileri tetkiklere geçilmeden önce anne ve babada tam kan sayımı yapılarak β -talasemi taşıyıcılığı tanısına yaklaşmak veya tanıdan uzaklaşmak yeterlidir. Yapılan tam kan sayımında karşılaşılabilecek laboratuvar sonuçlarını şöyle sıralayabiliriz. Hücrelerin çoğu genç hücre olduğu için artan normoblastlar lökosit artmadığı halde cihaz tarafından lökosit artışı varmış gibi algılanır. Hb ve Htc miktarı düşüktür. Eritrosit büyüklük dağılımını ifade eden RDW genellikle normal veya normal değerlerin üst sınırında bulunmaktadır. Ortalama eritrosit hacmini ifade eden MCV talasemilerde azalmıştır. Daha sonra bakılması gereken Hb F ve HbA2 parametreleridir. Altta yatan mutasyon ve genetik defekte göre değişiklikler gösterebilir. Hemogloblin elektroforezinde HbF hafif artmıştır (%30-%99). Beraberinde HbA2 yüksek bulunmuyorsa heterozigot yani minör talasemi düşünülür. HbA2 değeri çok yüksek bulunuyorsa majör talasemi tanısını desteklemektedir. Ayrıca daha büyük bir gen delesyonunu düşünmek gerekir (18,26,32).

Beta zincir patolojilerinde alfa zincir rölâtif olarak yüksektir, fakat tetramer yapı oluşturamazlar dolayısı ile hemogloblin oluşturma şansları yoktur. Alfa 2 inklüzyonlarının bir kısmı hücre membranına yapışarak proteinleri denatüre ederek erken hücre ölümüne sebep olmaktadır. Alfa zincir patolojilerinde beta zincirleri rölâtif olarak daha fazladır. Fakat beta zincirler

tetramer yapı oluşturabilir, hem yapısı ile bağlanır ve durağan olmayan bir yapıya Hb H'ye dönüşür. Bu yapıda erken ölüm görülmez (15).

3.5. Beta Talasemi Majör Tedavisi

Bu kadar karışık bir hastalığın tedavisi de oldukça sıkıntılı ve masraflı olmaktadır. Tedavi dört ana başlıkta incelenmektedir (6,16,30).

1-Destek tedavisi

2-HbF hücrelerini artırmak

3-Kemik iliği transplantasyonu

4-Eradikasyon amaçlı tedavi (Prenatal tanı)

Destek tedavisinde en önemli hadise kan değerlerinin stabilizasyonudur. Küçük yaşlarda kompensatuvar mekanizmalar ve harcama azlığı sonucu düşük Hb miktarları ile yaşamlarını sorunsuz yürütebilirler. Sonrasında hastaların durumlarını kontrol altında tutmak için Hb miktarını 10 gr/dl civarında dengelemek yeterlidir. Transfüzyonu ihtiyaç durumunda yapmak gerekmektedir. Çünkü bu hastalarda demir fazlalığı mevcuttur. Fazla demirin dokularda birikimi sonucu dokularda ciddi hastalıklar oluşmaktadır. Günümüzde demiri bağlayıp idrarla atılımını sağlayan maddelerin kullanımı ile bu risk azalmıştır. Zaman içinde dalak operasyonla çıkarılarak hücre yıkımının önüne geçilebilir. Hb F miktarının artırılması intermedia tipinde etkili olabilir. Kemik iliği transplantasyonu klasik ilikten, periferik kandan kök hücre nakli veya kordon kanından kök hücre nakli gerçekleştirilebilir.

Tablo 2.β- Talasemi majör tedavi tipleri (54)

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

Eradikasyon ise prenatal tanı ile hamileliğin 10–11. haftalarında koryon villustan; 19–20. haftalarında kordon kanından alınan numunede yapılan mutasyon çalışması ile hasta doğumların önlenmesi ile yapılabilmektedir (46).

3.5.1.Tedavide Yeni Bir Yaklaşım: Gen Terapisi

Hemoglobinopatiler, tek bir genin transferi ile teorik olarak tedavi edici bir etki sağlanabileceğinden gen terapisi için düşünülen ilk hastalıklardan birisidir. Anemilerin patofizyolojisi ve globin gen ekspresyonu üzerindeki

bilgiler bu hastalıkların gen terapisi ile iyileştirilmesi konusunda onları kusursuz bir aday yapmaktadır (39,54,55,56,57).

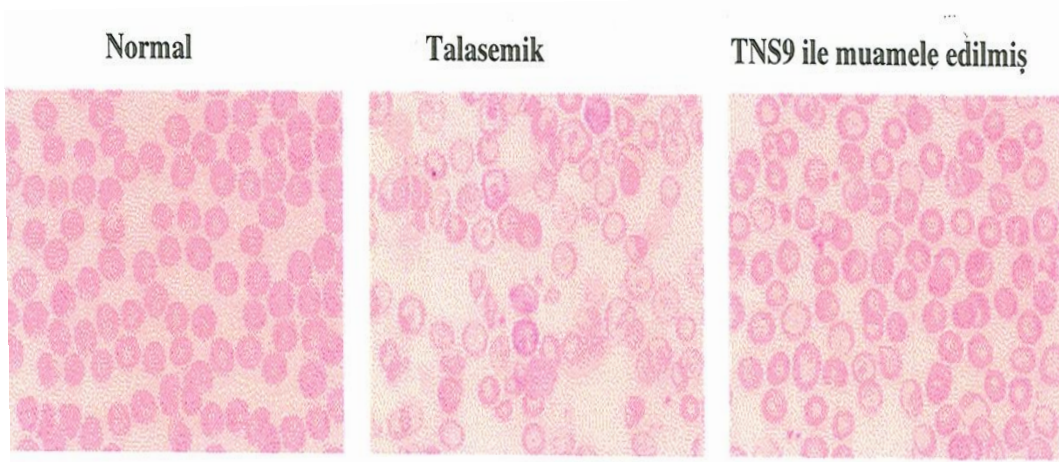
Beta talasemi tek bir genin fonksiyonundaki azalma ya da yok olması ile ilgili olduğu gerçeği gen terapisi için en erken aday olarak düşünülmesine yol açmaktadır. Bu düşünce ilk olarak yaklaşık 15 yıl önce transgenik bir fare modelinde farelere beta globin geninin transferi ve talaseminin iyileştirilmesini kapsayan başarılı deneylerle desteklenmiştir(14,65).

Beta talasemi gen tedavisi için üç genel strateji düşünülmüştür. Birincisi gen transferidir, insan hematopoetik hücrelerine eksojen bir genin eklenmesi. Bu doğrultuda en yaygın kullanılan metod viral aracılıklı gen transferidir. Çok sayıda vektör tipleri kullanılmakla birlikte, en yaygın olanları retrovirusler ve adenovirüslerdir. Retroviral vektör ailesinden olan ve yeni keşfedilen lentivirüsler de tedavide kullanılmaktadır, ancak henüz insanlarda denenmemiştir. Ancak lentiviral vektör dizaynındaki pek çok avantaj yakın gelecekte klinik kullanımlarının artmasını sağlayacaktır (17,38,65).

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

Son strateji, alfa globin geninin verimini aşağıya doğru regüle etme modellerini geliştirmektedir. Bu şekilde zincir dengesizliği azaltılacaktır. Bu metod Talasemi İntermedia’nın tedavisi için en yararlısı olabilir (54).

Gen terapisi konusunda yapılan bir çalışmada; May ve arkadaşları TNS9 adını verdikleri lentiviral bir vektör aracılığıyla talasemi tedavisinde ilerleme kaydetmişlerdir. TNS9 ile tedavi edilen farelerde anemide azalma ve hematopoezin normaleştiği görülmüştür (42,43).



Şekil 6. TNS9 ile muameleden sonra talasemik kemik iliği hücrelerinde görülen düzelmenin yayma kan preparatlarında gösterimi (43)

3.6. Beta Talaseminin Mutasyon Tipleri

Oldukça küçük ve yapısal olarak basit bir gen olan β -globin geni, 11. kromozomun kısa kolu üzerinde, β -globin gen kümesi içinde yer almaktadır.

Beta globin geninde beta talasemiye neden olan yaklaşık 200'e yakın mutasyon bildirilmiştir. Bu geniş moleküler çeşitliliği biraz basite indirgeyen bir faktör, 200 mutasyonun tamamının bir toplumda görülmemesidir. Mutasyonlar etnik gruplara özgüdür. Genelde bir toplumda az sayıda bulunan mutasyonlar, o toplumdaki mutasyonların %90–95 'ini oluşturmaktadır. Bunların çoğu öncelikle beta talasemideki nokta mutasyonları ve daha az sıklıkla delesyonlar şeklindedir.

Nokta mutasyonları RNA transkripsiyonunun başlamasını, RNA işlemeşmesini ve RNA stabilitesini önleyerek globin sentezini etkilemektedir. Buna karşın çerçeve kayması veya zincir mutasyonları translosyonu bloke ederek globin zincir sentezini engeller (59).

3.6.1. Gen Delesyonları

Alfa talasemilerin aksine beta talasemide gen delesyonları çok sık gözlenmez. Bugüne kadar yaklaşık 17 tane gen delesyonu tanımlanmıştır. Beta geninin 3' ucundaki 619-bp delesyonu Pakistan ve Hindistan'daki, Sind ve Gujarati populasyonunda görülen beta talasemilerin %50'sinden sorumludur (30,75,78,79).

3.6.2. Transkripsiyonel Mutasyonlar

Beta genin promotor bölgesinde birçok baz değişimi tanımlanmıştır. CAP bölgesinde CCAAT ve ATA kutusunda görülen mutasyonlar RNA polimerazın, beta genine bağlanma ve transkripsiyonu başlatma yeteneğini azaltır. Beta mRNA transkripsiyonu bu durumdan etkilenir ve beta mRNA miktarı azalır. Bütün olguların fenotipi β^+ talasemidir (23,78).

3.6.3. RNA Processing Mutasyonları

Haberçi RNA 'nın nukleusa girmesini engelleyen tek baz mutasyonudur. Ekson ve intronun bağlanma noktasında 5' GT (donor) 3' AG (reseptör) bölgesinde gözlenir. Beta talaseminin farklı tipleri IVS-I konsensus sekansındaki tek baz değişimine bağlıdır (23,35,79). Üç türlü oluşabilir.

1-Splice Kavşağındaki Mutasyonlar

2-Konsensus Dizi Değişikliklerine Neden Olanlar

3-Intronlardaki Değişiklikler

4-Kodlanan Bölgedeki Mutasyonlar

3.6.4. RNA Translasyon Mutasyonları

3.6.4.1. Anlamsız Mutasyonlar

Tek bir nükleotidin yer değiştirmesi sonucu normalde bir aminoasidi kodlayan kodon, translosyonun durdurulması sinyalini veren durdurucu kodon (UAA, UAG veya UGA) haline gelir. Mutasyonun olduğu kodondan itibaren globin zincir üretimi normalden önce durur (58).

3.6.4.2. Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonları

Bir veya birden fazla nükleotidin delesyonu veya insersiyonu sonucu öne veya arkaya doğru (5' - 3' veya 3' - 5' yönünde) (36) oluşan nükleotid kayması ile

mutasyon bölgesinden sonraki kodonların şifreleri değişerek farklı aminoasitlerin şifreleri ortaya çıkar (45).

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

Son 20 yılda ağır beta talasemiden ayrılamayan sporadik vakalar tanımlanmıştır. Bu tip vakalarda eritrosit prekürsörlerinin inklüzyon cisimcikleri çokça gözlenmektedir. Fakat çoğu beta globin geninde ekson 3'te mutasyon içermektedir. Frameshift veya prematür zincir sonlanması gözlenir. Bu düzensizlik uzmış unstabil beta globin gen ürünlerini oluşturur. En sık görülen mutasyon ise kodon 121'de GAA→TAA değişikliğidir.

Bazı beta Globin zincir varyantları oldukça unstabildir ve tetramer yapma eğilimi gösterirler. Oluşan unstabil hemoglobinler eritrosit prekürsörlerinde ve kanda birikirler. Dominant geçen beta talasemiden hemolitik anemiye kadar değişik klinik gösterirler. Buna örnek olarak hemoglobin Indianapolis verebilir (23,59,80).

3.6.6. Başlık Bölgesi (Cap Site) Mutasyonları

Beta(+) Talasemi fenotipi ile sonuçlanan +1 A→C yer değişimi sonucu transkripsiyon azalır, başlıklanma yavaşlar ve mRNA kararlılığı bozulur. Homozigot olarak bulunması halinde bile kişide heterozigot gibi bulgu veren bir fenotiptir (58).

3.6.7. Başlangıç Kodonu Mutasyonları

Başlangıç kodonu olan ATG'deki nükleotid değişiklikleri sonucu transkripsiyon başlatılmaz ve bunun sonucunda β^0 talasemi fenotipi oluşur (29).

3.6.8. 3' UTR Mutasyonları

3' UTR bölgesinde + 1565'den + 1577 nükleotidine kadar olan kısmın delesyonu sonucu beta (+) talasemi fenotipi ortaya çıkar (29).

3.6.9. Poliadenilasyon Sinyal Mutasyonları

Beta globin m RNA'nın 3'un translated bölgesinde AAUAAA dizisi beta gen transkripsiyonunun klevaj ve poliadenilasyon için uygundur. Örneğin beta globin geninin bu bölgesinde T \rightarrow C değişimi orta şiddette beta (+) talasemi ile sonuçlanmaktadır.

Aşağıda bugüne kadar bilimsel çalışmalarda tespit edilmiş çeşitli etnik kökene sahip insanlara özgü β -talasemik mutasyon tipleri tablolar halinde geniş bir şekilde sunulmaktadır (79).

Tablo 3. Farklı etnik kökenlere özgü β -talasemik mutasyon tipleri

Mutasyon	Tip	Etnik Grup
β-a.RNA İşlenmesi ile ilgili Mutasyonlar: Splice Kavşağındaki Mutasyonlar		
IVS-I (-3), C->T (Codon 29;Gly>Gly)	β^+	Lübnanlılar
IVS-I (-2), A->G (Codon 30; Ar>Gly)	β°	İspanyol Museviler
IVS-I (-1), G->A (Codon 30; Ar>Lys)	β°	Bulgarlar
IVS-I (-1),G->C (Codon 30; Ar>Thm)	β°	Amerikalı zenciler, Tunuslular, Hintliler
IVS-I-I G->A	β°	Akdenizliler, Asya Hintlileri
IVS-I-I, G->T	β°	Asya Hintlileri
IVS-II-I, G->A	β°	Akdenizliler, Amerikalı zenciler, Tunuslular
IVS-II-I, G->C	β°	İranlılar
IVS-I-2, T->A	β°	Cezayirliler
IVS-I-2, T->C	β°	Amerikalı zenciler
IVS-I-2 T->G	β°	Tunuslular
IVS-II-2,3,+11 bp, -2bp	β°	İranlılar
IVS-I -17 nts (3'end)	β°	Kuveytliler
IVS-I -130,G->A	β°	Mısırlılar
IVS-I-130, G->C	β°	Türkler, Japonlar
Codon30, G->C(IVS-I-130+1)	β°	Ortadoğulular
IVS-II-849, A->C	β°	Amerikalı zenciler
IVS-II-849 A->G	β°	Amerikalı zenciler
IVS-II-850,-G	β°	İtalyanlar

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

Codon 2/3/4,-9bp;+31bp	β°	Cezayirliler
Codon5,-CT	β°	Akdenizliler
Codon6,-A	β°	Akdenizliler, Amerikalı zenciler
Codon8,-AA	β°	Akdenizliler
Codon8/9,+G	β°	Asya Hintlileri
Codon9/10,+T	β°	Yunanlılar
Codon11,-T	β°	Meksikalılar
Codon14/15,+G	β°	Çinliler
Codon15,-T	β°	Malezyalılar
Codon16,-C	β°	Asya Hintlileri
Codon22/23/24,AAGTTGG	β°	Türkler
Codon24,-G;+CAC	β°	Mısırlılar
Codon25/26,+T	β°	Tunuslular
Codon26,+T	β°	Japonlar
Codon27/28,C	β°	Çinliler
Codon28,-C	β°	Mısırlılar
Codon28/29,-G	β°	Japonlar, Mısırlılar
Codon31,-C	β°	Çinliler
Codon35,-C	β°	Malezyalılar
Codon36/37,-T	β°	İranlılar, Türkiyeli Kürtler
Codon37/38/39,GACCCAG	β°	Türkler
Codon38/39,-C	β°	Çekler
Codon38/39,-C	β°	Belçikalılar
Codon40,-G	β°	Japonlar
Codon40/41,+T	β°	Çinliler
Codon41,-C	β°	Tayvanlılar
Codon41/42,-TTCT	β°	Çinliler
Codon42/43,+G	β°	Japonlar
Codon42/43,+T	β°	Japonlar
Codon44,-C	β°	Türkiyeli Kürtler
Codon45,-T	β°	Birleşik Arap Emirlikleri
Codon47,+A	β°	Suriyeliler
Codon47/48,+ATCT	β°	Pencaplılar
Codon51,-C	β°	Macarlar
Codon53/54,+G	β°	Japonlar
Codon54,-T	β°	Cezayirliler, İsveçliler
Codon54/55,+A	β°	Hintliler
Codon56/60,+14bp	β°	
Codon57/58,+C	β°	Pencaplılar
Codon59,-A	β°	İtalyanlar
Codon64,-G	β°	İsviçreliler
Codon67,-TG	β°	Filipinliler
Codon71/72,+A	β°	Çinliler
Codon71/72,+T	β°	Çinliler
Codon72/73,-AGTGA;+T	β°	Britanyalılar

IVS-II-850,G>A	β°	İngilizler, İskoçlar
IVS-II-850,G>C	β°	Yugoslavlilar
IVS-II-850,G>T	β°	Japonlar
B-b.RNA işlemeşmesi ile ilgili Mutasyonlar: Konsensus Dizilerdeki Mutasyonlar		
IVS-I-5,G>A	β°	Cezayirliler, Akdenizliler
IVS-I-5,G>C	β°	Asya Hintlileri, Çinliler, Melanezyalılar
IVS-I-5,G>T	β°	Akdenizliler, Amerikalı zenciler
IVS-II-4,5,AG	β°	Portekizliler
IVS-II 5,G>C	β°	Çinliler
IVS-I-6,T>G	β°	Akdenizliler
IVS-I-128, T>G	β°	Suudi Arabistanlılar
IVS-II-837, T>G	β°	Asya Hintlileri
IVS-II-843, T>G	β°	Cezayirliler
IVS-II-844, C>G	β°	İtalyanlar
IVS-II-848, C>A	β°	Amerikalı zenciler, Mısırlılar, İranlılar
IVS-II-848, C>G	β°	Japonlar
B-c. RNA işlemeşmesi ile ilgili Mutasyonlar: IVS-I ya da IVS-II'deki		
IVS-I-110, G>A	β°	Akdenizliler
IVS-I-110, T>A	β°	Akdenizliler
IVS-II-654, C>T	β°	Çinliler
IVS-II-705, C>T	β°	Akdenizliler
IVS-II-745 C>T	β°	Akdenizliler
B-d. RNA işlemeşmesi ile ilgili Mutasyonlar: Kodlanan Bölgedeki Mutasyonlar		
Codon10,-C>A	β°	Asya Hintlileri
Codon19,A>G	β°	Malezyalılar
Codon24,T>A	β°	Amerikalı zenciler, Japonlar
Codon26,G>A	β°	Güneydoğu Asyalılar
Codon27,G>T	β°	Akdenizliler
C-a. RNA Translasyon Mutasyonları: Anlamsız Mutasyonlar		
Codon15,TGG->TAG	β°	Asya Hintlileri, Türkler
Codon15,TGG>TGA	β°	Portekizliler
Codon17,A>T	β°	Çinliler
Codon22,G>T	β°	Reunion Adalılar
Codon26,G>T	β°	Tayvanlılar
Codon35,C>A	β°	Tayvanlılar
Codon37,G>A	β°	Suudi Arabistanlılar, İspanyollar
Codon39,C>A	β°	Akdenizliler
Codon43,G>T	β°	Çinliler
Codon61,A>T	β°	Zenciler
Codon90,G>T	β°	Japonlar
Codon112,T>A	β°	Slovaklar
C-b. RNA Translasyon Mutasyonları: Çerçeve Kayması(Frameshift) Mutasyonlar		
Codon1, G	β°	Akdenizliler
Codon74/75,-C	β°	Türkler
Codon76, -C	β°	İtalyanlar

Codon82/83,G	β°	Azerbaycanlılar
Codon84/85,-C	β°	Japonlar
Codon84/85/86, T	β°	Japonlar
Codon88,T	β°	Asya Hintlileri
Codon89/90, GT	β°	Koreliler
Codon95,+A	β°	Tayvanlılar
Codon106/107,G	β°	Amerikalı zenciler
D.Dominant Beta-Thal ve Stabil Olmayan Beta Zincir Varyantları		
Codon24/25,-GGT	β°	Japonlar
Codon28,CTG>CGG	β°	Hb Chesterfield
Codon31/32, CGG	β°	İspanyollar
Codon32, CTG>CAG	β°	Hb Medicine Lake
Codon98,GTC>ATG	β°	Hb Medicine Lake
Codon33/34, GTG	β°	Koreliler (Hb Korea)
Codon60,GTG>GAG	β°	İtalyanlar (Hb Cagliari)
Codon94,TG	β°	İtalyanlar (Hb Agnana)
Codon100,-CTT,+TCTGAG	β°	Güney Afrikalılar
Codon108/109/110/111/112	β°	İsviçreliler
Codon109,-G	β°	Askenazi Yahudileri (HbManhattan)
Codon110,T>C	β°	Japonlar(Hb showa)
Codon114,-CT; G	β°	İsviçreli Fransızlar
Codon114,T>C	β°	İtalyanlar
Codon115,C>A	β°	Çekler
Codon120/121,A	β°	Filipinliler
Codon121,G>T	β°	Polonyalılar, İsviçreliler, Japonlar
Codon123,-A	β°	Japonlar
Codon123/124/125,ACCCAC	β°	Tayvanlılar
Codon124,A	β°	Ruslar
Codon124/125/126,CCA	β°	Ruslar
Codon125,-A	β°	Japonlar
Codon126,-T	β°	İtalyanlar
Codon126,GTG>GGG	β°	İtalyanlar, Almanlar, Tayvanlılar
Codon126/127/128/129/130	β°	Pakistanlılar
Codon127,CAG>TAG	β°	İngilizler
Codon127,CAG>CCG	β°	Britanyalılar
Codon127,CAG>CGG	β°	Fransızlar
Codon127/128,AGG	β°	Japonlar
Codon128/129,-4bp	β°	İrlandalılar
Codon134/135/136/137,-10bp	β°	Portekizler
E.Başlık Bölgesi (Cap Site) Mutasyonları		
Cap +1,A>C	β°	Asya Hintlileri
F.Başlangıç Kodonu Mutasyonları		
ATG>GTC	β°	Japonlar
ATG>ACG	β°	Yugoslavlar
ATG>AGG	β°	Çinliler,Koreliler,Kuzey Avrupalılar

ATG>ATA	β°	İtalyanlar, İsveçliler
ATG>ATC	β°	Japonlar
ATG>ATT	β°	İranlılar
G.3'UTR Mutasyonları		
3'UTR+6,+1,480;C>G	β°	Yunanlılar
3'UTR+1, 565, 577;-13bp	β°	Türkler
3'UTR+1,570,T>C	β°	İrlandalılar
H. Poliadenilasyon (poly A) ile İlgili Mutasyonlar		
AATAAA>AACAAA	β^{+}	Amerikalı zenciler
AATAAA>AATGAA	β^{+}	Akdenizliler
AATAAA>AATAGA	β^{+}	Malezyalılar
AATAAA>AATAAG	β^{+}	Türkiyeli Kürtler
AATAAA>AAAA(-AT or-TA)	β^{+}	Fransızlar
AATAAA>A(-AATAA)	β^{+}	Araplar

4.GEREÇ VE YÖNTEMLER

4.1.Gereçler

- * Kan sayım cihazı(Coulter counter, Beckman-Multisizer; USA)
- * Santrifüj (Fisher, Germany)
- * Etüv (Heraeus, Germany)
- * Thermal Cyclor (Perkin Elmer Cetus 9600; California, USA)
- * Otomatik pipet(Socorex, Finland)
- * pH metre (Beckman,USA)
- * Spektrofotometre (Spectronic 20-D)
- * Derin dondurucu (-20 Bosch)
- * HPLC (Hb Gold, Drew, Scentific Ltd. United Kingdom)

4.2.Örnek Toplama

Çalışma grubu, il merkezi ve ilçe sağlık ocaklarına reçete yazdırmak için başvuran yetişkin hastalar ve hasta yakınlarından alınan 5ml'lik kan örnekleri soğuk zincir kurallarına uyularak Elazığ Sağlık Müdürlüğü, Halk Sağlığı Merkez laboratuvarına getirildi, kan sayım cihazı ile sonuçları değerlendirildi. Ayrıca il Merkezinde bulunan özel bir hastane laboratuvarında hastaneye başvuran hastaların kan numuneleri, hastane laboratuvarında hemogramları çalışıldı, sonuçlar değerlendirildi. Sağlık ocaklarından alınan kan örnekleri hazırlanan bir kodlama sistemi sayesinde adresleri kayıt altına alınmıştır. Özel sağlık kuruluşu ise hastaların adres ve telefon numaralarını bilgi işlem sistemine kayıt edildi.

Böylece numunelerde meydana gelen aksama veya ileri tetkikleri için geri dönüşümü sorun olmaktan çıkarılmıştır

Çalışma grubumuz sayısal olarak Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalından danışılarak alınan hedef nüfus belirleme formülü kullanılarak tespit edilmiştir (66).

$$n = \frac{N \times t^2 \times P \times Q}{[(N-1) \times D^2] + (t^2 \times P \times Q)}$$

n: Çalışma yapılacak kişi sayısı

N: Tarama yapılacak nüfus toplamı (572 933 Elazığ nüfusu)

t: 2,59 (sabit katsayı, üst limit için)

P: Hastalığın toplumda görülme sıklığı; (0,021)

Q: (1 – P); (1 – 0,021)= 0,979

D: Standart sapma (0,05 -0,01)

Yukarıdaki rakamları yerine koyduktan sonra yapılan hesaplamalar sonucu 1377 örnekleme yapılacak kişi sayısı tespit olunmuştur. Örneklemelerin yapılacağı çalışma grubunda meydana gelebilecek aksilikler göz önünde bulundurularak kişi sayısının 1500 olması gerekmektedir.

İlçe nüfusunun il nüfusuna oranı ile ilçelerden alınması gereken örnek sayısı tespit edilecek ve tespit edilen kişiler rasgele yöntemle seçilecek, böylece toplumdaki genel rastlanma sıklığı tespit edilmiş olacaktır. Elazığ il nüfusu 2000 yılı verilerine göre 572 933 kişi olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç il nüfus idaresi tarafından verilmiştir. Aynı kurumun verilerine göre merkez ve ilçelerin nüfus sayısı ise şöyle sıralanmaktadır.

İlçe	Nüf.	(n)
Ağın	5255	13
Alaca kaya	9467	24
Arıcak	20703	54
Baskil	26460	69
Karakoçan.	45396	118
Kovancılar	45953	120
Maden	19593	51
Palu	26166	68
Sivrice	13859	36
Keban	9596	25
Merkez	350486	928

Yukarıda ifade edilen toplam 1500 kişiden alınan, tam kan numunesi ilgili laboratuvarlarda çalışıldı ve örnek sonuçları değerlendirildi. Kan sonuçlarında MCV değeri, Hb değeri ve HbA2 değerleri çalışmanın alt grubunu oluşturdu (6,18).

MCV'si 80 fl'nin ve Hb fizyolojik referans değerinin altında ise numunenin HPLC cihazı ile HbF ve HbA2 yüzde miktarları belirlenerek, talasemi taraması yapıldı (31). HbA2 değeri % 3,5 ve üzerinde bulunan vakalarda yeni numune alımına gidilerek PCR yöntemi ile DNA izolasyonları yapıldı ve en son olarak β -Globin Strip yöntemi, kullanılarak 22 farklı mutasyon özellikleri kayıt altına alındı. Böylece genel toplumda yakalanacak vakaların sıklığı ve bölgemize ait genetik özellikleri ortaya konuldu. Akdeniz bölgesinde evlilik öncesi rutinine giren ve prenatal tanı yöntemleri içinde önemli bir yer tutan, genetik geçişli bu hastalığın tespiti ve kontrolü mümkün hale gelecektir (26,41,44).

4.3.Yöntemler

4.3.1. Kan Sayımı

Hematolojik analizlerden hemoglobin (Hb), hematokrit (Hct), eritrosit (RBC), ortalama eritrosit hacmi (MCV) ,ortalama eritrosit hemoglobin Konsantrasyonu (MCHC) ve Lökosit (WBC) değerleri aptanmıştır. Tam kan sayımı (hemogram) iletken sıvı ortamda iki elektrod ve aralarında daralıp genişleyen bir lobül sistemi vardır. Kanın şekilli elemanlarının genişliğine göre, tubul sistemi genişleyip daralarak farklı potansiyel enerji farkları ile değişik grafikler çıkmaktadır. Bu grafiklerdeki ölçümler hücrelerin hacimler ve sayısı ile doğru orantılıdır (10,19,5).

4.3.2.HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)

Hemoglobin moleküllerinin ayrıştırılması ve miktarının belirlenmesi için HPLC (Hb Gold-Hb Analysis) kullanılan hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Zayıf iyon değiştirici (anyon veya katyon değiştiriciler) kolonlar Hb'lerin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca globin zincirlerinin ayrıştırılması ve miktarlarının belirlenmesinde ise reverse faz kolonu kullanılarak analiz edilmektedir. Moleküllerin hidrofobik özelliklerinden faydalanılan bu yöntemde geniş çaplı dolgu maddesi içeren Vaydac C4 kolonu kullanılmaktadır (25,47).

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisini oluşturan önemli parçalar şunlardır.

* İki adet pompa: yüksek basınç sağlar.

- * Gradient kontrolör: İki farklı tamponun karışım oranını ve akış hızını kontrol eder.
- * Kolon: Basınca dayanması için çelikten yapılmış bir boru içerisine değişik kimyasal maddeler (anyon veya katyon değiştirici) doldurulmuştur.
- * Enjektör: Sisteme numune tatbik etmek için kullanılır.
- * Dedektör: kolonda tatbik edilen kimyasalların absorpsiyonunu ölçer.
- * Recorder-integratör: Dedektörden gelen verileri yüzdelerine göre hesaplar ve sonuçları kaydeder.
- * Tamponlar: Aynı pH'da farklı konsantrasyonlarda iki çözelti mevcuttur.

HPLC'de hemoglobin ve globin analizleri için farklı kolon ve tamponlar kullanılır. Hemoglobinin özelliğine göre zayıf katyon ve anyon değiştirici kolonlar seçilir (26,44,68).

Talasemi ve anormal hemoglobinlerin saptanmasında HPLC doğru ve hassas bir metottur. Hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir olmasından dolayı talasemi taramalarında özellikle kullanılır. Teknoloji sahibi olan firmalar hastalığın çok görüldüğü bölgelerde daha hızlı çalışan kısa sürede fazla örnek taraması yapabilen bilgisayar destekli modeller geliştirdiler.(Ülkemizde çalışma şekilleri kit karşılığı olduğu için tampon solusyonlar ve kolonlarda kullanılan kimyasallar hakkında yeterli bilgiye sahip olamıyoruz.) Örnekler verildikten sonra değerlendirmeyi yapan cihaz ayrılma süreleri ve konsantrasyonları okuyarak grafik haline çevirmektedir. Yüzde oranları birlikte verilerek tarama sonuçlanmaktadır (19,46). Taramalarda vaka kaçırılmaması için Hb A2

değerinin % 3,5 ve üzerinde alınması UHK (Ulusal Hemoglobinopati Konseyi) tarafından tavsiye edilmiştir. Selüloz asetat elektroforezinde %4 kabul edilmiştir(28).

4.3.3.Tam Kandan DNA İzolasyonları

EDTA'lı (Etilen Diamin Tetra Asetkasit) tüplere alınan kanın, plazması uzaklaştırılarak şekilli elemanlar yıkanır. Eritrositler hemoliz edilerek saf lökositler temin edilir. Daha sonra lökositlerin hücre duvarı patlatılır ve protein elemanlar hidroliz edilir. Fenil-kloroform ile hücre zarı ve atıklarından arındırılan DNA, saf etanolde çöktürülerek elde edilir (Ponez yöntemi) (19,53,82).

4.3.3.1.Çözeltiler

1-Lizis Tampon: 3.570 g Amonyum Klorür ve 0.0350 g Amonyum bikarbonat distile suda çözülerek 1 L'ye tamamlanır.

2-Tampon:

4M NaCl	3,75 ml
0,5M EDTA Na ₂ (pH 7,5)	5.0 ml
SDS (%0.1)	100 ml
Proteinaz K (25mg/mL)	0.2 ml

Distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlanır

3-Doymuş Fenol Çözeltisi:

Kristal halde 250 g fenol, 50 ml distile suda eritilir. Üzerine pH'sı 8'e ayarlanmış 50 ml tampon eklenerek karıştırılır. Fenol ve su fazı ayrıldıktan sonra

üstte kalan su fazının pH'sı 8 olana kadar bu işlem tekrar edilir. Son olarak üstte bir miktar tampon bırakılarak + 4° C'de ve renkli cam şişede saklanır.

4-Kloroform

5-%70'lik Etil Alkol

4.3.3.2.Yöntem

1- 1 ml EDTA'lı tam kan üzerine 3ml soğuk parçalayıcı tampon eklenip 10 dakika buz içinde bekletilir.

2- + 4°C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılır ve bu işlem iki kez tekrarlanır.

3- Lökosit pelleti üzerine 1 ml tampon eklenerek hafifçe karıştırılır ve 37°C'de bir gece bekletilir.

4- Süre sonunda tüplere 400 µl fenol, 400 µl kloroform eklenir ve bu karışım 5000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir. Altta kalan fenol kloroform karışımı atılıp bu işlem 2 kez tekrar edilir.

5-Aynı işlem 2 kez kloroform ile tekrar edilir.

6- Tüpler santrifüj edilerek süpernatant 5ml %95'lik etil alkol içine aktarılıp tüp yavaşça altüst edilerek DNA'nın ipliksi bir görünüm alması sağlanır. DNA ipliksi bir görünüm aldıktan sonra 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek DNA çökeltisi elde edilir.

7-Süpernatant dökülerek DNA'nın kurulması için tüp ters çevrilir.

8-Pelletin büyüklüğüne göre üzerine 40–100 µl saf su eklenip DNA'nın çözünmesi için bir gece 37°C'de bekletilir.

9-DNA çözüldükten sonra konsantrasyonu hesaplanır

5µl DNA çözeltisi 595µl saf su ile karıştırılarak 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbansları (OD: Optik dansite) ölçülür.

Konsantrasyon (µg/mL)= OD₂₆₀ x Sulandırma Oranı(120)x 50

Verim=OD₂₆₀ / OD₂₈₀ Bu oranın 1.5–1.8 arasında olması istenir.

4.3.4. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

DNA'nın istenilen bölgesinin, in vitro koşullarda, bu hedeflenen bölgeye özgü primer kullanılarak konsantrasyonunun moleküler açıdan değerlendirilebilir düzeye çıkartılması işlemidir.1988 yılında "thermus aquaticus" bakterisinden saflaştırılmış ısıya dayanıklı (taq polimeraz) kullanımı ile birlikte polimeraz zincir reaksiyonları için (PCR) otomatize termal siklüs cihazları geliştirmeye başlanmıştır. Floresan ışımaya tekniklerinin de kullanıma girmesi ile PCR'da bir devrim yaşanmaktadır (9,61,62,73).

Bu gelişim sayesinde artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek, devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek eş zamanlı olarak reaksiyonun gidişine müdahale şansına sahip olabiliriz. Birçok alanda etkin olarak kullanılmaktadır. Gen ekspresyonunun kantitasyonu, viral kantitasyon, patojenlerin tespiti, DNA hasarı, genotipleme, anne karnında izole edilen tek hücrede prenatal tanı önemli kullanım alanlarının başında gelmektedir. Konvansiyonel ölçümlerden 1000 kat daha az örnek ile çalışılabilir, PCR sonrası elektroforez gerektirmemesi gibi de önemli avantajları mevcuttur (9,60).

4.3.4.1.Çözeltiler

1-10X Tris Tamponu

2M KCL	1.25 ml
1M Tris. HCl(pH 8.3)	0.5 ml
1M MgCl ₂	75µl
Jelatin	5 mg
Distile su	3.2 ml

(Jelatin erimesi için 37°C'de bekletilir.)

2-Spermidin 1M

3-PCR Karışımı (4 ml)

10X Cetus tamponu	500µl
Distile su	2700µl
1.25 mM dNTP karışımı	800µl
Spermidin 1M	4µl

(dNTP'lerin her birinden 60 µl alınıp üzerine 4740 µl steril distile su eklenerek 1.25 mM'lık çözelti hazırlanır.)

4.3.4.2.Yöntem

Amplifikasyon işleminde DNA 95°C'ye kadar ısıtılır, çift iplikli DNA ayrılarak tek iplikli DNA haline gelmesi ile denatürasyon sağlanır. İkinci aşamada ısı 65°C'ye ayarlanarak spesifik primerlerin komplementer dizilerine yapışması gerçekleştirilir. Son aşamada 72°C'de DNA polimerazın yerini tutan ve yüksek ısıdan etkilenmeyen Taq polimeraz enzimiyle, ortamda bulunan

deoksinükleozid trifosfatların 5'→3' yönünde eklenmesiyle zincir uzaması sağlanır. Bu ısı değişimi döngüsünde iki katına çıkan hedef diziler de tekrarlanan döngüde şablon olarak kullanılarak; her döngünün geometrik olarak artışı sağlanır (5,73).

4.3.5. β -Globin Strip Assay

Bu test Akdeniz ülkelerine özgü 22 mutasyonu kapsamaktadır. Bunların iki tanesi anormal hemoglobin (HbS ve HbC), 20 tanesi ise β -talasemi mutasyonudur. 22 mutant dizi cihaz üzerindeki 12 normal prob ile tanımlanabilmektedir (73).

Yakın zamana kadar β -talasemi taramalarında mutasyonların tespiti için restriksiyon enzimleri kullanılarak çeşitli mutasyonlar tespit ediliyordu. Bu yöntemler oldukça güvenilir yöntemler olup, doğum öncesi erken tanı söz konusu olduğu zaman, toplumda en sık görülen mutasyondan başlanıp çeşitli varyasyonlar denenmekte idi. Bu arada ailelerin geldikleri yörelerde göz önüne alınmalıdır(48)

Tablo 4.Bazı talasemi mutasyonları ve tespit için kullanılan enzimler (48)

Mutasyonlar	Enzimler
Cd 39	RmaI
Cd74/75	HaeIII
IVS-1-1	BspMI
IVS-2-1	HphI
IVS-1-6	SfaNI
FSC-5	Ddel/TaqI
FSC-6	Ddel
13bp del	Hinfl
-87	AvII
IVS-2-745	RsaI

Günümüzde yapılan çalışmalarda şu anda 3. nesli geliştirilmiş olan β -Globin Assay adlı hazır bir kit ile bu tanı yöntemleri talasemi tanısını oldukça kolaylaştırmıştır. Yöntemin güvenilirliği bir yüksek lisans tezi kanıtlanmıştır(48). Hemen akabinde tüm laboratuvarlarda hızla kullanıma girmiştir. Eğer β -globin kiti ile tanı konulamıyorsa DNA dizi analizi yöntemi kullanılmaktadır.

PCR ile çoğaltılmış DNA ürünlerinin mutasyona özgü oligonükleotid problemleri ile hibritleşmesi prensibi üzerine kurulmuş bir testtir. Test üç aşamadan oluşmaktadır.

- 1- Kandan DNA izolasyonu
- 2- β -globin geninin biyotin ile işaretlenmiş primerlerle amplifiye edilmesi
- 3- PCR ürününün normal ve mutant problemleri paralel bantlar şeklinde taşıyan, hazır membranlarla hibridizasyona sokulması
- 4- Renk reaksiyonu ile görüntüleme.

Test şeridindeki mutasyonların bazıları birbirine oldukça yakın oldukları için, bunlara tek bir normal oligonükleotid probu kullanılmıştır. Dolayısı ile 22 mutasyon sadece 12 normal prob ile tanımlanabilmektedir.

β -globin Strip Assay (Vienna Lab-Labordiagnostika GmbH) adlı kit Türkiye'de β -talasemi tanısını büyük ölçüde kolaylaştırmıştır. Olguların % 90'ı tek aşamada % 100 güvenilirlik ile tanımlanabildiği gibi bir kısmında bölgesel özellikler kullanılarak DNA dizi analizi yöntemleri ile tanı konur. DNA izolasyonundan tanıya alana kadar geçen süre toplam yarım gündür (48,73).

Bizim çalışmamız, tarama testi yapılacak çalışmalarda ciddi zaman kazandırması, güvenilirliği ve pratikliği göstermesi açısından da ayrıca önem

taşımaktadır. Fırat niversitesi bünyesinde Biyokimya laboratuvarının rutin işleyişine girmesi, hızlı ve fazla sayıda mutasyona aynı anda bakılması, iç yükünün hafiflemesi anlamında oldukça önemlidir.

5-BULGULAR

Elazığ merkezde ve ilçelerde toplanan sağlıklı yetişkinlerin kanları Elazığ Sağlık Müdürlüğü Halk Sağlığı laboratuvarında ve Elazığ merkezde hizmet vermekte olan özel bir sağlık kuruluşunun biyokimya laboratuvarında tam kan sayımları gerçekleştirildi. Toplanan 1500 kan numunesi 3 aylık bir zaman dilimi içerisinde parça parça çalışılarak ilk aşama tamamlanmış oldu.

Daha sonra bu sonuçlar değerlendirilerek hemoglobin ve MCV değeri normalin altında olan vakalar tespit edildi. Ayrıca kan değerlerinden biri normal veya biri düşük olan hastalarda çalışma grubuna dâhil edildi.

Çalışmanın sonucu 1500 kişilik gruptan 76 tane hastamızda hemoglobin ve MCV değerleri birlikte düşük olan veya herhangi birinin değeri düşük olanlar tespit edildi. Bu 76 kişilik grup HPLC ile HbF ve HbA₂ değerlerine bakıldı. Yapılan değerlendirmeler sonucu HbA₂ değeri 3,5 mg/dl ve üzerinde olan 9 muhtemel vaka tespit edildi. Bu vakalarda mutasyon tipinin tespiti için PCR uygulaması yapıldı. Çıkan sonuçlar β -globin strip yöntemi ile adlandırıldı.

Yapılan çalışma sonucu 953 tane kadın, 547 tane erkek hasta tespit edildi. Hastaların cinsiyet ve kan değerleri aşağıda bir tablo halinde verilmiştir.

Tablo 5. Tüm vakaların kan sayım verileri

	n	Hb	Htc	MCV
ERKEK	547	13,1±0,41	39,7±2,9	82,9±2,1
KADIN	953	14,1±0,27	40,6±1,7	85,3±1,1
TOPLAM	1500	13,8±1,66	39,9±8,1	83,7±5,1

Tablo 6.Tespit edilen vakaların hematolojik verileri

SIRA NO	CİNSİYETİ	YAŞI	ADI SOYADI	Hb	MCV	HbA2	HbF
1-	KADIN	26	S.G.	10,2	77	2,5	0,2
2-	KADIN	29	K.B.	11,1	76	2,6	0,2
3-	KADIN	34	P.D	11,5	83	3,3	0,2
4-	KADIN	25	S.T	11,2	79	3,3	0,2
5-	KADIN	27	N.S	13,0	83	2,7	0,4
6-	KADIN	22	N.D	12,0	78	2,7	0,2
7-	KADIN	38	S.G.	11,0	79	3,2	1,3
8-	KADIN	43	R.B	10,5	78	3,1	0,1
9-	KADIN	25	E.S	12,0	80	3,0	0,3
10-	KADIN	31	M.K.	11,1	79	3,1	0,1
11-	KADIN	45	N.K	10,3	80	2,8	0,7
12-	KADIN	33	M.P	12,2	81	2,8	0,2
13-	ERKEK	26	U.U	11,8	80	2,8	0,2
14-	KADIN	36	N.Ç *	10,3	65	5,2	0,5
15-	ERKEK	41	E.I	11,9	74	2,7	1,8
16-	ERKEK	18	F.Y	9,9	66	3,0	0,4
17-	KADIN	41	A.K	10,2	77	2,5	0,6
18-	KADIN	38	F.K	11,8	81	2,8	0,4
19-	KADIN	57	S.A	11,1	79	2,6	0,3
20-	KADIN	61	H.K	12,9	80	2,8	0,2
21-	KADIN	21	S.G.	13,2	79	3,1	0,2
22-	KADIN	41	F.G	13,1	79	3,0	0,3
23-	KADIN	38	A.H	12,6	81	2,8	0,1
24-	KADIN	59	V.E	7,8	67	2,6	0,2
25-	ERKEK	47	M.K.	11,5	81	2,6	0,4
26-	KADIN	34	N.O	11,2	80	2,9	0,4
27-	ERKEK	21	F.O *	12,2	56	5,9	1,2
28-	KADIN	31	L.L	11,3	79	2,2	0,4
29-	KADIN	22	A.B	10,3	83	2,9	0,4
30-	KADIN	41	G.S	9,1	77	3,2	0,4
31-	ERKEK	37	F.Ç	11,3	81	3,3	0,1
32-	KADIN	34	H.M *	12,0	83	3,5	0,1
33-	KADIN	37	A.B	8,3	69	2,2	0,1
34-	KADIN	46	S.C	11,5	79	2,7	0,8
35-	KADIN	51	Z.O	12,3	79	2,8	0,2
36-	KADIN	33	G.G	12,3	76	3,3	0,3
37-	KADIN	27	F.Ç	12,8	79	2,7	1,4
38-	KADIN	23	Z.M	13,9	77	2,7	0,3
39-	KADIN	26	B.S	11,8	81	2,4	0,1
40-	KADIN	23	S.S	11,7	73	2,4	0,2
41-	KADIN	24	H.B	9,5	78	2,9	0,8
42-	KADIN	27	N.A.K.	12,1	76	2,8	2,6
43-	KADIN	23	S.A	10,2	83	2,5	0,3
44-	KADIN	39	T.A *	10,8	69	5,6	1,7
45-	KADIN	22	G.S	10,1	79	2,6	0,5

46-	KADIN	22	M.D *	7,4	58	3,9	0,3
47-	KADIN	41	S.K.	9,5	76	3,0	0,3
48-	KADIN	19	S.E	10,0	79	2,6	0,2
49-	KADIN	41	G.A	11,1	76	2,9	0,2
50-	KADIN	51	M.H	12,1	79	3,2	0,8
51-	KADIN	36	S.Ö	9,9	78	2,5	0,1
52-	ERKEK	21	Y.A.T	11,1	80	3,3	1,7
53-	ERKEK	34	H.T	12,3	76	3,0	0,5
54-	KADIN	31	H.S	10,8	79	2,7	0,5
55-	KADIN	42	S.P	12,1	76	2,9	0,4
56-	KADIN	34	A.U	9,7	76	3,0	0,2
57-	KADIN	27	G.C	11,9	80	3,0	0,5
58-	ERKEK	47	R.A	10,3	78	3,0	0,2
59-	ERKEK	34	E.Ö	9,9	79	3,0	0,3
60-	KADIN	27	M.İ	10,2	79	2,9	0,2
61-	KADIN	41	G.F	10,1	80	3,0	0,6
62-	KADIN	39	Ş.Y	9,2	76	3,0	0,2
63-	KADIN	47	S.Ö	9,9	78	3,2	0,2
64-	KADIN	33	H.O *	9,8	79	5,3	0,7
65-	KADIN	27	R.K	9,6	78	3,2	0,3
66-	ERKEK	57	S.Y *	8,5	57	5,7	0,8
67-	KADIN	61	M.S	12,6	79	3,1	0,4
68-	KADIN	26	T.D	11,4	72	3,3	0,4
69-	KADIN	33	G.P	10,0	72	3,2	0,5
70-	KADIN	26	C.Y	10,1	77	3,2	0,6
71-	KADIN	31	N.A	11,3	79	3,2	0,4
72-	KADIN	24	H.G.T.	11,0	77	3,0	0,3
73-	ERKEK	32	H.C	11,1	79	3,2	0,5
74-	KADIN	32	B.Ç	12,5	77	3,2	0,9
75-	ERKEK	34	İ.Y *	10,5	79	6,0	1,1
76-	ERKEK	23	N.M *	7,6	69	6,0	0,6

* HbA₂ 3,5 ve üzeri olan vakalar

Tablo 7.Çalışmada tespit olunan vakaların mutasyon tipleri ve görülme sıklığı

Sıra no	Cinsiyeti Yaşı	Adı soyadı	Hb A ₂	HbF	Mutasyonlar	Pozitif vakalardaki Yüzdesi n = 9
14-	Kadın-36	N.Ç.	5,2	0,5	IVS-1-110	55,5
27-	Erkek-21	F.O.	5,9	1,2	FSC-5	11,1
32-	Kadın-34	H.M.	3,5	0,1	CD 39	11,1
44-	Kadın-39	T.A.	5,6	1,7	IVS-2-1	11,1
46-	Kadın-22	M.D.	3,9	0,3	IVS-1-110	55,5
64-	Kadın-33	H.O.	5,3	0,7	IVS-1-110	55,5
66-	Erkek-57	S.Y.	5,7	0,8	IVS-1-110	55,5
75-	Erkek-34	İ.Y.	6,0	1,1	IVS-1-110	55,5
76-	Erkek-23	N.M.	6,0	0,6	-30 T>A	11,1

Yukarıdaki tabloda da görüldüğü üzere sonuçta 9 vakada tespit edilen hasta genlerin β -globin strip assay metodu ile tespit edilen mutasyon tipleri çıkarılmıştır.

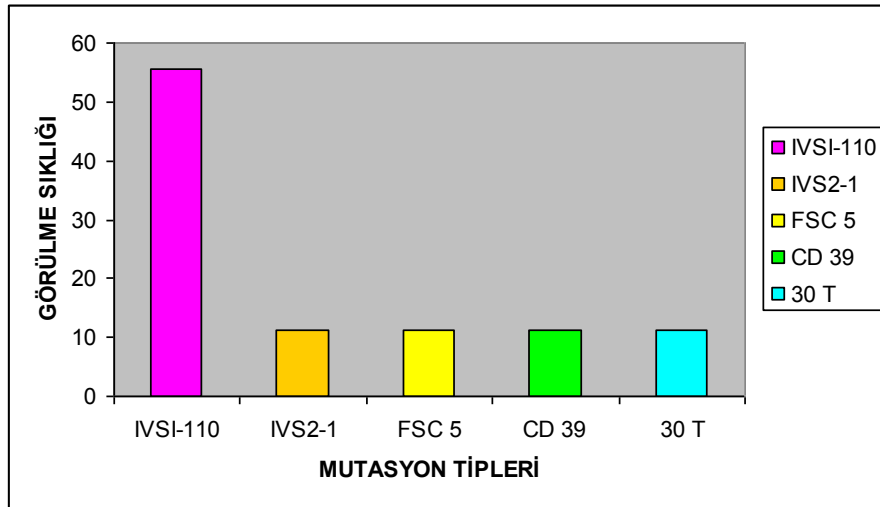
Tablo 8. Türkiye'de saptanan olguların mutasyon tipleri

Mutasyon tipleri	Kendi çalışmamız		Yüreğir ve arkadaşları (86)		Evrensel (27)		Topal (74)		Tadmori ve arkadaşları (71)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
IVSI-110	5	55.5	140	54.6	59	75.6	63	60.6	312	39.3
IVS2-745	-	-	5	1.9	-	-	2	1.9	40	5.0
—30	1	11.1	6	2.4	-	-	4	3.8	25	3.1
IVSI-6	-	-	12	4.7	6	7.7	5	4.8	80	10.1
IVS2-1	1	11.1	7	2.7	-	-	3	2.9	37	4.7
Cd8	-	-	9	3.5	5	6.4	10	9.6	43	5.5
Fsc5	1	11.1	-	-	-	-	-	-	-	-
IVSI-1	-	-	24	9.4	-	-	9	8.6	40	5.0
Cd39	1	11.1	22	8.7	2	2.6	4	3.8	30	3.8
Cd5	-	-	-	-	6	7.7	3	2.9	17	2.1
—28	-	-	-	-	-	-	1	0.9	1	0.1
Diğer	-	-	31	12.1	-	-	-	-	98	13.2
Bilinmeyen	-	-	-	-	-	-	-	-	72	9.1
Toplam	9	100.0	256	100.0	78	100.0	104	100.0	795	100.0

Toplam 76 vakanın cinsiyetlerine göre hematolojik verilerinin dağılımı ve ortalama \pm SD değerleri aşağıdaki tablo 8.'de verilmiştir.

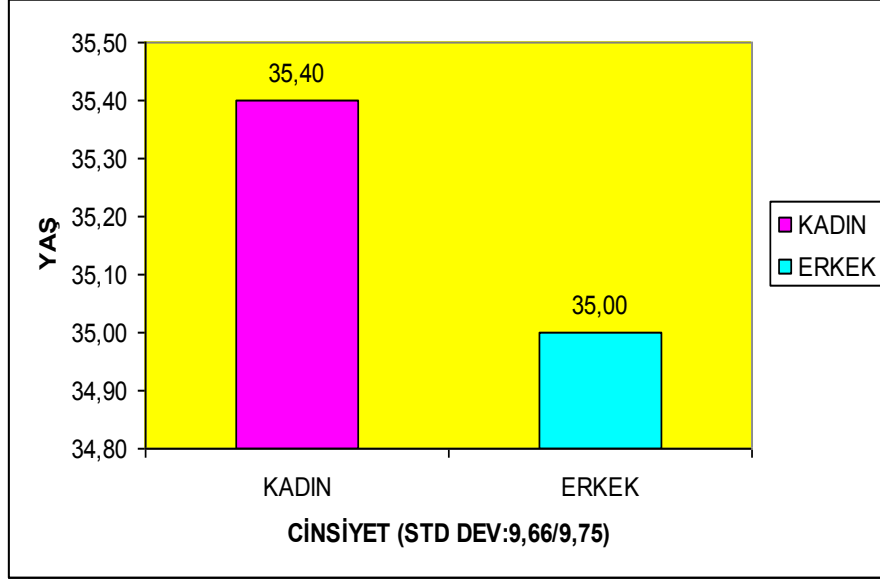
Tablo 8.Kadın ve erkek olguların verilerinin istatistiksel dağılımı

	n	Yaş	Hb	MCV	HbA ₂	HbF
Erkek	14	35,00 \pm 2,6 18–57	10,70 \pm 0,36 7,6–12,3	73,92 \pm 2,3 56–81	3,60 \pm 0,3 2,6–6,0	0,70 \pm 0,14 0,1–1,8
Kadın	62	35,41 \pm 1,2 19–61	11,00 \pm 0,16 7,4–13,9	77,43 \pm 0,55 58–83	3,02 \pm 0,7 2,2–5,6	0,43 \pm 0,5 0,1–2,6
Toplam	76	35,34 \pm 9,6 18–61	10,95 \pm 1,3 7,4–13,9	76,78 \pm 5,5 56–83	3,12 \pm 0,79 2,2–6,0	0,48 \pm 0,45 0,1–2,6

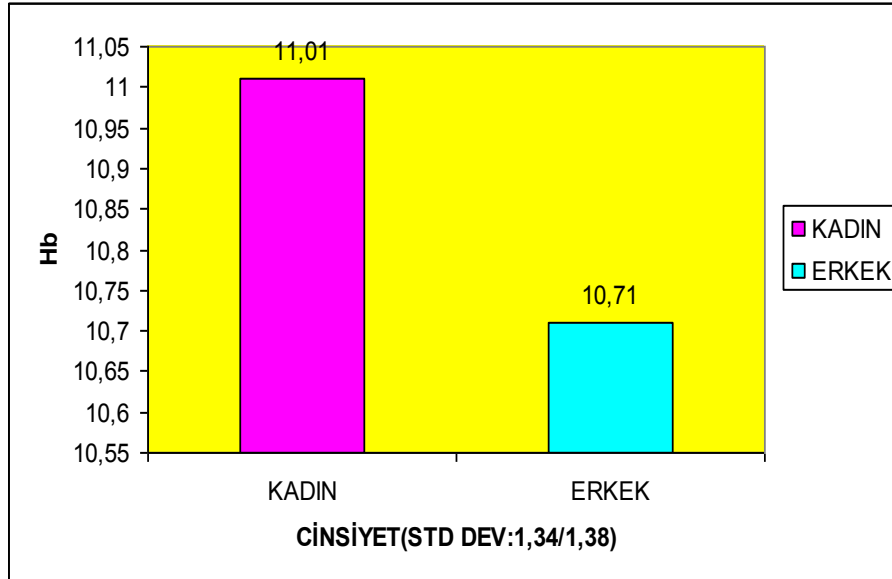


Şekil 7. Mutasyonların yüzde dağılım grafiği

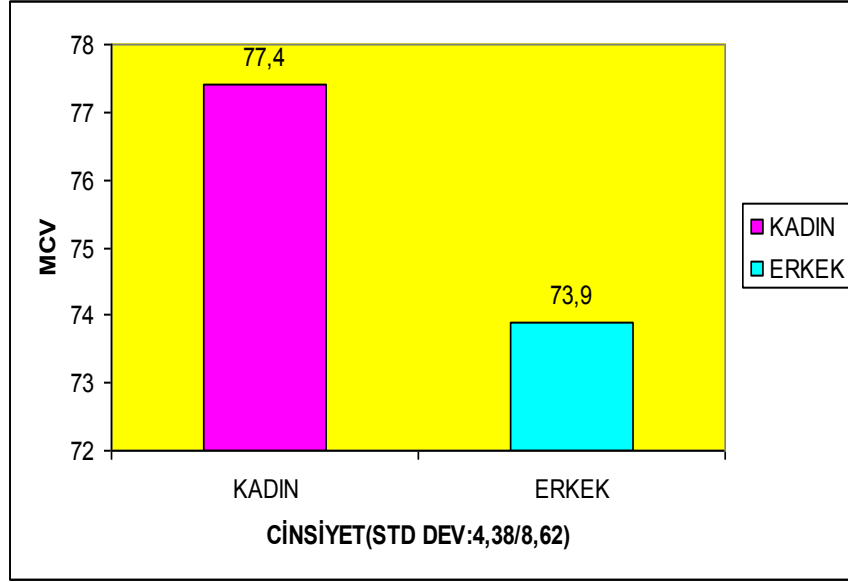
Hastaların sonuçlarının cinsiyetlerine göre yaş, Hb, MCV, HbA₂ ve HbF değerlerine göre grafikleri aşağıda şekiller halinde sunulmuştur.



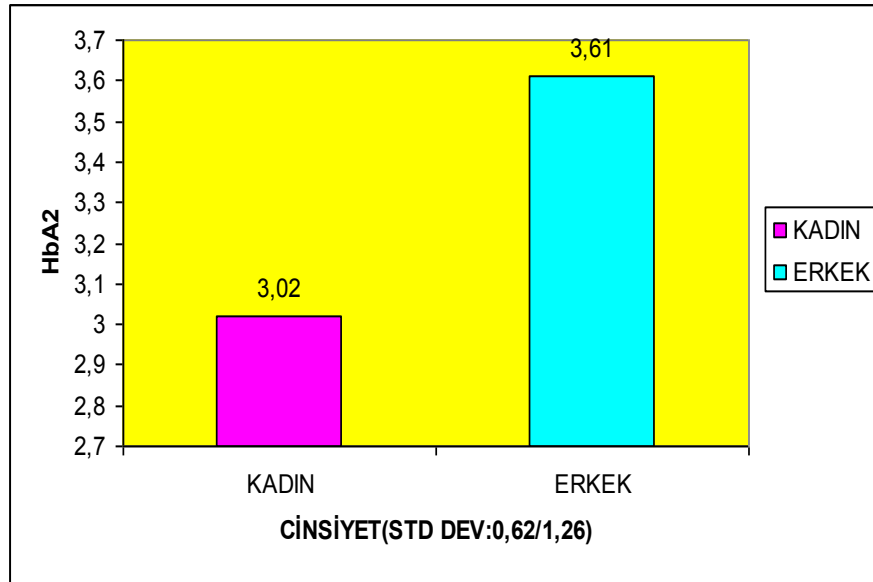
Şekil 8. Olguların yaşa göre dağılımı (64)



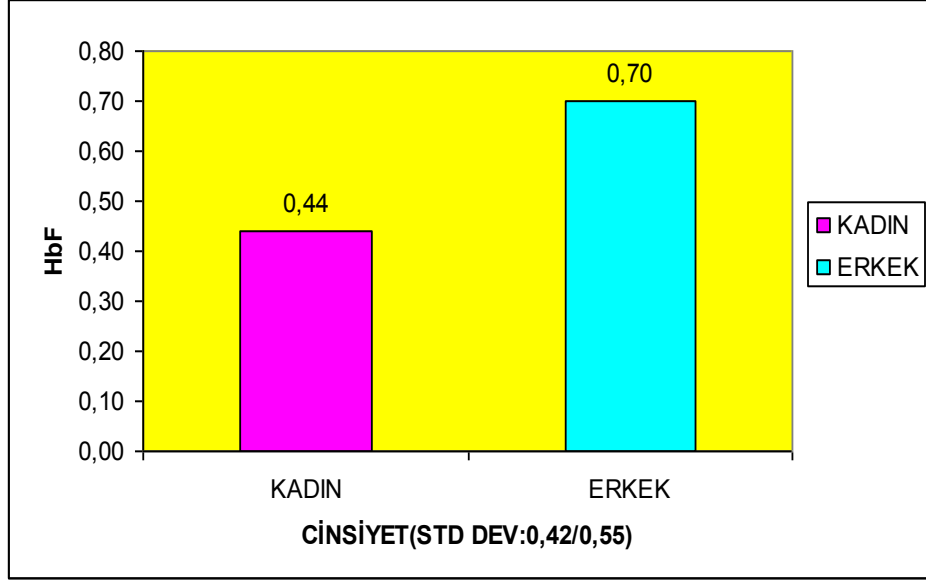
Şekil 9.Olguların Hb değerlerine göre dağılımı (64)



Şekil 10. Olguların MCV değerlerine göre dağılımı (64)



Şekil 11. Olguların HbA2 değerlerine göre dağılımı (64)



Şekil 12.Olguların HbF değerlerine göre dağılımı (64)

6-TARTIŞMA

Ülkemiz coğrafi konumu tarihi geçmişi ile birçok toplumun etkisi altında kalmıştır. Bu karışıklıklar ve etnik kimliklerin karışması sonucu mutasyon çeşitliliği ülkemizde çok fazladır. Türkiye’de β -talasemi taşıyıcılığı % 2,1 olmakla birlikte bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. Adana % 3,2, Antakya% 3,7, Antalya %10,2, Bursa % 2,6, Denizli %3,6, Kahramanmaraş % 0,9 olarak bulunmuştur. Akdeniz bölgesinde oldukça yaygın olduğu için ciddi bir halk sağlığı sorunudur (4,6,49).

β -talaseminin dünya üzerindeki yaklaşık 250 milyon taşıyıcı ile morbidite mortaliteye yol açan başlıca genetik hastalık olduğu bildirilmiştir. İlimiz Akdeniz bölgesine kısmi bir coğrafi açılımı ve sosyal ilişkiler sebebi ile hastalığın görülme sıklığı ve bölgeye özgü mutasyon tipleri araştırıldı ve sonuçlar tablolarda verildi. Tablo 5’de verildiği üzere Hb değerleri 7,4–13,9 g/dl arasında değişmektedir. Arpacı ve arkadaşları hemoglobin değerlerini 7,8–14,5 g/dl olarak tespit etmişler. Tanrıverdi çalışmasında 21 β -talasemi taşıyıcısında hemoglobin değerini 5,7–14,4 g/dl olarak tespit etti. Topal doktora tez çalışmasında Antakya, Kayseri ve İzmir bölgesinin β -talasemi mutasyonlarını çalışmış ve hemoglobin değerlerini 9,0–12,9 arasında bulmuştur. Evrensel Kayseri bölgesinde mutasyon tipleri üzerinde yaptığı çalışmada hemoglobin değerlerini 8,7–14,9 arasında bulmuştur (22,71).

Talasemi tanısında kullanılan ikinci önemli parametre olan MCV değerleri değerlendirildiği zaman bizim çalışmamızda 57–83 fl arasında değiştiği görülmüştür. Aynı değerler Aksoy ve arkadaşlarında(3) 60–79 fl arasında,

Arpacının çalışmasında (8) 59–83 fl arasında, Tanrıverdi'nin çalışmasında(70) 60–71 fl arasında, Topal'ın çalışmasında(71) 65–82 fl arasında ve Evrensel'in çalışmasında ise 56–71 arasında bulunmuştur.

HbA₂ düzeyleri ve kıyaslamalarına baktığımız zaman 76 olguda % 3,5 ve üzerindeki vaka sıklığı yüzdesini % 0,60 olarak tespit ettik. Yüreğir ve arkadaşlarının Kahramanmaraş ve çevresindeki tarama çalışmasında bu sıklık % 0,68 olarak bulunmuştur (83,84). Evrenselin çalışmasında ise Hb A₂ değerleri hastalarda % 1.5–5.6 arasında bulunmuştur (22).Topal tarafından yapılan çalışmasında Hb A₂ değeri %3.9 bulunmuştur (49).

Çalışmamızın ana konusunu oluşturan β -talasemi mutasyon tiplendirmesi konusunda mutasyonların belirlenmesine yönelik pek çok farklı çalışma yapılmıştır. Özellikle Akdenizin doğusunda IVSI–110 pozisyonunda alternatif splice bölgesini oluşturan G→A değişiminin neden olduğu IVSI–110 mutasyon tipi en yaygın olandır. IVSI–110 mutasyonu Güney Kıbrısta %79.8, Kuzey Kıbrıs'ta %74.1, Lübnan'da %62.0, eski Yugoslavya'da %45.4, Arnavutluk'ta %43.2, Yunanistan'da %42.6, Azerbaycan'da ve Türkiye'de % 41.2 sıklıkla görülmektedir (12,13).

Tadmouri ve arkadaşları(69) İstanbul, İzmir, Adana ve Antakya'daki farklı hastanelerde tespit edilen toplam 795 vakanın sonuçlarını değerlendirmiş, toplam 31 farklı mutasyon tipi tespit etmiştir. Bu çalışmada en çok rastlanan mutasyon tipi IVS–1–110 olarak tespit edilmiştir. Bu tipi sırayla azalan oranla IVS–1–6, Cd8, IVS–2–745, IVS–1–1, IVS–2–1, Cd39, -30, Cd5 ve -28 mutasyon tiplerinin izlediği bulunmuştur.

Topal çalışmasında (71) IVS-1-110 mutasyonu Antakya bölgesinde %63,7, Kayseri'de %68,3 ve İzmir bölgesinde %46,7 olarak bulmuşlardır. Antakya bölgesinin mutasyon sıklığı sırası ile IVSI-1 %18,2, Cd9, IVSI-6 ve IVS2-1 için %6 olarak bulunmuştur. Kayseri örneklerinde ise IVSI-110 %68,3, Cd8 %19,5, IVSI-6 ve Cd5 %4,9 ve IVSI-1 %2,4 olarak bulunmuştur. İzmir örneklerinde IVSI-10 %46,7 oranında bulunmuş olup, bunu %13,3 ile -30, %6,7 ile IVSI-1, Cd39 ve Cd8, %3,3 ile de Cd5, IVSI-6, IVS2-1, IVS2-745 ve -28 izlemiştir (2,71).

Aksoy ve arkadaşları Çukurova'da (2), Akar ve arkadaşları Mustafakemalpaşa ve civarında (1), hasta bir aile üzerinde yaptığı bir çalışmada sadece IVS-1-110 ve IVS-1-1 mutasyonlarını tespit etmişlerdir.

Öner ve arkadaşlarının(50) Türkiye genelinde yaptıkları bir çalışmada yaygın olarak görülen mutasyon tipleri sıklıkları şöyledir. IVS1-110 %42,5, IVS1-6 %18, IVS2-1 %11,5, Cd8 %7,14, Cd39 %6, IVS2-745 %4,4, IVS1-1 %2,5, -30 %2,2 ve Cd5 %1,1 dir. Atalay ve arkadaşları, Türkiye'de β -talasemi mutasyon tipleri ve sıklıklarını şöyle tespit etmişlerdir. IVSI-110 %35,9, IVSI-6 %21,6, IVSI-1 %13,0, Cd39 %7,2, IVS2-745 %3,6, Cd8 %2,2 ve IVS2-1 %1,4. Öner ve arkadaşları Doğu Anadolu bölgesinde yaptıkları çalışmada Cd8, -30, IVSI-110, IVSI-130 ve IVS2-1 mutasyonları bulmuşlardır.

Tadmouri ve arkadaşları (69) çalışmalarında coğrafi bölgelere göre mutasyon tiplerinin farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ülkemizde de doğudan batıya gidildikçe çeşitlilik azalmaktadır. En sık olmakla birlikte IVS1-110 mutasyon tipi Anadolu'daki en eski mutasyon tipi olduğuna inanılmaktadır. M.Ö.6500-2000 senelerinde sıtma seleksiyonu ile çoğaldığı yönünde ipuçları

mevcuttur. Mevcut mutasyon tipleri 13 yy. itibariyle şu andaki oranlara ulaşmış olduğu düşünülmektedir.

Tadmouri çalışmasında (13) Orta Anadolu bölgesi civarında IVS1–110 % 52,3'lük bir oranla en sık görülmektedir. Bizim çalışmamızda da çıkan sonuçlar bu referans bulgularla uyumludur (% 55,5). Cd 39 Marmara bölgesinde en sık rastlanan tiptir. Bizim çalışmamızda da 1 vaka ile bulunmuştur. Türklere ve Bulgarlara özgü bir mutasyon olan -30'dan da 1 kişi tespit edilmiştir (13).

Koç ve arkadaşları (33) daha önce Elazığ'da yapılan taşıyıcı taramasında 10–13 yaşlarındaki bir grupta ve il merkezinde Hb A2 ve Hb F yüksekliği ile seyreden oran % 0,1 bulunmuştur. Bizim çalışmamızda Elazığ merkez ve ilçeleri beraber değerlendirildi ve yetişkin sağlıklı insanlar üzerinde gerçekleştirildi. Koç'un çalışmasından farklı olarak genetik mutasyonlarını tespit edildi.

Tamamlamış olduğumuz çalışmamıza göre bugüne kadar yapılmış olan çalışmalara uygun mutasyon tipleri bölgemizde tespit edilmiştir. Orta Anadolu çalışmalarında yapılan değerlendirmeler sonucu gerek MCV değerleri gerekse hemoglobin değerleri Topal, Aksoy ve Arpacı ve arkadaşlarının (65,77,81) çalışmalarına uyum göstermektedir. Elazığ bölgesinde tespit edilen mutasyon tipleri ve sıklığı şöyle sıralanmaktadır; IVS1–110 5 kişi %55,5, Cd39 1 kişi, FSC5 1 kişi, IVS2–1 1 kişi, -30 T >A 1 kişi %11,1 'dir. Tespit edilen bu mutasyon tipleri Türkiye geneli çalışmalardaki sonuçlarla ve bölgesel yapılmış sonuçlarla çok uyumlu çıkmıştır. Ayrıca bölgeye özel yeni bir mutasyona çalışma esnasında rastlanmamıştır.

Önemli bir Akdeniz mutasyonu olan IVS2–745 bizim bölgesel çalışmamızda tespit edilmemiştir. Bu durumda bize bazı mutasyonların bölgesel

farklılıklar gösterdiği ve coğrafi farklılıklarla değişime uğradığını göstermektedir. Ama genetiksel özelliklerimizde olan genel ortalamanın Elazığ'da da değişmediği ve ülke genelinde sıklıkla görülen IVSI-110 mutasyon tipinin Elazığ içinde geçerli olduğu anlaşılmıştır.

Bölgemizin coğrafi ve ekonomik ilişkiler sebebi ile Akdeniz bölgesiyle ilişkileri giderek artmaktadır. Bu durum mevcut hasta ve taşıyıcı insanların evlenmesi ile mutasyon tipinin değişmesi ve sıklılığın artması kuvvetle muhtemel bir sonuçtur.

Henüz bu kültürel etkileşmelere rağmen bölgemiz insanının taşıyıcı olma olasılığı düşüktür. Buna bağlı olarak evlenmeleri durumunda dahi hasta çocuk olma olasılığı zayıftır. İlerleyen zamanla birlikte taşıyıcı insan sayısı arttıkça iki taşıyıcı insanın evlenmesi ile hasta olguların sayısı ve mutasyon çeşitliliği artacaktır. Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de kontrolsüz evlenmeler, özellikle akraba evlilikleri bu çeşitliliği tetikleyecektir.

Şu ana kadar olan bilgiler ve veriler sonucu Türkiye'de farklı dağılımların mevcut olduğu tespit edilmiştir. Her coğrafi bölgede bulunan değişik mutant alellerin dağılımında da farklılıklar olduğu görülmektedir.

Elimizdeki % 0,60 oranına baktığımız zaman Elazığ için acil eylem planında bir talasemi merkezi düşünülmemeyebilir. Fakat olaya makro ölçekte baktığımız zaman bir sağlık merkezi olan Elazığ'da böyle bir tanı merkezi ihtiyacı kaçınılmazdır.

Hastalığın majör formunun tedavisi uzun ve pahalıdır. Önceden tespit şansının olması ve genetik danışmanlıkla önlenabilir olması bu çalışmaların önemini artırmaktadır. Riskli popülasyonlarda tarama testleri ile taşıyıcıların

tespit edilmesi ve halk eğitimi çalışmaları ile toplumun bilinçlendirmesi ile hastalık popülasyonunu azaltmak mümkün olabilir. Son yıllarda genetikte meydana gelen gelişmelerde anne karnında hasta gene müdahale edilme şansı doğabilmektedir. Çalışmamızın temel amaçlarından bir tek gen hastalığı olan talaseminin genetik mutasyonlara göre tedavi formatlarının hazır olmasıdır. Prenatal tanı ile riskli çiftler uyarılmakta ve bilgilendirilmektedir.

Ayrıca çalışmamızda kullandığımız β -globin strip metodu taramaların hızlı ve güvenilir olarak yapılması konusunda da önemli örneklerden olacaktır.

Türkiye’de 1993 yılında “Kalıtsal Kan Hastalıkları ile Mücadele” yasasının çıkmasından sonra Sağlık Bakanlığı tarafından Antalya, Antakya, Mersin ve Muğla’da talasemi merkezleri kurulmuştur. Bu tarihten sonra Başbakanlık Aile Araştırma Kurumu Başkanlığı tarafından Sağlık Bakanlığı ve İç İşleri Bakanlığı aracılığı ile evlenecek çiftlerden talasemi tarama testi istenmesi önerilmektedir. Daha da önemlisi üniversiteler ve Sağlık Bakanlığı öncülüğünde hemoglobinopati konseyinin kurulmasıdır.

7- SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1-Yaptığımız bu çalışma ile Elazığ il genelinde % 0,6 oranında β -Talasemi taşıyıcı sıklığı bulunmuştur. Bu oran Türkiye ortalamalarının altındadır. Buda ilimiz için sevindirici bir sonuçtur.

2-Türkiye'nin diğer bölgelerinde tespit edilen mutasyon tipi olan IVS1-110 Elazığ içinde en sık görülen mutasyon tipi olmuştur.

3-Türkiye genelinde görülen farklılıklar Elazığ içinde de rastlanmıştır. Beş farklı mutasyon tipi görülmüştür.

4-Bölgemizin Akdeniz bölgesi ile olan yakın ilişkilerinden ötürü prenatal tanı merkezleri acil olarak olmasa bile kurulmalı ve bir halk sağlığı sorunu olan bu hastalığın tanı giderleri devlet tarafından karşılanmalıdır

5-Türkiye'de ciddi oranların olduğu bölgeler düşünülerek β - talasemi haritasının çıkarılması ve halk eğitimi ile taşıyıcı olan ailelerin arasındaki evliliklerin kontrollü olması ve akraba evliliğinin önüne geçilmesi gerekmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. **Akar N, Uysal Z, Yeşil N, İnce E, Arcasoy A, Ata Y.** Mustafakemalpaşa ve köylerinde anormal hemoglobin ve HbA₂ Yüksekliği ile karakterize β -Thalassemia taşıyıcılığı araştırılması. Turk J Med Sci, **1990**;14: 551–554.
2. **Aksoy K, Çürük MA, Arpacı A, Dikmen N, Yüreğir GT:** β - Talasemili bir ailenin mutasyon tipinin Dot-Blot Hibridizasyon yöntemi ile saptanması. Ç ü Sağlık bil der, **1992**;7: 87–91.
3. **Aksoy M.** Anormal hemoglobinler ve hemoglobinopatiler. Çocuk Hematolojisi ve immünoolojisi, İstanbul, **1973**; 33–71.
4. **Altay Ç, Gürgey A.** Distribution of hemoglobinopathies in Turkey. Tr J Pediatr, **1986**; 28: 218–29.
5. **Arcasoy A, Canatan D, köse M üstündag M.** Hemoglobinopati ve Talasemi, Önlem-Tanı-Tedavi. Antalya: SiyahGrafik Matbacılık Ltd. Şti., **2002**;13-17.
6. **Arcasoy A.** Türkiye’de thalassemia taşıyıcı sıklığı ve anormal hemoglobinler. Ankara talasemi Derneği, **1994**.
7. **Arcasoy MO, Gallagher PG.** Molecular diagnosis of hemoglobinopathies and other red blood cell disorders. Semi Hematol, **1999**;36(4):328–339.
8. **Arpacı A, Aksoy K, Yüreğir GT.** Preliminary studies for prenatal diagnosis: Incidence and mutation site of β -thalassemia in Antakya, Türkiye. Ann Med Sci, **1992**;1: 103–110
9. **Atalay EÖ, Çırakoglu B, Dinçol G, Atalay A, Kılınç Y, Aytekin H, Yüreğir GT, Arpacı A, Bermek E, Aksoy M.** Regional distributions of β -thalassaemia mutations in Turkey. JHematol, **1993**;57: 207–211.
10. **Bain BJ, Amos RJ, Chapman B, Davies SC, Old JM, Wild BJ.** The laboratory diagnosis of hemoglobinopathies Br J Haematol, **1998**;101:783–792.
11. **Baron MH.** Transcriptional control of globin gene switching during vertebrate development. Biochim Biophys acta, **1997**;1351,51–72.

12. **Baysal E, Indrak K, Bozkurt G, Berkalp A, Aritkan E, Old JM, Lannou P, Angastiniotis M, Droushiotou A, Yüregir GT, Kılınç Y, Huisman THJ.** The β thalassemia mutations in the population of Cyprus. *Br J Haematol*, **1992**; 81: 607–609.
13. **Boletini E, Svobodova M, Divoky V, Baysal E, Çürük MA, Dimovski AJ, Liang R, Adekile AD, Husisnan THJ.** Sick cell anemia, sickle β -thalassemia, and thalassemia major in Albania: Characterization of mutations. *Hum genet*, **1994**; 88: 182–187.
14. **Brant RLS, Brant SJ.** Molecular Genetics and Hematology ; Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. Eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*, 10th Ed., Baltimore, **1999**; 124-142.
15. **Bunn HF, Forget BG,** Hemoglobin: Molecular Genetic and Clinical Aspects, Philadelphia; W.B. Saunders Company, **1986**; 60–90.
16. **Cao A, Furbetta M, Galanello R, Melis MA,** et al. Status of thalassemia studies in Italy. *Am J Pediatr Haematol Oncol*, **1983**; 5: 219–223.
17. **Cao A, Moi P.** Regulation of the globin genes. *Pediatr Res*, **2002**; 51:415–421.
18. **Cao A.** β -thalassaemia mutation in Mediterranean populations. *Br J haematol*, 1989; 71: 309-312.
19. **Clarke GM, Higgins TN.** Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem*, **2000**; 46 (8B):1284–1290.
20. **Çürük MA.** Azerbaycan Türklerinde β -Talasemi'nin DNA ve Globin Zincir analizi ile Belirlenmesi. Doktora Tezi, Ç.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **1994**.
21. **Diaz-Chico JC, yang K, Yang K, Efremov DG, Stoming TA, Huisman THJ.** The detection of β -globin gene mutations in β thalassemia using oligonucleotide probes and amplified DNA. *Biochim Biophys Acta*, **1988**; 949:43-48
22. **Evrensel E.** Kayseri bölgesindeki β -talasemi mutasyon tipleri. Biyokimya Uzmanlık Tezi, Adana, **2002**.

23. **Fu XH, Liu DP, Liang CC.** Chromatin Structure and transcriptional regulation of the β -globin locus. *Exp Cell Res*, **2002**; 278:1–11.
24. **Gümrük F.** Hemoglobin ve hemoglobinopatiler. İliçin G, Ünal S, Biberoğlu K, Akalın HE, Süleymanlar G, Eds. *Temel iç hastalıkları*, 1. Baskı, Güneş Kitabevi Ltd, Ankara, **1996**;12333–1243
25. **Gürgey A.** Talasemi ve Hemoglobinopatilerde Yeni Görüşler. Tübitak, Ankara, **1986**
26. **Higgs DR, Thein SL, Wood WG.** Human haemoglobin In; *The Thalassemia Syndromes*, Eds; Gibbons R, Higgs DR, Old JM, Oliveri NF, Thein SL, Wood WG, 4th Ed, Blackwell Science Ltd, Oxford, **2001**;65-120.
27. **Huisman THJ, Carver MFH,** Baysal E. *A Syllabus of Thalassemia Mutations* (1997). The Sickle Cell Anemia Foundation, Augusta, USA, **1997**.
28. **Huisman THJ, Schroeder WA, Brodie AN, Mayson M, Jakway J.** Microchromatography of hemoglobin III.A. simplified procedure for the determination of hemoglobin A2. *J Lab Clin Med*, **1975**;86: 700–702.
29. **Kazazian HH, Boehm CD,** Molecular basis and prenatal diagnosis of β -thalassemia. *Blood*, **1988**; 72(4): 1107–1116.
30. **Kazazian HH.** The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol*, **1990**; 27(3): 209–228
31. **Kiouis D, Festenstein R.** Locus control regions: overcoming heterochromatin-induced gene inactivation in mammals. *Curr Opin Genet Dev*, **1997**; 7: 614–619.
32. **Klinken SP.** Red blood cell. *Intj Biochem Cell Biol*, **2002**;34:1513-1518
33. **Koç A, Kocabay K, Öncü T, Güvenç H.** Elazığ yöresinde beta talasemi taşıyıcılığı ve anormal hemoglobin taraması, *Türkiye Klinikleri Pediatri* **1993**; 2(2):70–71
34. **Kohn J.** Separation of hemoglobin on cellulose acetate. *J Clin Path*, **1962**; 22: 109–110.

35. **Li Q, Peterson KR, Fang X, Stamatoyannopoulos G**, Locus control regions. *Blood*, **2002**; 100:3077–3086.
36. **Li Q, Peterson KR, Harju S**. Locus control regions coming of age at a decade plus. **1999**; 15:403–408.
37. **Li X, Liu D, Liang c**. Beyond the locus control region: new light on β -globin locus regulation. *IntJ Biochem Cell Biol*, **2001**; 33:914–923.
38. **Logan AC, Lutzko C, Kohn DB**. Advances in lentiviral vector design for gene-modification of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Biotechnol*, **2002**; 13: 429–436
39. **Loukopoulos D**. Thalassemia: genotypes and phenotypes . *Ann Hematol*, **1991**; 62(4): 85–94.
40. **Lukens J**. The thalassaemia and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis. In; Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP and Rodgers GM. Eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*, 10th Ed., Baltimore, **1999**; 1405-1448.
41. **Macromedia inc**. *Lehninger Principles of Biochemistry* ,Version 3/e (CD-ROM), The Mona Group , **2000**.
42. **May C, Rivella S, Chadburn A, Sadelain M.A**. Successful treatment of murine β -thalassemia intermedia by transfer of the human β -globin gene. *Blood*, **2002**; 99: 1902–1908.
43. **May C, Sadelain M.A** promising genetic approach to the treatment of β -thalassemia. *Trends cardiovasc med*, **2001**; 11:276-280
44. **Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW**. Harper'ın *Biyokimyası*. 22. Baskı, İstanbul; Sistem Matbaası, **1993**.
45. **Nienhuis AW, Anagnou Np, Ley TJ**. Advances in thalassemia research. *Blood*, **1984**; 63(4):738–758.
46. **Old j, Petrou m, Varnavides L, Layton M, Modell B**. Accuracy of prenatal diagnosis for haemoglobin disorders in the UK: 25 years' experience. *prenat Diag*, **2000**; 20:986-989

47. **Olivieri NF, Weatheral DJ. Thalassemiyas.in; Lilleyman JS, Hann IM, Blanchette VS** Eds. Pediatric Hematology, 2th Ed. London: Churchill & Livingstone, **1999**; 307–327.
48. **Onur Bilenoglu**, Molecular Analysis of β -thalassemia and hemoglobins by the β -Globin Strip Assay: Anovel diagnostic apporach, yüksek lisans tezi, Boğaziçi Üniversitesi, **1996**; 17-24
49. **Öner AF, Özer R, Üner A, Arslan Ş, Gümrük F.** β -thalassaemia mutations in the east of Turkey. Tr J Haematol, **2001**; 18(4): 239–242.
50. **Öner R, Altay C, Gürgey A, Aksoy M, Kılınç Y, Stoming TA, Reese AL, Kutlar A, Kutlar F, Huisman THJ.** β -tahalassemia in Turkey. Hemoglaobin, **1990**; 14: 1–13
51. **Perkins A.** Erytroid Kruppel like factor: from fishing expedition to gourmet metal. IntJ Biochem Cell Biol, **1999**; 31: 1175–119
52. **Perkins SL.** Examination of the Blood and Bone Marrow. In; lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP and rodgers GM. Eds. Wintrobe's clinical hematology, 10th Ed. Baltimore, **1999**: 9-35.
53. **Ponez M, Slolowiejzk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S.** Construction of human gene library from small amounts peripheral blood. Analysis of β - like globin genes. Hemoglobin, **1982**; 6: 27–36.
54. **Raund D, Rachmilevitz E.** New trends in the treatment of β -thalassemia. Crit Rev Oncol Hematol, **2000**; 33: 105–118.
55. **Remick DG, Kunkel SL, Holbrock EA, Hanson CA.** Theroy and applications of the polymerase chain reaction. Am j Clin Pathol, **1990**; 93(4): s49–54.
56. **Ristaldi SR, Casula S, Porcu s, Marongiu MF, Pirastu M, Cao A.** Activation of the β -globin gene by the β -globin gene CACC motif. Blood Cells Mol Dis, **1999**; 31: 193–209.
57. **Rivalla S, May C, Chadburn A, Riviere I, Sadelain M.** A novel murine model of β -globin gene transfer. Blood, **2003**; 101: 2932–2939.

- 58. Rosatelli MC, Dozy A, Faa V, Meloni A, Sardu R, Saba L, Kan YW, Cao A.** Molecular Characterization of β - thalassemia in the Sardinian Population. *Am J Hum Genet*, **1992**; 50: 422–426.
- 59. Round D, Rachmilewitz E.** Pathophysiology of α - and β -thalassemia: Therapeutic implications. *Sem Hematol*, **2001**; 38(4):343–349.
- 60. Routledge SJE, Proudfoot NJ.** Definition Structure and transcriptional promoters in the human β -globin locus control region. *J Mol Biol*, **2002**; 323:601–611.
- 61. Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian DJ, Erlich HA.** Diagnosis of sickle cell anemia and β thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele specific oligonucleotide probes . *N Eng J Med*, **1988**; 319(9):537–541.
- 62. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** Primer directed amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **1988**; 239:487–491.
- 63. Singer K, Chernof AA, Singer L.** Studies on abnormal hemoglobins I. Alkali Denaturation. *Blood*, **1951**; 6: 413–424.
- 64. SPSS Inc.** SPSS for Windows. Version 14,0, Chicago: SPSS Inc: **2005**.
- 65. Stathopoulos Pb,** Taking the good out of the bad: lentiviral-based gene therapy of the hemoglobinopathies. *Biotechnology Advances*, **2003**; 21: 513–526.
- 66. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V.** Biyoistatistik. Ankara Hacettepe Üniversitesi Biyoistatistik, Özdemir Yayıncılık; **1995**; 264–265.
- 67. Swank AR, Stamatoyannopoulos G.** Fetal gene reactivation. *Curr Opin Genet Dev*, **1998**; 8:366-370
- 68. Tadmouri GO, Tüzmen Ş, Özçelik H. Özer A, Baig SM, Senga EB, Başkan AN.** Molecular and population genetic Analyses of Tukey .*Am J Hematol*,**1998**; 57:215-220.

69. **Tadmouri GO.** β -thalassemia in Turkey: distribution, diversity, evolution and phenotype/genotype correlations. Doktora tezi, İstanbul, **1999**.
70. **Tanrıverdi K.** β -talasemi mutasyon tiplerinin moleküler düzeyde incelenmesi. Bilim uzmanlığı tezi, Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **1993**.
71. **Topal K.** Antakya, Kayseri ve İzmir örneklerinde β -talasemi mutasyon tiplerinin saptanması. Doktora tezi, Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **1998**.
72. **Türkiye Kalkınma Bankası Araştırma Müdürlüğü,** Elazığ raporu. Temmuz, **1998**
73. **Tüzmen Ş, Schechter AN.** Genetic diseases of hemoglobin: Diagnostik method for elucidating β - thalassemia mutations. Blok Rev, **2001**; 15 (1): 19–29.
74. **Weatheral DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG.** The Thalassemias. In; scriver CR, Arthur AL, Sly WS, Valle D. Eds. The Metabolic and molecular bases of inherited Disease, 8th Ed., New York: McGraw Hill Publishing Division, **2001**; 4571-4636.
75. **Weatheral DJ, Clegg JB. In: gibbons R, Higgs DR, OLD JM, Oliveri NF, Thein SL, Wood WG.** Eds. Historical perspectives: The Many and Diverse Routes to Our Current understanding of the thalassemias. The Thalassemia syndromes, 4th ed. Oxford: Blackwell Science Ltd; **2001**; 3-62.
76. **Weatheral DJ, Clegg JB.** The thalassemia Blackwell Scientific Publications, Oxford, **1981**.
77. **Weatheral DJ.** Disorders of the Synthesis or Function of Haemoglobin. In; Ledingham JGG, Warrell DA. Eds. Concise Oxford Textbook Of Medicine, 1th Ed. Oxford: Oxford Universty Press, **2000**; 234–246.
78. **Weatheral DJ. The Thalassemias. In; Bentler E, Coller BS, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligshn U,** Eds. Williams Hematology, 6th Ed., New York: Mc Graw Hill Publishing co, **2001**; 547-580.
79. **Weatheral Dj. The Thalassemias. In; Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H.** Eds. The Molecular Basis of Blood Diseases 3th Ed, Philadelphia: WB Saunders company, **2001**; 183–226

- 80. Weatherall Dj. The Thalassemias. In; Williams Wj, Beutner E, Coller BS, Lichtman Ma, Kipps TJ, Seligsohn U. Eds. Williams Hematology, 5th Ed., New York: McGraw Hill Publishing Co, 1995; 581-615.**
- 81. Weatherall DJ, Clegg JB. Thalassemia-a global public health problem. Nat Med. 1996; 2 (8): 847-9.**
- 82. Yüregir GT, Arpacı A, Aksoy K, Tuli A, Dikmen N, Özgünen FT, Kılınç Y. Population at risk for hemoglobinopathies in Çukurova, Türkiye: need for prenatal diagnosis. Ann Med Sci, 1995; 4: 61-65.**
- 83. Yüregir GT, Arpacı A, Tuli A. Temel ve biyokimyada ileri teknoloji yöntemleri. Adana. Ç.Ü. Tıp Fak Yay,1995**
- 84. Yüregir GT, Kılınç M, Ekerbiçer H, Bilaloğlu N, Tekin N. Screening of Hemoglobinopathies in Kahramanmaraş, Turkey. Turk J Haematol, 2001; 18(2):79-83.**

9. ÖZGEÇMİŞ

1969 yılında Elazığ'da dünyaya geldim. İlk ve orta tahsilimi Elazığ'da tamamladım.1985 yılında Elazığ lisesinden mezun oldum. Üniversite sınavında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesine girmeye hak kazandım.1992 yılında adı geçen fakülteden mezun oldum. Mecburi hizmetimi Kars'ta tamamladıktan sonra 1993 yılı güz döneminde Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında doktora öğrencisi olarak başladım. İki çocuk babasıyım, halen Sağlık Bakanlığı bünyesinde Elazığ Sağlık Müdürlüğü'ne bağlı 75 No'lu Aile Hekimi olarak çalışmaktayım. Orta derecede İngilizce bilmekteyim.