

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

HEMOGLOBİNOPATİLERİN MİKROARRAY YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

GÖNÜL ŞEYDA SEYDEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. KIYMET AKSOY

ADANA -2007

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

HEMOGLOBİNOPATİLERİN MİKROARRAY YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

GÖNÜL ŞEYDA SEYDEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. KIYMET AKSOY

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TF2006YL9
nolu Proje Olarak Desteklenmiştir.

Tez No:

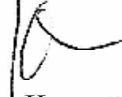
ADANA-2007

KABUL VE ONAY FORMU

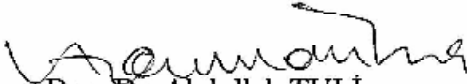
Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Hemoglobinopatilerin Mikroarray Yöntemiyle Belirlenmesi” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

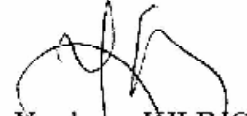
Tez Savunma Tarihi : 24 / 07 / 2007



Prof. Dr. Kıymet AKSOY
Çukurova Üniversitesi
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Abdullah TULİ
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi



Prof. Dr. Yurdanur KILINÇ
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Yönetim kurulununtarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halil KASAP
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimi yaptığım süre içerisinde, en derin bilgilerini ve bilim alanındaki engin tecrübelerini benden esirgemeyen, araştırma ve çalışma şevkini kazanmamı sağlayan, tez konumun seçiminde ve yürütülmesinde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım çok değerli tez danışmanım sayın Prof.Dr. Kıymet Aksoy'a çok teşekkür ederim.

Ders aşamasında teorik bilgilerini aktaran, pratik alandaki uygulamalarımda yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Nurten Dikmen'e, Prof.Dr. Levent Kayrın'a, Doç.Dr. Abdullah Tuli'ye, Doç.Dr. Akif Çürük'e ve Yrd. Dr. Tamer İnal'a teşekkür ederim.

Deneylerin yapılmasında, teknik ekipmanların kullanılmasında yardımcı olan Arş. Gör. Sedefgöl Yüzbaşıoğlu Arıyürek'ede ayrıca teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim sürecinde desteklerini ve tecrübelerini bana gösteren Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma görevlileri, teknik ve diğer personellerede teşekkür ederim.

Sabır ve içtenlikle bana en büyük desteği veren sevgili annem ve babamada çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamı TF2006YL9 nolu proje olarak destekleyen Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne maddi katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1.Hemoglobinin Yapısı	3
2.1.1. Hemoglobinin Moleküler Yapısı	3
2.1.2. Hemin Yapısı	4
2.1.3. Globin Zincir Gen Yapısı	4
2.1.3.1. α Benzer Globin Genler	4
2.1.3.2. β Benzer Globin Genler	5
2.1.4. Normal Hemoglobinler	6
2.1.5. Hemoglobin Dönüşümleri	8
2.2. Hemoglobinopatiler	9
2.2.1. Anormal Hemoglobinler	9
2.2.1.1. Anormal Hemoglobin Sendromları	9
2.2.1.1.1. Hb S(β 6 (A3) Glu \rightarrow Val: GAG-GTG)	9
2.2.1.1.2. Hb D Los Angeles (β 121(GH4) Glu \rightarrow Gln: GAA \rightarrow CAA)	12
2.2.1.1.3. Hb O – Arab (β 121(GH4) Glu \rightarrow Lys: GAA \rightarrow AAA)	12
2.2.1.1.4. Hb E (β 26 (B8) Glu \rightarrow Lys: GAG \rightarrow AAA)	12
2.2.1.1.5. Hb E Saskatoon (β 22(B4) Glu \rightarrow Lys: GAA \rightarrow AAA)	13
2.2.1.1.6. Hb G- Coughatta (β 22(B4) Glu \rightarrow Ala: GAA \rightarrow GCA)	13
2.2.1.1.7. Hb D-İran (β 22 (B4) Glu \rightarrow Gln: GAA \rightarrow CAA)	14
2.2.1.1.8. Hb C (β 6(A3) Glu \rightarrow Lys: GAG \rightarrow AAG)	14

2.2.1.2. Türkiye’de Görülen Anormal Hemoglobinlerin Dağılımı	15
2.2.1.3. Çukurova Bölgesinde Görülen Anormal Hemoglobinlerin Dağılımı	18
2.2.2. Talasemiler	19
2.2.2.1. β Talasemi	19
2.2.2.1.1. β Talasemilerde Tanımlanan Mutasyon Tipleri	20
2.2.2.1.2. β Talasemi Sendromları	20
2.2.2.1.2.1. β Talasemi Minör	20
2.2.2.1.2.2. β Talasemi Major	20
2.2.2.1.2.3. β Talasemi İntermedia	21
2.2.2.1.3. Dünyada β –Talasemi Dağılımı	21
2.2.2.1.4. Türkiye’de β –Talasemi Dağılımı	21
2.2.2.1.5. Çukurova Bölgesinde β –Talasemi Dağılımı	24
2.3. Mikroarray Teknolojisi	26
2.3.1. Mikroarraylerin Yapımı	27
2.3.2. Mikroarrayin Kullanım Alanları	28
2.3.3. Mikroarray Tekniğinin Aşamaları	29
2.3.4. Mikroarray Tekniğinin Avantajları	30
2.3.5. Mikroarray Tekniğinin Dezavantajları	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Gereçler	32
3.1.1. Cihazlar	32
3.1.2. Kimyasal Malzemeler	33
3.2. Örnek Toplama	34
3.3. Yöntemler	34
3.3.1. Hematolojik Çalışmalar	34
3.3.1.1. Hemoglobin Elektroforezi	34
3.3.1.1.1. Ayıraçlar	34
3.3.1.1.2. Yöntem	35
3.3.1.2. Mikrokolon Kromatografisi ile HbA ₂ Ölçümü	35
3.3.1.2.1. Ayıraçlar	35
3.3.1.2.2. Yöntem	36
3.3.1.3. Modifiye Betke yöntemi ile Fetal Hemoglobin (HbF) Ölçümü	36
3.3.1.3.1. Ayıraçlar	37

3.3.1.3.2. Yöntem	37
3.3.1.4. Oraklaşma Testi	37
3.3.1.4.1. Ayıraçlar	37
3.3.1.4.2. Yöntem	37
3.3.1.5. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	38
3.3.2. Mikroarray Yöntemiyle Mutasyon Analizi	39
3.3.2.1. Mikroarray'in Çalışma Prensipleri	39
3.3.2.1.1. PCR Ürünleri	40
3.3.2.1.2. Mutant ve Yabancı Tip İşaretleyici	40
3.3.2.1.3. Stabilizör	40
3.3.2.2. Mikroarray'in Çalışma Basamakları	42
3.3.2.2.1. Tam Kandan DNA İzolasyonu	42
3.3.2.2.1.1. Lökositlerden DNA İzolasyonu	42
3.3.2.2.1.1.1. Ayıraçlar	42
3.3.2.2.1.1.2. Yöntem	42
3.3.2.2.2. Amplifikasyon	43
3.3.2.2.2.1. Ayıraçlar	43
3.3.2.2.2.2. Yöntem	44
3.3.2.2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi	45
3.3.2.2.2.3.1. Ayıraçlar	45
3.3.2.2.2.3.2. Yöntem	46
3.3.2.2.3. Pürifikasyon	46
3.3.2.2.3.1. Yöntem	46
3.3.2.2.4. Yükleme	47
3.3.2.2.4.1. Ayıraçlar	47
3.3.2.2.4.2. Yöntem	47
3.3.2.2.5. Okutma	47
3.3.2.2.5.1. Yöntem	47
3.3.2.2.6. Analiz	48
4. BULGULAR	50
4.1. Anormal Hemoglobin Tipleri	50
4.2. Beta Talasemi Olguları	64
4.2.1. Hematolojik Veriler	64
4.2.2. Mutasyon Analizleri	65

5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇLAR	79
7. KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Hemoglobin molekülünün yapısı	3
Şekil 2. Hemin yapısı	4
Şekil 3. α -Benzer globin genler	5
Şekil 4. β -Benzer globin genler	5
Şekil 5. Embriyonik ve fetal gelişimin farklı evrelerinde globin zincir sentezi	8
Şekil 6. HbS'in oraklaşması	10
Şekil 7. Hb S taşıyıcısı olma durumunda doğacak çocukların Hb genotipleri ve oranları	11
Şekil 8. Mutant ve yabancıl tip işaretleyici	40
Şekil 9. Baz etkileşim enerjileri	41
Şekil 10. Veri analizi değerlendirme şeması	49
Şekil 11. Hb S olgusunun HPLC görüntüsü	51
Şekil 12. Hb D Los Angeles olgusunun HPLC görüntüsü	53
Şekil 13. HbO Arab olgusunun HPLC görüntüsü	55
Şekil 14. HbO Arab olgusunun HPLC görüntüsü	56
Şekil 15. Hb E Saskatoon olgusunun HPLC görüntüsü	58
Şekil 16. Hb G Coughatto olgusunun HPLC görüntüsü	60
Şekil 17. Hb G Coughatto olgusunun HPLC görüntüsü	61
Şekil 18. Hb D-İran olgusunun HPLC görüntüsü	63
Şekil 19. IVS I-110 mutasyonunun mikroarray analiz grafiği	66
Şekil 20. IVS I-1 mutasyonunun mikroarray analiz grafiği	67
Şekil 21. IVS I-6 mutasyonunun mikroarray analiz grafiği	68
Şekil 22. IVS II-1 mutasyonunun mikroarray analiz grafiği	69
Şekil 23. Cd8 mutasyonunun mikroarray analiz grafiği	70
Şekil 24. Cd8 mutasyonunun mikroarray analiz grafiği	70
Şekil 25. -30 mutasyonunun mikroarray analiz grafiği	71

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Embriyonik, fetal ve erişkin dönemde sentezlenen insan hemoglobinleri	7
Tablo 2. Türkiye’de gözlenen anormal hemoglobin varyantları	15
Tablo 3. Türkiye’de gözlenen unstabil hemoglobinler	17
Tablo 4. Türkiye’de saptanan talesemik anormal hemoglobinler	17
Tablo 5. β talasemi/anormal hemoglobin varyantları birlikteliği	18
Tablo 6. Türkiyede gözlenen beta talasemi mutasyonları	23
Tablo 7. Çukurova’da gözlenen beta talasemi mutasyonlarının sıklığı	25
Tablo 8. Amplifikasyon protokolü	44
Tablo 9. Amplifikasyon döngü protokülünün ısı ve süreleri	44
Tablo 10. Amplikonlarda yer alan mutasyonlar	45
Tablo 11. HbS olgularının hematolojik verileri	50
Tablo 12. Hb S mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi	50
Tablo 13. Hb D Los Angeles olgularının hematolojik verileri	52
Tablo 14. Hb D Los Angeles mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi	52
Tablo 15. HbO Arab olgularının hematolojik verileri	54
Tablo 16. HbO Arab mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi	54
Tablo 17. Hb E Saskatoon olguların hematolojik verileri	57
Tablo 18. Hb E Saskatoon mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi	57
Tablo 19. Hb G Coughatto olgularının hematolojik verileri	59
Tablo 20. Hb G Coughatto mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi	59
Tablo 21. Hb D İran olgusunun hematolojik verileri	62
Tablo 22. Hb D İran mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi	62

Tablo 23. β -talasemili olguların hematolojik verileri	64
Tablo 24. β -talasemili olguların mutasyon tipleri	65
Tablo 25. IVS I-110 mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi	66
Tablo 26 . IVS I-I mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi	67
Tablo 27. IVS I-6 mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi	68
Tablo 28. IVS II-1 mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi	69
Tablo 29. Cd8 mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi	70
Tablo 30. -30 mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi	71

SİMGELER ve KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
ϵ	Epsilon
γ	Gama
RBC	Eritrosit hücresi
Hb	Hemoglobin
Hct	Hematokrit
MCH	Ortalama Eritrosit Hemoglobini
MCV	Ortalama Eritrosit Hacmi
MCHC	Ortalama Eritrosit Hemoglobin konsantrasyonu
Kb	Kilo baz
bç	Baz çifti
IVS	İntron dizileri
Cd	Kodon
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
dNTP	Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
μ L	Mikro litre
μ M	Mikro Molar
μ S	Mikro Siemens
nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SNP	Tekli Nükleotid Polimorfizmi
pM	Piko Molar

ÖZET

Hemoglobinopatilerin Mikroarray Yöntemiyle Belirlenmesi

Dünya’da yaygın olarak gözlenen kalıtsal hastalıklardan biri olan hemoglobinopatiler hemoglobin molekülünün polipeptid zincirindeki yapısal değişiklikler veya sentez bozuklarından kaynaklanan bir kan hastalığıdır. Anormal hemoglobinler ve talasemiler olmak üzere iki kısma ayrılır. Anormal hemoglobinler polipeptid zincirlerini kodlayan genlerdeki çeşitli mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Dağılımı coğrafik lokalizasyon ve ırksal gruplara göre oldukça farklılık göstermektedir. Ülkemizde bugüne kadar 42 anormal hemoglobin tanımlanmıştır. En sık gözlenen HbS, HbD ve HbE’dir. Talasemiler hemoglobin molekülünün globin zincirlerinin bir ya da daha fazlasının üretimindeki azalmadan kaynaklanmaktadır. α globin zincir sentezindeki azalma α talasemiye, β globin zincir sentezindeki azalma β talasemiye neden olmaktadır. α ve β talasemi Türkiye’deki en yaygın hemoglobinopatiler olup α ve β talasemi taşıyıcı sıklığı sırasıyla % 3,3 ve % 3,7 dir. Türkiye’de en sık görülen beta talasemi mutasyonu IVSI-110’dur. Bu çalışmada Çukurova bölgesinde en sık görülen Hb S ve nadir olarak görülen Hb D-Los Angeles, Hb E Saskatoon, Hb O Arab, Hb D İran ve Hb G-Coushatta gibi hemoglobin tiplendirilmesi mikroarray yöntemiyle yapılmıştır. Ayrıca 19 β talasemi hastasının mutasyon tiplendirilmesi yapılmış, bütün olguların çift heterozigot özellik gösterdiği ve 15 olgunun IVSI-110 mutasyon içerdiği gözlenmiştir. Anormal hemoglobin ve β talasemi mutasyonlarının bölgemize özgü çip tasarımı yapılarak çiplerin bu mutasyonlara özgü olduğuda kanıtlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Anormal hemoglobin, Talasemi, Mikroarray

ABSTRACT

The Determination of Hemoglobinopathies by Microarray Method

The inherited disorders of hemoglobin, the hemoglobinopathies, are the commonest single gene conditions in humans and genetic disorders of structure and synthesis of one or more of the globin polypeptide chains. The hemoglobinopathies fall into two groups: abnormal hemoglobin, and thalassemias. 42 abnormal hemoglobins have been identified in the Turkish population. The most frequently observed abnormal hemoglobins are HbS, HbD, and HbE. Thalassemias are inherited hemoglobinopathies resulting from a decreased rate or production of one or more of the globin chains of hemoglobin. In α Thalassemias the synthesis of α chains is diminished, In β Thalassemias the synthesis of β chains is diminished. α Thalassemias and β Thalassemias are common hemoglobinopathies in Turkey. Survey for α and β Thalassemias showed prevalence rates of % 3,3 ,% 3,7. The most common β thalassemia mutation is IVS I-110 in Turkey. In this study, general form HbS and rare form Hb D-Los Angeles, Hb E Saskatoon, Hb O Arab, Hb D Iran and Hb G-Coushatta Hb types have been worked on rather samples in Çukurova Region via microarray system. Besides, classification of mutation type of 19 β thalassemia patients have been studied, all of findings were shown that entire studies had double heterozygote characteristics and 15 studies of whole patients samples had IVSI-110 type mutation. Regional chip designs of mutation of Abnormal Hemoglobin and β -Thalassemia have been done and these chip designs have been proved that characteristics for Abnormal Hemoglobin and β -Thalassemia.

Key Words: Abnormal Hemoglobin, Thalassemia, Microarray

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan popülasyonlarında en yaygın görülen kalıtsal hastalıklardan birisi de hemoglobinopatidir. Hemoglobinopati, hemoglobin molekülünün polipeptid zincirlerindeki yapısal değişiklikler veya sentez bozukluklarından kaynaklanan bir kan hastalığıdır¹. Bu kalıtsal hastalık yoğun olarak Afrika, Asya ve Akdeniz ülkelerinde görülmekle birlikte göçlerle Avrupa, Amerika ve Avustralya'ya da yayılmıştır².

Anormal hemoglobinler hemoglobin molekülün yapısında yer alan globin zincirleri üzerindeki aminoasit değişikliği sonucu meydana gelmektedir. Milyonlarca insanın etkilendiği anormal hemoglobinlerin en yaygın olanları Hb S, Hb D, Hb E ve Hb C' dir³. Türk popülasyonunda bugüne kadar 42 anormal hemoglobin tanımlanmıştır. Bu 42 anormal hemoglobinin 13 tanesi α zincir varyantı, 24 tanesi β zincir varyantı, 1 tanesi gama zincir varyantı, 2 tanesi hibrid hemoglobin; 1 uzamış α zinciri ve 1 delesyon/insersiyon sonucunda uzamış β zincir varyantıdır⁴. Dünyada birinci sıklıkta gözlenen ve ilk belirlenen hemoglobin varyantı olan HbS geninin Çukurova bölgesinde taşıyıcı sıklığının %8,2 olduğu, sıklığın %3 ten %44 e kadar değiştiği saptanmıştır⁵. Ülkemizde 2. anormal hemoglobin Hb D Los Angeles olup görülme sıklığı % 0,2 olarak saptanmıştır⁶. Ülkemizde üçüncü sıklıkta gözlenmekte olan Hb E özellikle Çukurova bölgesinde bulunmaktadır ve taşıyıcı sıklığı %0,6- 2,4 olarak belirlenmiştir⁴.

Talasemiler hemoglobin molekülünün yapısında yer alan globin zincirlerinden birisinin veya birden fazlasının sentezindeki azalma veya tamamen yokluğu ile karakterize olan genetik bir hastalıktır. Otozomal mutant genler sonucu oluşur. Dünyada en sık görülen genetik hastalıktır. Özellikle Akdeniz, Orta Asya, Afrika'nın bazı bölümleri Hindistan ve Asya'yı içine alan kuşakta yüksek sıklıkla gözlenmektedir⁷⁻⁹. α -Talasemi; α globin üretimindeki genetik bozukluğa bağlı olarak α - globin zincir sentezinin azalması ya da yokluğuyla seyreden genetik bir hastalıktır¹⁰. β -Talasemiler, en yaygın görülen talasemi tipi olup hemoglobin molekülünün β - globin zincirinin hiç sentezlenmemesinden (β^0 talasemi) veya az miktarda sentezlenmesinden (β^+ talasemi) kaynaklanmaktadır¹¹. Türkiye'de taşıyıcı sıklığı % 2 oranındadır^{12,13}. Bu oran bazı bölgelerde artmaktadır, Çukurova bölgesinde ise %3,7 oranındadır¹⁴. β -Talasemiyi moleküler düzeyde araştıran çalışmalarda; Türkiye'de 43'ün üzerinde farklı mutasyonun olduğu ve β -Talaseminin moleküler düzeyde çok heterojen bir yapı gösterdiği saptanmıştır¹⁵⁻¹⁷. Bu mutasyonlardan

20 tanesi Çukurova bölgesinde grlmtir. IVS-1-110 Türkiye’de en sık rastlanılan mutasyondur¹⁴.

Dünya Sağlık rgt, dünyada hemoglobinopati taşıyıcı sıklığının % 5,1 olduğunu ve 266 milyon kişinin etkilendiğini bildirmiştir. Her yıl yaklaşık 300.000 hasta çocuğun dünyaya geldiği tahmin edilmektedir¹⁸. Günümüzde bu hastalıkların henüz etkin bir tedavisi bulunmamaktadır. Orak hücre ve talasemili hasta doğumları önlemenin ve bu hastaların eradikasyonunu sağlamanın tek yolu doğum öncesi tanı ile hasta bireylerin doğumunun nlenmesidir¹⁹. Bu amaçla bölgemizde taşıyıcı aile oranının yüksek olması ve hasta ocuk doğumunu önlemek amacıyla Çukurova Üniversitesi Tıp fakültesinde Doğum ncesi Tanı Merkezi kurulmuştur. Bu hastalıkların genetik tanısına yönelik çok çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Hızla artan dizilim bilgilerinden en yüksek kapasitede faydalanabilmek için yeni teknolojilere gereksinim duyulmuştur. Bu yeni teknolojiler arasında en güçlü olanlarından biriside oligonukleotidlerin veya tamamlayıcı DNA (complementary DNA, cDNA) parçalarının yüksek yoğunlukta yan yana dizilmeleri ile ortaya çıkan mikroarray (mikroçipler, mikrodizilimler) teknolojisidir²⁰. Mikroarraylerin en önemli avantajları, aynı anda birçok gen ile ilgili bilgi alınması, hızlı sonuç elde edilmesi, az sayıda deney yapılması, güvenilir olması ve sistem kurulduktan sonra ucuz olmasıdır^{21,22}. Böylece mikroarray cihazının kullanımının yaygınlatırılmasıyla bölgemize ve ülkemize özgün anormal hemoglobin ve talasemi mutasyon tiplerini tanıyan çipler tasarlanarak daha kısa sürede daha çok olguyu tanımlama olasılığı sağlanmış olacaktır.

2.GENEL BİLGİ

2.1.Hemoglobinin Yapısı

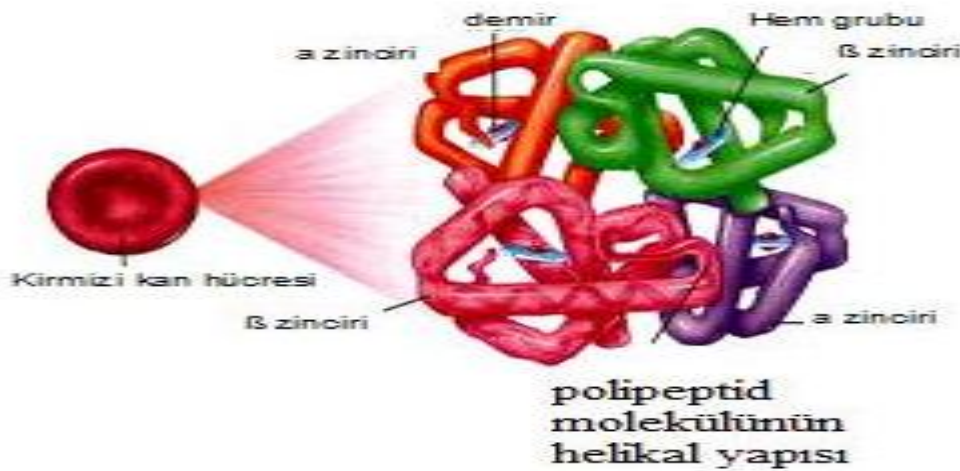
Eritrositlerin yapısında yer alan ve oksijen bağlama kapasitesi yüksek olan hemoglobin, oksijeni akciğerden dokulara, CO₂ ve protonları dokulardan akciğere taşır. Hemoglobinin bu özelliği organ ve dokuların işlevlerini yapabilmeleri için hayati öneme sahiptir²³.

Omurgalı eritrositlerinde bulunan hemoglobin molekülünün moleküler ağırlığı 64.500 dalton, maksimum çapı ise 6,4 nm' dir²⁴. Hemoglobin molekülü, hücre kuru ağırlığının % 60'ını, kan proteinlerinin 2/3'nü oluşturmaktadır. Erkeklerde 100 ml kanda ortalama 15 gr, kadınlarda ise 13 gr hemoglobin bulunmaktadır²⁵. Yenidoğanlarda ise bu değer yaklaşık 20 gr'dır²⁶.

2.1.1.Hemoglobinin Moleküler Yapısı

Tetramer yapıda olan hemoglobin molekülünün "globin" adı verilen protein parçası ile "hem" halkasından oluşmaktadır. Hemoglobin molekülünde bulunan hem halkası bütün hemoglobinlerde aynıdır. Buna karşılık globin zincirleri, aminoasitlerin cins, sıra ve sayısı açısından farklılık gösterir²⁴.

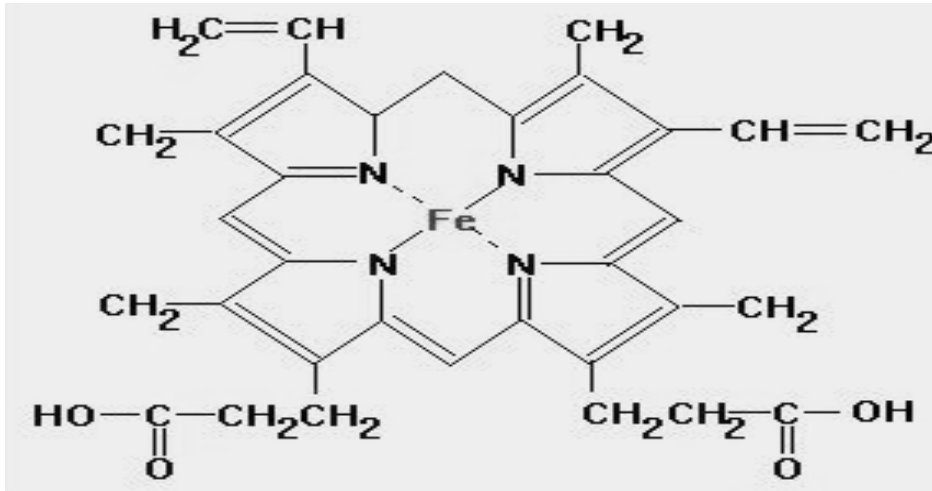
Molekülün globin kısmında 4 adet polipeptid zinciri bulunur, bu polipeptidlerin her biri, bir hem grubuna bağlıdır²⁴ (Şekil 1).



Şekil 1. Hemoglobin molekülünün yapısı.

2.1.2.Hemin Yapısı

Hem grubu, 4 pirok halkasından meydana gelen protoporfirin IX halka sistemi ile bir demir atomundan oluşmaktadır. Metenil köprüleriyle birbirine bağlanan dört pirok halkasından meydana gelen tetrapirok halkasına yan zincir olarak iki vinil, iki propiyonat ve dört metil bağlanmıştır²⁷. Fe atomu porfirin halkasının dört N' i ile bağlanarak hem halkasının ortasında tutunur. Hemin Fe⁺²'i her biri düzlemsel porfirin halkasının ayrı tarafında olan iki bağ daha yapar. Bunlardan biri globin molekülünün bir histidin kalıntısının yan zincirine bağlanırken diğeri ise oksijen bağlamaya uygundur. Böylelikle hemoglobin oksijen taşıma pozisyonuna sahip olur²⁸(Şekil 2).



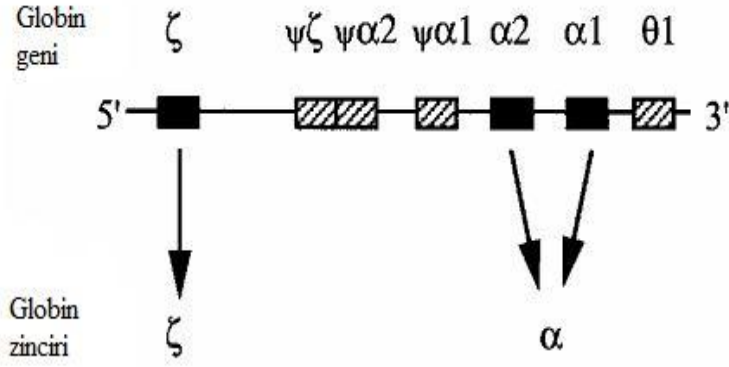
Şekil 2. Hemin yapısı.

2.1.3. Globin Zincir Gen Yapısı

Globin zincirlerinin aminoasit bilgileri iki farklı gen ailesinden oluşur. Her polipeptid zinciri bir Yunan alfabesi tarafından adlandırılır.

2.1.3.1. α -Benzer globin genler

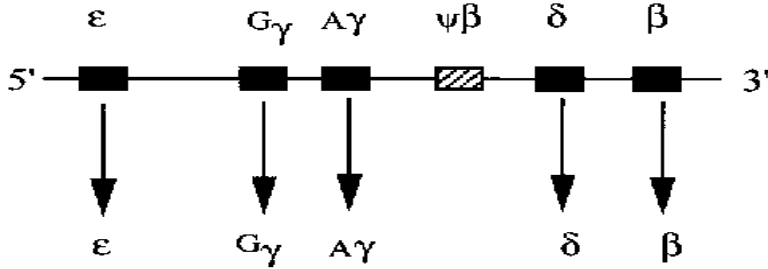
16. kromozomun kısa kolunun p 13,3 bölgesinde bulunmaktadır ve genomda yaklaşık 30 kb'lık bir yer tutar. 5' uçtan başlayarak 3' ucuna doğru ζ , $\psi\zeta$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$, α_2 , α_1 ve θ şeklinde sıralanmaktadır²⁹ (Şekil 3).



Şekil 3. α -Benzer globin genler.

2.1.3.2. β -Benzer globin genler

11.kromozomun kısa kolu üzerinde p14 bölgesinde bulunur. Genomda yaklaşık 50 kb'lık yer tutar. 5' uçtan başlayarak 3' ucuna doğru ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, $\psi\beta$, δ ve β şeklinde sıralanmıştır²⁹(Şekil 4).



Şekil 4. β -Benzer globin genler.

β lokusu üzerinde bulunan $G\gamma$ ile $A\gamma$ genleride yapısal olarak benzer protein ürünü vermektedir. Gama globin zincirlerinin bu iki geni 136.pozisyondaki aminoasit açısından farklılık gösterir. $G\gamma$ -globin zincirinde 136.aminoasit Glisin, $A\gamma$ globin zincirinde ise aynı pozisyonda Alanin bulunur. $A\gamma$ globin zincirinin ayrıca iki varyantı vardır. Bu

varyantlardan 75.aminoasitte Treonin içeren A γ T, İzolösin içeren A γ I olarak adlandırılır. A γ T varyantı özellikle bazı ırksal gruplarda sık gözlenir. Fetal yaşamda total gama zincirlerinin %75'ini G γ , %25'ini ise A γ oluşturur. Doğum sonrası bu oran değişir ve erişkinde A γ oranı %60'a yükselirken, G γ oranı ise %40 civarına düşer. Epsilon, gama, delta ve beta zincirleri 146,alfa zincirleri ise 141 aminoasitten oluşurlar. Bu globinleri kodlayan genler ise 3 ekson ve 2 introndan meydana gelmektedir^{29,30}.

Globin zincirini şifreleyen dizilerin olduğu gen bölgelerine ekson, proteine dönüşmeyen dizileri içeren bölgelere ise intron denilmektedir. Translasyona uğramamasına rağmen 5' ve 3' bölgelerindeki diziler oldukça önemli olup gen ekspresyonunda rol oynarlar^{29,30}.

β -globin geni, β -globin zincirindeki 146 aminoasidi kodlamak için gerekli bilgiyi, 3 ekson, 2 intronda içerirken 5' ve 3' düzenleyici bölgeleride kapsayan yaklaşık 1,8 kb uzunluğunda gen bölgesine sahiptir^{29,30}.

β -benzer genlerinde ekson 1 ilk 30 aminoasiti, ekson 2 ise 74 (31–104) ve ekson 3 de 42 aminoasidi (105–146) kodlamaktadır, α genide ekson 1 de ilk 31 aminoasiti, ekson 2 (32–99) 67 aminoasit ve ekson 3 ise (100–141) 41 aminoasidi kodlamaktadır^{29,30}.

β -globin geninde oluşan mutasyonlar β -talasemiye, orak hücreli anemiye ya da diğer anormal hemoglobinelere neden olmaktadır^{29,30}.

2.1.4. Normal Hemoglobinler

Normal hemoglobinde 4 hem halkası 2 farklı globin zincirinden oluşur. Erişkinde normalde üç tip hemoglobin bulunur. Bu hemoglobinlerde hem halkası aynı olup, globin yapısı farklıdır³¹.

Hb A: Normal bir erişkinde hemoglobin molekülünün yaklaşık %97'si Hb A' dır. Hb A, iki α ve iki β globin zincirinden oluşur. $\alpha_2\beta_2$ şeklinde gösterilir. α zincirleri 141 β zincirleri ise 146 aminoasitten oluşur. Erişkinlerde Hb A dışında iki minör hemoglobin grubu daha bulunur³¹.

Hb A₂: 2 α ve 2 δ globin zincirinden oluşur ve $\alpha_2\delta_2$ şeklinde gösterilir. Normal erişkinde %2–3 oranında bulunur. Hb A₂ oranı β talasemi taşıyıcılarında yükselir. Unstable hemoglobinopatilerde ve megaloblastik anemilerdede bazen yükselir. Buna karşın demir eksikliği anemisinde ve sideroblastik anemilerde azalır³¹.

Hb F: Fetus ve yeni doğanın temel hemoglobini olan Hb F ise ikinci minör hemoglobin olup 2 α ve 2 γ zincirinden oluşur, $\alpha_2\gamma_2$ şeklinde gösterilir. Erişkinde ortalama Hb F düzeyi %1'in altındadır³¹. Yeni doğan çocuklarda hemoglobinin % 70- 90 'nını oluşturur. Doğumdan sonra hızla düşerek 6. ayda % 5' e düşer. Hb F'in başlıca yükseldiği hastalıklar, hemoglobinopatiler ve talasemik sendromlardır. Bununla beraber ara sıra diğer hastalıklarda da Hb F düzeyinde artma olduğu bildirilmiştir. Bu hastalıklar arasında, konjenital ve akkiz aplastik anemiler, bazı lösemler çeşitleri, sideroblastik anemiler, paroksizmal nokturnal hemoglobinüri, megaloblastik anemiler sayılabilir. Embriyonik dönemde ise Portland I ve II, Gower I ve II hemoglobinleri sentezlenir. Portland I'nın (embriyonik) moleküler yapısında $\zeta_2\gamma_2$, Portland II'nin moleküler yapısında $\zeta_2\beta_2$, Gower I'nın (embriyonik) moleküler yapısında $\zeta_2\varepsilon_2$ ve Gower II (embriyonik)'nin moleküler yapısında $\alpha_2\varepsilon_2$ globin zincirleri bulunur^{32,33}(Tablo1).

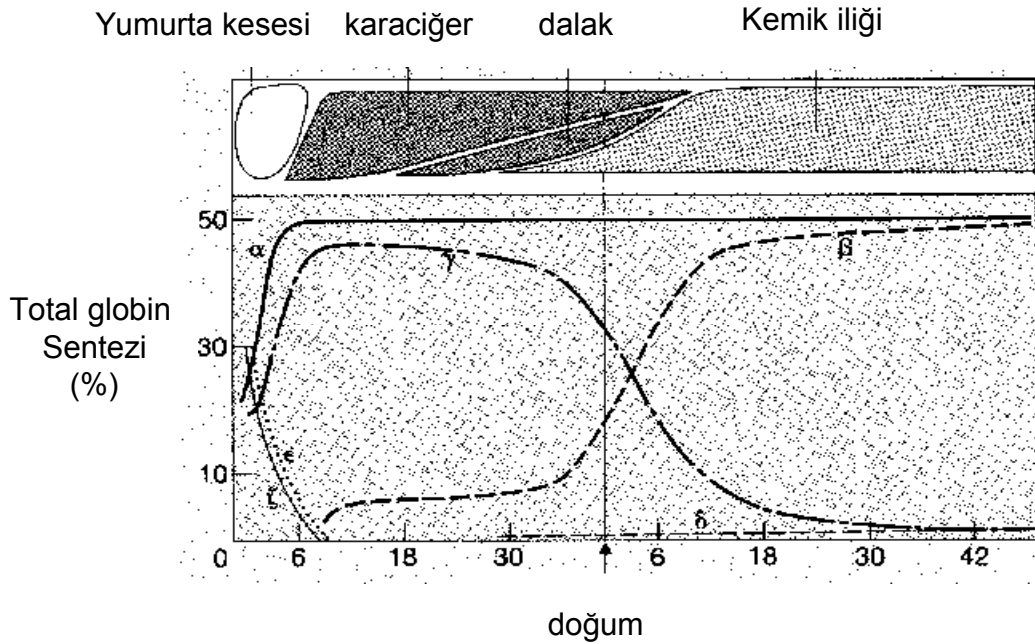
Tablo 1. Embriyonik, fetal ve erişkin dönemde sentezlenen insan hemoglobinleri.

İsim	Formül	Erişkin Değeri
Embriyonik Hemoglobin		
Hemoglobin Gower 1	$\zeta_2\varepsilon_2$	
Hemoglobin Portland I	$\zeta_2\gamma_2$	
Hemoglobin Portland II	$\zeta_2\beta_2$	
Hemoglobin Gower 2	$\alpha_2\varepsilon_2$	
Fetal Hemoglobin		
Hemoglobin F	$\alpha_2^G\gamma_2^*$	%1'den az
	$\alpha_2^A\gamma_2^*$	
Erişkin Hemoglobin		
Hemoglobin A	$\alpha_2\beta_2$	%96
Hemoglobin A ₂	$\alpha_2\delta_2$	%2,5-3,5

2.1.5. Hemoglobin Dönüşümleri

Hemoglobin sentezi prenatal ve postnatal yaşam süresince belirgin gelişimsel değişim gösterir. Tüm evrelerde değişmeyen α ve β benzer globin zincirler arasındaki dengedir. α benzer ve β benzer globin genlerinin her ikisi de gelişim evrelerinin farklı dönemlerinde (embriyo, fetüs, yeni doğan ve erişkin) aktive olurlar. Bu genlerin ardışık aktivasyonu sonucu ise farklı gelişim evrelerinde farklı hemoglobinler üretilir^{24,34}.

Eritropoezin mezoblastik döneminde ilk sentezlenen hemoglobin Hb Gower 1'dir. 2 zeta (ζ_2) ve 2 epsilon (ϵ_2) zincirinden oluşur. Bundan kısa bir süre sonra α ve β zincir sentezi başlar. Bu sırada diğer üç embriyonik hemoglobin; Hb Portland I ($\zeta_2\gamma$), Portland II ($\zeta_2\beta_2$) ve Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) gözlenir. Gebeliğin 6.cı haftasından sonra γ zincir sentezi başlar, ardından gebeliğin 13. haftasında embriyonik hemoglobinler kaybolur ve fetüsta sadece Hb F bulunur. Gebeliğin ilerlemesiyle γ zincirlerindeki dereceli azalmaya paralel olarak β -zincir sentezinde artma gözlenir. Gebeliğin 35.ci haftasında %85'e düşen Hb F düzeyleri, haftada % 3 – 4 oranında azalmaya devam ederken bu sırada Hb A sentezi artmaya başlar³⁵(Şekil5).



Şekil 5. Embriyonik ve fetal gelişimin farklı evrelerinde globin zincir sentezi.

2.2.Hemoglobinopatiler

Dünyada en yaygın görülen kalıtsal hastalıklardan birisi de hemoglobinopatidir. Hemoglobinopati, hemoglobin molekülünün polipeptid zincirlerindeki yapısal değişiklikler veya sentez bozukluklarından kaynaklanan bir kan hastalığıdır. Talasemi ve anormal hemoglobinler olmak üzere iki kısımda incelenir¹.

Dünya Sağlık Örgütü, dünyada hemoglobinopati taşıyıcı sıklığını % 5,1 olarak ve etkilenen kişi sayısını 266 milyon olarak açıklamıştır. Her yıl yaklaşık 300.000 hasta çocuğun dünyaya geldiği bildirilmiştir¹⁸. Bu kalıtsal hastalık yoğun olarak Afrika, Asya ve Akdeniz ülkelerinde görülmekle birlikte göçlerle Avrupa, Amerika ve Avustralya'ya da yayılmıştır².

2.2.1.Anormal Hemoglobinler

Hemoglobin molekülün yapısında yer alan globin zincirleri üzerindeki aminoasit değişikliği sonucu meydana gelmektedir. Bu genlerin ekzon bölgesindeki veya bu bölge dışındaki nokta mutasyonları, insersiyonlar ve delesyonlar çeşitli hemoglobin varyantlarının oluşumuna yol açmaktadır³⁶.

Mutasyonların büyük bir kısmını nokta mutasyonları oluşturmaktadır. Bu mutasyonlar bazen polipeptid zincirinde tek bir aminoasit değişimine neden olmaktadır. Delesyonlar polipeptid zincirinin kısalmasına, insersiyonlar ise uzamasına yol açmaktadır. Homolog olmayan crossing-over sonucu oluşan bazı varyantlar ise normal uzunlukta hibrit polipeptid zincirleri içermektedirler³⁶.

2.2.1.1. Anormal Hemoglobin Sendromları

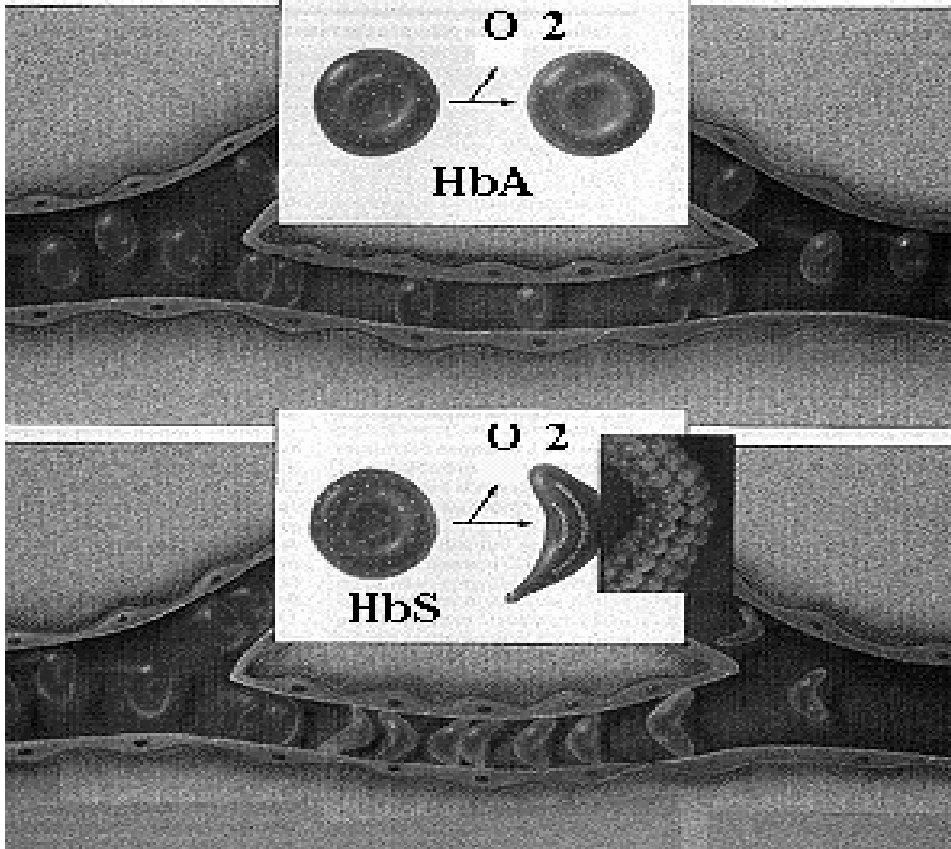
2.2.1.1.1. Hb S (β 6 (A3) Glu→ Val: GAG-GTG)

Dünyada birinci sıklıkta gözlenen ve ilk belirlenen hemoglobin varyantıdır. Özellikle Afrika'da (ekvator) ve bu bölgeden göç eden siyahların yaşadığı ülkelerde, daha az sıklıkta Akdeniz ülkeleri, Suudi Arabistan ve Hindistan'ın bazı bölgelerinde gözlenir^{3,37}.

Hb S molekülü, Hb A' nın β globin zincirindeki 6.aminoasidi olan glutamik asit yerine valinin geçmesi yani glutamik asiti kodlayan GAG nükleotid dizisinde adenin yerine timinin (GTG) geçmesine neden olan nokta mutasyonu sonucu oluşmaktadır^{23,29}.

Hb S içeren eritrositler O_2 azlığı sonucunda polimerleşerek kırmızı hücrelerin orak şeklini almasına neden olmaktadır. Oluşan bu hücreler kısa ömürlüdürler ve kapiller damarları tıkararak normal kan akımında bozulma ve lokal hipoksiye neden olurlar^{23,29} (Şekil 6).

Bu varyant Orta Afrika'daki siyah populasyonda yaygındır. Bu bölgelerde yüksek oranda sıtma görülmektedir. Hb S heterozigot bireylerin Plasmodium Falciparum parazitiye karşı, Hb A taşıyanlardan daha dirençli olduğu ve bu bireylerde hastalığın daha hafif seyrettiği saptanmıştır. Bu durum biyolojik direnç ve çevre arasındaki ilişkiye bir örnek olup dengelenmiş polimorfizm olarak bilinir^{2,38}.



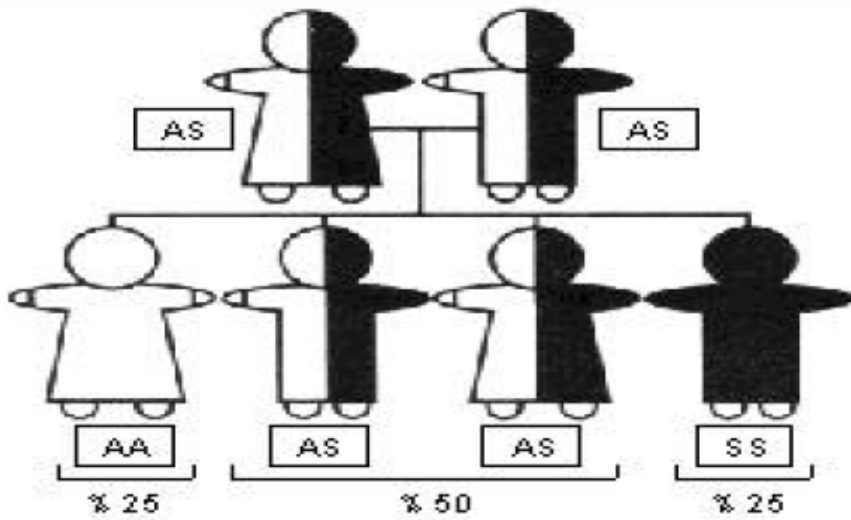
Şekil 6. HbS'in oraklaşması.

Hb S genini heterozigot taşıyan (HbA/S genotipli) bireyler, orak hücre taşıyıcısıdır. Eritrositlerde Hb A ve Hb S birlikte bulunur. Bu bireylerde dolaşımdaki hemoglobin S konsantrasyonu % 50'den azdır. Orak hücre taşıyıcılarının kan morfolojileri, fiziksel gelişimleri, aktiviteleri ve yaşam süreleri normaldir^{1,3}.

Hb S/S genotipli bireylerde otozomal resesif kalıtsal hastalık olan “orak hücre anemisi” (Sickle cell anemia) görülür. Anemi, bazı enfeksiyonların şiddetinde artış, organ hasarına yol açabilecek doku enfarktüsleri ve tekrarlayan ağrılar bu sendromun klinik belirtileri arasında yer almaktadır. Hastalar genellikle ilk yaşlarda kaybedilmektedir. Bu bireylerin eritrositlerinde, Hb S ve Hb F bulunmaktadır^{3,26}.

Bir ebeveynen Hb S diğer ebeveynen β talasemi kalıtımı söz konusu ise birey Hb S/ β talasemi olarak tanımlanır. Hb S ile β talasemi kombinasyonunu taşıyan hastaların klinik tablolarında değişkendir. Hb S/ β mutasyonlarının büyük bir oranı haplotip 19 (benin) olarak saptanmıştır. Hb S mutasyonun 9 farklı β talasemi mutasyonu ile kombinasyonu gözlenmiştir. Bunlar IVS I-110/S, IVSI-1/S, IVS II-745/S, IVS II-1/S, IVS I-6/S, Cd39/S, Cd44/S, -30/S ve FSC8/S 'dir³⁹.

Her iki ebeveynin de Hb S taşıyıcısı olduğu durumlarda, doğacak çocuğun Hb S taşıyıcısı olma oranı % 50, orak hücre sendromlu doğma riski % 25, normal hemoglobinli doğma oranı ise % 25'dir. Bu oranlar her gebelik için aynıdır⁴⁰(Şekil 7).



Şekil 7. Hb S taşıyıcısı olma durumunda doğacak çocukların Hb genotipleri ve oranları.

2.2.1.1.2. Hb D Los Angeles (β 121(GH4) Glu→ Gln: GAA→CAA)

β globin zincirinin 121.pozisyonundaki glutamik asit yerine glutamin geçmiştir. Hb D Los Angeles, D-Punjab, D-North Carolina, D-Portugal, Oak Ridge ve D-Chicago olarak adlandırılmaktadır. Hindistan’da Punjab Sih’lerinde %2–3 oranında görülürken İran, Amerikalı siyahlar ve beyaz ırktada nadiren gözlenmiştir. Ülkemizde 2.en yaygın anormal hemoglobin Hb D Los Angeles olup görülme sıklığı % 0,2 olarak saptanmıştır. Çukurova yöresinde ise Hb D- β talasemi birlikteliği bulunmuştur. Hb D- β talasemi taşıyıcıların hematolojik verileri homozigot Hb D taşıyıcılarından farklıdır^{3,6}.

Atalay ve arkadaşları Denizli ilinde en sık gözlenen hemoglobinopatinin HbD-Los Angeles (%57,8) olduğunu bildirmişlerdir⁴¹.

Taşıyıcılarda klinik, hematolojik yada fizyolojik herhangi bir anomali gözlenmemiştir. Homozigot olgularda ise orta derecede hemolitik anemi ve dalak büyümesi görülmüştür. Hb F ve HbA₂ düzeyleri ise normaldir^{10,24}.

Hb A/D heterozigot ve Hb D/D homozigot genotipli bireylerde herhangi bir semptom görülmemektedir. HbS/D genotipli bireylerde orak hücre sendromu görülmektedir³.

pH 8,6’da elektroforetik mobilitesi Hb S ile aynıdır. Hb S’ den ayırımı solübilitesinin normal oluşu ve asit pH’daki farklı göçüdür. Tam ayırımı HPLC ve mutasyon analizleri ile yapılır, oraklaşma testi negatiftir^{10,24}.

2.2.1.1.3. Hb O-Arab (β 121(GH4) Glu→ Lys: GAA→AAA)

β globin zincirinin 121. aminoasidi olan glutamikasit yerine lizin geçmektedir. Homozigot olgularda anemi görülmez. Amerikan zencilerinde, Suudi Arablarında, Sudanlılarda, Bulgarlarda, Türk halkı ve Kıbrıs Türklerinde gözlenmiştir. Elektroforetik mobilitesi Hb A₂ ile aynıdır⁴.

2.2.1.1.4. Hb E (β 26 (B8) Glu→ Lys: GAG→AAA)

β Globin zincirindeki 26.aminoasit olan glutamik asitin yerine lizinin geçmesi yani GAG → AAG baz değişimi sonucu oluşur. Bu değişim, pre-mRNA’nın fonksiyonel mRNA’ya dönüşüm işleminde anormalliğe neden olduğundan Hb E, olması gerektiğinden daha az miktarda sentezlenmektedir^{24,36}.

Dünyada ikinci sıklıkla görülen hemoglobin varyantıdır. Yaklaşık 1 milyon homozigot ve 30 milyon heterozigot olgu olduğu bildirilmiştir ve bu olguların %80'ni Güneydoğu Asya'da yaşamaktadır. Thailand, Combodia ve Laos'un bazı bölgelerinde görülme sıklığı % 30 -40'a ulaşmaktadır^{42,43}.

Ülkemizde üçüncü sıklıkta gözlenmektedir (Hb S,Hb D, Hb E), özellikle Çukurova bölgesinde bulunmaktadır ve taşıyıcı sıklığı %0,16- 2,4 olarak belirlenmiştir⁴.

Hb A/E heterozigotlarında herhangi bir semptom görülmemektedir. Eritrositlerdeki Hb E oranı yaklaşık % 27 civarındadır. Hb E/E homozigot bireylerinde, orta derecede anemi görülmekte olup eritrositlerin ömrü biraz kısalmıştır³⁶.

Hb E talasemik fenotip içerdiğinden diğer hemoglobin varyantlarından farklı olarak kırmızı kan hücrelerinde mikrositoz ve hipokromi gözlenir. Bazı hastalar asemptomatiktir. Hafif sarılık olduğu gibi, karaciğer ve dalakta hafifçe büyümüştür. Periferik yaymada şiddetli hipokromi ile beraber target hücreleri bulunur^{42,43}.

pH 8,6'da elektroforetik mobilitesi Hb C' ye çok benzesede kesin ayırım asit pH'da agar jel elektroforezi, HPLC ve mutasyon analizleri ile yapılmaktadır⁴⁴.

2.2.1.1.5. Hb E Saskatoon (β 22(B4) Glu \rightarrow Lys: GAA \rightarrow AAA)

β globin zincirininin 22.aminoasit olan glutamik asitin yerine lizin geçmektedir. Çukurova, Kayseri, Aksaray ve Antalya'da saptanmıştır. Hb E' li olgularda Hb yüzdesi Hb E Saskatoon olgularından daha az olarak tespit edilmektedir. Ayrıca Hb E' li olgular mikrositer ve hipokrom özelliği göstermektedir. Bu iki varyant birbirinden HPLC ve moleküler analizle ayırt edilebilmektedir⁴⁵.

2.2.1.1.6. Hb G- Cousatta (β 22(B4) Glu \rightarrow Ala: GAA \rightarrow GCA)

G-Saskatoon, G-Hsin Chu, G-Taegu olarak adlandırılır. Bölgemizde görülen diğer nadir hemoglobin varyantıdır Hb G- Cousatta'dır. Oraklaşma özellik göstermeyen Hb G-Coushatta seluloz asetat elektroforezinde elektroforetik mobilitesi HbS ve HbD'ye benzer özellik gösterir. Homozigot ve heterozigot hali normaldir. Çinlilerde, Türklere, Japonlarda, Korelilerde, Hindistanda gözlenmiştir¹.

2.2.1.1.7. Hb D-İran (β 22 (B4) Glu→Gln: GAA→CAA)

Hb D-İran ilk kez 1973'de tanımlanan β zincir varyantıdır. Hb S ve β talasemiyle kombinasyon oluşturmaktadır. Seluloz asetat elektroforezinde HbS ve HbD gibi hareket eder. Heterozigot hali hematolojik olarak normaldir. İranlılarda, Pakistanlılarda, İtalyanlarda ve Türklerde gözlenmiştir¹.

2.2.1.1.8. Hb C (β 6(A3) Glu→Lys: GAG→AAG)

β globin zincirinin 6.aminoasidi olan glutamik asit yerine lizin geçmektedir. Bu değişiklik eritrositin dikdörtgen şeklinde deforme olmasına ve kristalleşerek çökmesine neden olmaktadır Batı Afrika kıyılarında taşıyıcılık oranı %25 civarındadır. Amerika birleşik devletleri'ndeki siyah ırkta ise %3 oranında gözlenmiştir. Bu hemoglobinin varyantının da malaraya karşı direnç sağladığı saptanmıştır^{3,24}.

Hb C, elektroforetik tekniklerle ayrılamaz. Tam olarak ayırım kolon kromatografisi, HPLC ve mutasyon analizleriyle yapılabilmektedir⁴⁶.

Hb C taşıyıcısı olan heterozigot bireylerde önemli bir klinik belirti görülmez genel olarak asemptomatiklerdir. Periferik yaymada fazla miktarda target hücrelerinin bulunması ile şüphe edilebilir. Ancak bazı vakalarda target hücrelerindeki artış belirgin olmayabilir^{29,30}.

Hb C/C homozigot bireylerde kronik hemolitik anemi ve splenomegali görülmektedir. Periferik yaymada target hücrelerinin belirgin olduğu gözlenir. Kırmızı kürelerin % 30 ila % 100' ü target hücreleridir. Splenomegali hemen her vakada gözlenir. Bazı vakalarda sarılık bulunabilir²⁶.

Hb S/C heterozigot bireylerinde ise "Hemoglobin SC Hastalığı" görülür. Bu hastalar orak hücre sendromundaki klinik tabloyu gösterirler³.

2.2.1.2. Türkiye’de Görülen Anormal Hemoglobinlerin Dağılımı

Anormal hemoglobinlerin dağılımı coğrafik lokalizasyon ve ırksal gruplara göre oldukça farklılık göstermektedir. Milyonlarca insanın etkilendiği anormal hemoglobinlerin en yaygın olanları Hb S, Hb D, Hb E ve Hb C’ dir³.

Türk popülasyonunda bugüne kadar 42 anormal hemoglobin tanımlanmıştır. Bu 42 anormal hemoglobinin 13 tanesi α zincir varyantı, 24 tanesi β zincir varyantı, 1 tanesi gama zincir varyantı, 2 tanesi hibrid hemoglobin; 1 uzamış α zinciri ve 1 delesyon/insersiyon sonucunda uzamış β zincir varyantıdır⁴(Tablo 2).

Bu anormal hemoglobinlerden bazıları ilk defa Türk popülasyonunda tanımlanmıştır⁴. β Zincir varyantlarından, Hb Ankara, Hb Hakkâri, Hb J- Antakya ve Hb İstanbul ilk kez Türklerde tanımlanmıştır⁴⁷. A gama varyantı olan Hb F- Başkent (128 Ala \rightarrow Thr) ilk kez Ülkemizde tanımlanmıştır⁴. α Zincir varyantlarından, Hb Adana; 59 Gln \rightarrow Asp α^0 talasemi ile birlikte tespit edilmiştir ve bu hastada Hb Barts , Hb A’ dan sonra ikinci major hemoglobin olduğu gösterilmiştir⁴⁸.

Tablo 2. Türkiye’de gözlenen anormal hemoglobin varyantları.

No	Hemoglobin adı	Aminoasit değişimi	Mutasyon
Tek baz değişimli alfa zincir varyantları			
1	O-Padova	30 Glu \rightarrow Lys	GAG \rightarrow AAG
2	Hasharon	47 Asp \rightarrow His	GAC \rightarrow CAC
3	Montgomery	48 Leu \rightarrow Arg	CTG \rightarrow CGG
4	Adana	59 Gly \rightarrow Asp	GGC \rightarrow GAC
5	J-Anatolia	61 Lys \rightarrow Thr	AAG \rightarrow ACG
6	Ube-2	68 Asn \rightarrow Asp	AAC \rightarrow GAC
7	Q- Iran	75 Asp \rightarrow His	GAC \rightarrow CAC
8	Moabit	86 Leu \rightarrow Arg	CTG \rightarrow CGG
9	M-Iwate	87 His \rightarrow Tyr	CAC \rightarrow TAC
10	Çapa	94 Asp \rightarrow Gly	GAC \rightarrow GGC
11	G-Georgia	95 Pro \rightarrow Leu	CCG \rightarrow CTG
12	Strumica	112 His \rightarrow Arg	CAC \rightarrow CGC
13	J-Meerut(J Birming ham)	120 Ala \rightarrow Glu	GCG \rightarrow GAG
Tek baz değişimli beta zincir varyantları			
14	S	6Glu \rightarrow Val	GAT \rightarrow GTG
15	C	6 Glu \rightarrow Lys	GAG \rightarrow AAG
16	Ankara	10 Ala \rightarrow Asp	GCC \rightarrow GAC

17	E-Saskatoon	22 Glu→ Lys	GAA →AAA
18	G-Coushatta	22 Glu →Ala	GAA→ GCA
19	D- Iran	22 Glu →Gln	GAA→ CAA
20	E	26 Glu→ Lys	GAG→ AAG
21	Knossos	27 Ala→ Ser	GCC→ TCC
22	Hakkâri	31 Leu→ Arg	CTG →CGG
23	G-Copenhagen	47 Asp→ Asn	GAT→ AAT
24	SummerHill	52 Asp→ His	GAT→ AAT
25	Hamadan	56 Gly→ Arg	GGC→ CGC
26	J-Antakya	65 Lys→ Met	AAG→ ATG
27	City of Hope	69 Gly→ Ser	GGT→ AGT
28	J-Iran	77 His→ Asp	CAC →GAC
29	G-Szuhu	80 Asn→ Lys	AAC→ AAA veya AAG
30	İstanbul Saint Etienne	92 His→ Gln	CAC→ CAA veya CAG
31	N-Batimore	95 Lys→ Glu	AAG→ GAG
32	Köln	98 Val→ Met	GTG→ ATG
33	Los Angeles (D-Punjab)	121 Glu→ Gln	GAA→ CAA
34	O-Arab	121 Glu→ Lys	GAA→ AAA
35	Beograd	121 Glu →Val	GAA→ GTA
36	Sarrebourg	131 Gln→ Arg	CAG→ CGG
37	Bronckton	138 Gln→Arg	GCT→ CCT
Tek baz değişimli gama zincir varyantları			
38	F-Başkent	128 Ala→Thr	GCT→ACT
39	Lepore-Boston- Washington		
40	P- Nilotic		
41	Constant Spring	Alfa 142	
42	Antalya Unstable	β zincirinde delesyon	

Türkiye’de gözlenen 42 anormal hemoglobin varyantlarından 8 tanesinde unstabil hemoglobinlerdendir (Tablo 3). Bunlardan Hb İstanbul, Aksoy tarafından genç bir Türk hastada bulunan unstabil bir hemoglobindir. Daha sonra Hb İstanbul, Fransız araştırmacılar tarafından başka bir hastada Hb Saint Etienne olarak rapor edilmiştir^{4,47}.

Tablo 3. Türkiye’de gözlenen unstabil hemoglobinler

No	Hemoglobin adı	Aminoasit değişimi	Mutasyon
1	Hasharon	47 Asp→ His	GAC→ CAC
2	Adana	59 Gly→ Asp	GGC→ GAC
3	Moabit	86 Leu→ Arg	CTG →CGG
4	Çapa	94 Asp→ Gly	GAC→ GGC
5	Hakkâri	31 Leu→ Arg	CTG →CGG
6	İstanbul Saint Etienne	92 His→ Gln	CAC→ CAA veya CAG
7	Köln	98 Val→ Met	GTG→ ATG
8	Constant Spring	Alfa 142	
9	Antalya	β Zincirinde delesyon	

Türkiye’de 3 tür talasemik anormal hemoglobin saptanmıştır⁴ (Tablo 4).

Tablo 4. Türkiye’de saptanan talesemik anormal hemoglobinler.

No	Hemoglobin adı	Aminoasit değişimi	Mutasyon
1	E	β 26 Glu→Lys	GAG →AAG
2	Knossos	β 27 Ala →Ser	GCC→ TCC
3	City of Hope	β Gly→ Ser	GGT→ AGT

Hb Knossos basit bir elektroforetik incelemeyle belirlenememektedir. Türkiye’de sadece iki vakada gözlenmiştir ve iki farklı β talasemi mutasyonu ile heterozigot olarak tespit edilmiştir⁴.

Hb E ise en yaygın gözlenen talasemik hemoglobinopatilerden birisidir. Türkiye’de ise özellikle Çukurova bölgesinde Eti –Türkleri arasında %0,16–2,4 oranında saptanmıştır. Türkiye’de β talasemi ile beraber heterozigot olarak gözlenen anormal hemoglobin varyantlarında saptanmıştır⁴ (Tablo 5).

Tablo 5. β talasemi/anormal hemoglobin varyantları birlikteliği

Anormal hemoglobinler	Bölge	Sıklığı
Hb S	Türkiye'nin güneyi	Yaygın
Hb D/ IVS I-110	K.Maraş, Eskişehir	2 ailede
Hb O Arab/ IVS I-110		
Hb O Arab/ IVS II-1		1 ailede
Hb E	Çukurova	
Hb E Saskatoon/ IVS I-6		1 ailede
Hb C/ IVS II-745	Antalya	1 ailede
Hb Knossos/ FSC 8	Antalya	1 ailede
Hb Knossos/ IVSI-1	İzmir	1 ailede
Hb City of Hope/ β talasemi		
Hb Strumica/ β talasemi	Bursa	1 ailede
Hb Beograd+ BTT		1 ailede

2.2.1.3. Çukurova Bölgesinde Görülen Anormal Hemoglobinlerin Dağılımı

Yüreğir ve arkadaşları Çukurova'da HbS ve G6PD enzim eksikliği ve aralarındaki ilişki adlı çalışmalarında HbS geninin ortalama % 8,2 oranında olduğunu, bu genin Eti Türklerine özgü olduğunu, sıklığın yöresel olarak %3 'ten % 44'e kadar değiştiğini, gen sıklığının Antakya, Adana, Mersin ve Tarsus'da yüksek; klinik seyrin Antakya'da hafif diğer bölgelerde ise ağır olduğunu saptamışlardır⁴⁹.

Yüreğir ve arkadaşları Çukurova'da orak hücre anemili hastalarda haplotipler adlı çalışmada Çukurova Bölgesinde rastlanan HbSS'li olguların incelenmesinde Amerikan zenci HbSS'li olgular ile benzerlik gösterdiğini, Çukurova'da rastlanan HbSS'lilerin Benin Cezayir(haplotip 19) tipi olduğunu, Amerikan zencilerinde ise Benin-Cezayir ile birlikte Merkezi Afrika tipi (haplotip 20) olduğunu saptamışlardır⁵.

Kılınç ve arkadaşları Adana bölgesinde hemoglobin S sıklığını 0,78 olarak rapor etmiştir. Bir vakada hemoglobin Q-İran, diğer bir vakada anormal bir alfa zincir varyantı olan hemoglobin O-Padova, iki vakada ise hemoglobin D bulmuşlardır⁵⁰.

Yüreğir ve arkadaşları Çukurova'daki risk altındaki hemoglobinopatilerin populasyon çalışmasında orak hücre anemisi taşıyıcı sıklığını %8,2 olarak rapor etmiştir ayrıca bölgede talasemik özelliğe sahip olan HbE taşıyıcılık oranında %1 olduğunu bildirmişlerdir⁵¹.

Kılınç ve arkadaşları İçel ilinde Orak hücre anemi taşıyıcı oranını %6,4 olarak saptamışlardır⁵².

Kılınç Türkiye'deki hemoglobinopatiler adlı çalışmasında HbS taşıyıcı sıklığının Çukurova bölgesinde % 3–47 arasında değiştiğini göstermiştir⁵³.

2.2.2. Talasemiler

Hemoglobin molekülünün yapısında yer alan globin zincirlerinden birisinin veya birden fazlasının sentezindeki azalma veya tamamen yokluğu ile karakterize olan genetiksel bir hastalıktır⁷⁻⁹.

Talasemi ilk defa 1925'de hayatlarının ilk yıllarında derin anemi ve splenomegali gelişen bebekleri tanımlayan pediatrist Thomas Cooley tarafından tarif edilmiştir. Daha sonra benzer vakaların görülmesi üzerine bu herediter hemolitik anemiye Van Jaksch anemisi, splenik anemi, eritroblastozis ve Akdeniz anemisi gibi adlar verilmiştir. George Whipple ve Lesley Bradford inceledikleri vakaların Akdeniz civarı ülkelerden geldiğini saptadıkları hastalığa Yunanca deniz anlamına gelen “Thalassemia” adını vermişlerdir. Daha sonra bu hastalığın yalnız Akdeniz ülkeleri toplumlarında olmadığı diğer toplumlarda da bulunduğu saptanmıştır⁵⁴.

Talasemiler otozomal mutant genler sonucu oluşur. Dünyada en sık görülen genetik hastalıktır. Özellikle Akdeniz, Orta Asya, Afrika'nın bazı bölümleri Hindistan ve Asya'yı içine alan kuşakta yüksek sıklıkla gözlenmektedir. Azalmış veya sentezlenemeyen globin zinciri veya zincirlerine göre sınıflandırılır. En iyi tanımlanan tipleri α , β , δ , $\delta\beta$ ve $\gamma\delta\beta$ talasemilerdir⁷⁻⁹.

2.2.2.1. β -Talasemi

β - Talasemiler, en yaygın görülen talasemi tipi olup hemoglobin molekülünün β -globin zincirinin hiç sentezlenmemesinden (β^0 talasemi) veya az miktarda sentezlenmesinden (β^+ talasemi) kaynaklanmaktadır^{11,36}.

β^0 talasemilerin moleküler düzeyde üç tipi tarif edilmiştir; β -globin mRNA'sının hiç sentezlenemediği durumlar, fonksiyon görmeyen mRNA'nın sentezlendiği durumlar, fonksiyonel β - globin mRNA'sının translasyon mekanizmasındaki bozukluktan dolayı kullanılmadığı durumlar^{11,36}.

β^+ talasemilerde, β -globin mRNA yapımının azalmasından dolayı β -globin zincir sentezinde değişik derecelerde olmak üzere azalmıştır^{11,36}.

2.2.2.1.1. β Talasemilerde Tanımlanan Mutasyon Tipleri

β - Talaseminin en yaygın moleküler patolojisi nokta mutasyonu veya β globin genindeki birkaç baz çiftlik delesyon veya insersiyonu kapsayan mutasyonlardır. Bu mutasyonların ilk 40'ı β -globin geninin klonlanmasını takiben, DNA dizi analizi ile tanımlanmıştır. PCR yöntemi ve direkt DNA dizi analizi ile son 20 yılda, β -talasemiye yol açtığı bilinen mutasyonların sayısı büyük bir hızla artmış ve 200'ü geçmiştir. Bu mutasyonların belirlenmesi risk altındaki fetusların prenatal tanısını kolaylaştırmıştır⁵⁵.

Nokta mutasyonları RNA transkripsiyonunun başlamasını , RNA processingini veya RNA stabilitesini önleyerek normal RNA globin sentezini önler. Buna karşın frameshift veya zincir mutasyonları translasyonu bloke ederler⁵⁶.

2.2.2.1.2. β Talasemi Sendromları

2.2.2.1.2.1. β Talasemi Minör

Bir β talasemi alleleline sahip olan erişkin klinik olarak sağlıklıdır. β talasemi geninin heterozigot (Hb A/ β tal) taşınması durumuna β Talasemi Minör denilmektedir. β talasemi heterozigotun önemli bir özelliği Hb A₂ seviyesi normale göre artmıştır. Düşük MCV (80 fl) ve yüksek Hb A₂ (> % 3,7) β talasemiye düşündürmektedir. Hb F oranı artabilir (%1–5). Bu bireylerde mikrositer anemi ve hipokrom görülmektedir^{1,3,11}.

2.2.2.1.2.2. β Talasemi Major

İki β^0 allelini taşıyan homozigot veya çifte heterozigot vakalarda β globin zinciri hiç sentezlenemez. β talasemi majorlu bebek doğduğunda normaldir, fakat 6 aydan sonra 1 yıla kadar derin anemi gelişmektedir. Kalıtsal olan talasemi major, hamilelik süresince fetusu etkilemez. Her iki β globin geninde görülen talasemik mutasyon ağır anemi, büyüme geriliğine, hipokromik, mikrositer anemi hemoliz ve rejenerasyon bulgularına neden olmaktadır. β talasemi majorlu hasta yaşamın erken evresinden itibaren transfüzyona bağımlıdır^{1,3,11}.

β globin mRNA'sının yokluğu veya çok az miktarda sentezlenmesi sonucu bu bireylerde yeterli oranda β globin sentezlenemediğinden bunun yerine α globin zincir sentezi artmaktadır. Bu bireylerde fonksiyonel hemoglobin oluşturmak için γ zincirleri aşırı miktardaki α globin zincirlerinin bir kısmı ile birleşerek Hb F'i oluştururlar. Bireylerdeki hemoglobinin % 60-85'i HbF şeklindedir^{1,3,11}.

2.2.2.1.2.3. β Talasemi İntermedia

Talasemi taşıyıcıları ile talasemi major arasındaki spektrumu içine almakta olup hastaların çoğu transfüzyona bağımlı değildir. Zencilerde beta talasemi intermedianın en sık nedeni -88(C-T), -29 (A-G) gibi promotör bölge mutasyonlarıdır. Buna karşın Akdeniz ülkelerinde ise homozigot IVSI-6 (T-C) bozukluğu sıklıkla beta talasemi intermediaya neden olmaktadır^{1,3,11},

2.2.2.1.3. Dünyada β –Talasemi Dağılımı

Yüksek oranda talasemi geni taşıyan toplumları içine alan dünya talasemi kuşağı; Akdeniz'den başlayıp Ortadoğu üzerinden Güneydoğu Asya ülkelerine kadar uzanmaktadır. Dünya nüfusunun % 3'ü (250 milyon) β talasemi geni taşımaktadır. En sık olarak Akdeniz ülkelerinde (0,5–14) ; Kıbrıs (14,7) ,Sardunya (%12,6), Sicilya (%5,9) ve Yunan adalarında (%5–20) insidansın yüksek olması kapalı toplum olmalarından kaynaklanmaktadır. Afrika ve Amerikalı siyahlarda (%1,5) Güneydoğu Asya ülkelerinde(%5) Türkiye, Lübnan, İsrail, Malta, Cezayir, Fas, Korsika (%2–3), Yugoslavya (%1,4) ve Fransa'da (%0,1) talasemi taşıyıcılığı oldukça yüksek oranda gözlenmektedir^{1,57}.

2.2.2.1.4. Türkiye'de β –Talasemi Dağılımı

Talasemilerin Türkiye'de en sık görülen tipi β –Talasemidir. Akraba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği, Türkiye'de beklenenin de üzerinde β -talasemili çocuk doğmasına neden olmaktadır. Hastalık, hafif klinikli β -talasemi intermedya ile, tranfüzyona bağımlı β -talasemi majör arasında seyreden çok geniş bir yelpazede görülmektedir, Türkiye'de β -talasemi majör olguları daha fazladır⁵⁷.

Türkiye'de yaklaşık 1.300.000 talasemi taşıyıcısı olduğu ve 4000 hasta birey bulunduğu bildirilmektedir. Bu hastaların büyük bir kısmı erken yaşta kaybedilmektedir. Bu hastalığın tedavisinde genel olarak kan transfüzyonları ve demir şelasyonu kullanılmaktadır⁵⁵.

Türkiye'de talasemi ile ilgili ilk çalışmalar Aksoy tarafından yapılmıştır. Talasemi sıklığını göstermeye yönelik ilk çalışmada Çavdar ve Arcasoy tarafından gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki yıllarda β -talasemi sıklığına yönelik çalışmalar Türkiye'nin birçok bölgesinde yapılmış olup yoğunluğun güney illerinde daha yüksek

olmak üzere değişik bölgelerde % 0,6-12 arasında değiştiiği saptanmıştır. β -talasemi taşıyıcılığı oranı Türkiye genelinde %2,1 olmakla birlikte, bu sayı Türkiye'nin bazı yörelerinde %10'a kadar çıkmaktadır^{12,13}.

β –Talasemiye moleküler düzeyde araştıran çalışmalarda; Türkiye'de 43'ün üzerinde farklı mutasyon bulunduğu ve β –Talaseminin moleküler düzeyde çok heterojen bir yapı gösterdiği saptanmıştır¹⁵⁻¹⁷. (Tablo 6).

Tadmori ve arkadaşları Türkiye'de 31 farklı mutasyon tipi saptamışlardır. Bu çalışmada IVS I-110'nun Türkiye'de en sık görülen mutasyon olduğunu, bunu azalan oranlarda IVS–1–6(T→C), Cd 8(-AA), IVS 2–745(C→G), IVS1–1(G→A), IVS II-1(G→A), Codon 39 (C→T), -30 (T→A), Cd 5(-CT) ve -28 mutasyonunun izlediğini rapor etmişlerdir¹⁷.

Başak'ın raporunda; IVS-I-110'nun Türkiye'de en sıklıkla rastlanan β -talasemi mutasyonu olduğu bunu IVS-I-6, FSC-8, IVS-I-1, IVS-II-745, IVS-II-1, Cd39, -30 ve FSC-5 mutasyonlarının takip ettiği bildirilmiştir. .IVS-I-110'nun Türkiye genelinde %40 olan sıklığı, Orta Anadolu'da %50'yi bulmakta, Doğu ve Güney Doğu Anadolu'da %25'lere düşmektedir. Türkiye'nin coğrafi bölgeleri, mutasyon sıklığı ve çeşitliliği açısından kıyaslandığında, ülke nüfusunun %50'sini barındıran Batı Anadolu ve Akdeniz bölgelerinin, Türkiye genelindeki dağılımıyla uyumlu olduğu Kuzey, Güney ve Doğu Anadolu bölgelerinin daha az heterojen olduğu ve kendilerine özgü mutasyonlar (-30, -87, FSC8/9, IVS II–745 gibi) içerdiği görülmüştür⁵⁵.

Altay'ın raporunda IVS I-110, IVS–I–6, IVS II-1, IVS II–745 ve IVSI–1 mutasyonlarının tüm β -talasemi mutasyonlarının % 71'ini oluşturduğunu, IVS I-110'nun bütün bölgelerde en yaygın mutasyon olduğu Akdeniz Bölgesinde %47 ve Marmara Bölgesinde %27.5 oranında gözleendiği bildirilmiştir. Türkiye'de 2. en sık görülen mutasyon IVS–I–6'dır. IVSI–1 mutasyonunun en sık Ege Bölgesinde, onu takiben Marmara, Karadeniz, İç Anadolu,Doğu Anadolu ve GüneyDoğu Anadolu'da görüldüğünü, IVS II–745 mutasyonununda en sık Akdeniz Bölgesinde gözleendiğini saptanmıştır. Bu iki mutasyonun aksine cd 8(-AA), IVS II-1 ve -30 (T→A) mutasyonları en sık Doğu Anadolu'da bunu takibinde GüneyDoğu Anadolu'da, Akdeniz Bölgesinde ve Ege'de görülmektedir. β -talaseminin en yüksek oranda görüldüğü yer %10 oranıyla Antalya olup,en az oranında görüldüğü yerde %0.2 oranıyla Doğu Anadolu'dur³⁹.

Tablo 6. Türkiye'de gözlenen beta talasemi mutasyonları.

No	Mutasyonun yeri	Mutasyonun türü
1	- 101	(C→T)
2	-87	(C→G)
3	-30	(T→A)
4	-28	(G→C)
5	+22	(G→A)
6	Fsc 5	(-CT)
7	Fsc 6	(-A)
8	Fsc 8	(-AA)
9	Fsc 8/9	(+G)
10	Cd 15	(TGG→TAG)
11	Cd 15	(TGG→TGA)
12	Fsc 22/23/24	(-AAGTTGG)
13	Cd27	(G→T)
14	Cd 30	(G→C)
15	IVS1-1	(G→A)
16	IVS1-1	(G→C)
17	IVS1-1	(G→T)
18	IVS1-5	(G→A)
19	IVS1-5	(G→C)
20	IVS1-5	(G→T)
21	IVS1-6	(T→C)
22	IVS1-110	(G→A)
23	IVS1-116	(T→G)
24	IVS1-130	(G→A)
25	IVS1-130	(G→C)
26	Fsc 36/37	(-T)
27	Cd 37	(G→A)
28	Cd 39	(C→T)
29	Fsc 44	(-C)
30	Fsc 74/75	(-C)
31	Fsc 82/83	(-G)
32	IVS 2-1	(G→A)
33	IVS 2-654	(C→T)
34	IVS 2-745	(C→G)
35	IVS 2-848	(C→A)
36	3' UTR	(-13 bp)
37	Poly A	(TAAA→TAAG)

38	Poly A	(TAA→TGA)
39	-290 bp del	

2.2.2.1.5. Çukurova Bölgesinde β -Talasemi Dağılımı

Yüreğir ve arkadaşları Çukurova'daki beta talasemi taşıyıcı oranlarını Hatay'da % 5,7, Mersin'de % 1,8 ve Adana'da %3,0 olarak rapor etmişlerdir⁵⁸.

Yüreğir ve arkadaşları Türkiye'nin güney bölgesinde beta talasemi sıklığı ve mutasyon tiplerini çalışmışlar, A₂'si yüksek beta talasemi sıklığını %3,9 olarak saptamışlar ve en yüksek oranda IVS1-110 mutasyonu görüldüğü ve haplotip 1 özelliği gösterdiği rapor edilmiştir⁵⁹.

Arpacı ve arkadaşlarının çalışmasında ; HbF değeri yüksek 2olguda hemoglobin tipi HbAA ve IVS1-110 mutasyonu, 2 olguda hemoglobin tipi HbAS ve IVS1-110 mutasyonu ve bir olguda hemoglobin tipi HbSF ve IVS1-110 mutasyonu bulunmuştur⁶⁰.

Thadmouri ve arkadaşları Adana'lı ama İstanbul'da yaşayan bir ailede nadir olarak gözlenen FSC 36/37 (-T) mutasyonu saptamışlardır¹⁷.

Çürük ve arkadaşları Çukurova'daki β talaseminin genetik heterojenitesini vurgulamışlar ve bu çalışmada mutasyonların IVS-1-110 (G→A) %57,3, IVS1-1(G→A) %8,3, Codon 39 (C→T) % 6,4, IVS-1-6(T→C) %5,7, Fsc 8 % 5,5 oranında olduğunu bildirmişler, ayrıca bu çalışmada Çukurova'da ilk defa gözlenen Codon 15 ve Fsc 82/83(-G) mutasyonu varlığı bildirmiştir¹⁴(Tablo 7).

Tablo 7. Çukurova’da gözlenen beta talasemi mutasyonlarının sıklığı.

Mutasyon yeri	Mutasyon türü	%
IVS1-110	(G→A)	57,3
IVS1-1	(G→A)	8,3
Cd 39	(C→T)	6,4
IVS1-6	(T→C)	5,7
Fsc 8	(-AA)	5,5
-30	(T→A)	5,1
IVS 2-1	(G→A)	2,1
IVS 2-745	(C→G)	4,2
Fsc 5	(-CT)	5,1
Fsc 44	(-C)	3,4
Fsc 74/75	(-C)	2,1
IVS1-5	(G→C)	0,4
Fsc 8/9	(+G)	0,8
Fsc 36/37	(-T)	0,8
Fsc 22/23/24	(-AAGTTGG)	0,8
IVS1-130	(G→C)	0,8
IVS1-5	(G→A)	0,4
-28	(G→C)	0,2
Cd 15	(TGG→TGA)	0,2
Fsc 82/83	(-G)	0,2

Attila ve arkadaşları Çukurova’daki hemoglobinopatilerin prenatal tanısıyla ilgili çalışmasında en sık gözlenen olguların β talasemi major, HbSS ve HbS / β talasemi olguları olduğunu bildirmişlerdir⁶¹.

2.3. Mikroarray Teknolojisi

DNA, RNA, protein yapı ve işlevinin incelenmesinde, yeni genlerin bulunmasında veya transkripsiyon varyantlarının ve polimorfizmlerin belirlenmesinde etkin bir şekilde kullanılan biyoinformatiksel yaklaşımlar günümüzde çok önemli bir yere sahiptir. Moleküler biyoinformatik; büyük moleküllerle (DNA, RNA, protein) ilgili her türlü bilginin toplanması, sınıflandırılması, uygun formata getirilerek analiz edilmesi, analizlerin yorumlanması ve bu bilgilerin ham veya işlenmiş olarak veri tabanlarında bilim adamları veya diğer kesimler arasında paylaşımını sağlayarak biyoloji, bilgisayar ve istatistik bilimlerinin ortak olarak kullanımını gerçekleştirmektedir⁶².

İnsan genomunda yaklaşık 30.000 gen bulunduğu varsayılmaktadır. Bu kadar çok genin tek tek analizi mümkün değildir. Fakat günümüzde, geliştirilen otomasyona dayalı sistemlerle çok fazla sayıdaki genin aynı anda analizi mümkün hale gelmiştir⁶³. Hızla artan dizilim bilgilerinden en yüksek kapasitede faydalanabilmek için yeni teknolojilere gereksinim duyulmuştur. Bu yeni teknolojiler arasında en güçlü olanlarından birisi oligonukleotidlerin veya tamamlayıcı DNA (complementary DNA, cDNA) parçalarının yüksek yoğunlukta yan yana dizilmeleri ile ortaya çıkan mikroarray (mikroçipler, mikrodizilimler) teknolojisidir²⁰.

Hücrelerdeki hemen hemen tüm değişimler mRNA yapılarındaki değişikliklerle oluşmaktadır. Diğer yandan, çevresel faktörlerin değişimlerinde hücrelerde gen ekspresyonlarında değişikliklere neden olmaktadır. Gen ekspresyonu mRNA seviyesinde analizi için birkaç yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerden en fazla kullanılanlar RNA hibridizasyonu (Northern Blotting), nokta hibridizasyonu (Dotblot Analysis), karşılaştırmalı ayırım metodu (Differential Display, DD), serisel gen ekspresyon analizleridir (Serial Analysis of Gene Expression, SAGE)⁶⁴. Genlerin ekspresyon paternlerini bilmek fonksiyonları hakkında önemli bilgiler verir. Genler ve gen ürünleri arasındaki etkileşimi anlamak için; genomdaki, binlerce-onbinlerce genin ekspresyon değişimlerini analiz etmek gereklidir. DNA mikroarray; genomdaki tüm genlerin ekspresyon analizlerini hızlı bir şekilde yapmak üzere geliştirilmiş bir metottur. Küçük örnek hacimleri kullanılarak tek deneyde mikroarrayler, SNP'lerin (tek nükleotid polimorfizminin), hastalıklı ve normal gen ekspresyonunun (mRNA'daki artış ve azalışlar) hızlı bir şekilde çalışılmasını sağlamaktadır⁶⁵.

Temeli Northern ve Southern blottinge dayanan mikroarray teknolojisi farklı düzeylerde 10-15 yıldan beri kullanılan bir teknik olmasına rağmen son zamanlarda

kullanılan cDNA mikroarray teknolojisiyle bilim dünyasında hızlı bir gelişme kaydedilmiştir^{20,66}.

Sıklıkla kullanılan geleneksel laboratuvar yöntemleri, genellikle tek bir gen veya proteinin araştırılmasına yöneliktir. Hastalıkların çoğunda birçok gen etkilenmekte (multigenik) ve birçok faktöre bağlı olarak hastalıklar oluşmaktadır (multifaktöriyel)⁶⁷. Bu da, birçok farklı genin ve proteinin bir arada, kolay ve verimli olarak incelenebilmesini gündeme getirmiştir. Günümüzde gelişen bilgisayar teknolojisinin biyolojiye uyarlanması ile ortaya çıkan DNA çipleri hücre döngüsünü etkileyen yüzlerce genin ekspresyonunun takip edilebilmesini sağlamıştır⁶⁵.

Mikroarray teknolojisi moleküler biyoloji yöntemleriyle fizikokimya yöntemlerinin ilerlemesinin doğal bir sonucu olarak ortaya çıkan ve günümüzde halen gelişimi devam eden bir bilim dalıdır. Son yıllarda membran yerine camın kullanılması, radyoaktivitenin yerini floresan işaretleyicilerin alması ve nukleik asit parçacıklarının belli noktalara bağlanmasını sağlayabilecek hassas yöntemlerin geliştirilmesi bu tür çalışmaların verimliliğini ve elde edilen bilgilerin miktarını artırmıştır⁶⁴. Eskiden bu bilgileri birkaç yüz insan bir araya gelerek değerlendirirken şimdi biyoinformatik alanındaki gelişmeler ve hızlı bilgisayar teknolojisiyle kısa zamanda milyonlarca bilgi bir kişi tarafından değerlendirilebilmektedir. Bu gün 250.000 oligonukleotid veya 10.000'lerle ifade edilen cDNA; 1 cm²'lik alanına sığdırılarak hızla analiz edilebilmektedir²⁰.

2.3.1. Mikroarraylerin Yapımı

Birçok farklı mikroarray teknikleri, aletleri ve enstruman sistemleri hızla gelişmektedir ve yaygın olarak kullanım alanı bulmaktadır. Mikroarrayde, DNA'ların çipler, küçük cam slayd veya naylon membran üzerindeki hibridizasyonunu analiz ederek genlerin ekspresyon düzeyleri hakkında bilgi sağlamaktadır⁶⁴.

En basit array mikroskop lamının yüzeyine binlerce DNA molekülünün noktalar halinde değişik yöntemlerle sabitlenmesiyle oluşturulur. Bir mikroskop lamına 50.000 DNA noktacığı yerleştirilebilir. Mikroskop lamına bırakılan DNA'nın kaynağı hücreden alınan herhangi bir gen parçacığı olabileceği gibi cDNA, mRNA, tRNA veya yapay olarak sentezlenen oligonükleotitlerde olabilir⁶⁴.

Genel olarak üç farklı mikroarray tipi bulunmaktadır: naylon membran üzerinde sentezlenen cDNA mikrodizilimleri, cam üzerinde sentezlenen cDNA mikrodizilimleri

veya oligonükleotide dizilimler (DNA çipleri) olabilir. 1995’de Stanford Üniversitesi tarafından geliştirilen cDNA mikroarraylerinde cam üzerine UV-maskelemesi veya ışıkta aktif olan kimyasallar kullanılarak direk olarak cDNA dizileri sabitlenmiştir. Oligonükleotid arraylar ise Affimetrix firması tarafından geliştirilmiş bu yüzden Affimetrix veya DNA çipleri olarak anılmaktadır. İn situ olarak cam slayd veya siklon yüzeyler üzerine sentezlenmiş oligolardan (mRNA ve/veya cDNA) oluşurlar. DNA çipleri de cDNA mikroarrayleri gibi Photolithografi prosesi kullanılarak hazırlanmaktadır. PCR kullanılarak cDNA veya EST’lerden amplifikasyonla elde edilen cDNA’lar cam slayd veya naylon membran üzerine yerleştirilerek cDNA arrayleri oluşturulmaktadır^{20,68}.

2.3.2. Mikroarrayin Kullanım Alanları

İlk arrayler, 1980’lerin ortalarında keşfedilmiş ve mikroarray olarak adlandırılmıştır. Bu cihaz üretimine 300 mikronluk DNA problemleri ile başlanmış ve spot büyüklüğü 300 micron olarak ayarlanmıştır. Çoğunlukla DNA klonlamada, PCR ürünlerinde ya da oligonükleotidlerde ve özellikle radyoaktif olarak etiketlenmiş hedefler için kullanılmıştır. Bu teknoloji ilk olarak tıp alanında kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonraki mikroarray cihazları iğne uçlu yüzeyler (pin spotter) kullanılarak tasarlanmıştır. Bu iğne temelli robotik sistemde bir cam yüzeye yaklaşık 150 mikronluk DNA solusyonları homojen olarak dağıtılmıştır. 1990’lara gelindiğinde ise, araştırmacılar mikroarrayi farklı profiller gösteren doku türleri ve farklı süreçlerde bulunan bakteriyel hücreleri saptamak ve değerlendirmek için kullanmışlardır^{69,70}.

Günümüzde birçok mikroarray cihazı mevcuttur. Bunlar ticari veya klinik araştırmalar ve tedavi amaçları doğrultusunda çeşitli tiplerde üretilmektedir. Bu çeşitlilik araştırmacılara yapmakta oldukları araştırmalarda maksimum esnekliği sağlamaktadır.

Mikroarray teknolojisinin kullanım alanları her geçen gün artmaktadır. Çok sayıda DNA molekülünün lamlar ya da naylon membranlar üzerine noktalanması ile mikroarrayler oluşturulur. Kullanım alanları, gen ifade profillerinin araştırılması, mutasyon taraması ve analizi, genotipleme (örneğin; ökaryot, mikroorganizma, virüs), genlerin ve klonların haritalanması, mikrodelyasyon ve kromozomal aberasyonların tespiti olarak sıralanabilir⁶⁴.

Mikroarray uygulamaları ve sekanslama tabanlı metodlar gen ekspresyon çalışmalarına ve dolayısıyla genomik çalışmalara yeni boyutlar katmışlardır. Sahip oldukları özelliklerden dolayı sekanslama tabanlı yöntemler kantitatif düzeyde gen ekspresyonunu belirlemede oldukça etkilidirler. En yaygın kullanım alanlarından birisi gen ekspresyon profillerinin izlenmesidir. Genomik DNA'dan transkripsiyona uğrayan genlerin tamamına transkriptom veya gen ekspresyon profili adı verilmektedir. Bir hücrenin fenotipi ve fonksiyonu transkriptomu tarafından belirlenir. Genom hücreden hücreye sabit olmasına karşın gen ekspresyon profili hücrenin içinde bulunduğu koşullara göre hızla değişebilen bir yapıdadır. Çeşitli koşullarda genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimler takip edilerek bu genlerin kodladığı proteinlerin işlevleri hakkında önemli ipuçları elde edilebilir^{20,71}.

Mikroarrayler çeşitli fizyolojik veya patolojik süreçlerde gen ekspresyon paternlerindeki değişimi izlemek için kullanılmaktadır. Nükleik asit arrayleri gen ekspresyon profillerinin yanı sıra polimorfizm analizinde, mutasyon analizinde, evolüsyonel çalışmalarda ve sekanslamada da kullanılabilir. Bunların yanı sıra potansiyel terapötik ajanların bulunmasında, geliştirilmesinde, optimizasyonunda ve klinik değerlendirmelerinde mikroarraylerden yararlanılmaktadır^{20,71}

2.3.3. Mikroarray Tekniğinin Aşamaları

Mikroarray teknolojisi nükleik asitlerin seçici ve farklılığına dayanan hibridizasyon yöntemi ile elde edilen gen ekspresyon analiz sonuçlarını kullanır. Bu teknolojiye ilk olarak iki farklı koşulda tutulan iki ayrı örnekten izole edilen messenger RNA (mRNA)'lardan RT yöntemi ile cDNA'lar sentezlenip sonra bu örneklerin biri siyanin 3 [cyanine, Cy3, (565-615nm)] rhodamin içeren kırmızı renkli floresan boya ile ve diğeri de siyanin 5 [cyanine, Cy5 (649-670nm)] flourescein içeren yeşil renkli floresan boya ile etiketlenip işaretlenerek iki farklı probu oluşturur. Cy5 ve Cy3 iki farklı boya olup farklı emme ve uyarılma özelliğine sahip olmalarından dolayı iki farklı renk, kırmızı ve yeşil olarak üretilirler. Bu iki farklı boyayla etiketlenip işaretlenen ve iki farklı örnekten elde edilen cDNA'lar karıştırılır ve oligonükleotidleri veya cDNA baz dizilerini içeren ve binlerce geni ifade eden genomik DNA mikroarrayle analiz edilebilir. Genomdaki her bir geni temsil eden bu cDNA parçacıkları hibridizasyon sırasında farklı sinyaller vermektedir. Hibridizasyon sırasında üretilen sinyallerin yoğunluğu örneklerdeki mRNA miktarları ile orantılıdır. Sonra bağlanmayan problemler

uzaklaştırmak için yıkama işlemi yapılır. Daha sonra boyaların ışıkla uyarılmasıyla oluşan kırmızı ve yeşil renkteki Cy3 ve Cy5 sinyalleri array tarayıcıları yardımıyla farklı dalga boylarında okunur. Bunun için Charge-Coupled Device (CCD) veya fotomultiple tupler içeren confocal floresan mikroskoplar kullanılır. İki farklı dalga boyunda elde edilen Cy3 ve Cy5 sinyallerinin oranları bir cDNA parçacığının iki farklı probdaki, yoğunluğunu ifade eder. Bu sinyallerin yoğunluklarını karşılaştırmak ve analiz sonuçlarını sayısal olarak belirlemek için bu amaçla hazırlanmış bilgisayar programları kullanılır. Bu programlar sayesinde hibridizasyon sonucunda mikroarrayden elde edilen sinyaller bilgisayarda birleştirilerek veriler sağlanır. Daha sonra her bir sinyalin ortalaması alındıktan sonra mikroarrayde kendiliğinden oluşabilecek sinyaller çıkartılıp her bir değer için normalizasyon işlemi farklı koşullarda ekspresyonu değişmeyen temel bir genle (housekeeping gene) veya sinyal yoğunluğu bilinen herhangi bir mRNA kullanılarak yapılır. Normalleştirilen bu veriler gen ekspresyon profillerinin belirlenmesinde kullanılır^{20,68}.

2.3.4. Mikroarray Tekniğinin Avantajları

Mikroarraylerin en önemli avantajları, aynı anda birçok gen ile ilgili bilgi alınması, hızlı sonuç elde edilmesi, az sayıda deney yapılması, güvenilir olması ve sistem kurulduktan sonra ucuz olmasıdır²².

DNA array teknolojisinin diğer tekniklerle karşılaştırıldığında avantajı, fazla sayıda genin aynı anda analiz edilmesine olanak tanınmasıdır. Eğer çalışılan organizmadaki gen sayısı fazla değilse ve üzerinde çalışılan genler biliniyorsa, gen sekanslarına ait kodlama bölgelerindeki DNA sekansları array üzerine yerleştirilebilir. Daha sonra bu genlerin çevresel veya genetiksel etmenlere verdikleri yanıtlar kolay bir şekilde analiz edilebilir.

Önceden tanımlanmış tekli nükleotid değişimlerinin (SNP) güvenilir, kısa ve verimli bir metod olması rutin işler olarak özellikle genetik epidemiyoloji çalışmalarda büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla bugüne kadar geliştirilen metodlarda PCR teknolojisinin sunduğu olanaklar kullanılmıştır. SNP'lerin tanısında yaygın olarak kullanılan metodlar arasında RFLP, allel spesifik PCR ve SNaPSSHOT analizleri bulunmaktadır. Bu metodlar arasında RFLP her SNP için uygulanamaz oluşu, allel spesifik PCR ise kesin güvenilirlikle optimizasyonunun özellikle bazı SNP'lerin bulunduğu

bölgeler için ciddi zorluklar çıkarması açısından yaygın uygulamalarında güçlükler yaşanan yöntemler arasında bulunmaktadır^{22,72}.

Son yıllarda keşfedilen array teknolojisinin otomasyona adapte edilebilir olması nedeniyle rutin analizlerde kullanılma avantajı teknolojinin hızla yaygınlaşmasına neden olmuştur. Nanogen array platformu cam bazlı diğer array'lerden farklı olarak kullanıcının tasarımına açık, elektronik array teknolojisine sahip olan ve rutin SNP analizlerinde yüksek güvenilirlik arz eden bir sistemdir. Mikroarray; SNP analizlerinin yanısıra STR, gen ifadelenmesi analizlerinde ve bilinmeyen mutasyonların saptanmasında da güvenilirlikle kullanılan teknolojiye dönüşmüştür^{22,72}.

2.3.5. Mikroarray Tekniğinin Dezavantajları

Mikroarraylerin bilimin hizmetine sunulması büyük bir heyecan yaratmış olmasına rağmen bazı problemleri de beraberinde getirmiştir. Birbirinden farklı çipler kullanılarak yapılan deneylerin birbiriyle karşılaştırılmasında yaşanan zorluklar, optimizasyon ve standardizasyon sorunları ve herhangi bir deneyden elde edilen sonuçları her yönü ile değerlendirebilecek biyoinformatik programlarının henüz geliştirilememiş olması bunlardan bazılarıdır. Bu tür sorunları çözebilmek için Mikroarray Gene Expression Data Society gibi bazı yeni kuruluşlar oluşturulmaktadır. Bu tür derneklerin amacı elde edilen verilerin tüm bilim dünyasına açık ortamlarda saklanmasını, farklı koşullarda yapılan çalışmalardan elde edilen bilgilerin birbirine tercüme edilmesini ve standardizasyonu sağlamaktır. Bu tür çalışmalar bilgi paylaşımını ve yeni buluşları kolaylaştırmaktadır. Bunun yanı sıra mikroarray çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçların geçerliliği, tekrarlanabilirliği ve günlük hayatta uygulanabilirliği konusunda çalışmalar hızla bulunmaktadır^{20,64}.

Mikroarray işlemlerinin oldukça fazla miktarda data üretmesi ve bu datanın analizi, tekniğin diğer dezavantajlarından birisidir. Değişik oranlarda ve çeşitlilikte hibridizasyon sonuçları kısa zamanda çok sayıda data üretir. Datanın istatistiksel analizini ve yorumunu yapacak yazılım programlarına ihtiyaç vardır. Bazı durumlarda DNA sekans sonuçlarının daha önceden yapılmış analizlerle kıyaslanması gerekmektedir^{20,64}. Data bilgilerin günümüzde kullanımını kolaylaştırıcı programların olmayışı mikroarrayin dezavantajlarından biridir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1.Cihazlar

Hassas Terazı	Mettler AJ 100
Kan sayım cihazı	Coulter Counter T-890
Spektrofotometre	Shimadzu UV-120-02
Santrifüj	Eppendorf 5403
Otomatik Pipet	Gilson 0-10 µL, 0-20 µL, 0-100 µL, 0-200 µL
pH metre	Beckman Century SS-1
Etüv	Nüve EN 500
Vorteks	Nüve NM 110
Buz Makinesi	Scotsman AF-10
Derin dondurucu	Bosh
Çalkalayıcı	Irma Shaker
Mikrosantrifüj	Beckman Microfuge E
Elektroforez Güç Kaynağı	Pharmacia Electroforesis Power Supply EPS 500/400, Bio-Rad Power PAC 300
Elektroforez Tankı	Bio-Rad Mini Protean II
Mikrodalga fırın	Arçelik
Thermal Cyclers	Perkin Elmer Cetus DNA thermal Cyclers
Mikroarray	Nanogen Nanoçip Molecular Biology Workstation
İletkenlik ölçer	Horiba Twin Compact Meter
Pürifikasyon pompası	Millipore

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Fenol	Merck
Kloroform	Merck
Glisin	Merck
Potasyum siyanür	Merck
DE-52	Whatman
Amonyum sülfat	Sigma
Sodyum hidroksit	Merck
Potasyum siyanoferrat	Merck
Amonyum Bikarbonat	Sigma
Amonyum Klorür	Merck
Sodyuk klorür	Merck
EDTA Na ₂	Merck
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma
Proteinaz K	Sigma
Etil Alkol	Merck
Tris	Amresco
Borik asit	Merck
Sodyum dietil barbital	Merck
Dietil barbitürik asit	Merck
Ponceau-S	Sigma
Seluloz asetat kağıdı	Sepraphore III
Trikloroasetik asit	Merck
Asetikasit	Merck
Whatman kağıdı	Whatman III
Primerler	
Taq DNA polimeraz	
dNTP'ler	
L-Histidin	
Yüksek tuz çözeltisi	
Düşük tuz çözeltisi	

3.2. Örnek Toplama

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalına anormal hemoglobin ve talasemi ön tanısı ile başvuran kişilerin kan örnekleri kullanılmıştır. EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinin kan sayımları⁷³, hemoglobin elektroforezleri⁷⁴, mikrokolon kromatografisi ile HbA₂ düzeyleri⁷⁵, alkali denaturasyon yöntemiyle de HbF düzeyi saptanmıştır⁷⁶. HPLC ile anormal hemoglobin tiplendirilmesi yapılmıştır⁷³. Moleküler analizlerde kullanılacak olan DNA'larda Poncz yöntemiyle lökositden elde edilmiştir⁷⁷.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hematolojik Çalışmalar

Hemoglobin (Hb), hematokrit (Hct), ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH) ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) Coulter T 890 cihazı ile belirlenmiştir⁷³.

3.3.1.1. Hemoglobin Elektroforezi

Alkali pH'ta hemoglobin molekülü negatif yüklüdür ve elektiksel ortamda anado doğru göç eder. Yük değişikliği olan varyantlar ise farklı göç ederler. Alkali ortamda selüloz asetat kağıdı üzerine uygulanan hemolizat örneklerine, elektriksel güç uygulanarak hemoglobin tipleri farklı olarak göç ederek tiplendirilmesi yapılmıştır⁷⁴.

3.3.1.1.1. Ayraçlar

1. Anot tamponu pH 9.1

Tris 25.2 g

EDTA 2.5 g

Borik asit 1.9 g

Bir miktar distile suda çözülüp, pH 9.1'e ayarlanarak 1 litreye distile su ile tamamlanmıştır.

2. Katot tamponu pH 8.6

Na-Barbital 5.15 g

Barbital 0.92 g

Bir miktar distile suda çözülüp, pH 8.6'ya ayarlanarak 1 litreye distile su ile tamamlanmıştır.

3.Boya çözeltisi

500 mg Ponceau-S 100 ml % 5'lik trikloroasetik asitte çözülmüştür.

4.Yıkama çözeltisi

% 5 lik asetik asit

5.Elektrorez koşulları

Süre	45 dk
Voltaj	190-200 volt
Amper	0.75 mA/ cm
Uygulama	katodik

6.Taşıyıcı ortam

Seluloz asetat kağıdı

3.3.1.1.2. Yöntem

1. Hemolizat hazırlanması: EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri santrifüj edilerek plazmasından ayrılmıştır.
2. Eritrositler serum fizyolojik ile üç defa yıkanmıştır.
3. 60 µl eritrosit üzerine 800 µl saf su eklenerek eritrositler parçalanarak hemoliz edilmiştir.

3.3.1.2. Mikrokolon Kromatografisi ile HbA₂ Ölçümü

Hemoglobin molekülünün yüklü gruplarının iyon değiştirici reçineye bağlanmasıyla HbA₂ diğer hemoglobinlerden uzaklaştırılmıştır. Reçineye bağlı HbA₂ geliştirici tamponuyla eluve edilerek miktarı spektrofotometrede okunmuştur⁷⁵.

3.3.1.2.1. Ayıraçlar

- 1.Geliştirici A-1 (yıkama için) : 15 g Glisin ve 0,1 g KCN saf suda çözülerek 1 L 'ye tamamlanmıştır.
- 2.Geliştirici A-2: 15 g Glisin 0,1 g KCN ve 1.17 g NaCl saf suda çözülerek 1 L 'ye tamamlanmıştır.

3. Geliştirici B: 15 g Glisin, 0,1 g KCN ve 11,7 g NaCl saf suda çözülerek 1 L 'ye tamamlanmıştır.

4. İyon değiştirici DE-52 kolonunun hazırlanması: 1 hacim DE-52 üzerine 3 hacim geliştirici A-1 eklenerek jel yıkanıp pH 'sı 7,2-7,6 arasında oluncaya kadar bu işleme devam devam edilmiştir.

3.3.1.2.2. Yöntem

Kolon dengelendikten sonra üzerine 60 µL hemolizat tatbik edilerek geliştirici A-2 ile yıkanıp 8 mL eluvat toplanmıştır. Bu sırada HbA₂'nin kolondan ayrılması sağlanmıştır. Total Hb'nin reçineden eluve edilmesi için kolon geliştirici B ile yıkanmıştır. Toplanan eluvat saf su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Eluvatların spektrofotometrede absorbansları 415 nm dalga boyunda saf su körüne karşı okunarak % HbA₂ hesaplanmıştır.

Hesaplama

Aşağıdaki eşitliğe göre hesaplama yapılmıştır.

$$\%HbA_2 = OD\ Hb\ A_2 / (OD\ Hb\ A_2 + 3.125 \times OD\ HbA)$$

Referans Aralığı: % 1,5-3,7

3.3.1.3. Modifiye Betke yöntemi ile Fetal Hemoglobin (HbF) Ölçümü

Hemoglobinler içinde alkaliye en dirençli olanı HbF' dir. Bu özelliğinden faydalanılarak HbF miktarı belirlenmektedir. NaOH ile denaturasyondan sonra diğer hemoglobinler amonyum sülfatla çöktürülerek filtre kağıdından süzülür ve HbF içeren berrak süpernatant solusyonunun absorbansı spektrofotometrede 540 nm'de okunup konsantrasyonu saptanmıştır⁷⁶.

Hesaplama

Aşağıdaki eşitliğe göre hesaplama yapılmıştır.

$$\% Hb\ F = (OD_{HbF\ süzüntü} / (OD_{Hb\ Toplam} \times 100)) \times 100$$

Referans Aralığı: % 0,8-2,5

3.3.1.3.1. Ayıraçlar

1. Siyanür çözeltisi

0,2 g $K_3Fe(CN)_6$ ve 0,2 KCN 1L saf suda çözülmüştür.

2. 1,2 N NaOH

3. Doymuş Amonyum Sülfat

70 g $(NH_4)_2SO_4$ distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3.3.1.3.2. Yöntem

Her bir örnek için 3 deney tüpü hazırlanıp ayıraçlar oda ısısına getirildikten sonra I.tüpe 3,8 mL siyanür çözeltisi konup 0,2 mL hemolizat ile karıştırılarak 10 dakika bekletilmiştir. Bu karışımdan 2,8 mL II. tüpe alınıp üzerine 1,2 N NaOH'dan 0,2 mL ilave edilip 2 dakika bekletilmiştir. Daha sonra II. tüpün üstüne 2 mL amonyum sülfat eklenip 20 dakika bekletilmiş ve filtre kâğıdından süzümüştür. Total hemoglobin tayini için I.tüpten 0,4 ml alınıp üzerine 6,75 ml saf su ilave edilerek III. tüp hazırlanmıştır. II. ve III. Tüplerin absorbansları spektrofotometrede 540 nm'de saf suya karşı okunarak HbF oranı % olarak hesaplanmıştır.

3.3.1.4. Oraklaşma Testi

Hemoglobin S, oksijensiz ortamda veya güçlü bir indirgeyici ajan olan sodyum metabisülfid varlığında eritrositlerin orak şeklini almasıyla tanımlanmaktadır⁷³.

3.3.1.4.1. Ayıraçlar

0,2 g $Na_2S_2O_5$ 10 mL suda çözülmüştür.

3.3.1.4.2. Yöntem

Tam kan örneğinden 20 μ L alınarak lamın ortasına konup üzerine % 2'lik sodyum meta bisülfitten bir damla eklenip üzeri lamelle kapatılıp lamelin kenarları entellan veya oje gibi yapıştırıcı ile hava almaması için kapatılıp 5–30 dk. sonra mikroskopta eritrositlerin oraklaşması incelenmiştir.

3.3.1.5. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı Kromatografisi, hareketli sıvı fazın kolon ya da ince tabaka partikülleri arasında dağılması esasına göre yapılan ayırma tekniğidir. Bu sistem ile proteinler, peptidler, ilaçlar ve metabolik ürünler kolaylıkla analiz edilebilmektedir.

HPLC, temelde farklı olmamasına karşın diğer konvansiyonel sıvı kromatografilerinden ileri teknolojik aletlerin, özel kolonların, çok duyarlı saptayıcıların ve yüksek akış hızlarının kullanımı ile daha üstün ayırma özelliğine sahiptir.

HPLC sistemi aşağıdaki bölümlerden oluşmaktadır^{73,78,79}.

1-Hareketli sıvı deposu

2. Pompalar: yüksek basınç sağlar

3.Enjeksiyon halkası

4.Kolon: Basınca dayanması için çelikten yapılmış bir boru içerisine anyon veya katyon değiştirici reçine doldurulmuştur.

5.Değişken dalga boyu saptayıcısı (Hb için 415 nm, globin zincir analizi için 220 nm.)

6.Kaydedici ve integrator: Dedektörden gelen sinyalleri kaydeder ve her fraksiyonun yüzde değerlerini hesaplar.

7.Sonikator

Açık sistemli klasik kolon kromatografisinde hareketli faz, durgun faz içinden yerçekimi veya düşük basınçla geçerken, HPLC' de hareketli faz kolon içine yüksek basınç ile pompalanmaktadır. Durgun faz, hareketli faz ve örnek arasındaki etkileşimlerin tipine bağlı olarak, HPLC' de çeşitli ayırma özellikleri kullanılabilir^{73,78,79}.

HPLC' nin klasik kromatografik sistemlere üstünlüğü;

1.Seçiciliğinin yüksek oluşu

2.Duyarlılık

3.Analiz süresinin kısalığı

4.İstenilen fraksiyonların saflaştırılması

5.Tekrarlanabilirlik

6.Uygulama kolaylığı

7.Mikrogram düzeyinde az örnekle çalışılması gibi özellikleri vardır.

Sistemin Özellikleri

- 1.Sabit akım hızı sağlar, bu nedenle retansiyon zamanları ve pik alanları analizden analize değişim göstermez.
- 2.Kompüterize gradyan kontrollü çözelti kompozisyonunun analizden analize tekrarlanabilirliğini sağlar.
- 3.Enjeksiyon valfi sayesinde enjekte edilen madde miktarı sabit tutulur ve istenilen miktarda örnek enjekte edilebilir.
- 4.Saptayıcılar istenilen duyarlılığı sağlar.

Uygulama Alanları

Oldukça geniş kullanım alanları vardır; peptidler, kimyasallar, ilaçlar, hormonlar, enzimler, nükleikasitler, proteinler (hemoglobinler, immunoglobulin G vb), yiyecekler, aminoasitler ve vitaminler gibi konsantrasyonu düşük kimyasallar ayrıştırılabilirler^{73,78,79}.

3.3.2. Mikroarray Yöntemiyle Mutasyon Analizi

3.3.2.1. Mikroarray'in Çalışma Prensibi

Nanochip 100 tane test alanına sahip olan elektronik bir mikrodizin platformudur. Çip yapısında DNA test alanlarına ek olarak bulunan kanal sistemi örneklerin test alanlarına gönderilmesini, hibridizasyon ve yıkama işlemlerinin yapılmasını sağlar²².

Çip yüzeyindeki DNA test alanları streptavidin molekülleri ile kaplıdır. Test alanlarına gönderilecek DNA molekülleri 5' uçlarından biotin ile işaretlenirler. DNA molekülleri sahip oldukları negatif elektrik yükü sayesinde çip yüzeyindeki test alanlarına elektronik olarak gönderilirken ulaştıkları test alanlarına sabitlenebilmeleri için 5' uçlarında bulunan biotin moleküllerinden yararlanırlar. Biotin molekülleri streptavidin ile özgül ve güçlü bir bağ kurma özelliğine sahiptir²².

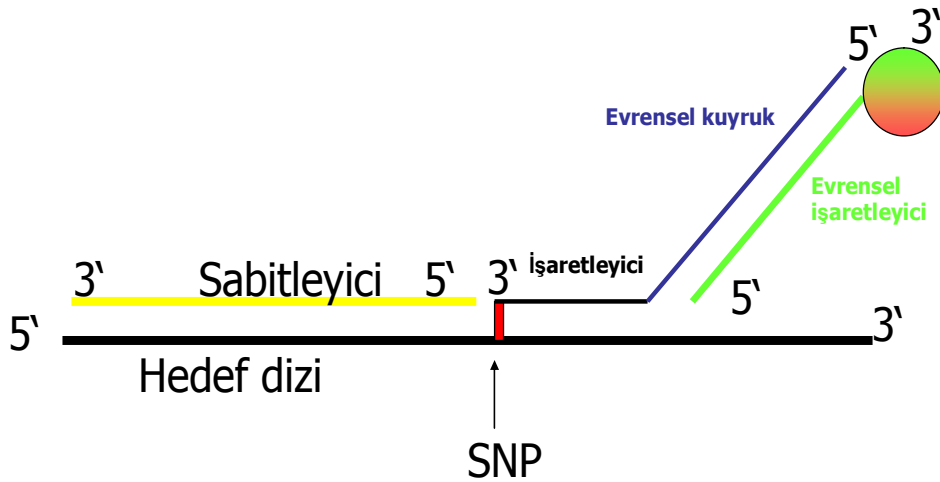
SNP analizlerinde amplicon down metodu yani 5' uçlarında biotinle işaretlenmiş PCR ürünlerinin çip yüzeyindeki test alanlarına gönderilmesi tercih edilmektedir. Test alanlarına stabil bir şekilde bağlanan PCR ürünlerinin analizi mutant ve yabancıl tip problemlerle hibridizasyona tabi tutularak yapılır²².

3.3.2.1.1. PCR Ürünleri

Tanımlanmak istenen SNP'nin yaklaşık olarak çoğaltılacak PCR ürününün (200-400 bç) ortalarına gelmesi istenir. Ürünün biotinle işaretlenmesi PCR için kullanılan primerlerden birinin biotinli olarak kullanılması ile sağlanır²².

3.3.2.1.2. Mutant ve Yabancı Tip İşaretleyici

SNP analizlerinde işaretleyici olarak tanımlanmak istenen SNP'yi 5' ucunda taşıyan bir yabancı tip bir de mutant tip yaklaşık 10-12 baz çiftlik oligonükleotidler tasarlanır. Analiz edilen hedef dizi ile bir ilgisi olmayan ve uygulanan bütün testler için kullanılan bu floresan işaretli işaretleyicilerin özgül diziyeye bağlanabilmesini sağlayabilmek için mutant-yabancı tip prob dizisinin 5' ucuna evrensel işaretleyicinin dizisi de bir kuyruk olarak takılır. Böylece hibridizasyon sırasında floresan işaretli evrensel işaretleyiciler özgül diziyeye ait problemlere bağlanabilir²² (Şekil 8).



Şekil 8. Mutant ve yabancı tip işaretleyici.

3.3.2.1.3. Stabilizör

Nanogen sisteminde tek nücleotid değişimlerinin yabancı tip veya mutant problemlerin hibridizasyonu ile tanıya kesin güvenilirlik özelliği kazandırmak için bağımsız DNA molekülleri arasındaki baz etkileşim enerjisinden (base stacking energy)

faýdalanılmaktadır. Baz etkileşim enerjisi DNA zincirleri boyunca nükleotidler arasındaki elektronların üstüste binmesi ile açığa çıkar²² (Şekil 9).

Diziye özgül işaretleyici probun 5' ucunun hemen bitiminden başlayan 25-35 nükleotidlik sabitleyici olarak tabir edilen bir ikinci oligo hibridizasyon aşamasına eşlik eder. Hibridizasyon sırasında stabilizör ve diziye özgül işaretleyici prob dipdibe PCR ürününe bağlanırlar. Dipdibe yerleşen stabilizör 5' ucundaki baz ile işaretleyicinin 3' ucundaki baz arasında oluşan "baz etkileşim" enerjisi hibridizasyonun kuvvetini arttıran bir etken olarak belirir. Çip hibridizasyon sonrası özgül olmayan bağlanmalardan arındırılmak üzere yıkamalara ve artan sıcaklığa mağruz bırakılır. Yabancı tip probun mutant allele, mutant probun ise yabancı allele bağlanması, aralarındaki fark yalnızca bir bazdan ibaret olduğu için mümkündür. Nanochip sisteminde uygulanan ısı ve yıkama işlemlerine ek olarak stabilizörün yarattığı baz etkileşim enerjisi özgül olmayan bağlamaların saf dışı edilmesinde etkinlik kazanır. Dolayısıyla SNP analizlerinde meydana gelebilecek yanlış eşleşmelerde test alanındaki DNA'ya bağlanmayan tek baz, stabilizör ve işaretleyici oligo arasındaki etkileşimi değiştirecek bu da yıkama ve ısı uygulamaları sırasında söz konusu yanlış eşleşmiş problemlerin uzaklaştırılmasını iyice kolaylaştıracaktır. Baz etkileşim enerjisinin en düşük olduğu ve bu nedenle en az tercih edilen baz kombinasyonu TA'dır. İlgilenilen DNA dizisinin içeriği gereği stabilizör ve işaretleyici arasında tercih edilmeyen baz kombinasyonları oluştuğunda tasarımın diğer zincir (antisens) üzerinden yapılması gerekmektedir. (AC,GC,GT en çok tercih edilen; TA,AA ve TT en az tercih edilen kombinasyonlardır)²².

5'-3'	AA	AC	AG	AT
Enerji	-5,37	-10,5	-6,78	-6,57
5'-3'	TA	TC	TG	TT
Enerji	-3,82	-9,81	-6,57	-5,37
5'-3'	CA	CC	CG	CT
Enerji	-6,57	-8,26	-9,69	-6,87
5'-3'	GA	GC	GG	GT
Enerji	-9,81	-14,6	-8,26	-10,5

Şekil 9. Baz etkileşim enerjileri.

3.3.2.2. Mikroarray'in Çalışma Basamakları

DNA mikroarray yöntemi; DNA izolasyonu, amplifikasyon, saflaştırma (pürifikasyon), yükleme, okutma ve analiz olmak üzere 6 basamaktan oluşmaktadır.

3.3.2.2.1. Tam Kandan DNA İzolasyonu

3.3.2.2.1.1. Lökositten DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüplere alınan kanın plazması uzaklaştırılarak şekilli elemanlar yıkanmıştır. Eritrositler hemoliz edilerek saf lökosit elde edilmiştir. Proteinaz K, sodyum klorür ve Tris EDTA ile muamele edilen lökositlerin hücre zarı parçalanarak proteinler hidroliz edilmiştir. Fenol-kloroform ile hücre zarı ve atıklarından arındırılan DNA, saf etanolde çöktürülerek elde edilmiştir⁷⁷.

3.3.2.2.1.1.1. Ayıraçlar

1. Parçalayıcı (Lizis) Tampon

Amonyum Klorür (NH₄CL) 131 mM

Amonyum Bikarbonat (NH₄HCO₃) 0,9 mM

2. NaCl 4 M

3. EDTA Na₂ 0,5 M (pH 7,5)

4. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) %10'luk

5. Proteinaz K 10 µg/ml

6. Doymuş Fenol Çözeltisi

7. Kloroform

8. Saf soğuk etanol

9. %70'lik etanol

3.3.2.2.1.1.2. Yöntem

1. 1mL EDTA'lı tam kan üzerine 3 ml soğuk parçalayıcı tampon eklenip 5-10 dakika buz içerisinde bekletilmiştir.

2. +4°C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atılmıştır

3. Lökosit pelleti üzerine 1 ml tampon eklenerek hafifçe karıştırılıp ve 37°C'de bir gece bekletilmiştir.

4. Etüvden çıkarılan deney tüplerinin üzerine 400 µl fenol konulup iyice karıştırılır, 400 µl kloroform konulup yine karıştırılıp 5000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Altta kalan fenol kloroform karışımı atılmıştır.

5. Aynı işlem kloroform konularak yapıp 5000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir.

6. Tüpler santrifüj edilerek süpernatant 5 ml % 95'lik etil alkol içine aktarılıp tüp yavaşça alt üst edilerek DNA'nın ipliksi bir görünüm alması sağlanmıştır.

7. Alkolün içinde kümeleşen DNA'lar mikropipet ile alınıp eppendorf tüplerine konulmuştur.

8. 13.000 rpm 'de 3 dk santrifüj edilerek DNA'nın tüpün dip kısmına yapışması sağlanmıştır.

9. Santrifüj edilen tüpün içindeki alkol dökülerek kuruması sağlanır ve tüpe 40-100 µl saf su eklenerek DNA'nın çözülmesi için bir gece 37°C beklenmiştir.

3.3.2.2.2. Amplifikasyon

Mikroarray yönteminin ikinci aşaması genomik DNA'nın amplifikasyonudur.

3.3.2.2.2.1. Ayıraçlar

1. 10×Tampon (KCL'li)
100 mM Tris-HCLpH 8,8
500 mM KCL
2. 25 mM MgCl₂
3. 10 mM dNTPs
4. Taq polimeraz
5. 5µM Primer karışımı

3.3.2.2.2. Yöntem

Bir örnek için amplifikasyonda konulması gereken kimyasallar Tablo 8’ de gösterilmiştir.

Tablo 8. Amplifikasyon protokolü.

dH ₂ O	16,6 µl
10×Tampon(KCL’li)	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	1,1 µl
5µM Primer karışımı	2 µl
10 mM dNTPs	0,5 µl
Taq polimeraz	0,3 µl
DNA	2 µl

Amplifikasyon döngüsü Nanotal programıyla yapılmıştır. Döngü protokolünün ısı ve süreleri Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo.9. Amplifikasyon döngü protokolünün ısı ve süreleri.

95°C	3dk	35 döngü
95°C	30sn	
57°C	45sn	
72°C	45sn	
72°C	10dk	

Bu çalışmada mutasyonlara özgün ampikonlar kullanılmıştır. Ampikonlarda yer alan mutasyonlar Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10. Amplikonlarda yer alan mutasyonlar.

Amplikon	Mutasyonlar
1	IVS I-110(G→A), Cd 44(-C),Cd 39(C→T), IVS1-130(G→C), IVS 1-130(G→A)
2	IVS I-1(G→A), IVS I-5(G→A), IVS I-6(T→C),IVS II-1(G→A),Cd 74/75(-C)
3	IVS II.745(C→T),Hb D(G→C), Hb O Arab(G→A), IVS II.848(C→A), IVS II.849(A→G), Hb Beograd(A→T)
4	-87(C→G), Cd8(-AA), Cd8/9 (+G), Hb G-Coushatta(A→C), Hb E Saskatoon(G→A),Hb D İran(G→C),
5	Hb S (A→T), -30 (T→A), Cd5(-CT), Hb C (G→A)

3.3.2.2.2.3. Agaroz Jel Elektrofrezisi

Agaroz jel elektrofrezisi, amplifiye edilmiş DNA molekülünün tanımlanması, ayrıştırılması ve saflaştırılması için kullanılır. Agaroz jelde DNA moleküllerinin içerdikleri nükleotid sayısının logaritması ile ters orantılı olarak anoda doğru göç ederler. Bu göç hızı jele eş zamanlı amplike edilen kontrol DNA ile birlikte değerlendirilir.

3.3.2.2.2.3.1. Ayıraçlar

1.% 2'lik agaroz jel

2 g agaroz 100 ml 0,5XTBE tamponu içinde mikrodalga fırında eritilerek hazırlanmıştır.

2. Yükleme tamponu

Brom fenol mavisi % 0,05

Gliserol % 10

Ficoll % 15

0,5XTBE tamponu ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3. 10xTris 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

1 L saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

4.Etidyum bromür çözeltisi

Etidyum bromür çözeltisi 5 µg/µl olacak şekilde saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

3.3.2.2.3.2. Yöntem

0,5XTBE tamponu içinde mikrodalga fırında çözülen % 2'lik agoroz jel elektroforez kapları içine döküldükten sonra soğumaya bırakılmıştır. 0,5XTBE tamponuyla dolu elektroforez tankı içine yerleştirilerek jel içindeki tarak çıkarıldığında oluşan kuyulara, amplifiye örnekten 5 µl alınarak 2 µl yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra jele aplike edilip, 150 voltta 30 dakika yürütülmüştür. Elektroforez sonrası jel etidyum bromür ile 3 dakika boyanıp saf su ile yıkanarak boya atıklarından temizlenmiştir. DNA fragmanları UV ile görünür hale getirilip, fotoğrafı çekilerek değerlendirilmiştir.

3.3.2.2.3. Pürifikasyon

Pürifikasyon işlemine başlamadan önce kullanılacak olan pürifikasyon tabağı ile sistemin basınç kontrolü yapılmıştır. Tabağa herhangi bir şey yüklemeyen vakum pompası çalıştırılıp basıncın istenilen seviyede (8-10mbar) 1–2 dakika sabit kalması kontrol edilmiştir.

Pürifikasyon işleminde kullanılacak dH₂O'nun iletkenliği amplifiye ürünlerin tuzdan iyi arındırılması için önemlidir. dH₂O'nun iletkenliğinin 15 µS/cm' ye kadar olması istenir. Bunun için iletkenlik ölçerin üzerine bir damla kullanılacak dH₂O'dan konulmuştur. Göstergedeki değer dH₂O'nun iletkenliğini verir (sertlik derecesini).

3.3.2.2.3.1. Yöntem

1. 20 µl amplifiye ürünü 80 µl dH₂O'la karıştırılıp pürifikasyon tabağının kuyularına aktarılmıştır.

2. Pürifikasyon tabağı millipora yerleştirilip 10 inç Hg (□ 1/3 Atm) olacak şekilde 10–15 dk basınç uygulanmıştır.

3. Kuyulardaki örnek miktarını takip ederek membran yüzeyinin tamamen kurummasını engellemek için örnek miktarı erken biten kuyulara birkaç damla dH₂O eklenmiştir.

4. Tüm kuyularda sıvı kalmadığında basınç kesilerek üzerlerine tekrar 100 µl dH₂O eklenmiştir. Bu işlem birkez daha yapılmıştır.

5. Tüm kuyularda sıvı kalmadığında basınç kesilerek pürifikasyon tabağı temiz bir kurutma kağıdı üzerine alınarak her bir kuyuya 65 µl dH₂O eklenerek 15 dakika orta hızda çalkalanmıştır.

6. Membran yüzeyindeki amplikonların tekrar suya karışması sağlandıktan sonra örnekler tekrar işaretlenen tüplere aktarılmıştır.

5 µl pürifiye amplikon % 2'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

3.3.2.2.4. Yükleme

3.3.2.2.4.1. Ayıraçlar

1.50 mM L-Histidin

L-Histidin'den 3,88 g tartılıp dH₂O ile 500 mL'ye tamamlanmıştır.

2. 100 mM L- Histidin

L-Histidin'den 0,776 g tartılıp dH₂O ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.

3. 0,3 M NaOH

50 veya 100 ml'lik 1M'lık NaOH stoku hazırlanıp dH₂O ile sulandırılılma yapılarak 0,3 M NaOH elde edilmiştir.

3.3.2.2.4.2. Yöntem

Yükleme tabağının kuyularına (96 kuyucuklu) 30 µl pürifiye amplikon ve 30 µl 100 mM 'lık L-Histidin karışımı, en son kuyucuğada 60 µl 50mM L- Histidin pipetlenmiştir. Histidinden sonraki kuyucuğada 60 µl 0,3 M NaOH konulmuştur. Yükleme tabağı ile kartuja adresleme yapılarak cihaza yükleme yapılmıştır.

3.3.2.2.5. Okutma

3.3.2.2.5.1. Yöntem

1. Denaturasyon için çip yüzeyini kaplayacak şekilde 0,3 M NaOH konup 3 dk beklenmiştir.

2. Çip yüzeyi dH₂O ile 2-3 defa iyice yıkanmıştır.

3. Çip yüzeyini kaplayacak şekilde yüksek tuz tamponu konulup 10–15 dk bekletilmiştir.

4. Her mutasyona özgü reporter(işaretleyici) karışımı hazırlanmıştır.

WT reporter	1 µl
MT reporter	1 µl
Stabilizer	1 µl
WT Universal Reporter	1 µl
MT Universal Reporter	1 µl
Yüksek tuz tamponu	95 µl

5. Çipin üzerindeki yüksek tuz tamponu çekilip her mutasyona özgü 7 reporter karışımı (IVS I-110, Cd39, IVS I-1, IVS I-6, IVS II-1, Cd8, -30) sıra ile tek tek çip yüzeyine gönderilmiştir ve mutasyonların okutma aşaması yapılmıştır.

3.3.2.2.6. Analiz

1. Veri analiz programında örneklerden alınan sinyaller değerlendirilirken öncelikle bir örnekten alınan kırmızı ve/veya yeşil sinyallerin en az 50 düzeyinde olup olmadığı kontrol edilmiştir. Sinyallerden en az biri bu düzeyi aşmıyorsa söz konusu örnek değerlendirmeye alınmamıştır.

2. Veri analizinin değerlendirilmesinde iki türlü sinyal bulunmaktadır. Bunlar geri plan kırmızı/yeşil sinyaller ve özgül kırmızı/yeşil sinyallerdir.

3. Geri plan sinyalleri; çipe yüklenen histidin üzerinden alınan özgül olmayan yeşil ve kırmızı sinyallerdir.

4. Geri plan sinyalleri ile örneklerden alınan özgül sinyallerden biri arasında, özgül sinyallerin sağlıklı sınırdaki değerlendirilebilmesi için, 5'e 1 veya daha fazla oranda bir fark bulunması gerekmektedir.

5. Geri plan kırmızı veya yeşil sinyallerinden en az birine göre özgül sinyalleri 5'e 1 veya üzeri oranı tutturamayan örnekler değerlendirilmeye alınmamıştır. Bu oran istatistiksel olarak hesaplanmış standart sapma değerinin 3 katı kullanılarak ve kesin doğruluk arz eden sonuçlar elde etmek üzere belirlenmiştir.

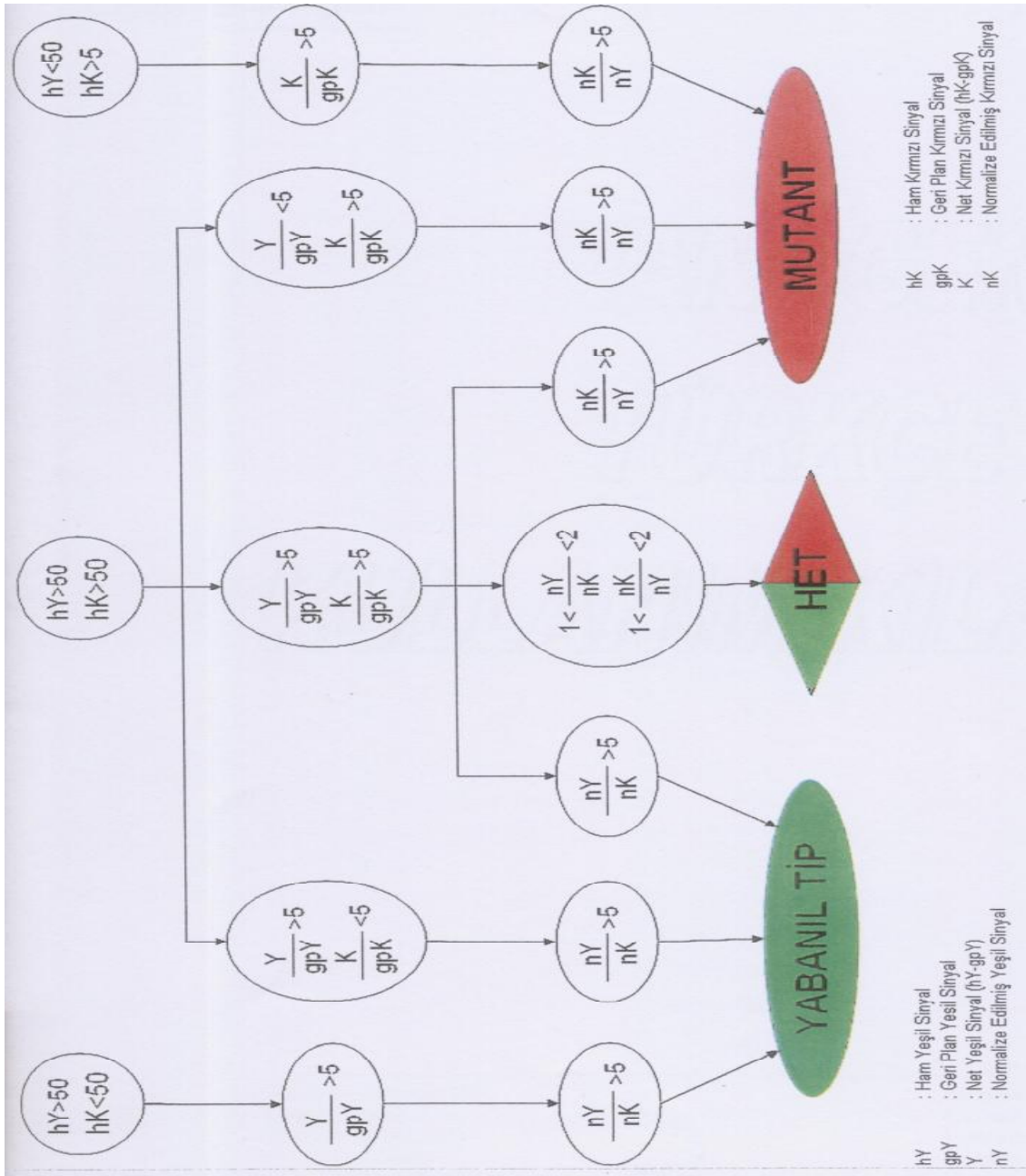
6. Doğru belirlemelerin yapılabilmesi için heterozigot kontrollerde, hem kırmızı hem de yeşil kanalların 5:1 kriterini geçmiş olması gerekmektedir. Homozigot örneklerde ise kırmızı veya yeşil kanalın bu oranı yakalaması esastır.

7. Özgül sinyaller; örneklerden alınan özgül yeşil ve kırmızı sinyallerdir. Bu sinyallerin birbirine olan oranı ile örneğin genotipi belirlenmiştir.

8. 1:1 – 1:2 arasındaki oranlarda örnek heterozigottur.

9. 1:5 ve üzerindeki oranlarda yüksek olan sinyal kırmızı ise mutant, yeşil ise yabanıl tiptir.

10. 1:2'den fazla ve 1:5'den az ise genotipleme yapılamaz. Bu değerlendirmelerin anlatımı Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10. Veri analizi değerlendirme şeması.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'na anormal hemoglobin tanısıyla başvuran 21 olgunun ve β talasemi hastası olarak başvuran 19 olgunun hematolojik özellikleri ve mutasyon tipleri moleküler düzeyde çalışılmıştır. Kan örneklerinin hematolojik verileri Coulter Counter T890 kan sayım cihazında ölçülmüştür. Örneklerin hemoglobin tiplendirilmesi elektroforez ve HPLC sistemiyle, HbA₂ yüzdesi mikrokolon ve HPLC sistemiyle, HbF oranları alkali denaturasyon ve HPLC sistemiyle çalışılmıştır. Bütün olguların lökosit DNA'sı poncz yöntemine göre izole edildikten sonra mikroarray yöntemiyle anormal hemoglobin ve beta talasemi mutasyon tiplendirilmesi yapılmıştır.

4.1. Anormal Hemoglobin Tipleri

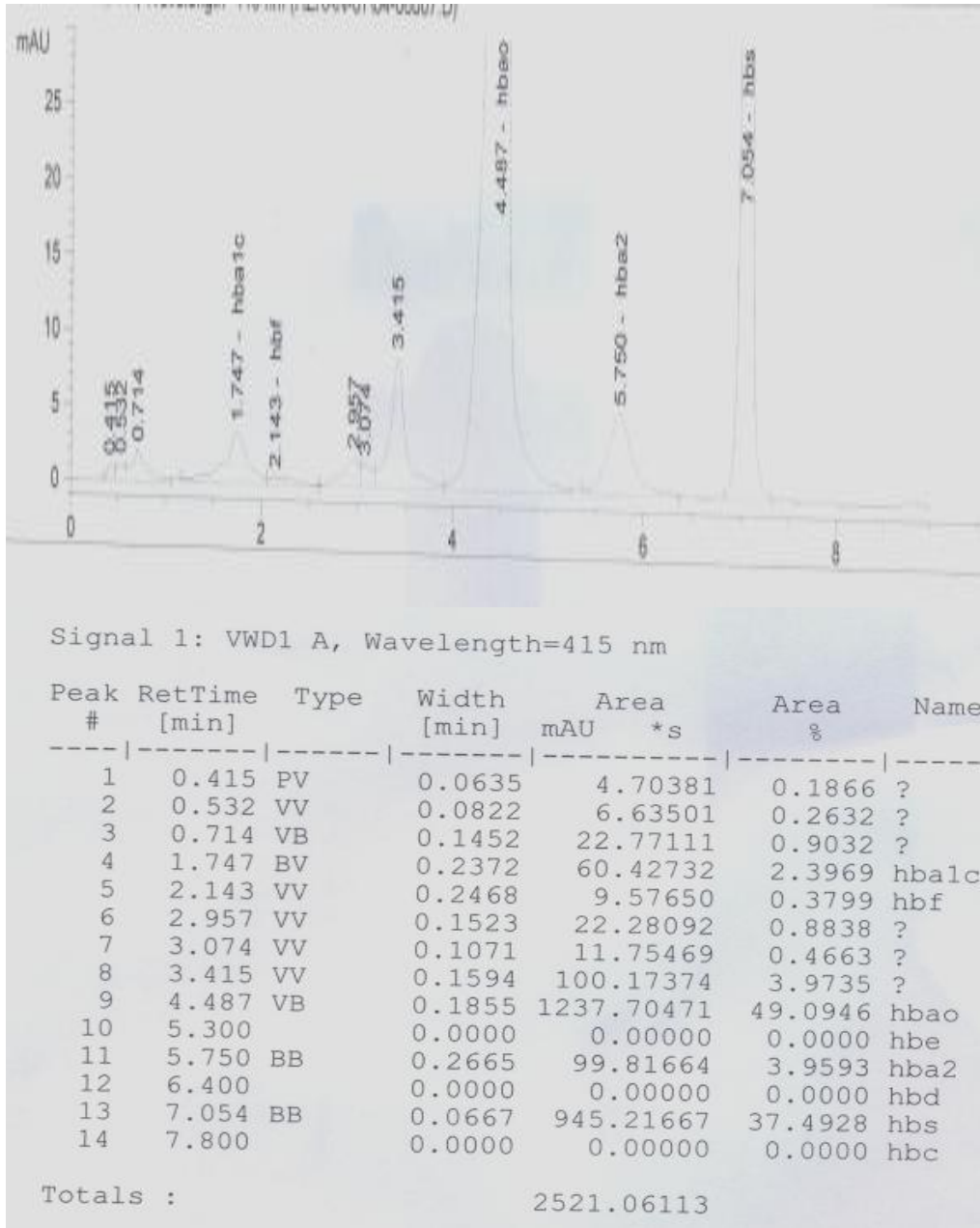
Selülöz asetat elektroforeziyle Hb S taşıyıcı tanısı konan 4 olgunun hematolojik verileri Tablo 11'de, floresan sinyali Tablo 12 'de ve HPLC görüntüsü Şekil 11'de verilmiştir.

Tablo 11. HbS olgularının hematolojik verileri.

No	Ad Soyad	WBC 10 ⁹ /L	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hb Elekt.	% Hb A ₂	% HbF	% HPLC % HbA ₂
1	S.A.	5.2	3.53	10.5	32.1	90.9	29.7	32.7	AS	3.3	0.7	4.0
2	C.A.	5.6	4.54	13.5	40.1	88.2	29.8	33.8	AS	2.8	0.5	4.2
3	E.Ö.	5.2	5.03	13.6	41.6	82.7	27.0	32.7	AS	---	0.5	4.1
4	M.A.	9.3	5.38	14.4	45.4	84.4	26.8	31.7	AS	3.3	0.9	4.6

Tablo 12. Hb S mutasyonunun floresan sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi.

Sample	Red	Green	Pads	Ratio (R::G)	Probe Designation
5.10	24	40	1	1 :: 1.67	Red/Green
5.11	27	40	1	1 :: 1.48	Red/Green
5.13	22	39	1	1 :: 1.77	Red/Green
5.14	31	52	1	1 :: 1.68	Red/Green



Şekil 11. Hb S oligusunun HPLC görüntüsü

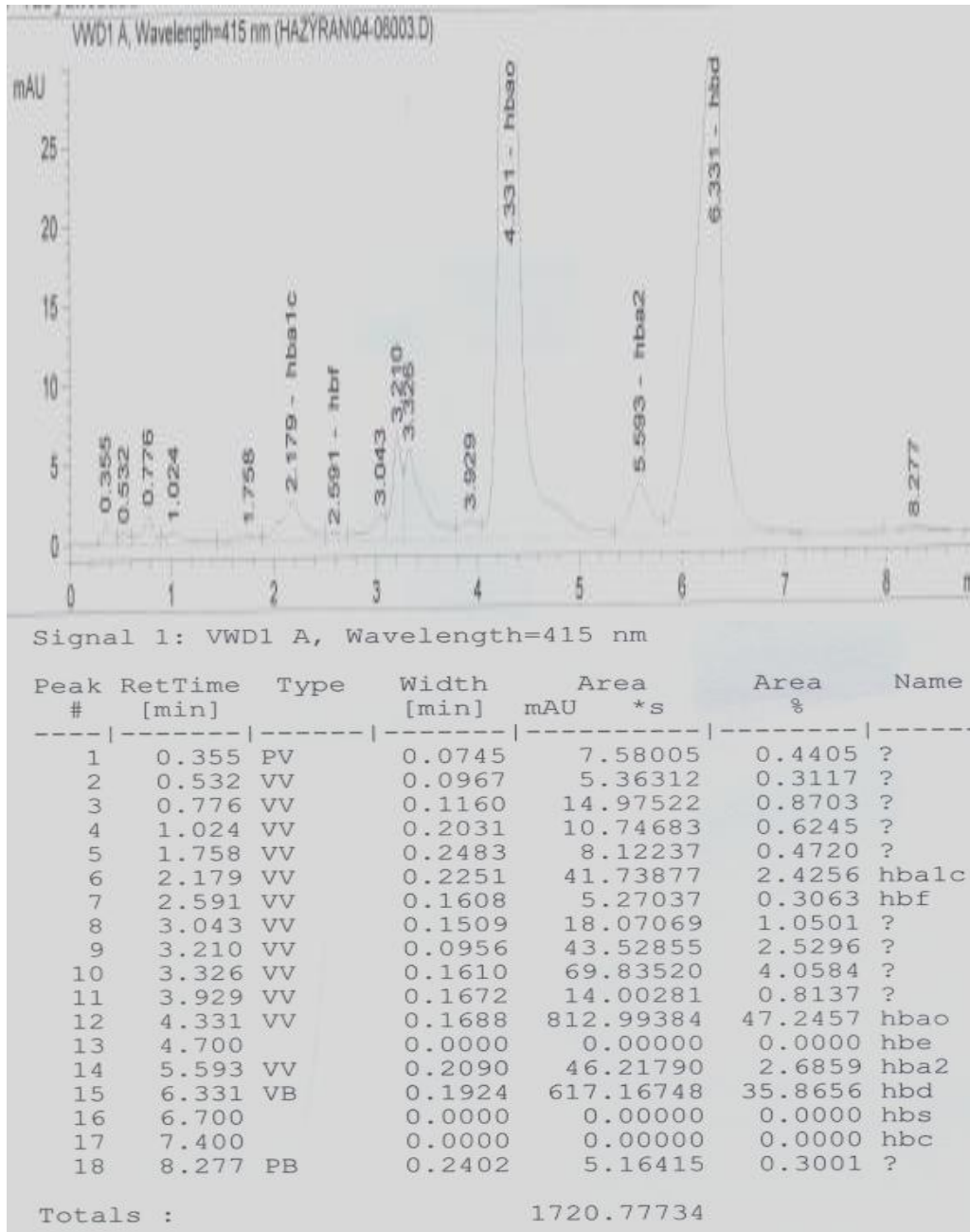
HPLC yöntemiyle Hb D Los Angeles taşıyıcı tanısı konan 10 olgunun ve Hb D homozigot olan bir olgunun hematolojik verileri Tablo 13’de, floresan sinyalleri Tablo 14’te ve HPLC görüntüsü Şekil 12’de verilmiştir.

Tablo 13. Hb D Los Angeles olgularının hematolojik verileri.

No	Ad Soyad	WBC 10 ⁹ /L	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hb Elekt.	% HbA ₂	% HbF
5	M.D.	13.8	5.70	10.9	34.7	60.9	19.2	31.5	AD	3.1	----
6	S.E.	7.4	4.08	11.4	34.4	84.3	27.9	33.1	AD	2.7	1.8
7	S.D	8.6	4.67	11.7	34.2	73.3	25.1	34.2	DD	3.0	1.7
8	F.D.	13.5	4.15	11.8	34.8	83.8	28.4	34.0	AD	2.6	----
9	G.V.	6.8	5.07	12.0	39.4	77.8	23.7	30.5	AD	3.4	1.5
10	S.N.	5.7	3.98	12.3	34.7	87.2	31.0	35.6	AD	2.8	1.7
11	H.K.	7.7	4.43	12.5	38.2	86.2	28.1	32.7	AD	2.9	1.5
12	D.Ö.	15.1	4.79	13.2	38.5	80.5	27.5	34.2	AD	2.9	1.7
13	E.G.	8.2	5.77	13.4	41.9	72.6	23.2	31.9	AD	5.1	1.5
14	F.K.	-----	4.87	13.7	42.9	88.2	28.1	31.9	AD	----	1.9
15	İ.N.	6.6	5.61	15.7	44.7	80.0	28.0	34.9	AD	2.8	1.8

Tablo 14. Hb D Los Angeles mutasyonunun floresan sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi.

Sample	Red	Green	Pads	Ratio (R::G)	Probe Designation
3.1	443	708	1	1 :: 1.6	Red/Green
3.2	213	169	1	1.26 :: 1	Red/Green
3.3	190	376	1	1 :: 1.98	Red/Green
3.4	575	47	1	12.23 :: 1	Red/Red
3.5	557	789	1	1 :: 1.42	Red/Green
3.9	133	200	1	1 :: 1.5	Red/Green
3.10	86	170	1	1 :: 1.98	Red/Green
3.13	235	392	1	1 :: 1.67	Red/Green
3.15	110	210	1	1 :: 1.91	Red/Green
3.18	116	204	1	1 :: 1.76	Red/Green



Şekil 12. Hb D Los Angeles olgusunun HPLC görüntüsü

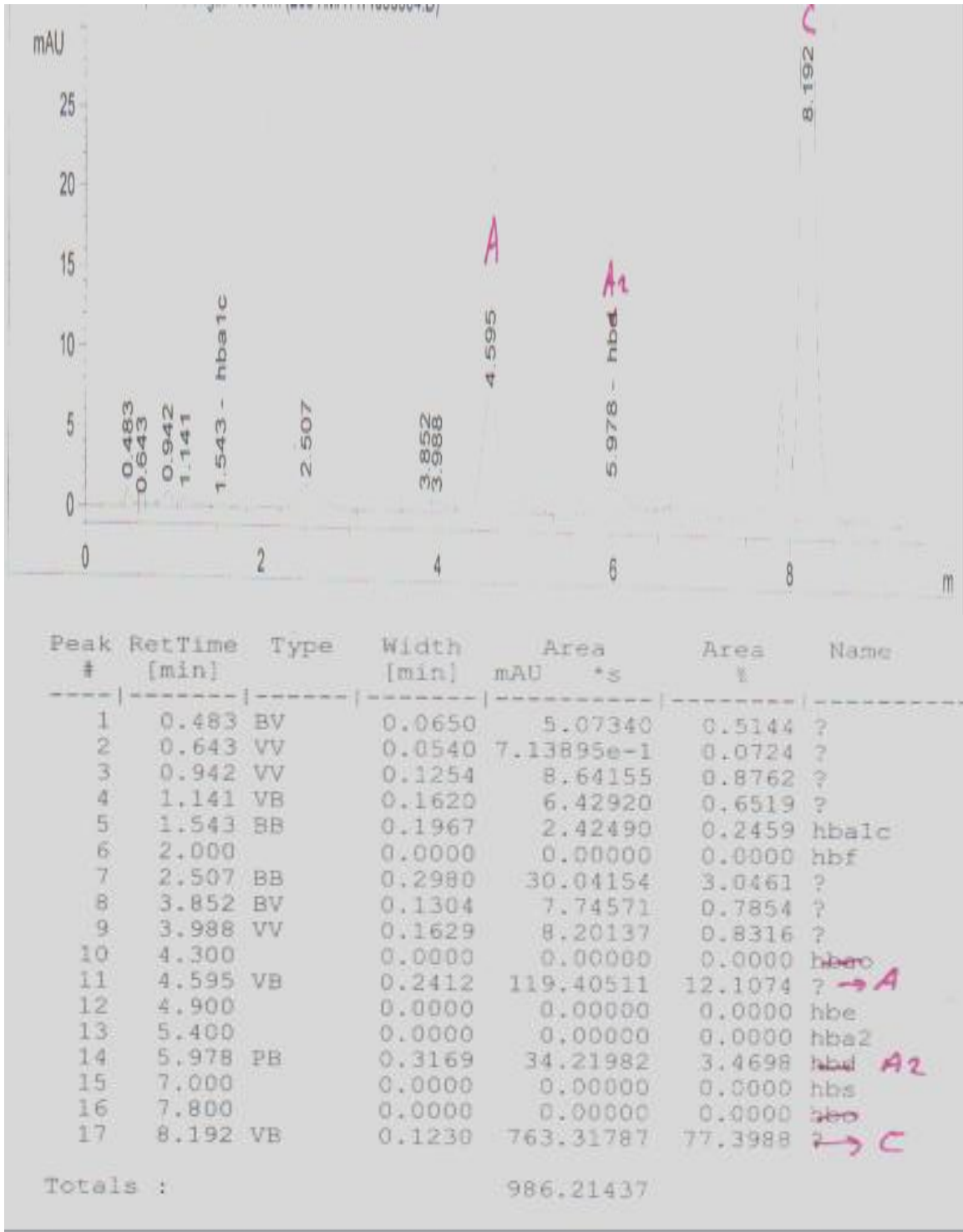
Mikroarray yöntemiyle Hb O Arab homozigot tanısı konan iki olgunun hematolojik verileri Tablo 15’de, floresan sinyalleri Tablo 16’da ve HPLC görüntüsü Şekil 13 ve 14’de verilmiştir.

Tablo 15. HbO Arab olgularının hematolojik verileri.

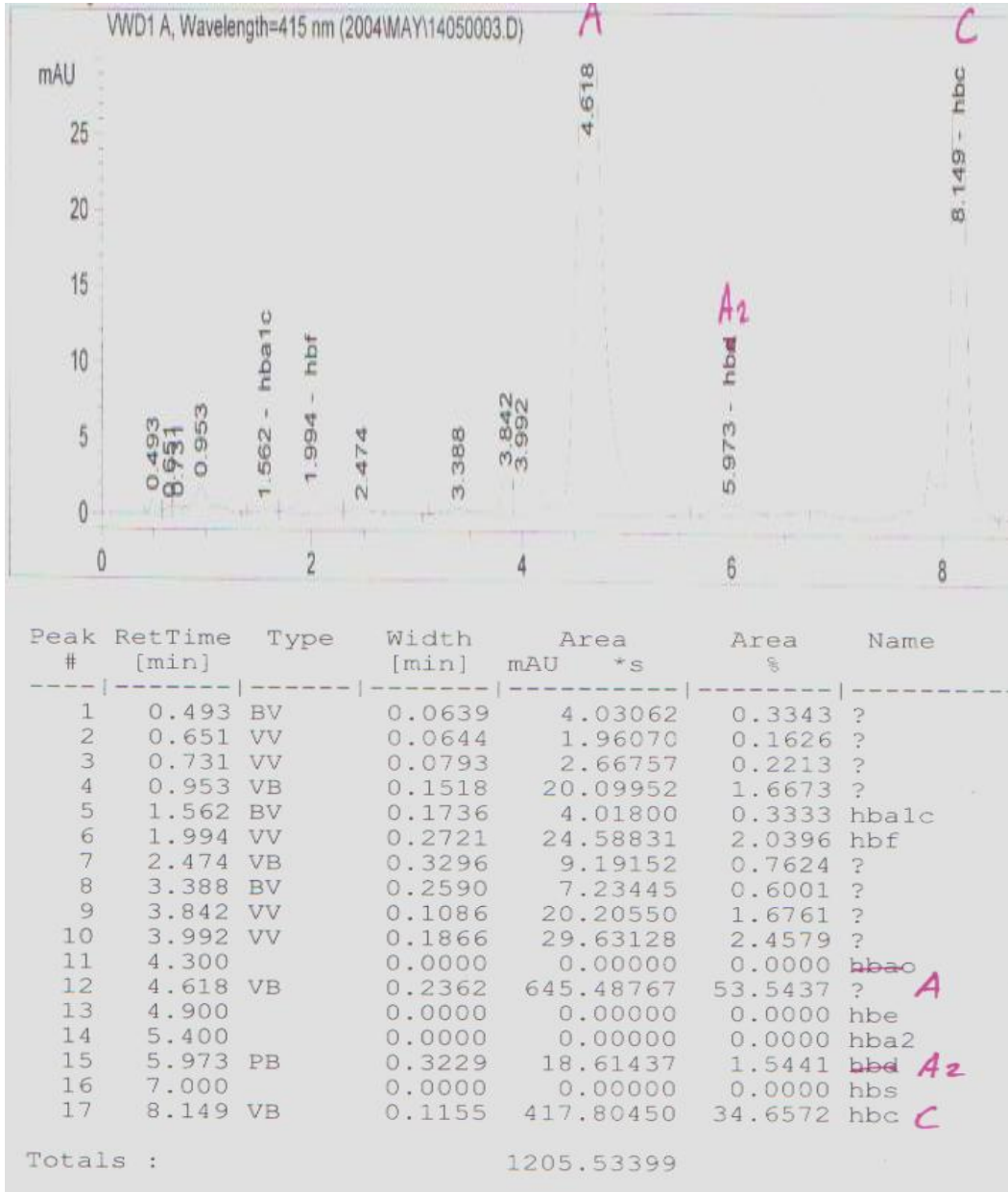
No	Ad Soyad	WBC 10 ⁹ /L	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hb Elekt.	% HbA ₂	% HbF
16	A.A.	----	3.98	8.6	26.2	65.9	32.7	32.7	AC?	5.1	3.0
17	B.A.	----	4.50	11.6	35.9	79.7	25.7	32.3	AC?	2.2	0.6

Tablo 16. HbO Arab mutasyonlarının floresan sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi.

Sample	Red	Green	Pads	Ratio (R::G)	Probe Designation
3.7	136	9	1	15.11 :: 1	Red/Red
3.8	270	22	1	12.27 :: 1	Red/Red
Hb O arab	372	1	1	372 :: 1	Red/Red



Şekil 13. HbO Arab ölgusunun HPLC görüntüsü



Şekil 14. HbO Arab olgusunun HPLC görüntüsü

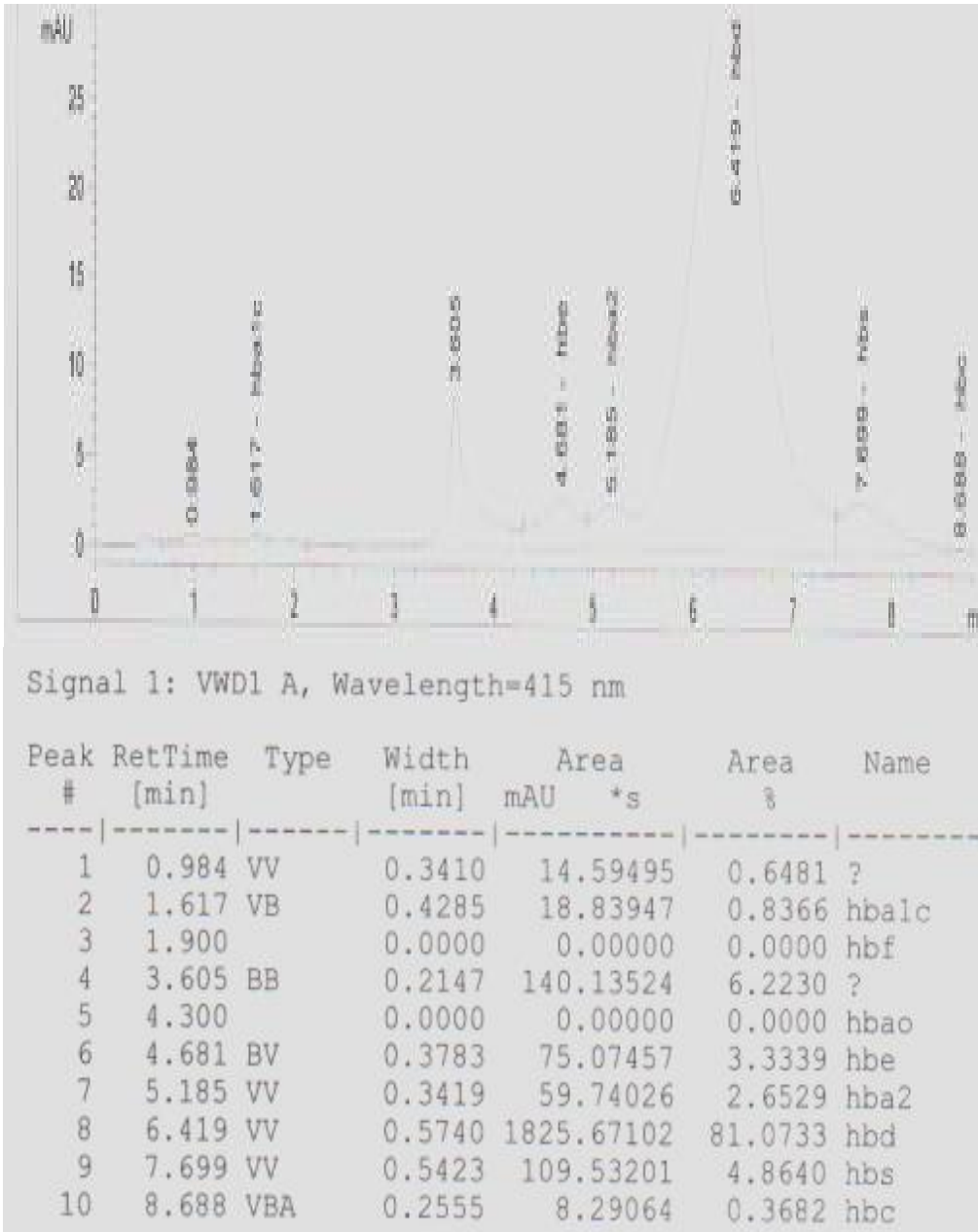
Mikroarray yöntemiyle Hb E Saskatoon tanısı konan bir olgunun hematolojik verileri Tablo 17’de, floresan sinyal verileri Tablo 18’de, HPLC görüntüsü de Şekil 15’de verilmiştir.

Tablo 17. Hb E Saskatoon olguların hematolojik verileri.

No	Adı Soyadı	WBC 10 ⁹ /L	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hb Elekt.	% HbA ₂	% HbF
18	S.A.Y.	7.0	4.28	12.4	36.3	84.9	29.0	34.1	EE Saskaton	79.6	1.5

Tablo 18. Hb E Saskatoon mutasyonunun floresan sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi.

Sample	Red	Green	Pads	Ratio (R::G)	Probe Designation
4.6	967	1	1	967 :: 1	Red/Red
hb Esas mt	567	5	1	113.4 :: 1	Red/Red



Şekil 15. Hb E Saskatoon mutasyonunun HPLC görüntüsü

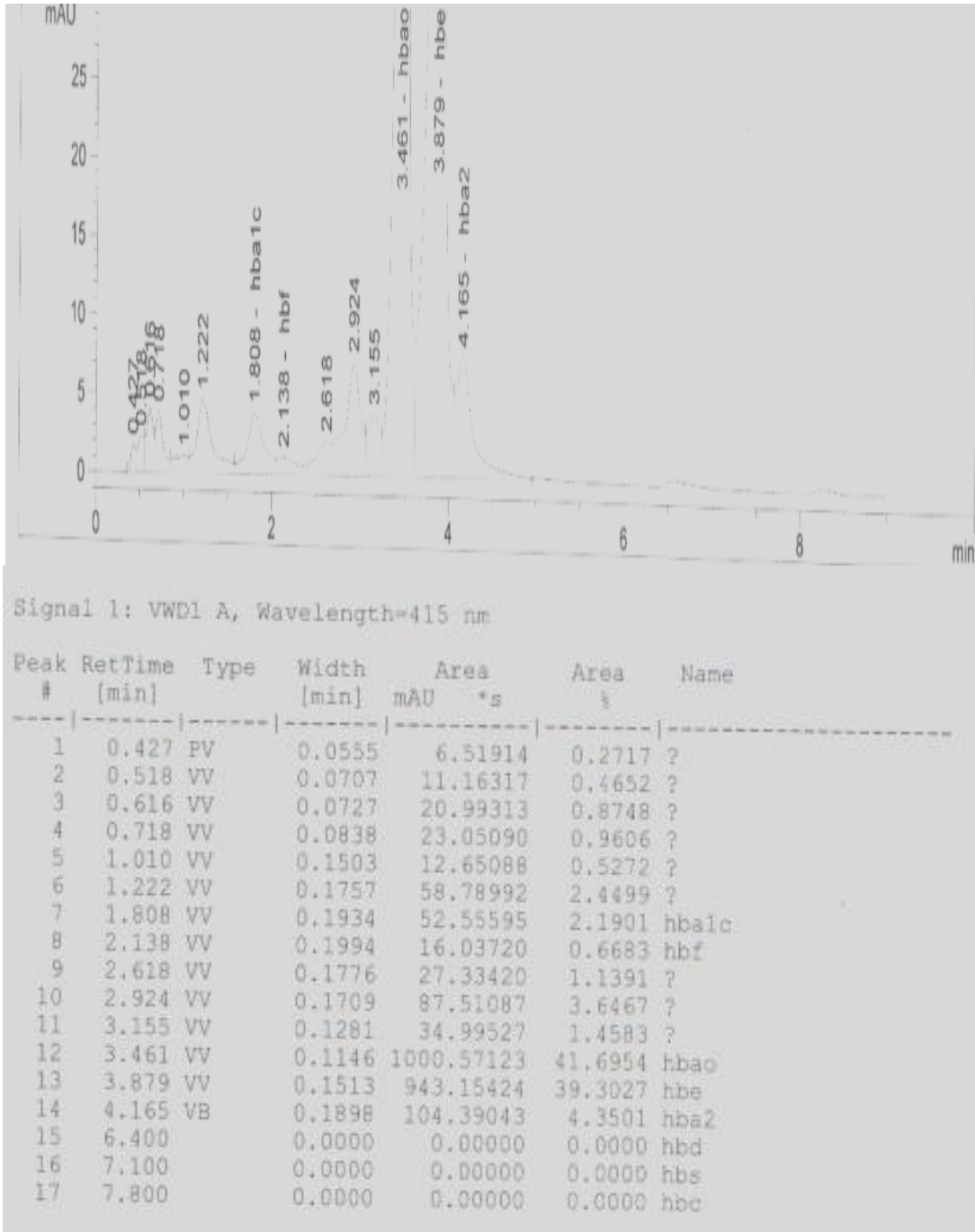
Mikroarray yöntemiyle Hb G Coushatto tanısı konan iki olgunun hematolojik verileri Tablo 19’da, floresan sinyali Tablo 20’de, HPLC görüntüleri de Şekil 16 ve 17’de verilmiştir.

Tablo 19. Hb G Coushatto olgularının hematolojik verileri.

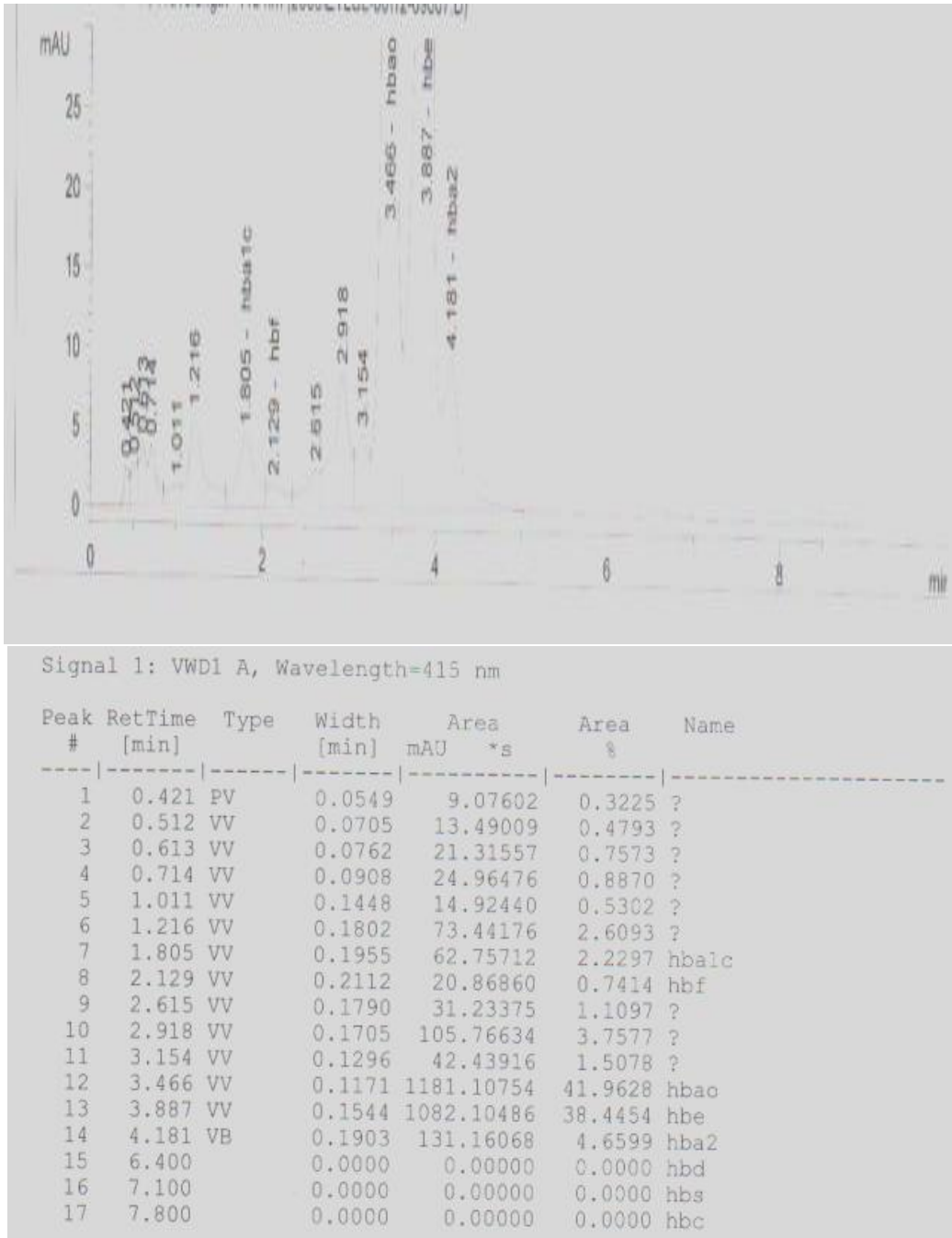
No	Ad Soyad	WBC 10 ⁹ /L	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hb Elekt.	% HbA ₂	% HbF	% HPLC HbA ₂
19	Y.G.	6.4	4.76	13.4	42.8	90.0	29.1	12.3	HbG Causatta	2.8	0.6	4.63
20	E.G.	11.2	5.50	13.6	43.0	78.0	24.7	31.6	HbG Causatta	2.9	0.8	4.87

Tablo 20. Hb G Coushatto mutasyonlarının floresan sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi.

Sample	Red	Green	Pads	Ratio (R::G)	Probe Designation
4.12	45	37	1	1.22 :: 1	Red/Green
4.13	38	29	1	1.31 :: 1	Red/Green
hbg cous mt	178	2	1	89 :: 1	Red/Red



Şekil 16. Hb G Coughatto olgusunun HPLC görüntüsü



Şekil 17. Hb G Coushatto olgusunun HPLC görüntüsü.

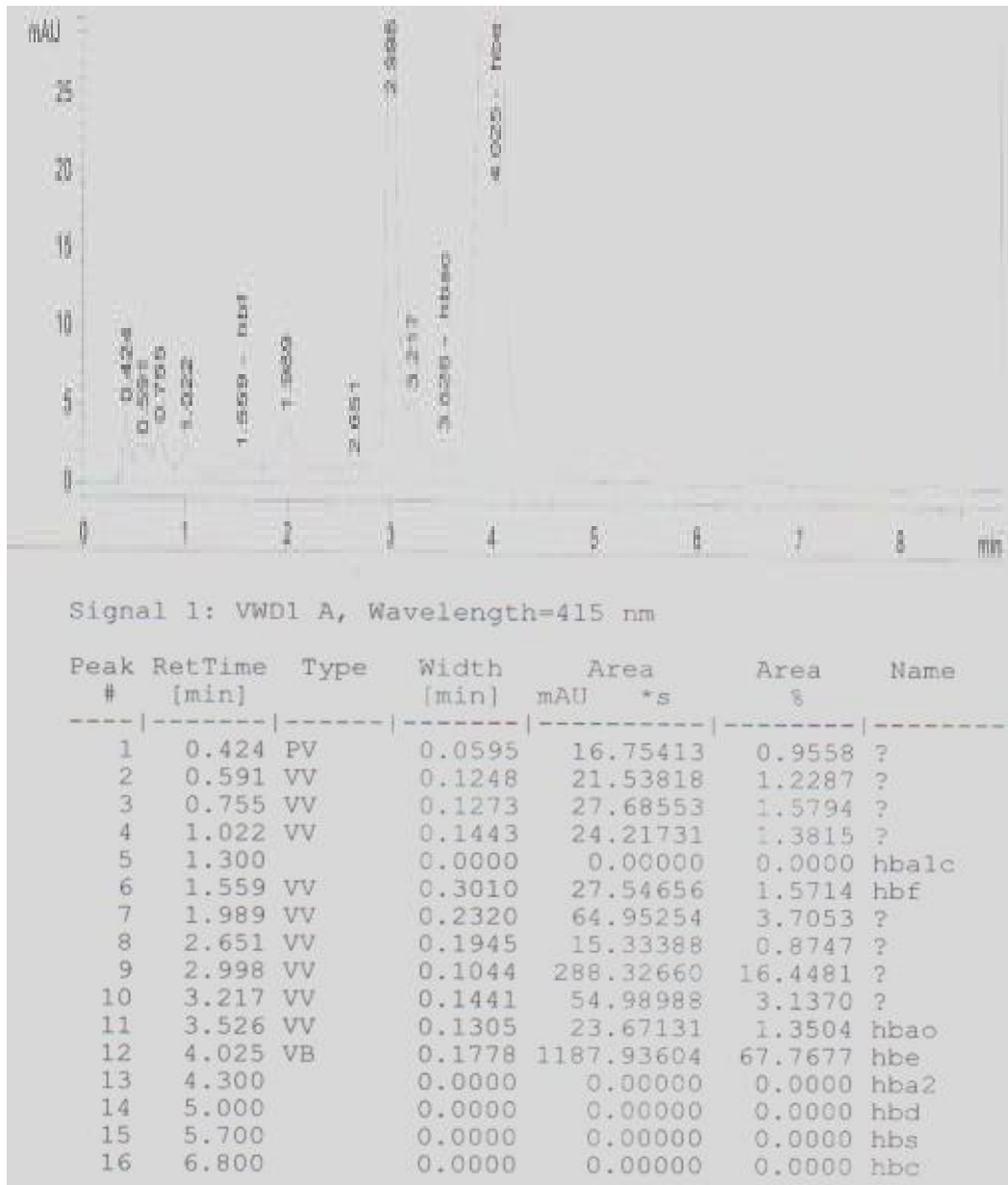
Mikroarray yöntemiyle Hb D İran tanısı konan olgunun hematolojik verileri Tablo 21’de, floresan sinyal verileri Tablo 22’de, HPLC görüntüsü de Şekil 18’de verilmiştir.

Tablo 21. Hb D İran mutasyonunun hematolojik verileri.

No	Adı Soyadı	WBC 10 ⁹ /L	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hb Elekt.	% HbA ₂	% HbF
21	N.G.	6.8	4.66	10.4	42.7	91.7	22.3	24.4	D İran	3.1	1.3

Tablo 22. Hb D İran olgusunun floresan sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi.

Sample	Red	Green	Pads	Ratio (R::G)	Probe Designation
4.14	199	1	1	199 :: 1	Red/Red
hbD iran mt	160	0	1	Inf	Red/Red



Şekil 18. Hb D-İran oligusunun HPLC görüntüsü

4.2. Beta Talasemi Olguları

4.2.1. Hematolojik Veriler

Beta talasemi olguların hematolojik verileri (WBC ($10^9/L$), RBC ($10^{12}/L$), Hb (g/dl), Hct (%), MCV (fL), MCH (pg), MCHC (g/dL)), Hb elektroforez tiplendirilmesi, mikrokolon HbA₂ yüzdesi ve alkali denaturasyon HbF yüzdesi çalışılmış veriler tablo 23’de verilmiştir.

Tablo 23. β - talasemili olguların hematolojik verileri.

No	Adı Soyadı	WBC $10^9/L$	RBC $10^{12}/L$	Hb g/dl	Hct %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hb Elekt.	% Hb A ₂	% HbF
1	M.T.	5.8	1.81	4.7	14.6	81.2	25.9	32.0	AF	2.6	6.5
2	S.Ç.	14.4	2.39	4.9	15.2	63.6	20.3	31.9	F	1.8	43.3
3	M.G.	75.8	3.34	6.3	27.7	82.9	19.0	22.9	F	1.4	72.0
4	Y.K.	5.9	2.39	6.7	17.9	74.7	28.0	37.6	AA	2.6	3.3
5	S.Ö.	13.5	2.98	7.4	21.7	72.9	25.0	34.3	AF	2.6	31.0
6	D.Ç.	28.0	3.25	8.8	26.5	81.5	27.0	33.1	AF	2.4	4.5
7	E.G.	5.5	2.86	7.8	23.2	81.1	27.2	33.5	AF	2.4	15.4
8	M.D.	27.2	3.33	9.0	28.8	86.5	27.1	31.3	F	1.4	34.0
9	N.Y.	3.6	4.05	11.7	34.3	84.7	28.9	34.1	AA	2.5	1.4
10	H.B.	4.6	2.39	6.0	19.3	81.0	25.3	31.2	AF	2.3	39.5
11	A.Ö.	9.8	3.36	6.5	22.9	62.7	17.9	28.5	AF	5.6	16.0
12	C.A.	38.1	3.35	9.6	29.0	86.6	28.7	33.2	AA	2.9	3.3
13	K.S.	7.8	3.60	10.0	30.6	84.9	27.9	32.9	AA	3.1	1.8
14	S.K.		2.82	7.1	23.9	84.9	25.4	29.9	AA	5.0	3.8
15	T.E.	9.7	2.25	5.0	16.7	74.3	22.5	30.2	AF	3.0	18.4
16	S.S.	13.2	3.24	8.8	25.2	77.9	27.0	34.6	AA	2.7	1.5
17	M.E.	7.9	3.30	9.3	27.5	83.2	28.2	33.9	AF	2.1	8.7
18	V.T.	12.0	3.96	11.7	36.5	92.2	29.6	32.1	AA	2.7	1.0
19	A.K.	59.1	1.92	6.0	17.3	89.9	31.5	35.0	AA	2.9	2.6

Olguların hemoglobin tipleri selüloz asetat elektroforez yöntemiyle çalışıldığında 8 olgunun HbAA, 8 olgunun HbAF ve 3 olgununda HbF olduğu gözlenmiştir (Tablo 23).

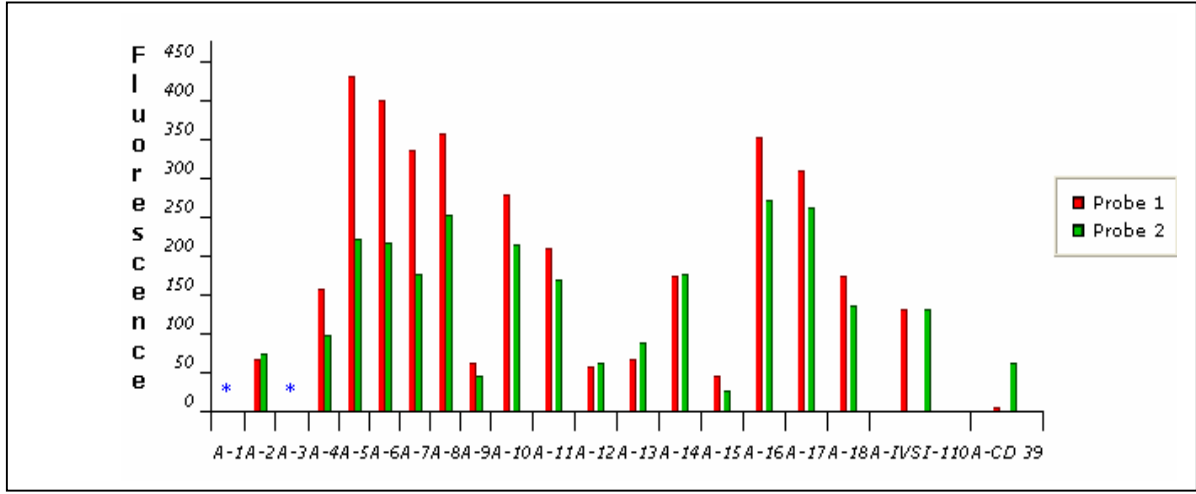
4.2.2. Mutasyon Analizleri

Çalışma kapsamına alınan beta talasemili olguların mutasyon tipleri mikroarray cihazında çalışılmış olguların çifte heterizigot özellik gösterdiği bulunmuştur(Tablo 24).

Tablo 24. β -talasemili olguların mutasyon tipleri.

No	Adı Soyadı	Mutasyon Tipi
1	M.T.	IVS I-110/Cd8
2	S.Ç.	IVS I-110/Cd8
3	M.G.	IVS I-110/Cd8
4	Y.K.	IVS I-110/Cd8
5	S.Ö.	IVS I-110/Cd8
6	D.Ç.	IVS I-110/Cd8
7	E.G.	IVS I-1/Cd8
8	M.D.	Cd8/-30
9	N.Y.	IVS I-110 /-30
10	H.B.	IVS I-110 /-30
11	A.Ö.	IVS I-6/-30
12	C.A.	IVS I-110/ IVS I-6
13	K.S.	IVS I-110/ IVS I-6
14	S.K.	IVS I-110/ IVS I-6
15	T.E.	IVS I-110/ IVS I-6
16	S.S.	IVS I-6/ IVS II-1
17	M.E.	IVS I-110 / IVS II-1
18	V.T.	IVS I-110 /IVS I-1
19	A.K.	IVS I-110 /IVS I-1

IVS1-110, IVS1-1 ,IVS1-6, , IVS II-I, cd 8 ve -30 mutasyonunun mikroarray analiz grafikleri Şekil 19-25 arasında, floresan sinyal verileri ise Tablo 25-30 arasında verilmiştir.

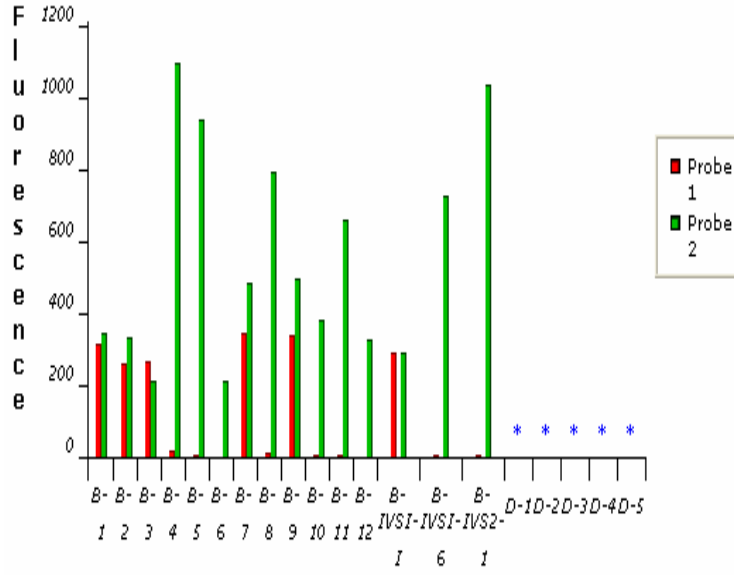


Şekil 19. IVS I-110 mutasyonunun mikroarray analiz grafiği.

2,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18; heterozigot, IVS1-110 kontrol örneği

Tablo 25. IVS I-110 mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi.

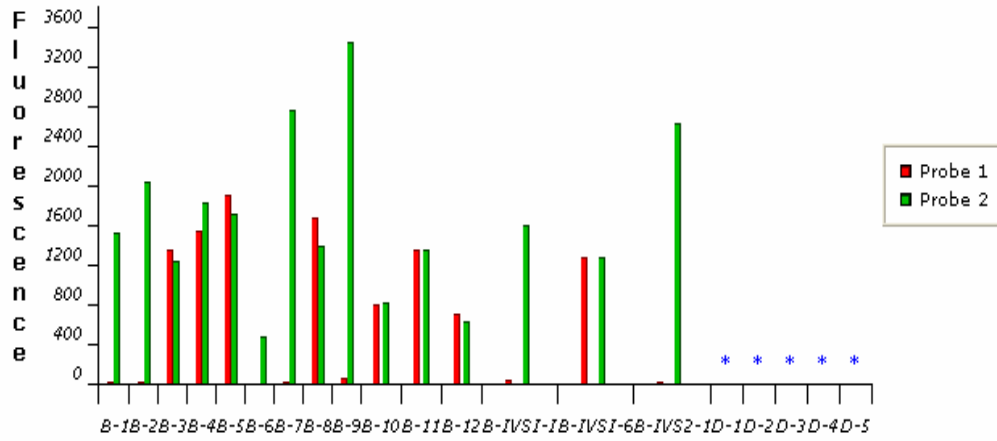
Sample	Red	Green	Pads	Ratio (R::G)	Probe Designation
A-1	N/A	N/A	0	N/A	N/A
A-2	70.72	78	1	1 :: 1.1	Red/Green
A-3	N/A	N/A	0	N/A	N/A
A-4	163.2	101	1	1.62 :: 1	Red/Green
A-5	446.08	230	1	1.94 :: 1	Red/Green
A-6	413.44	224	1	1.85 :: 1	Red/Green
A-7	348.16	182	1	1.91 :: 1	Red/Green
A-8	369.92	261	1	1.42 :: 1	Red/Green
A-9	65.28	49	1	1.33 :: 1	Red/Green
A-10	288.32	221	1	1.3 :: 1	Red/Green
A-11	217.6	175	1	1.24 :: 1	Red/Green
A-12	59.84	65	1	1 :: 1.09	Red/Green
A-13	70.72	92	1	1 :: 1.3	Red/Green
A-14	179.52	184	1	1 :: 1.02	Red/Green
A-15	48.96	29	1	1.69 :: 1	Red/Green
A-16	364.48	280	1	1.3 :: 1	Red/Green
A-17	320.96	270	1	1.19 :: 1	Red/Green
A-18	179.52	140	1	1.28 :: 1	Red/Green
A-IVSI-110	136	136	1	1 :: 1	Red/Green



Şekil 20. IVS I-1 mutasyonunun mikroarray analiz grafiği. 1,2,3,7,9; heterozigot örnek, IVS1-1 kontrol örneği.

Tablo 26. IVS I-I mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi.

Sample	Red	Green	Pads	Ratio (R::G)	Probe Designation
B-1	318	352.07	1	1 :: 1.11	Red/Green
B-2	262	335.14	1	1 :: 1.28	Red/Green
B-3	270	214.15	1	1.26 :: 1	Red/Green
B-4	19	1107.04	1	1 :: 58.27	Green/Green
B-5	12	947.33	1	1 :: 78.94	Green/Green
B-6	1	217.78	1	1 :: 217.78	Green/Green
B-7	352	490	1	1 :: 1.39	Red/Green
B-8	15	799.73	1	1 :: 53.32	Green/Green
B-9	341	503.31	1	1 :: 1.48	Red/Green
B-10	11	389.58	1	1 :: 35.42	Green/Green
B-11	8	665.43	1	1 :: 83.18	Green/Green
B-12	4	332.72	1	1 :: 83.18	Green/Green
B-IVSI-I	294	294	1	1 :: 1	Red/Green

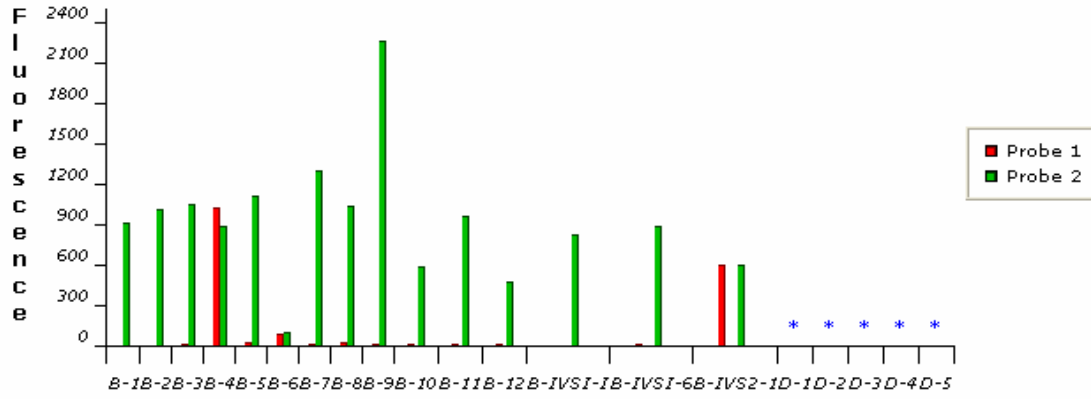


Şekil 21. IVS I-6 mutasyonunun mikroarray analiz grafiği.

3,4,5,8,10,11,12 heterozigot örnek, IVS1-6 kontrol örneği

Tablo 27. IVS I-6 mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi.

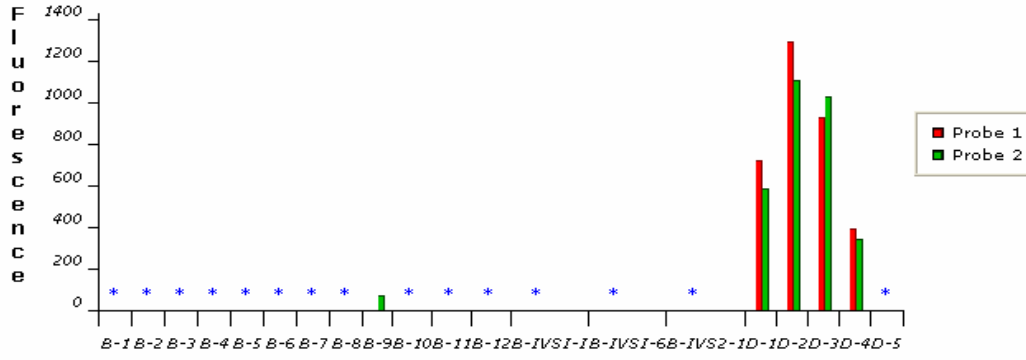
Sample	Red	Green	Pads	Ratio (R::G)	Probe Designation
B-1	33.58	1568	1	1 :: 46.7	Green/Green
B-2	22.38	2081	1	1 :: 92.97	Green/Green
B-3	1391.54	1261	1	1.1 :: 1	Red/Green
B-4	1570.61	1875	1	1 :: 1.19	Red/Green
B-5	1947.4	1745	1	1.12 :: 1	Red/Green
B-6	11.19	496	1	1 :: 44.32	Green/Green
B-7	37.31	2826	1	1 :: 75.75	Green/Green
B-8	1719.83	1424	1	1.21 :: 1	Red/Green
B-9	70.88	3525	1	1 :: 49.73	Green/Green
B-10	831.94	837	1	1 :: 1.01	Red/Green
B-11	1391.54	1379	1	1.01 :: 1	Red/Green
B-12	723.75	649	1	1.12 :: 1	Red/Green
B-IVSI-1	41.04	1636	1	1 :: 39.87	Green/Green
B-IVSI-6	1302	1302	1	1 :: 1	Red/Green



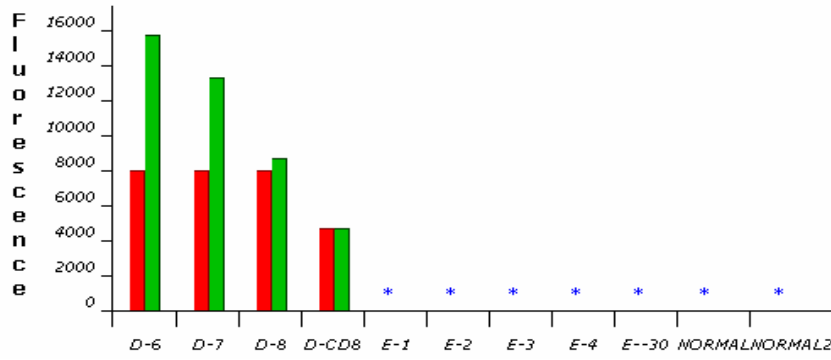
Şekil 22. IVS II-1 mutasyonunun mikroarray analiz grafiği. 4B ve 6B; heterozigot, IVSII-1 kontrol örneği.

Tablo 28. IVS II-1 mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi.

Sample	Red	Green	Pads	Ratio (R::G)	Probe Designation
B-1	8.07	924	1	1 :: 114.56	Green/Green
B-2	8.07	1026	1	1 :: 127.2	Green/Green
B-3	21.51	1063	1	1 :: 49.42	Green/Green
B-4	1035.11	892	1	1.16 :: 1	Red/Green
B-5	34.95	1129	1	1 :: 32.3	Green/Green
B-6	94.1	107	1	1 :: 1.14	Red/Green
B-7	13.44	1314	1	1 :: 97.75	Green/Green
B-8	29.57	1049	1	1 :: 35.47	Green/Green
B-9	16.13	2282	1	1 :: 141.46	Green/Green
B-10	16.13	595	1	1 :: 36.88	Green/Green
B-11	24.2	972	1	1 :: 40.17	Green/Green
B-12	16.13	488	1	1 :: 30.25	Green/Green
B-IVSI-I	8.07	832	1	1 :: 103.15	Green/Green
B-IVSI-6	21.51	895	1	1 :: 41.61	Green/Green
B-IVS2-1	613	613	1	1 :: 1	Red/Green



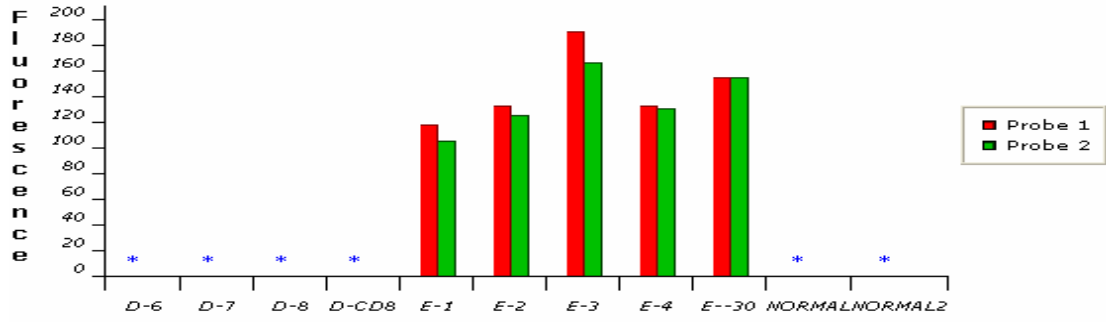
Şekil 23. Cd8 mutasyonunun mikroarray analiz grafiği. 1D,2D,3D,4D heterozigot örnek.



Şekil 24. Cd8 mutasyonunun mikroarray analiz grafiği. 6D, 7D,8D heterozigot örnek.

Tablo 29. Cd8 mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi.

Sample	Red	Green	Pads	Ratio (R::G)	Probe Designation
D-1	744	603.7	1	1.23 :: 1	Red/Green
D-2	1333	1137.84	1	1.17 :: 1	Red/Green
D-3	956	1058.34	1	1 :: 1.11	Red/Green
D-4	405	355.27	1	1.14 :: 1	Red/Green
D-5	N/A	N/A	0	N/A	N/A
D-6	1312	1035.98	1	1.27 :: 1	Red/Green
D-7	1195	1008.66	1	1.18 :: 1	Red/Green
D-8	921	722.95	1	1.27 :: 1	Red/Green
D-CD8	318	318	1	1 :: 1	Red/Green



Şekil 25. -30 mutasyonunun mikroarray analiz grafiği.
E1, E2, E3, E4 Heterozigot, E -30 kontrol örneği

Tablo 30. -30 mutasyonunun floresen sinyali, sinyal oranları ve analiz sonucunda belirlenen genotipi.

Sample	Red	Green	Pads	Ratio (R::G)	Probe Designation
E-1	118.63	106	1	1.12 :: 1	Red/Green
E-2	133.25	126	1	1.06 :: 1	Red/Green
E-3	191.75	167	1	1.15 :: 1	Red/Green
E-4	133.25	131	1	1.02 :: 1	Red/Green
E--30	156	156	1	1 :: 1	Red/Green

5. TARTIŞMA

Hemoglobinopati ülkemizde en sık görülen kalıtsal hastalıklar arasında yer almaktadır ve ülkemizin özellikle Çukurova Bölgesinde önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü, dünyada hemoglobinopati sıklığını % 5.1, taşıyıcı sayısını ise; 266 milyon olarak açıklamıştır. Her yıl yaklaşık 300.000 hasta çocuğun dünyaya geldiği bildirilmiştir¹⁸.

Hemoglobin molekülün yapısında yer alan globin zincirleri üzerindeki aminoasit değişikliği sonucu anormal hemoglobinler meydana gelmektedir³⁶. Anormal hemoglobinlerin dağılımı coğrafik lokalizasyon ve ırksal gruplara göre oldukça farklılık göstermektedir. Milyonlarca insanın etkilendiği anormal hemoglobinlerin en yaygın olanları Hb S, Hb D, Hb E ve Hb C' dir³. Hb S 1949 yılında Pauling ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Ülkemizde de ilk kez 1957 yılında Aksoy tarafından bildirilmiştir⁴. Çeşitli çalışmalar da Türkiye'de Hb S frekansının % 0.5–44.2 arasında olduğu gösterilmiştir^{6,80,81}.

Yüreğir ve arkadaşları Çukurova bölgesinde Hb S taşıyıcılığını % 8,2 olarak bildirmişlerdir⁵¹. Kılınç HbS'in taşıyıcı oranını Çukurova bölgesi için %3-47 arasında olduğunu, Türkiye'nin güney bölgesinde % 2,5, doğu bölgesinde %0,5, Ege bölgesinde %0,5 ve Marmara bölgesinde % 2,5 olarak bildirmişlerdir⁵³. Hb S taşıyan eritrositler deoksijenasyonla orak şekline gelip kristalize olduklarından eritrositlerin parçalanmasına ve çeşitli klinik problemlere neden olmaktadır²⁴. Orak hücre anemili hastalarda anemi doğumdan birkaç ay sonra başlar. Bu hastalarda HbF değerinin %1-30 arasında değiştiği görülmüştür^{29,30}.

Bu çalışmada seluloz asetat elektroforeziyle Hb S taşıyıcısı tanısı konan 4 olgunun hematolojik verileri Tablo 11'de verilmiştir. Hb S alkali pH'da seluloz asetat elektroforezinde Hb D,Hb G-Coushatta ile aynı yere göç etmektedir. Hb S'i diğer hemoglobinlerden ayırmak içinde oraklaşma testi, HPLC ve moleküler analizler yapılır.

Ülkemizde yaygın olarak gözlenen diğer anormal hemoglobin ise Hb D Los Angeles olup görülme sıklığı % 0,2 olarak saptanmıştır. Hb F ve HbA₂ düzeyleri normaldir^{10,24}.Hb A/D heterozigot ve Hb D/D homozigot genotipli bireylerde herhangi bir semptom görülmemektedir. HbS/D genotipli bireylerde orak hücre sendromu görülmektedir³. Kılınç'ın çalışmasında Hb D'nin oranı Çukurova bölgesi için % 0,3 olarak bildirilmiştir⁵³.Atalay ve arkadaşları Denizli ilinde en sık gözlenen anormal

varyantın %57,8 sıklıkla HbD-Los Angeles olduğunu, Hb S'in % 21.9 oranıyla en sık 2. anormal hemoglobin olduğunu, Hb G-Cousatta, Hb E Saskatoon ve Hb C sıklığını ise sırasıyla %15.6, %3.1 ve % 1.6 olarak bildirmişlerdir⁴¹. Yüreğir ve arkadaşlarının Kahramanmaraş ve çevresinde yaptıkları tarama çalışmasında HbD taşıyıcı oranını %0,27 olarak saptamışlardır⁸².

Bu çalışmada Hb D taşıyıcısı olan 10 olgunun ve Hb D hastası olan bir olgunun hematolojik verileri Tablo 13'de gösterilmiştir. Hematolojik verileri genelde normal olmasına karşın bazı olguların Hb'ni ve MCV'si düşük bulunmuştur. Hb D tanısı içinde HPLC ve moleküler çalışmalar yapılmıştır (Şekil 12, Tablo 14)

Türkiye'de en yaygın görülen 4. anormal hemoglobin HbO Arab'tır. İlk olarak bir Arabta saptanmıştır daha sonra Türkiye'de, Bulgaristan'da ve Makedonya'da bulunmuştur. Bu varyant hemoglobinin, homozigot hali ilk kez Kütahya'da bir ailede saptanmıştır. Elektroforetik mobilitesi Hb A₂ ile aynıdır⁴.

Hb O Arab hastası olan 2 olgunun hematolojik verileri Tablo 15'te verilmiştir. İki hastanında Hb ve MCV değerleri düşük çıkmıştır. HPLC analiz sonucunda Hb E gibi görülmektedir (Şekil 13 ve 14). Yapılan mikroarray analizi sonucunda da Hb O Arab olduğu saptanmıştır (Tablo 16).

Hb E ülkemizde üçüncü sıklıkta gözlenmektedir özellikle Çukurova bölgesinde bulunmaktadır ve taşıyıcı sıklığı %0,16- 2,4 olarak bildirilmiştir⁴. Aksoy tarafından Mersin Eti-Türklerinde %1.37 ve Hatay Eti-Türklerinde ise % 2.43 oranında saptanmıştır⁸¹. Hb E talasemik bir mutasyon olup fenotipi diğer hemoglobin varyantlarından farklı olarak kırmızı kan hücrelerinde mikrositoz ve hipokromi gözlenir. Bazı hastalar asemptomatiktir. Hafif sarılık olduğu gibi, karaciğer ve dalakta hafifçe büyümüştür. Periferik yaymada şiddetli hipokromi ile beraber target hücreleride bulunur^{42,43}. Hb E alkali pH elektroforezinde HbA₂ ile aynı yere göç etmektedir. Aynı şekilde HbC'de aynı yere göç etmektedir. Elektroforetik mobilitesi Hb C' ye çok benzesede kesin ayırım asit pH'da agar jel elektroforezi, HPLC ve mutasyon analizleri ile yapılmaktadır⁴⁴.

Hb E Saskaton bölgemizde yaygın olarak gözlenen anormal hemoglobinler dışında gözlenen diğer anormal hemoglobinlerden biridir. Bugüne kadar Çukurova, Kayseri, Aksaray ve Antalya'da saptanmıştır⁴⁵. Hb E Saskatoon mutasyon tanısı konan bir olgunun hematolojik verileri Tablo 17'de verilmiştir. Bu olgu elektroforezde HbE/C gibi göç etmesine rağmen şekil 15'de gösterildiği gibi HPLC'de Hb D olarak belirlenmiştir. Yapılan moleküler analizler sonucunda Hb E, Hb C ve Hb D mutasyonu

tespit edilememiştir. Mikroarray yöntemiyle çalışılarak bu olgunun Hb E-Saskooton olduğu tespit edilmiştir (Tablo 18).

Bölgemizde görülen diğer nadir hemoglobin varyantıda Hb G- Cousatta'dır. Hb G-Coushatta seluloz asetat elektroforezinde elektroforetik mobilitesi HbS ve HbD'ye benzer özellik gösterir¹. Ülkemizde ilk defa Kastamonu'da daha sonraları Denizli ve Nazilli'de saptanmıştır⁸³. Hb G Coushatta olguların hematolojik verileri Tablo 19'da verilmiştir. Bir olgunun MCV ve MCH değerleri düşük bulunmuştur. Hb elektroforezinde Hb S gibi göç etmesine rağmen oraklaşma testi negatif çıkmış ve HPLC'de Hb E olarak saptanmıştır (Şekil 16 ve 17). Yapılan moleküler analizler sonucunda Hb E, Hb C ve Hb D mutasyonu tespit edilememiştir. Mikroarray yöntemiyle çalışılarak bu olguların Hb G Coushatta olduğu tespit edilmiştir (Tablo 20).

Hb D-İran ilk kez 1973'de tanımlanan β zincir varyantıdır. Hb S ve β talasemiyle kombinasyon oluşturduğu olgular rapor edilmiştir. Heterozigot hali hematolojik olarak normaldir^{1,84}. Hb D İran olgusunun hematolojik verileri Tablo 21'de verilmiştir. Hb değeri düşük bulunmuştur. Şekil 18'de gösterildiği gibi HPLC'de Hb E olarak gözlenmiştir. Mikroarray yöntemiyle çalışılarak bu olgunun Hb D-İran olduğu tespit edilmiştir (Tablo 22).

Anormal hemoglobinli toplam 21 olgunun 4'ü Hb S taşıyıcısı, 10 olgu Hb D taşıyıcısı, 1 olgu Hb D hastası, 2 olgu Hb O Arab, 1 olgu homozigot Hb E Saskatoon, 2 olgu Hb G Coushatta taşıyıcısı ve 1 olguda HbD İran olarak mikroarrayde saptanmıştır.

Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de alfa ve beta talasemiler yaygındır. Genellikle mikrositoz ve hipokromi ile karakterize olan bu bozuklukların birbirinden ayrımları ve doğru tanımlanmaları özellikle evlilik öncesi tarama programlarının yürütüldüğü Çukurova bölgesinde taşıyıcıların belirlenmesi açısından ayrı bir önem taşımaktadır²⁹.

Talasemilerin Türkiye'de en sık görülen tipi β -Talasemidir⁵⁷. β -talasemi kalıtsal otozomal resesif geçen bir hastalıktır ve otozomal resesif geçiş gösteren hastalıklarda taşıyıcılar, genellikle sağlıklıdırlar, ancak kendileri gibi bir taşıyıcıyla evlendikleri zaman hasta çocuk doğmasına neden olmaktadır¹². Akriba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği, Türkiye'de beklenenin de üzerinde β -talasemili çocuk doğmasına neden olmaktadır. Türkiye'de yaklaşık 1.300.000 talasemi taşıyıcısı olduğu ve 4000 hasta birey bulunduğu bildirilmektedir⁵⁷.

Talasemilerin tanısında en iyi yol öncelikle hematolojik verilerin analizidir. Talasemi taşıyıcı tanısında kan sayımı, HbA₂ ve HbF düzeyleri kullanılmaktadır. HbA₂ oranı mikrokolon ve HPLC sistemiyle HbF oranı da alkali denaturasyon ve HPLC sistemiyle yapılmaktadır⁸⁵. MCV ve MCH değerlerinin sırasıyla 80 fL ve 27 pg altındaki değerlere sahip olan olgularda talasemi düşünülerek moleküler analizler yapılmalıdır. Hb A₂ konsantrasyonları %3,7 ve/veya HbF için % 2.0'nin üzerindeki olgular β talasemi taşıyıcısı olarak kabul edilerek moleküler düzeyde araştırılmaktadır⁸⁶. Anabilim dalımızda talasemi mutasyonlarının saptanmasında kullanılan moleküler analizler ARMS, RFLP, DNA dizi analizi ve en son olarak ta mikroarray yöntemidir⁸⁵.

Bu çalışmada talasemili olguların hemoglobin elektroforezi sonuçlarında 8 olgunun HbAA, 8 olgunun HbAF ve 3 olgununda HbFF olduğu gözlenmiştir (Tablo 23). Mikrokolon kromatografisi yöntemiyle saptanan HbA₂ düzeyleri 1,4-5,6 arasında bulunmuştur. Aksoy'un çalışmasında; tüm olguların HbA₂ düzeyleri normal sınırın üstünde bulunmuştur (%3,6-5,6)⁸⁷. Tanrıverdi'nin çalışmasında; HbA₂ düzeyleri 5'i hariç, 13 olguda normal sınırın üzerinde bulunmuştur⁸⁸. Topal'ın çalışmasında HbA₂ düzeyleri heterozigot taşıyıcılarda %3.9, homozigotlarda %2.5 bulunmuştur⁸⁹. Yüreğir ve arkadaşları Kahramanmaraş ve çevresinde yaptıkları tarama çalışmasında HbA₂ düzeyi %3,5 'in üzerindeki talasemi taşıyıcı sıklığını %0,68 olarak saptamışlardır⁸².

Bu çalışmada talasemili olguların alkali denaturasyon yöntemiyle HbF değerleri % 1.0-72.0 arasında bulunmuştur (Tablo 23). On beş olgunun HbF değerleri normal sınırın üzerinde bulunmuştur. Arpacı'nın çalışmasında ; HbF değeri yüksek olan 2 olguda mutasyon tipi IVS1-110 bulunmuş, 2 olguda HbAS olup talasemi mutasyonu yine IVS1-110 bulunmuş ve bir olgudada HbSF ve IVS1-110 mutasyonu bulunmuştur⁶⁰. Tanrıverdi'nin çalışmasında; Hb F düzeyleri %2.5-5.6 aralığında; 10 olgunun Hb F değerleri normal ve 7 olgunun yüksek olduğu bildirilmiştir (%2.1-5.6)⁸⁸. Topal'ın çalışmasında Hb F değerleri; heterozigot taşıyıcılarda % 3.1, homozigotlarda %10.1 bulunmuştur⁸⁹.

Ülkemizde β-talasemi mutasyon tiplerini belirlemeye yönelik bir çok çalışma yapılmıştır. β-talasemi Türkiye' de ilk olarak 1941 yılında Aksoy tarafından tanımlanmıştır. Fakat β-talaseminin ciddi bir sağlık problemi olduğu 1950'li yılların sonlarına doğru anlaşılmıştır⁹⁰. Daha sonraki yıllarda talasemiye yönelik çalışmalarda Türkiye'nin birçok bölgesinde taşıyıcıların olduğu ve yoğunluğun güney illerimizde daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Aksoy ve arkadaşları Çukurova’da β talasemili bir ailenin mutasyon tiplemesinde sadece IVS-1-110 ve IVS I-110 ve IVS I-1 mutasyonlarını saptamışlardır⁸⁷.

Çürük ve arkadaşları Çukurova’ da β talaseminin genetik heterojenitesini vurgulamışlar ve mutasyonların görülme sıklığını rapor etmişlerdir. (IVS-1-110 (G→A) %57,3, IVS1-1(G→A) %8,3, Codon 39 (C→T) % 6,4, IVS-1-6(T→C) %5,7, Fsc 8 % 5,5, Tablo 7). Ayrıca bu çalışmada Çukurova’da ilk defa Codon 15 ve Fsc 82/83(-G) mutasyonu rapor edilmiştir¹⁴.

Yüzbaşıoğlu ve arkadaşları Konya bölgesinde talasemi mutasyon tiplendirilmesi yapmıştır ve moleküler tanı için ARMS ve RFLP yöntemini kullanmışlardır. Mikrokolon yöntemi ile HbA₂ düzeyi %2.5’un altında olan olguların HPLC ile HbA₂ düzeyleri %1.3-2.9 arasında ve %3.7’nin üzerinde olan olguların ise %4.3-5.4 arasında olduğu saptanmıştır. Mikrokolon yöntemiyle HbA₂ düzeyi %3.7’nin üzerinde ve MCV değeri de 80fL’nin altında olan olgularda β talasemi mutasyon analizi yapılmıştır ve mutasyon tiplerini IVS1-110, IVS1-1, IVS II-745, Cd 8, Cd 39 ve Fsc 5 olarak bulmuşlardır^{91,92}.

Altunkılıç’ın Anamur bölgesinde yaptığı beta talasemi mutasyon tiplendirilmesi çalışmasında IVS1-110, IVS II-745, IVS II-1, Cd 8 ve Fsc 5 mutasyonlarını saptamıştır. Türkiye’de en sık bulunan mutasyon olan IVS1-110 mutasyonunun Anamur Bölgesi’nde de yüksek oranda olduğu rapor edilmiştir⁹³.

Evrensel ve arkadaşları Kayseri yöresinde talasemi mutasyon tiplendirmesi yapmışlar ve mutasyon tiplerini IVS1-110, Fsc 5, Cd 8, IVS I-6 ve Cd 39 olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada Kayseri bölgesinde en yaygın mutasyonun IVS1-110 olduğu gösterilmiştir⁹⁴.

Tahiroğlu ve arkadaşlarının Hatay-Altınözü Bölgesinin talasemi mutasyon tiplendirilmesi çalışmasında mikroarray yöntemi ile MCV’si 80 fL’nin altında, HbA₂’si %3.7’nin üzerinde bir olgunun IVS1-110, bir olgunun Cd8, bir olgununda IVS1-110/30 çifte heterozigot mutasyon içerdiği saptanmıştır⁹⁵.

Atalay ve arkadaşları; Türkiye’de β -talasemi mutasyon tiplerinin bölgesel dağılımına yönelik yaptıkları çalışmada, mutasyon tipleri ve sıklıklarını şu şekilde bildirmişlerdir: IVS1-110 (G→A) % 35,9, IVS-1-6(T→C) %21,6, IVS1-1(G→A) %13,0, Codon 39 (C→T) % 7,2, IVS 2-745(C→G) %3,6, Cd 8(-AA) %2.2 ve IVS II-1(G→ A) % 1,4⁹⁶.

Yüreğir ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada; Çukurova bölgesi için beta talasemi frekansı %3.5 bulunmuş bu bölge için en yaygın mutasyon tipinin IVS1-110 olduğu rapor edilmiştir⁹⁷.

Kılınç bir çalışmasında; β -talasemi oranını Çukurova bölgesi için %2.3-4.6 arasında, Güney bölgesinde % 2.4-13.1 arasında, Doğu bölgesinde % 0.7-3.6 arasında, Ege bölgesinde %2.6-5.1 arasında, Marmara bölgesinde % 3.4-11.7 arasında ve İç Anadolu'da %2.1 olduğunu rapor etmişlerdir⁵³.

Yalın ve arkadaşları ülkemizde yaygın olarak gözlenen 15 beta talasemi ve anormal hemoglobin mutasyonunu mikroarray teknolojisini kullanılarak tanımlamaya çalışmışlar ve IVS1-1, IVS I-5, IVS I-6, IVS I-110, IVS II-1, IVS II-745, Cd 5, Cd8/9, Cd 39, Cd 44,-87,-30, Hb D ve Hb S mutasyonlarını ayrıca klasik moleküler yöntemlerle çalışarak her iki yöntemin uyumlu olduğunu göstermişlerdir⁹⁸.

Özkaralı çalışmasında β - talasemi moleküler tanısında klasik yöntemlerle microarray yöntemini karşılaştırmış ve mikroarrayin avantajlarını rapor etmiştir⁹⁹.

Anabilim Dalımızda DPT desteğiyle kurulan ve teknolojik olarak yenilenen Moleküler ve Biyokimyasal Genetik Tanı İstasyonu'nda bulunan Mikroarray cihazıyla kısa sürede daha fazla olguya % 100 güvenilirlikle tanı konulabildiği Yüzbaşıoğlu, Tahiroğlu, Yalın ve Özkaralı'nın çalışmalarıyla gösterilmiştir^{92,95, 98,99}.

Foglieni ve arkadaşları Nanogen Workstation microarray cihazıyla İtalya'da en sık görülen 9 β -talasemi mutasyonunu çalışmışlar (cd 39, IVS I-110, IVS1-1, IVS1-6, IVS 2-745, cd6, -87, IVS II-1, cd8) ve aletin güvenilirliğini kanıtlamışlar¹⁰⁰.

İnsanlık tarihinin en büyük ve sonuçları açısından en önemli projelerinden birisi olan İnsan Genom Projesi ("Human Genome Project"), DNA'nın moleküler yapısının Watson ve Crick tarafından 1953 yılında açıklanmasından tam 50 yıl sonra bitme aşamasına gelmiştir. Elde edilen veriler, insanoğluna yeni ufuklar sunarken, birçok farklı projelerinde başlamasına neden olmuştur. Bunların içinde, insanoğlunun ırklara bağlı özelliklerini inceleyen tek nükleotid polimorfizminin (SNP) bulunduğu proje en yaygın olanlarındandır. Diğer taraftan İnsan Genom Projesi ile elde edilen bilgilerin çoğu ham bilgilerdir. Bu bilgilerin kliniğe uygulanabilmesi için, yeni bazı bilgilere ihtiyaç duyulmaktadır. Halen hücrede birçok molekülün nereden, hangi koşullar altında sentezlendiği bilinmemekte ve protein moleküllerinin rolleri açıklanamamaktadır. Bu nedenle günümüzde genomiks denilen DNA-RNA ilişkisini açıklamaya çalışan ve proteomiks denilen RNA protein ilişkisini açıklamaya çalışan yeni çalışma alanları ortaya çıkmıştır⁶⁵.

Günümüzde sıklıkla kullanılan geleneksel laboratuvar yöntemleri, tek bir gen veya proteinin araştırılmasına yöneliktir. Hastalıkların çoğunda birçok gen birlikte etkilenmekte (multigenik) ve birçok faktöre bağlı olarak hastalıklar gelişmektedir (multifaktöriyel)⁶⁷. Bu da, birçok farklı genin ve proteinin bir arada, daha kolay ve daha verimli olarak incelenebilmesini gündeme getirmiştir. Günümüzde gelişen bilgisayar teknolojisinin biyolojiye uyarlanması ile karşımıza çıkan DNA çipleri, bize bu olanakları sağlamaktadır.

Populasyon genetiğinde kullanılan tekli nükleotid değişimlerini (SNP) saptamada kullanılan güvenilir, kısa ve verimli moleküler yöntemler arasında RFLP, allel spesifik PCR ve SNaPSSHOT analizleri bulunmaktadır. Bu metodlar arasında bulunan RFLP'nin her SNP için uygulanamaz oluşu, allel spesifik PCR ise kesin güvenilirlikle optimizasyonunun özellikle bazı SNP'lerin bulunduğu bölgeler için ciddi zorluklar çıkarması nedeniyle yaygın uygulamalarda zorluklar çıkarmaktadır. Son yıllarda keşfedilen array teknolojisinin otomasyona adapte edilebilir olması nedeniyle bu teknolojinin kullanım alanlarının yaygınlaşmasına neden olmuştur^{20,72}. Nanogen array platformu kullanıcının tasarımına açık, her aşamada optimize edilebilen, elektronik array teknolojisine sahip olan ve rutin SNP analizlerinde yüksek güvenilirlik arz eden bir sistemdir. Mikroarray teknolojisi nükleik asitlerin seçici ve farklılığına dayanan hibridizasyon yöntemidir ayrıca bu yöntem gen ekspresyon analizleri içinde kullanılabilir. Genomdaki her bir geni temsil eden cDNA parçacıkları hibridizasyon sırasında farklı sinyaller vermektedir. Bu sinyallerin yoğunluklarını karşılaştırmak ve analiz sonuçlarını sayısal olarak belirlemek için bu amaca yönelik bilgisayar programları geliştirilmeye başlanmıştır. Bu programlar sayesinde hibridizasyon sonucunda mikroarrayden elde edilen sinyaller bilgisayarda birleştirilerek daha çok veri analizi yapılabilmektedir^{20,68}. Mikroarrayin ve biyoinformatiğin bu özellikleri kullanım alanlarının yaygınlaşmasına neden olmuştur.

Beta talasemi ve anormal hemoglobinler Türkiye'de özellikle Çukurova bölgesinde önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Bu hastalıkların henüz kesin bir tedavisi yoktur. Hasta çocuk doğumunu önlemek için doğum öncesi tanıda süreyi ve tanı malzemelerinin miktarını azaltmak için nanoteknolojik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ihtiyacı karşılamak için anabilim dalımızda kurulan Nanotıp laboratuvarında bulunan mikroarray cihazını daha verimli kullanmak amacıyla bu tez çalışması yapılmıştır.

6. SONUÇLAR

1. Teknolojik yeniliklerin doğum öncesi tanıda kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla Anabilim Dalımızda kurulan Moleküler ve Biyokimyasal Genetik Tanı İstasyonu'nun Nanotıp laboratuvarında bulunan mikroarray cihazında anormal hemoglobinleri ve beta talasemi mutasyonlarını tanımlamak için yeni mikroarray çiplerin tasarımı yapılarak bunların tanısal doğruluğuda kontrol edilmiştir.

2. Hemoglobinopatilerin tanısında sadece hemoglobinin kimyasal özelliği veya genetik yapısıyla tanı koymanın zorlukları bu tez çalışmasında gösterilmiştir. Gelecekte tanıya yardımcı olmak amacıyla proteomik ve genomik özellikleri birlikte gösterecek mikroarray tasarımların yapımına ihtiyaç duyulmuştur.

7. KAYNAKLAR

1. <http://globin.csu.edu.tr>. Erişim Tarihi: 17/04/2007.
2. **Cavalli SL, Menozzi P, Piazza A**: The History and Geography of Human Genes. Princeton, University Pres. **1996**.
3. **Lukens JN, Lee GR**: The Abnormal Hemoglobins. In: Wintrobe's Clinical Hematology, Eds Lee GR, Bithell CT, Foester J, Athens JW, Lukens JN. Lea and Febiger Com, Pennsylvania **1993**.
4. **Altay Ç**: Anormal hemoglobins in Turkey. Turk J Hea **2002**;19(1): 63–74.
5. **Yüreğir GT, Bakioğlu İ, Çürük A, Kılıç Y, Aksoy M, Huisman THJ**: Çukurova'da orak hücre anemili hastalarda haplotipler. ÇÜ Sağlık Bil **1988**; (2,3)83–94.
6. **Altay Ç, Gürgey A**: Distribution of hemoglobinopathies in Turkey. Turk J Pediatr **1986** ;8:219.
7. **Lukens JN**: The Thalassemias and Related Disorders In: Quantitative Disorders of Hemoglobin Synthesis; Eds: Lee GR, Bithell CT, Foester J, Athens JW, Lukens JN. Lea and Febiger Com, Pennsylvania **1993**.
8. **Loukopoulos D**: Thalassemia: genotypes and phenotypes. Ann Hematol **1991**;62:85.
9. **Weatherall DJ**: The Thalassemia. In Hematology; Eds: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA. 3theds, Mc Graw-Hill, Singapore **1986**.
10. **Kutlar A, Huisman THJ**: Dedection of hemoglobinopathies techniques in diagnostic. Hum Biochem Gen **1991**;519.
11. **Weatherall DJ, Clegg JB**: The Thalassaemia Syndromes. 3th ed, Blacwell Scientific Pub. Oxford **1981**.
12. **Arcasoy A**: Türkiye'de Thalassemia Taşıyıcı Sıklığı ve Anormal Hemoglobinler. Ankara Talasemi Derneği, **1994**.
13. **Çavdar AO**: Türkiye'de talasemi insidansı. Thalassemia Sempozyumu, TÜBİTAK, Ankara, **1981**.
14. **Çürük M A, Arpacı A, Atilla G, Tuli A, Kılınc Y, Aksoy K, Yüreğir GT**: Genetic heterogeneity of β thalassemia at Çukurova in Southern Turkey. Hemoglobin **2001**; 25(2):241-245.

15. Akar N, Cavdar AO, Dessi E, Loi A, Pirastu M, Cao A: β -Thalassemia mutations in the Turkish population. J Med Genet 1987; 24: 378–379.
16. Başak AN, Özçelik H, Özer A, Tolun A, Aksoy M, Ağaoğlu L, Ridolfi F, Ulukutlu L, Akar N, Gurgey A, Kırdar B: The Molecular basis of β -thalassemia in Turkey. Hum Genet 1992; 89:315-318.
17. Tadmouri GO, Tüzmen Ő, Özçelik H, Özer A, Baig SM, Senga EB, Başak AN: Molecular and population genetic analyses of β -thalassemia in Turkey. Am J Hematol 1998; 57:215-220.
18. Guidelines for The Control of Haemoglobin Disorders. WHO/HDP/HB/GL/94.1. Control of Hereditary Diseases. 1996, Genova WHO.
19. Tüzmen Ő, Tadmouri GO, Özer A, Baig SM, Özçelik H, Başaran S, Başak AN: Prenatal diagnosis of β -thalassemia and sickle cell anemia in Turkey. Pren Dia 1996; 16: 252-258.
20. www.istanbul.edu.tr/fen/mbg. Erişim Tarihi:20/05/2007
21. www.DNAmikroarray.com. Erişim Tarihi:17/05/2007
22. Nanogen Nanochip Molecular Biology Workstaion Kullanım Klavuzu.
23. Thomson M, Mcinnes R R, Willard H F: Genetics in Medicine. 5th ed, Philadelphia, B.Saunders Copany 1991.
24. Huisman THJ: The structure and function of normal and abnormal hemoglobins. Br Clin Haematol 1993 ; 6:1.
25. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Radwell VW. Harper's Biochemistry. 21th ed. Long. Medical Book London 1988.
26. Huisman THJ: Human Hemoglobin In: Blood Disease of Infancy and Childhood. 7thed, St Louis, Mosby, Inc ,st Louis 1995.
27. Őiřli N: İnsan Biyokimyası. Palme Yayıncılık, Ankara 2002.
28. Champe PC, Harvey RA: Globuler ve Fibroz Proteinler. Lippincott Biyokimya: Nobel Kitabevleri, Ankara 1997.

- 29. Weatherall D J, Clegg J B, Higgs D R Wood W G:** The Hemoglobinopathies. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease Eds: **Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Vale D.** 8thed U.S.A: International Edition, **2001**.
- 30. Weatherall DJ, Clegg JB:** The Thalassemia Syndromes. 4thed, Blackwell Science, London **2001**.
- 31. Clarke GM, Higgins TN:** Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: *Clin Chem* **2000**; 46(8B): 1284-1290.
- 32. Lukens JN, Lee GR:** The Abnormal Hemoglobins. In: Wintrobe's Clinical Hematology. Eds: Lee GR, Bithell CT, Foerster J, Athens JW, Wkens JN. Lea and Febiger Com, Pennsylvania **1993**.
- 33. Olivieri NF, Weatherall DJ:** Thalassemias. In; Pediatric Hematology. Eds: Lilleyman JS, Hann IM, Blanchette VS . 2th Ed, Churchill and Livingstone, London: **1999**.
- 34. Nienhuis AW, Benz EJ :** Regulation of hemoglobinsynthesis during the development of the red cell. *New Eng J Med* **1977**; 297:1430.
- 35. Rodwell W V:** Proteins: Myoglobin and Hemoglobin. In: Harper' in Biyokimyası, Barış Kitabevi **1996**.
- 36. Bunn HF, Forget BG:** Hemoglobin In; Molecular, Genetic and Clinical Aspects. WB Saunders Com, Philadelphia. **1986**.
- 37. Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC:** Sickle –cell anemia, a molecular disease. *Science* **1949**; 110:543.
- 38. Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB:** The Population genetics of the haemoglobinopathies. *Br Clin Haematol* **1998**; 11:1-51.
- 39. Altay Ç:** The frequency and distribution pattern of β -thalassemia mutations in Turkey. *Turk J Haematol* **2002**; 19(2): 309-315.
- 40. Dönbak L:** İnsan Hemoglobin (Hb) Varyantları. *KSÜ Fen ve Mühendislik Der*, **2005**; 8(2).
- 41. Atalay EÖ, Koyuncu H, Turgut B, Atalay A, Yıldız S, Bahadır A, Köseleler A:** High incidence of Hb D-Losangeles in Denizli province, Aegean region of Turkey. *Hemoglobin* **2005**; 29(4): 307-310.

- 42. Kazazian HH Jr, Waber PG, Boehm CD, Lee JI, Antonarakis SE, Fairbanks VF:** Hemoglobin E in Europeans further evidence for multiple origins of the beta E-globin gene. *Am J Hum Genet* **1984**;36(1):212.
- 43. Sanguanserm Sri T, Flatz G, Flatz SD:** Distribution of hemoglobine E and beta-thalassemia in Kampuchea (Cambodia). *Hemoglobine* **1987**;11(5):481.
- 44. Johnson JP, Vichinsky E, Hurst D, Camber A, Lubin B, Louie E:** Differentiation of homozygous hemoglobin E from compound heterozygous hemoglobin E-beta O-thalassemia by hemoglobin E mutation analysis. *J Pediatr* **1992**;120: (5): 775.
- 45. Prozorova V, Özsoylu S, Aksoy M, Headlee M G, Lam H, Wilson J B, Altay Ç, Huisman THJ:** Hb E-like variants in individuals from Turkey. *Hemoglobin* **1981**;5(7&8):743-748.
- 46. Kutlar F, Kutlar A, Nuguid E, Prchal J, Huisman THJ:** Usefulness of HPLC methodology for the characterization of combination of the common β chain variants HbS, C, and O-Arab, and the α chain. *Hemoglobine* **1993**;17(1):55.
- 47. Aksoy M, Erdem Ş, Efremov GD, Wilson JB, Huisman THJ, Schroeder J, Müftüoğlu A:** Hemoglobin İstanbul: Substitution of glutamine for histidine in a proximal histidine (F8(92) β). *J Clin Inv* **1972**;51:1380-1387.
- 48. Çürük MA, Dimovski AJ, Baysal E, Gu LH, Kutlar F, Molchanova TP, Webber BB, Altay Ç, Gürgey A, Huisman TH:** Hb Adana or alpha 2 (59)(E8)Gly \rightarrow 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.
- 49. Yüreğir GT, Ispir T:** Çukurova'da Hb S ve G6PD enzim eksikliği ve aralarındaki ilişki. *DOĞA TU Tıp Ecz Der* **1984**; 8: 232-244.
- 50. Kılınç Y, Kumi M, Gurgey A, Altay C:** Adana bölgesinde doğan bebeklerde kordon kanı çalışması ile alfa talasemi, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği ve hemoglobin S sıklığının araştırılması. *DOĞA TU Tıp Ecz Der* **1986**;10:162-167.
- 51. Yüreğir GT, Arpacı A, Aksoy K, Tuli A, Dikmen N, Özgönen T, Kılınç Y:** Population at risk for hemoglobinopathies in Çukurova. Türkiye: Need for prenatal diagnosis. *Ann Med Sci* **1995**; 4:61-60.
- 52. Kılınç M, Koçak F, Yüreğir GT, Aksoy K:** İçel ilinde Orak hücre anemisi ve β talasemi taşıyıcı sıklığı. *ÇÜ Tıp Fak* **1999**;2: 62-65.

- 53. Kılınc Y:** Hemoglobinopathies in Turkey. Turk J Hematol **2006**; 23:214-216.
- 54. Günçağ D, Pekçelen Y, Atamer T:** Klinik Hematoloji. Nobel Matbaacılık, İstanbul **2003**.
- 55. Başak AN:** Talaseminin Moleküler Genetiği. Temel Moleküler Hematoloji Kursu. Mersin, **2005**.
- 56. Raund D, Rachmilewitz E:** Pathophysiology of α - and β - thalassemia: Therapeutic implications. Sem Hematol **2001**; 38(4): 343-349.
- 57. Thein SW:** β -Thalassemia. Br Clin Haem **1993**;6:151.
- 58. Yüreğir GT, Donma O, Dikmen N, İspir T, Çınar M:** Population studies of hemoglobin S and other variants in Çukurova. The southern part of Turkey. Acta Haematol **1987**; 50:757-765.
- 59. Yüreğir GT, Aksungur P, Burgut R:** A survey of high A₂ β Talasemi, hemoglobin variants, G6PD deficiency anemia in Karataş, Çukurova, Southern Turkey. Doğa TU Med Sci **1989**;13: 203-210.
- 60. Arpacı A, Aksoy K, Yüreğir GT:** Preliminary studies for prenatal diagnosis: Incidence and mutation sites of β -thalassaemia in Antakya, Türkiye. Ann Med Sci **1992**;1:103-110.
- 61. Atilla G, Çürük MA, Arpacı A, Özgünen FT, Kılınc Y, Aksoy K, Yüreğir GT:** Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in Southern Turkey. Ann Med Sci **1999**; 8:93-97.
- 62.** <http://www.ziraat.harran.edu.tr/kongre/bildiriler>. Erişim Tarihi:20/06/2007
- 63.** <http://www.yontemlerdnamicroarray>. Erişim Tarihi:20/06/2007
- 64. Karaca M, Onus AN:** Array gen ekspresyon teknolojisi ve bitkisel üretimde kullanımı. Alatarım **2004**;3: 5–10.
- 65. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P:** Molecular Biology of Cell. 4thed. Garland Science, New York **2002**.
- 66. Freeman W M, Robertson, DJ, Vrana KE:** Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. BioTech. **2000**; 29:1042-1055.
- 67. Connor M, Ferguson SM:** Essential Medical Genetics. 5th ed, Blackwell Science, New York **1997**.

- 68. Ayalew TM, Mark E, Bolander M, Stephen M, Ansell M, Eric D, Wieben P, Thomas C, Spelsberg P:** Primer on medical genomics. Microarray experiments and data analysis. *Mayo Clin Proc* **2002**; *77*: 927-940.
- 69. Stephen H, Stoughton, RB:** The Magic of microarrays. *Scientific American*, 2002; 34-41
- 70. Weiner DM:** Microarray Technologies in Target Validation and Drug Discovery. *Microarray Methods and Applications*. Eagleville PA, USA 2003.
- 71. Üner A:** Array Teknolojileri ve Onkolojide Kullanım Alanları.XV. Ulusal Kanser Kongresi. 23-Nisan. Antalya, **2003**
- 72. Kashi Y, King D, Soller M:** Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Gen* **1997**; *13*:74-78.
- 73. Huisman THJ, Jonxis JHP:** The Hemoglobinopathies, Techniques of Identification. Marcel Dekker Inc, New York **1977**.
- 74. Kohn J:** Separation of hemoglobin on cellulose acetate. *J Clin Pathol* **1969**; *22*:109-110
- 75. Huisman THJ, Scroder WA, Brodie AN, Mayson M, Jakway J:** Microchromatography of hemoglobin. A simplified procedure for determination of hemoglobin A₂. *J Lab Clin Med* **1975**; *86*: 700-702.
- 76. Singer K, Chernoff AA, Singer L:** Studies on abnormal hemoglobins. Alkali denaturation. *Blood* **1951**; *6*:413-423.
- 77. Poncz M, Solowiejzk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S:** Construction of human gene library from small amounts of peripheral blood . Analysis of β like globin genes. *Hemoglobin* **1982**; *6*: 27-36.
- 78. Huisman THJ:** High Performance liquid chromatography as a method to identify haemoglobin abnormalities. *Acta Haemat* **1987**; 78-123
- 79. Aksoy K, Kayrın L, Tuli A, Çürük MA, Atilla G:** Anormal Hemoglobinler ve Talasemi Tanısında Kullanılan Yöntemler. 8. Biyokimya Yaz Okulu, Adana, **2006**.
- 80. Özsoylu Ş, Şahinoğlu M:** Hemoglobinopathy survey in an Eti-Turk village. *Hum Hered* **1978**; *25*:50-59.

- 81. Aksoy M:** Abnormal hemoglobins and thalassemia in Eti Turks living in Antakya. Med Bull **1968**; 1:296-301.
- 82. Yüreğir GT, Kılınc M, Ekerbiçer H, Bilaloğlu N, Tekin N:** Screening of hemoglobinopathies in Kahramanmaraş, Turkey. Turk J Haematol **2001**; 18(2): 79-83.
- 83. Yenice Ş, Kemahlı, Bilenoğlu O, Gül Ö, Akar N, Başak N, Akar N.** Two rare hemoglobin variants in the Turkish population(Hb G-Goushatta(β 22 (β 4) GLU-ALA and Hb J- Iran (β 77(EF1) HIS-ASP). Turk J Haematol **2000**; 17(1): 27-28.
- 84. www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&** Erişim Tarihi:25/06/2007.
- 85. Aksoy K:** Hemoglobinopati ve Talasemi Tanısında Kullanılan Yöntemler. II. Ulusal HPLC ve Diğer Separasyon Teknikleri Sempozyumu. Ankara, **2004**.
- 86. Gürgey A:** Talasemi ve hemoglobinopatilerde yeni görüşler. TÜBİTAK, Ankara, **1996**.
- 87. Aksoy K, Çürük MA, Arpacı A, Dikmen N, Yüreğir GT.** β –Talasemili bir ailenin mutasyon tipinin Dot-Blot hibridizasyon yöntemi ile saptanması. ÇÜ Sağlık Bil Der, **1992**; 7: 87-91.
- 88. Tanrıverdi K.** β –Talasemi mutasyon tiplerinin moleküler düzeyde incelenmesi. Bilim uzmanlığı tezi, Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **1993**.
- 89. Topal K.** Antakya, Kayseri ve İzmir örneklerinde β –Talasemi mutasyon tiplerinin saptanması. Doktora tezi, Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **1998**.
- 90. Aksoy M:** The history of β thalssemia in Turkey. Turk J Pediatr **1991**;33,195-197.
- 91. Yüzbaşıoğlu S, Sönmez A, Aksoy K:** Konya Bölgesinin Talasemi Mutasyon Tiplendirilmesi. II. Ulusal HPLC ve Diğer Separasyon Teknikleri Sempozyumu. Ankara, **2004**.
- 92. Yüzbaşıoğlu S, Aksoy K:** Konya Bölgesinin Kalıtsal Kan Hastalıkları Açısından Moleküler Yapısı. 3.Ulusal Kongresi. Antalya, **2005**.
- 93. Altunkılıç S, Aksoy K:** Anamur Bölgesinin Talasemi Mutasyon Tiplendirilmesi. Tanıda Moleküler Tıp Sempozyumu. **2003**, Diyarbakır.
- 94. Evrensel E, Yalın AE, Aksoy K:** Kayseri Yöresinde β –Talasemi Mutasyon Dağılımı. Tanıda Moleküler Tıp Sempozyumu. **2003**, Diyarbakır.

- 95. Tahiroğlu M, Arıyürek SY, Yıldız ŐM, Seydel ŐG, Aksoy K:** Hatay-Altınözü Bölgesinin Talasemi Mutasyon Tiplendirilmesi. VII. Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi. Adana, **2007**.
- 96. Atalay EÖ, Çırakoğlu B, Dinçol G, Atalay A, Kılınç Y, Aytekin H, Yüreğir GT, Arpacı A, Benuek E, Aksoy M:** Regional distributions of β -thalassaemia mutations in Turkey.Int J Hematol **1993**; 57:207-211.
- 97. Yüreğir GT, Arpacı A, Aksoy K, Azar AM, Tanrıverdi K.** Çukurova'da beta talasemik gen sıklığının taranması ve mutasyon odaklarının belirlenmesi. TÜBİTAK, TAG:0758 **1993**.
- 98. Yalın AE, Yüzbaşıoğlu S, Yıldız ŐM, Yenilmez ED, Düzgünce D, Özkarah E, Tuli A, Aksoy K:** DNA Mikroarray Teknolojisi Kullanılarak Beta Talasemi Ve Anormal Hemoglobin Mutasyonlarının Tanımlanması. VI. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi. Antalya,**2006**.
- 99. Özkarah E:** β - Talasemi Moleküler Tanısında Klasik Yöntemlerle Microarray Yönteminin Karşılaştırılması.Yüksek Lisans Tezi; Çukurova Üniversitesi, Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2007**.
- 100. Foglieni B, Cremonesi L, Travi M,Ravani A, Glambona A,Rosatelli M A, Perra C, Fortina P Ferrari M:** β thalassemia Microelectronic Chip: A Fast and accurate method for mutation dedection. Clin Chem **2004**; 50:73-79.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı

Doğum Tarihi ve yeri

Mezun olduğu Okul

:Gönül Şeyda Seydel

:17.10.1982, Ceyhan/ADANA

**:Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü (2000–2004)**