

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çukurova Bölgesinde Görülen Hemoglobin Varyantları

Seyyede Touran HOSSEİNİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Ağustos, 2024

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

Çukurova Bölgesinde Görülen Hemoglobin Varyantları

Seyyede Touran HOSSEİNİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi/..../.... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. ŞULE SULTAN MENZİLETOĞLU YILDIZ (Danışman)

: Prof.Dr. Ali DÖNDAŞ

: Dr. Öğr. Üyesi Efsun ANTMEN

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2022-14516

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. Hemoglobinlerin Yapısı ve Özellikleri	3
2.1.1. Hem ve Globin Zincirleri	4
2.1.2. Globin Gen Kümesi.....	5
2.2. Normal İnsan Hemoglobinleri	5
2.3. Hemoglobin Molekülünün Kalıtsal Bozuklukları.....	6
2.3.1. Hemoglobin Varyantları.....	7
2.4. Türkiye’de saptanan hemoglobin varyantları.....	12
3. MATERYAL VE METOD	15
3.1. Cihazlar	15
3.2. Kimyasal Malzemeler	15
3.3. Örnek Toplama	16
3.4. Analiz Yöntemleri.....	16
3.4.1. Hematolojik İncelemeler	16
3.4.2. Hemolizat Hazırlama.....	16
3.4.3. Hemoglobin Elektrophorezi.....	16
3.4.4. Oraklaşma Testi ile HbS ve HbD ayrımı.....	19
3.4.5. DNA İzolasyonu.....	19
3.4.6. ARMS-PCR Yöntemiyle HbC ve HbE Varyantlarının Tanımlanması:	20
3.4.7. Agaroz jel elektrophorezi.....	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1. Bulgular.....	25
4.2. Tartışma	36
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	47

Çukurova Bölgesinde Görülen Hemoglobin Varyantları

Seyyede Touran HOSSEİNİ

Danışman: Prof. Dr. Şule Sultan MENZİLETOĞLU YILDIZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Hemoglobinopatiler, dünya çapında en yaygın görülen tek gen hastalıklarıdır ve gelecekte prevalanslarının artacağı tahmin edilmektedir. Bu çalışmanın amacı, Çukurova bölgesinde görülen anormal hemoglobin varyantlarını belirlemektir. Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarına gelen kan örnekleri üzerinde gerçekleştirilen bu araştırmada, hemoglobin elektroforezi, oraklaşma testi ve ARMS-PCR yöntemleri kullanılarak anormal hemoglobin tipleri belirlenmiştir. Çalışma sonuçları, Çukurova bölgesinde %63.53'ünde HbAS, %33.15'inde HbSS, %1.65'inde HbSC, %1.12'inde HbAC ve %0.55'inde HbAE olduğunu belirleyerek, bölgede orak hücre taşıyıcılığının yüksek oranda olduğunu göstermektedir. Önerimiz, hemoglobinopatinin endemik olduğu bölgelerde tarama programları uygulayarak etkilenen doğum sayısını azaltmak ve böylece ülke ekonomisine olan maliyetleri düşürmektir.

Anahtar Kelimeler: Çukurova Bölgesi, Hemoglobin, Hemoglobinopati, Hemoglobin Varyantları, Orak Hücre Anemisi

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MSc THESIS

Hemoglobin Variants Seen In The Çukurova Region

Seyyede Touran HOSSEİNİ

Advisor: Prof. Dr. Şule Sultan MENZİLETOĞLU YILDIZ

Department of Biotechnology

ABSTRACT

Hemoglobinopathies are the most common single-gene disorders worldwide, and their prevalence is expected to increase in the future. This study aims to identify abnormal hemoglobin variants in the Çukurova region. Blood samples collected at the Central Laboratory of Çukurova University Balcalı Hospital were analyzed using hemoglobin electrophoresis, sickling test, and ARMS-PCR methods to determine the types of abnormal hemoglobin present. The results showed that 63.53% of the samples had HbAS, 33.15% had HbSS, 1.65% had HbSC, 1.12% had HbAC, and 0.55% had HbAE, indicating a high rate of sickle cell carriage in the region. We recommend implementing screening programs in areas where hemoglobinopathy is endemic to reduce the number of affected births and thereby lower the economic costs to the country.

Keywords: Abnormal Hemoglobin, Çukurova Region, Hemoglobin, Hemoglobinopathy, Sickle Cell Anemia

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimi yaptığım süre içerisinde, en derin bilgilerini ve bilim alanındaki engin tecrübelerini benden esirgemeyen, araştırma ve çalışma şevkini kazanmamı sağlayan, hoşgörüsü, desteği ve fedakarlığıyla bana hayat dersi veren çok değerli danışmanım sayın Prof. Dr.

Şule Sultan MENZİLETOĞLU YILDIZ'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Tez konumun seçimi ve yürütülmesinde tecrübelerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK'e teşekkür ederim.

Tez sınav jürilerim olan sayın Prof. Dr. Şule Sultan MENZİLETOĞLU YILDIZ, Prof. Dr. Ali DÖNDAŞ ve Dr. Öğr. Üyesi Efsun ANTMEN'e, tezimi değerlendirdikleri ve değerli bilimsel yorumlarıyla katkıda bulundukları için teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca her zaman yanımda bulunan, sürekli sevgi ve destekleriyle beni güçlendiren ve mutluluğumu her zaman ön planda tutan kıymetli babam Reza HOSSENİ ve sevgili eşim Dr. Amin DAEMİ'ye derin teşekkürlerimi sunuyorum. Bu tezi, hayatım boyunca bana ilham veren ve her an yanımda hissettiğim sevgili annemin değerli hatırasına ithaf ediyorum.

Tez çalışmasını FYL-2022-14516 no'lu proje ile destekleyen Ç.Ü. Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine de ayrıca teşekkür ederim.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. İnsandaki normal Hb'lerin moleküler yapıları ile yetişkin ve yeni doğanlardaki oranları.....	6
Çizelge 2.2. Bilinen Hemoglobin Varyantlarının Sayısı	8
Çizelge 2.3. Türkiye’de Anormal hemoglobinlerin dağılımı.....	13
Çizelge 3.1. Hemoglobin Elektroforezi boyama ünitesinin adım protokolü	18
Çizelge 3.2. ARMS-PCR yönteminde kullanılan PCR cihazındaki protokol basamakları.....	22
Çizelge 4.1. Çalışmamıza dahil olan tüm olguların verileri	26
Çizelge 4.2. Tüm olguların hemoglobin tiplerinin yüzde oranları.....	30
Çizelge 4.3. Orak Hücre Taşıyıcısı Vakaları	31
Çizelge 4.4. Orak hücre taşıyıcılarında hemoglobin tipleri	33
Çizelge 4.5. Orak hücre hastalarında hemoglobin tiplerinin yüzde oranı.....	34
Çizelge 4.6. Hem HbS hem de C birlikteliği olan vakalar.....	35
Çizelge 4.7. Hemoglobin C taşıyıcısı olan vakaalr.....	35
Çizelge 4.8. Hemoglobin E taşıyıcısı olan vaka	35
Çizelge 4.9. Çalışmada bulunan hemoglobin varyantlarının yüzde oranı	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. (a) İnsan deoksi-Hb yapısı. (b) Protoporfirin IX'in kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2.2. Gelişim sırasında insan globin zincirleri konsantrasyonundaki değişiklikler.....	6
Şekil 2.3. β geni normal ve mutant Hb gen dizisi	9
Şekil 2.4. Orak hücre hastalığının genetik aktarımı.....	9
Şekil 3.1. Hemoglobin Elektroforez cihazı	18
Şekil 3.2. Hemoglobin türlerinin elektroforezindeki yerleri	18
Şekil 3.3. Hemoglobin Elektroforezi görüntüsü.....	19
Şekil 3.4. Oraklaşma Pozitif.....	19
Şekil 3.5. ARMS yöntemi ile HbAC ve HbAE mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü. .	23
Şekil 4.1. Bir Grup Olguda Normal Ve Anormal Hemoglobin Türleri	25
Şekil 4.2. Tüm olguların hemoglobin tiplerinin yüzde oranları.....	30
Şekil 4.3. Orak hücre taşıyıcı hastalarda hemoglobin tipleri	34
Şekil 4.4. Orak hücre hastalarında hemoglobin tiplerinin yüzde oranları.....	34
Şekil 4.5. Hb Tiplerinin Oranı	36

SİMGELER VE KISALTMALAR

Hb	: Hemoglobin
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
δ	: Delta
ϵ	: Epsilon
ζ	: Zeta
kb	: Kilobaz
RNA	: Ribonükleik Asit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
PA	: Poliadenilasyon
Fe	: Demir
HSC	: Hematopoietik Kök Hücreler
β -TM	: β -Talasemi Major
FSC	: Frameshift
IVS	: İntron Dizileri
IEF	: İzoelektrik Odaklama Yöntemi
MCS-R	: α -Globin Düzenleyici Bölge
RBC	: Eritrosit
Hct	: Hematokrit
MCV	: Ortalama Eritrosit Hacmi
MCH	: Ortalama Eritrosit Hemoglobini
MCHC	: Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu
Nt	: Nükleotit
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
UTR	: Translasyona Uğramayan Bölgeler
dNTP	: Deoksiribonükleik Asit Bazları
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ARMS	: Amplification Refractory Mutation System

1. GİRİŞ

Hemoglobin, insan vücudunda oksijen taşınmasından sorumlu olan kanın fonksiyonel bileşenidir. Hemoglobin molekülü, "globin" olarak adlandırılan protein kısmı ve "hem" adı verilen prostetik grubun birleşiminden oluşmaktadır. Globin kısmında, her biri bir hem grubuna bağlı olan dört polipeptid zinciri bulunmaktadır. Yetişkin HbA ($\alpha_2\beta_2$), kodlayan genlerin genomdaki farklı konumlarda iki ayrı globin gen kümesi ailesinde gruplandırıldığı tetramerik bir proteindir. Hemoglobinopatiler, hemoglobin sentezi ile ilgili genetik hastalıklar olup dünya çapında en yaygın monogenik bozuklukları oluşturur. Bu hastalık grubunun genetik nedeni, tetramerik hemoglobin proteininin globin zincirlerini kodlayan globin genlerinin içindeki veya yakınındaki DNA varyantlarıdır. Bu DNA varyantları, α - veya β -globinin sentezinin değişmesine neden olabilmektedir (Williams ve Weatherall, 2012; Steinberg ve ark., 2009).

Hemoglobin molekülünün yapısında bulunan globin zincir sentezinin azalması, tamamen engellenmesi ya da zincirlerdeki amino asitlerin değişmesi sonucu hemoglobinopatiler ortaya çıkmaktadır. Kalıtsal hemoglobin bozuklukları, dünya nüfusunun yaklaşık %7'sinin taşıyıcı olduğu ve her yıl 300.000 ile 500.000 arasında ciddi vakaların raporlandığı yaygın hastalıklardır. Yaklaşık 1000 hemoglobin mutasyonu, hemoglobinin yapısını, ekspresyonunu ve globin genlerinin gelişimsel düzenlenmesini değiştirmektedir. Hemoglobinopatilerin dünyadaki dağılımı, coğrafi lokalizasyon ve etnik gruplara bağlı olarak oldukça farklılık göstermektedir. Bu kalıtsal hastalıklar en çok Afrika, Asya ve Akdeniz ülkelerinde görülmekte, ancak göçler sonucu Avrupa, Amerika ve Avustralya'ya da yayılmaktadır. Türkiye'de ise Çukurova, Akdeniz kıyı şeridi, Ege ve Marmara bölgelerinde çok sık görülmektedir (Canatan, 2014; Weatherall, 2008 ;Christopher.S, 2013).

Anormal hemoglobin varyantları, genellikle globin polipeptid zincirlerinde tek nükleotid baz değişimi ile oluşur; örneğin Hb S, Hb C, Hb D ve Hb E. Bazı durumlarda, HbC-Harlem, HbS-Travis ve Arlington Park gibi varyantlar, iki amino asitin yer değiştirmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Delesyon ve insersiyonlara ek olarak, füzyon hemoglobinleri de meydana gelebilmektedir (HB Lepore, Hb Kenya). Hemoglobin varyantlarının çoğu beta zincir mutasyonları sonucunda oluşmaktadır. Ayrıca, alfa, delta ve gamma zincir mutasyonları da tanımlanmıştır. Hemoglobinopatiler, yapısal temellerine göre bir kısmı hiçbir semptom ve klinik bulgu göstermezken, bir kısmı ağır hemolitik anemi, siyanoz, polisitemi, sarılık, splenomegali ve retikülositoz gibi belirtilerle seyredebilmektedir. Klinik olarak önem taşıyan hemoglobinopatilerin tanısı önemlidir. Anormal hemoglobinlerin büyük kısmı, klinik bulgu vermediği için genellikle tarama çalışmalarıyla ortaya çıkmaktadır. Günümüzde anormal hemoglobinlerin tanısı ve taraması için Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi (ARMS), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), kapiller elektroforez, selüloz asetat kağıdı elektroforezi ve izoelektrik fokuslama yöntemleri rutinde sık kullanılan yöntemler arasındadır.

Milyonlarca insanı etkileyen anormal hemoglobin türleri arasında en yaygın olanları S, C, E ve D'dir (Carver ve Kutlar, 1995; Güngör, 2011; Bunn 1998; Wajcman, 2011).

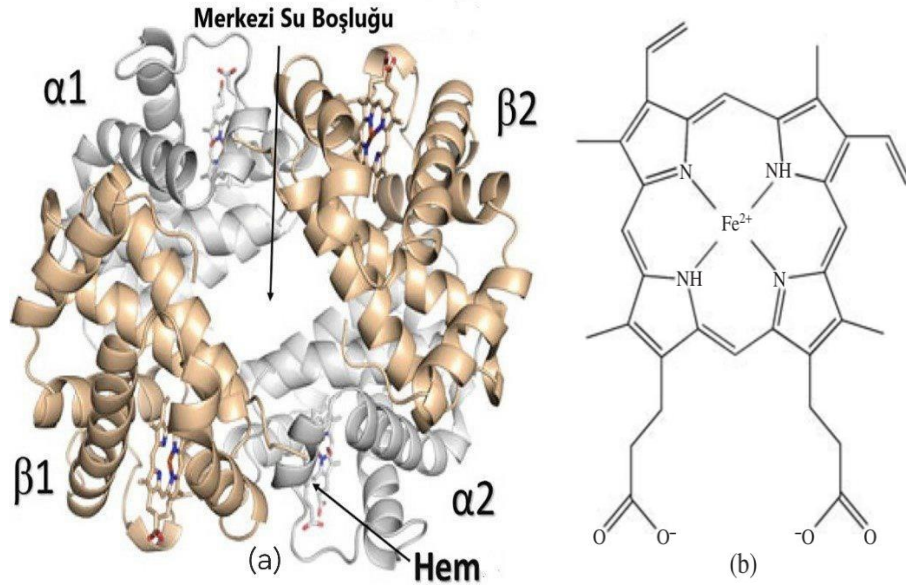
Bu çalışmanın amacı; Türkiye'nin güneyinde bulunan Çukurova bölgesinde görülen anormal hemoglobin varyantlarını belirlemek ve Türkiye için önemli olabilecek hemoglobinopatilerin sıklığının ve olası yeni hemoglobin tiplerinin belirlenmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Hemoglobinlerin Yapısı ve Özellikleri

Hemoglobin (Hb), oksijeni (O₂) akciğerlerden periferik dokulara ve karbondioksiti (CO₂) dokulardan akciğerlere taşıyan bir metalloprotein tetrameridir. Hemoglobin, keşfedilen ilk proteinlerden biridir. Hb'nin üç boyutlu yapısı, Perutz ve arkadaşları tarafından 1950'lerin sonlarında X-ışını kristalografisi yoluyla belirlenmiştir. Hemoglobin, her biri bir polipeptit zincirine ve bir hem grubuna sahip dört alt birimden oluşur. Globin polipeptit zinciri, bir çift alfa benzeri zincir ($\alpha 1$ ve $\alpha 2$) ve bir çift beta zinciri ($\beta 1$ ve $\beta 2$) içerir. Her bir zincir, bir hem grubuna bağlanır. Her zincirin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 16 kDa'dır, bu da Hb molekülünün moleküler ağırlığının 64.5 kDa ve maksimum çapının 6.4 nm olduğu anlamına gelmektedir. Hb molekülü, globin kısmında yer alan polipeptid zincirlerinin amino asit dizilimleri ve sayıları açısından farklılıklar göstermektedir. İnsanda, Hb molekülünün globin kısmında altı farklı polipeptid zinciri tanımlanmıştır: alfa (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ), epsilon (ϵ) ve zeta (ζ). α polipeptid zinciri 141 amino asit, β , γ , δ , ϵ ve ζ polipeptid zincirlerinin her biri 146 amino asit içermektedir. HbA, sağlıklı erişkin insanlarda bulunan hemoglobinin %95-98'ini oluşturur ve iki alfa zinciri ile iki beta zincirinden ($\alpha 2\beta 2$) oluşur. Hem grubu, ferröz (Fe⁺²) şeklinde demir atomu ve ferroprotoporfirin IX halka sisteminden oluşmaktadır. Her bir globin alt birimi, proteinin dış yüzeyinde bulunan hem ile stabil bir bağlantı kurmalıdır, böylece eritrosit sitozolündeki oksijen, hem grubunun demir atomlarına geri dönüşümlü olarak bağlanabilir. İki $\alpha\beta$ dimer ($\alpha 1\beta 1$ ve $\alpha 2\beta 2$ olarak adlandırılır), 2 katlı bir simetri eksenini etrafında düzenlenir ve bu düzenleme, T formunda (gergin) veya oksijensiz yapıda büyük bir merkezi su boşluğu ve R formunda veya oksijenli yapıda daha dar bir boşluk oluşmasına neden olmaktadır. Globin alt birimleri arasındaki tuz köprülerinin, bu konformasyonel değişikliklerin istikrarlı bir şekilde sürdürülmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir (Forget, 2013; Ahmed, 2020; Alain, 2006; Christopher.S, 2013).



Şekil 2.1. (a) İnsan deoksi-Hb yapısı. (b) Protoporfirin IX'in kimyasal yapısı (Papadopoulos,1969).

2.1.1. Hem ve Globin Zincirleri

Kemik iliğindeki eritroblastlar ve retikülositler, hemoglobin molekülünün biyosentezi için koordineli olarak hem ve globin üretimi gerektirmektedir. Hem sentezi, hücrelerin mitokondrisinde ve sitoplazmasında gerçekleşen karmaşık ve çok aşamalı bir süreçtir. Süksinil-CoA ve glisin ile başlayan bu süreç, δ -Aminolevulinik Asit (ALA) sentezi ile mitokondride başlar ve ardından porfobilinojen basamağına geçer. Son aşamalar ise protoporfirin IX'a demir atomunun eklenmesiyle mitokondride tamamlanır. Globin zincirlerinin sentezi, eritrosit prekürsör hücrelerinde gerçekleşmekte olup, DNA'dan mRNA'ya transkripsiyon, mRNA işlenmesi ve translasyon aşamalarını içermektedir. Transkripsiyon sırasında globin genleri mRNA'ya çevrilmekte, ardından pre-mRNA'daki intronlar çıkarılıp ekzonlar birleştirilmektedir. İşlenmiş mRNA sitoplazmaya taşınmakta ve ribozomlarda globin proteinine çevrilmektedir; bu süreç sonunda her globin zincirine hem grupları bağlanarak aktif hemoglobin oluşmaktadır. (Chiabrand, 2014; Farid, 2023).

Globin polipeptitleri, insanın 16. ve 11. kromozomlarında bulunan α -benzeri ve β -benzeri globin gen kümelerinden uygun şekilde sentezlenmektedir. Yeni sentezlenen globin zincirleri, hızla hem moleülleriyle birleşmekte ve bu etkileşim, zincirlerin sırasıyla A-H olarak adlandırılan 7 ve 8 sarmaldan oluşan bir yapıda katlanmalarını sağlamaktadır. Bu katlanma süreci, zincirlerin küresel bir yapıda düzenlenmesini sağlar ve bu düzenleme Hb alt birimlerinin stabilizasyonunu gerçekleştirmektedir. Hem demiri, F8 sarmalında bulunan ve "proksimal histidin" olarak adlandırılan sabit bir histidin kalıntısının imidazol grubu tarafından globin proteinlerine eksenel olarak koordine edilir ve heme proksimal cebinde hemoglobine Hb bağlanmaktadır. Ters eksenel konum, E7 sarmalındaki korunan "distal" histidin ile etkileşim yoluyla stabilize edilen O₂'yi bağlamaktadır. Globin proteinleri içindeki amino asitler, non-kovalent etkileşimler yoluyla hem bağlanmasını

stabilize etmektedir. Hemoglobinin (Hb) O₂'yi bağlayabilmesi için demirin indirgenmiş (ferröz, Fe²⁺) durumda olması gerekmektedir. (Schechter, 2012; Christopher.S, 2013).

Hb'nin O₂'yi bağlaması için demirin indirgenmiş ferröz, Fe²⁺ durumunda olması gerekmektedir. Oksitlenmiş veya "met" Hb (ferrik, Fe³⁺) O₂'yi bağlayamaz ve nispeten kararsızdır. Met-Hb hemini kaybetme ve denatüre olma eğilimindedir. Böylece eritrositleri, Hb'yi indirgenmiş durumda tutmak için ayrıntılı mekanizmalar geliştirmiştir (Ganz ve Nemeth, 2012). Nitrik oksit ve karbon monoksit gibi oksijen dışındaki bileşikler de hemoglobinin demir atomu ile birleşebilir. Karbon monoksit kendisini demir atomuna oksijenden daha sıkı bağlar. Karboksihemoglobin oluşuktan sonra, oksijen herhangi bir ölçüde karbon monoksitin yerini alamaz. CO için Hb bağlanma afinitesi, O₂'den 240 kat daha fazladır ve havadaki %0,1 CO konsantrasyonu bilinç kaybına ve sonunda ölüme yol açabilmektedir (Alain , 2006).

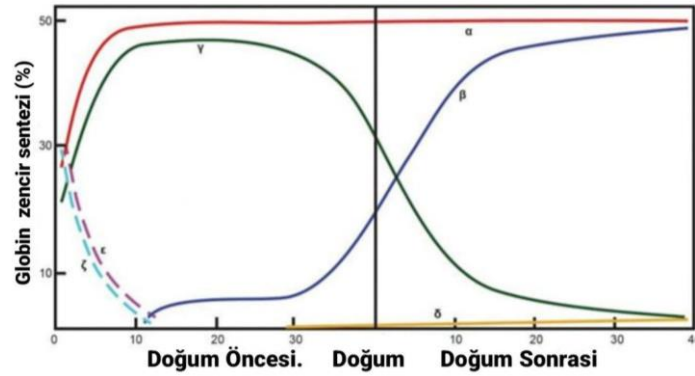
2.1.2. Globin Gen Kümesi

İnsan globin genleri; embriyonik, fetal ve yetişkin yaşamında üretilen farklı hemoglobinlerin yapısını belirlemekte ve sentezini düzenlemektedir. İki küme halinde düzenlenirler ve Yunan alfabesi tarafından adlandırılırlar. α -benzeri genler, kromozom 16 üzerinde 5'- ζ 2- ψ 1- ψ 2- ψ 1- α 2- α 1- θ -3' sırasıyla yer alırken, β -benzeri genler, kromozom 11 üzerinde 5'- ϵ -G γ -A γ - ψ β - δ - β -3' sırasıyla bir küme oluşturmaktadırlar. β -benzeri genler, 30 ve 31 ile 104 ve 105 kodonları arasında sırasıyla 122-130 ve 850-900 baz çifti (bp) uzunluğunda iki intron içermektedir. α - ve ζ -genleri benzer, ancak daha küçük intronlar içermektedir. Tipik promotör ve enhansör dizilerine ek olarak, her globin gen kümesinin önemli bir yukarı akış düzenleyici bölgesi bulunmaktadır. Bu bölge, β -gen kümesinde lokus kontrol bölgesi (LCR) ve α -gen kümesinde HS-40 olarak tanımlanmaktadır. β -globin LCR, tüm β -globin gen kümesini kapsayan transkripsiyonel olarak aktif bir alan oluşturmaktadır. α ve β -globin gen kümesi, katı bir ontolojik çizelgeye göre ifade edilir ve bu iki kümenin her birinden gelen genlerin kantitatif ifadesi, dengeli ve koordinelidir (Weatherall ,2001).

2.2. Normal İnsan Hemoglobinleri

1940'larda insan kanından protein elektroforezi yapılması ile insan embriyosunda/fetüsünde farklı hemoglobin molekülleri olduğu belirlenmiştir. Hemoglobin sentezi, gebe kaldıktan yaklaşık 14 gün sonra ζ -globin ve ϵ -globin (embriyonik Gower1) zincirlerinin sentezi ile başlamaktadır. Gebeliğin 5. ila 7. haftasında α -globin ve γ -globin zincirlerinin sentezi başlarken embriyonik Gower2 (α 2 ϵ 2) , Portland (ζ 2 γ 2) ve HbF (α 2 γ 2) üretilmektedir. Gebeliğin ilk 2 ayında iki farklı fetal Hb (HbF) (α 2G γ 2 ve α 2A γ 2) tetramerleri üretilmektedir. HbF'nin oksijen için HbA'dan daha yüksek bir afinitesi vardır ve HbF'nin 2,3-DPG için daha düşük afinitesi nedeniyle anneden fetal dolaşıma oksijen transferini kolaylaştırır. Gebeliğin 12. haftasında, HbF (α 2 γ 2) hemoglobinin tamamını oluşturur. Embriyonik hemoglobinler normalde fetusta gebeliğin ilk üç ayından sonra bulunmaz çünkü ζ ve ϵ zincirlerinin sentezi gebeliğin onuncu haftasından önce durmaktadır (Şekil 2.2). HbA

için gerekli olan beta-globin sentezi gebeliğin altıncı haftasında başlamakta olup, γ -globin sentezi azaldıkça artar ve yaşamın altıncı ayına kadar devam etmektedir. HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) için gerekli olan δ -globin zincirlerinin sentezi, gebeliğin 34. haftalarında başlamaktadır. Böylece HbA sentezi ilk olarak gebeliğin 30. haftasından sonra kantitatif olarak artıp, son üç aylık dönemin sonunda, fetal hemoglobinin sentezinden yetişkin hemoglobine hızlı bir geçiş gerçekleşmekte ve gebeliğin 34. haftasında %85'ten doğumda %60'tan %80'e düşmektedir. Doğumda dolaşımdaki hemoglobinin, HbF'nin %70 ila 80'ini içerirken, 6 ay sonra HbF, toplamın %4-5'inden daha azını içermektedir. Nihai yetişkin Hb modeline yaşamın 1. yılında ulaşılmakta olup, o sırada HbA ~%97, HbA2 ~%2 ve HbF ~%1'den oluşmaktadır. Bu aşamada β genini etkileyen mutasyonlar klinik olarak belirgin hale gelmektedir. Çizelge 2.1'de, normal hemoglobinler gelişim sırasında oluştukları sırayla gösterilmektedir (Huisman, 1993; Bunn,1977; Choi,2014; Yıldız,2019).



Şekil 2.2. Gelişim sırasında insan globin zincirleri konsantrasyonundaki değişiklikler (Huisman, 1993).

Çizelge 2.1. İnsandaki normal Hb'lerin moleküler yapıları ile yetişkin ve yeni doğanlardaki oranları (Huisman, 1993)

Hb Tipi	Yapısı	Erişkindeki Miktarı	Yapım Zamanı
Hb Gower 1	$\zeta_2\varepsilon_2$	-	Embriyonik
Hb Gower 2	$\alpha_2\varepsilon_2$	-	Embriyonik
Hb Portland 1	$\zeta_2\gamma_2$	-	Embriyonik
Hb F	$\alpha_2\gamma_2$	<%1	Fetal
Hb A2	$\alpha_2\delta_2$	%2,5-%3,5	Erişkin
Hb A	$\alpha_2\beta_2$	% 95-%96	Erişkin

2.3. Hemoglobin Molekülünün Kalıtsal Bozuklukları

Hemoglobin molekülünün yapısında bulunan globin zincirlerinde herhangi bir değişiklik, hemoglobinopatilere yol açabilmektedir. Hemoglobinin kalıtsal bozuklukları üç ana grupta incelenmektedir; globin zincirlerinin yapısal değişimi sonucu ortaya çıkan anormal hemoglobinler, Globin zincirlerinden birisinin veya birden fazlasının yetersiz sentezi ya da hiç sentezlenmemesi

sonucu oluşan talasemiler, ve yetişkin dönemde fetal hemoglobin sentezinin devam etmesi sonucunda ortaya çıkan “Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH)” olarak sınıflandırılır (Weatherall, 2001a, 2001b).

"Talasemi" terimi, kalıtsal bu hastalık ilk olarak Akdeniz bölgesinde tanımlandığı için Yunanca "thalassa (deniz)" kelimesinden türetilmiştir. Talasemi α -, β -, $\delta\beta$ -, $\gamma\delta\beta$ -, δ - ve γ -talasemi olarak sınıflandırılır ve bunlar, bozulmuş sentezin meydana geldiği spesifik globin zincir(ler)i tipi ile tanımlanır. Örneğin, α - ve β -talasemi sırasıyla α - ve β -globin zincirlerinin sentezinde yetersizdir (Munkongdee, 2020). Bu çeşitli formlar arasında en yaygın iki form α - ve β -talasemidir. Her yıl 70.000 çocuğun çeşitli talasemi formlarıyla doğduğu tahmin edilmektedir (Musharraf, 2017).

2.3.1. Hemoglobin Varyantları

Hemoglobin (Hb) varyantları, polipeptid zincirlerini kodlayan genlerdeki çeşitli mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu genlerin egzon bölgesindeki veya bu bölge dışındaki nokta mutasyonları, insersiyonlar ve delesyonlar çeşitli Hb varyantlarının oluşmasına sebep olmaktadır (Dönbak, 2005)

Anormal Hb ve talasemiler konusunda hizmet veren Globin Gene Server Web sitesinde <http://globin.cse.psu.edu> yayınlanan Hb varyantlarının sayısı Çizelge 2.2'de gösterildiği gibi 1.400'ü aşmıştır. Listelenen toplam hemoglobin varyantından 710'unun beta, 450'sinin alfa, 148'inin gama, 144'ünün delta zincir varyantı, 103'ünün yüksek oksijen afinitesine sahip, 48'inin düşük oksijen afinitesine sahip, 156'sının kararsız, 11'inin füzyon gen mutasyonu içeren ve 331'inin delesyon, insersiyon veya delesyon/insersiyon mutasyonları içeren varyant olarak belirlenmiştir. β -zinciri varyantlarının sayısı, tek bir β -lokusuna kıyasla iki α -lokusu olmasına rağmen, α -varyantlarından daha fazladır. α -zinciri varyantlarının çoğu, $\alpha 1$ geni veya $\alpha 2$ geni üzerindeki bir mutasyondan ortaya çıkmıştır. $\alpha 2$ Gen mutasyonu tarafından ifade edilen Hb varyant yüzdesi, $\alpha 1$ gen mutasyonunununkinden daha yüksektir (Old,2013; <http://globin.bx.psu.edu> [Son erişim tarihi: 01.02.2024]).

Meydana gelen varyantların bir kısmı nadirdir ve klinik hastalık oluşturmaz, bazıları ise örneğin Hb S, Hb C ve Hb E, belirli popülasyon gruplarında yüksek frekanslara ulaşmaktadır ve klinik olarak anlamlı semptomlar üreten bir dizi biyokimyasal anormalliğe neden olabilmektedir. En yaygın ve tıbbi açıdan önemli Hb varyantları arasında HbS bulunmaktadır (Patrinos, 2004; Weatherall, 2001).

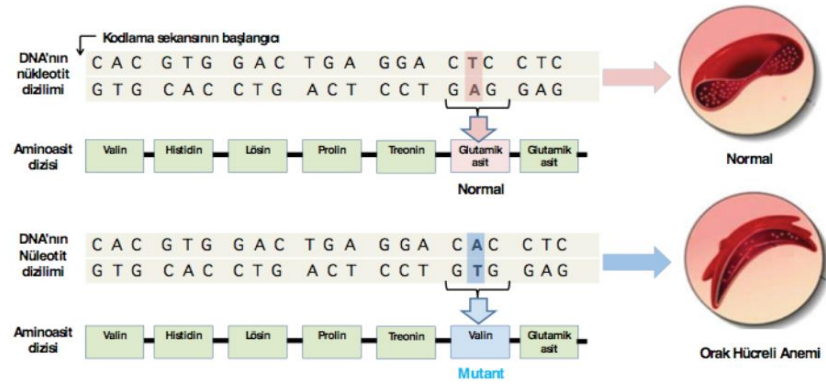
Çizelge 2.2. Bilinen Hemoglobin Varyantlarının Sayısı

Tip	Sayısı
α zincir varyantları	450
β zincir varyantları	710
γ zincir varyantları	148
δ zincir varyantları	144
Delesyonlu; insersiyonlu; delesyonlu ve insersiyonlu varyantlar	331
Yüksek oksijen afinitesine sahip Hb varyantlar	103
Düşük oksijen afinitesine sahip Hb varyantlar	48
Kararsız Hb varyantlar	156
Füzyon gen mutasyonu içeren varyantlar	11

Hb S (Orak Hücre Anemisi)

Dünyada en yaygın kalıtsal hastalıklardan biri Orak hücreli anemi (Oha) ve ya Orak hücre hastalığı (Ohh) ilk olarak 1910 yılında Herrick tarafından pulmoner semptomlarıyla başvuran bir diş hekimliği öğrencisinin kan yaymasını incelemesi sırasında eritrosit tuhaf bir görünümü olan “orak biçiminde” görülmesi ile tanımlanmıştır. 1927’de Hahn ve Gillespie, oksijen eksikliğinin eritrositlerinin oraklaşmasına neden olduğunu açıklanmıştır ve hastalığın patolojik temelini tanımlanmıştır. Bu ufuk açıcı çalışmalar, hastalığın hemoglobin molekülündeki bir anormallikten kaynaklanabileceğini ilk kez açıklayan Linus Pauling tarafından 1945 yılında not edilmiştir. Kısa bir süre sonra 1949’da Pauling ve arkadaşları tarafında bu hipotez jel elektroforezi ile değerlendirilmiş ve oraklaşmış hemoglobine karşı diferansiyel göçünün gösterilmesiyle onaylanmıştır. Ingram ve arkadaşları 1958’de mutant orak hemoglobinin (HbS) normal hemoglobin (HbA)’dan tek bir amino asit farklı olduğunu göstermişler ve hastalığın genetik temelini keşfetmişlerdir (Chatterjee, 2018).

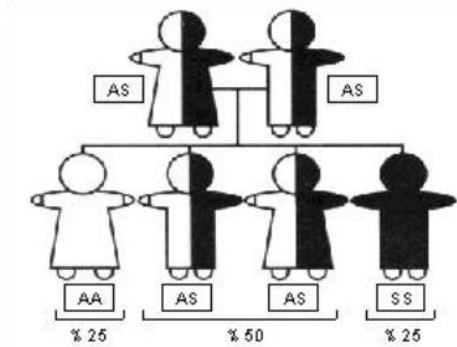
Hb molekülünün ilk keşfedilen varyant ve Orak hücre anemisine neden olan Hb S’tir. Hb S molekülü, 11. kromozomun kısa kolunda yer alan, β globin geninin 6. konumundaki tek nükleotit değişimi ile adenin yerine timin (GAG→GTG) geçmiş, böylece glutamik asit yerine valin ($\beta 6; \text{Glu} \rightarrow \text{Val}$) amino asiti oluşmaktadır (Şekil 2.3) (Dönbak, 2005). Bu yapısal değişiklik nedeniyle eritrositlerin dış zarında bulunan hidrofilik amino asidin yerine hidrofobik bir amino asidin geçmesi sonucu, Hb molekülünün çözünürlük özelliği etkilenmekte ve değişmektedir. Oksijenin azalması durumunda HbS molekülleri HbA’ya göre daha az çözünmekte ve aşamalı olarak büyümektedir. Hemoglobinin fiziksel yapısındaki bozulma, eritrositlerin şekil değiştirmesine neden olur ve normalde çift çukur disk şeklinde olan eritrositleri sert, düzensiz ve orak şekline dönüştürmektedir (Söylemez, 2016.).



Şekil 2.3. β geni normal ve mutant Hb gen dizisi (Gürgey, 2014).

Orak hücre, otozomal resesif bir gen bozukluğu olarak gelecek nesillere aktarılmaktadır. Orak hücre mutasyonu heterozigot HbA/S (taşıyıcı) veya homozigot HbS/S (hasta) yapıda olabilmektedir. Her iki ebeveynin de Hb S taşıyıcısı olduğu durumlarda, ebeveynin sağlığı nadiren etkilenmekte, ancak çocukta kusurlu duruma yol açan bir mutasyona uğramış gen ve sağlıklı gen bulunmaktadır. Bu durumda doğacak çocuğun HbS taşıyıcısı doğma oranı % 50, hasta doğma oranı % 25, sağlıklı doğma oranı ise % 25'dir (Şekil 2.4). Bu oranlar her gebelik için geçerlidir (Gürgey, 2014; Dönbak, 2005).

Orak hücre taşıyıcı bireylerde klinik bulguları görülmez ve genellikle normal bir hayata sahiptirler. Orak hücre hastalığı (HbSS) olanlar tekrarlayan ağrılı dönemler (krizler) yaşamakla kalmayıp, aynı zamanda tekrarlayan vazooklüzyon atakları nedeniyle, sonuçta kronik organ hasarına maruz kalmaktadırlar. (Savitt, 2014).



Şekil 2.4. Orak hücre hastalığının genetik aktarımı (Gürgey, 2014).

Orak hücre hastalığı Afrika kıtası, Orta Doğu, Hindistan, Karayipler, Güney ve Orta Amerika, Akdeniz kıyısındaki bazı ülkeler karakteristik bir coğrafik dağılıma sahiptirler.(Gürgey, 2014) Dünya çapında her yıl 400.000'den fazla çocuğun Oha ile doğduğu tahmin edilmektedir. Böylece bu hastalık artık küresel öneme sahip ve klinik önemi kadar ekonomik önemi de olan bir hastalık olduğu anlaşılmaktadır (Reena, 2020).

Hemoglobin E

Dünyada yaygınlığı ikinci sırada olan Hb E varyantı, kromozom 11p15.5 üzerinde lokalize olup β -globin polipeptid zincirinde 26. konumundaki glutamik asit (Glu) yerine lizin amino asiti (Lys) geçmektedir ($\beta 26\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$). Bu nokta mutasyonunun (GAG $\rightarrow$ AAG) sonucu, β globin geninde, mRNA splice bölgesini aktive ederek β -E zincirinin sentezinde azalma görülmektedir. Bu nedenle HbE fenotipik olarak talasemik olup eritrositlerinde mikrositoz ve hipokromi gözlenir (Ohashi, 2004).

HbA/E heterozigot bireylerde genellikle hafif veya hiç anemi gözlenmez, ancak Hb E/E homozigotlarında orta derecede anemi gözlenmektedir. Hb E'nin talasemik fenotipi içerdiği için, diğer hemoglobin varyantlarından farklı olarak eritrositlerde mikrositoz ve hipokromi gözlenmektedir. HbE/beta talasemi ise hafif asemptomatik durumdan ciddi transfüzyon bağımlı anemiye kadar geniş bir klinik şiddet aralığında değişkenlik göstermektedir (Johnson, 1992).

Hemoglobin C

Hemoglobin C (HbC), β -globin zincirinin altıncı konumunda glutamik asit yerine lizinin ($\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$) geçmesi ile oluşan bir varyanttır. Buna bağlı olarak, Hb C'yi Hb A'dan daha az çözünür hale getirerek altıgen kristaller oluşturmaktadır. Bu kristalleşme, membran hasarına, KCl kotransportundaki bozulmaya sekonder eritrosit dehidrasyonuna ve kısalmış eritrosit sağkalımına neden olmaktadır. Hemoglobin C, dünyada üçüncü sıklık ile görülen Hb varyantı olarak, Batı Afrika ve Güneydoğu Asya, Güney ve Orta Amerika ve Güney Avrupa'da çeşitli popülasyonlarda bulunmaktadır (Karna, 2022; Perumbeti, 2014).

Hemoglobin C özelliği (HbAC) klinik olarak asemptomatiktir. HbC Homozigot (HbCC), bireylerde hafif hemolitik anemi, mikrositoz ve splenomegali olabilmektedir. Hemoglobin C hastalığı ciddi klinik komplikasyonlara dönüşmemesine rağmen, hemoglobin S (Hb SC) gibi diğer hemoglobinopatilerle kalıtımının ciddi sonuçlar doğurabilmektedir. Hemoglobin C, HbS (HbSC) hastalığı ile kombinasyon halinde, HbSS'den daha hafif bir fenotipe sahip orak hücre hastalığına neden olup, tipik özelliği vazooklüzif kriz veya inme riskinin azaltılmasıdır. β -talasemi (hemoglobin C- β talasemi), splenomegali ile orta derecede hemolitik anemiye yol açmaktadır (Karna, 2022; Perumbeti, 2014; Aleluia, 2017).

Hemoglobin D

Bir diğerde hemoglobin ilk olarak 1951 yılında Itano tarafından tanımlanan Hb D'dir. Bulunan bu mutant hemoglobin için en yaygın adlandırmalar Hb D-Los Angeles veya Hb D-Punjab'dır. HbD-Punjab, Glutaminin glutamik asidin yerini aldığı β zincirinde 121. pozisyonda ($\beta 121\text{Glu}\rightarrow\text{Gln}$) yapı olarak Hb A'dan farklıdır. Alkali elektroforezde hemoglobin S ile birlikte hareket eder ve birbirinden ayırt edilebilmesi için asit pH'da yapılan agar jel elektroforezi, HPLC veya mutasyon analizleri yapılmalıdır (Shanthala. Dev, 2016).

HbD heterozigotlarda klinik, hematolojik yada fizyolojik herhangi bir anomali gözlenmez ve homozigotlar ise klinik olarak orta derecede hemolitik anemi ve dalak büyümesi gibi hafif bir fenotipe sahiptir. Ayrıca bu varyant, talasemiler gibi diğer hemoglobinopatilerle birlikte bulunabilir; en göze çarpan klinik değişiklikler, hemoglobin D-Punjab hemoglobin S ile ilişkili olduğunda meydana gelmektedir. Bu ilişkinin klinik belirtileri, hemoglobin S için homozigotza benzer olabilmektedir (Fucharoen, 2012).

Hemoglobin O-Arab

β -globin zincirinin 121. pozisyonunda glutamik asit yerine lizinin (121Glu→Lys) yer değiştirmesi ile karakterize edilen HbO-Arab, homozigot bireylerde hafif bir splenomegali ve hafif bir hemolitik anemi dışında herhangi bir klinik semptom görülmez. Bununla birlikte, Hb O-Arab, Hb S ile kalıtsal olduğunda, Hb SS'dekine benzer ciddi klinik durumlar ortaya çıkar. Hb O-Arab, alkali bir pH'ta (pH 8,6) selüloz asetat kağıdı elektroforezinde Hb A2, Hb C ve Hb E ile göç ettiğinden, onu Hb C'den ayırt etmek için asit pH'ta sitrat agar elektroforezi gereklidir. Hb O-Arab, Araplar, Amerikan zencileri, Bulgarlar, Kuzey Afrikalılar, Sudanlılar ve Türklerde bildirilmiştir. İrken ve arkadaşlarının (2002) İzmir'de yaptığı çalışmada Hb O-Arab'ın %0,12 prevalansla bulunduğu, Dikker ve arkadaşlarının (2016) İstanbul'da gerçekleştirdiği çalışmada ise %0,05 prevalans oranı bildirilmektedir (Altay, 2002; Zimmerman, 1999; Irken, 2002; Dikker, 2016).

Hemoglobin Q-İran

Hb Q-İran, ilk olarak 1970'te açıklanan ve α -globin zincirinin 75 konumunda aspartik asit yerine histidin ($\alpha75\text{Asp}\rightarrow\text{His}$) geçmesi ile oluşan bir varyanttır. Bu varyant heterozigot durumda miktarının %17-19 ve normal hematolojiye sahip olduğu bildirilmektedir (Altay, 2002).

Türkiye'de Hb Q-İran'ın tespit edildiği bildirilmiştir. Kılınç ve arkadaşları, Adana bölgesinde Hb Q-İran'ı bir vakada tespit etmişlerdir. Dikker ve arkadaşlarının İstanbul'da gerçekleştirdiği çalışmada %0,05 prevalansı %3,9 olarak rapor edilmiştir (Irken, 2002; Dikker, 2016).

Hemoglobin H

Hb H, β -globin zincirleri eksprese edildiğinde azaltılmış α -globin ekspresyonu koşulları altında β -globin (β_4) tetramerlerinden kaynaklanır. İki tip Hb H hastalığı vardır: delesyonel Hb H ($-\alpha$) ve delesyonel olmayan Hb H ($-\alpha^T$). Delesyonel olmayan Hb H hastaları, delesyonel Hb H hastalarından daha belirgin klinik semptomlara sahiptir ve daha fazla tıbbi müdahale gerektirir. HbH, oksijen için son derece yüksek bir afiniteye sahiptir ve bu nedenle oksijen iletimi için yararlı değildir, bu da hemoglobin seviyesiyle orantısız doku hipoksisine yol açar. Ek olarak, HbH, dalakta eritrosit ekstrasyonunu ve fagositozu teşvik eden hücre içi inklüzyonların çökmesine ve oluşmasına neden

olan oksidasyona eğilimlidir. Sonuç, β -talasemi intermediaya benzeyen orta derecede şiddetli bir anemidir (Kumar, 2020; Fucharoen, 2009).

2.4. Türkiye’de saptanan hemoglobin varyantları

Türkiye’de yapılan çalışmalar sonucunda 60 hemoglobin varyantı tanımlanmıştır. Bu 60 anormal hemoglobinin 15 tanesi alfa, 37 beta, 1 gama, 2 delta, 2 hibrid hemoglobin, 2 yapısal değişimli; 1 uzamış alfa zinciri ve indelesyon/insersiyon sonucunda uzamış beta zincir varyantıdır. Saptanan hemoglobin varyantlarından 10 tanesi ilk defa Türk populasyonunda tanımlanmıştır. Türkiye’de Anormal hemoglobinlerin dağılımı Çizelge 2.3’de gösterilmektedir (Yıldız, 2019).

Yapılan çeşitli araştırmalar Türkiye’de HbS frekansının % 0.5-44.2 arasında, Hb E (% 0,16-2,4), Hb D (% 0,2), Hb C ve Hb O- Arab (% 3,9) olduğunu gösterilmiştir (Dönbak, 2005).



Çizelge 2.3. Türkiye’de Anormal hemoglobinlerin dağılımı (Yıldız, 2019).

Sıra	İsim	Zinciri /Mutasyon	Sıra	İsim	Zinciri /Mutasyon
1	Adana*	$\alpha 59$ Gly>Asp	31	J-Antakya*	$\beta 65$ Lys>Met
2	Ankara*	$\beta 10$ Ala>Asp	32	J-Iran	$\beta 77$ His>Asp
3	A2 Yialousa	$\delta 82$ Ala>Ser	33	J-Meerut	$\alpha 120$ Ala>Glu
4	Antalya*	Deletion/insertion	34	Knosos	$\beta 27$ Ala>Ser
5	Başkent*	$\gamma 128$ Ala>Thr	35	Köln	$\beta 98$ Val>Met
6	Beograd	$\beta 121$ Glu>Val	26	Lepore- Boston	Hybrid
7	Brocton	$\beta 138$ Ala>Pro	37	M-Iwate	$\alpha 87$ His>Tyr
8	Bronova	$\alpha 103$ His>Leu	38	Moabit	$\alpha 86$ Leu>Arg
9	C	$\beta 6$ Glu>Lys	39	Monthgomery	$\alpha 48$ Leu>Arg
10	City of Hope	$\beta 69$ Gly>Ser	40	M-Saskatoon	$\beta 63$ His>Tyr
11	Costant Spring	Prolonged α chain	41	N-Baltimore	$\beta 95$ Lys>Glu
12	Crete	$\beta 129$ Ala>Pro	42	Noah	$\delta 143$ His>Tyr
13	Çapa*	$\alpha 94$ Asp>Gly	43	O-Arab	$\beta 121$ Glu>Lys
14	D-Iran	$\beta 22$ Glu>Gln	44	O-Podova	$\alpha 30$ Glu>Lys
15	D-Punjab	$\beta 121$ Glu>Gln	45	P-Nilotic	Hybrid
16	D-Ouled Rabah	$\beta 19$ Asn>Lys	46	Pyrgos	$\beta 83$ Gly>Asp
17	E	$\beta 26$ Glu>Lys	47	Q-Iran	$\alpha 75$ Asp>His
18	Ernz	$\beta 123$ Thr>Asn	48	S	$\beta 6$ Glu>Val
19	E-Saskatoon	$\beta 22$ Glu>Lys	49	Sarrebourg	$\beta 131$ Gln>Arg
20	G-Copenhagen	$\beta 47$ Asp>Asn	50	Setif	$\alpha 94$ Asp>His
21	G-Cousatta	$\beta 22$ Glu>Ala	51	Siirt*	$\beta 27$ Ala>Gly
22	G-Georgia	$\alpha 95$ Pro>Leu	52	South Florida	$\beta 1$ Val>Met
23	G-Szuhu	$\beta 80$ Asn>Lys	53	Strumica	$\alpha 112$ His>Arg
24	Hakkari*	$\beta 31$ Leu>Arg	54	Summer Hill	$\beta 52$ Asp>His
25	Hamadan	$\beta 56$ Gly>Arg	55	Tunis	$\beta 124$ Pro>Ser
26	Hamilton	$\beta 11$ Val>Ile	56	Tyne	$\beta 5$ Pro>Ser
27	Hasharon	$\alpha 47$ Asp>His	57	Ube-2	$\alpha 68$ Asn>Asp
28	Istanbul*	$\beta 92$ His>Gln	58	Volga	$\beta 27$ Ala>Asp
29	Izmir*	$\beta 86$ Ala>Val	59	Yauzi	$\beta 79$ Asp>Asn
30	J-Anatolia	$\alpha 61$ Lys>Thr	60	Westeinde	$\alpha 125$ Leu>Gln

*İlk olarak Türk Hastalarda Keşfedildi.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Cihazlar

Cihaz Adı	Marka/ Model
Kan Sayımı Cihazı	Beckman
Mikrosantrifüj	Beckman Microfuge E
Vorteks	Nüve NM 110
Derin Dondurucu	Bosch
Etüv	Nüve -EN 500
UV lamba	Cole-Parmer 9814
Hassas Terazı	Mettler AJ 100
Otomatik pipetler	Ependorf
pH metre	Beckman Century SS-1
Mikrodalga Fırın	Arçelik
Hemoglobin elektroforezi	SAS-1 plus veSAS-2
Thermo-Cycler	Biometra
Jel elektroforez Tankı	Bio-Rad
Elektroforez güç kaynağı	Bio-Rad
Jel dökümantasyon sistemi	Bio-Rad

3.2. Kimyasal Malzemeler

Malzeme	Marka/ Model
Gliserol	Merck
Sodyum klorür	Merck
EDTA Na2	Merck
Tris	Amresco
Borik asit	Merck
Asetik asit	Merck
Agaroz	Bio-Rad
Ficoll	Sigma
Brom fenol mavisi	Sigma B-0149
Hemoglobin elektroforezi SAS-1Alk Hb	Helena

Taq polimeraz	Sigma D 6677
DNA izolasyon kiti	Roche (High Pure PCR Template Preparation Kit)
dNTP	Sigma
Primerler	Fermantas

3.3. Örnek Toplama

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesine başvuran kişilerin kan örnekleri kullanılmıştır. EDTA'lı tüplere alınan 5 mL kan, soğuk zincir kurallarına uyularak laboratuvara getirildi. Bu kan örneklerinden hemoglobin elektroforezi yapıldı. HbS ve HbD'yi birbirinden ayrılması için oraklaşma testi yapıldı. Tüm olguların DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, genomik DNA örnekleri sonraki adım için buzdolabında (+4°C) saklandı. Hb C ve Hb E ARMS yöntemi ile birbirinden ayrıldı.

3.4. Analiz Yöntemleri

3.4.1. Hematolojik İncelemeler

Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi merkez laboratuvar gelen kan örnekleri hemoglobin (Hb), eritrosit sayısı, hematokrit (Hct), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH), ortalama eritrosit hacmi (MCV) ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) otomatik kan sayım cihazı (Bechman DxH 800) ile analiz edildi.

3.4.2. Hemolizat Hazırlama

Kan örnekleri üç kez serum fizyolojik ile yıkandı. Sonra 200 µL kan örnekleri ve 1000 µL Serum fizyolojik ependorf tüplerine konulup vorteks ile karıştırıldı. Plazma, eritrositleri çöktirmek için 3000 rpm'de 1 dakika santrifüj ederek ayrılmıştır. Çökelen hücre üzerine 1 mL serum fizyolojik (1000µL) ilave edilerek 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı, üzerindeki faz atıldı. Yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra son santrifüj yapılır ve tüpün dibinde yıkanmış eritrositler kaldı. Daha sonra bir ependorf tüpüne 200µL hemoliz solüsyonu konuldu. Üzerine 50 µL yıkanmış eritrosit eklendi. Bu ekleme ile eritrositleri 1/5 oranında dilüe edilmiş oldu. Hemolizat olarak bilinen kısım Hb elektroforezi için kullanılmıştır.

3.4.3. Hemoglobin Elektroforezi

Prensip

Yüklü Hb partikülleri elektriksel alanda sahip olduğu yüklere göre katoda yada anoda doğru göç etmektedir. Yüzey yük değişikliği olan varyantlar ise farklı göç etmektedir. Alkali ortamda sellüloz asetat kâğıdına uygulanan hemolizat, elektriksel alanda göç hızlarına göre ayrıştırılarak hemoglobin tiplendirilmesi yapılmaktadır (Kohn, 1969).

SAS-1 AlkHb Kit Bileşenleri;

1. SAS-1 ALK HbGel (10 adet)

Agaroz jel paketlenmiş halde kullanıma hazırdır. Koruyucu olarak sodyum azit içerir. Tris/EDTA/Glisin tampon içinde agaroz içerir.

2. Acid Blue Stain (1x75mL)

Konsantre asit mavi boyası: Şişenin içeriğini saf suyla 700 mL'ye seyreltildi. Gece boyunca karıştırıldı, kullanılmadan önce süzüldü. Sıkıca kapatılmış bir şişede saklandı.

3. Hemoglobin Lysing Agent (1x50mL)

Hemoglobin lysing agent paketlenmiş halde kullanıma hazırdır. Triton X-100, saf su içerisinde potasyum siyanür ve koruyucu olarak tiyomersal içerir.

4. Destain (A) (1x10mL)

Yıkama çözeltisi (Destain A) saf suyla 1 litreye tamamlandı.

5. Yıkama çözeltisi (Destain B) (1x40mL)

Destain A çözeltisi içine Destain B çözeltisi eklendi. Daha sonra içerisine 1 litre saf su eklendi.

SAS-1 AlkHb Kiti ile Hb Elektroforezi

1. 12 kuyucuklu SAS-1 numune tepsisinin her kuyucuğuna 35 µL önceden hazırlanmış olan hemolizat eklendi. Daha sonra aplikatör çekmecesine dikkatlice yerleştirildi.
2. SAS-1 AlkHb Gel ambalajından çıkarıldı. 400 µL REP PREP'i jeli üzerine koyacağımız tabakaya eklendi. Jel ısı bölmesi üzerine agaroz tarafı yukarıya gelecek şekilde yerleştirildi. Jelin pozitif ve negatif tarafları ilgili elektrot kolonlarına uygun şekilde ayarlandı. Jelin altında hava kabarcıkları olmamasına dikkat edildi. Fazla olan REP PREP çözeltisi jelin kenarından çıkarıldı.
3. SAS-1 karbon elektrotları, elektrot direklerinin üst tarafına takıldı. Böylece jel ile elektrotların temas etmesi sağlandı.
4. Kapak jel ve elektrotların üzerine yerleştirildi. Dik temasın sağlaması için 5 saniye basılı tutuldu.
5. SAS-1 aplikatörü SAS-1 plus cihazındaki üst konuma yerleştirildi. Program 25°C'de 30 dak süre ile 200 volt uygulandı.
6. Sonlanmış olan programda kapak açma düğmesine basıldı. Kapalı olan jel dışarıya çıkarıldı.
7. Jel boyama cihazındaki tutucusuna takıldı.

Boyama işlemi aşağıdaki Çizelge da 3.1'de gösterdiği gibi yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Hemoglobin Elektroforezi boyama ünitesinin adım protokolü

Adım	Çözüm	Zaman dak	Port	Sıcaklık °C
Boya	Acid Blue Boyası	05:00	6	---
Yıkama	Yıkama Solüsyonu	00:30	2	---
Kurutma	-----	15:00	---	65
Yıkama	Yıkama Solüsyonu	02:00	2	---
Yıkama	Yıkama Solüsyonu	02:00	2	---
Yıkama	Saf Su	01:00	1	---
Kurutma	-----	15:00	---	65

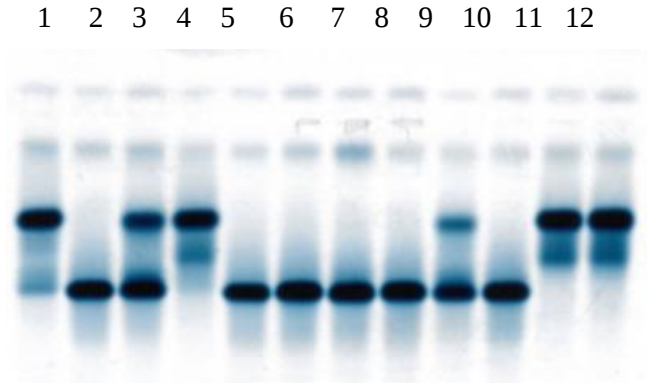
Jel okuyucuya yerleştirilerek bilgisayar programına aktarıldı. 12 örneğin ayrı ayrı bantların yerleri belirlendi. Pik ayarları yapılarak hemoglobin türleri ve hemoglobin yüzdeleri belirlendi.



Şekil 3.1. Hemoglobin Elektroforez cihazı

□ →	Aplikasyon noktası
□ →	Proteinler
□ →	HbA ₂ - Hb E, HbC, O Arap(>%10)
□ →	Hb S veya Hb D
□ →	Hb Lepore
□ →	Hb F
□ →	Hb A ₁
□ →	Hb A ₁ C
□ →	Hb J İran
□ →	Hb Barts
□ →	Hb H

Şekil 3.2. Hemoglobin türlerinin elektroforezindeki yerleri



Şekil 3.3. Hemoglobin Elektroforezi görüntüsü.

3.4.4. Oraklaşma Testi ile HbS ve HbD ayrımı

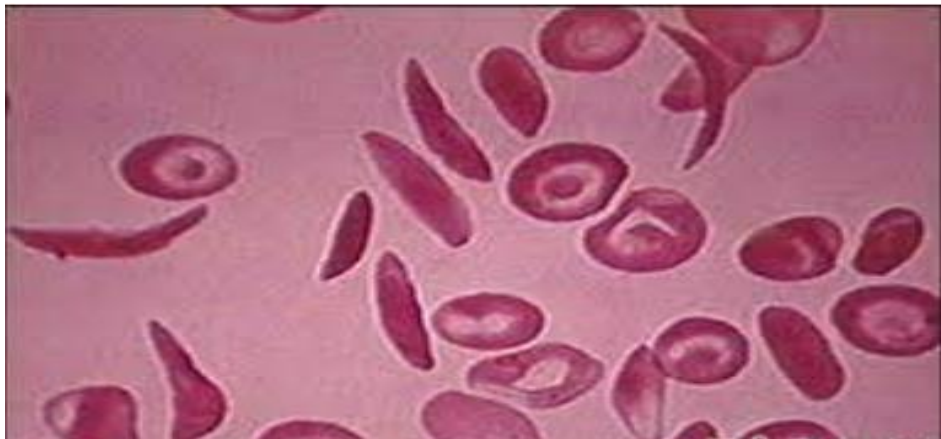
Oraklaşma Testi

Hemoglobin S, oksijensiz bir ortamda veya güçlü bir indirgeyici ajan olan sodyum metabisülfite varlığında eritrositlerin orak şeklini almasıyla tanımlanmaktadır (Huisman ve Jonxis, 1977).

Çözeltiler

0,2 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 10 mL suda çözölmüştür.

Yöntem: Tam kan örneğinden 20 μL aldıktan sonra lamın ortasına konup üzerine % 2'lik sodyum meta bisülfitten bir damla eklenip üzeri lamelle kapatılıp lamelin kenarları entellan ile hava almayacak şekilde kapatıldı, 30 dk. sonra mikroskopta eritrositlerin oraklaşması incelendi. HbS de oraklaşma pozitif HbD'de ise oraklaşma negatiftir.



Şekil 3.4. Oraklaşma Pozitif

3.4.5. DNA İzolasyonu

Kan sayımı yapıldıktan sonra arta kalan örneklerden hazır kit ile (Roche Kat No:11796828001, USA) genomik DNA izole edildi.

Kit içindeki reaktifler prosedüre uygun olarak hazırlandı.

- 1) Proteinaz K: 4,5mL distile suda çözüldü.
- 2) İnhibitör Removal tampon: Tampon içerisine 20 mL mutlak etanol eklendi.
- 3) Yıkama tamponu: Tampon içerisine 80 mL mutlak etanol eklendi.

Kit Prosedürü:

- 1) Ependorf içerisine 200 µL Binding tampon, 40µL proteinaz K, 200 µL tam kan eklendi. Karıştırıldıktan sonra 10 dakika +70°C'de inkübasyona bırakıldı.
- 2) İnkübasyondan alınan ependorf tüplerine 100 µL izopropanol eklendi, vorteks ile karıştırıldı. Daha sonra başka bir ependorf içerisindeki filtre üzerine eklendi ve 8.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- 3) Filtreli ependorfun altında biriken çözelti döküldü. Filtreli ependorf üzerine 500 µL inhibitör removal tampon eklendi, 1 dakika 8.000 rpm de santrifüj edildi.
- 4) Filtre yeni bir ependorf üzerine konuldu. Daha sonra üzerine 500 µL yıkama tamponu eklendi, 1 dakika 8.000 rpm de santrifüj edildi.
- 5) Tekrar Filtre yeni bir ependorf üzerine konuldu. Daha sonra üzerine 500 µL yıkama tamponu eklendi ve 1 dakika 8.000 rpm de santrifüj edildi.
- 6) Filtreli ependorfun altında biriken çözelti döküldü, boş olarak filtreli ependorf 10 saniye 13.000 rpm de santrifüj edildi.
- 7) Filtre yeni bir ependorf üzerine konuldu. Daha sonra üzerine önceden +70°C'de olan 200 µL Elution tampon eklendi, 1 dakika 8.000 rpm de santrifüj edildi.
- 8) Filtreli ependorfun filtresi atıldı ve ependorfun içinde toplanan genomik DNA çalışma gününe kadar +4°C'de saklandı

3.4.6. ARMS-PCR Yöntemiyle HbC ve HbE Varyantlarının Tanımlanması:

Ploimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu ile genomik DNA'nın istenilen bölgesi, ilgili gene spesifik bir çift primer yardımıyla çoğaltılmaktadır. Amplifikasyon işleminde önce iki oligonükleotid (primer) ve dört deoksinnükleotid trifosfatın (dNTP) varlığında DNA 95°C'ye kadar ısıtılmasıyla denatürasyon gerçekleştirilmektedir. İkinci aşamada, ısı 55°C-65°C aralığına düşürülerek spesifik primerlerin komplementer dizilerine yapışması (annealing) sağlanmaktadır. Son aşamada, 72°C'de DNA polimerazın yerini tutan ve yüksek ısıdan etkilenmeyen Taq polimeraz enzimi, ortamda bulunan deoksinnükleotid trifosfatların 5'→3' yönünde ekleyerek zincirin uzamasını gerçekleştirmektedir. Bu ısı değişimi döngüsünde DNA iki katına çıkmakta ve bu tekrarlanan her döngüde DNA geometrik olarak artmaktadır. PCR sonucu elde edilen fragmant 585 bp uzunluğunda olup bu ürün agaroz jel elektroforezi kullanılarak görüntülenmektedir (White, 1993).

Çözeltiler:

1. 10X Cetus Tamponu:

2M KCl	1,25 mL
1M Tris. HCl	0,5 mL
1M MgCl ₂	75 µL
Jelatin	5 mg
Steril dH ₂ O	3,2 mL

Jelatinin erimesi için 37°C'de bekletilir.

2. 1 M Spermidin

3. 1,25 mM dNTP

4. PCR Karışımı:

10X Cetus tamponu	500 µL
Steril distile su	2700 µL
1,25mM dNTP	800 µL
1M Spermidin 4 µl alınıp karıştırılır.	

5. Taq polimeraz (5 Ü/µL)

6. Primerler (5 pmol/µL):

Ortak primer 1: 5'ACC TCA CCC TGT GGA GCC AC 3'

Ortak primer 2: 5'CCC CTT CCT ATG ACA TGA ACT TAA 3'

5'sabit primer: 5'CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC 3'

3'sabit primer: 5'GAG TCA AGG CTG AGA GAT GCA GGA 3'

Amplification Refractory Mutation System (ARMS)

Nokta mutasyonları veya küçük delesyonları tanımlamak için ARMS yöntemi geliştirilmiştir. Mutasyona özgü çoğaltma (amplifikasyon) işlemi yapılarak mutant β globin genindeki mutasyonları saptanmaya saptanmaktadır. Mutant β globin alelline özgü primer sadece mutasyonun olduğu bölgeyi tanıırken, mutasyonun olmadığı bölgeye yapışmayacak ve çoğaltma işlemi sonuçsuz kalacaktır. Böylece bir tane mutant alelle özgü primer, bir tane bunun zıt bölgesini karşılayan primer ve iki tane de genin mutasyon içermeyen herhangi bir bölgesini çoğaltarak koşulların doğruluğunu kontrol etmeye yarayacak toplam dört primerin tek bir tüpte kullanılmasıyla β geninin mutasyonları saptanabilmektedir.

ARMS Primerleri:

Hb E (T→C)¹: 5' TAA CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG GGC GTT 3'

Hb E (T→C)²: 5' TAA CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG GGC GTC 3'

(1: Mutant primeri, 2: Normal primeri)

Hb E genini çoğaltma karışımı:

PCR karışımı	20 µL
ARMS primeri 1 veya 2	1 µL
Ortak primer 1 veya 2	1 µL
5' Sabit primer	1 µL
3' Sabit primer	1 µL
gDNA (0.5-1 µg/ml)	1 µL
Taq polimeraz	0.1 µL
Toplam hacim	25.1 µL

Yöntem: Çoğaltma ısıya dayanıklı mikrotüpler içinde ısısal döngüleyici cihaz (Thermal Cycler) ile yapılır. Mikrotüplerin yerleştirildiği bir ısı bloğu ve ısı değişimlerini kısa sürede gerçekleştiren bir mikroişlemciden oluşan bu alette ısısal döngü programları önceden belirlenerek uygulanır. Bir ARMS-PCR protokolündeki sıcaklık, süre ve döngü sayısı Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. ARMS-PCR yönteminde kullanılan PCR cihazındaki protokol basamakları

PCR Programı	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	94°C	1 dk	25
Yapışma	65°C	1 dk	25
Uzama	72°C	1.30 dk	25
Son Döngü	72°C	3 dk	1

Elde edilen çoğaltılmış gen ürünleri agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılarak bantlar görüntülendi ve mutasyonlar belirlendi.

3.4.7. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi; amplifiye edilmiş DNA molekülünün tanımlanması, ayrıştırılması ve saflaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Agaroz jel elektroforezinde, DNA moleküllerinin nükleotid sayısının logaritması ile ters orantılı olarak anoda doğru göç ederler ve bu göç hızı, jele eş zamanlı olarak uygulanan kontrol DNA ile birlikte değerlendirilir.

Ayrıçlar**1) 5×Tris Borat EDTA (TBE) Tamponu pH 8,0:**

Tris baz	54,0 g
Borik asit	27,5 g

EDTA [0.5 M, pH:8,0] 20 mL

Bir miktar saf suda çözünerek bir litreye tamamlanır.

2) Elektroforez için 0,5X TBE Tamponu:

5×TBE'den 10 mL alınarak saf su ile 200 mL'ye tamamlanır.

3) %1'lik Agaroz jel:

2 g Agaroz 100 mL 0,5×TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritilir. Hafif soğuyunca jel kaplarına dökülür.

4) Yükleme tamponu

Brom Fenol Mavisi 50 mg

Gliserol 10 mL

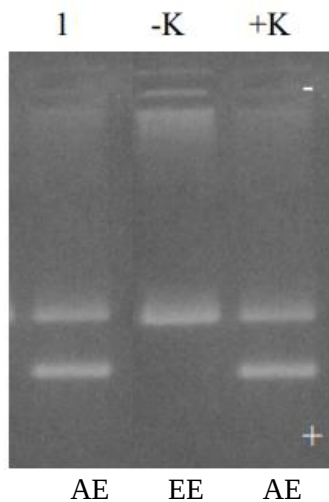
Ficoll 15 g

0,5×TBE tamponu ile 100 mL'ye tamamlanır.

5) Etidyum Bromür çözeltisi:

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

Yöntem: 0,5×TBE tamponu içinde mikrodalga fırında çözülen agaroz jel elektroforez tabağına döküldükten sonra soğumaya bırakılır. 0,5×TBE tamponuyla dolu elektroforez tankı içine yerleştirilerek jel içindeki tarak çıkarıldığında oluşan kuyulara, çoğaltılmış örnekten 20 µL alınarak 2 µL yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra jele yüklenip, 30 dakika 150 volt elektrik akımı verilir. Elektroforez sonrası jel Etidyum Bromür ile 1 dakika boyanır ve dH₂O ile yıkanarak boya atıklarından temizlenir. DNA parçaları UV ile görünür hale getirilip, fotoğrafı çekilerek değerlendirilir.



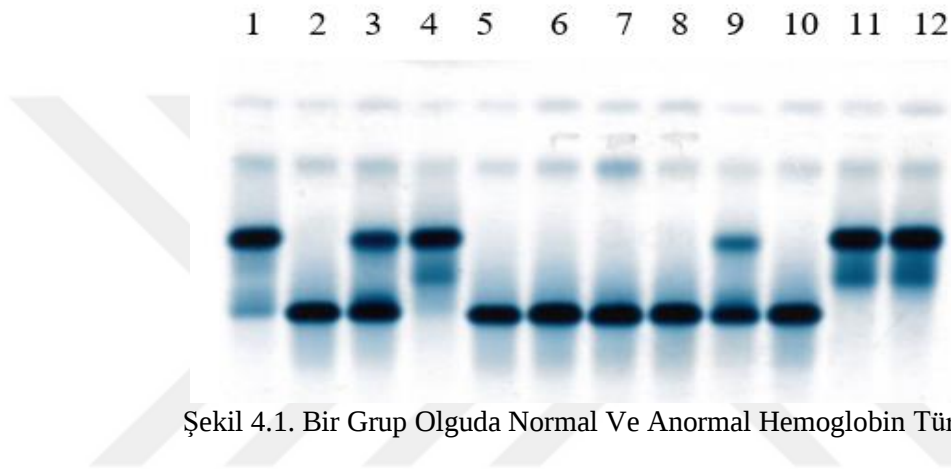
Şekil 3.4. ARMS yöntemi ile HbAC ve HbAE mutasyonu için elde edilen agaroz jel görüntüsü.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarında kan sayımı yapılan anemili hastalar üzerinde yapıldı. Demir eksikliği olmayan 181 kişinin kanları çalışmaya dahil edildi. Hemoglobin tiplendirmesi, Hemoglobin elektroforez ile yapılarak HbAS, HbSS HbAE, HbAC, HbAD olabileceği düşünülen hastalarda oraklaşma testi ve ARMS yöntemi kullanılarak bu anormal hemoglobinler birbirlerinden ayrılmıştır. Örneğin 12 hastanın elektroforez sonuçları Şekil 4.1’de gösterimiştir.



Çalışmamızda hemoglobin elekraforezi, ARMS, Oraklaşma testleri sonucunda 115 olgu HbAS, 60 olgu HbSS, 3 olgu HbSC, 2 olgu HbAC, 1 olgu HbAE hemoglobin türü belirlendi. Çizelge 4.1 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmamıza dahil olan tüm olguların verileri

hasta Sırası	HbA%	HbF%	HbS%	HbA2%	HbC%	HbE%	Hb türleri
1	31.33	7.61	56.39	4.67			A(F)S
2	69.71		27.10	3.19			AS
3	71.52		26.03	2.45			AS
4	26.29	10.95	57.75	5.02			A(F)S
5	2.92	41.97	51.42	3.70			A(F)S
6		19.69	75.33	4.98			SS
7	2.93	38.37	56.15	2.54			A(F)S
8		20.09	76.50	3.41			SS
9		5.00	88.04	6.96			SS
10		26.14	70.76	3.06			SS
11	31.76	7.41	58.43	2.40			A(F)S
12		27.06	70.00	2.94			SS
13	25.52	9.13	57.82	4.53			A(F)S
14	38.29	8.43	50.97	2.31			A(F)S
15	50.175		46.54	3.29			AS
16	56.00		40.87	3.13			AS
17	53.13	7.65	37.62	1.60			A(F)S
18		14.32	81.22	4.46			SS
19	65.55					34.45	AE
20	69.40		27.98	2.62			AS
21	74.35		22.93	2.72			AS
22	70.97		26.35	2.98			AS
23	62.42		33.87	3.72			AS
24		8.90	86.33	4.77			SS
25	21.20	9.72	47.39	1.69			A(F)S
26	12.89	8.29	75.38	3.44			A(F)S
27			96.48	3.52			SS
28	35.52	10.13	52.15	2.21			A(F)S
29	54.56		42.33	2.81			AS
30	32.27	10.58	55.09	2.06			A(F)S
31	22.67	11.65	61.62	4.06			A(F)S
32		25.06	71.98	2.69			SS
33	48.76		48.15	3.09			AS
34		33.25	65.13	1.62			SS
35	53.33		43.71	2.97			AS
36	57.91		40.14	1.95			AS
37	75.01		22.76	2.21			AS
38	69.69		28.55	1.76			AS
39		43.15	53.76	3.09			SS
40		15.64	81.59	2.77			SS
41		28.45	69.01	2.54			SS
42	55.82		41.04	3.15			AS

Çizelge 4.1. Çalışmamıza dahil olan tüm olguların verileri(devamı)

43		23.47	72.69	3.85			SS
44	69.31		28.55	2.14			AS
45	63.07		34.82	2.11			AS
46	61.07		36.39	2.54			AS
47		31.37	66.37	2.26			SS
48	39.12	7.36	50.68	2.83			A(F)S
49		42.82	55.27	1.91			SS
50	57.56		39.12	2.32			AS
51	40.20	9.98	46.22	3.59			A(F)S
52	13.35		83.79	2.86			AS
53	54.46		42.80	2.74			AS
54		20.36	75.93	3.71			SS
55		33.13	64.64	2.23			SS
56		20.60	76.43	2.97			SS
57		4.52	62.27		33.22		SC
58	66.77		30.63	2.60			AS
59	50.84		45.77	3.39			AS
60	19.02	17.28	57.95	5.74			A(F)S
61		25.03	70.99	3.98			SS
62	62.72	7.08	27.40	2.80			A(F)S
63		9.39	85.53	5.03			SS
64	65.62		31.59	2.79			AS
65	60.82		35.99	3.19			AS
66		9.38	84.90	5.73			SS
67	73.56		23.36	3.08			AS
68	56.61		40.18	3.22			AS
69		8.38	85.59	6.03			SS
70	8.92	16.06	71.27	3.75			A(F)S
71	68.06		28.48	3.46			AS
72	54.45		43.23	2.32			AS
73		16.53	77.70	5.77			SS
74	45.20	13.12	39.63	2.06			A(S)F
75	78.69		19.07	2.24			AS
76	45.78	11.88	40.26	2.08			A(F)S
77	68.59		28.65	2.77			AS
78	49.20		48.65	2.15			AS
79		17.70	79.59	2.21			SS
80	77.08		20.72	2.20			AS
81		17.97	79.46	2.57			SS
82	11.67		85.40	2.92			AS
83		25.89	71.65	2.46			SS
84	38.82	11.18	47.91	2.09			A(F)S
85	70.74		27.28	1.98			AS
86	62.27				35.73		AC

Çizelge 4.1. Çalışmamıza dahil olan tüm olguların verileri(devamı)

87	85.48		11.74	2.78			AS
88		19.06	77.76	3.18			SS
89	71.40		25.92	2.68			AS
90	77.58		19.53	2.89			AS
91		19.42	77.43	3.15			SS
92	72.39		24.81	2.80			AS
93		28.68	69.31	2.02			SS
94	9.35	8.15	78.57	3.93			A(F)S
95	68.22		29.61	2.16			AS
96	23.68	12.20	60.94	3.17			A(F)S
97	38.89	11.04	47.18	2.89			A(F)S
98		21.80	74.81	3.39			SS
99	39.97		57.04	2.98			AS
100		20.60	76.64	3.76			SS
101		23.69	72.77	3.54			SS
102	53.47		43.17	3.36			AS
103		11.48	83.23	5.29			SS
104	68.67		28.84	2.49			AS
105		20.60	75.64	3.76			SS
106		27.16	70.61	2.24			SS
107		25.22	70.67	4.11			SS
108		4.77	59.09		36.14		SC
109	67.10				32.90		AC
110	13.75	6.44	75.50	4.32			A(F)S
111	24.06	19.17	54.57	2.20			A(F)S
112	13.17	8.14	75.72	2.97			A(F)S
113	60.32		36.61	3.07			AS
114		4.77	59.09		36.14		SC
115		21.79	76.55	1.66			SS
116	34.93	11.70	50.53	2.84			A(F)S
117	8.50	28.58	60.34	2.58			A(F)S
118	59.51	6.57	31.48	2.44			A(F)S
119	20.98	13.46	62.12	3.43			A(F)S
120	62.49		33.69	3.82			AS
121	64.32		33.76	2.01			AS
122	54.63		42.79	2.58			AS
123		17.03	78.89	4.07			SS
124	55.43		41.89	2.69			AS
125		48.85	49.46	1.69			SS
126	68.63		28.17	3.19			AS
127		13.82	81.92	4.26			SS
128		21.44	75.40	3.17			SS
129	72.25		25.81	1.94			AS
130		32.37	63.80	3.83			SS

Çizelge 4.1. Çalışmamıza dahil olan tüm olguların verileri(devamı)

131	18.64	12.50	63.12	5.73			A(F)S
132		19.76	75.83	4.50			SS
133	54.23		42.16	3.61			AS
134		31.69	66.46	1.85			SS
135		37.18	60.27	2.55			SS
136		23.44	74.18	2.38			SS
137	26.85	7.29	63.52	2.35			A(F)S
138	57.91		39.60	2.49			AS
139	59.94		37.66	2.40			AS
140	73.50		23.88	2.62			AS
141		34.40	64.42	1.18			SS
142		25.33	73.25	1.43			SS
143	37.30	10.28	51.63	0.79			A(F)S
144	33.62	14.50	50.70	1.18			A(F)S
145	12.94	28.33	57.61	1.11			A(F)S
146	63.48		33.41	3.11			AS
147	15.58	18.82	69.25	4.34			A(F)S
148	67.21		29.93	2.87			AS
149	34.75	9.53	52.37	3.35			A(F)S
150	67.57		29.83	2.60			AS
151	66.80		30.82	2.38			AS
152		31.15	64.91	3.94			SS
153		21.18	74.64	4.18			SS
154	55.79		41.48	2.73			AS
155		27.89	68.71	3.41			SS
156		31.86	64.53	3.61			SS
157	9.63	15.51	70.57	4.29			A(F)S
158	23.92	9.55	62.03	4.50			A(F)S
159	39.26	9.69	48.40	2.65			A(F)S
160		34.44	62.86	2.70			SS
161		80.48	17.23	2.29			SS
162	19.53	6.73	70.40	3.34			A(F)S
163	51.27	6.07	40.12	2.55			A(F)S
164		14.83	80.50	4.66			SS
165	16.50	14.38	65.08	4.04			A(F)S
166	73.07		24.50	2.43			AS
167		20.44	75.91	3.65			SS
168	20.12	11.94	64.13	3.80			A(F)S
169	15.00	24.19	58.51	2.29			A(F)S
170	64.87		33.20	1.93			AS
171	66.06		31.15	2.78			AS
172	53.30		43.77	2.93			AS
173		45.81	52.45	1.74			SS
174		51.84	46.94	1.22			SS

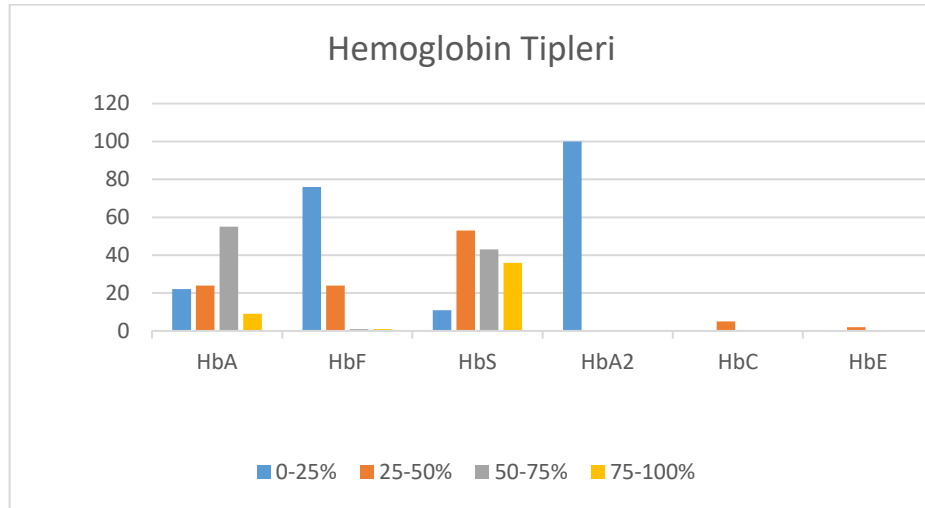
Çizelge 4.1. Çalışmamıza dahil olan tüm olguların verileri(devamı)

175	34.12	11.45	51.02	3.41			A(F)S
176	27.67	19.79	49.98	2.57			A(F)S
177	56.01		41.79	2.20			AS
178		15.93	79.23	4.85			SS
179	28.86	10.02	57.55	3.57			A(F)S
180	26.38	10.52	58.98	4.12			A(F)S
181	53.22		43.81	2.97			AS

Hemoglobin elektroforezi, oraklaşma testi ve ARMS-PCR ile, 115 HbAS, 60 HbSS, 3 HbSC, 2 HbAC ve 1 HbAE vakası tespit edildi. Tüm olguların hemoglobin tiplerinin yüzde oranları Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2'de gösterildi.

Çizelge 4.2. Tüm olguların hemoglobin tiplerinin yüzde oranları

Yüzde/Vaka	0-25%	25-50%	50-75%	75-100%
HbA%	22	24	55	9
HbF%	76	24	1	1
HbS%	11	53	43	36
HbA2%	160	0	0	0
HbC%	-	5	-	-
HbE%	-	1	-	-



Şekil 4.2. Tüm olguların hemoglobin tiplerinin yüzde oranları

Çizelge 4.1'deki vaka sıraları değiştirilmeden 115 olgu orak hücre taşıyıcısı çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Hemoglobin elektroforezi sonucu Hemoglobin S ve D aynı yerde görülmektedir. Bunların ayrımı oraklaşma testi ile yapılmıştır. Bazı hastalarda hemoglobin F de görülmektedir. Bunun nedeni doğumdan 2 yaşına kadar hemoglobin F düzeyi yüksek görülmektedir. Hasta büyüdükçe hemoglobin F in yerini Hemoglobin A almaktadır.

Çizelge 4.3.Orak Hücre Taşıyıcısı Vakaları

hasta Sırası	HbA%	HbF%	HbS%	HbA2%	Hb türleri
1	31.33	7.61	56.39	4.67	A(F)S
2	69.71		27.10	3.19	AS
3	71.52		26.03	2.45	AS
4	26.29	10.95	57.75	5.02	A(F)S
5	2.92	41.97	51.42	3.70	A(F)S
7	2.93	38.37	56.15	2.54	A(F)S
11	31.76	7.41	58.43	2.40	A(F)S
13	25.52	9.13	57.82	4.53	A(F)S
14	38.29	8.43	50.97	2.31	A(F)S
15	50.17		46.54	3.29	AS
16	56.00		40.87	3.13	AS
17	53.13	7.65	37.62	1.60	A(F)S
20	69.40		27.98	2.62	AS
21	74.35		22.93	2.72	AS
22	70.97		26.35	2.98	AS
23	62.42		33.87	3.72	AS
25	21.20	9.72	47.39	1.69	A(F)S
26	12.89	8.29	75.38	3.44	A(F)S
28	35.52	10.13	52.15	2.21	A(F)S
29	54.56		42.33	2.81	AS
30	32.27	10.58	55.09	2.06	A(F)S
31	22.67	11.65	61.62	4.06	A(F)S
33	48.76		48.15	3.09	AS
35	53.33		43.71	2.97	AS
36	57.91		40.14	1.95	AS
37	75.01		22.76	2.21	AS
38	69.69		28.55	1.76	AS
42	55.82		41.04	3.15	AS
44	69.31		28.55	2.14	AS
45	63.07		34.82	2.11	AS
46	61.07		36.39	2.54	AS
48	39.12	7.36	50.68	2.83	A(F)S
50	57.56		39.12	2.32	AS
51	40.20	9.98	46.22	3.59	A(F)S
52	13.35		83.79	2.86	AS
53	54.46		42.80	2.74	AS
58	66.77		30.63	2.60	AS
59	50.84		45.77	3.39	AS
60	19.02	17.28	57.95	5.74	A(F)S
62	62.72	7.08	27.40	2.80	A(F)S
64	65.62		31.59	2.79	AS
65	60.82		35.99	3.19	AS
67	73.56		23.36	3.08	AS

Çizelge 4.3.Orak Hücre Taşıyıcısı Vakaları(devamı)

68	56.61		40.18	3.22	AS
70	8.92	16.06	71.27	3.75	A(F)S
71	68.06		28.48	3.46	AS
72	54.45		43.23	2.32	AS
73		16.53	77.70	5.77	SS
74	45.20	13.12	39.63	2.06	A(S)F
75	78.69		19.07	2.24	AS
76	45.78	11.88	40.26	2.08	A(F)S
77	68.59		28.65	2.77	AS
78	49.20		48.65	2.15	AS
80	77.08		20.72	2.20	AS
82	11.67		85.40	2.92	AS
84	38.82	11.18	47.91	2.09	A(F)S
85	70.74		27.28	1.98	AS
87	85.48		11.74	2.78	AS
89	71.40		25.92	2.68	AS
90	77.58		19.53	2.89	AS
92	72.39		24.81	2.80	AS
94	9.35	8.15	78.57	3.93	A(F)S
95	68.22		29.61	2.16	AS
96	23.68	12.20	60.94	3.17	A(F)S
97	38.89	11.04	47.18	2.89	A(F)S
99	39.97		57.04	2.98	AS
102	53.47		43.17	3.36	AS
104	68.67		28.84	2.49	AS
110	13.75	6.44	75.50	4.32	A(F)S
111	24.06	19.17	54.57	2.20	A(F)S
112	13.17	8.14	75.72	2.97	A(F)S
113	60.32		36.61	3.07	AS
116	34.93	11.70	50.53	2.84	A(F)S
117	8.50	28.58	60.34	2.58	A(F)S
118	59.5	6.57	31.48	2.44	A(F)S
119	20.85	13.46	62.12	3.43	A(F)S
120	62.49		33.69	3.82	AS
121	64.32		33.76	2.01	AS
122	54.63		42.79	2.58	AS
124	55.43		41.89	2.68	AS
126	68.63		28.17	3.19	AS
129	72.25		25.81	1.94	AS
131	18.64	12.50	63.12	5.73	A(F)S
133	54.23		42.16	3.61	AS
137	26.85	7.29	63.52	2.35	A(F)S
138	57.91		39.60	2.49	AS
139	59.94		37.66	2.40	AS

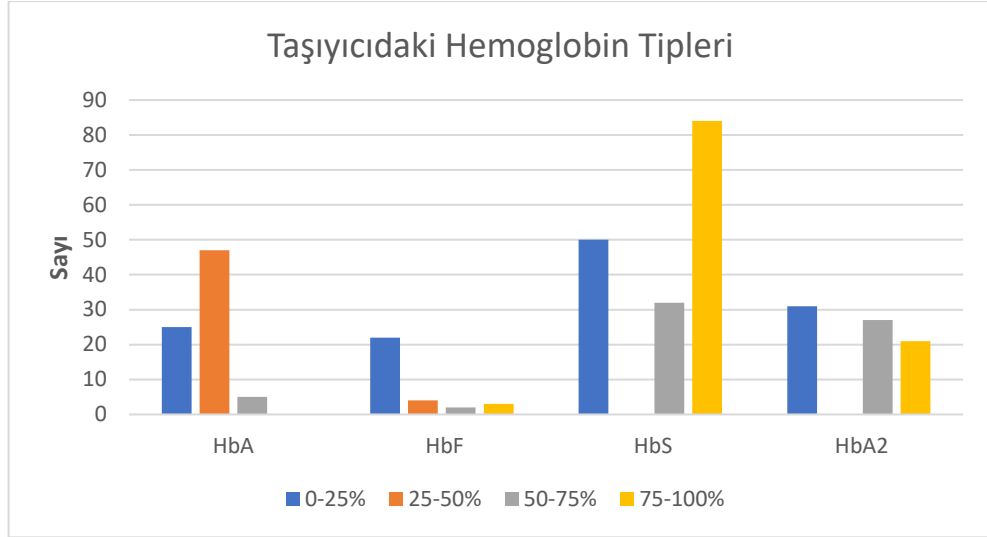
Çizelge 4.3.Orak Hücre Taşıyıcısı Vakaları(devamı)

140	73.50		23.88	2.62	AS
143	37.30	10.28	51.63	0.79	A(F)S
144	33.62	14.50	50.70	1.18	A(F)S
145	12.94	28.33	57.61	1.11	A(F)S
146	63.48		33.41	3.11	AS
147	15.58	18.82	69.25	4.34	A(F)S
148	67.21		29.93	2.87	AS
149	34.75	9.53	52.37	3.35	A(F)S
150	67.57		29.83	2.60	AS
151	66.80		30.82	2.38	AS
154	55.79		41.48	2.73	AS
157	9.63	15.51	70.57	4.29	A(F)S
158	23.92	9.55	62.03	4.50	A(F)S
159	39.26	9.69	48.40	2.65	A(F)S
162	19.53	6.73	70.40	3.34	A(F)S
163	51.27	6.07	40.12	2.55	A(F)S
165	16.50	14.38	65.08	4.04	A(F)S
166	73.07		24.50	2.43	AS
168	20.12	11.94	64.13	3.80	A(F)S
169	15.00	24.19	58.51	2.29	A(F)S
170	64.87		33.20	1.93	AS
171	66.06		31.15	2.78	AS
172	53.30		43.77	2.93	AS
175	34.12	11.45	51.02	3.41	A(F)S
176	27.67	19.79	49.98	2.57	A(F)S
177	56.01		41.79	2.20	AS
179	28.86	10.02	57.55	3.57	A(F)S
180	26.38	10.52	58.98	4.12	A(F)S
181	53.22		43.81	2.97	AS

Hemoglobin elektroforezi sırasında, Hemoglobin S ve D aynı konuma göç etmektedir. Bu iki hemoglobin türü, oraklaşma testi ile ayırt edildi. Bazı vakalarda HbF seviyeleri de gözlemlenmektedir. HbF, doğumdan itibaren yaklaşık iki yaşına kadar yüksek seviyelerde bulunmaktadır. Erişkinde ise yaklaşık olarak %1'in altına inmektedir (Huisman, 1993).

Çizelge 4.4. Orak hücre taşıyıcılarında hemoglobin tipleri

Yüzde/Vaka	0-25%	25-50%	50-75%	75-100%
HbA%	25	47	5	0
HbF%	22	4	2	3
HbS%	50	0	32	84
HbA2%	31	0	27	21

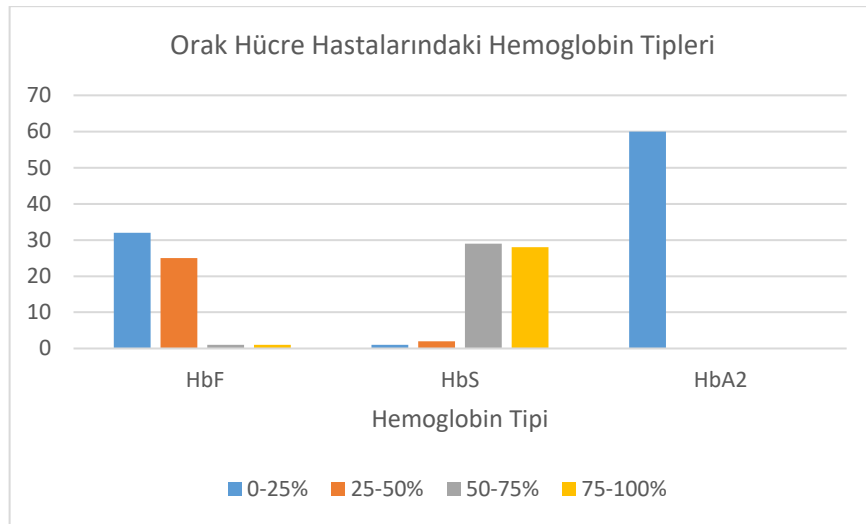


Şekil 4.3. Orak hücre taşıyıcı hastalarda hemoglobin tipleri

Hemoglobin elektroforezi ve oraklaşma testi sonucunda 60 hemoglobin hastasının verileri Çizelge 4.5 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Orak hücre hastalarında hemoglobin tiplerinin yüzde oranı

Yüzde/Vaka	0-25%	25-50%	50-75%	75-100%
HbF%	32	25	1	1
HbS%	1	2	29	28
HbA2%	60	0	0	0



Şekil 4.4. Orak hücre hastalarında hemoglobin tiplerinin yüzde oranları

Hemoglobin elektroforezi , oraklaşma testi ve ARMS-PCR sonucu 3 olgu hemoglobin hastasının verisi çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Hem HbS hem de C birlikteliği olan vakalar

Hasta Sırası	HbF%	HbS%	HbC%		Hb türleri
57	4.52	62.27	33.22		SC
108	3.53	65.09	29.15		SC
114	4.77	59.09	36.14		SC

Hemoglobin elektroforezi ve ARMS-PCR sonucu 3 olgu hemoglobin vakaların verisi çizelge 4.7 ve 4.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Hemoglobin C taşıyıcısı olan vakaalr

Vaka Sırası	HbA%	HbC%	Hb types
86	62.27	35.73	AC
109	67.10	32.90	AC

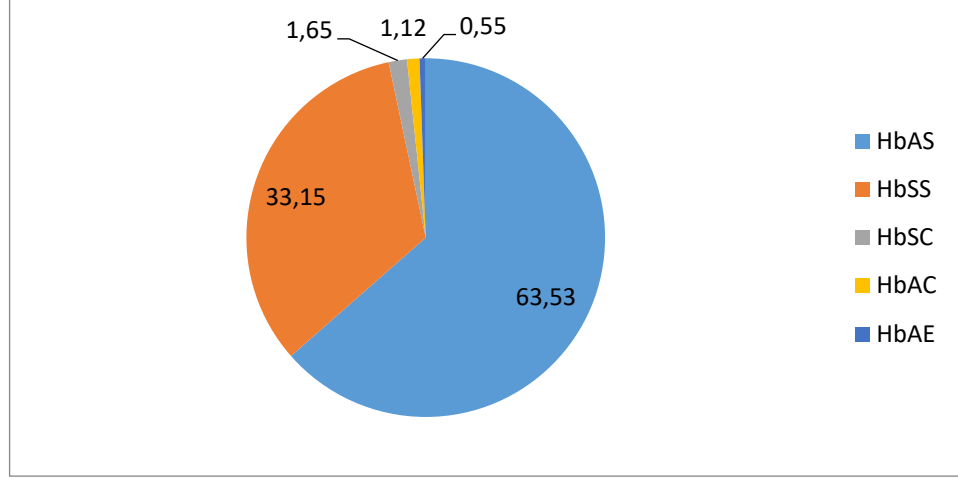
Çizelge 4.8. Hemoglobin E taşıyıcısı olan vaka

Vaka Sırası	HbA%	HbE%	Hb types
19	65.55	34.45	AE

Çalışmamızda hemoglobin elekraforezi, Oraklaşma testi, ARMS-PCR sonucunda 115 olgu HbAS, 60 olgu HbSS, 3 olgu HbSC, 2 olgu HbAC, 1 olgu HbAE hemoglobin türü belirlendi. Çizelge 4.9’ da yüzdeler olarak ve oranları Şekil 4.5’ te gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Çalışmada bulunan hemoglobin varyantlarının yüzde oranı

Hemoglobin Varyantları	Yüzde (%)
HbAS	63.53
HbSS	33.15
HbSC	1.65
HbAC	1.12
HbAE	0.55



Şekil 4.5. Hb Tiplerinin Oranı

4.2. Tartışma

Hemoglobinopatiler tüm dünyada en yaygın olarak gözlenen genetik hemoglobin anomalilerinde birisidir. Dünya Sağlık Örgütü hemoglobin bozukluklarının dünya genelinde sıklığını %5 olarak bildirmektedir. Talasemiler ve anormal hemoglobinler olarak ikiye ayrılırlar. Anormal hemoglobinler, hemoglobin molekülünün yapısında yer alan globin zincirleri üzerindeki amino asitlerin değişmesi sonucu oluşmaktadır (Flint ve ark., 1998).

Genetik alanında yürütülen çalışmalar, özellikle rekombinant DNA teknolojilerinin yaygınlaşmasıyla hemoglobin sentezinin genetik kontrolü ve gen kümelerinin tanımlanmasına yardımcı olmuştur. Türkiye’de Çukurova, Akdeniz kıyı şeridi, Ege ve Marmara bölgelerinde talasemi taşıyıcılığı sık görülmektedir. T.C. Sağlık Bakanlığı verileri ve Ulusal Hemoglobinopati Konseyi’nin çalışmalarına göre sağlıklı Türk populasyonunda beta talasemi taşıyıcı sıklığı %2,1’dir ve Türkiye’de yaklaşık 1.500.000 taşıyıcı ile 4.500 kadar hasta bulunmaktadır. Adana’da β talasemi taşıyıcı sıklığı %3,7 iken Hb S sıklığı ise %10 olarak bildirilmektedir (Canatan, 2014).

Dünya genelinde en yaygın monojenik hastalıklardan biri olan Orak hücreli anemi, her yıl yaklaşık 312,000 kişinin orak hücreli anemi ile doğduğu tahmin edilmektedir. Küresel ölçekte, bu hastalığın yükünün 2050 yılına kadar %30 oranında artması beklenmektedir (Saraf, 2014; Piel, 2013).

Anormal hemoglobinlerin dağılımı coğrafik olarak ve ırksal gruplara göre oldukça farklılık göstermektedir. Dünya genelinde olduğu gibi Türkiye’de de en yaygın olarak gözlenen Hb S’in yanı sıra diğer anormal hemoglobinlerden Hb D, Hb E ve Hb C de gözlenmektedir (Lukens ve Lee, 1993).

Güler ve arkadaşlarının (2007) Konya’da evlilik öncesi tarama çalışmalarında, taşıyıcılıkları belirlenen çiftler üzerinde yaptıkları araştırmada beta talasemi taşıyıcı oranını %2 ve Hb S taşıyıcı oranını %0,05 olarak saptamışlardır. Koçak ve arkadaşlarının (1995) güney Türkiye’de yaptıkları bir çalışmada, orak hücre testi kullanılıp Hb S’nin toplam prevalansı %3,9 olarak rapor edilmiştir. Aynı zamanda, Arapça konuşan bireyler arasında prevalans daha yüksek olup %9,6 olarak bildirilmiştir.

Bu alışmalar, farklı bölgelerdeki taşıyıcılık oranlarını karşılaştırmak ve hemoglobinopati taşıyıcılığının yaygınlığını ve çeşitliliğini anlamak için önemli veriler sunmaktadır.

Ariyrek ve arkadaşlarının (2016) gerçekleştirdiği çalışmada, Adana, Hatay, Mersin, Konya ve Kayseri illerinden toplam 8135 örnek analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda 1382 örnekte hemoglobin (Hb) mutasyonları tespit edilmiştir. Bu mutasyon taşıyıcılarının 826'sında (%59,7) anormal hemoglobin (HbS), 416'sında (%30,7) beta talasemi (β -talasemi) ve 136'sında (%9,9) alfa talasemi (α -talasemi) mutasyonları bulunduğu rapor edilmiştir.

Tosun ve arkadaşlarının (2006) Mersin ilinde 79,000 kişide gerçekleştirdiği evlilik öncesi taramada beta talasemi %2,04, Hb S %1,21, Hb D %0,17, Hb E %0,04 bulunmuştur.

Güvenç ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan çalışmada, Adana'da β -talasemi ve anormal hemoglobinlerin sıklık oranlarının sırasıyla %13,46 ve %6,83 olduğu rapor etmişlerdir. Çalışmada 18 farklı β -talasemi mutasyonu ve üç ayrı anormal hemoglobin türü (HbS, HbD Los Angeles ve HbE) belirlenmiştir. Adana'nın Çukurova ilçesinde elde edilen sonuçlara da bakılacak olursa, Yüregir ve arkadaşlarının (1995) yaptıkları bir çalışmada, Hb S taşıyıcılığı %8,2 olarak raporlanmıştır. Attila ve arkadaşlarının (1999) yaptığı çalışmada, Hb S oranı %10, β -talasemi oranı %3,7 ve α -talasemi oranı %3,3 olarak rapor etmişlerdir.

ukurova bölgesinde yaptığımız bu çalışmada HbAS %63.53, HbSS %33.15, HbSC %1.65, HbAC %1.12, HbAE %0.55 olarak bulunmuştur. alışmalar incelendiğinde Türkiye'nin bölgeleri mutasyon sıklığı açısından her coğrafik bölgedeki mutant allellerin dağılımının farklı olduğu gözlenmektedir. Bu bulgular, bölgede hemoglobinopati taşıyıcılığının yaygınlığını ve çeşitliliğini göstermektedir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Çukurova Bölgesinde görülen anormal hemoglobinler sırası ile; HbAS %63.53, HbSS %33.15, HbSC %1.65, HbAC %1.12, HbAE %0.55'dir. HbS oranının yüksek olması, Çukurova Bölgesi'nde kapalı toplum ve akraba evliliğinin yaygın olması nedeniyle, HbSS taşıyan olguların dünyaya gelme olasılığını artırmaktadır.

Hemoglobinopatilerin dünya genelinde nüfusun önemli bir kısmında görüldüğü, hastalık yükünü yönetmek amacıyla ulusal veya bölgesel programların bir parçası olarak uygulandığını gösterilmiştir. Taşıyıcıları hastalardan ayırt edebilecek ve demir eksikliği anemisi gibi yaygın durumları ekarte edebilecek, pratik ve ekonomik olarak uygun yeni tarama yöntemlerine acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Tarama programlarının başarısı büyük ölçüde taranacak popülasyonun kabulüne bağlıdır; bu da hedef popülasyonda iyi bir farkındalık yaratılmasına ve teşhis sonrasında genetik danışmanlığın sağlanmasına bağlıdır. Etkili danışmanlık, olumlu tutumları desteklemekte ve bu süreç, derinlemesine anlayışı ve olumlu sonuçları sağlamaktadır. Mikro haritalama çalışmaları, küçük coğrafi bölgelerde yaşayan popülasyonlarda mutasyon spektrumunun daha çeşitli olduğunu ve dolayısıyla hemoglobinopatiler için bilinen mevcut prevalans oranlarının bu bölgelerde farklılık gösterebileceğini ortaya çıkarmıştır. Daha fazla mikro haritalama verisinin elde edilmesi, gelecekteki nüfus tarama programlarının daha etkin şekilde planlanmasına katkı sağlamaktadır. Yeni teknolojilerin yaygın olarak kullanılması ve hemoglobinopati test kılavuzlarına dahil edilmesi, gelecekteki hemoglobinopati popülasyonu tarama uygulamalarını kolaylaştıracaktır. Etkilenen doğumların görülme sıklığındaki azalma, bu programların başarısını değerlendirmede ölçü olarak kullanılmıştır.



KAYNAKLAR

- Ahmed, M. H., Ghatge, M. S., Safo, M. K., 2020. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Subcell Biochem.* 94:345-382. doi:10.1007/978-3-030-41769-7_14. PMID: 32189307.
- Alain, J., ve Marengo-Rowe, MD., 2006. Structure-function relations of human hemoglobins 2006.19(3): 239–245 doi: 10.1080/08998280.2006.11928171.
- Aleluia, M. M., Fonseca, T. C. C., Souza, R. Q., Neves, F.I., Guarda, C.C., Santiago, R.P., et all., 2017. Comparative study of sickle cell anemia and hemoglobin SC disease: clinical characterization. laboratory biomarkers and genetic profiles. *BMC Hematol.* 2017;17:15, DOI: 10.1186/s12878-017-0087-7
- Altay Ç., 2002. Anormal Hemoglobins in Turkey. *TJH*, 2002;19 (1): 63-74
- Attila, G., Çürük, M. A., Arpacı, A., Özgünen, F. T., Kılınç, Y., Aksoy, K., Yüregir, G. T., 1999. Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in southern Turkey. *Ann Med Sci*, 1999; 8(2): 93-97.
- Bunn, F. H., 1998. Human hemoglobins:normal and abnormal. In “Nathan and Oski’s Hematology of Infancy and Childhood”, Nathan DG, and Orkin SH(editors), 5th ed, WB Saunders Company, Philadelphia, 1998, ch 19, pp 729- 810
- Bunn, H. F., Forget, B. G., Ranney, H. M., 1977. Hemoglobinopathies. *Major Probl Intern* 12:1-291. PMID: 323584.
- Canatan, D., 2014. Thalassemias and hemoglobinopathies in Turkey. 38(5):305-7. doi: 10.3109/03630269.2014.938163.
- Carver, M. F. H, ve Kutlar, A.,1995. International hemoglobin Information Center Variants list. *Hemoglobin* 19(1-2):37-149. PMID: 7615401.
- Chatterjee, A., Agrawal, A., Adapa, D., Sarangi, T. K., 2018. Sickle Cell Anaemia- A Synopsis of the Inherited Ailment, *Rchives Of Medicine*, vol.10 No.2:6, DOI: 10.21767/1989-5216.1000266.
- Chiabrando, D., Mercurio, S., Tolosano, E., 2014. Heme and erythropoiesis: more than a structural role. *Haematologica.* 99(6):973-83. doi: 10.3324/haematol.2013.091991. PMID: 24881043; PMCID: PMC4040894.
- Choi, J.K., 2014. Embryonic and Fetal Red Blood Cell Development, In book: *Pathobiology of Human Disease*, DOI: 10.1016/B978-0-12-386456-7.05004-8.
- Christopher. S, Thom., Claire. F, Dickson., David. A, Gell., Mitchell. J, Weiss., 2013 Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. 1;3(3):a011858. doi: 10.1101/cshperspect.a011858.
- Delivoria-Papadopoulos, M., Oski, F. A., and Gottlieb, A. J., 1969. Oxygen-hemoglobulin dissociation curves: effect of inherited enzyme defects of the red cell, *Science*, 8;165(3893):601-2. doi: 10.1126/science.165.3893.601.

- Dikker, O., Vardar, M., Sandıkçı, R., Basat, B., Sucu, V., Vurgun, E., Tekin, M. H.,*, Dağ, H., 2016. Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında HPLC Yöntemi ile Saptanan Anormal Hemoglobin Varyantları. Okmeydanı Tıp Dergisi 32(4):185-189, 2016 doi:10.5222/otd.2016.1065
- Dönbak, L., 2005. İnsan Hemoglobin (Hb) Varyantları KSU. Journal of Science and Engine 13:8(2)
- Farid, Y., Bowman, N. S., Lecat, P., 2023. Biochemistry, Hemoglobin Synthesis. In: StatPearls . Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 30725597.
- Flint, J., Harding, R. M., Boyce, A. J., Clegg, J. B., 1998. The population genetics of the haemoglobinopathies. Baillieres Clin Haematol. 11(1):1-51. doi: 10.1016/s0950-3536(98)80069-3.
- Forget, B. G., Bunn, H., 2013. Classification of the disorders of hemoglobin. Cold Spring Harb Perspect Med. 1;3(2):a011684. doi: 10.1101/cshperspect.a011684. PMID: 23378597; PMCID: PMC3552344.
- Fucharoen, S., and Weatherall, J., 2012. The hemoglobin E thalassemias. Cold Spring Harb Perspect Med. 1;2(8):a011734. doi: 10.1101/cshperspect.a011734.
- Fucharoen, S., Viprakasit, V., 2009. Hb H disease: clinical course and disease modifiers Hematology Am Soc Hematol Educ Program (1): 26–34. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.26>
- Fucharoen, S., and Viprakasit, V., 2009. Hb H disease: clinical course and disease modifiers. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 26-34. doi: 10.1182/asheducation-2009.1.26.
- Ganz, T., and Nemeth, E., 2012. Iron metabolism: interactions with normal and disordered erythropoiesis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2(5):a011668. doi: 10.1101/cshperspect.a011668.
- Guler, E., Caliskan, U., UcarAlbayrak, C., Karacan, M., 2007. Prevalence of beta-thalassemia and sickle cell anemia trait in premarital screening in Konya urban area, Turkey. J Pediatr Hematol Onco. 29(11):783-5. doi: 10.1097/MPH.0b013e318159a570.
- Guvenc, B., Canataroglu, A., Unsal, C., Yildiz, M. S., Turhan, F. T., Bozdogan, S. T., Dincer, S., Erkman, H., 2012. β -Thalassemia mutations and hemoglobinopathies in Adana, Turkey: results from a single center study. Arch Med Sci. 4;8(3):411-4. doi: 10.5114/aoms.2012.28811.
- Güngör, A. A., Demir, Y., Demir, N., 2011. Anormal Hemoglobinler'in Farklı Hemoglobin Elektroforezleri ile Belirlenmesi . SDU Journal of Science, 6 (1): 40-54
- Gürgey, A., 2014. Anormal Hemoglobinler. Türk Hematoloji Derneği 2014:4:1 <http://globin.cse.psu.edu> [Son erişim tarihi: 01.02.2024].
- Huisman, T. H. J., Jonxis, J. H. P., 1977. The Hemoglobinopathies, Techniques of Identification. New York: Marcel Dekker Inc, 449 pages, ISBN : 9780824765293
- Huisman, T. H., 1993. The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. Baillieres Clin Haematol. 6(1):1-30. doi: 10.1016/s0950-3536(05)80064-2

- Irken, G., Oren, H., Undar, B., Duman, M., Gülen, H., Uçar, C., Sanli, N., 2002. Analysis of thalassemia syndromes and abnormal hemoglobins in patients from the Aegean region of Turkey. *Turk J Pediatr.* 44(1):21-4. PMID: 11858374.
- Johnson, J. P., Vichinsky, E., Hurst, D., Camber, A., Lubin, B., Louie, E., 1992. Differentiation of homozygous hemoglobin E from compound heterozygous hemoglobin E-beta O-thalassemia by hemoglobin E mutation analysis. *J Pediatr.* 120(5):775-9. doi: 10.1016/s0022-3476(05)80247-1.
- Karna, B., Suman, K. J. h. a., Al. Zaabi, E., 2022. Hemoglobin C Disease. In: StatPearls Published in Definitions. DOI:10.32388/hqsjpi. PMID: 32644469.
- Kemper, A. R., Knapp, A. A., Metterville, D. R., Comeau, A. M., Green, N. S., Perrin, J. M., 2011. Weighing the evidence for newborn screening for Hemoglobin H disease. *J Pediatr.* 158(5):780-3. doi: 10.1016/j.jpeds.2010.10.042.
- Kılınç, Y., Kumi, M., Gurgey, A., Altay, C., 1986. Adana bölgesinde doğan bebeklerde kordon kanı çalışması ile alfa talasemi, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği ve hemoglobin S sıklığının araştırılması. *DOĞA TU Tıp Ecz Der* 10:162-167.
- Koçak, R., Alparslan, Z. N., Ağridağ, G., Başlamisli, F., Aksungur, P. D., Koltaş, S., 1995. The frequency of anaemia, iron deficiency, hemoglobin S and beta thalassemia in the south of Turkey. *Eur J Epidemiol.* 11(2):181-4. doi: 10.1007/BF01719485.
- Kohn, J., 1969. Separation of haemoglobins on cellulose acetate. *J Clin Pathol.* 22(1):109-11. doi: 10.1136/jcp.22.1.109. PMID: 5784687; PMCID: PMC474010.
- Kumar, V., Abbas, A., Aster, J., 2020. Red Blood Cell and Bleeding Disorders in Robbins & Cotran Pathologi Basis of Disease, 10th Edition May 18, Page 869 <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa163>
- Lukens, J. N., and Lee, G. R., 1993. The Abnormal Hemoglobins. (Wintrobe's Clinical Hematology, Lea and Febiger Com., Pennsylvania: Ed. Lee, G.R., Bithell, C.T., Foerster, J., Athens, J.W., Wkens, J.N.) USA, 1993. s 1023-1053
- Munkongdee, T., Chen, P., Winichagoon, P., Fucharoen, S., Paiboonsukwong, K., 2020. Update in Laboratory Diagnosis of Thalassemia. *Front Mol Biosci.* 27;7:74. doi: 10.3389/fmolb.2020.00074.
- Musharraf, S. G., Iqbal, A., Ansari, S. H., Parveen, S., Khan, I. A., Siddiqui, A. J., 2017. β -Thalassemia Patients Revealed a Significant Change of Untargeted Metabolites in Comparison to Healthy Individuals. 13;7:42249. doi: 10.1038/srep42249.
- Nainggolan, I. M., Harahap, A., Setianingsih, I., 2010. Hydrops fetalis associated with homozygosity for Hb Adana [α 59(E8)Gly $\rightarrow$ Asp (α 2)] Hemoglobin, Hemoglobin. 34(4):394-401. doi: 10.3109/03630269.2010.493405.

- Ohashi, J., Naka, I., Patarapotikul, J., et al. 2004. Extended linkage disequilibrium surrounding the hemoglobin E variant due to malarial selection. *Am J Hum Genet.* 74:1198–208. doi: 10.1086/421330
- Old, J., 2013. Hemoglobinopathies and Thalassemias. in Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics (Sixth Edition), Chapter 71 DOI:10.1016/B978-0-12-383834-6.00075-6Corpus ID: 81629227
- Patrinos, G.P., Giardine, B., Riemer, C., Miller, W., Chui, DH., Anagnou, N. P., 2004. Improvements in the HbVar human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. *Nucleic Acids Res* 32:D537–D541 doi:10.1093/nar/gkh006
- Perumbeti, A.,(2014). Hemoglobinopathies and Thalassemia Syndromes in Pathobiology of Human Disease
- Piel, F. B., Hay, S. I., Gupta, S., Weatherall, D. J., Williams, T. N., 2013. Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010-2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. *PLoS Med.* 2013;10(7):e1001484. doi: 10.1371/journal.pmed.1001484. PMID: 23874164; PMCID: PMC3712914.
- Reena, D., Prashant, Sh., 2020. Disorders of abnormal hemoglobin. Chapter 18- Clinical Molecular Medicine. Pages 327-339. DOI: 10.1016/B978-0-12-809356-6.00018-6
- Saraf, S. L., Molokie, R. E., Nouraire, M., Sable, C. A., Jones, L. L., Ensing, G. J., et al., 2014. Differences in the clinical and genotypic presentation of sickle cell disease around the world. *Paediatr Respir* 15: 4–12. 10.1016/j.prrv.2013.11.003
- Savitt, T. L., 2014. Learning About Sickle Cell: The Patient in Early Sickle Cell Disease Case Reports, 1910-1933. *J Natl Med Assoc.* 106(1):31-41. doi:10.1016/S0027-9684(15)30068-7.
- Schechter, A., 2012. Hemoglobin function. *Cold Spring Harb Perspect Med* doi: 10.1101/cshperspect.a011650.
- Shanthala. Devi, A. M., Ramesh.kumar, K., Sitalakshmi, S., 2016. Hb D: A Not So Rare Hemoglobinopathy. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 32(Suppl 1):294-8. doi: 10.1007/s12288-013-0319-3.
- Somervaille, T., 2001. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. *J R Soc Med.* 94(11):602–3. PMCID: PMC1282256.
- Söylemez, G. D., Kayaaltı, Z., 2016. Türkiye’de Orak Hücreli Anemi Dağılımı, Patofizyolojisi ve Demir Toksisitesi. *Marmara Pharmaceutical Journal* 20: 92-99 . DOI: 10.12991/mpj.201620227342
- Thom, C. S., Dickson, C. F., Gell, D. A., Weiss, M. J., 2013. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Mar 1;3(3):a011858, doi: 10.1101/cshperspect.a011858.

- Tosun, F., Bilgin, A., Kızılok, A., Arpacı, A., Yüreğir, G. T., (2006). Five-year evaluation of premarital screening program for hemoglobinopathies in the province of Mersin, Turkey. *Turk J Haematol.* 5;23(2):84-9. English. PMID: 27265288.
- Wajcman, H., Moradkhani, K., 2011. Abnormal hemoglobins: detection & characterization. *Indian J Med Res* 134:538-46. PMID: 22089618; PMCID: PMC3237254.
- Weatherall, D. J., 1991. *The New Genetics and Clinical Practice*. 3rd ed., New York: Oxford University Press, 376 pages.
- Weatherall, D. J., 2001. Phenotype—genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias . *Nat Rev Genet* 2, 245–255. DOI: 10.1038/35066048
- Weatherall, D. J., 2008. Hemoglobinopathies worldwide: present and future. *Curr Mol Med.* 8(7):592-9. doi: 10.2174/156652408786241375. PMID: 18991645.
- Weatherall, D. J., Clegg, J. B., Higgs, D. R., Wood, W. G., 2001. The Hemoglobinopathies. In: Scriver CR, Beadet A, Sly WS, Vale D, Eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. USA:International Edition, 2001
- White, B. A., 1993. *PCR Protocols Current Methods and Applications* (1st ed. 1993.). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0896032442>
- Williams, T. N., Weatherall, D. J., 2012. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect med.* 2(9):a011692. doi: 10.1101/cshperspect.a011692.
- Yıldız, i., Oral. D, Tekeş, S., Çürük, M. A., 2019. ‘First Observation of Hemoglobin Hamilton [β11(A8) Val→Ile] in Turkey. *Balkan Clinical Laboratory Biochemical Society TBS 2019*
- Yuzbasioglu. Ariyurek, S., Yildiz. M, S., Yalin, A. E., Guzelgul, F., Aksoy, K., 2016. Hemoglobinopathies in the Çukurova Region and Neighboring Provinces. *Hemoglobin.* 40(3):168-72. doi: 10.3109/03630269.2016.1155156. PMID: 26984585.
- Yüreğir, G. T., Arpacı, A., Aksoy, K., Tuli, A., Dikmen, N., Özgünen, T., Kılınç, Y.,1995. Population at risk for hemoglobinopathies in Çukurova. *Türkiye: Need for prenatal diagnosis.* *Ann Med Sci*, 4:61-60.
- Zimmerman, S. A., O'Branski, E. E., Rosse, W. F., Ware, R. E.,1999. Hemoglobin S/O(Arab): thirteen new cases and review of the literature. *Am J Hematol.* 60(4):279-84. doi: 10.1002/(sici)1096-8652(199904)60:4<279::aid-ajh5>3.0.co;2-2.
- Bu tezin sonuçlarına ilişkin yayımlanan makale aşağıdaki bağlantıdan görüntülenebilmektedir: [\[https://intjmi.com/article-1-1154-en.html\]](https://intjmi.com/article-1-1154-en.html)(<https://intjmi.com/article-1-1154-en.html>).



ÖZGEÇMİŞ

Seyyedehtouran HOSSEINI, 2016 yılında İran'da Damghan Azad Üniversitesi'nde Biyoloji Bölümü, Genetik Anabilim Dalı'ndan mezun oldu. 2019 yılında Çukurova Üniversitesi TÖMER merkezinde B2 seviyesinde Türkçe dil yeterlilik sertifikasını aldı. 2020 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.

