

**ORAK HÜCRE HASTALARINDA
PARAOKSONAZ 1 (PON1)
GEN POL MORF ZMLER ANAL Z**

GONCA AY

**MERS N ÜN VERS TES
FEN B L MLER ENST TÜSÜ**

**B YOLOJ
ANA B L M DALI**

YÜKSEK L SANS TEZ

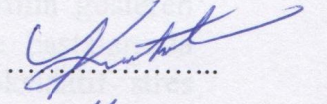
**Danı man
Prof. Dr. Yasemin KAÇAR**

**MERS N
ARALIK – 2013**

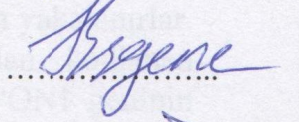
Gonca AY tarafından Prof. Dr. Yasemin KAÇAR danışmanlığında hazırlanan “Orak Hücre Hastalarında Paraoksonaz 1 (PON1) Gen Polimorfizmleri Analizi” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

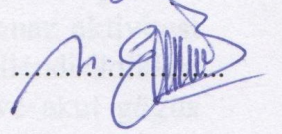
Prof. Dr. Yasemin KAÇAR



Prof. Dr. Serap ERGENE



Prof. Dr. Emin ERDAL



Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27./12./2013 tarih ve 2013.26./...8.30 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Mehmet KÜÇÜKASLAN
Enstitü Müdürü



Orak Hücre Hastalarında Paraoksonaz 1 (PON1) Gen Polimorfizmleri Analizi

Gonca AY

ÖZ

Dünyadaki en yaygın tek gen hastalıkları hemoglobinopatilerdir ve bunlardan orak hücre hastalığı (OHH) hemoglobin yapısı bozukluğu kaynaklı otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalıktır. Ülkemizde Akdeniz Bölgesi'nde yayılım gösteren OHH'li bireylerin %13,6'sı Mersin'de bulunmaktadır. Orak hücre hastalarında orakla an alyuvarlar küçük damarlarda tıkanıklık yaparak, a rı oksidatif stres nedeniyle ateroskleroz ve kalp hastalıklarına sıklıkla ve erken ya larda yakalanırlar. LDL'deki okside lipit birikimini önleyen PON1 geni tarafından kodlanan paraoksonaz-1 oksidatif stresin azaltılmasında görevli bir enzimdir. PON1 geninin iki önemli polimorfizmi olan PONL55M ve PONQ192R'nin paraksonaz aktivitesi üzerine etkili oldu u ve koroner arter hastalıkları (KAH) ili kilendirildikleri gösterilmiştir. Bu amaçla OHH'li çocuklarda görülen a rılı krizler ve akut gö üs sendromu (AGS) ile ilk kez PONL55M ve PONQ192R arasında ba lantı ara tırılmıştır. Bu çalı mada Mersin Üniversitesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalına kayıtlı 88 OHH'li çocukta TaqMan SNP Tanımlama Yöntemi ile PON1 polimorfizmleri belirlenmiştir. OHH'li çocuklarda PONL55M polimorfizmi için 33 L/L (yabancıl, %37,5), 46 L/M (heterozigot, %52,3), 9 M/M (mutant, %10,2) olarak bulunmu tur. L allel frekansı %64 iken M allel frekansı %36'dır. PONQ192R polimorfizmi için 36 Q/Q (yabancıl, %40,9), 43 Q/R (heterozigot, %48,9), 9 R/R (mutant, %10,2) olarak bulunmu tur. Q allel frekansı 65,4 iken, R allel frekansı 34,6'dır. Hastaların ilk krizi ya 1, bir yıllık dönemde kriz geçirmi li i, AGS geçmi i ve cinsiyeti dikkate alınarak ki-kare testi ile istatistiksel olarak kar ıla tırılmıştır. PONL55M polimorfizmi ile OHH'li çocukların a rılı kriz, AGS episodları arasında anlamlı bir ili ki bulunmamıştır. OHH'li çocuklarda yalnızca PONL55M polimorfizmi ve cinsiyet arasındaki ili ki istatistiksel olarak anlamlı bulunmu tur. PONQ192R polimorfizmi için de tüm parametreler bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir ili ki gösterilememiştir. OHH'li çocuklarda PONL55M için yüksek enzim aktivitesi gösteren L allel frekansı %64 iken, PONQ192R için dü ük enzim aktivitesi gösteren Q allel frekası %65,4'tür. ki polimorfizm kar ılıklı incelendi inde popülasyondaki da ılım PON1 enzim aktivitesi bakımından orta seviyede oldu unu göstermektedir. PONL55M ve PONQ192R polimorfizmlerinde mutant allel varlı ının birbirlerine etkisi incelenmiştir. Bu ili ki istatistiksel olarak anlamlı bulunmu ve popülasyonda iki polimorfizm için mutant olan allellerin birlikte bulundu u görülmemiştir (p<0,001).

Anahtar Kelimeler: OHH, PON1, Polimorfizm, TaqMan SNP Tanımlama, RT-PCR

Danı man: Prof. Dr. Yasemin KAÇAR, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı

Paraoxonase 1 (PON1) Gene Polimorphism in Patients with Sickle Cell Disease

Gonca AY

ABSTRACT

The most common single gene disorders in the world are hemoglobinopathies and one of the most important type of these disease, sickle cell disease (SCD) is autosomal recessive inherited. In Mersin, Mediterranean region of Turkey, 13,6% of the population has SCD. In Sickle cell patients since sickled erythrocytes block arteries so they subjected to excessive oxidative stress which causes atherosclerosis and coronary artery disease (CAD) in young age. Paraoxonase-1 coded by PON1 gene prevents lipid oxidation in LDL is an important enzyme in overcoming oxidative stress. Two polymorphisms of PON1 namely PONL55M and PONQ192R has affect on enzyme activity so they were related with coronary artery disease (CAD). The aim of the present study was to determine the relationship between painful episode, ACS and PONL55M, PONQ192R polymorphisms in SCD patients. In 88 children with SCD who are the patients of Mersin University Pediatrics Hematology, PON1 polymorphisms were analysed by TaqMan SNP Drug Metabolism Genotyping Assay. The genotype distribution of the children with SCD for PONL55M is found to be 33 L/L (wild, 37,5%), 46 L/M (heterozygote, 52,3%), 9 M/M (mutant, 10,2%). The frequency of the L allele is 64% while the frequency of the M allele is 36%. 36 Q/Q (wild, 40,9%), 43 Q/R (heterozygote, 48,9%), 9 R/R (mutant, 10,2%) for PONQ192R polymorphism. The frequency of the Q allele is 65,4 while the frequency of the R allele is 34,6. The first attack age of the patients, last year attack history, ACS history and genders of the patients are compared with chi-square test. Between PONL55M polymorphism and painful attacks, ACS episodes of SCD patients no significant relation is found. PONL55M polymorphism and the gender with the children with SCD is found to be significant. The relation between PONQ192R polymorphism and indicated parameters also found not significant. L allele frequency with high enzyme activity represented 64% among SCD patients for PONL55M, whereas Q allele with low activity with 35,6%. This results suggests that expected paraoxonase-1 activity should be middle in children with SCD. The effect between PONL55M and PONQ192R polymorphisms are scrutinized for mutant allele existence. This relation is found to be significant statistically and mutant alleles for these polymorphisms are not observed to be linked together ($p < 0,001$).

Key words: SCD, PON1, Polimorphism, TaqMan Drug Metabolism, RT-PCR

Advisor: Prof. Dr. Yasemin KAÇAR, Department of Biology, University of Mersin

TE EKKÜR

Bana her konu da destek olan, lisans e itimimden bugüne kadar sonsuz sabrı ve ho görüsü için minnettar oldu um danı man hocam Prof. Dr. Yasemin KAÇAR'a, bana bu çalı mayı yapma imkanı veren, bitmek bilmeyen çalı ma iste ine hayran oldu um de erli hocam Prof. Dr. Selma ÜNAL'a sonsuz te ekkürler.

Genetik yorumlarıyla bakı açımı geni leten, yorum kabiliyetimi geli tiren de erli hocam Prof. Dr. Serap ERGENE'ye, tezimin planlamasında fikirleri ile çalı mama yön veren sayın Prof. Dr. Emin ERDAL'a çok te ekkür ederim.

Çalı mamın deneysel a amalarında tecrübelerini payla an Yrd. Doç. Dr. A. Ata ÖZÇ MEN'e ve tüm bu süreçte yardımlarını benden esirmeyen deneylerimde bana e lik eden de erli arkada ım Bio.Turhan YILMAZ'a yürekten te ekkürler.

Çalı mamın temel ta ı olan Mersin Üniversitesi Çocuk Hematoloji BD kayıtlı hepsi birbirinden de erli OHH'li küçük arkada larıma ve çalı maya destek veren anlayı lı ailelerine gönülden te ekkürler. Bu süreçte hastalarla ileti imimde bana yardımcı olan Çocuk Hematoloji BD Tıbbi Sekreteri sevgili arkada ım Mahir AYRAN'a , teknisyen Menek e DALAY'a, Bio. Hülya KAZAN'a ve kan alımında yardımlarını esirgemeyen hem ire ablalarım a çok te ekkür ederim.

Verilerimin de erlendirilmesinde yardımcı olan Tıp Fakültesi Biyoistatistik Bölümü hocalarımdan Yrd. Doç. Dr. Semra ERDO AN'a te ekkürler.

Tez sürem boyunca ihtiyacım oldu unda benden yardımların esirgemeyen Dr. Hatice Bige KOÇ, Dr. Ender D NÇER, Mol. Bio. Hikmet ÇEL K, Zehra SAKLANAN ve Yasemin P LOR'a tesekkürler.

Tez çalı mam için maddi destek sa layan MEÜ BAP birimine te ekkür ederim.

Çalı mamda manevi desteklerini benden esirgemeyen, bugüne kadar oldu u gibi bu çalı mamın da her a amasında benimle birlikte heyecanlanan, çalı an, yorulan anneme, sonsuz sabrı ve anlayı ı için Bio. Erdi KESEL K'e te ekkürler,

tezimi yazım a amasında pe imden ayrılmayan huzur kaynaklarım Siyah'ım ve Gri'me te ekkür ederim.

Son olarak benden maddi deste ini esirgemeyen babam Yılmaz AY'a sonsuz te ekkürler.

Ç İNDEK İLER

Sayfa

ÖZ	
ABSTRACT	
TEŞEKKÜR	
Ç İNDEK İLER	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	V
EKLER DİZİNİ	V
EKLER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. HEMOGLOBİN VE HEMOGLOBİN GENLERİ.....	3
2.1.1. Hemoglobin.....	3
2.1.2. Hemoglobin Genleri ve Sentezi.....	4
<i>Alfa Globin Genleri</i>	5
<i>Beta Globin Genleri</i>	5
<i>Gelişim Sürecine Bağlı Hemoglobin Sentezi</i>	6
2.1.3. Hemoglobin Evrimi.....	7
2.2. HEMOGLOBİN VARYANTLARI.....	8
2.3. ORAK HÜCRE HASTALIĞI.....	9
2.4. PARAOKSONAZ-1 (PON1) ENZİMİ VE POLİMORFİZMLERİ.....	16
2.4.1. Paraoksonaz-1 (PON1) Enzimi.....	16
2.4.2. PON1 Geni Polimorfizmleri.....	19
2.4.3. Hastalıklarla İlişkileri.....	22
3. MATERYAL ve YÖNTEM	28
3.1. KAN ÖRNEKLERİNDEN DNA EKSTRAKSİYONU ve DNA ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI.....	28
3.2. TaqMan SNP TANIMLAMA YÖNTEMİ.....	29
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	32
4.1. ORAK HÜCRE HASTASI ÇOCUKLARININ DNA ÖRNEKLERİ.....	32
4.2. ORAK HÜCRE HASTASI ÇOCUKLARININ PON1 POLİMORFİZM SONUÇLARI.....	32
4.2.1. Orak Hücre Hastası Çocuklarının İlk Akrut Yaşlı Akrut Kriz Sıklığı, Akrut Kriz Sıklığı, Akut Göğüs Sendromu ve Cinsiyete Göre Dağılımı.....	32

4.2.2. OHH'lı Çocuklarda PON1 SNP Tanımlama Sonuçları	33
4.2.2.1. PONL55M Polimorfizmi Tanımlama Sonuçları ile OHH'lı Çocukların İlk Kriz Yaşı, Kriz Sıklığı, Akut Göğüs Sendromu ve Cinsiyete Göre Değerlendirilmesi	34
4.2.2.2. PONQ192R Polimorfizmi Tanımlama Sonuçları ile OHH'lı Çocukların İlk Kriz Yaşı, Kriz Sıklığı, Akut Göğüs Sendromu ve Cinsiyete Göre Değerlendirilmesi	42
<i>OHH'lı Çocukların Polimorfizmi PON Allozimlerine göre İlk Kriz Yaşı, Kriz Sıklığı, Akut Göğüs Sendromu ve Cinsiyete Göre Değerlendirilmesi</i>	<i>49</i>
4.2.2.3. OHH'lı Çocukların PONL55M ve PONQ192R SNP'lerinin Birlikte İncelenmesi	50
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	59
EKLER	72
ÖZGEÇMİŞ	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Hemoglobin Genleri.....	4
Çizelge 2.2. Gelişim Sürecine Göre Hemoglobinler.....	6
Çizelge 2.3. Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği dünya üzerinde OHH'nin dağılımı	10
Çizelge 2.4. KAH'lı hastalarla yapılan PON1 Polimorfizm Araştırmaları.....	23
Çizelge 2.5. Çocuklarla yapılan PON1 polimorfizm Araştırmaları.....	25
Çizelge 2.6. Diyabetli Hastalarla Yapılmış PON1 Polimorfizmi Araştırmaları	25
Çizelge 2.7. Kanser Hastalarında Yapılmış PON1 Polimorfizm Araştırmaları.....	27
Çizelge 3.1. PON1 Polimorfizmlerinin RS ve Assay Numaraları	30
Çizelge 3.2. TaqMan testi PCR karışımının hazırlanmasında kullanılan miktarlar.	30
Çizelge 3.3. RT-PCR SNP Genotipleme Programı.....	31
Çizelge 4.1. OHH'lı Çocukların Dağılımı	33
Çizelge 4.2. OHH'lı Çocuklarda PONL55M Polimorfizmi Sonuçları	35
Çizelge 4.3. PONL55M Polimorfizmlerinin Hastalıklarla İlişkisi	36
Çizelge 4.4. OHH'lı Çocuklarda PONQ192R Polimorfizmi Sonuçları.....	42
Çizelge 4.5. PONQ192R Polimorfizmlerinin Hastalıklarla İlişkisi	44
Çizelge 4.6. OHH'lı Çocuklarda PONQ192R Polimorfizmi A ve B Allozimlerine Göre Sınıflandırılması.....	50
Çizelge 4.7. OHH'lı Çocuklarda PONL55M ve PONQ192R Polimorfizmleri Karşılaştırılması	51
Çizelge 4.8. PONL55M ve PONQ192R Literatürdeki Karşılaştırmaları	52

EK L L E R D Z N

	<u>Sayfa</u>
ekil 2.1. Gelişim Süresince Sentezlenen Hemoglobin	7
ekil 2.2. Hemoglobinin Evrimi	8
ekil 2.3. Normal kırmızı kan hücresi ve normal hemoglobinin temel yapısı ve Orakla mı kırmızı kan hücresi ve orak hemoglobinin temel yapısı	11
ekil 2.4. Paraoksonazın yapısı.....	17
ekil 2.5. PON1 Kromozom Üzerindeki Yeri	19
ekil 2.6. PON1 Geninin Yapısı	21
ekil 4.1. Agaroz Jelde DNA Bantları	32

EKLER D Z N

	<u>Sayfa</u>
Ek-1. Etik Kurul Kararı.....	73
Ek-2. Hasta Verileri	77
Ek-3. Kullanılan Aletler Ve Cihazlar.....	80
Ek-4 Kimyasal Maddeler	81
Ek-5 Çözeltiler	82
Ek-6 High Pure Pzr Template Preperation Kit-Roche	83
Ek-7 Agaroz Jel.....	84
Ek-8 Hasta Bilgi Formu	85
Ek-9. Bilgilendirilmi Hasta Onam Formu	88

S MGE ve KISALTMALAR D Z N

AGS	Akut Göğüs Sendromu
ALL	Akut Lenfoid Lösemi
AML	Akut Miyeloid Lösemi
bç	Baz çifti
CF	Kistik Fibröz
FSGS	Fokal Segmental Glomerülo Skleroz
Hb	Hemoglobin
HbA	Yeti kin Hemoglobin
HbF	Fötal Hemoglobin
KAH	Koroner Arter Hastalık
LCR	Lokus Kontrol Bölgesi
ml	mililitre
MPGN	Membrano Proliferatif Glomerulo Nefrit
OHH	Orak Hücre Hastalı 1
PON1	Paraoksonaz
PONL55M	55. pozisyonda lösün metiyonin dönü ümü
PONQ192R	192. pozisyonda glutamin arjinin dönü ümü
RT-PCR	Real-Time Polimeraz Chain Reaktion
SCD	Sickle Cell Disease
SNP	Single Nükleoide Polimkorphisn
TNF-	Tümör Neköz Faktör-Alfa
µl	mikrolitre
°C	Santigrat derece

1. G R

Orak hücre hastalığı (OHH), hemoglobinopatiler arasında en sık görülen, hemoglobin (Hb) sentez bozukluğu kaynaklı otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalıktır. Normal hemoglobin 2 Alfa () 2 Beta () zincirinden oluşmaktadır. Beta () zincirini kodlayan 11. kromozomdaki 146 aminoasitlik genin 6. kodonundaki adenin (GAG) yerine timin (GTG) geçmesi sonucu, glutamik asit yerine valin sentezlenme hemoglobinde yapısal değişim ile sonuçlanır ve hemoglobin HbS üretilmesi ile karakterize bir hemoglobinopati gelişir. [Harmening, 1997; Kuru, 2005]. Oksijensiz durumda HbS çözümlülüğü azalır. Hemoglobinler hücreye orak eklini veren uzun ve sert yapılara polimerize olma eğilimine geçerler. Oksijen altında polimerize olmu HbS'ler tekrar eski hallerine dönebilirler. Ancak tekrarlayan orakla malar hücrenin yapısını değiştirir ve sonunda eritrositler kalıcı olarak orak hücrelere dönüşür.

OHH'nın yayılım gösterdiği bölgeler içinde Akdeniz Bölgesi de yer almaktadır. Ülkemizde orak hücre hastalığı olan kişilerin sayısının yaklaşık 1200 civarında olduğu düşünülmektedir. Bunlardan Adana'da %10, Antakya'da %10,5 ve Mersin'de %13,6 olmak üzere dağılım gösterdiği bilinmektedir [Aygün, 2012; Arcasoy, 2003; Canatan, 2006].

Orak hücre hastaları özellikle oksijensizlik ve enfeksiyonlar nedeniyle oluşan iskemik ve vazo-oklüzyon krizleri sonucu oksidatif strese maruz kalırlar. Buna bağlı olarak ateroskleroz, kalp hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve kanserin de yer aldığı patolojik durumların oluşmasının sağlıklı bireylere göre daha erken dönemde tetiklendiği bilinmektedir. Oksidatif stresi azaltmada önemli mekanizmalardan birisinin de PON1 gen ürünleri olduğu bilinmektedir. PON1 paraoksonaz enzimi LDL'deki okside lipit birikimini fosfolipit hidroperoksit hidrolizi yaparak önlemektedir. PON1 gen polimorfizimleri paraoksonaz aktivitesi üzerine etkili olduğu ve çeşitli hastalıklarla ilişkilendirildikleri, özellikle koroner arter hastalığı (KAH)'nda etkili olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda serum paraoksonaz enziminin plazmada yüksek dansiteli

lipoproteinlerin (HDL) yapısında yer aldı ı, LDL kolesterolü oksidasyon reaksiyonundan korudu u ve LDL'deki kolesterol-linoleat-hidroperoksitleri ve özgün okside fosfolipidleri hidroliz ederek HDL'de lipid peroksit ve aldehit birikimini %95'e kadar azalttı ı gösterilmi tir [Mackness vd., 1987].

PON1 geninin sık görülen iki polimorfizminden birisi 3. ekzonda, 55. pozisyonda C/G ve di eri 4. ekzonda 192. pozisyonda A/T nükleotit de i imi oldu u belirlenmi tir. 55. pozisyonda C/G nükleotit de i imi sonucu proteindeki amino asit dizisi lösinden metiyonine (Leu55Met) ve 192. pozisyonunda A/T nükleotit de i imi sonucu ise amino asit dizisi glutaminden arjinine (Gln192Arg) de i im göstermektedir [Mueller , 1983]. PON1'e özgü üçüncü bir polimorfizmde, 4. ekzonun 102. pozisyonda A/G transisyonu sonucu izolösin / valin de i imine neden olan ve fonksiyonel oldu u dü ünülen, ancak 55 ve 192'ye göre daha az görülen bir polimorfizmdir [Marchesani, 2003].

Mersin bölgesinde sıklıkla rastlanan orak hücre hastalı nda hasta ya am kalitesini arttıracak tedavi yöntemleri geli tirilmeye çalı ılmaktadır. Orak hücreli bireyler ya adıkları kriz sonucu maruz kaldıkları oksidatif stres sonucu erken dönemde KAH tablosu geli mesine neden olmaktadır. Yangıyla ili kisi bulunan orak hücre hastalı nın yangı cevabı sonucu olu an hasarların sınırlandırılmasında PON1 polimorfizmlerinin önemli rol oynayabilece ini dü ündürmektedir. Bu amaçla çalı mada orak hücre hastası çocuklarda görülen a rılı krizler ve akut göğüs sendromu (AGS) ile iki PON1 gen polimorfizmi olan PONL55M ve PONQ192R arasında ba lantı ara tırılmı tir. Birçok hastalıkla ili kilendirilmi olan PON1 polimorfizmlerinin ilk kez OHH'lı çocuk bireylerde da ılımlarının belirlenmesi ile tedavi ve kriz baskılama yöntemleri için yol haritası sunması hedeflenmektedir.

DNA polimorfizmleri ve SNP tanımlamada son yıllarda TaqMan SNP Tanımlama Yöntemi yaygın ve güvenilir bir ekilde kullanılmaktadır. PON 1 polimorfizmleri TaqMan SNP Tanımlama Kiti ile RT-PCR'da gerçekte tirilmi tir.

2. KAYNAK ARA TIRMA

2.1 HEMOGLOBİN VE HEMOGLOBİN GENLERİ

2.1.1 Hemoglobin

Oksijenli solunum yapan canlılarda oksijen taşınmasından sorumlu hemoglobin 2 α ve 2 β polipeptidinden ve her bir polipeptide oksijenin geri dönüşümlü bağlandığı demir içeren dört hem merkezine sahip bir proteindir. Polipeptit zinciri ve protoporfirin IX'un halka yapısının ortasına yerleşmiş demir atomundan oluşan hem grubu sentezi farklı hücresel kompartmanlarda gerçekleşmektedir [Nelson ve Cox, 2005].

Yetişkin hemoglobini, 2 α ve 2 β polipeptit zincirlerinden oluşan kuarterner yapıdaki hemoglobin HbA olarak gösterilir. Hemoglobin yüksek organizasyonlu canlılarda (omurgalıların tümünde) özel hücreler olan alyuvarlar içerisinde yer alır. Alyuvar içerisindeki hemoglobin (HbA-2 α 2 β) akciğerlerden O₂ alınıp, dokularda bırakır, oksijen bağlama ve salınımı allosterik olarak hemoglobin formundaki değişiklikler ile sağlanır. [Hardison, 1999].

insanda alyuvar hücreleri pluripotent kök hücreden köken alan ortak miyeloid kök hücreden yolk kesesinde oluşur (eritropoiez). Gebeliğin 2. haftasında eritropoiez mezoblastik evresinde primitif eritroblast halini alır, bu amaçdaki alyuvar çekirdeklidir. Gebeliğin 6. haftası itibaren eritropoiezden sorumlu ana organ karaciğerdir ve hepatik evre olarak adlandırılır. Gebeliğin 4. ayından sonra eritropoiez myeloid evresi olarak adlandırılır ve kemik iliğinde kan üretimi başlar. Kemik iliği postnatal dönemde eritropoiez için ana kaynak olarak kan üretimi görevini devralır. Ergenliğe kadar iskelet sistemindeki ilik kırmızı ve aktiftir. Yetişkin dönemde aktif kemik iliği vertebra, kaburga, sternum, kafatası, pelvis gibi yassı kemik iliğinde, humerus ve femurun proksimal epifizinde bulunur [Nussbaum vd. 2007].

Hemoglobin sentezi bazofil eritroblastlarda başlar, bu amaçla çekirdek heterokromatin özelliği kazanır ve küçülme gösterir. Polikromatofil eritroblastlarda iyice küçülür, normoblastlarda ise çekirdek kenara itilir, hemoglobin miktarı %34'e ulaştığında çekirdek hücreden atılarak retikülosit halini alır. Retikülositler dolaşıma geçer ve 1-2 gün içerisinde olgunlaşır, bu amaçla diğer organellerini kaybederler. Olgunlaşmış alyuvarın ömrü 120 gündür. Yaşanan alyuvar dalakta makrofajlarca ortadan kaldırılır, dolaşımdaki denge kemik iliğinde sürekli üretilen kan ile sağlanır [Nussbaum vd., 2007; Akay, 2001].

2.1.2 Hemoglobin Genleri ve Sentezi

Alfa polipeptidini kodlayan genler (alfa globin) 16 kromozom, alfa-olmayan (beta) globin genleri ise 11. kromozom üzerindedir. Çeşitli tipte ve sayıda gen içeren hemoglobin lokusları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir. (Çizelge 2.1.)

Çizelge 2.1. Hemoglobin Genleri

HEMOGLOBİN GENLERİ												
Gen Kümesi/ Kromozom	BENZER GENLER / 16. KROMOZOM						BENZER GENLER / 11. KROMOZOM					
Etkin Genler												
Gen Kümesi			2	1	2	1	1		G	A		

Alfa benzer genler globin gen lokusu, alfa-olmayan genler ise globin gen lokusu olarak adlandırılır. Bu iki lokustaki genlerin ifadelerinin düzenlenmesi tam anlamıyla olmazsa da alfa ve beta benzeri zincirlerin eklemlenmesiyle globinlerin dengesi sağlanmaktadır. Etkin bir kırmızı kan hücresi için globinlerin dengeli ifadesi gereklidir. Bu dengenin bozulması çeşitli hastalıkların oluşmasına sebep olur [Provan, 2005; Nelson ve Cox, 2005].

Alfa Globin Genleri

Alfa globin gen lokusu kromozom 16 üzerindeki pe pe e yerle en iki genini ta ır. Gen kümesi 30 kb'lık bir alan kaplamaktadır. Her hücrede bulunan iki kromozom 16 ile bireylerde toplamda 4 globin geni bulunur. Bu genlerin her biri hemoglobin sentezi için gerekli globin zincirinin dörtte birini kar ılamaktadır. Alfa genlerinin her birinde 5' ucunda ba langıç kodonundan 30 baz üst bölgede promotor element (ATA BOX) yer alır. Gen kontrolünden sorumlu korunmu düzenleyici dizinin di eri AATAAA dizisi 3' ucuna eklenecek polyA kuyru unu tanımakla görevlidir. Bunlardan ba ka CCAAT , GGGGTG ve CACCC korunmu düzenleyici dizilerden bazılarıdır. Bu diziler memelilerde homoloji gösterirler ve ifade süresince çe itli transkripsiyon faktörlerinin ba lanmalarını uyarırlar [Stamatoyannopoulos, 2005].

Gen ifadesini arttırıcı etkide bulunan LCR (lokus kontro bölgesi) ise globin lokusunun birkaç kb üst bölgesindedir. Bu lokusta bulunan bir di er gen ise embriyonik dönemde geçici bir süre var olan zeta (ζ). Bunların dı nda üç tane protein vermeyen ürün psödogenleri (ζ_1 , ζ_2 , ζ_3) bulunmaktadır. Gen kümesinin sonunda fonksiyonu bilinmeyen teta (θ) geni bulunmaktadır ve ekspresyon engelleyici bir mutasyon ta ımıyor olsa da protein ürün varlı ı belirlenememi tir [Nelson ve Cox, 2005; Hardison, 1998].

Beta Globin Genleri

Beta globin gen lokusu embriyonik geli imde etkinlik sırasına göre ifade olan epsilon (ϵ), gama (γ), delta (δ) ve beta (β) genlerini bulundurur. Lokusta protein ürünü olmayan ve evrimel kalıntı oldu u dü ünülen bir psödogen (δ_1) vardır. Gen kümesi 60 kb'lık bir alanı kaplamaktadır. Her bir gen tekli kopya halinde bulunurken δ_1 geninin iki kopyası bulunmaktadır. Mekanizması bilinmemekle birlikte embriyonik geli im süresince etkin olan benzeri zincir, δ_1 zincirine uyumlu miktarda sentezlenmektedir [Nelson ve Cox, 2005].

gen kümesinde yer alan ve gen ifadesini arttırıcı etkide bulunan LCR, hemoglobin gen ifadesinde ana düzenleyicidir. Transgenik fareler üstünde yapılan çalı malarda globin gen kümesi üstündeki kimi genler çıkartıldı ında LCR'nin kontrol görevini tam olarak yerine getirmedir i, ancak gen kümesi bütün halinde iken kontrolün sa landı ı gösterilmi tir [Stamatoyannopoulos, 2005; Sumer vd, 2011].

Geli im Sürecine Ba lı Hemoglobin Sentezi

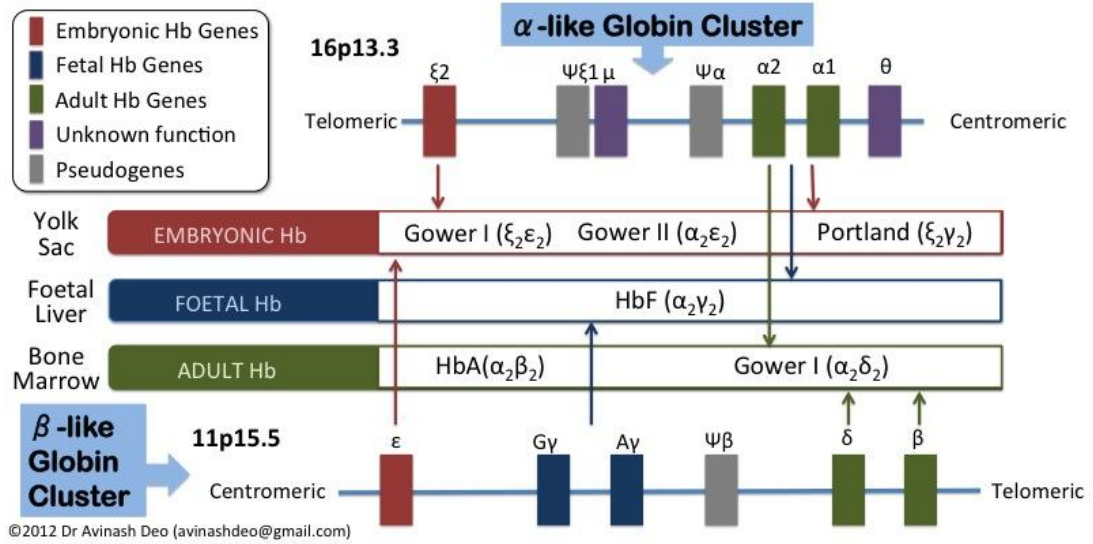
Alfa gen kümesinden zeta () geni sadece embriyogenezin ilk birkaç haftasında eksprese olur. Sonrasında görevi globin devralır. Beta globin gen kümesinde ise epsilon () geni embriyonik süreçte ilk eksprese olan benzeri globindir. Gama () geni fetal geli im süresince ekspresyonunu korur. 2 2 kombinasyonundan olu an hemoglobinin bu formu HbF'tir. Gama () globin üretimi do umla beraber globindenki artı la uyumlu olarak azalma gösterir. Bu süreçte do um sonrasındaki 7-8 ay içinde HbF varlı ı önemli oranda korunmaktadır. Nadir durumlarda bebeklik sonrasında HbF varlı ı ile kar ıla ılabilmektedir. [Nelson ve Cox, 2005; Dulbecco, 1997; Stamatoyannopoulos, 2005]. (Çizelge 2.2.)

Çizelge 2.2. Geli im Sürecine Göre Hemoglobinler

Embriyonik Hemoglobinler	Fetal Hemoglobin	Yeti kin Hemoglobinleri
Gower1 2 2	HbF 2 2	HbA 2 2
Gower2 2 2		HbA2 2 2
Portland 2 2		

Embriyonik dönem hemoglobinleri Hb Gower I (2 ζ 2 ϵ), Hb Gower II (2 α 2 ϵ), Hb Portland (2 ζ 2 γ) iken, fetal dönemde az mikarda yeti kin hemoglobini olan HbA (2 α 2 β) sentezi görülsede, baskın hemoglobin oksijen tutma kapasitesi daha yüksek olan HbF (2 α 2 γ)dir. HbA yeti kin hemoglobin olarak adlandırılrsa da do umdan sonraki 18-24. aylar itibari ile bireyde baskın hale gelir [Guyton, 1991].

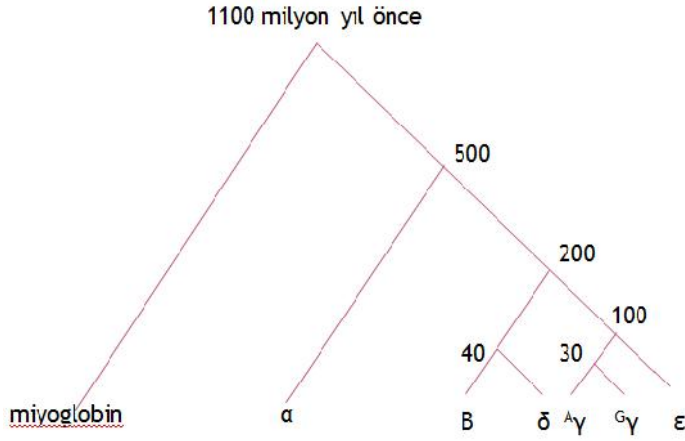
Normal yeti kinlerde baskın hemoglobin HbA (2 2)'dan ba ka HbF (2 2) ve delta () geni ürünü 2 ve 2 zincirinden olu an HbA2 %3'den az oranda bulunur. [Nussbaum vd., 2007]. (ekil 2.1.)



ekil 2.1. Geli im Süresince Sentezlenen Hemoglobin Tipleri [Deo, 2012]

2.1.3. Hemoglobinin Evrimi

Hemoglobinin yüzen memeli olan balinalardaki görevda ı olan miyoglobin ile 141 aminoasit içinden 24 tanesi ile uyumluluk gösterir. [Stamatoyannopoulos, 2005]. Miyoglobin ve günümüz hemoglobini 1100 milyon yıl önce olu an hemoglobin benzeri genden farklıla mı tır. Süreç içinde önce geninin olu tu u içerd i mutasyon sıklıklarından anla ılmaktadır. benzeri genler ise 200 milyon yıl öncesine dayalı gen duplikasyonları ile geli mi tir. ve geni ise yakla ık 40 milyon yıl önce farklıla mı tır. geni ve 100 yıl önce birbirinden ayrılmı olup, 30 milyon yıllık süreçte genleri de farklı iki gruba ayrılmı tır [Hardison, 1998; Çıplak, 2009]. (ekil 2.2.) Geli mi olan hemoglobin zincirlerinin milyon yılları kapsayan bir sürede gen duplikasyonu ile miyoglobinden geli ti i dü ünülmektedir. Gen duplikasyonları yeni gen olu umu için en önemli kaynak oldu u dü ünülmektedir.



ekil 2.2. Hemoglobinin Evrimi [Çıplak, 2007]

2.2 HEMOGLOBİN VARYANTLARI

Hemoglobin üretiminin kontrolü hemoglobin proteinlerinin ifadesindeki uyum ile sağlanır [Sumer vd, 20011]. Hemoglobinin i levine etki eden yapısal (amino asit) de i iklikler ve/veya globinlerden birisinin sentezlenmemesi (globin eksikli i) durumu anormal hemoglobinin olu umundaki en önemli etkenlerdir [Hardison, 1999]. Anormal hemoglobinlerin bir kısmında i levi etkilemeyen sessiz mutasyonlar bulunmaktadır. HbA'dan farklılık gösteren tüm anormal hemoglobinler hemoglobin varyantları olarak sınıflandırılmaktadır [Menzel vd., 2010]. Hemoglobin i lev bozuklu u sonucu geli en hastalıklar ise hemoglobinopatiler olarak de erlendirilmektedir.

Talasemiler, hemoglobinin veya zincirlerinin birisinin eksik olması halidir ve globinlerinde dengesizlik sonucu alyuvarda bozuklu a neden olur ve anemi geli ir. Hemoglobin alt biriminden biri etkilenmesine ra men, di er alt birimler bir çok talasemide normaldir [Hardison, 1999; Nussbaum vd., 2007].

Alfa ve beta gen lokuslarında mutasyon sonucu olu mu bugüne kadar belirlenmi ve halen tanımlanmakta olan yüzlerce hemoglobin varyantı vardır.

Varyantların sınıflandırmaları farklıla manın bulundu u globine göre yapılmaktadır. International HapMap Project, bugüne kadar dünyada görülen hemoglobin varyantlarını özelliklerine göre sınıflandıran, hemoglobinopati ve hemoglobin varyantlarının dökümünü gösteren en geni kaynaktır. Klinik önemi olan ve hastalıklarla ili kilendirilen varyanatların bazıları HbS, Hb Barts, HbC ve HbE'dir. Bundan ba ka çe itli olan bu varyantlar kimi zaman anne ve babadan farklı varyantların gelmesi ile bireylerde birle ik hemoglobin varyantları ta ınmaktadır. Bu durumda gösterilen belirtiler ta ınan hemoglobin varyantına göre de i mektedir.

2.3 ORAK HÜCRE HASTALI I

Orak hücre hastalı ı ilk kez 1910 yılında Herrick tarafından 20 ya ında a rıları ve kansızlı ı olan bir hastanın kan yaymasının incelemesi sırasında orakla mı hücrelerin görülmesi ile tanımlanmı tır [Harmening, 1997].

Hemoglobinin globin zincirde 6. pozisyonundaki glutamik asit yerine valin geçmesi sonucu olu ur. GAG kodonundaki adeninin timine de i ip GTG kodonunu yani valin olu turmasıyla yük dengesi bozulur ve hemoglobin katlanma yapar [Noguchi, 1993]. Yapı kanlı ı fazla olan yeni hemoglobin zaman içinde kendisi gibi orakla mı di er hemoglobinlerle birle me e ilimindedir ve damar tıkanmalarına sebep verebilir [Kılıç vd., 2000]. Ayrıca bu mutasyon moleküler denge ve çözünürlü ünde büyük de i ikli e yol açar.

Hastalı ın merkezi Afrika olmakla birlikte göçler ile tüm dünyaya yayılım gerçekleş mi tir [Aksoy, 1958; Aygün, 2012]. (Çizelge 2.3.) Karayipler, Orta ve Güney Amerika, Akdeniz bölgesi (Türkiye ve Yunanistan'ı içine alan), Ortado u ve Hindistan hastalı ın sık görüldü ü bölgelerdir [Canatan, 2006].

Toplumda her 1000 sa lıklı bireyden 2 veya 3'ü orak hücre ta ıyıcısıdır. Bu oran risk bölgelerine göre de i im göstermektedir.

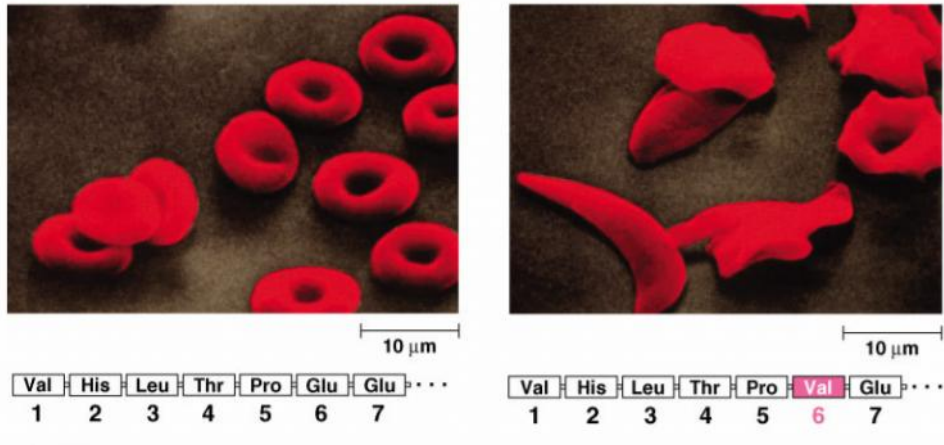
Çizelge 2.3. Dünya Sağlık Örgütü'nün Belirlediği Dünya Üzerinde OHH'nin Dağılımı [Aygün, 2012]

Bölge	Sayı
Afrika	233,289
Amerika	9,047
Doğu Akdeniz	6,491
Avrupa	1,292
Kuzeydoğu Asya	26,037
Batı Pasifik	13
Dünya Geneli	276,168

Sağlık Bakanlığı ve Ulusal Hemoglobinopati Konseyi'nin verilerine göre taıyıcı sıklığının Adana'da %10, Antakya'da %10,5, Mersin'de %13,6 ve ülkemizdeki toplam orak hücre hastalığı olan kişi sayısının yaklaşık 1200 civarında olduğu belirtilmiştir [Arcasoy, 2003; Canatan, 2006]. Ayrıca hastalığın Antalya'da %2,5, Diyarbakır'da %0,5, Muğla'da %0,5 sıklıkta görüldüğü bildirilmiştir [Eraslan, 2005] Orak hücre hastalığı bölgemiz için oldukça önemli bir sağlık sorunudur. Yapılan çalışmalarda Mersin, Adana ve Hatay'da OHH görülme sıklığının %10-13 gibi çok yüksek oranlarda olduğu bilinmektedir.

Orak hücre hemoglobini genetik olarak homozigot durumda taşıyan hastalar için OHH terimi kullanılır. Otozomal çekinik (resesif) geçi gösteren bu hastalıkta hasta birey doğması için her iki ebeveynin de taşıyıcı olmaları gerekir [Harmening, 1997]. Bu akraba evliliklerinde oldukça sık karşılaşılan bir durumdur. Heterozigot durumdaki kişi anne ya da babanın sadece birinden mutasyona uğramış gen almaktadır ve eritrositlerde HbA ile birlikte HbS de bulunmaktadır. Bu durum OHA taşıyıcılığı olarak adlandırılmaktadır. Genotip olarak OHA taşıyıcısı olan ebeveynler %25 olasılıkla OHH'li çocuğa sahip olma riski taşımaktadır. Böyle anne ve babadan genotipi normal olan çocuk doğma olasılığı ancak %25'tir [Tüzmen, 2001].

HbS molekülleri, oksijen düzeyi düştüğü zaman polimerize olur, eriyebilirliği ve akıkanlığı azalır. Alyuvardaki HbS yoğunluğu 30 g/dL'ye ulaştığında yarı katı hale gelir. Orak hücre hemoglobininin likid ve solid fazları arasındaki dengeyi dört faktör tayin eder. Bunlar oksijen düzeyi, HbS düzeyi, ısı ve HbS dâhilindeki diğer hemoglobinlerin varlığıdır. Bu etmenlerdeki patolojik değişiklikler belirgin olarak alyuvarın orak şeklini almasına neden olur. Oraklaşmış hücreler, küçük kapillerleri geçmek için gerekli esneklik yeteneğini kaybederler. Oraklaşmış eritrositler dolaşımın viskozitesini artırır ve kan akımını yavaşlatır. Bu da özellikle küçük damarlarda tıkanıklık ve oksijensiz bir ortam oluşturularak, ağrılı kriz ve organ nekrozuna, sonuçta akut ve kronik süreçte doku harabiyetine neden olur [Harmening, 1997; Noguchi, 1993; Embury, 2000].



ekil 2.3. Normal Kırmızı Kan Hücresi ve Normal Hemoglobinin Temel Yapısı, Oraklaşmış Kırmızı Kan Hücresi ve Orak Hemoglobinin Temel Yapısı [Embury, 2000].

Oraklaşmış hücreler dönüştürülebilir veya dönüştürülemez olabilir. Orak hücre anemisi hastalarının periferik yaymasında görülen orak şeklindeki hücreler geri dönüştürülebilir orak hücrelerdir. Bu hücrelerin sayısı sabittir ve hastalığın komplikasyonları ile (ağrılı kriz gibi) değişir. Geri dönüştürülebilir orak hücreler,

özkalıtlımlı orak hücre hastalı ında bulunurken ta ıyıcılık tipinde yoktur. [Wang, 1999]. (ekil 2.3.)

Enfeksiyonlar, parsiyel oksijen basıncında azalma, a ırı fiziksel egzersiz, alkol, gebelik, damar çapını azaltan durumlar, vücut ısısının artı ı, kan yo unlu unda artma, oksihemoglobin disosiasyon e risinin sa a kaymasına neden olan pH azalması, yüksek HbS, dü ük HbF miktarı, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikli i ve 2,3 difosfogliserat düzeyinin azalması orakla ma e ilimini arttıran etkenlerdir [Mary, 2000; Canatan, 2003].

Orak hücre hastalı ındaki klinik belirtilerin ço unlu u kan akı kanlı ının azalması ile ilgilidir ve dokuda oksijen doygunlu unun dü mesine ve daha sonra orakla maya yol açan kısır döngünün devamına neden olur. Sonuçta dalak, kemik ili i ve plasentada doku enfarktları ve fibrozis görülür. OHH'da eritrositlerin yakla ık 2/3'ü makrofajlar tarafından dola ımdan uzakla tırılır. Total hücre yıkımının 1/3'ü damar içi olmaktadır. Orakla manın düzelmesi sırasında mikroflamanların dökülmesi veya kapiller damarlardan orakla mı hücrelerin geçi i sırasında hemoliz gerçekleşir [Noguchi, 1993; Embury, 2000; Mary, 2000]

Orak hücre hastalı ında çok çe itli klinik tablolar gözlenmektedir. Kimi bireyler hiçbir bulgu vermez ve toplum taramaları sırasında tanınırken, kimi olgu da erken bebeklik döneminde ciddi bulgularla kar ımıza çıkabilir. Erkek hastaların ortalama ya am süresi 42, kadınlarınsa 48 yıldır. Fakat bu ya sınırları hastalı ın ilerleyi ine göre de i kenlik gösterebilir [Embury, 2000]. Günümüzde 50-60' lı ya lara uzanmaktadır. Bireylerde HbS do umdan itibaren mevcut oldu u halde, fetal ve erken postnatal dönemde yeterli miktarda HbF mevcut oldu undan, bulgular genellikle 6 aylıktan sonra ortaya çıkar. Klinik tablo haplotiplere ba lı olarak farklılık gösterir. Ayrıca HbF miktarı ve alfa talasemi varlı ı da klinik iddetini etkiler. İlk üç ayda anemi, 6. aydan sonra ilk kez splenomegali fark edilir. İlk vazo-okluziv kriz olguların yakla ık yarısında ya amın 6.-12. ayında görülür; büyük ço unlu unda 6 ya tan önce, çok azında

da yeti kin ya ta klinik semptom verebilir [Serjeant, 1995], [Turgeon, 2005; Ozen , 2013]. Hastalı ın belirti ve bulguları hematolojik olan ve hematolojik olmayan ekinde ikiye ayrılır [Canatan, 2003].

Hematolojik bulgulardan aplastik kriz kemik ili inde kırmızı hücre öncüleri ve retikülosit sayısında azalmasına ba lı Hb düzeylerinde ani dü ü sonucu alyuvar yapımının geçici olarak durmasıdır [Saarinen, 1986; Dover, 2003]. Hemolitik kriz hemoglobin ve hematokrit düzeylerinde dü me, ate , ikter, laktat dehidrogenaz (LDH) ve retikülosit düzeylerinde artı olarak ifade edilir [Embury 2000]. Vazo-oklüziv kriz damar içi orakla ma ve buna ba lı geli en doku kanlanması bozulması sonucu a rının e lik etti i yan etkidir ve OHH'lı çocukların en önemli klinik bulgularını olu turur. Damar tıkaçıcı krizler; el-ayak sendromu, a rılı krizler, akut gö üs sendromu (AGS), santral sinir sistemi etkilenimi ve priapizm olarak kendini gösterebilir [Mary, 2000; Canatan, 2003; Beutler, 1998; Unal, 2011]. Ara tırmada ilk a rılı kriz ya ı ve çalı ma süresini kapsayan dönemde a rılı kriz geçirmi li i vazo-oklüziv a rılı krizlerin bilgilerini içermektedir.

Hematolojik olmayan bulgular ilki vücut a rılı nı etkileyen büyüme gerili idir. OHH'li bireylerde kalp hastalıkları çocukluk ça ından itibaren kronik anemiye ba lı olarak kalp atım hacminde artı , kalp odacıklarında veya boyutlarında büyüme ba lar. Ayrıca hastalarda kalp damar hastalı ı olmaksızın kalp damarları orak hücrelerin tıkanması nedeniyle kalp krizi geli ebilir [Embury, 2000]. Bir di er önemli hastalık, ara tırmada da hasta geçi lerinin incelendi i akut gö üs sendromudur. Orak hücre hastalarının yakla ık % 30'unda akut gö üs sendromu görülür ve eri kinlerde hastalı a ba lı ölümlerin % 15'inden sorumludur. A ır olgularda akci er fonksiyonları hızla bozulur ve ciddi hipoksi ile solunum yetmezli i geli ebilir [Mary, 2000; Beutler, E 1998]. Enfeksiyonlar orak hücre hastası çocuklarda en yaygın ölüm nedeni sepsisi ve menenjit gibi enfeksiyonlardır. İlk on yıldan sonra anaerobik ve enterik organizmalar önemli patojenlerdir. [Wang, 1999]. Dalak ve karaci erin etkilenmesi orakla an hücrelerin dalaktaki kan dola ımının tıkanmasıyla ba lar. Hemoglobin

yo unlu unda azalma ve dalakta ani büyüme ile kendini gösterir ve bu olay dalak sekestrasyon krizi olarak bilinir ve kanın dalakta göllenmesi ile kendini gösterir [Pappo, 1989; Buchanan, 1977]. Santral sinir sistemi olayları inme, ana serebral ve intraserebral damarların tıkanıklı ı veya subaraknoid kanamaya ba lı olarak geli en OHH'lı çocuk ve genç eri kinlerin % 6-17'sinde bildirilen ciddi bir yan etkidir. OHH'ya ba lı geli en serebrovasküler olaylardan en sık kar ıla ılanı sessiz iskemilerdir [Milbauer, 2008]. Nörolojik sistem orak hücre hastalarında konvülziyon, ba a rısı, parestezi, menenjit, denge bozuklu u, i itme kaybı ve subaraknoid kanama sayılabilir OHH'li çocuklarda beyinde iskemi ve enfaktüs sonucu nörolojik bulgularla düzelebilir hemiplejiler geli ebilir, gözde ani görme kaybı görülebilir [Mary, 2000; Canatan, 2003;Claster, 2003]. Kızlarda menstrüasyon ve hamilelik sık tekrarlayan orakla ma atakları ile kendini gösterir, hamilelikte dü ük do um a ırlı ı ve uterus içi fetus ölümüne sebep olabilir [Claster, 1993].

Orak hücre hastalı nda tanı ve tedavi hastanın öyküsünde ırk, geldi i yöre, aile öyküsü, yakınmalarının ba langıç zamanı ve tetikleyen etkenler de erlendirilmeli, fizik muayenede solukluk, sarılık, splenomegali, enfeksiyon bulguları, organ ve iskelet sistemindeki ekil bozuklukları de erlendirilmelidir [Canatan, 2003].

Bebeklik döneminde HbS oranı artıp HbF dü tükçe orak hücre hastalı nın bulguları ortaya çıkmaya ba lar. 4. ayda hemolitik anemi ortaya çıkar. Asit ve alkali elektroforez, HPLC ve izoelektrik fokuslama (IEF) tanı yöntemlerindedir. DNA'nın PCR amplifikasyonu ile de beta mutasyon kontrol edilip orak hücre hastalı ı belirlenebilir [Jinks vd, 1989].

Tedavide temel prensipler, HbF yapımını arttırmak, HbS miktarını azaltıp oksijene ilgisini arttırmak ve sonuçta orak hücrelerin küçük damarlarda tutulmalarını azaltmaktır. Orakla ma mekanizmasında en önemli olay olan HbS polimerizasyonu, HbF miktarının yükseltilmesi ile azaltılabilir [Canatan, 2003], [Vichinsky, 2002]. HbF seviyesinin yüksek olması OHH'da koruyucu etkiye

sahiptir. HbF, HbS'in polimerizasyonunu in vitro ortamda inhibe etmektedir [Charache, 1995]. HbF yapımını artıran ilaçların ba ında hidroksiüre gelmektedir. Hidroksiüre HbF sentezini artırarak eritrosit kök hücrelerin farklıla malarına etki eder ve eritrosit ya am süresini etkileyerek orakla mayı azaltır. Bu ilaç a rı krizlerini, hastanede kalı sürelerini, akci er ve nörolojik olayları azaltmada % 60 ba arılı olmu tur fakat hastaların % 40'ında ilacın kullanımına yanıt alınmayabilir. Önemli bir yan etkisi yoktur [Canatan, 2003], [Claster, 2003]. Kısa zincirli ya asitleri (valproik asid), eritropoietin, 5-azacitidin de HbF yapımını artırarak etkili olan di er ilaçlardır [Canatan, 2003].

Kronik kan transfüzyon OHH'ya ba lı merkezi sinir sistemi iskemileri, akut gö üs sendromu, vazo-oklusif krizler, büyüme gerili i ve dala ın fonksiyonsuz olması durumlarında kronik transfüzyonların bu a ır orak hücre semptomlarını engelleyebilece i gösterilmi tir [Styles, 1994]. Tedavi HbS seviyesinin % 30' un altında kalmasını sa lamaktır [Vermylen, 1994].

Belirgin organ hasarı olmayan küçük çocuklarda doku uygunluk antijeni (HLA= Human Lökosit Antijen) uygun karde lerden yapılan kök hücre nakli oldukça yüksek oranda ba arı sa lamaktadır [Vermylen, 1994].

Prenatal tanı hamileli in 8.-10. haftalarında koryon villustan veya amniyosentezden elde edilen fetal DNA kullanılarak orak hücre mutasyonunun moleküler analizi yapılabilir [Ducrocq, 2001]. Bu durumun yaygınla ması ve hastalı ın önüne geçmek adına Hemoglobinopati Kontrol Programı ba latılmı ve ülke genelinde mevcut sorunların çözümü için, 30.12.1993 tarihinde 3960 sayılı olarak yayımlanan Kalıtsal Kan Hastalıkları ile Mücadele Kanunu'na dayanılarak hazırlanmı , "Kalıtsal Kan Hastalıklarından Hemoglobinopati Kontrol Programı ile Tanı ve Tedavi Merkezleri Yönetmeli i" 24 Ekim 2002 tarihli ve 24916 sayılı Resmi Gazete' de yayımlanmı tır. Toplum taraması, halk e itimi, genetik danı ma ve rehberlik hizmetleri verilmesi yoluyla gebelik ve do um öncesi tanı ve tedavi yöntemleri kullanılarak anormal hemoglobin hastası do umunun uygun strateji ile önlenmesidir. Her ikisi de ta ıyıcı olan çiftlerin

bilinmesi ve çocuk sahibi olmadan önce genetik danışmanlıktan yararlanmaları hastalığın önlenmesi açısından gereklidir [Özba, 2008]. Ülkemizde aralarında Mersin ve Adana’nda olduğu 33 ilde bu merkezler bulunmaktadır.

2.4. PARAOKSONAZI (PON1) ENZİM VE POLİMORFİZMLER

2.4.1. Paraoksonaz1 (PON1) Enzimi

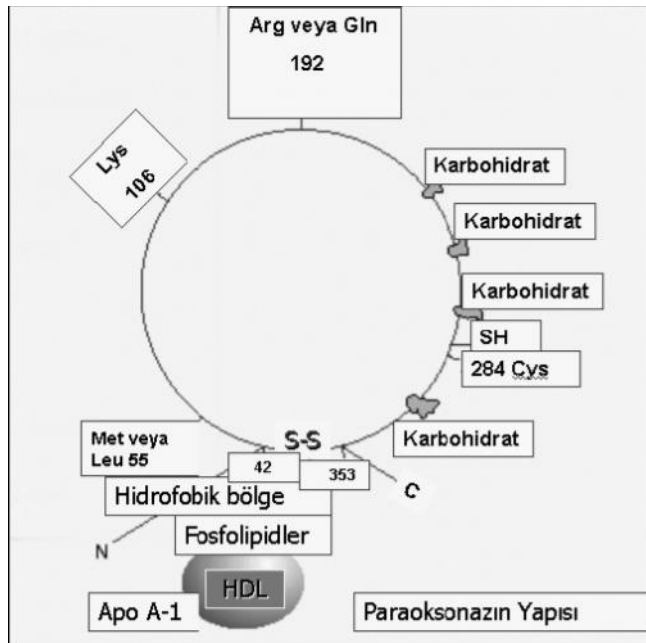
Glikoprotein yapıda, kalsiyum bağımlı bir ester hidrolaz olan paraoksonaz (PON), hem arilesteraz (E.C. 3.1.1.2) hem de paraoksonaz (E.C.3.1.8.1) aktivitesine sahip bir enzimdir [Durrington, 2001]. Oksidatif stres ve serbest radikaller hastalıklara neden olabilmektedirler [Ames, 1983], [Goldstein, 1990]. İnsan vücudunda serbest radikalleri uzaklaştırmada görevli enzimatik mekanizmalardan biri olup sistematik adı aril dialkil fosfatazdır. Paraoksonaz geni ailesi PON1, PON2 ve PON3 olarak adlandırılmış üç üyeye sahiptir. [Draganov, 2005].

PON1 50’li yıllarda serumda azo boyaların hidroliz yeteneğiyle esteraz olarak tanımlanmıştır. Paraoksonun (dietyl-4-nitrofenilfosfat) enzimatik olarak hidrolizini katalizlediği gösterildikten sonra esteraz A olarak sınıflandırılmıştır (Aldridge, 1953; Tashian ve Show 1962; Krish, 1968). A esterazların, B esterazların tersine birçok organofosfatlı insektisitleri, sinir gazını hidrolize ederek, bu tür toksik bileşiklerin detoksifikasyonunu sağladıkları anlaşılmıştır [Mackness, 1987].

İnsan ve tavşan dokularına ait mRNA’lar paraoksonazın sadece karaciğerde bulunduğunu göstermektedir. İnsan PON1 karaciğerden sentezlenerek kana salınan enzimin HDL ile etkiletiği ve ateroskleroz gelişimini önlediği belirtilmektedir [Hasset, 1991; Draganov 2005]. (Eki 2.4.)

Paraoksonaz (PON1) paraoksonun hidrolizini sağlayan, kalsiyum bağımlı çalınan ve dolaşıma giren organofosfatların nörotoksitesinden sinir

sistemini koruyucu bir ajandır. [Poore, 1972; Zech, 1974; Furlong, 1988]. Örne in; parathion karaci er ve di er dokulardaki mikrosomal sitokrom p450 sistemi tarafından oksidatif desülfirizasyonla paraoksona dönü üp, estraz B olan asetilkolin esteraz inhibisyonuna neden olur [La Du, 1992]. Farklı bir organofosfatlı insektisit grubunun metaboliti olan klorpirifos oksonun da paraoksonaz tarafından hidroliz edildi i ve bu grup insektisitlerin detoksifikasyonunda önemli ölçüde rol oynadı ı belirlenmi tir [Mackness vd, 1987; Furlong, 1988; Primo-Parmo, 1996]. Organofosfatların kullanımının ve yayılımının 40 yıl önce ba ladı nı göz önüne alırsak bu bile iklerin metabolizması gittikçe önem kazanmaktadır.



ekil 2.4. Paraoksonazın Yapısı [Aviram, 1999].

In vitro çalı malar, PON1 ve PON3'ün LDL'nin lipid oksidasyonunu inhibe etti ini, böylece ateroskleroza ba latan ve ilerleten okside lipid seviyelerini azalttı nı göstermi tir [Harel, 2007]. Paraoksonazın, okside LDL'deki kolesterol-linoleat-hidroperoksitleri ve özgün okside fosfolipidleri hidroliz ederek HDL'de lipid peroksit ve aldehit birikimini %95'e kadar azalttı ı gösterilmi tir [Aviram, 1999]. Paraoksonaz enzimi tepkimesiyle lipid peroksitlerinin aterojenik etkilerini nötralize etti i ve hücre membranlarını

korudu u dü ünülmektedir. Ayrıca paraksonazın lökotren metabolizmasında da önemli rol oynadı ı Watson ve arkadaşlarının yaptığı bir çalı mayla gösterilmi tir [Navab, 1995; Watson, 1995].

Memelilerde hepatik detoksifikasyon mekanizmasından herhangi bir nedenle kaçan oksonun serum paraoksonaz tarafından çok hızlı metabolize edilerek beyine ulaşmasının engellendi i gösterilmi tir. Paraoksonaz memelilerde bulunmasına kar ın böceklerde ve ku larda bulunmayı ı bu grup canlıların organofosfat zehirlenmelerine daha hassas olmalarını da açıklamaktadır [Brealey, 1980].

nsan serumundan safla tırılan paraoksonaz (PON1) enzimi minimum 43-45 kDa moleküler kütleyle sahip ve 354 aminoasitlik bir glikoproteindir. Katalitik aktivitesi için kalsiyum iyonuna ihtiyaç duyar, sülfidrilli ajanlarla inhibe edilebilir ve yapısında sisteinlerin yer aldı ı gösterilmi tir [Mackness, 1998]. Paraoksonaz proteininin yapısal kısmı birincil transkript ile tipik verici ve alıcı kısımlardan olu an 9 ekzon ile kodlanmı tır. [Clandenning, 1996]. Yenido an insanda eri kinin yarısı seviyede PON1 aktivitesi oldu u ve bir yılda yeti kin enzim seviyesine eri ti i ve ömür boyu aktivitenin sabit kaldı ı gösterilmi tir. Ayrıca enzim aktivitesinin cinsiyete ba lı bir de i im göstermedi i bulunmu tur [Mackness, 1998].

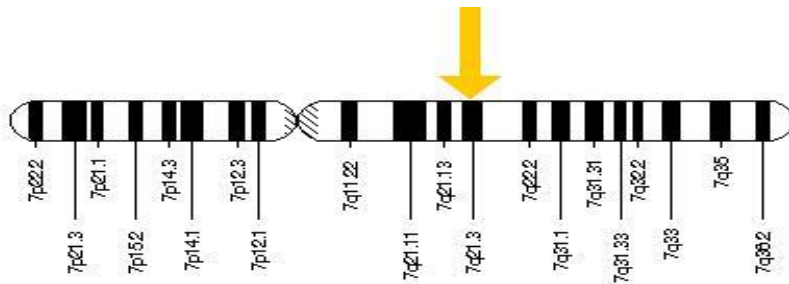
PON1'in HDL ile ili kisi Uriel tarafından 1961'de yapılan immünopresipitasyon çalı malarıyla tespit edilmi tir. HDL ile ili kili olarak lipid peroksidasyonunu önlemedeki rolü 1990'lardan sonra anla ılmı tır [La Du, 1992; Mackness, 1998]. Yapılan çe itli ara tırmalarla PON1'in Apolipoprotein A1 (ApoA1) ile birlikte HDL partiküllerine ba lı oldu u gösterilmi tir. PON1'in N-terminalinde bulunan hidrofobik sinyal dizisi ile HDL içerisine entegre oldu u dü ünülmektedir [Aviram, 1999]. mmünoafinite kromatografisi yöntemiyle insan PON1'in ApoA1 ve clusterin içeren HDL alt grubu içerisinde bulunması sonucu enzimin membran ve lipoprotein tamir ve yapılandırma mekanizmasında rol oynadı ını dü ündürmektedir [Mackness, 1998]. PON1'in bunu HDL'de lipit

peroksit ve aldehit birikimi; okside LDL'deki kolesterol-linoleat-hidroperoksit ve özgün okside fosfolipitleri hidrolize ederek engelledi i belirtilmektedir [Durrington, 2001].

Paraoksonaz aktivitesinin tespiti ile birlikte bu enzim için genetik polimorfik farklılıkların varlığı da araştırılmaya başlanmıştır. Bazı insan epidemolojik çalışmaları, PON gen polimorfizmleri ile kardiyovasküler hastalık riski arasında ilişki bulunduğunu göstermiştir. İnsan ve fare üzerinde yapılan çalışmalar ile PON1'in antioksidatif ve ateroprotektif özelliği gösterilmiştir [Shih, 2009].

2.4.2. PON1 Geni Polimorfizmleri

Paraoksonaz1, PON2 ve PON3 ile bağlantılı olarak 7q 21.3-22.1 bölgesinde bulunur [Durrington, 2001]. (ekil 2.5.) Birbirine 120kb'lık uzaklıkta yer aldığı ve diğerlerinin PON1 ile %65 aminoasit homolojisi ve arilesteraz aktivitesi gösterdiği bulunmuştur [Mochizuki, 1998; Aviram ve Rosenblot, 2004; Huen, 2010].



ekil 2.5. PON1 Kromozom Üzerindeki Yeri [Genetics Home Reference, 2013]

İnsan serum paraoksonazı için ilk genetik polimorfizm 70'li yıllarda tanımlanmıştır [Geldmacher von Mallinckrodt, 1973]). Yapılan çalışmalarda paraoksonaz aktivitesinin iki farklı fenotipini kontrol eden aynı otozomal lokusta yer alan iki allel olduğu belirlenmiştir. [Playfer, 1976]. Sonrasında paraoksonazın üç farklı aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir [Mueller, 1983]. Albuminin

paraoksonaz aktivitesine sahip olması, polimorfik paraokson aktivitesi optimal assayinin albumin olmayan fraksiyondan temel alındığını dü ündürmü tür [Jorge, 1984].

DNA'da nükleotit seviyesinde çalı maların ba laması sonucu kistik fibröz geni ile beraber raslantısal olarak aynı lokusta yer alan paraksonazı kodlayan PON geninin dizisi ortaya çıkartılmı tır [Eiberg, 1985; Nielsen, 1986; Schmiegelow, 1986].

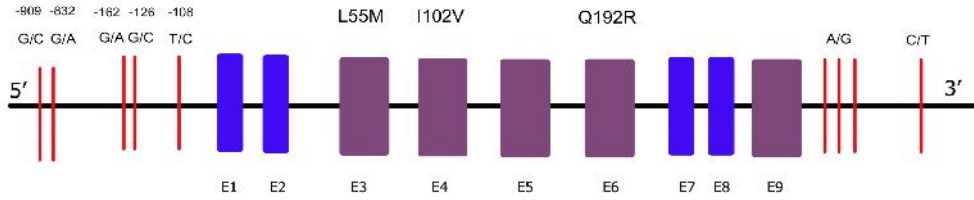
Daha sonra insan serum ve tav an paraoksonaz cDNA klonlarını tanımlamı lardır [Hassett vd, 1991].

Serum paraoksonaz polimorfizmlerinin moleküler dayana mını enzim aktivitesiyle birlikte tespit edilmi tir. zole edilen üç ba ımsız cDNA klonlarında 55. ve 192. aminoasit kodonlarında farklılıklar bulmu lardır [Humpert, 1993]. PON1 geninin sık görülen iki polimorfizminden birisi 3. ekzonda, 55. pozisyonda A/T ve di eri 6. ekzonda 192. pozisyonda A/G nükleotit de i imi oldu u belirlenmi tir. 55. pozisyonda A/T nükleotit de i imi sonucu proteindeki amino asit dizisi lösinden (L) metiyonine (M) de i mi tir. Altı farklı kodonla ifade edilen lösine ait kodonlardan biri de AAG'dir. Kodondaki 2. nükleotidin T nükleotidine de i imiyle olu an ATG kodonu ise metiyonini kodlar. 192. pozisyonunda A/G nükleotit de i imi sonucu ise aminoasit dizisi glutaminden (Q) arjinine (R) de i im göstermektedir. ki farklı kodonun kodladı ı glutaminin CAG kodondaki 2. aminoasitin G nükleotidine de i imiyle olu an CGG kodonu ise arjinini kodlayan altı kodondan biridir [Pasar, 2006].

PONL55M polimorfizmi, PON1'in HDL ile ba lanmasında rol oynayan N-terminal bölgesinde lokalizedir [Adkins S, 1993]. PONQ192R polimorfizmi, enzimin hidrolitik aktivitesinde substrat farklılı ından sorumludur [Levieu, 2001].

PON1'e özgü üçüncü bir polimorfizmde, 6. ekzonun 102. pozisyonda A/G transisyonu sonucu izolösin / valin de i imine neden olan ve fonksiyonel oldu u dü ünülen, ancak PONL55M ve PONQ192R'ye göre daha az görülen bir polimorfizmdir [Marchesani, M 2003]. PONL55M, PONI102V ve PONQ192R kodlama bölgesi üzerinde bulunmaktadır [Gupta, 2009]. (ekil 2.6.)

Enzim seviyesine etki eden di er önemli polimorfik pozisyonlar da PON1 geni promotor bölgesinde PON -162, PON -108 bölgesinde yer almaktadır [Huen, 2010].



ekil 2.6. PON1 Geninin Yapısı. Mavi ve mor renkli kutucuklar dokuz ekzonu (E1-9) simgelemektedir. 5' promotor bölgede 5, kodlanan bölgede 3, 3' translayona u ramayan bölgede 4 polimorfizm gösterilmi tir [Furlong, 2002].

PON Q192R polimorfizminin enzim aktivitesi üzerinde etkili oldu u görülmü tür. 192. pozisyonda Q (glutamin) içeren bireylerin serum paraoksonaz enzim aktiviteleri R (arjinin) içeren bireylerinkine göre daha dü ük bulunmu tur. R içerenler yüksek aktiviteli paraoksonaza sahipken Q polimorfizmi ta ryanlar dü ük aktiviteli paraoksonaz bulundurmaktadır. Bu polimorfizm, substrat olarak paraokson kullanıldı ında 192. pozisyon PONQ192R polimorfizmi için dü ük aktivite göstereni A alloenzimi yüksek aktivite göstereni B alloenzimi tanımlamı tir. Q/Q dü ük aktiviteli, R/R ve Q/R ise yüksek aktivitelidir. [Humbert, 1993]. Ancak çalı malarda kullanılan substrat de i tirildi inde enzim aktivitesinde farklılıklar görülmü tür. Sinir gazı, sarin, diaoksozon gibi substratlar kullanıldı ında A alloziminin B allozimine göre bunları daha hızlı hidrolize etti i gösterilmi tir. Fenilasetat substrat olarak kullanıldı ında ise iki allozim arasında aktivite farklılı ı gözlenmemi tir [Davis vd, 1996]. Bu da

polimorfizmlerin tespitinde SNP tanımlama yöntemlerinin kullanılmasını zorunlu kılmı tır.

PONL55M pozisyonunda L (lösin) ve M (metiyonin) de i iminin paraoksonaz aktivitesi açısından bir farklılık göstermedi i ve bu pozisyon için alloenzim tipi olmadı nı dü ündüren çalı maların yanı sıra [Humbert, 1993], NIDDM'li hastalarda bu polimorfizmin PON aktivitesini yönlendirdi i gösterilmi tir [Blatter-Garin, 1997]. Farklı bir çalı mada PONL55M polimorfizminde ise; MM homozigot bireylerde, LL homozigotlara kıyasla paraoksona kar ı daha dü ük PON1 aktivitesi gösterdi i de gözlenmi tir. [Leviev, 2001]. PONL55M ve PONQ192R polimorfizmleri enzim aktiviteleri için MM ve QQ dü ük aktiviteli olup, RR ve LL yüksek aktivite gösterdi i, L/M ve Q/R için orta seviyede aktiviteye sahip oldu u gösterilmi tir [Altuner, 2010].

Osteoporozlu hastalar ve sa lıklı kontrol grubu ile yapılan çalı mada PON1 PONL55M, PONQ192 dü ük PON enzim aktivitesi göstermektedir, bu osteoporoz için risk faktörü oldu u gözlenmi tir [Topba , 2013].

2.4.3. Hastalıklarla ili kileri

PON1 geni polimorfizmlerinin koroner arter hastalıklar (KAH), felç, serebral enfarktüs, iskemik felç, tip II diabetes mellitus, alzhemier gibi hastalıklarla ili kisi ara tırılmı tır.

Koroner arter hastalı ı (KAH): PON1 gen polimorfizmleri, enzimin koruyucu fonksiyonunu engelleyerek koroner arter hastalı ı riskini artırmaktadır [Blatter-Garin, 1997; Mackness, 1998]. Serum PON1 seviyesi dü ük olan farelerde ateroskleroza yatkınlı ın ve stenoz oranının arttı ı da gösterilmi tir [Rozenberg, 2003]. (Çizelge 2.4.)

Amerikan popülasyonuyla yapılan bir çalı ma sonucunda PONQ192R polimorfizmi için Q alleli (dü ük enzim aktiviteli) bulundurmanın KAH için risk

faktörü olabilece i gösterilmi tir [Sanghera, 1997]. Fransız popülasyonu ile yapılan bir çalı mada da benzer bir sonuç gözlenmi tir [Ruiz, 1995]. Aynı polimorfizm için Japon popülasyonunda R/R genotipi hakimdir ve beyaz ırkdaki Hardy-Weinberg'e uygun olan allel da ılımının bulunmayı ı nedeniyle KAH ile Q192R polimorfizmi arasında istatistiksel bir ili ki kurulamamı tır [Zama, 1997].

Çizelge 2.4. KAH'lı Hastalarla Yapılan PON1 Polimorfizm Ara tırmaları

Hastalık	Ara tırla n Populasy on	Risk Faktörü		Atıf
		PONL 55M	PONQ1 92R	
KAH	Amerika	-	Q alleli	Sanghera, 1997
	Fransa	-	Q alleli	Ruiz, 1995
	Japon	-	Anlamlı li ki yok	Zama, 1997
	Singapur Kökenli Çinli	-	Anlamlı li ki yok	Sanghera, 1997
	Hintli	-	R alleli	Sanghera, 1997,, Pati ve arkadaş ları 1998
	Çin	-	Q alleli	Wang, 2004
	Türk	-	Anlamlı li ki yok	Aynacıo lu, 2000
	Türk	M alleli	Anlamlı li ki yok	Ta kiran, 2009

Singapur kökenli Çinliler ve Hint Asyalıların çalı ıldı ı ara tırmada Hintli KAH hastalarında R alleli sıklı ı sa lıklı bireylere göre oldukça yüksek bulunmu ve Q192R polimorfizminin popülasyonda KAH için ba ımsız bir risk faktörü olabilece i belirlenmi tir, Çinlilerde böyle bir ili ki gözlenmemi tir [Sanghera, 1997]. Hint popülasyonunda yapılan bir çalı mada Q/R genotipi ve R

allel sıklığının KAH hastalarda sağlıklı bireylere oranla daha yüksek olduğu görülmüştür. Hintli bireylerde KAH için bilinen risk faktörlerinin ve aile geçmihinin genotip sıklığını etkilediği, paraoksonaz polimorfizminin ise lipit oksidasyonunun dışında KAH yatkınlığı üzerine etkili olabileceği bulunmuştur [Pati vd, 1998].

Çin popülasyonunda yapılan bir başka araştırmada Q allelinin (düşük enzim aktiviteli) kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü olabileceği söylenmiştir [Wang, 2004].

Türk popülasyonunda KAH'lı bireylerle yapılan bir araştırmada R allel sıklığının hasta bireylerde daha yüksek olduğu, ancak genotip ve allel dağınıkları açısından sağlıklı ve hasta bireyler arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığı görülmüştür [Aynacıoğlu, 2000].

Türk popülasyonunda yapılan bir başka çalışmada PONQ192R ve PONL55M polimorfizmleri taranmış, KAH'lı bireylerde PONL55M polimorfizmi için M allel frekansı yüksek iken, PONQ192R polimorfizminde R alleli için farklılık görülmemiştir. Türk popülasyonu için PON1 L55M polimorfizminin KAH gelişiminde risk faktörü olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir [Taşkıran, 2009].

Çocuk hastalarda PON1 polimorfizmi çok az çalışmada rastlanmıştır. Türk popülasyonunda yapılan PON1 polimorfizm çalışmaları birinde Q alleli ve/veya L alleli varlığının çocuklarda FSGS (Fokal Segmental Glomerulo Skleroz) gelişimi için risk faktörü olabileceği belirlenmiştir [Bıyıklı, 2006]. Bir başka çalışmada MPGN'li Türk çocuklar taranmıştır ve PONQ192R için QQ genotipi ile MPGN (Membranoproliferatif Glomerulonefrit) gelişimi arasında önemli bir ilişki olduğu belirlenmiştir [Bilge, 2007]. Brezilya'da ise akut lösemili çocuklar PON1 polimorfizmlerince incelenmiş, akut lösemi ve PON1 polimorfizmleri arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki kurulamamıştır. Daha

önce çocuklarda yapılan PON1 polimorfizm çalışmalarının bir kısmı tabloda gösterilmiştir [Gonçalvez, 2012]. (Çizelge 2.5.)

Çizelge 2.5. Çocuklarla Yapılan PON1 Polimorfizm Araştırmaları

Hastalık	PON1 ile ilgili kişi	Risk Faktörü		Atıf
		PON L55 M	PONQ1 92R	
Fokal Segmental Glomerulo Skleroz (FSGS)	Hiperlipidemia ve nefrotik sendromlarda artan lipid oksidasyonu	L alleli	Q alleli	(Bıyıklı, 2006).
Membranoproliferatif Glomerulonefrit (MPGN)	arteriel hipertans. ve hiperlipidemi görülen böbrek rahatsızlığı	-	QQ genotipi	(Bilge, 2007).

Diyabet: Diyabetik komplikasyonlarda PON1 Q192R, L55M polimorfizmleri ve enzim aktivitesini belirlemek üzere yapılan çalışmada Tip2 diyabette MM ve QQ genotipleri çok sık görülmü ve enzim aktivitesinin ise hasta bireylerde daha düşük olduğu belirlenmiştir [Ergun, 2011]. Diyabetli hastalarla yapılan diğer bir çalışmada ise her iki polimorfizmle hastalık arasında bir ilişki bulunmasına rağmen PONQ192R genotipinin komplikasyon ortaya çıkmasında 3 kat daha etkili olduğu belirlenmiştir ve Q192R polimorfizminin diyabetik komplikasyon riski ile ilişkisinin daha güçlü olduğu bulunmuştur [Altuner, 2010]. (Çizelge 2.6.)

Çizelge 2.6. Diyabetli Hastalarla Yapılan PON1 Polimorfizmi Araştırmaları

Hastalık	Populasyon	Risk Faktörü		Atıf
		PONL 55M	PONQ1 92R	
DİYABET	Türk	M/M	Q/Q	Ergun, 2011
	Çek	M/M	Q/Q	Flekac, 2008
	Avustralya	L/L	Anlamli ki Yok	Kao, 1998
	Mısır	L/L	QQ, QR genotipi	Helaly, 2013

Çek populasyonunda PON1 geni L55M, Q192R polimorfizmlerinin diyabetik anjiyopati ve enzim aktivitesi ile ilişkileri araştırılmış, makroanjyopatili hastalarda daha düşük PON1 enzim aktivitesi ve daha zayıf diyabet kontrolü belirlenmiş, MM ve QQ genotip sıklığının fazla olduğu bulunmuştur [Flekac, 2008].

Oksidatif LDL'nin retinada bulunan kılcal damar epitel hücreleri ve perisitler için toksik etki yarattığı bilinmektedir. Bu nedenle PON1 Q192R ve L55M polimorfizmlerinin TipII diyabetlilerde retinopati patogeneziinde önemli olduğu düşünülmüş ve genotip dağılımları ile allel sıklıkları araştırılmıştır. Q192R polimorfizminin hastalık gelişiminde etkili olmadığı ancak LL genotipinin hastalıkla ilişkili olduğu ve L allel sıklığının hasta bireylerde yüksek bulunduğu bildirilmiştir [Kao, 1998].

Mısırlı populasyonda TipII diyabet hastaları ile yapılan çalışmada PONL55M için L/L genotipi ve PONQ192R için Q/R ve Q/Q genotipleri risk faktörü olarak bulunmuştur [Helaly, 2013].

İskemik felç: PONL55M, PONQ192R ve PONT107C polimorfizmlerinin ve 3 farklı PON1 enzim aktivitesinin (diazoksonaz, paraoksonaz, arilesteraz) iskemik felç ile ilişkisi araştırılmış, iskemik felç için risk faktörü olarak diazoksonaz aktivitesi ilk kez çalışılmış ve sağlıklı ve hasta bireylerde her üç enzim aktivitesi hemen hemen aynı bulunmuştur. Genotip analizi sonuçlarında her üç polimorfizm için ayrı ayrı anlamlı farklılık gözükmemiş de, aynı anda heterozigot olduğu bireyler için risk faktörü olarak gösterilebileceği düşünülmüştür [Demirdöven, 2009].

Kanser: İtalyan populasyonunda yapılan çalışmada prostat kanserli hastalarda PONL55M polimorfizmi için LM ve MM genotipi, PONQ192R polimorfizmi için QR genotipi risk faktörü olarak görülmüştür [Antognelli, 2005]. (Çizelge 2.7.)

Türk populasyonunda osteosarkomlu hastalar ile yapılan çalışmada, PONL55M polimorfizminin homozigot L/L genotipinin ve PONQ192R polimorfizminin homozigot Q/Q osteosarkom gelişiminde risk faktörü olabileceği bulunmuştur [Ergen, 2010].

Göğüs kanseri hastası kadınlarda L55M polimorfizmi için MM genotipi etkiliyken, Q192R polimorfizmi için ilişki yoktur [Stevens, 2006].

Türk populasyonunda mesane kanseri hastalarıyla yapılan bir çalışmada PON1 L55M bölgesinin MM genotipinin mesane kanseri için risk faktörü olabileceği, LM genotipli bireylerin ise mesane kanseri yatkınlığını gösterebileceği gösterilmiştir. PONQ192R için ise homozigot R/R genotipinin yalnızca hasta bireylerde görülmesi, her iki allelin R olması durumunda bireylerde hastalık riski olabileceğini düşündürmektedir (Koç, 2012)

Çizelge 2.7. Kanser Hastalarında PON Polimorfizm Araştırmaları

Hastalık	Populasyon	Risk Faktörü		Atıf
		PONL55M	PONQ192R	
Prostat	İtalya	LM, MM genotipi	QR genotipi	Antognelli 2005
Aterosarkom	Türk	LL genotipi	QQ genotipi	Ergen, 2010
Göğüs Kanseri	Amerika	MM genotipi	Yok	Stevens, 2006
Mesane Kanseri	Türk	M alleli	Yok	Koç, 2012

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Kliniğinde mevcut takip edilen gönüllü 88 orak hücre anemili hasta bireyin kanlarından elde edilen DNA'ları kullanılmıştır. Tez çalışmasına, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 20 Aralık 2012 tarih ve 2012/401 sayılı etik kurul kararı ile belirtilen ve "etik açıdan uygun" olarak değerlendirilmesi sonucu başlanmıştır. Kararın kopyası ekte sunulmuştur. (Ek-1)

3.1. KAN ÖRNEKLERİNDEN DNA İZOLASYONU ve DNA ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI

Hastalara ait kan örnekleri hastaların başvuru zamanlarındaki demir eksikliği nedeniyle farklı zamanlarda demir eksiklik sayılarda gerçekleştirilmiştir. Örnekler 5 ml'lik EDTA'lı tüplerde toplanmıştır. Soğuk köpük kutu içinde Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne ait Hemoglobinopati laboratuvarına taşınmıştır. DNA izolasyonu yapılmaya kadar 4°C saklanmıştır.

DNA izolasyonları High Pure PCR Template Preparation Kit-ROCHE (Cat. No. 11 796 828 001) kullanılarak yapılmıştır. Kit içerisinde bulunan el kitabındaki protokol takip edilerek kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır (Ek-6).

Çalışmada hasta bireylerden elde edilen genomik DNA'ların miktarı Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi Kök Hücre Hazırlık Laboratuvarı'nda NanoQ Mikrovolum Spektrofotometre ile belirlenmiş, DNA kalitesi etidyum bromit ile boyanmış agaroz jelde incelenmiştir. (Ek-7)

3.2 TaqMan SNP TANIMLAMA YÖNTEM

DNA polimorfizmleri ve SNP tanımlamada son yıllarda TaqMan SNP Tanımlama Yöntemi yaygın ve güvenilir bir şekilde kullanılmaktadır. TaqMan testi (5' Nükleaz Testi) PCR yöntemi ve floresan işaretli problarla çalışmaktadır. [McGuigan, 2002]

Polimorfizmdeki nükleotit değişimleri VIC ve FAM boyalı problar ile analiz edilmiştir. PON L55M için VIC floresan boyalı prob A nükleotidini, FAM boyalı prob T nükleotidini işaretlemektedir. Her iki allel A nükleotid içeriyorsa yani birey polimorfizm için homozigot özellik gösteriyorsa yalnızca VIC boya ile işaretlenecektir. Eğer her iki allel T nükleotidi içeriyorsa FAM boya ile işaretlenecek ve birey yine homozigot olarak değerlendirilmiştir. Allellerden biri A diğeri T nükleotidi bulunduruyorsa her iki boya ile işaretlenecektir. Bu nedenle bireyler heterozigot olarak değerlendirilmiştir.

PON1 Q192R polimorfizminde A/G nükleotidleri değişimi söz konusudur. Tasarlanan assay mix içerisindeki problar A ve G nükleotidlerini işaretlemektedir. PON Q192R için G nükleotidi VIC, A nükleotidi FAM boyası ile işaretlenmiştir. Değerlendirme buna göre yapılmıştır.

PON1 polimorfizminin genotip analizleri Çizelge 3.1.'de belirtilen TaqMan SNP Tanımlama (Applied Biosystems, Foster City) kiti kullanılarak, ViiA™7 Real-Time PCR System (Applied Biosystem) cihazında yapılmıştır. Cihazın kendi yazılımı ile allelik ayırım analiz edilmiştir. Zelenilen amaçlar aşağıda belirtilmiştir.

Her iki PON1 polimorfizmi için SNP tanımlama analizi hasta bireylerin kan DNA'sı ile Çizelge 3.2.'de verilen emaya göre pipetlenmiştir. Hazırlanan karışım kuyulara çalışılan kuyu sayısına göre (96 well plakte) 24µl olarak dağıtılmış, üzerine son olarak 1 µl genomik DNA pipetlenmiştir.

Çizelge 3.1. PON1 Polimorfizmlerinin RS ve Assay Numaraları

PON1 Polimorfizmleri	RS Numaraları	Assay Numaraları
PONL55M (A/T)	rs854560	C_2259750_20
PONQ192R (A/G)	rs662	C_32339722_10

[SNP numaraları rs854560 ve rs662, NCBI Database Entrez SNP'de kayıt numarası olarak kullanılmaktadır.]

Çizelge 3.2. TaqMan Testi PCR Karışımının Hazırlanmasında Kullanılan Miktarlar

Reaksiyon içeriği	Hacim/kuyucuk (96 well plate) (25 µl Reaksiyon hacmi)
2x TaqMan Universal PCR Master Mix II (Applied Biosystem)	12,5
20x TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay Mix	1,25
dH ₂ O	10,25
Toplam	24

Deney Protokolü

1. Çizelgede tek reaksiyon için belirtilen karışım çalışılacak örnek sayısına uyumlu olarak hazırlanır. (24 µl x örnek sayısı+2)
2. Karışımın hazırlanmasının ardından her kuyuya 24 µl olacak şekilde dağıtılır.
3. Kuyulara 1'er µl DNA örneği eklenir.
4. Plate adesif film ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde, filmi üst yüzeyi ve plate'in alt yüzeyine temas edilmeden kapatılır.

5. Plate santrifüj ile 2 dakika santrifüj edilir.
6. Plate cihaza yerle tirilir ve uygun program ile çalı tırılır (Çizelge 3.3.)

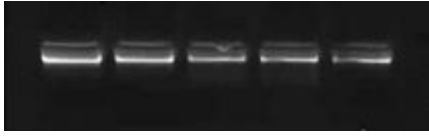
Çizelge 3.3. PON Polimorfizimlerinin Applied Biosystem ViiA7 Real-Time PCR için SNP Tanımlama PCR Programı

Enzim Aktivasyonu	PCR (50 .döngü)	
HOLD	Denature	Uzama
95 °C 10 dk	92 °C 15 sn	60 °C 1dk 30 sn

BULGULAR ve TARTI MA

4.1. ORAK HÜCRE HASTASI ÇOCUKLARIN DNA ÖRNEKLER

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji BD kayıtlı 88 çocuk hastanın kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmı tır. Örneklerdeki DNA konsantrasyonu 15-85 ng/µl arasında ölçülmü tür. Ayrıca DNA bantları agaroz jel elektroforeziyle kontrol edilmi tir. (ekil 4.1.)



ekil 4.1. DNA Bantlarının Görüntüsü

4.2. ORAK HÜCRE HASTASI ÇOCUKLARIN PON1 POL MORF ZM SONUÇLARI

4.2.1. Orak Hücre Hastası Çocukların İlk A rılı Kriz Ya 1, A rılı Kriz Sıklı 1, Akut Gö üs Sendromu ve Cinsiyete Göre Da ılımı

Ara tırma grubu 35 (%39,8)'i kız, 53 (%60,2)'ü erkek olmak üzere toplam 88 OHH'li çocuktan oluşmaktadır. 87 hastanın tanısı ilk a rılı krizin ardından konulmu tur. Bu hastalar içinde 1 ya ve öncesinde tanı koyulmu 55 (%62,5) birey varken, 32 (%36,4) bireye 1 ya ından sonra tanı konulmu tur. Gruba dahil 1 çocu a OHH tanısı prenatal amniyosentez testi ile belirlenmi tir.

Çalı ma ba langıcından itibaren 88 OHH'li çocu un 87'sine ait a rılı kriz bilgileri takip edilerek a rılı kriz sıklı ı belirlenmi tir. (Çizelge 4.1.) Bir çocu un a rılı kriz bilgisine ula ılamamı tır. Hastalardan 31'inde (%35,2) yıl içinde a rılı kriz görülmezken, 56'sında (%63,6) a rılı kriz gözlenmi tir.

Ara tırma populasyonu içinde Akut Gö üs Sendromu 22 OHH'li çocukta görülürken, 64'ünde görülmemi tir. ki çocu un ise AGS bilgisine ula ılamamı tır. Beutler, 1998 de belirtildi i üzere OHH bireylerin % 30'unda akut gö üs sendromu görülmesi bizim çalı ma populasyonumuzca da desteklenmi tir.

Çizelge 4.1. OHH'lı Çocukların Da ılımı

Veriler	Sayı	
İlk Kriz Ya ı	1 Ya	55 (62,5)
	1 Ya <	32 (36,4)
Kriz sıklı ı*	Yok	31 (35,2)
	Var	56 (63,6)
Akut Gö üs Sendromu	Geçirmeyen	64 (72,7)
	Geçiren	22 (25,0)
PONL55M	L/L	33 (37,5)
	L/M	46 (52,3)
	M/M	9 (10,2)
PONQ192R	Q/Q	36 (40,9)
	Q/R	43 (48,9)
	R/R	9 (10,2)
Allozim**	A	36 (40,9)
	B	52 (59,1)
Cinsiyet	Kız	35 (39,8)
	Erkek	53 (60,2)

* kriz sıklı ı çalı ma süresini kapsayan son 1 yılı nitelemektedir.

** Humbert, 1993'e göre enzim aktivitesinin ikili sınıflandırılması

4.2.2. OHH'lı Çocuklarda PON1 SNP Tanımlama Sonuçları

Ara tırma grubunda bulunan tüm OHH'li bireylerin DNA örnekleride PON1 polimorfizmleri olan PONL55M ve PONQ192R için tasarlanmı TaqMan SNP Tanımlama kitleri kullanılarak SNP tanımlama yapılmı tır. Her bir PON1 polimorfizminin SNP genotipleme sonuçları, OHH'li çocukların ilk kriz ya ı, kriz sıklı ı, AGS ve cinsiyete göre istatistiksel analizlerle de erlendirilmi tir. Kar ıla tırılmalar için tablo altında verilen yüzde oranına göre %20'den büyükse Likelihood ratio ki-kare de erine ait, %20'den küçükse Pearson ki-kare testine ait anlamlı de er kullanılmı tır. statistik anlamlılık olarak $p < 0.05$ alınmı tır.

4.2.2.1. PONL55M Polimorfizmi Tanımlama Sonuçları ile OHH'li Çocukların İlk Kriz Yaşı, Kriz Sıklığı, Akut Göğüs Sendromu ve Cinsiyete Göre Değerlendirilmesi

OHH'li çocukların PONL55M polimorfizmi SNP sonuçlarına bakıldığında L/L yabancıl 33 (%37,5), L/M heterozigot 46 (%52,0) ve M/M mutant 9 (%10,2) birey olduğu görülmektedir. (Çizelge 4.2.) L allel frekansı %64 iken M allel frekansı %36'dır.

Orak Hücre Hastası çocuklarda ilk kriz yaşı ile PONL55M polimorfizmi incelendiğinde hastaların L/L genotipli çocuklardan 19'u 1 yaş ve öncesi grupta, 14'ü ise 1 yaşından sonra kriz geçirenler grubunda yer almaktadır. L/M genotipli çocuklarda 1 yaş ve öncesinde ilk kriz 30 bireyde gözlenmiştir, 15 birey ise 1 yaşından sonra ilk krizi geçirmiştir. M/M genotipli bireylerde ise 6 kişi 1 yaş ve öncesinde kriz grubuna dahilken, 3 birey 1 yaşından sonra ilk krizini yaşamıştır. Yapılan ki-kare testi sonucuna göre Pearson Chi-Square anlamlı değildir. Buna göre iki de iken arasındaki ilişkinin anlamlı olmadığı kanaatine varılmıştır (0,695).

Araştırma grubunda OHH'li çocuklarda bir yıllık çalışma dönemi içerisinde geçirilen kriz sıklığı ve PONL55M polimorfizmi dağılımı karşılaştırıldığında, L/L genotipli 13 bireyde kriz olmazken 19'unda en az 1 kez kriz gözlenmiştir. L/M genotipi için 15 krizsiz, 31 bireyde kriz gözlenmiştir. M/M genotipinde ise 3 kriz geçirmeyen, 6 kriz geçirmiş birey bulunmaktadır. Statistiksiz analiz sonucunda PONL55M ile son yıl içinde geçirilen kriz sayısı arasındaki Pearson Chi-Square testine göre iki de iken arasındaki ilişkinin anlamlı olmadığı kanaatine varılmıştır. (0,759)

Akut göğüs sendromu geçiren 22 OHH'li bireyin 9'u L/L, 11'i L/M ve 2'si M/M genotipindedir. Kriz geçirmeyen 64 bireyin dağılımı ise 22 L/L, 35 M/L ve 7 M/M olarak bulunmuştur. Statistiksiz analiz sonucunda iki kategori arasında Pearson Chi-Square testine göre anlamlı bir ilişki bulunmadığı gözlenmiştir (0,854). (Çizelge 4.2.)

Ara tırma grubunun PONL55M polimorfizmi ile cinsiyet dağılımı incelendi inde L/L genotipi için OHH'li kız çocuk sayısı 8 iken erkek çocuk sayısı 25'tir. L/M genotipli 21 kız ve 25 erkek, M/M genotipi ise kızlarda 6 erkeklerde 3 olarak gözlenmiştir. PONL55M polimorfizmi ve cinsiyet dağılımı arasındaki ilişkinin anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır (0,035).

Çizelge 4.2. OHH'li Çocuklarda PONL55M Polimorfizmi Sonuçları

PONL55M		L/L		L/M		M/M		P
		Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	
İlk Kriz Yaşı	1 Ya	19	57,6	30	66,7	6	66,7	0,695
	1 Ya <	14	42,4	15	33,3	3	33,3	
Kriz Sıklığı*	Yok	13	40,6	15	32,6	3	33,3	0,759
	Var	19	59,4	31	67,4	6	66,7	
Akut Göçüş Send.	Geçirmeyen	22	71,0	35	76,1	7	77,8	0,854
	Geçiren	9	29,0	11	23,9	2	22,2	
Cinsiyet	Kız	8	24,2	21	45,7	6	66,7	0,035
	Erkek	25	75,8	25	54,3	3	33,3	

* kriz sıklığı çalışmaya süresini kapsayan son 1 yılı nitelendirilmiştir.

Türkiye'de PON1 polimorfizmlerinin ilk taraması Aynacıoğlu tarafından 381 birey ile gerçekleştirilmiştir. Ara tırma sonucunda PONL55M polimorfizmi için popülasyondaki genotip dağılımı L/L % 52, L/M %39, M/M %9 olarak gözlenmiştir [Aynacıoğlu, 1999]. Bu çalışmada popülasyonunda L/L yabancıl genotipinin yaygın olduğu gözlenmiştir. OHH'li çocuk popülasyonunda da yaptığımız ara tırma da ise heterozigot (L/M) genotip daha sık görülmüştür.

Literatürde PON1 polimorfizmlerinin Türkiye ve dünya popülasyonunda yapılmış çalışmalardan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3.'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.3. PONL55M Polimorfizmlerinin Hastalıklarla İlişkisi

PONL55M							
HASTALIK	POPULASYON	Risk Faktörü	ALLEL/GENOT P DA İLİMİ (%)			ATIF	
K A H	Japon	Anlamlı	Hasta	LL	LM	MM	[Zama, 1997]
		Yok	Kont	86,6	13,3	0	
	Türk	M	Hasta	L 70	M 30		[Ta kran , 2009]
			Kont	L 80	M 20		
	Türk	L	Hasta	LL	LM	MM	[A açhan, 2005]
			Kont	54,1	42	3,9	
FSGS	Türk	L	Hasta	L 86	M 14	[Bıyıklı, 2006]	
			Kont	L 65	M 35		
D Y A B E T	İngiliz	Anlamlı	Hasta	LL	LM	MM	Mackness, 1998
		Yok	Kont	46	42	12	
	Çek	M/M	TipI	LL	LM	MM	[Flekac, 2008]
			TipII	27	50	23	
			Kont	34	48	18	
	Avustralya	L/L	X*	QQ	QR	RR	[Kao, 1998]
			Y**	50	46	4	
	Mısır	L/L	Hasta	LL	LM	MM	[Helaly, 2013]
			Kont	50	39	11	
	Türk	M/M	Hasta	LL	LM	MM	[Ergün, 2010]
Kont			21	26	53		
SKEM K FELÇ	Türk	L/M	Hasta	LL	LM	MM	[Demirdö en, 2009]
			Kont	47,7	39,5	12,2	
			Kont	42	40	18	

Çizelge 4.3. PONL55M Polimorfizmlerinin Hastalıklarla İlişkisi (devamı)

HASTALIK	POPULASYON	Risk Faktörü	ALLEL/GENOTİP DAĞILIMI (%)			ATIF	
SEDEF HASTALISI	İran	M/M	Hasta	LL	LM	MM	[Asefi, 2012]
				37	48	15	
			Kont	LL	LM	MM	
				47	48	5	

* Retinopati var; ** Retinopati yok

PON1 gen polimorfizmleri PON1 enzim aktivitesi üzerine etkili olduğu ve çeşitli hastalıklarla ilişkili kılınmış oldukları, özellikle koroner arter hastalığı (KAH)'nda etkili olduğu araştırmalarla gösterilmiştir. Tağıran'ın yaptığı olduğu araştırmada Türk popülasyonunda KAH'a yatkınlık ve PONL55M polimorfizmi ilişkisi incelenmiş ve M alleli bulundurmamak KAH için risk faktörü olarak bulunmuştur (0,017). Çalışmada allel dağılımları 120 bireylik hasta popülasyonu için L/L %46,7, L/M %46,7 ve M/M %6,7 olarak gözlenmiştir. Kontrol grubu 102 bireyden oluşmaktadır ve L/L %65,7, L/M %29,4 ve M/M %4,9'dur. Kontrol grubunda %20 olan M allel frekansı, hasta grubunda %30'dur [Tağıran 2009]. OHH'li çocukları KAH'a yatkınlığına sebep olan M alleleline göre incelediğimizde allel frekans %36,4 olarak gözlenmiştir. PONL55M polimorfizminin M allelinin OHH'li hastalarda KAH için risk faktörü olabileceğini düşündürmektedir.

Bir başka çalışmada TipII diyabet hastalarının KAH'a yatkınlığı araştırılmış ve 205 hastanın genotip dağılımı L/L %54,1, L/M %42, L/L %3,9 bulunmuştur. Kontrol grubu 109 bireyden oluşmaktadır ve dağılımı L/L %46,8, L/M %46,8, L/L %6,4'dür. Araştırma sonucunda L allelinin TipII diyabet hastalarında KAH gelişiminde risk faktörü olduğu belirlenmiştir [Açıkan, 2005].

Avrupa popülasyonunda PONL55M ile KAH arasındaki ilişki 252 TipII diyabetli hasta ve 282 sağlıklı birey karşılaştırılarak araştırılmıştır. Ayrıca paraoksonazın endojenik özelliklerine, düşük LDL'ye karşı HDL'nin koruyucu etkisine, HDL'de paraoksonazın ateroskleroz ve yangından koruma özelliğine

bakımı istatistiksel olarak anlamlı derecede ili kilendirilmi tir ($p<0,01$). Hasta populasyonu 209 Avrupa kökenli, 43 Asya kökenli olmak üzere da ılım göstermektedir. Populasyonunda yapılan çalı mada allel da ılımı L/L %33, L/M %47, M/M %20 olarak gözlemlenmi tir ancak istatistiksel olarak anlamlı bir ili ki bulunmamı tır [Mackness, 1987]. Japon populasyonunda da benzer bir çalı ma yapılmı ancak anlamlı bir istatistiksel ili ki bulunmamı tır [Zama, 1997].

PONL55M polimorfizminin KAH dı ında ba ka hastalıklarla ili kisi ara tırılmı tır.

Türkiye’de 171 diyabet hastası ve 80 kontrol bireyinde yapılan ve PON1 polimorfizmlerinin diyabetin sebep oldu u kalp rahatsızlıkları ve renopati gibi hastalıklara yatkınlıklarını inceleyen çalı mada hastalarda genotip da ılımı L/L %20,5, L/M %26,3 ve M/M %53.2, kontrol grubunda ise L/L %20 - L/M %37,5 - M/M %42,5 olarak gözlenmi tir. Genotipteki da ılım farklılı ı istatistiksel anlamlılık göstermemi tir ($p=0,1810$). [Ergün, 2010]. Bu ara tırma populasyonunda OHH’li çocuk populasyonuna göre M/M alleli yüksek frekansa sahiptir, L/L alleli ise daha azdır.

Altuner, 2010 Türk diyabet hastalarında TipI ve TipII diyabet için PONL55M polimorfizmini taramı tır. Ara tırmada PONL55M polimorfizminin populasyondaki allel frekansları L için %63, M için %37 olarak gözlemlenmi tir. Allelik etkinin enzim aktivitesinde L/L>L/M>M/M ekinde yansıdı ını göstermi tir [Altuner, 2010].

Türk iskemik felçli hastalar ile PON1 polimorfizmlerinin üç tanesi birlikte incelenmi tir. 172 bireyden olu an hasta grubu için PONL55M polimorfizmi genotipleri L/L %47,7, L/M %39,5, M/M %12,2 olarak bulunmu tur. Kontrol grubu

105 bireyden oluşmakta ve L/L %41,9, L/M %40,0, M/M %18.1 olarak daılmaktadır. Çalışmada PONL55M verileri arasında hastalıkla yakınlık için istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır (0,3030) [Demirdöken, 2009].

PON1 polimorfizmlerinin kanserle ilişkisi araştırılan çalışmaları çoğunda mutant M alleli bulundurmanın risk faktörü olabileceği gösterilmiştir [Koç, 2011; Stevans, 2006; Antognelli, 2005].

Türk populasyonunda 50 mesane kanseri hastası ile yapılan araştırmada istatistik analiz sonucunda mesane kanserinin gelişiminin PONL55M polimorfizminin farklı genotipleri ile ilişkili olduğu görülmüştür (p=0,0010). M/M genotipi mesane kanserine yakınlık sebebidir. Hasta bireylerde L/L %30, L/M %40 ve M/M %30 olarak gözlenmiştir. 57 bireyden oluşan kontrol grubunda ise L/L %22,8, L/M %66,7 ve M/M %10,5 olduğu görülmüştür [Koç, 2011]. OHH'li populasyonla M/M genotipi bu çalışmanın kontrol grubu karşılaştırıldığında de erlerin yakınlık olduğu gözlenmiştir.

Amerika'da göğüs kanseri hastaları ile yapılan PON1 polimorfizmleri çalışmasında M/M genotipi %57'den yüksek meme kanseri insidansı ve %87'den yüksek invazif meme kanseri insidansı göstermiştir [Stevans, 2006].

Paraoksonazın ekzojenik etkisinin prostat kanserine yakınlığını inceleyen bir di er Avrupa populasyonu ile yapılan araştırmada ise talyanlarda M allelinin risk faktörü olduğu belirlenmiştir [Antognelli, 2005].

Osteosarkomlu hastalarda yakınlığı inceleyen PONL55M polimorfizmi taramasında, 50 hasta birey ve 50 kontrol grubu bireyinden oluşan bir populasyon

incelenmi tir. Ara tırma yüksek enzim aktivitesi ile ili kilendirilmi L/L genotipinin osteosarkom için risk faktörünü oldu unu göstermi tir [Ergen, 2010].

Yeti kin bireylerle çok sayıda PON1 polimorfizmi taraması yapılmı olup çocuk hastalarda PON1 polimorfizm etkilerinin ara tırıldı ı sınırlı sayıda çalı ma oldu u görülmektedir. Çocuk hastalarda ülkemizde Bıyıklı tarafından Fokal Segmental Glomerülo Skleroz (FSGS) hastası 25 çocu un dahil oldu u ara tırmada PONL55M polimorfizmi genotipleri L/L %76, L/M %20 ve M/M %4 olarak bildirmi tir. 30 ki ilik kontrol grubu genotipleri L/L %43, L/M %43 birey, M/M %14 olarak gözlenmi tir. L alleli bulundurma FSGS hastası çocuklar için risk faktörü olarak bulunmu tur [Bıyıklı, 2006]. Çalı manın kontrol grubu OHH'li çocuklar ile kar ılaştırıldı nda mutant allel de erinin oldukça yakın oldu u gözlenmi tir.

Brezilyalı 519 Akut Lenfoid Lösemi (ALL), 107 Akut Miyeloid Lösemi (AML) hastası çocuklarda ve sa lıklı 401 çocukta PONL55M polimorfizmi taramı tır. Hasta çocuklarda genotip L/L %44, L/M %42, M/M %14 olarak gözlenmi tir. Kontrol grubu çocuklarında ise L/L %58, L/M %33, M/M %9'dur. Akut lösemi ve PONL55M arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ili ki gözlenmemi tir [Gonçalves, 2012].

Aynacıo lu, 1999'da Gaziantep yöresinde yaptı ı çalı mada L/L genotipi yüksek bulunmu tur. OHH'li çocuklarda ise L/M genotipine daha sık rastlanmı tır. Bu durum OHH'li çocukların genel da ılımdan farklı enzim aktivitesi gösterdi ini dü ündürmektedir. Altuner, 2010'a göre paraoksonaz aktivitesi genotiplere göre L/L>L/M>M/M olarak sınıflanmaktadır. OHH'li çocuk popülasyonunda orta seviyede enzim aktivitesi beklenmektedir. Ta kıran KAH'lı hastalarda yapmı oldu u ara tırmada M alleli ta ımak KAH için risk faktörü oldu unu belirtmi tir [Ta kıran, 2009]. OHH'li popülasyonda %36,4'lük allel frekansı ile risk grubuna dahil olabilece ini dü ündürmektedir. imdiye kadar yapılan ara tırmalarda KAH için en

yüksek M allel frekansını ve M/M genotipi gösteren çalı ma populasyonu Ergün, 2010'da ara tırılan diyabet populasyonu ve aynı ara tırmanın kontrol grubu vermi tir. Ara tırma populasyonunda M allel frekansı %66,4'tür. Kontrol grubunun da %60 olması bu çalı mayı istatistiksel olarak anlamlı kılmamı tır.

KAH ile ili kilendiren paraoksonaz aktivitesi daha çok enzimin lipit metabolizmasındaki endojenik aktivitesidir. PON1 polimorfizminin enzim aktivitesi ve KAH'a yakınlı ı nasıl etkiledi i tam olarak anla ılamamı tır. Bunun nedenlerinden birisi SNP taraması yapılan polimorfizm çalı malarının sadece bir kısmında enzim aktivitesinin belirlenmi olmasıdır. SNP taraması ve enzim aktivitesinin belirlenmesi dı ında lipit peroksidasyonu ve oksidatif stres göstergesi gibi ba ka parametlerinde taranması PONL55M polimorfizmlerinin etkisini daha iyi anlamamız için gerekli oldu u anla ılmaktadır. Türk populasyonunda TipII diyabetlilerde L allelinin KAH için risk olu turdu u gösterilmi tir [A açhan, 2005]. PON1 enziminin ekzojen substratlara kar ı gösterdi i aktivite ise yabancı madde detoksifikasyonu ile ili kili oldu undan, PON1 polimorfizmlerinin çe itli kanserlerle ili kisinin incelendi i ara tırmalarda farklı sonuçlar elde edilmi tir. Türk populasyonunda PONL55M polimorfizmi yüksek enzim aktivitesi ile ili kili L/L genotipinin [Altuner, 2010] osteosarkoma yakınlık sebebi oldu unu göstermi tir [Ergen, 2010]. Bir di er çalı ma da ise Altuner, 2010'da dü ük enzim aktivitesi ile ili kilendirilmi M/M genotipinin, mesane kanserine yakınlı a sebep oldu u sonucuna varılmı tır [Koç, 2011].

Dünyada PONL55M polimorfizminin çe itli hastalıklarla ili kisinin ara tırıldı ı çalı malardan Avrupa populasyonunda diyabetli hastalarda renopati, nöropati ve diyabetik kardiyak gibi damarsal hastalıklara yakalanmalarında Türk populasyonunda yapılmı çalı malarla uyumlu ekilde M/M alleli risk faktörü olarak görülmü tür [A açhan, 2005; Ergün, 2010; Flekac, 2008]. Avustralya ve Mısır populasyonlarında ise aynı hastalıklar L/L genotipi ile ili kilendirilmi ve L/L risk faktörü olarak gösterilmi tir [Kao, 1998; Helaly, 2013]. Sedef hastalarında ran

populasyonunda yapılmı çalı ma da ise M/M genotipinin risk faktörü oldu u vurgulanmı tır [Asefi, 2012].

4.2.2.2. PONQ192R Polimorfizmi Tanımlama Sonuçları ile OHH'lı Çocukların İlk Kriz Ya ı, Kriz Sıklı ı, Akut Gö üs Sendromu ve Cinsiyete Göre De erlendirilmesi

Yapılan alı ma sonucunda 88 OHH'lı çocuk için PONQ192R polimorfizmi Q/Q 36 (%40,9), Q/R 43 (%48,9), R/R 9 (%10,2) olarak da ılm göstermektedir. (Çizelge 4.4.) Q allel frekansı 65,4 iken, R allel frekansı 34,6'dır.

OHH'lı çocukların PONQ192R polimorfizmi ve ilk krizin görüldü ü dönemler incelendi inde Q/Q genotipli çocuklardan 20'si 1 ya ve öncesi grubuna, 15'i ise 1 ya ndan sonra kriz geçirenler grubuna dahildir. Q/R genotipli çocuklarda 1 ya ve öncesinde kriz 29 bireyde gözlenmi , 14 birey ise 1 ya ndan sonra ilk krizi geçirmi tir. R/R genotipli bireylerde ise 6 ki i 1 ya ve öncesinde kriz grubuna dahilken, 3 birey 1 ya ndan sonra ilk krizini ya amı tır. ki de i ken arasındaki ili kinin anlamlı olmadığı kanaatine varılmı tır. (p=0,628)

Çizelge 4.4. OHH'lı Çocuklarda PONQ192R Polimorfizmi Sonuçları

PONQ192R		Q/Q		Q/R		R/R		P
		Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	
İlk Kriz Ya ı	1 Ya	20	57,1	29	67,4	6	66,7	0,628
	1 Ya <	15	42,9	14	32,6	3	33,3	
Kriz sıklı ı*	Yok	14	38,9	12	27,9	5	62,5	0,149
	Var	22	61,1	31	72,1	3	37,5	
Akut Gö üs Send.	Geçirmeyen	26	74,3	30	69,8	8	100,0	0,198
	Geçiren	9	25,7	13	30,2	0	0	
Cinsiyet	Kız	18	50,0	16	37,2	1	11,1	0,092
	Erkek	18	50,0	27	62,8	8	88,9	

* kriz sıklı ı çalı ma süresini kapsayan son 1 yılı nitelemektedir.

Çalı ma dönemini kapsayan bir yıl içinde hastaların kriz geçirmi li i ve PONQ192R polimorfizmi da ılımına bakıldı nda Q/Q genotipli hastalardan

14'ünde kriz olmazken 22'sinde en az 1 kez kriz gözlenmi tir. Q/R genotipi için 12 birey krizsiz, 31 bireyde ise kriz gözlenmi tir. R/R genotipinde ise 5 kriz geçirmeyen, 3 kriz geçirmi birey bulunmaktadır. istatistiksel analiz sonucunda PONQ192R ile çalı ma süresini kapsayan 1 içinde kriz geçmi i arasındaki ili ki anlamlı bulunmamı tir (0,149).

Akut gö üs sendromu ve PONQ192R polimorfizmi incelendi inde Q/Q genotipli bireylerin 26'sinde görülmezken 9'unda görülmü tür. Q/R için 30 bireyin geçmi inde AGS yoktur, 13 birey ise AGS geçirmi tir. R/R genotipli bireylerden 8'si AGS geçirmemi ken, geçiren gözlenmemi tir. istatistiksel analiz sonucunda iki kategori arasında anlamlı bir ili ki bulunmadı ı gözlenmi tir (0,198).

Ara tırma grubunun PONQ192R polimorfizminde cinsiyet da ılımı incelendi inde Q/Q genotipi için OHH'li kız çocuk ve erkek çocuk sayısı e it olup 18'dir. Q/R genotipli 29 kız ve 14 erkek, R/R genotipi ise kızlarda 1 erkeklerde 8 olarak gözlenmi tir. PONQ192R polimorfizmi ve cinsiyet da ılımı arasındaki ili kinin anlamlı olmadı ı sonucuna varılmı tir (0,092).

Aynacıo lu'nun daha önce belirtilen PONL55M için yapılan populasyon taramasını aynı populasyonla PONQ192R polimorfizmi için de gerçekte tirmi tir. Populasyon taraması niteli i ta ıyan bu çalı ma göstermi tir ki; PONQ192R polimorfizmi Q/Q %49,1, Q/R %40,2, R/R % 10,8 olarak da ılımını göstermektedir. Taranan populasyonun yakla ık %50'sinde Q/Q genotipi görülmektedir [Aynacıo lu 1999]. OHH'li çocuk populasyonunda ise populasyonun yakla ık yarısı heterozigot özelliktedir. Aynacıo lu 2000'de yaptı ı çalı masında, KAH hastalarının PONQ192R polimorfizmi taranmı ve hastalarda Q/R genotipinin yüksek sıklıkta oldu unu göstermi tir. Çalı maya kontrol grubu olarak Aynacıo lu, 1999 referans olmu tur. KAH'lı hastalarda allel frekansı Q/Q % 36,5, Q/R % 52 ve R/R %11,5 olarak gözlenmi tir [Aynacıo lu, 2000].

PONQ192R polimorfizminin çe itli hastalıklarla ili kisinin incelendi i Türk ve dünya populasyon çalı maları tablola tırılmı tır. (Çizelge 4.5.)

Çizelge 4.5. PONQ192R Polimorfizmlerinin Hastalıklarla li kisi

PONQ192R					
	POPULASYON	Risk Faktörü	ALLEL/GENOT P DA ILIMI (%)		ATIF
K A H	Fransız	R			[Ruiz, 1995]
	Japon	R	Hasta Q 26 R 74 Kont Q 41 R 59		[Zama, 1997]
	Singapur Kökenli Çinli	Anlamli ki Yok	Hasta Q 41 R 59 Kont Q 42 R 58		[Sanghera, 1997]
	Hintli	R	Hasta Q 57 R 43 Kont Q 67 R 33		[Sanghera, 1997, Pati vd., 1998]
	Çinli	Anlamli ki Yok	Hasta Q 41 R 59 Kont Q 42 R 58		[Sanghera, 1997]
	Çinli	Q			[Wang, 2004]
	Türk	Anlamli ki Yok	Hasta Q 62 R 38 Kont: Q 70 R 30		[Aynacio lu , 2000]
	Türk	Anlamli ki Yok	Hasta Q 75,8 R 24 Kont Q 80 R 20		[Ta kiran, 2009]
	Türk	Anlamli ki Yok	Hasta QQ 43,3 QR 41,1 RR 10,6 Kont QQ 33,6 QR 57 RR 9,3		[A açhan, 2005]
	ngiliz	Anlamli ki Yok	Hasta Q 71,4 R 28,6 Kont Q - R -		[Lawlor, 2004]
F S G S	Türk	R	Hasta Q 68 R 32 Kont Q 83 R 17		[Bıyıklı, 2006]

Çizelge 4.5. PONQ192R Polimorfizmlerinin Hastalıklarla İlişkisi (devamı)

	POPULASYON	Risk Faktörü	ALLEL/GENOTİP DAĞILIMI (%)			ATIF	
M P G N	Türk	Q/Q	Hasta	QQ	QR	RR	[Bilge, 2007]
			Kont	61	22	17	
D Y A B E T	Çek	Q/Q	TipI	QQ	QR	RR	[Flekac, 2008]
			TipII	65	31	4	
S K E M K FEL Ç	Avustralya	Anlamlı İlişki Yok	X*	QQ	QR	RR	[Kao, 1998]
			Y**	44	32	24	
S K E M K FEL Ç	Mısır	Q	Hasta	Q 64	R 36	[Helaly, 2013]	
			Kont	Q 68	R 32		
S K E M K FEL Ç	Türk	Q/Q	Hasta	QQ	QR	RR	[Ergün, 2010]
			Kont	53	29	18	
S K E M K FEL Ç	Türk	Q/R (T/C ve L/M ile birlikte)	Hasta	QQ	QR	RR	[Demirdö en, 2009]
			Kont	45	43	12	
S K E M K FEL Ç	Türk	Q/R (T/C ve L/M ile birlikte)	Hasta	QQ	QR	RR	[Demirdö en, 2009]
			Kont	44	48	8	

* Retinopati var; ** Retinopati yok

Türk popülasyonunda 120 KAH'lı hasta ve 102 kontrol grubu bireyinin PON1 polimorfizmlerini taraması, PONQ192R ve KAH'a yakınlık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0,445). Hasta popülasyonda Q/Q %55,8, Q/R %40, R/R %4,2, kontrol grubunda Q/Q 62,8, Q/R 35,3, R/R %2 olarak bulunmuştur [Ta kiran, 2009].

PONQ192R polimorfizmi, TipII diyabet hastalarında KAH'a yakınlığı incelemek için araştırılmıştır. Türk popülasyonunda yapılan bu araştırmaya göre

TipII diyabetlilerde PONQ192R polimorfizmi KAH için risk faktörü de ildir ($p>0,05$). Ara tırmaya 207 TipII diyabet hastası ve 107 sa lıklı birey katılmı tır. Genotipleri hasta grubu için Q/Q %43,3, Q/R %41,1, R/R %10,6 iken, kontrol grubu için ise Q/Q %33,6, Q/R %57 ve R/R %9,3'dür [A açhan, 2005].

ngiltere'de 223 KAH'lı hasta, 247 sa lıklı bireyin PONQ192R polimorfizmleri taramı ve Q allelinin kontrol grubunda daha sık görüldü ü istatistiksel olarak anlamlı bulunmu tur ($p<0,01$). Allel frekansı KAH'lı grupta Q %56, R %44 bulunmu , kontrol grubu ise Q %69, R %31 olarak gözlenmi tir. Q allel varlı ı KAH için koruyucu olarak yorumlanmı tır [Serrato, 1995].

ngiltere'de yapılan bir ara tırmada PON1 polimorfizmlerinin dü ük LDL'ye kar ı HDL'nin koruyuculu una etkisini konu almı tır. Çalı mada 36 sa lıklı birey taranmı , HDL'nin ateroskleroz ve yangıdan koruma özelli i istatistiksel olarak anlamlı bulunmu tur ($p<0,005$). Allel da ılımı Q/Q %39, Q/R %47, R/R %14 olarak gözlemlenmi tir [Mackness, 1987].

ngiltere'de yapılan bir ba ka çalı mada, 252 diyabet hastası (43'ü Asya kökenli grubun geri kalanı Avrupa kökenli) ve 282 sa lıklı kontrol bireyinin PONQ192R polimorfizmi taranmı tır. PON polimorfizmleri ve aktivite farklılıklarının istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) oldu u bu çalı mada hasta ve kontrol gruplarının ikisinde de R/R genotipine sahip bireylerde yüksek aktivite gözlenirken, en dü ük aktivite Q/Q genotipli bireylerde gözlenmi tir. Çalı ma kontrol grubu Q/Q %56, Q/R %35, R/R %9 olarak bulunmu tur. Q/Q allel sıklı ı fazla olarak gözlenmi , dü ük enzim aktivitesine sahip oldukları belirtilmi tir [Mackness, 1998]. Bu verilere göre OHH'li çocuk populasyonunda enzim aktivitesi genel olarak orta seviye de olmakla beraber, yüksek aktiviteye sahip birey sıklı ı oldukça azdır.

PONQ192R polimorfizmini İngiltere’de 4286 kadın KAH’lı hastada tarama anlamlı bir istatistiksel ilişki kurulamamıştır ($p=0,48$). Genotip dağılımları Q/Q %51,1, Q/R %40,6, R/R %8,3’dür [Lawlor, 2004]. Populasyonun dağılımı Aynacıo lu’nun populasyon taramasına yakınlık gösterirken, OHH’li çocuk populasyonundan farklıdır.

Türk 171 diyabet hastası ve 80 sağlıklı birey ile yapılan bir diler ara tırmada PONQ192R polimorfizminin hastalığa yakınlık arasında istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır. Hasta populasyonunun %53,3 Q/Q, %29,2’si Q/R, %17,5’i R/R’dir. Kontrol grubu ise %47,5 Q/Q, %38,8 Q/R, %13,7 R/R olarak dağılım göstermektedir [Ergün, 2010]. Hasta grubunda ve kontrol grubunda Q/Q genotipi yüksektir. OHH’li populasyonda ise populasyonun yaklaşık %50’si Q/R genotipindedir.

Türk populasyonunda diyabet hastalarıyla yapılan bir ara tırmada PONQ192R polimorfizmi 100 TipII diyabet hastası ve 50 sağlıklı bireyde taramıştır. Populasyondaki frekansları Q için %86, R için %14 olarak gözlenmiştir. Allelik etkinin enzim aktivitesinde R/R>Q/R>Q/Q ekinde yansıdığını göstermiştir [Altuner, 2010]. OHH’li çocuklarda Q allel frekansı daha düşük bulunmuştur, yüksek aktiviteli R/R alleli %10,5 gözlenmiştir.

Çek populasyonunda 86 TipI, 246 TipII diyabet hastası Flekac, 2007’de PONQ192R polimorfizmlerini taramıştır ve R/R genotipinin diyabette mikroanjyopatiyi korumada Q/Q’ya göre daha etkili olduğunu vurgulamıştır. TipI hasta genotipleri Q/Q %65 - Q/R %31 - R/R %4, TipII hasta genotipleri Q/Q %72- Q/R %26 - R/R %2 olarak gözlenmiştir. Çalı manın kontrol grubu %29 Q/Q, %49 Q/R, %22 R/R olarak dağılım göstermiştir [Flekac, 2007].

Ülkemizde PONQ192R polimorfizm etkilerinin araştırıldı ı çocuk Membrano Proliferatif Glomerulo Nefrit (MPGN) hastalarında genotip dağılımı Q/Q %61,1, Q/R %22,3, R/R %16,6 olarak bulunmu tur. Kontrol grubu Q/Q %15,1, Q/R %35,8, R/R %49,1 olarak bulunmu tur. Hasta popülasyonunda Q/Q genotipi risk faktörü olarak gösterilmi tir ($p<0,01$) [Bilge, 2005].

Daha önce PONL55M polimorfizm araştırması yapılan FSGS hastası çocuklarda PONQ192R polimorfizmi de taranmı tir. Genotip dağılımı Q/Q %48, Q/R %40, R/R %12 olarak bulunmu tur. Kontrol grubu tarama sonuçları ise Q/Q %73, Q/R %20, R/R %7'dir. İki veri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmu , R allelinin FSGS risk faktörü olduğu belirlenmi tir [Bıyıklı, 2006]. Brezilya popülasyonunda ise akut lösemi hastası 1027 çocukla PONQ192R polimorfizmi bakımından anlamlı istatistiksel ilişkinin olmadığı görülmü tür ($p>0,05$) [Gonçavez 2012].

Aynacıo lu Q/Q genotipi popülasyonda yaygın olduğunu bulmu tur [Aynacıo lu, 1999]. Altuner ise Q/Q genotipinin düşük enzim aktivitesi ile sonuçlandırılmı göstermi tir [Altuner, 2010]. Türk popülasyonu çalışmalarında R allelinin FSGS [Bıyıklı, 2006], Q/Q genotipinin ise MPGN hastalarında yatkinlik sebebi olduğunu görülmü tür [Bilge, 2007]. Türk popülasyonunda yapılmı farklı çalışmalarda KAH ile PONQ192R polimorfizmi arasında anlamlı ilişki bulunmamı tir [Açıhan, 2005; Aynacıo lu 2000; Ta kiran, 2009]. Buna karşın diyabet hastaları ile yapılmı ara tırmada Q/Q genotipinin diyabette lipit metabolizması kaynaklı diyabetik kardiyak, renopati ve nöropati ile istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermi tir [Ergün, 2010].

Q/Q genotipindeki bireylerde düşük aktivite, R/R yüksek aktivite göstermektedir [Mackness, 1998; Altuner, 2000]. KAH için Hint, Japon ve Fransız popülasyonunda yapılmı çalışmalar R allelinin risk faktörü olduğunu gösterirken, Çin popülasyonunda Q'nun risk faktörü olduğu gözlenmi tir [Wang, 2004]. Diyabetli bireylerde Avustralya ve Mısır popülasyonlarında Q alleli anlamlı oranda yükseklik

gösterilmi ve renopati, mikroanjiyopati gibi çe itli damarsal hastalıklara yatkınlık sa ladı ı belirlenmi tir [Kao, 1998; Helaly, 2013]. Ekzojenik etki ile oksidatif stres ve kanseri ara tıran çalı malar sonucunda talyan populasyonunda Q/R genotipinin prostat kanseri için risk faktörü oldu u [Agnotelli, 2005], Türk populasyonunda ise Q/Q gentipinin osterosarkom için risk olu turdu u belirlenirken [Ergen, 2010], mesane kanseri için anlamlı bir istatistiksel ili ki görülmemi tir [Koç, 2011].

OHH'lı Çocukların Polimorfizmi PON Allozimlerine Göre İlk Kriz Ya ı, Kriz Sıklı ı, Akut Gö üs Sendromu ve Cinsiyete Göre De erlendirilmesi

Humbert, 1993'te 192. pozisyonda Q (glutamat) içeren bireylerin serum paraoksonaz enzim aktiviteleri R (arjinin) içeren bireyelerinkine göre daha dü ük bulunmu tur. R içerenler yüksek aktiviteli paraoksonaza sahipken Q polimorfizmi ta ıyanlar dü ük aktiviteli paraoksonaz bulundurmaktadır. Bu polimorfizm, substrat olarak paraokson kullanıldı ında 192. pozisyon PONQ192R polimorfizmi için dü ük aktivite göstereni A alloenzimi yüksek aktivite göstereni B alloenzimi tanımlamı tir. Q/Q dü ük aktiviteli, R/R ve Q/R ise yüksek aktivitelidir.

PONQ192R polimorfizmleri Humbert'in 1993'te aktivite farkına göre iki gruba ayırdı ımızda, Q/Q'yu içeren dü ük aktiviteli A grubu 36 (%40,9) birey, Q/R e R/R'yi içeren yüksek aktiviteli B grubu 52 (5%9,1) birey içerir.

A ve B allozimleri ilk krizin görüldü ü dönemlerle incelendi inde A grubundaki çocuklardan 20'si 1 ya ve öncesi grubuna, 15'ü ise 1 ya ından sonra kriz geçirenler grubuna dahildir. B grubundaki çocuklarda 1 ya ve öncesinde kriz 35 bireyde gözlenmi , 17 birey ise 1 ya ından sonra ilk krizi geçirmi tir. ki de i ken arasındaki ili kinin anlamlı olmadığı kanaatine varılmı tir (0,335). (izelge 4.6.)

Çalı ma dönemini kapsayan bir yıl içinde hastanın kriz geçirmi likleri allozimlere göre incelendi inde A grubuna dahil hastalardan 14'ünde kriz olmazken 22'sinde en az 1 kez kriz gözlenmi tir. B grubu için 17 katılımcı krizsiz, 34

katılımcıda kriz gözlenmi tir. ki kategori arasındaki ili ki anlamlı bulunmamı tır (0,594).

Çizelge 4.6. OHH'lı Çocuklarda PONQ192R Polimorfizmi A ve B Allozimlerine Göre Sınıflandırılması

PONL192M		A (Q/Q)		B (Q/R - R/R)		P
		Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	
İlk Kriz Ya 1	1 Ya	20	57,1	35	67,3	0,335
	1 Ya <	15	42,9	17	32,7	
Kriz sıklı 1*	Yok	14	38,9	17	33,3	0,594
	Var	22	61,1	34	66,7	
Akut Gö üs Send.	Geçirmeyen	26	74,3	38	74,5	0,981
	Geçiren	9	25,7	13	25,5	
Cinsiyet	Kız	18	50,0	17	32,7	0,103
	Erkek	18	50,0	35	67,3	

* kriz sıklı 1 çalı ma süresini kapsayan son 1 yılı nitelemektedir.

Akut gö üs sendromu allozimlere göre incelendi inde A grubu bireylerinin 26'sinde görülmezken 9'unda görülmü tür. B grubu için 38 bireyin geçmi inde AGS yoktur, 13 birey ise AGS geçirmi tir. ki kategori arasında anlamlı bir ili ki bulunmadı ı gözlenmi tir (0,981).

Ara tırma grubu allozimlerine göre cinsiyet da ılımı incelendi inde A grubu için OHH'li kız çocuk sayısı 18 iken erkek çocuk sayısı 18'dir. B grubu 17 kız ve 35 erkek olarak gözlenmi tir. Cinsiyet da ılımı arasındaki ili kinin anlamlı olmadı ı sonucuna varılmı tır (0,103).

4.2.2.3. OHH'li Çocukların PONL55M ve PONQ192R SNP'lerinin Birlikte ncelenmesi

88 birey kendi aralarında polimorfik bölgelerin allellere göre kar ıla tırıldı nda L/L-Q/Q 8, L/L-Q/R 16, L/L-R/R 9 birey, L/M-Q/Q 19, L/M-Q/R 27, L/M-R/R hiç birey bulunmamı olup, M/M bireylerin tümü Q/Q olarak gözlenmi tir. Kategorilerin istatistiksel analizi iki verinin arasındaki ili ki anlamlı

göstermektedir, iki polimorfik bölgede aynı anda mutasyona rastlanmamı tır. (Çizelge 4.5.) Bu sonuç farklı çalı ma verileri ile kar ıla tırıldı nda yine benzer sonuçlar çıkmı tır. (Çizelge 4.7.)

Çizelge 4.7. OHH'lı Çocuklarda PONL55M ve PONQ192R Polimorfizmleri Kar ıla tırılması

		PONL55M			P
		L/L	L/M	M/M	
PONQ192R	Q/Q	8	19	9	<0,001
	Q/R	16	27	0	
	R/R	9	0	0	

Garin 1997'de TipII diyabet hastası Kafkas populasyonunda yapılan çalı mada PONL55M ve PONQ192R polimorfizmleri etkile ini incelenmi , ili ki istatistiksel olarak anlamlı bulunmu tur ($p<0,001$). Genotip da ılımı L/L-Q/Q 45, L/L-Q/R 89, L/L-R/R 57, L/M-Q/Q 87, L/M-Q/R 96, L/M-R/R 4, M/M-Q/Q 57, M/M-Q/R 4, M/M-R/R 0, R/R-Q/Q 30 birey de görülürken M/M-Q/R ve M/M-R/R hiç gözlenmemi tir. OHH'li çocuklarda oldu u gibi bu populasyonda da iki mutant allel aynı anda ta ıyan birey bulunmamaktadır.

Aynacıo lu, 1999 çalı masında yine M/M-R/R birey görülmemi , 4 bireyde M/M-Q/R özelli e rastlanmı tır. Veriler arası ili kinin anlamlı oldu u dü ünülmektedir.

Koç, 2011 tez çalı masında M/M-R/R bireye rastlanmamı , M/M-Q/R ise 1 bireyde görülmü tür. istatistiksel analiz sonucu bu veriler arası ili kinin de anlamlı oldu unu göstermi tir. (Çizelge 4.8.)

PON1 polimorfizmlerinden PONL55M, PONT107C ve PONQ192R birlikte incelemi tir. Üç polimorfizmin de aynı anda heterozigot oldu u iskemik felçli bireylerin kontrol grubuna göre daha dü ük frekansta oldu u istatistiksel olarak anlamlı bulunmu tur ($p=0,019$). Enzim aktivite ölçümleri sonucunda her üç polimorfizm için de genotipsel farklılıkların farklı aktiviteye sahip oldu u gösterilmi tir ($p<0,05$) [Demirdö en, 2009].

Çizelge 4.8. PONL55M ve PONQ192R Literatürdeki Karşılaştırmaları

		PONL55M			ATIF
		L/L	L/M	M/M	
PONQ192R	Q/Q	45	87	57	[Garin, 1997]
	Q/R	89	96	4	
	R/R	57	4	0	
	Q/Q	77	80	30	[Aynacıoğlu, 1999]
	Q/R	82	67	4	
	R/R	41	0	0	
	Q/Q	3	30	20	[Koç, 2011]
	Q/R	21	28	1	
	R/R	4	0	0	

TipI ve TipII diyabetli hastalar da PONL55M ve PONQ192R polimorfizm kombinasyonları Q/Q-M/M ve R/R-L/L karşılaştırıldığında, bu genotiplere sahip bireylerin risk oluşumu yönünden farklı olmadıkları gösterilmiştir. Ancak R/R-L/L genotipli bireylerin risk önleyici etkisi anlamlı bulunurken, Q/Q-M/M’de bu etki gözlenmemiştir [Altuner, 2010].

TipII hastalarında PONL55M L alleinin KAH gelişiminde risk faktörü olduğu bilinmektedir. Aynı çalışmada PONQ192R polimorfizminin PONL55M polimorfizmi L alleleine etki etmediğini de göstermiştir [Aydın, 2005].

PONL55M ve PONQ192R diyabet hastalarında makroanjyopati ile ilişkili bulunmuştur. Yüksek M ve düşük Q söz konusu olduğunda makroanjyopati riski anlamlı bulunmuştur, mikroanjyopati ise bu bireylerde gözlenmemiştir [Flekac, 2008].

Türk ve dünya popülasyonunda Paraoksonaz1 enzim aktivitesinin araştırıldığı birkaç çalışma bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalarda PON1 gen polimorfizmleri incelenmemiş olup, değerlendirilmeler enzim aktivitesi üzerinden yapılmıştır.

Türk popülasyonunda Paraoksonaz1 enzim aktivitesi talasemi hastası çocuklar incelenmiştir. 22 BTM (beta talasemi minor) ve 28 sağlıklı kontrol bireyi lipid hidroperoksit, total antioksidan kapasitesi, total oksidant durumu ve oksidatif stres indeksi belirlenmiştir. BTM hastalarında total antioksidan kapasitesi, paraokson

ve arilesteraz aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük gözlenmiştir ($p<0,01$). Lipit hidroperoksit, total oksidant durumu ve oksidatif indeksi ise yüksek çıkmıştır ($p<0,05$). BTM hastalarında serum PON1 aktivitesi düşükken, oksidatif stresin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu BTM hastalarında düşük aktivitenin damar tıkanıklığına yatkınlığa sebep olabileceğini göstermektedir [Selek, 2006].

Talasemi hastalarında PON1 enzim aktivitesinin araştırıldığı Tayland'da yapılmış bir çalışmada 28 α -thal/HbE özellikli hasta KAH yatkınlıklarını incelemek için taranmıştır. PON1 aktivite artısının PAF-AF aktivitesini tetiklediği ve α -thal/HbE bireylerde oksidatif stres artışı olduğu gözlenmiştir [Morales, 2007].

Mısır talasemi taşıyıcılarının (BTT) ateroskleroza yatkınlıkları incelendiği bir ara tırma 60 BTT'nin serum PON1 aktivitesi, total antioksidan kapasitesi, malondialdehit ve karotit arteri intima media yoğunluğu belirlenmiştir. Ara tırma sonunda BTT'li bireylerin antioksidan kapasiteleri kontrol grubundan düşük bulunmuştur ($p<0,001$), malondialdehit ve karotit arteri intima media yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Sonuçlar göstermiştir ki PON1 aktivitesinin düşük olduğu BTT'lerinde yüksek oksidatif strese sebep olmaktadır. Düşük PON1 aktivitesi ise oksidatif stres ve anemi dereceleri ve yüksek karotit arteri intima media yoğunluğu ile ilişkilidir, bu nedenle BTT'ler ateroskleroz gelişimine yatkın olarak görülmüştür [Labib, 2011].

Enzim aktivitesi ölçüm sonuçlarına göre talasemili hastalar, talasemi taşıyıcıları ve α -thal/HbE özellikli hastalarda KAH'a yatkınlık görülmektedir [Selek, 2006; Labib, 2011; Morales, 2007]. OHH'li çocuk popülasyonunda PON1 polimorfizm taraması yapıldığından bu gruplar ile karşılaştırma imkanı vermemektedir. Türk popülasyonunda hemoglobinopatiler ve KAH yatkınlığının daha verimli karşılaştırılması için OHH'li çocuk popülasyonunda paraoksonaz enzim aktivitesine bakılmalı, Türk popülasyonunda yapılmış Selek'in araştırması içinde ise PON1 polimorfizmleri taranmalıdır.

5. SONUÇLAR ve ÖNER LER

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı'na kayıtlı 88 OHH'li çocukta PONL55M ve PONQ192R PON1 polimorfizmleri taranmıştır. Hastaların ilk krizi yaşı, çalışmaya süresince kriz geçirmişliği akut göğüs sendromu geçirmişliği ve cinsiyeti ile PON1 polimorfizmleri arasındaki bağlantı araştırılarak şu sonuçlar elde edilmiştir:

1. Orak hücre hastası çocuklarda PONL55M polimorfizmi genotip dağılımı L/L 33 (%37,5), L/M 46 (%52,3), M/M 9 (%10,2) olarak bulunmuştur. L allel frekansı %64 iken M allel frekansı %36'dır.
2. OHH'li çocuklarda PONQ192R polimorfizmi genotip dağılımı Q/Q 36 (%40,9), Q/R 43 (%48,9), R/R 9 (%10,2) olarak bulunmuştur. Q allel frekansı 65,4 iken, R allel frekansı 34,6'dır.
3. OHH'li çocuklarda PONL55M polimorfizm genotipi için ilk kriz yaşı incelendiğinde çocukların dağılımı L/L için 1 yaşı ve öncesinde ilk krizi geçiren 19 birey (%57,6), 1 yaşımdan sonra geçiren ise 14 (%42,6) birey bulunmuştur. L/M genotipinde 1 yaşı ve öncesinde ilk krizi geçiren 30 (%66,7) birey, 1 yaşımdan sonra geçiren 15 (%33,3) birey söz konusudur. M/M genotipindeki bireylerin 6'sı (%66,7) 1 yaşı ve 3 (%33,3)'ü ise 1 yaşı sonrasında ilk krizini geçirmiştir. İlk kriz ve PONL55M polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,695$).
4. Orak hücre hastalarında çalışmaya dönemini kapsayan 1 yıllık süreçte kriz sıklığı 1 PONL55M polimorfizmleriyle karşılaştırılmıştır, L/L genotipli kriz

geçirmeyen 13 (%40,6), kriz geçiren 19 (%59,4), L/M genotipli kriz geçirmeyen 15 (%32,6), geçiren 31 (67,4), M/M genotipli ise kriz geçirmeyen 3 (%33,3), kriz geçiren 6 (%66,7) birey bulunmu tur. Kriz sıklı ı ve PONL55M polimorfizmi arasında anlamlı istatistiksel bir ili ki bulunmamı tır (p=0,759).

5. PONL55M polimorfizmi OHH'li çocuklarda AGS geçirmi lerine göre incelenmi tir. Çıkan sonuçlara göre L/L genotipli 22 (%71,0) birey AGS geçirmemi ken, 9 (%29,0) birey geçirmi tir. Genotipi M/L olan çocuklarda 35 (%76,1) çocuk AGS geçirmemi , 11 (%23,9) çocuk ise AGS görülmü tür. M/M genotipli çocuklarda ise 7 (%77,8) çocukta AGS görülmemi , 2'sinde (%22,2) görülmü tür. PONL55M polimorfizmi OHH'li çocuklarda AGS için risk faktörü olarak istatistiksel anlamlılık göstermemi tir (p=0,854).
6. PONL55M polimorfizmi OHH'li çocukların cinsiyetleri ile kar ıla tırılmı tır. L/L genotipli kız çocuk 8 (%24,2), erkek ise 25 (%75,8), L/M genotipli kız çocuk sayısı 21 (%45,7), erkek çocuk 25 (%54,3), M/M genotipinde ise kız çocuk 6 (%66,7) iken erkek çocuk 3 (%33,3) bireydir. Buna göre PONL55M polimorfizmi genotip da ılımında cinsiyete göre istatistiksel olarak anlamlı oranda farklılık göstermektedir (0,035).
7. PONQ192R polimorfizmi Q/Q genotipi 1 ya ve öncesinde ilk a rılı krizi geçiren 20 bireye (%57,1) sahiptir. 1 ya ndan sonra kriz geçiren sayısı ise 15 (%42,9)'tir. Q/R genotipinde 1 ya ve öncesi grubuna dahil 29 (%67,4) birey, sonrasına ait 32,6 birey bulunmaktadır. R/R genotipi ise 1 ya ve öncesi 6 (%66,7), 1 ya ndan sonra ise 3 (%33,3) bireyle temsil edilir.

8. PONQ192R polimorfizmi OHH'li çocuklarda, çalışma dönemini kapsayan 1 yıllık süreçte kriz sıklığı ile karıllaştırılmış, Q/Q genotipli kriz geçirmeyen 14 (%38,9), kriz geçiren 22 (%61,1), Q/R genotipli kriz geçirmeyen 12 (%27,9), geçiren 31 (72,1), R/R genotipli ise kriz geçirmeyen 5 (%62,5), kriz geçiren 3 (%37,5) birey bulunmuştur. Kriz sıklığı ve PONQ192R polimorfizmi arasında anlamlı istatistiksel bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,149$).
9. PONQ192R polimorfizmi OHH'li çocuklarda AGS geçirmelerine göre incelenmiştir. Çıkan sonuçlara göre Q/Q genotipli 26 (%74,3) birey AGS geçirmemiştir, 9 (%25,7) birey geçirmiştir. Genotipi Q/R olan çocuklarda 30 (%69,8) çocuk AGS geçirmemiştir, 13 (%30,2) çocuk ise AGS atlatmıştır. R/R genotipine sahip 8 çocuğun hiçbirisinde (%100) AGS görülmemiştir. PONQ192R polimorfizmi OHH'li çocuklarda AGS için risk faktörü olarak istatistiksel anlamlılık göstermemiştir ($p=0,198$).
10. PONQ192R polimorfizmi OHH'li çocukların cinsiyetleri ile karıllaştırılmıştır. Q/Q genotipli kız çocuk 18 (%50,0), erkek ise 18 (%50,0), Q/R genotipli kız çocuk sayısı 16 (%37,2), erkek çocuk 27 (%62,8), R/R genotipinde ise kız çocuk 1 (%11,1) iken erkek çocuk 8 (%88,9) bireydir. Buna göre PONQ192R polimorfizmi genotip dağılımında cinsiyete göre istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki göstermemektedir ($p=0,092$).
11. OHH'li çocuklarda PONL55M için yüksek enzim aktivitesi gösteren L allel frekansı %64 iken, PONQ192R için düşük enzim aktivitesi gösteren Q allel frekansı %65,4'tür. ki polimorfizm karıllıklı incelendiğinde popülasyondaki dağılım PON1 enzim aktivitesi bakımından orta seviyede olduğunu göstermektedir.

12. PONL55M polimorfizmi OHH'li grupta orta seviyede aktivite ile anılan L/M (%64) genotip sıklığı fazla iken, PONQ192R için de aktivitesi orta seviyede olduğu bilinen Q/R genotip sıklığı (%48,9) fazladır.
13. PONL55M ve PONQ192R polimorfizmlerinde mutant allel varlığının birbirlerine etkisi incelenmiştir. Bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve popülasyonda iki polimorfizm için mutant olan allellerin birlikte bulunduğu görülmemiştir ($p < 0,001$). Farklı çalılmalardaki da ilim incelendiğinde M/M-R/R genotipli birey bulunmamıştır. Bu iki polimorfizmin gen bölgesi üzerindeki konumundan ve krosing-over ile birlikte girmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

OHH'li çocukların grup içi karışılması sonucu, ilk aylık kriz, kriz sayısı ve ASG geçirmelikleri PON1 polimorfizmleri arasındaki anlamlı genotipik bir farklılık bulunamamıştır. Buna bağlı olarak PON1 polimorfizmlerinin OHH'li çocuklar için KAH'a yatkınlık sebebi olarak görülmemesi ($p > 0,05$) sonucu çıkmaktadır. Ancak HbS'li veya taşıyıcı olmayan sağlıklı kontrol grubu ile OHH'li verilerin karışılması ile farklı neticeler elde edilebilir. Ayrıca popülasyonun geniletilmesi yine sonuçlara etki etmesi beklenmektedir.

Cinsiyet ve PONL55M polimorfizminin istatistiksel ilişkisinin anlamlı çıkması popülasyonun yarıya yakınının erkek ağırlıklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

OHH'li çocukların ilk 6 aylık döneminde yüksek HbF'nin seviyeleri oksijen seviyesini normal düzeyde tuttuğu bilinmektedir. OHH'li çocuklarda HbF seviyesini

etkileyen polimorfizmlerin taranması ve ilk kriz ya mı etkileyen bireysel HbF seviyesi arasındaki ili ki ara tırılmalıdır.

Genotipleme sonuçlarına bakılarak OHH'li çocuk populasyonunda genel olarak orta seviyede enzim aktivitesi oldu u gözlenmi tir. Ancak bu çalı mada serum paraoksonaz enzim aktivitesine bakılamamı tır. Talasemi gibi hemoglobin kaynaklı bir kan hastalı ı olan OHH'nin da bu örneklerde oldu u gibi oksidatif stres, ateroskleroz ve KAH ile ili kili oldu u dü ünülmü tür. Polimorfik bölgelerde yapılan taramalar ile genotipsel farklılıklardan yola çıkarak enzim aktivite yorumları yapılmı tır. PON1 polimorfizmlerinin paraoksonaz aktivitesine etkisini daha iyi anlayabilmek için OHH'li çocukların PON1 enzim aktivitesi dı nda, PAF-AF aktivitesi, lipid hidroperoksit (LOOH) seviyesi, total antioksidan kapasitesi (TAC), total oksidant durumu (TOS) ve oksidatif stres indeksine de bakılmalıdır. Bunların sonucunda OHH'li çocukların oksidatif stres ve KAH ile ba etmelerindeki mekanizma ve PON1 polimorfizmi arasındaki ba lantıların anla ılmasına yardımcı olaca ı dü ünülmektedir.

Ya adı ımız co rafyada OHH oldukça sık kar ılan bir hastalık olup, hastaların ya am kalitesi dü üktür ve eldeki tedavi yöntemleri hastanın ya am kalitesi yeterince arttıramamakta, hastaların bireysel farklılıkları tedavide farklı etkiler göstermektedir. OHH'li bireylerde hastalık a amaları, taranacak polimorfizmler ile genotipleme ve haplotipleme yöntemleri ile daha iyi anla ılması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Adkins, S., Gan Kn, Mody M, La Du Bn. “Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes”, Am J Hum Genet, 52(3):598-608, (1993)
- A açhan, B., Yılmaz, H., Ergen, H.A., Karaali, Z.E. ve Isbır, T. “Paraoxonase (PON1) 55 and 192 Polymorphism and Its Effects to Oxidant-Antioxidant System in Turkish Patients with Type 2 Diabetes Mellitus”, Physiological Research, 54:287-293, (2005).
- Akay, T., “Genel Histoloji”, 5. Baskı, Palme Yayıncılık, 82-87, (2001)
- Aksoy M., Ikin E.W., Maurant A.E., Lehmann H., “Blood groups, haemoglobins, and thalassaemia in Turks in southern Turkey and Eti-Turks”, Br Med J, 2:937-939, (1958).
- Aldridge, W.N., “Serum Esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate and a method for their determination”, Biochem. J. 53:110-117, (1953).
- Altuner, D., Süzen, S. H., Ate , ., Koç, G. V., Aral, Y., Karakaya, A., “Are PON1 Q/R 192 and M/L 55 Polymorphisms Risk Factor for Diabetes complications in turkish population?”, J Clin Biochem, 10:1016, (2010).
- Ames, B. N. “Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases.”, Science, 221:1256–1264, (1983).
- Antognelli, C., Mearini, L., Talesa, V.N., Giannantoni, A, Mearini, E., Association of CYP17, GSTP1, and PON1 polymorphisms with the risk of prostate cancer, Prostate, 63:3, 240-251, (2005).
- Arcasoy A, Canatan D. Dünyada ve Türkiye’de talasemi ve hemoglobinopatiler. Ulusal Hemoglobinopati Konseyi-Sa lık Bakanlığı 1, 2. baskı. Antalya-Türkiye 11-19, (2003).

- Asefi, M., Vaisi-Raygani, A., Bahrehmand, F., Kiani, A., Rahimi, Z., H. Nomani, H., Ebrahimi, A., Tavilani, H., Pourmotabbed, T., "Paraoksonase 1 (PON1) 55 polymorphism, lipid profiles and psoriasis", *British Journal of Dermatology*, 167:1279–1286, (2012)
- Aviram, M., Rosenblat, M., Billecke, S., Erogul, J., Sorenson, R., Bisgaier, C. L., Newton, R.S., La Du, B., "Human serum paraoksonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants.", *Free Radical Biology and Medicine*, 2(7): 892-904, (1999).
- Aviram, M., Rosenblat, M., "Paraoksonases 1, 2 and 3, oxidative stress and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development.", *Free Radical Biology and Medicine*, 37(9): 1304-1316, (2004).
- Aynacıoğlu, A. ., Cascorbi, I., Mrozikiewicz, P.M., Nacak, M., "Paraoksonase 1 Mutations in a Turkish Population", 157: 174–177 (1999).
- Aynacıoğlu, A. ., Kepekçi, Y., "The human paraoksonase Gln-Arg192 (Q/R) polymorphism in Turkish patients with coronary artery disease", *International Journal of Cardiology*, 74: 33-37, (2000).
- Aygün, B., Odame, I. "A Global Perspective on Sickle Cell Disease", *Pediatr Blood Cancer*, 59:386–390, (2012).
- Beutler E. Disorders of Hemoglobin. In: Fauci A. S., Braunwald E, Isselbacher K. J., Wilson J. D., Martin J. B., Kasper D. L., Hauser S. L., Longo D. L., Eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine* , USA, McGraw Hill Companies Inc, 14th Ed, 645-653 s., (1998).
- Bıyıklı, N. K., Alpay, H., Yıldız, N., Açıkan, B., Ergen, A., Zeybek, Ü., Bozkurt, N., Bir, T., "Paraoksonase 1 192 and 55 polymorphisms in nephrotic children", *Pediatr Nephrol*, 21: 649-654, (2006).
- Bilge, I., İrin, A., Açıkan, B., Emre, S., Sadıkoğlu, B., Yılmaz, H., Sucu, A., Bir, T., "Is paraoksonase 192 gene polymorphism a risk factor for

- membranoproliferative glomerulonephritis in children?”, *Cell Biochem Funct*, 25: 159-165, (2007).
- Brealey, C.J., Walker, C.H., Baldwin, B.C., “A-esterase activities in relations to the differential toxicity of primiphos-methyl to birds and mammals.”, *Pestic. Sci.*, 11: 546-554,(1980).
- Buchanan G.R., Glader B.E., Benign course of extreme hyperbilirubinemia in sickle cell anemia: analysis of six cases,*J Pediatr*, 91(1):21-4, (1977).
- Canatan D., Kose M. R, Ustundag M., Haznedaroglu D., Ozbas S.,*Hemoglobinopathy Control Program in Turkey*, 9(2):124-6, (2006).
- Charache S, Terin ML, Moore RD. Effect of hydroxyure on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N Eng J Med.*, 332: 1317, (1995).
- Ciurea S. O., Thulborn K. R, Gowhari M. Dural, “Venous Sinus Thrombosis in a Patient With Sickle Cell Disease: Case Report and Literature Review.” *Am J Hematol*, 81: 290-293, (2006).
- Claster, S., Vichinsky, EP., “Managing sickle cell disease”, 15: 327, 1151–1155 (2003).
- Clendenning, J. B., Humbert, R., Green, E. D., Wood, C., Traver, D., Furlong, C. E. Structural organization of the human PON1 gene. *Genomics* 35, 586-589, (1996).
- Çıplak, B., Ba ıbüyük, H. H., Karaytu , S., Gündüz, ., (Çeviri Editörleri), “Evrimsel Analiz”, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 141 s., (2009). [Freeman, S, Herron, J.C. “Evolutionary Analysis 4th ed.” *Pearson Education*, UK, (2007).
- Demirdö en B.C., Demirkaya, S., Turkanoglu A., Bek, S., Arınc, E., Adalı, O., Analysis of paraoxonase 1 (PON1) genetic polymorphisms and activities as risk factors for ischemic stroke in Turkish population, *Cell Biochem Funct*, 27: 558–567, (2009).

- Dover G, Platt O. Sick cell disease. Hematology of Infancy and Childhood. Saunders Company, Philadelphia, 790- 841, (2003).
- Durrington PN., Mackness B., Mackness MI., “Paraoxonase and Atherosclerosis”, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(4): 473-80, (2001).
- Draganov, D. I., Teiber, J. F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., La Du, B. N. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J. Lipid Res.* 46, 1239-1247, (2005).
- Ducrocq R., Pascaud O., Bevier A., Finet C., Benkerrou M., Elion J. “Strategy linking several analytical methods of neonatal screening for sickle cell disease.” *J Med Screen*, 8, 8-14, (2001).
- Embury S.H., Sick cell anemia and associated hemoglobinopathies, *Cecil Textbook of Medicine*, ed: Goldman L., Bennett J.C., WB Saunders Company-Philadelphia, 893-905, (2000).
- Eiberg, H., Mohr, J., Schmiegelow, K., Nielsen, L. S., Williamson, R., “Linkage relationships of paraoxonase (PON) with other markers: indication of PON-cystic fibrosis synteny.”, *Clin. Genet.*, 28: 265-271, (1985).
- Eraslan S. Beta Talaseminin Moleküler Tanısı. Düzen Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi, Ankara-Türkiye, (2005).
- Ergen, A., Kılıço lu, Ö., Özger, H., A açhan, B., bir, T., “Paraoxonase 1 192 and 55 polymorphisms in osteosarcoma”, *Mol Biol Rep*, 10.1007:11033-010-0538-8, (2010).
- Ergun, M. A., Yurtcu, E., Demirci, H., lhan, M.N., Barkar, V., Yetkin, ., Menev e, A., “PON1 55 and 192 Gene Polymorphisms in Type 2 Diabetes Mellitus Patients in a Turkish Population”, *Biochem Genet*, 49:1-8, (2011).
- Flekac, M., Skrha, J., Zidkova, K., Lacinova, Z., Hilgertova, J., “Paraoxonase 1 gene Polymorphisms and Enzyme Activities in Diabetes Mellitus”, *Physiol Res*, 57: 717-726, (2008).

- Furlong, C. E., Richter, R. J., Seidel, S. L., Motulsky, A. G., “Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon.”, *Am. J. Hum. Genet.*, 43: 230-238, (1988).
- Garin, M. C., James, R. W., Dussoix, P., Blanché, H., Passa, P., Froguel, P. and Ruiz, J., “Paraoxonase Polymorphism Met-Leu54 Is Associated with Modified Serum Concentrations of the Enzyme. A Possible Link between the Paraoxonase Gene and Increased Risk of Cardiovascular Disease in Diabetes”, *J. Clin. Invest.*, 99 (1): 62-66, (1997).
- Geldmacher-von Mallinckrodt, M., Lindorft, H. H., Petenyi, M., Flugel, M., Fischer, T., Hiller, T., “Genetisch determinierter Polymorphismus de menschlichen Serum-Paroxonase (E.C.3.1.1.2).”, *Humangenetik*, 17: 331-335, (1973).
- Gonçalves, BA., Vasconcelos, GM., Santos Thuler, LC., Andrade, C., Faro, F., Pombo-de-Oliveira, MS., NQO1 rs1800566 (C609T), PON1 rs662 (Q192R), and PON1 rs854560 (L55M) polymorphisms segregate the risk of childhood acute leukemias according to age range distribution, *Cancer Causes Control*, 23: 1811–1819, (2012).
- Genetics Home Reference, “PON1 - paraoxonase 1”, Genetics Home Reference, <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PON1> (16.13.2013)
- Gupta, N., Gill, K, Singh, S., Paraoxonases: Structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease, *Indian J Med Res*, 130: 4, 361-8, (2009).
- Guyton, A.C. *Textbook of Medical Physiology: Eighth Edition*. W.B. Saunders Company, 356-364.
- Hardison, R., Hemoglobins From Bacteria To Man: Evolution Of Different, *The Journal of Experimental Biology*, 201: 1099–1117 (1998).
- Harmening D.M, Hemoglobinopathies, *Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis 3rd Edition*, ed: Harmening D.M., F.A. Davis Co-Philadelphia, 173-192, (1997).

- Harel M., Brumshtein B., Meged R. Dvir H., Ravelli R. B. G., Mccarthy A, et al. “3-D structure of serum paraoxonase 1 sheds light on its activity, sability, solubility and crystallizability”, *Arh Hig Rada Toksikol*, 58(3): 347-53, (2007).
- Harris J. W., Brewster H. H., Ham T.H., Castle W.B., *Studies on the Destruction of Red Blood Cells X. The Biophysics and Biology of Sickle-Cell Disease*, *AMA Arch Intern Med*, 97(2): 145-168, (1956).
- Hassett, C., Richter, R. J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J. W., Omiecinski, C. J., Furlong, C. E., “Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence.”, *Biochemistry*, 30: 10141-10149, (1991).
- Helaly, M. A. H., Abdel-Khalek¹, E. E. S., Abdel-Hafez¹, H. A., Ibrahem, E. F., Soliman, A. W., Daoud, E. M., Lotfy, Z. F., *Paraoxonase1 55 and 192 Gene Polymorphisms in an Egyptian Population with Diabetic Complications*, *Eur J Basic Med Sci*, 3(1): 9-16, (2013).
- Huen, K., Barcellos, L., Beckman, K., rose, S., Eskenazi, B., Holland, L., “Effects of PON Polymorphisms and Haplotypes on Molecular Phenotype in Mexican-American Mothers and Children”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 10: 1002-20567, (2010).
- Humbert, R., Adler, D. A., Disteché, C. M., Haset, C., Omiecinski, C. J., Furlong, C.E., “The Molecular Basis of the Human Serum Paraoxonase Activity Polymorphism”, *Nature Genetics*, 3:73-76, (1993).
- International HapMap Project, HapMap, <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en>, (06.12.2012).
- Jinks DC, Minter M, Tarver DA, Vanderford M, Hejtmancik JF, McCabe ER. Molecular genetic diagnosis of sickle cell disease using dried blood specimens on blotters used for newborn screening. *Hum Genet.*, 81, 4, 363-6, (1989).

- Jorge, O.F., Richter, R.J., Hornung, S.K., Motulsky, A.G., Furlong, C.E., Paraoxon Hydrolysis in Human Serum Mediated by a Genetically Variable Arylesterase and Albumin, *Am J Hum Genet* 36:295 -305, (1984).
- Kao, Y. L., Donaghue, K., Chan, A., Knight, J., Slink, M., “A Variant of Paraoxonase (PON1) Gene is Associated With Diabetic Retinopathy in IDDM”, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*”, 83(7): 2589-2592, (2008).
- Kılıç, N.,(Çeviri Editörü) Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Palme Yayıncılık, 203-242 s., (2005) [Nelson D.L.,Cox M.M., “ Lehninger Principles of Biochemistry 3th ed.” Worth Publishers, New York (2000)]
- Koç, H. B., “Paraoksonaz1 (PON1) Geni Polimorfizmlerinin Mesane Kanserinin Gelişimi Üzerine Etkileri” Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 45 s., (2011).
- Koç, H. B., Kaçar, Y., Paraoksonaz1 (Pon1) Enzimi ve Polimorfizmleri, *Ariv Kaynak Tarama Dergisi*, 21(1): 27-41, (2012).
- Kuru, M., Ergene, S., Genetik (Örnek Problemlerle) 2. Baskı, Palme Yayınları, Ankara, (2005).
- La Du, B. N., “Human serum PON1/arylesterase”, *Pharmasogenetics of Drug Metabolism* (Edited by Kalow W.), New York, 51-59, (1992).
- Labib, H., A., Etewa, R. L., Gaber, O. A., Atfy, M., Mostafa, T.M., Barsoum, I., “Paraoxonase-1 and oxidative status in common Mediterranean b-thalassaemia mutations trait, and their relations to atherosclerosis”, *J Clin Pathol*, 64: 437-442, (2011).
- Lawlor, D. A., Day I., Gaunt, TR., Hinks, LJ., Briggs, PJ., Kiessling, M., Timpson1, N., Smith, GD., Ebrahim, S., The association of the PON1 Q192R polymorphism with coronary heart disease: findings from the British Women’s Heart and Health cohort study and a meta-analysis, *BMC Genetics*, 5,17, (2004).

- Leviev I, Deakin S, James RW. “Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations”, *J Lipid Res*, 42(4): 528-35, (2001).
- Mackness, B., Durrington, P. N., Mackness, M., “Human Serum Paraoxonase”, *Gen. Pharmac.* 31(3): 329-336, (1998).
- Mackness, M. I., Thompson, H. M., Hardy, A. R., Walker, C. H., “Distinction between A-esteraz and arylesterases. Implications for esterase classification.”, *Biochem. J.*, 245: 293-296, (1987).
- Marchesani, M., Hakkarainen, A., Tuomainen, T. P., Kaikkonen, J., Pukkala, E., Uimari, P., Seppälä, E., Matikainen, M., Kallioniemi, O-P., Schleutker, J., Lehtimäki, T., Salonen, J.T., “New Paraoxonase 1 Polymorphism I102V and the Risk of Prostate Cancer in Finnish Men”, *Journal of the National Cancer Institute*, 95(11): 812-818, (2003).
- Mary E.E., *Hereditary Hemolytic Anemias, Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide 5th Edition Companion Handbook*, ed: Tintinalli J.E., Kelen G.D., Stapczynski J.S., McGraw-Hill Companies Inc-North Carolina, 1382-1387, (2000).
- McGuigan, F.E., Ralston, S.H., “Single nucleotide polymorphism detection: allelic discrimination using TaqMan.”, *Psychiatr Genet.*, 12(3): 133-6, (2002).
- Menzel S., Qin J., Vasavda N., Thein S.L., Ramakrishnan R., Experimental generation of SNP haplotype signatures in patients with sickle cell anaemia, *PloS One* 5: 13004, (2010).
- Milbauer LC, Wei P, Enestein J. Genetic endothelial System biology of sickle stroke risk. *Blood*, 111: 3872- 3879, (2008).
- Mochizuki, H., Scherer, S. W., Xi, T., Nickle, D. C., Majer, M., Huizenga, J. J., Tsui, L.-C., Prochazka, M., “Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence.”, *Gene*, 213: 149-157, (1998).

- Morales, N. P., Cherlermchoung, C., Fucharoen, S., Chantharaksri, U., "Paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase activities in lipoproteins of b-thalassemia/hemoglobin E patients", *Clin Chem Lab Med*, 45(7):884–889, (2007).
- Mueller, R. F., Hornung, S., Furlong, C. E., Anderson, J., Giblett, E. R., Motulsky, A. G., "Plasma paraoxonase polymorphism: a new enzyme assay, population, family, biochemical, and linkage studies.", *Am. J. Hum. Genet.*, 35: 393-408, (1983).
- Navab, M., Hama, S., Nguyen, T., Aldons, J.L. and Fogelman, A. M., "High density lipoprotein from fatty streak prone mice on atherogenic diet contains reduced levels of paraoxonase.", *FASEB J.*, 9: A584 (1995).
- Nielsen, A., Eiberg, H., Mohr, J., "Number of loci responsible for the inheritance of high and low activity of paraoxonase.", *Clin. Genet.*, 29: 216-221, (1986).
- Noguchi C.T., Schechter A.N., Rodgers G.P., *Sickle cell disease pathophysiology*, Baillieres Clin Haematol, 6(1): 57-91, (1993).
- Nussbaum, R., McInnes, R.R., Willard, F., "Thompson&Thompson Genetics in Medicine", 7th ed., Saunders, Philadelphia, 323-345 s (2007).
- Özba , S., "Hemoglobinopati Tanı Merkezleri", 5. Uluslararası Talasemi Yazokulu, 23-28, (2008).
- Özen, S, Unal, S., Erçetin, N., Ta delen, B., Frequency and Risk Factors of Endocrine Complications in Turkish Children and Adolescents with Sickle Cell Anemia, 30, 1, 25-31, (2013).
- Pasdar, A., Adams, H.R., Cumming, A., Cheung, J., Whalley, L., St Clair, D. and MacLeod, M-J., Paraoxonase Gene Polymorphisms and Haplotype Analysis in a Stroke Population, *BMC Medical Genetics*, 7, 28, 1-6, (2006).
- Pati, N., Pati, U., "Paraoxonase gene polymorphism and coronary artery disease in Indian subjects", *International Journal of Cardiology*, 66, 165-168, (1998).

- Pappo, A., Buchanan, G.R., Acute Splenic Sequestration in a 2-Month-Old Infant With Sick Cell Anemia, *Experience and Reason*, 131: 65-76, (1989).
- Playfer, J. R., Eze, L. C., Bullen, M. F., Evans, D. A. P., "Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity.", *J. Med. Genet.*, 13: 337-342, (1976).
- Poore, R.E., Neal, R.A., "Evidence for extrahepatic metabolism of parathion", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 23: 759-768 (1972).
- Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, Du BNL., "The Human Serum Paraoxonase/Arylesterase Gene (PON1) Is One Member of a Multigene Family.", *Genomics*, 33: 498-507 (1996).
- Provan, D. and Gribben, J., *Molecular Hematology*, Blackwell Publishing, UK, 1-17 s, (2005).
- Rozenberg O, Rosenblat M, Coleman R, Shih DM, Aviram M. Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. *Free Radic Biol Med*, 34(6): 774-84, (2003).
- Ruiz, J., Blanché, H., James, R.W., Blatter-Garin, M.C., Vaisse, C., Charpentier, G., Cohen, N., Morabia, A., Passa, P., Froguel, P., "Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes.", *Lancet*, 346: 869-872, (1995).
- Saarinen, U. M., Chorba, T. L., "Human parvovirus B19 induced epidemic acute red cell aplasia in patients with hereditary hemolytic anemia", *Blood*, 67: 1411, (1986).
- Sanghera, D. K., Saha, N., Aston, C.E., Kamboh, M.I., "Genetic Polymorphism of Paraoxonase and the Risk of Coronary Heart Disease", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 1067-1073, (1997).
- Schmiegelow, K., Eiberg, H., Tsui, L.-C., Buchwald, M., Phelan, P. D., Williamson, R., Warwick, W., Niebuhr, E., Mohr, J., Schwartz, M., Koch, C., "Linkage

- between the loci for cystic fibrosis and paraoxonase.”, *Clin. Genet.*, 29: 374-377, (1986).
- Selek, S., Aslan, M., Horoz, M., Gur, M., Erel, O., “Oxidative status and serum PON1 activity in beta-thalassemia minor”, *Clinical Biochemistry* 40: 287–291, (2007).
- Serjeant, GR. “Natural history and determinants of clinical severity of sickle cell disease”, *Curr Opin Hematol*, 2: 103-10, (1995).
- Serrato, M., Marian, A. J., “A Variant of Human Paraoxonase/Arylesterase (HUMPONA) Gene Is a Risk Factor for Coronary Artery Disease”, *J. Clin. Invest.*, Vol. 96, 3005-3008, (1995).
- Shih, D.M., Lusis, A.J., The roles of PON1 and PON2 in cardiovascular disease and innate immunity, *Current Opinion In Lipidology*, 20(4): 288-92, (2009).
- Stamatoyannopoulos, G., “Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation”, *Experimental Hematology*, 33: 259-271, (2005).
- Stevens, V.L., Rodriguez, C., Pavluk A.L., Thun, M.C. and Calle, E.E. “Association of Polymorphisms in the Paraoxonase 1 Gene with Breast Cancer Incidence in the CPS-II Nutrition Cohort”, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(6): 1226-1228, (2006).
- Styles LA, Vichinsky E. Effects of a long-term transfusion regimen on sickle cell-related illnesses., *J pediatrics*, 125: 909-11, (1994).
- Sumer, S., Öner, R., Ö ü , A., A ık, L., (Çeviri Editörleri) “Gentik Kavramlar” Palme Yayıncılık, Ankara, 503 s. (2011). [Klug, W.S., Cummings M.R., Spencer, C.A., “Concepts of Genetics 8th ed.” Pearson Education, UK, (2006)]
- Ta kiran, P., ım, F.S., ekuri, C., Tüzün, N., Alio lu, E., Altınta , N., Berdeli, A. “Paraoksonaz geninde Leu-Met (55) ve Gln-Arg (192) polimorfizmleri iel

koroner arter hastalığı arasındaki ilişki”, Türk Kardiyol Dern Ar , 37(7): 473-478, (2009).

Turgeon, ML, “The principles of hematology”, Clinical hematology: theory and procedures, 4th ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 171-90, (2005).

Türk Hematoloji Derneği (THD), Orak Hücre Anemisi Tanı Tedavi Kılavuzu 2011

Tüzmen , Scheter A N, Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating α -thalassemia mutations, Blood Reviews, 15: 19-29 (2001).

Ünal, S., Toros, F., Kutuk, M. O., Uyaniker, M.G., MD1, Evaluation of the Psychological Problems in Children with Sickle Cell Anemia and Their Families, Pediatric Hematology and Oncology, 28:321–328, (2011).

Vermlyen C, Cornu G. Bone marrow transplantation for sickle cell disease: The European experience. Am J Pediatr Hematology Oncol, 16: 18, (1994).

Vichinsky E. P. “New therapies in sickle cell disease.” Lancet, 360: 620-31, (2002).

Wang W., Lukens J.N., Sickle cell anemia and other sickling syndromes, Wintrobe’s Clinical Hematology 10 Ed Middle East Edition, ed: Lee R.G., Foerster J., Lukens J., Paraskevas F., Greer J.P., Rodgers G.M., Williams and Wilkins Company-Baltimore, 1347-1397, (1999).

Wang, X., Huang, J., Fan, Z., Su, S., Zhao, J., Shen, Y., Qiang, B. and Gu, D., “Genetic and Environmental Factors Associated with Plasma Paraoxonase Activity in Healthy Chinese”, International Journal of Molecular Medicine, 13: 445-450, (2004).


Watson A. D, Berliner J. A, Hama S. Y, La Du, B. N., Faul, K.F., Fogelman, A.M. and Navab, M., “Protective effect of HDL associated paraoxonase inhibition of the biological activity of minimally oxidized LDL.”, J Clin Invest., 96: 2882-2891, (1995).

Zama, T., Murata, M., Matsubara, Y., Kawano, K., Aoki, N., Yoshino, H., Watanabe, G., Ishikawa, K., Ikeda, Y., “A 192arg Variant of Human Paraoxonase (HUMPONA) Gene Polymorphism Is Associated With an Increased Risk for Coronary Artery Disease in the Japanese”, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 3565-9, (1997).

Zech, R. & Zurcher, K., “Organophosphate splitting enzyme in different mammals.”, *Comp. Biochem. Physiol.*, 48: 427-433, (1974).

EKLER

Ek-1 Etik Kurul Kararı



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

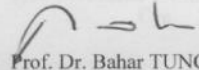
Sayı : B.08.6.YÖK.2.ME.0.05.0.07.00/11 d /2013

Konu : Kurul Kararı

Sayın Prof. Dr. Yasemin KAÇAR
Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi

Sorumluluğunuzda yapılması tasarlanan "Orak Hücre Hastalarında Paraoksonaz 1 (PON1) Gen Polimorfizmleri Analizi" adlı araştırmaya ilişkin 20/12/2012 tarihli ve 2012/401 sayılı Kurul Kararı ile Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi arz/rica ederim.


Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Kurul Başkanı

EKLER:

- 1- Kurulun 20/12/2012 tarihli ve 2012/401 sayılı kararı (1 sayfa)
- 2- Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu (2 sayfa)

Form No: MEU.BA.FR-006/00 Form Yay. Tarihi: 03/10/2011 Form Rev. Tarihi: Form Rev. No: 00

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
20/12/2012	24	2012/401

Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yasemin KAÇAR'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan "Orak Hücre Hastalarında Paraoksonaz 1 (PON1) Gen Polimorfizmleri Analizi" adlı araştırma için hazırlanmış olan ve 19/12/2012 ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın yürürlükte olan ilgili yasal düzenlemelere uyularak yürütülmesi ve sonuçlandırılması koşulu ile gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

İmza
Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Başkan

İmza
Prof. Dr. Olgu HALLIOĞLU KILINÇ
Başkan Yrd.

İmza
Yrd. Doç. Dr. Gülçin YAPICI
Raportör

İmza
Prof. Dr. Lülüfer TAMER GÜMÜŞ
Üye

(Katılmadı)
Doç. Dr. İrfan AYAN
Üye

İmza
Prof. Dr. Aylin ERTEKİN YAZICI
Üye

İmza
Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN
Üye

İmza
Doç. Dr. Bahar TAŞDELEN
Üye

İmza
Doç. Dr. Sabire YURTSEVER
Üye

(Katılmadı)
Yrd. Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE
Üye

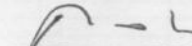
İmza
Yrd. Doç. Dr. Oya ÖGENLER
Üye

(Katılmadı)
Yrd. Doç. Dr. Nalan TİFTİK
Üye

İmza
Uzm. Dr. Kıvılcım EREN ERDOĞAN
Üye

İmza
Hürrem Betül LEVENT ERDAL
Üye

(Katılmadı)
Lale DAĞLI
Üye


Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Başkan
ASLI GİBİDİR

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Orak Hücre Hastalarında PON1 Gen Polimorfizmleri Analizi			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Yasemin KAÇAR			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyoloji Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi			
	DESTEKLEYİCİ	---			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>			
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
	DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	01/11/2012		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
OLGU RAPOR FORMU				Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ				Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER		Belge Adı	Açıklama				
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>					
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>					
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>					
	ILAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
	DİĞER-GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU	<input checked="" type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMACILARIN ÖZGEÇMİŞİ	<input checked="" type="checkbox"/>					
	3 ADET LİTERATÜR	<input checked="" type="checkbox"/>					

T.C
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2012/401	Tarih: 20/12/2012
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

MERSİN ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *		İmza
			E	K	H	Y	H	H	
Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN	Farmakoloji	MEÜ Eczacılık Fakültesi Meslek Bilimleri Bölümü Farmakoloji Ab.D.	E	<input checked="" type="checkbox"/>	E	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Olgu HALLIOĞLU KILINÇ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ab.D.	E	<input checked="" type="checkbox"/>	E	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Gülşin YAPICI	Halk Sağlığı	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Halk Sağlığı Ab.D.	E	<input checked="" type="checkbox"/>	E	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Lütfü TAMER GÜMÜŞ	Biyokimya	MEÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyokimya Ab.D.	E	<input checked="" type="checkbox"/>	E	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. İrfan AYAN	Ortopedi ve Travmatoloji	MEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü Ortopedi ve Travmatoloji Ab.D.	E	<input checked="" type="checkbox"/>	E	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Aylin ERTEKİN YAZICI	Psikiyatri	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Psikiyatri Ab.D.	E	<input checked="" type="checkbox"/>	E	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN	Mikrobiyoloji	MEÜ Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Ab.D.	E	<input checked="" type="checkbox"/>	E	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Bahar TAŞDELEN	Biyostatistik	MEÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Biyostatistik ve Tıbbi Bilgi Ab.D.	E	<input checked="" type="checkbox"/>	E	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sabire YURTSEVER	İç Hastalıkları Hemşireliği	MEÜ Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik Bölümü İç Hastalıkları Hemşireliği Ab.D.	E	<input checked="" type="checkbox"/>	E	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Nimet KARAGÖLLE	Biyomühendislik	MEÜ Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü	E	<input checked="" type="checkbox"/>	E	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Oya ÖGENLER	Tıp Tarihi ve Etik	MEÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıp Tarihi ve Etik Ab.D.	E	<input checked="" type="checkbox"/>	E	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Nalan TIFTİK	Farmakoloji	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Farmakoloji Ab.D.	E	<input checked="" type="checkbox"/>	E	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Kıvılcım EREN ERDOĞAN	Patoloji	Mersin Devlet Hastanesi	E	<input checked="" type="checkbox"/>	E	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yüksek Şehir Planlama Hürrem Betül LEVENT ERDAL	Şehir ve Bölge Planlama/Uluslararası Proje Yönetimi	Mersin Ticaret ve Sanayi Odası Projesi Müdürlüğü	E	<input checked="" type="checkbox"/>	E	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Avukat Lale DAĞLI	Hukuk	Serbest	E	<input checked="" type="checkbox"/>	E	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

Ek-2 Hasta Verileri

NO	PONQ19 2R Q/Q=1, Q/R=2, Q/R=3	Humper, 1993 Q/Q=A=1 Q/R=R/R= B=2	PONL55M L/L=1, L/M=2, L/L=3	C NS YET kız 1, erkek 2	TANI 1=1, <1= 2	KR Z YOK =1, VAR =2	CHEST YOK=1, VAR=2
1	1	1	2	1	1	2	2
2	2	2	2	2	1	2	1
3	2	2	2	2	1	1	1
4	1	1	2	2	2	2	1
5	2	2	2	2	1	2	1
6	2	2	2	2	1	2	2
7	2	2	2	1	1	2	1
8	1	1	3	1	2	2	1
9	1	1	3	1	1	2	1
10	2	2	1	2	1	2	1
11	2	2	2	2	1	1	2
12	1	1	2	2	2	2	1
13	1	1	1	2	1	1	1
14	2	2	2	1	2	2	1
15	1	1	3	1	1	1	1
16	2	2	1	2	1	2	2
17	1	1	3	1	1	2	2
18	2	2	2	1	1	2	1
19	1	1	2	2	1	2	1
20	1	1	2	2	2	2	1
21	2	2	1	1	2	2	1
22	3	2	1	2	1	2	1
23	2	2	1	2	1	2	1
24	2	2	2	1	1	2	2
25	2	2	2	2	2	1	1
26	1	1	2	1	1	2	1
27	2	2	2	1	1	2	2
28	2	2	2	2	2	2	1
30	3	2	1	2	1	2	1
31	2	2	2	2	1	2	1
32	1	1	1	2	1	2	2
33	2	2	1	1	1	1	2
34	2	2	2	2	2	2	1
35	3	2	1	2	1	1	1
36	3	2	1	2	1	1	1
37	2	2	1	2	2	2	2
38	1	1	2	1	1	1	1
39	1	1	2	1	PRE*	1	1
40	1	1	2	1	1	2	2

NO	PONQ19 2R Q/Q=1, Q/R=2, Q/R=3	Humper, 1993 Q/Q=A=1 Q/R=R/R= B=2	PONL55M L/L=1, L/M=2, L/L=3	C NS YET kız 1, erkek 2	TANI 1=1, <1= 2	KR Z YOK =1, VAR =2	CHEST YOK=1, VAR=2
41	2	2	2	1	1	2	1
42	2	2	1	2	2	2	2
43	1	1	3	2	2	2	2
44	2	2	1	2	2	2	2
45	2	2	2	1	2	2	1
46	1	1	3	2	1	2	1
47	1	1	2	2	1	2	2
48	1	1	1	1	2	2	1
49	1	1	1	2	1	1	1
50	3	2	1	2	2	2	1
51	1	1	2	1	1	2	2
52	1	1	2	1	2	1	1
53	3	2	1	2	2	1	1
55	1	1	3	2	2	1	1
56	3	2	1	1	2	-	-
57	1	1	2	1	1	1	1
58	2	2	2	2	1	1	1
59	2	2	1	1	2	2	1
60	2	2	1	2	2	2	1
61	2	2	1	2	2	1	1
62	2	2	2	1	1	2	1
63	3	2	1	2	1	1	1
64	3	2	1	2	1	1	1
65	1	1	1	1	1	2	2
66	1	1	2	2	2	1	1
67	2	2	1	2	1	1	1
68	2	2	2	1	2	2	1
69	2	2	2	2	1	1	2
70	2	2	1	2	1	2	1
71	1	1	1	2	2	1	2
72	2	2	2	1	1	1	1
73	2	2	1	1	1	1	1
74	2	2	2	2	1	2	2
75	1	1	3	1	1	2	1
76	2	2	2	2	1	1	1
77	1	1	1	2	2	1	1
78	1	1	2	2	2	2	1
79	2	2	2	1	1	2	1
80	1	1	2	2	1	1	1
81	2	2	1	2	1	2	1
82	1	1	2	2	1	1	1
83	2	2	2	2	1	2	2

NO	PONQ19 2R Q/Q=1, Q/R=2, Q/R=3	Humper, 1993 Q/Q=A=1 Q/R=R/R= B=2	PONL55M L/L=1, L/M=2, L/L=3	C NS YET kız 1, erkek 2	TANI 1=1, <1= 2	KR Z YOK =1, VAR =2	CHEST YOK=1, VAR=2
84	2	2	2	1	1	1	1
85	1	1	2	1	2	2	1
87	2	2	2	2	2	2	1
88	2	2	1	2	1	2	2
89	1	1	2	2	2	2	1
90	1	1	1	1	2	2	-
91	1	1	3	1	1	1	1

*PRE: prenatal tanı

Ek-3 Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Genel Laboratuvar Cihazları

- Buzdolabı +4°C (U ur)
- -20°C dondurucu (U ur)
- -80°C dondurucu (Hettich)
- Etüv (Nüve EN-500)
- Hassas terazi (Denver Instrument)
- Manyetik karı tırıcı (Nüve MK 418)
- Mikrodalga fırın (Beko)
- Mikropipet seti (Eppendorf)
- Mikrosantrifüj (Hermle, Z160M)
- Otoklav (Selekta 4002136)
- Vorteks (Heidolph Reax)

Elektroforezle İlgili Cihazlar

- Elektroforez aparatı (EC Midicell EC 350, 20x20cm)
- Elektroforez güç kayna ı (BioRAD PowerPack)
- Jel görüntüleme sistemi (Quantum ST4)

PCR Cihazları

- Applied Biosystem ViiA7

Ek-4 Kimyasal Maddeler

DNA zolasyonu

- High Pure PCR Template Preparation Kit-ROCHE (Cat. No. 11 796 828 001)
- 2-propanol (Sigma Aldrich CAS Number 67-63-0 I9516-500ML)
- Etanol (Merck)

Agaroz Jel Elektroforezi

- Agaroz (Sigma Aldrich Cas: 9012-36-6 A9539-100G)
- Borik Asit (Carlo Erba 302177)
- EDTA (Sigma-Aldrich Cas: 60-00-4 EDS-1KG)
- Ethidium Bromide (10mg/ml, Sigma E-1510)
- Trizma Base (Sigma T-6066)

SNP Tanımlama için Gerekli Maddeler (TaqMan Tesi)

- 20x TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay Mix PON1 L55M, C/T, rs854560 için C_2259750_20, 150 reaksiyon
- 20x TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay Mix PON1 Q192R, A/G, rs662 için C_2548962_20, 150 reaksiyon
- 2x TaqMan Universal PCR Master Mix II (Applied Biosystem), 500 reaksiyon

Ek-5 Çözeltiler

▪ Tris HCl Tamponu (100mM)

Trizma base..... 2.42 g

HCl..... 0,8ml

150 ml distile su içinde çözdükten sonra pH kontrol edilir. pH 8 oldu unda 200mlye tamamlanır. Otoklavda steril edilerek + 4 °C’de saklanmı tır.

▪ Yükleme Tamponu (6x)

10 mM Tris-HCl (pH 7.6)

0.03% Bromophenol blue

0.03% Xylene cyanol FF

60% Glycerol

60 mM EDTA

Ek-6 High Pure PCR Template Preparation Kit-Roche (Cat. No. 11 796 828 001)
zolasyon Protokolü

1. 1,5 ml mikrofüj tüplerine 200µl kan örne i, 200µl Binding Buffer ve 40µl proteinaz K konmu tur. Karı im vortekslenerek 70°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmı tır.
2. Kısa santrifüjden sonra üzerine 100µl izopropanol eklenmi ve vortekslenir.
3. Vortekslenen karı im filtreli tüp ve kolon düzene ine aktarıldıktan sonra 8000xg de 1 dakika santrifüj edilir. Alt kolon de i tirilir.
4. 500µl inhibitor removal buffer eklenmi ve yeniden 8000xg'de 1 dakika santrifüj edilmi tir. Kolonlar de i tirilmi tir.
5. 500µl wash buffer eklenmi ve 8000xg'de 1 dakika santrifüj edilmi tir. Kolonlar de i tirilmi tir.
6. 500µl wash buffer eklenerek 8000xg'de 1 dakika santrifüj edilmi tir ve alttaki sıvı atılarak kolon bo altılmı tır. Ardından 13000 rpm'de 20 saniye santrifüj edilmi tir. Kolonu atılır, yerine 1,5 ml mikrofüj tüpü yerle tirilir.
7. 200µl 70°C'ye ısıtılmı elution buffer pipetlenir ve 8000xg'de 1 dakika santrifüj edilir.
8. Filtreli tüp atılır. Mikrofüj tüpü içindeki DNA +4°C'de muhafaza edilir.

Ek-7 Agaroz Jel Hazırlama ve DNA Bantlarının Gözlenmesi

Agaroz çözeltisi içerisinde 1xTBE ve 0.1 µg/ml etidyum bromit olacak şekilde distile su içerisinde mikro dalga fırında effafla ıncaya kadar kaynatıldıktan sonra jel tepsisine döküldü ve 1 saat katıla maya bırakıldı. Aynı gün kullanılmayan jeller + 4°C’de plastik torbalar içerisinde saklanmıştır.

Genomik DNA için %1,2’lik, 35 ml hacimde 8 kuyulu agaroz jel hazırlanmıştır.

DNA izolasyonu sonucu elde edilen genomik ve PCR sonucu elde edilen DNA örneklerinden 10 µl alınarak üzerine 6x yükleme tamponundan 3µl eklendikten sonra agaroz jel üzerindeki kuyulara yüklenmiştir.

Elektroforez için yürütme tamponu olarak 1x TBE kullanılmıştır ve elektroforez 80 voltta 30 dakika yürütülmüştür.

DNA Bantlarının Gözlenmesi ve Görüntülenmesi etidyum bromit ile boyanmış jeller “Ultra Viyole Transiluminatör” üzerine konularak oluşan fu ya rengi çıplak gözle izlenmiştir. Görüntülemek için ME TAM Mikrobiyoloji Laboratuvarı’nda bulunan Jel Görüntüleme Sistemi (Quantum ST4) görüntüleme kabini kullanılmıştır. Bilgisayarda jpeg fotoğraf dosyası olarak depolanmıştır.

Ek-8 Hasta Bilgi Formu

ORAK HÜCRE HASTALARINDA PON1 GEN POLİ MORFİZMLERİNİN ANALİZİNE İLİŞKİN ANKET FORMU

Sayın katılımcı,

Bu anket formu “*Orak Hücre Hastalarında Pon1 Geni Polimorfizmleri Analizi*” adlı ara tırma kapsamında *orak hücre hastalığının ve PON1 polimorfizmlerinin ilişkisi* hakkında bilgi toplamayı amaçlamaktadır. Sonuçlar *orak hücre hastalarının yaşam kalitesini arttırmayı hedefleyen tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.*

Anket formunda 30 adet soru yer almaktadır. Sorulara yanıt verme süreniz 10 dakika/saattir. Ara tırmaya katılmak gönüllülük esasına dayalıdır. Ara tırma sürerken herhangi bir zamanda istemeniz durumunda sorumlu ara tırmacıyı bilgilendirmek ko ulu ile ara tırmadan ayrılabilirsiniz. Ara tırma sırasında sizden alınan bilgiler ara tırmacıda saklı kalacak ve toplanan veriler yalnızca bilimsel amaçla kullanılacaktır. Ankette bulunan sorulara verece iniz yanıtların do rulu u, ara tırmanın niteli i açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle, ankette bulunan sorulara do ru yanıt vermenizi rica eder, i birli iniz için te ekkür ederiz.

Sorumlu
Ara tırmacı

Ünvan/Ad/
Soyad

ANNE-BABA ve ÇOCUĞUNUN KATILACAĞI ANKET SORULARI

KATILIMCININ;

K	E
---	---

Cinsiyeti :

Doğum Tarihi ve Yaşı :

Doğum Yeri – Memleketi :

Yaşadığı Yer :

Formun Doldurulduğu Tarih:

Hastalığa ne zaman yakalandığı :

NO	ANKET SORULARI	EVET	HAYIR
1)	Ebeveynler arasında sigara kullanan var mı?		
2)	Ebeveynler arasında alkol kullanan var mı?		
3)	Ebeveynler arasında hipertansiyon hastası olan var mı?		
4)	Diyabet hastalığınız var mı?		
5)	Ebeveynler arasında diyabet hastası olan var mı?		
6)	Kan hastalığınız var mı?		
7)	Ebeveynler arasında kan hastalığı olan var mı?		
8)	Ebeveynler arasında yüksek kolesterol hastalığı olan		
9)	Kalp hastalığınız var mı?		
10)	Ebeveynler arasında kalp hastalığı olan var mı?		
11)	Ebeveynler arasında osteoskleroz hastası var mı?		
12)	Obezite hastası mısınız?		
13)	Ebeveynler arasında obezite hastalığı olan var mı?		
14)	Böbrek hastalığınız var mı?		
15)	Ebeveynler arasında böbrek hastalığı olan var mı?		

16)	Ebeveynde prostat hastalığı var mı?		
17)	Karaciğer hastalığınız var mı?		
18)	Ebeveynler arasında karaciğer hastalığı olan var mı?		
19)	Daha önce felç geçirdiniz mi?		
20)	Ebeveynler arasında felç geçiren, geçirmi olan var		
21)	Daha önce beyin kanaması geçirdiniz mi?		
22)	Ailenizde arasında beyin kanaması geçiren var mı?		
23)	Ailenizde alzheimer hastası var mı?		
24)	Sıtmaya yakalandınız mı?		
25)	Ebeveynler arasında sıtmaya yakalanan var mı?		
26)	Daha önce kanser geçirdiniz mi?		
27)	Ailenizde kanser hastası var mı?		

Ek-9 Bilgilendirilmi Hasta Onam Formu

“Orak Hücre Hastalarında Paraoksonaz1 (Pon1) Gen Polimorfizmleri Analizi” simli Yüksek Lisans Tezi için

ASGAR B LG LEND R LM GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Orak Hücre Hastası Çocu u Olan Anne-Baba için

Ara tırcının Açıklaması

Kalp hastalıklarda rol oynayan genetik (kalıtsal) nedenleri bulmak üzere yeni bir ara tırma yapmaktayız. Amacımız orak hücre hastalığı ile paraoksonaz 1 gen polimorfizmlerini ilişkilendirmektir. Ara tırmanın ismi “Orak Hücre hastalarında paraoksonaz 1 (PON1) gen polimorfizmleri analizi” dir. Ara tırmaya davet edilmenizin nedeni sizde/ailenizin bir üyesinde ORAK HÜCRE HASTALIĞI bulunmasıdır ve bunun için tedavi uygulanmı tır veya uygulanmaktadır. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD’dan Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı ve Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji AD’nın ortak katılımı ile 170 gönüllünün yer alacağı bir ara tırma gerçekte gerçekleştirilecektir.

Bu ara tırmayı yapmak istememizin nedeni orak hücre hastası bireylerin sağlıklı bireylere göre kalp hastalıklarına yakalanma sıklıklarının incelemektir. Sizin çocuğunuzun da bu ara tırmaya katılmasını öneriyoruz. Çocuğunuzun çalışmaya Orak Hücre Hastası Birey olarak katkıda bulunacak. Ancak hemen söyleyelim ki çocuğunuzun bu ara tırmaya katılıp katılmamakta serbesttir. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce ara tırma hakkında sizi ve çocuğunuzun bilgilendirmek istiyoruz.

Her çocuğunuzun ara tırmaya katılmasını kabul ederseniz, öncelikle yapılacak çalışmaya hakkında sözel bilgilendirme yapılacaktır. Bu ara tırmada orak hücre hastalığının bireysel tedavi yöntemlerine katkıda bulunmak için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Selma ÜNAL’ın gözetiminde kan örnekleri alınacak ve Mersin Üniversitesi Biyoloji AD’ndan Prof. Dr. Yasemin KAÇAR ve yüksek lisans öğrencisi Gonca AY tarafından kalp hastalığı gelişimi ile ilişkilendirilen paraoksonaz gen farklılıkları incelenecektir. Gönüllü olmanız dahilinde çocuğunuzun 5 ml (1 tüp) kadar kan almamız gerekmektedir. Bu kandan genetik materyal DNA elde edilecektir ve serum ayrı tırılacaktır. Genetik materyalde paraoksonaz gen polimorfizmlerine, serumda paraoksonaz enzim aktivitesine bakılacaktır. Bu amaçla DNA izole edilemez olunursa sizden tekrar kan vermeniz istenebilir. Testiniz doğrultusunda çocuklarınızın sağlıkları ile ilgili ayrıntılı bilgi alabileceksiniz.

Bu çalışmaya çocuğunuzun katılması için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya çocuğunuzun katılması için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Bu çalışmaya çocuğunuzun katılmasını reddedebilirsiniz. Bu ara tırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

Bu çalışmaya çocuğunuzun katılmasını kabul ederseniz, Prof. Dr. Selma ÜNAL veya onun görevlendireceği bir hekim tarafından muayene edilecek ve bulgular kaydedilecektir. Yaklaşık olarak 10dk süre içerisinde Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Kliniğinde kan vermeniz ve gerekli anketi doldurmanız yeterli olacaktır.

Bu kayıtlar ileride tekrar incelenerek doğru tanı konulmasına yardımcı olacaktır. Bu kayıtlar kimlik belirtilmeden tıp öğrencilerinin eğitiminde veya bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçları dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: 1-) Çocuğunuzun iğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilir. 2-) Az bir ihtimalde olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir. Çocuğunuzun aile genetik bilginin gizli kalmasına dair elimizden geleni yapacağız ve anormal bir gen taşıdığı saptanırsa bulgularımızı herhangi bir ücret talep etmeden size bildireceğiz. Ancak böyle bir bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Yine hemen belirtmeliyiz ki; bu bilgiyi sizin dışında birisi ile paylaşmamız sadece sizin

izninize olacaktır. Bu durumlarda gizlilik ilkesine bağlı kalmacaktır. Yukarıda sayılanlar böylesi bir analizde yararlanabileceğiniz olası risklerdir. Ancak bunlardan en az oranda zarar görmeyi sağlamak için elimizden geleni yapacağız.

Yapılacak genetik testin getireceği olası yararlar: Böyle bir analiz ilgili genetik bozukluğun nedeninin öğrenilmesinde yararlı olacaktır. Burada bu çalışmanın hemen size veya çocuğunuza bir fayda olarak dönüp dönmeyeceğini bilmiyoruz. Ancak ilgili hastalığın temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi ileride ilgili bozukluktan etkilenmiş bireylere fayda sağlayacaktır.

Gönüllü Anne-Babanın Beyanı

Sayın **Prof. Dr. Selma ÜNAL** tarafından Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı ve Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji AD'na bağlı bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya çocuğum "katılımcı" olarak yer alabilmesi için davet edildi.

Eğer bu araştırmaya çocuğumun katılmasına onay verirsem hekim ile aramda kalması gereken çocuğuma ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük önem ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında çocuğumun kişisel bilgilerinin ihtimalla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebiliriz. (**Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacaktır umun bilincindeyim**) Ayrıca tıbbi durumuna herhangi bir zarar verilmemesi konusunda çocuğum araştırmacı tarafından araştırma dı tutulabilir. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaşmadıkça; herhangi bir saatte, Prof. Dr. Selma ÜNAL, telefon ve adres'ten (Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Selma Ünal: 0324 337 43 00 dahili: 1149) arayabileceğimi biliyorum. Her doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi (bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğimi). Çocuğum bu araştırmaya katılmak zorunda değil ve katılmayabilir. Araştırmaya katılması konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmıyacağımı biliyorum. Eğer çocuğumun katılmasını reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkimize herhangi bir zarar getirmeyeceğini biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda çocuğumun adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" olarak yer alması kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu araştırma kapsamında alınacak kan örneklerini;

- a) Sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum,
- b) Her yerde yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum,
- c) Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

mzalı bu form kaidinin bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllü	Yasal Temsilci
Adı, soyadı:	Adı, soyadı:
mza:	mza:
Tarih:	Tarih:
Yetkin Araştırmacı	Görüşme Tanımlı
Adı, soyadı:	Adı, soyadı:
mza:	mza:
Tarih:	Tarih:
Yetkin Araştırmacı	

Adı, soyadı:

mza:

Tarih:

“Orak Hücre Hastalarında Paraoksonaz1 (Pon1) Gen Polimorfizmleri Analizi” simli Yüksek Lisans Tezi için

ARA TIRMA AMAÇLI ÇALI MA Ç N ÇOCUK RIZA FORMU

Sevgili Karde im,

Benim adım **Prof. Dr. Yasemin KAÇAR**. Orak Hücre Anemisi adı ile bilinen bir kan hastalığı nda, Çocuk Hematoloji Bilim Dalı Ba kanı Prof. Dr. Selma Ünal'ın da izni ile ara tırma yapıyorum. Ara tırmanın ismi “**Orak Hücre Hastalarında Paraoksonaz Gen Polimorfizmleri**”dir. Ara tırma ile; sizin gibi Orak Hücre Hastası olan küçük karde lerimizin ya am kalitesini arttıran tedavilerin geli mesine vesile olaca ız. Bu ara tırmaya katılmanızı öneriyoruz. Siz çalı maya Orak Hücre Hastası birey olarak katkıda bulunacaksınız.

Ara tırmayı ben **Prof. Dr. Yasemin KAÇAR** ve Yüksek Lisans ö rencimiz **Gonca AY** ile birlikte yapıyoruz. Bu ara tırmanın sonuçları sizinle aynı ya larda sizin gibi hasta arkada larımıza yeni tedaviler geli tirebilmemiz için gereklidir. Bu ara tırmanın sonuçlarını ba ka doktorlara da söyleyece iz, sonuçları bildirece iz ama sizin adınızı söylemeyece iz.

Bu ara tırmaya katılıp katılmamak için karar vermeden önce çalı manın nasıl yapılaca ma dair verece imiz bilgiler do rultusunda anne ve babanız ile konu up onlara danı malısınız.

Son olarak, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sa lı ı ve Hastalıkları AD Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı çalı anları tarafından izniniz do rultusunda bu çalı mayı yapabilmek için kolunuzdan 5 ml (1 tüp) kadar kan almamız gerekmektedir. Bu kandan genetik materyal DNA elde edilecektir ve serum ayrı tırılacaktır. Genetik materyalde paraoksonaz gen polimorfizmlerine, serumda paraoksonaz enzim aktivitesine bakılacaktır. Bu a amada ba arsız olunursa tekrar kan vermeni istenebiliriz. Kan alırken canınız biraz acıyabilir ama çabuk geçecektir.

Anne ve babanız veya yasal temsilcinize bu ara tırmadan bahsedip onaylarını/izinlerini alaca ız. Anne ve babanız veya yasal temsilciniz tamam deseler bile siz kabul etmeyebilirsiniz. Bu ara tırmaya katılmak sizin iste inize ba lı ve istemezseniz katılmazsınız. Bu nedenle hiç kimse size kızmaz ya da küsmez. Önce katılmayı kabul etseniz bile sonradan vazgeçebilirsiniz, bu tamamen size ba lı. Kabul etmedi iniz durumda da doktorlar ve e iticilerin, muayene ve di er faaliyetlerinde size önceden oldu u gibi iyi davranır, önceye göre farklılık olmaz.

Aklınıza imdi gelen veya daha sonra gelecek olan soruları istedi iniz zaman bana sorabilirsiniz. Telefon numaram ve adresim bu ka itta yazıyor. (Prof. Dr. Selma ÜNAL, telefon ve adres'ten (Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sa lı ı ve Hastalıkları AD Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı Ba kanı Prof. Dr. Selma Ünal: 0324 337 43 00 dahili: 1149) Bu ara tırmaya katılmayı kabul ediyorsanız a a ıya lütfen adınızı ve soyadınızı yazınız ve imzanızı atınız. mızaladıktan sonra size ve ailenize bu formun bir kopyası verilecektir.

Çocu un adı, soyadı:

Çocu un imzası:

Yasal temsilcinin adı, soyadı:

Yasal temsilcinin imzası:

ÖZGEÇM

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	:	Gonca AY
Doğum Tarihi	:	11.03.1988
Doğum Yeri	:	zmir

Eğitim Bilgileri

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	Mersin Üniversitesi	2006-2011
Yüksek Lisans	Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü	Mersin Üniversitesi	2011-2013

Yabancı Dil Bilgisi

İngilizce	yi (B1)
Almanca	yi (B2)

Bildiri, Bilimsel Aktivite ve Etkinlikler

Erasmus Öğrenci Değişim Programı, Julius Maximilian Üniversite, Würzburg, Eylül, 2009 - Ağustos, 2010

Bitirme Tezi “DNA Polimorfizmlerinin PCR-RFLP Yöntemleri ile Analizi”, Mersin Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Haziran 2011

Poster Sunumu “Biyokimya Laboratuvarı Nasıl Olmalı?”, Biyokimya Laboratuvar Eğitimine Çok Disiplinli Yaklaşım Çalışması, Ankara Mayıs 2012

Poster sunumu: Orak Hücre Hastası Çocuklarda PONL55M ve PONQ192R

Polimorfizmleri Analizi, I. Ulusal Hematolojik Genetik Sempozyumu , zmir, Aralık 2013

Projeler

MEÜ BAP Birimi Yüksek Lisans Tezi Ocak 2013-halen

“Orak Hücre Hastalarında Paraoksonaz
Gen Polimorfizmleri Analizi”