

**SİTOKİN SİNYAL BASKILAYICILARI (SOCS)  
OLAN SOCS-1 VE SOCS-3 GEN İFADE  
DÜZEYLERİNİN ORAK HÜCRE ANEMİLİ  
HASTALARDA ARAŞTIRILMASI**

**HATİCE SEVGİ**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ  
ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MERSİN  
HAZİRAN-2012**

**SİTOKİN SİNYAL BASKILAYICILARI (SOCS)  
OLAN SOCS-1 VE SOCS-3 GEN İFADE  
DÜZEYLERİNİN ORAK HÜCRE ANEMİLİ  
HASTALARDA ARAŞTIRILMASI**

**HATİCE SEVGİ**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ  
ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman  
Yrd. Doç. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN**

**MERSİN  
HAZİRAN-2012**

Hatice SEVGİ tarafından Yrd. Doç. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN danışmanlığında ve Prof. Dr. Selma ÜNAL eş danışmanlığında hazırlanan “Sitokin Sinyal Baskılayıcıları (SOCS) Olan SOCS-1 ve SOCS-3 Gen İfade Düzeylerinin Orak Hücre Anemili Hastalarda Araştırılması” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

Prof. Dr. Serap ERGENE

Prof. Dr. Selma ÜNAL

Doç. Dr. Yasemin KAÇAR

Yrd. Doç. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN

İmza

.....

.....

.....

.....

.....

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 23/07/2012 tarih ve 2012.15./436 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

~~Prof. Dr. A. Murat GİZAR~~  
Enstitü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

## SİTOKİN SİNYAL BASKILAYICILARI (SOCS) OLAN SOCS-1 VE SOCS-3 GEN İFADE DÜZEYLERİNİN ORAK HÜCRE ANEMİLİ HASTALARDA ARAŞTIRILMASI

Hatice SEVGİ

### ÖZ

Orak Hücre Anemisi (OHA) tek nokta mustasyonlu bir hastalıktır ve  $\beta$ -globin zincirinin altıncı pozisyonunda glutamik asit yerine valin geçisi ile tek bir aminoasitin yer değiştirmesi sonucu oluşur. SOCS-1 ve SOCS-3 genleri sitokin sinyal baskılayıcı genlerin iki üyesidir. Bu çalışmada, inflamatuvar bir hastalık olan OHA'nin patogeneğinde sitokin sinyal baskılayıcılarının gen düzeyinde ifadesi ilk kez kantitatif real-time RT-PZR tekniği ile araştırılmıştır. SOCS-1 ve SOCS-3 gen ifade düzeyleri hastalığın evrelerine (kriz öncesi ve kriz halinde) göre değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada stabil durumdaki 73 orak hücre anemili hasta ve kriz nedeniyle hastaneye başvuran 26 hasta, aynı yaş grubundaki 56 sağlıklı populasyon ile karşılaştırılarak incelenmiştir. OHA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarından kan örnekleri alınarak lenfosit izolasyonu yapılmış ve total RNA pürifikasyonu yapıldıktan sonra cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerine özgül primer ve probler kullanılarak amplifikasyon yapılmıştır ve genlerin kantitasyonu B-aktin geni ile normalize edilmiştir.

Kriz grubunun SOCS-1 gen ifadesinin, orak hücre anemisi ve sağlıklı kontrollerden anlamlı derecede düşük olduğu fakat SOCS-3 ifadesinin kontrol grubuna göre değişmediği sonucu elde edilmiştir. SOCS-1 gen ifadesinin kriz döneminde azalması, özellikle SOCS-1 geninin inflamasyonla ilişkili olduğunu ve inflamasyonu azaltıcı yönde etki yapabileceği fikrini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PZR, İnflamasyon, Orak Hücre Anemisi, SOCS-1, SOCS-3

**Danışman:** Yrd. Doç. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı

## THE INVESTIGATION OF SUPPRESSOR OF CYTOKINE SIGNALLING (SOCS) GENE EXPRESSION IN SICKLE CELL ANEMIA

Hatice SEVGİ

### ABSTRACT

The sickle cell anemia (SCA) is a disorder which caused by a point mutation and results from a single aminoacid substitution of valine for glutamic acid at the sixth position of the beta-globin chain. SOCS-1 and SOCS-3 genes are two members of suppressor of cytokine signaling genes. In this study, suppressors of cytokine signaling in the pathogenesis of SCA is an inflammatory disease of gene expression level for the first time investigated. SOCS-1 and SOCS-3 gene expression levels were evaluated according to stages (in the pre-crisis and crisis) of the disease.

In this study stable conditions 73 patients with sickle cell anemia and 26 patients were admitted to the hospital because of the crisis, the same age group were compared with 56 healthy population. The blood samples were collected from SCA patients and healthy groups and lymphocytes were isolated and managed cDNA synthesis after purification of total RNA. Amplification was carried out by quantitative TaqMan real-time PCR technique using specific primers and probes to SOCS-1 and SOCS-3 genes. Beta-actin gene was used for normalization of the genes.

SOCS-1 gene expression in the crisis group, was significantly lower than those of sickle cell anemia and healthy controls but SOCS-3 expression did not change compared to the control group. SOCS-1 gene expression decreased during the crisis. These data suggest that SOCS-1 gene seems to be associated with inflammation in SCA and may act a positive role of reducing inflammation.

**Keywords:** Quantitative real-time RT-PCR, inflammation, sickle cell anemia, SOCS-1, SOCS-3

**Advisor:** Asist. Prof. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN, Department of Biology, University of Mersin

## TEŞEKKÜR

Bana bu çalışmayı yapma fırsatı veren, her konuda desteğini eksik etmeyen ve bana karşı her zaman sabır ve hoşgörü ile yaklaşan çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN'e ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı'ndan ikinci danışmanım olan Prof. Dr. Selma ÜNAL'a, kan örneklerinin toplanmasında ve laboratuvar çalışmamız esnasında yardımını esirgemeyen Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı'ndan Uzm. Dr. Özlem ÖZDEMİR'e, tez çalışması süresince bana laboratuvarlarında çalışma imkanı sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Yasemin KAÇAR'a, çalışmamın kantitatif real-time revers transkriptaz PZR ölçümü sırasında laboratuvarlarında çalışma olanağı sağlayan Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İmmünoloji Bilim Dalından değerli hocam Prof. Dr. Güher GÖRAL'a, Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL'a, Doç. Dr. Ferah BUDAK'a ve laboratuvar çalışanlarına ve özel olarak, çalışma sırasında tecrübelerini paylaştan çok değerli tıbbi tekniker Figen AYMAK'a ve Uludağ Üniversitesi İmmünoloji Bilim Dalı çalışanlarına, Uludağ Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndan Uzm. Bio. Görkem UMUT'a ve Mersin Devlet Opera ve Balesi'nden Yağmur ARINLI'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmam süresince benden manevi yardımlarını esirgemeyen Mersin Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden çok değerli arkadaşım Uzm. Bio. Burcu MANSUROĞLU REYHANİ, Mol. Bio. Hikmet ÇELİK'e ve Biyoloji Bölümü çalışanlarına teşekkürlerimi borç bilirim. Benden maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen anneme, babama, kardeşlerime, bütün aileme ve ayrıca her zaman bana destek olan nişanlım Ahmet TURAN'a edeceğim teşekkür hiçbir zaman yeterli olmayacaktır. Desteklerinden dolayı tüm arkadaşlarıma en içten sevgilerimle teşekkür ederim.

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı BAP birimine teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZ</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	iv
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	ix
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI</b> .....	<b>3</b>
2.1. ORAK HÜCRE ANEMİSİ.....	3
2.1.1. Orak Hücre Anemisinin Tanımı.....	3
2.1.2. Prevelans ve Coğrafi Dağılım.....	3
2.1.3. Oraklaşmanın Patofizyolojisi.....	4
2.1.4. Orak Hücre Anemisinin Genetik Geçışı.....	6
2.1.5. Klinik Bulgular.....	7
2.1.5.1. Hematolojik bulgular.....	8
<i>Aplastik kriz</i> .....	8
<i>Hemolitik kriz</i> .....	8
<i>Vazo-oklüzif kriz</i> .....	9
2.1.5.2. Hematolojik olmayan bulgular.....	9
<i>Büyüme geriliği</i> .....	9
<i>Kemik ve eklem anormallikleri</i> .....	9
<i>Genitoüriner</i> .....	10
<i>Karaciğer ve dalak</i> .....	10
<i>Kalp ve akciğer</i> .....	10
<i>Nörolojik sistem</i> .....	11
<i>Göz</i> .....	11
<i>Bacak ülserleri</i> .....	11
<i>Enfeksiyonlar</i> .....	11
<i>Hamilelik</i> .....	11
2.1.6. Orak Hücre Anemisinin Tanısı.....	12
2.1.7. Orak Hücre Anemisinde Tedavi.....	12
2.1.8. Ölüm.....	14
2.2. SİTOKİNLER.....	14

2.2.1. İnterlökin-1 (IL-1).....	15
2.2.2. İnterlökin-6 (IL-6).....	16
2.2.3. İnterlökin-8 (IL-8).....	17
2.2.4. TNF- $\alpha$ (Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$ ).....	17
<b>2.3. JANUS KİNAZ AİLESİ - SİNYAL İLETİCİ VE TRANSKRİPSİYON AKTİVATÖRLERİ.....</b>	<b>18</b>
2.3.1. Janus Kinaz Ailesi.....	18
2.3.2. Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyonel Aktivatör Ailesi .....	19
2.3.3. Janus Kinaz/Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyonel Aktivatör (JAK/STAT Yolağı).....	20
<b>2.4. SİTOKİN SİNYAL BASKILAYICILARI (SOCS) .....</b>	<b>21</b>
2.4.1. SOCS-1 Proteini ve İnflamasyon .....	23
2.4.2. SOCS-3 Proteini ve İnflamasyon .....	24
2.4.3. İnflamatuvar Hastalıklarda SOCS Proteinleri .....	25
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1. MATERYAL .....</b>	<b>27</b>
3.1.1. Tam Kandan RNA İzolasyonu Eldesinde Kullanılan Kimyasallar.....	27
3.1.2. Cihazlar .....	29
<b>3.2.YÖNTEM.....</b>	<b>29</b>
3.2.1. Lökosit İzolasyonu .....	30
3.2.2. Total RNA Saflaştırması .....	30
3.2.3. cDNA Sentezi .....	31
3.2.4. Gerçek Zamanlı PZR Ölçümü.....	32
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1. BULGULAR.....</b>	<b>37</b>
4.1.1. SOCS-1 ve SOCS-3 Genlerinin İfadelerinin Gerçek Zamanlı RT-PZR' da Niceliksel Ölçümü .....	37
4.1.1.1. Birinci çalışma absolut (tam) niceliksel ölçüm.....	37
4.1.1.2. İkinci çalışma tam niceliksel ölçüm.....	40
4.1.1.3. Üçüncü çalışma tam niceliksel ölçüm.....	43
4.1.1.4. Dördüncü çalışma tam niceliksel ölçüm .....	46



4.1.1.5. Beşinci çalışma tam niceliksel ölçüm .....	49
4.1.1.6. Altıncı çalışma tam niceliksel ölçüm .....	52
4.1.2. Hasta Gruplarının Değerlendirilmesi .....	55
4.1.3. Hematolojik Bulgular .....	61
4.1.4. İstatistiksel Analiz .....	62
4.2. TARTIŞMA .....	63
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>71</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>72</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>84</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 3.1. Birinci grup çalışma örneklerinin 96 well plate'e yüklenmesi .....	34
Çizelge 3.2. İkinci grup çalışma örneklerinin 96 well plate'e yüklenmesi.....	34
Çizelge 3.3. Üçüncü grup çalışma örneklerinin 96 well plate'e yüklenmesi.....	35
Çizelge 3.4. Dördüncü grup çalışma örneklerinin 96 well plate'e yüklenmesi ....	35
Çizelge 3.5. Beşinci grup çalışma örneklerinin 96 well plate'e yüklenmesi.....	36
Çizelge 3.6. Altıncı grup çalışma örneklerinin 96 well plate'e yüklenmesi.....	36
Çizelge 4.1. Örnek ve referans genlerin birinci çalışma sonucunda elde edilen tam niceliksel eşik değerleri .....	38
Çizelge 4.2. Hedef genlerin birinci çalışma sonucunda elde edilen göreceli ölçüm değerleri .....	39
Çizelge 4.3. Örnek ve referans genlerin ikinci çalışma sonucunda elde edilen tam niceliksel eşik değerleri .....	41
Çizelge 4.4. Hedef genlerin ikinci çalışma sonucunda elde edilen göreceli ölçüm değerleri .....	42
Çizelge 4.5. Örnek ve referans genlerin üçüncü çalışma sonucunda elde edilen tam niceliksel eşik değerleri.....	44
Çizelge 4.6. Hedef genlerin üçüncü çalışma sonucunda elde edilen göreceli ölçüm değerleri .....	45
Çizelge 4.7. Örnek ve referans genlerin dördüncü çalışma sonucunda elde edilen tam niceliksel eşik değerleri .....	47
Çizelge 4.8. Hedef genlerin dördüncü çalışma sonucunda elde edilen göreceli ölçüm değerleri .....	48
Çizelge 4.9. Örnek ve referans genlerin beşinci çalışma sonucunda elde edilen tam niceliksel eşik değerleri .....	50
Çizelge 4.10. Hedef genlerin beşinci çalışma sonucunda elde edilen göreceli ölçüm değerleri .....	51
Çizelge 4.11. Örnek ve referans genlerin altıncı çalışma sonucunda elde edilen tam niceliksel eşik değerleri .....	53
Çizelge 4.12. Hedef genlerin altıncı çalışma sonucunda elde edilen göreceli ölçüm değerleri .....	54
Çizelge 4.13. OHA hastalarının SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin $\Delta\Delta CT$ ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçları.....	56-57
Çizelge 4.14. Kriz hastalarının SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin $\Delta\Delta CT$ ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçları .....	58
Çizelge 4.15. Kontrol grubunun SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin $\Delta\Delta CT$ ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçları.....	59-60
Çizelge 4.16. Hasta ve kontrol gruplarının $\Delta\Delta CT$ değerleri bakımından SOCS-1 ile SOCS-3 ölçümlerinin karşılaştırılması .....	60
Çizelge 4.17. Hasta ve kontrol gruplarının $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri bakımından SOCS-1 ile SOCS-3 gen ifadelerinin karşılaştırılması .....	61
Çizelge 4.18. Hasta ve kontrol grubunun WBC, HBG, HCT, PLT ve CRP sonuçları .....	61

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Orak hücre anemisi hastalığında eritrositlerin elektron mikroskopik görünümü.....	5
Şekil 2.2. Orak hücre hastalığının fizyopatolojisi.....	6
Şekil 2.3. Orak hücre anemisinin kalıtım modeli.....	7
Şekil 2.4. JAK protein yapısı .....	19
Şekil 2.5. JAK/STAT mekanizmasının işleyişi.....	20
Şekil 2.6. SOCS ailesi üyelerinin domen yapıları ve alternatif adları.....	21
Şekil 2.7. Negatif geri-bildirim mekanizması.....	23
Şekil 4.1. Hedef ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüyü gösteren amplifikasyon eğimi.....	37
Şekil 4.2. Hedef ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüyü gösteren amplifikasyon eğimi.....	40
Şekil 4.3. Hedef ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüyü gösteren amplifikasyon eğimi.....	43
Şekil 4.4. Hedef ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüyü gösteren amplifikasyon eğimi.....	46
Şekil 4.5. Hedef ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüyü gösteren amplifikasyon eğimi.....	49
Şekil 4.6. Hedef ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüyü gösteren amplifikasyon eğimi.....	52

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>OHA</b>	: Orak Hücre Anemisi
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekroz Faktör-alfa
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	: İnterlökin-1 alfa
<b>IL-6</b>	: İnterlökin-6
<b>IL-8</b>	: İnterlökin-8
<b>SOCS</b>	: Sitokin Sinyal Baskılayıcı
<b>CP</b>	: (Crossing Point) Eşik Değer
<b>CT</b>	: (Treshold Cycle) Threshold Döngüsü
<b>Hb</b>	: Hemoglobin
<b>G6PD</b>	: Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
<b>Hkt</b>	: Hematokrit
<b>LDH</b>	: Laktat Dehidrogenaz
<b>CRP</b>	: C reaktif protein
<b>JAK/STAT</b>	: Janus Kinaz/ Sitokin iletiler ve transkripsiyon aktivatörleri
<b>IEF</b>	: İzoelektrik fokuslama
<b>KIT</b>	: Kemik İliği Transplantasyonu
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>IBD</b>	: İnflammatory Bowel Diseases
<b>RA</b>	: Rheumatoid Arthritis
<b>SH2</b>	: Scr-homology-2
<b>KIR</b>	: Kinase inhibitory Region
<b>CD</b>	: Crohn Disease
<b>RT-PZR</b>	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>UC</b>	: Ulcerative Colitis
<b>BA</b>	: Beta Aktin
<b>WBC</b>	: White Blood Cell
<b>PLT</b>	: Plate

## 1. GİRİŞ

Orak Hücre Anemisi (OHA), ilk defa 1910 yılında Herrick tarafından 20 yaşında bir hemolitik anemili hastanın periferik yaymasında orak hücrelerin görülmesi ile tanımlanmıştır. Nokta mutasyonları sonucu hemoglobin Beta zincirinin NH<sub>2</sub> ucunda 6. aminoasidi olan Glutamin yerine Valin geçmesi ile yani baz düzeyinde GAG yerine GTG gelmesi ile oluşan hematolojik bir hastalıktır [1]. Anormal globin sentezi sonucu oluşan eritrositler çeşitli nedenlerle normal şeklini kaybeder ve oraklaşırlar. Oksijen basıncının artması, asit pH, dehidratasyon, ısı artışı ve hücre içi HbS konsantrasyonunun artması eritrosit oraklaşmasını arttıran sebepler arasındadır [2]. Oraklaşan eritrositler küçük damarlarda tıkanıklık yaparak organ hasarına neden olur. Kronik hemolitik anemi, tekrarlayan ağrılı ataklar ve etkilenen organda görülen işlev bozukluğu hastalığın temel bulguları arasında sayılabilir. Hastalığın gidişatı sırasında oluşan akut vazo-oklüzif ağrılı krizler en sık rastlanan komplikasyondur [3].

Vazo-oklüzif ağrılı kriz tanısı ile hastaneye başvuran hastalarda etkilenen alanda hassasiyet, ödem, ısı artışı gibi bulguların yanısıra ateş ve lökositoz gibi inflamasyonun sistemik belirtileri de tespit edilebilir. İnflamatuvar sitokinlerden tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1alfa (IL-1 $\alpha$ ), interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8), histamin ve lökotrien-B<sub>4</sub> düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Özellikle TNF- $\alpha$  ve IL-8'in orak şeklini almış eritrositlerin damar endoteline yapışmasını artırarak kan akışını bozduğu ve iskemik atakların oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir [4].

Orak hücre anemisi patogenezinde rol oynayan sinyal aracılarının gerek hücresel düzeyde ve gerekse gen ifadeleri düzeyinde ilişkileri deneysel hematoloji çalışmalarında sıklıkla yer almasına rağmen, inflamasyonda önemli rolleri olan sitokin ve onların düzenleyicileri olan sitokin sinyal baskılayıcılarının bu hastalık üzerindeki etkileri araştırmaya açıktır. Bu çalışmanın sonucunda, OHA patogenezinde özellikle inflamasyonda rol oynayan sitokin proteinlerinin düzenlenmesinde Sitokin Sinyal Baskılayıcı (SOCS) genlerinin etkilerini açıklığa

kavuşturma ve yeni potansiyel tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlaması düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasının kapsamında, 99 Orak Hücre Anemi (OHA) hastalarından ve 56 sağlıklı popülasyondan alınan periferik kan materyalinden elde edilen total RNA'lerden inflamasyonda önemli olan SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesi Gerçek Zamanlı PZR yöntemiyle araştırılmıştır.

OHA'nin gelecekteki tedavisine ışık tutacak stratejilerin geliştirilmesinde öncü olacak sinyal yollarında önemli rollere sahip SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesi üzerindeki etkilerinin araştırılması, bu alandaki eksikliklerin tamamlanması, doğru ilaç tedavisi ile doğru hedefin saptanması ve OHA etiyojisinde moleküler mekanizmaların önemli bir işlev kazanması amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

### 2.1. ORAK HÜCRE ANEMİSİ

#### 2.1.1. Orak Hücre Anemisinin Tanımı

Orak Hücre Anemisi (OHA), ilk defa 1910 yılında Herrick tarafından tanımlanmış dünyada en sık görülen hemoglobinopatilerden biri olan kronik ve hemolitik tipte bir anemidir [1]. HbS,  $\beta$  globin zincirinin amino (NH<sub>2</sub>) ucunda 6. pozisyondaki Glutamin'in, Valin aminoasidi ile yer değiştirmesiyle; baz düzeyinde GAG (Guanin-**Adenin**-Guanin) yerine GTG (Guanin-**Timin**-Guanin) geçmesiyle oluşur. Bu mutasyonun sonucu olarak oksijensiz HbS polimerize olur ve katı kristal halinde çöker [5]. Eritrositlerin oraklaşması sonucunda kan akışkanlığı yavaşlar ve damarlarda tıkanıklık meydana gelir.

Hemoglobin (Hb), dokulara oksijeni dağıtır ve eritrositlerin içindeki yüksek yoğunluğu eritrositin şeklini koruma ve şekil değiştirebilme yeteneğini sağlar. Normal insan hemoglobininde 4 tane polipeptit zinciri ve 4 tane hem grubu bulunur. Polipeptit zincirleri 2 tane  $\alpha$  ve 2 tane  $\beta$  zincirinden oluşmaktadır. Erişkinlerde bulunan temel hemoglobin HbA'dır ve HbA2 miktarı çok azdır. Fetal hayat boyunca HbF düzeyi yüksektir, doğumdan 6 ay sonra ise HbF yerini yavaş yavaş HbS'e bırakmaya başladığında hastalık kendini belli eder [6].

Orak hücre anemisi otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalıktır. Taşıyıcılık formu; SA, homozigot formu: SS, birleşik formları; S-Beta, S-Alfa, S-C, S-D şeklindedir [1]. Orak hücre geni homozigot ve genotipi HbSS olan kişilerde hastalığın klinik bulguları görülür.

#### 2.1.2. Prevelans ve Coğrafi Dağılım

Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yenidoğan siyahi bebeklerde orak hücre taşıyıcılığı %8-10 iken; Batı Afrika'da oran %25-30'a kadar çıkmaktadır.

ABD’de yaklaşık 50.000–60.000 civarında orak hücre hastasının yaşadığı düşünülmektedir. Afrika’da her yıl orak hücre hastalığı olan ortalama 120.000 bebek dünyaya gelmektedir [3]. Karablen, Orta ve Güney Amerika, Akdeniz bölgesi (Türkiye ve Yunanistan’ı içine alan), Ortadoğu ve Hindistan hastalığın sık görüldüğü bölgelerdir [7].

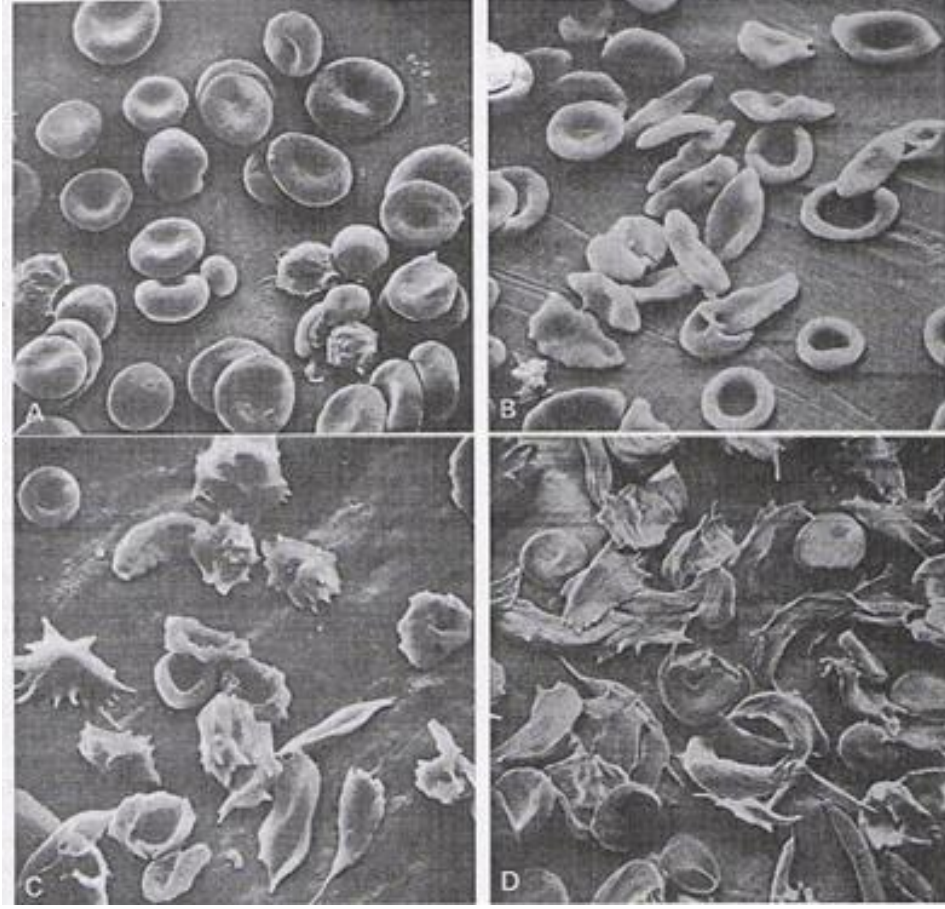
Ülkemizde hemoglobinopatiler ile ilgili ilk çalışmalar, M. Aksoy tarafından 1950’li yıllarda Çukurova bölgesinde yaşayan Eti Türkleri’nde yapılmıştır [8]. Sağlık Bakanlığı ve Ulusal Hemoglobinopati Konseyi’nin verilerine göre taşıyıcı sıklığının Adana’da %10, Antakya’da %10,5, Mersin’de %13,6 ve ülkemizdeki toplam orak hücre hastalığı olan kişi sayısının yaklaşık 1200 civarında olduğu belirtilmiştir [9-10]. Ayrıca hastalığın Antalya’da %2,5, Diyarbakır’da %0,5, Muğla’da %0,5 sıklıkta görüldüğü bildirilmiştir [11].

### 2.1.3. Oraklaşmanın Patofizyolojisi

Oraklaşan hücreler dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir. Orak hücre anemisi hastalarının periferik yaymasında görülen orak şeklindeki hücreler geri dönüşsüz orak hücrelerdir. Bu hücrelerin sayısı sabittir ve hastalığın komplikasyonları ile (ağrılı kriz gibi) değişmez. Geri dönüşsüz orak hücreler, özkalıtlı orak hücre hastalığında bulunurken taşıyıcılık tipinde yoktur (şekil 2.1.) [12].

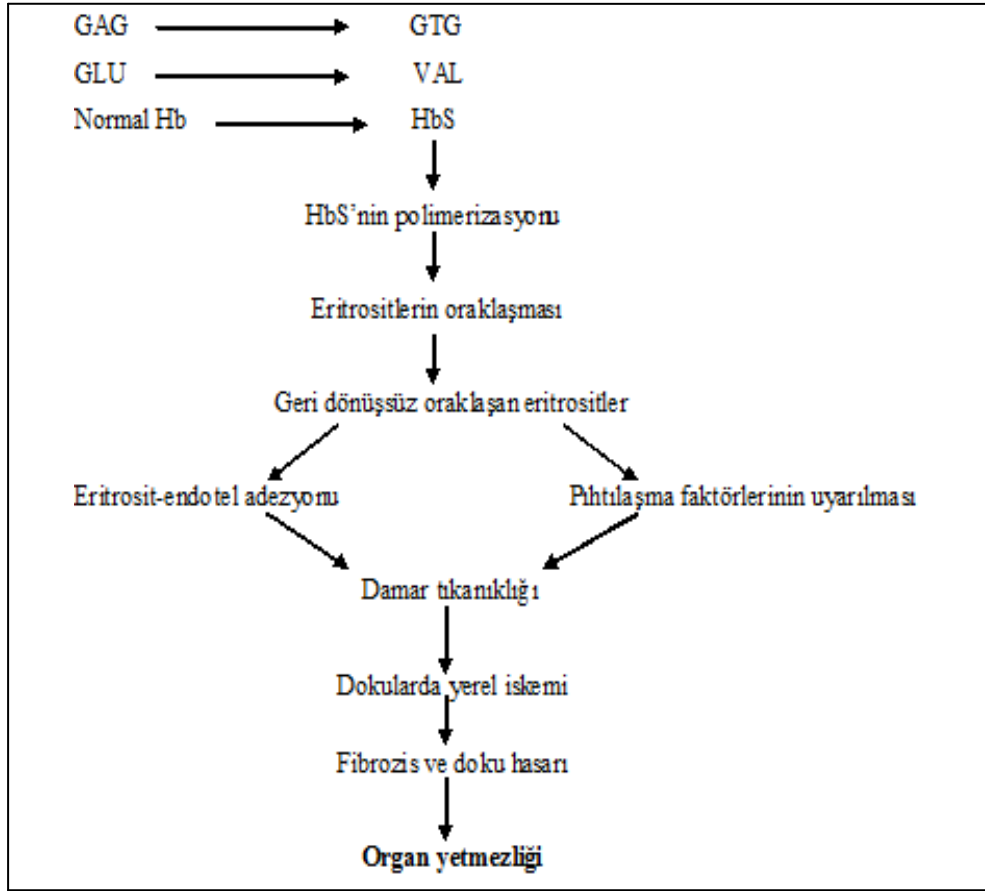
HbS molekülleri, oksijen düzeyi düştüğü zaman polimerize olur. HbS’nin fiziksel yapısındaki değişim eritrositlerin şekil değiştirmesine yol açar ve eritrositler orak şeklini alırlar. Oraklaşan eritrositler dolaşımın viskozitesini artırır ve kan akımını yavaşlatır. Bu da özellikle küçük damarlarda tıkanıklık ve oksijensiz bir ortam oluşturarak, ağrılı kriz ve organ nekrozuna, sonuçta akut ve kronik süreçte doku harabiyetine neden olur (şekil 2.2.) [3].





Şekil 2.1. Orak hücre anemisi hastalığında eritrositlerin elektron mikroskopik görünümü. A) Oksijenlenmiş kanda normal kırmızı küreler arasında 1 tane mikrosferosit ve 3 adet lökosit görünümü B) Şekilleri bozulmaya başlayan oval görümlü kırmızı küreler. C) Kısmi oksijensizlik durumunda keskin sınırlı, çıkıntılı filamentli hücreler D) Tam oksijensizlik durumunda keskin sınırlı, uzun yüzeyli yarımay şeklindeki eritrositler [12].

Enfeksiyonlar, parsiyel oksijen basıncında azalma, aşırı fiziksel egzersiz, alkol, gebelik, damar çapını azaltan durumlar, vücut ısısının artışı, kan yoğunluğunda artma, oksihemoglobin disosiasyon eğrisinin sağa kaymasına neden olan pH azalması, yüksek HbS, düşük HbF miktarı, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliği ve 2,3 difosfogliserat düzeyinin azalması oraklaşma eğilimini artıran etkenlerdir [6-7].



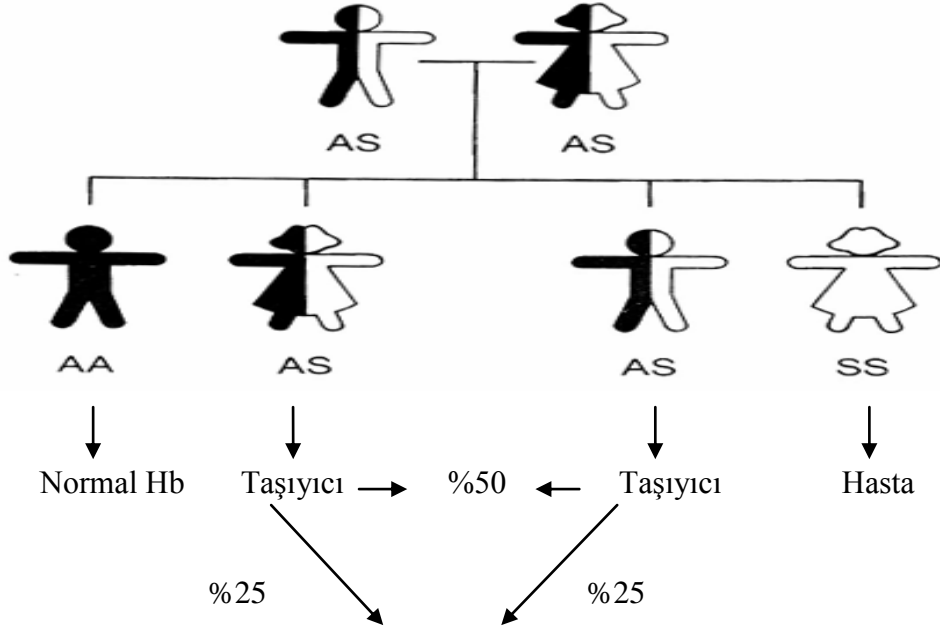
Şekil 2.2. Orak hücre hastalığının fizyopatolojisi [7].

#### 2.1.4. Orak Hücre Anemisinin Genetik Geçişi

1917 yılında Victor E. EMMEL tarafından bir OHA hastasının babasında orak hücrelerinin gösterilmesi, hastalığın genetik bir temeli olduğunu gündeme getirmiştir [13].

Çoğu otozomal resesif kalıtmalı bir genetik hastalık olmasına rağmen akraba evliliklerinde oldukça sık karşılaşılan bir durumdur. Orak hücre mutasyonu homozigot ya da heterozigot durumda olabilir. Heterozigot durumdaki kişi anne ya da babanın sadece birinden mutasyona uğramış geni almaktadır ve eritrositlerde HbA ile birlikte HbS de bulunmaktadır. Bu durum OHA taşıyıcılığı olarak adlandırılmaktadır. Homozigot durumda ise anne ve babanın her ikisinden de mutasyona uğramış gen alınarak OHA söz konusu olmaktadır. Genotip olarak OHA taşıyıcısı (HbAS) olan ebeveynler %25 olasılıkla OHA'li hasta çocuğa sahip olma

riski taşımaktadır. Böyle anne ve babadan genotipi normal olan (HbAA) çocuk doğma olasılığı ancak %25'tir (Şekil 2.3.) [14].



Bunlar kendi çocuklarına geçecek şekilde taşıyıcı olabilir

Şekil 2.3. Orak hücre anemisinin kalıtım modeli [14]

#### 2.1.5. Klinik Bulgular

OHA'nin semptomları ve klinik bulguları çok değişiktir. Ağrılı kriz dönemleri dışında genellikle belirti vermezler. Erkek hastaların ortalama yaşam süresi 42, kadınların ise 48 yıldır. Fakat bu yaş sınırları hastalığın ilerleyişine göre değişkenlik gösterebilir [3].

Orak hücre anemili bebeklerde tipik semptomlar ve bulgular ilk altı aydan sonra görülür. HbSS fenotipinin fetal ve erken postnatal devrede klinik olarak belirmemesi, oraklaşmayı önleyen yeterli miktarda HbF varlığına bağlıdır. İlk üç ayda anemi, 6. aydan sonra ilk kez splenomegali fark edilir. İlk vazo-okluzif kriz olguların yaklaşık yarısında yaşamın 6.-12. ayında görülür; büyük çoğunluğunda 6 yaştan evvel, çok azında da yetişkin yaşta klinik semptom verebilir [15-16].

Hastalığın belirti ve bulguları hematolojik ve hematolojik olmayan şeklinde ikiye ayrılır [7].

#### 2.1.5.1. Hematolojik bulgular

##### *Aplastik kriz*

Aplastik kriz sırasında ilk olarak kısa yaşam süresine sahip HbF'den fakir hücreler dolaşımdan kalkmaktadır. Daha yüksek oranda HbF içeren hücreler daha uzun süre dolaşımda kalmaktadır. Bu doğal seleksiyon aplastik kriz sırasında HbF içeren hücrelerin daha yüksek oranda saptanmasına neden olmaktadır [17].

Aplastik krizlerin büyük bir kısmı kısa ve hafif olduğundan tedavi gerektirmemektedir. Bazı hastalara eritrosit transfüzyonu yapılması gerekebilmektedir. İyileşme döneminde hastanın yeterli folik asit alması sağlanmalıdır [17].

Aplastik krize neden olan viral enfeksiyonların en önemlisi parvovirüs B19 enfeksiyonudur. Parvovirüsün geç eritrosit öncülerinin farklılaşmasını engellediği ve hemolitik anemiler sırasında görülen geçici eritroid aplaziden sorumlu olduğu gösterilmiştir [18].

##### *Hemolitik kriz*

Hemoglobin ve hematokrit düzeylerinde düşme, ateş, ikter, laktat dehidrogenaz (LDH) ve retikülosit düzeylerinde artış hemolitik krizin karakteristik özellikleridir. Bazı ilaçlar ve glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliği hemolitik krizi artırır.

### *Vazo-oklüzif kriz*

Vazo-oklüzif krizler OHA'nin damgasıdır. Geri dönüşümsüz orak hücrelerin kan damarlarını tıkanması sonucu oluşan doku infarktına bağlı olarak gelişen akut ve ağrılı ataklardır. Ağrılı krizler hastaların dörtte birinden fazlasında hastalığın ilk belirtisi olarak kendini göstermektedir. İki yaşından sonra en sık görülen belirtidir. Akut ağrılı ataklarda başlatıcı etkenler; soğuğa maruz kalma, dehidratasyon, enfeksiyon, stres, menstruasyon veya alkol alımı olabilir. Başlatıcı neden hastaların %80'inde enfeksiyonlardır. Genellikle kemikler, akciğer, karaciğer, dalak, böbrek ve peniste oluşur [19].

Eritrositlerin oraklaşması küçük damarlarda tıkanmaya yol açar. Bunun sonucunda iç organ ve yumuşak doku nekrozları gelişir. Nekroz kendisini yaygın kemik, eklem ve kas ağrıları ile gösterir. Ağrılı krizlere ateş, eklemlerde şişlik, hassasiyet, takipne, hipertansiyon, bulantı ve kusma gibi bulgular eşlik edebilir.

Ağrılı kriz sırasında; eritrosit yıkımında artış, C-reaktif protein (CRP),  $\alpha$ 1-glikoprotein, transferin gibi akut faz reaktanlarının düzeylerinde artma, serum LDH, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , Substans-P gibi sitokinlerin düzeylerinde artma ve serum akışkanlığında azalma görülebilir [6-7, 20].

#### 2.1.5.2. Hematolojik olmayan bulgular

*Büyüme geriliği:* Büyüme geriliği boydan çok vücut ağırlığını etkiler ve görülme sıklığı açısından kadın veya erkek arasında belirgin bir fark yoktur. Erişkin döneminde genellikle normal boya ulaşılır fakat kilo normal seviyenin altında seyreder [3].

*Kemik ve eklem anormallikleri:* Kemik ve eklemler en sık tutulan yerlerdir. Çocukluk döneminde hastalığın en erken belirtilerinden biri daktilitistir (el-ayak sendromu). İnfarkt, çocuklarda el-ayak sendromuna neden olurken ilerleyen yaşlarda el ve ayak parmaklarında eşit olmayan kemik deformitelerine, ağrılı şiş eklemlere ve femur başı

aseptik nekroza yol açar. Femur başı aseptik nekroz 35 yaşına gelmiş OHA hastalarının %50'sinden fazlasında görülmüştür [21].

*Genitoüriner:* Priapizm hızla gelişen ağır bir komplikasyondur. Tekrarlama olasılığı %50'dir. Priapizmde corpus cavernosum oraklaşan hücrelerle tıkanmıştır, glans penis ve corpus spongiosum ise korunmuştur [6, 20].

Hastalarda dehidrasyona bağlı olarak aşırı su kaybı olur. Deoksijenasyon nedeniyle oraklaşma diğer organlara göre daha hızlı olur [22]. Bunun sonucu oluşan hipoksi, hipertansiyon, asidozis, papilla ve medulla iskemisine neden olarak böbrekte ilerleyici harabiyete yol açar.

*Karaciğer ve dalak:* Yaşamın ilk yılının ikinci yarısında oraklaşan hücrelerin dalaktaki kan dolaşımının tıkanması, hemoglobin yoğunluğunda azalma ve dalakta ani büyüme ile kendini gösterir ve hayatı tehdit edebilir. Bu olay dalak sekestrasyon krizi (dalakta kanın göllenmesi) olarak bilinir. Hb ve Hkt düzeylerinde ani düşme ve kanın dalakta göllenmesi ile kendini gösterir [23]. Sekestrasyon aynı zamanda karaciğerde de olabilir. Hiperbilirubinemi, artmış anemi ve retikülositoz ile birlikte karaciğer büyümesi ve yumuşaklığı genel klinik belirtilerdir [24].

*Kalp ve akciğer:* Çocukluk çağından itibaren kronik anemiye bağlı olarak kalp atım hacminde artış, kalp odacıklarında veya boyutlarında büyüme başlar. Egzersiz kapasitesinde azalmaya ve kardiyak kapasitenin giderek azalmasına rağmen kalp yetmezliği belirtileri genelde görülmez. Fakat hipertansiyon, kan hacminde aşırı yüklenme veya aneminin artması gibi durumlar sebebiyle kalp yetmezliği ortaya çıkabilir. Ayrıca hastalarda kalp damar hastalığı olmaksızın kalp damarlarının orak hücreler tarafından tıkanması ile kalp krizi gelişebilir [3].

Akut göğüs sendromu orak hücre hastalarının yaklaşık %30'unda görülür ve erişkinlerde hastalığa bağlı ölümlerin %15'inden sorumludur. Plöretik tipte göğüs ağrısı, ateş, lökositoz, öksürük, dispne ve takipne akut göğüs sendromunun başlıca

belirtileridir. Ağır olgularda akciğer fonksiyonları hızla bozulur ve ciddi hipoksi ile solunum yetmezliği gelişebilir [6, 20].

*Nörolojik sistem:* Orak hücre anemili çocuklarda beyinde iskemi ve infarkt sonucu nörolojik bulgularla hemiplejiler gelişebilir. Bazıları kalıcı olmaksızın tamamen düzelirler [25-26]. Diğer komplikasyonlar arasında, konvülsiyon, başağrısı, parestezi, menenjit, denge bozukluğu, işitme kaybı ve subaraknoid kanama sayılabilir [6-7, 12].

*Göz:* Retinada nekroz, retinal ayrılma, vitröz kanama ve proliferatif retinopati göz komplikasyonları arasında sayılabilir [12].

*Bacak ülserleri:* Çocuklarda nadir adölesan evrede ve erişkinlerde kronik bacak ülserlerine sıklıkla rastlanır. Oraklaşmış hücreler tarafından damarların obstrüksiyonu, venöz ve kapiller basınçta artma, sekonder bakteriyel enfeksiyonlar ve kanın oksijen taşıma kapasitesinde azalma bacak ülserlerinin gelişmesine neden olan sebepler arasındadır [27].

*Enfeksiyonlar:* OHA'li çocuklarda en yaygın ölüm nedeni enfeksiyonlardır. Ciddi bakteriyel enfeksiyonlar esas mortalite ve morbidite nedenidir. Çocuklukta en önemli ölüm nedeni fırsatçı enfeksiyonlar sepsisi ve menenjittir. OHA'nde splenik disfonksiyon *S. pnömonia*, *H. influenza* gibi kapsülsüz bakterilere fırsat yaratır. 10 yıldan sonra anaerobik ve enterik organizmalar önemli patojenlerdir. Yineleyen infarktlar sonucu otosplenektomi gelişir, kapsüllü bakterilerin ciddi enfeksiyonlarına yol açar [7].

*Hamilelik:* Orak hücre hastalarında en önemli risk faktörü hamileliktir. Hamilelikte sık tekrarlayan oraklaşma atakları plasentadaki dolaşımı bozabilir ve bu da kendiliğinden düşük, uterus içi fetusta büyüme geriliği, düşük doğum ağırlığı ve uterus içi fetus ölümüne yol açabilir [28].

### 2.1.6. Orak Hücre Anemisinin Tanısı

Hastanın öyküsünde ırk, geldiği yöre, aile öyküsü, yakınmalarının başlangıç zamanı ve tetikleyen etkenler değerlendirilir. Fizik muayenede solukluk, sarılık, splenomegali, enfeksiyon bulguları, organ ve iskelet sistemindeki şekil bozuklukları değerlendirilmelidir [7].

Hamileliğin 8.-10. haftalarında koryon villustan veya amniyosentezden elde edilen fetal DNA kullanılarak orak hücre mutasyonunun moleküler analizi ile prenatal tanı yapılır [29-30].

Bebeklik döneminde HbS oranı artıp HbF düştükçe orak hücre hastalığının bulguları ortaya çıkmaya başlar. Periferik yaymada 3. ayın sonunda geri dönüşümsüz orak hücreler belirmeye başlar ve 4. ayda hemolitik anemi ortaya çıkar. Süregelen tanı yöntemleri olarak asit ve alkali elektroforez, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve izoelektrik fokuslama (IEF) kullanılır [31].

Laboratuvar bulgularında: Orak hücre hastalığındaki hemolitik anemi hematokrit, hemoglobin ve eritrosit düzeylerinde hafif ve orta düzeye kadar düşmeye yol açar. Bazal hemoglobin düzeyi 6-9 gr/dl iken retikülositlerin oranı %3-15 arasındadır. Beyaz küre ve trombosit sayısı genellikle artmıştır. Biyokimyasal değişkenlerden laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri kronik hemoliz nedeniyle hafif oranda artmış, haptoglobulin düzeyleri de düşmüştür [6-7, 20].

### 2.1.7. Orak Hücre Anemisinde Tedavi

Tedavide temel prensipler, HbF yapımını artırmak, HbS miktarını azaltıp oksijene ilgisini artırmak ve sonuçta orak hücrelerin küçük damarlarda tutulmalarını azaltmaktır. Oraklaşma mekanizmasında en önemli olay olan HbS polimerizasyonu, HbF miktarının yükseltilmesi ile azaltılabilir [7, 32]. HbF seviyesinin yüksek olması OHA'nde koruyucu etkiye sahiptir. HbF, HbS'in polimerizasyonunu *in vitro* ortamda inhibe etmektedir [33]. HbF yapımını artıran ilaçların başında "hidroksiüre" gelmektedir. Hidroksiüre HbF sentezini artırarak eritrosit kök hücrelerinin



farklılaşmalarına etki eder ve eritrosit yaşam süresini etkileyerek oraklaşmayı azaltır. Bu ilaç ağrı krizlerini, hastanede kalış sürelerini, akciğer ve nörolojik olayları azaltmada kullanılır. Önemli bir yan etkisi yoktur [7, 32]. Kısa zincirli yağ asitleri (valproik asid), eritropoietin, 5-azasitidin de HbF yapımını artırarak etkili olan diğer ilaçlardır [7].

Kronik kan transfüzyon tedavisinin amacı eritropoezi etkili şekilde baskılamak ve transfüzyonlarla HbS seviyesinin %30'un altında kalmasını sağlamaktır [34]. Bu tedavi yaklaşımının merkezi sinir sistemi iskemileri, akut göğüs sendromu, vazo-oklüzif krizler, büyüme geriliği ve dalağın fonksiyonsuz olması durumlarında kronik transfüzyonların bu ağır orak hücre semptomlarını engelleyebileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [35].

Bütün hastalara pnömokok, *Haemophilus influenza*, Hepatit B aşıları yapılmalıdır. Beş yaşın altındaki çocuklara penisilin profilaksisi verilmelidir [13, 17, 36]. Kullanılan önleyici amaçlı penisilin ile pnömokoklara bağlı sepsis riski azaltılabilir [37]. Enfeksiyonlar orak hücre anemisinin en yaygın ölüm nedenlerinden biri olup, zamanında teşhis ve tedavi edilmesi gerekir.

OHA'li hastalarda Zn (çinko) eksikliği de oraklaşma krizini tetiklemektedir, aynı zamanda büyüme geriliğine, iskelet, kas kitlesinde azalmaya da yol açmaktadır, bu nedenle düzenli çinko desteği sağlanmalıdır [38].

Günümüzde orak hücre hastalığını tedavi edebilecek tek gen tedavisi yöntemi allojenik kemik iliği transplantasyonu (KIT)'dur. Genellikle ağır komplikasyonları olan hastalara uygulanır [33]. Belirgin kronik organ hasarı olmayan küçük çocuklarda, HLA uygun kardeşlerden yapılan allojenik kök hücre transplantasyonu ile başarı %93, hastalısız yaşam oranı %82'dir. Akraba olmayan donörlerden yapıldığında başarı %70'dir [34, 39]. Gen tedavisi çok büyük bir umut fakat uygun olmayan gen transferi ve etkisi düşük gen ekspresyonu nedeni ile yavaş ilerlemektedir [40].

### 2.1.8. Ölüm

Orak hücre sendromlu hastalarda yaşam süresi günümüzde 50-60'lı yaşlara uzanmaktadır. Ortalama yaşam erkeklerde 42, kadınlarda 48 yaşa uzamıştır. Hastalık nedenleri olarak son-devre renal yetersizlik ve pulmoner hipertansiyon gittikçe artmaktadır. Daha nadiren orak hücre kardiyomiyopatisi ve/veya erken koroner arter hastalığının ileri yaşlarda kalp işlevini bozduğu düşünülebilir. Orak hücre hastaları böbrek nakli olabilirler, fakat genellikle hastalıklarına ait krizlerin sıklık ve şiddeti artar, olasılıkla bağışıklığın baskılanması sonucu enfeksiyonların artması da söz konusudur [41].

### 2.2. SİTOKİNLER

Sitokinler, çeşitli dış uyarılara karşı tam bir yanıt meydana gelmesi için gerekli olan birçok hücrelerarası haberleşmeye aracılık eden polipeptid veya glikoprotein yapısındaki moleküllerdir. Hücre büyümesi, iyileşmesi ve yaralanmaya karşı sistemik yanıtı da içine alan bağışıklık ve inflamatuvar olayları düzenlerler. Başlıca monosit, lenfosit, nötrofil, platelet, fibroblast, endotel hücresi, kas hücresi ve diğer hücreler tarafından üretilir [42]. Farklı sitokinler bir hücrede aynı sinyal yollarını tetikleyebilir ya da bir sitokin farklı hücrelerde farklı sinyal yollarını uyarabilir. Hangi sürecin tetikleneceği sitokinin tetiklediği hücre içi sinyal yoluna, bu da bağlandığı reseptörlere, reseptörlerin ilişkide olduğu alt birimlere ve transkripsiyon faktörlerine bağlı olarak değişmektedir [43].

Sitokinler başlıca altı ana gruba ayrılır:

- 1) Büyüme faktörleri (Epidermal büyüme faktörü, EGF; Trombosit orijinli büyüme faktörü, PDGF; İnsülin benzeri büyüme faktörü-1, IGF-1; İnsülin benzeri büyüme faktörü-2, IGF-2; Sinir büyüme faktörü (NGF); Asidik fibroblast büyüme faktörü, aFGF; Bazik fibroblast büyüme faktörü, bFGF; Nörolökin; Hepatosit büyüme faktörü, HGF v.b.) [44].

- 2) Lenfokinler (İnterlökin-1a, IL-1b; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9; IL-10; IL-11; IL-12; IL-13; IL-14; IL-15,...,IL-37) [45].
- 3) Koloni teşvik eden faktörler (Granülosit/makrofaj koloni teşvik eden faktör, GM-CSF; Granülosit-CSF; Multi-CSF; Eritropoetin, EPO; Lösemi inhibitör faktör, LIF) [44].
- 4) Transforme edici büyüme faktörleri (TGF- $\alpha$ ; TGF- $\beta$ ) [44].
- 5) Tümör nekroz faktörleri (TNF- $\alpha$ ; TNF-  $\beta$ ) [44].
- 6) İnterferonlar (IFN-  $\alpha$ ; IFN-  $\beta$ ; IFN- $\gamma$ ) [44].

OHA'nde kronik hemoliz sonucu açığa çıkan hücre içeriği plazmanın kimyasal bileşimini değiştirmekte ve inflamatuvar bir ortam hazırlamaktadır [46]. Sitokinlerin ve plazma faktörlerinin OHA patolojisinde önemli bir rolü olduğu anlaşılmıştır [47]. IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  gibi sitokinler, proinflamatuvar sitokinler olarak bilinir ve inflamatuvar değişikliklerin oluşmasında, patojenin eliminasyonunu sağlayan hızlı bağışıklık yanıtının ortaya çıkmasında rol oynarlar [48]. Daha önce yapılan çalışmalarda; OHA'nde platelet kökenli CD40 ligand düzeyleri artmış iken krizlerde daha da artış olmuştur [49]. OHA'nde kronik inflamasyon bulguları olmakla beraber, hasta krize girdiğinde akut inflamasyon bulguları artar [50].

### 2.2.1. İnterlökin 1 (IL-1)

IL-1 ve TNF gibi sitokinler, proinflamatuvar sitokinler olarak bilinir ve inflamatuvar değişikliklerin oluşmasında, patojenin eliminasyonunu sağlayan hızlı bağışıklık yanıtının ortaya çıkmasında rol oynarlar [48]. IL-1 monositler, lenfositler, endotel hücreleri ve mikroglialar gibi bağışıklık sistemi hücreleri tarafından salınır. IL-1 beyinde ilk tanımlanan sitokinlerden olup, başlangıçta endojen pirojen olarak tanımlanmıştır. Kilo kaybı, uykunun düzenlenmesi, endokrin sistem, immün sistem

ve sinir sistemi fonksiyonlarını değiştirme, nöronal iletim, epilepsi, sinir hücre ölümü dahil IL-1'in endojen ve ekzojen bir çok etkisi gösterilmiştir [51].

IL-1, mononükleer fagositlerden salgılanan 2 temel polipeptidten oluşur. Bunlardan biri IL-1 $\alpha$  diğeri IL-1 $\beta$ 'dir. Bu ikisi iki farklı genin ürünüdür. Fakat her ikisi de aynı hücre yüzey reseptörlerine bağlanırlar ve biyolojik etkileri temelde özdeştir. IL-1 ailesinin üçüncü üyesine IL-1 reseptör antagonisti denir. IL-1 moleküllerinin çeşitli şekillerdeki fibroblast büyüme faktörü ile de yapısal ilişkisi vardır [52].

IL-1'in biyolojik etkileri TNF ile benzerdir ve serbestleşen sitokin miktarına bağlıdır. IL-1 aynı zamanda TNF'nin birçok inflamatuvar özelliğini de paylaşır. Örneğin; IL-1 endotel hücrelerine etkiyle pıhtılaşmayı artırır. Lökositlerin yapışmasına aracılık eden yüzey moleküllerinin ekspresyonunu artırır. IL-1 doğrudan nötrofil gibi inflamatuvar lökositleri aktive etmez. Mononükleer ve endotel hücrelerine etki ederek lökositleri aktive eden kemokinlerin sentezine neden olur [52].

### 2.2.2. İnterlökin 6 (IL-6)

IL-6, proinflamatuvar sitokinlerden olup başlıca mononükleer fagositler, damar endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitelyum hücreleri ile bazı aktive T hücreleri tarafından sentez edilirler. Genellikle doğal ve kazanılmış bağışıklıkta görev alır. B lenfositlerinin immunglobulin salınımı için bir kofaktör olarak rol oynar. Yani B lenfositlerinin ayrışım sıralamasının geç dönemlerinde B lenfositleri için büyüme faktörü olarak rol oynar. Benzer şekilde malign plazma hücreleri için de (plasmositoma ya da myelom) büyüme hücresi rolü oynar ve kendi kendine büyüyen plazmasitom hücreleri otokrin büyüme faktörü olarak IL-6'yı salgılar [53-54].

Bunlara ilaveten yapılan invitro çalışmalarda, IL-6'nın T hücreleri ve timositlerin kostimulatörü olarak görev yaptığı gösterilmiştir. IL-6 diğer sitokinlerle birlikte kemik iliği hemopoetik ana hücreleri için erken dönemde büyüme kofaktörü

olarak etki gösterir [53]. IL-6'nın en iyi tanımlanan etkileri hepatositler ve B lenfositleri üzerinedir [52].

### 2.2.3. İnterlökin 8 (IL-8)

Proinflamatuvar sitokinler olarak da bilinen 58-67 kD ağırlığında bir interlökindir. Bu interlökin nötrofiller üzerinde daha etkili, eozinofiller, bazofiller ve lenfositler üzerinde daha az olmak üzere aktive edici ve kemotaktik etkiye sahiptir. Aynı zamanda T lenfositleri içinde kuvvetli kemotaktik aktiviteye sahip olup bu etkisini bütün T alt tiplerinde de gösterir [55].

Başlıca monositler, makrofajlar, fibroblastlar, lenfositler, hepatositler, nötrofiller, mezenşiyal hücreler, endotel hücreler ve eozinofiller tarafından üretilmektedir. Bu interlökin üretimi için en önemli uyarıcılar IL-1 ve TNF- $\alpha$ 'dır. IL-8 ve bu aile ile ilgili sitokinler yangıda sekonder etkili araçlar olarak görev yaparlar [55].

### 2.2.4. TNF- $\alpha$ (Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$ )

TNF mononükleer fagosit hücreler tarafından salgılanır. Gram negatif bakterilerin aktif bir hücre duvarı maddesi olan lipopolisakkarit (LPS) (endotoksin) uyarımı ile salgılanan TNF'e tümör dokusunu nekroze eden özelliği nedeniyle bu ad verilmiştir [56].

TNF pek çok biyoaktivite içerir; inflamasyon hücrelerinin aktivasyonu, endotelial hücrelerin prokoagülant aktivasyonu, hepatosit aktivasyonu, vücut ısısının artması ve diğer pek çok etkinin oluşmasında rol oynar. TNF, TNF-alfa ( $\alpha$ ) ve TNF-beta ( $\beta$ ) olmak üzere iki peptitden oluşur. Her iki TNF hücrelerde aynı reseptörlere bağlanır ve birçok ortak biyolojik aktiviteye sahiptirler [56].

Gram negatif bakteriyel sepsis durumlarında çok yüksek miktarda TNF üretilir ve serum TNF yoğunluğu artar. Bu yoğunluktaki TNF, dolaşımda kollaps ve

dissemine intravasküler koagülasyonu'na (DIC) neden olur. Yani TNF, septik ve endotoksik şokun önemli bir mediatörüdür. Yüksek düzeyde infüzyonu ölümcüldür ve çok benzeri bir sendrom oluşturur [52].

TNF' nin şu etkileri inflamatuvar yanıtta önemlidir;

1) TNF, lökositlere karşı endotel hücre yüzeyini adezyon molekülleri aracılığı ile daha yapışkan hale getirerek damar endotel hücrelerinin yeni yüzey reseptörlerini eksprese etmelerine neden olur. TNF aynı zamanda nötrofillere de etki ederek endotel hücrelerinin yapışkan özelliklerini artırır [52].

2) TNF, inflamatuvar lökositleri özellikle nötrofilleri mikropları öldürecek şekilde aktive eder [52].

3) TNF, IL-1, IL-6, kemokinler ve TNF' nin kendisini üretmek üzere mononükleer fagositleri ve diğer hücre tiplerini uyarır. IL-6 ile sinerjik etki gösterir [52].

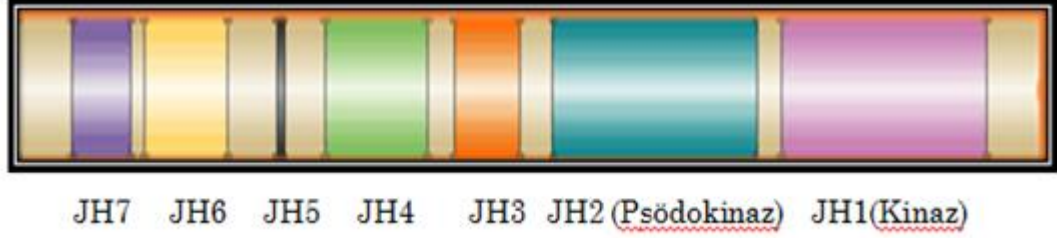
4) TNF, virüslere karşı interferon benzeri koruyucu etki gösterir [52].

## 2.3. JANUS KİNAZ AİLESİ, SİNYAL İLETİCİ VE TRANSKRİPSİYON AKTİVATÖRLERİ

### 2.3.1. Janus Kinaz Ailesi

Janus kinazlar hücre yüzey reseptörlerine bağlı olan sitoplazmik protein kinazlardır. Memelilerde dört farklı janus kinaz olduğu bilinmektedir: JAK-1, JAK-2, JAK-3, ve TYK-2 [57-58-59]. Ayrıca JAK ailesi FERM, SH2, Psödokinaz ve Tirozin Kinaz olan 4 fonksiyonel JAK homolojik alana sahiptir. J1, tirozin kinaz olarak görev yapmaktadır. J2, psödokinaz etki göstermektedir. J3 ve J4'ün bir parçası, SH2 benzeri bir fonksiyona sahiptir. J4'ün diğer parçası ise FERM olarak görev yapmaktadır. Sitokin reseptörü ile ilişki kurarlar [60-61]. Psödokinaz bölgesi

tirozin kinaz fonksiyonu olan bir bölge değildir. Bu alan JAK proteinlerinin aktivasyonunu negatif olarak düzenler (Şekil 2.4.) [61].



Şekil 2.4. JAK protein yapısı [61].

### 2.3.2. Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyonel Aktivatör Ailesi

STAT moleküllerinin yedi üyesi bulunmaktadır: STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b ve STAT-6 [58-59-60]. Her bir STAT proteininin yedi fonksiyonel korunmuş bölgesi mevcuttur. Bunlar; amino uç bölge (NH<sub>2</sub>), kangal gibi kıvrılmış bölge (coiled-coil), DNA bağlama bölgesi (DBD), bağlayıcı bölge (LK), SH2 bölge, tirozin aktivasyon bölge ve transkripsiyonel aktivasyon bölgesi (TAD)'dir. NH<sub>2</sub> bölgesi çok iyi korunmuştur. Fosforile olamayan STAT'lar arasında homotipik dimer oluşumunu desteklemektedir. Kangal gibi kıvrılmış bölge, düzenleyici proteinlerle ilişkilidir. Nükleer giriş-çıkışın kontrol sürecinden sorumlu tutulmaktadır. DNA bağlayıcı bölge, nükleer giriş-çıkışın düzenlenmesinden sorumlu tutulmaktadır. Bağlayıcı bölge, DNA bağlayıcı motif için görev yapar. SH2 bölgesi, en çok korunmuş bölgedir. Aktif STAT dimerlerinin oluşumunun yanı sıra, reseptör zincirinde özel iç göç hareketine aracılık eder. Tirozin aktivasyon bölgesi, SH2 bölgesine benzerlik gösterir ve inaktif homodimerin dış yüzeyinde bulunur. Aktif bir uyum için gerekli kritik yapısal değişiklikleri yönetir. Transkripsiyonel aktivasyon bölgesi, STAT aile üyeleri arasında farklılık göstermektedir. Hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu düzenler [60-61].

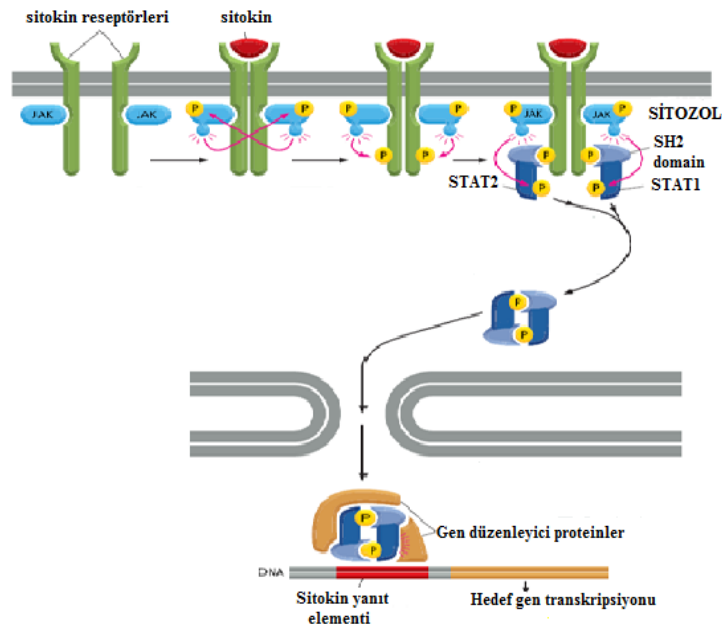
STAT2, STAT4 ve STAT6; T hücre gelişiminde ve interferon (IFN)- $\gamma$  sinyalizasyon yolunda rol oynar. STAT1, STAT3 ve STAT5 ise büyüme hormonu (Growth Hormon; GH), prolaktin ve eritropoetin sinyalinde yer alır. Bunlar hücre

döngüsünün ve apoptozisin önemli düzenleyicileridir. Bunların regülasyonundaki bozuklukları malign hücre çoğalmasına katkıda bulunur [62].

### 2.3.3. Janus Kinaz/Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyonel Aktivatör (JAK/STAT Yolağı)

JAK/STAT sinyal yolağı, ekstraselluler sitokin sinyallerinin nükleusa iletilmesinde önemli bir yere sahiptir ve bu hücre büyümesi, farklılaşması ve transformasyonunu içeren hücresel olayları düzenler [63].

Sitokin ligandlarının reseptörlere bağlanması ile reseptörlerde dimerizasyon veya oligomerizasyon meydana gelir. Bunun sonucunda tirozin fosforilasyonu gerçekleşir ve reseptör ilişkili JAK'lar aktive olur. Daha sonra STAT molekülleri yapılarındaki SH2 (Src homoloji bölgesi) ile JAK'ların korunmuş Tyr bölgesine bağlanır ve fosforillenir. JAK, bu STAT moleküllerinin reseptörden ayrılmasını sağlar. Aktive olmuş STAT molekülleri birbirleriyle homodimer veya heterodimer oluşturarak nükleusa transloke olurlar ve DNA üzerinde spesifik sekanslara bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu başlatırlar (Şekil 2.5.) [43, 57-58-59, 64-65].



Şekil 2.5. JAK/STAT mekanizmasının işleyişi [58].

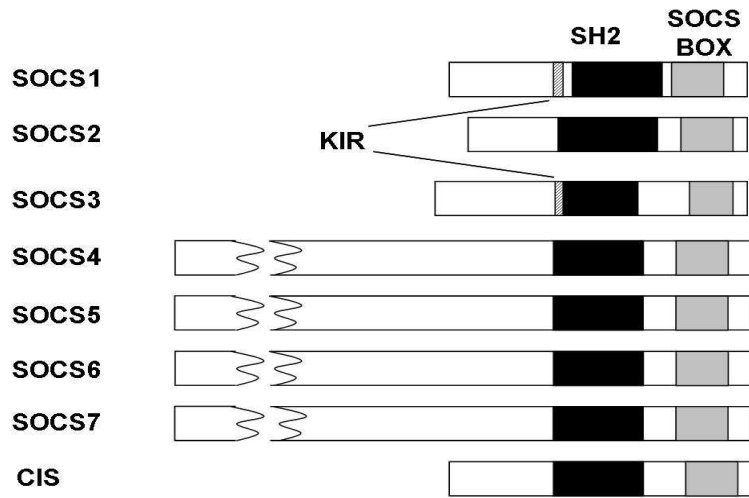


JAK/STAT yolağı 3 protein ailesi tarafından negatif olarak regüle edilir;

- (i) Aktive olmuş STAT'ların protein inhibitörleri (PIAS),
- (ii) SH2 (Scr-homology-2) içeren protein tirozin fosfatazlar (SHP),
- (iii) Sitokin sinyali baskılayıcı protein ailesi (SOCS) [66-67].

## 2.4. SİTOKİN SİNYAL BASKILAYICILARI (SOCS)

SOCS ailesinin sekiz farklı üyesi bulunmaktadır: SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3, SOCS-4, SOCS-5, SOCS-6, SOCS-7 ve CIS (Sitokin uyarıcı Src homoloji-2 proteini). Bunlardan CIS, SOCS-1, SOCS-2 ve SOCS-3 özellikleri en iyi bilinendir. Bu proteinlerin amino-terminal bölgelerinde 50 ila 380 amino asit uzunluğunda bölgeler mevcut iken bütün bu sekiz proteinin ortak özellikleri; yaklaşık 95 amino asit uzunluğunda olan src homoloji-2 (SH2)-domen, değişen uzunluklarda amino-terminal-domen, SOCS-box adı verilen 40-aminoasit motifinden oluşan karboksiterminal domenden oluşmalarıdır [68]. Ayrıca SOCS-1 ve SOCS-3 proteinlerinde diğerlerinden farklı olarak SH2-domene bitişik KIR adı verilen kinaz inhibitor bölgesi (Kinase Inhibitory Region) yer almaktadır (Şekil 2.6.) [69].

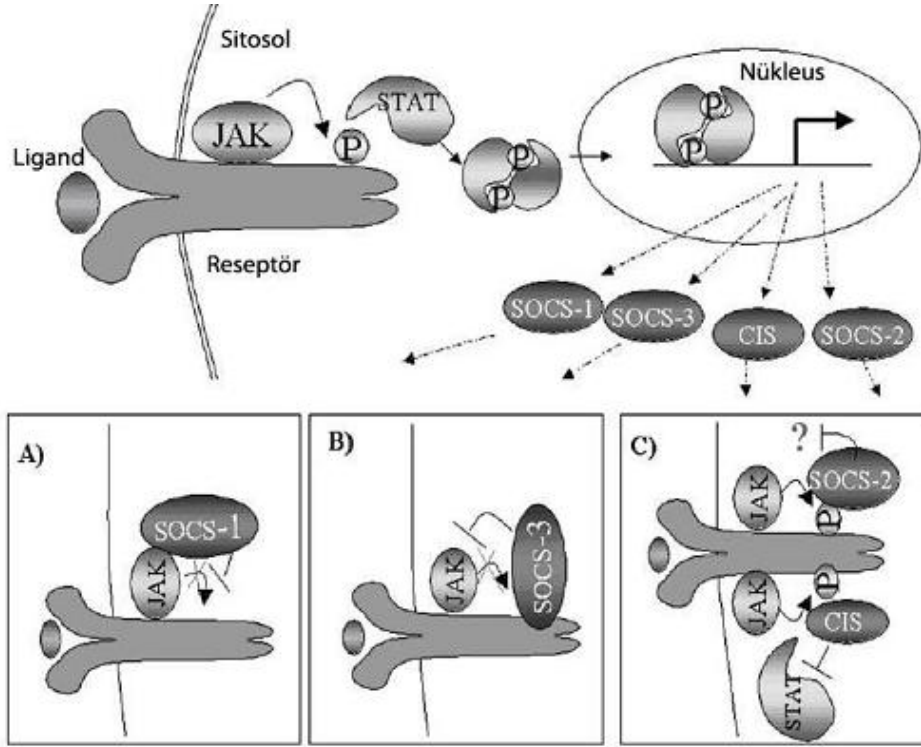


Şekil.2.6. SOCS ailesi üyelerinin domen yapıları ve alternatif adları [69].

JAK-STAT mekanizması ile oluşan sitokin sinyal iletimi kısmi olarak, sitokin sinyal baskılayıcı genler (SOCS) veya SH2 proteinleri (CIS) olarak bilinen endojen JAK kinaz inhibitör proteinleri tarafından düzenlenmektedir [70].

SOCS proteinleri sadece JAK/STAT yolağı ile indüklenir. Uyarılmamış hücrelerde JAK'lar ve STAT'lar aktif değildir ve tipik olarak SOCS genleri de bu hücrelerde eksprese edilmezler [68]. Ancak sürekli aktif JAK-STAT sinyali sonucunda çekirdekte hızlı bir şekilde transkribe olurlar ve JAK-STAT mekanizmasını durdurmaya yönelik aktive olurlar [70].

SOCS ailesine ait proteinler sahip oldukları SH2 domainleri sayesinde hem JAK'lar (SOCS-1) hem de sitokin reseptörleri (SOCS-2, SOCS-3 ve CIS) üzerindeki fosfotirozin rezidülerine bağlanabilmektedirler (Şekil 2.7.). Bunlar sitokin sinyalini ya JAK aktivitesini inhibe etmek suretiyle veya reseptör üzerindeki fosforile olmuş bölge için STAT'lar ile rekabet etmek üzere ya da E3 ubiquitin ligazın bir parçası olan SOCS box'lar aracılığıyla inhibe ederler. Böylece, SOCS box'lar SOCS-SH2 interaktif proteinler ile E3 ubiquitin ligaz arasında bir köprü olarak hareket ederler ve protein turnoverini düzenlerler [71-72-73].



Şekil 2.7. Negatif geri-bildirim mekanizması. Sitokinler aracılığıyla JAK/STAT yolağı aktive olur, bu da CIS, SOCS-1, SOCS-2 ve SOCS-3'un indüklenmesine neden olur. SOCS proteinleri sinyal yolağını inhibe ederler. (A) SOCS-1, JAK'a bağlanır ve onun katalitik aktivitesini inhibe eder. (B) SOCS-3 aktive olan reseptöre bağlanarak yine JAK'ın katalitik aktivitesini inhibe eder. (C) CIS, STAT'ın reseptöre bağlanmasını engelleyerek STAT aktivasyonunu engeller. Tam olarak bilinmemekle birlikte SOCS-2 de aynı işlevi görür [69].

#### 2.4.1. SOCS-1 Proteini ve İnflamasyon

Sitokin sinyalini baskılayan proteinlerden olan SOCS-1, sitokin sinyalinin negatif regülatörü olarak fonksiyon görür. JAK-bağlayıcı protein (JAB), STAT uyarımlı STAT inhibitörü-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1=SSI-1) olarak da isimlendirilir [74].

SOCS-1 geni SH2 domainiyle JAK'ın tüm üyelerine bağlanabilir ve tirozin kinaz aktivitesini inhibe eder. SOCS-1'in amino-terminal domenindeki K bölgesi JAK'ın psödo-substrat inhibitör bölge sekansı ile homoloji gösterir. Bu bölge JAK aktivasyon bölgesine bağlanır ve JAK'ın katalitik aktivitesini durdurur [70-75].

*In vitro* çalışmalarda IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-12, IFN $\gamma$ , eritropoetin, granülosit-koloni uyarıcı faktör (G-CSF), granülosit monosit koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), lösemi inhibitör faktör, prolaktin, büyüme hormonu (GH) gibi çeşitli moleküller tarafından SOCS-1 geninin uyarıldığı tespit edilmiştir [76].

Transgenik farelerle yapılan çalışma, SOCS-1'in IFN- $\gamma$  sinyal bastırma ve T hücre aktivasyonu için gerekli olduğunu göstermiştir. Bu fareler doğumda normal olmalarına rağmen, doğumdan sonra bodur büyüme gösterirler ve şiddetli lenfopeni, periferik T hücrelerinin aktivasyonu, yağ dejenerasyonu, karaciğer nekrozu ve major organların makrofaj infiltrasyonu ile karakterize edilen bir sendromla doğduktan sonra 3 hafta içinde ölürlere [77-78].

SOCS-1 hem tip-I hem de tip-II IFN sinyalini inhibe eden bir protein olduğu için IFN'ların faydalı anti-viral etkileri ile zararlı inflamatuvar etkilerinin dengede tutulmasında önemli bir rol alır. Gerçekten de SOCS-1 eksik hücreler ve SOCS1<sup>-/-</sup> farelerin viral enfeksiyonlara dirençli olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [79-80].

SOCS-1 protein stabilitesi oldukça sıkı kontrol altındadır. SOCS proteinlerinin stabilizasyonu, proteozom inhibitörleri aracılığıyla sağlandığından SOCS-1 düzeyinin proteozom yolağı aracılığıyla regüle edildiği düşünülmektedir [81].

SOCS proteinleri özellikle sitokinlerin aracılık ettiği immün düzenleyici işlevlerde rol aldıkları için inflamatuvar hastalıkların patogenezinde yer almaları beklenebilir. Gerçekten SOCS-1 eksik farelerde oluşturulan otoimmün artrit modelinde eklem inflamasyonu ve hasarının arttığı gözlenmiştir [82-83].

#### 2.4.2. SOCS-3 Proteini ve İnflamasyon

SOCS-3, sitokin reseptörü üzerinde bulunan Janus kinaza yakın bir bölgeye bağlanır ve JAK'ın aktivitesini durdurur. Ayrıca JAK2 proteinine de bağlanabilmektedir ancak SOCS-1 proteinine göre daha zayıf bağlanmaktadır.

SOCS-3 proteininin promotor bölgesinde STAT-1 ve STAT-3'e bağlanan bir element bulunmaktadır [76].

*In vivo* SOCS-3'ün sinyal komponenti olarak gp130'u kullanan IL-6 LIF ailesi sitokinlerin inhibitörü olduğu için, inflamasyonun negatif düzenleyicisi olabileceği düşünülmektedir [79].

SOCS-3'ün lipopolisakkarit (LPS) yanı sıra TNF- $\alpha$  ve IL-1 ile de indüklendiği gösterilmiştir [84-85]. Bu nedenle, inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) ve romatoid artrit (RA) gibi insan kronik inflamatuvar hastalıklarda SOCS-3 ekspresyonu incelenmiştir. IBD model farelerin yanı sıra insan krohn hastalığı (CD) ve ülseratif kolitis (UC) hastalarında kolon epitel ve lamina propria hücrelerinde yüksek miktarda SOCS-3 eksprese edildiği ortaya çıkarılmıştır [86]. Dekstran sülfat sodyum uyarımlı (DSS) fare kolit modelinde bir deney, STAT-3 aktivasyonunun SOCS-3 indüksiyonundan 1 gün önce olduğunu göstermiştir. STAT-3 aktivasyonu 3-5 gün içerisinde belirgin hale gelip daha sonra azalırken, SOCS-3 ekspresyonu 5 gün içerisinde indüklenmiş ve daha sonra yüksek düzeyde korunmuştur. Yüksek düzeyde SOCS-3 ifadesi yalnızca osteoartrit (OA) hastalarında değil, aynı zamanda insan RA'larda da gözlenmiştir [87]. İnflamatuvar sinovitlerin mürin modellerinde STAT-3 fosforilasyonunun SOCS-3 ekspresyonundan önce gelmesi, SOCS-3'ün JAK/STAT negatif feedback döngüsünün bir parçası olduğu fikrini doğrular [88].

#### 2.4.3. İnflamatuvar Hastalıklarda SOCS Proteinleri

SOCS proteinleri kullanılarak sitokin sinyallerinin baskılanması özellikle inflamatuvar hastalıkların tedavisinde ve transplantasyon sonrası rejeksiyonun önlenmesinde yararlı olabilir. Özellikle SOCS-3 protein tedavisi çeşitli inflamatuvar hastalıklar ve septik şokta etkili bulunmuştur [80, 87].

SOCS-1 eksik farelerde oluşturulan otoimmün artrit modelinde eklem inflamasyonu ve hasarının arttığı gözlenmiştir [82-83]. Romatoid artrit'li hastaların kandan izole edilen CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin de sağlıklı kontrollerden daha yüksek

düzeyde SOCS-1 ve düşük düzeyde SOCS-3 ekspresyonu ettikleri rapor edilmiştir [88]. Zimosan ile artrit oluşturulan STAT1<sup>-/-</sup> farelerde sinoviyal SOCS-1 ekspresyonunun belirgin olarak düştüğünün ancak SOCS-3 ekspresyonunda değişiklik olmadığını gösterilmesi SOCS-1'in özellikle STAT proteinlerinin kontrol ettiği eklem inflamasyonunda altta yatan mekanizmalardan biri olabileceğini düşündürmektedir [80, 90].

IL-6/STAT-3 yolu sitokin ve büyüme faktörlerinin yapımına katkıda bulunarak, doku hipoplazisi, sinoviyal fibroblast proliferasyonu, fibrozis ve osteoklast aktivasyonuna sebep olarak inflamatuvar eklem hastalıklarının kronikleşip ilerlemesi sürecinde yer almaktadır [91]. Nitekim, IL-6 aracılı STAT-3 aktivasyonunu inhibe ettiği bilinen SOCS-3'ü kodlayan genin adenoviral vektör aracılı olarak ekspresyonu ile deneysel artrit gelişiminin önlenildiği gösterilmiştir [87].

Bu çalışmanın sonucunda, OHA patogeneğinde özellikle inflamasyonda rol oynayan sitokin proteinlerinin düzenlenmesinde SOCS genlerinin etkilerini açıklığa kavuşturma ve yeni potansiyel tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Tam Kandan RNA İzolasyonu Eldesinde Kullanılan Kimyasallar

İleriye dönük olarak planlanan kliniksel çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Komitesinin onayı alındıktan sonra başlandı. Bu çalışmada Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Hematoloji Kliniği'nde takip edilen stabil durumdaki 73 orak hücre anemili hasta ve kriz nedeniyle hastaneye başvuran 26 hasta ile aynı yaş grubundaki 56 sağlıklı çocuk karşılaştırılarak incelenmiştir. Uygulanacak tedavi açısından bilgilendirilen hastalar imzalı onayları alındıktan sonra çalışma grubuna dahil edildi. İki grubun tam kan sayımı, hemoglobin elektroforezi ve biyokimya parametreleri için kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinden lökosit izolasyonu yapıldı ve total RNA pürifikasyonu yapıldıktan sonra cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Bu çalışmada uygulanan ajanlar;

- i) Red blood cell lysis buffer
- ii) High Pure RNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics, GmbH Roche Applied Science 68298 Mannheim, Germany)

Kitin içeriği;

Lizis /bağlama tamponu (Lysis/Binding Buffer): 25 ml [4.5 M guanidin-HCL, 50 mM Tris-HCl, 300% Triton X-100 (w/v), pH 6.6 (25 °C)]

DNaz-1, rekombinant, liyofilizat: 10 KU liyofilize DNaz-1 (0.55 ml elüsyon tamponunda süspanse edildi)

DNaz inkübasyon tamponu: 10 ml [1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl ve 10 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7.0 (25 °C)]

Yıkama tamponu-1: 33 ml (İlk kullanımdan önce 20 ml etanol p.a. eklendi), [5 M guanidin hidroklorid ve 20 mM Tris-HCl, pH 6.6 (25 °C)]

Yıkama tamponu-2: 10 ml (İlk kullanımdan önce 40 ml etanol p.a. eklendi), [20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 (25 °C)]

Elüsyon Tamponu: 30 ml

iii) Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti (Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science 68298 Mannheim, Germany)

Kitin içeriği;

- Random Hexamer →1 vial, 200 µl (600 µM)
- H<sub>2</sub>O, PCR grade (seviye) →2 vials, 1 ml
- Transcriptor reverse transcriptase reaksiyon tamponu →1 vial, 1 ml
- Protector RNaz inhibitörü →1 vial, 50 µl (40 U/µl)
- Deoksinükleotid mix →1 vial, 200 µl
- DTT →1 vial, 1 ml, 0.1 M
- Transkriptör Revers Transkriptaz →1 vial, 110 µl

iv) β-actin housekeeping geni forward / revers primer çifti ve prob dizisi

F'(141.4 nmol) →5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3'

R'(113.6 nmol)→5'-GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA-3'

P'(41.4 nmol) →5' Fam-ATC AAG ATC ATT GCT CCT CCT GAG CGC-TAMRA 3'

v) SOCS-1 geni forward / reverse primer çifti ve prob dizisi

F'(50 nmol)→5' CCC TGG TTG TTG TAG CAG CTT-3'

R'(85 nmol) →5' CAA CCC CTG GTT TGT GCA A-3'

P'(27 nmol) →5' Fam-ACC TGA ACT CGC ACC TCC TAC CTC TTC ATG-TAMRA-3'



vi) SOCS-3 geni forward / reverse primer çifti ve prob dizisi

F' (91.4 nmol)→5'- CTT CAG CAT CTC TGT CGG AAG-A-3'

R' (112.3 nmol)→5'-GCA TCG TAC TGG TCC AGG AAC T-3'

P' (29.7 nmol) →5'-Fam - CGT CAA CGG CCA CCT GGA CTC  
CTA -TAMRA-3'

vii) Light Cycler TaqMan Master Mix (Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science 68298 Mannheim, Germany)

Kitin içeriği;

- Enzim (vial 1a): Fast Start Enzim
- Reaksiyon Mix (vial 1b): Fast Start TaqMan Reaksiyon Mix
- H<sub>2</sub>O, PCR grade

### 3.1.2. Cihazlar

- -20°C derin dondurucu
- -80 °C derin dondurucu
- Termal Cyclers
- Light Cycler 480 – II

## 3.2. YÖNTEM

Bu araştırmada kullanılan yöntemler aşağıda sıralanmıştır.

- Bu çalışmada 96 Orak hücre anemili hasta ve 56 sağlıklı birey çalışılmıştır. Hasta ve sağlıklı kişilerden EDTA'lı tüplere alınan tam kandan lökositler izole edilerek total RNA'ları saflaştırılmıştır.
- Niceliksel revers transkriptaz yönteminde değerlendirilmeleri için, RNA'lardan komplementer DNA'lar (cDNA) sentezlenmiştir.

- Orak hücre hastaları ve sağlıklı popülasyondan alınan kan örneklerinde, SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadelerini niceliksel gerçek zamanlı RT-PZR ile ölçmek için genlere ve referans genine (beta actin) yönelik primer ve Taq-Man hibridizasyon problemleri kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.
- Genlerin ifade düzeylerini belirleyebilmek için, niceliksel revers transkriptaz RT-PZR, Light Cycler cihazında gerçekleştirilmiştir.
- SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin orak hücre anemili ve sağlıklı popülasyon kan örnekleri üzerindeki etkilerini belirlemek üzere  $2^{-\Delta\Delta CT}$  de elde edilen veriler, bağımsız iki veya daha fazla grubun karşılaştırılması şeklinde değerlendirilmiştir.

### 3.2.1. Lökosit İzolasyonu

EDTA'lı tüp içerisinde getirilen kanların lökosit sayısı ölçülmüştür. Lökosit sayısı 1000 ile çarpılıp bulunan sonuç 3 milyon eritrosit sayısına bölünmüştür ( $3000000/WBC \times 1000 =$  bulunan sonuç kadar  $\mu L$  kan alınmıştır). Kanlar eppendorf tüp içerisine konulup üzerine 900 $\mu L$  Red Blood Cell Lysis Buffer solüsyonu eklenmiştir. 10 dakika karıştırıcıda oda sıcaklığında bekletilmiştir. 13000 devirde 30 saniye santrifüj edilmiştir. Dipte oluşan lökosit çökeltisine dokunmadan üstteki berrak kırmızı sıvı pipetle toplanıp atılmıştır. Lökosit çökeltisi üzerine tekrar 900 $\mu L$  Red Blood Cell Lysis Buffer eklendikten sonra 13000 devirde 30 saniye santrifüj edilmiştir. Tekrar üstteki sıvı pipetle atılmıştır. Kalan lökosit çökeltisinin üzerine 200 $\mu L$  serum fizyolojik eklenip 13000 devirde 30 saniye santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı pipetle toplanıp atılmıştır. Pellet üzerine 400  $\mu L$  Lysis Binding Buffer eklenerek çökelti süspansiyon haline getirildikten sonra hücreler RNA izolasyonu yapılana kadar 20°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2. Total RNA Saflaştırması

Bu çalışmada kullanılan orak hücre anemili ve sağlıklı popülasyondan alınan kan örnekleri lökosit izolasyonu yapıldıktan sonra total RNA'lar saflaştırılmıştır. Total

RNA saflaştırması Roche Diagnostics firmasından temin edilen 'High Pure RNA İsolation Kiti'ne uygun olarak yapılmıştır.

Çalışma solüsyonlarının hazırlanması

Wash buffer I (Yıkama tamponu I)=20 µl absolut etanol ile

Wash buffer II= 40 µl absolut etanol ile

DNaz I → 550 µl elüsyon tamponu ile hazırlandı.

Derin dondurucudan çıkarılan tüpler 15 sn. vortekslenmiştir. Filtreli tüpler, toplama tüplerinin içine yerleştirilip, 15 sn. 8000 devirde santrifüj edilmiştir. Filtreli tüpten toplama tüpüne akan sıvı boşaltılıp aynı toplama tüpü yeniden kullanılmıştır. Steril tüplere 10 µl DNaz I, 90 µl de DNaz inkübasyon tamponundan eklenerek karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyondan her örnek için 100 µl eklenip, 15 dk. oda sıcaklığında (20-25°C) inkübe edilmiştir. Her tüpe 500 µl yıkama tamponu-I eklenmiştir. Tüpler 15 sn. 8000 devirde santrifüj edilip ardından filtrasyon tüpleri atılmıştır. Her tüpe 500 µl yıkama tamponu-II konulup yeniden 15 sn. 8000 devirde santrifüj edilmiştir. Tüpler boşaltıldıktan sonra her tüpe 200 µl wash tamponu-II eklenerek tüpler 2 dk. 13000 devirde santrifüj edilmiştir. Toplama tüpleri atılarak, filtreli tüpler ependorf tüplere yerleştirilmiştir. Tüplere 80 µl elüsyon tamponu eklenip 1 dk. 8000 devirde santrifüj edilmiştir. Tüpler -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.

### 3.2.3. cDNA Sentezi

Çalışma sırasında tüm aşama buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. RNA örnekleri -80°C derin dondurucudan çıkarılıp, buzları çözdürülmüştür. Örnekler kısa santrifüj edilmiştir. 1.5 ml'lik tüplere, Roche Diagnostics firmasından temin edilen 'Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti'nde belirtilen ajanlardan, belirtilen miktarlar eklenerek Karışım-I hazırlanmıştır.

### KARIŞIM-I İçeriği

Total RNA .....	5 µl
Random Hexamer .....	2 µl
H <sub>2</sub> O .....	6 µl
TOPLAM .....	13µl

Revers transkriptaz kontrol reaksiyonuna paralel olarak, negatif kontrol hazırlanmıştır. Negatif kontrolde, PCR tüpüne RNA örneği yerine aynı miktarda su kullanılmıştır. Karışım-I, daha önceden 65°C’de ısıtılmış hot mix’te 10 dakika bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra tüpler tekrar soğutulmuştur ve ardından karışım-II eklenmiştir.

### KARIŞIM-II İçeriği

Transcriptor reverse transcriptase reaction buffer .....	4 µl
Protector RNase inhibitor.....	0.5 µl
Deoksinükleotid mix .....	2 µl
Transcriptor reverse transcriptase .....	0.5 µl
TOPLAM.....	7 µl

TOPLAM KARIŞIM= Karışım-I + Karışım-II = 13 µl + 7 µl = 20 µl

PZR tüpleri yavaş yavaş pipetaj edilmiştir. Tüpler termal cycler cihazına kapakları kapalı bir şekilde yerleştirilerek bir döngü olacak şekilde 25°C’de 10 dakika, 50°C’de 60 dakika ve 85°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir.

#### 3.2.4. Gerçek Zamanlı PZR Ölçümü

Sentez edilen cDNA örneklerinin niceliksel ölçümü Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji-Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünoloji Bilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Genlerin niceliksel ölçümü ‘Roche Diagnostics’ firmasından önceden temin edilen ‘Light Cycler 480-II’ Real-Time PCR cihazında gerçekleştirilmiştir.

SOCS-1 ve SOCS-3 genlerine uygun primerlerin hazırlanışı;

500  $\mu\text{M}$ 'lık primerler 50  $\mu\text{M}$ 'a seyreltilmiştir. Bu işlem sırasında 500  $\mu\text{M}$ 'lık primerden 10  $\mu\text{l}$  alınmıştır ve üzerine 90  $\mu\text{l}$  su eklenerek 100  $\mu\text{l}$ 'ye tamamlanmıştır.

Primerlerin kullanım derişimi;

50  $\mu\text{M}$ 'lık primer 10  $\mu\text{M}$ 'a seyreltilmiştir. Seyreltme işlemi sırasında 50  $\mu\text{M}$  primerden 10  $\mu\text{l}$  alınmıştır ve üzerine 40  $\mu\text{l}$  su eklenerek 50  $\mu\text{l}$ 'ye tamamlanmıştır.

Probların kullanım derişimi;

50  $\mu\text{M}$ 'a seyreltilen problar kullanım amacına uygun olarak 5  $\mu\text{M}$ 'a seyreltilmiştir. 50  $\mu\text{M}$ 'lık primerden 10  $\mu\text{l}$  alınmıştır ve üzerine 90  $\mu\text{l}$  su eklenerek 100  $\mu\text{l}$ 'ye tamamlanmıştır.

LightCycler TaqMan Master Kit içerisinde bulunan 'FastStart' enziminden 10  $\mu\text{l}$  alınıp, tepkime karışımına eklenerek master karışım hazırlanmıştır. Referans gen olarak  $\beta$ -actin housekeeping gen kullanılmıştır. Deney altı grup şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Light Cycler PCR 480 uyumlu 96'lık well plate'lere sırasıyla;

Master	.....	10	$\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	.....	2	$\mu\text{l}$
Forward	.....	1	$\mu\text{l}$
Reverse	.....	1	$\mu\text{l}$
Prob	.....	1	$\mu\text{l}$
cDNA	.....	5	$\mu\text{l}$
Toplam		20	$\mu\text{l}$

kimyasalları hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu Well plate'e önce hazırlanan karışım, ardından SOCS-1, SOCS-3 ve  $\beta$ -aktin primer-probları ilgili kuyucuklara yüklenmiştir.

Yükleme işleminden sonra 96'lık well plate Light Cycler 480 II cihazına yerleştirilip örneklerin niceliksel ölçüm miktarları belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Birinci grup çalışma örneklerinin 96 well plate'e yüklenmesi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1-SOCS1	2-SOCS1	3-SOCS1	4-SOCS1	5-SOCS1	6-SOCS1	7-SOCS1	8-SOCS1	9-SOCS1	10-SOCS1	11-SOCS1	12-SOCS1
B	13-SOCS1	14-SOCS1	18-SOCS1	22-SOCS1	23-SOCS1	26-SOCS1	31-SOCS1	32-SOCS1	33-SOCS1	34-SOCS1	NC-SOCS1	
C	1-SOCS3	2-SOCS3	3-SOCS3	4-SOCS3	5-SOCS3	6-SOCS3	7-SOCS3	8-SOCS3	9-SOCS3	10-SOCS3	11-SOCS3	12-SOCS3
D	13-SOCS3	14-SOCS3	18-SOCS3	22-SOCS3	23-SOCS3	26-SOCS3	31-SOCS3	32-SOCS3	33-SOCS3	34-SOCS3	NC-SOCS3	
E	1-SOCS3	2-SOCS3	3-SOCS3	4-SOCS3	5-SOCS3	6-SOCS3	7-Beta Actin	8-Beta Actin	9-Beta Actin	10-Beta Actin	11-Beta Actin	12-Beta Actin
F	13-Beta Actin	14-Beta Actin	18-Beta Actin	22-Beta Actin	23-Beta Actin	26-Beta Actin	31-Beta Actin	32-Beta Actin	33-Beta Actin	34-Beta Actin	NC-Beta Actin	
G												
H												

Birinci çalışmada uygulanan yöntemlerin aynısı diğer çalışmalarda da uygulanmıştır.

Çizelge 3.2. İkinci grup çalışma örneklerinin 96 well plate'e yüklenmesi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	35-SOCS1	36-SOCS1	37-SOCS1	38-SOCS1	39-SOCS1	40-SOCS1	41-SOCS1	42-SOCS1	43-SOCS1	44-SOCS1	45-SOCS1	46-SOCS1
B	47-SOCS1	48-SOCS1	49-SOCS1	50-SOCS1	51-SOCS1	52-SOCS1	53-SOCS1	54-SOCS1	55-SOCS1	56-SOCS1	57-SOCS1	58-SOCS1
C	59-SOCS1	60-SOCS1	NC-SOCS1	NC-SOCS3	NC-Beta Actin							
D	35-SOCS3	36-SOCS3	37-SOCS3	38-SOCS3	39-SOCS3	40-SOCS3	41-SOCS3	42-SOCS3	43-SOCS3	44-SOCS3	45-SOCS3	46-SOCS3
E	47-SOCS3	48-SOCS3	49-SOCS3	50-SOCS3	51-SOCS3	52-SOCS3	53-SOCS3	54-SOCS3	55-SOCS3	56-SOCS3	57-SOCS3	58-SOCS3
F	59-SOCS3	60-SOCS3									60-Beta Actin	59-Beta Actin
G	35-Beta Actin	36-Beta Actin	37-Beta Actin	38-Beta Actin	39-Beta Actin	40-Beta Actin	41-Beta Actin	42-Beta Actin	43-Beta Actin	44-Beta Actin	45-Beta Actin	46-Beta Actin
H	47-Beta Actin	48-Beta Actin	49-Beta Actin	50-Beta Actin	51-Beta Actin	52-Beta Actin	53-Beta Actin	54-Beta Actin	55-Beta Actin	56-Beta Actin	57-Beta Actin	58-Beta Actin

96'lık well plate Light Cyler cihazına yerleştirilip örneklerin niceliksel ölçümü belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. Üçüncü grup çalışma örneklerinin 96 well plate'e yüklenmesi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	61-SOCS1	62-SOCS1	63-SOCS1	64-SOCS1	65-SOCS1	66-SOCS1	67-SOCS1	68-SOCS1	69-SOCS1	70-SOCS1	71-SOCS1	72-SOCS1
B	73-SOCS1	74-SOCS1	75-SOCS1	76-SOCS1	77-SOCS1	78-SOCS1	79-SOCS1	80-SOCS1	81-SOCS1	82-SOCS1	83-SOCS1	84-SOCS1
C	85-SOCS1	86-SOCS1	87-SOCS1	88-SOCS1	89-SOCS3	90-SOCS1	NC-SOCS1	NC-SOCS3	NC-Beta Actin			
D	61-SOCS3	62-SOCS3	63-SOCS3	64-SOCS3	65-SOCS3	66-SOCS3	67-SOCS3	68-SOCS3	69-SOCS3	70-SOCS3	71-SOCS3	72-SOCS3
E	73-SOCS3	74-SOCS3	75-SOCS3	76-SOCS3	77-SOCS3	78-SOCS3	79-SOCS3	80-SOCS3	81-SOCS3	82-SOCS3	83-SOCS3	84-SOCS3
F	85-SOCS3	86-SOCS3	87-SOCS3	88-SOCS3	89-SOCS3	90-SOCS3	90-Beta Actin	89-Beta Actin	88-Beta Actin	87-Beta Actin	86-Beta Actin	85-Beta Actin
G	61-Beta Actin	62-Beta Actin	63-Beta Actin	64-Beta Actin	65-Beta Actin	66-Beta Actin	67-Beta Actin	68-Beta Actin	69-Beta Actin	70-Beta Actin	71-Beta Actin	72-Beta Actin
H	73-Beta Actin	74-Beta Actin	75-Beta Actin	76-Beta Actin	77-Beta Actin	78-Beta Actin	79-Beta Actin	80-Beta Actin	81-Beta Actin	82-Beta Actin	83-Beta Actin	84-Beta Actin

96'lık well plate Light Cyler cihazına yerleştirilip örneklerin niceliksel ölçümü belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. Dördüncü grup çalışma örneklerinin 96 well plate'e yüklenmesi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	91-SOCS1	92-SOCS1	93-SOCS1	94-SOCS1	95-SOCS1	96-SOCS1	97-SOCS1	98-SOCS1	99-SOCS1	100-SOCS1	101-SOCS1	102-SOCS1
B	103-SOCS1	104-SOCS1	105-SOCS1	106-SOCS1	107-SOCS1	108-SOCS1	109-SOCS1	110-SOCS1	111-SOCS1	112-SOCS1	113-SOCS1	114-SOCS1
C	115-SOCS1	116-SOCS1	117-SOCS1	118-SOCS1	119-SOCS3	120-SOCS1	NC-SOCS1	NC-SOCS3	NC-Beta Actin			
D	91-SOCS3	92-SOCS3	93-SOCS3	94-SOCS3	95-SOCS3	96-SOCS3	97-SOCS3	98-SOCS3	99-SOCS3	100-SOCS3	101-SOCS3	102-SOCS3
E	103-SOCS3	104-SOCS3	105-SOCS3	106-SOCS3	107-SOCS3	108-SOCS3	109-SOCS3	110-SOCS3	111-SOCS3	112-SOCS3	113-SOCS3	114-SOCS3
F	115-SOCS3	116-SOCS3	117-SOCS3	118-SOCS3	119-SOCS3	120-SOCS3	120-Beta Actin	119-Beta Actin	118-Beta Actin	117-Beta Actin	116-Beta Actin	115-Beta Actin
G	91-Beta Actin	92-Beta Actin	93-Beta Actin	94-Beta Actin	95-Beta Actin	96-Beta Actin	97-Beta Actin	98-Beta Actin	99-Beta Actin	100-Beta Actin	101-Beta Actin	102-Beta Actin
H	103-Beta Actin	104-Beta Actin	105-Beta Actin	106-Beta Actin	107-Beta Actin	108-Beta Actin	109-Beta Actin	110-Beta Actin	111-Beta Actin	112-Beta Actin	113-Beta Actin	114-Beta Actin

96'lık well plate Light Cyler cihazına yerleştirilip örneklerin niceliksel ölçümü belirlenmiştir

Çizelge 3.5. Beşinci grup çalışma örneklerinin 96 well plate'e yüklenmesi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	121-SOCS1	122-SOCS1	123-SOCS1	124-SOCS1	125-SOCS1	126-SOCS1	127-SOCS1	128-SOCS1	129-SOCS1	130-SOCS1	131-SOCS1	132-SOCS1
B	133-SOCS1	134-SOCS1	135-SOCS1	136-SOCS1	137-SOCS1	138-SOCS1	139-SOCS1	NC-SOCS1	NC-SOCS1	NC-SOCS1		
C	121-SOCS3	122-SOCS3	123-SOCS3	124-SOCS3	125-SOCS3	126-SOCS3	127-SOCS3	128-SOCS3	129-SOCS3	130-SOCS3	131-SOCS3	132-SOCS3
D	133-SOCS3	134-SOCS3	135-SOCS3	136-SOCS3	137-SOCS3	138-SOCS3	139-SOCS3					
E	121-Beta Actin	122-Beta Actin	123-Beta Actin	124-Beta Actin	125-Beta Actin	126-Beta Actin	127-Beta Actin	128-Beta Actin	129-Beta Actin	130-Beta Actin	131-Beta Actin	132-Beta Actin
F	133-Beta Actin	134-Beta Actin	135-Beta Actin	136-Beta Actin	137-Beta Actin	138-Beta Actin	139-Beta Actin					
G												
H												

96'lık well plate Light Cycler cihazına yerleştirilip örneklerin niceliksel ölçümü belirlenmiştir.

Çizelge 3.6. Altıncı grup çalışma örneklerinin 96 well plate'e yüklenmesi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	140-SOCS1	141-SOCS1	142-SOCS1	143-SOCS1	144-SOCS1	145-SOCS1	146-SOCS1	147-SOCS1	148-SOCS1	149-SOCS1	150-SOCS1	151-SOCS1
B	152-SOCS1	153-SOCS1	154-SOCS1	155-SOCS1	156-SOCS1	157-SOCS1	158-SOCS1	159-SOCS1	160-SOCS1	161-SOCS1	162-SOCS1	163-SOCS1
C	164-SOCS1	165-SOCS1	166-SOCS1	167-SOCS1	NC-SOCS1	NC-SOCS3	NC-Beta Actin					
D	140-SOCS3	141-SOCS3	142-SOCS3	143-SOCS3	144-SOCS3	145-SOCS3	146-SOCS3	147-SOCS3	148-SOCS3	149-SOCS3	150-SOCS3	151-SOCS3
E	152-SOCS3	153-SOCS3	154-SOCS3	155-SOCS3	156-SOCS3	157-SOCS3	158-SOCS3	159-SOCS3	160-SOCS3	161-SOCS3	162-SOCS3	163-SOCS3
F	164-SOCS3	165-SOCS3	166-SOCS3	167-SOCS3					167-Beta Actin	166-Beta Actin	165-Beta Actin	164-Beta Actin
G	140-Beta Actin	141-Beta Actin	142-Beta Actin	143-Beta Actin	144-Beta Actin	145-Beta Actin	146-Beta Actin	147-Beta Actin	148-Beta Actin	149-Beta Actin	150-Beta Actin	151-Beta Actin
H	152-Beta Actin	153-Beta Actin	154-Beta Actin	155-Beta Actin	156-Beta Actin	157-Beta Actin	158-Beta Actin	159-Beta Actin	160-Beta Actin	161-Beta Actin	162-Beta Actin	163-Beta Actin

96'lık well plate Light Cycler cihazına yerleştirilip örneklerin niceliksel ölçümü belirlenmiştir.



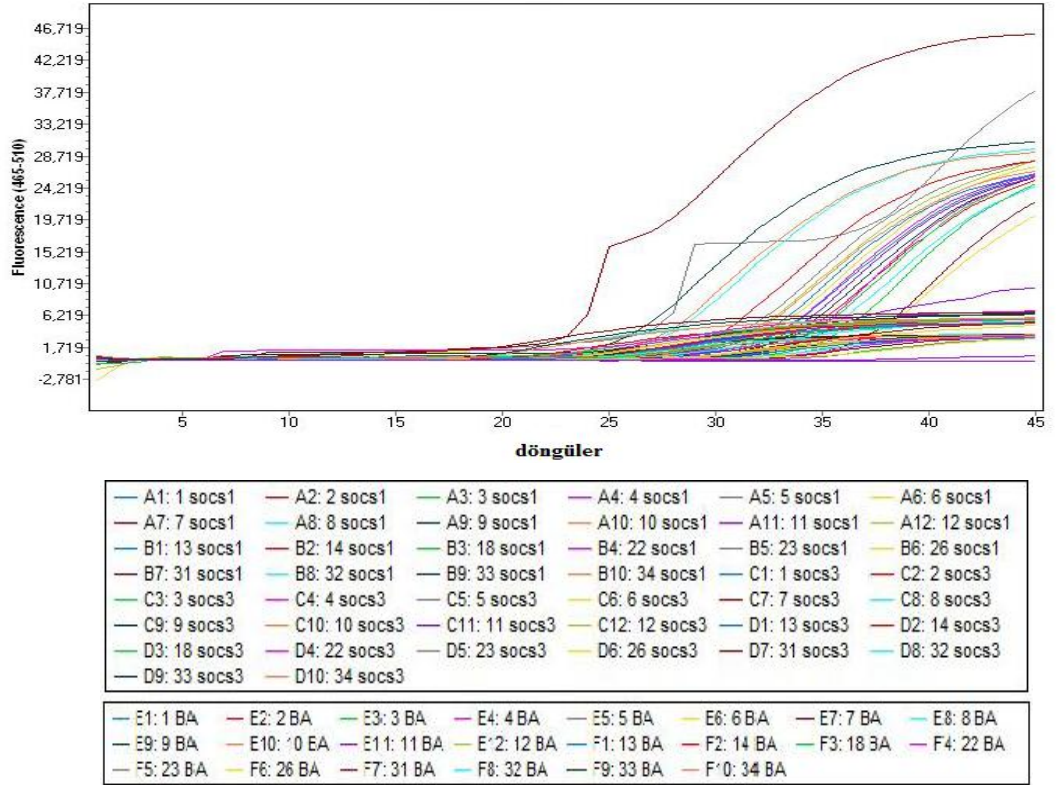
## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. BULGULAR

#### 4.1.1. SOCS-1 ve SOCS-3 Genlerinin İfadesinin Gerçek Zamanlı RT-PZR'da Niceliksel Ölçümü

##### 4.1.1.1. Birinci çalışma absolut (tam) niceliksel ölçüm

Amplifikasyon aşamasında örnek ve referans genlerin 465-510 nm floresan aralığında eşik değerine girdikleri döngüler saptanmıştır.



Şekil 4.1. Hedef ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüyü gösteren amplifikasyon eğimi (BA: Beta Aktin, S1: SOCS-1, S3: SOCS-3)

Tüm RT-PZR çalışmasında örnek ve referans genlerin 465-510 nm floresan aralığındaki tam niceliksel eşik değerleri (CP) ölçülmüştür.

Çizelge 4.1. Örnek ve referans genlerin birinci çalışma sonucunda elde edilen tam niceliksel eşik değerleri

Örnek	CP	Örnek	CP	Örnek	CP
1 SOCS1	<b>32,26</b>	1 SOCS3	<b>27,72</b>	1 BA	<b>22,91</b>
2 SOCS1	<b>33,52</b>	2 SOCS3	<b>28,31</b>	2 BA	<b>23,54</b>
3 SOCS1	<b>33,94</b>	3 SOCS3	<b>31,17</b>	3 BA	<b>25,75</b>
4 SOCS1	<b>32,27</b>	4 SOCS3	<b>26</b>	4 BA	<b>22,22</b>
5 SOCS1	<b>30,65</b>	5 SOCS3	<b>26,6</b>	5 BA	<b>23,09</b>
6 SOCS1	<b>32,29</b>	6 SOCS3	<b>29,6</b>	6 BA	<b>23,4</b>
7 SOCS1	<b>36,57</b>	7 SOCS3	<b>32,64</b>	7 BA	<b>28,9</b>
8 SOCS1	<b>34,33</b>	8 SOCS3	<b>31,51</b>	8 BA	<b>27,09</b>
9 SOCS1	<b>32,99</b>	9 SOCS3	<b>29,18</b>	9 BA	<b>24,66</b>
10 SOCS1	<b>30,95</b>	10 SOCS3	<b>28,12</b>	10 BA	<b>21,6</b>
11 SOCS1	<b>30,95</b>	11 SOCS3	<b>29,78</b>	11 BA	<b>24,38</b>
12 SOCS1	<b>31,09</b>	12 SOCS3	<b>28,57</b>	12 BA	<b>23</b>
13 SOCS1	<b>31,65</b>	13 SOCS3	<b>29,67</b>	13 BA	<b>24,26</b>
14 SOCS1	<b>29,45</b>	14 SOCS3	<b>25,3</b>	14 BA	<b>20,49</b>
18 SOCS1	<b>35,03</b>	18 SOCS3	<b>33,92</b>	18 BA	<b>22</b>
22 SOCS1	<b>33,67</b>	22 SOCS3	<b>32,59</b>	22 BA	<b>24,41</b>
23 SOCS1	<b>25,53</b>	23 SOCS3	<b>34,19</b>	23 BA	<b>25,36</b>
26 SOCS1	<b>36,55</b>	26 SOCS3	<b>35,05</b>	26 BA	<b>28,6</b>
31 SOCS1	<b>21,83</b>	31 SOCS3	<b>21,92</b>	31 BA	<b>18,56</b>
32 SOCS1	<b>27,38</b>	32 SOCS3	<b>24,05</b>	32 BA	<b>18,67</b>
33 SOCS1	<b>25,56</b>	33 SOCS3	<b>22,95</b>	33 BA	<b>18,56</b>
34 SOCS1	<b>26,82</b>	34 SOCS3	<b>24,96</b>	34 BA	<b>18,84</b>

Tüm çalışmalarda hedef ve referans genlerinin relative (göreceli) niceliksel ölçümü Pfaffl metoduna uygun olarak karşılaştırılıp [62], hedef genin göreceli ekspresyon oranı (Ratios); kontrol gene karşı bilinmeyen bir örneğin CP sapması ve E değerine bağlı olarak elde edilmiştir.

$$R = \frac{(E_{hedef})^{\Delta CP_{hedef} (kontrol-örnek)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref} (kontrol-örnek)}}$$

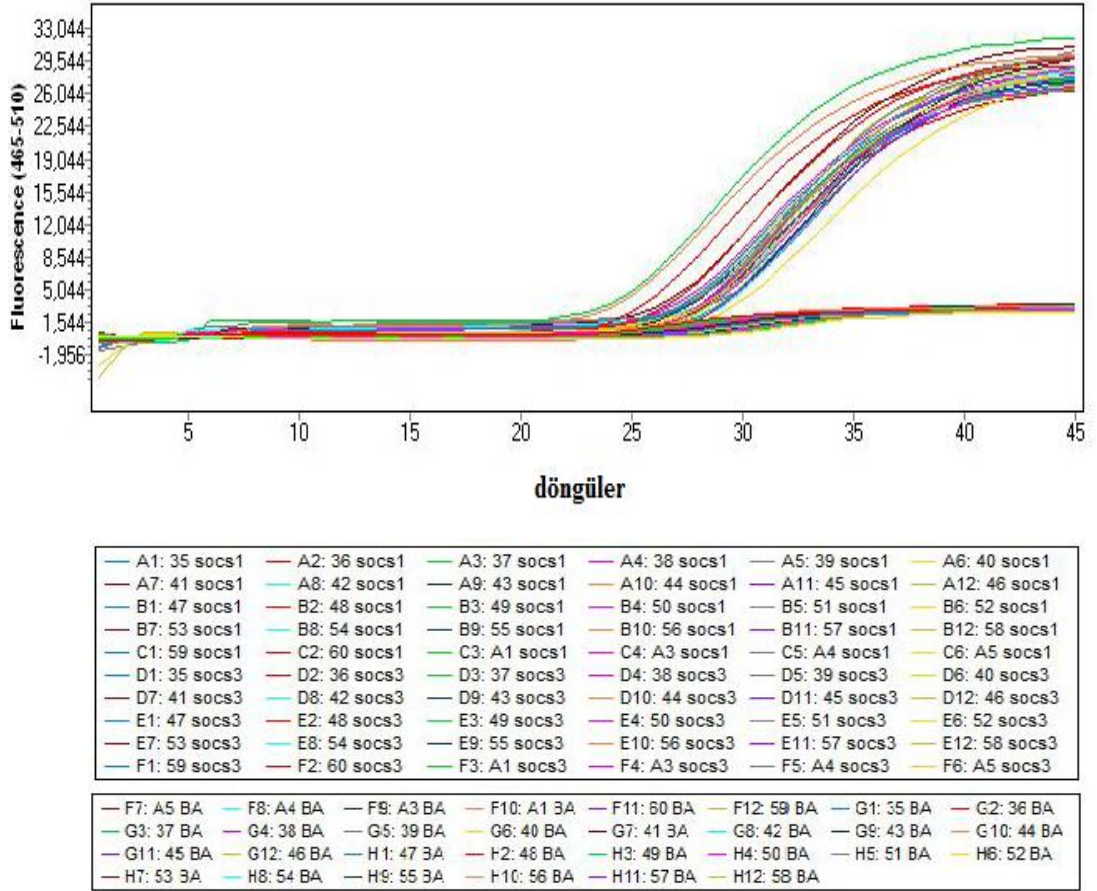
(R : Relative ekspresyon oranı, E : Başlangıç fazda bir döngünün real-time RT-PCR etkinliği,  $\Delta\Delta CP$  : Hedef ve referans genlerin delta delta CP değerleri

Çizelge 4.2. Hedef genlerin birinci çalışma sonucunda elde edilen göreceli ölçüm değerleri

<b>Örnek</b>	<b>Ratios</b>	<b>Örnek</b>	<b>Ratios</b>
	<b>Tgt/Ref</b>		<b>Tgt/Ref</b>
1-BA; 1-S1	<b>1,53E-03</b>	1-BA; 1-S3	<b>3,56E-02</b>
2-BA; 2-S1	<b>9,88E-04</b>	2-BA; 2-S3	<b>3,66E-02</b>
3-BA; 3-S1	<b>3,43E-03</b>	3-BA; 3-S3	<b>2,33E-02</b>
4-BA; 4-S1	<b>9,44E-04</b>	4-BA; 4-S3	<b>7,29E-02</b>
5-BA; 5-S1	<b>5,33E-03</b>	5-BA; 5-S3	<b>8,83E-02</b>
6-BA; 6-S1	<b>2,11E-03</b>	6-BA; 6-S3	<b>1,36E-02</b>
7-BA; 7-S1	<b>4,92E-03</b>	7-BA; 7-S3	<b>7,46E-02</b>
8-BA; 8-S1	<b>6,66E-03</b>	8-BA; 8-S3	<b>4,70E-02</b>
9-BA; 9-S1	<b>3,10E-03</b>	9-BA; 9-S3	<b>4,35E-02</b>
10-BA; 10-S1	<b>1,53E-03</b>	10-BA; 10-S3	<b>1,09E-02</b>
11-BA; 11-S1	<b>1,05E-02</b>	11-BA; 11-S3	<b>2,36E-02</b>
12-BA; 12-S1	<b>3,67E-03</b>	12-BA; 12-S3	<b>2,11E-02</b>
13-BA; 13-S1	<b>6,00E-03</b>	13-BA; 13-S3	<b>2,36E-02</b>
14-BA; 14-S1	<b>2,00E-03</b>	14-BA; 14-S3	<b>3,55E-02</b>
18-BA; 18-S1	<b>1,19E-04</b>	18-BA; 18-S3	<b>2,59E-04</b>
22-BA; 22-S1	<b>1,63E-03</b>	22-BA; 22-S3	<b>3,44E-03</b>
23-BA; 23-S1	<b>0,8924</b>	23-BA; 23-S3	<b>2,20E-03</b>
26-BA; 26-S1	<b>4,04E-03</b>	26-BA; 26-S3	<b>1,15E-02</b>
31-BA; 31-S1	<b>0,1035</b>	31-BA; 31-S3	<b>9,69E-02</b>
32-BA; 32-S1	<b>2,39E-03</b>	32-BA; 32-S3	<b>2,39E-02</b>
33-BA; 33-S1	<b>7,86E-03</b>	33-BA; 33-S3	<b>4,80E-02</b>
34-BA; 34-S1	<b>3,96E-03</b>	34-BA; 34-S3	<b>1,44E-02</b>

#### 4.1.1.2. İkinci çalışma tam niceliksel ölçüm

Amplifikasyon aşamasında örnek ve referans genlerin 465–510 nm floresan aralığında eşik değerine girdikleri döngüler saptanmıştır.



Şekil 4.2. Hedef ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüyü gösteren amplifikasyon eğimi (BA: Beta Aktin, S1: SOCS-1, S3: SOCS-3)

465–510 nm floresan aralığında örneklerin ve referans genin absolut (tam) niceliksel eşik değerleri (CP) ölçülmüştür.

Çizelge 4.3. Örnek ve referans genlerin ikinci çalışma sonucunda elde edilen tam niceliksel eşik değerleri (CP)

<b>Örnek</b>	<b>CP</b>	<b>Örnek</b>	<b>CP</b>	<b>Örnek</b>	<b>CP</b>
35 SOCS1	<b>27,01</b>	35 SOCS3	<b>23,22</b>	35 BA	<b>18,05</b>
36 SOCS1	<b>27,46</b>	36 SOCS3	<b>23,78</b>	36 BA	<b>18,49</b>
37 SOCS1	<b>28,21</b>	37 SOCS3	<b>24,67</b>	37 BA	<b>19,83</b>
38 SOCS1	<b>26,83</b>	38 SOCS3	<b>24,14</b>	38 BA	<b>18,35</b>
39 SOCS1	<b>29,33</b>	39 SOCS3	<b>27,51</b>	39 BA	<b>21,12</b>
40 SOCS1	<b>28,23</b>	40 SOCS3	<b>25,96</b>	40 BA	<b>19,55</b>
41 SOCS1	<b>27,71</b>	41 SOCS3	<b>24,57</b>	41 BA	<b>18,36</b>
42 SOCS1	<b>28,35</b>	42 SOCS3	<b>24,89</b>	42 BA	<b>18,57</b>
43 SOCS1	<b>27</b>	43 SOCS3	<b>25,01</b>	43 BA	<b>18,62</b>
44 SOCS1	<b>27,08</b>	44 SOCS3	<b>24,69</b>	44 BA	<b>18,73</b>
45 SOCS1	<b>27,16</b>	45 SOCS3	<b>25,93</b>	45 BA	<b>19,6</b>
46 SOCS1	<b>26,88</b>	46 SOCS3	<b>22,69</b>	46 BA	<b>16,58</b>
47 SOCS1	<b>27,24</b>	47 SOCS3	<b>24,65</b>	47 BA	<b>17,89</b>
48 SOCS1	<b>24,84</b>	48 SOCS3	<b>24,73</b>	48 BA	<b>18,47</b>
49 SOCS1	<b>24,4</b>	49 SOCS3	<b>23,32</b>	49 BA	<b>17,99</b>
50 SOCS1	<b>28,22</b>	50 SOCS3	<b>24,59</b>	50 BA	<b>18,72</b>
51 SOCS1	<b>27,84</b>	51 SOCS3	<b>23,87</b>	51 BA	<b>18,76</b>
52 SOCS1	<b>29,09</b>	52 SOCS3	<b>26,16</b>	52 BA	<b>20,06</b>
53 SOCS1	<b>26,63</b>	53 SOCS3	<b>24,96</b>	53 BA	<b>18,74</b>
54 SOCS1	<b>28,51</b>	54 SOCS3	<b>26,19</b>	54 BA	<b>19,92</b>
55 SOCS1	<b>28,37</b>	55 SOCS3	<b>26,83</b>	55 BA	<b>20,66</b>
56 SOCS1	<b>24,36</b>	56 SOCS3	<b>22,48</b>	56 BA	<b>19,04</b>
57 SOCS1	<b>28,24</b>	57 SOCS3	<b>25,76</b>	57 BA	<b>21,02</b>
58 SOCS1	<b>27,91</b>	58 SOCS3	<b>26,58</b>	58 BA	<b>21,18</b>
59 SOCS1	<b>27,68</b>	59 SOCS3	<b>25,56</b>	59 BA	<b>20,9</b>
60 SOCS1	<b>26,28</b>	60 SOCS3	<b>22,58</b>	60 BA	<b>19,74</b>

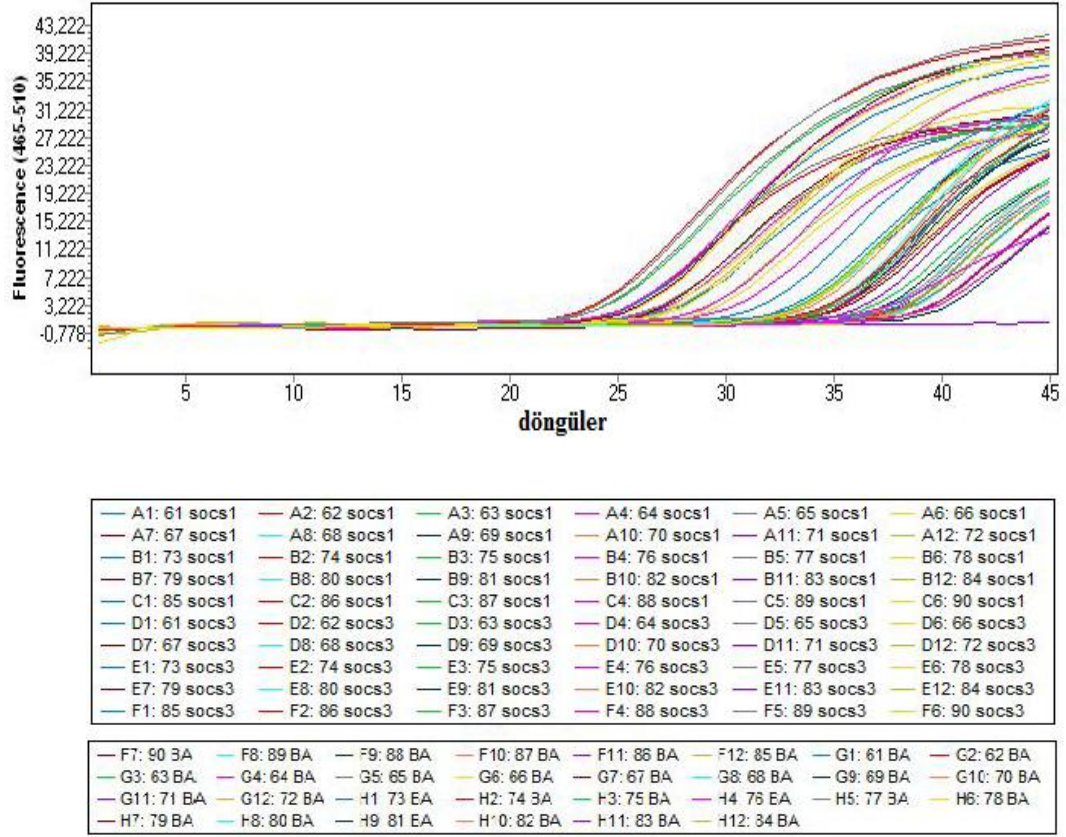
Pfaffl metoduna göre, hedef genlerin relative (göreceli) niceliksel ölçümü hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4. Hedef genlerin ikinci çalışma sonucunda elde edilen göreceli ölçüm değerleri

<b>Örnek</b>	<b>Ratios</b>	<b>Örnek</b>	<b>Ratios</b>
	<b>Tgt/Ref</b>		<b>Tgt/Ref</b>
35-BA; 36-S1	<b>2,01E-03</b>	35-BA; 36-S3	<b>2,78E-02</b>
36-BA; 36-S1	<b>2,00E-03</b>	36-BA; 36-S3	<b>2,57E-02</b>
37-BA; 37-S1	<b>3,01E-03</b>	37-BA; 37-S3	<b>3,50E-02</b>
38-BA; 38-S1	<b>2,81E-03</b>	38-BA; 38-S3	<b>1,81E-02</b>
39-BA; 39-S1	<b>3,38E-03</b>	39-BA; 39-S3	<b>1,19E-02</b>
40-BA; 40-S1	<b>2,43E-03</b>	40-BA; 40-S3	<b>1,18E-02</b>
41-BA; 41-S1	<b>1,53E-03</b>	41-BA; 41-S3	<b>1,35E-02</b>
42-BA; 42-S1	<b>1,14E-03</b>	42-BA; 42-S3	<b>1,25E-02</b>
43-BA; 43-S1	<b>3,00E-03</b>	43-BA; 43-S3	<b>1,29E-02</b>
44-BA;44-S1	<b>3,07E-03</b>	44-BA;44-S3	<b>1,49E-02</b>
45-BA; 45-S1	<b>5,30E-03</b>	45-BA; 45-S3	<b>1,24E-02</b>
46-BA; 46-S1	<b>7,91E-04</b>	46-BA; 46-S3	<b>1,45E-02</b>
47-BA; 47-S1	<b>1,52E-03</b>	47-BA; 47-S3	<b>9,23E-03</b>
48-BA; 48-S1	<b>1,21E-02</b>	48-BA; 48-S3	<b>1,31E-02</b>
49-BA; 49-S1	<b>1,18E-02</b>	49-BA; 49-S3	<b>2,50E-02</b>
50-BA; 50-S1	<b>1,38E-03</b>	50-BA; 50-S3	<b>1,72E-02</b>
51-BA; 51-S1	<b>1,85E-03</b>	51-BA; 51-S3	<b>2,89E-02</b>
52-BA; 52-S1	<b>1,92E-03</b>	52-BA; 52-S3	<b>1,46E-02</b>
53-BA; 53-S1	<b>4,22E-03</b>	53-BA; 53-S3	<b>1,34E-02</b>
54-BA; 54-S1	<b>2,59E-03</b>	54-BA; 54-S3	<b>1,30E-02</b>
55-BA; 55-S1	<b>4,76E-03</b>	55-BA; 55-S3	<b>1,38E-02</b>
56-BA; 56-S1	<b>2,50E-02</b>	56-BA; 56-S3	<b>9,16E-02</b>
57-BA; 57-S1	<b>6,73E-03</b>	57-BA; 57-S3	<b>3,74E-02</b>
58-BA; 58-S1	<b>9,41E-03</b>	58-BA; 58-S3	<b>2,37E-02</b>
59-BA; 59-S1	<b>9,14E-03</b>	59-BA; 59-S3	<b>3,96E-02</b>
60-BA; 60-S1	<b>1,08E-02</b>	60-BA; 60-S3	<b>0,1401</b>

#### 4.1.1.3. Üçüncü çalışma tam niceliksel ölçüm

Amplifikasyon aşamasında örnek ve referans genlerin 465-510 nm floresan aralığında eşik değerine girdikleri döngüler saptanmıştır.



Şekil 4.3. Hedef ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüyü gösteren amplifikasyon eğimi (BA: Beta Aktin, S1: SOCS-1, S3: SOCS-3)

465-510 nm floresan aralığında örneklerin ve referans genin absolut (tam) niceliksel eşik değerleri (CP) ölçülmüştür.

Çizelge 4.5. Örnek ve referans genlerin üçüncü çalışma sonucunda elde edilen tam niceliksel eşik değerleri (CP)

<b>Örnek</b>	<b>CP</b>	<b>Örnek</b>	<b>CP</b>	<b>Örnek</b>	<b>CP</b>
61 SOCS1	<b>28,03</b>	61 SOCS3	<b>25,79</b>	61 BA	<b>19,28</b>
62 SOCS1	<b>25,38</b>	62 SOCS3	<b>24,06</b>	62 BA	<b>18,76</b>
63 SOCS1	<b>26,79</b>	63 SOCS3	<b>24,71</b>	63 BA	<b>18,89</b>
64 SOCS1	<b>27,25</b>	64 SOCS3	<b>25,75</b>	64 BA	<b>20,92</b>
65 SOCS1	<b>26,84</b>	65 SOCS3	<b>24,26</b>	65 BA	<b>18,22</b>
66 SOCS1	<b>26,92</b>	66 SOCS3	<b>26,23</b>	66 BA	<b>19,16</b>
67 SOCS1	<b>26,7</b>	67 SOCS3	<b>26,23</b>	67 BA	<b>19,7</b>
68 SOCS1	<b>37,22</b>	68 SOCS3	<b>35,05</b>	68 BA	<b>28,62</b>
69 SOCS1	<b>36,88</b>	69 SOCS3	<b>34,88</b>	69 BA	<b>32,01</b>
70 SOCS1	<b>37,29</b>	70 SOCS3	<b>35,06</b>	70 BA	<b>28,55</b>
71 SOCS1	<b>0</b>	71 SOCS3	<b>35,49</b>	71 BA	<b>33,07</b>
72 SOCS1	<b>28,83</b>	72 SOCS3	<b>27,73</b>	72 BA	<b>26,69</b>
73 SOCS1	<b>33,24</b>	73 SOCS3	<b>31,71</b>	73 BA	<b>29,84</b>
74 SOCS1	<b>37,79</b>	74 SOCS3	<b>34,92</b>	74 BA	<b>31,07</b>
75 SOCS1	<b>37,8</b>	75 SOCS3	<b>35,27</b>	75 BA	<b>28,2</b>
76 SOCS1	<b>30,5</b>	76 SOCS3	<b>29,38</b>	76 BA	<b>28,19</b>
77 SOCS1	<b>25,26</b>	77 SOCS3	<b>24,5</b>	77 BA	<b>24,18</b>
78 SOCS1	<b>29,38</b>	78 SOCS3	<b>28,36</b>	78 BA	<b>28,04</b>
79 SOCS1	<b>35,61</b>	79 SOCS3	<b>33,77</b>	79 BA	<b>28,36</b>
80 SOCS1	<b>38,49</b>	80 SOCS3	<b>34,04</b>	80 BA	<b>29,1</b>
81 SOCS1	<b>40</b>	81 SOCS3	<b>35,29</b>	81 BA	<b>31,59</b>
82 SOCS1	<b>37,76</b>	82 SOCS3	<b>34,13</b>	82 BA	<b>28,3</b>
83 SOCS1	<b>39,29</b>	83 SOCS3	<b>36,09</b>	83 BA	<b>30,94</b>
84 SOCS1	<b>37,92</b>	84 SOCS3	<b>33,7</b>	84 BA	<b>26,77</b>
85 SOCS1	<b>37,32</b>	85 SOCS3	<b>33,12</b>	85 BA	<b>27,14</b>
86 SOCS1	<b>40</b>	86 SOCS3	<b>35,15</b>	86 BA	<b>28,54</b>
87 SOCS1	<b>36,53</b>	87 SOCS3	<b>33,42</b>	87 BA	<b>26,3</b>
88 SOCS1	<b>40</b>	88 SOCS3	<b>36,18</b>	88 BA	<b>31,19</b>
89 SOCS1	<b>38,99</b>	89 SOCS3	<b>34,83</b>	89 BA	<b>30,99</b>
90 SOCS1	<b>35,27</b>	90 SOCS3	<b>33,6</b>	90 BA	<b>31,71</b>

Pfaffl metoduna göre, hedef genlerin relative (göreceli) niceliksel ölçümü hesaplanmıştır.

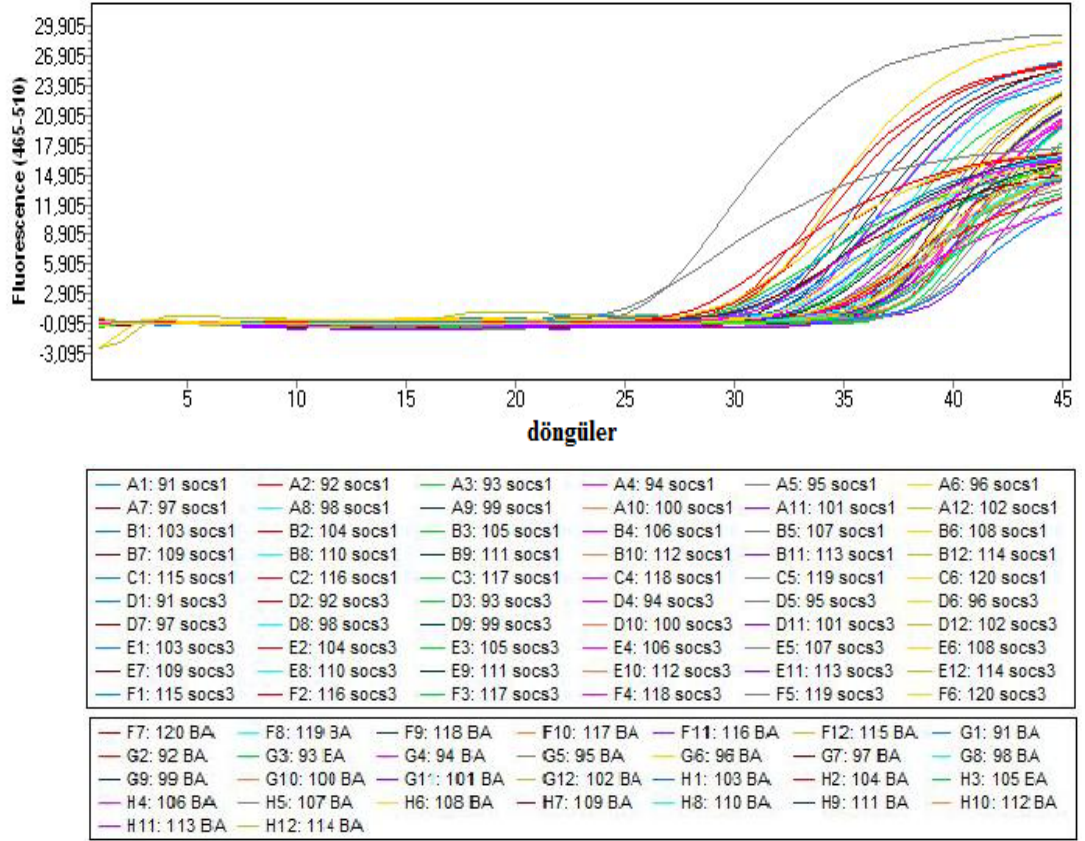


Çizelge 4.6. Hedef genlerin üçüncü çalışma sonucunda elde edilen göreceli ölçüm değerleri

<b>Örnek</b>	<b>Ratios</b>	<b>Örnek</b>	<b>Ratios</b>
	<b>Tgt/Ref</b>		<b>Tgt/Ref</b>
61-BA; 61-S1	<b>2,32E-03</b>	61-BA; 61-S3	<b>1,10E-02</b>
62-BA; 62-S1	<b>1,01E-02</b>	62-BA; 62-S3	<b>2,52E-02</b>
63-BA; 63-S1	<b>4,17E-03</b>	63-BA; 63-S3	<b>1,76E-02</b>
64-BA; 64-S1	<b>1,24E-02</b>	64-BA; 64-S3	<b>3,52E-02</b>
65-BA; 65-S1	<b>2,55E-03</b>	65-BA; 65-S3	<b>1,52E-02</b>
66-BA; 66-S1	<b>4,59E-03</b>	66-BA; 66-S3	<b>7,40E-03</b>
67-BA; 67-S1	<b>7,81E-03</b>	67-BA; 67-S3	<b>1,08E-02</b>
68-BA; 68-S1	<b>2,58E-03</b>	68-BA; 68-S3	<b>1,16E-02</b>
69-BA; 69-S1	<b>3,41E-02</b>	69-BA; 69-S3	<b>0,1366</b>
70-BA; 70-S1	<b>2,34E-03</b>	70-BA; 70-S3	<b>1,10E-02</b>
71-BA; 71-S1	<b>0</b>	71-BA; 71-S3	<b>0,1869</b>
72-BA; 72-S1	<b>0,2271</b>	72-BA; 72-S3	<b>0,4879</b>
73-BA; 73-S1	<b>9,48E-02</b>	73-BA; 73-S3	<b>0,2734</b>
74-BA; 74-S1	<b>9,51E-03</b>	74-BA; 74-S3	<b>6,91E-02</b>
75-BA; 75-S1	<b>1,29E-03</b>	75-BA; 75-S3	<b>7,44E-03</b>
76-BA; 76-S1	<b>0,2011</b>	76-BA; 76-S3	<b>0,4393</b>
77-BA; 77-S1	<b>0,4743</b>	77-BA; 77-S3	<b>0,7989</b>
78-BA; 78-S1	<b>0,3951</b>	78-BA; 78-S3	<b>0,801</b>
79-BA; 79-S1	<b>6,57E-03</b>	79-BA; 79-S3	<b>2,35E-02</b>
80-BA; 80-S1	<b>1,49E-03</b>	80-BA; 80-S3	<b>3,27E-02</b>
81-BA; 81-S1	<b>2,96E-03</b>	81-BA; 81-S3	<b>7,69E-02</b>
82-BA; 82-S1	<b>1,42E-03</b>	82-BA; 82-S3	<b>1,76E-02</b>
83-BA; 83-S1	<b>3,07E-03</b>	83-BA; 83-S3	<b>2,80E-02</b>
84-BA; 84-S1	<b>4,39E-04</b>	84-BA; 84-S3	<b>8,20E-03</b>
85-BA; 85-S1	<b>8,64E-04</b>	85-BA; 85-S3	<b>1,58E-02</b>
86-BA; 86-S1	<b>3,56E-04</b>	86-BA; 86-S3	<b>1,02E-02</b>
87-BA; 87-S1	<b>8,29E-04</b>	87-BA; 87-S3	<b>7,17E-03</b>
88-BA; 88-S1	<b>2,23E-03</b>	88-BA; 88-S3	<b>3,13E-02</b>
89-BA; 89-S1	<b>3,92E-03</b>	89-BA; 89-S3	<b>7,01E-02</b>
90-BA; 90-S1	<b>8,47E-02</b>	90-BA; 90-S3	<b>0,2702</b>

#### 4.1.1.4. Dördüncü çalışma tam niceliksel ölçüm

Amplifikasyon aşamasında örnek ve referans genlerin 465-510 nm floresan aralığında eşik değerine girdikleri döngüler saptanmıştır.



Şekil 4.4. Hedef ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüyü gösteren amplifikasyon eğimi (BA: Beta Aktin, S1: SOCS-1, S3: SOCS-3)

465–510 nm floresan aralığında örneklerin ve referans genin absolut (tam) niceliksel eşik değerleri (CP) ölçülmüştür.

Çizelge 4.7. Örnek ve referans genlerin dördüncü çalışma sonucunda elde edilen tam niceliksel eşik değerleri (CP)

<b>Örnek</b>	<b>CP</b>	<b>Örnek</b>	<b>CP</b>	<b>Örnek</b>	<b>CP</b>
91 SOCS1	<b>31,69</b>	91 SOCS3	<b>30,19</b>	91 BA	<b>30,36</b>
92 SOCS1	<b>30,5</b>	92 SOCS3	<b>29,23</b>	92 BA	<b>28,55</b>
93 SOCS1	<b>33,87</b>	93 SOCS3	<b>29,59</b>	93 BA	<b>26,75</b>
94 SOCS1	<b>36,96</b>	94 SOCS3	<b>34,75</b>	94 BA	<b>29,14</b>
95 SOCS1	<b>37,94</b>	95 SOCS3	<b>37,78</b>	95 BA	<b>33,8</b>
96 SOCS1	<b>30,71</b>	96 SOCS3	<b>29,22</b>	96 BA	<b>29,05</b>
97 SOCS1	<b>35,99</b>	97 SOCS3	<b>35,07</b>	97 BA	<b>33,24</b>
98 SOCS1	<b>34,1</b>	98 SOCS3	<b>32,77</b>	98 BA	<b>33,1</b>
99 SOCS1	<b>32,57</b>	99 SOCS3	<b>31,06</b>	99 BA	<b>31,2</b>
100 SOCS1	<b>36,8</b>	100 SOCS3	<b>36,25</b>	100 BA	<b>32,63</b>
101 SOCS1	<b>39,38</b>	101 SOCS3	<b>36,07</b>	101 BA	<b>30,17</b>
102 SOCS1	<b>36,32</b>	102 SOCS3	<b>35,45</b>	102 BA	<b>29,81</b>
103 SOCS1	<b>32,88</b>	103 SOCS3	<b>31,18</b>	103 BA	<b>30,04</b>
104 SOCS1	<b>37,17</b>	104 SOCS3	<b>34,19</b>	104 BA	<b>28,62</b>
105 SOCS1	<b>37,63</b>	105 SOCS3	<b>33,11</b>	105 BA	<b>28,16</b>
106 SOCS1	<b>36,81</b>	106 SOCS3	<b>34,06</b>	106 BA	<b>28,58</b>
107 SOCS1	<b>35,38</b>	107 SOCS3	<b>33,77</b>	107 BA	<b>28,88</b>
108 SOCS1	<b>36,12</b>	108 SOCS3	<b>34,76</b>	108 BA	<b>30,78</b>
109 SOCS1	<b>31,66</b>	109SOCS3	<b>30,35</b>	109 BA	<b>27,93</b>
110 SOCS1	<b>37,58</b>	110SOCS3	<b>35,04</b>	110 BA	<b>28,28</b>
111 SOCS1	<b>36,43</b>	111 SOCS3	<b>33,52</b>	111 BA	<b>27,39</b>
112 SOCS1	<b>37,49</b>	112 SOCS3	<b>35,54</b>	112 BA	<b>29,23</b>
113 SOCS1	<b>36,31</b>	113 SOCS3	<b>32,69</b>	113 BA	<b>27,98</b>
114 SOCS1	<b>36,52</b>	114 SOCS3	<b>35,46</b>	114 BA	<b>28,91</b>
115 SOCS1	<b>37,3</b>	115 SOCS3	<b>37,87</b>	115 BA	<b>33,43</b>
116 SOCS1	<b>29,89</b>	116 SOCS3	<b>28,09</b>	116 BA	<b>26,75</b>
117 SOCS1	<b>37,4</b>	117 SOCS3	<b>36,02</b>	117 BA	<b>31,98</b>
118 SOCS1	<b>32,93</b>	118 SOCS3	<b>31,17</b>	118 BA	<b>30,63</b>
119 SOCS1	<b>25,9</b>	119 SOCS3	<b>25,09</b>	119 BA	<b>24,29</b>
120 SOCS1	<b>35,46</b>	120 SOCS3	<b>32,25</b>	120 BA	<b>27,64</b>

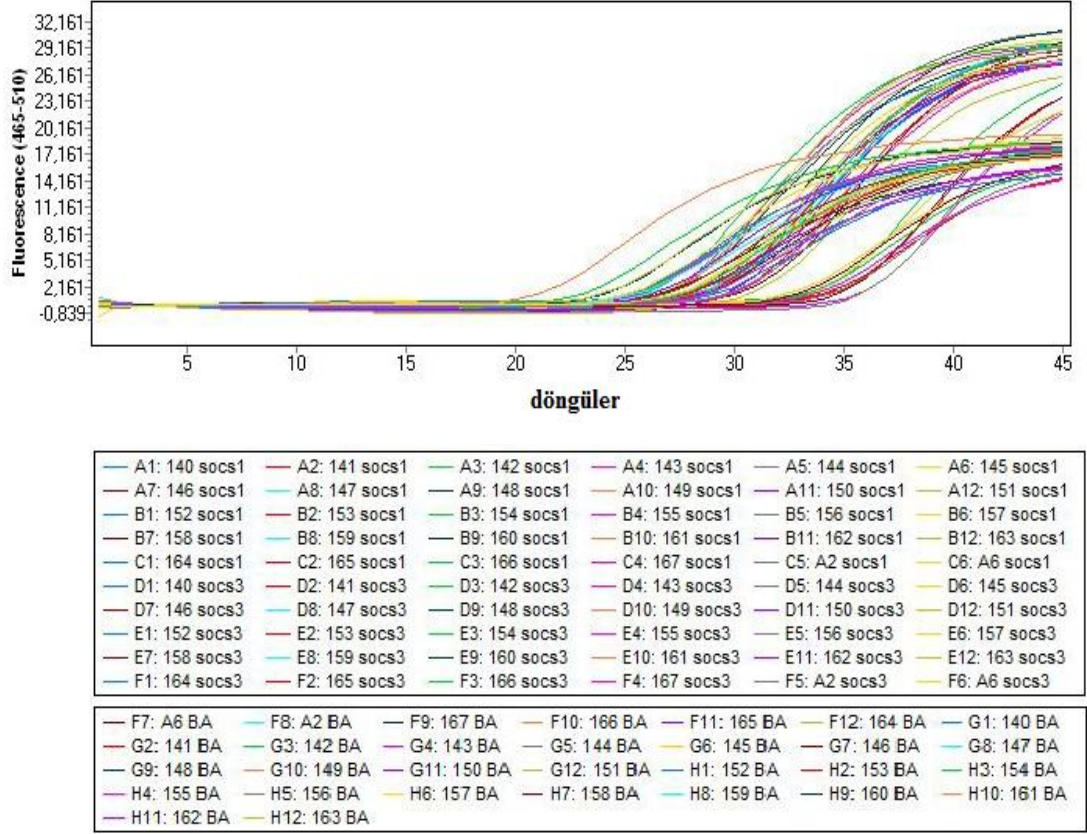
Pfaffl metoduna göre, hedef genlerin relative (göreceli) niceliksel ölçümü hesaplanmıştır.

Çizelge 4.8. Hedef genlerin dördüncü çalışma sonucunda elde edilen göreceli ölçüm değerleri

<b>Örnek</b>	<b>Ratios</b>	<b>Örnek</b>	<b>Ratios</b>
	<b>Tgt/Ref</b>		<b>Tgt/Ref</b>
91-BA; 91-S1	<b>0,3972</b>	91-BA; 91-S3	<b>1,129</b>
92-BA; 92-S1	<b>0,2579</b>	92-BA; 92-S3	<b>0,6245</b>
93-BA; 93-S1	<b>7,18E-03</b>	93-BA; 93-S3	<b>0,1398</b>
94-BA; 94-S1	<b>4,44E-03</b>	94-BA; 94-S3	<b>2,04E-02</b>
95-BA; 95-S1	<b>5,67E-02</b>	95-BA; 95-S3	<b>6,34E-02</b>
96-BA; 96-S1	<b>0,3169</b>	96-BA; 96-S3	<b>0,8862</b>
97-BA; 97-S1	<b>0,1487</b>	97-BA; 97-S3	<b>0,2817</b>
98-BA; 98-S1	<b>0,4986</b>	98-BA; 98-S3	<b>1,253</b>
99-BA; 99-S1	<b>0,3845</b>	99-BA; 99-S3	<b>1,095</b>
100-BA; 100-S1	<b>5,56E-02</b>	100-BA; 100-S3	<b>8,15E-02</b>
101-BA; 101-S1	<b>1,68E-03</b>	101-BA; 101-S3	<b>1,67E-02</b>
102-BA; 102-S1	<b>1,10E-02</b>	102-BA; 102-S	<b>2,01E-02</b>
103-BA; 103-S1	<b>0,1394</b>	103-BA; 103-S3	<b>0,4536</b>
104-BA; 104-S1	<b>2,68E-03</b>	104-BA; 104-S3	<b>2,11E-02</b>
105-BA; 105-S1	<b>1,41E-03</b>	105-BA; 105-S3	<b>3,23E-02</b>
106-BA; 106-S1	<b>3,34E-03</b>	106-BA; 106-S3	<b>2,24E-02</b>
107-BA; 107-S1	<b>1,11E-02</b>	107-BA; 107-S3	<b>3,37E-02</b>
108-BA; 108-S1	<b>2,48E-02</b>	108-BA; 108-S3	<b>6,34E-02</b>
109-BA; 109-S1	<b>7,55E-02</b>	109-BA; 109-S3	<b>0,1869</b>
110-BA; 110-S1	<b>1,59E-03</b>	110-BA; 110-S3	<b>9,23E-03</b>
111-BA; 111-S1	<b>1,90E-03</b>	111-BA; 111-S3	<b>1,43E-02</b>
112-BA; 112-S1	<b>3,27E-03</b>	112-BA; 112-S3	<b>1,26E-02</b>
113-BA; 113-S1	<b>3,10E-03</b>	113-BA; 113-S3	<b>3,80E-02</b>
114-BA; 114-S1	<b>5,14E-03</b>	114-BA; 114-S3	<b>1,07E-02</b>
115-BA; 115-S1	<b>6,84E-02</b>	115-BA; 115-S3	<b>4,61E-02</b>
116-BA; 116-S1	<b>0,113</b>	116-BA; 116-S3	<b>0,394</b>
117-BA; 117-S1	<b>2,33E-02</b>	117-BA; 117-S3	<b>6,08E-02</b>
118-BA; 118-S1	<b>0,2031</b>	118-BA; 118-S3	<b>0,6895</b>
119-BA; 119-S1	<b>0,3266</b>	119-BA; 119-S3	<b>0,5747</b>
120-BA; 120-S1	<b>4,42E-03</b>	120-BA; 120-S3	<b>4,08E-02</b>

#### 4.1.1.5. Beşinci çalışma tam niceliksel ölçüm

Amplifikasyon aşamasında örnek ve referans genlerin 465-510 nm floresan aralığında eşik değerine girdikleri döngüler saptanmıştır.



Şekil 4.5. Hedef ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüyü gösteren amplifikasyon eğimi (BA: Beta Aktin, S1: SOCS-1, S3: SOCS-3)

465-510 nm floresan aralığında örneklerin ve referans genin absolut (tam) niceliksel eşik değerleri (CP) ölçülmüştür.

Çizelge 4.9. Örnek ve referans genlerin beşinci çalışma sonucunda elde edilen tam niceliksel eşik değerleri (CP)

<b>Örnek</b>	<b>CP</b>	<b>Örnek</b>	<b>CP</b>	<b>Örnek</b>	<b>CP</b>
121 SOCS1	<b>34,84</b>	121 SOCS3	<b>32,13</b>	121 BA	<b>25,99</b>
122 SOCS1	<b>33,59</b>	122 SOCS3	<b>31,4</b>	122 BA	<b>27,3</b>
123 SOCS1	<b>35,81</b>	123 SOCS3	<b>31,74</b>	123 BA	<b>28,26</b>
124 SOCS1	<b>34,31</b>	124 SOCS3	<b>33,09</b>	124 BA	<b>29,39</b>
125 SOCS1	<b>36,81</b>	125 SOCS3	<b>34,99</b>	125 BA	<b>29,27</b>
126 SOCS1	<b>34,97</b>	126 SOCS3	<b>34,16</b>	126 BA	<b>28,55</b>
127 SOCS1	<b>34,58</b>	127 SOCS3	<b>35,63</b>	127 BA	<b>31,22</b>
128 SOCS1	<b>34,55</b>	128 SOCS3	<b>0</b>	128 BA	<b>26,83</b>
129 SOCS1	<b>33,4</b>	129 SOCS3	<b>35,99</b>	129 BA	<b>28,67</b>
130 SOCS1	<b>35,3</b>	130 SOCS3	<b>33,3</b>	130 BA	<b>30,99</b>
131 SOCS1	<b>33,79</b>	131 SOCS3	<b>36,4</b>	131 BA	<b>34,03</b>
132 SOCS1	<b>34,89</b>	132 SOCS3	<b>36,58</b>	132 BA	<b>28,3</b>
133 SOCS1	<b>31,84</b>	133 SOCS3	<b>30,13</b>	133 BA	<b>30,1</b>
134 SOCS1	<b>33,86</b>	134 SOCS3	<b>31,49</b>	134 BA	<b>25,74</b>
135 SOCS1	<b>27,75</b>	135 SOCS3	<b>26,82</b>	135 BA	<b>24,71</b>
136 SOCS1	<b>34,04</b>	136 SOCS3	<b>31,97</b>	136 BA	<b>26,66</b>
137 SOCS1	<b>33,37</b>	137 SOCS3	<b>36,16</b>	137 BA	<b>29,1</b>
138 SOCS1	<b>33,67</b>	138 SOCS3	<b>35,97</b>	138 BA	<b>28,75</b>
139 SOCS1	<b>33,3</b>	139 SOCS3	<b>34,2</b>	139 BA	<b>27,21</b>

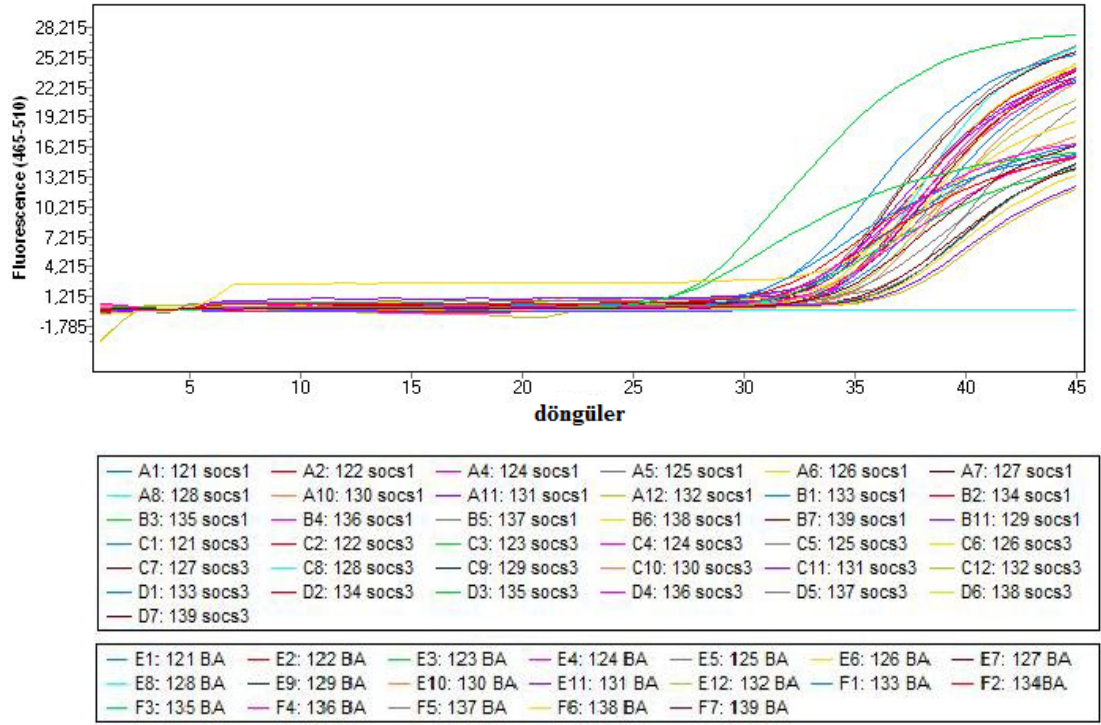
Pfaffl metoduna göre, hedef genlerin relative (göreceli) niceliksel ölçümü hesaplanmıştır.

Çizelge 4.10. Hedef genlerin beşinci çalışma sonucunda elde edilen göreceli ölçüm değerleri

<b>Örnek</b>	<b>Ratios</b>	<b>Örnek</b>	<b>Ratios</b>
	<b>Tgt/Ref</b>		<b>Tgt/Ref</b>
121-BA; 121-S1	<b>2,17E-03</b>	121-BA; 121-S3	<b>1,42E-02</b>
122-BA; 122-S1	<b>1,28E-02</b>	122-BA; 122-S3	<b>5,83E-02</b>
123-BA; 123-S1	<b>5,33E-03</b>	123-BA; 123-S3	<b>8,99E-02</b>
124-BA; 124-S1	<b>3,31E-02</b>	124-BA; 124-S3	<b>7,69E-02</b>
125-BA; 125-S1	<b>5,36E-03</b>	125-BA; 125-S3	<b>1,90E-02</b>
126-BA; 126-S1	<b>1,17E-02</b>	126-BA; 126-S3	<b>2,05E-02</b>
127-BA; 127-S1	<b>9,75E-02</b>	127-BA; 127-S3	<b>4,70E-02</b>
128-BA; 128-S1	<b>4,73E-03</b>	128-BA; 128-S3	<b>0</b>
129-BA; 129-S1	<b>3,78E-02</b>	129-BA; 129-S3	<b>6,24E-03</b>
130-BA; 130-S1	<b>5,05E-02</b>	130-BA; 130-S3	<b>0,2024</b>
131-BA; 131-S1	<b>1,182</b>	131-BA; 131-S3	<b>0,1937</b>
132-BA; 132-S1	<b>1,04E-02</b>	132-BA; 132-S3	<b>3,23E-03</b>
133-BA; 133-S1	<b>0,2989</b>	133-BA; 133-S3	<b>0,9842</b>
134-BA; 134-S1	<b>3,60E-03</b>	134-BA; 134-S3	<b>1,86E-02</b>
135-BA; 135-S1	<b>0,1214</b>	135-BA; 135-S3	<b>0,2321</b>
136-BA; 136-S1	<b>6,00E-03</b>	136-BA; 136-S3	<b>2,52E-02</b>
137-BA; 137-S1	<b>5,19E-02</b>	137-BA; 137-S3	<b>7,50E-03</b>
138-BA; 138-S1	<b>3,31E-02</b>	138-BA; 138-S3	<b>6,70E-03</b>
139-BA; 139-S1	<b>1,46E-02</b>	139-BA; 139-S3	<b>7,86E-03</b>

#### 4.1.1.6. Altıncı çalışma tam niceliksel ölçüm

Amplifikasyon aşamasında örnek ve referans genlerin 465-510 nm floresan aralığında eşik değerine girdikleri döngüler saptanmıştır.



Şekil 4.6. Hedef ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüyü gösteren amplifikasyon eğimi (BA: Beta Aktin, S1: SOCS-1, S3: SOCS-3)

465–510 nm floresan aralığında örneklerin ve referans genin absolut (tam) niceliksel eşik değerleri (CP) ölçülmüştür.



Çizelge 4.11. Örnek ve referans genlerin altıncı çalışma sonucunda elde edilen tam niceliksel eşik değerleri (CP)

<b>Örnek</b>	<b>CP</b>	<b>Örnek</b>	<b>CP</b>	<b>Örnek</b>	<b>CP</b>
140 SOCS1	<b>30,19</b>	140 SOCS3	<b>29,01</b>	140 BA	<b>27,69</b>
141 SOCS1	<b>35,59</b>	141 SOCS3	<b>34,18</b>	141 BA	<b>29,01</b>
142 SOCS1	<b>34,68</b>	142 SOCS3	<b>33,56</b>	142 BA	<b>29,23</b>
143 SOCS1	<b>36,07</b>	143 SOCS3	<b>33,74</b>	143 BA	<b>27,99</b>
144 SOCS1	<b>35,94</b>	144 SOCS3	<b>34,56</b>	144 BA	<b>28,7</b>
145 SOCS1	<b>33,97</b>	145 SOCS3	<b>32,71</b>	145 BA	<b>26,2</b>
146 SOCS1	<b>35,28</b>	146 SOCS3	<b>33,05</b>	146 BA	<b>27,43</b>
147 SOCS1	<b>29,84</b>	147 SOCS3	<b>26,17</b>	147 BA	<b>23,79</b>
148 SOCS1	<b>27,64</b>	148 SOCS3	<b>26,3</b>	148 BA	<b>25,16</b>
149 SOCS1	<b>30,61</b>	149 SOCS3	<b>27,63</b>	149 BA	<b>23,58</b>
150 SOCS1	<b>28,77</b>	150 SOCS3	<b>27,58</b>	150 BA	<b>25,27</b>
151 SOCS1	<b>31,36</b>	151 SOCS3	<b>28,84</b>	151 BA	<b>22,06</b>
152 SOCS1	<b>27,24</b>	152 SOCS3	<b>25,17</b>	152 BA	<b>19,95</b>
153 SOCS1	<b>29,63</b>	153 SOCS3	<b>26,96</b>	153 BA	<b>20,07</b>
154 SOCS1	<b>26,81</b>	154 SOCS3	<b>23,2</b>	154 BA	<b>19,01</b>
155 SOCS1	<b>27,49</b>	155 SOCS3	<b>25,68</b>	155 BA	<b>19,9</b>
156 SOCS1	<b>27,68</b>	156 SOCS3	<b>25,52</b>	156 BA	<b>19,38</b>
157 SOCS1	<b>27,45</b>	157 SOCS3	<b>25,33</b>	157 BA	<b>18,87</b>
158 SOCS1	<b>31,55</b>	158 SOCS3	<b>28,66</b>	158 BA	<b>22,52</b>
159 SOCS1	<b>29,58</b>	159 SOCS3	<b>25,4</b>	159 BA	<b>19,84</b>
160 SOCS1	<b>29</b>	160 SOCS3	<b>24,18</b>	160 BA	<b>20</b>
161 SOCS1	<b>27,84</b>	161 SOCS3	<b>21,16</b>	161 BA	<b>18,53</b>
162 SOCS1	<b>30,04</b>	162 SOCS3	<b>26,24</b>	162 BA	<b>20,86</b>
163 SOCS1	<b>28,79</b>	163 SOCS3	<b>24,1</b>	163 BA	<b>19,82</b>
164 SOCS1	<b>29,8</b>	164 SOCS3	<b>27,65</b>	164 BA	<b>20,64</b>
165 SOCS1	<b>30,77</b>	165 SOCS3	<b>28,02</b>	165 BA	<b>22,71</b>
166 SOCS1	<b>29,83</b>	166 SOCS3	<b>27,58</b>	166 BA	<b>21,31</b>
167 SOCS1	<b>30,79</b>	167 SOCS3	<b>28,51</b>	167 BA	<b>21,88</b>

Pfaffl metoduna göre, hedef genlerin relative (göreceli) niceliksel ölçümü hesaplanmıştır.

Çizelge 4.12. Hedef genlerin altıncı çalışma sonucunda elde edilen göreceli ölçüm değerleri

<b>Örnek</b>	<b>Ratios</b>	<b>Örnek</b>	<b>Ratios</b>
	<b>Tgt/Ref</b>		<b>Tgt/Ref</b>
140-BA; 140-S1	<b>0,1762</b>	140-BA; 140-S3	<b>0,3995</b>
141-BA; 141-S1	<b>1,04E-02</b>	141-BA; 141-S3	<b>2,76E-02</b>
142-BA; 142-S1	<b>2,29E-02</b>	142-BA; 142-S3	<b>4,97E-02</b>
143-BA; 143-S1	<b>3,70E-03</b>	143-BA; 143-S3	<b>1,86E-02</b>
144-BA; 144-S1	<b>6,58E-03</b>	144-BA; 144-S3	<b>1,72E-02</b>
145-BA; 145-S1	<b>4,58E-03</b>	145-BA; 145-S3	<b>1,10E-02</b>
146-BA; 146-S1	<b>4,35E-03</b>	146-BA; 146-S3	<b>2,04E-02</b>
147-BA; 147-S1	<b>1,51E-02</b>	147-BA; 147-S3	<b>0,1925</b>
148-BA; 148-S1	<b>0,1788</b>	148-BA; 148-S3	<b>0,4532</b>
149-BA; 149-S1	<b>7,62E-03</b>	149-BA; 149-S3	<b>6,03E-02</b>
150-BA; 150-S1	<b>8,86E-02</b>	150-BA; 150-S3	<b>0,2016</b>
151-BA; 151-S1	<b>1,59E-03</b>	151-BA; 151-S3	<b>9,12E-03</b>
152-BA; 152-S1	<b>6,40E-03</b>	152-BA; 152-S3	<b>2,69E-02</b>
153-BA; 153-S1	<b>1,33E-03</b>	153-BA; 153-S3	<b>8,48E-03</b>
154-BA; 154-S1	<b>4,50E-03</b>	154-BA; 154-S3	<b>5,48E-02</b>
155-BA; 155-S1	<b>5,21E-03</b>	155-BA; 155-S3	<b>1,83E-02</b>
156-BA; 156-S1	<b>3,16E-03</b>	156-BA; 156-S3	<b>1,41E-02</b>
157-BA; 157-S1	<b>2,61E-03</b>	157-BA; 157-S3	<b>1,14E-02</b>
158-BA; 158-S1	<b>1,92E-03</b>	158-BA; 158-S3	<b>1,42E-02</b>
159-BA; 159-S1	<b>1,17E-03</b>	159-BA; 159-S3	<b>2,12E-02</b>
160-BA; 160-S1	<b>1,95E-03</b>	160-BA; 160-S3	<b>5,52E-02</b>
161-BA; 161-S1	<b>1,58E-03</b>	161-BA; 161-S3	<b>0,1614</b>
162-BA; 162-S1	<b>1,72E-03</b>	162-BA; 162-S3	<b>2,39E-02</b>
163-BA; 163-S1	<b>2,00E-03</b>	163-BA; 163-S3	<b>5,15E-02</b>
164-BA; 164-S1	<b>1,75E-03</b>	164-BA; 164-S3	<b>7,74E-03</b>
165-BA; 165-S1	<b>3,74E-03</b>	165-BA; 165-S3	<b>2,51E-02</b>
166-BA; 166-S1	<b>2,72E-03</b>	166-BA; 166-S3	<b>1,30E-02</b>
167-BA; 167-S1	<b>2,08E-03</b>	167-BA; 167-S3	<b>1,01E-02</b>

#### 4.1.2. Hasta Gruplarının Değerlendirilmesi

Pfaffl modeline uygun olarak, gerçek zamanlı PZR'nda uygulamalar arasındaki göreceli ifade oranları karşılaştırılarak Delta-Delta CT metodu oluşturulmuştur [62, 92].

$$R = 2^{-(\Delta CP_{\text{örnek}} - \Delta CP_{\text{kontrol}})}$$

ve

$$R = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

Bu metoda göre, referans gene karşılık istenilen genin verimliliği belirlenmektedir.

Kendi çalışmamızda SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin orak hücre anemisi ve kriz hastalarının üzerindeki etkinliğini ölçmek üzere, delta-delta CT metodu uygulanmıştır.

Çizelge 4.13. OHA hastalarının SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin  $\Delta\Delta CT$  ve  $2^{-\Delta\Delta CT}$  sonuçları

OHA HASTASI	SOCS1			SOCS3			
	$\Delta CT$	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	$\Delta CT$	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	
kontrol	6,48	0	1	kontrol	4,91	0	1
2 SOCS1	9,98	3,5	0,09	2 SOCS3	4,77	-0,14	1,10
6 SOCS1	8,89	2,41	0,19	3 SOCS3	6,2	1,29	0,41
13 SOCS1	7,39	0,91	0,53	13 SOCS3	5,41	0,5	0,71
14 SOCS1	8,96	2,48	0,18	14 SOCS3	4,81	-0,1	1,07
23 SOCS1	0,17	-6,31	79,34	23 SOCS3	8,83	3,92	0,07
26 SOCS1	7,95	1,47	0,36	26 SOCS3	6,45	1,54	0,34
35 SOCS1	8,96	2,48	0,18	35 SOCS3	5,17	0,26	0,84
38 SOCS1	8,48	2	0,25	38 SOCS3	5,77	0,86	0,55
39 SOCS1	8,21	1,73	0,30	39 SOCS3	6,39	1,48	0,36
43 SOCS1	8,38	1,9	0,27	43 SOCS3	6,07	1,16	0,45
50 SOCS1	9,5	3,02	0,12	50 SOCS3	5,87	0,96	0,51
52 SOCS1	9,03	2,55	0,17	52 SOCS3	6,1	1,19	0,44
54 SOCS1	8,59	2,11	0,23	54 SOCS3	6,27	1,36	0,39
55 SOCS1	7,71	1,23	0,43	55 SOCS3	6,17	1,26	0,42
58 SOCS1	6,73	0,25	0,84	58 SOCS3	5,4	0,49	0,71
59 SOCS1	6,78	0,3	0,81	59 SOCS3	4,66	-0,25	1,19
61 SOCS1	8,75	2,27	0,21	61 SOCS3	6,51	1,6	0,33
62 SOCS1	6,62	0,14	0,91	62 SOCS3	5,3	0,39	0,76
63 SOCS1	7,9	1,42	0,37	63 SOCS3	5,82	0,91	0,53
64 SOCS1	6,33	-0,15	1,11	64 SOCS3	4,83	-0,08	1,06
65 SOCS1	8,62	2,14	0,23	65 SOCS3	6,04	1,13	0,46
66 SOCS1	7,76	1,28	0,41	66 SOCS3	7,07	2,16	0,22
67 SOCS1	7	0,52	0,70	67 SOCS3	6,53	1,62	0,33
68 SOCS1	8,6	2,12	0,23	68 SOCS3	6,43	1,52	0,35
69 SOCS1	4,87	-1,61	3,05	69 SOCS3	2,87	-2,04	4,11
70 SOCS1	8,74	2,26	0,21	70 SOCS3	6,51	1,6	0,33
78 SOCS1	1,34	-5,14	35,26	78 SOCS3	2,42	-2,49	5,62
79 SOCS1	7,25	0,77	0,59	79 SOCS3	0,32	-4,59	24,08
80 SOCS1	9,39	2,91	0,13	80 SOCS3	5,41	0,5	0,71
81 SOCS1	8,41	1,93	0,26	81 SOCS3	4,94	0,03	0,98
83 SOCS1	8,35	1,87	0,27	83 SOCS3	3,7	-1,21	2,31

Çizelge 4.13. (devam)

OHA HASTASI	SOCS1				SOCS3		
	$\Delta CT$	$\Delta\Delta CT$	$2 - \Delta\Delta CT$		$\Delta CT$	$\Delta\Delta CT$	$2 - \Delta\Delta CT$
kontrol	6,48	0	1	kontrol	4,91	0	1
84 SOCS1	11,15	4,67	0,04	84 SOCS3	5,15	0,24	0,85
86 SOCS1	11,46	4,98	0,03	86 SOCS3	6,93	2,02	0,25
87 SOCS1	10,23	3,75	0,07	87 SOCS3	6,61	1,7	0,31
88 SOCS1	8,81	2,33	0,20	88 SOCS3	7,12	2,21	0,22
92 SOCS1	1,95	-4,53	23,10	92 SOCS3	4,99	0,08	0,95
106 SOCS1	8,23	1,75	0,30	106 SOCS3	0,68	-4,23	18,77
107 SOCS1	6,5	0,02	0,99	107 SOCS3	5,48	0,57	0,67
108 SOCS1	5,34	-1,14	2,20	108 SOCS3	4,89	-0,02	1,01
109 SOCS1	3,73	-2,75	6,73	109 SOCS3	3,98	-0,93	1,91
110 SOCS1	9,3	2,82	0,14	110 SOCS3	2,42	-2,49	5,62
111 SOCS1	9,04	2,56	0,17	111 SOCS3	6,76	1,85	0,28
115 SOCS1	3,87	-2,61	6,11	115 SOCS3	6,13	1,22	0,43
118 SOCS1	2,3	-4,18	18,13	118 SOCS3	4,44	-0,47	1,39
126SOCS1	6,42	-0,06	1,04	126 SOCS3	0,54	-4,37	20,68
127 SOCS1	3,36	-3,12	8,69	127 SOCS3	5,61	0,7	0,62
128 SOCS1	7,72	1,24	0,42	128 SOCS3	4,41	-0,5	1,41
129 SOCS1	4,73	-1,75	3,36	129 SOCS3	7,32	2,41	0,19
130 SOCS1	4,31	-2,17	4,50	130 SOCS3	2,31	-2,6	6,06
131 SOCS1	-0,24	-6,72	105,42	131 SOCS3	2,37	-2,54	5,82
132 SOCS1	6,59	0,11	0,93	132 SOCS3	8,28	3,37	0,10
133 SOCS1	1,74	-4,74	26,72	133 SOCS3	0,03	-4,88	29,45
136 SOCS1	7,38	0,9	0,54	136 SOCS3	5,31	0,4	0,76
138 SOCS1	4,92	-1,56	2,95	138 SOCS3	7,22	2,31	0,20
139 SOCS1	6,09	-0,39	1,31	139 SOCS3	6,99	2,08	0,24
141 SOCS1	6,58	0,1	0,93	141 SOCS3	5,17	0,26	0,84
142 SOCS1	5,45	-1,03	2,04	142 SOCS3	4,33	-0,58	1,49
143 SOCS1	8,08	1,6	0,33	143 SOCS3	5,75	0,84	0,56
144 SOCS1	7,24	0,76	0,59	144 SOCS3	5,86	0,95	0,52
145 SOCS1	7,77	1,29	0,41	145 SOCS3	6,51	1,6	0,33
146 SOCS1	7,85	1,37	0,39	146 SOCS3	5,62	0,71	0,61
147 SOCS1	6,05	-0,43	1,35	147 SOCS3	2,38	-2,53	5,78
148 SOCS1	2,48	-4	16,00	148 SOCS3	1,14	-3,77	13,64
149 SOCS1	7,03	0,55	0,68	149 SOCS3	4,05	-0,86	1,82
150 SOCS1	3,5	-2,98	7,89	150 SOCS3	2,31	-2,6	6,06
151 SOCS1	9,3	2,82	0,14	151 SOCS3	6,78	1,87	0,27
152 SOCS1	7,29	0,81	0,57	152 SOCS3	5,22	0,31	0,81
153 SOCS1	9,56	3,08	0,12	153 SOCS3	6,89	1,98	0,25
154 SOCS1	7,8	1,32	0,40	154 SOCS3	4,19	-0,72	1,65
155 SOCS1	7,59	1,11	0,46	155 SOCS3	5,78	0,87	0,55
156 SOCS1	8,3	1,82	0,28	156 SOCS3	6,14	1,23	0,43
157 SOCS1	8,58	2,1	0,23	157 SOCS3	6,46	1,55	0,34

Çizelge 4.14. Kriz hastalarının SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin  $\Delta\Delta CT$  ve  $2^{-\Delta\Delta CT}$  sonuçları

KRİZ	SOCS1				SOCS3		
	$\Delta CT$	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$		$\Delta CT$	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
kontrol	6,48	0	1	kontrol	4,91	0	1
1 SOCS1	9,35	2,87	0,14	1 SOCS3	4,81	-0,1	1,07
4 SOCS1	10,05	3,57	0,08	4 SOCS3	3,78	-1,13	2,19
5 SOCS1	7,55	1,07	0,48	5 SOCS3	3,5	-1,41	2,66
9 SOCS1	8,33	1,85	0,28	9 SOCS3	4,52	-0,39	1,31
18 SOCS1	13,03	6,55	0,01	18 SOCS3	11,92	7,01	0,01
22 SOCS1	9,26	2,78	0,15	22 SOCS3	8,18	3,27	0,10
51 SOCS1	9,08	2,6	0,16	51 SOCS3	5,11	0,2	0,87
53 SOCS1	7,89	1,41	0,38	53 SOCS3	6,22	1,31	0,40
90 SOCS1	3,56	-2,92	7,57	90 SOCS3	1,89	-3,02	8,11
98 SOCS1	1	-5,48	44,63	98 SOCS3	-0,33	-5,24	37,79
99 SOCS1	1,37	-5,11	34,54	99 SOCS3	-0,14	-5,05	33,13
100 SOCS1	4,17	-2,31	4,96	100 SOCS3	3,62	-1,29	2,45
101 SOCS1	9,21	2,73	0,15	101 SOCS3	5,9	0,99	0,50
114 SOCS1	7,61	1,13	0,46	114 SOCS3	6,55	1,64	0,32
121 SOCS1	8,85	2,37	0,19	121 SOCS3	6,14	1,23	0,43
134 SOCS1	8,12	1,64	0,32	134 SOCS3	5,75	0,84	0,56
158 SOCS1	9,03	2,55	0,17	158 SOCS3	6,14	1,23	0,43
159 SOCS1	9,74	3,26	0,10	159 SOCS3	5,56	0,65	0,64
160 SOCS1	9	2,52	0,17	160 SOCS3	4,18	-0,73	1,66
161 SOCS1	9,31	2,83	0,14	161 SOCS3	2,63	-2,28	4,86
162 SOCS1	9,18	2,7	0,15	162 SOCS3	5,38	0,47	0,72
163 SOCS1	8,97	2,49	0,18	163 SOCS3	4,28	-0,63	1,55
164 SOCS1	9,16	2,68	0,16	164 SOCS3	7,01	2,1	0,23
165 SOCS1	8,06	1,58	0,33	165 SOCS3	5,31	0,4	0,76
166 SOCS1	8,52	2,04	0,24	166 SOCS3	6,27	1,36	0,39
167 SOCS1	8,91	2,43	0,19	167 SOCS3	6,63	1,72	0,30

Çizelge 4.15. Kontrol grubunun SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin  $\Delta\Delta CT$  ve  $2^{-\Delta\Delta CT}$  sonuçları

KONTROL GRUBU	SOCS1			KONTROL GRUBU	SOCS3		
	$\Delta CT$	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$		$\Delta CT$	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
kontrol ortalama	6,48	0	1	kontrol ortalama	4,91	0	1
3 SOCS1	8,19	1,71	0,31	3 SOCS3	5,42	0,51	0,7
7 SOCS1	7,67	1,19	0,44	7 SOCS3	3,74	-1,17	2,25
8 SOCS1	7,24	0,76	0,59	8 SOCS3	4,42	-0,49	1,4
10 SOCS1	9,35	2,87	0,14	10 SOCS3	6,52	1,61	0,33
11 SOCS1	6,57	0,09	0,94	11 SOCS3	5,4	0,49	0,71
12 SOCS1	8,09	1,61	0,33	12 SOCS3	5,57	0,66	0,63
31 SOCS1	3,27	-3,21	9,25	31 SOCS3	3,36	-1,55	2,93
32 SOCS1	8,71	2,23	0,21	32 SOCS3	5,38	0,47	0,72
33 SOCS1	7	0,52	0,7	33 SOCS3	4,39	-0,52	1,43
34 SOCS1	7,98	1,5	0,35	34 SOCS3	6,12	1,21	0,43
36 SOCS1	8,97	2,49	0,18	36 SOCS3	8,97	4,06	0,06
37 SOCS1	8,38	1,9	0,27	37 SOCS3	8,38	3,47	0,09
40 SOCS1	8,68	2,2	0,22	40 SOCS3	8,68	3,77	0,07
41 SOCS1	9,35	2,87	0,14	41 SOCS3	9,35	4,44	0,05
42 SOCS1	9,78	3,3	0,1	42 SOCS3	9,78	4,87	0,03
44 SOCS1	8,35	1,87	0,27	44 SOCS3	8,35	3,44	0,09
45 SOCS1	7,56	1,08	0,47	45 SOCS3	7,56	2,65	0,16
46 SOCS1	10,3	3,82	0,07	46 SOCS3	10,3	5,39	0,02
47 SOCS1	9,35	2,87	0,14	47 SOCS3	9,35	4,44	0,05
48 SOCS1	6,37	-0,11	1,08	48 SOCS3	6,37	1,46	0,36
49 SOCS1	6,41	-0,07	1,05	49 SOCS3	6,41	1,5	0,35
56 SOCS1	5,32	-1,16	2,23	56 SOCS3	5,32	0,41	0,75
57 SOCS1	7,22	0,74	0,6	57 SOCS3	7,22	2,31	0,2
60 SOCS1	6,54	0,06	0,96	60 SOCS3	6,54	1,63	0,32
72 SOCS1	2,14	-4,34	20,25	72 SOCS3	1,04	-3,87	14,62
73 SOCS1	3,4	-3,08	8,46	73 SOCS3	1,87	-3,04	8,22
74 SOCS1	6,72	0,24	0,85	74 SOCS3	3,85	-1,06	2,08
75 SOCS1	9,6	3,12	0,12	75 SOCS3	7,07	2,16	0,22
76 SOCS1	2,31	-4,17	18	76 SOCS3	1,19	-3,72	13,18
77 SOCS1	1,08	-5,4	42,22	77 SOCS3	0,32	-4,59	24,08
82 SOCS1	9,46	2,98	0,13	82 SOCS3	5,83	0,92	0,53
85 SOCS1	10,18	3,7	0,08	85 SOCS3	5,98	1,07	0,48
89 SOCS1	8	1,52	0,35	89 SOCS3	3,84	-1,07	2,1
91 SOCS1	1,33	-5,15	35,51	91 SOCS3	-0,17	-5,08	33,82
93 SOCS1	7,12	0,64	0,64	93 SOCS3	2,84	-2,07	4,2
94 SOCS1	7,82	1,34	0,4	94 SOCS3	5,61	0,7	0,62
95 SOCS1	4,14	-2,34	5,06	95 SOCS3	3,98	-0,93	1,91
96 SOCS1	1,66	-4,82	28,25	96 SOCS3	0,17	-4,74	26,72
97 SOCS1	2,75	-3,73	13,27	97 SOCS3	1,83	-3,08	8,46

Çizelge 4.15. (devam)

	SOCS1				SOCS3		
KONTROL GRUBU	$\Delta CT$	$\Delta\Delta CT$	$2 - \Delta\Delta CT$	KONTROL GRUBU	$\Delta CT$	$\Delta\Delta CT$	$2 - \Delta\Delta CT$
kontrol ortalama	6,48	0	1	kontrol ortalama	4,91	0	1
102 SOCS1	6,51	0,03	0,98	102 SOCS3	5,64	0,73	0,6
103 SOCS1	2,84	-3,64	12,47	103 SOCS3	1,14	-3,77	13,64
104 SOCS1	8,55	2,07	0,24	104 SOCS3	5,57	0,66	0,63
105 SOCS1	9,47	2,99	0,13	105 SOCS3	4,95	0,04	0,97
112 SOCS1	8,26	1,78	0,29	112 SOCS3	6,31	1,4	0,38
113 SOCS1	8,33	1,85	0,28	113 SOCS3	4,71	-0,2	1,15
116 SOCS1	3,14	-3,34	10,13	116 SOCS3	1,34	-3,57	11,88
117 SOCS1	5,42	-1,06	2,08	117 SOCS3	4,04	-0,87	1,83
119 SOCS1	1,61	-4,87	29,24	119 SOCS3	0,8	-4,11	17,27
120 SOCS1	7,82	1,34	0,4	120 SOCS3	4,61	-0,3	1,23
122 SOCS1	6,29	-0,19	1,14	122 SOCS3	4,1	-0,81	1,75
123 SOCS1	7,55	1,07	0,48	123 SOCS3	3,48	-1,43	2,69
124 SOCS1	4,92	-1,56	2,95	124 SOCS3	3,7	-1,21	2,31
125 SOCS1	7,54	1,06	0,48	125 SOCS3	5,72	0,81	0,57
135 SOCS1	3,04	-3,44	10,85	135 SOCS3	2,11	-2,8	6,96
137 SOCS1	4,27	-2,21	4,63	137 SOCS3	7,06	2,15	0,23
140 SOCS1	2,5	-3,98	15,78	140 SOCS3	1,32	-3,59	12,04

Çizelge 4.16. Hasta ve kontrol gruplarının  $\Delta\Delta Ct$  değerleri bakımından SOCS-1 ile SOCS-3 gen ifadelerinin karşılaştırılması

	Socs1 (n=153)		Socs3 (n=153)		p**
	Min-Max	Medyan [%25-75 percentil]	Min-Max	Medyan [%25-75 percentil]	
Kriz (n=26)	-5.48 - 6.55	2.46 [1.34-2.74]	-5.24 - 7.01	0.43 [-1.17 - 1.32]	<0.001
Orak Hücre (n=71)	-6.72 - 4.98	1.23 [-0.43 - 2.14]	-4.88 - 3.92	0.70 [-0.47 - 1.54]	0.009
Kontrol (n=56)	-5.40 - 3.82	0.58 [-2.67 - 1.89]	-5.08 - 5.39	0.44 [-1.52 - 1.58]	0.516
p*	0.005		0.600		

\*Kruskal Wallis

\*\*Wilcoxon t test



Çizelge 4.17. Hasta ve kontrol gruplarının  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ölçümleri bakımından SOCS-1 ile SOCS-3 gen ifadelerinin karşılaştırılması

	Socs1 (n=153)		Socs3 (n=153)		p**
	Min-Max	Medyan [%25–75 percentil]	Min-Max	Medyan [%25–75 percentil]	
Kriz (n=26)	0.01–44.63	0.18 [0.15–0.40]	0.01–37.79	0.74 [0.40–2.25]	0.017
Orak Hücre (n=71)	0.03–105.42	0.43 [0.23–1.35]	0.07–29.45	0.62 [0.34–1.39]	0.221
Kontrol (n=56)	0.07–42.22	0.67 [0.27–6.42]	0.02–33.82	0.73 [0.33–2.87]	0.182
p*	0.005		0.604		

\*Kruskal Wallis

\*\*Wilcoxon t test

#### 4.1.3.Hematolojik bulgular

Hasta ve kontrol grubunun hematolojik bulgularının ortalama değerleri Tablo 4.18’de gösterilmiştir. Bu çalışmadaki hasta ve kontrol grubunun hematolojik tetkik sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda Hb, Hct, WBC, PLT ve CRP değerleri normal sınırlarda olup gruplar arasında herhangi bir fark tespit edilmezken, OHA ve kriz hastalarında, hemoglobin ve hematokrit miktarı daha düşük seyrederken WBC, PLT ve CRP değerleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.18. Hasta ve kontrol grubunun WBC (White Blood Cell), HBG (Hemoglobin), HCT (Hematokrit), PLT (Platelet) ve CRP (C-Reactive Protein) sonuçları

	Kontrol Grubu (n=56)	Orak Hücre Anemisi (n=73)	Kriz Hastası (n=26)
WBC ( $\times 10^9/L$ )	8,70	12,54	12,36
HBG (g/dl)	12,7	8,54	8,21
HCT (%)	34,6	24,59	23,95
PLT( $\times 10^9/L$ )	366	478	480
CRP (mg/L)	2,6	7,18	28,63

#### 4.1.4. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada hasta ve kontrol gruplarından elde edilen RNA örneklerinin cDNA sentezi ve niceliksel eş zamanlı RT-PZR ölçümü çalışılmıştır. İstatistiksel analizler için SPSS v. 11.5.1 ve MedCalc v. 12.1.4 paket programları kullanılmıştır. Bu analizde hasta grupları ve kontrol grubunun karşılaştırılmasında *Kruskal Wallis testi*, aynı bireylere ait SOCS-1 ve SOCS-3 gen ifadelerinin karşılaştırılmasında ise *Wilcoxon t testi* kullanılmıştır.  $\alpha$  anlamlılık düzeyi 0.05 olarak alınmıştır.

SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadelerinin ortalama  $\Delta\Delta CT$  ve  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleri hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırılmıştır. SOCS-1 gen ifadesinin  $\Delta\Delta Ct$  değerleri bakımından, kriz grubunun orak hücre anemisi ve kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu sonucu elde edilmiştir ( $p=0.005$ ). SOCS-3 gen ifadesi bakımından, kriz hastası, orak hücre anemisi ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

## 4.2. TARTIŞMA

Bu çalışmada, OHA'nin, SOCS-1 ve SOCS-3 gen ifadeleri ile ilişkisi olup olmadığının ortaya konulması hedeflendi. Bu çalışmaya 73 OHA hasta grubu, 26 krize girmiş hasta grubu ve 56 kontrol grubu olmak üzere toplam 155 birey dahil edildi. SOCS-1 ve SOCS-3 gen ifadesi bakımından yapılan tüm istatistiksel analizler 155 birey üzerinden yapıldı.

OHA ilk defa 1910 yılında Herrick tarafından tanımlanmış dünyada en sık görülen hemoglobinopatilerden biridir. Nokta mutasyonları sonucu hemoglobin Beta zincirinin NH<sub>2</sub> ucunda 6. aminoasidi olan Glutamin yerine Valin geçmesi ile yani baz düzeyinde GAG yerine GTG gelmesi ile oluşan hematolojik bir hastalıktır [1].

İnflamasyon, organizmanın zararlı ve yabancı yıkıcı etkilere karşı verdiği, birçok hücre ve araçların karıştığı doğal bir savunma mekanizmasıdır. Ateroskleroz, miyokard infarktüsü, romatoid artrit, yenidoğan akciğer hastalığı, sepsis, menenjit gibi ciddi hastalıkların patogenezinde önemli yere sahiptir [93]. İnflamatuvar reaksiyonlarda, o bölgede salınan araçların etkisiyle kızarıklık, şişlik, ısı artışı, ağrı ve fonksiyonlarda azalma semptomları ortaya çıkmaktadır. İnflamasyon reaksiyonlarında nötrofiller, makrofajlar, sitokinler, (IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- $\alpha$  gibi) akut faz reaktanları (CRP, SAA, fibrinojen), trombositler ve endotel hücreleri gibi pek çok aracı rol almaktadır [93].

JAK'lar hücre içinde çözünük halde veya hücre zarının iç yüzeyine zayıf bağlanan protein kinazlardır. JAK'lar sitokinin alıcı proteinine bağlanmasından sonra işlevsel hale gelir ve alıcı proteinin hücre içi bölgelerine yapışarak alıcı proteinin diğer alt birimlerinin tirozin amino asid kalıntılarını fosforile eder. Bu fosforillenmiş tirozin kalıntıları SH<sub>2</sub> bölgesini ihtiva eden diğer uyarıcı moleküllerin bağlanmasını sağlar. Böylece muhtelif interlökin tip sitokinler alıcı proteinlerine bağlanarak

JAK'ları çeker, JAK'lar alıcı protein alt birimlerinin tirozin kalıntılarını fosforile ederek STAT gibi gen ifadesi düzenleyici moleküllerin alıcı protein hücre içi alt birimlerine bağlanmasını sağlar [94].

SOCS ailesinin tümü SH2 domeni ve C ucuna yakın yerleşik SOCS kutusu (SOCS-box) adlı segmente sahip, sekiz farklı molekülden ibarettir [95-96]. SOCS-1 geninin sadece SOCS kutusunun uzaklaştırıldığı fare deneylerinde, denek farenin SOCS-1'i tümüyle uzaklaştırılmış fare ile benzer fenotipi göstermesi sebebiyle SOCS-1 kutusunun sitokin sinyal iletiminin düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğu anlaşılmıştır [97].

SOCS-3, SOCS ailesinin en iyi tanımlanmış üçüncü molekülüdür. SOCS-3 sahip olduğu SH2 domeni ile Janus kinazların etkinlik bölgesine bağlanarak kinaz etkinliğini engelleyen, dolayısıyla sitokin sinyal iletimini baskılayan bir proteindir. SOCS-3, SOCS-1'e KIR (Kinase Inhibitory Region) bölgesi içermesi ve immün sistemin organlarında ifade edilmesi gibi yapısal benzerlikler göstermektedir. Ancak bu iki molekül işlev mekanizmaları yönünden büyük farklılıklar göstermektedir: SOCS-1 JAK inhibisyonunu JAK'a bağlanarak gösterirken, SOCS-3 JAK'ın etkinliğini ancak gerektiği kadar gp130 gibi alıcıların varlığında inhibe etmektedir [95].

Ernst ve arkadaşları [98] STAT bağlama bölgeleri çıkarılarak mutasyona uğratılmış ve gp130 STAT bölgesi olmayan karboksil ucuna sahip fareler üretmişlerdir. gp130 STAT farelerinde gastrointestinal ülser ve kronik sinovit karakterli ciddi bir eklem hastalığı, kıkırdak metaplazi ve eklem kıkırdağının bozulduğu görülmüştür. Sinoviyal hücrelerin LIF/IL-6 sitokin familyasına aşırı mitojenik duyarlılığı, gp 130 sinyallerini sınırlayan STAT aracılı SOCS-1 indüksiyonunun bozulmasından dolayı gp130-aracılı SHP-2/Ras/Erk aktivasyonuna neden olmuştur. Bu veri dokulardaki SOCS-1 indüksiyonunun inflamasyon için duyarlı olduğunu göstermektedir [70, 98].

Bu çalışmada OHA ve kriz hastaları ayrı ayrı olmak üzere kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Buna bağlı olarak hasta krize girdiğinde hangi bulgularının değiştiği gözlemlendi. M.S. Gonçalves ve arkadaşları [99] tarafından yapılan çalışmaya benzer olarak bu tez çalışmasındaki hasta ve kontrol grubunun hematolojik tetkik sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. OHA hastaları ve kontrol grupları karşılaştırıldığında Hb, Hct değerlerinin hasta grubunda daha düşük olduğu fakat WBC, PLT ve CRP değerlerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulundu. Benzer şekilde kriz hastaları ve kontrol grupları karşılaştırıldığında Hb, Hct değerlerinin kriz grubunda daha düşük olduğu fakat WBC, PLT ve CRP değerlerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü. Kriz grubu ve OHA hastaları karşılaştırıldığında ise kriz grubunda Hb, Hct değerlerinin OHA hastalarına göre daha düşük olduğu WBC, PLT ve CRP değerlerinin daha yüksek olduğu görüldü. Hastalar krize girdiğinde inflamasyon bulguları artmıştır ve buna bağlı olarak da WBC, PLT ve CRP değerlerinde kontrol ve hasta grubuna oranla artış gözlenmiştir.

Çalışmada, genlerin ifadesinin ölçümü niceliksel eş zamanlı RT-PZR yöntemi kullanılarak Light Cycler 480 II cihazı ile yapıldı. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifade düzeylerini belirlemek için  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülü kullanıldı. Hasta ve kontrol gruplarının  $\Delta\Delta Ct$  ve  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri hesaplandı.

SOCS-1 ölçümlerinin  $\Delta\Delta Ct$  değerleri bakımından hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında kriz grubunun; OHA ve kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu sonucu elde edildi. SOCS-3 ölçümleri bakımından herhangi bir fark bulunmadı. Orak hücre anemisinin gidişatı esnasında kriz dönemine giren hastalarda SOCS-1 gen ifadesi artmıştır. Bu sonuçlara dayanarak, SOCS-1 geninin inflamasyona bağlı olarak artabileceği söylenebilir.

SOCS-1 ölçümlerinin  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri bakımından hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında kriz grubunun; OHA ve kontrol grubundan anlamlı derecede düşük olduğu sonucu elde edildi. SOCS-3 ölçümleri bakımından herhangi bir fark bulunmadı. Bu verilerin ışığında SOCS-1'in, SOCS-3'e göre orak hücre ağırlı krizde ağrı kontrolünde daha etkin olabileceği söylenebilir.

Bu çalışmada niceliksel eş zamanlı RT-PCR yöntemi sonucunda SOCS-3 geninin amplifikasyon döngüsüne SOCS-1 geninden daha önce girdiği görülmüştür. Yani SOCS-3 geninin, SOCS-1 genine göre daha önce ifade edildiği tespit edilmiştir. OHA hastaları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında SOCS-1 ifadesinin kontrol grubuna göre azaldığı fakat SOCS-3 ifadesinde herhangi bir değişiklik olmadığı sonucu elde edilmiştir. Kriz hastalarının SOCS-1 ifadesinin kontrol grubu ve OHA hastalarına göre çok düşük olduğu fakat SOCS-3 ifadesinde herhangi bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Hasta krize girdiğinde inflamasyon bulgularının artması sonucu SOCS-1 ifadesi azalmıştır.

Yapılan çalışmalarda ağırlı krizler sırasında C-reaktif protein (CRP),  $\alpha$ 1-glikoprotein ve transferin seviyesinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca yapılan değişik çalışmalarda inflamatuvar sitokinlerden tümör nekrotizan faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1alfa (IL-1 $\alpha$ ), interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8), histamin ve lökotrien-B4'ün serum düzeylerinin artışı gösterdiği saptanmıştır [20]. Pathare ve arkadaşları [4] yaptığı çalışmada, orak hücre hastalığı olup ağırlı kriz ile başvuran hastalarda TNF- $\alpha$  ve IL-6'nın normal kişilere göre belirgin olarak arttığını ve inflamatuvar araçların orak şekli almış eritrositlerin damar endoteline yapışmasını artırarak kan akımını bozduğu ve iskemik ataklara neden olduğunu bildirmişlerdir [4].

Ağırlı krizdeki hastalarda inflamatuvar ve proinflamatuvar sitokin düzeylerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Michaels ve arkadaşları [100] yaptığı çalışmada, ağırlı krizde substans P ve IL-8 düzeylerinin belirgin olarak arttığını ancak TNF- $\alpha$  düzeyinde değişiklik olmadığını bulmuşlardır [100]. Benzer olarak yapılan bir çalışmada, ağırlı krizde endotelin-1 ve prostaglandin E2 (PGE2) düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı; TNF- $\alpha$ , IL-1, -6, -8, -10 düzeylerinde artış olmadığı tespit edilmiştir [101]. Ağırlı kriz hastalarında özellikle IL-8'in serum seviyesinin anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Yapılan iki çalışmada IL-8'in normal hasta gruplarına göre anlamlı olarak arttığı ve oraklaşan eritrositlerin damar endoteline yapışmasına neden olarak ağırlı krizi başlatıcı faktör olduğu tespit edilmiştir [99-100-101-102].

CRP inflamasyonun genel bir göstergesi olarak tanımlanır. CRP düzeyindeki artış daha önce OHA hastalarında bildirilmiştir [103-104]. Bu çalışmada benzer şekilde OHA hastalarının CRP düzeylerinin kontrol grubuna göre oldukça arttığı görülmüştür. Kriz hastalarının CRP düzeyleri ise, kontrol grubu ve OHA hastalarına göre daha fazla artmıştır. Çünkü kriz hastalarında inflamasyon bulguları artmış ve buna bağlı olarak CRP düzeyleri de yükselmiştir. Buradan orak hücre anemisinde özellikle hastaların krize girdiği dönemde CRP düzeylerinin yüksek olduğu sonucuna ulaşılabilir.

Platt ve arkadaşları [105] lökosit sayısının artışının orak hücre anemisinin şiddetinde önemli bir risk faktörü olduğunu göstermiştir. Orak hücre anemisi olan tüm bireylerin aynı globin gen mutasyonuna sahip olmasına rağmen, hastalığın klinik şiddeti bireylere göre farklılık gösterir. Örneğin, hastalığın en yaygın klinik bulgusu ağrılı krizdir ve yılda 0 ile 10'dan daha fazla tekrar meydana gelebilir [105]. Aynı zamanda lökosit sayısı da hastalığın şiddeti için çok önemli bir risk faktörüdür. Yüksek lökosit sayısı olan hastaların genç yaşta ölme olasılığı daha yüksektir. Lökosit sayısının artışı sessiz beyin infarkt gelişimi için de bir risk faktörüdür [106]. Artan lökosit sayısı devam eden kronik inflamasyonu yansıtır ya da verilen bir uyarana karşı inflamatuvar yanıt geliştirme eğilimi gösterir. Bu çalışmada, inflamasyon nedeniyle hastaneye başvuran kriz hastalarının lökosit sayılarının kontrol grubuna göre oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Orak hücre anemisinde inflamasyon bulgularının artması ve hastalık şiddetinin ilerlemesi durumunda lökosit sayısı artmıştır. Lökosit sayısındaki artış tüm hastalarda aynı oranda gözlenmemiştir. Bu da orak hücre anemisinin şiddetinin bireylere göre değişebileceğini gösterir. Buna bağlı olarak, bu durumu Platt ve arkadaşlarının çalışmalarındaki bulgular ile ilişkilendirmek mümkün olabilir [105].

Yapılan bir çalışmada SOCS-3 geni silinmiş farelerde IL-6 uyarısı sonucunda STAT-1 ve STAT-3 aktivasyonunun uzadığı tespit edilmiştir [107]. SOCS-3 eksikliğinde inflamasyon şiddetlenmektedir. SOCS-3 eksikliği sonucu Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör (G-CSF)'ün etkisi artmakta, buna bağlı olarak nötrofil hücre

çoğalması ve hayatta kalma süresinin de arttığı tespit edilmiştir. Hepatosellüler karsinomada SOCS-1 promotor bölgesinin hipermetilasyon ile baskılanıp ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir [108]. SOCS-1'in azalması hipermetilasyon dışında SOCS-1 gen silinmeleri, mutasyonları ya da polimorfizmlere bağlı olabilir.

OHA inflamatuvar bir hastalık olduğu için diğer inflamatuvar hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Daha önce Ivashkiv ve Tassiulas'ın yaptığı çalışmada SOCS genlerinin artrit üzerine etkileri araştırılmıştır [83]. mBSA/IL-1 (metillenmiş BSA) akut bir artrittir. Miyeloid hücreler tarafından eklemlerin tutulumu, pannus, inflamasyon ve doku yıkımı gibi yönleriyle RA'ya (Romatoid artrit) benzer. SOCS-1<sup>-/-</sup> ve IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> knockout fareler kullanılarak SOCS-1'in rolü açıklanmıştır. SOCS-1 eksikliğinde artrit şiddeti artmış fakat gidişatında bir değişiklik olmamıştır [77, 109-110]. mBSA/IL-1 artrit gidişatı sırasında; aktif nod T hücrelerinde, fibroblastlarda, lenfositlerde ve sinoviyal makrofajlarda SOCS-1 geninin ifade edildiğini gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak mBSA/IL-1 artrit modelinde, SOCS-1'in akut artrit önemli bir negatif düzenleyicisi olduğunu tespit etmişlerdir. SOCS-3'ün ise sinoviyal makrofajlarda ve fibroblastlarda aşırı ifade edildiği zaman artriti baskılayabileceğini belirtmişlerdir. Artrit şiddetinin değişmesinde, sinoviyal inflamasyonda sinyal iletimi çapraz düzenleme ve geri-bildirim inhibisyonunda SOCS-1'in önemli bir rolü olduğunu göstermişlerdir. Hastalığın şiddeti arttığında yani hastalar krize girdiğinde inflamasyon bulguları artar. Bu çalışmada kriz hastalarında SOCS-1 ifadesinin azalması, SOCS-1 geninin inflamasyonla ilişkili olduğunu göstermiştir. Buna bağlı olarak, bu durumu Ivashkiv ve Tassiulas'nın çalışmalarındaki bulgular ile ilişkilendirmek mümkün olabilir [83].

SOCS-3'ün ileri düzeyde ifadesi alerjik yanıtları artırabilir çünkü son yapılan bir çalışmada transgenik SOCS-3 ifadesinin T hücrelerinde T1 gelişimini engellediği T2 gelişimini ise artırdığı görülmüştür [111]. T hücrelerinde SOCS-3 ifadesinin artışı atopik dermatit ve astım gibi alerjik hastalıkların şiddeti ile ilişkilidir. T hücrelerindeki SOCS-3 seviyelerindeki değişim otoimmün inflamatuvar hastalıkların tedavisinde Th1/Th2 dengesinin düzenlenmesinde yardımcı olabilir [91]. RA fare modellerinde SOCS-3'ün aşırı ifadesi adenovirüs ile engellenebilir [87]. SOCS-1 ve



SOCS-3 ifadesindeki azalma antisens RNA tedavisi ile kullanılarak, obez diabetik farelerde insülin duyarlılığı geliştirilmiş ve karaciğer yağlanması ile hipertrigliseridemide iyileşme sağlanmıştır [91].

Daha önce yapılan bir çalışmada [112] SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesi hepatosellüler karsinoma'da (HCC) araştırılmıştır. Çalışma sonucunda SOCS-1'in HCC'nin gelişimi ve/veya ilerlemesini engellediğini çünkü HCC hücrelerinde SOCS-1 ifadesinin önemli derecede azaldığını tespit etmişlerdir. SOCS-1 ifadesinin azalmasının doku hasarı ve inflamasyonu artırabileceği sonucuna ulaşmışlardır. SOCS-1 ifadesinin arttığı gibi SOCS-3 ifadesinde de HCC hücrelerinde azalma gözlemlenmiştir. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin malignitelerin gelişimi ve ilerlemesinde yer alabileceği sonucuna ulaşmışlardır [112].

İmmün düzenleyici işlevlerin büyük bir kısmında SOCS-1'in inflamatuvar hastalıkların patolojisinde rol oynadığı görülmektedir [91]. Otoimmün artritli sıçanlarda SOCS-1 eksikliğinde eklem inflamasyonu ve tahribatta ciddi oranda artış olmuştur [82-83]. Wong ve arkadaşları [113] akut IL-1 bağımlı artrit modeli kullanarak eklem inflamasyonunu ortaya çıkarmışlardır. Bu inflamasyonlar hematopoetik ve endotelial hücre bölünmesinde SOCS-3'ten yoksun farelerde T hücreleri, osteoklastlar ve makrofajların aktivasyonun artmasıyla karakterize edilir [113]. Egan ve arkadaşları, IFN $\gamma$  ve SOCS-1'den yoksun farelerde artrit şiddetinin arttığını göstermişlerdir [82].

Yamana ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [89] RA'lı hastalardan alınan kan örneklerinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında CD4<sup>+</sup> T hücrelerinde kontrol hücrelerden daha yüksek seviyede SOCS-1 fakat daha düşük seviyede SOCS-3'e rastlanılmıştır [89]. Aksine, De Hooge ve arkadaşları [90] zimosan uyarımlı artrit modelinde SOCS-1 ve SOCS-3 gen ifadelerini araştırmışlardır. Semi-kantitatif RT-PCR ile WT (wild-type) farelerinde zimosan uyarımlı artrit 14. gününde inflamasyonlu eklemlerde SOCS-1 gen ifadesinin arttığı gösterilmiştir. İnflamasyonlu sinoviyal dokulardaki STAT-1 aktivasyonu da aynı anda gerçekleşmiştir. Aksine SOCS-3 gen ifadesi zimosan uyarımlı artrit 7. ve

14. gününde artmıştır. Bu da STAT-3 aktivasyonu ile aynı zamanda gerçekleşmiştir. STAT-1<sup>-/-</sup> farelerindeki artrit şiddetlenmesine SOCS proteinlerinin neden olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Buna dayanarak STAT-1<sup>-/-</sup> ve WT fareleri arasındaki sinoviyal SOCS-1 ve SOCS-3 ifadelerini karşılaştırmışlardır. STAT-1<sup>-/-</sup> farelerinin inflamasyonlu eklemlerinde SOCS-1 ifadesinin azaldığını, aksine SOCS-3 ifadesinin ise STAT-1<sup>-/-</sup> farelerinde değişmediğini görmüşlerdir. Zimosan uyarımlı artrit esnasında inflamasyonun kontrolünde STAT-1'in önemli bir rolü olduğu sonucuna ulaşmışlardır. STAT-1<sup>-/-</sup> farelerindeki SOCS-1 ifadesinin azalması göz önünde bulundurularak SOCS-1'in artrit kontrolünde yardımcı bir gen olabileceğini ortaya çıkarmışlardır [90].

Bu tez çalışmasında, OHA hastaları ve kriz hastalarının SOCS-1 ifadesi kontrol grubuna göre azalmıştır, SOCS-3 ifadesi ise değişmemiştir. Bu sonuçlar De Hooge ve diğerlerinin [90] çalışmalarındaki bulguları desteklerken, Yamana ve diğerlerinin [89] çalışmalarındaki bulguları desteklememektedir. RA'lı hastalarda ve zimosan uyarımlı artrit modelinde farklı SOCS ifadesi sonuçlarının elde edildiği görülmektedir. Buradan farklı inflamatuvar hastalıklarda değişik SOCS ifadesi sonuçlarının hücre tipleri veya dokularına bağlı olarak değişebileceği sonucu çıkarılabilir.

Bu çalışmada, SOCS-1 geninin OHA'nin gidişatında önemli bir rol oynadığı sonucuna varılabilir. Özellikle kriz hastalarının SOCS-1 gen ifadesi, OHA hastaları ve kontrol grubuna göre daha da azalmıştır. Bu da SOCS-1 geninin inflamasyonla ilişkili olduğunu gösterir. Çünkü kriz hastalarında inflamasyon bulguları arttıkça SOCS-1 gen ifadesi azalmıştır. Burada olasılıkla SOCS-1 geni kriz hastalarında inflamasyonu azaltıcı yönde etki yapmıştır. SOCS-3 gen ifadesinde değişiklik gözlenmemesi ise, OHA'nin SOCS-3 geni ile ilişkisinin olmadığını gösterir.

SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin uygun zamanda uygun hücrelerde ifade edilmesi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımlar getirebilir. OHA'nin gidişatı esnasında meydana gelen inflamasyon, gen ifade düzeylerini etkileyebilir. Bu çalışma ile SOCS-1 gen ifade düzeyindeki azalışın, OHA ile bir ilişkisinin olduğunu

ortaya koymaktadır. Sonuç olarak OHA'nin ilerlemesinde önemli olan SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifade düzeyleri konusunda araştırmaların devamının gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu çalışma bu konuda yapılan ilk çalışmadır. Dolayısıyla bu tez çalışması ile başlatmış olduğumuz moleküler çalışma devam ettirilmelidir.

## **5. SONUÇ VE ÖNERİLER**

Ülkemizde özellikle Akdeniz Bölgesi'nde sıkça karşılaşılan orak hücre anemili hastaların problemlerinin çözümlenmesi ve daha iyi anlaşılması için araştırmalara gereksinim vardır. Hasta sayısı artırılarak daha net sonuçlar elde edilebilir. Bu çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir.

1. OHA grubundaki hemoglobin ve hematokrit ortalama değerleri kontrol grubundan belirgin olarak düşük çıkmıştır. Kriz dönemindeki hastaların ise hemoglobin ve hematokrit değerlerinin hem kontrol grubu hem de orak hücre anemi grubuna göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir.
2. OHA grubundaki WBC, PLT ve CRP ortalama değerleri kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Kriz dönemindeki hastaların ise WBC, PLT ve özellikle CRP değerlerinin hem kontrol grubu hem de orak hücre anemi grubuna göre oldukça arttığı görülmüştür.
3. OHA grubunun SOCS-1 gen ifadesi, kontrol grubuna göre azalmıştır. Kriz hastalarındaki SOCS-1 ifadesi ise hem kontrol grubu hem de orak hücre anemi grubuna göre oldukça azaldığı gözlenmiştir.
4. OHA ve kriz grubunun SOCS-3 gen ifadesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir.
5. Yapılan çalışma sonucunda, orak hücre anemisinin SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinden özellikle SOCS-1 geni ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] Harmening, DM., “Clinical hematology and fundamentals of hemostasis”, 3<sup>rd</sup> ed. (Editör: Harmening, DM.), Philadelphia, USA, 173-192, (1997).
- [2] Noguchi, C. T., Schechter, A. N., and Rodgers, GP., “Sickle cell disease pathophysiology”, *Baillieres Clin Haematology*, **6**: 57-91, (1993).
- [3] Embury, S. H., “Sickle cell anemia and associated hemoglobinopathies”, 21<sup>st</sup> ed. (Editör: Goldman, L., Bennett, J. C.), *Cecil Textbook of Medicine*, Philadelphia: WB Saunders Company, 893-905, (2000).
- [4] Pathare, A., Kindi, S. A., Alnaqdy, A., Daar, S., Knox-Macaulay, H., Dennison, D., “Cytokine profile of sickle cell disease in Oman”, *Am J Hematol*, **77**: 323-328, (2004).
- [5] Harris, J. W., Brewster, H. H., Ham, T. H., and Castle, W. B., “Studies on the destruction of red blood cells. X. The biophysics and biology of sickle cell disease”, *Archives of Internal Medicine*, **97**: 145-168, (1956).
- [6] Mary, E. E., “Hereditary hemolytic anemias”, 5<sup>th</sup>. (Ed. Tintinalli, J. E., Kelen, G. D., Stapczynski, J. S.), *Emergency Medicine, A Comprehensive Study Guide*, North Carolina: McGraw Hill Companies Inc, 1382-1387, (2000).
- [7] Canatan. D., “Orak hücre anemisi”, XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi, 7. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu, İstanbul-Türkiye, 93-99, (2003).
- [8] Aksoy, M., Lekin, E. W., Maurant, A. E., Lehman, H., “Blood groups hemoglobins and thalasemia in Southern Turkey and Eti Turks”, *Brit, Med. J*, **2**: 937, (1958).

- [9] Arcasoy, A., Canatan, D., “Dünyada ve Türkiye’de talasemi ve hemoglobinopatiler”, Ulusal Hemoglobinopati Konseyi-Sağlık Bakanlığı, 2. Baskı, Antalya-Türkiye, 11-19, (2003).
- [10] Canatan, D., Köse, M. R., Üstündağ, M., Haznedaroğlu, D., Özbaş, S., “Hemoglobinopathy Control Program in Turkey”, *Community Genet*, **9**: 124-126, (2006).
- [11] Eraslan, S., “Beta Talaseminin Moleküler Tanısı”, Düzen Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi, Ankara-Türkiye, (2005).
- [12] Wang, W., Lukens, J. N., “Sickle cell anemia and other sickling syndromes”, 10<sup>th</sup> ed. (Editör: Lee, R. G., Foerster, J., Lukens, J., Paraskevas, F., Greer, J. P., Rodgers, G. M.), *Wintrobe’s Clinical Hematology*, Middle East Edition, Baltimore: Williams and Wilkins Company, 1347-1397, (1999).
- [13] Emmel, V. E., “A study of the erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle shaped red blood corpuscles”, *Archives of Internal Medicine*, **20**: 586-98, (1917).
- [14] Tüzmen, Ş., Scheter, A. N., “Genetic diseases of hemoglobin: Diagnostic methods for elucidating sickle cell mutations”, *Blood Reviews*, 19-25, (2001).
- [15] Serjeant, G. R., “Natural history and determinants of clinical severity of sickle cell disease”, *Curr Opin Hematol*, **2**: 103-10, (1995).
- [16] Turgeon, M. L., “The principles of hematology”, *Clinical hematology: theory and procedures*, 4<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 171-90, (2005).
- [17] Dover, G., Platt, O., “Sickle cell disease”, *Hematology of Infancy and Childhood*, 6<sup>th</sup> ed. (Editör: Nathan, D., Orkin, S. H., Ginsburg, D., Look, A. T.), WB Saunders Company, Philadelphia, 790-841, (2003).
- [18] 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).
- [19] Lutzker, L. G., Alavi, A., “Bone and marrow imaging in sickle cell disease: diagnosis of Infarction”, *Semin Nucl Med*, **6**: 83, (1976).
- [20] Beutler, E., “Disorders of Hemoglobin”, *Harrison’s Principles of Internal Medicine*, 14<sup>th</sup> ed. (Editör: Fauci, A. S., Braunwald, E., Isselbacher, K. J.,

- Wilson, J. D., Martin, J. B., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L.), McGraw Hill Companies Inc, USA, 645-653, (1998).
- [21] Milner, P. F., Kraus, A. P., Sebes, J. I., Sleeper, L. A., Dukes, K. A., Embury, S. H., Bellevue, R., Koshy, M., Moohr, J. W., and Smith, Jeanne., “Sickle cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head”, *N Engl J Med*, **325**: 1476-81, (1991).
- [22] Falk, R. J., Scheinman, J., Phillips, G., Orringer, E., Johnson, A., and Jennette, J. C., “Prevalence and pathologic features of sickle cell nephropathy and response to inhibition of angiotensin-converting enzyme”, *N Engl J Med*, **326**: 910-5, (1992).
- [23] Pappo, A., Buchanan, G. R., “Acute splenic sequestration in a 2-month-old infant with sickle cell anemia”, *Pediatrics*, **84**: 578-9, (1989).
- [24] Buchanan, G. R., Glader, B. E., “Benign course of extreme hiperbilirubinemia in sickle cell anemia: Analysis of six cases”, *J. Pediatr*, **91**: 21-24, (1977).
- [25] Ohene-Frempong, K., Weiner, S. J., Sleeper, L. A., Miller, S. T., Embury, S., Moohr, J. W., Wethers, D. L., Pegelow, C. H., and Gill, F. M., “Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors”, *Blood*, **91**: 288-94, (1998).
- [26] Adams, R. J., “Stroke prevention trial in sickle cell anemia(STOP):extended follow-up and final results”, *Blood*, **108**: 847-52, (2006).
- [27] Cacciola, F., Musso, R., Giustolisi, R., Cacciola, E., Alessi, M., “Blood hypercoagulability as a risk factor for leg ulcers in sickle cell disease”, *Blood*, **75(12)**: 2467-2468, (1990).
- [28] Claster, S., Vichinsky, E. P., “Managing sickle cell disease”, *BMJ*, **327**: 1151-1155, (2003).
- [29] Old, JM., “DNA-based diagnosis of hemoglobin”, *Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, clinical management*, (Editör: Steinberg, M. H., Forget, B. G., Higgs, D. R., Nagel, R. L.), Cambridge University Press, 941-57, (2001).

- [30] 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).
- [31] Jinks, D. C., Minter, M., Tarver, D. A., Vanderford, M., Hejtmancik, J. F., McCabe, E. R., “Molecular genetic diagnosis of sickle cell disease using dried blood specimens on blotters used for newborn screening”, *Hum Genet*, **81(4)**: 363-6, (1989).
- [32] Vichinsky, E. P., “New therapies in sickle cell disease”, *Lancet*, **360**: 620-31, (2002).
- [33] Charache, S., Terin, M. L., Moore, R. D., “Effect of hydroxyure on the frequency of painful crises in sickle cell anemia”, *N Eng J Med*, **332**: 1317, (1995).
- [34] Vermynen, C., Cornu, G., “Bone marrow transplantation for sickle cell disease: The European experience”, *Am J Pediatr Hematology Oncol*, **16**: 18, (1994).
- [35] Styles, L. A., Vichinsky, E., “Effects of a long-term transfusion regimen on sickle cell-related illnesses”, *J Pediatrics*, **125**: 909-11, (1994).
- [36] Allison, A. C., “The distribution of sickle cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria”, *Transactions of Royal Society Of Tropical Medicine and Hygiene*, **48**: 312-318, (1954).
- [37] Okpala, I., “Management of pain in sickle cell disease”, *Journal of the Royal Society of Medicine*, **95**: 456-58, (2002).
- [38] Arcasoy, A., Canatan, D., Sinav, B., Kutlay, L., Oğuz, N., Şen, M., Bengü, A., “Serum zinc levels and zinc binding capacity in thalassemia”, *J Trace Elem Med Biol*, **15**: 85-87, (2001).
- [39] Hope, C. C., Walters, M. C., “Bone marrow transplantation in sickle cell anemia”, *Cur Opin Oncol*, **13(5)**: 85-90, (2001).
- [40] Tisdale, J., Sadelain, M., “Toward gene therapy for disorders of globin synthesis”, *Semin Hematol*, **38**: 382-92, (2001).
- [41] Antmen, B., “Orak Hücre Anemisi”, *Türk Ped Arş*, **44**: 39-42, (2009).

- [42] Andus, T., Bauer, J., Gerok, W., “Effects of cytokines on the liver”, *Hepatology*, **13**: 364-375, (1991).
- [43] Campbell, I. L., “Cytokine-mediated inflammation, tumorigenesis, and disease associated JAK/STAT/SOCS signaling circuits in the CNS”, *Brain Research Reviews*, **48**: 166–177, (2005).
- [44] Güneş, H., “Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri”, *Tr. J. Of Biology, TÜBİTAK*, **23**: 283–292, (1999).
- [45] Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O’Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., and Akdis, C. A., “Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : Receptors, functions, and roles in diseases”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **127(3)**: 701-721, (2011).
- [46] Platt, O. S., “Sickle cell anemia as an inflammatory disease”, *J Clin Invest*, **106(3)**: 337-338, (2000).
- [47] Brittain, J. E., Parise, L. V., “Cytokines and plasma factors in sickle cell disease”, *Curr Opin Hematol*, **14(5)**: 438-443, (2007).
- [48] Rapalino, O., Lazarov-Spiegler, O., Agranov, E., Velan, G. J., Yoles, E., Fraidakis, M., Solomon, A., Gepstein, R., Katz, A., Belkin, M., Hadani, M., and Schwartz, M., “Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats”, *Nature medicine*, **4**: 814-821, (1998).
- [49] Lee, S. P., Ataga, K. I., Orringer, E. P., Phillips, D. R., and Paris, L.V., “Biologically active CD40 ligand is elevated in sickle cell anemia: potential role for platelet-mediated inflammation”, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26(7)**: 1626-1631, (2006).
- [50] Redding-Lallinger, R., Knoll, C., “Sickle cell disease-pathophysiology and treatment”, *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, **36(10)**: 346-376, (2006).
- [51] Guilion, D., Robertson, C., “Inhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord”, *Ann Neurol*, **27**: 33-42, (1990).
- [52] Güner, İ., Özmen, D., Bayındır, O., “Sitokinler”, *T Klin J Med Sci*, **17**, (1997).



- [53] Horii, Y., Muraguchi, A., Iwano, M., “Involvement of IL-1 in mesengial proliferative glomerulonephritis”, *J Immunol*, **143**: 3949-3955, (1989).
- [54] Stahl, R., “Chemoattractive cytokines (chemokines) and immune renal injury”, *Nephrol Dial Transplant*, **10(3)**: 307-309, (1995).
- [55] Serdengeçti, S., Melikoğlu, M., “Sitokinler”, *Sendrom*, **5(1)**: 75-79, (1993).
- [56] Olsson, I., “The cytokine network”, *Journal of Internal Medicine*, **233(2)**: 103-115, (1993).
- [57] Ward, A. C., Touw, I., and Yoshimura, A., “The JAK-STAT pathway in normal and perturbed hematopoiesis”, *Blood*, **95**: 19-29, (2009).
- [58] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P., “Molecular Biology of the Cell, 5<sup>th</sup> ed.”, Garland science, Taylor and Francis Group, UK, 1725 s., (2008).
- [59] Krauss, G., “Biochemistry of Signal Transduction and Regulation, 3<sup>th</sup> ed.”, Germany, 541 s., (2003).
- [60] Schindler, C., Plumlee, C., “Interferons and the JAK-STAT pathway”, *Semin Cell Dev Biol*, **19(4)**: 311-318, (2008).
- [61] Jatiani, S. S., Baker, S. J., Silverman, L. R., Reddy, E. P., “JAK/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: Approaches for targeted therapies”, *Genes Cancer*, **1(10)**: 979-993, (2010).
- [62] Pfaffl M. W., “A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR”, *Nucleic Acids Research*, **29(9)**: 2003-2007, (2001).
- [63] Brankensiek, K., Langer, F., Schlegelberger, B., Kreipe, H., Lehmann, U., “Hypermethylation of the suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1) in myelodysplastic syndrome”, *British Journal of Haematology*, **130**: 209–217, (2005).
- [64] Chim, C. S., Wong, A. S. Y., Kwong, Y. L., “Epigenetic dysregulation of the JAK/STAT pathway by frequent aberrant methylation of SHP1 but not SOCS-1 in acute leukaemias”, *Ann Hematol*, **83**: 527–532, (2004).
- [65] Watanabe, D., Ezoe, S., Fujimoto, M., Kimura, A., Saito, Y., Nagai, H., Tachibana, I., Matsumura, I., Tanaka, T., Kanegane, H., Miyawaki, T., Emi, M., Kanakura, Y., Kawase, I., Naka, T., Kishimoto, T., “Suppressor of

- cytokine signalling-1 gene silencing in acute myeloid leukaemia and human haematopoietic cell lines”, *British Journal of Haematology*, **126**: 726–735, (2004).
- [66] Okochi, O., Hibi, K., Sakai, M., Inoue, S., Takeda, S., Kaneko T., Nakao, A., “Methylation-mediated silencing of SOCS-1 gene in hepatocellular carcinoma derived from cirrhosis”, *Clinical Cancer Research*, **9**: 5295–5298, (2003).
- [67] Johan, M. F., Bowen, T., Frew, M. E., Goodeve, A. C., Reilly, T., “Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia”, *British Journal of Haematology*, **129**: 60-65, (2005).
- [68] Greenhalgh, C. J., Alexander, W. S., “Suppressors of cytokine signalling and regulation of growth hormone action”, *Growth Horm IGF Res*, **14**: 200-206, (2004).
- [69] Larsen, L., Ropke, C., “Suppressors of cytokine signalling: SOCS”, *APMIS*, **110**: 833–844, (2002).
- [70] Hanada, T., Yoshimura, A., “Regulation of cytokine signaling and inflammation”, *Cytokine and Growth Factor Reviews*, **13**: 413–421, (2002).
- [71] Yoshikawa, H., Matsubara, K., Qian, G. S., Jackson, P., Groopman, J. D., Manning, J. E., Harris, C. C., Herman, J. G., “SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and show growth-suppression activity”, *Nature Genetics*, **28**: 29-35, (2001).
- [72] Sutherland, K. D., Lindeman, G. J., Choong, D. Y. H., Wittlin, S., Brentzell, L., Phillips, W., Campbell, I. G., Visvader, J. E., “Differential hypermethylation of SOCS genes in ovarian and breast carcinomas oncogen”, **23**: 7726-7733, (2004).
- [73] Valentino, L., Pierre, J., “JAK/STAT signal transduction: Regulators and implication in hematological malignancies”, *Biochemical pharmacology*, **71**: 713-721, (2006).

- [74] Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M., “SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation”, *Nature Reviews , Immunology*, (2007).
- [75] Alexander, W. S., “Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system”, *Nature Reviews, Immunology*, (2002).
- [76] Krebs, D. L., Hilton, D. J., “SOCS proteins: Negative regulators of cytokine signaling”, *Stem Cells*, **19**: 378-387, (2001).
- [77] Naka, T., Matsumoto, T., Narazaki, M., Fujimoto, M., Morita, Y., Ohsawa, Y., Saito, H., Nagasawa, T., Uchiyama, Y., and Kishimoto, T., “Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice”, *Proc Natl Acad Sci, USA*, **95**: 15577–82, (1998).
- [78] Starr, R., Metcalf, D., Elefanty, A. G., Brysha, M., Willson, T. A., Nicola, N. A., Hilton, D. I., and Alexander, W. S., “Liver degeneration and lymphoid mice lacking suppressor of cytokine signaling-1”, *Proc Natl Acad Sci, USA*, **95**: 14395–9, (1998).
- [79] Fenner, J. E., Starr, R., Cornish, A. L., Zhang, J. G., Metcalf, D., Schreiber, R. D., Sheehan, K., Hilton, D. J., Alexander, W. S., and Hertzog, P. J., “Suppressor of cytokine signaling-1 regulates the immune response to infection by a unique inhibition of type I interferon activity”, *Nat Immunol*, **7**: 33-9, (2006).
- [80] Oral, H. B., “Sitokin sinyal supresörleri ve hastalıklarla ilişkisi”, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, **3(43)**: 26-32, (2007).
- [81] Vuong, B. Q., Arenzana, T. L., Showalter, B. M., Losman, J., Chen, X. P., Mosteckı, J., Banks, A. S., Limnander, F. N., Rothman, P. B., “SOCS-1 localizes to the microtubule organizing complex-associated 20S proteasome”, *Mol Cell Biol*, **24**: 9092–9101, (2004).
- [82] Egan, P. J., Lawlor, K. E., Alexander, W. S., Wicks, I. P., “Suppressor of cytokine signaling-1 regulates acute inflammatory arthritis and T cell activation”, *J Clin Invest*, **111**: 915-24, (2003).
- [83] Ivashkiv, L. B., Tassiulas, I., “Can SOCS make arthritis better”, *J Clin Invest*, **111**: 795-7, (2003).

- [84] Boisclair, Y. R., Wang, J., Shi, J., Hurst, K. R., Ooi, G. T., “Role of the suppressor of cytokine signaling-3 in mediating the inhibitory effects of interleukin-1beta on the growth hormone-dependent transcription of the acid-labile subunit gene in liver cells”, *J Biol Chem*, **275**: 3841–7, (2000).
- [85] Bode, J. G., Nimmesgern, A., Schmitz, J., Schaper, F., Schmitz, M., Frisch, W., Haussinger, D., Heinrich, P. C., and Graeve, L., “LPS and TNF-alpha induce SOCS-3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT-3 in macrophages”, *FEBS Lett*, **463**: 365–70, (1999).
- [86] Suzuki, A., Hanada, T., Mitsuyama, K., Yoshida, T., Kamizono, S., Hoshino, T., Kubo, M., Yamashita, A., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S., Matsumoto, S., Toyonaga, A., Sata, M., and Yoshimura, A., “CIS-3/SOCS-3/SSI-3 plays a negative regulatory role in STAT-3 activation and intestinal inflammation”, *J Exp Med*, **193(4)**: 471–81, (2001).
- [87] Shouda, T., Yoshida, T., Hanada, T., “Induction of the cytokine signal regulator SOCS-3/CIS-3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis”, *J Clin Invest*, **108**: 1781–8, (2001).
- [88] Zhang, J.G., Farley, A., Nicholson, S. E., Willson, T. A., Zugaro, L. M., Simpson, R. J., Moritz, R. L., Cary, D., Richardson, R., Hausmann, G., Kile, B. J., Kent, S. B., Alexander, W. S., Metcalf, D., Hilton, D. J., Nicola, N. A., and Baca, M., “The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation”, *Proc Natl Acad Sci, USA*, **96**: 2071–2076, (1999).
- [89] Yamana, J., Yamamura, M., Okamoto, A., Aita, T., Iwahashi, M., Sunahori, K., and Makino, H., “Resistance to IL-10 inhibition of interferon gamma production and expression of suppressor of cytokine signaling-1 in CD4<sup>+</sup> T cells from patients with rheumatoid arthritis”, *Arthritis Rheum*, **50(6)**: 2014-23, (2004).
- [90] Hooge, A. S. K., Van de Loo, F. A. J., Koenders, M. I., Bennink, M. B., Arntz, O. J., Kolbe, T., and Van de Berg, V. M., “Local activation of STAT-1 and STAT-3 in the inflamed synovium during zymosan-induced arthritis: exacerbation of joint inflammation in STAT-1 gene-knockout mice”, *Arthritis Rheum*, **50(6)**: 2014-23, (2004).

- [91] Yoshimura, A., Nishinakamura, H., Matsumura, Y., Hanada, T., “Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins”, *Arthritis Res Ther*, **7(3)**: 100-10, (2005).
- [92] Aydın-Saitoğlu, M., “Hematoloji’de Real Time PCR”, *Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu, İstanbul*, 20-22, (2005).
- [93] Gannong, F. W., “Tıbbi Fizyoloji”, 19.baskıdan çeviri, Barış Kitabevi, Ankara, 550-552, (1999).
- [94] Tan, J. C., “Ralph rabkin suppressors of cytokine signaling in health and disease”, *Pediatr Nephrol*, **20**: 567–575, (2005).
- [95] Fujimoto, M., Naka, T., “Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules”, *TRENDS in Immunology*, Vol.24, No.12, December, (2003).
- [96] Hilton, D. J., Richardson, R. T., Alexander, W. S., Viney, E. M., Willson, T. A., Springg, N. S., Starr, R., Nicholson, S. E., Metcalf, D., and Nicola, N. A., “Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes”, *Proc. Natl. Acad. Sci, U. S. A.*, **95(1)**: 114–119, (1998).
- [97] Zhang, J. G., Metcalf, D., Rakar, Steven., Asimakis, M., Greenhalgh, C. J., Willson, T. A., Starr, R., Nicholson, S. E., Carter, W., Alexander, W. S., Hilton, D. J., and Nicola, N. A., “The SOCS box of suppressor of cytokine signaling-1 is important for inhibition of cytokine action in vivo.”, *Proc. Natl. Acad. Sci, U. S. A.*, **98(23)**: 13261–13265, (2001).
- [98] Ernst, M., Inglese, M., Waring, P., Campbell, I. K., Bao, S., Clay, F. J., Alexander, W. S., Wicks, I. P., Tarlinton, D. M., Novak, U., Heath, J. K., and Dunn, A. R., “Defective gp130-mediated signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling results in degenerative joint disease, gastrointestinal ulceration, and failure of uterine implantation”, *J Exp Med*, **194**: 189–203, (2001).
- [99] Goncalves, M. S., Quelroz, I. L., Cardoso, S. A., Zanetti, A., Strapazoni, A. C., Adorno, E., Albuquerque, A., Sant, A. A., Reis, M. G., Barral, A., Barral, N. M., “Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **34**: 1309-1313, (2001).

- [100] Michaels, L. A., Frempong, K. O., Zhao, H., Douglas, S. D., “Serum levels of substance P are elevated in patients with sickle cell disease and increase further during vaso-occlusive crisis”, *Blood*, **92(9)**: 3148-3151, (1998).
- [101] Gonzalez, E. G., Doherty, J. C., Bergreen, E. W., Organ, G., Tefler, M., Mc Millen, M. A., “Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis” *Blood*, **92(7)**: 2551-2555, (1998).
- [102] Julan, M. E., Belloy, M. S., Decastel, M., Dougoparsad, S., Ravion, S., Dessources, M. D. H., “Childhood sickle cell crises: clinical severity, inflammatory markers and the role of interleukin-8”, *Haematologica*, **89**: 863-864, (2004).
- [103] Bourantas, K. L., Dalekos, G. N., Makis, A., Chaidos, A., Tsiara, S., Mavridis, A., “Acute phase proteins and interleukins in steady state sickle cell disease”, *Eur J Haematol*, **61**: 49–54, (1998).
- [104] Hedo, C. C., Aken’ova, Y. A., Okpala, I. E., Durojaiye, A. O., Salimonu, L. S., “Acute phase reactants and severity of homozygous sickle cell disease”, *J Intern Med*, **233**: 467–470, (1993).
- [105] Platt, O.S., Thorington, B. D., Brambilla, D. J., Milner, P. F., Rosse, W. F., Vichinsky, E., and Kinney, T. R., “Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors”, *N. Engl. J. Med*, **325(1)**: 11–16, (1991).
- [106] Kinney, T. R., Sleeper, L. A., Wang, W. C., Zimmerman, R. A., Pegelow, C. H., Ohene-Frempong, K., Wethers, D. L., Bello, J. A., Vichinsky, E. P., Moser, F. G., Gallagher, D. M., DeBaun, M. R., Platt, O. S., Miller, S. T., “Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: a risk factor analysis. The cooperative study of sickle cell disease”, *Pediatrics*, **103(3)**: 640–645, (1999).
- [107] Croker B. A., Krebs D. L., Zhang J. G., Wormald, S., Willson, T. A., Stanley, E. G., Robb, L., Greenhalgh, C., Forster, I., Clausen, B. E., Nicola, N. A., Metcalf, D., Hilton, D. J., Roberts, A. W., Alexander, W. S., “SOCS-3 negatively regulates IL-6 signaling *in-vivo*”, *Nature Immunology*, Volume 4, Number 6, June (2003).
- [108] Yoshikawa, H., Matsubara, K., Qian, G. S., Jackson, P., Groopman, J. D., Manning, J. E., Harris, C. C., Herman, J. G., “SOCS-1, a negative regulator

of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity”, *Nature Genetics*, Vol. 28, (2001).

- [109] Alexander, W.S., Starr, R., Fenner, J. E., Scott, C. L., Handman, E., Sprigg, N. S., Corbin, J. E., Cornish, A. L., Darwiche, R., Owczarek, C. M., Kay, T. W., Nicola, N. A., Hertzog, P. J., Metcalf, D., and Hilton, D. J., “SOCS-1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine”, *Cell*, **98(5)**: 597–608, (1999).
- [110] Marine, J. C., Topham, D. J., McKay, C., Wang, D., Parganas, E., Stravopodis, D., Yoshimura, A., and Ihle, J. N., “SOCS-1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality”, *Cell*, **98(5)**: 609–616, (1999).
- [111] Seki, Y., Inoue, H., Nagata, N., Hayashi, K., Fukuyama, S., Matsumoto, K., Komine, O., Hamano, S., Himeno, K., Inagaki-Ohara, K., Cacalano, N., O’Garra, A., Oshida, T., Saito, H., Johnston, J. A., Yoshimura, A., and Kubo, M., “SOCS-3 regulates onset and maintenance of TH2-mediated allergic responses”, *Nat Med*, **9(8)**: 1047-1054, (2003).
- [112] Yoshimura, A., “Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development”, *Cancer Sci*, **97(6)**: 439–447, (2006).
- [113] Wong, P. K., Egan, P. J., Croker, B. A., O’Donnell, K., Sims, N. A., Drake, S., Kiu, H., McManus, E. J., Alexander, W. S., Roberts, A. W., and Wicks, I. P., “SOCS-3 negatively regulates innate and adaptive immune mechanisms in acute IL-1-dependent inflammatory arthritis”, *J Clin Invest*, **116(6)**: 1571–81, (2006).

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Hatice SEVGİ

**Doğum Tarihi:** 16/08/1984

**Öğrenim Durumu:**

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise		Fitnat Nuri Tekerekoğlu Anadolu Lisesi	1999-2003
Lisans	Biyoloji Bölümü	Niğde Üniversitesi	2004-2008
Yüksek Lisans	Biyoloji Bölümü/Moleküler Biyoloji ve Genetik	Mersin Üniversitesi	2009-2012

## ESERLER (Bildiri)

Hatice Sevgi<sup>1</sup>, Özlem Özdemir<sup>2</sup>, Figen Aymak<sup>3</sup>, Görkem Umut<sup>4</sup>, Yasemin Kaçar<sup>1</sup>, Selma Ünal<sup>2</sup>, Haluk Barbaros Oral<sup>3</sup>, Ahmet Ata Özçimen<sup>1</sup>

**The Investigation Of Suppressor of Cytokine Signalling (SOCS-1 and SOCS-3) Gene expression in Sickle Cell Anemia**

Molecular Immunology & Immunogenetics Congress, 2012 Antalya-TURKEY