

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TALASEMİ TAŞIYICISI ÇOCUKLARDA PERİFERİK
KANDAKİ LENFOSİTLERDE COMET YÖNTEMİYLE
GENOTOKSİSİTENİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Deniz MENDERES

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Deniz ASLAN**

**ANKARA
2016**

TEŞEKKÜR

Dört yıllık pediatri uzmanlığım süresince hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen ve tez çalışmamda çok büyük emeği ve desteği olan Hocam Prof. Dr. Deniz Aslan'a, Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Aysun Bideci'ye ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nın öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan Doç. Dr. Gonca Çakmak Demircigil ve Uzm. Dr. Esra Emerce'ye (GÜ Eczacılık Fak. Farmakolojik Toksikoloji), Uzm. Dr. Tayfun Göktaş'a (GÜ Tıp Fak. Fizyoloji Anabilim Dalı), Doç. Dr. Umut Arslan'a (Hacettepe Üniv. Tıp Fak. Halk Sağlığı Enstitüsü), hemşireler Sn. Serpil Erdoğan, Mine Tutkal, Melek Şen, Aylin Azmaz ve Songül Akın'a, emeği geçen diğer herkese ve ailelere işbirliği ve sabırları için çok teşekkür ederim.

Asistanlık süresince her zaman yanımda olan ve sabrını, anlayışını hiç azaltmayan sevgili eşim Yasin Menderes'e ve aileme, dostlarım Burcu Biral ve Mete Han Kızılkaya'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	v
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tanım.....	3
2.2. Epidemiyoloji	3
2.3. Fizyopatoloji.....	5
2.3.1. Globin Zincir Yapımı	6
2.3.2. Talasemi Tipleri.....	9
2.3.2.1. Beta Talasemi.....	9
2.3.2.1.1. Sessiz Beta Talasemi.....	10
2.3.2.1.2. Talasemi Minör	11
2.3.2.1.3. Talasemi İntermedia.....	13
2.3.2.1.4. Talasemi Majör	15
2.3.2.2. Alfa Talasemi	16
2.3.3. Oksidatif Stres	17
2.3.3.1. Serbest Radikaller	17
2.3.3.1.1. Süperoksit Radikali.....	19
2.3.3.1.2. Hidrojen Peroksit	20
2.3.3.1.3. Hidroksil Radikali.....	21
2.3.3.2. Antioksidan Savunma	21

2.3.3.3. Oksidatif Stres	24
2.3.3.4. Talasemi ve Oksidatif Stres	25
2.3.4. Genotoksisite ve DNA Hasarı	26
2.3.4.1. Talasemi ve DNA Hasarı	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Total Oksidan Kapasite (TOS), Total Antioksidan Kapasite (TAS), Vitamin C ve Vitamin E düzeyi çalışılması	31
3.2. Comet Yönteminin Çalışılması	33
3.3. Yöntemler	33
3.3.1. Periferik lenfositlerde Comet Yöntemi (tek hücre jel elektroforez yöntemi)	34
3.4. İstatistiksel yöntemler	35
4. BULGULAR.....	36
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇLAR.....	53
ÖZET	54
SUMMARY	55
7. KAYNAKLAR.....	56
8. EKLER.....	69
EK 1. GÖNÜLLÜ BEYAN FORMU.....	69
EK 2. ANKET	70
ÖZGEÇMİŞ	72

KISALTMALAR

BK	: Lökosit sayısı
CRP	: Seroreaktif protein
Fe	: Demir
Hb F	: Fetal hemoglobin
Hb	: Hemoglobin
HCT	: Hematokrit
KKD	: Kardeş kromatid değişimi
LOOH	: Lipid hidroperoksidaz
MCH	: Ortalama eritrosit hemoglobini
MCHC	: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
MCV	: Ortalama eritrosit hacmi
MDA	: Malondialdehid
OSİ	: Oksidatif stres indeksi
PLT	: Trombosit sayısı
PON1	: Paraoksonaze-1
RBC	: Eritrosit sayısı
RDW	: Eritrosit dağılım genişliği
ROS	: Reaktif oksijen partikülleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
Tail Intensity	: Kuyruk yoğunluğu
Tail Length	: Kuyruk uzunluğu
Tail Moment	: Kuyruk momenti

TAS	: Total antioksidan kapasite
TBARS	: Thiobarbitürik asit reaktif parçaları
TEAC	: Trolox equivalent antioxidant capacity
Tİ	: Talasemi intermedia
TM	: Talasemi majör
TOS	: Total oksidan kapasite
TSI	: Transferrin saturasyon indeksi = (Serum demir düzeyi/ Demir bağlama kapasitesi) x 100

TABLolar LİSTESİ

	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 1. Reaktif Oksijen Partikülleri	18
Tablo 2. Reaktif Oksijen Partiküllerinin Kaynakları	19
Tablo 3. Endojen Antioksidanlar	22
Tablo 4. Eksojen Antioksidanlar	23
Tablo 5. Talasemi minör ve kontrol grubunun tanımlayıcı bilgileri, tam kan sayımı parametreleri, biyokimyasal parametreleri ve hemoglobin elektroforez sonuçları	37
Tablo 6. Talasemi minör ve kontrol grubunun oksidatif stres belirteçleri	38
Tablo 7. Talasemi minör ve kontrol grubunun comet assay ile DNA hasarı parametreleri	39
Tablo 8. Çalışma grubunda (n=255), DNA hasarı, oksidan-antioksidan sistem ve bazı biyokimyasal parametreler arasında korelasyon sonuçları	40
Tablo 9. Çalışma grubunda (n=255), oksidan-antioksidan sistem ve bazı biyokimyasal parametreler arasında korelasyon sonuçları	41

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No:

- Şekil 1.** Hemoglobin Molekülünün Yapısı 6
- Şekil 2.** Hemoglobin Tipleri..... 7
- Şekil 3.** Hemoglobinin Normal Gelişimsel Değişimi 8
- Şekil 4.** Beta Talasemi Patofizyolojisi 16
- Şekil 5.** Görsel Analizde “Comet” Kategorileri 28

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Talasemiler, tüm dünyada en yaygın olarak görülen tek gen hastalığıdır. Özellikle Akdeniz bölgesi, Ortadoğu, Hindistan, Uzakdoğu ve tropikal Afrika'da büyük bir halk sağlığı sorunudur. Günümüzde hızlı nüfus göçleri nedeniyle Kuzey ve Güney Amerika ve Avrupa kıtasında da yaygın olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalar dünya nüfusunun % 4,5'inin etkilenmiş olduğunu göstermektedir (1).

Talasemiler, hemoglobinopatilerin bir alt grubudur. Hemoglobinin yapısını oluşturan globin zincirlerinin yapımının bozukluğuyla gelişir. İsimlendirme yapımı bozulan zincirin adına göre yapılır; α genlerinden bir, iki, üç veya dört tanesinde delesyon olması durumunda alfa globin zincir yapımı bozulur ve alfa talasemiler gelişir, bir veya iki β geninde noktasal mutasyonlar olması durumunda ise beta globin zincirinin yapımı bozulur ve beta talasemiler gelişir (2).

Talaseminin patofizyolojisinde α ve β globin zincirlerinin bozulan dengesi rol oynar. Hemoglobin molekülünde, normalde birebir eşleşen globin zincirleri, yapımı bozulan zincirinin oranının azalmasıyla orantısız/dengesiz hale gelir. Görece fazla olan zincirler eritrosit içinde çöker ve hücre yıkımını başlatır. Beta talasemide görülen belirgin hemolizin nedeni eritrositlerdeki α globin zincirinin birikmesidir. Biriken eşleşmemiş globin zincirleri reaktif oksijen türleri (ROS, reactive oxygen species) gelişimine yol açarak oksidatif stresi başlatır. Geriye dönüşümsüz membran hasarı, hücre içi yüksek hemoglobin dışı demir ve yüksek plazma demiri oksidatif stresin kaynağıdır (3). Hücre içinde fazla miktarda

oksidatif stres, antioksidan sistemler (ROS sistemine karşı savunma sistemleri) tarafından nötralize edilemezse DNA hasarına (genotoksik etkiye) yol açar. Başlıca antioksidan sistemler Vitamin E ve Vitamin C'dir. Bu vitaminlerin ve benzer etkisi olan çinkonun talasemilerde düşük olduğu gösterilmiştir (4, 5). Taşıyıcılarda görülen folat eksikliği de DNA tamirini engeller ve DNA hasarına katkı verir (6, 7). Beta talaseminin ağır formu olan majör formunda artmış oksidatif stres ve DNA hasarı pek çok çalışmayla kanıtlanmıştır (8-11). Bazı çalışmalarda talaseminin en hafif klinik formu olan ve semptomsuz olduğu bilinen talasemi taşıyıcılarında da DNA hasarı olabileceğini gösteren bulgular elde edilmiştir ancak bu çalışmalar çok az sayıda olup çocuk hastalarda hiç yapılmamıştır (12, 13).

Bu çalışmanın ana amacı, talasemi taşıyıcısı olan çocuklarda artan oksidatif stres ve buna bağlı DNA hasarı olup olmadığını saptamaktır. Çalışmamızda talasemi taşıyıcısı çocuklarda ilk kez olarak genotoksik etki incelenecektir ve çoğunluğunu bu çocukların kardeşlerinin oluşturduğu sağlıklı, anemik olmayan kontrol grubu ile genotoksik hasar yönünden fark olup olmadığı araştırılacaktır. Fark bulunması durumunda, toplumun bilgilendirilmesi ve talasemi taşıyıcısı olan çocukların günlük yaşamlarının düzenlenmesi ve ileride meslek seçimi yönünden ailelere danışmanlık verilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım

Talasemi, hemoglobin yapısında yer alan globin zincirlerinden bir veya daha fazlasının yapımının azalması veya hiç olmamasına bağılı olarak gelişen ve genellikle hipokrom mikrositer anemiyle karakterize olan herediter bir grup hastalıktır. Talasemi, ilk kez Detroitli bir çocuk hekimi olan Thomas Cooley tarafından 1925 yılında derin anemi, dalak büyümesi, gelişme geriliğı ve kemik deformiteleri gibi bulguları olan çocuklarda ayrı bir hastalık olarak tanımlanmıştır (14). George Whipple ve Lesley Bradford 1936'da inceledikleri vakaların Akdeniz civarındaki ülkelerden geldiğini saptadıkları hastalığa Yunanca deniz anemisi anlamına gelen "Thalassaemia" adını vermişlerdir (15). Türkiye'de ilk iki talasemi vakası Ord. Prof. Dr. Sedat Tavat ve Prof. Erich Frank tarafından 1940 yılında eşzamanlı olarak bildirilmiştir (16).

2.2. Epidemiyoloji

Kalıtsal hemoglobin hastalıkları tüm dünyada en sık görülen tek gen hastalıklarıdır. Dünya nüfusunun yaklaşık %7'si kalıtsal hemoglobin hastalıkları taşıyıcısıdır. Her yıl 300.000-400.000 yenidoğan bu hastalıkların ciddi formlarına sahip olarak doğmaktadır. İki geniş gruba ayrılır: yapısal hemoglobin varyantları (anormal hemoglobinler) ve talasemiler (17).

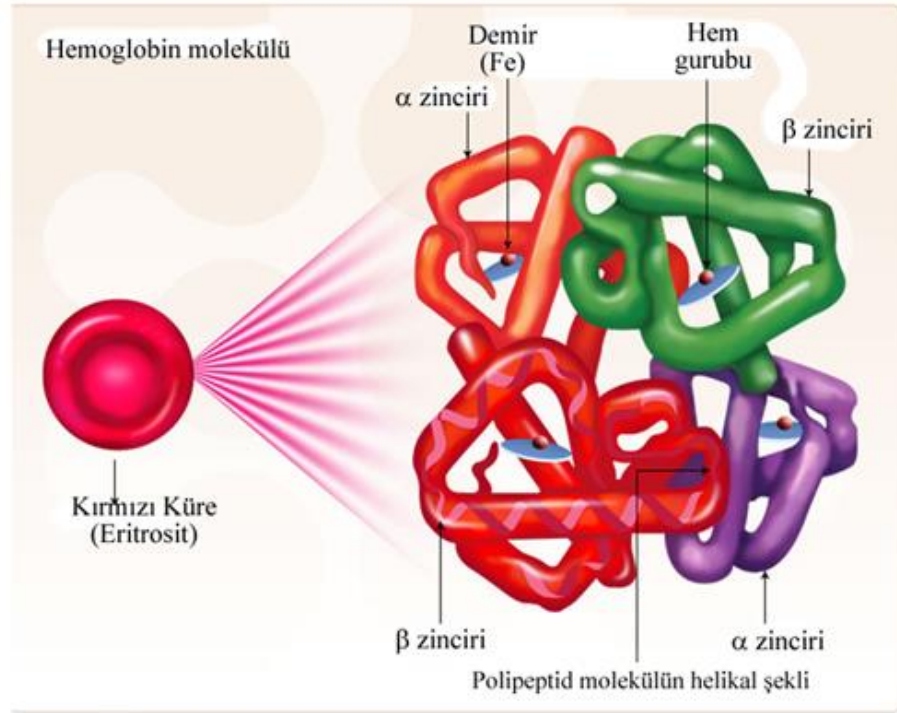
Anormal hemoglobinler globin zincir yapısındaki değişiklikler nedeniyle oluşurken, talasemiler globin gen ekspresyonu değişikliklerinden kaynaklanır (18).

Talasemiler tüm dünya nüfusunun %3'ünü etkilemekle beraber, özellikle Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz Havzası, Ortadoğu, Hindistan, Güneydoęu Asya ve Tropikal Afrika'da endemik olarak görülür. Birçok farklı mutant alel, heterozigotların bir ölçüde *falciparum* malaryanın etkilerinden korunmuş olmasından dolayı, dünyanın tropikal ve subtropikal bölgelerinde seçilerek çok yüksek sıklıklara ulaşmıştır. Son yıllarda Avrupa ve Amerika kıtalarında da yoğun göçler nedeniyle görülme sıklığı artmıştır (1, 18, 19).

Türkiye'de yaklaşık 1.500.000 beta talasemi taşıyıcı ve 5500 civarında beta talasemi hastası vardır. Talasemi taşıyıcılığı özellikle Çukurova, Akdeniz kıyı şeridi, Ege ve Marmara bölgelerinde çok sık görülmektedir (20). Bu nedenle Hemoglobinopati Önleme Programı uygulaması öncelikle bu bölgelerden başlamıştır. Sağlık Bakanlığı ve Türk Ulusal Hemoglobinopati Konseyi'nin ortak çalışması sonucunda 1995-2000 yılları arasında Akdeniz Bölgesi kıyı şehirleri, Ege ve Marmara bölgelerinin batı şehirlerinden 16 şehirde tarama yapıldı. Toplam 377,339 sağlıklı birey tarandı, beta talasemi taşıyıcılığı %4,3 olarak bulundu. En yüksek taşıyıcılık Antalya bölgesinde ve %13,1 olarak saptandı (21).

2.3. Fizyopatoloji

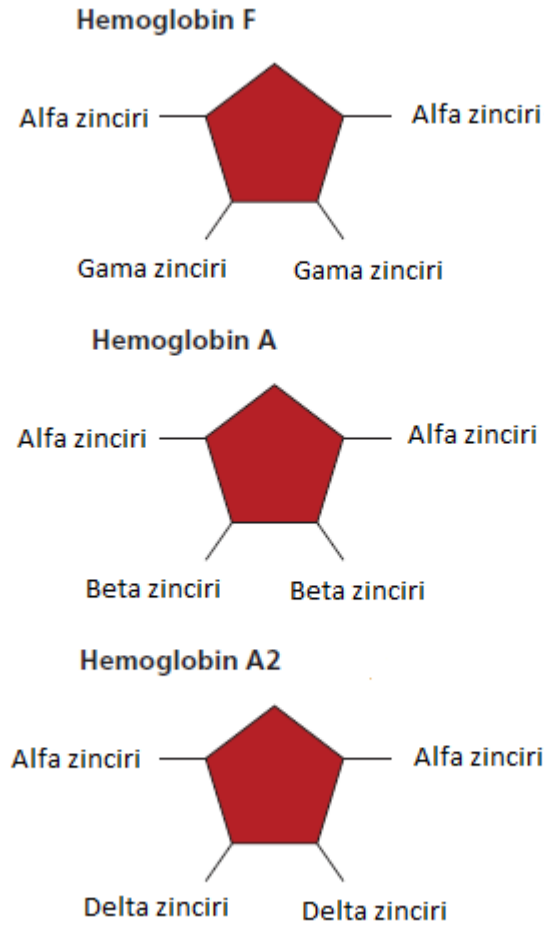
Talasemi sendromları değişik derecelerde inefektif hematopoez ve artmış hemolizle karakterizedir. Klinik sendromlar, hangi gen mutasyona uğramışsa onunla ifade edilir (α , β , $\delta\beta$ gibi). Talasemiler genel olarak alfa ve beta talasemi olarak ikiye ayrılır. Beta talasemiler, 11. kromozomda eksprese edilen iki beta globin geninden bir veya ikisinde oluşan nokta mutasyonları nedeniyle görülür. 16. kromozomda eksprese edilen alfa talasemiler, dört adet alfa globin geninden bir veya birkaçında delesyon olması nedeniyle gelişir (22). Eksik olan globin, hemoglobin tetramerlerinin yapımını bozar, hipokromi ve mikrositoza neden olur. Etkilenmeyen globinlerin yapımı normal hızda olduğundan alfa veya beta subünitlerinin dengesiz birikimi oluşur. Hemoglobin molekülünde normalde birebir olan alfa ve beta globin zincir oranı yapımı bozulan globin zincirinin aleyhine olarak bozular (Şekil 1). Globin sentezinin etkilenme derecesine bağlı olarak, klinik şiddet geniş değişkenlik gösterir (23, 24).



Şekil 1. Hemoglobin Molekülünün Yapısı

2.3.1. Globin Zincir Yapımı

Embriyo, fetüs ve erişkin dönemlerinde oksijen taşınmasında görevli farklı hemoglobinler sentezlenir. Bütün hemoglobinlerin benzer tetramerik yapısı vardır; iki farklı globin zinciri ve bunlara bağlı hem molekülü içerirler. Erişkin ve fetüs hemoglobinlerinde α zincirleri β zincirleriyle (HbA, $\alpha_2\beta_2$), δ zincirleriyle (HbA₂, $\alpha_2\delta_2$) ve γ zincirleriyle (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) kombine edilmiştir (25) (Şekil 2).

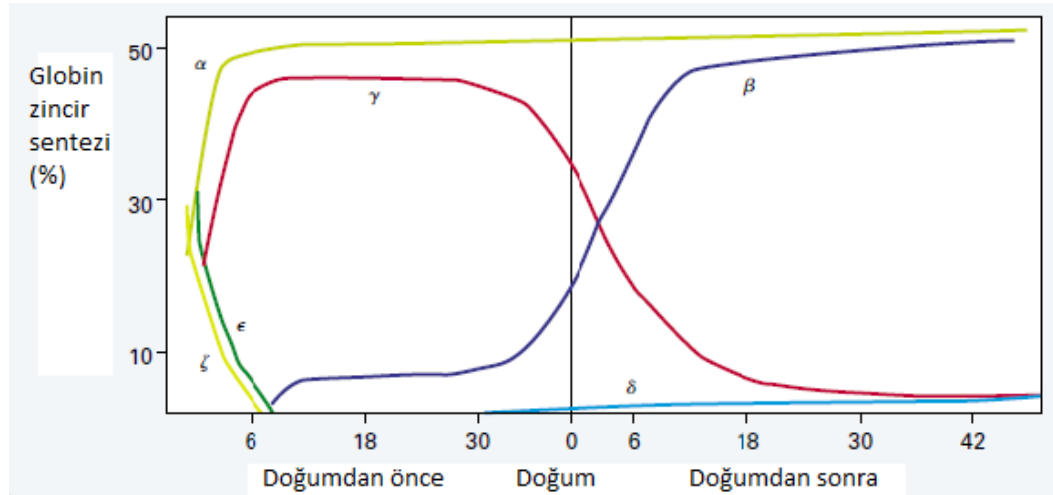


Şekil 2. Hemoglobin Tipleri

Embriyonik yaşamda α zincirleri ζ zincirleri olarak adlandırılır ve γ zincirleriyle kombine edilerek Hb Portland, ε zincirleriyle kombine edilerek Hb Gower I oluşur. α zincirleri, ε zincirleriyle kombine edilirse Hb Gower II oluşur (26).

Embriyonik globin sentezi vitellus kesesinde gebeliğin 3. haftasından 8. haftasına kadar olan dönemde oluşur, ancak yaklaşık 5. haftada hematopoezin başlıca yeri olan vitellus kesesinden fetal karaciğere doğru hareket etmeye başlar. Gebeliğin erken devrelerinde Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$), Hb Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$) ve Hb Gower

II ($\alpha_2\epsilon_2$), dominant tespit edilen embriyonik hemoglobinlerdir. Ancak, çok az miktarlarda HbF ve HbA da vardır (27). Gebeliğin 10-11. haftalarında eritropoezin karaciğer ve dalakta başlaması ile embriyonik hemoglobinler azalarak kaybolur ve HbF ($\alpha_2\gamma_2$) yapımı başlar. HbF ($\alpha_2\gamma_2$) fetal yaşam boyunca çoğunluk teşkil eden hemoglobindir. Doğumda toplam hemoglobinin %70'ini, erişkin yaşamda ise toplam hemoglobinin %1'inden azını oluşturur. Bir yaşından itibaren hemoglobin kompozisyonu yaklaşık olarak HbA % 97,5, HbA2 % 2 ve HbF % 0,5 oranlarında meydana gelir (28). β zincirleri erken gebelikte tespit edilmesine rağmen, sentezleri sadece doğuma yakın belirgin hale gelir ve 3 aylıktan itibaren neredeyse tüm mevcut hemoglobin yetişkin tip HbA'dır. δ zincirinin sentezi doğumdan sonra da devam eder, ancak HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) normal yetişkin hemoglobinin yaklaşık % 2'sinden fazlasını oluşturmaz (27, 29) (Şekil 3).



Şekil 3. Hemoglobinin Normal Gelişimsel Değişimi

2.3.2. Talasemi Tipleri

2.3.2.1. Beta Talasemi

β globin geninde beta talasemiye neden olan iki yüzden fazla mutasyon saptanmıştır. Bunların çoğu nokta mutasyonlarıdır ve az sayıda birkaç bazın eklenmesi veya delesyonu gözlenmiştir (30).

Bazı mutasyonlar β globin geninin ekspresyonunu tamamen yok etmekte ve β^0 talasemi oluşumuna neden olmaktadır. Bazıları ise, sadece β globin zincir sentezini azaltmakta ve bunun sonucunda β^+ talasemi kliniği oluşmaktadır (22, 31).

α /non- α globin sentez oranının dengesizliği beta talasemide hastalığın şiddetini belirlemedeki temel faktördür (32, 33). Hemoglobinin yapısındaki β globin zincirinin azalmış veya bozulmuş biyosentezi, yapımı normal hızda olan ve tutulmayan α globin zincirlerinin hücre içinde dengesiz birikimine yol açar (34, 35). Serbest α zincirleri normal tetramerler oluşturamaz, bunun yerine eritrosit prekürsörlerinde inklüzyon cisimcikleri yapan presipitatlar oluşturur. Bu inklüzyonlar, inefektif eritropoezle karakterize beta talasemide eritroid prekürsörlerin intramedüller yıkımından sorumludur. Beta globin genlerinin sentezinin bozulması nedeniyle, γ globin zincirlerinin artan miktarlardaki üretimine bağlı olarak Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) sentezi artacak ve δ globin zincirlerinin artan miktarda üretilmesine bağlı olarak HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) düzeyi yükselecektir. Beta talasemide aneminin primer ve en önemli neden inefektif eritropoezdir. Dolaşımdaki α zincir inklüzyonlarını içeren olgun eritrositlerin dalak tarafından yıkımına bağlı olarak gelişen hemoliz de bu durumu ağırlaştırmaktadır (1, 36).

Beta talaseminin en ağır formu olan talasemi majör, klinik olarak tranfüzyona bağımlılık, derin anemi ve demir fazlalığına bağlı ağır komplikasyonlarla karakterizedir. Talasemi intermedia; mutasyonların ağırlığına göre klinik gösterir. Genellikle düzenli transfüzyon tedavisi gerekmez ve hastalar erişkin yaşa kadar ulaşırlar. Talasemi majör ve talasemi intermedialı olgularda globin genlerinin homozigot veya bileşik heterozigot, talasemi minör olgularda ise heterozigot olarak etkilendiği gösterilmiştir (37, 38). Talasemi minör; hafif anemi ile ya da hiç anemi olmaksızın eritrosit morfolojisinin göze çarpan anormallikleri ile ilişkili asemptomatik bir klinik durumdur. Sessiz taşıyıcılık; talasemi geninin zorunlu taşıyıcısı oldukları halde anemisi ve anormal kırmızı hücre morfolojisi olmayan bir durumdur (38).

2.3.2.1.1. Sessiz Beta Talasemi

Alta yatan moleküler defektler β globin sentezinde sadece çok az bir oranda azalmaya neden olur. Sessiz taşıyıcı fenotipi β globin genindeki iki nokta mutasyonu ile kalıtılmaktadır. En sık -101 promotor mutasyonu görülür. Karakteristik olarak sessiz taşıyıcılarda HbA₂ seviyeleri normal seviyelerdedir. Homozigot sessiz β talasemi geni taşıyan bazı hastalar tanımlanmıştır. Anemi orta düzeyde olup (Hb:10-11g/dl), nadiren transfüzyon gerekir. Hepatosplenomegali olabilir. HbF seviyeleri %10-15 arasındadır ve HbA₂ seviyeleri talasemi minör olan kişilerde görülen normal aralıktan daha yüksektir (37, 39).

2.3.2.1.2. Talasemi Minör

Beta talasemi minör; hafif anemi, mikrositoz ve normal fizik muayene bulgularına sahip bir klinikle karşımıza çıkar. Genellikle tesadüfen ya da diğer aile bireyleri incelenirken tanı konur. Hastaların klinik olarak herhangi bir bulgularının olmaması nedeniyle talasemi minör uzun yıllar boyunca “hastalık” olarak adlandırılmamıştır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarla hem talaseminin bazı klinik durumlarla ilişkisi olabileceği gösterilmiştir (40-42), hem de talasemi majör ve intermedialarda kanıtlanmış olan DNA hasarı ve artmış oksidatif stresin talasemi minörlerde de var olduğu gösterilmiştir (10-13, 40-43).

Beta talasemi minör 4 farklı tipte olabilir (37, 39):

1. Yüksek A_2 ile olan beta talasemi minör

- En fazla görülen tiptir
- HbA_2 %3,5-8, HbF %1-5'dir
- β^+ veya β^0 mutasyonlarla olan heterozigotlar farklıdır
- β^+ taşıyıcılarda MCV ve MCH daha yüksektir. Homozigot çocuklarında transfüzyona bağımlı anemi veya talasemi intermedia fenotipi olabilir.

2. Yüksek A_2 ve yüksek F ile olan beta talasemi minör

- Farklı bir varyanttır. Hem HbA_2 hem de HbF (%5-20) yüksektir. β gen delesyonu varken, δ ve γ genleri sağlamdır.

3. Normal A_2 ile olan beta talasemi minör

- Sessiz taşıyıcılardan ayrılmalıdır. Sessiz taşıyıcılardan farkı, hipokrom mikrositer anemi oluşudur (HbA_2 seviyesi sınırda saptanır).
- Hem β hem δ geni hasarlıdır (aynı kromozom veya karşı sağlam kromozomda).
- Ebeveynlerden biri bu tip, diğeri klasik taşıyıcı ise homozigot çocukta ağır klinik tablo görülür.

4. $\delta\beta$ talasemi minör

- Heterozigot bireylerdeki bu mutasyonlarda, yüksek HbF (%5-%15) ve düşük HbA_2 seviyeleri vardır. Bu fenotip, sıklıkla δ ve β globin genlerin kodlayan bölgelerin tamamının veya çok büyük bir kısmının kaybolmasıyla ortaya çıkmaktadır.

Talasemi minör hematolojik özellikleriyle diğer anemilerden ayırt edilmelidir:

- Tam kan sayımında hafif eritrositoz (>5 milyon/mm³), mikrositoz (Ortalama Eritrosit Hacmi <80fl), hafif anemi (9-11 gr/dl) vardır.

- Periferik kan yaymasında hipokromi, mikrositoz ve target hücreleri görülür.
- Hemoglobin elektroforezinde HbA₂, HbF veya her ikisi birden artmıştır. HbA₂ > 3,5'dir; Hb F ise %50 olguda yüksek bulunur.
- Kemik iliğinde hafif-orta derecede eritroid hiperplazi bulunur (44).

Talasemi minör, en çok demir eksikliği anemisiyle karıştırılır. Demir eksikliğinde eritrosit sayısı azalmış veya normaldir, talasemi minörde artmıştır. Her ikisinde de MCV azalmıştır. RDW talasemi minörde normalken, demir eksikliğinde artmıştır (45). Talasemi minör bireylerde de demir eksikliği anemisi olabilir, bu durumda HbA₂ normal ya da düşük bulunabilir. Böyle bir durumda demir eksikliği tedavi edildikten sonra hemoglobin elektroforezi tekrarlanmalıdır (46).

2.3.2.1.3. Talasemi İntermedia

Homozigot beta talasemilerin yaklaşık %10 kadarında klinik seyir beta talasemi majör'den daha hafif ve talasemi taşıyıcılarından daha ağırdır. Beta talasemi intermedia adı verilen bu grupta periferik kan bulguları ve eritrosit indeksleri beta talasemi majörde olduğu gibidir (46). Hb elektroforezinde HbA, HbF ve HbA₂ seviyeleri değişkenlik göstermektedir. Genellikle 2 yaşından sonra tanı alırlar, klinik olarak aneminin şiddeti daha ılımlıdır (Hb7-7,5/dl ve üzerinde). Klinik, hematolojik ve moleküler çalışmalar ile talasemi majör ve intermedia ayırıcı tanısı başlangıçta yapılmalı, hasta gereksiz transfüzyon ve

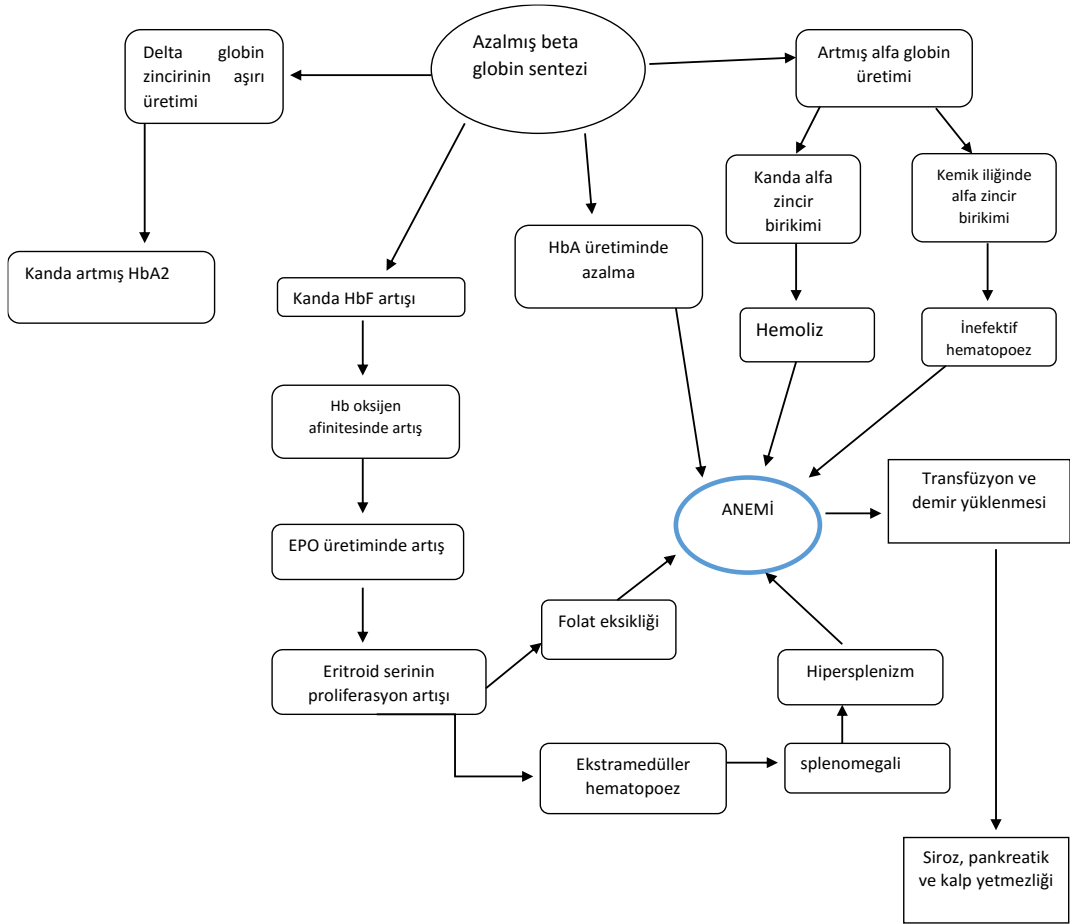
komplifikasyonlarından böylelikle korunmalıdır. Beta talasemi intermedialı olgular genelde düzenli transfüzyon gereksinimi olmaksızın normal büyüme ve gelişmelerini sürdürebilirler (35).

Bazı beta talasemi intermedialı olgular ise kardiyomegali, osteoporoz, kırık, artrit, splenomegali ve hipersplenizm gibi komplikasyonlara maruz kalabilmektedir. Yaşamın ikinci on yılında safra taşları, geç adölesan ve daha sonraki dönemlerde transfüzyon almayan hastalarda bacak ülserleri gözlenebilmektedir (32).

Aneminin derecesi hipersplenizm, enfeksiyon varlığı veya folat eksikliği gibi nedenlerle ağırlaşmakta ve çok değişkenlik gösterebilmektedir. Parvovirus B19 veya diğer enfeksiyonlara bağlı aplastik krizler gelişebilmekte ve buna bağlı olarak hayatı tehdit eden anemi görülebilmektedir. Daha hafif klinik gidişe karşın, bu olgularda da hepatosplenomegali, kemik değişiklikleri, intestinal demir emiliminin yüksek oluşu nedeniyle aşırı demir yükü ve ilişkili organ disfonksiyonları oluşabilir. Sekonder hipersplenizm gözlenen hastalarda splenektomi sonrasında anemilerin derecesinde düzelme olup kan transfüzyon gereksinimleri ortadan kalkabilmektedir. Bu komplikasyonlar talasemi majördeki gibi hemoglobin seviyesini normal düzeylerde idame ettirip eritropoezi süprese edecek şekilde transfüzyon programları ile önlenmektedir (35, 46, 47).

2.3.2.1.4. Talasemi Majör

Talasemi majörde görülen klinik bulgular; kronik anemi, kemik iliğinde genişleme, demir birikimi ve kronik hemoliz ile ilişkilidir. Doğumdan 3-6 ay sonra, derin anemi, solukluk, halsizlik, irritabilite, beslenememe, hepatosplenomegali, büyümede duraklama ilk bulgulardır. Hemogloblin düzeyleri çoğunda ilk altı ay ile bir yıl arasında transfüzyon gerektirecek düzeylere iner. Uygun transfüzyon yapılmayan hastalarda, kemik iliğinin genişlemesi sonucu, tipik talasemik yüz görünümü (burun kökü basıklığı, maksilla ve alın kemiklerinin çıkıklığı) ortaya çıkar. Vertebra ve uzun kemiklerde kemik iliği genişlemesine bağlı incelmeden dolayı kortekste spontan kırıklar olabilir. İnefektif eritropoez, hipogonadizm, hipoparatiroidi, hipotiroidi, folat eksikliği, demir yükü, yoğun demir şelasyon tedavileri osteoporoza yol açan nedenler arasında sayılabilir. Demir aşırı yükü, gastrointestinal sistemden demir fazla emilimi ve eritrosit transfüzyonları ile oluşur (Şekil 4). Yetersiz şelasyon alan olgularda, genellikle ilk on yıldan sonra, kardiyak fonksiyon bozukluğu, karaciğer yetmezliği (fibroz, siroz) ve endokrin bozukluklar (diyabet, hipotiroidi, hipoparatiroidi, büyüme ve gelişme geriliği) görülür. Renal tubuler dilatasyona bağlı böbreklerde büyüme, orta derecede proteinüri ve mikroskopik hematüri ve interstisyel nefrit demir depolanmasına bağlı olarak meydana gelmektedir. Büyük yaşlardaki hastalarda safra taşları, kolesistit ve diyare oluşabilir. Ölüm yaşamın 2. ve 3. on yıllarında konjestif kalp yetmezliği ve kardiak aritmilerle beraber olup, kalpte demir birikimi halen ölümlerin %70'inden sorumludur (22, 31, 32, 46).



Şekil 4. Beta Talasemi Patofizyolojisi

2.3.2.2. Alfa Talasemi

Alfa talasemi alfa globin zincirlerinin eksikliği ya da yokluğu nedeniyle oluşur. Patofizyolojiye yol açan, görece fazla miktarda beta globin zincirlerinin eritrositlerde birikimidir. Alfa globin zinciri üretimi, 16. kromozomda yer alan dört gen ile kontrol edilir. Yetersiz üretim, bu genlerin bir ya da birkaçındaki delesyon nedeniyle görülür. Tek gen delesyonu sessiz alfa talasemi taşıyıcılığına neden olur ve normal hematolojik bulgularla asemptomatik olarak seyreder. İki gen delesyonu mikrositoz ve genellikle anemiye sebep olarak alfa talasemi minöre yol açar. Üç

gen delesyonu hemoglobin H (alfa talasemi intermedia) hastalığına neden olur. Bu hastalıkta belirgin olarak globin zinciri üretimi azalır, mikrositik anemi, hemoliz ve splenomegali gelişir. Dört genin tamamının delesyonu, hemoglobin Bart hastalığına neden olur. Hb Bart hastalığı yaşamla bağdaşmaz. İntrauterin veya postpartum ölümle karakterize hidrops fetalise neden olur (25, 31).

2.3.3. Oksidatif Stres

2.3.3.1. Serbest Radikaller

Oksijen bütün canlılar için vazgeçilmez bir element olup hidrojen, karbon, nitrojen ve kükürt ile birlikte organik moleküllerin temel yapısal atomlarını oluşturur. Organik moleküllerdeki yapısal görevinin yanı sıra, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle oksijen hayati bir öneme sahiptir. Bilinen bütün canlı türleri, organik moleküllerin içindeki şekli ile oksijene gereksinim duysalar da, serbest formdaki moleküler oksijen her canlı türü için aynı anlamı ifade etmez (48).

Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda çiftlenmemiş tek elektron bölümlerine verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen partiküller (ROP)" denmektedir (49, 50). Reaktif oksijen partikülleri normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır ve vücuda yoğun bir zarar verme potansiyeline sahiptir (51-

53). Reaktif oksijen partikülleri, hücrelerin protein, DNA, karbonhidrat, lipid, enzim ve diğer molekül grupları ile reaksiyona girerek onların metabolizmalarını etkiler (54, 55).

Lipidlerin hücre zarının akışkanlığını ve geçirgenliğini etkileyerek hücre bütünlüğünü bozar. Proteinlerin, aminoasidlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu ve agregasyonu, proteinlerde fonksiyon bozukluğu ve proteolize neden olur. Karbonhidratların ve monosakkaridlerin oksidasyonuna neden olur. Sonuç olarak, DNA'da genetik değişikliğe ve hücre ölümüne yol açar (56, 57).

Organizmada pek çok türde reaktif oksijen partikülleri oluşabilir. Tablo 1'de reaktif oksijen partiküllerinin tipleri (58) ve Tablo 2'de reaktif oksijen partiküllerinin kaynakları görülmektedir (59).

Tablo 1. Reaktif Oksijen Partikülleri

Reaktif Oksijen Partikülleri
1. Radikaller: Süperoksit radikal Hidroksil radikal Alfoksil radikal Peroksil radikal
2. Radikal olmayanlar: Hidrojen peroksit Lipid hidroperoksit Hipoklorik asit (HOCl)
3. Singlet oksijen

Tablo 2. Reaktif Oksijen Partiküllerinin Kaynakları

<p>I - Normal biyolojik işlemler</p> <p>1 - Oksijenli solunum</p> <p>2 - Katabolik ve anabolik işlemler</p>
<p>II - Oksidatif stres yapıcı durumlar</p> <p>1 – İskemi, hemoraji, travma, radyoaktivite, intoksikasyon</p> <p>2 - Ksenobiotik maddelerin etkisi (inhale edilenler, alışkanlık yapan maddeler, ilaçlar)</p> <p>3 - Oksidan enzimler (Ksantin oksidaz, Siklooksigenaz, Triptofan dioksigenaz vb.)</p> <p>4 - Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu</p> <p>5 - Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eozinofil, endotelial hücreler)</p> <p>6 - Uzun süreli metabolik hastalıklar</p> <p>7 - Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara</p>
<p>III - Yaşlanma süreci</p>

Reaktif oksijen partiküllerinin içinde en önemlileri süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleridir (60).

2.3.3.1.1. Süperoksit Radikali

Canlılarda oluştuğu ilk gösterilen radikal olan süperoksit, moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallere otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir (48, 49). Süperoksit radikalının kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (49, 52).

Süperoksit, metal iyonlarını indirgeyerek bağlı oldukları proteinlerden salınımına neden olur, kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozar ve metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikali yapım tepkimelerini hızlandırır. Diğer radikallere göre daha az reaktif olsa da, süperoksit indirgenmiş nükleotidleri, bazı amino asitleri ve antioksidan bileşikleri (glutatyon, askorbik asit, tokoferol) oksitler (48).

2.3.3.1.2. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit, süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton ile birleşmesi sonucu meydana gelir. Hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin dismutasyonu ile olur (49, 52). Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak hidrojen peroksit radikalini oluşturur. Hidrojen peroksit de hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir ve zarsal antioksidanları (tokoferol) oksitleyebilir (48, 60).

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe^{+2} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalinin varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturur (61).

2.3.3.1.3. Hidroksil Radikali

En tehlikeli reaktif oksijen radikalidir. Normal biyolojik fonksiyonlarda da kullanılmaktadır. Fagositoz ve çeşitli enzimatik katalizlerde üretilmektedir.

Hidroksil radikali biyolojik makromolekülerin bütün türlerine atak yaparak, DNA'nın pürin ve pirimidin bazları ile etkileşebilmekte, DNA sarmalında kırılmalara ve enzim inaktivasyonuna neden olabilmektedir. Lipid peroksidasyonu, hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasardır (49, 58, 61).

2.3.3.2. Antioksidan Savunma

Reaktif oksijen partiküllerinin etkilerinin dengede tutulması için bir karşıt sistem mevcut olup bu sisteme "antioksidan sistem" denir (53).

Antioksidanlar 4 ayrı şekilde etki ederler:

- 1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme *toplayıcı* etkidir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.
- 2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme *bastırıcı* etkidir. Vitaminler ve flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller *zincir kırıcı* etki gösterirler.

4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması *onarıcı* etkidir (49, 62).

Antioksidanları endojen ve ekzojen antioksidanlar olarak sınıflayabiliriz (49, 63).

Endojen antioksidanlar: Enzim ve enzim olmayanlar olarak iki gruptur (Tablo 3).

Tablo 3. Endojen Antioksidanlar

Enzim olan endojen antioksidanlar	Enzim olmayan endojen antioksidanlar
Süperoksit dismutaz	Melatonin
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Seruloplazmin
Glutasyon S-Transferazlar (GST)	Transferrin
Katalaz (CAT)	Miyoglobin
Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi	Hemoglobin
Hidroperoksidaz	Ferritin
	Bilirubin
	Glutasyon
	Sistein
	Metiyonin
	Ürat
	Laktoferrin
	Albümin

Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. SOD'ın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler öldürülmesinde de rol oynar (51).

Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Glutasyon peroksidazın, fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte glutasyon peroksidaz, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. Glutasyon peroksidaz, eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır (52, 63).

Ekzojen Antioksidanlar: Vitaminler ve ilaçlar olarak iki gruptur (Tablo 4).

Tablo 4. Eksojen Antioksidanlar

Vitamin eksojen antioksidanlar	İlaç eksojen antioksidanlar
α-tokoferol (vitamin E)	Ksantin oksidaz inhibitörleri
β-karoten	NADPH oksidaz inhibitörleri
Askorbik asit (vitamin C)	Rekombinant süperoksit dismutaz
Folik asit (folat).	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar
	Demir redoks döngüsü inhibitörleri
	Nötrofil adezyon inhibitörleri
	Barbitüratlar
	Demir şelatörleri

Vitamin E (α tokoferol), antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferoldur. selüler ve organel zarlar arasına girer ve serbest radikalleri daha az reaktif bileşiklere çevirerek zarları lipid peroksidasyona karşı korur (64, 65). Vitamin E süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger (63).

Vitamin C (askorbik asit), süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. Vitamin C'nin antioksidan etkisinin yanında prooksidan etkisi de söz konusudur. Çünkü vitamin C, Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyen süperoksit dışındaki tek hücrel ajandır. Bu yolla askorbik asit proteine bağlı ferrik demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek Fenton reaksiyonunda H_2O_2 ile etkileşmeye uygun olan ferröz demire dönüştürür. Bu prooksidan etkinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, daha yüksek konsantrasyonlarda ise güçlü bir antioksidan olarak etki gösterdiği belirtilmiştir (56, 66).

2.3.3.3. Oksidatif Stres

Oksijen radikallerininin yapımının fazla olduğu durumlarda oksidan ve antioksidan sistemin dengesi bozulur ve "oksidatif stres" ortaya çıkar. Oksidatif stres pek çok hastalıkla ilişkilidir (48, 58). Pek çok çalışmada kanser, ateroskleroz, kronik böbrek yetmezliği, diyabet, pankreatit, inflamatuvar barsak hastalıkları, demans, Alzheimer hastalığı ve katarakt gibi tüm organ sistemlerini ilgilendiren hastalıklarda oksidatif stresin rolü saptanmıştır (67-74).

Oksidatif stres pek çok yöntemle ölçülebilir. Bunlardan bazıları malondialdehid (MDA), MDA/LDL kolesterol oranı, thiobarbiturik asit reaktif parçacıkları ve total oksidan kapasitedir (75-77).

2.3.3.4. Talasemi ve Oksidatif Stres

Talasemi hastalarında artmış oksidatif stres, pek çok çalışmayla kanıtlanmıştır. Eritrosit tranfüzyonları nedeniyle artmış demir yüklenmesi ve globin zincirleri dengesizliği nedeniyle artmış serbest radikaller, lipid peroksidasyonu ve bunlara bağlı olarak oksidatif stres görülmektedir (8-10).

β talasemide, eşleşmemiş fazla α globin zincirleri, non-hemoglobin demiri ve hücre içinde hemoglobinin düşük oluşu bu oksidatif stresi kolaylaştıran faktörlerdendir. Özellikle serbest α globin subünitleri, serbest radikallerin ortaya çıkmasına neden olur (61, 78). Membran iskeletinde bozulma, rijiditede artma, membran lipidlerinde peroksidasyon ve antijenik değişme ile eritrositlerde erken yaşlanma gibi sebeplerle inefektif hematopoeze katkıda bulunmaktadır (79).

Talasemide oksidatif mekanizmalara karşı çalışması gereken antioksidan savunma mekanizmalarında da zayıflık vardır. Özellikle vitamin C ve vitamin E düzeyleri düşük saptanır (10, 80, 81).

2.3.4. Genotoksisite ve DNA Hasarı

Genetik bilginin nesilden nesile sağlıklı olarak aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemlidir. DNA'nın fonksiyonu, bazlar üzerindeki polar gruplara bağlıdır. Bu gruplar arasında spesifik olarak oluşan hidrojen bağları çift sarmal DNA'yı oluşturur. DNA yapısındaki bozulmalar, yanlış eşleşmelere, mutasyonlara, replikasyonun bloke olmasına ve hücre ölümüne yol açmaktadır. DNA hasarı düşük seviyede ise DNA onarım mekanizmaları tarafından verimli bir şekilde onarılır. Ağır hasarlar apoptotik mekanizmaları uyararak hücre ölümüne sebep olur. Orta dereceli hasarlar çoğunlukla mutasyonla sonuçlanırlar. DNA hasarı, kendiliğinden veya çevresel faktörlerin etkisiyle oluşmaktadır (55, 82).

Genotoksisite; çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA kırıklarını, gen mutasyonlarını, kromozom anormallikleri, klastojenite ve anöploidide gibi hasarların bütünüdür. Genotoksisite DNA yapısında bozulmalara neden olarak, kanserin oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Genotoksisiteye neden olan pek çok farklı durum bilinmektedir. Örneğin radyasyon, sigara içimi veya sigara dumanına maruz kalmak, viral enfeksiyonlar, vitamin eksiklikleri ve bazı kalıtsal hastalıklar (ataksi telenjektazi, Bloom sendromu vb.) bunlardan bazılarıdır (83-85).

İç ve dış etkenlerle oluşan genotoksisitenin DNA'yı ne kadar etkilediğini belirlemek amacıyla çeşitli testler ve farklı yöntemler kullanılmaktadır (86).

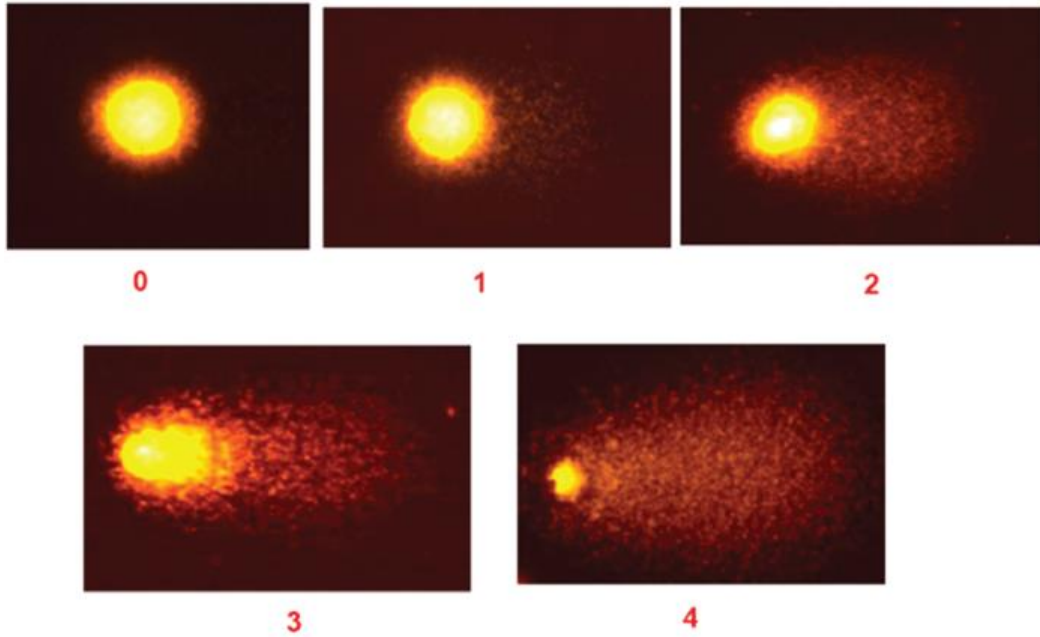
Bu yöntemlerden en sık kullanılanlar kromozomal anormallikleri testi, mikroçekirdek testi, kardeş kromatid değişim testi ve “comet assay” testidir (87-91).

Kromozomal anormallikler testi, periferel lenfositlerde bulunan kromozomlarda saptanan yapısal hasarların sıklığını saptar. Özellikle mesleki ve çevresel kanserojenlerin genotoksik erken etkilerini inceler. (92) Kardeş kromatid değişim testi, mutajenite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılan kardeş kromatidleri farklı boyayarak aralarında parça değişiminin olduğunu belirlemeye dayanan bir testtir (83).

Mikroçekirdek testi, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan mikroçekirdeklerin ölçümünü yapan bir testtir. Mikroçekirdek sayısındaki artış, mutajenite ile orantılıdır. Anoploidi ve klastojeniteyi hızlı ve kolay bir şekilde gösterilmesini sağlar (93).

Comet assay yöntemi, tek hücre jel elektroforezi olarak da adlandırılır. DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan bu yöntemin, en önemli avantajları, çok düşük düzeydeki DNA hasarlarını bile ayırt edebilmesi, çeşitli doku ve hücre tiplerinde uygulanabiliyor olması, hızlı sonuç elde edilebilmesi ve hücrelerdeki DNA kırıklarının görsel olarak belirlenebilmesidir. Comet assay yöntemi, alkali pH’da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüke sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle göre, hücreler veya çekirdekçikler, daha sonra lizis ve alkali elektroforez tamponunda yürütme ve nötralizasyon işlemlerinden geçirilerek floresan boya ile

boyanmaktadır. Floresan mikroskop ile incelenen preparatlarda zarar görmemiş DNA'lar comet (kuyruk) oluşturmazken, hasar görmüş DNA moleküllerindeki fragmanlar farklı moleküler ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek çekirdekten dışarı doğru göç etmekte ve kuyruklu yıldız görünümü oluşturmaktadırlar (94, 95). Görsel değerlendirmeye göre "comet"ler DNA göç uzunluğuna göre 5 kategoride tanımlanır (Kategori 0-4). Sınıflandırma "comet"lerin görünümüne göre aşağıdaki gibi gerçekleştirilir: Parlak başlı objeler ve görünmeyen kuyruklar 0 kategorisine girer (kuyuksuz spot şeklindeki görüntüler), çok küçük başlı cometler ve uzun dağınık kuyruklar 4. Kategoriyeye girer (Şekil 5) (82).



Şekil 5. Görsel Analizde "Comet" Kategorileri

2.3.4.1. Talasemi ve DNA Hasarı

Talasemide α ve β globin zincirlerinin dengesiz üretimi nedeniyle eritropoez etkisizdir. Dengesiz globin zinciri tetramerleri çökelir ve oksidasyona uğrayarak hem ve globin birbirinden ayrılır. Talasemik eritroid hücrelerden salınan serbest demir serbest oksijen radikallerini oluşturur. Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif stres ise yapısal proteinlerde defektlere, membran proteinlerinin oksidasyonuna ve kemik iliğindeki (etkisiz eritropoez) ve periferik dolaşımdaki (hemoliz) kırmızı kan hücrelerinin prematür ölümüne neden olur (96, 97).

Talasemide artmış oksidatif stresin DNA hasarına yol açtığı çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (12, 13, 98, 99). Bu çalışmalarda çeşitli yöntemlerle ölçülen DNA hasarı, hastalarda sağlam kontrol grubuna göre artmış olarak bulunmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Hematolojisi Bilim dalı Polikliniğinde beta talasemi taşıyıcısı tanısı verilen çocuklar incelenmiştir. Kontrol grubu olarak, çoğunluğunu bu çocukların talasemi taşıyıcısı olmayan kardeşlerinin oluşturduğu yaş ve cinsiyet özellikleri benzer olan çocuklar çalışılmıştır.

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmış ve Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (01/2014-19).

Tüm katılımcılarla görüşme yapılarak bir anket doldurulmuştur. Anket, hastanın yaşadığı sosyoekonomik koşulları ve maruz kaldığı bazı çevresel etmenleri açığa çıkarmaya yönelik sorular içermektedir (Ek 1). Tüm katılımcılardan, sözlü ve yazılı onam sonrası, rutin takip ve tedavi sırasında elde edilen kan örneklerinden genotoksisiteyi gösteren test (comet yöntemi) ve DNA hasarında etkisi olabilecek bazı temel testler (total oksidan kapasite, total antioksidan kapasite, vitamin C düzeyi, vitamin E düzeyi) çalışılmıştır. Katılımcıların rutin değerlendirme testleri olan tam kan sayımı, vücut demir göstergeleri, hemoglobin elektroforezi, vitamin B12, folik asit ve seroreaktif protein (CRP) değerleri de kullanılmıştır.

3.1. Total Oksidan Kapasite (TOS), Total Antioksidan Kapasite (TAS), Vitamin C ve Vitamin E düzeyi çalışması

Çalışmamızda hastalardan toplanan plazma örneklerinde Total oksidan kapasite (TOS), Total antioksidan kapasite (TAS), Vitamin C ve Vitamin E düzeyleri saptanmıştır. Tüm ölçümler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında yapılmıştır. Örneklerin hazırlanması için kullanılan kan, EDTA'lı antikoagülan kaplı tüplere alındıktan sonra + 4 derecede; 15 dakika; 1000 xg santrifüje edilmiş, daha sonra çalışılmak üzere ayrılan süpernatant – 80 derecelik derin dondurucularda çalışılana kadar muhafaza edilmiştir. Kan alımından derin dondurucuya kaldırılıncaya kadar geçen süre maksimum 30 dakika olarak belirlenmiş ve standartizasyon için bu süre geçilmemiştir.

Örneklerde Vitamin C ve Vitamin E düzeyleri CUSABIO marka Human Vitamin C (VC) (Cat no: CSB-E08090h) ve Vitamin E (VE) (Cat no: CSB-E07893h) ELISA kitleri aracılığıyla tespit edilmiştir. Bu kitlerde bulunan 96 kuyucuklu plate, kuyucuk duvarlarında sabit duran antikorlar ve ölçümlenecek vitamin türevleri maddeler ile örneklerin içerisinde bulunan vitaminler ile yarışmalı inhibisyona girer. İkinci inkübasyon basamağında, peroksidazla konjuge edilmiş ikinci bir antikor önceden vitaminlere bağlı olan antikoruna bağlanmak için eklenir. Daha sonra yıkama yapılarak bağlı olmayanlar uzaklaştırılır. Bağlı olanlar için eklenen substrat ile ortaya çıkan renk değişikliği mikropate reader ile okunur. Kitlerin çalışma yöntemleri aynen uygulanmış, en son olarak mikropate

reader ile 450 nm'de okunma yapılmıştır. Birimler ng/ml ve mikromol/ml şeklinde belirtilmiştir.

Örneklerde ölçümlenecek olan TOS ve TAS değerleri “Rel Assay Diagnostics” marka “Total Oxidant Status Assay Kit” ve “Total Antioksidant Status Assay Kit” ile bakılmıştır. Total Antioksidan kapasite; ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) molekülü, asidik ortamda (asetat tamponu 30 mmol/l pH 3,6) hidrojen peroksit kullanılarak ABTS+ haline okside edilir. Asetat tamponu içerisinde konsantre (koyu yeşil) ABTS+ molekülü daha stabildir. Daha konsantre ve yüksek pH' a sahip asetat tamponu içinde (0.4 mol/l pH 5.8) dilüe edilme esnasında spontan şekilde koyu yeşil renk yavaşça kaybolur. Örnekte bulunan antioksidan konsantrasyonu oranında bu renk kaybı hızlanır. Bu reaksiyon spektrofotometrik olarak takip edilebilir ve ağarma hızı örnekteki TAC ile ters orantılıdır. Bu reaksiyon suda çözünen vitamin E analogu olan Trolox (6-hidroksi-2.5.7.8-tetrametilchroman-2-karboksilik asit) ile kalibre edilir. Ölçüm sonuçları mmol Trolox equivalent/L olarak ifade edilir (100).

Total Oksidan kapasite; Örnekte bulunan oksidanlar ferro iyon (Fe^{+2})-o-dianisidine kompleksini ferrik iyon (Fe^{+3}) haline getirir. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bolca bulunan gliserol molekülleri ile güçlendirilir. Ferrik iyon xilenol orange ile asidik ortamda renkli bileşik oluşturur. Renk yoğunluğu örnekte bulunan oksidan moleküllerinin miktarı ile ilişkilidir. Ölçüm hidrojen peroksit (H_2O_2) ile kalibre edilir. Sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit equivalent olarak ifade edilir ($\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ Equiv./L}$) (101).

3.2. Comet Yönteminin Çalışılması

Genotoksisite değerlendirmelerinde Comet yönteminin yaygın uygulamaları; çevresel biyoizleme ve insan topluluklarının izlenmesinde bulunmaktadır (102).

Yöntemin çeşitli etkenlerin toksisite mekanizmalarını izlemede hücre dizilerinde in vitro uygulanaşı da basit, tekrarlanabilir, kolay olması ve düşük dozlardaki genotoksisiteyi gösterebilmesi nedeniyle mümkündür (90).

3.3. Yöntemler

Hastalardan ve kontrol grubundan venöz kan örnekleri alınmıştır. Çalışmaya katılan her bir gönüllüden alınan heparinli kan örneklerinde genotoksisite yöntemlerinden Comet yöntemi genotoksisitenin belirlenmesi için uygulanmıştır. Örnekler laboratuvara getirilene kadar ışıktan korunmuştur ve 6 saat içinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Kan örneklerinde yapılmış olan genotoksisite değerlendirmesi, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Periferal lenfositlerde Comet Yöntemi (tek hücre jel elektroforez yöntemi)

Talasemili çocuklarda olası DNA hasarını ölçmek amacıyla hızlı, güvenilir, duyarlı ve yaygın kullanım alanına sahip comet yönteminden yararlanılmıştır. Yöntem, periferal kandan lenfositlerin izole edilmesi, lenfositlerin agar içine gömülerek lamlara yayılması ve hücrenin DNA'sının çıplak hale getirilmesi (lisis işlemi) sonrası elektroforez uygulamasına tabi tutularak DNA spesifik floresan boya ile boyamak suretiyle genotoksisitenin değerlendirilmesi prensibine dayanmaktadır. DNA hasarı, her bir hücre için hasar seviyesine göre farklı yük ve molekül ağırlıklarına sahip göç eden DNA parçalarının mikroskop altında ölçülmesi ile değerlendirilmektedir. Alkali Comet yönteminde tek sarmal kırıkları, alkali pH'da sarmal kırıklarına dönen lezyonlar teşhis edilebilmektedir.

Bu kapsamda comet yöntemi için, hasta ve kontrol grubundan heparinli tüplere alınmış kanlardan lenfosit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Lenfositler 37°C'de düşük erime noktalı agarozun 100µl'si ile karıştırılarak önceden %0.65'lik yüksek erime noktalı agaroz ile kaplanmış lamlara yayılmıştır. Tüm örnekler ikişer lama yayılarak çalışılmıştır. Daha sonra bir gece +40C'de lisis çözeltisinde hücrelerin parçalanması için bekletilmiştir. Daha sonra lamlar +4°C'de 20 dakika NaOH ve Na₂EDTA içeren alkali çözeltisinde bekletildikten sonra elektroforeze tabi tutulmuştur. Elektroforez + 4°C'de 25V, 300A, 20 dakika şartlarında gerçekleştirilerek kırılan DNA fragmanlarının çekirdekten göç etmesi

sağlanmıştır. Lamlar nötralizasyon tamponu ile nötralize edildikten sonra floresan bir boya olan etidium bromür ile boyanarak floresan mikroskopunda Comet Assay III görüntü analiz sistemi (Perceptive Instruments, UK) kullanarak her birey için 50 hücrede kantitatif DNA hasar ölçümü yapılmıştır (102).

3.4. İstatistiksel yöntemler

Tüm istatistiksel çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Enstitüsü'nde yapılmıştır. İstatistiksel analizler SPSS 22 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney ve kontrol gruplarında sayısal değişkenler açısından karşılaştırma yapmak için, normal dağılım gösteren değerler iki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi ile, normal dağılım göstermeyen değerler Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. Sayısal değişkenler arasındaki korelasyon Spearman Rho katsayısı ile incelenmiştir. Tanımlayıcı istatistik olarak nitelik değişkenler için sayı ve yüzde, sayısal değişkenler için aritmetik ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maximum değerler verilmiştir. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmaya yaş ortalaması $6,03 \pm 3,56$ yıl (1-17) yıl arasında değişen 142 talasemi minör ile yaş ortalaması $8,18 \pm 3,42$ (1-17) yıl arasında değişen anemik olmayan 113 sağlıklı çocuk alındı. Talasemi minörlü çocukların 73'ü erkek (%55,8) ve 69'u kız (%48,6), kontrol grubunun ise 50'si erkek (%44,2) ve 63'ü kız (%51,4) idi.

Talasemi minör ve kontrol grubunun tanımlayıcı bilgileri, tam kan sayımı parametreleri, biyokimyasal parametreleri ve hemoglobin elektroforez sonuçları Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Talasemi minör ve kontrol grubunun tanımlayıcı bilgileri, tam kan sayımı parametreleri, biyokimyasal parametreleri ve hemoglobin elektroforez sonuçları

	Talasemi minör	Kontrol	p değeri
Yaş (yıl)**	6,03 ± 3,56	8,18 ± 3,42	<0,001
Cinsiyet (E/K)**	73/69	50/63	>0,05
RBC (10.e6/UL)*	5,46 (4,37-7,14)	4,68 (3,96-6,23)	<0,001
HB (g/dl)*	11,64 (8,1-14,67)	13,03 (10,2-17,04)	<0,001
HCT (%)*	36,09 (24,79-46,51)	38,7 (33,67-51,63)	<0,001
MCV (fL)*	64,95 (53,4-79,81)	83 (57,89-89,70)	<0,001
MCH (pg)*	20,75 (16,2-27,19)	28,0 (18,37-30,13)	<0,001
MCHC (g/dl)*	32,12 (29,2-34,51)	33,68 (12,62-36,17)	<0,001
RDW (%)*	15,78 (12,17-30,90)	13,2 (11,83-16,37)	<0,001
PLT (10.e3/UL)*	323,7 (175,1-595)	289,5 (172,7-509,8)	<0,05
BK (10.e3/UL)*	7,7 (3,99-20,9)	7,17 (4,70-20,09)	<0,05
Demir (Ug/dl)**	77,44±30,59	85,21±32,52	0,51
Demir bağlama kapasitesi (Ug/dl)**	290,64±49,79	287,76±52,76	0,655
TSI (%)*	26,3 (3,4-104,2)	26,79 (6,8-106,1)	0,201
Ferritin (ng/ml)*	33,42 (7,80-223,7)	34,54 (10,4-149,3)	0,564
B ₁₂ (pg/ml)*	396,0 (117,3-1208)	364,5 (166,2-1240)	0,78
Folat (ng/ml)*	11,17 (4,93-80)	11,2 (4,88-48,70)	0,37
CRP (mg/L)*	1,92 (0,3-12,7)	1,99 (1-16,6)	0,951
Hb A ₀ (%)*	84,4 (62-92)	85,9 (71-95)	<0,001
Hb A ₂ (%)*	3,5 (2,1-8,7)	3 (2-6)	<0,001
Hb F (%)*	1 (0,1-20,1)	0,6 (1-13)	<0,001

* Ortanca (En düşük-en yüksek değerler) **Ortalama ± SD olarak verilmiştir.

RBC: Eritrosit sayısı, **HB:** Hemoglobin, **HCT:** Hematokrit, **MCV:** Ortalama eritrosit hacmi, **MCH:** Ortalama eritrosit hemoglobini, **MCHC:** Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu, **RDW:** Eritrosit dağılım genişliği, **PLT:** Trombosit sayısı, **BK:** Lökosit sayısı, **CRP:** Seroreaktif protein **TSI:** Transferrin saturasyon indeksi = (Serum demir düzeyi/ Demir bağlama kapasitesi) x 100

Hasta ve kontrol grubu arasında yaş yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuş ($p<0,05$), cinsiyet yönünden fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Tam kan sayımı parametreleri (hem eritrosit parametreleri hem de lökosit ve trombosit sayıları) ve hemoglobin elektroforez sonuçları yönünden iki grup arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). İki grup arasında, çalışılan biyokimyasal parametreler ve vücut demir göstergeleri yönünden anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Talasemi minör ve kontrol grubunun oksidatif stres belirteçleri karşılaştırması Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Talasemi minör ve kontrol grubunun oksidatif stres belirteçleri

	Talasemi minör	Kontrol	P değeri
TAS (mmol/l) *	2,18 (0,2-4,0)	2,18 (0,15-4,26)	0,283
TOS (umol/l) *	6,40 (1,26-51,12)	6,61 (0,28-67,04)	0,842
Vit C (ng/ml) *	63,23 (6,38-313,88)	69,44 (9,69-312,1)	0,737
Vit E (nmol/ml) *	30,87 (10,32-130,25)	37,69 (10,42-128,94)	0,289

* Ortanca (En düşük-en yüksek değerler)

TAS: Total antioksidan kapasite, TOS: Total oksidan kapasite, Vit C: Vitamin C, Vit E: Vitamin E

Talasemi minör ve kontrol grubu arasında, oksidatif stres belirteçleri yönünden anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Talasemi minör ve kontrol grubunun comet assay yöntemiyle saptanan DNA hasarı parametrelerinin karşılaştırması Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Talasemi minör ve kontrol grubunun comet assay ile DNA hasarı parametreleri

	Talasemi minör	Kontrol	P değeri
Tail Length *	31,51 (22,78-139,52)	32,02 (23,48-161,66)	0,873
Tail Intensity*	6,50 (2,56-31,76)	6,72 (1,67-40,89)	0,551
Tail Moment*	1,50 (0,44-13,27)	1,52 (0,63-23,13)	0,447

* Ortanca (En düşük-en yüksek değerler)

Tail Length: Kuyruk uzunluğu, Tail Intensity: Kuyruk yoğunluğu, Tail Moment: Kuyruk momenti

Talasemi minör ve kontrol grubu arasında, DNA hasarı parametreleri yönünden anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Hem DNA hasarı parametrelerinde, hem de DNA hasarı etyopatolojisinde rol oynadığı düşünülen oksidatif stres belirteçlerinde, talasemi minör ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Ayrıca, DNA hasarı yapabilecek çevresel etmenleri açığa çıkarmaya yönelik sorular içeren anket bilgileri yönünden, iki grup arasında fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 8. Çalışma grubunda (n=255), DNA hasarı, oksidan-antioksidan sistem ve bazı biyokimyasal parametreler arasında korelasyon sonuçları

	Tail intensity	Tail moment	TAS	TOS	Vit C	Vit E	B₁₂	Folat	CRP	TSI	Ferritin
Tail length											
<i>r</i>	0,396	0,614	0,285	0,129	-0,174	-0,202	0,090	-0,118	0,133	0,040	0,119
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,039	0,025	0,037	0,152	0,061	0,034	0,529	0,058
Tail intensity											
<i>r</i>		0,894	0,065	-0,026	-0,309	-0,245	0,035	-0,119	0,150	-0,006	0,108
<i>p</i>		<0,001	0,304	0,683	<0,001	0,011	0,578	0,057	0,017	0,918	0,084
Tail moment											
<i>r</i>			0,129	0,000	-0,300	-0,305	0,063	-0,096	0,161	0,024	0,098
<i>p</i>			0,040	0,998	<0,001	<0,001	0,316	0,125	0,010	0,700	0,117

Tablo 9. Çalışma grubunda (n=255), oksidan-antioksidan sistem ve bazı biyokimyasal parametreler arasında korelasyon sonuçları

	TOS	Vit C	Vit E	B₁₂	Folat	CRP
TAS						
<i>r</i>	0,102	0,037	0,074	0,008	-0,095	0,106
<i>p</i>	0,105	0,641	0,456	0,902	0,134	0,095
TOS						
<i>r</i>		-0,133	-0,126	0,030	0,012	0,023
<i>p</i>		0,088	0,198	0,636	0,850	0,716
Vit C						
<i>r</i>			0,835	-0,116	0,090	-0,040
<i>p</i>			<0,001	0,142	0,253	0,607
Vit E						
<i>r</i>				-0,256	-0,012	0,009
<i>p</i>				0,008	0,906	0,929

Çalışmaya katılan tüm çocukların comet yöntemi ile hesaplanan tail length ölçümü ile sırasıyla tail intensity, tail moment ve TAS arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon ($r=0,396$, $p<0,001$; $r=0,614$, $p<0,001$; $r=0,285$, $p<0,001$) saptandı. Tail intensity ölçümü ile tail moment arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon ($r=0,894$, $p<0,001$), Vitamin C ile arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon ($r=-0,309$, $p<0,001$) saptandı. Tail moment ölçümü ile sırasıyla Vitamin C ve Vitamin E arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon ($r= - 0,300$, $p<0,001$; $r= - 0,305$, $p<0,001$) saptandı (Tablo 8.1). Vitamin C ve Vitamin E arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif

korelasyon ($r=0,835$, $p<0,001$), Vitamin E ile B₁₂ vitamini arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon ($r= -0,256$, $p= 0,008$) saptandı (Tablo 8.2).

5. TARTIŞMA

Talasemi, Akdeniz havzasında yer alan ülkelerde ve ülkemizde ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Hastalığın kendisi önemli bir sağlık sorunu ve tedavisi önemli bir ekonomik yüküdür. Talasemi tipleri içinde, klinik olarak en ağır olan form ve ülkemizde en sık görülen form beta talasemidir. Beta talasemi 11. kromozomda nokta mutasyonlarıyla gelişir. Her iki alel mutant olduğunda talasemi major (hastalık) ve tek alel mutant olduğunda talasemi minör (taşıyıcılık) gelişir. Talasemi taşıyıcılığı genel olarak klinik olarak sessiz kabul edilir. Taşıyıcılık sessiz olmakla beraber, her iki ebeveynin taşıyıcı olması durumunda, her gebelikte %25 olasılıkla hasta çocuklar doğar. Türkiye’de yapılan çalışmalarda talasemi taşıyıcılığının %4,3 olduğu saptanmıştır, bu oran bazı bölgelerde %13’e kadar çıkmaktadır (21).

Yıllar içinde talasemi minör olgularında bazı klinik özellikler olduğu dikkati çekmiştir (41-43). Hatta bazı çalışmalarda, talasemi taşıyıcılarında DNA hasarı olabileceğine dair işaretler saptanmıştır (12, 13). Bu çalışmalar, yetişkin hastalarda yapılmış olup talasemi majör olguların transfüzyonlara bağlı demir yüklenmesine ikincil olarak ve demir yüklenmesini tedavi etmek için verilen şelasyon ajanlarının yan etkisi olarak gelişen DNA hasarını inceleyen çalışmalardır. Çok az sayıda çalışmada ise talasemi taşıyıcıları direkt olarak incelenmiştir ancak olgular hem yetişkin bireylerdir hem de az sayıdadır (76, 77). Ancak, talasemi taşıyıcılığında DNA hasarı varsa bunun çocukluktan itibaren bilinmesi gereklidir. Bu sayede, hastanın yaşam koşullarının buna göre

düzenlenmesi ve ileride meslek seçimi yönünden ailelere genetik danışmanlık verilmesi mümkün olabilecektir. Bu gerekçelerle, bu çalışmada, literatürde bir ilk olarak, çocuk yaştaki talasemi taşıyıcılarında DNA hasarı incelenmektedir. Kontrol grubu olarak, çoğunluğunu bu çocukların talasemi taşıyıcısı olmayan kardeşlerinin oluşturduğu sağlam çocuklar çalışılmıştır. Tüm katılımcılarda (toplam: 255 çocuk, talasemi minör: 142 çocuk, kontrol grubu:113 çocuk) tam kan sayımı, vücut demir göstergeleri (serum demiri, serum demiri bağlama kapasitesi, serum ferritin), biyokimyasal parametreler (B12, folat, CRP), hemoglobin elektroforezi, oksidatif stres belirteçleri (TAS, TOS), antioksidatif sistemi temsil eden serum vitamin düzeyleri (Vitamin C, Vitamin E) ve olası DNA hasarı incelenmiştir.

Talasemi minör ve kontrol grubunu yaş ortalamaları sırasıyla $6,03 \pm 3,56$ yıl ve $8,18 \pm 3,42$ yıl idi. Talasemi taşıyıcılarında DNA hasarını inceleyen diğer çalışmalarda, değerlendirilen hastalar erişkin yaşlardadır. *Ondei ve ark.*larının çalışmasında 49 heterozigot talasemi (18-79 yaş) ve 81 sağlıklı erişkin (18-62 yaş) (76), *Al-Sweedan ve ark.*larının çalışmasında erişkin yaştaki 18 talasemi minör ve 18 sağlıklı erkek (12), *Al-Mudalal ve ark.*larının çalışmasında erişkin yaştaki 14 talasemi minör ve 19 sağlıklı olgu (103), *Labib ve ark.*larının çalışmasında 60 talasemi minör (26-45 yaş) ve 20 sağlıklı erişkin (27-49 yaş) (104), *Adhiyanto ve ark.*larının çalışmasında erişkin yaştaki 33 talasemi minör ve 12 sağlıklı olgu (105), *Selek ve ark.*larının çalışmasında ise 32 talasemi minör (28 ± 2 yaş) ve 28 erişkin (27 ± 4 yaş) (77) değerlendirilmiştir. Talasemilerde oksidatif stres ve/veya DNA hasarını araştıran bu çalışmaların tümünde, hasta grubu erişkin talasemi

minör olgularıdır. Bizim çalışmamız, talasemi minörlü çocuklarda oksidatif stres ve DNA hasarı araştırması yapan literatürdeki ilk çalışmadır. Ayrıca, diğer çalışmalara göre daha geniş hasta grubu değerlendirilmiştir, kontrol grubu olarak sağlam kardeşler seçilmiş ve bu sayede hem ailelerindeki tanı almamış çocukların tanı alması sağlanmıştır hem de DNA hasarı potansiyeli olan çevresel etmenlerin etkisi en aza indirilmiştir. Böylelikle, DNA hasarı saptanması durumunda, etyolojide talasemi hastalığının patofizyolojisinin etkisinden bahsetmek mümkün olabilecektir. Ancak talasemi taşıyıcısı her çocuğun sağlam bir kardeşi olmadığından, kontrol grubunun bir bölümü yaş ve cins özellikleri benzer anemik olmayan sağlam çocuklardan oluşturulmuştur.

Talasemi minörde, olası DNA hasarının etyopatolojiyle ilgili olması öngörüldüğünden sonuçların cinsiyeti farklı gruplar arasında farklılık göstermemesi beklenmektedir. Bununla uyumlu olarak, kız ve erkek katılımcılar arasında çalışılan parametreler yönünden fark bulunmamıştır.

Beta talaseminin fizyopatolojisinin temelinde görece olarak fazla α globin zincirlerinin hücrede çökmesinin neden olduğu hemoliz, inefektif hematopoez ve artmış serbest demir vardır. Bunların sonucunda hücre içi artmış oksidatif stres ve ROS'ların neden olduğu DNA hasarı görülür (106). Globin zincir orantısızlığından doğan bu durum hastalığın en ağır formu olan talasemi majörde görülse de talasemi intermedia ve minörde de oksidatif stres ve DNA hasarı olduğu gösterilmiştir. *Cighetti ve ark.*ları 21 transfüzyon alan talasemi majör (19-39 yaş), 13 transfüzyon almayan talasemi intermedia (23-46 yaş) ve 17 sağlıklı

kontrol grubuyla (23-40 yaş) yaptıkları çalışmada kontrol grubuna göre talasemi major grubunda daha çok olmak üzere talasemi intermedia grubunda da oksidatif hasar artmış bulunmuştur. Serum antioksidan kapasite üç grupta da benzer değerlerde ve normal sınırlar arasında saptanmıştır. Oksidatif stres belirteci olarak seçilen MDA (Malondialdehid) ile serum demir düzeyi ile arasında anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır (36). *Ferro ve ark.*larının çalışmasında, 92 talasemi majör (18-72 yaş), 21 talasemi intermedia (19-57 yaş) ve 10 sağlıklı erişkinden (22-52 yaş) oluşan 3 grup oksidatif hasar ve DNA hasarı yönünden değerlendirmiştir. ROS ve lipid hidroperoksitleri talasemi majör ve talasemi intermedia grubunda kontrol grubuna göre yüksek saptanmıştır. Özellikle talasemi intermedia grubunda ROS seviyeleri daha yüksek bulunmuş olup bu durum talasemi major grubunun düzenli transfüzyon alması nedeniyle kronik doku hipoksisinin daha az olmasına bağlanmıştır. Aynı çalışmada comet assay ve mikroçekirdek yöntemiyle DNA hasarı da araştırılmıştır. Her iki yöntemle de talasemi major ve talasemi intermedia gruplarında kontrol grubuna göre DNA hasarı artmış olarak saptanmıştır. Mikroçekirdek yönteminde DNA hasarı karşılaştırmasında iki grup arasında fark bulunurken, comet assay yöntemiyle yapılan değerlendirmede talasemi major ve talasemi intermedia grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır (13). Literatürde mevcut bu bilgiler, talasemide hastalığın patofizyolojisiyle ilgili olarak oksidatif stres artışı olduğunu göstermektedir. Bu durum klinik olarak daha hafif olan talasemi intermedia hastalarında da görülmüş olup DNA hasarına yol açabilmektedir.

*Al- Sweedan ve ark.*larının 18 talasemi minör, 18 sağlıklı erişkin kontrol grubu ve 7 talasemi majörü inceledikleri çalışmada DNA hasarı tespiti için kardeş kromatid değişimi testi, kromozomal anormallikler testi ve idrar 8-hidrioksi-2'-deoksiguanozin (8OHdG) biyobelirteçleri kullanılmıştır. Bu testler arasında sadece kardeş kromatid değişimi testi sonuçlarında talasemi minör ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmuştur; talasemi minörlerde kardeş kromatid değişimi sıklığı artmıştır (12). *Ondei ve ark.*ları 49 heterozigot talasemi ve 81 sağlıklı erişkinde oksidatif stresi ve antioksidan durumunu incelemiştir. Bu çalışmada oksidatif stres belirteci olarak TBARS (thiobarbitürik asit reaktif parçaları), antioksidan durum göstergesi olarak TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) değerlendirilmiştir. TBARS ve TEAC seviyelerinde heterozigot talasemilerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükselme saptanmıştır. Oksidatif stres belirtecinin artışı beklenen bir durum iken antioksidan durumun yükselmesini artmış oksidatif strese cevap olabileceği şeklinde açıklanmıştır. Serum demir, transferrin veya ferritin ile TBARS ve TEAC seviyeleri arasında korelasyon saptanmamıştır (76). *Labib ve ark.*ları ise 60 talasemi minör ve 20 sağlıklı erişkinde tam kan sayımı ve hemoglobin elektroforez parametreleri, demir parametreleri, oksidatif stres belirteci olarak MDA, antioksidan durum belirteci olarak PON1 (paraoksonaze-1) aktivitesi ve TAK (total antioksidan kapasite) değerlendirmesi yapmışlardır. İki grup arasında, beklendiği üzere, tam kan sayımı parametreleri ve hemoglobin elektroforezi parametreleri açısından anlamlı fark saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da bu veriler açısından iki grup arasında anlamlı fark saptanmıştır. Hastalarımız çocuk

yaş grubunda olduğundan *Labib ve ark.*larının çalışmasından farklı olarak Hb F de çalışılmış ve farklı bulunmuştur. Çalışmamızda, enfeksiyon veya inflamasyonu gösteren lökosit ve trombosit değerleri bakımından da hasta ve kontrol grupları arasında fark bulunmamış olup bu, saptanması olası DNA hasarı üzerine karıştırıcı bir etki olabileceği için bulunmaması yardımcı bir durumdur. Talasemi minör ve kontrol grubu arasında, bizim çalışmamızla benzer olarak, serum demir, demir bağlama kapasitesi arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Sadece serum ferritin düzeyi talasemi minörlerde daha yüksek saptanmıştır, bunu sebebi olarak bazı talasemi minör olarak bilinen hastaların talasemi intermedia olabileceği öne sürülmüştür. MDA seviyesi ise talasemi minör grubunda anlamlı şekilde yüksek saptanırken, TAK ve PON1 aktivitesi talasemi minörlerde anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Serum PON1 aktivitesi TAK ile pozitif korelasyon, MDA seviyesi ile negatif korelasyon göstermektedir (104). *Adhiyanto ve ark.*larının çalışmasında, benzer şekilde, MDA talasemi minörlerde yüksek bulunurken, TAK düşük bulunmuştur (105). *Selek ve ark.*larının çalışmasında da benzer bulgular saptanmıştır. Talasemi minör ve kontrol grubu arasında TAK, PON1 aktivitesi, lipid hidroperoksidaz (LOOH) seviyesi, TOS (total antioksidan kapasite) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) araştırılmıştır. Talasemi minör grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olacak şekilde PON1 aktivitesi, TAK seviyeleri düşük; TOS, LOOH ve OSİ yüksek saptanmıştır (77). Bu çalışmalar sonucunda, yetişkin olgular incelenmiş, değişik belirteçler ve değişik yöntemler kullanılmış olsa da, talasemi taşıyıcılarında oksidatif stresin artmış olduğu gözlenmektedir ve antioksidan kapasitenin düşük olabileceği izlenimi alınmaktadır.

Vitamin E ve vitamin C vücuttaki en güçlü antioksidanlardandır (5). *Dhawan ve ark.*larının yaptığı çalışmada beta talasemi hastalarında vitamin E düzeyi, kontrol grubuna göre 3 kez daha düşük bulunmuştur (10). *Şimşek ve ark.*ları da benzer şekilde sağlıklı kontrol grubunda vitamin E düzeyini talasemi hasta grubuna göre daha yüksek bulmuşlardır (81). *Livrea ve ark.*ları talasemilerde hem vitamin E hem vitamin C'yi sırasıyla %42 ve %44 oranında kontrol grubuna göre daha düşük bulmuştur (5). Bu ve benzer çalışmaların ortak sonucu, talasemide antioksidan düzeylerinin düşük olmasıdır. Bu durum oksidatif strese yol açacağı ve hastalığı şiddetlendireceği için, talasemide tedavi olarak vitamin E ve vitamin C verilmesi ve oksidatif stresin azaltılması yoluna gidilmesi önerilmiştir. *Pfeifer ve ark.*larının yaptığı çalışmada, talasemi intermedialarda verilen vitamin E tedavisi sonrası ROS düzeyinin azaldığı ve glutatyon düzeyinin arttığı, oksidatif streste azalma olduğu gösterilmiştir (107). *Elalfy ve ark.*ları çalışmalarında demir şelatörleri kullanmakta olan beta talasemili hastalara adjuvan tedavi olarak vitamin C vermişlerdir. Özellikle de deferoksaminin etkilerini arttığını göstermişlerdir (108). *Elalfy ve ark.*ları başka bir çalışmalarında ise vitamin E, C ve A düzeyleri düşük beta talasemili hastalara terapötik dozda vitamin E, C ve A vermişlerdir. Oniki aylık tedavi sonrası vitamin düzeylerinde %70'ten fazla artış, MDA düzeyi ve antioksidan enzimlerde artış saptamışlardır (109). Bizim çalışmamızda ise, genel bilginin ve beklentinin dışında olarak, talasemi minör ve kontrol grubu arasında vitamin C ve E açısından fark saptanmamıştır. Bunun olası nedeni, kontrol grubunun büyük çoğunluğunun hastalarla aynı aileden ve koşullardan gelen çocuklardan seçilmiş olmasıdır.

Ayrıca, hasta ve kontrol gruplarının yetişkin yaşta olmayıp çocuk yaşta olmaları da bu benzerliğin nedenlerinden biri olabilir. Beklendiği üzere, yaş ilerledikçe çevresel koşullardaki (beslenme gibi) değişim artacaktır.

Hasta ve kontrol grupları arasında oksidan ve antioksidan parametreler yönünden fark bulunmamasıyla uyumlu olarak, bu sistemlere etki edebileceği bilinen bazı biyokimyasal parametrelerin de (B12, folat, CRP) sonuçları iki grup arasında benzer düzeylerde dir.

Çalışmamızın en çarpıcı sonucu, iki grup arasında DNA hasarı yönünden fark bulunmamış olmasıdır. Mevcut literatür bilgileri talasemi taşıyıcılarında hastalığın patofizyolojisine bağlı olarak DNA hasarı olabileceğine işaret etmekteydi. Ancak, bizim çalışmamızda talasemi minör ile kontrol grubu arasında DNA hasarı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. DNA hasarı yapabilecek hastalıkla ilgili faktörlerin de (oksidatif stres belirteçleri ve vitamin düzeyleri) gruplar arasında farklı olmaması nedeniyle, bu, çalışmamızda beklenen bir sonuçtur. DNA hasarını göstermek için kullanılmış olan comet assay yöntemi genotoksisiteyi gösteren valide edilmiş bir yöntem olduğundan sonuçtan sorumlu olması beklenmemektedir. Talasemi taşıyıcıları ve kontrol grubu arasında DNA hasarı yönünden fark bulunmamasının başlıca olası nedenleri, bizce, çalışma gruplarının sayısının geniş olması ve çalışılan popülasyonun çocuk yaş grubunda olmasıdır. Çalışmamızla benzer nitelikte olan diğer çalışmaların tümünde erişkin bireyler çalışılmış ve çalışma grupları az sayıda katılımcıdan oluşmuştur. Erişkinlerin, yaşları nedeniyle DNA hasarı yapabilecek çevresel etmenlere

çocuklara göre daha fazla maruz kalmış olmaları muhtemel bir durumdur. Ayrıca, küçük gruplar arasında olduğu saptanan farklılığın (bu durumda, talasemi taşıyıcılarında DNA hasarı bulunması) gerçek bir etken olup olmadığı çalışma grubu genişletilerek bulunabilir. Çalışmamızda bu yapılmış ve çalışma grubu olabildiğince geniş tutulmuştur. Ayrıca, çalışma ve kontrol gruplarının aynı ailelerden seçilmiş olması da karıştırıcı dış faktörlerin etkisini en aza indirdiği için önceki çalışmalardan farklı bir sonuç elde edilmesine yol açmış olabilir. Bu durumda, kontrol grubu talasemi taşıyıcısı grubundan daha ileri yaşta olduğu halde neden DNA hasarı yönünden farklı bulunmadığı düşünülebilir. Bu durum, DNAda hasar gelişimi için uzun yılların geçmesi gerektiğini düşündürmektedir. Nitekim, çalışmamıza katılan tüm çocuklara uyguladığımız ankette DNA hasarı yapabilecek çeşitli dış faktörlerden etkilenim (ilaç kullanımı, viral enfeksiyonlar, aşı olma durumu, X-ray maruziyeti, çay, pasif sigara içiciliği) sorgulanmış ve gruplar arasında bu bilgiler açısından da anlamlı fark saptanmamıştır. Bu durum, DNA hasarı yapabilecek faktörlerin etkisi için yeterli zaman geçmediği düşüncesini doğrulamaktadır.

Sonuç olarak, benzer çevrelerde benzer çevresel etmenlere maruz kalan pediatrik yaşta iki grup arasında DNA hasarı farkı saptamamış olmamız nedeniyle, talasemi majörlerde saptanan DNA hasarı ve oksidatif stresin kaynağının daha çok transfüzyon nedeniyle vücutta biriken serbest demir, transfüzyon almayan talasemi intermedialarda ise kronik hipoksiye bağlı ROS kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Bizden önceki çalışmalarda erişkin talasemi

minörlerde saptanmış olan DNA hasarı ve artmış oksidatif stresin nedeninin hastalığın patofizyolojisiyle değil yaşla ilgili olabileceği düşünülmüştür.

6. SONUÇLAR

Benzer ortamlarda benzer çevresel etmenlere maruz kalmış olan pediatrik yaştaki olguların değerlendirildiği ve DNA hasarı araştırılan bu çalışmamızda;

1. Talasemi minör ve kontrol grubu arasında comet yöntemiyle DNA hasarı açısından farklılık saptanmadı.
2. Talasemi minör ve kontrol grubu arasında oksidatif stres (TOS) ve antioksidan kapasite (TAS, Vitamin E, Vitamin C) parametreleri açısından farklılık saptanmadı.
3. DNA hasarı parametrelerinden kuyruk yoğunluğu ile vitamin C arasında anlamlı negatif korelasyon, kuyruk momenti ile vitamin C ve vitamin E arasında anlamlı negatif korelasyon, vitamin C ve vitamin E arasında anlamlı pozitif korelasyon saptandı.
4. Talasemi minörde DNA hasarı gelişmesi hastalığın salt patofizyolojisiyle ilgili görünmemektedir. Talasemi minörlerde DNA hasarı saptanabilmesi için uzun yıllar çevresel faktörlere maruziyet gerekli görünmektedir. Talasemi minörlü çocuklarda, çocukluktan başlayarak yetişkinliğe kadar belli yaş aralıklarında DNA hasarı değerlendirmesi yapan çok sayıda gönüllü ile tekrarlanacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

ÖZET

Bu çalışmada, literatürde bir ilk olarak, talasemi taşıyıcısı çocuklarda DNA hasarı olup olmadığı araştırılmıştır. Yaşları 1-17 yıl arasında değişen 142 hastada comet assay yöntemiyle periferik kanda lenfositlerde DNA hasarı değerlendirilmesi yapılmıştır. Kontrol grubu olarak, çoğunluğunu bu çocukların talasemi taşıyıcısı olmayan sağlam kardeşlerinin oluşturduğu, yaş ve cins özellikleri benzer 113 sağlam çocuk çalışılmıştır. Tüm katılımcılarda DNA hasarında etkisi olduğu bilinen serum TAS, TOS, Vit C ve Vit E düzeyleri ve diğer bazı biyokimyasal parametreler (Vit B12, folat, CRP) değerlendirilmiştir. Çalışma ve kontrol grupları arasında, DNA hasarı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. DNA hasarına yol açabileceği öngörülen TAS ve TOS değerleri, Vit C ve Vit E düzeyleri ve diğer biyokimyasal parametreler de gruplar arasında farklı bulunmamıştır.

Bu sonuçlarla, talasemi taşıyıcısı çocuklarda DNA hasarı bulunmadığı gösterilmiştir. Ailelerin talasemi taşıyıcısı çocuklarının günlük yaşamlarının düzenlenmesi ve ileride meslek seçimi yönünden danışmanlığa ihtiyacı olmadığı sonucuna varılmıştır. Erişkin talasemi taşıyıcılarında gözlenmiş olan DNA hasarının salt hastalığın patofizyolojisiyle ilgili olmadığı, muhtemelen uzun yıllar çevresel etmenlere maruz kalmakla ilgili olabileceği düşünülmüştür.

SUMMARY

In this study, the presence of DNA damage in children with thalassemia minor is investigated, for the first time in medical literature. One hundred and forty two (142) children with the age of 1 to 17 years were enrolled the study and DNA damage in the peripheral blood lymphocytes was assessed with comet assay. Control group was consist of the age and gender matched 113 healthy children, mostly from the same family of these thalassemia minor children. In all participants, the known etiological factors for DNA damage (total oxidant capacity-TOS, total antioxidant capacity-TAS, serum Vitamin C and Vitamin E levels) and some other biochemical parameters (serum Vitamin 12, folate, and CRP) were assessed. DNA damage was not found to be statistically different between thalassemia minor group and control group. The possible etiological factors of TAS, TOS, Vit C and Vit E for DNA damage were not different between the two groups, as well.

Based on these results, it was shown that DNA damage was not present in children with thalassemia minor. No counseling is required for the families of the children with thalassemia minor to arrange the daily life conditions or for their future occupational choices. It was considered that the DNA damage previously observed in adult thalassemia minor patients might not be related merely with the pathophysiology of the disease, it might be related with the exposure to the enviromental factors by aging.

7. KAYNAKLAR

1. Tuzmen S, Schechter AN. Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating beta-thalassemia mutations. *Blood reviews*. 2001;15 (1):19-29.
2. Weatherall DJ. Pathophysiology of thalassaemia. *Bailliere's clinical haematology*. 1998;11 (1):127-46.
3. Rachmilewitz EA. The role of intracellular hemoglobin precipitation, low MCHC, and iron overload on red blood cell membrane peroxidation in thalassemia. *Birth defects original article series*. 1976;12 (8):123-33.
4. Dissayabutra T, Tosukhowong P, Seksan P. The benefits of vitamin C and vitamin E in children with beta-thalassemia with high oxidative stress. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het thangphaet*. 2005;88 Suppl 4:S317-21.
5. Livrea MA, Tesoriere L, Pintaudi AM, Calabrese A, Maggio A, Freisleben HJ, et al. Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. *Blood*. 1996;88 (9):3608-14.
6. Tso SC. Significance of subnormal red-cell folate in thalassaemia. *Journal of clinical pathology*. 1976;29 (2):140-3.
7. Castaldi G, Bagni B, Trotta F, Menegale G, Cavallini AR, Piffanelli A. Folic acid deficiency in beta-thalassaemia heterozygotes. *Scandinavian journal of haematology*. 1983;30 (2):125-9.

8. Chakraborty D, Bhattacharyya M. Antioxidant defense status of red blood cells of patients with beta-thalassemia and Ebeta-thalassemia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2001;305 (1-2):123-9.
9. Waseem F, Khemomal KA, Sajid R. Antioxidant status in beta thalassemia major: a single-center study. *Indian journal of pathology & microbiology*. 2011;54 (4):761-3.
10. Dhawan V, Kumar Kh R, Marwaha RK, Ganguly NK. Antioxidant status in children with homozygous thalassemia. *Indian pediatrics*. 2005;42 (11):1141-5.
11. Sagar CS, Kumar R, Sharma DC, Kishor P. DNA damage: beta zero versus beta plus thalassemia. *Annals of human biology*. 2015;42 (6):585-8.
12. Al-Sweedan SA, Khabour O, Isam R. Genotoxicity assessment in patients with thalassemia minor. *Mutation research*. 2012;744 (2):167-71.
13. Ferro E, Visalli G, Civa R, La Rosa MA, Randazzo Papa G, Baluce B, et al. Oxidative damage and genotoxicity biomarkers in transfused and untransfused thalassemic subjects. *Free radical biology & medicine*. 2012;53 (10):1829-37.
14. Weatherall DJ, Clegg JB, Wood WG, Old JM, Higgs DR, Pressley L, et al. The clinical and molecular heterogeneity of the thalassemia syndromes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1980;344:83-100.
15. Canatan D. Talasemi ve Hemoglobinopatilerin Dünya ve Türkiye’de Durumu. *Türkiye Klinikleri Hematoloji Onkoloji Özel Sayısı*. 2010;3 (1):1-4.
16. Günçağ D, Pekçelen Y, Atamer T. Talasemi Klinik Hematoloji. 2003:137-47.

17. Weatherall D. The inherited disorders of haemoglobin: an increasingly neglected global health burden. *The Indian journal of medical research*. 2011;134:493-7.
18. Ip HW, So CC. Diagnosis and prevention of thalassemia. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2013;50 (6):125-41.
19. Higgs DR. Gene regulation in hematopoiesis: new lessons from thalassemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2004:1-13.
20. Canatan D. Thalassemias and hemoglobinopathies in Turkey. *Hemoglobin*. 2014;38 (5):305-7.
21. Canatan D, Kose MR, Ustundag M, Haznedaroglu D, Ozbas S. Hemoglobinopathy control program in Turkey. *Community genetics*. 2006;9 (2):124-6.
22. Lanzkowsky P. *Lanzkowsky Manual of Pediatric Hematology and Oncology 4ed*2005.
23. Weatherall DJ. The thalassemia syndromes. *Texas reports on biology and medicine*. 1980;40:323-33.
24. Rund D, Rachmilewitz E. Pathophysiology of alpha- and beta-thalassemia: therapeutic implications. *Seminars in hematology*. 2001;38 (4):343-9.
25. Muncie HL, Jr., Campbell J. Alpha and beta thalassemia. *American family physician*. 2009;80 (4):339-44.
26. Robert J. Arceci, Ian M. Hann, Smith OP. *Pediatric Hematology, Third Edition*. 3rd ed. Olivieri NF, editor2006. 281-301 p.

27. Thompson&Thompson Tıbbi Genetik (Thompson&Thompson Genetics in Medicine)2005. 17-31 p.
28. Fathallah H. DNA hypomethylation therapies and hemoglobin disorders. [An interview with Hassana Fathallah by H&O]. Clinical advances in hematology & oncology : H&O. 2008;6 (11):806-8.
29. Olivieri NF. The beta-thalassemias. The New England journal of medicine. 1999;341 (2):99-109.
30. Thein SL. Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia. British journal of haematology. 2004;124 (3):264-74.
31. Birgens H, Ljung R. The thalassaemia syndromes. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2007;67 (1):11-25.
32. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics. 2010;12 (2):61-76.
33. May C, Sadelain M. A promising genetic approach to the treatment of beta-thalassemia. Trends in cardiovascular medicine. 2001;11 (7):276-80.
34. Yeşilipek A. Beta Talasemi. Eritrosit Hastalıkları Tanı ve Tedavi El Kitabı. 2007:41-4.
35. Kutlu M, Çekmiş H, Başak M. Talasemiler. Bakırköy Tıp Dergisi. 2006;2 (33):33-40.
36. Cighetti G, Duca L, Bortone L, Sala S, Nava I, Fiorelli G, et al. Oxidative status and malondialdehyde in beta-thalassaemia patients. European journal of clinical investigation. 2002;32 Suppl 1:55-60.

37. Eritrosit Hastalıkları ve Hemoglobin Bozuklukları Tanı ve Tedavi Kılavuzu. Türk Hematoloji Derneği. 2011:81-97.
38. C Borgna-Pignatti RG. Thalasseмии and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis; Wintrobe's clinical hematology, Lippincott Williams & Wilkins. 11 ed. JP Greer JF, JN Lukens, GM Rodgers, F Paraskevas, B Glader editor 2004.
39. Melody J, Nathan D, Orkin S. The Thalasseмии; nathan and oski's hematology of infancy and childhood. 7 ed 2009.
40. Amer J, Goldfarb A, Fibach E. Flow cytometric analysis of the oxidative status of normal and thalassemic red blood cells. Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology. 2004;60 (1):73-80.
41. Karimi M, Karamifar HA. Short stature in beta-thalassemia minor subjects. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research. 2004;10 (11):CR603-5.
42. Palma-Carlos AG, Palma-Carlos ML, Costa AC. "Minor" hemoglobinopathies: a risk factor for asthma. European annals of allergy and clinical immunology. 2005;37 (5):177-82.
43. Tong PC, Ng MC, Ho CS, So WY, Li JK, Lam CW, et al. C-reactive protein and insulin resistance in subjects with thalassemia minor and a family history of diabetes. Diabetes care. 2002;25 (8):1480-1.
44. Weatherall DJ. The Thalassemia Syndromes 4ed 2005.
45. Burdick C. Combined iron deficiency and thalassemia minor. American journal of clinical pathology. 2013;139 (2):260.

46. Gümrük F. Hemoglobin ve hemoglobinopatiler, Temel İç Hastalıkları 1996.
47. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. Orphanet journal of rare diseases. 2010;5:11.
48. Kılınç K. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi. 2002;33 (2):110-.
49. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri: Mimoza Yayınları; 1995.
50. Halliwell B. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? Drugs. 1991;42 (4):569-605.
51. Koca N. Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vcttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. Gıda Mhendislięi Dergisi. 2003:32-7.
52. Jensen S. Oxidative stress and free radicals. Journal of Molecular Structure (Theochem) 2003:666-7.
53. Diplock AT. Defense against reactive oxygen species. Free radical research. 1998;29 (6):463-7.
54. Halliwell B. Free Radicals in Biology and Medicine 4ed. 18-21 p.
55. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Critical reviews in toxicology. 1993;23 (1):21-48.
56. Barber DA, Harris SR. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. American pharmacy. 1994;NS34 (9):26-35.

57. Jacob RA, Burri BJ. Oxidative damage and defense. The American journal of clinical nutrition. 1996;63 (6):985S-90S.
58. Çavdar C. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. 1997;3-4:92-5. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi. 1997;3-4:92-5.
59. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. Oxygen radicals and human disease. Annals of internal medicine. 1987;107 (4):526-45.
60. Delibaş N. Serbest Radikaller. SDÜ Tıp Fak Dergisi. 1995;2 (3):11-7.
61. Baykal Y. Demir, serbest radikaller ve oksidatif hasar. Sendrom Aylık Tıp Dergisi. 2002;14 (1):94-100.
62. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant physiology. 2006;141 (2):312-22.
63. Liebler DC. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. Critical reviews in toxicology. 1993;23 (2):147-69.
64. Burton GW. Vitamin E: molecular and biological function. The Proceedings of the Nutrition Society. 1994;53 (2):251-62.
65. Engle WA, Yoder MC, Baurley JL, Yu PL. Vitamin E decreases superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes. Pediatric research. 1988;23 (3):245-8.
66. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. The American journal of clinical nutrition. 1991;53 (1 Suppl):194S-200S.

67. Thiagarajan R, Manikandan R. Antioxidants and cataract. Free radical research. 2013;47 (5):337-45.
68. Santos RX, Correia SC, Zhu X, Lee HG, Petersen RB, Nunomura A, et al. Nuclear and mitochondrial DNA oxidation in Alzheimer's disease. Free radical research. 2012;46 (4):565-76.
69. Popolo A, Autore G, Pinto A, Marzocco S. Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure. Free radical research. 2013;47 (5):346-56.
70. Malik Q, Herbert KE. Oxidative and non-oxidative DNA damage and cardiovascular disease. Free radical research. 2012;46 (4):554-64.
71. Jaganjac M, Tirosh O, Cohen G, Sasson S, Zarkovic N. Reactive aldehydes-second messengers of free radicals in diabetes mellitus. Free radical research. 2013;47 Suppl 1:39-48.
72. Yuzhalin AE, Kutikhin AG. Inherited variations in the SOD and GPX gene families and cancer risk. Free radical research. 2012;46 (5):581-99.
73. Bhardwaj P, Yadav RK. Chronic pancreatitis: role of oxidative stress and antioxidants. Free radical research. 2013;47 (11):941-9.
74. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. Free radical research. 2010;44 (5):479-96.
75. Nasr MR, Abdelmaksoud AM, Abd El-Aal KS, Mabrouk NA, Ismael WM. Plasma lipid profile and lipid peroxidation in beta-thalassemic children. Journal of clinical lipidology. 2008;2 (6):405-9.

76. Ondei Lde S, Estevaso Ida F, Rocha MI, Percario S, Souza DR, Pinhel MA, et al. Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassemia heterozygotes. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2013;35 (6):409-13.
77. Selek S, Aslan M, Horoz M, Gur M, Erel O. Oxidative status and serum PON1 activity in beta-thalassemia minor. *Clinical biochemistry*. 2007;40 (5-6):287-91.
78. Scott MD, van den Berg JJ, Repka T, Rouyer-Fessard P, Hebbel RP, Beuzard Y, et al. Effect of excess alpha-hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model beta-thalassemic erythrocytes. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91 (4):1706-12.
79. Fibach E, Rachmilewitz E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. *Current molecular medicine*. 2008;8 (7):609-19.
80. Kassab-Chekir A, Laradi S, Ferchichi S, Haj Khelil A, Feki M, Amri F, et al. Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2003;338 (1-2):79-86.
81. Şimşek F, Öztürk G, Kemahlı S, Erbaş D, Hasanoğlu A. Oxidant and antioxidant status in beta thalassemia major patients. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 2005;58:34-8.
82. Dinçer Y, Karıkaya S. DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay *Türkiye Klinikleri J Med Science*. 2010;30 (4):1365-73.
83. Şekeroğlu Z. Genetik Toksikite Testleri. *TÜBAV Bilim*. 2011;4 (3):221-9.

84. Fenech M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug discovery today*. 2002;7 (22):1128-37.
85. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007;28 (3):625-31.
86. Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M, Stromberg U, Vermeulen R, Tucker JD. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2005;45 (2-3):258-70.
87. Kassie F, Parzefall W, Knasmuller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation research*. 2000;463 (1):13-31.
88. McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation research*. 1993;288 (1):47-63.
89. Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Stromberg U, Rossner P, et al. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutation research*. 2006;600 (1-2):37-45.
90. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*. 1988;175 (1):184-91.
91. Wilson DM, 3rd, Thompson LH. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation research*. 2007;616 (1-2):11-23.

92. Demircigil GC, Emerce E, Ulutas OK. Genotoxicity Tests from Biomarker Studies to the Regulations. *FABAD J Pharm Science*. 2009;34:217-32.
93. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation research*. 2000;455 (1-2):81-95.
94. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology*. 2004;26 (3):249-61.
95. Yüzbaşıoğlu D, Zengin N, Ünal F. Gıda Koruyucuları Ve Genotoksisite Testleri Gıda Teknolojileri Dergisi. 2014;39 (3):179-86.
96. Musallam KM, Rivella S, Vichinsky E, Rachmilewitz EA. Non-transfusion-dependent thalassemias. *Haematologica*. 2013;98 (6):833-44.
97. Rivella S. The role of ineffective erythropoiesis in non-transfusion-dependent thalassemia. *Blood reviews*. 2012;26 Suppl 1:S12-5.
98. Offer T, Bhagat A, Lal A, Atamna W, Singer ST, Vichinsky EP, et al. Measuring chromosome breaks in patients with thalassemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1054:439-44.
99. Cote GB, Papadakou-Lagoyanni S. Beta-thalassaemia: increased chromosomal anomalies in lymphocyte cultures. *Journal of medical genetics*. 1979;16 (1):52-5.
100. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*. 2004;37 (4):277-85.
101. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*. 2005;38 (12):1103-11.

102. Speit G, Hartmann A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods in molecular biology*. 1999;113:203-12.
103. AL-Mudalal SS, Musa RJ, AL-Duliami N. Antioxidant status in thalassemic patients. *Iraqi J Med Sci*. 2005;4 (1):38-44.
104. Labib HA, Etewa RL, Gaber OA, Atfy M, Mostafa TM, Barsoum I. Paraoxonase-1 and oxidative status in common Mediterranean beta-thalassaemia mutations trait, and their relations to atherosclerosis. *Journal of clinical pathology*. 2011;64 (5):437-42.
105. Adhiyanto C, Hattori Y, Yamashiro Y, Mella F, Nitta T, Iihoshi M, et al. Oxidation status of beta-thalassemia minor and Hb H disease, and its association with glycerol lysis time (GLT50). *Hemoglobin*. 2014;38 (3):169-72.
106. Shazia Q, Mohammad ZH, Rahman T, Shekhar HU. Correlation of oxidative stress with serum trace element levels and antioxidant enzyme status in Beta thalassemia major patients: a review of the literature. *Anemia*. 2012;2012:270923.
107. Pfeifer WP, Degasperi GR, Almeida MT, Vercesi AE, Costa FF, Saad ST. Vitamin E supplementation reduces oxidative stress in beta thalassaemia intermedia. *Acta haematologica*. 2008;120 (4):225-31.
108. Elalfy MS, Saber MM, Adly AA, Ismail EA, Tarif M, Ibrahim F, et al. Role of vitamin C as an adjuvant therapy to different iron chelators in young beta-thalassemia major patients: efficacy and safety in relation to tissue iron overload. *European journal of haematology*. 2015.

109. Elalfy MS, Adly AA, Attia AA, Ibrahim FA, Mohammed AS, Sayed AM. Effect of antioxidant therapy on hepatic fibrosis and liver iron concentrations in beta-thalassemia major patients. *Hemoglobin*. 2013;37(3):257-76.

8. EKLER

EK 1. GÖNÜLLÜ BEYAN FORMU

..... adlı çocuğumun hücrelerindeki hasarların araştırılmasını amaçlayan çalışmada yer almasını gönüllü olarak onaylıyorum. Kan örneklerinin bu projedeki çalışmalarda kullanılmasını kabul ediyorum.

Ad :

Soyad :

Telefon no :

İmza :

Tarih:

EK 2. ANKET

A) Çocuğun ebeveyni tarafından doldurulacak kısım (Dolduranın Adı Soyadı

1.Çocuğun Adı Soyadı:

2.Yaş: Cinsiyeti: Kilo: Boy: Doğum yeri:

3.Öğrenim durumu; İlk Orta Lise

4.Nerede yaşıyor? Adı: Köy İlçe İl

5.Son bir yılda herhangi bir aşı oldu mu? Evet Hayır

Cevabınız evet ise ne aşısı oldu?

6.Son 3 ay içinde röntgen çekti mi? (Diş ve diğer) Hangisi?

7.Doktorunuzun tavsiyesi dışında herhangi bir ilaç alıyor mu? Evet Hayır

Cevabınız evet ise adı nedir?

Ne kadar süredir?

8.Doktorunuzun tavsiyesi dışında vitamin ve mineral takviyesi alıyor mu? Evet Hayır

Cevabınız evet ise adı nedir?

Hangi sıklıkta?

9.Sigara içme alışkanlığınız (Hastanın anne ve babası için ayrı ayrı dolduracak):

Anne Hiç içmedim Eskiden içerdim Ay Yıl önce bıraktım

İçiyorum Günde adet sigara içiyorum..... Ay Yıldır içiyorum

Baba Hiç içmedim Eskiden içerdim Ay Yıl önce bıraktım

İçiyorum Günde adet sigara içiyorum..... Ay Yıldır içiyorum

10.Yaşadığı ortamda Sigara içiliyor Sigara içilmiyor

11.Çay içme alışkanlığı var mı? Evet Hayır

Cevabınız EVET ise aşağıdakilerden hangisi ?

Günde 1 bardak 2 bardak 3 ve daha fazla bardak

12.Yaptığı spor ve aktivitelere ilişkin olarak;

Az enerji gerektiren spor ya da diğer aktivitelere bulunuyorum.

(yürüme, bahçe işleri, ev işleri gibi)

_____ saat/gün

Orta derecede enerji gerektiren spor ya da diğer aktivitelere bulunuyorum.

(ağır ev işleri ya da bahçe işleri, yüzme, bisiklet sürme gibi)

_____ saat/gün

Fazla güç ve enerji gerektiren spor ve aktivitelere bulunuyorum.

(koşu, hızlı yüzme ya da bisiklet sürme, futbol gibi)

_____ saat/gün

13.Beslenme alışkanlığı nedir?

Et ağırlıklı ()

Sebze-meyve ağırlıklı ()

Kuru bakliyat ağırlıklı ()

Balık ve deniz ürünleri ağırlıklı ()

Kızartma, hamur işi ağırlıklı yağlı diyet ()

Dengeli beslenme ()

14.Aile bireylerinde kalıtsal bir hastalık var mı? Varsa nedir?

Ebeveynlerinde talasemi durumu:

Anne: yok () taşıyıcı () var ()

Baba: yok () taşıyıcı () var ()

B) Hekim Tarafından Doldurulacak Bölüm

8.Hasta başka ilaç kullanıyor mu? Evet Hayır

Cevabınız EVET ise nedir? _____

9.Hasta vitamin ve mineral takviyesi alıyor mu? Evet Hayır

Cevabınız EVET ise aşağıdakilerden hangisi?

Multivitamin C vitamini E vitamini Beta karoten Çinko Hangi sıklıkta?

10.Hasta son iki yılda herhangi bir viral enfeksiyon geçirdi mi? (sarılık, kızamık, kızamıkçık, su çiçeği, kabakulak, menenjit vb gibi)

Cevabınız EVET ise hangi viral enfeksiyonu geçirdi

Dr.

Tarih

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Deniz

Soyadı : Menderes

Doğum yeri ve tarihi : İstanbul / 27.09.1985

Eğitimi :

1996-2003 Çorlu Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi, Tekirdağ

2004-2010 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

2011-2016 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
Anabilim Dalı'nda Uzmanlık Eğitimi, Ankara

Yabancı dili : İngilizce

e-mail : denizkrn@gmail.com