

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ORAK HÜCRE ANEMİLİ HASTALARDA METİLENTETRAHİDROFOLAT
REDÜKTAZ GENİNİN C677T POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ**

MEHMET AYTAÇ ÇOKLUK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANTAKYA

OCAK-2007

Mustafa Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN danışmanlığında, Mehmet Aytaç ÇOKLUK tarafından hazırlanan bu çalışma 23/01/2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, BİYOLOJİ Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN	İmza:.....
Üye : Doç. Dr. Hasan KAYA	İmza:.....
Üye : Yrd. Doç. Dr. Birgül ÖZCAN	İmza:.....

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım

Kod No:

İmza
23/01/2007
Enstitü Müdürü
Prof.Dr.Necat AĞCA

Bu çalışma M.K.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca desteklenmiştir.

Proje No:05M0301

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

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
ÖNSÖZ.....	III
ŞİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Hemoglobinopati.....	2
1.1.1. Hemoglobinopatilerin Sınıflandırılması.....	2
1.1.2. Türkiye’de Sağlık Sorunu Olan Hemoglobinopatiler.....	4
1.2. Talasemiler.....	5
1.3. Orak Hücre Anemisi.....	7
1.3.1. Orak Hücre Anemisinin Genetik Geçişi.....	10
1.3.2. Eritrositlerin Oraklaşmasını Etkileyen Faktörler.....	10
1.3.3. Orak Hücre Anemisinin Patolojisi	11
1.3.4. Orak Hücre Anemisinin Tanısı.....	12
1.3.5. Orak Hücre Anemisinin (HbS) Hatay ilindeki Durumu.....	13
1.4. MTHFR C677T Polimorfizminin Klinik ve Biyolojik Önemi.....	14
1.4.1. 5,10 Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geni ve gen ürünleri..	14
1.4.2. MTHFR Gen Varyantları.....	16
1.4.3. MTHFR’nin Klinik ve Biyolojik Önemi.....	17
1.4.4. Metabolik Etkileri.....	17
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	21
3.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler.....	22
3.3. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal ve Solüsyonların Hazırlanması	22

3.3.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar	23
3.3.2. Elektroforez Analiz Solüsyonları	24
3.4. Kan Örneklerinin Toplanması ve Genomik DNA'nın Elde Edilmesi.....	25
3.5. Periferik Kandan Genomik DNA'nın İzolasyonu	25
3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kullanılarak MTHFR Geninin Çoğaltılması.....	27
3.7. Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile Kesim ve Genotiplendirme.....	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	30
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	37
KAYNAKLAR.....	39
ÖZGEÇMİŞ.....	44

ÖZET**ORAK HÜCRE ANEMİLİ HASTALARDA METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ GENİNİN C677T POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ**

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, folatın DNA sentezi veya homosistein remetilasyonuna katılmasından sorumlu bir enzimdir. Flavin adenin dinükleotid (FAD) bağımlı bir enzim olan 5,10 metilentetrahidrofolat redüktaz (EC 1.5.1.20), homosisteinin metionine dönüşümündeki remetilasyondaki metilin kaynağı olan 5,10 metilen tetrahidrofolatın 5- metiltetrahidrofolata geri dönüşümsüz olarak dönüşmesini sağlamaktadır. Enzim, folatın DNA ve RNA biyosentezi işleminde folat havuzundan homosistein remetilasyonuna katılmasını sağlamaktadır. Olağan MTHFR C677T polimorfizmi, enzimin aktivitesini ve bundan dolayı folatın dağılımını etkilemektedir. Homozigot TT genotipinin ortaya çıktığı durumlarda folat metabolizmasının bozulması plazma total homosisteinin artmasına bağlı olarak zararlara neden olmaktadır. Bu zararlar arasında, noral tüp defekti, kolorektal kanserler, antifolat etkili ilaçların yan etkileri gibi çeşitli patolojik sendromlar bulunmaktadır. Bunun yanında orak hücre anemisindeki; felç ve avasküler nekroz gibi ciddi komplikasyonların meydana gelmesinde önemli rol oynayan tromboz oluşumuna neden olduğu ve MTHFR genindeki bu mutasyonun total homosistein seviyesinin artmasının ayrıca koroner kalp hastalıklarının görülme sıklığının arttırdığı daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir.

Bu çalışmada Hatay ilinde orak hücre anemili hasta olduğu tespit edilen 50, orak hücre anemisi olmayan 22 bireyden alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. MTHFR genotipi PCR-RFLP yöntemiyle belirlenmiştir. Hasta olmayan kontrol bireylerin % 22,7'sinde, (5 birey) ve hasta bireylerin %24'ünde (12 birey) oraklaşma krizlerinin artmasına neden olan homozigot TT mutasyonun olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç mutasyonun görülme sıklığının hastalıkla belirgin bir ilişkisi olmadığını göstermektedir. Bu mutasyonun frekansı, Arap ve Kafkas kökenli toplumlarda orak hücreli anemili bireylerde yapılan daha önceki çalışmalardaki %20,7'lik oranla kıyaslandığında; Hatay ilindeki mutasyon sıklığının bu bölgelerdeki topluma yakın olduğu gözlenmiştir.

2007, 53 sayfa

Anahtar Kelimeler : Metilentetrahidrofolat redüktaz; PCR-RFLP; Orak hücre anemisi, Hatay.

ABSTRACT**THE PERFORMING C677T POLYMORPHISM OF THE METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE GENE IN SICKLE CELL ANEMIA**

The enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) directs folate species either to DNA synthesis or to homocysteine (Hcy) remethylation. The flavin adenine dinucleotide (FAD) dependent enzyme 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (EC 1.5.1.20) catalyzes the irreversible conversion of 5,10 methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, which serves as a methyl donor in the remethylation of homocysteine to methionine. The enzyme resides at a metabolic branch point directing the folate pool towards homocysteine remethylation at the expense of DNA and RNA biosynthesis. The common MTHFR C677T polymorphism affects the activity of enzyme and hence folate distribution. Under conditions of impaired folate status, the homozygous TT genotype has been regarded as harmful because it is associated with a high concentration of plasma total homocysteine, increased risk of neural tube defect and colorectal neoplasias, and can also predispose individuals to adverse effects from drugs with antifolate effects. Thrombosis may play an important role in the pathophysiology of the certain complications of sickle cell disease, including stroke and avascular necrosis. These mutations could be called as thrombophilic mutations reported that a thermolabile enzyme variant was associated with increased concentration of plasma total homocysteine which has been identified as a risk factor for incidence of coronary heart disease. Recently, there has been increased research about MTHFR polymorphism associated with neural tube defect, colorectal neoplasias, and coronary heart disease. In this study we obtained genomic DNA from peripheral blood leucocytes 50 person with sickle cell anemia and 22 person without sickle cell anemia in Hatay. MTHFR polymorphism was determined by using PCR-RFLP method. 24% of the individuals with sickle cell disease (12 person) and 22,7% of the control groups (5 person) were homozygous for the mutation. These results do not suggest a significant correlation between prevalence of mutation and sickle disease. Genotype frequencies were determined for sickle cell disease in our study is quite similar to those reported for Caucasians and Arab population (20,7%).

2007, 53 pages

Key words: Methylenetetrahydrofolate reductase; PCR-RFLP; Sickle Cell Anemia; Hatay

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın amacı, Hatay bölgesi de dahil olmak üzere Türkiye’de özellikle Akdeniz Bölgesinde yaygın bir şekilde görülen genetik temelli bir hemoglobinopati olan orak hücre anemisinde, kandaki homosistein düzeyinin miktarının artması ve endotelial hücre fonksiyonlarının değişmesine bağlı olarak tromboz ve benzeri bir takım patolojik durumlara yol açan MTHFR geninin C677T mutasyonunun polimorfizminin Hatay toplumunda ortaya çıkarmaktır. Orak hücre anemisinde MTHFR polimorfizminin belirlenmesi, hangi hasta profilinin orak hücre komplikasyonlarını ne derece geliştireceğinin tahmin edilebilmesi, günümüzde geçerli tedavisi olmayan bu hastalık için önleyici stratejiler ve tedavi edici müdahaleler şansı doğmasına olanak tanıyacaktır. Bu çalışmada orak hücreli hastalardan ve kontrol amaçlı hasta olmayan bireylerden alınan kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra MTHFR gen bölgesi PCR yöntemiyle çoğaltılıp restriksiyon endonükleaz enzimi yardımıyla kişilerin genotiplerini belirleme yoluna gidilmiştir.

Bu çalışmayı yapmamı mümkün kılan, gerek deneysel çalışmalar ve gerekse tez yazma aşamasındaki katkılarından dolayı danışmanım Prof. Dr. Mahmut Çalışkan’a (MKÜ, Biyoloji Bölümü) teşekkür ederim.

Bu çalışma sırasında bana yardımlarını esirgemeyen aşağıdaki kişilere teşekkürü bir borç bilirim. Bana deneysel çalışmalarında her türlü yardımda bulunup, değerli vaktini ayıran Yrd. Doç. Dr. Birgül Özcan’a (MKÜ, Biyoloji Bölümü). Hastalardan kan örneklerinin doğru şekilde toplanması ve temini konusundaki desteklerinden dolayı Antakya Devlet Hastanesi Hemoglobinopati Merkezi (HEMER) hekimlerine çok teşekkür ederim. Aileme ve arkadaşlarıma sabır ve desteklerinden dolayı şükranlarımı sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ado Met	Adenozil Metionin
bp	Baz Çifti
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dTMP	Deoksi Timidin Monofosfat
dUMP	Deoksi Uridin Monofosfat
EDTA:	Etilen Diamin Tetra Asetikasit
Hb:	Hemoglobin
HbA	Hemoglobin A (Erişkin hemoglobini)
Hb F	Hemoglobin F (Embriyonik dönem hemoglobini)
Hb S	Hemoglobin S (Oraklaşmış hemoglobin)
MTHFR	Metilen Tetra Hidro Folat Redüktaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
THF	Tetra Hidro Folat

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Orak hücre anemisine yol açan nokta mutasyonun sebep olduğu aminoasit değişikliği.....	8
Şekil 2. Orak hücre anemisinin kalıtım modeli.....	9
Şekil 3. Hemogloblin molekülünün jelasyonu ve taktoid cisimcikler meydana getirmesi.....	11
Şekil 4. Normal (Hb A) ve oraklaşmış (Hb S) hemogloblin içeren eritrositler.....	12
Şekil5. MTHFR enziminin DNA biosentezi ve yapısal elemanların metilasyon metabolizmasındaki yeri.....	15
Şekil 6. 24 bireye ait periferik kandan izole edilen DNA'nın %0,8 lik agaroz jel elektroforez sonuçları.....	30
Şekil 7. 12 bireye ait 198 bp'lik PCR ürünlerinin amplifikasyonu ve %1 lik agaroz jelde elde edilen görüntüsü.....	31
Şekil 8. MTHFR geninin Hinf I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi.....	32
Şekil 9. 11 bireye ait MTHFR geninin Hinf I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi.....	33
Şekil10. 11 bireye ait MTHFR geninin Hinf I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi.....	34
Şekil 11. 11 bireye ait MTHFR geninin Hinf I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi.....	35
Şekil 12. 11 bireye ait MTHFR geninin Hinf I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi.....	35
Şekil 13. 11 bireye ait MTHFR geninin Hinf I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi.....	36

1.GİRİŞ

Orak hücre anemisi en sık rastlanan hemoglobinopatilerden ikincisi olan, hemoglobinin beta zincirini kodlayan gende meydana gelen bir mutasyondan kaynaklanan ve kronik hemolitik tipte seyreden bir anemi tipidir. Bu mutasyon beta globin zincirinin, altıncı kodonunda bulunan adenin nükleotidinin yerine timin nükleotidinin gelmesiyle meydana gelmektedir. Orak hücreli anemide eritrositler oksijensiz ortamda orak şekline benzer bir görünüm aldığı için bu hastalığa orak hücre anemisi denmektedir. Bu hastalık ilk olarak tanımlanan hemoglobinopatidir. İlk olarak 1904 yılında, zenci bir hastada ortaya çıkarılmıştır (AKSOY, 1975). Orak hücre anemisi tüm dünyada ailesel hemolitik aneminin en sık tipi olarak karşımıza çıkmaktadır. Akdeniz çevresinde hastalığa belirgin bir şekilde rastlanır. Ayrıca kısıtlı alanlarda söz konusu olmak üzere Arap yarımadası ve Hindistan'ın bazı kesimlerinde de görülmektedir. Orak hücre anemisi otozomal resesif kalıtım ile aktarılan tek gen hastalıklarına tipik bir örnektir. Toplumda görülme olasılığı akraba evlilikleri gibi durumlarda oldukça yüksektir (AKSOY, 1978).

Özet olarak, DNA molekülündeki tek bir baz değişikliği anormal hemoglobin moleküllerinin oluşmasına neden olmaktadır. Kırmızı kan hücrelerinin oraklaşması ve bu oraklaşmanın çeşitli organlara giden kan akımının zarar görmesi sonucu kalp, beyin, böbrek gibi hayati organlarda fonksiyon yetmezliğine ve bunun sonucunda ölüme neden olabilmektedir. Orak hücre anemisinin bugün için özel bir tedavisi yoktur, fakat özel yöntemlerle tüp bebek merkezlerinde geliştirilen bazı tekniklerle orak hücreli olmayan gametlerin seçilip suni dölllenmeyle bu hastalığı taşımayan bireylerin doğması sağlanabilmektedir. Bir başka tedavi umudu ise kök hücre ve genetik tedavilerdeki gelişmelerdir (ARCASOY, 2001).

Bu çalışmada Hatay İlinde orak hücre anemili hastalarından ve hasta olmayan bireylerden alınan kan örneklerinden izole edilen genomik DNA üzerinde, mutasyonu sonucu kandaki homosistein düzeylerini değişmesine yol açan MTHFR geninin genotipinin, RFLP-PCR gibi moleküler biyolojik yöntemler yardımıyla belirlenmesi ve bu mutasyonun Hatay ilindeki sıklığının saptanması amaçlanmıştır.

1.1.Hemoglobinopati

Hemoglobin zincirlerinin sentezini sağlayan genler 11 ve 16 sayılı kromozomlarda bulunmaktadır. 16 sayılı kromozomda 2 adet alfa (α) geni (2 lokus), 11 sayılı kromozomda da bir adet beta (β) geni, bir adet delta (δ) ve iki adet gama (γ) geni lokusu bulunmaktadır. Fetal hayatta alfa ve gama genlerinin etkisiyle alfa ve gama zincirleri yapılı ve böylece F hemoglobini oluşmaktadır. Fetal gelişimin son zamanlarında beta ve delta genleri faaliyete geçmekte, A ve A2 hemoglobinleri meydana gelmeye başlamaktadır. Genlerin eksikliği ve zayıflığı transkripsiyon ve translasyon anomalileri ya da globin sentezini yöneten haberci RNA (mRNA) anomalisi gibi nedenlerle bazı globin zincirleri eksik yapılmakta ya da hiç yapılmamaktadır. Bu durumda çeşitli talasemiler ortaya çıkmaktadır. Bu anomalilerin yanında polipeptid zinciri sentezinde yanlışlıklar oluşmakta ve çeşitli anormal hemoglobinler meydana gelmektedir. Hemoglobinin yapısal anormallikleriyle ortaya çıkan bozukluklara hemoglobinopati denilmektedir (HUEHS ve FAROOQUI, 1975; WEATHERALL ve CLEGG, 1987).

1.1.1. Hemoglobinopatilerin sınıflandırılması

Hemoglobinopatilerin büyük bir çoğunluğu tek bir amino asitin diğer aminoasit ile yer değiştirilmesiyle meydana gelmektedir. Ayrıca iki amino asit substitusyonu, delesyonlar, füzyonlar ve uzamış zincirlerde söz konusu olabilmektedir. Bir globin zincirinin yapısal anormallikleriyle ortaya çıkan hemoglobin bozuklukları hemoglobinopatileri meydana getirmektedir. Örneğin tek amino asit değişimiyle oluşan HbS'de β zincirinde N-terminalinden itibaren 6. pozisyondaki glutamik asidin yerine valin geçmiştir (DAVIES, 1991). Anormal hemoglobinlerin sayısı günümüzde 100'den fazla olmakla beraber, bunların yalnız bir kısmı klinik öneme sahiptir. Fonksiyonel özelliklerine göre anormal hemoglobinler şöyle sınıflandırılmaktadır;

- a) Fizyolojik değişiklik yapmayan anormal hemoglobinler, klinik önemleri yoktur.
- b) Hemoglobin sentezinde dengesizlik durumları veya talasemi sendromları. Burada hemoglobinde yapı bozukluğu yoktur. Fakat polipeptid zincirlerinin bir tanesinin sentezi diğerlerine göre az veya çok düşük seviyelerdedir.

- c) Deforme olan hemoglobinler, Hemoglobin S ve Hemoglobin C
- d) Dayanıksız hemoglobinler; Bu hemoglobinler oksidasyona dayanıksız olup. Heinz cisimcikleri şeklinde çökmektedir.
- e) Anormal “hem” fonksiyonuna sahip olan hemoglobinler. Bu grupta M hemoglobinleri (methemoglobinemi) ile oksijene karşı ilgileri azalmış ya da artmış hemoglobinler bulunmaktadır (BÜYÜKELÇİ ve NİŞLİ, 1996).

Hemoglobinin kalıtım şekilleri değişiklikler göstermektedir. Hemoglobinopatilere bağlı bozukluklar heterozigot bir durumda ortaya çıkıyorsa dominant bir kalıttan söz edilebilir. Eğer belirtiler sadece homozigot genotiplerde ortaya çıkıyorsa otozomal resesif kalıttan söz edilmektedir. Buna en güzel örnek olarak hücre anemisi'dir. Bu hastalığın heterozigot olması durumunda taşıyıcılık söz konusu olmaktadır. Eğer hasta iki farklı anormal hemoglobin genini taşıyorsa buna çift heterozigotluk adı verilmektedir (KARLSSON, 1985). Hemoglobinopatilerin oluşmasında rol oynayan genetik olaylar çeşitlidir. Genetik kod üçlü kodonlar halindedir burada bir bazın dahi değişmesi zincirdeki tüm amino asitlerin değişmesine neden olmaktadır. Bu olay eşit olmayan çaprazlamalar sonucu meydana gelen “çerçeve kayması” olayıdır. Buna ek olarak nokta mutasyonu, ve krossingover da hemoglobinopatilerin oluşmasına katkıda bulunan genetik olaylardır (BROZOVIC, 1994). Tek bir DNA nükleotid bazının bir başka bazla değişmesi sonucu genetik kodun değişmesine nokta mutasyon denir. Bu genetik değişim en sık karşılaşılan mutasyon tipidir. İki şekli tanımlanmıştır.

- (i) **Transisyon:** Bir purin bazının diğer bir purin bazıyla veya bir pirimidin bazıyla yer değiştirmesi olayıdır.
- (ii) **Transversiyon:** Bir purin bazının pirimidin bazıyla yer değiştirilmesi veya bunun tam tersi bir durum söz konusudur.

Hemoglobinopatilerin moleküler mekanizması incelendiğinde bunların ya DNA kodonunda nokta mutasyonu ya da homolog olmayan mayotik krossingover ile oluştuğu görülmektedir. İlk

olarak HbS nin bulunmasından sonra elektroforetik olarak farklı bulunan ek varyantlar alfabe harfleri ile işaretlenmiştir (LUKENS ve LEE, 1993).

HbS: Homozigot formu orak hücre anemisi nedenidir. β -globin geninin 6. pozisyonunda adenin- timin nükleotidinin yer değiştirmesi (GAG \rightarrow GTG) sonucu glutamik asit yerine valin amino asitinin yer almasıyla ortaya çıkmaktadır. Bu durum polimerizasyonu başlatmaktadır. Hücre içi fiberlerin formasyonu hücre esnekliğinde anlamlı bir azalmaya ve bazen hücre şeklinde bozukluğa sebep olmaktadır. Bu rijit hücreler mikrosirkulasyonda akımın engellenmesine neden olmaktadır (ATİLLA, 1995).

Hb C: Beta zincirinin 6. pozisyonundaki glutamik asit yerine lizin amino asitinin geçmesiyle oluşur. Elektroforetik mobilitesi yavaştır. Batı Afrika'da taşıyıcıların sıklığı %25'e kadar ulaşabilmektedir Periferik yaymada bağışıklık sistem hücreleri sferositler görülebilir. Kesin tanı hemoglobin elektroforezi ile konulmaktadır (WINTROBE, 1981).

Hb D: β - zincirinin 121. amino asiti glutamik asit yerine glutamin amino asitinin geçmesi sonucu oluşur. Homozigot Hb D'li olgular normal hemoglobin değerine sahiptirler. Eritrosit indeksleri genellikle normal sınırlardadır. Bazı olgularda hedef hücreleri vardır ve ozmotik frajilite azalmıştır (WEATHERAL, 1990).

Hb E: β - zincir geninde β -globin molekülünün 26. amino asitinde glutamin yerine lizin amino asidinin gelmesine yol açan bir nokta mutasyonunun bulunduğu bir hemoglobin varyantıdır. Bu mutasyon β -zincir sentezinin azalmasına yol açmaktadır ve hemoglobinin selüloz asetat jeli üzerinde değişik bir elektroforetik hareketliliği olmaktadır ve hemoglobinin %99'u Hb E, kalanı da Hb F tipindedir. Hemoglobin elektroforezinde yaklaşık %30 Hb E görülmektedir (WEATHERAL,1990).

1.1.2. Türkiye'de sağlık sorunu olan hemoglobinopatiler

Türkiye'de 30'un üzerinde hemoglobinopati varyantının olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde hemoglobinopatilerden en sık rastlanılanları sırası ile; Orak hücre anemisi (Hemoglobin S), beta (β) talasemi , alfa (α) talasemi, HbD, HbO, HbO Arab ve HbE'dir. β -

talasemi ve HbS ülkemizde önemli sağlık sorununa yol açtıkları halde diğer hemoglobinopatilerin görülme sıklığı oldukça düşüktür (BERK ve ÖNDER, 1992).

1.2. Talasemiler

Talasemiler normal hemoglobin polipeptid zincirlerinin bir veya daha fazlasının sentezindeki eksiklik sonucu ortaya çıkmaktadır. Talaseminin genetik yapısı aydınlatılmadan önce klinik şiddetine göre sınıflandırılmaktaydı. Majör klinik bulgular ve ciddi aneminin bulunduğu duruma talasemi majör, aneminin bulunmadığı ve düzenli kan transfüzyonlarını gerektirmeyen duruma ise talasemi intermedia adı verilmekteydi. Talaseminin genetik yapısı anlaşıldıktan sonra talasemi majörlü çocukların anne-babaları daha detaylı araştırılmış ve bunlarda eritrosit morfolojisindeki bozukluklarla birlikte hafif anemi olabileceği gösterilmiştir ve bu duruma talasemi minör adı verilmiştir. Talasemi genini taşımakla birlikte eritrosit morfolojisinin normal olduğu ve aneminin olmadığı durumlara ise talasemi minima adı verilmiştir. Bugün ise talasemiler sentezi yetersiz olan polipeptid zincirinin adıyla anılmaktadır (BÜYÜKELÇİ, 1996).

α -Talasemi

Alfa zincir sentezinin azlığıyla giden tabloya α -talasemi denir. α zincirinin sentezinin yetersiz olduğu bu sendromlarda alfa zincirinin eksikliği ile semptomların şiddeti arasında bir ilişki mevcuttur ve iki grupta incelenmektedir

- i) Delesyon Tipi α talasemi
- ii) Nondelesyon Tipi

Delesyon tipi α talasemi 4 grupta incelenir;

Homozigot α -talasemi: Alfa zincirinin tam yokluğu söz konusudur.

HbH Hastalığı: Orta şiddette hemolitik anemi mevcuttur. Alfa zinciri sentezi beta zincirinin yaklaşık 1/3' ü kadardır.

α - talasemi minör: (Heterozigot alfa talasemi-1): Beta/ Alfa oranı 1.25 kadardır. Eritrositlerde şekil bozukluğu mevcuttur ancak, anemi çok hafiftir veya yoktur.

Sessiz Taşıyıcı Durumu : (Heterozigot alfa talasemi-2): Beta/ Alfa oranı 1.15 kadardır. Hematolojik anormallik yoktur. 3.7 ve 4.2 kilobazlık delesyonlar saptanmıştır (ARCASOY, 1990).

β -Talasemi

β -talasemi, beta zincir sentez azlığıyla oluşan talasemilerdir. Heterozigot sıklığı Doğu Anadolu gibi bazı bölgelerde %0,6 lık bir oranda görülse de Türkiye genelinde %2'dir (BERK, 1992). β -globin geni 11 nolu kromozom üzerindedir ve insanda her bir homolog kromozom üzerinde bir adet olmak üzere iki β geni bulunmaktadır. β geninin proksimalinde sırasıyla delta ve iki farklı gama geni yer almaktadır. β -talasemide, hemoglobinin β zinciri yapım hızı azalmıştır veya β zinciri hiç yapılmamaktadır. β -talasemiye yol açan 130'dan fazla moleküler defekt tarif edilmiştir. Türkiye'de bu farklı talasemi mutasyonları belirli bir coğrafi dağılım özelliği göstermemektedir. Doğu Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi Türkiye'de de en sık rastlanılan talasemi mutasyonu β geninin 1. intronunda 110. nükleotiddeki bir mutasyondur (IVS-110 mutasyonu). Türkiye'de mutasyon sayısının çok fazla olması ve mutasyonların bölgelere göre farklılık göstermemesi popülasyon genetiği açısından çok ilginçtir. β -talaseminin; Beta zincirlerinin hiç yapılmadığı Beta^o (β^o) talasemi tipi ve beta zincirinin az yapıldığı Beta+ (β^+) talasemi tipi olmak üzere iki beta talasemi tipi tanımlanmıştır (ARCASOY, 1990). Beta + talasemi daha yaygın olup, beta zincir sentezi normalin %5-30'u kadar azalmıştır. Talasemi sendromlarının moleküler temeli oldukça karmaşıktır. Bazı vakalarda, globin yapısal gen delesyonları gösterilmiş olsa da gen kaybının eşit olmayan çaprazlaşma sonucu olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca defektif transkripsiyon veya nükleotid mutasyonları sonucunda da talasemi sendromları oluşabilir. Delta ve beta zincirlerinin her ikisinin birden sentez azlığıyla giden tabloya delta-beta talasemi adı verilmiştir (KAN, 1968). Beta genlerinden birinde Hb S mutasyonunun, diğerinde beta talaseminin olduğu tabloya orak hücre/ β -talasemi sendromu adı verilmiştir. Bu durumda anemi ve hemoliz daha hafif olabilir. Bu sendromda klinik oldukça heterojendir. Hb S/ β -talasemi tanısı koymak için mutlaka aile çalışması yapılmalı, anne, babadan birisinin orak hücre, diğerinin, β - talasemi taşıdığı gösterilmelidir. Sadece hastanın incelenmesi bu tanının konulmasında yeterli olmamaktadır. Ülkemizde Hb S/ β -talasemi birlikteliğine özellikle

Mersin Antalya arasında kalan kuşakta, Alanya ve Manavgat'ta rastlanır. Hb SC birlikteliği, Amerika Birleşik Devletleri'nde oldukça sık görülür. Ülkemizde ise sadece 1-2 ailede bildirilmiştir. Hastalık orak hücre anemisi gibi seyretmektedir (GÜRGEY, 1996).

1.3. Orak Hücre Anemisi

Orak hücre anemisi otozomal resesif kalıtımla geçiş gösteren kronik ve hemolitik tipte bir anemi çeşididir. En sık görülen ve prototip olarak kabul edilen hemoglobinopati, β -globin zincirini kodlayan gende meydana gelen bir mutasyondan kaynaklanmaktadır. Diğer anormal hemoglobinlerin %90'ında olduğu gibi HbS de globin zincirindeki tek bir aminoasitin değişimi ile meydana gelmektedir. Hemoglobin birbirine benzer iki çift yani dört adet globin zinciri içeren bir tetramerdir. β zincirinde 6. sırada bulunan glutamik asit valin ile yer değiştirdiğinde HbS meydana gelmektedir (Şekil 1). Orak hücreli anemide eritrositler oksijensiz ortamda orak şekline benzer bir görünüm aldıkları için bu hastalığa orak hücreli anemi denilmektedir. HbS ve HbD, HbS ve HbS-Arab, HbS ve Hb E birliktelikleri söz konusu olmaktadır. Bu durumlarda orak hücredekine benzer genelde daha hafif bir hastalık tablosu ortaya çıkmaktadır (AKSOY, 1985).

HbS oksijensiz ortamda polimerize olur ve uzun çomaklar oluşturur, bunlar hücrenin gerilmesine yol açarak bikonkav disk şekli yerine orak şeklindeki hücrelerin oluşmasına neden olmaktadır (HARRIS, 1956). Hücre tekrar oksijenlendiği zaman oraklaşma bir dereceye kadar geri dönebilmektedir. Ancak tekrarlayan oraklaşma ve geri dönme olayları hücre membranlarında deformasyona neden olmaktadır. Eritrosit membranının başlıca yapısal proteinleri olan aktin ve spektrin polimerize olmasından dolayı eritrositler tamamen oksijenlense bile normal şekline dönememektedir. Membran hasarının olduğu bu hücrelere geri dönüşümsüz (irreversible) oraklaşmış hücreler adı verilmektedir (WINTROBE, 1981).



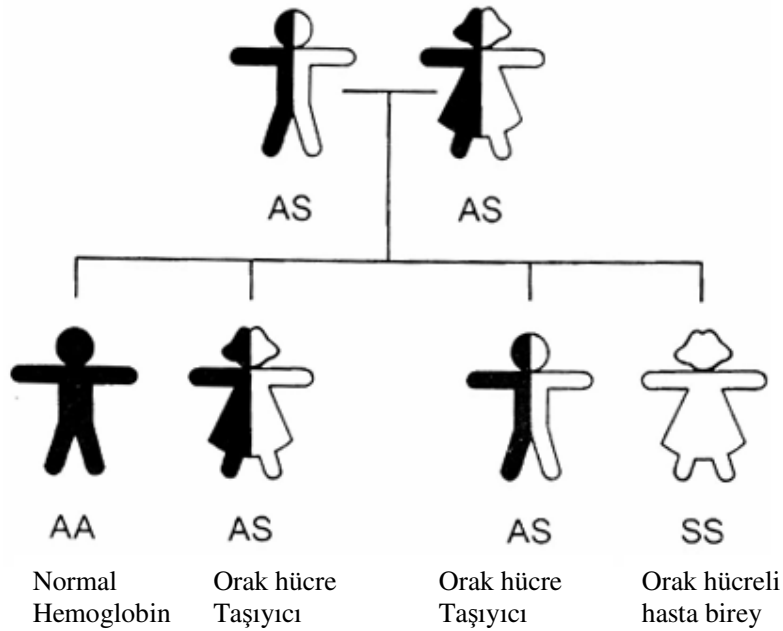
Şekil 1. Orak hücre anemisine yol açan nokta mutasyonun sebep olduğu aminoasit değişikliği (RICHARD, 2000).

Oraklaşan hücrelerden; Na^+ , K^+ , ATPase pompasının parsiyel yetmezliği sonucu K^+ dışarıya çıkar ve Na^+ hücre içine girmektedir. Geri dönüşümlü olarak oraklaşan hücrelerde Na^+ ve K^+ değişimi dengelenmekte ve sonuçta hemoglobin konsantrasyonu ve hücre içi su dengesinde bir değişim meydana gelmektedir. Oraklaşma esnasında hücre membranının geçirgenliğinin artması ile birlikte kalsiyum pompalarının yetersizliği sonucu kalsiyumun hücre içindeki konsantrasyonunda bir artış gözlenmektedir. Oraklaşmada kalsiyum birikmekte, potasyum ve su kaybı meydana gelmektedir ve yeterli oksijenasyona rağmen oraklaşma geri dönüşümsüz bir hale gelmektedir (FALES, 1978).

Orak hücre anemisinde hastalık HbA'nın HbS'e dönüşmesinden doğmaktadır. Orak hücreli olgularda globulin molekülündeki beta (β) zincirinin 6. aminoasiti olan glutamik asit yerine valin aminoasiti bulunmaktadır (Şekil 1). Bu değişiklik her iki moleküldeki iki karboksil grubunun kaybına neden olmaktadır (DAVIES, 1991). Böylece molekül daha çok pozitif yük kazanmaktadır. pH 8,6' da kağıt elektroforezinde HbS molekülün pozitif kutuba HbA'dan daha yavaş olarak hareket ettiği gözlenmektedir. HbS düşük O_2 basıncında erimeyen "tactoid" biçimindedir (YENSON, 1996). HbS içeren hücrelerin şeklinin bozulması, hemoglobin polimerizasyonunun ve agregasyonunun sonucudur (BEUTLER, 1991). Buna ek olarak intraselüler hemoglobin polimerizasyonundan dolayı gelişen deoksijenasyon oraklaşmanın nedenlerindedir. β zincirindeki hidrofilik aminoasit glutamik asit yerine hidrofobik aminoasit valinin geçmesi ile HbS'in β zincirinin N-terminal sonunun hidrofobik valin zincirinin yapımı söz konusudur. Bu oluşum β zincirinin yüzeyinde yer almaktadır ve deoksijene hemoglobin yakınındaki hemoglobine bağlanmaktadır. Giderek monofilament bir görüntü ortaya çıkmakta ve birkaç monofilament bir araya gelerek kablo

görünümünü meydana getirmektedir. Hb S'in fiziksel yapısındaki değişim eritrositlerin şekil değiştirilmesine yol açmakta ve eritrositler uzamış yarım ay şeklini veya bir başka değişle orak şeklini almaktadır. Polimerizasyon sonucu oraklaşan

hücreler oksijenasyonla polimerlerin çözünmesine bağlı olarak tekrar normal şekle dönebilmektedir (GÜRGEY, 1996). Polimerizasyonun 4 fizyolojik belirleyicisi vardır: O₂ basıncı, ısı, Hb S derişimi ve Hb S dışındaki hemoglobinler. HbS içeren bir eritrositte oraklaşmayı sağlayan en önemli faktör, deoksijeneasyondur. Deoksijeneasyonla Hb S'nin oksijene ilgisi düşmektedir, böylece deoksi durum korunmaktadır. Orak hücre anemili hastalarda eritrositler yaklaşık 40 mmHg oksijen basıncında oraklaşma başlamaktadır (BEUTLER, 1991). Asidoz veya artmış eritrosit 2,3-bifosfogliserat hemoglobinin oksijene olan ilgisini düşürmektedir. Böylece deoksihemoglobin S'nin hücre içi polimerizasyonu ve ardından oraklaşma görülmektedir. Eritrositteki HbS içeriğiyle oraklaşma arasında pozitif bir ilişki mevcuttur. Deoksihemoglobin S derişimi 20,8 g/dl'nin üzerine çıktığında polimerizasyon görülmektedir (WANG ve LUKENS, 1999).



Şekil 2. Orak hücre anemisinin kalıtım modeli

1.3.1. Orak Hücre Anemisinin Genetik Geçişi

Orak hücre anemisi otozomal resesif kalıtım ile aktarılan tek gen hastalıklarına (monogenik) tipik bir örnektir. Mutant gen etkisinin ancak geni homozigot olarak taşıyanlarda ortaya çıktığı bir kalıtım mekanizması söz konusudur. Doğuştan olan (konjenital) metabolizma bozukluklarının çoğu bu gruptandır. Genotip olarak orak hücre taşıyıcısı (HbAS) olan ebeveynler %25 olasılıkla orak hücreli hasta çocuğa sahip olma riski taşımaktadır. Böyle anne ve babadan genotipi normal olan (Hb AA) çocuk doğma olasılığı %25'tir (Şekil 2). Çoğu otozomal resesif kalıtmıli genetik hastalıkta olduğu gibi orak hücre anemisi de akraba evliliklerinde (kuzenlerin evlenmesi) gibi durumlarda oldukça sık karşılaşılan bir durumdur (TÜZMEN, 2001).

Orak hücre mutasyonu homozigot ya da heterozigot durumda olabilir. Heterozigot durumdaki kişi anne veya babanın sadece birinden mutasyona uğramış geni almaktadır ve eritrositlerde Hb A ile birlikte Hb S'de bulunmaktadır. Bu durum orak hücre taşıyıcılığı olarak adlandırılmaktadır. Homozigot durumda ise anne ve babanın her ikisinden de mutasyona uğramış gen alınmaktadır. Bu durumda orak hücre anemisi söz konusu olmaktadır. Ayrıca iki değişik hemoglobin varyantının kalıtılmasıyla çift heterozigotluk ortaya çıkabilmektedir; Örneğin Hb SC hastalığı, Hb S- β talasemia gibi durumlarda da orak hücre hastalığı genel bir tanım olarak kullanılmakta ve fenomenin olduğu tüm durumları kapsamaktadır (TÜZMEN, 2001).

1.3.2. Eritrositlerin Oraklaşmasını Etkileyen Faktörler

Eritrositlerin oraklaşmasını etkileyen birçok faktör vardır bunlar;

Hücredeki Hb S miktarı: Heterozigotlarda hemoglobinin yaklaşık %40'ı HbS, geri kalanı ise agregasyon sırasında HbS ile zayıf bir ilişkisi olan HbA'dır. Bu nedenle heterozigotlarda oraklaşma eğilimi azdır ve bu kişiler orak hücre taşıyıcısı olarak adlandırılmaktadır. Homozigotlarda ise bütün hemoglobin HbS'den oluşur ve orak hücreli anemi bütün özellikleri ile homozigotlarda görülmektedir (GÜRGEY, 1996).

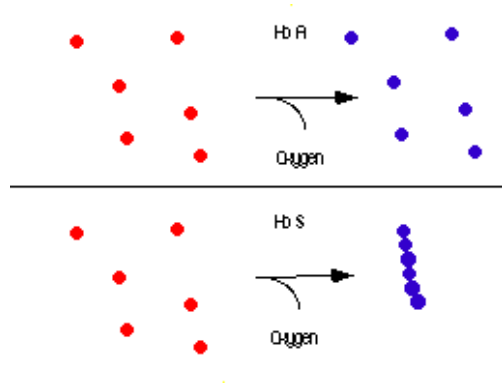
Hb A dışındaki diğer hemoglobinlerin varlığı: Diğer bir mutant β -globulini olan HbC nadir olarak görülmektedir. Amerikalı zenciler arasında taşıyıcılık oranı yaklaşık %2-3'tür. Bu her 1250 yeni doğanda birinin hem Hb S hem Hb C için heterozigot olduğu (bir ebeveynden Hb

S diğ erinden Hb C geni alındığı) anlamına gelmektedir. Hb C Hb S ile agregasyona Hb A dan daha meyillidir ve hem Hb S hem de Hb C' ye sahip olanlar (Hb SC) orak hücre taşıyıcılığ ından daha ağır hastadırlar. Hb F de Hb S ile az ilişkilidir. Bu nedenle orak hücreli anemi olan yeni doğ anlar 5-6 aylık oluncaya kadar yani, Hb F seviyeleri yetişkin seviyelerine düşünc eye kadar hastalık ortaya çıkmamaktadır. Çünkü Hb F diğ er hemoglobin tiplerine göre (HbS, HbA v.b.) alkali denatürasyon ve pH farklılıklarına daha dayanıklıdır. Bu durum orak hücre anemisinde ve bazı hemoglobinopatilerde tedavide Hb F oranının artırılmak istenmesinin altında yatan sebeptir (KILINÇ, 2000).

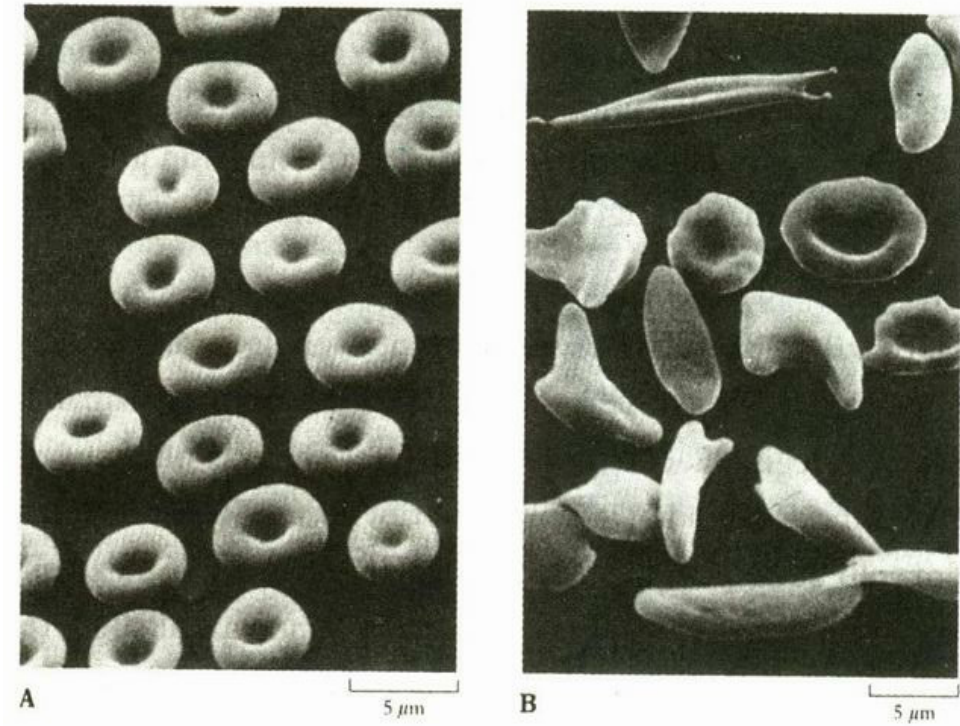
1.3.3. Orak Hücre Anemisinin Patolojisi

Orak hücre anemisi Hb S'in homozigot durumda kişide bulunmasıdır. Orak hücre hastalığı ise sickle cell sendromları yani hem homozigot Hb SS, hem de Hb S ve diğ er bozuklukların bir arada olduğu Hb S/C, Hb S/-thal, Hb S/ D, Hb S/O Arab gibi kombinasyonları belirtmektedir (KILINÇ, 2000).

Hastalığın fizyopatolojisinde, Hb S içeren eritrositlerdeki hemoglobin konsantrasyonunun % 20 üzerine çıkması sonucu eritrosit içi hemoglobinin polimerizasyon sonucu sıvı fazdan jel fazına geçmektedir (Şekil 3). Hb S'nin polimerizasyonu ve katılaşıarak taktoid cisimcikleri oluşturması, eritrositlerin oraklaşmasını ve kırılğan hale gelmesine neden olmaktadır. (Şekil 4) (WANG, 1999). Eritrositlerin damar içi oklüzyonu, vazkülopati sonucu doku ve organ perfüzyon bozukluklarına, bunun sonucunda, iskemi, infarkt, kanamayla birlikte çeşitli doku, organ ve sistemler düzeyinde komplikasyonlara yol açmaktadır (KILINÇ, 2000).



Şekil 3. Hemoglobin molekülünün jelasyonu ve taktoid cisimcikler meydana getirmesi (WANG, 1999).



Şekil 4. Normal (Hb A) ve oraklaşmış (Hb S) hemoglobin içeren eritrositler (WANG, 1999).

Sickle cell krizleri, tuttuğu doku ve organ sistemlerine göre adlandırılmaktadır. Krizlerin fizyopatolojisinde bir tarafta oraklaşmanın getirdiği vazooklüzyona bağlı hipoksi, iskemi, infarkt, kanama, diğer tarafta damar içi ve damar dışı yıkım ve bundan kaynaklanan böbrek perfüzyon bozukluğu ve sonuçları yatmaktadır.

1.3.4. Orak Hücre Anemisinin Tanısı

Orak hücre anemisinin tanısı aşağıdaki yöntemlerle konulabilmektedir;

1. Tam Kan Sayımı: Anemi retikulositoz'un yanı sıra, periferik kan yaymasında irreversibl olarak hücre tanıda yardımcı olmaktadır.

2. Oraklaşma Fenomeni: Sodyum metabisulfit ile hasta eritrositleri oksijensiz ortamda inkübe edilirse 1-24 saat içinde, eritrositlerin oraklaşması izlenebilmektedir.
3. Hemoglobin Elektrofrezisi: pH 8,6 nişasta ve pH 6,1 agar elektrofrezleri yapılarak Hb S tanısı kolayca yapılmaktadır. Orak hücreli anemili kişilerde hemoglobin elektrofrezinde sadece Hb S, Hb F, ve Hb A2, bulunmaktadır. Hb S/ β^0 -talasemi birlikteliğinde de benzer görünüm elde edildiğinden bu iki hastalığın ayırt edilmesi için aile çalışması yapılmalıdır. Hb S/ β^0 -talasemi birlikteliğinde ortalama eritrosit volümünün (OEV) küçük olması ve periferik kan yaymasında hipokrom mikrositik eritrositlerin varlığı, talasemi komponentini düşündürmelidir. Hb S ile birlikte diğer anormal hemoglobinlerin birlikteliği durumlarında tanı koymada DNA yöntemlerinden yararlanılabilmektedir (GÜRGEY,1996).

1.3.5. Orak Hücre Anemisi'nin (Hb S) Hatay ilindeki Durumu

Orak hücre anemisi (Hb S) Hatay ilinde saptanan anormal hemoglobinlerin başında gelmektedir (TOSUN, 1998). Çukurova ve Türkiye'nin başlıca yörelerinde Hb S sıklığı ve odaklarının saptanmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. 1961'de Adana, Mersin ve Hatay'da yaşayan Eti Türklerinde Hb S sıklığını %16,8 olarak bildirilmiştir (AKSOY, 1975). Yüreğir ve arkadaşları 1987 yılında yaptıkları çalışma da Çataltepe köyünde %39,6, Aliğa köyünde % 44,2 gibi yüksek oranlara dikkat çekmişlerdir. Ayrıca Çukurova geneli içinde % 8,3 oranının belirtmişlerdir (TOSUN, 1998). Samandağ Meydan Köyünde %22,1 oranı bildirilmiştir (ARPACI, 1991). Bu değerler oldukça yüksek değerler olup Hb S'in bölgemiz için önemli bir sağlık sorunu olduğunu ortaya koymaktadır. Türkiye genelinde Hb S sıklığının % 0,60 oranında olduğu tespit edilmiştir (ARCASOY, 1978). Bu çalışmalar Hb S'nin tüm Türkiye'nin değil belli bölgelerin önemli bir halk sağlığı sorunu olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Eti Türklerinde Hb S oranının % 13,2 ile 16,8 arasında belirtilen insidansın

Türkiye'nin güneybatısında yaşayan Arapça konuşan (Arap) popülasyonda yüksek olduğu ve ayrıca Hb S'in diğer anormal hemoglobinlerle kombinasyonuna dikkat çekilmiştir. Yapılan çalışmalarda bazı olgularda orak hücreli anemi ile α -talasemi kombinasyonuna dikkat çekilmiştir (AKSOY, 1978). Hb S heterozigot olgularda Hb A % 60, Hb S % 40 olarak gözlenmekte α -talasemi varlığında Hb S oranı azalmaktadır. Tek α -gen delesyonuna sahip Hb S heterozigot olgularda Hb S % 35 kadardır. İki α gen delesyonu varsa HbS % 30'a kadar düşmektedir (WEATHERAL, 1987).

Bazı köylerinde %22 gibi yüksek oranlarda taşıyıcılığı gözlenen orak hücre anemisi hastası çocukların doğmasının engellenmesi amacıyla Hatay ili genelinde evlilik öncesi hemoglobinopati tarama çalışmaları yapılmaktadır. Üç yılda (15 Eylül 1994-05 Eylül 1997 arası) 10.207 çift taranmış ve bunların içinde taşıyıcı evliliği 120 çiftte gerçekleşmiştir (%1,2). Çiftlere verilen genetik danışmanlık hizmetinin ne derece yararlı olduğunu (hamilelik, çocuk doğurma prenatal tanı yaptırma) saptamak amacıyla anket çalışması yapıldığında ulaşılabilen 93 çiftten 5'i evlenmekten vazgeçmiş 1'i evlendikten sonra ayrılmıştır. 87 çiftin değerlendirmesinde çiftlerden 56'sının (% 64,4) taşıyıcı olduğunu biliyor ve 31 çiftin (% 35,6) bilmediği saptanmıştır. Taşıyıcı olduğunu bilenlerden 43'ü (% 76,7) taşıyıcılığın anlamını ve 38'i (% 67,9) hamilelik halinde ne yapmaları gerektiğini biliyordu. Çiftlerin 63'ünde (% 72,4) hamilelik gerçekleşmiş; bunlardan 11'i (% 17,5) prenatal tanıya gitmiştir (YÜREGİR, 1997).

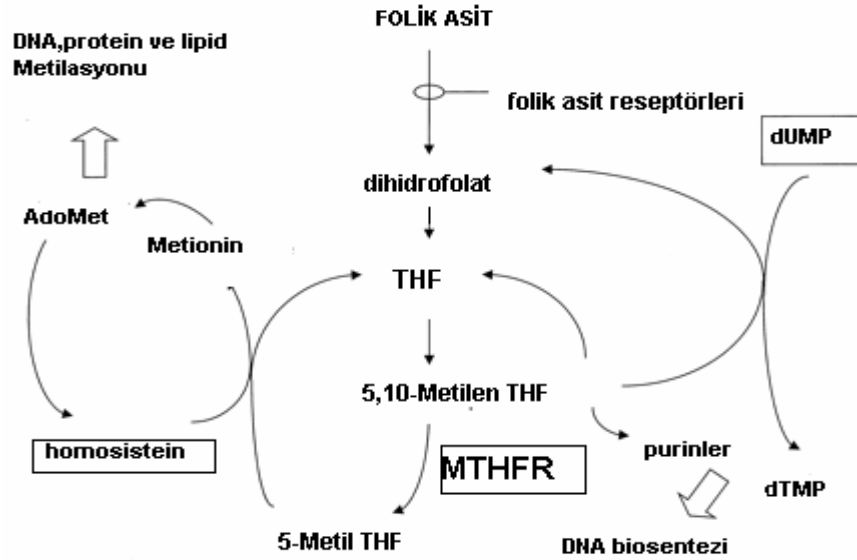
1.4. MTHFR C677T Polimorfizminin Klinik ve Biyolojik Önemi

1.4.1. 5,10- Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geni ve gen ürünleri

5,10- Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geni 1. kromozomun kısa kolu olan 1p36.3 pozisyonunda lokalize olmuş, 2,2 kilobaz uzunluğunda komplementer DNA dizisine sahip ve 11 ekzonu bulunan bir gendir. Bu gene ait alternatif ekleme mRNA'lar hem fare hem de insan genomunda ortaya konulmuştur (GOYETTE, 1998). Bazı dokularda yaklaşık 70 kilodaltonluk molekül ağırlıklı

izoformlarına rastlansa da insanda MTHFR geninin ana ürünü 77 kilodalton ağırlığındaki katalitik aktiviteli bir proteindir (ROZEN, 1997).

MTHFR (EC 1.5.1.20) 5,10- metilentetrahidrofolatın folat metabolizmasında önemli rol oynayan 5-metiltetrahidrofolata dönüşümünü katalize etmektedir (Şekil 5). Folik asit ve MTHFR metabolizması oldukça kompleks biyokimyasal yollardan oluşmaktadır. Nükleotid sentezinin bir parçası olan Folatın oluşumu, 5-metil formuna tek bir karbon grubunun transferiyle gerçekleşmektedir. S-adenosil-metiyonin oluşumunun yanında DNA, proteinler, norotransmitterler ve fosfolipidlerin metilasyonu, homosisteinin metionine remetilasyonu ile olmaktadır (HUSTAD, 2001, Şekil 5). Normal MTHFR aktivitesi dolaşımdaki folat ve metioninin devamını sağlamak ve dolaşımdaki olası homosistein düzeyinin artmasını engellemektir. Folat metabolizması hakkında bilinenler ne kadar fazla olsa da üstelik önemli metabolitlerin yetersiz metilasyonu ve homosisteinin direkt toksisitesi olası teratojen faktör olarak belirtirse de folat metabolizmasındaki anormalliklerin embriyodaki yapısal bozukluklara nasıl etki ettiği net değildir (ROSENQUIST, 1996).



Şekil 5. MTHFR enziminin DNA biosentezi ve yapısal elemanların metilasyon metabolizmasındaki yeri (HUSTAD, 2001).

1.4.2. MTHFR Gen Varyantları

Klinik önemi olan C677T alleli dışında yine doğumsal anomali ve erişkin kalp hastalıkları felç ve benzeri çeşitli klinik durumların ortaya çıkmasından sorumlu A1298C'in C677T alleli kadar etkili olmadığı belirtilmiştir. Bu iki allele göre daha seyrek rastlanmak üzere otozomal resesif metabolik hastalıklar ve homosisteinurinin eşlik ettiği durumlarda gözlenen T1059C allelide mevcuttur (GOYETTE, 1996). C677T alleli, MTHFR geninin 677. sıradaki sitozinin (C) timine (T) dönüşmesiyle meydana gelen bir nokta mutasyon ile karakterizedir. Bu mutasyon sonucunda enzimde, alanin aminoasiti valin aminoasidine dönüşmektedir (FROSST, 1995). C677T alleli genellikle "termolabil mutasyon" olarak adlandırılır bunun nedeni; normal olarak kodlanamayan enzimin 37 C° ve üstü sıcaklıklarda aktivitesinin azalmasıdır (KANG, 1991). Bu yüzden C677T homozigot bireylerin % 50-60 arasında MTHFR enziminin aktivitesi 37 C° de oldukça düşüktür. Yaklaşık % 65 oranında ise 46 C° de kontrol grubuyla kıyaslandığında daha düşük aktivite gözlenmiştir. Heterozigot bireylerin enzimleri yukarıda verilen değerler arasında bir ortalamaya sahipti (ROZEN, 1997). Homozigot C677T allele sahip bireyler yeterli düzeyde folat alınmaması gibi durumlarda kanda homosistein düzeyini artmasına eğilimli bireylerdir. Bu durumda kandaki homosistein seviyesi diyet yada destek yoluyla yeteri miktarda folat alınımıyla normal değerlere çekilebilmektedir (ROZEN,1997).

A1298C allelinde 7. ekzonda glutamat amino asidini alanin amino asidine çeviren bir nokta mutasyonu saptanmıştır (WEISBERG, 1998). Bu allel aynı zamanda C1298A olarak da adlandırılmaktadır (TREMBATH, 1999). Kodlanan enzimin aktivitesi C677T allelindekine nazaran düşüktür. A1298C alleli bakımından homozigot olan bireyler kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında daha yüksek serum homosistein seviyelerine sahip olmadıkları gözlenmesine de, her iki allel (C677T ve A1298C) bakımından heterozigot olan bireylerin homozigot C677T bireylerinde görülen düşük folat seviyesi ve yüksek serum homosistein seviyesi gibi benzer biyokimyasal profillere sahip oldukları gözlenmiştir (GABREELS, 1998).

T1059 allelinin klinik bir fenotipin ortaya çıkmasından sorumlu olduğuna dair bulgular yoktur. Bu allel ile bugüne dek yapılan çalışmalar bu mutasyonun sesiz bir mutasyon olduğu ve A1298C mutasyonunun kalıtımına yardımcı bir mutasyon olduğunu ortaya koymuştur (TREMBATH, 1999).

1.4.3. MTHFR'nin Klinik ve Biyolojik Önemi

MTHFR geninin C677T allelinin neden olduğu çeşitli klinik durumlardan ilki; değişen folat dağılımını ve artan total homosistein konsantrasyonunu içeren metabolik değişim ve bu etkinin yaşam standardı ve hastalıklara olan etkidir. Buna ek olarak bu allelin özellikle kardiyovasküler, kolorektal kanserler, doğumsal anomaliler ve gebelik komplikasyonları gibi ciddi hastalıklarla ilişkili bir risk faktörü olduğu vurgulanmıştır. MTHFR genindeki bu polimorfizmin anlaşılması ve çalışılması günümüzde ve gelecekte söz konusu metabolik mekanizma ile etkili olan ilaçların terapisi ve geliştirilmesi açısından oldukça önem kazanmıştır (HUSTAD,2001).

1.4.4. Metabolik Etkileri

Bir çok çalışma tutarlı bir şekilde, homozigot C677T allelinin yüksek plazma homosistein seviyesiyle ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Homosistein konsantrasyonu ve folat seviyeleri üzerine etkisi homozigot TT durumlarında meydana gelmektedir (BRATTSTROM, 1998). Bu durum, TT genotipli bireylerle CC genotipli bireyler arasında karşılaştırma yapıldığında plazma homosistein miktarları ve folat düzeyleri arasındaki ters ilişkiyi daha da güçlü kılmaktadır (GUTTOMSEN, 1996). C677T genotipinin geçişi durumunda verilecek en iyi yanıt folat seviyelerini yüksek tutma ve folat alımıdır. Günlük, 0,5-2,0 mg folik asit alımı TT homozigot bireylerin total homosistein düzeylerinde belirgin bir azalmaya neden olmuştur ki bu seviye homozigot CC genotipli bireylerdeki seviyeler ile hemen hemen aynı seviyelerde seyredilmektedir. Genotipe bağlı olarak eritrositlerin folat konsantrasyonları da değişmektedir (NELEN, 1998).

Vitamin B2 ve B12

Yapılan çalışmalar, riboflavin konsantrasyonunun homosisteinin plazma konsantrasyonu ile ters ilişkili olduğunu saptamıştır. Bu ilişki sağlıklı bireylerde, hem düşük hem de yüksek serum folat konsantrasyonlarında gösterilmiştir. Genotipe bağlı olarak temel olarak ilişkilendirme C677T genotipli bireylerde yapıldığında; folat dağılımının ve total plazma homosistein konsantrasyonunun olası regülasyonunun riboflavin durumu ve C677T

polimorfizmi ile açıklanabilmesi MTHFR için bir kofaktörü sayılabilen FAD'ın fonksiyonları ile açıklanabilir (HUSTAD, 2000). Serum kobalamin ile plazma homosisteinin ters ilişkili belirleyicisi olarak tanımlanabilir. Total homosistein ile kobalamin arasındaki negatif ilişki TT genotipli bireylerde CT yada CC bireylere göre belirgin bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Total homosistein ile kobalamin arasındaki bu ilişkinin folat desteğinden sonrada sürmesi kobalamin ve homosisteinin folat miktarı ve durumundan etkilenmediğini işaret etmesi açısından not edilmesi gereken bir durumdur (ANGELO, 2000). Bu ilişkinin mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir fakat TT genotipli bireylerin kanlarında total homosistein düzeylerinin yüksek oldukları belirtilmiştir (HUSTAD,2001).

DNA Metilasyonu

Yapılan çalışmalar TT genotipine sahip bireylerin CC genotipli bireylerle kıyaslandığında periferik lokositlerinde DNA metilasyonunun daha az olduğu saptanmıştır. Bu durumun olası nedeni mutasyon sonucu S- Adenosilmetiyonin biyosentezi için gerekli olan 5-metiltetrahidrofolat'ın miktarındaki azalmadır. (STERN, 2000). Bu gözlem TT genotipli bireylerde hiperhomosisteinemiye ek olarak folat dağılımının sonuçlarının sekonder metabolik etkilerini göstermek açısından oldukça önemlidir. Aynı zamanda DNA metilasyonunun karsinogenez (kansere oluşumu) aşamasında önemli bir faktör olması, üzerinde durulması gereken bir konu olmaktadır (KIM, 1999).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Orak hücre anemisi her ne kadar tek bir mutasyonun sebep olduğu bir hastalık olsa da, hasta bireylerin gen çeşitliliği ve multigenetik etkileşimler, orak hücreli bireylerin fenotiplerinin birbirlerinden farklı olması ve komplikasyonlarının çeşitli derecelerde görülmesine neden olmaktadır (KUTLAR, 2001). Trombotik aktiviteyi etkileyen mutasyonlar ve bu mutasyonların ne şekilde etki ettiklerinin anlaşılması hastalığın fenotipinin belirlenmesine katkıda bulunmaktadır. Tromboz oluşumunu tetikleyen orak hücre anemisinin komplikasyonları ve patogenezinde önemli rol oynayan ve kalıtsal olarak damarsal hasarlanma riski faktörü olan mutasyonlardan biride Metilentetrahidrofolat genindeki C677T nokta mutasyonudur (ZIMMERMAN, 1998).

NAGLAA 2004 yılında, Suudi Arabistan'ın doğu bölgesindeki orak hücre anemili hastalarda MTHFR C677T ile birlikte faktör V (FV Leiden) mutasyonunun hastalığın komplikasyonlarına olan etkisini araştırmıştır. FV Leiden mutasyonunu orak hücre anemili hastaların fenotipik farklılıklarının oluşmasına neden olan çeşitli genetik faktörlerden biri olarak gösterirken aynı zamanda, kandaki homosistein seviyesinin artması ve buna bağlı olarak ilişkilendirdikleri damarsal hasarlanmalara bağlı trombotik değişimlerin meydana gelmesine neden olan MTHFR C677T mutasyonunda özellikle homozigör T/T bireylerde daha çok etkili olduğunu saptamıştır.

Prematüre damar hasarlanmalarının bağımsız risk faktörü olan hiperhomosisteinemi, folat metabolizmasının biyokimyasal metabolik yollarındaki çeşitli enzimatik eksiklikten kaynaklanmaktadır. Methilentetrahidrofolat redüktaz geninin 677. nükleotidindeki C→T değişiminin meydana gelmesi sonucu azalan enzim aktivitesi kandaki homosistein miktarını artmasına ve hiperhomosisteinemi oluşumuna neden olmaktadır (CLARKE, 1991). Brezilya ve Amerika Birleşik Devleti genelindeki orak hücre anemili hastalarda yapılan çalışmalarda, iskemik hasarlanmayla hiperhomosisteinemi arasında bir ilişkinin olmadığı ileri sürülmüştür (ANDRADE, 1998).

KUTLAR 2001 yılında, MTHFR mutasyonunun Kuveyt'li Arap orak hücre anemisi hastalarında yaptıkları çalışmada, oraklaşma krizlerini tetikleyen avasküler nekroz oluşumunun gelişmesini sağlayan bir risk faktörü olduğunu saptamış 677 C→T mutasyonunun

Kuveyt genelindeki orak hücre anemi hasta gurubunda osteonekroz ve bazı hematolojik parametrelerle ilişkisini araştırmıştır (KUTLAR ve ark., 2001).

Hiperhomosisteinemi serebral, periferal ve koroner arter hastalıkları için bağımsız bir risk faktörüdür. Homosistein, trombojenik nidusların oluşması ve düz kas hücrelerinin proliferasyonunu artırarak damar endoteline zarar vermektedir. MTHFR geninin 677. nükleotitteki C→T değişimiyle meydana gelen nokta mutasyon alanin amino asitinin valin amino asitine dönüşmesine ve enzim aktivitesinin ve termolabilitesinin azalmasına neden olmaktadır (FROSST, 1995). Bu mutasyonun görülme sıklığı çeşitli etnik gruplarda farklılıklar göstermektedir örneğin; Kanadalı Fransız toplumunda % 38, Brezilyada yapılan çalışmada beyaz tenlilerin % 36 sında, Asyalıların % 24'ünde, Afrikalı zencilerde %12, Brezilyalı zencilerde % 12 olarak bildirilmiştir (FRANCO, 1998). Afrika kökenli Amerikan orak hücreli hastalar arasında yapılan iki çalışmada %9 ve % 15 lik oranlar bildirilmiştir (ANDRADE, 1998). Kafkas toplumunda bu oran % 20,7 olarak saptanmıştır (KUTLAR, 1998).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada Antakya Devlet Hastanesine bağlı bir merkez olarak Hatay ilinde başta orak hücre anemisi olmak üzere bir çok kalıtsal kan hastalığının tedavisi, hastaların bakımı ve hastalığı önleme amacıyla taşıyıcı olma riski olan bireylere evlilik öncesi tanı hizmeti veren hemoglobinopati merkezindeki (HEMER), orak hücre anemisi tanısı konmuş hasta ve hasta olmayan bireylerden alınan kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınıp laboratuara getirilip 4 C° de saklandı. Tuzla çöktürme yöntemiyle genomik DNA'nın izolasyonu yapıldı (SAMBROOK, 1989). DNA örnekleri C677T polimorfizimleri bakımından MTHFR genotiplerini belirlemek için spesifik primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonuyla amplifiye edildi. Bu reaksiyon sonucu oluşan ürünler restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilerek 198 bp'lik DNA fragmentinin 175 ve 23 bp'lik fragmentlere ayrılması sağlandı. Kesim işleminden sonra DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezi ile birbirinden ayrılarak UV görüntüleme sistemiyle incelendi. C677T mutasyonu için; 677CC homozigot normal 198 bp, 677CT heterozigot 198, 175 ve 23 bp ve 677TT homozigot mutant 175 ve 23 bp olan üç farklı genotip belirlendi.

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

1. Taq DNA polimeraz enzimi (Fermentas) (5U/μL)
2. Magnezyum klorür (MgCl₂) (Fermentas) (25mM)
3. PCR tamponu (Fermentas) (10X) (Magnezyum Klorürsüz)
4. dNTPs set (dATP,dTTP,dCTP,dGTP) (Fermentas)
5. Etidiyum bromid (Sigma) (E7637)
6. Agaroz (Sigma) (A9539)
7. Akrilamid (Sigma) (A3553)
8. N,N'- Metilen-bis-akrilamid (Sigma) 7279
9. Amonyum per sülfat (APS) (Sigma) (A3678)
10. Tetrametil etilen diamin, (TEMED) (Merck) (1.10732)
11. Tris-baz (Sigma) (T6066)
12. Triton X-100 (Sigma) (T6066)
13. Proteinaz- K (Sigma) P2308 100 mg yada (in vitrogen) (25530.031)
14. Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (Sigma) (E9884)

15. Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma) (L3771)
16. Restriksiyon enzimi Hinf I (Fermentas) ER0803
17. Hinf I (New England Bio Lab) R.0155 S
18. DNA M.W. Marker (Fermentas) Pst I Marker 24)
19. DNA M.W. Marker (Fermentas) 100 bp DNA ladder SM 02411213
20. Borik Asit (Sigma) (B7901)
21. Sodyum klorür (NaCl) Sigma (9888)
22. Sükroz (Sigma) (S0389)
23. Bromfenol mavisi (Sigma) (B5525)
24. Etil Alkol (Merck) (1.00986)
25. Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck) 106469

3.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler

1. Otomatik Eppendorf pipetler (10-100-1000 µL)
2. Soğutmalı Santrifüj (Hettich)
3. Su banyosu (Nüve)
4. Hassas Terazî (Ohaus)
5. pH metre (Hanna)
6. Jel görüntüleme sistemi UVP Bioimaging System (Labswork)
7. Vorteks (Ika)
8. Elektroforez güç kaynağı (Biogen)
9. Horizontal (yatay) elektroforez sistemi (Biogen)
10. PCR cihazı (Termal Cyclers Eppendorf Mastercycler)

3.3. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal ve Solüsyonların Hazırlanması

Kullanılan kimyasal ve solüsyonların hazırlanmasında kaynak olarak “Molecular Cloning”(SAMBROOK, 1989) esas alınmıştır. Hazırlanan solüsyonlar genel olarak konsantre stoklar halindedir. Çalışma konsantrasyonlarını elde etmek için stoklardan belli oranlarda alınarak seyreltilmiştir.

3.3.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar

1. Eritrosit Lizis Tamponu (pH=7,5)

1 Litre için;

0,32 M Sükroz	Sükroz	=	109,563 gr
10 mM Tris-HCl (pH=7,5)	Tris-HCl	=	1,211 gr
5mM MgCl ₂	MgCl ₂	=	1,015 gr
%1 Triton X 100	Triton X- 100	=	10 gr

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözdürülüp otoklavlandı. pH = 7,5 olarak ayarlandı. Triton X-100 otoklavlanmadan sonra ilave edildi.

2. Fizyolojik Tampon (pH=7,5)

1 Litre için

0,075 M NaCl	NaCl	=	4,383 gr
0,025 M EDTA	EDTA	=	9,305 gr

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözdürülüp otoklavlandı. pH = 7,5 olarak ayarlandı

3. TE-9 (pH=9)

1 Litre için

500 mM Tris baz	Tris baz	=	60,5 gr
20 mM EDTA	EDTA	=	7,44 gr
10 mM NaCl	NaCl	=	0,58 gr

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözdürülüp otoklavlandı. pH = 9 olarak ayarlandı.

4. %10'luk SDS

20 ml için;

2 gr SDS tartılıp, üzerine bir miktar (20 ml'den az) saf su ilave edilip iyice çözdürüldü. Son hacim 20 ml olacak şekilde ayarlandı.

5. Proteinaz-K (10mg/ml)

100 ml için;

10 gr PK tartılır, üzerine bir miktar (100 ml'den az) saf su ilave edilip iyice çözdürüldü. Son hacim 100 ml olacak şekilde ayarlandı.

6. 6 M NaCl

1 litre için;

321.4 gr NaCl tartılıp, üzerine bir miktar (1000 ml'den az) bidistile su ilave edilip iyice çözdürölüp son hacim 1000 ml olacak şekilde ayarlandı.

7. TE tamponu (Tris/EDTA) (pH= 8)

10 mM Tris-Cl (pH=8)

0,1 mM EDTA (pH=8)

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözdürölüp otoklavlandı. pH = 8 olarak ayarlandı.

8. % 70 Etil Alkol

100 ml için;

70 ml etil alkol (absolut) ve 30 ml bidistile su ilave edildi.

3.3.2. Elektroforez Analiz Solüsyonları**1. 10 X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok solüsyonu**

108 gr Tris baz (890 mM)

55 gr borik asit (890 mM)

40 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0 (20 mM)

Bir miktar bidistile su içinde çözündükten sonra pH 8.0 olarak ayarlanıp solüsyon 1 litreye tamamlandı.

2. 1 X TBE (1 litre için)

100 ml 10 X TBE stok solüsyonu

900 ml bidistile su

3. Etidyum bromid solüsyonu (10 mg/ml)

0,1 gr etidyum bromid

10 ml bidistile su içinde çözünüp ışık almayan bir cam şişe içinde buzdolabında muhafaza edildi.

4. DNA Yükleme Tamponu (Loading dye) (6X)

40 gr sükröz

0,25 gr bromfenol mavisi

100 ml olacak şekilde bidistile su içinde çözüldü. Ependorf tüplerine paylaştırılarak buzdolabında muhafaza edildi.

6. %1'lik Agaroz jel

1 gr agaroz tartıldı 100 ml 1X TBE içinde çözdürüldü

3.4. Kan Örneklerinin Toplanması ve Genomik DNA'nın Elde Edilmesi

Kan örnekleri Antakya Devlet Hastanesi Hemoglobinopati Merkezinden (HEMER) elde edilerek çalışılmıştır. Orak hücre anemisi olduğu tespit edilmiş 55 hasta ve hasta olmayan 25 bireyden alınan kan örnekleri EDTA'lı tüplere konularak laboratuara getirilmiştir. DNA izolasyonuna kadar +4 C° de saklanmıştır. Her örnek numaralandırılmış eppendorf tüplere alınarak DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.5. Periferik Kandan Genomik DNA'nın İzolasyonu

DNA üzerinde değişik amaçlı ve çok yönlü analiz yapılmasına olanak sağlayan ve gen teknolojisi uygulamalarında ilk basamak DNA'nın elde edilmesidir. Genomik DNA nükleuslu hücrelere sahip periferik kan, kemik iliği, amniyon sıvısı gibi herhangi bir insan doku parçasından elde edilebilmektedir.

Periferik kandan DNA eldesi için tuzla çöktürme yöntemi modifiye edilerek uygulandı (SAMBROOK, 1989)

Laboratuara EDTA'lı tüplerle gelen kan örnekleri numaralandırılmış 1,5 ml'lik eppendorf tüplere alınarak sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

1. 1,5 ml'lik eppendorf tüpü içersine iyice alt üst edilmiş kan örneğinden 700 µl, Eritrosit lizis solüsyonundan 700 µl konulup dikkatlice alt üst edilerek 3-5 dk oda ısısında bekletildi. 4000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.
2. Elde edilen pellet üzerine 700 µl eritrosit lizis solüsyonu eklendi. Tüp kuvvetlice çalkalanarak pellet çözdürüldü. 4000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.
3. Pellet üzerine 1000 µl (1 ml) fizyolojik tampon eklenip pellet çözdürüldü 4000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.
4. 300 µl TE-9 tamponu ilave edilip pellet çözdürüldü. Bunun üzerine 100 µl SDS ile 20 µl Proteinaz-K ilave edildi. Vorteks üzerinde tüp içeriği iyice karıştırıldı 65 C° de 1-2 saat benmaride tutuldu 20 dk da bir alt üst edildi.
5. İnkübasyon sonunda tüp içeriğine 200 µl 6M NaCl ilave edildi. Oluşan beyaz görünümlü yapıyı dağıtmak için tüp kuvvetlice çalkalanıp 13500 rpm de 10 dk santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonunda süpernatant başka bir tüpe alınıp pellet atıldı. Tekrar 13500 rpm de 5 dk santrifüj edildi.
7. Yine süpernatant başka bir tüpe alınıp pellet atıldı. Tuzdan arınmış olan süpernatant üzerine 900 µl %99' luk etil alkolden eklendi Tüp iyice karıştırıldı. Bu aşamada DNA ipliksi formunda görülebilmektedir.
8. 13500 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.

9. Tüpün dibine yapışan DNA'yı kaldırmak için %70 lik etil alkolden 1000µl eklendi 13500 rpm de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi.
10. Süpernatant dökülüp tüp ters çevrilip DNA'nın tüpe yapışması için 15 dk beklendi
11. DNA'nın büyüklüğüne göre 50-100 µl TE (Tris-EDTA) konuldu.
12. DNaz aktivitesini ortadan kaldırmak için 70-80 °C benmaride 10-15 dk inkübasyona bırakıldı.
13. DNA örnekleri + 4 °C kullanılıncaya kadar muhafaza edildi. Uzun süreli muhafazalar için -20 °C ye alındı.

3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kullanılarak MTHFR Geninin Çoğaltılması

Periferik kandan izole edilen genomik DNA örneklerinde, MTHFR gen bölgesi, Polimeraz zincir reaksiyonu adı verilen, moleküler düzeyde hücre içersinde gerçekleşen DNA sentezini, spesifik primerler ve uygun şartların sağlanması ile analizi yapılması istenen gen bölgesinin deneysel ortamda çoğaltılması esasına dayanan bir yöntemle MTHFR geninin 198 bp'lik kopyaları elde edildi. Reaksiyon şartları hazırlanmadan önce DNA ekstraksiyonun doğru yapıp yapılmadığını ve izole edilen DNA'nın gözlenmesi adına DNA örnekleri % 0,8 lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. C677T mutasyonu için;

5'-TGAAGGAGAAGGAGGTGTCTGCGGGA-3' (ekzonik)

5'-AGGACGCGGTGCGGTGAGAGTG-3' (intronik) primerler kullanıldı (DİKMEN,2004).

DNA örneklerinin PCR ile amplifikasyonu için;

- Her bir primerden 35 pikomol
- Her bir dNTP'den 0,2 mM,
- 1,5 mM MgCl₂
- % 10 Reaksiyon Tamponu

- 1U Taq Polimeraz
- Distile su

Belirtilen oranlarda oluşturulan reaksiyon, özel PCR eppendorf tüplerinde karıştırıldı Termal Cycler Cihazı kullanılarak, 94 °C de 4 dk denatürasyon ve ardından 94 °C de 1 dk, 61 °C 1 dk, 72 °C de 1,5 dk, şeklinde 35 döngü tekrar edilip son olarak uzama reaksiyonları için 72 °C de 10 dk da bekletildi (FROST, 1995).

3.7. Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile Kesim ve Genotiplendirme

Restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak yapılan analiz DNA üzerindeki önemli bir kalitatif değişikliğin tespitine dayanmaktadır. Doğrudan gen tanısının varyasyonlarından biri olan bu teknikte bazı mutasyonların özellikle nokta mutasyonlarının normal DNA'daki belli restriksiyon bölgelerini değiştirmesi yada ortadan kaldırması temeline dayanmaktadır. Örneğin normal MTHFR geninin 677. sıradaki sitozinin (C) timine (T) dönüşmesiyle C677T alleli meydana gelmektedir ve Hinf I restriksiyon endonükleaz enziminin tanıma bölgesinin değişmesine neden olmaktadır. Normal bir bireyin DNA sı Hinf I ile kesilip agaroz jel üzerinde analizi yapıldığında 198 bp'lik bir fragman gözlemlenirken, mutasyona uğramış bireylerden alınan örneklerin kesimi sonucu 198 bp, 175 bp ve 23 bp lik üç ayrı fragman gözlenmektedir. Eğer mutasyon heterozigot durumda ortaya çıkmışsa yapılan analizde bir 198' lik birde 175'lik fragman gözlenirken, homozigot mutasyona uğramış bireylerde sadece her iki allele ait 175 bp'lik fragmanlar gözlenmektedir (ZIMMERMAN, 1998).

Uygun koşullarda yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünler Hinf I (fermentas) restriksiyon enzimi kullanılarak aşağıdaki oranlarda optimum koşullar sağlandı;

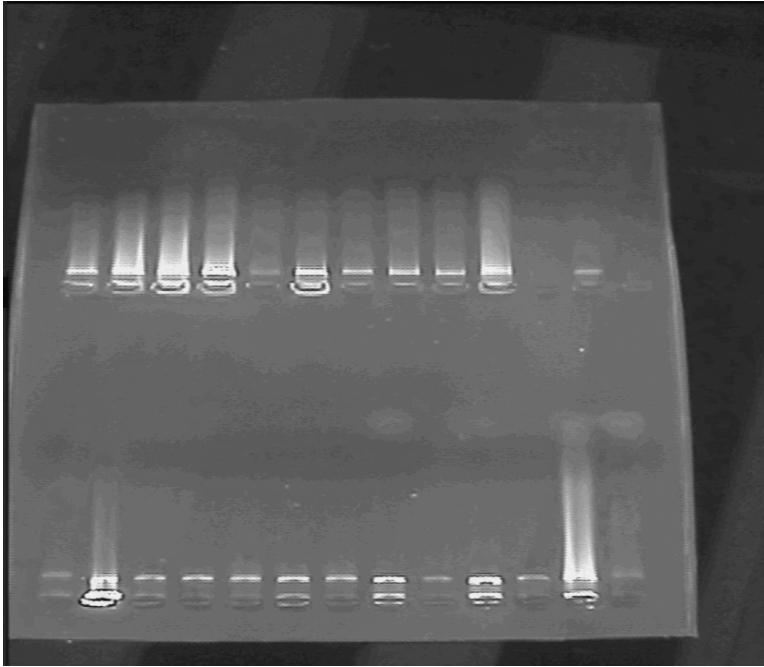
- Fermentas'ın enzim ile beraber verilen 10 X NE tamponu..... 2,5 µl
- Kesim yapılacak DNA (kalıp DNA=PCR DNA' sı)..... 10 µl
- Hinf I Restriksiyon Endonükleaz enzimi (Fermentas)..... 0,5 µl (5U)
- Distile su..... 12 µl

37 °C de 1-1,5 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra etidium bromidli %2,5 lik agaroz jelle yürütölüp UV ışık altında görünlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

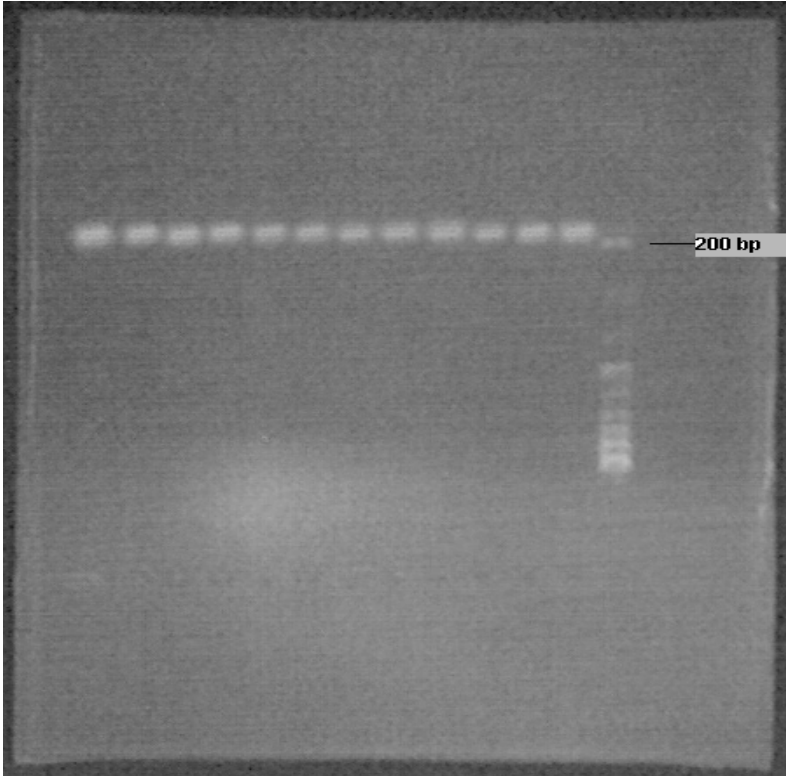
Bu çalışmada, ülkemizde Akdeniz bölgesi ve Hatay genelinde taşıyıcılık ve hastalık oranı oldukça yüksek olan hemoglobinopatilerden biri olan Orak Hücre Anemisi hastalarının, farklı fenotiplerinin meydana gelmesinde rol oynayan genetik belirteçlerinden biri olan ve damarsal hasarlanma ve buna bağlı avasküler nekroz ve oraklaşma krizlerinin görülme sıklığına etkisi olan MTHFR geninin C677T polimorfizminin (KUTLAR, 2001) bölgemizdeki hasta ve hasta olmayan bireylerden elde edilen örnekler üzerinde analizi yapılmıştır.

Toplanmış olan kan örneklerinden ilk olarak genomik DNA tuzla çöktürme yöntemiyle izole edilmiştir (SAMBROOK, 1989). İzole edilen DNA kontrol amaçlı %0,8'lik agaroz jele yüklendikten sonra elektroforez sistemine verilen elektrik sayesinde oluşan elektriksel alanda DNA'molekülünün hareketi gözlenerek çalışılan örneklerde DNA'nın varlığı gösterilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. 24 bireye ait periferik kandan izole edilen DNA'nın %0,8 lik agaroz jel elektroforez sonuçları

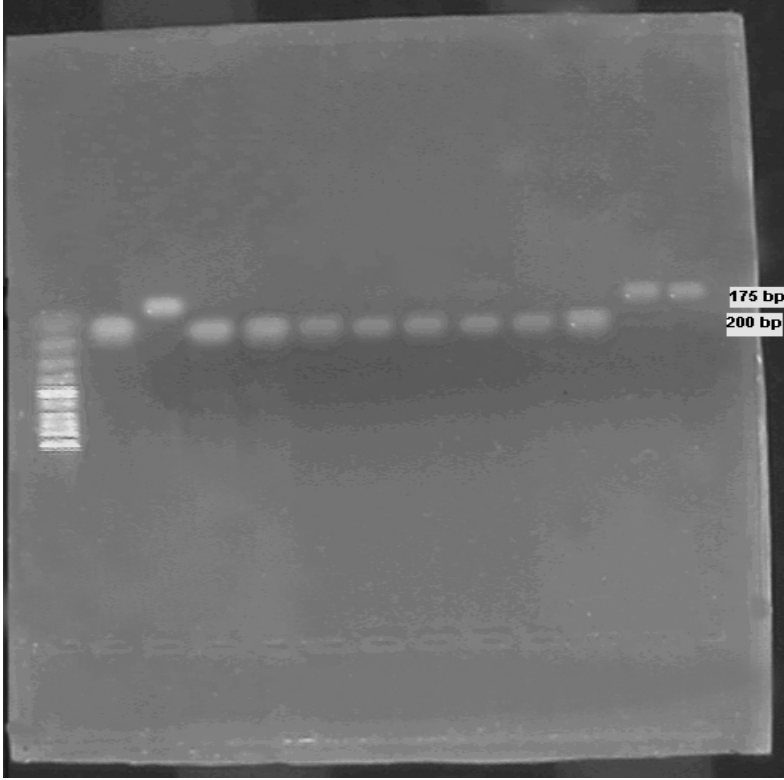
DNA izolasyonu başarılı geçen 72 örnekten, 22 orak hücre anemisi olmayan, 50 orak hücre anemisi hastası olan bireylerde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) MTHFR gen bölgesi çoğaltılmış sonuçta 198 bp uzunluğunda bir gen bölgesi elde edilmiştir. C677T mutasyonu için (ekzonik) 5'-TGAAGGAGAAGGAGGTGTCTGCGGGA-3' ve (intronik) 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3' primerleri kullanılmıştır (DİKMEN, 2004). PCR tüpleri Termal Cyler cihazında, 94 °C de 4 dk denatürasyon ve ardından 94 °C de 1 dk, 61 °C 1 dk, 72 °C de 1,5 dk, şeklinde 35 döngü tekrar edilip son olarak uzama reaksiyonları için 72 °C de 10 dk da tutulmuştur (FROST, 1995). PCR reaksiyonu sonunda 198 bp lik MTHFR gen bölgesi çoğaltıldıktan sonra %1'lik agaroz jelde yürütülerek PCR ürünleri kontrol edilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. 12 bireye ait 198 bp'lik PCR ürünlerinin amplifikasyonu ve %1 lik agaroz jelde elde edilen görüntüsü

MTHFR geninin 677. sıradaki sitozinin (C), timine (T) dönüşmesi sonucunda C677T alleli meydana gelmektedir. Bu değişim Hinf I restriksiyon endonükleaz enziminin tanıma bölgesinin değişmesine neden olmakta ve 198 bp lik PCR ürünleri Hinf I endonükleaz enzimiyle kesim reaksiyonuna girdiğinde sonuçta 198 bp, 175 bp ve 23 bp lik üç ayrı fragman

gözlenmektedir (ZIMMERMAN, 1998). PCR ürünleri gözlenen örnekler kesim reaksiyonuna alındıktan sonra % 2,5 lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 8).

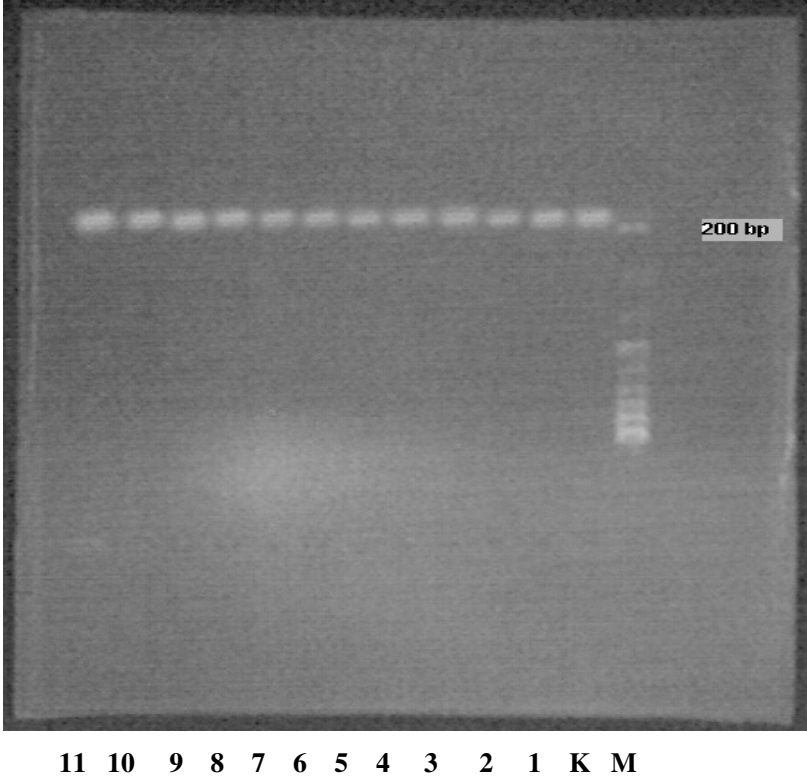


M K 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Şekil 8. 11 bireye ait MTHFR geninin Hinf I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi. M: Marker (100 bp ladder), K: Kesim yapılmayan PCR ürünü (Kontrol örneği), 1.10.11. Homozigot hasta (175 bp), 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, Kesim görülmeyen normal genotipli bireyler.

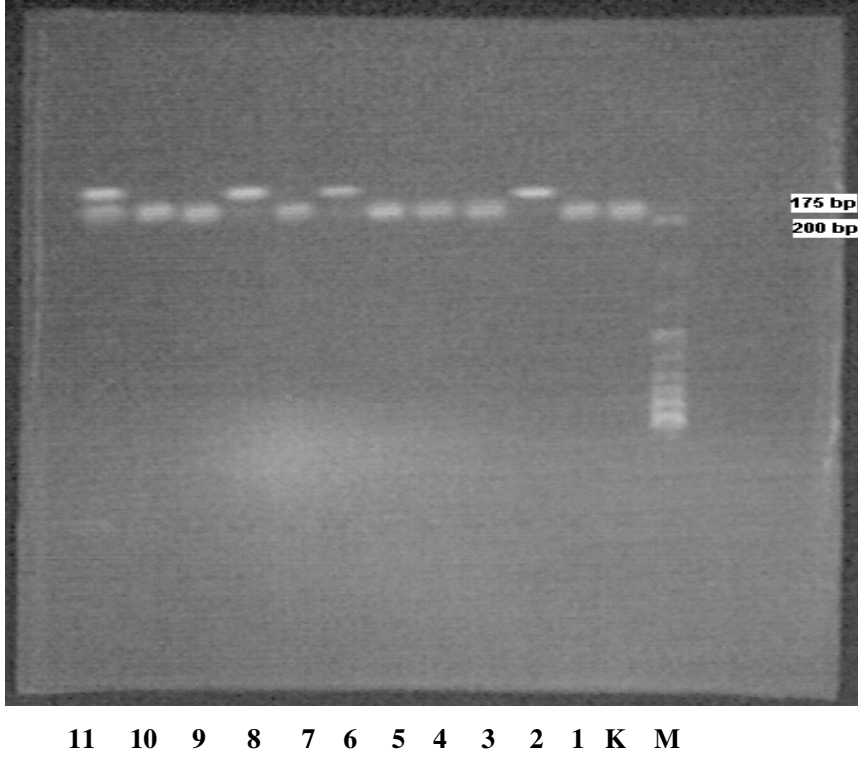
Şekil 8'de, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 nolu bireylerde kesim reaksiyonu gerçekleşmediğinden %2,5'lik agaroz jel elektroforezi sonucunda enzim ile muamele edilmeyen kontrol örneğiyle (PCR) aynı oranda yol almıştır. Bu örneklerde MTHFR genininde 677. nükleotitte sitozin (C), nin timine (T) dönüşmediği dolayısıyla restriksiyon bölgesine spesifik bir kesim bölgesi her iki ebeveynden gelen alleler içinde söz konusu olduğu için bu bireyler Homozigot CC (C667/C677) olarak belirlenmiştir. 2, 10, 11 nolu bireylerde oluşan bantlar markerla kıyaslandığında 175 bp'lik bantlar gözlenmiştir. Bu bireylerde her iki allelde meydana gelen nokta mutasyonda C→T dönüşümü her iki allelde de meydana geldiğinden kesim sonrası iki

175 bp'lik parça meydana gelmektedir. Bu bireyler Homozigot TT (T677/T677) olarak belirlenmiştir.



Şekil 9. 11 bireye ait MTHFR geninin Hinf I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi. M:Marker (100 bp ladder). K: Kontrol PCR restriksiyon endonükleazla kesilmemiş. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 198 bp'lik kesim gerçekleşmeyen bireyler.

Şekil 9'da görülen 11 Orak hücre anemili hasta bireyde de kesim reaksiyonu gerçekleşmemiştir. Bu bireyler mutasyona uğramamış homozigot CC genotipli bireyler olarak belirlenmiştir.



Şekil 10. 11 bireye ait MTHFR geninin Hinf I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi. M:Marker (100 bp ladder). K: Kontrol PCR restriksiyon endonükleazla kesilmemiş. Homozigot normal bireyler 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10. kesim gerçekleşmeyen (198 bp) lik. Homozigot mutant birey 3,7,8, 175 bp lik. Heterozigot birey 11 (175 ve 198 bp).

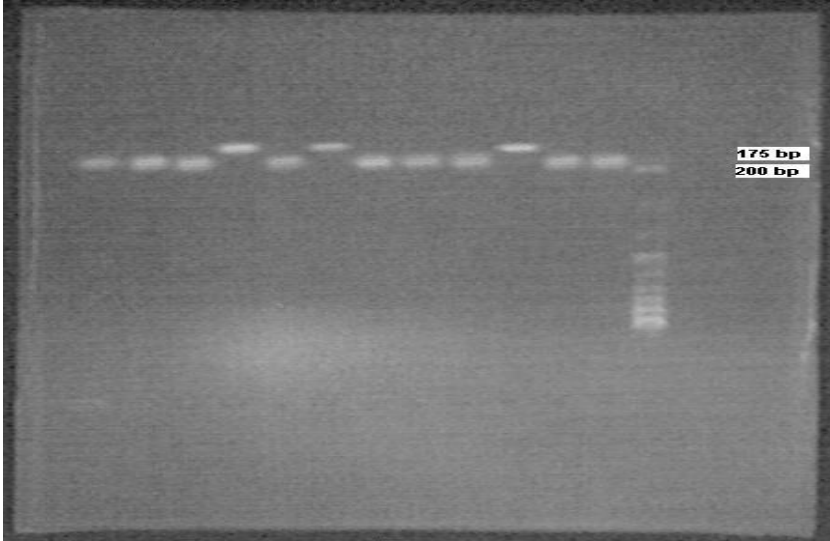
Şekil 10'da görülen 11 orak hücre anemili bireylerden elde edilen 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10 nolu örneklerde kesim gerçekleşmemiş homozigot CC genotipli bireylerdir. 11 nolu bireyde allelerden birinde kesim varken diğerinde olmamıştır. Bu birey heterozigot genotipli bireydir. Heterozigot bireylerde ayrıca meydana gelebilen 23 bp lik bir fragman %2,5'lik agaroz jelde görüntülenememiştir.



11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 K M

Şekil 11. 11 bireye ait MTHFR geninin Hinf I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi. M:Marker (100 bp ladder). K: Kontrol PCR restriksiyon endonükleazla kesilmemiş. Homozigot normal bireyler 1.3.4.5.7.8.9.10. kesim gerçekleşmeyen (198 bp) lik. Homozigot mutant bireyler 2.6.8.11 (175 bp) lik.

Şekil 11'de görülen 11 Orak hücre anemili bireylerden elde edilen örneklerde, 8 bireyde (1,3,4,5,7,8,9,10) mutasyon gözlenmezken 4 bireyde homozigot mutasyon gözlenmiştir. (2, 6, 8,11).



11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 K M

Şekil 12. 11 bireye ait MTHFR geninin Hinf I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi. M:Marker (100 bp ladder). K: Kontrol PCR restriksiyon endonükleazla kesilmemiş. Homozigot normal bireyler 1.3.4.5.7.8.9.10.11. kesim gerçekleşmeyen (198 bp) lik. Homozigot mutant bireyler 2.6.8. (175 bp) lik.



Şekil 13. 11 bireye ait MTHFR geninin Hinf I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi. M:Marker (100 bp ladder). K: Kontrol PCR restriksiyon endonükleazla kesilmemiş. Homozigot normal bireyler 1.3.4.5.7.8.9.10.11. kesim gerçekleşmeyen (198 bp) lik. Homozigot mutant bireyler 2.6.8. (175 bp) lik.

Şekil 12 ve 13 teki 22 birey olarak hücre anemisi olmayan bireylerden elde edilen örneklerin Hinf I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucu yapılan elektroforez sonucunda 17 bireyin MTHFR genleri homozigot normal CC genotipli, 5 bireyse homozigot TT mutant genotipli olarak saptanmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Orak hücre anemisi yaklaşık 40 kadar belirlenmiş hemoglobinopatiden ülkemizde ve özellikle bölgemizde oldukça sık rastlanan hemoglobinopatilerden biridir (TOSUN, 1998). Hastalık hemoglobin zincirlerinin sentezinden sorumlu beta globin genindeki tek bir bazın değişmesine bağlı olarak ortaya çıkmış olsada klinik seyri ve fenotipinin ortaya çıkmasında başka genler ve gen aileleri etkilidir. Bunlar genetik belirteçler olarak adlandırılmıştır (KUTLAR, ve TÜRKER, 2001). Bu genlerden biri olan metilentetrahidrofolatredüktaz geninde meydana gelen mutasyonun sonunda azalan enzim aktivitesi kandaki homosistein miktarının artmasına neden olmakta ve damar endotelinin hasarlanmasına bağlı olarak vasküler bozukluklara neden olmaktadır (HUSTAD, 2001). Orak hücre anemisinde deforme olmuş HbS bulunduran eritrositlerin polimerizasyonu damarsal tıkanmalara ve eklem ağrıları, organ yetmezliklerine yol açan oraklaşma krizlerine neden olmaktadır (KILINÇ, 2000). MTHFR genindeki mutasyonlardan kandaki total homosistein miktarına etki eden C677T mutasyonu ile oraklaşma krizlerinde ciddi hasarlanmaya neden olan avasküler nekroz oluşumunun gözlenmesi yüksek kan homosistein miktarıyla ilişkilendirilmiştir. (KUTLAR, 2001).

Yaptığımız çalışmada orak hücre anemisi tanısı konmuş 50 hastadan izole edilen genomik DNA' dan amplifiye edilen MTHFR genin spesifik restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak genotipi belirlenmiştir. 12 bireyde (% 24) homozigot TT mutasyon gözlenirken, CT genotipi sadece 1 bireyde (% 2), normal form olan CC genotipi 37 bireyde (% 74) gözlenmiştir. Bunun yanında orak hücre anemisi olmayan kontrol grubu olarak belirlenen 22 bireyden elde edilen örneklerde 5 bireyde (% 22,7) TT mutasyonu gözlemlenirken 17 bireyde (% 77,2) mutasyon saptanmamıştır.

Trombotik aktiviteyi etkileyerek, orak hücreli bireylerin fenotiplerinin birbirinden farklı olmasına yol açan bu mutasyonun sıklığı çeşitli toplumlarda farklılık göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda bu genin klinik önem arzetmesine bağlı olarak çeşitli toplumdaki genel olarak görülme sıklığı tespit edilmiştir. Bu oran, Kanadalı Fransız toplumunda % 38, Brezilya da beyaz tenlilerin % 36'sında zencilerin % 12'sinde, Asyalıların %24'ünde, Afrikalı zencilerde %12 olarak saptanmıştır (FRANCO, 1998).

Analizini yaptığımız MTHFR C677T alleli, Orak hücre anemili hastalarda %24 (12 birey), hasta olmayan kontrol grubunda % 22,7 (5 birey) gibi bir oranda ortaya çıkmıştır. Bu durum mutasyonun hastalığın klinik çeşitliliğine neden olsa da, görülme sıklığının orak hücre anemisiyle belirgin bir ilişkide olmayıp hastalığa özgü olmayan bir genetik çeşitlilik olduğunu göstermektedir.

Araştırmalarımızın sonunda, tüm örneklerimiz genel olarak ele alındığında (Hatay ilindeki orak hücre anemisi olan ve olmayan) 72 bireyin %23,6'sında (17 bireyde) homozigot mutasyona rastladık. Bu oran, % 24 olan Asya toplumundakine yakınlık göstermektedir.

KUTLAR'ın (2001) yapmış olduğu çalışmada Kafkas ve Arap toplumundaki orak hücre anemili hastalarında mutasyon sıklığını % 20,7 olarak bildirmiştir. Çalışmamızda orak hücre anemili hastalarda 50 bireyin %24'ünde (12 bireyde) homozigot mutasyon saptanmıştır. Bu sonuç, coğrafi yakınlık ve gen akrabalığı ilişkilendirilerek karşılaştırılma yapıldığında Hatay ilindeki mutasyon sıklığının bu bölgelerdeki toplumların mutasyon sıklığına yakın olduğu gözlenmiştir.

Bölgemizde taşıyıcılık ve hastalık oranı oldukça yüksek ve ciddi bir sağlık sorunu olan orak hücre anemisinin tedavisi günümüz koşullarında mümkün değildir. Hastaların yaşam kalitesinin artırılması adına, azaltılmak istenen oraklaşma krizlerinin ortaya çıkışında etkili olan trombotik aktiviteye sebep olan bu mutasyonun sıklığının bilinmesi ve hasta olmayan bireylerde, kanserden damar-kalp rahatsızlıklarına kadar pek çok klinik etkisi olan bu geninin profilinin belirlenmesi, özel stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlaması açısından fayda sağlayacaktır.

Uygulama maliyeti çok fazla olmayan RFLP-PCR yönteminin kullanımıyla daha çok hasta bireyin analizinin yapılması, özellikle genotipi homozigot TT olarak bilinen hastaların folat alımının kritik seviyeler üstünde tutulması gibi bireye özgü bir takip ve tedavi şeklinin geliştirilmesine katkıda bulunması adına oldukça yarar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- AKSOY, M., 1975. **Hemoglobins in Eti Turks and ammlewits of Lebanon** .Blood, 17: 657-859.
- AKSOY, M., DİNÇOL, G., ERDEM, S., 1978. **Sickle Cell Syndromes in Turkey**. New İstanbul Contribution to clinical science, 12: 185-200.
- AKSOY , M., 1985. **Hemoglobinopathies in Turkey**. Hemoglobin, 9:209-210.
- ANDRADE, F., ANNICHINO, J., SAAD, S., COSTA, F., ARRUDA, V., 1998. **Prothrombin mutant, factor V Leiden, and thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase among patients with sickle cell disease in Brazil**. American Journal of Hematology 59: 46-50.
- ANGELO, D., 2000. **The role of vitamin B12 in fasting hyperhomocysteinemia and is interaction with the homozygous C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. A case- control study of patients wityh early onset thrombotic events**. Thropmbotic Haematology 83: 563-570
- ARCASOY, A., ÇAVDAR, A.O., CİN, Ş., 1978. **Türkiye’de talasemi ve anormal hemoglobin insidansı**. Tubitak pediatrik onkoloji ve hematoloji ünitesi, Ankara.
- ARCASOY ,A., CANATAN, D., KÖSE M.R, 2001. **Hemoglobinopati ve Talasemilerde Önlem, Tam ve Tedavi**. Ulusal Hemoglobinopati Konseyi. 117-124.
- ARPACI, A., 1991. **Antakya Yöresinde β -talasemi gen sıklığı ve mutasyonların gen amplifikasyon yöntemi ile saptanması**. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adana.
- ATİLLA, G., 1995. **Çukurova Bölgesinde Hemoglobinopatilerin HPLC Yöntemleriyle İncelenmesi**. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bil. Enst. Adana.
- BERK, E., ÖNDER, A. 1992. **Türkiye Kan Hastalıkları Atlası** 74-178, Ankara.
- BEUTLER, E., 1991. **The Sickle Cell Disease And Related Disorders**. In Haematology. Fourth Edition, 613-622, New York.
- BÜYÜKELÇİ, F., NİŞLİ, G., 1996. **Erişkin ve Çocuk Anemilerine Yaklaşım** 212-216, İstanbul.
- BRATTSTROM, L., 1998. **Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis**. Circulation 98: 2520-2526.
- BROZOVIC, M., HENTHOM, J., 1994. **Investigation of abnormal hemoglobins and tahalassemia**. Practical Hematology 249-286.

ÇETİNER, S., AKOĞLU, T., KILINÇ, Y., AKOĞLU, E., 1991. **Immunological studies in sickle cell disease and comparison of homozygote mild and severe variants.** Hematology 53: 32-39.

CLARKE, R., DALY, L., ROBINSON, K., NAUGHTEN, E., CHALAME S., 1991. **Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease.** New England Journal of Medicine . 324: 1149-1155.

CONNOR, JM., ve FERGUSON-SMITH, MA., 1987. **Essential Medical Genetics 2th edition, Blackwell Scientific Publications , Oxford.**

DAVIES, SC., WONKE, B., 1991. **The management of haemoglobinopathies.** Clin.Heamatol 4: 361-365.

DİKMEN, M., GÜLEL, B., GÜNEŞ, H., GÜCÜYENER, D., 2004 **Akut İnme Hastalarında Risk Faktörü Olan Homosistein Düzeyine MTHFR Gen Polimorfizmlerinin Etkisi.** Kocatepe Tıp Dergisi 5: 55-61

FALES, F.W., 1978. **Water Distribution in Blood During Sickling Erythrocytes.** Blood,51: 703.

FRANCO, R., ARAUJO, A., GUERREIRO, J., ZAGO, M., 1998. **Analysis of the 677 C→T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups.** Thromb Haemostasis 79: 119-121.

FROSTT , P.,BLOM, H.J., MILOS, R., 1995. **A candidate genetic risk factor for vascular disease; a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase.** National Genetic 10: 111-13.

GABREELS, F., STEVENS, E.M., 1998. **A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural- tube defects.** American Journal of Human Genetic. 62: 1044-1051.

GOYETTE, P., SUMMER, J.S., MILOS, R., 1996. **Seven novel mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification.** National Genetic 7: 195-200.

GOYETTE, P., PAÍ, A., MİLOS,R., 1998 **Gen structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR).** Mammalian Genome 9: 652-6.

GUTTOMSEN, A.B., 1996. **Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia. The Hordaland homocysteine study.** Journal Clinical Investigation. 98:2174-2183.

GÜRGEY, A., İLİCİN, G., ÜNAL, S., BİBEROĞLU, S., AKALIN, G. 1996. **Hemoglobinopatiler.** Temel İç Hastalıkları. Ankara.

HARRIS, J.W., 1996. **Studies On The Destruction Of Red Blood Cells. X. The Biophysics And Biology Of Sickle Cell Disease .** Arch. Intern. Med., 97:145.

HUEHS, E.R., FAROOQUI, A.M., 1975. **Oxygen Dissociation Properties of Human Embryonic Red Cells.** Nature , 254:336-339.

HUSTAD, S., MAGNE, U., SCHNEEDE, J., REFSUM,H., 2001. **Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism.** Trends in Pharmacological Sciences 4: 195-201.

HUSTAD, S., 2000. **Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism.** Clinical Chemistry 46: 1065-1071.

KAN, Y.W., 1968. **Globin Chain Synthesis in Alpha-Thalassemia Syndromes.** Journal Clinical. Investigations 47: 2515.

KANG, S.S, WONG, P.W., SUSMANO, A., 1993. **Thermolabile methyleneterahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease.** American Journal Human Genetic 48: 536-545.

KARLSSON , S., NIENHUIS, A.W., 1985. **Developmental regulation of globin genes.** Ann Rev Biochem , 54: 1071-1108.

KILINÇ, Y., KÜMİ, M., YILMAZ, B., TANYELİ A., 2000. Stroke in Sickle Cell Anemia in Childhood . **Heamostasis.**, 80: 144-146.

KIM, Y.I., 1999. **Folate and carcinogenesis evidence, mechanisims and implications.** Journal Nutrition Biochemistry 10: 66-68.

KUTLAR, F., TURAL, C., PARK, D., WOODS, K., 1998. **MTHFR (5-10-methylenetetrahydrofolate reductase) 677 C→T mutation as a candidate risk factor for avascular necrosis (AVN) in patients with sickle cell disease.** Blood: 82-89.

KUTLAR, A., KUTLAR, F., TÜRKER, I., TURAL C., 2001. **The methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) mutation as a potential risk factor for avascular necrosis in sickle cell disease.** Hemoglobin 25:213-217.

LUKENS, J.N., LEE, G.R., 1993. **The abnormal Hemoglobins.** Wintrobe's Clinical Hematology, 1023-1053.

MANKAD, W., 1995. **Sickle cell disease and other disorders of abnormal hemoglobines.** 415-420.

NAGLAA, A., LAYLA, B., IMAN, A., AHLAM, Q., SARA, S., 2004. **Factor V-Leiden, Prothombin G20210A, and MTHFR C677T Mutations Among Patients With Sickle Cell Disease in Eastern Saudi Arabia.** American Journal of Hematology 76: 307-309.

NELEN, W.L., 1998. **Methylenetatrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocystein and folate concentrations resulting from low dose folic acid**

supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. Journal Nutrition 128: 1336-1341.

RICHARD, A., 2000 **Clinical Biochemistry of Hemoglobinopathies.** Lippincott Illustrated Reviews 5: 25-40.

ROSENQUIST, T.H., RATASHAK, S.A., SELHUB, J., 1996. **Homocystein induces congenital defects of the heart and neural tube effect of folic acid.** National Academic Science United States of America 93:15227-32.

ROZEN, R., 1997. **Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR).** 78: 523-6.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E., MANIATIS, T., 1989. **Molecular Cloning a Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2: 50-55.

STERN, L., 2000. **Genomic DNA hypomethylation a characteristic of most cancer, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene.** Cancer Epidemiology Biomarkers Previous 9: 849-853.

TREMBATH, D., SHERBONDY, A.L., VANDYKE, D.C., 1999. **Analysis of select folate pathway genes, PAX3, and human T in a Midwestern neural tube defect population.** Teratology 35: 1009-10013.

TOSUN, F., 1998. **Tavla Beldesinde Hemoglobinopati ve Demir Eksikliği Anemisi Araştırması.** Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Adana.

TÜZMEN, Ş., SCHETER, A.N., 2001. **Genetic Diseases of Hemoglobin: Diagnostic methods for elucidating Sickle Cell Mutations ,** Blood Reviews 15, 19-25.

WANG, W.C., LUKENS, J.T., 1999. **Sickle Cell Anemia and Other Sickling Syndromes.** In: Wintrobe's Clinical Hematology. Tenth Edition Vol 1, 1346-1397.

WEATHERALL, D.J., 1990. **The Thalassemias.** (W.J. WILLIAMS, E. BEUTLER, A. ERSLEV, M.A. LICHTMAN Editörler). In: Hematology 510-539.

WEATHERALL, D.J., CLEGG J.B., 1987, **The Thalassemia Syndromes.** 3rd edition, Blackwell, 169-176, Oxford.

WEISBERG, I., TRAN, P., CHRISTENSEN, B., 1998. **A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity.** Molecular Genetic Metabolism 64: 169-172.

WINTROBE, M.M. 1981 **Clinical Hematology** (LEA, FEBIGER, EIGHT edition) Philadelphia, USA.

YENSON, M., 1986. **Klinik Biyokimya Laboratuar Çalışmaları.** 353, İstanbul.

YÜREĞİR, G., PARLAR, A., AKGÖL, M., DOĞDU, Ö., POLAT, G., GALİ, E., 1997. **Hatay İlinde Evlilik Öncesi Hemoglobinopati Taraması Sonuçlarının Değerlendirmesi.** Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2001; 3: 305-310.

ZIMMERMAN, S., WARE, R., 1998. **Inherited DNA mutations contributing to thrombotic complications in patients with sickle cell disease.** American Journal Hematology 59: 267-272.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Antakya'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Antakya'da tamamladım. 1998 yılında girdiğim Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2003 yılında mezun oldum. 2000-2002 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD. ve Biyokimya Bölümlerinde Talasemi ve Orak Hücre Anemisi ile ilgili çalışmalarda bulundum. 2004 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı , Moleküler Biyoloji Bilim dalında master eğitimine başladım.