

T.C.

HARRAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA'DA TALASEMİ HASTALARINDA  
MUTASYON TİPLERİNE GÖRE  
OKSİDATİF DURUM VE ESER ELEMENT  
DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ

Dr. Hasan BİLİNÇ

DANIŞMAN  
Prof.Dr. Nurten AKSOY

ŞANLIURFA  
2011

T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA'DA TALASEMİ HASTALARINDA  
MUTASYON TIPLERİNE GÖRE  
OKSİDATİF DURUM VE ESER ELEMENT  
DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ

Dr. Hasan BİLİNÇ

DANIŞMAN  
Prof.Dr. Nurten AKSOY

Bu tez, Harran Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 1064 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA  
2011

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgisi, deneyimleri ve hoşgörüsüyle her zaman örnek olan ve tezimin hazırlanmasına bilgi ve önerileriyle katkıda bulunan tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Nurten AKSOY'a, eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerimden yararlandığım değerli hocam Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT'e, Yrd.Doç.Dr.Şahbettin SELEK'e, Öğrt.Gör. Hakim ÇELİK'e dört yılı aşkın eğitim süresi boyunca bilgileri ve tecrübeleriyle destek olan değerli arkadaşım Öğrt.Gör.Abdullah TAŞKIN'a, ekonomik destekte bulunan Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığı'na (HÜBAK) teşekkür ederim.

Asistan arkadaşlarım ve biyokimya çalışanlarına, her zaman sevgisi ve desteğiyle yanımda olan hayat arkadaşım Safiye BİLİNÇ'e, neşe kaynağımız biricik kızım Erva'ya ve emeklerini ödeyemeyeceğim aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Hasan BİLİNÇ

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No:</u>
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hb Molekülü.....	4
2.1.1. Hb Yapısı ve Fonksiyonu .....	5
2.1.2. Globin Zincirleri ve Eritropoezin Gelişim Dönemleri.....	7
2.1.3. Hb'nin Genetik Kontrolü.....	8
2.1.4. Gen Ekspresyonu.....	9
2.1.5. Globin Zincirlerinin Üretimi.....	10
2.1.6. $\beta$ -Globin Gen Ekspresyonu.....	11
2.1.6.1. RNA Splicing.....	12
2.1.6.2. Poliadenilasyon.....	13
2.2. $\beta$ -Talasemiler .....	13
2.2.1. $\beta$ -Talasemi Major (Homozigot $\beta$ -talasemi) .....	17
2.2.1.1. Fیزیopatoloji.....	17
2.2.1.2. Klinik.....	20
2.2.1.3. Laboratuvar.....	21
2.2.1.4. Talasemi Major'un Komplikasyonları.....	21
2.2.1.5. Tedavi.....	25
2.2.1.6. Prognoz.....	28
2.2.1.7. Talasemi Kontrol Programı (Taşıyıcıların Saptanması ve Prenatal Tanı)..	29
2.3. $\beta$ -Talasemi İntermedia.....	30
2.4. $\beta$ -Talasemi Minör ( $\beta$ -talasemi taşıyıcılığı, talasemi trait) .....	30
2.5. $\alpha$ -Talasemiler.....	31
2.6. Eser Elementler.....	33
2.6.1. Çinko.....	33

2.6.2. Demir.....	35
2.6.3. Bakır.....	36
2.7. Atomik Spektrometri.....	37
2.7.1. Atomik Absorpsiyon ve Atomik Emisyon Spektrometri.....	38
2.7.1.1. Alevli Atomlaştırıcılar.....	39
2.7.1.2. Elektrotermal Atomlaştırıcılar.....	40
2.7.2. Atomik Absorpsiyon Spektrometre'nin Kısımları.....	41
2.7.2.1. Işın Kaynağı.....	42
2.7.2.2. Atomlaştırıcı.....	44
2.7.2.3. Monokromatör (Dalga Boyu Seçici).....	44
2.7.2.4. Detektör.....	45
2.7.2.5. Kaydedici.....	45
2.7.3. Analiz ve Yöntem.....	45
2.8. Oksidatif Stres ve Total Antioksidan Kapasite.....	47
2.8.1. Serbest Oksijen Radikalleri.....	48
2.8.1.1. Süperoksit Radikali.....	49
2.8.1.2. Hidrojen Peroksit.....	50
2.8.1.3. Hidroksil Radikali.....	51
2.8.1.4. Singlet Oksijen.....	51
2.8.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Hürelere Olan Zararlı Etkileri.....	52
2.8.2.1. Membranların Lipid Peroksidasyonu.....	52
2.8.2.2. Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu.....	53
2.8.2.3. Karbonhidratlara Etkileri.....	53
2.8.2.4. DNA Üzerine Etkileri.....	54
2.8.3. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Mekanizmaları.....	54
2.8.3.1. Antioksidan Sistemler.....	54
2.8.3.2. Enzimatik Antioksidanlar.....	56
2.8.3.3. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri.....	57
2.9. Total Antioksidan Kapasite.....	60

2.10. Beta Talasemi Major ve Oksidatif Stres .....	61
2.11. Beta Talasemi Major ve Demir Toksisitesi.....	62
2.12. Beta Talasemi Major ve Lipid Peroksidasyonu.....	64
3. MATERYAL ve METOD.....	66
3.1. Örneklerin Toplanması ve Ölçümler.....	67
3.2. Kullanılan Araç Gereçler Kimyasallar.....	67
3.3. Mutasyon Tipleri.....	68
3.4. Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) .....	68
3.5. Toplam Oksidan Seviye (TOS) .....	69
3.6. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) .....	69
3.7. Lipid Hidroperoksidasyonu (LOOH) .....	70
3.8. Serüloplazmin düzeyi.....	70
3.9. Eser Element Düzeyleri.....	70
3.10. Örneklerin Hazırlanması.....	70
3.11. Kalibratörlerin Hazırlanması.....	70
3.12. İstatistiksel Analiz.....	71
4. BULGULAR.....	72
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	81
6. KAYNAKLAR.....	89

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No:</u>
Şekil-1 : Hb molekülü.....	5
Şekil-2 : $\alpha$ ve $\beta$ gen kümesi, globin zincirleri ve gelişim dönemlerine göre Hb'ler.....	6
Şekil-3 : Fetus ve infantta eritropoez.....	7
Şekil-4 : İnsan globin genleri .....	8
Şekil-5 : $\beta$ -talaseminin dünyada dağılımı.....	15
Şekil-6 : $\beta$ talasemi hastalığının patofizyolojisi. ....	19
Şekil-7 : Talasemide serbest demirin oksidatif stresin oluşumu ve hücre hasarlanması üzerindeki rolü. ....	23
Şekil-8 : Eş merkezli borulu bir sisleştirci .....	39
Şekil-9 : Laminer akışlı bir alev başlığı.....	40
Şekil-10: (a) Bir grafit fırın kesiti, (b) Grafit tüp.....	41
Şekil-11: Alevli atomik absorpsiyon spektrometre'nin başlıca kısımları.....	42
Şekil-12: Oyuk katot lambanın şematik görünümü.....	43
Şekil-13: Elektrotsuz boşalım lambasının kesiti.....	44
Şekil-14: Bunsen prizmalı bir monokromatör ( $\lambda_1 > \lambda_2$ ) .....	45
Şekil-15: Cu için kalibrasyon grafiği.....	47
Şekil-16: Bakır (Cu) Elementi Kalibrasyon grafiği.....	71
Şekil-17: Çinko (Zn) Elementi Kalibrasyon grafiği.....	71
Şekil-18: Şanlıurfa bölgesinde görülen $\beta$ -talasemi mutasyon sıklıkları.....	73
Şekil-19: Hasta ve kontrol grubu OSİ değerleri.....	78
Şekil-20: Hasta ve kontrol grubu TOS değerleri.....	78
Şekil-21: Hasta ve kontrol grubu TAK değerleri.....	79
Şekil-22: Hasta ve kontrol grubu Zn değerleri.....	79
Şekil-23: Hasta ve kontrol grubu Cu değerleri.....	80
Şekil-24: Hasta ve kontrol grubu Serüloplazmin düzeyleri.....	80

## TABLO LİSTESİ

Sayfa No:

Tablo-1: $\beta$ -talasemi taşıyıcılığı ve demir eksikliği anemisi ayırıcı tanısı.....	31
Tablo-2: Atomik spektrometri'nin sınıflandırılması.....	38
Tablo-3: Farklı konsantrasyonlarda bir seri standart Cu çözeltileri için absorbanş değerleri .....	46
Tablo-4: Reaktif oksijen partiküllerinin kaynakları.....	48
Tablo-5: Şanlıurfa bölgesinde görülen $\beta$ -talasemi mutasyon sıklıkları.....	72
Tablo-6: $\beta$ -TM ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet değerleri dağılımı.....	74
Tablo 7: $\beta$ -TM hasta grubunun ferritin, fe ve bazı kan sayımı değerleri.....	74
Tablo-8: $\beta$ -TM ve kontrol grubunun bazı serum biyokimyasal parametreleri.....	74
Tablo-9: $\beta$ -TM ve kontrol grubun eser element düzeyleri ve oksidatif stres parametrelerin karşılaştırılması. ....	75
Tablo-10: $\beta$ -TM hastaların mutasyon tiplerine göre eser element düzeyleri ve oksidatif stres parametrelerin karşılaştırılması.....	77



## KISALTMALAR

HB	:	Hemoglobin
HCT	:	Hematokrit
MCV	:	Ortalama eritrosit hacmi
MCHC	:	Ortalama eritrosit hemoglobini
RDW	:	Eritrosit dağılım hacmi
NTBI	:	Transferine bağı olmayan demir
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
RNA	:	Ribonükleik asit
$\beta$ -TI	:	$\beta$ -talasemi intermedia
$\beta$ -TM	:	$\beta$ -talasemi major
MRG	:	Manyetik rezonans görüntüleme
DFO	:	Desferrioksamin
DFP	:	Deferipron
DFR	:	Deferasiroks
NO	:	Nitrikoksit
O <sub>2</sub>	:	Oksijen
SOD	:	Süperoksit dismutaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Hidrojen peroksit
HO <sup>•</sup>	:	Hidroksi radikali
GPX	:	Glutasyon peroksidaz
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	:	Süperoksit
O <sup>•</sup>	:	Singlet oksijen
MDA	:	Malondialdehit
RNS	:	Reaktif Nitrojen Türleri
AAS	:	Atomik Absorbsiyon spektrofotometresi
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
CAT	:	Katalaz
LOOH	:	Lipid Hidroperoksidasyonu

TOS	:	Total oksidan seviye
TAK	:	Total antioksidan kapasite
OSİ	:	Oksidatif stres indeksi
LDL	:	Düşük dansiteli lipoprotein
AST	:	Aspartat aminotransferaz
ALT	:	Alanin aminotransferaz
EDTA	:	Etilen daimin tetra asetik asit
PCR	:	Polimeraz zincirleme tepkimesi
AAS	:	Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi
$\beta$	:	Beta
Cu	:	Bakır
Fe	:	Demir
Mg	:	Magnezyum
Se	:	Selenyum
Zn	:	Çinko
Hb	:	Hemoglobin
HbF	:	Fetal hemoglobin
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
Cd	:	Kodon
$\gamma$	:	Gamma
$\lambda$	:	Delta
$\alpha$	:	Alfa
$\zeta$	:	Zeta
$\varepsilon$	:	Epsilon
Cd	:	Kodon
Bç	:	Baz çifti

## ÖZET

### **Şanlıurfa'da Talasemi Hastalarında Mutasyon Tiplerine Göre Oksidatif Durum ve Eser Element Düzeylerinin Değerlendirilmesi** **Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Tezi**

Dünyada en yaygın genetik hastalıklardan biri olan  $\beta$ -talasemi, 11. kromozomun kısa kolunda lokalize olan  $\beta$ -globin genindeki genellikle nokta mutasyonlarının neden olduğu otozomal resesif bir hastalıktır. Çalışmamızda  $\beta$ -talasemi hastalarını mutasyon tiplerine göre gruplandırarak oksidatif stres indeksinin ve eser element düzeylerinin gruplar arasında farklılık gösterip göstermediğini araştırmayı amaçladık.

Bu çalışma Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematoloji Bilim Dalı ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesi Çocuk Hematoloji bölümünde takipli yaşları  $7,43 \pm 4,62$  yıl arasında değişen 122 (55 kız, 66 erkek)  $\beta$ -talasemi major çocuk hasta ve anemisi olmayan yaşları  $7,92 \pm 3,28$  yıl arasında değişen 126 (61 kız, 65 erkek) sağlıklı çocuk ile Nisan-Temmuz 2011 tarihleri arasında yapıldı.

Hastaların mutasyon tipleri ticari kit kullanılarak reverse dot blot platform yöntemiyle (Beta-globin Strip Testi, Viyana Lab, Viyana, Avusturya) gerçekleştirildi. Hastalar mutasyon tiplerine göre gruplandırıldı, gruplar hem kendi aralarında hemde kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Hasta ve kontrol gruplarında toplam oksidan seviye (TOS) ve toplam antioksidan kapasite (TAK) kolorimetrik yöntemle çalışıldı. TOS/TAK oranı hesaplanarak oksidatif stres indeksi (OSI) bulundu. Cu ve Zn düzeyleri AAS ile çalışıldı. Şanlıurfa bölgesindeki mutasyon sıklığı diğer bölge illerinin birçoğunda yapılan çalışmalarla uyumlu olarak görülmüştür.

Şanlıurfa bölgesinde de en sık  $\beta$ -talasemi mutasyon tipi IVS1-110 olarak tespit edilmiştir. Bunun yanında en sık ikinci mutasyon Antalya'da IVS1-6, Isparta bölgesinde IVS2-1 yayınlanmışken, Şanlıurfa ve Denizli'de IVS1-1, olarak tespit edilmiştir.

$\beta$ -talasemili olgularımızda oksidan-antioksidan sistem değerlendirmesinde TOS, OSI, LOOH ve Serüloplazmin düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı TAK değerlerinin ise istatistiksel olarak anlamlı olmasada azalma gösterdiği saptandı. Literatürde ilk kez yapılmakta olan eser elementler açısından yaptığımız bu mukayese çalışmamızda Cu düzeylerinin hasta grubunda arttığı Zn düzeylerinin ise anlamlı ölçüde azaldığı tespit edildi. Sonuç olarak bu hastalarda artmış oksidatif stresle baş edebilmek için doğal veya sentetik antioksidan kullanımıyla tedavilerinin desteklenmesinin faydalı olabileceği düşünölmektedir.

**Anahtar kelimeler:**  $\beta$ -talasemi major,  $\beta$ -globin, oksidan-antioksidan sistem, mutasyon

## SUMMARY

### **Evaluation of Oxidative Status and Trace Element Levels in order to Mutation types in Thalassemia Patients in Sanliurfa. Medical Biochemistry Expertise Thesis**

$\beta$  thalassemia, one of the most common genetic diseases in the World, is an autosomal recessive disease caused by usually point mutations in the  $\beta$ -globin gene that localized on the short arm of chromosome 11. In this study we aimed to investigate oxidative stress index and trace element levels by grouping  $\beta$  thalassemia patients in order to their mutation types.

This study prepared from april to july 2011 in Harran University, Medical Faculty, Department of Pediatric Hematology and Sanliurfa Children's Health and Diseases Hospital, Pediatric Hematology departments on 122 pediatric patients (55 girls, 66 boys) with  $\beta$ -thalassemia major about  $7,43 \pm 4,62$  ages and 126 (61 girls, 65 boys) healthy children with about  $7,92 \pm 3,28$  ages.

Types of mutations in the patients studied by  $\beta$ -globin gene was performed using a commercially available reverse dot blot platform (Beta-Globin Strip Assay, Vienna Lab, Vienna, Austria). The patients were grouped according to their mutation types, the groups were compared with each other and also with the controls. In patients and control groups total oksidative status (TOS) and total antioksidative capacity (TAC) with a full automatic colorometric method were studied. Taking the ratio of TOS to TAC oksidative stres index (OSI) were found. Cu and Zn levels were measured with AAS.

The frequency of mutation in Şanlıurfa was confirmed coherent with the other studies undertaken in other cities of the close regions. The most common thalassemia mutation type is IVS 1-110 in Sanliurfa similar to the other cities, besides , while the second most common mutation is in Antalya IVS 1-6, in Isparta IVS 2-1, in Şanlıurfa and Denizli is IVS1-1.

In the evaluation of oxidant-antioxidant system in  $\beta$ -thalassemia patients, it was found that TOS , OSI, LOOH and ceruloplasmin levels have significantly increased and TAC levels have decreased insignificantly comparing to the control group. In this first comparative study in which trace elements were compared between  $\beta$ -thalassemia patients and controls, it was detected that Cu levels have increased in patients' group, Zn levels have decreased accordingly. In conclusion it is highlighted that it will be beneficial to support their treatment by using natural or synthetic antioxidants to cope with the increased oxidative stress.

**Keywords:**  $\beta$ -thalassemia major,  $\beta$ -globin, oxidant-antioxidant system, mutation

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünyada en yaygın genetik hastalıklardan biri olan  $\beta$ -talasemi, 11. kromozomun kısa kolunda küme olarak lokalize olan  $\beta$ -globin genindeki genellikle nokta mutasyonlarının neden olduğu otozomal resesif bir hastalıktır (1). Hemolitik mikrositik anemiyle ortaya çıkan  $\beta$ -talasemi, diğer bazı Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi Türkiye’de de en yaygın genetik bozukluklardan biridir. Türkiye’de  $\beta$ -talasemi ve diğer Hb bozuklukları üzerindeki araştırmalar 1941’de Aksoy ve arkadaşları(ark) tarafından başlatıldı. 1971’de Türkiye’de  $\beta$ -talaseminin sıklığı % 2 olarak bulundu (2,3). Daha sonra Altay ve Sağlık Bakanlığı tarafından 2000-2006 arasındaki verilere dayanılarak verilen bilgilere göre Türkiye’deki  $\beta$ -talasemi ve hemoglobinopatilerin oranı % 4,3 olarak bildirildi. Bu oran farklı bölgelerde % 0,6-13,0 arasında değişmektedir (4). Moleküler çalışmalarda Türkiye’de  $\beta$ -talasemiyle ilişkili 35’ten fazla mutasyon gösterildi. En yüksek sıklık % 10 oranıyla Antalya ve çevresinde, % 4,5 oranıyla Muğla’da gözlemlendi (5).

Eser elementlerinin normal fizyolojik sınırlarının değişmesi oksidan/antioksidan sistemine ve reaktif oksijen türleri (ROT) üretimine etkilerinin olduğu bilinmektedir (6). Eser elementler normal fizyolojik sınırlar içinde çeşitli metabolik ve sinyal ileti süreçlerinde önemli roller üstlenmişlerdir. Demir (Fe), çinko (Zn) ve bakır (Cu) çeşitli metalloenzimlerin yapısında bulunan bileşenlerdir (7). Bu enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikalini hidrojen perokside ve oksijene dönüştürürken, katalaz (CAT) da hidrojen peroksiti suya dönüştüren antioksidan enzimlerdir. Aşırı hidrojen peroksit ile birleşen Fe ve Cu gibi geçiş elementleri fenton veya haber-weiss reaksiyonu ile hidrosil radikali oluşumunu arttırmaktadır. Hidrosil radikali de aşırı okside edici bir reaktif radikal olup DNA hidrosilasyonuna, protein agregasyonuna, membran lipid peroksidasyonu neden olmakta ve çoğu biyomolekülle reaksiyona girebilmektedir (8).

Değişik birçok reaksiyonla hücre ve dokularda oluşabilen ve oksijenden tek elektron indirgenmesi sonucu oluşan serbest radikaller; proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve nükleik

asitleri yıkıma uğratabilir. Poliansature yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olan lipit peroksidasyonu serbest radikallerin uyardığı hücre yıkımında önemli bir mekanizmadır. Birçok hastalıkta doku yıkımı serbest radikaller ve lipit peroksidasyonu sonucu oluşur. Organizmadaki serbest radikal reaksiyonları, radikal oluşumunu önleyen veya zincir kıran yapılar olarak işlev gören birçok antioksidan sistem ile kontrol edilir (12,13). Pro-oksidan/antioksidan dengede bozulma hücrel yapılar da oksidatif hasara ve DNA'da kırıklara neden olabilir.

$\beta$ -talasemili hastalarda eritrosit hemolizinin etyopatogenezinde oksidatif stresin major faktör olarak rol aldığı giderek kabul gören bir görüştür (9). Bu hastalara uzun süreli kan transfüzyonu yapılması vücutta demir birikmesine neden olur. Diğer taraftan bu hastalarda gastrointestinal sistemden demir emiliminin artması da demir yüklenmesini artırır (10). Demir yüklenmesi sonucunda artan serbest demir en güçlü prooksidan moleküllerden biridir. Demirin oksidatif stres, toksik serbest radikal oluşumu, lipit peroksidasyonu ve endotel disfonksiyonu gibi pek çok süreçte rol oynadığı bilinmektedir (11).  $\beta$ -globin zincirinin azalmış veya bozulmuş biyosentezi,  $\alpha$ -globin zincirlerinin hücre içi birikimine yol açar ve eritrosit membran proteinlerinde oksidatif hasara neden olabilir.

Şanlıurfa bölgesinde  $\beta$ -talasemi hastalarında görülen mutasyonların çeşitlilik göstermesi hastalığın etyopatogenezinde farklılık göstermesi ihtimalini ortaya koymaktadır. Bu nedenle bu hastaları sahip oldukları mutasyonun tipine göre gruplandırarak değerlendirmeyi amaçladık.  $\beta$ -talasemi hastalarındaki mutasyonun tipine göre oksidatif stres indeksinin ve eser element düzeylerinin değişip değişmediğini araştırdık. Toplumsal bir etkiye sahip olan bu hastalıkta oksidan-antioksidan parametreleri ve eser elementleri inceleyerek hangi yönde değişiklik gösterdikleri ve bu değişikliklerin mutasyon tipine göre farklılık gösterip göstermediğini ortaya koyarak destekleyici tedavi protokollerine katkıda bulunmayı hedeflemekteyiz.



## 2. GENEL BİLGİLER

Talasemi kalıtsal bir hata sonucu bir veya daha fazla globin zincirinde yapısal bir bozukluk görülmesinin yapım hızındaki azalmaya bağlı olarak gelişen hipokrom mikrositer anemi ile karakterize heterojen bir grup hastalıktır. Talasemi ilk kez 1925 yılında yaşamlarının ilk yıllarında derin anemi ve splenomegali gelişen bebekleri tanımlayan pediatrist Thomas Cooley tarafından tarif edilmiştir. Benzer vakaların görülmesi üzerine bu herediter hemolitik anemiye çeşitli isimler konulmuştur. George Whipple ve Lesley Bradford 1936 yılında inceledikleri vakaların Akdeniz civarı ülkelerden geldiklerini tespit etmişler ve hastalığa Yunanca deniz anemisi anlamına gelen "thalassemia" adını vermişlerdir (15,16). Tanımlanan bu resesif mendelian bozuklukların homozigot veya birleşik heterozigot formlarının Akdeniz çevresi ülkelerle sınırlı olmadığı, tropikal ülkeleri de içine alan geniş bir bölgede ortaya çıktığı görülmüştür (20).

Talasemiler dünyada en yaygın görülen tek gen bozukluklarıdır. Özellikle Akdeniz Bölgesi, Orta Doğu, Hindistan, Uzak Doğu ve Tropikal Afrika'da büyük bir halk sağlığı problemine neden olmaktadır. Günümüzde hızlı nüfus göçünden dolayı, Kuzey ve Güney Amerika ile Avrupa kıtasında da yaygın olarak görülmektedir. Elde edilen bilgiler ışığında dünya nüfusunun % 4,5'ini oluşturan 250 milyon kişinin etkilenmiş olduğu tahmin edilmektedir. Bu etkilenen kişilerin çoğunluğu hatalı globin geni için heterozigottur. Yaklaşık 300 bin kişi ise homozigot olarak doğmaktadır, bu insanların da yarısını orak hücreli anemi diğer yarısını talasemili hastalar oluşturmaktadır (14,19).

$\beta$ -talasemi ve bununla ilgili bozukluğu olan hastalarda yaklaşık 200 farklı mutasyon tanımlanmıştır. Her popülasyonda sınırlı sayıda haplotip bulunur. Mutasyonların, % 80'i sadece 20 değişik haplotip ile bağlantılıdır. Bu gözlem bazı popülasyonlarda  $\beta$ -talaseminin bağımsız kaynağını göstermede yardımcı olmuştur (1,17). Yaşamın ilk yılında HbF (fetal hemoglobin)'in ( $\alpha_2\gamma_2$ ) sentezindeki azalma nedeniyle ciddi  $\beta$ -talasemi genellikle aşikâr hale gelmektedir (20).

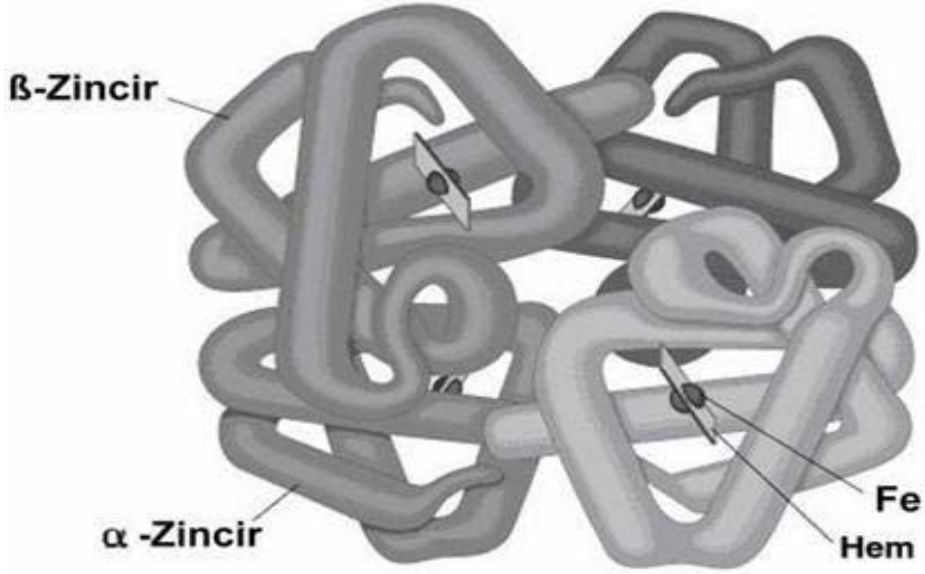
Türkiye, Asya ve Avrupa arasında bir köprü durumunda olması nedeniyle farklı popülasyonların göçüne uğramıştır. Bu nedenle etnik yapısı diğer Akdeniz ülkelerine paralel değildir. Bu durum Türkiye'de gözlenen  $\beta$ -talasemi mutasyonlarının allel çeşitliliğinin daha fazla olmasına neden olmuştur (18).

## 2.1. Hb Molekülü

Hb, globin ve hemden oluşan 64400 dalton ağırlığında tetramer bir yapıdır (Şekil-1). İki çift özdeş olmayan polipeptid zinciri ve dört molekül hemden oluşur. Bu tetrameri oluşturan polipeptid zincirleri özgül aminoasitlerden oluşur. Aminoasitlerin sıralanması birincil yapıyı, aminoasitlerin aralarında hidrojen bağlarıyla heliksler biçiminde düzenlenmesi de ikincil yapıyı oluşturur. Üçüncül yapı ise polipeptid zincirlerin katlanarak üç boyutlu bir forma ulaşmasıyla ortaya çıkar. Dört polipeptid zincirinin birleşerek oluşturduğu tek bir molekül ise dördüncül yapıyı oluşturur (19).

Hb, eritrositlerdeki oksijen taşıyıcısıdır. Molekül tetramer yapıda olup her bir alt birimi, demir pigmenti içeren hemden meydana gelir. Bir polipeptid zincir olan globin ve oksijenle hemin birleşmesi sonucu, Hb oksijen taşıma yeteneği kazanır (24).

Globüler Hb molekülünün karmaşık yapısındaki hem, tüm insan Hb tiplerinde aynıdır ve hidrofobik bir ortam oluşturan hem cepleri içerisinde yerleşmiştir. Oksijenin kanda taşınması Hb'le geri dönüşümlü kombinasyonlar yapması yoluyla olur (19).



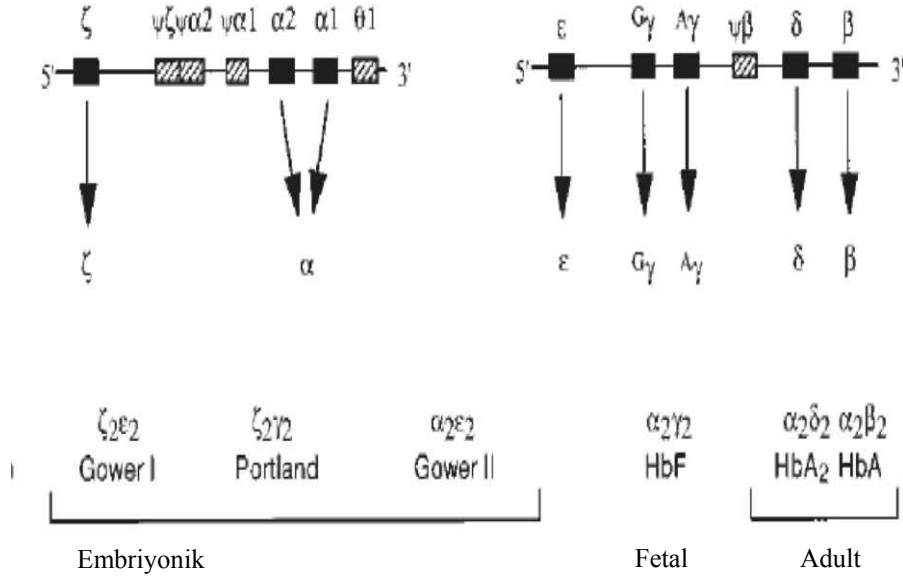
Şekil-1: Hb molekülü (151)

### 2.1.1. Hb Yapısı ve Fonksiyonu

Embriyo, fetüs ve erişkin Hb'leri farklı globin zincirlerine sahiptir. Hb'lerin tümü, her bir globin zincirine bir hemin bağlandığı farklı ikişer çift globin zincirinden oluşan, bir tetramerik yapıya sahiptir (19). Erişkin ve fetal Hb'ler β(beta), delta (δ) ve λ(gama) zincirlerinin alfa (α) zincirleri ile birleşmelerinden oluşur (Şekil-2). Böylece erişkin Hb'ni HbA  $\alpha_2\beta_2$ , HbA<sub>2</sub>  $\alpha_2\delta_2$  ve fetal Hb HbF  $\alpha_2\gamma_2$  yapısındadır. Embriyonik Hb'lerden Hb portland ( $\zeta_2\lambda_2$ ), zeta (ζ) zincirinin λ zinciriyle, Hb Gower 1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), ζ(zeta) zincirinin epsilon (ε) zinciriyle ve Hb Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ), α zincirinin ε zinciriyle birleşmelerinden oluşur (19,22). γ zincirinin 136. aminoasit pozisyonunda glisin (Gl) ve alanin (Al) bulunmasına göre iki farklı fetal Hb mevcuttur. γ glisin (Gl γ) ve γ alanin (Al γ) zincirlerinin gen lokusları da ayrıdır (15).

### Kromozom 16

### Kromozom 11

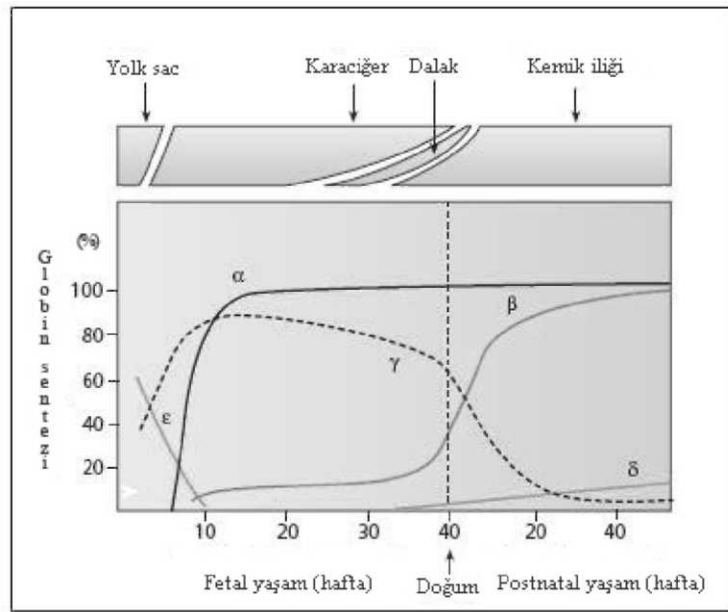


Şekil-2:  $\alpha$  ve  $\beta$  gen kümesi, globin zincirleri ve gelişim dönemlerine göre Hb'ler (20).

Farklı yapıdaki Hb'ler değişen çevrelerin oksijen ihtiyaçlarını sağlamaktadır. Hb'nin başlıca fonksiyonu oksijen bağlama ve bağladığı bu oksijeni dokulara vermektir. Oksijen hem demirine bağlanır. Hemdeki demir, oksijen bağlayabilmesi için +2 değerlikli (ferröz) durumda bulunmalıdır. Oksijenin bağlanması ve dokulara verilmesi sırasında globin zincirlerinin bizzat kendilerinde ve zincirlerin birbirleriyle ilgili bütünlüğünde yapısal değişimler olur. Böylece, oksijenle farklı birleşme eğilimleriyle ilgili Hb molekülünde bir seri şekil değişiklikleri meydana gelir. Oksijene bağlı olmayan Hb molekülünün, oksijenle birleşme yeteneği düşüktür. Oksijen-hem bağlanması olduğunda Hb molekülü daha fazla oksijen tutma yeteneği kazanır. Bu kooperatif etkileşim sonucunda Hb'nin oksijenasyonu yoluyla ilgili sigmoid şekilli eğri elde edilir. Hb molekülünün oksijen bağlaması pH, karbondioksit ( $CO_2$ ) basıncı, 2,3-difosfogliserat (DPG), ATP, ısı ve globin zincirlerini etkileyen mutasyonlardan etkilenir ve bu olay eğrinin şeklini değiştirir (15).

### 2.1.2. Globin Zincirleri ve Eritropoezin Gelişim Dönemleri

Globin dönüşümü olarak da adlandırılan olay, çeşitli globin genlerinin gelişimi esnasında meydana gelen değişiklikler sonucu gen ekspresyonunun artışının düzenlenmesine klasik bir örnektir.  $\alpha$  ve  $\beta$  kümelerindeki genler aynı transkripsiyonel düzen içinde sıralanır ve her kümedeki genler gelişim sırasında ekspresyonlarında aynı sekansa sahip olur. Hem  $\alpha$  hem  $\beta$  benzeri globin zincirlerinin de aynı şekilde üretimi vardır (24).



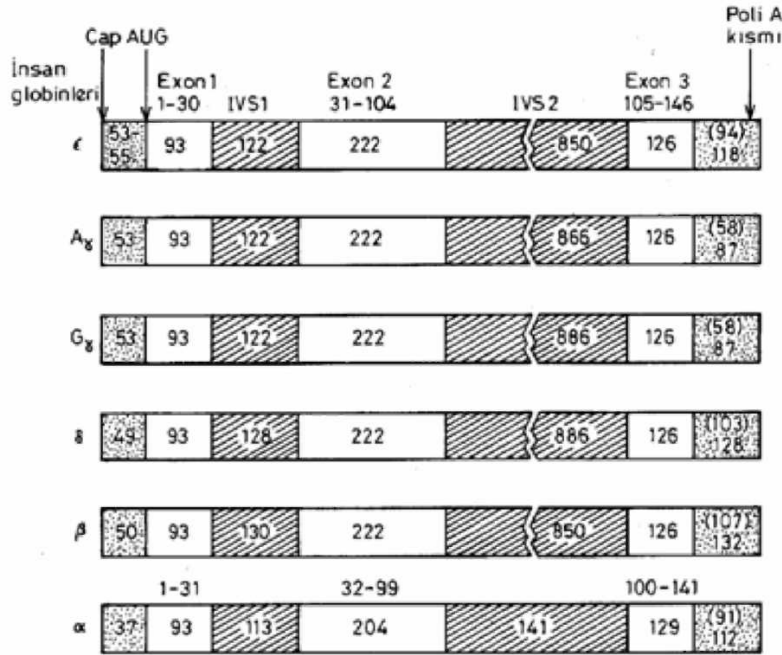
Şekil-3: Fetus ve infantta eritropoez (22).

Globin sentezinin geçici dönüşümlerinin, eritropoezin başlıca bölgelerindeki değişikliğe uymaları oldukça ilginçtir. 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(Şekil-3). HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) fetal yaşam boyunca çoğunluk teşkil eden Hb'dir. Doğumda toplam Hb'nin % 70'ini, erişkin yaşamda ise toplam Hb'nin %1'inden azını oluşturur (24). Bir yaşından itibaren Hb kompozisyonu yaklaşık olarak HbA % 97,5, HbA<sub>2</sub> % 2 ve HbF % 0,5 oranlarında meydana gelir (23).

$\beta$  zincirleri erken gebelikte tespit edilmesine rağmen, sentezleri sadece doğuma yakın belirgin hale gelir ve 3 aylıktan itibaren neredeyse tüm mevcut Hb yetişkin tip HbA'dır.  $\delta$  zincirinin sentezi doğumdan sonra da devam eder, ancak HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) normal yetişkin Hb'nin yaklaşık % 2'sinden fazlasını oluşturmaz (24).

### 2.1.3. Hb'nin Genetik Kontrolü

Globin zincir genleri iki farklı gen ailesine mensuptur.  $\beta$  zincir ailesi genleri 11. kromozom üzerinde 5'- $\epsilon$ -G-A $\lambda$ - $\psi\beta$ - $\delta$ - $\beta$ -3' şeklinde sıralanmış olarak bulunur (Şekil-4). Bu kromozomda birer tane aktif  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  geni ve iki tane de aktif  $\delta$  geni mevcuttur.  $\alpha$  zincir ailesi genleri ise 5'- $\zeta$ - $\psi\zeta$ - $\psi\alpha$ - $\psi\alpha$ - $\alpha$ - $\alpha$ -3' şeklinde 16. kromozomda yer almaktadırlar (15,23). Bu kromozomda bir tane aktif  $\zeta$  ve iki tane aktif  $\alpha$  geni mevcuttur.  $\psi\beta$ , ve  $\psi\alpha$  genleri gelişimin erken devrelerinde aktif olan daha sonra aktivitesini kaybederek ancak kalıntı şeklinde bulunan psödo genlerdir (15).



Şekil-4: İnsan globin genleri

Genin kodlanan kısımları eksonlardır. Genin uzunluğu boyunca yer alan intronlar genin kodlanmayan kısımlarıdır.  $\beta$ ,  $\lambda$ ,  $\epsilon$  globin genlerinde olduğu gibi  $\alpha$  ve  $\zeta$  globin genlerinde de iki küçük intron mevcuttur. İtronlar ve yapısal genlerin düzenlenmesinde önemli rol oynayan, genin 5' tarafında bulunan ve şifrelenmeyen bölgeler (untranslated region, UTR) gen kopyalanmasının başlangıcında yer alır (15).  $\beta$  -globin geninin genel yapısı iki kodlanmayan intron ve üç kodlanan ekzon içeren diğer globin lokusları gibidir. Ekzon 2 hem bağlanmasını ve  $\alpha\beta$  dimer formasyonunun meydana gelmesini sağlayan yapıları kodlarken, ekzon 3 de 2,3-DPG bağlanması ve Bohr etkisi için gerekli olan etkileşimleri oluşturan birçok aminoasidi içeren globin alt ünitesini kodlar (30).

#### 2.1.4. Gen Ekspresyonu

Gen en basit haliyle bir polipeptid zincirindeki aminoasit dizisinin kodunu ve ekspresyonda gerekli olan düzenleyici dizileri taşıyan bir DNA parçası olarak düşünülmektedir. Ancak bu tanımlama insan genomundaki genler için yetersizdir. İnsanlarda çok az gen kesintisiz kodlanan diziler halindedir. Genlerin çoğu bir veya daha fazla kodlanmayan bölge tarafından kesintiye uğrar. Araya giren bu dizilere intron denir; bunlar, nükleusta RNA'ya transkribe olur, fakat sitoplazmadaki olgun RNA'da bulunmazlar. Bu nedenle intronik dizilerdeki bilgi normal olarak son ürün olan proteinde temsil edilmez. İtronlar, proteinin aminoasit dizisini kodlayan dizi olan ekzonlarla ardarda dizilirler (25).

Gen sadece kodlayan dizileri değil, doğru gen ekspresyonu için gerekli komşu nükleotid dizilerini de kapsar. Komşu nükleotid dizileri genden transkribe edilen mRNA sentezi için "başla" ve "dur" sinyallerini sağlamaktadır. Genin 5' ucunda transkripsiyonun doğru başlamasından sorumlu olan dizileri içeren promotor bölge bulunur. İnsan genomunda birkaç farklı tipte promotor bulunur. Bu promotorların hem gelişim şekillerini hem de aynı genin değişik dokularda ekspresyon düzeylerini belirleyen farklı düzenleyici özellikleri vardır. Genin 3' ucunda, olgun mesajcı RNA (mRNA)'nın sonuna adenozin (poliA kuyruğu) dizisi eklenmesi için sinyal taşıyan ve translasyonu olmayan bir bölge vardır. Bir genin transkripsiyonunun başlaması düzenleyici elemanların, promotorun ve bu bölgelerdeki özgül dizilerle ilişki kuran transkripsiyon faktörleri denilen proteinlerin etkisi altındadır. Bir genin transkripsiyonu, kodlayan dizinin 5' ucundaki kromozomal DNA'da bulunan transkripsiyon

başlangıç bölgesi ile başlar ve kromozomda ekzon ve intronlar boyunca kodlayan dizilerin sonuna kadar, birkaç yüz baz çiftinden bir milyondan fazla baz çiftine kadar devam eder. Primer RNA transkriptinin 5' ve 3' modifikasyonlarından ve introna karşılık gelen kısımların çıkartılmasından sonra ekzona karşılık gelen parçalar birleştirilir (splicing). RNA "splicing"den sonra oluşan mRNA (genin sadece kodlanan kısmı), nükleustan sitoplazmaya taşınır kodlanmış olan polipeptidin aminoasit dizisine çevrilir. Bu karmaşık işlemin her evresi hataya açıktır ve bu evreleri etkileyen mutasyonlar, kalıtsal hastalıklara neden olmaktadır (25).

Primer RNA transkripti, 5' ucuna kimyasal bir "başlık" (cap) yapısı eklenmesi ve kodlayan bölgenin sonundaki özgül bir noktadan 3' ucunun kesilmesi ile işlenir. Bu kesilmeyi RNA'nın 3' ucuna poliA kuyruğunun eklenmesi izler; poliA kuyruğu, poliadenile RNA'nın stabilitesini arttırmaktadır. Poliadenilasyon noktasının yeri genellikle RNA transkriptinin 3' ucunda bulunan ve proteine çevrilmeyen kısmında yer alan AAUAAA (veya benzeri bir dizi) ile belirlenir. Bu post-transkripsiyonel modifikasyonlar da RNA "splicing" gibi nükleusta yer alır. Tamamen işlenmiş olan RNA'ya mRNA adı verilir ve translasyonun yapılacağı sitoplazmaya taşınır (23).

İşlenmiş olan mRNA'nın translasyonu her zaman metionin belirleyen kodonla (Cd) başlar. Bu nedenle her polipeptid zincirinin ilk (amino ucu) aminoasidi genellikle protein sentezi bitince çıkartılmasına rağmen, metionin olmaktadır. Metionin Cd'u (başlangıç Cd'u, AUG) mRNA'nın "okuma çerçevesini" (reading frame) oluşturur. Bundan sonraki her Cd, proteinde doğru aminoasit dizilimini sağlayacak şekilde okunmaktadır (23).

### **2.1.5. Globin Zincirlerinin Üretimi**

Globin zincirlerinin oluşumu herhangi bir proteinin yapılmasından farklı değildir. Yapısal genin DNA'sından mRNA aracılığı ile sitoplazmaya bir bilgi akışı mevcuttur. Bu bilgiye göre sitoplazmada kopyalanan genin aynadaki görüntüsü olan bir mRNA kalıbı üzerinde protein zincirleri oluşur. Bir globin geni kopyalandığı sırada, bunun bandlarından



birinde RNA polimeraz enzimi etkisiyle bir mRNA molekülü oluşur. Globin genlerinin ilk kopyası hem intronları hem de ekzonları ihtiva eden geniş bir prekürsör mRNA molekülüdür. Bu molekül çekirdekte küçük değişikliklere maruz kalır. İlk olarak intronlar kesilir ve ekzonlar uç uca gelecek şekilde birleşir. mRNA molekülü 5' ucuna bir CAP yapısı ve 3' ucuna bir poli A'nın ilavesiyle değişir. Bu şekilde işlenmiş mRNA globin zincir yapımı için bir kalıp vazifesi görmek üzere sitoplazma içine hareket eder (15).

Aminoasitler, taşıyıcı RNA'larla (tRNA) kalıba taşınır. Her aminoasit için özel bir tRNA vardır. Bir globin zincirinde aminoasitlerin düzeni bir üçlü bazla tayin edilir. Yani, üç baz (Cd) belirli bir aminoasiti kodlar. tRNA'lar da üç baz içermektedir (anti-Cd). Bunlar belirli aminoasitlerin mRNA Cd'nin tamamlayıcılarıdır. tRNA'lar aminoasitleri kalıba taşır ve Cd/antiCd bazların çift teşkil etmesiyle gereken doğru pozisyonu bulur. İlk tRNA pozisyona girince birkaç protein başlama faktörüyle ve ribozomal alt üniteler arasında bir başlangıç kompleksi oluşturur. İkinci tRNA bunun boyunca hareket eder ve iki aminoasit arasında bir peptid bağı oluşur. Globin zincirleri bu şekilde iki aminoasit uzunluğuna ulaşır. Daha fazla tRNA'nın uygun pozisyonlara hareketiyle globin zincirleri büyür (15).

Spesifik başlamada AUG ve sonlanmada da UAA, UAG, UGA Cd'ları mevcuttur. Ribozomlar sonlanma Cd'na erişince nakil olayı durur ve tamamlanmış globin zincirleri serbest hale gelir. Her bir globin zinciri hem ile birleşir ve hemoglobin molekülünün nihai şeklini vermek üzere de birbirleriyle birleşirler. Genin normal kopyalanmasını, mRNA'nın oluşumunu veya proteine dönüşümünü önleyen kusurların hepsi talasemiye neden olur (15).

### **2.1.6. $\beta$ -Globin Gen Ekspresyonu**

Oldukça küçük ve yapısal olarak basit bir gen olan  $\beta$ -globin geni, 11. kromozomun kısa kolu üzerinde (11p 15,5),  $\beta$ -globin gen kümesi içinde yer almaktadır (Şekil-2).  $\beta$ -globin geni  $\beta$ -globin zincirindeki 146 aminoasidi kodlamak için gerekli bilgiyi, 3 ekzon, 2 intron, 3' ve 5' düzenleyici bölgelerden oluşan yaklaşık 1,8 kb üzerinde taşımaktadır (26).

$\beta$ -talasemi promotörü diğer birçok gen promotörü gibi, transkripsiyonu düzenleyen özgül proteinlerle (transkripsiyonel faktörler) ilişkili olduğu düşünölen oldukça kısa fonksiyonel eleman serisinden oluşmaktadır. Bu proteinler, Hb üreten eritroid hücrelerin  $\beta$ -globin genlerinde gen ekspresyonunu düzenler. Önemli bir promotör dizisi olan "TATA dizisi" (TATA kutusu) transkripsiyon başlangıç dizisinin yaklaşık olarak 25-30 baz çifti öncesinde bulunan adenin (A) ve timin (T) yönünden zengin olan korunmuş bir bölgedir. "TATA dizisi",  $\beta$ -globin geninde translasyon başlangıç bölgesinin yaklaşık olarak 50 baz çifti öncesinde yer alan transkripsiyon başlangıç pozisyonunu belirlemede önemlidir. Bu nedenle gende transkribe edilmiş ancak proteine çevrilmemiş 50 baz çifti uzunluğunda bir dizi bulunmaktadır. İkinci korunmuş bölge olan "CAT dizisi" (CCAAT) birkaç düzine baz çifti daha önde yer alır (25).

Promotörü oluşturan dizilere ek olarak transkripsiyon etkinliğini belirgin derecede değiştirebilen başka dizi elemanları da vardır. Bu aktive edici dizilerin en iyi tanımlanmış olanına "enhancer" adı verilir. "Enhancer"ler transkripsiyonu uyarmak üzere genden uzakta (çoğunlukla birkaç kb) fonksiyon görebilen dizi elemanlarıdır. "Enhancer"ler promotörlardan farklı olarak hem yerleşim hem de yön açısından bağımsızdır ve transkripsiyon başlangıç bölgesinin 5' veya 3' ucunda yer alabilir. "Enhancer"lerin özel bazı proteinlerle ilişki kurması, transkripsiyon düzeyini arttırmaktadır (25).

$\beta$ -globin geninin, gelişim sırasında yüksek düzeyde eksprese olabilmesi için  $\epsilon$ -globin geninin de 5' ucunda yer alan lokus kontrol bölgeleri (LCR, Locus Control Region) adı verilen daha uzak dizilere ihtiyaç duyulur. Beklenildiği gibi, "Enhancer" veya LCR dizilerini bozan mutasyonlar  $\beta$ -globin gen ekspresyonunu engeller veya bozar (25).

### **2.1.6.1. RNA Splicing**

$\beta$ -globin geninin primer RNA transkriptinde yaklaşık olarak 100 ve 850 baz çifti uzunluğunda olan ve birlikte "splice" edilmesi gereken iki ekzon bulunur. Bu işlem, hatasız ve oldukça verimlidir;  $\beta$ -globin transkriptlerinin % 95'inin fonksiyonel globin mRNA'sını oluşturmak üzere doğru olarak kesilip birleştirildiği düşünülmektedir. "Splicing" reaksiyonları

intronların 5' ve 3' uçlarındaki özgül DNA dizileri tarafından kontrol edilir. 5' dizisi, 9 nükleotidden oluşmaktadır; bunların ikisi ("splice" bölgesinin hemen yanındaki intronda bulunan GT dinükleotidi) farklı genlerin "splice" bölgeleri arasında değişmez. 3' dizisi, yaklaşık olarak bir düzine nükleotidden oluşmaktadır; bunların ikisi normal "splicing" için zorunlu olan ve intron/ekzon sınırının 5' ucunda yerleşen AG'dir. Kesim bölgeleri mRNA'nın okuma çerçevelerine dahil değildir (25).

RNA "splicing"ın tıbbi önemi, ekzon/intron sınırlarında yer alan korunmuş dizilerdeki mutasyonların genellikle RNA "splicing"ı bozmasıyla ve buna bağlı olarak olgun  $\beta$ -globin mRNA'sının miktarındaki azalma ile açıklanmıştır. Daha önce bahsedildiği gibi GT veya AG dinükleotidlerindeki mutasyonlar, mutasyonu bulunduran intronun normal "splicing"ini bozar (25).

#### **2.1.6.2. Poliadenilasyon**

Olgun  $\beta$ -globin mRNA'sının dur Cd'u ile poliA kuyruğu arasında, yaklaşık olarak 130 baz çifti (bç) uzunluğunda 3' proteine çevrilmeyen bölge (3' UTR) bulunur. Diğer genlerde olduğu gibi, mRNA'nın 3' ucunun kesimi ve poliA kuyruğun eklenmesi, poliA bölgesinden yaklaşık olarak 20 bç önce bulunan bir AAUAAA dizisinin kontrolü altındadır.  $\beta$ -talasemili hastalardaki poliadenilasyon sinyal mutasyonları, doğru 3' kesimi ve poliadenilasyon için bu sinyalin önemini kanıtlamaktadır (25).

#### **2.2. $\beta$ -talasemiler**

Talasemilerin klasik şeklidir. Bir pediatrist olan Dr. Thomas Cooley tarafından 1925 yılında 4 Yunan ve İtalyan çocukta hayatlarının ilk yıllarında derin anemi, hepatosplenomegali, büyüme geriliği ve kemik deformiteleri ile karakterize bir sendrom (Cooley Anemisi) olarak tanımlanmıştır (31, 32-33). Daha sonra benzer vakaların görülmesi üzerine bu herediter hemolitik anemiye Van Jaksch anemisi, splenik anemi, eritroblastozis adları verilmiştir (29). 1936'da George Whipple ve Lesley Bradford inceledikleri vakaların Akdeniz civarı ülkelerden geldiğini saptadıkları hastalığa deniz anlamına gelen "thalassa=deniz (eski Yunanca)" adını vermişlerdir (32,35). Zamanla bu hastalığın yalnız Akdeniz

ülkeleri toplumlarında olmadığı diğer toplumlarda da bulunduğu saptanmıştır (19). Türkiye’de ilk iki talasemi vakası Ord. Prof. Dr. Sedat Tavat ve Prof. Erich Frank tarafından 1940 yılında eşzamanlı olarak bildirildi (35). Valentine ve Neel talasemi genetiğini aydınlatarak talasemi minor ve major terimlerini 1944 yılında tıp literatürüne eklediler (35).

Talasemi yaygın görülen tek gen hastalıklarından olup otozomal resessif geçiş özelliği olan bir hastalıktır.  $\alpha$  globin zincirini sentezleyen gen 16. kromozomda ve  $\beta$  globin zincirini kodlayan gen 11. kromozomda yer almaktadır.  $\alpha$ -talasemide moleküler defekt daha çok delesyon,  $\beta$ -talasemide ise nokta mutasyonlar şeklindedir (29,33,36,37). Ülkemizde talasemi mutasyonları çok heterojendir. Toplam 35’in üzerinde mutasyon olduğu bilinmektedir. Mutasyonların dağılımı büyük farklılıklar göstermez (5,29).

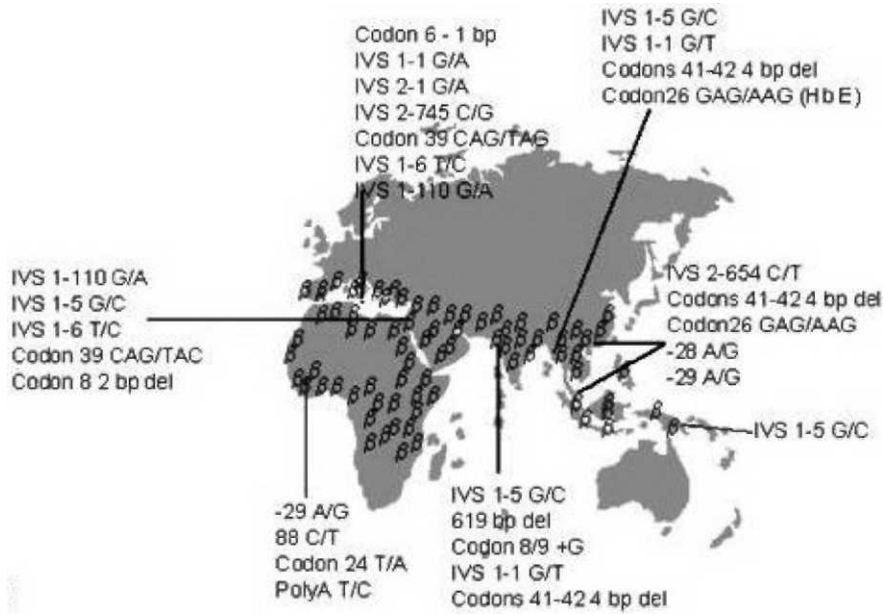
$\beta$ -talasemi Akdeniz Ülkeleri, Kuzey ve Batı Afrika'dan Orta Doğu ve Güney Doğu Asya Ülkelerini de içine alan bir kuşak tarzında yayılma gösterir (15).  $\beta$  -talasemili hastalarda,  $\beta$  -globin geninin 200'den fazla farklı mutasyonu tanımlanmıştır. Dünyada yüksek sıklığa sahip popülasyonların her birinin özellikle bir bölgede birkaç yaygın mutasyonu taşıdığı görülürken nadir olan mutasyonlara da rastlanabilir (27).  $\beta$ -talasemi, Akdeniz ülkeleri, Afrika ve Güneydoğu Asya gibi malarya için endemik alanlarda yüksek sıklıkta görülür. Hastalığın taşıyıcıları malaryaya karşı genetik olarak korunur ve seçici bir avantaja sahiptir (19,28). Dünya popülasyonunun yaklaşık % 3 kadarı (150 milyon)  $\beta$ -talasemi mutasyonu taşıyıcısıdır (29).

### **$\beta$ -Talasemiye Neden Olan Mutasyonlar**

$\beta$ -talasemiye neden olan 200 civarında farklı mutasyon tanımlanmıştır (Şekil-5). Her ne kadar çoğu, küme içinde küçük nükleotid değişimleri olsa da, delesyonlar da  $\beta$ -talasemiye neden olabilir. Bütün mutasyonlar  $\beta$ -globin zincirlerinin sentezinin yokluğu ( $\beta^0$  talasemi) veya sentezdeki bir azalmayla ( $\beta^+$  talasemi) sonuçlanır (20).

$\beta$ -globin genindeki mutasyonlar gen ekspresyonunun herhangi bir kademesini etkileyerek  $\beta$ -globin zincir sentezinde bozukluklara neden olur. Bu nedenle  $\beta$  globin genindeki mutasyonların sınıflandırılması gen ekspresyonu kademelerindeki etkilerine göre yapılabilir.

1. Transkripsiyonel mutasyonlar
2. RNA işlenmesi (processing) ile ilgili mutasyonlar
  - Splice kavşağındaki mutasyonlar
  - Konsensus dizi değişikliklerine neden olan mutasyonlar
  - İntronlardaki değişiklikler
  - Kodlanan bölgelerdeki mutasyonlar
3. RNA translasyon mutasyonları
  - Anlamsız (nonsense) mutasyonlar
  - Çerçeve kayması (frameshift) mutasyonları
4. RNA ayrılması ve poliadenilasyonla ilgili mutasyonlar
5. Başlık bölgesi (cap site) mutasyonu
  - 3'-Translasyonu yapılmayan bölgedeki mutasyon
  - Başlangıç kodonu mutasyonları
  - Delesyonel mutasyonlar



Şekil-5:  $\beta$ -talaseminin dünyada dağılımı (152).

Altay'ın Türkiye'nin değişik coğrafi bölgelerinden gelen hastalarda tespit edilen 1064 mutant kromozom üzerinde yaptığı çalışmada 32 farklı mutasyon görülmüştür. Dağılım

bölgeler arası oranlarda farklılık gösterse de toplam dağılımda en yaygın mutasyonun IVS 1-110 (% 40,88) olduğu görülmüştür. Bunu takiben sırasıyla azalan oranlarda en yaygın 10 mutasyon, IVS 1-6 (% 10,33), IVS 2-1 (% 8,08), IVS 2-745 (% 6,20), IVS 1-1 (% 5,73), FSC 8 (% 4,69), -30 (% 4,22), Cd 39 (% 2,91), FSC 8/9 (% 2,63), Cd 44 (% 1,78), FSC 5 (% 1,22) şeklindedir (5).

Dünya popülasyonunun yaklaşık %3 kadarı (150 milyon)  $\beta$ -talasemi geni taşıyıcısıdır (29,39, 44.). Bazı kaynaklara göre tüm dünyada 240 milyon kişi  $\beta$ -talasemi heterozigottur ve her yıl 200 bin  $\beta$ -talasemi hasta çocuk doğum olduğu sanılmaktadır (40). Özellikle Yunanistan ve İtalya'da bu oran çok yüksektir. En yüksek taşıyıcılık prevalansı Sardinya adasındadır (%11-34) (33,41). Türkiye genelinde  $\beta$ -talasemi taşıyıcılığı %2 olarak bildirilirken, geniş bölgesel farklar dikkati çekmektedir (%0.6-%10.8) (4). Ülkemizde 1.4 milyon taşıyıcı ve 4500 civarında talasemi hastası bulunmaktadır (37). Ülkemizde taşıyıcılık prevalansının bölgelere göre dağılımı incelendiğinde, Batı Trakya göçmenleri ve Güney Anadolu'da prevalansın daha yüksek olduğu görülmektedir. Talasemi taşıyıcılığı, İzmir'de %2.7, Antalya'da %5.7, Denizli'de %3.6, Adana'da %3.9, Batı-Trakya göçmenlerinde ise %10.8 olarak bildirilmektedir (37,39, 44).

$\beta$ -talasemiler klinik tablonun ağırlığına göre 3 ana grupta incelenir (31,41,44).

a)  $\beta$ -talasemi major ( $\beta$ -TM):  $\beta$ -talasemilerin en ağır formudur. Ağır anemi vardır. Düzenli kan transfüzyonu yaşam için gereklidir (31).

b)  $\beta$ -talasemi intermedia ( $\beta$ -TI): Zaman zaman semptomatik olan, infeksiyon, cerrahi vb. nedenler dışında genellikle transfüzyon gerektirmeyen orta şiddette anemisi olan hasta grubudur (31).

c)  $\beta$ -talasemi minör ( $\beta$  -talasemi taşıyıcılığı, talasemi trait): Genellikle asemptomatik olan hastalarda, eritrosit morfolojisinde değişiklikler vardır. Sıklıkla toplum veya aile taramaları ile tanı konulur. Anemi yoktur veya çok hafiftir.

### 2.2.1. $\beta$ -Talasemi Major (Homozigot $\beta$ -talasemi)

Her iki  $\beta$  geni de talasemi mutasyonu taşıyor ise homozigot  $\beta$ -talasemi adı verilir. Moleküler defekt %5-30 civarında  $\beta$ -globin zincir sentezine izin veriyor ise  $\beta^+$  talasemi;  $\beta$ -globin zincir sentezine izin vermiyorsa  $\beta^0$  talasemi'den söz edilir. Ülkemizde en sık görülen IVS1-110 mutasyonu  $\beta^0$  talasemi ve ikinci sıklıkla görülen IVS1-6 (T-C) mutasyonu ise  $\beta^+$  talasemi nedenidir. Bu durumda kişinin taşıdığı moleküler defektin şiddeti, hastalığın klinik şiddetinin belirleyicisidir.  $\beta$  zincir sentezi ve kişinin heterozigot /homozigot oluşu klinik ağırlığı etkiler. Homozigot talasemi olgularında hafif  $\beta$ -talasemi mutasyonu varlığı ve/veya  $\beta$ -talasemi yanısıra  $\alpha$ -talaseminin veya fetal Hb üretimini arttıran  $\gamma$  globin geni modulatörlerinin kalıtılmış olması daha hafif klinik gidişe sahip “Talasemi İntermedia” fenotipine neden olmaktadır. Şiddetli moleküler defekte sahip olgular ise “Talasemi Major” olarak tanımlanan şiddetli hastalığa sahiptir (37,44).

#### 2.2.1.1. Fizyopatoloji

$\beta$ -talasemide,  $\beta$ -globin zincir üretiminin azalması veya hiç yapılamaması buna karşın  $\alpha$  zincir yapımının normal düzeyde devamı,  $\alpha$  globin zincirinde relatif bir artmaya neden olur.  $\alpha$  ve  $\beta$  globin subünitlerinin sentezindeki bu dengesizlik fizyopatolojideki temel olaydır. Artmış  $\alpha$ -globin subünitleri Hb tetrameri oluşturamazlar.  $\alpha$  zincirlerinin, oksijen taşıma yeteneği olmadığı gibi, solubiliteleride azdır. Artmış, stabil olmayan serbest  $\alpha$  zincirleri dimer şeklinde kemik iliğindeki eritroid öncü hücrelerin içinde birikir ve membranına çökerler. Eritrosit membranı çift katlı bir lipid zar ve onun altında onu destekleyen iskelet proteinlerinden yapılmıştır. Bu iskelet proteinleri spektrin, protein 4.1, protein 3, aktin ve glukoforinlerdir.  $\beta$ -talasemide biriken ve çöken  $\alpha$ -globin agregatları, protein 4.1'in bazı aminoasitlerinin oksidasyonuna neden olup, fonksiyonel ve yapısal anormalliğine yol açarlar. Neticede normalde spektrin, aktine bağlanmasını artıran protein 4.1, bu işlevini yapamaz. Spektrin-aktin-protein 4.1 ilişkisi bozulur (31,43). Çöken agregatlar, eritrosit membran ve organellerinde harabiyete ve eritrositin kemik iliği içinde yıkımına, eritroid prekürsörlerin ölümüne, ineffektif eritropoeze neden olmaktadır. Homozigot  $\beta$ -talasemide kemik iliği normoblastlarının %15-30'dan fazlası yıkımdan kurtulamamaktadır.  $\alpha$  zincirlerinin yarattığı

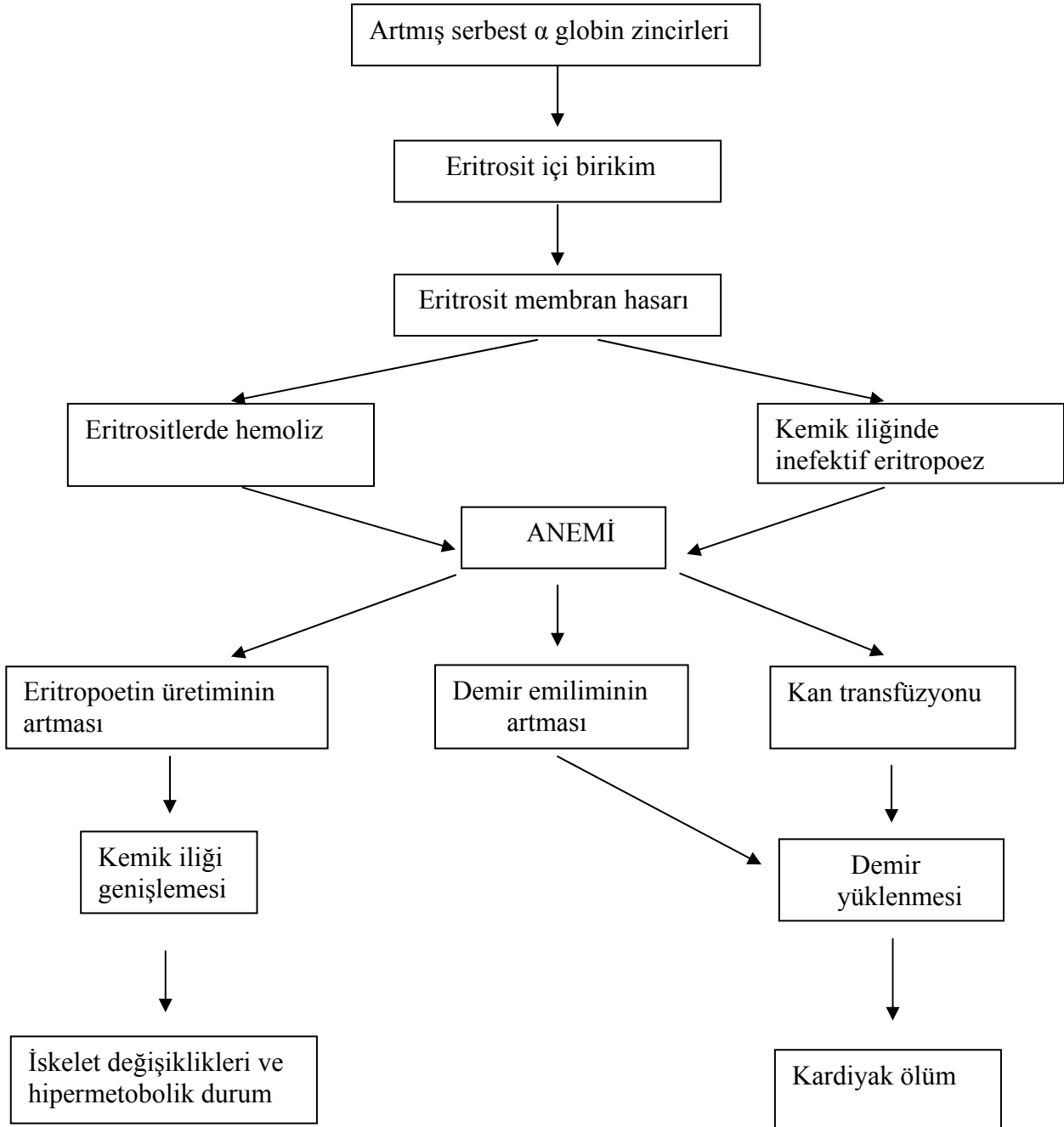
inklüzyonlar (Hemikromlar) eritroid kök hücrelerin içinde bile görülmektedir (69,70). Eritroid hücrelerin kemik iliğinde yıkımı yüzünden dolaşımdaki hücrelerde ölçülen  $\beta/\alpha$  globin sentez oranı, hastalığın ağırlık derecesi ile tam korelasyon göstermez. Çünkü globin dengesizliğinin çok fazla olduğu hücreler dolaşıma geçmeden yıkılmaktadırlar(43).

$\beta$ -talasemide;  $\beta$ -globin zincir üretiminin eksikliği veya yokluğu, diğer zincirleri içeren Hb'lerin artışı (HbA<sub>2</sub> ve HbF artması) ile telafi edilmeye çalışılır. Fakat bu artışlar,  $\beta$  zincir yokluğunu yeteri kadar tamamlayamaz ve başlıca erişkin Hb'i olan HbA' nın eksikliği devam eder. Yine globinle bağlanmamış Hem ara ürünlerinin ALA sentetaz enzimi üzerine feed back inhibisyonu, Hb'nin eksik yapımına katkıda bulunur. Sonuçta fonksiyonel Hb tetramerlerinin yapımında azalmaya bağlı olarak Hb seviyesi düşer ve hipokromi, mikrositoz, target hücreleri ve daha az sıklıkla gözyaşı hücreleri, mikrosferositler meydana gelir (31).

Olgunlaşmasını tamamlayarak periferik dolaşıma çıkabilen eritrositler hem yoğun olarak inklüzyon cisimleri taşıyor olmaları nedeniyle, hem de serbest “hem”, alfa zincirlerinin ve demir etkisiyle oluşan serbest oksijen (radikalleri) türevlerinin yaptığı patolojiler nedeniyle, dalakta ve retiküloendoteliyal sistem dokularında yıkıma uğramaktadırlar. Eşleşmemiş  $\alpha$  zincirleri direkt yoldan veya oluşturduğu oksidatif hasar nedeniyle eritrosit membranının antijenik yapısında değişikliğe yol açar. Bu antijenik yapı değişikliği otoreaktif IgG antikorları oluşumuna neden olmaktadır. IgG antikorları  $\alpha$ -antigalaktosit ile reaksiyona girer, membran içeriğindeki sialik asitte azalmayla, talasemik eritrositlerin dolaşımdan temizlenmesine yardımcı olabilir (31). Demir normalde membranda bulunmaz. Ama talasemide denature Hb ve membran kompleksi “hemichrome” oluştururlar (43). Bu hücrelerin dalaktan geçişleri sırasında değişik şekilli eritrositler ortaya çıkar (poikilositoz). Anormal eritrositlerin yıkım yeri olan dalak, konjesyona uğrar ve myeloid metaplazi ile beraber splenomegali gelişimi olur. Derin anemi ve oluşan doku hipoksisi eritropoetin üretimini arttırarak kemik iliğinin normalin 15-30 kat genişlemesine, kortikal incelmeye ortaya çıkan tipik kemik deformitelerine ve mide-barsak lümeninden demir emiliminin artışına neden olur (29,71). Artmış demir emilimi ve kan transfüzyonlarıysa, aşırı demir birikimi ve bunun sonucu olan organ disfonksiyonlarından sorumludur (37). Fetal hayatta eritropoetik organlar olan dalak ve karaciğerde eritroid aktiviteye katılırlar (31,41,33).



Sonuç olarak  $\beta$ -talasemide  $\beta$ -globin zincir sentezindeki azalmaya bağı olarak; azalmış Hb sentezi, artmış serbest  $\alpha$ -globin zincirlerinin agregasyonu, ineffektif eritropoez ve ekstravasküler hemoliz talaseminin fizyopatolojisini oluşturur (31,45). Serbest  $\alpha$  zinciri, klinik ve patolojik olaylarla direk bağlantılıdır (Şekil-6).



Şekil-6.  $\beta$ -talasemi hastalığının patofizyolojisi.

### 2.2.1.2. Klinik

$\beta$ -talasemi olgularında klinik bulgular kronik anemi, kemik iliğinde genişleme, demir birikimi ve kronik hemoliz ile ilişkilidir. Doğumdan 3-6 ay sonra, derin hipokrom ve mikrositer anemi ve kronik anemiye ait, solukluk, halsizlik, irritabilite, beslenememe, büyümede duraklama, yanısıra hepatosplenomegali ile ilişkili olarak karın şişliği ilk bulgulardır. Hb 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. Bu kemik değişiklikleri kafa, uzun kemik ve parmaklarda karakteristik radyolojik bulgular ile birliktedir. Vertebra ve uzun kemiklerde kemik iliği genişlemesine bağlı incelmeden dolayı kortekste spontan kırıklar olabilir. Maksiller kemikteki deformitelere bağlı olarak dental maloklüzyonlar ile ısırma ve çiğneme bozuklukları gelişir. İneffektif eritropoez, hipogonadizm, hipoparatroidi, hipotroidi, folat eksikliği, demir yükü, yoğun desferrioksamin (DFO) tedavileri osteoporoza yol açan nedenler arasında sayılabilir. Demir aşırı yükü, gastrointestinal sistemden demir hiperabsorbsiyonu ve eritrosit transfüzyonları ile oluşur. Ciltte koyu renkli pigmentasyona ve yetersiz şelasyon alan olgularda, genellikle ilk on yıldan sonra, başta kardiyak fonksiyon bozukluğu olmak üzere, karaciğerde portal fibroz ve siroza, diyabet, hipotiroidi, hipoparatiroidi, büyüme ve gelişme geriliği gibi endokrin disfonksiyonlara neden olur. Epistaksis ve hemostatik diğer problemler KC fonksiyonlarındaki bozulmaya bağlı olarak gelişir ve daha çok koagülasyon faktörleri sentez bozukluğu sonucu oluşur. Renal tubuler dilatasyona bağlı böbreklerde büyüme, orta derecede proteinüri ve mikroskopik hematüri, interstisyel nefrit, demir depolanmasına bağlı olarak meydana gelmektedir. Büyük yaşlardaki hastalarda safra taşları, kolesistit ve diyare oluşabilir (29,44). Ölüm yaşamın 2. ve 3. dekatlarında konjestif kalp yetmezliği ve kardiyak aritmilerle beraber olup (31, 47), kalpte demir birikimi halen ölümlerin %70'inden sorumludur (46).

### 2.2.1.3. Laboratuvar

Anemi ilk bulgudur ve kan tranfüzyonu yapılmamış hastalarda hemoglobin konsantrasyonu 2.5-6.5 g/dl civarındadır. Anemi; hipokrom (MCHC:23-32 g/dl), mikrositer (MCV:48-72 fl) özelliktedir. Anizositoz çok belirgindir. Eritrosit çapları 3-15 µm gibi değişkenlik gösterir. Çoğunlukla şiddetli hemoliz sonucu, dolaşımdaki normoblastlar nedeniyle tam kan sayımında yalancı bir lökositöz vardır. Normoblast sayısı fazla olduğu halde, retikülosit yüzdesi beklenenden azdır. Retikülosit % 5-15 arası değişkenlik gösterir. Retikülositoza şiddetli hemolitik anemi ile ilişkili diğer biyokimyasal göstergeler (LDH artışı, indirek hiperbilirubinemi ve haptoglobin azalması) eşlik eder. Serum demiri önemli oranda artmış, demir bağlama kapasitesi ise hafifçe artmıştır. Transferrin saturasyonu %80'nin üzerindedir (31,37). Trombosit sayısı normal veya artmıştır. Periferik kan yaymasında, belirgin anizositoz, poikilositoz, polikromazi, hedef hücreler, göz yaşı damlası hücreler, normoblastlar, eliptositler ve parçalanmış anormal şekiller bulunur. Hipokromi çok belirgindir ancak mikrositoz kan yaymasında her zaman çok açık olmayabilir. Bazofilik noktalanma ve pappenheimer cisimleri bulunur. Hastalığın genotipik şiddetine göre, Hb elektroforezinde HbA ya hiç yoktur ve yerini HbF'e (%98) ve Hb A<sub>2</sub>'ye (%2) bırakmıştır (β<sup>0</sup> talasemilerde) ya da daha ılımlı genotipik özellik taşıyan olgularda olduğu gibi HbF (%70-80) ve HbA<sub>2</sub> (%2) yanısıra bir miktar HbA (%10-20) (β<sup>+</sup> talasemi) bulunur. Talasemi intermedia olgularında HbF düzeyleri % 20-40 civarında olabilir. Kemik iliği hipersellülerdir ve eritroid hiperplazi (E/M:20/1) saptanır (31). Eritrosit prekürsörleri metil viole ile boyandığında α-zincir presipitat inklüzyonları görülebilir. β-TM (β-talasemi major)'ün kesin laboratuvar tanısı rutinde yapılmayan, kemik iliği veya periferik kan retikülositlerinde globin biyosentetik oranına bakmaktır (31).

### 2.2.1.4. Talasemi Major'un Komplikasyonları:

Komplikasyonların etyolojisi multifaktöriyeldir, değişkendir ve genotipe bağlıdır. Bunlar inefektif eritropoez, ekstramedüller hematopoez, transfüzyonel demir yüklenmesi, transfüzyon ilişkili infeksiyon ve şelasyon tedavisi gibi faktörlerden kaynaklanır. Yakın zamanlarda bu hastalarda, tam olarak anlaşılmasa da, klinik olarak aşikar veya sessiz

trombozların pulmoner hipertansiyon ve portal hipertansiyona neden olduğu rapor edilmiştir (74).

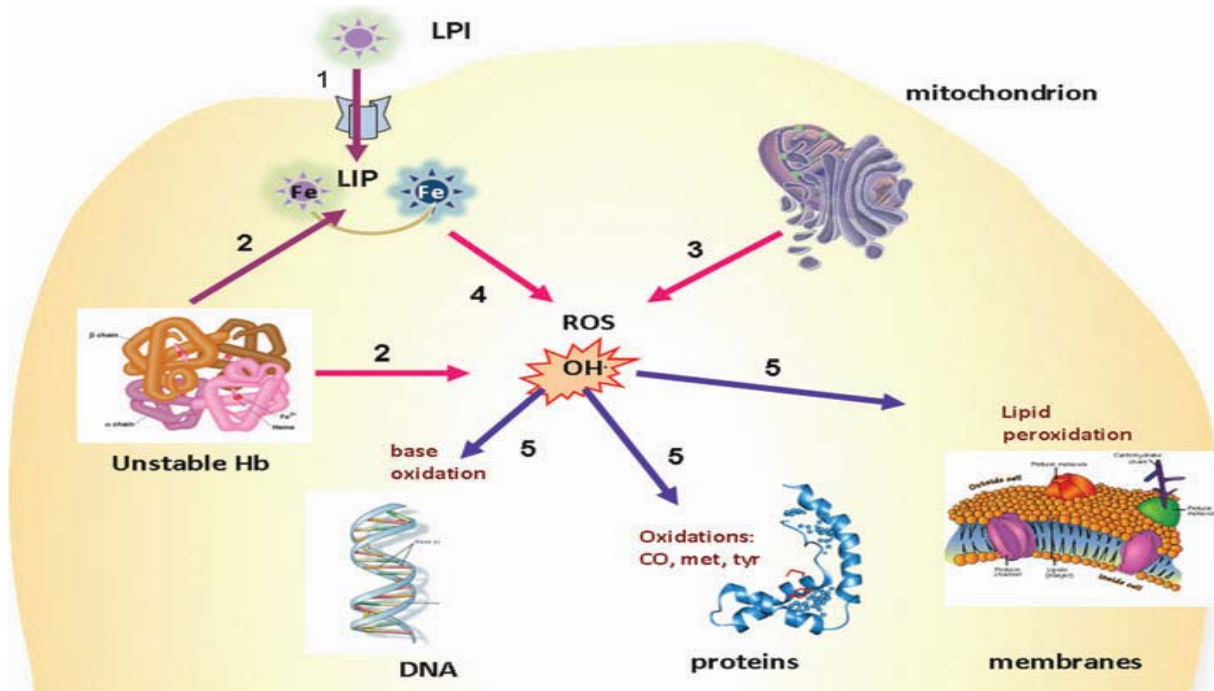
**Demir birikimi:** Hayat kurtaran kan transfüzyonlarının en önemli komplikasyonudur (74). Bir ünite kan ile vücuda yaklaşık 200 mg demir girer (1,37). Talasemi major hastalarında ortalama demir yüklenme hızı 0,4 mg/kg/gün'dür. Fakat bu değer çok değişkendir. Hastaların %20 kadarında 0,3 mg/kg/gün'den az, %60'ında 0,3-0,5 mg/kg/gün arasında, %20'sinde 0,5 mg/kg/gün'ün üzerindedir (75).  $\beta$ -talasemi hastalarında gastrointestinal sistemden demir emilimi de demir yüklenmesine katkıda bulunur. Emilen demirin miktarı inefektif eritropoezin derecesine, eritroid ekspansiyonun büyüklüğüne ve aneminin şiddetine bağlıdır (77). Yapılan bir çalışmada  $\beta$ -talasemi hastalarında ağız yolundan alınan demirin absorpsiyonunun %20-75 arasında olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılara göre barsaktan demir absorpsiyonu plazma demir döngüsü, transferrin saturasyonu ve karaciğer demir konsantrasyonu ile korelasyon göstermektedir (76).

**Demir toksisitesinin mekanizması:** Normal koşullar altında demir transferrin gibi fizyolojik ligandlara bağlı olarak taşındığından zararlı radikallerin oluşumuna neden olacak düzeyde bulunmaz. Ancak demir yüklenmesi geliştiğinde bu koruyucu mekanizmalar doygun hale gelir. Transferrinin demir taşıma kapasitesi dolar ve transferrine bağlı olmayan demir (serbest demir, non-transferrin bound iron, NTBI) oluşur. NTBI türleri muhtemelen heterojen yapıdadır. Demir sitrat monomerleri, oligomerleri ve polimerler şeklinde bulunur ve proteine bağlı olarak taşınır (78). Demir yüklenmesi devam ettiği sürece NTBI ve redoks aktif düşük moleküler ağırlıklı intraselüler demir miktarı artar (79,80). Parankimal hücrelerdeki demir (labil demir havuzu) artınca, bir korunma mekanizması olarak, transferrin demirinin hücre içine girişi engellenir. Ancak NTBI'nın hücrelere girişi, üstelik transferrin demirinden çok daha hızlı olarak devam eder (81,82,84) (Şekil-7). Deneysel modellerde NTBI'nın hızla hepatositlerin içine girdiği gösterilmiştir (83).

Başka bir çalışmada kalp kültürü hücrelerinde NTBI türlerinin transferrin demirinden 200 kat daha hızlı hücre içine alındığı ve serbest radikaller ile lipid peroksidasyonu, organel disfonksiyonu ve anormal ritim meydana getirdiği gösterilmiştir (85). Diğer taraftan labil demir havuzunun kontrol edilemez genişlemesi, oksiradikal oluşumunu başlatarak demir

toksitesine neden olur (81,82,84). Aynı zamanda plazmada artmış NTBI ile ilişkili olarak plazma antioksidan seviyeleri azalır (86,87) (Şekil-7).

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) kendisi göreceli olarak stabil ve nontoksikdir. Hidroksil radikalının ( $OH^\cdot$ ) önemli bir prekürsörüdür. Ancak ortamda demir, bakır ve kobalt gibi katalitik elementler bulunduğu  $OH^\cdot$  radikalini meydana getirir. Dokuda yeterli miktarda  $Fe^{+2}$  olduğunda  $H_2O_2$  ile fenton reaksiyonuna girerek  $OH^\cdot$  radikali ve  $Fe^{+3}$  ün oluşmasına neden olur. Ortaya çıkan  $OH^\cdot$  radikali ise oldukça toksik bir molekül olup protein, DNA ve membran lipidlerinde peroksidasyon yolu ile hasarlanma meydana getirebilir (8,88). Özellikle karaciğer hücrelerindeki lizozomlarda yoğunlaşan demirin yarattığı lipid peroksidasyonu ve organel hasarı apoptotik hücre ölümüne neden olabildiği gibi fibrojenезisi de uyarabilir (90). Demir yüklenmesi lipid peroksidasyonu ile birlikte transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  gen ekspresyonunu artırır ve iki faktör hepatik zedelenme ve fibrojenезisin gelişmesine katkıda bulunur (91).



Şekil-7. Talasemide serbest demirin oksidatif stresin oluşumu ve hücre hasarlanması üzerindeki rolü. (1) Labil plazma demiri (LPI), demir yüklenmesi olan talasemik hastalarda hücre içine girerek birikir ve labil demir havuzunu oluşturur. (2) Kararsız yapıdaki hemoglobin molekülü LPI'nın birikimine katkıda bulunur eritroid hücrelerde reaktif oksijen ürünleri oluşur. (3) Normalde birçok hücrede mitokondride enerji üretimi süresince reaktif oksijen ürünleri oluşur. (4) Fakat talasemide artmış LPI reaktif oksijen ürünlerinin

oluşumunu arttırır. (5) Reaktif oksijen ürünleri hücrel DNA, proeinler ve lipidlerin yapısını değiştirir (154).

### **Demir yükünün saptanması:**

**a) Serum ferritini:** Vücut demir depolarının en sık kullanılan indirek göstergesidir (96). Normal olarak ferritin düzeyleri, depo demirinin azalması ile düşüş gösterirken depo demir birikimi ile beraber artış gösterir. Sürekli transfüzyon yapılan hastalarda serum ferritin düzeyleri ilk yıllarda vücut demir deposu ile iyi korelasyon gösterirken, daha sonraki yıllarda bu korelasyon azalır (92,93). Ferritin düzeyi 4000 µg/l'yi geçtiğinde hasarlanmış hücrelerden demir salınımı olması nedeni ile serum ferritini vücut demir deposunu doğru şekilde yansıtmayabilir (94). Diğer taraftan ferritin bir akut faz reaktanıdır, bunun yanında hepatoselüler zedelenme ürünüdür. Bundan dolayı serum ferritininin yorumlanması güç olabilir. İnfeksiyon, konjestif kalp yetmezliği ve hepatit de serum ferritin düzeylerini yükseltebilir (95-98). Uzun süreli ferritin izlemi, vücut demir yükündeki dalgalanmalarla ilgili fikir verir. Bu nedenle tekrarlanan ölçümler daha değerlidir (99).

**b) Karaciğer demir yoğunluğu:** Vücut demirinin büyük bölümü karaciğerde depolandığından, hepatic demir yoğunluğu ölçümü kantitatif, spesifik ve vücut demir yükünü değerlendirmede hassas bir ölçümdür. Karaciğer biyopsi preparatında demirin atomik absorpsiyon veya emisyon spektrometre ile kimyasal ölçümü sağlanabilir (100). Ancak biyopsi materyalinin 0.4 mg kuru karaciğer ağırlığından daha küçük olduğu örneklerde demir görece yüksek bulunur. Ayrıca, orta veya şiddetli karaciğer fibrozisi varlığında, fibrotik bantlara düşen biyopsi örneğinde demir yanıltıcı olarak düşük bulunabilir. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile ölçülen değerlerin biyopsi ile ölçülenle çok uyumlu olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle biyopsinin bahsedilen zorlukları da göz önünde bulundurularak non invaziv bir teknik olarak karaciğer MRI yapılabilir (99).

**c) Kardiyak demir birikimi:** Talasemik olgularda, kalpte demir birikimi ile ilişkili aritmiler ve kalp yetmezliği en sık ölüm nedenini oluşturmaktadır. Bu yüzden myokardial demir birikimini ölçen non-invaziv teknikler, kardiyak riski belirlemede yardımcı olabilir. Kardiyak T2\* MRI, kalp demir yoğunluğunu saptamada standardize bir yöntemdir. MRI T2\*'ın 20

milisaniye üzerinde bulunması, kalpte normal demir birikimini tanımlarken, 14 – 20 milisaniye değerleri hafif, 8-14 milisaniye orta şiddette ve <8 milisaniye şiddetli demir yüküne karşılık gelmektedir (101). Nitekim kalp yetmezliği bulunan talasemik olguların çoğunda (%89), kardiyak T2\*MRI şiddetli demir birikimine işaret etmektedir. Buna karşın, karaciğer ve kalp demir birikimi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bundan öte, bazı olgularda, karaciğer demir yoğunluğu düşük iken şiddetli kardiyak demir birikimi gözlenmiştir. Serum ferritini ile karaciğer demir yoğunluğu ve kardiyak fonksiyonlar arasında da anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (102,103).

Tüm bu bulgular, serum ferritin seviyelerinin yanı sıra, yılda bir (en fazla iki) kez karaciğer ve 10 yaş üzerinde kalp demir yoğunluğu izleminin, demir şelasyon sağaltımının yönetiminde, demir yükünü güvenli optimum seviyelerde korumak yönünde, avantaj sağlayabileceğini göstermektedir.

### **2.2.1.5. Tedavi**

Klasik tedavi yaklaşımı eritrosit transfüzyonu, demir şelasyonu ve splenektomiden oluşur. Hematopoetik kök hücre transplantasyonu ileri tedavi yaklaşımlarındandır (48).

Eritrosit transfüzyonu:  $\beta$ -talasemili hastaların yaşam süreleri ve kaliteleri 1960'larda uygulanan düzenli kan transfüzyonu ile artmıştır (49). Düzenli transfüzyon programı ile; aneminin düzeltilmesi, ineffektif eritropoezin baskılanması, gastrointestinal demir emiliminin inhibisyonu amaçlanır. Yine splenomegali, gelişme geriliği ve kemik deformasyonları gibi komplikasyonlar engellenir. Transfüzyon öncesi Hb'i 10g/dl (hipertransfüzyon) ve 12g/dl (süpertransfüzyon) tutacak şekilde transfüzyonlar amaca ulaştıran transfüzyon programları olmasına rağmen aşırı demir birikimi dezavantajıyla beraberdir (50-52). Transfüzyon öncesi Hb>9-9.5g/dl tutacak ılımlı transfüzyon rejimleri daha az demir birikimi ile beraber normalin 2-3 katı ilik baskılanmasını sağlar (29).  $\beta$ -talasemi majorlölü olgulara, transfüzyon öncesi Hb düzeyleri 9,5-11,5 g/dl olacak şekilde, 3-5 hafta aralıklarla, ABO-Rh(D) uygun lökositten fakir, log4 filtre ile eritrosit süspansiyonu 10-20 ml/kg dozda ve 2 saat içinde verilir (31). Transfüzyon öncesi periferik yaymada her 100 BK sayısına karşılık çekirdekli eritrosit sayısı 5'in altında, normal gelişme sağlanmış ve yıllık kemik grafileri takibinde kemik iliği alanı genişlememiş ise transfüzyon uygulaması başarılı kabul edilir (53).

Transfüzyon reaksiyonları, demir yüklenmesi ve transfüzyonla bulaşan enfeksiyonlar önemli transfüzyon komplikasyonlarından sayılabilir. Alloimmünizasyon hastaların %20-30'unda ve genelde 3 yaşın üzerinde transfüzyona başlayan olgularda, minor kan grup antijenlerine bağlı olarak gelişebilir. Bu yüzden hastaların ABO-Rh(D) dışında Rh subgrup (CcEe) ve Kell uygun kan almaları önerilir (31,54).

Transfüzyon programındaki hastaların 3 ayda bir boy, kilo, KC fonksiyon testleri, bilirubin, LDH, ferritin düzeyleri ölçülmelidir (31). Aynı zamanda hepatit A ve B virus aşılı ile aşılama programına alınmalı; Hepatit (A, B, C) ve HIV serolojisi 6 ayda bir kontrol edilmelidir. Son yıllarda talasemik hastalarda transfüzyon sıklığını ve demir yükünü azaltmak amacıyla, neosit transfüzyonu, exchange transfüzyon, yapay kan gibi yenilikler üzerinde durulmaktadır (55-57).

Demir yüklenmesi uzamış transfüzyon tedavisinin istenmeyen ve ciddi bir komplikasyonudur. Çünkü her eritrosit süspansiyonunda 200-250 mg demir vardır. Vücudumuzda biriken demirin atılımını düzenleyen bir mekanizma yoktur (58). Transfüzyonlarla kazanılan demir önce kemik iliği ve RES makrofajları tarafından depolanır. Bu kapasite dolunca demir, makrofajlardan plazma transferrinine ve ardından parankim hücrelerine geçerek doku hasarını oluşturur (58). Demir şelasyon tedavisiyle, demir yükünün toksik etkisinin olmadığı güvenli doku demir seviyelerini sürdürmek ve aşırı demiri detoksifiye ederek organizmayı demir toksisitesinden korumak amaçlanır (58). Demir şelasyonu, düzenli transfüzyon 1. yılını doldurduğunda ve/veya 10-12 transfüzyon sonrasında ve/veya serum ferritini 1000 µg/L düzeylerine ulaştığında ve/veya karaciğer demir yoğunluğu 3.2 mg/g'a ulaştığında başlatılır (50,58).

Şelasyon tedavisi; serum ferritin düzeyi, R2 MRI ile KC demiri ve T2\* MRI ile kardiak demirin belirli aralıklarla ölçümü ile takib edilir. Fe<sup>+3</sup> afinitesi yüksek, metabolizması yavaş, şelasyon etkinliği yüksek, doku penetrasyonu iyi, negatif demir dengesi sağlayan ve toksik olmayan şelatör, iyi bir demir şelatörüdür (58).



DFO demire karşı önemli affinitesi olan kompleks bir hidroksilamin'dir (31). Hücre içine girer, demiri bağlar, serum ve safrada demir bağlı ferriksamin formunda bulunarak atılır. 30-40 mg/kg dozda, desferriksamin pompası ile 8-12 saatte subkutan infüzyon yoluyla genelde geceleri haftanın 5-7 günü, infüzyondan hemen önce 100 mg C vitamini ile beraber uygulanır (31, 36). Terapötik indeks <0.025 ve ferritin değerlerini 1000-1500 µg/L düzeyinde tutacak şekilde uygulanması gereklidir (58, 59). Parenteral uygulanması hasta uyumu açısından dezavantajdır. Retinopati, işitme kaybı, kemik/kartilaj displazisi ciddi yan etkilerindendir.

Deferipron (DFP), ülkemizde 2004 yılından itibaren "Standart tedavinin yetersiz kaldığı, tolere edilemediği veya kabul edilemez olduğu demir yükünün tedavisi" nde 75-100 mg/kg/gün 3 dozda kullanılabilen oral demir şelatörüdür (58). Günümüzde oral DFP'nun kalp dokusuna geçişinin daha iyi ve demir yükünün giderilmesinde daha etkili bir preparat olduğu kabul edilmektedir. Bu bulgu, ölümlerin çoğunun kardiyak komplikasyonlara bağlı olan talasemili hastalar için oldukça önemlidir. Solüsyon formu bulunmadığından 6 yaş altı çocuklarda deneyim sınırlıdır. En sık yan etkisi bulantı ve kusmadır (60). En ciddi yan etkisi ise, genellikle tedavinin ilk aylarında ve splenektomili olmayan olgularda daha sık tanımlanan ve ilacın bırakılması ile gerileyen agranülozitodur (58,61). Bu yan etki 7-10 gün aralarla hemogram izlemine gerekli kılar (37).

Kombine Tedavi: Klinik çalışmalar DFO ve DFP'un sinerjik oldukları ve beraber kullanıldıklarında daha etkin sonuç alınabileceğini göstermiştir (62). Bu etki "shuttle" etkisi ile açıklanmaktadır: DFP lipofilik özelliği nedeniyle dokulara kolayca penetre olmakta demiri bağlayarak kan dolaşımında bulunan DFO'ye aktarmaktadır. DFP tek başına kullanıldığında plazmada bağlı demir geçici olarak artmakta, DFO eklenmesi ile DFP ile bağlı olan demir DFO aktarılarak daha etkin bir şelasyon yapılabilmektedir (63). Bu yüzden DFO'ya uyumsuz, DFP'nin tek başına etkin olmadığı, demir yükünün hızla azaltılması gereken (kök hücre transplantasyonu öncesi) hastalara özellikle önerilmelidir.

Deferasirox(DFR), 2005 yılından itibaren, suda eriyebilen formuyla 2 yaş ve üzeri transfüzyonel hemosideroz olgularında, 20-30 mg/kg/gün başlangıç dozunda ve günde bir kez alınan oral demir şelatörüdür. Kullanımı sırasında serum kreatinin düzeylerinin ayda bir

kez izlemi, renal toksisite izlemi açısından uygundur. Deferasirox'un  $Fe^{+3}$  affinitesi yüksektir. 2 deferasirox molekülü 1 demir atomunun 6 koordinasyon alanını bağlayabilir. DFR, DFO'ne göre lipofilik, daha küçük molekül ağırlığına sahip olup, kalp hücrelerinden demiri daha iyi uzaklaştırdığı gösterilmiştir (58,64).

**Splenektomi:** Splenektomi ağır  $\beta$ -talasemili hastaların tedavisinde sıklıkla kullanılır (31,33,36). Masif splenomegalili, lökopeni ve trombositopenisi olan, minimum Hb:9-9.5 gr/dl'yi sağlamak için yıllık kan tüketimi 200-250 ml/kg'ı aşan 5 yaşın üzerindeki olgularda splenektomi önerilir (31,50,65). Talasemi intermedia olgularındaysa dalak boyutlarının  $>7$  cm olması ve/veya Hb seviyelerinde düşüş splenektomi endikasyonudur. Splenektomiden 4-6 hafta önce N.meningitidis, S.pneumoniae ve H.influenzae aşılı ve splenektomi sonrası en az 2 yıl ve  $>16$  yaşa kadar penisilin profilaksisi başlatılmalıdır (37).

**Hematopoetik kök hücre transplantasyonu:** Talasemi major olgularına hastaliksız yaşam sunan tek sağaltım şeklidir. Talasemi majorlu hastalarda ilk kemik iliği nakli 1981 yılında Thomas ve ark.ları tarafından gerçekleştirilmiştir (37). HLA tam uygun kardeş veya tam uygun aile içi vericisi olan her talasemili hastaya en erken dönemde hematopoetik kök hücre transplantasyonu uygulanmalıdır. Hepatomegali (kosta kenarında 2 cm 'den daha fazla), karaciğer fibrozisi ve aşırı demir yükü bulunmaması (pesaro kriterleri) transplant başarısının belirleyicisidir. Toksikiteden erken ölüm ve graft versus host hastalığı oranı gençlerde hepatik disfonksiyon yoksa düşüktür (%10'dan az). Yine transplant sonrası mikst kimerizm olasılığı ve demir yükü açısından olgular takip edilmelidir. Bugün için hastalığın tek kesin tedavi yöntemi allogenik kök hücre transplantasyonu olmasına rağmen, gelecekte genetik mühendislik ile yapılabilecek gen tedavileri sayesinde hastalık için kesin kür sağlanabilir (66).

#### **2.2.1.6. Prognoz**

Hastanın uygun transfüzyon ve düzenli şelasyon tedavisi alıp almaması ile yakından ilişkilidir. Uygun transfüzyon ve şelasyon tedavisi almayan hastalar çok erken yaşlarda anemi, kalp yetmezliği veya KC yetmezliğinden kaybedilir. 1960-1976 yılları arasında sadece

konvansiyonel transfüzyon ile hastalarda ortalama yaşam 17 yıl, hipertransfüzyon ve düzgün selasyon tedavisi ile 31 yıl olarak saptanmıştır (33). Talasemi majorlülü hastalarda en sık ölüm nedeni kalp yetmezliğidir. Kan transfüzyonları ile Hb düzeyi normal düzeylerde tutularak kalpteki büyüme azaltılabilir. Fakat tekrarlayan transfüzyonlara bağlı olarak hayatın ikinci on yılında kardiyak hemosiderozis sonucu kardiyak problemler ön safhaya geçmekte, aritmi ve dirençli kalp yetmezliğinden dolayı hastalar kaybedilebilmektedirler (33,41).

#### **2.2.1.7. Talasemi Kontrol Programı ( Taşıyıcıların Saptanması ve Prenatal tanı)**

Homozigot talasemi olgularının ağır morbidite ve erken mortalite özelliği, sağaltım maliyetlerinin yüksekliği, buna karşın taşıyıcıların ise basit hematolojik testlerle saptanabilir oluşu, bu genetik hastalığın toplum temelinde eradikasyonuna olanak sağlamaktadır. Bu 2 temel yaklaşımla gerçekleştirilir (37).

a) Evlenecek olan çiftlerin, talasemi taşıyıcılığı açısından taranmaları ve her ikisinin de taşıyıcı olduğu (risk altındaki) çiftlerin belirlenmesi. Bu tarama çalışması,  $MCV < 80$  fl ve  $OEHb < 27$  pg olan olguların Hb elektroforezi ile  $HbA_2$ , HbF ve anormal Hb'ler için değerlendirilmesi şeklinde gerçekleştirilir (37).

b) Risk altındaki çiftlere, genetik danışma verilmesi ve çocuk sahibi olmak istediklerinde prenatal tanı önerilmesi. Talasemilerde başarılı ilk prenatal tanı 1975 yılında Kan ve ark.ları tarafından fetal kanda globin sentez oranlarının gösterilmesi ile gerçekleştirilmiştir (67). Risk altındaki çiftlerde, hasta çocuk sahibi olma olasılığı, her gebelikte %25'tir. Risk altındaki çiftler bebek sahibi olmak istediklerinde önce moleküler genetik (DNA) analizi yapılır ve taşıdıkları mutasyon saptanır. Talasemilerde prenatal tanı amacıyla gebeliğin 18-20. haftalarında fiberoptik fetoskoplardan fetal umbilikal venden alınan kan örneklerinde  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -globin biyosentez oranları incelenmektedir (41). Gebeliğin 15-17. (33,68) haftalarında amniyositlerden, 9-11. (13-73) haftalarında koryonik villus biyopsisi ile alınan örneklerden fetal DNA çalışmaları yapılmaktadır (31,41). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanılarak yapılan fetal DNA çalışmasıyla 1-3. günde spesifik tanı konulmaktadır. PCR yöntemi ile maternal kanda fetal kökenli çekirdekli eritrositlerde de genetik markerler aranabilir (41). Yine DNA analizi yöntemi ile fetusun anne

ve babanın mutasyonlarını taşıyıp/taşımadığı yani hasta olup/olmadığı saptanır. Fetusun hasta olduğunun saptanması durumunda aileye tıbbi abortus önerilir. Fetus tamamen normal (%25) veya sadece taşıyıcı (%50) ise doğum beklenir.

### 2.3. $\beta$ -Talasemi İntermedia

Homozigot  $\beta$ -talasemilerin yaklaşık %10 kadarında klinik seyir  $\beta$ -TM'den daha hafif ve talasemi taşıyıcılarından daha ağırdır.  $\beta$ -talasemi intermedia (TI) adı verilen bu grupta periferik kan bulguları ve eritrosit indeksleri  $\beta$ -TM'de olduğu gibidir (44). Hb elektroforezinde HbA, HbF ve HbA<sub>2</sub> seviyeleri değişkenlik göstermektedir. Genellikle 2 yaşından sonra tanı alırlar, klinik olarak aneminin şiddeti daha ılımlıdır (Hb:7-7,5/dl ve üzerinde). Klinik, hematolojik ve moleküler çalışmalar ile TM/TI ayırıcı tanısı başlangıçta yapılmalı gereksiz transfüzyon ve komplikasyonlarından böylelikle korunulmalıdır.  $\beta$ -TI'lı olgular genelde düzenli transfüzyon gereksinimi olmaksızın normal büyüme ve gelişmelerini sürdürebilirler (29). Bazı  $\beta$ -TI'lı olgular ise kardiyomegali, osteoporoz, kırık, artrit, splenomegali ve hipersplenizm gibi komplikasyonlara maruz kalabilmektedir. Yaşamın ikinci 10 yılında safra taşları, geç adölesan ve daha sonraki dönemlerde transfüzyon almayan hastalarda bacak ülserleri gözlenebilmektedir. Aneminin derecesi hipersplenizm, enfeksiyon varlığı veya folat eksikliği gibi nedenlerle ağırlaşmakta ve çok değişkenlik göstermektedir. Parvovirus B19 veya diğer enfeksiyonlara bağlı aplastik krizler olabilmekte ve buna bağlı olarak da 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 TM'deki gibi Hb seviyesini normal düzeylerde idame ettirip endojen eritropoezi süprese edecek şekilde transfüzyon programları ile önlenmektedir (29-44).

#### 2.4. $\beta$ -Talasemi Minör ( $\beta$ -talasemi Taşıyıcılığı, Talasemi Trait)

İki  $\beta$ -globin geninin sadece birinin defektif olduğu bireyler  $\beta$ -talasemi taşıyıcısı olarak tanımlanan heterozigot  $\beta^0$  veya  $\beta^+$  talasemi olgularıdır. Talasemi taşıyıcıları tamamen sağlıklı bireyler iken hemogramlarında hipokromi, mikrositoz, anizositoz, poikilositoz, target hücreleri ve bazofilik noktalanma olabilir. Bu özellikleri nedeniyle toplumdaki en sık hipokrom mikrositer anemi nedeni olan demir eksikliği ile ayırıcı tanıya gereksinim göstermektedirler (Tablo-1 ) (37).

Tablo-1.  $\beta$ -talasemi taşıyıcılığı ve demir eksikliği anemisi ayırıcı tanısı (37).

Anemi	Eritrosit	Hb	MCV	OEHb	RDW	MI
Demir Eksikliği	N / ↓	↓ / ↓↓	↓	↓	>14	>13
$\beta$ -Talasemi taşıyıcı	↑	N / ↓	↓↓	↓↓	<14	<13

MI: MCV / Eritrosit sayısı

Aynı zamanda, demir eksikliği anemisinde serum ferritin veya transferrin saturasyonu,  $\beta$ -talasemi taşıyıcılığında ise Hb elektroforezi (özellikle HbA<sub>2</sub> düzeyi ölçümü) ayırıcı tanıda önemlidir (37).  $\beta$ -talasemi taşıyıcılığında, yaşamın 6. ayından sonra Hb elektroforezi ile ölçülen HbA'nın %90-95'lere indiği, HbA<sub>2</sub> düzeyinin (>% 3.5-4) olduğu görülür (36,37). Bu olguların yaklaşık %50'sinde HbF değerleri normal veya hafifçe yüksektir (HbF %1-5).  $\delta\beta$  talasemi ve herediter persistan fetal hemoglobin taşıyıcılarında ise, HbA<sub>2</sub> düzeyleri normal iken HbF düzeyleri sırasıyla %2-10 ve %10-40 arasında değişmektedir (36).

#### 2.5. $\alpha$ -Talasemiler

$\alpha$ -globin zinciri yapımı sorumluluğu 16 nolu kromozom üzerindeki gen kümesindedir.  $\alpha$ -talasemi,  $\alpha$ -globin genlerinin delesyonu sonucu ortaya çıkar ve normal olarak her kişide iki 16 kromozom ve 4 alfa geni olduğu düşünülür ise delesyon bu genlerin birinde, ikisinde, üçünde veya dördünde oluşabilir (44,45).  $\beta$ -talasemiden farklı olarak intraüterin dönemde de mevcut olup, çoğunluğu hafif şekildedir ve erişkin heterozigotlarda bulgu yoktur (32).

Hastalığın ağırlığı etkilenen alfa geni sayısı ile doğru orantılıdır.

**a) Sessiz (hafif)  $\alpha$ -talasemi taşıyıcılığı ( $\alpha$ -talasemi-2):** Dört alfa geninden birinde parsiyel veya tama yakın delesyon veya fonksiyonel bozukluk vardır ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ). Bu hastalar genellikle klinik veya hematolojik olarak tamamen normal olup semptomları olmaz. HbH'li hastaların aile incelemesi sırasında tespit edilirler. Yenidoğan devresinde kordon kanında % 2-5 oranında Hb Barts tespit edilir. Bu da ilk üç aydan sonra kaybolur. Yenidoğan devresi dışında bunların tesbiti ancak in-vitro Hb zincir sentezi ve DNA çalışmaları iledir (44). Bu genin anti-orak hücre geni olduğu düşünülmektedir. Çünkü gizli  $\alpha$ -talasemi taşıyıcısı olan homozigot orak hücre anemililerde hastalık hafif seyretmektedir (32).

**b) Ağır  $\alpha$ -talasemi taşıyıcılığı ( $\alpha$ -talasemi-1):** Aynı kromozom üzerinde iki veya farklı kromozom üzerinde birer alfa geninde parsiyel veya tama yakın delesyon veya fonksiyonel bozukluk vardır ( $-\alpha/-\alpha$ ;  $--/\alpha\alpha$ ).  $\beta$ -talasemi taşıyıcılarında görülen hematolojik bulgulara benzer bulgular gözlenir. Bu hastalarda anemi yoktur ama periferik kan yaymasında eritrositlerde hipokromi, mikrositoz, anizositoz, poikilositoz, polikromazi ve bazofilik noktalanma vardır. HbA<sub>2</sub> ve HbF düzeyleri normaldir. MCV düşüktür. Yenidoğan devresinde %5-10 Hb Barts vardır, fakat altı aydan sonra görülmez. Bu durumun hastalar açısından en önemli sıkıntısı teşhis amacıyla uygulanan birçok test ve zaman kaybıdır. İn vitro Hb zincir sentezi ve DNA çalışmaları ile kesin tanı konur. İki  $\alpha$ - talasemi-1 taşıyıcısı ( $--/\alpha\alpha$ ) bireyin evlenmesi %25 oranında letal homozigot hastalık oluşturabilir (32,44).

**c) HbH hastalığı: ( $--/-\alpha$ ).** Dört alfa geninden üçünde parsiyel veya tam fonksiyonel bozukluk vardır. HbH hastalığında klinik bulgular TI'ya benzer. Hastaların hafif splenomegalileri, sarılıkları vardır. Periferik kan yaymalarında eritrositlerde hipokromi, mikrositoz, anizositoz, poikilositoz, polikromazi ve target hücreleri vardır. Supravital boyalarla eritrosit içinde  $\beta$ -globin zincirlerinin oluşturduğu inklüzyonlar görülür. Yenidoğan devresinde Hb elektroforezinde %20-40 oranında Hb Barts gözlenir. Daha sonra bunun yerini %5-30 oranında HbH alır. İn vitro Hb zincir sentezinde alfa zincir sentezinde azalma görülmesiyle ve DNA çalışmaları ile kesin tanı konur (44). Tedavide aralıklı transfüzyon ve folik asit desteği yapılır.

**d) Hidrops fetalis:** (α-talaseminin en ağır formudur. Dört alfa geninin dördünde de tam veya kısmi delesyon veya fonksiyon kaybı ile Hb Barts'a bağlı hidrops fetalis oluşturur. Hb Barts'ın oksijene olan affinitesinin çok yüksek olması nedeniyle dokulara oksijen geçişi olmaz, fetuslar genellikle hipoksiye bağlı ölü doğarlar (44).

## 2.6. Eser Elementler

Mineraller, yaşam için nispeten küçük miktarlarda gerekli mikrobeyinlerdir. Minerallerin kaynağı toprakta bulunan ve besinlerin bir bileşeni haline gelmiş olan mineral tuzları ya da deniz sularında çözünerek deniz canlılarının yapısına katılan doğal elementlerdir. Makroelementler, günde 100 mg'dan fazla miktarda gerekli olan ve dokularda g/kg düzeylerinde bulunan elementlerdir. Karbon (C), hidrojen (H), oksijen (O) ve azot (N); karbonhidratlar, lipitler, proteinler ve nükleik asitlerin yapı taşı olan 17 makroelementlerdir. Sodyum (Na), potasyum (K), klor (Cl), kalsiyum (Ca), fosfor (P), magnezyum (Mg) ve kükürt (S) insan vücudunda bulunan makrominerallerdir. Eser elementler, günde 100 mg'dan daha az miktarda gerekli olan ve dokularda mg/kg doku düzeylerinde bulunan elementlerdir. Demir (Fe), bakır (Cu), çinko (Zn), kobalt (Co), mangan (Mn), krom (Cr), molibden (Mo), selenyum (Se), ve iyot (I) eser elementlerdir.

Ultraeser elementler, günde 100 µg kadarı gerekli olan ve dokularda µg/kg doku düzeylerinde bulunan elementlerdir. Arsenik (As), bor (B), brom (Br), kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), lityum (Li), nikel (Ni), silisyum (Si), kalay (Sn), vanadyum (V) ve stronsiyum (Sr) ultraeser elementlerdir.

Bir element, yeterli miktarda alınmadığında organizmada bir fonksiyon bozukluğu görülürse ve sadece o elementin fizyolojik miktarları bu bozukluğu önler veya ortadan kaldırırsa esansiyel element olarak adlandırılır(156).

### 2.6.1. Çinko

Serum çinko miktarı normalde 100 ml'de 100 mikrogramdır. Ağır metallerin eliminasyonu ve depolanması ile sürekli olarak serum çinko değeri düşer ve 100 ml.de 20

mikrogramın altına kadar iner ve kronik zehirlenme meydana gelir. Hafif rahatsızlık belirtileri erken ortaya çıkar. Çinko eksikliği belirtileri, paradontopati ve sallanan dişlerdir. Çinko eksikliği daima kadmiyum yüklenmesi ile kombine olur. Genellikle alerji ve astım görülür. Çinko verilmesi durumunda iyileşme görülür. Astımlı çocuklarda ilk tedavi laser ile yapılır. Birkaç hafta sonra belirgin bir iyileşme görülür (% 90). Bu iyileşme uzun süre devam eder. Şayet nüks ederse birkaç seans tekrar uygulanır (153) .

Çinkonun biyolojik olarak birçok önemi vardır. Bunlar arasında enzimlerin etkisi, membran ve karbonhidrat metabolizması, endokrin sistemler gibi etkileri ortaya konulmuştur. Çinko memeli sistemlerde esansiyel bir elementtir. Çinko kadmiyumun metabolik bir antagonistidir. Vücutta herhangi bir kadmiyum fazlalığında çinko devreye girerek ağır metal birikimini engeller. Ağır metallerin muhakkak ki zararsız hale getirilmesinde çinkoya ihtiyaç vardır. Araştırmalara göre çinko eksikliğinde civanın zararsız hale getirilmesi aksar. Metallothionin enziminin aktive olması için çinko iyonuna ihtiyaç vardır (153). RNA ve DNA polimerazlar, SOD, karbonik anhidraz, alkalin fosfataz, karboksipeptidaz, alkol dehidrojenaz, timidin kinaz gibi 300'den fazla metaloenzimin yapısal bileşenidir. Genellikle bu enzimlerin katalitik bölgesinde sıkıca bağlı halde bulunur. Çinko yapısında bulunduğu bu enzimler aracılığıyla çok çeşitli biyokimyasal reaksiyonlara katılır. Bağ dokusu biosentezi ve bütünlüğü için temel role sahip olduğundan yara iyileşmesi için mutlak gereklidir. İmmün sistemin bütünlüğü ve fonksiyonları için (özellikle antiviral etki için) gereklidir. Çinko timidin kinaz, RNA ve DNA polimerazın yapısal bir bileşenidir. Ayrıca, DNA ve RNA'ya çinko bağlanması replikasyon ve protein senteziyle ilişkili bazı makromoleküllerin fizikokimyasal özelliklerinin değiştirilmesinde de etkilidir. DNA'ya bağlanarak gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan çinko parmak proteinlerin konformasyonlarının stabilizasyonu ve DNA'ya bağlanabilmesi için gereklidir. DNA, RNA metabolizması ve protein sentezindeki bu önemi nedeniyle çinko eksikliğinde protein sentezinde azalma, büyüme ve gelişmede gerileme görülür. Çinko, pankreasın  $\beta$ -hücrelerinde insülin sentezlenmesi, depolanması ve salınmasında da rol alır (157).

Çinko başlıca bitki ve hayvan kaynaklı besinlerde yaygındır, özellikle sebze ve meyvelerde çok miktarda çinko mevcuttur. Yapılan bir araştırmada Zn ve Cu arası bir bağlantı olduğu saptanmıştır. Yaşlı diabetiklerin taze vakalarında çinko verilmesi ile yetersiz



insülinin kafi geldiği görülür. Birkaç vakada akupunktur kombinasyonu ile kulaktaki pankreas noktasının iğnelenmesi ile iyileşme görülmüştür. Çinko hemen hemen bütün dokularda bulunur. Çinko başlıca vücuttan böbrek, deri ve bağırsak yoluyla atılır. Normalin altındaki plazma çinko düzeyleri öldürücü tümörler, ateroskleroz karaciğer ve karaciğer hastalıklarında postalkolik siroz, tüberküloz, cüzzam, tehlikeli anemi, kronik ve akut infeksiyonları olan hastalarda belirlenmiştir (104).

Çinko sperm üretiminde çok önemlidir. Çinko azlığı sperm sayısı azlığı ve testosteron seviyesinin azlığına sebep olmaktadır. Geç iyileşen kesik yaralar, bedenin çinkoya ihtiyacını gösterebilir. Bu mineral yaraların iyileşmesini hızlandırmada önemlidir. Hücreleri yenilemede ve yenilerinin oluşmasını sağlamada çinko önemlidir. Maden suları, biftek, istiridye, hindi, tahıl ve baklagiller, kahvaltı gevrekleri, lifli yiyecekler de bulunur (153) .

### **2.6.2. Demir**

Demir, kırmızı kan hücrelerinde bir protein olan hemoglobinde bulunur. Bu protein akciğerlerden çeşitli vücut dokularına oksijen taşır. Demir ayrıca, güç gerektiren herhangi bir iş esnasında kaslara ekstra yakıt sağlayan bir protein olan miyoglobin'in de bir bileşenidir. Besin olarak alınacak demir iki formda bulunur:

1. Kırmızı et, tavuk, deniz ürünü ve diğer hayvansal ürünlerde bulunan "heme" demir,
2. Koyu yeşil sebzeler, tüm tahıllar, çerezler, kurutulmuş meyve ve diğer bitkisel besinlerde bulunan "heme olmayan" demir.

Heme demirini vücut daha kolay absorplar. Ancak heme demir içeren yiyeceklerle beraber heme olmayan demir içeren yiyeceklerin yenmesi demir absorpsiyonunu arttırır. Ayrıca bu yiyeceklerle beraber C vitamini alımı da demir absorpsiyonunu arttırır. Kahve, çay, soya bazlı yiyecekler, asit önleyiciler ve tetrasiklinler demir emilimini engeller. Ayrıca aşırı miktarlarda kalsiyum, çinko ve manganez de demir emilimini engeller (153) .

Demir, bağışıklık fonksiyonunu güçlendirdiğinden, demir eksikliği aynı zamanda enfeksiyonlara karşı direncin düşmesine neden olur. Hamile kadınlar, iki yaş altı çocuklar, vejetaryenler ve hemoroidli ya da kanamalı mide ülserli ve kan vericiler gibi kanamalı

durumunda olanlar özel olarak dışarıdan yüksek oranda demir alması gerekir (153) .

Aşırı demir problemlere neden olabilir. Fosforun absorpsiyonunu engeller, bağışıklık fonksiyonunu bozar ve kanser, siroz ya da kalp krizi riskini arttırabilir. Demir zehirlenmesi belirtileri; ishal, kusma, baş ağrısı, baş dönmesi, yorgunluk, mide krampları ve zayıf nabızdır.

Maden suları, badem, avokado, fasulye, kırmızı pancar, pancar, mısır gevreği, hurma, yeşil yapraklı sebzeler, karaciğer, Lima fasulyesi, böbrek, et, yumurta, balık, fındık, midye, şeftali, armut, piliç, kabak, kuru üzüm, pirinç, kahve, tahıl, deniz sebzeleri, istiridye bol miktarda demir bulunur (153) .

### **2.6.3. Bakır**

Bakır, kırmızı kan hücrelerinin üretimi için gerekli olan ve hematopoezde demirle birlikte rol oynayan esansiyel bir eser elementtir. Demirin mobilizasyonunda, kemik ve bağ dokusu metabolizmasında, büyüme ve çoğalmada, miyelinizasyonda, deri, saç ve uveanın pigmentasyonunda önemli rolü vardır. Serbest radikallerden gelebilecek zararlardan dokuları koruyabilir, vücudun bağışıklık fonksiyonunu destekler ve kanseri önlemeye katkıda bulunur (158,159).

Kan Cu'sunun yaklaşık %90-95'i plazmada bir plazma proteini olan seruloplazmine bağlı olarak bulunur. Eritrositlerde Cu süperoksid dismutaz (SOD) ile birlikte olabilir veya amioasit karışımıyla kompleks oluşturabilir. Bütün vücut sıvıları Cu bileşimlerine sahiptir. En yüksek oranda da safrada bulunur, pankreatik sıvıdaysa daha azdır (160).

Bakır enzimleri vücutta dağılmış halde bulunur. Bakırın elektron ve O<sub>2</sub> transportu, oksidasyon- redüksiyon reaksiyonlarında katalizör ve O<sub>2</sub> radikallerinin hasarına karşı hücreyi koruma gibi görevleri vardır. Sitokrom C oksidaz, dopamin B hidroksilaz, lizil oksidaz ve SOD gibi enzimlerin yapısına girer (160).

Çoğu yetişkin insan normal günlük besinlerden yeteri kadar bakır alır. Deniz ürünleri, çeşitli organ etleri en zengin bakır kaynaklarıdır. Fındık, çekirdek, yeşil sebzeler, karabiber ve

kakao önemli miktarda bakır içerir. Aşırı kalsiyum, kadmiyum ve özellikle çinko bakır absorpsiyonuna engel olur, bunun sebebi metallothionin'nin hem Zn ile hem de Cu ile kompleks yaparak bağırsak mukozasını uarması sonucunda hücrelerin bağırsak lümenine dökülerek Cu atılımına neden olmasıdır. Fitat ve lifler de Cu emilimini engellerler. Fakat bu etki nispeten azdır ve ciddi bir duruma sebep olmaz. Eksiklikleri aynı zamanda memeden kesilmiş ve bazı prematüre bebeklerde oluşabilir. Bakır başlıca midenin ve bağırsağın üst kısmından emilir. Daha çok 37 aminoasitlerden histidin ve peptitlerle bileşik oluşturur ve bağırsağın alt kısmından da emilebilir (207).

Bakır eksikliği, kırılğan ve renksizleşen saçlar, vücut iskeletinde kusurlar, anemi, yüksek kan basıncı gibi belirtilerle ortaya çıkar. Günlük 10 mg'dan daha fazla bakır alımı, bulantı, kusma, kas ağrısı ve mide ağrısına neden olabilir. Hamile ya da doğum kontrol hapları alan kadınlar, bakırın kandaki aşırı miktarına oldukça duyarlıdırlar (153).

## 2.7. Atomik Spektrometri

Numune hazırlama işlemlerinin ardından numunede hangi elementten ne kadar olduğunu tayin etmek için günümüzde Atomik spektrometri, x-ışınları floresans spektrometri, kütle spektrometri, elektrokimyasal yöntemler ve kromatografi gibi çok değişik enstrümental metotlar geliştirilmiştir. Özellikle atomik spektrometri bu yöntemler arasında önemli bir yer tutmaktadır. Atomik spektrometri 70 kadar elementin kalitatif ve kantitatif tayininde kullanılır. Atomik metotların tipik duyarlılığı milyonda bir ile milyarda bir arasında değişir. Bu metotların diğer üstün yönleri arasında hız, kullanılışlık, az bulunan yüksek seçicilik ve fazla yüksek olmayan cihaz fiyatları da sayılabilir.

Atomik türlerin spektrometrik tayini, ancak tek atomların (veya bazen  $Fe^+$ ,  $Mg^+$ ,  $Al^+$  gibi element iyonlarının) birbirlerinden iyice ayrılmış bulunduğu gaz ortamında yapılabilir. Dolayısıyla tüm atomik spektrometri işlemleri için ilk aşama atomlaştırmadır. Atomlaşma, bir nümunenin gaz halindeki atomlara dönüşmesi işlemidir. Bu süreç sırasında numune, atomik bir gaz oluşturacak şekilde buharlaştırılır ve parçalanır. Metodun duyarlılık, kesinlik ve doğruluk gibi nitelikleri, büyük ölçüde atomlaştırma basamağının verimliliği ve

tekrarlanabilirliğine bağlıdır. Dolayısıyla atomlaştırma atomik spektrometride en önemli aşamadır (106).

Atomik spektrometri çalışmalarında numunelerin atomlaşması için kullanılan bazı metotlar Tablo-2’de gösterilmektedir.

Tablo-2. Atomik spektrometri’nin sınıflandırılması

Atomlaştırma metodu	Atomlaştırma sıcaklığı, °C	Metodun temeli	Metodun temel adı ve kısaltması
Alev	1700–3150	Absorpsiyon	Atomik absorpsiyon spektrometri, AAS
		Emisyon	Atomik emisyon spektrometri, AES
		Floresans	Atomik floresans spektrometri, AFS
Elektrotermal	1200–3000	Absorpsiyon	Elektrotermal atomik abs. spektrometri
		Floresans	Elektrotermal atomik flor. spektrometri
Endüktif eşleşmiş argon plazma	6000–8000	Emisyon	Endüktif eşleşmiş plazma spektrometri, ICP
		Floresans	Endüktif eşleşmiş plazma floresans spektrometri
Doğru–akım argon plazma	6000–10000	Emisyon	DC plazma spektrometri, DCP
Elektrik arkı	4000–5000	Emisyon	Ark kaynaklı emisyon spektrometri
Elektrik kıvılcımı	40000	Emisyon	Kıvılcım kaynaklı emisyon spektrometri

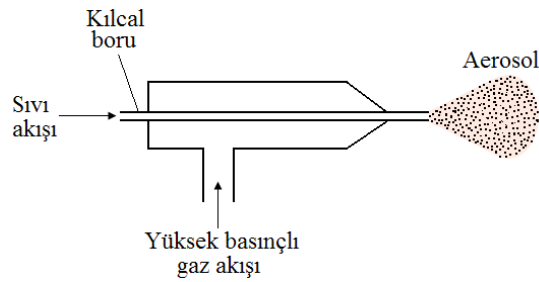
### 2.7.1. Atomik Absorpsiyon ve Atomik Emisyon Spektrometri

Atomik absorpsiyon ve atomik emisyon için alevli ve alevsiz olmak üzere iki tip atomlaştırma tekniği mevcuttur. Alev atomlaştırmasında genellikle sulu ortamdaki analit

çözeltisi, sisleştirme işlemiyle bir buluta dönüştürüldükten sonra gaz halindeki yükseltgen veya yakıt akışıyla alev taşınır. Böylece, oluşan sıcak gaz ortamında emisyon ve absorpsiyon spektrumları elde edilir.

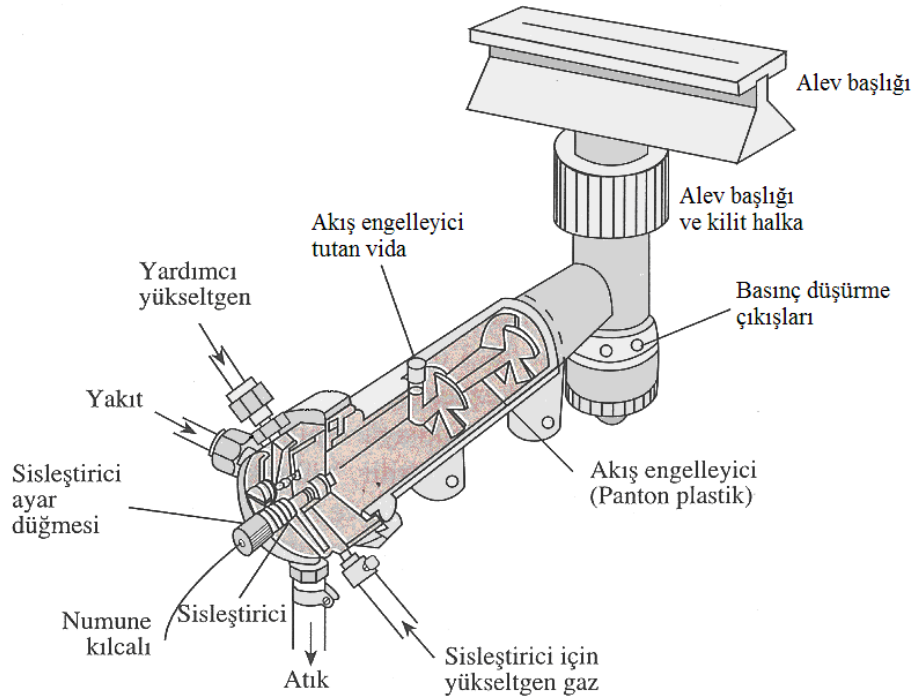
### 2.7.1.1. Alevli Atomlaştırıcılar

Alevli atomlaştırıcı, numuneyi bir bulut veya aerosol şekline dönüştürdükten sonra alev başlığına yollayan bir sisleştiriciden ibarettir. Bir sisleştirici türü Şekil-8’de gösterilen eş merkezli borulardan oluşan bir sistemdir. Sıvı numune, merkezdeki kılcal borudan bu borunun ucunun çevresinde yüksek basınçla verilen gazın etkisiyle emilir. Sıvının bu şekilde aktarılmasına püskürtme adı verilir. Yüksek hızdaki gaz, sıvıyı çeşitli büyüklüklerde damlacıklara dönüştürerek alev taşır. Atomlaştırıcıların çoğunda yüksek basınçlı gaz yükseltgen olup, aerosolü içeren bu gaz daha sonra yakıt gazı ile karıştırılır.



Şekil-8. Eş merkezli borulu bir sisleştirici

Şekil-9’da laminer akışlı bir alev başlığı ve tek merkezli boru türü sisleştirici içeren tipik bir ticari sistemi göstermektedir. Aerosol, yakıt gazı ile karıştıktan sonra ancak en küçük boyuttaki damlacıkların aşabildiği bir dizi engelden geçirilir. Bu engellemeler sonucu numunenin büyük bir bölümü karıştırma odacığının altında toplanarak atık kabına akıtılır. Aerosol, yükseltgen ve yakıt gazları daha sonra yarıklı bir alev başlığına ve buradaki yaklaşık 5 veya 10 cm uzunluğundaki alev yöneltilir.

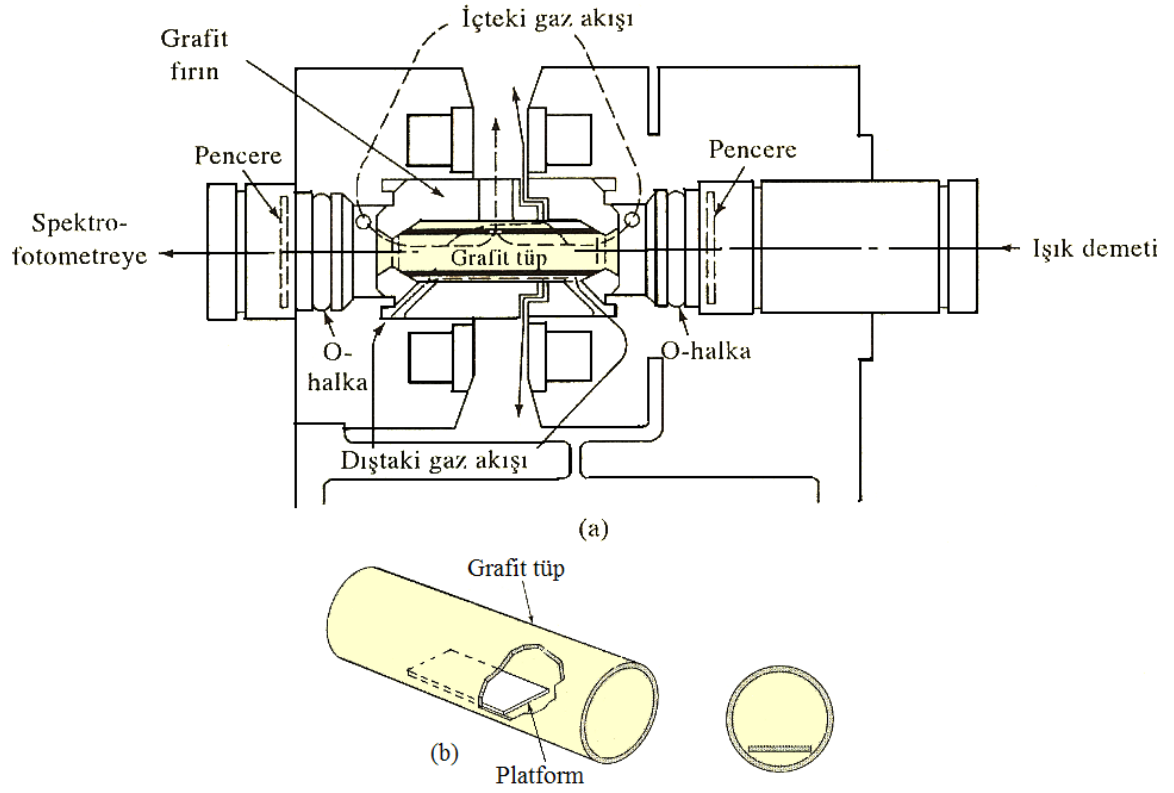


Şekil-9. Laminer akışlı bir alev başlığı

### 2.7.1.2. Elektrotermal Atomlaştırıcılar

Aleve göre çok daha fazla duyarlılık sağlarlar. Çünkü numunenin tümü kısa bir sürede atomlaştırılır ve ışın yolunda atomların ortalama kalış süresi bir saniye veya daha uzundur. Elektrotermal atomlaştırıcılarda, elektrikle ısıtılmış bir grafit tüpü veya kap içerisinde önce düşük sıcaklıkta buharlaştırılan birkaç mikrolitre numune, sonra daha yüksek bir sıcaklıkta kül edilir. Kül etme aşamasından sonra elektrik akımının hızla birkaç yüz ampere yükseltilmesi sonucu, 2000 °C–3000 °C arasındaki bir değere ulaşan sıcaklıkla numunenin atomlaşması birkaç milisaniye ile saniye arasındaki bir süreçte gerçekleşir. Atomlaşmış analitin absorpsiyon sinyali ısıtılmış yüzeyin hemen yukarısındaki bir bölgede kaydedilir.

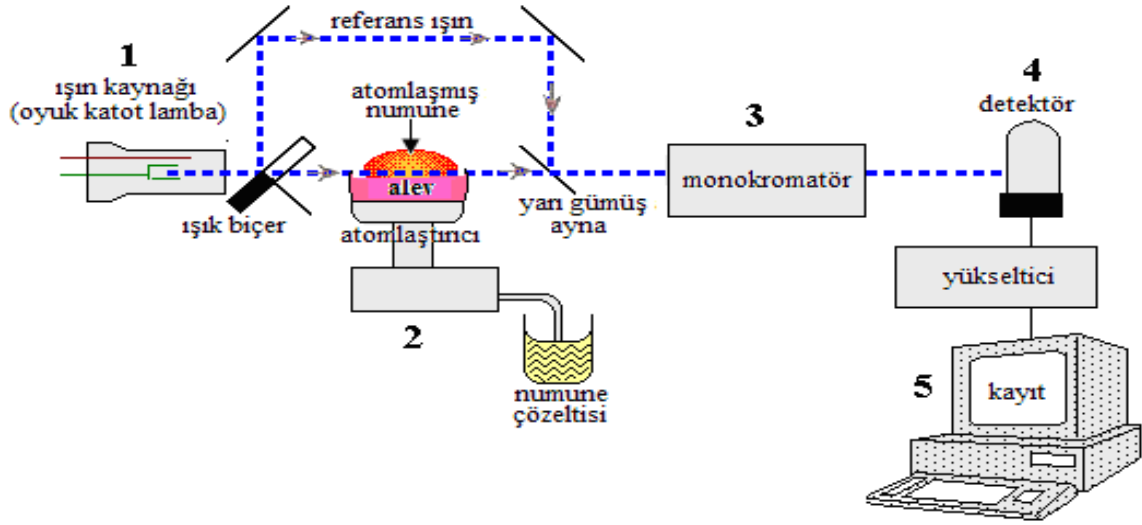
Şekil-10’da ticari bir elektrotermal atomlaştırıcının kesit görünümü verilmektedir. Atomlaşmanın yer aldığı silindirik şeklindeki grafit tüpün iki ucu açık olup, merkezinde numunenin bir mikropipet ile konulması için bir delik bulunmaktadır. Tüpün uzunluğu 5 cm kadar olup, iç çapı ise 1 cm’den azdır (Skoog vd, 1996, Fuller, 1978 ve Varma, 1989).



Şekil-10. (a) Bir grafit fırın kesiti, (b) Grafit tüp

### 2.7.2. Atomik Absorpsiyon Spektrometre'nin Kısımları

Temel olarak bir alevli atomik absorpsiyon spektrometresi 5 parçadan oluşur; Işın kaynağı (oyuk katot lamba), atomlaştırıcı, monokromatör, dedektör ve kaydedicidir. Çok sayıda üretici tarafından hem tek, hem de çift ışıklı cihazlar sunulmaktadır (Şekil-11).



Şekil-11. Alevli atomik absorpsiyon spektrometre'nin başlıca kısımları

### 2.7.2.1. Işık Kaynağı

Atomik absorpsiyon cihazlarında ışık kaynağı olarak iki tür lamba kullanılır: Oyuk katot lambalar ve elektrotsuz boşalım lambalarıdır.

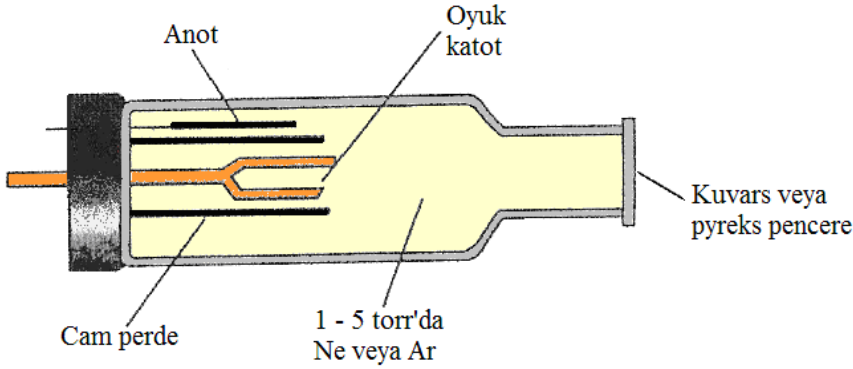
**Oyuk Katot Lambaları:** Atomik absorpsiyon spektrometride en kullanışlı ışık kaynağı olan oyuk katot lamba, şematik olarak Şekil-12'de gösterilmektedir. Bu kaynak, 1–5 torr arasında basınca sahip argon gibi inert bir gaz ortamında kapatılmış bir cam boruda tungsten bir anot ve silindirik bir katottan ibarettir. Katot, analitin metalinden yapılmıştır veya o metalin kaplamasına destek olabilecek yapıdadır.

Elektrotlar arasında uygulanan 300 V kadar bir potansiyel, argonun iyonlaşmasını ve argon iyonları ile elektronların elektrotlara yönelişinden doğan 5–10 mA'lık bir akımı oluşturur. Potansiyel yeterince büyükse, argon katyonları katoda yeterli bir enerji ile çarparak metal atomlarının bazılarını yerinden sökerek bir atom bulutu oluşturabilir. Bu işleme sıçratma adı verilir. Sıçratılan metal atomlarından bazıları uyarılmış halde olup, temel hale dönerken karakteristik dalga boyundaki emisyonuna neden olurlar. Hatırlanması gerekli önemli bir nokta, emisyonun oluşturulduğu lambadaki atomların, alevdeki analit atomlarına göre önemli ölçüde daha düşük sıcaklıkta olmasıdır. Böylece lambanın emisyon çizgileri, alevdeki absorpsiyon piklerine göre daha az genişlerler.



Lambada sıçratılan metal atomları sonunda katot yüzeyine veya lambanın iç çeperlerine dönerek buralarda toplanırlar.

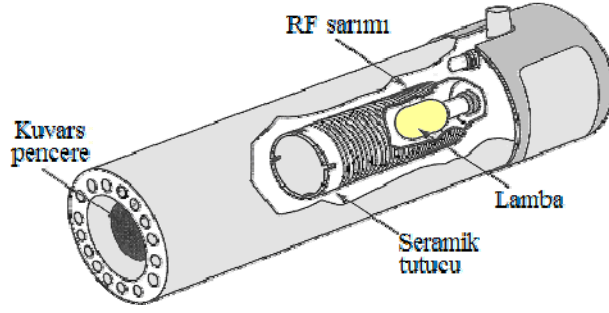
Ticari olarak yaklaşık 40 element için oyuk katot lambası bulunabilir. Bazılarının katodu, birden fazla element içerebilir. Böyle kaynaklar birkaç analitin tayini için gerekli spektrum çizgilerini aynı anda verebilir. Oyuk katot lambalarının geliştirilmesi, genellikle atomik absorpsiyon spektrometrimin doğuşunda rol oynamış en önemli olay olarak kabul edilir.



Şekil-12. Oyuk katot lambanın şematik görünümü

**Elektrotsuz Boşalım Lambaları:** Elektrotsuz boşalım lambası, atomik çizgi spektrumu için yararlı bir kaynak olup, aynı element için yapılmış oyuk katot lambalarına göre 10 ila 100 kat fazla ışın şiddeti sağlayabilir. Tipik bir lamba, birkaç torr basınçlı argon gibi inert bir gaz ortamında, analiti metal veya bir tuzu şeklinde içeren kapalı bir kuvars borudur. Bu kaynak elektrot içermez, bunun yerine şiddetli bir radyo frekansı veya mikrodalga ışınım alanı ile gerekli enerji sağlanır. Bu alanda argon iyonlaşır ve iyonlar, alanın yüksek frekanslı bileşeni ile hızlandırılırlar. Böylece spektrumu istenilen metalin atomlarını uyaracak enerjiye ulaşırlar.

Ticari olarak elektrotsuz boşalım lambaları birkaç element için bulunabilir. Performansları oyuk katot lambalar kadar güvenilir değildir. Şekil-13 da 27 MHz'lik radyo frekans kaynağı ile çalışan bir ticari elektrotsuz boşalım lambasının şeması verilmiştir.



Şekil-13. Elektrotsuz boşalım lambasının kesiti

### 2.7.2.2. Atomlaştırıcı

AAS'de iki tip atomlaştırma tekniği vardır; alevli ve alevsiz. Alevli atomlaştırma sistemi şekil-10'da gösterildiği gibidir. Alevsiz atomlaştırma başlıca, elektrotermal atomlaştırma, hidrür oluşturma ve soğuk buhar tekniklerini içerir.

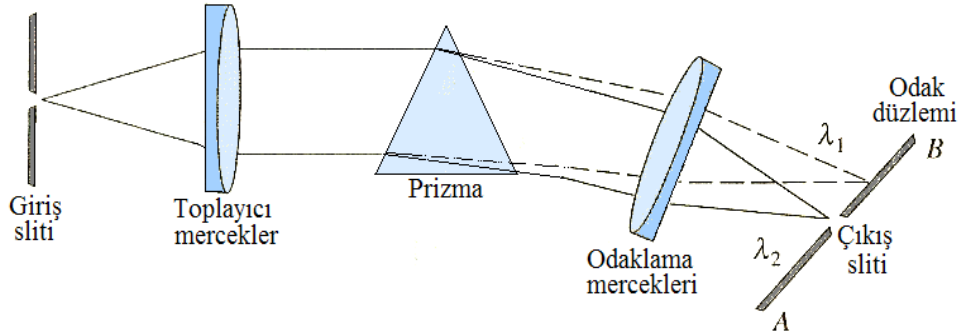
### 2.7.2.3. Monokromatör (Dalga Boyu Seçici)

Spektroskopik analizlerin çoğunda bant adı verilen ve dar, sürekli dalga boyu gösteren ışınlara ihtiyaç duyulmaktadır. Dar bant genişlikleri absorpsiyon ölçümlerinin duyarlılığını artırır, absorpsiyon ve emisyon yöntemlerine seçicilik sağlar ve optik sinyal ile derişim arasında doğrusal ilişki elde etmede aranılan özellikler arasındadır ( $A=\epsilon bc$ ). Dalga boyu seçicisinden çıkan ışınların tek dalga boylu veya frekanslı olması ideal olarak beklenebilir. Ancak bu isteği hiçbir dalga boyu seçicisi yerine getiremeyip, aksine bir bant oluşturmaktadır.

Monokromatörler, spektral taramaları yapabilmek için tasarlanmış sistemlerdir. Ultraviyole, görünür ve infrared ışınları için kullanılan monokromatörler mekanik açıdan aynı tasarlanmış olup, yapılarında slitler, mercekler, pencereler ve optik ağ veya prizmalar içerirler. Ancak bu bileşenlerin yapımında kullanılan malzemeler dalga boyu aralıkları dikkate alınarak seçilir.

Şekil-14'te dalga boyu ayırıcı olarak prizma sistemini göstermektedir. Dalga boyu ayırımının anlaşılması açısından  $\lambda_1$  ve  $\lambda_2$  gibi iki dalga boyu alınmış ve  $\lambda_1 > \lambda_2$  varsayılarak gösterilmiştir. Bu ışınlar monokromatöre dar bir slitten geçerek girer ki, paralel ışın demeti

olarak yönlendirilen bu ışınlar ayırma elemanının üzerine belirli bir açıyla düşürülürler. Prizmalı sistemlerde yüzeydeki kırılma, ışının şekilde görüldüğü gibi açısal dispersiyonunu oluşturacaktır. Ayrılan ışınlar AB odak düzlemi üzerinde giriş slitinin ( $\lambda_1$  ve  $\lambda_2$  için birer) dik görüntülerini oluşturacaktır. Ayırıcı eleman döndürülerek çıkış slitine düşen bantlar birbiri arkasına odaklanabilir (107).



Şekil-14. Bunsen prizmalı bir monokromatör ( $\lambda_1 > \lambda_2$ )

#### 2.7.2.4. Dedektör

Dedektörler, ışın enerjisini elektrik sinyallerine çeviren cihazlardır. İdeal bir dedektör yüksek duyarlılık göstermeli, sinyal/gürültü oranı yüksek olmalı ve geniş bir dalga boyu aralığında sabit, orantılı cevap verme özellikleri gösterebilmelidir.

#### 2.7.2.5. Kaydedici

Detektörden çıkan sinyallerin belli bir düzende anlaşılabilir şekilde gösterildiği düzeneklerdir. Bu bir yazıcı, dijital bir ortam veya bir bilgisayar olabilir.

#### 2.7.3. Analiz ve Yöntem

Özetlenen numune alma, saklama, çözünürleştirme (N ve P tayinleri hariç) işlemleri ile çeşitli metal analizleri için hazırlanan çözeltilerin, Atomik spektrometri ile konsantrasyonlarının tayini ve elde edilen verilerin doğru bir şekilde işlenmesi, bir analizin en önemli basamaklarından biridir. Bu nedenle atomik spektrometri ölçümlerinde bazı temel

kavramların iyi bilinmesi gerekir.

## Kalibrasyon Yöntemleri

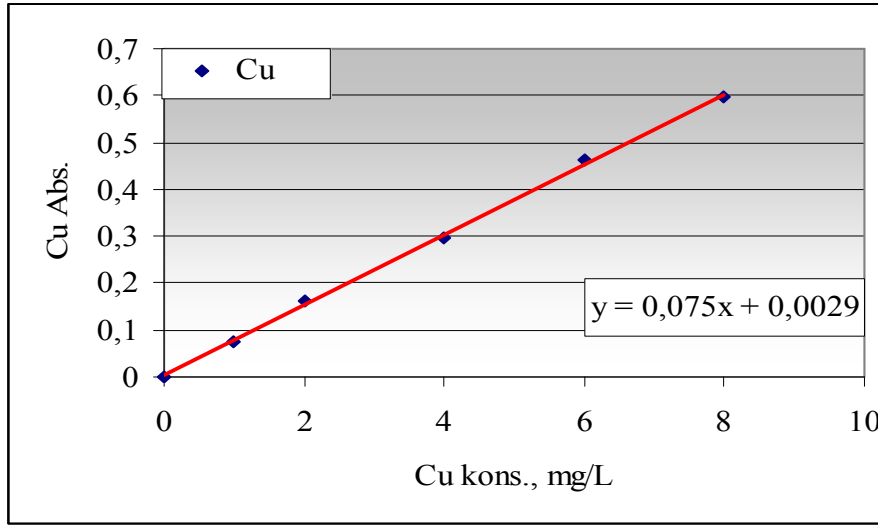
### Standart Kalibrasyon Eğrisi

Birçok analitik teknik için miktarları belli standartlara karşı, bilinmeyen bir numunenin cevabının değerlendirilmesi gerekir (Şekil-15). Tüm spektroskopik yöntemler birer mukayese yöntemleridir. Yani bilinen konsantrasyonda bir çözelti ile bilinmeyenin tayini gerçekleştirilir. Örneğin,  $\text{Cu}^{2+}$ 'nin bilinen konsantrasyonlarda 6 farklı çözeltisi hazırlanmış olsun. Daha sonra bu 6 çözeltinin, tayini yapılacak elementin ( $\text{Cu}^{2+}$ ) rezonans hattında (primer dalga boyunda) uygun bir cihazla absorbanları ölçülür ve kaydedilir. Sonuçların aşağıdaki gibi olduğu farzedilsin (Tablo-3):

Tablo-3. Farklı konsantrasyonlarda bir seri standart Cu çözeltileri için absorban değerleri

Cu konsantras. $\text{mg L}^{-1}$	Absorbans	Düzeltilmiş Absorbans
0	0.002	0.000
1	0.078	0.076
2	0.163	0.161
4	0.297	0.295
6	0.464	0.462
8	0.600	0.598

Düzeltilmiş Absorbans = Standardın absorbanı – tanık çözeltinin absorbanı



Şekil-15. Cu için kalibrasyon grafiği

Yukarıdaki doğrusal kalibrasyon grafiği çizildikten sonra bilinmeyen numune çözeltisinin absorbansı cihazdan okunur ve grafikten ölçülen bu absorbansa karşılık gelen konsantrasyon bulunur.

Bilinmeyen numunenin absorbansının 0.418 ve tanık numunenin absorbansının 0.003 olduğu düşünülürse;

Düzeltilmiş Absorbans =  $0.418 - 0.003 = 0.415$ 'dir. Bu absorbans grafikte işaretlenir ve buna karşılık gelen konsantrasyon ( $5.49 \text{ mg L}^{-1}$ ) bulunur. Ya da doğrunun denklemi ( $y = 0.0750 x + 0.0029$ ) hesaplanır. y; absorbansı ve x; konsantrasyonu temsil ettiğine göre;  $0.415 = 0.0750 x + 0.0029$ 'ten x (bilinmeyen konsantrasyonu) =  $5.49 \text{ mg L}^{-1}$  bulunur.

## 2.8. Oksidatif Stres ve Total Antioksidan Kapasite

Atomlarda elektronlar orbital adı verilen uzaysal bölgede belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt momentli çiftler halinde bulunurlar (13). Serbest radikaller; radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkması veya ilavesi sonucu elektron çiftinin dengesinin bozulmasıyla oluşan, dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron taşıyan, organik ve inorganik moleküller ile reaksiyona girebilme yeteneğine sahip, yüksek oranda reaktif kısa ömürlü bileşiklerdir (108). Normal metabolizma sırasında ya da patolojik intra ve ekstrasellüler olaylarla ortaya çıkan serbest radikallerin etkileri oksidatif stres olarak adlandırılır. Bu

radikaller ortamdaki uzaklaştırılmadığı takdirde, enzim ve proteinleri inaktive ederek (kovalent bağlanma teorisi) veya serbest radikalın kendisi primer olarak (serbest radikal teorisi) hücre hasarına veya ölümüne neden olabilirler (108). Sonuçta serbest radikaller erken yaşlanma, kanser, otoimmün hastalıklar, enflamatuar hastalıklar gibi birçok hastalıkların etyopatogenezinde suçlanmaktadır (109-111).

### 2.8.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Oksijenden zengin atmosferde yaşarız ve oksijen birçok metabolik aktivite için gereklidir. Aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle hayati öneme sahip oksijen, yer aldığı biyokimyasal tepkimelerde gerçekleşen enzim inhibisyonları ve oluşan oksijen radikalleriyle toksik etki de yapabilmektedir (13, 111-113 ). Oksijen radikalleri, biyolojik sistemlerde meydana gelen serbest radikallerin en önemlisidir. Serbest oksijen radikalleri, normal hücre metabolizmasında oksijen içeren birçok biyokimyasal indirgenme reaksiyonları (mitokondrilerdeki oksijenli solunum gibi) sonucunda oluşabilmektedir (111-114) (Tablo-4).

Tablo-4: Reaktif oksijen partiküllerinin kaynakları (13,115).

---

#### I - Normal biyolojik işlemler

- 1 - Oksijenli solunum
- 2 - Katabolik ve anabolik işlemler

#### II - Oksidatif stres yapıcı durumlar

- 1 - İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite - intoksikasyon
- 2 - Ksenobiotik maddelerin etkisi
  - a-) İnhale edilenler
  - b-) Alışkanlık yapan maddeler
  - c-) İlaçlar
- 3 - Oksidan enzimler
  - a-) Ksantin oksidaz
  - b-) İndolamin dioksigenaz

- c-) Triptofan dioksijenaz
- d-) Galaktoz oksidaz
- e-) Siklooksijenaz
- f-) Lipooksijenaz
- g-) Monoamino oksidaz

4 - Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu

5 -Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelial hücreler)

6 - Uzun süreli metabolik hastalıklar

7 - Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara

III - Yaşlanma süreci

---

Vücutta üretilen radikaller her zaman zararlı olarak görülmemelidir. Oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılması için reaktif formlarına çevrilmesi zorunludur. Örneğin, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, steroid yapıdaki çok sayıdaki bileşiklerin ve eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, çok sayıdaki oksidaz ve hidroksilaz enzimleri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için radikal yapımı elzem bir koşuldur (114).

En Önemli Serbest Oksijen Radikalleri;  $O_2^-$  (Süperoksit) Radikali,  $H_2O_2$  (Hidrojen Peroksit),  $HO^\cdot$  (Hidroksil Radikali) ve Singlet Oksijen'dir ( $O_2^{\uparrow\downarrow}$ ). Bunların dışında;  $HOCl$  (Hipoklorid),  $ROO^\cdot$  (Peroksil radikali),  $RCOO^\cdot$  (Organik peroksit radikali),  $HO_2^\cdot$  (Perhidroksil radikali),  $RO^\cdot$  (Alkoksil radikali) gibi reaktif oksijen türevleri sayılabilir.

### 2.8.1.1.Süperoksit Radikali

Moleküler oksijenin ( $O_2$ ) bir elektron alarak indirgenmesiyle kararsız bir yapı olan  $O_2^-$  radikali oluşur ( $O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$ ).  $H_2O_2$  kaynağı olup canlılarda oluştuğu ilk gösterilen serbest radikal türevidir. Hücre dışı ortamda endotel hücreleri, lenfositler, trombositler, fibroblastlar ve diğer hücreler tarafından normal hücreyel reaksiyonlar sonrası ortaya çıkan zayıf bir oksidan olan  $O_2^-$ 'nin kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün

görülmemektedir (8). Ancak süperoksit radikalleri oksitleyici ve metal iyonları redükleyici etkisi ile oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları başlatabilir. Aktive edilen fagositik lökositlerden bol miktarda süperoksit üretilerek, fagozom içine ve buldukları ortama verilebilir. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatabilmektedir (111, 112, 114, 116).

### **2.8.1.2.Hidrojen Peroksit**

$O_2^-$ 'e bir elektron eklenirse (süperoksit dismutasyonu) veya oksijenin direkt olarak indirgenmesiyle hidrojen peroksit oluşur. Dismutasyon spontan olarak veya süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla katalizle olabilir ( $2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ ). Metal iyonlarının varlığında hidroksil radikallerinin oluşumuna neden olmasından dolayı radikal olmamakla birlikte reaktif oksijen kategorisine sokulur (108,117).

Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri sitoplazmaya göre daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak hidrojen peroksit radikalini oluşturabilmektedir. Hidrojen peroksit membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek, yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturmaktadır. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilmektedir (108,112,114).

Nötrofiller tarafından kullanılan antibakteriyel savunma mekanizması myeloperoksidaz enzimidir. Hidrojen peroksit myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla reaksiyona girerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan hipoklorik asidi oluşturur. İnfeksiyöz ajanlarla savaş için gerekli olan radikaller kan hücreleri tarafından aşırı salgılanacak olurlarsa bu kez yarar yerine zararlı olmaya başlarlar (13).



### 2.8.1.3.Hidroksil Radikali

En tehlikeli reaktif oksijen radikalidir. Normal biyolojik fonksiyonlarda da kullanılmaktadır. Fagositoz ve çeşitli enzimatik katalizlerde üretilmektedir (112,114,118).

Ana oluşum yolları;

- a) Fenton reaksiyonu: Hidrojen peroksit  $Fe^{+2}$  ve diğer geçiş elementleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek  $HO\cdot$  radikali oluşur ( $Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + HO\cdot + OH^-$ ).
- b) Haber-Weiss reaksiyonu: Hidrojen peroksit  $O_2^{\cdot-}$  ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur (reaksiyon bakır ve demir tarafından katalizlenir) ( $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O + HO\cdot$ ).
- c) Dokular gamma radyasyona maruz kaldıklarında, enerjinin çoğu hücre içindeki su tarafından absorbe edilmekte ve radyasyon, oksijen ile hidrojen arasında kovalent bağa neden olmaktadır ( $H_2O (X \text{ veya } \gamma \text{ ışını}) \rightarrow H\cdot + HO\cdot$ ).
- d)  $H_2O_2$ 'nin UV ışığına maruz kalması ile de hidroksil radikali oluşabilmektedir ( $H_2O_2 \rightarrow 2 HO\cdot$ ) (53).

Hidroksil radikali biyolojik makromolekülerin bütün türlerine atak yaparak, DNA'nın pürin ve pirimidin bazları ile etkileşebilmekte, DNA sarmalında kırılmalara, enzim inaktivasyonuna neden olabilmektedir (108, 119). Lipid peroksidasyonu, hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasardır (112,114).

### 2.8.1.4. Singlet Oksijen

Oksijenin uyarılmış şekli "singlet oksijen" olarak adlandırılır. Normal oksijenden çok daha hızlı bir biyolojik moleküldür. Reaktivitesi çok yüksek bir oksijen türüdür. Singlet  $O_2$ , oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi süperoksit radikalinin dismutasyonu ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir. Doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksil radikalini oluşturmakta ve hidroksil radikali kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu oluşturabilmektedir (114).

## **2.8.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Hücelere Olan Zararlı Etkileri**

Serbest radikaller; hücre organelleri ve membranındaki lipid ve protein yapısını bozarlar. Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler. DNA'yı tahrip ederler. Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar. Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksinaz, siklooksigenaz, ksantinoksidaz, indolamin dioksigenaz, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler. Hücrenin potasyum kaybını arttırırlar. Trombosit agregasyonunu arttırırlar. Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırırlar. Hücre dışındaki kollagen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar (13).

### **2.8.2.1. Membranların Lipid Peroksidasyonu**

Serbest oksijen radikallerin en önemli etkileri lipidler üzerine olup, lipidlerin oksidatif modifikasyonunu katalizlerler. Biyomembranlar, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi hücre içi organellerin membran fosfolipidlerindeki poliansatüre yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyona uğrayabilmekte, dolayısı ile hücre ve organel zarlarında oksidatif hasarlara neden olabilmektedir (108).

Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin doymamış yağ asitlerinin metilen grubundan bir hidrojen atomunu çıkarmak için yaptıkları atakla başlamakta ve zincir reaksiyonu şeklinde ilerlemektedir. Oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksi radikalini oluşturur. Peroksidikal, elektronları ve diğer duyarlı yağ asitlerini alarak lipid radikal ve lipid hidroperoksitleri oluşturur. Lipit peroksitleri hücre zarlarının önemli bir komponentidir ve Fe, Cu gibi geçiş metallerinin varlığında alkoksi ve peroksi radikallerini verirler. Bu nedenle Fe veya Cu tuzları lipit peroksidasyonunu hızlandırır (13). Sonuçta hücre zarının akiskanlığını ve permabilitesini azaltarak geri dönüşümsüz olarak zar bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar. Permeabilite özelliklerinin değişmesi anormal  $Ca^{+2}$  girişine yol açarak hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve oksidasyonla fosforilasyonun ayrılmasına yol açabilmektedir. Lizozomal membranların tahribi hidrolitik enzimlerin salınmasına ve intrasellüler sindirime neden olur. Biriken hidroperoksitler direkt olarak toksik etki

göstermenin yanısıra duyarlı aminoasit kalıntılarını okside eder veya polimeraz zincir reaksiyonlarıyla enzimleri inaktive edebilirler (120-123).

Peroksiradikali, poliansatüre yağ asidi moleküllerini okside edebilmekte, radikallerin ve aldehydlerin oluşmasına neden olan hidroperoksitlerin meydana gelmesini sağlayabilmektedir. Bu maddelerin yıkılması sırasında oluşan aldehydler uzun ömürlü olduklarından hücre hasarının yayılmasına neden olabilmektedirler. Aldehydler arasında en iyi bilinen sitotoksik ürün üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan malondialdehyd (MDA) (114). MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, ancak lipid peroksidasyonunun derecesi ile korelasyon gösteren son üründür. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna sebep olmaktadır. Bunun sonucunda da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özellikleri değişmektedir (114, 124).

#### **2.8.2.2. Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu:**

Proteinler, serbest radikal hasarına duyarlı moleküllerdir. Proteinlerin, sülfhidril veya amino gruplarıyla serbest radikallerin etkileşmesi sonucu protein moleküllerinin yapısı değişmekte amino asitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu, agregasyonu veya çapraz bağlanmaları gibi hasarlar meydana gelebilmektedir (120, 125). Proteinin temel yapısındaki değişme, antijenitesindeki değişmeye ve proteolize hassasiyete yol açabilir. Radikaller, membran proteinleri ile reaksiyona girebilirler. Enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilirler (120, 126). Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin  $O_2$  veya  $H_2O_2$  ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur (114, 120, 124).

#### **2.8.2.3. Karbonhidratlara Etkileri:**

Monosakkaritlerin otooksidasyonu ile vücudumuzda  $H_2O_2$ , peroksitler ve okzoaldehytler meydana gelmektedir (53). Serbest radikallerin gözün vitröz sıvısında bol miktarda bulunan hyalüronik aside oksidatif hasarı katarakta zemin hazırlarken; eklem

sinovial sıvısına geçen nötrofillerden extrasellüler sıvıya salınan  $H_2O_2$  ve  $O_2$ , bu bölgedeki hyalüronik asidi parçalayarak enflamatuvar eklem hastalıkları oluşumuna katkıda bulunmaktadır (114, 127).

#### **2.9.2.4. DNA Üzerine Etkileri:**

Proteinler, lipidler ve karbonhidratlar gibi DNA'da kimyasal-oksitatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde  $10^3$  kez oksitatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür (50). DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar sağlıklı bireylerde de saptanmaktadır. Antioksidan enzim düzeylerindeki azalma, DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksitatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır. DNA'da tek ve çift dal kırıkları, kontrolsüz baz dizilimi, baz modifikasyonları, DNA-protein arasında çapraz bağlanma oksitatif hasarlarla olabilir (111,128,129). Bu oksitatif DNA hasarları mutasyonlara, kanserogeneze ve yaşlanmaya yol açabilir (130).

Serbest radikaller, DNA'da mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açabilirler. DNA'da oksitatif hasar oluşturan radikaller OH ve  $O_2^-$  radikalleridir. OH radikali, DNA'daki dört bazın herhangi birine saldırı yapabilirken,  $O_2^-$  dal kırığından ziyade, guanine spesifik bağlanarak hasar oluşturur (111,131).

### **2.8.3. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Mekanizmaları**

#### **2.8.3.1. Antioksidan Sistemler**

Vücutta reaktif oksijen türlerinin düzeylerini kontrol altında tutmak ve oluşturabilecekleri hasarları engellemek için birçok savunma mekanizmaları bulunmaktadır (132,133). Bu savunma mekanizmaları arasında oksidanların organizmadaki düzeylerini arttırıcı etkenlerin ve risk faktörlerinin iyi belirlenmesi ve bunlardan uzak durulması, radikallerle tetiklenen biyokimyasal reaksiyonları kırmak, oluşan mediyatörlerle aktive olan inflamatuvar hücrelerin lezyon yerine hücumunu ve orada aşırı birikimini önlemek sayılabilir. Oksidan moleküllerle mücadelede üzerinde durulacak esas girişim ise belirli düzeyi aşmış

oksidanlara direkt olarak etki edip onları inaktif hale getiren antioksidanlardır (13). Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önlemek veya geciktirebilmek amacıyla serbest radikalleri metabolize eden, serbest radikal oluşumunu önleyen veya serbest radikallerin temizlenmesini arttıran bu maddelere “antioksidanlar” ve bu olaya antioksidan savunma denir. Bu antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olarak ikiye ayrılır (114, 115, 118, 132).

Endojen antioksidanlar, enzim olarak görev yapan ve enzim olmayan antioksidanlar olarak iki grupta incelenmektedir. Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir (GSH hariç).

Enzim olan antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), glutatyon transferaz (GST), glutatyon redüktaz ve mitokondrial oksidaz sistemidir. Enzim olmayanlar ise, bilirubin, albumin, ürik asit,  $\alpha$ - tokoferol, askorbik asit, seruloplazmin, transferrin, ferritin ve glutatyon gibi maddelerdir. Bunlar oksijen radikallerine karşı ilk savunma sistemini oluşturmaktadırlar (111,114,132). Eksojen antioksidan olarak da allopurinol, folik asit, B, C ve E vitamini, flavinoidler, asetilsistein, mannitol, adenozin, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar ve demir şelatörleri sayılabilir (111,114,132,134).

SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimler, aktif oksijen türlerini direkt olarak etkileyen ilk savunma hattı olarak görev yaparlar. Bu savunma sistemleri yetersiz kalırsa ve lipid peroksidasyonu artarsa ikinci sıra savunma sistemleri devreye girer. Antioksidan bir enzim olan fosfolipid hidroperoksid, glutatyon peroksidaz, peroksidleri alkollerle indirgeyerek peroksidize edilmiş membran komponentlerini uzaklaştırma görevi yapar. Antioksidan olarak E ve C vitaminleri birlikte zincir reaksiyonlarını sonlandırarak peroksidlerin daha fazla birikmesini önlerler. Tüm bu savunma yetersiz kaldığında veya tükendiğinde hücre membranı o kadar çok hasara uğrar ki, sonunda hücre ölür.

Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler:

- 1) Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:
  1. Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki,
  2. Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki,

3. Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki.

2) Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

a) Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini tutma ya da çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine “toplayıcı etki” denilmektedir. Bilirubin, antioksidan enzimler bu tip bir etki göstermektedirler (53,79).

b) Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip, onlara bir proton aktararak aktivitelerini azaltan ya da inaktif biçime dönüştüren etkidir (ör; Vit'ler, flavinoidler, bilirubin) (114).

c) Zincir kırıcı : Serbest oksijen radikallerine bağlanarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyerek serbest radikalleri uzaklaştırmaktadırlar (ör; Bilirubin, Hb, seruloplazmin, mineraller ) (114, 135,136).

d) Onarıcı etki: Serbest radikaller tarafından hasar gören biyomolekülleri onarırlar. Hasar görmüş DNA molekülünü tamir eden enzimler bu gruba örnek olarak verilebilir (114,137).

### 2.8.3.2. Enzimatik Antioksidanlar

**Süperoksit Dismutaz (SOD):** SOD, substrat olarak serbest oksijen radikallerini kullanan ve süperoksiti hidrojen perokside ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalize eden, yapısında bakır, çinko ve manganezin olduğu bir metalloenzimdir ( $2 O_2^- + 2 H^+ (SOD) \rightarrow H_2O_2 + O_2$  ). Oluşan reaksiyon “oksidatif strese karşı ilk savunma” olarak da adlandırılmaktadır. Çünkü, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücrel kompartmanlardaki süperoksit düzeyleri kontrol altında tutulur. Aynı zamanda SOD, lipid peroksidasyonunu da inhibe etmektedir. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanan dokularda fazladır. SOD’ın ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür (114).

**Katalaz (CAT):** Peroksizomlarda bulunan, yapısında hem grubu içerdiğinden bir hemoprotein olarak kabul edilen bir enzimdir. Hidrojen peroksidi su ve oksijene

ayrıştırılmaktadır ( $2\text{H}_2\text{O}_2$  (CAT)  $\rightarrow$   $2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ). Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve muköz membranda yüksek miktarda bulunmaktadır (111, 132).

**Glutasyon Peroksidaz (GPx):** GPx, hücrelerin sitozollerinde yerleşmiş ve yapısında selenyum bulunan bir metalloenzimdir. Sitozol ve mitokondrilerde SOD tarafından oluşturulan  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve lipid hidroperoksitlerini ortadan kaldırmaktadır. Yalnız kapasitesi sınırlı olup düşük hidrojen peroksit konsantrasyonunda çalışmaktadır. Hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin indirgenmesiyle oksitlenen glutasyon, glutasyon redüktaz enzimi ve başlıca pentoz fosfat yolundan sağlanan NADPH yardımıyla indirgenerek reaksiyonların devamını sağlar (114). Eritrositlerde GPx “oksidan strese karşı en etkili antioksidandır.” GPx aktivitesindeki azalma,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in artmasına ve şiddetli hücre hasarına neden olur (114).

**Glutasyon Redüktaz (GR):** Glutasyon peroksidaz tarafından  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve diğer lipid peroksitlerin yükseltgenmesi sırasında glutasyon, okside glutatyona dönüşmektedir. Organizmanın glutasyon deposu sınırlı olduğundan oksidasyona uğramış bu yapıyı ileride yeniden kullanmak için redükte glutatyona dönüştüren enzim glutasyon redüktazdır (114).

**Glutasyon-S-Transferazlar (GST):** Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli görev almaktadırlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere karşı GST'ler selenyum bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstermektedirler. Antioksidan aktivitelerine ek olarak çok önemli başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahip olup bilirubin, hem ve bazı kortikosteroidler gibi endojen maddelere geri dönüşümlü olarak bağlanarak bunların hücre içi transportunda da görev almaktadırlar (114,120).

### 2.8.3.3. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri

**Glutasyon (GSH):** Önemli bir intrasellüler antioksidandır ve ekstrasellüler mesafede çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. GSH'a antioksidan özelliğini sisteinin tiyol grubu

kazandırır. Glutasyon, HO<sup>·</sup> ve O<sub>2</sub><sup>↑↓</sup> gibi reaktif oksijen türevlerinin temizleyicisidir. Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Demirin Fe<sup>+2</sup> (ferröz) halde tutulmasını sağlar. Böylece, protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller, hatta rejenere olmalarını sağlar. N-asetil sistein hücre membranını geçip hücre içinde sisteine dönerek GSH üretimini artırır.

**Albümin:** Albümin kuvvetli şekilde bakır ve zayıf olarak da demiri bağlar. Yüksek konsantrasyonlarda (40-60 mg/ml) bulunur. Albumine bağlı bakır, Fenton reaksiyonuna katılabilir fakat albumin yüzeyinde oluşacak olan OH radikali albumin tarafından temizlenir ve radikalın serbest solüsyona kaçmasına izin vermez. Bu biyolojik olarak önemli olmayan, albumine ait bir reaksiyon örneğidir. Aynı zamanda myeloperoksidaz türevi bir oksidan olan HOCl'i hızlı bir şekilde temizler(105).

**Vitamin C (Askorbik Asit):** Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan C vit'i, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. C vit'in antioksidan etkisinin yanında pro-oksidan etkisi de söz konusudur. Çünkü, vitamin C, Fe<sup>+3</sup>'ü Fe<sup>+2</sup>'ye indirgeyen süperoksit dışındaki tek hücresel ajandır. Bu yolla askorbik asit proteine bağlı ferrik demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek fenton reaksiyonunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile etkileşmeye uygun olan ferröz demire dönüştürür. Bu prooksidan etki sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü daha yüksek konsantrasyonlarda ise güçlü bir antioksidan olarak etki gösterdiği belirtilmiştir (120,123).

**Vitamin E (Tokoferol):** α-tokoferol, yağda çözünen ve lipid peroksidasyon zincirini kıran bir antioksidandır. Mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi membrandan zengin hücre kısımlarında vitamin E konsantrasyonu artmıştır. Çok güçlü bir antioksidan olan α-tokoferol hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal ataklarına karşı korur, oluşan radikalleri temizler, lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Askorbik asit E vitamininin etkisini artırır. E vitamini ve GPx serbest radikal etkisine karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. E vitamini sentezlerini engeller iken GPx oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırır.



**Vitamin A ( $\beta$ -Karoten):** A vitamininin metabolik ön maddesi olan ve yağda çözünen bir antioksidan olan  $\beta$ -karoten son derece güçlü singlet  $O_2$  temizleyicisidir. Serbest radikaller biyolojik hedeflerle interaksiyonuna girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak etki ederek de peroksit radikalleri oluşumunu engeller (120,123).

**Seruloplazmin:** Molekül ağırlığı yaklaşık 151 kDa olan serüloplazminin yarılanma ömrü 5–7 gündür. Tek bir polipeptid zincirinden oluşan ve bir  $\alpha_2$ -globulin olan serüloplazmin, molekül başına 8 Cu atomu bağlamaktadır(181). Plazma antioksidan aktivitesinin önemli bir kısmı, bakır içeren ve taşıyan akut faz proteini seruloplazminden kaynaklanır. Birçok poliamin ve polifenol substratları için oksidaz aktivitesine sahip olduğu gösterilen ve “bakır oksidaz” olarak isimlendirilen serüloplazmin bir oksidoredüktaz olup, akut faz yanıtta önemli bir role sahiptir. Çünkü bu sayede, oksijenden türemiş ortaklanmamış elektronlara sahip olan, oldukça reaktif reaksiyonlara katılan ve doku hasarına neden olabilen serbest radikalleri etkisizleştirebilmektedir (183). Organik bileşiklerin oksijen ile spontan oksidasyonu sonucu oluşan, hücrel toksik bileşiklere karşı plazma ve dokularda bulunan antioksidan aktivitenin önemli bir bölümünü serüloplazmin ve transferrin göstermektedir (34). Seruloplazmin oksijen radikal ara ürünleri salınmaksızın ferro-oksidaz aktivitesi göstererek  $Fe^{+2}$ 'i  $Fe^{+3}$ 'e okside eder. Böylece fenton reaksiyonunu ve serbest radikal oluşumunu inhibe eder. Demir ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonunu önleyici etki gösterir (13). Wilson hastalığında plazmanın albümine bağlı Cu konsantrasyonu artmakta, serüloplazmin düzeyi ise belirgin olarak azalmaktadır. Erkek bebeklerde görülen ve ölüm ile sonuçlanan menkes hastalığında da plazma Cu, serüloplazmin düzeyleri ve karaciğerde Cu konsantrasyonunda azalma olduğu kaydedilmiştir (72).

**Ferritin:** Dokulardaki demiri bağlar, serbest radikal reaksiyonlarında yer almasını engeller.

**Transferrin ve Laktoferrin:** Transferrin dolaşımdaki, laktoferrin lökositlerdeki serbest demiri bağlar, serbest radikal oluşumunu önler.

**Haptoglobin ve Hemopeksin:** Hemoglobin, gerek dekompozisyonla ortama demir vererek gerekse doğrudan peroksitlerle etkileşerek lipid peroksidasyonunu uyarabilir. Haptoglobin hemoglobini, hemopeksin “hem”i bağlayarak bu demir bileşiklerinin lipid peroksidasyonunu uyarmasını engeller.

**Desferrioksamin (DFO):** DFO, ferrik demirin güçlü bir bağlayıcısıdır ve oluşan bu kompleksteki demirin indirgenmesi son derece zordur. Bu sayede DFO, demir iyonuna bağımlı lipid peroksidasyonunu önler. DFO, transferrin veya laktoferrine bağlı demir iyonlarını uzaklaştırmada zayıf bir etkinliğe sahiptir.

## **2.9. Total Antioksidan Kapasite**

Normal fizyolojik koşullarda organizma, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı oluşan oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan defans sistemine sahiptir. Vücudun oluşan oksidan durumlara karşı redoks ayarını sürdürebilmesinde kan çok önemlidir. Çünkü kan antioksidanların vücudun tüm bölümlerine taşınmasını ve dağıtımını gerçekleştirmektedir (111).

Total antioksidan kapasiteye en büyük katkı plazmadaki antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada bilirubin, serbest demiri toplayan transferrin ve seruloplazmin, ürik asit, E vit'i, C vit'i yanında serbest radikalleri tutan zincir kırıcı antioksidanlarda bulunmaktadır (111,136). Albumin, ürik asit, askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan kapasitenin %85'inden fazlasını oluşturmaktadır. Bunun nedeni, kanda bilirubin, glutatyon, flavinoidler, alfa tokoferol ve beta karoten gibi antioksidan sistemin komponentlerine nazaran albumin, ürik asit ve askorbik asitin seviyelerinin fazla olmasıdır (111,138).

Plazmada antioksidanlar bir etkileşim içinde bulunurlar. Genel olarak bu maddeler sinerjist olarak çalışmaktadırlar. Bu etkileşimden dolayı, bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Bu sinerjizme örnek glutatyonun askorbatı, askorbatın da tokoferolün yeniden aktifleşmesini sağlaması gösterilebilir. Ayrıca bir antioksidandaki azalma diğerindeki artış ile kompanse edilebilmektedir. Ör; yenidoğanda postnatal dönemde fizyolojik şartlarda plazmada ürik asit, C vit'i, ve sülfidril grupları azalırken, bilirubin ve E vit'i düzeyleri artmaktadır. Total antioksidan kapasitenin ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler vermektedir. Bu yüzden kanın antioksidan durumunu saptamada, bireysel antioksidanlardan çok bunların toplam antioksidan değerini veren toplam antioksidan kapasite ölçümü yaygınlaşmaktadır (111,138).

## **2.10. Beta Talasemi Major ve Oksidatif Stres**

Talasemik eritrositlerin yaşam süresinin kısalığı; morfolojik değişiklikler, biyokimyasal ve metabolik dengesizliklerle ilişkilidir (139).  $\beta$ -TM'lü hastaların eritrositlerinde hem eksojen hem de endojen oksidatif hasar sıklığı artmıştır (139).  $\beta$ -TM'lü hastalarda eritrositlerin biyokimyasal ve metabolik değişikliklerle oksidatif strese artmış duyarlılığı; i) Serbest radikallerle oluşan oksidatif hasar, ii) Lipid peroksidasyonu, iii) Artmış demir toksisitesi, serbest demir salınımı ile bağımlı olduğu kabul edilen görüşlerdir (139, 140).

Eşleşmemiş fazla  $\alpha$ -globin zincirleri, Non-Hb demiri ve hücre içinde Hb'nin düşük oluşu bu oksidatif stresi kolaylaştıran faktörlerdendir. Özellikle serbest, eşleşmemiş unstable  $\alpha$ -globin subünitleri oksidatif olaylar zincirini başlatırlar (31,12, 141). Önce metHb oluşur, sonra reversible ve irreversible hemikromlar presipite olurlar ve membranın çeşitli komponentleri ile ilişkiye girerler. Hem ve globülini parçalarlar. Membran iskeletinde bozulma ile, deformabilitede azalma, rijiditede artma, membran lipidlerinde peroksidasyon ve antijenik değişme ile eritrositlerde erken yaşlanma, katyon değişiminde bozulma ile hücre içi potasyum kaybı gibi olaylara da neden olmaktadır.

## 2.11. Beta Talasemi Major ve Demir Toksikitesi

Demir; katalaz, akonitaz, ribonukleotid redüktaz, peroksidaz, sitokrom oksidaz gibi enzimlerle redoks kimyasını kullanarak vücuttaki hayati fonksiyonlarda görev alan, Hb ve diğer demir içeren proteinlerin yapısına giren bir elementtir. Demir, fizyolojik olarak gerekli ama biyokimyasal açıdan oldukça tehlikelidir (108,142). Besinlerdeki demir'in yaklaşık olarak %10 kadarı emilir, ancak fazla demir'in atılmasını sağlayan bir mekanizma bulunmamaktadır. Kan transfüzyonları, hemokromatoz ve talasemi gibi bazı anemilerin tedavisi sırasında plazma demir konsantrasyonu yükselmektedir (143).

Fazla demir sağlıklı organizmada bile toksik olabilir (108). Demir yüklenmiş hücrelerde lizozomal hasar ve proteazların salgılanmasıyla hücre ölümü görülebilir (142). Kalp, KC, eklem, pankreas gibi organ hasarları oluşabilir. Nitekim yüksek doz demir verilen sıçan hepatositlerinde demirin mitokondrilerde depolandığı, matriks boşluğunda amorf yoğunluklu yapıların biriktiği ve mitokondriyumlarda şişme olduğu bildirilmiştir (144). Demir yüklenmiş hayvanların kalpleri normal hayvanların kalplerine göre iskemi-reperfüzyona maruz kaldığında belirgin olarak daha fazla hasara uğrar. Bu olayda en önemli mediatör oksijen radikalleridir. Kalp kasında hücre membranları ve sarkoplazmik membranlar ekstrasellüler sıvı ile doğrudan temas halinde bulunurlar. Membranların demir toksisitesinden aşırı etkilenmesi özellikle kolaylaşmaktadır. İskemi-reperfüzyon olayı demirin mobilize olmasına veya yeniden dağılımına neden olabilir.

Demir ve süperoksit radikali, özellikle de patolojik şartlar altında, birbirleriyle etkileşim halindedir. Bu iki molekülden her biri diğerinin toksisitesini artırıcı etki göstermektedir. Artmış demirin zararlı etkileri, öncelikle oksijen radikallerinin üretiminde başlıca kaynak ürün olmasıyla açıklanır (144). Aşırı demir yükü, aşırı süperoksit üretimi sonucu, bu maddelerin hasar verici etkisini artırabilir. Diğer taraftan ortaya çıkan kronik oksidatif stres, sitotoksik ve mutajenik olaylara neden olabilir (108,145).

Süperoksit radikallerinin hasar verici etkilerinin ferritinden demirin ayrışmasının azaltılmasıyla zayıflayacağına inanılır. Süperoksit, hidrofilik kanallar boyunca  $Fe^{+3}$ 'ün  $Fe^{+2}$ 'ye indirgenmesini takiben ferritin molekülüne girer, bu durum ferritinden demir'in

serbestleşmesini kolaylaştırır. demir, hücre içinde çeşitli hasar verici reaksiyonları katalizlemek suretiyle çeşitli biyolojik maddelere elektron verir ve alır. Süperoksit radikali ve hidrojen peroksit özellikle serbest demir ve bakır iyonu varlığında hidrosil grubu gibi daha tehlikeli radikallere dönüşmesi nedeniyle, antioksidan savunmayı güçlendirmek amacıyla organizmanın demir ve bakır iyonlarını bağlı duruma getirmesi önemlidir. Normal şartlarda demir, redoks aktivitesi nedeni ile hücreler ve organizmalar tarafından çok dikkatli bir şekilde tutulur. Yine serbest olmayan demir, sitrat veya ATP gibi bileşiklerle hemen şelat oluşturmaz, fakat bu kompleksler lipid oksidasyonunu veya HO<sup>-</sup> oluşumunu katalizleyen redoks reaksiyonlarına kolayca girer(155).

Transferrin ve ferritin, demiri Fe<sup>+3</sup> durumda tutarlar ve hücrel indirgeyiciler tarafından Fe<sup>+3</sup> uzaklaştırılması çok güçtür. Demir transport proteini olan transferrin sağlıklı insanlarda % 20 -30 oranında demir ile yüklüdür. Böylece plazmadaki serbest iyonik demirin etkinliği sıfıra dek düşer. Transferrine bağlı demir lipid peroksidasyon işlemi yapamaz (13). Sağlıklı insanda depolanmış demirde büyük bir sorun oluşturmaz, ancak hastalık gibi durumlarda süperoksit radikalleri tarafından yapılan saldırıya ferritin açıktır (108). Kısaca, süperoksit anyonları, Fe<sup>+3</sup>'in Fe<sup>+2</sup>'ye indirgenmesini katalize eder. Fenton reaksiyonu ve haber-weiss reaksiyonunda demir, hidrojen peroksit ve süperoksit moleküllerini toksik serbest HO<sup>-</sup> dönüştürür (114, 146-148). Protein ve DNA'yı da içine alan birçok biyolojik makromolekül bu radikalden etkilenir.

TI'lı hastalarda gastrointestinal artmış demir absorpsiyonu, TM'lü hastalarda ise buna ek olarak hayat boyu devam eden kan transfüzyonları demir yüklenmesine neden olur (37,58). Demir önce RES ve kemik iliği makrofajları tarafından tutulur. Kapasite aşılnca önce transferrine demir verilir ve oradan da parankimal hücrelere girerek doku hasarı oluşur. Aşırı demir yüklü olgularda, transferrinin demir taşıma kapasitesi dolmakta ve transferrine bağlı olmayan demir (serbest demir, NTBI) oluşmaktadır. Parankimal hücrelerdeki labil demir havuzu artınca, bir korunma mekanizması olarak, transferrin demirin hücre içine girişi engellenir. Ancak transferrine bağlı olmayan NTBI hücrelere girişi, üstelik transferrin demirinden çok daha hızlı olarak devam eder (37,58). Böylece hem yüksek plazma demiri hem de intraselüler non-Hb demirinin artışı oksijenden zengin intraeritrositik çevre ile beraber

reaktif oksijen radikallerinin yapımı için uygun ortam oluşturur. Oksidatif stres'e yol açar. Demir yüklenmesi, lipid peroksidasyonu, hepatik hasar ve fibrojenezise neden olur (149).

## 2.12. Beta Talasemi Major ve Lipid Peroksidasyonu

Demirin yol açtığı fenton reaksiyonu ile oluşan HO<sup>•</sup>, lipid peroksidasyonunun en önemli nedenlerinden biridir. Lipid peroksidasyonu vücuttaki tüm hücreleri ve organelleri etkilemekte, bir kere başladıktan sonra da, bir antioksidan devreye girmez ise, zincirleme devam etmektedir.

Lipid peroksidasyonunun artması hem akut hem de kronik demir toksisitesinin önemli bir özelliğidir. Demir, fenton reaksiyonu yoluyla hidroksil radikallerinin oluşmasını sağlarken stabil lipid hidroperoksitlerinin peroksi ve alkoksi radikallerine dönüşümünü hızlandırır. Doymamış yağ asitleri içeren membran lipidleri ve proteinleri demire bağlı peroksidatif hasara aşırı duyarlılık gösterir. Membran lipidlerinde peroksidasyon işlevi hidroksil, alkoksil ve peroksil radikalleri gibi reaktif maddelerin bir metilen grubundan hidrojen atomunu çıkarması ile olur (146,147). Talasemilerde membran fosfolipidlerinden fosfotidil etanol aminin ve poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) aşırı oksidasyona bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca talasemideki hepatik bozukluk da, serumda fosfolipid, kolesterol ve PUFA' nın azalmasına katkıda bulunmaktadır. Yine lipid solubl antioksidanların azalması demir bağımlı karaciğer harabiyetini artırabilir (150). Membran lipidlerinin peroksidatif harabiyetinin önemli bir göstergesi, PUFA'nın oksidasyonu sonucu oluşan, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) konsantrasyonlarının artışıdır (42).

Serbest radikallerin membran fosfolipidleri üzerindeki etkisini sonlandırmada rol alan SOD gibi enzimleri destekleyen, doğal antioksidan,  $\alpha$ -tokoferolün (vit E) serum düzeyi, talasemik hastalarda çok düşük bulunmuş, MDA'nın ise arttığı saptanmıştır (12,21,38). Bu eksikliğin fazlaca tüketime bağlı olabileceği vurgulanmıştır. Ağızdan sürekli  $\alpha$ -tokoferol verilmesi, serum  $\alpha$ -tokoferol düzeyini artırıp, verildiği müddetçe MDA konsantrasyonunu azaltmaktadır. Fakat transfüzyon ihtiyacında bir değişiklik yapmadığı vurgulanmıştır (140). E vit'i sadece membran lipidlerinin peroksidasyonunu önlemekte, oksijen radikallerinin diğer hücre komponentleri üzerine olan etkisini önleyememektedir. Talasemik hastalarda vit E ve

vit A'nın azaldığını, kompanzasyon olarak SOD ve GPx'in arttığı vurgulanmıştır (72,89). Hastanın yetersiz şelasyon tedavisi alması antioksidanları azaltabileceği vurgulanmıştır (34).

### 3. MATERYAL VE METOD:

Bu çalışma Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Hematoloji Bilim Dalı'nda ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesi Çocuk Hematoloji bölümünde takipli yaşları  $7,43 \pm 4,62$  yıl arasında değişen 122 (55 kız, 67 erkek)  $\beta$ -talasemi major çocuk hasta ve anemisi olmayan yaşları  $7,92 \pm 3,28$  yıl arasında değişen 126 (61 kız, 65 erkek) sağlıklı çocuk ile nisan-temmuz 2011 tarihleri arasında yapıldı. Çalışma için Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun onayı alındı. Ayrıca çalışma, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (HÜBAK) tarafından desteklendi. Çocukların ebeveynlerinden çalışma başlangıcında bilgilendirilmiş olur formu alındı.

Hastalara  $\beta$ -talasemi majör tanısı hemoglobin elektroforezi, biyokimyasal tetkikler ve moleküler genetik teknik ile konuldu. Düzenli olarak kan transfüzyonu alan ve demir şelatörü kullanan hastalar çalışmaya alındı. Hbs-Ag, HCV, HIV pozitifliği olması, yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon öyküsü ve/veya operasyon öyküsü olması, ilaç kullanımı olması, hipersplenizm gelişmiş olması çalışmadan çıkarılma kriteri olarak kabul edildi.

Kan örnekleri Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda çalışıldı.

Kan örnekleri son kan transfüzyonu üzerinden iki hafta geçtikten sonra toplandı. Alınan kan örneklerinden tam kan sayımı, serum demir, ferritin, karaciğer fonksiyon testleri olarak aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), böbrek fonksiyon testleri olarak üre, kreatinin düzeyleri çalışıldı. Geriye kalan kan örneğinin serumu ayrılarak Total antioksidan kapasite (TAK), total oksidan seviye (TOS), Lipid Hidroperoksidasyonu (LOOH), serüloplazmin ve eser element ölçümleri için  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Sağlıklı kontrol



grubundan da çalışmanın başlangıcında kan örnekleri toplandı. Tam kan sayımı, AST,ALT, üre, kreatinin taze olarak çalışıldı daha sonra geriye kalan kan örneğinin serumu ayrılarak TAK, TOS, LOOH, serüloplazmin ve eser element ölçümleri için -20° C’de saklandı.

### **3.1. Örneklerin Toplanması ve Ölçümler:**

Kan örnekleri EDTA’lı ve jelli biyokimya tüpler kullanılarak alındı.

EDTA’lı kan örnekleri ile otomatik kan sayım cihazı (Celldyn 3700® USA) kullanılarak tam kan sayımı yapıldı ve hastaların mutasyon tipleri ticari kit kullanılarak reverse dot blot platform yöntemiyle (Beta-globin Strip Assay, Vienna Lab, Viyana, Avusturya) gerçekleştirildi. Jelli biyokimya tüplerine alınan kan örnekleri Hettich marka soğutmalı santrifüj cihazında 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldıktan sonra AST, ALT, üre, kreatinin, demir ve ferritin düzeylerinin ölçümleri yapıldı. Kalan serum örnekleri TAK, TOS, LOOH, serüloplazmin ve eser elementler çalışılmak üzere depolandı.

Serum ferritin düzeyi rutin biyokimya laboratuvarında elektrokemiluminesans yöntemle ticari kitler kullanılarak hormon otoanalizöründe (Roche, E-170®) ölçüldü. Serum AST, ALT, üre, kreatinin ve demir düzeyleri ticari biyokimya kitleri kullanılarak biyokimya otoanalizöründe (Abbott, Architect C16000®, USA) spektrofotometrik yöntemle çalışıldı. Eser element düzeyleri atomik absorpsiyon spektrofotometresinde (AAS) (Varian AA 240FS®, Australia) ölçüldü. TOS, TAK düzeyleri Rel® assay kitleri kullanılarak biyokimya otoanalizöründe (Abbott Architect C4000®, USA) çalışıldı.

### **3.2. Kullanılan Araç, Gereç ve Kimyasallar**

- Biyokimya otoanalizörü (Abbott Architect C16000®, USA)
- Biyokimya otoanalizörü (Abbott Architect C4000®, USA)
- Kan sayımı otoanalizörü (Abbott Celldyn 3700®, USA)
- Hormon otoanalizörü (Roche E-170®, USA)
- Atomik absorpsiyon spektrofotometresi (Varian AA 240FS®, Australia)
- Derin Dondurucu (Uğur®, Türkiye)
- Buzdolabı ( Profilo®, Germany)

- Santrifüj ( Hettich<sup>®</sup> Universal 30 RF, Germany)
- Otomatik multipipetler ( Gilson<sup>®</sup>, Germany)
- Hassas terazi (Sartorius<sup>®</sup>, Germany)
- Vorteks (Nüve<sup>®</sup> NM 110 model, Türkiye)
- Dijital pH-metre (Hanna<sup>®</sup> pH 211 model, Japon)
- Copper (Cu) atomic absorbtion standart solution (Sigma<sup>®</sup>)
- Zinc (Zn) atomic absorbtion standart solution (Sigma<sup>®</sup>)
- Nitric acid %65 (CARLO ERBA<sup>®</sup>)
- Asetilen gazı
- Beta-globin Strip Assay (Vienna Lab<sup>®</sup>, Avusturya)

Oksidatif parametreler Rel<sup>®</sup> assay (Mega Tip, Gaziantep, Türkiye) kitleri kullanılarak Abbott marka architect C4000 modelinde çalışıldı.

### 3.3. Mutasyon Tipleri

Hastaların mutasyon tipleri ticari kit kullanılarak reverse dot blot platform yöntemiyle (Beta-globin Strip Assay, Vienna Lab, Viyana, Avusturya) gerçekleştirildi.

### 3.4. Total Antioksidan Kapasite (TAK)

Örneklerin total antioksidan kapasite (TAK) düzeyi, Rel<sup>®</sup> assay ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm yöntemi örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS\* katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edildi (161).

**Reaktif 1:** 75 mM Clark tamponu ( pH=1.8) içerisinde 10 mM o-dianisidine ve 45 µmol (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O çözümlere hazırlandı.

**Reaktif 2:** 7,5 mM hidrojen peroksit 75 mM Clark tamponu ( pH=1.8) içerisinde karıştırılarak hazırlanır.

**Prensip:**  $Fe^{2+}$ -o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile fenton tipi reaksiyon oluşturarak  $OH^-$  radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgenerek düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. Dianisidyl radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumunu artırmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar.

### 3.5. Total Oksidant Seviye (TOS)

Örneklerin TOS düzeyi, Relassay<sup>®</sup> ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm testin çalışma prensibinde ifade edildiği üzere örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu ferrik iyonla kümülatif olarak oksitlemesine dayanan, kolorimetrik yöntem kullanıldı. Sonuçlar  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equivalent/L olarak ifade edildi (162).

**Reaktif 1:** 140 mM'lık NaCl çözeltisi içerisine 25 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  çözülerek ana solüsyon hazırlanır. Ana solüsyonda önce % 10 oranında gliserol çözülüp daha sonra total volümde 250  $\mu\text{M}$  Xylenol orange çözülerek hazırlanır.

**Reaktif 2:** Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-Dianisidine dihydrochloride çözülüp sonra 5 mM amonyom ferröz sülfat çözülerek reaktif hazırlanır.

**Prensip:** Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xylenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir .

### 3.6. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Örneklerin oksidatif stres indeksi (OSİ), örneklerin toplam oksidan seviye (TOS) düzeylerinin, örneklerin toplam antioksidan kapasite (TAK) oranına yüzdesi olarak belirtilir (Harma ve ark., 2005.). TAK testinin mmol değeri mikromole çevrilir.

$$\text{OSI} = \frac{(\text{TOS}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. / L.})}{(\text{TAK}, \mu\text{mol trolox Equiv. / L. X 10)}$$

### **3.7. Lipid Hidroperoksidasyonu (LOOH)**

LOOH tayini, Khelifa Arab ve Jean–Paul. Steghens’in tam otomatik yöntemiyle, xyleneol orange ve demir oksidasyonun kullanılmasıyla ölçüldü (118).

### **3.8. Serüloplazmin düzeyi**

Örneklerin Serüloplazmin enzim aktivitesi düzeyi Erel tarafından geliştirilen motoda göre ölçülmüştür (164).

### **3.9.Eser Element Düzeyleri**

Eser element düzeyleri atomik absorpsiyon spektrofotometri cihazında (AAS) (VARIAN® AA 240FS, Australia) tayin edildi. Kullanılan tüm malzemeler % 20’lik HNO<sub>3</sub> çözeltisi içerisinde 24 saat bekletildikten sonra deiyonize sudan geçirilerek kullanıma kadar ağızları parafilm ile kapatıldı.

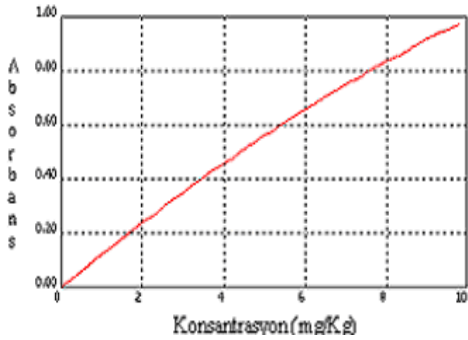
### **3.10. Örneklerin Hazırlanması**

Çinko ve bakır düzeyi çalışılmak üzere numuneler tüplere alındı ve etiketlenip deiyonize su ile 1/5 oranında dilüe edildi.

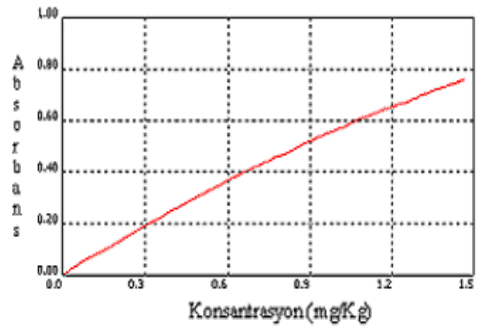
### **3.11. Kalibratörlerin Hazırlanması**

Atomik absorpsiyon spektrofotometri cihazı (VARIAN® AA 240FS, Australia)’nın yazılımına yüklü olan element absorpsiyon-konsantrasyon grafiklerinden yararlanıldı. Her

element için uygun minimum ve maximum ölçüm konsantrasyonları belirlendi ve kalibratör solüsyonları bu konsantrasyonlara göre yapıldı. Her elementin ölçümü için kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil-16,17) ve numunelerin element içeriğinin konsantrasyonları bu kalibrasyon eğrisine göre belirlendi. Elementlere ait kalibrasyon eğrileri aşağıda verilmiştir. Ölçümü yapılan elementler Cu ve Zn dur.



Şekil-16. Cu elementi kalibrasyon grafiği



Şekil 17. Zn elementi kalibrasyon grafiği

### 3.12. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 11,5 (SPSS® for Windows 11.5, Chicago, IL) programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki cinsiyet dağılımlarını değerlendirmek için Chi-square testi kullanıldı. Gruplardaki verilerin dağılımı için Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Talasemi ve kontrol grubunun karşılaştırılmasında bağımsız student t testi kullanıldı.  $\beta$ -talasemi hastalarının mutasyon tiplerine göre karşılaştırılması için Oneway ANOVA testi kullanıldı. Değerler mean  $\pm$  standart deviation olarak verildi. İstatistiksel olarak  $p < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi. Grafikler aynı istatistik programı kullanılarak pie cake ve boxplot ile yapıldı.

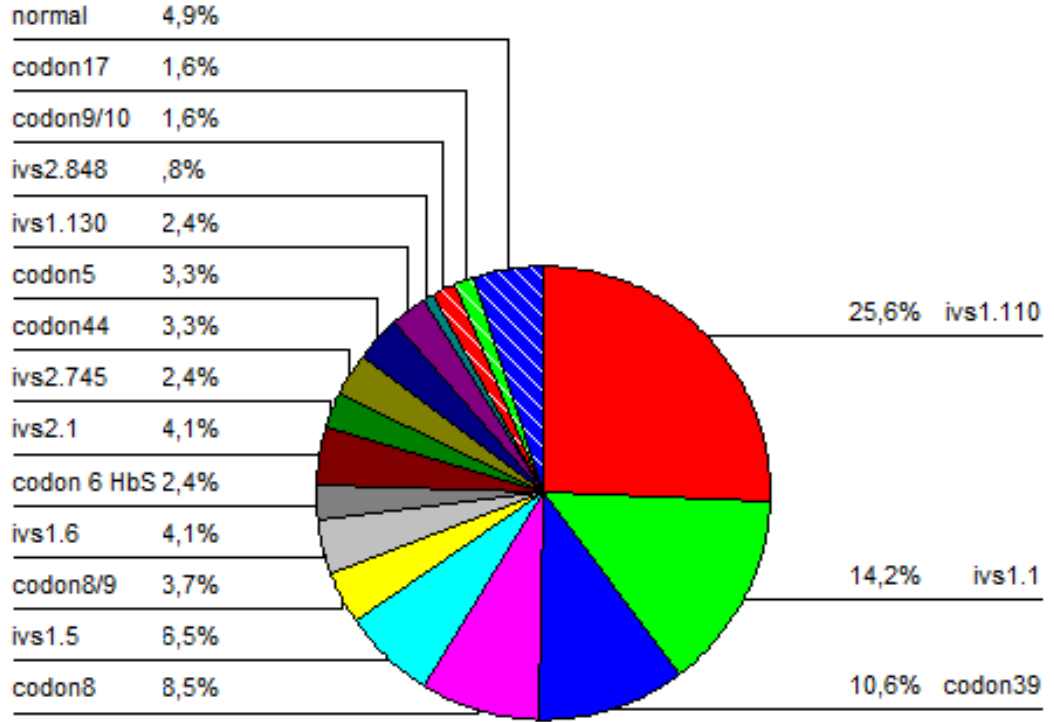
#### 4. BULGULAR

Tablo -5 Şanlıurfa bölgesinde görülen  $\beta$ -talasemi mutasyon sıklıkları

	Homozygote (%)	Heterozygote (%)	Total (%)
IVS 1.110 (G>A)	52 (21.1)	11(4.5)	63 (25.6)
IVS 1.1 (G>A)	28 (11.4)	7 (2.8)	35 (14.2)
codon 39 (C>T)	18 (7.3)	8 (3.3)	26 (10.6)
codon 8 (-AA)	16 (6.5)	5 (2.0)	21 (8.5)
IVS 1.5 (G>C)	12(4.9)	4 (1.6)	16 (6.5)
codon 5 (-CT)	8 (3.3)	0	8 (3.3)
codon 44 (-C)	8 (3.3)	0	8 (3.3)
IVS 2.1 (G>A)	10 (4.1)	0	10 (4.1)
codon 8/9 (+G)	6(2.4)	3 (1.2)	9(3.7)
IVS 1.130 (G>C)	6 (2.4)	0	6 (2.4)
IVS 1.6 (T>C)	8 (3.3)	2 (0.8)	10 (4.1)
IVS 2.745 (C>G)	4 (1.6)	2 (0.8)	6 (2.4)
IVS 2.848	2 (0.8)	0	2 (0.8)
codon 6 (A>T) HbS	2 (0.8)	4 (1.6)	6 (2.4)
codon6(G>A)HbC	0	0	0
codon 6 (-A)	0	0	0
-110 (C>T)	0	0	0
-87 (C>T)	0	0	0
-30 (T>A)	0	0	0
codon15 (TTG>TGA)	0	0	0
codon 27 (G>T) knossos	0	0	0
IVS 1.116 (T>G)	0	0	0
codon 9/10, (+T)	4 (1.6)	0	4 (1.6)
codon 17, (A>T)	4 (1.6)	0	4 (1.6)
Undetermined	12 (4.9)	NA	12 (4.9)
Total	200 (81.3)	46 (18.7)	246 (100)

Tablo-5'te ve Şekil-18'de görüldüğü gibi Şanlıurfa bölgesinde en yaygın görülen  $\beta$ -talasemi mutasyonu IVS1-110 (% 25.6) olarak tespit edildi. Bunu IVS1-1 (% 14,2), Codon39 (% 10,6), Codon 8 (% 8,5), IVS1-5 (6,5), IVS2-1 (% 4,1), IVS1-6 (% 4,1), Codon8/9 (3,7), Codon 5 (% 3,3), Codon 44 (% 3,3), IVS1-130 (% 2,4), Codon 6 HbS (% 2,4), IVS2-745

(%2,4), Codon 17 (%1,6), Codon 9/10 (%1,6), IVS 2.848 (%0,8), tanımlanmayan (%4,9) olarak belirlenmiştir.



Şekil-18: Şanlıurfa bölgesinde görülen  $\beta$ -talasemi mutasyon sıklıkları

Hasta ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet değerleri Tablo-6’de, ferritin, Fe ve kan sayımı değerleri Tablo-7’de ve bazı biyokimyasal parametreler Tablo-8’de özetlenmiştir.

Tablo 6:  $\beta$ -TM ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet değerleri dağılımı.

	Hasta (n:122)	Kontrol (n:126)	P değeri
Cinsiyet (E/K)**	67 / 55	65 / 61	0,641
Yaş (Yıl)*	7,43 $\pm$ 4,62	7,92 $\pm$ 3,28	0,332

Değerler Mean  $\pm$  SD olarak verilmiştir.

Tablo 7:  $\beta$ -TM hasta grubunun ferritin, Fe ve bazı kan sayımı değerleri (n=122).

HB (g/dL)	HCT (%)	RDW (%)	MCV (fL)	MCHC (g/dL)	MCH (pg/eritrosit)	Ferritin (ng/ml)	fe ( $\mu$ g/dl)
8,4 $\pm$ 1,4	26,7 $\pm$ 4,4	15,5 $\pm$ 3,9	79,6 $\pm$ 3,8	31,7 $\pm$ 1,1	25,2 $\pm$ 1,6	2922,1 $\pm$ 1468,6	197,8 $\pm$ 61,2

Değerler Mean  $\pm$  SD olarak verilmiştir.

Tablo 8:  $\beta$ -TM ve kontrol grubunun bazı serum biyokimyasal parametreleri.

	Hasta(n:122)	Kontrol(n:126)	p değeri
Üre (mg/dl)	25,71 $\pm$ 7,80	23,19 $\pm$ 5,77	<0,001
Kreatinin (mg/dl)	0,41 $\pm$ 0,97	0,51 $\pm$ 0,14	=0,004
ALT(U/L)	35,60 $\pm$ 11,50	16,67 $\pm$ 2,23	<0,001
AST(U/L)	38,37 $\pm$ 11,48	26,37 $\pm$ 6,33	<0,001

Değerler Mean  $\pm$  SD olarak verilmiştir. AST:Aspartat transaminaz, ALT:Alanin Transaminaz



Hasta ve kontrol grubu arasındaki farka bakıldığında talasemi hasta grubunun kontrol grubuna göre serum AST, ALT ve üre değerlerinin yüksek, kreatinin değerinin düşük olduğunu bulduk p değerleri sırayla  $p<0,001$ ,  $p=0,004$ ,  $p<0,001$ ,  $p<0,001$  hesaplandı.

Hasta ve kontrol grubunun eser element ve oksidatif stres parametreleri Tablo 9’da özetlenmiştir. Hasta ve kontrol grubuna ait değerlerin karşılaştırılmasında hastalarımızın TOS, OSI, LOOH, serüloplazmin ve Cu değerlerinin sağlıklı kontrol grubundan yüksek, Zn değerlerini ise düşük bulduk (p değerleri sırayla  $p<0,001$ ,  $p<0,001$ ,  $p=0,001$ ,  $p=0,001$ ,  $p<0,001$ ,  $p=0,004$ ). Serum TAK düzeyleri arasında anlamlı fark yoktu ( $p=0,354$ ) (Şekil-19,20,21,22,23,24).

Tablo 9:  $\beta$ -TM ve kontrol grubun eser element düzeyleri ve oksidatif stres parametrelerin karşılaştırılması.

	Hasta (n:122)	Kontrol (n:126)	p değeri
Cu ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )	180,27 $\pm$ 49,21	153,91 $\pm$ 37,38	<0.001
Zn ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )	142,90 $\pm$ 41,70	177,18 $\pm$ 41,81	<0.001
TOS ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L)	19,52 $\pm$ 5,65	17,51 $\pm$ 3,44	=0.001
TAK (mmol Trolox Eqv./L)	0,86 $\pm$ 0,15	0,88 $\pm$ 0,16	=0,354
OSI (Arbitrary Unit)	2,31 $\pm$ 0,74	2,03 $\pm$ 0,50	=0.001
LOOH ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L)	12,39 $\pm$ 3,46	11,01 $\pm$ 2,03	<0.001
Serüloplazmin (U/L)	637,22 $\pm$ 93,01	603,94 $\pm$ 86,76	=0,004

Değerler Mean  $\pm$  SD olarak verilmiştir. TOS:Toplam oksidan seviye,TAK: Toplam antioksidan kapasite, OSI: Oksidatif stres indeksi, LOOH: Lipit hidroperoksit.

$\beta$ -TM hastaların mutasyon tiplerine göre eser element düzeyleri ve oksidatif stres parametrelerin karşılaştırılması Tablo-10’da özetlenmiştir. Gruplar arasındaki dağılıma bakıldığında LOOH, Serüloplazmin ve Fe düzeyleri arasında anlamlı fark yoktu.

Serum TAK düzeyleri codon 39 (C>T), IVS 1.5(G>C) mutasyonu olan hastalarda IVS 1.110 (G>A) ve IVS 1.1 (G>A) mutasyonu olan hastalara göre, anlamlı oranda yüksekti, p değerleri sırasıyla  $p=0,05$ ,  $p=0,01$  ve  $p=0,03$ ,  $p=0,017$ .

Serum TOS düzeylerinde IVS 1. 5(G>C) mutasyonu olan hastalarda diğer tüm gruplara göre yüksekti, bu artış codon 39 (C>T) ve IVS 1.1(G>A) mutasyonu olan hastalara göre istatistiksel olarak anlamlıydı, p değerleri sırasıyla p=0,008, p=0,043.

Serum Cu düzeylerin codon 8 (-AA) mutasyonu olan hastalarda diğer gruplara göre en düşüktü, bu fark IVS 1.110 (G>A) ) ve codon 39(C>T) mutasyonu olan gruplara göre anlamlıydı, p değerleri sırasıyla p=0,012, p=0,011.

Serum Zn düzeyleri codon 8 (-AA) mutasyonu olan hastalarda codon 39(C>T) mutasyonu olan hastalara göre anlamlı düşük, IVS 1.5 (G>C) mutasyonu olan hastalarda da codon 39 (C>T), IVS 1.1 (G>A), codon 8 (-AA) ve IVS 1.110 (G>A) mutasyonu olan hastalara göre anlamlı yüksekti, p değerleri sırasıyla p=0,037, p=0,003, p=0,000, p=0,000, p=0,000 şeklindedir.

Mutasyon grupları içerisinde eser element düzeyleriyle ile oksidatif stres parametreleri arasında pozitif veya negatif korelasyon tespit edilmedi.

Tablo 10:  $\beta$ -TM hastaların mutasyon tiplerine göre eser element düzeyleri ve oksidatif stres parametrelerinin karşılaştırılması.

	<b>IVS 1.110 (G&gt;A) (n:37)</b>	<b>IVS 1.1 (G&gt;A) (n:21)</b>	<b>codon 39 (C&gt;T) (n:17)</b>	<b>codon 8 (-AA) (n:13)</b>	<b>IVS 1.5 (G&gt;C) (n:10)</b>	<b>p değeri</b>
Cu (mg/dl)	187,53±31,58 <sup>c*</sup>	180,21±23,92	191,88±48,04	158,74±39,64 <sup>h*</sup>	164,48±30,61	0,038
Fe (µg/dl)	192,94±59,78	196,48±66,63	196,27±65,21	170,46±60,57	210,78±49,21	=0,627
Zn (mg/dl)	134,66±34,93 <sup>d***</sup>	140,99±38,37 <sup>e***</sup>	149,86±34,48 <sup>h*1**</sup>	123,41±25,45 <sup>i***</sup>	190,94±28,55	=0,000
TOS (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv./L)	19,69±5,02	18,86±5,55 <sup>e*</sup>	17,52±3,369 <sup>**</sup>	19,07±3,16	22,53±4,67	=0,111
TAK (mmol Trolox Eqv./L)	0,85±,147 <sup>b***d*</sup>	0,80±0,17 <sup>e***g*</sup>	0,97±0,13	0,88±0,12	0,97±0,11	=0,002
OSİ (Arbutrary Unit)	2,39±0,762 <sup>b*</sup>	2,43±0,74 <sup>e*</sup>	1,84±0,51	2,18±0,40	2,3367±0,56	=0,052
LOOH (µmolH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv./L)	12,90±3,46	12,32±2,92	11,27±3,34	12,52±2,46	13,52±1,62	=0,350
Serüloplazmin (U/L)	627,04±86,55	634,15±84,43	649,75±124,99	631,06±78,21	636,86±52,64	=0,943

Değerler Mean ± SD olarak verilmiştir.

a: IVS 1.110(G>A) ve IVS 1.1(G>A) arasında anlamlı fark vardır

b: IVS 1.110 (G>A) ve codon 39(C>T) arasında anlamlı fark vardır

c: IVS 1.110 (G>A) ve codon 8(-AA) arasında anlamlı fark vardır

d: IVS 1.110 (G>A) ve IVS 1.5(G>C) arasında anlamlı fark vardır

e: IVS 1.1 (G>A) ve codon 39(C>T) arasında anlamlı fark vardır

f: IVS 1.1 (G>A) ve ve codon 8(-AA) arasında anlamlı fark vardır

g: IVS 1.1(G>A) ve IVS 1.5(G>C) arasında anlamlı fark vardır

h: codon 39(C>T) ve codon 8(-AA) arasında anlamlı fark vardır

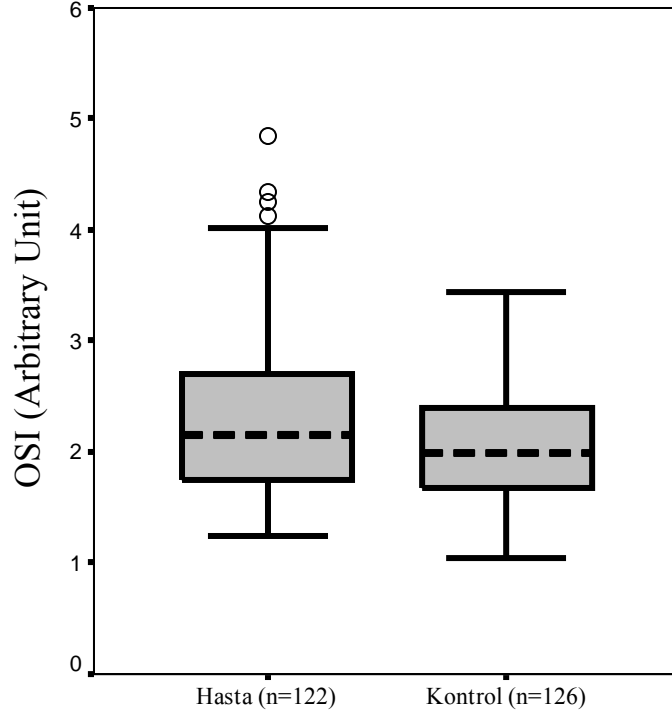
i: codon 39(C>T) ve IVS 1.5(G>C) arasında anlamlı fark vardır

j: codon 8(-AA) ve IVS 1.5(G>C) arasında anlamlı fark vardır

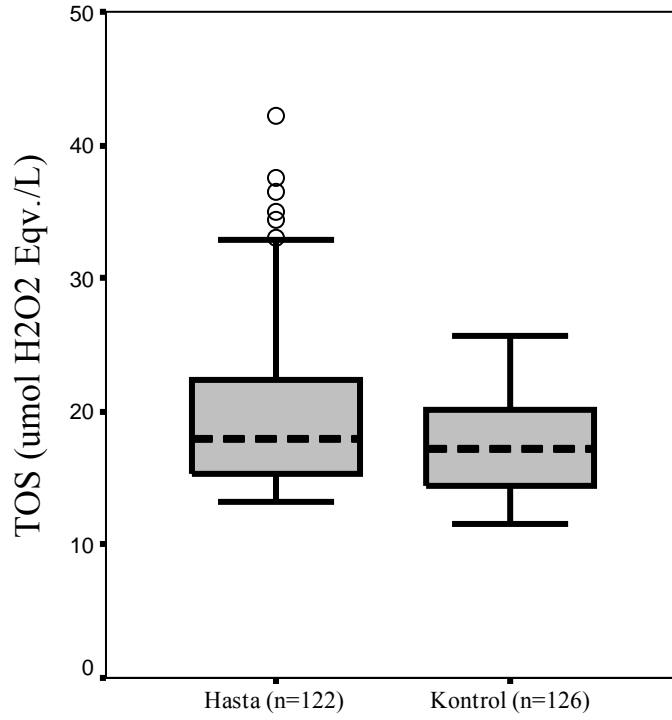
p<0,05:\*

p<0,01:\*\*

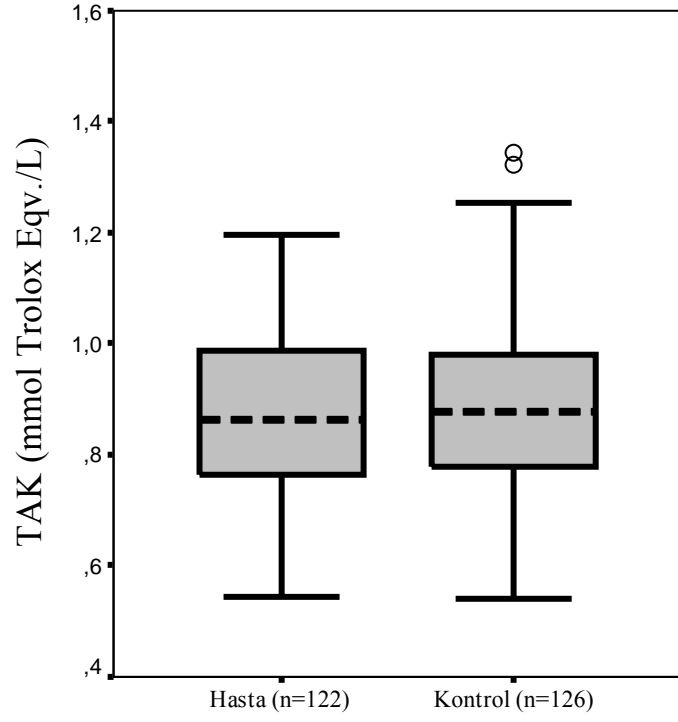
p<0,001:\*\*\*



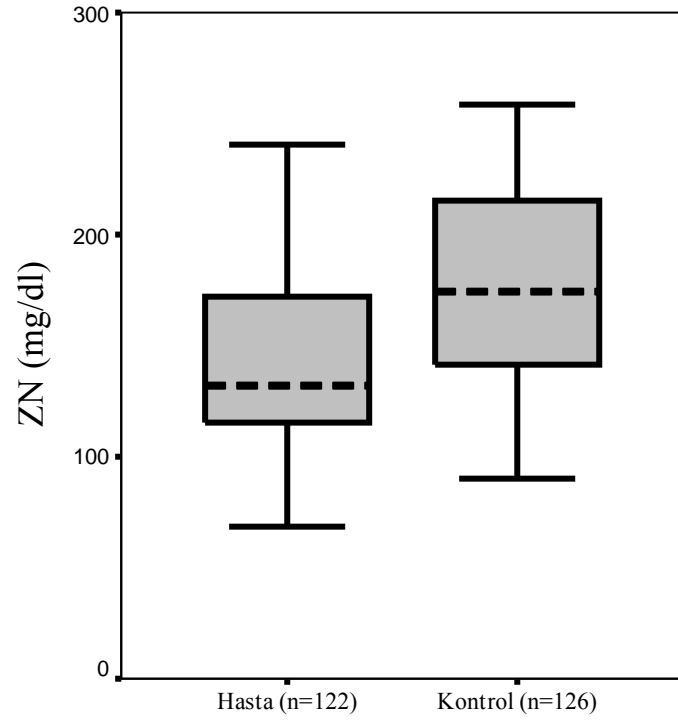
Şekil-19: Hasta ve kontrol grubu OSI düzeyleri.



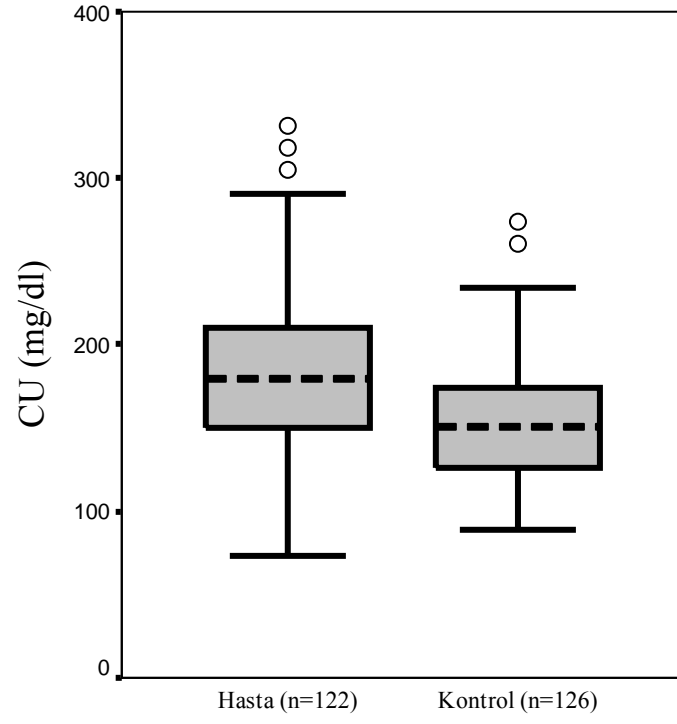
Şekil-20: Hasta ve kontrol grubu TOS düzeyleri.



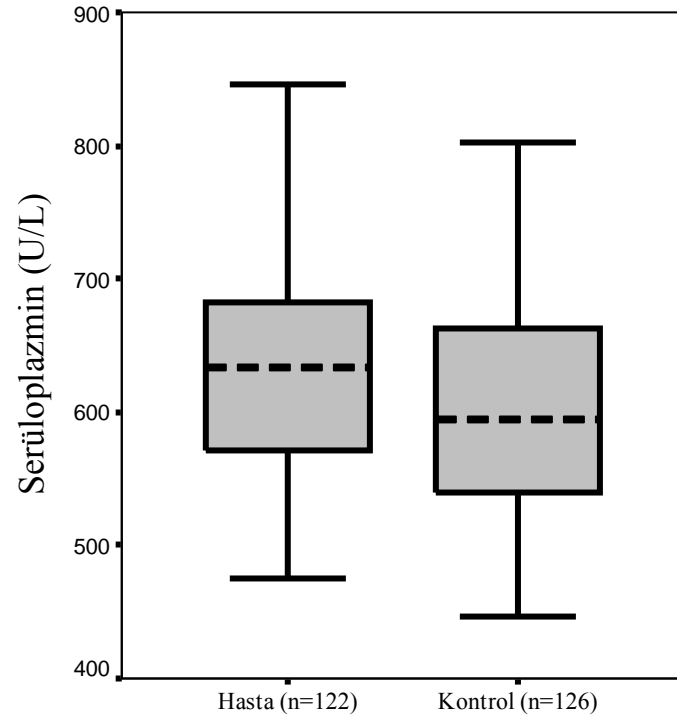
Şekil-21: Hasta ve kontrol grubu TAK düzeyleri.



Şekil-22: Hasta ve kontrol grubu Zn düzeyleri.



Şekil-23: Hasta ve kontrol grubu Cu düzeyleri.



Şekil-24: Hasta ve kontrol grubu serüloplazmin düzeyleri.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

$\beta$ -talasemiler çok geniş klinik çeşitlilik gösteren genetik geçişli hastalıklardır. Kısalmış eritrosit ömrü, hızlı demir döngüsü ve dokularda demirin birikimi, hastalığın patogenezinin sorumlu başlıca faktörlerdir (167,169). Normal koşullar altında plazmadaki demirin büyük kısmı transferrine bağlı şekilde taşınır ve hücrelerin yüzeyindeki transferrin reseptörleri aracılığı ile hücre içine alınır. Fakat demir yüklenmesinin geliştiği patolojik durumlarda, plazma demir düzeyleri transferrinin bağlama kapasitesini aşar ve transferrine bağlı olmayan demir artar. Bu demir, labil plazma demiridir ve indirgeyici reaksiyonlarda rol oynar. Matür eritrositler ve gelişmekte olan eritroid öncüller tarafından değişik yollarla hücre içine alınabilir. Hücre içinde artan labil plazma demiri de reaktif oksijen ürünlerinin artmasına ve antioksidan kapasitenin azalmasına yol açarak oksidatif stresin artmasına ve sonuç olarak birçok hücre bileşeninin hasarlanmasına yol açar (170,171).

Reaktivitesi yüksek olan  $Fe^{+2}$  iyonları, fenton ve haber weiss reaksiyonlarını katalizler ve reaktif oksijen ürünlerinin oluşumuna neden olurlar. Bu ürünler lipid peroksidasyonuna yol açarak potansiyel genotoksik yıkılma ürünlerinin (peroksil radikalleri, aldehytler) oluşumunu başlatırlar. Diğer taraftan demir yüklenmesi ile hücre membranında oksidatif hasar şeklinde başka bir patolojik mekanizma başlar (165).

Organik bileşiklerin oksijen ile spontan oksidasyonu sonucu oluşan, hücresele toksik bileşiklere karşı plazma ve dokularda bulunan antioksidan aktivitenin önemli bir bölümünü serüloplazmin ve transferrin göstermektedir (34). Serüloplazmin oksijen radikal ara ürünleri salınmaksızın ferro-oksidad aktivitesi göstererek  $Fe^{+2}$ 'i  $Fe^{+3}$ 'e okside eder. Böylece fenton reaksiyonunu ve serbest radikal oluşumunu inhibe eder. Demir ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonunu önleyici etki gösterir (13).

Talasemi major hastalarında demir yükü ile oksidatif stres ilişkisini değerlendiren çalışmalar yapılmıştır (141,165,167,169,172). Pavlova ve ark.ları, yaşları 5-21 yıl arasında değişen 22  $\beta$ -talasemili hastada lipid peroksidasyon ürünlerinin belirgin arttığını, buna

karşılık SOD enzimi ve total antioksidan aktivitenin ise belirgin azaldığını saptamışlardır. Sonuçta  $\beta$ -talasemili hastalarda serbest radikaller ve lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığını, antioksidan aktivitenin azaldığını ve bunun da oksidan stresi arttırdığını vurgulamışlardır (165). Pavlova ve ark.ları yaptıkları bu çalışmada  $\beta$ -talasemili hastalarda oksidatif strese bağlı TAK'de ki azalmanın, antioksidan enzimlerin yapımı-aktivasyonunda veya antioksidanların organlardan salınımında yetersizlikten kaynaklandığını ifade etmişlerdir (165). Kassab-Chekir ve ark.ları, yaşları  $8\pm 3,4$  yıl arasında değişen 56 transfüzyon bağımlı  $\beta$ -talasemili çocukta oksidan parametre olarak TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), antioksidan olarak TRAP (total peroxy radical-trapping antioxidant parameter), SOD (Süperoksit dismutaz), GPX (glutatyon peroksidaz) düzeylerine bakmışlardır. Araştırmacılar  $\beta$ -talasemili hastalarda SOD, GPx ve TBARS konsantrasyonunda artış, TRAP düzeyinde ise azalma saptamışlardır. Bu sonuca göre de serumdaki transferrine bağlı olmayan demirin ve intraselüler demir havuzunun peroksidatif hasarı indüklediğini öne sürmüşlerdir (167). Bunun yanında, eritrosit içinde fazla olan  $\alpha$ -globin zincirlerinin oksidasyonunun reaktif oksijen ürünlerinin oluşumuna yol açtığı, bunların da hem kaynaklı demir ile fenton reaksiyonu sonucu  $\text{OH}^-$  radikallerinin oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (141,169,172). Bizde bu çalışmamızda literatürle uyumlu olarak  $\beta$ -talasemili hastalarda oksidatif stresin anlamlı ölçüde arttığını, antioksidan kapasitenin ise anlamlı olmasada azaldığını tespit ettik. Önceki çalışmalardan farklı olarak mevcut çalışmamızda toplam oksidatif seviye ve toplam antioksidan kapasiteleri ölçerek oksidatif hasarı değerlendirdik.

Eritroid progenitörlerde gelişim süresince hemoglobin birikimi olur ve eritrositler yirmi günlük yaşam süreleri boyunca sürekli bir şekilde büyük miktarda oksijen taşırlar. Bu da onların yüksek oranda oksidatif strese maruz kalmalarına neden olur. Matür eritrositlerde nükleus yoktur ve oksidatif strese cevap olarak yeni proteinler sentez edemezler. Yaşamlarının erken döneminde sentez ettikleri proteinler ile kendilerini reaktif oksijen ürünlerinden korumak zorundadırlar. Bu antioksidan proteinler; membran oksidoredüktazlar, selüler antioksidanlar olarak katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon sistemidir. Ancak eritrosit ömrünü ve oksidatif strese cevabı düzenleyen faktörler çok açık değildir (174).

$\beta$ -talasemi hastalarında artmış süperoksit dismutaz aktivitesi  $\text{O}_2^-$  radikalinin parçalanmasını sağlarken bir yandan da daha fazla  $\text{H}_2\text{O}_2$  oluşumuna neden olur. Artmış



glutasyon peroksidaz aktivitesi de OH<sup>-</sup> radikallerini etkisizleştirir. Araştırmacılar bu bilgiler çerçevesinde hücre içerisindeki yüksek demirin neden olduğu oksidatif strese cevap olarak antioksidan enzimlerin aktivitesinin arttığını fakat bu kompensatuar mekanizmanın yetersiz olduğunu ve oksidatif zedelenme ile ilgili biyokimyasal göstergelerin yükseldiğini ileri sürmüşlerdir (167,168).

Naithani ve arkadaşları,  $\beta$ -talasemi majorlu 50 çocuk hastada yaptıkları çalışmada ortalama serum demirini  $183 \pm 89$   $\mu\text{g/ml}$ , ferritin düzeyini  $3709 \pm 1625$   $\text{mg/dl}$  olarak bulmuşlar ve kan örneklerinde sağlıklı kontrollere göre MDA, süperoksid dismutaz ve nitrik oksit düzeylerinin yüksek, antioksidan olan glutasyon peroksidaz düzeyinin düşük, glutasyon düzeyinin benzer olduğunu göstermişlerdir (169). Bunun yanında serum ferritini ile oksidatif stres belirleyicileri arasında pozitif korelasyon, glutasyon peroksidaz arasında negatif korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Bunun tersine Cheng ve arkadaşları (175) ise uzun süreli oksidatif strese maruziyet sonucu süperoksid dismutaz düzeyinin azaldığını rapor etmişlerdir. Chakroborty ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, sağlıklı kontrollere göre talasemik eritrositlerde glutasyon peroksidaz ve süperoksid dismutaz aktivitelerinin yüksek, redükte glutasyon düzeyinin ise önemli ölçüde düşük olduğunu rapor etmişlerdir (173).

Eritrositlerde lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA'nın karbonil grupları oldukça reaktiftir. Bu gruplar protein ve fosfolipidlerin amino grupları ile çapraz bağlar yapma yeteneğine sahiptir. Çapraz bağlanmadan sonra MDA'dan zengin, membranı hasarlanmış eritrositler dalak tarafından ortadan kaldırılır. Araştırmacılar, talasemik eritrositlerin demir şelatörü ile maruz bırakılmasından sonra MDA miktarının azaldığını göstermişler ve MDA'nın tipik olarak demir aracılı oksidatif hasarın ürünü olduğunu göstermişlerdir (173). Livrea ve arkadaşları, ortalama ferritin düzeyini  $1866 \pm 996$   $\text{ng/ml}$  olan 42  $\beta$ -talasemi majorlu olguda konjuge dien ve MDA düzeylerinin artmış, TAK düzeylerinin azalmış olduğunu ve ferritin düzeyi ile MDA arasında pozitif korelasyon olduğunu saptamışlardır (150). Özetlemeye çalıştığımız çalışmalardan anlaşıldığı üzere  $\beta$ -talasemideki patolojik değişikliklerin temel mekanizmalarından biri oksidatif stres gibi görünmektedir.

Vücutta reaktif oksijen türlerinin düzeylerini kontrol altında tutmak ve oluşturabilecekleri hasarları engellemek için savunma mekanizmalarından biri de antioksidan

vitaminlerdir. Cheng ve ark.ları A, C ve E vit'i düzeylerinin  $\beta$ -talasemi hastalarında belirgin azaldığını belirtmişlerdir (175). Serbest radikallerin membran fosfolipidleri üzerindeki etkisini sonlandırmada rol alan SOD gibi enzimleri destekleyen, doğal antioksidan, E vit'i talasemik hastalarda daha sıklıkla çalışılmıştır. E vit'inin talasemik hastalarda azaldığı ve E vit'ini suplementasyonu ile oksidatif rezistansın arttığı gösterilmiştir (150).

Toplam antioksidan kapasitenin ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler vermektedir. Bu yüzden kanın antioksidan durumunu saptamada, bireysel antioksidanlardan çok bunların toplam antioksidan değerini veren toplam antioksidan kapasite ölçümü yaygınlaşmaktadır (138). Sema Koc ve ark. tarafından yapılan araştırmada sık enfeksiyonlara neden olan kronik adenotonsillitli hastalarda ameliyat öncesi serum paraoksanaz, arilesteraz, TAK, TOS ve OSİ düzeylerinin ameliyat sonrası ve kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu vurgulanmıştır (163).

Biz de talasemi hastalarının oksidan-antioksidan durumunu değerlendirmek üzere toplam oksidan-antioksidan kapasite ölçümü yapmayı tercih ettik. Çalışmamızda yukarıda özetlemiş olduğumuz çalışmalar ile uyumlu şekilde hastalarımızın TOS, OSİ, LOOH ve serüloplazmin değerlerini sağlıklı kontrol grubundan belirgin yüksek TAK değerleri ise anlamlı oranda değil fakat düşük bulduk.  $\beta$ -talasemi hasta gurubunun kontrol gurubuna göre serum AST, ALT ve üre değerlerinin yüksek, kreatinin değerinin düşük olduğunu bulduk.

Antioksidan sistem oksidatif hemolize karşı koruyucu özellikleri olan savunma mekanizmasıdır. Yapılan çalışmalarda orak hücreli anemi ve diğer hemolitik anemilerde oksidatif stresi nötralize etmek için artan ihtiyaç nedeni ile hidrofilik ve hidrofobik antioksidanlar azalmaktadır (170). Talasemik hastalarında da süperoksid dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinin artması oksidatif hasarı önlemede yetersiz kalmakta ve antioksidan kapasitesi azalmaktadır (167). Talasemilerde TAK düzeyinin azaldığı bilimsel veriler ile ispatlanmıştır (155,89,172,173). Bu bilgiler ile de uyumlu şekilde çalışmamızda sağlıklı kontrol grup ile kıyaslandığında talasemik hastalarda oksidan seviyenin anlamlı derecede yüksek, antioksidan kapasitenin ise anlamlı olmasada düşük olduğu gösterilmiştir.

SOD enziminin aktivitesi için esansiyel elementlerden olan Cu ve Zn, CAT enziminin de yapısında yer alan Fe, antioksidan sisteme önemli katkıda bulunurlar. Cu aynı zamanda GSH ile ilişkili bir elementtir. Eritrositlerde Cu transportunda GSH önemli rol oynamaktadır. GSH yapısında bulunan SH grupları birçok metale affinite göstermekte, metallerin reaksiyona girmesini azaltabilir ya da konjugat oluşturarak hücre dışına atılmalarına neden olabilir (176). Cu, Fe'in bağırsaklardan emilimini ve dokulardan plazmaya dağılımını etkilemektedir. Ayrıca Fe'in Hb oluşumunda kullanılabilmesi ve eritrosit yapımı için gerekli bir elementtir. Zn metabolik olaylarda protein, karbonhidrat, enerji, nükleik asit, lipid ve hem sentezinde, gen ekspresyonu, doku sentezi ve embriyogenezde önemli roller üstlenmiştir (6). Ayrıca Zn hücre membranı ve damar endotelinin stabilizasyonunu sağlamaktadır. Redoks aktivitesi olmadığı için bağlandığı proteini dayanıklı hale getirir. Oysaki redoks aktif metaller olan Fe ve Cu RNA ve DNA'ya kilitlenir ve radikal reaksiyonları başlatır ve bu reaksiyonlar nükleik asitlerin hasara uğramasına neden olur. Cu ve Fe hidroksil radikal oluşumunu arttırarak lipid peroksidasyonuna neden olurken, Zn lipid peroksidasyonunu engelleyen bir metal olarak görev almaktadır. Redoks aktif geçiş metallerinden olan Fe ve Cu oksidatif hasarı arttırdığını gösteren ya da eksikliklerinde antioksidan savunmanın azaldığını gösteren bulgular mevcuttur (179,180.).  $\beta$ -talasemili hastalarda demir yüklemesi sonucunda serum Fe konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak hücre ve organel membranlarında peroksidatif hasarın arttığı gösterilmiştir (150). Beydoğan ve ark. demir eksikliği anemisi tanısı konmuş bir hastada Fe ve Zn preparatı tedavisi ile anemi tablosunun düzeldiğini tespit etmişlerdir (178). Oktem ve ark. yaptıkları çalışmada çocuklarda beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak hematolojik parametreler ile Fe ve Zn elementleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır (177). Sosyoekonomik düzeyleri iyi olan çocuklarda sosyoekonomik düzeyleri kötü olan çocuklara göre Fe ve Zn düzeyleri ile hematokrit değerlerinin anlamlı olarak yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Hematolojik parametreler ile eser elementler arasında herhangi bir ilişki gösterilmemiştir. Ayrıca gastrointestinal sistemden Zn absorpsiyonu Cu ile yarışma halindedir. Çalışmamızda  $\beta$ -talasemi major hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hastalarda Zn miktarının azaldığı, Cu miktarlarının da arttığı görüldü. Ayrıca hasta ve kontrol grubunda serum serüloplazmin ile serum Cu düzeyleri arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır. Zn, ve Cu düzeylerindeki bu değişikliklerin artan oksidatif strese kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda ayrıca literatürde ilk olarak  $\beta$ -talasemi major mutasyonu olan hastaları mutasyon tiplerine göre gruplandırarak eser element düzeyleri ve oksidatif stres bakımından gruplar arasındaki farklılıkları inceledik.

Elde edilen verilere göre LOOH, Serüloplazmin ve Fe düzeyleri arasında anlamlı fark yoktu. Serum TAK düzeyleri codon 39 (C>T), IVS 1.5(G>C) mutasyonu olan hastalarda IVS 1.110 (G>A) ve IVS 1.1 (G>A) mutasyonu olan hastalara göre anlamlı oranda yüksekti. Serum TOS düzeylerinde IVS 1.5(G>C) mutasyonu olan hastalarda diğer tüm gruplara göre yüksekti.

Serum Cu düzeyleri codon 8 (-AA) mutasyonu olan hastalarda diğer gruplara göre en düşüktü, bu fark IVS 1.110 (G>A) ) ve codon 39(C>T) mutasyonu olan gruplara göre anlamlıydı, Serum Zn düzeyleri codon 8 (-AA) mutasyonu olan hastalarda codon 39(C>T) mutasyonu olan hastalara göre anlamlı düşük, IVS 1.5 (G>C) mutasyonu olan hastalarda da codon 39 (C>T), IVS 1.1 (G>A), codon 8 (-AA) ve IVS 1.110 (G>A) mutasyonu olan hastalara göre anlamlı yüksekti.

Şanlıurfa yöresinde en sık rastlanan  $\beta$ -talasemi tipi olan IVS 1.110 (G>A) mutasyonuna sahip hastalarda serum TAK düzeyleri IVS 1.1 (G>A) mutasyonu olan grup hariç codon 39 (C>T), codon 8 (-AA) ve IVS 1.5 (G>C) mutasyonlu gruplara göre en düşüktü ( $p<0,005$  hepsi için). Ayrıca OSİ değerleri yine IVS 1.110 (G>A) grubumuzda IVS 1.1 (G>A) mutasyonu olan grup hariç en yüksekti. Dolayısıyla bu bulgularımız ışığında oksidatif stresin en yaygın görülen mutasyon tipi olan IVS 1.110 (G>A) grubumuzda daha şiddetli olduğunu düşünebiliriz. Ayrıca eser elementler açısından yine istatistiksel açıdan hepsinde anlamlı olmasada codon 39 (C>T) hariç en yüksek Cu seviyeleri codon 8 (-AA) hariç en düşük Zn seviyeleride yine bu grubumuzda tespit edildi.

Mutasyon grupları içerisinde eser element düzeyleriyle ile oksidatif stres parametreleri arasında pozitif veya negatif korelasyon tespit edilmedi.

$\beta$ -talasemi için homozigot ve birleşik heterozigot durumlarında klinik seyir değişken olsa da, transfüzyon almayan vakaların büyük bir çoğunluğunda yaşamının ilk birkaç yılında

ölüm meydana gelir. Yeterli transfüzyon, şelasyon ajanlarının uygulanması, desferrioksamin ile çocuklar büyüyüp gelişebilir ve yaşam süreleri yetişkin döneme kadar uzayabilir. Desferrioksamin dezavantajı devamlı infüzyon pompasıyla verilmesi ve pahalı olmasıdır. Yoksul ülkelerin tamamında ilaçlar ücretsiz elde edilse de çoğu hastanın yetersiz dozajda aldığı görülmektedir ve bunların çoğu aşırı demir yüklenmesinin etkilerinden dolayı çocukluk ve adölesan dönemde ölmektedir (27). Hemoglobino patilerin önlenmesinde en etkin yöntemler taşıyıcıların tespit edilmesi, taşıyıcılara genetik danışma verilmesi ve prenatal tanı metodlarının kullanılması ile hemoglobino patili bebek doğumunun önlenmesidir (166). Akdeniz toplumlarında antenatal tanı programları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun başarısı hastalık hakkında halk eğitim programlarının mükemmelliği ve devamında antenatal tanı için etkin tarama rejimleri ve kolaylıklarının geliştirilmesine bağlıdır. Dini, kültürel, kurumsal ve ekonomik nedenlerden dolayı bu tür programların, Hindistan ve Güneydoğu Asya'nın büyük popülasyonlarında uygulanması çok daha zor olabilir. Bir başlangıç olarak, eğitim programları geliştirilmeli, gönüllü tabanlı taşıyıcı taramaları kolaylıkla desteklenmelidir. Ülkelerin bunları takip etmesi, geliştirilmiş popülasyon kontrol programlarının oluşturulmasında temel yaklaşımı oluşturur (27).

Şanlıurfa bölgesindeki mutasyon sıklığı diğer bölge illerinin birçoğunda yapılan çalışmalarla uyumlu olarak görülmüştür. Şanlıurfa bölgesinde de en sık talasemi mutasyon tipi IVS1-110 olarak tespit edilmiştir bunun yanında en sık ikinci mutasyon Antalya'da IVS1-6, Isparta bölgesinde IVS2-1 yayınlanmışken, Şanlıurfa ve Denizli'de IVS1-1, olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; daha önce yapılmış çalışmalarla uyumlu olarak bu çalışmada  $\beta$ -talasemili olgularımızda oksidan-antioksidan sistem değerlendirmesinde oksidatif sistem parametrelerinden TOS, OSI ve LOOH düzeylerinin kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı, antioksidatif sistem parametrelerinden TAK düzeylerinin ise istatistiksel açıdan anlamlı olmasada azaldığı saptandı. Yine bir antioksidan olan ve aynı zamanda plazmada hem Cu bağlama hem de akut faz reaktanı olma özelliği gösteren serüloplazmin düzeyleride taleemili hasta grubunda kontrole göre yüksek bulundu. Yine bulgularımız ışığında oksidatif stresin Şanlıurfa yöresinde en yaygın görülen mutasyon tipi olan IVS 1.110 (G>A) grubumuzda daha şiddetli olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca eser elementler açısından mutasyon

tiplerinin ilk kez mukayese edildiği bu çalışmada yine istatistiksel açıdan hepsinde anlamlı olmasada codon 39 (C>T) hariç en yüksek Cu seviyeleri, codon 8 (-AA) hariç en düşük Zn seviyeleride yine bu grubumuzda tespit edildi.

$\beta$ -talasemili hastalarda tespit ettiğimiz yüksek oksidatif stres durumundan dolayı bu çalışmada bulgularımız ışığında, hastalara doğal veya sentetik antioksidanlarla esas tedaviye destek tedavilerin verilmesinin oksidatif stresi azaltacağını veya önleyebileceğini, böylece tedavi etkinliğinin artabileceğini düşünmekteyiz.

## 6. KAYNAK

1. Kayışlı ÖG, Keser İ, Canatan D, Şanlıoğlu A, Özeş ON, Lüleci G. Turk J Med Sci. 2005; 35: 175–177.
2. Yıldız S, Atalay A, Bağcı H, Atalay EÖ. Beta-thalassemia mutations in Denizli province of Turkey. Turk J Hematol. 2005; 22: 19-23.
3. Keser İ, Manguoğlu E, Kayışlı ÖG, Kurt F, Mendilcioğlu İ, Şimşek M, Bağcı G, Küpesiz A, Lüleci G. Prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia in the Antalya Province. Turk J Med Sci, 2005; 35: 251–253.
4. Kılınç Y. Hemoglobinopathies in Turkey. Turk J Hematol, 2006; 23: 214-216.
5. Altay Ç. The Frequency and Distribution Pattern of  $\beta$ -thalassemia Mutations in Turkey. Turk J Hematol, 2002; 19: 309–315.
6. O'Dell BL. Zinc plays both structural and catalytic roles in metalloproteins. Nutr Rev. 1992; 50:48-50. Review.
7. Gutteridge JMC. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. FEBS Lett. 1986; 201:291-295.
8. Aydemir B, Kızıler AR, Onaran I, et al. Impact of Cu and Fe concentrations on oxidative damage in male infertility. Biol Trace Elem Res. 2006; 112:193-204.
9. Vives Corrons JL, Miguel-Garcia A, Pujades MA, et al. Increased susceptibility of microcytic red blood cells to in vitro oxidative stress. Eur J Haematol. 1995; 55:327-331.
10. Çakmak A, Söker M, Koç A, Erel Ö. Paraoxonase and arylesterase activity with oxidative status in children with thalassemia major. J Pediatr Hematol. 2009;31:583-587.
11. Buege JA, Aust SD; Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1978;52:302-310.

12. Şimşek F. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipit peroksidasyonu. Türkiye Klinikleri J Pediatr. 1999; 8:42-47.
13. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi. 1997; 3-4:92-95.
14. Tüzmen S, Tadmouri, GO, Ozer A, Baig SM, Ozçelik H, Basaran S, Basak AN. Prenatal Diagnosis of  $\beta$ -Thalassaemia and Sickle Cell Anaemia in Turkey. Prenat Diagn 1996; 16: 252-258.
15. Günçağ D. Hemolitik Anemiler. Klinik Hematoloji. Dinçol G, Pekçelen Y, Atamer T, Sargın D, Nalçacı M, Aktan M, Beşışık SK (editör) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 2003; s: 87-152.
16. Weatherall DJ. Disorders of globin synthesis: The thalassemys. Williams Hematology, 7 nd Ed. In Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT (eds). New York: McGraw-Hill, 2006; pp: 633-666.
17. Flint J, Harding SM, Boyce AJ, Clegg JB. The population genetics of the haemoglobinopathies. Baillieres Clin Haematol 1993; 6: 215-262.
18. Akar E, Özdemir S, Hakki Timur I, Akar N. First observation of homozygous hemoglobin hamadan (B 56 (D7) GLY-ARG) and beta thalassaemia (-29 G>A)-hemoglobin Hamadan combination in a Turkish family. Am J Hematol. 2003;74: 280-282.
19. Higgs DR. Gene Regulation in Hematopoiesis: New Lessons from Thalassaemia. Hematol 2004; 1: 1-13.
20. Olivieri NF. The  $\beta$ -Thalassemys. Medical Progress. 1999; 341: 99-109.
21. Rachmilewitz EA, Kornberg A, Acker M. Vitamin E deficiency due to increased consumption in  $\beta$ -thalassaemia and in Gaucher's disease. Ann NY Acad Sci. 1982; 393: 336-347.
22. Weatherall D. The Thalassemys: The Role of Molecular Genetics in an Evolving Global Health Problem. Am J Hum Genet. 2004; 74: 385-392.



23. Fathallah H, Atweh FG. DNA hypomethylation therapy for hemoglobin disorders: Molecular mechanisms and clinical applications. *Blood Reviews*. 2006; 20: 227-234.
24. Yurter HE. İnsan genomu. Thompson & Thompson Tıbbi Genetik, 6. baskı, Türkçe çeviri. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF (editör). Ankara, Güneş Kitabevi. 2005; s:17-31.
25. Aktaş D. Moleküler hastalığın ilkeleri: hemoglobinopatilerden dersler. Thompson & Thompson Tıbbi Genetik, 6. baskı, Türkçe çeviri. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF (editör). Ankara, Güneş Kitabevi. 2005; s: 181-201.
26. Başak AN. Talasemi Moleküler Genetiği. Türk Hematoloji Derneği Temel Moleküler Hematoloji Kursu, 12-13 Mart 2005; 99-106.
27. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ*. 2001; 79: 704-712.
28. Makhoul NJ, Wells RS, Kaspar H, Shbaklo H, Taher A, Chakar N, Zalloua PA. Genetic Heterogeneity of Beta Thalassemia in Lebanon Reflects Historic and Recent population Migration. *Ann Hum Genet*. 2005; 69: 55-56.
29. Kutlu M, Çekmiş H, Başak M, Osman N, Açıkgöz Ö, Sevindir İ, Özcan ZÖ. Talasemiler. *Bakırköy Tıp Dergisi*. 2006; 2: 33-40.
30. Thein SL.  $\beta$ -Thalassaemia Prototype of a Single Gene Disorder with Multiple Phenotypes. *Int J Hemato l*. 2002; 76: 96-104.
31. Orkin SH, Nathan DG. The Thalassemias. In: Nathan DG, Orkin SH (eds), Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998; 811-886.
32. Apak H. Hemoglobinopatiler ve Talasemiler. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Anemiler Sempozyumu, 19-20 Nisan 2001, İstanbul,s:149-162.
33. Borgna-Pignatti C, Galanello R. Thalassemias and Related Disorders: Quantitative Disorders of Hemoglobin Synthesis. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN Rodgers GM,

- Paraskevas F, Glader B. (eds). Wintrobe's Clinical Hematology, eleventh ed, Vol 1, Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins, 2004; 1319-1365.
34. Hellman, N.E., Gitlin, J.D.: Ceruloplasmin metabolism and function, *Annu. Rev. Nutr.*, 22: 439-458, 2002.
35. Aksoy M. Türkiye'de Talaseminin tarihçesine kısa bir bakış. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. 1991; 34:1-8.
36. Lanzkowsky P. Hemolytic anemia. In: Lanzkowsky P (ed), *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. 4th ed. California: Elsevier Academic Press, 2005; 136-198.
37. Aydınok Y. Beta Talasemi. *Eritrosit Hastalıkları Tanı ve Tedavi El Kitabı*, 2007, s: 41-46.
38. Miniero R, Canducci E, Ghigo D, et al. Vitamin E in beta-thalassemia. *Acta Vitaminol Enzymol*. 1982; 4:21-25.
39. Tadmouri GO, Tüzmen Ş, Özçelik H, Özer A. Molecular and population genetic analyses of  $\beta$ -Thalassemia in Turkey. *American Journal of Hematology*. 1998; 57:215-220.
40. Cao A, Saba L, Galanello MD, Rosatelli MC. Molecular diagnosis and carrier screening for beta thalassemia, *JAMA*. 1997; 278: 1273-1277.
41. Lukens JN. Abnormal hemoglobins: General Principles. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B (eds). *Wintrobe's Clinical Hematology*, 11th ed, Vol 1, Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins, 2004; 1247-1262.
42. Seymen O, Seven A, Hatemi S, Hatemi H, Candan G, Yiğit G. Lipid peroxidation in experimental hyperthyroidism: effects of iron supplementation. *Med Sci Res*. 1995; 23: 695-696.
43. [http://www.medicine.ankara.edu.tr/internal\\_medical/pediatrics/molgen/index.php?PgId=77](http://www.medicine.ankara.edu.tr/internal_medical/pediatrics/molgen/index.php?PgId=77)
44. Gümrük F, Altay Ç. Talasemiler. *Katkı Pediatri Dergisi*. 1995; 3:307-326.

45. Kern WF. PDQ Hematoloji. Ferhanoğlu F (Çev). Kalıtsal Hemoliik Anemiler: Hemoglobinopatiler, Talasemiler, Enzim Eksiklikleri ve Membran Bozuklukları. İstanbul Medikal Yayıncılık, 2005,s:77-113.
46. Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Piga A, Di Gregorio F, Gamberini MR, Sabato V, Melevendi C, Cappellini MD, Verlato G. Survival and disease complications in thalassemia major. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 850: 227-31.
47. Engle MA. Cardiac involvement in Cooley's anemia. *Ann N Y Acad Sci.* 1964; 119:694.
48. Yeşilipek MA. Talasemi Tedavisindeki Gelişmeler. *Güncel Pediatri.* 2005; 3:47-48.
49. Wolman IJ. Transfusion therapy in Cooley's Anemia: Growth and Health as related to Long-range Hemoglobin levels. A progress report. *Ann N Y Acad Sci.* 1964; 119: 736-47.
50. Aydınok Y. Clinical management of thalassemia. *Turkish Journal of Hematology* 2006; 23:13-21.
51. Piomelli S, Karpatkin MH, Arzianian M, Zamani M, Becker MH, Geneiser N, Danoff SJ, Kuhns WJ. Hypertransfusion regimen in patients with Cooley's anemia. *Ann N Y Acad Sci.* 1974; 232: 186-92.
52. Propper RD, Button LN, Nathan DG. New approaches to the transfusion management of thalassemia. *Blood.* 1980; 55: 55-60.
53. Canatan D. Talasemi trasfüzyonunda Prensipler. In: Talasemi ve Hemoglobinopatiler Tanı ve Tedavi . Canatan D, Aydınok Y (eds). Retma Matbaa Ltd. Antalya, 2007,s: 101-107.
54. Michail-Merianou V, Pamphili-Panousopoulou L, Piperi-Lowes L, Pelegrinis E, Karaklis A. Alloimmunization to red cell antigens in thalassemia: comparative study of usual versus better-match transfusion programmes. *Vox Sang.* 1987; 52: 95-8.
55. Collins AF, Gonçaves-Dias C, Haddad S, Talbot R, Herst R, Tyler BJ, Zuber E, Blanchette VS, Olivieri NF. Comparison of a transfusion preparation of newly formed red cells and standard washed red cell transfusions in patients with homozygous beta-thalassemia. *Transfusion.* 1994; 34: 517-20.

56. Berdoukas VA, Kwan YL, Sansotta ML. A study on the value of red cell exchange transfusion in transfusion dependent anaemias. *Clin Lab Haematol.* 1986; 8: 209-20.
57. Kresie L. Artificial blood: an update on current red cell and platelet substitutes. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2001; 14: 158-61.
58. Aydınok Y. Talasemide demir yükü ve şelasyon. In: *Talasemi ve Hemoglobinopatiler Tanı ve Tedavi*. Canatan D, Aydınok Y (eds). Antalya; Retma Matbaa Ltd. 2007; 159-173.
59. Porter JB, Jaswon MS, Huehns ER, East CA, Hazell JW. Desferrioxamine ototoxicity: evaluation of risk factors in thalassaemic patients and guidelines for safe dosage. *Br J Haematol.* 1989; 73: 403-9.
60. Origa R, Bina P, Agus A, Crobu G, Defraia E, Dessì C, Leoni G, Muroli PP, Galanello R. Combined therapy with deferiprone and desferrioxamine in thalassemia major. *Haematologica.* 2005 ; 90: 1309-14.
61. Cohen AR, Galanello R, Piga A, Dipalma A, Vullo C, Tricta F. Safety profile of the oral iron chelator deferiprone: a multicentre study. *Br J Haematol* 2000; 108: 305-12.
62. Wonke B, Wright C, Hoffbrand AV. Combined therapy with deferiprone and desferrioxamine. *Br J Haematol.* 1998; 103: 361-4.
63. Breuer W, Ermers MJ, Pootrakul P, Abramov A, Hershko C, Cabantchik ZI. Desferrioxamine-chelatable iron, a component of serum non-transferrin-bound iron, used for assessing chelation therapy. *Blood.* 2001; 97(3):792-8.
64. Glickstein H, El RB, Link G, Breuer W, Konijn AM, Hershko C, Nick H, Cabantchik ZI. Action of chelators in iron-loaded cardiac cells: Accessibility to intracellular labile iron and functional consequences. *Blood.* 2006; 108(9):3195-203.
65. Graziano JH, Piomelli S, Hilgartner M, Giardina P, Karpatkin M, Andrew M, LoIacono N, Seaman C. Chelation therapy in beta-thalassemia major. III. The role of splenectomy in achieving iron balance. *J Pediatr.* 1981; 99(5):695-9.

66. Anak S, Yeşilipek A. Talasemi’de kemik iliği transplantasyonu. In: Talasemi ve Hemoglobinopatiler Tanı ve Tedavi. Canatan D, Aydınok Y (eds). Antalya; Retma Matbaa Ltd. 2007, s:231-242.
67. Kan YW, Golbus MS, Klein P, Dozy AM: Successful application of prenatal diagnosis in a pregnancy at risk for homozygous beta thalassemia. N Eng J Med. 1975; 292: 1096-1099.
68. Cooley TB, Witwer ER et al. Anemia in children with splenomegaly and peculiar changes in the bones. Report of cases. Am J Dis Child. 1927; 34:347.
69. Fessas P. Inclusions of hemoglobin in erythroblasts and erythrocytes of thalassemia. Blood. 1963; 21:21.
70. Nathan DG. Thalassemia as a proliferative disorder. Medicine. 1964; 43:779.
71. Günçağ D, Pekçelen Y, Atamer T. Talasemi. In: Günçağ D (Editör) Klinik Hematoloji, İstanbul; Nobel Matbaacılık, 2003; 137-147.
72. Yuan, D.S., Stearman, R., Dancis, A., Dunn, T., Beeler, T., Klausner, R.D.: The Menkes / Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin like oxidase required for iron uptake, Proc. Natl. Acad. Sci., 92: 2632-2636, 1995
73. Offer T, Bhagat A, Lal A, Atamna W, Singer ST, Vichinsky EP, Kuypers FA, Ames BN. Measuring chromosome breaks in patients with thalassemia. Ann NY Acad Sci. 2005; 1054: 439-44.
74. Olivieri NF, Brittenham GM. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. Blood. 1997; 89:739–61.
75. Cohen AR, Glimm E, Porter JB. Effect of transfusional iron intake on response to chelation therapy in  $\beta$ -thalassemia major. Blood. 2008; 111(2): 583–587.
76. Pootrakul P, Kitcharoen K, Yansukon P, et al. The effect of erythroid hyperplasia on iron balance. Blood. 1988; 71(4): 1124– 1129.
77. Thein SL, Wood WG. The molecular basis of  $\beta$ -thalassemia,  $\delta\beta$  thalassemia, and hereditary persistence of fetal hemoglobin. In: Steiberg MH, Forget BG (eds). Disorders of

hemoglobin genetics, pathophysiology, and clinical management 2th ed. Cambridge University Press New York, 2009; 323-356.

78. Evans RW, Rafique R, Zarea A, et al. Nature of nontransferrin-bound iron: studies on iron citrate complexes and thalassemic sera. *J Biol Inorg Chem*. 2008; 13(1): 57–749.

79. Morris CR, Suh JH, Hagar W, et al. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*. 2008; 111: 402–410.

80. Niihara Y, Zerez CR, Akiyama DS, Tanaka KR. Increased red cell glutamine availability in sickle cell anemia: demonstration of increased active transport, affinity, and increased glutamate level in intact red cells. *J Lab Clin Med*. 1997;130:83– 90.

81. Olivieri NF. The  $\beta$  thalasseмии. *N Engl J Med*.1999; 341(2): 99-109.

82. Rund D, Rachmilewitz E.  $\beta$  thalassemia. *N Engl J Med*. 2005; 353(11): 1135-46.

83. Link G, Pinson A, Kahane I, Hershko C. Iron loading modifies the fatty acid composition of cultured rat myocardial cells and liposomal vesicles: effect of ascorbate and alphatocopherol on myocardial lipid peroxidation. *J Lab Clin Med*. 1989; 114: 243–249.

84. Weatherall DJ. Pathophysiology of thalassaemia. *Baillières Clin Haematol*. 1998; 11: 127–46.

85. Link G, Pinson A, Hershko C. Iron loading of cultured cardiac myocytes modifies sarcolemmal structure and increases lysosomal fragility. *J Lab Clin Med*. 1993;121(1): 127–134.

86. Gutteridge J, Rowley D, Griffiths E, Halliwell B. Low molecular weight iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis. *Clin Sci*. 1985; 68: 463–467.

87. De Luca C, Filosa A, Grandinetti M, Maggio F, Lamba M, Passi S. Blood antioxidant status and urinary levels of catecholamine metabolites in beta-thalassemia. *Free Radic Res*. 1999; 30(6): 453–462.

88. Gutteridge J, Halliwell B. Iron toxicity and oxygen radicals. *Bailliere Clin Haematol*. 1989; 2: 195–256.

89. Meral A, Tuncel P, Surmen-Gur E, et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2000; 17:687-693.
90. Antunes F, Cadenas E, Brunk UT. Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a consequence of lysosomal rupture. *Biochem J*. 2001; 356(2): 549–555.
91. Eaton JW, Qian M. Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic Biol Med*. 2002; 32(9): 833–840.
92. Lagos P, Lagona E, Kattamis C, Matsaniotis N. Serum ferritin in beta-thalassemia intermedia. *Lancet*. 1980;1:204-205
93. Kaltwasser T, Werner E. Assessment of iron burden. *Baillieres Clin Haematol*. 1989;2: 363-389.
94. Worwood M, Cragg SJ, Jacobs A, McLaren C, Ricketts C, Economidou J. Binding of serum ferritin to concanavalin A: patients with homozygous beta thalassaemia and transfusional iron overload. *Br J Haematol*. 1980; 46: 409–16.
95. Olivieri NC, Weatherall DJ. Thalassemias. In: Arceci RJ, Han IM, Smith OP (eds). *Pediatric Hematology* 3th ed. Blackwell Publishing USA, 2006; 281-301
96. Cunningham MJ, Sankaran VG, Nathan DG, Orkin SH. The Thalassemias. In: Nathan DG, Orkin SH (eds), *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*, 7th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2009; 1015-1075,
97. Baynes R, Bezwoda W, Bothwell T, Khan Q, Mansoor N. The non-immune inflammatory response: serial changes in plasma iron, iron-binding capacity, lactoferrin, ferritin and C-reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest*. 1986; 46: 695– 704.
98. Roeser HP, Halliday JW, Sizemore DEA. Serum ferritin in ascorbic acid deficiency. *Br J Haematol*. 1980; 45: 457–466.
99. Karakaş Z. Talasemi tedavisinde güncel yaklaşımlar ve yeni şelatörler. *Türkiye Klinikleri Pediatrik Hematoloji Özel Sayısı*. 2009;1(5): 15-27.

100. Angelucci E, Brittenham GM, McLaren CE et al. Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major. *N Engl J Med.* 2000; 343: 327–31.
101. Pennell DJ. T2\* magnetic resonance and myocardial iron in thalassaemia. *Ann. NY Acad.Sci.* 2005; 1054: 373-378.
102. Anderson LJ, Holden S, Davis B, et.al. Cardiovascular T2\* magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur Heart J.* 2001; 22: 2171-2179.
103. Tanner M, Westwood MA, Galanello R, Pennell DJ. Baseline findings of CMR driven randomized controlled trial of iron chelation therapy in thalassemia major. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2005; 7: 31-32.
104. Bilici M. Van Yöresi Sanayi Sitesinde Çalışan İşçilerin Kan Serumlarında Bazı Elementler (Çinko, Krom, Kurşun, ve Kadmiyum) ile Bazı Karaciğer Enzimleri (ALT ve AST) Seviyesinin Tayini, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Van 2005.
105. Taşkın A. Sıtma hastalarında lökositlerin oksidatif stresinin araştırılması. HR.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 2010
106. Skoog D.A, West D.M, Holler F.J. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7. Edition, Saunders College Publishing, USA. *Analitik Kimya Temelleri–1*, Çeviri Ed: Esmâ Kılıç ve Fitnat Köseoğlu, Bilim Yayıncılık, Ankara 1996.
107. Skoog, D.A., Holler, J.F. ve Nieman, T.A., *Principles of Instrumental Analysis*, Fifth Ed.; Saunders, Philadelphia. Çeviri: Enstrümental Analiz İlkeleri, Çeviri Ed.: Kılıç, E.; Köseoğlu, F. ve Yılmaz, H., Bilim Yayıncılık, Ankara. 1998.
108. Baykal Y, Gök F, Erikçi S. Demir, serbest radikaller ve oksidatif hasar. *Sendrom.* 2002; 14(1): 94-100.
109. Bayir H, Kagan VE, Tyurina YY et al. Assessment of antioxidant reserves and oxidative stress in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatric Research.* 2002; 51:571-578.



110. Cirak B, Inci S, Palaoglu S, et al. Lipid peroxidation in cerebral tumors. *Clinica Chimica Acta*. 2003; 327: 103-107.
111. Minnet C. Çocukluk çağında B12 vitamin eksikliğinin oksidan-antioksidan sistem ve DNA hasarı ile ilişkisi. Uzmanlık tezi, 2006.
112. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2002; 33: 110-118.
113. Jensen SJK, Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 2003; 666: 387-392.
114. Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya; Mimoza yayınları,1995.
115. Cross CE, Halliwell B, Borish ET. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*. 1987; 107: 526 - 545.
116. Yamamoto Y. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *Journal of Dermatological Science*. 2001; 27: 1-4.
117. Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med*. 1990; 9: 315-25.
118. Yigit A, Yurdakök M. Yeni doğanlarda serbest radikallere bağlı hastalıklar. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. 1997;39:749-765.
119. Shi X, Dong Z, Huang C et al. The role of hydroxyl radical as a messenger in the activation of nuclear transcription factor NF-kappaB. *Mol Cell Biochem*. 1999; 194: 63-70.
120. Çelik H. Malarya (Sıtma) hastalarında oksidatif stres ve mononükleer lenfosit DNA hasarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, 2005.
121. Mead J. Free radical mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins. *Free radical in molecular biology. J. Aging and Disease*. 1984; 65: 53-66.
122. Braughler M, Chose L, Pregenter F. Oxidation of ferrous iron during peroxidation of lipid substrates. *J. Biochemica and Biohysica Acta*. 1987; 921: 457-64.

123. Burton G, Traber M. Antioxidants action of carotenoids. *J. Nutr.* 1989; 119: 109–111.
124. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical Biochemistry.* 1993; 26: 351-357.
125. Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stresses in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156: 341–357.
126. Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safadi A. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *J. Biochem.* 1992; 286(35): 607–11.
127. Bowry VW, Mohr D, Cleary J, et al. Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1995; 270: 5756-63.
128. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003; 17: 1195-1214.
129. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays.* 2004; 26: 533-542.
130. Totter JR. Proc. Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Natl Acad Sci USA,* 1980; 77: 1763–7.
131. Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res.* 2003; 531: 5-23.
132. Scandalios JG. The rise of ROS. *TRENDS in Biochemical Sciences.* 2002; 27: 483-486.
133. Yeşilkaya A, Altınayak R, Korgun DK. The antioxidant effect of free bilirubin on cumene-hydroperoxide treated human leukocytes. *Gen Pharmacol.* 2000; 35:17-20.
134. Makarov VG, Makarova M, Selezneva AI. Studying the mechanism of antioxidant effect of vitamins and flavonoids. *Vopr Pitan.* 2005; 74:10-3.
135. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 1987; 235:1043-6.

136. Stocker R, Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal*. 2004; 6: 841-9.
137. De Boer J, Hoeijmakers J. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*. 2000; 21: 453-460.
138. Romay C, Pascual C, Lissi EA. The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Braz J Med Biol Res*. 1996; 29: 175-183.
139. Kattamis C, Kattamis AC. Oxidative stress disturbances in erythrocytes of  $\beta$ -thalassemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2001; 18: 85-88.
140. Clemens MR. Antioxidant therapy in hematological disorders. In: *Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine*. Emeritetal (ed), New York: Plenum Press, 1990:423-433.
141. Scott MD, Van den Berg JJM, Repka T, et al. Effect to excess  $\beta$ -hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model  $\beta$ -thalassemic erythrocytes. *J Clin Invest*. 1993; 91:1706-1712.
142. Andrews NC, Bridges KR. Disorders of Iron Metabolism and Sideroblastic Anemia. In: Nathan DG, Oski FA, ed. *Hematology of Infancy and Childhood*, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998: 424-426.
143. Miller M, Hutchins GM. Hemochromatosis, multiorgan hemosiderosis, and coronary artery disease. *JAMA*. 1994; 272: 231-233.
144. Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Sem Hematol*. 1989; 26: 277-285.
145. Anderson AC. Iron poisoning in Children. *Curr Opin Pediatr*. 1994; 6:289-294.
146. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. *Lancet*. 1994; 334: 721-724.

147. Agil A, Fuller CJ, Jialal I. Susceptibility of plasma to ferrous iron/hydrogen peroxide-mediated oxidation: demonstration of a possible Fenton reaction. *Clin Chem*. 1995, 41: 220-225.
148. Asad SF, Singh A, Ahmad A, et al. Prooxidant and antioxidant activities of bilirubin and its metabolic precursor biliverdin: a structure-activity study. *Chem Biol Interact*. 2001; 137: 59-74.
149. Hershko C, Konijn AM, Link G. Iron chelators for thalassaemia. *Br J Haematol*. 1998; 101:399-406.
150. Livrea MA, Tesoriere L, Pintaudi AM, Calabrese A, Maggio A, Freisleben HJ, D'Arpa D, D'Anna R, Bongiorno A. Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. *Blood*. 1996;88: 3608-14.
151. Olgun A. Proteinlerde yapı-işlev ilişkileri. Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası, çeviri 2. baskı. İnal ME, Atik U, Aksoy N, Haşimi A (editör). Ankara, Güneş Kitabevi, 2007; s: 102.
152. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Genetics*. 2001; 2: 245-255.
153. Uygül E. Türkiye'de üretilen ballarda mineral ve eser element konsantrasyonlarının araştırılması. HR.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 2011
154. Özdemir ZC.  $\beta$ -talasemi majorlu çocuklarda E vitamini ve N-Asetilsistein'in oksidan-antioksidan sistem ve DNA hasarı üzerine etkilerinin araştırılması. Yan Dal Uzmanlık Tezi, Şanlıurfa, 2010
155. Söker M. Beta talasemili çocuklarda oksidan- antioksidan sistem ve lenfosit DNA hasarı. Yan Dal Uzmanlık Tezi, Şanlıurfa, 2008
156. Carroll E. Cross. Oxygen radicals and human disease, *Ann Intern Med*. 1987; 107, 526-545.
157. Gül A. Nazal polip dokusunda antioksidan enzim ve esr element düzeyleri. Uzmanlık tezi, Kahramanmaraş, 2008

158. Eisenger MJ. Hepatic copper metabolism. In Zakim D, Boyer TD (eds) : Hepatology: A Textbook of Liver Disease. Philadelphia, WB Saunders, pp. 1996; 554– 563.
159. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. 1997; 338: 482–488.
160. Fırat M. Fenilketonüri hastaların serum selenyum, çinko, bakır düzeyleri ve bunların diyetle ilişkisi. Uzmanlık tezi, SİVAS, 2009
161. 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: 277–285
162. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005;38(12):1103-11.
163. Sema Koc, Nurten Aksoy , Hasan Bilinc, Fazilet Duygu, İsmail Onder Uysal, Adnan Ekinci. Paraoxonase and arylesterase activity and total oxidative/anti-oxidative status in patients with chronic adenotonsillitis. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2011; 75: 1364–1367
164. Erel O. Automated measurement of serum ferroxidase activity. *Clin Chem* 1998; 44(11): 2313– 9.
165. Pavlova LE, Savov VM, Petkov HG, Charova IP. Oxidative stress in patients with beta-thalassemia major. *Prilozi* 2007; 28(1):145-54.
166. Gümrük F. Hemoglobinopatilerin Tanı ve Tedavisinde Yenilikler. *Türk Hematoloji Derneği 9. mezuniyet sonrası eğitim kursu* 2006; 62–64.
167. Kassab-Chekir A, Laradi S, Ferchichi S. Et al. Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patient with beta thalassemia. *Clinica Chimica Acta*. 2003; 338: 79-86.
168. Rachmilewitz EA, Lubin BH, Shohet SB. Lipid membrane peroxidation in  $\beta$ -Thalassemia Major. *Blood* 1976;47(3): 495-505.

169. Naithani R, Chandra J, Bhattacharjee J, et.al. Peroxidative stres and antioxidant enzymes in children with  $\beta$ -thalassemia major. *Pediatr Blood Cancer*. 2006;46: 780-785.
170. Fibach E, Rachmilewitz EA. The role of antioxidants and iron chelators in the treatment of oxidative stres in thalassemia. *Ann. N.Y.Acad. Sci*. 2010; 1202: 10-16.
171. Comporti M, Signorini C, Buonocore G, Ciccoli L. Iron release, oxidative stres and erythrocyte ageing. *Free Radical Biology&Medicine*. 2002; 32: 568-576.
172. Ghone RA, Kumbar KM, Suryakar AN, Katkam RV, Joshi NG. Oxidative stres and disturbance in antioxidant balance in beta thalassemia major. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2008; 23(4): 337-340.
- 173.Chakraborty D, Bhattacharyya. Antioxidant defense status of red blood cells of patients with  $\beta$ -thalassemia and E  $\beta$ -thalassemia.*Clinica Chimica Acta*. 2001; 305: 123-129.
174. Hattangadi SM, Lodish HF. Regulation of erythrocyte lifespan: do reactive oxygen species set the lock? *The Journal of Clinical Investigation*. 2007; 117: 2075-2077.
175. Cheng M, Ho H, Tseng H, et al. Antioxidant deficit and enhanced susceptibility to oxidative damage in individuals with different forms of b-thalassemia. *Br J Haematol*. 2005; 128: 119–127.
176. Steinkuhler C, Pedersen JZ, Weser U, Rotilio G. Oxidative stress induced by a di-Schiff base copper complex is both mediated and modulated by glutathione. *Biochem Pharmacol*. 1991; 42:1821-1827.
177. Oktem F, Yavrucuoğlu H, Turedi A, Tunc B. Cocuklarda Beslenme Aliskanlıklarının Hematolojik Parametreler ve Eser Elementler Uzerine Etkisi. *S. D. U. Tıp Dergisi* 2005; 12:6-10.
178. Beydoğan M, Afsar CU, Pilancı KN, et al. Cinko Eksikliği ve Anemi: Bir Olgu Sunumu. *T.C. Sağlık Bakanlığı Đstanbul Eğitim ve Arastırma Hastanesi Tıp Dergisi*. 2006; 7 (1).

179. Chan AC, Chow CK, Chiu D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999; 222:274-282. Review.
180. Nasr MR, Ali S, Shaker M, Elgabry E. Antioxidan micronutrients in children with thalassaemia in Egypt. *East Mediterr Health J.* 2002; 8:490-495.
181. Cerón, J.J., Eckersall, P.D., Martinez-Subiela, S.: Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives, *Vet. Clin. Pathol.* 2005; 34(2): 85-99.
182. Chang, I.C., Milholland, D.C., Matrone, G.: Controlling factors in the development of ceruloplasmin in pigs during the neonatal growth period, *J. Nutr.* 1976;106: 1343-1350.
183. Eckersall, P.D., Conner J.G.: Bovine and canine acute phase proteins, *Vet. Res. Commun.* 1988;12: 169-178.