

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MALATYA'DA BETA-TALASEMİ MUTASYONLARININ MOLEKÜLER  
TEMELİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Gonca GÜLBAY  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN  
Doç.Dr.Elif YEŞİLADA**

Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2004/4 proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA-2006

## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	1
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	2
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	4
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	5
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	6
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	7
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	9
2.1. Hemoglobinin Yapısı.....	9
2.2. Talasemiler.....	11
2.2.1. Beta Talasemi.....	12
2.2.1.1. Fizyopatolojisi.....	12
2.2.1.2. Kliniği ve Tipleri.....	13
2.2.1.2.1. Beta Talasemi Major.....	13
2.2.1.2.2. Beta Talasemi Minör.....	14
2.2.1.2.3. Beta Talasemi İntermedia.....	15
2.2.1.3. Tedavi.....	15
2.3. Globin Gen Yapısı.....	16
2.4. Beta Talasemi Mutasyon Tipleri.....	18
2.4.1. Talasemi Fenotipli Varyant Hemoglobinler.....	22
2.5. Epidemiyoloji.....	23
<b>3. MATERYAL VE METOD</b> .....	26
3.1. Alet ve Cihazlar.....	26
3.2. Sarf Malzemeler.....	26
3.3. Örnek Toplama.....	27
3.4. Yöntemler.....	27
3.4.1. Hematolojik İncelemeler.....	27
3.4.1.1. Hemoglobin Elektrofrezisi.....	27
3.4.2. $\beta$ -Globin Geni Mutasyon Analizi.....	28
3.4.2.1. Tam Kandan DNA izolasyonu.....	29
3.4.2.1.1. Ayıraçlar.....	29
3.4.2.1.2. Yöntem.....	29

3.4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Belirli Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu.....	30
3.4.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	31
3.4.2.4. Hibridizasyon.....	32
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>34</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>39</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>46</b>
<b>7. ÖZET.....</b>	<b>42</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>48</b>
<b>9. KAYNAKLAR.....</b>	<b>49</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>56</b>

## ***ŞEKİLLER DİZİNİ***

Şekil 2.1	Hemoglobinin üç boyutlu yapısı.....	9
Şekil 2.2	$\beta$ -globin geninde beta talasemiye neden olan mutasyonlar.....	18
Şekil 2.3	Splays konsensus dizileri.....	19
Şekil 2.4	Beta talasemi mutasyonlarının dünyadaki yayılışı.....	23
Şekil 3.1	Hemoglobin elektroforezi.....	28
Şekil 3.2	Agaroz jel elektroforezi.....	31
Şekil 4.1	Mutant ve normal oligonükleotit problemlerinin pozisyonlarını gösteren referans membranı.....	37
Şekil 4.2	Farklı genotiplere sahip hasta sonuçları.....	38

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Hemoglobinin Tipleri.....	11
Çizelge 4.1.	Olguların hematolojik bulguları ve mutasyon tipleri.....	35
Çizelge 4.2.	Beta talasemi ön tanılı hastalarda beta globin genotipleri.....	36
Çizelge 4.3.	Beta globin mutasyonlarının homozigot ya da heterozigot olarak taşıyan olgularda allellerin frekansı.....	36
Çizelge 4.4.	Strip Assay sonuçlarının değerlendirilmesi.....	37

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\beta$ -talasemi	Beta talasemi
$\alpha$ -talasemi	Alfa talasemi
$\gamma$ -talasemi	Gamma talasemi
$\delta$ -talasemi	Delta talasemi
$\delta\beta$ -talasemi	DeltaBeta talasemi
$\epsilon\gamma\delta\beta$ -talasemi	EpsilonGammaDeltaBeta talasemi
$\beta$ -globin	Beta globin
$\alpha$ -globin	Alfa globin
Hb	Hemoglobin
HbA	HemoglobinA
HbA <sub>2</sub>	HemoglobinA <sub>2</sub>
HbF	HemoglobinF
$\alpha_2\beta_2$	HbA
$\alpha_2\delta_2$	HbA <sub>2</sub>
$\alpha_2\gamma_2$	HbF
Hb Portland	Hemoglobin Portland
Hb Gower 1	Hemoglobin Gower 1
Hb Gower 2	Hemoglobin Gower 2
$\zeta_2\gamma_2$	Hb Portland
$\zeta_2\epsilon_2$	Hb Gower 1
$\alpha_2\epsilon_2$	Hb Gower 2
A $\gamma$	Alanin [Gamma]
G $\gamma$	Glisin [Gamma]
$\beta^+$	$\beta$ -globin zincirinin normal sentezinin azalması
$\beta^o$	$\beta$ -globin zincirinin normal sentezinin kaybolması
IVS	İntervening Sekans

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Talasemi ilk kez 1925'te yaşamın ilk yıllarında ileri düzeyde anemi ve splenomegali gelişen hastalarda Thomas Cooley ve Pearl Lee tarafından tanımlanmıştır (1, 2). Daha sonra benzer vakaların görülmesi üzerine bu herediter hemolitik anemiye Van Jaksch anemisi, splenik anemi, Akdeniz anemisi gibi isimler verilmiştir. 1936'da ise George Whipple ve Lesley Bradford inceledikleri vakaların Akdeniz civarı ülkelerde daha sık görülmesi nedeni ile hastalığa Yunanca deniz anlamına gelen talasemi adını vermişlerdir. Ancak daha sonra bu hastalığın yalnız Akdeniz ülkelerinde değil diğer toplumlarda da bulunduğu belirlenmiştir (2, 3).

Beta talasemi en sık görülen tek gen hastalıklarından biridir (4, 5). Dünya nüfusunun yaklaşık %4.5'i bir beta globin mutasyonu taşıyıcısıdır (3). Türkiye'de yaklaşık 1 milyon 400 bin taşıyıcı tahmin edilmektedir. Ülkemizdeki toplam hasta sayısı ise 4 bin 500 civarındadır. Yeterince sentezlenemeyen globin zincirine bağlı olarak  $\alpha$ -talasemi veya  $\beta$ -talasemi olarak ortaya çıkar. Talasemiler, farklı genotip ve fenotiplerin geniş bir spektrumuna sahiptir. Alfa talasemilerde alfa globin genlerinin biri, ikisi, üçü ya da dördü birden etkilenmiş olabilir. Beta talasemilerde beta zincirinin yokluğu ile yapımının azalması söz konusu olabilir. Beta-globin genindeki birçok mutasyon beta talasemiye yol açmaktadır. Bu gen insanda 11. kromozomda haritalanmıştır ve iki intron ve üç eksondan meydana gelmiştir (4, 5-7).

Beta talasemi taşıyıcı sıklığı Türkiye genelinde % 2 olmakla birlikte bazı yörelerde % 10'a kadar çıkmaktadır. Akraba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği, Türkiye'de beklenenin de üzerinde beta talasemili çocuk doğmasının nedenidir. Hastalık, hafif klinikli beta talasemi intermedia ile transfüzyona bağımlı beta talasemi major arasında seyreden çok geniş bir yelpazede görülmekle birlikte Türkiye'de beta talasemi major olguları ağır basmaktadır (8).

Günümüzde beta talasemiye yol açtığı bilinen mutasyonların sayısı 200'ü geçmiştir (9). Bu mutasyonlar oldukça çeşitlidir ve kodlanamayan dizilerde de görülmektedir. Halen Türk toplumunda 40'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır (5, 10); bu geniş moleküler çeşitlilik, hastalığa önlem alma stratejilerini ve programlarını önemli

ölçüde zorlaştırmaktadır (8, 9). Beta globin geninin mutasyonları ve sıklığını belirlemek amacı ile yapılan çeşitli araştırmalar literatürde bildirilmiştir (4-7, 11-16).

Bu çalışmada 2004-2006 yılları arasında İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi'nde teşhis ve tedavisi yapılan beta talasemi hastalarının beta globin geninde taşınan mutasyon tiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

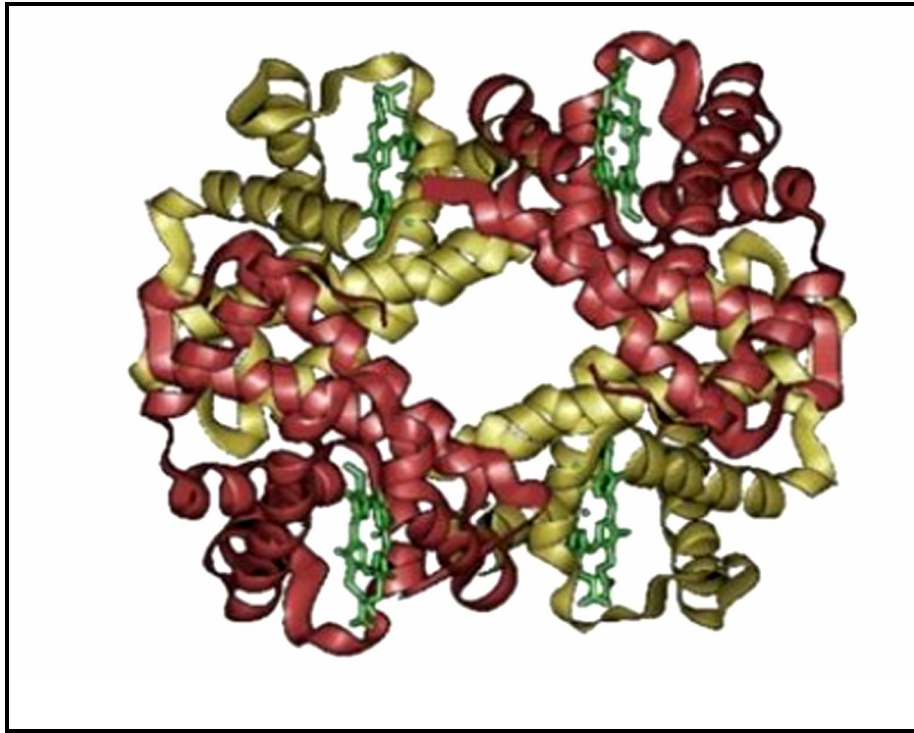


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 HEMOGLOBİNİN YAPISI

Hemoglobin (Hb) omurgalılarda kırmızı kan hücrelerinde oksijen taşıyan (17) ve hem ve dört globin molekülünün biraraya gelmesi ile oluşan bir moleküldür (18). Globin polipeptid zinciri, bir çift alfa benzeri ve bir çift de non-alfa zincirinden oluşan tetramer bir yapıdır (19). Bu zincirler hem aminoasit dizisi bakımından (primer yapı) hem de üç boyutlu konfigürasyonları bakımından (tersiyer) birbirlerine benzer. Alfa ve beta globin zincirleri ayrı lokuslardaki genler tarafından kodlandığından, bir nokta mutasyonu yalnızca bir zincirde ya da diğerinde izlenirken, aynı anda her iki zincirde gözlenmez (17).

Erişkin insanlarda hemoglobinin en az %96'sı hemoglobinA (HbA)'dır (20). HbA iki alfa ve iki beta zincirinden oluşmaktadır ( $\alpha_2\beta_2$ ) (Şekil 1) (1, 18, 20-22). Bu zincirler yapısal olarak birbirine benzerdir. Herbir zincirin moleküler ağırlığı yaklaşık 16.000 dalton ve dört zincirin moleküler ağırlığı ise yaklaşık 64.000 daltondur (18).



Şekil 2.1 Hemoglobinin üç boyutlu yapısı (18)

Erişkin hemoglobininin küçük bir kısmı da iki alfa ve iki delta zincirinden oluşan hemoglobinA<sub>2</sub>'dir (HbA<sub>2</sub>) (1, 20, 22-25). HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), toplam hemoglobininin %2,5-3 kadarını oluşturmaktadır (26).

Gelişimin farklı evrelerinde, farklı tipte hemoglobinler yapılmaktadır (Tablo 1) (19). Bunlar; sırası ile erken embriyonik dönemde (12. haftaya kadar) embriyonik hemoglobin, 12. haftadan doğuma kadar fetal hemoglobin (HbF) ve bundan sonra erişkin hemoglobini olmak üzere sıralanır. Oksijen bağlama kapasiteleri yönünden farklı olan hemoglobin tiplerinin sentez bölgeleri de farklıdır (20). 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. HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) fetal yaşam boyunca çoğunluğu oluşturan hemoglobindir ve doğumda toplam hemoglobininin %70'ini oluştururken, erişkin yaşamında toplam hemoglobininin %1'inden azını temsil etmektedir (17).

İnsan fetusu başlangıçta  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirlerini sentezleyemez; bunların yerine  $\zeta$  (zeta) ve  $\epsilon$  (epsilon) zincirleri sentezlenir. Birinci trimester sonunda  $\alpha$ ,  $\zeta$  alt-ünitelerinin yerini alırken  $\gamma$ ,  $\epsilon$  peptidlerinin yerini alır. Fetal yaşamın sonundaki hemoglobin olan HbF'in yapısı bu nedenle  $\alpha_2\gamma_2$  olur. Üçüncü trimesterde sentezlenmeye başlayan beta alt-üniteleri, ancak doğumdan birkaç hafta sonra, tam olarak  $\gamma$ 'nın yerini alır (27).

HbF fetal hayat boyunca baskındır. Postnatal hayatın ilk yılı boyunca hızla azalır. Normal erişkinlerde HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) toplam Hb'nin %1'inden daha azdır (26). HbF gamma zincirinin bileşenlerinden oluşur. Gamma zincirinin 136. kodonu alanin aminoasitini içeriyorsa A[gamma] ( $A\gamma$ ) veya glisin aminoasitini içeriyorsa G[gamma] ( $G\gamma$ ) olmak üzere iki farklı gamma zinciri bulunmaktadır (1, 19, 21). Doğumda,  $G\gamma$  zincirinin,  $A\gamma$  zincirine oranı yaklaşık olarak 3:1'dir (1).

Embriyonik evrede  $\zeta$  zincirleri,  $\epsilon$  ve  $\gamma$  zincirlerine bağlanır (20). Üç normal embriyonik Hb tanımlanır. Hb Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ), Hb Gower 1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Hb Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) (1, 18-20, 26). Bu Hb'ler prenatal hayat boyunca vardır (26). HbF'in  $\alpha$ ,  $\zeta$  zincir genleri 16. kromozomda;  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  genleri ise 11. kromozomda kümelenmişlerdir (21). 16. kromozomun her bir kopyasında,  $\alpha_1$  ve  $\alpha_2$  olarak tanımlanan iki özdeş  $\alpha$ -globin geni

vardır. Beta globin ( $\beta$ -globin) kompleksi içinde yer alan farklı genler arasında yakın bir benzerlik vardır. Örneğin,  $\beta$  ve  $\delta$  globinler arasında 146 amino asitin yalnızca 10'unda farklılık gözlenir (17).

Çizelge 2.1 Hemoglobin Tipleri

Hemoglobinin Adı	Yapısı	Dönem
Hemoglobin Portland	$\zeta_2\gamma_2$	Embriyonik Dönem
Hemoglobin Gower 1	$\zeta_2\varepsilon_2$	Embriyonik Dönem
Hemoglobin Gower 2	$\alpha_2\varepsilon_2$	Embriyonik Dönem
Hemoglobin F	$\alpha_2\gamma_2$	Fetal Dönem
Hemoglobin A <sub>2</sub>	$\alpha_2\delta_2$	Erişkin hemoglobini
Hemoglobin A	$\alpha_2\beta_2$	Erişkin hemoglobini

Hemoglobinin yapısı, fonksiyonu veya üretimi ile ilgili hastalıklar hemoglobinopatiler olarak adlandırılır (19). Genetik hastalıklar içinde önemli bir yere sahip olan hemoglobinopatilerin pek çok ülkede önemli bir sağlık sorunu oluşturduğu bilinmektedir. Bunlardan orak hücre anemisi ve talasemiler hemoglobin hastalıklarının büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Her iki hastalık da resesif olarak seyretmekte olup, 11 no'lu kromozomun kısa kolu üzerinde yer alan  $\beta$ -globin gen mutasyonları sonucu ortaya çıkmaktadır (1, 28, 29).

## 2.2 TALASEMİLER

Talasemiler, globin zinciri yapımının azalmasına ya da yapılamamasına bağlı olarak ortaya çıkan, heterojen bir grup hastalıktır (1, 3-7, 16, 21, 30-32).

Talasemiler, oldukça geniş bir genetik yelpazeyi kapsar (21, 33-35). Sentezi bozulmuş olan globin zincirine göre  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , ( $\delta\beta$ ), ( $\varepsilon\gamma\delta\beta$ ) talasemi olarak adlandırılırlar (3, 30). En sık görülen tipleri  $\alpha$  ve  $\beta$  talasemidir.  $\alpha$  talasemi daha çok Uzak Doğu'da görülürken,  $\beta$  talasemi Akdeniz ülkeleri ve Türkiye'de sıktır. Tek tip bir mutasyonun neden olduğu orak hücreli aneminin aksine beta talasemi moleküler düzeyde oldukça heterojendir (21, 33-35).

## 2.2.1 BETA TALASEMİ

Beta talasemi 11. kromozomun kısa kolunda (1, 5, 14)  $\beta$ -globin zincirinin normal sentezinin kaybolması ( $\beta^0$ ) veya azalmasına ( $\beta^+$ ) neden olan bir mutasyondan kaynaklanmaktadır (1, 2, 5, 14, 16, 21, 30, 31, 36, 37).

Beta talasemi hemolitik anemi ve mikrositoz ile karakterize otozomal resesif geçiş gösteren bir hastalıktır (4, 5, 16, 36, 38-41).

### 2.2.1.1 FİZYOPATOLOJİSİ

Beta globin genindeki mutasyonlar, beta zincirinin hiç yapılmamasına veya yeteri kadar yapılamamasına neden olmaktadır. Bu durumda alfa zincir yapımı normal hızda devam ettiği için alfa zincir lehine bir zincir dengesizliği olur. Hemoglobinin sentezinde kullanılmayan alfa zincirleri, büyük intrasellüler inklüzyonlar oluşturarak eritroid serinin kemik iliğinde olgunlaşmakta olan geçen hücrelerinde çöker. Bu hücrelerin bir kısmı kemik iliğinde olgunlaşmadan parçalanır (ineffektif eritropoiez). Dolaşıma geçen alfa zincir inklzyonlarını içeren olgunlaşmış kırmızı seri hücreleri yaşam sürelerini tamamlamadan, özellikle dalağın mikrosirklasyonundan geçerken harap olur. Buna bağlı olarak ortaya çıkan anemi, böbreklerden eritropoietin yapımının artışı için bir uyarıdır. Talasemi majrl vakalarda hemoglobinin büyük kısmını oluşturan HbF`in oksijene ilgisi fazla olduğundan dolayı doku anoksisine katkıda bulunarak eritropoietin artışına neden olur. Eritropoietin etkisiyle kemik iliği aktivitesinin artışına bağlı olarak kafatası ve ekstremite kemiklerinde masif bir genişleme ile ilgili olarak ciddi deformiteler oluşur. Anormal kırmızı seri hücreleri daima dalak tarafından dolaşımdan kaldırıldığı için dalak hipertrofiye uğrar. Böylece gelişen splenomegali anemiye katkısı olan plazma volümünün artışına ve hipersplenizme neden olur (2).

Doğumdan sonra fetal hemoglobin yapımı durur. Fakat, erişkinde az sayıda kırmızı seri prekürsörleri gamma zincir üretimine devam eder. Gamma zincirleri HbF`i oluşturmak için alfa zincirleriyle kombine olduklarından dolayı beta talasemililerin kemik iliklerinde rölatif olarak fazla gamma zincir yapan hücreler alfa zincir

presipitasyonunun zararlı etkisine karşı kısmen korunmuş olur. Bu hücreler selektif yaşama avantajına sahip oldukları için periferal kanda da bulunurlar. Bu sebepten dolayı yüksek fetal hemoglobin seviyesi ve HbA<sub>2</sub>'deki artış beta talaseminin karakteristik bulgularını oluşturur (2).

## **2.2.1.2 KLİNİĞİ VE TİPLERİ**

### **2.2.1.2.1 Beta Talasemi Major**

Cooley anemisi veya beta talasemi majorlü vakaların bir kısmı aynı beta talasemi mutasyonunun homozigot ve bir kısmı da aynı beta talasemi mutasyonlarının çift heterozigot genotipine sahiptir (2, 21). Homozigotlar ve birleşik heterozigotlar talasemi major hastalardır (26).

Cooley anemili bebeklerin hastalığı, hayatın ilk birkaç ayında dikkati çeker. Bu bebekler doğumda iyidir. Ancak doğum sonrası anemi progressif olarak gelişir. Aralıklı ateşlenmeler, solukluk, kronik sarılık ve iştahsızlık gibi semptomlar ortaya çıkar. Çoğunlukla bebekler hekime hayatın ilk 6 aylık devresinde getirilir. Bu sırada anemi, splenomegali, hafif hepatomegali gibi bulgular vardır. Bebekte yaş ilerledikçe Cooley anemisinin tipik görünümü belirir. Çocuklarda gelişme geriliği, maksiller bölge kemiklerinde hipertrofi ve frontal kemiklerde çıkıntı ile yüz mongoloid bir görünüm alır. Değişik büyüklükte hepatosplenomegali yanında deride safra pigmentlerinin ve hemokromatozisin sebep olduğu koyu kirli sarı pigmentasyon mevcuttur. Özellikle kafa kemiklerinde belirgin olan değişiklikler, artan hemoliz dolayısıyla medullanın kemik dokusu aleyhine genişlemesinden ileri gelir. Aynı değişiklikler kaburgalarda, ekstremitelerin küçük kemiklerinde ve uzun kemiklerin proksimal ve distal bölgelerinde de dikkati çeker. Ekstremitelerin uzun ve küçük kemiklerinde korteksin incilmesi ve osteoporoz belirgindir. Küçük kemiklerde bu değişiklere medüller boşlukların genişlemesinin katılımıyla, kemikler dikdörtgen görünümünü alır. Kemik değişiklikleri hayatın birinci yılında dahi belirgin durumdadır (2).

Klinik seyrin değişken olmasına rağmen Cooley anemili çocukların çoğu çocukluk çağı içinde düzenli aralıklarla eritrosit transfüzyonuna gereksinim gösterirler. Dalağın tedricen büyümesi ile gelişen hipersplenizm, aneminin artması ile birlikte

enfeksiyonlara ve kanamalara eğilim artar. Bu vakaların hemen hepsinde hemokromatozis geliştiği için birçoğu miyokardda demir birikmesine bağlı kalp yetmezliği sonucu 10 veya 20 yaş civarında kaybedilir (2).

#### Hematolojik Bulgular

Anemi ağır olup hipokrom mikrositer tiptedir. Çoğunlukla hemoglobin seviyeleri 2-8 g/dl civarındadır. Eritrositlerde hipokromi, mikrositoz, hedef hücreleri ve bazofilik noktalanma gibi değişiklikler dikkati çeker. Splenektomiden sonra küçük deforme olmuş mikrositlere ve büyük yassı makrositlere daha fazla rastlanır. Ayrıca yine splenektomiden sonra periferik kanda genellikle bulunan çekirdekli eritrositlerin sayıları çok artar. Retikülosit sayısı orta şiddette artmıştır. Kemik iliğinde ise eritroid hiperplazi, eritroblastlarda bazofil noktalar ve bunların demir içeriğinde artış vardır (2).

Beta talasemi majorlü vakalarda %10'dan daha az HbA<sub>2</sub> ve %90'dan daha fazla HbF bulunur. Hasta  $\beta^0$  talasemi geninin homozigot taşıyıcısı ise HbA'ya sahip değildir ve mevcut hemoglobin, artmış HbF ve HbA<sub>2</sub>'den ibarettir. Bu durum  $\beta^+$  talaseminin homozigot formu veya  $\beta^+$  talasemi ve  $\beta^0$  talasemi genlerinin kombinasyonu sonucu oluşmuş ise değişik miktarlarda HbA yapımı görülür. HbA<sub>2</sub> seviyesi toplam hemoglobinin yüzdesi olarak ifade edildiği zaman normal ve yüksek değerlerde bulunabilir. HbF'in eritrositlerdeki dağılımı heterojendir (2).

Artmış hemoliz ve aşırı demir yüklenmesinden dolayı bazı biyokimyasal değişiklikler oluşur. Transaminazlar (AST ve ALT) genellikle artmıştır. Serum gamma globin seviyesi de yüksek bulunabilir. İndirekt bilirubin düzeyleri yükselmiş ve haptoglobin azalmış veya tamamen yok olmuştur. Laktik dehidrogenaz artmıştır. Serum demiri progressif olarak yükselir. Plazma ferritin seviyesi yüksektir. Karaciğer biyopsisinde hem retiküloendoteliyal hücrelerde hem de parankim hücrelerinde demirin aşırı biriktiği görülür (2).

#### 2.2.1.2.2 Beta Talasemi Minör (Heterozigot Beta Talasemi)

Hastalığın hafif bir tipi olan beta talasemi minörlü (heterozigot beta talasemi, beta talasemi taşıyıcısı) bireyler bir mutant allele sahiptir. Heterozigot durumda olan

bireylerin klinik bulguları yoktur ve kan tablolarında eritrositlere ait morfolojik değişiklikler minimal düzeydedir. Ancak gebelik ve enfeksiyon gibi stres hallerinde anemiye bağlı olarak klinik semptomlar gelişebilir (2).

### Hematolojik Bulgular

Hemoglobin değerleri genellikle 9-11g/dl'dir (2). En karakteristik bulgu, yüksek eritrosit sayısı ile ortalama eritrosit hacminde ve ortalama eritrosit hemoglobinindeki ileri derecede azalmadır. Retikülosit sayısı nadiren yüksek bulunur. Eritrositlerde orta şiddette hipokrominin yanı sıra bazofil noktalar ve değişik oranda hedef hücreleri, anizositoz, poikilositoz, ovalositoz ve eliptositoz dikkati çeken eritrosit şekil değişiklikleridir (2). Taşıyıcıların önemli bir kısmında mikrositoz önemli bir bulgudur (42).

Hemoglobin incelemelerinde HbA<sub>2</sub>'nin artışı dışında bir özellik yoktur. HbF seviyeleri ise hafifçe yükselmiş olup %50 vakada %1-3 arasındadır. Nadir de olsa HbA<sub>2</sub> seviyeleri normal bulunabilir. Bu tip heterozigotların kesin tanısı DNA analizleri ile genetik mutasyonları göstermeye dayanır (2).

Heterozigot beta talasemi türlerinin her biri için anemi olmaksızın HbA<sub>2</sub> artar ve nadir olarak klinik belirti verir (26).

#### **2.2.1.2.3 Beta Talasemi İntermedia**

Beta talasemi majörden daha hafif, beta talasemi minörden daha ağır klinik ve hematolojik bulgu gösteren, 20 yaşı aşabilen ve nisbeten ileri yaşı bulabilen, transfüzyon ihtiyaçları seyrek veya hiç olmayan talasemili vakalar bu grupta toplanır (2). Hemoglobin değerleri 7.0-10.0 g/dl arasındadır (21).

#### **2.2.1.3 TEDAVİ**

Talasemi minör hastalarının çoğunda genellikle herhangi bir şikayet yoktur, ancak oral folik asit tedavisi önerilmektedir. Bu hastalarda genetik danışmanlık önemlidir (43).

Talasemi intermedia ve özellikle talasemi major hastalarda temel tedavi yaklaşımı eritrosit transfüzyonu ve demir şelasyon tedavisidir. Talasemi major hastalarına sıklıkla hipertransfüzyon (kan hemoglobin düzeyi >9-10 gr/dl tutacak şekilde) uygulanır. Bu şekilde eritropoietinin tetiklediği eritroid hiperplazi kontrol altına alınarak talasemiye bağlı kemik komplikasyonları engellenir. Ayrıca normal büyüme ve cinsel gelişim sağlanır. Bu hastalarda ortalama transfüzyon ihtiyacı 3-5 hafta aralarla 1-3 ünitedir. Demir yüklenmesi bu hastalarda transfüzyon tedavisinin ciddi bir komplikasyonudur. Sekonder hemokromatoz gelişimini önlemek için şelasyon tedavisine ihtiyaç vardır. Desferroksiamin bu endikasyonda kullanılan en önemli demir şelatörüdür. Hipersplenizme bağlı artmış transfüzyon ihtiyacı gösteren hastalar splenektomiden fayda görürler. Allojenik kemik iliği transplantasyonu, talasemi hastalarında küratif bir tedavi yöntemidir. HLA uygun vericisi olan ağır talasemi hastalarında ciddi komplikasyonlar gelişmeden kemik iliği transplantasyonu erken dönemde yapılırsa sonuçlar oldukça başarılıdır (43).

### 2.3 GLOBİN GEN YAPISI

Tetramerik bir protein olan insan erişkin hemoglobini HbA, iki alfa ve iki beta zincinden oluşmaktadır ( $\alpha_2\beta_2$ ) (1, 18, 20, 21).  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirlerinin genetik kontrolü iki ayrı gen kümesi tarafından yapılmaktadır.  $\alpha$  gen kümesi 16 ve  $\beta$  gen kümesi 11. kromozom üzerinde yer alır (21, 44 ).

$\beta$ -globin geni 3 ekson ve 2 intron ile 5' ve 3' düzenleyici bölgelerden oluşmuştur. 1.8 kb büyüklüğünde olup 146 aminoasitten oluşan  $\beta$ -globin zincirine şifre vermektedir.  $\beta$ -globin geninden hemoglobinin  $\beta$ -globin zincirlerine giden yol üzerindeki çeşitli mutasyonlar beta talasemiye, orak hücreli anemiye ya da diğer bir anormal hemoglobine neden olmaktadır (9).  $\beta$ -globin geni,  $\beta$ -globin gen kümesinin diğer genleri gibi sentromerden telomer yönüne doğru transkribe olmaktadır. Bu yön genomdaki diğer genlerde farklıdır ve kromozomal çift sarmalın hangi zincirinin ilgililenen gen için kodlayan zincir olduğuna bağlıdır (17).

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 (9,20). DNA'nın yaklaşık 60 000 baz çifti (bp) veya 60 kilobazlık (kb) bir bölümünü



kapsarlar. Sadece 136. kodonda farklılık gösteren A $\gamma$  ve G $\gamma$  şeklinde iki  $\gamma$  geni vardır (20). A $\gamma$ 'nın 136. kodonu alanin, G $\gamma$ 'ninki ise glisindir (1, 19-21,). A $\gamma$  ile  $\delta$  geni arasında bir psödogen ( $\psi\beta$ ) yerleşmiştir. Bazı globin genleri RNA veya protein ürünü oluşturmazlar ve bu nedenle herhangi bir fonksiyonları yoktur. Bilinen genlere çok benzeyen fakat fonksiyonel olmayan DNA dizilerine psödogen adı verilir. Psödogenler genomda yayılmıştır ve evrim sırasında oluşan yan ürünler olarak düşünülmektedir. Önceleri fonksiyonel olan bu genler, kodlayan veya regülatör dizilerdeki mutasyonlarla inaktive edilmiştir (17). Bu gen  $\beta$  genine çok benzemekle birlikte, delesyon ve içine yerleşmiş bir dur kodonu ile kalıcı şekilde değişmiştir, bu nedenle işlevsel bir polipeptid kodlayamaz. Bu genleri, birlikte düzenleyen bir bölge,  $\beta$  genlerinin yukarı kısmında (upstream) (5' yönünde) yerleşmiştir (20).

Ortak atasal bir genden köken almaları nedeni ile tüm globin genleri birbirine benzer yapıya sahiptir. Kodlayıcı dizileri üç eksonda düzenlenmiştir. Her globin transkripsiyon birimi, 5' ve 3' uçlarında proteine yansımayan diziler içerir.  $\beta$  ve  $\alpha$ -globin eksonlarının uzunluğu benzer olmasına karşın (örneğin;  $\beta$  geninin 1.eksonu 30 kodon,  $\alpha$  geninin 1. eksonu 31 kodon kapsar) intronların uzunluğu farklıdır (20). Sentezlenen ilk RNA öncül RNA olup, hem intronlar hem de eksonları içerir. İtronlar daima GT nükleotidleriyle başlar ve AG nükleotidleriyle sonlanır. Protein sentezi için kullanılacak olan mRNA'da ise intronlar kesilerek uzaklaştırılmıştır (21).

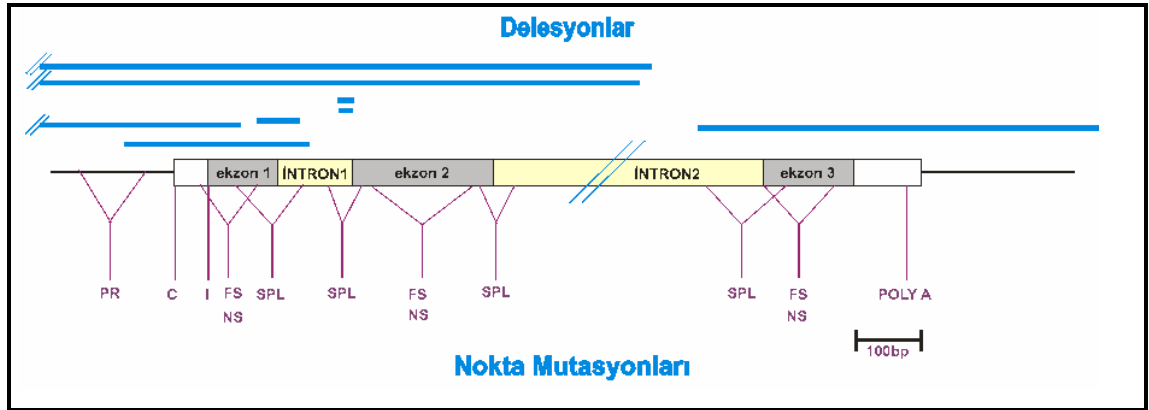
mRNA ve protein sentezinin azalmasına neden olan ve bilinen her tip mutasyon, beta talasemi nedeni olarak tanımlanmıştır.  $\beta$ -globin gen kompleksinin mutasyonları, farklı klinik fenotipli iki geniş gruba ayrılmaktadır. Hastaların büyük çoğunluğunda görülen bir grup mutasyon, yalnızca  $\beta$ -globin üretimini bozar ve basit beta talasemiye neden olmaktadır. Mutasyonların ikinci grubunda  $\beta$ -globin genine ilave olarak,  $\beta$ -globin demetinde ya da lokus kontrol bölgesinde bir ya da daha fazla geni ortadan kaldıran büyük delesyonlar vardır. Bu tip mutasyonlar kompleks talasemilere neden olmaktadır (17).

Bazı mutasyonlar  $\beta$ -globin zincir sentezini tamamen ortadan kaldırır; bu tür iki mutasyon taşıyan bireylerin fenotipi  $\beta^0$  talasemidir; diğer bir grup mutasyon ise yaklaşık %5-30 oranında  $\beta$ -globin sentezine izin verir; bu hastaların fenotipi  $\beta^+$  talasemidir (9, 33).

$\beta^0$  talasemide HbA sentezlenmez;  $\beta^+$  talasemide ise HbA söz konusu mutasyonun izin verdiği oranda sentezlenmektedir. Genin kodlayıcı bölgeleri ile ekson-intron sınırındaki konservatif bölgeleri hedef alan mutasyonlar  $\beta^0$  talasemiye, promotor bölgesinde, intronların iç kısımlarında ve genin Poli A sinyali civarında olan mutasyonlar  $\beta^+$  talasemiye yol açmaktadır. Bu mutasyonlar,  $\beta$ -globin geninden  $\beta$ -globin zincirlerine giden yol üzerinde gen ifadesinin değişik kademelerinde,  $\beta$ -globin geninin inaktive olmasına neden olurlar (9, 33).

## 2.4 BETA TALASEMİYE NEDEN OLAN MUTASYON TİPLERİ

Günümüzde beta talaseminin nedeni, yalnızca delesyonlar değil aynı zamanda gen içindeki nokta mutasyonlarıdır (9, 30, 33). Son yıllarda rutin kullanıma giren polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ve DNA dizi analizi ile beta talasemiye yol açtığı bilinen mutasyonların sayısı artmıştır. Bu geniş moleküler çeşitliliği biraz basite indirgeyen bir faktör, tüm mutasyonların her toplumda görülmemesi ve mutasyonların etnik gruplara özgü olmasıdır. Genelde bir toplumda belirlenen az sayıdaki mutasyon (9, 33) o toplumdaki beta talasemi genlerinin % 90-95'ini tanımlamaktadır (33).



PR: Promotor, C: Kep, I: Başlama kodonu, FS: Çerçeve kayması, NS: Nonsens, SPL: Splays, Poly A: Poli A

Şekil 2.2  $\beta$ -globin geninde beta talasemiye neden olan mutasyonlar (1)

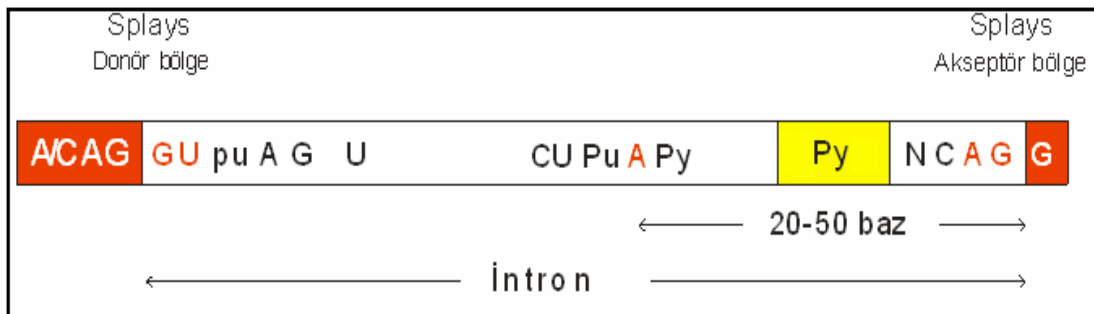
$\beta$ -globin genini etkileyen en azından 17 farklı delesyon tanımlanmıştır (1). Bunların en sık görülenlerinden biri olan Hb Lepor, delta ve beta genlerini içeren yaklaşık 7 kb'lik delesyon nedeniyle oluşur (17, 38). Diğer bir delesyon ise  $\beta$ -globin geninin 3' ucunda 619 bp büyüklüğünde olup Pakistan ve Hindistan'ın Sind ve Gujarati

toplumlarında yaygındır (1, 38). Bu delesyonların homozigot formları  $\beta^0$  talasemiye neden olur (1).

Beta talasemi mutasyonları; Promotor bölge mutasyonları, RNA splays mutasyonları (en sık olarak) ve mRNA kep ve 3'-ucuna Poli A kuyruğunun eklenmesi ile ilişkili mutasyonları içermektedir. Daha az olarak, genin kodlanan bölgesinde kısa ve stabil olmayan beta globin polipeptidine neden olan, nonsens ya da çerçeve kayması mutasyonlarını sayabiliriz (17).

**Defektif mRNA Sentezi:** Defektif mRNA sentezli beta talasemi hastalarının büyük çoğunluğunda öncül mRNA'dan intronların kesilip çıkarılması işlemi anomaliler vardır. Bu şekilde intronların tanınarak doğru kesilmesini engelleyen 24'ten fazla farklı mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar öncül mRNA'da bulunan bölgelere bağlı olarak üç gruba ayrılır (17).

**Grup 1. Splays Birleşme Mutasyonları:** İtronların 5'donör ya da 3' akseptör splays birleşmelerindeki konsensus dizilerinde oluşan mutasyonları içine alır (Şekil 2.3). 5' intron donör bölgesinde korunmuş GU ve 3' intron akseptör bölgesinde AG dinükleotidlerinin kritik olan yapısı nedeniyle, bu dinükleotidlerdeki mutasyonlar normal splays oluşumunu engeller. Normal akseptör yerinin inaktivasyonu, öncül RNA'da başka bir yerde, diğer akseptör benzeri dizilerin kullanımına neden olur. Bu alternatif yerler kriptik splays bölgesi olarak adlandırılır ve normalde kullanılmaz. Kriptik bölgeler ekzonlar veya intronlar içinde bulunabilir ve tek başlarına kullanılabilir veya diğer kriptik bölgelerle veya normal splays bölgeleriyle yarışa girebilir (17).



Pu: Pürin bazları, Py: Pirimidin bazları

Şekil 2.3 Splays konsensus dizileri

Donör ya da akseptör dinükleotidlere bitişik konsensus dizilerin önemi, mutasyonların etkisiyle de açıklanmaktadır. Böylece intron 1'in donör dizisinin beşinci ya da altıncı nükleotidinin değişimi, normal splays olayının etkinliğini azaltır; ancak bazen normal splayslar da olduğu için  $\beta^+$  talasemi fenotipleri gelişir (17).

RNA işlenmesi sırasındaki mutasyonlar belirgin olarak ekson ve intronun birleşme noktasında 5'GU ve 3'AG bölgesinde gözlenmektedir. Bu noktadaki tek baz değişiklikleri splaysı bozarak  $\beta^0$  talasemi fenotipine neden olmaktadır. IVS 1'in donör bölgesi içindeki tek baz substitüsyonları beta talaseminin farklı tiplerine neden olmaktadır (1).

**Grup 2. İtron Mutasyonları:** İtronunda yer alan kriptik splays içindeki bir mutasyon, bu bölgeyi normal splays bölgesine çok benzer ya da tamamen eşdeğer hale getirerek etkisini arttırabilir. Aktive edilmiş kriptik bölge, normal bölge ile çeşitli etkileşmeler yoluyla bir yarışa girer; sonuçta çok iyi bir şekilde korunmuş olan doğru splays bölgesinde azalan splays nedeniyle normal mRNA miktarı da azalır. Kriptik splays bölge mutasyonları, sıklıkla beta talasemi fenotipi oluştururlar (17).

RNA processing, ya intronları ya da eksonları içine alan yeni splays bölgeleri oluşturan mutasyonlar nedeniyle de etkilenir. Örneğin IVS 1'in pozisyon 110'daki G->A substitüsyonu, beta talaseminin Akdeniz bölgesindeki en yaygın mutasyonlardan biridir. Normal bölgede splaysın yaklaşık olarak sadece %10'una izin verir. Bu nedenle şiddetli  $\beta^+$  talasemi fenotipine neden olur. Benzer bir diğer mutasyon da IVS 1'in pozisyon 116'daki mutasyonudur.  $\beta^0$  talasemi fenotipiyle sonuçlanan bu mutasyon da beta-globin mRNA üretimi çok az veya hiç yoktur (1).

**Grup 3. Splaysı Etkileyen Ekzon Mutasyonları:** Genel olarak kodon olarak kullanılan bölgedeki hastalığa neden olan mutasyonlar, proteinin aminoasit dizisinde değişikliğe neden olurken, bu bölgenin dışında kalan mutasyonlar spesifik olarak mRNA'da değişiklik yaratarak hastalığa neden olur. Yapısal varyant HbE her iki problemin tek bir mutasyonda olabileceğini gösterir. Hafif beta talasemiye neden olan böyle bir mutasyon 24. kodonda bulunmuştur. Ancak bu mutasyon kodlanan aminoasiti (glisin için GGT ve GGA kodu) değiştirmez; bu bir sinonim mutasyon örneğidir (17).

Anormal splay ile sonuçlanan diğerk bir mekanizma ise ekson 1 kriptik donör bölgesindedir. Bu bölge GT dinükleotidi içerir. Kodon 19'da A->G, kodon 26'da G->A ve kodon 27'de G->T substitüsyonları beta globin mRNA'sının üretimini azaltır (1).

**Fonksiyonel Olmayan mRNA'lar:** Bazı mRNA'lar fonksiyonel değildir. Stop kodonların oluşumu nedeni ile translasyonun beklenenden önce sonlanmasına neden olan mutasyonlar mRNA'ların fonksiyonel olarak kullanımını engeller. İki beta talasemi mutasyonu bu etkiyi temsil eder. Translasyondaki yetersizliklerden biri de (Gln39Stop) nonsens bir mutasyon oluşturan tek bir nükleotit değışimidir. Bir başkasında ise kodlanan dizide tek bir baz çiftinin delesyonuyla sonuçlanan bir çerçeve kayması mutasyonu gerçekleşir. Yeni okunan çerçevede prematür stop kodon normal terminasyon sinyalinden hemen önce okunur. Bu durumda beta globin hiç yapılmadığı için, fonksiyonel olmayan mRNA mutasyonlarının bu her iki tipi de  $\beta^0$  talasemiye neden olur. Bunun aksine proteinin karboksil ucunun yanındaki çerçeve kayması, çoğunlukla mRNA'nın normal olarak translasyonuna ya da varyant bir hemoglobine yol açan uzun globin zincirlerinin üretimine izin verir (17).

Zincir terminasyon kodonunda bir aminoasit kodonunun değışimine neden olan baz substitüsyonları mRNA'nın translasyonunu önler ve  $\beta^0$  talasemi ile sonuçlanır. Güneydoğu Asya'da yaygın olan kodon 17 ve Akdeniz Bölgesi'nde yüksek frekansı olan kodon 39 mutasyonları örnek olarak gösterilebilir (1).

**Beta Globin mRNA'sının 5'-ucuna 7-metil guanozin ve 3'-ucuna Poli A kuyruğunun eklenmesi ile ilişkili mutasyonlar:** Ökaryotik RNA transkriptlerinin mRNA olma yolundaki ilk transkripsiyon sonrası değışiklik bu moleküllerin 5'-ucuna 7-metil guanozin (-7mG) kep yapısının takılmasıdır. 3' ucuna eklenen poli A (çoklu adenin) uzantısı ise -7mG yapısı takıldıktan sonra eklenmektedir. Poli A uzantısının eklenmesi 3'-ucunda bulunan ve son derece korunmuş olan AAUAA dizisinin varlığına bağlıdır. Bu dizide bir mutasyon varsa Poli A kuyruğı takılamaz. Poli A kuyruğı taşımayan mRNA ise hızla parçalanır. Asyalı bir beta talasemi hastasında birinci nükleotidde A→C transversiyonu olduğu gösterilmiştir. Sinyal dizisini AACAA'ya dönüştüren bir mutasyon taşıyan bir başka hastada da ise normal pozisyonda poliadenilasyonun izlendiğı fakat beta globin mRNA'sının küçük bir bölümünün üretildiğı gözlenmiştir (17).

$\beta$ -globin geninin -101 pozisyonundaki C->T substitüsyonu taşıyan bireylerin normal fenotipli olduğu görülmüştür. Sadece bileşik heterozigot olarak taşıdığı durumda şiddetli hastalık formu olarak tanımlanabilir. KEP bölgesi (+1)'nde A->C substitüsyonunun tek örneği Asya Hintlerinde görülmüştür. Mutasyon olarak homozigot olmasına rağmen fenotipte beta talasemi taşıyıcısı olarak yansımıştır (1).

#### **2.4.1 Talasemi Fenotipli Varyant Hemoglobinler**

Bugün yaklaşık 700 anormal hemoglobin tanımlanmıştır (30, 33, 34). Bunların 335'i  $\beta$  zinciri varyantıdır (33, 45). Anormal hemoglobinler genellikle bölge ve etnik gruba özgündür (30).

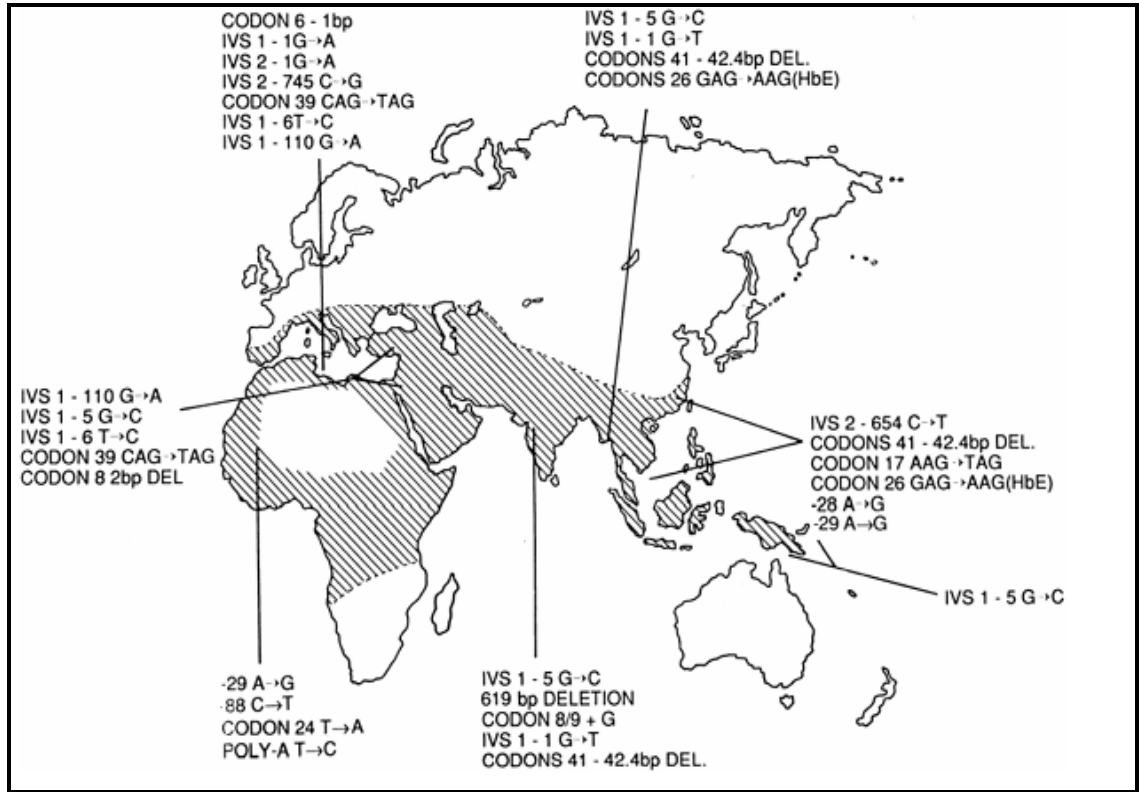
1. HbE, sentezindeki azalmış oranıyla talasemiye neden olan bir  $\beta$ -globin'in yapısal varyantıdır (Glutamin26Lizin) (17, 46). Dünyada belki de en yaygın yapısal hemoglobin anomalisi olup, Güney Asya'da sıkça bulunur. HbE allel sıklığı,  $\beta$ -globin mutantlarla olan allel ilişkisi ve RNA splays üzerine etkileri gibi birçok nedenden dolayı önemlidir. HbE homozigotları, asemptomatiktir ve sadece hafif anemik olmasına rağmen, HbE mutasyonu ve farklı beta talasemi allelleriyle birlikte oluşan genetik bileşenlerle anormal bir fenotip oluşturur (17).

2.  $\delta\beta$  talasemiler,  $\delta\beta^+$  ve  $\delta\beta^o$  talasemiler olarak sınıflandırılır.  $\delta\beta^o$  talasemilerde hem  $\delta$ -globin ve hem de  $\beta$ -globin genlerinin sentezi yoktur.  $\delta\beta^+$  talasemiler, Hemoglobin Lepore olarak adlandırılır (1). Normal bir  $\delta$  zincirindeki N-terminal kısmının  $\alpha$ -olmayan zincir kısmı ile normal bir  $\beta$  zincirindeki C-terminal kısmının birleşimiyle füzyon oluşumu izlenir (17).

## 2.5 EPİDEMİYOLOJİ

Beta talasemi en yaygın tek gen hastalıklarından biridir (5, 30, 47). Dünya populasyonunun yaklaşık %4.5'i hemoglobin molekülünün globin zincirinde bir mutasyon taşıyıcısıdır (3, 30).

Beta talasemi alfa talasemi gibi dünyada en sık görülen bir talasemi tipidir (2, 3). Bu talasemi Akdeniz Ülkeleri, Kuzey ve Batı Afrika'dan Orta Doğu ve Güney Doğu Asya Ülkelerini içine alan bir kuşakta yayılma gösterir (şekil 2. 3) (3, 38, 44, 48). Bugünlerde populasyonun hızlı yayılışı yüzünden Avrupa Kıtası, Kuzey ve Güney Amerika'ya da yayılmaya başlamıştır (30). Hemoglobinopatiler özellikle malyarının endemik olduğu bölgelerde yaygındır (19, 49).



Şekil 2.4 Beta talasemi mutasyonlarının dünyadaki yayılışı (1)

Beta talasemi taşıyıcılığı oranı Türkiye genelinde % 2 olmakla birlikte bu sayı Türkiye'nin bazı yörelerinde % 10'a kadar çıkmaktadır. Akraba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği, Türkiye'de beklenenin de üzerinde beta talasemili çocuk

doğmasının nedenidir. Hastalık, hafif klinikli beta talasemi intermedia ile transfüzyona bağımlı beta talasemi major arasında seyreden çok geniş bir yelpazede görülmekle birlikte Türkiye’de beta talasemi major olguları ağır basmaktadır (8). Halen Türk toplumunda 40’ı aşkın mutasyon tanımlanmıştır (10). Bu geniş moleküler çeşitlilik, hastalığa önlem alma stratejilerini ve programlarını önemli ölçüde zorlaştırmaktadır.

Ülkemizde Çukurova, Akdeniz kıyı şeridi, Ege ve Marmara bölgelerinde talasemi taşıyıcılığı çok sıktır. İç Anadolu, Doğu ve Güneydoğu Anadolu’ da yeterince araştırma merkezi olmadığından bu yörelerde kesin bir rakam bilinmemektedir. Sağlıklı Türk popülasyonunda beta talasemi taşıyıcı sıklığı % 2.1’dir. 1.300.000 taşıyıcı ve 4000 civarında hasta vardır (50).

Ülkemizde 30.12.1993 tarihinde 3960 sayılı Kalıtsal Kan Hastalıkları ile Mücadele Kanunu çıkmıştır. Bu çerçevede Bakanlığa bağlı olarak Antalya, Antakya, Mersin ve Muğla’da 1994 yılında talasemi merkezleri kurulmuştur (50).

Sağlık Bakanlığı ve Ulusal Hemoglobinopati Konseyi son beş yılda Marmara, Ege ve Akdeniz bölgelerindeki 16 merkezin yaptığı tarama çalışmalarını toplamıştır. Toplam 377.339 sağlıklı kişi taranmış olup, taranan kişi sayısı ile talasemi ve anormal hemoglobin sıklığının illere göre dağılımı şöyledir. Adana: %3.7 (68460), Antakya: %4.6 (47755), Antalya: %13.1 (19594), Aydın: %5.1 (2209), Bursa: %1.7 (4040), Denizli: %2.6 (20000), Diyarbakır: %3.6 (2830), Edirne: %6.4 (2610), Isparta: %2.4 (6654), İstanbul: %4.5 (4944), İzmir: %4.8 (97510), K.Maraş: %0.7 (2398), Kırklareli: % 3.4 (2439), Mersin: %2.3 (40977), Muğla: %4.5 (52042) ve Urfa: %6.4 (2913). Sonuç olarak, talaseminin sık görüldüğü 16 merkezde son beş yıl içinde 377.399 sağlıklı kişi taranmış olup, ortalama talasemi taşıyıcı sıklığı %4.3 bulunmuştur (50, 51).

Türkiye’de çok sayıda hemoglobin varyantının görülmesi, Anadolu’da yıllar boyunca çok çeşitli ırk ve kültürlerin yaşamasından ve akraba evliliklerinden kaynaklanmaktadır. Türkiye’de yapılan her 4 evlilikten biri akraba evliliği olup % 70’i birinci dereceden akrabalar arasında yapılmaktadır (50).



Türkiye’de akraba evliliklerinin fazla olmasından dolayı evlilik öncesi tarama testleri ile yeni hasta doğumunun engellenebilmesi ve koruyucu hekimliğin başlatılabilmesi amacıyla Hemoglobinopati Kontrol Programı başlatılmıştır (50).

Türkiye’de beta talaseminin moleküler temeli ile ilgili araştırmalar ilk kez Prof. Dr. Muzaffer Aksoy tarafından yapılmıştır (7, 39, 41). 1971’de beta talasemi prevalansının %2 olduğu (Çavdar ve Arcasoy tarafından) bildirilmiştir (39, 41). 1987’den beri beta talaseminin moleküler temeli aydınlatılmaktadır (Akar ve arkadaşları 1987; Diaz-Chico ve arkadaşları 1988; Gürgey ve arkadaşları 1989; Schnee ve arkadaşları 1989; Aulehla-Scholz ve arkadaşları 1990; Öner ve arkadaşları 1990; Başak ve arkadaşları 1992a; Atalay ve arkadaşları 1993; Altay ve Başak 1995; Nisli ve arkadaşları 1997; Tadmouri ve arkadaşları 1998a ) (39).

Türkiye’de moleküler temele dayalı çalışmaların başlaması beta talasemi araştırmalarında büyük ilerlemelere izin vermiştir. 1987’de Akdeniz toplumlarında yaygın üç beta talasemi mutasyonu *kodon 39 (C>T)* , *IVS 1.6 (T>C)* ve *IVS 1.110 (G>A)* olarak tanımlanmış iken, Akar ve arkadaşları sadece sonuncusunu Türk hastalarında baskın olarak tanımlamışlardır (5, 52). Bu çalışmalar göstermiştir ki çoğu diğer popülasyonların aksine beta talasemi, Türk toplumunda oldukça heterojendir. 40’ı aşkın mutasyon da bu hastalığın klinik bulgularındaki büyük değişkenlikten dolayı hesaplanmıştır; bu yüzden dünyada tanımlanan her 5 mutasyondan biri Türkiye popülasyonunda bulunmuştur. En yaygın 7 mutasyon, Türk popülasyonunda toplam beta talasemi alellerinin yaklaşık %72’sini oluşturmaktadır (*IVS 1.110, IVS 1.6, IVS 2.1 kodon 8, IVS 1.1, IVS 2.745*) (5, 53).

### **3. MATERYAL VE METOD**

#### **3.1 Alet ve Cihazlar**

1. Kan sayım cihazı (Coulter A<sup>C</sup>.T 5diff AL)
2. Santrifüj (Hettich)
3. Mikro santrifüj (Hettich Mikro 20)
4. Etüv (Heraeus)
5. Derin dondurucu (-20°C Regal)
6. Thermal cycler (Applied Biosystems 9600)
7. Mikrodalga fırın (Beko MD 1500)
8. Jel elektroforez cihazı (Bio-Rad Power Pac Basic)
9. Fotograf bağlantılı UV translüminatör (Vilber Lourmat)
10. Su banyosu (Memmert)
11. Hassas terazi (Precisa XB 320M)
12. Vorteks (Nüve NM 110)
13. Magnetik karıştırıcı (Nüve MK 390)
14. Otomatik pipet (20, 100, 200 µl) (eppendorf)
15. Orbital shaker (Gerhardt Laboshake)

#### **3.2 Sarf Malzemeler**

1. Beta Globin Strip Assay Kiti (Vienna Lab)
2. Amonyum Klorid MA=53.49 gr (Ambresco)
3. Potasyum Hidrojen Karbonat MA=100.1 gr/mol (Merck)
4. EDTA (ethilendiamintetraasetikasit) MA=292.2 gr (pH8) (Fluka)
5. SDS (sodyom dodecyl sulfat) MA=288.38 gr (Ambresco)
6. Amonyum Asetat MA=77.08 gr (J.T.Baker)
7. Tris-aminomethan MA=121.14 gr/mol (Merck)
8. Borik Asit MA=61.83 gr/mol (J.T.Baker)
9. Etil alkol (J.T.Baker)
10. 2-Propanol (J.T.Baker)
11. Agaroz (Sigma)
12. Ethidium bromür

13. Yükleme boyası (Loading dye) (6X Fermentas)

14. DNA boyut marker (Biotools)

### **3.3 Örnek Toplama**

İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Hematoloji ve Pediatrik Hematoloji Polikliniklerine başvuran ve talasemi tanısı almış hastalardan kan örnekleri alınmıştır.

### **3.4 Yöntemler**

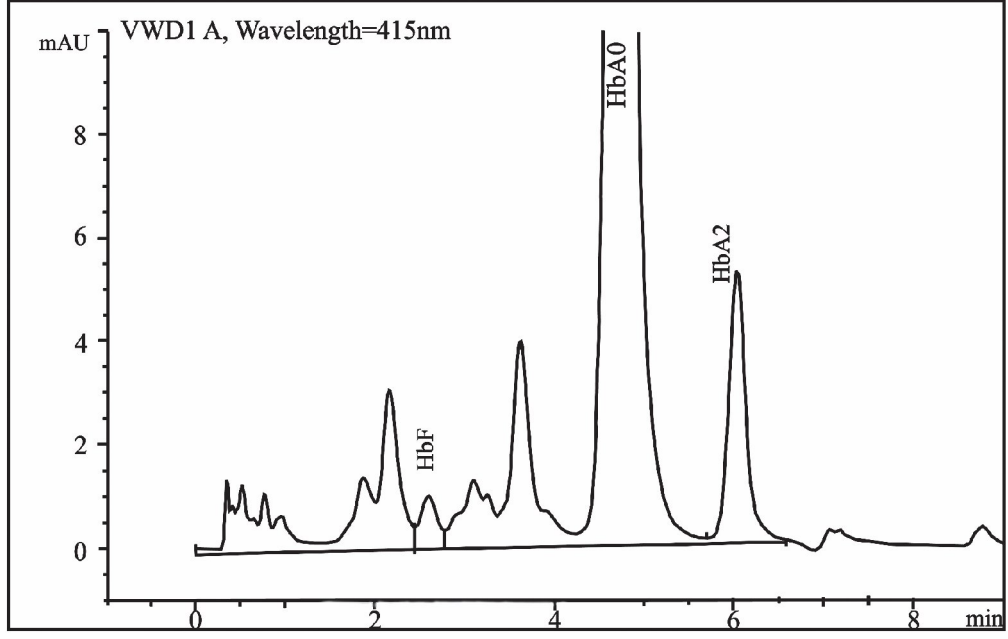
#### **3.4.1 Hematolojik İncelemeler**

Hemoglobin (Hb), hematokrit (Hct), eritrosit (RBC), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH), ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) parametreleri Coulter A<sup>C</sup>.T 5 diff AL cihazı ile belirlenmiştir (24, 54).

##### **3.4.1.1 Hemoglobin Elektroforezi**

#### **Yöntem**

Talasemileri teşhis edebilmek amacıyla yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği kullanılmıştır. HPLC'nin en önemli özelliği ayırma gücü, duyarlılığı ve geri kazanımı yüksek, hızlı bir yöntem olmasıdır (55). Güvenilir, tekrarlanabilir ve hızlı olan bu yöntem, hemoglobin ve globinlerin ayrıştırılması ve miktarlarının belirlenmesi için kullanılmaktadır (28, 56, 57). Zayıf iyon değiştirici kolonlar hemoglobinlerin analizinde (28), globin zincirleri de HPLC ile ayrıştırılarak hangi zincirde mutasyonun olduğu belirlenmektedir (Şekil 2.1). Bu işlem globinlerin hidrofobik özelliklerinden faydalanılarak yapılmaktadır (28, 58).



Şekil 3.1 Hemoglobin elektroforezi

### 3.4.2 $\beta$ -Globin Geni Mutasyon Analizi

Bu çalışmada 41 hastanın kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınarak aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

1. Kandan DNA izolasyonu
2. Biotin ile işaretlenmiş primerler kullanılarak  $\beta$ -globin geninin amplifiye edilmesi ve UV translüminatörde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ürünlerinin gözlenmesi
3. PZR ürününün normal ve mutant problemleri taşıyan hazır membranla hibridizasyona sokulması ve yıkanması
4. Renk reaksiyonu ile görüntüleme ve değerlendirme (9).

$\beta$ -globin strip testi,  $\beta$ -globin geninde sıklıkla görülen ve Akdeniz ülkelerine özgü 22 mutasyonu kapsamaktadır. Bunların iki tanesi hemoglobin S ve hemoglobin C, 20 tanesi ise beta talasemi mutasyonudur. Membranın üst kısmında toplam 22 mutant dizi, alt kısmında ise 12 tane normal dizi vardır. Test şeridindeki mutasyonların bazıları birbirine çok yakın oldukları için, bunlar için tek bir normal oligonükleotid probu

kullanılmıştır. Dolayısıyla 22 mutasyon sadece 12 normal prob ile tanımlanabilmiştir (9).

### **3.4.2.1 Tam Kandan DNA izolasyonu**

#### **3.4.2.1.1 Ayıraçlar**

##### **a. Eritrosit Lizis Çözeltisi**

500 ml hazırlamak için;

155 mM Amonyum Klorid MA=53.49 gr

10 mM Potasyum Hidrojen Karbonat MA=100.1 gr

1 mM EDTA MA=292.2 gr (pH8) (NaOH içinde eritilir)

Distile su ile 500 ml'ye tamamlanır.

+4°C'de saklanmalıdır.

##### **b. Lökosit Lizis Çözeltisi**

500 ml hazırlamak için;

10 gr SDS

25 ml EDTA MA=292.2 gr (pH=8)

Distile su ile 500 ml'ye tamamlanır.

Oda ısısında saklanmalıdır.

##### **c. 10 mM Amonyum Asetat Çözeltisi**

Oda ısısında saklanmalıdır.

##### **d. % 70'lik etil alkol**

##### **e. 2-Propanol**

#### **3.4.2.1.2 Yöntem**

- 3 ml EDTA' lı tam kan 9 ml eritrosit lizis çözeltisi ile falkon tüplerinde karıştırılarak 20 dakika oda ısısında bekletilir.
- 2500 rpm'de 12 dakika santrifüj yapılır. Süpernatant atılır. Lökosit pelleti üzerine 3 ml lökosit lizis çözeltisi eklenerek vortekslenir ve 2-3 gün etüvde inkübasyona bırakılır.
- Etüvden çıkarılan tüplerin üzerine 3 ml amonyum asetat eklenerek 3500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir.

- Santrifüj işleminin sonrasında süpernatant kısmı yeni hazırlanan falkon tüplerine alınarak üzerine 3 ml 2-propanol eklenir ve falkon tüpü iki dakika alt üst edilir.
- DNA pelletinin görülmesinden sonra 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant atılarak DNA çöktürülür ve üzerine %70’lik etil alkol eklenerek 4000 rpm’de 8 dakika santrifüj edilir.
- Süre sonunda süpernatant atılır ve DNA bir gece oda ısısında kurumaya bırakılır.
- Ertesi gün DNA’nın üzerine 200 µl steril distile su eklenerek 2-3 gün +4°C’de bekletilir. Süre sonunda DNA ependorflara alınarak kullanılmak üzere -20°C’ye kaldırılır.

### 3.4.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Belirli Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu

Mikrotüpler içinde hazırlanan PZR karışımı Termal Döngü Düzenleyici Cihazı’na (59) (Termal Cycler) yerleştirilerek amplifikasyon başlatılır.

PZR karışımı

Amplifikasyon karışımı	15 µl
Taq dilüsyonu	4,8 µl
Taq polimeraz (1U/µl)	0,2 µl
Genomik DNA	5µl
Toplam hacim	25µl

### Termal Döngü Protokolü

Termal döngü protokolünün ısı ve süreleri

94°C	2 dakika	
94°C	10 saniye	→35 döngü
54°C	15 saniye	
72°C	45 saniye	
72°C	3 dakika	

### 3.4.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi

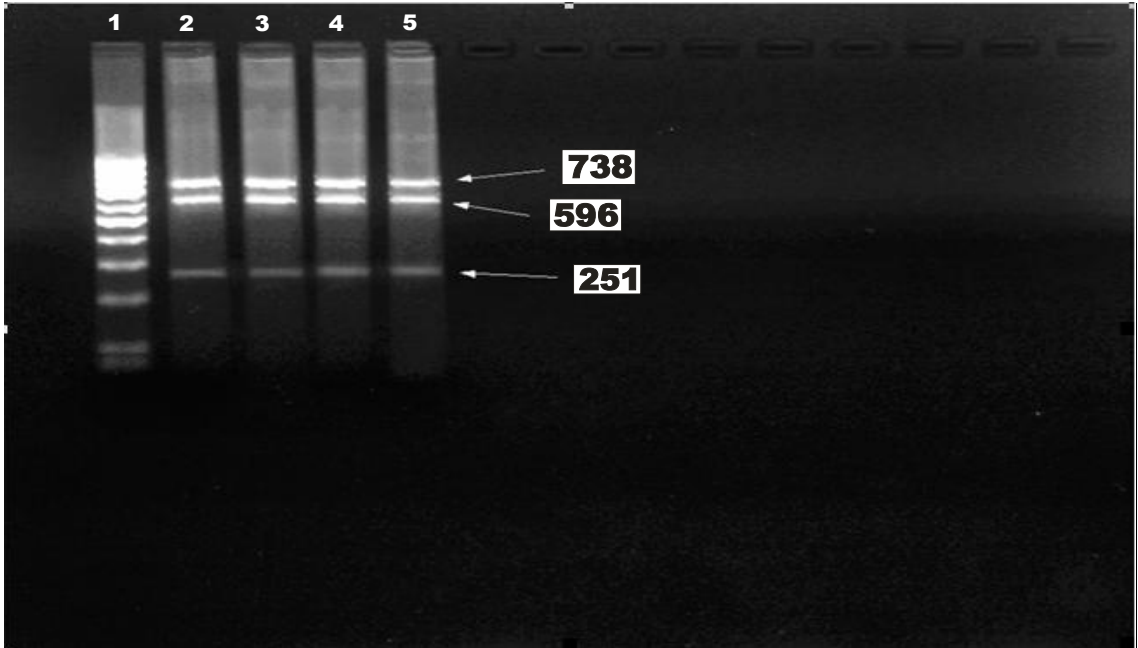
1 lt 10X TBE (Tris, Borik Asit, EDTA) Buffer: 108 gr Tris

55 gr Borik Asit

0.5 M EDTA (pH=8)

TBE'nin hazırlanışı: 108 gr tris ve 55 gr borik asit 700 µl distile su içinde çözülür. Üzerine 40 ml 0.5M EDTA (pH=8) eklenir ve distile su ile 1 litreye tamamlanır.

% 2'lik agaroz jel, 100 ml 1X TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritildikten sonra bir süre soğumaya bırakılır. Çözünen agaroz jelin içine 7µl ethidium bromid eklenerek jel içinde homojen olarak dağılması sağlanır. Jel, elektroforez tepsisine döküldükten sonra soğumaya bırakılır. 1X TBE tamponu ile dolu olan elektroforez tankı içine yerleştirilerek jel içine yerleştirilmiş tarak çıkartıldıktan sonra oluşan kuyulara 7µl ampikon, 3 µl yükleme boyası ile karıştırılarak pipetlenir. DNA boyut markerı da bir başka kuyuya pipetlenerek 90 voltta 60 dakika yürütülür. 251, 596, 738 bp'lerin gözlenmesi ile multiplex PZR kontrol edilmiştir. DNA fragmentleri UV translüminatör ile görüntülenip fotoğrafı çekilerek değerlendirilir (Şekil 2.2).



1. Boyut marker; 2,3,4 ve 5 PZR ürünleri

Şekil 3.2 Agaroz Jel Elektroforezi

#### 3.4.2.4 Hibridizasyon (45°)

12 tane normal ve 22 tane de mutant-spesifik immobilize oligonükleotid problemlerini taşıyan bir test şeridine amplifikasyon ürünlerinin hibridizasyonu sağlanıp sonrasında biyotinle işaretlenen dizilerin streptavidine-alkaline fosfataz ve renk substratları kullanılarak belirlenmesinin ardından sonuçlar analiz edilmiştir (60).

Stok Çözeltiler

Denaturasyon solusyonu (DNAT)

Hibridizasyon solusyonu

Yıkama solusyonu A

Konjugat solusyonu

Yıkama solusyonu B

Renk geliştirme solusyonu

- 10µl DNAT tepsiye pipetlenir.
- DNAT'ın üzerine 10µl amplifikasyon ürünü pipetlenerek 5 dakika oda ısısında beklenir.
- Bu karışımın üzerine 1 ml hibridizasyon solusyonu eklenerek test stripleri tepside ilgili bölgelere yerleştirildikten sonra 45°C'de çalkalamalı su banyosunda 30 dakika inkübasyona bırakılır.
- Süre sonunda hibridizasyon solusyonunun hepsi pastör pipeti ile alınarak 1ml yıkama solusyonu A bırakılır ve 10 saniye çalkalanır.
- Daha sonra tepsideki yıkama solusyonu A yenilenir ve tepsi aynı ısıda 15 dakika su banyosuna konur. Bu işlem iki defa tekrarlanır.
- Yıkama solusyonu A tepside alınır, 1 ml konjugat solusyonu eklenerek oda ısısında orbital shakerda 180 rpm'de 15 dakika inkübe edilir.
- Konjugat solusyonu tepside alınır ve 1 ml yıkama solusyonu B ile 10 saniyelik çalkalama işleminden sonra iki kez yıkama solusyonu B'yi yenileyerek 5'er dakika oda ısısında orbital shakerda 180 rpm'de 15 dakika inkübasyona bırakılır.



- Hibridizasyon, yıkama solusyonu B'nin tepside alınır 1 ml renk geliştirme solusyonunun 15 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilmesiyle sonlanır. Stripler distile su ile yıkanarak değerlendirilmeye hazırdır.

#### 4. BULGULAR

Bu çalışmada İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi'nde tedavi gören 41 hastadan alınan kan örnekleri çalışılmıştır. Hastaların hematolojik verileri Coulter A<sup>C</sup>.T 5 diff AL cihazı ile HbA, HbA<sub>2</sub>, HbF değerleri ise HPLC yöntemiyle belirlenmiş olup çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelge 4.1'de gözlemlendiği gibi 41 örneğin ancak 32'sinde beta talasemi mutasyonu saptanmıştır.

Mutasyonların belirlenmesinde mutant ve normal oligonükleotit problemlerinin pozisyonlarını gösteren referans teststrip dizaynı kullanılmıştır (Şekil 4.1). Bu aşamada herhangi bir gen bölgesi ile ilgili olarak yalnızca normal allel için pozitiflik varsa birey normal, yalnızca mutant allel için pozitiflik varsa birey homozigot mutant ve hem normal hem de mutant allel için pozitiflik varsa birey heterozigot olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.2).

Beta talasemi ön tanısı ile referans edilen 41 olgunun 32'sinde mutasyon belirlenmiştir (%78.05). Mutasyonlar çeşitlilik göstermektedir. Bunlar arasında homozigot mutasyonlar *IVS 1.110 [G>A] / IVS1.110 [G>A]* (N=4), *IVS 1.1 / IVS 1.1* (N=2) olmak üzere tanımlanmıştır. Heterozigot mutasyonlar arasında *IVS 1.110 [G>A]* (N=10), *IVS 2.1* (N=3), *IVS 1.1* (N=2), *kodon 8* (N=3), *kodon 8/9* (N=3), *kodon 5* (N=1), *kodon 22* (N=1), *kodon 39* (N=1) ve *kodon 44* (N=2) belirlenmiştir. 9 olgu ise klinik olarak talasemi major veya talasemi minör tanısı almasına rağmen mutasyon belirlenememiştir.

Beta talasemi ön tanılı hastalarda beta globin genotipleri çizelge 4.2'de ve beta globin mutasyonlarını homozigot ya da heterozigot olarak taşıyan olgularda allellerin (N=32) frekansı ise çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Olguların hematolojik bulguları ve mutasyon tipleri

No	Yaş	Ad	RBC (10 <sup>12</sup> /L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	HbA (%)	HbA <sub>2</sub> (%)	HbF (%)	Mutasyon tipi
1	1.5	SP	5.10	11.7	36.7	71	31.8	32.4	7.7	1.2	90.2	IVS 1.110/ IVS 1.110
2	2.5	MK	3.50	10.1	30.6	87.4	28.8	33.0	71.7	2.2	26.1	IVS 1.110/ IVS 1.110
3	9	ED	3.75	9.8	30.4	81.5	26.4	32.0	74.0	3.1	23.1	IVS 1.110/ IVS 1.110
4	18	EK	2.89	6.0	25.3	72.7	20.8	28.6	71.4	2.6	26.0	IVS 1.110/ IVS 1.110
5	5	DA	3.85	9.9	31.1	80.8	25.7	31.8	62.3	1.7	36.0	IVS 1.1/ IVS 1.1
6	10	SA	3.55	9.5	28.4	79.9	26.7	33.4	72.0	2.2	25.8	IVS 1.1/ IVS 1.1
7	2	İKA	4.41	10.2	32.4	65.1	20.4	31.4	91.7	5.4	2.5	IVS 1.110
8	21	EA	4.98	10.5	32.1	63.0	20.5	32.6	93.7	5.2	1.0	IVS 1.110
9	21	CMK	5.98	12.3	39.5	66.0	20.6	31.2	95.3	4.4	0.3	IVS 1.110
10	25	SG	5.21	11.2	35.1	66.1	21.0	31.8	92.1	5.9	2.0	IVS 1.110
11	28	SG	4.58	10.8	32.6	62.4	21.4	31.6	94.2	3.8	2.0	IVS 1.110
12	30	GN	6.70	10.9	34.9	63.5	22.4	31.3	94.8	4.4	1.0	IVS 1.110
13	31	EA	6.18	13.8	42.5	68.8	22.3	32.4	95.1	4.1	0.8	IVS 1.110
14	37	MT	5.31	10.8	33.7	65.7	21.0	32.0	95.0	4.3	0.7	IVS 1.110
15	37	ÖG	5.15	10.4	32.8	63.8	20.2	30.8	93.5	5.0	1.5	IVS 1.110
16	42	İD	5.42	11.4	35.6	61.3	19.4	30.6	92.1	6.5	1.4	IVS 1.110
17	21	DT	4.32	10.3	31.6	64.2	21.3	30.4	93.1	4.1	2.8	IVS 2.1
18	24	PK	5.79	11.9	37.4	64.6	20.6	31.9	94.4	4.6	1.0	IVS 2.1
19	32	AY	5.41	11.6	35.4	60.2	20.1	30.4	94.6	4.5	0.9	IVS 2.1
20	25	HK	6.50	12.5	38.8	59.6	19.2	32.1	93.2	5.5	1.3	IVS 1.1
21	26	SB	4.60	9.5	30.1	62.1	19.5	31.5	95.0	4.5	0.9	IVS 1.1
22	31	MÖ	5.30	11.6	33.4	62.0	20.6	32.1	95.0	4.6	0.6	kodon 8
23	25	NA	4.80	9.6	30.9	62.1	19.3	31.3	91.6	3.9	4.5	kodon 8
24	4	RÖ	4.43	10.6	30.1	62.5	19.8	30.2	92.5	4.6	2.9	kodon 8
25	7	ACK	5.95	11.1	34.7	58.3	18.6	31.9	93.9	4.7	1.5	kodon 8/9
26	37	GK	4.81	10.7	34.4	65.0	20.3	31.1	94.7	4.3	1.0	kodon 8/9
27	41	SK	5.70	12.3	37.8	65.8	22.3	31.4	93.4	4.7	2.0	kodon 8/9
28	20	AB	6.77	12.9	41.2	60	19	33.9	94.7	4.2	1.1	kodon 44
29	32	SB	5.60	10.4	32.4	62.9	20.3	32.2	93.0	5.1	1.9	kodon 44
30	31	EMK	5.02	10.4	30.9	61.5	20.7	33.7	86.2	10.8	3.0	kodon 5
31	50	YS	5.12	11.6	34.5	68.0	22.1	30.5	93.0	5.0	2.0	kodon 22
32	30	İG	5.83	11.6	35.5	60.8	19.9	32.7	88.7	8.0	3.3	kodon 39
33	1.5	HD	3.10	8.8	10.9	81	33.0	27.0	0.7	6.6	92.7	NORMAL
34	39	AŞ	4.94	9.0	29.0	58.8	18.3	31.1	91.0	7.6	1.4	NORMAL
35	32	EÖ	5.81	11.8	36.3	62.6	18.8	32.6	95.8	0.3	3.9	NORMAL
36	32	FA	5.42	12.4	40.0	61.0	18.8	30.9	90.5	8.5	1.0	NORMAL
37	28	SA	5.30	11.1	34.7	61.9	19.8	31.9	90.7	7.2	2.1	NORMAL
38	44	NA	3.02	6.6	27.6	49.9	14.5	29.1	92.0	6.5	1.5	NORMAL
39	51	KB	4.31	9.9	31.8	73.7	23.1	31.3	97.1	1.6	1.4	NORMAL
40	46	YE	5.51	14.8	42.6	61.0	18.6	30.4	93.4	4.8	1.8	NORMAL
41	46	FT	3.80	8.7	28.0	63.1	19.7	31.1	94.8	4.2	1.0	NORMAL

RBC: Eritrosit, Hb: Hemoglobin, Hct: Hematokrit, MCV: Ortalama eritrosit hacmi, MCH: Ortalama eritrosit hemoglobini, MCHC: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu

Çizelge 4.2 Beta talasemi ön tanılı hastalarda beta globin genotipleri

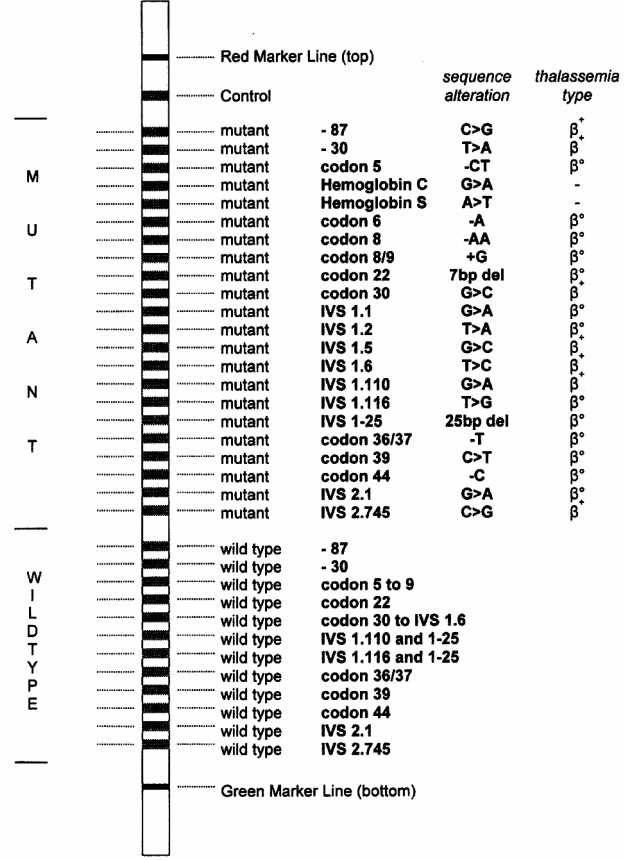
<b>GENOTİPLER</b>		
<b>Allel 1</b>	<b>Allel 2</b>	<b>Hasta sayısı</b>
IVS 1.110 (G>A)	IVS 1.110 (G>A)	4
IVS 1.110 (G>A)	wt	10
IVS 2.1 (G>A)	wt	3
IVS 1.1 (G>A)	IVS 1.1 (G>A)	2
IVS 1.1 (G>A)	wt	2
kodon 8 (-AA)	wt	3
kodon 8/9 (+G)	wt	3
kodon 5 (-CT)	wt	1
kodon 22 (7bp del)	wt	1
kodon 39 (C>T)	wt	1
kodon 44 (-C)	wt	2
wt	wt	9
<b>Toplam</b>		<b>41</b>

wt : yabancı tip, normal allel

Çizelge 4.3 Beta globin mutasyonlarını homozigot ya da heterozigot olarak taşıyan olgularda allellerin (N=32) frekansı

<b>Mutasyon</b>	<b>Allel sayısı</b>	<b>%</b>
IVS 1.110 (G>A)	18	28.13
IVS 2.1 (G>A)	3	4.69
IVS 1.1 (G>A)	6	9.38
kodon 8 (-AA)	3	4.69
kodon 8/9 (+G)	3	4.69
kodon 5 (-CT)	1	1.56
kodon 22 (7bp del)	1	1.56
kodon 39 (C>T)	1	1.56
kodon 44 (-C)	2	3.13
wt	26	40.63
<b>Toplam</b>	<b>64</b>	<b>100</b>

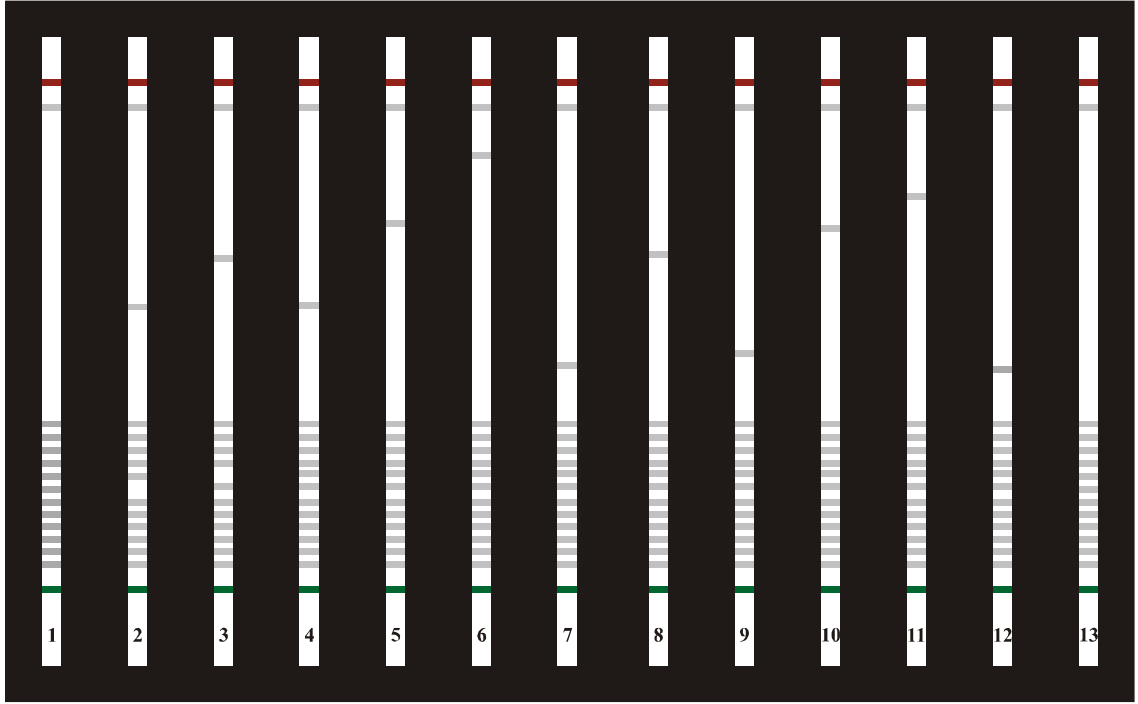
wt.: yabancı tip, normal allel



Şekil 4.1 Mutant ve normal oligonükleotit problemlerinin pozisyonlarını gösteren referans membran

Çizelge 4.4 StripAssay sonuçlarının değerlendirilmesi

Wild type	Mutant	Genotip
pozitif	negatif	normal
pozitif	pozitif	heterozigot
negatif	pozitif	homozigot



Şekil 4.2 Farklı genotiplere sahip hasta sonuçları

1. Normal
2. IVS 1.110 (G>A) homozigot
3. IVS 1.1 (G>A) homozigot
4. IVS 1.110 (G>A) heterozigot
5. Kodon 8/9 (+G) heterozigot
6. Kodon 5 (-CT) heterozigot
7. Kodon 44 (-C) heterozigot
8. IVS 1.1 (G>A) heterozigot
9. Kodon 39 (C>T) heterozigot
10. Kodon 22 (7 bp del) heterozigot
11. Kodon 8 (-AA) heterozigot
12. IVS 2.1 (G>A) heterozigot
13. Normal

## 5. TARTIŞMA

Genetik hastalıklar içinde önemli bir yere sahip olan hemoglobinopatilerin pek çok ülkede önemli bir sağlık sorunu oluşturduğu bilinmektedir. Bunlardan orak hücre anemisi ve beta talasemi hemoglobin hastalıklarının büyük bir kısmını oluşturmaktadır (1, 28, 29, 61). Hemoglobinopatiler özellikle malaryanın endemik olduğu bölgelerde yaygındır (19, 39, 49). Malarya paraziti ile enfekte olmuş eritrositler talasemi için seçici avantaj sağlar (19, 38). Heterozigot taşıyıcılar malaryaya karşı daha dirençlidir (1, 3).

Beta talasemi, dünyada en sık gözlenen tek gen hastalığı (5) olup hemolitik anemi ve mikrositoz ile karakterize otozomal resesif geçiş gösteren bir hastalıktır (4, 5, 16, 38). Dünya popülasyonunun %4.5'i (3, 30) globin zincirinde bir mutasyon taşımakta ve her yıl 300.000 birey homozigot olarak doğmaktadır (30).

Türkiye'de beta talasemi major ilk kez 1941'de iki hastada bildirilmiştir. Ancak bir sağlık problemi olarak 1950'lerden sonra hekimlerin dikkatini çekmiştir (5, 62). Ülkemizde beta talaseminin klinik ve hematolojik görüntüsü oldukça heterojendir. Hastaların hematolojik verileri ile beta talasemi intermedia, beta talasemi major ve heterozigot beta talasemi olarak gruplandırılır (62).

Talasemiler arasında en yaygın olan ise beta talasemi minor olup bu hastalar hafif anemik bulgular vermekle birlikte hastalık belirtileri göstermezler. Ancak, talasemi major hastaları erken yaşlarda şiddetli anemi, splenomegali ve tekrarlayan enfeksiyonlarla karşı karşıyadır (3).  $\alpha$ /non- $\alpha$  globin sentez oranındaki dengesizlik beta talaseminin şiddetini belirleyen önemli bir faktördür (30, 32).

Talasemi tanısı için ilk bilgiyi, ortalama eritrosit hemoglobini (MCH), ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) ve eritrosit sayısını (RBC) içeren tam kan sayımı ve kan yaymasının mikroskopik incelemesi verir. Serum demiri ve ferritin değerleri talasemiye demir eksikliği anemisinden ayırır (30). Talasemi taşıyıcılarında kan değerleri genellikle normaldir. Bununla birlikte ortalama eritrosit hacmi (MCV) ve ortalama eritrosit hemoglobin değerleri azalırken hemoglobin A<sub>2</sub> seviyesi yükselir (38). Beta talasemi taşıyıcılarında tam kan sayımı sonuçlarında Hct %36'dan büyük, MCV 80 fl'den ve MCHC ise 27 pg'den küçüktür. Hemoglobin elektroforezi sonuçlarında ise

HbA<sub>2</sub> değeri %3.5'tan daha büyüktür. HbF değeri de artış gösterir. Beta talasemi intermedia ve major hastalarda Hct %36'dan, MCV değeri 80 fl'den, MCHC ise 27 pg'dan düşük olduğu gözlenirken biyokimya sonuçlarında ise demir ve ferritin değerlerinin düştüğü görülür (30). Çalışmamıza dahil edilen hastaların tam kan sayımı ve hemoglobin elektroforezi sonuçları yukarıdaki veriler ile uyumaktadır.

Günümüzde beta talaseminin genetik temeli iyi bilinmektedir. 1987 yılında rutin kullanıma giren PZR yöntemi ve DNA dizi analizi beta talasemiye yol açtığı bilinen mutasyonların sayısının artmasına neden olmuştur (9, 33).

Moleküler çalışmalar farklı coğrafik bölge ve etnik gruplar arasında beta globin gen mutasyonlarının farklı olduğunu göstermiştir. (36, 63). Türkiye üç kıta arasında olup Asya ile Avrupa arasında bir geçiş yoludur (36). Ülkemizde çok sayıda Hb varyantının görülmesi, Anadolu'da yıllar boyunca çok çeşitli ırk ve kültürlerin yaşamasından ve akraba evliliklerinden kaynaklanmaktadır. Akraba evlilikleri nadir görülen otozomal ressesif geçişli hastalıkların toplumdaki sıklığını artırır (50).

Ülkemizde yaklaşık %21 oranında akraba evliliği yapılmakta olup bu oran, %46-63'lere kadar çıkmaktadır. İlk kuzen evlilikleri en sık rastlanan akraba evliliğidir. 1990-1996 yılları arasında yapılan bir çalışmada, beta talasemili çocukların ebeveynleri arasındaki akraba evliliğinin oranı %35-65 arasında olduğu saptanmıştır. Asıl ilginç olan, akraba evliliği yapmış eşlerin %9-30'nun, iki farklı beta talasemi mutasyonunu taşımasıdır ki bu durum Türkiye'deki mutasyon sayısındaki çeşitliliğinin bir kanıtıdır (5). Çalışmamızda mutasyon belirlediğimiz 32 hastanın ebeveynlerinin %16.6'sı birinci dereceden, %10'u ikinci dereceden akraba evliliği yaptığı belirlenmiştir.

Mortalite ve morbiditesi yüksek olan hemoglobinopatilerin sayısının azalması için dünyaca önerilen en yaygın yöntem prenatal tanıdır. Hemoglobinopatili çocuk doğumları, her iki eşin de taşıyıcı olduğu ailelerin saptanması ve bu çiftlerin hamileliklerinin erken dönemlerinde prenatal tanı yaptırmaları için belirli merkezlere başvurmalarının sağlanması ile önlenabilir (64). Ülkemizde beta talasemili olarak doğan bebek sayısının yıllık olarak 150-200 arasında olduğu hesaplanmaktadır. Bununla ilişkili olarak her yıl yaklaşık 800 gebe kadın, prenatal tanıya ihtiyaç duymaktadır (5).



Hemoglobinopatilerde ilk prenatal tanı 1974 yılında yapılmış ve bu hastalıkların sık görüldüğü ülkelerde hızla uygulamaya girmiştir (64).

Türkiye’de moleküler temele dayalı çalışmaların başlaması beta talasemi araştırmalarında önemli katkılar sağlamıştır. Bu çalışmalar ile diğer populasyonların aksine beta talaseminin Türk toplumunda oldukça heterojen olduğu kanıtlanmıştır. Beta talasemi taşıyıcılık frekansı, Doğu’dan (%3.4) Batı Anadolu’ya (%11) doğru gidildikçe artmaktadır (5).

Türkiye genelinde %40 olasılıkla bulunduğu belirtilen *IVS 1.110* mutasyonunun sıklığı, Orta Anadolu’da %50’yi aşarken Doğu ve Güney Doğu Anadolu’da % 25’lere düşmektedir. Türkiye’nin coğrafi bölgeleri, mutasyon çeşitliliği ve sıklığı açısından değerlendirildiğinde Batı Anadolu ve Akdeniz bölgelerinin Türkiye genelindeki dağılımla uyumlu olduğu, ancak Kuzey, Doğu ve Güney Anadolu bölgelerinin daha az heterojen olduğu, ama kendilerine özgü mutasyonlar içerdiği görülmektedir (-30, -87, *kodon 8/9*, *IVS 2.745* gibi) (5, 9).

Tadmouri ve arkadaşları (36) yaptıkları çalışmada Türkiye’de en yaygın mutasyonun *IVS 1.110 (G>A)* olduğunu saptamışlardır. Bunu sırası ile *IVS 1.6 (T>C)*, *kodon 8 (-AA)*, *IVS 1.1 (G>A)*, *IVS 2.745 (C>G)*, *IVS 2.1 (G>A)*, *kodon 39 (C>T)*, -30 (*T>A*), *kodon 5 (-CT)* mutasyonları takip etmektedir. Yine aynı çalışma ile Doğu Anadolu’da beta talasemi ve bazı anormal hemoglobinlerin frekansı %7.5 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada *IVS 1.110 (G>A)*’nin %27.1, *IVS 1.6 (T>C)*’nin %10.2, *kodon 8 (-AA)*’in %8.4, *IVS 1.1 (G>A)*’in %5.1, *IVS 2.745 (C>G)*’nin %1.7, *IVS 2.1 (G>A)* ve *kodon 39 (C>T)*’nin %3.4, -30 (*T>A*)’nin %8.5, *kodon 8/9 (+G)*’in %5.1, *kodon 44 (-C)*, *IVS 1.5 (G>C)*, *poly A (TAA>TGA)*, *kodon-74/75 (-C)*, *kodon-36/37 (-T)* ve -290 *bp delesyon*’nun %1.7 ve bilinmeyen mutasyonların ise %15.2 oranında olduğunu belirtmiştir. Yine Tadmouri ve arkadaşları yaptıkları diğer bir çalışmada (65) nadir rastlanan bir mutasyon olan *kodon-36/37 (-T)*’yi ilk kez bir Türk hastada belirlemişlerdir.

Güleşken ve arkadaşlarının (66) Akdeniz Bölgesi’nde talasemi major ve intermedia hastalarını kapsayan çalışmalarında %44.1 *IVS 1.110 (G>A)*, %28.2 *IVS 1.1*

(G>A), %13.3 *IVS 1.6 (T>C)*, %2.7 *IVS 2.1 (G>A)* ve %2.4 olasılıkla *kodon 39* mutasyonlarını belirlenmiştir.

Çukurova Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada (14) ise 20 farklı beta talasemi alleli gösterilmiştir. *IVS 1.110 (G>A)* mutasyonunun %57,3 ile en yüksek frekansa sahip olduğu belirtilirken *IVS I-1 (G>A)*, *kodon 39 (C>T)*, *IVS 1.6 (T>C)*, *kodon 8 (-AA)*, *-30 (T>A)*, *IVS 2.1 (G>A)*, *IVS 2.745 (G>C)* ve *kodon 5 (-CT)*'nin diğer yaygın mutasyonlar olduğu rapor edilmiştir.

Keser ve arkadaşları (7), Antalya'da 918 kromozomun moleküler analizi sonucunda  $\beta$ -globin geninde, amplifiye  $\beta$ -globinin sekans analizi ile 2 yeni mutasyonu kapsayan 19 farklı mutasyonu listelemiştir. Liste beta talasemi major, beta talasemi intermedia, beta talasemi minör, HbS veya HbS/beta talasemi mutasyonlarını kapsamaktadır. *IVS 1.110* en sık rastlanan mutasyon olarak gözlenmiştir (% 38,6). Bunu *IVS 1.6* (% 9,4), *-30* (% 8,4) , *IVS 2.1* (% 6,9), *IVS 2.745* (% 5,9), *kodon 44* (% 3) ve *IVS 1.1* (%3) mutasyonları izlemektedir. HbS'in  $\beta$ -globin mutasyonları arasındaki oranı ise %14,9'dur. Heterozigot genotipler arasında %47,3 oran ile en yaygın genotip *IVS 1.110* olarak gözlenmiştir. Aynı çalışmada *kodon 3 (+T)* mutasyonu Türkiye'de ilk kez Antalya'da tanımlanmıştır.

İnce ve arkadaşları (4) Diyarbakır'da yaptığı bir çalışmada ARMS (amplifikasyon refractory mutation system) yöntemini kullanarak en yaygın 8 mutasyonu belirlemişlerdir. *IVS 1.110 (G>A)*, *IVS 1.1 (G>A)*, *kodon 39 (C>T)*, *IVS 1.6 (T>C)* , *IVS 2.1 (G>A)*, *IVS 2.745 (C>G)*, *kodon 8 (-AA)* ve *-30 (T>A)* mutasyon veya frameshiftleri saptamışlardır. Bu 8 mutasyon Türkiye'de yaygın 18 beta talasemi mutasyon arasındadır. % 27,8'lik ile 10 hastada tanımlanan *IVS 1.110 (G>A)* mutasyonu en yaygın mutasyon olarak bulunmuştur. *IVS 1.6 (T>C)*, *kodon 8 (-AA)*, *IVS 2.1 (G>A)* ve *IVS 2.745 (C>G)* mutasyonlarının toplam frekansı % 63,8'dir. *IVS 1.1(G>A)*, *kodon 39 (C>T)* ve *-30 (T>A)*'un frekansı % 8,4'dür.

Tadmouri ve arkadaşları (39) Akdeniz Bölgesi'ni kapsayan çalışmasında; *IVS 1.110 (G>A)* (%56.7), *kodon 8 (-AA)* (%6.7), *IVS 2.1 (G>A)* ve *kodon 5 (-CT)* (%3.3) mutasyonlarını belirlemişlerdir.

Yıldız ve arkadaşları (41) Denizli’de yaptıkları çalışmada yine en sıklıkla rastlanan mutasyon olarak *IVS 1.110 (G>A)* (%36.4)’u ve bunu takiben *IVS 1.1 (G>A)* (%16.4), *kodon 39 (C>T)* (%9.1), *kodon 8 (-AA)* ve *IVS 2.1 (G>A)* (%3.6) ve *kodon 8/9 (+G)* (%1.8) mutasyonlarını belirlemişlerdir. Bu çalışmada *kodon 5 (-CT)*, *kodon 22 (7bp delesyon)*, *kodon 44 (-C)* mutasyonlarına rastlamamışlardır.

Öner ve arkadaşları (67) Van Gölü çevresinde yaptıkları çalışmada *kodon 8/9*, -30, *IVS 1.110* ve *IVS 2.1* mutasyonlarını en yaygın mutasyonlar olarak belirlemişlerdir.

Ghazi Omar Tadmouri ve arkadaşları (16) Yunanistan Xanthe’den göç edip İstanbul’ da yaşayan göçmen bir Türk ailesinde ilk kez Çin *IVS 2.654 (C>T)* mutasyonunu tanımlamışlardır. Ailenin 4 üyesi de bu mutasyon için heterozigottur. Ailenin beş jenerasyon öncesi Yunanistan orjinli olduğu saptanıp, akraba evliliği veya göç kaydı bulunmamaktadır.

Başak ve arkadaşları (13) Türkiye’de ilk kez beta talasemi major bir hastada nadir gözlenen *IVS 1.130 (G>A)* mutasyonunu tanımlamışlardır.

Çalışma kapsamımızda bulunan 22 mutasyon [-87 (*C>G*), -30 (*T>A*), *kodon5 (-CT)*, *hemoglobin C (HbC)*, *hemoglobin S (HbS)*, *kodon 6 (-A)*, *kodon 8 (-AA)*, *kodon 8/9 (+G)*, *kodon 22 (7bp del)*, *kodon 30 (G>C)*, *IVS 1.1 (G>A)*, *IVS 1.2 (T>A)*, *IVS 1.5 (G>C)*, *IVS 1.6 (T>C)*, *IVS 1.110 (G>A)*, *IVS 1.116 (T>G)*, *IVS 1-25 (25bp del)*, *kodon 36/37 (-T)*, *kodon 39 (C>T)*, *kodon 44(-C)*, *IVS 2.1 (G>A)*, *IVS 2.745 (C>G)*] çeşitli araştırmacılar tarafından ülkemizde sıklıkla rastlandığı belirtilen mutasyonları içermektedir ( 4, 5, 7, 9, 14, 36, 39, 41, 67).

Çalışmamızda en sık (%28.13) rastlanan mutasyon *IVS 1.110 (G>A)* olup bu sonuç yukarıdaki verileri desteklemektedir. Tüm çalışmalar dikkatte alındığında söz konusu mutasyonun sıklığı %27.1-56.7 arasında değişmektedir (4, 7, 36, 41, 66, 39). *IVS 1.110 (G>A)* mutasyonu Akdeniz’in doğusunda baskın olan bir mutasyondur olarak rapor edilmektedir (68). Avrupa’nın kuzeyindeki Almanya’da homozigot ve heterozigot hastalarda yapılan bir çalışmada da *IVS 1.110*’un %28 olasılıkla olduğu belirlenmiştir (69).

Çalışmamızda %9.38 frekans ile ikinci sırada belirlediğimiz mutasyon *IVS 1.1 (G>A)* mutasyonudur. Bu mutasyon ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda; % 5.1-28.2 arasında belirlenmiştir (4, 7, 14, 36, 41, 66). *IVS 1.1 (G>A)* mutasyonu Çekoslovakya (70), Mısır (71), Macaristan (72) ve Yunanistan (73)'da da çeşitli oranlarda rapor edilmektedir.

*IVS 2.1, (G>A) kodon 8 (-AA) ve kodon 8/9 (+G)* mutasyonlarına ise çalışmamızda aynı sıklıkta (%4.69) rastlanmıştır. Bunlardan ilki olan *IVS 2.1 (G>A)* mutasyonunun Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarda belirlenen frekansları %2.7-8.4 (4,14,41, 66) ve *kodon 8 (-AA)* mutasyonunun ise %5.7-8.4 arasında (14, 36, 39) değiştiği belirtilmektedir. *Kodon 8 (-AA)* mutasyonunun Azerbaycan'da yüksek frekansda bulunduğu belirtilmektedir. *Kodon 8/9 (+G)* mutasyonu ise Çin, Hindistan ve İran'da yayılış gösteren bir mutasyondur (36). Akdeniz ülkelerinde nadir olmakla birlikte İspanya'da rastlanan en sık beta talasemi mutasyonlarından biri olduğu belirtilmektedir (74). Bu mutasyonun farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda ülkemizdeki sıklığının %1.8-5.1 arasında değiştiği belirtilmektedir (36, 41).

*Kodon 44 (-C)* mutasyonu %3.13 oran ile iki hasta da saptadığımız bir mutasyondur. Bu mutasyonun ülkemizde belirlenen değerleri iki farklı çalışmada %3 ve %1.7'dir (7, 36).

*Kodon 5 (-CT) ve Kodon 22 (7bp del)* mutasyonları çalışmamızda birer (%1.56) hastada tanımlanmıştır. *Kodon 5* mutasyonunu taşıyan heterozigot hastamızın ebeveynlerinden biri göçmen, diğeri Malatyalıdır. Tadmouri ve arkadaşları Akdeniz bölgesini kapsayan çalışmasında *kodon 5 (-CT)*'i %3.3 olarak belirlemişlerdir (39). *Kodon 22* mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan hastamız ise Malatyalıdır.

*Kodon 39 (C>T)* mutasyonu %1.56 frekans ile çalışmamızda belirlediğimiz diğer bir mutasyondur. %2.4-9.1 arasında değişen frekansları saptanmıştır (4, 14, 36, 41, 66). Ülkemiz genelinde ortalama %3.8 frekansda bulunduğu rapor edilmiştir. Batı anadolu Bölgesi'nde daha sık gözlemlendiği belirtilmektedir (36). Yunanistan, Bulgaristan, Romanya gibi Balkan ülkelerinden köken almaktadır (36). İtalya'yı da içine alan Akdeniz'in batısında baskındır (68). Fas'da da en sık saptanan mutasyonlar arasındadır

(75). Çalışmamızda *kodon 39 (C>T)* mutasyonunu taşıyan kişi ile görüşmelerimizde Türkiye'nin Güneybatı bölgesinden olduğu anlaşılmıştır.

-30, -87, *hemoglobin S, hemoglobin C, kodon 6, kodon 30, IVS 1.5, IVS 1.6, IVS 1.116, IVS 1-25, kodon 36/37, IVS 2.745* mutasyonları taradığımız mutasyonlar arasında olmasına rağmen bu mutasyonları taşıyan olguya rastlanmamıştır. Bu mutasyonlardan *IVS 1.6* mutasyonu ise ülkemizde sıklıkla (%10.1) rastlanan mutasyonlardan biri olarak belirtilmesine (36) karşın bizim çalışma grubumuzda rastlanmamıştır. -30 ve -87 mutasyonlarının ise promotor bölge mutasyonları olduğu belirtilmektedir. Bunlardan -30 mutasyonunun Akdeniz ülkelerinde nadiren görüldüğü belirtilmektedir. Ülkemizde bu mutasyona özellikle Batı Anadolu'da rastlanmaktadır (39).

Ayrıca çeşitli araştırmacılar (5, 9, 36) tarafından ülkemiz için değişen frekanslarda belirtilen *-290 bp delesyon, poly A (TAA>TGA), kodon -74/75 (-C), IVS 2.848 (C>A), -101, -28, kodon 15, kodon 27, 3'UTR (-13bp), kodon 22-24 (-7bp), IVS 1.130* mutasyonları bizim çalışma kapsamımızda bulunmamaktadır. Bu konu ile ilişkili olarak 92.7 HbF ve 6.6 HbA<sub>2</sub> değerlerine sahip ve klinik olarak talasemi major tanısı alan 33 numaralı hastamız ve talasemi minör tanısı almış ancak mutasyon analizi sonucunda normal olarak belirlenen diğer 8 hastamız taradığımız mutasyonlardan hiçbirini taşımamaktadır. Söz konusu hastalar çalışma kapsamımız içinde olmayan fakat çeşitli araştırmacılar tarafından ülkemiz için refere edilen yukarıdaki mutasyonlardan birini taşıyor olabilir. Bu hastalarda yukarıdaki mutasyonları belirlemek amacı ile ARMS yöntemi kullanılarak taranması veya DNA dizi analizi yapılarak olası farklı mutasyonların belirlenmesi yararlı olacaktır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu çalışma beta talasemi mutasyonlarını belirlemek amacı ile Malatya’da yapılan ilk çalışmadır.
- Mutasyonun belirlenmesi hastalığın tanısını koymada ve kesin tanıyı destekleme noktasında çok önemlidir. Sonuçlarımıza göre mutasyon çeşidi bakımından ilimiz oldukça heterojen bir yapı göstermekte olup 9 farklı mutasyon (*IVS 1.110 (G>A)*, *IVS 1.1 (G>A)*, *IVS 2.1 (G>A)*, *kodon 8 (-AA)* ve *kodon 8/9 (+G)*, *kodon 44 (-C)*, *Kodon 5 (-CT)* ve *kodon 22 (7bp del)*, *kodon 39 (C>T)*) belirlenmiştir.
- *IVS 1.110* mutasyonu, ülkemizin diğer bölgelerinde olduğu gibi Malatya’da da en sık rastlanan beta talasemi mutasyonu olarak belirlenmiştir.
- Mutant beta globin geni bakımından hastalarımızın %81.25’inin heterozigot olduğu saptanmıştır.
- Genetik hastalıkların artışında en önemli etken olan ve bölgemizde de oldukça yaygın olarak rastlanan akraba evliliklerinin riskleri konusunda toplumumuz bilgilendirilmelidir.
- Riskli bölgelerde tarama çalışmaları ile hasta ve taşıyıcı bireyler belirlenerek bu bireylere genetik danışmanlık hizmeti sunulmalıdır.
- Hasta sayısı ve taşıyıcı sıklığını kapsayan ve tüm Türkiye’yi içine alan bir talasemi haritası oluşturularak korunma ve kontrolün sağlanması için referans merkezler yaygınlaştırılmalıdır.
- Ülkemizde prenatal tanının tam yerleşmesi ve ağır klinik seyirli bebeklerin doğumunun önlenmesi için evlilik öncesi hematolojik değerlendirmelerin ardından olası bireylerde mutasyon analizi yapılmalıdır. Özellikle her iki eşin taşıyıcı olduğunun saptanması durumunda çifte prenatal tanının önemi anlatılarak, mutlaka prenatal tanıya yönlendirilmelidir.

## 7. ÖZET

Beta talasemi, özellikle Akdeniz ülkelerinde ve Türkiye’de görülen, mikrositoz ve hemolitik anemi tablosu ortaya koyan en yaygın kalıtsal bozuklardan bir tanesidir. Çalışmamızda beta talasemi tanısı ile refere edilen 41 olgunun beta globin geninde en yaygın gen mutasyonları (-87 (C>G), -30 (T>A), kodon 5 (-CT), hemoglobin C (HbC), hemoglobin S (HbS), kodon 6 (-A), kodon 8 (-AA), kodon 8/9 (+G), kodon 22 (7bp del), kodon 30 (G>C), IVS 1.1 (G>A), IVS 1.2 (T>A), IVS 1.5 (G>C), IVS 1.6 (T>C), IVS 1.110 (G>A), IVS 1.116 (T>G), IVS 1-25 (25bp del), kodon 36/37 (-T), kodon 39 (C>T), kodon 44 (-C), IVS 2.1 (G>A), IVS 2.745 (C>G)) araştırılmıştır. Çalışılan olguların 32 (%78.05)’sinde beta globin geni mutasyonları gözlenmiştir. Bunlar arasında 6 hastanın beta globin geni mutasyonları bakımından homozigot olduğu belirlenirken; 26 hastanın ise test edilen mutasyonlardan yalnızca birini taşıdığı bulunmuştur. Çalışmamızın sonuçlarına göre; IVS 1.110 (G>A) mutasyonu, Türkiye’nin diğer bölgelerinde olduğu gibi en yaygın mutasyon olarak belirlenmiştir. Homozigot veya heterozigot hastalarda IVS 1.110 (G>A), IVS 1.1(G>A), IVS 2.1(G>A), kodon 8(-AA)ve kodon 8/9 (+G) mutasyonlarının allel frekansları sırası ile %28.13, %9.38 ve %4.64’dür. Kodon 44(-C) mutasyonu %3.13 olarak belirlenirken kodon 5 (-CT), kodon 22 (7bp del) ve kodon 44 (-C) mutasyonları nadir rastlanan mutasyonlar olarak tanımlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Beta talasemi, mutasyon, globin geni, moleküler analiz, PZR

## 8. SUMMARY

Beta thalassemia is one of the most common genetic disorders in Turkey as well as in several other Mediterranean countries presenting microcytosis and hemolytic anemia. In this study, the most prevalent beta globin gene mutations (-87 (C>G), -30 (T>A), codon 5 (-CT), hemoglobin C (HbC), hemoglobin S (HbS), codon 6 (-A), codon 8 (-AA), codon 8/9 (+G), codon 22 (7bp del), codon 30 (G>C), IVS 1.1 (G>A), IVS 1.2 (T>A), IVS 1.5 (G>C), IVS 1.6 (T>C), IVS 1.110 (G>A), IVS 1.116 (T>G), IVS 1-25 (25bp del), codon 36/37 (-T), codon 39 (C>T), codon 44 (-C), IVS 2.1 (G>A), IVS 2.745 (C>G)) were analyzed for 41 cases referred to our department with the diagnosis of beta thalassemia. Of these cases, 32 (78.05%) were identified with an beta globin gene mutation. Among those, 6 patients were found to be homozygote for beta globin gene mutations; 26 patients were heterozygous. According to our results; the IVS 1.110 (G>A) is the most frequent mutation type in our province the same as other geographical regions of Turkey. The most frequent mutations in heterozygous or homozygous patients were IVS 1.110 (G>A), IVS 1.1 (G>A), IVS 2.1(G>A), codon 8(-AA) and codon 8/9 (+G), comprising 28.13%, 9.38% and 4.64% of the alleles, respectively. The codon 44 (-C) mutation accounted for 3.13% of the alleles only and codon 5 (-CT), codon 22 (7bp del) and codon 39(C>T) mutations were rarely determined.

**Key Words:** Beta thalassemia, mutation, globin gene, molecular analysis, PCR



## 9. KAYNAKLAR

1. Weatherall D.J.: Disorders of Globin Synthesis: The Thalassemias. Edited by: Litchman M.A., Beutler E., Kipps T.J., Seligsohn U., Kaushansky K., Prchal J.T.: Williams Hematoloji. U.S.A: McGraw-Hill, 633-641, 2006
2. Dinçol G., Pekçelen Y., Atamer T., Sargın D., Nalçacı M., Aktan M., Beşışık S.: Hemolitik Anemiler. Edited by: Nobel Tıp Kitabevleri Klinik Hematoloji: Türkiye: İstanbul Üniversitesi, 87-152, 2003.
3. Vallance H., Ford J.: Carrier testing for autosomal-recessive disorders. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science* 40, (4), 473,2003
4. İnce H.H., Ayyıldız O., Kalkanlı S., Batun S., Müftüoğlu E.: Molecular basis of beta-thalassemia mutations in Diyarbakır in the southeastern region of Turkey. *Hemoglobin* 27,(4), 275-278, 2003
5. Tadmouri G.O., Başak A.N.:  $\beta$ -Thalassemia in Turkey: A Review of the Clinical, Epidemiological, Molecular and Evolutionary Aspects *Hemoglobin* 25,(2), 227-239, 2001
6. Atalay E.O., Cirakoğlu B., Dinçol G., Atalay A., Kılınç Y., Aytekin H., Yüreğir G.T., Arpacı A., Bermek E., Aksoy M.: Regional distributions of beta-thalassemi mutations in Turkey. *Int J Hematol* 57,(3), 207-211, 1993
7. Keser I., Şanlıoğlu A.D., Manguoğlu E., Kayışlı Güzeloğlu O., Nal N., Sargın F., Yeşilipek A., Şimşek M., Mendilcioğlu I., Canatan D., Lüleci G.: Molecular Analysis of Beta-Thalassemia and Sickle Cell Anemia in Antalya. *Acta Haematologica* 111, 205-210, 2004
8. Cai S.P., Wall J., Kan Y.W., Chehab F.F.: Reverse dot blot probes for the screening of beta-thalassemia mutations in Asians and American blacks. *Hum Mutat* 3,(1), 59-63, 1994
9. <http://www.thd.org.transkripsiyon/sub/turk/doc/nazlibasak>
10. Hardison R., Reimer C., Chui D.H., Huisman T.H., Miller W.: Electronic access to sequence alignments, experimental results and human mutation and aid to studying globin gene. *Genomics* 47,429-437, 1998
11. Atalay E., Cirakoğlu B., Erdoğan G., Bermek E., Aksoy M.: Prenatal diagnosis of beta-globin gene IVS 1nt/110 mutation in chrionic villus from a mosaic triple-X mother with high HbA2. *Prenat Diagn* 10,(5),343-344, 1990

12. Birben E, Öner C., Öner R., Mergen H., Yeşilipek A., Gümrük F., Aytemiz Gürgey., Altay Ç.: Severe  $\beta$ -Thalassemia in Frameshift Codon 6 (-A) Homozygotes: Effects of Haplotype on Phenotype. *Hemoglobin* 25,(4), 441-445, 2001
13. Tadmouri G.O., Bilenoglu O., Kantarcı S., Kayserili H., Perrin P., Başak A.N.: Arare mutation [IVS -I-130 (G-A)] in a Turkish beta-thalassemia major patient. *Am J Hematol* 63,(4), 223-225, 2000
14. Çürük M.A., Arpacı A., Atilla G., Tuli A., Kılınç Y., Aksoy K., Yüreğir G.T.: Genetic Heterogeneity of  $\beta$ -Thalassemia at Çukurova in Southern Turkey. *Hemoglobin*, 25,(2), 241-245, 2001
15. Akar E., Özdemir S., Hakkı T.İ., Akar N.: First observation of homozygous hemoglobin hamadan (B56 (D7) GLY-ARG) and bata thalassemia (-29 G>A)-hemoglobin Hamadan combination in a Turkish family. *Am J Hematol* 74,(4),280-282,2003
16. Tadmouri G.O., Bilenoglu O., Kutlar F., Markowitz R.B., Kutlar A., Başak A.N.: İdentification of the Chinese IVS-II-654 (C-->T) beta-thalassemia mutation in an immigrant Turkish family: recurrance or migration?. *Hum Biol* 71,(2), 295-302, 1999
17. Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F.: Principles of Molecular Disease Lessons from the Hemoglobinopathies: Edited by: W.B.Saunders Company: Thompson & Thompson Genetics in Medicine. Philadelphia: 181-201, 2001
18. <http://en.wikipedia.org/wiki/Hemoglobin>
19. Atweh, G.F., Benz, E.J.: Hemoglobinopathies. Edited by: Humes H.D., Dupont H.L., Gardner L.B., Griffin J.W., Harris E.D., Hazzard W.R., King T.E., Loriaux D.L., Nabel E.G., Tood R.F., Traber P.G.: Kelley's Texbook of Internal Medicine. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1741-1746, 2000
20. Lüleci G., Sakızlı M., Alper Ö.: Renkli Genetik Atlası. 1 ed. İstanbul: 160-286, 2000
21. Hoffbrand A.V., Pettit J.E.: Genetic Defects of Haemoglobin. Edited By: Oxford Blackwell Scientific Publications: Essential Heamaetology. London: 94-120, 1985.
22. Poole J.H.: Thalassemia and pregnancy. *Journal of Perinatal & Neonatal Nursing* 17,(3), 196, 2003
23. Weatherall D.J., Clegg J.B., Higgs D.R., Wood W.G.: The Thalassemias. Edited by: Scriver C.R., Arthur A.L., Sly W.S., Valle D.: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases. New York: Mc Graw Hill, 4571-4636, 2001

24. Clarke G.M., Higgins T.N.: Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias. *Clin Chem* 46,(8B), 1284-1290, 2000
25. Aksoy M.: Anormal Hemoglobinler ve Hemoglobinopatiler. Çocuk Hematolojisi ve İmmünolojisi. İstanbul: 33-71,1973
26. Burtis C.A.,Ashwood E.R.: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry.Edited by: Burtis C.A., Ashwood E.R.: Biochemical Aspects of Hematoloji. Philadelphia: 709-730,1996
27. Murray R.K., MayesP.A., Granner D.K., Rodwell W.V.: Harper'ın Biyokimyası. Edited by: Menteş G., Ersöz B.: Proteinler: Miyoglobin ve Hemoglobin. İstanbul: 60-73, 1993
28. Çürük M.A.: Hemoglobinopatilerde Tarama ve Tanı Yöntemleri Neler Olmalı? Edited by: Canatan D., Aydınok Y.: 3.Uluslar arası Talasemi Yaz Okulu & Avrupa Transfüzyon Tıbbı Okulu. İstanbul: 157-168, 2004
29. Beaudet A.L., Csriver C.R., Sly W.S., Valle D.: Genetics, biochemistry and molecular basis of variant human phenotypes. Edited by: Scriver C.R., Beaudet A., William S.S., Valle D.: The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases. New York: McGraw-Hill, 3-45, 2001
30. Tüzmen Ş., Schechter A.N.: Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating  $\beta$ -Thalassemia mutations. *Blood* 15, 19-29, 2001
31. Weatherall D.J., Clegg J.B., Higgs D.R., Wood W.G.: The Hemoglobinopathies. Edited by: Scriver C.R., Beaudet A., Sly W.S., Valle D.: The Metabolic and Molecular Bases of İnherited Disease. New York: McGraw-Hill, 3417-3483, 1989
32. Lukens J.N., Lee R.: The thalassemias and related disorders: Quantitative disorders of hemoglobin Synthesis. Edited by: Lee G.R., Foerzter J., Lukens J., Paraskevas F., Greer J.P., Rodgers G.M.: Wintrobe's Clinical Hematology. Egypt: 1405-1448, 1999
33. Başak A.N.: Moleküler Tanı ve Yöntemleri. Edited by: Canatan D., Aydınok Y.: 3. UluslararasıTalasemi Yaz Okulu & Avrupa Transfüzyon Tıbbı Okulu. İstanbul: 199-206, 2004
34. <http://globin.cse.psu.edu>
35. <http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>
36. Tadmouri G.O., Tüzmen Ş., Özçelik H., Özer A., Baig S.M., Senga E.B., Başak A.N.: Molecular and Population Genetic Analyses of  $\beta$ -Thalassemia in Turkey. *American Journal of Hematology* 57, 215- 220, 1998

37. Keser İ., Manguoğlu E., Güzeloğlu Kayışlı Ö., Kurt F., Mendilcioğlu İ., Şimşek M., Balcı G., Küpesiz A.: Prenatal Diagnosis of  $\beta$ -Thalassemia in the Antalya Province. *Turk J Med Sci* 35, 251-253, 2005
38. Kazazian H.H., Jr, Boehm D.C.: Molecular Basis and Prenatal Diagnosis of  $\beta$ -Thalassemia. *Blood* 72,(4), 1107-1116, 1988
39. Tadmouri G.O., Garguier N., Demont J., Perrin P., Başak A.N.: History and Origin of  $\beta$ -Thalassemia in Turkey: Sequence haplotype Diversity of  $\beta$ -Globin Genes. *Human Biology*, 73,(5), 661-674, 2001
40. Cao A., Saba L., Galanello R., Rosatelli M.C.: Molecular diagnosis and carrier screening for beta thalassemia. *The journal of the American Medical Association* 278,(15), 1273, 1997
41. Yıldız S., Atalay A., Bağcı H., Atalay E.Ö.: Beta Thalassemia Mutations in Denizli province of Turkey *Turkish Journal of Haematology* 22,(1), 19-23, 2005
42. Wang C., Beganyı L., Fernandes B.J.: Measurements of Red Cell Parameters in Thalassemia Trait: Correlation With the Gen. *Laboratory hematology* 6, 163-166, 2000
43. Ferhanoğlu B.: Kalıtsal Hemolitik Anemiler. Edited By: Ferhanoğlu B.: PDQ Hematoloji. İstanbul: 98-100, 2005
44. Weatherall D.J., Provan A.B.: Red Cell I: Inherited anemias. *The Lancet*. 355, 1169-1175, 2000
45. Huisman T.H.J., Carver M.F.H., Efremov G.D.: A Syllabus of Hemoglobin Variants, The Sickle Cell Anemia Foundation. 1996
46. Panigrahi I., Agarwal S., Gupta T., Singhal P., Pradhan M.: Hemoglobin E- beta Thalassemia: Factors Affecting Phenotype. *Indian Pediatr* 42,(4), 357-362, 2005
47. Moorsel C., Wijngaarden E., Fokkema I., Dunnen J., Roos D., Zwieter R., Giordano P., Hartevelde C.:  $\beta$ -Globin mutation detection by tagged single-base extension and hybridization to universal glass and flow-through microarrays. *European Journal of Human Genetics* 12,(7), 567-573, 2004
48. Canatan D., Ratip S., Kaptan S., Coşan R.: Psychosocial burden of  $\beta$ -thalassemia major in Antalya, south Turkey. *Social Science & Medicine* 56,(4), 815-819, 2003
49. Patrinos G.P., Kollia P., Papadakis M.N.: Molecular diagnosis of inherited disorders: lessons from hemoglobinopathies. *Hum Mutat* 26,(5), 399-412, 2005
50. Üstündağ M.: Hemoglobinopati Kontrol Programı. Edited by: Canatan D., Aydınok Y.: 3.UluslararasıTalasemi Yaz Okulu & Avrupa Transfüzyon Tıbbı Okulu. İstanbul: 145-148, 2004

51. Canatan D., Köse M.R., Üstündağ M., Haznedaroğlu D., Özbaş S.: Hemoglobinopathy Control Program in Turkey. *Community Genetics* 9,(2), 124-126, 2006
52. Akar N., Çavdar A.O., Dessi E., Loi A., Pirastu M., Cao A.:  $\beta$ -Thalassemia mutations in the turkish population. *J Med Genet* 24, 378-379, 1987
53. Altay Ç., Başak A.N.: Molecular basis and perinatal Diagnosis of Hemoglobinopathies in Turkey. *Int J Pediatr Hematol Oncol* 2, 283-290, 1995
54. Perkins S.L: Examination of the Blood and Bone Marrow. Edited by: Lee G.R., Foerster J., Lukens J., Paraskevas F., Greer J.P., Rodgers G.M.: Wintrobe's Clinical Hematoloji. Baltimore, 9-35, 1999
55. Ertan H., Arda N.: Proteinlerin İzolasyonu ve Saflaştırılması. Edited by: Temizkan G., Arda N.: Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 115-201, 1999
56. Kutlar A., Kutlar F., Wilson J.B., Headlee M.G. Huisman T.H.J.: Quantitation of hemoglobin components by high performance chain-exchange liquid chromatography; use in diagnosis and in the assesment of cellular distrubition of hemoglobin variants. *Am J Haematol* 17, 39-53, 1984
57. Kutlar A., Kutlar F., Gu L.G., Mayson S.M., Huisman T.H.J.: Fetal hemoglobin in normal adults and  $\beta$ -thalassemia heterozygotes. *Hum Genet* 85, 1066-110, 1990
58. Kutlar A., Kutlar F., Huisman T.H.J.: Seperation of normal and abnormal hemoglobin chains by reversed phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 357, 147-153, 1986
59. Evrensel E.E.: Kayseri Bölgesindeki  $\beta$ -thalassemia Mutasyon tipleri. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, 2002
60. Yeşilada E., Savacı S., Yüksel Ş., Gülbay G., Otlı G., Kaygusuzoğlu E., Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) Düşünülen Olgularda MEFV Gen Mutasyonları. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 12,(4), 235-238, 2005
61. Tadmouri G.O., Yüksel L., Başak A.N.: HbS/beta(del)-thalassemia associated with high levels of hemoglobins A2 and F in a Turkish family. *Am J Hematol* 59,(1), 83-86, 1988
62. Aksoy M.: The History of beta-thalassemia in Turkey. *Turk J. Pediatr* 33,(3), 195-197, 1991

63. Nal N., Manguoğlu A.E., Sargin C.F., Keser I. Küpesiz A., Yeşilipek A., Lüleci G.: Two rare mutations in Turkey: IVS 1.130 (G-C) and IVS II.848 (C-A) *Clinical & Laboratory Haematology* 27,(4), 274, 2005
64. Gümrük F.: Hemoglobinopatilerde Prenatal Tanı Yöntemleri. Edited by: Canatan D., Aydınok Y.: 3. UluslararasıTalasemi Yaz Okulu & Avrupa Transfüzyon Tıbbi Okulu. İstanbul: 39-41, 2004
65. Tadmouri G.O., Tüzmen S., Başak A.N.: Rare beta-thalassemia mutation in a Turkish patient: FSC-36/37(-T). *Hum Biol* 69,(2), 263-267, 1997
66. Güleşken S., Ören H., Vergin C., Şanlı N., Gülen H., Uçar C., İrken G.: Mutational Analysis of Turkey Using an Allele-Specific Oligonucleotide Hybridization Technique. *Acta Haematologica* 104, 181-184, 2000
67. Öner A.F., Özer R., Üner A., Arslan Ş., Gümrük F.: Beta Thalassemia Mutations in The East of Turkey. *Turkish Journal of Haematology* 18,(4), 239-242, 2001
68. Özçelik H.: The Molecular Basis of  $\beta$ -thalassemia in Turkey. Boğaziçi Üniversitesi Doktora Tezi, 1987
69. Schwarz C., Vetter B., Kohne E., Kulozik A.E.: Beta thalassemia in Germany: molecular genetics and clinical phenotype in immigrant and in the native population. *Klin Padiatr* 209,(4), 172-177, 1997
70. Indrak K., Brabec V., Indrakova J., Chrobak L., Sakalov A., Jarosova M., Crermok J., Fei Y.J., Kutlar F., Gu Y.C., Baysal E., Huisman T.H.J.; Molecular characterization of  $\beta$ -Thalassemia in Czechoslovakia. *Human Genetic* 88, 399, 1992
71. Hussein I.R., Temtamy S.A., El-Beshlawy A., Fearon C., Shalaby Z., Vassilopoulos G., Kazazian H.H. Jr.: Molecular characterization of  $\beta$ -Thalassemia in Egyptians. *Human Mutat* 2, 48, 1993
72. Ringelhann B., Szelengyi J.G., Horanyi M., Svobodova M., Divoky V., Indrak K., Hollan S., Marosi A., Laub M., Huisman T.H.J.: Molecular characterization of  $\beta$ -Thalassemia in Hungary. *Human Genet* 92, 385, 1993
73. Huisman T.H.J.:  $\beta$ -Thalassemia in four Mediterranean countries; an editorial commentery. *Hemoglobin* 14 ,35, 1990
74. Villegas A., Ropero P., Gonzales F.A., Marti E., Anguita E., Blas J.M.: High incidence of the CD8/9  $\beta^o$ -thalassemia mutation in Spain. *Haematologica* 83, 1066-1068, 1998

75. Lemsaddek W., Picanco I., Seuanes F., Noguera P., Mahmal L., Benchekroun S., Khattab M., Osorio A.L.: THA beta-thalassemia mutation haplotype distribution in the Moroccan population. *Hemoglobin* 28,(1), 25-37, 2004

## **10. ÖZGEÇMİŞ**

Malatya doğumlu. İlk orta ve lise öğrenimimi Malatya'da tamamladıktan sonra 2001 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2003 yılında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.